

平成28-30年度
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, 福田 現 青森県環境保健センター
平良雅克 千葉県衛生研究所
山本徳栄 埼玉県衛生研究所
長嶋真美, 新開敬行 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
寺杉文男 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, 松本道明 高知県衛生研究所
御供田睦代, 山本真美, 中堂園文子 鹿児島県環境保健センター
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：増え続ける日本紅斑熱をはじめリケッチア症の強い地域特性，国内外の多様性を考慮し，本研究では全国ブロックの横系となる地方衛生研究所のリケッチア・レファレンスセンターを中心とした全国共通基盤の構築を目指している。レファレンスセンター会議等において，リケッチア症の疫学，診断法の情報のアップデートによる全国の担当施設を中心に情報・技術の普及をおこなった。

ネットワークで評価検討したマルチプレックス・リアルタイムPCRは，紅斑熱群とつつが虫病の臨床材料による評価でも良好な結果を得た。多施設間評価を実施後，成果を学術誌に公開，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ている。既存の検査系とともにリケッチア関連実験室診断の体系化し，情報発信，情報共有とともに課題の洗い出しを行い，遺伝子診断のスクリーニング系に関しては非特異的な偽陽性などの課題情報が収集された。次の課題として検討を開始している。

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。つつが虫病は発生時期や地域が血清型によって異なり，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。またリケッチア性病原体は，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が行い難い。地方衛生研究所（以下，地衛研）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となる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

平成28年

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マルチプレックス・リアルタイム PCR の地衛研での検討

開発した地衛研(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。ブロックレファレンスエンターを中心とした患者報告が多い複数の地衛研の協力のものと、臨床検体への適用性について検討した。

2. 発疹チフス群リケッチア用 Probe の検討

検討したマルチプレックス・リアルタイム PCR は一組のプライマーに紅斑熱群用とつつが虫病用それぞれのプローブを加えただけで、国内のリケッチア症への汎用性が高いことが期待された。ここに新たに発疹チフス群用のプローブを加えることにより、すべてのリケッチア科病原体を網羅できるシステムができるようプローブの設計と評価を試みた。

平成29年

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 の地衛研での検討

開発評価中のリアルタイム PCR (Duplex) と既報の conventional nested

PCR の感度比較を精査するとともに、ブロックレファレンスエ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のと、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を検討した。

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した情報が多い。施設間情報共有のための資料収集とリスト化を試みた。

平成 30 年

1. リケッチア症実験室診断の体系化

平成 29 年度までに開発、評価を行ってきた紅斑熱群リケッチア症とつつが虫の Duplex Real time PCR をスクリーニング系とし、既報の遺伝子検出法、血清診断法等を組み合わせた体系的なリケッチア症の実験室診断法の構築を行った。さらに、レファレンスセンター担当者との情報交換の中で、診断系の問題、課題の抽出を試みた。

平成 28~30 年

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、各施設の検査と並行し、それぞれの施設の取り扱いによって行った。

C. 研究結果

平成 28 年

1. マルチプレックス・リアルタイム PCR の地衛研での検討

6 施設の協力を得、既法の conventional PCR，日本紅斑熱を標的としたリアルタイム PCR，血清診断等の結果と比較し，ほぼ同等以上の検出率の結果が得られた。

2. 発疹チフス群リケッチア用 Probe の検討

紅斑熱群リケッチアとつつが虫病のマルチプレックスの標的領域においては設計した発疹チフス群の候補プローブはいずれも標準株の発疹チフス群リケッチアを検出できなかった。

平成 29 年

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 の地衛研での検討

既報の conventional nested PCR と比較し，臨床検体を用いた Duplex Real time PCR は，同等以上の検出結果を示し，供試した検出機器と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。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，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一部認められた。

2. リケッチア症に関する国内情報収集

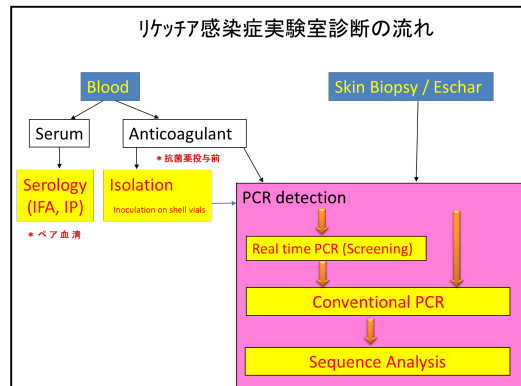
地衛研の年報等は，地域性の強いリケッチア症に関連の情報が多ことから，全国の地衛研の年報についてリケッチア関連情報を過去に遡って抽出した。現在では国内で認められない発疹チフスに関する情報を含め，一般の学術誌では認められない情報，また，ライム病をはじめ，リケッチアと同様に節足動物によ

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。

平成 30 年

1. リケッチア症実験室診断の体系化

図に示すように，遺伝子検出系におけるスクリーニング系ならび確定方法，既存の血清診断法のフローを示し，各所の地衛研において実施が始められた。あわせて，一部の地衛研で実施された評価段階よりさらに多数の臨床検体に適用することにより課題の洗い出しを進め，各検出系の非特異等と考えられるケースや，表在菌との反応などいくつかの課題もスクリーニング系において報告された。



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(平成 28～30 年)

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地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(平成 29 年 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

日本紅斑熱，つつが虫病を中心とした国内のリケッチア症は，患者数，発生地域ともに拡大している。臨床現場に近い，地衛研での実験室診断体制の維持・強化は重要性を増している。紅斑熱群リケッチアでは，*R. heilongjiangensis* による極東紅斑熱，*R. tamurae* 感染症例，*R. helvetica* 感染疑似症例等の発生，つつが虫病では標準株 Karp，Kato，Gilliam，Kawasaki，Kuroki に加え，地域が限定されていた Shimokoshi 株の患者発生地域の広がりなどが報告されるようになった。

複数の地衛研による臨床検体への適用性の検討から，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，従来法と比較して遜色ない検出感度を示すなど十分な結果が得られ，試薬の準備等の簡便さからも使いやすい系であることが示された。さらに，輸入リケッチア症への対応の必要性から，*O. tsutsugamushi*，*R. africae*，*R. conorii*，*R. australis*，*Cand. R. indica* 等も検出可能であることから，評価した系は地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事が期待される。

リケッチア症の実験室診断系の体系を再構築，実施と情報交換の中で，診断系の問題，課題の抽出を試み，非特異と考えられるケースなどいくつかの課題もスクリーニング系において報告されたが，スクリーニング系で使用した 16S rRNA を標的とした検出系の場合，一般に非特異が出やすいともされている。急性期検体を検査材料としたリケッチア症の遺伝子検出系では，検体中のリケッチア遺伝子が極めて少ないこと，抗菌薬投与前でも血液中では極めて短期間しか検出しえないことが従来より分かって

いる。報告された問題や課題を共有し，あくまでもスクリーニング系という意味で，簡便性のメリットが勝ると考える。多様なリケッチア症をとりこぼしなく診断し，適切な治療につながるような情報を現場に提供するうえでもメリットがあると考えている。実際，海外でも症例が少なく，症例として明確に確立しておらずまだ十分な検討が難しい紅斑熱群リケッチア症の可能性を示す症例もスクリーニング系から浮かび上がってきており，現在詳細な検討が進められている。

ブロック地衛研によるリケッチア・レファレンスセンターの目的は，標準株，分離株の維持（リスク分散），診断用抗原並びに PCR 陽性コントロールの分担作製と供給，実験室診断技術の相互評価（技術の維持），新規診断法等の相互評価（標準化），疫学情報，診断情報の収集・分析と共有，緊急時のバックアップ体制，検査マニュアルの作成，改訂，検査技術の研修，地域ごとの課題対応（調査，特定ツールの検討），その他（個々の担当者のスキルアップ）等が挙げられ，診断系の評価や情報交換から，機能が全国の横系として機能しており，その維持の仕方についてもさらに検討していく必要がある。

E．結論

リケッチア・レファレンスセンターは，患者数の増加とともに多様な鑑別対象疾患からも重要性がさらに増している。近年，国内でも SFTS をはじめ複数のダニ媒介感染症が報告され，輸入症例でもデング熱をはじめとする様々な節足動物媒介感染症が報告される。リケッチア症はこれらの疾患との鑑別も重要であり，特定の疾患にとらわれず適切な診断が遅滞なく行われるよう

より網羅的な診断体制が現場で構築できる
よう情報発信においても一層の検討が求め
られている。

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
難しさが示されている。

G . 研究発表

論文発表

1. Satoh M, Akashi S, Ogawa M, Wakeyama T, Ogawa H, Fukuma A, Taniguchi S, Tani H, Kurosu T, Fukushi S, Shimojima M, Ando S, Saijo M: Retrospective survey of severe fever with thrombocytopenia syndrome in patients with suspected rickettsiosis in Japan. *J. Infect. Chemother.*, 23: 34-50, 2017
2. 佐藤寛子, 柴田ちひろ, 秋野和華子, 斎藤博之, 齊藤志保子, 門馬直太, 東海林彰, 高橋守, 藤田博己, 角坂照貴, 高田伸弘, 川端寛樹, 安藤秀二: 秋田県雄物川流域におけるアカツツガムシ生息調査 (2011年~2014年), 衛生動物学会誌, 67(3): 167-175, 2016
3. 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
4. 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
5. 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. *Jpn J Infect Dis.* 2018 Jul 24; 71(4): 267-273.

6. 安藤秀二: つつが虫病とは . 新薬と臨床, 67(10):70-74(1246-1250) , 2018年
7. 安藤秀二: マダニ媒介性の日本紅斑熱と紅斑熱群リケッチア症 . 人と動物の共通感染症研究会ニューズレター , 17: 9-12 , 2018年
8. 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 . 69(2) : 49-54 , 2018年
9. 佐藤(大久保)梢, 高野愛, 高娃, 安藤秀二, 川端寛樹: ダニ媒介性感染症-国内に常在する感染症を主に-. 衛生動物学会誌 (in press)

学会発表

1. 安藤秀二: ダニ媒介感染~リケッチア症, 平成28年度希少感染症診断技術研修会, 2017年2月21~22日, 東京
2. 安藤秀二, 成田雅: リケッチア研究会情報update~リケッチア症の発生状況とトピックスのレビュー, 第23回リケッチア研究会, 2016年12月3-4日, 東京
3. 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

4. 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
5. 佐藤優貴子, Putu Eka Sudaryatma, 桐野有美, 山本正悟, 安藤秀二, 後藤義孝, 岡林環樹:「宮崎県で採集されたマダニと野生動物からの重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分離」第67回九州地区獣医師大会並びに平成30年度獣医学術九州地区学会, 2018年10月14日, 福岡
6. 桐野有美, 野町太郎, 山本正悟, 安藤秀二, 岡林環樹:「宮崎県の野生動物における重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルス感染状況調査」第1回SFTS研究会, 2018年9月8-9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