

列とは異なり（相同性 98.4%）、野生げっ歯類は JP-2 型に近縁であった。そこで、さらに過去の患者について確認するため、1993 年から 1995 年に Karp 型感染が疑われた患者の血液 DNA について PCR を行ったところ、1995 年の 1 検体から配列が得られた（図 1、patient1995）。この配列は 2011 年の患者 No.12 の配列と一致しており、患者発生地は No.12 と同じ地域であった。

野生げっ歯類 1 個体（No.1868）から得られた配列は、いずれの型とも異なっていた。LX-1 株とは相同性 83.5%であった。

D. 考察

今回、過去につつが虫病が疑われたものの、3 型（Karp, Kato, Gilliam）の抗体価からは判断できなかった患者 18 例について再調査したところ、1 例は Kawasaki 型に対する IgM 抗体が陽性であったことから、つつが虫病であったと考えられた。これにより、3 つの型だけを抗原に用いると患者を見逃す可能性が示唆された。また、本症例では急性期血清しか得られなかったが、回復期血清が得られれば、抗体の上昇が確認できた可能性があった。ペア血清の重要性が改めて示唆された。従って、単一血清だけを用い、3 つの型に対する抗体価でのみ判断すると、つつが虫病と判断できない可能性が高くなると考えられた。

患者 No.13 では、わずかに IgM 抗体が検出されたが、回復期での上昇がなかったことから、非特異反応であったと考えられた。

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、シークエンスを行っておらず、抗体価上昇が全くみられなかったことから、非特異増幅であった可

能性が考えられた。PCR 陽性であっても、急性期で抗体陰性であった場合、ペア血清による抗体上昇を確認することの重要性が示唆された。また、できる限り塩基配列の確認をする必要があると考えられた。

これまでに患者、野生げっ歯類から得られたつつが虫病リケッチアの塩基配列を比較したところ、少なくとも黒部川扇状地と富山市、立山町、上市町については同じタイプの 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、同じつつが虫病流行地（黒部川扇状地）であっても、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いた。また、隣県である岐阜県での感染が疑われた例から得られた Karp 型は、富山県内で感染した例から得られた配列とはわずかに異なっていた。従って、異なる Karp 型を持つツツガムシのコロニーが局所的に存在していると考えられた。

日本の Karp 型は、サブタイプごとに保有ツツガムシが異なると考えられており、JP-2 はフトゲツツガムシから、JP-1 はアラトツツガムシから分離されている（多村，1999，日本細菌学会誌 54:815-832；SADI 組織委員会編，2007，ダニと新興感染症）。今回、富山県で JP-1 と JP-2 が存在していることが明らかになった。なお、過去の調査では県内でフトゲツツガムシとアラトツツガムシが確認されている（富山県厚生部公衆衛生課，1984，富山県におけるつつが虫病）。

富山県においては、ネズミから多数のフトゲツツガムシが得られ、Karp 型も分離されていた（富山県厚生部公衆衛生課，1984，

富山県におけるつつが虫病)にもかかわらず、Karp 型患者の発生が少ないことが謎であった(石倉ら, 1997, 富山県衛生研究所年報 20:120-127)。しかしながら、今回の結果により、Karp 型であってもネズミが高頻度に感染している JP-2 と患者が感染した JP-1 で異なっていたと考えられた。今後の課題として、JP-2 はヒトへの病原性が低いのか、富山県ではフトゲツツガムシはあまりヒトに吸着する機会がないのか、JP-2 による患者が本当にいないのか、黒部川扇状地以外での Karp 型患者は JP-1、JP-2 のいずれかなど、さらなる調査を進めていく必要がある。

島根県での調査(田原ら, 2012, 日本獣医師会雑誌 65:535-541)によると、隠岐島で捕獲されたアカネズミから型不明のつつが虫病リケッチアが検出されている。富山県においてアカネズミから確認された型不明の配列が、このリケッチアと関連するのか、今後比較する予定である。

E. 結論

つつが虫病が疑われながら判断できなかった過去の患者について、新たに 2 つの型に対する抗体を再調査したところ、1 例で Kawasaki 型に対する IgM 抗体が陽性となった。他に、低い IgM 抗体価を示したものの、回復期での上昇がなかった症例、当時の検査結果で PCR 陽性となっていたが、抗体価上昇が全くみられなかった症例が確認され

た。従って、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。

これまでに検出されたつつが虫病リケッチアの塩基配列を比較したところ、少なくとも県内の 4 つの地域で同じタイプの Kawasaki 型が分布していた。一方 Karp 型では、ヒトから JP-1 型が、野生げっ歯類から JP-2 型が検出されており、富山県内に JP-1 型を持つアラトツツガムシと JP-2 型を持つフトゲツツガムシのコロニーが存在していると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 学会発表
特になし
2. 論文発表
特になし

H. 謝辞

調査にご協力いただいた富山市保健所、富山県内各厚生センター、健康課の関係各位に深謝いたします。

表 1. 1992～1997 年のつつが虫病疑い患者の抗体価

患者No.	年	発病日	採血日	病日	Kawasaki		Kuroki	
					IgM	IgG	IgM	IgG
1	1992年	11月30日	12月3日	4	80	10	<10	<10
2	1993年	8月1日	8月10日	10	<10	<10	<10	<10
			8月17日	17	<10	<10	<10	<10
3	1993年	8月6日	8月12日	7	<10	<10	<10	<10
			8月25日	20	<10	<10	<10	<10
4	1994年	11月9日	11月12日	4	<10	<10	<10	<10
5	1994年	12月7日	12月7日	1	<10	<10	<10	<10
			1月11日	36	<10	<10	<10	<10
6	1995年	5月21日	5月25日	5	<10	<10	<10	<10
7	1995年	7月21日	7月27日	7	<10	<10	<10	<10
			8月3日	14	<10	<10	<10	<10
			8月10日	21	<10	<10	<10	<10
8	1996年	不明	4月8日		<10	<10	<10	<10
			4月11日		<10	<10	<10	<10
9	1996年	5月12日	5月22日	11	<10	<10	<10	<10
10	1996年	5月23日	5月23日	1	<10	<10	<10	<10
11	1996年	不明	10月1日		<10	<10	<10	<10
12	1996年	不明	10月7日		<10	<10	<10	<10
13	1996年	不明	11月6日		10	<10	<10	<10
			11月12日		<10	<10	<10	<10
14	1996年	11月30日	12月5日	6	<10	<10	<10	<10
15	1997年	5月24日	5月26日	3	<10	<10	<10	<10
16	1997年	5月26日	6月2日	8	<10	<10	<10	<10
17	1997年	不明	7月7日		<10	<10	<10	<10
			7月14日		<10	<10	<10	<10
18	1997年	不明	11月14日		<10	<10	<10	<10
			11月21日		<10	<10	<10	<10

表 2. 患者から得られたつつが虫病リケッチア遺伝子の型別

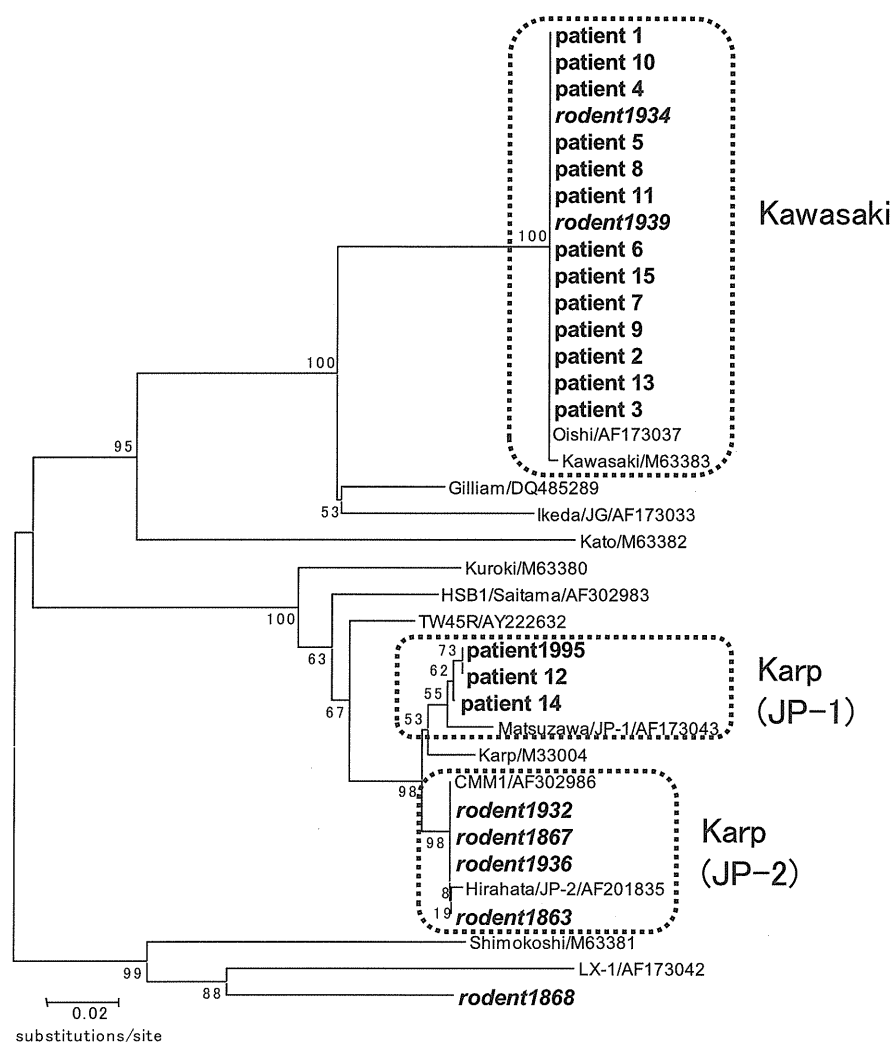
患者No.	発症年月	推定感染地	型別
1	2005年10月	入善町	Kawasaki
2	2005年11月	入善町	Kawasaki
3	2005年11月	入善町	Kawasaki
4	2006年11月	入善町	Kawasaki
5	2008年10月	入善町	Kawasaki
6	2008年11月	入善町	Kawasaki
7	2009年10月	入善町	Kawasaki
8	2009年10月	入善町	Kawasaki
9	2009年11月	黒部市	Kawasaki
10	2009年11月	富山市	Kawasaki
11	2010年11月	立山町	Kawasaki
12	2011年5月	黒部市／朝日町	Karp
13	2011年11月	上市町	Kawasaki
14	2012年4月	岐阜県	Karp
15	2012年11月	入善町	Kawasaki

はつつが虫病流行地(黒部川扇状地)

表 3. 野生げっ歯類から得られたつつが虫病リケッチア遺伝子の型別

番号	捕獲年月	地点	種類	性別	型別
1863	2006年11月	入善町	アカネズミ	♀	Karp
1867	2006年11月	入善町	アカネズミ	♀	Karp
1868	2006年11月	入善町	アカネズミ	♀	不明型
1932	2010年11月	入善町	アカネズミ	♀	Karp
1934	2010年11月	入善町	アカネズミ	♂	Kawasaki
1936	2010年11月	入善町	アカネズミ	♀	Karp
1939	2010年11月	入善町	アカネズミ	♂	Kawasaki

図 1. つつが虫病リケッチア 56kD 蛋白遺伝子の系統樹



患者は patient no. で、野生げっ歯類は rodent no. で示す。1995 年の患者は “patient1995” で示す。参考株は株名 / (型別 /) accession no. で示す。ブートストラップ反復は 1,000 回行い、分岐点の数値はブートストラップ値(%)を示す。

和歌山県内のマダニ類の日本紅斑熱リケッチア保有状況調査

研究協力者	寺杣文男	和歌山県環境衛生研究センター
	仲浩臣	同
	山本眞司	同

研究要旨

和歌山県における日本紅斑熱の発生地域は、これまで県南部に限定されていたが、2010年以降、新たに県北部を含む大阪府との県境付近でも発生が確認されるようになった。県北部における日本紅斑熱リケッチアの浸淫状況について検討するため、マダニ類の捕獲調査を実施した。7種計100匹を採取したが、PCR法によりいずれも *R.japonica* 遺伝子は検出されなかった。

A.研究目的

近年、和歌山県ではほぼ継続的に日本紅斑熱の発生がみられており、1999年以降の患者届出数は累積で120例を超える。患者の感染推定地域は、1994年に県内の初発例が確認されて以降、県南部に限定されていたが、2010年以降、県北部周辺での感染が疑われる症例も確認されるようになった。県北部において *R.japonica* を保有するマダニ類の生息の有無、分布密度等についての知見を得る為、マダニ類の捕獲調査を行った。

B.研究方法

1.マダニ類の採取

2012年5月から9月にかけて、旗振り法によりマダニ類の採取を行った。採取場所は2010年以降確認された患者の感染推定地域の中から、和歌山県と大阪府を隔てる和泉山脈内の麓に位置する岩出市北部の山林内とした。

2.リケッチア遺伝子の検出とマダニの同定

採取されたマダニ類について、形態学的に発育ステージを分類した後、各個体毎に破砕し、市販のキットを用いてDNA抽出を行った。PCR法によりリケッチアの17kDa、GltA、及びOmpA遺伝子の検出を試み、3領域共に陽性の場合には、ダイレクトシーケンス法により増幅産物の塩基配列を解析し、*R.japonica* 遺伝子との比較を行った。またマダニ種の同定については、マダニミトコンドリア遺伝子の一部塩基配列を解析し、国立感染症研究所細菌第一部の所有するマダニ類の mt-rrs 配列パネルと比較することにより行った。

C.研究結果

マダニ類は成虫・若虫を中心に、3属7種計100匹を採取した(表1)。ヤマアラシマダニが最も多く、全体の約1/3を占めた。採取時期別では、フタトゲチマダニは5~7月に多く採取され、逆にキチマダニは8、9月に多い傾向がみられた。PCR法によ

り、フタトゲチマダニでは 18 匹中 18 匹、ヤマアラシチマダニでは 34 匹中 4 匹、そしてタネガタマダニでは採取された 1 匹から紅斑熱群リケッチア遺伝子が検出された。遺伝子解析の結果、いずれも *R.japonica* 遺伝子とは一致しなかった (図 1)。

D. 考察

2010 年から 2012 年にかけて、和歌山県北部地域周辺では 6 例の日本紅斑熱患者の発生がみられており、*R.japonica* を媒介するマダニの生息が強く示唆されているが、現時点では症例数も少なく、その分布エリアを含め詳細については明らかではない。今回、和泉山脈の麓において実施したフィールド調査では、採取されたマダニ類から *R.japonica* 遺伝子は検出されず、媒介マダニの生息について確証は得られなかった。しかし他県において日本紅斑熱媒介の可能性が疑われている種が、本調査で多く採取されていること、また他県の日本紅斑熱の発生がみられる地域で行われたマダニ類の調査においても *R.japonica* の保有頻度は決して高くないことから、今回の結果が調査地域における日本紅斑熱媒介マダニの生息を否定するものでないことは明らかであり、今後の患者発生の動向も含め、更に現地の実態把握に努めることが必要と思われる。

E. 結論

日本紅斑熱には抗生剤による早期治療が重要であることはいうまでもないが、そのためにはまず、正しく診断されることが必要である。和歌山県において、日本紅斑熱の発生は長く県南部の限られた地域にしか見られなかったにも拘らず、2010 年に県北部での感染が疑われる最初の症例が確認されて以降、3 年間に継続して計 6 例の患者が確認された。このことは医療現場における日本紅斑熱に対する認識の重要性を伺わせる。他の地域も含め、地域の感染リスクを正しく把握することが、県内においても課題であると考えられる。

この研究の一部は、和歌山県環境衛生研究センターの「健康と環境を守る調査研究事業」により行った。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 学会発表

寺杣文男. 日本紅斑熱の発生状況と予防. 平成 24 年度日本獣医師会 獣医学術学会年次大会. 大阪市

2. 論文発表

論文発表は特になし

表 1. マダニ類の採取数

		採取日				
		5/22	6/6	7/26	8/21	9/25
<i>A. testudinarium</i> タカサゴキラマダニ	幼虫					
	若虫					
	成虫	4	7	5	1	3
<i>H. flava</i> キチマダニ	幼虫					
	若虫		2	1	8	11
	成虫	1				1
<i>H. formosensis</i> タカサゴチマダニ	幼虫					1
	若虫					
	成虫				1	
<i>H. longicornis</i> フタトゲチマダニ	幼虫					
	若虫	5 (5)	3 (3)	4 (4)	1 (1)	1 (1)
	成虫		1 (1)	2 (2)	1 (1)	
<i>H. hystricis</i> ヤマアラシチマダニ	幼虫			1		
	若虫		4	1	4	5 (1)
	成虫	6	1	6 (3)	6	
<i>I. ovatus</i> ヤマトマダニ	幼虫					
	若虫					
	成虫			1		
<i>I. nipponensis</i> タネガタマダニ	幼虫			1 (1)		
	若虫					
	成虫					

()内は Rickettsia spp 検出数

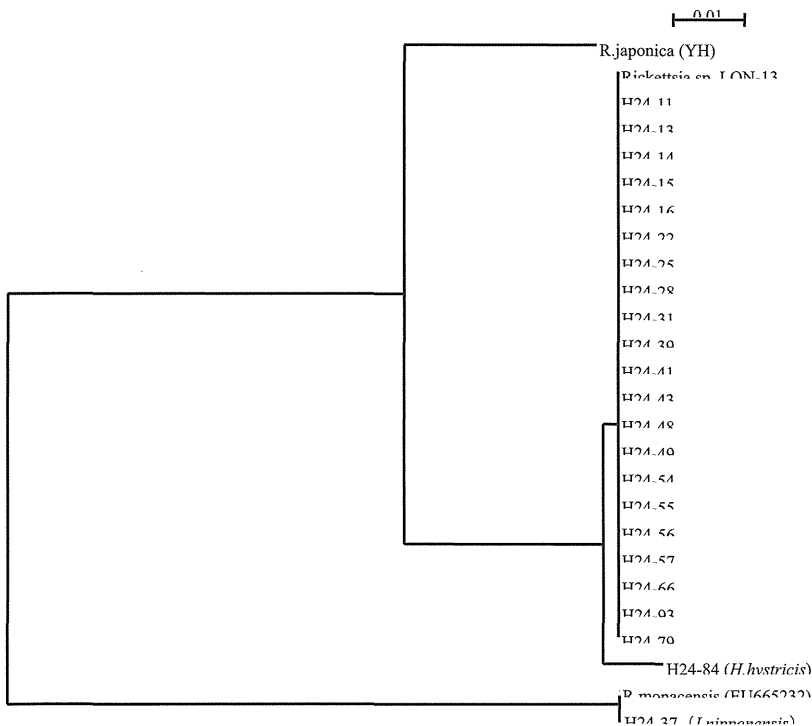


図 1. 検出されたリケッチア遺伝子(OmpA)の塩基配列による系統樹

兵庫県内の紅斑熱群リケッチア浸淫状況に関する調査研究

研究協力者 北本 寛明 兵庫県健康生活科学研究所 健康科学研究センター
感染症部 主任研究員
久本 千絵 兵庫県動物愛護センター 課長補佐
藤原 香次 兵庫県動物愛護センター 三木支所 課長補佐
竹下 勝弘 兵庫県動物愛護センター 龍野支所 課長補佐
村田 由美 兵庫県動物愛護センター 淡路支所 課長
庄田 徹 兵庫県豊岡健康福祉事務所 主任
吉田 昌史 兵庫県健康生活科学研究所 健康科学研究センター
感染症部 部長

研究要旨

毎年日本紅斑熱(JSF : Japanese Spotted Fever)患者の発生が報告される兵庫県において、日本紅斑熱リケッチア(*Rickettsia japonica*)を含む紅斑熱群リケッチア(SFGR : Spotted Fever Group *Rickettsia*)の存在状況を把握するため、兵庫県内でマダニを捕獲し、種を同定すると共に紅斑熱群リケッチア保有状況を調査した。

2012年7月に淡路島南部地域の植生から得られたマダニ91匹の優勢種はフタゲチマダニ(97.8%)であった。17-kDa膜タンパク質をコードする遺伝子領域のPCR検査では、SFGRおよび*R. japonica*の遺伝子は検出されなかった。

2012年8月に県内5つの地点で収容されたイヌ5頭から得た、飽血後のマダニ計14匹の主要な種はフタゲチマダニ(71.4%)であった。PCRで計4匹がgltA遺伝子(citrate synthase-encoding gene)領域のSFGRが陽性、内2匹が17-kDa膜タンパク質をコードする遺伝子領域のSFGRとJSFが陽性と判断されたが、検出されたgltA遺伝子領域の塩基配列を確認した結果、*R. japonica*と100%の相同性を示すものはなかった。この内3匹のマダニから検出されたgltA遺伝子領域のSFGR遺伝子は、ヒトへの感染が報告されていない*Rickettsia* sp. Lon-12及び*Rickettsia* sp. Mie180と100%の相同性を示し、残り1匹から検出されたgltA遺伝子領域のSFGR遺伝子は、ヒトへの感染が報告される*Rickettsia felis*と100%の相同性を示した。

A. 研究目的

兵庫県では、近年*R. japonica*を病原体とするJSF患者が毎年確認され、2005年には死者も報告された。2007年から2010年に兵庫県内で発生したJSF患者は、ほとんどが淡路島地域での発生であったが、1名は兵庫県の淡路島地域以外の本州地域でマ

ダニに刺咬されて発症した。

これらの状況から、JSF患者がこれまで多く発生している淡路島地域の他に、兵庫県本州地域も含め、兵庫県内のJSFリケッチアの存在状況を評価し、感染予防や早期治療に資することを目的に調査をおこなった。

これまでに当研究センターで実施した兵庫県内の JSF が疑われる患者の検査データ、およびイヌの血清中抗 *R. japonica* 抗体価のデータを補完するために、兵庫県内のマダニを捕獲し、その種を調べると共に SFGR の保有状況を調査した。

B. 研究方法

2012年7月に兵庫県の淡路島南部地域の植生で、旗振り法と捕虫網により捕獲したマダニ(植生のマダニ)91匹、及び2012年8月に兵庫県動物愛護センターに収容されたイヌから得た飽血後のマダニ(飽血マダニ)14匹を調査対象とした。

植生のマダニは、南あわじ市の2地域から得られた計70匹、洲本市の2地域で得られた計21匹を用いた。

飽血マダニは、南あわじ市で収容されたイヌ1頭から得られた1匹、洲本市でのイヌ1頭から3匹、川西市でのイヌ1頭からの4匹、たつの市でのイヌ2頭からの6匹を用いた。

マダニは形態学的に同定した後、紅斑熱群リケッチア症診断マニュアル(平成12年国立感染症研究所)(以下、感染研マニュアル)に従い体表を消毒・洗浄後、マダニを細切して Vero 細胞に接種培養し、得られた培養物より核酸を抽出して PCR に用いた。

PCR 法は、感染研マニュアルの 17-kDa の膜タンパク質をコードする遺伝子領域を標的とした Nested PCR 法、または Inokuma ら(2008)および Rous ら(1997)の *gltA* 遺伝子領域を標的とした方法を用い、JSF リケッチア および SFGR の遺伝子の検出を行った。得られた PCR 産物の一部は塩基配列を決定し、NCBI (National Center

for Biotechnology Information)の BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)により解析を行った。

C. 研究結果

マダニの形態学的同定では、植生のマダニ 91 匹のうちフタトゲチマダニが 97.8%(91 匹中 89 匹)を占めた(表 1)。飽血マダニ 14 匹のうち、フタトゲチマダニは 71.4%(14 匹中 10 匹)であったが、他の 4 匹については、状態が悪く同定困難であった(表 2)。

遺伝子検査の結果について、植生のマダニに対して行った、17-kDa の膜タンパク質をコードする遺伝子領域を標的とした PCR 法では、特異的な遺伝子の増幅は認めなかった。

飽血マダニ 14 匹に対して行った PCR 検査では、17-kDa の膜タンパク質をコードする遺伝子領域を標的とした PCR 法で、淡路島の 2 地域(南あわじ市 1 匹、洲本市 3 匹)の飽血マダニ計 4 匹中、それぞれの地域で 1 匹ずつ、計 2 匹が SFGR と JSF リケッチア(*R. japonica*)が陽性となった(表 2)。更に行った、*gltA* 遺伝子領域を標的とした SFGR 遺伝子を検出する PCR 法では、前述の淡路島の 2 匹が SFGR 陽性であったことに加えて、兵庫県本州地域の川西市(4 匹中 1 匹)とたつの市(6 匹中 1 匹)で、それぞれ 1 匹の陽性が確認された(表 2)。

gltA 遺伝子領域の PCR 法で、SFGR 陽性となった 4 匹について、PCR 増幅産物の塩基配列(322bp)を確認したところ、本州地域の 1 匹(川西市)を除く 3 匹(南あわじ市、洲本市、たつの市)は 100%同一の配列であり、BLAST 解析で *R. japonica*、および

表1 淡路島南部地域の植生から得られたマダニの同定結果

マダニを採取した南あわじ市と洲本市のそれぞれ2地点は、①と②として示した。
飽血したマダニは認められなかった。

マダニ 採取地域	種類	マダニの同定結果		
		発育 ステージ	雌雄の別	匹数
南あわじ市①	フタトゲチマダニ (<i>Haemaphysalis longicornis</i>)	成ダニ	雌	14
			雄	18
		若ダニ	雌	6
			雄	3
		幼ダニ	不明	4
南あわじ市②	フタトゲチマダニ (<i>H. longicornis</i>)	成ダニ	雌	12
			雄	9
洲本市①	フタトゲチマダニ (<i>H. longicornis</i>)	幼ダニ	不明	2
		成ダニ	雌	10
			雄	7
洲本市②	フタトゲチマダニ (<i>H. longicornis</i>)	若ダニ	雌	3
		成ダニ	雌	1
合計				91

表2 動物愛護センターに収容されたイヌから得られた飽血したマダニの検査結果

収容地域について、たつの市では異なる2地域で1頭ずつイヌが収容されたため、それぞれの地域を①と②として示した。

他の市については、それぞれ1頭のイヌから得られたマダニについて同様に示した。

Nested PCR¹⁾は、17-kDa膜タンパクをコードする遺伝子領域、Nested PCR^{2,3)}は、gtAをコードする遺伝子領域を標的とした方法を示した。

イヌ 収容地域	マダニの同定結果			遺伝子検査結果			
	種類	発育 ステージ	雌雄の別	Nested PCR ¹⁾		Nested PCR ^{2,3)}	
				1 st PCR SFGR	2 nd PCR JSF	1 st PCR SFGR	2 nd PCR SFGR
南あわじ市	フタトゲチマダニ (<i>H. longicornis</i>)	成ダニ	雌	○	○	○	○
洲本市	マダニ属 不明 (<i>Ixodes</i> sp.)	成ダニ	雌	○	○		○
	チマダニ属 不明 (<i>Hemaphysalis</i> sp.)	幼ダニ	不明				
川西市	フタトゲチマダニ (<i>H. longicornis</i>)	成ダニ	雌				
			雌				
		若ダニ	雄				
たつの市①	フタトゲチマダニ (<i>H. longicornis</i>)	成ダニ	雌				
			雌				
たつの市②	フタトゲチマダニ (<i>H. longicornis</i>)	成ダニ	雌				○
			雌				
			雌				
			雌				
合計			14	2	2	1	4

1) 国立感染症研究所、地方衛生研究所全国協議会：リケッチア感染症診断マニュアル(2000)

2) V. Roux, et al., Int J Syst Bacteriol, 47(2), 252-261(1997)

3) H. Inokuma, et al., J Wildl Dis, 44(1), 164-167(2008)

Rickettsia heilongjiangensis と 99%、*Rickettsia* sp. Mie180 および *Rickettsia* sp. lon-13 と 100%の相同性を示した。残り 1 匹は、*Rickettsia felis* と 100%の相同性を示した。

D.考察

淡路島南部地域で採取された植生のマダニの 97.8%(91 匹中 89 匹)がフタトゲチマダニであったことから、この種は今回の調査地域において 7 月の優勢種である可能性が考えられる(表 1)。

本州地域のマダニの優勢種については、今回の本州地域で調査したマダニが、8 月に採取した飽血マダニのみであり、調査対象としたイヌが収容された地域と個体数が少ないことや、検査した飽血マダニ数が限られていること、そして調査対象がイヌを吸血したマダニに限定されていることから不明であった。一方、飽血マダニの内、兵庫県本州地域で採取された種はフタトゲチマダニが多く、この種は本州地域にも多く存在すると思われる(表 2)。

gltA 遺伝子領域の PCR で SFGR 陽性となった、淡路島地域の飽血マダニ 2 匹と本州地域のたつの市の 1 匹は、この遺伝子配列が 100%同一配列であったが、たつの市由来の飽血マダニからは、17-kDa 膜タンパク質をコードする遺伝子領域を標的とした PCR で特異的遺伝子が検出されなかったことについて、回収できたリケッチア遺伝子量が淡路島地域で陽性となった飽血マダニに比べて少なかったためではないかと考える。

この 3 匹から得られた gltA 遺伝子領域の SFGR 遺伝子を BLAST 解析し、*Rickettsia*

sp. Mie180 および *Rickettsia* sp. lon-13 と 100%の相同性を示し、*R. japonica* の同遺伝子配列とは 99%の相同性であったことから、*R. japonica* が兵庫県本州地域に存在することと関連付けることはできなかった。

gltA 遺伝子領域の SFGR 遺伝子が 100%の相同性を示したこれらのリケッチアが、ヒトへ感染した報告は確認されなかった。

なお、今回の遺伝子解析の対象とした遺伝子領域(322bp)は 1 つであり、遺伝子型別をより正確に判断するためには他の遺伝子領域についても今後確認する必要があると思われる。

一方、川西市から得られた飽血マダニ 1 匹は、増幅された gltA 遺伝子領域の配列の BLAST 解析により *R. felis* と 100%一致したことから、*R. felis* がこの地域に存在している可能性が考えられる。*R. felis* はヒトへの感染例が報告されていることから、イヌやネコからのマダニを介したヒトへの感染に、注意を要するものと思われる。

ネコ属の意味合いを持つ単語の“felis”の名前がつくりケッチア遺伝子がイヌを吸血したマダニから検出されたことについて、イヌを収容していた犬舎の構造上、施設内でネコを吸血していたマダニが、イヌに移動して吸血した可能性はあまり考えられない。おそらくマダニがイヌを吸血する以前に、*R. felis* に感染したネコなどの動物を吸血したか、*R. felis* を保有する親ダニから垂直伝播したことにより、*R. felis* を保有していたのではないかと推測されるが今回の調査では原因は不明である。

前述の飽血マダニ 3 匹と同様に、他の遺伝子領域についても遺伝子配列を決定し、今後確認する必要があると思われる。

これまでの調査で、2007年4月から2011年3月に、兵庫県の健康福祉事務所を通じて得られたJSFが疑われる患者のペア血清34検体について実施した検査、およびJSF感染地に関するデータでは、兵庫県でJSF多発地域とされる淡路島以外の地域で、兵庫県の本州地域に位置する三田市内で感染したJSF患者1名が2008年に発生している。このことから、兵庫県の本州地域に*R. japonica*が存在していると考えられた。

更に、2010年1月から4月に兵庫県動物愛護センターに収容されたイヌ93頭より得た血清の、抗*R. japonica* YH株抗体価調査では、兵庫県の淡路島地域および兵庫県の本州地域である養父市と丹波市で、国内で同様にイヌの調査を行った多くの報告で示される、最も高いIgG抗体価である1:320を超える個体が確認された。

これらから、兵庫県の本州地域に*R. japonica*が存在することを疑ったが、イヌの血清中*R. japonica*に対する抗体検査では、他のSFGRと交差反応することが報告(Tabuchiら、2007)されていることから、兵庫県本州地域のマダニから直接*R. japonica*の存在を確認する必要があると考えられた。

今回のマダニの調査では、*R. japonica*の存在を確認することはできなかったが、更に調査地域と対象を広げて調査を継続すべきと思われる。

一方、ヒトに感染し発症する*R. felis*の可能性のある遺伝子がマダニから検出されたことから、ヒトの発症者の発生動向に注意する必要があると思われる。

E.結論

2012年7月に兵庫県淡路島南部地域4地点から得られた91匹のマダニの97.8%がフタトゲチマダニであり7月のこの地域の優勢種の可能性が高いと考える。

同年8月に兵庫県本州域を含む兵庫県内5地点のイヌから得られた飽血後のマダニ14匹の内、71.4%はフタトゲチマダニであり、本マダニ種は兵庫県本州地域にも比較的多く存在している可能性が考えられる。

遺伝子検査の結果、*R. japonica*と100%相同性を示す遺伝子は検出されなかったものの、*gltA*遺伝子領域のPCRで得られたSFRG遺伝子(322bp)の解析の結果、兵庫県本州地域である川西市のイヌを吸血した飽血マダニ1匹から検出された遺伝子は、ヒトへの感染事例が報告される*R. felis*と100%一致することが分かった。

我々の行った、兵庫県での過去のヒトJSF患者感染地域のデータと、収容犬の血清中の抗*R. japonica*抗体価の検討で、兵庫県の本州地域に*R. japonica*が存在する可能性が考えられたが、今回のマダニ調査では、*R. japonica*が兵庫県の本州地域に存在することを確認するには至らなかった。

しかし、これまでに三田市内でJSFに感染した患者が発生していることから、更に調査を進め、兵庫県内の日本紅斑熱リケッチアを含めた紅斑熱群リケッチアの存在状況を把握し、データを示すことにより感染予防と早期治療について注意喚起をする必要があると思われる。

F.健康危険情報

この調査の後であるが、神戸市内で日本紅斑熱患者が発生し、平成25年1月患者発生

の届出がされており、これまでに JSF 感染がほとんど報告されない兵庫県本州地域においても、更に JSF の感染に関して注意を要すると思われる。

G.研究発表

1.学会発表

・北本寛明、高井伝仕、山本昭夫、近平雅嗣田淵喜昭、栗岡稔、神田郁、久本千絵、清水弥生、中村啓. 兵庫県域の日本紅斑熱発生状況とイヌ血清の抗体価の比較及び評価. 平成 24 年度 兵庫県公衆衛生協会中央研究会 研究発表演題要旨集, p23-24, (2012.11. 神戸市)

・北本寛明、久本千絵、藤原香次、竹下勝弘、村田由美、庄田徹、吉田昌史. 兵庫県における紅斑熱群リケッチアの浸淫状況調査. 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, (2012.12. 大津市)

2. 論文発表

論文発表は特になし

四国地方における日本紅斑熱診断技術研修

研究協力者	木田浩司	岡山県環境保健センター
研究分担者	岸本壽男	同
研究協力者	松本道明	高知県衛生研究所
	松本一繁	同

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、感染症法では四類感染症に分類される重篤な熱性発疹性感染症である。本感染症の実験室診断を実施しているのは一部の大学と地方衛生研究所のみであるが、これらの施設であっても人事異動等による技術の低下・喪失で診断が困難となるケースが問題となっている。そこで、2012年7月23日～24日に、四国地方の4県(香川県、高知県、愛媛県及び徳島県)を対象とした日本紅斑熱の診断技術研修会を開催し、患者血清からの蛍光抗体法による抗リケッチア抗体の検出法及び real-time PCR 法を用いた *R. japonica* 遺伝子の検出法等について講義を行った。real-timePCR 法については、血液検体を用い、核酸抽出から標的遺伝子検出・解析までの実習を行った。また、2012年8月16日～17日に、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。採集したマダニ42匹については、real-timePCR 法による *R. japonica* 遺伝子の検出を試みたが、全て陰性であり、感染源の特定はできなかった。

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る。本感染症の実験室診断を実施しているのは一部の大学と地方衛生研究所のみであるが、これらの施設であっても人事異動等による技術の低下・喪失で診断が困難となるケースが問題となっている。そこで今回、四国地方の4県(香川県、高知県、愛媛県及び徳島県)を対象に、本感染症の検査技術研の移転を目的として、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採集し、形態学的な種同定法及びマダニからの *R. japonica* 遺伝子の検出法について実習を行った。

B.研究方法

1) 日本紅斑熱診断技術研修会

2012年7月23日、香川県、高知県、愛媛県及び徳島県の日本紅斑熱実験室診断担当者を対象として、日本紅斑熱の診断技術研修会を実施した。講義は患者血清からの蛍光抗体法による抗リケッチア抗体の検出法及び real-timePCR 法を用いた *R. japonica* 遺伝子の検出法について、原理、注意点等を説明した。7月24日には、血液検体を用い、核酸抽出から real-timePCR 法による標的

遺伝子検出・解析までの実習を行った。

2) 感染源調査実習

2012年8月16日～17日、香川県、高知県愛媛県及び徳島県の日本紅斑熱実験室診断担当者を対象として感染源調査実習を実施した。

①マダニの捕獲

香川県における日本紅斑熱患者の感染推定地で、旗振り法によるマダニの捕獲法について実習を行った(図1)

②マダニ種の形態学的同定

捕獲したマダニについては、香川県環境保健研究センターで実体顕微鏡を用いて形態学的同定を行った(図2、3)。

③マダニからの *R. japonica* 遺伝子の検出

マダニからの遺伝子抽出法及び real-timePCR による *R. japonica* 遺伝子検出法について講習を行った。後日、香川県環境保健研究センター及び岡山県環境保健センターで検体を処理し、*R. japonica* 遺伝子の検出を試みた。

マダニを1.5ml マイクロチューブに入れ、PBSを1ml加えて攪拌後、上清を除去した。新たに10 μ lのPBSを加え、マダニを薬匙で圧潰後、InstaGeneMatrix (Bio-rad) を200 μ l加えて56 $^{\circ}$ Cで30分間処理した。良く攪拌し、100 $^{\circ}$ Cで8分間処理後、12,000rpmで3分間遠心し、上清を real-timePCR に供した。

Real-timePCR法は、Hanaoka(2009)らの報告をもとに実施した。*R. japonica* 特異的とされる216bp領域をターゲットに、Primer

及び Taqman probe は、それぞれ SpRija5' = GAACACGATGATACACCTCTGCA, SpRija3' = GATTAGCCTCTGTCTTCAGTAGTATTTTA ACT, SpRijaMGB = FAM-TAGCGTCTATTCTAAGTAAAG-NFQ-MGB を使用した。また、Positive control として合成 Oligo = GAACACGATGATACACCTCTGCATATAGC GTCTATTCTAAGTAAAGAAAATATAGTTA AAATACTACTGAAGACAGAGGCTAATCc を使用し、定性分析を行った。

C.研究結果

1) 日本紅斑熱診断技術研修会

香川県、高知県、愛媛県及び徳島県の日本紅斑熱実験室診断担当者に、患者検体からの蛍光抗体法を用いた抗リケッチア抗体の検出法及び real-timePCR 法を用いた *R. japonica* 遺伝子検出法についての技術が伝達できた。

2) 感染源調査実習

マダニは42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) 8匹、*H. longicornis* (フタトゲチマダニ) 1匹、*H. hystrix* (ヤマアラシチマダニ) 28匹、*H. formosensis* (タカサゴチマダニ) 5匹であった(表1)。

また、マダニから real-timePCR による *R. japonica* 遺伝子の検索を試みたが、全て陰性であった。

D.考察

近年、地方衛生研究所では、人事異動等による技術の低下により、重大な疾病の実験室

診断が困難となるケースが度々指摘されている。今回、四国地方の日本紅斑熱実験室診断担当者へ、患者検体からの抗体測定法及び遺伝子診断法、またマダニの捕獲・同定法、マダニからの遺伝子検出法等について、技術伝達を実施したが、全ての参加自治体が永続的に技術を維持することは現実的には困難であり、今後も必要に応じて同様の研修会を実施する必要があると考えられた。

香川県における日本紅斑熱患者の感染推定地で実施した感染源調査実習で捕獲されたマダニ 42 匹からは *R. japonica* 遺伝子は検出できなかったが、捕獲数が少なく、調査地点は 1 カ所しか設定していないことから、この地域のリケツチア侵淫実態について結論づけるには更に調査を進める必要があると考えられた。

E. 結論

四国地方の日本紅斑熱実験室診断担当者へ患者検体からの抗体測定法及び遺伝子診断法、またマダニの捕獲・同定法、マダニからの遺伝子検出法等について、技術伝達を実施した。また、香川県における日本紅斑熱患者の感染推定地で感染源調査実習を実施したが、*R. japonica* は検出されなかった。しかし、この地域のリケツチア侵淫実態について結論づけるには更に調査を進める必要があると考えられた。

F.健康危険情報 特になし

G.研究発表

学会発表 特になし

論文発表 特になし



図1 旗振り法による調査実習



図2 実体顕微鏡によるマダニの同定



図3 捕獲したタカサゴチマダニ♀

表1 香川県の感染源調査実習で捕獲したマダニと *R. japonica* 検出結果

種 類	捕獲数	発育ステージ				PCR 結果
		♂	♀	若	幼	
キチマダニ (<i>Haemaphysalis flava</i>)	8	0	0	8	0	0
ヤマアラシチマダニ (<i>Haemaphysalis hystrix</i>)	28	13	15	0	0	0
フタトゲチマダニ (<i>Haemaphysalis longicornis</i>)	1	0	1	0	0	0
タカサゴチマダニ (<i>Haemaphysalis formosensis</i>)	5	1	1	3	0	0

岡山県備前保健所東備支所管内で発生した日本紅斑熱事例における感染源調査

研究協力者	木田浩司	岡山県環境保健センター
研究分担者	岸本壽男	岡山県環境保健センター
研究協力者	溝口嘉範	同
	藤井理津志	同
	葛谷光隆	同
	濱野雅子	同

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、感染症法では四類感染症に分類される重篤な熱性発疹性感染症である。岡山県では 2009 年 10 月に初めて患者が報告されて以来、5 名の発症が確認されている。今回我々は、備前保健所東備支所管内の患者居住地域における *R. japonica* を含む SFGR の侵淫実態を明らかにし、感染源を特定することを目的として調査を行った。

調査は 2011 年 6 月、7 月、2012 年 5 月、6 月及び 7 月の 5 回実施した。患者居住地を中心として、半径 10 km に A (患者居住地) ~ E の計 5 地点を設定してマダニを捕獲し、形態観察によって種を同定した。生存個体の一部については L929 細胞及び VERO 細胞を用いてリケッチアの分離を試みた。また、マダニから 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 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。このうち、既知種と一致したものは、クエン酸合成酵素 (*gltA*) 領域についても遺伝子配列を決定し、既知種との比較を行った。

捕獲したマダニは 11 種 900 匹で、検査に供した 391 匹のうち 39 匹から 17kDa 遺伝子が検出された。系統解析の結果、これらはすべて SFGR に属しており、既知種との比較の結果、地点 A (患者の居住地) のヤマアラシチマダニから検出された 1 株は *R. japonica* YH 株、地点 B のヤマトマダニから検出された 1 株は *R. asiatica* IO-1 株、地点 E のタカサゴキララマダニから検出された 2 株は *R. tamurae* AT-1 株とそれぞれ 100% の相同性を示した。*gltA* 領域における既知種との相同性についても、それぞれ 100% であった。また、ヤマアラシチマダニ及びタカサゴキララマダニから L929 細胞及び VERO 細胞による分離株も得られ、これらの遺伝子配列は PCR 検出株と 100% 一致していた。

今回、ヤマアラシチマダニから *R. japonica* が検出されたことで、岡山県内における媒介種が初めて明らかになった。また、捕獲地点が患者居住地であったことから、その病因は *R. japonica* であることが強く示唆された。今後も患者発生地域の調査を実施することで、SFGR の侵淫実態を明らかにし、適切な治療及び予防啓発へ繋げたい。

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。治療が遅れると致命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。患者の届出は、血清診断のみで行われているケースが多いが、SFGR に属するリケッチアの抗原性は *R. japonica* と大きく交差するため、類似の病原性を持つとされる *R. heilongjiangensis*、*R. helvetica*、*R. tamurae* 等の感染例と区別されていないのが現状であり、これらの感染実態を正確に把握するには遺伝子診断が必要である。2009 年 10 月、岡山県南部に位置する倉敷市保健所管内において、県内で初めて日本紅斑熱患者が報告された。2010 年は患者の報告が無かったものの、2011 年 5 月に県東部の備前保健所東備支所管内で、9 月に県南部の備中保健所管内で相次いで報告された (図 1)。いずれの患者も血中抗体の上昇がみられ、倉敷市保健所管内及び備中保健所管内の患者からはいずれも *R. japonica* の遺伝子が検出されたが、備前保健所東備支所管内の患者からは検出されず、病因種が不明であった。そこで今回は、備前保健所東備支所管内の患者居住地域における *R. japonica* を含む SFGR の侵淫実態を明らかにし、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

感染推定時期である 5 月頃に活発に活動するマダニを捕獲するため、調査は 2011 年 6 月、7 月、2012 年 5 月、6 月及び 7 月の 5 回実施した。患者居住地を中心として、半径 10 km に A (患者居住地) ~E の計 5 地点を設定し (図 2)、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) リケッチア分離

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) 及び VERO 細胞 (アフリカミドリザル腎臓上皮由来) 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°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

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) からの報告した

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 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。既知種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 Inokuma (1997)らの報告した RpCS.896f=GGCTAATGAAGCGGTAATAA 及び PpCS.1258n=

ATTGCAAAAAGTACAGTGAAC 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) 捕獲したマダニの種同定

マダニは 900 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) 542 匹、*H. longicornis* (フタトゲチマダニ) 55 匹、*H. hystricis* (ヤマアラシチマダニ) 147 匹、*H. formosensis* (タカサゴチマダニ) 1 匹、*H. kitaokai* (ヒゲナガチマダニ) 23 匹、*H. megaspinosa* (オオトゲチマダニ) 10 匹、*Ixodes turdus* (アカコッ

コマダニ) 7 匹、*I. ovatus* (ヤマトマダニ)、42 匹 *I. nipponensis* (タネガタマダニ) 8 匹、*Amblyomma testudinarium* (タカサゴキララマダニ) 56 匹及び *Dermacentor taiwanensis* (タイワンカクマダニ) 9 匹であった (表 1)。

2) リケッチア分離

捕獲したマダニ 900 匹のうち、391 匹について、L929 細胞及び VERO 細胞を用いてリケッチア分離を試みたところ、地点 A (患者の居住地) のヤマアラシチマダニから 1 株、地点 C のタネガタマダニから 1 株、地点 E のタカサゴキララマダニから 1 株及びタネガタマダニから 1 株の計 4 株が、それぞれ分離された。(表 1)。

3) マダニからのリケッチア遺伝子検索

検査に供したマダニ 391 匹のうち、39 匹が 17kDa 領域 394 塩基を標的とした nested PCR で陽性を示した。

既知種との比較の結果、地点 A (患者の居住地) のヤマアラシチマダニから検出された 1 株は *R. japonica* YH 株の塩基配列 (Accession No. AP011533)、地点 B のヤマトマダニから検出された 1 株は *R. asiatica* IO-1 株の塩基配列 (Accession No. AB114798)、地点 E のタカサゴキララマダニから検出された 2 株は *R. tamurae* AT-1 株 (Accession No. AB114825) の塩基配列とそれぞれ 100% の相同性を示した。系統解析の結果を図 3 に示した。これらの株については、さらに *gltA* 領域 321 塩基の配列を決定し、*R. japonica* YH 株 (Accession No. AP011533)、*R. asiatica* IO-1 株 (Accession No. AF394901) 及び *R. tamurae* AT-1 株 (Accession No. AF394896) の塩基配列とそれぞれ比較した