

# リケッチア症レファレンスセンター会議 報告2016

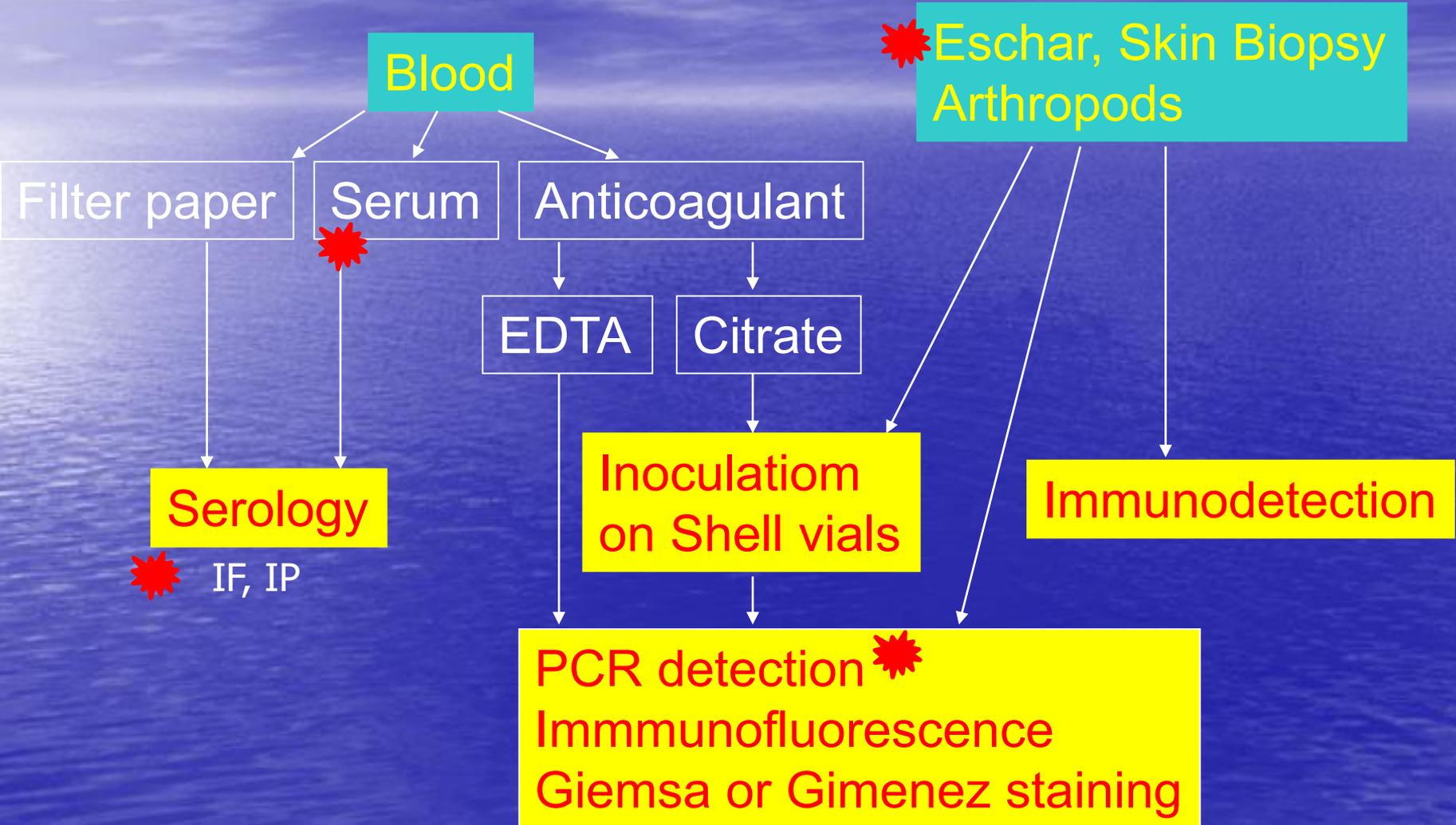
全国衛生微生物技術協議会, 2016年7月22日, 広島

- 北海道東北地区  
福島県衛生研究所  
青森県環境保健センター
- 東海北陸  
三重県保健環境研究所  
富山県衛生研究所
- 関東甲信静  
東京都健康安全研究センター  
埼玉県衛生研究所
- 近畿ブロック  
和歌山県環境衛生研究センター  
兵庫県立生活科学研究所健康科学研究センター
- 中国・四国  
岡山県環境保健センター  
広島県総合科学研究所環境保健センター  
高知県衛生研究所
- 九州  
宮崎県衛生環境研究所  
鹿児島県環境保健センター

世話人 安藤秀二  
国立感染症研究所  
ウイルス第一部第五室  
shuando@nih.go.jp

- **イントロ（情報共有：発生状況等）**
- **情報提供（診断系の流れの確認。新規LAMP法）**
- **情報提供（感染細胞抗原を用いたELISA（抗体検出））**
- **情報提供（広島県の取り組み）**
  - **広島県内のダニ類媒介感染症の発生状況と検査対応等について**
    - **ダニ媒介感染症について総合的に対応している実例を紹介，他県での取り組みの参考とする。**
- **意見交換**

# Strategy of Laboratory Diagnosis of Rickettsial Infection



# リケッチア症に用いる遺伝子検出

国内のリケッチア症の多様性 (*Rickettsia japonica* 以外の紅斑熱群リケッチアによる患者発生, つつが虫病の抗原性状の多様性) から, 特異性は保ちながらも, より広範なリケッチアを検出する系でスクリーニングし, その後 conventional PCR からシーケンス解析で種, 型を決定するのが望ましい。

- Kawamori et al (SFG and Scrub typhus Realtime PCR, H26衛微協)
  - 感染症法で規定され、国内で確実に発生するつつが虫病と日本紅斑熱をスクリーニング可能
- Hanaoka et al (*R. japonica* Realtime PCR, *R. heilongjiangensis*, *Emerg Infect Dis* 15:1994-7, 2009)
  - イスカマダニの生息が現在確認されている地域以外(宮城県より南)は *R. japonica* としてほぼ間違いない。
- Conventional PCR (*Rickettsia* spp 17KDa, *gltA*, H20希少感染症研修)
  - シーケンスにより種の確定
- Conventional PCR (*O. tsutsugamushi* type-specific antigen (TSA))
  - Furuya et al: Furuya Y, Yoshida Y, Katayama T, Yamamoto S, Kawamura A Jr.: Serotype-specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA by nested polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, 31; 1637-40
  - Sato et al: 佐藤寛子、柴田ちひろ、斎藤博之、須藤恒久: 秋田県における Shimokoshi 型 つつが虫病の遡及的疫学調査. *Med. Entomol. Zool.*, 2014, 65(4):183-188

# リケッチア属検出のためのLAMP法の検討

## 背景と目的

- 国内の紅斑熱群リケッチア症として、*Rickettsia japonica*による日本紅斑熱は発生地域拡大とともに近年増加傾向にある。
- *R. heilongjiangensis*による極東紅斑熱や*R. helvetica*、*R. tamurae*による患者も報告されている。
- 紅斑熱群リケッチアは世界的にも極めて多種のものが知られ、従来の遺伝子増幅検出系では特異性を重視するあまり、異なる種の検出には不適切である。
- すべてのリケッチア属を検出できる遺伝子検出系の検討が必要。

# 方法: LAMP 使用機器及び反応組成

使用酵素 LoopampDNA増幅試薬キット [栄研化学]

使用機器 リアルタイム濁度測定装置 RT-160C [栄研化学]  
LOOP 反応チューブ [栄研化学]

反応時間

63°C 60分

## 基本反応組成

### 使用量

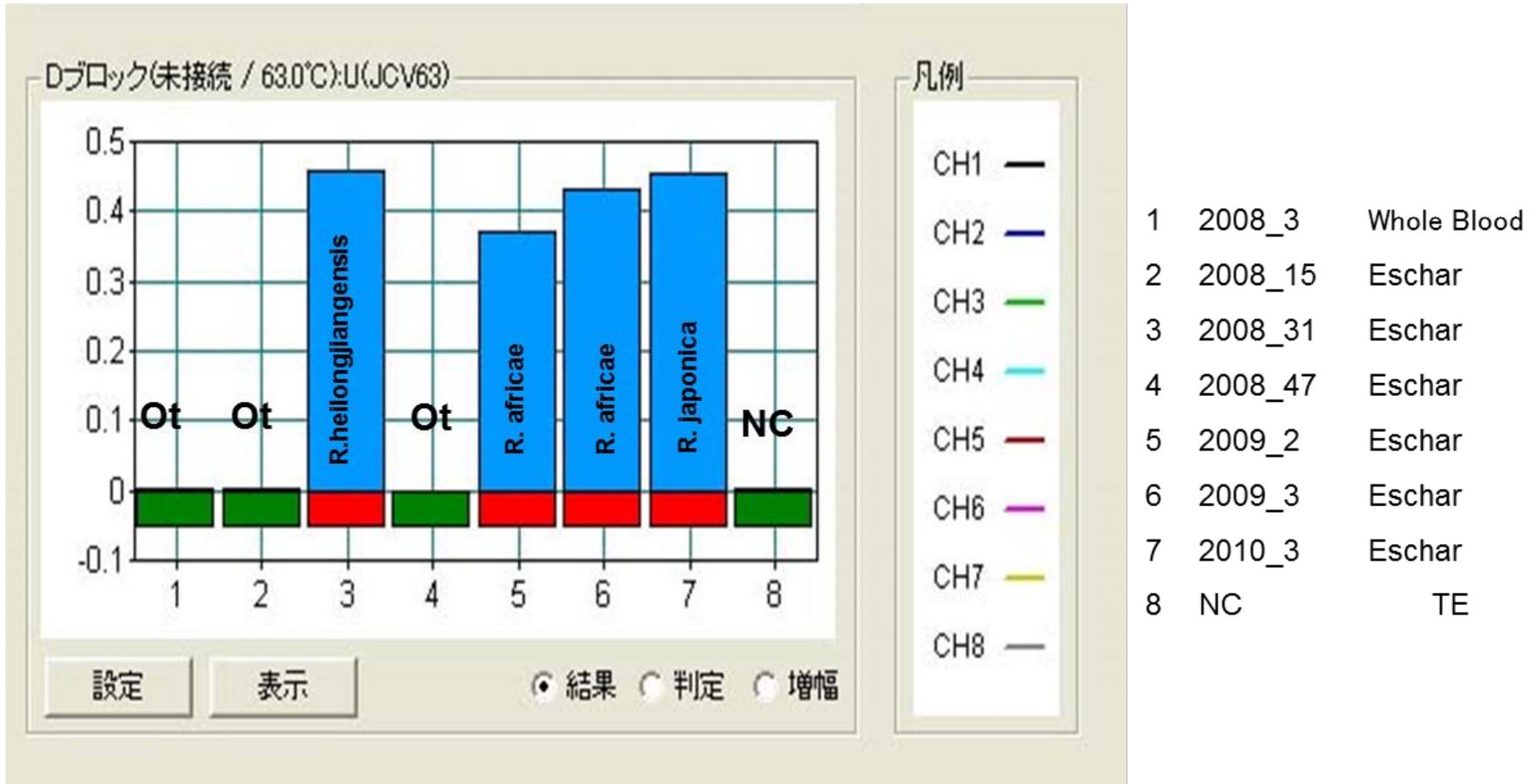
Reaction Mix (2 ×)	12.5 μl
FIP (40 μM)	1 μl
BIP (40 μM)	1 μl
Loop-F (20 μM)	1 μl
Loop-B (20 μM)	1 μl
F3 (5 μM)	1 μl
B3 (5 μM)	1 μl
F3_cana (5 μM)*	1 μl
B3_cana (5 μM)*	1 μl
Bst DNA polymerase	1 μl
template	1 μl
dH2O (滅菌蒸留水)	8.5 μl
Total	25 μl

Set ID	Name	Nucleotide sequence (5'-3')	Purpose
	164_3_F3	GGATCATTACTATGCTAATAGGTT	
	164_3_B3	TCGATTAATAACCGCAGCT	
	164_3_FIP	TCTTTGTTGCAGGAGGCCAGGGCTTATAGGAATTTT ATGGATAGC	
	164_3_BIP	TACTCACTGGTTCGCTTCAAAGAATAGCAAGAGCA CCACCT	
164_3	164_3_F3_cana	GGATCATTACTATTCTAATAGGCT	LAMP for <i>Rickettsia</i> spp.
	164_3_B3_cana	TCGACACCAATAAATTAACT	
	164_LF	CCCATAGATTGAAACCAGTTACTG	
	164_LB	TGGGCTATGGGTGCAACTTCTAATC	

\*反応性向上のために配列の若干異なるF3\_cana,B3\_canaを加えた。

\*JJID Advance Publication, Hanaoka N et al

# 臨床検体



Each samples were amplified by Rickettsia spp. or Orientia-specific nested PCR, and identified by sequence analysis.