

原 著

村上総合病院におけるツツガムシ病患者の血清学的診断と *Orientia tsutsugamushi* の分離、及び現地調査について

大久保 耕 嗣^{*1,3)} 渡 辺 七 朗^{*1)}
斉 藤 良 一^{*2)} 高 橋 英 伸^{*2)}
福 原 正 博^{*3)} 浦 上 弘^{*3)} 多 村 憲^{*3)}

村上総合病院で96年に遭遇した2例の患者について、*Orientia tsutsugamushi* に対する間接蛍光抗体法による抗体価の測定を行い、2例とも恙虫病と診断された。同時に血液よりリケッチアの分離を試み、分離した1例については、モノクローナル抗体及びPCP-RFLPによる血清型の同定を行い、Karp typeであることが判明した。さらに、患者が刺されたと思われる現地で、野鼠と土壌からツツガムシを採取しリケッチアの保有状況について調査したが、全て陰性であった。今後疫学調査を実施するとともに、ツツガムシの *O. tsutsugamushi* 保有率を簡便に調査出来る方法を開発中である。

キーワード：恙虫病、抗体価、リケッチア分離、血清型同定、疫学調査

はじめに

ツツガムシ病は、ツツガムシ病リケッチア (*Orientia tsutsugamushi*) を保有するツツガムシの幼虫に刺されて発症し、発熱・発疹・所属リンパ節の腫脹および刺し口の形成を主徴とする急性発疹性熱性疾患¹⁾である。*O. tsutsugamushi* は偏性寄生性のグラム陰性桿菌で、刺咬部の皮膚から侵入しリンパ球中心の炎症細胞浸潤を起す。現在12種ある届出伝染病の1種に属する²⁾。治療にはミノサイクリン (MINO) 等のテトラサイクリン系またはクロラムフェニコール系抗生物質が有効であるが、セフェム・ペニシリン等のβラクタム剤、ニューキノロン系抗生物質は無効である^{3,4)}。また培養には宿主を必要とし、培養細胞系が用いられる。一般の細菌と違い、人工の培地上では培養できない。

ツツガムシはほぼ日本全国に存在し、現在100種類以上が知られているが、リケッチアを保有するものは10数種といわれている⁵⁾。うち人を刺す可能性のあるものとして、アカツツガムシ (*Leptotrombidium akamushi*)、タテツツガムシ (*L. scutellare*)、フトゲツツガムシ (*L. pallidum*) が主なものである。その保有率は約0.03~2%程度と推定されている^{5,6)}。リケッチアを保有した幼虫に刺された際に、約10日の潜伏期を経て発症する場合がある。また不顕性感染の

まま推移することもある。保有率の低さ等から、山菜取りなどで刺されても、発症する可能性は低いと思われる。

O. tsutsugamushi には、血清学的性状を異にする Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki, Shimokoshi 株に代表される血清型が存在し、これらの抗原性の違いがリケッチア表面に存在する56kDa蛋白 (TSA) の型特異的抗原性によることが明かにされている⁷⁾。

今回我々は、村上総合病院で96年に遭遇した2例の患者について、抗体価測定を実施した。うちリケッチアの分離に成功した1例については、モノクローナル抗体を用いて血清型の同定を行った。また Polymerase chain reaction法により遺伝子を増幅し、制限酵素で切断した時に見られる Restriction fragment length パターンを比較し (PCR-RFLP法) タイピングを試み、迅速な確定診断が下せるかを調査した。さらに患者が刺されたと思われる現地に赴き、野鼠の脾臓から分離を試みた。野鼠からはツツガムシの満腹幼虫、土壌から未吸着幼虫を採取し、その種のリケッチアの保有状況についても調査したので報告する。

方 法

1) 患者抗体価の測定

Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki, Shimokoshi 株に対するIgG・Mの抗体価を間接蛍光抗体法 (IF)

*1) 〒958-0854 新潟県村上市田端町2番17号
村上総合病院薬剤部

*2) " 内科

*3) 新潟薬科大学微生物学教室

にて測定した。すなわち患者血清を10倍から20480倍まで2倍段階希釈し、リケッチア抗原に1次抗体として作用させた後、FITCをラベルした抗ヒトIgG、IgM抗体を2次抗体として作用させた。蛍光顕微鏡下で、抗原と抗体と抗IgG(M)抗体・FITC複合体の蛍光を観察し、患者血清の最高希釈倍数の逆数を各抗原に対する抗体価とした。U励起で検鏡した。

2) *O. tsutsugamushi* の分離、モノクローナル抗体による血清型の同定

ヘパリナイズされた患者血液試料から単球分画を採取し、マウス (ddY一系 ♀ 4 week) およびL細胞 (マウス繊維芽細胞) に接種した。マウスにはシクロホスファミド (エンドキサン®) を腹腔内に注射し免疫能を低下させ、これを3代継代した (Fig.1)。分離された株を精製後これを抗原とし、6血清型に特異的に反応するモノクローナル抗体を用い、間接IF法により血清型を調査した。

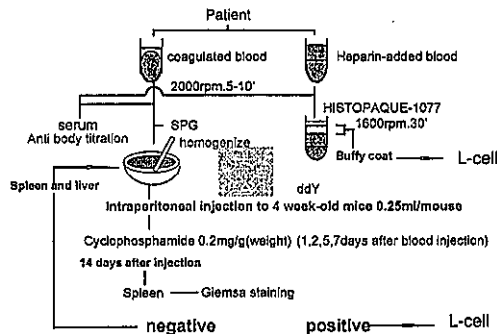
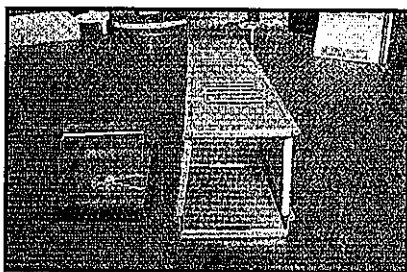


Fig.1. Isolation of *Orientia tsutsugamushi*

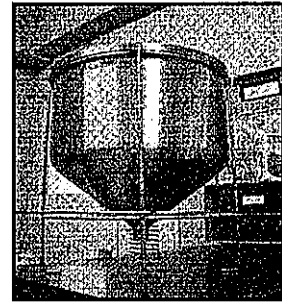
3) 野鼠の脾臓からの分離、ツツガムシのリケッチア保有状況の調査

現地での野鼠の捕獲はパンチューとシャーマン (Fig.2) を用いた。野鼠を解剖後、脾臓を潰しMEMで20%乳剤とし、200μLをマウス (ddY一系 ♀ 4 week) に接種した (Fig.1)。また野鼠を解剖後1~2日間吊し、落ちてきた満腹幼虫を採取した。土壌からの未吸着幼虫の採取はツルグレン (Fig.3) を用いた。



パンチュー シャーマン

Fig. 2. Rodent traps



ツルグレン

Fig. 3. Tullgren funnel to collect mites in soil

採取したツツガムシをスライドガラスに並べて潰し、これを抗原とした。間接IF法にて、ツツガムシ中のリケッチア保有状況を調査した。

4) PCR-RFLP法による *O. tsutsugamushi* のタイピング

Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki, Shimokoshi 株の56kDa遺伝子がクローニングされ、当教室ではその塩基配列の解析から、株間で共通性の高い領域と4ヶ所の非共通領域 (variable domain; VD) の存在を明らかにした⁹⁾。VDIからIVを増幅することによりタイピングが可能⁹⁾である。今回は増幅しやすいようHorinouchiらの方法に従い、IからIIIを含んでいる約0.6kbを増幅した^{10,11)}した (Fig.4)。nested-PCR法で増幅したDNA断片を制限酵素で切断し、1.8%アガロースゲルで電気泳動した。

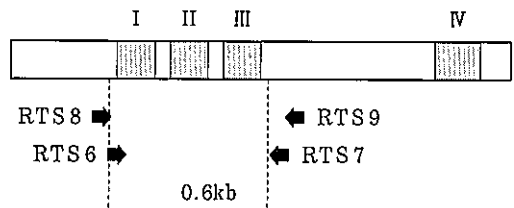


Fig.4. Schematic representation of primer positions in the 56kDa protein gene for nested polymerase chain reaction (PCR)

結果

1) 患者臨床経過および抗体価の推移

2症例の入院までの経過を示す (Fig.5)。両患者とも、刺されたと思われた日から約10日前後に風邪症状を呈し、近医でセフェム系抗生物質等を処方されたが治癒せず、刺し口およびリンパ節の腫脹を認め、ツツガムシ病の疑いで入院した。

●症例1, T.A(74)♀ 症例2, T.S(62)♀

5月始め: 山菜取りに山に行った 5月1日頃: 自宅畑にて草取り
虫さされの軟膏塗布

6日: 寝ていたら背部痛あり 12日: 発熱, 食欲なし
近医受診(風邪薬処方)

7日: 朝から発熱(38.5℃), 寒気+ 15日: 別の医院受診
近医受診(CCL処方) 左前腕部に刺し口

8日: 当科紹介受診 15日: 当科紹介受診
頸部・腋窩リンパ節腫脹 皮疹, BT39.3℃
背に血皮を伴った特徴的刺し口 左腋窩リンパ節触知

ツツガムシ病の疑いで入院 ツツガムシ病の疑いで入院

Fig.5. History of the present illness

臨床経過を示す (Fig.6,7)。発熱してからの経過日数を病日で示してある。症例1では、5月始めの山菜取りで刺されたと思われる。入院後MINO投与により速やかに解熱し、1週間で退院した。採血前にMINO投与されていたので、リケッチアの分離は出来なかった。

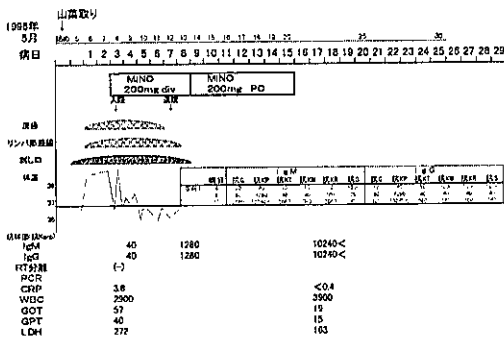


Fig.6. Clinical course of case 1

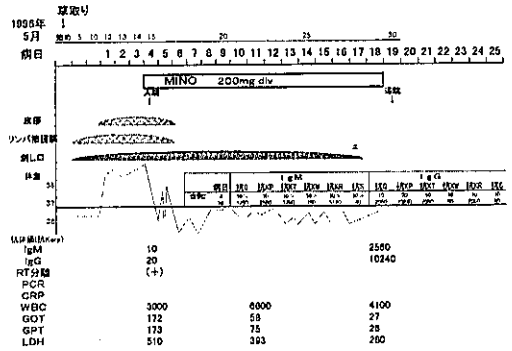


Fig.7. Clinical course of case 2

症例2でも、5月始めに自宅畑において農作業中に刺されたと思われる。入院後MINO投与により速やかに解熱したが、肝機能が改善しなかったため18病日まで入院していた。抗体価は4病日頃より上昇し、各血清型に対するIgG・IgMの抗体価の推移から血清学的にツツガムシ病との診断が下された。

抗体価の特異性により、両患者ともKarp typeのリケッチアによる感染であることが推測された。

2) *O. tsutsugamushi* の分離と分離株のモノクローナル抗体による血清型の同定

症例2の患者ではMINO投与前に採血できたので、リケッチアの分離に成功した。L細胞で分離に成功したが、マウスからは分離出来なかった。

分離された*O. tsutsugamushi* をモノクローナル抗体を用い血清型を調査した結果、Karp typeであることが解った (Table 1)。日本ではフトゲツツガムシは主にKarp, Gilliamのベクター (媒介種) となっており、新潟県で患者を発症させるツツガムシの種はフトゲが主であるので、患者がフトゲツツガムシに刺された可能性が示唆された。

Table1. Reactivities of strains in monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence test

使用抗原	Anti-Gilliam		Anti-Karp			Anti-Kato			Anti-Kawasaki	Anti-Kuroki	Anti-Shimokoshi	株別クロー
	4B-6(G2a)	1-18(G)	I-19(G2a)	3C9(G3)	KP7(G)	1D12(G2a)	3A-6(G2a)	5D-3(G2b)	417(G2b)	55-12(G)	1E9H8	GPTWRS
T.S株	-	-	++	+	++	-	-	-	-	-	-	++
Gilliam	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
Karp	-	-	++	±	++	-	-	-	-	-	-	++
Kato	-	-	-	-	-	++	++	+	-	-	-	++
Kawasaki	+	+	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++
Kuroki	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	++
Shimokoshi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++

3) PCR-RFLP法による *O. tsutsugamushi* のタイピング

症例2 および Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki, Shimokoshi 株を、TSA に特異的なプライマーを用いて nested-PCR を実施した。PCR 産物を制限酵素を用いて切断し、アガロースゲルを用い電気泳動した結果、症例2 は Karp と同一パターンであった (Fig. 8)。より詳細なタイピングをするためには、VDI から IV 全てを増幅する必要があると思われる。

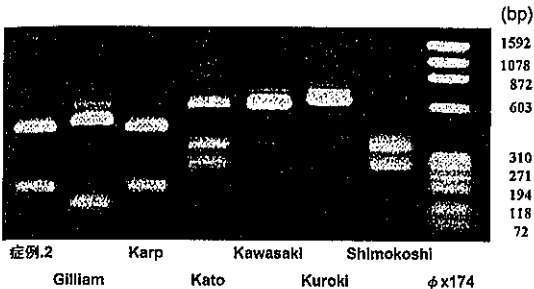


Fig. 8. PCR-RFLP profiles of 56-kDa protein genes of isolates after digestion with endonuclease HaeIII

4) 野鼠の脾臓から分離、ツツガムシのリケッチア保有状況の調査

症例2 の患者が刺されたと思われる現地に赴き、野鼠の捕獲と土壌の採取を行い、ツツガムシ中のリケッチア保有状況を調査した。土壌および野鼠から採取したツツガムシ種を示す (Fig. 9)。未吸着幼虫44匹と満腹幼虫134匹、計178匹のリケッチア保有の有無を間接IF法で調べたが、全て陰性であった。

	土壌(未吸着幼虫)	野鼠(満腹幼虫)
<i>Leptotrombidium fujii</i>	20	44
<i>Leptotrombidium pallidum</i>	19	12
<i>Neotrombicula japonica</i>	1	5
<i>Gahlepiea saduski</i>	4	73

Fig. 9. Species of mites collected from soil wild rodents

考 察

ツツガムシ病は、臨床的にはMINO投与にて容易に治癒するが、血清学的診断を下すまでにはペア血清の抗体価測定を行う必要があり、かなりの時間を要する。今後、nested PCR-RFLP法を患者血液に用いる方法を検討し、迅速かつ簡単にタイピングを含めた確定診断を下せる方法を確立していきたいと思う。

ツツガムシはほぼ日本全国に分布しているが、患者

多発地においてはツツガムシのリケッチア保有率が10%を越える場合もある。リケッチア保有率の疫学的調査をすることは、有意義であると思われる¹¹⁾。現在保有率を簡便に調査出来る方法を開発中¹²⁾である。

今後患者からの分離を続けていくとともに、患者が発症した場所からツツガムシの未吸着幼虫を採取・種を調査し、リケッチアの保有率等を長期的な視点で調査していきたいと思う。また未吸着幼虫からリケッチアを分離し、遺伝子レベルで調査していきたいと思う。

結 語

1. 1996年村上総合病院において2例の患者が発症し入院した。新潟県では36症例の届け出があった。
2. 血清診断により、両患者ともKarp typeのリケッチアによる感染であることが推測された。
3. 1例の患者から *O. tsutsugamushi* を分離し、モノクローナル抗体を用いた間接IF法で調査した結果、Karp typeであった。
4. TSA に特異的なプライマーを用い nested-PCR を実施した結果 *O. tsutsugamushi* のDNAが増幅された。
5. PCR-RFLP法で調査した結果、Karp株と同じパターンであった。
6. 患者が刺されたと推定された場所で、野鼠と土壌からツツガムシを採取し、リケッチアの保有状況を調査したが全て陰性であった。

謝 辞

今回患者血液・血清を快くご提供いただきました、検査科、榎原義市技師長、ライム病(ボレリア)を疑い血清をいただいた皮膚科、佐武純子、小林夏子先生ならびにその検査をしていただいた静岡大学薬学部助教、増沢俊幸先生。猫ひっかき病(バルトネラ)を疑い血清をいただいた、内科、瀬賀弘行先生。また今回、ツツガムシ種の同定をしていただきました、埼玉県立川越総合高校、高橋守先生に深謝します。

文 献

- 1) 三淵一二編:微生物学, p.93, 南山堂, 1993.
- 2) 橘宣祥, 村井幸一:ツツガムシ病, 感染症, MEDICAL VIEW, 102-107, 1994.
- 3) 浦上弘, 多村憲, 宮村定男, 山本正悟, 川畑紀彦:最近分離された恙虫リケッチアの化学療法剤に対する感受性について, 感染症学雑誌, 62:931-937.
- 4) 宮村定男, 太田達夫, 多村憲:各種化学療法剤に

- 対する *Rickettsia prowazekii*, *R. rickettsii*, *R. si birica* および *R. tsutsugamushi* の感受性の比較, 日本細菌学雑誌, 44:717-721.
- 5) 浅沼靖: 媒介ツツガムシと恙虫病リケッチアの保有種, 臨床と細菌, 10:174-179.
- 6) 浦上弘, 多村憲: 恙虫病リケッチア *O. tsutsugamushi* と宿主ツツガムシとの共生関係について, 日本細菌学雑誌, 51:497-511.
- 7) Tamura, A. Ohashi, N, Urakami, H. Takahashi, K. and Oyanagi, M. (1985): Analysis of polypeptide composition and antigenic components of *Rickettsia tsutsugamushi* by polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting. Infect. Immun. 48:671-675.
- 8) Ohashi, N. Nashimoto, H. Ikeda, H. and Tamura, A. (1992): Diversity of immunodominant 56-kDa type-specific antigen (TSA) of *Rickettsia tsutsugamushi*. J. Biol. Chem. 267:12728-12735.
- 9) Ohashi, N. Koyama, Y. Urakami, H. Fukuhara, M. Tamura, A. Kawamori, F. Yamamoto, S. Kusuya, S. and Yoshimura, K. (1996): Demonstration of antigenic and genotypic variation in *Orientia tsutsugamushi* which were isolated in Japan, and their classification into type and subtype. Microbiol. Immunol., 40:627-638, 1996.
- 10) Horinouchi, H. Murai, K. Okayama, A. Nagatomo, Y. Tachibana, N. and Tsubouchi, H. (1996): Genotypic Identification of *Rickettsia tsutsugamushi* by Restriction fragment length polymorphism analysis of DNA amplified by the polymerase chain reaction. Am. J. Trop. Med. Hyg. 54:647-651.
- 11) Horinouchi, H. Murai, K. Okayama, A. Nagatomo, Y. Tachibana, N. and Tsubouchi, H. (1997): Prevalence of Genotypes of *Orientia tsutsugamushi* in patients with Scrub Typhus in Miyazaki Prefecture. Microbiol. Immunol., 41:503-507.
- 12) 浦上弘, 大久保耕嗣, 多村憲: 北海道, 野幌における恙虫病の疫学調査, 第70回日本細菌学会総会抄録, p.196, 1997.
- 13) 浦上弘, 大久保耕嗣, 多村憲: 京都府岩滝町における *Orientia tsutsugamushi* の疫学調査, 第71回日本細菌学会総会抄録掲載予定.

Serodiagnosis and isolation of *Orientia tsutsugamushi*
from a patient found
in Murakami General Hospital and field investigation

Koji Okubo^{*1,3)}, Shichiro Watanabe^{*1)}, Ryouichi Saito^{*2)}, Hidenobu Takahashi^{*2)}
, Masahiro Fukuhara^{*3)}, Hiroshi Urakami^{*3)} and Akira Tamura^{*3)}

Sera from two febrile patients were subjected to immunofluorescence diagnosis against several strains of *Orientia tsutsugamushi*, and found strongly positive to Karp strain.

We isolated *O. tsutsugamushi* from one of the patients and classified it into Karp type by the reactivity to type-specific monoclonal antibodies and PCR-RFLP of 56kDa type-specific antigen. We made an epidemiological survey in agricultural fields where the patient might be infected to capture wild rodents and chigger mites, but found that none of them were infected with *O. tsutsugamushi*.

Key words: *Orientia tsutsugamushi*, immunofluorescence diagnosis monoclonal antibodies, PCR-RFLP, epidemiological survey

^{*1)} Department of Pharmacy, Murakami General Hospital
Tabatamachi2-17, Murakami, Niigata958-0854

^{*2)} Department of Medicine, Murakami General Hospital

^{*3)} Niigata College of Pharmacy, Department of Microbiology