

兵庫県における日本紅斑熱リケッチア感染症の発生状況

北本 寛明* 高井 伝仕 榎本 美貴 近平 雅嗣

Trend of Rickettsial Infection “Japanese Spotted Fever” in Hyogo Prefecture

Hiroaki KITAMOTO*, Denshi TAKAI, Miki ENOMOTO and Masatsugu CHIKAHIRA

Infectious Disease Research Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

Eleven patients of Japanese spotted fever (JSF) were diagnosed among the 33 suspected patients by indirect immunofluorescence assay in Hyogo prefecture between 2007 and 2010. These confirmed patients were emerged in August, October and November. Most specific antibody positive sera were collected from elderly patients and many were residents of south area of Awaji Island.

Twenty-two patients suspected of rickettsial infection from the clinical symptoms could not be identified as having the pathogen, including patients rejected with *Orientia tsutsugamushi* infection. It is considered that all of the *O.tsutsugamushi* infection could not be diagnosed by commercial clinical laboratory, because only limited antigens were used at these laboratories despite the existence of varied antigen types. Therefore, laboratory assays to apply the extra type of antigens is needed to diagnose the *O.tsutsugamushi* infection correctly.

There was a case showing nonspecific fluorescence by use only of FITC labeled anti-human IgG, and the titer of the convalescent serum was same as that of an acute phase. In this case, the fluorescence was seen only in the nucleus of *R.japonica* infected Vero cells, and it was considered that the fluorescence related to the antinuclear antibody of patient.

From our results about only a few cases, it was confirmed that employing an eschar formed after the tick bite had the high degree of availability on the PCR amplification of *R.japonica* gene.

According to the data of the infectious disease surveillance of patients, annual numbers of JSF patients of Hyogo prefecture had no relation to that of the whole country. Therefore independent investigation is needed to understand the idiosyncratic trend of JSF in Hyogo prefecture.

I はじめに

リケッチア感染症の1つである日本紅斑熱は、1984年に馬原が徳島県阿南市での発生を報告¹⁾して以来、国内各地での発生が報告²⁻⁵⁾されている。日本紅斑熱の病原体は、リケッチア科に属する *Rickettsia japonica* であり⁶⁾、

節足動物であるマダニにより媒介される。

兵庫県では、淡路島南部諭鶴羽山系が日本紅斑熱の好発地帯で、毎年患者が発生しており、2005年には死亡例が報告された⁷⁾。このため、感染症法において四類感染症に指定される日本紅斑熱は、県内で注意すべき動物由来感染症の1つとなっている。

本報告では、近年における県内の日本紅斑熱発生状況と、当センターでの検査状況を示し、これについて全国での患者届け出状況と比較検討した。あわせて、PCR検査による *R.japonica* の遺伝子検出法や、抗体検査における非特異反応の事例を示し、つつが虫病との類症鑑別の

感染症部

*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター
感染症部 北本 寛明

必要性についても報告する。

II 材料と方法

検体は、2007～2010年に医療機関において日本紅斑熱を疑う患者から採取され、県健康福祉事務所（保健所）及び県庁疾病対策課経由で、センターに搬入された。医療機関には、急性期検体には、血液凝固防止処理を行った全血及びダニによる刺し口の痂皮を、回復期は血清の採取を依頼した。

痂皮及び全血から Ficoll-Paque (GE Healthcare 社) で分離した末梢血単核細胞 (PBMC) の DNA を、PCR 検査に用いた。また、急性期の血清及び回復期の血清は、間接蛍光抗体法 (IF 法) による *R.japonica* 抗体の検出を行った。

IF 法は、紅斑熱群リケッチア症診断マニュアル⁸⁾に準じて実施した。

R.japonica YH 株⁹⁾¹⁰⁾を感染させた Vero 細胞をスライドグラス上にスポットし、アセトン固定したものを抗原プレートとして用いた。

被検血清を 10 倍希釈から 2 倍段階希釈して抗原プレートの各 hole に 10 μ L ずつ添加し、湿潤状態で 37°C、45 分間反応後、PBS (-) で 4 回洗浄した。これに希釈した FITC 標識ウサギ抗ヒト IgG あるいは IgM 抗体 (Dako 社) を各 hole に 10 μ L ずつ添加して 37°C で 30 分間反応させた。PBS (-) で 4 回洗浄後に 50% グリセリン-PBS 溶液で封入して、蛍光顕微鏡で特異蛍光を観察し、抗体価を決定した。IF 抗体価は、特異抗体が認められた最も高い希釈倍率で表した。

ペア血清を用いた抗体検査では、急性期の抗体価に対して回復期の抗体価が 4 倍以上上昇したものを日本紅斑熱陽性と判定した。

PCR 法では、全血は遠心分離後の PBMC 層を分取して PBS で懸濁させ、Ficoll Paque を用いて PBMC を分離し、QIAamp[®]DNA Blood Mini Kit (QIAGEN 社) で DNA を抽出した。

痂皮及びこれと同時に採取した真皮は Proteinase K で消化し、QIAamp[®]DNA Blood Mini Kit で DNA を抽出した。

PCR 反応には、日本紅斑熱リケッチア検出用プライマー (Rj5 および Rj10) 及び紅斑熱群リケッチア検出用プライマー (R1 および R2)⁸⁾を用いた。PCR による増幅液を、アガロースゲル電気泳動して、目的遺伝子の増幅を確認した。

なお、本報告においては、保健所から検査依頼があった日本紅斑熱疑い者数を依頼検査数、その抗体検査が陽

性であったものを抗体検査陽性者、感染症発生動向調査における日本紅斑熱等の患者数を届け出患者数と記載した。

III 結果と考察

1. 検査データの経年変化

Fig.1 に、2007～2010 年に実施した日本紅斑熱の依頼検査数と抗体検査陽性者数を示した。検査数には、ペア血清が得られなかったため日本紅斑熱の最終判定が困難となった検体も含まれる。

4 年間の依頼検査数は 33 名で、毎年 6 名～11 名の依頼があった。このうち、抗体検査陽性者は 11 名で、年に 1 名～5 名が陽性となった。

2008 年は、依頼検査数 (11 名) と抗体検査陽性者数 (5 名) 共に 4 年間で最も多かった。依頼検査数に占める抗体検査陽性者の比率は、4 年間を通じて 50% を超えることはなかった。

2. センターでの日本紅斑熱依頼検査の特徴

日本紅斑熱依頼検査の被検者の年齢、及び抗体検査陽性者数を Table 1 に示した。抗体検査陽性者には下線を付した。

検査依頼は 5～12 月にあり、抗体検査が陽性となったのは、8 月、10 月、11 月であった。抗体検査陽性者は、2007 及び 2008 年は 10 月と 11 月の秋季のみに限られた。2009 及び 2010 年は 8 月にも確認された。4 年間では 10 月に 8 名中 7 名が抗体陽性となり、その比率 (86%) が最も高かった。前半の 2 年間に比べて後半の 2 年間では、8 月に抗体検査陽性者が発生しており、リケッチア保有ダニの数や分布が徐々に変化していることも考えられる。

9 月の依頼検査数が少なく、また抗体検査陽性者が出していないが、台風や降水量、気温などの影響によるが、これはダニ類の吸血行動の変化や、ヒトの汚染地域への

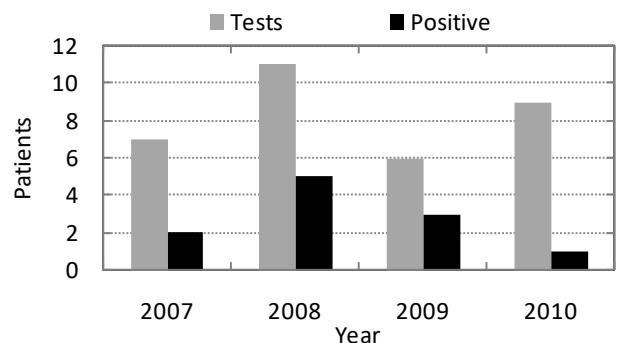


Fig.1 The number of Japanese spotted fever tests and positive patients on antibody test

Table 1 A comparison between tested month and age group of patients and positive-patients on antibody test
Positive-patients are shown as bold and underlined.

Tested month	Tested year				positives-patients ⁻¹
	2007	2008	2009	2010	
May	-	-	-	10's	0/1
June	-	20's	<10's	50's	0/3
July	-	10's	70's	-	0/2
August	60's	-	50's	40's	3/9
	80's	-	80's	70's	
	70's	-	70's	-	
	60's	-	-	-	
September	-	70's	-	40's	0/5
	-	40's	-	50's	
	-	60's	-	-	
October	50's	70's	60's	10's	7/8
	60's	60's	-	-	
	-	40's	-	-	
	-	50's	-	-	
November	-	90's	-	40's	1/4
	-	80's	-	20's	
December	60's	-	-	-	0/1
Total					11/33

立ち入り行動の変化などが考えられるものの、その原因は不明であった。

4年間の検査依頼の64%は淡路島南部地域（洲本市・南あわじ市）からであった。依頼検査数全体に占める淡路島南部地域の抗体検査陽性率は27%（9名）で、他の地域の抗体検査陽性率6%（2名）より高かった。

この地域での依頼検査数に占める抗体検査陽性率は43%であり、淡路島南部以外の地域での抗体検査陽性率17%より高かった。

依頼検査は10歳未満～90歳代と幅広く、平均年齢は56歳であった。このうち抗体検査陽性者は、40～80歳代で、依頼検査者に比べて年代幅が狭く、平均年齢（68歳）は高かった。

総務省の住民基本台帳データ（平成20～22年）¹²⁾では、40歳以上の年齢分布は全国では56%であるが、淡路島南部地域では61%と、高齢層の人口が全国平均よりやや高い。依頼検査の年齢層が高かった一因として、高齢者の山林等での野外活動の状況に加えて、淡路島南部における年齢構成が影響していると思われる。

3. 全国と県内の届け出患者数経年変化と解析

感染症発生動向調査における、全国と兵庫県での日本紅斑熱患者発生届け出数の推移をFig.2-1, Fig.2-2に示した。

全国データ（Fig.2-1）では、2007年～2008年に届け出患者数が増加しているが、兵庫県（Fig.2-2）でも同様の傾向が認められた。2003年～2008年の全国と兵庫県

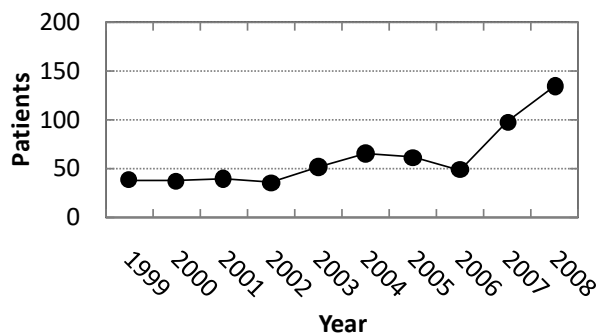


Fig.2-1 Trend of Japanese spotted fever patients reported to the authorities in Japan

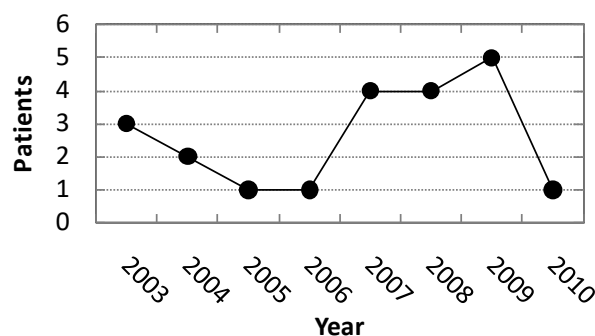


Fig.2-2 Trend of Japanese spotted fever patients reported to the authorities in Hyogo

での日本紅斑熱届け出患者数には、有意な相関は認められなかった。このため、兵庫県独自の日本紅斑熱届け出患者の発生動向は、地域特性を考慮した注意が必要であると思われる。

4. PCR法による日本紅斑熱核酸確認結果

14名のPBMCについてPCR検査を行ったが、全員が陰性であった。この中で抗体検査陽性となった者は7名であった。また、4名についてはPBMCと同時に痂皮を採取し検査を行ったところ、抗体検査陽性の2名がPCR検査陽性であった。

供試した例数は少ないが、PCR法では痂皮を用いると、PBMCより陽性率が向上すると考えられる。抗体検査では、ペア血清が必要となり、結果判定に時間を要することから、今後より迅速な判定が可能なPCR法の検体に痂皮を、加える必要があると思われる。

5. IF法における非特異事例

IF法による日本紅斑熱の抗IgG抗体を用いた蛍光像をFig.3に示した。通常の陽性検体では、細胞質及びその周辺に*R.japonica*に由来する微細な蛍光粒子が観察される（Fig.3-1）。Fig.3-3に今回観察された非特異反応を示した。

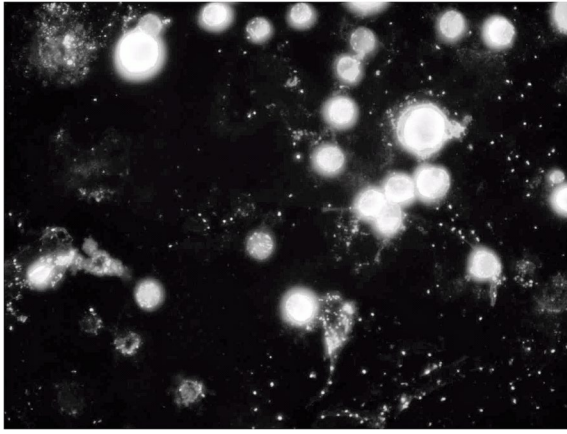


Fig.3-1 Positive image on IF test
Positive samples were yielded a specific fluorescence from cytoplasm.

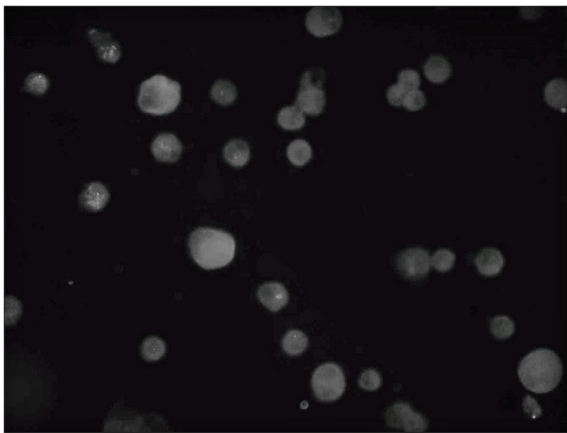


Fig.3-2 Negative image on IF test
The Specific fluorescence was not yielded.

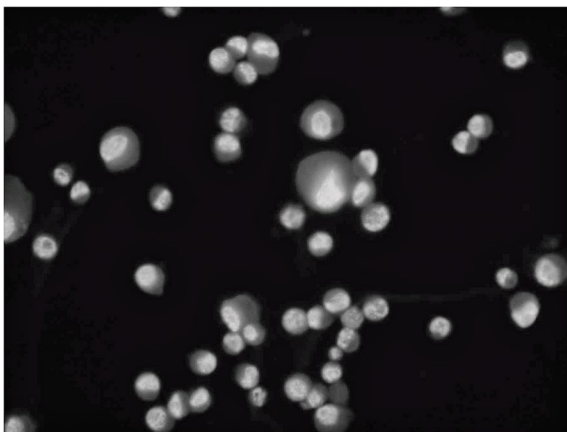


Fig. 3-3 The case of nonspecific fluorescence on IF test
Non specific fluorescence was yielded from cell nuclei on this image, and specific fluorescence stemmed from *Rickettsia* was not yielded from cytoplasm.

この血清では Vero 細胞の核が蛍光を発し、細胞質にはリケッチア由来の特異蛍光は認められなかった。

この蛍光は抗 IgG 抗体を用いた場合に観察され、抗

IgM 抗体では出現しなかった。急性期の血清では 1,280 倍希釈まで観察され、回復期血清でもこの値に変化はなかった。

このため、本蛍光は日本紅斑熱リケッチアに由来しない、非特異抗体と判断された。被検者は自己免疫疾患を有することが報告されており、この反応像は抗核抗体¹³⁾に由来する非特異反応と考えられた。直接蛍光抗体法と異なり、二次抗体を用いる間接蛍光抗体法では、今回のような非特異蛍光が出現する頻度が高くなることが考えられる。IF 法での診断の正確性を保つためには、適切な抗原スライドの作製や対照血清を用いた検査の標準化に加えて、事前に被検者の詳細な疾病歴などを入手することが必要と思われる。

6. 類症鑑別について

今回、日本紅斑熱抗体が陰性となった依頼検査には、つつが虫病の検査が陰性となった 3 例が含まれていた。つつが虫病の病原体である *Orientia tsutsugamushi* は、ツツガムシが媒介するが、その症状のうち、頭痛、発熱、発疹、刺し口形成¹⁴⁾等が日本紅斑熱と類似しており、検査診断による類症鑑別が必要と思われる。

感染症発生動向調査における全国と兵庫県での、つつが虫病届け出患者数の推移を Fig.4-1, Fig.4-2 に示した。つつが虫病届け出患者数 (Fig.4-1) は、全国で年間 400 名程であるのに対し、日本紅斑熱届け出患者数 (Fig.2-1) は数 10 名~100 名と、4 分の 1 ほどであった。このことから日本紅斑熱検査の類症鑑別の対象として、つつが虫病の検査は重要と思われる。

兵庫県での双方の届け出患者数には、大きな違いは認められなかった。

つつが虫病の血清診断に際して民間検査所等では、国際標準株とされる Kato, Karp, Gilliam を用いている。3 例については日本紅斑熱抗体も陰性であったが、日本紅斑熱抗体及びつつが虫病抗体が陰性となった事例については、標準的に用いる 3 株に反応しない型の *O.tsutsugamushi* 感染であることも考えられる。

小川ら (2000)¹⁴⁾は、九州地方などの南部日本では Kawasaki 株及び Kuroki 株のつつが虫病が多く認められたことを報告しており、松井ら¹⁵⁾も、Kato, Karp, Gilliam の 3 株のみによる検査では不十分であると述べている。さらに、山本ら¹⁶⁾は、埼玉県の野鼠では、Kawasaki 及び Kuroki 型リケッチアの感染を示唆している。

このため、リケッチア感染を疑う患者においては、日本紅斑熱検査に加えて、抗原に Kawasaki, Kuroki を加えたつつが虫病の検査体制が必要である。

IV 要 旨

謝 辞

2007年～2010年に実施した日本紅斑熱抗体検査（33名）の陽性数は11名で、年間に1名～5名であった。

早く情報を賜りました、馬原文彦先生、ならびに財団法人阿南市医師会事務局の皆様にご感謝申し上げます。

文 献

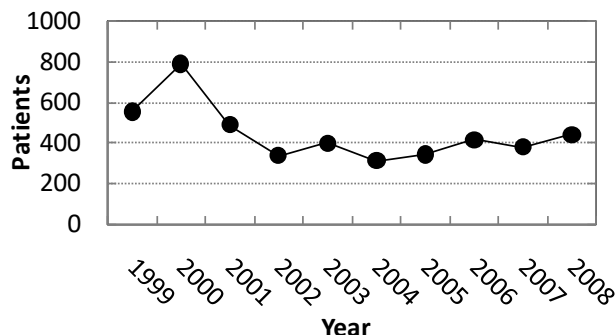


Fig. 4-1 Trend of tsutsugamushi disease patients reported to the authorities in Japan

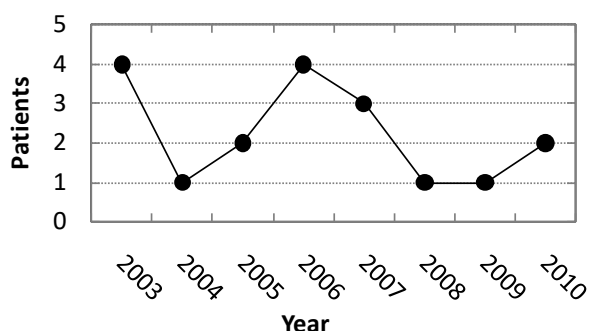


Fig. 4-2 Trend of tsutsugamushi disease patients reported to the authorities in Hyogo

抗体検査陽性者の発生は、8、10、11月に認められ、高齢者が多く、淡路島南部地域で多いことが分かった。

全国と兵庫県での日本紅斑熱届け出患者数間の経年変化に有意な相関は認められなかったことから、兵庫県独自の日本紅斑熱届け出患者の発生動向は、地域特性を考慮して判断する必要があることが分かった。

日本紅斑熱の核酸増幅検査（PCR法）においては、検体に痂皮を用いると、検出感度が高くなることが確認された。

日本紅斑熱抗体検査では、抗核抗体によって非特異蛍光が出現することもあるため、被検者の既往歴等の情報が必要と思われた。

日本紅斑熱検査において陰性となる事例に対応するために、Kuroki及びKawasaki株を加えた、つつが虫病の検査体制の整備が必要と思われた。

- 1) 馬原文彦：発疹と高熱を主徴とし Weil-Felix 反応（OX2）陽性を示した 3 症例について。阿南医報，**68**（9），4-7（1984）
- 2) Mahara, F.: Japanese spotted fever: Report of 31 cases and review of the literature. *Emerging Infectious Diseases*, **3**, 05-111（1997）
- 3) 近藤玲子，大瀬戸光明，山下育孝，豊嶋千俊，井上博雄，千屋誠造，田中良憲，近藤敏文：愛媛県内における日本紅斑熱の初発事例。愛媛県衛環研年報，**6**，13-17（2003）
- 4) 千屋誠造，永安聖二，小松照子，山脇忠幸，上岡英和：高知県における日本紅斑熱の発生状況：50 症例についての臨床的疫学的検討（1995-2001 年）。高知県衛研所報，**48**，29-32（2002）
- 5) 松尾繁，八尋俊輔，原田誠也，中島龍一：熊本県における日本紅斑熱について（～2007 年）。熊本県保環科研所報，**37**，88-89（2007）
- 6) 平松啓一，中込治：標準微生物学 第 10 版，p318-322，医学書院，東京（2009）
- 7) 野村哲彦，戎谷力，堀口英久，藤本嗣人：淡路島の日本紅斑熱死亡例について。IASR，**27**，36-37（2006）
- 8) 国立感染症研究所・地方衛生研究所全国協議会：2000（平成 12）年度リケッチア感染症診断マニュアル
- 9) Uchida, T., Uchiyama, T., Kumano, K. and Walker, DH.: *Rickettsia japonica* sp. nov., the etiological agent of spotted fever group rickettsiosis in Japan. *Int J Syst Bacteriol*, **42**, 303-305（1992）
- 10) Uchida, T., Tashiro, F., Funato, T. and Kitamura, Y.: Isolation of a spotted fever group rickettsia from a patient with febrile exanthematous illness in Shikoku, Japan. *Microbiol Immunol*, **30**, 1323-1326（1986）
- 11) Uchida, T., Yu, X., Uchiyama, T. and Walker, DH.: Identification of a unique spotted fever group rickettsia from humans in Japan. *J Infect Dis*, **159**, 1122-1126（1989）

- 12) 総務省自治行政局:住民基本台帳に基づく人口・人口動態及び世帯数(平成22年3月31日現在)
- 13) 三橋進, 相沢幹, 花岡正男:免疫の病理, p381-390, 朝倉書店, 東京(1969)
- 14) 小川基彦, 萩原敏且, 岸本寿男, 志賀定嗣, 吉田芳哉, 古屋由美子, 海保郁夫, 伊藤忠彦, 根本治育, 山本徳栄, 益川邦彦:我が国のツツガムシ病の発生状況-疫学的考察-. 感染症誌, **75** (5), 353-358 (2000)
- 15) 松井珠乃, 小川基彦, 岸本寿男, 海保郁男, 大山卓昭, ジョンコバヤシ, 岡部信彦:地方衛生研究所におけるツツガムシ病診断の現状-アンケートによる調査結果と感染症発生動向調査との比較-. 感染症誌, **78** (3), 248-252 (2004)
- 16) 山本徳栄, 浦辺研一, 高岡正敏, 中澤清明, 多村憲:埼玉県における野鼠の恙虫病リケッチアに関する血清学的調査と分離株の性状. 埼玉県衛生研究所報, **34**, 57-62 (2000)