

リケッチア感染症 診断マニュアル

令和 元年 6 月版

リケッチア感染症診断マニュアル

はじめに

リケッチア感染症の確定診断は患者血清中の抗体の検出, 急性期の血液や発疹部皮膚生検, 刺し口の痂痂などからのリケッチアの遺伝子検出などにより行われている。リケッチアの分離は時間を要し迅速診断には向かないため, 一般的には抗体価測定および遺伝子検出によって行われることが多い。

「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」いわゆる「感染症法」で四類感染症(全数把握)に指定されているリケッチア症は, つつが虫病, 日本紅斑熱, ロッキー山紅斑熱, 発疹チフスがあるが, 国内の紅斑熱群リケッチア症の多様性や輸入感染症としても多岐にわたることから, 幅広くリケッチア症を診断するための血清診断法および病原体検出法を紹介する。

なお, リケッチア症の病原体はバイオセーフティレベル3に分類されており, 血清診断用の抗原の作製は適合実験施設のない施設では難しい。

目次

疾患の概要

つつが虫病

日本紅斑熱と紅斑熱群リケッチア症(ロッキー山紅斑熱を含む)

検体

検査の流れ

病原体検出

遺伝子検出

検体の前処理

リアルタイム PCR

コンベンショナル PCR

血清診断法

間接蛍光抗体法 Indirect immunofluorescence assay (IF 法)

間接免疫ペルオキシダーゼ法 Indirect immunoperoxidase assay (IP 法)

著者 一覧

全国衛生研究所衛生微生物協議会 リケッチア・レファレンスセンター 一覧

疾患の概要

つつが虫病：

つつが虫病は、古来、山形県、秋田県、新潟県などの地方で夏季に河川敷で偏性細胞内寄生細菌 *Orientia tsutsugamushi* を保有するアカツツガムシに刺咬され感染する風土病として知られていた。戦後、タテあるいはフトゲツツガムシにより媒介されるつつが虫病が出現し、北海道を除いて全国に発生がみられるようになった。ヒトは保菌ツツガムシの幼虫に刺咬されたときに感染するが、感染時期は、地域に生息するツツガムシの種類に影響され、地域ごとの発生状況を事前に知っておくことが迅速な対応につながる。患者には、発熱、発疹、刺し口、CRP 陽性、肝逸脱酵素の上昇、血小板減少などの所見がみられる。年間 400～500 例の患者確定数が報告されている。

日本紅斑熱と紅斑熱群リケッチア症(ロッキー山紅斑熱を含む)：

マダニ等の節足動物により媒介される紅斑熱群リケッチアによるリケッチア症は、国内における日本紅斑熱のほか、ロッキー山紅斑熱、地中海紅斑熱、African tick bite fever 等、様々な紅斑熱群リケッチア症が全世界に広く分布する。つつが虫病と同様、発熱と発疹、刺し口の痂痂の臨床症状や、血液データも似るが、ロッキー山紅斑熱では刺し口が稀など、疾患毎の特徴が有る。

我が国では、1980 年代に *Rickettsia japonica* による日本紅斑熱が報告され、それ以降、日本各地で日本紅斑熱患者が確認され、沖縄県を含む関東以南で、年間届出患者数が 300 例を超えるようになった。一方、そのような状況の中、2008 年に日本紅斑熱として報告された宮城県の患者が、極東ユーラシアで報告される *R. heilongjiangensis* 感染による極東紅斑熱であったことが明らかとなり、感染源調査から、北日本では別種の紅斑熱が発生し得ることが明らかとなった。また、様々な病原性が考えられる紅斑熱群リケッチアに分類される種が国内に生息するマダニから分離・検出されている。さらに、African tick bite fever をはじめ、地中海紅斑熱など様々な紅斑熱群リケッチア症の輸入症例が全国で確定診断され、報告されている。

検体

リケッチア症の実験室診断には以下の検体を用いる。

遺伝子検出（検出効率が低い順）

紅斑熱群リケッチア（日本紅斑熱含む）：刺し口痂皮（Eschar）＞紅斑部生検≫急性期血液＊
つつが虫病：刺し口痂皮（Eschar）＞紅斑部生検≧急性期血液＊

発疹チフス群リケッチア：紅斑部生検≒急性期血液＊

① 血液：抗菌薬投与前の急性期血液。EDTA-2K またはクエン酸 Na 処理全血のバフィーコート画分やプレーン血の血餅 200～500 μ L 容量。

＊後日にリケッチアの分離に用いる場合は、血球部分を-80℃で保存しておく。

②刺し口の痂皮：刺咬部位の痂皮をピンセット等ではがす。

③皮膚生検：発疹部の皮膚生検は2 mm 径前後のパンチ（トレパン）で採取できる大きさでよい。

ポイント1．痂皮からは抗菌薬投与後でも検出できることが多い。1辺が数 mm 大で可能。
ポイント2．提出の際、痂皮や皮膚検体を滅菌容器にそのまま入れてもよいが、特に乾燥した季節、痂皮等は乾燥しない程度に生食等で湿らせたガーゼ等と同封して提出されると取り扱しやすい。スピッツ等では綿球を使うとよい。

血清診断

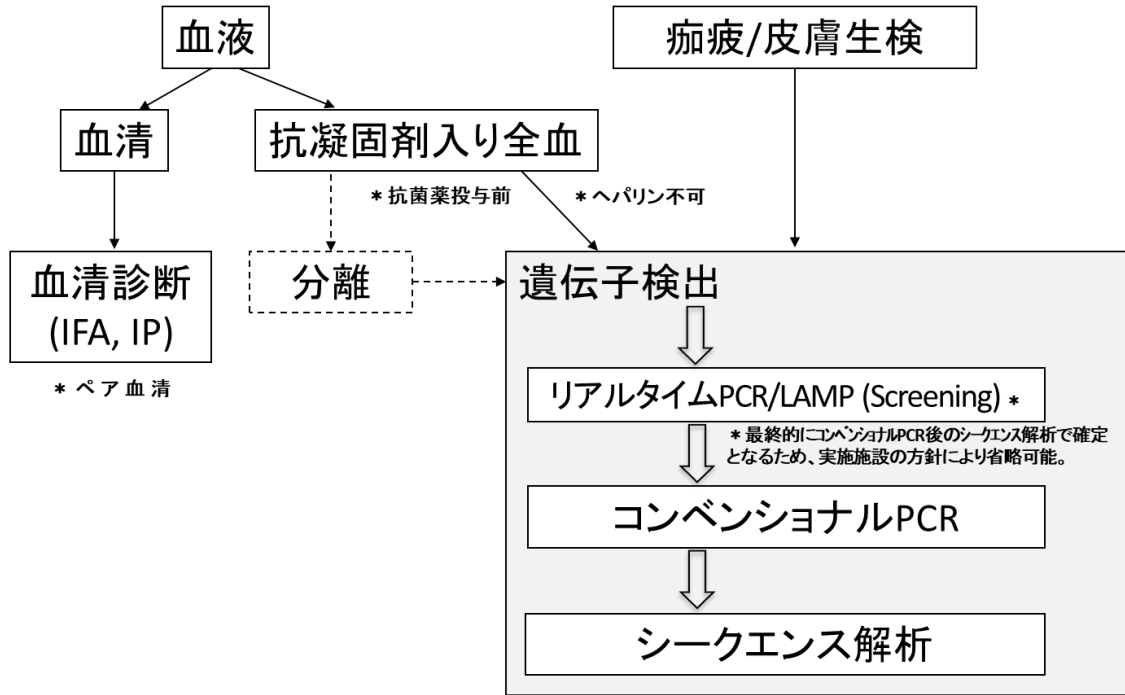
血清：急性期とその後10日から2週間後の回復期の2点（ペア血清）を基本とする。

1点、0.5～1.0 mL

＊遺伝診断等では検出限界も考慮せざるを得ないため、抗体上昇を確認できるペア血清の確保は重要である。まれに抗体上昇に1か月程度を要する症例もある。

いずれの検体も冷蔵保存。直ちに輸送できない場合は、-20℃以下で凍結保存をする。

リケッチア感染症実験室診断の流れ



病原体検出

遺伝子検出

リケッチア症患者の診断に関しては血清診断が一般的に行われてきた。しかし、血清診断に関しては、発病初期の血清では抗体確認ができない場合が多く、また低い抗体価で検出された抗体が過去の感染によるものか否かの判断等が難しい場合があるなどの問題点もある。

本症は、発症後早期に有効な抗菌剤を投与することで治療可能であることから、患者の治療の観点からも迅速な診断を求められる機会が多くなっている。このような場合には、血清診断に加えて、以下に示す遺伝子検査法（PCR法、リアルタイムPCR法）は有効な診断手段となる。

遺伝子検査法は、ベクターと考えられるダニ等からから、リケッチア DNA あるいは *R. japonica* DNA を検出する手段としても利用可能であるが、近年の調査情報の蓄積から、ベクターの保有する近縁種の多様性がわかっており、結果の解析には十分な注意を要する。

さらにリケッチア症の遺伝子検出においては、リアルタイムPCR系のみで *Rickettsia* 属の種の同定、*Orientia* の型別は困難であるため、コンベンショナルPCR産物のシーケンス解析は必須となっている。リアルタイムPCR系からの最終同定、型別、または直接、各コンベンショナルPCRを実施する。

なおコンベンショナルPCR系は特に、用いる酵素の種類、機械によって結果にばらつきが出るのが少なくない、本マニュアルで示す、試薬調製、反応条件は一例であり、これから導入する施設においては、巻末に掲載する各ブロックのリケッチア・レファレンスセンターの担当者等、先行する施設と相談しながら各施設に適合した条件を設定されたい。

検体の前処理（DNAの抽出）

鋳型 DNA の抽出にあたっては、多くの試薬メーカーから各種簡易抽出キットが現在では出ており、これらのキットを用いる方が多検体を短時間で処理する上では簡便である。Kitの使用説明書に従ってDNAを抽出するが、Kitに添付されているProteaseは使用せず、溶解液とサンプルの全量に対し、各試薬メーカーから販売されているProteinase K(20 mg/ml)を1/100容量加えて細胞成分を溶解する方が比較的良い結果が得られる。検体の溶解の状態により、Proteinase Kならびに溶解液の量を調整する。

抽出を始める各種材料の開始ボリュームは、抗凝固剤入り血液の Buffy coat 200 μ L、全血 300~400 μ L、血餅 300 μ L 容量、痲痲等の組織片 1辺 2~4 mm 程度を目安とする。最終的な抽出鋳型 DNA は 50~200 μ L の TE に抽出して用いる。

リアルタイム PCR (1) SFG and Tsutsugamushi Diseases

*紅斑熱群リケッチア (*R. japonica* 含む) とつつが虫病リケッチア (*O. tsutsugamushi*) の Duplex Real-time PCR (Kawamori et al, 2018)

日本国内の紅斑熱群リケッチアとつつが虫病の多様性, 輸入リケッチア症を幅広く拾い上げるために開発された Duplex の系である. 試薬調製が比較的単純である利点がある.

①プライマー及びプローブ

Primer (probe)	Sequence (5' to 3')
OR-F	GGAGCATGCGGTTTAATTCG
OR-R	GCCATGCAACACCTGTGTGT
(Ot-FAM)	FAM-AATGGAGACATTTTTCTTC-MGB
(Rj-VIC)	VIC-CGGATCGCAGAGATG-MGB

②試薬調製 *Premix Ex Taq (Perfect Real Time)(TaKaRa)

Premix Ex Taq (2×) *	12.5 µL
OR-F (10 µM)	0.7 µL
OR-R (10 µM)	0.7 µL
Ot-FAM (10 µM)	0.5 µL
Rj-VIC (10 µM)	0.5 µL
DW	1.1 µL
	each 16 µL
DNA Template	9 µL
	total 25 µL

③反応条件

Initial denaturation	95°C 30 s
PCR Denaturation	95°C 5 s
PCR Annealing/extension	62°C 40 s
PCR Cycle	45 cycles

留意点 : *O. tsutsugamushi* の検出にはいまのところ問題はないが, 16S rDNA を標的にしていることもあり, 共生体として極めて多様な近縁種が存在することがわかってきている紅斑熱群リケッチアに関し, 臨床検体では非特異的にシグナルが上がることもある. あくまでスクリーニング系として用い, 最終的にコンベンショナル PCR で標的領域の配列を確認, リケッチア種の同定を行う必要がある.

参考文献 : Kawamori F, Shimazu Y, Sato H, et al., Jpn J Infect Dis. 2018 Jul 24;71(4):267-273. doi: 10.7883/yoken.JJID.2017.447.

リアルタイム PCR (2) *Rickettsia japonica* and other

日本紅斑熱リケッチア *R. japonica* を特異的に検出するために開発されたが, *R. heilongjiangensis* など極めて近縁な紅斑熱群リケッチアとの鑑別は難しい.

①プライマー及びプローブ

Primer (probe)	Sequence (5' to 3')
SpRija5'	GAACACGATGATACACCTCTGCAT
SpRija3'	GATTAGCCTCTGTCTTCAGTAGTATTTTAACT
(SpRija MGB)	FAM- TAGCGTCTATTCTAAGTAAAG -MGB

② 試薬調製 *Premix Ex Taq (Perfect Real Time)(TaKaRa)

Premix Ex Taq (2×) *	10 μL	
SpRija5' (10 μM)	0.4 μL	
SpRija3' (10 μM)	0.4 μL	
(SpRija MGB) (10 μM)	0.4 μL	
DW	7.3 μL	
	each	18.5 μL
DNA Template	1.5 μL	
	total	20 μL

③反応条件

Initial denaturation	95°C 20 s
PCR Denaturation	95°C 5 s
PCR Annealing/extension	62°C 34 s
PCR Cycle	45 cycles

留意点: 本検出系は *R. japonica* だけでなく, 紅斑熱群の中でも特に近縁な *R. heilongjiangensis* も検出する. しかしながら日本国内では, *R. heilongjiangensis* はイスカチマダニが生息する比較的寒冷な地域での発生の可能性を考慮し, それ以外の地域で発生した患者は *R. japonica* の感染によるものと推察される. 最終的にはコンベンショナル PCR 後, 配列解析をすることが望ましい.

参考文献 : Hanaoka N, Matsutani M, Kawabata H, et al., Emerg Infect Dis. 2009, 15(12):1994-1997. DOI: 10.3201/eid1512.090252

紹介した二つのリアルタイム PCR 系はあくまでも患者検体に使用することを前提としている. 多数の検体を処理するためにマダニ調査への使用を望む声が多いが, マダニは多様なリケッチア性の共生体を保有しており, リアルタイム PCR 系のように検出領域がおよそ 200 bp 以下では, リケッチア種を鑑別する系は困難である. そのため, マダニからのリケッチア検出は, コンベンショナル PCR から遺伝子配列を確認することが最も正確な結果となる. 臨床検体においては, 経験的に Kawamori らの方法が感度的にはよいとの意見がある.

コンベンショナル PCR

1. *Orientia tsutsugamushi* 共通プライマーによる Nested PCR (I)

プライマーは Gilliam 株と Karp 株の 56 kDa のポリペプチドをコードした DNA 塩基配列を基にし、相同性が高く、合成効率の良い部分を一对のプライマー (34, 55), 変異の著しい領域をはさむよう一对のプライマー(10, 11)を設計した Furuya らをベースに Shimokoshi 株も検出できるように佐藤らの改変を加えたものである。

①プライマー

1 st	Sequence (5' to 3')
34'	ATTGCTAGTGCAATGTCTGC
55'	CTGCTGCTGTGCTTGCTGCG
SH6	TAGTATCTGACTGCTTCTTATCCTTAGAG
Nested	Sequence (5' to 3')
10m2	CCD CCT CAR CCT AMT ATR ATG CC
10'	CCTCAGCCTACTATAATGCC
11'	CGACAGATGCACTATTAGGC

②試薬調製(Taq, Buffer, dNTP は用いる酵素 Kit に準じる)

1stPCR

10×PCR Buffer	5 μL
2 mM dNTPs	5 μL
Primer1 (34') (10 μM)	1 μL
Primer2 (55') (10 μM)	1 μL
Primer3 (SH6) (10 μM)*	1 μL
*Shimokoshi を想定する場合加える。不要の際は省略, DW の量を調整。	
DW	31.5 μL
Taq (5 U/μL)	0.5 μL
	Each 45 μL
Template DNA	5 μL
	Total 50 μl

Nested PCR

上記と同様の組成量で, Shimokoshi 株を想定する場合は (10m2/11') のプライマーの組み合わせ, Shimokoshi 株を想定しない場合は, (10' /11')の組み合わせを用いる。

③反応条件

98°C	3分	} 35~40 サイクル
94°C	30秒	
57°C	1分	
72°C	1分	
72°C	7分	
4°C	hold	

*エキストラバンドが多い場合は, 1st PCR において annealing 温度を 1 サイクル目 [67°C] に設定し, 初めの 5~10 サイクルで 57°C にするタッチダウンによりエキストラバンドを減らす。

判定と留意点：

プライマー10', 11'により増幅されるバンドは, Gilliam 株 481 bp~Karp 株 507 bp に位置する. 型別は PCR 産物のダイレクトシーケンス解析による.

参考文献

- 1) Furuya Y et al. J Clin. Microbiol. 1993. 31: 1637-1640.
- 2) 佐藤寛子ほか. 衛生動物誌 Med. Entomol. Zool. 2014. 65(4):183-188

2. *Orientia tsutsugamushi* 共通プライマーによる Nested PCR (II)

Shimokoshi 株を含め日本国内株の検出は可能であるが, 配列を読んでも型別はできない.

①プライマー

1 st	Sequence (5' to 3') (増幅産物 : 238 bp)
OtsuFP555	TCCTTTCGGTTTAAGAGGAACA
OtsuRP771	GCATTCAACTGCTTCAAGTACA
Nested	Sequence (5' to 3') (増幅産物 : 118 bp)
OtsuFP630	AACTGATTTTATTCAAATAATGCTGCT
OtsuRP747	TATGCCTGAGTAAGATACRTGAATRGAATT

②試薬調製(1st/nested とともに同じ組成)

10×PCR Buffer	5 μL
2.5 mM dNTPs	4 μL
Primer1 (50 μM)	0.25 μL
Primer2 (50 μM)	0.25 μL
DW	35.25 μL
Taq (5 U/μL)	0.5 μL
	Each 45 μL
Template DNA	5 μL
	Total 50 μL

③反応条件

1 st 94°C	10 分	Nested 94°C	10 分
94°C	1 分	94°C	30 秒
56°C	1 分	57°C	30 秒
72°C	1 分	72°C	1 分
72°C	7 分	72°C	7 分
4°C	hold	4°C	hold

30 サイクル

25 サイクル

参考文献

- Kim DM et al. JCM 2011 p607-614
Jiang J et al. Am J Trop Med Hg 2004 p351-356

参考

Orientia tsutsugamushi 型別プライマーによる Nested PCR

Orientia tsutsugamushi 共通プライマー(34'・55')の PCR 産物を鋳型とし、型別用のプライマーは、Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki の 5 株の DNA 塩基配列を比較検討して、それぞれの株(型)に特異的な配列を認識するように設計された Nested PCR も用いることができる。型別のプライマーにより増幅されるバンドは、Gilliam 株 407 bp, Karp 株 230 bp, Kato 株 242 bp, Kawasaki 株 523 bp, Kuroki 株 220 bp である。しかしながら Shimokoshi 型に対応していないことに加え、複数の型別プライマーで増幅がみられることがあるため、最終的には共通プライマー(10, 11)、型別プライマーの各増幅産物の配列をダイレクトシーケンス法により決定する必要がある。

型別プライマー

- Primer G : 5'-CTTTATATCACTATATATCTT-3'
- Primer KP : 5'-ACAATATCGGATTTATAACC-3'
- Primer KT : 5'-GAATATTTAATAGCACTGGA-3'
- Primer KW : 5'-ATGCTGCTATTGATACAGGC-3'
- Primer KR : 5'-ACCGGATTTACCATCATAT-3'

参考文献

吉田芳哉ほか, 感染症誌, 68:601-606, 1994.

国立感染症研究所(レファレンス委員会), 地方衛生研究所全国協議会リケッチア感染症診断マニュアル. 2000. pp. 9-16

3. リケッチア属検出のためのコンベンショナル PCR 法

これまで紅斑熱群リケッチア特異的および日本紅斑熱リケッチア特異的に検出するとして用いられてきたコンベンショナル PCR は、リケッチアの多様性が明らかになるにつれ、特定の種のみを検出することは難しいことがわかってきている。現在、コンベンショナル PCR 系の使用においては、その検出範囲とリアルタイム PCR では得られない配列長から種の系統解析を可能にする配列情報を得るためのものと理解しておくのがよい。

1) リケッチア属共通 17 kDa 蛋白遺伝子

①プライマー Sequence (5' to 3') (増幅産物 : 537~540 bp)

R1	TCAATTCACAACCTTGCCATT
R2	TTTACAAAATTCTAAAAACC

②試薬調製 (酵素例 : Takara Ex Taq)

10×PCR Buffer	5 μL
2.5 mM dNTPs	4 μL
Primer1 (50 μM)	1 μL
Primer2 (50 μM)	1 μL
DW	33.75 μL
Taq (5 U/μL)	0.25 μL
	Each 45 μL
Template DNA	5 μL
	Total 50 μL

③反応条件

95°C	2 分	} 35 サイクル
94°C	45 秒	
52°C	30 秒	
72°C	45 秒	
72°C	7 分	
4°C	hold	

2) リケッチア属共通 17 kDa 蛋白遺伝子 nested PCR

①プライマー Sequence (5' to 3') (増幅産物 : 約 430 bp)

Rr17.61p	GCTCTTGCAACTTCTATGTT
Rr17.492n	CATTGTTCGTCAGGTTGGCG

②試薬調製と反応条件は、上記 R1/R2 の系と同様。R1/R2 の PCR 反応液を鋳型とする。

参考文献

片山 丘 他 ; 感染症学雑誌 第 70 巻第 6 号, 561-568, 1996
Noda H, Munderloh UG. et al. Appl. Environ. Microbiol., 63(10):3926-3932.

3) リケッチア属共通 citrate synthase (*gltA*) 遺伝子

先の 17 kDa 共通蛋白遺伝子と同様, リケッチア属をカバーする. 二つの系を行えば, 発疹チフス群を含め, 現時点登録されているリケッチア属をほぼカバーすると言ってよい.

①プライマー

1st	Sequence (5' to 3')
Cs2d	ATGACCAATGAAAATAATAAT
CsEndR	CTTATACTCTCTATGTACA
nested	Sequence (5' to 3') (増幅産物 : 381 bp)
RpCS.877p	GGGGGCCTGCTCACGGCGG
RpCS.1258n	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA

②試薬調製 (酵素例 : Takara Ex Taq)

10×PCR Buffer	5 μL
2.5 mM dNTPs	4 μL
Primer1 (50 μM)	1 μL
Primer2 (50 μM)	1 μL
DW	33.75 μL
Taq (5 U/μL)	0.25 μL
	Each 45 μL
Template DNA	5 μL
	Total 50 μL

③反応条件

95°C	2 分	} 35 サイクル
94°C	45 秒	
52°C	30 秒	
72°C	45 秒	
72°C	7 分	
4°C	hold	

* 試薬組成ならびに反応条件は, 1st PCR, nested PCR ともに同じである.

参考文献

Mediannikov OY et al. EID, 2004, 10(5), 810-817.

参考 1

以下のプライマーデザインが *Rickettsia japonica* 特異的な PCR 系として報告され, 利用されてきた.

参考文献 : Furuya Y, Katayama T, Yoshida Y, et al. J. Clin. Microbiol, 1995, 33 : 487-489)

Rj5 CGCCATTCTACGTTACTACC
Rj10 ATTCTAAAAACCATATACTG

本系の設計後, 多数の配列情報ならびにリケッチア検出情報が蓄積され, 他のコンベンショナル PCR 系と同様に, 必ずしも種特異的とは言えないことが明らかとなり, 最終的にシーケンス解析が必要である. また, プライマー設定領域が先の R1/R2 の内側に設定されていることから, その nested PCR 系として用いられることがあるが, 著者らによると, outer と inner のプライマーそれぞれの Forward と Reverse の組み合わせにより, 4 つのバンドが出現することもあり, いずれの系もあくまでも Single PCR として用いることを推奨している.

参考 2

発疹チフス (*R. prowazekii*) と発疹熱 (*R. typhi*) に関し, 平成 14 年に感染研ならびに地方衛生研究所全国協議会によって公開された「発疹チフス群リケッチア診断マニュアル」記載の二つのプライマーセットは, 2019 年 6 月時点で国際データベースに登録されている情報を見る限りは, 現在もそれぞれのリケッチア種特異的なコンベンショナル PCR 系として用いられる可能性は高い. 参考に, プライマー条件を下記に示す. 試薬構成ならびに反応条件は先の 17 kDa 共通蛋白遺伝子と同様である.

R. prowazekii 特異的プライマーセット

Rpro 2F ACAAGCTTGTAATGGTCAGA
Rpro 3R GCCATTGCCCATCAGGTTGA

R. typhi 特異的プライマーセット

Rty 2F GTATGAACAAACAAGGGACT
Rty 3R TTACGTAACCATGATTGCCA

血清診断法

リケッチア症の血清学的診断には、間接蛍光抗体法(IF法: Indirect immunofluorescence assay), 間接免疫ペルオキシダーゼ法(IP法: Indirect immuno-peroxidase assay)などが利用されている。検出を目的とするリケッチア種、型を培養し、抗原として用いる。

紅斑熱群リケッチア患者の抗体は、原因リケッチア種以外の紅斑熱群リケッチア種とも比較的広く交差反応することから、血清診断を行うにあたってはいずれの種を用いても可能である。日本で常在感染した紅斑熱群リケッチア症は主に日本紅斑熱であることから、患者を診断するにあっては *R. japonica* を抗原として使用することが望ましいが、他の紅斑熱群リケッチアを用いる場合も、準じて行うことが可能である。*R. japonica* は感染症法の3種病原体に指定されたため、施設間での移動が極めて難しくなっている。このため、各衛研等で患者から分離された *R. japonica* 株を培養増殖させたものを抗原に用いてもよい。

つつが虫病の診断では、わが国に分布する *O. tsutsugamushi* の多様な血清型に注意が必要である。現在、国内では Karp, Gilliam, Kato, Irie/Kawasaki, Hirano/Kuroki, Shimokoshi の6型が知られている。患者発生地域毎の型の偏りに合わせ、その地域の主体となる型を選択して血清診断の抗原とすることも可能である。しかしながら、ある程度の交差性はあるものの、感染した型にしか抗体上昇が認められない症例も稀にある。(Irie, Hirano はそれぞれ Kawasaki, Kuroki と同型と考えられるが、先に分離された Irie, Hirano より後者二つが診断用抗原等として全国に普及したため、それらの型名が広く使われてきた経緯がある。)

つつが虫病患者の血清診断は、一部の血清型 (Karp, Gilliam, Kato) について、民間検査機関での抗体検査が可能で、保険適用の血清診断として一般的にも行われるが、他のリケッチア症と同様、急性期血清では抗体上昇の確認は難しく、早期診断には有効ではない。

1. リケッチアの培養と抗原スライドの作製

- 1) リケッチアの培養には様々な株化細胞が用いられるが、日本国内では L929 細胞や Vero 細胞が一般に用いられている。
- 2) フルシートを形成した細胞の上清を除き、1/3~1/5 量の凍結保存感染細胞を接種する。定期的にキルティングしながら 33~35°C の CO₂ 培養器内で 2~4 時間吸着させる。
- 3) 1~3% の牛胎児血清を加えた培地を加え、3~7 日間培養を継続する。70~80% の細胞が感染したら、細胞を剥離するとともに、PBS で培養容器を洗浄してすべて回収する。
 - * 培養開始 3~7 日目に、細胞の一部を掻きとり、スライドに風乾・アセトン固定後、ギムザ染色等で染色、リケッチアの増殖を確認する。培養細胞をそのまま暗視野で観察できる場合は、培養状態のままリケッチアの増殖を確認できる。
 - * リケッチアが少ない場合は、細胞の状態によって非感染細胞を加え、培養を続ける。
- 4) 回収した細胞、上清は 12,000 rpm, 30 分遠心し、上清を捨てる。
- 5) 沈査を PBS に懸濁する。細胞培養面積 25 cm² あたり、3~5 mL を目安とする。
- 6) 終濃度 0.3% になるようホルマリンを加え、34°C, オーバーナイトで不活化する。
 - * この処理後、小分け分注し、-80°C で長期保存も可能である。
- 7) 不活化処理した抗原液に終濃度 0.3% のウシアルブミン (FCS で代用可能) を添加し、スライドに [~1] μL 点置する。
 - * 点置する抗原の種類の数により適宜、多穴スライドの径を選択使用するが、8 mm 径に 9 種類の抗原を点置することも可能である。
- 8) 乾燥したら冷アセトンで 10 分間固定する。
- 9) 固定した抗原スライドガラスは密封し、使用時まで -20°C 以下で保存する。

2. 間接蛍光抗体法 Indirect immunofluorescence assay (IF 法)

抗体検査法 (抗原 - 抗体反応)

- 1) 被検血清は PBS を用いて 10 倍 (または 20 倍) 希釈し, 以後 2 倍階段希釈する.
- 2) 凍結保存していた抗原スライドグラスを室温にもどす.
- 3) 抗原スライドの径にあわせ, 被験血清の希釈系列を各々 10~50 μL のせる.
- 4) スライドグラスを湿潤箱に入れ, インキュベーターに入れ 37°C で 30~60 分間反応させる.
- 5) 抗原スライドのフロスト部分に, 直接スポットに注いで抗原を剥がさないため, 洗浄瓶で PBS を注ぎ, 血清を洗い流してから PBS を入れたドーズに入れ, 10 分間, 振盪させながらの洗浄を 2~3 回繰り返す.
- 6) スライドグラスを風乾させる.
- 7) あらかじめ使用希釈倍数を決め PBS で希釈した FITC 標識抗ヒト IgM 抗体または抗ヒト IgG 抗体を各々 10~50 μL のせる.
*使用する 2 次抗体は, 被検血清の動物種, 測定しようとする抗体の種類により選択する. また, 使用濃度はメーカー, 製品のロット等により異なるためボックスタイトレーションを行って, あらかじめ最適な希釈濃度を決めておく必要がある. 2 次抗体希釈液に 0.1 のエバンスブルーを添加してあれば対比染色で陽性が確認しやすい.
- 8) 湿潤箱に入れた後, インキュベーターに入れ 37°C で 40 分間反応させる.
- 9) 上記 5) を繰り返す.
- 10) スライドグラスを 2 回蒸留水に通し, 風乾させる.
- 11) グリセリン緩衝液(0.5 M 炭酸重炭酸緩衝液, pH9.5 1 容 : 特級無蛍光グリセリン 9 容)を滴下し, カバーグラスにて封入する. 市販の蛍光封入材を用いてもよい.
- 12) 蛍光顕微鏡を用いて倍率 200~400 倍で観察する. リケッチア粒子は黄緑色の蛍光色に, 細胞はエバンスブルーによって赤く染まって見える(肉眼では青). 必ず陽性および陰性対照血清の染色所見と比較し判断を行う. 染色したスライドを保存する場合には遮光する.

判定

回復期血清中の IgM 抗体・IgG 抗体のどちらか一方, あるいは両方の抗体価が急性期血清中のそれと比較して, 4 倍以上上昇しているものを陽性とする. やむをえず急性期血清だけで診断する場合には, IgM 抗体価が 80 倍以上のものを陽性とする (注:使用する試薬, 器具によりカットオフ値は若干異なる).

参考

*IF 法, 後述の IP 法も同様であるが, 非特異反応を抑えるために, 希釈液, 洗浄液にウシ血清アルブミンや Tween 20 を用いるラボもある. またさらに, IgM の非特異をおさえる市販試薬を用いるところもある. いずれにせよ, 導入にあたっては, 先行するラボに相談することがよい.

3. 間接免疫ペルオキシダーゼ法 Indirect immunoperoxidase assay (IP 法)

IP 法は光学顕微鏡を用いて観察ができ、退色が遅いので後日に鏡検できる利点がある。
以下、須藤の原法に、簡素化した発色方法を加えた手技を示す。

抗体検査法 (抗原 - 抗体反応)

- 1) 被検血清は PBS を用いて 10 倍 (または 20 倍) 希釈し、以後 2 倍階段希釈する。
- 2) 凍結保存していた抗原スライドガラスを室温にもどす。
- 3) 抗原スライドの径にあわせ、被験血清の希釈系列を各々 10~50 μL のせる。
- 4) スライドガラスを湿潤箱に入れ、インキュベーターに入れ 37°C で 30~60 分間反応させる。
- 5) 抗原スライドのフロスト部分に、直接スポットに注いで抗原を剥がさないため、洗浄瓶で PBS を注ぎ、血清を洗い流してから PBS を入れたドーゼに入れ、10 分間、振盪させながらの洗浄を 2~3 回繰り返す。
- 6) スライドガラスを風乾させる。
- 7) あらかじめ使用希釈倍数を決め PBS で希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgM 抗体または抗ヒト IgG 抗体を各々 10~50 μL のせる。使用する 2 次抗体の希釈に関しては IF 法と同様事前に至適濃度を決めておく。
- 8) 湿潤箱に入れた後、インキュベーターに入れ 37°C で 40 分間反応させる。
- 9) 上記 5) と同様に洗浄した後、室温の蒸留水で 2~3 回洗浄する。
- 10) 用時調製した発色基質液を入れたドーゼにスライドガラスを入れ、2~3 回上下してから、遮光しながら室温で 5~7 分間反応させる。
- 11) 発色液を除き、手早く蒸留水ですすぎ、再び蒸留水で数分間よく洗浄する。
- 12) 風乾後、グリセロールゼラチン液を載せ、カバーガラスで封入する(40°C 前後のホットプレート上で行うと封入液の伸展が良好である)。
- 13) 光学顕微鏡により観察する。陽性および陰性対照と比較し、発色基質の染色を確認する。
* 染色したスライドを保存する場合には遮光する。

判定

IF 法と同様である。

試薬調製 (以下に 4-Chloro-1-naphthol の調製例を示す。各種市販発色キットも利用できる。)

- 1) 発色基質原液： 4-Chloro-1-naphthol 200 mg を 80% エタノール 100 ml に溶解し、褐色瓶にて 4°C で保存する (約 2 か月使用可)。
- 2) 発色液： 検査当日に発色基質原液 10 ml に対して、PBS を 40 ml、次いで 3% H_2O_2 を 0.1 ml の割合で混和して調製する。

* 使用後の発色液は、回収して 3 回まで当日中の反復使用が可能。遮光、室温保存。

留意点：

* 発色基質は、原法における DAB(3,3'-Diaminobenzidine, tetrahydrochloride) の代わりに発癌性のない 4-Chloro-1-naphthol を使用することも可能である。リケッチア粒子の陽性像は DAB では褐色であるが、4-Chloro-1-naphthol では青黒色に染色される。

* 4-Chloro-1-naphthol は DAB より退色が早い。

参考文献

須藤恒久. 臨床とウイルス, 11(1): 23-30, 1983.

マニュアル編集 協力者(所属は編集開始当時)

秋田県健康環境センター 佐藤寛子
福島県衛生研究所 門馬直人
埼玉県衛生研究所 山本徳栄
東京都健康安全研究センター 新開敬行
岡山県環境保健センター 木田浩司, 濱野 雅子
広島県総合科学研究所環境保健センター 島津幸枝
国立感染症研究所ウイルス第一部第五室 安藤秀二

全国地方衛生研究所衛生微生物協議会 リケッチャ・レファレンスセンター(令和元年現在)

北海道・東北ブロック

青森県環境保健センター
福島県衛生研究所

関東・甲信越ブロック

千葉県衛生研究所
東京都健康安全研究センター

中部ブロック

三重県保健環境研究所
富山県衛生研究所

近畿ブロック

和歌山県環境衛生研究センター
兵庫県立生活科学研究所健康科学研究センター

中国・四国ブロック

岡山県環境保健センター
広島県総合科学研究所環境保健センター
高知県衛生研究所

九州ブロック

鹿児島県環境保健センター
宮崎県衛生環境研究所

国立感染症研究所ウイルス第一部第五室