

福島県のつつが虫病における Karp 型の新規 variant と考えられる感染症例

千葉一樹 北川和寛¹⁾ 鈴木理恵¹⁾ 柏木佳子¹⁾ 金成篤子¹⁾

尾股千里²⁾ 成田雅³⁾ 藤田博己⁴⁾ 吉田学⁵⁾

総務企画課 ¹⁾ 微生物課 ²⁾ 太田西ノ内病院 内科 ³⁾ 沖縄県立中部病院 感染症内科

⁴⁾ 馬原アカリ医学研究所 ⁵⁾ 県南保健福祉事務所

要 旨

2014 年 5 月上旬に発症した福島県内在住の 54 歳女性のつつが虫病症例において患者検体から検出された病原体 *Orientia tsutsugamushi* の解析を行った。56-kDa の外膜蛋白遺伝子の塩基配列を系統樹解析したところ、Karp 型ではあるが、既知の Japanese Karp-1 型（以下、“JP-1 型”とする。）および Japanese Karp-2 型（以下、“JP-2 型”とする。）とは異なるタイプに分類された。また、血清抗体価は、回復期血清の IgG 値で台湾系 Karp 型と Hirano (= Kuroki) 型が他の血清型よりも高値であった。これまで国内に分布する Karp 型は、JP-1 型と JP-2 型の 2 種類のサブタイプに分類されると報告されていた。しかし、今回我々は、従来と異なる Karp 型の新規 variant と示唆される感染症例を経験した。

キーワード：つつが虫病, *Orientia tsutsugamushi*, Karp 型の新規 variant

はじめに

つつが虫病は、感染症法の 4 類感染症全数報告の疾患である。診断した医師はただちに届出を行うことが義務づけられており、近年の我が国では年間 300 ~ 400 例の報告がある。感染の契機は、病原体である *Orientia tsutsugamushi*（以下、“O.t”とする。）を保有するツツガムシ幼虫に直接刺咬されることによる。発症すると発熱、発疹、リンパ節腫脹等を伴う。また、O.t の血清型は、大きく Gilliam 型, Karp 型, Kato 型, Irie (= Kawasaki) 型, Hirano (= Kuroki) 型, Shimokoshi 型に型別され、さらに遺伝子解析から国内で分離される Gilliam 型の大部分は、Japanese Gilliam 型（以下、“JG 型”とする。）に、Karp 型は JP-1 型および JP-2 型に型別されることが分かっ

ている¹⁾。

また、病原体を媒介するツツガムシの種類は遺伝子型によって各々異なる（表 1）。

近年、福島県のつつが虫病発生状況は、年間 30 例ほどの患者報告があり、国内有数のつつが虫病侵淫地域となっている。この様な背景から福島県衛生研究所では、2010 年度よりつつが虫の分子疫学的調査及び迅速診断法の検討を行い、県内のつつが虫病の実態把握に努めてきた^{2, 3)}。2014 年度は、患者検体から既知の JP-1 型および JP-2 型のいずれにも型別されない Karp 型の新規 variant の存在が示唆されたことを含めて、当該症例についてこれまでの調査結果をまとめたので報告する。

表 1 ツツガムシから分離された O. t の遺伝子型

ツツガムシ種		O.t の遺伝子型
<i>L.pallidum</i>	(フトゲツツガムシ)	JG 型, JP-2 型
<i>L.scutellare</i>	(タテツツガムシ)	Irie 型, Hirano 型 (未確定)
<i>L.akamushi</i>	(アカツツガムシ)	Kato 型
<i>L.intermedium</i>	(アラトツツガムシ)	JP-1 型
<i>L.palpale</i>	(ヒゲツツガムシ)	Shimokoshi 型
<i>L.fuji</i>	(フジツツガムシ)	Fuji 型

症 例

患者は郡山市 A 地区に在住の 54 歳女性で、2014 年 5 月上旬に庭の土の入れ替え作業を行っていた。その後、5 月 13 日に発熱、悪寒、咽頭痛といった症状を訴え、近医を 2 度受診し、アミノグリコシド系のイセパマイシンとカルバペネム系のファロペネムで抗菌薬治療が行われたが、症状は改善せず 5 月 23 日に地域の中核病院へ入院となった。入院時の患者所見は、発熱、頭痛、関節痛、咽頭痛といった感冒様症状に加え、四肢体幹に円形の軽度発赤を伴う発疹が多数認められた。なお発疹は、5 月 16 日から出始めていたことを患者本人が自覚していた。その他にも消化器症状、肝機能障害、腎機能障害、DIC、全身のリンパ節腫脹が認められた。また、右腋窩部に黒色痂皮形成を伴う刺し口がみられた。これらの所見から担当医はつつが虫病を疑い、抗菌薬治療はテトラサイクリン系のミノサイクリン静注で行われた。抗菌薬投与以降は徐々に炎症反応も沈静化し、肝機能、腎機能に改善が認められた。また、一時血小板数が $3.8 \text{ 万}/\mu\text{L}$ まで低下したため、血小板輸血が施行された。その後は血小板数も正常値へと回復傾向に向かった。また、経口摂取も可能となってきたため 6 月 2 日に抗菌薬をテトラサイクリン系のドキシサイクリン内服に切り替え、6 月 5 日に抗菌薬治療が終了となり、6 月 9 日に退院となった。

材料及び方法

1 血清抗体価測定

須藤⁴⁾の方法に準じたが、標識酵素の発色基質には 4-クロロ-1-ナフトールを用いた。間接免疫ペルオキシダーゼ染色（以下、“IP”とする。）によって、患者血清の抗体価を測定した。

2 核酸抽出

刺し口の痂皮を、2mm 角程度に細断し、適量の検体破砕用ビーズと共に専用チューブに入れ、そこに PBS を $200 \mu\text{L}$ 添加し、ビーズ式破砕装置 MS-100R（トミー精工）で 5,000rpm、3 分処理し、その処理液について QIAamp DNA Mini Kit（QIAGEN）を使用し

て、核酸を抽出した。

3 遺伝子解析

患者検体から得られた核酸抽出液を Nested PCR 法⁵⁾により O.t の 56-kDa 外膜蛋白遺伝子を検出し、塩基配列を解析した。遺伝子解析で得られた検体の塩基配列情報は、データベースに登録された株と系統樹を作成することによってその相同性を比較した。なお、系統樹作成には MEGA バージョン 5.0 ソフトウェアを使用し、Bootstrap 試行回数 1000 回、Kimura 2-parameter model に設定し NJ 法を用いた。

4 ツツガムシの生息調査

患者本人の同意を得て、推定感染場所である患者の自宅庭とその近隣の河川敷で土壌の採取を行った。土壌の採取方法は、30cm × 30cm 程度の範囲の表層土壌を約 200mL 量りとした。これを繰り返し約 1m 間隔で 5 箇所から採取したものを 1 セット分とした。患者自宅の庭で 4 セット、河川敷で 3 セット行い、ツルグレン法でツツガムシの採取を試みた。また、ツツガムシの生息調査と併せつつが虫病予防啓発リーフレットを配布し、つつが虫の注意喚起を行った（図 1）。

結 果

1 血清抗体価測定

つつが虫の血清診断基準は、急性期で IgM 値が 40 - 80 倍以上あるいは、急性期と回復期の IgG 値が 4 倍以上の上昇を認めた場合に陽性とする。IP の結果からつつが虫の診断基準を満たしていた（表 2）。さらに、後日、回復期血清について他の Karp 血清型の抗原を追加して抗体価測定を実施した（表 3）。その結果、台湾系 Karp 型の抗原との反応において IgG 値が有意に上昇していた。

2 遺伝子解析

遺伝子解析に使用した 56-kDa の外膜蛋白領域は、O.t の主要構成蛋白のうち表在性蛋白の一つであり強い型特異的抗原性を示すためこの遺伝子を増幅し、塩基配列を解析する

ことで遺伝子型別が可能である。また、この蛋白の遺伝子構造から得られたアミノ酸配列は株間で特に相同性の低い可変領域が4カ所存在し、この部分が株特異的な抗原性を示すと考えられている⁶⁾。

今回の解析で得られた検体の塩基配列の長さは1,400bpであり、基準株との分子系統樹では、国内で分離される Karp 型の JP-1 型および JP-2 型のいずれにも分類されなかった。さらに、タイや台湾で患者あるいはツツガムシから分離されている株とも異なり、最も類似したのは O2 および O3 株であった(図2)。各々は藤田ら⁷⁾によって O2 株は1984年に福島県福島市の B ダムで捕獲されたアカネズミから分離され、O3 株は同年、同市に C 地区で捕獲されたヒメネズミから分離された株であり、いずれもマウスに対する致死性毒性があったと報告されている。さらに、モノクローナル抗体を使った血清同定において患者由来の Sato 株(JP-2型)との反応性の違いから O2 株や O3 株は JP-2 型とは異なる可能性があるとして報告されている。

次に、塩基配列をアミノ酸配列に変換し、検体と国内外の遺伝子型 Karp 型の各株について可変領域における相同性を比較したところ、標準 Karp 株で 79.53%，JP-1 型の Matsuzawa 株で 77.95%，JP-2 型の各株で 77.17～87.40%，タイ系 Karp 型の各株で 89.76%，台湾系 Karp 型の各株で 92.13～92.91%，Saitama 型で 72.44%，O2 および O3 株で 96.85～100%となった(表3)。

3 ツツガムシ媒介種の推定

土壌からツツガムシを採取することができず、媒介種の特定には至らなかった。

考 察

当該症例の検体は、回復期の血清の IgG 値で台湾系 Karp 型および Hirano 型に有意に高値であったが、遺伝子解析の結果も考慮すると Hirano 型については交叉反応が考えられ、既知の JP-1 型や JP-2 型よりも台湾系 Karp 型の抗原性に類似していることが示唆された。また、過去の調査報告⁷⁾も含めて考えると当該症例の検体は、Karp 型ではあ

るが、既知の JP-1 型や JP-2 型とは異なる性状を示し、Karp 型の新規 variant である可能性が示唆された。今後は、凍結保存した患者血液から病原体の分離を試みて、さらなる追加解析を行い、実態を明らかにすることが重要と考える。

まとめ

患者検体からの O.t の分子疫学的解析を開始してから、これまでに、JG 型、JP-1 型、JP-2 型、Irie 型、Hirano 型および Shimokoshi 型の6種類のタイプの O.t を検出してきた。さらに、今回の調査結果で Karp 型の新規 variant の存在が示唆されたことから、福島県のつつが虫病は多種類の媒介ツツガムシが関与して発生していることがうかがえる。また、過去のツツガムシの生息調査では県中から県南地域にかけ広い範囲でタテツツガムシの生息が確認されている^{2) 3)}。今後も患者および媒介種の調査を継続し、本県のつつが虫病の実態把握、そして県民への予防啓発につなげることが公衆衛生上重要であると考えられる。

謝 辞

今回の調査にご協力いただいた郡山市保健所の職員の皆様に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) 田原研司, 山本正悟. つつが虫病—多種多彩な疫学—. SADI 組織委員会, 編. ダニと新興再興感染症. 東京都: 株式会社全国農村教育協会, 2007年; 151-164.
- 2) 門馬直太, 塚田敬子, 北川和寛, 他. つつが虫病起因リケッチアの分子疫学的解析について(第2報). 福島県衛生研究所年報 2011; 29: 32-34.
- 3) 門馬直太, 塚田敬子, 北川和寛, 他. つつが虫病起因リケッチアの分子疫学的解析について(第3報). 福島県衛生研究所年報 2012; 30: 36-39.
- 4) 須藤恒久. 我が国における最近のつつが虫の現状とその早期迅速診断法—特に免疫ペルオキシダーゼ反応による三型 IgG, IgM 抗体の完全同時測定法について—. 臨床とウイルス 1983; 11: 23-30.

- 5) 国立感染症研究所・地方衛生研究所全国協議会, 編. リケッチア感染症診断マニュアル.
- 6) 多村 憲. 恙虫病病原体 *Orientia tsutsugamushi* の微生物学. 日本細菌学雑誌 1999 ; 54 (4) : 815-832.
- 7) 藤田博己, 渡辺百合子, 萩原敏且, 他. 福島県北部の野鼠類における寄生ツツガムシとツツガムシ病リケッチアの保有状況. 大原年報 2000 ; 43 : 33-44.

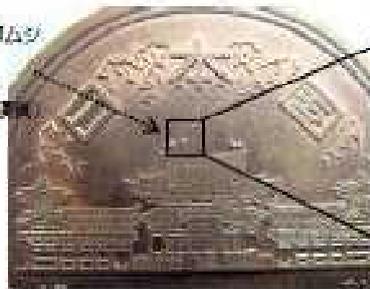
つつが虫病にご注意を！

■つつが虫病とは？

病原微生物を保有するツツガムシ[®]（ダニの一種）に刺された後、1～2週間後に発症する感染症です。ツツガムシは非常に小さく肉眼ではほとんど見えません。そのため、衣類の隙間から入り込み、また刺された時の痛みもほとんどないと言われています。

※つつが虫病の原因となる微生物を保有するツツガムシは0.1～1%程度と考えられています。

この中にツツガムシ
がいます。
(写真：10円硬貨)



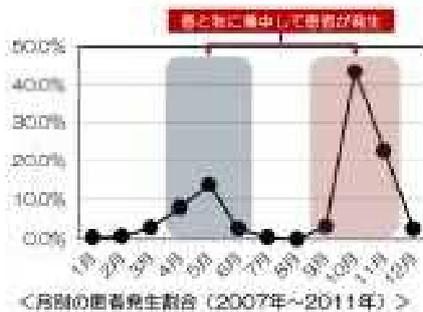
(愛知医科大学 鳥坂雅貴講師より)

■どのような症状？

主な症状として「発熱」、「発疹」、「刺し口（刺された部位がカサブタに変化）」、「頭痛」、「倦怠感」、「肝機能障害」などがあります。治療には適切な抗生薬の投与が必要ですので、出来るだけ早く医療機関（内科、皮膚科など）を受診しましょう。

■福島県では？

福島県は全国有数のつつが虫の多発地域で、毎年50名前後の患者が発生しています。春（3～6月）と秋（9～11月）に患者発生ピークがあり、県内の様々な地域で患者が報告されています。



■予防、注意点は？

- (1) 一部の虫よけスプレー（対象害虫にツツガムシが記載されている製品）に効果が認められていますが、持続時間が限られるためこまめにスプレーしましょう
- (2) 野外作業後は速やかに入浴、**髪替え**をし、皮膚に付着したダニを洗い落としましょう
- (3) **人から人へは感染しません**

福島県衛生研究所 微生物課 TEL024-546-7105

図1 つつが虫病予防啓発リーフレット

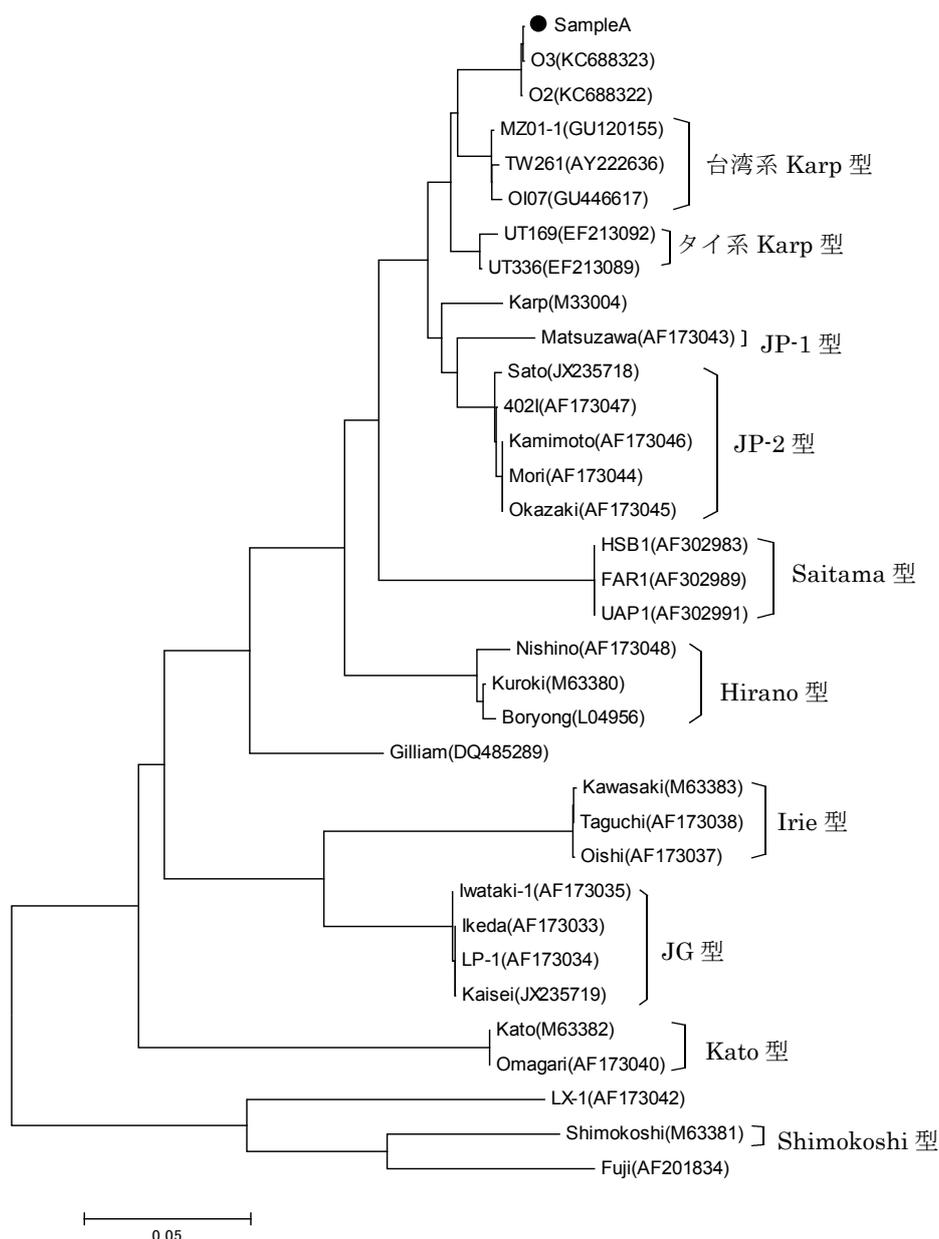


図2 0.t.の56k-Da外膜蛋白遺伝子の相同性に基づく分子系統樹(1400bp)

表2 患者血清の0.t抗体価

使用抗原の型別と株			急性期		回復期	
			採取日 2014年5月23日		採取日 2014年6月2日	
血清型	遺伝子型	株名	IgG	IgM	IgG	IgM
Gilliam	JG	Kaisei	80	320	640	2,560
Karp	JP-2	Sato	1,280	10,240	5,120	40,960
Kato	Kato	Kato	40	1,280	1,280	5,120
Irie	Irie	Irie	40	640	160	640
Hirano	Hirano	Hirano	20,480	10,240	20,480	≥ 40,960
Shimokoshi	Shimokoshi	Shimokoshi	80	160	80	320

表3 追加した抗原と患者血清との反応

使用抗原の型別と株			回復期 採取日 2014年6月2日	
血清型	遺伝子型	株名	IgG	IgM
Karp	JP-1	Matsuzawa	5,120	≥ 40,960
	台湾系 Karp	Ikemajima7R	20,480	≥ 40,960
	Saitama	HSB 1	640	5,120

表4 0. tの56-kDa外膜蛋白の可変領域における検体と遺伝子型Karp型の各株とのアミノ酸の相同性比較

遺伝子型	株名	アクセッション番号	比較アミノ酸数	置換, 挿入 欠損の数	検体との 相同性 (%)
Karp	Karp	M33004	127	26	79.53
	O2	KC688322	127	0	100
	O3	KC688323	127	4	96.85
JP-1	Matsuzawa	AF173043	127	28	77.95
	Mori	AF173044	127	29	77.17
	Okazaki	AF173045	127	29	77.17
JP-2	Kamimoto	AF173046	127	29	77.17
	402I	AF173047	127	29	77.17
	Sato	JX235718	127	16	87.40
タイ系 Karp	UT336	EF213089	127	13	89.76
	UT169	EF213092	127	13	89.76
台湾系 Karp	TW261	AY222636	127	9	92.91
	MZ01-1	GU120155	127	10	92.13
	OI07	GU446617	127	9	92.91
Saitama	HSB1	AF302983	127	35	72.44
	FAR1	AF302989	127	35	72.44
	UAP1	AF302991	127	35	72.44