

東京都内山間部において採取したマダニ類における病原微生物の検索 (2016年度)

吉田 勲^a, 加来 英美子^a, 根岸 あかね^a, 北村 有里恵^a, 熊谷 遼太^a,
 長島 真美^a, 高橋 久美子^b, 井口 智義^b, 小西 浩之^b,
 新開 敬行^a, 貞升 健志^c

重症熱性血小板減少症候群の起因ウイルス (SFTSV) は、2011年に初めて特定され、現在も西日本を中心にマダニに咬刺され発病する例が新聞などで報道されている。また近年、他のダニ媒介性感染症についても感染地の特定はできないものの患者報告が見られ、これらのダニ媒介性感染症についての検査の必要性は年々高まっている。今回、2016年度に東京都内で採取され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、58件のマダニ検体より、紅斑熱群リケッチア遺伝子が 23件、*Borrelia japonica*類似の遺伝子が1件検出され、SFTSV及びTBEVの遺伝子は検出されなかった。これらの結果から、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ことが重要である。

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, ライム病, リアルタイム-RT-PCR法, Nested-PCR法

はじめに

近年、西日本の各府県においてマダニが媒介する重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の患者発生が新聞などに取り上げられている。2017年4月26日現在累計232名の患者が発生し、内53名の死亡が報告されている。その推定感染地域は、宮崎県をはじめとする九州全域、四国全域、島根県、大阪府、奈良県を除く近畿地域であり、西日本が中心である¹⁾²⁾。また、北海道では2016年8月にダニ媒介性脳炎³⁾ (TBE) により男性が1名死亡し、国内では23年ぶりの患

者の報告となった。TBE起因ウイルスは北海道以外でも野鼠の感染例が島根県で見つかっており⁴⁾、北海道に限ったものではないとの報告がある。マダニは他に、日本紅斑熱、ライム病、回帰熱などの感染症も媒介することが知られている。

既報⁵⁾において2005年に採取され凍結保存されていたマダニ類の病原体検索結果を報告した。今回は、都内水源林 (水道局所管) において採取され、当センター環境衛生研

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	対象病原体 (関連疾患名)	プライマー名	プライマー塩基配列	領域	出典
Realtime RT-PCR	SFTSV (SFTS)	S2-237s	GCAACAAGATCGTCAAGGCATCAGG	S分節	国立感染症研究所
		S2-400a S2-317MGB	TGCTGCAGCACATGTCCAAGTGG 5' FAM-CTGGTTGAGAGGGCA 3' MGB		
	TBEV (ダニ媒介性脳炎)	TBE F	TGGAYTTYAGACAGGAAYCAACACA	NS1	Achazi ら
		TBE R TBE prob	TCCAGAGACTYTGRTCDGTGTGGA 5' FAM-CCCATCACTCCWGTGTCAC 3' MGB		
nested-PCR	紅斑熱群リケッチア (日本紅斑熱など)	Rr17k.1p Rr17k.539n Rr17k.90p Rr17k.539n	TTTACAAAATTCTAAAAACCAT TCAATTCACAACCTTGCCATT GCTCTTGCAACTTCTATGTT TCAATTCACAACCTTGCCATT	17kDa	Mitsuhiro Ishikura ら ⁷⁾
		ボレリア属 (ライム病, 回帰熱)	BflaPAD BflaPDU BflaPBU BflaPCR	GATCARGCWCAAYATAACCAWATGCA AGATTCAAGTCTGTTTGGAAAGC GCTGAAGAGCTTGAATGCAACC TGATCAGTTATCTTAATAGCA	flaB
	エーリキア・アナプラズマ (ヒト単球性エーリキア症, ヒト顆粒球性アナプラズマ症)	ge3a ge10r ge2 ge9f	CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG AACGGATTATCTTTATAGCTTGCT	16S	2014年希少感染症診断技術研修会資料

^a 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科

169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部環境衛生科

^c 東京都健康安全研究センター微生物部

究科にて分類されたマダニ類のダニ媒介感染症原因病原体について検索を行ったので、その結果を報告する。

材 料 と 方 法

1. 供試材料

2016年6月から2017年3月までに水源林（聖滝付近、滝上橋付近）および奥多摩湖周辺の計3か所において引きずり法により採取され、当センター環境衛生研究科において分類されたダニ597匹を供試材料とした。採取日別に種類を分類し15匹（若虫は微小のため上限は設けず）を上限に、プールした58件（オオトゲマダニ 22件、ヤマトマダニ 4件、キチマダニ 7件、ヒゲナガチマダニ20件、ヒトツトゲマダニ3件、フタトゲチマダニ 1件、ヤマトチマダニ1件）を対象とした。

2. マダニからの遺伝子抽出

プールしたマダニを1.5mLのチューブに移し、リン酸緩衝生理食塩水（PBS(-)）pH7.4を200 μ L加えて、電動ディスポーザブルマイクロミキサーにて粉碎した。その粉碎液を5,300g(8,000rpm)10分間遠心分離を行い、その上清140 μ Lを核酸抽出の試料とし、QIAmp Viral RNA mini Kit (QIAGEN)を用いて核酸抽出を行った。

3. 遺伝子検査

抽出した核酸を用いて、リアルタイムRT-PCR法によりSFTSV及びTBEVの検出を行った。また、紅斑熱群リケッチア（Spotted fever group rickettsia : SFGR）、ボレリア属、エーリキア・アナプラズマ、ツツガムシ病リケッチアについてNested PCR法にて検出を行い（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、検出と病原体の同定を行った。検出条件については表1に示す出典に従った。

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の調査によると、複数の種類のマダニ（フタトゲチマダニ、ヒゲナガチマダニ、オオ

トゲチマダニ、キチマダニ、タカサゴキララマダニ）の5～15%からSFTSV ウイルスが検出されたことが報告されている¹¹⁾。今回の調査では、このうちオオトゲチマダニ、キチマダニ、フタトゲチマダニ、ヒゲナガチマダニの4種類のマダニが採取されているが、SFTSV遺伝子はいずれのマダニからも検出されなかった。また、TBEV、ツツガムシ病リケッチア遺伝子も検出されなかった。

一方、オオトゲチマダニから、SFGRの*Rickettsia raoultii*の遺伝子が22件中18件（81.8%）、アナプラズマの一種で反芻獣に発熱等を起こすとされている、*Anaplasma bovis*の遺伝子が22件中1件（4.5%）検出された。キチマダニからも*Rickettsia raoultii*遺伝子が7件中2件（28.6%）、ヒトツトゲマダニからは*Rickettsia helvetica*の遺伝子が3件中3件（100%）検出された。また、ボレリア属として、ライム病起因病原体である*Borrelia burgdorferi*と同族の*Borrelia japonica*に近縁の遺伝子がヤマトマダニから4件中1件（25.0%）検出された。ヒゲナガチマダニ、フタトゲチマダニ、ヤマトチマダニからは今回対象としたダニ媒介性感染症の起因病原体は検出されなかった。

2. 検出されたリケッチア等の遺伝子解析

SFGRの検索では、*Rickettsia raoultii*が最も多く検出された。本リケッチアは、ヨーロッパおよびモンゴル、中国を含むアジアなどに生息するアメリカ犬ダニに寄生していると報告されており、ヒトではフランスのマダニ媒介性リンパ節炎患者より分離報告がある¹²⁾。この疾患はヨーロッパに限定されており、その症状は概ね軽症といわれる。しかし、最近、中国において発疹熱様疾患の患者からこのリケッチアが分離されており、何らかの病原性を持つ可能性が考えられる¹³⁾。また、*Rickettsia helvetica*は、紅斑熱様の疾患を起こすことがヨーロッパ等で報告されている¹⁴⁾。

ボレリア属の検索では、*Borrelia japonica*に近縁の遺伝子がヤマトマダニから検出された。*Borrelia japonica*は静岡県内で発生したライム病様患者の血液から血清学的検査により感染報告された病原体である¹⁵⁾。わが国でのライム病の主な病原体は*Borrelia garinii*、*Borrelia afzelii*とされており、今回の検索では検出されなかった。しかし、ライム病様疾患の報告のある*Borrelia japonica*に近縁のボレリアが東京都の山間部で見つかり、病原性を持つことが示唆さ

表2. マダニが保有していたダニ媒介性感染症病原体検索結果

マダニ種類	検体数	SFTSV	TBEV	SFGR	ボレリア属	エーリキア・アナプラズマ	ツツガムシ病リケッチ
オオトゲチマダニ	22	0	0	18	0	1	0
キチマダニ	7	0	0	2	0	0	0
ヒゲナガチマダニ	20	0	0	0	0	0	0
ヒトツトゲマダニ	3	0	0	3	0	0	0
フタトゲチマダニ	1	0	0	0	0	0	0
ヤマトチマダニ	1	0	0	0	0	0	0
ヤマトマダニ	4	0	0	0	1	0	0

表3. マダニから検出されたダニ媒介性感染症病原体

マダニ種類	検出された病原体
オオトゲチマダニ	<i>Rickettsia raoultii</i> , <i>Anaplasma bovis</i>
キチマダニ	<i>Rickettsia raoultii</i>
ヒトツトゲマダニ	<i>Rickettsia helvetica</i>
ヤマトマダニ	<i>Borrelia japonica</i>

れることから注意が必要である。

今回の検索ではSFTSやTBEの原因となるウイルスは検出されなかった。しかし、SFTSVを保有するマダニは既に山梨県や静岡県などでみつかっており、東京都においても継続的に調査を行う必要があると思われる。また、東京都においては古くから七島熱として知られているツツガムシ病が年間10例程度報告されている。過去には、多摩地域においてツツガムシ病の発生後に野鼠の調査が行われている¹⁶⁾。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ことは必要であると考えられる。また、ダニの生息地においては、マダニ類に咬刺されないような服装や注意喚起についての啓発が一層求められよう。

ま と め

2016年6月から2017年3月に東京都の山間部で採取されたマダニ類の保有するダニ媒介性感染症の病原体について検索を行った。プールした58件のマダニ類から*Borrelia*属病原体1件、紅斑熱群リケッチア23件、アナプラズマ1件を検出した。

今回の検索では重篤な疾患である重症熱性血小板減少症候群、ダニ媒介性脳炎の原因となるウイルスの遺伝子は検出されなかった。

今回検出されたボレリア属病原体、紅斑熱群リケッチアはいずれも典型的な起因病原体ではなかった。しかし、これらの病原体による疾患の患者から検出され数は少ないが報告されている。また、今回は検出されなかったが既報にあるように東京都山間部より採取されたマダニから回帰熱の起因病原体の1つである*Borrelia miyamotoi*が検出されている。これは北海道などでまれに検出され患者の報告もある注目すべき病原体である。これらのことから、今後もマダニ類の病原体保有状況を明らかにするための調査を実施し、結果を公表すると共に、マダニ類に咬刺されないような個人対策を啓蒙することが重要である。

謝 辞

マダニの採取にあたり水道局水源管理事務所技術課ならびに西多摩保健所の関係各位のご協力に深謝いたします。

文 献

- 1) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，**34**, 303-304, 2013.
- 2) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，**35**, 75-76, 2014.
- 3) 国立感染症研究所：ダニ媒介性脳炎とは。
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/434-tick-encephalitis-intro.html> (2017年9月11日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 4) 北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医科学講座 公衆衛生学教室：ダニ媒介性脳炎ウイルスの疫学的研究。
<https://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/pbhealth/research.html> (2017年9月11日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 5) 吉田 勲, 加來英美子, 根岸あかね, 他：東京健安七 年報，**67**, 75-78, 2016.
- 6) 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）
- 7) Choi Y., Jang W., Kim J., et al.: *Emerg. Infect. Dis.*, **11**(2), 237-244, 2005.
- 8) Ergunay, K., Tkachev, S., Kozlova, I., et al.: *Vector-borne zoonot.*, **16**(1), 412, 2016.
- 9) Ishikura, M., Ando, S., Shinagawa, Y., et al.: *Microbiol. Immunol.*, **47**(11), 823-832, 2003.
- 10) 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
- 11) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，**37**, 50-51, 2016.
- 12) Parola, P., Rovero, C., Rolain, J., et al.: *Emerg. Infect. Dis.*, **15**(7), 1105-1108, 2009.
- 13) Jia, N., Zheng, Y., Ma, L., et al.: *Emerg. Infect. Dis.*, **20**(5), 866-868, 2014.
- 14) Nilsson, K., Elfving, K., Pahlson, C.: *Emerg. Infect. Dis.*, **16**(3), 490-492, 2010.
- 15) 増澤俊幸, 柳原保武, 藤田 弘：感染症誌，**70**, 264-267, 1996.
- 16) 新開敬行, 伊藤忠彦, 山崎 清, 他：東京衛研年報，**39**, 35-42, 1988.

The Search for Pathogens in Ticks Collected in the Mountains of Tokyo (April 2016-March 2017)

Isao YOSHIDA^a, Emiko KAKU^a, Akane NEGISHI^a, Yurie KITAMURA^a, Ryouta KUMAGAI^a, Mami NAGASHIMA^a,
Kumiko TAKAHASHI^a, Tomoyoshi IGUCHI^a, Hiroyuki KONISHI^a, Takayuki SHINKAI^a, and Kenji SADAMASU^a

The virus causing severe febrile thrombocytopenic syndrome (SFTSV) was first identified in 2011. Since then, examples of individuals being infected via ticks in western Japan region are commonly reported in the news. In the Tokyo metropolitan area alone, approximately 10 cases of tsutsugamushi disease, caused by tsutsugamushi bite, are annually reported. However, given that infection sites have not been identified for other tick borne infectious diseases, our group has aimed to examine the causes of such diseases. In this study, we performed a variety of pathogen searches on ticks collected in Tokyo in the year 2016. Search methods applied include SFTSV, tick-borne encephalitis virus (TBEV), and erythrocytic rickettsia using real-time RT-PCR and nested-PCR. Through these tests, we detected 23 cases of erythema thermophilia rickettsia and other organisms from 58 tick specimens, and one case of *Borrelia* was detected from Lyme disease patients. Interestingly, SFTSV and TBEV were not detected from the specimens. Our results support the notion that preventive measures for these diseases should focus on the prevention of tick bites.

Keywords: Severe febrile thrombocytopenia syndrome, tick-borne encephalitis, Spotted fever group rickettsia, Lyme disease, real-time RT-PCR method, nested-PCR method

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan