

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 (2018年度)

吉田 勲^a, 加來 英美子^a, 鈴木 愛^a, 内田 悠太^a,
森 功次^a, 千葉 隆司^a, 貞升 健志^b

マダニが媒介する致死性の感染症は、2011年に原因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 (Severe fever with thrombocytopenia syndrome :SFTS) や、2016年に北海道で23年ぶりに患者が報告されたダニ媒介性脳炎(Tick-borne encephalitis :TBE)が注目されている。今回、2018年度に東京都内山間部において採取されたマダニ類を用いて、nested-PCR法により紅斑熱群リケッチアやライム病の病原体であるボレリア属などの病原体検索を行った。その結果、紅斑熱群リケッチア遺伝子が10件、ボレリア属の遺伝子が1件検出された。病原性が高いリケッチアやボレリアの遺伝子は検出されなかったが、何らかの微生物を保有しているマダニが生息していた。そのため、これらの地域に入る際は、マダニに刺咬されないように予防策を徹底する必要がある。

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，日本紅斑熱，ライム病，PCR法，nested-PCR法

はじめに

西日本を中心に、マダニが媒介する重症熱性血小板減少症候群(Severe fever with thrombocytopenia syndrome :SFTS)の患者発生が毎年報告されている¹⁾。2019年、東京都においても西日本(長崎県)を旅行した男性の患者が初めて報告された²⁾。ダニ媒介性脳炎(Tick-borne encephalitis :TBE)は1993年に初めて北海道で患者が発生し、23年後の2016年8月に再びTBEの患者が届出され、後に死亡が報告された³⁾。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、北海道に限ったものではないとの報告がある⁴⁾。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、そのうち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報告されている。発生地域は鹿児島県、宮崎県、高知県、徳島県、兵庫県、島根県、和歌山県、三重県、神奈川県、千葉県などであったが、近年では広島県、長崎県、静岡県でも確認されている⁵⁾。マダニが媒介する感染症は、このほかにライム病、回帰熱などが知られている。

表1. マダニ類の遺伝子検査に使用したプライマー

方法	対象病原体 (関連疾患名)	領域	プライマー名	プライマー配列	出典
nested-PCR	紅斑熱群リケッチア (日本紅斑熱など)	17kDa	Rr17k.1p	TTTACAAAATTCTAAAAACCAT	Mitsuhiro Ishikura ⁶⁾
			Rr17k.539n	TCAATTCACAACCTTGCCATT	
			Rr17K.90P	GCTCTTGCAACTTCTATGTT	
			Rr17k.539n	TCAATTCACAACCTTGCCATT	
	gltA	RP-F	GGGACCTGCTCACGGCGG	Yeon-Joo Choi ⁷⁾	
		RP-R	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA		
		IN-F	GGCTAATGAAGCGGTAATAA		
		IN-R	CGTGCTATTGCAAAAAGTAC		
	ボレリア属 (ライム病、回帰熱など)	flaB	BflaPAD	GATCARGCWCAAYATAACCAWATGCA	国立感染症研究所 ⁸⁾
			BflaPDU	AGATTCAGTCTGTTTTGGAAAGC	
BflaPBU			GCTGAAGAGCTTGAATGCAACC		
BflaPCR			TGATCAGTTATCATTCTAATAGCA		
エーリキア・アナプラズマ	16S	ge3a	CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC	2014年希少感染症診断 技術研修会資料	
		ge10r	TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC		
		ge2	GGCAGTATTAAGAAGCAGTCCAGG		
		ge9f	AACGGATTATCTTTATAGCTTGCT		
PCR	マダニ分類	ミトコリア	mt-rns1 mt-rns2	CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG CCGGTCTGAACTCAGATCAAGTA	高野 愛 ⁹⁾

^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微生物部

表2. マダニ試料の遺伝子検索結果とリケッチア等微生物遺伝子検索結果

	No.	大きさ	匹数	遺伝子検索結果	和名	検出されたリケッチア等微生物遺伝子
6月	1	若ダニ	4	<i>Haemaphysalis japonica</i>	ヤマトチマダニ	<i>Rickettsia raoultii</i> <i>Borrelia</i> sp.
	2	成ダニ	1	<i>H. megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	
	3	若ダニ	2	<i>H. megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	<i>R. raoultii</i>
	4	幼ダニ	12	<i>H. megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	
8月	5	幼ダニ	11	<i>H. longicornis</i>	フタトゲチマダニ	<i>R. raoultii</i>
	6	幼ダニ	28	<i>H. megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	<i>R. raoultii</i>
	7	成ダニ	1	<i>H. megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	
10月	8	成ダニ	1	<i>H. megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	<i>R. raoultii</i>
	9	成ダニ	1	<i>H. kitaokai</i>	ヒゲナガチマダニ	
	10	若ダニ	6	<i>H. megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	<i>R. raoultii</i>
	11	若ダニ	6	<i>H. megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	<i>R. raoultii</i>
	12	幼ダニ	14	<i>H. japonica</i>	ヤマトチマダニ	<i>R. raoultii</i>
12月	13	若ダニ	4	<i>H. kitaokai</i>	ヒゲナガチマダニ	
	14	若ダニ	1	<i>Ixodes monospinosus</i>	ヒトツトゲマダニ	
	15	成ダニ	1	<i>H. japonica</i>	ヤマトチマダニ	
	16	幼ダニ	16	<i>H. japonica</i>	ヤマトチマダニ	<i>R. raoultii</i>
	17	幼ダニ	7	<i>H. megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	<i>R. raoultii</i>

我々は、既報^{10,11)}において2016年度、2017年度に都内水源林（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。これまで、SFTS 起因ウイルスやTBE 起因ウイルスを保有しているマダニは検出されることはなかったが、日本紅斑熱の原因である *R. japonica* 類似遺伝子を検出した。

今回の調査では、同地で採取されたマダニ類について、リケッチア、ボレリア属などの病原体検索を行ったので、その結果を報告する。

材料と方法

1. 供試材料

2018年6, 8, 10, 12月に水源林（西多摩郡奥多摩町聖滝付近）で引きずり法により採取されたものを供試材料とした（当センター環境衛生研究科が担当）。採取されたマダニを肉眼で大きさを揃え、実体顕微鏡下で同じ種類のものを滅菌チューブにプールし、これらプールした17件を対象とした。

2. マダニからの遺伝子抽出

プールしたマダニにリン酸緩衝生理食塩水（PBS（-）：pH7.4）を400 μ L加え、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分間遠心分離を行い、その上清200 μ Lを核酸抽出の試料としてQIAmp DNA mini Kit(QIAGEN)を用いて核酸を抽出した。

3. 遺伝子検査

抽出した核酸について、nested-PCR法を用いて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。なお、使用したプライマーについては表1に示した。

これとあわせ、抽出した核酸を用いてマダニの種鑑別も試みた。

結果及び考察

1. 遺伝子検査結果

マダニの遺伝子による鑑別、及びダニによる媒介性感染症の病原体遺伝子検査結果を表2に示した。

昨年の調査までは採取場所が3ヶ所であり、ダニの種類は8種類と多く見られたが、今回はオオトゲチマダニが大部分を占め、その中にヤマトチマダニ、フタトゲチマダニ、ヒゲナガチマダニやヒトツトゲマダニが散見された。

また、SFGRの1つである *Rickettsia raoultii* 遺伝子はオオトゲチマダニ9件中6件（66.7%）、ヤマトチマダニ2件中2件（100%）、フタトゲチマダニ1件中1件（100%）検出された。さらに、ボレリア属として *Borrelia* sp. 遺伝子がヤマトチマダニから2件中1件（50.0%）検出された。なお、今回の遺伝子検索ではエーリキアやアナプラズマなどの遺伝子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の遺伝子検索では、*R. raoultii* が最も多く検出された。マダニの病原体検索は2016年から行っているが¹¹⁾、*R. raoultii* 遺伝子が最も多く検出される。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からの分離報告があり^{12,13)}、今回の調査でもヒゲナガチマダニ、オオトゲチマダニ、ヤマトチマダニ、フタトゲチマダニなどのダニから検出された。検出されたリケッチア遺伝子は、17kDa共通抗原領域での検索では *R. raoultii* isolate Wuwei-Ha-23 株（塩基一致率99%）に類似していたが、別の領域（*glTA* 領域）で検索を行うと *Rickettsia* sp. Mie201（塩基一

致率99%以上)に類似していた。この *Rickettsia* sp.Mic201 は, *Rickettsia principis*に近縁とされている¹⁴⁾。このため, 中国などで熱性疾患患者からの分離報告されている *R. raoultii*とはやや異なる性質があると考えられる。しかし, SFGRに属する *R.principis*に類似していることから, 何らかの病原性も考えられている¹⁴⁾。

また, 今回は検出されなかったが, 日本紅斑熱の病原体である *R. japonica*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。この中でフタトゲチマダニが数は少ないものの今回採取された。昨年度の調査においてフタトゲチマダニから, 本リケッチア遺伝子が検出されていることから注意が必要と考える。

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¹⁵⁾。静岡県では2017年秋に日本紅斑熱の患者発生が報告された。

ボレリア属の検索では, *Borrelia* sp.の遺伝子配列がヤマトチマダニから2検体中1件 (50.0%) 検出されたが, その病原性については不明である。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¹⁶⁾今回の検索では検出されなかった。

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が重要と考える。

ま と め

2018年6月から2018年12月に東京都の山間部で採取されたマダニ類が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17件のマダニ類からボレリア属1件, SFGR10件を検出した。

今回の検索では重篤な疾患である日本紅斑熱やライム病の原因となるリケッチアやボレリアの遺伝子は検出されなかった。

検出されたSFGRやボレリアは, いずれも典型的な紅斑熱やライム病の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が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日本紅斑熱の起因病原体である *R.japonica*や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の実施と結果の公表を行うと共に, マダニ類に咬刺されないような個人対策を啓発することが重要である。

謝 辞

マダニの採取などにご協力いただいた当センター環境衛生研究科, 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に深謝いたします。

文 献

- 1) 国立感染症研究所：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6月17日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 2) 東京都福祉保健局：重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の発生について, 東京都福祉保健局報道資料。
<http://www.metro.tokyo.jp/tosei/hodohappyo/press/2019/05/16/12.html> (2019年8月29日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 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> (2019年8月29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> (2019年8月29日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 5) 国立感染症研究所：日本紅斑熱とは。
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/448-jsf-intro.html> (2019年8月29日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 6) Ishikura, M., Ando, S., Shinagawa, Y., et al.: *J. Virol. Method. Immunol.* ,**47(11)**,823-832, 2003.
- 7) CDC:Spotted Fever Group and Typhus Group Rickettsioses in Humans,South Korea, *Emerging Infection Diseases*,11,**2**,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) 高野 愛, 他：遺伝子型別によるマダニ種同定方法。
http://www.maff.go.jp/j/budget/yosan_kansi/sikkou/tokutei_keihi/seika_H29/h29itaku_seika_ippan/attach/pdf/index-16.pdf (2019年8月29日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 10) 吉田 勲, 加來英美子, 根岸あかね 他：東京都健安研七 年 報, **68**,61-64,2017.
- 11) 吉田 勲, 加來英美子, 根岸あかね 他：東京都健安研七 年 報, **69**,65-69,2018.
- 12) CDC: Rickettsia slovacica and R.raoultii in Tick-borne Rickettsioses, *Emerging Infections Diseases*,15,7,2009.
- 13) Mediannikov, O., Matsumoto, K., Samoylenko, I., et al.: *Int J Syst Evol Microbiol.*,**58**,1635-1639,58,2008.
- 14) CDC:Rickettsia in Ticks,Japan,2007-2011, *Emerging Infections Diseases*,**19**,2,2013.
- 15) Akter, A., Ooka, T., Gotoh, Y., et al.: *Genome Biol. Evol.*, **9**, 124-133, 2017.

- 16) 増澤俊幸, 柳原保武, 藤田 弘 : *Borrelia japonica* 感染が疑われるライムボレリア症の 1 例, 感染症誌, **70**,264-267,1996.

Evaluation of pathogens in ticks collected from mountains in Tokyo (April 2018_March 2019)

Isao YOSHIDA^a, Emiko KAKU^a, Ai SUZUKI^a, Yuta UCHIDA^a, Kohji MORI^a,
Takashi CHIBA^a, and Kenji SADAMASU^a

Infections caused by ticks are associated with severe fever thrombocytopenia syndrome (SFTS), identified in China as a pathogenic virus in 2011, and tick-borne encephalitis (TBE). A patient presented with a tick-borne infection for the first time in 23 years in Hokkaido. This suggests that tick-borne infectious diseases still pose public health threats. We used the nested-PCR method to search for some pathogens such as the spotted fever group Rickettsiae and Borrelia (a pathogen of Lyme disease) from ticks collected in the inner mountainous areas in Tokyo in 2018.

As a result, 10 cases of spotted fever group rickettsial gene and a case of Borrelia gene were detected. Although no sequences were detected to indicate the presence of highly pathogenic Rickettsiae or Borrelia, ticks carrying some microorganisms were found. These results suggest that, when entering the inner mountainous areas, it is necessary to thoroughly implement preventive measures in order to avoid tick bites.

Keywords: 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

