

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	比嘉 由紀子	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
	林 利彦	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
	駒形 修	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
	沢辺 京子	国立感染症研究所・昆虫医科学部
	小林 大介	日本医療開発機構（AMED）
	今西 望	日本科学未来館

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、渡り鳥の飛来地でマダニ相を調査し、採取された植生マダニからウイルス検出を行なった。さらに、植生マダニの吸血履歴を調査することで、マダニが保有するウイルスの感染環を明らかにすることを目的とした。

北陸3県（富山県、石川県、福井県）の渡り鳥飛来地の合計7地点において、4月～11月の間、月に1回フランネル法により植生マダニを採取した。2017～2019年の調査で、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生息数が多い傾向が認められた。さらに、愛媛県内のSFTS浸淫地において採取したマダニも加えてウイルス分離および次世代シーケンス（NGS）解析を行った結果、Kabuto mountain virus（KAMV）、Tarumizu tick virus（TarTV）が分離され、Okutama tick virus（OKTV）の遺伝子が検出され、その全ゲノム配列を解析することができた。NGS解析により、その他にも複数の新規・未分類のウイルスの遺伝子が検出された。次いで、マダニの吸血源動物種の推定に用いるReverse line blot hybridization（RLB）法を改良し、国内の哺乳類18種、鳥類15種の特定を可能にした。予備的に試験として用いた広島県および愛媛県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。

本研究により、マダニは複数のウイルスを保有していること、SFTSのベクターは環境によって異なる可能性が高いこと、国内外の広範な地域に同一ウイルスが点在することが示唆され、NGS解析がダニ媒介病原体を対象とするサーベイランスに有用であることが確認された。マダニ媒介感染症の海外からの侵入を監視すると同時に、国内での媒介マダニの生息域の拡大等に関する情報を収集し、提供することによって献血者への注意喚起を促し、マダニ媒介感染症の感染リスクを減少させる努力が必要である。

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。2019 年の患者数は過去最高の 102 名となり、これまで西日本を中心に 1 都 2 府 21 県から合計で 498 名の患者数 (うち死亡例は 70) が報告されている。当初は 20% 以上と非常に高い致死率を記録したが、2017 年以降は 10% を下回るようになった。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ており、今後、東日本へ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。

他方、1993 年に北海道で初めての感染例が報告されたダニ脳炎は、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っており、ダニ脳炎が国内に常在していると推察されている。近年では、2016 年から 2018 年まで 3 年連続で感染例が報告されている。

これらダニ媒介性の病原体は、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、これまでは輸血によってダニ媒介ウイルス感染症に罹患した報告はないが、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を喚起し、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。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知られていない。

本研究では、渡り鳥の飛来地および SFTS 浸淫地のマダニ相を調査し、マダニが保有するウイルスの網羅的検出を行った。また、マダニの吸血源動物種を特定するために、欧州で開発された Reverse line blot hybridization (RLB) 法 (Pichon et al., 2003, Estrada-Pena et al., 2005) を国内の野生動物検出用にプローブを改良した。本研究では、特に SFTS ウイルスを媒介すると推定されるフタトゲチマダニ、キチマダニ等に注目し、それら植生マダニの吸血履歴を明らかにすることで、SFTS ウイルスの感染環を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) マダニ相の調査

福井、石川および富山県内の渡り鳥飛来地の合計 7 地点 (片野鴨池、北潟湖、河北郡津幡町、輪島市門前町・猿山岬、輪島市舳倉島、および富山市 (各地点で

複数カ所を選定)でマダニ相の調査を行った。2017年から2019年の3年間、4~11月の間に原則月に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。

愛媛県のSFTS浸淫地においても上記同様に、フランネル法により植生マダニを採取した。

2) 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種、発育ステージ、雌雄、採取地、採取日に分けて乳剤を調整し、主にシリアンハムスター腎臓由来BHK-21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、マダニの破碎液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、バイオイ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、ウイルス種を同定した。

3) マダニの吸血源動物の探索

RLB法を本邦産の野生動物検出用に改良し、微量な動物血液由来DNAからマダニが利用した動物種を推定した。まず、植生マダニから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、各種動物種に特異的なプローブと反応させた。

C. 研究結果

1) マダニ相の調査

2017年~2019年に福井、石川および富

山県の北陸3県の渡り鳥飛来地周辺でマダニを採取し、これまでに合計4属9種約2,300頭の植生マダニを同定した。3年間の傾向として、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生息数が多いと推察された。特に前2種は、鳥類寄生例が多い種類のダニである(山内, 2001)。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)の季節消長が明らかになった。

2) マダニからのウイルス分離および遺伝子検出

北陸2県および愛媛県で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)が分離された。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、フタトゲチマダニとアカコッコマダニからはそれぞれ新規の異なるナイロウイルスの遺伝子が検出された。また、富山市では、キチマダニからコルチウイルス属のTarumizu tick virus(TarTV)が分離された。

本研究で初めてマダニに試みたNGS解析により、Jingmen tick virus(JMTV)、新規のイフラウイルス、レオウイルス、プニヤウイルス、ノダウイルス等、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。

3) マダニの吸血源動物の探索

我々はこれまでに、欧米の野生動物を検出するために設計されたRLBのプローブ(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、新たにプローブを設計し、合計で哺乳類 18 種、鳥類 15 種の検出を可能にすることができた。また、鳥類共通プローブと特異的プローブを組み合わせた方法の併用も検討した。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 頭がスズメ目の鳥を吸血した履歴があることが示唆された。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ことが明らかになり、これら野生動物は、調査地点の周辺での目撃情報ともほぼ一致していた。

D. 考察

本研究において、兵庫県で初めて確認された KAMV、鹿児島、鳥取、福島県の国内に広く分布している TarTV、東京都下で検出された OKTV を北陸地方から初めて分離し、これらのウイルスが日本各地に広範囲に分布していることが明らかになった。これらのウイルスは、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 5 目 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と考えられる。

KAMV は、これまでに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分離されているが (Ejiri et al., 2018) 長崎県内の植生マダニから分離された報告もある (Hayasaka et al., 2016)。今回の調査で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距離を説明する上で、鳥類が

関与している可能性は否定できない。TarTV は、国内の地理的な連続性がない地域 (鹿児島、鳥取、福島県) の植生マダニからそれぞれ分離されたが (Fujita et al., 2017) 本研究では、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ている。OKTV は、2015 年に東京都青梅市の植生マダニからウイルス遺伝子が検出されたが (Matsumoto et al., 2018) 今回マダニに対して初めて導入した NGS 解析により、輪島市のキチマダニから検出された OKTV の全ゲノムを初めて決定することができた。詳細な配列解析から、OKTV は M セグメントが欠損しているが (M セグメント欠損ウイルス、M segment-deficient phlebovirus: MdPV と命名) 各セグメントの末端にフレボウイルスに共通する保存配列があることが確認された。これらの結果から、マダニ媒介フレボウイルスの一群にみられる新たな進化のメカニズムを提唱するに至った (Kobayashi et al., 2020)。上述した KAMV、TarTV、OKTV は、国内各地に点在するという特徴や宿主であるキチマダニの鳥類寄生性が高いことから、鳥類の移動に伴い、ウイルスが拡散した可能性が高いと考えられた。

鳥類に咬着するマダニは海外から運ばれる可能性が高いことが指摘されている。例えば、中国のマダニから遺伝子が検出された JMTV は、長崎県対馬市のツシマヤマネコに咬着していたタカサゴキラマダニから見つか (Fujita et al., 投稿準備中) 近年、ロシアやトルコからも確認されている。本研究では新たに愛媛県のマダニからも JMTV の存在が NGS 解析により明らかになったが、中国では JMTV により熱性疾患の患者発生が報告されており (Qin et al., 2014) 海外との関連性ならびに人への病原性が危惧されている。

さらに、輪島市のアカコッコマダニとフタトゲチマダニからは、それぞれ異なる未分類のナイロウイルスの遺伝子が検出され、国内で初めての報告となった。アカコッコマダニは、キチマダニに次いで鳥類寄生例が多く、27 種類の鳥類への寄生が報告されている(山内, 2001)。また、フタトゲチマダニもスズメ目 7 種の鳥類への寄生が確認されており、両種ともに鳥類寄生性が高いマダニと言える。このことから、輪島市由来の未分類ナイロウイルスは鳥類が関わるウイルスである可能性が高いと考えられた。ナイロウイルス属には人への病原性の高いクリミア・コンゴ出血熱(CCHF)ウイルスが属すことから、輪島産ナイロウイルスの病原性の確認を急ぐとともに、海外からのウイルスの侵入監視必要である。

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、プニヤウイルス、ノダウイルス等)を保有していることも明らかになった。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ことが示唆された。NGS 解析の利用は、今後のマダニ媒介病原体を対象としたサーベイランスに有用であると結論した(Kobayashi et al., 2020)。

本研究期間内に、合計 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することができた。予備的な試験ではあったが、広島県産の植生マダニの多くに鳥類を吸血した履歴が確認されたことから、マダニの移動は、哺乳類のみならず、鳥類の移動をも考慮する必要があることが示唆された。これ

らの結果は、直接、輸血制限範囲を拡大することには繋がらないが、マダニ媒介病原体はすでに国内に分布しているものだけでなく、海外から侵入する病原体があることも事実である。マダニ媒介感染症の海外からの侵入を監視すると同時に、国内での媒介マダニの生息域の拡大等に関する情報を収集し、提供することによって献血者への注意喚起を促し、マダニ媒介感染症の感染リスクを減少させる努力が必要である。

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することができた。ここに御礼を申し上げます。

E. 結論

1) 富山県、石川県、福井県の渡り鳥飛来地の計 7 地点でマダニ相の調査を行い、季節消長、種構成を把握した。

2) 採取された植生マダニをウイルス分離および NGS 解析に供した結果、KAMV、TarTV、OKTV、JMTV 以外に複数の新規および未分類のウイルスが分離・検出された。

3) マダニは複数のウイルスを保有しており、SFTS のベクターは環境によって異なる可能性が高く、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) NGS 解析がマダニ媒介病原体を対象とするサーベイランスに有用であることが確認された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kobayashi D., Murota K., Itokawa K., Ejiri H., Amoa-Bosompem M., Faizah AN.,

Watanabe M., Maekawa Y., Hayashi T., Noda S., Yamauchi T., Komagata O., Sawabe K., Isawa H. RNA virome analysis of questing ticks from Hokuriku District, Japan, and the evolutionary dynamics of tick-borne phleboviruses. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 11(2): 101364, 2020.

2 . 学会発表

沢辺京子, 比嘉由紀子, 小林大介, 前川芳秀, 今西望, 林利彦, 伊澤晴彦, 渡辺護. 北陸三県の渡り鳥飛来地におけるマダニ相調査. 第 71 回日本衛生動物学会大会, 2019 年 4 月, 山口市

小林大介, Faizah AN, Amoa-Bosompem M, 室田勝功, 糸川健太郎, 渡辺護, 比嘉由紀子, 前川芳秀, 沢辺京子, 伊澤晴彦. 次世代シーケンサーを用いたマダニ保有ウイルスのサーベイランス. 第 71 回日本衛生動物学会大会, 2019 年 4 月, 山口市

小林大介, 伊澤晴彦, 室田勝功, 糸川健太郎, Faizan AN, Amoa-Bosompem M, 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

- 1 . 特許取得
なし
- 2 . 実用新案登録
なし
- 3 . その他
なし