

## 38. 原因不明マダニ由来感染症の原因究明に向けたマダニ保有病原体の調査研究

○北本 寛明 (兵庫県立健康生活科学研究所)

### 【はじめに】

兵庫県ではマダニを介してヒトが感染する日本紅斑熱(Japanese spotted fever, JSF)患者が毎年発生し、2005年にはJSF浸淫地の淡路島で死亡例が報告された<sup>1)</sup>。当所が実施するJSFが疑われる有症者の検査<sup>2)</sup>では、2007年から2013年8月までに39名の検査依頼があり、11名の陽性者が確認された。検査依頼があった患者のうち6名はペア血清が揃わず判定不能となったものの、有症のJSF陰性者も22名確認されており、マダニ由来感染症が疑われる原因不明の有症者は、判定不能例を除き66.7%存在した。一方、高知県ではJSFが疑われた患者の血液から、ヒト顆粒球アナプラズマ症(Human granulocytic Anaplasmosis, HGA)の原因アナプラズマに特異的な遺伝子を検出した事例が報告された<sup>3)</sup>。

また、過去に当センターが県内で実施したイヌ血清による抗JSF抗体の保有状況調査<sup>4)</sup>では、国内の他の報告より高い抗体価が確認された。イヌの高い抗体価は、県内の淡路島以外の地域にも及んでおり、今後注意を要することが示唆された。しかし、イヌのJSFに対する抗体価測定では、他の紅斑熱群リケッチア(Spotted Fever Group Rickettsia, SFGR)と交差反応を示すとの報告<sup>5)</sup>があり、高い抗体価を示したイヌの調査データがJSF感染のみに起因するのかを確かめる必要がある。

さらにマダニが媒介あるいは関与する感染症は複数知られており、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(以下、感染症法)では2013年4月には急性熱性血小板減少症候群(Sever Fever with Thrombocytopenia Syndrome, SFTS)が新たに追加され、計11種のマダニが関与する感染症が指定されている。地方自治体の衛生研究所等でのSFTS発生時の検査も追加され、SFTSは国内でも注意を要する感染症となっている。

SFTSは2013年に国内で初の患者が確認され、兵庫県内でも同年の7月末に2名の患者が発生した。

そこで、ヒトの原因不明有症事例の原因究明と、リケッチア浸淫状況調査においてのイヌでの交差反応性の問題を解決すべく、感染源であるマダニを調査し、その保有する病原体の実態を把握すると共に、原因不明のマダニ由来感染症の診断に寄与することを目的として調査をおこなった。

### 【材料と方法】

平成24年7月に、兵庫県内で日本紅斑熱患者が最も多い淡路島南部地域の内4地点(洲本市2地点、南あわじ市2地点)から得られた、植生上のマダニ91個体を調査対象とした。また、兵庫県内のリケッチア浸淫状況のモニタリング調査として、イヌのリケッチア感染を調べる視点から、平成25年8月に兵庫県動物愛護センターに収容された4地域(洲本市、南あわじ市、川西市、たつの市)からのイヌ5頭より採取された吸血後のマダニ14匹も合

わせて調査した。

得られたマダニは種を同定<sup>6,7)</sup>後、国立感染症研究所のリケッチア感染症診断マニュアル<sup>8)</sup>に従い、マダニ体表を 70%アルコールとポピドンヨード溶液で消毒後、マダニを細切して Vero 細胞に接種した。その培養物より遺伝子を抽出して遺伝子検査に用いた。

遺伝子検査は、(1) SFGR と JSF リケッチア(*Rickettsia japonica*)の 17-kDa の膜タンパク質領域を標的とした Nested PCR 法<sup>8)</sup>、(2) SFGR の *gltA* をコードする遺伝子を標的とした Nested PCR 法<sup>9)</sup>、(3) HGA の原因アナプラズマを検出するための 16S rDNA を標的とした PCR 法<sup>10)</sup>、(4) SFTS の NP (nucleocapsid protein)遺伝子を標的とした RT-PCR 法を SFTS ウイルス検査マニュアル<sup>11)</sup>に示される PCR プライマーを用い、植生上のマダニには(1)(4)、イヌ吸血マダニには(1)から(4)を適用して PCR 検査を行った。

検査陽性となった検体の一部は塩基配列を確認し、DDBJ (DNA Data Bank of Japan)<sup>12)</sup> の BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) により解析を行い、WEB データベース上の情報と比較評価した。

#### 【結果および考察】

##### 1. マダニの同定

植生上のマダニの同定結果を表 1 に示した。日本紅斑熱患者が毎年発生する淡路島南部地域由来の植生上のマダニは、91 匹中 89 匹(97.8%)がフタトゲチマダニであり、今回の優勢種であった。残り 2 匹は不明のチマダニ属であった。

イヌ吸血マダニ(表 2)は、14 匹中フタトゲチマダニが 10 匹と多く、淡路島以外の地域である川西市とたつの市のイヌでも確認された。

##### 2. PCR による検査

PCR 法による遺伝子検査では、植生上のマダニからは SFGR、JSF、SFTS は検出されなかった(表 1)。

イヌ吸血マダニ(表 2)では、5 頭中 4 頭のイヌを吸血していたそれぞれのマダニ計 4 匹から SFGR 遺伝子が検出された、その内 3 頭のイヌからのマダニ 3 匹では JSF 遺伝子が陽性となった。HGA、SFTS は、全て陰性であった。

高知県の日本紅斑熱が疑われた患者から HGA 遺伝子を検出した大橋ら(2009)<sup>3)</sup>の報告や、兵庫県のマダニから SFTS ウイルス遺伝子を検出した森川ら(2013)<sup>13)</sup>の報告があるものの、今回の我々の調査では、HGA の原因アナプラズマおよび SFTS ウイルスの遺伝子は、マダニから検出されなかった。今後、検体数や調査対象地域を増やした調査が必要と思われる。

##### 3. リケッチア遺伝子の解析

SFGR が陽性となったイヌ吸血マダニ 4 匹全てで PCR 増幅産物の得られた *gltA* (glutamate synthase)遺伝子の塩基配列 322bp を決定し、検討に用いた。南あわじ市、洲本市、たつの市のイヌ由来のマダニから得られた遺伝子は相互に 100%の相同性を示し、川西市からのものはこれらと 305bp(94.7%)が一致した。BLAST 解析を行った結果、前者は *Rickettsia* sp. Mie180 (Accession no. JQ697958)、*R. sp.* LON-13 (Accession no. AB516964)と 100%の相同性を示したが、これらはフタトゲチマダニ由来の株であり、これらがヒトから検出された報告はなかった。一方、ヒトに感染し JSF を起こす *R. japonica*

表1 淡路島南部地域の植生上から採取したマダニの同定及び遺伝子検査結果

採取地域	マダニの種類	数								Nested PCR <sup>8)</sup>		RT-PCR <sup>11)</sup>	
		計	成ダニ		若ダニ		幼ダニ		1 <sup>st</sup> PCR	2 <sup>nd</sup> PCR	set 1	set 2	
			雄	雌	雄	雌	雄	雌	不明	SFGR	JSF	SFTS	
南あわじ市 ①	フタトゲチマダニ	45	18	14	3	6	2	2	0	0/45	0/45	0/45	0/45
	不明(チマダニ属)	2	0	0	1	1	0	0	0	0/2	0/2	0/2	0/2
南あわじ市 ②	フタトゲチマダニ	23	9	12	0	0	0	0	2	0/23	0/23	0/23	0/23
洲本市 ①	フタトゲチマダニ	20	7	10	0	3	0	0	0	0/20	0/20	0/20	0/20
洲本市 ②	フタトゲチマダニ	1	0	1	0	0	0	0	0	0/1	0/1	0/1	0/1
合計		91	34	37	4	10	2	2	2	0/91	0/91	0/91	0/91

[陽性数]/[検体数]

表2 イヌを吸血していたマダニの同定及び遺伝子検査結果

採取地域	マダニの種類	数						Nested PCR <sup>8)</sup>		Nested PCR <sup>9)</sup>		PCR <sup>10)</sup>	RT-PCR <sup>11)</sup>	
		計	成ダニ		若ダニ		幼ダニ	1 <sup>st</sup> PCR	2 <sup>nd</sup> PCR	1 <sup>st</sup> PCR	2 <sup>nd</sup> PCR	HGE	set 1	set 2
			雄	雌	雄	雌	不明	SFGR	JSF	SFGR	SFGR	SFTS		
南あわじ市	フタトゲチマダニ	1	0	1	0	0	0	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1
洲本市	アカコッコマダニ	1	0	1	0	0	0	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1
	不明(チマダニ属)	2	0	0	0	0	2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
川西市	フタトゲチマダニ	3	0	2	1	0	0	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	不明(チマダニ属)	1	0	1	0	0	0	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1
たつの市 ①	フタトゲチマダニ	1	0	1	0	0	0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
たつの市 ②	フタトゲチマダニ	5	0	5	0	0	0	0/5	1/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5
合計		14	0	11	1	0	2	2/14	3/14	1/14	4/14	0/14	0/14	0/14

[陽性数]/[検体数]

(Accession no. AP011533, AY743327, U59724)、や紅斑熱群リケツチア感染症の1つである *R. heilongjiangensis* (Accession no. AY285776, AY28709) とは、2塩基の配列が異なり、相同性は99.4%であった。一部の遺伝子配列の比較のみではあるが、イヌを吸血していたマダニから、遺伝子配列がヒトに対する病原株に大変近いが、ヒトのリケツチア感染症患者からの検出が報告されていないリケツチア遺伝子が検出された。このことから、イヌがヒトで発症の報告がない、これらのリケツチアに感染することにより、*R. japonica* に対する抗体価が交差反応として上昇する可能性が考えられた。我々が行ったイヌのSFGR抗体価調査<sup>4)</sup>においても、抗体価が上昇していたイヌの中には、同様の交差反応が起きている個体が含まれる可能性が考えられる。*R. japonica* を抗原としたイヌの抗体検査によりSFGRをモニタリングに活用する上で、ヒトに感染が報告されないリケツチアを分離し、交差反応性を直接確認することが、今後の検討課題の1つと思われる。

同様に、川西市のイヌ由来のマダニから得られた、リケツチア遺伝子配列のBLAST解析では、節足動物から分離された *R. felis* (Accession no. CP000053, KC158583, JQ674484, GQ329877, GQ329873) 株と322塩基中319塩基(99.1%)が一致した。*R. felis* はSFGRの1つであり、ヒトへの感染例も報告<sup>14)</sup>されるが、今回検出された *R. felis* と99.1%の相同性を持つリケツチアの、ヒトへの感染性については不明であった。前述と同様に、交差反応によりイヌの *R. japonica* に対する抗体価を上昇させる要因の1つである可能性が考えられる。

#### 【まとめ】

今回の調査で、マダニからヒトへの病原体は検出されなかったが、2種類のリケツチア

が検出され、兵庫県内でもマダニがヒトへの病原株以外のリケッチアを保有していることが確認された。これらのリケッチアがイヌに感染し、その結果 *R. japonica* に対するイヌの抗体価が交叉反応的に高くなっている個体がいる可能性が考えられた。イヌの抗体価調査によりリケッチア浸淫状況を調査するに際し、ヒトへの病原性が報告されないリケッチアの影響を考慮する必要があると思われる。

今回の調査ではマダニから HGA の原因アナプラズマおよび SFTS ウイルスの遺伝子は検出されなかった。今後、検体数と調査対象地域を増やした調査を行うことが重要と思われる。

なお研究成果の一部は、研修会<sup>15)</sup>や学会等<sup>16)</sup>で広く公表した。

#### 【謝辞】

本研究にアドバイスを賜りました、馬原アカリ医学研究所藤田博己先生、国立感染症研究所安藤秀二先生、並びにご協力賜りました、兵庫県動物愛護センター、兵庫県庁生活衛生課、並びに各健康福祉事務所の担当者の方々に感謝いたします。

また、研究助成を賜り成果を公表する場を与えていただきました、財団法人大同生命厚生事業団に、感謝申し上げます。

#### 【参考文献】

- 1) 野村哲彦, 戎谷力, 堀口英久, 藤本嗣人: 淡路島の日本紅斑熱死亡例について. IASR, 27, 36-37 (2006)
- 2) 北本寛明, 高井伝仕, 榎本美貴, 近平雅嗣: 兵庫県における日本紅斑熱リケッチア感染症の発生状況. 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告, 2, 20-25(2011)
- 3) 大橋典男, 烏日囃, 高娃, 川森文彦, 高野愛, 川端寛樹, 高野愛, 安藤秀二, 岸本壽男: 国内初の新興感染症「アナプラズマ症」について. 日本細菌学雑誌, 64(1), p. 220(2009)
- 4) 北本寛明, 久本千絵, 藤原香次, 竹下勝弘, 村田由美, 庄田徹, 吉田昌史: 兵庫県における紅斑熱群リケッチア浸淫状況調査. 第5回日本リケッチア症臨床研究会・第19回リケッチア研究会合同研究発表会, (2012年12月, 大津市)
- 5) Masae Tabuchi, Jilintai, Yoshimi Sakata, Naomi Miyazaki, and Hisashi Inokuma: Serological Survey of *Rickettsia japonica* Infection in Dogs and Cats in Japan. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(11), 1526-1528(2007)
- 6) 高田伸弘: 病原ダニ類図譜. 金芳堂, pp.216(1990, 京都)
- 7) 江原昭三: 日本ダニ類図鑑. 全国農村教育協会, pp.562(1980, 東京)
- 8) 国立感染症研究所・地方衛生研究所全国協議会: 2000(平成12)年度リケッチア感染症診断マニュアル
- 9) Veronique Roux, Elena Rydkina, Marina Eremeeva, and Didier Raoult: Citrate Synthase Gene Comparison, a New Tool for Phylogenetic Analysis, and Its Application for the Rickettsiae. *International Journal of Systematic Bacteriology*.

- 47(2), 252-261(1997)
- 10) Martin E. Adelson, Raja-Venkitesh S. Rao, Richard C. Tilton, Kimberly Cabets, Eugene Eskow, Lesley Fein, James L. Occi, and Eli Mordechai : Prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Bartonella* spp., *Babesia microti*, and *Anaplasma phagocytophila* in Ixodes scapularis Ticks Collected in Northern New Jersey. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6), 2799-2801(2004)
- 11) SFTS ウイルス検査マニュアル 平成 25 年 3 月 13 日 (国立感染症研究所)
- 12) DDBJ (DNA Data Bank of Japan) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>)
- 13) 森川茂、宇田昌彦、加来義浩、木村昌信、今岡浩一、福士秀悦、吉河智城、谷英樹、下島昌幸、安藤秀二、西條政幸、澤辺京子、川端寛樹、新倉綾、前田健、高野愛、柳井徳磨、藤田博己、高田伸弘：重症熱接血小板減少症候群(SFTS)ウイルスの国内分布調査結果(第一報). *IASR<速報>*, 2013/8/29 掲載
- 14) Alice N. Maina, Darryn L. Knodel, Ju Jiang, Jo Halliday, Daniel R. Feikin, Sarah Cleaveland, Zipporah Ng'ang'a, Muthoni Junghae, Robert F. Breiman, Allen L. Richards, and M. Kariuki Njenga : *Rickettsia felis* Infection in Fevрил Patients, Western Kenya, 2007-2010. *Emerging Infectious Diseases*, 18(2),328-331(2012) (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/sfts/sfts-iasrs/3864-pr4043.html>)
- 15) 北本寛明：マダニとダニ媒介性疾患. 平成 25 年度環境衛生監視員研修会, (2013. 6, 神戸)
- 16) 北本寛明, 久本千絵, 藤原香次, 竹下勝弘, 田村由美, 庄田徹, 吉田昌史：兵庫県内における紅斑熱群リケッチアの浸淫状況調査. 第 5 回日本リケッチア症臨床研究会・第 19 回リケッチア研究会合同研究発表会, 演題番号 20, (2012, 大津)

【経費使途明細】

遺伝子検査 (核酸抽出キット・遺伝子増幅検査試薬・培養関連等) DNeasy Blood & Tissue Kit(250) (Cat.No.69506)[Qiagen 社]1 個 Minisart (Cat.No.16534K)[Sartorius 社]2 個 TaKaRa Ex Taq 3,000U (Cat.No.RR001C)	96,373 円 20,387 円 165,375 円
参考図書 Dr.夏秋の臨床図鑑 虫と皮膚炎[秀潤社]	12,600 円
事務費用 コピー用紙、通信費、光熱費等	5,265 円
合 計	300,000 円