

池間島，来間島，伊良部島，多良間島）で計 10 回の調査が行われ，患者の発生やベクター種として疑われる *Leptotrombidium deliense* (*Ld*) の浸潤，さらには *Orientia tsutsugamushi* (*Ot*) を保有するネズミの分布は，宮古列島のなかでも池間島との関連がみられている。また，患者から検出された *Ot* の遺伝子配列が台湾系の株と一致したことや *Ld* という東南アジアにおける主要ベクター種の浸潤を確認したことから，その感染環が注目されている。

今回，2010 年 7 月以降の調査でネズミと *Ld* から検出あるいは分離された *Ot* について，56kDa 抗原領域の遺伝子系統解析および Multi Locus Sequence 解析 (MLSA) を行った。

45 頭中 13 頭 (クマネズミ 11 頭，ドブネズミ 2 頭) から *Ot* が分離され，ドブネズミ 1 頭から *Ot* の遺伝子のみが検出された。また，*Ld* の付着を認めた 35 頭中クマネズミ 1 頭から回収した *Ld* から *Ot* が分離され，これまでの調査ではじめて *Ld* からの分離に成功した。さらに，分離は陰性であったが，他のクマネズミ 2 頭から回収された *Ld* から *Ot* 遺伝子が検出された。これらの検出例はいずれも宮古列島の中の池間島で捕獲されたネズミに由来するものであった。

56kDa 抗原領域の遺伝子系統解析では，池間島という限られた地域から分離・検出されたにも関わらず，4 つのグループに分類され，それぞれ台湾系 Gilliam 株，Saitama 株，Karp 株，タイの TA678 株に一致または近縁であった。タイの TA678 株に近縁なグループは，*Ld* から *Ot* 遺伝子が検出されたのみで分離株は得られなかった。

56kDa 抗原は表層抗原であり，それをコードする遺伝子は株間でバリエーションが著しい。また，外環境にさらされるため遺伝子配列が一度に大きく変化する可能性があり，進化系統を正確に反映しないと考えられるため，今回，分離株の得られた 3 つのグループについて MLSA を行った。その結果，*Ld* 由来株を含めたすべての株は，Kato，Ikeda に近縁であったが，これらを含めて国内主要株とは異なる一つのクラスターを形成した。これらの株はさらに 3 つのサブクラスターに別れ，各サブクラスターは，56kDa 抗原領域の遺伝子解析で示されたグループと一致し，現在，最低でも 3 種のクローンが池間島に混在していると考えら

れる。

56kDa 抗原領域の遺伝子解析から，患者は台湾系 Gilliam 株に近縁な *Ot* に感染したと推定されている。今回分離された *Ld* 由来株は 56kDa 抗原領域の遺伝子解析では Saitama 株に近縁で，*Ld* がベクターであるという直接的証拠は得られなかった。しかし，池間島で分離された株は MLSA で同じクラスターを形成しており，*Ld* をベクターとして複数のサブクラスターの *Ot* が共進化している可能性が高い。今後さらに調査を継続し，宮古島列島における本疾病の感染環や東南アジアとの疫学的関連を明らかにする必要がある。

○衛生環境研究所における呼吸器系 RNA ウイルスの遺伝子検査法について 新型インフルエンザを否定された症例における呼吸器系ウイルスの検索

・北野智一 三浦美穂 櫻井涼子 山本正悟
「宮崎小児感染症研究会学術講演会
(平成 23 年 9 月 29 日 宮崎市)」

2009 年 4 月 28 日，日本政府が新型インフルエンザの発生を宣言した。以降，スクリーニング検査や臨床症状から新型インフルエンザが疑われる症例の検体が急激に増加し，検査対応に追われた。検査対応としては，リアルタイム PCR 法を用いた遺伝子検出により迅速に結果を還元するとともに，細胞培養法による検体からの病原体分離も同時に行ってきた。

2009 年度，リアルタイム PCR 法で検査した患者数は，のべ 754 名であり，498 名については，新型インフルエンザまたは A 香港型の遺伝子が検出され，うち 467 名からインフルエンザウイルスが分離された。一方，256 名については，その多くが発熱や呼吸器症状を呈していたにも関わらず，遺伝子検査と病原体分離ともに陰性となった。そこで今回，これらの遺伝子検査と病原体分離ともに陰性となった例について病因を明らかとするため，ヒト RS ウイルス (hRSV)，ヒトメタニューモウイルス (hMPV)，ヒトライノウイルス (hRV)，パラインフルエンザウイルス 1 型から 4 型 (PIV-1,-2,-3,-4)，ヒトコロナウイルス OC43 および 229E (HCoV) の 9 種類の呼吸器系 RNA ウイルスの遺伝子検索を行った。

インフルエンザが否定された 207 検体中 61 件

から6種類の呼吸器系RNAウイルス遺伝子が検出されたことから、宮崎県においてもhRSV、hMPV、PIV-1、PIV-3、PIV-4、hRVが侵入し、呼吸器症状を起こしていたことが明らかとなった。このうち、hMPV、PIV-1、PIV-3、PIV-4については、初めての遺伝子検出であり、今後の検査対応を考えなくてはならない。

一般に呼吸器系ウイルスは、細胞変性効果(CPE)の判断が難しく、また、鼻咽頭ぬぐい液中のウイルス量が少ない場合には分離に時間がかかったり、種によって、輸送培地のpHや塩濃度、凍結融解等に弱いものもあり、分離が難しいとされている。今回検査に使用した検体はすべて細胞培養法による分離を試みているが、今回遺伝子検索を行った9種類のウイルスの中で、昨年度分離されたものはhRVが1株であった。今後、ウイルス分離に使用する細胞の数や種類、検体の処理方法等について検討が必要と考えられる。

今回、呼吸器系ウイルスの検出に遺伝子検査を用いることで、大幅に検出率を上げることができた。すなわち、昨年度の呼吸器症状を起こしたウイルスは、インフルエンザだけでなく、他のウイルスも関与していることが明らかになった。このように、遺伝子検査の導入によって感染症発生病動向調査において、より多くの情報を得ることが可能と考えられた。

○九州地域におけるリケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症の疫学的解明とリファレンス体制の構築

厚生労働省科学研究費補助金事業(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業):「リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症の総合的対策に関する研究」研究班の分担研究

・北野智一 三浦美穂 櫻井涼子 山本正悟

「平成23年度県立試験研究機関合同研修会

(平成23年12月20日~21日 林業技術センター東臼杵郡美郷町)

宮崎県は恙虫病や日本紅斑熱の多発地である。本研究では、両疾患に加え、最近その存在が報告された新型紅斑熱群リケッチア症やヒトアナプラズマ症を対象に、ダニや動物の生態系における病原体の分布状況を含めて発生実態を明らかにすること、また、*Orientia tsutsugamushi* に関して

Multi Locus Sequence Analysis(MLSA)による再分類を行いベクターや病原性についての新たな知見を得て、啓発や対策に有用な情報を提供することを目的とする。また、主な調査対象地域を北部離島及び九州・沖縄とする。

1. 九州地域における日本紅斑熱の病原体・ベクター・保有動物

熊本県天草地域の患者、野鼠、ダニから *Rickettsia japonica* を分離・検出(PCR)し、感染環の一端を明らかにした。長崎県中通島では、患者からの *R.japonica* 遺伝子検出と野鼠の抗体保有を確認したが、ベクターの確定には至っていない。

2. 日本紅斑熱の発生におけるイノシシの役割

県北部の7頭中1頭、県南部の83頭中29頭で紅斑熱群リケッチアに対する抗体保有を確認したが、112頭の血液・脾臓からは *R.japonica* は検出されず、イノシシは媒介マダニを人活動域へ拡散させることで患者発生に関与すると推定された。

3. 宮崎県におけるヒトアナプラズマ症存在の可能性

2007~2009年にリケッチア症疑いで採取された計142名の血液材料および捕獲したイノシシ112頭、シカ9頭の脾臓・血液からアナプラズマの検出を試みたが全て陰性であり、本県における本疾患のリスクは低いと思われる。

4. 啓発法のモデル化に関する試み

ツツガムシ病と日本紅斑熱に関する一般住民向けの宮崎版リーフレットを作成し、県内の医療機関(内科や皮膚科等)、獣医師会、猟友会等を通じ配布した。今後、医療従事者向けのリーフレット作成を検討する。

5. *Orientia tsutsugamushi* の新分類法 Multi Locus Sequence Analysis(MLSA)による解析

2008年に沖縄県宮古島市池間島において、初の恙虫病患者が発生し、以来、野鼠、恙虫の調査を行い、ベクターは東南アジア共通性のデリーツツガムシ(デリー)と推定された。野鼠の脾臓から *Orientia tsutsugamushi* が検出(PCR)あるいは分離され、56KDa抗原領域の遺伝子解析の結果、限られた地域に関わらず、日本本土や台湾系の種々の遺伝子型に属することが明らかとなった。しかし、この結果からベクター種と遺伝子型の関係に矛盾が生じたため、複数の必須遺伝子を標的