

表1 日本紅斑熱報告数 (人)

| 県名 | 2009 | 2010 | 2011 | 計 |
|----|------|------|------|-----|
| 徳島 | 3 | 5 | 10 | 18 |
| 香川 | | | 2 * | 2 |
| 愛媛 | 10 | 17 | 13 | 40 |
| 高知 | 6 | 8 | 14 | 28 |
| 計 | 19 | 30 | 39 | 88 |
| 全国 | 132 | 133 | 178 | 443 |

* 香川県の2名:1名は県外在住で感染推定地域は香川県、他1名は香川県在住で感染推定地域は徳島県

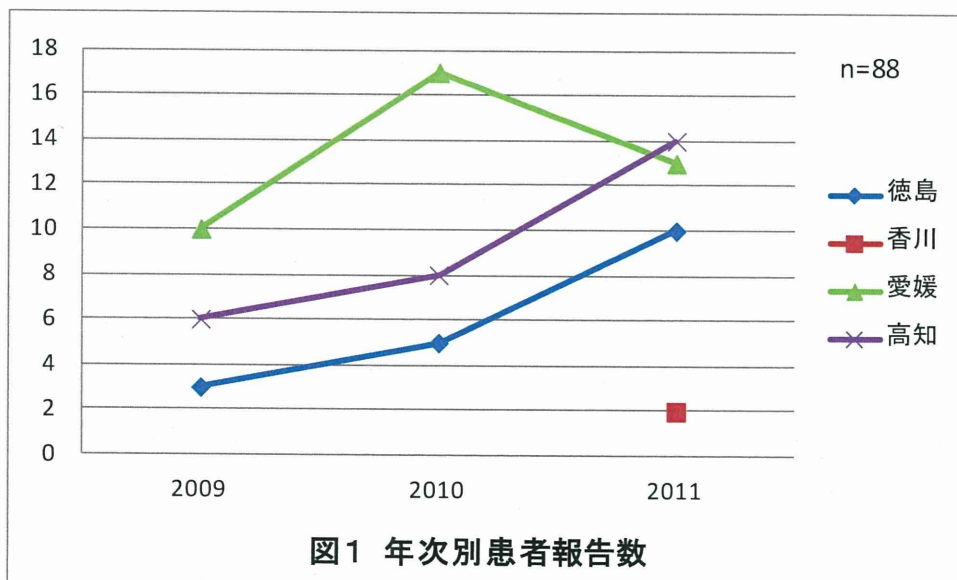


表2 日本紅斑熱患者の年次別患者報告数
感染推定地域(既報地域・初発地域) (人)

| 県名 | 2009 | 2010 | | 2010 計 | 2011 | | | 2011 計 | 総計 |
|----|------|------|---|-----------|------|---|----|-----------|----|
| | 既 | 既 | 初 | | 既 | 初 | 不明 | | |
| 徳島 | 3 | 4 | 1 | 5 | 6 | 3 | 1 | 10 | 18 |
| 香川 | | | | | 1 | 1 | | 2 | 2 |
| 愛媛 | 10 | 17 | | 17 | 12 | 1 | | 13 | 40 |
| 高知 | 6 | 7 | 1 | 8 | 12 | 2 | | 14 | 28 |
| 計 | 19 | 28 | 2 | 30 | 31 | 7 | 1 | 39 | 88 |

表3 県別感染推定地域別患者発生状況 (人)

| | | | | | | | | | |
|-----|------|--------|------|-----|------|--------------|----|---|----|
| | 徳島市 | 阿南市 | 吉野川市 | 美馬市 | 海部郡 | 名西郡(神山町・石井町) | 不明 | 計 | |
| 徳島県 | 5 | 5 | 1 | 1 | 3 | | 2 | 1 | 18 |
| | さぬき市 | 徳島県美馬市 | 計 | | | | | | |
| 香川県 | 1 | | 1 | | | | | | 2 |
| | 松山市 | 宇和島市 | 今治市 | 計 | | | | | |
| 愛媛県 | 11 | 28 | 1 | | | | | | 40 |
| | 室戸市 | 安芸市 | 土佐市 | 春野町 | 中土佐町 | 計 | | | |
| 高知県 | 21 | 1 | 3 | 2 | 1 | | | | 28 |

□ 地点は、初患者報告のあった感染推定地域

表4 月別患者報告数 (人)

| | 4月 | 5月 | 6月 | 7月 | 8月 | 9月 | 10月 | 11月 | 計 |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| 徳島 | 4 | 4 | 3 | 1 | 2 | | 3 | 1 | 18 |
| 香川 | | 1 | | | | | 1 | | 2 |
| 愛媛 | 4 | 2 | 5 | 6 | 3 | 12 | 8 | | 40 |
| 高知 | 1 | 3 | 4 | 4 | 12 | 2 | 2 | | 28 |
| 計 | 9 | 10 | 12 | 11 | 17 | 14 | 14 | 1 | 88 |
| | 10% | 11% | 14% | 13% | 19% | 16% | 16% | 1% | |

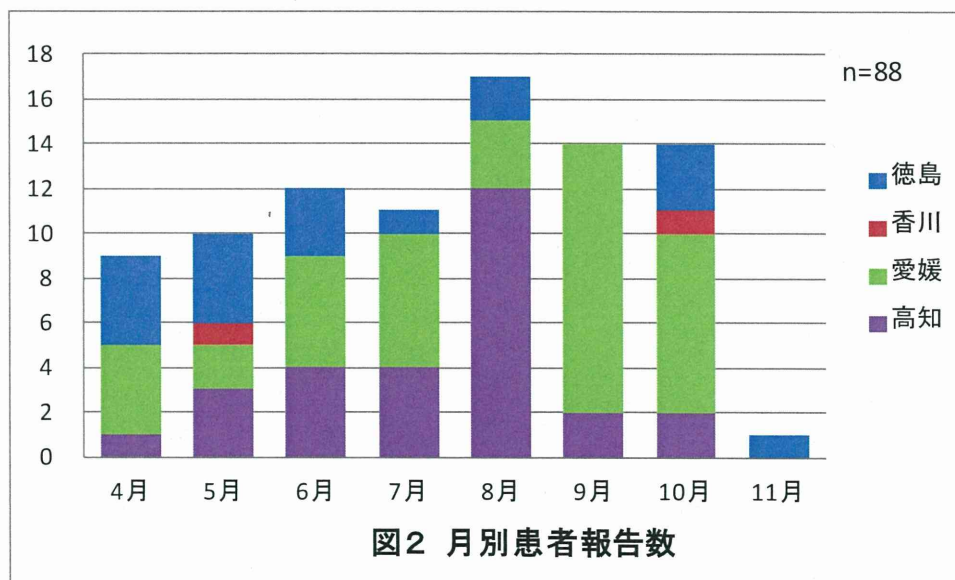


図2 月別患者報告数

表5 年齢群別患者報告数

(人)

| | 5~9 | 15~19 | 20~29 | 30~39 | 40~49 | 50~59 | 60~69 | 70~79 | 80~89 | 計 |
|----|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| 徳島 | | | | | 1 | 4 | 4 | 7 | 2 | 18 |
| 香川 | | | | 1 | | | | 1 | | 2 |
| 愛媛 | 1 | 1 | 1 | | | 5 | 20 | 9 | 3 | 40 |
| 高知 | | | | | | | 11 | 9 | 8 | 28 |
| 計 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 9 | 35 | 26 | 13 | 88 |
| | 1% | 1% | 1% | 1% | 1% | 10% | 40% | 30% | 15% | |

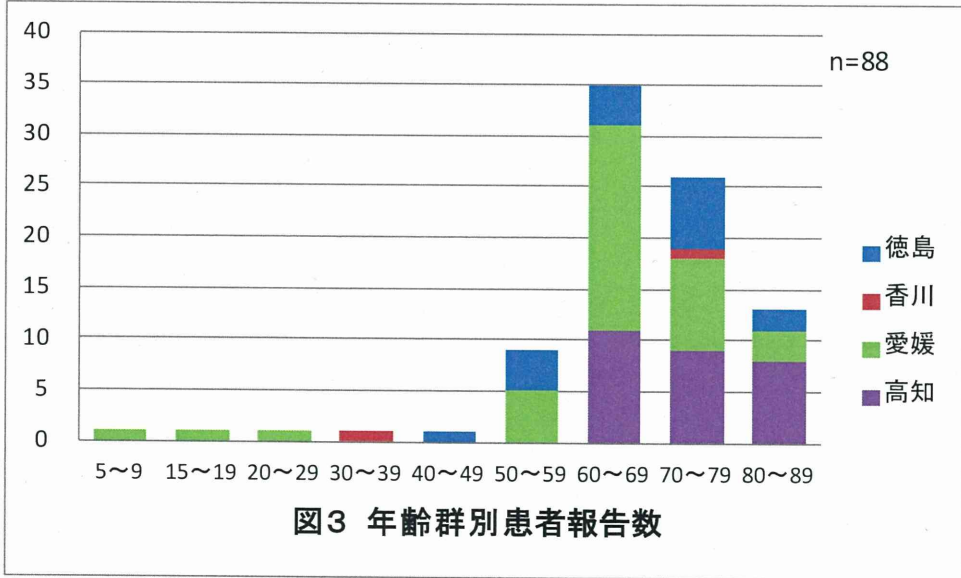


図3 年齢群別患者報告数

表6 性別年齢群別患者報告数

(人)

| 年齢群 | 男性 | | | | | | | | 男性計 | 女性 | | | | | 女性計 | 総計 |
|-----|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-----|----|
| | 5~9 | 15~19 | 20~29 | 40~49 | 50~59 | 60~69 | 70~79 | 80~89 | | 30~39 | 50~59 | 60~69 | 70~79 | 80~89 | | |
| 徳島 | | | | 1 | 2 | 1 | 3 | 1 | 8 | | 2 | 3 | 4 | 1 | 10 | 18 |
| 香川 | | | | | | | 1 | | 1 | | | | | | 1 | 2 |
| 愛媛 | 1 | 1 | 1 | | 1 | 9 | 4 | 1 | 18 | 1 | 4 | 11 | 5 | 2 | 22 | 40 |
| 高知 | | | | | 5 | 3 | 3 | 3 | 11 | | | 6 | 6 | 5 | 17 | 28 |
| 計 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 15 | 11 | 5 | 38 | 1 | 6 | 20 | 15 | 8 | 50 | 88 |
| | 3% | 3% | 3% | 3% | 8% | 39% | 29% | 13% | 43% | 2% | 12% | 40% | 30% | 16% | 57% | |

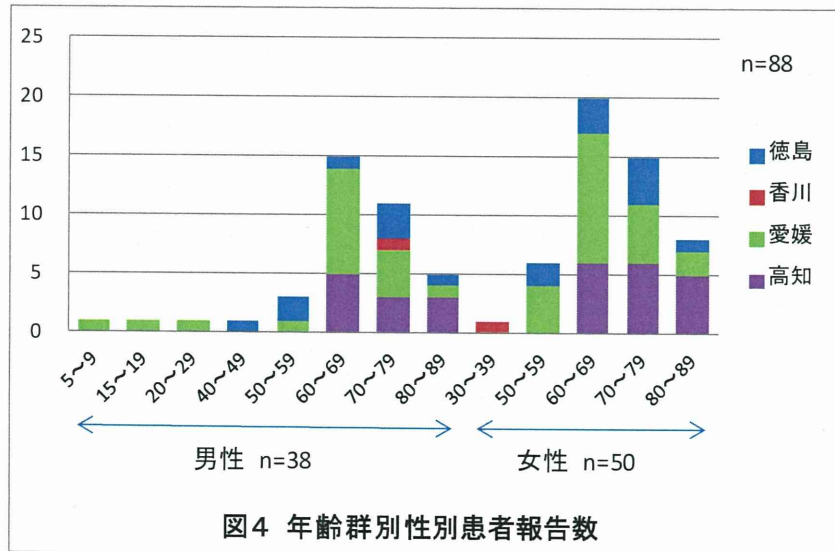


図4 年齢群別性別患者報告数

表7 職業別患者報告数

(人)

| | 農業 | 社員 | 農会社員 | 自営業 | 学生 | 小学生 | 漁業 | 無職 | その他 | 不明 | 計 |
|----|----|----|------|-----|----|-----|----|----|-----|----|----|
| 徳島 | 2 | | 1 | | | | | 13 | 2 | | 18 |
| 香川 | | | 1 | | | | | | | 1 | 2 |
| 愛媛 | 13 | 1 | 2 | 3 | 1 | 1 | 1 | 11 | 2 | 5 | 40 |
| 高知 | 6 | | 2 | 1 | | | | 16 | | 3 | 28 |
| 計 | 21 | 1 | 6 | 4 | 1 | 1 | 1 | 40 | 4 | 9 | 88 |

職業別では、農業が21人(24%)、無職が40人(45%)であった。
特に、愛媛県では農業13人中6人がみかん農家であった。

表8 患者症状

| 県名 | 発熱 | | | 発疹 | | | 刺し口 | | | 肝機能異常 | | | DICの有無 | | | |
|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|-----|----|-------|-----|----|--------|-----|----|----|
| | 有 | 無 | 計 | 有 | 無 | 計 | 有 | 無 | 計 | 有 | 無 | 計 | 有 | 無 | 不明 | 計 |
| 徳島 | 18 | | 18 | 18 | | 18 | 16 | 2 | 18 | 11 | 7 | 18 | 1 | 17 | | 18 |
| 香川 | 2 | | 2 | 2 | | 2 | 2 | | 2 | 2 | | 2 | | | 2 | 2 |
| 愛媛 | 39 | 1 | 40 | 39 | 1 | 40 | 32 | 8 | 40 | 32 | 8 | 40 | 6 | 34 | | 40 |
| 高知 | 28 | | 28 | 28 | | 28 | 16 | 12 | 28 | 26 | 2 | 28 | 17 | 11 | | 28 |
| 計 | 87 | 1 | 88 | 87 | 1 | 88 | 66 | 22 | 88 | 71 | 17 | 88 | 24 | 62 | 2 | 88 |
| | 99% | 1% | | 99% | 1% | | 75% | 25% | | 81% | 19% | | 27% | 70% | | |

表8 患者症状

| 県名 | 発熱 | | | 発疹 | | | 刺し口 | | | 肝機能異常 | | | DICの有無 | | | |
|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|-----|----|-------|-----|----|--------|-----|----|----|
| | 有 | 無 | 計 | 有 | 無 | 計 | 有 | 無 | 計 | 有 | 無 | 計 | 有 | 無 | 不明 | 計 |
| 徳島 | 18 | | 18 | 18 | | 18 | 16 | 2 | 18 | 11 | 7 | 18 | 1 | 17 | | 18 |
| 香川 | 2 | | 2 | 2 | | 2 | 2 | | 2 | 2 | | 2 | | | 2 | 2 |
| 愛媛 | 39 | 1 | 40 | 39 | 1 | 40 | 32 | 8 | 40 | 32 | 8 | 40 | 6 | 34 | | 40 |
| 高知 | 28 | | 28 | 28 | | 28 | 16 | 12 | 28 | 26 | 2 | 28 | 17 | 11 | | 28 |
| 計 | 87 | 1 | 88 | 87 | 1 | 88 | 66 | 22 | 88 | 71 | 17 | 88 | 24 | 62 | 2 | 88 |
| | 99% | 1% | | 99% | 1% | | 75% | 25% | | 81% | 19% | | 27% | 70% | | |

表9 肝機能異常とDICの状況

| 県名 | 肝機能異常有 | | | 計 | 肝機能異常無 | | 計 | 総計 |
|----|--------|------|----|----|--------|----|----|----|
| | DIC有 | DIC無 | 不明 | | DIC無 | | | |
| 徳島 | 1 | 10 | | 11 | | 7 | 7 | 18 |
| 香川 | | | 2 | 2 | | | | 2 |
| 愛媛 | 6 | 26 | | 32 | | 8 | 8 | 40 |
| 高知 | 17 | 9 | | 26 | | 2 | 2 | 28 |
| 計 | 24 | 45 | 2 | 71 | | 17 | 17 | 88 |

表10 つつが虫病報告数 (人)

| | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 計 |
|----|------|------|------|------|------|-------|
| 徳島 | | | 3 | 1 | | 5 |
| 香川 | 1 | | | | | |
| 愛媛 | | | 1 | 3 | | 4 |
| 高知 | 2 | 5 | 4 | 2 | 5 | 18 |
| 計 | 3 | 5 | 8 | 6 | 5 | 27 |
| 全国 | 382 | 442 | 465 | 396 | 438 | 2,123 |

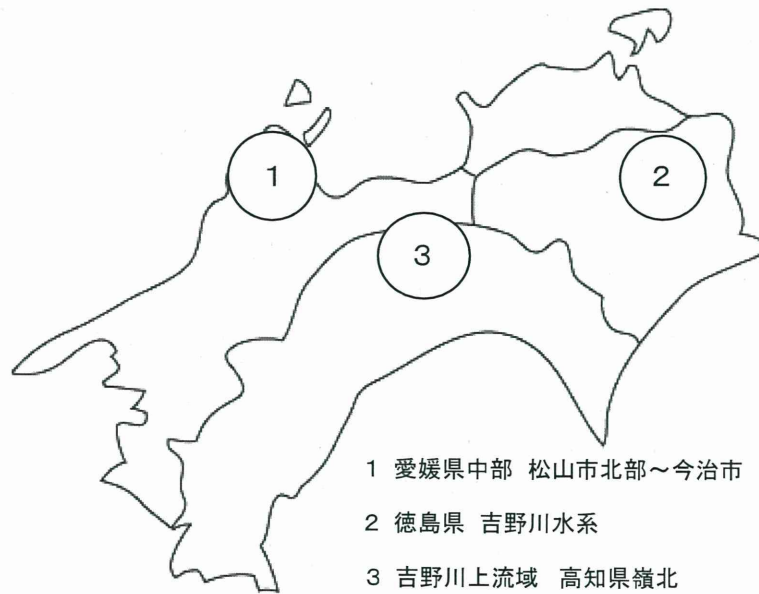
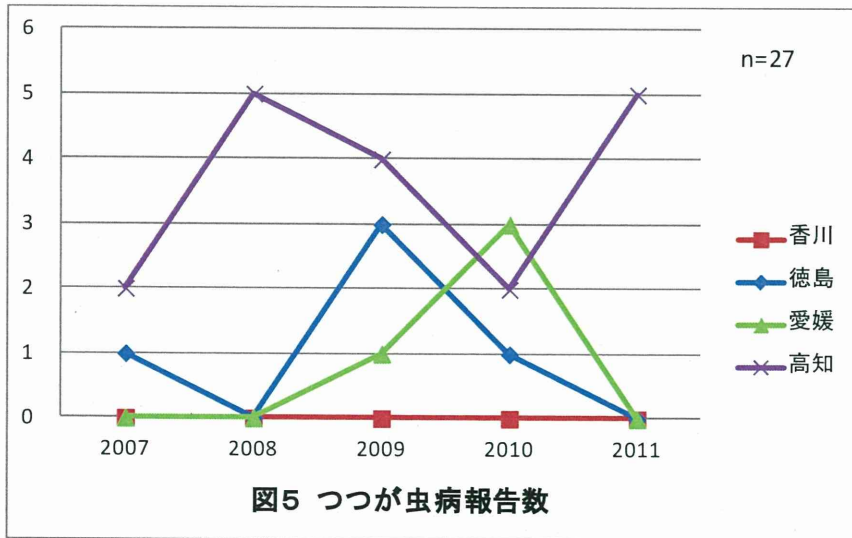


図6 つつが虫病患者報告

表11 高知県及び香川県で採集したマダニ

| Species of ticks | 徳島県 | | 香川県 | | 高知県 | | | | | 高知県計 | 総計 |
|-------------------------|-----|----|------|----|-----|-----|-----|------|-----|------|----|
| | 徳島市 | 計 | さぬき市 | 計 | 室戸市 | 東洋町 | いの町 | 中土佐町 | 春野町 | | |
| <i>H. flava</i> ♂ | | | 1 | 1 | | | | | | | 1 |
| ♀ | | | | | | | 1 | | 2 | | 3 |
| nymph | | | 38 | 38 | 2 | | 1 | | 2 | | 5 |
| unknown | 10 | 10 | | | | | | | | | 10 |
| <i>H. formosensis</i> ♀ | | | 1 | 1 | 4 | | 1 | | | | 5 |
| <i>H. longicornis</i> ♀ | | | | | 3 | 3 | | | | | 6 |
| nymph | | | | | 11 | | | | | 2 | 13 |
| unknown | 1 | 1 | | | | | | | | | 1 |
| <i>H. hystricis</i> ♀ | | | | | | | 1 | | | | 1 |
| 計 | 11 | 11 | 40 | 40 | 20 | 4 | 3 | 4 | 2 | 33 | 84 |

採集年月

徳島県 2011.10 徳島市

香川県 2011.10 さぬき市

高知県 2011.09 室戸市
 2011.09 安芸郡東洋町
 2011.10 吾川郡いの町
 2011.10 高岡郡中土佐町
 2011.10 高知市春野町

表12 マダニの遺伝子検査結果

| Species of ticks | 検査結果 | | 計 |
|-------------------------|------|---|----|
| | — | * | |
| <i>H. flava</i> ♂ | 1 | | 1 |
| ♀ | 3 | | 3 |
| nymph | 43 | | 43 |
| unknown | 9 | 1 | 10 |
| <i>H. formosensis</i> ♀ | 6 | | 6 |
| <i>H. longicornis</i> ♀ | 6 | | 6 |
| nymph | 13 | | 13 |
| unknown | 1 | | 1 |
| <i>H. hystricis</i> ♀ | 1 | | 1 |
| 計 | 83 | 1 | 84 |

*印: 非特異反応(徳島県)

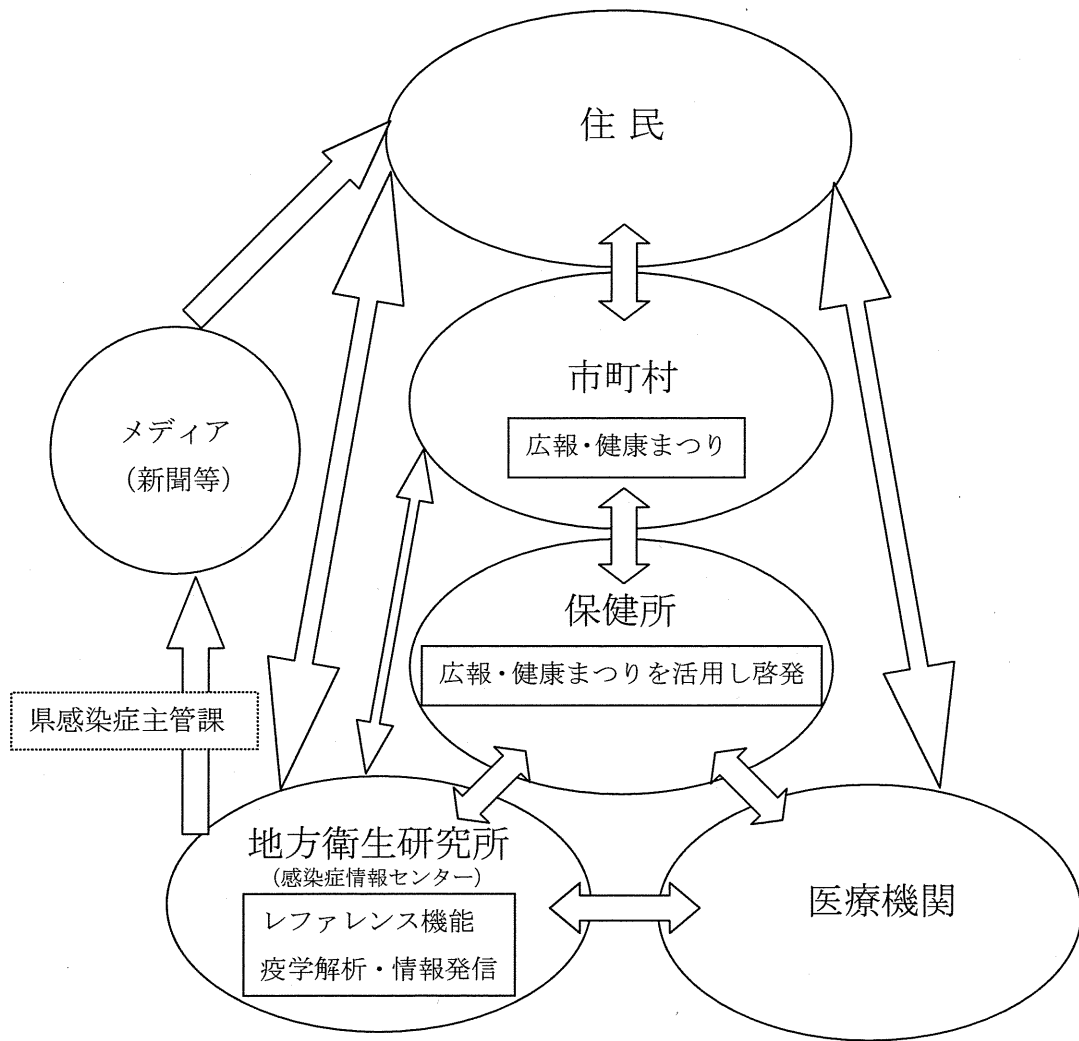


図7 地域のネットワーク

赤磐市及び総社市で発生した日本紅斑熱の感染源調査

| | | | |
|-------|-------|-------------------|-----------|
| 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 |
| 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 | 中本 敦 | 岡山県環境保健センター 保健科学部 | リサーチレジデント |
| | 溝口嘉範 | 同 | 研究員 |
| | 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 |
| | 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 日本紅斑熱は、紅斑熱群リケッチア (*spotted fever group rickettsia* : SFGR) に属する *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る。2009年10月、倉敷市において、岡山県で初めての患者が報告された。2010年は患者の報告が無かったものの、2011年5月に赤磐市で、9月に総社市で相次いで患者が報告された。そこで今回は、赤磐市及び倉敷市の患者発生地域における *R. japonica* の感染源を特定することを目的として調査を行った。赤磐市周辺調査は2011年6月及び7月、総社市周辺調査は10月及び11月に実施した。患者居住地を中心として、赤磐市周辺調査では半径10キロメートルに5地点を、総社市周辺調査では半径2キロメートルに4地点を設定してマダニを捕獲した。形態観察によってマダニの種を同定し、生存個体の一部についてはL929細胞を用いて微生物分離を試みた。また、DNAを抽出し、リケッチアの種特異抗原である17kDa領域についてnested PCRによる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、系統解析を実施した。その結果、赤磐市周辺調査で捕獲したマダニ397匹のうち、検査に供した240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23匹が陽性であった。系統解析の結果、すべてSFGRに属していた。既知種の塩基配列と100%一致した2株について、クエン酸合成酵素 (*gltA*) 領域についても検討したところ、ヤマトマダニからの検出株は *R. asiatica*、タカサゴキララマダニからの検出株は *R. tamurae* であると考えられた。また、総社市周辺調査で捕獲したマダニ320匹のうち、検査に供した108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3匹が陽性であった。系統解析の結果、全てSFGRに属すが既知種ではなかった。本調査では、いずれの調査地域でも *R. japonica* が検出されなかったが、2010年に島根県で初めて病原性が確認された *R. tamurae* が本県で初めて検出された。今後も調査を継続することで患者発生地域のリケッチア侵淫実体を明らかにし、適切な治療・啓発へ繋げたい。

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、倉敷市において、岡山県初の日本紅斑熱患者が確認された。我々は、2009年から2010年にかけて感染源調査を実施したが、*R. japonica* は検出されなかった。しかし、マダニからSFGRが多数検出され、岡山県への侵淫が確認された。2010年は患者の報告が無かったものの、2011年5月に赤磐市で、9月に総社市で相次いで患者が報告された(図1)。そこで今回は、赤磐市及び倉敷市の患者発生地域における *R. japonica* の感染源を特定することを目的として調査を行った。

B.研究方法

1) マダニの捕獲

赤磐市周辺調査は2011年6月及び7月、総社市周辺調査は10月及び11月に実施した。患者居住地を中心として、赤磐市周辺調査では半径10キロメートルに5地点を、

総社市周辺調査では半径2キロメートルに4地点を設定した。旗振り法によってマダニを捕獲し、形態観察によって種を同定した。

2) 病原体分離

捕獲したマダニの体表面を1%イソジン加70%アルコールで消毒・圧潰後、100 μ lのウシ胎児血清に浮遊した内臓浮遊液を作成し、10 μ lを24穴プレートに培養したL929細胞(マウス結合組織由来)に接種した。接種細胞を14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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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) リケッチア遺伝子の検索

マダニの内臓浮遊液50 μ lから、QIAamp DNA mini kit (Qiagen)を用いてDNAを抽出し、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)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=

CATTGTTCGTCAGGTTGGCG を使用した nested PCR 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、Genetyx Ver. 10 (ゼネティックス) を用い、系統解析を実施した。既知株と相同性の高かった検体については、さらにクエン酸合成酵素(*gltA*)領域について、プライマーとして Roux (1997)らの報告した

RpCS.877p=
GGGGACCTGCTCACGGCGG 及び
RpCS.1273r=

CATAACCAGTGTAAGCTG を使用して増幅し、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、Genetyx Ver. 10 (ゼネティックス) を用いて既知株との比較を行った。

C. 研究結果

1) 捕獲されたマダニ

赤磐市周辺調査において、マダニは 397 匹捕獲された。形態観察によって種を同定したところ、*Haemaphysalis flava* (キチマダニ) 240 匹、*H. longicornis* (フタトゲチマダニ) 65 匹、*H. hystricis* (ヤマアラシチマダニ) 29 匹、*H. formosensis* (タカサゴチマダニ) 1 匹、*H. kitaokai* (ヒゲナガチマダニ) 7 匹、*H. megaspinosa* (オオトゲチマダニ) 3 匹、*Ixodes turdus* (アカコッコマダニ)、*I. ovatus* (ヤマトマダニ)、*I. nipponensis* (タネガタマダニ)、*Amblyomma testudinarium* (タカサゴキララマダニ 7 匹及び *Dermacentor taiwanensis* (タイワンカクマダ

ニ) 7 匹であった (表 1)。

総社市周辺調査において、マダニは 320 匹捕獲された。形態観察によって種を同定したところ、*H. flava* (キチマダニ) 242 匹、*H. longicornis* (フタトゲチマダニ) 76 匹、*H. megaspinosa* (オオトゲチマダニ) 1 匹、及び *Dermacentor taiwanensis* (タイワンカクマダニ) 1 匹であった (表 2)

2) 病原体分離

赤磐市周辺調査において捕獲したマダニ 397 匹のうち、240 匹について、また赤磐市周辺調査において捕獲したマダニ 320 匹のうち、108 匹について病原体分離を試みたが、全て陰性であった (表 1、2)。

3) マダニからのリケッチア遺伝子検索

赤磐市周辺調査で検査に供したマダニ 240 匹のうち、23 匹が 17kDa 領域 394 塩基を標的とした nested PCR で陽性を示した。系統解析の結果、すべて SFGR に属していた (図 2)。そのうち、ヤマトマダニからの検出株は既知種の標準株である *R. asiatica* IO-1 の塩基配列 (Accession No. AB114798) と 100%一致しており、またタカサゴキララマダニからの検出株は標準株である *R. tamurae* AT-1 の塩基配列 (Accession No. AB114825) と 100%一致していた。これらの株については、さらに *gltA* 領域 440 塩基の配列を決定し、*R. asiatica* IO-1 株 (Accession No. AF394901) 及び *R. tamurae* AT-1 株 (Accession No. AF394896) の塩基配列と比較した (表 3)。その結果、ヤマトマダニから検出された株は、1142 番目及び 1202 番目の塩基が標準株 IO-1 と異なっており、

タカサゴキララマダニから検出された株は1142番目の塩基が標準株 AT-1 と異なっていた。

また、総社市周辺調査で検査に供したマダニ108匹のうち、3匹が17kDa領域を標的とした nested PCR で陽性を示した。系統解析の結果、全て SFGR であるが既知種ではなかった。

D. 考察

赤磐市周辺調査では、11種のマダニが捕獲された。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 細胞による病原体分離は陰性であった。このため、遺伝子が検出された 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、ヤマトマダニからの検出株は17kDa領域394塩基について、既知種標準株である *R.asiatica* IO-1 の塩基配列と100%一致しており、またタカサゴキララマダニからの検出株は標準株である *R.tamurae* AT-1 の塩基配列と100%一致していた。これらの検出株を *gltA* 領域440塩基についても検討したところ、ヤマトマダニから検出された株は、1142番目及び1202番目の塩基が標準株 IO-1 と異なっており、タカサゴキララマダニから検出された株は1142番目の塩基が標準株 AT-1 と異なっていた。ヤマトマダニの検出株の塩基配列から推測されるアミノ酸残基を標準株 IO-1 と比較すると、1142番目の塩基を含むコード

ンから翻訳されるアミノ酸残基は標準株同様スレオニンであり、表現型には違いが無いと考えられた。また、1202番目の塩基については、検出株がグルタミン酸であるのに対し、標準株はグリシンであった。一方、タカサゴキララマダニからの検出株も同様に標準株 AT-1 と比較したが、1142番目の塩基を含むコードから翻訳されるアミノ酸残基はいずれもスレオニンであり、表現型には違いが無いと考えられた。*R.asiatica* IO-1 株はヤマトマダニから分離されており、*R.tamurae* は、タカサゴキララマダニの固有種であると言われている。これらのことを勘案すると、ヤマトマダニからの検出株は、表現型は一部異なるものの *R.asiatica*、タカサゴキララマダニからの検出株は *R.tamurae* であると考えられた。現在、本邦における病原性紅斑熱群リケッチアとして、*R.japonica* の他に *R.helvetica*、*R.heilongjiangensis* 及び *R.tamurae* が知られているが、これらは患者の抗体では識別できない。そのため、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律による届出では、これらのリケッチア感染症が区別されていないのが実情である。2011年6月に赤磐市で罹患したと思われる日本紅斑熱患者からは病原体遺伝子が検出されておらず、本調査で検出された *R.tamurae* に感染した可能性も考えられた。

総社市周辺調査では、マダニが4種しか捕獲できなかったが、うち2種が *R.japonica* の媒介種であった。最も捕獲数の多かったキチマダニ3匹からリケッチア遺伝子が検出されたが、*R.japonica* ではなかった。9月に罹患した患者血液からは、*R.japonica* が分離されており、また2009年の初発例の感

染推定地とも近いと見られるため、この地域に *R.japonica* の媒介マダニ種が定着している可能性は高い。しかしながら、本調査を行ったのは10月及び11月であり、患者発生時のマダニ相と異なっている可能性がある。これが *R.japonica* を検出できなかった原因かもしれない。当該地域の媒介種を特定するためにはさらなる調査が必要である。

R.tamurae の病原性が2009年に島根県で初めて確認されるなど、リケッチア感染症は未だ不明な点が多い。患者発生地域については、今後も調査を継続し、病原種及び媒介マダニ種を解明する予定である。

E. 結論

本調査では、いずれの調査地域でも *R.japonica* が検出されなかったが、赤磐市周辺調査では、2010年に島根県で初めて病原性が確認された *R.tamurae* が本県で初めて検出された。今後も調査を継続することで患者発生地域のリケッチア侵淫実体を明らかにし、適切な治療・啓発へ繋げたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

学会発表

木田浩司、中本敦、溝口嘉範、葛谷光隆、濱野雅子、藤井理津志、岸本壽男、森光亮太、小林秀司、清水慶子、藤田博己. 岡山県リケッチア症の動向. 第19回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー. 広島県安芸太田町

木田浩司、中本敦、溝口嘉範、葛谷光隆、濱野雅子、藤井理津志、岸本壽男、森光亮太、

小林秀司、清水慶子、藤田博己. 2011年5月に赤磐市で発生した日本紅斑熱の感染源調査. 第4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. 大阪市

論文発表

特になし

表1 赤磐地方で捕獲したマダニからの病原体分離及びリケッチア遺伝子検出

| 種名 | 捕獲数 | 検体数 | 病原体分離 | PCR陽性 |
|---|-----|-----|-------|-------|
| キチマダニ (<i>Haemaphysalis flava</i>) | 240 | 128 | 0 | 4 |
| ヤマアラシマダニ (<i>Haemaphysalis hystricis</i>) | 29 | 22 | 0 | 5 |
| フタゲチマダニ (<i>Haemaphysalis longicornis</i>) | 65 | 54 | 0 | 8 |
| タカサゴチマダニ (<i>Haemaphysalis formosensis</i>) | 1 | 1 | 0 | 0 |
| ヒゲナガチマダニ (<i>Haemaphysalis kitaokai</i>) | 7 | 0 | 0 | 0 |
| オトゲチマダニ (<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>) | 3 | 3 | 0 | 2 |
| アカコッコマダニ (<i>Ixodes turdus</i>) | 4 | 2 | 0 | 0 |
| ヤマトマダニ (<i>Ixodes ovatus</i>) | 30 | 18 | 0 | 2 |
| タネガタマダニ (<i>Ixodes nipponensis</i>) | 4 | 1 | 0 | 1 |
| タカサゴキラマダニ (<i>Amblyomma testudinarium</i>) | 7 | 7 | 0 | 1 |
| 台湾カクマダニ (<i>Dermacentor taiwanensis</i>) | 7 | 4 | 0 | 0 |
| 合計 | 397 | 240 | 0 | 23 |

表2 総社地方で捕獲したマダニからの病原体分離及びリケッチア遺伝子検出

| 種名 | 捕獲数 | 検体数 | 病原体分離 | PCR陽性 |
|--|-----|-----|-------|-------|
| キチマダニ (<i>Haemaphysalis flava</i>) | 242 | 87 | 0 | 3 |
| フタゲチマダニ (<i>Haemaphysalis longicornis</i>) | 76 | 19 | 0 | 0 |
| オトゲチマダニ (<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>) | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 台湾カクマダニ (<i>Dermacentor taiwanensis</i>) | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 合計 | 320 | 108 | 0 | 3 |

表3 マダニから検出されたリケッチア遺伝子gltA領域440塩基の既知株との比較

| 検体名 | マダニ種 | 塩基配列 ^{a)} | | | アミノ酸 | | | 標準株 ^{b)} |
|----------|-----------|--------------------|-----|------|------|-----|-----|------------------------------------|
| | | 検出株 | 標準株 | 部位 | 検出株 | 標準株 | 部位 | |
| 赤磐マダニ123 | ヤマトマダニ | ACG | ACT | 1142 | Thr | Thr | 381 | <i>R. asiatica</i> IO-1 (AF394901) |
| | | GAA | GGA | 1202 | Glu | Gly | 401 | |
| 赤磐マダニ126 | タカサゴキラマダニ | ACG | ACT | 1142 | Thr | Thr | 381 | <i>R. tamurae</i> AT-1 (AF394896) |

- a) アンダーラインは塩基配列の異なる部位を示す
b) 括弧内にaccession No.を示す

(平成19年1月22日 現在)

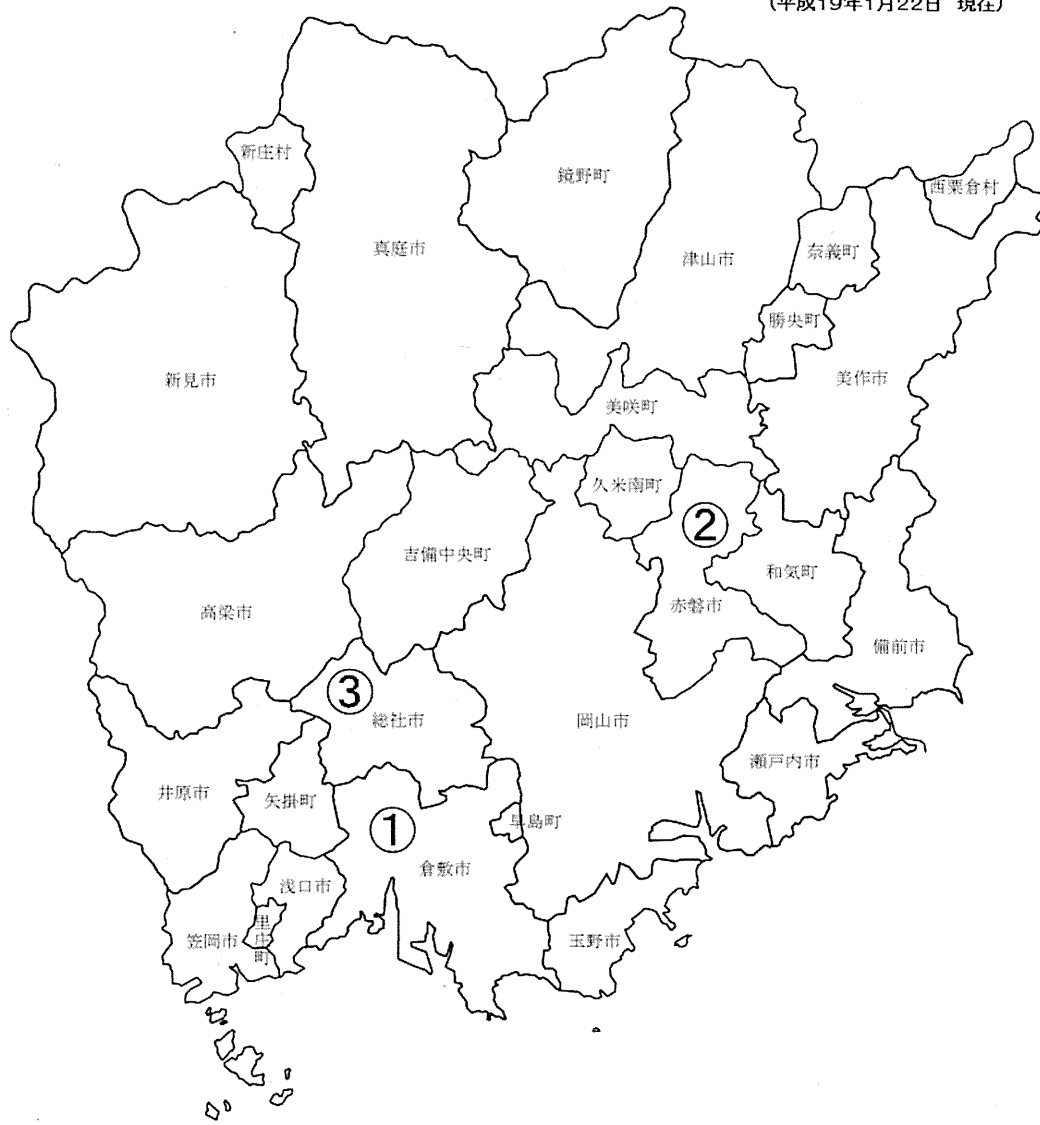


図1 岡山県の日本紅斑熱患者発生地域と時期

①倉敷市:2009年10月、②赤磐市:2011年5月、③総社市:2011年9月

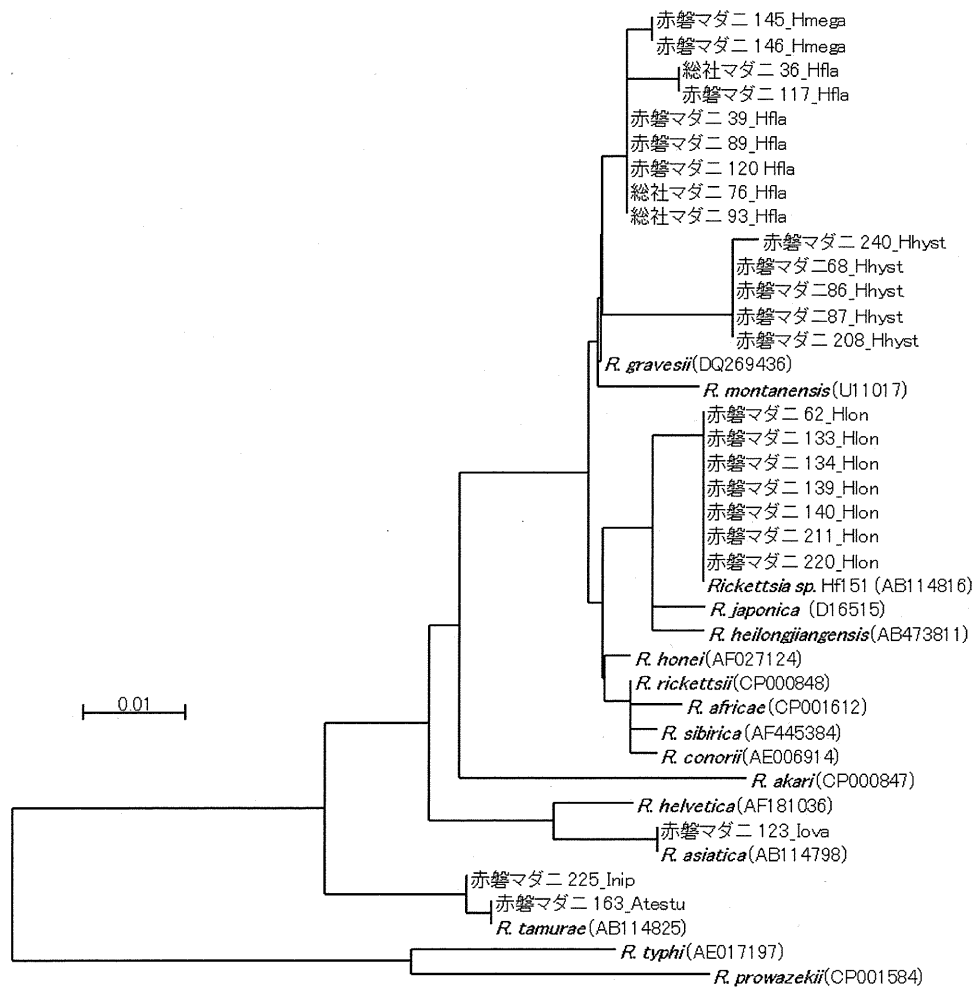


図2 マダニから検出されたリケッチアの系統樹

マダニから検出したリケッチア遺伝子の1.7kDa領域394塩基について、近隣結合法による系統解析を実施した。ブートストラップ反復は1,000回行った。アンダーバーの後にマダニ種を示した(Hfla: *H. flava*, Hlon: *H. longicornis*, Hmega: *H. megaspinosa*, Hhyst: *H. hystericis*, Iova: *I. ovatus*, Inip: *I. nipponensis*, Atestu: *A. testudinarium*)。既知株の塩基配列のAccession No.を括弧内に示した。なお、遺伝的距離(サイトあたりの塩基期待置換数)をスケールバーで示した。

岡山県内の野ネズミにおけるリケッチア侵淫調査

| | | | | |
|-------|-------|-------------|----------|------------|
| 研究協力者 | 中本 敦 | 岡山県環境保健センター | 保健科学部 | リサーチ・レジデント |
| 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 |
| | 溝口嘉範 | 同 | | 研究員 |
| | 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 |
| | 小林秀司 | 岡山理科大学 | 理学部 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

岡山県における現在のリケッチアの侵淫状況を把握するとともに、日本紅斑熱の発生メカニズム及び伝播様式を明らかにするために、2010年10月～2011年12月に岡山県全域を対象とした小型哺乳類とマダニ類の生息状況調査、採集されたネズミ類の脾臓及びマダニ類からのPCRによるリケッチアの検出、ネズミ類の全血からのリケッチアの分離及びネズミ類の血清抗体価の測定を行った。遺伝子陽性検体については遺伝子配列の決定後、系統解析を実施した。食虫目2種、齧歯目6種、計135個体を捕獲した。優占種はアカネズミで(61.5%)、その生息密度は年2回の繁殖によって大きく変動していた。マダニ属3種、チマダニ属6種の計1783個体が採集された。マダニ類の生息密度には種ごとに異なった季節的な消長が見られた。マダニ類は山地で多く採集された。小型哺乳類とマダニ類から病原性リケッチアは検出されなかった。5種の紅斑熱群リケッチアに対する抗体陽性率にはネズミ種による違いが見られた。抗体価の中央値はアカネズミで全ての株に対して1280～2560倍、ヒメネズミで *Rickettsia. asiatica* に対して320倍と高い値を示した。アカネズミの成獣は亜成獣よりも高い抗体価を示した。アカネズミ個体群の抗体価は繁殖による新規個体の加入により減少した。今回の調査では病原性リケッチアは検出できなかったが、いくつかのネズミ種は紅斑熱群リケッチアに対する高い抗体価を示した。このことから、岡山県内では広範囲に紅斑熱群リケッチアが侵淫しているが、病原性リケッチアは低い密度で潜在していると思われる。また、アカネズミの生息密度は季節や年によって大きく変動しており、紅斑熱群リケッチアの動態に係わっていると考えられる。

A. 研究目的

岡山県ではこれまで日本紅斑熱の患者の発生は知られていなかったが、2009年以降（2012年1月）現在までに5名の患者が次々と報告された。患者が連続して発生している原因としては、マダニ類の宿主である野生動物の移動・分散を介した県外感染地域からの病原体の伝播、もしくは県内に低密度で潜在していた病原体が近年の環境変化や野生動物の生息状況・行動の変化によって顕在化したことなどが考えられる。

本研究は、岡山県内の紅斑熱群リケッチアの分布状況の把握、また日本紅斑熱の発生メカニズム及び伝播様式を明らかにすることを目的とした。リケッチアとそれを保有するマダニ類の間には種特異的な関係が見られることが多く、マダニ類の季節的消長と地理的な分布を明らかにすることは感染リスクの評価やリスクマップの作成に必要な基礎情報にすることができる。同様に、ホストの地理的な分布や生息地の選好性は、今後の感染地域の拡がりや患者数の予測など、将来的な感染リスク対策に有用であると思われるため、ベクター（マダニ類）と宿主（今回は小型哺乳類）の生息状況の把握に努めた。

B. 研究方法

1) 小型哺乳類及びマダニ類の生息状況調査

調査は2010年10月～2011年12月に岡山県全域を対象として行った。岡山県は北部の中国山地に近いほど標高が高く、南部の瀬戸内海に近いほど標高が低く住宅地や田畑が広がるという地理的な特徴がある。また、県内を3本の大きな河川（吉井川・旭川・高梁川）が流れており、野生動物の移動の障壁となっている可能性が高い。そこで2次メッシュを元に岡山県の地理的な特徴を反映させ県内を16のメッシュに

区切った（図1）。メッシュごとに5ヶ所（山地2ヶ所、河川敷2ヶ所、休耕地1ヶ所）以上で小型哺乳類及びマダニ類の捕獲・採集を行った。小型哺乳類の捕獲はシャーントラップ（5.0×6.3×16.5 cm）を用いて行い、餌はピーナッツと油揚げを使用した。トラップの配置は基本的には21個のトラップを5 m間隔で100 mのライン上に並べたものを平行に3本（ラインの間隔は5 m）並べて用いた。この計63個の格子状（21個×3列）のトラップを1セットとして夕方から翌朝まで設置した。設置トラップごとにGPS（GARMIN社製）で地図上の位置と標高を記録した。調査地の標高はGPSで得た値の平均を用いた。捕獲個体は外部形態の計測の後、種と繁殖状態、マダニ類（参考としてツツガムシ類も含む）の寄生の有無を記録し、捕獲地点で放逐した。一部の個体はリケッチアの検出及び血清抗体価を測定するための検体として持ち帰った。小型哺乳類の生息密度は畝有効面積を考慮した次式によって算出した。

$$D = N / (A + hL + \pi h^2)$$

D: 生息密度、N: 捕獲個体数、A: 格子状の畝設置面積、L: 格子状の畝設置面積の周囲長、h: 対象種の行動圏の半径（今回は簡易的にアカネズミの平均的な行動圏の半径7.5 mを使用）

マダニ類の採集は白いフランネルの生地（70 cm × 80 cm）を1調査地点あたり20分間振り、付着したマダニ類を適宜採集する方法（旗振り法）によって行った。採集個体は全て持ち帰り、種の同定と採集個体数のカウントを行った後、一部の個体については細菌分離と遺伝子検索によってリケッチアの保有状況を確認した。

2) 病原体分離

ネズミ類55個体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、紅斑熱群リケッチアの分離を試みた。また、採集個体が

ら抽出した 187 個体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、スライドガラスに冷アセトンで固定後、間接蛍光抗体法 (IFA) 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) リケッチア遺伝子の検索

ネズミ類 78 個体の脾臓をホモジナイザーペースル (アズワン) で破碎し、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)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。マダニ類 274 個体の内臓浮遊液から 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。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、Genetyx Ver. 10 を用い、系統解析を実施した。

4) 紅斑熱群リケッチアに関する血清疫学調査
ネズミ類 78 個体の血清抗体価を *R. japonica* (HH-14 株)、*R. asiatica* (IO-1 株)、*R. Helvetica* (IM-1 株)、*R. tamurae* (AT-1 株)、*R. honei* (GRA-1 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 倍以上を陽性とした。

C. 研究結果

1) 小型哺乳類

食虫目 2 種(ジネズミ *Crocidura dsinezumi*、ヒミズ *Urotrichus talpoides*)、齧歯目 6 種(スミスネズミ *Eothenomys smithii*、ハタネズミ *Microtus montebelli*、カヤネズミ *Micromys minutus*、ヒメネズミ *Apodemus argenteus*、アカネズミ *A. speciosus*、ハツカネズミ *Mus musculus*)、計 135 個体を捕獲した。アカネズミが 83 個体と最も多く、全体の 61.5%を占めた。アカネズミの生息密度は季節的に大きく変動し、秋期 (10-11 月) と春期 (2-3 月) の年 2 回のピークを示した (図 2)。この 2 つのピークはアカネズミの亜成獣の出現時期や精巢の肥大時期と一致していた。2011 年の秋期にはこのピークは見られなかった。種において捕獲地域やハビタット、標高に明らかな選択性の違いが見られた (図 3、4)。アカネズミは最もハビタットの選択幅が広く、岡山県の全域に渡って高標高から低標高地域までで捕獲された (mean ±

SD : 181±209.3 m, range : 20-833 m)。カヤネズミは河川敷を好み、南部の低標高地域でよく捕獲された (70±102.4 m, 5-309 m)。ヒメネズミは山地のみで捕獲され、高標高域まで生息するものの南部ほど捕獲率が高かった (311±252.2 m, 112-755 m)。ジネズミは河川敷を好み、極端な高標高や低標高では捕獲されなかった (95±58.1 m, 54-136 m)。ハタネズミは休耕地を好み、極端な高標高や低標高では捕獲されなかった (59±49.6 m, 15-116 m)。スミスネズミは高標高地の山地でのみ捕獲された (887±0.0 m, 887-887 m)。ハツカネズミは河川敷を好み、南部の低標高地域でより多く捕獲された (11±17.4 m, 5-61 m)。ヒミズは山地・河川敷・休耕地のいずれの環境でも捕獲されたが、北部の高標高地域のみで捕獲された (508±175.4 m, 315-694 m)。捕獲数の少ない種については不明な点が多いが、スミスネズミとハタネズミは限られた場所で複数個体が捕獲されたため生息地は局所的であると思われた。

ネズミ種に対するマダニ類の付着率はサンプル数が少ないもののスミスネズミとヒミズでそれぞれ 100%、50%と高い値を示した。ハタネズミとカヤネズミにはマダニ類の寄生は見られなかった。

病原体分離の結果、小型哺乳類の脾臓からはリケッチアは検出されなかった。

PCR によるリケッチア検索の結果、小型哺乳類の脾臓からはリケッチアは検出されなかった。

1) マダニ類

マダニ属 3 種 (タネガタマダニ *Ixodes nipponensis*、ヤマトマダニ *I. ovatus*、アカコッコマダニ *I. turcius*)、チマダニ属 6 種(キチマダニ *Haemaphysalis flava*、タカサゴチマダニ *H. formosensis*、ヤマアラシチマダニ *H. hystrix*、ヒゲ

ナガチマダニ *H. kitaokai*、フタトゲチマダニ *H. longicornis*、オオトゲチマダニ *H. megaspinosa*) の計 1783 個体が採集された。マダニ類の各ステージの個体数の増減には季節的な消長が見られた (表 2)。マダニ類は基本的には山地で多く採集されたが (図 5)、地理的な位置による違いが見られた (図 6)。オオトゲチマダニはそのほとんどが県北東部で採集された。フタトゲチマダニも同様な傾向を示した。逆にキチマダニは県西部で採集数が多く、特に南部で高くなった。アカコッコマダニは県中央部の瀬戸内海側、すなわち岡山市や倉敷市などの住宅密集地周辺の山地で多く採集された。

病原体分離の結果、マダニ類からはリケッチアは検出されなかった。

PCR によるリケッチア検索の結果、キチマダニ 4 個体(オス 1、若虫 3)、オオトゲチマダニ 6 個体(幼虫 2、若虫 3、メス 1)、フタトゲチマダニ 18 個体(幼虫 14、若虫 4)、タネガタマダニ 1 個体(若虫 1) から紅斑熱群リケッチアが検出された。遺伝子配列による系統解析の結果を図 7 に示した。検出された遺伝子は、全て紅斑熱群リケッチア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紅斑熱群リケッチア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。

3) ネズミ類の血清抗体価

紅斑熱群リケッチアの各株に対する陽性率にはネズミ種による違いが見られた (表 3)。アカネズミは全てのリケッチア株に対してそれぞれ 94.3% 以上とほとんどの個体が陽性を示した。ヒメネズミは抗原株に対する反応の違いが見られ *R. helvetica* と *R. asiatica* に対する陽性率が 80%、100%と高率であったが、*R. japonica* と *R. tamurae* に対しては全て陰性であった。抗体価の中央値

はネズミ種による違いが見られ、アカネズミで全ての株に対して 1280～2560 倍、ヒメネズミで *R. asiatica* に対して 320 倍と高い値を示した(表 4)。アカネズミの成獣は亜成獣よりも高い抗体価を示した(表 5)。アカネズミの抗体価の月ごとの中央値は 80～5120 倍の間で季節的に大きく変動したが、その値はアカネズミの繁殖期後に減少した(図 8)。アカネズミの抗体価に地理的な差は見られなかった。

D. 考察

今回の調査では小型哺乳類やマダニ類から *R. japonica* は検出されなかった。しかしながらアカネズミをはじめとしたほとんどのネズミ種が紅斑熱群リケッチアに対して高い抗体価を示したことから、現時点ではどの種かは特定できないが、岡山県内の広範囲に紅斑熱群リケッチアが存在するものと思われる。赤磐市の感染推定地周辺のマダニ調査から *R. tamurae* と *R. asiatica* の遺伝子が検出されているが、県内の患者発生数が非常に少ないことから病原性リケッチアの密度はかなり低いと推測される。

病原性リケッチアのリザーバーやマダニの運搬に係わっている動物として、家畜やコンパニオンアニマルを含めた様々な動物がその候補として挙げられているが、ここでは今回得られた結果からいくつかの野生動物について考えてみたい。島根県では患者の発生地域とニホンジカ *Cervus nippon* の分布が一致することから、日本紅斑熱へのニホンジカの関与が示唆されている。しかし岡山県でこれまでに報告されている患者の感染推定地は倉敷市、赤磐市、総社市であり、分布が兵庫県との県境から吉井川までにほぼ限られるニホンジカの分布(図 9)とは一致しない。一方でオオトゲチマダニとフタトゲチマダニの分布はこのニホンジカの分布とよく一致し

ていた。したがって岡山県のニホンジカ個体群とそれに付着するオオトゲチマダニ、フタトゲチマダニには *R. japonica* などの病原性リケッチアはいない、もしくはその感染リスクは低いと考えられる。同様に岡山県の患者発生地をマダニ類の分布と重ね合わせると、アカコッコマダニの分布が比較的一致するように思われる。この種は主に鳥類に寄生していると考えられるため、*R. japonica* を保有したマダニを付着させた渡り鳥の飛来がこれまでの県内の散発的な患者の発生につながったとも考えられる。岡山県では、遺伝子検索によって既知種である *R. tamurae* と *R. asiatica* が確認されている。今回の抗体価の結果ではヒメネズミのみが *R. asiatica* に特異的な反応を示した。このことはヒメネズミが *R. asiatica* の伝播に関与している可能性を示している。

岡山県では小型哺乳類の生息密度が他の地域に比べて低いと考えられている。しかし、2010 年の密度推定では *Apodemus* 属で一般的に言われている値(10–20 頭/ha)よりやや少ない程度であった。ただし、この年は何らかの理由で生息密度がかなり高くなっていったように思われ、事実 2011 年には急速に個体群サイズが縮小した。このような小型哺乳類の密度の低さと個体群の不安定さが県内の日本紅斑熱の患者の少なさに関係しているのかもしれない。

ネズミ種の分布は主に植生・標高といった生息環境によって制限されている。ネズミ類の中ではアカネズミは最も選択幅が広く様々な環境に生息することが可能である。県内では山地・河川敷・休耕地のいずれの環境でも見られるが県中部の河川敷で生息密度が高い。しかしながら分布の端であると思われる北部及び南部では山地でのみしか捕獲されていないことから、本来は河川敷より山地を好むものと思われる。こ