

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

熊田信夫*・Sher Afzal Reka*・水野サホ子*・藤岡 寿*・内川公人**

Positive Isolation of *Rickettsia tsugamushi* from Field
Mice and Larvae of *Leptotrombidium pallidum* Collected
in Iida City, Nagano Prefecture

Nobuo KUMADA*, Sher Afzal REKA*, Sahoko MIZUNO*,
Hisashi FUJIOKA* and Kimito UCHIKAWA**

ABSTRACT: Isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* was attempted from field mice, *Apodemus speciosus*, and chiggers, *Leptotrombidium pallidum*, collected in a suburb of Iida City in November 1985. Three out of four *A. speciosus* were positive for the rickettsiae through intraperitoneal passage of their spleen homogenates in laboratory mice. Also positive were four out of 20 pools (each pool consisted of 20 engorged larvae) of *L. pallidum* detached from the hosts and crushed thoroughly in sucrose-PG solution. Positive rates were 75% for the field mice and 1.1% for the overall larvae of *L. pallidum* inoculated.

These results indicate that *L. pallidum* larvae would be the most probable vectors responsible for the occurrence of tsutsugamushi disease patients in the southern and possibly in other parts of Nagano Prefecture.

Discrepancy between the absence of reported cases of the disease in Iida City and existence of the pathogenic rickettsiae in *L. pallidum* and in the field mice may be attributable to inapparent infections and/or infrequent outdoor activities among the inhabitants in the cold season (November to January), when the suburban areas abound in *L. pallidum* larvae.

1 はじめに

日本国内の恙虫病は1975年頃から増加の傾向を示し、年毎に発生地域の拡大と患者数の急激な増大を続けている。1984年には28都府県から951名の届出患者があり、統計上過去最高の年間発生数が記録された。長野県下においても、1950年代に6名、1960年代に2名の、いずれも散発症例が知られるに過ぎなかったが、1980～1983年の4年間には合計27名の届出患者があり(内川ら、1984a)、1984年には20名の患者発生が報告された(厚生統計協会、1985)。長野県衛生部保健予防課資料によると、これら20名の患者はすべて臨床診断または血清学的診断によって決定ないし確認されている。

一方、本県下における恙虫病病原体〔*Rickettsia tsutsugamushi* (Hayashi)〕の存在は、Tamiya *et al.* (1962)が当時の下伊那郡下久堅村(現、飯田市下久堅)産のアカネズミ *Apodemus speciosus* から分離した1例だけに止まっており、媒介種と推測されているフトゲツツガムシ *Leptotrombidium pallidum* 等が病原リケッチアを保有するか否かも実証されていない。

1981年以降継続中の長野県下の恙虫および恙虫病に関する研究(内川ら、1983、1984a, b, 1985)の一環として、野鼠におけるリケッチア陽性例が知られている上記の地域において、推定媒介種(フトゲツツガムシ)における恙虫病リケッチア保有の有無およびその保有率を知ることが目的として、以下に述べる調査を行なった。晩秋から冬期にかけてこの地域に多数のフトゲツツガムシが発生し、その自然宿主となっているアカネズミに対し

*名古屋大学医学部 Nagoya University School of Medicine

**信州大学医学部 Shinshu University School of Medicine

て極めて高い寄生指数を示すことは、内川ら（1984a, b）の調査によってすでに明らかにされていた。

2 調査地および調査方法

調査地に選んだ下久堅地区は、天竜川をはさんで飯田市市街地の東南方約4 kmにあり、天竜川の左岸、海拔500～550 mの河岸段丘上に人家・社寺等の散在する階段耕作地帯を形成している。この地区の東部には海拔600ないし900 m程度の山地が続き、針葉樹・落葉広葉樹林帯となっている。川岸から約200 mの西南向き小斜面（日当りの良いススキ草地で低灌木が混生）と、その東南方に続く疎林の辺縁部（下生えの多い半日蔭地）とを捕鼠地点として選び、生捕り用捕鼠器（Sherman式）を設置した。

捕鼠作業は1985年11月11日～12日に行い、12日早朝にトラップを回収、捕獲した野鼠類はトラップごと大型のポリエチレン袋に個別に収納して研究室に運び、恙虫幼虫の採集と病原リケッチアの分離に供した。

研究室では野鼠類を個別別に小型の金網籠に移し、落下装置に固定した口径17 cmのガラス製ロートの内部に置き、約30 cm上方から40 Wの白熱電球で照射するとともに、ロートの直下には水を入れたシャレーを置いて、鼠体から離落する恙虫幼虫を収集した。

野鼠類からの恙虫病リケッチアの分離は個別別に行った。クロロホルム深麻酔による安楽死後、直ちに無菌的に開腹剖検してリンパ節腫脹・肝脾腫等の有無を観察記録し、次いで脾臓（および肝臓の一部）を摘出してSPG（Sucrose PG）液（Bovarnick *et al.*, 1950）1～2 mlを加え、ガラス製ホモジナイザーで磨砕して10～20%ホモジネートを作製した。2～3分間静置後、ホモジネートの上清部0.2 ml宛を約4週齢のICR系マウスの腹腔内に接種し、病的徴候（立毛・運動性および摂餌量の低下・腹水貯溜など）の有無を観察しながら飼育し、10日

間隔で盲継代を行った。継代時の剖検所見、特に鼠径リンパ節腫脹・肝腫・脾腫・腹水の貯溜と粘稠性などが陽性の場合には、腹膜漿膜の塗抹ギームザ染色標本を作り食細胞系細胞内のリケッチアの有無を鏡検により観察した。

恙虫幼虫からのリケッチアの分離は以下のような手順で行なった。宿主別に収集された満腹幼虫を40×～60×の実体顕微鏡下で同定分類ののち、主としてフトゲツツガムシ *L. pallidum*、対照としてサダスクツツガムシ *Gahrlipeia saduski* を分離に供した。供試個体は20個体（フトゲツツガムシ）または50個体（サダスクツツガムシ）が1接種系列となるようにプールのした。次いで、供試虫体をSPG液で十分に洗浄後、滅菌した凝集反応用のホールスライド内でよく磨砕し、0.2～0.3 mlのSPG液を加えて均質な懸濁液とし、その0.1 ml宛をマウス腹腔内に接種した。以後の手技は野鼠類からの分離法と同様である。

陽性所見があり、かつ腹膜塗抹標本内に恙虫病リケッチアを確認した供試マウスからは、脾臓を摘出して-60℃の冷凍庫に保存するとともに、脾臓の一部をSPG液ホモジネートとして次代マウス腹腔内に接種した。発症を確かめて、接種後10～14日目に心臓穿刺による採血を行ない、補体結合反応（デン化生研製乾燥CF抗原・CF正常抗原・CF抗血清、中間試薬キット）を利用して、分離株の血清型について検討した。

3 結 果

1. 野鼠類の捕獲成績と寄生恙虫

捕獲動物はヒミズ *Urotrichus talpoides* 1頭とアカネズミ *Apodemus speciosus* 4頭に過ぎなかったが、アカネズミからは3属6種合計2,052個体の恙虫幼虫が採集された。この調査例の最優占種はサダスクツツガムシで全数の61.3%を占め、フトゲツツガムシは2番目に多く32.7%（671個体）に達した。他の4種の合計は全体の僅か6%にとどまった（Table 1）。

Table 1. Chigger mites collected from *Apodemus speciosus* trapped at Shimohisakata, Iida City on November 12, 1985

Host no.	Sex	Body weight (g)	Chigger mites						Total
			<i>L. fuji</i>	<i>L. kit.</i>	<i>L. mij.</i>	<i>L. pall.</i>	<i>N. jap.</i>	<i>G. sad.</i>	
ID-2	M	44	34	18	0	361	6	643	1,062
ID-3	M	48	23	2	0	138	0	72	235
ID-4	M	23	18	2	0	73	0	246	339
ID-5	M	20	10	2	1	99	8	296	416
Total	4 Males		85	24	1	671	14	1,257	2,052
(Per cent composition)			(4.1)	(1.2)	(0.0)	(32.7)	(0.7)	(61.3)	(100)

Abbreviations: *L. fuji*: *Leptotrombidium fuji*, *L. kit.*: *L. kitasatoi*, *L. mij.*: *L. miyajimai*, *L. pall.*: *L. pallidum*, *N. jap.*: *Neotrombicula japonica*, *G. sad.*: *Gahrlipeia saduski*, M: male

2. 野鼠類からの恙虫病リケッチア分離成績

総ての捕獲動物を個別にリケッチア分離に供した結果、ヒミズ（個体番号 ID-1）はマウス継代3代で陰性、アカネズミ4頭中3頭（ID-2, 4, 5）はいずれも2代陽性、他の1頭（ID-3）は3代陰性に終わった。ID-2, 3は前述の西南小斜面のススキ草地で、ID-4, 5は疎林の辺縁部で捕獲されたものである。

3. 恙虫幼虫からの恙虫病リケッチア分離成績

アカネズミから採集した満腹落下幼虫から宿主別にフトゲツツガムシ（20個体/系列）とサダスクツツガムシ（50個体/系列）を分別し、合計22の接種系列を作ってリケッチアの分離に供した。その結果、ID-2 アカネズミ由来のフトゲツツガムシ10系列中の2系列において初代接種マウスが定型的に発症し、腹膜の塗抹染色標本内にもリケッチアが検出された。また、ID-3 由来のフトゲツツガムシ5系列中の2系列にも初代および3代継代マウスに明瞭な陽性所見が得られた。ID-4, 5に由来するフトゲツツガムシの5系列とID-2, 3由来のサダスクツツガムシ2系列は陰性であった（Fig. 1, Table 2）。

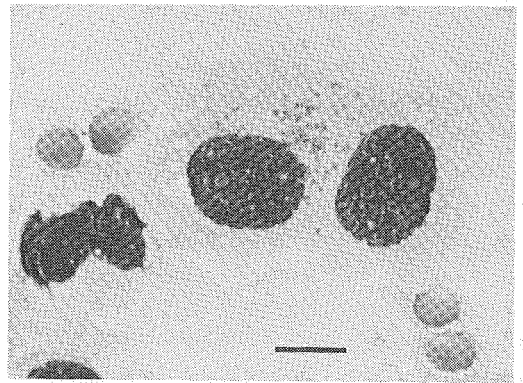


Fig. 1. *Rickettsia tsutsugamushi* isolated from *Leptotrombidium pallidum* in the peritoneal phagocytes of laboratory mouse inoculated with 20 crushed larvae of *L. pallidum* in SPG solution, 10 day post-inoculation; Bar: 10 μ m

Table 2. Results of isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* from *Apodemus speciosus* and chigger larvae (*Leptotrombidium pallidum* and *Gahrliepia saduski*) taken from these hosts

Isolation from hosts		Isolation from chiggers				
Host no.	Results	Chigger species	Pool size	Pool(s) tested (No. of chiggers)	Pools positive	Minimum positive per cent
ID- 2	Positive at 2nd passage	<i>L. pallidum</i>	20	10 (200)	2	1.0
		<i>G. saduski</i>	50	1 (50)	0	—
ID- 3	Negative at 3rd passage	<i>L. pallidum</i>	20	5 (100)	2	2.0
		<i>G. saduski</i>	50	1 (50)	0	—
ID- 4	Positive at 2nd passage	<i>L. pallidum</i>	20	2 (40)	0	—
ID- 5	Positive at 2nd passage	<i>L. pallidum</i>	20	3 (60)	0	—

4. 分離リケッチア株の血清型について

野鼠類からの分離株（3株）とフトゲツツガムシからの分離株（4株）計7株の恙虫病リケッチアについて、分離後1代継代して定型的な発症を確認したマウス血清の補体結合抗体価を測定した結果、Karp-Kato型（3株）、

Kato-Gilliam型（2株）、Gilliam型（1株）、Karp-Kato-Gilliam型（1株）等に分類される所見が得られた。ただし、得られた抗体価は最高32倍にとどまり、さらに高力価の抗血清を作製して改めて検討を加える予定である（Table 3）。

Table 3. Complement-fixing antibody titers of mice inoculated with the isolated rickettsiae

Strains	Antibody titer (1:)*		
	Karp	Kato	Gilliam
ID- 2	—	16	8
ID- 4	32	16	—
ID- 5	—	—	8
pall- 1	32	16	8
pall- 3	—	32	8
pall- 13	16	16	8
pall- 15	16	16	16

* Sample sera were obtained on day 10 to 14 post-inoculations.

4 考 察

1. 恙虫病の媒介種について

日本における恙虫病の媒介種は、1950年以降の一連の研究、特に Tamiya *et al.* (1962), Asanuma *et al.* (1962) などの広範な研究結果によって、従来からよく知られていたアカツツガムシ *Leptotrombidium akamushi* (Brumpt) のほかにタテツツガムシ *L. scutellare* (Nagayo *et al.*) およびフトゲツツガムシ *L. pallidum* (Nagayo *et al.*) の2種が追加され、合計3種が重要なものと考えられている。このうち、フトゲツツガムシは内川ら (1984 a, b) の調査によって長野県下の恙虫病患者の発生地を含む数地点から多数の記録があり、本県下における本病の推定媒介種として注目されていた。今回の調査結果、特にフトゲツツガムシ幼虫からの病原リケッチア分離陽性成績は、この推定に有力な根拠を与えたものと考えられる。

長野県下における恙虫病リケッチアの分離は、Tamiya *et al.* (1962) による僅かに1例の陽性成績 (1956年9月、下久堅産のアカネズミから分離) のみが知られていたに過ぎず、今回約30年ぶりに確認されたアカネズミ3頭からのリケッチア分離陽性成績は、この調査地域における本病の浸淫および野鼠に対する媒介種の存在を示すものである。Nagayo *et al.* (1921) によると、野鼠 (山形県下のハタネズミ *Microtus montebelli*) の間ではアラトツツガムシ *L. intermedium* とフトゲツツガムシの2種がリケッチアを媒介するというが、1950年代以降の広範な調査結果 (浅沼, 1983) にもアラトツツガムシのリケッチア陽性例は全く認められていない。内川ら (1984 b) の調査成績に照らしても、長野県下の野鼠に対する媒介種はフトゲツツガムシであることが推測される。

2. フトゲツツガムシのリケッチア保有率について

フトゲツツガムシ幼虫の病原リケッチア保有率は浅沼 (1983) によって詳しくまとめられている。特に新潟県五泉市では年間にわたって分離作業が行なわれ月別の個体群について「個体別最低有毒率」が示されているが、その範囲は0%から1.09%にわたり、また個体別に分離を試みた例では0.32% (1/314) の保有率がえられたという。飯田市下久堅地区で得られたフトゲツツガムシ個体群のリケッチア保有率は、浅沼 (1983) の計算法によると0%~2%の範囲にあり (Table 2)、一括して平均値を計算すれば1%となる。また、二項分布理論に基づいて Chang and Reeves (1962) が提唱した理論式、
$$\hat{p} = 1 - \left(\frac{n - X}{n} \right)^{\frac{1}{m}} \quad (\hat{P}: \text{推定保有率}, n: \text{供試系列数}, X: \text{陽性系列数}, m: \text{1系列中の個体数})$$
 によって推定保有率と母集団保有率の95%信頼区間を求めると、推定保有率はこの地区からの供試フトゲツツガムシの全系列については1.11%、日照条件の良いスキ草地で捕獲したアカネズミに由来する系列では1.54%となり、信頼区間はTable 4に示す範囲となる。換言すれば、フトゲツツガムシ幼虫の本地域における多発時期 (11月~1月) には、概ね0.3~4.0% (25~300個体に1個体) の割合で病原リケッチア保有個体の存在する可能性が示されたことになる。

3. 非流行地域におけるリケッチア保有恙虫の存在

フトゲツツガムシ幼虫個体群における恙虫病リケッチアの保有を確認したことにより、飯田市内の天竜川東岸地域に恙虫病浸淫地の存在することが明らかとなった。しかしながら、従来この地域は恙虫病の非流行地と考えられており、確認患者の発生記録は知られていない。天竜川流域で1983年以降に発生した確認患者は、飯田市よりやや上流域の豊丘村、静岡県境に近い中流域の阿南

Table 4. Rickettsia-positive rates estimated for the *L. pallidum* populations in Shimohisakata, Iida City

<i>L. pallidum</i> populations	Pool size	Pools tested	Pools positive	Estimated positive rates (%)	Confidence interval (%) (1 - α = 0.95)
Overall population tested	20	20	4	1.11	0.29 to 2.83
Population at sunny, grassy bank	20	15	4	1.54	0.40 to 3.93
Population at half shaded grass-bush	20	5	0	0	—

Note: Calculations were made after Chang and Reeves (1962).

町および天竜村から各2例、計6例に過ぎない。いずれも10月下旬から11月の間に発病している。

恙虫病の感染が成立するための不可欠な要因として、恙虫病リケッチアを保有する媒介種の未吸着幼虫が人体に接触・移行し、さらに体表面に吸着・寄生することがあげられ、その頻度と患者発生数との間には正の相関関係を認めることができるであろう。

飯田市下久堅地域のフトゲツツガムシ幼虫個体群は、季節的発消長の点で長野県北部の同種幼虫群とはかなり異なり、11月～1月にかけて年間一峰性の季節的消長を示すことが知られている(内川ら, 1984b)。農閑期に当るこの時期には住民の野外作業、特に耕作地周辺・草地・林縁部などのフトゲツツガムシの生息場所に立入る機会が減少するであろうこと、また外気温の低下によってツツガムシの地表面活動も抑制されることなどが推測され、住民とフトゲツツガムシ幼虫との接触頻度は相当に低いものと考えられる。恙虫病の浸淫地であるにもかかわらず患者の発生がみられない理由の一つとして、このような接触頻度の僅少性を挙げておきたい。不顕性感染者および軽症自然治癒例の有無についても、血清学的検討・アンケート調査などを行なうことが望まれる。

5 ま と め

長野県下の恙虫および恙虫病に関する研究の一環として、県下における恙虫病の媒介種と推定されるフトゲツツガムシ幼虫とその自然宿主である野鼠類の病原リケッチア保有性について検討した。秋冬季にフトゲツツガムシ幼虫が多発する飯田市内の天竜川東岸地区を調査地として選び、捕獲した野鼠類とこれに寄生していたフトゲツツガムシ幼虫を病原リケッチアの分離に供した結果、いずれも予想以上に高いリケッチア保有率を示し、この地域が恙虫病の浸淫地であることが明らかになった。また、この地域から恙虫病患者の発生が認められていない

理由について、寒冷期における住民の野外活動量の減少、これに伴う媒介種恙虫幼虫との接触頻度の僅少性、および不顕性感染者が潜在している可能性等についても検討を加えるべきことを考察した。

文 献

- ・浅沼 靖(1983):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.
- ・Asanuma, K., K. Okubo, N. Kumada M. Kitaoka (1962): Determination of the vector mites of scrub typhus in Japan. Jpn. J. Med. Sci. Biol., 15: 297-308.
- ・Bovarnick, M. R., J. C. Miller and J. C. Snyder (1950): The influence of certain salts, amino acids, sugars, and proteins on the stability of rickettsiae. J. Bact., 59: 509-522.
- ・Chang, C. L. and W. C. Reeves (1962): Statistical estimation of virus infection rates in mosquito vector populations. Amer. J. Hyg., 75: 377-391.
- ・厚生統計協会(1985): 厚生指標, 国民衛生の動向. 32(9): 416-419.
- ・長野県衛生部保健予防課(1986): つつが虫病患者発生状況. pp. 3.
- ・Nagayo, M., Y. Miyagawa, T. Mitamura, T. Tamiya and S. Tenjin (1921): Five species of tsutsugamushi (the carrier of Japanese river fever) and their relation to the tsutsugamushi disease. Amer. J. Hyg., 1: 569-591, with 8 pls.
- ・Tamiya, T. et al. (1962): Recent advances in studies of tsutsugamushi disease in Japan. pp. 309, Medical Culture Inc., Tokyo.
- ・内川公人・山田喜紹・熊田信夫(1983): フトゲツツガムシ *Leptotrombidium pallidum* の棲息環境に

関する一知見. 信大環境科学論集, 5 : 72-77.

- 内川公人・山田喜紹・熊田信夫 (1984 a) : 長野県における恙虫病の発生と媒介ツツガムシ類に関する調査の現状. 信大環境科学論集, 6 : 63-70.
- 内川公人・山田喜紹・佐藤 潔・熊田信夫 (1984 b) :

長野県の恙虫類に関する基礎調査. 衛生動物, 35: 233-243.

- 内川公人・熊田信夫・山田喜紹 (1985) : キジに寄生する恙虫類, とくにフトゲツツガムシの分散に果すキジの役割について. 衛生動物, 36 : 357-361.