

日本紅斑熱陽性例の検討

本 田 俊 郎 中 山 浩 一 郎 吉 國 謙 一 郎
 新 川 奈 緒 美 有 馬 忠 行¹ 湯 又 義 勝²
 伊 東 祐 治³

1 はじめに

日本紅斑熱 (Japanese spotted fever) は、1984年、徳島県の馬原らにより初の臨床例が報告¹⁾され、以来各地で患者発生が確認されている。さらに1992年には、病原体が *Rickettsia japonica* (以下 *R. japonica*) と命名された²⁾。本疾患は、紅斑熱群に属するリケッチア感染症の一つで、マダニ類により媒介される急性熱性発疹症である。臨床的には、発熱・発疹・刺し口を三徴候とし、ツツガムシ病と症状が類似している³⁾ため、当センターではツツガムシ病の検査依頼があった場合、併せて血清診断として日本紅斑熱リケッチア YH 株を抗原とした間接蛍光抗体法 (以下 IF 法) も実施し、判定している⁴⁾。

日本紅斑熱患者は、全国では1984年から1998年までに、210数例を確認し、年間患者発生数は10~20例であったけれども⁵⁾、感染症法施行後の1999年は38例、2000年は37例、2001年は38例、2002年は36例の届出があった。本県においては、1989年から2002年までの患者発生は図1に示すとおりで、感染症法施行以後1999年に報告をみなかったが、2000年は5例、2001年は11例、2002年は7例を確認した。

そこで、今回我々は当センターで血清学的に日本紅斑熱陽性を確認した23例 (2000年~2002年) について疫学調査の解析と、患者血液からの病原体 (*R. japonica*) の

分離、遺伝子学的検査 (PCR)、IF法検査等を検討したので報告する。

2 材料と方法

2.1 疫学調査

当センターでIF法により陽性と判定した23例について、患者検査依頼書の患者調査票をもとに、性別、年齢、感染推定地、作業内容、臨床症状、検査所見等について解析した。

2.2 患者血液からの病原体 (*R. japonica*) 分離

基本的には、リケッチア感染症診断マニュアル⁶⁾に準じて実施したけれども、検体搬送条件及び血液の種類 (EDTA加血・血餅) もしくは培養細胞L929 (マウス皮下脂肪組織) の準備等により、直ちに無菌的にL929に接種する場合と、一端血液を無菌的に約1mlずつプラスチックチューブに分注後直ちに-80℃に保存、後日接種する場合があった。この際、EDTA加血の場合、PCR用にマイクロチューブに約0.5mlずつ分注・保冷 (-80℃) した。

血餅の場合、等量のPBS(-) (以下PBS) を加え、ガラスホモジナイザーで破砕し、適量単層のL929細胞に添加後、35℃で60~120分吸着 (途中15分毎に軽く揺する) し、細胞維持培地 (以下MM) で細胞表面を洗い、液交換する。35℃に静置培養し、翌日および5日後にMMを交換し、5~7日間培養を続け、約10日目くらいから細胞を白金耳等で掻き取り、陽性患者血清を用いてIF法によりリケッチアの増殖確認を行い、細胞培養は30日間継続し、細胞変性効果 (CPE) が認められない場合を陰性とした。また、EDTA加血の場合には、等量PBSを加えそれをそのまま適量単層のL929細胞に添加し、後の操作は血餅の場合と同様に行い、また吸着中にかなりのフィブリン様血塊を生じることから、まめにこの塊を除去した。それでもかなり細胞がダメージを受け剥離浮遊するけれども、そのま

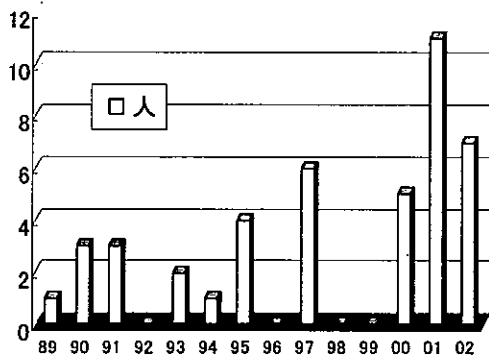


図1 年別日本紅斑熱陽性例数(鹿児島県)

1 鹿児島県立始良病院 〒899-5652 鹿児島県始良郡始良町平松6067
 2 鹿児島県志布志保健所 〒899-7103 鹿児島県曾於郡志布志町志布志二丁目1-11
 3 平成15.3.31付 退職

ま培養を継続した。

2. 3 患者血液からの遺伝子学的検査 (PCR)

2. 3. 1 DNAの抽出

従来は、DNA Extracor WB Kit(和光純薬)を用いて全血からのDNA抽出を行っていたけれども、多検体処理、短時間処理という観点から各種簡易キットが出されているので、2002年からGentra Capture Column Kit(フナコシ)を用いて、PCRテンプレートに最適なゲノムDNAを精製抽出するようにしている。なお、抽出は貼付説明書に準じて実施した。

また、EDTA加血の場合は直接一定量をマトリックスセルに添加した。血餅を用いる場合は、あらかじめ等量PBSを添加し、滅菌乳鉢でよくすりつぶした後、一定量をマトリックスセルに添加抽出した。

2. 3. 2 使用プライマー及びPCR条件と増幅DNAの検出

PCR検査は、宮崎県衛生環境研究所から分与を受けたプライマーを使用し、Furuyaら⁷⁾の方法に準じて行った。これらのプライマーは、紅斑熱群リケッチアと発疹熱群リケッチアに共通の抗原である、17-KDa膜蛋白質をコードする遺伝子上に設定してあるプライマーR1(5'-TCAATT CACAACCTGCCATT-3')とR2(5'-TTTACAAAATTCTAAAAACC-3')を用い、また*R. japonica* DNAを特異的に検出する場合には、プライマーRj5(5'-CGCCATTCTACGTTACTACC-3')とRj10(5'-ATTCTAAAAACCATATACTG-3')を用いた。

反応容量は、50 μl (PCR mixture 45 μl, 鋳型DNA溶液 5 μl)とし、DNA増幅反応は熱変性94℃30秒、アニーリング57℃120秒、相補鎖の合成70℃120秒を1サイクルとし、30サイクル実施した。1st PCR反応後、増幅産物を2%アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色し、増幅された紅斑熱群リケッチアDNA(537bp)あるいは*R. japonica* DNA(357bp)の確認を行い、増幅されたDNAのバンドが検出しなかった場合に、1st PCR産物5 μlを鋳型とし1st PCRと同一条件下で、2nd PCRを行った。

3 結果及び考察

3. 1 疫学調査の解析

患者23人の性別は、男性4人(17%)、女性19人(83%)と女性が多く、年齢別では23才から88才(平均65.5才)までと幅があったが、大部分(87%)は50才以上であった。

感染推定日は、月別発生割合をツツガムシ病患者発生と比較すると、夏季から秋季の発生(70%)が多く、4月から11月初旬までの期間の幅があり、7例はツツガムシ

病発生多発期(30%)にも認められた(図2)ことから、本県の場合通年で両疾患を疑い検査診断すべきである。

感染推定地は、県東部大隅半島の2市6町に限られていた(図3)。これは石田らの報告⁸⁾と同様の結果であったけれども、この地域を即 *R. japonica* 媒介マダニのホットスポットと決定するには、依頼検体数及び医療機関数等種々の要因を考慮するとともに、今後の発生状況の推移により媒介マダニ類の調査等を必要と考える。また、薩南諸島における届出は確認されていない。

感染機会として、山地や農地での森林作業と農作業中がほとんどで、居住地が山間部にあることから自宅周辺での感染も多く、高齢者では身近な所での感染もあった。

臨床所見では、陽性患者の91%に刺し口が有り、刺し口部位は、手足が33%、腹部が24%、背部が24%であった。発熱は96%とほとんどの患者に認められ、発熱(最高体温)平均は39.0℃で、有熱期間は平均5.9日であった。発疹は、全例の100%に認められ、全身が52%、腹部・手足が26%で、求心的発疹の拡がり方は、発病から来院までの日数によって若干異なった。リンパ節腫脹は53%に

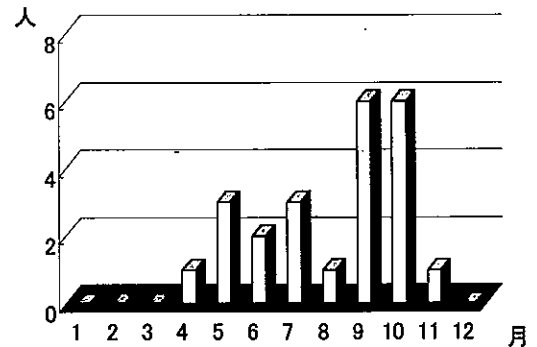
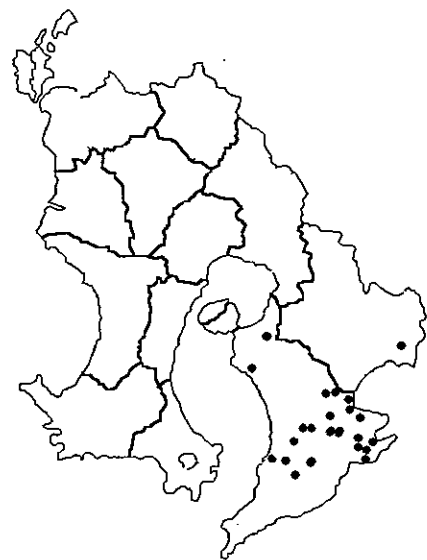


図2 日本紅斑熱月別患者報告数(2000~2002)



●: 患者感染推定地

図3 日本紅斑熱患者感染推定地(2000~2002)

認められ、症状としては、全身倦怠、頭痛、筋肉痛を訴える症例がほとんどであった。

検査データをみると、白血球数は3,200から11,200(平均7,711)と幅があったが、これは採血時期による影響もあると考えられる。CRP上昇は、記載のあった全例の100%に、肝機能データ上昇は73%に認められた。また、23例中1例(表1 No. 17)は、重症化しDICを併発していた。

3. 2 患者血液からの病原体分離結果

現在、鹿児島県においては日本紅斑熱患者血液から病原体 *R. japonica* を分離していない。

今回はできる限り、依頼検体が当センターに届き次第前述(2.2で示した)の方法で検体処理を実施したけれども、表1に示すとおり、全ての症例の急性血及び回復期血から *R. japonica* の分離はできなかった。原因は、検査材料としての血液は、あくまで血清抗体価検査の目的で依頼搬入されるが、病原体分離を目的に採取・保冷・搬送されていないことも考えられる。本県は全国最多のツツガムシ病患者届出があるためか、医療機関において急性期血採血前にリケッチア感染症を疑い、すでにテトラサイクリン系抗生剤の投与を開始しており、遺伝子検査(PCR)に不相当と考えられる。このことから今後は県内医療機関の協力を得て、病原体分離に最適な患者血液の確保に努め、県内で発生する日本紅斑熱病原体の確認をする必要がある。

3. 3 遺伝子学的(PCR)検査結果及びIF法検査結果

表1に示すとおり、全ての症例の急性期血及び回復期血から、病原体 *R. japonica* と紅斑熱群リケッチアに特異的なバンドは、確認できなかった。それは、前述(3.2)で推察したようなことに起因していると考えられた。

また、現在感染症法の日本紅斑熱届出基準によると、病原体診断や血清診断が成されなければ届出ができず、早期診断・早期治療が必要な疾患にもかかわらず、回復期血清抗体価上昇の有無を待つて、判断せざるを得ない状況にある。そこで、今回我々はIF法に代わる早期診断法の確立を目的に、依頼検査を受け使用している患者検体を用いてのPCR検査を初めて試みた。しかし、検体の採血条件、搬送条件等を考慮しなければ早期確定診断には使用できないと考えられた。

なお、図4はIF法で使用している抗原 *R. japonica* YH株に感染させたVERO E6細胞(ミドリザル腎組織)を、適量ヒト血漿に添加し、2.3.1で示した方法でDNAを抽出し、2.3.2のプライマーでPCRを実施したものである。レーン1から5までは1stPCRで、レーン6か

ら10までは、1st PCR産物をさらに同一条件で、2ndPCRしたものである。当センターのツツガムシ病検査検体数の推移(秋から冬にかけ検査依頼が集中すること)を考えると、今回試みた一連の検体処理、DNA抽出、PCR(1st, 2nd)のトータル処理時間では、早期診断には、まだ改良の必要があり、ルーチン検査法として用いるには、現在のIF法が適していると思われた。

現在使用している血清診断IF法では、表1に示すとおり、急性期血清では抗体価が低値の傾向を示し、回復期血清で有意な抗体価の上昇を示す症例が多かった。このことから、できる限りペア血清での確定診断が必要と考えられた。

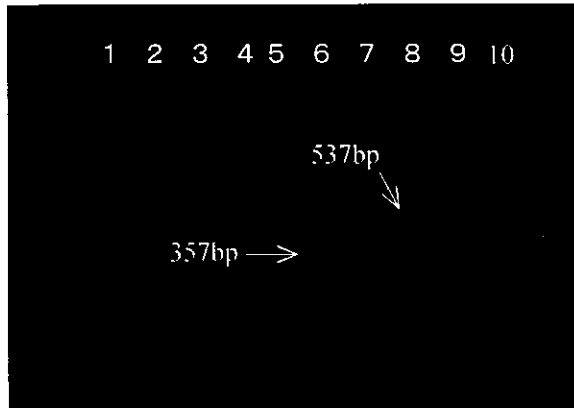
また、急性期から高抗体価を示す症例は、感染推定日から、医療機関を受診し採血・検査日まで、かなり経過している場合がほとんどであった。

さらに症例 No. 4の場合、急性期血清でのツツガムシ

表 1 分離・PCR・IF法検査結果(2000~2002)

		n=23				
症例 No.	分 離	PCR	IF 急性期抗体価		IF 回復期抗体価	
			IgG	IgM	IgG	IgM
1	(-)	(-)	40	20	320	160
2	(-)	(-)	20	<20	1280	80
3	(-)	(-)	20	20	1280	320
4	(-)	(-)	≥2560	≥2560	≥2560	1280
5	(-)	(-)	640	320	1280	640
6	(-)	(-)	40	20	≥2560	1280
7	(-)	(-)	40	160	160	1280
8	(-)	(-)	80	80	1280	1280
9	(-)	(-)	<20	<20	160	40
10	(-)	(-)	20	<20	640	160
11	(-)	(-)	20	40	320	160
12	(-)	(-)	40	80	640	640
13	(-)	(-)	320	160	1280	1280
14	(-)	(-)	640	160	*	*
15	(-)	(-)	640	1280	*	*
16	(-)	(-)	160	160	*	*
17	(-)	(-)	1280	320	*	*
18	(-)	(-)	640	640	*	*
19	(-)	(-)	<20	<20	640	320
20	(-)	(-)	<20	<20	640	160
21	(-)	(-)	<20	<20	1280	640
22	(-)	(-)	<20	<20	160	640
23	(-)	(-)	<20	<20	320	640

*;検査せず



レーン1, 2 : primerRj5+primerRj10
 レーン3, 4 : primerR1+primerR2
 レーン5 : Negative control
 レーン6, 7 : primerRj5+primerRj10
 レーン8, 9 : primerR1+primerR2
 レーン10 : Negative control

} 1st PCR
 } 2nd PCR

図 4 PCRによる*R. japonica* DNAと紅斑熱群
リケッチアDNAの検出 (YH strainによる)

病関連株 Kawasaki株, Kuroki株に対する IgG が高抗体価であったけれども、回復期血清では抗体価の上昇がなかったことから、残存抗体（以前ツツガムシ病に感染）と判定した。このことから、ツツガムシ病患者発生の多い本県では、このような症例が少なからず存在することが示唆された。

4 まとめ

日本紅斑熱陽性23例(2000年～2002年)の疫学調査解析と、患者血液からの病原体分離及び遺伝子学的検査(PCR)を行い検討した結果、以下のことが明らかになった。

- 1) 感染推定地は県東部大隅半島(2市6町)に限られ、4月から11月にかけて患者が発生していた。
- 2) 患者の性別・年齢・作業内容等については、ツツガムシ病患者に類似していたが、臨床症状は若干異なる点もあり、なかにはDICを併発し重症化した症例もあった。
- 3) 患者血液からの病原体(*R. japonica*)分離及びPCRによる本疾患に特異的バンドの検出は確認できなかった。これは、医療機関での採血方法、検査検体搬送方法、検査術式等によることが考えられ、今後の課題である。
- 4) IF法による確定診断のためには、急性期血清と回復期血清のペア血清による同時測定が必要である。

以上のことから、今後本県における日本紅斑熱患者発生の推移に注意しながら、医療機関の協力を得て急性期患者血によるPCR法による早期診断の確立、および病原体分離を実施したい。また、リケッチアの媒介マダニ(ベクター)と宿主動物(リザーバー)の調査も検討していきたい。

5 おわりに

今回調査に協力頂いた県内医療機関の関係各位、並びに、PCR検査技術のご教示を頂いた神奈川県衛生研究所の片山丘先生、病原体リケッチア分離法のご教示を頂いた大原総合病院附属大原研究所の藤田博己先生に深謝致します。

参考文献

- 1) 馬原文彦, 古賀敬一, 他; わが国初の紅斑熱リケッチア症. 感染症誌, 59, 1165-1171(1985)
- 2) 内田孝宏; 紅斑熱リケッチア症一病原体. 感染症誌 61, 1302-1303(1987)
- 3) 坪井義昌; 日本における紅斑熱の現況報告. 平成3年度稀少感染症診断技術研究会資料, 22(1992)
- 4) 本田俊郎, 吉國謙一郎, 他; 2000年度つつが虫病発生状況-鹿児島県. 病原微生物検出情報 月報 vol. 22, No9, 4-5(2001)
- 5) Mahara, F.; *Emerg. Infect. Dis.* 3:105-111(1997)
- 6) 国立感染症研究所(レファレンス委員会) 地方衛生研究所全国協議会編集/発行; リケッチア感染症診断マニュアル. 10-12(平成12年)
- 7) Furuya Y, Katayama, et al; Specific amplification of *Rickettsia japonica* DNA from clinical specimens by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 487-489(1995)
- 8) 石田孝仁, 吉國謙一郎, 他; 鹿児島県における紅斑熱群リケッチア症の調査研究. 鹿衛研報, 28, 46-48, (1992)