

三重県における日本紅斑熱発生状況と検査法の検討

○赤地重宏¹⁾、永田克行²⁾、田沼正路¹⁾

¹⁾三重県保環研、²⁾三重県薬務食品室

【はじめに】

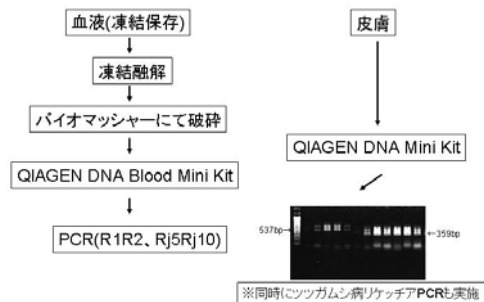
日本紅斑熱は *Rickettsia japonica* を原因とするダニ媒介性疾患であり、マダニ類の刺咬により体内にリケッチアが侵入することにより感染発病する。4 類感染症に指定されているヒトの疾患であるが、リザーバーとして野生の齧歯類、シカ等が疑われている人獣共通感染症でもある。1984 年に馬原らにより新しいリケッチア感染症として報告され、近年発生地域が拡大している。三重県においても県南部を中心に患者報告数が増加傾向にあり、公衆衛生上問題となってきている。臨床症状はツツガムシ病に類似しており鑑別は困難であるが、日本紅斑熱は時として重篤化する傾向があるため、正確に診断することが重要である。そこで、感染症発生動向調査事業に基づき提出された検体の検査を実施するとともに、PCR 法等検査法の検討もあわせて行った。

【材料および方法】

検査材料は患者の全血、血清、刺し口および紅斑部皮膚のうち、採材し得たものを検査対象とした。平成 19 年に検査を実施したのは 25 例で、内訳は伊勢保健所管内 23 例、松阪および鈴鹿保健所管内各 1 例であった。検査方法は平成 12 年度紅斑熱群リケッチア症診断マニュアルに準拠した。抗原検査は全血、皮膚を対象とした PCR 法、抗体検査は血清を対象とした間接蛍光抗体法により行った。

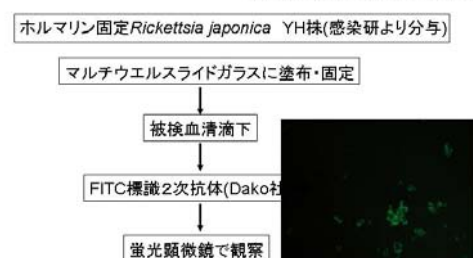
PCR法による日本紅斑熱病原体検査

紅斑熱群リケッチア症診断マニュアルに準拠



蛍光抗体法による抗日本紅斑熱抗体検査

紅斑熱群リケッチア症診断マニュアルに準拠



【成績および考察】

検査対象とした 25 例中 20 例が感染症法による診断基準を満たし、日本紅斑熱と診断された。また、日本紅斑熱患者の居住地は三重県南部に集中し、この地域に日本紅斑熱リケッチア保有マダニが多く生息している可能性が考えられた。平成 20 年もこの傾向は続いているが、現在まで認められなかった乳幼児(3 ヶ月～6 歳)での発生が 4 例あり、年齢層を問わず発生することから、発疹を伴う類似の疾患との鑑別が重要であると思われた。また、検査法について検討したところ、PCR 法において使用する酵素の種類により結果が異なる傾向が見られた。今回検討した中では HotStart 型の Taq Polymerase を用いた場合の検出感度が良好であったため、検査においては同酵素を用いることが適当と考えられた。また、核酸抽出法の違いにより若干の差が見られ、各キットの処理方法により PCR 反応阻害物質の残留や核酸回収量の差が現れてきているものと考えられた。検出感度については、日本紅斑熱と診断された患者の診断根拠となった材料を検討したところ、血液を対象とした PCR 法での陽性率は 58.8% であり、血液のみを材料とした場合 4 割程度が偽陰性と診断される可能性が示唆された。これに対し、刺し口皮膚を対象とした PCR 法および回復期の IgG 抗体検査では対象検体数は少ないものの陽性率が高い傾向にあり、検査対象材料として有用であると考えられた。

日本紅斑熱患者分布(20例)



日本紅斑熱陽性結果(20例)内訳

時期	検査検体	検査件数	陽性数	陽性%
急性期 (初診時)	全血(PCR)	17	10	58.8
	刺し口(PCR)	10	10	100
	紅斑部(PCR)	3	1	33.3
回復期	血清(蛍光抗体) IgM	18	5	27.8
	血清(蛍光抗体) IgM	16	15	93.8
	血清(蛍光抗体) IgG	16	16	100

酵素・方法の違いによるPCR検査結果の比較

材料:ウマ血液1mLにホルマリン固定Rickettsia japonica YH株1μL添加

核酸抽出:

- Qiagen DNA Blood Mini Kit 血液100uL+PBS100uLから100uLを溶出
- Roche MagNaPure TotalNA Kit 血液100uLから100uLを溶出
- Takara Genとるくん 血液100uLから60uLを抽出
抽出した原液5uL①、それをTEで10倍希釈した溶液5uL②を使用

PCR用酵素: Takara TaqHS
Takara ExTaq
AmpliTaq Gold

方法:血液を材料としたPCR法による検索、R1R2-RJ5Rj10のNested-PCR

PCR検査結果一覧

使用酵素	試料と核酸抽出法						プライマー
	①-Q	②-Q	①-M	②-M	①-G	②-G	
Takara ExTaq	-	-	-	-	-	-	R1R2(2回)
Takara TaqHS	-	+	+	+	+	-	
Amplitaq Gold	-	+	+	+	+	-	
Takara ExTaq	-	-	-	-	-	-	Rj5Rj10(2回)
Takara TaqHS	+	+	+	+	+	+	
Amplitaq Gold	+	+	+	+	+	+	
Takara ExTaq	-	+	-	+	+	-	R1R2-Rj5Rj10
Takara TaqHS	+	+	+	+	+	-	
Amplitaq Gold	+	+	+	+	+	+	

①:原液 ②:10倍希釈 Q:QIAGEN DNA Blood M:MagNA Pure G:Genとるくん

マニュアル上での指定はないが、検査にはHotStart型の酵素を使用すべき

【まとめ】

三重県において増加傾向にある日本紅斑熱を調査した結果、平成19年に当所に搬入された25例中20例が日本紅斑熱と診断された。患者の居住地は三重県南部に集中しており、リケッチア保有マダニの存在を示唆する結果と考えられた。検査法を検討したところ、PCR法を用いる場合、使用する酵素の種類により結果が異なる場合があり、日本紅斑熱のPCR法に関してはHotStart型Taq Polymeraseを用いることが適当と考えられた。検査材料と検査法としては、皮膚刺し口を用いたPCR法、回復期血清のIgG蛍光抗体法の感度が良好な傾向にあり有用であると考えられた。今後はPCR法におけるPrimerの検討、RealTimePCR法やLAMP法の導入など、正確でより迅速な検査法を検討し感染症対策に寄与したいと考えている。