

資料

広島県内の野鼠におけるつつが虫病リケッチア侵淫状況

島津 幸枝, 谷澤 由枝, 高尾 信一, 田原 研司*, 藤田 博己**, 矢野 泰弘***, 高田 伸弘***

Endemic Surveys of Genomic Types of *Orientia tsutsugamushi* in Field Rodents in Hiroshima Prefecture, Japan

YUKIE SHIMAZU, YUKIE TANIZAWA, SHINICHI TAKAO, KENJI TABARA, HIROMI FUJITA,
YASUHIRO YANO and NOBUHIRO TAKADA

(Received Oct. 1, 2009)

広島県におけるつつが虫病リケッチア (*Orientia tsutsugamushi*: 以下 *O. tsutsugamushi*) の侵淫状況を調べるため、過去に患者発生が報告されている地域を中心に設定した42カ所の調査地点において、2006年、2007年および2008年のそれぞれ10月～12月に野鼠を捕獲し *O. tsutsugamushi* に対する血清抗体検査および脾臓からの *O. tsutsugamushi* DNA の検出を行った。42地点から、アカネズミ152頭、ヒメネズミ7頭、クマネズミ1頭およびスミスネズミ4頭が捕獲され、その内の27地点で捕獲された野鼠56頭が *O. tsutsugamushi* に対する抗体陽性を示した。血清型別の抗体価の分布成績では、71.4%の野鼠がKarp株に対して高い抗体価を示した。また脾臓からのDNA検出では、11地点で捕獲された24頭のアカネズミから *O. tsutsugamushi* DNA が検出され、それらの遺伝子型別をみるとKarp (JP-2) 型22件、Karp (Saitama) 型1件およびKawasaki型1件であり、県内にはこれら3型のリケッチアが分布し、特にKarp (JP-2) 型が広範囲に分布していると考えられた。

Keywords: つつが虫病, *Orientia tsutsugamushi*, Karp (JP-2) 型, Kawasaki 型, 野鼠

緒言

つつが虫病は病原リケッチア *Orientia tsutsugamushi* (以下 *O. tsutsugamushi*) を保有するツツガムシ幼虫の媒介によって引き起こされるヒトや動物に共通の感染症である。*O. tsutsugamushi* はKarp型やKawasaki型など6種類の血清型に型別され、媒介するツツガムシの種類ごとに保有する血清型が異なることが分かっている[1]。

広島県におけるツツガムシの生息分布と、それらが保有する *O. tsutsugamushi* の血清型については、これまでに岩崎らが県西部を流れる太田川中流域でタテツツガムシの生息を確認しており[2]、毛利らがその地域で感染した患者からタテツツガムシ媒介性のKawasaki型[1]の *O. tsutsugamushi* DNA を検出している[3]。このことから、太田川中流域ではタテツツガムシ媒介性のKawasaki型を病因とするつつが虫病患者が発生していると推察されるが、それ以外の地域においては生息するツツガムシの種類や、それらが

保有する *O. tsutsugamushi* については不明である。

今回我々は、広島県内の *O. tsutsugamushi* の侵淫状況とその分布を明らかにするために、野鼠類における *O. tsutsugamushi* 感染状況を調査したので報告する。

方法

1 調査期間

調査はツツガムシの幼虫が孵化して宿主への吸着活動を行うとされる秋から初冬にかけての期間とし[1][4]、2006年は10月、2007年は10月～11月、2008年は10月～12月にそれぞれ実施した。

2 野鼠捕獲地点

これまでに広島県内でつつが虫病患者の発生が報告されている地域を中心に、42ヶ所の調査地点を設定し、野鼠の捕獲を実施した。

* 島根県保健環境科学研究所: Shimane Prefectural Institute of Public Health and Environment Science

** 大原総合病院附属大原研究所: Ohara Research Laboratory, Ohara General Hospital

*** 福井大学医学部: University of Fukui Faculty of Medical Sciences

3 野鼠の捕獲

金網トラップおよびシャーメントラップを用いた。各調査地点当り 10～50 個を午後に設置して翌日午前中に回収した。餌にはサツマイモと魚肉ソーセージを用いた。

4 検体の採取

捕獲した野鼠はトラップごとビニール袋に入れ、クロホルムで安楽死させた後採血し、次いで解剖して脾臓を採取した。

5 抗体価の測定

野鼠の *O. tsutsugamushi* に対する抗体価の測定は、Karp, Kato, Gilliam, Kawasaki および Kuroki の各株の抗原を用いて、リケッチア感染症診断マニュアル（国立感染症研究所）[5] の血清診断法に準拠して抗原スライドを作成し、2006 年の検体は間接免疫ペルオキシダーゼ法（IP 法）、2007 年および 2008 年の検体は間接蛍光抗体法（IF 法）で血清 IgG 抗体価を測定し、抗体価 20 倍以上を示すものを抗体陽性と判定した。なお、IP 法の標識抗体は HRP 標識プロテイン G、IF 法の標識抗体は FITC 標識抗マウス IgG 抗体を用いた。

6 *O. tsutsugamushi* DNA の検出

脾臓の一部に PBS を加えガラスホモジナイザーでホモゲナイズした後、QIAamp DNA Mini Kit（QIAGEN）を用いて DNA を抽出した。抽出 DNA について、*O. tsutsugamushi* の 56kDa 外膜タンパク遺伝子を標的

にした PCR を Nested PCR まで実施した。用いたプライマーはリケッチア感染症診断マニュアル [5] の primer34 (5'-TCAAGCTTATTGCTAGTGCAATGTCTGC-3') および primer55 (5'-AGGGATCCCTGCTGCTGTGCTTGCTGCG-3') を 1st PCR に、primer10 (5'-GATCAAGCTTCCTCAGCCTACTATAATGCC-3') および primer11 (5'-CTAGGGATCCCGACAGATGCACTATTAGGC-3') を Nested PCR に使用した。増幅された DNA (primer10/11 領域) はダイレクトシーケンシングで塩基配列を決定し、Clustal W で解析した後、MEGA 4 により系統樹を作成した。

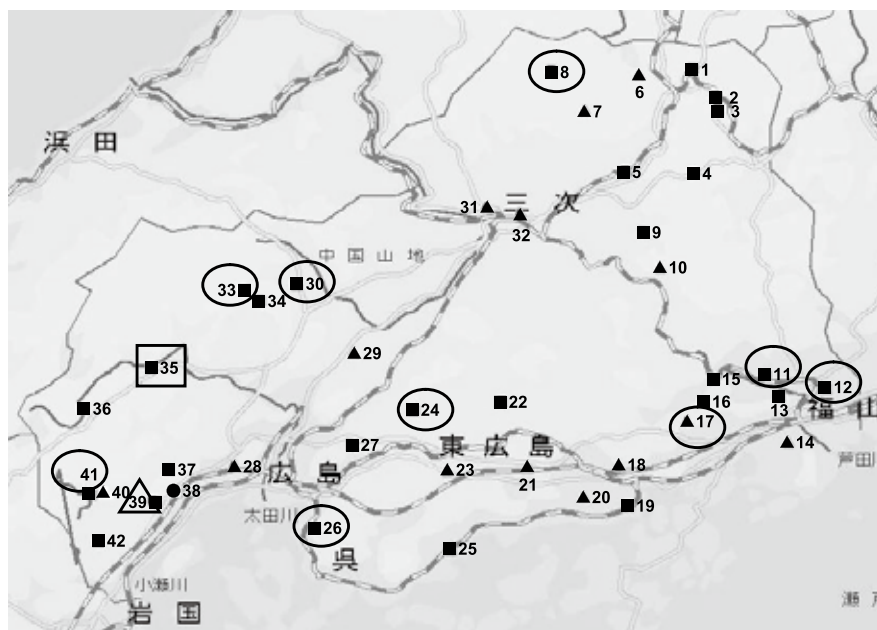
結 果

1 野鼠の捕獲状況

野鼠の捕獲状況を表 1 に示す。県内 42 地点で合計で 164 頭が捕獲された。内訳はアカネズミ 152 頭、ヒメネズミ 7 頭、クマネズミ 1 頭およびスミスネズミ 4 頭であった。なお、一部の野鼠はトラップ回収時に死亡していたために採血できず、それらについては脾臓からの *O. tsutsugamushi* DNA 検出のみを実施した。

2 野鼠の *O. tsutsugamushi* に対する抗体保有状況

捕獲された野鼠のうち、血清を採取できた 139 頭について *O. tsutsugamushi* に対する血清抗体価を測定した。その結果、調査を行った 42 地点の内 27 地点（図 1）で捕獲された野鼠 56 頭が、いずれかの *O. tsutsugamushi*



※この地図は、国土地理院の地図閲覧サービスで公開されている2万5千分1地図を使用したものである
 ■:抗体陽性の野鼠が捕獲された調査地 ▲:抗体陽性の野鼠が捕獲されなかった調査地 ●:野鼠が捕獲されたが、採血できなかった調査地
 ○:Karp (JP-2) 型の *O. tsutsugamushi* が検出された調査地 □:Kawasaki型が検出された調査地 △:Karp (JP2) および Sailama 型が検出された調査地

図 1 野鼠捕獲地点と *O. tsutsugamushi* に対する抗体保有状況および *O. tsutsugamushi* DNA 検出状況

抗原に対して抗体陽性を示した。陽性となった野鼠の結果を、表1に示した地域区分ごとにまとめ、各区域における野鼠の抗体保有状況を *O. tsutsugamushi* の型別に最も高い抗体価を示した血清型について集計した結果を表2に示す。血清型別の抗体価の測定に際しては、実際に感染した型以外の抗原に対しても交差反応によって抗体価が上昇することがあるため、複数の抗原に対して抗体陽性を示した場合には、最も高い抗体価を示した血清型を野鼠が感染していた *O. tsutsugamushi* の血清型と

推定して集計した。なお、複数の抗原に対して同じ抗体価を示したものは、別に集計した。

野鼠の抗体保有状況をみると、Karp 株に対して最高抗体価を示す野鼠が最も多く（計40頭：抗体陽性野鼠の71.4%）、それらは調査した全区域で認められた。次いで多かったのは Kawasaki 株に対してであり（計9頭：抗体陽性野鼠の16.1%）、県の北東部、中部、太田川水系および西部区域で確認された。また、県の北東部および東部区域では Gilliam 株に対して最高抗体価を示す野

表1 野鼠捕獲の概要

| 県内区域 | 地点 No. | 調査地域 | 捕獲年月日 | 野鼠の種類 | | | |
|-------|--------|----------|------------|-----------|-------|-------|--------|
| | | | | アカネズミ | ヒメネズミ | クマネズミ | スミスネズミ |
| 北東部 | 1 | 庄原市 | 2008/10/30 | 7 (7)* | 2 (2) | 0 | 0 |
| | 2 | 庄原市 | 2008/10/30 | 0 | 0 | 1 (1) | 0 |
| | 3 | 庄原市 | 2008/10/30 | 2 (2) | 1 (0) | 0 | 1 (0) |
| | 4 | 庄原市 | 2008/10/30 | 2 (2) | 0 | 0 | 0 |
| | 5 | 庄原市 | 2008/10/31 | 4 (4) | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 庄原市 | 2006/10/25 | 10 (9) | 4 (3) | 0 | 1 (1) |
| | 7 | 庄原市 | 2006/10/25 | 2 (2) | 0 | 0 | 0 |
| | 8 | 庄原市 | 2008/10/31 | 6 (6) | 0 | 0 | 0 |
| | 9 | 庄原市 | 2007/10/23 | 4 (4) | 0 | 0 | 0 |
| | 10 | 府中市 | 2007/10/23 | 4 (4) | 0 | 0 | 0 |
| 東部 | 11 | 福山市 | 2008/12/11 | 2 (2) | 0 | 0 | 0 |
| | 12 | 福山市 | 2008/12/11 | 6 (6) | 0 | 0 | 0 |
| | 13 | 福山市 | 2007/10/24 | 4 (4) | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | 福山市 | 2008/12/11 | 2 (2) | 0 | 0 | 0 |
| | 15 | 府中市 | 2006/10/24 | 10 (7) | 0 | 0 | 0 |
| | 16 | 尾道市 | 2006/10/24 | 2 (2) | 0 | 0 | 0 |
| | 17 | 尾道市 | 2006/10/24 | 6 (3) | 0 | 0 | 0 |
| | 18 | 三原市 | 2008/12/17 | 1 (1) | 0 | 0 | 0 |
| | 19 | 三原市 | 2008/12/17 | 2 (2) | 0 | 0 | 0 |
| | 20 | 三原市 | 2008/12/17 | 2 (2) | 0 | 0 | 0 |
| 中部 | 21 | 竹原市 | 2008/12/12 | 5 (5) | 0 | 0 | 0 |
| | 22 | 東広島市 | 2008/11/29 | 10 (7) | 0 | 0 | 0 |
| | 23 | 東広島市 | 2008/12/12 | 1 (1) | 0 | 0 | 0 |
| | 24 | 東広島市 | 2008/11/29 | 6 (5) | 0 | 0 | 0 |
| | 25 | 呉市 | 2008/12/25 | 4 (3) | 0 | 0 | 0 |
| | 26 | 広島市 | 2008/12/25 | 5 (4) | 0 | 0 | 0 |
| | 27 | 広島市 | 2008/11/29 | 3 (3) | 0 | 0 | 0 |
| | 28 | 広島市 | 2008/11/21 | 1 (1) | 0 | 0 | 0 |
| 江の川水系 | 29 | 安芸高田市 | 2008/10/24 | 1 (1) | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 山県郡北広島町 | 2008/11/13 | 3 (3) | 0 | 0 | 0 |
| | 31 | 三次市 | 2006/10/25 | 1 (1) | 0 | 0 | 0 |
| | 32 | 三次市 | 2006/10/25 | 3 (3) | 0 | 0 | 0 |
| 太田川水系 | 33 | 山県郡北広島町 | 2008/11/13 | 6 (5) | 0 | 0 | 1 (0) |
| | 34 | 山県郡北広島町 | 2008/11/13 | 2 (2) | 0 | 0 | 0 |
| | 35 | 山県郡安芸太田町 | 2008/11/5 | 4 (4) | 0 | 0 | 0 |
| | 36 | 廿日市市 | 2008/11/5 | 2 (2) | 0 | 0 | 1 (0) |
| 西部 | 37 | 広島市 | 2007/11/21 | 2 (2) | 0 | 0 | 0 |
| | 38 | 廿日市市 | 2008/11/20 | 1 (0) | 0 | 0 | 0 |
| | 39 | 廿日市市 | 2008/11/20 | 3 (2) | 0 | 0 | 0 |
| | 40 | 廿日市市 | 2007/11/16 | 1 (1) | 0 | 0 | 0 |
| | 41 | 廿日市市 | 2008/11/20 | 7 (4) | 0 | 0 | 0 |
| | 42 | 大竹市 | 2007/11/16 | 3 (2) | 0 | 0 | 0 |
| 合計 | | | | 152 (132) | 7 (5) | 1 (1) | 4 (1) |

※ () 内は抗体価を測定した野鼠数を再掲

表2 県内区域別の野鼠の *O. tsutsugamushi* に対する IgG 抗体保有状況

| 県内区域 | 野鼠種類 | 検査数 | 最高抗体価を示した抗原* | | | | | 最高抗体価複数** |
|-------|--------|-----|--------------|--------|-----------|------------|----------|--------------|
| | | | Karp 株 | Kato 株 | Gilliam 株 | Kawasaki 株 | Kuroki 株 | |
| 北東部 | アカネズミ | 40 | 7 | 0 | 1 | 3 | 0 | 1 (KP=KW=KR) |
| | ヒメネズミ | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | クマネズミ | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | スミスネズミ | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 東部 | アカネズミ | 31 | 7 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 中部 | アカネズミ | 29 | 9 | 0 | 0 | 3 | 0 | 1 (KP=KW) |
| 江の川水系 | アカネズミ | 8 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 太田川水系 | アカネズミ | 13 | 6 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 (KP=KW) |
| 西部 | アカネズミ | 11 | 7 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (KP=KR) |
| 合計 | | 139 | 40 | 0 | 2 | 9 | 1 | 4 |

※ 最高抗体価を示した抗原の陽性数

※※ 複数抗原について最高抗体価が同値であった陽性数。

() 内は同値であった抗原 (KP : Karp, KW : Kawasaki, KR : Kuroki)。

鼠が各1頭、東部区域では Kuroki 株に対して最高抗体価を示す野鼠が1頭確認された。なお、複数の抗原に対して最高抗体価を示す野鼠も4頭認められた。

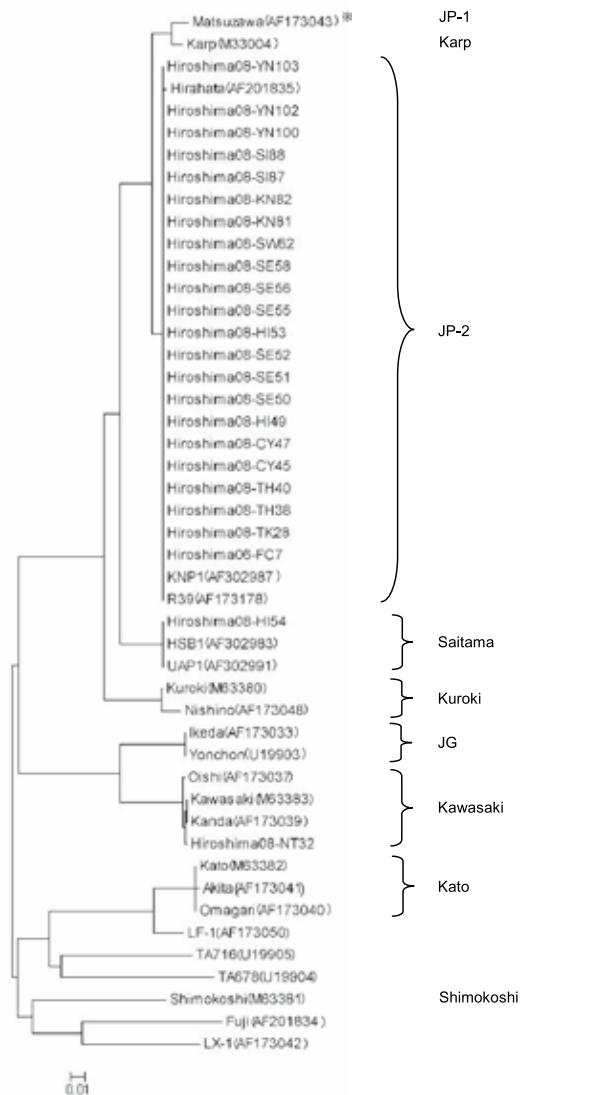
3 *O. tsutsugamushi* DNA 検出状況

捕獲された野鼠164頭の脾臓を材料としてPCR法による遺伝子検出を行ったところ、11地点、24頭のアカネズミが遺伝子陽性となった(図1, 表3)。24件のDNAの primer10/11 領域の増幅産物の塩基配列を決定し、日本DNAデータベース(DDBJ)に登録されている *O. tsutsugamushi* の標準株等の塩基配列を用いて分子系統樹解析を実施したところ、24件中22件は Karp (JP-2) 型、1件は Karp (Saitama) 型、別の1件は Kawasaki 型のクラスターに属していた(図2)。なお、Karp (JP-2) 型の22件の primer10/11 領域は全て配列が100%一致していた。

考 察

広島県におけるつつが虫病患者の発生は4月から5月にかけて、および10月から12月にかけてが多く二峰性のパターンを示すが、その多くが秋季の県西部の太田川中流域で発生している[3]。これまでの研究からこの地域では、患者からタテツツガムシ媒介性の Kawasaki 型の *O. tsutsugamushi* のDNAが検出されており[3]、またタテツツガムシの生息も確認されている[2]。今回我々が実施した調査で Kawasaki 型のDNAが検出されたアカネズミもこの地域で捕獲されたものであった。これらを併せ考えると、広島県内の太田川中流域ではタテツツガムシ媒介性の Kawasaki 型 *O. tsutsugamushi* が分布し、これによるつつが虫病が発生しているものと考えられる。

一方、太田川中流域以外の地域では患者発生は散発的



* () 内は日本DNAデータベース(DDBJ)のアクセッション番号

図2 アカネズミから検出された *O. tsutsugamushi* 56kDa 外膜タンパク遺伝子の系統樹

表3 アカネズミから検出された *O. tsutsugamushi* DNA とその遺伝子型

| 県内区域 | 地点 No. | 調査地域 | 検出 DNA | 遺伝子型 | |
|-------|--------|----------|-------------------|------------------|---------------|
| 北東部 | 8 | 庄原市 | Hiroshima08-TK28 | Karp (JP-2) 型 | |
| | 東部 | 11 | 福山市 | Hiroshima08-SI87 | Karp (JP-2) 型 |
| | | 11 | 福山市 | Hiroshima08-SI88 | Karp (JP-2) 型 |
| | | 12 | 福山市 | Hiroshima08-KN81 | Karp (JP-2) 型 |
| | | 12 | 福山市 | Hiroshima08-KN82 | Karp (JP-2) 型 |
| | 17 | 尾道市 | Hiroshima06-FC7 | Karp (JP-2) 型 | |
| 中部 | 24 | 東広島市 | Hiroshima08-SW62 | Karp (JP-2) 型 | |
| | 26 | 広島市 | Hiroshima08-YN100 | Karp (JP-2) 型 | |
| | 26 | 広島市 | Hiroshima08-YN102 | Karp (JP-2) 型 | |
| | 26 | 広島市 | Hiroshima08-YN103 | Karp (JP-2) 型 | |
| 江の川水系 | 30 | 山県郡北広島町 | Hiroshima08-CY45 | Karp (JP-2) 型 | |
| | 30 | 山県郡北広島町 | Hiroshima08-CY47 | Karp (JP-2) 型 | |
| 太田川水系 | 33 | 山県郡北広島町 | Hiroshima08-TH38 | Karp (JP-2) 型 | |
| | 33 | 山県郡北広島町 | Hiroshima08-TH40 | Karp (JP-2) 型 | |
| | 35 | 山県郡安芸太田町 | Hiroshima08-NT32 | Kawasaki 型 | |
| 西部 | 39 | 廿日市市 | Hiroshima08-HI49 | Karp (JP-2) 型 | |
| | 39 | 廿日市市 | Hiroshima08-HI53 | Karp (JP-2) 型 | |
| | 39 | 廿日市市 | Hiroshima08-HI54 | Karp (Saitama) 型 | |
| | 41 | 廿日市市 | Hiroshima08-SE50 | Karp (JP-2) 型 | |
| | 41 | 廿日市市 | Hiroshima08-SE51 | Karp (JP-2) 型 | |
| | 41 | 廿日市市 | Hiroshima08-SE52 | Karp (JP-2) 型 | |
| | 41 | 廿日市市 | Hiroshima08-SE55 | Karp (JP-2) 型 | |
| | 41 | 廿日市市 | Hiroshima08-SE56 | Karp (JP-2) 型 | |
| | 41 | 廿日市市 | Hiroshima08-SE58 | Karp (JP-2) 型 | |

に春あるいは秋から冬にかけて発生しているが、今回の調査で、県内の広い範囲におよぶ地域で Karp (JP-2) 型に感染した野鼠や Karp 株に対して高い抗体価を示す野鼠が多く確認されたことから、これらの地域においては Karp (JP-2) 型によるつつが虫病が発生している可能性が考えられる。この Karp (JP-2) 型はフトゲツツガムシ媒介性であるが [1]、過去に県内で実施された調査結果から、県内の複数の患者発生地付近ではフトゲツツガムシが確認されていることから [6] [7]、県内の広範囲の地域でフトゲツツガムシ媒介性の Karp (JP-2) 型が患者の発生に関与している可能性がある。また、Kawasaki 株に対して高い抗体価を示すアカネズミは太田川中流域以外でも確認されたことから、Kawasaki 型がそれらの地域で患者発生に関与している可能性もある。

なお、今回、廿日市市の 1 地点の野鼠 1 頭から検出された Karp (Saitama) 型については、広島県では初めて確認されたものである。他県ではこれまでに埼玉県 [8]、岡山県 [9]、愛媛県 [9]、高知県 [9] および徳島県 [10] の野鼠から検出されているが、患者からの検出例の報告はない [10]。広島県での本型の確認はその分布を示す新たなデータであり、今後県内の患者発生については、Karp (Saitama) 型による可能性にも留意する必要がある。

それら以外にも、Gilliam 株あるいは Kuroki 株に対する高い抗体価を示す野鼠も少数確認されていることから、

これらの型の *O. tsutsugamushi* が県内に存在している可能性も考えられる。今後、それらの型を原因とするつつが虫病患者が発生している可能性も視野に入れた検査が必要と考える。

以上、広島県内におけるつつが虫病患者発生の感染環を明らかにするために野鼠類における *O. tsutsugamushi* の侵淫状況の調査を行った結果から、県内では太田川中流域の Kawasaki 型 (タテツツガムシ媒介性) *O. tsutsugamushi* による患者発生以外に、広い範囲で Karp (JP-2) 型 (フトゲツツガムシ媒介性) による患者発生が起こっていることが強く示唆された。今後は、患者からの *O. tsutsugamushi* の直接検索、また媒介ツツガムシの詳細な調査データの蓄積などを通して、広島県の地域ごとにつつが虫病感染リスクを評価していくことが必要であると考えている。

文 献

- [1] 田原研司, 山本正悟 (2007): つつが虫病 - 多種多彩な疫学 -, ダニと新興再興感染症, 151-164, 全国農村教育協会.
- [2] 岩崎博道, 矢野貴彦, 金子栄, 江木素子, 高田伸弘, 上田孝典 (2001): 広島県において見いだされたツツガムシ病多数例の臨床的および疫学的解析, 感染症学雑誌, 75 (5), 365-370.
- [3] 毛利好江, 下村 佳, 河本 秀一, 石村 勝之, 橋渡

- 佳子, 平崎 和孝, 萱島 隆之, 佐々木敏之, 山本美和子, 古田 喜美 (2002): 広島市のツツガムシ病患者血液からの *Orientia tsutsugamushi* 遺伝子検出とシーケンス解析, 広島市衛生研究所年報, 22, 101-102.
- [4] 吉田芳哉, 古屋由美子 (2007): つつが虫病 - 再興感染症の波紋 -, ダニと新興再興感染症, 19-22, 全国農村教育協会.
- [5] 国立感染症研究所: リケッチア感染症診断マニュアル (2001).
- [6] 積山幸枝, 水田満里, 海佐裕幸 (1991): 広島県におけるツツガムシの分布, 広島県衛生研究所研究報告, 38, 17-21.
- [7] 中村玄, 高祖讓, 吉岡郁夫, 佐々学 (1959): 広島県下における恙虫類の季節消長の研究, 衛生動物, 10, 49-54.
- [8] Akira Tamura, Narishige Yamamoto, Shoichiro Koyama, Yukie Makisaka, Masakazu Takahashi, Ken-ichi Urabe, Masatoshi Takaoka, Kiyooki Nakazawa, Hiroshi Urakami, Masahiro Fukuhara (2001): Epidemiological Survey of *Orientia tsutsugamushi* Distribution in Field Rodents in Saitama Prefecture, Japan, and Discovery of a New Type, *Microbiol, Immunol.* 45 (6), 439-446.
- [9] 田原研司 (2008): 中国・四国地域におけるリケッチア症 (つつが虫病・日本紅斑熱) の発生状況と疫学 (2007年), 平成19年度厚生労働省科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業) 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分担研究者報告書, 87-98.
- [10] 山本保男, 川上百美子 (2007): 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年報, 25, 39-41.