

## 2. 北海道のエゾシカにおける紅斑熱群リケッチア保有状況調査

洞爺湖中島のエゾシカ 13 検体と、静内のエゾシカ 26 検体の末梢血における紅斑熱群リケッチアの PCR 検査結果は全て陰性であった。同調査地では過去に捕獲されたエゾシカの末梢血から *Rickettsia helvetica* の遺伝子が検出されたとの報告があるが、今回全て陰性となった原因としては検体数の不足の可能性がある。洞爺湖中島ではエゾシカの高密度化により植生の劣化が生じており、高密度化による種々の変化が紅斑熱群リケッチアの浸淫に与える影響を予測するモデルとなる可能性がある。このため、今後血清抗体価や咬着したマダニに関する保有状況などに関しても調査する必要がある。

### E. 結論

#### 1. 島根県のイノシシにおける紅斑熱群リケッチア感染状況調査

島根県美郷町において捕獲されたイノシシの末梢血や脾臓からは紅斑熱群リケッチア DNA が検出されなかったが、体表から採集したキチマダニから *Rickettsia* sp. Hj126 と相同性の高い遺伝子が検出された。またタカサゴキララマダニから *R. tamurae* が検出され、マダニが咬着していた皮膚の部分からも *R. tamurae* が検出された。このことは *R. tamurae* がイノシシの皮膚から侵入したことを示唆するが、体内での増殖の証拠は得られなかった。抗体陽性率の結果は流行地と比較して低い結果を示した。このことは流行地と非流行地における紅斑熱群リケッチアの浸淫状況の違いがイノシシの抗体陽性率の違いにも現れる

ことを示唆する。また加齢と共に抗体価が上昇する傾向が見られた。サンプルの年齢構成は季節や捕獲方法によってバイアスがかかるため、今後地域間での陽性率の比較においてはそれらに起因するバイアスを考慮すべきであろう。

## 2. 北海道のエゾシカにおける紅斑熱群リケッチア保有状況調査

洞爺湖中島と静内のエゾシカの末梢血について PCR 法により紅斑熱群リケッチア DNA の検出を試みたが、結果は全て陰性であった。

### F. 健康危機情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

なし

### H. 知的財産権の出願・登録状況

#### 1. 特許取得

なし

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし

表1 島根県美郷町のイノシシ<sup>※</sup>に咬着したマダニにおけるリケッチア保有状況(陽性数/検体数/採集数)

マダニの種類	♂	♀	Nymph	合計
<i>Amblyomma testudinarium</i>	5/21/21	2/5/5	1/1/1	8/27/27
<i>Haemaphysalis flava</i>	0/0/184	1/17/112	0/0/9	1/17/305

※2009年12月22日～2010年1月27日に捕獲した24検体

表2 島根県美郷町のイノシシ<sup>※</sup>に咬着したマダニと皮膚におけるリケッチア保有状況(陽性数/検体数)

マダニの種類	検体	♂	♀	Nymph	Larva	合計
<i>Amblyomma testudinarium</i>	マダニ	9/45	3/10	5/24	-	17/79
	皮膚	8/45	2/10	0/24	-	10/79
<i>Haemaphysalis flava</i>	マダニ	1/5	0/17	5/47	0/3	6/72
	皮膚	0/5	0/17	0/47	0/3	0/72

※2010年7月23日～2010年8月26日に捕獲した65検体

表3 島根県美郷町におけるイノシシ<sup>※</sup>の*R.japonica*に対する抗体保有状況

月齢	検体数	陽性数	陽性率(%)
3～5ヶ月	41	4	9.8
6～8ヶ月	1	1	-
12ヶ月	11	6	54.5
24ヶ月	1	0	-
36ヶ月以上	1	0	-
不明	4	2	-
計	59	13	22.0

※2010年7月23日～2010年8月26日に捕獲した65検体

## 岡山県で発生した日本紅斑熱患者の初発例における感染源調査

研究代表者	岸本壽男	岡山県環境保健センター	所長
研究協力者	木田浩司	岡山県環境保健センター 保健科学部	研究員
	中本 敦	同	リサーチレジデント
	藤井理津志	同	部長
	葛谷光隆	同	専門研究員
	濱野雅子	同	専門研究員
	川上万里	真備中央病院 内科	
	高田伸広	福井大学医学部	シニアフェロー(研究分担者)
	矢野泰弘	福井大学医学部	助教
	藤田博己	大原研究所	主任研究員(研究分担者)
	及川陽三郎	金沢医科大学	助教
	田原研司	島根県薬事衛生課	企画員(研究分担者)
	島津幸枝	広島県総合技術研究所	副主任研究員
	安藤秀二	国立感染症研究所 ウイルス第一部	室長(研究分担者)
	川端寛樹	国立感染症研究所 細菌第一部	室長(研究分担者)
	小林秀司	岡山理科大学動物学科	准教授
	清水慶子	同	教授
	森光亮太	同	大学院生

研究要旨 日本紅斑熱の病原体である *Rickettsia japonica* を含む紅斑熱群リケッチア (spotted fever group rickettsia : SFGR) は、マダニによって媒介され、リザーバーとして野鼠が重要視されている。2009年10月、倉敷市北部において、岡山県初の日本紅斑熱患者が確認され、その直後に2例目の患者も発生した。そこで、患者発生地域を中心に、野鼠及びマダニを捕獲し、SFGRの侵淫状況調査を行った。調査は2010年2月、6月、8月及び9月に実施した。患者居住地を中心として半径10キロメートルに19地点を設定し、6地点で野鼠を、全地点でマダニを捕獲した。L929細胞を用い、野鼠の全血からSFGRの分離を試みた。血清抗体価は、*R.japonica* YH株を抗原とした間接蛍光抗体法で測定した。また、脾臓からDNAを抽出し、リケッチア属共通抗原である17kDa領域及びグエン酸合成酵素(gltA)領域を標的とする2系統のPCRにより、リケッチア遺伝子の検索を行った。マダニについては、種の同定と同時に、生存個体の一部について同様に微生物分離と遺伝子検索を行った。陽性検体については遺伝子配列を決定し、両領域の系統解析を実施した。その結果、捕獲した野鼠31頭のPCR及び全血が採取できた22頭の微生物分離は全て陰性であった。血清抗体価は、80~640が11頭(50%)、1280≦が12頭(50%)であり、捕獲地点による差はなかった。捕獲したマダニ490匹のうち、検査に供した204匹における

微生物分離は全て陰性であったが、PCR については 7 地点で捕獲された 25 匹が陽性であった。内訳は 17kda、gltA 共に陽性が 16 匹、17kda のみ陽性が 3 匹、gltA のみ陽性が 1 匹であった。系統解析の結果、全て SFGR であると考えられたが、既知種ではなかった。また、マダニ種と保有するリケッチアとの間に強い関係性が認められた。今後、さらに調査を行い、本県の SFGR 侵淫の実態を解明していく予定である。

#### A. 研究目的

日本紅斑熱は 1984 年に発見された感染症であるが、近年、患者数は増加傾向にある。紅斑熱群リケッチア (*spotted fever group rickettsia* : SFGR) の一種 *Rickettsia japonica* を保有するマダニによって媒介される熱性発疹性疾患であり、西日本を中心に発生が報告されているが、その詳細は未だ明らかにされていない。治療が遅れると致死的な経過をとる症例も報告されており、病原体保有マダニの地理的分布と野生動物の関与についての解明が望まれている。

我々が 2002 年に実施したヒトの抗体保有調査で、既に本県における SFGR の侵淫が示唆されていたが、発症例は報告されていなかった。しかし、2009 年 10 月、倉敷市北部において、岡山県初の日本紅斑熱患者が確認され、その直後に 2 例目の患者も発生した。そこで、本県における SFGR の侵淫状況を明らかにすることを目的として本研究に着手した。まず患者発生地域を中心に、周辺を含めた地域のダニ相及び SFGR の保有実態について調査した。また、リザーバーとして重要視されている野鼠の病原体保有実態及び血清抗体価による過去の感染履歴について調査した。

#### B. 研究方法

##### 1) 野鼠及びマダニの捕獲

調査は 2010 年 2 月、6 月、8 月及び 9 月

に実施した。患者居住地を中心として、半径 10 キロメートルに 19 地点を設定し、旗振り法によって 490 匹のマダニを捕獲し、形態観察によって種を同定した。そのうち 204 匹については SFGR の分離及び遺伝子検索を実施した。

19 地点のうち 6 地点で、網式トラップを用いて 31 頭の野鼠を捕獲し、SFGR の遺伝子検索を実施した。また、捕獲時に生存していた 22 頭については病原体分離及び血清抗体価測定を実施した。

##### 2) 病原体分離

野鼠 22 頭から採取した全血を L929 細胞 (マウス結合組織由来) に接種し、SFGR の分離を試みた。また、204 匹のマダニの体表面を 1% イソジン加 70% アルコールで消毒・圧潰後、SPG 溶液に浮遊した内臓浮遊液についても、同様に L929 細胞に接種した。接種細胞を 8 日後に回収し、スライドグラスに冷アセトンで固定後、間接蛍光抗体法により、分離の有無を確認した。1 次抗体として milk diluent (KPL) で IgG 抗体価 40 に調整した患者血清を 37°C で 1 時間反応させた。0.05% tween20 加リン酸緩衝バッファー (PBS) で 5 分間 2 回洗浄後、0.001% エバンスブルー加 milk diluent で 20 倍希釈した FITC 標識抗ヒト IgG (Dako) を 37°C で 1 時間反応させた。PBS で 5 分間 2 回洗浄後、蛍光顕微鏡で観察した。

### 3) SFGR に関する血清疫学調査

22 頭の野鼠の血清抗体価を *R. japonica* YH 株を抗原とした間接蛍光抗体法で測定した。1 次抗体として milk diluent で 2 倍階段希釈した被検血清を 37°C で 1 時間反応させた。0.05% tween20 加リン酸緩衝バッファー (PBS) で 5 分間 2 回洗浄後、0.001% エバンスブルー加 milk diluent で 20 倍希釈した FITC 標識抗マウス Ig(Dako) を 37°C で 1 時間反応させた。PBS で 5 分間 2 回洗浄後、蛍光顕微鏡で観察した。判定は、抗体価 80 ≤ を陽性とした。

### 4) リケッチア遺伝子の検索

野鼠の脾臓をバイオマッシャー (Wako) で破砕し、QIAamp DNA mini kit (Qiagen) を用いて抽出した DNA から、PCR によるリケッチア遺伝子検索を実施した。リケッチア属共通抗原である 17kda 領域は、1 次増幅プライマーとして Anderson(1989) の報告した R1=TCAATTCACAACCTTGCCATT 及び R2=TTTACAAAATTCTAAAAACC を、2 次増幅プライマーとして Noda(1997) の報告した Rr17.61p=GCTCTTGCAACTTCTATGTT 及び Rr17.492n=CATTGTTCGTCAGGTTGGCG を使用した nestedPCR によって検出した。クエン酸合成酵素 (gltA) 領域は、Regnery (1991) からの報告したプライマーセット、すなわち RpCS.780p=GACCATGAGCAGAATGCT TCT 及び RpCS.1258n=ATTGCAAAAAGTACAGT GAACA を使用した PCR によって検出し

た。

マダニの内蔵浮遊液から QIAamp DNA mini kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出し、同様に SFGR の 17kda 領域について遺伝子検索を実施した。gltA 領域については、1 次増幅プライマーとして Regnery (1991) の報告した RpCS.780p=GACCATGAGCAGAATGCT TCT 及び RpCS.1258n=ATTGCAAAAAGTACAGT GAACA を、2 次増幅プライマーとして RpCS.877p=GGGGCCTGCTCACGGCG G 及び RpCS.1258n を使用した semi-nestedPCR によって検出した。遺伝子検索陽性検体については Applied Biosystems 3500 ジェネティックアナライザ (life technologies) を用い、ダイレクトシーケンス法によって遺伝子配列を決定した。また、MEGA4.0 ソフトウェア (<http://www.megasoftware.net/>) を用い、系統解析を実施した。

### C. 研究結果

#### 1) 野鼠全血からの SFGR 分離及び脾臓からのリケッチア遺伝子検索

野鼠 22 頭の全血からの SFGR 分離は全て陰性であった。また、31 頭の脾臓から抽出した DNA の PCR 結果は全て陰性であった (表 1)。

#### 2) 野鼠の SFGR に対する血清疫学調査

野鼠 22 頭の抗体価は、11 頭 (50%) が 80~640、12 頭 (50%) が 1280 ≤ を示した。また、捕獲地点による差はなかった (表 2)。

#### 3) マダニ類からの SFGR 分離及びリケッ

#### チア遺伝子検索

捕獲したマダニの分類、SFGR 分離及びリケッチア遺伝子検索の結果を表3に示した。当該地域におけるマダニ類は、*Haemaphysalis flava* (キチマダニ) 355 匹が最も多く、*Haemaphysalis hystricis* (ヤマアラシチマダニ) 68 匹、*Haemaphysalis longicornis* (フタトゲチマダニ) 30 匹、*Ixodes turdus* (アカコッコマダニ) 24 匹、*Ixodes ovatus* (ヤマトマダニ) 7 匹、*Ixodes nipponensis* (タネガタマダニ) 2 匹、*Amblyomma testudinarium* (タカサゴキラマダニ) 3 匹及び *Dermacentor taiwanensis* (タイワンカクマダニ) 1 匹であった。検査に供した 204 匹における SFGR の分離は全て陰性であったが、PCR では 17kda 領域で 24 個体、gltA 領域で 17 個体が陽性を示した。陽性個体数は地点 3 及び 8 で多く、地点によって検出率に偏りが見られた(表 4)。遺伝子配列による系統解析の結果を図 1 に示した。検出された遺伝子は、いずれの領域においても全て SFGR であると考えられたが、既知種ではなかった。また、同種のマダニから検出された SFGR 遺伝子は地点が異なっているにも関わらず高い相同性を示した。

#### D. 考察

我々が 2002 年に実施したヒトの抗体保有調査で、既に SFGR の侵淫が示唆されていたが、当時は患者が発生しておらず、病原体の存在も証明されていなかった。本調査によって、捕獲したマダニ類から多くの SFGR に属する遺伝子が検出され、岡山県における SFGR の存在が初めて明らかになった。

捕獲数の多かったキチマダニ、フタトゲチマダニ及びヤマアラシチマダニは、いずれも *R.japonica* の媒介種と言われており、当該地域に感染スポットが存在する可能性を示唆するものであった。しかしながら、今回の調査では *R.japonica* は検出されず、SFGR 遺伝子が検出されたマダニでも、L929 細胞による SFGR 分離は陰性であった。このため、検出された SFGR の病原性の有無等については確認することができなかったが、*R.tamurae* がヒトに対する病原性を有することが昨年初めて報告されるなど、リケッチア感染症は未だ不明な点が多い。今後は、分離方法を検討し、多くの株の病原性について検討する必要があると考えられた。

SFGR を有するマダニは、特定の調査地点に偏っており、侵淫には地域差があることが示唆された。また、同種のマダニから検出された SFGR 遺伝子は地点が異なっているにも関わらず高い相同性を示したことから、マダニ種と SFGR の間には強い関係性があると考えられた。今後、さらに調査を行い、初発例地域における *R.japonica* の感染スポットの特定及び本県の SFGR 侵淫の実態を解明していく予定である。

#### E. 結論

本調査では *R.japonica* は検出されなかったが、多くの野鼠が高い抗体価を示したことから、またマダニから SFGR に属するリケッチア DNA が検出されたことから、本県における *R.japonica* を含む SFGR の侵淫が初めて明らかとなった。リケッチア陽性マダニは特定の調査地点に偏っており、SFGR の侵淫に地域差があることが示唆された。今後、

さらに調査を行い、本県の SFGR 侵淫の実態を解明していく予定である。

#### F.健康危険情報

特になし

#### G.研究発表

##### 学会発表

木田浩司、葛谷光隆、濱野雅子、藤井理津志、岸本壽男、川上万里、梅川康弘、高田伸弘、矢野泰弘、藤田博己、田原研司、島津幸枝、及川陽三郎. 岡山県における紅斑熱群リケッチアの侵淫状況調査. 平成 22 年度岡山県獣医師会公衆衛生学会. 岡山市

木田浩司、葛谷光隆、濱野雅子、藤井理津志、岸本壽男、川上万里、梅川康弘、高田伸弘、矢野泰弘、藤田博己、田原研司、島津幸枝、及川陽三郎. 紅斑熱群リケッチアの岡山県におけるサーベイランス. 平成 22 年度岡山県獣医師会公衆衛生学会. 岡山市

##### 論文発表

川上万里、梅川康弘、田原研司、木田浩司、藤井理津志、岸本壽男. 日本紅斑熱の1例: 岡山県初発例. 肝臓. 2010, 51:714-721

表1 野鼠全血からのSFGR分離及び脾臓からのリケッチア遺伝子検出

種類	SFGR分離	PCR	
		17kda	gltA
アカネズミ	0/22	0/31	0/31

表2 間接蛍光抗体法による野鼠のSFGRに対する血清抗体価

	$\leq 40$	80~640	1280 $\leq$
抗体保有率	0/22 (0%)	11/22 (50%)	11/22 (50%)



表3 捕獲したマダニ類からのSFGR分離及びリケッチア遺伝子検出

種 類	捕獲数	検体数	SFGR 分離	PCR結果	
				17kda	gltA
キチマダニ ( <i>Haemaphysalis flava</i> )	355	114	0	8	2
ヤマアラシチマダニ ( <i>Haemaphysalis hystrix</i> )	68	52	0	14	14
フタトゲチマダニ ( <i>Haemaphysalis longicornis</i> )	30	12	0	1	0
アカコッコマダニ ( <i>Ixodes turdus</i> )	24	20	0	1	1
ヤマトマダニ ( <i>Ixodes ovatus</i> )	7	4	0	0	0
タネガタマダニ ( <i>Ixodes nipponensis</i> )	2	0	0	0	0
タカサゴキアラマダニ ( <i>Amblyomma testudinarium</i> )	3	1	0	0	0
タイワンカクマダニ ( <i>Dermacentor taiwanensis</i> )	1	1	0	0	0
合計	490	204	0	24	17

24匹が17kdaまたはgltA領域のPCRで陽性を示した。

表4 マダニ類からのリケッチア遺伝子検出(地点別)

地点	検体数	陽性数
1	7	0
2	3	0
3	54	12
4	7	0
5	5	1
6	19	1
7	6	1
8	41	6
9	17	1
10	21	0
11	0	0
12	10	1
13	12	0
14	8	2
15	0	0
16	2	0
17	2	0
18	2	0
19	2	0

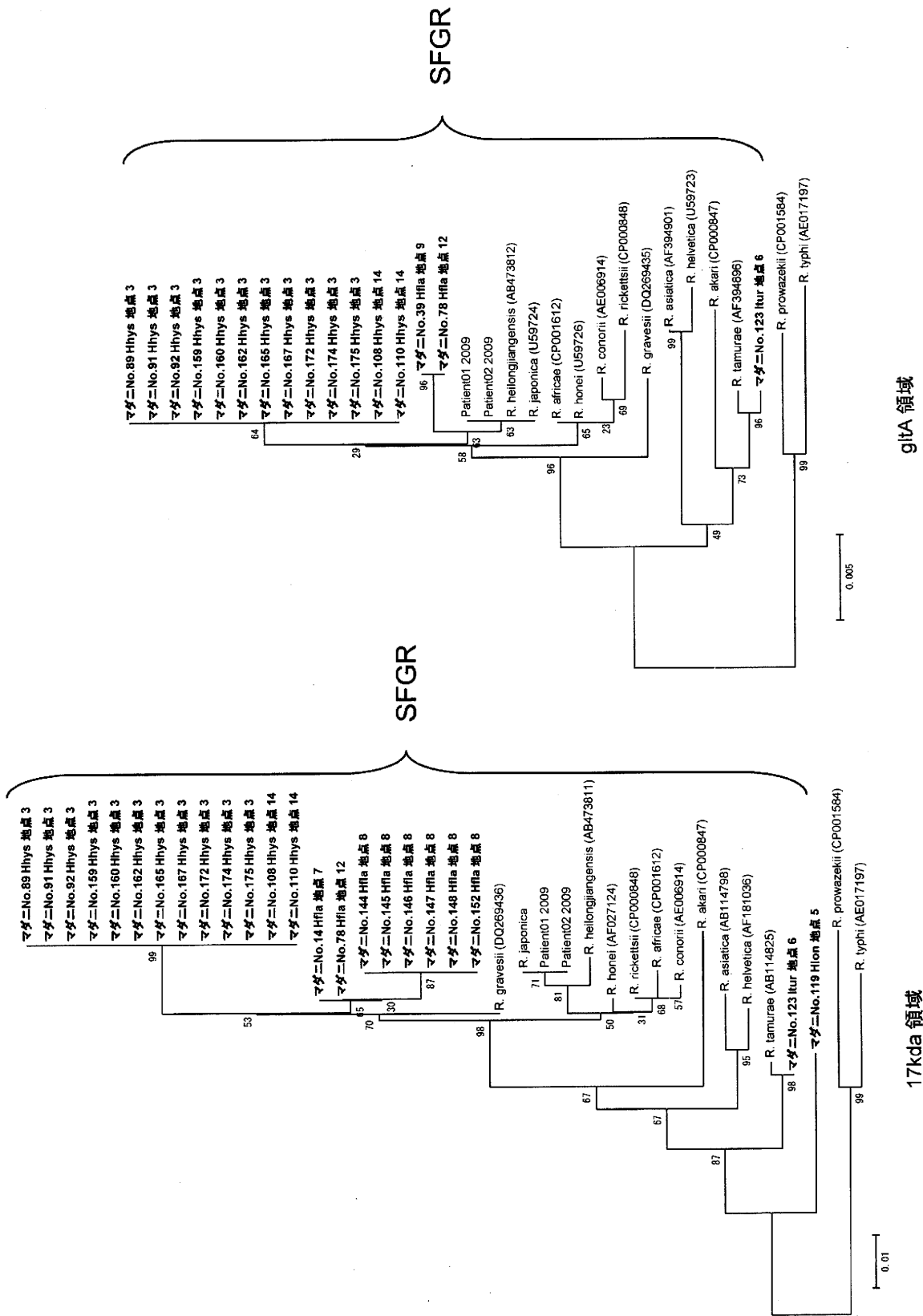


図1 マダニ類から検出したリケツチア遺伝子の系統樹

Hflaはキチマダニ、Hhysはヤマアラシチマダニ、Hlonはフタゲチマダニ、Hlonはアカコッコマダニを示す。

## 岡山県におけるヌートリアのリケッチア保有状況調査

研究代表者	岸本壽男	岡山県環境保健センター	所長
研究協力者	木田浩司	岡山県環境保健センター 保健科学部	研究員
	中本 敦	同	リサーチレジデント
	葛谷光隆	同	専門研究員
	濱野雅子	同	専門研究員
	藤井理津志	同	部長
	城ヶ原貴通	岡山理科大学理学部動物学科	助教
	小林秀司	同	准教授
	清水慶子	同	教授
	森光亮太	同	大学院生

研究要旨 ヌートリアは特定外来生物に指定されている南米原産の齧歯類であるが、岡山県は全国で最もその生息数が多い。本種は半水生であり、水系に沿ったリケッチア保有ダニの運搬に関与している可能性がある。そこで、本種に付着するダニ相とリケッチア属菌及びオリエンチア属菌の感染実態の解明を目的として、岡山県全域を対象に調査を行った。2010年1月から9月にかけて、17市町村で148頭のヌートリアを捕獲した。脾臓からDNAを抽出し、リケッチア属菌の17kda領域及びオリエンチア属菌の56kda領域を標的とする2系統のPCRにより、遺伝子検索を行った。また耳介からダニを捕集し、種の同定を行った後、DNAを抽出し、17kda領域について同様に遺伝子検索を行った。陽性検体の一部については、遺伝子配列を決定し系統解析を実施した。なお、マダニについては、日本紅斑熱の原因菌である *Rickettsia japonica* を特異的に検出する real-timePCR を実施した。その結果、ヌートリア 64頭の脾臓のPCRは、両領域とも全て陰性であった。76頭中17頭の耳介から451匹のマダニを捕集したが、ツツガムシは確認できなかった。付着種は、フタトゲチマダニが399匹で最も多かった。リケッチア遺伝子はフタトゲチマダニ48匹及びヤマアラシチマダニ3匹で検出されたが、real-timePCRによって *R.japonica* ではないことが確認された。陽性検体の一部について系統解析を行ったところ、フタトゲチマダニ由来の遺伝子は、全て非病原性であるとされる *Rickettsia* sp. (LONタイプ) であり、ヤマアラシチマダニ由来の遺伝子は、紅斑熱群リケッチアに属していると考えられるものの、既知種ではないことが確認された。今後、ヌートリアの抗体保有調査を実施すると共に、他の動物へも調査対象を広げ、野生動物におけるリケッチア感染実態について、さらに解明していく予定である。

### A.研究目的

岡山県では、2009年に初めて日本紅斑熱

患者が報告されたが、野生動物における紅斑熱群リケッチアの感染実態は未だ不明であり、

早急な解明が望まれている。ヌートリアは特定外来生物に指定されている南米原産の齧歯類であるが、岡山県は全国で最もその生息数が多く、農業被害が問題となっている。本種は半水性であり、川や沼から遠く離れることは無いとされているが、水系に沿ったりリケッチア保有ダニの運搬に関与している可能性がある。しかし、本種におけるリケッチアの感染実態やマダニの保有状況は世界的にも調査例が少なく、本邦においては全く不明である。そこで、本種に付着するダニ相、またリケッチア属菌及びオリエンチア属菌の感染実態の解明を目的として、岡山県全域を対象に調査を行った。

## B.研究方法

### 1) ヌートリアの捕獲及び耳介付着マダニの回収

調査は2010年1月から9月にかけて実施した。県内17市町村で、オリ式罟を用いて148頭のヌートリアを捕獲した(図1)。また、片側の耳介に付着したマダニを回収し、形態観察によって種を同定した。

### 2) PCRによる遺伝子検索

ヌートリアの脾臓をバイオマッシャー(Wako)で破碎し、DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen)を用いて抽出したDNAから、PCRによる遺伝子検索を実施した。リケッチア属共通抗原である17kda領域は、1次増幅プライマーとしてAnderson(1989)らの報告したR1=TCAATTCACAACCTTGCCATT及びR2=TTTACAAAATTCTAAAAACCを、2次増幅プライマーとしてNoda(1997)らの報告したRr17.61p =

GCTCTTGCAACTTCTATGTT 及び Rr17.492n = CATTGTTTCGTCAGGTTGGCG を使用した nestedPCR によって検出した。オリエンチア属菌の56kda領域は、Furuya(1993)らの報告した方法、すなわち1次増幅プライマーとして34 = TCAAGCTTATTGCTAGTGCAATGTCTGC 及び 55 = AGGGATCCCTGCTGCTGTGCTTGCTGCG を、2次増幅プライマーとして10 = GATCAAGCTTCCTCAGCCTACTATAATGCC 及び 11 = CTAGGGATCCCGACAGATGCACTATTAGGC を使用した nestedPCR によって検出した。

耳介から捕集したマダニについては、リン酸緩衝液(PBS)で洗浄・圧潰後、インスタジーン(Bio-Rad)を用いてDNAを抽出し、PCRに供した。17kda領域については、脾臓と同様に nestedPCR を実施した。*R.japonica* の Real-time PCR は、Hanaoka(2009)らの報告をもとに、本種に特異的に存在する216bp ORF をターゲットに、Primer 及び Taqman MGB probe は、それぞれ SpRija5' = GAACACGATGATACACCTCTGCA, SpRija3' = GATTAGCCTCTGTCTTCAGTAGTATTTTAACT, SpRijaMGB = FAM-TAGCGTCTATTCTAAGTAAAG-NFQ-MGB を使用した。また、合成 Oligo = GAACACGATGATACACCTCTGCATATAGCGTCTATTCTAAGTAAAGAAAATATAGTTAAATACTACTGAAGACAGAGGCTAATC を Internal control として、定量分析を行った。

17kda 領域の nestedPCR で陽性を示した検体の一部については、Applied Biosystems 3500 ジェネティックアナライザ (life technologies) を用い、ダイレクトシーケンス法によって遺伝子配列を決定した。また、MEGA4.0 ソフトウェア (<http://www.megasoftware.net/>) を用い、系統解析を実施した。

### C. 研究結果

#### 1) ヌートリアに付着していたダニ相

ヌートリア 148 頭の耳介から捕集したダニを表 1 に示した。76 頭に合計 451 匹のマダニが付着していたが、ツツガムシは確認できなかった。形態観察による同定の結果、マダニはチマダニ属の 3 種のみであり、その内訳は *Haemaphysalis longicornis* (フタトゲチマダニ) 399 匹が最も多く、*Haemaphysalis flava* (キチマダニ) 47 匹、*Haemaphysalis hystricis* (ヤマアラシチマダニ) 5 匹であった。捕獲時期別に比較すると、6 月及び 9 月の個体にマダニの付着数及び率が高かった。

#### 2) リケッチア遺伝子検索

脾臓 148 検体の PCR 結果は、リケッチア属の 17kda 領域、オリエンチア属の 56kda 領域ともに全て陰性であった。

マダニにおける 17kda 領域の PCR 及び *R.japonica* を特異的に検出する real-timePCR の結果を表 2 に示した。17kda 領域は、フタトゲチマダニ 48 検体及びヤマアラシチマダニ 3 検体が陽性を示した。しかし、real-timePCR では、451 検体全て陰性であった。

17kda 領域で陽性となったフタトゲチマ

ダニ由来 23 検体及びヤマアラシチマダニ 3 検体についての系統解析結果を図 2 に示した。フタトゲチマダニ由来検体は、23 検体全て非病原性とされる *Rickettsia* sp. (LON タイプ) であり、ヤマアラシチマダニ由来検体は 3 検体とも全て同じ遺伝子配列であったが、既知種ではないことが確認された。

### D. 考察

本調査で捕獲したヌートリアの耳介に付着していたマダニは 3 種のみであり、ツツガムシは確認できなかった。県内全域で捕獲したにもかかわらず付着マダニ種に偏りが見られたことから、ヌートリアに寄生できるマダニ種は限定されており、これは本種が半水性であることに起因する可能性が考えられた。6 月及び 9 月に捕獲した個体にマダニの付着率が高かったが、これはフタトゲチマダニが 4 月から 8 月にかけて成虫が出現する「夏型」のマダニであることが原因であると考えられた。また、付着マダニは 3 種とも *R.japonica* を媒介すると言われており、これはヌートリアが水系に沿って病原リケッチア保有マダニを運搬する可能性を示唆するものであった。

17kda 領域の PCR で陽性を示したフタトゲチマダニ由来検体のうち、系統解析を行った 23 検体については全て *Rickettsia* sp. LON タイプであり、残りの 25 検体についても real-timePCR の結果から *R.japonica* ではないことが確認された。しかし、フタトゲチマダニは病原性不明な別種リケッチアを保有していることも報告されているため、残りの検体についてもさらに精査する必要があると考えられた。

通常、リケッチア属菌はマダニの継卵感

染によって維持されているが、未感染マダニが感染動物を吸血することによって獲得する場合があると言われている。脾臓の PCR の結果、捕獲時におけるヌートリアのリケッチア感染は無かったと考えられたが、過去の感染については不明であり、リザーバーとなっている可能性を否定できない。感染履歴を確認するためには、ヌートリアの血清抗体価測定法を確立する必要があり、今後の課題である。

#### E. 結論

本調査によって、岡山県に生息するヌートリアの保有ダニ相がほぼ明らかになった。付着マダニは 3 種であったが、全種とも *R.japonica* を媒介すると言われており、これはヌートリアが水系に沿って病原リケッチア保有マダニを運搬する可能性を示唆するものであった。最も多く付着していたフタトゲチマダニは、*R.japonica* の媒介に関わることが報告されているが、今回マダニから検出されたリケッチアは、既知病原種ではなかった。

ヌートリア脾臓の PCR は全て陰性であったが、抗体検査が未実施であり、現状ではヌートリアへのリケッチアの感染実態についての結論は出せない。今後、さらに調査を行い、実態を解明していく予定である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

木田浩司、中本敦、葛谷光隆、濱野雅子、藤井理津志、岸本壽男、城ヶ原貴道、小林秀司、岡山県に生息するヌートリア及び付着マダニ

におけるリケッチア保有状況、第3回日本リケッチア臨床研究会・第18回リケッチア研究会合同研究発表会、大津市

論文発表は特になし

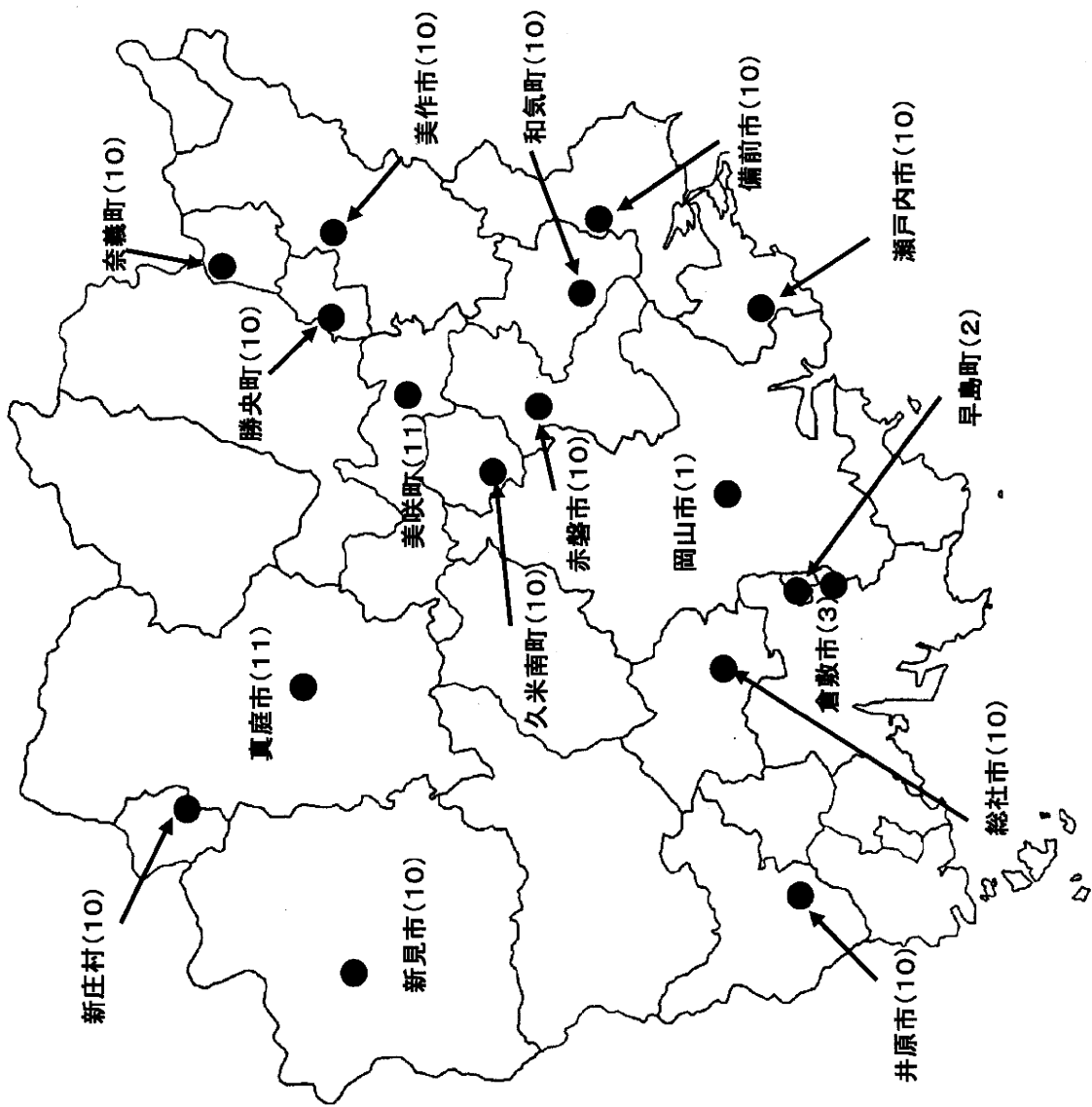


図1 ノートリア捕獲地域(2010)

括弧内は捕獲頭数を示す。



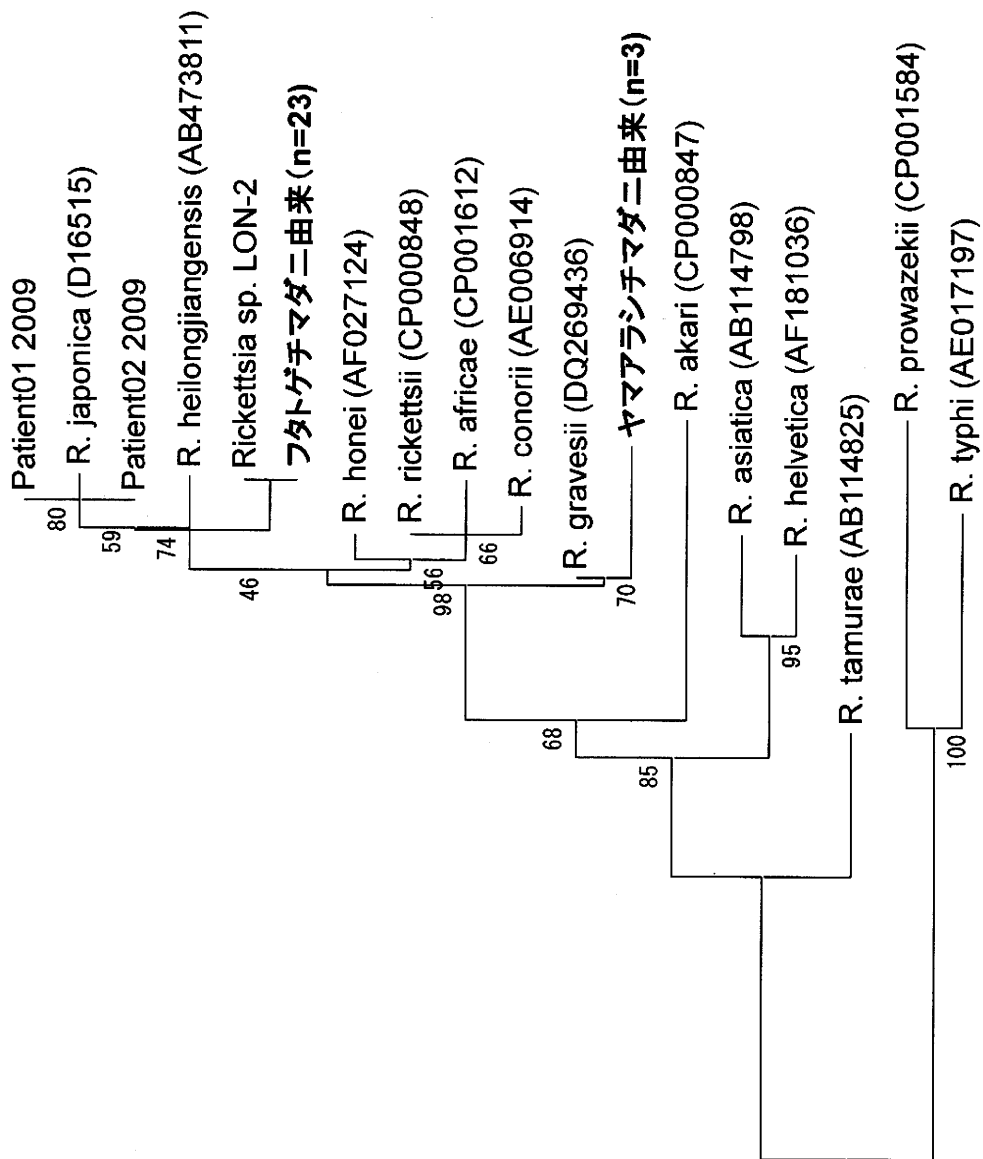
表1 月別ヌートリア捕獲数及び耳介付着マダニ

月	捕獲頭数	マダニ付着頭数 (率)	マダニ匹数	マダニ内訳
1	3	0 (0%)	0	
2	20	3 (15%)	3	<i>Haemaphysalis flava</i> (3)
5	12	5 (42%)	10	<i>Haemaphysalis flava</i> (2) <i>Haemaphysalis longicornis</i> (8)
6	41	31 (76%)	210	<i>Haemaphysalis flava</i> (8) <i>Haemaphysalis longicornis</i> (202)
7	21	5 (23%)	8	<i>Haemaphysalis flava</i> (1) <i>Haemaphysalis longicornis</i> (7)
8	20	11 (55%)	54	<i>Haemaphysalis flava</i> (8) <i>Haemaphysalis longicornis</i> (46)
9	31	19 (61%)	166	<i>Haemaphysalis flava</i> (25) <i>Haemaphysalis longicornis</i> (136) <i>Haemaphysalis hystricis</i> (5)
合計	148	76	451	<i>Haemaphysalis flava</i> (47) <i>Haemaphysalis longicornis</i> (399) <i>Haemaphysalis hystricis</i> (5)

マダニ内訳の括弧内には匹数を示す。

表2 ノートリア耳介付着マダニからのリケッチア遺伝子検出

	検体数	17kda領域PCR		real-timePCR	
		陽性数	陽性数	陽性数	陽性数
<i>Haemaphysalis flava</i>	47	0	0	0	0
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	399	48	48	0	0
<i>Haemaphysalis hystricis</i>	5	3	3	0	0
合計	451	51	51	0	0



0.01

図2 マダニから検出したリケッチア17kda領域遺伝子の系統樹

リケッチア症重症化に関する臨床および基礎的検討

分担研究者	岩崎博道	(福井大学医学部 准教授)
研究協力者	高田伸弘	(福井大学医学部 シニアフェロー)
	田居克規	(福井大学医学部 大学院生)
	池ヶ谷諭史	(福井大学医学部 助教)
	玉置幸子	(医療法人洗心会 玉置病院)
	上田孝典	(福井大学医学部 教授)

## 研究要旨

現在わが国では、リケッチア症としてつつが虫病と日本紅斑熱が多発している。近年は日本紅斑熱の重症例や死亡例が報告され、その臨床的背景が明らかになりつつある。本研究ではリケッチア感染症例の重症度を共通した評価のもと解析することを目的とした。また日本紅斑熱の適切な治療法が未だ確立されていないため、患者救命のための有効治療法の解明を臨床的、基礎的に検討することも重要課題とした。

2009年10月から2010年1月の和歌山県田辺市にて確認された Kawasaki 型つつが虫病において、重症度ならびに、急性期と回復期の血中サイトカイン濃度を測定した。IL-4 を除いて急性期にすべてのサイトカイン値は上昇していた。回復期には、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL12p40、IL-8、IP-10、MIP-1 $\alpha$ において、急性期に比し有意( $P<0.05$ )に血中濃度が低下した。とくに急性期の血中 TNF- $\alpha$ は重症群の  $13.4\pm 7.81$  pg/ml に対し、軽症群では  $2.39\pm 0.81$  pg/ml と低値( $p<0.01$ )を示し、TNF- $\alpha$ が重症度を示す指標となりうることが示唆された。

単球系培養細胞(THP-1)を用いた基礎的実験研究の結果から、TNF- $\alpha$ 産生がテトラサイクリン系薬剤(MINO, DOXY)により抑制されることが示され、他のサイトカイン/ケモカイン(IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , eotaxin)にも、その抑制が及んでいることが明らかとなった。細胞内シグナル伝達経路においては、MINO に関しては I $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化の抑制が、サイトカイン産生制御に係っていることが推測された。さらに CPF $\alpha$  単剤での TNF- $\alpha$ 産生抑制が確認され、MINO と CPF $\alpha$  の同時添加においては、さらなる産生抑制効果を認めた。このことは日本紅斑熱におけるニューキノロン系薬剤(CPF $\alpha$ )併用の有効性を、サイトカイン制御の立場から実験的に裏付けるものと考えられた。