

厚生労働科学研究費補助金「ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる技術・情報の体系化に関する研究」（平成 24～26 年度）

秋田県で確認された Shimokoshi 型つつが虫病 15 症例における 臨床、疫学及び診断法の検討

佐藤寛子 藤田博己^{*1} 柴田ちひろ 斎藤博之 須藤恒久^{*2}

つつが虫病リケッチア *Orientia tsutsugamushi* の Shimokoshi 型による感染例は稀であり、その臨床像や疫学的な特徴については不明な点が多いとされている。しかし、われわれは、秋田県において 1992 年～2012 年に 15 症例の Shimokoshi 型つつが虫病を確認した。これらは、軽症例から重症例を含む多彩な臨床像を示していた。発生時期は春（4 月から 6 月）と秋（10 月と 11 月）で、地域は県の北部から南部にまでおよんでいた。また、Shimokoshi 型検出を目的とした PCR primer を設計し、3 検体からこの型の DNA を検出した。更に、1 例の患者から国内では 2 株目となる Shimokoshi 型リケッチアを分離した。今後、Shimokoshi 型感染例についても、積極的な実験室診断体制の整備が望まれ、またヒトに対する病原性の再評価とベクター解明に向けた調査が課題となる。

1. 緒言

現在、国内におけるつつが虫病リケッチア *Orientia tsutsugamushi* (*O.tsutsugamushi*) は、Gilliam, Karp, Kato, Irie (= Kawasaki), Hirano (= Kuroki) 及び Shimokoshi の 6 血清型に大別されている¹⁾²⁾。このうち、Shimokoshi 型は 1980 年に新潟県の患者血液から分離された 1 株により樹立され、概してヒト病原性は低いものと認識されている。その後、Shimokoshi 型の感染例は、血清学的診断により数症例が確認されていたが³⁾⁴⁾、近年は山形県からの報告⁵⁾のみであり、発生は稀であると考えられてきた。しかし、当センターでの血清学的検査において、Shimokoshi 抗原を追加した 2009 年以降 2012 年までの 4 年間で 5 症例を確認し、これ以前の期間の検体についても検索を試みたところ、1992 年～2012 年に 15 症例を Shimokoshi 型感染と判定した。今回は、これらの Shimokoshi 型症例群の臨床像と疫学的背景の概要に加え、現在の Shimokoshi 型検出系の課題について検討したので併せて報告する。

2. 方法

2.1 対象と材料

1992 年～2008 年に当センターへ

つつが虫病疑いとして検査依頼があった症例のうち、次のような例を対象とした。1) 発熱、発疹及び刺し口の 3 徴候を認めながらも、この期間に使用していた標準 3 型抗原 (Gilliam, Karp, Kato) に対する抗体上昇が確認されない、あるいは軽度の上昇に留まった例、2) 3 徴候全てには合致しないが軽微な抗体上昇が認められた例、以上の条件を満たした対象 104 例の保存血清を材料とした。また、2009 年～2012 年に Shimokoshi 型抗原を加えたことによって確認し得た Shimokoshi 型 5 症例も同様に血清を材料としたが、このうち全血が -80℃ に保存されていた 3 例については血清の他、全血も材料とした。

2.2 方法

初めに、これら症例の回復期血清について、須藤による間接免疫ペルオキシダーゼ法 (IP 法)⁶⁾ を用いたスクリーニング検査を実施した。まず、被検血清を PBS (-) で非特異的な反応がほとんど起こらないとされる 40 倍に希釈し⁷⁾ Shimokoshi 型抗原に対して陽性反応が見られた症例を選別した。次に、これらの急性期と回復期の血清について、標準 3 型抗原に Irie, Hirano 及び Shimokoshi を加えた 6 型抗原に対する抗体価を測定した。これにより Shimokoshi 型に対す

*¹ 馬原アカリ医学研究所, *² 秋田大学

表1 Shimokoshi 型 *Orientia tsutsugamushi* 検出用 Primer

Primers	Sequence(5'-3')	Usage	PCR conditions		
			Denaturing	Anealing	Extention
34	ATT GCT AGT GCA ATG TCT GC	1st. PCR	94°C 30s	57°C 30s	70°C 30s
55	AGG GAT CCC TGC TGC TGT GCT TGC TGC G				
SH6	TAG TAT CTG ACT GCT TCT TAT CCT TAG AG				
10m2	CCD CCT CAR CCT AMT ATR ATG CC	2nd. PCR & Sequence analysis	94°C 30s	57°C 30s	70°C 30s
SH5	GGC CTT GAT CAA CAC CCA A				

34, 55 : Furuya et al. (1988) SH6, 10m2, and SH5 : This study

る抗体価が他の抗原型よりも4倍以上高値を示した場合を Shimokoshi 型感染症例と判定した。これらの症例について、患者調査票を元に感染時の状況、臨床像及び抗体価について解析、比較検討した。更に、全血については、融解後に SPG (sucrose phosphate-glutamic acid) 液で10倍希釈したものを材料として藤田の方法⁸⁾に準じ、培養細胞 L929 によるリケッチア分離を試みた。細胞培養液は L-15 MEDIUM LEIBOVITZ (SAFC BiosciencesTM) を用いた。同材料は QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN 社)により DNA 抽出し、*O. tsutsugamushi* の 56kDa 外膜蛋白遺伝子を標的とした Furuya et al.⁹⁾ の primer 34, 55 及び Shimokoshi 株 DNA (Accession No. M63381) の配列の型特異的な部分を元に今回新たに設計した Shimokoshi 型検出用 primer 10m2, SH5 及び SH6 による nested PCR を実施した(表1)。PCR の反応条件は、94°C 30 秒、67°C - 59°C 30 秒 (-2°C / 1 サイクル タッチダウン)、72°C 30 秒を5サイクル行った後、94°C 30 秒、57°C 30 秒、72°C 30 秒を30サイクル行った。この条件下で予測される 1st PCR での増幅サイズは 1198 bp, 2nd PCR での増幅サイズは 781 bp である。使用した酵素はグライナー社の Taq DNA Polymerase High Yield である。また、DNA 増幅産物を用いてダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。細胞培養によって分離された株は、これを抗原とした IP 法によって分離株由来患者血清抗体のホモ価測定を行い、更に DNA 抽出と PCR を血液材料と同様に行い、塩基配列を決定した。

3. 結果

今回、抗体価の再検査によって、1992年～2008年の17年間のうち、1993年に1例、1995年と1997年に各2例、2001年に3例、2002年と2004年に各1例、計10例の Shimokoshi 型つつが虫病を確定した。これにより、2009年と2011年の各2例と2012年の1例の計5症例を合わせると、1992年～2012年の21年間では Shimokoshi 型は15例発生していたことになり、この間の秋田県のつつが虫病届出数759例の2.0%を占めていた。なお、2002年と2004年の2例は当時の検査では抗体陰性と判定され、つつが虫病を否定されていた。以下はこれら15症例の発生状況、臨床及び検査所見である。

3.1 患者の年齢と発症時期及び感染推定地

患者の年齢層は 51 歳から 92 歳で平均 67.8 歳、男性 10 例、女性 5 例であった(表2)。感染推定地は県北部 3 例(20.0%)、県南部 10 例(66.7%)、不明 2 例(13.3%)であり(図1)、発病時期は4月から6月の春季が11例(73.3%)、10月から11月の秋季 4 例(26.7%)であった(表2)。立ち入り場所と作業内容は田畑で

図1 患者感染推定地
(数字は Case No.)

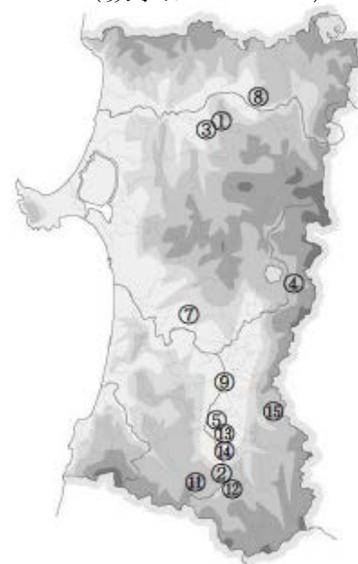


表 2 1993 年から 2012 年までの Shimokoshi 型つつが虫病症例

Case No.	年 齢	性別	発病年月日	感染推定地域、場所	作業内容	臨床所見			
						発熱 ℃	発疹	リンパ節腫脹	刺し口/状態
1	74	男性	不明 (1993.10.26*)	田沢湖町, 田畑	農作業	なし	背, 腹, 両手足	左右腋窩	左胸/水疱
2	64	男性	1995.5.29	湯沢市, 山林	山菜採り	38.0	なし	なし	左大腿/不明
3	59	男性	1995.10.12	合川町, 山林	山林作業	38.0	全身	左右鼠径	肛門/潰瘍
4	53	男性	1997.6.18	田沢湖町, 山林	山菜採り	38.0	なし	不明	右腕/痂皮
5	51	男性	1997.10.18	羽後町, 田畑	農作業	38.0	全身	なし	左手/痂皮
6	80	女性	2001.4.08	不明	不明	39.3	顔, 体幹, 両腕	なし	不明
7	59	女性	2001.6.08	協和町, 田畑	農作業	37.5	全身	なし	不明
8	88	男性	2001.6.19	大館市, 田畑	農作業	38.4	顔, 体幹	なし	不明
9	59	男性	2002.5.24	大森町, 河川敷	不明	40.0	全身	なし	不明
10	70	男性	2004.5.06	不明, 河川敷	レジャー	38.0	全身	なし	不明
11	92	女性	2009.5.08	湯沢市, 不明	不明	37.6	背, 腹	不明	左手/痂皮
12	75	女性	2009.5.17	湯沢市, 河川敷	山菜採り	38.3	背, 胸	左頸部	右手/痂皮
13	57	男性	2011.5.17	羽後町, 田畑	農作業	37.5	全身	なし	背/潰瘍
14	58	男性	2011.11.03	湯沢市, 河川敷	護岸工事	38.5	全身	なし	右腋窩/潰瘍
15	78	女性	2012.5.24	横手市, 田畑	農作業	38.6	顔, 体幹	左右腋窩	左胸/痂皮

* : 初診年月日

表 3 臨床検査データ

Case No.	病日	最高体温 ℃	CRP mg/dL	WBC /μL	AST IU/L	ALT IU/L	LDH IU/L
1	3	発熱無し	2.6	6,100	—	—	—
2	4	38.0	7.7	9,000	—	—	—
3	8	38.0	1.3	5,200	—	—	—
4	10	38.0	2.0	—	—	—	—
5	4	38.0	5.3	—	—	—	—
6	7	39.3	9.2	5,900	—	—	—
7	5	37.5	2.6	7,150	—	—	—
8	2	38.4	9.2	—	314	218	—
9	8	40.0	4.3	—	—	—	—
10	9	38.0	7.3	7,400	—	—	—
11	21	37.6	3.1	3,800	65	28	467
12	7	38.3	2.7	4,800	56	33	341
13	15	37.5	2.1	5,600	62	54	366
14	10	38.5	3.0	3,700	38	—	300
15	2	38.6	17.7	5,200	181	161	440

— : No data

の農作業が7例(46.7%)、河川敷での護岸工事やレジャー等が4例(26.7%)、山林での山菜取りが3例(20.0%)、及び不明1例(6.7%)であった。

3. 2 主要3徴候と臨床検査所見

主要3徴候のうち、発熱は14例(93.3%)、発疹は13例(85.7%)に認められ、部位は7例(53.8%)が全身、6例(46.2%)が背や腹などの体幹部であった(表2)。刺し口は10例(66.7%)に認められ、そのうち8例(80.0%)が上腕や胸、背などの上半身に、2例(20.0%)が肛門部等の下半身であった。刺し口の状態は、痂皮が5例(50.0%)、潰瘍が3例(30.0%)、水疱が1例及び不明が1例(10.0%)であった。

臨床検査所見のうち、白血球数は、3,700/μL～9,000/μLと基準値内にあったが、その他の項目は、症例間の差が大きく、Shimokoshi型感染の従来印象に近い軽症例だけではなく重症例に相当する数値を示すものも含まれていた(表3)。体温では、4例(Case No. 1, 7, 11, 13)が37.5℃～37.6℃の微熱あるいは平熱であった一方、3例(Case No. 6, 9, 15)が38.6℃～40.0℃の高熱であった。CRP値は、全例が基準値よりも上昇していたが、1.3 mg/dl～7.7 mg/dlの軽度～中程度の上昇例が多い中、3例(Case No. 6, 8, 15)が9.2 mg/dl～17.7 mg/dlの高度上昇を認めた。また、AST及びALT値は38 IU/L～65 IU/L、28 IU/L～54 IU/Lの基準値内、あるいは軽微な上昇が4例(No. 11, 12, 13, 14)あった一方、2例が181 IU/L～314 IU/L、161 IU/L～218 IU/Lの著明な上昇を示した。なお、DICや脳炎などを併発した重篤な症例はなかった。

3. 3 血清抗体価

15症例27検体の抗体価を示した(表4)。急性期血清(初回血清)においては、IgM抗体価が80倍以上の場合、確定診断が可能とされているが¹⁰⁾、この条件に合致したのは10例(Case No. 4～12, 15)で、これらのShimokoshiに対する抗体価は160倍～10,240倍であった。このうち、4例(Case No. 5, 9, 12, 15)のShimokoshi以外の5抗原(他5抗原)に対するIgM抗体価は、最高でも40倍であった。残る6例(No. 4,

6, 7, 8, 10, 11)は、KarpとKatoに対するIgM抗体価は、6例全てが80倍以上であったが、Gilliamに対して80倍以上を示したのは、3例(No. 4, 10, 11)、Irieは2例(No. 4, 7)、Hiranoは1例(No. 6)であった。

回復期血清(2回目の血清)においては、初回で全ての抗原に対するIgM抗体価が80倍未満であった5例(No. 1, 2, 3, 13, 14)が、2回目ではShimokoshiに対するIgM抗体価が160倍～10,240倍に達した。しかし、Irie及びHiranoに対するIgM抗体価は、依然40倍未満であった。Gilliam、Karp及びKatoに対しては抗体価上昇が認められたが、40倍～80倍と病日に対し極低値であった。また、No. 1とNo. 2においては、共に10病日未満にも関わらず、Gilliam及びKarpに対するIgG抗体価がIgM抗体価よりも高かった。

各症例の急性期、回復期血清は共に他5抗原に対する抗体価がShimokoshiに対するそれよりも著しく低く、とりわけIrie及びHiranoに対する抗体価上昇例が非常に少数であり、15例中5例及び3例に上昇が認められただけであった。一方、Gilliam、Karp及びKatoに対しては、病日を追うことにより、低値ではありながらも全例で抗体価上昇を認めた。また、15症例について他5抗原に対する抗体価をそれぞれ比較すると1例(No.2)がKatoに対して、3例が(No.4, 5, 15)Gilliamに対して最も高い抗体価を示したが、他11例は他5抗原に対する抗体価に差異がなかった。

3. 4 *O. tsutsugamushi* のPCRと分離

今回設計したprimerを使用したPCR法によって、3症例3検体の全血から*O. tsutsugamushi*が検出され、Shimokoshi型であることが確認された(Accession No. AB840991, AB840992, AB742542)。また、分離培養の結果、1検体で接種後20日目に明瞭な*O. tsutsugamushi*増殖像が観察された。この分離株(Matsui株)を抗原とした分離株由来患者の血清抗体価は、Shimokoshi株抗原とMatsui株抗原に対して同値であった。また、Matsui株の増幅DNA産物で決定された784 bpの塩基配列(Accession No. AB742542)は、国内で初めて分離されたShimokoshi株(Accession No. M63381)と6ヶ

所の相違とアミノ酸 1 個分の挿入が認められ、相同性は 99%であった。なお、この株は、強毒型に近い検査所見を示した Case No.15 由来血液からの分離であった。

4. 考察

Shimokoshi 株は、1980 年に新潟県で発症したつつが虫病患者血液から分離され、新たな血清型として報告された¹⁾。その後、この型は血清

疫学調査等により秋田、福島、福井、新潟、及び山形県において、少数例の患者が確認されたのみであり^{3)~5)}、これまでは「発生は非常に稀な血清型」という位置づけにあった。しかし、今回の調査研究結果によると発生頻度からは決して稀ではないことが示唆された。

秋田県における Shimokoshi 型症例の発生時期は、4 月～6 月の春季と 10 月～11 月の秋季の 2 峰性であり、感染推定地は、河川敷あるいは田

表 4 IP 法による患者血清抗体価

Case No.	病日	IgG 抗体価						IgM 抗体価					
		Shi	G	Kp	Kt	Ir	Hi	Shi	G	Kp	Kt	Ir	Hi
1	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	8	640	160	160	—	—	—	1,280	40	40	—	—	—
2	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	9	80	80	80	80	—	—	320	—	—	80	—	—
3	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	13	160	40	40	40	—	—	320	40	40	40	—	—
4	10	1,280	80	160	160	160	80	≥10,240	640	320	640	80	—
	17	2,560	40	80	160	160	80	≥10,240	2,560	320	640	40	—
5	4	—	—	—	—	—	—	160	—	—	—	—	—
	11	1,280	320	—	—	—	—	10,240	160	160	160	40	40
6	7	1,280	—	80	—	—	40	10,240	—	320	80	—	320
	12	1,280	40	80	80	80	80	10,240	—	320	160	80	320
7	5	640	—	80	80	80	—	5,120	40	80	80	80	—
	9	1,280	—	160	80	160	—	2,560	—	160	80	80	—
8	2	640	—	80	80	80	—	2,560	—	320	320	40	—
	8	1,280	—	160	80	40	—	1,280	—	320	160	80	—
9	8	640	—	—	40	—	—	160	40	40	40	—	—
10	9	320	80	80	80	—	—	640	80	80	160	—	—
11	21	2,560	—	—	—	—	—	5,120	1,280	640	640	—	—
12	7	—	—	—	—	—	—	160	—	—	—	—	—
	14	320	40	40	40	—	—	1,280	80	80	80	—	—
13	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	15	2,560	40	80	80	40	40	10,240	40	80	80	—	—
14	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	23	640	80	80	40	—	—	160	40	40	—	—	—
15	1	—	—	—	—	—	—	1,280	40	40	40	—	—
	7	2,560	160	—	—	—	—	≥10,240	640	80	160	—	80

Shi : Shimokoshi G : Gilliam Kp : Karp Kt : Kato Ir : Irie (Kawasaki) Hi : Hirano (Kuroki)

— : <40

畑が多い傾向にあった。多村らが報告した Shimokoshi 株分離症例も発症が 5 月であり、感染推定地は新潟県の河川上流とされている¹⁾。また、近年の山形からの報告も 5 月及び 11 月の山林での感染であった。これらの共通した東日本一帯における Shimokoshi 型つつが虫病の季節的発生消長や感染環境から、現在確定されていない Shimokoshi 型 *O.tsutsugamushi* のベクターは、生息域と幼虫発生時期が同様の種と考えられ、これまで同地域で発生したつつが虫病患者の中には Shimokoshi 型感染例も含まれていた可能性があると思われる。1980 年の Shimokoshi 株は、39℃の発熱と発疹があった患者由来であり、この株を接種したマウスの死亡率は 20～50%であったとされている¹⁾。今回判明した秋田県の Shimokoshi 型 15 症例は、軽症から重症に及ぶ多彩な臨床像を示していた。軽症例の中には、無熱例や発熱は夜間のみで発疹がない、通常のつつが虫症例ではあまり見られない臨床症状が認められた。しかし、このうちの無熱例は、刺し口が水疱状態であったことから、感染後早期につつが虫病が疑われ、治療が迅速に開始されたことによって軽症に留まった可能性がある。また、全症例中に DIC や脳炎等の併発例はなかったものの、AST が 314 IU/L、ALT が 218 IU/L や CRP が 17.7 mg/dl など重症化を示す異常高値の症例もあった。秋田県外で発生した Shimokoshi 型症例として、近年では 2007 年の山形県での報告があるが、8 日間の入院治療を要したこの症例は、急性期の検査所見が CRP 13.8 mg/dl、AST 83 IU/L、ALT 103 IU/L と比較的重症度が高かったとされている。これまで、Shimokoshi 型のヒト病原性は低いとされてきたが、この型のヒトに対する病原性についての評価は、今後も同型症例の発生に注視しつつ、疫学的及び分子生物学的な情報をより多く蓄積した上で判断する必要がある。

つつが虫の確定診断法として、病原体の分離同定と遺伝子の検出及び抗体検出の 3 つの手法が実施されている。今回我々は、3 法全てを実施したが、つつが虫の迅速な診断法として多くの検査機関が採用している血清学的及び遺伝子診断法について、Shimokoshi 型感染患者データを元に検討した。

血清学的診断法は、標準 3 型抗原のみが汎用

され、これに加えて一部機関が Irie と Hirano 等の抗原を使用しているが、Shimokoshi 抗原が常用されることはほとんどないのが実状である。IP 法による IgM 抗体価の一般的な推移について須藤は、再感染例を除けば発病後 10 日～14 日目には 5,120～10,240 倍以上のピークに達するとしている¹¹⁾。また、Ohashi らは IgM 抗体価が主に反応するのは 54-56 kDa 蛋白であり³⁾、型特異的抗原蛋白領域である 56 kDa 蛋白領域を含む全 ORF 領域の標準 6 型間における比較によると、Shimokoshi 型は他型との相同性が最も低いとしている¹²⁾。今回検討した症例群においても、急性期患者血清中の Shimokoshi に対する IgM 抗体価は、病日に比例して速やかな上昇が認められたが、他 5 抗原に対する IgM 抗体価は、未上昇あるいは非常に緩慢な上昇に留まった。更に、ペア血清においても、5 症例で他 5 型抗原に対しては抗体価の有意上昇を認めなかったことから、今回の Shimokoshi 型症例群においても Ohashi らの成績が裏付けられたことになる。この他、他 5 型抗原に対する抗体価においては、IgG と IgM に差異がないか病日が浅いにも関わらず IgG が IgM よりも高いなど、変則的な反応性を示す症例も見られた。Shimokoshi 型の抗原を用いずに Shimokoshi 型感染症例の診断をせざるを得ない場合、ペア血清での検査を基本とし、病日を追って検査することで Shimokoshi 型以外の抗原に対する交差反応を検出できれば、感染型は不明であっても感染者の見落とし等はある程度は防ぐ事が出来ると思われる。したがって、Shimokoshi 型の抗原を用いない場合に、抗体価が病日の割に低く型別の差異がない場合には Shimokoshi 型感染の疑いがあるものとして対応すると感染型の確定につながる可能性があると思われる。また、病日に対し、不相応な低抗体価という前提の他、抗体価が低いながらも Gilliam 型に若干高値である傾向がある、病日が浅いにもかかわらず IgG 抗体価が IgM 抗体価よりも高値である、などといった結果も目安の一つになるであろう。

遺伝子診断法では *O.tsutsugamushi* の 56 kDa 蛋白領域をターゲットとした PCR 法が一般的に用いられているが、Shimokoshi 型を特異的に検出する primer が現行の診断マニュアル¹³⁾に記載されていないことや、「発生が稀である」

という従来からの情報も重なり、日常検査において Shimokoshi 型が除外されているものと思われる。そのため、今回、マニュアルに記載されている Furuya et al.⁹⁾ の 1st primer 34, 55 と共に使用する primer SH6 (今回新たに構築) と 2nd PCR primer 10m2 及び SH5 によって Shimokoshi 型の効率的検出を可能とした。今後は、他型の特異的 primer との組み合わせによる方法等、より利便性と検出効率を高めた反応系の開発も必要であろう。

Shimokoshi 型が稀であるという従来への認識は、この型の感染症例に対する適切な検査が実施されてこなかったことの反映とも思われる。今後は Shimokoshi 型のヒトに対する病原性の再評価とベクター解明に向けた調査に加え、検査体制の整備が望まれる。

5. まとめ

Shimokoshi 型つつが虫病は弱毒性であり発生は稀であるとされていたが、当センターに保存されていた血清の再検査によって、この型の患者が、1992 年～2012 年までに、秋田県内では 15 例発生していたことを確認した。この症例群の病態は軽症から重症まで様々であり、これまでの概念とは異なっていた。また、抗体検査において、Shimokoshi 型の患者血清は標準的に検査対象としている抗原に反応性が低かったことから、今後は、Shimokoshi 型の抗原を日常的に使用することで患者の見逃しを防ぐことが可能と考えられる。遺伝子検査においては、今回設計した Shimokoshi 型特異的検出 Primer を使用することが有用と思われる。

参考文献

- 1) 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. 日細菌誌, **51**, 2, 1996, 497-501.
- 2) Tamura A, Takahashi K, Tsuruhara T, Urakami H, Miyamura S, Sekikawa H, et al: Isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* Antigenically Different from Kato, Karp, and Gilliam Strains from Patients. *Microbiol Immunol.* **28**, 8, 1984, 876-880.
- 3) Ohashi N, Tamura A, Suto T: Immunoblotting Analysis of Anti-Rickettsial Antibodies Produced in Patients of Tsutsugamushi Disease. *Microbiol Immunol.* **32**, 11, 1988, 1086.
- 4) 多村憲: 恙虫病病原体 *Orientia tsutsugamushi* の微生物学. 日細菌誌 **54**, 4, 1999, 827.
- 5) 大谷勝美, 金子紀子, 青木敏也, 藤田博己: 山形県で発生した Shimokoshi 型リケッチア感染によるつつが虫病の一例. 衛動物 **60**, 4, 2009, 317-321.
- 6) 須藤恒久: 我が国における最近のつつが虫の現状と早期迅速診断法—特に免疫ペルオキシダーゼ反応による三型 IgG, IgM 抗体の完全同時測定法について—. 臨とウイルス **11**, 1, 1983, 23-30.
- 7) 須藤恒久: ワイルフェリックス反応と間接免疫ペルオキシダーゼ反応. *Med Technol* **17**, 12, 1989, 1217.
- 8) 藤田博己: 過去 15 年間における培養細胞を用いた病原体分離法の改良と実績. 大原病年報 **48**, 2008, 21-24.
- 9) Furuya Y, Yoshida Y, Katayama T, Yamamoto S, Kawamura A., Jr.: Serotype-Specific Amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA by Nested Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* **31**, 6, 1993, 1637-1640
- 10) 古屋由美子, 片山丘: つつが虫病原体の知見—より良い検査へ向けて—. SADI 組織委員会編, ダニと新興再興感染症, 株式会社全国農村教育協会, 東京, 2007, 141-145.
- 11) 須藤恒久: 恙虫病の早期診断の重要性—特に酵素抗体法について. *Medical Way*, **3**, 8, 1986, 119-121.
- 12) Ohashi N, Nashimoto H, Ikeda H, Tamura A: Diversity of Immunodominant 56-kDa Type-specific Antigen (TSA) of *Rickettsia tsutsugamushi*. *J Biol Chem* **267**, 18, 1992, 12733-12735
- 13) 国立感染症研究所 (レファレンス委員会), 地方衛生研究所全国協議会: ツツガムシ病診断マニュアル. リケッチア感染症診断マニュアル, 2000, 9-16