

特に池間島での感染が推察されていることから、当該地域の疫学的背景を明らかにするため、宮古島市住民の血清疫学調査を実施したところ、池間島住民の抗体陽性率は28.6%で、城辺住民の7.8%、宮古島市職員の7.4%に比べて有意に高かった。現地での疫学調査の結果から、池間島にはツツガムシが多数生息し、病原体 *O.tsutsugamushi* も異なる血清型が数種類検出されているのに対し、宮古島ではツツガムシがまだ確認されていない。以上のことから、池間島住民は宮古島住民よりツツガムシとの接触機会、つまり何らかの *O.tsutsugamushi* に感染する機会が多く、抗体陽性率が有意に高くなったと思われた。各抗原に対する抗体価をみると、4例の患者感染血清型である Ikemajima30R に最も高い抗体価を示した検体はなかったことから、抗体陽性者は患者感染血清型に感染し、つつが虫病を発症した可能性は低く、少なくともそれ以外の別の血清型に感染し、その交差反応で抗体価が上昇した可能性が示唆された。

②地域ラボネットワーク構築に向けた活動

・北海道・東北・新潟ブロックにおけるリケッチア症検査技術の向上・維持及び地域における媒介種調査に関する研究

研究協力者 門馬直太 福島県衛生研究所ほか

近年の調査研究からこの地域ではつつが虫病や紅斑熱群リケッチア症などのリスク地域であることが明らかとなっている。そこで、血清抗体価測定に関する技術研修や新たな遺伝子検査系の評価を複数の地衛研で行い、診断ネットワークの構築にむけた準備を行った。さらに、青森県、秋田県、福

島県、それぞれのフィールド調査を共同で行うことで調査手法や各県が抱える課題を共有し、新たなリケッチア症の発生に備えた調査体制の整備を行った。Shimokoshi 株を特異的に検出する新たな primer を開発した。秋田県の調査では、雄物川流域でアカツツガムシの生息を確認した。福島県の調査では Shimokoshi 型に高い抗体価を示す野鼠を捕獲した。青森県八戸地方の調査では9個体野鼠が紅斑熱群リケッチアに高い抗体価を示した。*O.tsutsugamushi* の培養技術研修によって検査技術の移転が行われた。

・中国・四国ブロックにおけるリケッチア症検査技術の向上・維持及び地域における媒介種調査に関する研究

研究協力者 木田浩司 岡山県環境保健センターほか

中国・四国ブロックでは、人事異動等による技術の低下で診断が困難となるケースが問題となっている。そこで、四国地方の4県を対象とした日本紅斑熱の診断技術研修会を開催した。また、香川県における日本紅斑熱患者の感染推定地でマダニを捕獲し、形態学的な種同定法及びマダニからの *R.japonica* 遺伝子検出法についての技術研修会を実施した。患者検体からの real-timePCR 法による *R.japonica* 遺伝子検出技術の移転が行われた。旗振り法によるマダニ捕獲法と、そこからの *R.japonica* 遺伝子検出技術の移転が行われた。香川県の感染推定地で捕獲したマダニからは *R.japonica* は検出されなかった。

・九州地域におけるリケッチア症診断のラボネットワーク構築の試み

研究協力者 矢野浩司 宮崎県衛生環境研究所, 御供田睦代 鹿児島県環境保健センターほか

地方衛生研究所ではリケッチア症の検査や疫学調査に対応してきたが近年、人事異動や退職によって検査技術の継承が困難となり、検査機能の低下をきたす例が見られている。この状況はリケッチア症の多発地域である九州ブロックのリケッチア症検査担当者でも同様であることから、リケッチア症検査を取り巻く状況を把握するためアンケート調査を行った。その結果、検査体制の構築・維持における問題点を確認し、九州ブロックにおけるラボネットワーク構築と技術の継承を目標とした研修会を開催することになった。研修会の内容としては、リケッチア症と検査法の総論について講義し、間接蛍光抗体法実習とマダニとツツガムシの同定実習を行った。あわせて九州ブロック内の県から宮崎県衛生環境研究所に検査依頼された症例をまとめた。

③リケッチア症検査体制に関する検査体制の現状の把握と問題点の抽出

国内リケッチア症実驗室診断に関する状況調査として、地方衛生研究所全国協議会に加入している地方衛生研究所 79 施設に対してアンケートを配布し、回答をまとめた。その結果、地方衛生研究所における実驗室診断体制は、血清診断、遺伝子診断だけでなく病原体分離まで実施している施設がある一方、全く実施していない施設もあることが確認された。また、いずれの感染症においても、血清診断、遺伝子診断の実

施施設はともに 50%を切っていた。

D. 考察

①リケッチア症に対する地域特性を考慮した調査及び検査法の開発

リケッチア症は地域特性が大きく、その地域での発生状況、ベクター、動物、株などについて疫学調査が継続的に行われることが、啓発に資する科学的データの蓄積のためにも望ましい。また検査法についても、それぞれの地域特有の株があるため、診断用抗原の選定のための検討が必要である。これらの結果に基づく検査法の見直しや新規の診断法開発も重要である。個々の検討についての考察に関しては、それぞれの研究協力者の報告書を参照いただきたい。

②地域ラボネットワーク構築に向けた活動

今回は3つのブロックでの地域ネットワーク構築に向けた活動がなされたが、ラボネットワークの構築には、多くの課題が残されていることも明らかになった。検査用抗原の配布等も今後の検討課題である。さらに進めていく必要がある。

③リケッチア症検査体制に関する検査体制の現状の把握と問題点の抽出

いずれのリケッチア感染症においても、血清診断、遺伝子診断の実施施設はともに 50%を切っている現状が明らかとなったことから、地域協力体制構築の必要性が改めて浮き彫りとなった。アンケートを元に作成した地域ごとの診断体制、連絡先等を取りまとめた表については、地方衛生研究所、医療機関等に公表する予定であり、地域協力体制構築の一助となることが期待される。今後も継続的に同様のアンケート調査を実施し、全国的に診断体制の情報を共有して

いく予定である。

E. 結論

今後とも、リケッチア症に対する地域特性を考慮した調査及び検査法の開発、地域ラボネットワーク構築に向けた活動、リケッチア症検査体制に関する検査体制の現状の把握と問題点の抽出を進めていく必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

それぞれの研究協力者の報告書を参照

Ⅲ. 研究班 連携・支援による
ラボネットワークの活動

<ラボネットワーク北海道・東北・新潟 ブロック連携>

北海道・東北・新潟ブロックにおけるリケッチア症検査技術の向上・維持
及び地域における媒介種調査に関する研究

研究協力者 門馬直太 福島県衛生研究所
佐藤寛子 秋田県健康環境センター
東海林彰 青森県環境保健センター
川端寛樹 国立感染症研究所(研究分担者)
角坂照貴 愛知医科大学
藤田博己 馬原アカリ医学研究所(研究分担者)

研究要旨

近年の調査研究から北海道・東北・新潟ブロックは様々な血清型によるつつが虫病や紅斑熱群リケッチア症など多様なリケッチア症のリスク地域であることが明らかとなっており、それらに対応する検査体制の整備や媒介種の生息調査などが求められている。今回我々は、血清抗体価測定に関する技術研修や新たな遺伝子検査系の評価を複数の地衛研で行い、診断ネットワークの構築にむけた準備を行った。さらに、青森県、秋田県、福島県、それぞれのフィールド調査を共同で行うことで調査手法や各県が抱える課題を共有し、新たなリケッチア症の発生に備えた調査体制の整備を行った。

A.研究目的

北海道・東北・新潟ブロックに含まれる各地域では北海道を除いて全国有数のつつが虫病の発生数(届出数)が記録されていて、過去3年間の集計では全国の患者報告数の約3分の1が同ブロックから報告されている。また2008年の秋田県における古典型つつが虫病・Kato型の再確認や、秋田・山形・新潟・福島におけるShimokoshi型の発生事例など、同ブロック内におけるつつが虫病病原体の多様性は全国でも類を見ず、公衆衛生上の対策が画一的に行えないことを示している。さらに、2007年、2008年にはそれぞれ青森県、宮城県において紅斑熱群リケッチア症の発生報告があり、宮城県の症例からは国内初となる紅斑熱群リケッチア種(*Rickettsia heilongjiangensis*)が検出され、同ブロックには多様なリケッチア症

が存在することが明らかとなっている。これに対応するためには、各県の地方衛生研究所等(地衛研)における検査体制やフィールド調査体制の整備が必要となるが、高い専門性やマンパワー不足などの問題から直ちに全ての地衛研で体制を整備することは現実的に不可能である。

そこで、同ブロック内で発生する多様なリケッチア症に対応することを目的とし、青森・秋田・福島をコア地衛研と位置付け、近隣県も含めたサポート体制を整備するため検査技術の共有や青森県・秋田県・福島県においてフィールド調査を実施した。

B.研究方法

1. 検査体制整備について

(1) 血清抗体価測定に関する技術研修

2012年10月23日、11月1日に福島県衛

生研究所 P3 実験室において、L929 細胞の培養・維持、*Orientiatsutsugamushi* の接種および血清抗体価測定用抗原の調製について技術研修を行った。

(2) 遺伝子検査の体制整備

現行の病原体検出マニュアルに記載されているプライマーセット (1st; Pr34⇔Pr55, 2nd; Pr10⇔Pr11) では臨床検体から Shimokoshi 型を感度よく検出できないことから、Shimokoshi 型も含め、北海道・東北・新潟ブロック内で報告されている全ての血清型を検出可能な検査系を構築するため、新たなプライマーの開発 (佐藤ら、投稿準備中) および検査系の評価を行った。さらにフィールド調査などにおける多検体処理のため、リアルタイム PCR (川森ら、投稿準備中) の体制整備を併せて行った。

2. フィールド調査

(1) 秋田県におけるアカツツガムシの生息域実態調査

2012 年 8 月、主に雄物川支流の河川敷において、黒布見取り法 (面積 25×25 cm の黒布を使用) によるアカツツガムシの直接採取を行った。

(2) 福島県における Shimokoshi 型媒介種の探索

2012 年 11 月、福島県で報告された Shimokoshi 型つつが虫患者の推定感染地において、シャーマントラップを用いた野鼠の捕獲を行い、血清抗体価測定および病原体の検索を行った。

(3) 青森県における紅斑熱群リケッチアの生息調査

2012 年 11 月、2007 年に報告された紅斑熱群リケッチア症患者の推定感染地において、シャーマントラップを用いた野鼠の捕

獲を行い、血清抗体価測定を行った。

C. 研究結果

1. 検査体制整備について

(1) 血清抗体価測定に関する技術研修
本研修事業により、

①青森県における血清抗体価測定の体制整備にむけた準備

②福島県における抗体価測定用抗原の培養体制の整備
を行った。

(2) 遺伝子検査の体制整備

新たに Shimokoshi 型を検出可能なプライマー SH6 および SH5 を設計し、既存の 1stPCR と 2ndPCR のプライマーセットに加えた反応系 (Pr34⇔Pr55+SH6, 2nd: Pr10⇔SH5) とすることで、Shimokoshi 型を感度よく特異的に検出できることを確認した。なお、様々な臨床検体に対する評価については現在、青森・秋田・福島の 3 施設で検討を行っている。

2. フィールド調査

(1) 秋田県におけるアカツツガムシの生息調査

雄物川水系の支流の河川敷 27 箇所についてアカツツガムシの生息調査を行い、8 箇所 (6 支流) においてアカツツガムシの生息を確認した (表 1)。さらに過去 3 年間に行われた雄物川水系全体におけるアカツツガムシの生息状況を、調査ポイント毎にアカツツガムシ生息密度を集計し、地図上にプロットした (図 1)。

(2) 福島県における Shimokoshi 型媒介種の探索

2012 年 5 月に県南地域で報告された Shimokoshi 型つつが虫の推定感染地にお

いて野鼠の捕獲を試みた結果、11匹が捕獲された。野鼠の心採血液または心臓浸出液について各リケッチアを抗原として血清抗体価を測定した結果、2個体が他の抗原に比べ Shimokoshi 型に高い抗体価を示した(表2)。さらに脾臓破砕液から核酸を抽出し、56kDa 外膜タンパク質遺伝子を標的とした PCR を行った結果、2個体から増幅産物が確認され、塩基配列の解析からそれぞれ JP-2 型、Shimokoshi・Fuji・Lx-1 型が含まれるクラスターに型別された(図2)。

(3) 青森県における紅斑熱群リケッチアの生息調査

2007年に青森県で報告された紅斑熱群リケッチア症患者の推定感染地周辺の馬淵川流域3地点、新井田川流域1地点の計4地点において野鼠捕獲を試みた結果、すべての地点から計20匹が捕獲された(図3)。野鼠の心採血液または心臓浸出液について各リケッチアを抗原として血清抗体価を測定した結果、9個体が他の抗原に比べ紅斑熱群リケッチアに高い抗体価を示した(表3)。

D. 考察

今回、リケッチア症の検査診断に関する技術研修を行うことで、検査技術の習得や各施設が実際に検査を行う上での課題を明らかにすることができた。特に Shimokoshi 型の安定的な診断体制の整備は本ブロックが抱える重要な課題であり、新たに設計したプライマーの評価や精度確認など、リケッチア症の診断ネットワークを構築する上で大きな成果があったものと思われる。また今回の検査診断に関する一連の情報は福島県県南保健福祉事務所が管内の医療機関に対して配布した「つつが虫病

対応マニュアル」の中にも記載し、福島県で最も多くつつが虫病患者が報告される地域において実際に診察を行う医療関係者の参考文献として活用されている。診断ネットワークを構築する上で医療機関との連携は欠かせぬ課題であり、今後もわかりやすい形で情報発信を行う必要があるものと思われる。

既述のとおり、本ブロックは多様なリケッチア症が侵淫する地域であり、各県が抱える課題は様々である。秋田県は現在日本で唯一古典型つつが虫病(Kato型)患者が発生する雄物川流域を抱えており、これまでも患者の発生状況を参考に河川敷でアカツツガムシの生息を確認してきた。2012年は主に支流を中心に調査を行い、雄物川本流だけでなく支流の多くの地点でアカツツガムシの生息を確認した。この結果はこれまで秋田県が蓄積してきた長年の患者発生状況と合致しており、風土病と考えられていた時代から現在に至るまでつつが虫病のリスク地域に大きな変化が認められないことを示唆するものである。古典型つつが虫病は秋田県だけでなく、過去には山形県、新潟県でも発生が確認されていたことから、つつが虫病のリスク要因の変化を明らかにするためにも今後はこれらの地域においても調査が必要になるものと思われる。

2012年5月に福島県で初めて Shimokoshi 型つつが虫病の発生が報告され、主に日本海側で報告されていた Shimokoshi 型がこれまでよりも広範囲な地域に侵淫している可能性が考えられた。今回調査を行った感染推定地において捕獲された野鼠の中に Shimokoshi 型抗原に対して高い抗体価を示す個体が認められたことから、Shimokoshi 型を媒介するベクターが調査地点周辺に生息している可能性が示唆された。脾臓から検出された

Orientiatsutsugamushi の 56kDa 外膜タンパク質遺伝子は当該患者から検出された配列とは一部異なっており、このことから調査地点周辺に侵淫する ShimokoshiFuji・Lx-1 型の多様性が示唆される。

2007 年に青森県で紅斑熱群リケッチア症患者の発生が報告されたことで、本ブロックは多様なつつが虫病だけでなく、紅斑熱群リケッチア症のリスクも混在する地域であることが明らかとなった。今回調査を行った地点において紅斑熱群リケッチアに対して高い抗体価を有する野鼠が複数認められたことから、当該地域の潜在的なリスクが改めて確認されることとなった。日本紅斑熱が頻発する地域と異なり、本ブロックの医療機関で紅斑熱群リケッチア症が疑われることは少ないものと考えられることから、今後も引き続き調査を行い、当該地域のリスクについて明らかにするとともに、適切な情報発信を行う必要があるものと思われる。

E.結論

多様なリケッチア症が侵淫する北海道・東北・新潟ブロックにおいては、実験室診断の体制を整備・維持し、ベクターの生息状況などのリスク要因を解析することが重要であるが、一施設で全てを行うことは困難であり、より機動的な診断ネットワークの構築が必要となる。

今回、技術研修だけでなく、各県のフィールド調査を共同で実施できたことは、人的なネットワークに加え、新たなリケッチア症が発生した場合のサポート体制を構築する上で非常に有意義であったと思われる。今後は、各地衛研で検査体制の整備を進めるとともに、より広域な診断ネットワークの構築にむけた技術研修やフィールド調査が必要になると思われる。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. 学会発表

1.佐藤寛子, 柴田ちひろ, 斎藤博之, 門馬直太, 藤田博己, 須藤恒久:Shimokoshi 型つつが虫病症例および分離株と臨床検体を用いた検査診断の検討. 第 5 回日本リケッチア症臨床研究会・第19 回リケッチア研究会合同研究発表会 2012 年 12 月 9 日. 滋賀県大津市.

2.門馬直太, 結城智子, 佐藤寛子, 東海林彰, 佐藤七重, 成田雅, 千葉万智子, 竹之下秀雄, 藤田博己:福島県で発生した Shimokoshi 型つつが虫病について. 第 5 回日本リケッチア症臨床研究会・第19 回リケッチア研究会合同研究発表会 2012 年 12 月 9 日. 滋賀県大津市.

2. 論文発表

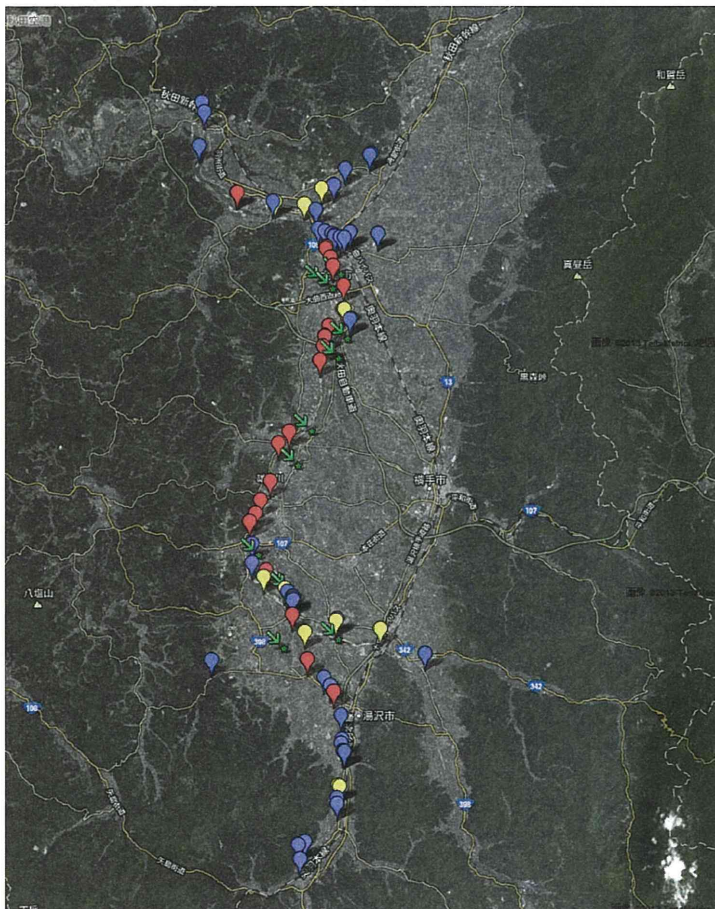
1.佐藤寛子, 柴田ちひろ, 斎藤博之, 佐藤了悦, 齊藤志保子, 高橋 守, 藤田博己, 角坂照貴, 高田伸弘, 川端寛樹, 高野 愛, 須藤恒久:アカツツガムシ親和性 Kato 型つつが虫病患者の確認を受けての秋田県雄物川流域における調査成績(2009). 衛生動物, 64(印刷中), 2013

2.藤田博己, 矢野泰弘, 高田伸弘, 安藤秀二, 川端寛樹, 藤田信子:2012 年までに確認できた福島県のマダニ類とマダニ媒介リケッチア. 衛生動物, 64(印刷中), 2013.

3.門馬直太:つつが虫病リケッチアの型別と媒介種との関係. 衛生動物, 64(印刷中), 2013.

表1 雄物川水系支流におけるアカツツガムシ生息調査結果(2012年8月)

No.	地区名	位置	岸	支流名	アカツツガムシ生息状況
1	大仙市大曲	玉川合流部	右岸	玉川	+
2	大仙市大曲	玉川橋上流	右岸	玉川	+
3	大仙市中仙	玉川橋上流	左岸	玉川	-
4	大仙市中仙	玉川橋上流	右岸	玉川	-
5	大仙市中仙	勝田橋上流	左岸	玉川	-
6	大仙市中仙	松倉橋下流部 船着き場	右岸	玉川	-
7	大仙市中仙	松倉橋上流部	右岸	玉川	-
8	大仙市大曲	大戸川	右岸	大戸川	-
9	大仙市大曲	丸子川合流部下流	左岸	丸子川	-
10	大仙市大曲	丸子橋下流	右岸	丸子川	-
11	大仙市大曲	丸子橋上流	右岸	丸子川	-
12	大仙市大曲	丸子橋下流 船着き場	右岸	丸子川	-
13	大仙市大曲	大曲黒瀬	右岸	丸子川	-
14	大仙市大曲	窪堰川と川口川合流部	右岸	川口川	-
15	大仙市大曲	窪堰川と川口川合流部	左岸	川口川	-
16	大仙市大曲	横手川合流部	左岸	横手川	+
17	大仙市大曲	横手川と出川合流部	右岸	出川	+
18	大仙市大曲	横手川と出川合流部	左岸	出川	-
19	羽後町	西馬音内川合流部 西馬音内川	左岸	西馬音内川	+
20	羽後町	西馬音内川	右岸	西馬音内川	-
21	横手市十文字	皆瀬川 雄平橋下流	左岸	皆瀬川	-
22	横手市十文字	皆瀬川 雄平橋下流	右岸	皆瀬川	+
23	横手市十文字	皆瀬川 岩崎鉄道橋下流	右岸	皆瀬川	+
24	横手市稲川	皆瀬川と成瀬川合流部より上流 戸波橋下流	左岸	成瀬川	-
25	湯沢市湯沢	光全寺付近	右岸	白子川	+
26	湯沢市湯沢	戸沢川合流部	左右岸	戸沢川	-
27	湯沢市雄勝	役内川合流部付近 万石橋下流	右岸	役内川	-



青：ツツガムシ（-）
 赤：ツツガムシ（+）布当て回数の10%以上のムシ数
 黄：ツツガムシ（+）布当て回数の10%以下のムシ数
 緑：石碑などのツツガムシ関連史跡

図1 雄物川水系におけるアカツツガムシの生息調査結果

表 2 福島調査における野鼠の血清抗体価

No.	種類	性別	体重 (g)	検体	IP抗原						
					Gilliam/JG	Karp/JP-2	Kato	Irie/Kawasaki	Hirano/Kuroki	Shimokoshi	<i>R. japonica</i>
1	アカネズミ	♀	37	血清	<20	80	80	<20	40	320	<20
2	アカネズミ	♂	16	心浸出	<2	<2	<2	<2	<2	<2	+
3	アカネズミ	♂	41	心浸出	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
4	アカネズミ	♀	37	心浸出	2	32	8	4	8	4	<2
5	アカネズミ	♀	18	心浸出	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
6	ヒメネズミ	♀	17	心浸出	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
7	ヒメネズミ	♂	16	心浸出	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
8	アカネズミ	♀	35	心浸出	64	128	64	64	128	32	+
9	アカネズミ	♀	36	血清	320	5120	320	160	2560	320	<20
10	アカネズミ	♂	23	血清	<20	<20	<20	<20	40	80	<20
11	ヒメネズミ	♀	20	血清	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20

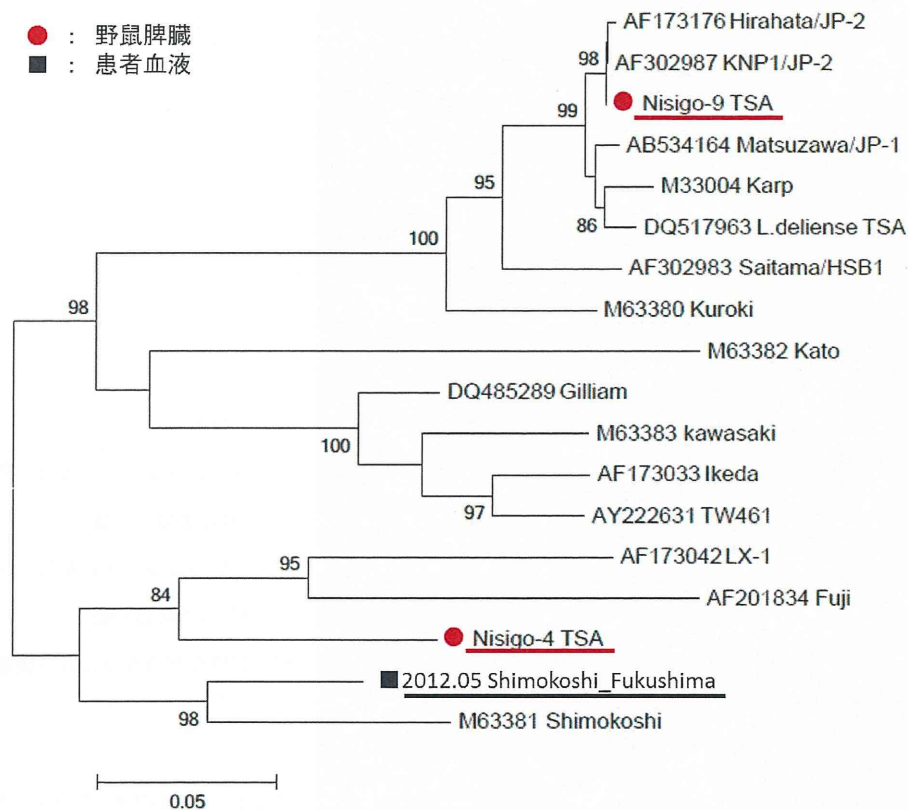


図 2 野鼠脾臓から検出された 56kDa 外膜タンパク質遺伝子の系統樹

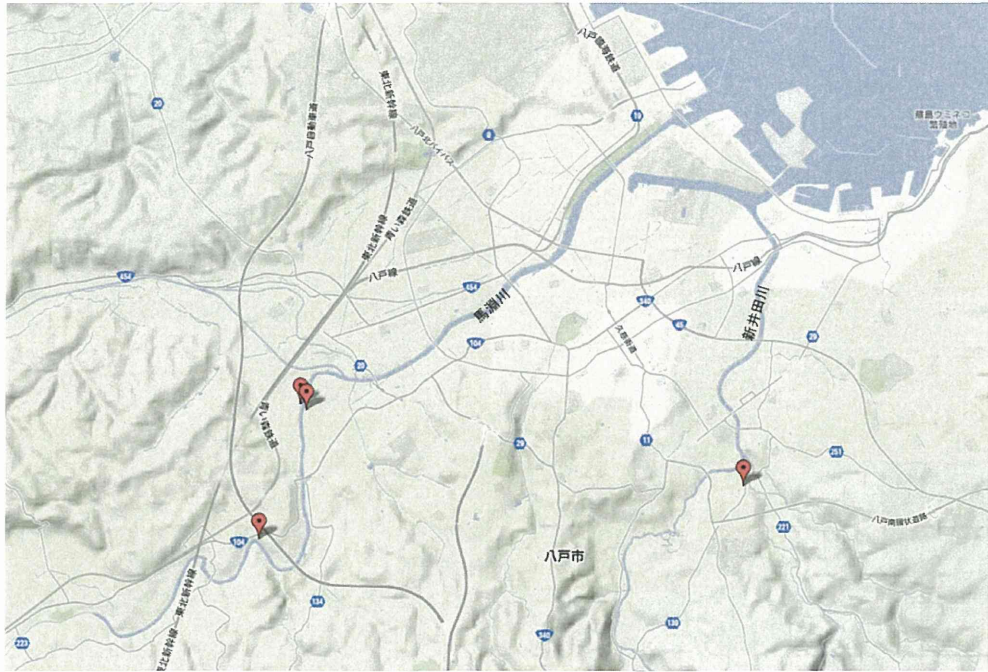


図3 馬淵川、新井田川における野鼠捕獲地点

表3 青森調査における野鼠の血清抗体価

No.	種類	性別	体重 (g)	検体	IP									
					JG	JP-2	Kt	Kw	Kr	Shi	Rj	Rhj	Rhv	Ra
N1	アカネズミ	♀	36	血清	20	20	160	40	20	320	40	40	20	80
M1	アカネズミ	♀	22	血清	<20	<20	<20	<20	<20	<20	640	640	640	640
M2	アカネズミ	♀	21	血清	<20	<20	<20	<20	<20	<20	40	40	40	160
M3	アカネズミ	♀	20	血清	<20	<20	20	<20	20	<20	80	320	160	160
M4	アカネズミ	♀	29	血清	<20	<20	<20	<20	<20	<20	320	160	40	160
M5	アカネズミ	♂	22	血清	<20	<20	<20	<20	<20	<20	40	20	40	40
M6	アカネズミ	♂	26	血清	<20	<20	<20	<20	<20	<20	80	80	160	160
M7	アカネズミ	♀	21	血清	<20	<20	80	40	20	320	40	20	20	20
M8	アカネズミ	♀	19	血清	40	20	20	40	40	40	<20	<20	<20	<20
M9	アカネズミ	♂	27	血清	160	2560	160	160	640	160	80	80	<20	<20
M10	ハタネズミ	♀	27	心浸出	8	128	32	16	128	8	<2	<2	<2	<2
M11	アカネズミ	♂	41	心浸出	16	128	16	16	32	32	32	16	64	64
M12	アカネズミ	♀	26	心浸出	2	4	4	4	8	8	<2	<2	<2	2
M13	アカネズミ	♂	30	血清	<20	<20	<20	<20	<20	<20	160	160	160	160
M14	アカネズミ	♀	31	心浸出	8	16	16	2	32	64	256	256	64	64
M15	アカネズミ	♀	22	心浸出	2	<2	4	4	2	16	<2	<2	<2	<2
M16	アカネズミ	♀	18	心浸出	16	64	16	8	32	8	8	16	16	16
M17	アカネズミ	♀	32	心浸出	32	512	256	32	256	256	128	64	64	64
M18	アカネズミ	♂	27	心浸出	4	4	16	32	8	32	64	64	128	128
M19	アカネズミ	♂	25	心浸出	<2	<2	<2	<2	<2	8	<2	<2	4	4

Kt: Kato, Kw: Kawasaki, Kr: Kuroki, Shi: Shimokoshi
 Rj: *R. japonica*, Rhj: *R. heilongjiangensis*, Rhv: *R. helvetica*, Ra: *R. asiatica*

リケッチア感染症の調査技術の維持に関する検証
～埼玉県のハクビシンが保有するリケッチア類に関する研究～

研究協力者	山本徳栄	埼玉県衛生研究所臨床微生物担当
研究分担者	岸本寿男	岡山県環境保健センター
研究協力者	近 真理奈	埼玉県衛生研究所臨床微生物担当
	増田純一郎	埼玉県衛生研究所臨床微生物担当
	大山龍也	東松山動物病院
	大山通夫	東松山動物病院
研究分担者	藤田博己	馬原アカリ医学研究所
研究代表者	安藤秀二	国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨:リケッチア感染症の調査の一環として、埼玉県で有害獣として捕獲されたハクビシンを対象としたリケッチア類の保有状況を調査した。つつが虫病、日本紅斑熱、発疹熱およびQ熱の各種病原微生物を用いて抗原プレートを作成し、血清抗体価を測定した。429 検体について測定した結果、*O. tsutsugamushi* は用いた抗原 5 型のうち Kuroki に対して 2 検体(0.4%)、*R. japonica* では 1 検体(0.2%)が、いずれも 64 倍を示した。*R. typhi* および *C. burnetii* ではすべて 16 倍未満であった。一方、全血 108 検体について、各種リケッチアの標的遺伝子の増幅を試みたが、すべて陰性の結果であった。なお、遺伝子検査は抗体検査とのバランスからもさらに多くの検体について実施する必要がある。また、今後はこのような調査を全県的に広げ、県内に侵淫するリケッチア類を特定するとともに、検査技術の維持の検証も随時併行させていく予定である。

A.研究目的

近年、埼玉県ではハクビシンおよびアライグマによる農業被害・生活環境被害が拡大している。今回は、ヒトとの関わりが密接になっているハクビシンを対象として、つつが虫病、日本紅斑熱、発疹熱およびQ熱の各種病原微生物の感染状況を調査し、埼玉県における侵淫状況を明らかにする。さらにはこれに係る調査技術の維持についても検証する。

B.研究方法

2007年4月から2012年3月の期間に、有害獣として駆除の目的で捕獲されたハクビシンの血清および全血を対象とした。

O. tsutsugamushi の 5 型 (Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki および Kuroki)、*Rickettsia japonica*、*Rickettsia typhi* および *Coxiella burnetii* II 相菌を細胞培養し、抗原プレートを作成した。二次

抗体には HRP 標識 Protein G (Zymed Laboratories)を用い、間接免疫ペルオキシダーゼ法により血清抗体価を測定した。

また、各捕獲場所から無作為に選んだ個体の全血は、Neasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を使用し、DNA 抽出を行った。*O. tsutsugamushi* は 56-kDa 表面蛋白抗原、紅斑熱群および発疹チフス群リケッチアはクエン酸合成酵素 *gltA* をそれぞれコードしている遺伝子を標的とした Nested-PCR 法を実施した。

C.研究結果および考察

血清 429 検体について各抗体価を測定した。*O. tsutsugamushi* の抗原 5 型の中で、最も高い値 64 倍を示した検体は 2 検体(0.4%)で、いずれも Kuroki 型であった。また、*R. japonica* では最も高い値は 64 倍であり、1 検体(0.2%)のみであった。一方、*R. typhi* および *C. burnetii* ではすべ

<ラボネットワーク関東甲信静ブロック・東京都>

東京都におけるリケッチア関連感染症の発生状況（平成 24 年度）

研究協力者 新開敬行 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
研究協力者 吉田勲 同
研究協力者 林志直 同

研究要旨

平成 24 年度内（平成 25 年 1 月現在）に感染症発生動向調査事業ならびに積極的疫学調査事業により搬入された 21 例のリケッチア関連の感染症例について発生状況および診断状況をもとに解析を行ったのでその概略を報告する。

A. 研究目的

東京都内におけるリケッチア関連感染症について、発生および侵淫状況について明らかにすることでリケッチア関連感染症を予防するための注意喚起を目的とする。

B. 研究方法

感染症発生動向調査ならびに積極的疫学調査事業により東京都健康安全研究センター（以下当センター）に臨床診断でリケッチアおよび関連感染症として搬入された 21 例の検体について、紅斑熱群リケッチア（Spotted fever : *Rickettsia Japonica*、*Rickettsia rickettii* 等）、発疹熱群リケッチア（*R. Typhi*、*Rickettsia prowazaekii* 等）ツツガムシ病リケッチア（Karp、Gilliam、Kato : 標準 3 株）、Q 熱（コクシエラ・バーネッティ : I 相菌、II 相菌）については間接蛍光抗体法による IgM、IgG 抗体検査を行った。また、各リケッチアおよびコクシエラの遺伝子検査（nested PCR 法、シークエンス法）は、各病原体の遺伝子配列から作成したプライマー対を用いて遺伝子の増

幅およびシークエンス反応等による塩基配列の解析を行い検出株の同定を行った。さらに、ライム病の抗体価測定には、酵素免疫測定法（ELISA）とウェスタンブロット（WB）法の市販測定キットを用いることによって IgM、IgG 抗体測定を行った。

C. 研究結果

検査事例を臨床診断名により分類すると、リケッチア症として搬入された例は 7 例、ツツガムシ病疑いとして搬入された例が 4 例、ライム病疑いとして搬入された例が 4 例、紅斑熱疑い例が 3 例、他にダニ咬傷、発疹熱疑い、Q 熱疑い、不明熱（一部複数診断名）といった事例がみられ、10 例に渡航歴があることから海外での感染が疑われる例が約半数を占めていることが判った。

リケッチア症疑い検体の内、抗体検査または遺伝子検査で陽性となった検体は 2 例であり、他 5 例は全て陰性であった。陽性となった 1 例は紅斑熱群リケッチア検査で IgG 抗体（+）、発疹熱群リケッチア IgG 抗体（±）であったが、IgM 抗体および紅斑

熱群リケッチア遺伝子の不検出、単身血清による血清学的診断が不可能であるため、新規感染の判定は不能となった。他の1例は発疹熱群リケッチア IgG 抗体(+)だが、ツツガムシ病リケッチア抗体検査で Karp 株および Kato 株に対する IgG 抗体が低倍率(×40)で検出された。単味血清であり、IgM 抗体、リケッチア遺伝子の検出もなかったことから感染履歴の確認のみで、新規感染の判定は不能となった。

ツツガムシ病疑い例は、4例中3例が伊豆七島からの症例であり、いずれも検査陽性となっている。1例は、急性期での IgM 抗体が検出されなかったものの、回復期で IgG 抗体価が急性期に比べ4倍以上上昇していたことから新規感染が強く疑われた。他の2例は、IgM 抗体が確認されたほか、PCR による *Orientia tsutsugamushi* の遺伝子が検出され、新規感染が確定した。

ライム病疑い例は、市販の酵素抗体法による IgM 抗体、IgG 抗体の測定とウェスタンブロット法による IgG 抗体の測定を行なっているが、搬入された4例とも全て陰性であった。

紅斑熱疑い例は、3例とも全て紅斑熱群および発疹熱群リケッチア抗体 IgM (-)、IgG (-)であったが、内2例はツツガムシ病抗体 IgM (+)、IgG (+)であったことからツツガムシ病の新規感染例として報告し、他1例は検出陰性であった。

一方、発疹熱疑い例として搬入された例は発疹熱群 IgM 抗体 (-)、IgG 抗体 (+)であったが、遺伝子検査で *Rickettsia Typhi* の遺伝子が検出されたことから発疹熱の新規感染が確定した。

その他の診断理由で搬入された検体の検

査結果は全て陰性であった。

D. 考察

平成24年度に搬入された21例の検査症例のうち10例に渡航歴が認められ、リケッチア症として診断された7例はいずれも渡航歴を有する症例であった。渡航先は欧米や、東南アジア等様々で固定された地域からの傾向は認められなかった。一方、ツツガムシ病疑いで搬入された4症例には全て渡航歴がなく、国内感染のみが疑われた例であった。

都内医療機関においてリケッチア症として診断される症例には渡航歴が認められる場合が多いため、国内外での感染を考慮して紅斑熱群、発疹熱群リケッチア検査を中心に行っているが、帰国後に数日の経過がみられる場合には国内での感染を疑う必要性からツツガムシ病リケッチアの検査も併せて行っている。逆に、ツツガムシ病と診断された症例についても日本紅斑熱等のリケッチア感染症等の可能性があるため、感染地や臨床所見を考慮の上、追加検査の必要性は常にある。また、これらの中には、細菌検査や肝炎ウイルス等の簡易検査の結果、原因不明となったものや臨床診断の最終候補としてリケッチア感染症を疑ったケースが含まれており、発症からリケッチア検査までの日数が経過している例がみられ検査診断を困難にしている原因の一つとなっている。

当センターでは、血清学的な検査診断には市販の蛍光抗体測定用抗原キットを積極的に使用している。これは1年間に遭遇するリケッチア症例数が少ないことと、リケッチアの培養系に使用する細胞や標準株が

過去において枯渇してしまったことから、抗原スライド等の自家製造が現状では困難になってしまったためであり、市販検査キットの使用により入手できた抗原に限定的な血清診断しかできない欠点がある。例としてツツガムシ病の抗体測定用に市販されている蛍光抗体法用抗原スライドは Karp、Gilliam、Kato 株の標準3株のみであり、Gilliam 系株の近年の流行株である Kawasaki 株や Kuroki 株といったの抗原性の若干異なる株については血清診断は実施できない。遺伝子診断では、これらの株の特定は可能であるが、検体採取日や条件等により遺伝子検出が陽性とならない例もあり、検査診断上では大きな問題である。市

販抗原は標準株でさえ受注生産品であり、受注量が低下すると生産、販売の中止も考えられ、小規模に検査を行っている機関では検査不能となる場合も想定されることから、全国的な検査環境を向上させるための連携や協力が必要であると思われる。

E. 結論

特になし

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

三重県におけるリケッチア感染症に関する研究

研究協力者	赤地重宏	三重県保健環境研究所 微生物研究課	主幹研究員
	楠原 一	三重県保健環境研究所 微生物研究課	主任研究員
	片山正彦	三重県保健環境研究所 微生物研究課	総括研究員

研究要旨

三重県はリケッチア感染症である日本紅斑熱患者報告数が全国 1 位であり、患者の居住地域から三重県南部に原因となるリケッチア保有ダニの存在が推定されるが、県下全域における実態は不明である。そこで、三重県下の日本紅斑熱患者数が多い地域において捕獲されたニホンジカ付着マダニを採取し、遺伝子検出を行った。

その結果、三重県下の日本紅斑熱患者多発地域において捕獲されたマダニ類 48 匹のうち 5 匹で *R.japonica* が検出された。これは、他県における既報と比較して高率であった。

A. 研究目的

三重県はリケッチア感染症である日本紅斑熱患者報告数が全国 1 位であり、患者の居住地域から三重県南部に原因となるリケッチア保有ダニの存在が推定されるが、県下全域における実態は不明である。また、日本紅斑熱は比較的新しい疾病であるため感染リスクや感染予防に関して不明な点が多く、公衆衛生学的見地からも実態把握が必須である。そこで、以下の点について研究を実施した。

- ・日本紅斑熱リケッチア保有ダニの分布状況を明らかにし、県内における日本紅斑熱発生のリスクについて把握・評価。

B. 研究方法

三重県下の日本紅斑熱患者数が多い地域において捕獲されたニホンジカ付着マダニを採取し、PCR 法およびダイレクトシーケンス法によりマダニの同定、リケッチアの保有状況について調査した。

C. 研究結果

ニホンジカ付着のマダニ類はフタトゲチマダニ *Haemaphysalis longicornis* およびキチマダニ *H.flava* が優占種であった。また、マダニの約 2 割から *Rickettsia* 属由来遺伝子が検出(48 検体中 9 検体)され、約半数(9 検体中 5 検体)が *R.japonica* 由来遺伝子と同定された。

D. 考察

患者多発地域で採取されたマダニの *R.japonica* 保有率は他県の報告例と比較して高率であった。日本紅斑熱の患者発生に関しては、マダニの刺咬が原因であるが、それに至るまでの状況(生活環境、習慣、従事する職業等)は明確ではない。今回調査を実施した地域は県内でも人口に比して患者が多く認められる場所であることから、生活習慣等によらず、単純に *R.japonica* 保有マダニの率が高いため患者数が多いことも考えられる。今後、他地域の調査結果から患者発生に関するリケッ

チア保有マダニの役割を明らかにしたい。

E. 結論

三重県下の日本紅斑熱患者多発地域において捕獲されたマダニ類に *R.japonica* 保有個体を認めた。また、*R.japonica* 保有マダニの比率は、他県における既報と比較して高率であった。

F. 健康危険情報

特に認めない

G. 研究発表

1.学会発表

第67回日本衛生動物学会西日本支部大会・伊勢志摩地方におけるマダニ類のリケッチア保有状況・赤地重宏、楠原 一、片山正彦、山口哲夫、坂部茂俊

平成 24 年度東海乳酸菌研究会・日本紅斑熱のリスク地域評価に関する研究・赤地重宏、楠原 一、片山正彦、山口哲夫

2.論文発表

なし

富山県のつつが虫病調査

研究協力者	名古屋 真弓	富山県衛生研究所	ウイルス部	主任研究員
	稲崎 倫子	富山県衛生研究所	ウイルス部	研究員
	山内 健生	富山県衛生研究所	がん研究部	主任研究員
	渡辺 護	国立感染症研究所	客員研究員	
		(富山県衛生研究所)	がん研究部	技師)
	滝澤 剛則	富山県衛生研究所	ウイルス部	部長

研究要旨 過去につつが虫病が疑われたものの、3つの型 (Karp,Kato,Gilliam) の抗体価からは判断できなかった患者の血清を再調査したところ、1例は Kawasaki 型に対する IgM 抗体が陽性であり、つつが虫病であったと考えられた。抗体の検出は少なくとも 5 つの型について行うこと、ペア血清を用いることが重要であることが再認識された。

これまでに患者、野生げっ歯類から検出されたつつが虫病リケッチア 56kDa 蛋白の塩基配列について比較したところ、Kawasaki 型については配列が一致しており、県内の広範囲に同じタイプの Kawasaki 型が分布している可能性が示唆された。一方、Karp 型については、患者から得られた配列と野生げっ歯類から得られた配列は異なっており、異なる Karp 型を持つツツガムシのコロニーが存在していると考えられた。

A.研究目的

つつが虫病は、リケッチア的一种であるつつが虫病リケッチア *Orientia tsutsugamushi* を保有するツツガムシによって媒介される疾患であり、症状は発疹、発熱、リンパ節腫脹などである。日本では年間数百人の患者が発生している。血清型は主に5つの型 (Karp, Kato, Gilliam, Kawasaki, Kuroki) が知られている。富山県では、毎年数名のつつが虫病患者が報告されているが、その大部分は県東部の黒部川扇状地で秋冬に発生する Kawasaki 型と、全県で春に散発する Karp 型である。

富山県では 2005 年から 5 つの型について抗体検査を行っているが、それ以前は 3 型

(Karp, Kato, Gilliam) に対する抗体しか検査していなかったため、Kawasaki 型や Kuroki 型にしか抗体が上昇していない患者であった場合、診断できなかった可能性がある。そこで、過去の患者について Kawasaki と Kuroki 型について抗体を測定し、いずれかにのみ抗体が上昇していた例がなかったか確認することを目的とした。

また、富山県内で検出されたつつが虫病リケッチアの詳細な遺伝子解析はこれまで不十分であった。そこで、これまで検出されたリケッチアの塩基配列を比較し、富山県における流行型の詳細を明らかにすることを目的とした。

B.研究方法

1. 過去のつつが虫病疑い検体の再確認

つつが虫病疑いの患者血清のうち、3株 (Karp, Kato, Gilliam) に対する抗体価 (IgM + IgG) が全て 10 倍未満で、つつが虫病と判断できなかった 18 症例 (1992 年から 1997 年までの 27 検体) を用いた。血清を 10 倍から 2 倍階段希釈して間接蛍光抗体法を行い、Kawasaki 型と Kuroki 型に対する IgM 抗体価、IgG 抗体価をそれぞれ測定した。

2. つつが虫病リケッチアの遺伝子解析

これまでに患者、野生げっ歯類から PCR で検出されたつつが虫病リケッチアについて、ダイレクトシーケンス法により遺伝子解析を行った。患者は 2005 年から 2012 年までの 15 名、野生げっ歯類は 7 個体の脾臓から塩基配列を得た。さらに、過去に Karp 型感染が疑われた患者のうち、血液 DNA の保存されていた 1993 年から 1995 年の 6 名 (12 検体) について PCR を行い、陽性の検体は遺伝子解析を行った。なお、PCR はつつが虫病リケッチア 56kDa 蛋白を対象とした系 (1st PCR : primer 34/55、nested PCR : primer 10/11) を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C.研究結果

1. 過去のつつが虫病疑い検体の再確認

27 検体の抗体価を表 1 に示す。抗体価 10 倍以上を示したのは 2 検体であった。患者 No.1 では急性期血清しか得られなかったが、Kawasaki 型に対する IgM 抗体価が 80 倍となり、つつが虫病と判断される抗体陽性の

基準 (シングル血清の場合、IgM 抗体価 80 倍以上を陽性とする) に合致した。なお、Kawasaki 型に対する IgG 抗体価は 10 倍であった。

患者 No.13 は、1 回目の採血で Kawasaki 型に対する IgM 抗体価が 10 倍となったが、2 回目の採血での抗体価はいずれも 10 倍未満であった。従って、抗体陽性の基準 (ペア血清の場合、IgM 抗体価または IgG 抗体価が 4 倍以上上昇したものを陽性とする) を満たさず、つつが虫病とは判断できなかった。

患者 No.5 は、当時の検査結果で急性期血液 PCR 陽性となっていたが、急性期・回復期血清での抗体上昇は全くみられなかった。

2. つつが虫病リケッチアの遺伝子解析

つつが虫病リケッチアの塩基配列が得られた 2005 年から 2012 年までの患者 15 名の概要を表 2 に、野生げっ歯類 7 個体の概要を表 3 に示す。得られた塩基配列を用いた系統樹を図 1 に示す。2005 年から 2012 年までに発生した患者の Kawasaki 型の塩基配列 420bp は、発生地に関わらず全て 100%一致した。さらに、2010 年につつが虫病流行地 (黒部川扇状地) で捕獲した野生げっ歯類 2 個体から得られた配列とも一致した。

患者から得られた Karp 型の塩基配列 (447bp) は、いずれもサブタイプである Japanese Karp type 1 (JP-1 型) に近縁であった (図 1)。2011 年の患者 No.12 はつつが虫病流行地 (黒部川扇状地) での感染、2012 年の患者 No.14 は岐阜県での感染が疑われ、両者の配列は 1 塩基異なっていた。一方、流行地で 2006 年と 2010 年に捕獲した野生げっ歯類 4 個体の脾臓から得られた Karp 型の配列は互いに 100%一致したが、患者の配