

に *Bst*VI と *Dde*I、マダニ属は *Asc*I と *Pst*I を中心とした最大 4 酵素の切断パターンを比較検討、遺伝子配列解析とほぼ同等の結果が得られることを見出した。費用等もダイレクトシーケンス法を用いた場合と比較し安価で、PCR 装置のある実験室等であればすぐに実施可能であること等、非常に有用であることも判明した。これら手法を用い三重県下のマダニ種を同定したところ、春季にはフタゲチマダニ、秋季にはオオトゲチマダニが優占種であることが判明したが、種の多様性を示す採取地点も存在した。

・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）

和歌山県内で確認されている日本紅斑熱症例の多くは、紀伊半島南端部が感染推定地域であるが、一方で近年、県北部周辺地域での感染が疑われる症例も継続的に確認されている。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、患者発生地域におけるマダニ類のフィールド調査を実施した。採取したマダニ類の内、12 種計 638 匹を調べた結果、ヤマアラシチマダニ 1 匹から *R. japonica* 遺伝子を検出した。

・鹿児島県薩南諸島のリケッチア症について（研究協力者：御供田睦代 鹿児島県環境保健センターほか）

薩南諸島のリケッチア症は、1990 年 3 月の徳之島における日本紅斑熱患者発生記録が最初である。その後、つつが虫病が、2001 年 12 月に大隅諸島の屋久島で 1 名、2001 年～2004 年にトカラ列島の口之島、中之島、諏訪之瀬島、悪石島で各 1 名の患者が発生している。日本紅斑熱患者は、奄美諸島の奄美大島で 2006 年～2013 年に 7 名、徳之島で 1990

年～2011 年に 3 名の発生となっている。

これらのリケッチア症の感染原因とされる媒介ダニ類と病原体リケッチア等の検出を行うため、患者発生地域とその周辺地域での調査を 2004 年度から 2014 年度に行った。奄美大島では、2011 年度に日本紅斑熱患者発生地で採集した *Haemaphysalis hystricis* (ヤマアラシチマダニ) から、*R. japonica* を分離した。悪石島では、つつが虫病の媒介種であるタテツツガムシを 2012 年 12 月に初確認し、中之島でも 2014 年 1 月に初確認した。また、中之島においては、アカネズミ脾臓から *O. tsutsugamushi* (Kuroki 型) を確認した。

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ダニ媒介性感染症に関する研修会について（研究協力者 佐藤 寛子 秋田県健康環境センターほか）

北海道・東北・新潟ブロックは多くの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が発生する高リスク地域である。今回、われわれはこれら様々なリケッチア症のうち、つつが虫病の血清抗体価測定法について、ブロック内技術研修を行った。研修においては、実習を行うと共に詳細なマニュアルを作成することで、今後も想定される担当者の異動に配慮した診断体制の充実と構築を目指した。

・近畿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：寺杣文男 和歌山県環境衛生研究センターほか）

マダニ類のフィールド調査技術の習得・向上を目的として、近畿ブロックの地方衛生研究所担当者を対象として研修会を開催した。内容は、大阪府阪南市の山中溪「銀の峯ハイキ

ングコース」内でのフラグging法によるマダニ類の採取と、顕微鏡鏡検下での種の同定実習、及び講義とした。計 11 施設から参加があり、各参加者がマダニ類の採取を行った。採取したマダニ類の一部については形態観察を行い、4 属 8 種を同定した。

③リケッチア症検査体制に関する現状把握と問題点の抽出と地域発信情報

国内リケッチア症実験室診断体制に関する情報を更新するため、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に対して、前年度からの状況変化を確認、情報発信状況を確認整理した。また、他の鑑別を要する感染症との取り扱いについて調査を行った。

秋田県は高病原性 Kato 型つつが虫病患者が現在も国内で唯一確認され、今年度も前回(2008 年)の患者感染推定地と同一地点での患者発生が確認された。そのため、媒介種アカツツガムシ生息調査結果を元に感染推定地の自治体や関連機関へ今後の対策についての説明会を行った。さらに、早期治療が重要とされるつつが虫病について医療機関を対象とした啓発を行った。紅斑熱群リケッチア症については、福島県、新潟県での日本紅斑熱患者発生を受け、今後他地域での患者発生に備える検査体制構築のための準備を行った。

宮崎県では、つつが虫病と日本紅斑熱が発生し、日本紅斑熱と同じくマダニが媒介する SFTS 発生も確認されている。今回、つつが虫病、日本紅斑熱及び SFTS の相違点と県内で発生した SFTS の現状について調査を行った。SFTS とリケッチア症では発生時期、地域に若干の違いが認められた。臨床症状は刺し口、発疹の出現に差が認められた。SFTS 陽性例については平成 25 年 1 月 30 日付け厚生労働省健康局結核感染症課長通知の記載項目へ

の適合状況をみたところ、陽性例でも全項目が適合するのは約 7 割あり、全て適合しない症例でも早期の SFTS 検査が必要と考えられた。

リケッチア症は地域特性が大きく、継続的に疫学調査が行われることが、啓発に資する科学的データの蓄積のためにも望ましい。また検査法も、地域特性に合わせた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詳細と考察に関しては、研究協力者の各報告書を参照いただきたい。

E. 結論

今後とも、リケッチア症はじめとしたダニ媒介性細菌感染症対策をより広くすべての病原体にも応用できるように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、検査体制に関する現状の把握と問題点の抽出、改善の試行を継続していく必要がある。

F. 健康危険情報

あり(総括報告書に記載)

G. 研究発表

それぞれの研究協力者の報告書を参照

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

Ⅲ. 研究班 連携・支援による ラボネットワークの活動

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
および啓発について

| | | |
|-------|-------|-----------------|
| 研究協力者 | 佐藤 寛子 | 秋田県健康環境センター |
| | 千葉 一樹 | 福島県衛生研究所 |
| | 木村 政明 | 青森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

北海道・東北・新潟ブロックは多くの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が発生する高リスク地域である。今回、われわれはこれら様々なリケッチア症のうち、つつが虫病の血清抗体価測定法について、ブロック内技術研修を行った。研修においては、実習を行うと共に詳細なマニュアルを作成することで、今後も想定される担当者の異動に配慮した診断体制の充実と構築を目指した。また、秋田県における事業として各種啓発活動を行った。当県は高病原性の Kato 型つつが虫病患者が現在も国内で唯一確認されており、今年度も前回(2008 年)の患者感染推定地と同一地点での患者発生が確認された。そのため、媒介種アカツツガムシの生息調査結果(既報)を元に感染推定地の自治体および関連機関へ今後の対策についての説明会を行った。さらに、早期治療が重要とされるつつが虫病について医療機関を対象とした啓発を行った。紅斑熱群リケッチア症については、福島県、新潟県での日本紅斑熱患者発生を受け、他地域での今後の患者発生に備えるため、検査体制構築のための準備を行った。

A. 研究目的

当ブロック内で発生するつつが虫病患者数は全国トップレベルを記録し続けている。

加えて、高病原性 Kato 型つつが虫病(秋田県)と、発生が稀であるという認識から多くの検査機関で検査対象外となっている Shimokoshi 型つつが虫病(秋田県・山形県・福島県・新潟県)が確認されるなど、同ブロック内においてつつが虫病は患者数のみならず病原体の多様性にも富んでおり、対策は一律

に行えないことを示している。さらに、発生は西日本のみと思われていた紅斑熱群リケッチア症が 2007 年、2008 年の青森県・宮城県での患者発生を契機に 2011 年、2014 年には福島県、新潟県においても日本紅斑熱患者の発生報告があり、幅広いリケッチア症の対策を講じることが求められている。そのため、各県の地方衛生研究所(地衛研)には、各々の実態と実情に合わせた検査体制の構築が求められるが、担当者の定期的な異動や配置転換などにより、

高い専門性と熟練した技術の保持が困難であるのが現実である。そこで、コア地衛研と位置付けた青森・秋田・福島の3県が互いにサポートし合うことにより近隣県も含めたラボネットワーク体制を維持することを目的とし、検査技術共有のための技術研修を実施した。加えて、紅斑熱群リケッチア症の検査体制を整えるべく準備を行った。さらに、秋田県においては啓発活動としてつつが虫病と日本紅斑熱群についての情報提供を行った。

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マニュアル作成

現在の抗体検査のために必要とされる技術について、L292細胞の維持、*Orientia tsutsugamushi*の接種、血清抗体価測定用抗原の調製、2次血清の検定および抗体検査判定法について、各工程を詳細に示すこととした。

(2) 血清抗体価測定に関する技術研修

血清抗体価測定に関する技術研修

2014年10月30日、10月31日に福島県衛生研究所P3実験室においてマニュアルを元に技術研修を行うこととした。

(3) 紅斑熱群リケッチア症の検査体制の準備

紅斑熱群リケッチア症の病原体の迅速な検出のため、Real-time PCR(Kawamoriら)に対応する試薬と陽性コントロールの整備を行うこととした。

2. 秋田県における医療機関と地域へ向けた啓発

県内の各関係機関につつが虫病に関する情報提供および啓発を行った。医療機関に対しては紅斑熱群リケッチア症に関する情報提供も行った。

C. 研究結果

1. 検査体制整備について

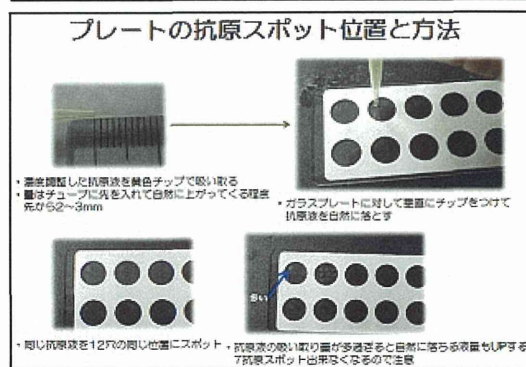
(1) 血清抗体価測定に関するマニュアル

抗体検査は検査に用いる抗原調整に時間と熟練を要するため、実際の作業工程を写真で示し「見てわかるマニュアル」とした。

(2) 血清抗体価測定に関する技術研修

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。



※マニュアルの一部



※作業風景

(3) 紅斑熱群リケッチア症の検査体制の前準備

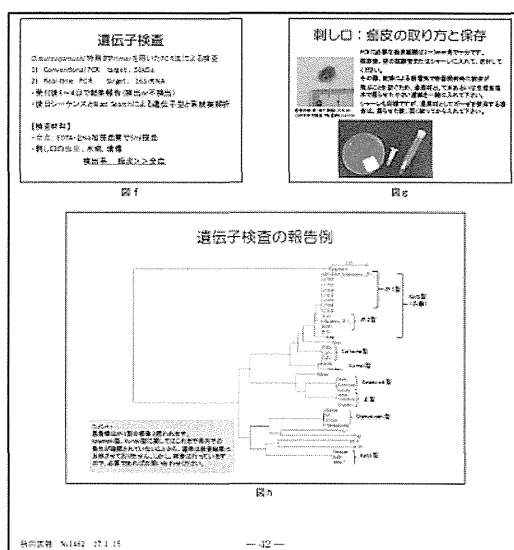
Real-time PCR による迅速な検査診断試薬を福島・秋田の両県で準備した、今後各県へ分配することとしている。

2. 秋田県における医療機関とアカツツガムシ生息地域へ向けた啓発

(1) 医療機関へ向けた啓発

2014年11月25日、秋田県医師会の主催により「ツツガムシ病について」と題した県医師会理事および会報編集メンバーとの座談会が開催され、確定診断のための遺伝子検査および血清学的検査とそれぞれに対応する検査材料について情報提供を行った。加えて検査結果の解釈についても説明した。県医師会からは啓発ポスターを医療機関の他、道の駅やJA関連の施設に掲示することなどの具体的な要望が案として示された。座談会の内容と検査法に関する資料は、pdfデータとして秋田県医師会のHPに公開された(以下、HPアドレス)。

http://www.akita.med.or.jp/_app/webroot/js/kcfinder/upload/files/261125.pdf



※資料一部

(2) 高病原性 Kato 型つつが虫病患者発生地域への啓発

昨年度までの研究で判明した Kato 型つつが虫の媒介種であるアカツツガムシは雄物川流域に限局した生態系を持つ。この生息域における患者発生地点について、地元自治体(大仙市)および国交省河川事務所(湯沢)に報告した。これにより、来年度、大仙市はアカツツガムシの幼虫発生前までに感染の注意喚起をする看板を感染推定地付近に設置することとした。国交省河川事務所は、アカツツガムシ生息域で作業をする職員に対し、作業前の指導徹底と県作成の啓発パンフレット配布することとした。

D. 考察

リケッチア症の検査診断において、血清抗体価による検査は欠かせないものであるが、これには熟練した技術が必要となる。しかし、各地衛研は、定期的な異動や配置換えがあるため、技術の伝達や維持が難しい状態にある。今回実施した血清抗体価測定に関する技術研修は、昨年度も実施したが、前述したように、レファレンスセンターを含む複数の県で検査経験者が異動となったため、今年度もやむを得ず行うこととなった。検査技術の断絶を避けるため、今回は写真を多用したマニュアルを作成し、今後の急な人事に備えた研修とした。検査工程を写真として示すことで研修に参加していない技術者への伝達をこれまでよりも簡略化することができたと思われる。

秋田県は、前述のとおり現在国内で唯一高病原性の古典型つつが虫病患者が認められているが、今年度、新たに確認された患者は2008年の患者と同一地点での感染の可能性が濃厚であることが判明した。そのため、同地

点を重要危険エリアと特定し、昨年度までに作成したアカツツガムシの生息域を示すハザードマップを参考に地元自治体へ情報提供したが、これにより、注意喚起の看板を設置することが決定した。危険域への立ち入りを注意する看板は、Kato 型つつが虫病が多発していた1980年代には多くみられたが、看板の老朽化と共に患者数が減少したことから、近年は設置されていない。しかし、今回は、危険性を十分に理解した地元自治体が感染予防対策費に看板の更新費用も組み込むことになった。

熱性発疹症であるつつが虫病は初期症状が類似する疾患が多く、さらに近年、つつが虫病患者の診療機会がない医師も少なくない。また、患者が初診で訪れる診療科は皮膚科、内科、循環器科、救急外来など多岐に渡るため、多くの診療科医師につつが虫病の早期診断と治療を呼びかける必要がある。秋田県においては、2013年に死亡例確認されていることから、県医師会は、医師に向けた啓発としてつつが虫病に関する座談会を開催し、会報へ掲載することを決定した。この会の中で筆者は紅斑熱群リケッチア症も加えた検査診断に関する情報提供をすると共に啓発に関する医療機関サイドの要望を把握することができた。県医師会からは啓発法の工夫としていくつかの案が提示されたが、これらはすべて来年度以降の感染予防対策に活用することが予定されている。本会の内容は印刷物として県内全医療機関へ配布されたが、反響が大きかったことから、県医師会が会員以外の医師や関係者も参考として活用できるようHP上にpdfデータが一般公開となった。検査診断ネットワークは、検査技術が向上しても医療機関および各地方自治体との連携がなくては完成しない。今年度は様々な機関との協力を得ることができたが、

これを単発のものとして継続することとしたい。

近年、当ブロックはつつが虫病の他、紅斑熱群リケッチア症も発生することが明らかとなってきた。秋田県では、2014年10月に紅斑熱群リケッチア症の病原体保有ヒトツツゲマダニの刺咬例が確認され、今後、紅斑熱群リケッチア症患者が発生する危険性の警鐘となった。紅斑熱群リケッチア症は、当ブロック全体において住民はもとより医療機関においても馴染みがないことから、受診や治療の遅れが懸念される。今後は当ブロック内における紅斑熱群リケッチア症の検査診断体制構築も視野に入れ、マダニ媒介性疾患に関するリスクの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

今回、福島県・青森県の各担当者が異動となったため再度の技術研修を実施したが、本ブロック内における検査体制ネットワークとサポート体制を保持する上で非常に有意義であったと思われる。さらに、秋田県においては啓発に関し充実した対応をとることができたが、今後も各地方の実態と実情に見合った検査体制の整備を進めるとともに、様々なリケッチア症の啓発を継続することが肝要と考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 佐藤寛子, 柴田ちひろ, 斎藤博之, 須藤恒久: 秋田県における Shimokoshi 型つつが虫病の遡及的疫学調査. 衛生動物, 65, No.4, 183-188, 2013

2. 学会発表

- 1) 佐藤寛子: つつが虫病 リスクコミュニケーションの在り方. 衛生微生物協議会第35回研究会. 2014年6月27日. 東京都.
- 2) 千葉一樹, 吉田学, 門馬直太, 藤田博己, 笹原賢司: 福島県における2014年つつが虫病調査報告. 第21回リケッチア研究会発表会. 2014年12月20日. 東京都.
- 3) 佐藤寛子, 村井博宣, 藤田博己, 柴田ちひろ, 秋野和華子, 安藤匡子: 秋田県における *Richettsia helvetica* 保有マダニ刺咬例初確認と感染推定地の調査. 第21回リケッチア研究会発表会. 2014年12月20日. 東京都.

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

リケッチア感染症の調査技術の維持に関する検証

～ 埼玉県内のイヌ、ネコにおける *Coxiella* 属および

Rickettsia 属に対する血清抗体価—第3報—～

| | | |
|-------|-------|---------------------|
| 研究協力者 | 山本 徳栄 | 埼玉県衛生研究所臨床微生物担当 |
| | 近 真理奈 | 埼玉県衛生研究所臨床微生物担当 |
| | 伊佐 拓也 | 埼玉県動物指導センター |
| | 杉山 郁 | 埼玉県動物指導センター |
| | 根岸 努 | 埼玉県動物指導センター |
| | 新井 陽子 | 埼玉県動物指導センター |
| | 小山 雅也 | 埼玉県動物指導センター |
| | 三田 和正 | 埼玉県動物指導センター |
| | 藤田 博己 | 馬原アカリ医学研究所 (研究分担者) |
| | 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) |

研究要旨

埼玉県におけるリケッチア感染症の調査の一環として、イヌおよびネコを対象とした病原微生物の保有状況を調査した。Q熱、日本紅斑熱および発疹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。イヌの血清 357 検体において、*Coxiella burnetii*、*Rickettsia japonica* および *Rickettsia typhi* に対する IgM および IgG 抗体価のいずれかが 64 倍以上を示す検体をそれぞれ認めた。

また、ネコの血清 84 検体において、*C. burnetii* に対する IgM 抗体、*R. japonica* に対する IgM 抗体、*R. typhi* に対する IgM 抗体および IgG 抗体のいずれかが 64 倍以上を示す検体をそれぞれ認めた。

一方、全血 94 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。遺伝子検査はさらに多くの検体について実施し、県内に侵淫するリケッチア類を特定する必要がある。また、検査技術の維持の検証も随時併行させていく。

A. 研究目的

当所では、1999年5月より動物指導センターとの共同研究として、イヌおよびネコを対象

とした人獣共通感染症に関する調査を実施している。今回は、2011年10月以降の検体について、Q熱、日本紅斑熱および発疹熱の各

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

2011年10月～2014年9月の期間に採取したイヌおよびネコの血清および全血を対象とした。*C. burnetii* II相菌、*R. japonica*および*R. typhi*について抗原プレートを作成した。二次抗体にはHRP標識免疫血清を用い、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。

全ての検体についてIgMおよびIgG血清抗体価を測定し、抗体価が32倍以上を示した個体の全血については、Neasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を使用し、DNA抽出を行った。*C. burnetii*については*Coxiella*外膜蛋白 *com1* 遺伝子を標的とし、紅斑熱群および発疹チフス群リケッチアは17-kDa膜タンパクおよびクエン酸合成酵素 *gltA* をコードしている遺伝子を標的とした各プライマーを用いてNested-PCR法を実施した。また、*R. japonica* および *R. typhi* については、17-kDa膜タンパクをコードしている遺伝子を標的とした各プライマーを用いてPCR法を実施した。

C. 研究結果およびD. 考察

イヌの血清357検体についてIgMおよびIgG抗体価を測定した。64倍以上であったのは*C. burnetii*に対するIgM抗体が2検体(0.6%)、IgG抗体が4検体(1.1%)、*R. japonica*に対するIgM抗体が3検体(0.8%)、IgG抗体が11検体(3.1%)であり、*R. typhi*に対するIgM抗体が11検体(3.1%)、IgG抗体が20検体(5.6%)であった。

また、ネコの血清84検体については、64倍以上であったのは*C. burnetii*に対するIgM抗体が2検体(2.4%)、IgG抗体は0検体、*R. japonica*に対するIgM抗体が4検体(4.8%)、IgG抗体は0検体であった。また、*R. typhi*に対するIgM抗体が3検体(3.6%)、IgG抗体が1検体(1.2%)であった。

一方、各病原体の遺伝子解析では94検体についてPCR法を実施した結果、紅斑熱群、発疹チフス群の17-kDa膜タンパク遺伝子で2検体、*gltA* 遺伝子で1検体、*R. typhi* の17-kDa膜タンパク遺伝子で6検体において、複数の増幅産物と共に目的とした大きさの増幅産物が認められた。そこで、当該部位のゲルを切り出して精製し、塩基配列を解析したが、全て陰性であった。

前回、アライグマの血清1,228検体におけるIgG抗体価の測定結果を報告した。*C. burnetii* ではすべて16倍未満であったが、64倍以上を示した検体は*R. japonica* では13検体(1.1%)、*R. typhi*は4検体(0.3%)であった。このことから、イヌはアライグマと比較して明らかに高い抗体保有率であることが分かった。媒介ダニ類が宿主動物の種類ごとに寄生頻度が異なっていることが示唆され、それに応じた病原体との関わり方があることが推測される。

遺伝子検査においても前回同様の手技を踏襲し、全血94検体について標的遺伝子の増幅を試みたが、各病原体の特異的遺伝子は検出されなかった。

埼玉県にける日本紅斑熱の患者は、1999年に1名の届出があるが、それ以降は無いことから、*R. japonica*の密度は低く、県民の感染リスクも低いものと考えられた。

本研究の材料は、動物指導センターによっ

て採材され、提供されたものである。そして、その調査結果は県民の健康情報に関する基礎データとなるものである。今後も本研究を継続し、県内に侵淫するリケッチア類の実態の一層の解明が望まれる。

E. 結論

埼玉県内イヌおよびネコの血清について、各種リケッチアに対する抗体価を測定した。その結果、イヌの血清 357 検体において、*Coxiella burnetii*、*Rickettsia japonica* および *Rickettsia typhi* に対する IgM および IgG 抗体価のいずれかが 64 倍以上を示す検体をそれぞれ認めた。

また、ネコの血清 84 検体において、*C. burnetii* に対する IgM 抗体、*R. japonica* に対する IgM 抗体、*R. typhi* に対する IgM 抗体および IgG 抗体のいずれかが 64 倍以上を示す検体をそれぞれ認めた。

一方、全血 94 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。

遺伝子検査においては、血清検体と同等のさらに多くの検体について実施する必要がある。同時に調査に必須な各種検査法を含む調査技術も検証しつつ、維持に努めて行く必要がある。この埼玉県の事例を、他の自治体でも対応の参考にしていただきたい。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表：特記事項なし

2. 学会発表

1) 山本徳栄、近 真理奈、伊佐拓也、杉山 郁、根岸 努、新井陽子、小山雅也、三田和正、藤田博己、岸本寿男、安藤秀二：埼玉県内のイヌ、ネコにおける *Coxiella* 属および *Rickettsia* 属に対する血清抗体価－第3報－. 第21回リケッチア研究会. 東京. 2014年12月20日.

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

PCR-RFLP 法を中心とした分子生物学的マダニ同定法の検討

研究協力者 赤地 重宏 三重県保健環境研究所
楠原 一 三重県保健環境研究所
小林 隆司 三重県保健環境研究所

研究要旨

リケッチア感染症の調査には、媒介動物であるマダニ種の同定が不可欠であるが、形態学的なマダニ種の同定は熟練を要する。そこで、PCR-RFLP 法を用いた簡便で安価なマダニ種同定法を検討した。Takanoら既報のマダニ科 7 属 39 種の *mt-rrs* 遺伝子を PCR で増幅後、マダニ属以外のものについては主に *Bst*YI と *Dde*I、マダニ属については *Ase*I と *Pst*I を中心とした最大 4 酵素の切断パターンを比較検討することで、遺伝子配列解析とほぼ同等の結果が得られることを見出した。また、費用等についてもダイレクトシーケンス法を用いた場合と比較し安価であること、PCR 装置のある実験室等であればすぐに実施可能であること等、非常に有用であることも判明した。これら手法を用い三重県下のマダニ種を同定したところ、春季にはフタゲチマダニ、秋季にはオオトゲチマダニが優占種であることが判明したが、種の多様性を示す採取地点も存在した。さらに、日本紅斑熱患者発生地域で採取されたフタゲチマダニおよびツノチマダニから *Rickettsia japonica* 遺伝子を検出した。

A. 研究目的

近年、日本国内において重症熱性血小板減少症候群(SFTS)や日本紅斑熱、ライム病、回帰熱等、マダニ刺咬による感染症が注目されている¹⁻⁴⁾。同時に、媒介動物であるマダニの生息状況や病原体の保有状況等の調査が並行して実施されることもあり、多くの場合、マダニ種の同定が不可欠となる⁴⁻⁵⁾。しかしながら、現在の形態学的種別同定法は熟練を要する点も多く、経験の浅い技術者が着手することは困難と考えられる。そこで、形態学的同定法の補助手段として、PCR-RFLP 法を中心とした安価で簡易な分子生物学的な手法を検討し

た。また、同手法を用い、三重県で捕獲されたマダニの同定を試みた。

B. 研究方法

1) マダニ由来遺伝子

マダニ個体については平成 23 年～26 年に三重県において環境中に生息あるいは動物に付着し、捕獲後-80℃にて保管されていたものを使用した。環境中からのマダニの採取は 80cm 四方のネル生地による Flag 法を用い、一人の術者で 1 か所 30 分を目安に実施した(図 1)。動物に付着した個体については、獣害対策として捕殺されたニホンジカもしくはイノシ

シの皮膚に固着していたマダニを回収し使用した(図 1)。これらマダニより Instagene Matrix(Bio-Rad)を用い、ヒートブロック等を用いた熱抽出によりマダニ由来遺伝子(DNA)を抽出した(図 2)。

2) 制限酵素の選択

Takano ら⁶⁾既報のマダニ科 7 属 39 種の *mt-rrs* 遺伝子配列に対し、New England Biolab 社の Web ツール(Nebcutter)等によって、RFLP 法により PCR 産物の切断パターンが種に応じ特徴的となる酵素を選択した(図 3)。その際、アガロースで電気泳動することを考慮し、切断パターンが比較的単純なものとなる酵素を優先的に採用した。

3) PCR-RFLP

抽出したマダニ由来遺伝子に対し、*mt-rrs* 遺伝子を標的とした PCR 法(KOD-FX(TOYOBO))を実施した。手法は Takano ら⁶⁾の報告に基づき、5'-CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG-3' と 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCAAGTA-3' のプライマーセットを用い、94°C 10sec.、55°C 30sec.、72°C 30sec.、30cycle の条件で PCR を実施した。その後得られた PCR 増幅産物に対し選択した制限酵素を用い RFLP を実施し、PCR 産物切断パターンによりマダニ種を同定した(図 2)。

C. 研究結果

マダニ由来遺伝子の抽出については Instagene Matrix を用いた場合、マダニ個体断片を 96 穴マイクロプレートに入れサーマルサイクラーを利用して熱抽出する方法で多検体を迅速に処理することが可能であった。使用す

る制限酵素については、既報のマダニ 39 種の *mt-rrs* 遺伝子を各個に比較し、切断パターンが各マダニ種に特徴的となる酵素を検討した。結果、マダニ属とそれ以外のマダニ科の形態判別を加えることで、マダニ属以外については *Bst*YI、*Dde*I を中心とした最大 4 酵素(図 4、5)、マダニ属に対しては *Psi*I、*Ase*I を中心とした最大 4 酵素(図 6)の切断パターンによる PCR-RFLP 法により、遺伝子配列解析を用いずとも種別同定が可能となることが判明した。マダニ属とそれ以外のマダニ科の判別は尾部の形状を比較するのみでよく、形態学的特徴のみによる同定と比較して簡易であると考えられた。また、検査にかかる費用は遺伝子配列解析をダイナーミネーター法で実施する場合と比較し、約 1/20 まで節約することが可能であった。これら手法を用い三重県のマダニ種を同定したところ、地域によって若干の差はみられるものの、環境中マダニにおいては春季にはフタトゲチマダニ、秋季にはオトゲチマダニが優占種であった。また、検討した範囲において形態学的な同定法と PCR-RFLP 法による同定法の結果は一致していた。さらに、抽出した核酸を用いマダニ保有病原体の調査を実施したところ、同一地点で 2012 年 10 月に捕獲されたフタトゲチマダニおよび 2014 年 6 月に捕獲されたツノチマダニより *R. japonica* 遺伝子が検出された(図 7)。

D. 考察

マダニの形態学的同定は特徴の把握が困難な場合も多く、万人が実施するのは難しいと考えられる。今回実施した PCR-RFLP 法を用いた手法は安価かつ簡易であり、使用機材も PCR 法による遺伝子検出と大差ないため、PCR 法等の検査を実施している施設であれ

ば即応用が可能であると考えられ、衛生研究所・保健所等でのマダニ同定に大いに役立つと思われる。一方、遺伝子学的同定と形態学的同定の結果に差が生じることは、マダニに限らず多くの生物で知られている。mt-*rrs* 遺伝子を用いた場合の形態学的同定との大きな乖離は現在のところ報告されていないが、Takano らの報告にはヤマトチマダニとダグラスチマダニは分類不能なこと、安易に BLAST 結果のみの一致率で決定すると誤同定の可能性があること等⁶⁾の指摘がある。これらの点から、現在のところは遺伝子学的同定法は形態学的同定法の補助手段と位置付けて考えるべきと思われる。

遺伝子学的手法を取り入れた結果、マダニ種の同定は非常に簡易なものとなり、三重県内のマダニ種の季節消長を把握するのが容易となった。また、日本紅斑熱多発地域のマダニより *R.japonica* 遺伝子が検出されており、病原体がマダニ内で保持されていることを伺わせる。今後、マダニ種の季節消長と日本紅斑熱患者発生との関係等、生物地理学的観点からの疾病の動態が検討可能になると考えられた。

E. 結論

PCR-RFLP 法を基礎としたマダニ種同定法は安価かつ簡便であり、PCR 装置等を持つ実験室であれば手軽に応用できることが推察された。分子生物学的な同定の限界はあるものの、未経験者が実施する方法としては有用と考えられる。今後、リケツチア感染症発地域でのマダニ種同定等に活用できると考えられた。

参考文献

- 1) Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. 2013. The first identification and retrospective study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Infect Dis.* 209, 816-827.
- 2) 馬原文彦, 古賀敬一, 沢田誠三, 谷口哲三, 重見文雄, 須藤恒久, 坪井義昌, 大谷明, 小山一, 内山恒夫, 内田孝宏:わが国初の紅斑熱リケツチア感染症 感染症学雑誌59:1165-1172, 1985.
- 3) Kawabata H, Tashibu H, Yamada K, Masuzawa T, Yanagihara Y. 1994. Polymerase chain reaction analysis of *Borrelia* species isolated in Japan. *Microbiol Immunol.* 38, 591-598.
- 4) Takano A, Toyomane K, Konnai S, Ohashi K, Nakao M, Ito T, Andoh M, Maeda K, Watarai M, Sato K, Kawabata H. 2014. Tick surveillance for relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in Hokkaido, Japan. *PLoS One.* 9, e104532.
- 5) Takada N, Fujita H, Yano Y, Ishiguro F, Iwasaki H, Masuzawa T. 2001. First records of tick-borne pathogens, *Borrelia*, and spotted fever group *Rickettsiae* in Okinawajima Island, Japan. *Microbiol Immunol.* 45, 163-165.

6) 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., Andoh M., Sato K., Kawabata H. 2014. Construction of a DNA database for ticks collected in Japan: application of molecular identification based on the mitochondrial 16S rDNA gene. *Med. Entomol. Zool.* 65, 13-21.

F. 健康危険情報
特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表：特記事項なし
2. 学会発表：特記事項なし

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

図1 環境中および動物付着個体からのマダニの採取

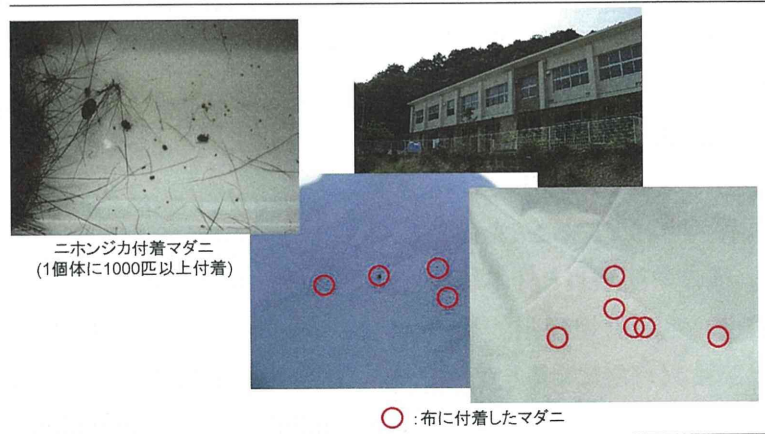
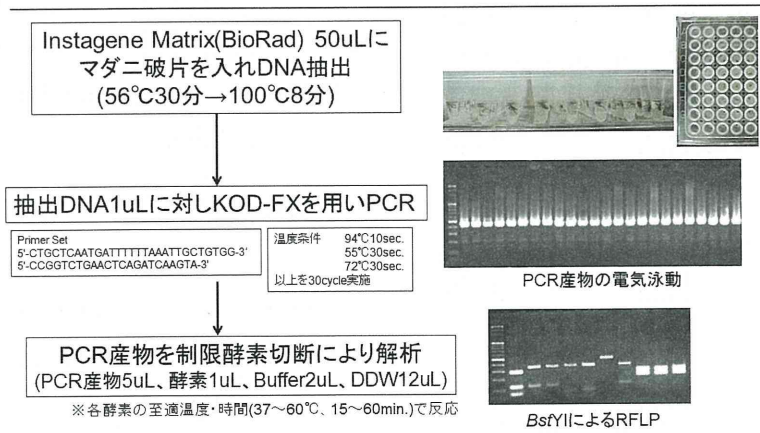


図2 PCR法による mt-rrs 遺伝子の増幅と RFLP



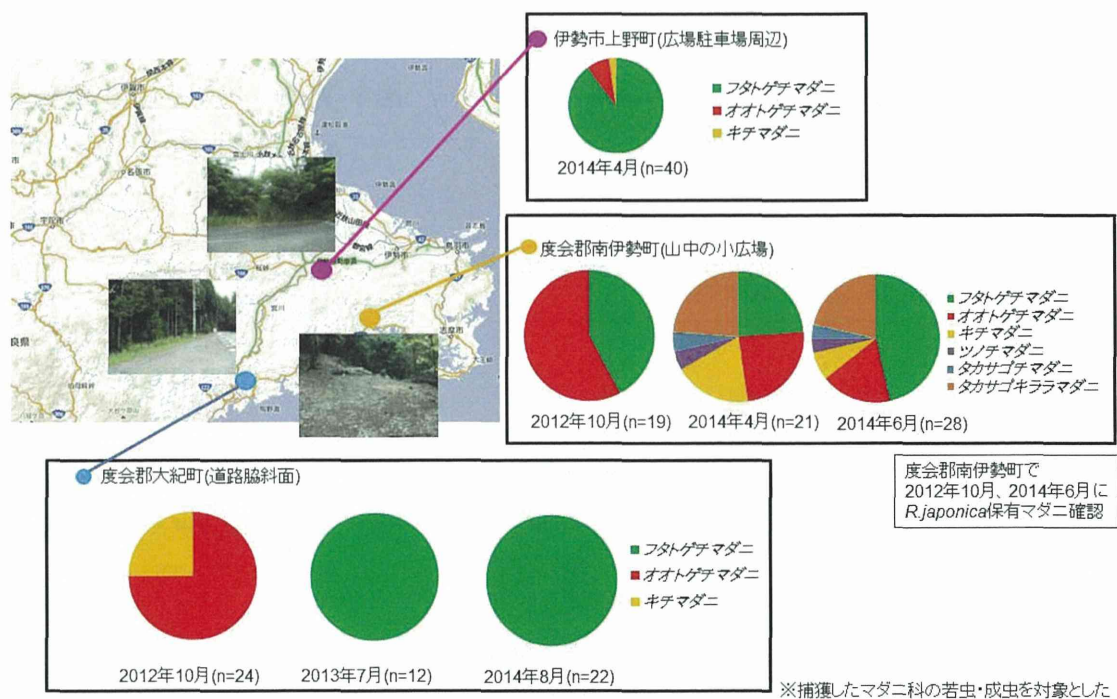


図7 環境中マダニの季節消長

近畿ブロックにおけるマダニ類のフィールド調査に関する研修会について

| | | |
|-------|----------|--------------------|
| 研究協力者 | 寺 柚 文男 | 和歌山県環境衛生研究センター |
| | 弓 指 孝博 | 大阪府立公衆衛生研究所 |
| | 小 川 有理 | 大阪府立公衆衛生研究所 |
| | 藤 田 博己 | 馬原アカリ医学研究所 |
| | 安 藤 秀二 | 国立感染症研究所ウイルス第一部第五室 |

研究要旨

マダニ類のフィールド調査技術の習得・向上を目的として、近畿ブロックの地方衛生研究所担当者を対象として研修会を開催した。内容は、大阪府阪南市の山中溪「銀の峯ハイキングコース」内でのフラグging法によるマダニ類の採取と、顕微鏡鏡検下での種の同定実習、及び講義とした。計 11 施設から参加があり、各参加者がマダニ類の採取を行った。採取したマダニ類の一部については形態観察を行い、4 属 8 種を同定した。

A. 研究目的

マダニ類はリケッチアやウイルス感染症のベクターとして知られ、近畿地方でもこれまで日本紅斑熱や重症熱性血小板減少症候群等の発生がみられている。マダニ類のフィールド調査は地域の感染リスクを把握する上で有用と考えられ、地方衛生研究所にはその役割を担うことが期待される。そこで今回、マダニ類調査に関する技術の習得を目的として、近畿ブロック各地方衛生研究所の担当者を対象とした研修会を開催した。

B. 研究方法

研修会は平成 26 年 5 月 13 日と 14 日の 2 日間にかけて開催した。研修指導は、馬原アカリ医学研究所 藤田博己 所長と、国立感染症研究所ウイルス第一部第五室 安藤秀二

室長が担当した。初日は大阪府阪南市の了解を頂き、同市内の山中溪「銀の峯ハイキングコース」において、各参加者がフラグging法によるマダニ類の採取を行った。2 日目は大阪府立公衆衛生研究所に会場を移し、前日採取したマダニ類の一部を用いて顕微鏡鏡検下での形態観察を行った。観察は顕微鏡視野をモニタに写しながら行い、形態学的同定の着目点等について解説を加えながら同定が行われた。また、両講師からマダニ類とマダニ媒介性感染症に関する講義があった。

C. 研究結果

本研修会には近畿ブロックの 14 地方衛生研究所の内、11 施設(表 1)から担当者 12 名が参加した。初日は夜半過ぎまで降った雨の影響が心配されたが、出発した午前 11 時頃に

は足場の状態も良好で、下山までに周遊コース内で多数のマダニ類が採取された。2 日目は、前日に採取されたマダニ類の一部を用いて、それぞれの形態的特徴を確認しながら種の同定を行った。タカサゴキララマダニ、タイワシクマダニ、キチマダニ、フタゲチマダニ、ヤマアラシチマダニ、タカサゴチマダニ、ヤマトマダニ、アカコッコマダニの 4 属 8 種が確認された。

表 1. 研修会に参加した地方衛生研究所

| |
|-------------------------|
| 滋賀県衛生科学センター |
| 京都府保健環境研究所 |
| 京都市衛生環境研究所 |
| 大阪府立公衆衛生研究所 |
| 堺市衛生研究所 |
| 東大阪市保健所 |
| (環境衛生検査センターの代理出席) |
| 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター |
| 尼崎市立衛生研究所 |
| 奈良県保健環境研究センター |
| 和歌山県環境衛生研究センター |
| 和歌山市衛生研究所 |

D. 考察

マダニ類の取扱い、特に形態学的同定には経験と知識が必要で、初心者が独学で習熟することは容易ではない。しかし、それぞれの地域に生息するマダニ種は限られており、その主な種に限定すれば、鑑別技術の習得は可能と思われる。今回大阪府阪南市において 4 属 8 種のマダニ類を採取した。その多くは近隣府県でも生息している種であると考えられることから、その形態的特徴についての知見は、それぞれの地域でマダニ類のフィールド調査

を実施する際にも直接的に役立つものと考えられる。

現在では分子生物学的手法を用いたマダニ類の同定方法もあり、それぞれの地域のマダニ相を把握する手段として用いたり、或いは形態学的同定が困難な場合の補助的手段として併用することもできる。今回の研修が、各参加者にとって技術向上の足掛かりになることを期待すると共に、今後も相互に連携を図りながら、各地方衛生研究所の技術レベルが更に向上されるよう努めたい。

E. 結論

マダニ媒介性感染症として、近畿地方では日本紅斑熱や重症熱性血小板減少症候群等の症例がみられている。いずれも発生地域は限られているが、他の地域において同様の症例が潜在している可能性も考えられる。これまでも近畿ブロック内では、マダニ類媒介性感染症を念頭に独自にフィールド調査を実施している地方衛生研究所もみられるが、今回の研修会をきっかけに、より広域で実態調査が行われることを期待したい。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表：特記事項なし
2. 学会発表：特記事項なし

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



採取された台湾カクマダニ

