
総説

リケッチア感染症診断法の現状と問題点**—特に恙虫病について—**

吉田 芳哉

**The Current Situation of Diagnostic Technology of the Rickettsiology and Problem.
— Particularly, the Tsutsugamushi Disease —**

Yoshiya YOSHIDA

緒言

リケッチアは、かつてウイルスと細菌の中間的な微生物と考えられていたが、現在は、細胞寄生性のグラム陰性菌に近似している細菌と位置づけられている。しかし、リケッチアの多くは、無細胞の人工培地で増殖することはできず、シラミ、ノミ、マダニなどの節足動物を自然宿主として共生している。そしてこれらの動物を介して哺乳動物、鳥類、ヒトなどに感染する。リケッチアのうちおよそ10種類がヒトに病原性をもち、感染した場合に頭痛、発疹、リンパ節腫脹などを伴う熱性疾患いわゆるリケッチア症 (rickettsiosis) を惹き起す。これらのリケッチアは種特異的抗原の免疫学的解析によって発疹チフス群、紅斑熱群、恙虫病群の3群に分けられている。

現在、わが国に発生しているリケッチア症は、恙虫病、日本紅斑熱と最近発生が確認された発疹熱があるが、圧倒的に患者数が多いのは恙虫病で1990年には年間941人、1991年937人、をピークに徐々に減少しており、2002年では329人の患者が報告されている。ここではリケッチア症のうち恙虫病について述べる。

恙虫病患者の診断は、従来から臨床診断および病原体である *Orientia tsutsugamushi* (*O. tsutsugamushi*) の分離同定あるいは患者血清中の特異抗体の検出により行われてきた。*O. tsutsugamushi* 分離同定にはマウスや細胞を用いて多くの日数が必要であるため、免疫蛍光法、免疫酵素法、補体結合反応法など血清学的方法が主に診断に使

われてきた。著者らはこの *O. tsutsugamushi* の56kDa ポリペプチドをコードする遺伝子の塩基配列の一部を利用して、polymerase chain reaction (PCR) による *O. tsutsugamushi* DNA の検出および型別を可能にし、恙虫病の診断に利用できるようにした^{1,2,3)}。この方法により *O. tsutsugamushi* の分離ができなかった保存材料や、臨床症状から恙虫病を疑いながら、血清抗体が証明されず血清学的には診断できなかった血液から *O. tsutsugamushi* DNA が証明でき、恙虫病の診断が可能になった。またPCRは長期間保存された患者血液や急性期で抗体の認められない血液からも効率よく *O. tsutsugamushi* DNA が検出でき、本病の診断に有効である。

そこで、現在広く行われている、恙虫病患者の実験室診断法の現状について記述するとともに、当衛生研究所において実施しているDNA診断法の詳細について述べる。

感染と症状

O. tsutsugamushi の感染はリケッチアを保有しているツツガムシの幼虫が人に吸着し、口吻を通してリケッチアが注入された時にのみ成立し、ヒトからヒトへの感染は起こらない。この感染部位では、リケッチアが局所的に増殖し、発赤、水泡形成、痂皮化、潰瘍と変化する。この病変部がいわゆる刺し口といわれるもので、普通は一つであるが、まれに複数のこともあり、その出現部位は全身にわたる。しかし多くは柔らかい部位で下腿、陰部にあり、頭髮の中にみられることもある。リケッチアは刺し口の支配するリンパ節に到達し、リンパ節腫脹を起こし、各所で血管内膜炎を起こす。感染 (吸着) 後約7

～10日後から、全身倦怠、頭痛、食欲不振、関節痛などが起こり、39～40℃の高熱が続き、発熱に少しおくれ、身幹、顔面などに、不定形発疹があらわれる。適切な治療が行われないときは、往々にして播種性血管内凝固症候群（DIC）に陥り、死亡するおそれもある。治療には感染症治療薬の主流であるβ-ラクタム系やアミノ配糖体系の薬剤はまったく無効であるが、テトラサイクリン系薬剤かクロラムフェニコールはきわめて有効である。

このように恙虫病は感染初期に診断さえできれば確実に治る病気であり、早期診断治療が重要である。

検査の目的

恙虫病は病原体保有ツツガムシの吸着により感染し、日本紅斑熱は同じく病原体保有のダニ類によって感染するが、発疹の出現部位や刺口の形状は酷似し、病状経過などから確実な診断を下すことはできない。そこで、患者血液からのリケッチアの分離と同定、血清中の特異抗体の検出、患者血液からリケッチア特異的DNAの検出を行うことにより、確定診断が可能である。

検査法

a. 血清学的診断

リケッチア感染症の診断には、一般に患者血清中の特異抗体の検出が行われている。血清学的な診断としては、かつて補体結合反応（CF）⁴⁾とワイルフェリックス反応（WFR）が利用されていたが、現在では免疫蛍光法（IF）⁵⁾や免疫ペルオキシダーゼ法（IP）⁶⁾がこの目的のために多くの研究者によっておもに行われている。また最近ではビオチンアビジン蛍光抗体法⁷⁾、酵素抗体法（ELISA）⁸⁾、ドットプロット法⁹⁾などの方法も様々な研究者によって報告されている。

リケッチア症では臨床症状が現われるまでの潜伏期間は7～10日くらいと考えられ、血清中の抗体価の上昇は通常感染後10～14日後に認められる。このため急性期の抗体価は低い場合が多いので、確定診断には急性期の採血から1～2週間後に再び採血し、抗体価の上昇を比較確認する必要がある。さらに、IgM抗体とIgG抗体それぞれの定量を行うことを薦めたい。

紅斑熱群や発疹チフス群はそれぞれ群特異的な強い共通抗原が存在するので、それぞれ代表の1つの株で診断可能である。しかし、恙虫病群リケッチアは群特異的な抗原性よりも株特異的な抗原性が強く表現される傾向にあるため、少なくともGilliam, Karp, Katoの標準3株以外にその地方で流行している分離株¹⁰⁾の使用を薦める。

1) ワイル・フェリックス反応（WFR）

WFRは、変形菌であるプロテウス菌のO抗原を用い

た凝集反応である。この反応系は、後に述べる特異的血清反応法がまだ確定していなかった時代から、広くリケッチア感染症の診断に利用されてきた血清診断法である。これに使用する抗原は、購入することが可能である。

a) 術式

生理食塩水で10倍希釈した非働化被検血清を2倍階段希釈し、それぞれ等量の抗原を加えて、37℃で2時間反応、4℃で一晩静置したものを肉眼で判定する。

b) 判定と問題点

凝集像の強さを対照の陰性血清と比較して表わす。原理的には発疹チフス群の多糖体抗原とプロテウス菌の間にある共通抗原と理解されているが、*O. tsutsugamushi*は多糖体を持たず、OXKとは共通抗原が無いことが判明した¹¹⁾。このように、WFRの結果を過信すべきではないが、操作が簡単なことから、スクリーニングテストの1つとして利用する意味はあると思われる。

2) 補体結合反応（CF）

CFは、リケッチア症の血清診断法として重要な方法として位置づけられていたが操作が複雑で感度が低く、かつIgM抗体の測定ができないことなどから、その主役をIFやIPに譲らざるを得なかった。CFに用いる抗原は、わが国では*O. tsutsugamushi*に限って市販品があるがそれ以外のリケッチア抗原は、自家製に頼らざるを得ない。

a) 術式

非働化した被検血清25μl、調整した抗原液25μl、補体50μlをよく混合し、4℃で1晩静置し、溶血素50μlを加えて37℃30分間反応させて溶血度を測定する。

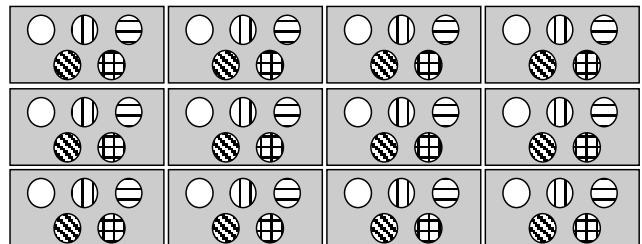
b) 判定と問題点

判定は、吸光度などで客観的に測定可能であるが、抗補体反応などが判定を狂わせる場合がある。

3) 免疫蛍光法（IF）と免疫ペルオキシダーゼ法（IP）

この方法は、抗体検査では最も確実で迅速な方法である。また、現在わが国で流行しているリケッチア症の全ての診断に有効である。

抗体検出のためのIFあるいはIP用の抗原作成は、マウス腹膜あるいは感染細胞の塗抹抗原を使用する方法が



Pattern of spotted prototype antigens on slide glass.
○: Gilliam, ⊕: Karp, ⊖: Kato, ⊙: Kawasaki, ⊕: Kuroki
Fig. 1 *Orientia tsutsugamushi* antigen slide for IF.

ある。ここでは、われわれが日常業務で行っている、培養細胞を用いた感染細胞の塗抹抗原を用いた方法を説明する。この方法は、容易に多量の抗原が得やすく、1枚のスライドガラス上に複数の抗原を塗布できることから、一度に複数の抗原に対する反応が同時に観察できるなどの利点がある(図1)。リケッチアの培養には株化細胞のL-929またはVero細胞を使用し、感染細胞が90%以上に達したものを塗抹標本とする。スライドガラス上に複数の抗原を塗抹して、冷風で乾燥後、冷アセトンで10分間固定し、標本箱に入れ使用時まで -80°C に保存する。この塗抹標本は、1年間は使用可能である。

a) 術式

- ① 凍結保存した抗原塗抹スライドガラスを取り出し冷風で乾燥する。PBS(-)で10倍希釈した被検血清を2倍階段希釈し、各々の希釈についてIgM抗体、IgG抗体用の抗原塗抹標本に約10-20 μl ずつ載せ、湿潤箱に入れて 37°C 40分間反応する。
- ② 反応後、PBS(-)でスライドガラス上の血清を洗い流し、染色壺に入れて約10分間ずつPBS(-)を交換して3回洗浄する。
- ③ 乾燥後に最適比に希釈した抗ヒトIgGおよびIgM蛍光色素(FITC)標識抗体またはペルオキシダーゼ標識抗体(ウサギまたはヤギ)をそれぞれ20 μl 載せ、湿潤箱に入れて 37°C 40分間反応する。
- ④②の操作を繰り返す。
- ⑤ IFはグリセリン緩衝液(pH9.5炭酸緩衝液:グリセリン=1:9)を適量滴下し、カバーガラスで封入する。

IPはスライドガラスを蒸留水で洗浄後ジアミノペンチジン四塩酸塩に過酸化水素を加えた酵素反応基質液に入れて水洗、乾燥してダイアテックで封入する。

- ⑥ IFは蛍光顕微鏡のUV励起で細胞内の蛍光を発するリケッチアを、またIPは光学顕微鏡下で細胞外にある褐色をしたリケッチアをそれぞれ200~400倍で観察する。

b) 判定及び問題点

各々の抗原で陽性と判定できた血清の最高希釈倍数をその検体の抗体価とする。原則的には急性期と回復期の抗体価で4倍以上の上昇を認めた場合に陽性とするが、急性期でもIgM抗体価が40-80倍以上ある場合には、陽性と判断できることもある。IF、IPいずれの方法でも観察者の主観が入る上に、判定には熟練を要する。これらの検査で得られた結果は、免疫学的状態から以下のように判定する。

- ① IgG抗体とIgM抗体のいずれも陰性の場合;リケ

ッチアに感染していないか、感染の初期である。

- ② IgM抗体が低く、IgG抗体が陰性の場合;感染初期の可能性はある。もしその後抗体の上昇がない場合は、非特異抗体と考える。
- ③ IgG抗体とIgM抗体がともに高い場合;最近のリケッチア感染を示している。
- ④ IgM抗体が低く、IgG抗体が高い場合;感染初期に上昇したIgM抗体が低下し、IgG抗体のみが持続している場合かあるいは再感染の可能性はある。
- ⑤ 中程度のIgG抗体がありIgM抗体が陰性の場合;過去においてリケッチアに感染した可能性がある。

b. リケッチアの分離

リケッチア症の確定診断には血清抗体価の測定以外にリケッチアの分離をする方法がある。分離に使う材料は、患者の急性期の血液か剖検の脾臓、肝臓、リンパ節などの材料がよい。得られた新鮮な材料をマウスに接種し、感染増殖させ細胞で増殖する方法が効率的である。しかし、リケッチアの分離は、バイオハザードの設備が必要であり無い場合は実験出来ない。

1) マウスを用いた分離法

治療前の有熱期の患者血液を有毛マウスの腹腔内に接種し、リケッチアの分離を行う。しかし、ほとんどのリケッチアはマウスに対して弱毒であり、症状を現わすことは稀である。このため、リケッチアの分離率を高める目的で、ヌードマウス¹²⁾や免疫抑制剤¹³⁾(サイクロフォスファミド等)処理を施した有毛マウスを用いる。

リケッチアが増殖した場合には、接種後1週間前後にマウスの行動は緩慢となり、うずくまるようになる。また腹部が膨れて下痢を伴う。そのまま放置すれば2週間ほどで死亡するので、時期をみて増殖したリケッチアの同定を行う必要がある。また、発症しない場合でも2週間ごとに接種マウスの臓器を継代培養すると分離効率が上がる。

2) 培養細胞による増殖法

マウスで分離したリケッチアは、様々な実験に供するために、できるだけ細胞での増殖を行うと便利である。感染を起こしたマウスの脾臓、肝臓を無菌的に取り出し、乳鉢でよくすりつぶし、予め準備したL-929、Veroなどの株化細胞に接種してリケッチアの増殖を行う。

3) 免疫学的同定法

マウスや細胞で培養したリケッチアの増殖状態や型別は、特異的な抗体を用いたIF、IPにより調べる。最近では各種リケッチアに対する群特異的、型特異的なモノクローナル抗体¹⁴⁾が入手できるので、同定が容易となった。また、分離したリケッチアを免疫原としてモノクローナル抗体を作成し、より詳細な抗原性の解析¹⁰⁾も可能となった。

c. DNA 診断法

1) PCR

a) プライマー

Gilliam 株と Karp 株の 56kDa のポリペプチドをコードした DNA 塩基配列より、相同性が高く、約 1,000 base pair (bp) の DNA の合成が可能と思われる配列部分を一对選び、プライマー 34 (p34) とプライマー 55 (p55) を合成した。

この p34 と p55 によって合成される DNA 塩基配列から、Gilliam 株と Karp 株に変異の著しい領域をはさむように、2 株に相同性のある一对のプライマー 10 (p10) とプライマー 11 (p11) を合成し、*O. tsutsugamushi* DNA 検出の nested PCR (2nd PCR) に用いた。

型別用のプライマーは、*O. tsutsugamushi* Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki の 5 株の DNA 塩基配列を比較検討して、それぞれの株に特異的と思われる配列部分を選別合成した。Gilliam 株特異的なプライマー G と p10, Karp 株特異的なプライマー KP と p10, Kato 株特異的なプライマー KT と p10, Kawasaki 株特異的なプライマー KW と p11, Kuroki 株特異的なプライマー KR と p10 の 5 対のプライマーを型別用のプライマーとして 2nd PCR を行った。

b) PCR 条件と増幅 DNA 検出

反応容量は 50 μ l を標準とした。反応液の組成は 10mM Tris \cdot HCl (pH8.8), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.2mM dGTP, 0.2mM dATP, 0.2mM dTTP, 0.2mM dCTP, 0.2 μ M の各プライマー, 1.25 unit Taq ポリメラーゼでこれを PCR mixture とし、5 μ l の鋳型 DNA を加えた。DNA 増幅反応は熱変性 94 $^{\circ}$ C 30 秒, アニール 57 $^{\circ}$ C 2 分, 相補鎖の合成 70 $^{\circ}$ C 2 分を 1 サイクルとし、30 サイクル行った。2nd PCR は、1st PCR 産物 5 μ l を PCR mixture に加えさらに 30 サイクル行った。PCR によって増幅された DNA は 1.5% アガロースゲルによる電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色により検出した。

2) ジゴキシゲニン標識プローブを用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法

a) ジゴキシゲニン標識プローブの作製

精製 *O. tsutsugamushi* Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki 株から DNA を抽出し、鋳型として各株特異的な型別プライマーにより PCR を行った。基質としては 0.2mM の dGTP, dATP, dCTP, 0.13mM dTTP, 0.07mM ジゴキシゲニン標識 dUTP を用いた。PCR 産物をエタノール沈澱させ、乾燥し、Tris \cdot HCl-EDTA (10mM Tris \cdot HCl, 1mM EDTA : TE) 緩衝液 (pH8.0) 100 μ l に溶解しプローブとした。

b) サザンブロットハイブリダイゼーション法

PCR 産物を電気泳動により分画後、ナイロン膜に移し、

変性溶液を加え振とうさせ、中和溶液で 2 回洗浄し、紫外線で DNA をナイロン膜上に固定した。膜をシールドバック中にいれ、ハイブリダイゼーション溶液を加え、68 $^{\circ}$ C で 4 時間プレハイブリダイゼーションした。プローブを 95 $^{\circ}$ C 10 分間熱変性させハイブリダイゼーション溶液に加え、68 $^{\circ}$ C で 18 時間ハイブリダイゼーションさせた。反応後ナイロン膜を洗浄し、続いて酵素標識抗体 (抗ジゴキシゲニン, アルカリホスファターゼ標識抗体) を反応させ、Nitroblue tetrazolium chloride と 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate を基質として発色反応を行った。

3) 培養 *O. tsutsugamushi* からの DNA 検出と型別

a) 試料の調整

それぞれ L929 細胞で継代した *O. tsutsugamushi* Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki 株, *Rickettsia. rickettsii* (*R. rickettsii*), *Rickettsia sibirica* (*R. sibirica*) および L929 細胞浮遊液 1ml に 10% SDS, プロテナー K (2mg/ml), 10 倍濃度 Tris \cdot HCl-EDTA (100mM Tris \cdot HCl, 10mM EDTA : pH8.0) 緩衝液をそれぞれ 1/10 量加えて 55 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させ、タンパク質を分解した。この反応液にフェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) 混合液を等量加え除タンパク操作を 2 回繰り返したのち、上清にクロロホルム : イソアミルアルコール (24 : 1) 混合液を等量加えフェノールを除き、上清に 1/20 量の 3M 酢酸ナトリウム及び 2 倍量の冷エタノールを加え、-80 $^{\circ}$ C で 30 分間静置させた。その後 15,000rpm で 10 分間遠心し、上清を吸引除去し、デシケーターで乾燥後 TE 緩衝液 100 μ l で溶解したものを鋳型 DNA 溶液とした。

b) DNA の検出と型別

培養 *O. tsutsugamushi* 5 株からそれぞれ抽出した DNA を鋳型として PCR を試みたところ、p34 と p55 による 1st PCR の 30 サイクルで、Gilliam 株 1003bp, Karp 株 1030bp, Kato 株 1003bp, Kawasaki 株 1003bp, Kuroki 株 1026bp の PCR 産物が検出され、さらにこれらの 1st PCR 産物を鋳型として p10 と p11 を用いて 30 サイクル PCR を行ったところ、Gilliam 株 481bp, Karp 株 507bp, Kato 株 495bp, Kawasaki 株 481bp, Kuroki 株 501bp の PCR 産物が検出された (図 2)。しかし *R. rickettsii*, *R. sibirica*, L929 細胞で DNA の増幅は認められなかった。この検出用プライマーにより *O. tsutsugamushi* 5 株の検出が可能であることが判明した。

また検出用のプライマーを用いて検出感度を検討した。p34 と p55 によって増幅した DNA 断片を様々な濃度に調整し鋳型として p10 と p11 の検出限界を算定したところ、2 コピーの *O. tsutsugamushi* DNA が試料中に存在すれば 2nd PCR で検出可能であることが示された。

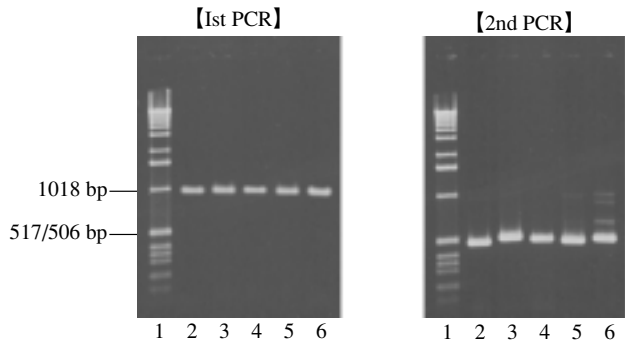


Fig. 2 The detection of *Orientia tsutsugamushi* DNA by PCR
 1.5 % agarosegel electrophoresis
 lane 1 : 1-kb DNA Ladder lane 2 : Gilliam strain
 lane 3 : Karp strain lane 4 : Kato strain
 lane 5 : Kawasaki strain lane 6 : Kuroki strain
 1st PCR is common region primers, 2nd PCR is nested PCR

p34, p55のプライマーを用いて1st PCRで増幅させた *O. tsutsugamushi* 5株のPCR産物を鋳型として型別用プライマー5対による2nd PCRでGilliam株は407bp, Karp株は230bp, Kato株は242bp, Kawasaki株は523bp, Kuroki株は220bpのそれぞれに特異的なDNAが増幅された(図3). これらの株特異的に増幅されたDNAは、ハイブリダイゼーション法により各株特異的なプローブのみがハイブリダイズし、株特異的であることが示された. 型別プライマーを使用することにより、感染株の型別が可能であった.

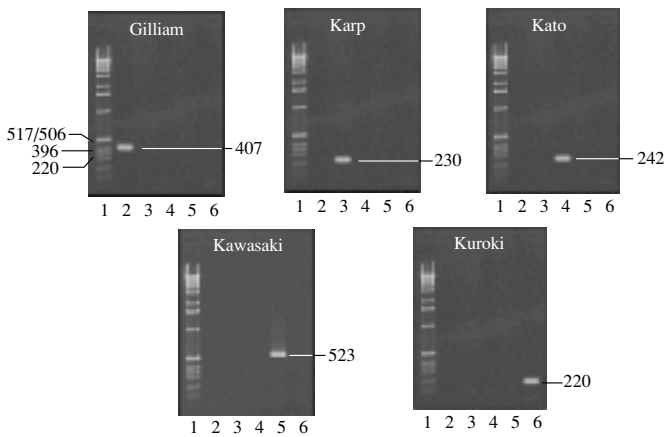


Fig. 3 Amplified DNA by nested PCR with serotype specific primer using template DNA from *Orientia tsutsugamushi* strains

4) 患者血液からのDNA検出および型別

a) 試料の調整

約0.5mlの血液から得られた血ぺいに精製水0.25mlを加えホモジナイザーでよくすりつぶした. この溶液を前記の細胞浮遊液と同様にタンパク質分解, 除タンパク, エタノール沈澱の操作を行い, 乾燥後TE緩衝液50 μ lで溶解したものを鋳型DNA溶液とした.

b) DNAの検出と型別

*O. tsutsugamushi*が分離同定された患者血ぺい7検体からDNAを抽出しPCRを行ったところ, 1st PCRではすべての検体においてDNAの増幅は認められなかったが, 2nd PCRにより *O. tsutsugamushi* DNAの増幅が7検体すべてに認められた. また健常人の血ぺい3検体では2nd PCRでも *O. tsutsugamushi* DNAの増幅は認められなかった. この結果より2nd PCRにより患者血ぺいから *O. tsutsugamushi* DNAの検出が可能であることが示された.

また患者血ぺい7検体から *O. tsutsugamushi*の型別を行ったところ, Kawasaki型5例, Kuroki型2例に型別され, 分離同定した株と一致した.

このように患者血ぺいから *O. tsutsugamushi* DNAをPCRで高感度に検出し, 型別できることが証明できた.

表1は, 1997年から1999年までの3年間の患者の血清診断法についてIFとPCRとの成績を示したものである. このように, IFの診断で81例中54例が陽性と確定でき, PCRによりさらに5例の患者が陽性となり, 合計59例(73%)の患者の陽性が確定できた.

Table. 1 Number of patients as to the examination

Year	Number of examination	Detection number of Positive			Number of confirmed patients
		Only IF	IF and PCR	Only PCR	
1997	17	3	6	0	9
1998	21	4	10	1	15
1999	43	5	26	4	35
Total	81	12	42	5	59

おわりに

PCRを利用した *O. tsutsugamushi*の型別は病原体の分離ができない施設環境においてはもちろん, 分離が困難と思われる微量な検体や長期間保存した検体からも簡便に型別できる有効な診断法である.

また *O. tsutsugamushi*を媒介するツツガムシの一虫体よりPCRにより *O. tsutsugamushi* DNAを直接検出できることを見いだした. このことは *O. tsutsugamushi* 陽性のコロニーを短時間にかつ高感度に検出でき, 恙虫病の予防対策に役立つと考えられる.

著者らは恙虫病の患者の血液を利用したDNA診断により, 感染 *O. tsutsugamushi*の株を正確に解析する手段を確立した. この技術と免疫学的方法を組み合わせることにより, 恙虫病の診断及び予防に寄与できるものと思われる.

(平成15年8月14日受理)

謝辞

神奈川県衛生研究所における恙虫病の診断技術向上と新技術の確立に助言をいただき, 多大な貢献をいただき

した古屋由美子博士，片山 丘博士に心より謝意を申し上げます。

文 献

- 1) Furuya, Y., Yoshida, Y., Katayama, T., Kawamori, F., Yamamoto, S., Ohashi, N., Tamura, A. & Kawamura, A. Jr. : Specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA from clinical specimens by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **29** : 2628-2630, 1991.
- 2) 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** : 1637-1640, 1993.
- 3) 吉田芳哉, 古屋由美子, 片山丘, 海保郁男, 山本正悟. Nested PCRによる *Rickettsia tsutsugamushi* DNAの検出と型別, *感染症誌*, **68**, 601-606, 1994.
- 4) Shishido A, et al : Strain variation of *Rickettsia tsutsugamushi* in complement fixation test. *Japan J. Med. Sci. Biol.* **17** : 59-72, 1964.
- 5) 山本正悟 : つつが虫病の臨床と診断.血清診断の各種—その特性と評価, 蛍光抗体法.臨床とウイルス, **12** : 270-274, 1984.
- 6) 須藤恒久 : わが国における最近のつつが虫病の現状と早期迅速診断—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—. *臨床とウイルス* **11** : 23-30, 1983.
- 7) Yamamoto S et al : Indirect immunofluorescence and avidin-biotin complex method. Meeting of the task force on the serological diagnosis of Tsutsugamushi disease (scrub typhus). Reginal Office for the Western Pacific, W. H. O., Manila, Philippines. pp.30-31, 1987.
- 8) Furuya Y et al: Use of monoclonal antibodies against *Rickettsia tsutsugamushi* Kawasaki for serodiagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* **29** : 340-345, 1991.
- 9) 多村憲ほか : ドットブロット法による恙虫病診断法の検討. *感染症学雑誌* **64** : 704-714, 1990.
- 10) 兼光望ほか : 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. **61** : 819-829, 1987.
- 11) Amano K et al : Deficiency of peptidoglycan and lipopolysaccharide components in *Rickettsia tsutsugamushi*. *Infect. Immun* **55** : 2290-2292, 1987.
- 12) Murata M, Kawamura A : Restoration of infectivity of *Rickettsia tsutsugamushi* to susceptible animals by passage in athymic nude mice, *Jpn. J. Exp. Med* **47** : 385-391, 1977.
- 13) Tachibana Y, Kobayashi Y : Effect of cyclophosphamide on the growth of *Rickettsia sennetsu* in experimentally infected mice, *Infect. Immun.* **12** : 625-629, 1975.
- 14) Murata M et al : Production and characterization of monoclonal strain-specific antibodies against prototype strains of *Rickettsia tsutsugamushi*. *Microbiol. Immunol.* **30** : 599-610, 1986.