

表4. *Orientia tsutsugamushi* 4株の年表

株名	年別	経緯	初出文献
Irie (入江)	1971年	患者から分離	Kobayashi et al (1978)
	1978年	分離を報告	Kobayashi et al (1978)
	1982年	新型別Irie型を提唱	橘ら(1982)
Hirano (平野)	1980年	患者から分離	橘ら(1982)
	1982年	分離の報告と新型別Hirano型を提唱	橘ら(1982)
Kawasaki (川崎)	1981年	患者から分離	Yamamoto et al (1986)
	1986年	分離の報告と新型別Kawasaki型を提唱	Yamamoto et al (1986)
Kuroki (黒木)	1981年	患者から分離	Yamamoto et al (1986)
	1986年	Kawasaki株の論文中で比較用にKuroki株を使用, Karp類似としている	Yamamoto et al (1986)
	1989年	新型別Kuroki型を提唱	山本ら(1989)

株と型の初出文献

Kobayashi, Y., Tachibana, N., Matsumoto, I., Oyama, T. and Kageyama, T. (1978)

Isolation of very low virulent strain of *Rickettsia tsutsugamushi* by the use of cyclophosphamide-treated mice. Kazar, J., Ormsbee, R. A. and Tarasevich I. N., eds. *Rickettsiae and Rickettsial Disease*. Bratislava: VEDA, Publishing House of the Slovak Acad. Sci., 181-188.

橘 宣祥, 橘根英司, 横田 勉, 志々目栄一, 津田和炬, 押川達己(1982)

宮崎地方の恙虫病, 疫学的, 免疫学的ならびに病原学的研究. *感染症学雑誌*, 56: 655-663.

Yamamoto, S., Kawabata, N., Tamura, A., Urakami, H., Ohashi, N., Murata, M., Yoshida, Y. and Kawamura, Jr. A. (1986)

Immunological properties of *Rickettsia tsutsugamushi*, Kawasaki strain, isolated from a patient in Kyushu. *Microbiol. Immunol.*, 30: 611-620.

山本正悟, 川畑紀彦, 大浦恭子, 村田道理, 南嶋洋一(1989)

宮崎県における恙虫病患者由来の *Rickettsia tsutsugamushi* の抗原型とその分布. *感染症学雑誌*, 63: 109-117.

型同一性についての文献

Ohashi, N., Koyama, Y., Urakami, H., Fukuhara, M., Tamura, A., Kawamori, F., Yamamoto, S., Kasuya, S. and Yoshimura, K. (1996)

Demonstration of antigenic and genotypic variation in *Orientia tsutsugamushi* which were isolated in Japan, and their classification into type and subtype. *Microbiol. Immunol.*, 40: 627-638.

Horinouchi, H., Murai, K., Okayama, A., Nagatomo, Y., Tachibana, N. and Tsubouchi, H. (1997)

Prevalence of genotypes of *Orientia tsutsugamushi* in patients with scrub typhus in Miyazaki Prefecture. *Microbiol. Immunol.*, 41: 503-507.

表5. モノクローナル抗体 抗-Kawasaki株 417と抗-Kuroki株 55-12の反応性

<i>Orientia tsutsugamushi</i> の各株に対するIP抗体価								
	Irie	Kawasaki	Hirano	Kuroki	Kaisei*	Sato**	Kato	Shimokoshi
417	128000	128000	<500	<500	<500	<500	<500	<500
55-12	<500	<500	16000	16000	<500	<500	<500	<500

\*, 日本系 Gilliam (JG) 型; \*\*, 日本系 Karp-2 (JP-2)型

表6. 恙虫病症例におけるIrie, Kawasaki, HiranoおよびKuroki株抗体価の比較

Irie型感染症例			Hirano型感染症例		
検体code	IP IgG/IgM		検体code	IP IgG/IgM	
	Irie	Kawasaki		Hirano	Kuroki
I-1	640/640	1280/640	H-1	1280/1280	1280/640
I-2	160/320	320/320	H-2	320/160	160/160
I-3	1280/1280	640/640	H-3	80/40	80/40
I-4	40/160	40/160	H-4	640/80	640/80
I-5	320/5120	320/5120	H-5	320/320	320/320
I-6	320/10240	320/10240	H-6	5120/5120	5120/5120
I-7	2560/2560	2560/5120	H-7	320/-	320/-
I-8	2560/40960	2560/40960	H-8	1280/1280	1280/640
I-9	5120/10240	5120/10240	H-9	-/320	-/320
I-10	1280/1280	1280/1280	H-10	640/2560	320/1280
I-11	640/-	640/-	H-11	640/2560	640/2560
I-12	2560/10240	2560/10240	H-12	160/640	80/640
I-13	2560/5120	2560/5120	H-13	160/5120	160/5120
I-14	1280/5120	1280/5120	H-14	1280/20480	640/20480
I-15	320/5120	640/5120			
I-16	1280/10240	1280/20480			

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)  
ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる技術・情報の体系化に関する研究  
分担研究報告書

マダニ起因性疾患の検査診断  
～フィールド視点での Dot-ELISA および刺し口紅斑の検討～

研究分担者 高田 伸弘 福井大学、医学野外研究支援会 MFSS  
研究協力者 及川 陽三郎 金沢医科大学  
夏秋 優 兵庫医科大学  
山本 正悟 宮崎大学医学部、MFSS  
御供田 睦代 鹿児島県環境保健センター  
藤田 博己 馬原アカリ医学研究所(研究分担者)  
矢野 泰弘 福井大学医学部  
協力機関 明神診療所 (森田裕司)  
上天草総合病院 (和田正文)

研究要旨

科研課題「診断・治療体制の構築および基盤となる技術・情報」を下支えするため、フィールドの立ち位置から検査診断法の研究を進めた。まず、紅斑熱菌体から抽出した常温安定な多糖抗原を用いた Dot-ELISA については、専門家レベルに加えて地域医療機関にも既知検査法との比較を依頼したところ、ペア血清を用いた IgG 測定なら有用と分かった。したがって、検査機器の整わない隔離地域での潜在感染スクリーニングやフィールド試料の検査まで適用できる便利ツールであることを認識した。また、マダニ刺し口の紅斑「TARI」については、マダニ唾液腺抽出液でマウスを感作誘導する実験により、遅延型アレルギーの可能性が強く示唆され、またそれが地域で分布相が異なるマダニ属種間で交差性や特異性に差のあることも分かったので、地域ごとに皮膚科臨床で留意すべきと思われる。以上、いずれもフィールドの立ち位置から検討されたもので、症例の確定診断法とは別に、発生現場に疫学対応のツールを供給するものである。

A. 研究目的

この研究事業の本体は“診断・治療体制の構築と基盤技術・情報の体系化”なので、ここ

では地域疫学に資するための検査、診断法につき、過去 2 年間の検討結果から、最終年の研究目的を次の2点に絞った。

1. フィールド視点での Dot-ELISA の検討：  
IP や IF など正攻法の検査では、ラボで抗原菌体の培養そして凍結保存での維持を要し、実施では生物顕微鏡ないし蛍光顕微鏡を要するため地域対応では煩雑なものである。そこで特に遠隔地や島嶼環境でのスクリーニングやフィールド試料へも適用可能な簡便法が囑望され、考えられたのが Dot-ELISA (DE) であり、その有用度を検証する。

2. 刺し口紅斑の検討：マダニ刺し口は、本科研で対象にしている細菌類の感染門戸になるものであるが(ほか SFTS などウイルス性も)、刺し口周辺にしばしば出現する TARI (tick-associated rash illness: 昨年度報告を参照) の機序を探っておかねば、地域の皮膚科臨床対応で困ることが多い。そこで昨年に続き、さらにアレルギー反応関与の可能性を再検討する。

## B. 研究方法

上記 2 つの目的に向けた方法論については、既に昨年報告で記した事項は周知という前提で、以下、今年度のポイントだけを記す。

### 1. フィールド視点での Dot-ELISA の検討

#### 1) 専門家による検討

分担者および日本紅斑熱発生地(宮崎県および鹿児島県)の衛生行政機関にて、従来法(IP や IF)と比較して有用性を検討した。

#### 2) 地域臨床現場での試用

DE のキットを日本紅斑熱多発地(W 県および K 県)の医療機関に配送して試用を依頼した。その際の注意書きとして；

<手技>ご自身試行へ向け手順書を同封しましたが、マイクロピペットなどで微量液の扱いもあり、用に応じ検査室へご相談の下さい。

<試料>今回のセットは 20~30 件用ですから、既にお手持ちの明らかな紅斑熱血清を中心に、検査では陰性ないし不明であったものなども少数加えて下さい。

<判定>乾燥された検査紙で茶色発色の濃さを、見本の添付画像と比較確認し、各血清の正規検査による記録とも照合した後で検査紙を返送下さい。

## 2. 刺し口紅斑の検討

### 1) マダニ材料の調製

*Amblyomma testudinarium* 雌成虫 (At) (福井県産)、*Ixodes persulcatus* 雌成虫 (Ip) (長野県産) および *Dermacentor taiwanensis* 雌成虫 (Dt) (福井県産) から摘出した唾液腺をリン酸緩衝生理食塩水で超音波破碎し 0.45 $\mu$ m ミリポアフィルターを通したものを、AtS、IpS および DtS とした。

### 2) マウスでの実験手順

試験マウスは 8~10 週齢 BALB/c マウス雌 5 頭を 1 群とし、各マウス背部に AtS、IpS および DtS を 50 $\mu$ l ずつ皮下注射して感作誘導し、5 日後に左耳介に AtS、IpS、DtS の 10 $\mu$ l を皮内注射して反応惹起、その後の耳介の厚さを測定して、注射前後の差(耳介腫脹)を炎症反応の指標とした。さらに、AtS または DtS を注射したマウス頸部リンパ節を摘出し、RPMI1640(抗原刺激用の AtS、IpS および DtS を添加)で単細胞浮遊液として 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> で 3 日間培養、終了 24 時間前に<sup>3</sup>H-Thymidine を添加して細胞増殖反応を測定した。

## C. 結果およびD. 考察

内容的には2つの項目になるので結果と考察を分離すると煩雑になるため、まとめて記述する。なお、DEの試験結果は、検査値を表に列記して比較検討し易くした。

### 1. フィールド視点でのDot-ELISAの検討

#### 1) 専門家実施による従来法とDEの相関

血清検査では専門性を有する機関(分担者および鹿児島県と宮崎県の衛生行政機関)で、各々が所有する日本紅斑熱患者の血清(急性期および回復期)について、従来法とDEの検出力の相関をみた(表1)。結果として、IgGではほぼ従来法と相関し、特にペア血清がある場合には十分な抗体上昇を確認できたが、IgMではペア血清でも相関性は高くなく有用性は低かった。ともあれ、ペア血清なら現症の診断に使い得るだろうし、地域での潜在例の掘り起こしなどスクリーニングを速攻で行なうには有用と思われた。特に遠隔地さらには近隣国での疫学調査時などで、さまざまな試料と局面で便利なツールになろう。

#### 2) 医療機関実施による従来法とDEの相関

リケッチア症検査では専門でないW県およびM県の医療機関で、各々が所有する日本紅斑熱患者の血清を用いて、従来法とDEの検出力の相関をみた(表2)。結果として、W県ではIgGで従来法と相関性は高かったが、やはりIgMでは相関は相当低かった。それに対して、K県では急性期で占められた血清であったことであろうかIgMはもちろんIgGでも相関は高くはなかったが、それでも相関する例はいろいろのレベルではみられて、DEの有用性はうかがわれた。ただ、予想したことではあるが、医療機関での広い実施にはもう一段の各検査室の支援が必要かも知れない。

## 2. 刺し口紅斑の検討

結果は図1に要約したが、順にまとめると;

- At、Dt および Ip の唾液腺物質によってマウスに遅延型アレルギー反応を誘導することができた。
- 唾液腺物質に対する感作が成立したマウスでは、皮膚所属リンパ節細胞が特異抗原刺激によって増殖反応を示した。
- At と Dt の唾液腺物質には相当高い免疫学的な交差反応性が認められたが、Ip とは交差性が低かった。

以上から、TARI 所見の病態としては、マダニ唾液腺物質に対する遅延型アレルギー反応が関与する可能性、すなわち“TARI≒アレルギー”がさらに強く示唆された。今回追加したリンパ節細胞の増殖実験では、マダニの属間や種間で免疫学的交差性はさまざまらしいことも示され、南方系大型種 At は北方系属の Ip などよりやはり南方系大型種の Dt と交差性が相当高い事実から、これら種が共に多く分布する南西日本の地域皮膚科の臨床では TARI の症例がより多く見られる状況と合致する。すなわち、刺し口は病原体の感染門戸ながら、非感染性の場合も多々含まれると思われるので、感染症対応の治療とは別にステロイドの選択肢など十分に留意すべきであろう。なお、今後は At と Dt それぞれの唾液腺抽出成分の抗原性自体を比較解析することも必要だろう。

## E. 結論

検討された2点につき結論をまとめる。

- DE は、ペア血清を対象にすれば従来の検査法に準じて現症の検査診断で使い得る。とくに検査インフラの不足した地域や遠隔地調査時に、住民スクリーニングあるいはフィ

ールド試料の便利ツールになる。

- ・マダニ刺咬例でみられる TARI は、マダニ唾液腺物質による遅延型アレルギー反応と思われる、At と Dt は免疫学的交差性が強かった。この 2 種が多く分布する南西日本では、非感染性の刺し口である可能性に留意して治療法を考えねばならない。

以上、今回の簡易な抗体検査法や皮膚反応の検討は互いに無関係ではなく、いずれもフィールドの立ち位置から考え工夫されたもので、症例の確定診断とは別に、発生現場に疫学対応のツールを供給するものである。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Natsuaki M, Takada N, Kawabata H, Ando S, Yamanishi K. Case of tick-associated rash illness caused by *Amblyomma testudinarium*, J.Dermatol. 41:834-836, 2014.
- 2) 高田伸弘. 予期せぬ感染症との遭遇. 2. 医ダニ類の多様性, とくに各種感染症を媒介するマダニたち. Clean Life 2014 年号:5-11, 2014.
- 3) 高田伸弘. わが国でも問題のベクター媒介性感染症. 8. 日本紅斑熱の発生状況と媒介マダニから見えてくる感染環. 化学療法の領域 30:305-312, 2014.
- 4) Tai K, Iwasaki H, Ikegaya S, Takada N, Tamaki Y, Tabara K Ueda T. Significantly higher cytokine and

chemokine levels in patients with Japanese spotted fever than in those with tsutsugamushi disease. J. Clin. Microbiol. 52:1938-1946, 2014.

- 5) Takano A, Fujita H, Kadosaka T, Takahashi M, Yamauchi T, Ishiguro F, Takada N, Yano Y, Oikawa Y, Honda T, Gokuden M, Tsunoda T, Tsurumi M, Ando S, Sato K, Kawabata H. Construction of a DNA database for ticks collected in Japan: application of molecular identification based on the mitochondrial rDNA gene. Med. Entomol. 65:13-21, 2014.

- 6) Takahashi M, Misumi H, Gokuden M, Kadosaka T, Sato H, Fujita H, Yamamoto S, Takada, N. Absorption of host hemolytic fluid by trombiculid mites (Acari:Trombiculidae). Ann. Rep. Ohara Gen. Hosp. 53:21-32, 2014.

- 7) 高田伸弘. つつが虫病. 小児疾患診療のための病態生理1. 小児内科 46(増):1059-1061, 2014.

##### 2. 学会発表

- 1) 高田伸弘, 岩崎博道, 矢野泰弘, 高橋 守, 山本正悟, 佐藤寛子. 西日本域の福井県で初確認されたシモコシ型恙虫病の感染環調査, 2年間の経過. 第 66 回日本衛生動物学会大会. 岐阜市, 2014.03.
- 2) 夏秋 優, 矢野泰弘, 高田伸弘. タカサゴキララマダニ唾液腺抽出物によるマウス遅延型アレルギー反応. 第 66 回日本衛生動物学会大会, 岐阜市, 2014.3.

3) 及川陽三郎, 藤田博己, 高田伸弘. アルカリ抽出多糖抗原試験紙による紅斑熱群リケッチア症血清抗体価の測定. 第 66 回日本衛生動物学会大会, 岐阜市, 2014.

4) 高田伸弘, 矢野泰弘, 池ヶ谷諭史, 岩崎博道, 石畝 史. シモコシ型恙虫病は東北から近畿地方まで在るらし? 第 22 回 SADI 大宰府大会, 太宰府市, 2014.7.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特記事項なし

##### 2. 実用新案登録

特記事項なし

##### 3. その他

特記事項なし

表 1 日本紅斑熱患者の血清につき従来法（IPやIF）とDEの相関

（福井大学、鹿児島県保環セ、宮崎県衛環研による検査分を統合）

IgG		急性期	1W	2W	3W	4W	IP や IF と DE の相関
1	IP	<40		1280		2560	相関する
	DE	-		+++			
2	IP	80	640	5120	10240		相関する
	DE	+		+++			
3	IP	80		1280		2560	急性期は相関するか？
	DE	-		+			
4	IP	80	2560	10240	20480	20480	急性期の相関は不明
	DE			+++		+++	
5	IP	<40		5120		5120	急性期の相関は不明
	DE			+		+	
6	IP	40		320			相関する
	DE	-		++			
7	IP		320	640			ほぼ相関
	DE		+	++			
8	IF	<20			640		相関する
	DE	-			+		
9	IF	40		160			相関する
	DE	-		+			
10	IF	80		160			急性期は相関するか？
	DE	-		+			
IgM		急性期	1W	2W	3W	4W	IP や IF と DE の相関
1	IP	<40		160			相関せず
	DE	-		-			
2	IP			80	320		相関は低い
	DE			-	+		
3	IP	<40		640			相関する
	DE	-		+++			
4	IF	20		640			急性期は相関するか？
	DE	+		+			
5	IF	<20		160			相関する
	DE	-		+			
6	IF	<20		160			相関せず
	DE	-		-			



表2 日本紅斑熱患者の血清につきIPやIFとDEの相関 (多発地の医療機関による検査試行)

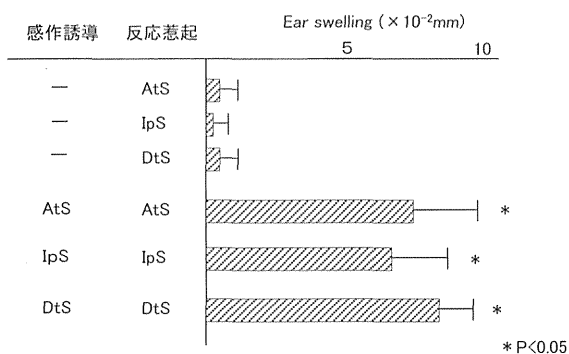
W県 (IPで陽性であったさまざまな病日の血清)				K県 (IFで陽性であった急性期血清)			
	IgG (IP / DE)	IgM (IP / DE)	相関性		IgG (DE)	IgM (DE)	相関性
1	20 / -	40 / -	相関する	1	+	-	IgM?
2	40 / -	320 / -	IgM?	2	+	+	相関
3	80 / -	320 / -	相関せず	3	+	+	相関
4	160 / +	640 / -	IgM?	4	-	+	IgG?
5	160 / -	40 / -	IgG?	5	-	±	IgG?
6	320 / ++	320 / +	相関する	6	+	±	相関?
7	320 / -	40 / -	IgG?	7	-	-	相関なし
8	640 / ++	40 / -	相関する	8	-	+	IgG?
9	640 / ++	40 / -	相関する	9	+	-	IgM?
10	640 / +	40 / -	相関する	10	-	-	相関なし
11	640 / ++	640 / -	IgM?	11	-	-	相関なし
12	1280 / ++	160 / -	IgM?	12	+	-	IgM?
13	1280 / +	80 / +	相関する	13	++	++	相関
14	1280 / +	20 / -	相関する	14	+	-	IgM?
15	1280 / +	20 / -	相関する	15	++	+	相関
16	1280 / ++	160 / -	IgM?	16	-	++	IgG?
17	2560 / ++	320 / -	IgM?	17	++	-	IgM?
18	5120 /+++	640 / -	IgM?	C1	+	+	非特異 or 不顕性
				C2	+	±	" "
				C3	-	-	相関

注：IPでX80≦がDE陽性に相当するとした

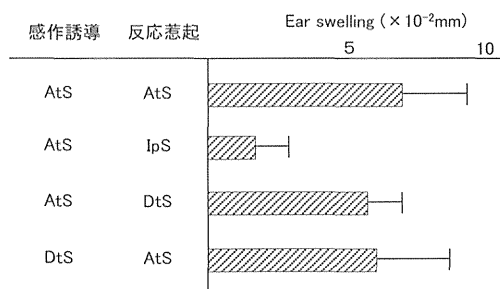
Cは患者外の血清

結果(1) マウスを唾液腺抽出液 AtS により感作した後、反応惹起により順調に耳介が腫脹した  
(この結果は前年報告と類似するため図を省略)。

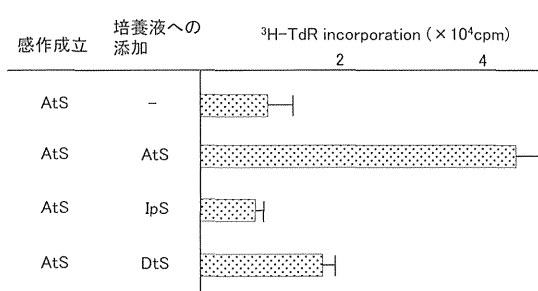
結果(2) AtS、IpS、DtSによる耳介腫脹



結果(3) AtS、IpS、DtSによる耳介腫脹の交差反応



結果(4) AtS感作マウスのリンパ節細胞増殖反応



結果(5) DtS感作マウスのリンパ節細胞増殖反応

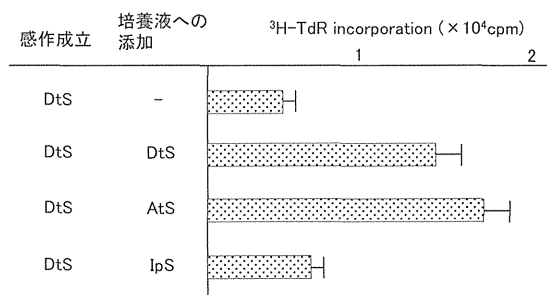


図1 マウス実験系で観察したマダニ唾液腺物質の遅延型アレルギー関与

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる技術・情報の体系化に関する研究  
分担研究報告書

## ダニ媒介感染症の調査研究における共通ツールの検討 ～マダニ形態同定用アーカイブ作成の試み～

研究代表者	安藤 秀二	国立感染症研究所ウイルス第一部
研究協力者	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)
	高野 愛	山口大学共同獣医学部(研究分担者)

### 研究要旨

ダニ媒介感染症の感染源調査として重要なマダニ類からの病原体検出において、ベクターであるマダニの形態的同定は、その生態や生息分布地域、感染リスクを検討、理解するために、重要な要素である。各種病原体遺伝子を検出する際にも、鋳型 DNA の抽出前に形態同定が可能ならば、幼虫のプールサンプル作製、またマダニ遺伝子の配列確認などを簡略化できる。しかしながら、形態学的同定のための国内アーカイブは限られており、記録的にも古くなってきている。マダニからの各種病原体検出では、大量のサンプルを取り扱いかつ遺伝子を増幅する作業が繰り返され、キャリアバーやクロスコンタミネーションの回避、また迅速性を考慮する必要がある。このため、未経験者にはハードルが高かった形態同定を目的に、可能な限り各種マダニのステージごとに標本となる個体を収集、画像アーカイブ作成を行った。

採取自体が稀であったり、特定の野生動物に吸着していた記録のみであったり、各ステージのマダニを採取するために通年が必要であるため、約 2 年の時間をもってしても困難な作業であったが、およそ 10 種について成虫(雌雄)、若虫、幼虫の画像を記録できた。他にも一部ステージの個体が得られなかったものの、相当数の画像アーカイブが作成できた。同定ポイント等を明確にし、今後のアーカイブの活用方法について検討している。

### A. 研究目的

国内におけるマダニ媒介性感染症は極めて多様である事がわかり、その自然界における存在を明らかにすることが迫られている。しかしながら、調査対象となるマダニ自体が極めて微小な生物であるため、調査材料の有効かつ

効率的取り扱いが求められている。これまでの形態同定用のモノグラフは古くなり、限られている。また、線画で記載されているため、多くの現場でより活用可能なカラー写真を中心としたアーカイブ作成を目的としてマダニの画像記録の蓄積を試みた。

## B. 研究方法

1. 日本産マダニ類のカラー同定アーカイブの作成: 入手できた各種マダニ類の全体像、形態同定ポイントとなる部分拡大の写真を記録、保存した。

## C. 研究結果

日本産マダニ類のカラー同定アーカイブの作成: 国内に生息することが記録されている47種の内、約10種について、成虫(雌雄)、若虫、幼虫の全ステージの写真アーカイブができた。これらについては、全体像の他、背面、腹面、背板、顎体部、基節部等形態鑑別のポイントとなる部分拡大像も記録した(組み写真1~3)。形態と合わせ、色調等でも違いが明らかであった。

## D. 考察

これまで国内におけるマダニ媒介性感染症の多くはリケッチアによる日本紅斑熱、ボレリアによるライム病が、毎年多数の患者が報告されていた。しかしながら、死亡率が高いウイルス性病原体が新たに報告されたことから、その自然界における存在を明らかにすることが迫られている。ベクターであるマダニの形態的同定は、その生態や生息分布地域、感染リスクを検討、理解するために、重要な要素であるが、調査対象となるマダニ自体が極めて小さい生物であるため、材料の有効かつ効率的取り扱い難しい状況にある。また各種病原体遺伝子を検出する際、鋳型DNAの抽出前に形態同定が可能ならば、幼虫のプールサンプル作製、マダニ遺伝子の配列確認などを短縮等、作業ステップの簡略化、迅速性とコスト面でも極めてメリットが高い。さらに、マダニからの各種病原体検出では、大量のサンプルを取り扱いかつ

遺伝子を増幅する作業が繰り返されることによるキャリアバーやクロスコンタミネーションの危険性を回避のため、マダニの形態同定は重要なスキルとなる。しかしながら、形態学的同定のための国内アーカイブは限られており、記録的にも古くなってきている。また感染リスクを検討するためには、ベクターの分布やヒトへの嗜好性を考慮する必要があるため、マダニ類の分類同定が必須であるが、形態同定に関しては経験等の蓄積が必要なため、未経験者にはハードルが高いものである。

本調査研究では、全国から可能な限り各種マダニのステージごとに標本となる個体を収集し、形態同定のための画像アーカイブ作成を試みた。マダニは採取自体が難しい希少種であったり、特定の野生動物に吸着していた記録のみであったり、季節消長がある。同一種でも全ステージの個体をそろえるには、採取に通年が必要であるため、相当の期間を要するものと思われた。また、調査の緊急性を要するために多くのマダニ検体がSFTS調査等に優先的に使用されたため、約2年の時間をもってしても画像アーカイブ作成のための標本を収集することは困難な作業であったが、入手できたマダニ種、成虫雌雄、若虫、幼虫について全体像の背腹、鑑別ポイントの部分拡大像の写真撮影を進め、およそ10種について全ステージの画像を記録できた。他にも一部ステージの個体が得られなかったものの、相当数の画像アーカイブが作成できた。例として掲載した組み写真の通り、全体像、背板、花彩、顎体部、基節部のほか、色調等から、実際に目にした際の同定に役立つものである。カラー写真による形態同定用アーカイブは、今後国内のマダニ媒介性感染症対策における感染源調査において大きな役割を果たせるものと考えら

れる。欠けているマダニ種、ステージ個体について暫時標本を採取することの試みを継続、同定ポイント等を明確にし、今後のアーカイブの活用方法について検討したい。

## E. 結論

新規のマダニ媒介性感染症の存在も明らかになり、鑑別とともにマダニ媒介性感染症を俯瞰した診断・治療に加え、調査研究のための共通ツールが重要である。分子生物学的解析の方法論の検討をますます進める必要があるが、あわせもつリスクも考慮し、ベクターの形態同定など高い経験値が求められ、継承の難しいと思われる古典的な知識やスキルを廃れさせず残すことは極めて重要である。このため、画像アーカイブの蓄積は今後も継続する重要な課題である。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Andoh M, Ogasawara Y, Sakata A, Ito T, Fujita H, Kawabata H, Ando S. Isolation of spotted fever group Rickettsia, *R. tamurae* and *Candidatus R. kotlanii*, from *Haemaphysalis megasinos* in Japan. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases** 14(9): 681-684, 2014
- 2) Harasawa R, Fujita H, Kadosaka T, Ando S, Rikihisa Y. Proposal for 'Candidatus Mycoplasma haemomuris subsp. musculi' in mice, and 'Candidatus Mycoplasma haemomuris

subsp. ratti' in rats. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. (in press)

### 2. 学会発表

- 1) 角坂照貴、藤田博己、藤田信子、高野愛、安藤秀二:写真でマダニの同定は可能か、第22回SADI、2014年7月4~6日、福岡県太宰府市
  - 2) 高田伸弘、藤田博己、佐藤寛子、高橋守、安藤秀二:東北地方における恙虫病ベクターの乱立模様、特に地理病理学の面から考察する、第60回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会、2014年10月18日、盛岡
  - 3) 藤田信子、藤田博己、角坂照貴、安藤秀二:四国型恙虫病の媒介種トサツツガムシの現況、川端寛第69回日本衛生動物学会西日本支部大会、平成26年11月8~9日、愛知県長久手市
  - 4) 御供田睦代、岩元由佳、中堂園文子、岩切忠文、福盛順子、藤田博己、山本正悟、角坂照貴、高橋守、川端寛樹、本田俊郎、坂元修治、蔵元強、北野智一、矢野浩二、藤田信子、島崎裕子、門馬直太、安藤匡子、高野愛、矢野泰弘、糸川健太郎、田原研司、及川陽三郎、川森文彦、大橋典男、高田伸弘、安藤秀二:薩南諸島のリケッチア症について、第21ケッチア研究会、平成26年12月20-21日、東京
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況
- 特記事項なし

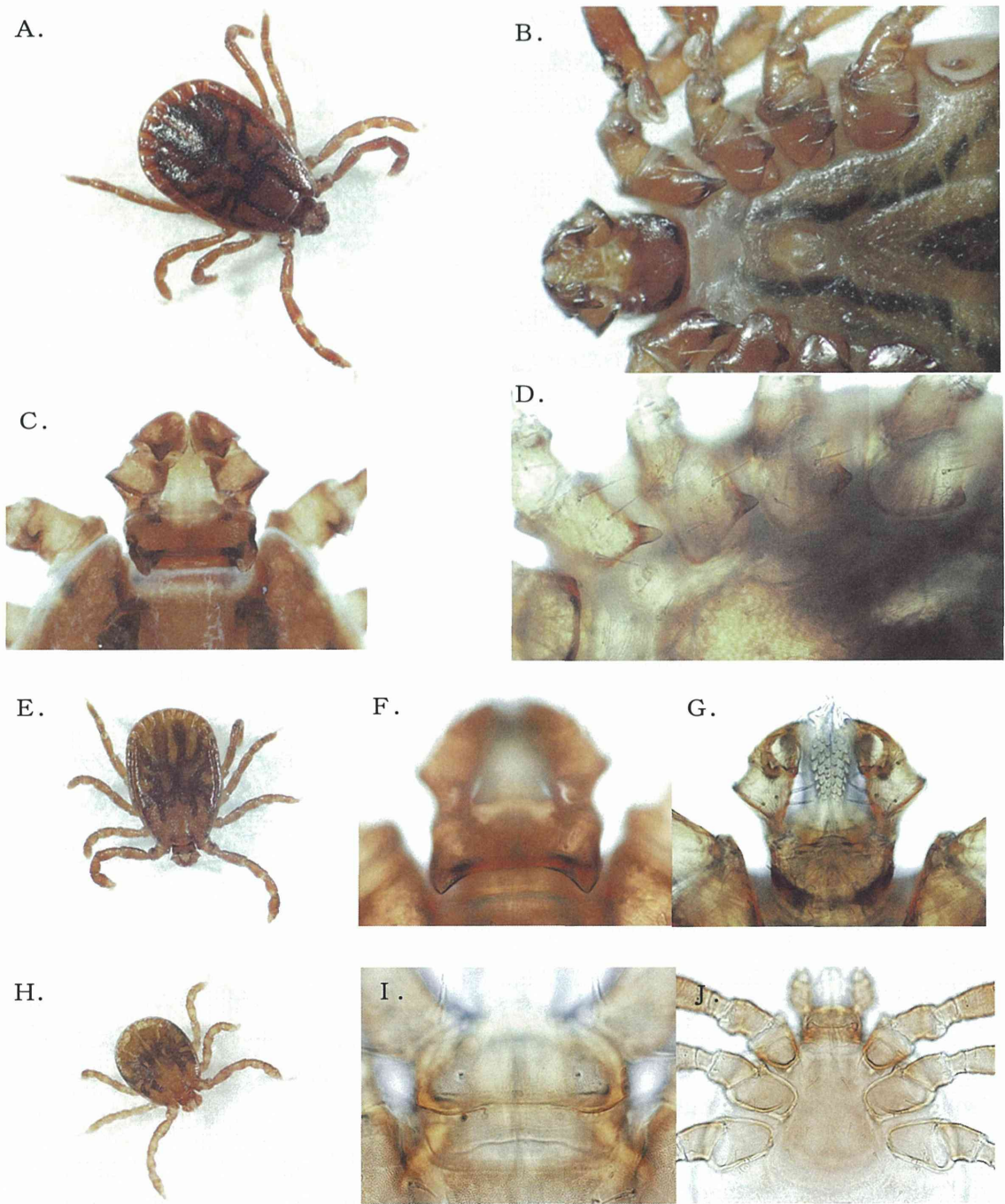


写真1. *Haemaphysalis longicornis*  
フタトゲチマダニ

- A. 成虫 (Adult) ♀    B. 成虫・腹面    C. 成虫・顎体部、背面    D. 基節  
 E. 若虫 (Nymph)    F. 若虫・顎体部、背面    G. 若虫・顎体部、腹面  
 H. 幼虫 (Larva)    I. 幼虫・角状体    J. 幼虫・腹面

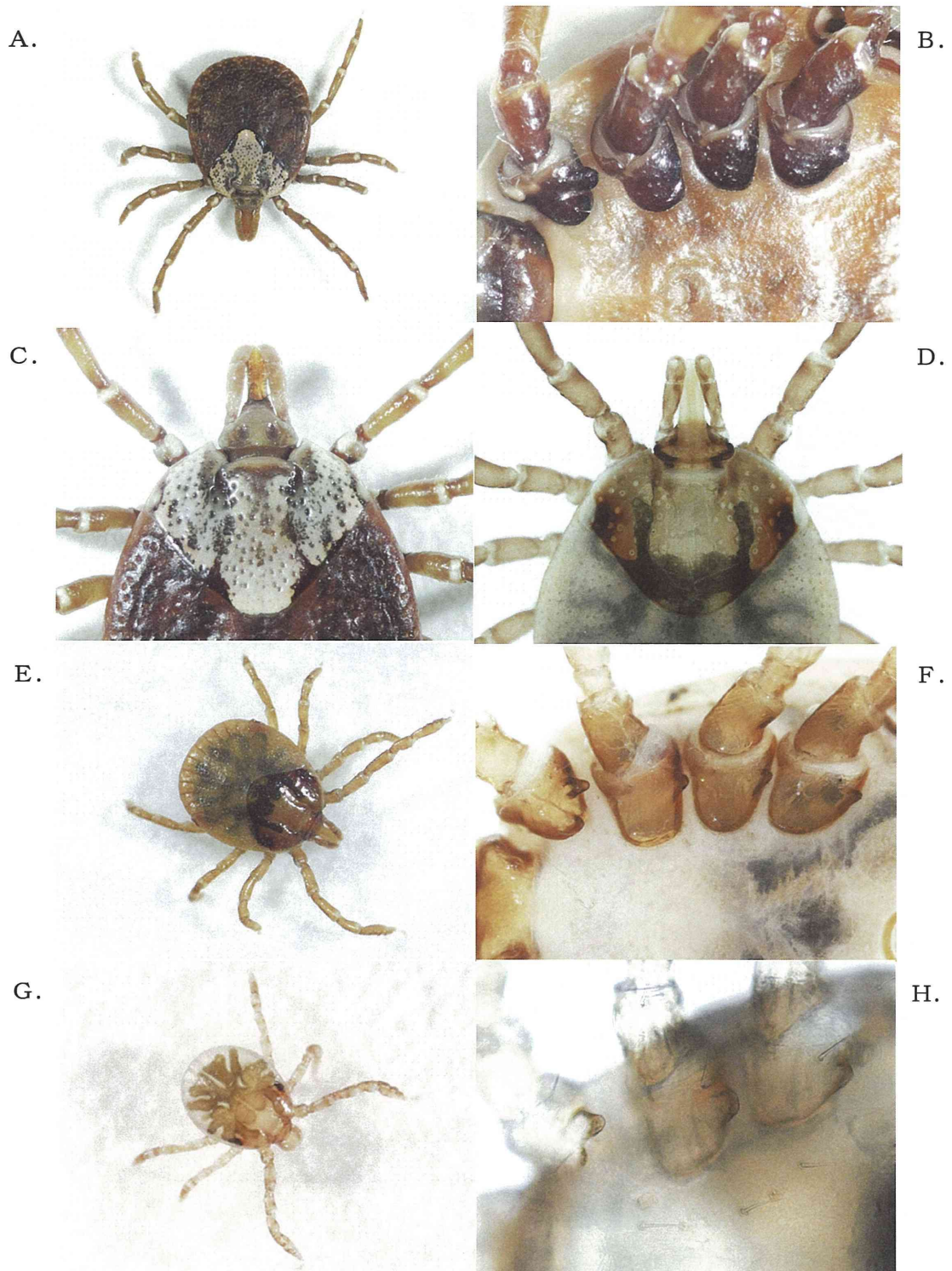


写真2. *Amblyoma testudinarium* タカサゴキララマダニ

- A. 成虫 背面 ♀    B. 成虫・基節    C. 成虫 ♀・背板    D. 若虫・背板  
 E. 若虫    F. 若虫・基節    G. 幼虫    H. 幼虫・基節

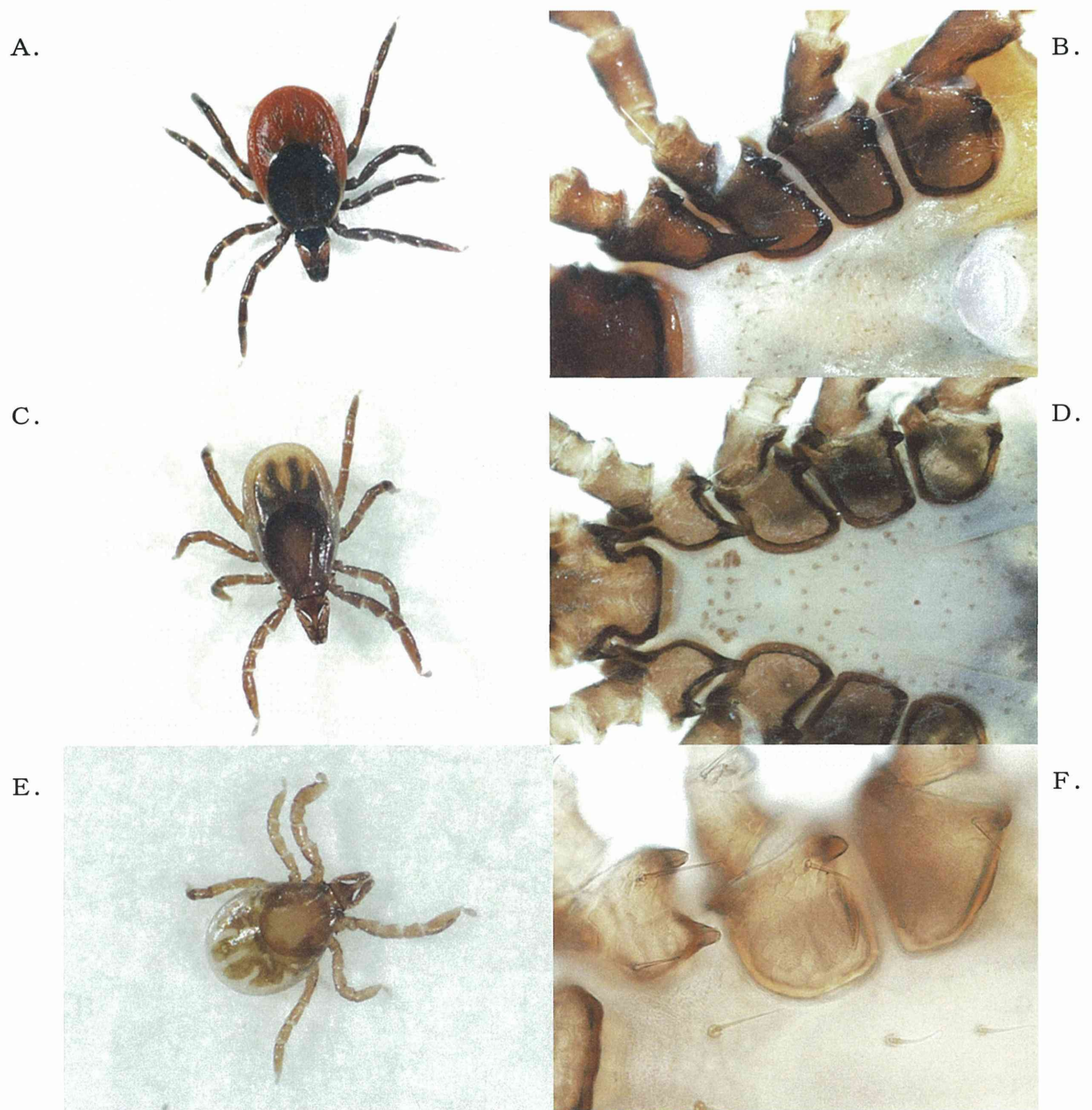


写真3. *Ixodes persulcatus* シュルツェマダニ

- |         |            |
|---------|------------|
| A. 成虫 ♀ | B. 成虫 ♀・基節 |
| C. 若虫   | D. 若虫・基節   |
| E. 幼虫   | F. 幼虫・基節   |



平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)  
ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる技術・情報の体系化に関する研究  
分担研究報告書

国内リケッチア症の実験室診断に関する全国状況調査

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	千葉 一樹	福島県衛生研究所
	山本 徳栄	埼玉県衛生研究所
	赤地 重宏	三重県保健環境研究所
	寺杣 文男	和歌山県環境衛生研究センター
	御供田 睦代	鹿児島県環境保健センター
	安藤 秀二	国立感染症研究所(研究代表者)

研究要旨

リケッチア症である「つつが虫病」及び「日本紅斑熱」は、感染症法で四類感染症に規定される重篤な熱性発疹性感染症であり、医療機関が診断した場合は届出が義務づけられ、実験室診断による確定が必須とされている。しかしながら、これらの実験室診断の主体施設である地方衛生研究所においては、人員不足や人事異動等による技術の低下で診断が困難になる施設が出ており、平成 24 年度の調査では、どちらの感染症においても、血清診断及び遺伝子診断の実施施設数が半数を下回った。この結果を受けて、検査法の開発、検査技術研修等を実施してきたが、平成 26 年度は、リケッチア症検査体制の現状を再度把握するため、全国を 6 地域に分け調査した。その結果、「つつが虫病」・「日本紅斑熱」両感染症とも、遺伝子診断の実施施設数が 50%を超え、それにともなって、「つつが虫病」・「日本紅斑熱」を血清診断または遺伝子診断で診断可能な施設数は、ともに 54.4%となった。また、実験室診断への導入部分である医療機関からの相談窓口は、地方衛生研究所や本庁感染症担当課が担当する自治体が増加し、より専門的かつ一元的な対応が可能な体制へ移行する傾向が伺われた。

A. 研究目的

リケッチア症はダニ媒介性細菌感染症であり、そのうち「つつが虫病」及び「日本紅斑熱」は感染症法で四類感染症に規定され、毎年

数百名の患者が報告される重篤な熱性発疹性感染症である。つつが虫の起原菌 *Orientia tsutsugamushi* の血清型は主として標準型 3 種 (Gilliam 型、Kato 型及び

Karp 型) 及び新型 3 種 (Kawasaki 型、Kuroki 型及び Shimokoshi 型) が知られているが、民間の検査機関で実施されているのは標準型の血清診断のみであり、新型の症例を見逃す恐れが指摘されている。また、日本紅斑熱の検査を実施しているのは一部の大学や研究機関と地方衛生研究所のみであり、民間検査機関では検査できないため、診断が困難となるケースが問題となっている。しかし、これらの実験室診断の主体施設である地方衛生研究所は、人事異動等による人員不足や技術の低下で診断が困難になる施設が報告されている。平成 24 年度の調査では、どちらの感染症においても、血清診断及び遺伝子診断の実施施設数は半数を割り込んでおり、地域協力体制構築の必要性が浮き彫りとなった。さらに、平成 25 年に、新たなダニ媒介性感染症として重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) が国内でも確認され、つつが虫病、日本紅斑熱と同様に四類感染症に規定されたため、これを含めたダニ媒介性感染症の鑑別・検査体制の再構築が急務となっている。そこで、全国的なりケッチア症検査体制に関する情報の更新と共有化を図ることを目的に、地方衛生研究所全国協議会に加入している 79 施設を対象として、平成 24 年度に引き続き調査を実施した。

## B. 研究方法

平成 26 年 11 月、地方衛生研究所全国協議会に加入している 79 施設 (北海道・東北・新潟地区: 12、関東・甲・信・静地区: 23、東海・北陸地区: 8、近畿地区: 14、中国・四国地区: 10、九州地区: 12) を対象として、平成 24 年度に実施した調査に基づくリケッチア症の実験室診断体制について、現状に合致するよう更新を依頼した。

## C. 研究結果

79 施設全てから回答が得られた (回収率 100%)。

### 1) つつが虫病の実験室診断

つつが虫病の実験室診断では、血清診断は 79 施設中 28 施設 (35.4%) で実施されており、前回調査より 3 施設 (3.8%) 減少した。(図 1)。抗原として、新型である Kawasaki 型、Kuroki 型 Shimokoshi 型等も使用しているのは 24 施設 (全実施施設の 85.7%、以下同じ)、うち Shimokoshi 型を使用しているのは 4 施設 (同 14.3%) であったのに対して、標準型 3 型 (Gilliam 型、Kato 型及び Karp 型) のみを使用しているのは 4 施設 (同 14.3%) にとどまった。前回調査と比較すると、新型を使用抗原として追加した施設が 2 施設 (Kawasaki 型、Kuroki 型追加 1 施設、Shimokoshi 型追加 1 施設)、標準型を追加した施設が 1 施設あった。遺伝子診断については、40 施設 (50.6%) で実施されており、前回調査より 4 施設増加した。(図 2)。検査材料については、25 施設が血液及び痂皮を、12 施設が血液、痂皮及び皮膚生検材料を、2 施設が血液を、また、1 施設が血液、咽頭ぬぐい液及び尿を使用していた。前回調査と比較すると、痂皮を追加した施設が 8 施設、皮膚生検材料を追加した施設が 9 施設あった。

血清あるいは遺伝子診断でつつが虫病を診断可能な施設は、43 施設 (54.4%) であったが、九州地域以外の 12 道府県は、同じ都道府県内にこうした施設がない現状であった。

### 2) 日本紅斑熱の実験室診断

日本紅斑熱の実験室診断では、血清診断は 79 施設中 29 施設 (36.7%) で実施されており、前回と比較して増減はなかった。抗原と

して、標準株である YH 株を使用しているのは 22 施設(全実施施設の 75.9%、以下同じ)、患者分離株等その他の株は 7 施設(同 24.1%)であった。

遺伝子診断については、42 施設(53.2%)で実施されており(図3)、前回調査より 4 施設(5.1%)増加した。検査材料については、27 施設が血液及び痂皮、10 施設が血液、痂皮及び皮膚生検材料、3 施設が血液のみ、1 施設が痂皮のみ、また、1 施設が血液、咽頭ぬぐい液及び尿を使用していた。前回調査と比較すると、痂皮を追加した施設が 6 施設、皮膚生検材料を追加した施設が 4 施設あった。

血清あるいは遺伝子診断で日本紅斑熱を診断可能な施設は、43 施設(54.4%)であったが、中国四国地域及び九州地域以外の 12 道府県は、同じ都道府県内にこうした施設がない現状であった。

### 3) 医療機関からの相談窓口・広報ホームページ

医療機関からの相談窓口については、「保健所」が 31 自治体(39.2%)、「保健所と地方衛生研究所の両方」が 20 自治体(25.3%)、「地方衛生研究所」が 14 自治体(17.7%)、「本庁担当課」が 3 自治体(3.8%)、「保健所と本庁担当課」が 2 自治体(2.5%)、「その他」が 1 自治体(1.3%)、「無回答」が 8 自治体(10.1%)であった。(図4)。前回調査と比較すると、「保健所」が 22 カ所減少し、代わって「地方衛生研究所」が 10 カ所、「保健所と地方衛生研究所の両方」が 3 カ所増加、また前回は見られなかった「本庁担当課」、「保健所と本庁担当課」を窓口とする自治体もみられた。

広報用ホームページについては、48 の自治体(60.8%)が開設していた。

なお、公表の承諾が得られた自治体については、広報用ホームページの URL と相談窓

口の一覧を示す(表1-6)。

### D. 考察

つつが虫病の血清診断が可能な施設は、79 施設中 28 施設であった。実施施設数が前回調査よりも 3 施設減少した一方で、新型と言われる Kawasaki 株、Kuroki 株、shimokoshi 株を使用抗原として追加する施設も見られ、技術レベルの低下と向上という相反する動きが見られ、地方衛生研究所間の差がさらに大きくなったと言わざるを得ない。日本紅斑熱の血清診断が可能な施設は、79 施設中 29 施設で前回調査と比較して減少こそなかったが、民間検査機関では実施できない検査であることを考えると、決して施設数が多いとはいえない。両感染症で血清診断に多く用いられる間接蛍光抗体法は、機器を用いた定量的な検査ではなく検査者の技術と経験に頼る部分が多い官能検査であるため、良質な抗原の調製が検査の信頼性の鍵となる。しかしながらリケッチア培養法の特殊性、特定病原体病原体である *Rickettsia japonica* の取り扱いの煩雑さから、良質な抗原の自家調製は、多くの地方衛生研究所にとって困難と考えられ、血清診断実施可能施設を増やすためには、安定した抗原の供給体制作りが、引き続き今後の課題である。

遺伝子診断法は、つつが虫病が 79 施設中 40 施設で、また、日本紅斑熱が 79 施設中 42 施設で実施されており、いずれも実施施設数が前回調査よりも 4 施設増加し、実施施設割合が 50%を超えた。これは、遺伝子診断法がプライマー、増幅条件等の基本情報を得られれば、リケッチアの取り扱い経験が無くても、比較的安定した結果を得られる検査法であるためと考えられる。迅速に結果が得られ、患者と

臨床家へのメリットも大きいと考えられるが、検体としてテトラサイクリン系抗菌薬投与前の血液が必要とされることが問題点となってきた。今回の調査では、採取時期が結果に影響しにくく検出率も高いと言われる痂皮や皮膚材料を、使用検体として追加した施設が多く見られ、この点も解決されつつあると考えられる。

血清あるいは遺伝子診断でつつが虫病および日本紅斑熱を診断可能な施設は、ともに54施設とようやく半数を上回った。これには遺伝子診断可能な施設の増加が寄与している。確実な診断のための血清診断の重要性の啓発と、実施体制の強化はもちろんであるが、それとともに、迅速に結果の判明する遺伝子検査についても、保健所や臨床家に対して検出率の高い痂皮や皮膚生検材料等の確保を啓発し、推進していく必要があると思われた。

医療機関からの相談を受ける窓口は、実験室診断への導入となる重要な部分であるが、前回の調査では、感染症法の業務を担う主体である「保健所」が多く窓口となっていた。これに対して、今回の調査では、依然「保健所」が窓口である自治体も多いが、「地方衛生研究所」、「保健所と地方衛生研究所の両方」、「本庁担当課」、「保健所と本庁担当課」等に窓口を置く自治体が増加した。これは、リケッチア感染症に関して、より専門的な対応と実際の検査実施へつながる一元的対応が可能な体制へ移行する傾向と考えられた。

#### E. 結論

リケッチア症の実験室診断体制については、血清診断と遺伝子診断の2本立てとなっているが、最も確実な診断方法である血清診断については、依然、抗原の安定供給に課題を残した状態にあり、この課題解決を図る必要があ

る。一方、遺伝子診断は迅速に結果が判明し、また、リケッチア症診断の経験のない施設でも比較的安定した結果が得られるメリットがあり、遺伝子診断に適した検体の確保等について啓発推進していくことも必要と考えられる。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 岸本壽男:小児の治療指針3. 感染症リケッチア感染症(つつが虫病、日本紅斑熱) 小児科診, .診断と治療社2014年増刊号 77: 153-154, 2014

2) 岸本壽男:グラム陰性細菌 リケッチア目, クラミジア目 病原微生物学 基礎と臨床 荒川宜親ほか編 東京科学同人 105-107, 2014

##### 2. 学会発表

1) 岸本壽男, 濱野雅子, 木田浩司, 磯田美穂子, 藤原香代子, 松岡保博, 藤井理律志:岡山県におけるダニ媒介感染症に関連するマダニ調査について, 第7回日本リケッチア症臨床研究会, 2015年1月10-11-, 滋賀

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特記事項なし

##### 2. 実用新案登録

特記事項なし

##### 3. その他

特記事項なし