

原 著

ツツガムシ病のDNA診断－病理組織への応用－

病理センター

長谷川 秀 浩、片 桐 丘 充、五十嵐 俊 彦

目的：病理組織材料からのツツガムシ病のDNA診断を目的に、中性ホルマリンにより固定されたOrientia Tsutsugamushi (O. tsutsugamushi) 培養細胞から抽出されたDNAを用いてPCR法により特異的DNAの増幅を行なった。更に、ホルマリン固定日数による影響について検討した。

方法と成績：O. tsutsugamushiに特異的塩基配列109bpを増幅するプライマーによるPCRの結果、未固定試料から過固定試料に至るすべての検討材料から特異的DNAの増幅が可能であった。これは、中性ホルマリンによるDNAの損傷が、本法による特異的DNAの検出に影響をおよぼす程度には至っていなかったためと考えられた。したがって、本法を用いた場合、固定日数に影響されずに中性ホルマリンにより固定された病理組織材料からのO. tsutsugamushi DNAの検出は可能であると判断された。

結論：ツツガムシ病について、早急に臨床所見の裏づけが要求される場合や臨床所見から診断の難しいケースなどに対し、本法により、有効かつ適切な情報の提供が可能となり、迅速な診断と早期治療に大きく貢献できる検査法と判断された。

キーワード：ツツガムシ病、DNA診断、PCR、ホルマリン固定材料

緒 言

ツツガムシ病は、ツツガムシ病リケッチヤ (O. tsutsugamushi) を保有するツツガムシの幼虫に刺されたことにより起こる感染症で、特有の刺し口を生じ、リンパ節の腫脹、発熱、発疹等の症状をおこす4類感染症に定められる届出伝染病に属する。かつて、本県においては1800年代初めより、夏季、信濃川河川敷で発生する風土病として知られていた。近年においては新種のツツガムシの発生により、河川周辺に限らず山野にて、山菜取りや農作業時に刺され発症する例が報告され、その発生傾向に変化が生じている。

ツツガムシ病の確定診断には蛍光抗体法、免疫酵素法、補体結合反応など、主に血清学的手法を用いた方法により行われている。そして、その病原体であるO. tsutsugamushiの同定には、一般細菌と異なり人工培地による培養が不可能なことからマウスを使い1~3ヶ月間かけて分離同定することが一般的である。また、近年の分子生物学的技術の飛躍的な発展により、病原遺伝子の核酸をポリメラーゼ反応により増幅させ検索する方法 (Polymerase chain reaction: PCR) が確立され、各種感染症の診断法として応用され始め、血

液を検査材料としてツツガムシ病の診断にも用いられている。従来、病理組織標本より抽出されたDNAを検出材料とした場合には不向きとされていた本解析法も、標本製作過程における固定液やプライマーの選定など各種条件に配慮しながら、その検出条件が確立されはじめている。^{1,2)} 今後、病理診断の補助的手段として、適応項目の拡大が望まれる。

今回、我々は病理組織材料からのツツガムシ病のDNA診断を目的に、ホルマリン固定されたツツガムシ病リケッチヤ培養細胞から抽出されたDNAを用いて、PCR法によりO. tsutsugamushiに特異的DNAの増幅を可能としたので報告する。

材 料 と 方 法

1. 材料

検討には病理検査への提出材料を想定し、新潟県保健環境科学研究所ウイルス科で保有していたマウス上皮系L929細胞に継代増殖させたO. tsutsugamushi培養細胞 (Kato株、Gilliam株) に、最終濃度が10%になるように中性ホルマリン (pH6.5) を添加した材料について検討した。DNA抽出は、未固定時から固定後10日の日数を経過した各細胞浮遊液から、それぞれ200 μ lを採取し、14000rpm、30分の遠心分離により、培養細胞を管底に集め上清を除去、10mM PBS (pH7.2) により培養細胞の洗浄をおこなった後10mg/ml Protease K 180 μ lと10% SDS 20 μ lを添加し56 $^{\circ}$ C、over nightにて蛋白質を分解した。この反応液にフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1) 混合液を200 μ l加え、除蛋白を行い14000rpm、10分の遠心分離により得られた上清100 μ lを回収し、これに3M酢酸ナトリウム10 μ lと冷プロパノール250 μ lを加え、-78 $^{\circ}$ Cディープリーザー内で30分間静置し、DNAを析出させた。その後14000rpmで30分間遠心分離後、管底のDNAペレットを70%エタノールで2回洗浄し、ヒートブロックにより乾燥後50 μ lのTE液で溶解させた。

2. プライマーの設定とPCR条件

Sugita等³⁾により設定されたO. tsutsugamushi 58KDaの表面蛋白の一部をコードするプライマーのうち各株共通部分をコードするForward (F. primer): 5'-gtt tca tct aat gga gac cgc gaa-3'とReverse (R. primer): 5'-caa agt taa aat ttt tag aat c-3'の組み合わせで増幅される109bpを標的とした。本プライマーの組み合わせは、O. sibirica O. rickettsiiを除くすべてのO. tsutsugamushi DNAに共通する塩基配列を特異的に増幅するプライマーの組み合わせである。

PCR反応液の組成は、d-H₂O:14 μ l、10 \times PCR buffer

with 15mM MgCl₂2 μ l, 2mM dNTP:2 μ l, 50pM F primer:0.5 μ l, 50pM R primer:0.5 μ l, 1U Ampli Taq GoldにDNA sol: 1 μ lを加えた全量20 μ lのPCR反応液を調整した。

DNA増幅にはプログラムテンプコントロールシステムPC707 (Astec Japan) を使用し、サーマルプログラムは94℃10分のHot startを行った後、①denature 94℃ 1分、②annealing 55℃ 1分30秒、③extension 72℃ 1分を40サイクル行った後、Last extensionとして72℃ 10分間伸張させた。

3. 増幅DNAの検出

PCR反応液3 μ lを12.5%ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動後、エチジウムブロマイド (EtBr) 染色を行い、紫外線 (UV) イルミネーターにより増幅産物の確認を行った。

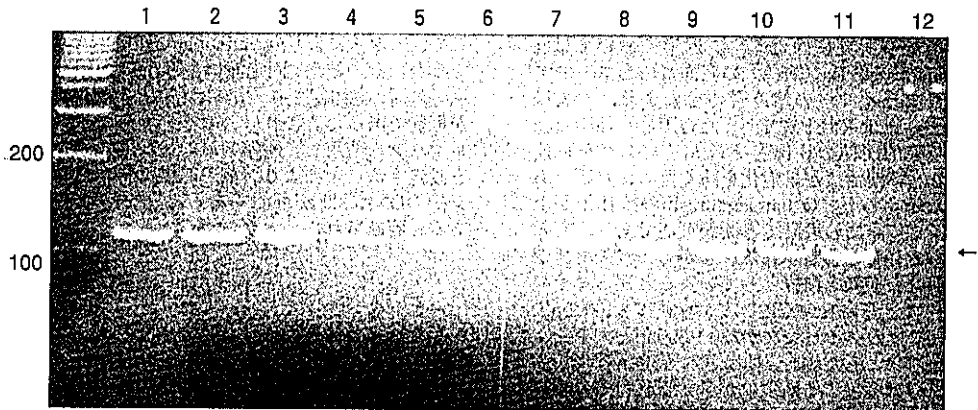
結 果

未固定時から固定後10日後に抽出されたDNA試料によりPCRをおこない、その反応液を12.5%アクリル

アミドゲルにより電気泳動した結果をFig.1およびFig.2に示す。Gilliam株、Kato株ともに未固定時から固定後10日後に至るすべての試料から*O. tsutsugamushi*に特異的なDNAの増幅を示す109bpの位置にバンドがみとめられ、その検出感度は両株間においても差は確認されなかった。なお、他に非特異的なバンドの増幅はなく、陰性対象としたヒト肝臓正常組織にも増幅されたバンドは認められなかった。

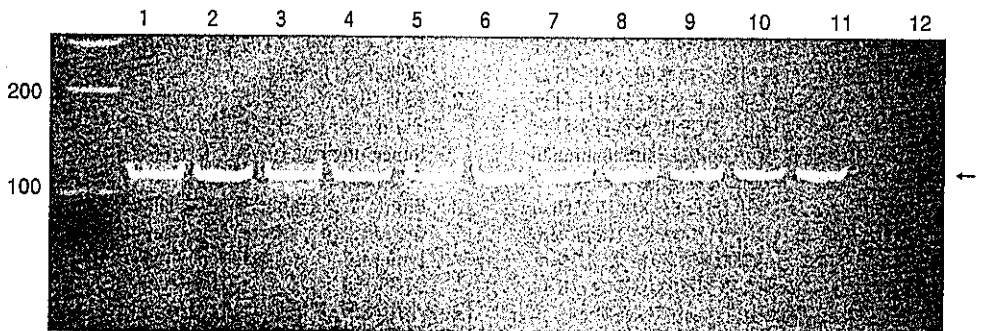
考 察

平成4年から平成13年のツツガムシ病の届出件数は全国で一年間に500件~900件あり、本県においては25件~50件程度の患者が報告されている。その内訳によれば、信濃川河川敷等に多発したようなアカツツガムシ (*Leptotrombidium akamushi*) による古典的ツツガムシ病は減少しているものの、新種のフトゲツツガムシ (*L. pallidum*) やタテツツガムシ (*L. scutellare*) が媒介する新型ツツガムシ病の増加により、一時減少傾向にあった患者発生数も再び増加に転じている。実際



1 : 1st day 2 : 2nd 3 : 3nd 4 : 4nd 5 : 5nd 6 : 6nd 7 : 7nd 8 : 8nd 9 : 9nd
10 : 10nd 11 : 11nd 12 : 12nd

Fig.1 DNA detection of the *O. tsutsugamushi* of type Gilliam by PCR-PAGE. (influence of the fixation number of days.)



1 : 1st day 2 : 2nd 3 : 3nd 4 : 4nd 5 : 5nd 6 : 6nd 7 : 7nd 8 : 8nd 9 : 9nd
10 : 10nd 11 : 11nd 12 : 12nd

Fig.2 DNA detection of the *O. tsutsugamushi* of type Kato by PCR-PAGE. (influence of the fixation number of days.)

には不顕性感染の患者と合わせて考えた場合、届出件数を相当数に上まわるものと予想される。1998年の調査を例に取ると、その推定感染場所は山地、山間部が50%と最も多く、感染時の作業の種類は農作業、森林作業、山菜、山芋採りでの感染が全体の60%を占める¹⁾。新潟県厚生連の各病院は、その殆んどが山間部に隣接していることから、ツツガムシ病患者に接する機会が多いものと考えられる。一方、ツツガムシ病の確定診断において血清学的診断を下すまでには、血清学的性状を異にするGilliam株、Karp株、Kato株、Kawasaki株、Kuroki株、Shimokoshi株が存在することから、それぞれに対する抗体価を測定する必要がある、判定までにかなりの時間を要す。また、リケッチアの分離同定にはマウスと新鮮な患者血清が必要であり、実施するには多くの時間と豊富な経験が必要とされる。組織学的には感染初期リンパ節では免疫芽球様の大型リンパ球様細胞が皮質およびリンパ洞内に認められ、重症時には壊死や出血を伴う。発疹部では真皮上層から中層の血管拡張と血管周囲性のリンパ浸潤が認められ、刺し口においては乳頭下部にいたる変性壊死と真皮全層に及ぶ炎症細胞の浸潤と血管の拡張等の所見が認められるが、いずれも組織学的にツツガムシ病と決定付けるような特徴的な所見には乏しい。近年においてはO. tsutsugamushiの56kDa (TSA) の表面蛋白をコードする特異的なプライマーの組み合わせにより、大久保等²⁾がNested PCR-RFLP法で、また吉田等³⁾はNested PCR法で特異的DNAの検出とそのタイピングを可能としている。早期治療が重症化を防ぐために重要であることから考えると、O. tsutsugamushiの抗体価が上がる前の極めて早期の段階で診断が可能であり、有効な手段であることと判断される。しかし、検査材料が未固定の新鮮な血液を前提としていることから、その増幅産物の大きさが1st PCRでは、いずれも1000bp以上、2nd PCRでのタイピングが220～600bpと大きく、病理材料を対象とした場合、抽出されるDNAはホルムアルデヒドの影響による断裂化が考えられ、それらの方法をそのまま応用することは不可能である。そこで我々はDNAの断裂化が予想される病理材料からでも増幅可能な増幅長であるプライマーを組み合わせO. tsutsugamushi各株共通部分58kDa蛋白の特異的塩基配列の増幅を行った。固定にはホルムアルデヒドによる影響を最小限におさえるため日常業務で使用可能な中性ホルマリンを使用した。その結果、固定後10日を経過した培養細胞からの検出が可能であった。これは通常、病理検査に提出される組織の標準的な固定日数以上であったことから、固定液としてpHを中性付近に調節したホルマリンを使用し、PCR阻害物質を除去することにより、病理組織からのO. tsutsugamushi DNAの検出は十分可能であることを意味するものであると考えられた。なお、58kDa蛋白抗原にはHeat shock protein 60とのホモロジーについての報告があるが、Stover CK等⁷⁾による詳細な検討の結果、本プライマーの組み合わせによる他との交叉反応については否定されている。また、治療にあたっては各株とも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を用いることから、治療を開始するにあたって正確なタイピングは必ずしも必要であるとは考えられない。したがって、O. tsutsugamushi DNAの存在有無を最優先事項と考えた場合、本法によるツツガムシ病の

診断は、より迅速な結果の報告が可能であると判断される。また、ツツガムシ病の臨床所見で主要3徴候とされる刺し口、発熱、発疹のすべてが必ずしも確認されるとは限らず、もっとも特徴的な所見である刺し口は86.5%にしか認められず、その中でも刺し口が、特徴的な痂皮状を示すものは全体の約60%に止まるほか、その他の症状として、リンパ節の腫脹、倦怠感、頭痛、筋肉痛などの症状が高率に認められたと報告されている。⁸⁾ これらの結果から、刺し口が発見できず臨床症状が軽症な症例では、一般的な風邪やその他の熱性疾患と判断され、適切な処置が遅れる可能性も否定できない。したがって、血清学的所見も含めた簡易で迅速な診断法の開発が急務であると考えられることから、本法によるO. tsutsugamushi DNAの検出は患者血液を含む病理組織材料から行えるツツガムシ病のスクリーニング用の検査法として極めて有効な手段と判断される。

結 語

中性ホルマリンにより固定されたツツガムシ病リケッチア培養細胞から抽出されたDNAをサンプルとして、PCR法によりO. tsutsugamushi DNAの増幅を行った。その結果、固定液によるDNAの損傷の影響は見られず、過固定された試料からも特異的DNAの増幅が可能であった。これは、組織を固定する際、中性ホルマリンを使用し、増幅領域の比較的短いプライマーを設定することにより、病理組織材料からのツツガムシ病のDNA診断が可能であることを示唆するものであると判断された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導いただきました新潟大学 医動物・免疫学教室 関川弘雄 助教授ならびに、今回O. tsutsugamushiの培養細胞を快く、ご提供いただきました新潟県保健環境科学研究所ウイルス科 渡辺香奈子技師に深謝いたします。

文 献

1. 長谷川秀浩, 五十嵐俊彦. Polymerase chain reaction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法による結核菌DNAの同定. 新潟県厚生連医誌. 2000;11 (1): 46-9.
2. 長谷川秀浩, 片桐丘克, 五十嵐俊彦. Polymerase chain reaction (PCR) 法による病理組織からのCytomegalovirus (CMV) DNAの検出. 新潟県厚生連医誌投稿中.
3. Sugita Y, Nagatani T, et al. Diagnosis of typhus infection with Rickettsia tsutsugamushi by polymerase chain reaction. J Med Microbiol 1992; 37:357-60.
4. 小川基彦, 萩原敏旦, 他. わが国のツツガムシ病の発生状況—疫学的考察—. 感染症誌. 2001;75 (5): 359-64.
5. 大久保耕嗣, 多村憲, 他. 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. 新潟県

- 厚生連医誌. 1998; 8 (1): 76-81.
6. 吉田芳哉, 古屋由美子, 他. Nested PCR法による *Rickettsia tsutsugamushi* DNAの検出と型別. 感染症誌. 1994;68:601-6.
 7. Stover CK, Marama DP, et al. Molecular cloning and sequence analysis of the Sta 58 major antigen gene of *Rickettsia tsutsugamushi*: Sequence homology and antigenic comparison of Sta58 to the 60-kilodalton family of stress proteins. *J Infection and Immunity* 1990;58:1360-8.
 8. 小川基彦, 萩原敏且, 他. わが国のツツガムシ病の発生状況－臨床所見－. 感染症誌. 2001;75 (5): 353-8.

英文抄録

Original Article

DNA diagnosis of the Tsutsugamushi disease-application to the pathological specimen-

Pathology Center

Hidehiro Hasegawa, Takemitsu Katagiri, and Toshihiko Ikarashi

Objective: This study was examined to establish

DNA diagnosis of the Tsutsugamushi disease from pathological specimens, and we checked the influence on DNA by the duration of formalin fixation.

Study design and Results: The cultured cells containing *Orientia tsutsugamushi* were fixed in and, further more, continuous ten samples were examined from 1st. day to 10th. day after fixation. We did the amplification of specific *O.tsutsugamushi* DNA by PCR method about each DNA sample. We used primers that amplified the short range to detection of *O. tsutsugamushi* DNA (109bp), and DNA was purified to enable the amplification in PCR method. Amplification of the *O. tsutsugamushi* DNA was done from all samples. *O. tsutsugamushi* DNA could not be cut at all by neutral formalin. *O. tsutsugamushi* DNA could be detected from the routine pathological specimens that was fixed by neutral formalin.

Conclusion: This technique appears to be useful in the identification of *O. tsutsugamushi* from routine pathological specimens

Key Words : Tsutsugamushi disease, Scrub typhus, PCR