

## ツツガムシ病及び日本紅斑熱の検査体制

三浦 佳奈、松本 文昭、吉川 亮、田栗 利紹

### Laboratory Diagnosis of Tsutsugamushi Disease and Japanese Spotted Fever in Nagasaki Prefecture

Kana MIURA, Fumiaki MATSUMOTO, Akira YOSHIKAWA and Toshitsugu TAGURI

Key words : Tsutsugamushi Disease, Japanese Spotted Fever, *Orientia tsutsugamushi*, *Rickettsia japonica*, Indirect Immunofluorescence Assay (IF Assay)

キーワード : ツツガムシ病、日本紅斑熱、オリエンチア・ツツガムシ、リケッチア・ジャポニカ、間接蛍光抗体法 (IF法)

#### はじめに

ツツガムシ病は、*Orientia tsutsugamushi* (以下、O.t)を保有したツツガムシの刺咬により感染するリケッチア感染症である。本菌には表面の抗原蛋白の差異に基づき、標準型と呼ばれる Kato, Karp, Gilliamのほか、近年報告されている Kuroki, Kawasaki などの血清型に分類される。潜伏期は 10～14 日で、39 以上の高熱を伴って発症し、皮膚にはダニの刺し口がみられ、その後対幹部を中心に発疹がみられるようになる(主要三徴候)。本症には予防のためのワクチンはなく、ダニの刺咬を防ぐことが極めて重要となる。治療にはテトラサイクリン系の抗菌薬を第一選択薬として用いる。テトラサイクリン系抗菌薬が使用できない場合はクロラムフェニコールを用いる<sup>1)</sup>。

日本紅斑熱は、*Rickettsia japonica* (以下、R.j)を保有したマダニの刺咬により感染するリケッチア感染症である。潜伏期は 2～8 日でツツガムシ病に比べやや短く、ツツガムシ病同様に発熱、発疹、刺し口が主要三徴候であり、発疹は四肢末端部に比較的強く出現する特徴がある。ツツガムシ病同様ワクチンはなく、ダニの吸着を防ぐことが最も重要である。治療は第一選択薬としてテトラサイクリン系の抗菌薬を用い、ニューキノロン系薬が有効であるとの報告もある<sup>2)</sup>。

これら疾病の診断には、間接蛍光抗体法 (Indirect Immunofluorescence Assay: IF 法)による血清診断、PCR 法によるリケッチア DNA の検出及びリケッチア分離などがあるが、現在、ペア血清による血清診断が最も信頼性のある検査法である<sup>3)</sup>。

本県における 2006～2013 年に報告のあったツツガムシ病及び日本紅斑熱の患者数及び分布を図 1 に示す。日本紅斑熱は 2006 年の本県初の患者報告以降、長崎・西彼地区及び五島列島において患者報告が多くみられるが、最近では佐世保市周辺においても患者報告がみられる。特に 2014 年度はこれらの地域より 11 名の患者報告があり、本県における潜在的な患者発生リスクの高さを知る機会となった。

これらのことも含め、2013 年以降はダニ媒介性の疾患である重症熱性血小板減少症候群 (Severe fever with thrombocytopenia syndrome: SFTS) ウイルスとの鑑別が求められることもあり、本県におけるツツガムシ病及び日本紅斑熱の検査体制を整備することは、喫緊の課題である。

今回、国立感染症研究所及び鹿児島県環境保健センターの協力のもとツツガムシ病及び日本紅斑熱の検査体制を整備することができたので、その概要を報告する。

#### 調査方法

##### 1 抗体検査

###### (1) 材料

2014 年 4 月から 2015 年 3 月 12 日現在までに当センターへ抗体検査依頼のあった検体のうち国立感染症研究所とのダブルチェックを行なった急性期血清 17 検体及び回復期血清 17 検体の計 34 検体を被検材料とした。

(2) 方法

国立感染症研究所のリケッチア感染症マニュアルに準拠するとともに、鹿児島県環境保健センターの検査手順書を参考にした。当センターの検査手順を図2に示す。

(3) 判定

O.t の Karp, Kato, Gilliam, Kawasaki, Kuroki 及

び R.j の 6 種類の抗原に対する回復期血清中の IgM, IgG のいずれか一方もしくは両方の抗体価が急性期血清中の IgM, IgG 抗体価と比較して4倍以上上昇しているものを陽性とした。やむをえず急性期血清のみで診断する場合、急性期血清中の IgM 抗体価が 80 倍以上のものを陽性とした<sup>3)</sup>。

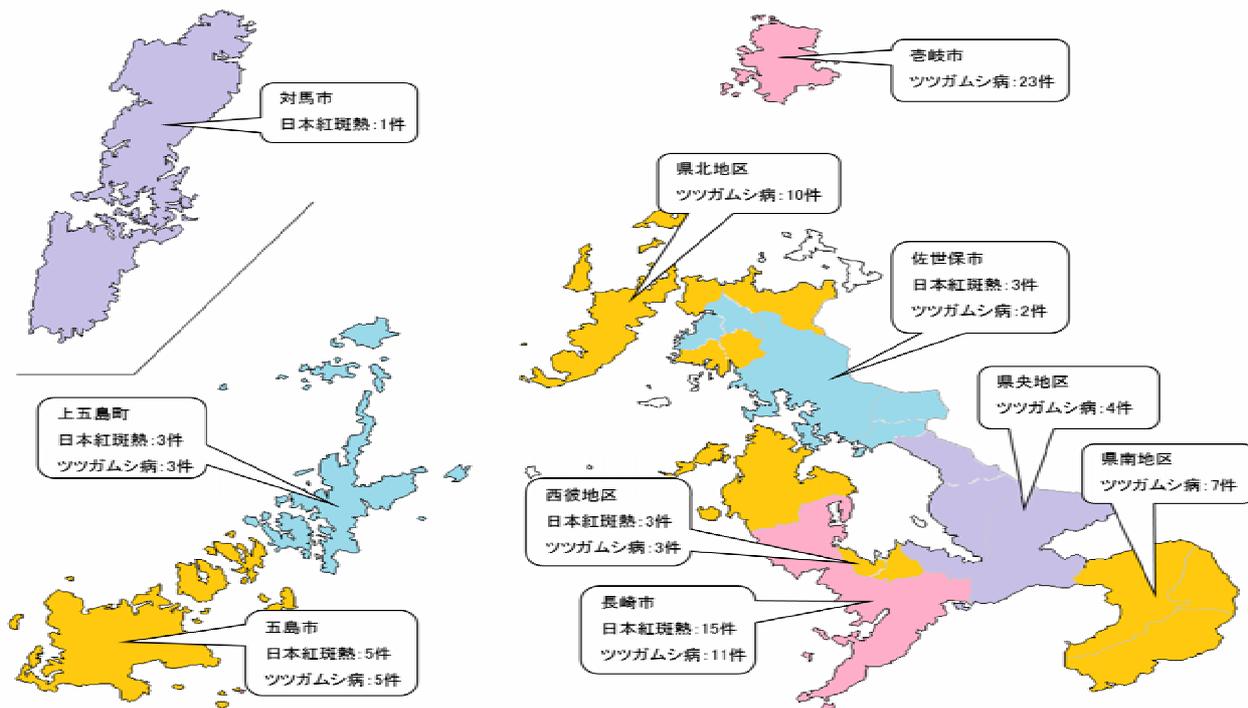


図1 ツツガムシ病及び日本紅斑熱の患者報告数 (2006～2013)

2 遺伝子検索

(1) 材料

2014年4月から2015年3月12日現在までに当センターへ抗体検査依頼のあった急性期血清20検体及び痂皮1検体を被検材料とした。

(2) 方法

国立感染症研究所のリケッチア感染症マニュアルに準拠し、急性期血清及び痂皮より QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA 抽出し、O.t は 56-kDa ポリペプチドをコードしている遺伝子、R.j は 17-kDa 膜タンパク質をコードしている遺伝子に設定したプライマーセット<sup>4),5)</sup>を各々用いて1次増幅反応を行った後、その産物の一部を用いて2次増幅反応を行った。遺伝子増幅反応 (PCR) 条件及びプライマーを図3及び図4に示す。ただし、PCR 条件のうちアニーリング温度は、O.t 及び R.j

の当センター保存株を用いて検討を行ない、特異性や収量等の観点から O.t を 57、R.j を 52 とした。増幅産物は、アガロースゲル電気泳動を行って確認した。

(3) 判定

O.t の 1 次増幅産物 は約 1,000 bp (Karp:1,030 bp, Kato:1,003 bp, Gilliam:1,003 bp, Kawasaki:1,003 bp, Kuroki:1,026 bp)、O.t の 2 次増幅産物 は約 500 bp (Karp:507 bp, Kato:495 bp, Gilliam:481 bp, Kawasaki:481 bp, Kuroki:501 bp) の位置にバンドが各々確認されたものを陽性とし、増幅産物を用いてダイレクトシーケンス法によりの塩基配列を決定することによって型別を行なった (図5)。

R.j の 1 次増幅産物 は約 540 bp、R.j の 2 次増幅産物 は 359 bp の位置にバンドが各々確認されたものを陽性とした。

## &lt; IF (間接蛍光抗体) 法 &gt;

- 1) リケッチア IF 検査用抗原スライド (8 穴、2 列) を冷凍庫 (-30 ) から必要分取り出し、しばらく室温に放置し、冷風にて乾かす
- 2) 冷蔵保存してある FITC 標識抗ヒト IgM 及び IgG 抗体をリン酸緩衝食塩水 (PBS) にて各々 75 倍希釈する
- 3) 被検血清 (急性期、回復期) を 20 倍希釈する
- 4) さらに被検血清 (急性期、回復期) をマイクロプレートもしくは 8 連 PCR チューブを用いて 2 倍段階希釈を行ない、1,280 倍までの希釈系列を作製する
- 5) 段階希釈した被検血清は、高希釈 (1,280 倍) から低希釈 (20 倍) の順に抗原スライドの 7 穴目から 1 穴目に 10  $\mu$ L ずつ滴下する。
- 6) 抗原スライドの 8 穴目には陽性コントロールもしくは陰性コントロールを滴下する
- 7) 滴下した被検血清及び陽性・陰性コントロールをチップの先を使い搾いっばいに広げる
- 8) 湿潤箱に抗原スライドを静置し、恒温培養器中で 37 、45 分間反応させる
- 9) 反応後、抗原スライドを滅菌 PBS で洗浄ピンにて洗い流す
- 10) PBS の入った角瓶に抗原スライドを入れ軽くすすぐ
- 11) PBS の入った角瓶に抗原スライドを移し、3 分間振とうする
- 12) 次に蒸留水の入った角瓶に抗原スライドを軽くくぐらせる
- 13) 冷風で水滴を飛ばすように乾燥させる
- 14) 75 倍希釈した FITC 標識抗ヒト IgM 及び IgG 抗体を抗原スライド上に 12.5  $\mu$ L ずつ滴下する
- 15) 滴下した FITC 標識の抗ヒト IgM 及び IgG 抗体を搾いっばいに広げる
- 16) 湿潤箱に抗原スライドを静置し、恒温培養器中で 37 、30 分間反応させる
- 17) 抗原スライド上の FITC 標識の抗ヒト IgM 及び IgG 抗体をよく振りきる
- 18) PBS の入った角瓶に抗原スライドを入れ軽くすすぐ
- 19) PBS の入った角瓶に抗原スライドを移し、3 分間振とうする
- 20) 蒸留水の入った角瓶に抗原スライドを軽くくぐらせる
- 21) 冷風で水滴を飛ばすように乾燥させる
- 22) 抗原スライドがある程度乾燥したら封入剤を滴下しカバーガラスで封入する
- 23) 暗室にて蛍光顕微鏡で抗原スライドを鏡検する

図 2 IF 法によるツツガムシ病・日本紅斑熱の検査手順

## 3 リケッチア分離

## (1) 材料

リケッチア遺伝子の存在が確認された血清及び痂皮を被検材料とした。

## (2) 方法

安全実験室 (Bio Safety Level: BSL-3 対応) において Vero 9013 細胞及び L929 細胞に上記被検材料を接種してリケッチアの分離を行った。すなわち、25  $\text{cm}^2$  カルチャーフラスコに単層を形成させた Vero 9013 細胞及び L929 細胞を滅菌 PBS で 1 回洗浄した後、被検材料 50  $\mu$ L を接種して 1 時間吸着させ、その後、各カルチャーフラスコに維持培養

液 (2% 非動化牛胎児血清加 Eagle MEM、ゲンタマイシン及びフェノールレッド不含) 450  $\mu$ L を加えてリケッチア分離を行った。炭酸ガス培養機 (37°C、5%  $\text{CO}_2$ 、95% Air) 内で 7 日間培養して細胞変性効果 (CPE) の有無を判定し、明瞭な CPE が観察されなかった場合は、感染細胞を回収し、再度 Vero 9013 細胞及び L929 細胞に接種して盲継代を 1 ~ 2 回行った。

リケッチア分離の確認は、感染細胞から抽出した DNA を鋳型にして前述のプライマーセットを用いた PCR により O.t 及び R.j 遺伝子を確認した。

O.t 遺伝子の 1 次増幅反応 (Ot-1st PCR)

< primer set > Ot34 : 5' TCA AGC TTA TTG CTA GTG CAA TGT CTG C 3' (28 mer)  
 Ot55 : 5' AGG GAT CCC TGC TGC TGT GCT TGC TGC G 3' (28 mer)

< 組成 >

	volume	final conc.
10× EX Taq Buffer	2.5 μL	
dNTP mixture (25 mM each)	2.0 μL	0.2 mM each
primer (Ot34: 25 μM)	0.2 μL	0.2 μM
primer (Ot55: 25 μM)	0.2 μL	0.2 μM
TaKaRa EX Taq HS	0.125 μL	0.025 U/μL
DW (DNase/RNase free)	17.475 μL	
Extract DNA	2.5 μL	
Total	25 μL	

< 反応条件 >

temp.	time	cycles
94°C	2 min.	1
98°C	10 sec.	
57°C	30 sec.	40
72°C	1 min.	
72°C	7 min.	1
4°C	∞	1

O.t 遺伝子の 2 次増幅反応 (Ot-Nested PCR)

< primer set > Ot10 : 5' GAT CAA GCT TCC TCA GCC TAC TAT AAT GCC 3' (30 mer)  
 Ot11 : 5' CTA GGG ATC CCG ACA GAT GCA CTA TTA GGC 3' (30 mer)

< 組成 >

	volume	final conc.
10× EX Taq Buffer	2.5 μL	
dNTP mixture (25 mM each)	2.0 μL	0.2 mM each
primer (Ot10: 25 μM)	0.2 μL	0.2 μM
primer (Ot11: 25 μM)	0.2 μL	0.2 μM
TaKaRa EX Taq HS	0.125 μL	0.025 U/μL
DW (DNase/RNase free)	18.475 μL	
1 <sup>st</sup> PCR products	1.5 μL	
Total	25 μL	

< 反応条件 >

temp.	time	cycles
94°C	2 min.	1
98°C	10 sec.	
57°C	30 sec.	35
72°C	30 sec.	
72°C	7 min.	1
4°C	∞	1

図 3 O.t 遺伝子の検索

R.j 遺伝子の 1 次増幅反応 (Rj-1st PCR)

< primer set > R1 : 5' TCA ATT CAC AAC TTG CCA TT 3' (20 mer)  
 R2 : 5' TTT ACA AAA TTC TAA AAA CC 3' (20 mer)

< 組成 >

	volume	final conc.
10× EX Taq Buffer	2.5 μL	
dNTP mixture (25 mM each)	2.0 μL	0.2 mM each
primer (R1: 25 μM)	0.2 μL	0.2 μM
primer (R2: 25 μM)	0.2 μL	0.2 μM
TaKaRa EX Taq HS	0.125 μL	0.025 U/μL
DW (DNase/RNase free)	17.475 μL	
Extract DNA	2.5 μL	
<b>Total</b>	<b>25 μL</b>	

< 反応条件 >

tenmp.	time	cycles
94°C	2 min.	1
98°C	10 sec.	
52°C	30 sec.	40
72°C	1 min.	
72°C	7 min.	1
4°C	∞	1

R.j 遺伝子の 2 次増幅反応 (Rj-Nested PCR)

< primer set > Rj5 : 5' CGC CAT TCT ACG TTA CTA CC 3' (20 mer)  
 Rj10 : 5' ATT CTA AAA ACC ATA TAC TG 3' (20 mer)

< 組成 >

	volume	final conc.
10× EX Taq Buffer	2.5 μL	
dNTP mixture (25 mM each)	2.0 μL	0.2 mM each
primer (Rj5: 25 μM)	0.2 μL	0.2 μM
primer (Rj10: 25 μM)	0.2 μL	0.2 μM
TaKaRa EX Taq HS	0.125 μL	0.025 U/μL
DW (DNase/RNase free)	18.475 μL	
1 <sup>st</sup> PCR products	1.5 μL	
<b>Total</b>	<b>25 μL</b>	

< 反応条件 >

tenmp.	time	cycles
94°C	2 min.	1
98°C	10 sec.	
52°C	30 sec.	35
72°C	30 sec.	
72°C	7 min.	1
4°C	∞	1

図 4 R.j 遺伝子の検索

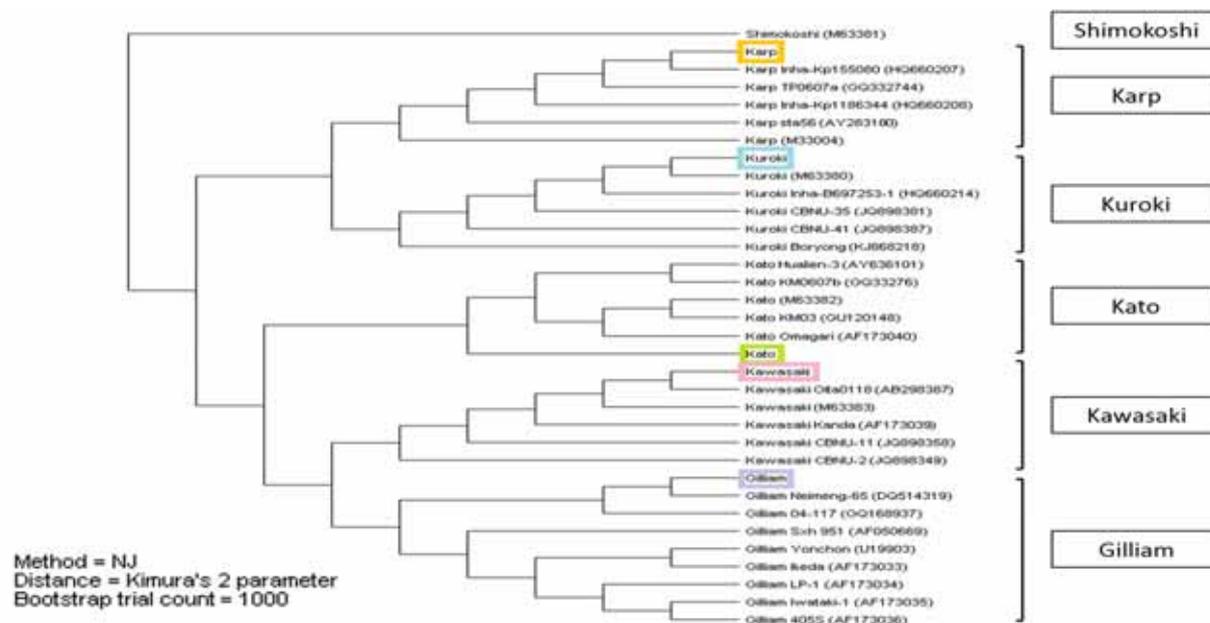


図 5 ツツガムシ病の系統樹による型別

結果及び考察

1 抗体検査結果

同一検体を用いて国立感染症研究所と当センターでツツガムシ病(5血清型)及び日本紅斑熱についてIF法により抗体検査を行なった結果を表1に示す。17名分の結果について、すべての検査結果(急性期血清及び回復期血清における6つの抗原に対するIgM抗体価及びIgG抗体価)を上段が当

センター、下段が国立感染症研究所列記として比較すると、1名分を除き、概ね良好な結果をえることができた。この除外した1名については、自己免疫疾患があり、非常に判定に苦慮し、非特異的なものについても陽性と判定したと考えられる。このように抗体検査には、判定に苦慮するケースがあることから、今後も国立感染症研究所等の協力を得ながら検査の精度を上げる必要があると感じられた。

表1 国立感染症研究所と当センターの抗体検査結果比較

ID	O.t (Karp)				O.t (Kato)				O.t (Gilliam)				O.t (Kawasaki)				O.t (Kuroki)				R.j (YH)			
	IgM		IgG		IgM		IgG		IgM		IgG		IgM		IgG		IgM		IgG		IgM		IgG	
	急	回	急	回	急	回	急	回	急	回	急	回	急	回	急	回	急	回	急	回	急	回	急	回
1	-	-	20	40	-	20	40	80	-	-	-	-	-	-	20	40	-	20	40	80	-	640	320	5120
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80	-	160
5	-	-	-	20	-	-	-	20	-	-	-	20	-	-	-	20	-	-	-	20	-	-	-	20
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	320	-	320
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	320	-	640
8	-	-	20	40	-	-	20	40	-	-	20	40	-	-	20	40	-	-	20	40	-	-	20	40
9	-	-	-	80	-	80	20	160	160	1280<	20	640	80	320	20	320	-	40	20	160	-	320	-	640
10	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	80	-	160
11	-	-	-	-	-	20	20	-	-	20	-	-	-	-	40	40	-	-	40	40	-	-	-	-
12	-	-	20	20	-	-	20	20	-	-	40	20	-	-	20	20	-	-	-	-	-	-	20	20
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80	-	40
15	-	-	-	-	-	20	20	-	-	-	-	-	-	20	20	-	-	-	20	-	-	160	-	160
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2560	-	640
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	320	-	160
																						640<	-	320

表中のIgMはIgM抗体価、IgGはIgG抗体価、急は急性期血清、回は回復期血清を示す上段が当センターの検査結果、下段が国立感染症研究所の検査結果

2 遺伝子検索結果

被検材料21検体よりO.t及びR.j遺伝子検索を行ったところ、O.t遺伝子は確認できなかったものの、血清2検体及び痂皮1検体よりR.j遺伝子が確認された(表2)。R.j遺伝子が確認された3検体は抗体検査の結果も日本紅斑熱であったことから検査の整

合性はとれていた。また、R.j遺伝子が確認された血清2検体は、いずれも抗菌薬の投与がなく、IgM及びIgG抗体の上昇もみられなかった検体であった。一方、R.j遺伝子が確認された痂皮1検体は、抗菌薬の投与があったにもかかわらずR.j遺伝子の検出ができたが、同日に採取された血清からR.j遺伝子

が検出されなかったことから、リケッチア遺伝子の検索を行なうにあたっては、抗菌薬投与の状況が大きく影響することが再確認できた。今回、PCR によるリケッチア遺伝子の検索を実施するにあたって、検体に関する検討をすることはなく、抗体検査のために提出された急性期血清を用いたが、今回の結果をふまえ、今後は、リケッチア遺伝子の検出率が高い

刺口部痂皮、紅斑部生検、血液(パフィーコート)などの提出を医療機関に検査依頼の際に求めていく必要がある。

### 3 リケッチア分離結果

R.j 遺伝子が確認された血清 2 検体及び痂皮 1 検体から Vero 9013 細胞及び L929 細胞を用いて R.j の分離を試みたが、分離はできなかった。

表 2 検体情報とリケッチア遺伝子の検出状況

No.	ID	被検材料	採取病日	抗菌薬投与	抗体検査	PCR
1	2	血清	第 9 病日	-	-	-
2	3	血清	第 3 病日	-	-	-
3	4	血清	第 8 病日	-	日本紅斑熱	R.j 遺伝子検出
4	5	血清	第 4 病日	-	-	-
5	6	血清	第 4 病日	-	日本紅斑熱	-
6	7	血清	第 5 病日	-	日本紅斑熱	-
7	8	血清	第 4 病日	有	-	-
8	9	血清	第 1 病日	-	ツツガムシ病	-
9	10	血清	第 6 病日	有	日本紅斑熱	-
10	11	血清	第 5 病日	有	-	-
11	12	血清	第 4 病日	-	-	-
12	13	血清	第 8 病日	有	-	-
13	14	血清	第 6 病日	有	日本紅斑熱	-
14	14	痂皮	第 6 病日	有	NT	R.j 遺伝子検出
15	15	血清	第 5 病日	有	日本紅斑熱	-
16	16	血清	第 4 病日	-	日本紅斑熱	R.j 遺伝子検出
17	17	血清	第 4 病日	有	NT	-
18	17	血清	第 5 病日	有	日本紅斑熱	-
19	18	血清	第 2 病日	-	NT	-
20	19	血清	第 10 病日	-	NT	-
21	20	血清	第 24 病日	有	NT	-

NT:Not Tested (PCR 検査のみ検査依頼もしくは痂皮のため検査せず)

## まとめ

### 1 抗体検査

抗体検査については、概ね検査体制の整備ができたと思われるが、リケッチア感染症における最も確実な診断法であることから、引き続き検査精度の向上を目指すとともに、検査体制維持のための診断技術の伝達も行なう必要予定である。また、現在、検査用抗原スライドは宮崎県及び鹿児島県より分与されているので、今後は自主的な検査体制を維持するためにも抗原スライドの作製を行なえる体制を整備する必要がある。

### 2 遺伝子検索

リケッチア遺伝子の検索は、次年度より積極的に取り組む、検査数を増やしていき、PCR に適した検体等の条件を検討していく予定である。今後は、PCR の迅速性を生かしつつ抗体検査と併せて効率的な検査体制の整備を図りたい。

### 3 リケッチア分離

リケッチア分離は今回できなかったが、PCR の結果をふまえ、今後も引き続き実施していく。

## 謝 辞

ツツガムシ病及び日本紅斑熱の血清診断の習得にご協力いただいた国立感染症研究所ウイルス第一部第5室の安藤秀二室長及び鹿児島県環境保健センターの職員の皆様に深謝します。

## 参 考 文 献

- 1) 国立感染症研究所 日本紅斑熱  
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/448-jsf->
- 2) 国立感染症研究所 つつがむし病  
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/436-tsu>
- 3) 国立感染症研究所 リケッチア感染症診断マニュアル(平成24年)
- 4) Furuya, I., Yoshida, Y., Katayama, T., Yamamoto, S., and Kawamura, A.: Serotype-specific amplification

- of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA by nested polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol, 31, 1637-1640 (1993)
- 5) Furuya, I., Katayama, T., Yoshida, Y. and Kaiho, I.: Specific Amplification of *Rickettsia japonica* DNA from Clinical Specimens by PCR. J. Clin. Microbiol, 33, 487-489 (1995)