

広島市のツツガムシ病患者血液からの *Orientia tsutsugamushi* 遺伝子検出とシーケンス解析

毛利 好江 石村 勝之 萱島 隆之 山本美和子
 下村 佳 橋渡 佳子 佐々木敏之 古田 喜美
 河本 秀一 平崎 和孝

はじめに

ツツガムシ病は、偏性細胞内寄生性の細菌 *Orientia tsutsugamushi* (Ot) を病原とする感染症で、ダニの一種のツツガムシによって媒介される。最近では春～初夏と秋～冬にかけて、全国的に発生している。広島市においても継続して発生しており、特に平成 11 年からは増加傾向を示し、平成 13 年は 22 名の届出があった。現在当所で行なっている間接蛍光抗体法による診断では、急性期血清と回復期血清の抗体上昇の確認が必要なため、診断確定までに発症から約 2 週間を必要とする。このため迅速性に欠けることから、臨床症状のある急性期に診断できる方法が望まれる。そこで、急性期患者血液中の Ot 遺伝子を検出する遺伝子増幅法¹⁾について検討した。また、陽性検体については、その塩基配列を決定し、比較検討を行った。

方 法

1 検体

平成 14 年度に保健センターを通じて医療機関の協力により採取された患者(疑)急性期の保存血液 7 検体と、当所に保存されていた平成 8 年から

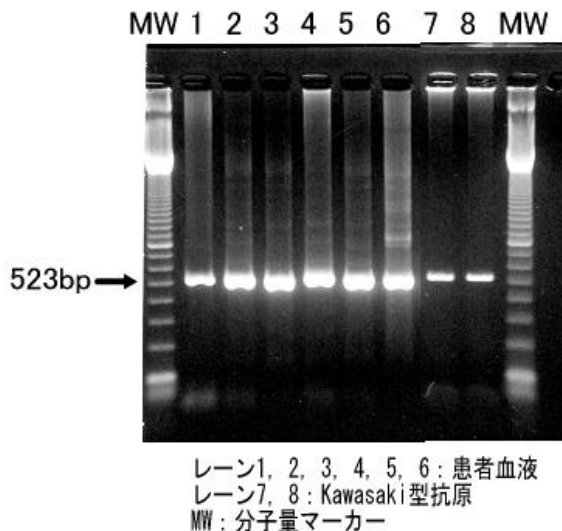


図1 血液からの nested PCR 増幅像

13年度までの患者(疑)血液 13 検体, 計 20 検体を供した。

2 検査方法

血餅からの DNA 抽出は、DNA 抽出キット NucleoSpin Blood (MACHEREY-NAGEL 社), Xtra-Amp(ジールサイエンス社)の2種類の市販品を用いて行った。次に 56kDa 型特異的抗原遺伝子をリケッチア感染症診断マニュアル¹⁾に記載されたプライマーを用いて nested PCR 法により増幅、検出した。血清型は、1st PCR の産物を鋳型として Kato 型, Karp 型, Gilliam 型, Kawasaki 型, Kuroki 型特異的プライマーにより 2nd PCR を行なうとともに、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を解析し、決定した。

結果と考察

1 Ot 遺伝子の検出と型別

保存血液 20 検体より抽出した DNA のうち、6 検体(NucleoSpin Blood 法 5 検体, Xtra Amp 法 1 検体)

Kawasaki型	101	TATGCTGGIATTGACTATATGGTCCGA
検体No 1	101	TATGCTGGIATTGACTATATGGTCCGA
検体No 2	101	TATGCTGGIATTGACTATATGGTCCGA
検体No 3	101	TATGCTGGIATTGACTATATGGTCCGA
検体No 4	101	TATGCTGGIATTGACTATATGGTCCGA
検体No 5	101	TATGCTGGIATTGACTATATGGTCCGA
検体No 6	101	TATGCTGGIATTGACTATATGGTCCGA
Kawasaki型	201	ATCCTAGACTTCGGCAAAATCTTAATA
検体No 1	201	ATCCTAGACTTCGGCAAAATCTTAATA
検体No 2	201	ATCCTAGACTTCGGCAAAATCTTAATA
検体No 3	201	ATCCTAGACTTCGGCAAAATCTTAATA
検体No 4	201	ATCCTAGACTTCGGCAAAATCTTAATA
検体No 5	201	ATCCTAGACTTCGGCAAAATCTTAATA
検体No 6	201	ATCCTAGACTTCGGCAAAATCTTAATA
Kawasaki型	301	TTCTTCTGTTAAAGTATTAAGTGACAA
検体No 1	301	TTCTTCTGTTAAAGTATTAAGTGACAA
検体No 2	301	TTCTTCTGTTAAAGTATTAAGTGACAA
検体No 3	301	TTCTTCTGTTAAAGTATTAAGTGACAA
検体No 4	301	TTCTTCTGTTAAAGTATTAAGTGACAA
検体No 5	301	TTCTTCTGTTAAAGTATTAAGTGACAA
検体No 6	301	TTCTTCTGTTAAAGTATTAAGTGACAA
Kawasaki型	401	CCTAATAGTGCATCTGTGGA
検体No 1	401	CCTAATAGTGCATCTGTGGA
検体No 2	401	CCTAATAGTGCATCTGTGGA
検体No 3	401	CCTAATAGTGCATCTGTGGA
検体No 4	401	CCTAATAGTGCATCTGTGGA
検体No 5	401	CCTAATAGTGCATCTGTGGA
検体No 6	401	CCTAATAGTGCATCTGTGGA

▲: 塩基配列の変異ヶ所

図2 Ot 遺伝子のシーケンス比較

表 Ot 遺伝子陽性者の検査結果

検体 No	発病日	性別	年齢	感染地域	採血日	IgG 抗体価			PCR 結果	血清型
						Kato	Karp	Gilliam		
1	H 8.11. 5	女	46	安佐北区可部町南原	H 8.11. 7	< 10	< 10	< 10	+	Kawasaki
					H 8.11.15	80	40	20	ND	
2	H 9.11. 9	女	58	安佐北区白木町三田	H 9.11.12	< 10	< 10	< 10	+	Kawasaki
					H 9.11.19	40	320	80	ND	
3	H12.11.20	男	59	安佐北区可部町	H12.11.30	1280	160	320	+	Kawasaki
					H12.12.13	1280	1280	1280	ND	
4	H13.10.16	男	52	千葉県	H13.10.24	< 10	< 10	< 10	+	Kawasaki
					H13.10.28	40	40	20	ND	
5	H13.10.15	女	72	安佐北区安佐町久地	H13.11. 2	< 10	< 10	< 10	+	Kawasaki
					H13.11.26	40	160	320	ND	
6	H13.11. 5	男	52	不明(安佐北区?)	H13.11.12	20	10	10	+	Kawasaki
					H13.11.27	160	80	160	ND	

ND:試験せず

から Ot 遺伝子が検出された(図 1)。しかし、型別では、Kawasaki 型プライマーで強い増幅が認められたものの、他のプライマーでも増幅があり、明確に決定できなかった。そこで、この 6 検体の遺伝子をシーケンスし、その塩基配列を解析した結果、6 検体とも Kawasaki 型の配列であることが判明した(図 2)。また、千葉県で感染したと思われる 1 検体(図 2: 検体 No4, 表: 検体 No4)を除き、5 検体からの Ot 遺伝子配列は同じであった。これらは、同一の 2ヶ所に同じ塩基変異が認められ、同系統の株と考えられた。岩崎ら²⁾は、安佐北区で発生した患者血清で Kawasaki 型株に対する抗

体上昇を報告しており、今回の塩基配列の解析結果から本市域におても、他の西日本地域と同様にこの Kawasaki 型 Ot が分布していることが明確となった。さらに、少なくとも平成 8 年には Kawasaki 型 Ot が存在しており、その後も同一系統の Ot が安佐北区や安佐南区を中心に広く存在していることが示唆された(図 3)。従って、感染予防の観点から、今後も、ツツガムシ病の発生状況や感染を防ぐための具体的方法に関する市民への情報提供が重要と考えられた。

一方、技術的課題として、今回の血清からの遺伝子検出率が 30%と低率であったことから、採血方法、DNA 抽出、PCR 標的遺伝子、nested PCR 方法など、細部条件についてさらに検討する必要があると考えられた。

謝 辞

血液の採取に際し、協力して頂いた医療機関および本市保健センターの皆様に深謝申し上げます。

文 献

- 1) 国立感染症研究所：リケッチア感染症診断マニュアル，10～16(2001)
- 2) 岩崎博道 他：広島県において見いだされたツツガムシ病多数例の臨床的および疫学的解析，感染症学雑誌，75(5)，365～370(2001)



図 3 患者推定感染地(平成 2 年～14 年)