

徳島市内周辺部におけるリケッチアの侵淫状況について

徳島県保健環境センター

山本 保男・川上百美子

Key words: *Orientia tsutsugamushi*, *Rickettsia japonica*, PCR, ツツガムシ病, 日本紅斑熱, 野鼠, 抗体保有

I はじめに

リケッチア感染症は治療の遅れが重篤な結果を招きかねない疾患であり、日本紅斑熱はその傾向が強いといわれている。本邦における主なリケッチア感染症としてツツガムシ病と日本紅斑熱が知られている。本県においても県南地方を中心として両リケッチア感染症が存在しているが、本県中心部である徳島市内におけるリケッチアの侵淫状況は不明である。このため徳島市内周辺部丘陵地において野鼠を捕獲し、抗リケッチア抗体の保有状況及び野鼠脾臓中のリケッチア遺伝子の検出を試みることでリケッチア侵淫状況を調査し、若干の知見が得られたので報告する。

II 材料及び方法

1 調査地点

徳島市中心部は東部が海、北部が吉野川にはさまれ、西部及び南部が丘陵地・山間部である。さらに西部・南部地域には各種野外施設が点在するため西部の入田地区及び南部の八多地区の丘陵地を調査地点に選定した。入田地区は2006年6月と11月に捕獲した。6月と11月の捕獲地点は異なり、鮎喰川をはさんだ2地点である。八多地区は2007年3月に捕獲した。

2 野鼠捕獲方法

鳥獣捕獲申請・許可後、1回あたり50個の生捕ワナ (HB. Sherman Trap Inc. 製: 通称シャーメントラップ) を午後に設置し、翌日午前中にトラップを回収する方法をとり地区内数カ所で野鼠を捕獲した。餌はさつまいもとピーナッツバターを用いた。

3 血中抗体価測定法

ツツガムシ病リケッチア (*Orientia tsutsugamushi*: 以下, *O. tsutsugamushi*) と日本紅斑熱リケッチア (*Rickettsia japonica*: 以下, *R. japonica*) に対する抗体価測定は自家製スライドを用いた間接蛍光抗体法 (以下, IF 法) によった。*O. tsu-*

tsugamushi は Gilliam, Karp, Kato の3株を抗原として用いた。

標識抗体は FITC 標識抗マウス IgG 抗体を用い、血清希釈10倍でスクリーニングを実施した。

4 脾臓中リケッチア遺伝子検出法

野鼠から心臓採血し、安楽死後、開胸し脾臓を摘出した。その後脾臓の10%乳剤を作成し、キット (QIAampDNA Mini Kit: QIAGEN) を用い DNA を抽出した。

遺伝子検出に使用したプライマー、反応条件等は「リケッチア感染症診断マニュアル」¹⁾ によった。増幅領域は *O. tsutsugamushi* の56kDa ポリペプチド領域, *R. japonica* の17kDa 膜蛋白質領域である。

遺伝子解析は、DDBJ (DNA Date Bank of Japan) の BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 検索, ClustalW 解析の後系統樹を作成した。

III 結 果

1 野鼠捕獲状況

徳島市入田地区: トラップを延べ120個設置し、25匹 (6月: 19匹, 11月: 6匹) の野鼠を捕獲した。しかし、6月に捕獲した19匹の内5匹はトラップ内で死亡しており採血不能であった。

徳島市八多地区: トラップを延べ300個設置し、25匹の野鼠を捕獲した。

入田地区、八多地区で合計50匹の野鼠を捕獲したが、いずれも①体調10~12cm ②尾の長さが体長とほぼ同じ③背面の体毛が赤褐色という特徴を備えていたためアカネズミと推定した。

2 間接蛍光抗体価測定結果 (10倍スクリーニング)

IF 法によるスクリーニング結果を表-1に示した。*O. tsutsugamushi* に対しては入田地区で5匹から抗体が検出され、5匹とも使用した3株に対して抗体を保有していた。

表-1 野鼠の抗体保有状況

地区 抗原	入田地区 (2006.6:n=14)	入田地区 (2006.11:n=6)	八多地区 (2007.3:n=25)
ツツガムシ Gilliam	1	4	18
ツツガムシ Karp	1	4	19
ツツガムシ Kato	1	4	15
紅斑熱群	1	4	16

しかし、入田地区においては野鼠の捕獲時期により成績に大きな差がみられた。2006年6月は14匹中1匹しか抗体保有個体がみられなかったが、2006年11月には6匹中4匹に抗体保有がみられた。一方八多地区においては25匹中19匹が抗体保有であり、Karp型は19匹全てが抗体を保有していた。Gilliam型に対しては18匹、Kato型に対しては15匹が抗体を保有していた。

R. japonica に対しては入田地区で5匹、八多地区で16匹が抗体保有であった。入田地区においては *R. japonica* に対しても野鼠の捕獲時期により抗体保有状況に大きな差がみられた。

地区別でみると入田地区では20匹中3匹が *O. tsutsugamushi* と *R. japonica* に重感染していた。一方八多地区では25匹中15匹が重感染していた。

以上の成績は10倍スクリーニングの結果であるため非特異反応を否定するため、各地区2匹ずつ抗体価を測定した(表-2)。*O. tsutsugamushi* に対しては入田地区・八多地区とも Karp に対して高い抗体価を示し、感染していることが確認された。*R. japonica* に対しては入田地区で6月に捕獲された野鼠が640倍という高抗体価を示したほか、ほかの3検体も160倍の抗体価であり紅斑熱群リケッチアに感染していることが確認された。

3 遺伝子検出状況

2地区で捕獲された50匹の野鼠脾臓から *O. tsutsugamushi* 及び *R. japonica* の遺伝子検出を試みた結果、2006年11月に

表-2 野鼠の抗体価測定結果

地区 抗原	入田地区 (2006.6)	入田地区 (2006.11)	八多地区 (2007.3)	八多地区 (2007.3)
ツツガムシ Gilliam	160	80	160	160
ツツガムシ Karp	≥320	≥320	≥320	≥320
ツツガムシ Kato	80	160	160	160
紅斑熱群	640	160	160	160

入田地区で捕獲された2匹 (RodentT-12, RodentT-23) から *O. tsutsugamushi* の遺伝子が検出された。*O. tsutsugamushi* が検出された2匹は1stPCR (プライマー-34'/35') 2ndPCR (プライマー-10'/11') とも陽性であったため型特異プライマーによるPCRを実施した。その結果、Karp型に強く増幅したが、Kato型にも弱増幅がみられた(図-1)。

型特異PCRで交差反応がみられたため、2ndPCRで増幅されたDNA (507bp) の塩基配列を決定し、ClustalWプログラムを用いて遺伝子解析を行い、TreeViewソフトウェアにより系統樹を作成した。その結果、Karp型のSaitama型に属することが判明した(図-2)。*R. japonica* の遺伝子検出は紅斑熱群リケッチアDNAを検出するプライマー (R1/R2) でスクリーニングにかけたが検出されなかった。

IV 考察

日本紅斑熱は1984年に馬原ら²⁾により報告されて以来、本邦には日本紅斑熱以外の紅斑熱群リケッチアによるリケッチア症は存在していないと考えられていた。しかし、*R. japonica* 以外の紅斑熱群リケッチアによるリケッチア症が報告さ

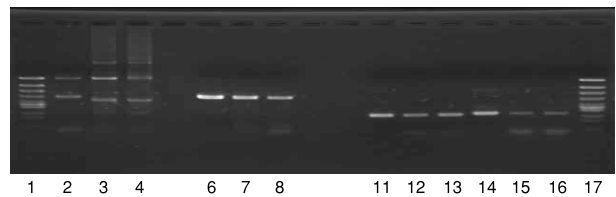


図-1 野鼠脾臓中 *O. Tsutsugamushi* 遺伝子の検索結果
 レーン1 (φX174/Hinc II)
 レーン2~4 (1stPCR)
 2: KarpPC 3: RodentT-12 4: RodentT-23
 レーン6~8 (2ndPCR)
 6: KarpPC 7: RodentT-12 8: RodentT-23
 レーン11~16 (Strain specificPCR)
 11: KarpPC 12: RodentT-12 13: RodentT-23
 14: KatoPC 15: RodentT-12 16: RodentT-23
 レーン17 (φX174/Hinc II)

図-1 野鼠脾臓中 *O. Tsutsugamushi* 遺伝子の検索結果

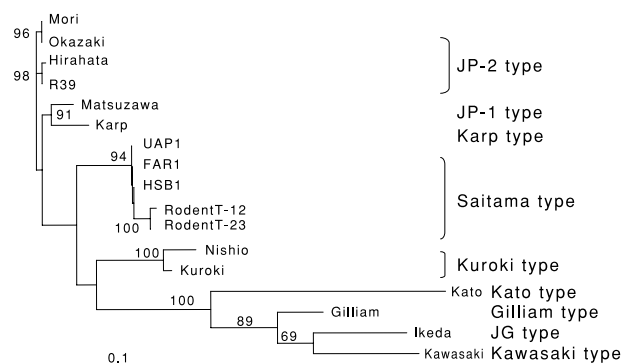


図-2 *O. tsutsugamushi* 56KDa 蛋白遺伝子の系統樹

れ³⁾、さらに最近の疫学調査の結果、ダニが様々な紅斑熱群リケッチアを保有していることが判明した⁴⁾。今回の我々の成績において、*R. japonica* を抗原としたIF法で野鼠から陽性例がみられたが、鼠脾臓中から*R. japonica* 遺伝子が検出されなかったことより*R. japonica* の存在は確定できなかったが紅斑熱群リケッチアの存在が確認できた。

O. tsutsugamushi に対しても血清学的、及び遺伝子学的に徳島市内周辺丘陵地が侵淫されていることが明らかになった。

しかし、入田地区においては野鼠捕獲時期或いは捕獲地点により、抗体保有状況に大きな差がみられた。

ツツガムシ病の発生時期は、リケッチアを媒介するツツガムシの成長サイクルに依存し、幼虫のみがヒト・動物の体液を吸い、同時に感染させる。これに対し、紅斑熱は媒介するマダニの幼虫、若虫、成虫、いずれも吸血するため患者発生時期が長い。また、ハツカネズミの場合、最適条件下での寿命は約1～1.5年といわれているが、自然界では1年以上生きるのは約5%程度であるといわれている。これらのことから2006年6月の入田地区の*O. tsutsugamushi* に対する低抗体保有状況については、侵淫状況が低かったのか、侵淫はあるものの、野鼠の世代交代が進みツツガムシの吸血時期が終了後に生まれた野鼠が主流となり低抗体保有状況となったのかは不明である。これに対し、*R. japonica* に対しては、ダニの吸血時期でもあり、患者発生時期であるにもかかわらず14匹中1匹しか抗体を保有していなかったことは、侵淫そのものが低いことを示している。

本県においては我々の調査と同時期に徳島県保健福祉部生活衛生課により、犬のツツガムシ病リケッチアと紅斑熱群リケッチアの抗体保有状況が調べられた。その結果、徳島市、鳴門市において捕獲された野犬及び飼い犬から*O. tsutsugamushi*、*R. japonica* に対する抗体が検出されている。我々の成績とあわせ、徳島市内周辺部においてもツツガムシ病リケッチア及び紅斑熱群リケッチアに侵淫されていることが明

らかになった。

今回の調査において野鼠からSaitama型の*O. tsutsugamushi* 遺伝子が検出された。本邦における検出例としては埼玉県⁵⁾、愛媛県⁶⁾に次ぐ3例目と思われる。しかし、いずれの検出例も野鼠からであり、患者からの検出例は報告されていない。本県における*O. tsutsugamushi* の病原体分離及び遺伝子検出例はいずれも県南地区の患者由来であり、1994年発症例(Mori株)、1995年発症例(Okazaki株)⁷⁾は共にKarp型のJP-2型である。その後、2000年報告例⁸⁾、2006年報告例⁹⁾もJP-2型である。県南地区の患者由来の遺伝子型と異なる遺伝子型が検出されたことから、Saitama型の病原性の有無及び徳島市周辺で患者発生がみられた場合の遺伝子型が今後の課題である。

文 献

- 1) リケッチア感染症診断マニュアル：国立感染症研究所・地方衛生研究所全国協議会編
- 2) 馬原文彦，古賀敬一，沢田誠三他：感染症誌，59，1165－1172（1985）
- 3) 高田伸弘，石畝 史，藤田博巳：病原微生物検出情報27，40－41（2006）
- 4) 藤田博巳，高田伸弘，矢野泰弘他：虫のしらせ，93－101，三恵社（2002）
- 5) Tamura A., Yamamoto N., Koyama S. et al: Microbiol. Immunol., 45, 439－446（2001）
- 6) 田原研司：平成18年度厚生労働科学研究費補助金報告書「リケッチア感染症の国内実態調査及び早期診断体制の確立による早期警鐘システムの構築」，49－62（2006）
- 7) Tamura A., Makisaka Y., Enatsu T. et al: Microbiol. Immunol., 43, 979－981（1999）
- 8) 馬原文彦：第8回SADIニュース（2000）
- 9) 馬原文彦：第13回SADIニュース（2005）