

患者背景

当院に受診した患者のうち確定例とカルテ等より日本紅斑熱が強く疑われる症例 39 症例 (7-100 歳、平均 67.54 歳、男性 15 名、女性 24 名) を検討した。

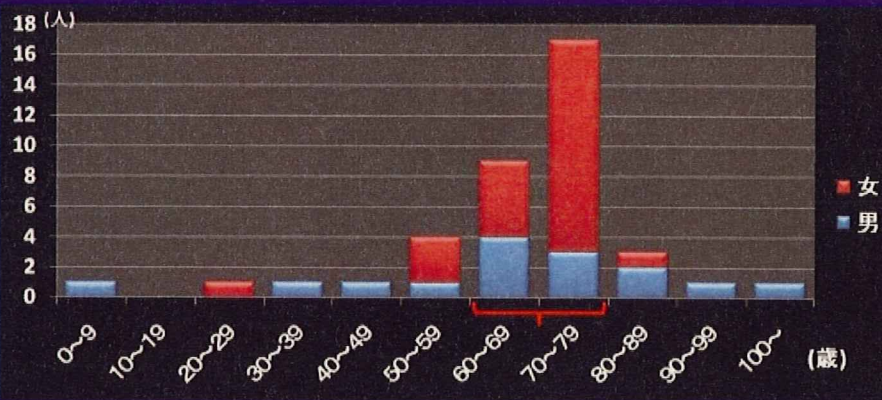
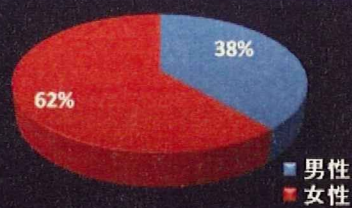


図 1 患者背景

月別発生数と感染状況

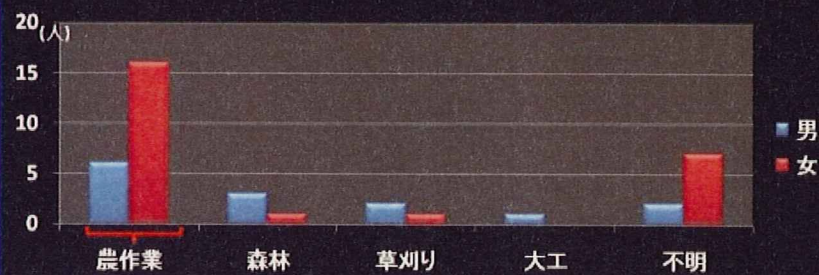
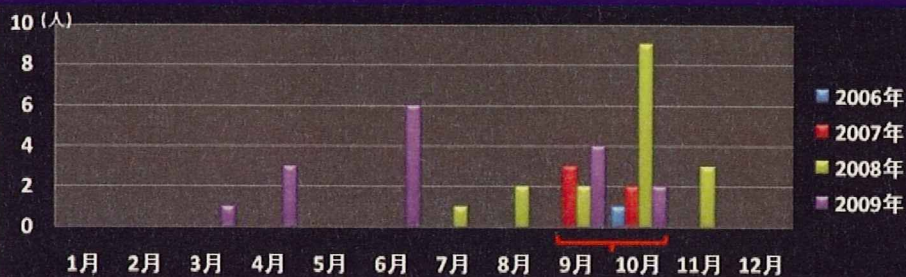


図 2 月別患者発生数と感染状況



図3 患者発生地域

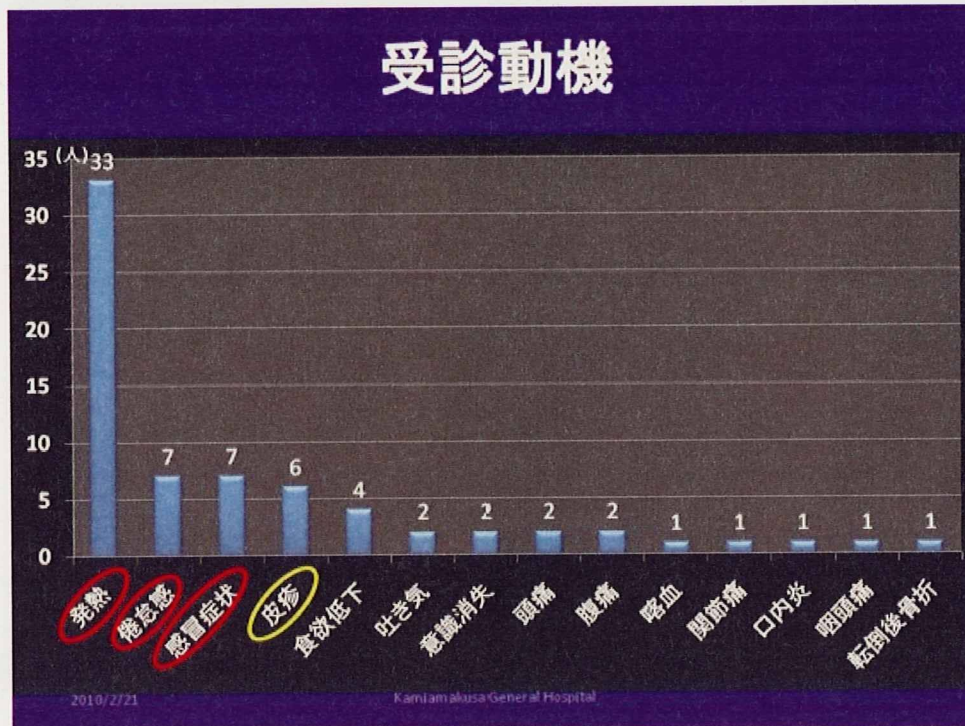
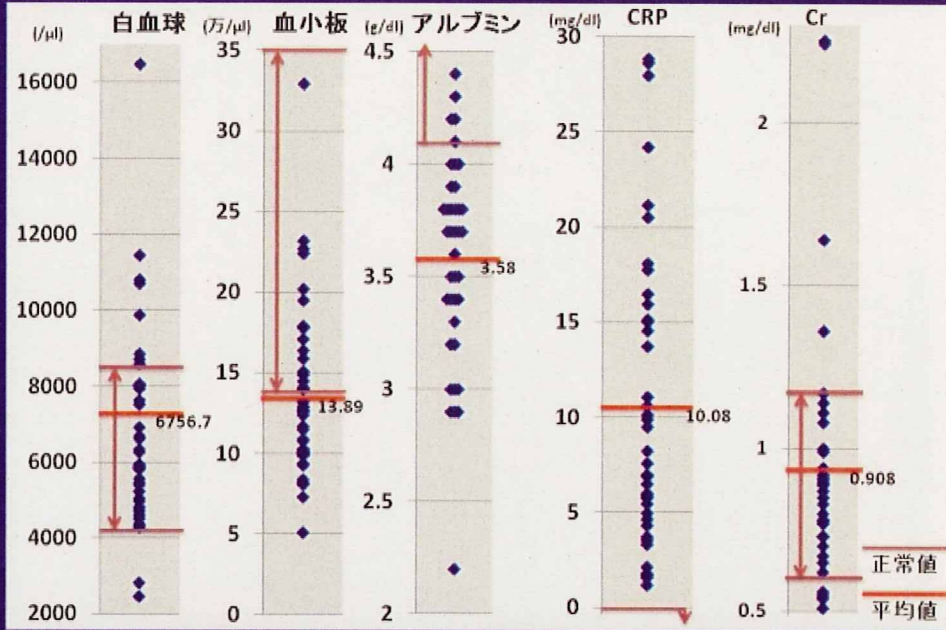


図4 日本紅斑熱患者受診動機

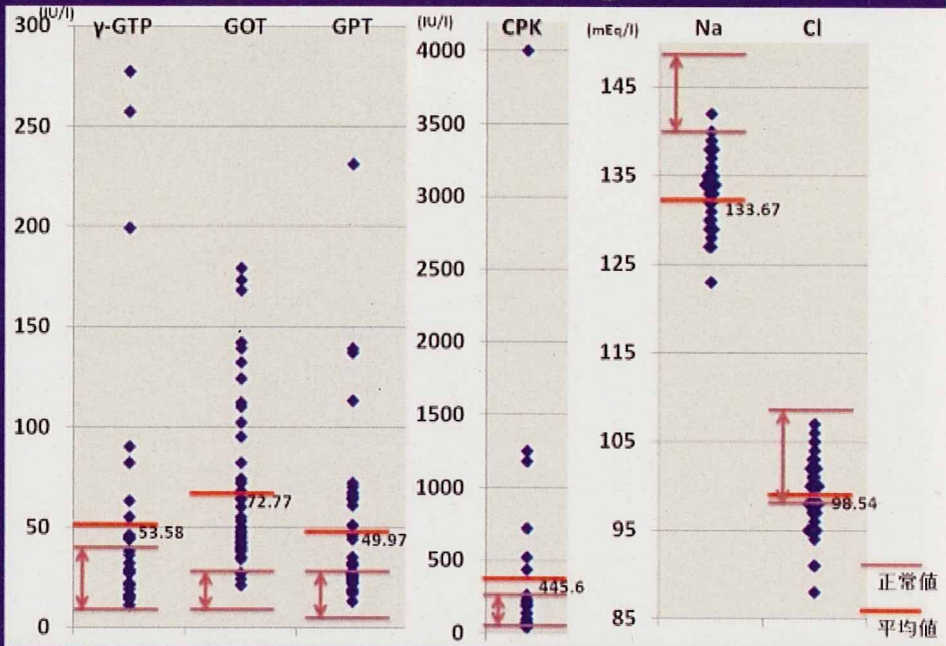
初診時採血データ①



2010/2/21

Kamimatakusa General Hospital

初診時採血データ②



2010/2/21

Kamimatakusa General Hospital

図5 初診時採血検査成績

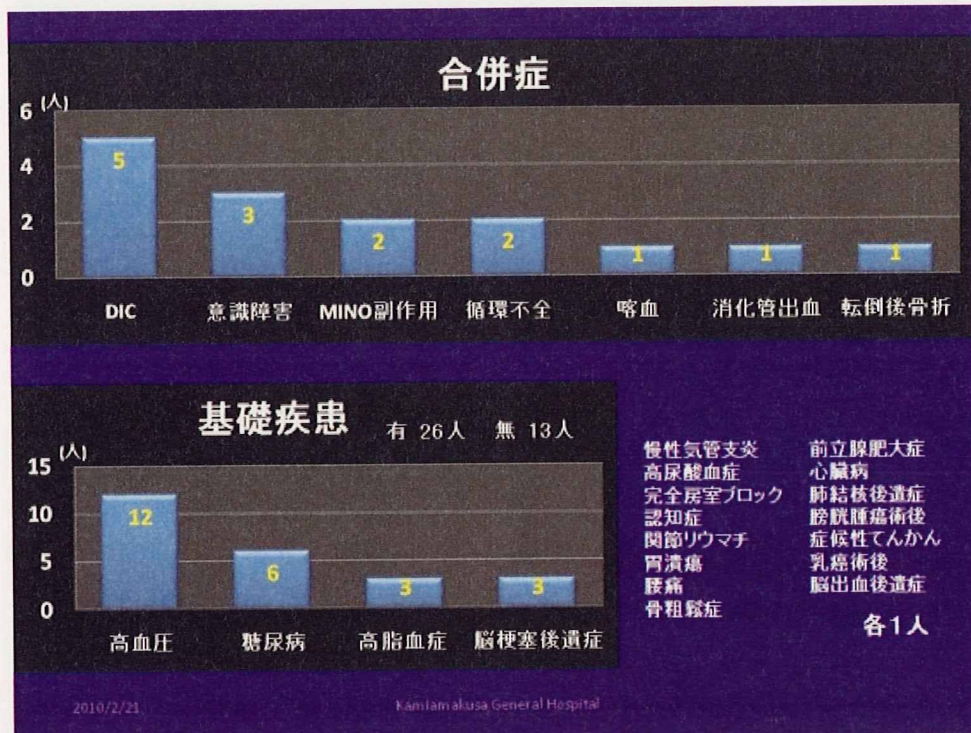


図6 日本紅斑熱患者の合併症と基礎疾患

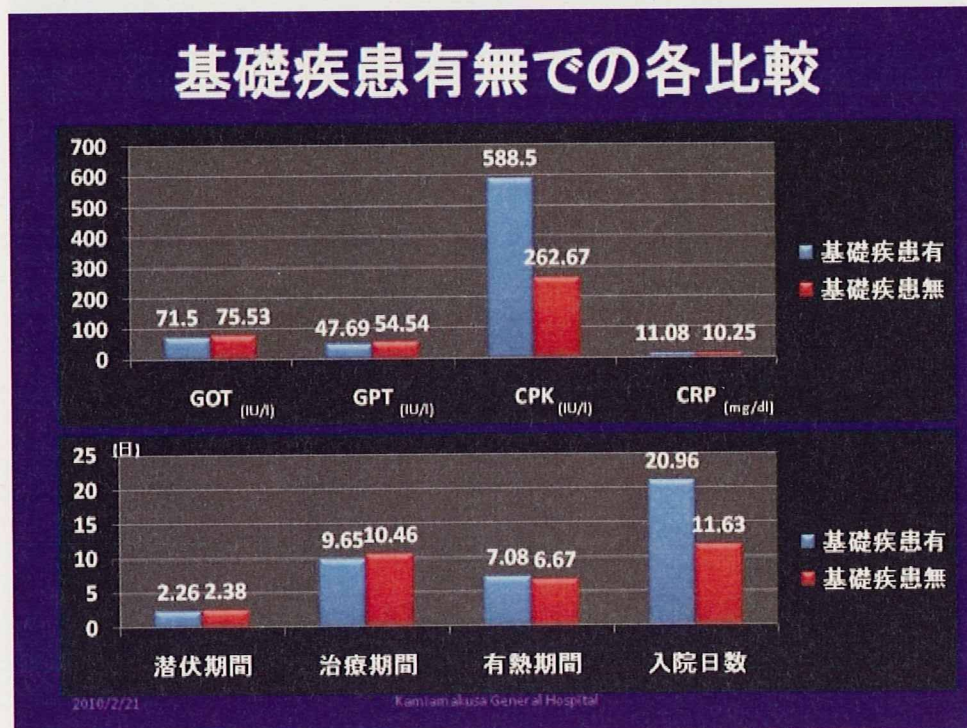


図7 基礎疾患の有無

治療方法と治療日数・有熱期間の比較

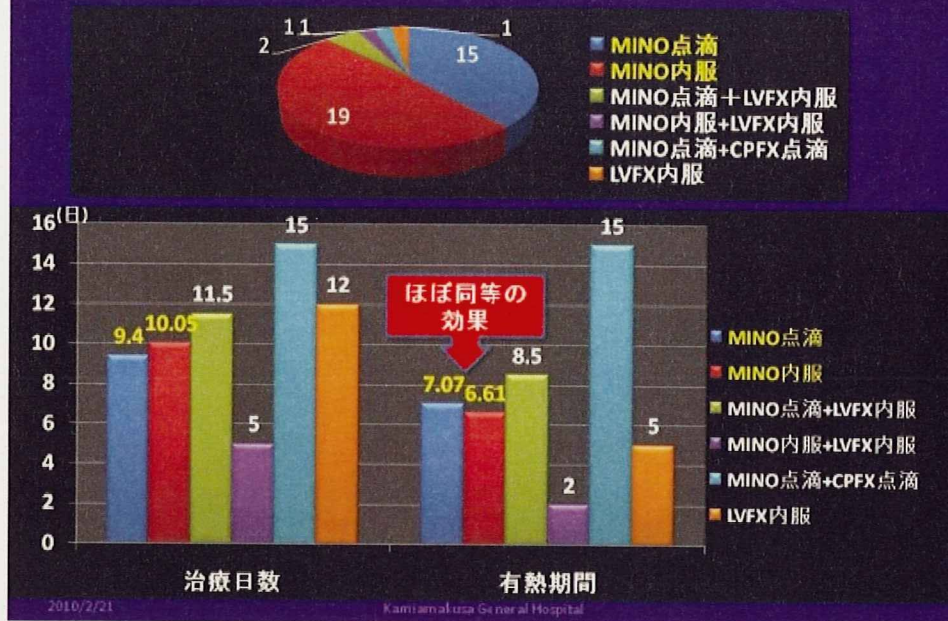


図8 治療方法別にみた治療日数および有熱期間

CPK値と治療期間・有熱期間の比較

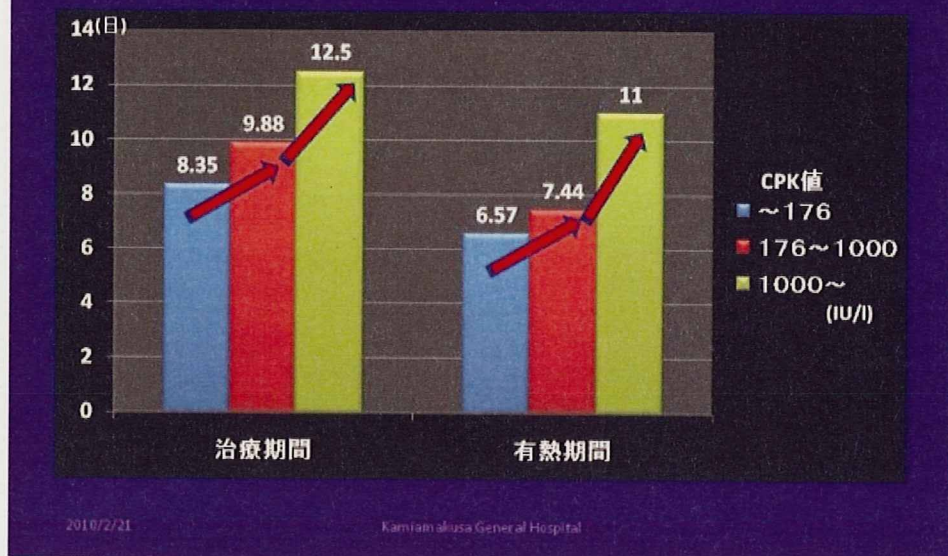


図9 CPK値と治療期間および有熱期間

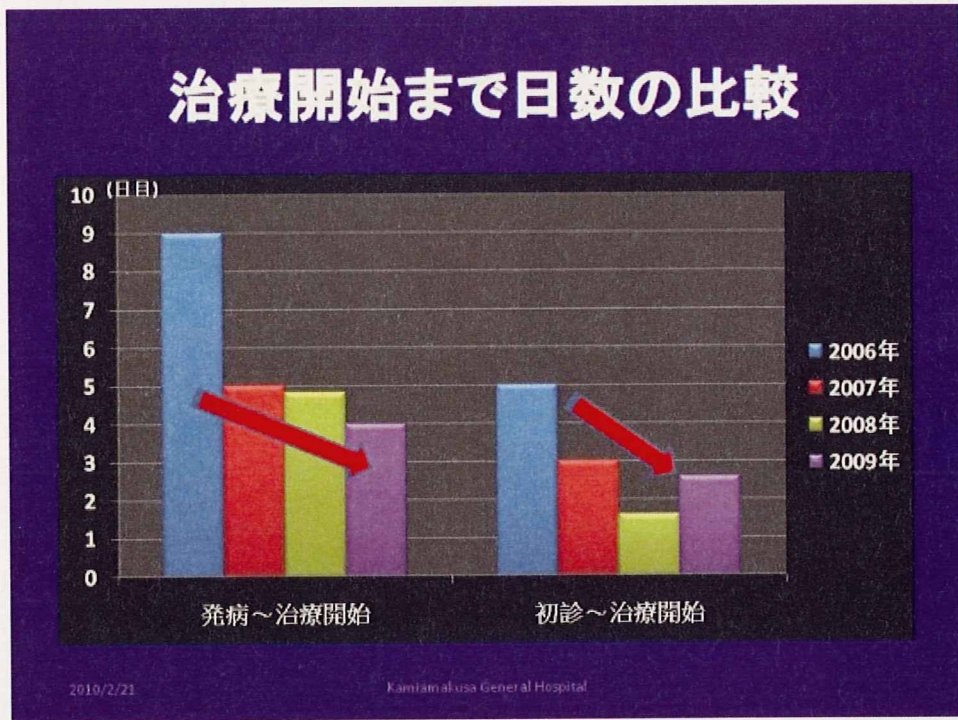


図 10 年別にみた治療開始までの日数

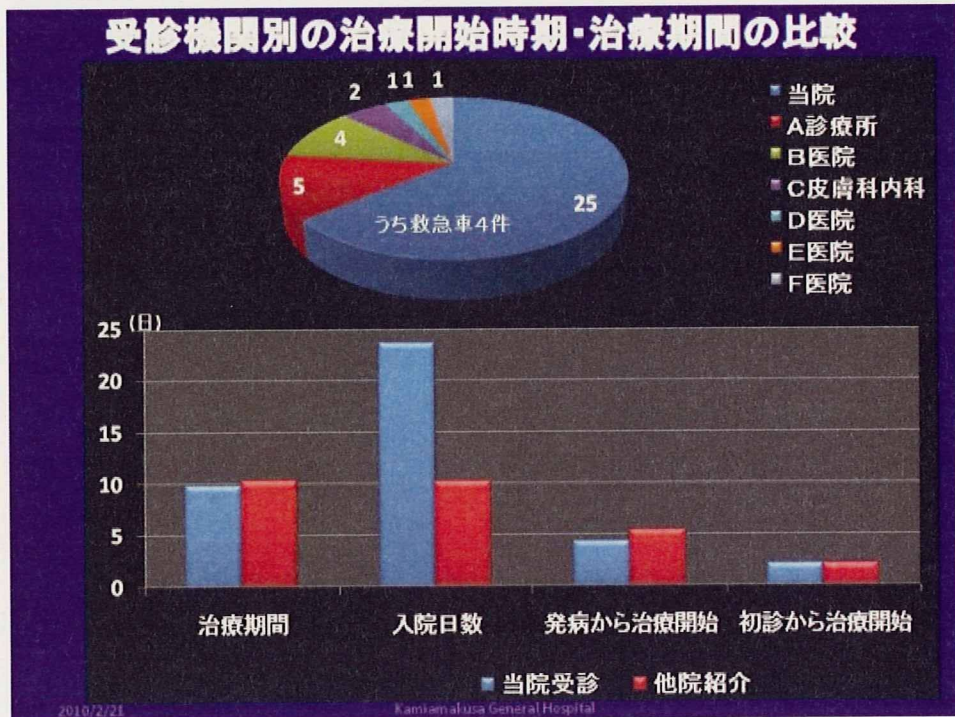


図 11 受診機関別にみた治療開始日数と治療期間

日本国内のリケッチア症実験室診断に関する状況調査

研究分担者 安藤秀二 国立感染症研究所ウイルス第一部第五室
協力研究者 坂田明子 国立感染症研究所ウイルス第一部第五室

研究要旨：日本国内におけるリケッチア感染症の診断並びにレファレンス体制構築における課題と改善方法を明確にし、実験室診断体制をより安定したものにするを目的に、本年度は、つつが虫病と日本紅斑熱の実験室診断の主体となっている地方衛生研究所における検査の実施状況について調査をおこなった。全国衛生微生物技術協議会に参加している地方衛生研究所 77 箇所を対象に、リケッチア症(つつが虫病および日本紅斑熱)の実験室診断の実施状況についてアンケート調査を実施したところ、地方衛生研究所における検査体制は、血清診断、遺伝子診断、分離までの充実した施設がある一方、つつが虫病については商業検査機関において血清診断が実施可能なことから、検査を日常業務から除外している施設もあり、全国的には実施施設が減少している。今回の調査した各項目をより多角的に解析すると共に、商業検査機関の情報収集とあわせ、より効率的な検査体制の構築と安定強化のための施策を検討、実施、継続することが必要である。

A.研究目的

日本に常在するリケッチア感染症としては、つつが虫病と日本紅斑熱が感染症法における全数届出の 4 類感染症に指定されている。つつが虫病は年間約 400 例前後が届出され、日本紅斑熱の届出は近年増加傾向にあり、2008 年には 132 例(暫定)が届け出られている。これらのリケッチア感染症の届出には実験室診断による確定が必須とされているが、患者に直面する医療現場と検査施設とのつながりが必ずしもスムーズに行われているわけではない。

本年度は、日本国内におけるリケッチア感染症の診断並びにレファレンス体制構築における課題と改善方法を明確にし、実験室診断体制をより安定したものにするを目的に、つつが虫病と日本紅斑熱の実験室診断の主体となっている地方衛生研究所に

における検査の実施状況について調査をおこなった。

B.研究方法

全国衛生微生物技術協議会(以下、衛微協)に参加している地方衛生研究所(以下、衛研。平成 21 年 7 月 1 日現在)77 箇所を対象に、リケッチア症(つつが虫病および日本紅斑熱)の実験室診断の実施状況についてアンケート調査を平成 21 年 12 月に実施した。

設問は、それぞれのリケッチア症における、血清診断(実施の有無、方法、使用抗原、抗原の入手方法)、遺伝子診断(実施の有無、方法、検査材料)、実施していない場合の理由、その他、実験室診断体制に必要と考えられるもの、リケッチア分離状況、菌株保有、平成 20(2008)年 1 月～12 月に各施設で

実施した検査数などの項目を設定した。

(倫理面への配慮) なし

C.研究結果

平成 22 年 2 月末現在、75 施設からの回答が得られた(回収率 97.4%)。

1. つつが虫病に関する実験室診断

回答施設 75 施設中 36 施設(48%)においてつつが虫病の実験室診断をルーチンで受け付け、実施していた。36 施設のうち、血清診断のみ 9 施設、遺伝子検出 PCR のみ 7 施設、血清診断および PCR ともに実施する施設が 20 施設であった。

血清診断の方法は間接蛍光抗体法(FA)のみ 25 施設、間接免疫ペルオキシダーゼ法(IP)のみ 2 施設、両検査実施が 1 施設、FA と補体結合反応が 1 施設であった。血清診断用の抗原は Kato、Karp、Gilliam の「3 抗原」を使用する施設が 8 施設、Kato、Karp、Gilliam に Kawasaki、Kuroki を加えた「5 抗原」が 16 施設、「3 抗原」にその他株 2 施設、「5 抗原」にその他株 1 施設、「5 抗原」から Kato 株をのぞく 4 抗原が 2 施設であった。抗原の供給は自家作製 9 施設、購入 6 施設、他施設分与 5 施設、自家作製と他施設分与が 8 施設、購入と他施設分与が 1 施設であった。実施していない施設の理由は、もともと実施していないとする 31 施設を除くと、3 施設は依頼がないため、8 施設が商業検査機関での実施ができるため、その他の理由が 4 施設で血清診断をとりやめている。但し、とりやめた施設でも若干の施設では、必要な際に実施できるように抗原等の準備をおこなっている。

PCR を実施する 27 施設のうち 23 施設で衛微協が作製したリケッチア感染症診断マニュアルの方法を踏襲し、2 施設がさらに独自に開発した方法を加え、1 施設が独自開発の方法のみであった(未回答 1 施設)。

PCR 検査に用いる検査材料は血液のみが 14 施設、血液に加え瘡蓋などの皮膚材料を用いる施設が 13 施設であった。PCR 検査に関しては 38 施設がもともと実施していなかったが、未記入 3 施設のほか、依頼がないためなどの理由で 7 施設が実施を取りやめていた。

2. 日本紅斑熱に関する実験室診断

日本紅斑熱に関する実験室診断は 29 施設(38.7%)においてルーチンで実施されていた。29 施設のうち、血清診断のみ 8 施設、PCR のみ 4 施設、血清診断および PCR ともに実施する施設が 17 施設であった。

血清診断は FA のみ 24 施設、FA と IP 両検査実施が 1 施設であった。抗原の供給は自家作製 10 施設、購入 1 施設、他施設分与 11 施設、自家作製と他施設分与が 3 施設であった。購入の 1 施設は *Rickettsia rickettsii* の抗原を購入、使用していた。実施していない施設の理由は、もともと実施していない 45 施設、3 施設は依頼がないため、その他の理由 1 施設、未回答 1 施設である。

PCR を実施する 21 施設のうち 16 施設で衛微協が作製したリケッチア感染症診断マニュアルの方法を、4 施設がさらに独自に開発した方法も行っていた(未回答 1 施設)。PCR 検査に用いる検査材料は血液のみが 7 施設、血液に加え瘡蓋などの皮膚材料を用いる施設が 12 施設であった(未回答 2 施設)。PCR 法を実施しない理由は、もともと実施していない 46 施設、依頼がないためなどの理

由で5施設が実施を取りやめていた。

つつが虫病と日本紅斑熱の両リケッチア感染症の検査を実施している施設は27施設、つつが虫病のみ9施設、日本紅斑熱のみ2施設であった。

また、リケッチア感染症の実験室診断に今後必要と考えられるものを複数回答可能として質問したところ、抗原の安定供給55施設、遺伝子診断用コントロール47施設、血清診断用コントロール43施設、経験者の維持38施設、実地研修36施設、検査プロトコール32施設、予算25施設、レファレンスセンター20施設の順に多かった。

D.考察

回答があった全国の衛研の36%(27/75)がつつが虫病と日本紅斑熱の両検査を実施している。つつが虫病のみや日本紅斑熱病のみの施設を合わせると半数の施設でこれらの実験室診断が実施されている。しかしながら、松井らが2002年に実施したつつが虫病に関する類似の調査によると、回答した67施設中44施設で実施されていた(65.7%、対象施設73施設)。今回の調査では、つつが虫病の検査を実施しているのは36施設(46.8%)になっている。商業検査機関(以下、民間ラボ)で血清診断が行われていることが理由のひとつと考えられるが、民間ラボではKato、Karp、Gilliamの「3抗原」を用いて検査を実施している。西日本に多いとされたKawasaki、Kuroki型は実施されていないため、以前から検査を実施していた西日本の衛研の多くがなおも「5抗原」による検査体制を維持してい

ることは、民間ラボにおいて検出できない症例があることを想定しているためであるが、民間ラボの検査オーダーでは、抗原、ペア血清、イムノグロブリン型の組み合わせから最大12項目(抗原3種、ペア2ポイント、IgGとIgM)を実施することが医療現場においては難しいことをカバーしていることにもなる。また、東北地域においては、「3抗原」に加え、この地域においてしばしば原因としてみとめられるShimokoshi株を抗原に加える施設もあるが、西日本に多いとされていたKawasaki、Kuroki型の患者が東北地域の南部において多数確認されていることから、血清診断における抗原に用いる型の選択を適切に選択できなければ、血清診断のみでは患者を確定できない場合が増えることが考えられる。

PCR法においては、以前より導入する施設が増えてはいるものの、検査材料とする「急性期血液」では、しばしば陰性になるため、PCRにのみ頼ることも危険である。PCRによる検出効率を上げるために皮膚材料の有用性について衛研を対象とした研修会などで情報発信してきたにもかかわらず、その適用は実施施設のすべてには行われていないため、コントロールの配布に加え、マニュアルの更新など導入に必要な方法を再検討する必要がある。

リケッチア感染症の検査体制として今後必要となるものに関する質問には、抗原、遺伝子および血清の陽性コントロールの供給体制への求めが上位になったが、全国の必要とする施設に対して安定供給をはかるには、予算、人員、体制の各面で単独施設では難しく、地域ブロック単位のレファレンスラボのネットワークの構築が、地域の

特異性を示しやすいリケッチア感染症の正確な状況を把握するためにも必要と思われる。この設問に関しては、複数回答の場合、優先順位をつけてもらったことから、優先順位を数値化し、より優先度の高いもの、本質的な項目を見極め、その対応策を暫時実施しなければならない。

2008年1月から12月までの感染症法に基づいた届出数(暫定)は、つつが虫病 434 症例、日本紅斑熱 132 症例であるのに対し、回答のあった施設での確定症例数はつつが虫病 219 症例、日本紅斑熱 127 症例であった。つつが虫病疑い症例の多くが民間ラボの検査によっても届出が行われているため、届出数に対する衛研での確定数は、ほぼ半数であるが、日本紅斑熱の症例のほとんどが衛研における検査によって確定している。しかしながら、衛研で日本紅斑熱の確定診断した数より届出数が少ない自治体もある。民間ラボの検査状況を現段階大まかに調べた情報から、つつが虫病においても多くの症例が届出がなされていない。このことは、抗原の不一致による陰性判断に加え、患者数の登録が不完全で、かなり少なく見られてしまうことになる。患者発生が少ないもしくは「ゼロ」との公的統計値は、医療現場における地域のリケッチア感染症に対する意識付けを低くすることになり、リケッチア感染症の経験の乏しい医療現場においてリケッチア感染症が疑われることがなく、治療の遅れから、患者の転帰に大きな影響を及ぼすことも危惧される。

<参考文献>

松井珠乃、小川基彦、岸本寿男、海保郁男、大山卓昭、ジョンコバヤシ、岡部信彦。地

方衛生研究所におけるツツガムシ病診断の現状—アンケートによる調査結果と感染症発生動向調査との比較—。感染症学雑誌, 78: 248-252

E.結論

地方衛生研究所におけるつつが虫病と日本紅斑熱に関する検査体制は、血清診断、遺伝子診断、分離までの充実した施設がある一方、つつが虫病については民間ラボにおいて血清診断が実施可能なことから、検査を日常業務から除外している施設もあり、全国的には実施施設が減少している。現在、民間ラボでのつつが虫病検査の実態についての聞き取り調査と情報提供依頼を開始している。今回の調査した各項目をより多面的に解析すると共に、民間ラボの情報をあわせ、検査実施数、検査陽性数と届出数などについても検討し、より効率的な検査体制の構築と安定強化のための施策を検討、実施、継続することが必要である。

F.健康危険情報 なし

G.研究発表

1.発表論文

1) 安藤秀二 リケッチア性紅斑熱, 化学療法の領域, 医薬ジャーナル社, 26: 240-248, 2010

2) 安藤秀二 ロッキー山紅斑熱, ズーノーシスハンドブック(岸本寿男, 山田章雄 編), メディカルサイエンス社, p201-203, 2009

- 3) 安藤秀二, 高橋聡. Q熱,ズーノーシスハンドブック(岸本寿男, 山田章雄 編), メディカルサイエンス社, p193-194, 2009
- 4) 馬原文彦, 安藤秀二. 日本紅斑熱,ズーノーシスハンドブック(岸本寿男, 山田章雄 編), メディカルサイエンス社, p198-200, 2009
- 5) Hanaoka N, Matsutani M, Kawabata H, Yamamoto S, Fujita H, Sakata A, Azuma Y, Ogawa M, Takano A, Watanabe H, Kishimoto T, Shirai M, Kurane I, and Ando S. : Diagnostic assay for *Rickettsia japonica*. Emerg Infect Dis, 15: 1994-1997. 2009.
- 6) Takano A, Muto M, Sakata A, Ogasawara Y, Ando S, Hanaoka N, Tsurumi M, Sato F, Nakamura N, Fujita H, Watanabe H, Kawabata H. Relapsing fever spirochete in seabird tick, Japan. Emerg Infect Dis. 15: 1528-30. 2009 ,
- 7) Matsui T, Kobayashi J, Satoh H, Fujimoto T, Okabe N, Ando S, Kishimoto T and Yamamoto S. Surveillance Recognition, and Reporting of Tsutsugamushi Disease (Scrub typhus) and Japanese Spotted Fever by General Practice Clinics in Miyazaki Prefecture, 2007. J Infect Chemoter, 15:269-272, 2009
- 8) Hanaoka N, Sakata A, Takano A, Kawabata H, Watanabe H, Kurane I, Kishimoto T and Ando S. Development of a pUC19-based recombinant plasmid to serve as a positive control in PCR for *Orientia tsutsugamushi*. Microbiol Immunol, 53: 305-308, 2009
- 9) Yamauchi T, Obara M, Watanabe M, Ando S, Ishikura M, Shinagawa Y, Hasegawa S, Nakamura K, Iwai M, Kurata T and Takizawa T. Survey of tick fauna possessing the ability to act as vectors of rickettsiosis in Toyama Prefecture, Japan. Med Entomol Zool, 60: 23-31, 2009
- 10) Takada N, Fujita H, Kawabata H, Ando S, Sakata A, Takano A and Chaithong U. Spotted Fever Group *Rickettsia* sp. Closely Related to *R. japonica*, Thailand. Emerg Infect Dis, 15: 610-611, 2009
- 11) Takano A, Ando S, Kishimoto T, Fujita H, Kadosaka T, Nitta Y, Kawabata H and Watanabe H. Presence of novel *Ehrlichia* sp. in *Ixodes granulatus* found in Okinawa, Japan. Microbiol Immunol, 53: 101-106, 2009
- 12) 中橋伸江、山本貴子、馬場俊一、川端寛樹、安藤秀二、照井正. *Ixodes holocyclus* によるマダニ刺咬症の1例. 臨床皮膚科、63: 159-161、2009

2.学会発表

- 1) 平良勝也、近藤章之、藤田博己、角坂照貴、高田伸弘、安藤秀二、他。沖縄県宮古島で初めて確認されたつつが虫病。平成21年度日本獣医師会学会年次大会日本獣医公衆衛生学会、宮崎、1月、2010
- 2) 安藤秀二。衛生行政における感染研の役割—ウイルス第一部第五室の事例より—。人獣共通感染症とダニ関連感染症 in 奄美2009 セミナー、鹿児島県奄美市、12月、2009
- 3) 山本正悟、安藤秀二、岸本寿男。つつが虫病および日本紅斑熱の早期診断における刺口(痂皮)の有用性。第79回日本感染症学会西日本地方会学術集会、福岡、11月、2009
- 4) 平良勝也、近藤章之、岡野祥、藤田博己、角坂照貴、高田信弘、安藤秀二、下地 崇、下地久代、平良セツ子。沖縄県宮古島で初めて確認されたつつが虫病。第41回沖縄県公衆衛生学会、沖縄、11月、2009
- 5) 松谷峰之介、東慶直、小川基彦、花岡希、川端寛樹、倉根一郎、安藤秀二、岸本寿男、白井睦訓。日本紅斑熱の原因菌 *Rickettsia japonica* の全ゲノム配列解析。第27回日本クラミジア研究会・第16回リケッチア研究会合同研究発表会、東京、11月、2009
- 6) 山本正悟、安藤秀二、岸本壽男。つつが虫病および日本紅斑熱の早期診断における刺口(痂皮)の有用性。第27回日本クラミジア研究会・第16回リケッチア研究会合同研究発表会、東京、11月、2009
- 7) 花岡希、松谷峰之介、川端寛樹、山本正悟、藤田博己、坂田明子、東 慶直、小川基彦、岸本寿男、白井睦訓、倉根一郎、安藤秀二。病原性 *Rickettsia japonica* グループにおける特異的 ORF の同定と検出系への応用。第27回日本クラミジア研究会・第16回リケッチア研究会合同研究発表会、東京、11月、2009
- 8) 藤田博己、高田伸弘、矢野泰弘、及川陽三郎、川端寛樹、安藤秀二、坂田明子、高野 愛。国内のキチマダニから分離された *Rickettsia canadensis* について。第27回日本クラミジア研究会・第16回リケッチア研究会合同研究発表会、東京、11月、2009
- 9) 小原真弓、山内健生、渡辺護、安藤秀二、石倉康宏、品川保弘、長谷川澄代、中村一哉、堀元栄詞、岩井雅恵、倉田毅、滝澤剛則。富山県におけるマダニ類と保有リケッチア。第27回日本クラミジア研究会・第16回リケッチア研究会合同研究発表会、東京、11月、2009
- 10) 松本一俊、松尾繁、八尋俊輔、原田誠也、山本正悟、安藤秀二。熊本県における日本紅斑熱の発生状況とベクター。第27回日本クラミジア研究会・第16回リケッチア研究会合同研究発表会、東京、11月、2009
- 11) 伊東拓也、高田伸弘、及川陽三郎、藤田博己、坂田明子、安藤秀二、川端寛樹、高野愛。日本北端地域におけるマダニ媒介性病原体の調査。第55回日本寄生虫学会・衛生動物学会北日本支部合同大会、帯広、

10月, 2009

12) 藤田博己、高田伸弘、及川陽三郎、安藤秀二、川端寛樹、高野愛、坂田明子. 青森県における紅斑熱ベクター調査. 第55回日本寄生虫学会・衛生動物学会北日本支部合同大会, 帯広, 10月, 2009

13) 安藤秀二、藤田博己、坂田明子、矢野泰弘、大竹秀男、及川陽三郎、角坂照貴、黒澤昌啓、川端寛樹、高田信弘. 仙台市での *Rickettsia heilongjiangensis* 感染症例の発見と保有マダニ調査. 第55回日本寄生虫学会・衛生動物学会北日本支部合同大会, 帯広, 10月, 2009

14) 中野敏明、衛藤光、横田恭子、古川恵一、安藤秀二、坂田明子. *R. africae* によるマダニ刺症の2例. 日本皮膚科学会関東支部会, 東京, 7月, 2009

15) 安藤秀二. マダニ媒介感染症の野外調査について. 衛生微生物技術協議会第30回研究会, 大阪府堺市, 7月, 2009

16) 藤田博己、安藤秀二. 北日本にみる新型都市型紅斑熱のベクター. 第17回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー. 福井県大野市, 6月, 2009

17) 安藤秀二, 黒澤昌啓, 坂田明子, 藤田博己, 矢野泰弘, 高野愛, 川端寛樹, 花岡希, 斉藤若奈, 岸本寿男. 仙台市で確認された新しい紅斑熱群リケッチア症. 第83日本感染症学会総会, 東京, 4月, 2009

18) 竹下望, 柳沢邦雄, 加藤康幸, 金川修造, 坂田明子, 安藤秀二, 岸本寿男, 照屋勝治, 菊池嘉, 岡慎一, 工藤宏一郎.

インドネシアからの輸入症例と考えられる急性腎不全を伴った発疹熱の一例.

第83日本感染症学会総会, 東京, 4月, 2009

19) 井本一也, 大路剛, 山本舜悟, 細川直登, 岸本寿男, 安藤秀二, 坂田明子.

当院で経験した発疹熱 (Murine Typhus) の症例. 第83日本感染症学会総会, 東京, 4月, 2009

20) 大橋典男, 千屋誠造, 船戸豊彦, 塩尻正明, 高野愛, 川端寛樹, 安藤秀二, 岸本寿男. 国内初の新興感染症「ヒトアナプラズマ症」2症例について. 第83日本感染症学会総会, 東京, 4月, 2009

21) 山本徳栄, 近真理奈, 山口正則, 大山龍也, 藤田博己, 安藤秀二, 小川基彦, 岸本寿男. 埼玉県の野生アライグマにおけるリケッチア類の保有状況調査-第一報-. 第83日本感染症学会総会, 東京, 4月, 2009

22) 高田伸弘, 藤田博己, 安藤秀二, 川端寛樹, 矢野泰弘, 高野愛, 岸本寿男. 仙台市内河川敷にみるネズミ分布相の特性-広東住血線虫や紅斑熱感染環との絡み-. 第61回日本衛生動物学会大会, 香川, 4月, 2009

23) 矢野泰弘, 高田伸弘, 岩崎博道, 藤田博己, 角坂照貴, 及川陽三郎, 田原研司, 山本正悟, 本田俊郎, 平良勝也, 岡野祥, 安藤秀二, 川端寛樹, 岸本寿男. 環東シナ

海の島嶼に分布するツツガムシ，疫学的な
連関は？ 第 61 回日本衛生動物学会大会，
香川，4 月，2009

24) 山内健生，小原真弓，渡辺護，安藤秀
二，品川保弘，長谷川澄代，中村一哉，滝
澤剛則． 富山県産哺乳類に寄生していた
マダニ類． 第 61 回日本衛生動物学会大会，
香川，4 月，2009

25) 藤田博己，大竹秀男，矢野泰弘，安藤
秀二，川端寛樹，岸本壽男，坂田明子，高
田伸弘． 宮城県で確認できたマダニとマ
ダニ保有リケッチア． 第 61 回日本衛生動物

学会大会，香川，4 月，2009

26) 藤田博己，高田伸弘，矢野泰弘，馬原文
彦，川端寛樹，安藤秀二，岸本壽男，坂田明
子． 四国のマダニ類における紅斑熱群リ
ケッチアの分離状況． 第 61 回日本衛生動物
学会大会，香川，4 月，2009

H.知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

日本紅斑熱の病理診断とその有用性

研究分担者

堤 寛 (藤田保健衛生大学医学部 第一病理学)

研究協力者

玉熊桂子 (藤田保健衛生大学医学部 第一病理学)

稲田健一 (藤田保健衛生大学医学部 第一病理学)

宮本和昭 (和歌山医科大学 微生物学講座)

濱本淳佐 (和歌山医科大学 医薬品探索講座)

宇都宮洋才 (和歌山医科大学 医薬品探索講座)

馬原文彦 (馬原医院, 藤田保健衛生大学医学部客員教授)

研究要旨

今年度は以下3点を重点的に検討した。

1) われわれは従来、日本紅斑熱の皮膚生検ホルマリン固定パラフィン切片を用いた免疫染色と Real-time PCR 法による早期診断の有用性を検討してきた。2004年から2009年の間に日本紅斑熱と判断された症例は、56例中51例だった。そのうち皮膚生検(主として刺し口)が実施されたのは47例で、免疫染色の病理診断に適した(真皮成分の含まれる)皮膚生検サンプルは37例だった。免疫染色が陽性だったのは、37例中30例(81%)だった。免疫染色陰性、real-time PCR 陽性の症例もみられた。皮膚生検に対する免疫染色と Real-time PCR 法の併用は、日本紅斑熱の早期診断に確実なサンプルであることが証明された。免疫染色および/または real-time PCR 法で陽性を呈した中で、回復期血清の上昇が遅延した7症例が経験された。

2) 日本紅斑熱リケッチアに対するモノクローナル抗体を新たに作製し、免疫染色への応用を試みた。検討した7種のうち、感染細胞株に顆粒状陽性所見を示したのは3種あったが、残念ながら臨床検体に応用できなかった。

3) 感染日本紅斑熱リケッチアの定量性について、real-time PCR で検討した。gltA 遺伝子と R17k 遺伝子の2種のプライマーを用いて株間の違いを検討したが、違いは見いだされなかった。したがって、患者サンプル内のリケッチア定量が可能であることが示唆された。今後、リケッチア感染症の病態や重症度との関連を検討する上で有用な情報を得られる可能性がある。

A. 研究目的

マダニ媒介性の日本紅斑熱は毎年初夏から秋に観察され、ときに死亡者が報告される重症感染症である。そのため、公衆衛生上の対策として、早期診断の重要性が強調されている。

本研究では、日本紅斑熱の早期診断のための方法論として、皮膚生検(刺し口、皮疹部)を用いた病理診断法を確立し、臨床医の協力のもと、2004年以来、臨床応用を実践している。

今年度は、2004年から2009年の間に経験された51例の皮膚生検を

まとめ、免疫染色と Real-time PCR 法の両法を併用の有用性を再検討した。その中で、回復期血清の上昇が遅延していると判断された 7 症例が経験されたので、これらの臨床的特徴をまとめた。

また、日本紅斑熱リケッチアに対する新たなモノクローナル抗体を利用した免疫染色の応用性を検討した。

リケッチア感染症の病態や重症度との関連を検討する上で重要となる日本紅斑熱リケッチアの定量性を real-time PCR 法で検討した。

本研究の軸は以下の 3 点である。

(1) a. 日本紅斑熱の皮膚生検ホルマリン固定パラフィン切片を用いた免疫染色と Real-time PCR 法による早期診断の有用性の証明

b. 回復期血清の上昇が遅延していると思われる 7 症例のまとめ

(2) 日本紅斑熱リケッチアマウスモノクローナル抗体 7 種を用いた免疫染色

(3) real-time PCR による日本紅斑熱リケッチアの定量性の検討

B. 研究方法

(1-1) 日本紅斑熱の皮膚生検ホルマリン固定パラフィン切片を用いた免疫染色と Real-time PCR 法による早期診断の有用性：

免疫染色については、加熱処理を利用した染色条件を既に確立している（マウス IgM 型モノクローナル抗体 S3、X1 を利用：平成 18 年度報告）。Real-time PCR 法についても、日本紅斑熱リケッチア DNA の新規 Open Reading Frame を用いた MGB probe 法（国立感染研究所、花岡希博士らが開発）と R17k genus common antigen に特異的なプライマーを用いた Taq-Man 法（研究協力者の玉熊桂子らが開

発）を確立している（平成 20 年度報告）。臨床医（馬原医院：馬原文彦博士、明神診療所：森田祐司博士、市立宇和島病院：薬師寺直喜博士）の協力のもと、2004 年から 2009 年の間に集積された日本紅斑熱症例の病理診断ホルマリン固定皮膚生検に対する免疫染色および real-time PCR 法の有用性についてまとめた。

(1-2) 回復期血清抗体価の上昇が遅延した症例：

日本紅斑熱の皮膚生検ホルマリン固定パラフィン切片を用いた免疫染色および／または real-time PCR 法で陽性となったにもかかわらず、回復期血清（発症後 2～3 週以降）の抗体価上昇が明らかではなかった 7 症例が抽出された。これらはいずれも、臨床的に日本紅斑熱として矛盾しなかった（表 1）。

(2) 日本紅斑熱リケッチアに対する新規マウスモノクローナル抗体による免疫染色：

候補となった 7 種の抗体を用いて、*R. japonica* (Aoki 株) 感染 L 細胞のホルマリン固定細胞ブロックを対象に免疫染色した。染色条件は、クエン酸緩衝液 (pH 6) ないし EDTA 液 (pH 8) による加熱処理、proteinase K 消化、および処理なしとした。その後、臨床材料（日本紅斑熱の患者皮膚生検）に応用した。

(3) real-time PCR 法による日本紅斑熱リケッチアの定量性検討：

生体内のリケッチア量を定量するために必要となるスタンダードを作製した。つまり、gltA 遺伝子の GenBank に登録されている全領域を PCR 法で増幅し、pGEM-T ベク

ター（プロメガ社）に組み込んで DNA 断片を作製した。それを用いて real-time PCR 法に必要となる至適プライマーの選択、Sybr-green 法の PCR 条件を検討した。従来用いられてきた gltA 遺伝子 (Stenos ら) と R17k 遺伝子に対するプライマーと比較した。SYBR-green 法による real-time PCR では、アニーリング温度を比較的高温である 64°C に設定した。

C. 研究結果 ならびに D. 考察

(1-1) 日本紅斑熱の皮膚生検ホルマリン固定パラフィン切片を用いた酵素抗体法と Real-time PCR 法による早期診断の有用性：

日本紅斑熱と判断された症例は、56 例中 51 例だった。そのうち、皮膚生検を実施したのは 47 例だった。免疫染色の病理診断に適した（真皮を含む）皮膚生検サンプルは 37 例あった。37 例の免疫染色で、紅斑熱リケッチア抗原が陽性となったのは、30 例 (81%) だった。免疫染色陰性、real-time PCR 陽性の症例もみられた（とくに、カサブタが採取された場合）。免疫染色に適した皮膚生検は、日本紅斑熱の早期診断に確実なサンプルであり、免疫染色と Real-time PCR 法の両法を併用することにより、病理診断の有用性が確実に高まった。

(1-2) 回復期血清抗体価の上昇が遅延した症例の検討：

皮膚生検の免疫染色や real-time PCR によって早期診断がなされると、早期に治療が開始される。その結果、回復期にも血清抗体価の上昇が生じない、ないし大幅に遅延する症例があることが示された。これらはいずれも、臨床的に日本紅斑熱として矛盾しなかった。全 7

例を表 1 にまとめた。馬原の経験した 3 例では、半年後にも抗体価の上昇を欠いた。

(2) 日本紅斑熱リケッチアに対する新規マウスモノクローナル抗体による免疫染色：

日本紅斑熱リケッチア感染細胞株での検討では、7 種の抗体のうち 3 種で、顆粒状の陽性像を認めた (10~100 倍希釈)。陽性所見は、前処理の有無に無関係だった。しかし、日本紅斑熱患者からの皮膚生検に応用すると、残念ながら、特異的陽性所見は得られなかった。

(3) real-time PCR 法による日本紅斑熱リケッチアの定量性検討：

日本紅斑熱の分離株 (14 種) を用いて、gltA と R17k の 2 種類の遺伝子配列を検討した結果、いずれも塩基配列に差は認めなかった。日本紅斑熱リケッチア Aoki 株および Katayama 株から調整した DNA を用いた希釈系列で検討した結果、定量性が示された。臨床サンプルにおけるリケッチア定量に十分対応できると思われた (図 2、3)。

E. 結論

①日本紅斑熱の早期診断には、皮膚生検に対して免疫染色と Real-time PCR 法を併用が優れており、この病理診断的アプローチの有用性が示された。

②早期診断により早期治療が実施された日本紅斑熱患者 7 例では、回復期血清の抗体価上昇がみられなかった。今後、引き続き抗体価をチェックし、半年以上の長期の経過観察が必要である。

③gltA 遺伝子と R17k 遺伝子に対するプライマーを用いると、株間に差がなく、日本紅斑熱リケッチ

ア DNA の定量が可能だった。ただし、ホルマリン固定サンプルでは、インヒビターの存在が示唆され、定量的 PCR 法の confounding factor となることが予測された。SYBR-green 法と Taq-Man 法との比較検討も今後の課題である。

F. 健康危険情報および倫理面への配慮

1) 日本紅斑熱リケッチアの取り扱い、和歌山医科大学の病原体取扱施設 P3 実験室の厳重な管理下で扱った。検体の持ち出しは、ホルマリンによる不活化後とした。

2) 日本紅斑熱疑いの患者から皮膚生検を行う際は、インフォームド・コンセントを得たのちに採取した。

3) バイオテロリストに分類される紅斑熱リケッチアに対するバイオハザードを考慮して、一般実験室（検査室）で安心して分析できるように、検出対象をホルマリン固定パラフィン切片とした。この手順により、今回開発中の方法が広く全国に浸透する可能性が高まるであろう。

G. 研究発表

学会発表

1) 玉熊桂子, 稲田健一, 堤 寛, 宮本和昭, 宇都宮洋才, 秋本茂, 馬原文彦. 日本紅斑熱とツツガムシ病の *in situ* hybridization 法による鑑別. ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー越の国大会. 2009 June, 福井

2) TAMAKUMA K, MIYAMOTO K, SHIOGAMA K, UTSUNOMIYA H, INADA K, FUJITA H, MAHARA F, TSUTSUMI Y. Detection of *Rickettsia japonica* & *Orientia tsutsugamushi* by *in situ* hybridization. 23rd Meeting of the American Society for Rickettsiology, 2009 Aug 15-18, South Carolina, USA

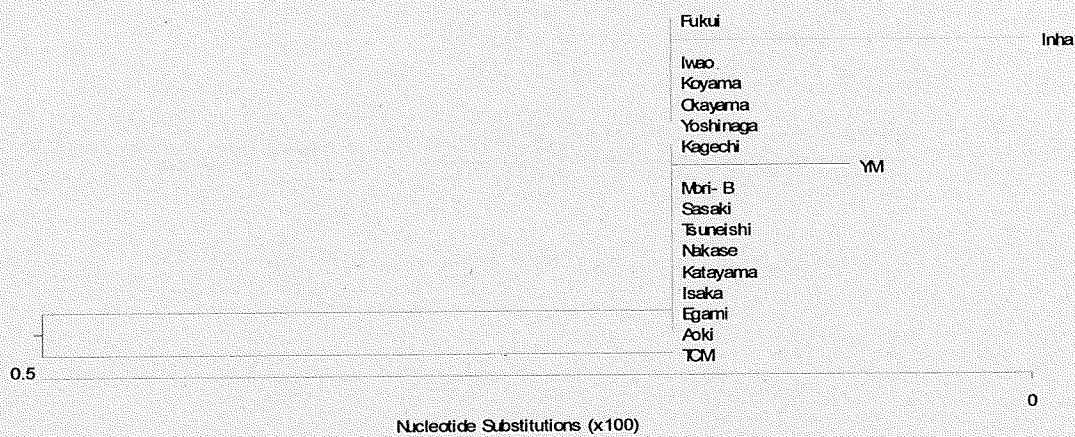
3) 玉熊桂子, 伊藤舞, 稲田健一, 堤 寛, 宮本和昭, 宇都宮洋才, 秋本茂, 馬原文彦. 日本紅斑熱に病理診断: 10%ホルマリン固定パラフィン包埋皮膚生検標本を利用した免疫染色と REAL-TIME PCR 法の比較検討. 2009 Oct, 滋賀

H. 知的財産権の出願・登録状況 とくになし

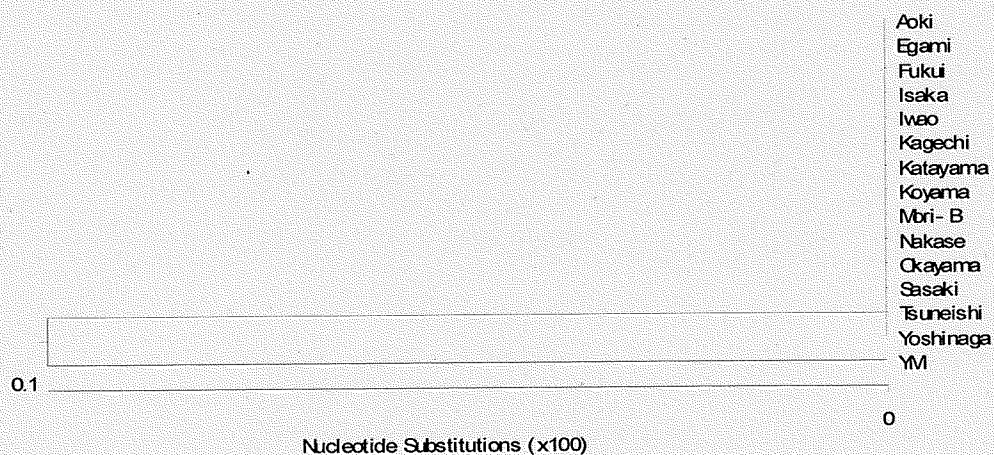
表 1. 日本紅斑熱リケッチア抗体価上昇が遅延した 7 症例

	年月日	年齢/ 性別	ダニ 刺咬	紅斑	高熱	皮膚 サンプル	免疫 染色	Real-time PCR	血清抗体価		地域
									急性期	回復期	
1	9/29, 2006	29/F	+	+	+	刺し口	陽性	陰性	IgM & IgG <10	IgM & IgG <10	三重
2	10/2, 2006	64/M	+	+	+	刺し口	陽性	陽性	u. n.	IgM & IgG <10	三重
3	11/2, 2006	50/M	+	+	+	刺し口	陽性	陰性	IgM & IgG <20	IgM & IgG <20	三重
						紅斑部	陽性	陰性			
4	5/7, 2007	64/M	+	+	+	刺し口	未実 施	陽性	IgM & IgG <10	IgM & IgG <10	徳島
5	6/7, 2008	38/M	+	+	+	刺し口	陽性	陰性	IgM & IgG <10	IgM & IgG <10	徳島
6	5/25, 2009	65/M	+	+	38°C 以下	ダニ& 刺し口	陽性	陽性	IgM & IgG <10	IgM & IgG <10	和歌山
7	5/26, 2009	54/F	+	+	+	刺し口	陽性	陰性	IgM & IgG <40	IgM & IgG <40	徳島

図 2. 日本紅斑熱リケッチア分離株 14 種における gltA 遺伝子と R17k 遺伝子の DNA 解析



gltA 遺伝子

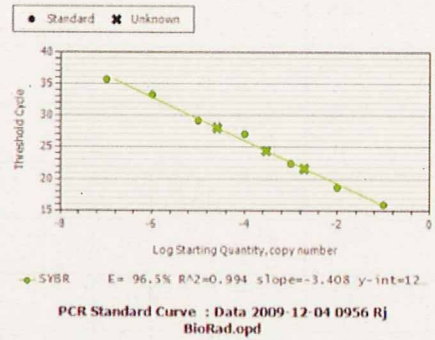
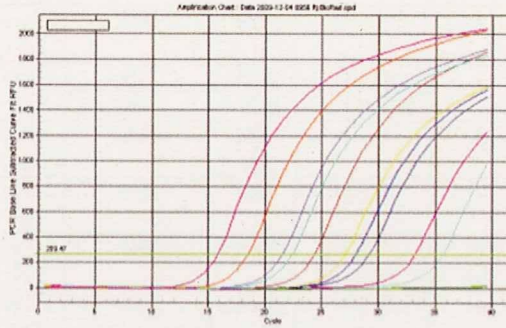


R17k 遺伝子

図 3. 日本紅斑熱リケッチア Aoki 株、Katayama 株に対する定量性の検討

Quantification of DNA samples from culture *Rickettsia japonica* strains
(BioRad)

Katayama



Aoki

