

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）
分担研究報告書

LAMP（Loop-mediated Isothermal Amplification）法による日本紅斑熱迅速診断の有用性
～薬疹の迅速な鑑別法としての重症感染症迅速遺伝子診断～
分担研究者 新原寛之 島根大学医学部皮膚科学 講師

研究要旨

日常臨床で急性に全身性紅斑、発熱を呈する急性発疹症に薬疹や感染症がある。いずれも重症化すれば数日～数週間に致死的となりうる急性の致死性疾患である。

リケッチア症の中でも日本紅斑熱は本邦で数百例/年で発症報告されており、特に島根県では多数報告されている。島根県のような好初地域で急性発疹症の診療を行う際は常に薬疹の他に日本紅斑熱の鑑別を念頭に行わないといけない。

近年、病原体の特異遺伝子を迅速に検出する LAMP 法が本邦で開発され、臨床応用されつつある。昨今のコロナ渦において迅速診断装置として日常臨床への普及が加速され、比較的どの医療施設においても検査機器の一つとして使用されるようになった。今回、日本紅斑熱原因病原体の特異遺伝子の迅速検出に LAMP 法を応用した。

A. 研究目的

急性発疹症の中でも薬疹と発疹を呈する感染症は、治療方針が全く真逆であるも同様な臨床所見を呈して鑑別が難しかったため、急性期の確実な鑑別法が必要とされていた。

発疹を呈する感染症の中で、1984年に最初に本邦で報告された日本紅斑熱が近年増加傾向であり、毎年死亡例が報告されている。当院の立地する島根県は、全国的にも日本紅斑熱が多発する地域であり、急性発疹症の鑑別に日本紅斑熱は必須であるが、これまで有用な鑑別法は研究室での使用に限定された Real-time PCR、または conventional PCR のみであった。2020年からの世界的なパンデミックをみた COVID-19 は、本邦において感染症簡易遺伝子検査の保険収載の適応拡大をもたらし、本邦開発の LAMP 法検査機器が日常臨床検査室に普及する一つのきっかけとなった。

B. 研究方法

(1) 対象者：2010年4月から2020年3月で当科で入院加療を行った日本紅斑熱症例で既報の LAMP プライマーを用いて LAMP 反応をおこなった。検体は痂皮、紅斑組織、

全血で検体が採取可能な検体を用いた。また、確認のために Nested PCR 施行してシーケンス解析、系統樹解析を行い、日本紅斑熱病原菌の *Rickettsia japonica* であることを確認した。

方法：使用した装置は LoopampEXIA を用いた。あらかじめ設定していた、温度サイクルで反応を確認した。すべての反応が 60 分以内で確認された。日本紅斑熱で加療された 9 症例全てで LAMP 陽性反応が得られ、シーケンス解析でも全て *Rickettsia japonica* であることが確認された。

（倫理面への配慮）

島根大学医学部倫理委員会にて「Loop mediated-isothermal amplification (LAMP)法、GENECUBE®を用いた急性感染発疹症の迅速診断法の確立」の研究課題名で承認(承認番号 4730)を得た。

C. 研究結果

Name	Sequences5'-3'
B3_cana	TCGACACCAATAAATTA

164_LF	CCCATAGATTGAAACCAGTTACTG
164_LB	TGGGCTATGGGTGCAACTTCTAATC
164_3detection5	TCGTCAGAATTTTAATATAGC
164_3detection3	TGGAACAAAAAAGGCAGCTCTCC
164_4	CCTCAGCTCCTTGTAGGT
164_4_F3	AATCCTCCTCTAAAAGAGC
<hr/>	
Rj5	5'-CGCCATTCTACGTTACTACC-3'
Rj10	5'-ATTCTAAAAACCATACTG-3'

	LAMP			Nested			Phylogenic tree analysis
	BC	TS	E	BC	TS	E	
P1	P	P	P	P	P	P	Rj
P2	N	P	-	N	P	-	Rj
P3	N	P	-	N	P	-	Rj
P4	-	-	P	-	-	P	Rj
P5	-	-	P	-	-	P	Rj
P6	-	P	-	-	P	-	Rj
P7	-	P	-	-	P	-	Rj
P8	N	P	-	N	P	-	Rj
P9	N	P	-	N	P	-	Rj

BC: Buffy Coat

TS: Tissue Specimen

E: Eschar

Rj: *Rickettsia japonica*

D. 考察

日本紅斑熱として治療された 9 例で全血、痂皮、紅斑部組織で採取可能な検体から DNA を抽出して、プライマー、試薬を混注して LAMP、Nested PCR を施行した。

9 例全てから Nested PCR にて陽性反応を得て、シーケンス解析、系統樹解析にて全例 *Rickettsia japonica* の DNA が検出された。また、LAMP も全例陽性反応が得られ

た。

症例 P1 は ICU 入室となり集中治療を要した最重症例であった。P1 のみ全血検体から LAMP、Nested PCR 陽性反応が得られた。

他 8 例は、紅斑部組織、または痂皮抽出 DNA にて陽性が得られた。

集中治療を要した最重症例のみから全血検体で PCR 陽性反応が得られたことから、最重症例では、PCR 反応が得られるほどの菌量が採取できたことから、菌血症の状態であることが考えられた。紅斑部皮膚、痂皮では *Rickettsia japonica* が PCR で陽性になるほど増殖していたことが確認された。

PCR 反応の採取検体として全血は不向きであった。痂皮、もしくは痂皮が自然脱落して診察時に体表面にみられなかったとしても、紅斑部組織検体から DNA 抽出して PCR 反応をすることが感度を上げるために重要であると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
特記することなし
2. 書籍
なし
3. 学会発表

- 1) 新原 寛之(島根大学) : SJS/TEN に対するステロイドハーフパルス初療の有用性 : アレルギーの臨床 42 巻 9 号 Page728-733(2022.08)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし