

表 1. 1996年及び1997年の検査対象動物

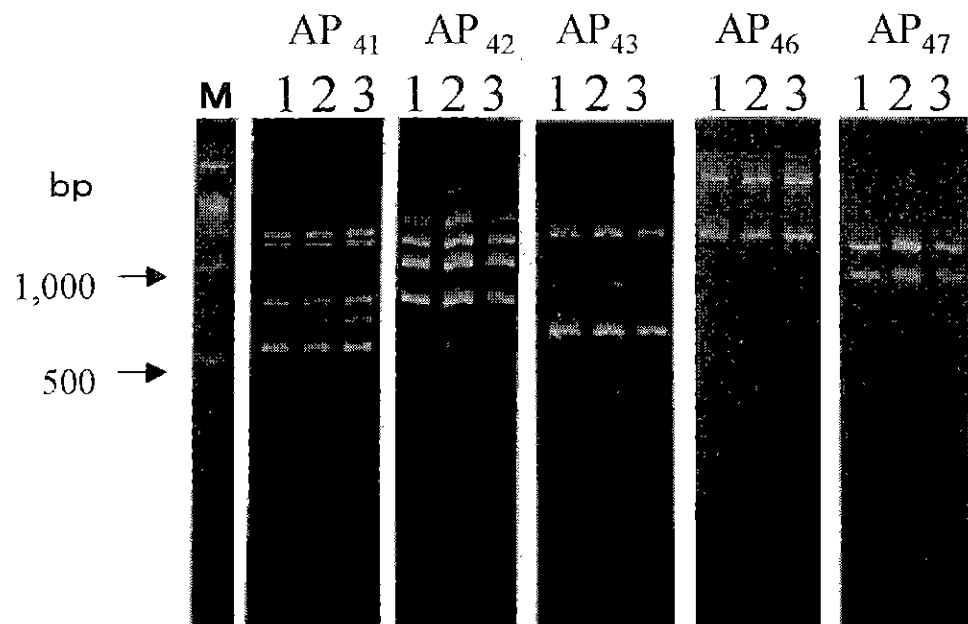
分 類	種 類	1996 年	1997 年
ほ乳類			
有袋目	オポッサム		1
	ワラビー	2	1
食虫目	ハリネズミ		6
翼手目	コウモリ		1
霊長目	サル	3	3
食肉目	アライグマ	1	
	イタチ	1	
	キツネ	2	
	ハクビシン		1
	フェレット	12	10
	ミーアキャット	1	1
	げっ歯目		
	チンチラ		3
	デグー		2
	ネズミ	5	2
ウサギ目	ハムスター	30	29
	ブレリードッグ	6	8
	マーモット	1	2
	モモンガ	3	
	モルモット	7	8
	リス	10	10
	ヤマネ		1
	ウサギ	44	2
は虫類			
	イグアナ	4	4
	カメ	5	3
	カメレオン	1	2
	トカゲ	2	1
計		140	101

表 2. 1996 年及び 1997 年に調査した各種動物の陽性検体

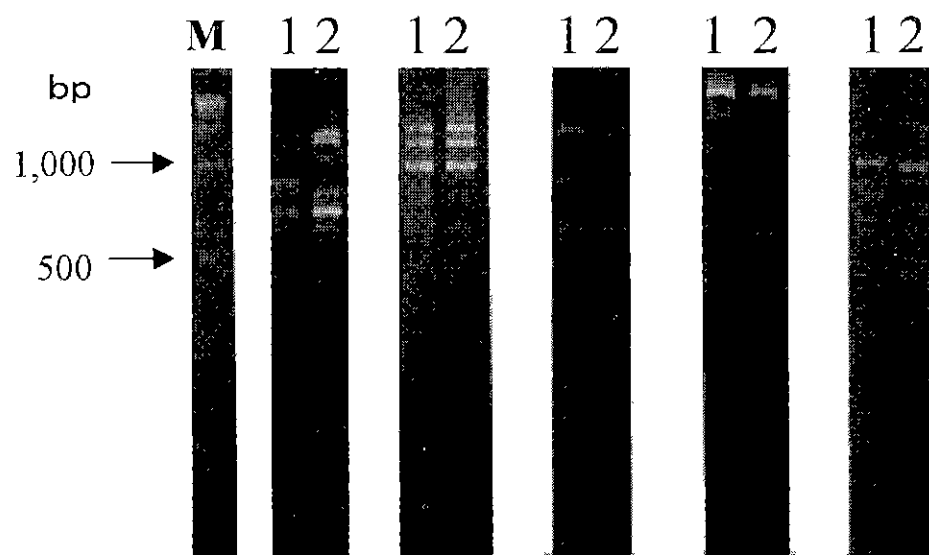
調査年及び動物種 飼育場所*		分離又は検出菌
1996 年		
イグアナ	一般家庭 a	<u>Salmonella</u> Fluntern
イタチ	ペットショップ A	<u>Chlamydia psittaci</u>
ウサギ	ペットショップ B	<u>Chlamydia psittaci</u>
カメ (陸ガメ)	一般家庭 b	<u>Salmonella</u> Virchow
キツネ	ペットショップ C	<u>Salmonella</u> Montevideo
ネズミ	一般家庭 c	<u>Chlamydia psittaci</u>
ハムスター	一般家庭 d	<u>Staphylococcus aureus</u>
ハムスター	一般家庭 e	<u>Chlamydia psittaci</u>
ハリネズミ	ペットショップ B	<u>Staphylococcus aureus</u>
フェレット	ペットショップ D	<u>Chlamydia psittaci</u>
フェレット	ペットショップ E	<u>Chlamydia psittaci</u>
プレリードッグ	ペットショップ F	<u>Chlamydia psittaci</u>
マーモット	ペットショップ F	<u>Chlamydia psittaci</u>
1997 年		
イグアナ	ペットショップ C	<u>Salmonella</u> Hvittingfoss
カメ (陸ガメ)	ペットショップ E	<u>Chlamydia psittaci</u>
カメレオン A	ペットショップ C	<u>Salmonella</u> Hvittingfoss
カメレオン B	ペットショップ C	<u>Salmonella</u> Hvittingfoss
ハリネズミ	ペットショップ D	<u>Chlamydia psittaci</u>
フェレット	一般家庭 f	<u>Chlamydia psittaci</u>
ミーアキャット	ペットショップ G	<u>Listeria monocytogenes</u> 1/2C 型
モルモット	ペットショップ B	<u>Salmonella</u> Enteritidis
モルモット	ペットショップ F	<u>Chlamydia psittaci</u>
リス	ペットショップ H	<u>Salmonella</u> Enteritidis

* : 同じ記号のペットショップは同一店舗を示す

検査総数 : ペットショップ 54 店舗, 一般家庭 52 軒



S. Hvittingfoss



S. Enteritidis

S. Hvittingfoss は 1 : イグアナ, 2 : カメレオン A, 3 : カメレオン B から分離

S. Enteritidis は 1 : モルモット, 2 : リス から分離

AP₄₁, AP₄₂, AP₄₃, AP₄₆, AP₄₇ : プライマー, M : 分子量マーカー

図. *Salmonella* の RAPD パターン

名古屋市のドブネズミにおける *Orientia tsutsugamushi* の抗体保有状況

水野恵子¹、杉山 誠¹、源 宣之¹、山下照夫²、内藤一夫³

(1 岐阜大学農学部獣医公衆衛生学講座、2 愛知県衛生研究所、3 名古屋市生活衛生センター)

要 約

近年、社会情勢の推移に伴う環境変化が急速に進み、媒介ツツガムシ及び自然宿主である野ネズミの棲息地域の拡大により、*Orientia tsutsugamushi*(OT)の広域に及ぶ浸淫が懸念されている。しかし、都市部におけるツツガムシ病の疫学的調査はほとんどなされていない。そこで、今回都市部におけるOTの浸淫状況を明らかにするために、人の生活圏と最も身近に棲息しているドブネズミを対象に抗体保有状況を調べた。

抗体価の測定は、抗原にOTの標準株であるKarp, Kato及びGilliam株を用い、間接蛍光抗体法(IFA)により行った。被検血清は1986～1989年(第1期)、1992～1995年(第2期)及び1998年(第3期)に名古屋市全域で捕獲されたドブネズミから採取されたものである。いずれの株に対する抗体価の分布も40倍を底とするに二峰性を呈したことから、その陽性限界を80倍とした。ドブネズミ959例のうち、いずれかの株で抗体陽性を示したのは22.9%であった。月別の抗体陽性率は、第1期では9月～3月、第2期では3月～4月にピークとなる一峰性の年内変化が見られ、第3期血清では2月～8月に抗体の上昇する分布を示した。夏季に抗体が高くなる傾向は野ネズミでも同様に認められた。幼獣に比べて成獣(150g以上)では抗体陽性率が有意に高かった。地区別では、中川区、北区などの西部地域と東部丘陵沿いに位置する昭和区で抗体陽性率の高い傾向が認められた。また、3株に対する陽性数の比較から、この地域に潜在するOTはKarp型であると思われた。抗体価が640倍以上の被検血清では100%がウエスタンブロッティングでOTに特異的な蛋白を検出した。また、陽性血清の一部では中和抗体価も検出された。

以上の成績から、名古屋市のドブネズミにおいてもOTが広く浸淫しているものと思われた。

はじめに

つつが虫病は *Orientia tsutsugamushi* (OT) を保有する幼虫期のツツガムシがヒトに刺咬した際に、唾液腺内のリケッチアが体内に移行することにより引き起こされる。病原体であるOTは、アカツツガムシ属の共生体として自然界に存続し、媒介種の雌成虫の保持するOTが卵を介して次世代に垂直伝搬することによって維持される(17,40,42,48,49,51)。

つつが虫病は東は日本から西はアフガニスタン、南は西南太平洋地域に広がるアジアの地方病である。日本にも古来から新潟、山形、秋田県の日本海沿岸の河川敷で夏期に発生し極めて致死率の高い風土病とされていた(古典型つつが虫病)。一方、第二次世界大戦後の1948年秋にわが国に駐留していた米軍兵士が富士裾野でつつが虫病に罹患したことを契機に、その後同様な疾患が伊豆七島(七島熱)、千葉(二十日熱)、香川(うまやど熱)などでも存在していることが明らかにされた(4,17)。現在では北海道を除く全国で本症の発生が認められている(新型つつが虫病)(4)。

法律に基づくつつが虫の届け出制度は1950年に開始され、当時は大部分が古典型つつが虫病で患者数は年間100名程度であったが、その後急速に減少し、1965～1975年の間は年間10名程度になった。しかし、1980年頃より新型つつが虫病患者が急増し、1984年には957名となった。その後、年によって増減しているものの、現在でも年間数百名にのぼる患者が発生しており、死者も毎年数名報告されている(4)。

このような患者急増の背景には、OTの血清型の多様化とそれに伴う病原性の変化^(25,43)、環境の変化や農薬の制限による媒介ツツガムシおよび自然宿主である野ネズミの増加や生息地域の拡大のほか、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われる前に治癒することが多かったこと、情報の発達、関心の増大および確定診断法の確立^(36,40)により、つつが虫の正確な発生数が把握できるようになったことなどがこれまでに考えられている⁽¹⁷⁾。しかし、正確な理由は不明であり、野ネズミ以外の野生動物とOTとの関連性も考慮に入れる必要がある。一方、野生動物においてOTに関する抗体調査の報告はなく、野ネズミ以外の他の鳥獣の自然界における浸淫状況はわかっていない。

衛生微生物技術協議会検査情報委員会に設置されているつつが虫病小委員会では、全国地方衛生研究所の協力により、1989年からつつが虫病様患者情報を収集している⁽⁴⁾。1991～1995年までに報告された2,512例について感染推定場所をみると、いずれの年も山地が多く、次いで農地であるが、ツツガムシの生息地域は河岸、山林、田畑、草原などのほかに新興住宅地の周辺にも拡大していることが報告されている^(11,51)。中部地方におけるつつが虫病患者発生数は毎年数十人と全国的にも多く、本症流行地の一つとなっている。近年、従来のKarp、KatoおよびGilliamの3つの血清型とは異なるKawasaki、KurokiおよびSimokoshi株が国内で相次いで分離され^(30,43,46,55)、その分布は拡大傾向にある。中部地方においても新たな血清型を示すOTが分離されており^(58,60)、先に述べた疫学的背景と近年の急速な都市開発の発展を考慮すると、新たな地域においてOTの浸淫している可能性は十分に考えられる。しかし都市部におけるつつが虫の疫学的調査はほとんどなされていない。

そこで今回、都市部におけるOTの浸淫状況を把握するために、ツツガムシの自然宿主であり、人の生活圏の最も身近に生息しているドブネズミを対象に血清疫学的調査を行った。本来の宿主であり、OTの常在地である山間部の野ネズミについても同様に抗体調査を行い、両者を比較検討した。

材料と方法

1. 供試された血清および脾臓

供試されたドブネズミ血清は、1986年4月～1989年3月まで(第1期)と1992年～1995年の11月～4月(第2期)および1998年1月～10月まで(第3期)の3期間に名古屋市全域のマンホールおよび公園で捕獲されたドブネズミより採取されたものである。その数は第1期が364匹、第2期が383匹、第3期が212匹の総計959匹である。また野ネズミ血清は1991年～1992年および1997年～1998年に岐阜大学農学部附属位山演習林(岐阜県益田郡萩原町)および岐阜県山間部で捕獲された総計191匹より採取されたものである。その内訳はアカネズミ107匹、ヒメネズミ21匹、ヤチネズミ18匹、ハタネズミ15匹、ハツカネズミ5匹、スミスネズミ1匹および鑑別不明の21匹である。ドブネズミおよ

び野ネズミは麻酔下で心臓穿刺により採血して死亡させ、体重などを測定後、脾臓が摘出された。分離した血清および脾臓はそれぞれ使用時まで-20℃、-80℃に保存された。なお、ドブネズミの捕獲は名古屋市生活衛生センターの協力によるものである。

2. アカネズミおよびドブネズミの年齢査定

野ネズミのうちその大半を占めるアカネズミについて高田の報告⁴¹⁾に従い、眼球水晶体の乾燥重量から年齢を査定した。すなわち、10%ホルマリン液で固定した眼球から水晶体を取り出し乾燥後、秤量し、与えられた回帰式からその日齢を鑑定し、3ヵ月齢以上の個体を成獣とした。なお、ドブネズミについては体重150g以上を成獣とした¹²⁾。

3. 培養細胞および培養液

感染細胞の作製にはマウス結合組織由来株化細胞のL-929細胞およびアフリカミドリザル腎由来株化細胞のVero細胞が用いられた。増殖培養液(GM)には5%ウシ胎児血清(FCS)、50ng/ μ l硫酸カナマイシン(明治)を加えたEagle's MEM(E-MEM)(ニッスイ)が、維持培養液(MM)にはGMからFCSを1%に減じたものが用いられた。なお、L-929細胞は本学家畜微生物学講座より分与された。

4. リケッチア株および抗血清

本研究に使用したOTはKarp、KatoおよびGilliamの標準3株である。陽性血清として抗Karp株マウス血清を用いた。いずれも愛知県衛生研究所の山下 照夫博士から分与された。

5. リケッチア感染細胞の作製

OT各株のストックリケッチアの作製は以下の方法で行われた。すなわち、SPG液(0.0038M KH_2PO_4 , 0.0072M K_2HPO_4 , 0.0049M L-グルタミン酸, 0.218M 蔗糖)に浮遊させた感染細胞をホモジナイザーで破碎し、3,000rpm5分間遠心した上清を、あらかじめハンクス液(ニッスイ)で3回洗浄した培養3日ないし4日目のL-929細胞あるいはVero細胞に接種した。37℃で2時間の吸着後、リケッチア液を除去して再度ハンクス液で3回洗浄し、細胞維持液(MM)を加えて37℃で6日~7日間培養した。途中3日ないし4日後にMMを交換した。

感染細胞の回収は、細胞変性効果(CPE)およ

びGimenez染色により80%以上の細胞にOTが感染していることを確認して行われた。感染細胞をラバーポリスマンで剥離、回収し、室温で1,500rpm5分間遠心して上清を除去後、SPG液に浮遊させ、使用時まで-80℃に保存した。

6. 酵素抗体法(ELISA)

ドブネズミおよび野ネズミ血清と抗ラットIgGおよび抗マウスIgGとの反応性は、概ねVollerら⁵³⁾の方法に従いELISAによりに確認された。

7. 間接蛍光抗体法(IFA)

24ウェルHTコーティングスライド(ARBROWN)に接着させた感染細胞を風乾させた後、冷アセトンを用いて10分間固定し、再び風乾した。すぐに使用しない場合には-80℃で保存した。固定、風乾させた感染細胞に、一次抗体として1%のスキムミルクを含むPBS(-)で20倍から段階希釈した12 μ l/ウェルのドブネズミおよび野ネズミ血清を37℃で1時間感作した後、PBS(-)で3、5および7分間の振とう洗浄をした。2次抗体として、ドブネズミ血清には500倍に希釈した蛍光標識抗ラットIgG抗体(Cappel)を、野ネズミ血清にはそれぞれ250倍に希釈した同抗ラットIgGおよび同抗マウスIgG抗体(ICN)を混合したものをを用いた。それぞれ10 μ l/ウェルの二次抗体を37℃で1時間感作した後、PBS(-)で同様に振とう洗浄をし、グリセロールバッファーで封入し、落射型蛍光顕微鏡(オリンパス)を用い400倍で観察した。判定は感染細胞の細胞質に局限して蛍光を発する顆粒(リケッチア粒子)の認められたものを陽性とし、陽性を示した最高希釈倍数をもって抗体価とした。

8. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

回収した感染細胞沈渣に10⁷個あたり1mlのライシスバッファー(150mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS, 50mM Tris-HCl pH8.0)を加え、氷上で30分間静置して可溶化し感染細胞ライセートとした。このライセートに等量の2倍濃縮サンプルバッファー(0.12% TrisHCl pH8.8, 4% SDS, 20% グリセロール, 0.01% BPB, 8% 2-メルカプトエタノール)を加えてよく混合し、100℃5分間加熱後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)を行った。泳動は、Laemmli²¹⁾の方法に従い、分離ゲルに濃縮ゲルを重ねたものをを用い、クロスパワー1000(ATTO)によりミニゲル一枚につき

30mA約60分間で行われた。

9. ウェスタンブロッティング (WB)

WB は Towbin ら⁴⁷⁾ の方法に、Chemiluminescence Reagent Plus (NENTM Life Science Products) による検出システムを取り入れて、以下の通りに行われた。上記と同様に SDS-PAGE 行い、泳動後、Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (MILLIPORE) に合わせ、常法に従ってゲルを陰極側、PVDF膜を陽極側にし、Sartoblot II (Sartorius) を用いて、Transwestern (ATTO) で12V90分間、さらに20V10分間プロットした。プロット後のPVDF膜は、直ちに5%のスキムミルクをおよびPBS-Tweenで室温1時間ブロッキングされた。このPVDF膜に一次抗体として、前述の5%のスキムミルクを含むPBS-Tweenで100倍に希釈したドブネズミおよび野ネズミ血清を4℃で一晩感作した。PVDF膜をPBS(-)で5分間1回、PBS-Tweenで5分間2回、さらにPBS(-)で5分間2回振とう洗浄をした後、二次抗体として、ドブネズミ血清には1%のスキムミルクを含むPBS-Tweenで4,000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ラットIgG抗体 (Zymed) を、野ネズミ血清には2,000倍に希釈した同抗ラットIgG抗体および500倍に希釈した同抗マウスIgG抗体 (Cappel) を混合したものを、室温で2時間感作した後、同様に振とう洗浄をした。PVDF膜の水分を除いた後、Chemiluminescence Reagent Plus検出液を乗せて室温で1分間反応させ、直ちにルミノ・イメージアナライザーLAS-1000 (FUJIFILM) を用いて10分間のフルオログラフィーを行った。なお、ウェスタンプロットの抗原として Karp、KatoおよびGilliam株感染Vero細胞ライセートを、また陰性コントロールとして非感染Vero細胞ライセートを用いた。

10. 中和試験

中和試験は、河村ら²⁰⁾の方法から抗原リケッチア量を30TCID₅₀/25μlに減じ、Karp株を用いて行われた。56℃30分間非働化後、2倍段階希釈した血清に上記のリケッチア液を等量加え、37℃で60分間感作した。それらの混合液を細胞培養用96ウェルマイクロプレート (NUNC) で3日ないし4日間培養し、あらかじめハンクス液で2回洗浄したVero細胞に各希釈あたり4ウェルずつ接種し、37℃で1,500rpm45分間遠心吸着させた。接種液を除去し再度ハンクス液で2回洗浄した後、MMを加え

た。3日ないし4日ごとにMMを交換し、37℃で10日間培養後、半数以上のウェルでCPEが観察されない最高希釈の逆数を中和抗体価として算出した。

11. DNAの抽出

DNAの抽出はRolfsら³⁴⁾の方法に従い、プロテイナーゼK処理、フェノール・クロロホルム抽出により行った。すなわち、感染細胞またはおよそ10mgのドブネズミおよび野ネズミの脾臓を0.4%SDSおよび終濃度400μg/mlになるように調製したプロテイナーゼK (GIBCO) を含むDNA抽出バッファー (150mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH8.8, 10mM EDTA-2Na) に浮遊させ、56℃2時間消化した。95℃10分間加熱してプロテイナーゼKを失活させ、溶解液に等量のフェノール・クロロホルムを加えよく攪拌して、室温で12,000 rpm5分間遠心し、水層を回収して再びこれを繰り返した。得られた水層にさらに等量のクロロホルム・イソアミルアルコールを加えよく攪拌して、室温で12,000rpm5分間遠心し、得られた水層に1/10量の3M酢酸ナトリウムと2倍量の99%エタノールを加えよく攪拌して、-80℃15分間放置した。4℃で12,000rpm10分間遠心後、得られた沈渣を70%エタノールで洗浄し、真空乾燥を行った。50μlの精製水に浮遊させDNA溶液とした。さらにDNA濃度をGene Quant II (Pharmacia Biotech) で測定し、200から400ng/μlになるように調整した。

12. Nested PCR

抽出したDNAを鋳型とし、Nested PCRを行った。使用したプライマーは Karp 株の56kDa蛋白をコードする遺伝子の配列を参考にしてHorinouchiら⁷⁾により報告されたものである。外側のプライマーには、5'-AGGATTAGAGTGTGGTCCTT-3' (RTS8) および 5'-ACAGATGCACTATTAGGCAA-3' (RTS9) を用いてThermal cycler MP (TaKaRa) で40回増幅 (熱変性: 94℃30秒、アニーリング: 55℃30秒、伸長反応: 72℃30秒) した。その後反応産物の1/10量をこのフラグメントの内側に位置するプライマー、5'-GTTGGAGGAATGATTACTGG-3' (RTS6)、5'-AGCGCTAGGTTTATTAGCAT-3' (RTS7) を用いて更に40回増幅した。なお、PCRは10倍濃度PCRバッファー、各0.25μMのプライマー、各2mMのdGTP、dATP、dTTPおよびdCTP、1.25U Ampli Taq GoldTM (PERKIN ELMER) と2.5μlの鋳型DNAを加え反応総量25μlで行われた。

PCR産物は、10mg/mlのエチジウムブロマイドを含む2.0%TBEアガロースゲル（同仁化学）を用いてMupid（ADVANCE）で電気泳動後、およそ650pの特異バンドの有無をトランスイルミネーター（ULTRA・LUM）で観察した。

結 果

1. IFAによるドブネズミおよび野ネズミのOTに対する抗体調査

1) ドブネズミおよび野ネズミ血清とビオチン標識抗ラットIgGおよび抗マウスIgGとの反応性

IFAによるOTの抗体調査に先立ち、ドブネズミおよび野ネズミ血清と、それぞれ4,000倍、16,000倍に希釈した抗ラットIgGおよび抗マウスIgGとの結合能をELISAにより比較した。ドブネズミ血清では抗ラットIgG単独で1.2 OD490と強く反応したのに対して、野ネズミ血清はいずれも抗ラットIgGおよび抗マウスIgGを混合させた場合に1.0～1.4 OD490と強く反応することがわかった。この成績から、以下ドブネズミ血清には抗ラットIgGを、野ネズミ血清には抗ラットIgGおよび抗マウスIgGを混合したものを二次抗体として用いた。

2) 抗体陽性限界の決定

ドブネズミ648例におけるOTに対する抗体価の分布は、いずれの株においても図1のように40倍を底とする二峰性を示した。このことから、抗体陽性限界をドブネズミについては80倍とした。野ネズミ血清の抗体陽性限界は、同様の試験から40倍とした。

3) ドブネズミおよび野ネズミにおける抗体保有状況

供試されたドブネズミ血清、総数959例中220例、および野ネズミ血清、総数191例中17例で標準株のいずれかに対する抗体を保有し、陽性率はそれぞれ22.9%（表1）および9.4%（表2）であった。ドブネズミにおける抗体価は80～5,120倍の間に分布していたが、その90%以上が80～320倍で（図2）、陽性血清に対する抗体価の幾何平均値も低値であった（表1）。一方、野ネズミにおける抗体価は40～20,480倍の間に認められ、約半数が40～320倍であったが、陽性血清に対する幾何平均値はドブネズミのそれより高い傾向を示した（表2）。

4) 株別にみた抗体保有状況

ドブネズミ血清において、Karp株とKato株に対する陽性率はGilliam株のそれに比べて明らかに高い値を示した（ $P<0.01$ ）。しかし、陽性血清における抗体価の幾何平均値に株間で差は認められなかった（表1）。

一方、野ネズミ血清では、株間で陽性率に有意な差は認められなかった。しかし、陽性血清における抗体価の幾何平均値に株間で有意な差が認められ（ $P<0.01$ ）、抗体価の分布に大きなばらつきがあった（表2）。標準3株に対する陽性血清の抗体価を詳しくみると（表3）、ドブネズミおよび野ネズミともKarp株に対して最も高い抗体価を示す血清が有意に多く認められた（ $P<0.01$ ）。また、ドブネズミでは220例中64例（29.1%）の血清が複数の株に対して最高値を示したものの、野ネズミでは17例中1例（5.9%）であった。

5) 年代別および月別にみた抗体保有状況

株別ではKarp株に対して最も高い抗体陽性率を示す傾向が認められたことから、以下Karp株に注目して検討した。

ドブネズミ血清について年代別に比較すると、第1期血清（1986～1989年）および第3期血清（1998年）における陽性率は第2期血清（1992～1995年）のそれに比べ有意に高い値を示した（ $P<0.01$ ）。しかし、陽性血清における抗体価の幾何平均値に年代による差は認められなかった（表4）。ドブネズミの抗体陽性率に年代による差がみられたことから、第1期および第3期の血清について月別に抗体陽性率を比較したところ（図3）、第1期血清では全体に低値であったが、9月～3月の比較的寒冷な時期に抗体陽性率が高くなる傾向がみられた。一方、第3期血清では2月～6月に高く、7月から10月にかけて低くなる傾向がみられた。なお、11月から4月に採集された第2期血清の抗体陽性率は3月および4月で高くなる傾向がみられた。3月から10月に採集された野ネズミ血清の抗体陽性率は低値であったが、その月別抗体陽性率は、ドブネズミ第3期血清と類似のパターンを示し、抗体は3月から7月に検出され、8月および9月は認められなかった（図3）。

6) 年齢別にみた抗体保有状況

年齢の推定されたドブネズミ889例中の抗体陽性率および抗体価の幾何平均値は成獣で高く（ $P<$

0.01) (表5)、アカネズミにおいても同様の結果であった。

8) 捕獲地域別にみた抗体保有状況

ドブネズミにおける抗体陽性率は各地区で4.0%から83.3%までかなりばらつきがあった(表6)。平均値(19.2%)以上の高い抗体保有率を示したドブネズミが捕獲された中川区、北区、昭和区、港区、中区、東区、瑞穂区および西区に対して、名古屋市の東部辺縁に位置する守山区、名東区、千種区、天白区および緑区ではそれを下回る低い陽性率であった(図4)。また、640倍以上の高い抗体価を保有する個体は、抗体陽性率の高い地区とほぼ一致してみられる傾向を示した。一方、陽性血清における抗体価の幾何平均値は瑞穂区の320倍を除き、各地区で差は認められなかった。

2. WBによる特異蛋白の検出

IFAによる血清反応の特異性を更に確認するため、Karp株感染Vero細胞ライセートを抗原としてWBを行った。陰性コントロールには非感染Vero細胞ライセートを用いた。抗Karp株マウス血清との反応では60、56、47および35kDa蛋白が検出され(図5)、これらいずれかの蛋白と反応した血清をWB陽性とした。その結果、図6に示すように、IFAによる抗体価の上昇に伴いWBによる特異蛋白の検出率も増加し、IFA抗体価が640倍以上の血清では全てがWB陽性となった。このことからIFA抗体価が160倍以上の血清では特異蛋白を検出していることが推測された。ドブネズミおよび野ネズミ血清ともOTの表在性主要蛋白のうち56および47kDa蛋白と高率に反応したが、中にはさらに抗Karp株血清では検出されなかった70kDa蛋白と反応する個体も38例中5例で認められた。なお、Kato株およびGilliam株においても56kDa蛋白が最も高率に検出され(データの記載なし)、Karp株と同様の傾向を示した。

3. 中和抗体の検出

IFAにより検出した抗体の特異性を更に検討するため、Karp株に対するIFA抗体価が320倍以上のドブネズミ血清について、同株に対する中和抗体価の測定を行った。調べた25例中2例で中和抗体価32倍および4倍(ともにKarp株に対するIFA抗体価320倍)を示す個体が認められた。

4. PCRによる遺伝子の検出

PCRによるドブネズミおよび野ネズミからのOT遺伝子の検出に先立ち、Kawamoriら¹⁹⁾およびMuraiら²²⁾の方法に従い、Karp株感染48時間後のL-929細胞を用いて今回行った条件下でのNested PCRの検出限界を測定したところ、3.2個のリケッチア粒子まで検出可能であることがわかった。

そこで、IFA抗体価の月別の分布(図3)より、抗体陽性率の上昇する冬季から夏季に捕獲されたドブネズミおよび野ネズミを中心に、その脾臓223例からDNAを抽出し、Nested PCRによりOT遺伝子の検出を試みたが、目的とする遺伝子は検出できなかった。

考 察

つつが虫病の疫学的研究は、1980年代初頭に突如始まった患者大発生を皮切りに全国各地で行われてきた。その結果、新たな地域において標準株とは病原性の異なるOTが分離され^{30,43,46,55,59)}、つつが虫病が広く浸淫していることが明らかとなった。それとともにOTとツツガムシの共生関係および自然界における生活環の解明が進められてきた⁵⁷⁾。その結果、野ネズミ、ヒトにOTを伝搬する有毒ツツガムシは、垂直伝搬により生まれながらにしてOTを保有している個体に限られること、ツツガムシを介して自然宿主である野ネズミからヒトへの伝搬はなく、ヒト寄生は偶発的であることなどがわかってきた^{42,49)}。このことはつつが虫病が地域限局性の発生をみせる要因であるが、ツツガムシ類の生息地域は環境依存性に決定されることから⁵¹⁾、近年の社会情勢の推移に伴う環境変化がツツガムシ相に何らかの影響を与えていることが懸念されている^{1,59)}。内川ら⁵⁰⁾は、野ネズミ調査法ではフトゲツツガムシの存在を認めることができなかった地域からツルグレン法³⁹⁾によりその存在を確認し、新たな地域においてツツガムシ類の生息している可能性を示した。

さらに自然宿主であるネズミの生息地域も環境変化により影響を受けている。とりわけ家ネズミ

であるドブネズミでは顕著で、その分布域は固定されたものではなく、人間社会の動きにより空間的にも時間的にも変動しているといえる⁵⁴⁾。アカネズミおよびハタネズミはツツガムシの好宿主性が知られているが^{9,18)}、古くから七島熱で知られる伊豆諸島ではアカネズミのみならずドブネズミもツツガムシの主要宿主であり、ドブネズミからのOT分離報告がある²³⁾。また富山県では、つつが虫患者の家の近辺からOT保有ドブネズミが捕獲され⁹⁾、その生活圏の拡大から新たな地域においてOTが広く浸淫している可能性は無視できない。

本研究ではOTの地域における浸淫状況を把握するため、つつが虫の血清診断法として広く用いられているIFAにより、名古屋市で捕獲されたドブネズミおよび岐阜県山間部の野ネズミについて抗体調査を行った。

IFAによる野ネズミにおけるOTの抗体調査では一般に抗体陽性限界を10~20倍とみる傾向があるが^{9,13,15,23,26,28,52)}、本研究ではドブネズミおよび野ネズミ血清とも抗体価が明瞭な二峰性の分布を示したことから(図1)、その陽性限界値をそれぞれ80倍および40倍とした。これは、IFAの特異性を検討するために行ったWBにより(図6)、IFA抗体価が160倍以上を示したドブネズミ血清の66.7%および80倍以上を示した野ネズミ血清の58.8%でKarp株に対する特異蛋白を検出し得たこと、さらにWBの感度を考慮にいとると妥当な数値であるといえる。今回、野ネズミ血清に対する二次抗体として抗マウスIgGおよび抗ラットIgGを混合させて用いたことは、特異抗体の検出感度を高め、結果的に通常より高い抗体陽性限界値の設定となった一つの要因であると考えられる。一方、ドブネズミ血清の場合は抗ラットIgGとの強い反応性から、野ネズミ血清より2倍高い抗体陽性限界値で妥当であると思われた。

標準株に対する抗体陽性率はドブネズミで22.9%(表1)、野ネズミで9.4%(表2)でありドブネズミで有意に高い値を示した($P<0.01$)。この成績はドブネズミにおいてより広範なOTの浸潤を示唆するが、野ネズミでは11月~2月の血清が得られていないことおよび二次抗体に対する両血清間の結合能が異なることが原因となり、抗体陽性率が低かったとも考えられ、安易に比較することは難しい。全国的にみてもドブネズミについてのOTに対する抗体調査の例は少ないが、二次抗体としてドブネズミおよびアカネズミには抗ラットIgGを、ハタネズミには抗ハタネズ抗体を用いた富山県にお

ける調査⁹⁾では、ドブネズミのIFA抗体陽性率は他の野ネズミに比べ高いことが報告され、今回の調査結果と一致した。

株別の抗体保有状況を比較すると、ドブネズミおよび野ネズミ血清とも抗体陽性率がKarp株に対して最も高い値を示した(表1、表2)、同株に対し最高値を示す個体が半数を占め有意に多かったこと($P<0.01$)(表3)、さらにドブネズミではKato株もしくはGilliam株に対して最高値を示した血清の中にはKarp株に対しても同値の抗体価を示す個体が多くみられたことから、今回供試した両血清は抗Karp株抗体優位の傾向であることが示唆された。大半の血清は複数の抗原と反応したが、Shiraiら³⁸⁾によるとマレーシアにおける患者からの分離株は、その78%が複数の標準株に対する抗血清に交差反応を示すことが報告されており、標準3株の間に存在する共通抗原がその主たる原因であると考えられた。陽性血清における抗体価の幾何平均値は(表1、表2)、ドブネズミでは株間で差が認められないものの、野ネズミではKarp株で463倍であり、Kato株の320倍およびGilliam株の170倍と比べ有意に高い値を示し($P<0.01$)、Karp株優位の傾向を裏づけた。

我が国のつつが虫病患者から分離される株のほとんどは標準3株およびKawasaki、KurokiおよびSimokoshiのいずれかに分類され、Kato株は東北地方日本海側の特定河川流域に局限し、Gilliam株は主に東北から北陸地方に、Karp株は東北から九州まで広範囲に分布するものと思われる²⁴⁾。またKawasaki株およびKuroki株は南九州と関東から東海にかけての太平洋側に多くみられるが^{5,56)}、Simokoshi株は東北から北陸に少数確認されているだけである。実際に、富山県での調査⁹⁾ではGilliam株によるものが多く、宮崎県での調査⁸⁾では患者の発生はKuroki株およびKawasaki株によるものが多いことが報告されている。また静岡県富士山麓における調査¹⁸⁾ではKarp株、Kawaski株の感染の多いことが知られており、分離株は地域により異なる様相をみせている。

岐阜県ではこれまでに患者、野ネズミおよびツツガムシからKarp、KawasakiおよびKuroki株のOTが分離されている⁶⁰⁾。一方、野田²⁸⁾およびYamashitaら⁶⁰⁾は岐阜県における標準株を用いた調査で、患者では抗Gilliam株抗体を、一方、野ネズミでは抗Karp株抗体をそれぞれ優位に保有していたことを報告している。Yamamotoら⁵⁵⁾によると、標準株の中ではKawasaki株はGilliam株に近

く、Kuroki株はKarpおよびKato両株の性状を持つことが知られ³⁷⁾、今回のドブネズミ血清におけるKarp株抗体優位かつKato株との高い交差反応性の結果(表3)を重ね合せると、Karp株のみならずKuroki株に対する抗体を検出している可能性が示唆された。一方、野ネズミについては複数の株に対する低い交差反応性からもKarp株に対する抗体の保有が裏づけられた。ドブネズミ血清における年代別の比較(表4)では、第3期血清で有意に抗体陽性率が高く($P<0.01$)、名古屋市におけるOTの浸潤拡大を意味していると考えられた。月別の比較では(図3)ドブネズミ第1期血清では抗体陽性率が9月～3月にかけて上昇し、初夏に低下する一峰性の年内変化がみられたものの、第3期血清では2月～6月に高く、抗体上昇のみられる時期に季節的なずれがあることは注目された。1992～1994年に名古屋市東部地域で行われた野ネズミの調査⁶⁾では、抗体陽性率は春から初夏に低く、冬季にピークとなる一峰性の年内変化を示し、第1期血清と類似のパターンを示した。

野ネズミ血清は3月～7月の初春から初夏にかけて抗体陽性率が上昇し、8月、9月で低下した。岐阜県山間部での患者発生の季節的ピークは晩秋から初冬にあり、厳冬期から初春に一旦ゼロになり、再び春から初夏に小ピークをみる二峰性の年内変動を示すことが報告されている⁶⁾。今回の調査では10月に抗体を保有する個体がみられるものの、11月～2月の血清が得られておらず冬季の抗体価の分布は不明であるが、初夏の抗体陽性率に上昇のみられたことは、この時期の患者発生と一致する。なお、4月には陽性個体がみられなかったが、これは検体数が少なかつたためと思われる、特異的な現象ではないと考えられた。

近年、日本各地で猛威を奮っているいわゆる新型つつが虫病は晩秋から初冬にかけて患者発生の顕著なピークを有している。さらに春から初夏にかけても少々の患者発生が認められる。これはOTを媒介するフトゲツツガムシやタテツツガムシの幼虫期に一致する時期と考えられてきた。現在までの調査でツツガムシの分布は地域、地点によって随分変化に富むものであり、地域限局的なOTの血清型の分布を反映していることがわかっている。タテツツガムシは東北中部から西南日本を中心に分布し、幼虫は秋から冬に出現し、年一峰性の季節消長を示す。一方、フトゲツツガムシは全土に生息することが知られ、秋から初春に多く見い出されるが、寒冷な地域では残存未吸着幼虫が越冬

し、気温の上昇とともに活動し始めるため、二峰性の季節消長を示すことが知られている^{1,33)}。

名古屋市におけるつつが虫病患者は今のところ非常に少ないが、1984年に実施された野ネズミの調査では市内で初めてタテツツガムシの生存が確認された。その後の調査でタテツツガムシは11月に多く採集され、その発生は晩秋から初冬にかけて一時期に一斉に増えることが確認された²⁶⁾。また幼虫の活動は気温と湿度に左右され¹⁶⁾、鹿児島県のような温暖な地域では、タテツツガムシは気温の低下する冬に、フトゲツツガムシは夏から春に、その幼虫の活動がずれこむことが知られている²⁹⁾。今回の調査では、第1期血清および第3期血清の最初のピークは、タテツツガムシ幼虫の活動時期に一致するよう抗体の上昇がみられた。一方、第3期血清の春から初夏にかけての抗体価の上昇はこれとは一致せず、むしろ温暖な地域におけるフトゲツツガムシ幼虫の活動時期に相当すると推測された。名古屋市ではこれまでにフトゲツツガムシの生息は確認されていないが、この成績は市内においてもフトゲツツガムシの生存の可能性を示唆した。

一方、岐阜県では1982年につつが虫の第1症例が報告されて以来患者が多発している。調査対象地となった益田郡でも毎年数名の患者発生があり⁶⁾本病常在地であるといえる。この地方における患者発生数とよく相関するのはタテツツガムシの発生で^{14,33)}、このツツガムシによって媒介されるKawasaki株およびKuroki株が大多数の患者の病原体となっている⁶⁰⁾。タテツツガムシの発生は11月～2月でことに11月に最も多く見い出され、患者発生はこれにほぼ一致する。一方フトゲツツガムシはこの地方に特有なKarp型のKN-3株を保有し、初冬の少数の患者発生に関与しているが、岐阜県山間部のような寒冷な地域では春から初夏にかけての患者発生も引き起こしている。今回の調査でも初夏に得られた血清はKarp株抗体を優位に保有していたことが示され、これまでの調査と一致した。

年齢別の比較では(表5)ドブネズミおよび野ネズミとも成獣で有意に高い抗体陽性率を示した。これまでに年齢による抗体陽性率の比較をしたデータはなく、今回の成績と照らし合わせることはできなかったが、ドブネズミおよび野ネズミとも交尾期が基本的に春秋の2回であり¹²⁾、OTの感染に季節性があることを考慮すると、幼獣期には感染を受ける機会が少ないためと思われる。ただ参考

として、粕谷らが行った野ネズミにおける調査¹⁵⁾では成獣と推定された個体において、体長増加に伴うOT抗体の蓄積効果は認められていない。このことはOT感染後の抗体価は4週～8週にかけて上昇するが攻撃感染によって再び抗体価の上昇をみないこと¹⁰⁾、抗OT抗体の持続期間が11ヵ月程度であること⁵²⁾などから感染を耐過し抗体の消失に至ったのではないかと推測している。

地区別の抗体陽性率は(図4、表6)、中川区、北区および昭和区で有意に高い値を示した($P < 0.01$)。平均値(19.2%)以上の高い抗体陽性率を示したのは、主に名古屋市西部地域であり、この地域にほぼ一致して高い抗体価を保有する個体が認められた。名古屋市においてOTの患者の届け出は非常に少なく²⁷⁾、しかも患者は市外で感染したものであると思われる。しかし、市の北部に位置する一宮市、江南市では過去に患者発生があり²⁾、この地域は岐阜県西南部の掛斐川流域における患者多発地帯と地理的に近接している。今回の成績は、この地域からのOTの汚染拡大の可能性を示唆した。一方、1990年には本市に隣接した日進町で患者の発生があり、市内の東部丘陵地域につつが虫病が浸淫している可能性が示唆された。その後の調査でこの地域に生息する野ネズミにおける抗体保有が確認され²⁶⁾、OTの浸潤を支持した。今回の調査でも東部丘陵沿いに位置し、過去に患者発生の届け出のある昭和区および瑞穂区²⁷⁾で高い抗体陽性率を示し、この地域においてOTが浸淫拡大している可能性が推測された。しかし、同じく東部に位置する守山区、名東区、天白区、緑区および千種区では平均値を下回る抗体陽性率を示していた。名古屋市のドブネズミの生息に関する調査では、市の中心部の下水道布設年次の古い地域の下水道内にドブネズミが特に多かったと指摘し⁵⁴⁾、このような地域では他のネズミに比べドブネズミ優位の生息率が予想される。抗体陽性率が低い値を示した東部丘陵地域では下水道布設年次が新しく、地形的要因もあいまってネズミの種による棲み分けのために、ドブネズミの分布密度が低いことが考えられ、市の中心部で高い抗体陽性率を示したことで何らかの関係があることが推測される。また抗体陽性率に季節性があることから、一概に地区別のみでは比較するのは難しく、採集時期による差も加味する必要がある。

これまでにOTの主要蛋白は80、70、60、56、47および35kDa蛋白であることが報告されている^{44,45,46)}。Karp株感染細胞ライセートを用いたWB

では抗血清において60、56、47および35kDa蛋白と反応するバンドが確認された(図5)。これらいずれかの蛋白と反応した血清をWB陽性とする、IFA抗体価が320倍以上のドブネズミのうち65%、野ネズミ血清のうち95%において56および47kDa蛋白と反応した。また両血清ともKarp株のみならず、Kato株およびGilliam株に対しても56および47kDa蛋白と高率に反応し、複数の株に交差反応を示す傾向にあった(データは記載していない)。これらの蛋白はOTの表在性主要蛋白であり、そのうち56kDa蛋白はOTの表面に最も多量に存在する蛋白であり、マウスを用いた感染実験では宿主に対して優位に抗体を産生することがわかっている。また、モノクローナル抗体の反応性から型特異抗原であると考えられているが、抗血清ではヘテロな株に対しても反応し、共通の抗原領域を認識していることがわかっている。一方、47kDa蛋白はモノクローナル抗体との反応性に株間で相違がないことから種特異抗原であることが知られている。検体の中には抗血清では認められなかった、70kDa蛋白と反応する個体も認められた。70kDa蛋白は47kDa蛋白と同様、種特異抗原であることが報告されており^{44,45,46)}、検体でみられた反応は特異的であると思われる。37kDa蛋白についても同様であり、感染後の経過期間によりこれらの蛋白とも反応する抗体が出現するものと思われる。

IFAで検出された抗体が320倍以上の個体25例についてKarp株に対する中和抗体価を測定した。一般に、中和試験は操作が繁雑でしかも判定までに日数を要するので、OTの抗体調査においてこの試験が用いられることは少ない。Barkerら³⁾によれば、免疫血清はホモの株では高い中和力価を示すものでもヘテロの株では中和活性を示さず、亜型に分類することが可能と報告されている。しかし今回、Karp株免疫血清においてIFAで32,000倍を示したのに対し、中和抗体価4倍と極めて低い値を有したに過ぎないことは、この手法が感度の低いことを示している。にもかかわらず、検体の中に32倍および4倍の中和力価を示す例が認められた。このことから、名古屋市のドブネズミにおいてKarp株あるいは同株に非常に近縁なOTが存在した可能性が示唆された。しかし、これら検体と同程度の中和抗体価でもKarp株免疫血清のIFA価(32,000倍)に比べて、両者とも320倍と低かった。この理由の一つとして、免疫と感染に対する生体反応の差が考えられた。一方、ヒトでの感染においては、回復早期にはT細胞および血清中にも

リケッチア増殖抑制作用があるが、回復後1年～3.5年経過した例ではT細胞にのみリケッチア増殖抑制作用が認められることなどから、OTに対する感染防御の主体はT細胞により活性化されたマクロファージによる細胞性免疫であり⁶¹⁾、中和抗体は感染初期に補助的に働くものと考えられる。今回、中和抗体はわずかな個体のみから検出されたが、このことはOTが都市のドブネズミにも確実に浸淫していることを物語っている。

近年、OTの診断はこれまでのマウス接種法からPCR法によるOT遺伝子の検出にとってかわり、検出感度の向上および迅速かつ簡便な診断が可能になった。PCRによるOT遺伝子の検出の試みは各地で行われており、つつが虫病流行地を中心に患者、野ネズミおよびツツガムシからOTが高率に分離され、広範なOTの浸淫が疑われている。今回の調査ではPCR法によってOT遺伝子の検出に至らなかったが、今回調査した岐阜県益田郡は患者発生地域であり、萩原町では過去に野ネズミからもOTが分離されている¹⁵⁾。OTの感染後の体内動態を考慮すると、分離は急性期の脾臓あるいは血餅から可能であることが知られているが^{7,19,22,36)}、今回野ネズミについてはこの地域で患者の多発する11月および12月の捕獲例がなく、いわばOT動態の休止期の調査であったとも考えられる。Ishikuraら⁹⁾の調査では、ドブネズミでは野ネズミに比べOT抗体陽性率は高い傾向にあるものの、分離率は低いことが報告されている。またマウスに比べラットではOT感受性が低いことも知られており、ドブネズミはOTに感染しても十分な増殖が得られないとも考えられる。これらの点は、今回のドブネズミで抗体陽性率が高いものの、陽性血清における抗体価の幾何平均値は野ネズミのそれより低いという結果からも伺える。

今回用いたプライマーは標準3株とは抗原性の異なるKurokiおよびKawasaki株においてもPCR法によりOTの検出が可能であることが証明され、広く野外分離株に応用可能であることが報告されている⁷⁾。しかし、Ohashiら³²⁾はモノクローナル抗体およびPCR-RFLP法を用いた分離株の型別により、Gilliam、Karp、KawasakiおよびKuroki型の各株はさらに抗原性の異なる数種の亜型に分類され、各地域により野外分離株の型あるいは亜型には片寄りがみられることを報告している。今回の調査ではこのために、この地域に浸淫している血清型を検出できなかったのかもしれない。

これまでに行われているOTの抗体調査は主に患

者発生地域を中心に行われてきた。しかし、今回行ったOTの抗体調査はこれまでとは対照的な都市部に生息するドブネズミにおける調査であったにもかかわらず、OT抗体陽性の個体が多数確認された。さらに、日本全国でOTの患者発生が急増した1980年代に、既に名古屋市において抗体陽性のドブネズミの存在していたことが示唆され、非流行地においてもOTが広範に浸淫し、土着していることが明らかとなった。

つつが虫病患者の発生は年によって変動があるものの、減少傾向にある。一方、今回の調査から、時を経てツツガムシ相が変化し、その生息地域が拡大している可能性が示唆された。両者を重ね合せると、これまでとは病原性の異なるOTが広く浸淫している傾向が伺える。今回調査対象となったドブネズミが人との生活圏をともにすることを考慮すると、今後の動向が多いに注目される。

1980年代に突如全国規模で始まったつつが虫病患者の大発生はツツガムシやネズミの生息地域の拡大によるものだけとは考えにくく、野鳥や中、大型哺乳動物による広範囲に及ぶ分散および新しい土地への侵入と定着の可能性も考えられる。今後このような視点での調査が重要であると思われる。

参考文献

- 1) 足立 雅彦, 中嶋 智子, 森本 芳弘, 岡嶋 伸親, 上田 彬博, 山川 和彦, 奈 順子, 松野 喜六, 降井 佐太郎: 京都府のツツガムシ相と恙虫病. 衛生動物 48: 97-107, 1997.
- 2) 愛知県衛生部環境衛生課: 伝染病関係資料 感染症サーベイランス事業報告書 第15報 愛知県 1998.
- 3) Barker, L.F., Patt, J. K. and Hopps, H. E.: Titration and neutralization of *Rickettsia tsutsugamushi* in tissue culture. J. Immunol. 100: 825-830, 1968.
- 4) 衛生微生物技術協議会検査情報委員会つつが虫病小委員会: つつが虫病 1991~1995 病原微生物検出情報: 197-198, 1997.
- 5) Furuya, Y., Yamamoto, S., Ota, M., Yoshida, Y., Ohashi, N., Murata, M.,

- Kawabata, N., Tamuura, A. and Kawamura, A. Jr.: Use of monoclonal antibodies against *Rickettsia tsutsugamushi* Kawasaki for serodiagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 29, 340-345, 1991.
- 6) 岐阜県環境衛生部: "衛生年報" 岐阜県 1998.
- 7) Horinouchi, H., Murai, K., Okayama, A., Nagatomo, Y., Tachibana, N. and Tsubouchi, H.: Genotypic identification of *Rickettsia tsutsugamushi* by restriction fragment length polymorphism analysis of DNA amplified by the polymerase chain reaction. Am. J. Trop. Med. Hyg. 54: 647-651, 1996.
- 8) Horinouchi, H., Murai, K., Okayama, A., Nagatomo, Y., Tachibana, N. and Tsubouchi, H.: Prevalence of genotypes of *Orientia tsutsugamushi* in patients with scrub typhus in Miyazaki prefecture. Microbiol. Immunol. 41: 503-507, 1997.
- 9) Ishikura, M., Watanabe, M., Morita, O. and Uetake, H.: Epidemiological studies on the background of the endemic occurrence of tsutsugamushi disease in Toyama prefecture. Microbiol. Immunol. 29: 859-872, 1985.
- 10) 石郷岡 清基, 阿部 達也, 吉村 堅太郎: 恙虫病リケッチア弱毒株により誘導される強毒株に対するマウスの再感染抵抗性. 衛生動物 45: 53-56, 1996.
- 11) Iwasa, M., Kasuya, S., Noda, N., Hiroki, A., Ito, A. and Ohtomo, H.: Trombiculid mites (Akari: trombiculidae) and *Rickettsia tsutsugamushi* isolated from wild rodents in a new endemic. J. Med. Entomol. 27: 501-508, 1990.
- 12) 金子 之史, 塩谷 克典, 斎藤 隆, 矢部 辰男, 日高 敏隆 監修, 川道武男編集: ハタネズミ, アカネズミとヒメネズミ, ドブネズミ・クマネズミ・ハツカネズミ. 日本動物大百科第1巻哺乳類 I 平凡社: 92-105, 1996.
- 13) 粕谷 志郎, 岩佐 光啓, 日置 敦巳, 伊藤 亮, 大友 弘士, 野田 伸司, 渡辺 実, 山田 不二造: 岐阜県における恙虫病の研究-第1報 新たな地域の野鼠よりの *Rickettsia tsutsugamushi* の分離, および県下の患者発生状況, 住民の抗体陽性率に関する考察- 感染症学雑誌 59: 471-477, 1984.
- 14) 粕谷 志郎, 日置 敦巳, 伊藤 亮, 大友 弘士, 岩佐 光啓, 野田 伸司, 渡辺 実, 山田 不二造: 岐阜県における恙虫病の研究-第2報 媒介ツツガムシの推定- 感染症学雑誌 59: 1142-1148, 1985.
- 15) 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- 感染症学雑誌 60: 1022-1025, 1986.
- 16) 粕谷志郎: 岐阜県における恙虫病の研究 第6章 患者発生数と気象要素との関連. 感染症学雑誌 69: 1110-1116, 1995.
- 17) 川森 文彦: つつが虫病の疫学 獣医畜産新報 45: 843-847, 1992.
- 18) Kawamori, F., Akiyama, M., Sugieda, M., Kanda, T., Akahane, S., Uchikawa, K., Yamada, Y., Kumada, N., Furuya, Y., Yoshida, Y., Yamamoto, S., Ohashi, N. and Tamura, A.: Epidemiology of Tsutsugamushi disease in relation to the serotypes of *Rickettsia tsutsugamushi* isolated from patients, field mice, and unfed chiggers on the eastern slope of Mount Fuji, Shizuoka Prefecture, Japan. J. Clin. Microbiol. 30: 2842-2846, 1992.
- 19) Kawamori, F., Akiyama, M., Sugieda, M., Kanda, T., Akahane, S., Yamamoto, S., Ohashi, N. and Tamura, A.: Two-step polymerase chain reaction for diagnosis of scrub typhus and identification of antigenic variants of *Rickettsia*

tsutsugamushi.

J. Vet. Med. Sci. 55: 749-755, 1993.

20) 河村 美登里, 堀田 明豊, 水谷 美穂, 山口 剛士, 福士 秀人, 平井 克也: *Coxiella burnetii* に対するモノクローナル抗体の中和活性 第126回 日本獣医学会 1998.

21) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685, 1970.

22) Murai, K., Tachibana, N., Okayama, A., Shishime, E., Ysuda, K. and Oshikawa, T.: Sensitivity of polymerase chain reaction assay for *Rickettsia tsutsugamushi* in patient's blood samples. Microbiol. Immunol. 36: 1145-1153, 1992.

23) 村田 道里, 川村 明義, 野上 貞夫, 白坂 昭子, 田中 寛: 伊豆七島におけるつつが虫病 (七島熱) の研究-第3報 ノネズミにおける抗つつが虫病リケッチア抗体の保有率- 感染症学雑誌 54: 279-282, 1980.

24) Murata, M., Yoshida, Y., Osano, M., Oyanagi, M., Urakami, H., Tamura, A., Nogami, S., Tanaka, H. and Kawamura, A. Jr.: Production and characterization of monoclonal strain-specific antibodies against prototype strains of *Rickettsia tsutsugamushi*. Microbiol. Immunol. 30: 599-610, 1986.

25) Nagan o, I., Kasuya, S., Noda, N. and Yamashita T.: Virulence in mice of *Orientia tsutsugamushi* isolated from patients in a new endemic area in Japan. Microbiol. Immunol. 40: 743-747, 1996.

26) 名古屋市防疫センター: 市内に生息する野そのつつが虫病実態調査 平成5年度 環境衛生調査成績 24: 34-37, 1993.

27) 名古屋市衛生局: 名古屋市衛生年報 統計編

名古屋市, 1998.

28) 野田 伸司: 岐阜県におけるつつが虫病の血清学的研究-患者血清検査の概要と分離株抗原使用の有用性について- 岐阜県獣医師会報 29: 31-36.

29) Noda, S., Yamamoto, S. and Uchikawa, K.: Seasonal occurrence of larval trombiculid mites and distribution of *Leptotrombidium scutellare* in residential area and farmland in Kagoshima Prefecture. Med. Entomol. Zool. 47: 339-346, 1996.

30) Ohashi, N., Tamura, A., Sakurai, H. and Yamamoto, S.: Characterization of a new antigenic type, Kuroki, of *Rickettsia tsutsugamushi* isolated from a patient in Japan. J. Clin. Microbiol. 28: 2111-2113, 1990.

31) Ohashi, N., Fukuhara, M., Shimada, M. and Tamura, A.: Phylogenetic position of *Rickettsia tsutsugamushi* and the relationship among its antigenic variants by analyses of 16S rRNA gene sequences. FEMS Microbiol. Letters. 125: 299-304, 1995.

32) Ohashi, N., Koyama, Y., Urakami, H., Fukuhara, M., Tamura, A., Kawamori, F., Yamamoto, S., Kasuya, S. and Yoshimura, K.: Demonstration of antigenic and genotypic variation in *Orientia tsutsugamushi* which were isolated in Japan, and their classification into type and subtype. Microbiol. Immunol. 40: 627-638, 1996.

33) Reka, S. A., Mizuno, S. and Kumada, N.: Chiggers and *Rickettsia tsutsugamushi* from wild rodents of southern Gifu prefecture, Japan. Jpn. J. Sanit. Zool. 38, 19-23, 1987.

34) Rolfs, A., Schuller, I., Finckh, U. and

- Weber-Rolfs, I. 加藤 郁之進 監訳: "第7章 細胞および組織からのDNAの単離" ラボマニュアルPCR -研究と臨床診断への応用- 宝酒造株式会社: 95-97, 1996.
- 35) Roux, V. and Raoult, D.: Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing. Res. Microbiol. 146: 385-396, 1995.
- 36) Scola, B. L. and Raoult, D.: Minireview -Laboratory diagnosis of Rickettsioses: Current approaches to diagnosis of old and new Rickettsial diseases. J. Clin. Microbiol. 35: 2715-2727, 1997.
- 37) 志賀 耕二, 小河 正雄, 小野 哲郎, 橘 宣祥: 感染 *Rickettsia tsutsugamushi* の血清型によるつつが虫病の臨床所見の解析. 感染症学雑誌 71: 299-305, 1997.
- 38) Shirai, A., Robinson, D. M., Brown, G.W., Gan, E. and Huxsoll, D.L.: Antigenic analysis by direct immunofluorescence of 114 isolated of *Rickettsia tsutsugamushi* recovered from febrile patients in rural Malaysia. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 32: 337-344, 1979.
- 39) 鈴木 博: 長崎県対馬の恙虫-宿主と土壌採取による採集法との比較. 衛生動物 29: 9, 1978.
- 40) 高田 伸弘: 病原性ダニ類図譜. 金芳堂: 11-104, 1990.
- 41) 高田 靖司: 休耕地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齢査定報 成長 21: 8-11, 1982.
- 42) 高橋 守: フトゲツツガムシ *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.
- 43) Tamura, A., Takahashi, K., Tsuruhara, T., Urakami, H., Miyamura, S., Sekikawa, H., Kenmotsu, M., Shibata, M., Abe, S. and Nezu H.: Isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* antigenically different from Kato, Karp, and Gilliam strains from patients. Microbiol. Immunol. 28: 873-882, 1984.
- 44) Tamura, A., Ohashi, N., Urakami, H., Takahashi, K. and Oyanagi M.: Analysis of Polypeptide composition and antigenic components of *Rickettsia tsutsugamushi* by Polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting. Infect. Immun. 48: 671-675, 1985.
- 45) 多村 憲: リケッチア・ツツガムシの病原因子. 日本細菌学雑誌 43: 629-639, 1988.
- 46) Tange, T., Kanemitsu, N. and Kobayashi, Y.: Analysis of immunological characteristics of newly isolated strains of *Rickettsia tsutsugamushi* using monoclonal antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 44: 371-381, 1991.
- 47) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets.-Procedure and some application. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76: 4350-4354, 1979.
- 48) Urakami, H., Takahashi, M., Hori, E. and Tamura, A.: An ultrastructural study of *Rickettsia tsutsugamushi* during oogenesis and spermatogenesis in *Leptotrombidium pallidum*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50: 219-228, 1994.
- 49) 浦上 弘, 多村 憲: 恙虫病リケッチア *Orientia tsutsugamushi* と宿主ツツガムシとの共生関係について. 日本細菌学雑誌 51: 497-511, 1996.
- 50) 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 衛生動物 38: 323-332, 1987.
- 51) 内川 公人: 恙虫病 臨床検査 39: 1021-1028,

- 1995.
- 52) Van Peenen, P.F.D., Ho, C.M. and Bourgeois, A.L. : Indirect immunofluorescence antibodies in natural and acquired *Rickettsia tsutsugamushi* infections of Philippine rodents. Infect. Immun. 15: 813-816, 1977.
- 53) Voller, A., Bidwell, D. and Bartlett, A. : "Enzyme-linked immunosorbent assay." Rose, N. R. and Friedman, H. ed. Manual of Clinical immunology American society for microbiology, Washington D.C. : 359-371, 1980
- 54) 矢部 辰男 : 都市におけるドブネズミとクマネズミの種類構成の変動. 衛生動物 48: 285-294, 1997.
- 55) Yamamoto, S., Kawamura, N., Tamura, A., Urakami, H., Ohashi, N., Murata, M., Yoshida, Y. and Kawamura, A. Jr. : Immunological properties of *Rickettsia tsutsugamushi*, Kawasaki strain, isolated from a patient in Kyusyu. Microbiol. Immunol. 30: 611-620, 1986.
- 56) 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. 感染症学雑誌 63, 108-117, 1989.
- 57) 山本 進, 松下 敏夫, 野田 伸一 : 植生の変化とツツガムシ - 鹿児島県加世田市における再調査 - 衛生動物 48: 361-363, 1997.
- 58) Yamashita, T., Kasuya, S., Noda, S., Nagano, I., Ohtsuka, S. and Ohtomo, H. : 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.
- 59) 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 - 感染症学雑誌66: 1262-1269, 1992.
- 60) Yamashita, T., Kasuya, S., Noda, N., Nagano, I. and Jae-Seung Kang. : Transmission of *Rickettsia tsutsugamushi* strains among humans, wild rodents, and trombiculid mites in an area of Japan in which tsutsugamushi disease is newly endemic. J. Clin. Microbiol. 32: 2780-2785, 1994
- 61) 横田 勉, 橘 宣祥, 志々目 栄一, 岡山 昭彦, 津田 和矩 : 恙虫病の感染免疫の研究. 感染症学雑誌 63: 1149-1159, 1989.

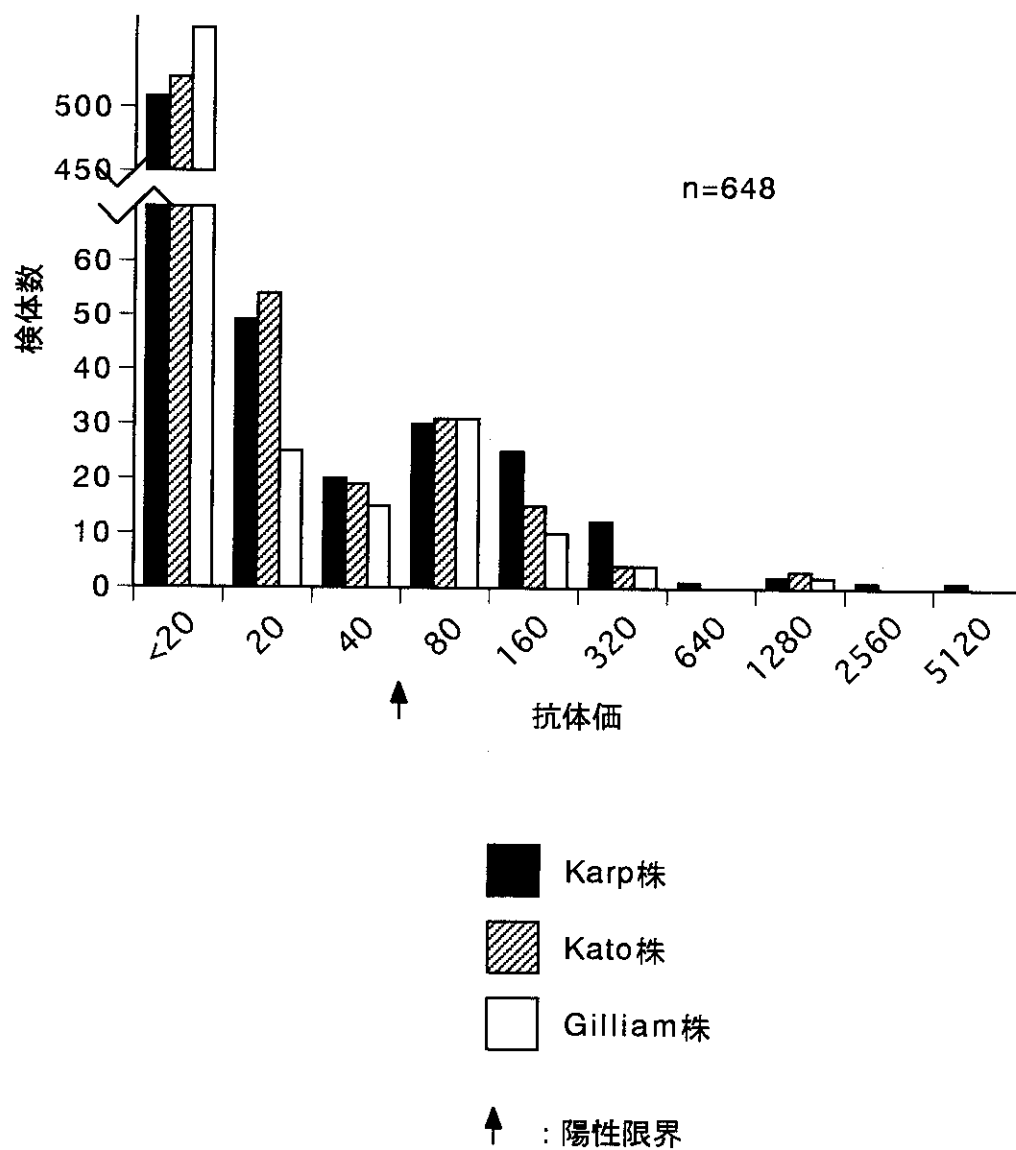


図1 ドブネズミにおけるOTに対する抗体価の分布

表1 ドブネズミにおける各株に対する抗体陽性率

抗原	陽性数 ^{a)}	陽性率(%)	幾何平均値 ^{b)}
Kp+Kt+Gl	220 ^{c)}	22.9	：
Kp	184	19.2	162
Kt	149	15.5	152
Gl	108	11.3	133

Kp : Karp株 Kt : Kato株 Gl : Gilliam株
 ドブネズミ959例を調べた。

a) 80倍以上を陽性とした。

b) 陽性血清における抗体価の幾何平均値

c) いずれかの株に対して陽性を示した検体数

表2 野ネズミにおける各株に対する抗体陽性率

抗原	陽性数 ^{a)}	陽性率(%)	幾何平均値 ^{b)}
Kp+Kt+Gl	18	9.4	・
Kp	15	7.9	463 ^{d)}
Kt	11	5.2	320 ^{d)}
Gl	12	6.3	170 ^{d)}

野ネズミ191例を調べた。

a) 40倍以上を陽性とした。

b) 抗体陽性血清における幾何平均値

c)とd) との間に有意差あり (P<0.01) 。

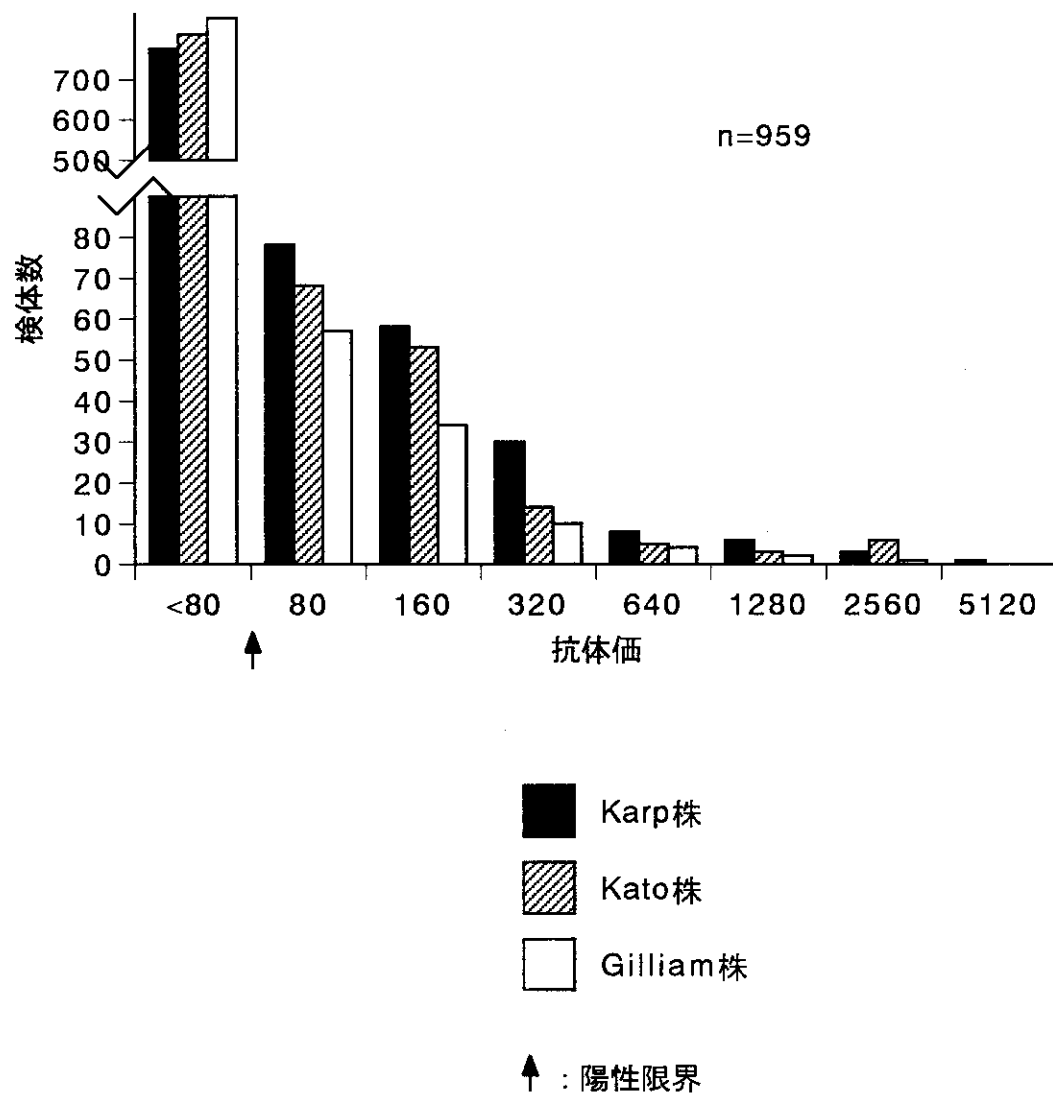


図2 ドブネズミにおける抗体価の分布