

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)  
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班  
分担研究報告書

リケッチア・レファレンスセンターの2017年度活動

研究分担者 安藤秀二 国立感染症研究所ウイルス第一部 室長

研究協力者 鈴木理恵 福島県衛生研究所  
坂 恭平 青森県環境保健センター  
平良雅克 千葉県衛生研究所  
長島真美 東京都健康安全研究センター  
赤地重宏 三重県保健環境研究所  
名古屋真由美, 佐賀由美子 富山県衛生研究所  
寺杣文男 和歌山県環境衛生研究センター  
近平雅嗣 兵庫県健康生活科学研究所健康科学研究センター  
木田浩司, 岸本寿男 岡山県環境保健センター  
島津幸枝 広島県立総合技術研究所保健環境センター  
戸梶彰彦 高知県衛生研究所  
御供田睦代, 山本真美 鹿児島県環境保健センター  
野町太朗 宮崎県衛生環境研究所  
佐藤寛子 秋田県健康環境センター  
大橋典男, 川森文彦 静岡県立大学

研究要旨 日本紅斑熱を含む紅斑熱群リケッチアとつつが虫病を検出可能なDuplex Real time PCRについて臨床検体を用いてリ多施設間評価を実施、成果を学術誌に投稿、採択された。今後のラボスクリーニングが飛躍的に改善することが期待される。また、前年度と同様、全国情報の共有やブロック研修会に協力した。

A. 研究目的

つつが虫病, 日本紅斑熱などリケッチア症は, 国内感染患者が多数報告され, 死亡例, 重症化例もいまだ発生する。発生時期やつつが虫病血清型が地域によって異なり, 診断用抗原の選択など地域状況に即した対応が必要となる。また BSL3 を要する取扱い, 特定病原体指定などから, 検査担当者の異動に伴う変更を行い難い。地方衛生研究所(以下, 衛研)を中心とした地域, 全国ラボネットワーク構築方法の検討することは, 臨床に即したリケッチア症の迅速対応と情報発信が可能で, 患者QOL に資することになる。

本研究では, リケッチア・レファレンスセンターの活動を通じ, リケッチア症の診断と病原体サーベイランスに必要な実験室診断系の

質的標準化, 疫学情報の発信, 相互信頼と連携, 機能強化を目的とする。

B. 研究方法

1. 紅斑熱群リケッチアとつつが虫病リケッチアを標的とした Duplex Real time PCR の地方衛生研究所での検討

開発衛研(静岡県)と感染研に保有する各種紅斑熱群リケッチアとつつが虫病標準株を用いて特異性と汎用性を検討し, 良好な結果を得てきた。本年度さらに, 既報の conventional nested PCR との感度比較を精査するとともに, ブロックレファレンスセンターを中心とした患者報告が多い複数の衛研の協力のもと, 複数の検出機器 (ABI7500, ABI StepOnePlus, Lightcycler 480, Lightcycler Nano)ならびに試

薬 (Premix Ex Taq (Perfect Real Time), LightCycler Probes Master)を組み合わせ、臨床検体への適用性について検討した。

## 2. リケッチア症に関する国内情報収集

地衛研の年報等は、地域性の強いリケッチア症に関連の情報が多い。施設間情報共有のための資料収集とリスト化を試みた。

## 3. レファレンスセンター担当者のスキルアップと情報交換

センター会議、ブロック会議等を通じ、各所の問題点ならびに情報交換を行うとともに、技術研修などにより担当者の相互連携とお互いの顔が見えるつながりの構築を図った。

(倫理面からの配慮について)

臨床検体の取り扱いについては、核施設の検査と並行し、それぞれの施設の取り扱い規則に従って実施した。

## C. 研究結果

### 1. 紅斑熱群リケッチアとつつが虫病リケッチアを標的とした Duplex Real time PCR の地方衛生研究所での検討

臨床検体を用いた Duplex Real time PCR は、既報の conventional nested PCR と比較し、同等以上の検出結果を示した(表1)。また、供試した検出機器並びに試薬の組み合わせにおいても同等の結果を示した。さらに、感染細胞の希釈列を用いた比較においても同等の検出感度を示した(data not shown)。しかしながら、血清抗体価の上昇を確認しえた症例のなかで、一部いずれの遺伝子検出系でもリケッチアの遺伝子を検出できない症例も認められた。

### 2. リケッチア症に関する国内情報収集(表2)

地衛研の年報等は、地域性の強いリケッチア症に関連の情報が多いことから、全国の衛研の年報についてリケッチア関連情報を過去に遡って抽出した。現在では国内で認められ

ない発疹チフスに関する情報を含め、一般の学術誌では認められない情報、また、ライム病をはじめ、リケッチアと同様に節足動物によって媒介される様々な感染症に関する情報が網羅されていた。

### 3. レファレンスセンター担当者のスキルアップと情報交換

レファレンスセンター会議、研究会、研修会を通じ、全国とそれぞれの地域の発生状況情報の共有、他のダニ媒介性感染症との類症鑑別の問題点等の情報交換を行い、臨床現場と直結する衛研のリケッチア検査対応の情報更新の準備を行った。また、九州ブロックにおいて開催された地方衛生研究所のリケッチア診断技術研修会(7/24-26、鹿児島県環境保健センター)の取り組みに協力、参加した。

## D. 考察

より詳細な評価を行えた紅斑熱群リケッチアとつつが虫病リケッチアを標的とした Duplex Real time PCR は、既存の PCR と遜色ない検出感度を示した。このことから、本法が学術誌に掲載されることは、国内のダニ媒介感染症の多様化する中、*R. japonica*, *R. heilongjiangensis*, *R. tamurae*, *R. helvetica*等の国内の紅斑熱群リケッチア症の多様性やつつが虫病 *Orientia* の多様性(最低6型)が増す中、輸入感染症(*O. tsutsugamushi*, *R. africae*, *R. conorii*, *R. australis*, *Cand. R. indica*等)も検出可能であることから、衛研でのスクリーニングに強力なツールとなり、迅速な情報発信につながることを期待される。

しかしながら、遺伝子検出系の改善・構築により多くの衛研での検査実施の可能性が広がるものの、PCRの検体としてもっとも有効な刺し口が見つからないなど一部の症例ではなお血清診断に頼らざるを得ない症例も存在する。これらも含め、リケッチア関連疾患実験室診断の

体系的な構築はなおも改善の余地があり、今後他の関連疾患も含めた検査体制作りと情報の整理、各機関の密な連携が必要と考えられる。

#### E. 結論

紅斑熱群リケッチアとつつが虫病リケッチアのマルチプレックスリアルタイムPCRは、従来法と比較しても十分な結果がえられ、試薬の準備等の簡便さからも、国内のリケッチア症実験室診断の迅速なスクリーニング系として期待できる。

一方、国内での多様性ととも、地域特性の強いリケッチア症の対応においては、スキル維持が困難となっている衛研と情報共有のためにもレファレンスセンターの維持が必要である。今後、リケッチア性疾患とその他の関連疾患の実験室診断のより効果的な体系化のために、既存のリケッチア関連疾患実験室診断の体系化、検査機関情報の更新(リケッチアの検査に関する情報の更新と臨床現場への還元)、課題の洗い出しを継続検討していく。

#### F. 健康危険情報

レファレンスセンターを中心に、リケッチア症に関する情報発信を試みるも、死亡例が発生している。迅速な治療につながる情報発信の難しさが示される。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Kawamori F, Shimazu Y, Sato H, Monma N, Ikegaya A, Yamamoto S, Fujita H, Morita H, Tamaki Y, Su H, Shimada M, Takamoto N, Shimamura Y, Masuda S, Ando S, Ohashi N : Evaluation of Diagnostic Assay for Rickettsioses Using Duplex Real-Time PCR in Multiple

Laboratories in Japan. Japanese journal of Infectious Diseases. (in press)

2. 佐藤寛子、村井博宜、石田晋之介、藤田博己、安藤匡子、安藤秀二：秋田県のマダニ刺咬 3 症例における紅斑熱群リケッチア感染の検索。衛生動物学雑誌(印刷中)
3. 安藤秀二：リケッチア、中込治監修、神谷茂・錫谷達夫編集 標準微生物学 第 13 版、p262-270, 2018 年
4. 安藤秀二：発疹チフス epidemic typhus. 特集「グローバル化・温暖化と感染症対策」、小児科臨床増刊号、vol. 70: 2261-2266, 日本小児医事出版社、東京、2017 年

##### 学会発表

1. 佐藤寛子、藤田博己、安藤秀二：秋田県のツキノワグマと刺咬マダニのリケッチア検索。第24回リケッチア研究会、2017年12月2-3日、東京
2. 木下一美、安藤秀二、砂川富正、大石和徳：感染症発生動向調査における「つつが虫病」と「日本紅斑熱」届出報告の検討。第24回リケッチア研究会、2017年12月2-3日、東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

表1

Detection assays of *O. tsutsugamushi* (Ot) and *R. japonica* (Rj) DNAs from febrile patients by Ot-Rj-duplex real-time PCR, conventional PCRs, and serological tests in 6-endemic prefectures of Japan, 1997-2016

Location (year)	Total nos. of febrile patients tested	Laboratory tested <sup>1)</sup>	Ot				Rj				Ot-Rj-duplex real-time PCR	Range of Cq value	
			Ot-Rj-duplex real-time PCR	Conventional PCRs <sup>2)</sup>	Serological test of IFA <sup>3)</sup> or IPA <sup>4)</sup>	Nos. of patients diagnosed/total patients tested (%) <sup>5)</sup>	Ot-Rj-duplex real-time PCR	Conventional PCRs <sup>2)</sup>		Serological test of IFA <sup>3)</sup> or IPA <sup>4)</sup>			Nos. of patients diagnosed/total patients tested (%) <sup>5)</sup>
								Nos. of positive/patients tested (%)	Nos. of positive/patients tested (%)				
Akita (1997-2015)	33	秋田県	33/33 (100)	33/33 (100) <sup>6)</sup>	18/33 (55%) <sup>6)</sup>	33/33 (100)	0/33	NT <sup>10)</sup>	NT	NT	0/33	24.4-37.7	
Fukushima (2010-2013)	67	福島県	64/67 (96)	67/67 (100) <sup>6)</sup>	67/67 (100) <sup>6)</sup>	67/67 (100)	0/67	NT	NT	NT	0/67	21.6-41.0	
Shizuoka (2010-2016)	28	静岡県	18/28 (64)	18/28 (64)	21/28 (75) <sup>3)</sup>	21/28 (75)	3/28 (11) <sup>8)</sup>	NT	NT	3/28 (11)	4/28 (14)	27.9-40.0	
Wakayama (2008-2012)	22	静岡県	3/22 (14)	3/22 (14)	3/22 (14) <sup>3)</sup>	3/22 (14)	9/22 (41)	5/22 (23)	5/22 (23)	12/22 (55) <sup>9)</sup>	12/22 (55)	21.3-40.1	
Miyazaki (2008-2009)	28	静岡県	11/28 (39)	11/28 (39)	11/28 (39) <sup>3)</sup>	11/28 (39)	7/28 (25)	2/28 (7)	2/28 (7)	9/28 (32) <sup>3)</sup>	9/28 (32)	22.6-41.0	
Subtotal <sup>7)</sup>			129/178 (72)	132/178 (74)	120/178 (67)	135/178 (76)	16/50 (32)	7/50 (14)	7/50 (14)	21/50 (42)	21/50 (42)		
Hiroshima (2013-2015)	139	HPTRI	6/139 (4) <sup>8)</sup>	6/33 (18)	2/13 (15) <sup>3)</sup>	6/139 (4)	55/139 (40) <sup>8)</sup>	12/31 (39)	54/102 (53)	4/13 (31) <sup>3)</sup>	56/139 (40)	22.0-37.9	
Total	317		135/317 (43)			141/317 (44)	74/317 (23)				81/317 (26)		

<sup>1)</sup> Conventional PCRs were performed by the procedures of previous studies: Ot-nested PCR (9, 13), Rj-double PCR (10), and SFGR-double PCR (6).  
<sup>2)</sup> Assayed by indirect immunofluorescent assays (IFA; potentially positive of more than 40 antibody titer).  
<sup>3)</sup> Assayed by indirect immunoperoxidase assays (IPA; potentially positive of more than 80 antibody titer).  
<sup>4)</sup> Final results of rickettsiosis determined by a combination of Ot-Rj-duplex real-time PCR, conventional PCRs, and/or serological tests (IFA or IPA).  
<sup>5)</sup> Ot-nested PCR was done by some modifications to improve the low detection efficiency of *O. tsutsugamushi* Shimokoshi strain as described previously.  
<sup>6)</sup> The subunit consisting of confirmed cases of rickettsiosis was obtained for statistics analysis as shown in Table 5.  
<sup>7)</sup> The subunit consisting of confirmed cases of rickettsiosis was obtained for statistics analysis as shown in Table 5.  
<sup>8)</sup> Ot-Rj-duplex real-time PCR was used for diagnosis in clinically suspected cases of rickettsiosis.

**Instrument:**

- ABI7500
- ABI StepOnePlus
- LightCycler 480 (Roche)
- LightCycler Nano (Roche)

**Reagents:**

- Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (TAKARA BIO)
- LightCycler 480 Probes Master (NIPPON Genetics)

表2

年報名	No.(年報)	タイトル
北海道立衛生研究所報 (1951~2016)	04(1954)	腸管チフス
	07(1957)	ネズミシラミ
	08(1958)	北海道1956年恙虫
	08(1958)	北海道の新しい恙虫種
	08(1958)	札幌島のシラミ類
	09(1959)	札幌島野鼠の吸血性外部寄生虫相
	09(1959)	北海道リス上科のシラミ類
	09(1959)	北海道吸血性昆虫類(7)
	09(1959)	恙虫幼虫の真実ネコツツガムシ
	10(1960)	北海道野鼠類
	10(1960)	恙虫幼虫の真実 道産Miyazaki群及びAutumnalis群
	11(1961)	エンシカ
	11(1961)	北海道ナキウサギのツツガムシおよびシラミ
	11(1961)	北海道吸血性昆虫類2
	11(1961)	北海道吸血性昆虫類3
	12(1962)	Rickettsia orientalisの免疫1
	13(1963)	北海道の野鼠と体外寄生虫よりリケッチア分
	13(1963)	北海道新記録のツツガムシの一種 Ascoschoenastia sp.について
	14(1964)	Rickettsia orientalisの免疫2
	14(1964)	北海道における鼠害
	15(1965)	エゾモモンガ (Peromyscus volans orii) の害類
	16(1966)	北海道における野鼠寄生マダニ類
	17(1967)	Ritt Valley熱の第1編
	17(1967)	Ritt Valley熱の第2編
	17(1967)	Ritt Valley熱の第3編
	17(1967)	北海道野鼠類2
	18(1968)	北海道における食品昆虫類記録(1959~1967)
	18(1968)	北海道における不快動物発生例
	18(1968)	北海道における野鼠寄生シラミ類
	18(1968)	北海道における野鼠寄生トグダニ類
	18(1968)	北海道に発生した野鼠病
	19(1969)	北海道のネズミに寄生するケモチダニ
	20(1970)	家屋寄虫
	20(1970)	佐呂間町シラミ力
	20(1970)	北海道カリネズミ寄生ノミ類
	21(1971)	野鼠害類に関する知見補遺10
	21(1971)	北海道産鼠目2
	22(1972)	北海道産鼠目2
	23(1973)	東北地方北部における野鼠のシラミ類
	23(1973)	北海道におけるシラミダニ
	23(1973)	野幌森林公園における野鼠の外部寄生虫類
	29(1979)	アカネズミ類の飼育と実験動物化
	30(1980)	北海道小哺乳類の外部寄生虫類
	31(1981)	北海道における恙虫病調査小哺乳類からの恙虫病リケッチア分離
	32(1982)	北海道におけるカマムラサキとツツガムシ分布
	35(1985)	エノリス外部寄生虫
	35(1985)	道産野ネズミのツツガムシ病リケッチア株
	38(1988)	美瑛管内動物によるツツガムシの生活史の研究3
	40(1990)	Cases of Erythema and Lyme Disease Associated with Tick Bite in Hokkaido, Japan
	41(1991)	森林作業者のマダニ刺咬と Borrelia burgdorferi に対する抗体
	42(1992)	Antigenic Properties of Borrelia burgdorferi Isolated in Hokkaido
	42(1992)	Serological Survey for Lyme Disease Sika Deer
	43(1993)	北海道におけるアタマシラミ
	46(1996)	エンシカ寄生マダニ類