

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 (2017年度)

吉田 勲^a, 加来 英美子^a, 根岸 あかね^a, 鈴木 愛^a, 内田 悠太^a,
 長谷川 道弥^a, 長島 真美^a, 森 功次^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

我が国におけるマダニ媒介性の疾患としては、2011年に病原ウイルスが中国で特定された重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) や23年ぶりに北海道で患者が報告されたダニ媒介性脳炎 (TBE) が注目されている。また、2017年には東京都近県で日本紅斑熱による死亡例が報告されるなど、ダニ媒介性感染症の重要度は高くなっている。

今回、2017年度に東京都内山間部において採取されたマダニ類から、リアルタイムRT-PCR法及びnested-PCR法によるSFTSウイルス、TBEウイルス及び紅斑熱群リケッチア等の病原体検索を行った。その結果、SFTSウイルス及びTBEウイルスの遺伝子は検出されなかったが、79件のマダニ検体より、紅斑熱群リケッチア遺伝子が27件、*Borrelia japonica*類似の遺伝子が3件、牛アナプラズマの遺伝子が1件検出された。以上の結果から、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必要があると考えられた。

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, 日本紅斑熱, ライム病, リアルタイムRT-PCR法, nested-PCR法

はじめに

マダニ媒介性の疾患として、西日本において重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の患者発生が毎年報告されており¹⁾, SFTS 起因ウイルス (SFTSV) は日本各地のマダニから検出されている。ダニ媒介性脳炎 (TBE) はユーラシア大陸において広域に発生しており、1990年代前半までは日本に存在しないと考えられていたが、1993年に初めて北海道で患者が発生した。それ以後、発生はなかったが2016年8月にTBEの死亡例が報告された²⁾。TBE 起因ウイルス (TBEV) は北海道以外でも野鼠の感染例が島根県で報告され、北海道に限ったものではない³⁾。また、静岡県では2017年9月に静岡県東部地域において5例の日本紅斑熱患者が発生し⁴⁾, その内2例が死亡した。日本紅斑

熱の病原体はリケッチア (*Rickettsia japonica*) で我が国では1994年頃までは年間10~20名程度の患者発生があったが、1995年頃より増加し、1999~2001年には年間40名近くの患者発生が認められている。マダニが媒介する感染症としては、この他に *Borrelia* 属病原体によるライム病、回帰熱等が知られている。このようにマダニ媒介性の疾患は多種にわたり、自然界のマダニの病原体調査は重要である。

既報⁵⁾において2016年に都内水源林 (水道局所管) において採取されたマダニ類の病原体検索結果を報告した。今回、同地で採取され、当センター環境衛生研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。

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・プローブ	塩基配列	領域	出典
Realtime RT-PCR	SFTSV (SFTS)	S2-237s S2-400a S2-317MGB	GCAACAAGATCGTCAAGGCATCAGG TGCTGCAGCACATGTCCAAGTGG 5' FAM-CTGGTGTGAGAGGGCA 3' MGB	S分節	国立感染症研究所
	TBEV (ダニ媒介性脳炎)	TBE F TBE R TBE prob	TGGAYTTYAGACAGGAAYCAACACA TCCAGAGACTYTGRCDGTGTGGA 5' FAM-CCCATCACTCCWGTGTCAC 3' MGB	NS1	Achazi ⁶⁾
nested-PCR	紅斑熱群リケッチア (日本紅斑熱など)	Rr17k.1p Rr17k.S39n Rr17k.90p Rr17k.S39n	TTTACAAAATCTAAAAACCAT TCAATTCACAACCTGCCATT GCTCTGCAACTTCTATGTT TCAATTCACAACCTGCCATT	17kDa	Ishikura ⁶⁾
	ボレリア属 (ライム病, 回帰熱)	BflaPAD BflaPDU BflaPBU BflaPCR	GATCARGCWCAAYATAACCAWATGCA AGATTCAAGTCTGTTTTGGAAAGC GCTGAAGAGCTTGGAAATGCAACC TGATCAGTTATCATTCTAATAGCA	flaB	国立感染症研究所 ⁷⁾
	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 TTCGGTTAAGAAGGATCTAATCTCC GGCAGTATTAAGAAGCAGCTCCAGG 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研究科

^c 東京都健康安全研究センター微生物部

材 料 と 方 法

1. 供試材料

2017年6月から2018年3月までに水源林及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913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79件（ヒゲナガチマダニ 28件、オオトゲチマダニ 21件、キチマダニ 10件、ヤマトマダニ 9件、ヒトツトゲマダニ 6件、フタトゲチマダニ 3件、ハシブトマダニ 1件、アカコッコマダニ 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、電動ディスポーサブルマイクロミキサーにて粉碎した。粉碎後、5,300 g（8000rpm）にて10分間遠心分離を行った。その上清140 μ Lを核酸抽出の試料とし、QIAmp Viral RNA mini Kit(QIAGEN)を用い核酸を抽出した。

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、nested-PCR法により紅斑熱群リケッチア（Spotted fever group rickettsia : SFGR）、ライム病ボレリア及びエーリキア・アナプラズマ、ツツガムシ病リケッチアの検出を行った。検出した遺伝子は塩基配列を決定しNCBIのBlast解析により病原体の同定を行った。使用したプライマー及びプローブについては表1に示した。

結 果 及 び 考 察

1. マダニの遺伝子検査結果

マダニによる媒介性感染症の原因病原体遺伝子検査6項目の結果を表2、ダニ種別の検出結果を表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）からSFTSVが検出さ

れている^{9,10}。今回の調査では、そ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。

ヒトツトゲマダニ、ハシブトマダニからは紅斑熱群リケッチアの一種である*Rickettsia helvetica*遺伝子が7プール中5件(71.4%)で検出された。また、今回の調査ではフタトゲチマダニより日本紅斑熱の原因病原体である*Rickettsia japonica*に類似の遺伝子が3プール中1件(33.3%)で検出された。また、SFGRの1つである*Rickettsia raoultii*遺伝子がフタトゲチマダニ、オオトゲチマダニ、キチマダニ、ヒゲナガチマダニから計62プール中21件(33.9%)で検出された。

ボレリア属として*Borrelia japonica*類似の遺伝子がヤマトマダニより9プール中3件(33.3%)で検出された。また、アナプラズマの一種で牛など反芻獣に発熱などの病原性があるとされている*Anaplasma bovis*遺伝子がキチマダニより10プール中1件(10.0%)で検出されたが、アカコッコマダニからは、ダニ媒介性感染症の原因となる病原体遺伝子は検出されなかった(表2)。ヤマトマダニ、アカコッコマダニを除くその他のマダニからは、何らかのリケッチア属が検出されている。

2. 検出されたリケッチア等の遺伝子解析

SFGRの遺伝子検索では、*R.raoultii*が最も多く検出された。本リケッチアは、ヨーロッパや中国を含むアジア圏での熱性疾患の患者より分離報告があり¹¹⁻¹³、何らかの病原性があることが考えられる。今回の調査でも、ヒゲナガチマダニ、オオトゲチマダニ、キチマダニ等の複数の種類から検出された。最も多く検出されたオオトゲチマダニでは21検体中15件（71.4%）で検出された。また、*R.helvetica*はSFGRに属するリケッチアで、紅斑熱様の疾患を起こすことがヨーロッパなどで報告されており¹⁴、日本においても2006年に国内で初めて有症事例の病原体として報告されている¹⁵。今回の調査ではヒトツトゲマダニ6検体中4件（66.7%）とハシブトマダニ1検体（100%）からそれぞれ検出された。さらに、今回の調査で初めて*R. japonica*に類

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

	検体数	SFTSV	TBEV	紅斑熱群 リケッチア	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
ヒゲナガチマダニ	28	0	0	2	0	0	0
オオトゲチマダニ	21	0	0	15	0	0	0
キチマダニ	10	0	0	3	0	1	0
ヤマトマダニ	9	0	0	0	3	0	0
ヒトツトゲマダニ	6	0	0	4	0	0	0
ハシブトマダニ	1	0	0	1	0	0	0
フタトゲチマダニ	3	0	0	2	0	0	0
アカコッコマダニ	1	0	0	0	0	0	0
合計	79	0	0	27	3	1	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	
ヒゲナガチマダニ	<i>R.raoultii</i>	
オオトゲチマダニ	<i>R.raoultii</i>	
キチマダニ	<i>R.raoultii</i>	<i>A.bovis</i>
ヤマトマダニ	<i>B.japonica</i>	
ヒトツトゲマダニ	<i>R.helvetica</i>	
ハシブトマダニ	<i>R.helvetica</i>	
フタトゲチマダニ	<i>R.japonica</i>	<i>R.raoultii</i>

似の遺伝子がフタトゲチマダニより検出された。このリケッチアを媒介するダニはフタトゲチマダニ、キチマダニ、ヤマトマダニなどといわれている。また、関東圏での日本紅斑熱は神奈川県、千葉県と静岡県で発生が報告されている¹⁶⁾。静岡県では2017年秋に日本紅斑熱の患者発生が報告され死亡例もあった。

ボレリア属の検索では、*B.japonica*に近縁の遺伝子配列がヤマトマダニから9検体中3件（33.3%）検出された。*B.japonica*は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がその病原性は低いとされている¹⁷⁾。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¹⁸⁾。今回の検索では検出されなかった。

今回、SFTSやTBEの原因となるウイルスの検出はなかった。しかし、日本紅斑熱の原因病原体である*R.japonica*に類似の遺伝子が少数ではあるが検出された。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例程度報告されており、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た¹⁹⁾。このような地域に密着した実態調査は重要であり、今後も東京都において継続的にマダニについて病原体保有状況の調査を行う必要があると思われる。

感染症を媒介するマダニは幼虫、若虫、成虫のいずれも哺乳動物を吸血する。そのため、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重要であると考えられる。

ま と め

2017年6月から2018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79件のマダニ類からSFGRリケッチア27件、*Borrelia*属病原体3件、アナプラズマ1件などを検出した。今回の検索では重篤な疾患であるSFTS、TBEの原因となるウイルスの遺伝子は検出されなかったが、日本紅斑熱の原因となる*R.japonica*に類似の遺伝子を検出した。

また、今回検出されたボレリア属病原体、*R.japonica*以外の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い。しかし、これらの病原体による疾患が数は少ないが報告されている。以上のことから、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

マダニの採取などにあたり、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を深謝いたします。

文 献

- 1) 国立感染症研究所感染症疫学センター：重症熱性血小板減少症候群（SFTS）とは、
<http://www.mhlw.go.jp/niid/ja/sfts/3143-sfts.html> (2017年8月7日現在, なお本 URL は変更または抹消の可能性はある)
- 2) 国立感染症研究所感染症疫学センター：ダニ媒介性脳炎とは、
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/434-tick-encephalitis-intro.html>(2018年8月7日現在, なお本 URL は変更または抹消の可能性はある)
- 3) 北海道大学大学院獣医学研究科 環境獣医学講座 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> (2018年8月7日現在, なお本 URL は変更または抹消の可能性はある)
- 4) 静岡新聞NEWS：マダニ感染症,
<http://www.at-s.com/news/artical/shizuoka/409976.html>
(2018年7月7日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 5) Achazi, K., Nitsche, A., Patel, P., et al.: *J. Virol. Method*, **171**, 34-39, 2011.
- 6) Ishikura, M., Ando, S., Shinagawa, Y., et al.: *Microbiol. immunol.* **47(11)**, 823-832, 2003.
- 7) 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
- 8) 吉田 勲, 加來英美子, 根岸あかね, 他：東京健安研七 年 報, **68**, 61-64, 2017.
- 9) 国立感染症研究所感染症疫学センター：病原微生物検出情報, **35**, 31-32, 2014.

- <https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr/2241-infectious-diseases/disease-based/sa/sfts/idsc/iasr-topic/4410-tpc408-j.html> (2018年8月7日現在, なお本 URL は変更または抹消の可能性がある)
- 10) 森川 茂, 木村昌伸, 朴 ウルシル, 他: 病原微生物検出情報, **37**, 50-51, 2016.
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-sp/2342-related-articles/related-articles-433/6319-dj4339.html> (2018年8月7日現在, なお本 URL は変更または抹消の可能性ある)
- 11) Parola, P., Rovero, C., Rolain, J. M., *et al.*: *Emerg. Infect. Dis.*, **15**, 1105-1108, 2009.
- 12) Mediannikov, O., Matsumoto, K., Samoylenko, I., *et al.*: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **58**, 1635-1639, 2008.
- 13) Jia, N., Zheng, Y., Ma, L., *et al.*: *Emerg. Infect. Dis.*, **20**, 866-868, 2014.
- 14) 国立感染症研究所感染症疫学センター: 感染症発生動向調査週報, **25**, 11-15, 2002.
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/448-jsf-intro.html> (2018年8月7日現在, なお本 URL は変更または抹消の可能性がある)
- 15) 高田伸弘, 石畝 史, 藤田博己: 病原微生物検出情報, **27**, 40-41, 2006.
<https://idsc.nih.go.jp/iasr/27/312/dj312a.html> (2018年8月7日現在, なお本 URL は変更または抹消の可能性ある)
- 16) Akter, A., Ooka, T., Gotoh, Y., *et al.*: *Genome Biol. Evol.*, **9(1)**, 124-133, 2017.
- 17) Nilsson, K., Elfring, K., Pahlson, C.: *Emerg. Infect. Dis.*, **16**, 490-492, 2010.
- 18) 増澤俊幸, 柳原保武, 藤田 弘: 感染症誌, **70**, 264-267, 1996.
- 19) 新開敬行, 伊藤忠彦, 山崎 清, 他: 東京衛研年報, **39**, 35-42, 1988.

Search for Pathogens in ticks collected from mountains around Tokyo (June 2017_March 2018)

Isao YOSHIDA^a, Emiko KAKU^a, Akane NEGISHI^a, Ai SUZUKI^a, Yuta UCHIDA^a, Michiya HASEGAWA^a,
Mami NAGASHIMA^a, Kohji MORI^a, Kumiko TAKAHASHI^a, Tomoyoshi IGUCHI^a, Hiroyuki KONISHI^a,
Takayuki SHINKAI^a and Kenji SADAMASU^a

Infectious diseases transmitted by ticks should be actively monitored as exemplified by the case of severe febrile thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) identified in 2011, by the tick-borne encephalitis (TBEV) reported in Hokkaido for the first time in 1993. And by the deaths due to Japanese spotted fever reported in Shizuoka prefecture near Tokyo. Therefore, monitoring tick-borne infectious diseases is crucial. We searched for sequences of pathogens, SFTSV, TBEV and Spotted fever group Rickettsia using real-time PCR and nested PCR from ticks collected from the mountains in Tokyo. As a result, we obtained 27 Rickettsia sequences, 3 sequences similar to *Borrelia japonica* and 1 sequence of *Anaplasma* from 79 tick specimens, but we did not detect any SFTSV or TBEV sequences. From these results, we recommend that people wear protective clothing to prevent getting bitten by ticks that carry pathogens.

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

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

