

図2 日本紅斑熱患者年齢構成  
(2007年4月～2012年10月)

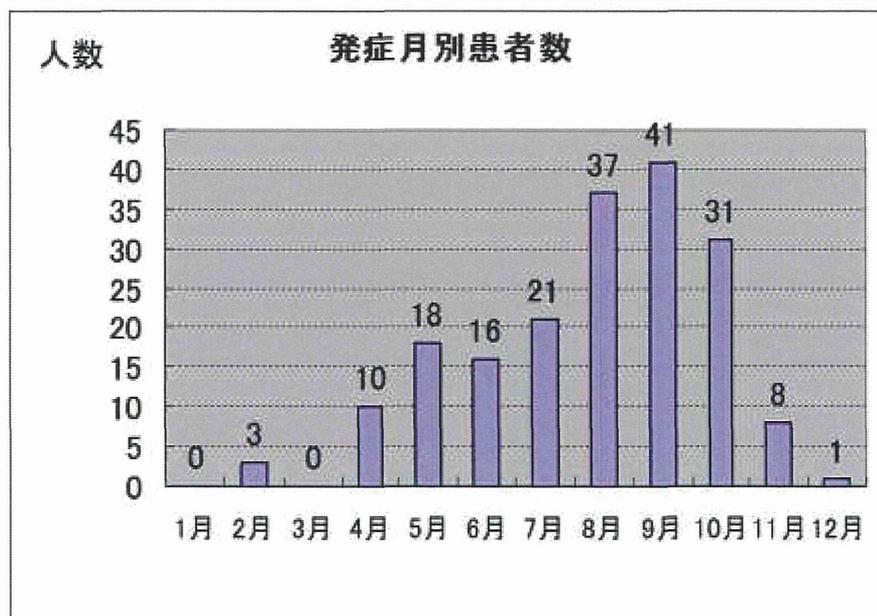


図3 日本紅斑熱患者月別発生状況  
(2007年4月～2012年10月)

## 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	寺柚 文男	和歌山県環境衛生研究センター
	下野 尚悦	同 上
	田中 敬子	同 上

### 研究要旨

和歌山県内では紀伊半島南端部を中心に日本紅斑熱の発生がみられていたが、2010 年以降、新たに大阪府との県境に位置する、和泉山脈周辺での感染が疑われる症例もみられるようになった。県内における日本紅斑熱リケッチアの感染リスクについて知見を得るため、媒介するマダニ類の浸淫状況についてフィールド調査を実施した。採取したマダニ類 10 種計 572 匹を調べた結果、いずれも *R.japonica* 遺伝子は検出されなかった。

### A. 研究目的

和歌山県内の日本紅斑熱患者の発生は 2007 年以降 2 桁台で推移しており、また 1999 年以降の患者届出数の累計は 140 例を超える。患者の発生地域は従来、紀伊半島南端部に限定されていたが、2010 年以降は県北部での感染が疑われる症例も継続的に確認されている。県南部、及び北部地域における日本紅斑熱リケッチアの感染リスクについて知見を得るため、マダニ類の分布状況、*R.japonica* 保有の有無等について調べた。

### B. 研究方法

#### 1. マダニ類の採取

マダニ類の捕獲はフランネル生地を用いた旗振り法により行った。調査地域は和泉山脈内の麓に位置する岩出市北部の山林内と、県南端部のすさみ町、古座川町、及び串本町内の山林やあぜ道等、各数カ所ずつとし、それぞれ 2013 年 5 月から 10 月にかけて(串本町

のみ 7 月から 10 月にかけて)毎月 1 回ずつ、マダニ類の成虫及び若虫を採取した。

#### 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を個体毎に破砕し、市販のキットを用いて DNA 抽出を行った後、PCR 法によるリケッチア遺伝子の検出を試みた。昨年度の調査において検出対象とした 17kDa、GltA、及び OmpA 遺伝子の内、OmpA 遺伝子が *R.japonica* 遺伝子との相同性が最も低く鑑別に適していたことから、今年度はまず OmpA 遺伝子について検出を試み、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うこととした。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後、マダニ遺伝子アーカイブとの比較により行い、また形態学的に発育ステージを分類した。

### C. 研究結果

マダニ類は 4 属 10 種、計 572 匹を採取した。フタトゲチマダニが最も多く、全体の約 39% を占めた。採取地域別にみると、岩出市北部の山林内ではキチマダニが全体の 4 割以上と最も多く、次いでヤマアラシチマダニが約 27% を占めた。採取時期別では、キチマダニは 6, 7 月に少なく、フタトゲチマダニは 5~7 月に多く採取される傾向がみられた。すさみ町ではタカサゴチマダニ(約 57%)とフタトゲチマダニ(約 36%)が圧倒的優勢種で、採取時期別ではタカサゴチマダニは 8~10 月、フタトゲチマダニは 5~7 月に比較的多い傾向がみられた。古座川町ではフタトゲチマダニが約 50% と最も多く、次いでタカサゴチマダニが約 26% を占めた。採取時期別では、10 月にフタトゲチマダニの採取数が減少し、オオトゲチマダニが比較的多く採取されるようになった。串本町では 7・8 月にはフタトゲチマダニが圧倒的優勢種であったが 9 月以降は減少し、代わってキチマダニ、オオトゲチマダニの割合が増えた。

採取したマダニ類 572 匹の内、PCR 法により 225 匹で紅斑熱群リケッチアの *OmpA* 遺伝子が検出された。特にフタトゲチマダニは、採取地域や発育ステージに関わらず検出率が高く、全体では 205 匹中 165 匹(約 80%)で検出された。それらを含め、3 属 7 種、計 225 匹のマダニ類から検出された紅斑熱群リケッチアの *OmpA* 遺伝子についてダイレクトシーケンス法により塩基配列の解析を行ったが、いずれも *R.japonica* 遺伝子とは一致しなかった(表1~4)。

### D. 考察

今回調査を行ったすさみ町、古座川町、及び串本町は県南端部の互いに隣接した町である。この 3 つの地域で採取されたマダニ種は、串本町で 9 月にみられたタイワンカクマダニ 1 匹を除き、いずれも同じ 2 属 6 種で一致し、生息するマダニ相は概ね同様であると考えられた。一方、和歌山県の南北両地域においてはマダニ相に差異が認められた。北部でのみ確認された種としてヤマアラシチマダニ、ヤマトマダニ、タネガタマダニがあり、逆に南部でのみ確認された種としてはタイワンカクマダニ、オオトゲチマダニ、ツノチマダニが挙げられる。特にヤマアラシチマダニは北部地域の優勢種の一つであったが、南部では全くみられなかった。そのような地域間のマダニ相の差異、及び患者の発生地域が和歌山県の南北両端部で、その中間地域では発生例がほとんどみられないという事実から、日本紅斑熱を媒介するマダニ種やその分布状況についても南北で様相が異なる可能性も考えられる。

県内の患者発生状況について発症月別にまとめると、2006 年以降の集計では 5~10 月の発症例が全体の 95% 以上を占める中で、県北部・南部共に 10 月の発症例が最も多く、次いで 9 月に多くみられている。患者の発生数と媒介するマダニの消長とに相関があると考え、例えばフタトゲチマダニについては、9 月・10 月と採取される割合の減少がみられており、患者発生の月別推移とは一致しない。今回の結果では県北部のキチマダニ、南部のキチマダニ或いはタカサゴチマダニの季節消長が傾向としては近いようにも思われるが、採取数が少ない他の種も含め、更に調査が必要である。

## E. 結論

今回の調査において *R.japonica* を保有するマダニ類は確認されず、県内のマダニ類における *R.japonica* 保有頻度は低いと考えられるが、日本紅斑熱患者の発生は継続的に確認されているという相反する事実を、どう解釈すべきかという点で疑問が残る。地域の感染リスクを正しく把握することは感染予防のみならず、早期診断・早期治療のためにも重要であり、実態解明に努めたい。

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

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

なし

表1. マダニ類の採取数 (岩出市)

		採取日					
		5/15	6/13	7/24	8/19	9/18	10/10
<i>A.testudinarium</i>	若虫	1(1)	1	4	1	5(1)	5(1)
タカサゴキララマダニ	成虫	0	0	0	0	0	0
<i>H.flava</i>	若虫	8	0	1	1	13	14
キチマダニ	成虫	2(1)	0	0	6(1)	3(1)	8
<i>H.formosensis</i>	若虫	0	0	0	0	0	0
タカサゴチマダニ	成虫	0	0	1	0	0	1
<i>H.longicornis</i>	若虫	7(6)	1(1)	4(3)	0	1(1)	0
フタトゲチマダニ	成虫	0	1(1)	5(5)	0	0	0
<i>H.hystricis</i>	若虫	4	2	1	1(1)	6	3
ヤマアラシチマダニ	成虫	1	2	8(2)	8(5)	0	0
<i>I.ovatus</i>	若虫	0	0	0	0	0	0
ヤマトマダニ	成虫	1	2	0	0	0	0
<i>I.nipponensis</i>	若虫	0	0	0	0	0	1(1)
タネガタマダニ	成虫	0	0	0	0	0	0

( )内は Rickettsia.spp 検出数

表2. マダニ類の採取数 (すさみ町)

		採取日					
		5/22	6/18	7/17	8/14	9/10	10/16
<i>A.testudinarium</i>	若虫	2(1)	0	0	0	0	1
タカサゴキララマダニ	成虫	0	0	0	0	0	0
<i>H.flava</i>	若虫	0	0	0	0	0	0
キチマダニ	成虫	0	0	0	0	0	1
<i>H.megaspinosa</i>	若虫	0	0	0	0	0	0
オオトゲチマダニ	成虫	0	0	0	0	0	1
<i>H.formosensis</i>	若虫	2	0	0	0	0	0
タカサゴチマダニ	成虫	7(1)	12(2)	9(1)	13(1)	19(1)	18(1)
<i>H.longicornis</i>	若虫	8(8)	4(3)	1(1)	0	2(1)	3(3)
フタトゲチマダニ	成虫	1	9(7)	11(8)	8(7)	4(4)	0
<i>H.cornigera</i>	若虫	1	1	0	1	1	0
ツノチマダニ	成虫	0	0	0	1	0	0

( )内は Rickettsia.spp 検出数

表3. マダニ類の採取数（古座川町）

		採取日					
		5/22	6/19	7/18	8/15	9/11	10/17
<i>A.testudinarium</i>	若虫	1	0	0	3(1)	0	0
タカサゴキララマダニ	成虫	0	0	0	0	0	0
<i>H.flava</i>	若虫	3(1)	2	0	0	8	0
キチマダニ	成虫	2	1	0	0	0	2
<i>H.megaspinosa</i>	若虫	0	0	0	0	0	4
オオトゲチマダニ	成虫	0	0	0	0	0	10(2)
<i>H.formosensis</i>	若虫	3	1	1	0	1	0
タカサゴチマダニ	成虫	3(1)	8(1)	8(1)	6	7(1)	10(3)
<i>H.longicornis</i>	若虫	19(16)	21(15)	5(2)	6(6)	9(6)	1(1)
フタトゲチマダニ	成虫	3(3)	7(6)	8(7)	12(9)	1(1)	0
<i>H.cornigera</i>	若虫	1	1	0	3	0	0
ツノチマダニ	成虫	0	2	1	1	0	0

( )内は Rickettsia.spp 検出数

表4. マダニ類の採取数（串本町）

		採取日					
		5	6	7/17	8/14	9/10	10/16
<i>A.testudinarium</i>	若虫	—	—	1(1)	1	0	0
タカサゴキララマダニ	成虫	—	—	0	0	0	0
<i>D.taiwanensis</i>	若虫	—	—	0	0	0	0
タイワンカクマダニ	成虫	—	—	0	0	1	0
<i>H.flava</i>	若虫	—	—	0	0	8(2)	4
キチマダニ	成虫	—	—	0	0	1	6(1)
<i>H.megaspinosa</i>	若虫	—	—	0	0	1(1)	5(2)
オオトゲチマダニ	成虫	—	—	0	0	0	5
<i>H.formosensis</i>	若虫	—	—	0	0	0	0
タカサゴチマダニ	成虫	—	—	4(1)	1	5	5(1)
<i>H.longicornis</i>	若虫	—	—	16(12)	2(2)	6(6)	0
フタトゲチマダニ	成虫	—	—	10(9)	28(22)	0	0
<i>H.cornigera</i>	若虫	—	—	0	0	1	0
ツノチマダニ	成虫	—	—	0	1	0	0

( )内は Rickettsia.spp 検出数

*Rickettsia japonica* の real-timePCR 検出系における検体への汚染が  
検証可能な陽性コントロールの作成

研究協力者	木田 浩司	岡山県環境保健センター
	岸本 壽男	岡山県環境保健センター (研究分担者)
	安藤 秀二	国立感染症研究所 (研究代表者)
	磯田 美穂子	岡山県環境保健センター
	溝口 嘉範	岡山県環境保健センター
	濱野 雅子	岡山県環境保健センター
	藤井 理津志	岡山県環境保健センター

研究要旨

現在、日本紅斑熱の病原リケッチアである *R.japonica* を検出する遺伝子検査法として、花岡ら (EID,2009) によって開発された real-timePCR 法が多くの施設で利用されている。しかし、遺伝子診断は陽性コントロール DNA の検体への混入による誤判定の危険性が高いことが知られており、本病原体に限らず、近年の実験室診断の大きな課題となっている。そこで我々は、*R.japonica* 検出 real-timePCR 法の標的遺伝子領域に遺伝子マーカー配列を組み込んだプラスミドを作成し、陽性コントロールとして利用可能か検証した。その結果、遺伝子マーカー配列挿入による影響はなく、プラスミドを用いた検量線による *R.japonica* 遺伝子の定量が可能であることが確認された。次に、遺伝子マーカー配列を検出する VIC 標識の MGB probe を作成し、*R.japonica* 検出用 probe (FAM 標識 MGB probe) との Duplex real-timePCR 法を実施したところ、コントロールプラスミドでは FAM と VIC の蛍光増幅が確認されたのに対し、*R.japonica* 培養液から抽出した DNA では、FAM の蛍光増幅のみが確認され、両者を明確に判別できた。今回開発した陽性コントロールプラスミドを用いた Duplex real-timePCR 法は、*R.japonica* 遺伝子の定量が可能となるだけでなく、検体への陽性コントロールの混入を検査と同時に確認できる検査系であり、非常に有用である。

A. 研究目的

日本紅斑熱は感染症法で四類感染症に規定されるダニ媒介性細菌感染症であり、毎年 100 名を超える患者が報告され、治療が遅れると死に至ることもある重篤な熱性発疹性感染

症である。本症は、発症後早期に有効な抗菌剤を投与することで重症化を防ぐことができるため、迅速な診断が求められている。2009 年、花岡らによって *R.japonica* を特異的に検出する real-timePCR 法が報告され、導入施設が

徐々に増加している。real-timePCR法は、感度・迅速性に優れるなど多くの利点を併せ持つ検査法であるが、反面、陽性コントロールの検体への混入による誤判定の危険性が高いことが知られており、本病原体に限らず、近年の実験室診断の大きな課題となっている。そこで我々は、*R.japonica* 検出 real-timePCR法の標的遺伝子領域に遺伝子マーカ配列を組み込んだプラスミドを作成し、陽性コントロールとして利用可能か検証した。

## B. 研究方法

### 1. コントロールプラスミドの作成

*R.japonica* 検出 real-timePCRの標的遺伝子216bpORFの増幅領域である85塩基に、遺伝子マーカ配列33塩基を挿入した118塩基を合成し(図1)、PCR法によって増幅した。次に、PCR増幅産物をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用い、添付マニュアルに従ってpCR2.1-TOPO vectorにクローニングした。プラスミドに挿入した遺伝子配列を、キット添付のM13プライマーセットを用いたダイレクトシーケンス法により確認した後、PureLink HiPure Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen)を用い、添付マニュアルに従って組換えプラスミドを精製した。得られた組換えプラスミド溶液のOD値から、TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA; pH8.0)にて $10^7$ copies/2 $\mu$ Lに調製したものをコントロールプラスミド原液とした。

### 2. コントロールプラスミドのPCR増幅効率と定量性の検討

$10^7$ ~ $10^0$ copies/wellとなるよう10倍階段希釈したコントロールプラスミド溶液を用いて検量線を作成し、real-timePCR法における増幅効率及び定量性の検討を行った。また、

遺伝子マーカ配列の挿入による影響を検討するため、*R.japonica* 培養液から抽出したDNAを $10^{-4}$ まで10倍階段希釈し、増幅効率を比較した。

real-timePCR法は、花岡らの報告をもとに、TaqMan Universal Master mix (life technologies社)を用い、20 $\mu$ L容量(検体2 $\mu$ L)でStepOnePlus (life technologies社)により実施した。プライマー及びプローブの配列を表1に示した。

### 3. Duplex real-timePCR法によるコントロールプラスミド及び*R.japonica*抽出DNAの検出

コントロールプラスミドに挿入した遺伝子マーカ配列を利用し、VIC標識したPC check probeを作成し(表1)、Duplex real-timePCR法によってコントロールプラスミドと*R.japonica*培養液から抽出したDNAが判別可能か検証した。

Duplex real-timePCR法は、花岡らの方法にPC check probe(表1)を0.1 $\mu$ Mとなるよう添加し、20 $\mu$ L容量(検体2 $\mu$ L)でStepOnePlusにより実施した。

## C. 研究結果

### 1. コントロールプラスミドのPCR増幅効率と定量性の検討

10倍階段希釈したコントロールプラスミド溶液を用いてreal-timePCR法を実施したところ、 $1 \times 10^7$ ~ $1 \times 10^1$ copies/wellの範囲内で、PCRサイクル数に比例した遺伝子の増幅が認められた。また、X軸にコントロールプラスミドのコピー数、Y軸にThreshold cycle (Ct)をプロットした検量線を作成したところ、直線性、傾きともに良好であった(図2)。また、*R.japonica*培養液から抽出したDNAを10倍階段希釈して

real-timePCR法を実施し、X軸に希釈倍数、Y軸に Threshold cycle (Ct) をプロットしたグラフを作成して解析を行ったところ、コントロールプラスミドと同様の直線性と傾きを示した(図2)。これらのことから、コントロールプラスミドへ挿入した遺伝子マーカー配列によるPCR増幅効率への影響はなく、定量が可能であることが明らかとなり、その感度は $1 \times 10^1$ copies/wellであると推定された。

## 2. Duplex real-timePCR法によるコントロールプラスミド及び *R. japonica* 抽出DNAの検出

Duplex real-timePCR法によって、コントロールプラスミドはFAMとVICの蛍光増幅が確認された。これに対し、*R. japonica* 培養液から抽出したDNAでは、FAMの蛍光増幅のみが確認された(図3)。

### D. 考察

real-timePCR法は迅速性に優れるだけでなく、電気泳動を必要としないためコンタミネーションのリスクも低い検査法であるが、近年、地方衛生研究所における陽性コントロールのコンタミネーション事例が頻繁に報告されている。これは、人事異動等による技術力の低下も要因の一つであると考えられるが、検査法の改善など、対策は急務である。

今回我々は遺伝子マーカー配列を挿入したコントロールプラスミドを作成し、花岡らの開発した *R. japonica* を特異的に検出するreal-timePCR法への応用を試みた。コントロールプラスミドと *R. japonica* から抽出したDNAを用いたreal-timePCR法によるPCR増幅効率と定量性の検討の結果、両者に明確な違いは観察されず、挿入した遺伝子マーカー配列によるreal-timePCR法への悪影響は

無いと考えられた。また、SpRijaMGB (FAM標識)とPC check probe (VIC標識)を用いたDuplex real-timePCR法において、コントロールプラスミドではFAMとVICの蛍光増幅が確認されたのに対し、*R. japonica* 培養液から抽出したDNAでは、FAMの蛍光増幅のみが確認され、両者を明確に判別できた。これらのことから、我々の開発したコントロールプラスミドを陽性コントロールとして利用したDuplex real-timePCR法によって、検査と同時にコンタミネーションの有無を確認できると考えられた。今後は、Duplex real-timePCR法の実用化に向け、今回用いたStepOnePlus以外の機器、また臨床検体を用いた検証を行っていく予定である。

### E. 結論

*R. japonica* を特異的に検出するreal-timePCR法における、遺伝子マーカー配列を挿入したコントロールプラスミドを作成した。遺伝子マーカー配列挿入によるPCR効率への影響は認められず、*R. japonica* 遺伝子の定量が可能となった。また、PC check probeを用いたDuplex real-timePCR法により、コントロールプラスミドと *R. japonica* 培養液から抽出したDNAは明確に判別されたことから、検査と同時にコンタミネーションが確認できる検査系が確立された。

### F. 健康危険情報

あり (総括研究報告書に記載)

### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表

- 1) 木田浩司、溝口嘉範、磯田美穂子、濱野雅子、藤井理津志、岸本壽男.

*Rickettsia japonica* の real-timePCR 検出系における検体への汚染が検証可能な陽性コントロールの作成. 第 21 回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー. 北海道稚内市

- 2) 木田浩司、溝口嘉範、磯田美穂子、濱野雅子、藤井理津志、岸本壽男. 中国

四国ブロックの地方衛生研究所における Duplex real-timePCR による *Rickettsia japonica* 検査法の模擬訓練. 第 6 回日本リケッチア症臨床研究会・第 20 回リケッチア研究会合同研究発表会. 滋賀県大津市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

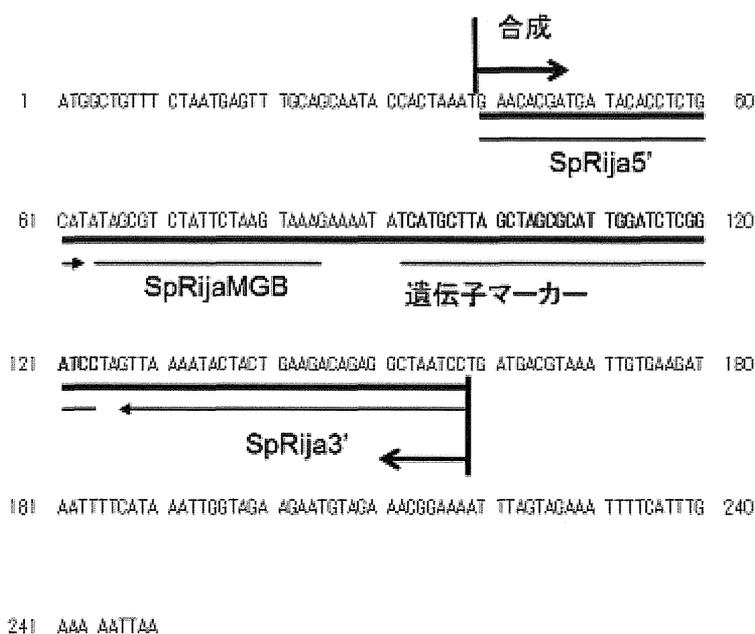


図1 *R. japonica*検出real-timePCRの増幅領域と遺伝子マーカーの挿入部位

Primerset : SpRija5' , SpRija3' Probe(MGB) : SpRijaMGB

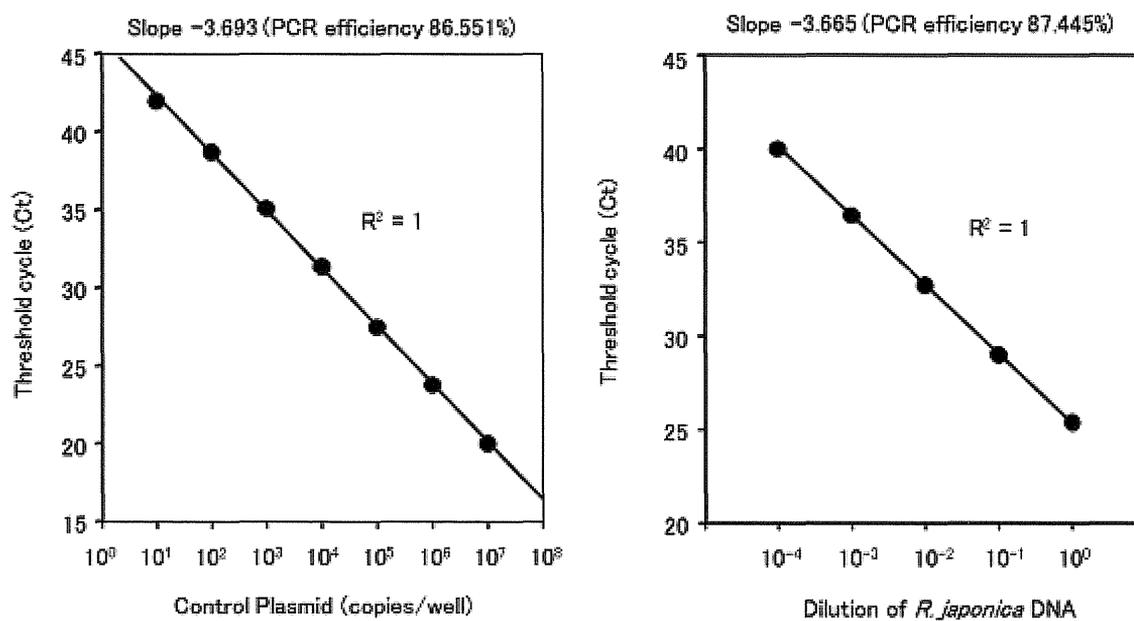


図2 コントロールプラスミドと*R. japonica*抽出DNAによるreal-timePCR効率の比較

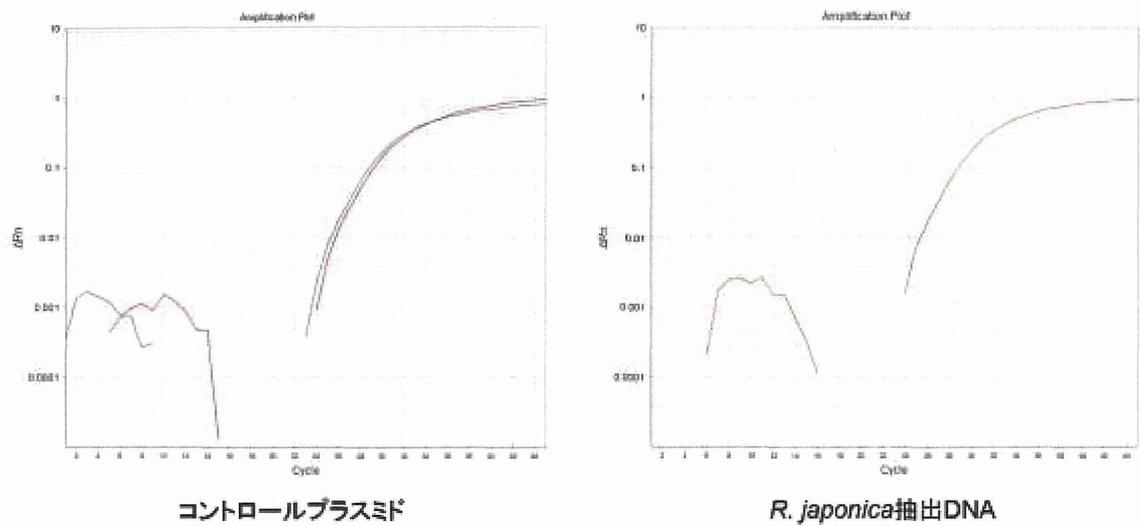


図3 Duplex real-timePCRによるコントロールプラスミド及び*R. japonica*抽出DNAの検出

赤: SpRijaMGB (FAM)

青: PC check probe (VIC)

表1 プライマー及びプローブ

	塩基長 (base)	塩基配列
SpRija5'	24	5'-GAA CAC GAT GAT ACA CCT CTG CA-3'
SpRija3'	32	5'-GAT TAG CCT CTG TCT TCA GTA GTA TTT TAA CT-3'
SpRijaMGB	21	5'-(FAM)-TAG CGT CTA TTC TAA GTA AAG-(NFQ)-(MGB)-3'
PC check probe*	33	5'-(VIC)-TCA TGC TTA GCT AGC GCA TTG GAT CTC GGA TCC -(NFQ)-(MGB)-3'

\* Duplex real-timePCRに使用



鹿児島県トカラ列島のリケッチア症に係る野外調査

研究協力者	御供田 睦代	鹿児島県環境保健センター
	岩元 由佳	鹿児島県環境保健センター
	矢野 浩司	宮崎県衛生環境研究所
	本田 俊郎	鹿児島県南薩地域振興局
	島崎 裕子	長崎市保健環境試験所
	門馬 直太	福島県衛生研究所
	山本 正悟	宮崎大学
	安藤 匡子	鹿児島大学
	糸川 健太郎	国立感染症研究所
	角坂 照貴	愛知医科大学
	藤田 信子	馬原アカリ医学研究所
	藤田 博己	馬原アカリ医学研究所 (研究分担者)
	安藤 秀二	国立感染症研究所

研究要旨:

トカラ列島の有人7島のうち、つつが虫病の発生報告のある4島(口之島, 中之島, 諏訪之瀬島, 悪石島)<sup>1),2)</sup>において、つつが虫病を主体としたリケッチア症の媒介種と病原体の調査を実施しているが、今回は、各県の地方衛生研究所ラボネットワークを通じ県境を越え、研究者と連携し、調査を実施することとなった。

昨年度(2012年度)においては、悪石島で初記載となるタテツツガムシの生息を確認したことから、今年度は、悪石島では、タテツツガムシの生息範囲確認および病原体検索をすすめ、諏訪之瀬島, 中之島では、野鼠捕獲とツツガムシおよびマダニの採集と病原体検索を行った。中之島の再調査では、タテツツガムシを地表面からの採集としては初めて確認し、野鼠の脾臓から、*Orientia tsutsugamushi*のKuroki型の遺伝子を確認した。

A. 研究目的

「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」において、四類感染症にダニ媒介性の疾患であるつつが虫病および日本紅斑熱がある。

ここでは、つつが虫病について、鹿児島県の離島のトカラ列島(悪石島)において、昨年度、患者発生原因となる媒介種の存在を確認したことから、さらに生息地を確認し病原体検出を行うこと、諏訪之瀬島, 中之島においても

媒介種の採集および野鼠を捕獲し、病原体を検出するために調査を行った。

一地方衛生研究所では困難な調査をラボネットワークを通じ、疫学調査の専門家の指導を仰ぎながら技術継承することも目的として実施した。

## B. 研究方法

### 1. 患者発生状況

つつが虫病患者発生状況(図1)および鹿児島県トカラ列島における患者発生状況(図2)をまとめた。

### 2. 疫学調査

#### 1)トカラ列島調査地と期間

##### ① 調査地(悪石島, 諏訪之瀬島, 中之島)

参加者 10 名

各島 3~4 名を配属して調査

##### ② 調査期間

・2013.12.20~12.24

悪天候のため、12月20日は出航できず21日23:00出航まで、鹿児島県内(指宿, 始良, 鹿屋)3カ所を分担し調査

・2014.1.14~1.16(中之島再調査)5名

#### 2) 調査方法

・鹿児島県内調査(指宿, 始良, 鹿屋)

黒布見取り法(図3)により、ツツガムシを採集し、マダニは、旗振り法(図4)により採集した。

・悪石島:2012年12月に悪石島でタテツツガムシを初めて確認した地点から、2013年1月に再調査を行い、どの範囲まで生息しているかを黒布見取り法で採集した。今回は、タテツツガムシ採集を主とした。野鼠捕獲は悪天候により、調査日程が1泊に短縮となったため、ト

ラップは、5個を使用した。

・諏訪之瀬島:野鼠のトラップは、30個とし、ツツガムシとマダニについては、上記同様の方法で採集を行った。

・中之島:デリーツツガムシの採集と野鼠の捕獲はあるものの地表面の未寄生期タテツツガムシが確認されていない。野鼠のトラップは、50個とし、ツツガムシ、マダニについては、上記同様の方法で採集を行った。

## C. 研究結果

鹿児島県内では、3カ所のすべての地域でタテツツガムシを確認した。病原体については、現在分析中である。

悪石島では、2012年12月に藤田らが確認した地点からタテツツガムシの生息地を調査し、角坂らがタテツツガムシ(図5)の生息地をさらに確認することができた。野鼠は、クマネズミ2頭を捕獲した。

諏訪之瀬島では、ツツガムシは採集することはできなかったが、野鼠は、クマネズミ1頭とキチマダニを採集した。

中之島では、ミヤガワタマツツガムシ(図6)および野鼠アカネズミ1頭を捕獲した。ミヤガワタマツツガムシは、初記載となったが、タテツツガムシの生息確認が得られなかったことや野鼠の捕獲数が少なかったことから、1月に再調査を実施した。

1月の再調査では、タテツツガムシとデリーツツガムシを採集し、野鼠ではアカネズミを、20頭捕獲した。

そのうち、3頭の野鼠脾臓から山本らが *Orientia tsutsugamushi* の 56kDa 外膜蛋白質遺伝子を標的とした PCR により増副産物から、*Orientia tsutsugamushi* Kuroki 型の

塩基配列を確認した(図7)。

#### D. 考察

鹿児島県では、つつが虫病患者届出が、全国第1位となっている。

トカラ列島(悪石島)において、今回の調査では、昨年度の調査地点から調査範囲を広げ調査を行うことによって、タテツツガムシの生息範囲をさらに確認し得た。

また、患者の感染時期を把握すると、11月から12月頃にタテツツガムシが発生していると推定される。また、昨年度には、黒布見取り法による採集によって、初めてタテツツガムシの生息地点を確認したものの、野鼠からのツツガムシが捕集できなかったことを考慮すると黒布見取り法による採集は、有効であった。

諏訪之瀬島調査において、野鼠(クマネズミ)1頭を捕獲し、ツツガムシは採集できなかったが、マダニは、キチマダニの生息を再確認できた。

中之島においては、12月の調査では、野鼠(アカネズミ)1頭とミヤガワタマツツガムシを採集した。ミヤガワタマツツガムシは、初記載となる。

中之島で、患者発生の原因とされる媒介種タテツツガムシの採集ができなかったことや野鼠の捕獲数が少なかったことから、1月に再調査を行った。

1月に、地表面からの黒布見取り法によってタテツツガムシが採集され、また、野鼠(アカネズミ)20頭を捕獲できた。12月の調査成績との違いが大きかったのは、時期的問題と採集場所に加え、採集者の経験と技術的要因の差も影響したことが推測される。

① 12月調査では調査の未経験者や経験の浅い者が中之島調査の主体であった。

② このことから実験室研究技術の継承とともに感染源対策のための重要な科学的データを得ることになる。野外調査においても技術継承と人材育成が重要である。

#### E. 結論

2012年から2013年の鹿児島県におけるつつが虫病患者は、昨年に比べると10人減少し、38名であった。しかし、同県では、四類感染症の中では、つつが虫病、日本紅斑熱の順に届出が多い感染症となっている。

今回の調査において悪石島で、タテツツガムシの生息地が再確認されるとともに、その生息範囲を把握できたこと、中之島において、野鼠(アカネズミ)3頭から、*Orientia tsutsugamushi*のKuroki型遺伝子を検出できたことは、鹿児島県のトカラ列島におけるつつが虫病の解明にとって大きな前進となったものと考えられる。

鹿児島県内3カ所の臨時的調査においては、全地域で、同時期にタテツツガムシの存在を確認できた。

12月は、タテツツガムシが発生しており、年末恒例の山林、畑、道路の草刈り作業など感染機会も多いと思われる。現在分析途中の検体もあり、さらに、検討をすすめていく予定である。

今回の悪石島、中之島におけるタテツツガムシの確認を受け、さらに病原体検索を進め、トカラ列島のつつが虫病患者発生の起因を解明することによって、感染予防に役立て啓発を行っていく必要がある。

今後も基礎となるデータの集積と継続した調査や病原体検索を行っていくことが重要であり、トカラ列島を含む鹿児島県のつつが虫病及びリケッチア症の解明にとっては、病原体検

索が重要となってきた。

今回のように、ツツガムシ調査においてラボネットワークを通じ、リケッチアレファレンスセンターが中心となり、全国から研究者が集まり、技術継承する機会として県域を越え調査を実施し得たことは、貴重経験となった。それぞれの地方衛生研究所でのスタッフのみでの疫学調査はなかなか困難なことが多いが、このようなラボネットワークを活用することで、今回は調査が有意義に図られたのではないかと考える。

○文献及び資料

- 1)永野広海:診断に苦慮したツツガムシ病による急性喉頭蓋炎例 耳鼻臨床 99:111:955～959,2006
- 2)本田俊郎 御供田睦代 藤田博己 角坂照貴 川端博樹 高野 愛 山本正悟 及川陽三郎 矢野康弘 高田伸弘:「鹿児島県の野鼠とダニ類からの病原体検索」

-2007年度調査から-  
鹿児島県環境保健センター所報 第9号(2008)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 御供田睦代, 濱田まどか, 濱田結花, 上村晃秀, 石谷完二, 岩切忠文, 福盛順子:鹿児島県におけるつつが虫病及び日本紅斑熱について 第55回鹿児島県公衆衛生学会(2013.5.17)鹿児島市

2. 論文発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

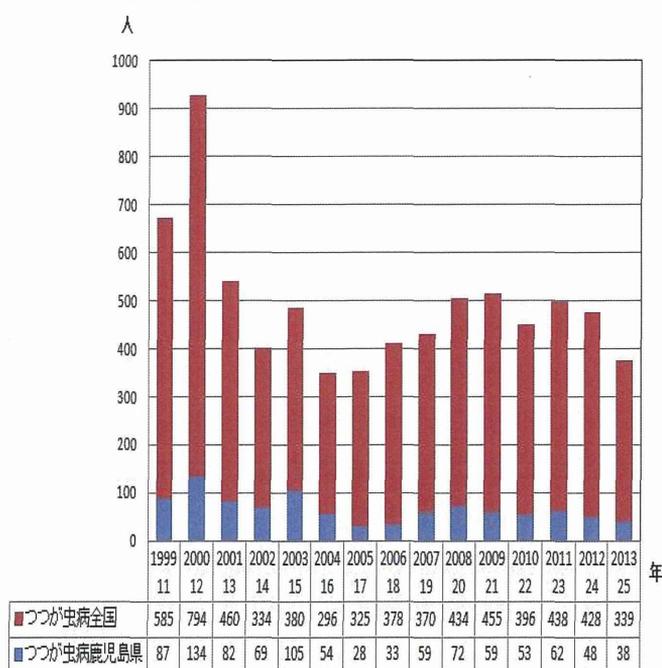


図1 つつが虫病患者発生状況



図2 トカラ列島の患者発生状況



図3 ツツガムシ採集：黒布見取り法



図4 マダニ採集：旗振り法

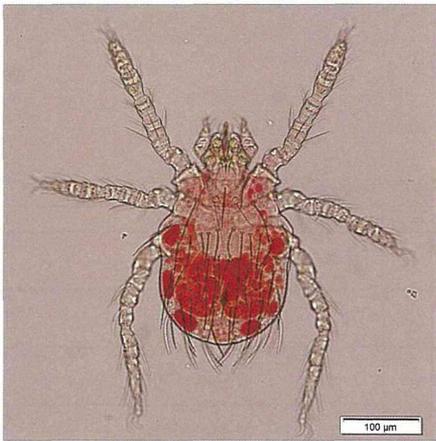


図5 タテツツガムシ

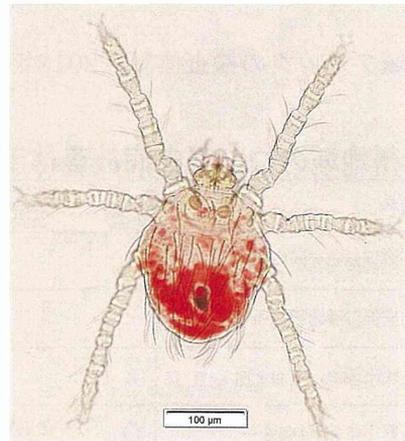


図6 ミヤガワタマツツガムシ

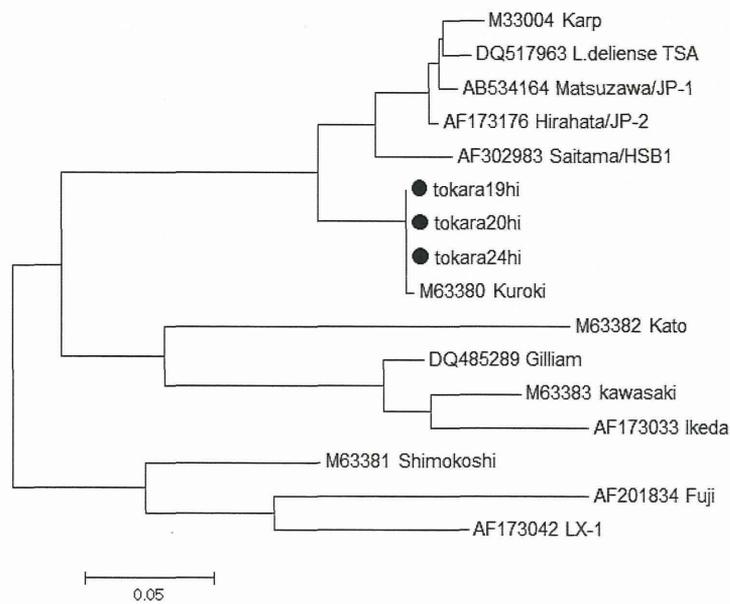


図7 中之島の野鼠脾臓から検出された56kDa外膜蛋白質遺伝子の系統樹

<参考>

九州ブロックでは、2012年に実施した全国リケッチアレファレンスセンターのアンケートを今年度も実施した。検査施設に変更はないか、異動等により変更はないか把握することとリケッチア症の検査機関として連携を図る目的で実施した。下記のアンケート結果により、検査体制の構築を図った。毎年把握することによって、リケッチアレファレンスセンターとしてリケッチア症の患者の検査支援と体制整備を行っていくことが重要である。

九州地域ブロックの検査体制（2013年アンケートより）

九州地域のつつが虫病検査体制（公表例）

	施設名	血清診断				遺伝子診断(PCR)		問い合わせ先 所轄の保健所
		可否	抗原	方法	備考1	可否	備考2	
福岡県	福岡県保健環境研究所	×				○	血液・痲皮	所轄の保健所
	福岡市保健環境研究所	×				×		所轄の保健所
	北九州市環境科学研究所	×				×		所轄の保健所
佐賀県	佐賀県衛生薬業センター	○	Kato,Karp,Gilliam, Kawasaki,Kuroki	IF	他施設か ら分与	○	血液・痲皮	所轄の保健所
長崎県	長崎県環境保健研究センター	○	Kato,Karp,Gilliam, Kawasaki,Kuroki	IF	他施設か ら分与	×		所轄の保健所
	長崎市保健環境試験センター	×				×		所轄の保健所
大分県	大分県衛生環境研究センター	○	Kato,Karp,Gilliam, Kawasaki,Kuroki	IF		○	血液	大分県衛生環境研究センター
熊本県	熊本県保健環境科学研究所	○	Kato,Karp,Gilliam, Kawasaki,Kuroki	IF		○	血液・痲皮	所轄の保健所
	熊本市環境総合センター	×				×		所轄の保健所
宮崎県	宮崎県衛生環境研究所	○	Kato,Karp,Gilliam, Kawasaki,Kuroki	IF		○	血液・痲皮・ 発疹部皮膚	宮崎県衛生環境研究所
鹿児島県	鹿児島県環境保健センター	○	Kato,Karp,Gilliam, Kawasaki,Kuroki	IF		○	血液・痲皮	所轄の保健所, 鹿児島県環境保健センター
沖縄県	沖縄衛生環境研究所	○	Kato,Karp,Gilliam, Kawasaki,Kuroki,sh imakoshi,	IP	他施設か ら分与	○	血液・痲皮	所轄の保健所, 沖縄衛生環境研究所

備考1 抗原の作成 備考2 検査検体の種類