

## 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 (2019年度)

吉田 勲<sup>a</sup>, 加来 英美子<sup>b</sup>, 鈴木 愛<sup>b</sup>, 内田 悠太<sup>b</sup>,  
森 功次<sup>b</sup>, 千葉 隆司<sup>b</sup>, 横山 敬子<sup>a</sup>, 貞升 健志<sup>c</sup>

マダニが媒介する致死性の感染症として、2011年に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) , 2016年に北海道で患者が報告されたダニ媒介性脳炎(Tick-borne encephalitis :TBE) や日本紅斑熱などが注目されている。今回、2019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、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マダニ媒介感染症に關与する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4件、アナプラズマ遺伝子が1件検出され、ボレリア属の遺伝子は検出されなかった。検出された紅斑熱群リケッチア遺伝子のうち、1件は病原性があるとされる*Rickettsia helvetica* 遺伝子であった。今回採取されたマダニの中に、病原性を持つ微生物を保有するマダニが確認されたことから、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，リアルタイムPCR法，nested-PCR法

イムPCR法， nested-PCR法

### はじめに

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) は、西日本を中心に、患者発生が毎年報告されている<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>。TBE 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<sup>4)</sup>。また、日本紅斑熱は2017年9月に静岡県東部地域において5例の患者が発生し、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1999~2006年頃までは年間40~60名程度の患者数で推移していたが、2008年頃より増加し、2014~2018年には年間200~340名近くの患者発生が報告されている<sup>5)</sup>。発生地域は鹿児島県、宮崎県、高知県、

表1. マダニの病原体検索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 <sup>5)</sup>	
			Rr17k.539n	TCAATTCACAACCTTGCCATT		
			Rr17K.90P	GCTCTTGCAACTTCTATGTT		
			Rr17k.539n	TCAATTCACAACCTTGCCATT		
		<i>gltA</i>		RP-F	GGGGACCTGCTCACGGCGG	Yeon-Joo Choi <sup>7)</sup>
				RP-R	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA	
				IN-F	GGCTAATGAAGCGGTAATAA	
				IN-R	CGTGCTATTGCAAAAAGTAC	
	ボレリア属 (ライム病、回帰熱など)	<i>flaB</i>		BflaPAD	GATCARGCWCAAYATAACCAWATGCA	国立感染症研究所 <sup>8)</sup>
				BflaPDU	AGATTC AAGTCTGTTTTGGAAAGC	
BflaPBU				GCTGAAGAGCTTGGAATGCAACC		
BflaPCR				TGATCAGTTATCATTCTAATAGCA		
ユーリキア・アナプラズマ	16S		gc3a	CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC	2014年希少感染症診断 技術研修会資料	
			gc10r	TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC		
			gc2	GGCAGTATTTAAAAGCAGCTCCAGG		
			gc9f	AACGGATTATCTTTATAGCTTGCT		

<sup>a</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  
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

<sup>b</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>c</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部

表 2. マダニ類のダニ媒介感染症病原体遺伝子検索結果

	検体数	リケッチア属	ボレリア属	エーリキア・ アナプラズマ	検出されたリケッチア等微生物遺伝子 (検出数)
6月	3	1	0	1	<i>R.helvetica</i> (1) <i>R.raoultii</i> (1) <i>Anaplasma</i> sp. (1)
8月	7	2	0	0	<i>R.raoultii</i> (2)
10月	9	0	0	0	

徳島県、兵庫県、島根県、和歌山県、三重県、神奈川県、千葉県であり、近年では広島県、長崎県、静岡県でも確認されている<sup>9)</sup>。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おり、近年ではライム病は年間10~20名程度、回帰熱は年間7、8名程度発生している。

我々は、既報<sup>10,11)</sup>において2017、2018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 ウイルスやTBE ウイルスがマダニから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* 類似遺伝子は検出されている。

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い、併せて検出されたリケッチアの培養を試みたので、その結果を報告する。

## 材料及び方法

### 1. 供試材料

2019年6、8、10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(1プール20匹まで)して19件の試料とした。

### 2. マダニからの遺伝子抽出

試料にリン酸緩衝生理食塩水(PBS(-): pH7.4)を400  $\mu$ 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 (8000 rpm)にて10分間遠心分離を行い、その上清200  $\mu$ 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。

### 4. リケッチアの分離培養

単層培養したL929細胞、Vero E6細胞およびVero細胞に<sup>12)</sup>、遺伝子抽出に用いたマダニの粉碎溶液をそれぞれ100

$\mu$ L接種し、60分吸着の後、2%FBS添加E-MEM培地を加え、36°C5%CO<sub>2</sub>存在下で培養をおこなった。7日後にヒメネス染色を行い、細胞内のリケッチア粒子を顕微鏡にて観察をおこなった。

## 結果及び考察

### 1. 遺伝子検索の結果

マダニが媒介する病原体の遺伝子検索結果を表2に示した。

今回の調査で採取されたマダニは、幼虫と思われる小型のものが多かったが、紅斑熱群リケッチアの1つである*Rickettsia helvetica*遺伝子が19件中1件(5.3%)、*R.raoultii*遺伝子が19件中3件(15.8%)検出され、その他、*Anaplasma* sp.遺伝子19件中1件(5.3%)が検出された。ボレリア属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解析

我々は、2016年からマダニの病原体検索を行っており<sup>11)</sup>、紅斑熱群リケッチアの17kDa領域の遺伝子による検索では、*R. raoultii*遺伝子が最も多く検出されている。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患者からの検出報告がある<sup>13,14)</sup>。しかし、検出された*R. raoultii*を*gltA*領域で解析すると、*Rickettsia* sp.Mie201(塩基一致率99%以上)への類似が確認され、この*Rickettsia* sp.Mie201は、*Rickettsia principis*に近縁とされている<sup>15)</sup>。このため、中国などで熱性疾患患者から分離報告されている*R. raoultii*とは異なる性質があると考えられた。

また、今回検出された*R.helvetica*はヒトへの病原性が報告されており<sup>16)</sup>、本リケッチア遺伝子を持つマダニが検出されていることから注意が必要と考える。

### 4. リケッチアの分離培養結果

*R.helvetica*および*R.raoultii*遺伝子が検出されたマダニ粉碎溶液を試料としてL929細胞、Vero細胞およびVero E6細胞の3種の細胞に接種し、培養に最適な細胞種を検討した。L929細胞はツツガムシ病リケッチア、Vero細胞は日本紅斑熱リケッチアを培養するために最も多く用いられている細胞である。

検討の結果、*R.helvetica*遺伝子陽性の試料を用いた分離培養では、いずれの細胞でもリケッチア様粒子は観察できず、培養上清を対象としたnested-PCRでもリケッチア遺伝子は検出されなかった。一方、*R.raoultii*遺伝子陽性の試料では、L929細胞による培養ではリケッチア様粒子を観察

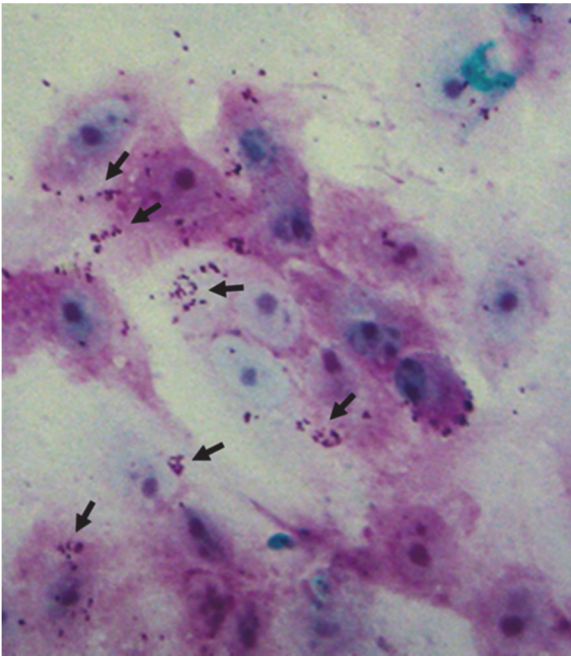


写真1. Vero 細胞中のリケッチア様粒子 (矢印)

することができず、培養上清中にリケッチア遺伝子は検出されなかった。VeroおよびVero E6細胞では、その細胞中にリケッチア様粒子が観察され、培養上清中にリケッチア遺伝子も検出できた。その後、継代を重ねた結果、Vero E6細胞では3代目でリケッチア様粒子は消失したが、Vero細胞では13代目まで細胞内のリケッチアを確認している。

13代継代したリケッチア様粒子をヒメネス染色した結果を写真1に示す。これらのことから*R.raoultii*様株の分離培養にはVero細胞が適していることが判明した。今回分離培養に至らなかった*R.helvetica*については、培養法についてさらに検討しなければならない。

本調査でも何らかのリケッチアを保有しているマダニが検出され、検出数は少なかったものの病原性を持つとされる*R.helvetica*遺伝子が検出された。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

2019年6月から2019年10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19件のマダニ類からSFGR遺伝子4件を検出した。今回の検索では感染症法上に規定される疾患である日本紅斑熱やライム病の原因となる病原体の遺伝子は検出されなかった。

今回検出されたSFGRは、いずれも典型的な紅斑熱の起因病原体ではなかったが、病原性が報告されていリケッチアがあった。

また、既報<sup>10)</sup>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継続的に実施する必要があり、都内においても山間部に入る場合には、マダニ類に咬刺されないような個人対策が重要と思われる。

**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> (2020年6月15日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 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> (2020年6月15日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 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> (2020年6月15日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 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> (2020年6月15日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 5) 国立感染症研究所：発生動向調査年別報告数一覧。  
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/ydata/8114-report-ja2017-20.html> (2020年6月15日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 6) 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> (2020年6月15日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 7) Ishikura, M., Ando, S., Shinagawa, Y., et al.: *J. Virol. Method. Immunol.*, **47(11)**, 823-832, 2003.
- 8) Y-J, C., W-J, J., J-H, K., et al.: *EID*, **11,2**, 2005.
- 9) 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。
- 10) 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.
- 11) 吉田 勲, 加來英美子, 根岸あかね, 他：東京都健安研七 年 報, **70**, 45-49, 2019.
- 12) 国立感染症研究所：リケッチア感染症診断マニュアル。
- 13) Hao, L., Pan-He, Z., Yang, H., et al.: *CID.*, **66**, 1109-1115,

2018.

- 14) Mediannikov, O., Matsumoto, K., Samoylenko, I., *et al.*:  
*Into J Syst Evol Microbiol.*, **58**, 1635-1639, 2008.
- 15) Gaowa, Ohashi, N., Aochi, M., *et al.*: *EID*, **19**, 2, 2013.

**Evaluation of Pathogens in Ticks collected from mountains in Tokyo (April 2019\_ October 2019)**

Isao YOSHIDA<sup>a</sup>, Emiko KAKU<sup>a</sup>, Ai SUZUKI<sup>a</sup>, Yuta UCHIDA<sup>a</sup>, Kohji MORI<sup>a</sup>,  
Takashi CHIBA<sup>a</sup>, Keiko YOKOYAMA<sup>a</sup>, and Kenji SADAMASU<sup>a</sup>

Severe fever thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus, identified in China as pathogenic in 2011, has recently emerged in Japan. Also, tick-borne encephalitis (TBE) was reported in 2016 in Hokkaido and Japanese spotted fever another tick-borne infectious diseases, was reported. Therefore, tick-borne infectious diseases still pose public health threats in Japan.

Here, we used nested-PCR to detect the pathogens in the spotted fever group rickettsioses, and *Borrelia*, a pathogen of Lyme disease, in ticks collected in Tokyo's inner mountainous areas in 2019.

The sequence of spotted fever group rickettsioses was detected in 4 cases, and the sequence of *Anaplasma* was detected in one case. However, no sequences of the highly pathogenic *Rickettsia* or *Anaplasma*, was detected in the ticks. Of the sequences of spotted fever group rickettsiae that were detected, one was the *Rickettsia helvetica*, which is considered pathogenic. These results suggest that, it is still necessary to implement thorough preventive measures to avoid tick bites when entering the inner mountainous areas..

**Keywords:** severe fever with thrombocytopenia syndrome, tick-borne encephalitis, spotted fever group rickettsiae, Japanese spotted fever, Lyme disease, real-time RT-PCR, nested-PCR

---

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