

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	国立感染症研究所・昆虫医科学部
	谷口ひとみ	国立感染症研究所・昆虫医科学部

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。

2020年は、過去の研究結果を踏まえ、より効率的にウイルス検出を行うため、北陸2県（富山県・石川県）の渡り鳥飛来地の計3地点において、重点的に調査を行った。加えて、SFTSV（重症熱性血小板減少症候群ウイルス）浸淫地である愛媛県のマダニサンプルも入手し、ウイルス解析を行った。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、Kabuto mountain virus（KAMV）（キチマダニ）やJingmen tick virus（タカサゴキララマダニ）が検出・分離された。また、愛媛県のマダニからは3種の新規ウイルスを含め、6種のマダニ媒介ウイルスの分離・検出が確認された。

本研究の過程で収集されたKAMVの分離株を用いてウイルスゲノム配列の多様性を解析し、この情報を活用して、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）であった。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。SFTSウイルスを媒介するマダニの種類については、中国ではフタトゲチマダニとオウシマダニからウイルス遺伝子が検出され、フタトゲチマダニにおけるSFTSウイルス媒介性が実験的に証明されている。また、韓国においてもフタトゲチマダニからはウイルスが分離されている。そのため、日本国内に広く分布しているフタトゲチマダニをはじめとしたマダニ種が、SFTSウイルスの媒介に関与している可能性が考えられる。

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国内に常在している場合が多い。国内には5属46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に依存するため、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、富山県、さらにKabuto mountain virus (KAMV) は、兵庫県ならびに石川県といった地理的に離れた地点で採集されたマダニからウイルスが分離されたことが報告されている。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から分離されているため、ウイルスの長距離拡散には、野鳥が介在している可能性が示唆されている。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、新興感染症を引き起こすことも懸念される上述のような新規に発見されたマダニ媒介ウイルスなどについては、効率的な予防対策を講じる上で必要となる自然界におけるウイルスの感染環などの基礎的な情報については、これまで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 cm×100 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。

愛媛県のSFTSウイルス浸淫地において、上記と同様のフランネル法により採集された植生マダニについても以降の実験に供試した。

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か所から採集されたマダニ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、次いで次世代シーケンス(NGS)解析により種の同定を行った。

マダニからのウイルス分離および遺伝子検出

採集されたマダニを種、発育ステージ、雌雄、採集地、採集日に分けて乳剤を調製し、主としてシリアンハムスター腎臓由来BHK-21細胞に接種することにより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、次世代シーケンサー(NGS)によりウイルス配列の網羅的探索を行った。

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、塩基配列の相同性比較解析を行った。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

RLB法は、種特異的プローブを利用して検出をするため特異性が高いという利点があるが、不特定多種の動物種の同定には向いていない。そこでNGS解析と併用して解析を行った。DNA抽出を行ったマダニ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。内、数の多かったキチマダニ61個体についてみたところ、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(図1)。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。実験に供試した全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キチマダニ61個体の内、35個体をNGS解析に用いた。11個体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、コジユケイ、ハツカネズミ、イノシシ、イエネコ、ニホンザル、トカゲ目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。ヒト由来のDNA断片がすべてのサンプルから検出された。

これまでに採集した植生マダニを用いて、それらが保有するウイルスの解析を行った結果、石川県で採集されたキチマダニからフェヌイウイルス科のKAMVが新たに2株分離された(表1:ISK49株およびISK53株)。本ウイルスは2017年ならびに2018年に同一調査地点で採集されたキチマダニからも分離されていることから、本調査地にはKAMVの病原巣あるいは安定的なウイルス伝播に関する要因が存在するものと考えられた。また、中国でヒトへの病原性が確認されているJingmen tick virus (JMTV)が愛媛県や石川県で採集されたタカサゴキララマダニから検出された(表2, Kobayashi et al., 2021a)。さらに愛媛県において採集されたマダニ検体からは、TarTVやTofla virus、その他、複数のウイルス分類群に属する新規ウイルスが分離あるいは検出された

(表2, Kobayashi et al., 2021a, b, 2022)。

本研究班で得られているKAMVの塩基配列の相同性比較解析を行った結果、これら株間の相同性は、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/ μ 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、本ウイルスの媒介マダニと目されるキチマダニは、これまで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鳥類嗜好性が高いマダニ種であると言える。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。2021 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。

TarTV は、地理的な連続性がない地域(鹿児島県、鳥取県、福島県、富山)の植生マダニからそれぞれ分離されているが、本研究の成果によって、愛媛県からも、同一ウイルスが分離された。KAMV については兵庫県から石川県までイノシシの移動に伴ってウイルス保有キチマダニが運ばれたとも考えられるが、TarTV は、九州、四国、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、および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、本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。さらに本研究において、国内では初めてとなるヒト病原性の新興マダニ媒介ウイルスとして注目される JMTV が、石川県および愛媛県のタカサゴキララマダニから検出された。本ウイルスは中国をはじめとして世界各地に分布することが報告されている。それらの地域とは海を隔てた日本列島に JMTV が分布することは、これら海外のウイルス分布地域から飛来する渡り鳥を介して、我が国へウイルス保有マダニが侵入している実態を反映しているものと推察される。このような海外からのマダニ媒介ウイルスの侵入実態に関しては、さらなる調査が必要であると思われる。

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い難い。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) 採集された植生マダニをウイルス分離および NGS 解析に供試した結果、KAMV ならびに TarTV 以外に、新規ウイルスを含め 7 種のマダニ媒介ウイルスが分離・検出された。

3) Kabuto mountain virus の高感度検出系を確立した。

4) 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, Faizah AN, Amoa-Bosompem M, Watanabe M, Maekawa Y, Hayashi T, Higa Y, Sawabe K, and Isawa H. Analysis of Trypanosoma sequences from *Haemaphysalis flava* (Acari: Ixodidae) and *Tabanus rufidens* (Diptera: Tabanidae) collected in Ishikawa, Japan. *Medical Entomology and Zoology*, 71: 225-243. 2020.

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. 2021a. doi: 10.3390/v13122547.

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. 2021b. doi: 10.1007/s00705-021-05193-w.

Kobayashi, D., Watanabe, M., Faizah, A. N., Amoa-Bosompem, M., Higa, Y., Tsuda, Y., Sawabe, K., and Isawa, H. Discovery of a novel flavivirus (Flaviviridae) from the horse fly, *Tabanus rufidens* (Diptera: Tabanidae): The possible coevolutionary relationships between the classical insect-specific flaviviruses and host dipteran insects. *Journal of Medical Entomology*, 58: 880-890. 2021c.

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

木村俊也, 鋤田龍星, 南博文, 小林大介, 伊澤晴彦, 前川芳秀, 比嘉由紀子, 林利彦, 葛西真治, 沢辺京子, SFTS 感染ネコの周辺環境におけるマダニ相および SFTS ウイルス調査, 第 71 回日本衛生動物学会大会, 2020/4/17-19, 東京, 口頭(みなし開催)。

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 本研究実施期間およびそれ以前に石川県の渡り鳥飛来地で採集されたマダニから分離された Kabuto mountain virus の株一覧

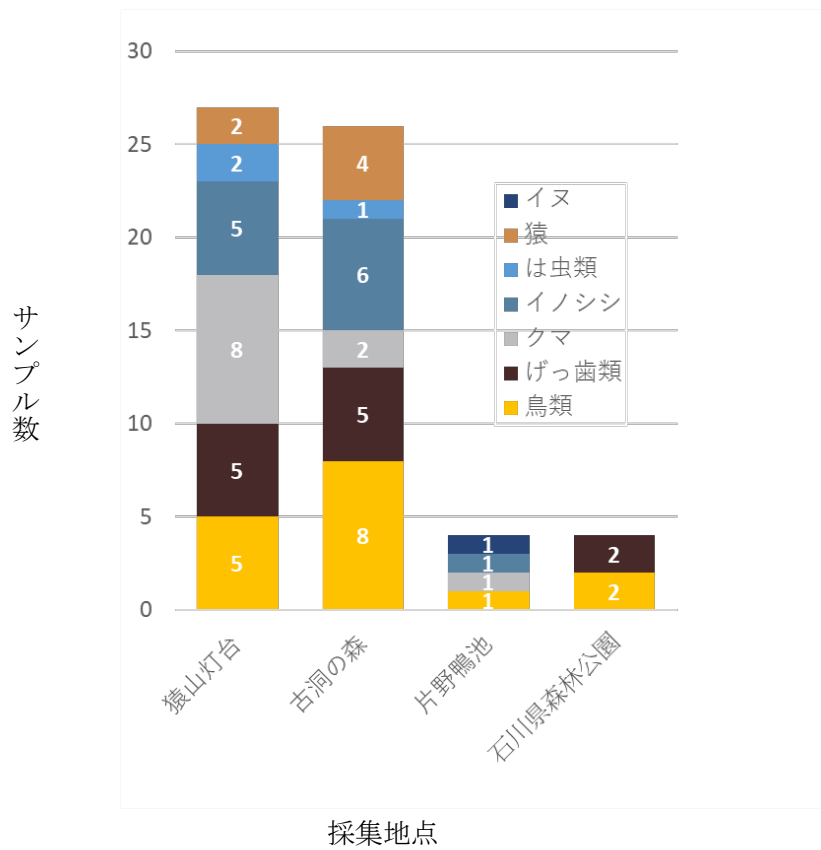


図 1 RLB 法により検出された DNA 断片から推定したキチマダニの吸血源動物種

	ウイルス名	ウイルス科・属	ヒト病原性	株名	検出・分離源マダニ種	採集地
	Tarumizu tick virus	レオウイルス科 コルチウイルス属	不明	IM-OI21	キチマダニ	愛媛県
	Tofla virus	ナイロウイルス科 オルソナイロウイルス属	不明	IM-OI4	キチマダニ	愛媛県
				IM-OI31	タカサゴチマダニ	愛媛県
				IM-OI36	タカサゴチマダニ	愛媛県
				IM-OI61	タカサゴチマダニ	愛媛県
				IM-OI89	タカサゴチマダニ	愛媛県
国内初確認	Jingmen tick virus	未分類	有	19EH-IM24	タカサゴキララマダニ	愛媛県
				IM-OI2	タカサゴキララマダニ	愛媛県
				IM-OI96	タカサゴキララマダニ	愛媛県
				IM-OI108	タカサゴキララマダニ	愛媛県
				IM-OI119	タカサゴキララマダニ	愛媛県
				ISK55	タカサゴキララマダニ	石川県
新規	Toyo virus	フェヌイウイルス科 ウウクウイルス属	不明	IM-OI100	タカサゴチマダニ	愛媛県
新規	Takachi virus	未分類	可能性有	IM-OI32	タカサゴチマダニ	愛媛県
				IM-OI36	タカサゴチマダニ	愛媛県
				IM-OI60	タカサゴチマダニ	愛媛県
				IM-OI70	タカサゴチマダニ	愛媛県
				IM-OI110	タカサゴチマダニ	愛媛県
新規	Ohshima virus	オルソミクソウイルス科 未帰属	不明	IM-OI114	ヤマアラシチマダニ	愛媛県
				IM-OI115	ヤマアラシチマダニ	愛媛県
				IM-OI125	ヤマアラシチマダニ	愛媛県

表2 本研究実施期間に植生マダニから分離・検出され、ゲノム解析等の結果としてウイルス種が特定された Kabuto mountain virus 以外のマダニ媒介ウイルス株の一覧