

厚生労働科学研究費補助金 [新興インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 (新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)]

研究分担者報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 (H25-新興-一般-008)

分担研究課題：動物由来新興ヒトバベシア症原虫の国内感染実態の解明

研究分担者 新倉 綾 (国立感染症研究所 動物管理室 主任研究官)

研究協力者 今岡 浩一 (国立感染症研究所 獣医科学部 第一室長)

研究協力者 平田 晴之 (酪農学園大学 獣医学群 准教授)

研究要旨：ヒトバベシア症はマダニ媒介性の人獣共通感染症である。世界的には、米国の *B. microti* 欧州の *B. divergens* が主要因であるが、流行地域以外での近縁種や新種が患者から相次いでみつかっており、ヒトバベシア症は新興感染症として注目されている。本研究で我々は、これまで日本に存在しないとされていた *B. divergens* をはじめてシカから検出し、全国的に分布している事を明らかにした。また、分子疫学的解析から、本原虫は欧州、米国と同じクレードに属する原虫であり、今後、感染患者が発生する可能性が示唆された。さらに、米国の *B. microti* と同系統である *B. microti* US-type の分離を *Ixodes persulcatus* (シュルツマダニ) からはじめて成功し、4 株を樹立した。分離株は遺伝的、抗原的に野ネズミ由来の原虫と同一であり、シュルツマダニが自然界での媒介種であることが確定した。シュルツマダニはマダニ刺口症の主要種であることから、汚染地域におけるヒトへの感染を監視する必要がある。

A. 研究目的

Babesia divergens は欧州のウシバベシア症の主病因であるが、時にヒトに感染して重症化することが知られ、とくに脾臓摘出者では死亡率は約 40% に上る。レゼルボアは、欧州ではウシとされてきたが、シカが自然界における本来の宿主ではないかとの報告が相次いでいる。一方、最近、米国で *B. divergens*

の近縁種 (*Babesia* sp.MO1) 感染による死亡例が相次ぎ、新興感染症として注目されている。本研究では、日本シカ (*Cervus nippon*) の血液を調べる機会に恵まれたため、*B. divergens* 感染の有無を、赤血球を材料とした遺伝子検査にて検出を行い、遺伝子配列の解読と系統解析を行った。

一方 *Babesia microti* US-lineage によるヒト

バベシア症は米国北東部が主な流行地であり、野ネズミ(deer mouse) と *Ixodes scapularis* (black legged tick) が、レゼルボアおよびベクターである。近年、シカやマダニの増加と生息域の拡大に伴い、患者発生地域の拡大や輸血による感染事故の増加が問題となっている。我々はこれまで、北海道、道東地方の野鼠から US-lineage を分離し、これが米国分離株と遺伝的に近縁であること、同地方の *Ixodes. persulcatus* (シュルツマダニ) から野鼠由来株と同一の遺伝子が検出されること等を報告してきた。本研究では、シュルツマダニがベクターであることを確定するため、原虫分離を試み、抗原・遺伝子性状を野鼠由来株や米国株と比較した。

B. 研究方法

1) *B. divergens* の検出と解析

21 都道府県 (北海道、岩手、宮城、栃木、群馬、山梨、長野、岐阜、静岡、千葉、三重、滋賀、京都、兵庫、鳥取、島根、広島、宮崎、徳島、熊本、鹿児島) で捕獲された、合計 449 匹のニホンシカの血餅をマイクロビーズで破碎し、定法により DNA を抽出した。次に *B. divergens* の 18SrRNA をターゲットとしたプライマー-dv101F/dv1353R (1st) と dv159F/dv1296R (2nd) を用いて Nested PCR によりスクリーニングを行った。陽性検体の 18SrRNA と β -tubulin、CCT7 遺伝子について、特異的プライマーにより増幅を試み、塩基配列を決定した。GenBank に登録されている類似の配列を用いて、ClustalW による

アライメントを行った。進化系統樹解析は neighbor-joining method 用い、系統樹の分枝位置の信頼性については 1,000 回のブーツストラップによって計算された値を用いた。

2) *B. microti* の分離

旗ずり法により未吸血のマダニを北海道各地で採集し、形態学的に種分類を行った。レゼルボアの生息密度を間接的に知るため、採集時間と採集数を記録し、各採集地域における採集効率を計算した。シュルツマダニのオスは冷凍、メスは 4 で保存した。オスはプール (~5 匹) してホモジナイザーで破碎後、定法により DNA した。US-lineage の β -tubulin をターゲットとした PCR でスクリーニングを行い、採集地ごとの *B. microti* US-lineage 陽性率を算出した。シュルツマダニのメスはスナネズミに数日吸血させた後回収した。実体顕微鏡下で唾液腺を取り出し、そのホモジェネートをハムスターに腹腔内接種した。感染ハムスターを定期的に微量採血し、血液塗抹標本を作成した。赤血球内感染率がピークに達した時点で全採血し、感染赤血球の凍結保存、ウェスタンブロット並びに CCT7 遺伝子のシークエンス材料とした。また、感染後 8 週後の血液から血清を分離し、抗血清とした。

(倫理面からの配慮について)

本課題の動物実験は、国立感染症研究所動物実験委員会に承認され、指針に基づいて国

立感染症研究所にて行われた。

C. 研究結果

- 1) 32 検体（北海道を含む 8 都道府県）が陽性を示し(図 1)、1 検体を除いて全てが *B. divergens* に分類された。そのうち 11 検体の *18SrRNA* 及び β -tubulin 遺伝子配列を決定したところ、同一であり、欧州の *B. divergens*、米国の *Babesia* sp. MO1 と近似していた(表 1)。また、進化系統樹上でシカの前虫は一つのクラスターを形成し、欧州や米国の原虫株と同じクレードに属した(図 2)。残りの 1 検体は、*B. divergens* および *B. odocoilei* の両種から遺伝的に中間に位置する原虫であった(図 2)。
- 2) マダニの採集効率は採集地によって大きく異なっていた(表 2)。シュルツマダニのオス合計 253 匹のうち 12 検体が PCR 陽性であり、採集効率の高い地域と相関していた。US-lineage 陽性地域は 4 カ所で最小感染率 (MIR、%) は 21.2 から 0.9 だった(表 2)。MIR の高い 3 地域の♀を分離に用いた。吸血刺激したメス 41 匹のうち、5 匹の唾液腺が PCR 陽性を示し、うち 4 株の原虫分離に成功した(表 3)。分離株の *18S rRNA*, β -tubulin、*CCT7* 遺伝子配列は一致しており、道東地方の野ネズミ由来株とも一致した。一方、海外の株とは 3 遺伝子とも一致することはなく、米国株の *CCT7* 遺伝子では 1.54% の相違が見られた(表 4)。抗原性状はシュルツマ

ダニ由来株と野鼠由来株の間ではほぼ同様の交差反応が認められたが、米国株とは殆ど交差が認められなかった(図 3)。

D. 考察

我が国では全国的にシカが *B. divergens* に感染し、これが、欧米や米国の患者由来の株と遺伝的に近縁であることが明らかとなった。これまで患者の報告は無いが、シカの生息域や生息数拡大に伴って、シカが保有する病原体にヒトが感染するリスクは高まっていると考えられる。世界的にも、近年新型原虫によるヒトのバベシア症の発生報告が続いており、早急な血清学的診断方法の開発、ヒトの抗体保有率の調査等が急務の課題であり、患者の発生を注意深く監視してゆく必要がある。さらに、今回我々は初めて *B. microti* US-lineage をシュルツマダニから分離し、ベクターであることを確定証明した。シュルツマダニはヒトを吸血し、ライム病のベクターでもあることから陽性地域感染地における、ヒトバベシア症の発生を注意深く観察していく必要がある。

E. 結論

日本のシカが、欧米の患者由来の原虫に近縁な *B. divergens* を保有していること、ヒト嗜好性の高い、道東地方のシュルツマダニが *B. microti* US-lineage のベクターであることを明らかにした。今後、診断法の確立、及び、ヒトバベシア症発生を注意深く監視していく必要がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Zamoto-Niikura A, Tsuji M, Qiang W, Hirata H, Nakajima R, Morikawa S, et al. Field survey and molecular analysis of *Babesia microti* group. In: Ltd. iP, editor. Epidemiology II -Theory, Research and Practice 1st ed: iConcept Press Ltd.; in press
- 2) Zamoto-Niikura A, Tsuji M, Imaoka K, Kimura M, Morikawa S, Holman PJ, et al. Sika deer carrying *Babesia* parasites closely related to *B. divergens*, Japan. Emerg Infect Dis. 20(8):1398-400, 2014
- 3) Taharaguchi, M., Takimoto, K., Zamoto-Niikura, A., Yamada, Y. K.. Effect of weak Acid hypochlorous solution on selected viruses and bacteria of laboratory rodents. Exp Anim, 63; 141-147, 2014.
- 4) Zamoto-Niikura A, Tsuji M, Qiang W, Nakao M, Hirata H, Ishihara C. Detection of two zoonotic *Babesia microti*, Hobetsu and U.S. lineages, respectively, in sympatric tick species, *Ixodes ovatus* and *Ixodes persulcatus*, in Japan. Appl Environ Microbiol. 78.3424 - 3430, 2012

2.学会発表

- 1) 新倉（座本）綾、森川茂、平田晴之、石原智明. 北海道のシュルツマダニ *Ixodes persulcatus* から分離された *Babesia microti* の性状解析. 第 157 回日本獣医学会学術集会, 札幌 (2014. 9)
- 2) 新倉（座本）綾、福士秀悦、森川茂、山田靖子. リフトバレー熱ウイルス L 蛋白のポリメラーゼ機能における C 末端領域の重要性. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013, 11)
- 3) 新倉(座本)綾、今岡浩一、木村昌伸、森川茂、平田晴之、石原智明、山田靖子. ニホンジカ (*Cervus nippon*) からの *Babesia divergens* 様遺伝子の検出, 第 156 回日本獣医学会学術集会, 岐阜 (2013. 9)
- 4) 根来沙弥、平田晴之、新倉 綾、萩原克郎、石原智明 . 北海道のエゾシカ (*Cervus nippon yezoensis*) における *B. divergens* の感染状況の把握進化と系統樹解析 .第 156 回日本獣医学会学術集会, 岐阜 (2013. 9)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得
なし .
2. 実用新案登録
なし .
3. その他
なし

図1. *B. divergens*のシカにおける分布

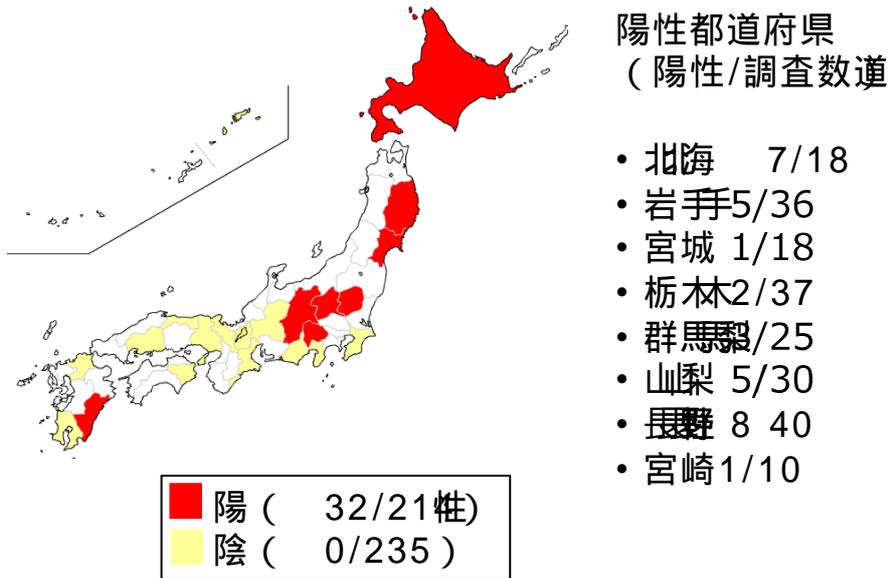


図2. 18S rRNA にもとづく系統樹

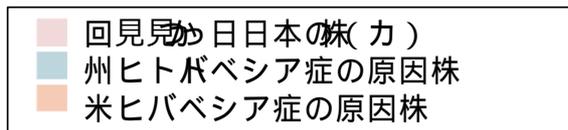
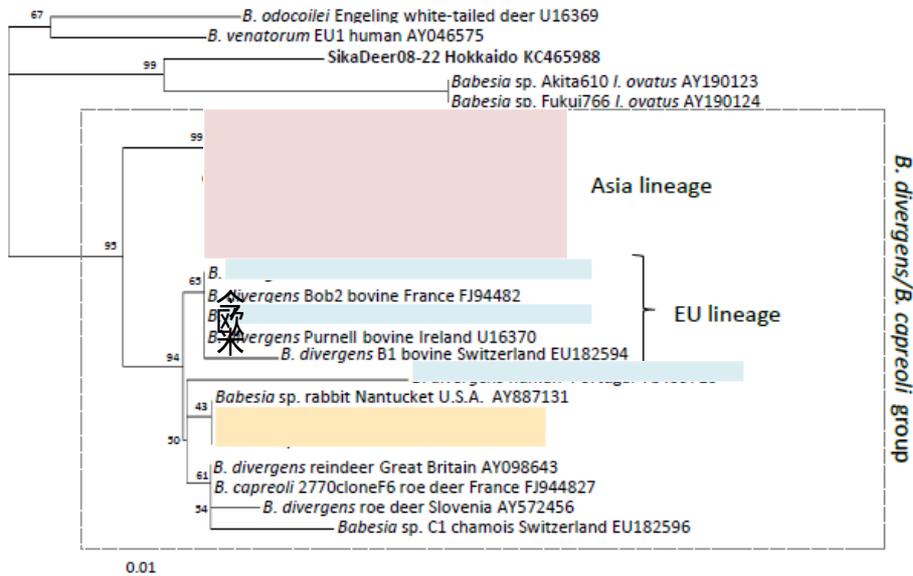


図3. シルツマダニから分離された
B. microti U.S.-lineageの抗原性状

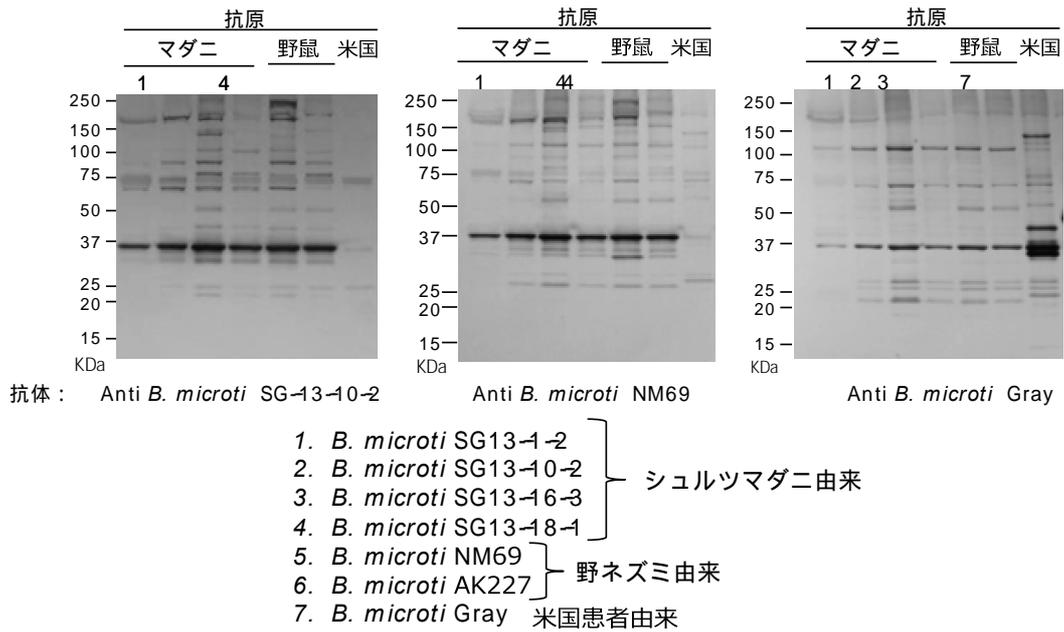


表1 シ由来 *B. divergens*と欧州及び米国者由来株間の塩基配列列同

遺伝子マーカー	シカ由来 <i>B. divergens</i> との相同性 (%)		
	SikaDeer	<i>B. divergens</i>	<i>Babesia</i> sp. MO1
	日本	欧州	米国
<i>rDNA</i> (1,567bp)	99.7-10	99.2-9.5	99.2-9.5
<i>α-tubulin</i> (900bp)	99.9-10	98.0-9.1	98.1-9.2
<i>CCT7</i> (1,622bp)	98.7-9.9	96.5-9	N.D.

マの集効率率率とシュルツマダニのB				. microti US-lineage 陽性率率		
採集地 (採集効率率)	マダニ全種			シュルツマダニ		
	採集数	採集時間 (分)	採集効率率 (匹数/ 分)	調査数	PCR 陽性 感染率率(%)	
浦幌町 1	387	160	2.4	111	1	0.9
帯広市 3	111	50	2.2	33	7	21.2
浦幌町 2	67	40	1.7	9	1	11.1町
上土幌 1	137	80	1.7	47	3	6.4
帯広市 2	88	60	1.5	28	0	0
帯広市 1 町	35	40	0.9	5	0	0
上土幌 2	35	60	0.6	20	0	0
合計	860	490	1.8	253	12	4.7

3 シルツマダニ からの *B. microti* US-lineage 分離

採集地	分離した マダニ数	PCR陽性数	分離数	陽性率率(%)
浦幌町 2 町	2	0	0	0
上土幌 来	16	2	2	12.5
帯広市 3	23	3*	2	8.7
合計	41	5*	4	9.8

*分離出なかった1 検体を含む

表4 日本のシルツマダニ由来*B. microti* 株と野ネズミ由来株及び国外株との塩基配列との比較

遺伝子 マーカー	長さ(bp)	<i>B. microti</i> US-lineage (株名、国)					
		NM69 北海道 (野ネズミ)	Korea 8 韓国	VL63 ロシア	Gray 米国	HK ドイツ	XJ1637 中国新疆
<i>18S rRNA</i>	1,552	100%	100%	100%	100%	99.87%	99.87%
		0*	0	0	0	2	2
<i>β-tubulin</i> (intron+exon)	1,079	100%	99.63%	99.54%	98.89%	96.94%	97.13%
		0	4	5	12	33	31
<i>CCT7</i> (intron+exon)	2,142	100%	99.63%	99.81%	98.55%	96.63%	96.40%
		0	8	4	31	72	77

*置換(in/del 含む)塩基数

