



Title	静岡県における恙虫病の疫学と恙虫病リケッチアの生態に関する研究
Author(s)	川森, 文彦; Kawamori, Fumihiko
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第4546号
Issue Date	1994-03-24
DOI	<a href="https://doi.org/10.11501/3076866">https://doi.org/10.11501/3076866</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/51220">https://hdl.handle.net/2115/51220</a>
Type	doctoral thesis
File Information	000000272944.pdf



静岡県における恙虫病の疫学と  
恙虫病リケッチアの生態に関する研究

川 森 文 彦

①

静岡県における恙虫病の疫学と  
恙虫病リケッチアの生態に関する研究

川 森 文 彦

## 目次

緒言	1
I. 恙虫病の流行史, 発生状況および症状	2
II. <i>Rickettsia tsutsugamushi</i>	3
III. ツツガムシ	5
IV. <i>R. tsutsugamushi</i> の血清型	7
V. 恙虫病の実験室内診断法	7
VI. 本研究の目的	8
第1章: 静岡県における恙虫病の発生状況ならびに <i>Rickettsia</i> <i>tsutsugamushi</i> 感染野ネズミと媒介ツツガムシの分布	9
序文	10
材料および方法	11
成績	14
1. 恙虫病発生状況	14
2. 恙虫病患者の年齢分布および臨床症状	15
3. 富士山東山麓地区における自衛官および一般住民の抗体保有状況	17
4. 野ネズミの種類別 <i>R. tsutsugamushi</i> 分離状況および 抗体保有状況	18
5. アカネズミにおけるリケッチア分離状況および抗体保有状況	19
6. 野ネズミからのツツガムシ幼虫採取状況	22
7. 富士山東山麓におけるTullgren法によるツツガムシ幼虫採取状況	25
考察	31
要旨	36

第2章：静岡県に存在する <i>Rickettsia tsutsugamushi</i> の血清型と 媒介ツツガムシとの関係	38
序 文	39
材料および方法	40
成 績	43
1. 単クローン性抗体およびモルモット免疫血清の性状	43
2. 8種類の患者由来株の免疫学的性状	45
3. マウスに対するKarp株および8種類の患者由来株の病原性	47
4. 富士山東山麓におけるリケッチア分離状況および分離株の血清型	48
5. 静岡県の恙虫病患者血清における <i>R. tsutsugamushi</i> 6株に 対する反応性	53
考 察	57
要 旨	64

第3章：Polymerase chain reaction 法による <i>Rickettsia</i> <i>tsutsugamushi</i> DNA の検出ならびに制限酵素切断法 によるリケッチア血清型の同定	67
序 文	68
材料および方法	69
成 績	72
1. PCR の特異性	72
2. Nested PCRの感度	74
3. Nested PCRによる患者血液とツツガムシからの <i>R. tsutsugamushi</i> DNAの検出	75
4. Nested PCR増幅産物の制限酵素による切断	78
考 察	81
要 旨	83

総 括 ..... 84

謝 辞 ..... 89

引用文献 ..... 90

英文抄録 ..... 102

# 1. 志願者の募集、募集状況の推移

志願者の募集は、昭和十一年から昭和二十一年まで、毎年、四月から六月にかけて行われてきた。この間に、志願者の数は、昭和十一年は、約一千名、昭和十二年は、約二千名、昭和十三年は、約三千名、昭和十四年は、約四千名、昭和十五年は、約五千名、昭和十六年は、約六千名、昭和十七年は、約七千名、昭和十八年は、約八千名、昭和十九年は、約九千名、昭和二十年は、約一万人、昭和二十一年は、約一万人と、年々増加してきている。これは、戦時体制の進展に伴って、志願者の意識が高まってきていること、また、募集の機会が増えていること、そして、募集の条件が厳格化していることなどが原因と見られる。

## 緒 言

戦時体制の進展に伴って、志願者の意識が高まってきていること、また、募集の機会が増えていること、そして、募集の条件が厳格化していることなどが原因と見られる。このように、志願者の数は年々増加してきているが、その一方で、募集の条件も厳格化している。これは、戦時体制の進展に伴って、志願者の意識が高まってきていること、また、募集の機会が増えていること、そして、募集の条件が厳格化していることなどが原因と見られる。



## I. 恙虫病の流行史，発生状況および症状

恙虫病の発生地域は日本だけでなく，韓国，中国，台湾，ロシア，タイ，マレーシア，インドネシア，ニューギニア，オーストラリア北部，インド，パキスタンなど広範囲に及んでおり，国際的にも重要な感染症となっている<sup>11, 15, 61)</sup>。

我が国では，本病は古くからケダニ，アカムシなどと呼ばれる虫に刺されることにより発病する致命率の高い地方病として，東北地方の信濃川，阿賀野川，雄物川および最上川流域において恐れられていた<sup>26)</sup>。しかし，1948年に富士山麓（静岡県）で演習を行った米軍兵士10数名が発病し，患者血液から *R. tsutsugamushi* が分離された<sup>16)</sup>。このことは，それまでの恙虫病の発生地域の常識を打ち破るものであったので，研究者の注目を集め，伊豆七島，神奈川県，高知県，千葉県などで相次いで患者が報告された<sup>67)</sup>。1950年代前半には全国で年間100名以上の届出患者がみられたが，1964年以降，全国の年間届出数は20例以下に減少していった。しかし，1976年頃から患者発生数は再び増加し始め，1984年の948名を最高に，最近では毎年800名前後に達している（図1）。また，発生地域も拡大傾向にあり，現在では北海道と沖縄を除く，ほぼ全国で発生が確認されている<sup>76)</sup>。

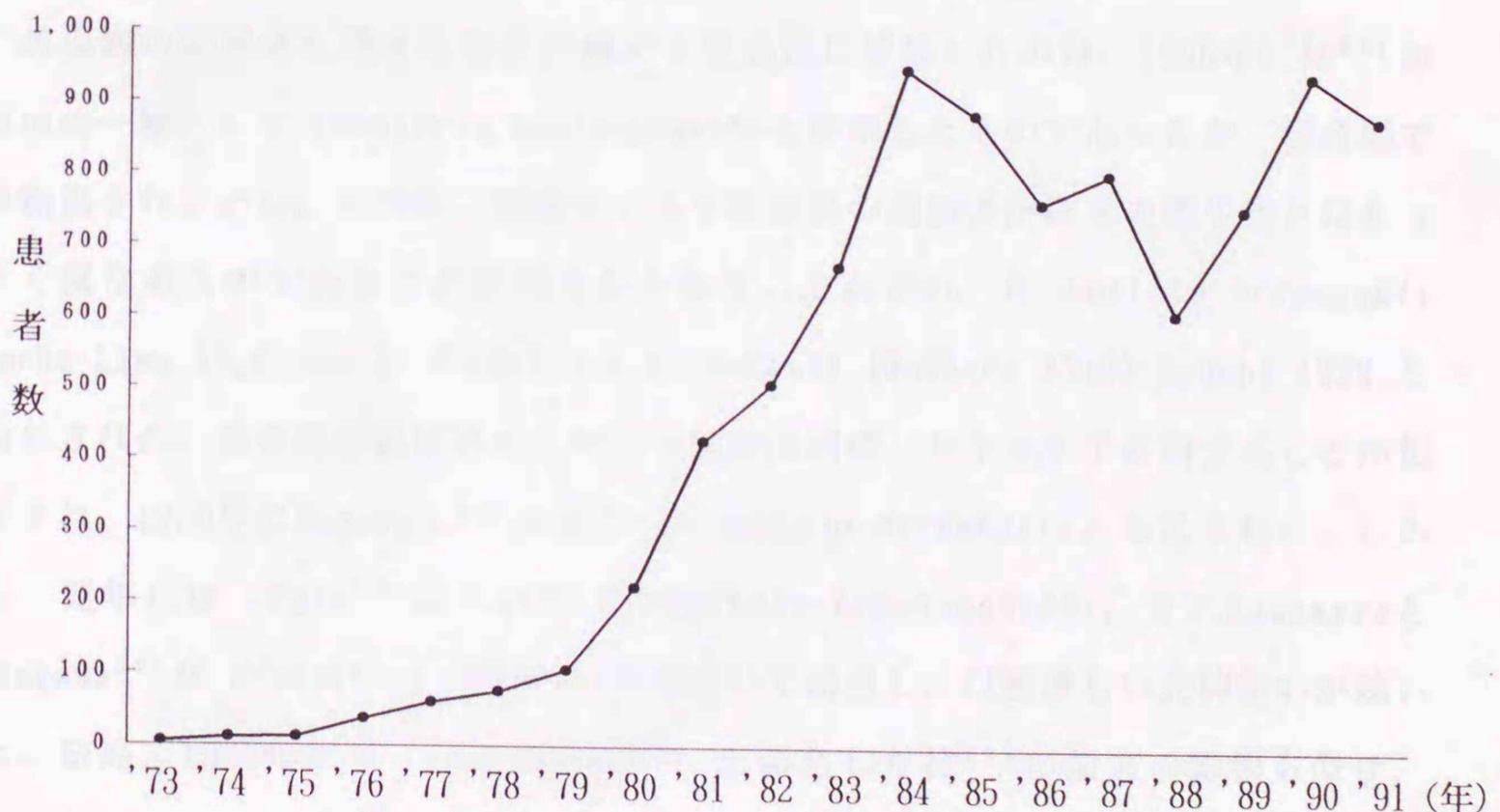


図1. 全国届出患者数の推移

本病の潜伏期間は7～14日で、頭痛や全身の倦怠感などの前駆症状の後に38℃以上の高熱が続き、発熱後3～4日経過すると全身に発疹が現れる。ツツガムシの刺し口は、発病時には潰瘍あるいは痂皮化病巣として確認されることが多く、診断上の大きな特徴となる。また、刺し口の部位を支配するリンパ節の腫脹もしばしば認められる。治療にはテトラサイクリン系の抗生物質が用いられるが、感染症に汎用されるβラクタム系抗生物質は本病には無効であり、適正治療が遅れると汎発性血管内凝固症候群(DIC)<sup>8)1)</sup>に陥って死亡することもある。

最近になり発生数が急増した原因としては、(a)以前はテトラサイクリンやクロラムフェニコールが熱性疾患に多用されていたので典型的な症状が現れる前に治癒することが多かった、(b)自然環境の変化、農薬の制限などによりツツガムシが増加した、(c)ツツガムシのリケッチア保有率が上昇した、(d)情報の発達・関心の増大により恙虫病の正確な発生数が把握できるようになった、などの説が唱えられているが<sup>35, 75, 100)</sup>、いずれも現状を説明するには充分ではなく、複数の要因が重なりあっているものと思われる。

## II. *Rickettsia tsutsugamushi*

恙虫病の病原体に関する報告が初めて学術誌に登場したのは、1906年に林<sup>21)</sup>が原虫の一種として *Theileria tsutsugamushi* と提唱したものであったが、学者間では無視されていた。その後、発疹チフスや紅斑熱の病原体が従来の微生物とはまったく異なるものであることが明らかとなり、それぞれ、*Rickettsia prowazekii* Rocha-Lima 1916 および *Rickettsia rickettsii* (Wolbach 1919) Brumpt 1922 と命名された。恙虫病の病原体もこれらの病原体同様、リケッチアに属することが想定され、1930年にNagayoら<sup>50)</sup>により *Rickettsia orientalis* と命名された。しかし、翌年には Ogata<sup>53)</sup> がこれに *Rickettsia tsutsugamushi*、また Kawamura と Imagawa<sup>38)</sup> が *Rickettsia akamushi* と相次いで命名し、以後激しい先陣争いが続いた。結局、1920年に *T. tsutsugamushi* と命名した林<sup>22)</sup> の論文の影響も受け、1948年に発刊された Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第6版<sup>7)</sup>

には *Rickettsia tsutsugamushi* (Hayashi) Ogata 1931が採用され、現在に至っている。

現在、リケッチア目 order *Rickettsiales* は3科 (*Rickettsiaceae*, *Bartonellaceae*, *Anaplasmataceae*), 14属, 43種に分類されている<sup>107)</sup>。 *R. tsutsugamushi* が属する genus *Rickettsia* には12種が含まれ、抗原性などから発疹チフス群, 紅斑熱群および恙虫病群の3群に分けられている。発疹チフス群には発疹チフスの病原体である *R. prowazekii* など3種が, また紅斑熱群にはロッキー山紅斑熱の病原体である *R. rickettsii* を始めとする8種が含まれるが, 恙虫病群に属するのは *R. tsutsugamushi* だけ1種である。

*R. tsutsugamushi*の形状は  $1.0\sim 2.0\ \mu\text{m} \times 0.5\sim 0.7\ \mu\text{m}$ の短桿菌状(図2)で, 細胞質内のみで2分裂により増殖する。実験的な宿主域は広く, チャイロコメノゴミムシダマシ幼虫(血体腔内)<sup>24)</sup>, コロモジラミ(消化管)<sup>108)</sup>, 発育鶏卵(卵黄囊), 哺乳類の培養細胞<sup>9)</sup>などでの培養の報告があるが, 現在では, 通常はL-929やVeroなどの培養細胞あるいはマウスにより培養されている。

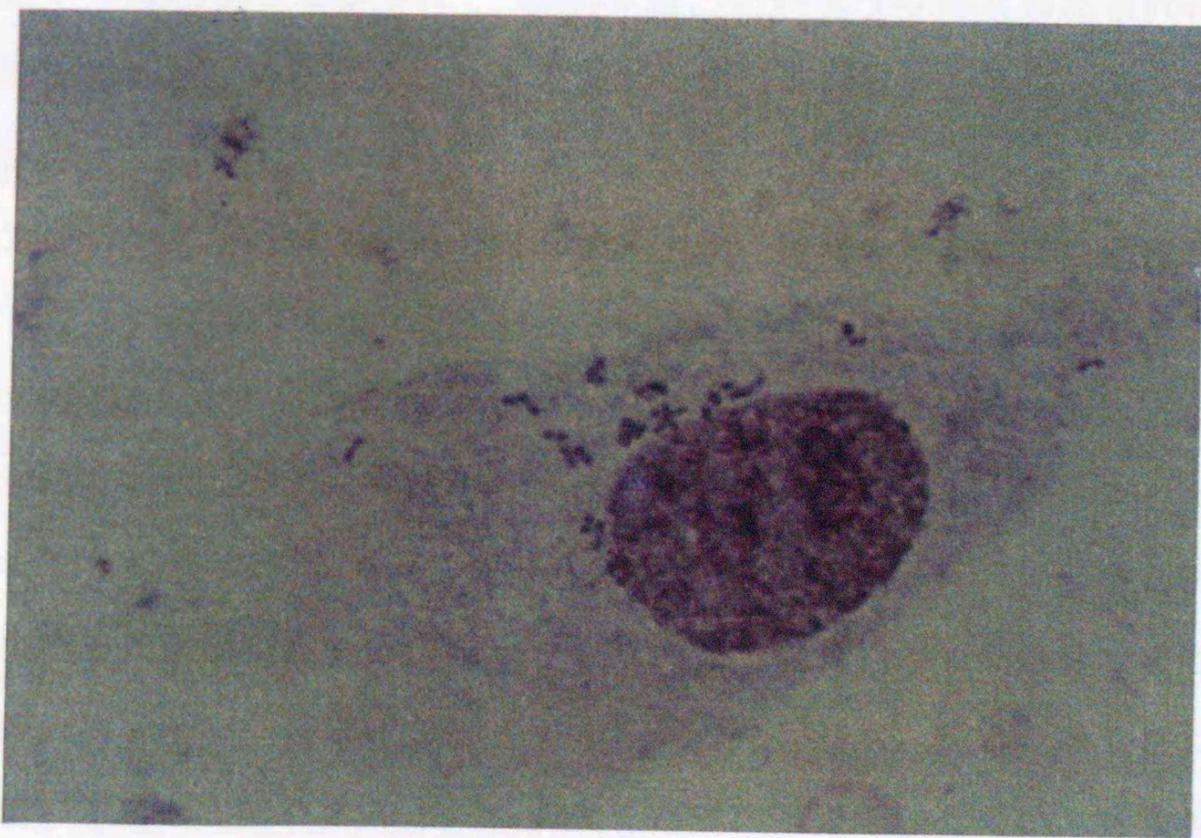


図2. マウス腹腔内細胞中の *R. tsutsugamushi* (ギムザ染色;  $\times 1,000$ )

### Ⅲ. ツツガムシ

ツツガムシは成虫でも体長1mm程度のダニの一種で、国内には80種類以上生息している。このうち、*R. tsutsugamushi* の保有が確認されたのは13種類<sup>2)</sup>であるが流行地の疫学状況やツツガムシの嗜好性などから、本病のベクターとして重要な種類としてはアカツツガムシ *Leptotrombidium akamushi*、タテツツガムシ *Leptotrombidium scutellare* およびフトゲツツガムシ *Leptotrombidium pallidum* (図3) の3種があげられている<sup>35)</sup>。

ツツガムシは幼虫(体長0.2~0.3mm)のときに通常1度だけ哺乳類や鳥類に寄生し組織液を吸い、他の世代は土中で土壤動物の卵などを餌としている(図4)。*R. tsutsugamushi* はツツガムシの共生体として、成虫から卵へ垂直伝播することにより維持されている<sup>59, 60, 63, 87)</sup>。恙虫病は有毒ツツガムシ幼虫が刺咬した際に唾液腺内のリケッチアがヒトの体内に移行することにより引き起こされる。恙虫病流行地では媒介ツツガムシの主要な宿主である野ネズミからも *R. tsutsugamushi* が高率に分離される<sup>30, 62)</sup>。リケッチア保有野ネズミの組織液を吸入することによりツツガムシ幼虫に *R. tsutsugamushi* が伝播され、このリケッチアがまれに経卵伝播するという報告もあるが<sup>97)</sup>、一般的には、このような場合は次世代には移行しないものと思われ、野ネズミはリケッチアの病原巣とは成り難いと考えられている<sup>60, 96)</sup>。

東北地方の特定河川流域で7月下旬~9月上旬に猛威を振るっていた恙虫病のベクターとしては、流行地域のみで夏期に多数採取されたアカツツガムシが考えられた<sup>88)</sup>。一方、第2次世界大戦後、東北~九州の広範囲で春と秋に確認されている恙虫病は河川流域にこだわらず発生しており、タテツツガムシとフトゲツツガムシにより主として媒介されているものと思われている<sup>34)</sup>。便宜的に前者と後者を、古典型恙虫病と新型恙虫病あるいはアカツツガムシ媒介性恙虫病と非アカツツガムシ媒介性恙虫病と呼び、区別する場合もある<sup>33, 34)</sup>。なお、前者は東北における河川敷の改修の影響などでほとんどみられなくなり、最近増加している恙虫病はほとんどが後者である。

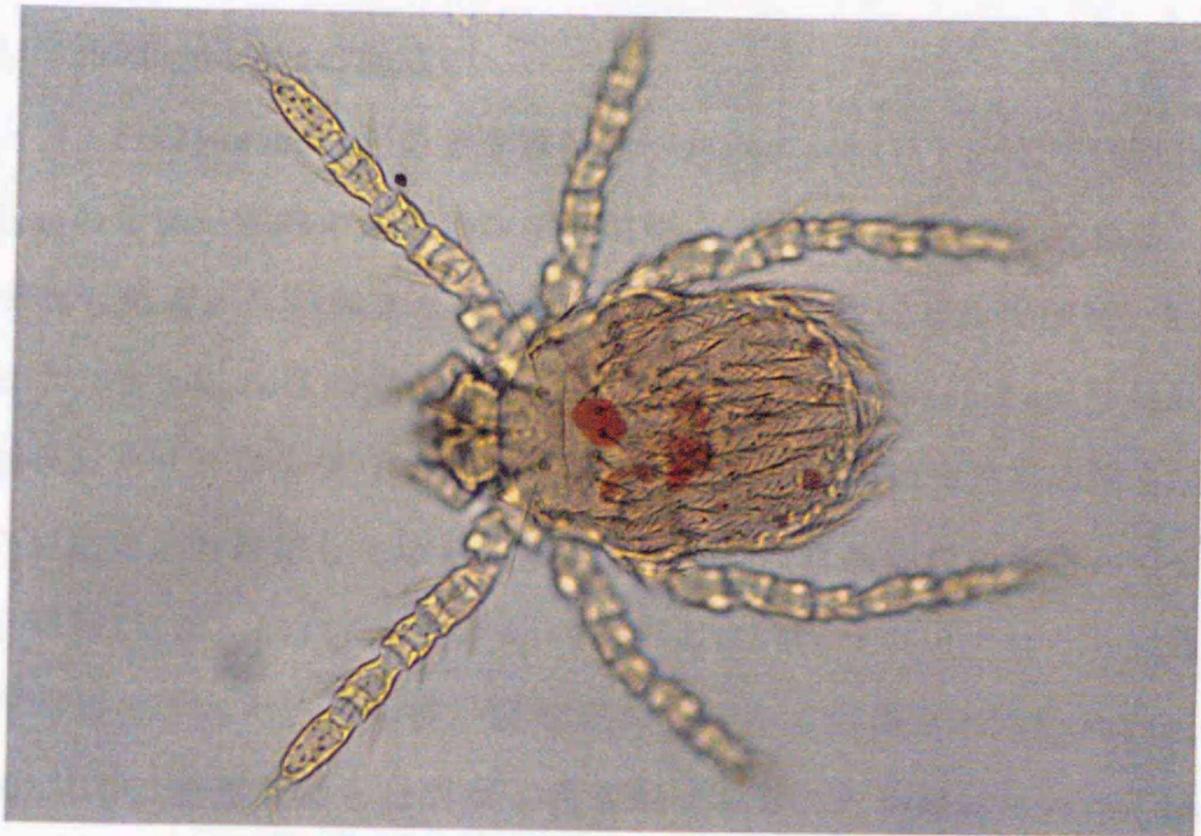


図3. フツゲツガムシ幼虫 (×200)

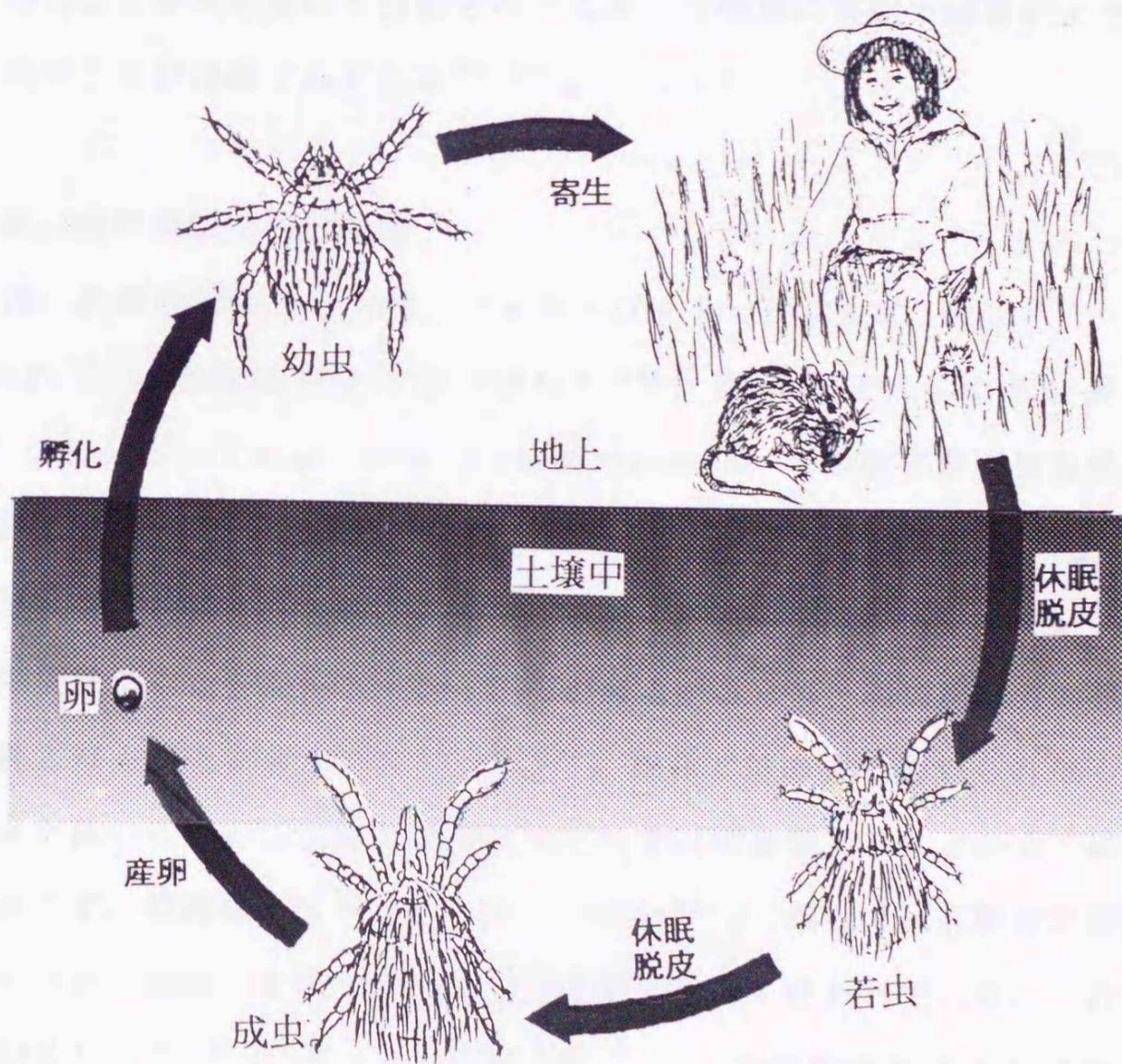


図4. ツツガムシの生活環

#### IV. *R. tsutsugamushi*の血清型

現在、*R. tsutsugamushi*の標準株 (prototype strain) として Gilliam, Karp および Kato の 3 株が国内の血清診断用の抗原として広く用いられている。これらの株はいずれも患者から分離されたもので、Gilliam 株はビルマ国境、Karp 株はニューギニア、また Kato 株は新潟県において発見された。Shishido<sup>72)</sup> は我が国において分離されたリケッチアはこれら 3 株のいずれかと高い交差反応性を示すことを補体結合反応により確認している。しかし、1984年に新潟県の患者から分離された Shimokoshi 株<sup>92)</sup> は、Gilliam 株、Karp 株および Kato 株のいずれとも交差反応性の低いことが報告された。その後、宮崎県の患者から分離された Kawasaki 株<sup>111)</sup> と Kuroki 株<sup>56)</sup> も、標準 3 株とは異なる血清型であることが確認された。Shimokoshi, Kawasaki および Kuroki の各株はいずれもサイクロフォスファミドの投与により免疫抑制を施したマウスを用いて分離されており、その後の実験で通常のマウスには病原性が弱いことが確認されている<sup>89, 90)</sup>。

#### V. 恙虫病の実験室内診断法

恙虫病の血清診断法としては、ワイル・フェリックス反応 (WF)<sup>109)</sup>、補体結合反応 (CF)<sup>72)</sup>、間接蛍光抗体法 (IFA)<sup>8, 32)</sup>、間接免疫ペルオキシダーゼ反応 (IP)<sup>77)</sup> などがあげられる。WF は *R. tsutsugamushi* との間に共通抗原性を有すると思われる *Proteus mirabilis* OX-K 株に対し恙虫病患者血清が凝集能を示す性質を利用したものなので特異性に乏しく、プロテウスの感染はもとよりレプトスピラ症などの疾患に対しても陽性となることがある。さらに、恙虫病患者の感染初期血清は陰性となることが多いので<sup>65, 80, 98)</sup>、現在ではあまり用いられなくなった。CF は感度が低いことと、手技が複雑で検査に 2 日間を要することから、早期診断としては適さず、最近はあまり用いられていない<sup>98)</sup>。現在では高感度で信頼性が高い IFA と IP が、全国の大学や衛生研究所を中心に広く使われている。これらの他にも ELISA 法<sup>12, 13, 18)</sup> やドットプロット法<sup>91, 105)</sup> が血清診断法として試みられている。

確定診断としては患者血液から*R. tsutsugamushi*をマウス（腹腔内接種）や培養細胞を用いて分離することが最も確実であるが、リケッチアが増殖し判定可能になるまでに10日以上を要することから、早期診断には適していない。最近、病原体の遺伝子を直接検出する方法として実用化され始めた Polymerase chain reaction (PCR)法<sup>64)</sup>は、検出感度が高く、短時間で判定できるので、抗体上昇前の恙虫病患者にも対応できる早期診断法として開発が期待されている。

## VI. 本研究の目的

静岡県は非アカツツガムシ媒介性恙虫病が国内で初めて発見された地域であり、現在でも毎年多数の患者の届出がなされている。国内有数の常在流行地である富士山東山麓を中心とした発生に関しては幾つかの報告<sup>47, 52)</sup>がみられるものの、これまで静岡県全体で本格的な調査は行われたことはない。そこで、本研究では、まず、全県下で恙虫病の発生状況、ツツガムシの分布および *R. tsutsugamushi* の野ネズミにおける浸淫状況を調査し、静岡県における恙虫病の疫学的な実態の把握に努めた。これらの資料を基にし、本県におけるベクターの種類や患者発生地の偏在の原因などを考察した。次に、著者は富士山東山麓において恙病患者、アカネズミ、タテツツガムシおよびフトゲツツガムシからリケッチアを分離し、単クローン性抗体を用いて血清型別を行うことにより、リケッチアの血清型と媒介ツツガムシの種類の間係を検討した。さらに、恙虫病の早期診断のための2段階PCR法 (nested PCR) ならびに感染リケッチアの血清型別のための制限酵素によるPCR増幅産物の切断法を開発し、その実用性を検討した。

## 第 1 章

静岡県における恙虫病の発生状況ならびに  
*Rickettsia tsutsugamushi* 感染野ネズミと

### 媒介ツツガムシの分布

## 序 文

静岡県における恙虫病の発生報告は1934年に富士山東山麓で演習中の旧日本軍兵士が臨床的に本病であると診断されたのが最初であるが<sup>66)</sup>、当時は東北地方の3大河川流域のみで見られる地方病であると信じ込まれていたため、この報告は無視されていた。1948年になり、米軍兵士10数名が富士山東山麓における演習に際して発病し、患者血液から *R. tsutsugamushi* が分離されたことから、本県にも本病の存在することが確実になった<sup>16)</sup>。この報告は非アカツツガムシ媒介性恙虫病の最初のものでもあり、以後の全国的な調査<sup>88)</sup>の発端ともなった。

本県においては1948年から1963年までの15年間に富士山東山麓と伊豆半島で200例近い症例が報告されている<sup>52)</sup>。その後の10年間は患者がほとんどみられなかったが、1970年代に入り再び患者数が増加し始め、1978年以降は毎年10名以上の患者の届出がなされるようになった<sup>30, 39)</sup>。

一方、我が国における恙虫病の媒介種としては、アカツツガムシ、タテツツガムシおよびフトゲツツガムシの3種類があげられているが、最近の流行の大半はタテツツガムシとフトゲツツガムシにより媒介されていることが示唆されている<sup>34)</sup>。また、Sasa<sup>67)</sup>は、本病の疫学状況と媒介ツツガムシとの関係から、我が国で発生する恙虫病を地域別に4つの型に分類した。これによると静岡県は広い範囲にみられるTsurumi-type (媒介種：フトゲツツガムシ) と伊豆七島、千葉、南九州などに分布するShichito-type (媒介種：タテツツガムシ) の混在する地域となっている。実際に、野口ら<sup>52)</sup>は1952年から1954年までの2年間、静岡県において野ネズミにおけるツツガムシ寄生状況を調査し、タテツツガムシとフトゲツツガムシが生息していることを報告している。

そこで、著者は間接蛍光抗体法 (Indirect fluorescent antibody technique: IFA) により県内の届出患者について血清診断を行うとともに、発生状況や臨床所見についても調査した。さらに、本県での *R. tsutsugamushi* の浸淫状況ならびにツツガムシ生息状況を把握するために、県内各地で野ネズミを捕獲し、リケッチア

分離，抗リケッチア抗体の測定および寄生ツツガムシの採取を試みた。また，本病の発生が集中している富士山東山麓（御殿場市および小山町）において，Tullgren法により土壌中のツツガムシを採取し，媒介ツツガムシの多発生息環境を検討した。

## 材料および方法

### 1. 恙虫病患者，自衛官および一般住民の血清

1982年から1991年までの10年間に静岡県において保健所に届出された恙虫病の患者数は151名であったが，そのうち147名の血清（71名は組血清）を入手した。また，1990年に御殿場市と小山町の4駐屯地に所属する自衛官930名および有隣厚生会富士病院（御殿場市）に恙虫病以外の用件で来院した503名から採取した血清を検査に供した。これらの血清は使用時まで $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した。

### 2. 野ネズミの捕獲および日齢査定

1983年から1990年までの8年間に静岡県内23市町村の主に雑木林や田畑周辺の48地点において延べ111回，恙虫病の発生が多い3～4月および10～12月を中心に金網製箱罠あるいはシャーマン・トラップにより野ネズミを捕獲した。餌として前者には落花生油を塗ったサツマイモを，後者にはひまわりの種やオートミールを用い，一晩放置しておき，翌朝回収した。なお，アカネズミの日齢査定は水晶体の乾燥重量の測定により行った<sup>86)</sup>。

### 3. 使用したリケッチア株および抗原塗抹スライドの作製

*R. tsutsugamushi*は，新潟薬科大学微生物学教室より分与を受けた Gilliam, KarpおよびKatoの各標準株を用いた。リケッチア株の培養はTamuraらの方法<sup>95)</sup>に従い，L-929細胞を用いて行った。ギムザ染色によりリケッチア粒子が多数確認されるようになった細胞をセルスクレイパー（Costar社製）を用いて培養フラスコ（Costar社製）より剥がし， $200 \times g$ で10分間遠心した。3種類の標準株感染細胞の沈渣を，それぞれ少量のPBS（pH 7.2）に浮遊させ，12ウェルのテフロンコー

ティングスライド (Cell-line社製) の各ウェルに混合しないように塗抹した。乾燥後、冷アセトンで10分間固定したものを IFA用の抗原塗抹スライドとして用いた。なお、スライドの保存は $-80^{\circ}\text{C}$ で行った。

#### 4. IFA による抗体測定法

血清はPBS を用いて1:10から2倍階段希釈した後、各希釈血清を $10\mu\text{l}$ ずつ抗原塗抹スライドの各ウェルに滴下した。なお、患者血清については、IgGおよびIgM抗体測定用に各希釈につき2ウェルずつ用意した。このスライドを湿潤箱中で $37^{\circ}\text{C}$  1時間反応後、PBS で3回、合計15分間洗浄し、直ちに風乾した。2次抗体として患者血清には、FITC標識抗ヒトIgG ( $\gamma$ 鎖) ヤギ血清および抗ヒトIgM ( $\mu$ 鎖) ヤギ血清 (ともにTago社製) の両方を、自衛官と一般住民については前者のみを用いた。一方、アカネズミとヒメネズミの血清については抗ラットIgG FITC標識ウサギ血清 (MBL社製) を、またハツカネズミ血清の場合は抗マウスIgG FITC標識ウサギ血清 (MBL社製) を使用した。これらの2次血清はPBS により30倍希釈し、1次血清と同様に反応させてから、洗浄を行った。

観察にはUV励起フィルターユニットをセットした落射型蛍光顕微鏡 (オリンパスBH-2) を用い、400倍において細胞質内にリケッチア粒子を確認できた最高希釈倍率を抗体価とした。なお、患者の血清診断の場合、IgM抗体が1:20以上か、組血清で4倍以上の抗体上昇がみられたものを陽性とした。

#### 5. 野ネズミからの *R. tsutsugamushi* の分離

野ネズミの脾臓をSPG ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.8mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7.2mM,  $\text{L}$ -グルタミン酸 4.9mM, サッカロース 218mM, ペニシリンG 200単位/ml; pH 7.0) で10%乳剤としたものを4~8週齢のマウス (ddY, SLC社) 2~3頭の腹腔内に $0.5\text{ml}$ ずつ接種した。3週間飼育、観察した後に解剖し、これらの腹膜塗抹標本を作製した。次に、抗 *R. tsutsugamushi* 抗体陽性の恙虫病患者血清を用いた IFAにより塗抹標本を染色し、リケッチア粒子が確認されたものを分離陽性とした。陰性のものはマウス脾臓を材料としてさらに3週間隔で2代継代し、リケッチアの分離を試みた。

#### 6. 野ネズミからのツツガムシ幼虫の採取および同定

野ネズミを解剖して、内臓を除去した後、水を張ったシャーレの上に3日間吊るした。水面に落下したツツガムシを小筆ですくい、ガムクロラール液（アラビアゴム8g、抱水クロラール30g、蒸留水10ml、氷酢酸1ml、グリセリン2ml）を用いてスライドグラス上に封入し、佐々のツツガムシ幼虫の同定法に従い<sup>69)</sup>、生物顕微鏡下で同定した。

#### 7. Tullgren法による土壌からのツツガムシ幼虫の採取

1988年1月から12月まで毎月中旬に1回、図14に示す小山町のZ地点のススキ草地、雑木林およびヒノキ林から、10cm×10cm×5cmの土壌採取枠を用いて、それぞれ6サンプル（3l）ずつ土壌を採取してTullgren装置<sup>101, 103)</sup>にかけ、ツツガムシ類を選別した。

1988年9～11月の期間に、それまでに報告のあった富士山東山麓の患家の周辺を含む草地、林縁、水田畦畔および路傍から2～10lの土壌サンプルを20cm×20cm×5cmの採取枠またはスコップで採取してTullgren装置にかけた。なお、この年の主だった調査地点は、図14に小さな丸印で示した。

1989年には、前年の調査結果を参考とし、調査時期を遅らせて10～11月とした。また、タテツツガムシの生息が予測された山脚部および水田地帯にある林の周辺部を重点的に調べるとともに、さらに調査地点が御殿場市から小山町一円に及ぶように努めた。主だった調査地点は図14に大きな丸印で示した。

1988年と1989年の両年、秋期の調査地点数は55（延べ数77）箇所であった。なお、全調査地点で可及的多数のツツガムシ幼虫を得るために、野ネズミの坑道の多い部分を探して土壌サンプルを採取するように努めた。

1989年11月30日にタテツツガムシの多発地（図14, N）で採取した土壌サンプルから本種幼虫が多数見いだされたので、その残存個体が幼虫の状態越冬する可能性を考慮に入れて、1990年2月17日に再度土壌サンプル10個（20l）を採取してタテツツガムシの生息調査を繰り返した。この日にはフトゲツツガムシの多発地である水田畦畔（図14, R）と路傍（図14, M）でもそれぞれ5サンプル（10l）を採取して、本種幼虫の冬期の生息状況を調査した。

Tullgren法で得られたタテツツガムシとフトゲツツガムシの幼虫の大半は *R. tsutsugamushi* の分離に供するために、スライドグラスに封入せずに実体顕微鏡下で直接観察して種を同定した。その他の種類のツツガムシは野ネズミから採取した虫体と同様の方法で封入と同定を行った。

## 成 績

### 1. 恙虫病発生状況

1982年から1991年までの10年間のうち最も届出患者数が多かったのは1990年の30名で、最も少なかったのは1983年の10名であった（図5）。血清が入手された147例中、IFAにより110例は陽性、18例は陰性と診断されたが、残りの19例はIgM抗体が1:20未満の感染初期血清しか入手できず診断することはできなかった。以下、血清学的に真正患者と確認された110症例を恙虫病患者として検討した。

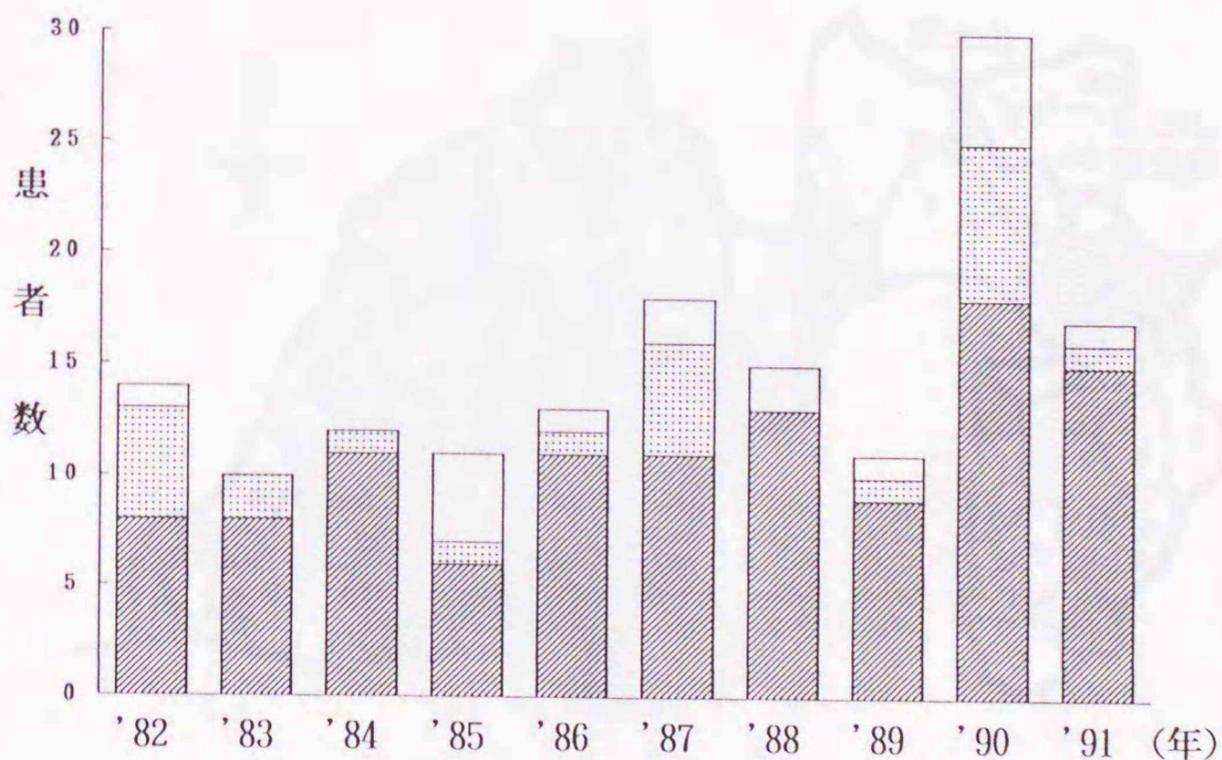


図5. 静岡県における年次別恙虫病届出患者数。 ▨ 抗体陽性患者数, ▤ 判定できなかった患者数, □ 抗体陰性患者数.

本病の発生は静岡県東部から伊豆にかけてと浜名湖周辺の19市町村で確認されたが、中部では患者がみられなかった（図6）。患者が特に多かったのは富士山東山麓に位置する御殿場市と小山町（自衛隊東富士演習場を含む）であり、この地域での発生数は全体の72.7%（80/110）に達した（表1）。10年間の人口10万人当たりの罹患率もこの地域は77.6と他の地域に比べ顕著に高かった。

本病の発生は全体の82.7%（91/110）が10～12月の3ヵ月に集中し、6～8月の夏期には発生はみられなかった。地域別にみると富士山東山麓では10～11月、東部では12月、西部では11月に多くみられたが、伊豆においては11～5月まで連続して1～3例の散发患者が確認された。

## 2. 恙虫病患者の年齢分布および臨床症状

患者は20歳代から60歳代に多く、最も発生数が多かったのは50歳代で全体の25.5%（28/110）を占めた（表2）。また、男性の患者は女性に比べ2倍以上多かった。患者の職業としては農業従事者（18名）、自衛官（16名）、主婦（14名）などが多数を占めた。

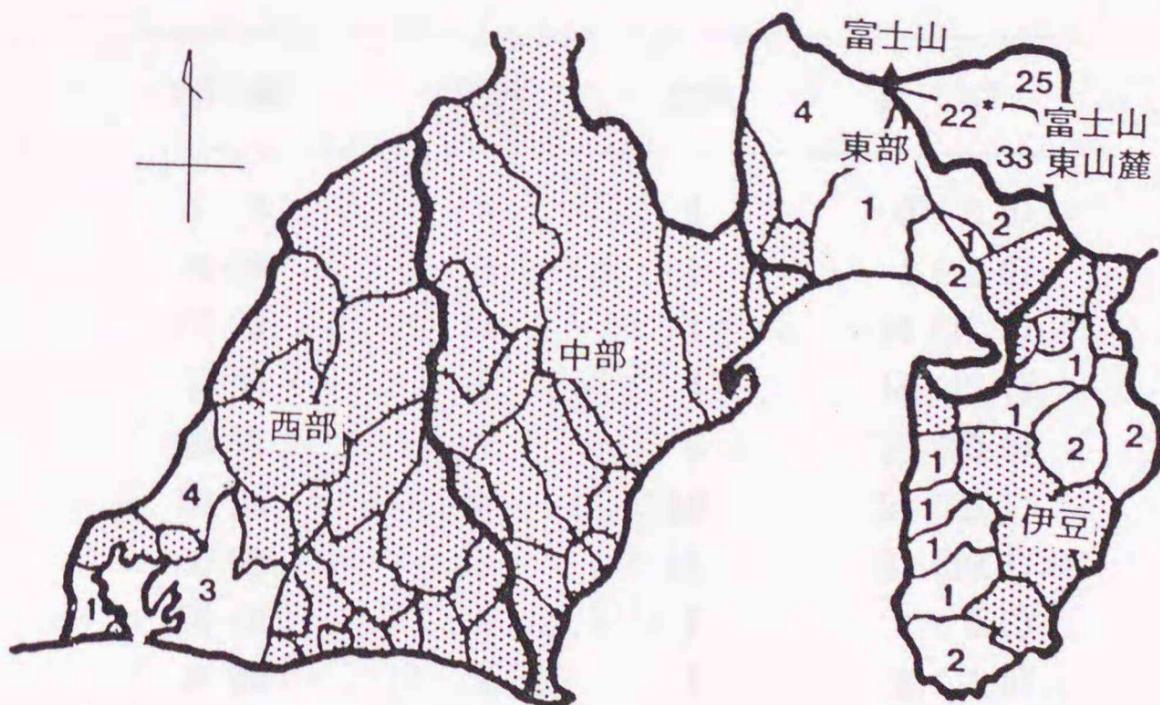


図6. 市町村別恙虫病患者数（1982～1991年）。数字：患者数，  
 ■■■ 未発生市町村， \* 自衛隊東富士演習場での感染者数。

表1. 月別恙虫病発生状況 (1982~1991年)

地 域	月別発生数												計	罹患率 <sup>a)</sup>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
富士山東山麓	1	0	1	2	0	0	0	0	3	40	28	5	80	77.6
東 部	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	6	10	1.3
伊 豆	2	1	3	2	1	0	0	0	0	0	2	1	12	3.6
中 部	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
西 部	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	5	1	8	0.6
計	4	1	4	4	3	0	0	0	3	42	36	13	110	3.0

<sup>a)</sup> 10年間(1982-1991)の人口10万人当たりの罹患率.

表2. 恙虫病患者の年齢分布

年 齢	男性	女性	計 (%)
≤ 9	0	0	0 (0.0)
10-19	3	1	4 (3.6)
20-29	13	1	14 (12.7)
30-39	10	4	14 (12.7)
40-49	17	6	23 (20.9)
50-59	18	10	28 (25.5)
60-69	10	11	21 (19.1)
70-79	3	1	4 (3.6)
≥ 80	1	1	2 (1.8)
計	75	35	110

恙虫病の主要な臨床所見の出現率は、発熱が98.2% (108/110)、発疹が97.3% (107/110)、刺し口が90.9% (100/110) といずれも高率であった。全ての症例においてこれらの臨床所見の最低2種類は確認されており、3種類ともみられた患者は86.4% (95/110) を占めた。また、68.2% (75/110) の患者は届出時までに38℃以上の高熱が確認されている。刺し口のみられた部位には胸腹部 (30名)、下腿部 (24名) などが多かった。

### 3. 富士山東山麓地区における自衛官および一般住民の抗体保有状況

*R. tsutsugamushi* に対する IgG抗体 (1:10以上) の保有率は、自衛官では 8.0% (74/930)、また一般住民では 3.8% (19/503) となり、両者の間には  $\chi^2$  検定 (1%以下の危険率) で有意差が認められた (表3)。加齢に伴った抗体保有率の上昇はみられず、また一般住民の男女間での抗体保有率に関しても有意差が認められなかった。抗体陽性血清の抗体価は1:20~1:40をピークとする一峰性の分布が示され、最高抗体価は 1:640であった。

表3. 富士山東山麓における自衛官および一般住民の  
*R. tsutsugamushi* に対する抗体保有状況

年 齢	自衛官		一般住民		
	男性	(%)	男性	女性	計 (%)
10-19	0/8 <sup>a)</sup>	(0.0)	0/6	1/12	1/18 (5.6)
20-29	38/396	(9.6)	2/15	0/25	2/40 (5.0)
30-39	16/244	(6.6)	2/25	2/31	4/56 (7.1)
40-49	17/235	(7.2)	1/28	2/47	3/75 (4.0)
50-59	3/47	(6.4)	2/35	1/52	3/87 (3.4)
60-69	0/0		1/62	3/54	4/116 (3.4)
≥70	0/0		1/40	1/71	2/111 (1.8)
計	74/930	(8.0)	9/211	10/292	19/503 (3.8)

<sup>a)</sup> 陽性数/検体数

#### 4. 野ネズミの種類別 *R. tsutsugamushi* 分離状況および抗体保有状況

静岡県で捕獲されたアカネズミ *Apodemus speciosus* (385頭), ヒメネズミ *Apodemus argenteus* (67頭), ハタネズミ *Microtus montebelli* (14頭) およびハツカネズミ *Mus musculus* (3頭) の4種類, 合計469頭を検査に供した。このうち, 23.9% (112/469) から *R. tsutsugamushi* が分離されたが, ヒメネズミとハタネズミの各々1頭から分離された2例以外は, 全てアカネズミからの分離例であり, アカネズミにおける分離率は28.6% (110/385) であった (表4)。また, ハタネズミ以外の455頭中, 148頭 (32.5%) は *R. tsutsugamushi* に対する抗体を保有していた。アカネズミにおける抗体保有率は37.6% (145/385) と高かったが, ヒメネズミではわずか4.5% (3/67) から抗体が確認されただけであり, ハツカネズミは全て陰性であった。

表4. 野ネズミ種類別リケッチア分離状況および抗体保有状況

野ネズミの種類	検査頭数	リケッチア分離数 (%)	抗体保有数 (%)
アカネズミ	385	110 (28.6)	145 (37.6)
ヒメネズミ	67	1 (1.5)	3 (4.5)
ハタネズミ	14	1 (7.1)	NT <sup>a)</sup>
ハツカネズミ	3	0 (0.0)	0 (0.0)
計	469	112 (23.9)	148 (32.5)

<sup>a)</sup> NT: 検査せず.

### 5. アカネズミにおけるリケッチア分離状況および抗体保有状況

捕獲数の多かったアカネズミにおける地域別のリケッチア分離率および抗体保有率を図7に示した。リケッチア分離率は富士山東山麓，東部および伊豆では，それぞれ47.6% (40/84)，40.7% (44/108) および46.8% (22/47) といずれも高率であったが，西部では3.9% (4/102) にとどまり，中部ではまったく分離されなかった。抗体保有率も分離率と同様，富士山東山麓，東部および伊豆では，それぞれ61.9% (52/84)，53.7% (58/108) および55.3% (26/47) といずれも高かったが，中部 (2.3% ; 1/44) と西部 (7.8% ; 8/102) では低率であった。なお，富士山東山麓，東部および伊豆の3地域のアカネズミ間ではリケッチア分離率，抗体保有率ともに $\chi^2$ 検定 (危険率5%以下) で有意差は認められなかった。また，これらの地域ではほとんどの調査地点でリケッチアが分離されたが，西部においてリケッチアが確認されたのは浜名湖周辺の3地点のみであった (図8)。抗体のみ確認された調査地点も西部では浜名湖周辺に限局されており，中部においては静岡市で抗体保有ネズミが1頭確認されたただけであった。

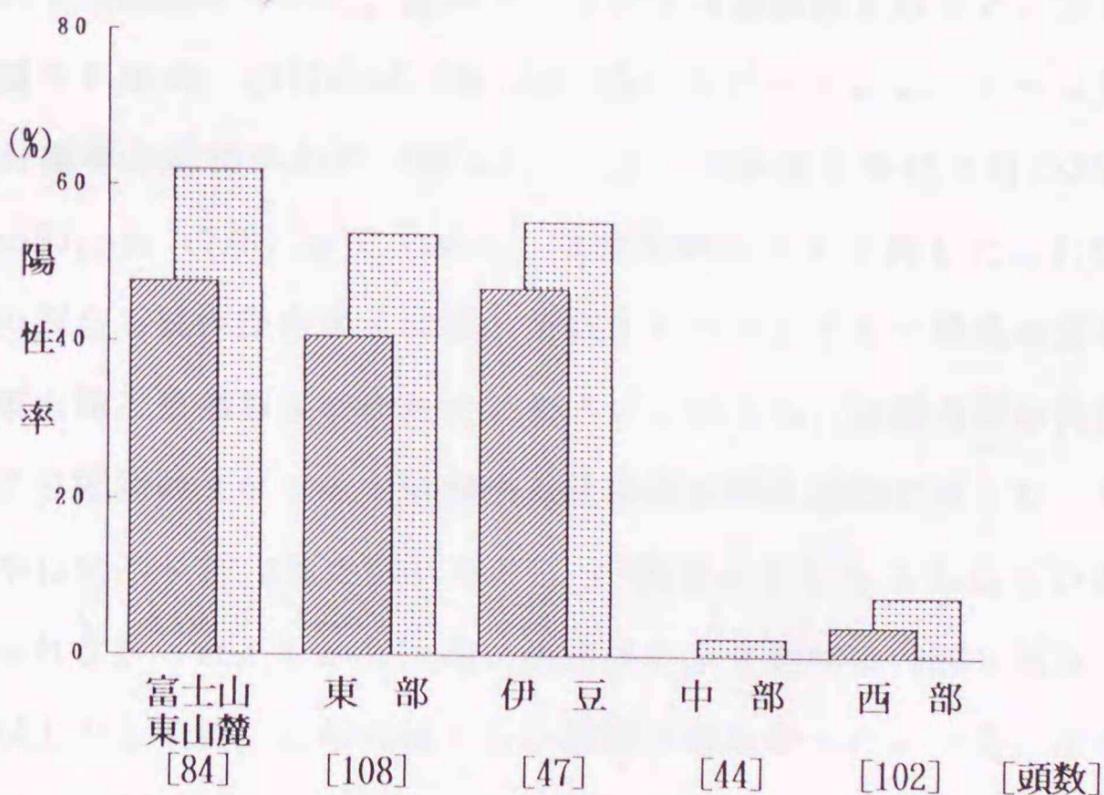


図7. アカネズミにおける地域別リケッチア分離状況 (▨) および抗体保有状況 (⋯)

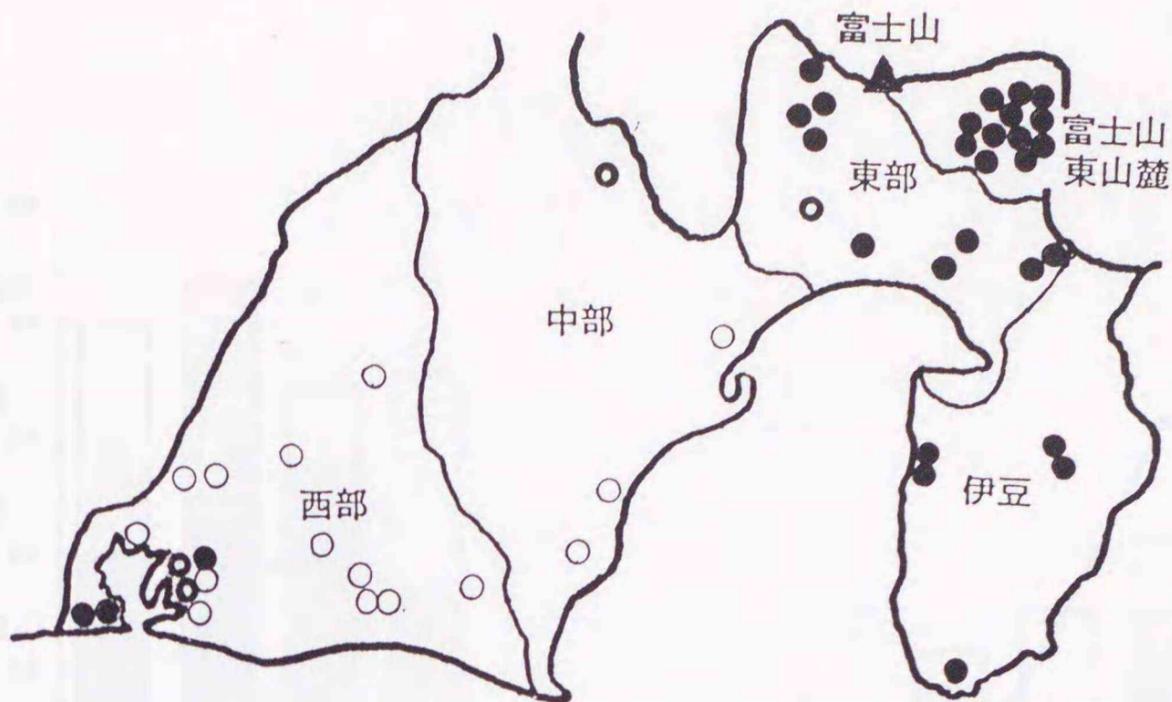


図8. アカネズミの捕獲地点別リケッチア分離および抗体保有状況.

● リケッチア分離陽性ネズミ捕獲地, ◐ 抗体保有ネズミ捕獲地  
 (リケッチア分離陰性), ○ リケッチア分離と抗体がともに陰性の  
 アカネズミしか採取されなかった調査地

リケッチア分離率, 抗体保有率とも高率であった富士山東山麓, 東部および伊豆のアカネズミ 239頭について, 月別リケッチア分離状況をみると, 10月からリケッチアが分離され始め, 11月の65.3% (32/49) をピークとし, 1~3月の3ヵ月は約40%の分離率が維持された (図9)。一方, 抗体保有率は9月の25.0% (4/16) から2月の87.5% (7/8) まで上昇し, 3月以降はやや下降した。1:160 以上の高い抗体価の割合も抗体保有率と同様, 2月をピークとする一峰性の分布がみられた。

富士山東山麓, 東部および伊豆のアカネズミのうち, 日齢査定の実施された 136頭について日齢別のリケッチア分離率と抗体保有率を図10に示した。日齢区別の抗体保有率は57.7~72.4%の間にあり,  $\chi^2$ 検定において5%以下の危険率で有意差は認められなかった。しかし, 高い抗体価を示す個体は 100日齢以下に多く, 特に 1:640以上のものは, この日齢でしか確認されなかった。一方, リケッチア分離率は50日齢以下が61.5% (16/26) で最も高く, 101~200日齢 (21.2%; 7/33) が最も低かったが, それ以後徐々に増加する傾向が認められた。

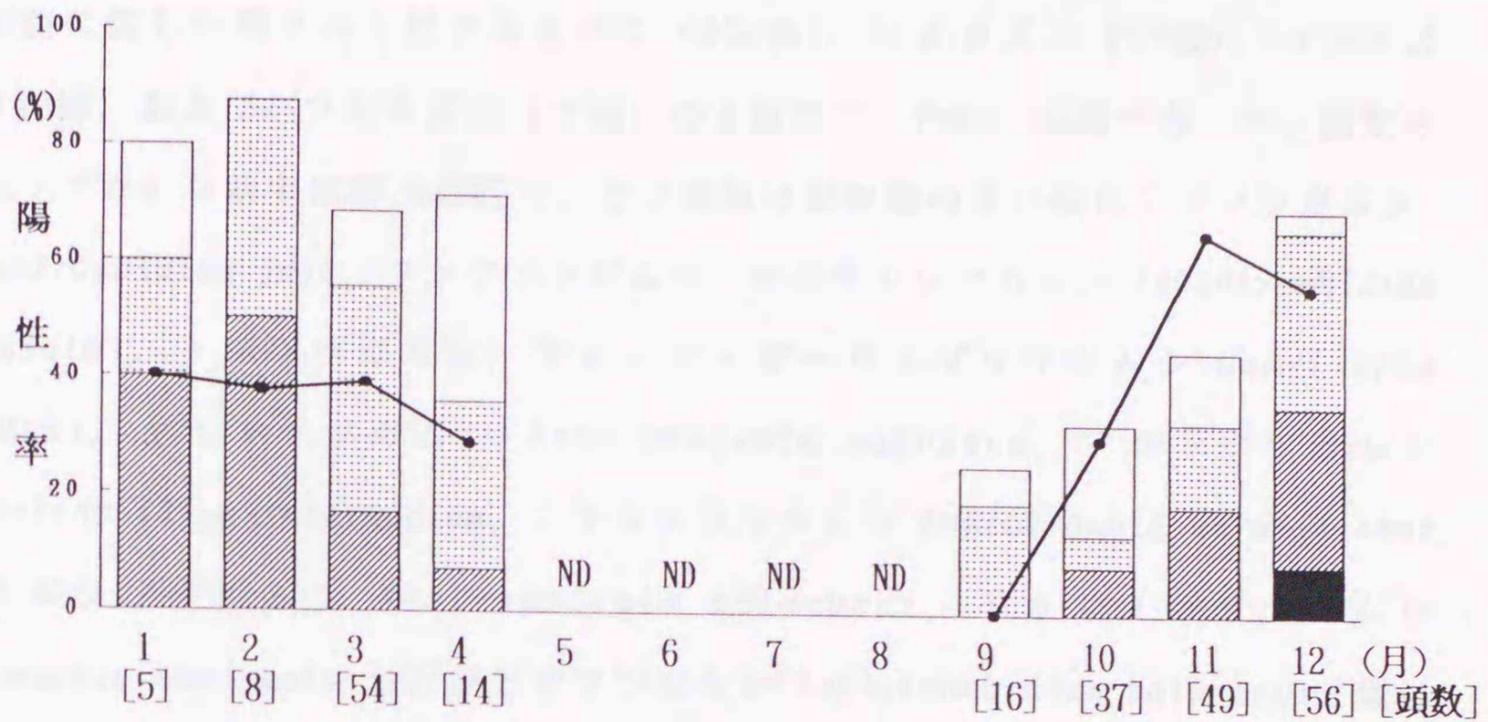


図9. アカネズミの捕獲月別リケッチア分離率 (●—) および抗体保有率  
 ND: 野ネズミ捕獲実施せず. 抗体価: ■  $\geq 1:640$ , ▨ 1:160-1:320, ▤ 1:40-1:80, □ 1:10-1:20.

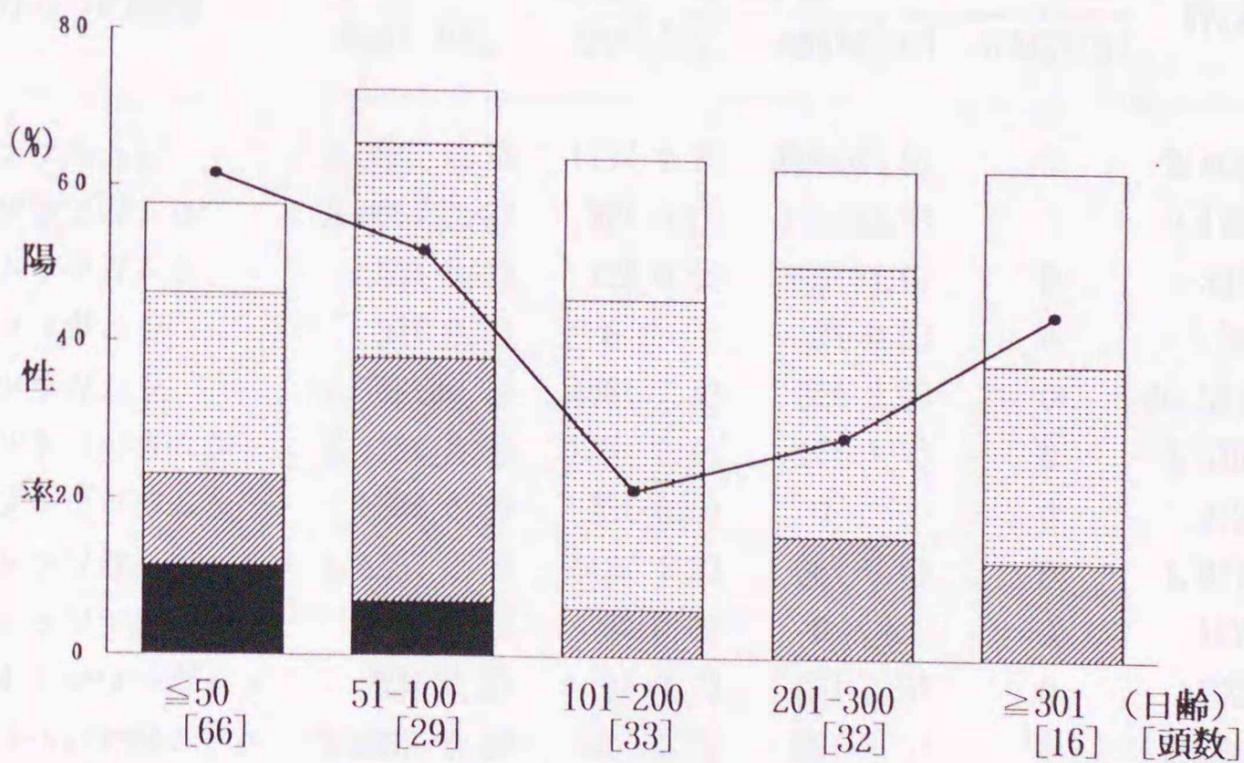


図10. アカネズミにおける日齢別リケッチア分離率 (●—) および抗体保有率.  
 抗体価: ■  $\geq 1:640$ , ▨ 1:160-1:320, ▤ 1:40-1:80, □ 1:10-1:20.

## 6. 野ネズミからのツツガムシ幼虫採取状況

検査に供した野ネズミはアカネズミ (404頭), ヒメネズミ (67頭), ハタネズミ (10頭) およびハツカネズミ (3頭) の4種類で, 合計 484頭であった。採取されたツツガムシ幼虫は37,942匹で, その種類は採取数の多い順にフジツツガムシ *Leptotrombidium fuji*, フトゲツツガムシ, キタサトツツガムシ *Leptotrombidium kitasatoi*, タテツツガムシ, サダスク・ガーリエプツツガムシ *Gahrlepiea saduski*, ヤマトツツガムシ *Neotrombicula japonica*, アラトツツガムシ *Leptotrombidium intermedium*, ミヤジマツツガムシ *Leptotrombidium miyajimai*, ミタムラツツガムシ *Neotrombicula mitamurai*, イカオタマツツガムシ *Cheladonta ikaoensis* およびヒゲツツガムシ *Leptotrombidium palpale* の4属11種であった (表5)。

表5. 野ネズミからのツツガムシ幼虫採取状況 (1983~1990年)

ツツガムシの種類	寄生ツツガムシ数				計[484]
	アカネズミ[404]	ヒメネズミ[67]	ハタネズミ[10]	ハツカネズミ[3]	
タテツツガムシ	2,695( 6.7)	117( 1.7)	656(65.6)	0	3,468( 7.2)
フトゲツツガムシ	8,965(22.2)	32( 0.5)	135(13.5)	0	9,132(18.9)
アラトツツガムシ	35( 0.1)	12( 0.2)	346(34.6)	0	393( 0.8)
ヒゲツツガムシ	97( 0.2)	0	2( 0.2)	0	99( 0.2)
フジツツガムシ	15,796(39.1)	496( 7.4)	32( 3.2)	0	16,324(33.7)
キタサトツツガムシ	3,418( 8.5)	135( 2.0)	17( 1.7)	0	3,570( 7.4)
ミヤジマツツガムシ	179( 0.4)	33( 0.5)	0	0	212( 0.4)
ヤマトツツガムシ	1,636( 4.0)	115( 1.7)	66( 6.6)	0	1,817( 3.8)
ミタムラツツガムシ	152( 0.4)	5( 0.1)	0	0	157( 0.3)
イカオタマツツガムシ	83( 0.2)	4( 0.1)	15( 1.5)	0	102( 0.2)
サダスク・ガーリエプツツガムシ	2,532( 6.3)	81( 1.2)	55( 5.5)	0	2,668( 5.5)
計	35,588(88.1)	1,030(15.4)	1,324(132.4)	0	37,942(78.4)

[ ] 野ネズミの頭数, ( ) 野ネズミ1頭当たりの寄生ツツガムシ数.

1頭当たりのツツガムシ寄生数はハタネズミ、アカネズミおよびヒメネズミの順に減少し、ハツカネズミからはまったく採取されなかった。タテツツガムシはハタネズミに、またフトゲツツガムシはアカネズミとハタネズミに多数寄生していた。

調査地点ごとのタテツツガムシとフトゲツツガムシの採取状況を図11に、地域別のアカネズミ1頭当たりのツツガムシ採取数を図12に示した。総ツツガムシ数は伊豆のアカネズミからの採取数が最も多く、中部のアカネズミに寄生するツツガムシは極めて少なかった。タテツツガムシは富士山東山麓では多くの調査地点で確認され、採取数も多かったが、それ以外の地域では中部から西部にかけてと東部においてわずかに採取されたに過ぎなかった。一方、フトゲツツガムシは伊豆、東部および富士山東山麓では全ての調査地点で認められ、採取数も多く、特に伊豆においては全採取数の半分近くを占めた。しかし、中部と西部ではほとんどみられなかった。

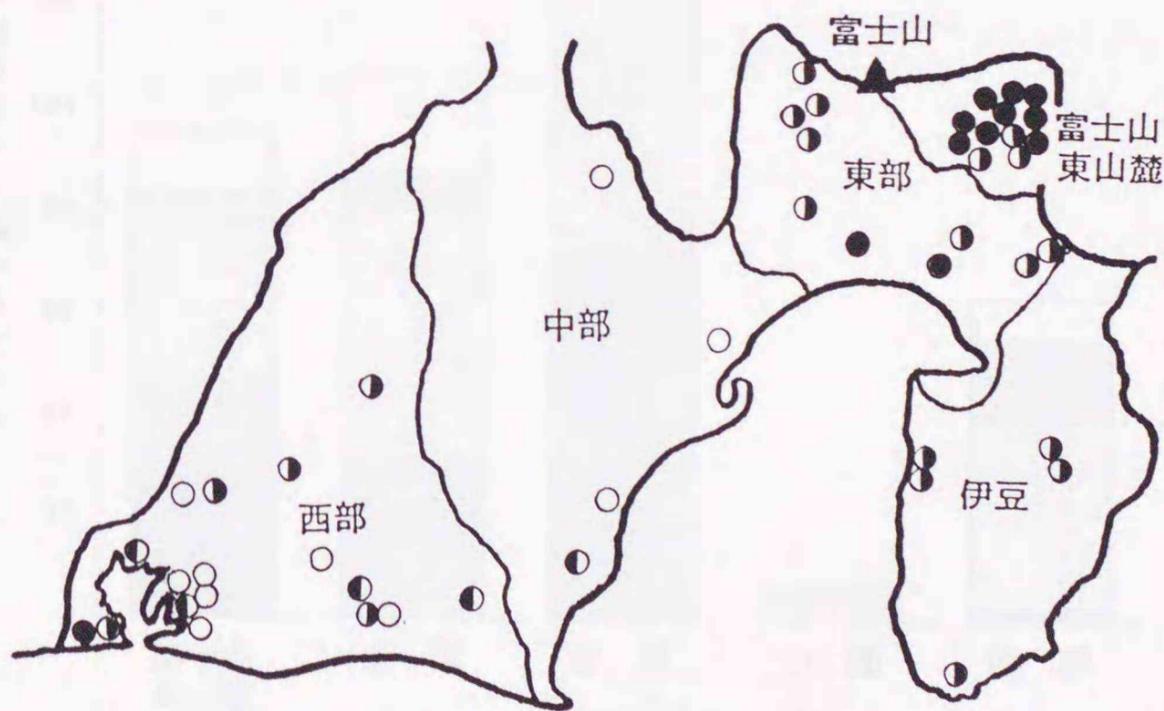


図11. アカネズミから採取されたタテツツガムシおよびフトゲツツガムシの分布.

- タテツツガムシとフトゲツツガムシの両種が採取された調査地,
- ① タテツツガムシのみ採取された調査地, ② フトゲツツガムシのみ採取された調査地, ○ 両種とも採取されなかった調査地.

タテツツガムシ、フトゲツツガムシの両種がともに多数採取された富士山東山麓における採取数の上位を占める5種類のツツガムシについて季節消長を図13に示した。タテツツガムシは10～11月に発生が集中する傾向がみられ、2～4月にはまったく採取されなかった。一方、フトゲツツガムシは10月から採取され始め12月まで上昇し、2月以降にも多数採取された。フジツツガムシは11月をピークとする発生がみられ、2～4月にも確認された。他の2種は大きな増減はみられなかったが、10～12月に多くなる傾向がみられた。

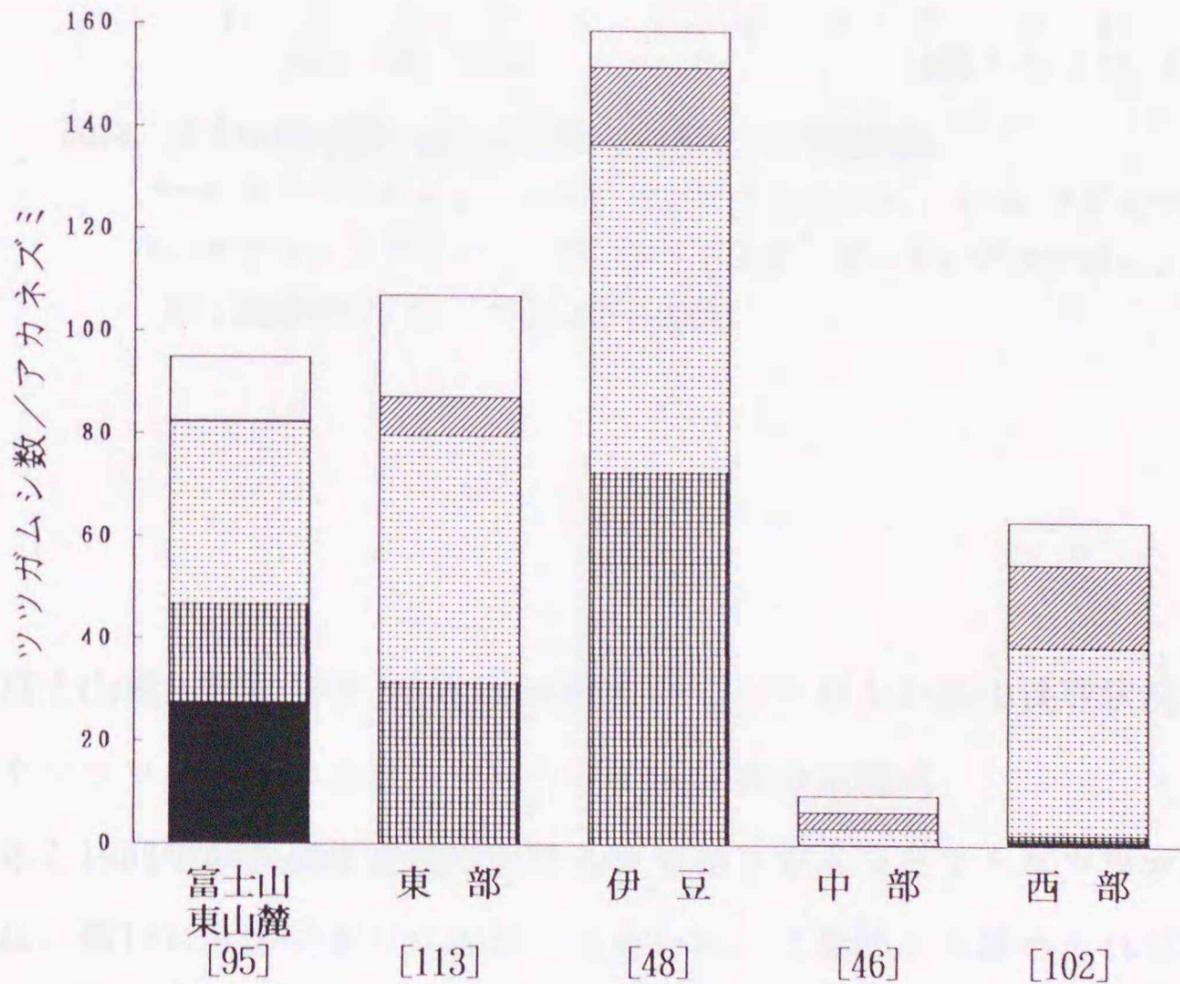


図12. 地域別主要ツツガムシ採取状況。■ タテツツガムシ，▨ フトゲツツガムシ，▩ フジツツガムシ，▧ キタサトツツガムシ，□ その他のツツガムシ，[ ] アカネズミ頭数。

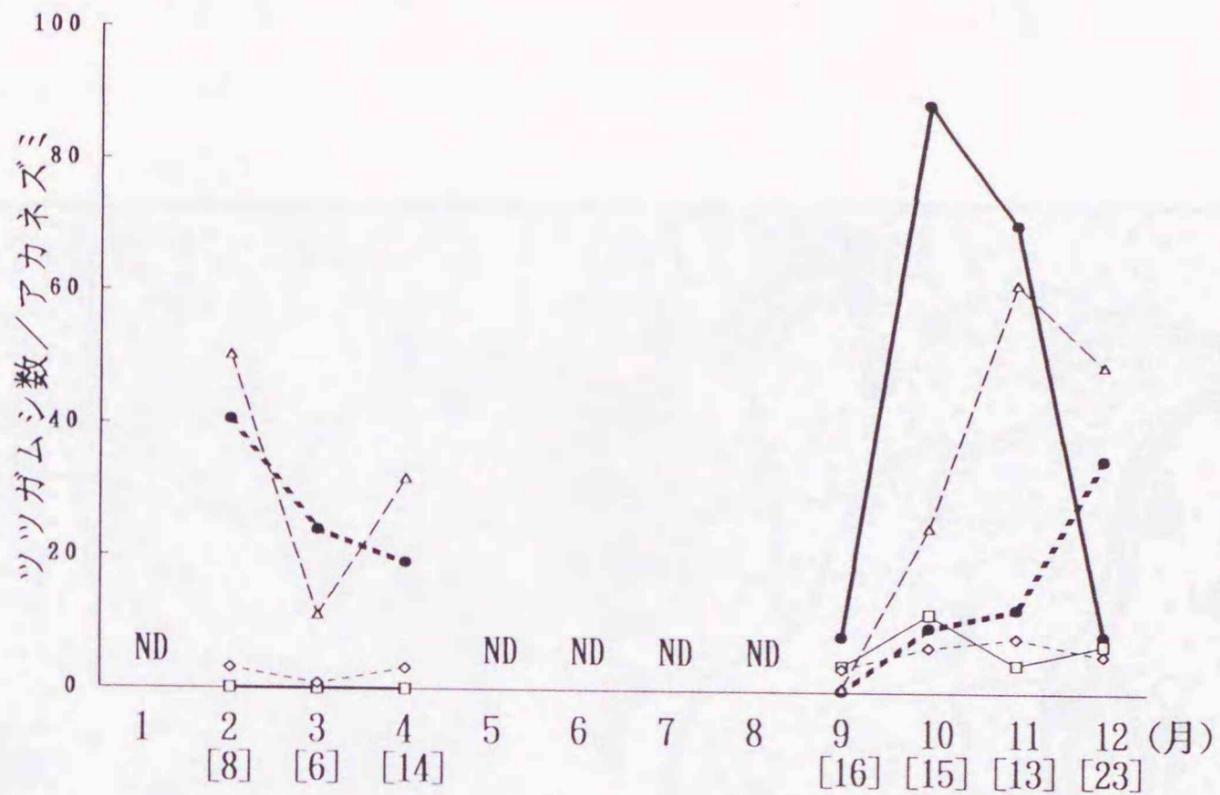


図13. 富士山東山麓における主要ツツガムシの季節消長

●-● タテツツガムシ, ●-●-● フトゲツツガムシ, △-△ フジツツガムシ,  
 □-□ ヤマトツツガムシ, ◇-◇ サダスク・ガーリエプツツガムシ,  
 ND: 調査せず, [ ] アカネズミ頭数.

## 7. 富士山東山麓におけるTullgren法によるツツガムシ幼虫採取状況

### 1) タテツツガムシおよびフトゲツツガムシの分布様式

1988年と1989年の各調査地点におけるタテツツガムシとフトゲツツガムシの出現の有無は、図14に丸印で示したとおりであった。2種類とも認められない地点も少数あったが、他の多くの地点でこれらの恙虫病媒介種の生息が観察された。タテツツガムシは御殿場市から小山町にかけての水田地帯と市街地を取り囲む山脚部や丘陵地の草地、林内および林縁部に認められた。一方、フトゲツツガムシの分布は調査地のほぼ全域に及び、市街地周縁部の水田地帯にも広く生息地がみられた。

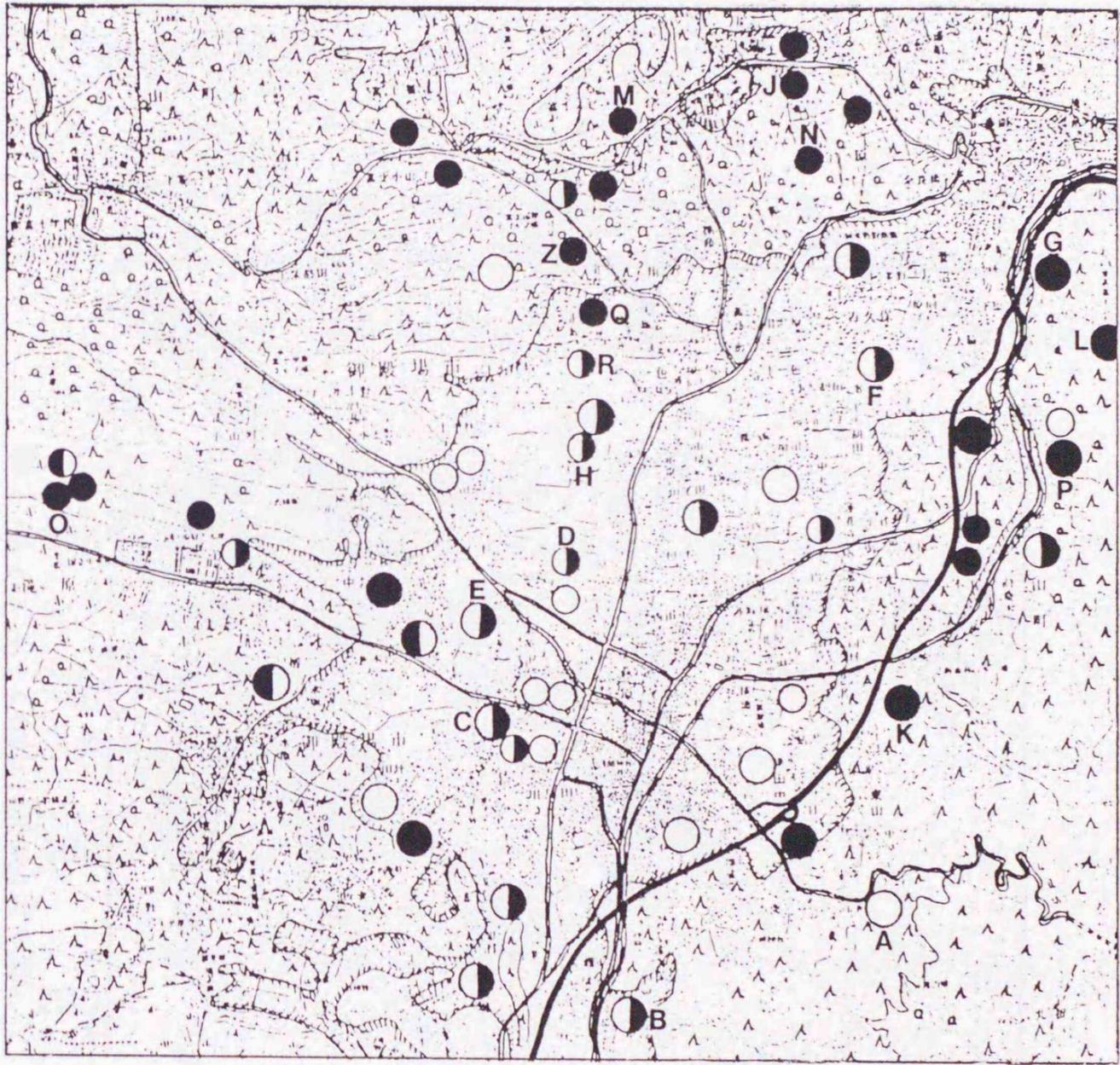


図14. 富士山東山麓におけるタテツツガムシとフトゲツツガムシの分布. A~R: 多数のツツガムシが採取された地点, Z地点: 1~12月に毎月調査した地点, 小丸: 1988年の調査地点, 大丸: 1989年の調査地点, ● タテツツガムシとフトゲツツガムシの両種が採取された地点, ◐ タテツツガムシのみ採取された地点, ◑ フトゲツツガムシのみ採取された地点, ○ いずれも採取されなかった地点.

2) 各調査地点におけるツツガムシ類の生息状況

1988年と1989年の秋期に、Z地点を除く延べ77地点で10 lの土壌サンプルから抽出されたツツガムシの種類数と個体数を図15に示した。9地点ではまったくツツガムシが認められず、他の10地点ではツツガムシが採取されたもののタテツツガムシとフトゲツツガムシは認められなかった。タテツツガムシあるいはフトゲツツガム

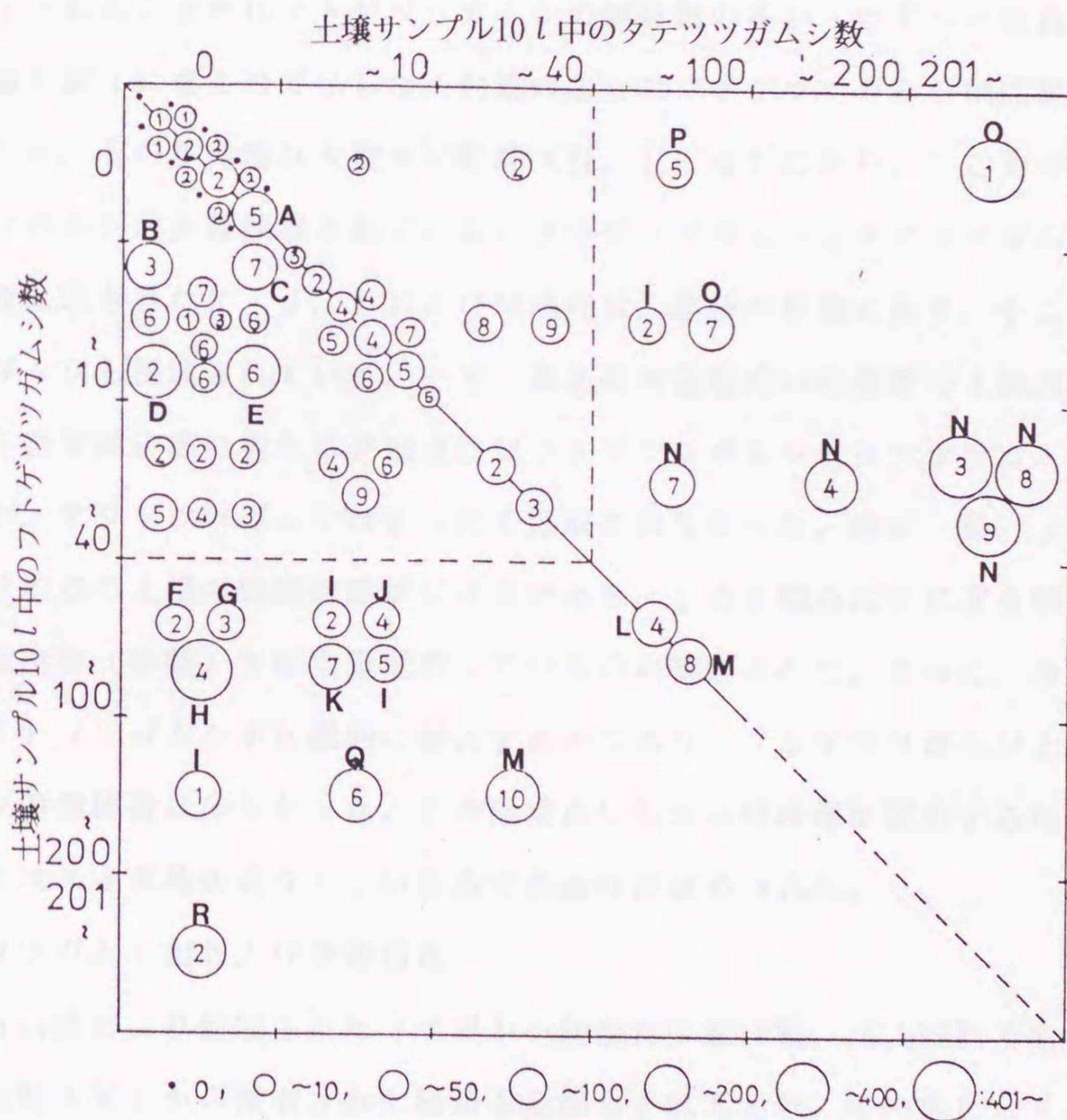


図15. 富士山東山麓における採取地点ごとの土壌サンプル10 l中のツツガムシ種類数およびタテツツガムシとフトゲツツガムシの採取数の関係 (1988~1989). 丸印の大きさは採取された全種類のツツガムシ数を, 丸印の中の数字は種類数を, また丸印の外側の英大文字は図14の調査地を示す.

シが土壌サンプル10 lあたり40個体以上の地点ではツツガムシの総数が多く、点線で囲んだ2種類の個体数がともに少ない地点ではツツガムシの総数も概して少なかった。タテツツガムシあるいはフトゲツツガムシが10 lあたり40個体を越えた地点では両種とも100個体以上検出された例は確認されなかった。すなわち、両種の多発地が独立して存在する傾向にあることが判明した。ただし、I地点のように調査時期によってタテツツガムシとフトゲツツガムシが交互に優占種となる例も認められた。

タテツツガムシまたはフトゲツツガムシの個体数の多かったF～R地点における採取記録を表6にまとめて示した。前述のようにフトゲツツガムシは広範囲に分布していたが、その多発地は大型水田畦畔(H, R, Q)にあり、ここでは同時にアラトツツガムシが多数採取されている。フトゲツツガムシとタテツツガムシが同時に相当数採取されたK, J, LおよびM地点は、路傍の草地にあり、そこではアラトツツガムシも採取されている。一方、東名高速道路沿いの草地のI地点と山腹に位置する患家周辺部に当たるP地点にはフトゲツツガムシとタテツツガムシは認められたが、アラトツツガムシはまったく採取されなかった。特に、K, J, M地点とI, P地点の土壌の物理的性状には差があり、IとP地点だけに宝永噴火(1707年)の噴出物(砂礫)が相当量混在しているのが観察された。さらに、NとOの2地点はタテツツガムシが圧倒的に優占する所であり、フトゲツツガムシとアラトツツガムシの個体数は少なかった。この両地点には火山性砂礫が露出する地表に株間の空いたススキ草地が成立している点で共通性が認められた。

### 3) ツツガムシ相および季節消長

Tullgren法により採取されたツツガムシ幼虫は7属16種、8,599匹であった。これらには野ネズミから採取された種類も全部含まれており、その他にヒミズツツガムシ *Leptotrombidium himizu*, オガタワルヒツツガムシ *Walchia ogatai*, シライトリタマツツガムシ *Neoschöngastia shiraii*, アサカワトリタマツツガムシ *Neoschöngastia asakawai* およびミヤガワタマツツガムシ *Helenicula miyagawai* の5種類が確認された(表7)。多数採取された種類はタテツツガムシ、フトゲツ

表6. タテツツガムシあるいはフトゲツツガムシが採取されたF~O地点における土壌サンプル10L中のツツガムシ採取数

調査地点	環境	採取日	タテ	フトゲ	アヲト	ヒゲ	フツ	キヲサト	ミヤマ	ヒミス	ヤマト	ミタムラ	イカオタマ	サダスク ガ-リエップ	オガタ ワルヒ	シライ トリタマ	ミヤガタマ	計
G	林縁	1989.11.9	0	49	0	0	10	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	63
F	水田畦畔	1989.10.25	0	58	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	59
H	水田畦畔	1988.10.27	0	56	489	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	547
R	水田畦畔	1988.10.14	0	266	58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	324
Q	水田畦畔	1990.2.17	0	318	188	0	0	0	0	4	0	13	0	0	0	0	0	523
K	道脇の草地	1988.11.10	2	197	178	7	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	386
J	道脇の草地	1989.10.26	1	50	3	0	24	0	0	1	0	0	1	0	27	0	0	107
L	草原	1988.10.27	2	79	15	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99
M	道脇の草地	1988.11.17	100	53	18	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	174
		1989.11.17	54	56	11	0	4	0	0	1	0	0	2	3	0	1	0	132
		1988.11.10	39	158	55	0	7	0	1	9	3	0	5	16	3	0	0	296
I	草原	1989.11.8	0	27	59	0	0	0	0	1	0	28	18	6	3	1	0	143
		1990.2.17	0	194	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	194
		1988.10.11	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	58
		1988.10.31	54	44	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	55
		1988.11.21	7	66	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	70
		1989.10.12	4	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11
		1989.10.30	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
P	林縁	1988.9.28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1989.10.25	42	0	0	0	7	25	0	7	0	0	0	3	0	0	0	84
		1989.11.30	28	4	0	0	5	0	2	6	2	0	3	5	17	0	1	73
N	草原 <sup>a)</sup>	1988.11.10	76	12	0	0	0	0	0	8	0	14	1	0	2	4	0	117
		1989.11.8	799	31	1	0	0	0	0	25	2	0	1	1	32	50	0	942
		1989.11.17	181	20	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	14	0	216
		1989.11.30	343	22	0	0	0	0	0	2	0	37	0	1	4	53	20	482
		1990.2.17	0	5	0	0	0	0	0	6	0	147	0	1	3	40	0	202
O	草原 <sup>a)</sup>	1988.9.28	1,305 <sup>b)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,305
	(演習場)	1988.10.11	6	4	2	0	0	0	0	0	10	0	2	0	0	0	0	24
		1988.11.11	65	8	6	7	0	0	0	0	1	0	65	3	0	0	0	155

<sup>a)</sup> まばらなススキ草地. <sup>b)</sup> 2Lの土壌サンプルから261匹を採取.

ツツガムシおよびアラトツツガムシであって、この3種だけで全体の69.4%を占めた。

通年調査を行ったZ地点には10種類のツツガムシが出現したものの、各種の発生消長を明確にすることはできなかった。1989年には秋期の調査を9月28日に開始したが、この日に東富士演習場内の標高800m付近のO地点では2lの土壌からタテツツガムシ1種だけが261個体(10lに換算すると1,305)抽出され、以後の調査で得られた個体数よりも著しく多かった。しかし、より低地にある他の調査地点では10月以後にタテツツガムシやフトゲツツガムシが多数採取されている(表6)。

表7. 富士山東山麓におけるTullgren法によるツツガムシ採取状況

ツツガムシの種類	1988年	1989年	1990年	計
	1-12月 〔465l〕	9-11月 〔342l〕	2月 〔40l〕	
タテツツガムシ	566(17.1)	1,750(41.5)	0	2,316(26.9)
フトゲツツガムシ	1,050(31.7)	649(15.4)	354(33.2)	2,053(23.9)
アラトツツガムシ	1,171(35.3)	185(4.4)	247(23.2)	1,603(18.6)
ヒゲツツガムシ	14(0.4)	0	0	14(0.2)
フジツツガムシ	77(2.3)	624(14.8)	0	701(8.2)
キタサトツツガムシ	1(0.03)	6(0.1)	0	7(0.1)
ミヤジマツツガムシ	9(0.3)	18(0.4)	0	27(0.3)
ヒミズツツガムシ	80(2.4)	522(12.4)	16(1.5)	618(7.2)
ヤマトツツガムシ	8(0.2)	32(0.8)	0	40(0.5)
ミタムラツツガムシ	161(4.9)	47(1.1)	334(31.4)	542(6.3)
イカオタマツツガムシ	83(2.5)	46(1.1)	18(1.7)	147(1.7)
サダク・ガーリエツツガムシ	23(0.7)	53(1.3)	7(0.6)	83(1.0)
オガワルヒツツガムシ	66(2.0)	144(3.4)	8(0.8)	218(2.5)
シライトリタマツツガムシ	5(0.2)	120(2.8)	81(7.6)	206(2.4)
アサカワリタマツツガムシ	3(0.1)	0	0	3(0.03)
ミヤガワタマツツガムシ	0	21(0.5)	0	21(0.2)
計	3,317(100.1)	4,217(100.0)	1,065(100.0)	8,599(100.0)

〔 〕 土壌サンプル量, ( ) 各ツツガムシの比率.

タテツツガムシは1990年2月にR地点(10 l)と前年の11月に本種が多数確認されたN地点(20 l)を調査したにもかかわらず、まったく採取されなかった。これに対して、フトゲツツガムシはRとNの両地点で2月にも採取され、特にN地点では1988年秋よりも1990年2月に個体数が多かった。また、2月のツツガムシ相は、秋期に比べて種類が少なく、冬期間に新たに加わった種類はまったくみられなかった。

### 考 察

静岡県における恙虫病発生地域は、1970年代までは富士山東山麓と伊豆半島に限局してみられていたが、1980年に静岡県の西部地区としては初めての真正患者が確認された<sup>39)</sup>。また、1984年以降はそれまで報告のなかった東部の富士宮市や沼津市においても確認されるようになったが、中部においては今回の調査でもまったく報告がみられなかった。さらに、同地域では、アカネズミから全くリケッチアが分離されず、抗体保有アカネズミも1頭確認されたただけなので、今後も本病が流行する可能性は低いものと思われる。

本県の恙虫病患者は、以前は東富士演習場で感染する自衛官が大半を占めていたが<sup>47)</sup>、今回の調査では発生地域が拡大するとともに、富士山東山麓においても一般住民の症例の方が自衛官のそれよりも多く認められるようになった。また、多発年齢層は他県<sup>57, 82, 84)</sup>同様、農作業などでツツガムシと接触する機会が多い40～60歳代であった。20歳代の若年齢層も12.7% (14/110) と多いことが本県の特徴としてあげられるが、これは演習中に感染する20歳代の自衛官(10症例)が多いことに起因している。

アカネズミにおけるリケッチア分離状況と抗体保有状況からは、富士山東山麓、東部および伊豆は *R. tsutsugamushi* の浸淫度が同程度に高いことが示唆された。一方、アカネズミからのツツガムシ採取調査では、フトゲツツガムシは富士山東山

麓，東部および伊豆において多数生息しているが，タテツツガムシは富士山東山麓にのみ集中する傾向が確認された。したがって，アカネズミに対してはフトゲツツガムシが最も高率にリケッチアを媒介していることが考えられた。さらに，これらの成績と患者発生状況を総合すると，恙虫病が多発する富士山東山麓においては，タテツツガムシが恙虫病の主媒介種であるものと思われ，また東部や伊豆における本病の発生はフトゲツツガムシにより媒介される可能性が高いと判断された。2種類のベクターがともに多数生息する地域で，タテツツガムシの方がヒトに対し重要なベクターとなる要因としては，本種がフトゲツツガムシに比べ活発で移動速度が速いことが考えられる。すなわち，タテツツガムシは野ネズミなどよりも接触機会が少ないヒトに対し，速やかに反応し，効率良く寄生しているものと思われる。

富士山東山麓におけるアカネズミの調査では，タテツツガムシは10～11月に集中的に採取されているのに対して，2～4月にはまったくみられなかった。また，この地域でのTullgren法による調査においても，本種の幼虫での越冬は確認されなかった。富士山東山麓における患者発生は10～11月に集中する傾向がみられるので，季節消長の上からもこの地域における主媒介種はタテツツガムシであることが推測されるが，タテツツガムシがまったくみられない春期にも恙虫病が発生していることから，本地域においても幼虫の状態での越冬可能なフトゲツツガムシが一部の症例の感染源となっていることが考えられる。

アカネズミにおけるリケッチア分離率のピークは患者発生のピークより1カ月後の11月であった。また，秋期に急増した患者発生は1月以降は急激に減少するのに対し，アカネズミにおけるリケッチア分離率は1～3月にも高い分離率を保っていた。この原因としては，冬期にはヒトへの主媒介種と思われるタテツツガムシ幼虫はみられなくなるのに対し，野ネズミに高率にリケッチアを媒介すると考えられるフトゲツツガムシはこの時期にもアカネズミに多数寄生していることがあげられる。また，実験的に *R. tsutsugamushi* を感染させたマウスは1年以上リケッチアを保有することが報告されている<sup>19, 70)</sup>。アカネズミにおいても感染後，長期間リケッチアが持続感染する可能性もあり，このことが本病流行後にもアカネズミからリ

ケッチアが高率に分離される一因となったことも考えられる。

アカネズミにおける抗体保有率も恙虫病発生数が多い10～11月よりも12月以降の方が高い値（60%以上）を示した。Van Peenenら<sup>106)</sup>は野ネズミ（*Rattus mindanensis* など）が *R. tsutsugamushi* の自然感染により獲得した抗体は少なくとも11カ月は持続することを報告している。したがって、アカネズミの場合にも抗体保有率は媒介ツツガムシ発生時に抗体を獲得した個体の総和となって現れ、本病多発期以後の方が高い抗体保有率を示すものと思われる。今回の調査では、患者がほとんどみられない9月にもアカネズミにおいては40%近い抗体保有率が得られたが、いずれも低力価であった。この月にはアカネズミからリケッチアがまったく分離されておらず、また媒介ツツガムシもタテツツガムシが少数認められただけだった。したがって、これらの抗体の大半は前年の秋から捕獲年の春までの恙虫病発生時に獲得したものであり、9月にはまだ感染機会が少ないものと思われる。

今回の調査では、アカネズミにおける日齢別の抗体保有率は加齢に伴い上昇する傾向はみられなかった。粕谷ら<sup>28)</sup>もアカネズミの体重と抗体保有率の間にはほとんど関連がみられないことを報告し、一時期に一齐に感染が起こる可能性を指摘している。本研究においても10～11月以降にアカネズミの抗体保有率が急上昇する傾向がみられたので、野性のアカネズミの寿命が約1年であることを考慮すると<sup>86)</sup>、アカネズミでは秋期に一齐に感染が成立したと考えられる。

アカネズミにおけるリケッチア分離率は100日齢以下が高く、101～200日齢が最も低率であった。月別分離率が特に高かった11月と12月に捕獲されたアカネズミの割合は100日齢以下（78.2%）が大半を占め、101～200日齢（9.1%）が最も低かったことから、今回の日齢別の分離率は加齢に伴う変動というよりも捕獲時期ごとのアカネズミの日齢の割合に起因している可能性が大きい。また、50日齢以下のアカネズミでは、母子間の移行抗体と思われる低力価抗体も確認される一方で、1:640以上の高い抗体価の占める割合およびリケッチアの分離率は、全日齢区分の中で最も高いことから、秋期に幼弱な個体がりケッチアに初感染する例が多いことが推測される。

アカネズミにおけるリケッチア分離率は28.6%と高率であったが、ヒメネズミでは1頭(1.5%)から分離されただけであった。このような傾向は岐阜県などでも確認されている<sup>62)</sup>。アカネズミは草原から明るい林間などの地上を生活の場としているが、ヒメネズミは主として樹上性で山麓から高山の森林に棲んでいる<sup>40)</sup>。一方、恙虫病媒介種であるフトゲツツガムシやタテツツガムシは濃い橙色を呈しているが、Nadchatram<sup>49)</sup>は草地など明るい環境になるほど、生息ツツガムシは赤みの強い種類が優占種となることを指摘している。実際にフトゲツツガムシはススキやヨモギの繁茂する新しい草地に多数生息することが報告されており<sup>102, 104)</sup>、タテツツガムシもススキが疎らに生えた草地が多発地であることが本研究で明らかとなった。したがって、アカネズミの方がヒメネズミに比べ、フトゲツツガムシやタテツツガムシなどの媒介ツツガムシとの接触機会が多いことが推測され、このことがリケッチア分離率の差に結びついた可能性も考えられる。

Tullgren法による富士山東山麓における調査の結果、タテツツガムシは山脚部のススキ草地や林縁に広く分布しており、火山性砂礫が露出するススキ草地に個体数が著しく多かった。この砂礫は1707年の富士山の宝永噴火に由来するものであり、東富士演習場内で3m以上、小山町と御殿場市の中心地においても70~100cmの堆積があったことを Tsuya<sup>99)</sup>は報告している。噴火時に埋もれた水田は残留砂礫を除去して再び拓かれたと伝えられているが、水田地帯の各所にある造林地や山地には現在でも相当量の噴出砂礫が残留している。実際に、タテツツガムシの生息地も水田地帯を取り囲む山地の山脚部に片寄って分布していたが、残留砂礫の多い演習場近辺の地域では居住地や水田に隣接する林縁部にもその生息が認められた。以上のように、タテツツガムシは宝永噴火に由来する残留砂礫に大きく依存して分布していることが確認された。千葉県<sup>57)</sup>や岐阜県<sup>29, 62)</sup>など火山の影響をあまり受けない地域でもタテツツガムシによる恙虫病の媒介が問題となっている場合もあるが、鹿児島県<sup>112)</sup>、宮崎県南部<sup>110)</sup>や伊豆七島<sup>36)</sup>など火山噴出物の多い地域にタテツツガムシ媒介性恙虫病が多発するケースが多いので、このような土壌はタテツツガムシの好適環境の一つと考えられる。タテツツガムシが火山灰土の水はけの良さを

好むのか、あるいは火山噴出物中の特殊化学成分を好むのかは今後の研究課題であろう。

一方、フトゲツツガムシは広範な分布を示し、草地、林縁、水田畦畔、宅地内等に出現する点で、内川ら<sup>100, 102, 104)</sup>が長野県下で観察した結果と同様の傾向がみられた。フトゲツツガムシはアラトツツガムシとともに大型水田畦畔を好適な発生の場としており、これらの2種はタテツツガムシの多発地では著しく個体数を減じた。このことから、フトゲツツガムシやアラトツツガムシはタテツツガムシよりも水田畦畔のような高湿度の環境下に好んで生息することが示唆された。

野口ら<sup>52)</sup>が1952年から1954年にかけて静岡県内で野ネズミから採取したツツガムシ類は、今回、野ネズミから確認された4属11種にヒミズツツガムシ、ナガヨツツガムシ *Neotrombicula nagayoi* およびミヤガワタマツツガムシの3種を加えた5属14種であり、今回の調査結果と大きな差異は認められなかった。また、タテツツガムシとフトゲツツガムシの分布の傾向も、1950年代と現在とではほぼ一致しており、少なくとも静岡県においては近年の恙虫病の再流行がツツガムシ相の変化によるものではないことが示唆された。

今回、Tullgren法により採取されたツツガムシ類は7属16種であって、これは野ネズミから採取された全種類に鳥類あるいはモグラ等を主な宿主とする5種類のツツガムシを加えたものに相当している。鈴木<sup>78, 79)</sup>は富士山麓で微環境を観察しながら、地表表面から直接ツツガムシを採取する方法を含む各種調査法を併用して、6属18種からなるツツガムシ相を記録している。このように記録されるツツガムシ相は調査法と調査対象環境の違いによって異なることが改めて確認されたことになる。このなかで、タテツツガムシやフトゲツツガムシが優占種として主要な位置を占めるが、Tullgren法で記録されるツツガムシ類の種構成は調査地の環境により著しく変動した。すなわち、これらの調査成績は各種ツツガムシ幼虫の発生が環境条件に大きく依存することを示しているものと思われる。

## 要 旨

静岡県における恙虫病の実態およびツツガムシの生息状況を把握する目的で、届出患者の血清学的診断を行うとともに、自衛官と一般住民における抗体保有状況ならびに野ネズミにおける *R. tsutsugamushi* の浸淫状況とツツガムシ寄生状況を調査した。さらに、富士山東山麓においては、Tullgren法により土壌中のツツガムシの生息状況の調査を行った。

1982年から1991年までの10年間の届出患者 151名のうち、147名の血清についてIFAによる血清診断を行い、110症例が血清学的に本病と確認された。110名中80名(72.7%)は富士山東山麓(御殿場市および小山町)において確認されており、それ以外に東部、伊豆、浜名湖周辺でも患者発生が報告された。発生は10~12月(82.7%)に集中する傾向がみられ、6~8月には認められなかった。富士山東山麓に居住する自衛官と一般住民における抗体保有率は、それぞれ、8.0%と3.8%で、野外活動の多い自衛官の方が抗体保有率は有意に高かった。

県下の野ネズミの捕獲調査では、アカネズミ 385頭のうち110頭(28.6%)からリケッチアが分離され、また145頭(37.6%)が抗体を保有していた。恙虫病発生地とリケッチアが分離された調査地点はよく一致していた。しかし、富士山東山麓、東部および伊豆ではアカネズミにおけるリケッチア分離率(40%以上)と抗体保有率(50%以上)がともに高率であって、地域差が認められなかったにもかかわらず患者は富士山東山麓に集中しており、感染アカネズミの分布と患者発生地の間にくい違いがみられた。また、西部では浜名湖周辺でリケッチアおよび抗体保有ネズミがわずかに検出されたが、中部では1頭から抗体が確認されたのみに過ぎなかった。

富士山東山麓、東部および伊豆のアカネズミにおける月別リケッチア分離状況では、11月に分離のピーク(65.3%)に達した後、下降し、1月以降は40%前後になるのに対し、抗体保有率は1月以降も下降せず、2月に最高値(87.5%)を示した。また、リケッチア分離率と抗体保有率のいずれでも加齢に伴う上昇は認められず、日齢よりも捕獲時期の影響の方が大きいことが示唆された。

野ネズミ 484頭（アカネズミ 404頭，ヒメネズミ67頭，ハタネズミ10頭，ハツカネズミ 3頭）から合計37,942匹，4属11種のツツガムシ幼虫が得られた。最も多かったのはフジツツガムシであったが，媒介ツツガムシであるタテツツガムシとフトゲツツガムシも多数採取された。フトゲツツガムシの大半は富士山東山麓，東部および伊豆において採取され，タテツツガムシは富士山東山麓のみで多数確認された。また，富士山東山麓における媒介ツツガムシの季節消長をみると，タテツツガムシは10～11月に急増したが，幼虫の状態での越冬は確認されなかった。一方，フトゲツツガムシはタテツツガムシより遅く発生し，春季にも多数採取された。これらのことと患者発生状況を総合すると，東部と伊豆における恙虫病のベクターはフトゲツツガムシであり，富士山東山麓においてはタテツツガムシが主媒介種であることが推測される。

富士山東山麓におけるTullgren法による調査では，タテツツガムシとフトゲツツガムシを含む6属16種のツツガムシ幼虫が採取された。タテツツガムシは御殿場市と小山町の市街地と水田地帯を取り囲む山地の山脚部や丘陵部に分布し，東富士演習場近辺では居住地間や水田に隣接する造林地の周縁部にも生息していた。宝永噴火由来の砂礫が堆積する地域とタテツツガムシの分布域が重なり，この砂礫が露出するススキ草地に多発地が限局されることから，本種は火山性の砂礫土壤に好んで生息することが示唆された。一方，フトゲツツガムシは広い地域に生息しており，多発環境は水田畦畔，道脇の草地などであった。ただし，タテツツガムシの多発地にはフトゲツツガムシの個体数が少なく，両種の多発環境は異なるものと考えられた。

## 第 2 章

### 静岡県に存在する *Rickettsia tsutsugamushi* の血清型と媒介ツツガムシとの関係

## 序 文

*R. tsutsugamushi* の標準型としては Gilliam型, Karp型およびKato型の3種類が知られており, 最近まで我が国に存在するリケッチアはこれらの型のいずれかに属するものと思われていた<sup>72)</sup>。したがって, 分離株の血清型の決定は標準3株を抗原として作製したモルモット, マウスやウサギなどの免疫血清との反応性を補体結合反応<sup>72)</sup>や蛍光抗体法<sup>8, 23)</sup>により調べる方法が一般的であった。しかし, これらの株間には交差反応性のあることから, Hanson<sup>20)</sup>は免疫ウサギ血清を用いた Immunoprecipitation法では, これら3株間の差を明確にすることが困難であると報告している。さらに, 最近国内においてShimokoshi株, Kawasaki株やKuroki株など標準株とは抗原性の異なる株が相次いで発見されているが, Kawasaki株はGilliam株に, Kuroki株はKarp株にある程度の交差反応性が認められている<sup>56, 92, 111)</sup>。これらのことから, モルモットなどの免疫血清のみを用いた免疫沈降反応やIFAでは, 分離株の免疫学的性状を的確に把握ことは困難であると思われる。単クローン性抗体は, それぞれ1種類の抗原決定基のみを認識しているので, リケッチア株の免疫学的性状の解析や血清型別を行う上で利用価値が高い。このため, 最近, *R. tsutsugamushi*の新しい同定法として単クローン性抗体を利用した報告も多数みられるようになった<sup>10, 27, 42, 48, 114)</sup>。

恙虫病患者の血清診断は通常 *R. tsutsugamushi* の標準3株を抗原として実施されている。しかし, 国内にはこれらの株とは抗原性を異にするリケッチアの存在が確認されており, このような株に感染した場合, 患者血清は標準3株の抗原に対してホモ株よりも弱く反応することが考えられる。したがって, 血清診断用の抗原として, 標準3株以外に各流行地に即したリケッチアを加えることが望まれる。実際, 橘ら<sup>83)</sup>や山本ら<sup>110)</sup>は, 血清診断の際, 抗原として標準3株に調査地域の患者由来株を加えたIFAを実施し, 流行株を加えた抗体検査の有用性を指摘している。

静岡県には複数の血清型の *R. tsutsugamushi* の存在することが指摘されており, また第1章ではタテツツガムシとフトゲツツガムシの2種類がこの地域において本

病を媒介していることが推測された。そこで、著者は静岡県におけるリケッチアの血清型の種類および媒介ツツガムシの役割を解明することを目的として、まず Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki および Kuroki の各株に対する単クローン性抗体を用いて、静岡県の患者から分離されたリケッチア株について免疫学的性状を解析するとともに、これらの分離株の病原性についても検討を行った。次に、静岡県における恙虫病多発地である富士山東山麓において、恙虫病患者、ツツガムシ幼虫および野ネズミから多数のリケッチアを分離し、型特異的単クローン性抗体を用いて IFA により血清型別を試みた。さらに、本県における恙虫病患者の血清について Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki および富士山東山麓の患者から分離された Karp 型の Ota の各株に対する反応性を IFA により検討した。

## 材料および方法

### 1. リケッチア株と培養細胞

GMK あるいは L-929 細胞で培養した Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki および Kuroki の各株を使用した。これらのリケッチア株は全て新潟薬科大学微生物学教室より分与を受け、培養は第 1 章の方法に従った。

### 2. 恙虫病患者の血清

1987 年から 1989 年までの 3 年間に静岡県内で血清学的に恙虫病と判定された 36 名 (1987 年 13 名, 1988 年 13 名, 1989 年 10 名) の患者血清を、検査時まで  $-30^{\circ}\text{C}$  に保存した。

### 3. *R. tsutsugamushi* に対する単クローン性抗体

Gilliam 株, Karp 株 および Kato 株 に対する単クローン性抗体は以下の方法で作製した。また, Kawasaki 株 と Kuroki 株 に対する単クローン性抗体は神奈川県衛生研究所ウイルス部より分与を受けた<sup>18)</sup>。

#### 1) マウスの免疫および細胞融合

Gilliam 株, Karp株あるいはKato株のいずれかを感染させた ddYマウスの脾臓から作製した10% SPG乳剤の 0.5mlを5週齢のBALB/Cマウス (SLC社) に皮下接種した。2週後に同量を腹腔内に接種し, その3日後に脾細胞を採取した。単クローン性抗体の作製は安東の方法に従った<sup>1)</sup>。すなわち, マウスミエローマ細胞(P3-X63-Ag8-U1) と脾細胞の比が 1:10 になるように混合し, ポリエチレングリコール 4,000 (メルク社製) を用いて融合させた。融合後, HAT培地に浮遊させ, 96穴平底マイクロプレートを用いて培養した。

## 2) 抗体産生細胞の選択およびクローニング

コロニーの増殖が認められたウェルの上清について, 第1章の方法に準じて IFAによりスクリーニングを行った。なお, 抗原は免疫源と同型のリケッチアを感染させた GMK細胞を用いた。抗体の産生が確認されたコロニーについては限界希釈法により2~3回クローニングを行った。

## 3) 単クローン性抗体の免疫グロブリンクラスとサブクラスの同定

抗体産生が認められたハイブリードーマの培養上清について, モノAb-ID EIAキット (ザイメット社製) を用いて, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub>およびIgMの同定を実施した。

## 4) マウス腹腔内での培養

あらかじめプリスタン 0.5mlを腹腔内接種した5~8週齢のBALB/Cマウスに抗体産生細胞の約 $10^7$ 個を腹腔内接種し, 2週後に腹水を採取した。これを  $2,000 \times g$  で10分遠心後, 上清を単クローン性抗体として用いた。

## 4. モルモット免疫血清の作製

Gilliam, Karp, Kato, KawasakiおよびKurokiの各株のいずれかを充分増殖させた L-929細胞 (25cm<sup>2</sup>フラスコ1本分) を, ペニシリンG 100単位/mlを添加した1%牛胎児血清加 Eagle's minimum essential medium (1%S-MEM) 0.5mlに浮遊させた。その0.1mlを8週齢のモルモット (SLC社) の脳内に接種し, 接種後3週目に採血して得られた血清を免疫血清として用いた。

## 5. *R. tsutsugamushi* の分離材料および分離方法

1985年から1990年までの6年間に御殿場市と小山町において発見された恙虫病患者32名から血液を採取した。なお、全ての検体は発病後1週間以内で抗生物質投与前に採血し、数時間～3日間、4℃で保存した。リケッチアの分離材料としては血餅を用い、滅菌乳鉢内で破碎した後、等量のSPGを加えてからガラスホモジナイザーを用いて50%乳剤とした。

69頭のアカネズミは1986年から1990年までの6年間に御殿場市と小山町の11地点においてシャーマントラップあるいは金網性箱罫により捕獲した。各々のアカネズミの脾臓を乳鉢に取り、これにSPGを加えて10%乳剤を作製した。

タテツツガムシおよびフトゲツツガムシの幼虫は1988年から1990年にかけて同地域の17地点においてTullgren法<sup>101, 103)</sup>あるいは黒色板法<sup>68)</sup>により、それぞれ、3,947匹と1,545匹採取した。これらの幼虫は4～125匹のプールに分け、ガラスホモジナイザーを用いて1mlのSPGで乳剤とした。

これらの乳剤を0.5mlずつ2ないし3頭のddYマウス(4～8週齢; SLC社)の腹腔内に接種し、一部のマウスについてはcyclophosphamide (CY)投与により免疫抑制を施した。CYは検体接種当日、4～5日目、9～10日目にそれぞれ0.25mg/g皮下接種した。未処置のマウスを用いた場合は3週後に、またCY投与マウスを用いた場合は12～14日後に解剖した。マウスの腹膜塗抹標本中にIFAによりリケッチア粒子が観察されない場合は脾臓の10%SPG乳剤を材料とし、さらに前者を用いた場合は3週間隔で2代、後者を用いた場合は12～14日間隔で4代までマウスによる継代を反復した。

腹腔内細胞中にリケッチアが確認された場合は、もう1代CY投与マウスで継代し、削瘦や立毛などの症状が現れた時点でエーテルによりマウスを安楽死させてから、PBSを5ml腹腔内に注入した。腹部をよく揉んでから、腹腔内液をヘパリン加スピッツ管に採取し、200×gで10分間遠心後、沈渣を少量の1%S-MEMで浮遊させ、ダウンス型ホモジナイザーで破碎した。このリケッチア液0.5mlを25cm<sup>2</sup>の培養フラスコ(Costar社製)に単層培養させたL-929細胞上に添加し、細胞表面が乾燥しないように時々振盪しながら37℃で2時間吸着させた。吸着後、1%S-MEM 5mlをフ

ラスコに加え，3ないし4日目ごとに培養液を交換しながら37℃で培養した。リケッチアが充分増殖した時点で，第1章に準じて抗原塗抹スライドを作製した。

#### 6. 患者血清，単クローン性抗体およびモルモット免疫血清の抗体価の測定

これらの血清と単クローン性抗体は PBSで10倍希釈してから2倍段階希釈し，抗体価は第1章の IFAに従って測定した。ただし，2次抗体としては，1次抗体が単クローン性抗体の場合は抗マウスIg(IgG + IgM) FITC 標識ヤギ血清（カッペル社製）を，モルモット免疫血清の場合は抗モルモットIgG（H鎖 + L鎖）FITC 標識ヤギ血清（カッペル社製）を使用した。また，患者の血清抗体価を測定する場合は，2次抗体としてFITC標識抗ヒトIgG（ $\gamma$ 鎖）ヤギ血清および抗ヒトIgM（ $\mu$ 鎖）ヤギ血清（ともにTago社製）を用いた。

#### 7. マウスに対する恙虫病リケッチア株の病原性の試験

Karp株および患者由来の8株を充分増殖させた L-929細胞をそれぞれダウンス型ホモジナイザーを用いて破碎してから低速遠心して得られた上清を 0.5ml ずつ5～6週齢の ddYマウス（SLC社）3匹の腹腔内に接種した。さらに，Karp株，Ota株およびMiyashita 株のリケッチア液については，1%S-MEM を用いて，100倍および10,000倍希釈液を作製し，原液同様の方法でマウスに接種した。これらのマウスを20日間観察し，同時にKarpとMiyashita 以外の株については体重測定も実施した。なお，腹部膨満，削瘦，立毛など典型的な恙虫病の症状を呈したものを発病とみなした。リケッチア液は L-929細胞にも接種し，多村らの方法<sup>93)</sup>に従い感染価（ICU）を求めた。

## 成 績

### 1. 単クローン性抗体およびモルモット免疫血清の性状

14種類の単クローン性抗体における Gilliam, Karp, Kato, KawasakiおよびKurokiの各株に対する IFA抗体価を表8に示した。Gilliam型の単クローン性抗体

のうち、3H5は Gilliam株にのみ反応したが、1H1はKawasaki株に、また3B6はKatoとKawasakiの両株に対しても反応した。しかし、Gilliam型の1H1と3B6では、Kawasaki株に対する抗体価はGilliam株に対する抗体価と比べ明らかに低かった。Karp型の単クローン性抗体の3C9と3G1はともにKarp株にのみ反応した。また、Kato型の単クローン性抗体のうち、1D12と3C8はKato株にのみ反応したが、1H12はGilliam株にも弱い反応を示した。一方、Kawasaki型の単クローン性抗体のうち

表8. Gilliam, Karp, Kuroki, KawasakiおよびKurokiの各株に対する単クローン性抗体のIFA抗体価

単クローン性抗体 血清型	モノクローナル コード番号	Igクラス	各株に対する抗体価 <sup>a)</sup>				
			Gilliam	Karp	Kato	Kawasaki	Kuroki
Gilliam型	3H5	IgM	10240	<10	<10	<10	<10
	1H1	IgM	20480	<10	<10	2560	<10
	3B6	IgG <sub>2a</sub>	20480	<10	10240	2560	<10
Karp型	3C9	IgG <sub>3</sub>	<10	10240	<10	<10	<10
	3G1	IgG <sub>2a</sub>	<10	20480	<10	<10	<10
Kato型	1D12	IgG <sub>2a</sub>	<10	<10	10240	<10	<10
	3C8	IgM	<10	<10	1280	<10	<10
	1H12	IgM	80	<10	2560	<10	<10
Kawasaki型	358	IgG <sub>2a</sub>	<10	<10	<10	81920	<10
	417	IgG <sub>2b</sub>	<10	<10	<10	81920	<10
	3	IgG <sub>2b</sub>	2560	<10	<10	40960	<10
	406	IgG <sub>2b</sub>	40960	<10	<10	40960	<10
	134	IgG <sub>3</sub>	<10	<10	<10	5120	5120
	52	IgG <sub>1</sub>	20480	20480	10240	20480	1280
Kuroki型	55-12	IgG <sub>1</sub>	<10	<10	<10	<10	10240

<sup>a)</sup> IFA 抗体価は血清の最高希釈倍率の逆数で示した。

358と 417はKawasaki株のみに反応したが, 3と 406は Gilliam株に, また 134は Kuroki株にもそれぞれ反応した。なお, Kawasaki型 52は 5種類のリケッチア株に対し同程度に反応が認められた。また, Kuroki型の単クローン性抗体である 55-12はKuroki株のみに反応した。

モルモット免疫血清では, ホモの抗原に対する抗体価が 1:640~1:20480倍であったが, そのうち抗Gilliam, 抗Katoおよび抗Kawasakiの各血清の抗体価はヘテロのそれよりも 8倍以上高かった (表9)。しかし, 抗Karp血清および抗Kuroki血清では, とともにホモとヘテロの組み合わせの間で反応に明瞭な相違はみられず, 抗体価の差は 2倍以内にとどまった。

## 2. 8種類の患者由来株の免疫学的性状

患者から分離された株のうち通常のマウスを用いて分離されたOtaとMiyashitaの2株ならびにCY投与マウスを用いて分離されたKatsumata, Morishita, Oishi, Rokudo, MaedaおよびSugizakiの6株に対する単クローン性抗体とモルモット免疫血清のIFA抗体価を, それぞれ, 表10と表11に示した。Ota株とMiyashita株は,

表9. Gilliam, Karp, Kuroki, KawasakiおよびKurokiの各株に対するモルモット免疫血清の IFA抗体価

モルモット 免疫血清	各株に対する抗体価 <sup>a)</sup>				
	Gilliam	Karp	Kato	Kawasaki	Kuroki
抗 Gilliam	5120	80	80	320	160
抗 Karp	1280	10240	2560	2560	5120
抗 Kato	640	640	5120	320	640
抗 Kawasaki	80	80	40	640	80
抗 Kuroki	1280	10240	640	640	20480

<sup>a)</sup> IFA 抗体価は血清の最高希釈倍率の逆数で示した。

Karp型の2種類の単クローン性抗体のみならず，抗Karpモルモット血清とも強く反応したので，いずれの株もKarp型であると考えられた。CY投与マウスを用いて分離された患者由来株のうち Katsumata, Morishita, OishiおよびRokudoの4株は6種類のKawasaki型単クローン性抗体のいずれとも反応し，抗Kawasakiモルモット血清とも強い反応が確認されたので，Kawasaki型に属することが示唆された。しかし，Katsumata株以外の3株は，Kawasaki型358との反応がKawasaki株に比べ明らかに弱かった。さらに，Rokudo株は Gilliam型の3B6と反応しない点でKawasaki株と異

表10. 患者由来株に対する単クローン性抗体の IFA抗体価

単クローン性抗体		各株に対する抗体価 <sup>a)</sup>							
血清型	コード番号	Ota	Miyashita	Katsumata	Morishita	Oishi	Rokudo	Maeda	Sugizaki
Gilliam 型	3H5	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	1H1	<10	<10	2560	1280	1280	1280	<10	<10
	3B6	<10	<10	10240	5120	10240	<10	<10	<10
Karp型	3C9	2560	2560	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	3G1	5120	5120	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Kato型	1D12	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	3C8	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	1H12	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Kawasaki型	358	<10	<10	81920	1280	1280	1280	<10	<10
	417	<10	<10	81920	81920	40960	81920	<10	<10
	3	<10	<10	40960	20480	40960	40960	<10	<10
	406	<10	<10	40960	20480	40960	20480	<10	<10
	134	<10	<10	5120	2560	5120	2560	2560	5120
	52	1280	1280	20480	10240	10240	5120	10240	5120
Kuroki型	55-12	<10	<10	<10	<10	<10	<10	5120	10240

<sup>a)</sup> IFA 抗体価は血清の最高希釈倍率の逆数で示した。

表11. 患者由来株に対するモルモット免疫血清の IFA抗体価

モルモット 免疫血清	各株に対する抗体価 <sup>a)</sup>							
	Ota	Miyashita	Katsumata	Morishita	Oishi	Rokudo	Maeda	Sugizaki
抗 Gilliam	160	80	320	640	320	640	160	160
抗 Karp	<u>5120</u> <sup>b)</sup>	<u>5120</u>	640	320	640	640	<u>5120</u>	<u>5120</u>
抗 Kato	640	320	640	160	160	320	320	160
抗 Kawasaki	80	40	<u>640</u>	<u>320</u>	<u>320</u>	<u>640</u>	160	80
抗 Kuroki	<u>10240</u>	5120	640	320	1280	1280	<u>20480</u>	<u>10240</u>

<sup>a)</sup> IFA 抗体価は血清の最高希釈倍率の逆数で示した。

<sup>b)</sup> アンダーラインはホモの株に対する抗体価と同じか差が4倍未満のもの。

なっていた。また、Maeda と Sugizaki の両株は Kuroki 型の単クローン性抗体 55-12 と反応し、抗 Kuroki モルモット免疫血清とも強い反応がみられたことから、Kuroki 型であると推定された。

### 3. マウスに対する Karp 株および 8 種類の患者由来株の病原性

Karp 株と患者由来の 8 株を ddY マウスに接種し、これらの発病および死亡状況を表12に、さらに Karp と Miyashita 以外の株については接種後のマウスの体重の変化を図16に表した。Karp 株を接種されたマウスでは 3 段階のいずれの濃度でも全頭発病して死亡したが、Ota 株と Miyashita 株の場合はいずれの濃度でもほとんどのマウスが発病したにもかかわらず、死亡せず回復するものも多かったため、これら 2 株はマウスに対して病原性は有しているものの、Karp 株に比べ病原性が弱いことが示唆された。Ota 株を接種したマウスは、高濃度のリケッチア液を接種したマウスほど体重の減少は早く始まり、体重が最も落ち込む時期も早期から発現したが、この時点で死亡するものと、回復に向かい体重が増加し始めるものとに分かれていく傾向がみられた。

表12. Karp株および患者由来株の ddYマウスに対する病原性

株名	原液 (ICU/0.5ml)	接種液 <sup>a)</sup> の希釈		
		1	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>
Karp	8.1×10 <sup>6</sup>	3/3(3) <sup>b)</sup>	3/3(3)	3/3(3)
Ota	1.5×10 <sup>6</sup>	3/3(1)	3/3(2)	2/3(1)
Miyashita	5.4×10 <sup>5</sup>	3/3(2)	3/3(3)	3/3(2)
Katsumata	1.2×10 <sup>6</sup>	0/3	ND <sup>c)</sup>	ND
Morishita	1.1×10 <sup>6</sup>	0/3	ND	ND
Oishi	6.5×10 <sup>5</sup>	0/3	ND	ND
Rokudo	1.7×10 <sup>5</sup>	0/3	ND	ND
Maeda	3.2×10 <sup>6</sup>	0/3	ND	ND
Sugizaki	6.0×10 <sup>5</sup>	0/3	ND	ND

<sup>a)</sup> 0.5ml / マウス (i. p.)

<sup>b)</sup> 発病数 / 接種数 (死亡数)

<sup>c)</sup> ND: 試験せず.

一方, CY投与マウスを用いて分離された6株の場合は, 一時的に体重が減少したマウスも認められたが, 発症例はまったくみられず, マウスに対する病原性が極めて弱いことが示唆された。

#### 4. 富士山東山麓におけるリケッチア分離状況および分離株の血清型

##### 1) *R. tsutsugamushi* 分離状況

患者血液, アカネズミ脾臓およびツツガムシプールの合計 248検体から, 59株の *R. tsutsugamushi* が分離された (表13, 表14)。患者血液からのリケッチア分離率は高く (75.0% ; 24/32), 特にCY投与マウスを用いた場合に最も高率 (81.5% ; 22/27) に分離された。しかし, ツツガムシからの分離率は低く, 147プール (5,492匹) 中リケッチアの分離されたのはタテツツガムシの2プール (30匹, 125匹) とフトゲツツガムシの3プール (各30匹) のみであった。

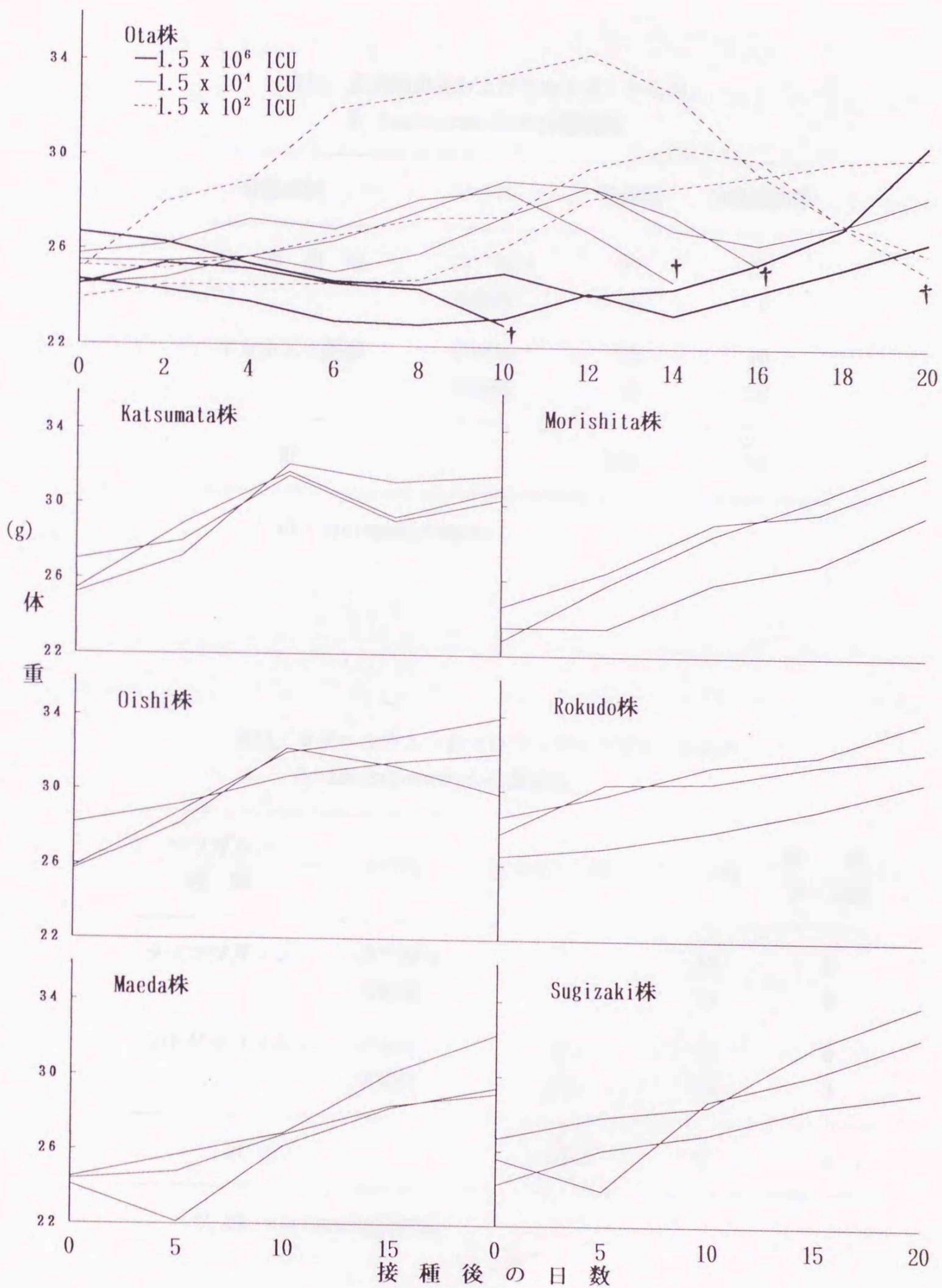


図16. リケッチア分離株を接種したマウスの体重変化。 † 死亡

表13. 恙虫病患者およびアカネズミからの  
*R. tsutsugamushi*の分離状況

分離材料	マウス	検体数	分離陽性数
患者血液	CY <sup>a)</sup> 投与	27	22
	未処置	5	2
アカネズミ脾臓	CY投与	33	10
	未処置	36	20
計		101	54

<sup>a)</sup> CY : cyclophosphamide.

表14. タテツツガムシおよびフトゲツツガムシからの  
*R. tsutsugamushi*の分離状況

ツツガムシ 種類	マウス	ツツガムシ数	プール数	陽性 プール数
タテツツガムシ	CY <sup>a)</sup> 投与	3,645	83	2
	未処置	302	11	0
フトゲツツガムシ	CY投与	744	24	0
	未処置	801	29	3
計		5,492	147	5

<sup>a)</sup> CY : cyclophosphamide.

## 2) 分離株の血清型

分離株と5種類の型特異的単クローン性抗体（Gilliam型 3H5, Karp型 3C9, Kato型 1D12, Kawasaki型 417, Kuroki型 55-12）との反応性を表15に示した。全ての分離株はそれぞれ型特異的単クローン性抗体の1種類とのみ反応し、その反応性からKarp型, Kawasaki型およびKuroki型の3種類の血清型に分類された。

これらの分離株ではKarp型が59.3% (35/59) で最も多く、この型のリケッチアは患者だけでなくフトゲツツガムシとアカネズミからも分離された。Kawasaki型のリケッチアは患者から54.2% (13/24), またタテツツガムシおよびアカネズミからわずかずつ分離された。また、Kuroki型のリケッチアは患者からのみ分離された。なお、Kawasaki型およびKuroki型に分類された分離株は全てCY投与マウスを用いて分離された。

## 3) 分離株の地理的分布

分離株59株の検体採取地の地理的分布を図17に示した。Kawasaki型のリケッチアが分離された患者13名は、東富士演習場（標高 500m以上）で働いている自衛官あ

表15. 単クローン性抗体を用いたIFAによる *R. tsutsugamushi* 分離株の血清型別

分離材料	分離株数	血清型の同定された株数				
		Gilliam	Karp	Kato	Kawasaki	Kuroki
患者血液	24(22) <sup>a)</sup>	0	7(5)	0	13(13)	4(4)
タテツツガムシ	2(2)	0	0	0	2(2)	0
フトゲツツガムシ	3(0)	0	3(0)	0	0	0
アカネズミ脾臓	30(10)	0	25(5)	0	5(5)	0
計	59(34)	0	35(10)	0	20(20)	4(4)

<sup>a)</sup> ( ) cyclophosphamide 投与マウスにより分離された株数.

るいは演習場の近くに住んでいる一般住民のどちらかであった。同地域では Kawasaki型のリケッチアがタテツツガムシ2プールとアカネズミ5匹からも分離された。一方, Kuroki型の4株は標高 500m以下の東地区と北東地区に居住していた患者から分離された。Karp型のリケッチアの分離された地点は演習場以外の広い地域に散在していたが, この型のリケッチアの分離された患者は標高 500m以下の中央地区から北東地区にかけてみられた。なお, アカネズミに由来したKarp型の25株のうち16株は東地区の箱根山の山麓で捕獲された個体から分離された。

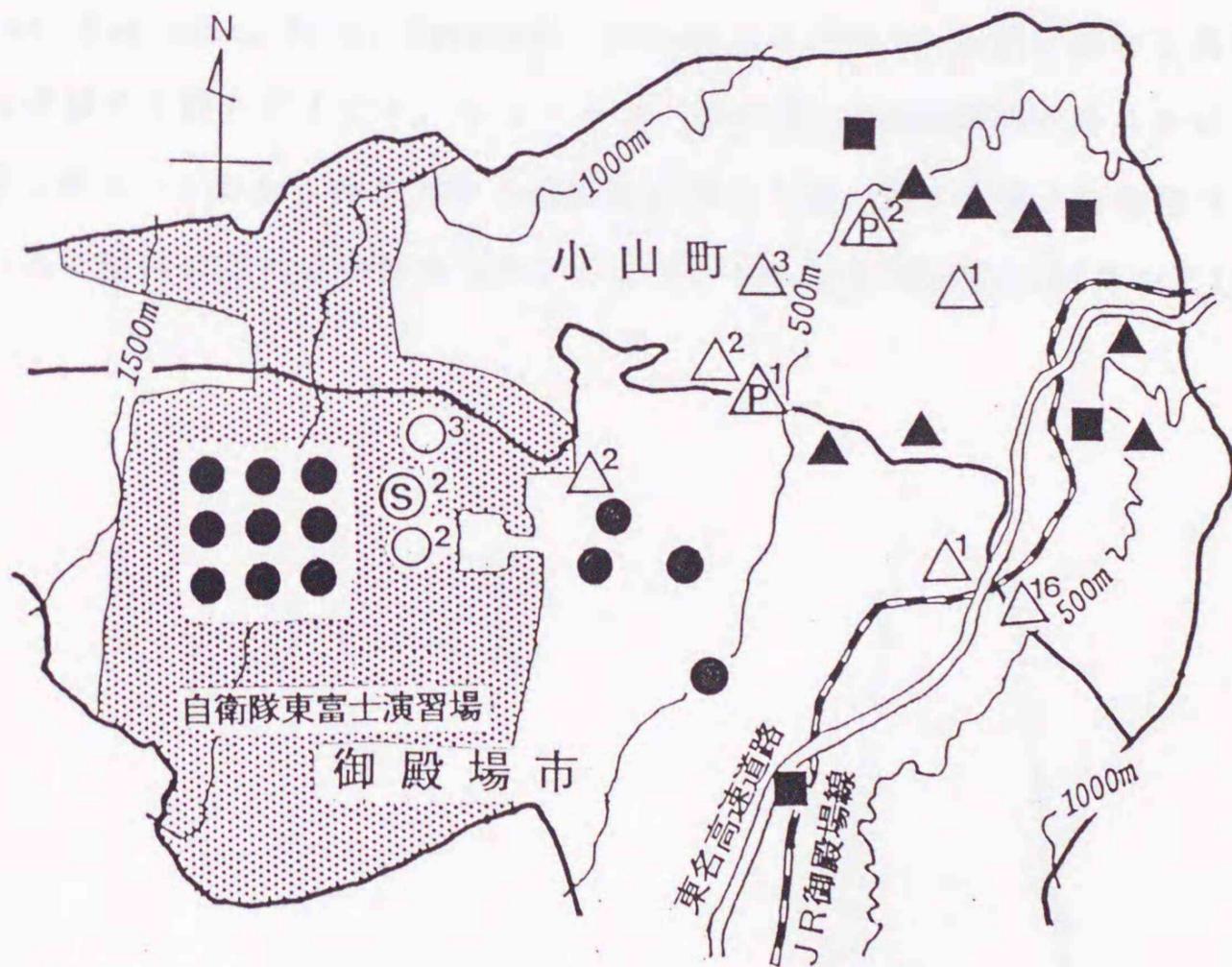


図17. 富士山東山麓における *R. tsutsugamushi* 分離株の血清型の分布。  
 患者由来株：▲ Karp型, ● Kawasaki型, ■ Kuroki型。  
 ツツガムシ由来株：△ Karp型 (7ヶ), ⊙ Kawasaki型 (5ヶ)。  
 アカネズミ由来株：△ Karp型, ○ Kawasaki型。  
 ツツガムシ由来株とアカネズミ由来株の肩数字は分離株数を表す。

4) 恙虫病発生数と患者由来株の血清型の季節消長との関係

御殿場市と小山町では9月から11月までの3カ月に恙虫病患者の大半が発見され、今回リケッチアが分離された24名の患者も全員この間に発病していた(図18)。3月と4月にも少数の患者がみられたが、リケッチアの分離は試みられなかった。分離株を血清型別したところ、Kawasaki型のリケッチアは10月に、またKarp型のリケッチアは11月に優勢となることが明らかとなった。Kuroki型のリケッチアは10月と11月に各々2名から分離されたただけであった。

5. 静岡県 of 恙虫病患者血清における *R. tsutsugamushi* 6株に対する反応性

1) 患者血清の特異性

Gilliam, Kawasaki, Kato, Kawasaki, KurokiおよびOtaの各株に対する各患者のIFA抗体価を比較したところ、少なくともIgG抗体とIgM抗体のどちらかにおいて、標準3株のいずれか1株に対する抗体価が他の5株に対する値より有意(4倍以上)に高い症例は認められなかった。しかし、Kawasaki株、Kuroki株およびOta

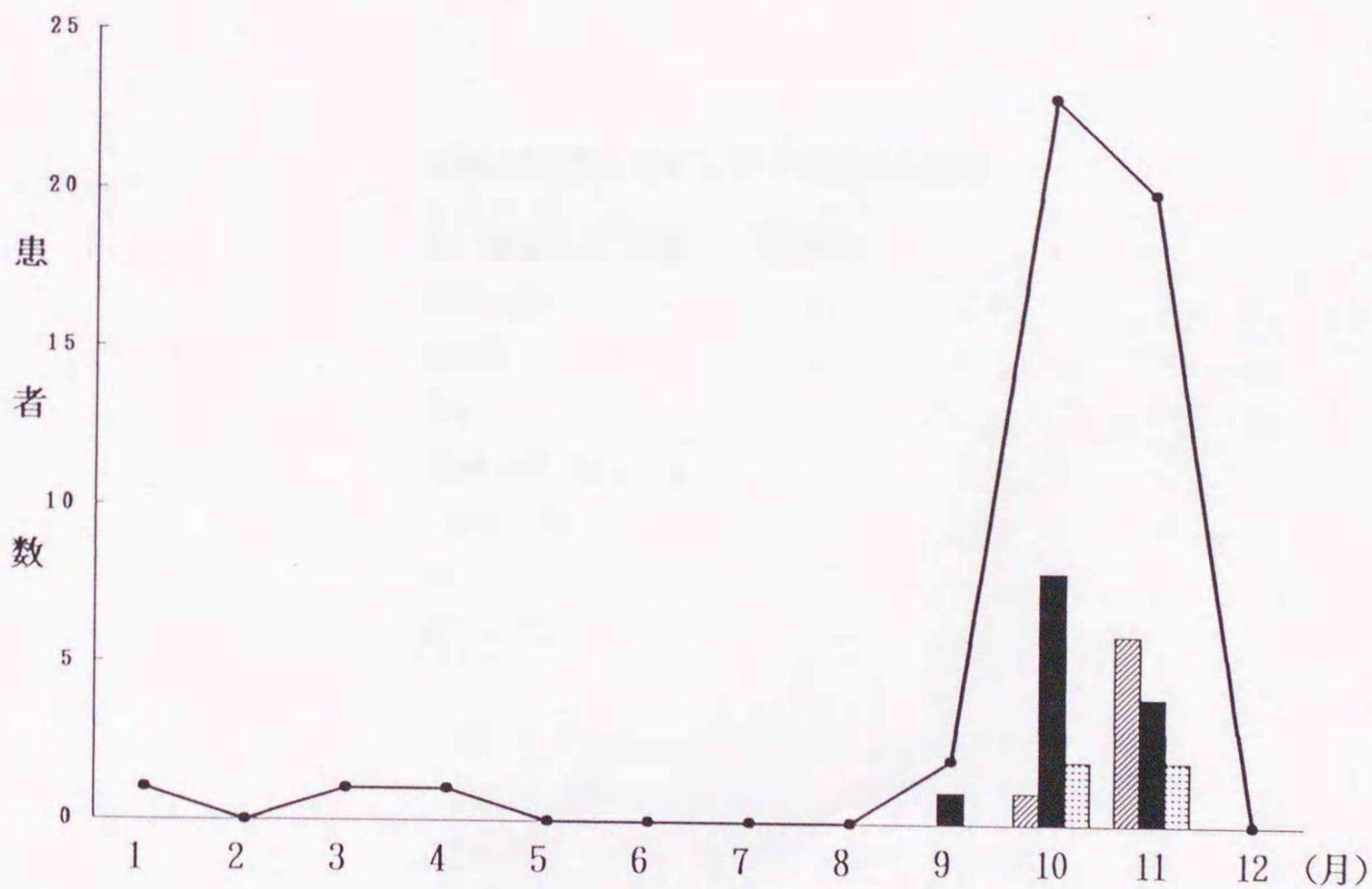


図18. 富士山東山麓における月別恙虫病患者数および患者からの分離株の血清型.

●—● 恙虫病患者数, 分離株: ▨ Karp型, ■ Kawasaki型, ▤ Kuroki型.

株のいずれか1株のみに有意に強く反応したのは、26症例（72.2%）に達していた（表16、表17）。また、Kawasaki株とGilliam株、Kuroki株とKarp株あるいはOta株とKarp株のそれぞれ2株に対し強く反応し（抗体価の差が4倍未満）、高い方の抗体価がこれら2株以外の4株の値に比べて有意に高かったのは7症例（19.4%）確認された。なお、有意に強く反応する株がみられなかった症例は3例（8.3%）に過ぎなかった。Kawasaki株単独あるいはKawasaki株とGilliam株に強く反応したのは20症例で過半数を占めた。また、Kuroki株単独あるいはKuroki株とKarp株に強く反応したのは4症例、Ota株単独あるいはOta株とKarp株に強く反応したのは9症例であった。

患者血清についてIgG抗体とIgM抗体の反応性の違いについて検討したところ、6株のうち1株にのみ強く反応したのはIgG抗体では13検体、IgM抗体では24検体であった（表17）。さらに、1株に対してのみ1:10以上の抗体価を示したのはIgG抗体では5検体、またIgM抗体では10検体で、後者の方が株間の抗体価の差が大きくなる傾向がみられた。

表16. 各株に対する患者血清の反応性

強く反応した株名 <sup>a)</sup>	症例数	%
Kawasaki	18	50.0
Kuroki	3	8.3
Ota	5	13.9
Kawasaki-Gilliam	2	5.6
Kuroki-Karp	1	2.8
Ota-Karp	4	11.1
該当株なし	3	8.3
計	36	100.0

<sup>a)</sup>他の5株よりも4倍以上高い抗体価を示した症例。2株連記は2株に対する抗体価の差が4倍未満で、高い方の抗体価が他の4株に対する抗体価より4倍以上高かった症例。

表17. 恙虫病患者の *R. tsutsugamushi* に対する IFA抗体価

症例 No.	発病 年月	採血 病日	IgG 抗体価 <sup>a)</sup>						IgM 抗体価					
			GL <sup>b)</sup>	KP	KT	KW	KR	OT	GL	KP	KT	KW	KR	OT
1	1987. 2	17	1280	1280	1280	1280	1280	1280	640	640	640	640	1280	5120
2	1987. 4	8	1280	2560	1280	320	640	2560	10240	10240	10240	2560	2560	5120
3	1987. 5	11	1280	10240	2560	640	320	10240	10240	10240	5120	1280	1280	10240
4	1987. 9	11	40	10	20	40	20	10	<10	<10	<10	40	<10	<10
5	1987. 10	16	160	160	160	320	80	80	160	10	20	1280	10	10
6	1987. 10	23	40	<10	<10	80	<10	<10	320	10	10	640	<10	<10
7	1987. 10	13	160	160	160	640	160	160	320	160	160	5120	160	320
8	1987. 10	59	640	320	640	640	640	160	160	160	160	80	80	80
9	1987. 11	51	640	640	160	2560	320	320	320	20	20	1280	20	10
10	1987. 11	8	40	40	40	40	40	20	320	160	160	40	160	160
11	1987. 11	46	160	40	20	1280	10	40	160	40	40	1280	10	40
12	1987. 11	7	<10	<10	<10	40	<10	<10	<10	<10	<10	80	<10	<10
13	1987. 11	3	40	<10	<10	40	<10	<10	<10	<10	<10	320	<10	<10
14	1988. 1	9	<10	20	<10	<10	10	20	<10	20	<10	<10	160	20
15	1988. 1	9	10	40	10	10	20	80	10	20	<10	10	10	80
16	1988. 1	24	2560	10240	2560	320	5120	10240	10240	20480	5120	320	640	10240
17	1988. 10	18	160	80	160	320	40	40	1280	320	320	2560	80	160
18	1988. 10	9	40	40	20	20	80	20	<10	<10	<10	<10	10	<10
19	1988. 10	6	160	20	80	160	20	40	160	10	20	5120	10	<10
20	1988. 10	9	80	40	80	640	20	20	1280	160	160	5120	80	80
21	1988. 11	6	20	20	<10	10	10	10	<10	<10	<10	10	<10	<10
22	1988. 11	6	640	1280	640	160	1280	160	160	640	160	80	640	160
23	1988. 11	8	<10	<10	<10	20	<10	<10	<10	<10	<10	320	<10	<10
24	1988. 11	23	640	5120	1280	320	640	2560	2560	5120	2560	1280	1280	10240
25	1988. 11	8	80	160	80	40	80	320	<10	<10	<10	<10	<10	160
26	1988. 12	13	320	320	160	1280	80	320	20480	5120	10240	40960	1280	5120
27	1989. 4	14	320	1280	640	160	640	1280	320	1280	160	160	160	1280
28	1989. 10	9	<10	<10	<10	40	<10	<10	1280	<10	<10	10240	<10	<10
29	1989. 10	10	80	80	40	1280	20	40	320	<10	<10	1280	<10	<10
30	1989. 10	7	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	<10	<10
31	1989. 10	9	160	160	160	1280	160	80	640	<10	<10	2560	<10	<10
32	1989. 11	4	20	20	320	40	320	40	80	80	640	<10	2560	80
33	1989. 11	8	<10	<10	<10	40	<10	<10	<10	<10	<10	320	<10	<10
34	1989. 11	7	80	320	160	80	160	320	80	160	160	<10	80	1280
35	1989. 11	8	<10	<10	<10	<10	<10	80	<10	<10	<10	<10	<10	40
36	1989. 12	15	40	10	<10	320	10	20	640	10	40	10240	10	40

<sup>a)</sup> IFA 抗体価は血清の最高希釈倍率の逆数で示した。

<sup>b)</sup> GL: Gilliam, KP: Karp, KT: Kato, KW: Kawasaki, KR: Kuroki, OT: Ota.

## 2) 血清供試患者の地理的分布および月別発生状況

患者数は富士山東山麓の御殿場市と小山町が全体の63.9% (23/36) を占め著しく多かったが、この地域ではKawasaki株単独あるいはKawasaki株とGilliam株に強く反応した症例が大半 (69.6% ; 16/23) を占め (図19), 10~11月の流行の主流となっていた (図20)。このような反応性を示した症例は富士山東山麓以外でも東部と浜名湖周辺で11~12月に少数みられた。また、Ota株単独あるいはOta株とKarp株に強く反応した症例は広い範囲で観察され、11月と1~5月にみられた。Kuroki株単独あるいはKuroki株とKarp株に対して高い抗体価を示した症例は、富士山東山麓において3症例 (10~11月) と伊豆で1症例 (1月) 確認されたただけであった。

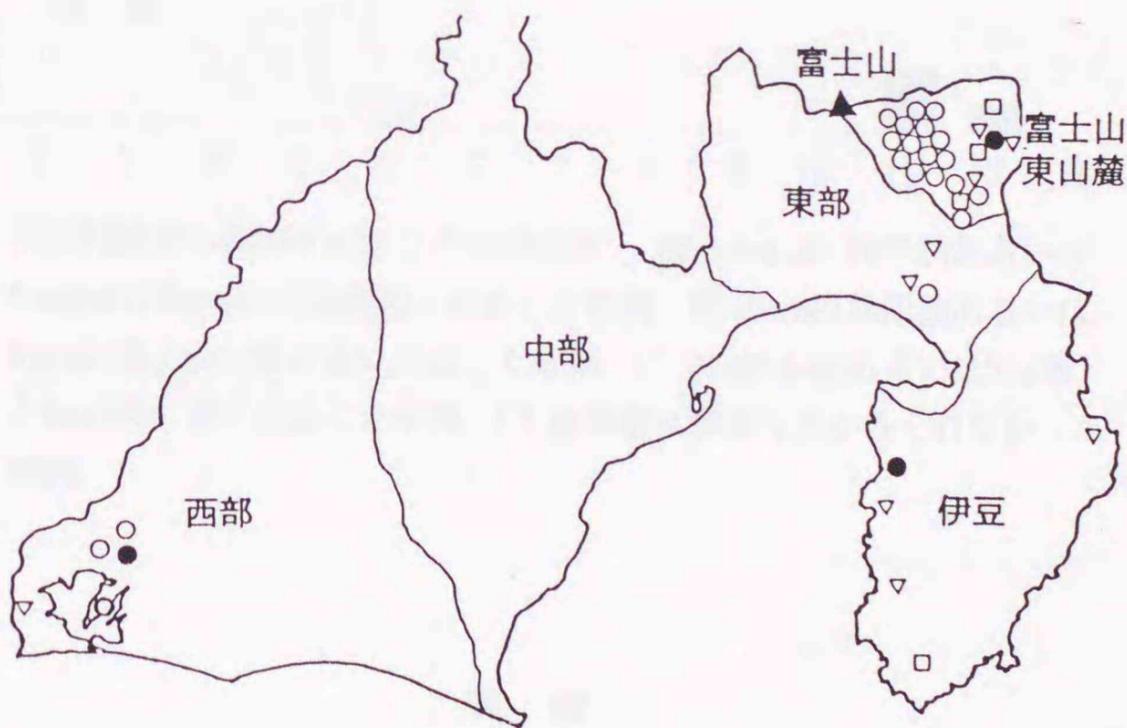


図19. 恙虫病患者の血清反応性と発生地の地理的分布. ○ Kawasaki株単独あるいはKawasaki株とGilliam株に強く反応した症例, □ Kuroki株単独あるいはKuroki株とKarp株に強く反応した症例, ▽ Ota株単独あるいはOta株とKarp株に強く反応した症例, ● 抗体価に顕著な差がなかった症例.

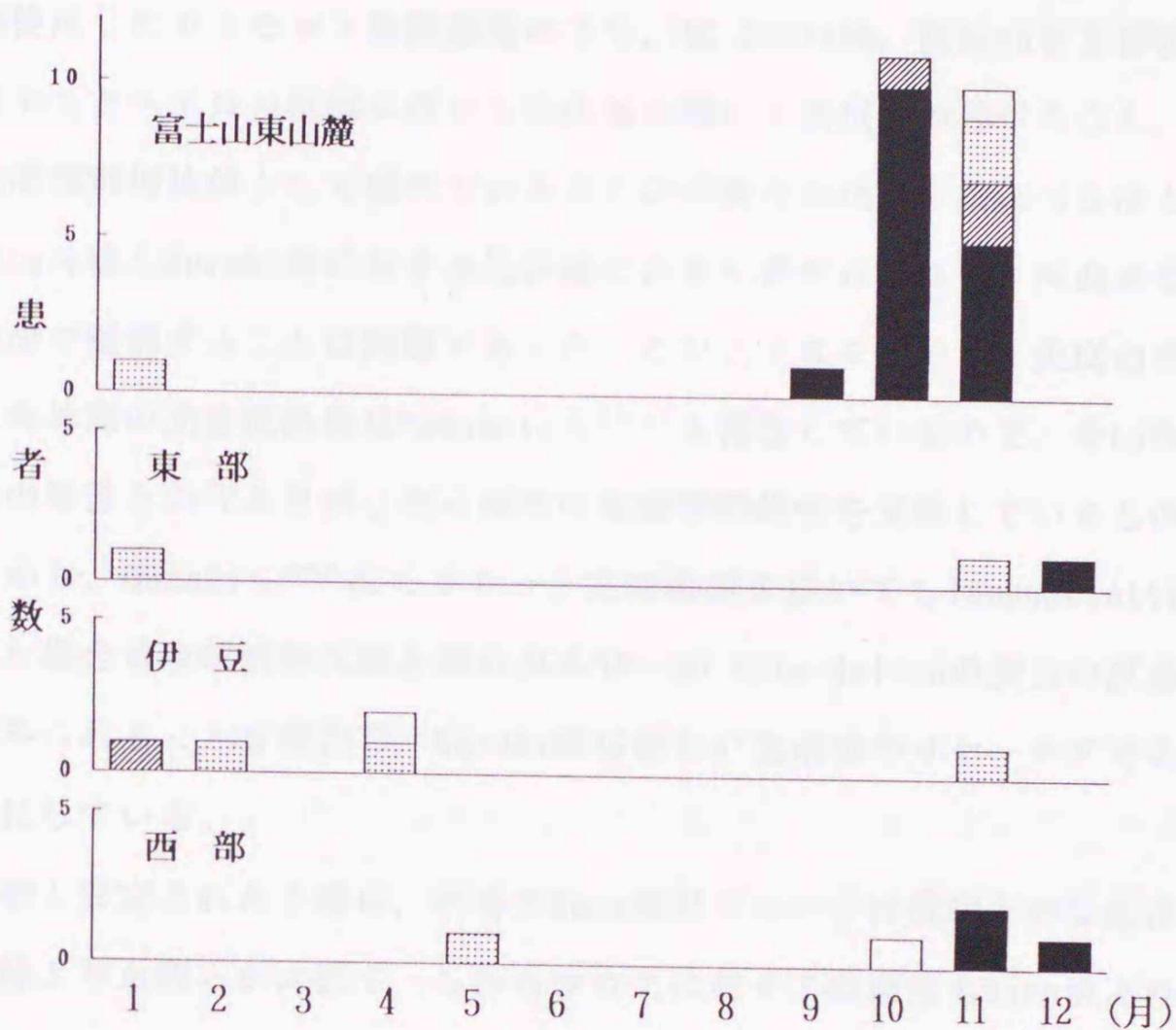


図20. 恙虫病患者の血清反応性と月別発生数。■ Kawasaki株単独あるいはKawasaki株とGilliam株強く反応した症例，// Kuroki株単独あるいはKuroki株とKarp株に強く反応した症例，... Ota株単独あるいはOta株とKarp株に強く反応した症例，□ 抗体価に顕著な差がみられなかった症例。

### 考 察

富士山東山麓において恙虫病患者から分離された8株の *R. tsutsugamushi* はモルモット免疫血清では抗Karpと抗Kuroki血清に強く反応する4株と抗Kawasaki血清に強く反応する4株の2群に分類された。しかし，単クローン性抗体を用いることにより前者はさらにKarp型の2株とKuroki型の2株に分類することができ，分離株の免疫学的性状を検討する上で，特異性が著しく高い単クローン性抗体の有用性が

明らかとなった。

今回使用したモルモット免疫血清のうち、抗 Gilliam, 抗Katoおよび抗Kawasaki血清はホモとヘテロの抗原に対する抗体価の間に8倍以上の差がみられ、リケッチアの血清型別用抗体として優れていることが示唆されたが、抗Karp血清と抗Kuroki血清はKarp株とKuroki株に対する抗体価にあまり差がみられず、両血清型株をこれらの血清で鑑別することは困難であった。このようなモルモット免疫血清におけるこれら両株間の交差反応性はYamamotoら<sup>11)</sup>も報告しているので、今回作製した免疫血清の特徴というよりはこれら両株の免疫学的特性を反映しているものと思われる。しかし、Ohashiら<sup>5,6)</sup>はモルモット免疫血清を用いてもImmunoblotting上で反応させた場合は型特異的抗原と思われる54~56 kilo daltonの蛋白の反応性に顕著な差がみられることを報告し、Kuroki株は新しい血清型のリケッチアであることを明らかにしている。

Karp型と同定された2株は、ホモのKarp型単クローン性抗体との反応性が標準株のKarp株よりも明らかに低く、しかもマウスに対する病原性もKarp株よりも低いので、Karp株とは抗原性のやや異なる株であったと判断された。Ota株接種マウスは、接種リケッチア数が多いほど潜伏期が短くなる傾向がみられたが、接種リケッチア数にかかわらず、体重が最も減少した時点で死亡するものと回復するものに別れた。このような現象は既知の3種類の標準株をそれぞれ接種されたマウスでは観察されなかったことから<sup>8,9)</sup>、これらはこの地域に存在するKarp型のリケッチア特有の病原性の程度を示すものと思われ、今後このような新しい現象についてもマウスの抗体産生や免疫系細胞との関連などを参考にしながら、解明していく必要があると思われる。

本研究において、著者はリケッチアの分離にCY投与マウスと未処置マウスの両方を使ったが、Kawasaki型とKuroki型のリケッチアはCY投与マウスを用いた場合にのみ分離され、Karp型のリケッチアはいずれのマウスを用いても分離された。また、フトゲツツガムシから分離されたKarp型の3株は、CY未処置マウスにおいて初代から典型的な症状を示したのに対し、タテツツガムシから分離されたKawasaki型の2

株は、CY投与マウスを用いて2～3代継代した後にやっと確認された。さらに、実際にマウスに対する病原性の検査された患者由来の8株は、マウスに対し病原性を有するKarp型の株と病原性を示さないKawasaki型とKuroki型の株に分けられた。これらの結果は、Kawasaki型、Kuroki型およびShimokoshi型に分類される全ての株が、マウスに対して Gilliam型、Karp型およびKato型のリケッチアよりも病原性が弱いというTamuraの説<sup>90)</sup>を支持するものであった。

Elisbergら<sup>14)</sup>は、タイでは複数の血清型の *R. tsutsugamushi* が混合して野ネズミに感染していることを確認している。また、Shiraiら<sup>71)</sup>がマレーシアの恙虫病患者から分離した114株の大半は複数の血清型が混合して感染したものであった。本研究において、恙虫病患者、野ネズミおよびツツガムシ幼虫から分離された59株は、すべてただ一つの型特異的単クローン性抗体 (Karp型 3C9, Kawasaki型 417, Kuroki型 55-12) に反応した。Murataら<sup>48)</sup>も国内の患者、野ネズミおよびフトゲツツガムシ幼虫から得られた22株のリケッチアは型特異的単クローン性抗体の1種類とのみ反応することを報告している。それぞれの患者や野ネズミに感染している *R. tsutsugamushi* の血清型が日本では単独でありタイやマレーシアでは大半が混合しているという相違点の原因はまだはっきりわかっていない。

浅沼<sup>2)</sup>は *R. tsutsugamushi* の保有が確認されている13種類のツツガムシを紹介している。この中には、タテツツガムシ、フトゲツツガムシ、アカツツガムシ、ヤマトツツガムシなどが含まれている。旧ソ連の研究者は、ミタムラツツガムシと *Neotrombicula pomeranzevi* からリケッチアの分離に成功している<sup>43, 73)</sup>。日本においては第2次世界大戦以前はアカツツガムシが最も重要なベクターと考えられており、最初にリケッチアが分離されたツツガムシもこの種類であった<sup>37)</sup>。第2次世界大戦以後、多数の研究者が国内の多くの流行地で採取したタテツツガムシ<sup>4, 6, 31, 41, 51)</sup> およびフトゲツツガムシ<sup>3, 5, 6, 28, 44, 87, 88)</sup>からのリケッチア分離に成功した。しかし、これらの報告では野ネズミに寄生していたツツガムシを分離材料としている。リケッチア保有野ネズミに吸着した際にまれに *R. tsutsugamushi* がツツガムシに移行することが知られているので<sup>60)</sup>、野ネズミに寄生しているツツ

ガムシからの分離株は、垂直伝播したものと野ネズミから移行したものの両方が考えられる。本研究の目的はリケッチアの血清型とベクターの種類を決定することなので、野ネズミからツツガムシへの *R. tsutsugamushi* の移行の可能性を排除できる寄生前のツツガムシ幼虫のみを分離材料として使った。その結果、タテツツガムシからKawasaki型のリケッチアを2株、フトゲツツガムシからKarp型のリケッチアを3株分離することに成功した。

リケッチアの血清型とベクターの種類に関しては、いくつかの示唆的な報告を見出すことができる。たとえば、新潟県においては最近の本病発生の主たるベクターはフトゲツツガムシと考えられているが、患者と野ネズミから分離された株はすべてKarp型とGilliam型に分類されている<sup>48)</sup>。また、タテツツガムシが多数生息している南九州<sup>112)</sup>において患者から分離された株は全てKawasaki型とKuroki型に分類された<sup>110)</sup>。これらの成績は、Karp型とGilliam型のリケッチアはフトゲツツガムシにより媒介され、Kawasaki型とKuroki型のリケッチアはタテツツガムシが関与していることを示唆している。実際、Murataら<sup>48)</sup>はフトゲツツガムシ由来のリケッチア2株をKarp型と同定しており、また高橋<sup>87)</sup>は継代飼育しているフトゲツツガムシのコロニーにKarp型のリケッチアが自然感染していることを報告している。同様に、本研究においてフトゲツツガムシからKarp型のリケッチアが分離された。さらに、著者はタテツツガムシからKawasaki型のリケッチアの分離に成功したが、このことはKawasaki型のリケッチアとその媒介ツツガムシの関係を示す最初の報告である。今回、Kuroki型のリケッチアは患者からしか分離できなかったため、この型のリケッチアについてはベクターの種類を解明できなかった。Kuroki型のリケッチアのベクターの可能性としては、(1)タテツツガムシまたはフトゲツツガムシのどちらか一方が複数の型のリケッチアを媒介している、(2)この両種以外にこの型のリケッチアを媒介するツツガムシが存在している、の2つの考え方ができる。

タテツツガムシは東富士演習場およびその周辺でよくみられるススキがまばらに生えた火山性の砂礫土壌の地域に多数生息していることが、第1章で明らかとなった。このようなタテツツガムシの分布様式は、患者、野ネズミおよびタテツツガム

シからKawasaki型のリケッチアが分離された地点の分布とよく一致していた。なお、演習場内では、野ネズミからKarp型のリケッチアは分離できなかった。一方、フトゲツツガムシの多数生息している環境はタテツツガムシの好適環境より低地の大型水田の畦畔であることが、第1章で示唆された。Karp型のリケッチアが分離された患者とフトゲツツガムシは本種が優占種となる水田地帯で確認されている。Kuroki型のリケッチアが分離された患者は、タテツツガムシとフトゲツツガムシの両種が混在する地域で感染しており、この型のリケッチアとベクターの種類を患者とツツガムシの地理的分布から推測することはできなかった。

著者は第1章において、静岡県におけるタテツツガムシとフトゲツツガムシの季節消長から、秋期にはタテツツガムシによって本病の発生が引き起こされ、冬から春にかけてはフトゲツツガムシが主ベクターになるものと推定した。ところが、本章では、Kawasaki, KarpおよびKurokiの3種類の血清型のリケッチアが秋期に分離され、両種のツツガムシがこの時期の恙虫病の発生に関与していることが示唆された。すなわち、患者からのKawasaki型(10月)とKarp型(11月)のリケッチア分離のピークはわずかに相違したに過ぎなかったため、今回の調査地域ではタテツツガムシが媒介するKawasaki型のリケッチアによる感染は早秋に優勢となり、またフトゲツツガムシによるKarp型のリケッチアの感染は晩秋とおそらく春期にもみられるという結論を下した。なお、Kuroki型のリケッチアによる感染は10月と11月の秋期にみられたが、様々な自然宿主体内でこの型のリケッチアの季節的変動を論じるにはより多くのデータが必要である。

恙虫病患者に感染した *R. tsutsugamushi* の型別は患者血液から分離されたりケッチアについて型特異性抗原を認識する単クローン性抗体等の反応性を調べるのが確実である<sup>18)</sup>。しかし、患者からのリケッチア分離は検体中のリケッチアが死滅しやすいことや手技が煩雑なことから、一般にはあまり実施されていない。鈴木ら<sup>82)</sup> および山本ら<sup>110)</sup> は、恙虫病患者の血清に対してIFAで最も強く反応した株の血清型は、ほとんどの場合その患者からの分離株の血清型と同じであったと報告している。したがって、リケッチア分離が実施できない場合には各抗原に対する抗

抗体価の差から感染リケッチアの血清型を推測することが可能であると考えられる。今回のように予め調査地域に存在するリケッチアの血清型を明らかにした上で、標準株以外のリケッチア株も抗原として加えて検討すれば、感染リケッチアの血清型の解析に関する信頼性も高まるものと思われる。

今回供試された恙虫病患者36名の血清のうち、各株に対する抗体価に明確な差がみられず、感染型の推定できなかつたものは標準3株のみを抗原として検討した場合では12症例(33.3%)であった。しかし、これらにKawasaki株、Kuroki株およびOta株を加えた場合に感染型不明となつたのはわずか3症例(8.3%)に過ぎなかつた。しかも、抗原として6種類の株を用いた場合、標準株にのみ強く反応する症例はなかつたことから、静岡県における恙虫病患者の発生の大半は標準3株よりもKawasaki株、Kuroki株あるいはOta株と抗原的に類似したリケッチアによって引き起こされている可能性が高いと思われる。また、感染初期血清では標準株以外の株に単独で反応するケースが多かつたことから、血清診断用の抗原にKawasaki株、Kuroki株およびOta株を加えることは感染リケッチアの血清型の推定を容易にするだけでなく、早期診断を行う上でも極めて有用であると判断された。

本県においてKawasaki株に対して高い抗体価を示した血清のほとんどは、タテツツガムシの生息数が著しく多い富士山東山麓で発生した患者由来のものであつた。また、このような反応を示した症例は10月と11月の秋期に集中しており、この地域におけるタテツツガムシ幼虫の出現時期とよく一致していた。一方、Ota株単独あるいはOta株とKarp株の両方に強く反応した症例は県内に広く生息するフトゲツツガムシの分布に一致して発生していることが確認され、しかもタテツツガムシ幼虫が採取されない春期にもみられた。これらのことから、静岡県ではタテツツガムシがKawasaki型のリケッチアを、またフトゲツツガムシがOta株のようなKarp型のリケッチアを媒介していることが推測され、富士山東山麓での分離株の型別成績から導かれた結論と一致していた。

本研究により静岡県にはKarp型の他にKawasaki型およびKuroki型の *R. tsutsugamushi* の存在が確認されたが、Kawasaki株<sup>11)</sup>とKuroki株<sup>56)</sup>は宮崎県の患者か

ら分離されたものであり、山本ら<sup>110)</sup>は、この地域で患者から分離された27株のリケッチアは全てこれら両株のどちらかに血清学的性状が類似することを報告している。一方、橘ら<sup>84, 85)</sup>は宮崎県において患者から分離されたリケッチアをIrie型とHirano型に大別しているが、山本ら<sup>110)</sup>はIrie株とKawasaki株ならびにHirano株とKuroki株がそれぞれ同一の抗原型である可能性を示唆している。また、岐阜県<sup>113)</sup>や神奈川県<sup>18)</sup>においても、Kawasaki型とKuroki型のリケッチアが存在する可能性が示されているので、これら2種類の血清型のリケッチアはヒトに対しては病原性を有し、関東以西の太平洋側の温暖な地域において、恙虫病の流行原因となっていることが推測された。

## 要 旨

*R. tsutsugamushi*のGilliam, Karp, Kato, KawasakiおよびKurokiの5種類の血清型株に対する合計15種類の単クローン性抗体について各株の交差反応性を検討したところ、それぞれの血清型に対する単クローン性抗体のうち1ないし2種類はホモの株にのみ反応した。また、Kawasaki型抗体の1種類は全ての血清型株と反応し、それ以外の単クローン性抗体はホモの株を含む2～3種類の株で反応がみられた。一方、Gilliam, Karp, Kato, KawasakiおよびKurokiの各株を抗原として免疫し、作製されたモルモット免疫血清のうち、抗Gilliam, 抗Katoおよび抗Kawasakiの各抗血清はホモの株でのみ強く反応したが、抗Karp血清と抗Kuroki血清では、Karp株とKuroki株に対する抗体価に差がみられず、両株は免疫学的に近縁であることが示唆された。

富士山東山麓で発生した恙虫病患者から分離された *R. tsutsugamushi* 8株について、単クローン性抗体とモルモット免疫血清に対する反応性を検討したところ、それらのうちの2株はKarp型に、4株はKawasaki型に、また2株はKuroki型に属することが明らかとなった。これらの株についてマウスに対する病原性を検討したところ、Karp型の2株は標準のKarp株よりも弱毒ながら病原性が認められた。しかし、それ以外の6株では明確な病原性が認められず、これらの株は病原性の面からもKawasaki株やKuroki株に類似していることが確認された。

富士山東山麓の御殿場市と小山町において、cyclophosphamide (CY) 投与マウスあるいは未処置のマウスを用いて恙虫病患者から24株、アカネズミから30株および未寄生のツツガムシ幼虫から5株（タテツツガムシ幼虫2株、フトゲツツガムシ幼虫3株）、合計59株の *R. tsutsugamushi* が分離された。また、これらの分離株は、供試された5種類の型特異的単クローン性抗体との反応性から、Karp型が35株、Kawasaki型が20株およびKuroki型が4株の3血清型のいずれかに分類された。なお、Kawasaki型とKuroki型の分離株はすべてCY投与マウスを用いて分離されたことから、これら両血清型の分離株はマウスに対する病原性の弱いことが示唆された。

Kawasaki型とKarp型のリケッチアは、それぞれタテツツガムシとフトゲツツガムシから分離された。さらに、これらの2つの型のリケッチアが分離された患者および野ネズミの地理的分布とそれぞれのツツガムシが多数生息する地域とは一致していたことから、Kawasaki型のリケッチアはタテツツガムシから、またKarp型のリケッチアはフトゲツツガムシから伝播するという結論が得られた。タテツツガムシとフトゲツツガムシの季節消長を反映して、Kawasaki型のリケッチアによる感染は早秋に、またKarp型の感染は晩秋に発生のピークが認められた。Kuroki型のリケッチアは10月と11月に4名の患者から分離されただけなので、この型のリケッチアを媒介するツツガムシの種類に関しては依然として不明のままである。

恙虫病患者の血清36検体について、*R. tsutsugamushi* の Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kurokiおよび静岡県患者から分離されたKarp型のOtaの各株との反応性をIFAにより検討した。標準株のいずれかに対し単独で強く反応する血清は確認されなかったが、Kawasaki, KurokiおよびOtaの各株のいずれかに単独で強く反応した検体は72.2%を占めた。このことから、静岡県における恙虫病起因リケッチアの大半はKawasaki株、Kuroki株およびOta株のいずれかに抗原的に類似していることが示唆された。なお、Kawasaki株単独あるいはKawasaki株とGilliam株に強く反応したのは20症例、またOta株単独あるいはOta株とKarp株に強く反応したのは9症例であった。しかし、Kuroki株単独あるいはKuroki株とKarp株に強く反応したのは4症例に過ぎなかった。

患者血清が1株にのみ強く反応したのはIgG抗体では13検体、またIgM抗体では24検体となり、IgM抗体の方で株間の抗体価の差が大きくなる傾向がみられた。また、感染初期の血清ではKawasaki株、Kuroki株およびOta株のいずれかの株に対してIgM抗体の反応する症例が多かったため、これらの株を血清診断用の抗原に加えることは早期診断を行う上でも極めて有用と判断された。

Kawasaki株に強く反応した症例は、地理的には富士山東山麓に、発生時期では秋期に集中した。また、Ota株に強く反応した症例は中部を除く地区で広範囲にみられ、発生時期も11～5月までの期間に及んだ。静岡県におけるツツガムシ幼虫の分

布と季節消長の成績を総合すると、この地域において本病を引き起こしている Kawasaki型株と Ota株のようなKarp型のリケッチアのベクターは、それぞれタテツツガムシとフトゲツツガムシであると推測された。また、これらの総合成績は分離株の血清型別成績から得られた結論とも良く一致していた。

### 第 3 章

Polymerase chain reaction 法による

*Rickettsia tsutsugamushi* DNA の検出

ならびに制限酵素切断法による

リケッチア血清型の同定

## 序 文

恙虫病は1～2週間の潜伏期間を経て突然発症するが、発病初期には *R. tsutsugamushi* に対する抗体が充分産生されていないために、この段階では血清診断の困難な場合が多い。最近導入された PCR法<sup>64)</sup> は、微量の病原体でも短時間で検出できるので、特に抗体があまり産生されていない本病の急性期（リケッチア血症時）における患者血液からのリケッチア DNAの検出への応用に期待されている。

我が国に存在する *R. tsutsugamushi* の6種類の血清型 (Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki, Shimokoshi) の抗原性の相違はリケッチア外膜に存在する56 kilo dalton (kDa)の主要蛋白である型特異的抗原 (type-specific antigen; TSA) に由来する。TSA遺伝子のクローニングおよびシーケンスは、Karp株についてはStoverら<sup>74)</sup> が、他の5株についてはOhashiら<sup>54, 55)</sup> が行った。TSA遺伝子の核酸の配列は、それぞれの血清型の間で70～90%のホモロジーがみられ、4箇所の variable domainが確認されている<sup>55)</sup>。

Furuyaら<sup>17)</sup> は、1回目のPCR産物を再度同じプライマーのセットを用いて増幅する PCR法 (double PCR) により恙虫病患者血液から TSA遺伝子上の 78 base pairs (bp) の短いDNAの増幅に成功した。患者血液のような一般的にはリケッチアが微量にしか含まれない臨床材料から長いDNAを single PCRや double PCRにより検出することは困難である。Nested PCR (two-step PCR) は1回目の PCR産物をその増幅領域内に対応させたもう一組のプライマーを用いて2回目の増幅を行うもので、非常に高感度でしかも特異性に優れている方法として、最近用いられるようになってきた<sup>25, 45)</sup>。もし、比較的長いDNAが増幅されれば、前記の6株の塩基配列の比較から患者に感染したリケッチアの血清型の解明も可能となる。

最近、Muraiら<sup>46)</sup> は nested PCRによる恙虫病診断法を報告したが、増幅されたDNAは *R. tsutsugamushi* の群特異的抗原蛋白 (58 kDa) 遺伝子の一部であった。そこで、著者らは恙虫病の診断するために TSA遺伝子の一部を増幅させる nested PCRおよびPCR産物の制限酵素による切断パターンからの感染株の血清型の同定を

試みた。

## 材料および方法

### 1. リケッチア株

*R. tsutsugamushi* の 6 血清型株 (Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki, Shimokoshi) および *Rickettsia sibirica* ATCC No. VR151 を使用した。これらのリケッチア株は第 1 章の方法に従い、L-929 細胞を用いて増殖させた。

### 2. 恙虫病患者とツツガムシからのリケッチア分離および分離株の血清型別

リケッチア分離には 1990 年から 1991 年に静岡県および宮崎県で発症した恙虫病患者から採取された血液 (血餅あるいはヘパリン血) を用いた。また、未寄生のタテツツガムシ幼虫は、1991 年 10 月に東富士演習場において黒色板法により採取した。これらの材料は PCR による DNA の増幅およびリケッチア分離の両方に供試された。リケッチア分離は第 1 章および第 2 章の方法に従って実施した。なお、患者血餅は第 2 章に準じて SPG 乳剤としてから、またヘパリン血はそのままの状態ですづつ cyclophosphamide (CY) 投与マウス (ddY, 5~8 週齢, SLC 社) および未処置のマウス各 2 頭に接種した。一方、タテツツガムシの場合は、90 匹ずつプールし、1.5 ml の SPG を加え軽く破碎したものを 0.5 ml ずつ CY 投与マウスと未処置マウスの各 1 頭に接種した。分離株の血清型別は第 2 章同様、Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki および Kuroki の各株のそれぞれに対して型特異的に反応する 5 種類の単クローン性抗体を 1 次抗体として用い、IFA により測定を行った。

### 3. PCR 用 DNA 試料の準備

*R. tsutsugamushi* を感染させた後、37℃ で 4 日間培養した L-929 細胞の約  $2 \times 10^6$  個を  $11,600 \times g$  で 5 分間遠心して収集した。この沈渣を 0.5% Nonidet P-40, 0.5% Tween 20 および 0.2% プロテイナーゼ K 含有 10 mM Tris-HCl (pH 8.3; プロテイナーゼ K 含有緩衝液) 50  $\mu$ l に浮遊させ、56℃ で 1 時間加温後、プロテイナー

ゼKを不活化するために95℃で10分間加熱した。得られた試料はそれ以上精製せず、そのまま PCR用のDNAサンプルとして用いた。

患者血液からのDNAの準備に際しては、血清分離後の血餅あるいはヘパリン血を遠心することにより集めた血球 0.2~0.3gを1% Triton X-100 加 SPG 2.5mlと混合した。血餅はダウンス型ホモジナイザーで破碎し、ヘパリン血からの血球はボルトックスミキサーで攪拌した。室温に5分間静置した後、200×gで5分間遠心し、その上清をさらに11,600×gで5分間遠心した。得られた沈渣をSPGにより2回洗浄(11,600×g, 5分間)し、沈渣にプロテイナーゼK含有緩衝液を加え、リケッチア感染細胞の場合と同じ方法でDNAサンプルを作製した。

タテツツガムシからのDNAの抽出に際しては、リケッチア分離用に作製したタテツツガムシのSPG 乳剤 0.5mlを11,600×gで5分間遠心し、沈渣にプロテイナーゼK含有緩衝液を加え、上述のごとく処理した。

#### 4. オリゴヌクレオチドプライマー

プライマーはGilliam株のTSA遺伝子上の塩基配列に対応させた4種類(プライマー a/bおよび a'/b')を用いた(表18, 図21)。なお、プライマーの作製は Bex社(東京)に依頼し、それ以上の精製は行わなかった。

表18. Nested PCRに用いたプライマーの塩基配列

種類	塩基配列	位置(bp) <sup>a)</sup>	Gilliam株における増幅DNAの大きさ
a	5'-TACATTAGCTGCGGTATGACA-3'	225-246	333bp
b	5'-CCAGCATAATTCCTCAACCAAG-3'	536-557	
a'	5'-GAGCAGAGCTAGGTGTTATGTA-3'	263-284	168bp
b'	5'-TAGGCATTATAGTAGGCTGAGG-3'	409-430	

<sup>a)</sup> TSA 遺伝子のスタートコドンからの塩基数

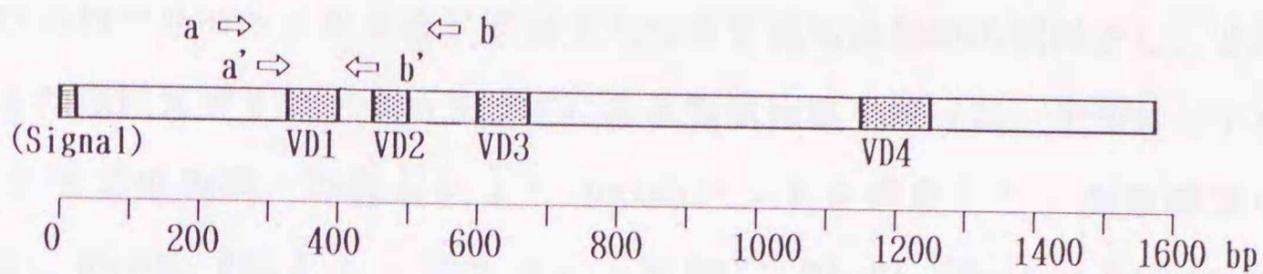


図21. TSA 遺伝子の模式図およびプライマーの位置.

矢印: プライマーの位置, Signal: signal peptide,

VD: variable domain.

## 5. PCR による増幅

Nested PCRの最初の増幅は, 5  $\mu$ lのDNAサンプル, デオキシヌクレオシドトリフオスフェイト (dNTP) 各 200  $\mu$ M, プライマー-aとプライマー-b 各100nM および Taq DNA ポリメラーゼ (Promega社製) 2単位を PCR反応緩衝液 (1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 0.01%ゼラチン含有10mM Tris-HCl; pH 8.3) に溶解し50  $\mu$ lとしたものを 0.5mlマイクロチューブに入れて実施した。2回目のPCRの反応混合液は DNAサンプルとして最初のPCR反応液 5  $\mu$ lを用い, プライマーをa' とb' 各400nM に置き換える以外は, 1回目のPCRの時と同じ構成にした。反応液表面はミネラルオイルで覆い, PCR反応は DNA thermal cycler (ASTECC PC-700, Astec 社製) を用いて実施した。最初のPCRは, 95 $^{\circ}$ C, 30秒 (DNA denaturation)  $\rightarrow$  50 $^{\circ}$ C, 2分 (primer annealing)  $\rightarrow$  72 $^{\circ}$ C, 1分 (1サイクル当たり 2秒ずつ増加; primer extention) を40サイクル行った。また, 2回目の PCRは, 95 $^{\circ}$ C, 30秒  $\rightarrow$  55 $^{\circ}$ C, 2分  $\rightarrow$  72 $^{\circ}$ C, 1分 (1サイクル当たり 3秒ずつ増加) を25サイクル実施した。

Single PCRの場合は, DNAサンプル以外は nested PCRの2回目の反応液と同様にし, 95 $^{\circ}$ C, 30秒  $\rightarrow$  55 $^{\circ}$ C, 2分  $\rightarrow$  72 $^{\circ}$ C, 1分 (1サイクル当たり 2秒ずつ増加) を40サイクル反復した。

## 6. DNA 産物の解析

PCR反応後, あるいは制限酵素処理後のサンプル (5または10  $\mu$ l) に1/10量のローディングバッファー (0.25%ブロムフェノールブルー, 0.25%キシレンシア

ノールおよび50%グリセリン水溶液)を加えたものを電気泳動用の試料とし、2%アガロースまたは12%ポリアクリルアミドによる電気泳動を行った。ゲルはエチジウムブロマイドで染色後、UV照射によりDNAのバンドを観察した。制限酵素は *Hha*I, *Bgl* II, *Mbo* II (以上ニッポンジーン社製), *Sfa*NI, *Mnl*Iおよび *Alw*NI (以上New England Biolabs.社製)の6種類を用い、PCR産物2  $\mu$ l, 制限酵素1~5単位および添付の緩衝液の混合液10  $\mu$ lを37°Cで3時間反応させた。

サザンブロッティングはAmersham社製の試薬を用い、enhanced chemiluminescence (ECL) 法<sup>5,8)</sup>により実施した。PCRで増幅されたDNAは2%アガロースで電気泳動した後、ナイロンメンブランに転写した。ハイブリダイゼーション用のプローブとしては、Gilliam株感染細胞からnested PCRで増幅されたDNA産物を2%低融点アガロースによる電気泳動を行った後、ゲルからDNAを分離、精製したものをを用いた。ハイブリダイゼーションを42°Cで一晩実施した後、プローブに標識したペルオキシダーゼの触媒をもとにECL反応を行った。目的のバンドは、紫外線感受性フィルム (Hyperfilm-ECL, Amersham社製)に露光し、観察した。

## 成 績

### 1. PCR の特異性

プライマーa/bないしはa'/b'を用いた single PCRにより増幅されるDNAは、StoverらとOhashiらによって決定されたTSA遺伝子の塩基配列から、それぞれ、306~339bpおよび150~168bpであることが推定される。実際、これらのプライマーのセットを用いてそれぞれのリケッチア株を感染させた細胞から得られた single PCRの増幅産物は、予想されたサイズと同一であることが電気泳動により確認された (図22-A)。これらのバンドはPCRにより増幅されたGilliam株のDNAとハイブリダイズし、明瞭なバンドが形成された (図22-B)。 *R. sibirica*感染細胞からのDNAをサンプルとして実施したPCR はどちらのプライマーのセットを用い

た場合も、電気泳動およびハイブリダイゼーションともにDNAのバンドが認められなかった。これらのことから、PCRの増幅産物は *R. tsutsugamushi* に特異的なものであることが確認された。

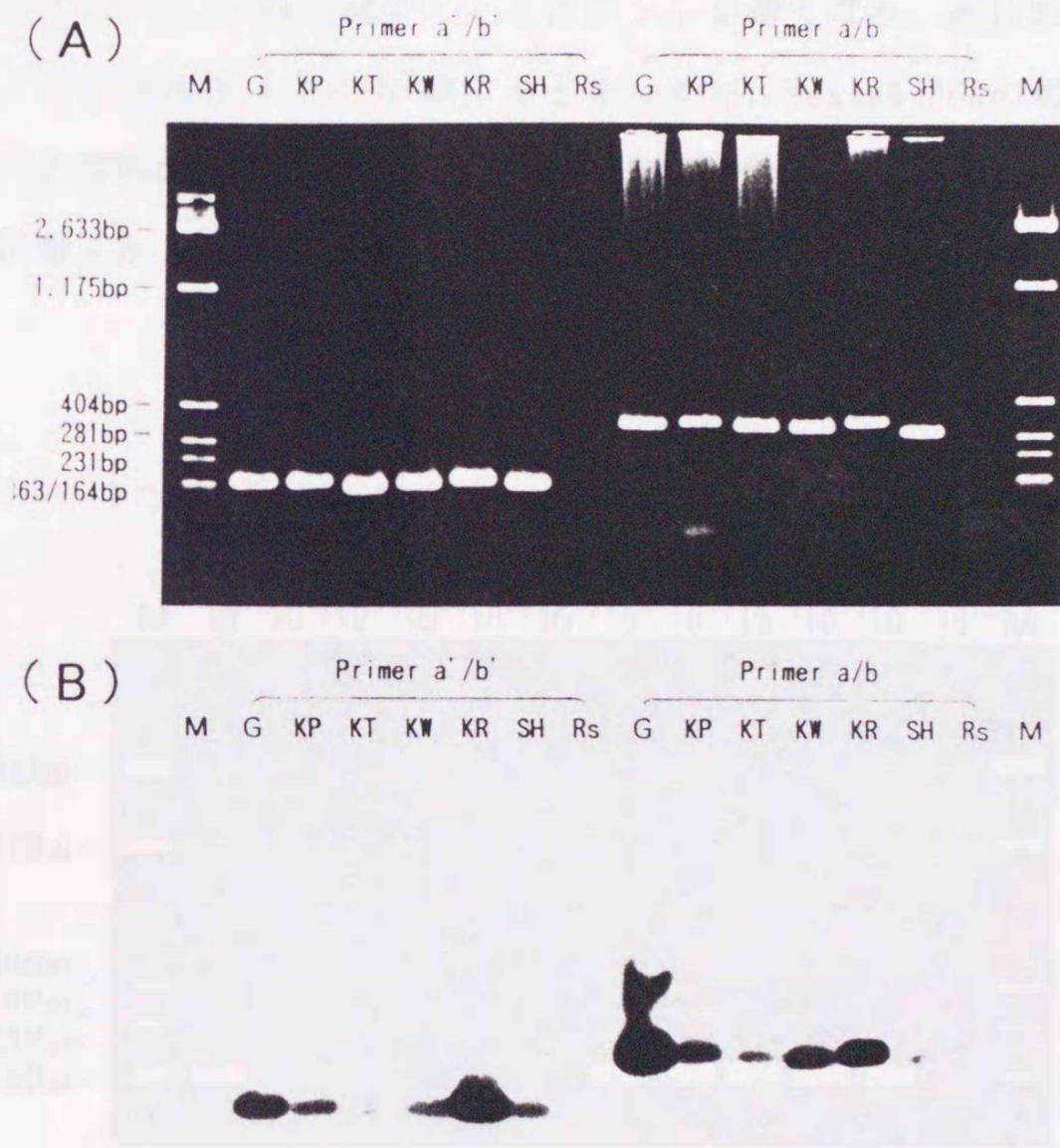


図22. リケッチア感染L-929細胞から single PCR (プライマーa'/b'ないしは a/b) により増幅されたDNAのアガロースゲル電気泳動像。(A): エチジウムブロマイドによる染色, (B): PCR (プライマーa'/b') により増幅した Gilliam株のDNAをプローブとして(A)のバンドをハイブリダイゼーションしたもの, M: マーカー ( $\phi$ X174RFI DNAをTaqIとDraIで切断), G: Gilliam, KP: Karp, KT: Kato, KW: Kawasaki, KR: Kuroki, SH: Shimokosi, Rs: *R. sibirica*.

## 2. Nested PCR の感度

*R. tsutsugamushi*を感染させて24時間培養したL-929細胞内の平均リケッチア数を、IFAによる細胞塗抹標本のリケッチア粒子の観察から算出した。PCR用のDNA試料(50 $\mu$ l)は、細胞当たりの平均リケッチア数(1.83)が確定している感染L-929細胞の $2.57 \times 10^6$ 個から作製した。DNA試料は10倍階段希釈を行い、それぞれの希釈の5 $\mu$ lを検体とし、single PCRと nested PCRを実施した。Single PCRでは、試料中のリケッチアDNAの減少とともにバンドが薄くなり、検出感度はリケッチア粒子サンプル当たり $4.7 \times 10^2$ 個にとどまったが、nested PCRの場合は、陽性バンドは $10^{-5}$ まで明瞭に確認でき、リケッチア粒子サンプル当たり4.7個まで検出可能なことが明らかとなった(図23)。



図23. Gilliam株感染細胞から抽出されたDNAを検体とした場合の single PCRと nested PCRの感度の比較。 M: マーカー(図22と同様)。各レーン上部の数字は検体の希釈倍数(10<sup>-1</sup>希釈の1検体当たりのリケッチア数は $4.7 \times 10^4$ 個)。

3. Nested PCRによる患者血液とツツガムシからの*R. tsutsugamushi*DNAの検出  
感染細胞の場合はサンプル中に多量のリケッチア遺伝子が存在しているので、プライマー a'/b'を用いた single PCRにより充分量の増幅産物が得られたが、患者材料では、ほとんどの場合はこの single PCRでは明確なバンドが確認されなかった。そこで、患者血液10検体およびタテツツガムシ14プール（90匹／プール）について、nested PCRを試みた。なお、10名の患者の居住地、検体の種類、血清抗体価およびリケッチアの分離状況については表19に示した。2回採血された患者については、初回採血の血液をPCR とリケッチア分離用の検体とした。No.1からNo.7までの患者血液からはCY投与マウスを用いた場合にのみリケッチアが分離され、しかも分離株の血清型は単クローン性抗体との反応性からKuroki型あるいはKawasaki型と同定された。No.8とNo.9の患者からはCY投与マウスおよび未処置マウスの両方でリケッチアが分離されたが、これらの感染株の血清型はいずれもKarp型であった。No.1からNo.4までの患者の感染初期血清の抗体価はいずれの血清型のリケッチアに対しても1:20未満であって、同時に血液からはリケッチアが分離された。また、No.10の患者のIgM抗体は急性期、回復期ともにいずれの血清型株に対しても1:20倍未満であったが、IgG抗体では明瞭な抗体価の上昇が認められたことから、この患者は再感染を受けていたことが示唆された。

これらの検体のDNA をプライマーa/bのセットを用いた1回目のPCRで増幅した場合、電気泳動では *R. tsutsugamushi* の増幅DNA（306～339bp）に対応する明確なバンド形成は認められなかった。しかし、1回目のPCRの増幅産物を検体としプライマーa'/b'を用いた2回目のPCRを実施したところ、抗リケッチア抗体が確認されなかったNo.1からNo.4までの患者の検体も含め、全検体から電気泳動により明瞭なバンドが確認された（図24-A）。一方、タテツツガムシ幼虫の14プールのうち2プールからCY投与マウスを用いてKawasaki型のリケッチアが分離されたが、これら2プールの検体からはPCRにおいても明確な増幅DNAのバンドが確認された（図25-A）。これらの電気泳動上の160bp前後のバンドはGilliam株の増幅DNAとのハイブリダイゼーションにより、*R. tsutsugamushi*に特異的なDNAであることが

表19. 血液検体が供された患者の検体の種類, IFA 抗体価および R. tsutsugamushi 分離状況

検体 番号	患者居住地 (採取年)	検体 採取 病日	PCR に供 された血 液の状態	患者血清 (血漿) の IFA 抗体価 <sup>a)</sup>						マウスを用いた リケッチア分離			分離株 血清型					
				IgG			IgM			CY <sup>c)</sup> 処理	未処置							
				G <sup>b)</sup>	KP	KT	KW	KR	G			KP		KT	KW	KR		
1	宮崎県都城市 (1990)	8	血餅	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	+	-	Kuroki	
2	静岡県小山町 (1991)	9	ハリソ血	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	+	-	Kawasaki
3	静岡県御殿場市 (1991)	7	ハリソ血	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	+	-	Kawasaki
4	静岡県御殿場市 (1991)	8	ハリソ血	5120	2560	1280	10240	2560	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	+	-	Kawasaki
5	静岡県小山町 (1991)	11	ハリソ血	640	320	320	1280	320	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	+	-	Kawasaki
6	静岡県小山町 (1991)	16	ハリソ血	640	80	80	80	80	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	+	-	Kawasaki
7	静岡県御殿場市 (1991)	10	ハリソ血	160	20	<20	640	40	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	+	-	Kawasaki
8	静岡県小山町 (1991)	8	ハリソ血	1280	10240	1280	1280	5120	1280	5120	2560	160	2560	160	2560	+	+	Karp
9	静岡県伊東市 (1991)	11	血餅	160	640	160	160	640	160	640	160	160	320	160	320	+	+	Karp
10	静岡県御殿場市 (1991)	6	ハリソ血	320	640	160	320	640	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	ND <sup>d)</sup>	ND	
		25		5120	5120	640	1280	2560	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20			

<sup>a)</sup> IFA抗体価は血清の最高希釈倍率の逆数で示した。

<sup>b)</sup> G: Gilliam, KP: Karp, KT: Kato, KW: Kawasaki, KR: Kuroki.

<sup>c)</sup> CY: cyclophosphamide. <sup>d)</sup> ND: 実施せず.

確認された (図24-B, 図25-B)。

陰性対照として, 表19に示したNo. 3, No. 4およびNo. 6の患者の抗生物質を投与した後の回復期血液および日本赤十字血液センター (静岡市) から分与を受けた健康な献血者20名の血液について, nested PCRを行った。しかし, いずれの検体でも電気泳動後に 160bp前後のバンドが全く観察されなかったことから, この nested PCRは *R. tsutsugamushi* に特異的なDNAの検出が可能であって, 恙虫病の診断法として使用できることが判明した。

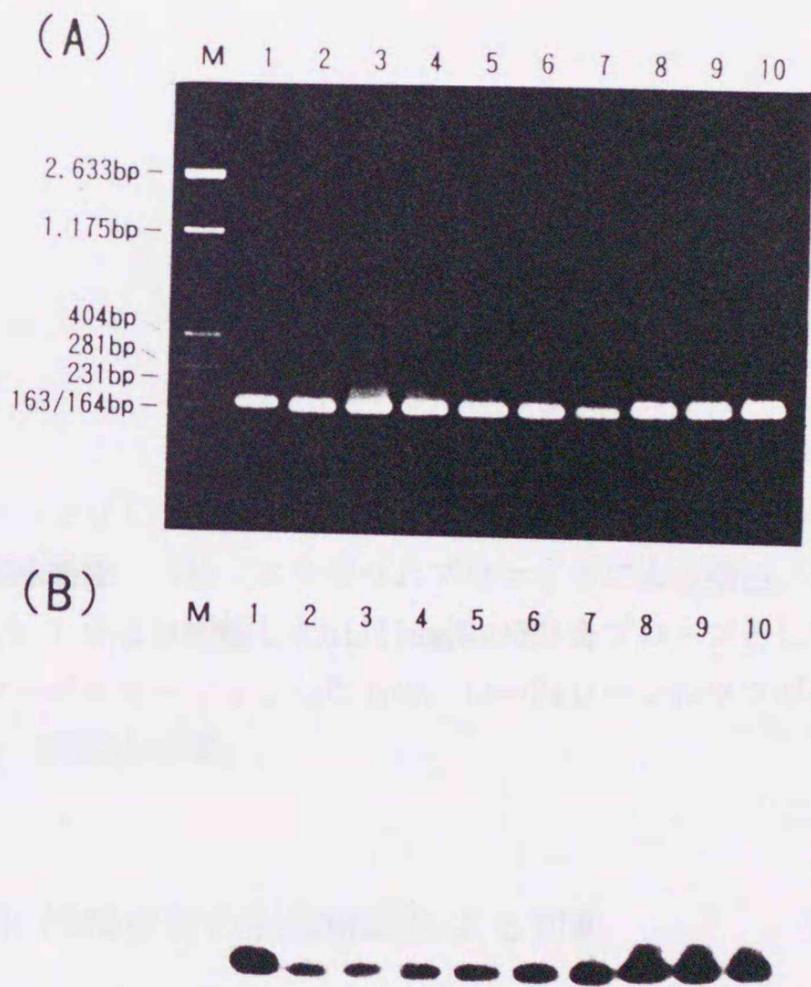


図24. 患者血液から nested PCRにより増幅されたDNAのアガロースゲル電気泳動像. (A): エチジウムブロマイドによる染色, (B): PCR (プライマーa'/b') により増幅したGilliam株の DNAをプローブとして(A)のバンドをハイブリダイゼーションしたもの, 1~10 レーンは表19の検体番号に対応, M: マーカー (図22と同様).

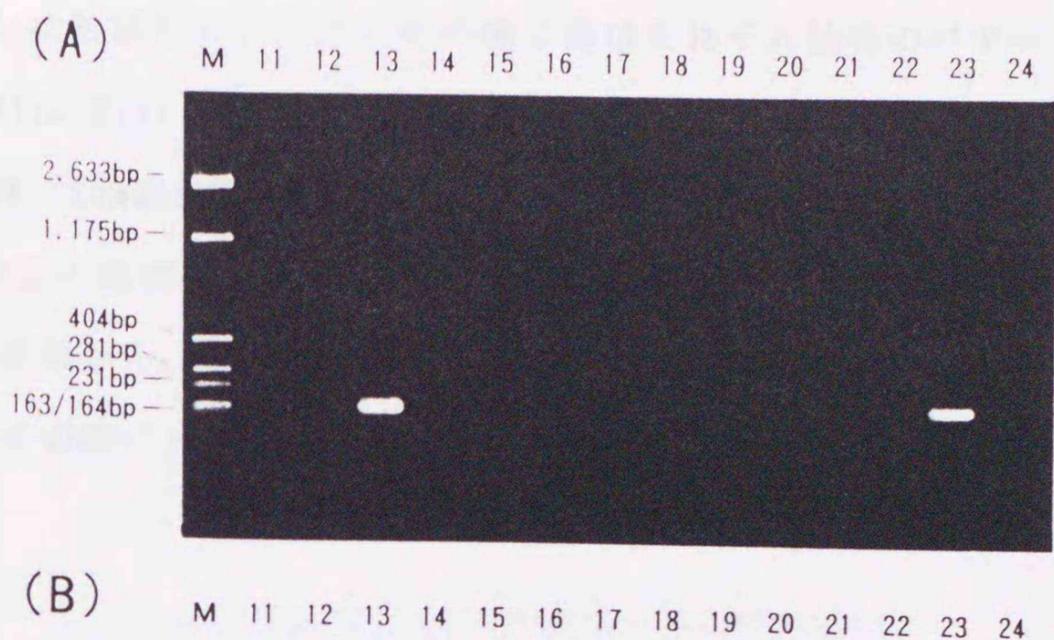


図25. タテツツガムシのプールから nested PCRにより増幅されたDNAのアガロース電気泳動像。(A): エチジウムブロマイドによる染色, (B): PCR (プライマー a'/b') により増幅したGilliam株のDNAをプローブとして(A)のバンドをハイブリダイゼーションしたもの, 11~24レーンはツツガムシの試料, M: マーカー (図22と同様)。

#### 4. Nested PCR 増幅産物の制限酵素による切断

*R. tsutsugamushi*の標準株のnested PCR増幅産物を *Hha*I, *Sfa*NI, *Mnl*I, *Alw*NI, *Bgl* II および *Mbo* II の6種類の制限酵素により処理し, その反応液の電気泳動上の切断パターンを図26に示した。*Hha*IはGilliam, KawasakiおよびKurokiの各株のDNAを切断した。Gilliam株とKuroki株のDNA切断パターンは同一であったが, Kawasaki株は独特のパターンを示した。*Sfa*NIはKarp, Kato, KurokiおよびShimokoshiの各株のDNAを切断したが, このうちKarp株とKuroki株のDNA切断パ

ターンは類似していた。MnlIでの処理においては、Kawasaki株とShimokoshi株のDNA切断パターンは類似していたが、その他の株はそれぞれ独特のパターンを示した。また、AlwNIは Gilliam, Karp, KawasakiおよびKurokiの各株のDNAを切断したが、Gilliam株, Kawasaki株およびKuroki株のDNA切断パターンは類似していた。Bgl IIおよびMbo IIの処理により、それぞれ、Kato株とKarp株由来のDNAが切断された。これらの結果から、それぞれの血清型株からの増幅産物をいくつかの制限酵素で処理し、その切断パターンから血清型の識別が可能であることが明らかとなった。

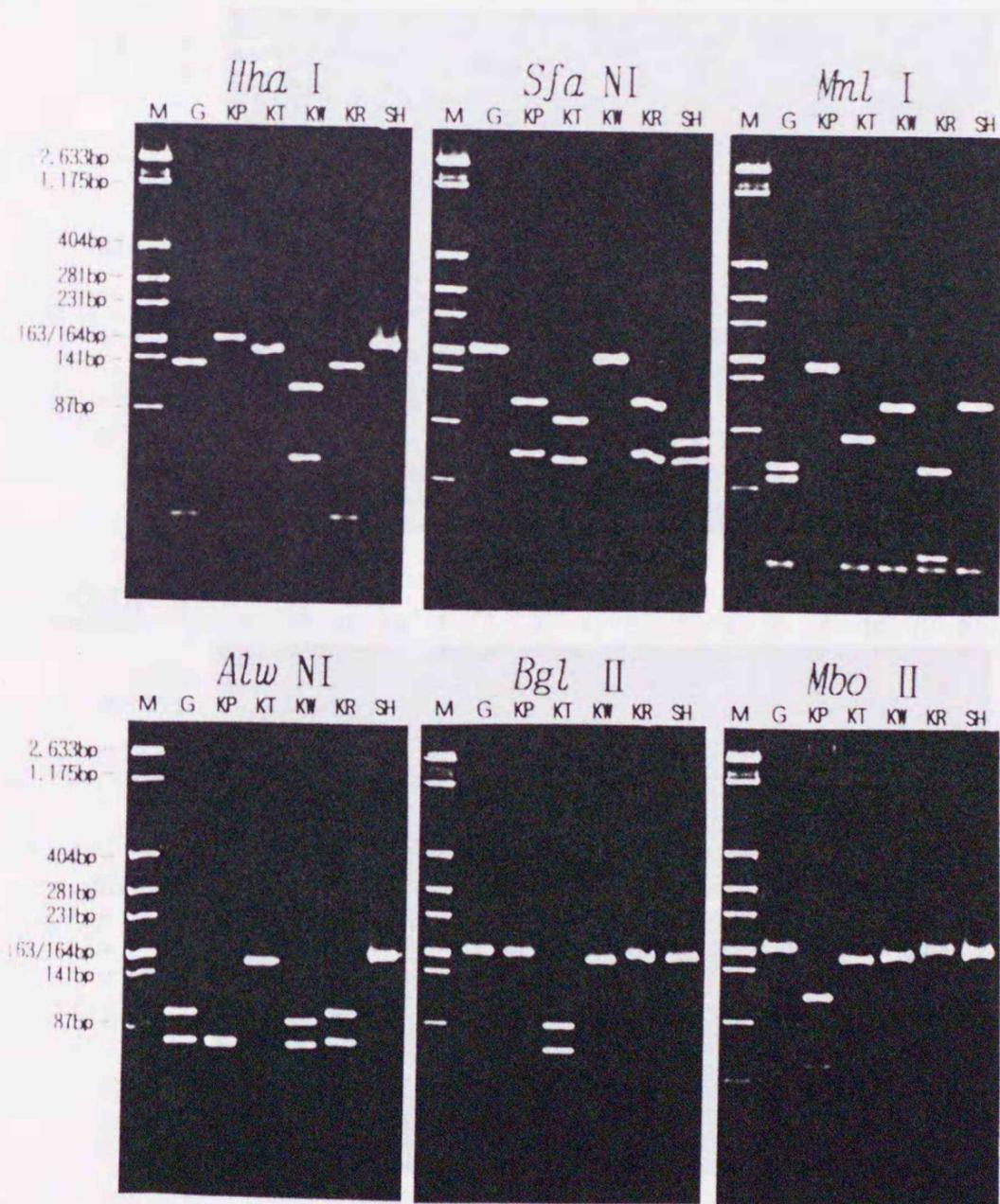


図26. Nested PCR増幅産物の *Hha*I, *Sfa*NI, *Mnl*I, *Alw*NI, *Bgl* II および *Mbo* II による切断パターン. 各レーン上部の文字は 図22の説明と同様.

この方法は患者血液およびツツガムシから nested PCRにより増幅されたDNAについて応用された。図23と図24の増幅DNAを *Hha*Iおよび*Sfa*NIで切断した成績を図27に示した。No.1の患者の増幅産物は *Hha*IによりGilliam株およびKuroki株と同様の切断パターンを示し、また *Sfa*NIの場合はKarp株およびKuroki株の切断パターンと一致した。したがって、この患者に感染したリケッチアはKuroki型であることが示唆された。

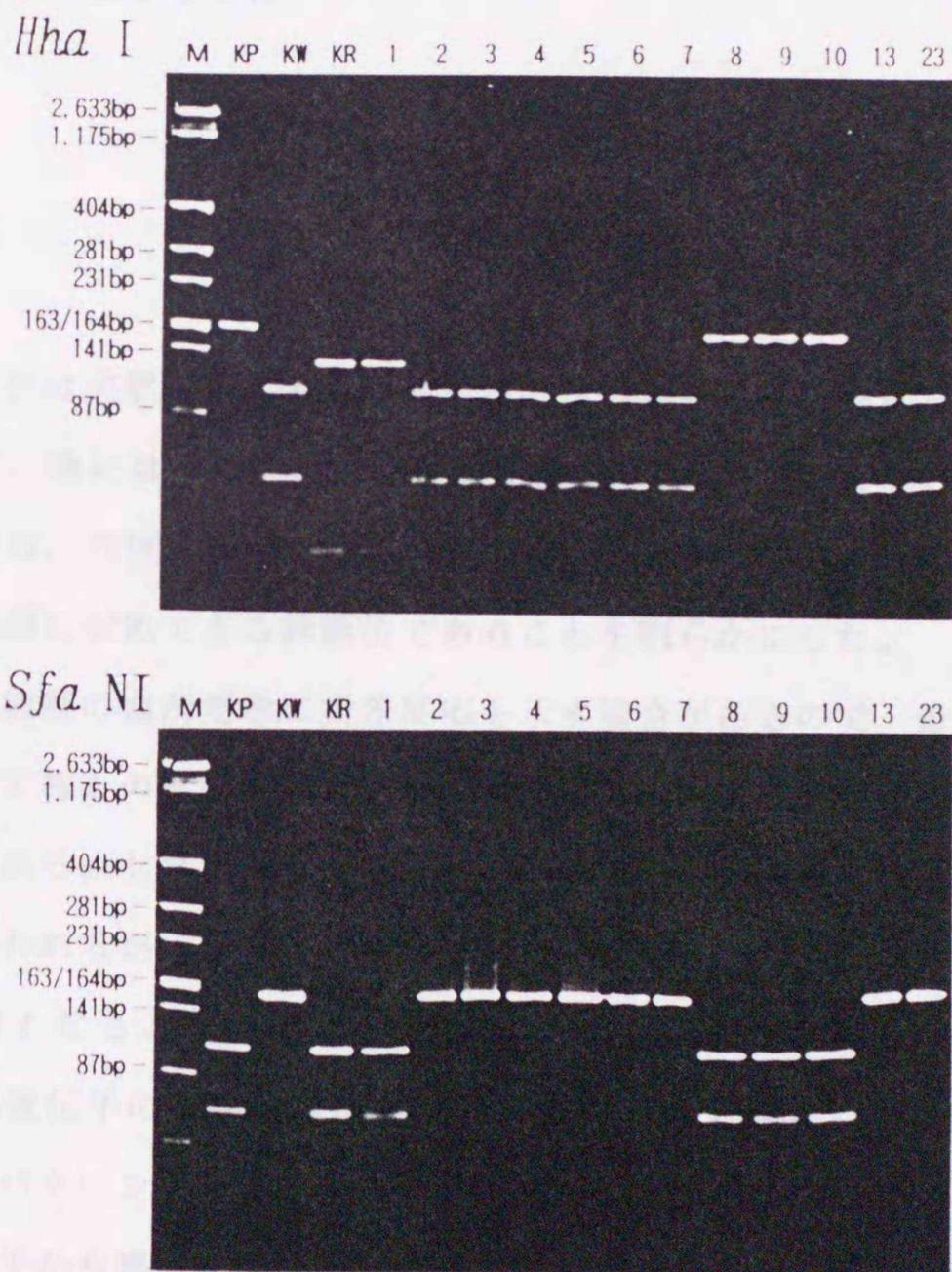


図27. 患者血液およびツツガムシ検体からの Nested PCR増幅産物の *Hha*Iおよび*Sfa*NIによる切断パターン. 各レーン上部の文字および数字は図22, 24および25の説明と同様.

No. 2からNo. 7までの患者およびNo. 13とNo. 23のツツガムシの検体由来の増幅DNAは *Sfa*NIでは切断されなかったが、*Hha*Iによる切断パターンから感染リケッチアの血清型はKawasaki型と同定された。また、No. 8からNo. 10までの患者の感染リケッチアの血清型はこれらの制限酵素との反応結果からKarp型と考えられた。このように、患者やツツガムシに感染しているリケッチアの血清型は、いくつかの種類の制限酵素による切断パターンを比較することで同定することができ、しかもこれらの結果は、リケッチアの分離を行わなかったNo. 10の患者を除いて、全て分離株の血清型とも一致していた。

## 考 察

恙虫病の症状は突然現れ、もし早期診断および適正治療が遅れると、肺炎や脳炎などに移行し、時には汎発性血管内凝固症候群 (DIC)<sup>8,1)</sup>に陥って死亡することもある。本研究は、今回開発したPCRが高感度で特異性にも優れ、鑑別診断の難しい本病の感染初期に対応できる診断法であることを明らかにした。

患者血清は複数の血清型株に交差反応を示す場合があるので、患者血清といくつかのリケッチア株との反応性から、感染リケッチアの血清型を常に明確に同定することは困難である。したがって、血清型別は最終的に患者から分離されたリケッチアについて行われるが、分離には最短でも10日間程度を要し、また安全実験室内での操作が必要となる。今回用いた方法は、患者血液からDNAを粗精製し nested PCRによりTSA遺伝子の一部を直接増幅するまでに約7時間、さらに制限酵素による消化と切断パターンを確認するための電気泳動に約5時間を要する。すなわち、本法は検体入手から感染リケッチアの血清型が判明するまでの所要時間が2日以内と短く、また患者血清の反応性から血清型を推定する場合のようにリケッチア株間の交差反応性を考慮する必要がないので、各々の流行地域に分布するリケッチアの血清型の種類をこの方法により迅速に同定できると思われる。

6種類の血清型のリケッチアのTSA遺伝子は、OhashiらとStoverらにより遺伝子配列が決定された<sup>54, 55, 74</sup>)。Furuyaら<sup>17</sup>)も本研究同様、Gilliam株のTSA遺伝子からプライマーを設計したが、Shimokoshi株のDNAは増幅することができなかった。本研究で用いたプライマーは、Gilliam株以外の血清型株のTSA遺伝子とは1ないし4塩基で一致しない例も含まれていたが、今回のプライマーを用いたPCRによりすべての血清型株からDNAを増幅することができた。

TSA遺伝子は、各血清型株間で大きく塩基配列の異なる領域(variable domain: VD)が4箇所含まれている<sup>55</sup>)。最初のPCRに用いたプライマーa/bはTSA遺伝子内のVD1およびVD2を含む領域を、また2回目のPCRのプライマーa'/b'はVD1領域を増幅するように設計した。プライマーa'/b'により増幅されるDNAの長さは、Gilliam株では168bpであったが、Kato, KawasakiおよびShimokoshiの各株の場合は塩基数が9ないし18bp少なかった。また、プライマーの部分を除いた増幅領域内のGilliam株の塩基配列との相違は、Kuroki株では3箇所だけであるが、その他の血清型株では15ないし45箇所に及んでいる。このような塩基配列の相違は制限酵素による切断パターンに反映されている。Gilliam株とKuroki株の増幅DNAの塩基配列は非常に類似していたが、SfaNIとMnIIにより鑑別可能であった。このように、増幅産物の塩基配列に相違点は認められたが、すべての血清型株からの増幅産物はGilliam株に由来するプローブとハイブリダイズすることが確認された。ただし、ハイブリダイゼーションにおける染色性は、遺伝子配列の一致度を反映していた。すなわち、このプローブはGilliam株とKuroki株に対してはハイブリダイゼーションの程度が高かったが、Kato株とShimokoshi株では低かった。

## 要 旨

*Rickettsia tsutsugamushi* Gilliam株の型特異的抗原蛋白の遺伝子配列に基づいて作製されたプライマーを用いて2段階PCR (nested PCR)法を確立し、恙虫病診断への応用の可否を検討した。その結果、このPCR法により血清型を異にするGilliam, Karp, Kato, Kawasaki, KurokiおよびShimokoshiの各株を感染させたL-929細胞のいずれからも *R. tsutsugamushi* に特異的なDNAの増幅されることを確認した。増幅産物の電気泳動像はそれぞれの株の塩基配列から推定される増幅産物のDNAの長さとも一致しており、Gilliam株のPCR産物をプライマーとしたハイブリダイゼーション像はGilliam株と他の株の塩基配列の一致度を反映していた。また、これらの増幅産物を制限酵素であるHhaIおよびSfaNIにより消化した場合の切断パターンは6株間でそれぞれ特有の差異を示し、型別可能なことが判明した。

この方法により恙虫病患者の感染初期血液10検体（4検体は抗体未上昇）および富士山東山麓のタテツツガムシ14プール（90匹／プール）中からリケッチアDNAの検出を試みたところ、患者の血液検体では全部から、またツツガムシでは14プール中2プールからリケッチアに特異的なDNAの増幅が認められた。次に、これらの増幅DNAを制限酵素で処理し、その切断パターンからリケッチアの血清型の推定を行ったところ、型特異的単クローン性抗体との反応性から確認された感染リケッチアの血清型と一致していた。すなわち、今回開発したPCR法は抗体上昇前の感染初期患者にも対応できる恙虫病診断法として応用可能であり、さらに増幅DNAの制限酵素処理による切断像から患者やツツガムシ中の *R. tsutsugamushi* の血清型を迅速に識別できることが明らかとなった。



恙虫病はツツガムシによって媒介されるヒトのリケッチア性熱性感染症であって、東アジアや東南アジアなどに広く分布している。我が国では、古くから東北地方の大河川流域にみられる致死率の高い地方病として知られていた。第2次世界大戦以後には、東北以南の地方にも本病の発生していることが明らかとなり、1950年代には、一時年間の届出患者数は全国で100名を越える状況となったが、その後次第に減少していった。しかし、1976年頃から再び患者数が増加し始め、現在では届出患者数は毎年800名前後に達しており、発生地域も北海道と沖縄以外のほぼ全域で確認されている。血清学的な診断法としては、これまで感度と特異性に優れたIFAとIPが広く使用されており、また血清診断用標準株としては、通常 Gilliam, Karp および Kato の3種類の血清型株が用いられている。しかし、最近、国内の患者から Kawasaki 株, Kuroki 株, Shimokoshi 株 など従来の標準株とは抗原性の異なるリケッチアが相次いで発見された。一方、我が国における本病のベクターとしてはアカツツガムシ, タテツツガムシ および フトゲツツガムシ の3種類があげられており、リケッチアの血清型と媒介ツツガムシの種類との間に関連性のあることが指摘されている。静岡県では、これまでにタテツツガムシとフトゲツツガムシの2種類が採取されており、同時に血清型の異なる幾つかのリケッチアの存在することが示唆されていた。そこで、著者はこの地域において恙虫病の疫学調査を実施して、リケッチアの血清型とツツガムシとの関係を検討するとともに血清診断に代わり得る確定診断法としてPCR法の導入を試みた。

第1章では、静岡県における恙虫病患者の発生状況、野ネズミにおける *R. tsutsugamushi* の浸淫状況ならびにツツガムシの分布などについて調査を行った。すなわち、静岡県における1982年から1991年までの10年間の恙虫病届出患者数は151名であった。この内147名の血清について *R. tsutsugamushi* の標準3株 (Gilliam, Karp, Kato) を用いてIFAにより抗体検査を実施したところ、110症例が恙虫病として確定診断された。抗体陽性患者は県東部から伊豆にかけてと西部の浜名湖周辺で確認されたが、その多くが富士山東山麓 (72.7%) に偏在する傾向が認められた。また、患者の発生時期は10~12月 (82.7%) に集中し、発生が確認されなかつ

たのは6～8月の3ヵ月だけであった。さらに、県内で捕獲したアカネズミ 385頭について、マウスの腹腔内接種法により、それぞれの脾臓材料からリケッチアの分離を行うと同時に IFAにより抗体検査を実施した。すなわち、アカネズミではリケッチア分離率が28.6%、また抗体保有率は37.6%にも達していた。さらに、リケッチア分離率と抗体保有率はいずれも富士山東山麓、県東部および伊豆で高く、これらの地域が *R. tsutsugamushi* の濃厚汚染地であることが判明した。しかし、患者は富士山東山麓に集中して発生しており、アカネズミにおける汚染地と患者発生地との地理的分布は一致しなかった。

野ネズミ 484頭についてツツガムシ幼虫の寄生状況を調べたところ、これらの動物から恙虫病媒介種であるタテツツガムシとフトゲツツガムシを含む 37,942匹、4属11種のツツガムシが採取された。タテツツガムシの大半は恙虫病が集中する富士山東山麓で採取されたが、フトゲツツガムシはアカネズミにおけるリケッチア分離率の高い県東部から伊豆にかけて多数認められ、特に伊豆において寄生数が著しく多かった。これらの成績と患者の分布ならびにアカネズミにおけるリケッチアの感染状況を総合すると、フトゲツツガムシはアカネズミに対するベクターとして、またタテツツガムシはヒトに対するベクターとして重要であり、特に富士山東山麓ではタテツツガムシに基づく恙虫病が多発していると推測された。

富士山東山麓の土壌サンプルからTullgren装置により採取されたツツガムシ幼虫は、通常鳥類に寄生する3種類を含む6属16種に分類された。フトゲツツガムシは広い範囲で採取されたが、最も密度が高かったのは標高500m以下の大型水田の畦畔であった。一方、タテツツガムシは東富士演習場あるいは標高500m以上の山脚部に散発的に存在するススキのまばらに生えた砂礫土壌地域で多数採取された。この火山性の砂礫は富士山の宝永噴火(1707年)に由来するもので、富士山の東方にのみ大量に堆積したことが報告されている。したがって、このような土壌の性状がタテツツガムシの好適環境となり、本種がこの地域の最優勢種として偏在する原因となったことが考えられる。

第2章では、静岡県内に存在する *R. tsutsugamushi* の血清型の種類を分類する

と同時に、この地域に生息する2種類の主要ツツガムシについて、ベクターとしての役割の解明を試みた。富士山東山麓の8名の患者から分離された8種類のリケッチア株について、Gilliam, Karp, Kato, KawasakiおよびKurokiの各株に対する単クローン性抗体ならびにモルモット免疫血清を用いて、IFAにより抗原性を検討した。その結果、2株はKarp型、4株はKawasaki型および2株はKuroki株に属することが判明した。Kawasaki型あるいはKuroki型に分類された6株は通常のマウスに対し病原性を示さず、Kawasaki株およびKuroki株と同様に弱毒株であることが示唆された。これらのことから、静岡県にはKarp型の他に、これまで宮崎県で多数存在の確認されていたKawasaki型とKuroki型のリケッチアも存在することが明らかとなった。

次に、富士山東山麓における恙虫病患者由来の24株、アカネズミ由来の30株および未寄生のツツガムシ幼虫由来の5株（タテツツガムシ2株、フトゲツツガムシ3株）、合計59株の *R. tsutsugamushi* について、Gilliam, Karp, Kato, KawasakiおよびKurokiの各株に対する型特異的な単クローン性抗体を用いて、IFAにより血清型別を試みた。その結果、分離株はKarp型が35株、Kawasaki型が20株およびKuroki型が4株の3血清型に分類された。Kawasaki型とKarp型のリケッチアは、それぞれ、タテツツガムシとフトゲツツガムシから分離された。これら2種類の血清型のリケッチア株の分離された患者発生地と感染アカネズミの分布域ならびにそれぞれのツツガムシが多数生息する地域はほぼ一致していた。さらに、Kawasaki型株が分離された患者は早秋に集中し、またKarp型株感染患者は晩秋に発生のピークが認められた。これらのことから、Kawasaki型とKarp型のリケッチアのベクターは、それぞれタテツツガムシとフトゲツツガムシであると推測されたが、Kuroki型のリケッチアは4名の患者から分離されたに過ぎず、Kuroki型株のベクターの解明には至らなかった。

県内の恙虫病患者36名の血清について、Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kurokiおよび静岡県の患者から分離されたKarp型のOtaの各株との反応性をIFAにより検討した。その結果、この地域における恙虫病起因リケッチアの大半は

Kawasaki型, Kuroki型およびKarp型のいずれかに属する抗原性を保有すると推測された。Kawasaki株単独あるいはKawasaki株とGilliam株に強く反応した患者血清は、地理的には富士山東山麓に多く、また患者は秋期に集中して発生していた。さらに、Ota株単独あるいはOta株とKarp株に強く反応した症例も広範囲に分布し、発生時期も11～5月の長期間に及んだ。これらのこととツツガムシの採取状況や分類成績を総合すると、タテツツガムシがKawasaki型株を、またフトゲツツガムシがOta株のようなKarp型株を、それぞれ媒介していることが推測され、分離株の血清型別成績から得られた結論と一致していた。

第3章では、Gilliam株の型特異的抗原蛋白の遺伝子配列に対応するプライマーを用いた nested PCRについて恙虫病の早期確定診断への応用の可否を検討した。このPCR法によりGilliam, Karp, Kato, Kawasaki, KurokiおよびShimokoshiのいずれの株からもリケッチアに特異的なDNAが増幅された。さらに、これらの増幅産物を制限酵素 (*Hha*I, *Sfa*NI) により消化したところ、いずれもそれぞれ独立した切断パターンを示した。そこで、このPCR法を用いて感染初期の患者血液10検体と流行地由来のタテツツガムシ14プール (90匹/プール) についてリケッチアDNAの検出を試みたところ、患者血液の全ての検体とタテツツガムシ2プールからリケッチア特有のDNAの増幅が認められ、しかもその増幅産物についての制限酵素による切断パターンから推定されたリケッチアの血清型は、血清学的に同定された感染リケッチアの血清型と良く一致していた。したがって、このPCR法は恙虫病患者の早期確定診断法として優れているだけでなく、ヒトや野性動物の保有するリケッチアの血清型を同定、分類する上でも有用であると判断された。

以上の研究により、静岡県における *R. tsutsugamushi* の浸淫状況、流行株の血清型および媒介ツツガムシの種類などが明らかにされるとともに、静岡県に生息する2種類の主要ツツガムシとそれらによって媒介されるリケッチアの血清型との関係についても解析が可能となった。また、本研究で用いたPCR法は本病の早期診断に応用できるだけでなく、*R. tsutsugamushi*の正確で迅速な血清型別も可能なことから恙虫病の疫学調査への活用が期待されている。

## 謝 辞

稿を終わるに当たり、研究の御指導と論文の御校閲を賜った北海道大学獣医学部の橋本信夫教授、神谷正男教授、小沼操教授ならびに高島郁夫助教授に厚く御礼申し上げます。

また、本研究に際して、終始御指導をいただいた新潟薬科大学の多村憲教授、大橋典男博士ならびに信州大学の内川公人助教授に心より深謝致します。また、本研究の遂行に当たり御援助をいただいた酪農学園大学の森田千春教授、静岡県衛生環境センター微生物部の赤羽荘資部長、秋山真人主幹をはじめとする多くの方々、ならびに恙虫病患者の調査や検体採取などに御協力いただいた静岡県内の医療機関と保健所の関係各位に深く感謝の意を表します。さらに、一部の単クローン性抗体、患者血液などを分与していただいた神奈川県衛生研究所の古屋由美子博士ならびに宮崎県衛生環境研究所の山本正悟博士に感謝致します。

## 引用文献

1. 安東民衛：単クローン抗体作製法. pp. 30-143. In 単クローン抗体. ハイブリドーマとELISA. 講談社, 東京, 1983.
2. 浅沼 靖：媒介ツツガムシと恙虫病リケッチアの保有種. 臨床と細菌 10: 174-179, 1983.
3. 浅沼 靖, 加納六郎, 熊田信夫, 北岡正見, 大久保 薫, 羽里彦左衛門, 清水文彦：三浦・下田地方の恙虫病有毒地における *Trombicula pallida* と病毒との関係. 衛生動物 11: 59-60, 1960.
4. 浅沼 靖, 北岡正見, 大久保 薫, 熊田信夫, 鈴木 誠, 柄沢敏夫, 久郷 準, 山本 久, 川村明義, 宮本武美, 秋山 順, 中村 宏, 堀 覚：千葉県下における恙虫病リケッチア伝播者としての *Trombicula scutellaris*. 感染症誌 10: 232-244, 1959.
5. 浅沼 靖, 熊田信夫, 谷口博一, 久郷 準, 大久保 薫, 北岡正見, 清水文彦：古典的恙虫病有毒地（新潟県長岡）の *Trombicula pallida* における恙虫病リケッチアの保有例. 衛生動物 12: 138, 1961.
6. Asanuma, K., K. Okubo, N. Kumada, and M. Kitaoka : Determination of the vector mites of scrub typhus in Japan. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 15: 297-308, 1962.
7. Bergey, s Manual of Determinative Bacteriology. 6th Edition, Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp. 1089-1091. 1948.
8. Bozeman, F. M. and B. L. Elisberg : Serological diagnosis of scrub typhus by indirect immunofluorescence. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112: 568-573, 1963.
9. Bozeman, F. M., H. E. Hopps, J. X. Danauskas, E. B. Jackson, and J. E. Smadel : Study on the growth of rickettsiae. I. A. tissue culture system or quantitative estimations of *Rickettsia tsutsugamushi*.

- J. Immunol. 76: 475-488, 1956.
10. Chang, W., J. Kang, W. Lee, M. Choi, and J. Lee : Serological classification by monoclonal antibodies of *R. tsutsugamushi* isolated in Korea. J. Clin. Microbiol. 28: 685-688, 1990.
  11. Cross, J. H. : Rickettsial Infections in Southeast Asia. Southeast Asian Clinics 11: 19-26, 1984.
  12. Crum, J. W., S. Hanchalay, and C. Eamsila : New paper enzyme-linked immunosorbent technique compared with microimmunofluorescence for detection of human serum antibodies to *Rickettsia tsutsugamushi*. J. Clin. Microbiol. 11: 584-588, 1980.
  13. Dasch, G. A., S. Halle, and A. L. Bourgeois : Sensitive microplate enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against the scrub typhus rickettsia, *Rickettsia tsutsugamushi*. J. Clin. Microbiol. 9: 38-48, 1979.
  14. Elisberg, B. L., V. Sangkasuvana, J. M. Campbell, F. M. Bodhidatta, and G. Rupmund : Physiogeographic distribution of scrub typhus in Thailand. Acta Med. Biol. 15: 61-67, 1967.
  15. Fan, M., D. H. Walker, S. Yu, and Q. Liu : Epidemiology and ecology of rickettsial diseases in the People's Republic of China. Rev. Infect. Dis. 9: 823-840, 1987.
  16. 406th Medical General Laboratory, U.S. Army : A new endemic area of tsutsugamushi disease in Japan. 406th Med. Gen. Lab. Ann. Hist. Rep. 90-99, 1948.
  17. Furuya, Y., Y. Yoshida, T. Katayama, F. Kawamori, S. Yamamoto, N. Ohashi, A. Tamura, and A. Kawamura, Jr. : Specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA from clinical specimens by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 29: 2628-2630, 1991.

18. Furuya, Y., S. Yamamoto, M. Otu, Y. Yoshida, N. Ohashi, M. Murata, N. Kawabata, A. Tamura, and A. Kawamura, Jr.: Use of monoclonal antibodies against *Rickettsia tsutsugamushi* Kawasaki for serodiagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2628-2630, 1991.
19. Groves, M. G., and D. J. Kelly : Characterization of factors determining *Rickettsia tsutsugamushi* pathogenicity for mice. *Infect. Immun.* 57: 1476-1482, 1989.
20. Hanson, B.: Identification and partial characterization of *Rickettsia tsutsugamushi* major protein immunogens. *Infect. Immun.* 50: 603-609, 1985.
21. 林 直助 : 恙虫病研究予報. 北越医会誌 156: 358-368, 1906.
22. Hayashi, N.: Etiology of Tsutsugamushi disease. *J. Parasitol* 7: 697-701, 1920.
23. Iida, T., H. Kawashima, and A. Kawamura Jr.: Direct immunofluorescence for typing of Tsutsugamushi disease rickettsia. *J. Immunol.* 95: 1129-1133, 1966.
24. Johnson, P. T. and R. Traub : Maintenance of *Rickettsia tsutsugamushi* in mealworms (*Tenebrio molitor*). *J. Parasitol.* 38: 24-25, 1952.
25. Kaltenboeck, B., K. G. Kousoulas, and J. Storz : Detection and strain differentiation of *Chlamydia psittaci* mediated by a two-step polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1969-1975, 1991.
26. 蒲原 宏 : 越後恙虫病雑記 : 恙虫病古文献の紹介. 日本医事新報 1620: 2191-2194, 1955.
27. 兼光 望 : つつが虫病リケッチアに対するモノクローナル抗体の性状と抗原の解析. 感染症誌 61: 819-829, 1987.

28. 粕谷志郎, 日置敦巳, 伊藤 亮, 大友弘士, 野田伸司, 渡辺 実, 山田不二造, 岩佐光啓 : 岐阜県における恙虫病の研究 : 第 3 報. 野鼠の *Rickettsia tsutsugamushi* および抗体保有の年内変化と患者発生状況. 感染症誌 60: 1022-1026, 1986.
29. 粕谷志郎, 古賀香理, 長野 功, 山下照夫, 日置敦巳, 大友弘士, 岩佐光啓, 野田伸司 : 岐阜県におけるつつが虫病の研究 : 第 4 報. 恵那および高山市の調査結果ならびに総合的考察. 感染症誌 65: 151-156, 1991.
30. 川森文彦, 中津川修二, 秋山真人, 幾島 隆雄, 三輪好伸, 望月 久 : 静岡県における恙虫病の実態について. 環境管理技術 6: 82-88, 1988.
31. 川村明義 : 七島熱の病原体について (第二報) . pp. 34-37. In 七島熱の研究 第二編. 東京都衛生局, 東京, 1953.
32. Kawamura, A. Jr.: Fluorescent antibody techniques and their application. 2nd., University of Tokyo Press and University Park Press, Tokyo, Baltimore and London, 1977.
33. 川村明義 : 最近急増している恙虫病について. 日本医事新報 2986: 26-30, 1981.
34. 川村明義 : つつが虫病. 医学のあゆみ 131: 924-930, 1984.
35. 川村明義 : リケッチア症, 特につつが虫病について. モダンメディア 30: 310-339, 1984.
36. Kawamura, A., Jr., M. Murata, M. Osono, S. Nogami, A. Shirasaka, H. Tanaka, K. Sudo, K. Suzuki, T. Miyairi, and H. Kijima : Studies on inapparent infection of tsutsugamushi disease in Izu Shichito Islands. Seroepidemiology and demonstration of an avirulent rickettsia strain for mice. Japan. J. Exp. Med. 50: 91-105, 1980.
37. 川村麟也, 今川與曹 : 恙蟲病々原決定. 日本醫事新報 446: 603-604, 1931.
38. Kawamura, R. and Y. Imagawa : Die Feststellung des Erregers bei der Tsutsugamushikrankheit. Zentr. Bacteriol. Parasitenk. Abt. 1. Orig.

- 122: 253-261, 1931.
39. 北原克之, 西田 茂, 藤沢弘芳: 静岡県西部地方で発症した恙虫病の1例. 感染症誌 55: 725-728, 1981.
40. 北原正宣: ネズミの分布. pp.64-126. In ネズミ (北原正宣編), 自由国民社, 東京, 1986.
41. 北岡正見, 大久保 薫, 高野宏一, 浅沼 靖: 八丈島における七島熱について: 病原体保有者並びに媒介者の検索. pp.29-31. In 七島熱の研究 第二編. 東京都衛生局, 東京, 1953.
42. 小林 譲, 兼光 望, 丹下宜紀, 橋 宣祥, 多村 憲: モノクローナル抗体による新型つつが虫病リケッチアの免疫学的性状の解析. 感染症誌 61: 1264-1269, 1987.
43. Kulagin, S. M., I. V. Tarasevich, N. I. Kudryashova, and L. F. Plotnikova: The investigation of scrub typhus in the U.S.S.R. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 12: 257-264, 1968.
44. 熊田信夫, S. A. Reka, 水野サホ子, 藤岡 寿, 内川公人: 長野県飯田市産野鼠およびフトゲツツガムシ幼虫からの恙虫病リケッチア分離陽性成績. 信大環境科学論集 8: 6-11, 1986.
45. Melchers, W., J. Meis, P. Rosa, E. Claas, L. Nohlmans, R. Koopman, A. Horrevorts, and J. Galama: Amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in skin biopsies from patients with Lyme disease. J. Clin. Microbiol. 29: 2401-2406, 1991.
46. Murai, K., N. Tachibana, A. Okayama, E. Shishime, K. Tsuda, and T. Oshikawa: Sensitivity of polymerase chain reaction assay for *Rickettsia tsutsugamushi* in patients' blood samples. Microbiol. Immunol. 36: 1145-1153, 1992.
47. 村田道里, 川村明義, 野口貞雄, 白坂昭子, 田中 寛, 望月久司, 大山英雄: 富士山麓におけるつつが虫病. 感染症誌 54: 291-298, 1979.

48. Murata, M., Y. Yoshida, M. Osono, N. Ohashi, M. Oyanagi, H. Urakami, A. Tamura, S. Nogami, H. Tanaka, and A. Kawamura, Jr.: Production and characterization of monoclonal strain-specific antibodies against prototype strains of *Rickettsia tsutsugamushi*. *Microbiol. Immunol.* 30: 599-610, 1986.
49. Nadchatram, M.: Correlation of habitat, environment and color of chiggers, and their potential significance in the epidemiology of scrub typhus in Malaya. *J. Med. Ent.* 7: 131-144, 1970.
50. Nagayo, M., T. Tamiya, T. Mitamura, and K. Sato : On the virus of Tsutsugamushi disease and its demonstration by a new method. *Jpn. J. Exptl. Med.* 8: 309-318, 1930.
51. 野口政輝, 望月 久, 北岡正見, 大久保 薫, 高野宏一, 徐慶一郎, 福住定吉, 小畑義男, 高木 誠 : 富士山麓 御殿場市付近の恙虫病に関する研究. *静岡衛研年報* 3: 7-10, 1953.
52. 野口政輝, 望月 久 : 静岡県の恙虫病と恙虫. pp. 97-123. *静岡県の地方病* 静岡県衛生部, 静岡, 1964.
53. Ogata, N.: Aetiologie der Tsutsugamushikrankheit, *Rickettsia tsutsugamushi*. *Zentr. Bacteriol. Parasitenk. Abt. I. Orig.* 122: 249-253, 1931.
54. Ohashi, N., H. Nashimoto, H. Ikeda, and A. Tamura : Cloning and sequencing of the gene ( *sta56* ) encoding a type-specific antigen from *Rickettsia tsutsugamushi* . *Gene* 91: 119-122, 1990.
55. Ohashi, N., H. Nashimoto, H. Ikeda, and A. Tamura : Diversity of immunodominant 56-KDa type-specific antigen (TSA) of *Rickettsia tsutsugamushi* : sequence and comparative analysis of the genes encoding TSA homologies from four antigenic variants. *J. Biol. Chem.* 267: 12728-12735, 1992.

56. Ohashi, N., A. Tamura, H. Sakurai, and S. Yamamoto : Characterization of a new antigenic type, Kuroki, of *Rickettsia tsutsugamushi* isolated from a patient in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2111-2113, 1990.
57. 太田原美作雄, 時枝正吉, 山辺靖子, 海保郁男, 酒井利郎, 春日邦子, 市村博, 七山悠三, 須藤恒久 : 千葉県におけるつつが虫病患者の発生状況. *臨床とウイルス* 12: 299-301, 1984.
58. Pollar-Knight, D., C. A. Read, M. J. Downess, L. A. Howard, M. R. Leadbetter, S. A. Pheby, E. McNaughton, A. Syms, and M. A. W. Brady : Nonradioactive nucleic acid detection by enhanced chemiluminescence using probes directly labeled with horseradish peroxidase. *Anal. Biochem.* 185: 84-89, 1990.
59. Rai, J. and D. Bandopadhyay : Vertical transmission in chigger-borne rickettsiosis. *Indian J. Med. Res.* 68: 31-38, 1978.
60. Rapmund, G. : Rickettsial disease of the Far East: New perspective. *J. Infect. Dis.* 149: 330-338, 1984.
61. Ree, H., H. Ree, I. Ree, and Y. Yoshida : Epidemiological studies on host animals of tsutsugamushi disease in Korea. *Korean J. Parasitol.* 29: 181-188, 1991.
62. Reka, S. A., S. Mizuno, and N. Kumada : Chigger and *Rickettsia tsutsugamushi* from Gifu Prefecture, Japan. *Jpn. J. Saint. Zool.* 38: 19-24, 1987.
63. Roberts, L. W., and D. M. Robinson : Efficiency of transmission of *Rickettsia tsutsugamushi* in *Leptotrombidium arenicola* (Acari: Trombiculidae). *J. Med. Entomol.* 13: 493-496, 1977.
64. Saiki, R., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich : Primer-directed enzymatic

- amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-494, 1988.
65. 斎藤英晁, 関川弘雄, 監物 実: 新恙虫病の臨床. *日本医事新報* 3007: 23-30, 1981.
66. 崎田平二: 富士裾野に於て発熱せる恙虫病様患者の一例. *医学中央雑誌* 41: 112-113, 1934.
67. Sasa, M.: Comparative epidemiology of tsutsugamushi disease in Japan (study on tsutsugamushi, part 76). *Jpn. J. Exp. Med.* 24: 335-361, 1954.
68. 佐々 学: 採取, 標本作製並びに飼育法. pp69-79. In *恙虫と恙虫病*, 医学書院, 東京, 1956.
69. 佐々 学: 幼虫の検索と解説. pp81-196. In *恙虫と恙虫病*, 医学書院, 東京, 1956.
70. Shirai, A., T. C. Chan, E. Gan, and D. L. Huxsoll: Persistence and reactivation of *Rickettsia tsutsugamushi* infections in laboratory mice. *Japan. J. Med. Sci. Biol.* 32: 179-184, 1979.
71. Shirai, A., D. M. Robinson, G. W. Brown, E. Gan, and D. L. Huxsoll: Antigenic analysis by direct immunofluorescence of 114 isolates of *Rickettsia tsutsugamushi* recovered from febrile patients in rural Malaysia. *Japan. J. Med. Sci. Biol.* 32: 337-344, 1979.
72. Shishido, A.: Identification and serological classification of the causative agent of scrub typhus in Japan. *Jpn. J. Sci. Biol.* 15: 308-321, 1962.
73. Shubin, F. N., K. V. Natsky, and G. P. Somov: Concerning vector of tsutsugamushi fever in the Far East. *Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunol.* 47: 112-115, 1970.
74. Stover, C. K., D. P. Marana, J. M. Carter, B. S. Roe, E. Maridis,

- and E. V. Oaks : The 56-kilodalton major protein antigen of *Rickettsia tsutsugamushi* : molecular cloning and sequence analysis of the *sta56* gene and precise identification of a strain-specific epitope. *Infect. Immun.* 58: 2076-2084, 1990
75. 須藤恒久 : わが国における最近の恙虫病発生の動向とその病原診断法の現状について. *臨床と最近*, 10:139-149, 1983.
76. 須藤恒久 : *Rickettsia* : 特に恙虫病と紅斑熱について. *検査と技術* 17: 575-580, 1989.
77. 須藤恒久, 藤宮芳章 : 細胞培養リケッチアを用いた免疫ペルオキシダーゼ反応による「つつが虫病」の迅速血清診断法. *臨床とウイルス* 8: 428, 1980.
78. 鈴木 博 : 富士山麓の恙虫 : 1. 未吸着幼虫の採取記録. *衛生動物* 21: 139, 1970.
79. 鈴木 博 : 富士山麓の恙虫 : 3. 未吸着幼虫6属18種の棲息場所とそれらの生態的特徴について. *衛生動物* 22:101, 1971.
80. 鈴木俊夫, 伊藤政志 : 恙虫病診断におけるワイルーフェリックス反応の価値 *日本医事新報* 2956: 43-47, 1980.
81. 鈴木俊夫, 関川弘雄 : 血管内凝固症候群を併発した恙虫病の4例. *感染症誌* 55: 642-648, 1981.
82. 鈴木俊夫, 須藤恒久 : 秋田県における新型(非アカツツガムシ媒介性)恙虫病 *感染症誌* 54: 755-765, 1980.
83. 橘 宣祥, 楠根英司, 横田 勉, 志々目栄一, 岡山昭彦, 津田和矩 : つつが虫病の血清学的診断における *Rickettsia tsutsugamushi* 弱毒株抗原の有用性 *感染症誌* 58: 583-589, 1984.
84. 橘 宣祥, 楠根英司, 横田 勉, 志々目栄一, 津田和矩, 押川達己 : 宮崎地方の恙虫病 : 疫学的, 免疫学的ならびに病原学的研究. *感染症誌* 56: 655-663, 1982.
85. 橘 宣祥, 志々目栄一, 村井幸一, 津田和矩 : 宮崎地方の臨床的, 病原学的

- 研究：病原リケッチアの血清型と臨床像。感染症誌 64: 76-79, 1989.
86. 高田靖司：休耕田における小哺乳類の生活史：第4報。レンズ重量によるアカネズミの齡査定法。成長 21: 8-11, 1982.
87. 高橋 守：フトゲツツガムシ *Leptotrombidium (Leptotrombidium) pallidum* におけるつつが虫病リケッチア *Rickettsia tsutsugamushi* の伝播に関する研究。衛生動物 41: 389-403, 1990.
88. Tamiya, T. (ed): Recent advances in studies of tsutsugamushi disease in Japan. Med. Cult., Inc., Tokyo, Japan, 1962.
89. 多村 憲：リケッチア・ツツガムシに関する基礎微生物学的研究。薬学雑誌 107: 751-766, 1987.
90. Tamura, A.: Studies on antigenic componets and surface structure of *Rickettsia tsutsugamushi*. Acta. Mediterr. Patol. Inf. Trop. 6: 309-315, 1987.
91. 多村 憲, 大橋典男, 桜井嗣之, 浦上 弘, 山本正悟, 川森文彦：ドットブロット法による恙虫病診断法の検討。感染症誌 64: 704-714, 1990.
92. Tamura, A., K. Takahashi, T. Tsuruhara, H. Urakami, S. Miyamura, H. Sekikawa, M. Kenmotsu, M. Shibata, S. Abe, and H. Nezu : Isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* antigenically different from Kato, Karp, and Gilliam strains from patients. Microbiol. Immunol. 24: 873-882, 1984.
93. 多村 憲, 浦上 弘：感染細胞計算法による *Rickettsia tsutsugamushi* の簡便な感染価測定法について。日本細菌学雑誌 36: 783-785, 1981.
94. 多村 憲, 浦上 弘, 大橋典男：*Rickettsia tsutsugamushi* の蛋白・抗原構造と血清学的variants。臨床とウイルス 15: 492-498, 1987.
95. Tamura, A., H. Urakami, and T. Tsuruhara : Purification of *Rickettsia tsutsugamushi* by Percoll density gradient centrifugation. Microbiol. Immunol. 26: 321-328, 1982.

96. Traub, R. and C. L. Wisseman, Jr.: The ecology of chigger-borne rickettsiosis (scrub typhus). *J. Med. Entmol.*, 11:237-303, 1974.
97. Traub, R., C. L. Wisseman, Jr., M. R. Jones, and J. J. O'keefe: The acquisition of *Rickettsia tsutsugamushi* by chiggers (Trombiculid mites) during the feeding process. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 266: 91-114, 1975.
98. 坪井義昌, 小山 孝: 補体結合反応およびウイル・フェリックス反応について. *臨床とウイルス* 12: 265-288, 1984.
99. Tsuya, H.: Geological and hetrological studies of Volcano, Fuji, V. 5. On the 1707 eruption of Volcano Fuji. *Bull. Earthq. Res. Inst.* 33: 341-382, 1955.
100. 内川公人: 恙虫病の再流行と恙虫病. *病理と臨床* 4: 671-675, 1986.
101. 内川公人, 服部 功, 小林浩一, 広沢毅一: 鈴木のツルグレン装置の改良と地表部における恙虫類幼虫の分布状況. *信大環境科学論集* 7: 71-75, 1985
102. 内川公人, 熊田信夫: ツルグレン法による恙虫類の生息調査: 2. 恙虫類の環境依存性と季節的発生消長. *衛生動物* 38: 323-332, 1987.
103. 内川公人, 熊田信夫, 田口敦史, 中塚龍也, 福田 晃: ツルグレン法による恙虫類の生息調査: 1. 調査法の検討と日常生活域におけるフトゲツツガムシの分布. *衛生動物* 37: 363-370, 1986.
104. 内川公人, 熊田信夫, 山田喜紹: ツルグレン法による恙虫類の生息調査: 3. 恙虫病の患家周辺部におけるフトゲツツガムシの発生. *衛生動物* 39: 13-17, 1988.
105. Urakami, H., S. Yamamoto, T. Tsuruhara, N. Ohashi, and A. Tamura: Serodiagnosis of scrub typhus with antigens immobilized on nitro-cellulose sheet. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1841-1846, 1989.
106. Van Peenen, P. F. D., C. M. Ho, and A. L. Bourgeois: Indirect immunofluorescence antibodies in natural and acquired *Rickettsia*

- tsutsugamushi* infections of Philippine rodents. *Infect. Immun.* 15: 813-816, 1977.
107. Weiss, E. and J. W. Molder : The Rickettsias and Chlamydias. pp. 687-739. *In* : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1 (Krieg, N. R., ed.), Williams & Wilkins, Baltimore/London, 1984.
108. Weler, F. : Kunstliche Infektion der Kleiderlaus mit *Rickettsia tsutsugamushi*. *Zt. Hyg.* 137: 419-428, 1953.
109. Wolf, J. W. : Observations on Weil-Felix reaction in Tsutsugamushi disease. *J. Hyg.*, 31:352-360, 1931.
110. 山本正悟, 川畑紀彦, 大浦恭子, 村田道里, 南嶋洋一 : 宮崎県における恙虫病患者由来の *Rickettsia tsutsugamushi* の抗原型とその分布. *感染症誌* 63: 109-117, 1989.
111. Yamamoto, S., N. Kawabata, A. Tamura, H. Urakami, N. Ohashi, M. Murata, Y. Yoshida, and A. Kawamura, Jr. : Immunological properties of *Rickettsia tsutsugamushi*, Kawasaki strain, isolated from a patient in Kyushu. *Microbiol. Immunol.* 30: 611-620, 1986.
112. 山本 進, 池畑正明, 鳥越富士夫, 村田道里 : 鹿児島県大隅地区の恙虫およびツツガムシ病リケッチアに関する調査成績. *衛生動物* 36: 279-283, 1985.
113. 山下照夫, 粕谷志郎, 長野 功, 大友弘士 : 岐阜県における恙虫病の研究 : 第5報. 標準株に対するモノクローナル抗体の性状と分離株の分類への応用. *感染症誌* 66: 1262-1269, 1992.
114. Yamashita, T., S. Kasuya, S. Noda, I. Nagano, S. Ohtsuka, and H. Ohtomo : Newly isolated strains of *Rickettsia tsutsugamushi* in Japan identified by using monoclonal antibodies to Karp, Gilliam, and Kato strains. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1859-1860, 1988.

Tsutsugamushi disease (scrub typhus) is a febrile illness caused by obligate intracellular bacteria that consists of several antigenic variants. In Japan, rickettsiae isolated from patients have been classified into not only the three standard serotypes, Gilliam, Kato and Kuno, but also Kawachi, Kuraji and Shimizu. The three species of rickettsiae are:

Studies on Epidemiology of Tsutsugamushi Disease and Ecology of *Rickettsia tsutsugamushi* in Shizuoka Prefecture

present study; the author investigated geographical distribution and seasonal fluctuations of serotypes of rickettsiae and attempted to relate the rickettsial serotypes and the species of their vector ticks.

In Shizuoka Prefecture, 191 patients were reported in 1952 through 1955 and 416 seropositive patients were confirmed by indirect fluorescent antibody technique (IFA) during the same period. Serotypes of rickettsiae were Gilliam, Kato and Kuno, and antigenic similarity was observed.

Fumihiko Kawamori

In the central part of the prefecture, 88 patients (72.5%) contracted the disease on the eastern slope of Mt. Fuji. The rickettsial infection and seropositive rates for 585 students in 1955 were 21.2% and 27.4%, respectively. These rates were high on the eastern slope of Mt. Fuji. Seropositive rates were high in 1956, and in the eastern part and the mountains.

A total of 27,547 ticks of rickettsiae were collected from 1955-1956 ticks. *A. japonicus*, 27 species, 10 rickettsiae were identified and classified into the four genera and 10 species. The majority of

Tsutsugamushi disease (scrub typhus) is a febrile ailment caused by chigger-borne *Rickettsia tsutsugamushi* that consists of several antigenic variants. In Japan, rickettsiae isolated from patients have been classified into not only the three standard serotypes, Gilliam, Karp and Kato, but also Kawasaki, Kuroki and Shimokoshi. The three species of trombiculid mites, *Leptotrombidium akamushi*, *Leptotrombidium scutellare*, and *Leptotrombidium pallidum*, mainly transmit the disease. In the present study, the author investigated geographic distribution and seasonal fluctuations of serotypes of rickettsiae and trombiculid mites to relate the rickettsial serotypes and the species of their chigger vectors.

In Shizuoka Prefecture, 151 patients were reported in 1982 through 1991, and 110 seropositive patients were confirmed by indirect fluorescent antibody technique (IFA) using the three prototype strains, Gilliam, Karp and Kato, as antigens. Although seropositive patients were widely distributed except the central part of the prefecture, 80 patients (72.7%) contracted the disease on the eastern slope of Mt. Fuji. The rickettsial isolation and seropositive rates for 385 *Apodemus speciosus* mice captured in the prefecture were 28.6% and 37.6%, respectively. These rates were high on the eastern slope of Mt. Fuji, where the disease was most heavily endemic, and in the eastern part and Izu Peninsula.

A total of 37,942 larvae of trombiculid mites collected from 484 wild rodents (404 *A. speciosus*, 67 *Apodemus argenteus*, 10 *Microtus montebelli*, and 3 *Mus musculus*) were classified into the four genera and 11 species. The majority of *L.*

*scutellare* larvae were found on the eastern slope of Mt. Fuji, and *L. pallidum* was heavily distributed in the eastern part of the prefecture including Izu Peninsula. The geographic distribution of chigger vectors, patients, and *A. speciosus* mice infected with the rickettsiae suggests that *L. pallidum* larvae transmit frequently to the wild rodents. However, *L. scutellare* seemed to be more important than *L. pallidum* as the vector causing human disease.

The larvae of trombiculid mites collected by Tullgren's funnel method from the soil samples on the eastern slope of Mt. Fuji were classified into the six genera and 16 species, inclusive of the three species that usually infest birds. *L. pallidum* was distributed widely in the district, with the heaviest distribution on large paddy banks lower than 500 m. *L. scutellare* was abundant on the sparse *Miscanthus* grassland developed on well-drained granular soil on the maneuver ground and, sporadically, in other mountainous areas higher than 500 m. This granular soil, which originated in the eruption of Mt. Fuji in 1707, is distributed only on the eastern slope of the mountain. Therefore, it is presumed that abundance of *L. scutellare* larvae on the eastern slope of Mt. Fuji is brought about by this suitable granular soil.

Immunological properties of the eight isolates of *R. tsutsugamushi*, which were obtained from patients on the eastern slope of Mt. Fuji, were analyzed by IFA with the monoclonal antibodies and immune guinea pig sera against Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki and Kuroki strains. These isolates were classified into Karp-type (two isolates), Kawasaki-type (four

isolates) and Kuroki-type (two isolates), but the reactivities of Karp-type and Kawasaki-type isolates with the monoclonal antibodies were slightly different from their respective standard strains. Additionally, six isolates except for Karp-type were less virulent to common mice the same as Kawasaki and Kuroki strains were.

A total of 59 strains of *R. tsutsugamushi* were isolated from patients (24 isolates), *A. speciosus* mice (30 isolates), and unfed larvae of *L. scutellare* (two isolates) and *L. pallidum* (three isolates) on the eastern slope of Mt. Fuji. All these isolates were classified into the three serotypes, Karp, Kawasaki and Kuroki, based on reactivity with strain-specific monoclonal antibodies. Kawasaki- and Karp-type rickettsiae were isolated from unfed *L. scutellare* and *L. pallidum*, respectively, and the geographic distribution of patients and rodents infected with these two types of rickettsiae coincided with the areas densely populated by the respective chigger vectors. Kawasaki-type rickettsial infection was prevalent in early autumn, while that of Karp-type showed a peak of occurrence in late autumn. This reflected the seasonal fluctuations of *L. scutellare* and *L. pallidum* larvae. From these results, the author concludes that Kawasaki-type rickettsiae are transmitted by *L. scutellare* and Karp-type ones are transmitted by *L. pallidum*. But, the vector transmitting Kuroki-type rickettsiae could not be fully defined, because isolates of this type were obtained only from four patients.

The reactivities of 36 patients' sera with the six rickettsial strains, Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki and

Ota (Karp-type rickettsiae isolated from a patient in the prefecture), were analyzed by IFA. Most of the sera were reacted strongly with only one of Kawasaki, Kuroki and Ota strains. The majority of cases with sera reacted strongly with Kawasaki strain were distributed on the eastern slope of Mt. Fuji, and occurred in autumn. On the other hand, the cases that yielded sera reacted strongly with Ota and Karp strains were widely distributed, and occurred from November to May. According to these data and the distribution pattern of chigger vectors, it is presumed that Kawasaki-type rickettsiae and Karp-type rickettsiae, which are similar to Ota strain, are transmitted by *L. scutellare* and *L. pallidum*, respectively.

In two-step polymerase chain reaction (nested PCR) method, the primers, which was derived from the TSA gene DNA sequences of Gilliam strain, served to produce rickettsia-specific products in the amplification of template DNA prepared from all the serovariants, Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki and Shimokoshi strains. The fragments of product after digestion with several kinds of restriction endonuclease showed the respective patterns to strain in polyacrylamide gel electrophoresis. The rickettsia-specific DNAs were also derived in this nested PCR by amplifying DNA from patients' bloods and *L. scutellare* larvae, and the serotype of rickettsiae in these hosts could be identified from fragment patterns of the amplified products observed after endonuclease treatment. These results indicate that this PCR is sensitive and specific not only for detection of rickettsial DNA in patients and chigger vectors, but also for the typing of rickettsiae in these hosts.



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

