

5. 山形県内におけるつつが虫病媒介ツツガムシの生息調査

○金子紀子(山形県衛生研究所)

瀬戸順次(山形県衛生研究所)、後藤恵美(山形県衛生研究所)

青木敏也(現 村山保健所検査課)、大谷勝実(山形県衛生研究所)

1. 目的

山形県において、つつが虫病は大正時代まで、最上川流域に多発し、風土病として住民に恐れられていた。住民は病気がある種の虫に刺されて発症することを経験的に知っていたが、特効薬のない時代にはその虫に刺されないように祈願するしかなく、現在でも石碑や祠がかつてのつつが虫の多発地帯に残されている。

山形県では最近でも、年間約 10 人の患者報告がある。患者数は少ないものの、東北地方には患者がいないとされていた Kawasaki 型や発生が稀な Shimokoshi 型の患者が確認されている。そこで Kawasaki 型を媒介するタテツツガムシ(*Leptotrombidium scutellare*)の生息を確認し、東北にも Kawasaki 型による患者発生の環境が存在することを明らかにすることにより、ツツガムシの生息状況を把握し、その地域におけるつつが虫病発生の可能性を示す。また、採集したツツガムシやツツガムシが寄生した野ネズミからつつが虫病病原体遺伝子を検出することにより、つつが虫病発生源としてのリスクを確認する。これらの基礎的な情報を公表することによりつつが虫病発生予防に資することを目的とした。

2. 方法

ツツガムシ生息調査

1)調査対象地域：県内 3 箇所を対象とした。

① 白鷹町(江戸時代と大正時代につつが虫病が大流行した所であり、1860 年(万延元年、退治祈願のために建立された「毛谷明神」がある。また、現在でも県内でつつが虫の患者が多い地域である)

②山辺町(患者発生が過去に確認された地区)

③鮭川村(過去 13 年間の人口 1 万人あたりの罹患率が県内で最も多く、これまで東北地方には患者がいないとされていた Kawasaki 型の患者が確認された地域の 1 つである)

2)調査期間：平成 19 年 5～6 月及び 10～11 月(山形県における患者発生時期)

3)野ネズミの捕獲：野ネズミ捕獲用のトラップ(シャーマントラップ)を野ネズミの巣穴付近に設置し、翌朝回収した。餌は、実験用マウスに与えるペレットを用いた。捕獲した野ネズミはトラップごとビニール袋に入れ、当所に搬入した。

4)野ネズミの処理：当所に搬入した野ネズミを数時間以内にエーテル麻酔下で開腹し、心

臓穿刺により血液を採取後、脾臓および肝臓の一部を採材した。採取血液から遠心分離した血清、脾臓及び肝臓は、使用時まで-80℃に凍結保存した。なお、搬入時死亡していた野ネズミについては、脾臓及び肝臓のみ採材した。

5)野ネズミからのツツガムシ幼虫の収集および種の同定：コップに水を張り、水面よりやや高い位置に臓器を除去した野ネズミを約1週間吊るした(懸垂法)。コップの水に落ちたツツガムシ幼虫を回収し、ガムクロール液でスライドガラスに封入した後、顕微鏡下で観察し、ツツガムシの形態から種の同定を行った。

6)PCR：摘出した脾臓の一部について、

QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN 社)を用いて DNA 抽出を行い *Orientia tsutsugamushi* の 56kDa 外膜タンパク遺伝子を標的にした PCR を実施した。PCR は Furuya ら^{(1), (2)}の方法に準じて行い、表 1 に示したプライマーを使用した。

表 1 プライマーの塩基配列

Primer 34	5'-TCAAGCTTATTGCTAGTGCAATGTCTGC-3'
Primer 55	5'-AGGGATCCCTGCTGCTGTGCTTGCTGCG-3'
Primer 10	5'-GATCAAGCTTCCTCAGCCTACTATAATGCC-3'
Primer 11	5'-CTAGGGATCCCGACAGATGCACTATTAGGC-3'
Primer G	5'-CTTTATATCACTATATATCTT-3'
Primer KP	5'-ACAATATCGGATTT ATAACC-3'
Primer KT	5'-GAATATTTAATAGCACTGGA-3'
Primer KW	5'-ATGCTGCTATTGATACAGGC-3'
Primer KR	5'-CACCGGATTTACCATCATAT-3'

7)血清抗体価：感染症研究所 病原体検出マニュアル リケッチア感染症診断マニ

ュアル⁽³⁾の間接蛍光抗体法に準拠し、Karp 株、Kato 株、Gilliam 株、Kawasaki 株、Kuroki 株、Shimokoshi 株を抗原として用い間接蛍光抗体法(IF)で抗体測定を行った。

3. 結果

1)野ネズミに寄生するツツガムシ幼虫

平成 19 年の春と秋に白鷹町、山辺町、鮭川村の 3 地点においてアカネズミ (*Apodemus speciosus*)37 匹とヤチネズミ (*Eothenomys andersoni*)2 匹、モグラ科であるヒミズ (*Urotrichus talpoides*)11 匹の計 50 匹を捕獲した。野ネズミの中で最も多く捕獲された種類は、アカネズミであり、ヤチネズミの捕獲数はわずかだった。

野ネズミ 39 匹から計 2,736 匹のツツガムシ幼虫を収集し、同定した結果、3 属 10 種に分類された(表 2)。野ネズミ 1 匹あたりのツツガムシ幼虫寄生数は、捕獲数の多かったアカネズミでは、67.6 匹、ヤチネズミでは、145.5 匹であった。なお、ヒミズ 11 匹に寄生していたツツガムシ幼虫は、9 匹(フジツツガムシ (*L. fuji*) 1 匹、テラムラツツガムシ (*L. teramurai*)2 匹、ヤマトツツガムシ (*Neotrombicula japonica*)6 匹)とごくわずかだった。

2)野ネズミの血清抗体保有状況

採血可能だった野ネズミ 19 検体、ヒミズ 5 検体の計 24 検体について血清中の抗体価を間接蛍光抗体法により測定した。血清希釈 40 倍でスクリーニングすると、野ネズミ 19 匹中 4 匹で抗体陽性であった。

3)野ネズミからの病原体遺伝子の確認

3 地点において捕獲できた野ネズミ、ヒミズ計 50 匹について、病原体遺伝子検出の PCR

を実施したところ、野ネズミ 39 匹のうち 2 匹で病原体遺伝子が検出された。1 株は、ダイレクトシーケンスにより Gilliam 型に型別できたが、他の 1 株は型別できなかった。

表2 野ネズミに寄生したツツガムシ幼虫

春												
	ネズミ 捕獲数	ツツガムシ 幼虫個体	<i>L.pallidum</i>	<i>L.scutellare</i>	<i>L.fuji</i>	<i>L.intermedium</i>	<i>L.teramura</i>	<i>L.kitasato</i>	<i>L.palpale</i>	<i>N.japonica</i>	<i>N.tamijai</i>	<i>G.saduski</i>
白鷹	5	131	64	0	28	14	3	0	0	0	0	22
山辺	5	405	1	0	231	67	54	46	0	0	0	6
鮭川	6	314	0	0	235	18	29	4	0	0	0	28
計	16	850	65	0	494	99	86	50	0	0	0	56

秋												
	ネズミ 捕獲数	ツツガムシ 幼虫個体	<i>L.pallidum</i>	<i>L.scutellare</i>	<i>L.fuji</i>	<i>L.intermedium</i>	<i>L.teramura</i>	<i>L.kitasato</i>	<i>L.palpale</i>	<i>N.japonica</i>	<i>N.tamijai</i>	<i>G.saduski</i>
白鷹	8	761	162	0	164	9	82	1	0	249	22	72
山辺	8	763	1	0	412	40	16	11	0	278	0	5
鮭川	7	362	20	115	3	3	7	1	1	195	3	14
計	23	1,886	183	115	579	52	105	13	1	722	25	91

4. 考察

1) 野ネズミに寄生するツツガムシ幼虫

本調査以前に、溝口ら⁽⁴⁾(1975~1985年)によって、県内の72地点において調査がおこなわれ、3属13種のツツガムシが同定された。今回の調査において特に注目すべきことは、以前の調査で確認できなかったタテツツガムシを確認することができたことである。タテツツガムシは、つつが虫病のKawasaki型やKuroki型を媒介する、疫学的に重要視されるツツガムシである。確認された調査地点は、Kawasaki型の患者が発生した地域であり、現在、タテツツガムシの生息が確認された日本の北限である。しかし、以前確認されていたオオウツツガムシ(*L. owuense*)、アサヌマツツガムシ(*L. asanumai*)、ナガヨツツガムシ(*N. nagayoi*)、イチカワツツガムシ(*Eltoneilla ichikawai*)は確認されなかった。これは、収集したツツガムシが少ないためと思われる。今後もこの調査を継続し、山形県内におけるツツガムシの分布状況を確認する必要がある。

2) ツツガムシ幼虫の季節的消長

春及び秋に多く検出された幼虫は、フトゲツツガムシ(*L. pallidum*)、フジツツガムシ、サダスク・ガーリエップツツガムシ(*Gahrliopia saduski*)で、秋のみに検出された幼虫は、タテツツガムシ、ヤマトツツガムシで、季節的な特徴が見られた。タテツツガムシ以外については、1975~85年に行われた調査でも同様であった⁽⁴⁾。

3) フトゲツツガムシ幼虫の地域別・季節別検出頻度

1年間の調査結果であり、収集したツツガムシ幼虫の個体数が少ないものの地域でかなりの偏りがみられた。本県で発生する約9割のつつが虫病は、Karp型であることから主なベクターはフトゲツツガムシと考えられる。今回の調査でフトゲツツガムシが多く採取された白鷹町は患者発生が多い地域の一つであり、この地域で患者が多く発生する一つの要因と思われる。季節的にみると、フトゲツツガムシは春、秋ともに確認された。フトゲツツガムシは9月に産卵し、未吸着幼虫の生存は翌年の5月頃までとされている⁽⁵⁾。山形県

は秋が短く冬季には積雪もあり、フトゲツツガムシの温血動物への吸着活動の時期が雪解けの4月以降に持ちこされるためと考えられる。

4) タテツツガムシ幼虫の地域別・季節別検出頻度

山形県において、Kawasaki型の患者は、現在までに4人確認されており、感染推定地域は、それぞれ鶴岡市(旧羽黒町)、新庄市、鮭川村、戸沢村である。いずれも10、11月の秋に発生している。今回の調査で患者の感染推定地域である鮭川村と戸沢村(データは示していない)でタテツツガムシの生息を確認した。これらの地域ではKawasaki型によるつつが虫病の患者が発生しうる環境にあると推察される。また、今回の調査地点である白鷹町、山辺町ではタテツツガムシは確認されなかったが、今後も調査をしていく必要がある。季節的にみるとタテツツガムシは秋のみ確認された。このツツガムシは、フトゲツツガムシと同じ9月頃に産卵するが越冬することができない⁽⁵⁾。山形のような気候の土地では、タテツツガムシの温血動物への吸着活動時期が短いため、生息を確認するにはネズミを捕獲する季節や捕獲数を検討する必要がある。

5) 野ネズミの血清抗体保有状況と病原体遺伝子の確認

血清抗体は、野ネズミ19匹中4匹(21.1%)が抗体陽性であった。1975～85年の調査では、免疫酵素抗体法で81%が陽性と報告している⁽⁴⁾。今回は、間接蛍光抗体法での測定であり、精度等、今後検討する必要がある。

一方、PCRによる病原体遺伝子検出では、野ネズミ39匹中2匹(5.1%)が陽性であった。群馬県の調査では、41匹中3匹(7.3%)が陽性と報告しており⁽⁷⁾、今回の調査と同様な陽性率であった。

日本でヒトに*O. tsutsugamushi*を伝播する主力は、アカツツガムシ(*L. akamushi*)、フトゲツツガムシ、タテツツガムシの3種にしばられる。この3種の*O. tsutsugamushi*の保有率は、アカツツガムシ1/100、フトゲツツガムシ1/100から1/500、タテツツガムシ1/3000から1/3500といわれ⁽⁶⁾、野ネズミへのツツガムシの吸着による*O. tsutsugamushi*感染率はそう高いものではないと推察される。検査を実施した野ネズミの頭数が少ないので、野ネズミ間の*O. tsutsugamushi*の浸淫状況については、言及できないが、今後、野ネズミの頭数を増やして確認する必要があると思われる。

文献

- 1) Furuya, Y et al: Specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA from clinical specimens by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 29:2628-2630, 1991.
- 2) Furuya, Y et al: Serotype-specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA by nested polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 31:1637-1640, 1993.
- 3) 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: リケッチア感染症診断マニュアル, 平成12年
- 4) 山形県環境保健部保健予防課、山形県衛生研究所: 山形県におけるツツガムシ病患者発

生とツツガムシ生息調査,

5) 吉田芳哉ら：つつが虫病－再興感染症の波紋－, ダニと新興再興感染症, 19-22, 2007

6) 古屋由美子ら：つつが虫病原体の知見－より良い検査へ向けて－, ダニと新興再興感染症, 141-146, 2007

7) 石岡大成ら：ツツガムシ病の診断法の検討と分子疫学的解析, 群馬県衛生環境研究所年報, 38, 36-40, 2006

経費使途明細

用途	金額
シャーマントラップ	157,500 (@5,250*30)
QIAamp DNA Mini Kit(250)	107,100
タカラバイオ Ex Taq	84,360
旅費 (ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー) 和歌山県田辺市:2泊3日	93,840
旅費(野ネズミ捕獲) 山形県白鷹町	22,000(@1,100*20)
旅費(野ネズミ捕獲) 山形県鮭川村	35,200(@2,200*16)
合計	500,000