

学 位 論 文 題 名

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

学位論文内容の要旨

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東アジアや東南アジアなどに広く分布している。病原体である *Rickettsia tsutsugamushi* には、これまで幾つかの血清型が知られているが、我が国では、Gilliam, Karp およびKatoの3血清型株が恙虫病の血清診断用の標準株として用いられてきた。しかし、最近、国内の患者からKawasaki株, Kuroki株, Shimokoshi株など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、*R. tsutsugamushi*の血清型は媒介ツツガムシの種類と関連していることが知られている。静岡県では、媒介ツツガムシとして、これまでタテツツガムシ *Leptotrombidium scutellare* とフトゲツツガムシ *Leptotrombidium pallidum* 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が存在することが示唆されている。そこで、著者はこの地域において恙病患者とツツガムシの地理的分布ならびに季節変動を調査するとともに、患者、野ネズミおよびツツガムシからのリケッチア分離を行い媒介ツツガムシの種類と分離株の血清型との関係を検討した。また、従来の血清診断法の代わりにPolymerase chain reaction (PCR) 法を早期確定診断法として導入し、実用化を試みた。

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名の血清について標準3株 (Gilliam, Karp, Kato)

を用いた間接蛍光抗体法(Immuno fluorescence antibody assay: IFA)により抗体測定を実施したところ、110 症例が恙虫病と確定診断された。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検出されたが、特に富士山東山麓(72.7%)に偏在する傾向がみられた。また、本病の大半の症例は10~12月(82.7%)に集中していた。さらに、県内で捕獲したアカネズミ *Apodemus speciosus* 385 頭について各脾臓材料からのマウス腹腔内接種法によるリケッチア分離ならびに IFAによる血清抗体価の測定を実施したところ、リケッチア分離率は28.6%、また抗体保有率は37.6%に達した。分離率と抗体保有率の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が、患者は富士山東山麓に集中して発生し、患者の地理的分布とは一致しなかった。

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、恙虫病媒介種であるタテツツガムシおよびフトゲツツガムシを含む37,942匹、4属11種の寄生が確認された。タテツツガムシの大半は恙虫病患者の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リケッチアのベクターとして、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。

富士山東山麓の土壤サンプルからTullgren装置によりツツガムシ幼虫を採取して分類したところ、6属16種に同定された。フトゲツツガムシはこの山麓で広範囲に採取されたが、最も密度の高かったのは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に多く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。この火山性砂礫(1707年の富士山の

噴火に由来)は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ので、このような土壌の性状がタテツツガムシ生息の好適環境となり、本種がこの地域に偏在する原因となったものと思われる。

富士山東山麓の患者から分離された *R. tsutsugamushi* の8株について Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki およびKurokiの各株に対する型特異的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型に属することが判明した。なお、Karp型とKawasaki型の分離株の大半は、標準株とは多少抗原性が異なっていることが示唆された。また、Kawasaki型またはKuroki型に分類された6株は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。

富士山東山麓における恙虫病患者(24株)、アカネズミ(30株)および寄生前のツツガムシ幼虫(タテツツガムシ2株、フトゲツツガムシ3株)から分離された計59株のリケッチアについて、Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki およびKurokiの各株に対する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。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アカネズミの生息地の分布ならびにそれぞれのツツガムシが多数生息する地域がほぼ一致していた。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いう結論が得られたが、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、ベクターの検討には至らなかった。

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 Ota（静岡県 of 患者から分離されたKarp型の株）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 halfはKawasaki, Kurokiおよび Otaの各株のいずれかに属する抗原性を保有すると推測された。これらの反応性が認められた症例の地理的分布と発生時期ならびにツツガムシの採取状況や分類成績を総合すると、タテツツガムシは主に富士山東山麓においてKawasaki型株を、またフトゲツツガムシは県内の広域で Ota株類似のKarp型株を、それぞれ媒介していることが推測された。

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 nested PCR法を試みたところ、Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, KurokiおよびShimokoshiのいずれの株からも *R. tsutsugamushi* に特異的な DNAが増幅された。さらに、これら 6 血清型株の増幅産物について制限酵素（*Hha*I, *Sfa*NI）による消化を行ったところ、これらはそれぞれ独立した切断パターンを示した。そこで、この PCR法で感染初期の患者血液および流行地由来のタテツツガムシ中からの *R. tsutsugamushi* DNA の検出を試みたところ、リケッチア特異 DNAの増幅が認められ、しかもその増幅産物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一致した。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、ヒトや野生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。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 橋 本 信 夫
副 査 教 授 神 谷 正 男
副 査 教 授 小 沼 操
副 査 助 教 授 高 島 郁 夫

学 位 論 文 題 名

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

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病であって、わが国では古くから極めて危険な風土病として知られ、これまで数多くの病原学的研究がある。

申請者は恙虫病の流行地において媒介ツツガムシと野ネズミの生態調査ならびに病原リケッチアの分離と型別を行い、本病の発生原因について疫学的解析を試みるとともに、PCRを用いた恙虫病の早期診断法の開発を行った。本論文は邦文101ページからなり、参考論文11編を付している。

静岡県では1982年から1991年までの10年間に110名の恙虫病患者が発生した。これらの多くは10月－12月に集中し、また富士山東山麓に偏在していた。一方、県内で捕獲されたアカネズミでは恙虫病リケッチアの分離率と抗体保有率がともに県中央部・西部より富士山東山麓を含む県東部で著しく高かった。またツツガムシの野外調査では県東部にフトゲツツガムシが広く分布するのに対し、富士山東山麓にはタテツツガムシも濃厚に生息していた。

そこで恙虫病患者、アカネズミとツツガムシから分離された合計59株のリケッチアについて、単クローン性抗体を用いて血清型別を行ったところ、これらはKarp、KawasakiとKurokiの3型に分類された。しかし、患者の発生地域ならびに感染野ネズミとツツガムシの種類や分布などとの対応から、Kawasaki型

の株がヒトへの吸血嗜好性の強いタテツツガムシに多く保有され、またKarp型の株はヒトより野ネズミに吸血性の強いフトゲツツガムシに保有されていることが判明した。

次に、恙虫病の早期診断を目的として2段階PCR法を用いて恙虫病リケッチアのDNAの増幅を試みた。すなわち、感染初期の患者血液から本法により高率に特異的DNAが検出された。また増幅産物を制限酵素切断法により型別したところ、単クローン性抗体による恙虫病リケッチアの血清型別の成績と一致し、早期診断法としての本法の実用性が証明された。

これらの知見は恙虫病の予防法を確立する上で貢献するところが大きい。よって審査員一同は川森文彦氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有するものと認める。