

## 2) 熊本県における日本紅斑熱の疫学調査

大迫英夫 古川真斗 徳岡英亮 松尾 繁<sup>1)</sup> 八尋俊輔<sup>2)</sup> 松本一俊<sup>3)</sup>  
本田俊郎<sup>4)</sup> 山本正悟<sup>5)</sup> 安藤秀二<sup>6)</sup> 猪熊 壽<sup>7)</sup> 和田正文<sup>8)</sup> 原田誠也

### 要 旨

マダニ媒介性の *Rickettsia Japonica* (Rj) 感染症である日本紅斑熱 (JSF) が、2007 年から上天草地域を中心に増加した。本研究所は共同研究機関と連携し、2007 年から 2011 年まで、患者データの収集、患者多発地域の野外捕獲マダニ、野鼠類、イノシシ、イノシシ付着マダニ及びイヌ付着マダニの調査を行った。

その結果、患者多発時期は 8 月～10 月であり、農作業時に感染した事例が多かった。また、多発地域のヤマアラシチマダニとアカネズミから Rj が分離された。一方イノシシは、血中からリケッチア属特異的 *gltA* 遺伝子は検出されず、Rj に対する抗体が認められたこと及び付着マダニから Rj 遺伝子が検出されたことから、Rj 保有マダニの運搬動物となっている可能性が考えられた。

また、発生地域の野外捕獲マダニ及びイノシシ付着マダニのみならず、県内各地のイヌ付着マダニからも、Rj に近縁の *gltA* 遺伝子が検出されたことから、発生地域以外でも野外での活動には十分注意する必要があると考えられた。

キーワード：日本紅斑熱，イノシシ，ヤマアラシチマダニ，*gltA* 遺伝子

### はじめに

日本紅斑熱 (JSF) は、1984 年に徳島県阿南市の開業医である馬原によって初めて報告された比較的新しいマダニ媒介性のリケッチア感染症で、病原体は 1992 年に徳島大学の内田らにより *Rickettsia Japonica* (Rj) と命名された。

本感染症は、1999 年 4 月には感染症法の第四類感染症に指定され、全数把握疾患となった。高熱、発疹、全身倦怠等の臨床症状を呈し、重症例や死亡例の報告もある。症状が *Orientia Tsutsugamushi* 感染症であるツツガムシ病と似ているため、臨床症状からの診断は困難と言われている。本感染症の患者は、従来、南九州や四国等をはじめとする主に西日本の温暖な太平洋沿いを中心に少数確認されていたが、2007 年から増加し、発生地域も北陸や東北地方にまで拡大した。さらに最近では、Rj 以外に、*R. helvetica* や *R. heilongjiangensis* による紅斑熱も報告されている。

熊本県では、2002 年に初めて 1 例確認されたが、そ

の後数年間、患者発生は見られなかった。ところが、2007 年から上天草市を中心に患者が増加した<sup>1)</sup>。

そこで我々は、2007 年から患者及び患者多発地域である上天草市のマダニ類と野鼠類の調査を開始した。また、患者多発地域では近年イノシシの増加が著しく、JSF 増加との関連が取り沙汰されていることから、イノシシの役割解明に取り組んだ。さらに、県内のマダニのリケッチア保有状況を明らかにし、患者発生防止のための有益な情報を県民に提供することを目的として、県動物管理センターに搬入されたイヌ (飼育放棄犬や捕獲犬等) に付着したマダニの調査を行った。

なお、2007 年まで確認された 16 症例の患者情報は既に資料として掲載<sup>1)</sup>したが、今回はそれも含めて 2011 年までの調査結果を報告する。

### 材料と方法

1) 患者検体：2002 年～2012 年 3 月末までにリケッチア感染症の疑いで検査依頼のあった患者血清 135 名分

<sup>1)</sup> 芦北地域振興局保健福祉環境部，<sup>2)</sup> 熊本県薬務衛生課，<sup>3)</sup> 菊池振興局保健福祉環境部，<sup>4)</sup> 鹿児島県立大島病院，<sup>5)</sup> 宮崎大学，<sup>6)</sup> 国立感染症研究所，<sup>7)</sup> 帯広畜産大学，<sup>8)</sup> 上天草総合病院

について、リケッチア感染症診断マニュアル<sup>2)</sup>に準じ、Rj(YH株)とツツガムシ(Karp株, Kat株, Gilliam株, Kawasaki株及びKuroki株)を抗原とした間接蛍光抗体法(IFA)でIgM抗体価及びIgG抗体価を測定し、原則として、ペア血清で4倍以上の抗体価上昇が認められたものを陽性と判定した。その他、刺し口の痂皮28名及び血液33名分について、QIAamp BloodDNA mini Kid(QIGENA)でDNAを抽出し、古屋らのPCR法<sup>3)</sup>及び花岡らのリアルタイムPCR法<sup>4)</sup>でRj特異的遺伝子の検出を行った。また、患者データは患者調査票を集計した。

2)野鼠類:シャーメントラップ又は網籠で捕獲した野鼠類81匹について、種を同定し、心臓からの採血後、腹部を切開して、肝臓、脾臓及び腎臓を採取した。臓器乳剤作成後、上記抽出キットでDNAを抽出し、古屋らのPCR法<sup>3)</sup>でRj特異的遺伝子検出を行った。

3)イノシシ:上天草地域で捕獲されたイノシシの血液49検体について、IshikuraらのPCR法<sup>5)</sup>によるリケッチア属に特異的な*gltA*遺伝子の検出及びIFAによる血清抗体価の測定を行った。また、イノシシの捕獲頭数は、上天草市農林水産課から聴取した。

4)マダニ:上天草地域で旗振り法により捕獲した野外捕獲マダニ1282匹、上記イノシシに付着していたイノシシ付着マダニ388匹及び県動物管理センターに搬入されたイヌ(飼育放棄犬や捕獲犬等)に付着したマダニ114匹について、種の同定後、マダニ乳剤からアルカリ抽出法でDNAを抽出し、PCR法で*gltA*遺伝子及びRj特異的遺伝子を検査した。ただし、イヌ付着マダニについては、県動物管理センターで保健所毎及びマダニの種類毎に数匹ずつプール(46プール)して検体とした。なお、PCR法によりRj特異的遺伝子が検出された場合には、単層培養したL929細胞に接種し、リケッチア分離を試みた。また、上記検体から検出されたPCR産物の一部及び培養後分離されたリケッチアのPCR産物を精製後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。野外捕獲及び犬付着マダニから検出した*gltA*遺伝子の一部は、決定した塩基配列をClustal Wで解析した後、MEGA 5により系統樹を作成した。

## 結 果

1)患者検体:2002年~2012年3月末までに、IFAによりJSF74例、ツツガムシ病15例の陽性が確認された。血清以外の臨床検体では、刺し口の痂皮6検体及び血液2検体がPCR法でRj特異的遺伝子陽性となり、このうち血液2検体からRjが分離された。紅斑熱患者

の年別患者数は、2002年1例、2006年2例、2007年13例、2008年14例、2009年16例、2010年9例、及び2011年19例の合計74例で、全国的な傾向で2007年以降増加している(図1)。患者発生月は3月~11月で、特に8月14例、9月15例、10月24例と8月~10月の3ヶ月に53例(約71%)が発生した(図2)。推定感染地域(図3)は、上天草地域49例、天草地域12例、八代地域6例、球磨地域1例、熊本市1例、及び不明・県外5例であった。患者が最も多かった上天草市の地域別内訳は、龍ヶ岳町29例、松島町11例、姫戸町9例であった。患者の年齢は、70代が最も多く45%を占め、次が60代17%であった(図4)。推定感染場所は、野山63%、平地33%(図5)で、農作業時の感染が67%と最も多く、次いで森林作業が9%であった(図6)。なお、IFAでツツガムシ病と診断された症例は、2003年1例、2004年3例、2005年4例、2006年1例、2010年3例、2011年3例で、患者発生月は、10月4例、11月7例、12月2例、1月1例、4月に1例であった。

2)野鼠類:捕獲された野鼠類81匹の内訳は、アカネズミが79匹、ヒメネズミが1匹及びヒミズが1匹であった。そのうちアカネズミ1匹の肝臓及び脾臓からPCR法によりRj特異的遺伝子が検出された。PCR産物のダイレクトシーケンスで得られた塩基配列はRjと100%一致した。

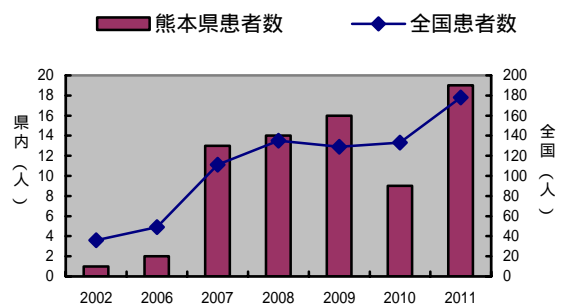


図1 紅斑熱患者数(県内、全国)推移

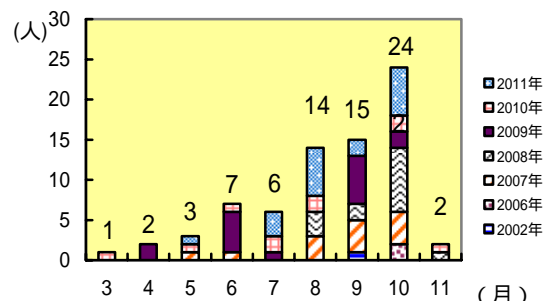


図2 紅斑熱患者数月別累積発生数

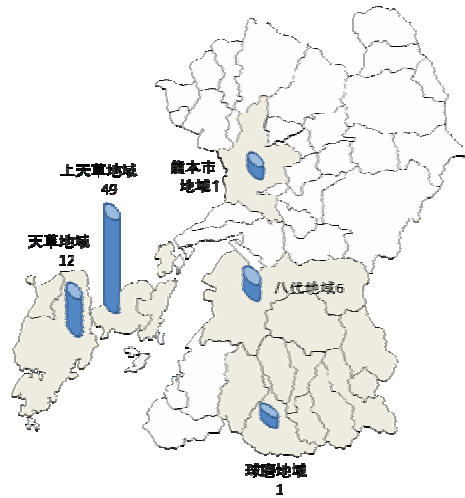


図3 県内の推定感染地域患者数

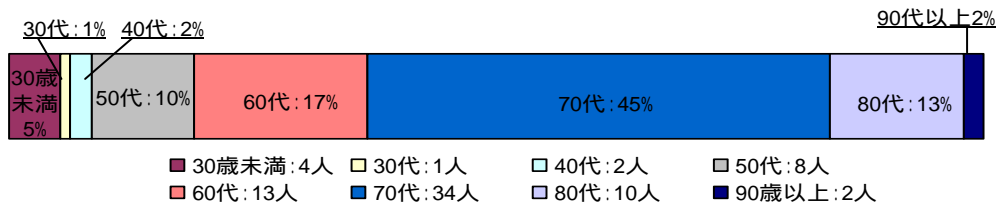


図4 年齢別患者割合



図5 推定感染場所の地形

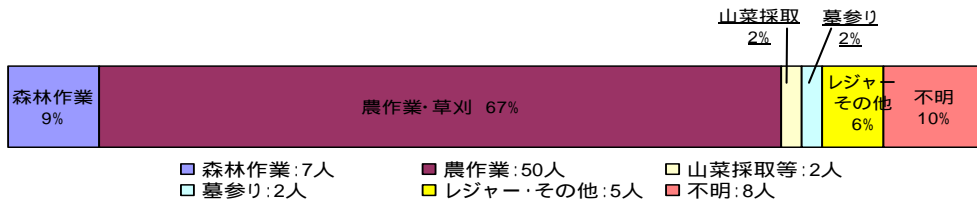


図6 感染時の状況

3) イノシシ: 血液から *gltA* 遺伝子は検出されなかったが、全頭から紅斑熱群リケッチアに対する抗体が検出された。抗体価は 40~640 倍の範囲で、160 倍が最も多く 22 頭であった。(図 7)。上天草地域のイノシシ捕獲頭数は、2002 年: 2 頭, 2006 年: 37 頭, 2007 年: 149 頭, 2008 年: 328 頭, 2009 年: 268 頭, 2010 年: 894 頭, 2011 年: 692 頭で、患者が増加した 2007 年以降増加傾向にあった(図 8)。

4) マダニ: 野外捕獲マダニは、タカサゴキララマダニ(At): 13 匹, キチマダニ(Hfl): 6 匹, タカサゴチマダニ(Hfo): 808 匹, ヤマアラシチマダニ(Hh): 196 匹, フトゲチマダニ(Hl): 71 匹, オトゲチマダニ(Hm): 80 匹, アカコッコマダニ(It): 108 匹の合計 3 属 7 種 1282 匹が採取され、そのうち、Hfo と Hh が多数を占めた(図 9)。PCR 検査では、Hfo: 27 匹, Hh: 20 匹, Hl: 3 匹, It: 8 匹、及び Hm: 2 匹の 2 属 5 種のマダニ 60 匹が *gltA* 遺伝子陽性であった。Hh: 4 匹は Rj 特異的遺伝子も陽性で、若虫と成虫雌の各 1 匹から Rj が分離された(表 1)。イノシシ付着マダニは、2 属 4 種 388 匹(At: 52 匹, Hfl: 9 匹, Hfo: 153 匹, Hh: 148 匹, その他のチマダニ: 26 匹)であった(図 10)。そのうちの 93 匹(At: 18 匹, Hfl: 2 匹, Hfo: 16 匹, Hh: 51 匹、及びその他のチマダニ: 6 匹)から *gltA* 遺伝子が検出され、ダイレクトシーケンスにより 3 種 11 匹(At 1: 匹, Hfo: 2 匹, Hh: 8 匹)が Rj と同定された(表 2)。イヌ付着マダニは 2 属 3 種 114 匹(Hfl: 46 匹, Hm: 23 匹, Hh: 5 匹, その他チマダニ属: 7 匹, マダニ属: 4 匹, 属種同定不可: 29 匹)(図 11)が採取され、そのうちの 17 プール(Hfl: 6 プール, Hm: 3 プール, Hh: 4 プール, その他チマダニ: 1 プール, 属種同定不可: 3 プール)から *gltA* 遺伝子が検出された(表 3)。保健所別では、有明: 5 プール, 山鹿・菊池: 4 プール, 宇城: 1 プール, 人吉・八代: 1 プール, 天草: 5 プール, 不明: 1 プールであった。

なお、Rj 特異的遺伝子は検出されなかった。マダニから検出された *gltA* 遺伝子 23 検体(野外捕獲マダニ: 19 匹, イヌ付着マダニ: 4 プール)を選択し、ダイレクトシーケンス解析を行ったところ、21 検体(野外捕獲マダニ: 18 検体, イヌ付着マダニ: 3 検体)が Rj と近縁であった(図 12)。

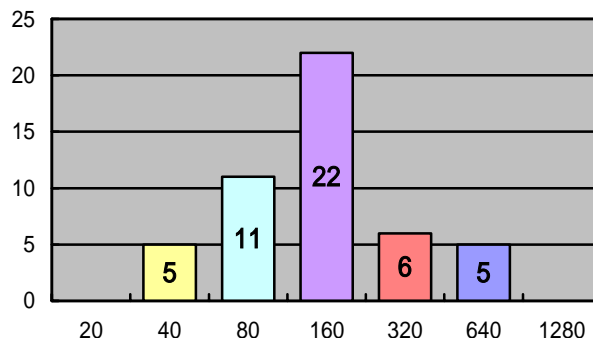


図 7 イノシシの Rj に対する抗体保有状況

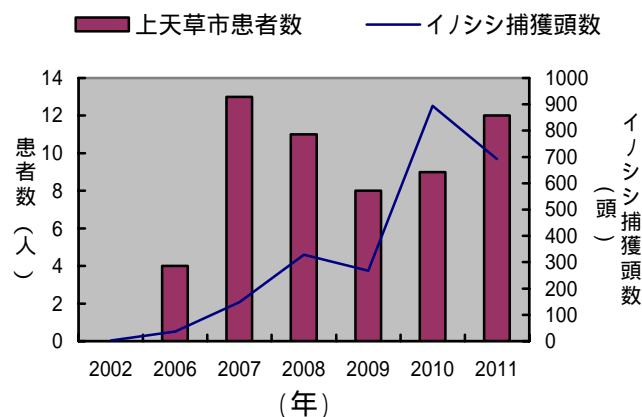


図 8 上天草市イノシシ捕獲頭数と上天草市 JSF 患者数推移

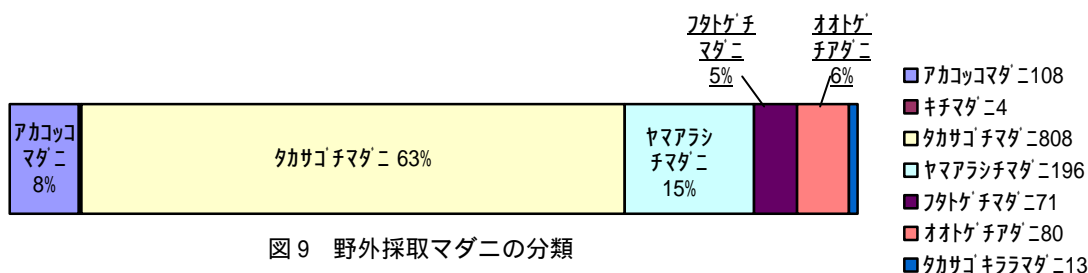


図 9 野外採取マダニの分類

表1 野外採取マダニ類別の遺伝子検出状況

	タカサゴ チマダニ	ヤマアラシ チマダニ	フタトゲ チマダニ	アカコッコ マダニ	オオトゲ チマダニ	合計
<i>gltA</i> 遺伝子 検出数	27	20	3	8	2	60
<i>Rj</i> 遺伝子検出数		4				4
<i>Rj</i> 分離数		2				2

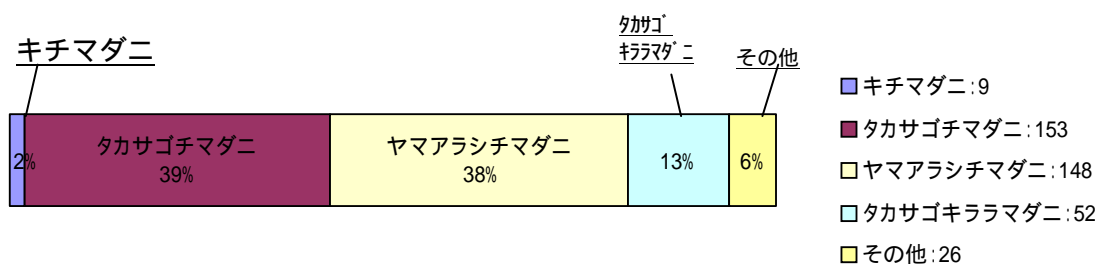


図10 イノシシ付着マダニの分類

表2 イノシシ付着マダニの種類別遺伝子検出状況

	タカサゴキ ララマダニ	キチマ ダニ	タカサゴ チマダニ	ヤマアラシ チマダニ	その他 チマダニ属	合計
<i>gltA</i> 遺伝子 検出数	18	2	16	51	6	93
<i>Rj</i> 遺伝子検出数	1	0	2	8	0	11

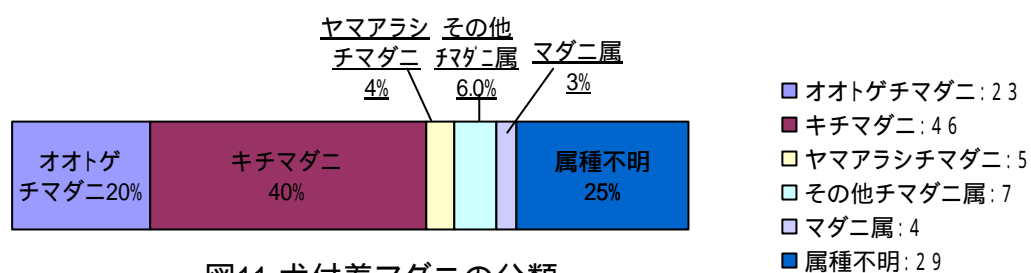


図11 犬付着マダニの分類

表3 イヌ付着マダニの種類別遺伝子検出状況

	マダニ属 種不明	キチマダニ	オオトゲ チマダニ	ヤマアラシ チマダニ	属種不明	合計
<i>gltA</i> 遺伝子検出 検体数	1	6	3	4	3	17

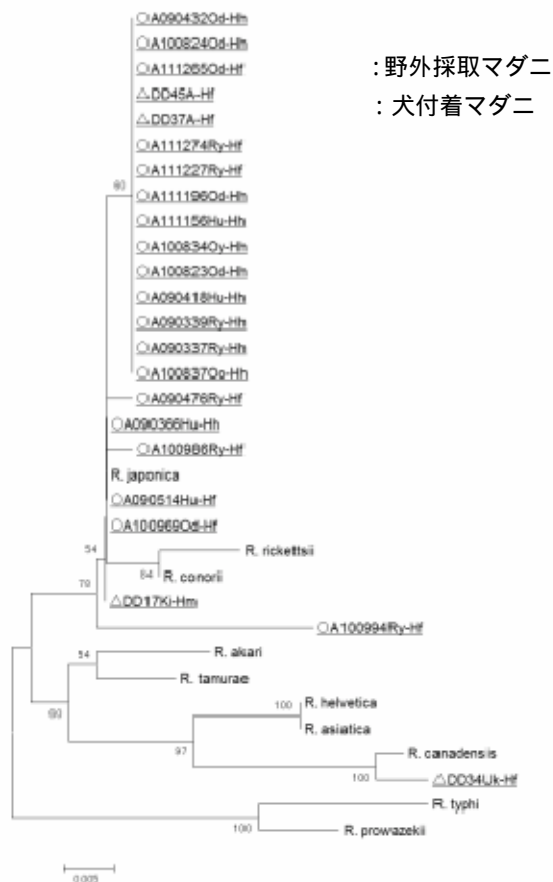


図 12 マダニ（野外捕獲，犬付着）から検出した *gltA* 遺伝子の系統樹

### 考 察

本県の JSF 患者発生は，上天草市が最も多く発生数の 66% (49/74) を占め，次が天草地域 16% (12/74)，八代地域 8% (6/74) の順であった。発生期間は 3 月～11 月で，特に 8 月～10 月の 3 か月に発生数の 71% (53/74) が集中していた。また，感染時の状況は農作業時が 67% で最も多かった。農繁期である晩夏～秋は農作業の機会が多いため，Rj 保有マダニに吸血される危険性が高くなると考えられた。患者多発地域では，農作業などで野山に入る場合，忌避剤の使用や，肌の露出を減らし，ダニが付着し難い素材の服の着用などの防ダニ対策を徹底することが重要と考えられる。

ヒト，イノシシ付着マダニ (At, Hfo, Hh) 及びアカネズミから Rj 特異的遺伝子が検出され，ヒト及び Hh から実際に Rj が分離されていることから，天草地域で増加している JSF の感染経路の一つとして，アカネズミをリザーバー，Hh, Hfo などを主な媒介マダニとしてヒトに感染する経路が推定された。

上天草地域のイノシシは，JSF 患者増加と共に増加

し，2007 年以降捕獲頭数も 3 桁となった。このことから JSF は，地元ではイノシシ病とも呼ばれていた。そこで今回，地元で捕獲されたイノシシ 49 頭について，血液検査を行ったところ，*gltA* 遺伝子は検出されず，全頭が Rj に対する抗体を保有していた。一方でイノシシ捕獲頭数が 894 頭と急増した 2010 年の JSF 患者発生数は 9 名で，2009 年の 16 名よりも少なかったこと，また，上天草市イノシシ被害実態調査報告書<sup>6)</sup> による 2002 年～2008 年のイノシシ捕獲頭数は，上天草地域の 516 頭，隣接する天草地域の約 1 万頭に対し，JSF 患者数は，前者が 49 例，後者が 12 例であったことなどから，上天草地域の JSF 患者増加とイノシシ頭数増加との関連性は認められなかったが，関連性の解明は今後の検討課題である。Inokuma ら<sup>7)</sup> は，洞爺湖の中ノ島の野生エゾシカで同様の調査を行い，シカの血液 112 検体中 8 検体から *R. helvetica* の遺伝子を検出した。また，同じくエゾシカの調査を行った Jilintai ら<sup>8)</sup> は，22 検体中 15 検体に *R. helvetica* の抗体を認め，14 検体から *R. asiatica* の遺伝子を検出した。このことから，シカは紅斑熱群リケッチアのリザーバーである可能性がある」と報告している。本県で実施した今回の調査ではイノシシから *gltA* 遺伝子は検出されていないことから，イノシシが Rj のリザーバーとなっている可能性は低いと考えられるが，さらなる調査が必要である。

一方，イノシシ付着マダニから *gltA* 遺伝子及び Rj 特異的遺伝子が検出されており，イノシシに付着していた Rj 保有マダニが畑の周囲や人里で脱落して繁殖し，ヒトを吸血する頻度が高くなっている可能性，つまり，イノシシは Rj 保有マダニの運搬動物となっている可能性は高いと推測された。

上天草市の患者増加の要因は未だ不明であるが，地元の基幹病院の臨床医が非常に熱心で，地域住民を対象とした講演会や他の医療機関への情報提供を積極的に行っていること，及び患者増加がマスコミ報道されたことなどで地域住民の関心が高まっていること等により罹患者の発見率が上がった可能性があることも患者増加の一因と考えられた。

さらに今回の調査では，県内におけるマダニのリケッチア保有状況を把握するため，県内各地から県動物管理センターに搬入されたイヌに付着したマダニの調査も実施したところ，Rj の主要な媒介種として知られている Hh が採取された。また，Rj と近縁な遺伝子を持つマダニが検出された。森中ら<sup>9)</sup> は，広島県のイヌ 200 頭中 37 頭 (18.5%) が紅斑熱群リケッチア抗体陽性であったと報告している。また，JSF 患者が飼育していたイヌからリケッチア抗原が検出されたという報告<sup>10)</sup> も

ある。Inokumaら<sup>11)</sup>によるとイヌがRjのリザーバーとなる可能性は低いようであるが、イヌ付着マダニを介した感染も考えられるため、特に猟犬など野山に入る機会の多いイヌは防ダニ対策が必要であろう。

JSF は、近年全国的に患者発生数が増加し、発生地域も拡大傾向にある。本県でも最近、新たな地域で患者が確認されるなど、全国と同様の傾向が見られている。JSF の治療にはテトラサクリン系抗菌剤が有効であるが、治療が遅くなれば、重症化し、死亡例もあるため、早期発見・早期治療が肝要である。現在当所は、患者多発地域の管轄保健所及び基幹病院と連携して対応し、速やかな検査診断結果の提供に努めている。今後も調査を継続し、地域住民への注意喚起及び医療関係者への情報提供を続けたい。

#### 謝 辞

イヌ付着マダニの採取のご協力頂きました熊本県動物管理センターの職員の皆様及び各保健所の狂犬病予防技術員の皆様方に深謝します。

#### 参考文献

- 1) 松尾繁, 八尋俊輔, 原田誠也, 中島龍一: 熊本県保健環境科学研究所報, 37, 88-89 (2007) .
- 2) 国立感染症研究所・地方衛生研究所全国協議会: 2000年度リケッチア感染症診断マニュアル
- 3) Furuya Y. , Takahashi K. , Yoshida Y. , Ikuo K. : *J.Clin.Microbiol.*, 33, 487-489 (1995) .
- 4) Hanaoka N, Matsutani M, Kawabata H, Yamamoto S., Fujita H., Sakata A., Azuma Y., Ogawa M., Takano A., Watanabe H., Kishimoto T., Shirai M., Kurane I., and Ando S. : *Emerging infectious Disease.*15, 1994-1997 (2009) .
- 5) Ishikura M, Ando S, Shinagawa Y, Matsuura K, Hasegawa S, Nakayama T, Fujita H, Watanabe M : *Microbiol Immunol.*,47, 823-832 (2003) .
- 6) 上天草市イノシシ被害実態調査報告
- 7) Inokuma H, Seino N, Suzuki M, Kaji K, Takahashi H, Igota H, Inoue S. : *J Wildl Dis.* 44 ,164-167( 2008 ) .
- 8) Jilintai, Seino N, Matsumoto K, Hayakawa D, Suzuki M, Hata H, Kondo S, Yokoyama N, Inokuma H : *Jpn. J Infect Dis.* , 61 , 315-317 ( 2008 )
- 9) 森中重雄, 勝部由紀子, 松田政明: 広島県獣医師会雑誌 : 25 ( 2010 )
- 10) 馬原文彦: モダンメディア 54, 4 - 13 ( 2007 ) .
- 11) Inokuma H ,Matsuda H ,Sakamoto L ,Tagawa M, and Matsumoto K : *Clinic . and Vaccine Immun.* , 18 ,