

## 東京都山間部で2005年に採取されたダニ類における病原微生物の検索

吉田 勲<sup>a</sup>, 加來 英美子<sup>a</sup>, 根岸 あかね<sup>a</sup>, 神門 幸大<sup>a</sup>, 北村 友里恵<sup>a</sup>,  
長島 真美<sup>a</sup>, 新開 敬行<sup>b</sup>, 秋場 哲哉<sup>a</sup>, 貞升 健志<sup>c</sup>

重症熱性血小板減少症候群の原因ウイルス (SFTSV) は, 2011年に初めて特定され2013年には国内最初の患者が報告された. 東京都では, 過去に島しょ地域, 多摩地域で発生するツツガムシ病のほか, 他のダニ媒介性感染症についても検査を行ってきた. 今回, 2005年に東京都で採取され保存されていたマダニ類を用いて, リアルタイムRT-PCR法及びNested-PCR法によるSFTSV, ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) 及び紅斑熱群リケッチアなどの病原体検索を行った. その結果, 133件のマダニ検体より, 回帰熱ボレリア 1件, 紅斑熱群リケッチア等が 5件検出された. また, SFTSV及びTBEVは検出されなかった. これらのことから, マダニの生息している地域に入る際は, マダニに刺咬されないような予防策を徹底する必要があると考える.

**キーワード:** 重症熱性血小板減少症候群, ダニ媒介性脳炎, 紅斑熱群リケッチア, 回帰熱, リアルタイム-RT-PCR法, Nested-PCR法

### はじめに

近年, 日本紅斑熱やライム病などダニに刺咬されることにより感染するダニ媒介性感染症が重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の患者発生により再認識されるようになってきた. SFTS は, 2011年に初めて原因ウイルスが特定された新しいダニ媒介性疾患で, その感染患者が 2013年1月に国内で初めて診断され<sup>1)</sup>, 2013年3月4日に感染症法上の四類感染症に指定された. その後, 各地域でSFTSVのダニ保有実態調査が行われてきた. 現在, 患者の発生した宮崎, 鹿児島, 徳島, 愛媛, 岡山, 高知, 島根, 山口, 兵庫県だけではなく, 患者の発生していない三重, 滋賀, 京都, 和歌山, 福井, 山梨, 長野, 岐阜, 静岡, 栃木, 群馬, 岩手, 宮城県, 北海道などでもSFTSVを保有するマダニが確認されたとの報告がある<sup>2)</sup>.

今回, 2005年にダニ類の調査で使用し, その後, 冷凍保存 (-20°C) されていたダニを用いて, SFTS やダニ媒介性脳炎 (TBE) の原因ウイルスを含めたダニ媒介性疾患の原因病原体検索を行ったので, その結果を報告する.

### 材料及び方法

#### 1. 供試材料

2005年5月から11月に東京都西部の山間部で捕獲されたシカの耳部より採取され, 種類ごとに分類後<sup>3)</sup>-20°Cで冷凍保存されていたダニを供試材料とした. 種類ごとに10匹を

上限にプールした133件 (オオトゲマダニ 38件, ヤマトマダニ 29件, キチマダニ 15件, シュルツェマダニ 5件, フタトゲマダニ 4件, 種別不明 42件) を対象とした.

#### 2. マダニからの遺伝子抽出

プールされたダニを室温にて解冻後, 1.5mLのチューブに移し, リン酸緩衝生理食塩水 (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>不含 :PBS(-)) pH7.4を400µL加えた. 電動ディスポーサブルマイクロミキサーにて粉碎後, 8,000rpm10分間遠心分離を行い, その上清を核酸抽出の試料とした. 上清140µLをQIAmp Viral RNA mini Kit(QIAGEN)を用いRNA抽出, 上清200µLをQIAmp DNA mini Kit (QIAGEN)を用いてDNA抽出を行った.

#### 3. 遺伝子検査

抽出したRNAを用いて, リアルタイムRT-PCR法によりSFTSV及びTBEVの検出を行った. 抽出したDNAを用いて, Nested-PCR法により紅斑熱群リケッチア (Spotted fever group rickettsia:SFGR), ライム病ボレリア, エーリキア・アナプラズマ, ツツガムシ病リケッチアの検出を行い (表1), 増幅された遺伝子の塩基配列を決定することにより病原体の同定を行った.

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科

<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科

<sup>c</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部  
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

表1. 遺伝子検査に使用したプライマー及びプローブ塩基配列

方法	対象疾患	Primer名	プライマー塩基配列	領域	文 献	
Realtime RT-PCR	SFTSV	S2-237s	GCAACAAGATCGTCAAGGCATCAGG	S分節	国立感染症研究所 <sup>4)</sup>	
		S2-400a	TGCTGCAGCACATGTCCAAGTGG			
		S2-317MGB	5' FAM-CTGGTTGAGAGGGCA 3' MGB			
	TBEV	TBE F	TGGAYTTYAGACAGGAAYCAACACA	NS1	Achaziら <sup>5)</sup>	
		TBE R	TCCAGAGACTYTGRTCDGTGTGGA			
		TBE prob	5' FAM-CCCATCACTCCWGTGTCAC 3' MGB			
nested-PCR	紅斑熱群 リケッチア	RP-F	GGGGACCTGCTCACGGCGG	gltA	M.Ishikuraら <sup>6)</sup>	
		RP-R	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA			
		IN-F	GGCTAATGAAGCGGTAATAA			Yeon-Joo Choiら <sup>7)</sup>
		IN-R	CGTGCTATTGCAAAAAGTAC			
ライム病 ボレリア	BflaPAD	BflaPAD	GATCARGCWCAAYATAACCAWATGCA	flaB	国立感染症研究所 <sup>8)</sup>	
		BflaPDU	AGATTCAAGTCTGTTTTGGAAAGC			
		BflaPBU	GCTGAAGAGCTTGGAAATGCAACC			
		BflaPCR	TGATCAGTTATCATTCTAATAGCA			
エーリキア・ アナプラズマ	ge3a	ge3a	CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC	16S	2014年希少感染症 診断技術研修会資 料	
		ge10r	TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC			
		ge2	GGCAGTATTAAGAAGCAGCTCCAGG			
		ge9f	AACGGATTATCTTTATAGCTTGCT			

## 結 果 及 び 考 察

### 1. 遺伝子検査結果

ダニ媒介性疾患原因病原体の遺伝子検査結果を表2、表3に示した。国立感染症研究所などによるマダニにおけるSFTSVウイルスの国内分布調査では、2013年から2015年にかけて、九州から北海道の26自治体でマダニのSFTSV遺伝子陽性率は、7~16%であったとされているが<sup>9)</sup>、今回、我々が行った調査ではすべてのダニ試料からSFTSV、TBEV、ツツガムシ病リケッチアの遺伝子は検出されなかった。

オオトゲチマダニから、SFGRは検出されなかったが、回帰熱の原因とされている*Borrelia miyamotoi*の遺伝子が38件中1件(2.6%)から検出された。また、家畜にアナプラズマ症を起こすとされている*Anaplasma centrale*が38件中1件(2.6%)検出された。

ヤマトマダニ、キチマダニからは、SFGRが検出され、それぞれ*Rickettsia felis*が29件中1件(3.4%)、*R. asiatica*が15件中1件(6.7%)検出された。ダニの種別不明な42件の試料からは、SFGRの*R. principis* 2件(4.8%)、*R. raoultii*が1件(2.4%)、*Borrelia spp.*、家畜に感染症を起こすことが知られている*Anaplasma bovis*、がそれぞれ1件(2.4%)

検出された。

シュルツェマダニ、フタトゲマダニからは、病原体の遺伝子は検出されなかった。

### 2. 検出された遺伝子について

回帰熱の原因菌である*B. miyamotoi*が検出されたが、この菌による回帰熱症例は2011年にロシアで報告<sup>10)</sup>されており、わが国では、1995年に北海道でシュルツェマダニから発見された。国内でも、国立感染症研究所の調査で2例の本菌による回帰熱症例が報告されており、いずれも北海道在住の患者であった<sup>11)</sup>。今回の調査では、シュルツェマダニからは検出されずオオトゲチマダニから検出された。また、本菌を媒介するマダニはライム病ボレリアを保有することもあるとされているが不検出であった。これらボレリアを媒介するダニは主に北海道や長野などの高原地帯に生息しているとされているが、東京都の山間部で検出されたことは、周囲にハイキングコースや自然公園等があることからさらに注意が必要であると考えられる。

次に、紅斑熱群リケッチアについては、わが国で発生している紅斑熱の原因菌の代表的な*R. japonica*は検出されなかった。検出された、*Rickettsia felis*は、ヨーロッパやアメリカなどで<sup>12-13)</sup>、*R. raoultii*はヨーロッパや中国でそれぞれ

表2 ダニ類が保有していたダニ媒介性疾患の原因病原体検索結果

	SFTSV	TBEV	紅斑熱群 リケッチア	ライム病 ボレリア	エーリキア・ アナプラズマ	ツツガムシ病 リケッチア
オオトゲチマダニ	38	0	0	1	1	0
ヤマトマダニ	29	0	1	0	0	0
キチマダニ	15	0	1	0	0	0
シュルツェマダニ	5	0	0	0	0	0
フタトゲチマダニ	4	0	0	0	0	0
不明・記載なし	42	0	3	1	1	0
計	133	0	5	2	2	0

表3 ダニ類から検出されたダニ媒介性疾患病原体

ダニ種類	検出された病原体
オオトゲチマダニ	<i>B.miyamotoi</i> , <i>A.centrale</i>
ヤマトマダニ	<i>R.felis</i>
キチマダニ	<i>R.asiatica</i>
不明・記載なし ダニ	<i>R.principis</i> , <i>R.raoultii</i> , <i>Borrelia spp.</i> , <i>A.bovis</i>

感染症例が報告されている<sup>14-15)</sup>。今回の調査で、検出された病原体のうち*B.miyamotoi*以外は国内での患者発生の報告はないが、諸外国においては患者が発生している。

今回、SFTSウイルスは検出されなかったが、2011年に初めて発見された原因ウイルスであることから、継続して調査を実施していく必要があると考えられた。また、東京都においては古くから七島熱として知られるように、年間10例以上のつづが虫病患者が報告されており、以前、多摩地区で感染した事例の発生により、野鼠おける *Orientia tsutsugamushi* の調査を実施した経験がある<sup>16)</sup>。このような地域に密着した実態調査は重要であり、今後も、マダニ類の保有するダニ媒介性感染症の病原体の検索を行う必要があると考える。また、ダニ生息地に入る際は、マダニ類に咬刺されないような配慮が重要であると啓発することが重要と考える。

### ま と め

2005年5月から11月に東京都西部の山間部で採取され冷凍保存されていたマダニ類の保有するダニ媒介性感染症の原因病原体について検索を行った。プールした133件のマダニ類から、回帰熱ボレリアの*B.miyamotoi* 1件、紅斑熱群リケッチア5件、アナプラズマ2件などが検出された。しかし、今回の検索では、最近、西日本で患者の発生が報告されている重症熱性血小板減少症候群ウイルスやダニ媒介性脳炎ウイルスなどは検出されなかった。検出された回帰熱ボレリアは、北海道でまれに検出されており、患者発生も現在のところ北海道に限局されているが、本州での検出状況は明らかでない。また、同様に検出された紅斑熱群リケッチアは、ヨーロッパなどでの感染例はあるが、国内での症例は報告されておらず、これらの病原性も明確ではない。

今後もマダニ類の病原体の保有状況についての調査が重要であり、また、マダニ類に咬刺されないような個人対策の啓蒙の必要性が示唆された。

### 文 献

- 1) 西條正幸, 他 : IASR 34,40-41,2013
- 2) 国立感染症研究所 : IASR<速報>重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスの国内分布調査結果(第二報) <http://www.nih.go.jp/niid/ja/sfts/sfts-iasrs/4428-pr4094.html> (2016年7月1日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 3) 秦 和壽 藤巻 直毅 中村 修ら, 野性ニホンジカに外部寄生するマダニ類からの病原菌の検索 —ボレリア及びリケッチアの検出—, 平成18年度福祉保健局保健医療学会抄録
- 4) 国立感染症研究所 : マダニからSFTSウイルス検出マニュアル (衛生研究所配布用)
- 5) Koray Ergunay, Sergey Tkachev, Irina Kozlova, and Daniel Ruzek : Vector borne and zoonotic diseases 16(1), 4-12, 2016
- 6) Mitsuhiro Ishikura, Shuji Ando, Yasuhiro Shinagawa, Kumiko Matsuura : Microbiol. Immunol., 47(11), 823-832, 2003
- 7) Spotted Fever Group and Typhus Group Rickettsioses in Humans, South Korea: Emerging Infections Diseases, [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid), Vol. 11, No. 2, February 2005
- 8) 国立感染症研究所 : ライム病 (ライムボレリア) 病原体検出マニュアル
- 9) IASR SFTSウイルスの国内分布調査 (第三報) : IASR Vol. 37, 50-51, 2016年3月号
- 10) IASR ロシアにおける *Borrelia miyamotoi* 感染による回帰熱の流行 <http://www.nih.go.jp/iasr/32/382/fr3822.html> (2016年7月1日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 11) IASR<速報>国内感染が確認された回帰熱の2例 <http://www.nih.go.jp/niid/ja/relapsing-fever-m/relapsing-fever-iasrs/3877-pr4046.html> (2016年7月1日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 12) Common Epidemiology of Rickettsia felis Infection and Malaria, Africa, Emerging Infectious Diseases, [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid), Vol. 19, No. 11, November 2013
- 13) Spotted Fever Group Rickettsia in Ticks, Germany, Emerging Infectious Diseases, [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid), Vol. 17, No. 5, May 2011
- 14) Human Infections with Rickettsia raultii, China, Emerging Infectious Diseases, [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid), Vol. 20, No. 5, May 2014
- 15) Rickettsia slovacica and R. raoultii in Tick-borne Rickettsioses Emerging Infectious Diseases, [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid), Vol. 15, No. 7, July 2009
- 16) 新開敬行, 伊藤忠彦, 他 : 東京健研年報, 39, 35-42, 1988

### Search for Pathogens in Ticks Collected from Tokyo and the Surrounding Mountainous Areas in 2015

Isao Yoshida<sup>a</sup>, Emiko Kaku<sup>a</sup>, Akane Negishi<sup>a</sup>, Yukihiro Koudo<sup>a</sup>, Yurie Kitamura<sup>a</sup>, Mami Nagashima<sup>a</sup>, Takayuki Shinkai<sup>a</sup>,  
Tetuya Akiba<sup>a</sup>, and Kenji Sadamasu<sup>a</sup>

A case of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) was reported in 2011, leading to this tick-borne infection being re-recognized. In Tokyo, surveillance is routinely undertaken to detect the tick-borne infection tsutsugamushi disease, which is known to occur in the island region. Therefore, the ticks that had been collected in Tokyo in 2005, were searched for several tick-borne infectious pathogens, including SFTS. RNA and DNA were extracted from a pooled sample of 133 ticks, and the SFTS virus (SFTSV), pathogens such as tick-borne encephalitis virus (TBEV), and spotted fever group rickettsia were searched for using real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and nested PCR. There was no evidence of SFTSV, or relapsing fever *Borrelia* 1 in any of samples; however, spotted fever group *Rickettsia* was detected in five ticks. Based on these findings, it is recommended that some precautions are taken when entering areas that are known tick habitats to avoid being parasitized by the ticks.

**Keywords:** Severe fever with thrombocytopenia syndrome, Tick-borne encephalitis, Spotted fever group rickettsia, Relapsing fever, Real-Time PCR, Nested-PCR

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan