

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860828

研究課題名(和文) LAMP法によるリケッチア感染症の新規迅速診断法の確立

研究課題名(英文) Establishment of rapid diagnostic methods for rickettsial infections using loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

研究代表者

新原 寛之 (NIIHARA, HIROYUKI)

島根大学・医学部・講師

研究者番号：60362935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：日本紅斑熱やツツガムシ病などのリケッチア症の診断に有用な病原体遺伝子検査法のあり方を検討した。リケッチア症を疑った場合、先ず抗生剤を投与して経過観察を行う。その間、迅速にLAMP法(loop-mediated isothermal amplification method)やreal-time PCR法による病原体遺伝子の検出を行って診断補助に用い、並行して2段階PCR検査を行う。検査陽性の場合には病原体を同定して確定診断を行うことが適切である。病原体遺伝子検査法としては2段階PCR法が最も精確であった。また、日本紅斑熱のLAMPプライマーを設計し、臨床検体を用いてその有用性を確認した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we propose a diagnostic flow towards the definite diagnosis of a rickettsial infection from the point of clinical importance. The first priority is an administration of antibiotic medication for the suspected cases. Next is to refer the diagnostic aids such as loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and real-time PCR in an expeditious way. At the same time, 2-step PCR including nested PCR should be performed in order to catch up the exceptional cases such as Shimokoshi type of *Orientia tsutsugamushi* or unknown type of rickettsia. For definite diagnosis, the most precious way is an identification of pathogenic gene using sequencing analysis and phylogenetic tree analysis following to the nested PCR. In addition, we developed the new detection method for the rapid detection of *Rickettsia japonica* using LAMP method. We also confirmed of its utility from the specimen of definite cases with rickettsial infection.

研究分野：皮膚科学、感染症、薬疹、下肢静脈瘤

キーワード：日本紅斑熱 ツツガムシ病 病原体遺伝子検査 LAMP Real-time PCR 2段階PCR リケッチア症

1. 研究開始当初の背景

島根県は日本紅斑熱、ツツガムシ病ともに多発する地域であり、実臨床、迅速診断検査の必要性は極めて高い。現在の実臨床における確定診断のゴールドスタンダードは血清抗体価上昇の確認であるが、本法は急性期および2-4週間後の回復期血清を用いるため、迅速診断には不向きである。ツツガムシ病の検査法は、1993年に nested PCR を含む2段階 PCR 法を用いた *Orientia tsutsugamushi* (*O. tsutsugamushi*) の病原体遺伝子検出法および型別プライマーによる型別化法が確立されている(文献1)。また、近年迅速診断法として2段階 PCR 法より感度が高く、尚且つ検出時間を1/2に短縮できる real-time PCR 法および簡便な loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法にて臨床検体から病原体遺伝子を検出する手法が試みられている(文献2,3)。日本紅斑熱の検査法は1995年に2段階 PCR 法が確立され(文献4)、2008年には *Rickettsia japonica* (*R. japonica*) に特異的な real-time PCR 法が確立された(文献5)。しかし上記作業は限られた公的研究機関でしか行えず、検体の搬送等に時間がかかる場合や土日祝日には検査が行えない現状が存在する。さらに、従来リケッチア感染症の治療にはテトラサイクリン系抗生剤が標準治療であったが、近年日本紅斑熱ではニューキノロン系がより有用とされ、ツツガムシ病と日本紅斑熱の早期鑑別も必要とされている。

2. 研究の目的

リケッチア症の迅速診断について、臨床業務上最適な流れを明らかにする。手法は既報のリケッチア症に対する遺伝子同定法を参考にする。また、新規に日本紅斑熱の LAMP 法による検出系を確立し、リケッチア感染症疑い患者の検体を、ラボ以外の臨床検査部でも簡便に確定診断できる検査系を確立する。

3. 研究の方法

ツツガムシ病および日本紅斑熱疑い患者から得た臨床検体を用いて LAMP 法、real-time PCR 法および2段階 PCR 法を行い、遺伝子配列を決定して、系統樹解析による病原体の同定を行った。ツツガムシ病の2段階 PCR 法、real-time PCR 法および LAMP 法、日本紅斑熱の2段階 PCR 法および real-time PCR 法は既報のプライマー類と条件を用いて行った。日本紅斑熱の LAMP 法はプライマーの設計および条件検討を行った。また、重症熱性血小板減少症候群 (Severe fever with thrombocytopenia syndrome: SFTS) の LAMP 測定法も先行研究を参考に準備した(文献6)。

3-1. 検体収集

島根県内の市中病院からリケッチア感染疑い症例の全血、紅斑部組織および痂皮検体が集められ、島根大学医学部皮膚科学講座の研究室内で検査を行った。

3-2. 検体からの DNA 抽出

リケッチア症疑い患者のパフィーコート、組織およびダニ刺傷部痂皮検体より、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて DNA の抽出を行った。

3-3. 病原体遺伝子検査に使用したプライマー

既報に基づいて表1および2に示すプライマーを入手し、2段階 PCR 法、real-time PCR 法および LAMP 法による病原体の遺伝子検出を行った。

日本紅斑熱の2段階 PCR 法は、プライマー R1/R2 を用いて 1st PCR を行い、nested PCR には、紅斑熱群リケッチア症を広く検出する Rr17.61p/Rr17.492n、および、*R. japonica* 検出を目的として作成された Rj5/Rj10 を用いた。ツツガムシ病の2段階 PCR 法は、プライマー 34/55 を用いて 1st PCR を行い、nested PCR には、Gillium 型、Karp 型、Kato 型、Kawasaki 型、Kuroki 型を全て検出するプライマー10/11 を用いた。また、型別 PCR を行う場合は、Gilliam 型にはプライマー10/G、Karp 型にはプライマー10/KP、Kato 型にはプライマー10/KT、Kawasaki 型にはプライマー11/KW、Kuroki 型にはプライマー10/KR を用いた。日本紅斑熱の real-time PCR には、プライマー SpRija 5'/SpRija 3' およびプローブ SpRija MGB を用いた。また、ツツガムシ病の real-time PCR には、OtsuFP630/OtsuRP747 およびプローブ OtsuPR665 を用いた。ツツガムシ病の LAMP 法には表1のプライマー F3/B3/FIP/BIP を用いた。

表1. ツツガムシ病検出用プライマーと配列

プライマー	配列
ツツガムシ病 2段階 PCR(文献1)	
34	ATTGCTAGTGCAATGTCTGC
55	CTGCTGCTGTGCTTGCTGCG
10	CCTCAGCCTACTATAATGCC
11	CGACAGATGCACTATTAGGC
G	CTTTATATCACTATATATCTT
KP	ACAATATCGGATTTATAACC
KT	GAATATTTAATAGCACTGGA
KW	ATGCTGCTATTGATACAGGC
KR	CACCGGATTTACCATCATAT
ツツガムシ病 real-time PCR (文献2)	
OtsuFP630	AACTGATTTTATTCAAACCTAATGCTGCT
OtsuRP747	TATGCCTGAGTAAGATACRTGAATRGAATT
OtsuPR665	TGGGTAGCTTTGGTGGACCGATGTTAATCT-Eclipse
ツツガムシ病 LAMP (文献3)	
F3	TGACCGYGGATATATATCACA
B3	CAATGCRGTAAGAGCTTCTC
FIP	GCACTGTAGATACCTTCTGATCCAATACTTTGCAACRAATCGTGAA
BIP	CCACTKGTTCCTGTGCTTGACGTC TACATCATCAGCAATCA

表 2. 日本紅斑熱検出用プライマーと配列

プライマー	配列
日本紅斑熱 2段階 PCR(文献 4)	
R1	TCAATTCACAACCTTGCCATT
R2	TTTACAAAATTCTAAAAACC
Rr17.61p	GCTCTTGCAACTTCTATGTT
Rr17.492n	CATTGTTTCGTCAGGTTGGCG
Rj5	CGCCATTCTACGTTACTACC
Rj10	ATTCTAAAAACCATATACTG
日本紅斑熱 real-time PCR(文献 5)	
SpRija5'	GAACACGATGATACACCTCTGCA
SpRija3'	GATTAGCCTCTGTCTTCAGTAGTAT TTTAACT
SpRijaMGB	TAGCGTCTATTCTAAGTAAAG-MGB

3-4. 遺伝子配列の決定と系統樹解析

3の2段階PCR法で得られたPCR産物をゲルから切り出して精製し、Big dye terminator v1.1 および各種プライマーを添加した反応液中で増幅させた後に、ダイレクトシーケンス法により目的領域の遺伝子配列を決定した。得られた配列について、系統樹解析を行うことにより、既知のリケッチア症病原体が持つ遺伝子配列との比較を行い、属種を決定した。このようにして、リケッチア症疑い患者の起因病原体を同定した。

3-5. 日本紅斑熱 LAMP プライマーの設計とリケッチア病原体遺伝子の検出

LAMP法専用のプライマー作成支援ソフトウェア(Primer Explorer)を用いて1組4本のプライマーを作成した。これまでに得られた臨床検体由来のDNA溶液をサンプルとして、LAMP法による病原体遺伝子の検出を試みた。蛍光強度の測定にGenie III(日本ジーン社)を用いた。

4. 研究成果

当初は年間10検体の検体確保を見込んでいたが、平成25年度は疑い症例3例中1例が紅斑熱群リケッチア、平成26年度は疑い症例6例中2例がツツガムシ病、平成27年度は疑い症例5例中3例が日本紅斑熱であった。平成25年度以前の検体をあわせると、紅斑熱群リケッチア症1検体、日本紅斑熱9検体、ツツガムシ病6検体、計16検体を収集し得た。リケッチア症疑いであったものの、陰性と判明した患者は後に薬疹、中毒疹、感冒、ダニ刺傷、成人Still病等の疾患が最終診断であった。

ツツガムシ病検体の6例中6例で従来報告のあるツツガムシ病であることを同定した(Karp型3例:うち1例はYeo-jooに最も近くJapanese Gilliamとの共感染、Shimokoshi型1例、Japanese Gilliam型3例)。感染推定地域は5例が中国山地であったが、Japanese Gilliam/Karp型共感染例1例は日本紅斑熱多発地域の島根半島西部の北山のふもとと考えられた。文献2の型別プライマーには、

Shimokoshi型判別用のプライマーは掲載されていなかったが、本検討では、2段階PCR法のプライマー10/11で56kDa抗原領域の遺伝子が増幅された。なお、既報のreal-time PCR法およびLAMP法では、Shimokoshi型は陰性を示し、注意が必要と考えられた。

紅斑熱群リケッチア症10症例のうち9症例で従来報告されている日本紅斑熱の病原体*R. japonica*を同定して確定診断とした。このうち1症例で、real-time PCR陰性およびLAMP法で増幅反応の立ち上がり時間が遅いものの、2段階PCR法で陽性となり、確定診断に至った症例が存在した。また、1症例で臨床上是典型的な日本紅斑熱の症例であったものの遺伝子検査ではLAMP法およびreal-time PCR法ともに*R. japonica*陰性を示し、2段階PCR法において遺伝子増幅によるバンドが見られ(図1)、系統樹解析の結果、*Rickettsia bellii*(*R. bellii*)の近縁種であると示唆された症例が存在した。

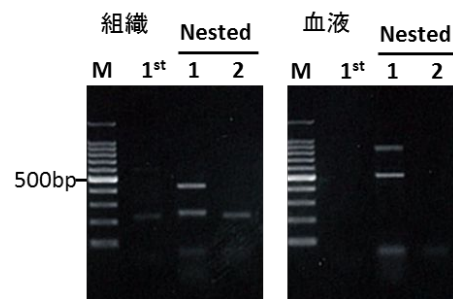


図1. 紅斑熱群リケッチア症患者のPCR像。組織および血液由来のDNAより、2段階PCRで500bp付近のバンドの増幅を確認(Nested 1: Rr17.61p/Rr17.492n, 2: Rj5/Rj10)

4-1. 临床上迅速診断に最適な検査法の検討

上記経験から、LAMP法やreal-time PCR法などの迅速診断法は、既知のリケッチア症の診断には有用であるが、未知の病原体については、見逃す可能性があることが示唆された。したがって、临床上重要な検査の流れは、疑い症例を経験した場合は図2に示すように、ミノマイシンを投与して経過観察を行い、同日あるいは翌日に迅速なLAMP法やreal-time PCR法の検査結果を確認して診断補助に用い、病原体を同定して最終的な確定診断をつける、という流れであることを見出した。

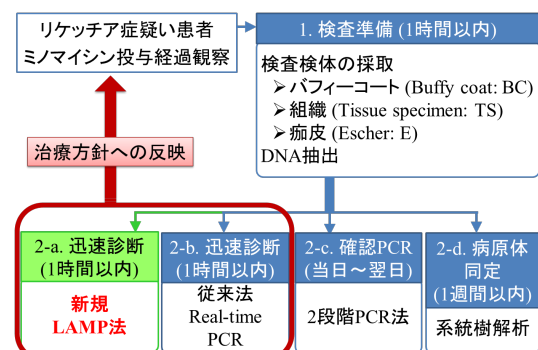


図2. リケッチア症疑い患者の検査概要

4-2. 日本紅斑熱の LAMP 法の開発

日本紅斑熱の 17kDa 共通抗原領域および 216 bp の日本紅斑熱特異的領域 (文献 5) をターゲットとして LAMP プライマーの作成を試みた。それぞれの対象領域で 3 種、および 1 種のプライマーを設計して、LAMP 反応を行ったところ、17kDa 共通抗原をターゲットとして作成した LAMP プライマーで、おおむね良好な結果が得られた。図 3 に、日本紅斑熱患者 6 例 (痂皮検体のあったもの) を対象として、本研究で開発した LAMP プライマー 127 を用いて増幅反応を行った際の解析結果を示す。P1, P7, P8, P10 の痂皮検体は、real-time PCR でも比較的早い段階に DNA 増幅が始まり、検体中の病原体量が多かったと考えられた。P11 は、real-time PCR 陰性症例であり、痂皮の病原体 DNA 含量が低かったと考えられた。*R. bellii* の近縁種の紅斑熱群リケッチア症と考えられた症例 P15 では、本 LAMP 法では病原体遺伝子の増幅はみられなかった。なお、日本紅斑熱に特異的な 216 bp 領域は AT リッチでプライマーの作成が困難であり、良好な増幅が得られなかった。

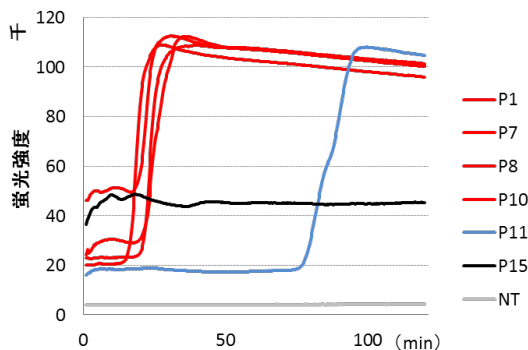


図3. 日本紅斑熱のLAMP法検討結果

<引用文献>

- 1) Furuya Y, Yoshida Y, Katayama T, Yamamoto S, Kawamura A Jr, Serotype-specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA by nested polymerase chain reaction, *J Clin Microbiol*, 31, 1993, 1637-40
- 2) Jiang J, Chan TC, Temenak JJ, Dasch GA, Ching WM, Richards AL, Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay specific for *Orientia tsutsugamushi*, *Am J Trop Med Hyg*, 70, 2004, 351-6.
- 3) Paris DH, Blacksell SD, Newton PN, Day NP. Simple, rapid and sensitive detection of *Orientia tsutsugamushi* by loop-isothermal DNA amplification, *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 102, 2008, 1239-46
- 4) Furuya Y, Katayama T, Yoshida Y, Kaiho I, Specific amplification of *Rickettsia japonica* DNA from clinical specimens by PCR, *J Clin Microbiol*, 33, 1995, 487-9
- 5) Hanaoka N, Matsutani M, Kawabata H, Yamamoto S, Fujita H, Sakata A, Azuma Y,

Ogawa M, akano A, Watanabe H, Kishimoto T, Shirai M, Kurane I, Ando S, Diagnostic assay for *Rickettsia japonica*, *Emerg Infect Dis*, 15, 2009, 1994-7

6) Huang XY, Hu XN, Ma H, Du YH, Ma HX, Kang K, You AG, Wang HF, Zhang L, Chen HM, Dumler JS, Xu BL. Detection of new bunyavirus RNA by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification, *J Clin Microbiol*, 52, 2014, 531-5

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計8件)

1) 新原寛之, 田原研司, 中村 嗣, 今田敏宏, 増野純二: 島根県におけるリケッチア感染症および PCR 法による迅速診断の取り組み. 第 87 回日本感染症学会各術講演会・第 61 回日本化療学会総会 合同学会. 横浜市, 2013 年 4 月

2) 新原寛之, 田原研司, 中村 嗣, 今田敏宏, 樋口 大, 河野邦江, 森田栄伸: 島根県におけるリケッチア感染症および PCR 法による迅速診断の取り組み. 第 65 回日本皮膚科学会西部支部学術大会. 鹿児島市, 2013 年 11 月

3) 新原寛之, 松木真吾, 吉田暁子, 飛田礼子, 森田栄伸, 河野邦江, 田原研司, 藤田博己: 原因リケッチア種の同定に困難を要した敗血症性ショックの 1 例. 第 6 回日本リケッチア症臨床研究会・第 20 回リケッチア研究会合同研究発表会. 大津市, 2014 年 1 月

4) 新原寛之: LAMP 法で迅速診断したツツガムシ病の 1 例. 第 7 回日本リケッチア症臨床研究会. 大津市, 2015 年 1 月

5) 新原寛之, 田原研二: LAMP 法による迅速診断を試みたツツガムシ病の 5 例. 第 89 回日本感染症学会学術講演会. 京都市, 2015 年 4 月

6) 新原寛之, 河野邦江, 田原研司: リケッチア・ウイルス感染症の遺伝子診断～遺伝子検査がより身近になれるか?～. 第 67 回日本皮膚科学会西部支部学術大会. 長崎市, 2015 年 10 月

7) 杉原靖子, 新原寛之, 高橋千春, 野上京子, 吉田暁子, 森田 栄伸: Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)にて迅速診断したツツガムシ病の 1 例. 第 67 回日本皮膚科学会西部支部学術大会. 長崎市, 2015 年 10 月

8) 野上京子, 新原寛之, 森田栄伸: LAMP 法で迅速診断した重症日本紅斑熱の 1 例. 第 8 回 日本リケッチア症臨床研究会. 大津市, 2016 年 1 月

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等：なし

6．研究組織

(1)研究代表者

新原寛之 (NIIHARA, Hiroyuki)

島根大学医学部附属病院・皮膚科・講師

研究者番号：60362935

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

河野邦江 (KOHNO, Kunie)

島根大学・医学部皮膚科学講座・特別協力

研究員

研究者番号：20432619