

9

調査研究

(1) 報 文

1) 大分県のつつが虫病 (1998～2007年)	19
---------------------------------	----

大分県のつつが虫病 (1998~2007年)

小河正雄, 長岡健朗

Tsutsugamushi disease in Oita prefecture, 1998-2007

Masao Ogawa, Kenro Nagaoka

Key words : つつが虫病 Tsutsugamushi disease

オリエンチア・ツツガムシ *Orientia tsutsugamushi*

はじめに

つつが虫病は、ダニの1種であるツツガムシが媒介する感染症で、病原体は*Orientia tsutsugamushi* (以下 Ot) というリケッチアである¹⁾。症状は、発熱、発疹、刺し口などが主症状である。以前は秋田県、新潟県、山形県などの東北地方の風土病として知られていたが、1970年に竹田市の梅木医師が本県で初めての患者を報告し²⁾、本県にもつつが虫病が存在することが明らかとなった。1980年代になりつつが虫の報告が全国的に増加しはじめたため、当センターにおいても患者の血清診断を行う体制を整えるとともに、疫学的調査を実施し、県内の媒介ツツガムシの分布や病原体の分布、患者の発生状況を調査した³⁾⁴⁾⁵⁾。

今回は、1998年から2007年に当センターに血清検査依頼があり陽性となった132人について疫学的な調査を行ったので、その結果を報告する。なお、1984年4月から1997年12月までの調査結果については既に報告した⁶⁾⁷⁾。

調査方法

1 調査期間 1998年1月~2007年12月

2 調査方法

2.1 血清診断

患者の血清抗体価は間接蛍光抗体法で測定した。抗原は、Vero細胞で培養したKarp及びKato, Gilliam, Kuroki, Kawasaki株のOtを24穴スライドの直径4mmの穴にスポットし、冷アセトンで10分間固定したものを使用した。FITC標識抗ヒトIgG抗

体及びFITC標識抗ヒトIgM抗体はカップル製のもので4単位に希釈して使用した。測定は、血清をPBS(-)で1:40から2倍階段希釈し、これを抗原スライドに20 μ lのせ、IgG測定用は37 $^{\circ}$ C60分間反応させ、IgM測定用は37 $^{\circ}$ C4時間反応させた。PBS(-)で5分間に3回洗浄した後、FITC標識抗体で37 $^{\circ}$ C60分間染色し、再びPBS(-)で5分間に3回洗浄した後、蛍光顕微鏡で観察した。

2.2 遺伝子診断

患者血餅からのリケッチアDNAの抽出は、PBS(-)2mlと血餅約2mlをダウンス型ホモジナイザーでよく混和し、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)で抽出した。

プライマーは川森⁸⁾らのプライマーを使用した。また、一部の検体については古屋⁹⁾らの方法を用いた。全容量25 μ lの反応系(10mM Tris-HCl緩衝液・pH8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 0.4 μ M プライマーa, 0.4 μ M プライマーb, 2unit Taq polymerase)を調整し、以下のPCRプログラムにより増幅を行った。

増幅器はアステックPC700を使用し、変性94 $^{\circ}$ C30秒、アニーリング55 $^{\circ}$ C30秒、合成72 $^{\circ}$ C30秒を1サイクルとし40サイクル増幅した。

さらに、Nested PCRを行うため、最初のPCR産物2.5 μ lにプライマーをa', b'に換えた反応混合液22.5 μ lを加え、変性95 $^{\circ}$ C30秒、アニーリング55 $^{\circ}$ C30秒、合成72 $^{\circ}$ C30秒で25サイクル増幅した。

増副産物の確認は4%NuSieve 3:1 (TaKaRa)で電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した後、紫外線の照射により観察した。バンドが観察

された増幅産物を制限酵素 Hha I 及びSfaN I で消化した後の切断パターンを比較することにより, Karp, Kato, Gilliam, Kuroki及びKawasakiの血清型を識別した。また, 2002年以降はDNAシーケンサーABIPRISM310(Applied Biosystems)を用いて増幅産物の遺伝子配列を決定し, 系統樹分析により血清型を決定した。

2.3 患者調査票

つつが虫病様患者の実態を把握するため, 医療機関に患者調査票の所定事項を記入し, 検査材料とともに当センターに提出するよう依頼した。調査票の様式は, 地方衛生研究所全国協議会・衛生微生物技術協議会・つつが虫病小委員会が作成した様式に準じた。これらのデータはマイクロソフト・アクセス2000 (Microsoft) を用いて, 解析を行なった。

結果及び考察

1 つつが虫病患者発生状況

感染症発生動向調査によると1998年から2007年までに報告されたつつが虫病患者数は183名で, 年平均18.3名の届出があった。中でも2000年は40名の届出があり, 1991年と並んで本県で2番目に患者発生が多い年であった。2001年以降は, 患者数は減少傾向にあった。この間, 県内医療機関より当センターに240名の抗体検査依頼があり, 届出患者の72.1%に相当する132名が抗体陽性であった(図1)。他の届出患者は, 民間の検査施設で抗体陽性であったり, 臨床症状で決定されたりしている。本県ではつつが虫病による死亡者の報告はまだない。

当センターで血清学的に陽性と確認された132名について月別の患者発生状況を見ると, 前回の調査⁷⁾と同様に10月, 11月が最も多く, 85.6%を占めた(図2)。つつが虫病的発生時期は, 地域により秋冬型と春秋型があるが, 大分県は秋冬型である。ただ, 4月に3名の患者発生があり, 春の患者発生にも注意が必要である。

つつが虫病は, 病原体を保有するツツガムシに刺されて感染するが, 患者が感染したと推定される地域を市町村別に見ると, 竹田市が32%と最も多く, 以下, 大山町, 荻町, 庄内町, 朝地町, 久住町と続いた(図3)。2000年以降, 庄内町からの患者報告数が増加したが, その要因は診断が可能な医療機関

が増えたためと考えられる。

2 年齢・性別患者発生状況

年齢別患者発生状況を見ると, 前回の調査では50代, 60代が多かったが, 今回の調査では, 60代から70代が多く, 患者の高齢化が進んでいる(図4)。後ほど述べるが, つつが虫病に感染する職業は農業従事者が多く, その高齢化と関連していると推定される。性別では男性52名女性80名で, 女性が多かった。前回の調査から, 女性の割合が増加し, 拡大している。

3 臨床症状

患者の臨床症状は, 発疹, 発熱, 倦怠感が90%以上に見られ, 次いで食欲不振, 悪寒, 頭痛が見られた(図5)。前回の調査結果より, 刺し口の割合が低下しているが, これは通常高率に存在するとされており, 積極的な観察がなされていないと推定される¹⁰⁾。発疹の現れた部位は, 全身と体幹が多く, それぞれ51%と32%を占めた(図6)。刺し口は, ツツガムシに刺された場所にできる潰瘍であるが, その場所は足と手が多く, 26%と16%を占めている(図7)。ツツガムシは地表もしくは地表近くの草や石などで待機し, 通りかかるヒトや動物に付着すると言われているので, 農作業や散歩のときに, まず足や手にツツガムシが付着して吸血する機会が多いと考えられる。リンパ節の腫脹が見られたのは48件であるが, その部位は鼠径, 頸部, 腋窩の順で多かった(図8)。

4 職業別患者発生状況

患者の職業は農業が最も多く33%であった。次いで, 無職, 一般事務, 主婦, 建設業で前回の調査と同様であった(図9)。農業は野外で作業する機会が多いのでツツガムシに刺されやすいと思われる。また, 無職の人は高齢者が多く, 多くは農作業中に感染している。一般事務や主婦も副業として農業をしている人が多かった。

5 作業別患者発生状況

感染推定時に行っていた作業は農作業が最も多く59%を占めた。次いで, 山菜・山芋等採取が9%, 森林作業が6%, レジャーが3%, 工事が1%であった(図10)。前回の調査に比べ, 農業の割合が高

くなっている。農作業の内容としては稲刈りや草刈り、シイタケ取りが多かった。山菜・山芋等採取では、ギンナンや山芋、キノコ採取が多かった。

6 感染推定場所

感染したと推定される場所は、畑と林が最も多くそれぞれ32%を占め、次いで、水田、住宅地、野原、果樹園が多かった(図11)。前回の調査と比較して、水田の割合が減り、畑の割合が増えた。

7 *Orientia tsutsugamushi*の血清型

凍結保存していた患者血液よりOt遺伝子を抽出・増幅し、Ot遺伝子の検出及び血清型別を行った。

血清診断で用いたIF法にはKarp及びKato, Gilliam, Kuroki, Kawasakiの5種類の血清型のOtを抗原として使用したが、最高抗体価を示した抗原が患者に感染したリケッチアの血清型であると推定できる。これにより推定したOtの血清型は、Kawasaki 40.9%(54件), Kuroki 38.6%(51件), Karp 9.9%(13件), 判定不能 10.6%(14件)であった。IF法は、血清型間の交差反応が多いので、血清型判定不能例が見られる。一方、患者血液からOt遺伝子を抽出し遺伝子検査する方法では、確実に血清型別ができる。検査依頼のあった240件の血液中35件からOt遺伝子を検出し、その血清型はKuroki 48.6%(17件), Kawasaki 45.7%(16件), Karp(JP-2) 5.7%(2株)であった(表1)。KurokiとKawasakiの割合が多く、Karpも少数検出される傾向は、前回の調査と同様である。

KurokiとKawasakiは九州南部の鹿児島県¹¹⁾や宮崎県¹²⁾に多い型で、国内では患者が多発する地域に多い型である。これらはタテツツガムシが媒介するOtと言われている。Karp型は本州の日本海側や、東北地方に多い型でフトゲツツガムシが媒介するといわれている¹³⁾。患者に感染したOtの血清型はKuroki型とKawasaki型が大部分を占めることから、本県の主要なつつが虫病の媒介種はタテツツガムシと推定される。また、一部の患者はフトゲツツガムシに刺されてつつが虫病感染したと推定される。

ま と め

1998年から2007年までに報告されたつつが虫病の患者数は183名で、年平均18.3名の届出があった。当センターの抗体検査で陽性となった132名について疫学的な解析を行なった。患者の多い月は10月及び11月であり、秋冬型の発生型であった。患者が感染したと推定された地域は、多い順に竹田市、大山町、荻町、庄内町、朝地町、久住町等であった。年齢別では、60歳代、70歳代が多く、前回の調査より高齢化していた。性別では、女性の方が多く、前回より割合が増加していた。臨床症状では、発疹、発熱、倦怠感が90%以上の患者に見られた。発疹の部位は全身又は体幹に多く、刺し口の部位は足又は手に、リンパ節の腫脹は鼠径又は頸部、腋窩に多かった。患者の職業は農業、無職、一般事務が多く、感染推定時の作業は農作業が最も多かった。感染推定場所は、畑、林、水田の順で多かった。Otの血清型は、Kuroki, Kawasakiの割合が多く、次いでKarp(JP-2)型が見られた。ツツガムシとOtの関係から、本県のつつが虫病の主な媒介種はタテツツガムシであると推定された。

つつが虫病の予防には、Otを保有するツツガムシに刺されないようにすることが最も重要である。大分県では毎年11月上旬に保健所や市町村を通じ、つつが虫病に対する注意を呼びかけている。また、当センターのホームページ(<http://www.pref.oita.jp/13002/index.html>)でもつつが虫病の情報を提供している。今回の調査結果をもとに、より効果的な広報を行ないたい。

参 考 文 献

- 1) Tamura, A., Ohashi, N., Urakami, H., Miyamura, S.: Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a New Genes, *Orientia* gen. nov., as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov., Int. J. System Bacteriol., 45, 589-591 (1995)
- 2) 梅木郁弥, 広瀬重信, 栗原浩生, 加藤新, 中島俊朗, 正岡正見, 浅沼靖: 大分県竹田市地区における恙虫患者発生について, 大分県医師会会報, 78, 20-23 (1970)
- 3) 小河正雄, 小野哲郎, 林薫: 大分県におけるつつが虫病の疫学的調査, 臨床とウイルス, 14(1),

66-70(1986)

- 4) 小野哲郎, 小河正雄, 林薫: 大分県におけるツツガ虫の分布調査, 臨床とウイルス, 14(3), 347-350(1986)
- 5) Masao Ogawa, Tetsuro Ono: Epidemiological characteristics of tsutsugamushi disease in Oita Prefecture, Japan: Yearly and monthly occurrences of its infections and serotypes of its causative agent, *Orientia tsutsugamushi*, during 1984-2005., Microbiol. Immunol., 52(3), 135-143 (2008)
- 6) 小河正雄, 小野哲郎, 大友信也: つつが虫病の疫学調査について, 大分県衛生環境研究センター年報, 19, 23-26(1991)
- 7) 小河正雄, 塚本伸哉, 小野哲朗: つつが虫病 (1992~1997), 大分県衛生環境研究センター年報, 25, 21-26(1997)
- 8) Kawamori, F., Akiyama, M., Sugieda, M., Kanda, T., Akahane, S., Yamamoto, S., Ohashi, N., Tamura, A.: Two-step polymerase chain reaction for diagnosis of scrub typhus and identification of antigenic variants of *Rickettsia tsutsugamushi*., J. Vet. Med. Sci., 55, 749-755 (1993)
- 9) Furuya, Y., Yoshida, T., Katayama, T., Yamamoto, S. & Kawamura, A. Jr.: Serotype-specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA by nested polymerase chain reaction., J. Clin. Microbiol., 31, 1637-1640(1993)
- 10) 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: わが国のツツガムシ病の発生状況-臨床所見-, 感染症学雑誌, 75, 359-364(2001)
- 11) 八木幸夫, 山本正悟, 吉家清貴, 野田伸一: 鹿児島県北部大隈地区におけるつつが虫病の臨床的血清学的検討, 感染症学雑誌, 71, 1193-1198 (1997)
- 12) 山本正悟, 川畑紀彦, 大浦恭子: 宮崎県におけるつつが虫病患者由来の *R. tsutsugamushi* の抗原型とその分布, 感染症学雑誌, 163(2), 109-117(1989)
- 13) 浦上弘, 田村憲: つつが虫病リケッチアと宿主ツツガムシとの共生関係, 日本細菌学雑誌, 151(2), 497-511(1996)

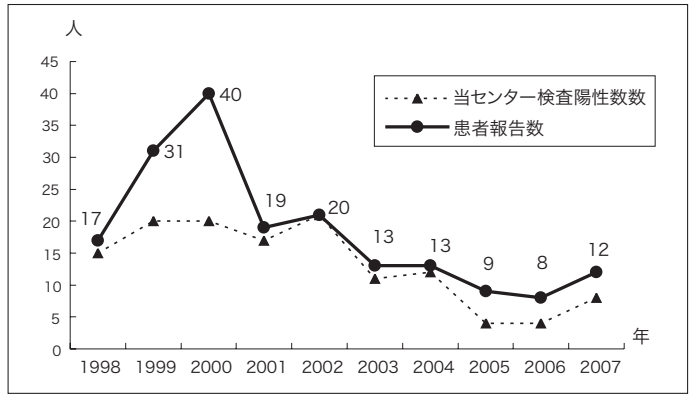


図1 つつが虫病患者報告数及び当センター検査陽性数 (1998-2007年)

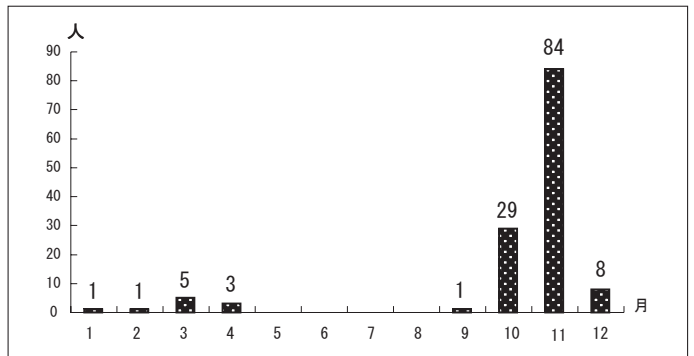


図2 月別患者数

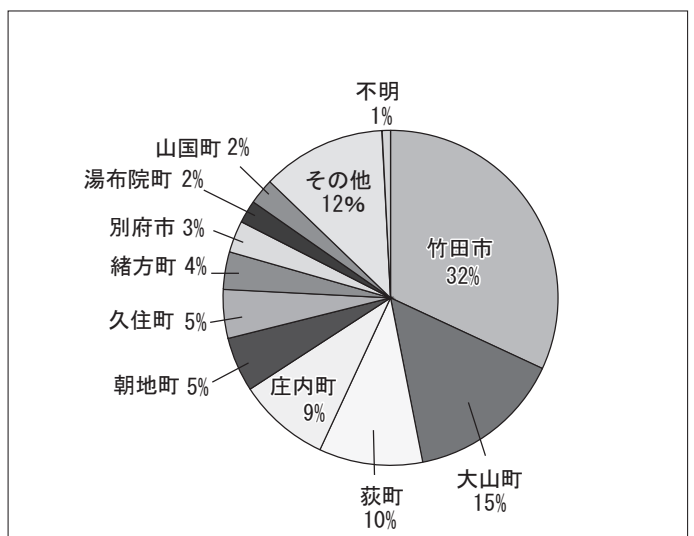


図3 市町村別患者発生状況
※市町村名は平成の市町村合併以前の名称を用いた

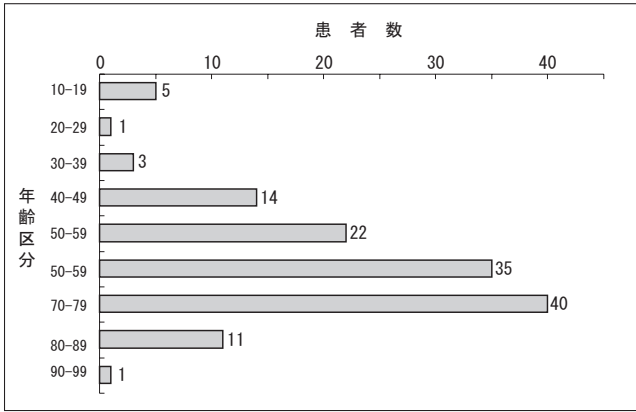


図4 年齢別患者数

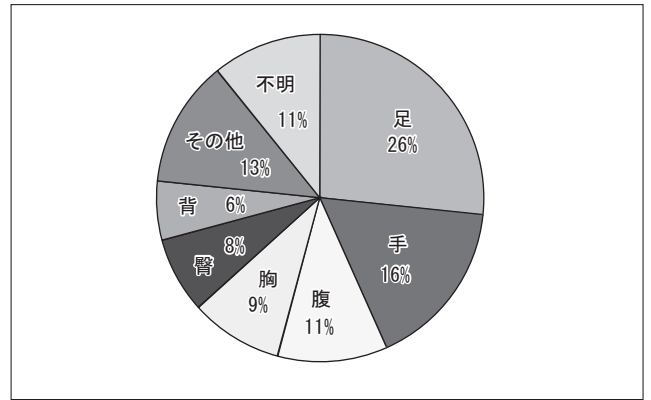


図7 刺し口の部位

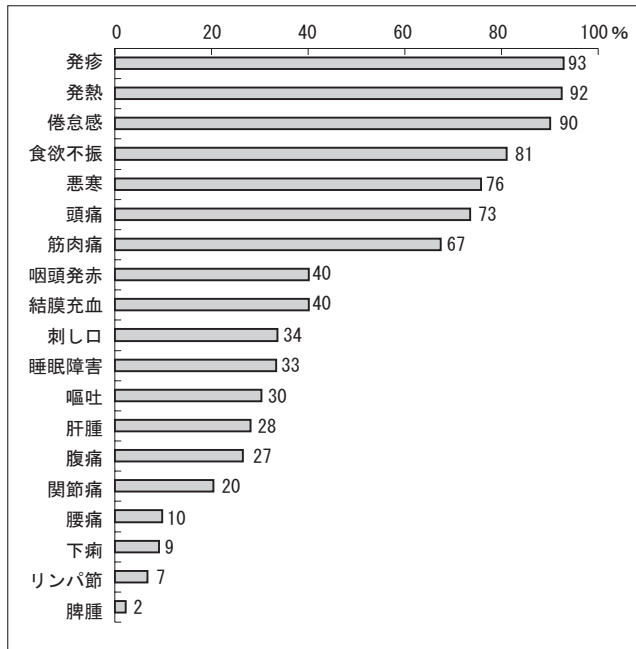


図5 臨床症状

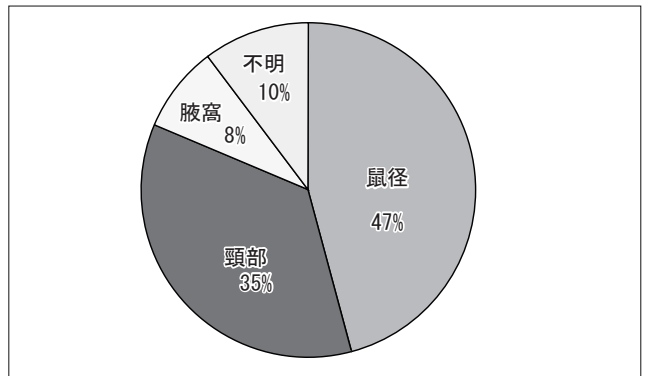


図8 リンパ節腫脹の部位

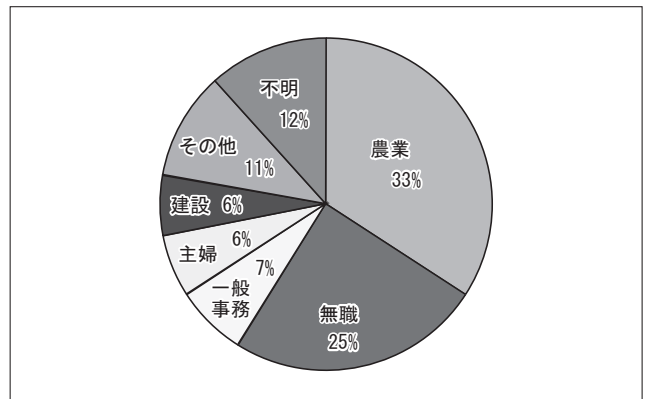


図9 職業別患者発生状況

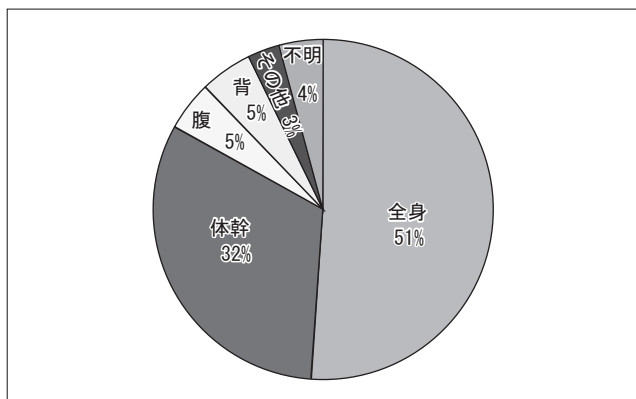


図6 発疹の部位

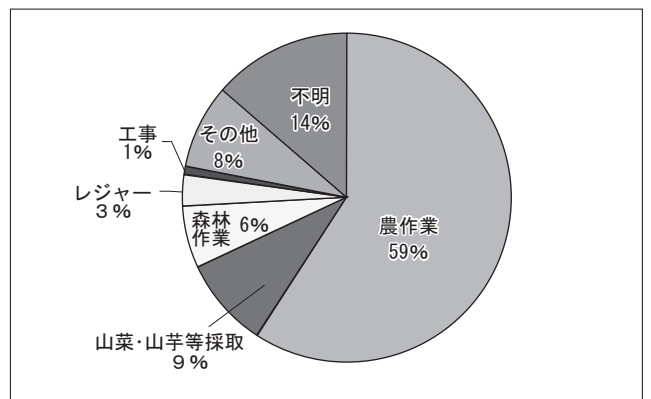


図10 作業別患者発生状況

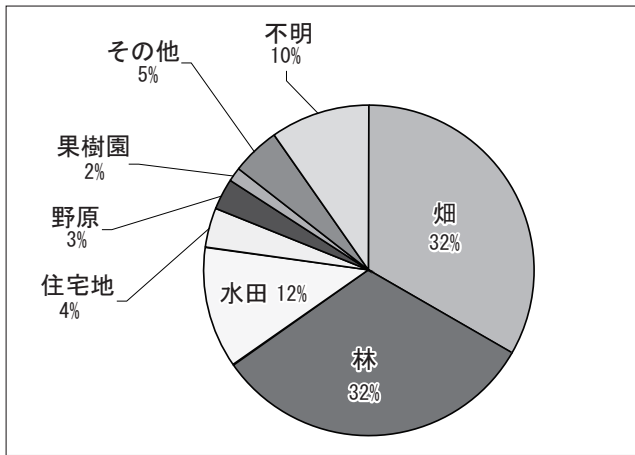


図11 感染推定場所

表1 *O. tsutsugamushi*の血清型

血清型	推定血清型 (I F法)	遺伝子型
Kawasaki	54	16
Kuroki	51	17
Karp	13	2
判定不能	14	