

## 福井県の紅斑熱発生に係るベクターと病原リケッチアの調査

石畝 史・藤田博己\*1・山崎史子・永田暁洋・矢野泰弘\*2・高田伸弘\*2

Survey of vectors and pathogens associated with spotted fever cases in Fukui Prefecture, Japan

Fubito ISHIGURO, Hiromi FUJITA\*1, Fumiko YAMAZAKI, Akihiro NAGATA,  
Yasuhiro YANO\*2, Nobuhiro TAKADA\*2

平成 15 年～20 年に、福井県の紅斑熱発生地区を含む各地山系で得られたマダニにつき紅斑熱群リケッチアの保有状況を調査した。4 属 11 種計 473 個体のうち、生菌分離できたのは、経ヶ岳、冠山および百里ヶ岳のヒトツトゲマダニから *Rickettsia helvetica*、また刈込池のヤマトマダニから *Rickettsia asiatica*、さらに野坂岳および百里ヶ岳のフタトゲチマダニから *R. sp. Lon type* で、各々はそのマダニ種に固有の菌種であった。このうち、福井県の紅斑熱感染の病原とされる *R. helvetica* 保有のヒトツトゲマダニ、また病原性が言われる *R. asiatica* 保有のヤマトマダニの広い分布は注意を要する。

## 1. はじめに

平成 16 年 7 月に、国内ひいては東アジアで初めての *Rickettsia helvetica* 感染が強く示唆される紅斑熱群の症例が、福井県において確認された<sup>1)2)</sup>。そこで我々は、患者が登山した福井県大野市の荒島岳地区において、媒介マダニ種と紅斑熱群リケッチア (spotted fever group rickettsiae: SFGR) の種を確定するため、平成 17 年から 18 年にかけてマダニの SFGR 保有状況を調査した。その結果、ヒトツトゲマダニ *Ixodes monospinosus* からのみ SFGR を生菌分離でき、その SFGR が *R. helvetica* と同定されたことから、このマダニが最も有力な媒介者であると推論するに至った<sup>3)</sup>。そうなれば、さらに登山者を啓発するための疫学情報を得る必要があると思われたため、県内の広い範囲の山間部において、マダニの SFGR 保有状況を調査することとした。

## 2. 材料および方法

## 2. 1 材料

## 2. 1. 1 調査期間および調査地域

調査期間は平成 15 年 5 月～9 月、17 年 6 月、18 年 5 月、19 年および 20 年の 6～7 月、調査地域は福井県越前地方の国見岳、浄法寺山、部子山、冠山、高倉峠、奥越地方の取立山、赤兎山、経ヶ岳、刈込池、および若狭地方の野坂岳、雲谷山、百里ヶ岳、小浜市郊外の計 13 ヶ所で延べ 20 回実施した。調査地域の標高は小浜市郊外の標高 30～50m を除いて、全体では約 300～1,600m の範囲である。なお、患者発生前年 (平成 15 年) の調査資料も併せて記載する。

## 2. 1. 2 材料

フランネル法により植生上から採集したマダニ 473 個体を病原体解析に用いた。生菌分離にはすべての個体を用い、PCR によるマダニからの SFGR 直接検出では 147 個体を供試した。

## 2. 2 方法

## 2. 2. 1 マダニからの SFGR 生菌分離

マダニからの SFGR の分離方法は、既報<sup>4)</sup>のとおり実施した。マダニ表面を 0.01% イソジン加 70% エタノールで消毒後、1% 牛胎児血清加 0.01M PBS (pH7.2) で 5 分間洗浄した。その後、SPG (sucrose phosphate glutamate) で乳剤とした各内臓を L929 細胞で培養し、2～4 週間観察した。SFGR の増殖をみた培養細胞は凍結保存した。

## 2. 2. 2 生菌分離した SFGR 株からの DNA 抽出

凍結した SFGR 陽性細胞を解凍後、4℃で 15,000rpm10 分間遠心分離し、その沈渣を PBS で 2 回 (4℃で 15,000rpm10 分間) 洗浄を行った。次に、沈渣に滅菌蒸留水を加え、100℃10 分間煮沸後、15,000rpm10 分間遠心し、その上清を抽出 DNA として PCR に用いた。

## 2. 2. 3 マダニから DNA の直接抽出

生菌分離に供した後で凍結保存されたマダニ残骸を材料に、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて抽出した。

## 2. 2. 4 抽出された SFGR の DNA について PCR

生菌分離株およびマダニから直接抽出された DNA を試料に、既報のとおり<sup>5)</sup> *Rickettsia prowazekii* クエン酸合成酵素遺伝子 (*glta*) 由来の常用プライマーにて、First PCR および Second PCR を行った。すなわち、プライマーは First PCR では RpCS.780p+RpCS.1258n、Second PCR では RpCS.877p+RpCS.1258n をそれぞれ用いた。Second PCR 後、3% アガロースゲルで電気泳動後、ethidium bromide で染色後、382bp の DAN band を確認した。

## 2. 2. 5 PCR 産物からの DNA 精製

PCR 産物からの DNA の精製は、既報のとおり<sup>5)</sup> 実施した。まず、2.2.4 で非特異的な band が確認されなかった試料は、MiniElute PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて DNA を精製した。非特異的な band が確認された試料は PCR 産物を 4% アガロースゲルで電気泳動を行い、染色後紫外線を照射下で、DNA band を切り取った。その後、MiniElute Gel Extracrion Kit (QIAGEN) を用いて DNA を精製した。

\*1 大原総合病院附属大原研究所 \*2 福井大学・医学部

精製後の DNA はどちらもその 1 $\mu$ L を、アガロースゲルで電気泳動し、DNA の濃度を確認した。

### 2. 2. 6 シークエンスによる同定

精製後の DNA のシークエンス反応は、RpCS. 877p + RpCS. 1258n のプライマーと sequencing kit (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit and GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, USA) を用いて行った。すなわち、反応液は 3.2pmol のプライマー、3~3.5 $\mu$ L (10-20ng) のテンプレート DNA、8 $\mu$ L の terminator ready reaction mix に最終容量が 20 $\mu$ L になるように滅菌蒸留水を加え調整した。サイクルシークエンスは、96 $^{\circ}$ C 5 秒、50 $^{\circ}$ C 5 秒および 60 $^{\circ}$ C 4 分を 25 回行った。

その後、反応液中の不要な蛍光物質を除去するためにスピнкаラム (DyeEx 2.0 Spin kit, QIAGEN) に通過させた後で乾燥させ、ホルムアミドおよび Blue dextran-EDTA で溶解後、ABI PRISM 377 DNA Sequencing System (Applied Biosystems) でシークエンスを行った。シークエンス後のデータは、multisequence alignment program in version 3.1.1 of the Sequencher (Gene Codes Corporation, USA) を用いて塩基配列を調べ、DNA data bank database (DDBJ) の標準株との相同性を調べることにより、SFGR の同定を行った。

## 3. 結果

マダニ相は表 1 のとおり地域により異なるものの、植生上から得られた総計では、ヒトツトゲマダニ 14 個体、ヤマトマダニ *Ixodes ovatus* 138 個体、シュルツェマダニ *Ixodes persulcatus* 45 個体、タネガタマダニ *Ixodes nipponensis* 1 個体、キチマダニ *Haemaphysalis flava* 112 個体、ヤマトチマダニ *Haemaphysalis japonica* 15 個体、ヒゲナガチマダニ *Haemaphysalis kitaokai* 6 個体、フタトゲチマダニ *Haemaphysalis longicornis* 70 個体、オオトゲチマダニ *Haemaphysalis megaspinosus* 51 個体、タイワンカクマダニ *Darmacentor taiwanensis* 18 個体およびタカサゴキララマダニ *Amblyomma testudinarium* 3 個体の 4 属 11 種計 473 個体となった。このうち、生菌分離に供したマダニの中で、ヒトツトゲマダニは経ヶ岳の 1/1 個体、冠山の 1/4 個体、百里ヶ岳の 2/2 個体、ヤマトマダニは刈込池の 1/13 個体、フタトゲチマダニは野坂岳の 16/28 個体および百里ヶ岳の 16/37 個体が SFGR 陽性で、ほかにシュルツェマダニ、タネガタマダニ、キチマダニ、ヤマトチマダニ、ヒゲナガチマダニ、オオトゲチマダニ、タイワンカクマダニおよびタカサゴキララマダニでは生菌分離がなかった。分離された SFGR 株のシークエンスによる塩基配列を標準株と比較すると、表 3 のとおりヒトツトゲマダニ 由来の 4 株は *R. helvetica*、ヤマトマダニ由来株は *Rickettsia asiatica*、およびフタトゲチマダニ由来株のうち供試した 3 株は *Rickettsia japonica* と 99.4% の相同性を示す *R. sp Lon type* と 100% 一致した。

表 1 福井県のマダニから紅斑熱群リケッチアの生菌分離

地域名	調査年月日	Im	Io	Ip	In	Hf	Hj	Hk	Hl	Hm	Dt	At
越前地方												
国見岳	H18. 5. 21		0/16			0/7						
浄法寺山	H19. 6. 13		0/1			0/17					0/5	
	H20. 6. 14		0/11				0/4				0/3	
部子山	H20. 6. 28		0/2	0/31			0/1					
冠山	H19. 6. 23	1♀/4	0/3				0/3					
高倉峠	H17. 6. 19	0/1										
奥越地方												
取立山	H15. 7. 5		0/6				0/1					
	H17. 8. 13		0/4									
	H19. 6. 16		0/24			0/1	0/2					
赤兎山	H17. 6. 19		0/3									
	H19. 6. 24		0/3	0/2								
	H19. 7. 1		0/3	0/3								
経ヶ岳	H15. 8. 3		0/26			0/1	0/1					
	H19. 7. 7	1♂/1	0/16	0/6			0/3					
刈込池	H20. 6. 28	0/2	1♀/13	0/3								
若狭地方												
野坂岳	H15. 5. 24	0/4	0/6			0/50			11/18 <sup>1)</sup>	0/17		
	H20. 6. 8					0/1		0/2	5/10 <sup>2)</sup>	0/1	0/1	
雲谷山	H20. 6. 8					0/3		0/4	0/5			
百里ヶ岳	H15. 6. 7	2♀/2	0/1			0/28			16/37 <sup>3)</sup>	0/33	0/1	0/3
小浜市郊外	H15. 9. 30				0/1	0/4						0/8
計		4/14	1/138	0/45	0/1	0/112	0/15	0/6	32/70	0/51	0/18	0/3

Im ; ヒトツトゲマダニ、Io ; ヤマトマダニ、Ip ; シュルツェマダニ、In ; タネガタマダニ、Hf ; キチマダニ  
Hj ; ヤマトチマダニ、Hk ; ヒゲナガチマダニ、Hl ; フタトゲチマダニ、Hm ; オオトゲチマダニ  
Dt ; タイワンカクマダニ、At ; タカサゴキララマダニ  
備考 ; 発生段階別の分離状況

1) 幼虫 1/4、若虫 9/13、♂ 1/1 2) ♂ 3/4、♀ 2/6 3) 幼虫 3/13、若虫 6/12、♂ 4/7、♀ 3/5

表2 マダニからの紅斑熱群リケッチアDNAの直接検出

地域名	Im	Io	Ip	Hf	Hj	Hk	Hl	Hm	Dt
国見岳		1/16		1/7					
浄法寺山		2/5		1/6	2/2				1/6
取立山		0/10		0/1	0/2				
赤兎山		0/6	0/5						
経ヶ岳	1/1	1/12	0/6		0/3				
刈込池	0/2	8/10	0/3						
部子山		1/2	0/7						
冠山	1/4	0/3			0/3				
高倉峠	0/1								
野坂岳						0/2	3/5	0/1	0/1
雲谷山				0/3		0/4	0/5		
計	2/8	12/67	0/21	2/17	2/10	0/6	3/10	0/1	1/7

表3 マダニからの分離株および抽出DNA増幅産物とリケッチア標準株との相同性

マダニ 検体数	分離株			PCRによる抽出DNA増幅産物					
	Im*	Io**	Hl	Im*	Io	Io**	Io	Hf	Hj
採集地点 標準株	経ヶ岳 冠山 百里ヶ岳	刈込池	野坂岳 百里ヶ岳	経ヶ岳 冠山	国見岳 赤兎山	刈込池	経ヶ岳	国見岳 浄法寺山	浄法寺山
<i>R. helvetica</i>	100	99.4	94.7	100	100	99.4	99.7	94.7~95.0	94.7
<i>R. asiatica</i>	99.4	100	95.3	99.4	99.4	100	99.1	95.6~95.9	95.3
<i>R. japonica</i>	95.3	95.9	99.4	95.3	95.3	95.9	95.6	98.8~99.1	99.1
<i>R. sp. Lon type</i>	94.7	95.3	100	94.7	94.7	95.3	95.0	98.2~98.5	98.5

Im\* & Io\*\* : それぞれ同一個体。

Im, ヒトツトゲマダニ ; Io, ヤマトマダニ ; Hl, フタトゲチマダニ Hf, キチマダニ ; Hj, ヤマトチマダニ

一方、マダニから直接抽出された DNA を材料とした PCR では、表2のとおりヒトツトゲマダニは経ヶ岳の1/1個体および冠山の1/4個体、ヤマトマダニは国見岳の1/16個体、赤兎山の1/9個体、経ヶ岳の1/12個体、刈込池の8/10個体および部子山の1/2個体、キチマダニは国見岳の1/7個体および浄法寺山の1/6個体、ヤマトチマダニは浄法寺山の2/2個体、フタトゲチマダニは野坂岳の3/5個体およびタイワンカクマダニは浄法寺山の1/6個体が陽性であった。このうち、解析できた9個体についての塩基配列は、表3のとおり経ヶ岳と冠山のヒトツトゲマダニおよび国見岳と赤兎山のヤマトマダニは *R. helvetica* に、刈込池のヤマトマダニは *R. asiatica* にそれぞれ100%一致した。経ヶ岳のヤマトマダニは *R. helvetica* に99.7%と相同性が極めて高く、国見岳と浄法寺山のキチマダニおよび浄法寺山のヤマトチマダニは *R. japonica* に最も相同性が高かった。

#### 4. 考察

経ヶ岳、冠山および百里ヶ岳のヒトツトゲマダニから *R. helvetica* が生菌分離された。福井県では患者が感染したと推定される荒島岳を含めて計4地域のヒトツトゲマダニから *R. helvetica* が分離されたことになる(図1)。また、ヒトツトゲマダニは分布個体数が少ないものの *R. helvetica* の分離率が33.3% (4/12個体) と高いことが注目された。この他、*R. asiatica* および *R. sp. Lon type* が、刈込池のヤマトマダニおよび野坂岳と百里ヶ岳のフタ

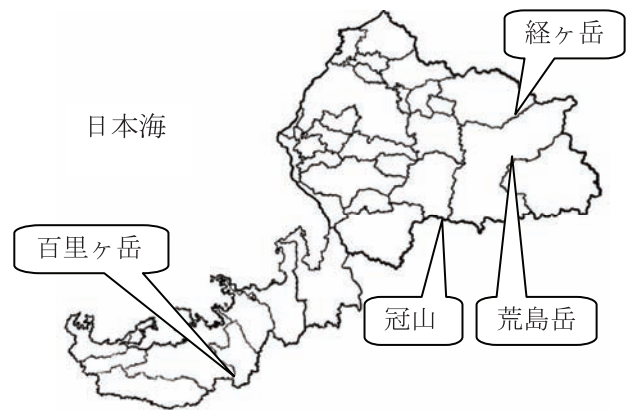


図1 *R. helvetica* 保有をみたヒトツトゲマダニの分布

トゲチマダニからそれぞれ分離された。したがって、本県では計6地域の3種類のマダニ(ヒトツトゲマダニ、ヤマトマダニおよびフタトゲチマダニ)から3種類のSFGRが分離されたことになる。しかし、これまでに日本紅斑熱病原体である *R. japonica* の分離報告<sup>6)</sup>があるフタトゲチマダニ、キチマダニおよびタイワンカクマダニからは、*R. japonica* は分離されなかった。また、同じく分離報告があるヤマアラシチマダニ *Haemaphysalis hystrix*<sup>6)7)</sup>、および *R. japonica* 遺伝子が検出され媒介種と想定されるツノチマダニ *Haemaphysalis cornigera*<sup>8)</sup>などは、

元来暖帯地域に多種であるためか、北陸地方である本県では分布が確認されなかった。

欧州では1999年に*R. helvetica*のヒトに対する病原性が確認されて以来<sup>9)</sup>、それを保有する*Ixodes ricinus*の調査<sup>10)</sup>、およびこのリケッチア感染による症例が蓄積されつつあり、東南アジアのタイ国の山岳地域などでも確認されつつある<sup>11)12)</sup>。これまでの調査で、日本各地のヒトツトゲマダニから*R. helvetica*が分離されている<sup>13)14)</sup>。また、北陸では現在のところ、*R. helvetica*はヒトツトゲマダニからの分離にとどまっているが、北日本ではシュルツェマダニからの分離報告<sup>14)15)16)</sup>も多い。以上から、中部以北では、南西日本に多発する日本紅斑熱(*R. japonica* 起因)が見られないものの、ヒトツトゲマダニあるいはシュルツェマダニ保有の*R. helvetica*感染による紅斑熱群症例が潜在し得ることに留意すべきである。一方、*R. asiatica*は1993年に日本で初めてヤマトマダニから分離されて以来<sup>17)</sup>、日本各地で分離されている中で<sup>6)</sup>、これによる感染が疑われた熱性発疹性患者が平成16年7月に長野県の白馬梅池で確認されたことから、このマダニに対しても注意が必要である。

さらに最近では、平成20年8月、仙台市においてイスカチマダニ*Haemaphysalis concinna*による媒介が確認された*Rickettsia heilongjiangensis*感染の患者が見出された。本菌種による症例は中国東北部からロシア極東部まで見出されているが、国内では初の確認である<sup>18)</sup>。福井県を含む北陸地方では現在のところ、イスカチマダニの分布は確認されていないものの、福井県に隣接して北日本に近い気候条件をもつ中部山岳では本種の動向に注意したい。なお、平成19年に青森県で見出された紅斑熱群リケッチア症については、患者が在住する八戸市にも見られるイスカチマダニとの関係が疑われつつある(データは示さず)。

## 謝辞

なお、本調査研究の一部は、平成19年および20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; H19-新興一般-014)によった。

## 参考文献

- 1) Noji, Y., Takada, N. et al : The first reported case of spotted fever in Fukui Prefecture, the northern part of central Japan, *Jpn. J. Infect. Dis.*, 58, 112~114 (2005)
- 2) 高田伸弘, 石畝史他 : 福井県で初めて確認された *R. helvetica* 感染が示唆された症例, 病原微生物検出情報, 27, 40~41 (2006)
- 3) Ishiguro, F., Takada, N. et al : Survey of the vectorial competence of ticks in an endemic area of spotted fever group rickettsioses in Fukui Prefecture, Japan, *Microbiol. Immunol.*, 52, 305~309 (2008)
- 4) Takada, N., Fujita, H. et al : First isolation of a rickettsia closely related to Japanese spotted fever pathogen from a tick in Japan. *J. Med. Entomol.*, 31, 183~185 (1994)
- 5) Ishikura, M., Ando, S. et al : Phylogenetic analysis

- of spotted fever group rickettsiae based on *gltA*, *17-kDa*, and *rOmpA* genes amplified by nested PCR from ticks in Japan, *Microbiol. Immunol.*, 47, 823~832 (2003)
- 6) 藤田博己, 高田伸弘 : マダニ類から検出されるリケッチアの多様性, ダニと新興再興感染症, SADI 組織委員会編集, 全国農村教育協会, 129~139 (2007)
- 7) 山本正悟 : 九州地域におけるリケッチア感染症の実態調査—日本紅斑熱の患者発生状況および宮崎県, 長崎県, 熊本県の患者発生地における媒介マダニ調査—, 厚生労働科学研究費補助金 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—平成19年度総括・分担研究報告, 99~107 (2008)
- 8) 高田伸弘 : 三重県志摩半島に多発する紅斑熱, その感染環と環境要因, 厚生労働科学研究費補助金 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—平成20年度総括・分担研究報告, 85~101 (2009)
- 9) Nilsson, K., Lindquist, O. et al : Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death, *Lancet*, 354, 1169~1173 (1999)
- 10) Nilsson, K., Lindquist, O. et al : *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in Sweden, *J. Clin. Microbiol.*, 37, 400~403 (1999)
- 11) Fournier, P.F., Allombert C. et al : Aneruptive fever associated with antibodies to *Rickettsia helvetica* in Europe and Thailand, *J. Clin. Microbiol.*, 42, 816~818 (2004)
- 12) Phongmany, S., Rolain, J.M. et al : *Rickettsia* infections and fever, Vientiane, Laos, *Emerg. Infect. Dis.*, 12, 256~262 (2006)
- 13) Fournier, P.E., Fujita, H. et al : Genetic identification of rickettsiae isolated from ticks in Japan, *J. Clin. Microbiol.*, 40, 2176~2181 (2002)
- 14) 藤田博己 : 2007年の国内各地におけるマダニ相とマダニ保有リケッチアの調査, 厚生労働科学研究費補助金 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—平成19年度総括・分担研究報告, 25~36 (2008)
- 15) 藤田博己 : 2008年の国内各地におけるマダニ相とマダニ保有リケッチアの調査, 厚生労働科学研究費補助金 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—平成20年度総括・分担研究報告, 35~45 (2009)
- 16) 高田伸弘 : 東南アジアにおけるリケッチア感染症の疫学—地理病理学の視点から—, 化学療法の領域, 845~852 (2005)
- 17) Fujita, H., Fournier, P.E., et al *Rickettsia asiatica* sp. nov., isolated in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 2365~2368 (2006)
- 18) 安藤秀二, 黒澤昌啓他 : 仙台市で確認された新しい紅斑熱リケッチア症, 感染症学雑誌—第83回日本感染症学会総会学術講演抄録—, Vol.83. 臨時増刊号, 214 (2009)