

マダニの生態から考察する血液製剤を介するダニ媒介感染症の予防

研究分担者	沢辺 京子	国立感染症研究所・昆虫医科学部
研究協力者	伊澤 晴彦	国立感染症研究所・昆虫医科学部
	比嘉 由紀子	国立感染症研究所・昆虫医科学部
	渡辺 護	国立感染症研究所・昆虫医科学部
	前川 芳秀	国立感染症研究所・昆虫医科学部
	今西 望	長崎大学熱帯医学研究所大学院・歯薬総合研究科
	小林 大介	日本医療開発機構（AMED）

研究要旨

マダニ媒介感染症の予防には、マダニの生態や生理的な知見を得ることが重要であるが、野外における情報は限られている。主に大型の哺乳動物がマダニの重要な吸血源となるため、その移動は基本的には宿主である野生動物の移動範囲となり、比較的狭いと考えられている。一方で、鳥類に寄生するマダニが海外から運ばれる可能性も指摘されていることから、本研究では渡り鳥の飛来地を調査地を選び、周辺環境に生息する植生マダニからウイルス検出を行なった。また、マダニの吸血履歴を調査し、マダニが保有する病原体の感染環を明らかにする目的で、鳥類および哺乳類を対象にした吸血源動物種を特定するReverse Line Blot（RLB）法の改良を進めた。

2018年は、北陸3県の渡り鳥飛来地において4月～11月の間、月に1回フランネル法によりマダニ相を調査し、3属8種1,600頭の植生マダニを採取した。キチマダニ、フタトゲチマダニ、ヤマトマダニ、ヤマアラシチマダニの順に多く採取されたが、特に前2種は、鳥類寄生例が多い種類であった。上記マダニをウイルス分離および次世代シーケンサー（NGS）解析に供した結果、既知ウイルス3種以外に、新規および未分類のウイルス遺伝子が複数検出された。以上の結果から、マダニは複数のウイルスを保有していること、国内の広範な地域に同一ウイルスが点在すること、半数以上のマダニが鳥類を吸血した履歴があることが明らかになった。また、従来のRLB法に鳥類検出用プローブを加え、本邦産の哺乳類18種および鳥類15種の検出が可能になり、予備的に試験した広島県産の植生マダニの多くに鳥類を吸血した履歴があることが確認された。

A. 研究目的

国内では、2012年秋に渡航歴のない山口県在住の女性が重症熱性血小板減少症候群（SFTS）により死亡したことが、翌2013年1月に国内1例目として報道され、その後も西日本を中心に患者が発生して

いる。2018年の患者数は77名となり、西日本の県から合計で397名の患者（うち死亡例は65）が報告されている。一方で、患者が発生していない東日本の地域からもSFTSウイルス抗体陽性の野生動物が確認され、複数のマダニ種からSFTS

ウイルス遺伝子が検出されるなど、今後の流行拡大も危惧されている。国内で SFTS ウイルスを媒介するマダニの種類は特定できていないが、中国ではフタトゲチマダニとオウシマダニから遺伝子が検出され、韓国のフタトゲチマダニからはウイルスが分離されている。

ダニ脳炎は 1993 年に北海道で初めての感染例が報告され、その後の疫学調査で道南地域のヤマトマダニからウイルスが分離され、野鼠とイヌに抗体陽性の個体が確認された。しかし、抗体陽性の野鼠は北海道以外に本州からも見つかり、ダニ脳炎が国内に常在していると推察された。近年では、2016 年、2017 年と感染例が相次いで報告された。

これらの病原体は、いずれもウイルス血症を起こすことから血液製剤を介して感染する可能性がある。近年、山歩きを趣味とする人が増え、また、シカやイノシシなどの野生動物の個体数も増加し、人がマダニに吸血される機会が増えている。幸い、これまでダニ媒介ウイルス感染症が輸血によって感染した報告はないが、これらの感染症は、重篤になることから、感染のリスクは無視できない。マダニの生態や吸血する対象動物の嗜好性を調査解析することによって献血者への注意喚起し、感染リスクを減少させる努力が必要である。

ダニ媒介感染症は、病原体も媒介マダニも従来より国内に常在している場合が多い。国内には 5 属 49 種のマダニ類が様々な環境に広く生息するが、主に大型の哺乳動物がマダニの吸血源となることが多く、マダニの移動は基本的には宿主である野生動物の移動範囲となり、比較的狭いと考えられている。一方で、鳥類に咬着するマダニは海外から運ばれるなど、広域に移動する可能性も指摘されて

いる。事実、中国のマダニから検出された *Jingmen tick virus* (Qin et al., 2014) は、長崎県対馬市でも見つかっている (Fujita et al., 投稿準備中)、*Muko virus* (MUV) は長崎県 (Hayasaka et al., 2016) と兵庫県 (Ejiri et al., 2015) から、*Tarumizu tick virus* (TarTV) は、鹿児島県、鳥取県、福島県 (Fujita et al., 2017) で、それぞれスポット的に定着していることが明らかになった。いずれのウイルスも、鳥類寄生性の高いとされるアカコッコマダニやキチマダニ等から分離・検出されている。マダニ媒介性感染症の予防にはマダニの生態や生理的知見を得ることが重要であるが、自然界での情報はあまり得られていない。

で本研究では、渡り鳥の飛来地周辺で植生マダニを採取しウイルス検出を行なった。また、SFTS ウイルスを媒介すると推定されるフタトゲチマダニとキチマダニに注目し、その国内サーベイランスを行いウイルス分離を試みる と同時に、鳥類を加えた吸血源動物種を特定し、これらマダニの吸血履歴を明らかにすることを目的とした。本年度は、渡り鳥飛来地で採取したマダニからのウイルス検出、ならびに吸血源動物を推定する Reverse Line Blot (RLB) 法 (Pichon et al., 2003, Estrada-Pena et al., 2005) の改良を行った。

## B. 研究方法

### マダニの採取

福井、石川および富山県内の渡り鳥飛来地の合計 6 地点 (輪島市、珠洲市、能登町、片野鴨池、津幡市および富山市のそれぞれ複数カ所を選定) でマダニ相の調査を行った。2018 年は 4~11 月の間に 1 回、フランネル法 (約 70 cmX100 cm の白い布で地面および植生の上を引きず

る方法)により各地点 30 分間、植生マダニを採取した。

### 吸血源動物の探索 (RLB 法の改良)

これまで我々は RLB 法を本邦産マダニ検出用に改良し、微量な動物血液由来 DNA の検出を可能にした。まず、マダニから DNA を抽出し、ミトコンドリア DNA 内の 12S リボソーム DNA 領域に設計した共通プライマーを用いて PCR で増幅、次いで各種動物種に特異的なプローブと反応させた。昨年度までに哺乳類 18 種、鳥類 10 種の検出を可能にしたが、本年度はさらに 5 種類の鳥類を検出できるプローブを追加し、鳥類共通プローブと鳥類種に特異的なプローブを組み合わせ、植生マダニの吸血履歴を探索した。

### マダニからのウイルス分離および遺伝子検出

採取されたマダニを採取地、種類に分けて乳剤を調整し、各種培養細胞に接種しウイルス分離を行った。分離されたウイルスについてはゲノム配列を解析し、ウイルス種や遺伝子型の解析、病原性等の性状解析を行った。また、マダニの破砕物あるいはウイルス分離作業後の細胞培養上清からウイルス核酸を選択的に回収し増幅後、次世代シーケンサー (NGS) により配列を解析した。次いで、バイオフィンフォマティクス解析により保有ウイルスを網羅的に探索し、種を同定した。

### C. 研究結果

福井県、石川県および富山県の北陸 3 県の渡り鳥飛来地から、合計で 3 属 8 種 1,600 頭の植生マダニを採取した。キチマダニ (76.3%)、フタトゲチマダニ (16.1%)、ヤマトマダニ (4.9%) の順に多く採集されたが (図 1)、特に前 2 種は、山内 (2001)

によると、鳥類寄生例が多い種類のダニであった。片野鴨池および北潟湖においては、月毎の定期調査によって、主要なマダニ 4 種 (キチマダニ、フタトゲチマダニ、ヤマトマダニおよびヤマアラシチマダニ) の季節消長も把握することができた。また、非常に近い距離にある調査地であっても、種構成が大きく異なることも示唆された。

採取した植生マダニからウイルス分離を行い、石川県加賀市および輪島市で採取されたキチマダニからフレボウイルス属の Kabuto Mountain virus (KAMV) が合計 3 株分離された (表 1)。輪島市においては、キチマダニから Okutama tick virus (OKTV) および新規フラビウイルスの遺伝子が、フタトゲチマダニから新規のナイロウイルスの遺伝子がそれぞれ検出された。また、富山市採取のキチマダニからはコルチウイルス属の TarTV が分離された。NGS 解析により、この他にも新規のイフラウイルス、レオウイルス、ブニヤウイルス、ノダウイルス、パルチチウイルス、未分類のウイルス等、複数の新規および未分類のウイルス遺伝子を検出することができた。

我々はこれまでに、欧米の野生動物を検出するために報告されたプローブ (Scott et al., 2012, Harmon et al., 2015) を国内の各調査地周辺に生息すると予想される野生動物に応用し、さらに、新たにプローブを設計し、昨年度までに哺乳類 18 種、鳥類 10 種の検出を可能にした。そこで、本年度はさらに 5 種類の鳥類を検出できるプローブを追加し、鳥類共通プローブと特異的プローブを組み合わせ、動物種由来の DNA を検出した。予備的に試験した広島県産のマダニ合計 124 頭の 61% (78/124 頭) が鳥類プローブに反応し、鳥類特異的プローブにより、

アカコッコマダニの若虫 1 頭がスズメ目のトリを吸血した履歴があることが示唆された (図 2)。哺乳類では、アナグマ、タヌキ、ニホンジカ、テンが吸血されていたと推察された。今後は、マダニ採集地の野生動物の生息状況と照合すると同時に、2017 年石川県採取のマダニの解析を順次進める。

#### D. 考察

一般的に、ダニ媒介感染症にはホットスポットと呼ばれる比較的狭い範囲での流行が特徴として挙げられる。一方で、渡り鳥を介して海外からマダニが侵入する可能性も指摘されており、その場合はかなりの距離を病原体が運ばれることになる。KAMV、TarTV、OKTV は、北陸地方からは初報告であり、これらのウイルスは日本各地に広範囲に分布していることが示唆された。

KAMV (石川県) および TarTV (富山県) は、いずれもキチマダニから分離されたが、山内 (2001) によると、キチマダニは 36 種類の鳥類への寄生例が報告されており、本邦産マダニの中で最も鳥類嗜好性が高い種類であると言える。これまでも KAMV は、兵庫県南部で捕獲されたイノシシに寄生していたマダニ、およびイノシシの生息地周辺の植生マダニからも分離され (Ejiri et al., 2018)、長崎県からの分離報告もある (Hayasaka et al., 2016)。他方 TarTV は、地理的な連続性がない地域 (鹿児島県、鳥取県、福島県) の植生マダニからそれぞれ分離されているが (Fujita et al., 2017)、本結果では、さらに石川県の 2 地域 (加賀市、輪島市) から同一ウイルスが分離された。

本年、新たに石川県内のキチマダニから分離された KAMV は、イノシシの移動で運ばれたとも考えられるが、長崎県

との地理的な関係が興味深い。また、TarTV においては、九州、山陰、北陸、東北地方に至る国内各地に点在するという分布の特徴、宿主であるキチマダニの鳥類寄生性が高い特徴等を考慮すると、両ウイルスの分布に鳥類の移動が関係している可能性は高いと考えられる。また、27 種類の鳥類への寄生例が報告されたアカコッコマダニ (山内, 2001) からは MUV が分離されており (Ejiri et al., 2015)、鳥類に関わるウイルスとして、今後注目すべきウイルスと考えられる。

本研究で導入した NGS 解析により、マダニは上記ウイルスに加え、複数の新規および未分類のウイルス遺伝子 (イフラウイルス、レオウイルス、ブニヤウイルス、ノダウイルス、パルチチウイルス等) を保有していることが明らかになった。野外のマダニが多数のウイルスを保有していることが示唆され、これまで使用してきた汎用性の高い培養細胞ではこれらウイルスを分離することが難しかったと推察された。今後、NGS 解析の利用はマダニ媒介性ウイルスを対象としたサーベイランスに貢献すると思われる。

今回、15 種類の鳥類を検出可能な共通プローブと種特異的なプローブをそれぞれ作製する等、RLB 法による検出法を改良し、広島県産のマダニではあったが、植生マダニが鳥類を吸血した履歴が確認された。今後は、鳥類と哺乳類の両者とマダニとの接点を考慮し、マダニが保有する病原体の自然生態、ならびにその移動を解析する。

本調査は、加賀市鴨池観察館のご理解とご協力により実施された。

#### E. 結論

1) 石川県および富山県の渡り鳥飛来地でマダニ相の調査を行い、季節消長、種

構成を把握した。

2) 採取されたマダニをウイルス分離および NGS 解析に供した結果、KAMV および TarTV、OKTV が分離されたが、それ以外にも複数の新規および未分類のウイルス遺伝子が検出された。

3) マダニは複数のウイルスを保有していること、国内の広範な地域に同一ウイルスが点在することが明らかになった。

4) マダニの吸血源動物を推定するために、従来の RLB 法に鳥類検出用プローブを加え、本邦産の哺乳類 18 種および鳥類 15 種の検出が可能になった

## G. 研究発表

- 論文発表  
なし

## 2. 学会発表

小林大介, 伊澤晴彦, 室田勝功, 糸川健太郎, Astri Nur Faizan, Michael Amoa-Bosompem, 津田良夫, 林利彦, 金京純, 渡辺護, 岩永史朗, 沢辺京子. 重要疾病媒介蚊の RNA ウイルス叢およびその季節的・地理的变化に関する研究. 第 70 回日本衛生動物学大会, 2018 年 5 月, 帯広市

## H. 知的所有権の取得状況

- 特許取得  
なし
- 実用新案登録  
なし
- その他  
なし

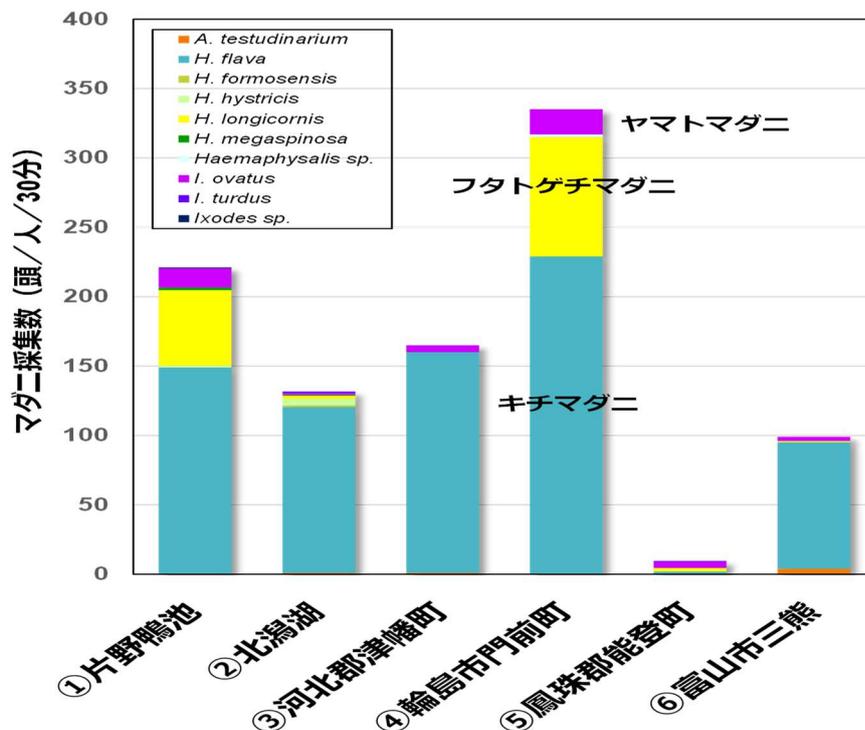


図 1 2018 年北陸 3 県の渡り鳥飛来地のマダニ相

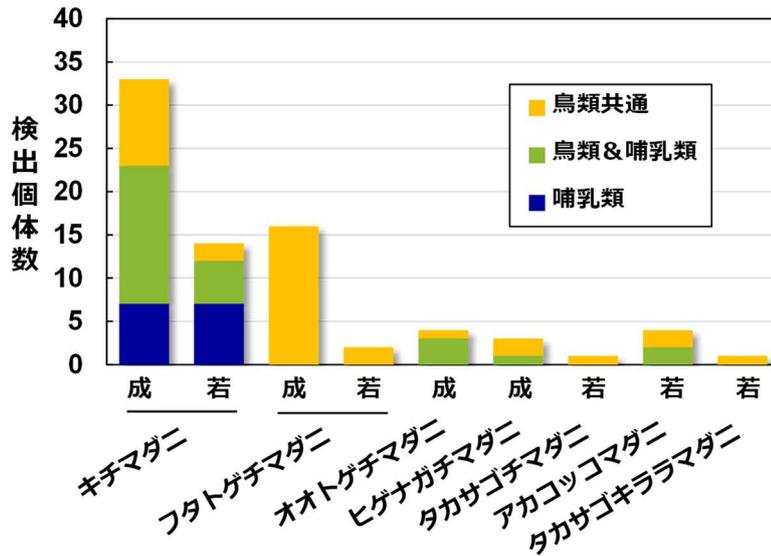


図2 RLB法によるマダニからの吸血源動物の探索

表1 渡り鳥飛来地で採集されたマダニから分離・検出されたウイルス

ウイルス	ウイルス科・属	株	ウイルス分離 / 遺伝子検出	マダニ種	マダニ採集地	マダニ採集日
Kabuto mountain virus (KAMV)	フェヌイウイルス科・ フレボウイルス属	17ISK-T11	分離	キチマダニ	石川県加賀市	2017年10月
		18HKR18	分離	キチマダニ	石川県加賀市	2018年5月
		18HKR66	分離	キチマダニ	石川県輪島市	2018年5月
Tarumizu tick virus (TarTV)	レオウイルス科・ コルチウイルス属	17TYM-T2	分離	キチマダニ	兵庫県西宮市	2009年10-12月
			<sup>1)</sup> 分離	キチマダニ	富山県富山市	2017年10月
			<sup>2)</sup> 分離	キチマダニ	鹿児島県垂水市	2013年7月
			<sup>2)</sup> 分離	キチマダニ	鳥取県米子市	2013年10月
			<sup>2)</sup> 分離	キチマダニ	福島県相馬市	2013年11月
Okutama tick virus	フェヌイウイルス科・ フレボウイルス属	17ISK-T8	遺伝子検出	キチマダニ	石川県輪島市	2017年10月
			<sup>3)</sup> 遺伝子検出	キチマダニ	東京都青梅市	2015-2016年
新規フラビウイルス	フラビウイルス科・ フラビウイルス属	18HKR14	遺伝子検出	キチマダニ	石川県輪島市	2018年5月
新規ナイロウイルス	ナイロウイルス科・ 未帰属	18HKR70	遺伝子検出	フタトゲチマダニ	石川県輪島市	2018年5月
新規イフラウイルス	イフラウイルス科・ 未帰属		遺伝子検出	キチマダニ	富山県富山市	2017年10月
新規イフラウイルス-2	イフラウイルス科・ 未帰属		遺伝子検出	未同定	石川県	2018年
新規レオウイルス	レオウイルス科・ 未帰属		遺伝子検出	未同定	石川県	2018年
新規ブニヤウイルス	未分類		遺伝子検出	未同定	石川県	2018年
新規ノダウイルス様 ウイルス	未分類		遺伝子検出	未同定	石川県	2018年
新規バルチチウイルス	バルチチウイルス科・ 未帰属		遺伝子検出	未同定	石川県	2018年
Ixodes scapularis associated virus 2 様ウイルス	未分類		遺伝子検出	未同定	石川県	2018年

これらのウイルスは <sup>1)</sup>Ejiri et al. (Virus Res., 2018), <sup>2)</sup>Fujita et al. (Virus Res., 2017), <sup>3)</sup>Matsumoto et al. (J. Vet. Med. Sci., 2018) で報告されている。