

5. 埼玉県で捕獲された野生化アライグマ血液による人のマダニ媒介性感染症浸淫状況調査

- 近 真理奈 (埼玉県衛生研究所)
- 山本 徳栄 (埼玉県衛生研究所)
- 増田純一郎 (埼玉県衛生研究所)
- 青木 敦子 (埼玉県衛生研究所)

【はじめに】

マダニ媒介性の感染症である「ヒトバベシア症」は、バベシア原虫(*Babesia microti* および *Babesia spp.*)が赤血球内で増殖し、それによる赤血球の大量破壊が溶血性貧血を引き起こす疾病で、米国ではこれまでに数百例にのぼる報告がある。日本では、1999年に初めてバベシア症患者が発生している。また、同じくマダニによって媒介される「ヒトアナプラズマ症」は、アナプラズマ (*Anaplasma phagocytophilum*) が血液中の顆粒球内で増殖し、発熱・頭痛・筋肉痛などの症状を呈し、治療が遅れると急性呼吸器不全などの疾病を併発し、死亡する場合がある。1993年に、米国で患者12名のうち2名が死亡する事例が初めて報告され、現在ではCDCに届け出を必要とする重要な感染症として位置づけられている。日本においても、これら2つの感染症の病原体遺伝子がダニや野生動物から検出され、実態調査による知見が蓄積されつつある。また、近年外来種のアライグマが野生化して、全国的に急増し、農作物等への被害が深刻化している。埼玉県においてもその生息地域は年々拡大し、現在では、人の生活圏に深く侵入し民家に住み着くほどになり、アライグマが人獣共通感染症の感染源になることが危惧されている。

【目的】

本研究は、埼玉県において生息数・生息地域ともに急増している野生化したアライグマについて、マダニ宿主および運搬動物としての役割に注目し、その血液から病原体遺伝子を検索することにより、ヒトに感染する可能性のあるバベシア原虫およびアナプラズマの侵淫状況を明らかにすることを目的として行った。

【材料および方法】

材料：埼玉県内で2007年4月から2011年8月までに捕獲されたアライグマ346頭から採取した血液を供試した。また、2008年10月以降に捕獲されたうち、ダニの吸着が認められた44頭からダニを採取し、80%エタノール入りのサンプル瓶に保存した。

方法：血液は、塗抹標本を作製して血液像の観察を行い、PureLink Genomic DNA Mini kit (Invitrogen) を用いてDNAを抽出した。抽出DNAについて、バベシア原虫およびアナプラズマに特異的な遺伝子を標的としたNested PCR法により病原体検索を行った。陽性検体については、ダイレクトシーケンス法で増幅産物の塩基配列を決定し、遺伝子解析に基づく系統学的分類を実施した。採取したダニについては、属の決定を行った。

1. バベシア原虫

18S ribosomal RNA 遺伝子(18SrDNA)を標的とした Nested PCR 法 (以下、18SrDNA PCR) を行った。陽性検体については、 β -Tubulin 遺伝子を標的とした Nested PCR 法 (以下、 β -Tubulin PCR) も併せて行った。得られた増幅産物は塩基配列を決定し、種の同定を行った。使用したプライマーは以下のとおりである。

18SrRNA gene

Primers	Origonucleotide Sequences(5'-3')	Use	Product length
Bab-rRNA5'	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	Primary PCR	1677-1678 bp
Bab-rRNA3'	ATCCTTCYGCAGGTTACCTAC	Primary PCR	
rRNA-Bab6F	GACACAGGGAGGTAGTGACAAGA	Nested PCR	329-330 bp
rRNA-Bab7R	CAACTGCTCCTATTAACCATTAC	Nested PCR	

β -Tubulin gene

Primers	Origonucleotide Sequences(5'-3')	Use	Product length
Tubu-ATG5F	ATGAGAGARATYGTACACATYCAAGC	Primary PCR	1417-1522bp
Tubu-1538R	TAYTGYTGGTAYTCGCTRACYA	Primary PCR	
Tubu-63F	CAAATWGGYGCMAARTTYTGGGA	Nested PCR	1315-1332 bp
Tubu-3R	TCGTCCATACCTTCWCCSGTRTACCAGT	Nested PCR	

2. アナプラズマ

16S ribosomal RNA 遺伝子(16Sr DNA)を標的とした Nested PCR 法 (以下、16SrDNA PCR) を行った。陽性検体については、アナプラズマに特異的な *p44/msp2* 遺伝子を標的とした Nested PCR 法 (以下、*p44/msp2* PCR) も併せて行った。得られた増幅産物は塩基配列を決定し、種の同定を行った。使用したプライマーは以下のとおりである。

16SrRNA gene

Primers	Origonucleotide Sequences(5'-3')	Use	Product length
EC9	TACCTTGTTACGACTT	Primary PCR	1462bp
EC12A	TGATCCTGGCTCAGAACGAACG	Primary PCR	
AP-f1	CATGCAAGTCGAACGGGTTA	Nested PCR	770bp
AP-r1	CATCAACACGGAGATAAATTATC	Nested PCR	

p44/msp2 gene

Primers	Origonucleotide Sequences(5'-3')	Use	Product length
P3726.F1	GCTAAGGAGTTAGCTTATGA	Primary PCR	531bp
P4257.R1	AGAAGATCATAACAAGCATTG	Primary PCR	
P3761.F2	CTGCTCTKGCCAARACCTC	Nested PCR	422bp
P4183.R2	CAATAGTYTTAGCTAGTAACC	Nested PCR	

【結 果】

1. バベシア原虫

18S rDNA PCR により、346 検体中 54 検体(15.6%)が陽性を示した。これらの血液像のうち、4 検体の赤血球に、虫体感染を疑わせる 3.5~5.0 μ m のリング状または洋梨状の異常所見が認められた(図 1)。

ダイレクトシーケンスにより得られた塩基配列による相同性検索を行ったところ、これらはいずれも典型的な大型のバベシア原虫であり、次の①~③と 100%の相同性を有するタイプに分類された(表 1)。これらのうち①と②は非常に近縁であるが、③は系統学的に大きく異なっていた。

① SAP091 タイプ：北海道のアライグマから検出されたタイプ

② Kh-Hj143 タイプ：ロシアのダニから検出されたタイプ

③ MA230 タイプ：北米のアライグマ由来原虫と近似したタイプ

図 1 血液塗抹像 (No.1187)

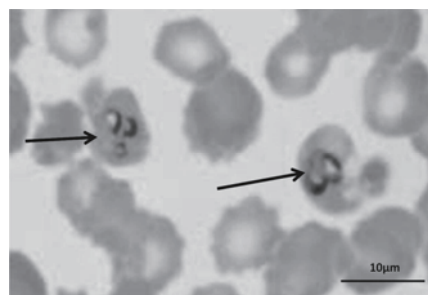


表1 18S rRNA PCRによるバベシア原虫のシーケンスタイプ

シーケンス (タイプ)			
SAP091 (北海道/アライグマ)	Kh-Hj 143 (ロシア/ダニ)	MA230 (北米/アライグマに近似)	Total
30/54 (55.6%)	12/54 (22.2%)	12/54 (22.2%)	54 (100%)

β -Tubulin PCR では、54 検体中 40 検体が陽性を示したが、14 検体は陰性であった。陽性の 40 検体は、相同性検索の結果 18Sr DNA PCR と同様に 3 タイプに分類された。

SAP091 タイプに分類された 18 検体と MA230 タイプに分類された 12 検体は、すべて 18SrDNA PCR の場合と同一のタイプであったが、Kh-Hj 143 タイプに分類された 9 検体のうち 2 検体は、18SrDNA PCR で SAP091 タイプに分類された検体であった。また、1 検体は、解析不能であったため、現在遺伝子クローニングにより確認中である(表 2)。

表2 β -Tubulin PCRによるバベシア原虫のシーケンスタイプ

シーケンス (タイプ)				
SAP091 (北海道/アライグマ)	Kh-Hj 143 (ロシア/ダニ)	MA230 (北米/アライグマに近似)	確認中	Total
18/40 (45%)	9/40 (22.5%)	12/40 (30%)	1/40 (2.5%)	40 (100%)

2. アナプラズマ

16S rDNA PCR により、346 検体中 8 検体(2.3%)が陽性を示したが、血液像には異常所見は認められなかった。塩基配列の遺伝子解析結果から、これらは全てアナプラズマであり、3 か所で塩基置換のある 2 種類の配列を持つ 2 検体と 6 検体に分けられた。これらは、いずれも過去には報告のない配列であったが、米国の患者由来のアナプラズマと近縁であっ

た。また、これらは *p44/msp2* PCR でも陽性を示し、このうち 2 検体では塩基配列が決定され、大橋らが日本国内のマダニから検出した *p44/msp2* 遺伝子と 95% の相同性を有した。残りの 6 検体は、ダイレクトシーケンスでは解析不能だった。

以上のとおり、バベシア原虫で 54 検体、アナプラズマで 8 検体が陽性を示し、そのうち 3 検体からは、両方の病原体遺伝子が検出された。

3. ダニの同定

アライグマ 44 頭から 153 検体のダニを採取した。44 頭のうち病原体が検出された 6 頭については、バベシア原虫のみ陽性の 5 頭とアナプラズマのみ陽性の 1 頭の耳介に、合計 16 検体のダニの吸着が認められた。これらについて属を同定したところ、*Ixodes* 属マダニ 2 検体および *Haemaphysalis* 属チマダニ 14 検体が確認された。

【考 察】

バベシア原虫は、その虫体の大きさが概ね 3 μ m 以上の大型バベシア原虫とそれ以下の小型バベシア原虫に分けられている。本研究において検出された 3 タイプのバベシア原虫は、その血液像 (図 1) と 18 S rDNA 解析の結果から、いずれも大型のバベシア原虫に分類されると考えられた。

アライグマにおけるバベシア原虫の調査では、米国の Birkenheuer らが、野生アライグマ 41 頭のうち 37 頭 (90%) に大型のバベシア原虫が、34 頭 (83%) に小型のバベシア原虫である *Babesia microti*-like parasite が感染しており、31 頭 (76%) にはその両方が混合感染していたことを報告した。この大型のバベシア原虫の遺伝子配列 (以下、DQ028958) は、米国のアライグマタイプ (*B. sp* US raccoon type) として、バベシア原虫の相同性検索に広く用いられている。

一方、日本では北海道のアライグマから、川淵らが *Babesia microti*-like parasite を、続いて陣内らが、これまで報告のない大型のバベシア原虫で、系統学的に異なる 2 種類を検出した (SAP091 および MA230)。このうち MA230 は、DQ28958 と 98.93% の相同性を有することから、アライグマの移入によって日本国内に持ち込まれた可能性が考えられた。また、ロシアでは V.A.Rar らがダニを調査し、*Ixodes* 属マダニ 458 検体中 2 検体 (0.4%) から *B. microti* を、*Haemaphysalis* 属のヤマトチマダニ (*H. japonica*) 128 検体中 3 検体 (2.3%) から、過去に報告のないタイプの大型のバベシア原虫を検出した (Kh-Hj143)。

本研究により、埼玉県には、北海道のアライグマ由来の SAP091 と MA230、ロシアのダニ由来の Kh-Hj143 とそれぞれ 100% 一致するタイプが存在することが明らかになった。また、2 検体において 18SrDNA では SAP091 が、 β -Tubulin 遺伝子では Kh-Hj143 と、異なるタイプのバベシア原虫が検出されたことから、これら 2 タイプが混合感染している可能性が考えられた。

ヒトバベシア症の原因としては、主に小型のバベシア原虫が確認されている。大型のバベシア原虫は、その病原性やヒトへの感染性は不明であり、今後明らかにしていく必要がある。また、米国と北海道のアライグマやロシアのダニからは、大型と小型両方のバベシ

ア原虫が検出されていることから、埼玉県においても、小型のバベシア原虫が存在する可能性もあるため、今後も注意深い監視が必要である。

一方、アナプラズマの国内分布については、2005年に大橋らが、国内に生息する *Ixodes* 属マダニがアナプラズマを保有することを報告した。その後、野生動物、家畜およびダニに関する調査研究が行われ、野生動物やウシには日本に固有のアナプラズマが、ダニには、これに加えて米国の患者由来株と近縁なアナプラズマが存在することがわかってきた。アライグマについては、Sashikaらが北海道の699頭を調査したが検出されなかった。

今回我々は、アライグマからアナプラズマを初めて検出した。遺伝子解析の結果、検出された2種類のアナプラズマは、国内の野生動物ではこれまで見つかっていなかった、患者から検出されたアナプラズマに近いタイプであることが明らかになった。さらに、3検体に、バベシア原虫とアナプラズマの混合感染例が確認された。このことから、埼玉県内のアライグマに、バベシア症とアナプラズマ症に共通する媒介マダニが存在する可能性が示唆された。今後はダニの種の同定を進め、ダニの感染への関与について検討したい。

本研究によって得られた知見を県内関係機関と共有し、野生動物による人獣共通感染症の予防対策に活用することは、公衆衛生上きわめて重要である。また、研究成果については、両感染症の感染経路を解明するため、遺伝子の相同性や分子系統樹解析などの詳細な結果を加えて学術誌に報告する予定である。

【主な参考文献】

1. Birkenheuer AJ , *et al.* Parasitology 135: 33-37, 2007.
2. Jinnai M , *et al.* Veterinary Parasitology Volume 162: 241-247, 2009.
3. Ohashi N , *et al.* Emerging Infectious Diseases 11: 1780-1783, 2005.
4. Sashika M, Inokuma H , *et al.* Vector-Borne and Zoonotic Diseases., 11(4): 349-354, 2011.

【謝 辞】

本研究を実施するにあたり、研究助成を頂きました財団法人大同生命厚生事業団に深甚なる謝意を表します。また、ご協力を頂きました東松山動物病院 大山通夫先生、大山龍也先生に深謝致します。さらに、研究に対し、終始ご指導ご助言を頂きました国立感染症研究所 新井 智先生、静岡県立大学 大橋典男先生、帯広畜産大学 猪熊 壽先生に心より感謝を申し上げます。

【経費使途明細】

DNA シークエンス解析 (委託)	200,119 円
プライマー合成 (委託)	34,272 円
AmpliTaq Gold 360 DNA polymerase (1000U) (PCR 試薬)	59,850 円
メタノール (試薬) 500ml 3本	1,874 円
銀行口座振込手数料	3,885 円

合計 300,000 円