

200829013A

厚生労働科学研究費補助金  
新興・再興感染症研究事業

リケッチア感染症の国内実態調査及び  
早期診断体制の確立による  
早期警鐘システムの構築

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21（2009）年3月

研究代表者 岸 本 壽 男  
（国立感染症研究所）

厚生労働科学研究費補助金  
新興・再興感染症研究事業

リケッチア感染症の国内実態調査及び  
早期診断体制の確立による  
早期警鐘システムの構築

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21（2009）年3月

研究代表者 岸 本 壽 男  
(国立感染症研究所)

平成 20 年度 新興・再興感染症研究事業  
 リケッチア感染症の国内実態調査及び早期診断体制の確立による早期警鐘システムの構築  
 研究班 名簿

氏名	所属	職名
岸本 壽男	国立感染症研究所 ウイルス第一部	室長
安藤 秀二	国立感染症研究所 ウイルス第一部	主任研究官
猪熊 壽	帯広畜産大学 畜産学部 獣医学科臨床獣医学講座	教授
岩崎 博道	福井大学 医学部 病態制御医学講座内科学(1)領域	准教授
大橋 典男	静岡県立大学 食品栄養科学部 食品生命科学科	教授
岡部 信彦	国立感染症研究所 感染症情報センター	センター長
川端 寛樹	国立感染症研究所 細菌第一部	室長
倉田 毅	富山県衛生研究所	所長
高田 伸弘	福井大学 医学部 病因病態医学講座	准教授
田原 研司	島根県保健環境科学研究所 保健科学部ウイルスグループ	専門研究員
堤 寛	藤田保健衛生大学 医学部 第一病理学	教授
藤田 博己	大原綜合病院附属大原研究所	主任研究員
古屋 由美子	神奈川県衛生研究所 微生物部	専門研究員
山本 正悟	宮崎県衛生環境研究所 微生物部	微生物部長

\*研究分担者 50 音順

業務委託

財団法人 山階鳥類研究所

## 目次

### リケッチア感染症の国内実態調査及び早期診断体制の確立による早期警鐘システムの構築

- I. 総括研究報告書 (平成 20 年度) . . . . . 1  
研究代表者 岸本 壽男 (国立感染症研究所 ウイルス第一部)
- II. 分担研究報告書 (平成 20 年度)
- 疫学的研究
1. リケッチア感染症の国内サーベイランスのまとめおよびサーベイランス改善に関する研究 . . . 13  
岡部 信彦(国立感染症研究所 感染症情報センター)
  2. ベクターダニ類とその保有リケッチア菌種の多様性に関する実態調査 . . . . . 21  
高田 伸弘(福井大学 医学部)
  3. 2008 年の国内各地におけるマダニ相とマダニ保有リケッチアの調査 . . . . . 35  
藤田 博己(大原総合病院附属大原研究所)
  4. 獣医学領域からのリケッチア感染サーベイランス . . . . . 47  
猪熊 壽(帯広畜産大学 畜産学部 獣医学科臨床獣医学講座)
  5. *Ehrlichia* の国内分布に関する研究 . . . . . 61  
川端 寛樹(国立感染症研究所 細菌第一部)
  6. 富山県におけるつつが虫病に関する調査とマダニ類調査  
及び東海北陸地域のリケッチア感染症について . . . . . 67  
倉田 毅(富山県衛生研究所)
  7. 紀伊半島を含む西日本地域における紅斑熱群リケッチア、アナプラズマ属菌  
およびエーリキア属菌の実態調査 . . . . . 73  
大橋 典男(静岡県立大学 食品栄養科学部)
  8. 三重県志摩半島に多発する紅斑熱、その感染環と環境要因 . . . . . 85  
高田 伸弘(福井大学 医学部)
  9. 日本紅斑熱の死亡例の発生に伴う強化サーベイランスの実施について . . . . . 103  
山本 正悟(宮崎県衛生環境研究所 微生物部)
  10. 新規リケッチア症の国内探索に関する研究  
— *Rickettsia heilongjiangensis* 国内感染の第一症例の確認経過と感染源調査 . . . . . 111  
安藤 秀二(国立感染症研究所 ウイルス第一部)

11. 輸入リケッチア症の実験室診断に関する検討 — 輸入発疹熱症例を経験し — 119  
安藤 秀二(国立感染症研究所 ウイルス第一部)

#### 疫学及び検査・診断的研究

12. 神奈川県におけるリケッチア症患者の発生状況の把握  
及び *Orientia tsutsugamushi* Shimokoshi 株検出 PCR の検討 123  
古屋 由美子(神奈川県衛生研究所 微生物部)
13. 中国・四国地域におけるリケッチア症(つつが虫病・日本紅斑熱)の発生状況と疫学(2008年)  
— 2008年島根県で発生した日本紅斑熱患者のダニ刺し口の痂皮の検査試料としての評価 — 129  
田原 研司(島根県保健環境科学研究所 保健科学部ウイルスグループ)
14. 九州地域におけるつつが虫病と日本紅斑熱の発生状況  
およびつつが虫病と日本紅斑熱の早期診断における刺口(痂皮)の有用性 139  
山本 正悟(宮崎県衛生環境研究所 微生物部)

#### 検査・診断的研究

15. リケッチア症感染病理診断のためのペプチド抗体作成 147  
川端 寛樹(国立感染症研究所 細菌第一部)
16. 日本紅斑熱の病理診断法の確立 155  
堤 寛(藤田保健衛生大学 医学部)

#### 予防・治療研究

17. 日本紅斑熱における重症度と血中サイトカイン値との関連性(島根県確認症例における検討) 163  
岩崎 博道(福井大学 医学部 病態制御医学講座内科学(1)領域)

### III. 方法論

- 離島調査の方法論 173  
高田 伸弘(福井大学 医学部)

#### 資料

- 業務委託 野鳥、巣材等からの感染症媒介節足動物採集調査 179  
尾崎 清明、鶴見 みや古(財団法人 山階鳥類研究所)

# I. 総括研究報告書

リケッチア感染症の国内実態調査及び早期診断体制の確立による早期警鐘システムの構築

研究代表者 岸本壽男 国立感染症研究所 ウイルス第一部第五室 室長

研究要旨: 本年度も引き続きリケッチア感染症の実態解明と早期診断体制の確立、早期警鐘システム構築を目指して、①疫学的研究、②検査・診断的研究、③予防・治療的研究を3本柱として総合的に研究を進めた。

①疫学的研究

つつが虫病、日本紅斑熱について疫学情報の解析疫学データの集約方法の検討を引き続き行い、四国 4 県の内科標榜医療機関におけるつつが虫病と日本紅斑熱のサーベイランスの認知度と診断・報告状況の調査を行った。リケッチア感染症の国内実態調査に関しては、関東以北地域、東海中部北陸地域、中国四国地域、九州沖縄地域で、つつが虫病と日本紅斑熱の患者発生状況調査と、推定感染地におけるダニと動物の実態調査を引き続き行い、多くの知見を積み重ねた。近年、日本紅斑熱患者の増加が認められる三重県、和歌山県、長崎県、熊本県、日本紅斑熱による死亡例が発生した宮崎市、紅斑熱群リケッチア症患者の新たな拡がりが見られた宮城県仙台市と青森県、県内でのつつが虫病感染が初めて確認された沖縄県宮古島など全国において、現地疫学調査を実施し、多くの知見を得た。宮崎市では、症例定義をもとに前向き疫学調査を実施し、今後の対策、サーベイランス体制の強化に向けた取り組みのモデルとなった。仙台市では、国内で確認されていなかった新規の紅斑熱群リケッチア *Rickettsia heilongjiangensis* による患者の発生が、患者、媒介動物(マダニ、野鼠)から裏付けられ、国内における紅斑熱群リケッチア症の新たな展開が明らかとなった。そのほか東北地方、北海道北部で大陸と共通する紅斑熱群リケッチアについての調査や、南西諸島でのツツガムシ調査でも有用な成果が得られた。獣医学領域からのアプローチとして、イヌの日本紅斑熱への関与について検討し、PCR での疫学、感染実験の結果からは保菌動物としての可能性は低いことが示唆された。また海外輸入リケッチア症例として、発疹熱の 2 症例を経験し、遺伝子検出と血清診断で確定し、注意喚起を行った。

②検査・診断的研究

*Orientia tsutsugamushi* Shimokoshi 株検出が可能な系を確立し検査法の改善を行った。実験室診断における試料として、患者のダニ刺し口の痂皮の検査材料としての有用性について検討し、痂皮が最適と判断された。紅斑熱群リケッチア症に対する新規の早期診断ツール開発を目的として、病理診断に有用なペプチド抗体を作成し評価を行った。現時点では特異的な染色像は見いだされておらず、他の抗体を模索の予定である。日本紅斑熱の早期診断法として、皮膚生検(刺し口、皮疹部)のホルマリン固定パラフィン切片による酵素抗体法と Real-time PCR 法の有用性を

検討し、ヒト症例へ応用した。両法を併用することにより、診断の有用性が高まった。また、日本紅斑熱の剖検例の臓器パラフィン切片からの Real-time PCR による検出を試みた。ヌードマウスを用いた感染実験では、マウスに対する本菌の病原性は証明されなかった。

### ③予防・治療的研究

日本紅斑熱の重症化機序解明のために、島根県の 23 症例の日本紅斑熱患者確定症例の臨床経過を調査し、生体防御の指標として血中サイトカイン値を測定し、重症度との関連性を検討した。tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  は重症化を予測するために有用な指標となることが推測された。啓発活動として、四国 4 県連携事業の動物の日本紅斑熱抗体調査、ならびに得られた結果を基にした住民への感染予防啓発のためのポスター作成をサポートした。

## 研究分担者

安藤秀二(国立感染症研究所 ウイルス第一部  
主任研究員)

猪熊 壽(帯広畜産大学 獣医学部 教授)

岩崎博道(福井大学 医学部 准教授)

大橋典男(静岡県立大学 食品栄養科学部 教授)

岡部信彦(国立感染症研究所 感染症情報センター センター長)

川端寛樹(国立感染症研究所 細菌第一部 室長)

倉田 毅(富山県衛生研究所 所長)

高田伸弘(福井大学 医学部 准教授)

田原研司(島根県保健環境科学研究所 主任研究員)

堤 寛(藤田保健衛生大学 医学部 教授)

藤田博己((財)大原総合病院付属大原研究所  
主任研究員)

古屋由美子(神奈川県衛生研究所 微生物部  
専門研究員)

山本正悟(宮崎県衛生環境研究所 微生物部  
微生物部長)

## 業務委託

山階鳥類研究所

## A. 研究目的

本研究は、つつが虫病をはじめ、近年の日本紅斑熱の増加や死亡例の発生、また新たな紅斑熱群リケッチア症やエーリキア症、アナプラズマ症等の発生に対応するため、それらリケッチア感染症の実態解明と早期診断体制の確立、早期警鐘システム構築を目指し、①疫学的研究、②検査・診断的研究、③予防・治療的研究を 3 本柱として総合的に進めた。疫学的研究は、サーベイランスの見直しと改善、患者発生と、リケッチア、マダニ、媒介動物についての疫学的、生物学的、血清学的、分子生物学的研究を実施する。検査・診断的研究は、病原体迅速診断法の開発や、皮膚生検等からの検出法の確立を目指している。得られた菌株や患者血清をリスト化し、地域毎のリファレンス体制構築に用いるための準備を行う。予防・治療的研究では、患者の病態解析によって重症化の機序の解明と、より有効な治療法の確立をめざす。また医療関係者や一般社会への情報提供と啓発によって、発生予防や重症化予防に結びつけることを目指している。



## B. 研究方法

### 1. 疫学的研究

#### a. リケッチア感染症の国内サーベイランスの改善

つつが虫病、日本紅斑熱について疫学情報の解析疫学データの集約法の検討を行うため、医師の感染症サーベイランスに対する認知度と診断の現状について、2006 および 2007 年度に、熊本県、宮崎県の医師を対象に調査したが、本年度は四国 4 県の内科標榜医療機関を対象とし認知度と診断・届出状況の調査を行った。また、市民向けの 3 つの公開講座において、つつが虫病・日本紅斑熱・ライム病に関する認知度を調査した。

#### b. リケッチア感染症の国内実態調査

・リケッチア感染症の国内実態調査に関しては、引き続き関東以北地域、東海中部北陸地域、中国四国地域、九州沖縄地域で、つつが虫病と日本紅斑熱の患者発生状況調査と、推定感染地におけるリケッチア、マダニ、動物の浸淫状況調査を行った。特に近年日本紅斑熱患者の増加が認められる三重県志摩半地域、和歌山県南紀地域、長崎県五島列島、熊本県天草地方、日本紅斑熱による死亡例が発生した宮崎市、紅斑熱群リケッチア症患者のあらたな拡がりが見られた宮城県仙台市と青森県、県内でのつつが虫病感染が初めて確認された沖縄県宮古島等において、現地疫学調査を実施した。特に日本紅斑熱の死亡例が見られた宮崎市では、我々の症例定義をもとに、宮崎市が実施した前向き疫学調査に協力した。

・2008 年 8 月、宮城県仙台市にて新規の紅斑熱群リケッチア(*R. heilongjiangensis*)による患者発生が確認され、患者、マダニ、動物の現地調査や病原体の解析を行った。

・東北地方、北海道北部で大陸と共通する紅斑熱群リケッチアについての調査や、南西諸島でのツツガムシ調査を行った。

・獣医学的な見地からの調査では、イヌと家畜を歩哨動物とした血清疫学調査をし、一部野生動物のリケッチア感染状況を調査した。アナプラズマ、エーリキア等については、国内におけるマダニの実態調査を行った。

#### ・輸入リケッチア症についての検討

これまでまれであった海外輸入リケッチア症例として、発疹熱症例の診断と注意喚起などの対応を行った。医療関係者への啓発のためセミナーを開催した。

### 2. 検査・診断的研究

#### a. リケッチア検査法の検討

・つつが虫病診断のための PCR 法の改良

*O. tsutsugamushi* Shimokoshi 株検出 PCR に用いるプライマーの検討を行った。

・日本の紅斑熱リケッチア DNA の迅速鑑別法の検討

sca4 遺伝子に基づく PCR 産物の RFLP により、国内に生息する 4 種の紅斑熱群リケッチアを迅速に鑑別することが可能かを検討した。

#### b. 診断用検体としての痂皮の有用性についての検討

つつが虫病ならびに日本紅斑熱患者の刺し口の痂皮の検査材料としての有用性について検討した。

#### c. 紅斑熱群リケッチア症に対する新規の早期診断ツール開発

紅斑熱群リケッチア症に対する新規の早期

診断ツール開発を目的として、病理診断に有用なペプチド抗体を作成し評価を行った。

#### d. 日本紅斑熱の迅速診断法としての病理診断法の確立

重症例や劇症例が比較的多い日本紅斑熱の早期診断法として、また剖検例での病理組織からの診断法としての病理学的診断を確立するため、皮膚生検（刺し口、皮疹部）のホルマリン固定パラフィン切片を材料とした酵素抗体法と Real-time PCR 法の有用性を検討した。また、ヒト症例への応用も検討した。

ヌードマウスを用いた感染実験で、皮下ならびに腹腔投与でマウスに対する本菌の病原性について検討した。

#### e. レファレンス構築のための菌株収集等の整備

新たな紅斑熱リケッチアをはじめ新規リケッチアに対しても早期把握が可能となるように、レファレンス構築のためのリケッチア株を収集し保存を進めた。

### 3. 予防・治療的研究

#### a. 重症化機序の解明

日本紅斑熱の重症化機序解明のために、島根県にて 2007～2008 年に発症した 23 症例の日本紅斑熱患者確定症例の臨床経過を調査すると同時に、生体防御の指標として急性期と回復期それぞれの血清を用いて、血中サイトカイン値を測定し、重症度との関連性を検討した。

#### b. 啓発活動の試み

啓発活動として、四国 4 県連携事業の動物の日本紅斑熱抗体調査をサポートし、得られ

た結果を基にして住民への感染予防啓発を実施した。

## C. 研究結果

### 1. 疫学的研究

#### a. リケッチア感染症の国内サーベイランス改善

四国 4 県の内科標榜医療機関におけるつつが虫病と日本紅斑熱のサーベイランスの認知度と診断・報告状況の調査を行った結果、両疾患のサーベイランス認知度は低い順に、香川県、愛媛県となっており、両疾患の発生が少ない順となっていた。今後は、発生状況の詳細と合わせて解析を行う予定としている。また特につつが虫病に関しては、臨床診断のみの症例が相当数存在することが示唆された。市民向けの 3 つの公開講座において、つつが虫病・日本紅斑熱・ライム病に関する認知度を調査した。「医療・公衆衛生」の職種において、病名、感染経路、症状についての認知度は十分なものではなく、今後さらなる調査が必要であると考えられる。また「その他・不明」の職種のつつが虫病についての集計からは、感染経路・症状について周知を図ることが、受診態度の向上につながる可能性が示唆された。

#### b. リケッチア感染症の国内実態調査

##### 1) 各地での患者実態調査ならびに媒介動物調査

① 新規の紅斑熱群リケッチア *R. heilongjiangensis* による患者の初確認  
急性期の検査材料の全血、血清、刺し口が日本紅斑熱の検査に供試された。刺し口の検体がリケッチア属 PCR 陽性となり、回復期とあわせたペア血清によって日本紅斑熱

リケッチア *R. japonica* に対する抗体価上昇も確認された。従来、この地域においては日本紅斑熱患者の発生は報告されていないため、さらに PCR 産物のシーケンス解析等、実験室検査の精査を進めるとともに、患者情報の収集と感染推定地域における媒介ベクターと動物の野外調査が8月中旬から開始された。実験室精査では、リケッチア属共通の 17KDa 遺伝子の他、*gltA*、*ompA* 遺伝子のいずれからも、日本国内では確認されていなかった *R. heilongjiangensis* の遺伝子配列が確認され、*R. japonica* と同程度の *R. heilongjiangensis* に対する抗体価の上昇が確認された。また、野外調査においてイスカチマダニ (*Haemaphysalis concinnae*) から *R. heilongjiangensis* が PCR で検出され、分離にも成功した。さらに、患者感染推定地域で捕獲されたドブネズミより *R. heilongjiangensis* に対する高い抗体価が検出された。

#### ②関東・東北地域におけるつつが虫病および日本紅斑熱の実態調査

神奈川県におけるリケッチア症患者の発生状況の把握を血清抗体測定と遺伝子検出により行い、つつが虫病患者が 12 名確定診断された。つつが虫病患者の感染株は Kawasaki 株 8 名 (66.7%)、Kuroki 株 1 名 (8.3%)、Karp 株 2 名 (16.7%)、不明 1 名 (8.3%) であり、県内の主な感染株は Kawasaki 株であった。また日本紅斑熱患者 1 名の発生が確認された。

#### ③東海北陸地域におけるつつが虫病および日本紅斑熱の実態調査

つつが虫病は全ての県で発生しており、特に岐阜県での発生が多かった。日本紅斑熱は 2 県でのみ発生しており、特に三

重県での発生が数年で急激に増加していた。

#### ④富山県内のつつが虫病および紅斑熱の浸淫状況調査

富山県内の野生げっ歯類およびマダニ類の調査を行った。野生げっ歯類 14 頭のうち港湾地区で捕獲した 1 頭がつつが虫病リケッチアに対する抗体を保有していた。つつが虫病患者発生地で捕獲した野生げっ歯類から抗体及び病原体は検出されず、1980 年代に比較してつつが虫病病原体による汚染の低下が、患者減少につながっている可能性が示唆された。マダニの季節消長調査においてキチマダニ、ヤマトマダニが多数採集された。マダニ 286 検体からの遺伝子検出では、マダニの成虫 20 個体、若虫 5 個体より紅斑熱群リケッチアの遺伝子が検出されたが、*R. japonica* は検出されなかった。これまでに患者報告がないことと合わせて、富山県内における *R. japonica* の浸淫の可能性は低いと考えられた。

#### ⑤中国四国地域におけるつつが虫病および日本紅斑熱実態調査

2008 年の中国・四国地域におけるリケッチア症 (つつが虫病・日本紅斑熱) の患者発生は、つつが虫病 28 例、日本紅斑熱 33 例であった。2007 年、初めて日本紅斑熱患者報告のあった鳥取県東部地域で 2008 年には 2 例報告された。つつが虫病は広島県 (15 例)、日本紅斑熱は島根県 (14 例) からの報告が最も多かった。一方、つつが虫病・日本紅斑熱ともに、岡山県・香川県からの患者報告は無かった。

#### ⑥九州沖縄地域におけるつつが虫病および日本紅斑熱実態調査

2008 年の九州地域におけるつつが虫病

患者の報告数は、鹿児島県 72 例、宮崎県 36 例、大分県 11 例、長崎県 10 例、熊本県 6 例、福岡県 2 例、佐賀県と沖縄県で各 1 例の計 139 例で、全国の患者数 (434 例) の 32% を占めた。九州沖縄地域の全ての県で発生が確認されたが、沖縄県からの報告は県内感染の初めての症例で、宮古島での感染であった。

2008 年の九州地域における日本紅斑熱患者の報告数は、熊本県 18 例、鹿児島県 11 例、宮崎県 7 例、長崎県 2 例の計 38 例で、全国の患者数 (132 例) の 29% であった。従来から鹿児島県と宮崎県が多発地として知られていたが、熊本県天草の上島で多発していることが確認された。九州地域内の地方衛生研究所の連携により、検査依頼の受付、診断用抗原スライドの提供、技術研修等を実施したことも患者の確認に寄与したと思われる。

## 2) 宮崎市日本紅斑熱強化サーベイランス事業

宮崎県では毎年つつが虫病および日本紅斑熱の発生が確認されているが、2008 年 7 月に、県内初の日本紅斑熱による死亡例が宮崎市保健所管内で発生した。このため、宮崎市は、市内における日本紅斑熱の発生状況を把握することともに、死亡例や重症例の発生の予防を目的として、「宮崎市日本紅斑熱強化サーベイランス事業」を実施した。本研究班は、この事業の実施に際して、症例定義の設定、確認検査用材料の選択、確認検査および推定感染地の調査等で宮崎市と連携した。2008 年に宮崎県内で確認された患者は 8 例 (未報告例 1 例を含む) で、宮崎市とその周辺で感染したと推定された患者は 4 例であった。宮崎県内では、例年 4 例前後の患者が報告されているが、2008

年度には患者数が増加した。強化サーベイランスの実施過程で啓発活動が進んだことにより、日本紅斑熱に対する医療従事者や住民の認知度が高まったことがその一因と考えられる。さらに、今回の宮崎市の事業は、同様の事例の発生時の対策のみならず、本疾患のサーベイランス体制の強化に向けた取り組みの貴重なモデルとなった。

## 3) 国内各地のマダニ相調査とマダニ類からのリケッチアの分離結果

2008 年 3 月から 2009 年 1 月に実施した国内各地のマダニ相調査とマダニ類からのリケッチアの分離結果を整理した。調査地域は県別に、北海道北部地域 (利尻島と礼文島を含む)、東北地方の青森、岩手、宮城および福島、関東地方の栃木、近畿地方の和歌山と兵庫、四国地方の香川、徳島および高知、九州地方の鹿児島本土域、南西諸島域の鹿児島 (竹島、硫黄島、黒島) と沖縄 (宮古島、西表島) である。これらの地域から採集したマダニ類は、4 属 23 種 1,374 個体で、このうち 564 個体についてリケッチア検査を実施し、2 属 9 種から病原種を含む紅斑熱群リケッチア 62 株を分離した。今回の成績の中では、特に北海道北部地域のシュルツェマダニにおける *R. helvetica* の高い保有率に加え、宮城県での *R. heilongjiangensis* 感染症例に関連した当該リケッチア保有イスカチマダニの生息確認が目された。

## 4) 三重県志摩半島における日本紅斑熱の実態調査

2006 年 8 月以来、三重県志摩半島一帯で紅斑熱の多発傾向がみられており、2007、2008 年に見られた症例につき臨床所見や感染状況を整理した。そのベクターとなるマダニ類発生の季節的消長を調べ、それら

から病原リケッチア DNA の検出も試みたところ、*R. japonica* を含む頻度高い保有を証明し得た。頻度高い感染環を象徴する事例として、同所同時感染した3症例について精査した結果、その患者宅裏庭のベクターから *R. japonica* を証明し得た。

#### 5) 獣医学領域からのリケッチア感染症へのアプローチ

① 伴侶動物のリケッチア類感染状況調査として、全国のイヌ 1427 頭の末梢血から PCR により紅斑熱群リケッチア遺伝子検出を試みたが、全頭陰性であり、イヌが紅斑熱群リケッチアの保菌動物になり得る可能性は低いものと考えられた。

② シクロスポリン投与による免疫抑制犬に対して *R. japonica* Aoki 株を接種したところ、接種後 2~3 日目に元気消沈、食欲・飲水欲の低下および 39.7~41.0 °C の発熱が見られた。しかし、4 日目以降一般状態は回復し、体温も平熱に復した。紅斑、リンパ節腫脹などは認められなかった。接種後 14 日目の抗体価は接種犬 2 頭とも 160 倍を示した。末梢血 PCR では病原体は検出されなかった。*R. japonica* Aoki 株のイヌに対する病原性は強くないものと思われた。

③ 全国のイヌ 1065 頭の末梢血から PCR によりエーリキアおよびアナプラズマ検索を行ったところ、150 頭 (14.1%) が陽性を示した。PCR 産物の遺伝子解析により *Wolbachia* spp. および *Anaplasma bovis* 遺伝子の一部が検出された。また血清学的検索により、*A. phagocytophilum* 陽性犬が検出された。

#### 6) 家畜のリケッチア類感染状況調査

① 北海道の牛放牧地におけるシュルツエマダニおよびオオトゲチマダニから *A.*

*phagocytophilum* および *A. bovis* の遺伝子断片が検出され、これらのマダニがベクターである可能性が示唆された。

② 沖縄県与那国島の牛放牧地におけるフタトゲチマダニから *A. phagocytophilum* 種特異的 PCR 陽性検体が検出され、フタトゲチマダニが本地域における *A. phagocytophilum* のベクターである可能性が示唆された。

③ 沖縄県石垣島において *A. marginale* 感染症牛を摘発し症例報告した。

#### 7) 野生動物のリケッチア類感染状況調査

北海道のアライグマ末梢血について、PCR を用いてリケッチアの検出を試みたところ、0.5% が紅斑熱群リケッチア陽性を示し、遺伝子解析の結果 *R. heilongjiangensis* と高い相同性を示した。また 3.8% がエーリキア/アナプラズマ陽性を示し、遺伝子解析で *A. bovis* および *Ehrlichia canis* に近縁であった。

#### 8) リケッチア関連細菌群の実態調査

① 日本国内におけるリケッチア関連細菌群の実態を明らかにするため、本年度は紀伊半島を含む西日本地域(和歌山県、三重県、長崎県五島列島、および沖縄県与那国島)でマダニ採集を行い、これらマダニの唾液腺 DNA から紅斑熱群リケッチアの *gltA* 遺伝子、アナプラズマ属菌の *p44* 遺伝子群、およびエーリキア属菌の *p28* 遺伝子群の検出と解析を行った。その結果、三重県のヤマアラシチマダニ、タカサゴチマダニ、およびツノチマダニから *R. japonica* が検出され、さらに三重県のタカサゴチマダニとキチマダニおよび五島列島のタカサゴチマダニからは新たな Genotype と思われる紅斑熱群リケッチアが検出された。アナプラズマ属菌に関しては、五島列島のタカ

サゴチマダニとオオトゲチマダニ、また与那国島のフタトゲチマダニからヒトに感染の恐れがある *A. phagocytophilum* が検出された。特に、五島列島のマダニは、*A. phagocytophilum* の保有率が極めて高く (42%)、ヒトへの感染が懸念される。エーリキア属菌では、昨年度より継続して解析していた鹿児島県のタカサゴキラマダニから *E. ruminantium* と 83-86% の相同性をもつ p28 遺伝子群が検出され、また与那国島のフタトゲチマダニからは *E. ewingii* と 67-73% の相同性をもつ p28 遺伝子群が検出された。これらは、いずれも既存のエーリキア属菌と低い相同性を示すことから、新種のエーリキア属菌である可能性が示唆された。

②1999年から2005年に国内で採取したマダニより抽出、精製されたのち凍結保存されていた DNA を用い、マダニ媒介性感染症病原体の網羅的検出を行った。360個体のマダニを試験に供し、ミナミネズミマダニ (*Ixodes granulatus*) より新種 *Ehrlichia* DNA を検出した。本 *Ehrlichia* 属細菌のヒト、家畜等への病原性は不明であり、今後その評価が必要であるとともに、*Ehrlichia* に関するサーベイランスの参照配列として有用であると考えられる。

#### 9) 発疹熱の輸入例

発疹熱症例 2 例を遺伝子検出と血清診断で確定し、注意喚起などの対応を行った。医療関係者への啓発のためセミナーを開催した。治療・予防の項で後述。

## 2. 検査・診断的研究

### a. リケッチア検査法の改良

- ・つつが虫病診断のための PCR 法の改良

*O. tsutsugamushi* Shimokoshi 株検出 PCR に用いるプライマーの検討を行ったところ、作製したプライマーにより Shimokoshi 株が検出可能であることが示された。

- ・日本の紅斑熱群リケッチア DNA の迅速鑑別法の検討

sca4 遺伝子に基づく PCR 産物の RFLP により我が国に生息する 4 種の紅斑熱群リケッチア *R. japonica*、*R. asiatica*、*R. helvetica*、*R. tamurae* を迅速に鑑別することが可能となった。またこの方法はマダニを用いたリケッチアの疫学調査に応用可能であることが示唆された。

### b. 診断用検体としての痂皮の有用性についての検討

2008年の島根県における日本紅斑熱患者 14 例の内、ダニ刺し口の痂皮 (7 検体) と全血 (6 検体)、血餅 (5 検体) について、*Rickettsia* 属 17 kDa 領域の PCR 検査試料としての比較評価をおこなった。結果、痂皮については 7 検体 (第 3~11 病日) すべて PCR 陽性となり、全血については 6 検体中 3 検体が PCR 陽性、血餅は 5 検体全て陰性となった。また、宮崎県においても血清診断によって確定した日本紅斑熱、つつが虫病、両疾患が否定された計 20 例の検討を行い、血液材料と比較して明らかに痂皮の PCR 検査材料としての有効性が明らかであった。すなわち、日本紅斑熱およびつつが虫病の実験室診断における試料は痂皮が最適と判断された。

### c. 紅斑熱リケッチア症に対する新規の早期診断ツール開発

- ・ペプチド抗体の作成と評価

作成が容易でかつ商業ベースで標準化が

可能なペプチド抗体を、細胞表層に恒常的に発現していると考えられた RickA 抗原について *in silico* 解析によりエピトープとなりうる領域を選定、この内の 4 配列についてペプチド抗体を作製した。この内、1 種類 (8476) が RickA 抗原を検出できることを Immunoblotting 法により示した。一方、平成 19 年度の報告書にあるように、*R. japonica* 感染 L-929 細胞 (ホルマリン固定) では、特異的な染色像は見いだされなかった。

#### ・モノクローナル抗体の評価

海保らによって作成されたモノクローナル抗体について、その特異性についてウエスタンブロット法によって調べた。3YH2C6 を除きいずれのモノクローナル抗体においても Immunoblotting 法による特異的な反応は見いだされなかった。3YH2C6 はタンパク抗原を認識していると考えられたがその抗原同定にはいたらなかった。

#### d. 日本紅斑熱の迅速診断法としての病理診断法の確立

日本紅斑熱の早期診断法として、皮膚生検 (刺し口、皮疹部) のホルマリン固定パラフィン切片による酵素抗体法と Real-time PCR 法の有用性を確認し、ヒト症例へ応用した。両法を併用することにより、診断の有用性が高まった。現在、*in situ* hybridization 法をあらたに開発中である。また、日本紅斑熱の剖検例の Real-time PCR 解析で、諸臓器のパラフィン切片から *R. japonica* DNA が同定された。ヌードマウスを用いた感染実験では、*R. japonica* 4 株を皮下ならびに腹腔投与して観察したが、マウスに対する本菌の病原性は証明されなかった。

#### e. レファレンス構築のための菌株収集等の整備

レファレンス構築のためのリケッチア株や遺伝子を収集し保存を進めた。

### 3. 予防・治療的研究

#### a. 重症化機序の解明

日本紅斑熱の重症化機序解明のために、確定症例の臨床経過を調査すると同時に、生体防御の指標として急性期と回復期それぞれ血清を用いて、血中サイトカイン値を測定し、重症度との関連性を検討した。島根県で発症した 23 症例の日本紅斑熱患者の臨床経過を検討し、重症度を数値化した結果、平均値スコア 1.78 を示した。前年度検討した和歌山県発症のつが虫患者の平均重症度スコア 1.16 (N=31) と比較し、有意に高値を示した ( $p < 0.05$ )。症例を重症群と軽症群に分類すると、急性期の TNF- $\alpha$  が重症群において有意に高値を示した。さらに、播種性血管内凝固症候群 (DIC) を発症した症例が 4 例あるが、その急性期血中 TNF- $\alpha$  値は平均 9.89 pg/ml を示し、非 DIC 例 (平均 2.19 pg/ml) と比較し、極めて高値であった ( $p < 0.001$ )。

#### b. 啓発活動の試み

##### ・四国 4 県連携事業での啓発

四国の動物の日本紅斑熱抗体調査を抗原の提供やアドバイス等でサポートし、得られた結果を基にして住民への感染予防啓発のためのポスター作成に協力をした。

##### ・発疹熱、輸入リケッチア症についての啓発

相次いで経験した発疹熱症例の診断と対応についてセミナー (第 4 回国際感染症セミナー、熱帯病治療研究班と共催、平成 20

年6月28日)を開催し、医療関係者への啓発を行った。

## D. 考察

### 1. 疫学的研究

#### a. リケッチア感染症の国内サーベイランス改善

四国4県での調査成績もサーベイランス認知度は両疾患の発生が少ない順に低くなっていたことから、啓発の重要性が示唆された。さらに時期を置いて検討すれば、サーベイランスの認知度の向上も見られる可能性があり、今後も検討すべきと考える。また特につつが虫病に関しては、臨床診断のみの症例が相当数存在することが示唆されたことから、届出の必要性についてより理解を深める努力も要する。

一般への啓発のための認知度調査については、情報量がまだ少ないが、今後も機会を捉えて検討していくことが望ましい。今後疫学情報の医療関係者、行政、メディア、一般社会への適切な情報提供と、啓発による感染予防の効果を検討するためにも、リスクコミュニケーションの手法も参考にしながら、リケッチア症ハイリスク地域における住民等への啓発のモデル化を試みることを考えている。

#### b. リケッチア感染症の国内実態調査

・新規の紅斑熱群リケッチア *R. heilongjiangensis* による患者の初確認  
一連の、患者確認と実験室診断、感染源調査のための野外調査から、日本国内に *R. heilongjiangensis* による紅斑熱群リケッチア症の患者発生がはじめて確認され、関東以西の西日本太平洋側を中心とする *R. japonica* による日本紅斑熱以外に紅斑熱リケッチア症の発

生が北日本を含む全国で発生している可能性が示された。仙台市は獣医師や本研究班の協力を得つつイヌにおける抗体調査を開始している。定期的な現地調査も含めて、この新たな紅斑熱群リケッチア症の疫学の解明は国内の日本紅斑熱の実態の認識を大きく変えるものになると予想される。今後の重要な課題ととらえている。

- ・各地域での調査結果についての考察は、膨大な情報のため、煩雑になることから、結果に示したものと詳細は各分担者の報告を参照いただきたい。
- ・患者、ベクターとしてのマダニやツツガムシ、動物の国内実態把握のための調査研究はこれまでと同様に継続するとともに、さらに新たなリケッチア症についても検討を加えて陽性のマダニや動物の分布様式を含む実態調査成績から、ヒトへの感染リスクマップを作成し監視体制の構築を目指したい。

### 2. 検査・診断的研究

#### a. PCR法を用いたリケッチア症病原体検出法の改良

- ・つつが虫病診断のためのPCR法の改良  
今後臨床応用を進めるとともに病原体検査マニュアルの改定を予定している。東北地域での Shimokoshi 株の実態調査が期待される。
- ・日本の紅斑熱群リケッチア DNA の迅速鑑別法の検討  
今後臨床応用を進め、ベクターの実態調査に活用する予定である。

#### b. 診断用検体としての痂皮の有用性についての検討



つつが虫病、日本紅斑熱の実験室診断における試料として、痂皮は治療後でもPCRでの検出率が高いことと、侵襲性が低いこと、急性期の血液からの検出が陰性の症例でも検出可能なことから、非常に有用な検体であることが明らかとなった。引き続き比較検討するとともに、今後は臨床医や医療関係者への情報提供とマニュアル等での啓発を進める。

#### c. リケッチア感染症に対する新規の早期診断ツール開発

新規早期診断ツールとして確立し、病理検査への実用化を目指して、ペプチド抗体を作成し評価したが、残念ながら、特異的な染色像は見いだされなかった。*R. japonica* 感染細胞では*R. conorii*で見られるようなコメット・テイル様細胞内移動像は見いだされないこと、さらにBalrajらは、RickA抗原がアクチン重合による宿主細胞内移動に関与しないことを*R. raoultii*で示している(PLoS One, 2008)。今後、本抗原の局在、および細胞外ドメインの再確認が必要であると考えられた。一方、近年ゲノム解析等により病理診断に有効と考えられる抗原候補が*in silico*解析から見いだせること、また検査ツールとしての標準化作業の容易さから、今後もこれら新規抗原に対するペプチド抗体による同様のアプローチは有効であると考えられる。

#### d. 日本紅斑熱の迅速診断法としての病理診断法の確立

重症例や劇症例が比較的多い日本紅斑熱の早期診断法として、また剖検例での病理組織からの診断法としての病理学的診断は重要である。さらに症例を増やして検討しヒト症例での診断法としての確立を目指したい。

診断法の検討のみならず、病状解析を含め

て動物実験の重要性は高い。今回ヌードマウスでの病原性については低いことが明らかとなったが、今後も日本紅斑熱の感染実験に適する動物種について引き続き検討していく予定である。

#### e. レファレンス構築のための菌株収集等の整備

地方衛生研究所の検査体制の厳しい現状ではレファレンス構築が急務であり、現時点ではまだ十分な収集と分与のための体制作りが出来ておらず、今後の課題として引き続き整備を行う必要がある。

### 3. 予防・治療的研究

#### a. 重症化機序の解明

TNF- $\alpha$ は重症化を予測するために有用な指標となることが推測された。日本紅斑熱において、TNF- $\alpha$ をはじめとする炎症性サイトカインの過剰な産生を抑制することは、救命のための治療戦略となる可能性があると考えられる。現在リケッチア感染症治療にはテトラサイクリン系抗菌剤がしばしば用いられるが、同薬剤には強力な抗リケッチア作用に加え、単球系細胞におけるTNF- $\alpha$ 産生を抑制する効力を有することも明らかとなりつつある。他方、日本紅斑熱において重症化を回避するために、臨床的にはニューキノロン系薬剤の併用が有効であることも指摘されている。日本紅斑熱の疾患としての全容はまだ不明な点も多く、今後、詳細な情報収集および、適切な治療法の開発を進める必要があると考える。

今後、患者の臨床病態に応じた薬剤選択や効果については、多施設間での検討による症例の追加や*in vitro*での検討が欠かせ

ず、また、動物実験に関しても検討課題である。

#### b. 啓発活動の試み

啓発活動について積極的に進めてきた高知県では、近年日本紅斑熱患者数の報告がやや減少傾向にあり、啓発効果の可能性が示唆されている。他の流行地域での啓発活動もより積極的に進める必要があると考えている。

### E. 結論

リケッチア感染症の実態解明と早期診断体制の確立、早期警鐘システム構築のための研究を行い、3年目もさらに知見を積み重ねた中で、新規紅斑熱群リケッチア症例やアナプラズマ症の国内初事例の発見を始め、多くの成果を得た。しかし、新たな課題も明らかになったことから、今後もリケッチア感染症の疫学的研究、検査・診断的研究、予防・治療的研究をさらに進める必要がある。

### F. 健康危機情報

- 1) 日本紅斑熱の死亡例発生に伴い、強化サーベイランスを実施するための情報提供を関係機関等に行った。
- 2) 宮古島におけるつつが虫病患者発生病原体検出情報 IASR 2009年1月号速報  
<http://idsc.nih.go.jp/iasr/rapid/pr3471.html>
- 3) 発疹熱症例に関する情報提供  
IDWR 速報第10巻13号, 29-30  
<http://idsc.nih.go.jp/idwr/kanja/idwr/idwr2008/idwr2008-13.pdf>

発疹熱の輸入感染症例の発生について

厚生労働省ホームページ

<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou24/index.html>

- 4) 日本紅斑熱の感染事例が発生しました  
記者発表資料 平成20年8月15日 仙台市健康福祉局保健医療課  
<http://www.city.sendai.jp/soumu/kouhou/houdou/08/0815kouhan.pdf>

### G. 研究発表

各分担研究報告書を参照。

### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

## II. 分担研究報告書

## リケッチア感染症の国内サーベイランスのまとめ およびサーベイランス改善に関する研究

研究分担者 岡部信彦 国立感染症研究所感染症情報センター長  
研究協力者 佐藤弘 国立感染症研究所感染症情報センター第三室研究員  
松井珠乃 国立感染症研究所感染症情報センター第一室主任研究官  
藤本嗣人 国立感染症研究所感染症情報センター第四室室長

### 研究要旨

#### 研究①

四国4県の内科標榜医療機関におけるつつが虫病と日本紅斑熱のサーベイランスの認知度と診断・報告状況の調査を行った。両疾患のサーベイランス認知度は低い順に、香川県、愛媛県となっており、両疾患の発生が少ない順となっていた。今後は、発生状況の詳細と合わせて解析を行う予定としている。また特につつが虫病に関しては、臨床診断のみの症例が相当数存在することが示唆された。

#### 研究②

市民向けの3つの公開講座において、つつが虫病・日本紅斑熱・ライム病に関する認知度を調査した。「医療・公衆衛生」の職種において、病名、感染経路、症状についての認知度は満足がいくものではなく、今後さらなる調査が必要であると考えられる。また「その他・不明」の職種のつつが虫病についての集計からは、感染経路・症状について周知を図ることが、受診態度の向上につながる可能性が示唆された。

### 研究①：四国4県の内科標榜医療機関におけるつつが虫病と日本紅斑熱に関する調査

#### A. 研究目的

平成12-18年の感染症発生動向調査によると、四国4県におけるつつが虫病の報告数合計は、徳島県11例、香川県1例、愛媛県3例、高知県38例であり、日本紅斑熱の報告数は、徳島県22例、香川県0例、愛媛県20例、高知県

64例であった。四国4県においては、両疾患の発生状況に差があり、これらの県の内科標榜医療機関において、両疾患のサーベイランスの認知度と、平成19年11月～平成20年10月の診断・報告状況について調査を行ってみることとした。