

【高浜町の1例】この患者は福井県の確実な第一例であるが、発症2日後に献血していたため血液センターに留置するよう連絡し、回収した血液をマウスに接種して3代目までに腹膜塗抹や抗体測定で弱いながら増殖を認めていた。この株は、現在起こしにかかっている。当該血清は当時の2機関へも盲検依頼しているが、抗体価は標準3株に対し妙に均等な数値を示して型別は曖昧に終わっていた。この経緯は高田・大槻により「感染症学雑誌、59:496-499、1985」に掲載はあるが、シモコシ型とは知らず難儀したものであった。

2. 宮古島の南方系恙虫病への対応

宮古本島の北端に接する小島「池間島」で、2010年に東南アジア共通のデリーツツガムシの濃厚分布が確認され、それによる患者(主に台湾系 Ot 型)も続発、今年度も6月下旬に池間島住民が明確に同島内で感染した5例目がみられた。宮古保健所では、昨 2012 年度は発生をみなかったので予防対策がようやく奏功したかに考え始めていた矢先だけに、改めての対応の必要性を感じ、三度目の連絡会を打診された。そこで、未吸着幼虫採集の方法論を探ることも兼ねて、安藤班長や研究協力者(山本、岡野)と共に現地に入り、保健所担当者の案内で今年度の患者の感染推定地も踏査した。

1) 恙虫病防圧に向けた連絡会

現地では充分には達成できてなかった感染予防策という認識から、宮古保健所の担当者のほか、市役所の複数関係部署からも参加があり、約 20 名にのぼった。席上、今回の感染地踏査を例に挙げて、関係者皆が議論し情報の共有に努め、今後も要に応じて連絡し合うことで防圧を進めることとなった。以下に、連絡

会の内容をあげる。

宮古島恙虫病対策の連絡会	
研究班の調査が一息あったこと、また貴保健所ご担当の交代もあったことなどを勘案して、この年末の現地調査の機会に連絡会をも開くことで相互の確認としたい。	
日時	平成25年12月24日11時～12時
場所	宮古島福祉保健所2階会議室
参加者	宮古島福祉保健所、宮古島市および県衛生研究所の各担当者とりけつチア研究班
項目	1. 研究班によるこれまでの調査概要…高田 (各年度報告書の記事のを配布して一括説明) 2. 保健所と市による現地対策の経過…担当 (地域説明会の経過などを説明) 3. 今回の調査目的の説明…山本 (フィールド調査が最終段階を迎えた点の説明) 4. 研究班が今後も継続できる疫学的支援…安藤 (県衛生研究所を通じての検査や資料の提供)

ついでながら、宮古島では住民への説明会で、恙虫病注意喚起の妙案、ウチワを配布していた(下写真)。



2) 未吸着幼虫採集の試み

媒介種の確定ないしシモコシ保有 Ot の型を決めるには、未吸着幼虫の多数採集を要する。しかし、デリーツツガムシは黒布見取法では充分量を採り難いため、ツルグレン装置で土壌から集める方法が期待された。昨年度は現地に紙製携帯用装置を持ち込んで試行したが、サンゴ礁由来の乾いた砂土が下部受け皿に多量に落ちて観察が極めて困難であった。そ

ここで今回は、感染推定地区4ヶ所の野生クマネズミの巣穴を中心に表土とリターを分別採取して持ち帰り(各地区で各々約500g×5袋の計10袋、総計で40袋)、金属製ツルグレン装置(3層フィルター;下写真)にかけてムシの回収を試みた(高橋)。土は落下せず土壌中のさまざま微小な虫類は清浄に得られたものの、やはりツツガムシは得られなかった。今後、最盛期の夏にも再試行の予定である。



3. 山岳帯の紅斑熱感染環の調査

ちょうど10年前の2004年7月に、福井県大野市の荒島岳および長野県白馬山系の梅池高原で相次いで見出され、届出上で日本紅斑熱とされた2例があった(図2)。前者はともかく、後者は未だ十分な調査ができていない。今回は両地域で未検査であった患者および野鼠試料も加えて再検討し、山岳帯(欧州と共通要素)で記録された紅斑熱の感染環を解明する一助としたい。

1) 荒島岳症例は *R. helvetica* 感染と再認識

当時すでにマダニ相や紅斑熱群遺伝子の検索による裏付けで *R. helvetica* 感染とほぼ断定されたが(石畝)、今回は、診断検査の時期には得なかった回復期28病日の血清も加えて、抗原も紅斑熱群5種を同時に置いて抗体価をみたところ、微妙な交差性を示しつ

つも、やはり *R. helvetica* に強く反応する傾向をみた。同地区の野鼠血清では同様の傾向が視われつつも、西日本地区の要因としてチマダニやキララマダニなど複数マダニ種に暴露されているためか反応が輻輳した(表3)。

2) 梅池症例も *R. helvetica* 感染を示唆

この患者では診断時期から2ヶ月後の血清も得ていたので、紅斑熱5種抗原を置いて再検したところ、これも *R. helvetica* 感染を示唆する反応を示した。また、症例発生4年後に得た野鼠の抗体も *R. helvetica* の介在が大きいことを示したが、標高の高い方で抗体価の低下傾向が明らかで、ヒメネズミでは検出されなかった。これは、当時も高高度ではマダニの採集数が激減したことと合致するようにはみえる(表3)。なお、同野鼠の脾臓および同時採集の少数マダニ(チマダニ属を含まず)で試行したPCR(17kDのR1-R2プライマー)ではリケッチア属遺伝子は検出されず、*gltA* も試行しつつある(赤地)。

なお、患者2例とも急性期のIgM値は低い傾向にあったが(当時の *R. japonica* 抗原による検査でも同様)、これが *R. helvetica* 感染の特徴なのか否か、とかく血清検査ではヒトも野鼠でも解釈し難い結果をみることは少なくない。ともあれ、山岳帯ないし北日本で *R. helvetica* など紅斑熱感染がさらに潜在する可能性は忘れるべきでない。

3) 長野県南部の山間で紅斑熱?

今年度6月下旬に長野県最南部の飯田市南西に位置する昼神地区(平均標高800m)に大阪方面(高槻市?)から山村研修に来ていた高校生が滞在3日で熱発し、急ぎ帰郷した例があった(長野県環境保全研究所の情報)。行政検査ではシングル血清で低抗体価

であったものの、主治医により日本紅斑熱として届出された。その発症2ヶ月後に、高校生が滞在した山腹のリゾート施設を訪れ、裏山の自然探索路を巡るもマダニは容易には得ないうち、施設建物すぐ裏でキチマダニ幼虫を多数得た。そのうち30個体をリケッチア分離にかけたが陰性であった(藤田)。こういう例は、診断の経緯、感染地特定など届出制度の運用に係る小さくとも少なくはない難儀な問題の1つであろう。

E. 結論

今回、これまで東北地方限定でマイナーな型と思われていたシモコシ型恙虫病が、西日本でもけっして稀ではないらしい事実を証明できた。今後は、同型が高浜-京都ラインを越えて在るものか否か? 南西日本の春の患者発生ではフトゲ由来型のほかシモコシ型が潜在しないものかさらに調査を要する。

一方、北方系マダニ種が分布する山岳帯ないし北日本では、*R. helvetica* などの紅斑熱感染が潜在する可能性を忘れるべきでなく、確実かつ速やかな届出制度の運用を要する。離島方面のリケッチア症への対応では、関係者皆が情報の共有に努め、持続して連絡し合うことで防圧を進めるべきだし、遠隔の現地では対策の基礎となる調査で常に工夫を要する。

F. 健康危険情報

あり(総括研究報告書に記載)

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 高田伸弘. 沖縄県で発生したツツガムシ病検査と技術 41:76-79, 2013

2) 高田伸弘. 国内外のマダニ媒介感染症における地理病理学の意義 衛生動物 64:1-2, 2013

3) 高田伸弘. ツツガムシ病, 予防そして小児対応へ 小児科臨床 66:1513-1519, 2013

4) 高田伸弘. 予期せぬ感染症との遭遇. 2. 医マダニ類の多様性, とくに各種感染症を媒介するマダニたち Clean Life 2014 年号, 5-11, 2013

5) 高田伸弘. わが国でも問題のベクター媒介性感染症. 8. 日本紅斑熱の発生状況と媒介マダニから見えてくる感染環 化学療法の領域 30:305-312. 2014

6) Gaowa, Ohashi N, Aochi M, Wuritu, Wu D, Yoshikawa Y, Kawamori F, Honda T, Fujita H, Takada N, Oikawa Y, Kawabata K, Ando S and Kishimoto T. Rickettsiae in ticks, Japan, 2007-2011. Emerg Infect Dis 19:338-340, 2013

7) 藤田博己, 矢野泰弘, 高田伸弘, 安藤秀二, 川端寛樹, 藤田信子. 2012年までに確認できた福島県のマダニ類とマダニ媒介リケッチア 衛生動物 64:37-41, 2013

8) 佐藤寛子, 柴田ちひろ, 斎藤博之, 佐藤了悦, 安部真理子, 齊藤志保子, 高橋 守, 藤田博己, 角坂照貴, 高田伸弘, 川端寛樹, 高野 愛, 須藤恒久. アカツツガムシ親和性 Kato 型つつが虫病患者の確認を受けての秋田県雄物川流域における調査成績 (2009) 衛生動物 64:21-25, 2013

9) Ikegaya S, Iwasaki H, Takada N, Yamamoto S and Ueda T.

Tsutsugamushi disease caused by Shimokoshi-type *Orientia tsutsugamushi*: the first report in Western Japan. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 88: 1217-1219, 2013

- 10) Kawabata H, Takano A, Kadosaka T, Fujita H, Nitta Y, Gokuden M, Honda T, Tomida J, Kawamura Y, Masuzawa T, Ishiguro F, Takada N, Yano Y, Andoh M, Ando S, Sato K, Takahashi H, Ohnishi M. Multilocus sequence typing and DNA similarity analysis implicate *Borrelia valaisiana*-related sp. isolated in Japan is distinguishable from European *B. valaisiana*. *J. Vet. Med. Sci.* 75:1201-1207, 2013

2. 学会発表

- 1) 高田伸弘. シンポジウム「わが国におけるダニ媒介感染症の多様性、その対応」:本邦のダニ相の特徴 第47回 ペストコントロールフォーラム 2013. 2
- 2) 高田伸弘. 公開シンポジウム「動物と人間社会」—現代社会の変容とその影響 拡大するダニ媒介感染症—ヒトと動物の触れ合いの狭間で— 第29回日本霊長類学会・日本哺乳類学会 2013年合同大会 2013. 9
- 3) 山内健生, 佐藤雅彦, 伊東拓也, 藤田博, 高田伸弘, 川端寛樹, 安藤秀二, 坂田明子, 高野 愛 利尻島のマダニ相とマダニ保有病原微生物 第65回日本衛生動物学会大会 2013. 4
- 4) 矢野泰弘, 高田伸弘, 御供田睦代, 安藤

秀二. ヤマアラシチマダニ若虫体内における紅斑熱リケッチアの存在様式-ベクターとしての検証 第65回日本衛生動物学会大会 2013. 4

- 5) 高田伸弘, 矢野泰弘, 池ヶ谷諭史, 岩崎博道, 山本正悟, 藤田博巳, 石畝 史. 西日本域としての福井県で初確認されたシモコシ型恙虫病の感染調査2012年 第65回日本衛生動物学会大会 2013. 4
- 6) 岩崎博道, 池ヶ谷諭史, 田居克規, 重見博子, 上田孝典, 高田伸弘. 福井県内で確認された3型(Gilliam, Shimokoshi, Kawasaki)のつつが虫の臨床的特徴 第87回日本感染症学会総会 2013. 6

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし



図1 シモコシ型恙虫病確認地（福井県永平寺町大月）での調査俯瞰



図2 シモコシ型恙虫病と山岳帯紅斑熱の地理概況

表 1 福井県永平寺町のシモコシ型感染地でのツツガムシと野鼠の検討

ツツガムシ相	2012 年			2013 年			
	5 月	10~11 月		4~5 月		11 月	
野鼠	As5♂10♀	As3♂8♀	Ut2♂	As2♂9♀	Mmn1♂	As3♂5♀	Mmu1♂
<i>L. kitasatoi</i> ｷﾀﾄ	44	16	-	19	1	1	-
<i>L. owuense</i> ｵｳ	1	2	-	-	-	-	-
<i>L. fuji</i> ﾌｼﾞ	18	10	-	4	2	3	-
<i>L. palpale</i> ﾋﾞﾀ	-	-	-	1	7	-	-
<i>L. miyajimai</i> ｷﾔｼﾞﾏ	4	3	-	-	-	-	-
<i>L. tanaka-ryoi</i> ﾀﾅｶ	3	-	-	-	-	-	-
<i>T. kansai</i> ｶﾝｻｲ	3	8	-	1	-	-	-
<i>N. japonica</i> ﾔﾏﾄ	-	14	-	-	-	6	1
<i>G. saduski</i> ｻﾀﾞｽｷ	11	64	1	13	1	23	-
参考 <i>I. ovatus</i> ﾔﾏﾄ		幼 1	-	-	-	幼 2	-
<i>D. taiwanensis</i> ﾀﾜﾝｶﾞ		幼 5	-	-	-	-	-

As:アカネズミ Ut:ヒミス Mmn:カヤネズミ Mmu:ハツカネズミ

土壌より採取ツツガムシ（感染スポットでツルグレン法にて未吸着幼虫の検索）

・P地区の感染スポットでヒゲのみ 21 個体（2013 年 5 月） 注:その秋にはヒゲの検出なし

野鼠からのシモコシ型など 0t の検出（図 1 参照）

- ・0t 遺伝子 A 地区でシモコシ型 1/As15 頭（2012 年 5 月）
P 地区でシモコシ型 1/As 2 頭（2013 年 5 月）
- ・0t 分離 遺伝子陽性 2 個体の脾臓からはマウスおよび細胞接種で陰性
- ・0t 抗体 A 地区でシモコシ型陽性 As は 15 頭中 5 頭（×5~20）（2012 年 5 月）
C 地区でギリウム型陽性 Ut は 1 頭中 1 頭（×160）（2012 年 10 月）
P 地区でシモコシ型陽性 As は 2 頭中 1 頭（×10）（2013 年 4 月）

参考：京都府のハタネズミ（Mm）にみたシモコシ型抗体

当時の捕獲データ	Kw	Sh	Kt	Kr	Kp	Gl	
岩滝町 1997 年 5 月 Mm♀成	80	10	40	40	-	160	ヒゲ+
弥栄町 1998 年 3 月 Mm♂成	10	20	80	20	80	320	ヒゲ+
八幡町 1998 年 1 月 Mm♀成	-	80	-	-	-	-	ヒゲ+

舞鶴市（1998 年 1 月）、伊根町（1997 年 12 月）、八幡町（1997 年 5 月）は Kw、Kr に×10
野田川町（1996 年 11 月）および若八幡町（1997 年 7 月）では陰性

Kw:Kawasaki 型 Sh:Shimokoshi 型 Kt:Kato 型 Kr:Kuroki 型 Kp:Karp 型 Gl:Gilliam 型

表2 北陸地方の過去の恙虫症例の再検で見出したシモコシ型感染

(IP で抗ヒトウサギ、-<40)

北陸 27 症例の型別分布 (1984~2013)		Kw	Sh	Kt	Kr	Kp	Gl	
福井県	9 地区	11	5	-	4	-	1	
石川県	4 地区	5	-	-	1	-	-	
他地域症例の型別分布 (委託症例の一部; 1981~2009 年)								
群馬県	1 地区	5	-	-	-	2	1	
兵庫県	2 地区	1	-	-	2	-	-	
奈良県	1 地区	-	-	-	-	-	1	
和歌山県	1 地区	10	-	-	-	-	-	
徳島県	1 地区	-	-	-	-	-	1	
高知県	1 地区	6	-	-	-	-	-	
再検でみたシモコシ型症例 (ペア血清)		Kw	Sh	Kt	Kr	Kp	Gl	
福井県高浜町								
東三松	M? 50 才♂	840530	IgM	40	160	-	-	-
			IgG	160	160	40	80	-
		840618	IgM	80	5120	80	640	160
			IgG	320	2560	320	1280	640
福井県大野市								
蓑道	KF 79 才♀	880702	IgM	80	1280	320	80	-
			IgG	160	640	160	160	80
		880718	IgM	320	10240	320	320	40
			IgG	640	10240	1280	1280	160
蓑道	TM 77 才♀	910415	IgM	40	320	40	-	-
			IgG	80	320	80	40	-
		910423	IgM	640	10240	320	320	80
			IgG	640	5120	640	1280	160
不動堂	NM 74 才♀	910414	IgM	80	1280	40	40	-
			IgG	160	640	160	160	-
		910423	IgM	320	5120	160	80	40
			IgG	640	5120	640	1280	160
南六呂師	MM 95 才♀	960417	IgM	160	1280	160	160	80
			IgG	160	1280	320	160	160
		960426	IgM	320	10240	320	320	80
			IgG	640	10240	1280	1280	160

表3 山岳帯の紅斑熱をめぐる抗体検査

(IP では、患者で抗ヒトウサギ、野鼠で ProteinG を使用)

福井県北部（大野市荒島岳） 2004 年発生 の 紅斑熱患者 53 才♂						
採血日 (病日)		Rjp	Rhl	Rhv	Ras	Rtm
7月16日(約7)	IgM	20	20	40	20	20
	IgG	640	640	1280	160	80
7月26日(約17)	IgM	1280	1280	2560	640	320
	IgG	5120	2560	10240	2560	1280
8月09日(約28)	IgM	320	160	640	160	160
	IgG	2560	2560	5120	2560	640
現地野鼠 IgG の検索						
標高 700m 内外	As♂成	80	40	80	40	40
	As♀成	160	160	320	160	80
	As♀成	20	-	40	20	-
	As♀若	80	80	80	40	160
	As♀成	40	40	80	20	20
長野県北部（白馬山系柵池高原） 2004 年発生 の 紅斑熱患者 39 才♂						
		Rjp	Rhl	Rhv	Ras	Rtm
7月20日(約13)	IgM	80	80	80	40	40
	IgG	320	160	320	160	160
7月26日(約19)	IgM	160	160	320	80	80
	IgG	1280	640	2560	640	320
7月12日(約60)	IgM	40	40	80	40	20
	IgG	320	320	640	320	160
現地野鼠 IgG の検索 (2008 年 7 月採集分)						
標高 1000m 付近	As♂成	320	320	1280	160	160
	As♀成	320	160	640	80	80
	As♀成	80	80	320	80	40
	As♂成	320	160	640	160	80
標高 1600m 内外	As♀若	160	80	160	80	20
	As♂成	80	80	160	80	40
	As♂成	160	160	320	80	40
	As♂成	40	20	80	20	-
Aa♀成 3 頭	-	-	-	-	-	

患者、野鼠共に<20

* 上記野鼠および同時採集マダニは、菌分離と PCR (R1-R2) でリケッチア属(-)

Rjp: *R. japonica* Rhl: *R. heilongjiangensis* Rhv: *R. helvetica* Ras: *R. asiatica* Rtm: *R. tamurae*

平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる技術・情報の体系化に関する研究
分担研究報告書

病原診断法の改良・開発 2013

研究分担者	藤田 博己	藤田保健衛生大学医学部、馬原アカリ医学研究所
研究協力者	安藤 秀二	国立感染症研究所（研究代表者）
	早坂 大輔	長崎大学熱帯医学研究所
	藤田 信子	馬原アカリ医学研究所

研究要旨

ダニ媒介性感染症の診断法として、抗体検出による確定のために間接免疫ペルオキシダーゼ (IP) 反応を主体に間接赤血球凝集 (HA) 反応と Weil-Felix (WF) 反応を補助的に使用して実績を集積してきた。今年度は新たなダニ媒介性疾患としてウイルス性の SFTS が加わり、鑑別の必要性がでてきたことから、SFTS ウイルス抗原を追加した IP 反応による包括的検査法を確立した。一方では、IP 反応においては強い交差反応がしばしば見られた紅斑熱群と発疹チフス群について、HA 反応と WF 反応の併用による鑑別法の可能性を検討し、当初に日本紅斑熱が疑われた症例中に発疹熱を確定する事例を得た。

A. 研究目的

前年に引き続き、ダニ媒介性感染症の中で発生頻度の高いつつが虫病と紅斑熱群を対象に、特異抗体の迅速検出法としての間接免疫ペルオキシダーゼ反応を主体に、間接赤血球凝集反応と Weil-Felix 反応の適用を検討した。その中で、今年度に新たに出現し、かつ実験室診断の相談を受ける機会の多かった重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) についても、除外診断の必要性からリケッチア症との同時診断を試みた。一方、紅斑熱抗体陽性例の中には発疹チフス群にも高い抗体価を示す症例が見られることが知られていたが、今回、当初に紅斑熱が疑われた症例に発疹熱症例を経験したことにより、両疾患鑑別の簡易法を検討した。

B. 研究方法

間接免疫ペルオキシダーゼ (IP) 反応：抗原スライドは 12 well を用い、つつが虫病リケッチア標準 6 型を各 1、紅斑熱群 1、発疹チフス群 1 および SFTS1 の合計 9 つのスポットを各 well (円形、直径 7mm) に配置した (図 1)。なお、SFTS ウイルスは感染 Vero E6 細胞を抗原とした。このウイルス対応抗原は長崎大学熱帯医学研究所の早坂大輔先生がパラホルムアルデヒド処理による不活化抗原として開発した。このウイルス抗原は、リケッチア抗原と同様に 0.3% に牛血清アルブミンを添加した PBS 中に浮遊させた状態で -80°C に凍結保存し、使用時にスライドグラスにスポット塗抹してアセトンで固定した。固定後のスライドは、直ちに使用しない場合には -20°C に凍結保存し

た。

間接赤血球凝集 (HA) 反応：紅斑熱群と発疹熱のリケッチアからアルカリ抽出した多糖体抗原をホルマリン固定ニワトリ赤血球に結合させたものを用い、マイクロプレートで反応、凝集像を観察して判定した。

Weil-Felix (WF) 反応：*Proteus* 菌の OX2, OX19, OXK の S コロニー型由来菌の湿菌重量 5mg/ml ホルマリン不活化 PBS 浮遊液を抗原とした。反応は、迅速スライド凝集法で行った。

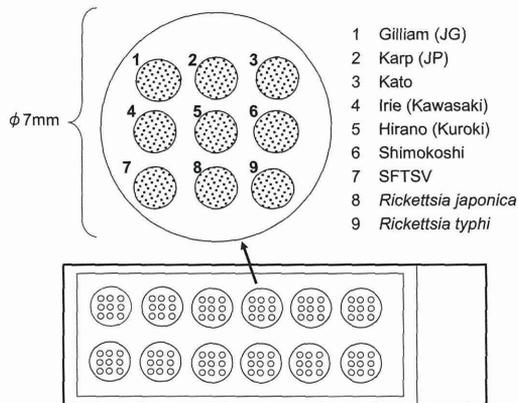


図 1. IP 用スライド上の抗原の配置

C. 研究結果

今回は IP 反应用抗原として従来のつつが虫病と紅斑熱リケッチアに SFTS ウイルスがあわったが、各抗原の保存とスライドへのスポット方法は統一し、取り扱いを簡略化した。リケッチア抗原の陽性像はリケッチアそのものが粒子状に染色されるが、ウイルス抗原の場合は感染細胞の発色の有無で判定することになる (図 2)。リケッチア診断に併行して SFTS ウイルス抗体価の測定を試行しつつあるが、SFTS 患者回復期血清の反応性は良好である。また、患者以外にも、疫学調査としての各種動物血清への適用を試験的に検討した。

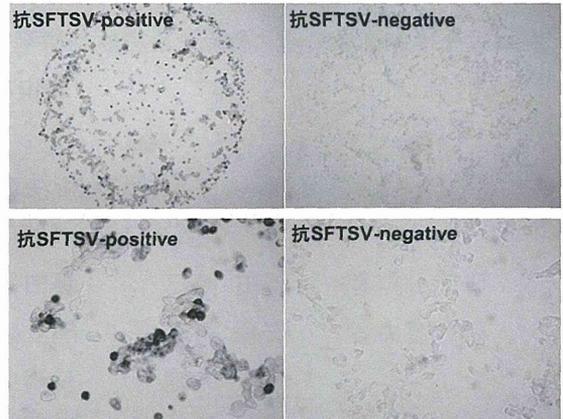


図 2. SFTS ウイルス感染細胞の IP 反応像。
上, 弱拡大; 下, 強拡大。

表 1 は、A 県のタヌキと B 県のイヌ (SFTS ウイルス抗体 ELISA 陽性例) の血清についての本研究で使用している IP 反応による抗体検査の結果である。つつが虫病、紅斑熱、SFTS の各病原体での陽性反応が見られた一方で、ELISA 法では全個体が SFTS ウイルス陽性と判定されたイヌ血清が、本研究の IP 反応では 2 個体が陰性の結果であった。また、複数の病原体に対する抗体陽性例も見られた。

表 2 は、紅斑熱と発疹熱患者の血清反応で、3 通りの診断法を比較したものである。IP 反応では、症例 Code の 1 から 5 は紅斑熱と発疹熱抗原に対する交差反応が無いかわずかな範囲であったが、表中の太線枠の部分のように、6 から 9 にはかなり強い交差反応が見られ、特に 7 では発疹熱のほうに高い値を示し、また発疹熱症例においても 10 は紅斑熱に強い交差反応を示した。一方、HA 反応では交差反応は見られなかった。WF 反応は、紅斑熱では OX2 だけではなく、OX19 にも陽性の症例が見られたが、発疹熱では全て OX19 のほうに強く反応した。

表1. 動物血清の抗体価測定例.

種類	Code	抗体検査 IP: -, <40								
		Gilliam	Karp	Kato	Irie/ Kawasaki	Hirano/ Kuroki	Shimokoshi	R. japonica	R. typhi	SFTSV
タヌキ	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	80	40	-	160	-	-	-	40
	4	80	40	80	40	640	40	40	-	-
	5	160	2560	320	320	10240	640	40	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	160	640	640	320	5120	160	-	-	-
	8	640	640	640	2560	5120	320	-	-	-
	9	40	160	160	80	640	40	160	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13	40	-	-	160	-	-	-	-	-
	14	160	160	160	160	1280	40	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	80	80	320	160	640	40	-	-	-
	17	40	80	160	160	320	40	-	-	-
	18	-	160	80	-	40	40	-	-	-
	19	160	160	160	160	2560	160	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	160	160	160	160	1280	160	-	-	-
	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-
イヌ	1	-	-	-	-	-	-	-	640	
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	40	80	40	80	40	80	320	
	4	-	-	-	-	-	-	-	80	
	5	-	-	-	-	-	-	-	1280	
	6	160	1280	320	-	-	-	160	-	

表2. 紅斑熱と発疹熱の抗体陽性例における検査法別抗体価の比較.

疾患別	症例 Code	IP IgG/IgM -, <40		HA -, <40		Weil-Felix -, <20	
		紅斑熱	発疹熱	紅斑熱	発疹熱	OX2	OX19
紅斑熱	1	2560/640	-/-	160	-	-	160
	2	1280/640	-/80	320	-	80	20
	3	20480/1280	-/-	320	-	-	20
	4	160/40	-/-	320	-	20	-
	5	20480/1280	-/80	320	-	640	-
	6	2560/-	2560/-	640	-	-	-
	7	40/-	640/-	160	-	20	-
	8	5120/640	2560/320	10240	-	320	20
	9	1280/-	2560/-	1280	-	-	-
発疹熱	10	5120/320	10240/320	-	160	-	40
	11	-/-	2560/2560	-	320	20	640
	12	-/-	320/640	-	640	-	640
	13	-/-	80/1280	-	640	-	160

IP, 間接免疫ペルオキシダーゼ反応; HA, 間接赤血球凝集反応

D. 考察

IP 反応への SFTS の追加: ダニ媒介性感染症のうち、つつが虫病と紅斑熱を主体とした検査法として IP 反応のより簡易化を試みつつ実際の実験室診断に対応しているが、今年度は新たに加わった SFTS にも対応すべく、IP 抗原に加えた。ただし、あくまでも本研究班の対象は細菌感染症なので、SFTS 診断への積極的対応よりも、リケッチア症が想定された疾患における SFTS の除外目的には有用と思われる。IP での反応性には特に問題はないようであるが、今後はさらなる症例集積による反応性の検討が課題となる。各種動物を対象とした血清疫学への使用は同時一括抗体検出を可能とした点では効率的で有用と思われる。

ただし、SFTS ウイルス抗体の検出感度には課題があるように思われた。別機関の ELISA 検査の結果との不一致性は、単なる IP 反応が ELISA よりも感度が劣るだけの理由なのかどうかは、カットオフ値の補正も含めて検討する必要がある。

紅斑熱と発疹熱の鑑別: 従来から、日本紅斑熱の蛍光抗体法や IP での抗体検査においては、発疹熱との強い交差反応の存在が指摘されてきた。全ての症例にこのような交差反応が見られるとは限らないが、両者に陽性反応が見られる症例において、紅斑熱か発疹熱の一方のみを抗原とした場合には、発疹熱を紅斑熱に、あるいは紅斑熱を発疹熱と誤診断してしまう可能性が高くなる。鑑別法の一つには相互の抗原による被検血清の吸収試験があるが、それは大容量の抗原の確保ができた場合に実施が可能な手法である。これに対して、紅斑熱と発疹熱の抗原で感作させた 2 種類の赤血球を使用した HA 反応はこの鑑別を容易にした。古くから汎用されてきた WF 反応も鑑別

には有用なことがある。OX2 が有意に陽転した症例は紅斑熱と判定して構わないと思うが、紅斑熱には OX19 陽性例も見られ、発疹熱との鑑別はできないことがある。

E. 結論

IP 反応に SFTS 抗原を加えた同時抗体検出系による実験室診断と動物を対象とした疫学調査への使用、ならびに HA による紅斑熱と発疹熱の簡易鑑別の可能性を検討し一定の目途をつけた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 野村哲彦, 倉田啓史, 池田宜央, 藤田博己: 日本紅斑熱を疑われ血清診断にて発疹熱と診断した 1 例. 病原微生物検出情報, 34: 313-315, 2013.
- 2) 竹之下秀雄, 草野良郎, 千葉万智子, 門馬直太, 藤田博己: Shimokoshi 型 *Orientia tsutsugamushi* 感染によるツツガムシ病の 1 例. 皮膚科の臨床, 55: 1181-1185, 2013.
- 3) 佐藤寛子, 藤田博己, 柴田ちひろ, 斎藤博之, 須藤恒久: 秋田県で確認された Shimokoshi 型つつが虫病 15 症例における臨床, 疫学及び診断法の検討. 秋田県健康環境センター年報, 8: 44-50, 2013.

2. 学会発表

- 1) 藤田博己: ダニ媒介性新興感染症. 徳島県公衆衛生獣医師協議会・徳島県獣医師

会公衆衛生部会合同第1回研修会. 2013年9月13日 徳島市.

- 2) 藤田博己: 四国地方のSFTSの実態とマダニ媒介感染症. シンポジウム「西日本のSFTSを考える」第68回日本衛生動物学会西日本支部大会. 2013年10月26日, 27日 越前市.
- 3) 及川陽三郎, 藤田博己, 高田伸弘: 紅斑熱群リケッチア症の抗体検査用試験紙について. 第68回日本衛生動物学会西日本支部大会. 2013年10月26日, 27日 越前市.
- 4) 栗田哲司, 夏秋 優, 栗田優子, 藤田博己: 淡路島における日本紅斑熱の1症例. 第68回日本衛生動物学会西日本支部大会. 2013年10月26日, 27日 越前市.
- 5) 藤田博己, 藤田信子, 安藤秀二: 国内における発疹熱リケッチアの潜在について. 第6回日本リケッチア症臨床研究会・第20回リケッチア研究会合同研究発表会. 2014年1月11日, 12日 大津市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる技術・情報の体系化に関する研究
分担研究報告書

紅斑熱の簡易血清診断法 Dot-ELISA の活用

研究分担者	高田 伸弘	福井大学、医学野外研究支援会 MFSS
研究協力者	及川 陽三郎	金沢医科大学
	藤田 博己	馬原アカリ医学研究所（研究分担者）
	山本 正悟	宮崎大学医学部、MFSS
	御供田 睦代	鹿児島県環境保健センター
協力機関	上天草総合病院（和田 正文）	
	明神診療所（森田 裕司）	
	伊勢赤十字病院（坂部 茂俊）	

研究要旨

科研課題「診断・治療体制の構築および基盤となる技術・情報」を下支えするため、ベクター一視点から感染環調査および関連する検査診断法の研究を進めた。

ここでは、関連の検査法として、紅斑熱菌体からアルカリ抽出した常温で安定かつ安全な多糖抗原を用いた Dot-ELISA について、その活用方策を検討した。その結果、辺地、離島また海外まで含みさまざまな地域の潜在感染のスクリーニングやフィールド調査現場の動物検査でも使い得るツールであることを認識した。医療の前線で、正規検査に回す前のプレテストとして用いる場合の有用性については、本法キットを送付して試行中であるが、良い感触は得ている。

A. 研究目的

この研究事業の本体は“診断・治療体制の構築および基盤となる技術・情報の体系化”であるので、分担者らは、地域ごとのフィールドそして症例を視野において調査研究を行うことで検査診断体制を下支えする。

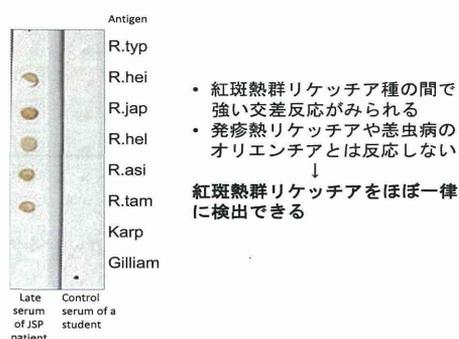
さて、紅斑熱の検査で菌体抗原を使う免疫染色法などはほぼ確立してはいるものの、ラボ室内で菌体の培養もしくは凍結状態を維持する必要があり、また抗体価読み取りも主観が入

るように思われた。そこで、一昨年から、菌体抽出のアルカリ多糖抗原（Alkali polysaccharides; APS）を使用して多数検体のスクリーニング向きとされる通常型 ELISA、そして器材が煩雑でなく場所や人も選ばない検査ツールとして Dot-ELISA も試作していた（後記研究発表を参照）。

ここでは、Dot-ELISA を現場で活用させる工夫を試み、その意義の検証を行った。

B. 研究方法

本法のポイントは、予め菌体から抽出したアルカリ多糖抗原であるが、この種の抽出抗原は以前から細菌検査の分野で赤血球凝集反応用に作られてきて、強アルカリ処理で蛋白質はほとんど壊れるため多糖類が主成分となっている。紅斑熱菌体(ハローゾーンあたりに局在)からの抽出物でも常温安定、非感染性、ホルマリンやアルコールまたトリプシンや100℃加熱で失活分解せず、紅斑熱群に特異的である(下写真)。



以下、研究発表に記述された手技の再掲。

- ① 既報のように APS を吸着させた試験紙を準備。
- ② ブロッキングワン R で 200 倍希釈した被検血清を 1.5ml のマイクロチューブに入れ、そこへ試験紙を投入して室温 15 分振盪して反応。
- ③ 試験紙を Tween 添加 PBS (PBS/T) に移して振盪 3 回洗浄。
- ④ 試験紙をペルオキシダーゼ標識プロテイン G (ブロッキングワン R で 1,000 倍希釈) に入れて、室温 15 分振盪して反応。
- ⑤ 試験紙を PBS/T で振盪 3 回洗浄した後、H₂O₂ 添加 DAB に入れて発色 1 分、すぐに水洗してから乾燥、呈色を判定。

なお、反応度の比較検証では、同じ血清について、協力者それぞれの専門性から、免疫

ペルオキシダーゼ染色法 (IP) ないしは免疫蛍光染色法 (IF) を用いた。

今回の検討項目は次の通りである。

1. 紅斑熱患者血清で従来法との比較

日本紅斑熱の発生地(宮崎県および鹿児島県の患者血清につき、比較検査を行った。

2. 現場活用の試み

紅斑熱調査のフィールドで野鼠の抗体測定に試用した。また、臨床でのプレテストの意義を計るため、日本紅斑熱多発地(熊本県天草、和歌山県古座川、三重県志摩半島)の医療機関に本法キットを送り試用を依頼した。

C. 研究結果 および D. 考察

1. 紅斑熱患者血清で従来法との比較

自家検査で宮崎県の患者血清を用いた場合、従来法 IP ないし IF で $\times 80 \sim 160$ 以上の抗体価を示すものなら Dot-ELISA でもまず一致した陽性反応は確保され、シングル血清でも感染の目安になり得ることが分かった(表1)。また鹿児島県の患者血清でも(御供田)、IgG、IgM 共に一定以上の抗体価なら一致性は堅いものの、 $\times 20 \sim 160$ 程度(特に早い病日)では不一致が散見された(表2)。ただ、IP や IF 間で想定外の不一致、あるいは患者の体内環境の要因による妙な反応の出現など(抗体陰性でも刺し口 PCR で陽性とか)、低抗体価の検体は扱い難いことはよく知られる。そういった寛容な見解に立てば、Dot-ELISA にみた反応の誤差は予想の範囲内であった。もちろん、従来の検査法でもそうするように、ペア血清を使って抗体上昇を確認すれば、現症の診断として使い得る(既に数例を経験)。

2. 現場活用の試み

以上、本法はスクリーニングに充分使えそうと判断されたので、現場への適用を試みた。

・現地フィールドでの抗体測定

紅斑熱のフィールド調査の出先にて、野鼠の血清検査に試用した場合、ラボに帰ってからの IP 結果と一致性が高かった(表3)。これなら、調査途中に適宜の場所で本法を試みて野鼠の感作個体が多い地区を急ぎ選べば有用な野鼠やマダニを採集できることが期待される。また、プロテイン G を使用するので多種動物に適用できるほか、調査先の病院や保健所などでヒトの疑い症例がある場合、確かな行政検査を手配する前に、本法を急ぎ適用することで広範囲な患者の掘り起こしに役立つかも知れない。特に辺地、離島さらには海外での調査時などさまざまな局面で便利なツールになろう。

・地域医療機関での直接活用(プレテスト)

多発地域ではむろん、散発ないし未経験地域ではさらに、疑心暗鬼の時点から行政検査の手続き(または研究者への依頼)に入るのは種々の躊躇があり得るらしい。そのような場合、プレテストとして簡易にメドをつけられるなら、診断治療も円滑に進むと思われる。

そこで、かく有用性を確かめるため、紅斑熱が多発する3地域の臨床医(所属病院の検査室の支援含む)に試みに検査キットを送付して、おのおの自験例につき自らの測定を勧めることにした。若干の曲折はあったが、今のところスクリーニングとして期待したくらいの結果は出つつあるが、未だ継続中のため結果の報告は後日としたい。

なお、今回のキット(下写真)では予備器材も多く同梱したが、実際はこの半分でよい。



E. 結論

ダニ媒介感染症の確定検査は衛生行政ないし専門家へ委託されるが、その前の段階で簡易な検査法で感染の有無にメドをつける、あるいはフィールド調査の途上で試料の選別ができるなら、随分と助かるに違いない。また、辺地、離島さらには海外で本法を用いるなら、広範かつ思いがけない患者掘り起こしに役立つかもしれない便利ツールになり得る。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 及川陽三郎, 藤田博己, 矢野泰弘, 高田伸弘. 紅斑熱群リケッチア症の簡易診断法としてのアルカリ多糖体抗原を用いた ELISA 法の検討 衛生動物 64:33-35, 2013

2. 学会発表

1) 及川陽三郎, 高田伸弘, 矢野浩司, 山本正悟. 紅斑熱リケッチアのアルカリ抽出多糖抗原を用いた ELISA によるヒト血清のスクリーニング・テストタイ国で採集されたヒト血清について 第 65 回日本衛生動物学会大会 2013. 4

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 宮崎県の紅斑熱血清につき免疫染色法と Dot-ELISA の検査比較 (ProteinG使用)

IgG

No.	patient.	病日	IF	IP	Dot-ELISA
1	2012. 3-2	18	1280	1280	++
2	2012. 10-2	3	<20	40	-
3	2012. 10-3	19	640	320	++
4	2012. 12-2	12	80	320	+
5	2012. 12-3	23	640	640	++
6	2012. 17-2	18	160	160	+
7	2012. 25-4	32	1280	640	++
8	2012. 30-2	18	640	1280	+
9	2012. 32-2	16	2560	2560	++
10	2012. 35-3	43	<20	<40	-
11	2012. 37-2	19	640	1280	++
12	2012. 41-2	28	640	640	+
学生 (cont)			<20	<40	-

IgM

No.	patient.	病日	IF	IP	Dot-ELISA
1	2012. 3-2	18	1280	640	++
2	2012. 10-2	3	<20	<40	-
3	2012. 10-3	19	640	160	-
4	2012. 12-2	12	80	80	-
5	2012. 12-3	23	160	320	+
6	2012. 17-2	18	320	640	+
7	2012. 25-4	32	1280	320	++
8	2012. 30-2	18	1280	640	++
9	2012. 32-2	16	20	640	+
10	2012. 35-3	43	20	<40	-
11	2012. 37-2	19	1280	320	++
12	2012. 41-2	28	<20	80	-
学生 (cont)			<20	<40	-

表2 鹿児島県の紅斑熱血清につき IF と Dot-ELISA の検査比較

	年齢	性別	感染推定日	発病日	採血日	病日	IgG	Dot	IgM	Dot	備考
								ELISA		ELISA	
1	5	女	24.詳細不明	24.05.07	24.05.17	11	20	(-)	80	(+)	
2	71	男	24.詳細不明	24.08.04	24.08.13	10	80	(+)	160	(+)	
3	71	女	24.7.30	24.08.06	24.08.25	20	80	(+)	160	(+)	
4	59	男	24.8中旬	24.08.15	24.08.27	13	40	(+)	160	(+)	
5	39	男	24.8.6	24.08.16	24.08.30	15	40	(+)	160	(+)	
6	78	女	24.8.15	24.08.22	24.08.30	9	160	(-)	640	(-)	
7	61	女	24.8月上旬	24.08.22	24.09.04	14	20	(+)	80	(+)	
8	69	女	不明	24.08.20	24.09.21	33	640	(+)	80	(+)	
9	80	女	24.9.4	24.09.14	24.09.24	11	1280	(+)	160	(+)	
10	66	男	24.9.16	24.09.16	24.10.03	18	<20	(-)	160	(+)	
11	61	男	24.10.6	24.10.09	24.10.11	3	<20	(-)	<20	(±)	痲皮PCR+
12	66	男	24.9.16	24.09.16	24.10.17	32	20	(-)	640	(+)	
13	14	男	24.9頃	24.10.6	24.10.9	4	80	(+)	640	(+)	
14	40	女	24.11.28	24.11.29	24.12.13	15	320	(+)	1280	(+)	
15	80	女	25.4.14	25.04.14	25.05.09	26	40	(-)	40	(±)	
16	71	女	25.5.4	25.05.04	25.05.17	14	320	(+)	320	(+)	
17	82	女	25.5頃	25.05.19	25.05.20	2	<20	(-)	20	(+)	
18	80	女	25.4.14	25.04.14	25.05.23	10	160	(-)	160	(+)	
19	5	女	25.5.19	25.05.19	25.05.28	10	320	(+)	320	(+)	
20	77	男	25.5.19	25.05.31	25.06.01	2	<20	(-)	<20	(±)	
21	82	女	25.5頃	25.05.19	25.06.12	25	640	(+)	640	(+)	
22	77	女	不明	25.05.31	25.06.18	19	160	(+)	80	(+)	
23	60	女	25.8.23	25.09.02	25.09.06	5	40	(-)	<20	(-)	
24	60	女	25.8.23	25.09.02	25.09.13	12	160	(+)	160	(+)	
25	83	女	25.9.12	25.09.17	25.09.19	3	80	(-)	<20	(-)	
26	83	女	25.9.12	25.09.17	25.09.30	14	160	(+)	160	(-)	
27	74	女	25.9下旬	25.09.26	25.10.12	17	2560	(+)	2560	(+)	
28	80	女	25.10.1	25.10.03	25.10.21	19	2560	(+)	1280	(+)	
29	77	男	25.11.3	25.11.07	25.11.19	13	320	(+)	640	(+)	
30		NC						(-)	?	(-)	

表3 紅斑熱について従来の免疫染色法と Dot-ELISA 法の検査比較

紅斑熱調査地の野鼠血清 (すべてアカネズミ)					
	野鼠数	IP 法			Dot-ELISA
		Rjp	Rhv	Rtm	
三重県志摩半島	1	320	160	160	+++
	3	20	20	-	-
	3	-	-	-	-
徳島県牟岐町	1	320	320	160	++
	1	640	320	80	+
	1	20	20	-	-
	2	-	-	-	-

ProteinG使用 (-<20) Rjp:*R. japonica* Rhv:*R. helvetica* Rtm:*R. tamurae*

平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる技術・情報の体系化に関する研究
分担研究報告書

ダニ媒介感染症の調査研究における共通ツールの検討

研究代表者	安藤 秀二	国立感染症研究所ウイルス第一部
研究協力者	角坂 照貴	愛知医科大学
	藤田 博己	馬原アカリ医学研究所(研究分担者)
	高野 愛	山口大学共同獣医学部(研究分担者)
	宇田 晶彦	国立感染症研究所獣医科学部
	門馬 直太	福島県衛生研究所
	梶田 弘子	岩手県環境保健研究センター
	川端 寛樹	国立感染症研究所細菌第一部(研究分担者)

研究要旨

ダニ媒介感染症の対象疾患として、リケッチアやボレリアに加え、ウイルス性の病原体にも対応できる方法論が強く望まれる状況にある。感染源調査として重要なマダニ類からの病原体検出において、特異的な遺伝子検出は強力なツールであるが、その鑄型として従来国内で対象とされてきたリケッチア、ボレリア、アナプラズマは細菌性であるため DNA を用いていた。ウイルスも検討できる条件として、マダニ類からの抽出 RNA から得られる cDNA が鑄型となりうるカリケッチアに関し検討した。また、感染リスクを検討するためには、分布やヒトへの嗜好性を考慮する必要があるため、マダニ類の分類同定が必須である。大量のサンプルを取り扱いかつ遺伝子を増幅する作業が繰り返されるため、キャリアーやクロスコンタミネーション、また可能となった場合の迅速性を考慮して、未経験者にはハードルが高かった形態同定のためのアーカイブ作成にとりかかった。

A. 研究目的

これまで国内におけるマダニ媒介性感染症の多くはリケッチアによる日本紅斑熱、ボレリアによるライム病があり、毎年多数の患者が発生することが知られていた。しかし、新たに死亡率が高いウイルス性の病原体が報告されたことから、その自然界における存在を明らかにすることが迫られている。しかしながら、調査対象

となるマダニ自体が極めて小さい生物であるため、遺伝子検出において調査材料の有効かつ効率的取り扱いが求められている。

B. 研究方法

1. マダニ：国内で採取された両性系のフタトゲチマダニ(*Haemaphysalis longicornis*)の成虫を用いた。両性系のフタトゲチマダニは、

そのほとんどに非病原性と考えられている *Rickettsia* sp. LON-type を保有している。

2. 遺伝子増幅のための鋳型作成 : No.10 のメス刃でフタゲマダニを2分割し、半分を Puregene(QIAGEN)、残りを Isogen II(日本ジーン)を用いて、total DNA と total RNA を抽出した。RNA はさらに SuperScript® VILO(Invitrogen)を用いて cDNA にし、PCR に供した。

3. PCR : 上記で用意した DNA を鋳型に、マダニミトコンドリア遺伝子を標的とした PCR ならびにリケッチア科共通 17k Da 主要抗原遺伝子を標的とした nested PCR をおこない、直接抽出 DNA と RNA 由来 cDNA を鋳型とした増幅結果を比較した。

4. 日本産マダニ類のカラー同定アーカイブの作成 : 入手できた各種マダニ類の全体像、形態同定ポイントとなる部分拡大の写真を記録、保存した。

C. 研究結果

直接抽出 DNA と RNA 由来 cDNA を鋳型としたリケッチア遺伝子の増幅比較

表 1 に示すように、抽出確認のための house keeping 遺伝子(マダニミトコンドリア遺伝子)は、いずれの抽出鋳型作製においてもほぼ同様の結果を得たが、リケッチア特異的遺伝子である 17k Da の増幅は、RNA 由来 cDNA を鋳型とした遺伝子増幅では検出できない検体が複数あった。

日本産マダニ類のカラー同定アーカイブの作成

図 1 に示すように、色調等でも鑑別が可能であった。同一種で全ステージの個体の写真記録がそろそろよう、入手できたマダニ種、成虫雌

雄、若虫、幼虫について全体像の背腹、鑑別ポイントの部分拡大像の撮影を進めている。

D. 考察

これまで国内におけるマダニ媒介性感染症の多くはリケッチアによる日本紅斑熱、ボレリアによるライム病があり、毎年多数の患者が発生することが知られていた。しかし、新たに死亡率が高いウイルス性の病原体が報告されたことから、その自然界における存在を明らかにすることが迫られているが、調査対象となるマダニ自体が極めて小さい生物であるため、リケッチアやボレリアと同時にウイルス性の病原体にも対応できる方法論が強く望まれ、遺伝子検出において調査材料の有効かつ効率的取り扱いが重要となる状況にある。

感染源調査として重要なマダニ類からの病原体検出において、特異的な遺伝子検出は強力なツールであるが、その鋳型として従来国内で対象とされてきたリケッチア、ボレリア、アナプラズマは細菌性であるため DNA を用いていた。ウイルスも検討できる条件として、マダニ類からの抽出 RNA から得られる cDNA が鋳型となりうるカリケッチアに関し検討したが、リケッチア特異的遺伝子である 17k Da 遺伝子の増幅は、RNA 由来 cDNA を鋳型とした増幅では検出できない検体が複数あった。リケッチアに関しては極めて微量で検出できる系や mRNA として多量に発現している遺伝子配列を標的とした増幅系を新たに構築する必要があるが、国内外のマダニは極めて多様なリケッチア種を保有していることから、遺伝子情報が蓄積されている遺伝子配列を標的とした従来の PCR 系が実施できないと、検出できても、どのようなリケッチアであるかが不明のままになる可能性が高い。このことから、抽出法ならびに