

【資 料】

日本紅斑熱リケッチアを特異的に検出するReal-timePCR法に 弱反応を示したリケッチア属菌の解析

Genomic Analysis of Rickettsia Reacted Weakly in
Specific Real-time PCR Method for *Rickettsia japonica*

松岡保博, 木田浩司, 谷川徳行, 磯田美穂子, 梶原香代子, 濱野雅子
Yasuhiro Matsuoka, Kouji Kida, Noriyuki Tanikawa, Mihoko Isoda,
Kayoko Kajihara and Masako Hamano
(Virology Section)

要 旨

2015年に実施した県内捕獲マダニの*Rickettsia japonica*保有状況調査において、*Rickettsia japonica*を特異的に検出するreal-timePCR法を使用したところ、キチマダニ内臓浮遊液1検体で、陽性とは明らかに異なる弱反応を確認した。検体中にリケッチア属菌遺伝子の存在が確認されたため、今回の弱反応は、この菌によるものである可能性が高いと考えられた。そこで、本菌をHF2株と命名し、詳細な解析を実施した。その結果、HF2株は、県内のキチマダニが従来から保有するリケッチア属菌であり、ヒトへの病原性を持つ可能性は低いと考えられた。また、HF2株は、今回使用したreal-timePCR法の標的である216bpORF領域を保有することが確認された。標的領域の塩基配列を*Rickettsia japonica*と比較すると、HF2株は、プライマー対及びプローブの結合部位の塩基配列が1塩基ずつだけ異なっており、これが弱反応の原因であったと考えられた。データベース上では、HF2株の他にも*Rickettsia japonica*とよく似た塩基配列の216bpORF領域を保有するリケッチア属菌が複数確認された。しかし、これらはいずれも国内においてヒトからの検出報告がないことから、今回使用したreal-timePCR法の日本紅斑熱が疑われる患者の迅速診断法としての有用性を否定するものではないと考えられた。ただし、マダニ由来検体のようなヒトの臨床検体以外のものに本法を使用する場合は、HF2株のようなリケッチア属菌又は同様の反応を起こす未知のリケッチア属菌が存在する可能性を考慮する必要がある。

[キーワード：マダニ，日本紅斑熱リケッチア，リアルタイムPCR]

[Key words: Tick, *Rickettsia japonica*, Real-time PCR]

1 はじめに

日本紅斑熱は、*Rickettsia japonica*（以下「R.j.」という。）を保有するマダニに刺さることによって感染するダニ媒介性細菌感染症であり、感染症法では四類感染症に規定されている。発熱及び発しんを主徴とし、死に至ることもある重篤な感染症であるが、発症早期に有効な抗菌薬を投与することで重症化を防ぐことができるため、迅速な検査診断が求められている。2009年、花岡らによって、R.j.を特異的に検出するreal-timePCR法が報告された¹⁾。本法は、R.j.及び極東紅斑熱の起因種である*R.heilongjiangensis*が特異的に保有する216bpORF領域を標的としており、現在では日本紅斑熱の迅速診断法として広く利用されている。2015年に実施した県内捕獲マダニのR.j.保有状況調査²⁾において本法を使用したところ、R.j.は全て陰性であったが、キチマダニ内臓浮遊液1検体で、陽性とは明らかに異なる弱反応を確認した。そこで、

その原因を明らかにするため、詳細な遺伝子解析を実施した。

2 材料と方法

2.1 検体

2015年に実施した県内捕獲マダニのR.j.保有状況調査において、real-timePCR法で陽性とは異なる弱反応を示したキチマダニ内臓浮遊液1検体を用いた。

2.2 real-timePCR法

花岡らが報告した方法¹⁾に従い、TaqMan Universal PCR Master mix (Thermo Fisher Scientific社)を用い、20μL容量(検体2μL)でStepOnePlus (Thermo Fisher Scientific社)により実施した。使用したプライマー及びプローブの塩基配列を表1に示す。

2.3 リケッチア遺伝子の確認

QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN社)により検体か

ら抽出したDNAを用いて、リケッチア属共通抗原である17kDa領域を標的としたnested PCR法によるリケッチア遺伝子検索を実施した。使用したプライマー^{3),4)}の塩基配列を表2に示す。ポリメラーゼはEx Taq (TaKaRa社)を使用し、反応条件は、95℃1分間の初期変性の後、95℃30秒間の熱変性、52℃30秒間のアニーリング、72℃1分間の伸長反応を行い、熱変性から伸長反応のサイクルを35回繰り返した後、5分間の最終伸長反応を行った。得られた増幅産物は、マイクロチップ電気泳動装置：MultiNA (島津製作所)により泳動した。

2.4 216bpORF領域の存在確認

検体から抽出したDNAを用いて、花岡らが報告した216bpORF領域を包含するように設計されたプライマー¹⁾(表3)によるPCR法を実施した。酵素及び反応条件は、2,3と同様に実施した。

2.5 ダイレクトシーケンス法

検体から得られたPCR増幅産物をBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific社)を用いてシーケンス反応した後、BigDye XTerminator Purification Kit (Thermo Fisher Scientific社)により精製し、ABI3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific社)を用いて塩基配列を決定した。

2.6 BLAST検索

BLAST検索には、DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

[index-j.html](#))を利用した。

2.7 系統解析

GENETYX ver.12 (ゼネティックス社)を用いて、近隣結合法による遺伝子系統解析を実施した。

3 結果

3.1 real-timePCR法での弱反応の確認

検体から抽出したDNAについて、real-timePCR法を実施したところ、陽性とは異なる弱反応が再び確認された(図1)。

3.2 検体中のリケッチア遺伝子の確認

検体から抽出したDNAについて、リケッチア属共通抗原である17kDa領域を標的としたnested PCR法を実施した。その結果、想定産物長とほぼ同じ434bpのPCR増幅産物が生成されており、検体がリケッチア属菌を含むことが確認された(図2)。これにより確認されたリケッチア属菌をHF2株と命名した。

3.3 HF2株の種を同定するための遺伝子解析

HF2株の種を同定するために、ダイレクトシーケンス法により決定した17kDa領域394bpについて、BLAST検索を実施した。その結果、塩基配列が100%一致するリケッチア属菌は無かったが、99%一致するものが複数存在し、そのうち種名が定められているのは*R.raoultii*のみであった。しかし、*R.raoultii*が、ヨーロッパやロシアの

表1 プライマー及びプローブ

名称	塩基配列(5'→3')	文献
SpRija5'	GAACACGATGATACACCTCTGCA	1)
SpRija3'	GATTAGCCTCTGTCTTCAGTAGTATTTAACT	1)
SpRijaMGB	(FAM)-TAGCGTCTATTCTAAGTAAAG-(NFQ)-(MGB)	1)

表2 プライマー

名称	塩基配列(5'→3')	文献
R1	TCAATTCACAACCTTGCCATT	3)
R2	TTTACAAAATTCTAAAACC	3)
Rr17.61p	GCTCTTGCAACTTCTATGTT	4)
Rr17.492n	CATTGTTTCGTCAGGTTGGCG	4)

表3 プライマー

名称	塩基配列(5'→3')	文献
JapoSP5'	GAACACGATGATACACCTCTGCA	1)
JapoSP3'	GATTAGCCTCTGTCTTCAGTAGTATTTAACT	1)

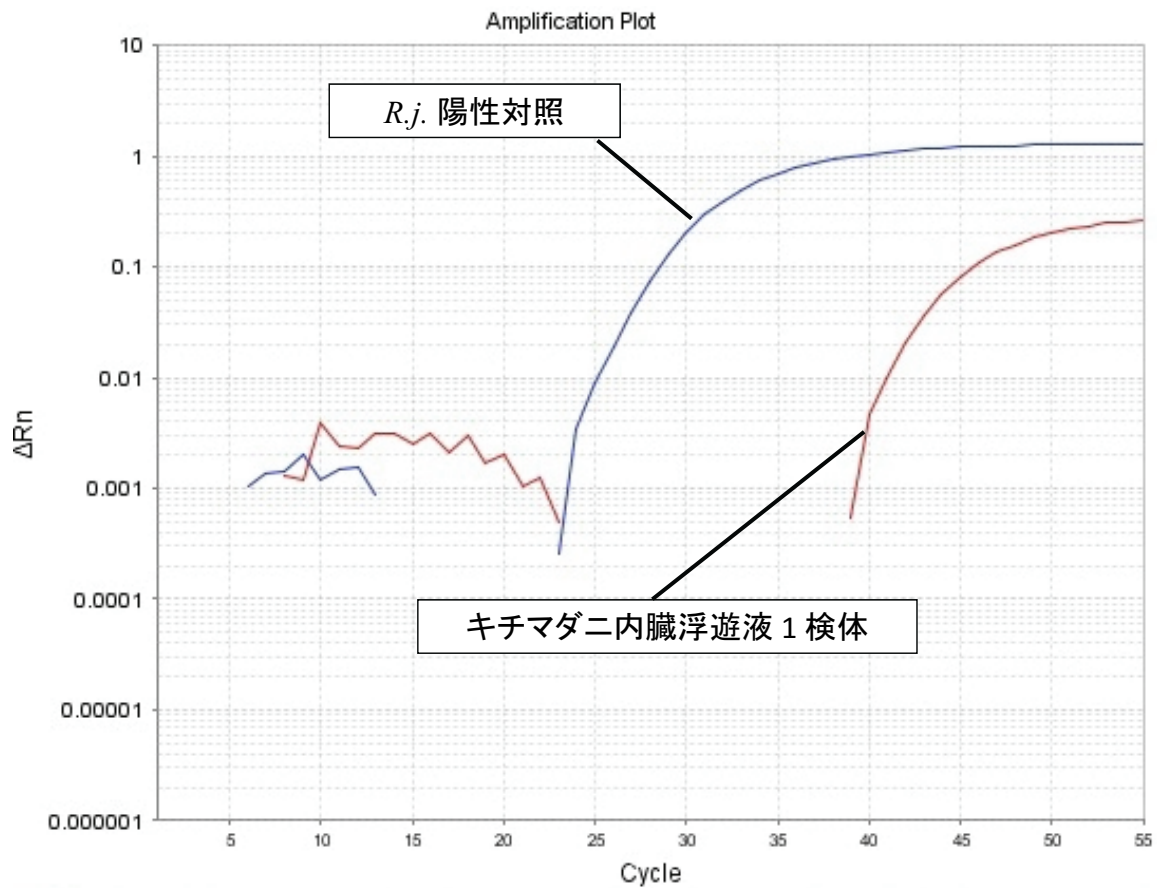


図1 検体がreal-timePCR法に示した弱反応

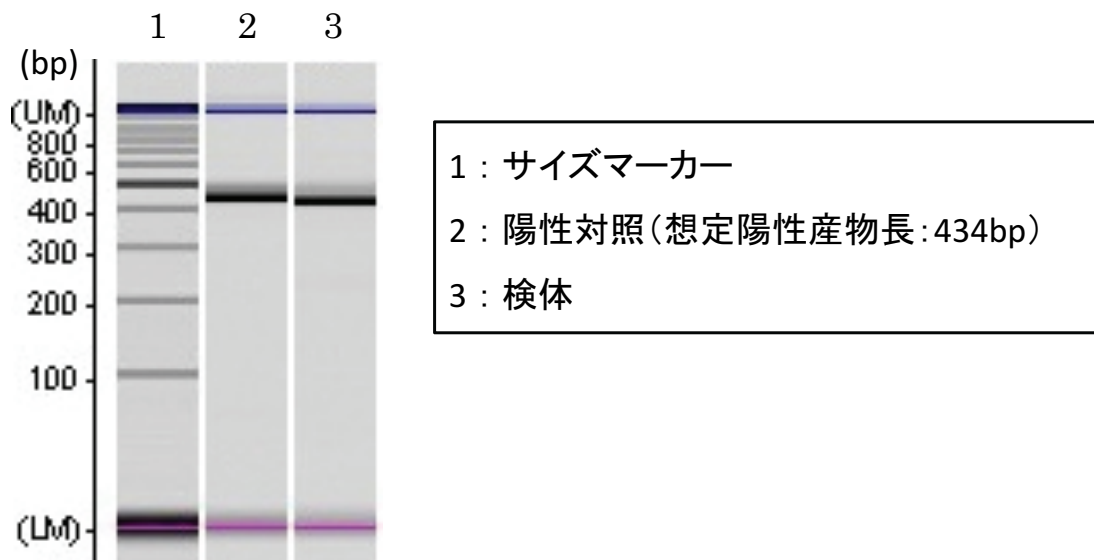


図2 リケッチア属共通抗原である17kDa領域PCR産物電気泳動像

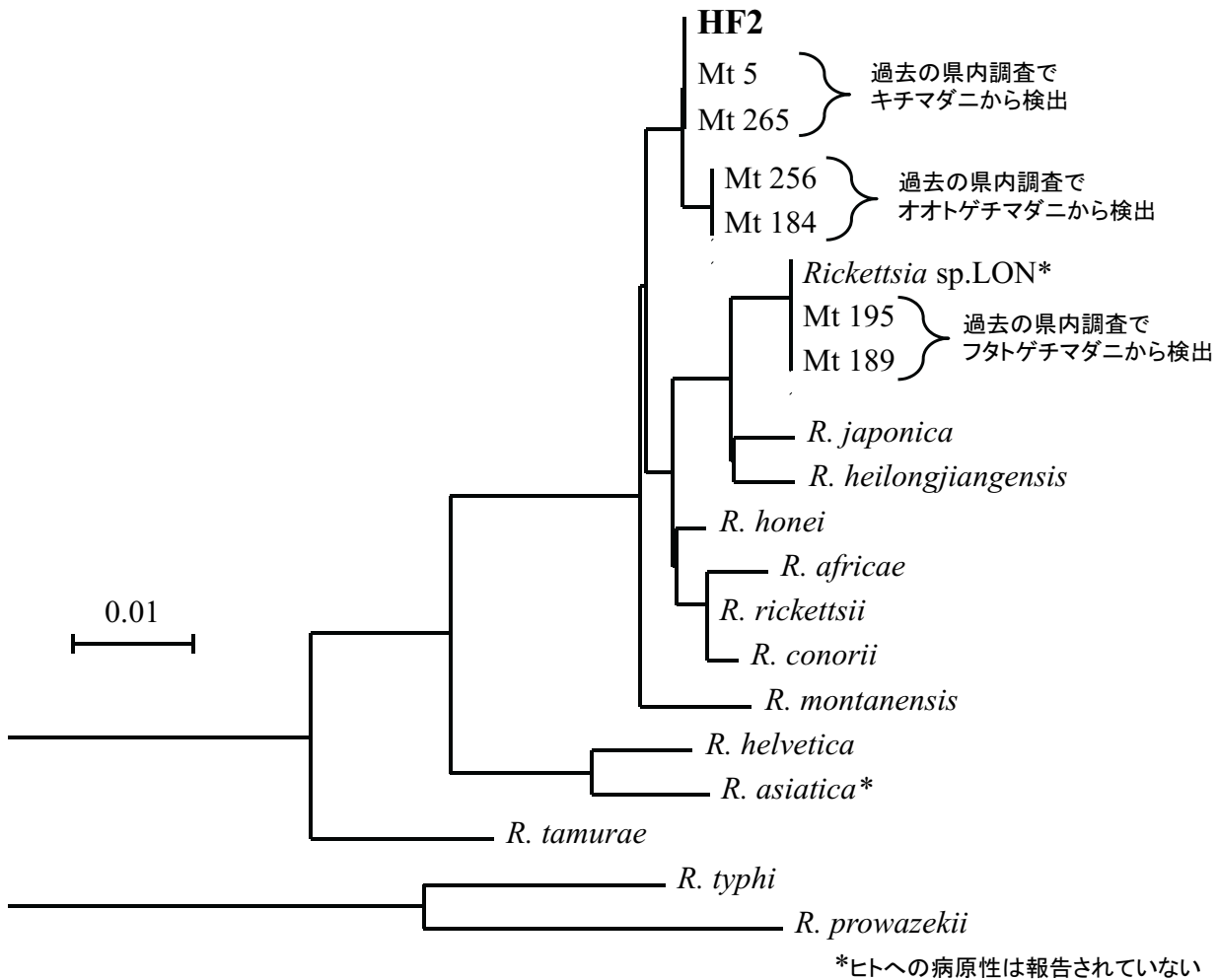


図3 リケッチア属共通抗原である17kDa領域 (394bp) 系統樹解析結果

カクマダニ属から検出された⁵⁾のに対し、HF2株は県内のチマダニ属のキチマダニから検出されたものである。両者は、保有マダニ種はもとより、その生息地域も異なることから別種である可能性が高いと考えられた。そこで、過去の県内調査でマダニから検出されたリケッチア属菌及びヒトへの病原性を有するリケッチア属菌を含む既知のリケッチア属菌の塩基配列データを用い、系統解析を実施した。その結果、HF2株は、過去の県内調査においてキチマダニから検出されたリケッチア属菌と同じクラスターに属しており、これはヒトへの病原性を有するリケッチア属菌の属するクラスターとは明らかに異なっていた (図3)。

3.4 HF2株の216bpORF領域の解析

HF2株について、216bpORF領域を包含するように設計されたプライマーを用いて、PCR法を実施し、得られた増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した。その結果、HF2株が216bpORF領域を保有することが確認された。また、DDBJのデータベー

スで検索したところ、同領域を保有するリケッチア属菌が、*R.j.*及び*R.heilongjiangensis*の他に4種 (*R.raoultii*, *R.amblyommii*, *R.montanensis*及び*Rickettsia sp.LON*)存在することが確認された。これらの塩基配列の一致率を確認したところ、HF2株が保有する216bpORF領域の塩基配列は、どのリケッチア属菌とも異なっていた (表4)。また、HF2株以外でも相互の216bpORF領域が100%一致するリケッチア属菌は存在しなかったが、*Rickettsia sp.LON*を除くリケッチア属菌の塩基配列は、互いによく似ていた (一致率94.9～99.5%)。

次に、HF2株がreal-timePCR法で弱反応を示した原因を明らかにするために、real-timePCR法における増幅部位85bpについて比較した。その結果、HF2株のプライマー対及びプローブ結合部位の塩基配列が*R.j.*とは1塩基ずつ異なっていることが確認された (図4)。また、*R.heilongjiangensis*の塩基配列は*R.j.*と100%一致していたが、他のリケッチア属菌の塩基配列も*R.j.*とよく似ており、各結合部位の違いは最大でも2塩基のみであった。

表4 216bpORF領域の塩基配列の一致率

表4 216bpORF領域の塩基配列の一致率

	HF2	<i>R.japonica</i>	<i>R.heilongjiangensis</i>	<i>R.raoultii</i>	<i>R.amblyommii</i>	<i>R.montanensis</i>	<i>Rickettsia</i> sp.LON
HF2	***						
<i>R.japonica</i>	96.8	***					
<i>R.heilongjiangensis</i>	97.2	99.5	***				
<i>R.raoultii</i>	98.1	96.8	97.2	***			
<i>R.amblyommii</i>	97.7	96.3	96.8	98.6	***		
<i>R.montanensis</i>	96.3	94.9	95.4	97.2	97.7	***	
<i>Rickettsia</i> sp.LON	91.7	91.2	91.7	91.7	91.2	89.8	***

```

R.japonica      GAACACGATGATACACCTCTGCATATAGCGTCTATTCTAAGTAAAGAAAATATAGTTAAAATACTACTGAAGACAGAGGCTAATC
R.heilongjiangensis GAACACGATGATACACCTCTGCATATAGCGTCTATTCTAAGTAAAGAAAATATAGTTAAAATACTACTGAAGACAGAGGCTAATC
HF2             GAACACGATGATACACCTCTGCATATAGCGTCTATTCTAAGTAAAGAAAATATAGTTAAAATACTACTGAAGACAGAGGCTAATC
R.raoultii      GAACACGATGATACACCTCTGCATATAGCGTCTATTCTAAGTAAAGAAAATATAGTTAAAATACTACTGAAGACAGAGGCTAATC
R.amblyommii    GAACACGATGATACACCTCTGCATATAGCGTCTATTCTAAGTAAAGAAAATATAGTTAAAATACTACTGAAGACAGAGGCTAATC
R.montanensis   GAACACGATGATACACCTCTGCATATAGCGTCTATTCTAAGTAAAGAAAATATAGTTAAAATACTACTGAAGACAGAGGCTAATC
Rickettsia sp.LON GAACACGATGATACACCTCTGCATATAGCGTCTATTCTAAGTAAAGAAAATATAGTTAAAATACTACTGAAGACAGAGGCTAATC
                SpRija5'            SpRijaMGB            SpRija3'
  
```

図4 real-timePCR法増幅部位85bpの塩基配列及びプライマー・プローブ配列

網掛け:プライマー・プローブ配列と異なっている塩基配列

4 考察

一般的に、TaqMan probeによるreal-timePCR法では、標的とは異なる遺伝子断片に対する非特異反応が生じることが知られている。また、標的に類似した配列を保有する検体の場合、陽性とは異なる反応を示すことも知られている。そのため、今回花岡らのreal-timePCR法においてキチマダニ由来の検体が示した弱反応が、標的とは異なる遺伝子断片あるいは類似配列を保有するリケッチア属菌のいずれの存在に起因するものか不明であった。そこで、リケッチア属共通抗原である17kDa領域のPCR法を実施したところ、リケッチア属菌の存在が確認された。これにより、今回の弱反応がリケッチア属菌によるものである可能性が高いと考えられたため、本菌をHF2株と命名し、詳細な解析を実施した。

HF2株の種を同定するため、17kDa領域394bpを用いてBLAST検索を実施したところ、HF2株は*R.raoultii*と塩基配列が99%一致しているという結果であったが、保有マダニ種はもとより、その生息地域も異なることから、別種である可能性が高いと考えられた。そこで、過去の県内調査でマダニから検出されたリケッチア属菌及びヒトへの病原性を有する既知のリケッチア属菌の塩基配列

データを用い、系統解析を実施した結果、HF2株は、県内のキチマダニが従来から保有するリケッチア属菌である可能性が高いと考えられた。またHF2株は、ヒトへの病原性を有する既知のリケッチア属菌とは明らかに異なるクラスターに属しており、過去にHF2類似株によると考えられる患者報告もないことから、ヒトへの病原性を持つ可能性は低いと考えられた。

HF2株が保有する216bpORF領域を解析したところ、プライマー対及びプローブの結合部位の塩基配列が*R.j.*とは1塩基ずつだけ異なっており、これが弱反応の原因であったと考えられた。また、216bpORF領域の保有が確認された*R.raoultii*、*R.amblyommii*、*R.montanensis*及び*Rickettsia* sp.LONについても、プライマー及びプローブ各結合部位の塩基配列の*R.j.*との違いは最大でも2塩基のみであり、同様の反応を示す可能性があった。しかし、*R.raoultii*、*R.amblyommii*及び*R.montanensis*は、海外でのみ報告されており、国内の検体についてこれらの種の存在を考慮する必要性は低いと考えられた。

216bpORF領域を保有するリケッチア属菌の中で、国内においてヒトへの病原性が報告されているリケッチア属菌は、*R.j.*及び*R.heilongjiangensis*のみである。そのため、日本紅斑熱が疑われる患者由来の検体において、花

岡らのreal-timePCR法により検出される可能性があるのは、この2菌種のみであり、今回確認されたような弱反応を起こすリケッチア属菌の存在が、本法の、国内において日本紅斑熱が疑われる患者の迅速診断法としての有用性を否定するものではないと考えられる。ただし、マダニ由来検体のようなヒトの臨床検体以外のものに本法を使用する場合は、HF2株及び*Rickettsia* sp.LONのようなリケッチア属菌又は同様の反応を起こす未知のリケッチア属菌が存在する可能性を考慮する必要がある。

本研究の概要は、平成28年度中国地区獣医公衆衛生学会において発表した。

文 献

- 1) Hanaoka N, Matsutani M, Kawabata H, Yamamoto S, Fujita H, et al.: Diagnostic assay for *Rickettsia japonica*, *Emerging Infect. Dis.*, 15, 1994-1997, 2009
- 2) 松岡保博, 濱野雅子, 磯田美穂子, 藤原香代子, 藤井理津志ら: 岡山県におけるマダニの季節的消長と日本紅斑熱リケッチア保有調査, 岡山県環境保健センター年報, 40, 73-76, 2016
- 3) Burt E. Anderson, Theodore Tzianabos: Comparative sequence analysis of a genus-common rickettsial antigen gene, *J. Bacteriol.*, 171, 5199-5201, 1989
- 4) Noda H, Ulrike G. Munderloh, Timothy J. Kurtti: Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of human and animals, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3926-3932, 1997
- 5) Mediannikov O, Matsumoto K, Samoylenko I, Drancourt M, Roux V, et al.: *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with *Dermacentor* ticks in Europe and Russia, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 1635-1639, 2008