別紙４

厚生労働行政推進調査事業費補助金
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
分担研究報告書

マダニ採集方法の検討・次世代シークエンサーを用いた網羅的なウイルス検出手法の確立

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	砂原　俊彦	長崎大学熱帯医学研究所・病害動物学分野
研究協力者	犬丸　瑞枝	国立感染症研究所・昆虫医科学部
研究協力者	楊　超	国立感染症研究所・昆虫医科学部
研究協力者	山田　藍生	国立感染症研究所・昆虫医科学部
研究協力者	小林　大介	国立感染症研究所・昆虫医科学部
研究協力者	澤邉　京子	国立感染症研究所・昆虫医科学部
研究協力者	駒形　修	国立感染症研究所・昆虫医科学部
研究協力者	土井　寛大	森林総合研究所
研究協力者	中尾　勝洋	森林総合研究所

研究要旨

マダニの採集法として一般的に旗振り法（Flagging 法）が使用されているが、経験則による採集が多く、効率的な採集環境、範囲、時間、植生に関する科学的データに基づいて標準化されているとは言い難い。また、2018 年にタカサゴキララマダニから新規に分離、報告されたオズウイルスによるヒト症例が 2023 年に世界で初めて日本で報告されたが、最初に媒介動物から分離された病原体の性状や遺伝情報が事前に調べられていたことで未知の感染症の的確な診断につながったことが注目される。新規ウイルスに関して調査手法及びウイルスの検出手法を確立しておくことでヒトコミュニティにウイルスが流入する前に補足できれば、流行抑制につながる。そこで本研究では、マダニを中心に採集方法の標準化のための条件の検討行うとともに、次世代シークエンサーを用いた網羅的なウイルス検出手法を確立及びマニュアル化を検討することを目的として調査を行った。その結果、マダニの密度を求める際には、距離ベースで調査を行い、単位面積あたりの採集数を求めると多地点での比較が可能と考えられた。次世代シーケンサーを用いた網羅的なウイルス探索のためには理解しやすいマニュアルの整備が必須で、さらに地方衛生研究所各所での実践性を高めるために実技研修を通じた技術移転が必要であると考えられた。

A. 研究目的

蚊媒介感染症と並び、日本で問題となるのはダニ媒介感染症で、近年、重症熱性血小板減少症候群、ダニ媒介脳炎といった新興ウイルス由来の感染症の報告が相次いでいる。マダニの採集法として一般

的に旗刷り法（以後 Dragging 法）と旗 振り法（以後 Flagging 法）が採用されて いる。前者は、棒にフランネル生地を取 り付けて、調査者の後方からある一定空 間を引きずって歩き、布ついてきた植生 マダニを採集する。後者も棒にフランネ ルを取り付けるところまでは同じであるが、基本的に調査者の側方から平行して地面に布の引き摺りながら歩き、布についてきたマダニを採集する。布を引き摺りながら採集することは同じであるものの、どのような環境でも常に布をひきずる旗刷り法に対し、環境にあわせて、例えば、岩場や泥など採集に不向きな地面の場合は、採集を停止し、適した環境から採集を開始するという大きな違いがある。その違いから双方それぞれメリットデメリットがある。前者は常に採集が可能な一定のスペースを確保したうえでのサンプリングとなるため、定量化しやすいというメリットがある一方で、常に布を引き摺るために木立の中では採集が困難で布のコントロールが難しい。後者は手元で布のコントロールがしやすいため、様々な環境での採集が可能である一方で、調査者間で結果にばらつきが生じやすく定量化しづらい。採集の容易さから Flagging 法が採用されることが多いが、経験則による採集が多く、効率的な採集環境、範囲、時間、植生に関する科学的 データに基づいて標準化されているとは言い難い。これらの制約から全国のマダニ調査の採集数データを比較することが著しく困難である。

2018 年にタカサゴキララマダニから新規に分離、報告されたオズウイルス（Ejiri, et al., 2018）によるヒト症例が 2023 年に世界で初めて日本で報告されたが（IASR, 2023）、最初に媒介動物から分離された病原体の性状や遺伝情報が事前に調べられていたことで未知の感染症の的確な診断につながったことが注目される。新規ウイルスに関して調査手法及びウイルスの検出手法を確立しておくことでヒトコミュニティにウイルスが流入する前に補足できれば、流行抑制につながる。

以上のことから、マダニの密度調査及び次世代シークエンサーを用いた網羅的なウイルス検出手法を確立し、マニュアル化を検討することを目的とする。 近年、報告が相次いでいる新興マダニ媒介感染症について、今後、どの程度の情報があれば、リスクマップの作成が可能かどうか検討を行った。

参考文献

Ejiri H, et al., Virus Res 249: 57-65, 2018
IASR, Vol.44, pp. 109-111, 2023

B. 研究方法

本課題は、研究分担者 : 比嘉由紀子、研究協力者 9 名（砂原俊彦、犬丸瑞枝、楊超、山田藍生、小林大介、澤邉京子、駒形修、土井寛大、中尾勝洋）によって遂行された。

1．マダニ採集法の検討

2024 年 6 月に長崎県対馬においてマダニの採集法の検討のための調査を行った。採集法（Dragging 及び Flagging 法）、調査者あたりの時間、距離に対するマダニ密度の違いを検討した。距離は 25m を 1 単位とし、25m ロープを用いて距離の計測を行った。

採集法：各調査者が Dragging 及び Flagging 法を用いて 4 回繰り返し採集を行った。

採集時間 : Flagging 法を用いて、各調査者が 30 分間採集を行い、その際に移動した距離も計測した。

採集位置：Flagging 法を用いて、1m 以下の地面（落葉や草本類）と 1m 以上（樹木の葉）で採集を行った。8 回繰り返し採集を行った。

採集されたマダニは形態学的に種同定を行い、必要に応じて分子同定を行った。得られたデータは採集法については t 検定、30 分間採集においては、密度と調査距離について相関関係を調べた。

2．次世代シークエンサーを用いた網羅的なウイルス検出手法の確立

吸血性節足動物が保有するウイルスの網羅的検出系についてのマニュアルを作成するにあたり、今年度は実験行程中に独自に加えた実験手技上の工夫を洗い出すとともに、その手順を整理した。また、これらの実験行程を図表としてまとめ、地方衛生研究所の病原体検査担当職員を対象とした国立保健医療科学院主催の令和 6 年度新興再興感染症技術研修講義において受講生に示し、講義内容についての感想等を問う受講生が回答したアンケート結果を分析することによって、分子生物学的な解析や実験操作の経験が豊富ではない者にとっても平易なマニュアル作成を実現するための参考とした。

3．マダニ媒介感染症のリスクマップ

マダニ媒介感染症のリスクマップ基盤開発にむけて、協力研究者間で会議を実施し、フレームワーク作成の可能性を検討した。

C．研究結果

1．マダニ採集法の検討

調査では、フタトゲチマダニが 490 個体（若虫 N437、雄 M4、雌 F49）で最も多く採集され、続いてタカサゴチマダニ 173（N146、M16、F11）、オオトゲチマダニ 59（N59）、タカサゴキララマダニ 57（幼虫 L4、N50、M1、F2）が採集された。

最も多く採集されたフタトゲチマダニについて Dragging 法と Flagging 法を比較したところ、採集数の多いフタトゲチマダニの場合、採集方法の違いで若虫（N）及び成虫（A）それぞれ採集数に有意な違いは見られなかった（N：t = 1.3846, df = 43.284, p-value = 0.1733、A：t = -1.0165, df = 119.47, p-value = 0.3114、図 1）。Flagging 法を用いて採集される高さを調べたところ、フタトゲチマダニ、ヤマアラシチマダニ、タカサゴチマダニ、オオトゲチマダニいずれにおいてもほとんどが 1m 以下で採集された。採集時間とカバー範囲について、代表者が通常採用している採集時間 30 分でどの程度のエリアをカバーできるか Flagging 法を用いて調べたところ、平均は 200.5m^2（200m×1m（布幅））で、採集数が多くなるとカバー範囲が減少する傾向があるがばらつきが大きかった（図 2）。距離の計測にロープを用いたが、多大な労力と時間がかかるため、より効率的な距離測定方法を検討する必要がある。

2．次世代シークエンサーを用いた網羅的なウイルス検出手法の確立

確立されている実験行程とその手順を整理したところ、吸血性節足動物を用いた検出系で独自に工夫した点は下記の通りであった。①マダニ破砕ろ過液からの直接検出とウイルス分離培養上清からの検出を併用、②宿主由来核酸を除去しウイルスゲノム RNA の選択的抽出、③高分子 RNA の抽出、④二本鎖 RNA ウイルスの検出効率向上を狙った熱変性、⑤NGS ライブラリーの PCR 増幅。これらの知見をもとに令和 6 年 10 月 11 日に開催され

た令和 6 年度新興再興感染症技術研修において地方衛生研究所担当者に対してウイルス検出に関する講義を行った。ウイルス検出の実際についてはある程度の技術移転が可能と考えられたが、試薬メーカーが推奨する汎用性プロトコールを節足動物に対応させるために独自に改良をしていることから、それらの点を文章化した、マニュアルの作成が必須と考えられた。

3．マダニ媒介感染症のリスクマップ
マダニ媒介感染症のリスクマップ基盤開発にむけて、協力研究者間で会議を実施した。新規ウイルスについての情報が少ないため、チャレンジングな研究になることが示唆されたが、まずは基本となるMaxEntを用いた解析簡易マニュアルを作成し検討を要すると考えられた。

D. 考察

1．マダニ採集法の検討

採集が多かったフタトゲチマダニの結果となるが、本種においてへ Draggin 法と Flagging 法で若虫、成虫ともに採集に違いがなかったことから、より扱いやすい Flagging 法の使用が効率的と考えられた。採集時間 30 分カバーできるエリアは環境に応じて移動距離が異なり、また、今回、統計的な違いははっきりとしなかったものの、想定されることとして、採集数が多くなると布からマダニを取り除く作業に時間を要し、故に調査者による作業バイアスがより大きくなることが考えられた。

2．次世代シークエンサーを用いた網羅的なウイルス検出手法の確立

様々な吸血性節足動物が保有するウイルスの網羅的探索に最適化した独自の方法を確立したが、実験行程が煩雑になることから、プロトコールのマニュアル化は重要である。それに加えて、本技術移転を目的とした実技研修が必要と考えられた。

E. 結論

1．マダニ採集法の検討

マダニの密度調査は、Flagging 法を用いて、地上 1m 以下の草本類を対象に時間ベースよりも距離（面積）ベースで採集を行ったほうが効率的で比較可能な密度を算出するできることが示唆されたが、標準化のためには調査数を増やして追加データが必要である。

2．次世代シークエンサーを用いた網羅的なウイルス検出手法の確立

次世代シーケンサーを用いた網羅的なウイルス探索のためには理解しやすいマニュアルの整備が必須で、さらに地方衛生研究所各所での実践性を高めるために、実技研修を通じた技術移転が必要であると考えられた。

3．新興マダニ媒介感染症に関するリスクマップ

リスクマップの作成については、マダニ種と吸血源動物の嗜好性が多岐にわたることから、症例や病原体の分離件数が少ない段階での作成はチャレンジングとなると予想されたが、環境変数及びパラメータを検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

１．論文発表

なし

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

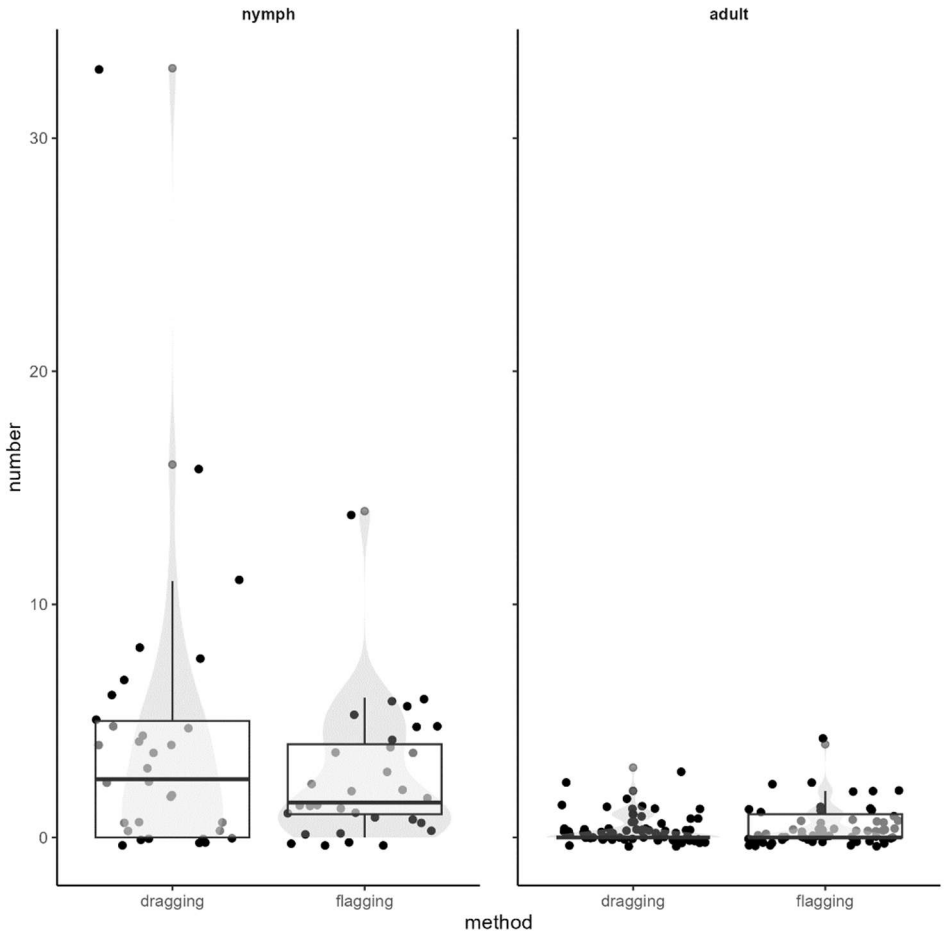


図 1. フタトゲチマダニ若虫及び成虫における Dragging 法と Flagging 法による採集数の違い（nymph：t＝t = 1.3846, df = 43.284, p-value = 0.1733、adult：t = -1.0165, df = 119.47, p-value = 0.3114）

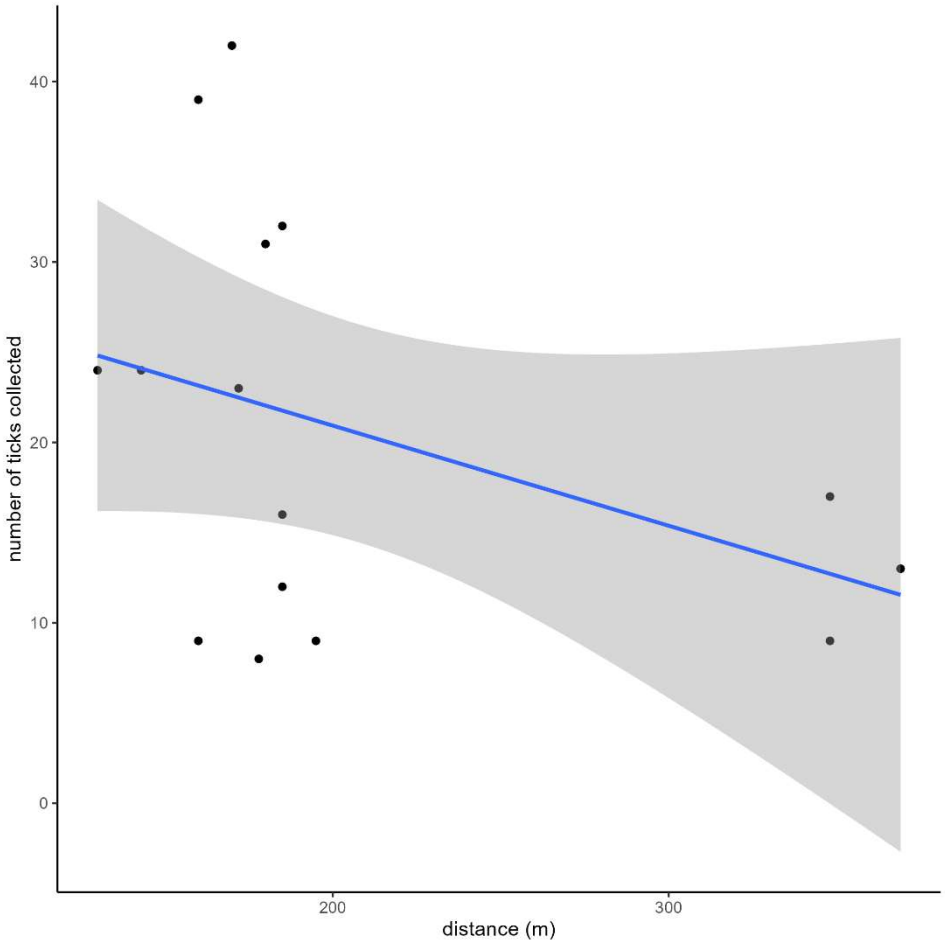


図 2．30 分間の植生マダニの採集数と調査できた範囲（距離）との相関関係