

ツツガムシ病検査におけるPCR法導入の試み

青木 順子・小暮 尚美・新井 礼子
西川 眞・篠川 旦

A method of *Orientia tsutsugamushi* detection using Polymerase Chain Reaction

Junko Aoki, Naomi Kogure, Reiko Arai, Makoto Nisikawa and Akira Sasagawa

Keywords: ツツガムシ病; PCR法; 型別.

1 はじめに

当県は、古くからツツガムシ病発生多発地として知られ、ツツガムシ病感染予防対策についても種々の努力が積み重ねられてきた。しかし近年でも、年間およそ40件程度のツツガムシ病患者発生が報告されている¹⁾。現在当所ではツツガムシ病の確定診断を免疫学的手法の1つ、間接蛍光抗体法によって行っている。免疫学的手法では急性期と回復期の抗体価測定を行うため、結果を得るまでに発病から約2週間を要する。

また、近年ツツガムシ病様の症状を呈しながら、抗体価の上昇が認められない症例が報告される²⁾など、免疫学的手法単独では完全にツツガムシ病を診断できないことが知られてきた。ツツガムシ病を正確に診断する方法として、病原体である *Orientia tsutsugamushi* (以下Ot) を患者材料から直接検出する、マウスを用いた検査法があるが、この方法は迅速性に劣るため、これに代わる高感度で迅速性に優れた検査法が必要となってきた。

近年Polymerase Chain Reaction (以下PCR) 法が開発されたことにより、種々の病原微生物の遺伝子解析が進み、Ot遺伝子配列においても各血清型間での相違が明らかにされつつある^{3, 4)}。これら遺伝子解析の結果から PCR 法はツツガムシ病の早期診断ばかりでなく、疫学的調査にも広く利用することが可能と思われる。

そこで、当所においてもツツガムシ病診断検査に PCR 法を導入する前段階として、検体中からOt 遺伝子を効率よく抽出及び検出する方法を検討したのでその結果を報告する。

2 方 法

2.1 材 料

県と新潟大学医学部医動物学教室とで、ツツガムシ病患者発生地域におけるツツガムシの Ot 保有状況及び野鼠の Ot 感染状況調査を実施している。この調査の中で、1997 年秋に捕獲した野鼠4匹 (スミスネズミ2匹, アカネズミ2匹) の10%脾臓乳剤をBalb/C系マウスにそれぞれ2代継代接種し、感染症状である背面立毛を確認後死亡したマウスを、新潟大学医学部医動物学教室より譲り受け、各マウス臓器から、Ot 遺伝子の抽出を行った。

スミスネズミ由来の検体を A, B とし、アカネズミ由来の検体を C, Dとした。

2.2 遺伝子の抽出

臓器乳剤からの抽出と臓器の凍結融解上清からの抽出を行い、二法の比較を行った。

臓器乳剤はPBS (-) で50%に作製後二分し、一方は8000G で3分間遠心を行い、上清と沈渣に分け、他方はそのまま用いた。

凍結融解は2回行い、8000G 3分間遠心分離した上清を用いた。

それぞれに Proteinase K Buffer (0.2M Tris; pH7.5, 25mM EDTA, 0.3M NaCl, 2% SDS) を加え10%液とし、0.1mg のProtenase K を入れ、55°C, 60分間反応後、反応液を二分し、一方はフェノールとクロロフォルムで精製し、もう一方はボーリングを10分間行った後、直接 PCR に用いた。

2.3 プライマー

Ot 遺伝子検出のプライマーには、地方衛生研究所微生物協議会検査情報委員会恙虫病小委員会及び国立感染症研

究所ウイルス第一部が行った「第1回恙虫病の遺伝子診断法技術講習会」において分与された、56kDa のポリペプチドをコードする属特異的領域のものを用いた。

血清型別には、既に報告されている³⁾ 1st PCR 増幅領域の内側で、Kato 株, Karp 株, Gilliam 株, Kawasaki 株, Kuroki 株に特異的な領域のプライマーを用いた (Table 1, Fig. 12).

2.4 PCR 反応

PCR 反応試薬は、Biotech International のキットを用いた。

サーマルサイクラーは Techne 社製 Progene を用いた。

血清型別時の nested-PCR 反応条件は、アニーリング温度を 57℃ と 60℃ に設定し、比較を行った (Fig. 3). nested PCR 産物は 2% アガロースゲルで電気泳動を行っ

Table 1. Oligonucleotide primers for detection of *Orientia tsutsugamushi*

| Primer | polarity | Sequence | |
|--------|----------|--------------------------|----|
| 34' | + | 5' ATTGCTAGTGCAATGTCTGC | 3' |
| 55' | - | 5' CTGCTGCTGTGCTTGCTGCG | 3' |
| 10' | + | 5' CCTCAGCCTACTATAATGCC | 3' |
| 11' | - | 5' CGACAGATGCACTATTAGGC | 3' |
| KT | - | 5' GAATATTTAATAGCACTGGA | 3' |
| KP | - | 5' ACAATATCGGATTTATAACC | 3' |
| G | - | 5' CTTTATATCACTATATATCTT | 3' |
| KW | + | 5' ATGCTGCTATTGATACAGGC | 3' |
| KP | - | 5' CACCGGATTTACCATCATAT | 3' |

The gene encoding the 56-kDa antigen of the *Orientia tsutsugamushi*

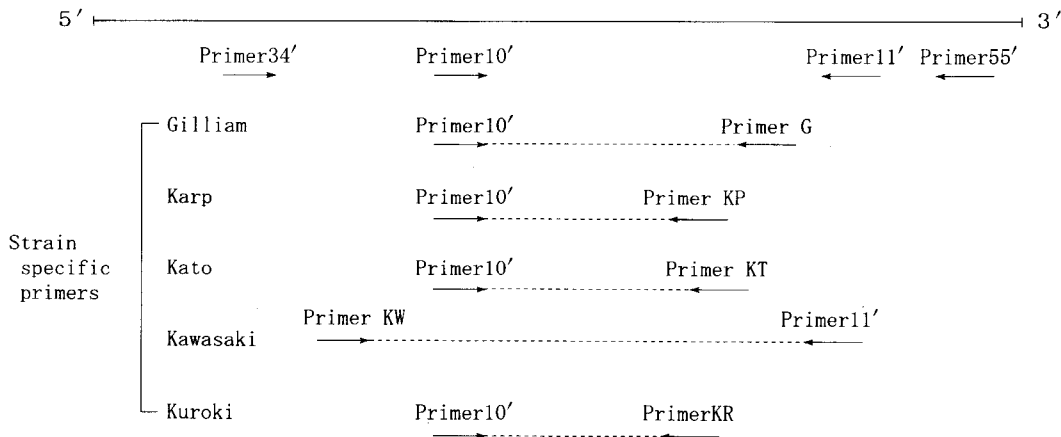


Fig. 1. Amplifying region each primer pairs¹⁾ (modified)

| 1st PCR | | nested PCR (<i>O.tsutsugamushi</i> DNA detection) | |
|--------------|----------|--|-------------------------|
| Primer34, 55 | | Primer10, 11 | |
| Kato | : 1003bp | Kato | : 495bp |
| Karp | : 1030bp | Karp | : 507bp |
| Gilliam | : 1003bp | Gilliam | : 481bp |
| Kawasaki | : 1003bp | Kawasaki | : 481bp |
| Kuroki | : 1026bp | Kuroki | : 501bp |
| | | nested PCR (serotyping) | |
| | | | type specific primers |
| | | Kato | : 242bp primer10' , KT |
| | | Karp | : 230bp primer10' , KP |
| | | Gilliam | : 407bp primer10' , G |
| | | Kawasaki | : 523bp primer KW , 11' |
| | | Kuroki | : 220bp primer10' , KR |

Fig. 2. Amplifying length by each primer pairs.

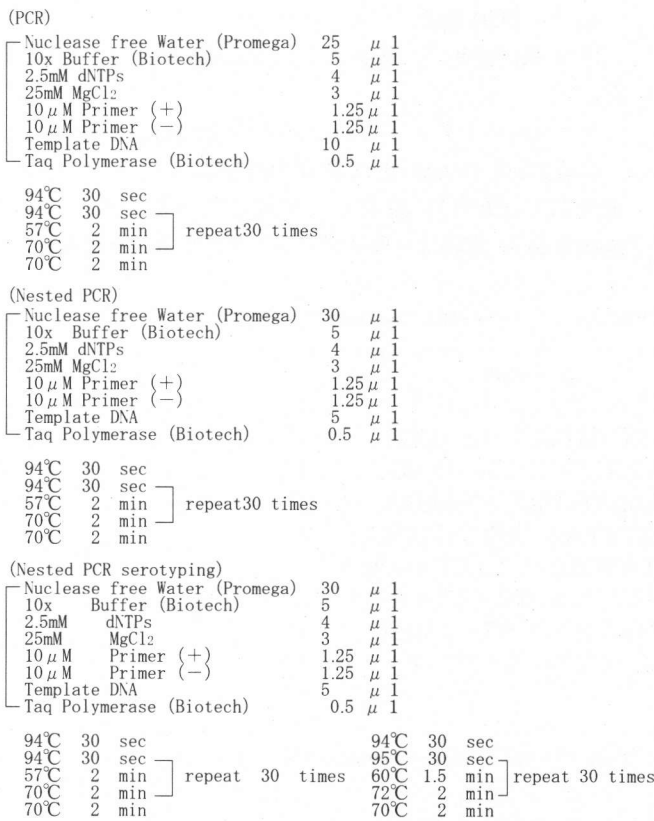


Fig. 3. Polymerase Chain Reaction strategy for detection of *Orientia tsutsugamushi*.

た後、エチジウムブロマイド染色し、増幅 DNA バンドを確認した。

3 結果および考察

3.1 DNA 抽出

結果を Table 2 に示す。

臓器乳剤からは、Proteinase K 反応後にボーリング処理を行った場合は nested PCR で、フェノールとクロロホルムで精製した場合は 1st PCR でそれぞれ Ot の遺伝子検出が可能であった。

しかし臓器を凍結した上清では、フェノールとクロロホルムで精製した場合は 1st PCR で Ot 遺伝子を検出できたが、ボーリング処理を行った場合は検出できなかった。

凍結融解上清のボーリング処理検体から Ot 遺伝子を検出できなかった原因として、検体中に多く含まれている PCR 反応阻害物質を、ボーリング処理だけでは取り除け

なかったことが考えられる。また臓器乳剤は凍結融解上清よりも Ot を多く含むため、ボーリング処理でも Ot 遺伝子の検出が可能であったと考えられる。ツツガムシ病診断検査で用いるヒト血液の場合は、感染マウス臓器と異なり、Ot 量がかなり少ないと思われることから、DNA の精製操作が必要と考えられる。

一方、凍結融解処理は、臓器乳剤作製に比べ、臓器片を乳鉢ですりつぶす過程で Ot が飛沫する危険性を避けることができるため、非常に有用な方法と思われる。

また、野鼠から直接 Ot の DNA 抽出を行う場合も、同じように凍結融解上清から抽出が可能であるかについては、今後検討を行う。

3.2 反応条件の比較

今回用いた各プライマーの McGraw らの方法⁵⁾ による計算上の至適アニーリング温度は、プライマー-55' が最高で 61°C、プライマー-G が最低で 45°C と、16°C の開きがあったが、5 種類の血清型の型別が同時に行える条件について検討を行った。

アニーリング温度を 57°C とした Furuya らの報告³⁾ と、60°C とした Ree らの報告⁶⁾ があり、両温度による増幅 DNA に相違があるか否かを検討した結果、アニーリング温度が 57°C でも、60°C で行っても、各血清型の遺伝子検出は確認できた。

しかし、アニーリング温度を 57°C にした場合は、Gilliam

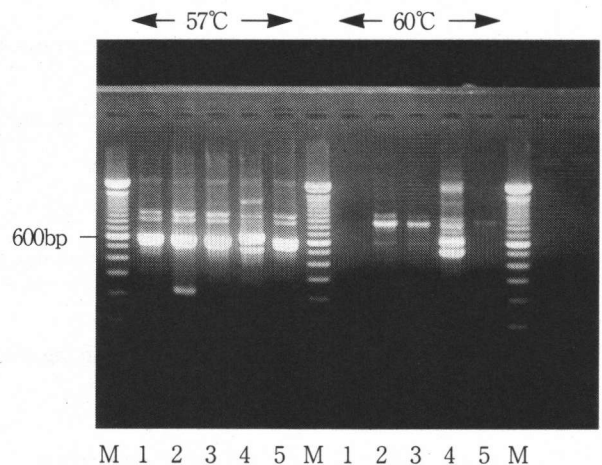


Fig. 4. Comparison of two annealing temperature condition in Kawasaki strain, M: 100bp DNA ladder marker; 1: primer pairs 10' -KT, 2: 10' -KP, 3: 10' -G, 4: KW-11', 5: 10' -KR

Table 2. Results between to extraction method

| | Supernatant after freezing and thawing | Tissue | | |
|---------|--|--------|-------------|--------|
| | | Whole | Supernatant | Pellet |
| Boiling | - | + | + | + |
| P: C | ++ | ++ | ++ | ++ |

++: 1st PCR (+) +: nested PCR (+)

Table 3. Recovery of *Orientia tsutsugamushi* from inoculated mouse

| Sample | Lung | Heart | Liver | Spleen | Kidney | Bowels | Uterus | Muscle | Serotype |
|--------|------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------|
| A | + | + | + | + | + | + | + | + | Kato,Karp |
| B | + | + | + | + | + | + | + | + | Karp |
| C | + | + | + | + | + | + | + | NT | Karp |
| D | + | + | + | + | + | - | + | NT | Karp |

NT : not tested

株, Kawasaki株, Kuroki株の血清型別において, Karp型の偽陽性バンドが検出されたが, 60°Cでは偽陽性バンドは検出されなくなった。(Fig4).

3.3 検出結果

結果を Table 3 に示す。

実験感染マウスAからDの各臓器について, Ot 遺伝子検出を行った結果, マウスDの腸以外の臓器全てから検出できた。この結果から, Ot が血行性で全身の臓器に感染を起こしたことが推察された。

またそれぞれの血清型別を行った結果, マウスB~Dからは Karp 型, マウスAからは Kato 型, Karp 型の両血清型の遺伝子が検出された。

マウスAの結果が両血清型の混合感染によるためか否かは, 検出された遺伝子の塩基配列を調べることにより判明すると思われる。

また, 過去において当県で発生したツツガムシ病患者から分離され, 非常に特異的な血清型を示す Shimokoshi 株⁷⁾が存在することから, 今回検討を行った5つの血清型に加え, Shimokoshi 株の型別が可能なプライマーの選定を今後検討する必要がある。

更に, 今回用いた血清型を決定する方法は, 今後新たな血清型が出現すれば, その血清型に合わせてプライマーの種類を増やす必要があるため, 操作が繁雑となり各操作段階での汚染の危険性が高くなることから, 2nd PCR 産物を制限酵素で切断し, 切断片の長さによって血清型の判別を可能にする, RF-PCR 法⁸⁾についても今後検討を行う予定である。

4 ま と め

1997年秋に野鼠を捕獲し, 実験感染させた Balb/C 系マウスの臓器から *Orientia tsutsugamushi* 遺伝子の抽出を行

ったところ, 次の結果を得た。

- 臓器凍結融解上清をフェノールクロロホルム処理することにより Ot の DNA 検出が可能であった。
- 血清型別は nested-PCR において, アニーリング温度を 60°Cにすると, 非特異産物が認められなくなった。
- 捕獲した4匹の野鼠のうち, 3匹は Karp 型, 1匹は Kato 型と Karp 型の混合感染と考えられる。

お わ り に

今回の研究にあたり, Ot 感染マウスの提供に御協力いただいた, 新潟大学医学部医動物学教室の関川弘雄助教授と監物実先生に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 新潟県福祉保健部:平成9年福祉保健年報, p.269 (1997).
- 2) 古屋由美子, 他:感染症学雑誌, 71, 474 (1997).
- 3) Yumiko Furuya, Yoshiya Yoshida, Takashi Katayama, Seigo Yamamoto, Akiyoshi Kawamura, Jr: Journal of Clinical Microbiology, 31, 1637 (1993).
- 4) 吉田 芳哉, 古屋由美子, 片山 丘, 海保 郁男, 山本 正悟:感染症学雑誌, 68, 601 (1994).
- 5) MacGraw, et al.: Biotechniques, 8, 674 (1990).
- 6) Han-Il-Ree, Woo-Hyun Chang, Sunho Kee, In-Yong Lee, Soung-Hoo Jeon: Med. Entomol. Zool, 48, 197 (1997).
- 7) Akira Tamura, et al.: Microbiol. Immunol, 28, 873 (1984).
- 8) Fumihiko Kawamori, et al.: J. Vet. Med. Sci, 55, 749 (1993).