

行われている。すなわち、培養された国内株等をもちいた蛍光もしくは発色法などによる血清診断、L929細胞やVero細胞を用いた分離培養法、PCR法による病原体DNAの検出が一般的に行われている。また近年、分担研究者である堤らによって、病理組織を用いた免疫染色法による確定診断も試行されるようになってきている。

一方で、これら診断においては、血清診断では、検査材料として培養された *Rickettsia* 菌体が必要である。また病理免疫染色には、標準化された抗体の供給が必要である。

そこで本研究では、3年間を目処に、これら実験室診断に“実際に用いることの出来る”検査材料の新規開発と検討、複数の検査施設への試験的配布と感度、特異性の検証、検査施設間での標準化と至便性の向上を到達目標とし、研究を行った(図1)。

B. 研究方法

1) 抗 RickA-ペプチド抗体の作成と *R. japonica* 分離株を用いた免疫染色

実験室診断への応用が可能と考えられた *Rickettsia* 遺伝子として RickA 遺伝子を候補として選択した。抗原として適切な部位の予測を行い、以下4配列に対しペプチド抗体を作成した。

配列1 (31-44) C+IEIQNETKALEKEH

配列2 (112-125) C+NFKDLTKKDLKSKDQ

配列3 (178-191) C+ISENSNIRELKEIQ

配列4 (230-243) C+KNKESNTRTISKIE

また免疫染色は、藤田保健大学、堤寛、玉熊桂子両氏との共同研究にて以下のように実施した。

1. 脱パラフィン

2. 内因性POD阻止;0.3%過酸化水素加メタノール 室温30mins

3. 流水水洗;5mins

4. 抗原性の賦活化

1) 未処理=PBSへ

2) 加熱処理=CB6, EDTA溶液を用いる

3) 酵素処理=Proteinase K (0.002%) 室温15mins

5. 流水水洗;5mins

6. PBS洗浄

7. 一次抗体;湿潤箱中 室温一晚(約20hr.)

8. PBSで洗浄;1回

9. 二次抗体;湿潤箱中 室温30mins

Histofine Simple Stain MAX-PO (MULTI) #424151 ニッスイ

10. PBS洗浄;3回

11. DAB発色;2.5mins

12. 流水水洗

13. ヘマトキシリンで軽く核染色

14. 流水水洗

15. PBSで色出し

16. 脱水, 透徹, 封入

2) 国内分離株における RickA 遺伝子の普遍性, および塩基配列の決定

RickA 遺伝子の塩基配列決定のため、ゲノムシーケンスが完了した紅斑熱群リケッチアの RickA 遺伝子の Multiple alignment を作成、保存領域を調べ、PCR 用 primer 候補を表1のように作成した(H18年度)。

表1.本研究で用いた primer 配列

Primer	Ologonucleotide dequence (5'-3')
rickA-F1	AATAAATTATTAGCACAAGA
rickA-F2	TAGCACAAGAAAATAATGCT
rickA-F3	GTTGCAAGGTTTAATCGAAA
rickA-F4	TTAATCGAAATACAAAATGA
rickA-F5	AAAAAGTGAAGAACAGTTAA
rickA-F6	GAACAGTTAACAAATGAAGC
rickA-F7	CAAATGAAGCAATAAAGTAT
rickA-R1	TCAGCAACCTGTTTTGTAT
rickA-R2	AACATTTTTAACATTTTGCC
rickA-R3	TGCTAAAACCTGCTCACTAT
rickA-R4	CTTTGTTTTTGTCTAAAACC
rickA-R6	TAATTCCTCAAATTTATGCT
rickA-R7	TACTTACTATCTTTTGTAAAC

死菌体より抽出した DNA を鋳型とし PCR の条件設定を行った。使用した株は *Rickettsia japonica* FLA-1 株、*Haemaphysalis kitaokai* 分離の未同定 *Rickettsia* 株、および *Haemaphysalis longicomis* より分離された *Rickettsia marmionii*

LON-2 株である。死菌体は大原研究所、藤田博己博士より分与を受けた。死菌体からの DNA 抽出は Genomic DNA purification kit (Promega)を用い、添付仕様書に準じて DNA 抽出精製を行った。PCR 反応条件は 95°C(10 秒)→50°C(30 秒)→72°C(30 秒)で 30 サイクル行った。PCR 反応後、反応液は 0.8% Agarose gel 電気泳動、EtBr 染色にて電気泳動し、増幅産物を確認した。

増幅産物の direct sequencing を行い、塩基配列の決定を行った。増幅 DNA は High pure PCR product purification kit(Roche)にて精製後、増幅に使用した primer にて direct sequencing を行った。

また、国内分離株 3 株を用いた場合の増幅産物の増幅効率から rickAF2/rickAR7 primer

set を、同定用 primer として一次的に選択、*R. helvetica* (IP 株群、IC-1 株)、*R. asiatica* と考えられる株(Jeju-6 株)、IriTA2, In56 等の未同定 *Rickettsia* sp.(IA 株群, IN 株群)についてその塩基配列を direct sequencing により決定した。

C. 研究結果 および D. 考察

ペプチド抗体作成に先立って、*R. japonica* RickA 抗原の抗原性を検討した結果を図 2a に示した。抗体作成部位は 1)疎水性(図 2b)、2)Flexibility(図 2c)、および 3)推定 2 次構造(図 2d)に基づいて設計される。これら情報から 4 種類の抗原性を付与すると考えられるペプチド配列を合成、抗血清を作成した。

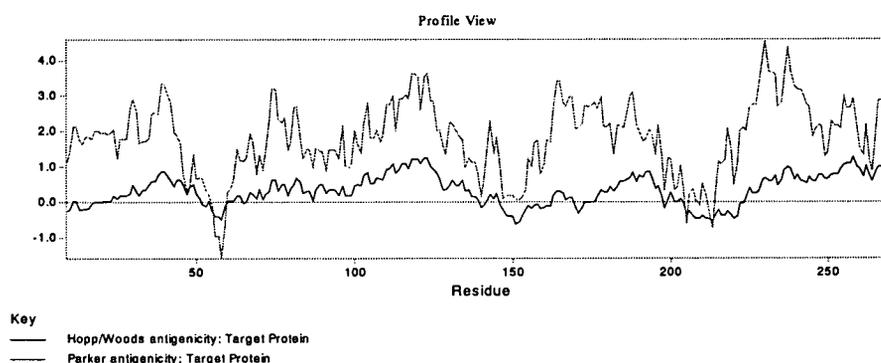


図2a. RickA抗原N'末端actin結合サイトの抗原性プロット
— Hopp/Woods Antigenicity — Parker Antigenicity

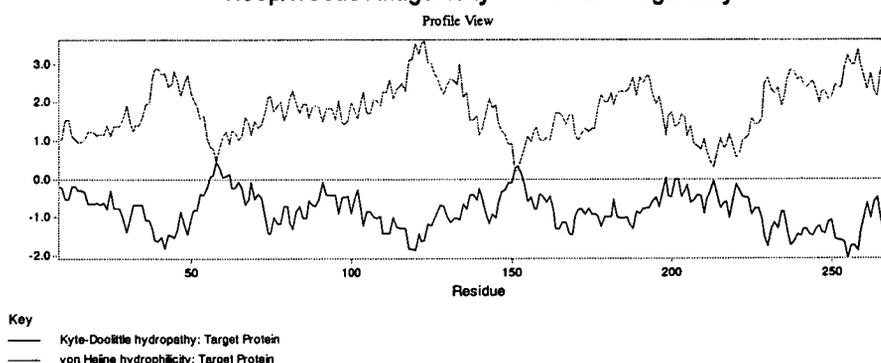


図2b. RickA抗原N'末端actin結合サイトの疎水性プロット
— Kyte-Doolittle hydrophobicity — von Heijne hydrophilicity

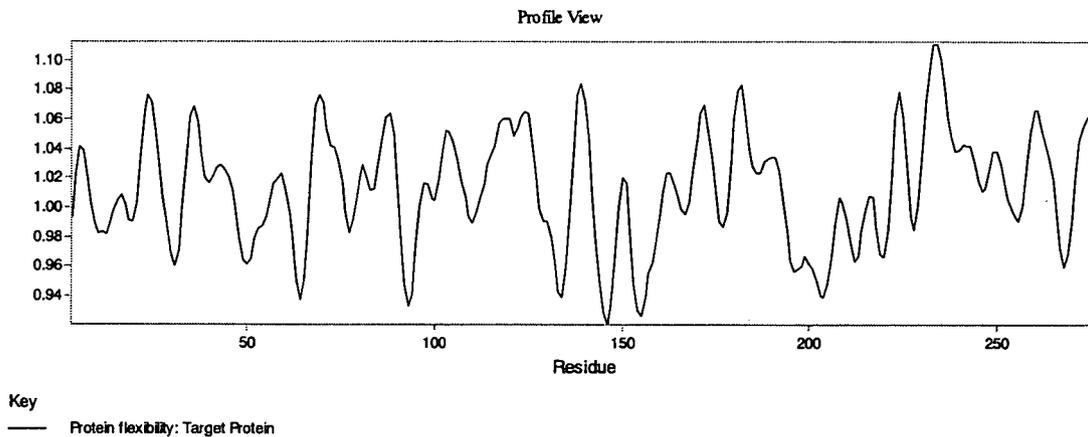


図2c. RickA抗原N'末端actin結合サイトのFlexibilityプロット
— Protein Flexibility

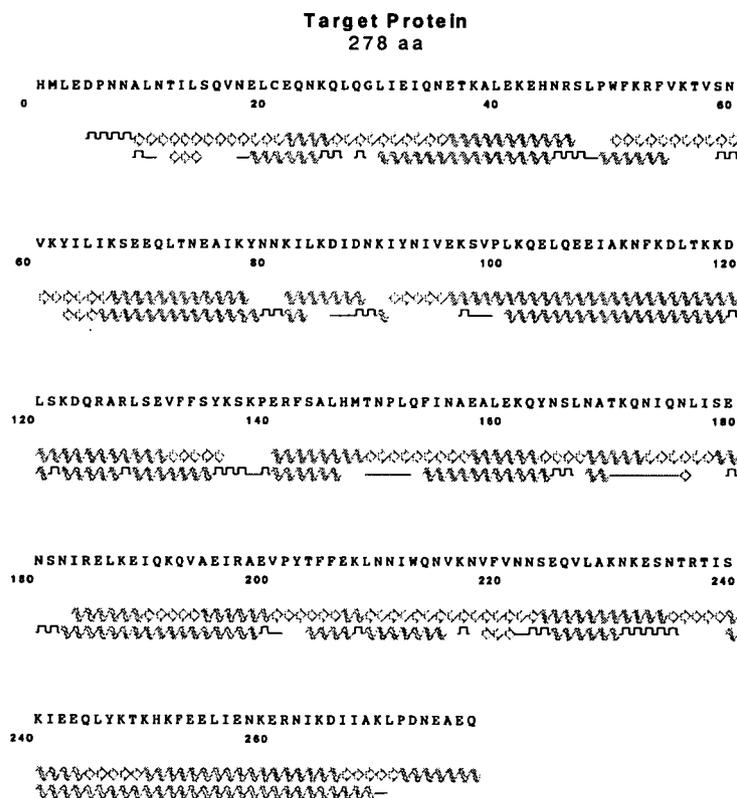


図2d. RickA抗原N'末端actin結合サイトの推定Secondary Structure

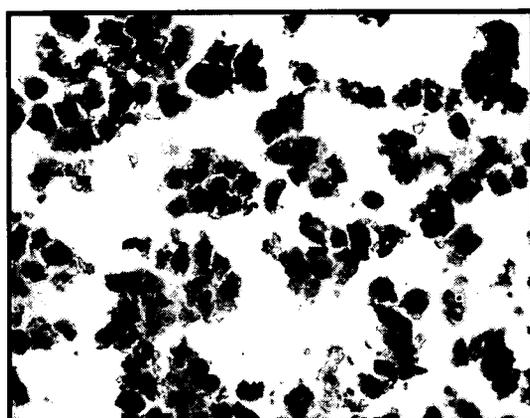
作成した抗ペプチド抗体の反応性を調べ、代表的な結果を図3に示した。前処理の方法によって、反応性が変化することが示された(表2)。このことから今後、反応条件についてさらに検討する必要があると考えられた。また、これら抗体設計部位についてはリ

ン酸化、糖鎖付加の可能性が考えられることから、またこれと平行して、モノクローナル抗体のcharacterization、反応エピトープの決定により、抗ペプチド抗体を作成する、なども検討している。

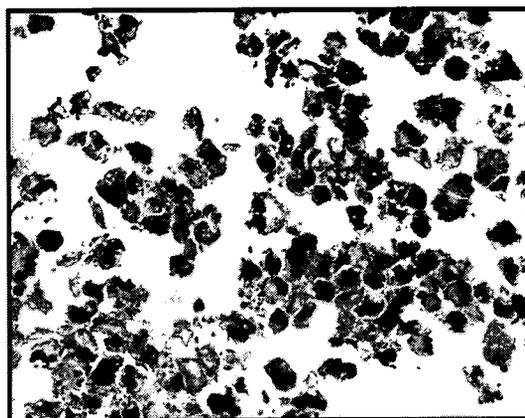
表 2. 各ペプチド抗体の反応性(玉熊、堤による)

Anti-peptide antibody	Pretreatment	Antibody dilution	
		×250	×1000
8475: 抗 IEIQNETKALEKEH 抗体 (31-44)	Not treated	+*1	+ (weak)
	Proteinase K	Inapplicable	-
	pH 6	+	Inapplicable
	EDTA	Inapplicable	Inapplicable
8476: 抗 NFKDLTKKDLKSDQ 抗体 (112-125)	Not treated	+*1	-
	Proteinase K	+	-
	pH 6	Inapplicable	Inapplicable
	EDTA	Inapplicable	-
8477: 抗 ISENSNIRELKEIQ 抗体 (178-191)	Not treated	+*1	-
	Proteinase K	+	-
	pH 6	Inapplicable	-
	EDTA	Inapplicable	-
8478: 抗 KNKESNTRTISKIE 抗体 (230-243)	Not treated	++	+++*1
	Proteinase K	+	+
	pH 6	+	Inapplicable
	EDTA	Inapplicable	-

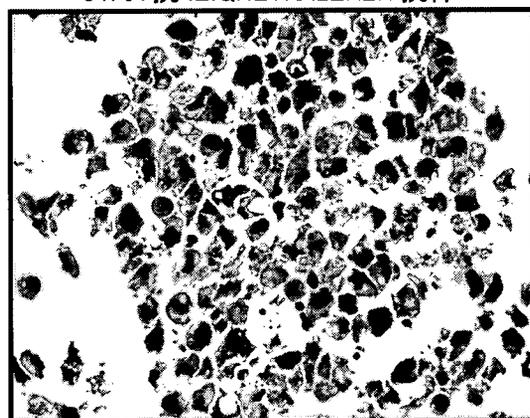
*1:各抗体による染色像を図3に代表例として示した。



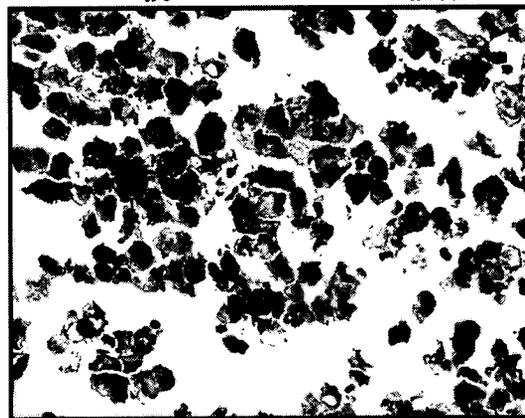
8475: 抗 IEIQNETKALEKEH 抗体



8476: 抗 NFKDLTKKDLKSDQ 抗体



8477: 抗 ISENSNIRELKEIQ 抗体



8478: 抗 KNKESNTRTISKIE 抗体

図3. 各抗体による実際の染色像(玉熊、堤による)

RickA遺伝子の塩基配列をもとにした紅斑熱

群リケッチアの系統解析結果を図4に示した。

本研究で使用したDNAは、17kDa抗原遺伝子、citrate synthase遺伝子(*gltA*)、および16SrRNA遺伝子配列、および一部抗血清の反応性等から同定済みのリケッチア株より

抽出した。この結果、RickA遺伝子の配列による系統解析は可能であることが明らかとなった。

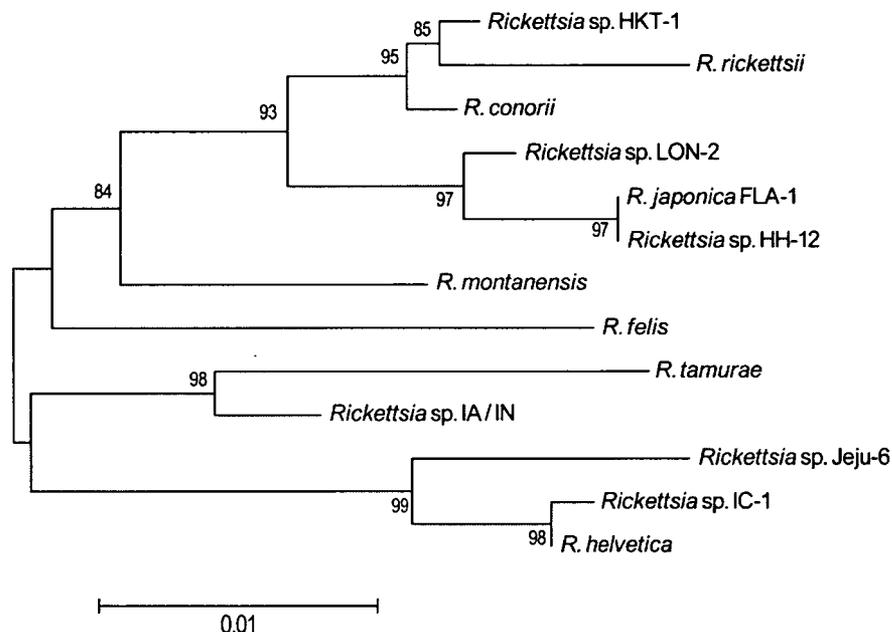


図4. 国内分離株における RickA 遺伝子と系統解析

また表3に、これら株より得られた遺伝子情報を整理し、高度に保存されている領域を示した。

表 3. 本研究で推定された病原体検出用至適 primer 配列

Primer	Ologonucleotide dequence (5'-3')
RickA diag-F	GAAGAACARTTAACAAATGAAG
RickA diag-R	CTAATTCAGCAACCTGTTT

本プライマーの感度、特異性については今後検討し、成績が良ければ、検査用プライマーとしての評価を進める予定である。

E. 結論

病原体診断ツールとしての、抗ペプチド抗体、PCR 用プライマー検索を行った。病理診断用の抗体については、検出方法などにつ

いて検討の余地がある。RickA 遺伝子は紅斑熱リケッチアで広範に保持されていることから診断ツール、型別ツールとして有望であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

発表論文、著書

1. Fujita H, Takada N, Kawabata H, Ishiguro F, Yamamoto S, Oikawa Y, Yano Y, Ma XH, Oh HS. Some suggestive records of rickettsiae isolated from ticks in Korea and central China. Annual report of Ohara General Hospital. 47: 21-24, 2007.

学会発表

1. 鶴見みや古、尾崎清明、藤田博己、川端寛

樹、安藤秀二、高橋守.鳥類標識調査における外部寄生虫採取調査.-2006 年度調査結果および本年度経過報告-.日本鳥類標識協会全国大会.2007 年 12 月.東京

2. 藤田博己, 角坂照貴, 高野愛, 川端寛樹, 本田俊郎, 御供田睦代, 及川陽三郎, 山本正悟, 高田伸弘.トカラ列島のマダニ類とツツガムシ. 日本衛生動物学会西日本支部会. 2007 年 10 月.大津
3. 花岡 希, 安藤秀二, 坂田明子, 川端寛樹, 高野 愛, 岸本寿男, 倉根一郎. PCR 法を用いたリケツチア症病原体検出法の改良—コンタミネーション防止のためのポジティブコントロール作製—. リケツチア・クラミジア研究会. 2007 年 10 月.東京
4. 藤田博己, 安藤秀二, 川端寛樹. 福島市の山林におけるタネガタマダニの紅斑熱リケツチア保有状況調査. 日本衛生動物学会北日本支部会. 2007 年 9 月.仙台
5. 藤田博己, 高田伸弘, 川端寛樹, 田原研司, 高野愛, 山内健生, 川森文彦. 東北地方中部のマダニ相とマダニ保有リケツチア検査. 日本衛生動物学会北日本支部会. 2007 年 9 月.仙台
6. 高野 愛, 安藤秀二, 坂田明子, 鶴見みや古, 仲村 昇, 佐藤文男, 高橋 守, 岸本寿男, 倉根一郎, 渡邊治雄, 藤田博己, 川端寛樹. *Carios* 属ダニの病原体ベクターとしてのリスク評価. 日本衛生動物学会北日本支部会. 2007 年 9 月.仙台

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

日本紅斑熱の早期診断と病理学的解析

分担研究者

堤 寛 藤田保健衛生大学医学部第1病理学、教授

研究協力者：

馬原文彦 馬原医院、徳島県阿南市（藤田保健衛生大学医学部客員教授）

稲田健一 藤田保健衛生大学医学部第1病理学、准教授

宇都宮洋才 和歌山県立医科大学中央研究機器施設、講師

宮本和明 和歌山県立医科大学微生物学、講師

武田公一 和歌山県立医科大学第2病理学、博士研究員

玉熊桂子 藤田保健衛生大学医学部第1病理学、大学院生

研究要旨

日本紅斑熱の早期診断法として、皮膚生検（刺し口、皮疹部）のホルマリン固定パラフィン切片を用いた免疫染色の有用性を確立し、実際のヒト症例へ応用した。血清診断より早期にリケッチア症の確定診断が可能となった。ただし、抗体は紅斑熱群リケッチア共通抗原を認識するため、今後、日本紅斑熱特異的な抗体を用いた特異的診断を計画している。さらに、皮膚生検材料を用いたPCR法を開発中である。固定後組織を用いることで、感染リスクをゼロにすることができる意義は大きい。また、日本紅斑熱の剖検例2例の解析を行い、重症感染症の病態を病理学的に検討した。一方、P3実験室を利用した動物への感染実験は今のところ不成立であり、日本紅斑熱感染の全身病変の観察は不十分である。人畜共通感染症としての意義もこれからの課題といえる。

A. 研究目的

日本紅斑熱は毎年症例数が増加し、死者が報告されている重症感染症であり、公衆衛生学上の適切な対策における早期診断の重要性が高まってきている。本研究では、日本紅斑熱の迅速な診断のための方法論としての病理診断法の確立をめざすとともに、重症死亡例の病理学的解析を目的とする。さらに、人畜共通感染症としての日本紅斑熱の可能性を明確にするために、イヌやマウスを用いた感染動物実験を施行して、全

身感染症としてのリケッチア症の病態を病理学的な立場から解明する。

研究の軸は以下の3点である。

- (1) 日本紅斑熱の早期診断法の確立と応用
 - a) 皮膚生検に対する酵素抗体法による特異的診断法の確立と応用
 - b) PCR法によるリケッチアDNA証明法の確立と応用
- (2) 致死的症例の病理学的病態解析
- (3) 人畜共通感染症としての日本紅斑熱の可能性の検討

B. 研究方法

- (1) ホルマリン固定パラフィン切片に対する酵素抗体法（アミノ酸ポリマー法）：
 - a) 10 mM クエン酸緩衝液（pH 7）による加熱賦活化処理（圧力鍋を利用）を行う。
 - b) 一次抗体は *Rickettsia japonica* 抗原に対する 2 種の IgM 型マウスモノクローナル抗体（S3、X1）を用いる。
 - c) 早期診断の対象は、刺し口ならびに皮疹部からの皮膚生検組織（ホルマリン固定パラフィン切片）とする。ホルマリン固定処理により、バイオハザードは完全に消失している。そのほか、剖検症例や実験動物の臓器のホルマリン固定パラフィン切片対象とする。陽性対照は、*R. japonica* 感染性培養 L 細胞の cell block 標本とする。
- (2) 新規抗体の開発：*R. japonica* に対する市販モノクローナル抗体と国立感染症研究所、川端寛樹博士の開発したペプチド抗体を新たに検討する。
- (3) PCR 法（SYBR-Green 法による real-time PCR）：とりあえず、17k genus-common antigen および citrate synthase (gltA) をコードする遺伝子を標的とする。
- (4) PCR 法の日本紅斑熱リケッチア特異性の確認
PCR プライマーを諸種工夫して、他種リケッチアとの鑑別法を確立するとともに、PCR 産物の塩基配列を sequencing により確認する。
- (5) 感染実験：ビーグル犬の頸部皮下およびマウス（正常マウス、免疫抑制剤＝シクロフォスファミド投与マウス、およびヌ

ードマウス）腹腔内に L 細胞内で培養した *R. japonica*、Aoki 株を投与し、リケッチア増殖の促進を観察する。組織学、免疫組織化学、PCR 法、血清学による解析を行う。和歌山県立医科大学動物実験室の P3 施設を利用する（宇都宮洋才博士、武田公一博士、宮本和明博士の協力による）。

（倫理面への配慮）

- a) 皮膚生検には患者から必ずインフォームド・コンセントをとる。
- b) 感染動物実験にあたっては、藤田保健衛生大学および和歌山医科大学の疫学研究に対する倫理審査委員会の了承を得る。

C. 研究結果

- (1) 皮膚生検による早期診断法の確立
ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた紅斑熱リケッチア共通抗原の免疫組織化学的証明（マウスモノクローナル抗体 S3 および X1 による）：刺し口では主としてマクロファージ、紅斑では主として血管内皮細胞に顆粒状に陽性だった（加熱前処理は必須条件だった）。一部の刺し口では、感染性壊死性血管炎の所見を認めた。
- (2) 皮膚生検による早期診断の応用
徳島県、三重県、和歌山県における感染疑い症例の皮膚生検に免疫染色を応用し、早期診断ならびに鑑別診断に貢献した（伊勢保健所の協力を得た）。血清抗体価上昇に先んじて、陽性所見が得られた。
- (3) 他の抗体の検討

米国 Fuller Laboratories 社の市販モノクローナル抗体および川端寛樹博士の開発したペプチド抗体4種による免疫染色は、感染L細胞の cell block 標本には応用可能だったが、残念ながら実際の臨床検体には応用不可能だった。

(4) 剖検例におけるリケッチア抗原の分布
兵庫県立淡路病院および徳島大学病院の剖検症例を解析し、全身の血管内皮細胞およびマクロファージへの感染を確認した (S3、X1 抗体による)。消化管粘膜の血管内皮下への感染マクロファージの集簇、尿管上皮細胞・肝細胞への感染がとくに特徴的だった。

(5) ホルマリン固定パラフィン包埋材料からの紅斑熱リケッチア DNA の証明

R. japonica を感染させた培養 L 細胞および皮膚生検のホルマリン固定パラフィン標本から、real-time PCR 法によって紅斑熱リケッチア DNA の検出を試みた。感染細胞の標本から特異的なバンドが検出された。ただし、皮膚生検標本では特異的バンドの検出の再現性が不十分のため、現在、PCR の増幅条件を検討中である。PCR 産物の長さが 100 塩基対程度になるように工夫することも重要なポイントとなるであろう。

(6) 人畜共通感染症の可能性の検討
急死した日本紅斑熱患者の飼い犬の脾臓胚中心および腎尿管にリケッチア抗原陽性所見を確認した (S3、X1 抗体による)。

(7) ビーグル犬を用いた感染実験
大原研究所の藤田博己博士から提供された日本紅斑熱リケッチア Aoki 株を2頭のイヌ (ビーグル犬) の皮下に投

与し、1ヶ月後に剖検。血清抗体価の上昇を確認したが、感染の成立は確認できなかった。S3、X1 抗体による免疫染色は、イヌでは非特異反応をもたらすことが判明した。したがって、(6)の陽性所見は再検討を要するといえる。

(8) マウスを用いた感染実験
培養日本紅斑熱リケッチアをマウス腹腔内に投与し、感染の成立を観察した。免疫抑制状態 (シクロフォスファミド投与およびヌードマウス) でも動物は特別な症状を呈さず、死亡もしなかったため、1ヶ月後に屠殺した。PCR 法により、ヌードマウス脾臓からリケッチア DNA が検出された。組織学、免疫組織化学、PCR 法、血清学による解析を継続している。

D. 考察

日本紅斑熱の早期診断に、皮膚生検を用いた酵素抗体法がきわめて有用だった。血清抗体価の上昇に先んじて診断が可能で、血液を対象とした PCR 法による DNA 診断が不安定な (再現性に乏しい) ため、現在のところ、もっとも早期に診断を確定できる手法となっていることは間違いない。実際に、この方法が実例に応用され、早期診断・早期治療に貢献してきている。皮膚生検組織を利用した PCR 法はさらに速やかにリケッチア症の確定ができ、免疫染色の特異性証明にも利用できると思われる。現在、その精度を検討中である。パラフィン包埋過程で DNA が寸断されるため、最終 PCR 増幅産物の長さをなるべく短く設定することがポイントとなる可能性が高い。ホルマリン固定パラフィン切片を利用する

こうした病理学的アプローチは、バイオハザードのない、いつでもどこでも安心して行える点が大きな利点となることをとくに強調したい。

致死的日本紅斑熱症例の解析は、本症の病態解明にとって欠かせない病理学的アプローチである。現在のところ、2例の解析が行われ、腸粘膜病変や腎尿管病変などユニークな組織所見が観察されている。今後、死亡例の病理解剖を待って、さらに解析を進める予定である。重症例の予知は、今後の重要なテーマである。皮膚生検（皮疹）の1例で確認された壊死性血管炎の所見が重症例の所見かどうか、今後さらに検討したい。

人畜共通感染症の証明は、本研究のもう一つのメインテーマである。イヌとマウスを用いた感染実験を実施中だが、現在のところ、これら動物へのリケッチア感染は証明できていない。用いたリケッチア株（Aoki株）が比較的弱毒だった可能性があるため、今後、株を替えて、さらに検討する予定である。モルモットを対象とすることも視野に入れている。

E. 結論

本研究の意義は以下のようにまとめられる。

- (1) 皮膚生検に対する免疫染色による日本紅斑熱の早期診断を確立し、人体例に応用した。病変部を対象としたPCR法による迅速診断は現在検討中である。
- (2) ホルマリン固定パラフィン包埋切片によるバイオハザードのない安全な診断法を確立した。
- (3) 剖検例の解析による重症例の病理学的

な病態解析をはじめて実施した。

- (4) P3実験施設を利用した感染実験をイヌとマウスを対象に試みた。現在のところ、リケッチアの感染は証明されず、人畜共通感染症の証明には至っていない。

F. 研究発表

1. 論文発表

- a) Tsutsumi Y. Pathology of Infectious Diseases (web site)
http://info.fujita-hu.ac.jp/_tsutsumi/index.html, 2003
- b) 馬原文彦、堤 寛. ツツガムシ病・日本紅斑熱の臨床と病理. 病理と臨床 21(臨時増刊):186-192, 2003
- c) 堤 寛、下村龍一. *in situ* hybridization法を利用した細菌感染症の病理診断(技術講座 病理). 検査と技術 33(9):809-816, 2005
- d) 堤 寛、馬原文彦. 日本紅斑熱の早期診断:皮膚生検を利用した免疫染色の実用性. 病原微生物検出情報(月報) 27(2)(No.312):12-14(38-40), 2006
- e) 堤 寛、下村龍一. ホルマリン固定パラフィン包埋標本から遺伝子変異/発現はどこまで検索できるか? *in situ* hybridization法による感染症の病理診断. 病理と臨床 24(3):83-88, 2006

2. 学会発表

- a) Tsutsumi Y. Histopathological diagnosis of Japanese spotted fever. The 4th International Conference on Rickettsiae and Rickettsial Diseases, Logrono (La Rioja), Spain, 2005
- b) Tsutsumi Y, Mahara H. Pathology of

Japanese spotted fever. 2006
Joint Meeting : The 20th Meeting
of the American Society for
Rickettsiology and The 5th
International Conference on
Bartonella as Emerging
Pathogens, California, U.S.A,
2006

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：とくになし
2. 実用新案登録：とくになし
3. その他：とくに予定なし

マダニ試料からのリケッチア分離マニュアルの試案

分担研究者 藤田博己（大原総合病院附属大原研究所）

要旨:マダニ試料からのリケッチア分離に汎用されている培養細胞への接種法の簡素化と効率化とともに、分離の難度の高い種類への適用を目指したマニュアル作成を試みた。現在、このマニュアルに沿った分離検査を実施中で、今後の評価用データを集積しつつある。検査対象のリケッチアの性状は必ずしも一様ではないので、各種のリケッチアの分離に広く適用できるように改良を積み重ねていく必要がある。

内容

- ・ 目的
- ・ 容器・器具類
- ・ 試薬類
- ・ 培養細胞の準備
- ・ 接種液調製の作業手順
- ・ 細胞への接種とそれ以後の作業手順
- ・ 分離の確認
- ・ 作業手順の一部簡略化のための変法
- ・ 雑菌汚染回避の一案
- ・ 分離高難度リケッチアに対する変法の試行
- ・ 分離確認作業の注意点
- ・ 分離株からの雑菌除去法
- ・ 国内のマダニ由来リケッチアの種類別にみた分離の難易度
- ・ 付随して分離されることのあるリケッチア以外の微生物
- ・ おわりに

目的

使用する容器類や試薬類の数量を可能な限り制限し、かつ経過観察と結果判定にかかる条件を省力化することは、リケッチア分離検査の効率を上げるための検討課題である。ま

た DNA が検出されながらも分離は不可能あるいは極めて難しいリケッチアの種類については、分離方法の改善が望まれる。

本報告では、現在、その高い分離検出効率から汎用されている「Shell vial」法を簡略化したマニュアルを提案したい。

基本的には分離方法は次のような手順から構成される。

虫体表面の消毒

↓

消毒液の除去・洗浄

↓

内臓摘出

↓

接種液調製

↓

接種

↓

培養

↓

分離判定

以下に大原研究所における分離の実施要領を具体的に記述した。

容器・器具類

- ・スクリューキャップ付平底サンプル管 ガラス製，容量約 3ml (図 1)
- ・シャーレ，直径 6cm と 9cm
- ・ホールスライドガラス，2穴
- ・ガラス棒，直径約 2mm，長さ約 10cm
- ・ガラス製中試験管
- ・中試験管に合うシリコン通気栓
- ・写真フィルムの空き缶
- ・凍結保存用チューブ 1ml 用 (滅菌)
- ・コップ
- ・小型金属製ピンセット (長さ 10cm ほど)
- ・ガスバーナーまたはアルコールランプ
- ・パストールピペット (滅菌)
- ・マイクロピペット 0.1ml 用
- ・ピペットチップ 0.1ml 用 (滅菌)
- ・マイクロ遠沈管 1ml 用

試薬類

- ・洗浄液 0.5% FBS 添加 0.01M PBS, pH 7.2
- ・マダニ内臓浮遊用 SPG 液
- ・細胞培養液 1% および 5% FBS 添加 L-15 (または MEM) 培地，グルタミン入り，抗生物質無添加
- ・マダニ体表消毒液 1% イソジン (明治製菓) 添加 70% エタノール
- ・80% エタノール

培養細胞の準備

L929 を 5% FBS 添加培地，培養温度 37℃ で，サンプル管の底に単層形成直前の状態に増殖させておく。接種直前のサンプル管当りの培養液量は 0.5ml。

器具・試薬類の準備

中試験管に入れたガラス棒 (試験管当り 7, 8 本収納)，直径 9cm シャーレに入れたホー

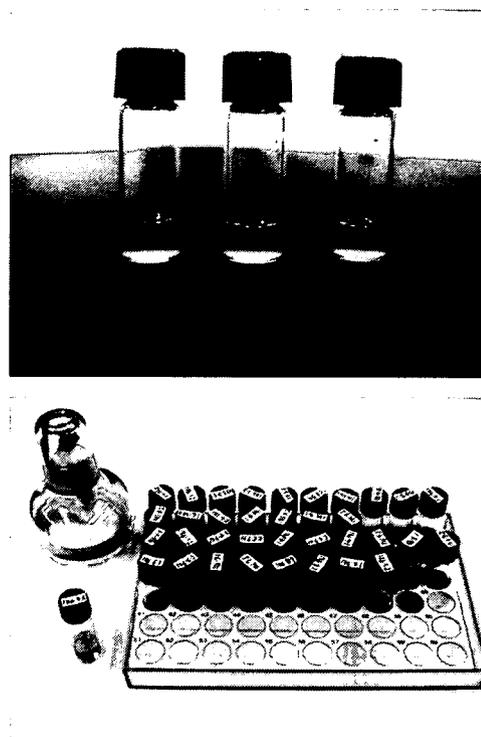


図 1 スクリューキャップ付サンプル管。

上，培養細胞をセットしたサンプル管。

下，マダニ試料を接種したラベル付サンプル管をコンテナに収納した状態。

ルスライドガラス (シャーレ当り 5, 6 枚)，直径 6cm シャーレを乾熱滅菌しておく。

処理直前の準備として，フィルム空き缶に消毒液を約 10ml，直径 6cm シャーレに洗浄液を約 10ml，凍結用チューブに SPG 液を 0.5ml 入れる。処理虫体約 10 個体当りの消毒にはフィルム空き缶 1 個，洗浄にはシャーレ 1 個とし，凍結用チューブは個体数分を用意する。コップに 80% エタノールを深さ約 3cm に入れ，ピンセットの先端を下方向にして浸しておく。

接種液調製の作業手順

1. 虫体を消毒液に投入，容器のふたを閉じ 10 分間浸す。その間に数回激しく攪拌する。
2. 容器を傾けて虫体を底の一箇所に集め

てから、ふたを開き、容器をさらに傾けて消毒液を捨てる。

3. 滅菌したピンセット（バーナーの火にかざしてエタノールを燃焼除去。以後、使用毎にこの滅菌操作を行う）で虫体を取り出し洗浄液に浸す。シャーレを軽く揺さぶる。

4. 虫体を個別にホールスライド上に置いてガラス棒の先端で潰す（図2）。虫体をバラバラに破碎する必要はなく、内臓や体液の一部が流出する程度で十分。流出した内臓は同じガラス棒で軽く破碎する。

5. チューブからSPG液を0.1mlとり、内臓破碎物と混和、チューブへ回収する。必要に応じて凍結保存する。-70℃以下の凍結保存でリケッチアの感染力は長期間維持できる（検証し得た1例では-70℃保存で10年3ヶ月後に分離陽性）。

細胞への接種とそれ以後の作業手順

1. 培養細胞入りサンプル管当り0.05ml～0.1mlを接種する。接種前に培養液を除去する必要はない。

2. 水平ローターで、室温、700×g、30分間遠心する。この操作によって、リケッチアの細胞への侵入が促進される。

3. サンプル管当り1%FBS添加細胞培養液を1ml追加する。FBSの最終濃度は約2.3%となる。

4. 接種済み培養細胞を33℃に7～10日静置する。細胞層を観察して（図3）、状態が悪化しているときには1%FBS添加培養液と交換する。このとき、廃液中の脱落細胞の一部を観察し、リケッチアの感染の有無を調べる（確認方法は次の項目参照）。

分離の確認

1. 細胞の一部回収：パスツールピペットで

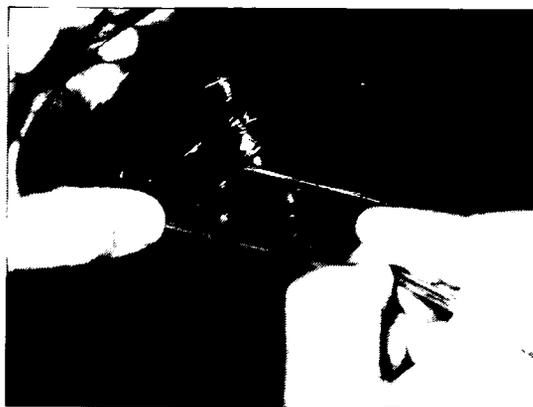


図2 マダニの処理。シャーレ当り2穴ホールスライドガラスを5枚収納すれば、これでマダニ10個体が処理できる。

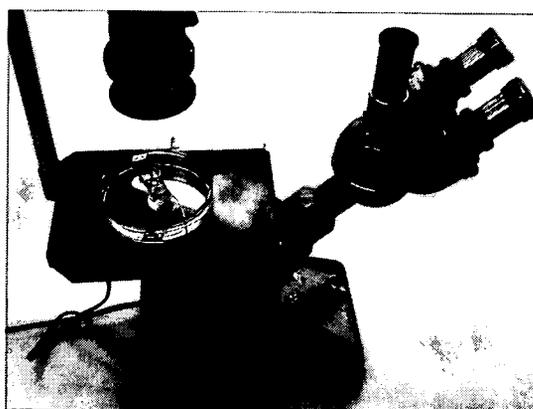


図3 位相差倒立顕微鏡による培養細胞の観察。傾斜を持たせた固定台にサンプル管を置いて、管底の細胞を観察する。固定台は針金とシャーレで簡単に作成できる。

のピペティングで菅底の細胞を剥離させ、1/3量(0.5ml)をマイクロ遠沈菅に回収する。

2. 遠沈濃縮：観察を容易にするために濃縮する。9,000×g, 5分間遠心, 沈渣を0.02mlの培養液に浮遊させる。

3. 鏡検：生標本の位相差顕微鏡観察と固定・染色標本の顕微鏡観察がある。位相差顕微鏡を使用する場合には、少量をスライドグラス上に取り、カバーグラスを載せる。このときの被検液量は、カバーグラス全体におよぶよりも若干少な目にしたほうが細胞質の伸展が良好で細胞内リケッチアが観察し易い。総合倍率400~1,000倍で観察する(図4上)。染色標本作成の場合は、まず被検液少量をスライドグラス上に取り、カバーグラスの端で引き伸ばす。紅斑熱群リケッチア染色には、Macchavello法とその変法のGimenez法が推奨されているが、*Orientia*に汎用されてきたGiemsa染色を次のように行えば、各種リケッチアに対しても簡便で安定した染色像が得られる。標本は乾燥後にメタノールで30秒から1分間固定する。1/150 M PBS, pH 6.4, で5%に調製したGiemsa液(MERCK社)を満たした染色バット中に標本塗抹スライドグラスを垂直に埋没させる。室温で2時間静置後、同PBSを染色バットに静かに注ぎ、液面に浮いた汚れを流出させた後に取り出す。冬季などで室内の気温が低いときには染色時間を2時間半から3時間に延長する。蒸留水で軽く洗浄後に乾燥、封入。総合倍率400~1,000倍で観察する(図4中)。細胞質内に桿菌状の小体が見えたときには分離陽性の可能性が高く、引き続いて同定作業に入る。

作業手順の一部簡略化のための変法

虫体処理と同時に接種する場合、SPG液とそのチューブの使用を省く方法がある。接種

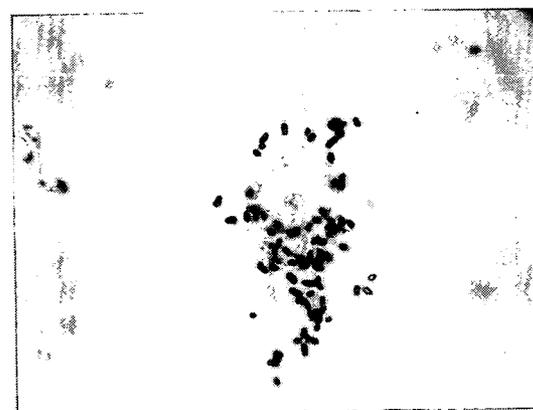
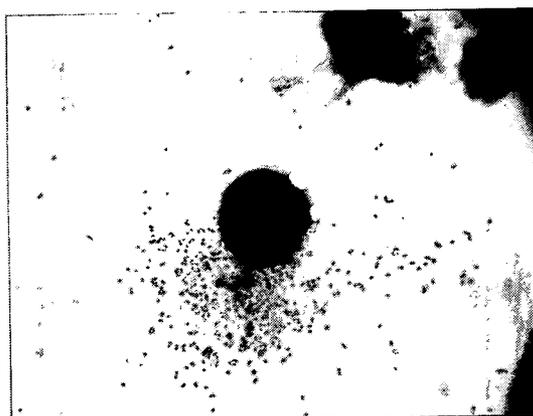


図4 紅斑熱群リケッチア感染細胞の顕微鏡像。

上, 位相差像; 中, Giemsa 染色。

下, 免疫ペルオキシダーゼ染色。

元の培養細胞の容器中の培養液0.1mlを直にSPG液の代わりに使用して再度同じ容器に戻し、軽く混和する。接種液を保存したいときには、接種・混和後に0.1~0.2mlを回収して凍結する。

雑菌汚染回避法の一案

すでに寄生して宿主動物の血液を吸い込んだ虫体などでは雑菌の汚染が頻発することがある。このような場合には10倍階段希釈系を作成して複数の濃度の接種系とすると雑菌汚染をかなりの程度までに回避できる。経験的には、原液や10倍の接種系で汚染があっても100倍から1,000倍希釈液では汚染が回避されてリケッチアが分離できた例があった。

分離高難度リケッチアに対する変法の試行

リケッチアのDNA検査では陽性でありながら分離の困難な種類が知られている。各地のタネガタマダニにはこれまでに不明リケッチア種の保有が知られていて、たとえば徳島県のhemolymph testでの紅斑熱群陽性例や富山県での紅斑熱群DNA陽性例Genotype IXが記録されてきたが、これらは培養細胞で増殖することはほとんどなく、わずかな増殖が一時的に認められたとしても継代は極めて難しかった。この種のリケッチアは今回、培養温度をこれまでの33℃から27℃へ変更することによって良好に増殖させることができた(未発表データ)。ただし、27℃では常法でのL929細胞の維持は難しく、培養条件を各種検討した結果、添加するFBS量を5%とすることで維持が可能であることが分かった。今後は、この条件で維持した培養細胞を用いることによって、タネガタマダニ以外からも新たな種類のリケッチアが分離されてくることが期待される。

分離確認作業の注意点

位相差顕微鏡による生標本の、あるいは光顕でのGiemsa染色標本の観察は、いずれもリケッチアを特異的に見いだす方法ではなく、また検出感度も免疫染色に比較して必ずしも高くない。感染率が極めて低い場合には見落

す可能性も高い。したがって、1サンプル当たり少なくとも1,000個ほどの細胞は観察すべきである。免疫染色(酵素抗体法や蛍光抗体法)(図4下)を行えば、感染細胞だけではなく細胞外の遊離リケッチアも効率よく検出できる反面、使用した抗体に反応しない種類は検出できない。さまざまな分類群のリケッチアを検出対象とする免疫染色には、それらを想定した抗体を使用する必要がある。

分離株からの雑菌除去法

リケッチアが雑菌汚染された状態で分離されたときには、実験用マウス(ddY, 5週令ほど)へ腹腔内接種し、2, 3日後に摘出した脾臓の乳剤を培養細胞へ接種するとリケッチアのみが増殖してくる。ただし、マウス処理までの日数を長くするとリケッチアも消滅する。マイコプラズマ類(スピロプラズマなど)の除去には効果的である。

国内のマダニ由来リケッチアの種類別にみた分離の難易度

以下に、本マニュアルにしたがった場合のこれまでの分離実績からみた難易度を示した。**容易な種類**: *Rickettsia japonica*, *Rickettsia asiatica*, *Rickettsia tamurae*, ミナミネズミマダニ分離株(IG株シリーズ, *Rickettsia honei* like), ヒゲナガタマダニ分離株(HKT-1株)およびアカコッコマダニ分離株は常法での分離が容易で、特に*Rickettsia asiatica*は接種から3, 4日目に、また他の種類でも7日目までには増殖したリケッチアを容易に観察できる。

やや難しい種類: *Rickettsia helvetica*と*Rickettsia canadensis*は増殖が遅いので、分離確認には2週間は必要。タネガタマダニからの分離株も前述したように低温度増殖性なので増殖は遅く、確認には通常2週間は必要

だが、ばらつきもあって早いものでは7日目に少数のリケッチア感染細胞が見いだされたこともある。

かなり難しい種類：*Rickettsia* sp. LONタイプは感染率が極めて低くかつ増殖も遅いので、分離確認までに1ヶ月以上を要することもある。

付随して分離されることのあるリケッチア以外の微生物

これまでに分離されたことのあるリケッチア以外の微生物には以下のようなものがあった。

スピロプラズマ：世界的には「Suckling mouse cataract agent, SMCA」などの病原体を含む各種スピロプラズマがマダニ類からの分離例が知られている。国内でもシュルツェマダニとヤマトマダニからの分離例がある。

自験例では、シュルツェマダニから *Rickettsia helvetica* とともに分離されたことがあった。このときには、前項の雑菌除去法にしたがってリケッチアの純培養が得られた。

ボレリア：細胞寄生性ではないが培養液中に少数が見られることがある。特有の運動性を示すので生菌の状態と思われる。シュルツェマダニからリケッチアとともに分離されたことがあるが、ボレリアはリケッチア株の継代

を重ねると徐々に減少していく。

トリパノソーマ：タカサゴキララマダニ、キチマダニ、ヤマアラシチマダニなどから分離されたことがある。キチマダニとヤマアラシチマダニからのトリパノソーマは細胞の周辺で活発に動き回り増殖性も高い。ただし、これらのトリパノソーマは、マダニ試料を生のまままで直に接種したときにのみ分離されるので、凍結保存試料中では死滅してしまうようである。野鼠の脾臓、肝臓、血液からも分離されたことがある。

その他に分離の可能性がある微生物：マダニではないが、野鼠類では *Bartonella* 属の菌種や *Brucella* 菌の分離例がある。この他の通性細胞寄生性の細菌類、たとえば野兎病菌なども分離が期待され、海外では実績がある。

おわりに

以上、マダニ試料からのリケッチア分離のマニュアル作成を中心にその周辺作業も含めて具体的な手順を記載した。現在、本研究班による各地で展開中のリケッチア調査に対してこの手順によるリケッチア分離検査を実施・試行中で、新たな分離株が集積されつつある。未だ分離・樹立株の得られていないリケッチア種も視野に入れた、さらなる分離方法の改良を検討していきたい。

和歌山県に発生するつつが虫病における重症度と 血中サイトカイン濃度との関連

分担研究者	岩崎博道	(福井大学医学部 准教授)
研究協力者	高田伸弘	(福井大学医学部 准教授)
	矢野泰弘	(福井大学医学部 助教)
	池ヶ谷諭史	(福井大学医学部)
	田居克規	(福井大学医学部)
	玉置幸子	(医療法人洗心会 玉置病院)
	玉置英人	(医療法人洗心会 玉置病院)
	那須征太郎	(那須医院)
	田原研司	(島根県保健環境科学研究所)

研究要旨

リケッチア感染症の重症化機序解明のために、宿主側要因を明らかにすることを目的として、リケッチア感染症例の臨床経過を調査すると同時に、生体防御の指標として急性期と回復期それぞれの血清を用いて、血中サイトカイン濃度を測定し、重症度とサイトカイン値との関連性を検討している。近年、和歌山県の南部に位置する田辺市近郊にて、つつが虫病が多発することが明らかになりつつある。この地域に2003年～2006年に発症した31症例の臨床経過を検討し、重症度を数値化した結果、この地域には軽症例が多いことが明らかとなった。全例入院することなく外来診療にて治癒していた。さらに非発熱であっても、的確な本病の診断とともに、早期治療が遂行されていた例も存在した。軽症例の多い集団といえども、急性期に種々の血中サイトカイン値は上昇し、回復期には有意に低下した。血中サイトカイン値と重症度を層別化し比較した結果、炎症性サイトカインのうち急性期の tumor necrosis factor(TNF)- α が症例の重症化を予測するために有用な指標となることが推測された。和歌山県田辺市では、住民に対するつつが虫病の啓蒙活動が十分に行われ、早期診断体制が整備された特殊な状況にあった。早期警鐘システムを構築するために、参考となる事例と考えられた。

A. 研究目的

近年、重症のダニ媒介性リケッチア感染症がしばしば報告されている。リケッチア敗血症にともなう全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome) を合併し、本病態の背景にある高サイトカイン血症から容易に回復しない場合に重症化すると考えられる。しかし、未だ重症化例ならびに、不顕性例や軽症例の存在の実態は明らかではない。

和歌山県南部では近年、田辺市を中心につつが虫病が多発することが確認され、当地域で発症した症例は 2 つの病院 (玉置病院、那須医院) に集積する。この 2 病院において確定診断されたつつが虫病症例の臨床所見、治療経過等を完全匿名化された患者調査票をもとに調査するとともに、重症度を数値化し、急性期ならびに回復期の血中サイトカイン値を測定し、症例の重症化を予測することを目的として症例解析を行った。

B. 研究方法

1. 対象患者

図 1 に示す調査票を用いて患者背景、臨床経過、治療内容を調査した。患者調査は、2003 から 2006 年の冬季(11 月~1 月)を中心に和歌山県田辺市において発症し、診断が確定したつつが虫病 31 例を対象とした。

2. 重症化の臨床評価

重症化の程度を層別化するために、これまで提案したリケッチア感染症の重症度スコア表(表 1) (Iwasaki H et al, J Clin Microbiol, 1997) を用いて、臨床所見を数値 (ポイント) 化した。評価項目には、中枢神経症状、筋肉症状、胸部 X 線、腎障害、肝障害、肝脾腫および播種性血管内症候群が含まれる。全身の主要臓器の障害が網羅されるよう配慮されている。

3. サイトカイン血中濃度の測定

患者血清は、急性期および回復期に採血後、血清分離し、測定まで -80°C に保存された。対象としたサイトカインは炎症の進展に深く関与している tumor necrosis factor (TNF)- α 、interleukin (IL)-4、IL-10、IL-12p40、IL-23、Interferon (IFN)- γ 、ケモカイン(IL-8)の血中濃度を測定した。測定は ELISA (Cytoscreen, Biosouce, USA) を用いた。数値の統計処理は Student's *t* test を用いて検定した。

4. 倫理面への配慮

本件研究における倫理に関する条件は、福井大学倫理委員会により承認されている。

承認番号：倫審 18 第 24 号(平成 18 年 10 月 18 日)

課題名：リケッチア感染症における病態と免疫応答の解析と特異的診断法の開発に関する研究

申請者：岩崎博道

C. 研究結果

1. 臨床的所見

対象患者は男性 15 例、女性 16 例、年齢は 13~86 歳に分布し、中央値は 66 歳であった。感染地は、上秋津、芳養、高尾山周辺に集中し、主にみかん畑や梅林等での農作業中の感染が多数を占めた (図 2)。

症例はいずれも間接免疫ペルオキシダーゼ法により、ペア血清にて急性期と比較し、回復期に 4 倍以上の抗体価上昇を呈した確定診断例である。つつが虫病リケッチアは Kawasaki 型が 21 例(67.7%)と最も多く、次いで Kuroki 型が 8 例(25.8%)であった。31 例の臨床所見は、発疹が 30 例(96.8%)、刺し口が 28 例(90.3%)、肝障害が 18 例(58.1%)、血小板減少が 13 例(41.9%)に認められた。リンパ節腫脹(7 例: 22.6%)や、中枢神経障害(1 例: 3.2%)は比

較的少数であった。

全例入院することなく外来治療にて軽快した。すべての症例でテトラサイクリン系薬剤である minocycline (MINO)が投与され有効性を示し、MINO の平均投与期間は 6.2 日で、解熱するのに要した平均期間は 1.5 日であった。テトラサイクリン系薬剤が早期にかつ、適切に投与されているため、速やかに全身性炎症反応症候群(SIRS)から脱却するか、SIRS に至る前に重症化を免れ、治癒したと考えられる。

2. 患者重症度

表 1 の重症度スコア表に従い評価した。重症度の分布を図 3 に示すが、23 例(74.2%)が重症度<2 であり、軽症例が多いことが示された。重症度は最高でも 4 ポイントまでに分布し、平均重症度は 1.16 であった。この値は、1997 年に調査した重症つつが虫病症例では、4.0 であった(Iwasaki et al. J Clin Microbiol 35, 1997)ことに比較すると極めて低値であった。22 例(71.0%)は 38.0℃以上の発熱を呈していたが、1 例は発熱を認める以前に、本疾患が診断され、早期に MINO が投与され治癒に至った。発熱を認めることなく、本リケッチア感染症を診断できることは、患者の早期受診に加え、医師の高度な臨床能力に裏づけられた早期診断体制の充実によるものと考えられる

3. 血中サイトカイン値の変動

マクロファージ関連サイトカインである IL-12p40 濃度を測定した結果、急性期には 84.8 pg/ml であったが、回復期には 46.4 pg/ml に有意に低下した($p < 0.001$)。また、炎症性サイトカインの TNF- α は急性期 3.52 pg/ml から、回復期 1.20 pg/ml に低下($p < 0.001$)し、抗炎症性サイトカインの IL-10 も急性期 3.12 pg/ml から回復期 0.18 pg/ml にいずれも有意に低下した($P < 0.001$)。IL-8、IFN- γ も回復期には、急性期に比較し低下していた(図 4)。

軽症例ではあっても、急性期には多くのサイトカイン値の上昇が示され、回復期には速やかに低下した。SIRS に進展する前に、早期の治療が生体の過剰なサイトカインネットワーク活性化を速やかに沈静化し、重症化には至らなかったと考えられる。

IL-4, IL-23 については治療前後において著変を認めなかった(図 5)。

4. 重症度と血中サイトカイン値の関連性

重症度をスコアにより、0 ポイント(7 例)、1 ポイント(16 例)、2 ポイント以上(8 例)の 3 群に分類し、それぞれの急性期における TNF- α 値を比較した。その結果、図 6 に示すように、重症度が増すに従い、TNF- α 値が上昇し(0 ポイント 2.39 ± 1.51 pg/ml、1 ポイント 3.47 ± 1.59 pg/ml、>2 ポイント 4.60 ± 1.39 pg/ml)、TNF- α が急性期において重症度を予測するために有用な指標となる可能性が示唆された。

D. 考察

つつが虫病において、テトラサイクリン系薬剤が著効を示すことはよく知られている。和歌山県田辺市のつつが虫病症例でも MINO が著効し、全例外来治療が可能であった。しかし、入院加療を必要としない症例ではあったが、高サイトカイン血症を呈しており、もし治療が遅れていたとすれば SIRS に至り重症化に至る症例が出現したことが推測される。

この地域では、医師から行われている地域住民に対する啓蒙の努力や、医師会を中心とする早期診断のための積極的な体制作りが機能していることより、住民にもつつが虫病に対する認識が高く、非常に早期に病院を受診し、医師の推定治療が可能となっている点が興味深い。本事例は特徴的症状より早期にリケッチア症を疑い、テトラサイクリン系薬剤の早期投与がなされることは、つつが虫の