

### 希少感染症 (II) 紅斑熱リケッチア症

はじめに

リケッチア症は、一般にリケッチアを内寄生体としてもつ節足動物がヒトを刺すことにより感染する急性発疹性熱性疾患の総称である。これらリケッチア症を引き起こすリケッチアは、現在、発疹チフス群、紅斑熱群、ツツガムシ病群の3群に分類される(表1)。

わが国におけるリケッチア症としては、従来までは、ツツガムシ病、発疹熱の2種類のリケッチア症が知られていた。しかし、1984年徳島県阿南市において紅斑熱群リケッチアの存在が報告され、現在は3種類のリケッチア症の存在が確認されている。今回は新たに日本における存在が確認された紅斑熱リケッチア症について紹介する。

#### 日本における紅斑熱リケッチアの発見

紅斑熱リケッチアは古くから日本には存在しないものと考えられていた。しかし、1984年5月～7月にかけて徳島県阿南市においてツツガムシ様刺し口を伴った発疹性熱性疾患3症例が報告された。先ずこれらの症例は、ツツガムシ病が疑われWeil-Felix(W-F)反応による血清検査が行われた。W-F反応は古くからリケッチア症の診断に補助的に用いられている凝集反応である。W-F反応の各リケッチア群に対する反応性を表2に示した。もしこれら症例がツツガムシ病であればプロテウス菌のOXKに凝集を示すはずである。しかし、それら血清はOX2に強い凝集性を示し、紅斑熱群リケッチアの可能性を示唆した。しかし、W-F反応はしばしば特異性に欠ける反応であるといわれており、紅斑熱リケッチア症と確定診断するまでには至らなかった。そこで、間接免疫ペルオキシダーゼ(IP)法によるツツガムシ病の確定診断が行われる一方、紅斑熱群リケッチアのR. rickettsiiおよびR. akariを抗原とする補体結合(CP)反応が

実施された。IP法ではGilliam, Karp, Katoのツツガムシリケッチア3標準抗原とは反応せずツツガムシ病は完全に否定された。紅斑熱群リケッチアのR. rickettsii, R. akariを用いたCP反応においてそれら血清は有意な反応性を示し、血清学的に紅斑熱群リケッチアがわが国にも存在することが示唆された。翌年高知県室戸市の患者よりリケッチアが分離されるに至り、ここにはじめて紅斑熱リケッチアの存在が確認され、この新しい株はRickettsia japonica(東洋紅斑熱)と命名された。

#### 紅斑熱リケッチア

紅斑熱群リケッチアは世界各地に分布し、動物地理区に一致している(図1)。ロッキー山紅斑熱はR. rickettsiiにより引き起こされるリケッチア症で米国、メキシコ、中南米に広く分布し米国においては晩春から初夏に多発する。ボタン熱は

表1 リケッチア属の分類

| 群                      | 種                     | リケッチア症         |
|------------------------|-----------------------|----------------|
| 発疹チフス群                 | <i>R. prowazekii</i>  | 発疹チフス          |
|                        | <i>R. typhi</i>       | 発疹熱            |
|                        | <i>R. canadensis</i>  |                |
| 紅斑熱群                   | <i>R. rickettsii</i>  | ロッキー山紅斑熱       |
|                        | <i>R. sibirica</i>    | シベリアマダニチフス     |
|                        | <i>R. conorii</i>     | ボタン熱           |
|                        | <i>R. australis</i>   | クイーンズランドマダニチフス |
|                        | <i>R. akari</i>       | リケッチア症         |
|                        | <i>R. parkeri</i>     |                |
|                        | <i>R. montana</i>     |                |
| <i>R. rhipicephali</i> |                       |                |
| つつが虫病群                 | <i>R. leishmanium</i> | つつが虫病          |

表2 Weil-Felix反応

| 群                  | プロテウス菌 |      |      |
|--------------------|--------|------|------|
|                    | OX19   | OX2  | OXK  |
| 発疹チフス群             | ++++   | +    | -    |
| 紅斑熱群 <sup>1)</sup> | ++++   | +    | -    |
| 2)                 | +      | ++++ | -    |
| つつが虫病群             | -      | -    | ++++ |

1) ロッキー山紅斑熱

2) 他のマダニ媒介紅斑熱群リケッチア症

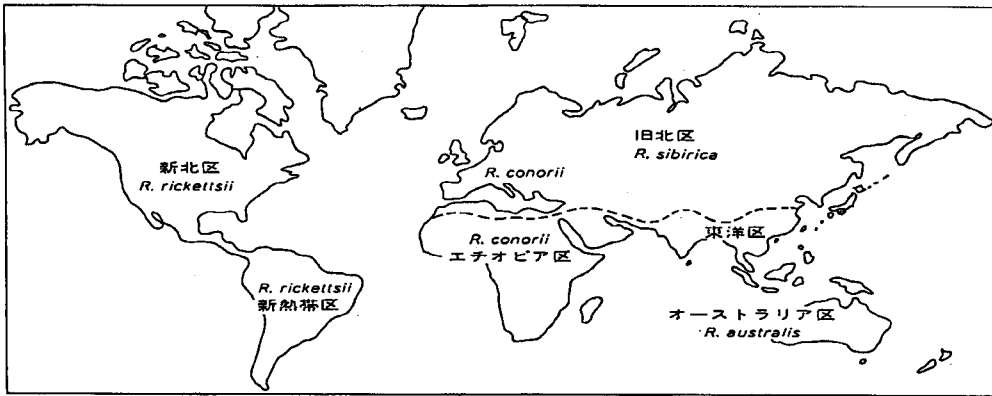


図1 動物地理区とマダニ媒介紅斑熱群リケッチアの分布

R. conoriiを病原体とし地中海沿岸、黒海周辺で発生がみられる。R. sibiricaは北アジアマダニチフスでウラル山脈以東、R. australisはオーストラリアに分布している。これらはいずれもマダニに刺されて感染する。症状は高熱と全身の紅斑で、多くはダニによる刺し口が認められる。この他に小型ダニによって媒介されるリケッチア症が存在する。

#### 東洋紅斑熱(R. japonica)

わが国における紅斑熱は、1984年の徳島県における血清学的診断、1985年の高知県の患者からの紅斑熱リケッチアの分離以来各地で紅斑熱リケッチア症の報告が出されるようになった。1985年に宮崎県で、1987年、千葉県、島根県、1988年、兵庫県淡路島、三重県、1990年に鹿児島県徳之島において患者の発生報告があり、1991年まで8県98名の紅斑熱患者が報告されている(表3)。これらの臨床症状の多くは、高熱、発疹、刺し口、テトラサイクリン系抗生物質の有効性などツツガムシ病と酷似しているがリンパ節腫脹、肝脾腫はほとんど認められない。また発生時期が4月~10月と新型ツツガムシ病の発生時期とは異なる。感染経路は刺し口、患者発生時期から多くの紅斑熱群

リケッチアと同様マダニ類と推測される。東洋紅斑熱においてはまだまだ不明な点が多いが、ロッキー山紅斑熱については詳細な研究が行われている。ロッキー山紅斑熱の病原体であるR. rickettsiiは自然界ではマダニに保有され、リケッチアは卵から成虫まで全世代にみられ卵を通じて次代にリケッチアを伝える。また、感染した動物を吸血したマダニがリケッチアを保有するようになる。このようにマダニは病原体を伝播する媒介動物(ベクター)でもあり、また病原体保有動物(リザーバー)でもある。哺乳動物に感染して病原体を殖やし、吸血したダニはリザーバーとなる。ヒトはそれらマダニ生息域の森林や田畑に入り感染する。東洋紅斑熱においてもほぼ同様の感染経路と考えられ患者も農業従事者や山菜取りなど山林や藪に入って感染した症例が多くみられる。患者発生地周辺で採取されたアカネズミ、クマネズミの脾臓乳剤からもリケッチアが分離され、これらネズミがリケッチア増幅動物となっている可能性が高い。

#### 検査法

##### 1) リケッチアの分離同定法

紅斑熱リケッチアの分離には抗生物質投与前の患者末梢血が用いられる。直ちに分離を行う場合以外はドライアイス・アセトンにより急速凍結させ超低温槽に保存する。リケッチアの分離には培養細胞、発育鶏卵、モルモット、ヌードマウスが用いられるが、ここでは培養細胞のVero細胞を用いた方法を述べる。末梢血を3,500 rpm、4℃、30分間遠心の後、沈渣を少量の10%FCS加Eagle's MEM(抗生物質不含)に再浮遊させ接種材料とす

表3 紅斑熱患者発生状況

|     | 1984 | 1985 | 1986 | 1987 | 1988 | 1989 | 1990 | 1991 | 計  |
|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|----|
| 鹿児島 |      |      |      |      |      |      | 1    |      | 1  |
| 宮崎  |      | 1    | 3    | 2    | 1    | 1    |      |      | 8  |
| 高知  | 3    | 9    | 7    | 2    | 8    | 9    | 2    | 4    | 44 |
| 徳島  | 5    |      | 5    | 4    | 2    | 2    | 3    | 5    | 26 |
| 島根  |      |      |      | 1    | 1    | 1    |      |      | 3  |
| 兵庫  |      |      |      |      | 3    |      | 1    |      | 4  |
| 三重  |      |      |      |      | 1    |      |      |      | 1  |
| 千葉  |      |      |      | 1    | 1    | 2    | 5    | 2    | 11 |
| 計   | 8    | 10   | 15   | 10   | 17   | 15   | 12   | 11   | 98 |

る。細胞による分離は25 cm<sup>2</sup>の細胞培養用フラスコを用い単層を形成したVero細胞に接種材料0.1 mlを接種する。34℃、1時間吸着の後、維持培地の1% FCS加Eagle's MEM (抗生物質不含)を加え34℃で3日毎に培地交換し10~15日間培養する。東洋紅斑熱リケッチアは細胞変性を伴わないため分離可否の判定は細胞の一部をとり間接蛍光抗体法により確認する。

## 2) 血清学的診断法

血清学的診断法にはW-F反応、間接赤血球凝集反応(IHA)、補体結合反応(CF)、間接蛍光抗体法(IFA)、免疫ペルオキシダーゼ法(IP)がある。

W-F反応は日本における紅斑熱発見に多大の功績を残したが、現在はほとんど使われておらず感度および特異性の高いIFA、IP法が主に用いられている。特にIFA法は国立予防衛生研究所の協力のもと既に地方衛生研究所で検査が可能となり当衛生研究所でも検査が可能である。IFA法はリケッチアをVero細胞に感染させ、その感染細胞を抗原として用いる。無蛍光スライドグラスに感染細胞をスポットし乾燥後アセトン固定し検査スライドとする。検査用スライドは-20℃に保存し随時使用する。血清はリン酸緩衝液(PBS)にて20倍に希釈し以後2倍階段希釈する。希釈血清を検査用スライドにのせ浸潤箱中37℃、1時間反応させる。スライドグラスをPBSで洗浄後FITC標識抗ヒトIgGまたはIgM抗体をのせ37℃浸潤箱中で30分間~1時間反応させる。反応終了後PBSで洗浄、緩衝グリセリン液を数滴滴下しカバーグラスをかけて封入し蛍光顕微鏡にて鏡検する。抗体価はリケッチア特異蛍光の認められる最大希釈倍数の逆数とし、一般に急性期、回復期血清で4倍以上の有意上昇が認められた場合、またはIgM抗体が検出された場合紅斑熱リケッチア症とする。

## 愛知県における紅斑熱の血清疫学

紅斑熱患者発生数は91年まで全国で8県98名の患者が報告されているが、本県からの患者発生報告はない。しかし1988年には隣接した三重県から1名の患者報告があり、本県も紅斑熱患者発生の可能性を否定できない。そこで当衛生研究所に熱性発疹性疾患でツツガムシ病の疑いのため搬入された血清でツツガムシ病リケッチア抗体陰性者23名とツツガムシ病患者発生地区でツツガムシ病抗

体測定のために採取された健康人血清72名の血清についてIFA法を用い紅斑熱抗体の測定を行った。ツツガムシ病リケッチア抗体陰性の熱性発疹性患者23名の紅斑熱リケッチアに対する抗体価はすべて20倍以下で紅斑熱患者は存在しなかった。一方、健康人血清72名の紅斑熱リケッチアに対する抗体保有率は2名(2.8%)でその抗体価はすべて20倍であった。紅斑熱リケッチアに対する血清疫学調査は各所で実施されている。患者非発生地における抗体保有率は20倍以上で0.9~6.0%、患者発生地では11.1~22.7%で非発生地と比較し高率である。当県の抗体保有率は2.8%と低率で患者非発生地のそれとほぼ同程度の価を示した。以上の結果より現在まで当県に紅斑熱の侵入はないと考えられる。

## おわりに

以上、紅斑熱リケッチアならびに日本で発見された東洋紅斑熱(*R. japonica*)について紹介した。現在まで本県においては患者発生はみられず、血清疫学調査からもその侵淫は認められない。

紅斑熱の臨床症状はツツガムシ病と酷似し、テトラサイクリン系抗生物質感受性も同じである。ただ発生時期が4月~10月とツツガムシ病とは異なる。本県においてツツガムシ病は昭和57年から発生が毎年みられ、その発生時期は9月~12月で、紅斑熱とツツガムシ病の発生時期が約2カ月間重複する。その間に発生した患者が臨床診断だけでツツガムシ病と診断されたり不明熱性発疹症と処理され紅斑熱が見過ごされる可能性も否定できない。本県においても少ないながら紅斑熱リケッチア抗体保有者が存在し、紅斑熱患者がいつ発生してもおかしくない状態である。今後紅斑熱の存在を臨床医ならびに検査機関に周知徹底するとともに監視の強化が必要と考えられる。

## 参考文献

- 海保郁男：紅斑熱リケッチア症，BMSA会報，Vol. 4, No. 2 P11-23
- 内田孝宏：紅斑熱リケッチア症とその診断，メディアサークル，Vol. 31 P529-540, 1986
- 国立予防衛生研究所：紅斑熱リケッチア検査指針，1990

(ウイルス部 森下高行)

## 腸管出血性大腸菌（EHEC）迅速検査法技術研修会の概要 及び愛知県内におけるEHECの検出状況

平成2年、埼玉県内の某幼稚園で腸管出血性大腸菌（以下EHECと略す）の集団発生があり園児2名が死亡した。この事例以来、全国的に本菌に対する関心が高まり、各地でEHECによる集団事例や散発事例が報告されている。国立予防衛生研究所（予研）及び地方衛生研究所（地研）では1989～1990年に地研で分離、保存された病原大腸菌575株について調査した結果、15株（2.6%）からEHECが検出され、本菌による汚染状況が明らかとなった。（詳細については技術情報Vol. 15 No. 3 1991）

今回は昨年11月に予研において開催された『腸管出血性大腸菌（EHEC）迅速検査法技術研修会』の概要と愛知県内におけるEHECの検出状況について報告する。

### I 腸管出血性大腸菌迅速検査法技術研修会の概要

初めにこの研修会の意義について考えてみたい。

#### 1. EHECの迅速診断の必要性

EHECは、他の病原大腸菌と異なり、血性下痢や激しい腹痛を伴い、一部の患者では溶血尿毒症性症候群（HUS）を併発し、死亡を伴う極めて危険性の高い病原菌であるため早期診断が必要である。

#### 2. ペロ毒素（以下VTと略す）検出の意味

EHECによって引き起こされる溶血尿毒症性症候群の原因は現在EHECの産生するVTによることが明らかにされている。VTは、腸管から吸収されて、血中に入り、特に腎臓では粘膜の細胞を破壊し、溶血尿毒症性症候群を併発する。なおVTには、現在VT1、VT2など数種類の毒素の存在が確認されている。またVT産生遺伝子はある特定のバクテリオファージにより他の大腸菌に伝達されることから、従来のOHの大腸菌血清型別だけではEHECを判定することができない。

腸管出血性大腸菌（EHEC）迅速検査法技術研修会のスケジュール

#### <一日目>

午前：講義－PCRの原理－①

#### ピペット使用法説明会

午後：PCR用DNAの調製－②

PCRカクテルの説明と調製－③

サーマルサイクラーにセット－④

講義－EHEC－⑤

#### <二日目>

午前：ゲル作成－⑥

午後：電気泳動開始－⑦

講義－プライマーについて－⑧

染色、脱染、観察、写真撮影－⑨

質疑応答

①～⑨について簡単な解説を加えてみたい。

①：今回の研修会で迅速診断に用いた方法は、PCR法である。その原理等については、技術情報Vol. 15 No. 1 1991 PCR法の原理と応用－ウイルス感染のDNA診断－で詳しく述べられているのでここでは簡潔に述べる。

PCR（Polymerase Chain Reaction）法は、目的とするDNA領域を囲む2種類のプライマーを用い、その間に存在するDNA塩基配列を試験管内でDNAポリメラーゼを用いてDNA合成を繰り返すことにより増幅させる方法である。PCR法は、以下の3つのステップからなっている。

#### I. DNAの熱変性

増幅しようとする目的の2本鎖DNA断片を1本鎖DNAとする。

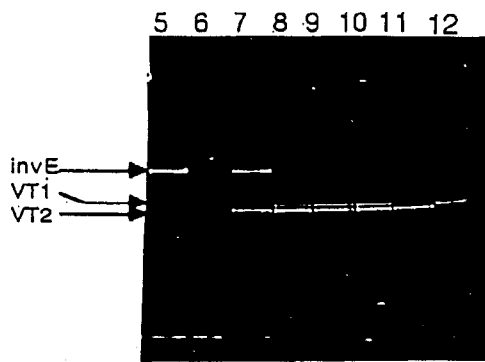
#### II. プライマーとのアニーリング

増幅したい領域に相補的な約20～24塩基の2種類の人工的に合成したプライマーと熱処理で1本鎖になったDNAとのアニーリングを起こさせる。アニーリングとは、「焼きなまし」というような訳語になるが、一般には一度熱をかけてその後冷やして相補的なDNA-DNAの対合を形成させることをいう。

#### III. プライマーの伸長反応

DNAポリメラーゼの作用により、プライマー部位から鋳型DNAの塩基配列に相補的なDNA合成を起こさせる。

このI～IIIのステップを繰り返すことにより2つのプライマーにはさまれたDNA領域が1～2



CLINICAL ISOLATES

- 5: *S. flexneri*2a
- 6: *S. flexneri*2a(plasmid-)
- 7: *S. dysenteriae*
- 8: EHEC
- 9: EHEC
- 10: EHEC
- 11: EHEC
- 12: EHEC

図1. PCR法によるVT1, VT2の検出

なお invE とは、赤痢菌の侵入性を司る遺伝子領域で赤痢菌検出のために用いられる

時間で数十万～数百万倍にも増幅され検出可能な量にまで達する。

②: 培養菌を滅菌蒸留水に懸濁、熱処理 (97℃、10min) を行い、菌体を破壊してDNAを放出させる。

③: PCRカクテルと称する反応液の組成は以下のとおりである。

伸長するDNAの基質となる四種類のデオキシヌクレオチド三リン酸、MgCl<sub>2</sub>等が加えられたPCR緩衝液、プライマー、DNA伸長反応を行なう酵素であるTaq Polymeraseそして検体。

④: ①で説明したようにI～IIIの3つのサイクルを自動的に行なうサーマルサイクラーにPCRカクテルをセットする。VT検出のための条件は、I: 熱変性94℃、30秒 II: アニール47℃、1分 III: 伸長反応72℃、1分30秒 これを20サイクル繰り返す。

⑤: 都立衛生研究所微生物部、工藤泰雄氏からVTの種々の検出法、彼らが開発したラテックスを用いた検出法、全国のEHECの発生状況等の講義があった。

⑥、⑦: 前日サーマルサイクラーで増やされたDNA産物をポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動で検出する。

⑧: プライマーは、任意に自分で目的とする遺伝子をはさむように作成することができる。その際注意すべきことは、1) 2本のプライマーは、目標DNA全体とのホモロジーを低くし、鎖長は、15～30塩基とする。2) プライマー自身のGC含量は50%以下とし、自己相補配列を含まないようにする。また上流、下流のプライマー同士がアニール

しないようにする等である。

⑨: 泳動が終了したら、ゲルを取り出しエチジウムブロマイド溶液に侵し染色する。その後、UVライトで観察。

図1には電気泳動の結果を示した。

II 愛知県内におけるEHECの検出状況

これまでに愛知県内で検出されたEHECは、表1のとおりである。何れも県内の病院で分離された菌株で、当所にてPCR法によりVT遺伝子が確認され、EHECと同定されたものである。No. 1～4は、EHECとして最もよく知られている血清型O157:H7であり、VT1, VT2の両毒素遺伝子が検出された。No. 1, 2の株は、A病院で下痢のみを有する散発患者から分離された。No. 3, 4は、下痢症の母親と子供からB病院で分離された。No. 5の菌株はEHECの典型的な症状である血便、HUSを発症した患者からC病院において分離されたもので、EHECとしてはめずらしい血清型O15:H2であり、VT1遺伝子のみ検出された。

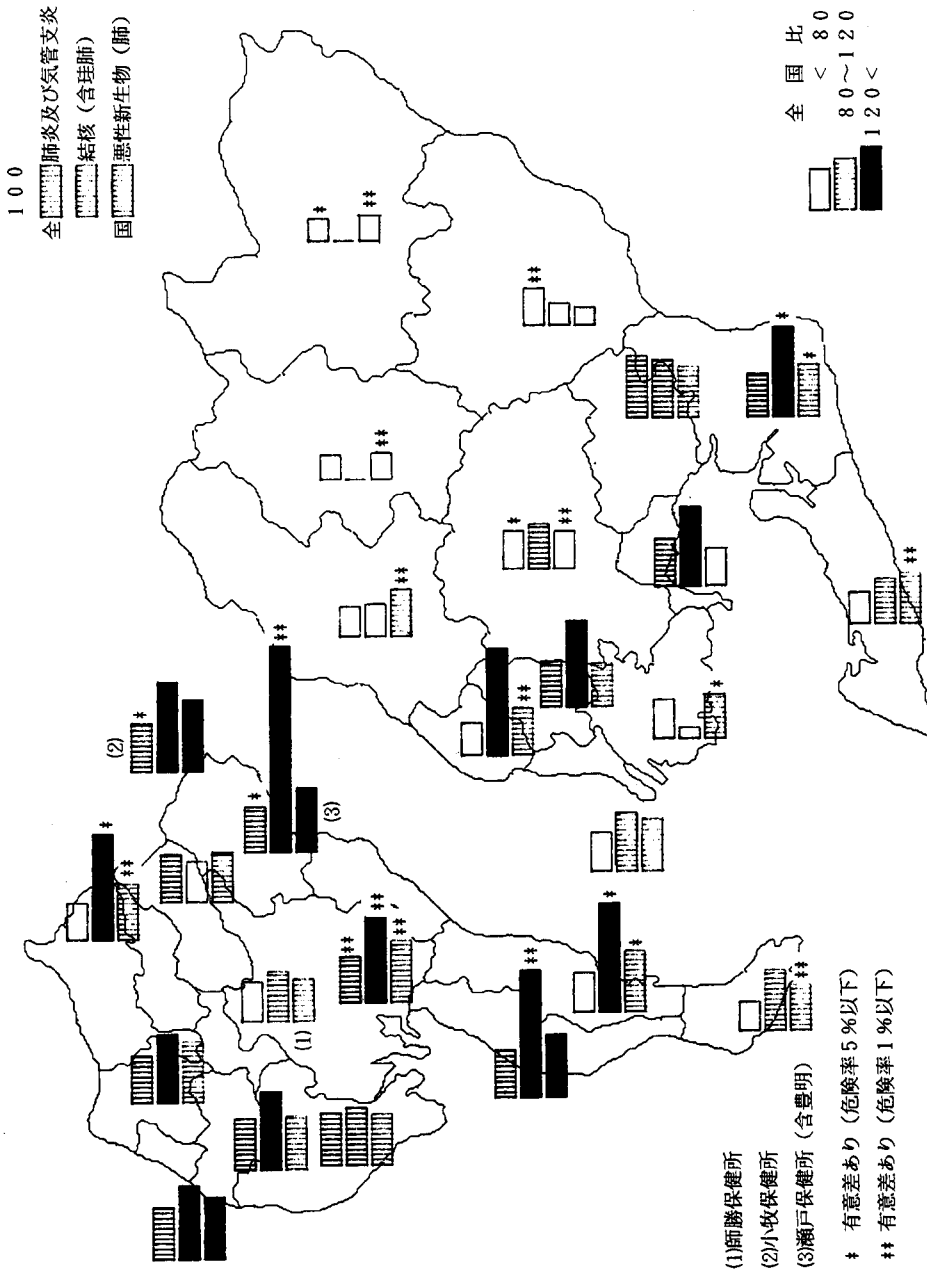
表1 PCR法により愛知県内で検出されたEHEC

| 番号 | 採取年月  | 血清型     | VT型      | 備考       |
|----|-------|---------|----------|----------|
| 1  | H3.7  | O157:H7 | VT1, VT2 |          |
| 2  | 10    | O157:H7 | VT1, VT2 |          |
| 3  | H4.7  | O157:H7 | VT1, VT2 | 同一家族、母親  |
| 4  |       | O157:H7 | VT1, VT2 | 子供       |
| 5  | H4.10 | O15:H2  | VT1      | 血便、HUS併発 |

(細菌部 松本昌門)

〔I〕地域特異性

(6)肺に関する疾病の標準化死亡率(全国比) 1990



(注)人口データは1985年のものを使用した  
(厚生省地域保健医療計画支援システムより)  
(保健情報室)

この図を見てご意見・ご感想などありましたら、ご連絡下さい。