

日本紅斑熱リケッチアの分離と 間接蛍光抗体法への応用

藤井 慶樹 則常 浩太 兼重 泰弘 山本 美和子
松室 信宏 坂本 綾

は じ め に

日本紅斑熱はマダニによって媒介される日本紅斑熱リケッチア (*Rickettsia japonica*, 以下, R. j) を病原体とする急性熱性疾患である。感染症法においては四類感染症に分類されており, 病原体である R. j は三種特定病原体として厳しい管理基準が設けられている。

2017 年に実施した日本紅斑熱疑い症例の検査において, 患者の急性期血液から培養細胞 (Vero-E6) を用いて, R. j を分離することに成功した。また, 分離した R. j を用いて, 抗体検査用の不活化抗原塗抹標本作製し, 間接蛍光抗体法 (Indirect immunofluorescence, 以下, IF 法) への応用について検討したので, その概要について報告する。

方 法

1 R. j の分離

(1) 材料

2017 年 5 月に日本紅斑熱疑い症例として検査依頼を受け, 遺伝子検査により R. j 陽性が確認された患者の急性期血液 (発症後 4 日目) を用いた。

(2) 分離方法

血液を遠心後, バフィーコート部分約 80 μ l を採取し, 継代で剥がした Vero-E6 細胞 1ml と混釈した後, 25cm² の培養フラスコに分注し, 抗生物質不含の 10% 牛胎児血清加 MEM 培地 (以下, 培地) 9ml を加え, 32℃ のフラン器で 2 週間培養した。

2 週間経過後, シートした細胞をセルスクレーパーで剥がし, 全量を回収後, 5,000rpm で 5 分遠心した。上清を捨て, 沈渣の細胞に 2ml の培地を加えて攪拌後, 600 μ l を分取し, Vero-E6 細胞 1ml と混釈後, 75cm² の培養フラスコに分注し, 培地 24ml を加え, 2 週間継代培養した。同様に, 3 代目まで継代培養を行い, この間, 細胞変性効果 (以下, CPE) の観察を行った。

(3) R. j 増殖の確認

1~3 代目までの各培養終了時に, 上述のとおり, 細胞を回収・遠心後, 2ml の培地を加えて攪拌した。このうち, 100 μ l を分取し, QIAamp DNA Blood

Mini Kit (QIAGEN) を用いて, DNA を抽出した。得られた DNA を鋳型として, Hanaoka らの方法¹⁾により, R. j のリアルタイム PCR を行い, 経時的な Ct 値の推移により, R. j の増殖を確認した。

2 IF 法

(1) 材料

不活化抗原塗抹標本の作製には R. j の増殖が確認できた Vero-E6 細胞を用いた。

IgM 抗体陽性血清は R. j が分離された患者の血清を用いた。また, IgG 抗体陽性血清は岡山県環境保健センターから分与を受けた。

(2) 手順

R. j の増殖が確認できた Vero-E6 細胞を回収し, 0.1% 濃度になるようにホルマリンを加え, R. j を不活化した後, スライドガラスに塗抹した。風乾後, 冷アセトンで 10 分間固定したものを不活化抗原塗抹標本とした。

IgM, IgG 抗体陽性血清については, 10 倍希釈を起点に 160 倍希釈までの 2 倍段階希釈系列を作成し, 細胞塗抹部位に滴下した。また, 陰性コントロールは PBS (-) を用いた。湿潤箱にて 37℃ で 1 時間反応させた後, 振盪器を用いて, PBS (-) で 3 分⇒5 分⇒7 分と計 3 回洗浄した。

風乾後, 至適濃度に希釈した FITC 標識 Goat anti-Human IgM 及び IgG 抗体 (abcam) をそれぞれ滴下し, 湿潤箱にて 37℃ で 30 分間反応させた後, 振盪器を用いて, 上記と同様に洗浄した。

風乾後, グリセリンで封入し, 暗視野蛍光顕微鏡下にて, 細胞内に蛍光を放つ R. j 粒子が認められるか否かを観察した。

結 果

1 CPE の状態

Vero-E6 細胞において 2 代目の継代時から, 細胞の剥離等の CPE が観察されるようになり, 3 代目まで継代すると約 7~10 日程度で明確な CPE が観察されるようになった。正常な Vero-E6 細胞及び CPE が認められた同細胞の状態をそれぞれ図 1, 2 に示す。

2 リアルタイム PCR 法による Ct 値の推移

リアルタイム PCR 法により、各継代終了時の経時的な R. j の DNA 量の推移を Ct 値をもとに確認した。急性期血液では Ct 値 38.2 であったが、継代を重ねるごとに Ct 値は低下し、3 代目には Ct 値 20.7 となった(図 3)。このことから、R. j の DNA 量の大幅な増加、すなわち、R. j が細胞内で増殖していることが確認できた。

3 不活化抗原塗抹標本を用いた IF 法の検討

IgM, IgG 抗体陽性血清を使用して IF 法を行った結果、両者ともに、細胞内に蛍光を放つ R. j 粒子を明確に確認することができた。また、陰性コントロールを用いた場合には、蛍光は確認されなかった。なお、IgG 抗体の測定においては、抗体価 80 倍以上を陽性とした。各陽性血清及び陰性コントロールを用いた IF 法の染色像を図 4, 5, 6 に示した。

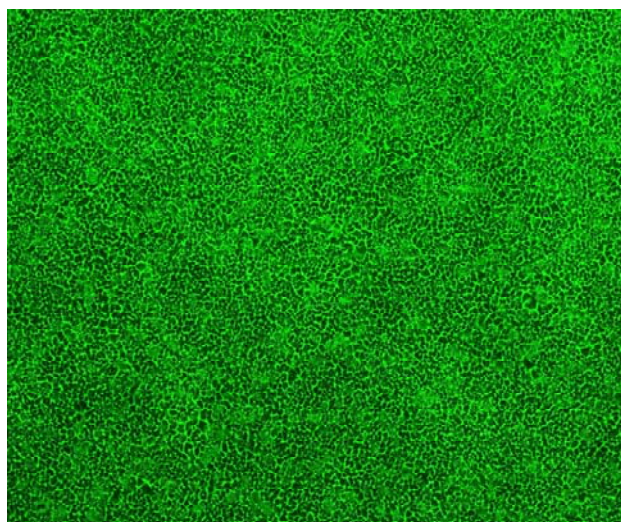


図 1 正常な Vero-E6 細胞

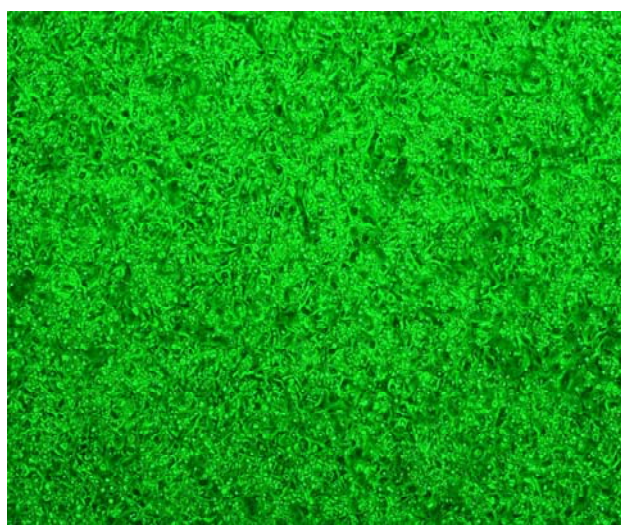


図 2 CPE の認められた Vero-E6 細胞

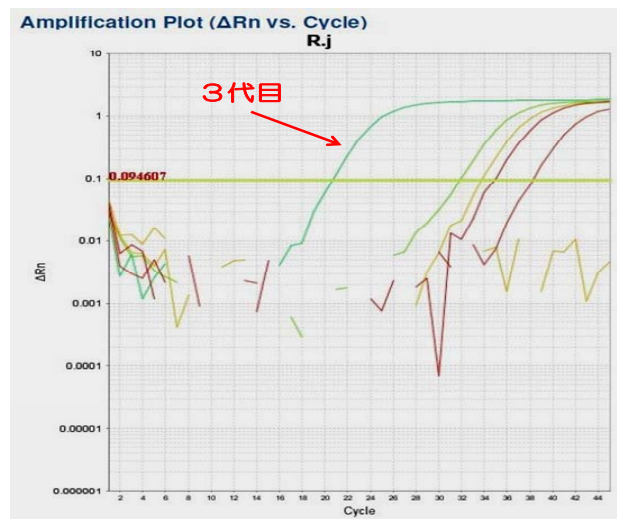


図 3 Ct 値の推移(リアルタイム PCR 法)

ま と め

当所においては過去 1990 年代に R. j が分離されているが、検体からどのようにして R. j を分離すればよいか、また、過去の分離株を起こして増やすためにはどうすればよいか、技術的に継承されていなかった。また、R. j は三種病原体であるため、病原体の分与を受けることも基準が非常に厳しく、現実的でなかった。そのため、日本紅斑熱の診断に必要な検査法のひとつである抗体検査の依頼を受けた場合には、広島県環境保健センターから分与を受けた不活化抗原を用いて、検査を実施する状況にあった。

この度、急性期患者の血液から R. j を分離する手順を確立し、持続的な継代が可能になったこと、さらに、分離した R. j を用いて、不活化抗原を作製し、IF 法に応用できたことは今後の検査の幅を広げる上で大きな収穫となった。

謝 辞

日本紅斑熱リケッチアの分離について、ご助言いただきました広島県環境保健センターの島津幸枝先生、IgG 抗体陽性血清を分与いただきました岡山県環境保健センターの木田浩司先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Hanaoka N et al.: Diagnostic assay for *Rickettsia japonica*, Emerging Infectious Diseases, 15(12), 1994~1997(2009)

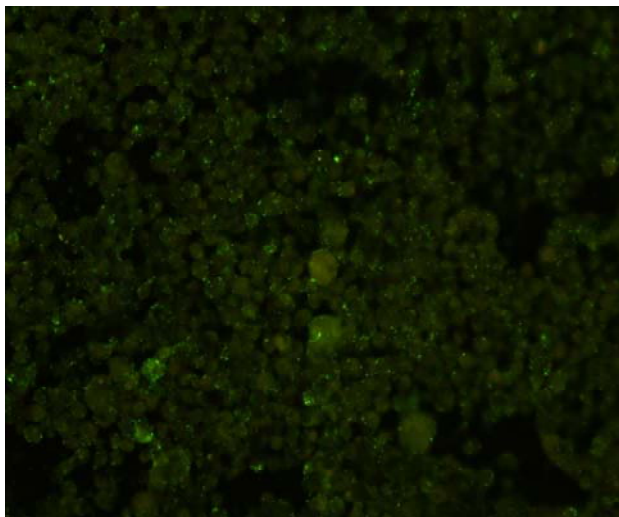


図4 IgM 抗体陽性の染色像(抗体価 10 倍)

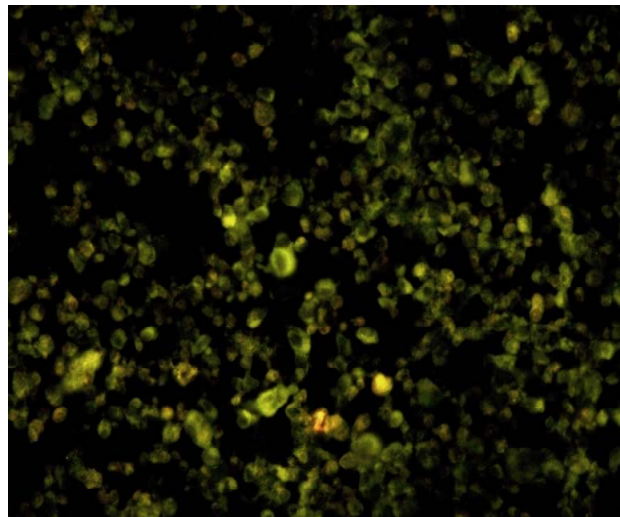


図6 陰性コントロールの染色像

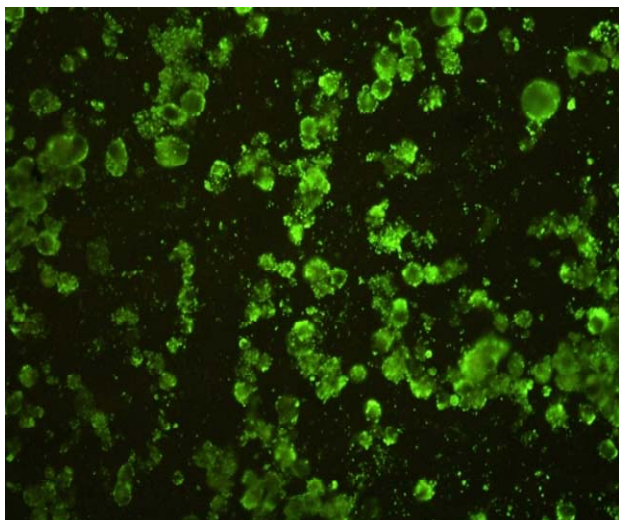


図5 IgG 抗体陽性の染色像(抗体価 80 倍)