

## 日本紅斑熱の遺伝子検査法の確立及び愛媛県内におけるマダニの日本紅斑熱リケッチア保有状況

豊嶋千俊 山下まゆみ 岩城洋己 山下育孝 滝山広志  
越智晶絵\*1 青野学\*2 四宮博人

Keywords : Japanese spotted fever, *Rickettsia japonica*, Duplex Real-Time PCR, Ticks

日本紅斑熱は日本紅斑熱リケッチア (*Rickettsia japonica*) を病原体とするマダニ媒介感染症である。患者数は全国的に増加傾向で、患者の増加・拡大を防止するためには、迅速かつ高感度な遺伝子検査による診断体制を構築するとともに、日本紅斑熱リケッチア保有マダニの種類や保有率等の最新の状況を明らかにすることが重要である。このことから、ヒト及びマダニそれぞれから、日本紅斑熱リケッチアを高感度かつ特異的に検出できる遺伝子検査方法を確立するとともに、マダニの日本紅斑熱リケッチア保有状況調査を行った。ヒトの臨床検体からの検出に関しては、DuplexリアルタイムPCR系によりスクリーニングを行い、陽性の場合にはシーケンスにより確定する方法を採用し、12事例の疑い患者検体について試験を行った結果、6事例から日本紅斑熱リケッチア遺伝子が検出された。マダニの日本紅斑熱リケッチア保有状況調査については、県内7地点で年4回、計1,640匹のマダニを採取・分類の上、リケッチア属共通の17kDa蛋白質をコードする遺伝子を標的とするNested PCR法にて検出を行った結果、日本紅斑熱リケッチアは検出されなかったが、他の紅斑熱群リケッチアが56検体から検出された。

### はじめに

日本紅斑熱は、日本紅斑熱リケッチア (*Rickettsia japonica*) を病原体とするマダニ媒介感染症で、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(感染症法)で、四類感染症に分類されている。

1984年に徳島県で初めて患者が確認され<sup>1)</sup>、その後、全国的に患者数が増加し、発生地域も拡大している<sup>2)</sup>。本県においては、2003年8月に初めて患者が確認され、それ以降患者数は増加傾向にあり(図1)、患者発生地域も拡大している<sup>3)</sup>。

日本紅斑熱は、高熱や発疹を主訴とし、治療が遅れると重症化し、播種性血管内凝固症候群(DIC)や多臓器不全に陥り、死に至る場合がある<sup>2)</sup>。しかし、当所で主に行わ

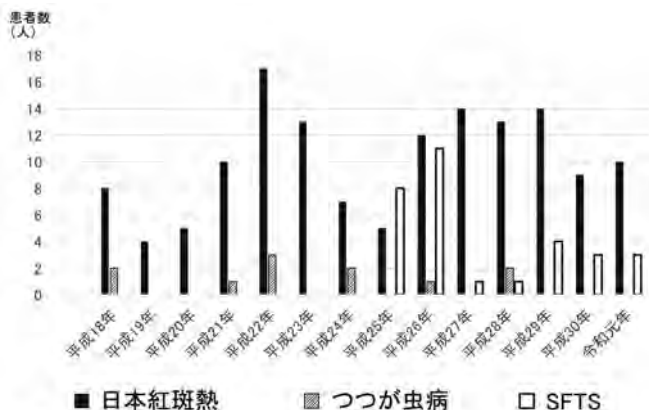


図1 愛媛県内のマダニ感染症(日本紅斑熱, つつが虫病, SFTS\*)届出状況  
※重症熱性血小板減少症候群

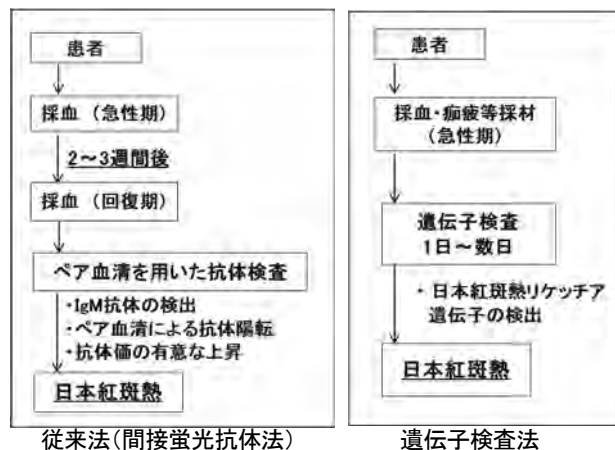


図2 日本紅斑熱検査診断の流れ

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町8丁目234番地

\*1 愛媛県保健福祉部健康衛生局薬務衛生課

\*2 愛媛県八幡浜保健所

れてきた抗体検査法は急性期と回復期のペア血清による診断が基本であり、結果的に判定までに20日程度を要することとなる。このことから、迅速に診断できる遺伝子検査法による体制を早期に確立させる必要があった(図2)。

また、日本紅斑熱は日本紅斑熱リケッチア保有マダニに咬まれることにより感染するため、マダニが保有している日本紅斑熱リケッチアを高感度に検出できる遺伝子検査法を確立させ、マダニの日本紅斑熱リケッチア保有状況の現状を正確に把握することは、患者の増加・拡大を防止するために重要である。

そこで、日本紅斑熱遺伝子検査法に関し、ヒト及びマダニそれぞれの検体からの検出法について、複数の方法において特異度や感度及び再現性等の確認を行い、日本紅斑熱リケッチアを高感度かつ特異的に検出できる方法を確立させるとともに、マダニの日本紅斑熱リケッチア保有状況調査として、定点7地点において年4回マダニを採取し、マダニの分類及びリケッチア検出を試みたので報告する。

## 材料と方法

### 1 日本紅斑熱疑い患者検体からの日本紅斑熱リケッチア

### の遺伝子学的検査法の検討

日本紅斑熱リケッチア遺伝子の検出には、リケッチア属に共通の17kDa蛋白質をコードする遺伝子を標的としたNested PCR法やリアルタイムPCR法等が報告されているが、より早く結果が判明するリアルタイムPCR法による検査体制の確立を図るため、既に報告されている216 bp open reading frame(ORF)遺伝子をターゲットとした日本紅斑熱リケッチアを特異的に検出するとされている方法(SpRija系)及び、近年、他の地方衛生研究所で検討が進んでいた、16S rRNAをターゲットとした紅斑熱群リケッチアとつつが虫病リケッチア(*Orientia tsutsugamushi*)の両方が検出可能なDuplexリアルタイム系の2つの系について、感度等を比較するとともに、当所に整備されているリアルタイムPCR機器での最適な条件の検討を行った。なお、感度比較用陽性コントロールとして、平成24年度配布のSpRija系用陽性コントロールプラスミド( $10^4 \sim 10^1$  copies / 9  $\mu$ Lとなるよう階段希釈)及び高知県衛生研究所分与の陽性検体DNA3検体(コピー数不明)を使用した。また、リアルタイムPCR法だけでは日本紅斑熱リケッチアと確定させることが困難なことも想定されたため、シーケンスの実施を考慮し、リケッチア属共通の17kDa蛋白質をコードする遺伝

表1 本研究で検討を行った遺伝子検出系

検出系	使用プライマー等	文献
リアルタイムPCR	【SpRija系】	
	・プライマー	
	SpRija5' : 5'- GAACACGATGATACACCTCTGCA -3'	4)
	SpRija3' : 5'- GATTAGCCTCTGTCTTCAGTAGTATTTAACT -3'	5)
	・TaqMan MGB probe	
	SpRijaMGB : 5'- (FAM)- TAGCGTCTATTCTAAGTAAAG -(MGB) -3'	
リアルタイムPCR	【Duplex系】	
	・プライマー(つつが虫, 紅斑熱群共通)	
	OR-F : 5'- GGAGCATGCGGTTTAATTCG -3'	
	OR-R : 5'- GCCATGCAACACCTGTGTGT-3'	6)
	・TaqMan MGB probe	
	(日本紅斑熱: <i>R.japonica</i> ) Rj-VIC : 5'- (VIC)- CGGATCGCAGAGATG -(MGB)-3'	7)
(つつが虫: <i>O. tsutsugamushi</i> ) Ot-FAM :5'- (FAM)- AATGGAGACATTTTTCTTC -(MGB)-3'		
コンベンショナルPCR	・1st PCR(リケッチア属共通)	
	R1 : TCAATTCACAACCTTGCCATT	
	R2 : TTTACAAAATTCTAAAAACC	8)
	・Nested PCR(リケッチア属共通)	
	Rr17.61p : GCTCTTGCAACTTCTATGTT	9)
	Rr17.492n : CATTGTTTCGTCAGGTTGGCG	10)
もしくは(以前は日本紅斑熱特異的とされていた)		
R5 : CGCCATTCTACGTTACTACC		
R10:ATTCTAAAAACCATATACTG		

子を標的としたNested PCR法についても併せて検討を行った(表1).

### 2 マダニ検体からの日本紅斑熱リケッチア遺伝子検査法の検討

マダニが保有しているリケッチアはごく微量であること、更には日本紅斑熱リケッチアと近縁のリケッチアが国内に存在することが報告されていることから、ヒトと同様のリアルタイムPCR法の適用も考慮に入れつつ、リケッチア属共通の17kDa蛋白質をコードする遺伝子を標的としたNested PCR法を基本に検討を行った。なお、マダニからのDNA抽出法は図3のとおり行った。

### 3 日本紅斑熱疑いの臨床検体を用いた日本紅斑熱リケッチア遺伝子検査

1で選定した遺伝子検査法で、日本紅斑熱疑いの臨床検体を用いた日本紅斑熱リケッチア遺伝子検査を実施した。検査材料として、血液凝固剤入り全血及びダニ刺し口の痲痲(刺し口が確認できた場合)及び皮疹を供試した。なお、全血はバフィーコート分画を用いた。また、各検体からのリケッチアDNA抽出はキアゲン社のキット(QIAamp DNA mini Kit, QIAamp DNA Blood Mini Kit)を使用した。

平成30年度に、管轄保健所を通じて、従来より日本紅斑熱の検査依頼の多かった医療機関に感染症発生動向調査事業の一環として痲痲検体の提供を依頼したが、日本紅斑熱の届出自体が少なく、検査に供することのできた検体は2事例4検体であった。より多くの検体を確保するため、令和元年度に、愛媛県立衛生環境研究所倫理審査委員会の承認を得たうえで、広く県内医療機関に対し協力を依頼し、承諾を得た医療機関で、通常の診療行

為・検査において日本紅斑熱が疑われ、かつ、検体提供の協力が得られた患者の臨床検体も含め、10事例(痲痲・皮疹7検体及び血液9検体)を供試した。

### 4 県内のマダニ相及び日本紅斑熱リケッチア保有状況調査

マダニはフランネル布を用いた旗づり法にて採取した。平成29年度に、患者が多く発生している中南予地域を中心に計5地点においてマダニを100匹程度採取し、一部は遺伝子検査法の検討材料とするとともに、次年度以降の調査定点設定の基礎資料とした。

平成30年度は、平成29年度の予備調査をもとに、宇和島市、大洲市、伊予市双海、松山市(旧北条)、久万高原町、今治市及び新居浜市の計7地点を定点採取地点に選定し(図4)、春季、夏季、秋季の3シーズン1回ずつ各地点でマダニを試験的に採取の上、分類の習熟を行った。なお、マダニの分類にあたっては、馬原アカリ医学研究所の藤田博己先生にご指導いただいた。令和元年度は、上記定点において、5~6月(春)、7~9月(夏)、10~11月(秋)及び2~3月(冬)の4回、計1,640匹のマダニを採取し、分類及びリケッチア検出を行った。

## 結果及び考察

### 1 日本紅斑熱疑い患者検体からの日本紅斑熱リケッチアの遺伝子学的検査法の検討

表2に、リアルタイムPCR 2つの系の感度比較を示した。Duplex系はSpRija系と比べ、陽性コントロールと高知県分与の低濃度検体いずれにおいても、感度がCt値で2程度優れている結果が得られた(表2)。

- 1) 1.5ml チューブにダニを入れ,PBS(-)を 1 ml 加えてボルテックス
- ↓
- 2) PBS(-)をアスピレーターで除去, ホモジナイザーペッスルで潰し, PBS(-) 10 µL 添加
- ↓
- 3) ピペッティングして内臓液を浮遊
- ↓
- 4) BioRad InstaGene Matrix を 200 µL 加えて 56 °C 30 分処理
- ↓
- 5) ボルテックス後, 100 °C 8 分加温
- ↓
- 6) ボルテックス後, 12,000 rpm 3 分遠心
- ↓
- 7) 上清を別のチューブに移して PCR 用テンプレートとする

図3 マダニからのDNA抽出法



図4 マダニの定点採取地域

SpRija系は感度がDuplex系と比べ劣る結果となったこと、また、近縁な紅斑熱群リケッチアも検出されることが分かっており確定検査とすることはできないこと、更にはDuplex系はツツガムシ病リケッチアや日本紅斑熱以外の紅斑熱群リケッチア等に広く適用可能で将来の検査においても発展性があると考えられたこと等から、以後の検査にはDuplexリアルタイム系を採用することとした(表2)。

但し、Duplexリアルタイム系だけでは日本紅斑熱と確定診断ができないことから、同法で陽性となった検体は、ま

表2 リアルタイム PCR による2つの検出系の感度比較

検体	Ct値(相関係数)	
	SpRija系	Duplex系
P. C. 10 <sup>4</sup>	31.2	29.2
P. C. 10 <sup>3</sup>	34.9	32.8
P. C. 10 <sup>2</sup>	(40.2)	37.3
P. C. 10 <sup>1</sup>	ND	ND
相関係数 R <sup>2</sup>	0.986	0.966
Kochi YH3 株	38.2	36.6
Kochi YH4 株	ND	37.1
Kochi YH6 株	39.0	37.5

○使用検体

- ・平成24年度配布のSpRija系用P.C.(プラスミド)  
(10<sup>4</sup>~10<sup>1</sup> copies / 9 μLとなるよう段階希釈)
- ・高知県衛生研究所分与の陽性検体DNA3検体  
(コピー数不明)
- ・SpRija系のP. C. 10<sup>2</sup>は、Ct値40以上のため参考値

○Nested PCRの感度は概ねP.C. 10<sup>2</sup>

ずは速報として医療現場側に情報提供し、その後リケッチア属共通の17kDa蛋白質をコードする遺伝子を標的としたNested PCR法を実施し、シークエンスにより確定するという方法を採用することとした。このことにより、検体搬入当日から翌日に速報を通知し、数日中に確定診断を通知するという迅速診断・早期治療体制をとることが可能と考えられた。

2 マダニ検体からの日本紅斑熱リケッチア遺伝子検査法の検討

マダニが保有しているリケッチアはごく微量であることに加えて、日本紅斑熱リケッチアと近縁のリケッチアが国内に存在することが報告されている。当初は高感度スクリーニング検査として1で述べたDuplexリアルタイム系の適用を考え、試行的にマダニからの検出を試みた結果、マダニが保有している多様なリケッチア性の共生体による非特異的な反応が多く確認され、必ずしも適当な検出法ではないと考えられた。また、マダニからの検出に関しては、迅速性が必要とされているわけではなく、コスト面からみてもリアルタイムPCR法の採用は適当でないと判断し、1の検討で感度がほぼDuplexリアルタイム系と同等であることが確認できていた、リケッチア属共通の17kDa蛋白質をコードする遺伝子を標的としたNested PCR法を採用することとした。なお、マダニからのDNA抽出法において、PCR反応阻害等の問題は認められなかった。

表3 臨床検体中の日本紅斑熱リケッチア遺伝子検査結果

症例No	住所地	年齢(歳)	性別	発症年月	検体の種類及び検査結果		
					痂痂	皮疹	血液
1	宇和島市	91	男	2018. 5	—	—	—
2	松山市	73	女	2018. 10	++	—	—
3	松前町	69	女	2019. 4	—	—	—
4	松山市	70	男	2019. 6	—	++	++
5	松山市	82	女	2019. 8	+++	—	++
6	松山市	69	男	2019. 9	—	—	—
7	新居浜市	77	男	2019. 8	—	++	+
8	四国中央市	55	女	2019. 9	—	—	—
9	松山市	59	男	2019. 10	—※	—	+
10	松山市	71	男	2019. 10	—	—	—
11	宇和島市	74	男	2019. 10	+	—	—
12	松山市	31	男	2019. 11	—	—	—

○ +++:リケッチア量が非常に多い, ++:多い, +:少ない, —:陰性

○ 検体の種類欄の空白は検体提供無

※ 検体量が極少量であった。

### 3 日本紅斑熱疑いの臨床検体を用いた日本紅斑熱リケッチア遺伝子検査

表3に、ヒトの臨床検体からの日本紅斑熱リケッチア検出結果を示した。

平成30年度に試験に供した2事例4検体中、日本紅斑熱リケッチアが検出されたのは痲疹1検体であった。なお、検査に供した検体が少なかったのは、同年度は日本紅斑熱の届出自体がやや少なかったことも影響していると考えられた。

令和元年度については、10事例(痲疹・皮疹7検体及び血液9検体)中5事例から日本紅斑熱リケッチアが検出された(内訳:痲疹・皮疹及び血液の両方から検出3例、痲疹検体のみの提供1例、血液からのみ検出1例)。痲疹(皮疹)と血液の両方提供があった症例については、痲疹(皮疹)の方が血液よりリケッチア量が多い傾向が認められた(表3)。

なお、供試した検体の種類(痲疹、皮疹、バフィーコート)では非特異反応は確認されず、実際の臨床検体でも本遺伝子検査法の有用性を確認することができた。

日本紅斑熱は速やかに診断できれば、抗生物質の投与等、適正な医療を行うことができるが、現在のところ民間検査機関では実施することができないことから、その対応を当所が担うことは重要である。本研究で遺伝子検査法が確立できたことは、県内の同感染症の診療に貢献できると考えられる。

但し、抗生物質投与後の血液からの検出は難しいことが報告されているほか、痲疹が複数カ所あってもリケッチアを保有するマダニによる刺し口でないと検出できないこと、更にはそもそも刺し口自体が確認できない症例もある。今回、皮疹からもリケッチアが検出されたことで、前述のような症例でも有用な検体になると考えられたことから、医療機関へはその有用性について周知するとともに、そのほかの検体についても、検体の持つ特性と適切な採取時期等について十分周知し、なるべく多くの種類の検体を検査に供することが正確な診断につながるということを啓発する必要があると考えられた。

### 4 県内のマダニ相及び日本紅斑熱リケッチア保有状況調査

県内における日本紅斑熱リケッチア保有マダニの種類や保有率等の同様調査は、当所でも2004年～2006年に実施したことがあるが、患者数が増加傾向で発生地域も拡大している現在、県内での日本紅斑熱患者の発生地域拡大要因の解明と患者発生防止のための有用な資料とするために、最新の状況を明らかにするとともに、過去の調査結果と比較することは重要であると考え、今回再度実施することとした。

その結果、今回は3属10種のマダニが採取され(表4)、遺伝子検査では、紅斑熱群リケッチアが56検体(複数匹のプール検体あり)から検出された。但し、日本紅斑熱リケッチアは検出されなかった(表5)。

表4 県内で定点採取したマダニ種の内訳

属	マダニ種	発育期	新居浜市				今治市				松山市(旧北条)				伊予市双海				久万高原町				大洲市				宇和島市				合計
			春	夏	秋	冬	春	夏	秋	冬	春	夏	秋	冬	春	夏	秋	冬	春	夏	秋	冬	春	夏	秋	冬	春	夏	秋	冬	
キチマダニ	成虫		2	2	2	5	1	0	1	0	1	0	3	5	1	1	5	8	6	0	0	1	1	0	10	8	0	0	0	1	497
	若虫		3	1	20	16	2	1	3	4	8	13	9	15	5	73	82	47	5	0	10	11	11	20	48	13	0	1	11	1	
フタトゲチマダニ	成虫♂		0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	283
	成虫♀		0	1	0	0	0	3	0	0	1	13	0	0	6	13	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	3	1	0	0	
チマダニ	若虫		1	2	0	0	0	0	0	0	84	4	0	2	42	1	0	4	0	0	0	0	26	1	0	0	56	3	0	0	100
	成虫		2	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ヤマアラシチマダニ	成虫		2	2	0	0	1	1	0	0	3	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	26
	若虫		2	1	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	
オオトゲチマダニ	成虫		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11
	若虫		0	1	3	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	
ヒゲナガチマダニ	成虫		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
	若虫		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
キララマダニ	成虫		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22
	若虫		0	0	0	0	0	0	0	0	6	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	4	0	0	0	0	
ヤマトマダニ	成虫		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
	若虫		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
マダニ	成虫		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	4
	若虫		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
アカコッコマダニ	成虫		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	若虫		0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	幼虫		0	50	40	0	0	119	54	31	13	49	0	1	40	70	27	12	0	48	2	0	0	50	0	0	0	49	25	0	680
	合計(成虫+若虫)		23	10	27	24	4	5	4	11	125	40	15	39	59	89	87	66	15	0	10	12	50	26	90	32	70	5	12	10	960
	合計(成虫+若虫+幼虫)		23	60	67	24	4	124	58	42	138	89	15	40	99	159	114	78	15	48	12	12	50	76	90	32	70	54	37	10	1640

表 5 県内で採取したマダニからのリケッチア検出状況

マダニ種	検体数	検出数	検出率(%)	リケッチア種/株	検出マダニが採取された地点及び検出数						
					①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
キチマダニ	164	14	8.5	<i>R. raoultii</i>	3		1	3	1	4	2
		2	1.2	<i>R. canadensis</i>				2			
フタトゲチマダニ	108	23	21.3	<i>R. sp.LON-2</i>							23
タカサゴチマダニ	28	1	3.6	<i>R. raoultii</i>						1	
ヤマアラシチマダニ	23	9	39.1	<i>R. raoultii</i>	1	1	5			2	
オトゲチマダニ	7	2	28.6	<i>R. raoultii</i>	1			1			
タカサゴキララマダニ	16	2	12.5	<i>R. tamurae</i>						2	
タネガタマダニ	4	3	75.0	<i>R. tamurae</i>			2	1			
アカコッコマダニ	3	0	0.0	-							
ヒゲナガマダニ	3	0	0.0	-							
ヤマトマダニ	4	0	0.0	-							

①新居浜市 ②今治市 ③松山市(旧北条) ④伊予市双海 ⑤久万高原町 ⑥大洲市 ⑦宇和島市

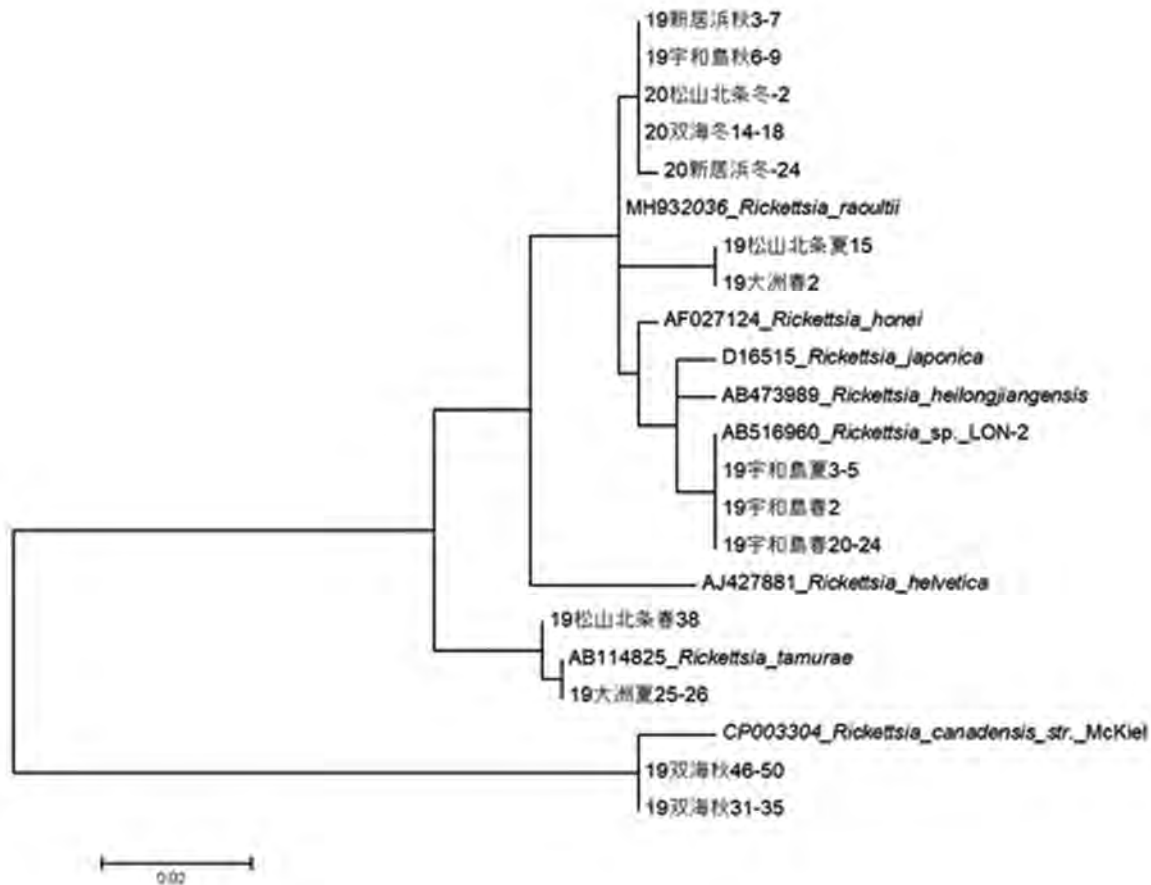


図 5 検出されたリケッチア遺伝子の配列に基づく系統樹解析(ML 法)

なお、宇和島市のフタトゲチマダニからは、高率に*R. sp. LON-2*株と100%一致する塩基配列が検出された(図5)。LONは共生体様リケッチアとも言われ、フタトゲチマダニ両性系に限って高率に検出され、特異保有種と推定されている。春季に採取された宇和島市のフタトゲチマダニは両性生殖群であったため、高率な検出となったものと思われる。

また、キチマダニ、ヤマアラシチマダニ等からは*R. raoultii*が、タネガタマダニやタカサゴキララマダニからは*R. tamurae*が検出された。これらのリケッチアはいずれも国内で散発的な報告例があり、かつ、ヒトへの病原性が確認されているため、今後も注視していく必要がある。

今回の調査では日本紅斑熱リケッチアは検出されなかつた。

ったことから、県内で広く日本紅斑熱リケッチアが浸潤している状況ではないことが確認できたが、2004年～2006年の調査では、約10%のマダニから日本紅斑熱リケッチアが検出されていること<sup>11)</sup>等を踏まえると、野生動物の動向や気象条件等の様々な要因により、マダニ相やリケッチア保有状況も大きく変動する可能性が示唆され、県民に正しい情報を提供するためにも、今後も定期的に本調査を継続していくことが必要である。

## まとめ

- 1 日本紅斑熱診断のための遺伝子検査法として、まず Duplex 系リアルタイム PCR 法を実施し、陽性となった場合は、速報として医療機関側に情報提供を行い、その後 Nested PCR とシーケンスにより確定させることとした。
- 2 マダニ検体からの日本紅斑熱リケッチア遺伝子検査法としては、リケッチア性の共生体による非特異反応等を考慮し、Nested PCR 法とシーケンスにより確定することが適切と考えられた。
- 3 日本紅斑熱疑いの臨床検体を用いた日本紅斑熱リケッチア遺伝子検査については、6 症例から日本紅斑熱リケッチア遺伝子を検出し、かつ、問題となるような非特異反応は認められなかったことから、本研究で採用した遺伝子検査方法は迅速診断に有用であると考えられた。
- 4 県内で採取されたマダニの日本紅斑熱リケッチア保有状況調査において、日本紅斑熱リケッチアは検出されなかったことから、広く日本紅斑熱リケッチアが浸潤している状況は認められなかったが、様々な要

因により大きく変動する可能性が示唆され、今後も定期的に調査を継続していくことが必要と考えられた。

本研究は、「衛生環境研究所特別研究調査費」によりなされたものである。

## 文献

- 1) 馬原文彦ほか:感染症学雑誌 第59巻第11号, 1165-1172 (1985)
- 2) 病原微生物検出情報月報, 41 (8), 133- 135 (2020)
- 3) 近藤玲子ほか:愛媛県立衛生環境研究所年報, 6, 13-17 (2003)
- 4) 紅斑熱群リケッチア症診断マニュアル(旧)(国立感染症研究所, 平成12年版)
- 5) Hanaoka N et al: Emerging Infect. Dis., 15 (12) 1994-1997 (2009)
- 6) Kawamori F et al: Jpn. J. Infect. Dis., 71, 267-273 (2018)
- 7) リケッチア感染症診断マニュアル(国立感染症研究所, 令和元年6月版)
- 8) Furuya Y et al: J.Clin.Microbiol., 33, 487-489 (1995)
- 9) 片山丘ほか:感染症学雑誌 第70巻第6号, 561-568 (1996)
- 10) Noda H et al: Appl. Environ. Microbiol., 63 (10): 3926-3932 (1997)
- 11) 稲荷公一ほか:愛媛県立衛生環境研究所年報, 7, 5-12 (2004)

## Establishment of genetic diagnostic methods for Japanese spotted fever and survey of ticks carrying *Rickettsia japonica* in Ehime

Chitoshi TOYOSHIMA, Mayumi YAMASHITA, Hiromi IWAKI, Yasutaka YAMASHITA  
Hiroshi TAKIYAMA, Akie OCHI, Manabu AONO, Hiroto SHINOMIYA

Japanese spotted fever is a tick-borne infectious disease caused by *Rickettsia japonica*. The number of patients with Japanese spotted fever has been increasing nationwide, and in order to prevent the increase and spread of patients, it is important to establish a diagnostic system using a rapid and highly sensitive genetic testing method, and to clarify the latest status of ticks carrying *Rickettsia japonica*, such as the type and rate of possession. Therefore, we established a highly sensitive and specific test for the detection of *Rickettsia japonica* in both human and ticks, and conducted a survey on the status of *Rickettsia japonica* in ticks. For detection in human clinical specimens, screening was performed using the Duplex real-time PCR method, and positive results were confirmed by sequencing. Twelve suspected patient specimens, were tested, and the *Rickettsia japonica* gene was detected in six cases. As for the survey on the possession of *Rickettsia japonica* in ticks, a total of 1640 ticks were collected four times a year at seven sites in Ehime and classified. The nested PCR method targeting the gene encoding the 17 kDa protein common to the rickettsial genus revealed that *Rickettsia japonica* was not detected in all samples, but that other spotted fever group rickettsiae were detected in 56 samples.