

つつが虫病起因リケッチアの分子疫学的解析について

門馬直太 塚田敬子 北川和寛 五十嵐郁美 柳沼幸¹⁾ 風間秀元¹⁾
平澤恭子 村松康成²⁾ 成田雅³⁾ 竹之下秀雄⁴⁾ 佐藤弘子 大竹俊秀
微生物課¹⁾ 総務企画課²⁾ 表郷クリニック
³⁾太田西ノ内病院総合診療科 ⁴⁾白河厚生総合病院皮膚科

要 旨

県内医療機関を受診したつつが虫病患者を迅速に診断する体制を構築するため、*Orientia tsutsugamushi* の遺伝子検査について検討した。既存の血清診断で陽性となった 23 名の患者から皮膚病変組織（痂皮）を採取し、*Orientia tsutsugamushi* の 56kDa 外膜タンパク質をコードする遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR を行った結果、21 検体から増幅産物が確認された。また型別 PCR から同定された血清型は血清診断から推定される血清型と全て一致しており、つつが虫の臨床検査における遺伝子検査の有用性が確認された。

キーワード：つつが虫病、*Orientia tsutsugamushi*、遺伝子検査

はじめに

つつが虫病は *Orientia tsutsugamushi*（以下“Ot”とする）を起因菌とするリケッチア症であり、ダニの一種ツツガムシによって媒介される。

本病の診断には病原体診断（培養または Ot 遺伝子の検出）と血清診断のいずれかが必要となる。当所も含め多くの検査施設では血清診断が広く用いられているが、①工程が煩雑であり検査員の熟練を要すること、②これまでに報告されている Ot の 6 種類（Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki, Shimokoshi）の血清型に対応する必要があること、③抗体価がほとんど上昇しないまたは上昇に時間を要する患者も散見される等、迅速かつ適切に本病の診断を行う上で解決すべき課題は多い。

遺伝子検査は血清診断に比べ検査工程も簡便であり、血清型の同定も可能なことから、つつが虫病が多発する本県においては非常に有用な手法と思われる。

これまでの Ot の遺伝子検査は全血または Buffy コートを検査材料として行われてきたが、近年、より検出率の高い材料として患者病変組織（痂皮）が見出されている¹⁾。

当所では多発するつつが虫の効果的な注

意喚起のため、県内における本病の実態把握を目的として本年度から 3 年間の調査研究事業「つつが虫の分子疫学的調査」を実施している。本報はその一年目として行った患者痂皮検体からの Ot の遺伝子検査の結果について報告する。

材料及び方法

1 つつが虫病患者皮膚病変組織（痂皮）

県内 3 医療機関に協力いただき、つつが虫病と診断された患者のうち、本調査研究に協力の同意をいただいた 23 名から採取した痂皮を用いた。協力の同意については、担当医師から文書による説明をした後、得た。

2 痂皮からの核酸抽出

1mm×1mm の患者痂皮断片に 200 μ L の PBS を加え、ビーズ式細胞破碎装置 MS-100R（トミー精工製）で 5,000rpm、3 分処理し、QIAamp Viral RNA Mini Kit により核酸を抽出した。

3 遺伝子検査

Nested PCR により Ot の 56-kDa 外膜タンパク質の遺伝子を検出した²⁾。各血清型共通の

Primer 34/55' で 1st PCR を行い，各血清型共通及び各型別判定用の Primer セットにより 2nd PCR を行った。

4 倫理面への配慮

本調査研究は福島県衛生研究所倫理規定（人を対象とする研究）に基づき，福島県衛生研究所倫理委員会の承認のもと実施した。

結果及び考察

1 痂皮の遺伝子検査

協力医療機関において患者の同意が得られた 23 症例について痂皮を採取し，Ot 遺伝子の検出を試みた。その結果，血清診断で Ot 抗体価が陽性となった 22 例中 21 例から Ot の遺伝子が検出され，血清診断で Ot 抗体価が陰性となった 1 例からは Ot 遺伝子は検出されなかった（表 1）。

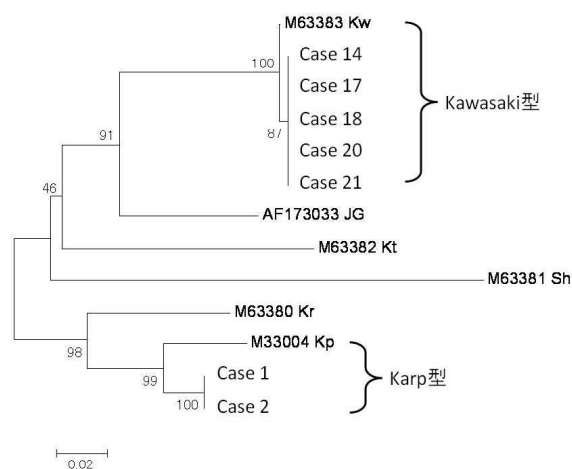
表 1 Ot の遺伝子検査と血清診断の相関

		遺伝子検査		計
		陽性	陰性	
血清診断	陽性	21	1	22
	陰性	0	1	1
計		21	2	23

以上の結果から，遺伝子検査と血清診断の結果は高い一致率を示すものと考えられる。今回血清診断で陽性となったにもかかわらず遺伝子が検出されなかった 1 例は，患者に典型的な刺し口が形成されず，痂皮と思われる組織について検査を行ったため，検体に含まれる Ot 遺伝子量が極めて少量であったまたは痂皮ではなく遺伝子が含まれなかった可能性が考えられる。また，血清型特異的なプライマーによる型別判定 PCR の結果，21 検体中 19 検体から Kawasaki 型，2 検体から Karp 型が検出され，既存の血清診断から推定される血清型とすべて一致していた。以上の結果から，患者痂皮からの遺伝子検査は感度，精度とも既存の血清診断とほぼ同等であると思われた。

2 検出された Ot の系統樹解析

遺伝子検査により Ot が検出された 21 検体中 7 検体について 2nd PCR の増幅産物を精製し，ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し，系統樹による解析を行った（図 1）。その結果，Karp 型に属した 2 例，Kawasaki 型に属した 5 例はそれぞれ全て同じ配列となり，各血清型の抗原性が強く保存されていることが示唆された。今後はより多くの Ot について塩基配列の解析を試みるとともに，より多様性を反映する分子疫学的な解析手法について



も検討する必要があると思われる。

図 1 Ot の系統樹解析（56kDa 外膜タンパク質）

謝 辞

本調査を行うにあたり，検体の採取にご協力いただきました県民の皆様には深く感謝いたします。

引用文献

- 1) 古結英樹，前久保理恵，山本正悟．ツツガムシ患者の痂皮 PCR の有用性．日本皮膚科学会雑誌 2010；120：762-.
- 2) リケッチア感染症診断マニュアル：国立感染症研究所・地方衛生研究所全国協議会編