

### 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
	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	国立感染症研究所・昆虫医科学部
	Astri Nur Faizah	東京大学

#### 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に生息する植生マダニからウイルス検出を行なうと同時に、それらマダニの吸血履歴を調査することで、マダニが保有する病原体の感染環を明らかにしようと考えた。

2021年は、これまで得られた植生マダニのサンプルを用いて、吸血源動物の探索、ウイルス検出と検査系の確立を中心に研究を進めた。マダニ媒介ウイルスの自然界における感染環を考える際、吸血源動物の特定が重要である。本研究では、植生マダニ（動物に咬着しておらず、マダニ体内に血液成分もほとんど認められないため吸血源動物を特定することが困難）に対して、RLB（Reverse Line Blot法）とNGS（Next Generation Sequencing）を併用することで、体内にわずかに残る血液成分から様々な分類群に属する吸血源動物を種レベルで同定する検出系を構築した。ヒト刺咬例が多く、植生マダニの優占種であるキチマダニについて解析したところ、北陸の渡り鳥飛来地4地点すべてから鳥類を吸血した個体が検出された。また、コジュケイ、ハツカネズミ、イノシシ、イエネコ、サルのDNA断片が検出され、これらの動物を吸血していることが示唆された。これまで北陸地域の渡り鳥飛来地を中心としたダニ媒介ウイルスの調査において、当該地域のキチマダニから複数年に渡ってKabuto mountain virus（KAMV）が計5株分離されており、これら分離株の配列情報を活用して、プローブ法によるリアルタイムPCRに基づく高感度KAMV検出系を今回新たに確立した。

#### 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。2020年の患者数は75名、2021年は68名（2021年7月28日現在）であつ

た。これまでの総患者数641名（2021年7月28日現在）のうち、西日本の府県から合計で638名の患者が報告されており、圧倒的に西日本からの報告が多い。一方で、患者の発生報告が少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っており、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。これまでの日本産マダニからのマ

ダニ媒介ウイルスの調査において、我々は複数のマダニ媒介ウイルスを分離・発見してきた。それらウイルスのうち、Muko virus (MUV) は長崎県と兵庫県から、Tarumizu tick virus (TarTV) は、鹿児島県、鳥取県、福島県で、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。

## B. 研究方法

### マダニサンプル

2018～2020 年までに得られた石川県、富山県、福井県内の渡り鳥飛来地において、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) によって得られた植生マダニを吸血源動物種の同定及びウイルス分離に用いた。

### 吸血源動物種の同定

採集された植生マダニ若虫、成虫のうち、石川県及び富山県の渡り鳥飛来地 4 か所から採集され、優占種であるキチマダニ 167 頭から DNA を抽出し、Reverse Line Blot Hybridization (RLB) 法による吸血源同定を行った。これまでに改良した RLB 法により、国内に生息する主要な哺乳類 18 種は種特異的プローブによって検出が可能となっている。一方で、鳥類、爬虫類、げっ歯類については、種数が多く、多くの種に対応した種特異的プローブがない。そのため、吸血源動物が未知のサンプルに対してまず、各網共通プローブによる検出を行い、次いで次世代シ

削除:

ークエンス (NGS) 解析により種の同定を行った。

### Kabuto mountain virus 分離株の配列解析ならびにリアルタイム PCR 検出系の確立

これまでに北陸地域の渡り鳥飛来地において採集されたキチマダニから 5 株の Kabuto mountain virus (KAMV) が分離されている (表 1)。これら分離株の配列多様性を把握するため、ウイルス L 分節にコードされる L タンパク質のコーディング領域のほぼ全長配列 (6288 塩基) について、本研究により得られた 5 分離株および先行研究により報告されている T32 株 (GenBank accession no. LC153711; Ejiri et al., 2018) の配列情報を用いて、配列アラインメントを行い、塩基配列の相対比較解析を行った。その結果、得られた配列保存性の高い領域上にプローブおよびプライマーを設計し、当該領域をカバーするように *in vitro* 転写によって合成された RNA をスタンダードとして、絶対定量法に基づくリアルタイム PCR 検出系の確立を試みた。

### C. 研究結果

DNA 抽出を行ったキチマダニ 167 個体の内、RLB 法では、77 個体 (46.1%) から吸血源動物由来の DNA 断片が検出された。イヌ、サル、爬虫類、イノシシ、クマ、げっ歯類、鳥類が吸血源動物として推定された。キチマダニの吸血源動物種構成は採集地で異なっていた。哺乳動物以外は種の特定はできなかった。実験に供した全 4 地点のキチマダニから鳥類由来の DNA が検出された。また、山間部に近くなるほど、大型の哺乳類を多く吸血しており、反対に都市部や建物が多い環境だと鳥類やげっ歯類など小型動物

の割合が高くなる傾向がみられた。

RLB 法で吸血源動物を推定できた 77 個体の内、48 個体を NGS 解析に用いた。12 個体 (25%) から吸血源動物由来の DNA 断片と推定される配列が検出された。解析の結果、キチマダニ 10 個体がコジュケイ、ハツカネズミ、イノシシ、イエネコ、ニホンザルから吸血したと推定された。RLB 法では鳥類と同定されたものの種同定に至らなかったサンプルにおいて、NGS 解析では鳥類種が特定できた。

これまでに得られている KAMV の塩基配列の相対比較解析を行った結果、これら株間の相対性は、94~100%であることが明らかとなった。またこれら分離株の配列アラインメントデータを用いて、6 株間において保存された塩基配列領域に、プローブ (KAMVLp, 5'-CTT CAA CAT CCT CCT CAG CTC TC-3') ならびにプライマー (KAMVL1, 5'-TTG CTC GCT GTC TGG AGT CA-3'; KAMVL2, 5'-TAC CGC CTG AAG TGT GGAGA-3') を設計した。本検出系を用いて KAMV 分離株から抽出した RNA をもとに試験的な検出を実施したところ、10 ウイルスゲノムコピー/ $\mu$ L 以下の微量なウイルス遺伝子についても検出可能であることが判明し、今回 KAMV の高感度検出系の確立に成功した。

### 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。これまでの本研究班の研究によって、KAMV について、北陸地方における本ウイルスの分布を初めて報告し、日本

各地に広範囲に分布していることを指摘した。KAMV は、いずれもキチマダニから分離されており、36 種類の鳥類への寄生例が報告されている。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。また、KAMV は、兵庫県南部で捕獲されたイノシシに寄生していたキチマダニ、およびイノシシの生息地周辺の植生キチマダニからも分離されている。今年度の植生キチマダニの吸血源動物種同定によって、鳥類（コジュケイ）やイノシシから吸血していることが示されており、キチマダニが鳥類を介した長距離移動及び移動先でのウイルスの維持（移動性の低い哺乳動物を吸血しその地域で繁殖）に関与している可能性が示唆された。

NGS を用いた吸血源同定は種の特定に有用と考えられるが、ヒト由来の DNA 断片が多く検出されること、解析の過程の PCR 反応で後の解析への悪影響も認められたことから、実験系の改善の余地がある。また、今回は動物分類群のスクリーニングとして RLB 法を用いたが、コストや時間がかかりスクリーニングに適しているとは言えない。RLB 法に代わるスクリーニング方法の検討が必要と考えられた。

KAMV はアルボウイルスの研究に汎用されるシリアンハムスター腎臓由来 BHK-21 細胞において、効率的に増殖することが確認されているが、当該細胞に対しては、細胞変性効果を示さない、あるいは極めて微弱であるために、ウイルス分離のスクリーニング作業には、conventional な RT-PCR 検出系が主として用いられていた。そのため、今回確立されたリアルタイム PCR 検出系を活用することによって、スクリーニング作業の効率化を図ることが可能となった。

また最近行われた KAMV の疫学調査において、ヒト血清中に KAMV の中和抗体の存在が確認され、KAMV はヒトに対して感染性を示すことが明らかとなった。KAMV の媒介種と推定されるキチマダニは、ヒト刺咬例も多数知られる我が国に広く分布する普通種のマダニである。これまでのところ、ヒトにおける KAMV の病原性の有無は不明であるが、媒介マダニ種の上記のような特性を鑑みるに、KAMV のヒトへの暴露リスクは高いものと考察される。そのため、今回確立したリアルタイム PCR による検出系を、KAMV の検査や診断に用いることによって、今後、ヒトにおける KAMV 感染や流行実態を解明するべく、調査研究が促進されることが期待される。

## E. 結論

- 1) マダニの吸血源動物の検出系を構築し、キチマダニの吸血源動物の一部を明らかにした。
- 2) Kabuto mountain virus の高感度検出系を確立した。
- 3) 渡り鳥飛来地に分布している植生マダニがヒトへの病原性を有す可能性のあるウイルスをはじめ様々なウイルスを保有していることが明らかになった。渡鳥の渡来地に情報提供することで地域の安全性と献血の安全性確保に役立つと考えられた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kobayashi D, Kuwata R, Kimura T, Faizah AN, Higa Y, Hayashi T, Sawabe K, Isawa H. Toyo virus, a novel member of the Kaisodi group in the genus Uukuvirus (family

Phenuiviridae) found in *Haemaphysalis formosensis* ticks in Japan. Archives of Virology. 166(10):2751-2762. 2021. doi: 10.1007/s00705-021-05193-w.

Kobayashi D, Kuwata R, Kimura T, Shimoda H, Fujita R, Faizah AN, Kai I, Matsumura R, Kuroda Y, Watanabe S, Kuniyoshi S, Yamauchi T, Watanabe M, Higa Y, Hayashi T, Shinomiya H, Maeda K, Kasai S, Sawabe K, Isawa H. Detection of Jingmenviruses in Japan with evidence of vertical transmission in ticks. Viruses. 13(12):2547. 2021. doi: 10.3390/v13122547.

Kobayashi D, Kuwata R, Kimura T, Faizah AN, Higa Y, Hayashi T, Sawabe K, Isawa H. Detection of quaranjavirus-like sequences from *Haemaphysalis hystricis* ticks collected in Japan. Japanese Journal of Infectious Diseases. 75(2), 195-198. 2022. doi: 10.7883/yoken.JJID.2021.129.

## 2. 学会発表

なし

## 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

株名	分離源	採集地	採集年月日
ISK49	キチマダニ 若虫 23 頭のプール	石川県加賀市片野	2019 年 10 月 15・16 日
ISK53	キチマダニ 若虫 39 頭のプール	石川県加賀市片野	2019 年 11 月 18 日
18HKR18	キチマダニ 雄成虫 1 頭	石川県加賀市片野	2018 年 5 月 16 日
18HKR66	キチマダニ 若虫 8 頭のプール	石川県輪島市猿山岬灯台	2018 年 5 月 6 日
17ISK-T11	キチマダニ 若虫 26 頭のプール	石川県加賀市片野	2017 年 10 月 24 日

表 1 これまでの研究で得られた Kabuto mountain virus の分離株一覧