

資

料

Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による つつが虫病の診断に関する基礎的検討

八柳 潤 鎌田 和子 田中 恵子 原田誠三郎
佐野 健 須藤 恒久 森田 盛大

PCR法によるつつが虫病患者の早期確定診断の可能性について検討した。杉田たちの報告したプライマーを使用し、2段階のPCR反応により、免疫ペルオキシダーゼ法によりつつが虫病と診断された患者の急性期の検体でDNAの増幅断片が得られたが、そのときの陽性率は約28%であった。このため、R. tsutsugamushi の検出感度を向上させる目的で nested PCR 用プライマーを新たに設計し、nested PCR 法について検討した結果、R. tsutsugamushi の検出感度が著しく増加すると同時に、contamination によると思われる偽陽性反応が出現することが明らかとなった。

キーワード：つつが虫病，PCR，R. tsutsugamushi

I はじめに

つつが虫病は県内では、とくに雄物川流域において発生する致死率の高い風土病として恐れられてきた。秋田県内においては現在もつつが虫病患者が発生しており、平成4年度は被検者数161人名、確定者58名であった¹⁾。

つつが虫病は重篤な症状を呈するが、感染初期に的確な治療が行われれば速やかに回復する。このため、つつが虫病の治療においては早期確定診断が非常に重要である。

本県では現在、つつが虫病の確定診断に免疫ペルオキシダーゼ (IP) 法が使用されている。一方、近年、PCR法がつつが虫病の確定診断に応用する試みがなされている^{2) 3) 4)}。PCR法は R. tsutsugamushi を直接検出するために、特に急性期において診断が容易であると言われている⁴⁾。このため、我々はつつが虫病の早期確定診断法としてPCR法を導入するための基礎的検討を実施した。

II 方法

1. PCR用試料の調製

当所に検査依頼されたつつが虫病疑い患者の血液から血清 (IP法に使用) を分離した後の血餅を凍結保存し、PCR法の検討材料とした。

凍結保存していた血餅約500 μ l にグアニジウムイソチオシアネート溶液を等量加え、室温で15分放置した。得られた溶液をフェノール/クロロホルム、クロロホルム/イソアミルアルコールでそれぞれ抽出した後、エタノール沈殿でDNAを回収した。得られたDNAを70%エタノールで洗浄した後、50 μ l の滅菌蒸留水に溶解して試料とした。

2. PCRによるつつが病リケッチアの検出

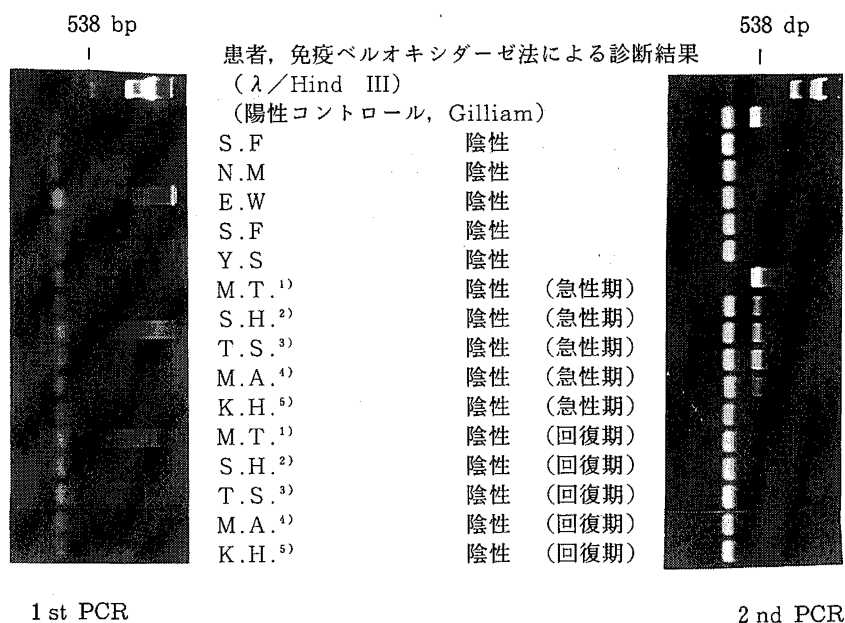
プライマーには杉田たち³⁾が報告した、つつが病リケッチアの 58KD 菌体タンパク質をコードする遺伝子⁵⁾ をターゲットとし、538bp の増幅断片が得られる組み合わせのものを使用した。PCR反応は液量50 μ l で行い、反応液の組成は既報⁶⁾に従った。なお、増幅反応を30回実施し、得られた反応液の5 μ l を新たな反応系に加え、さらに30サイクルの増幅反応を実施するという2段階の増幅を実施した。

III 結果および考察

免疫ペルオキシダーゼ法により、血清学的につつが虫病陰性と診断された被検者の血餅5検体、およびつつが虫病と診断された被検者の急性期、並びに当該被検者の回復期血餅それぞれ5検体ずつ、計15検体を対象としてPCR法を実施した。図1に示すように、最初の30サイクルの増幅では陽性対象である Gilliam 株以外は、いずれの検体においてもDNAの増幅断片は認められなかった。

一方、これらの検体についてさらに30サイクルの増幅を実施したところ、急性期血餅5検体においてDNA増幅断片が認められた。なお、陰性血餅19検体、急性期血餅25検体、回復期血餅12検体について検討した結果、陽性と判定されたのは急性期の7検体であった。

以上のように、杉田たちの報告したプライマー³⁾を使用して2段階のPCR反応を行うことにより、つつが虫病罹患者の急性期血餅からDNAの増幅断片が得られることが確認されたが、急性期検体の全てが本PCR法によっても陽性となるのではなく、約28%が陽性となるに過ぎなかった。また、今回検討に供した急性期検体が採血されたのは1病日から9病日であったが、病日とPCR



1), 2), 3), 4), 5): 同一患者

図1 PCR法によるつつが虫病診断例

Rの結果の間に明らかな相関は認められなかった。

なお、データは示していないが、杉田たちの原報³⁾どおり、40サイクルのPCR反応を1段階のみ行った場合、我々はいずれの検体からもDNAの増幅断片は得られなかった。これらのことから、本PCR法のR. tsutsugamushi 検出感度が低い可能性が考えられたため、我々はR. tsutsugamushi 58KD 菌体タンパク質をコードする遺伝子⁵⁾のうち、杉田たちがターゲットとした領域において、新たに nested PCR 用の2組のプライマーを設計した。これらのプライマーを使用した nested PCR 法においては検出感度が著しく増加することが明らかになったと同時に、contamination による偽陽性が出現した。従って、この nested PCR 法を実用化するためには、偽陽性反応の出現を回避する手法を確立することが必須である。

今回使用した杉田たちのプライマーでは、R. tsutsugamushi の Karp, Kato, Gilliam, Kuroki, Kawasaki の各株で同じサイズのDNA増幅産物が得られることが報告されている³⁾。我々の nested PCR 用プライマーは杉田たちの報告したプライマーの近傍の塩基配列に従って設計したものであるが、これによっても Gilliam, Karp, Kato の株で同じサイズのDNA増幅断片が得られた。従って、いずれのPCR法によっても検出された R. tsutsugamushi の型は不明である。一方、川森たちは R. tsutsugamushi の sta56 gene を

ターゲットとした nested PCR 法において RFLP 法により R. tsutsugamushi の型別が可能であることを報告している⁴⁾。今後、われわれの反応系においても RFLP による R. tsutsugamushi の型別についても検討する必要があるものと考えられた。

IV 文 献

- 1) 秋田県衛生科学研究所微生物部. 秋田県衛生科学研究所報, 1993; 37: 14.
- 2) Y. Furuya et al. Specific Amplification of Rickettsia tsutsugamushi DNA from Clinical Specimens by Polymerase Chain Recation. J. Clin. Mictobiol., 1991; 29: 2628-2629.
- 3) 杉田泰之, 他. Polymerase Chain Reaction (PCR) 法によるツツガムシ病のDNA診断. 日皮会誌, 1991; 101: 743-746.
- 4) 川森文彦. つつが虫病の検査法. 医学検査, 1994; 43: 715-720.
- 5) C.K. Stover et al. Molecular Cloning and Sequence Analysis of the Sta58 Major Antigen Gene of Rickttsia tsutsugamusi: Sequence Homology and antigenic Comparison of Sta58 to the 60-Kilodalton Family of Stress Protein. Infect. Immun., 1990; 58: 1360-1368.
- 6) 八柳潤, 他. 平成3年に秋田県で分離された腸管出

血性大腸菌について，秋田県衛生科学研究所報，1992；
36：43-47.