

## 3 2. 福岡県における SFTS の対策とリスク評価に向けた

### マダニの宿主動物の推定

○小林 孝行 (福岡県保健環境研究所)

芦塚 由紀 (福岡県保健環境研究所)

#### 【研究目的】

重症熱性血小板減少症候群 (severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS) はマダニにより媒介される人獣共通感染症である。リスク評価や対策のためにはマダニが寄生する動物 (宿主動物) や SFTS ウイルスの保有状況に関する情報が重要となる。本研究では、マダニ体内に残存する動物遺伝子の検出により宿主動物を推定する方法を構築し、SFTS ウイルスの検出を併せて行うことでリスク評価や対策につなげることを目的とした。

#### 【研究の必要性】

マダニは動物を吸血する際に様々な病原体を媒介する衛生害虫である。マダニ媒介感染症である SFTS は 2013 年に国内で初の患者が報告され、福岡県ではこれまでに 20 名の患者が報告されている<sup>1)</sup> (2021 年 7 月現在)。近年、野生動物の生息域の拡大により人の身近な生活圏にもマダニの生息が広がり、その感染リスクは高まりつつある。SFTS は人獣共通感染症であることから、感染リスクの低減にはマダニの宿主動物やその生息環境を含めた対策が必要である。即ち、地域のマダニがどのような動物を宿主として生息し、どのような動物との間で病原体が循環されているかを把握したうえで対策を講じる必要がある。マダニの宿主動物の調査には動物を捕獲して付着したマダニを調べる方法が一般的であるが労力がとても大きい。また、捕獲動物はシカやイノシシ等の有害鳥獣に偏ることから実態の把握が難しい。

そこで本研究では、マダニ体内に残存する動物遺伝子の検出により宿主動物を推定する方法を構築する。即ち、植生上の未吸血状態のマダニの体内から動物遺伝子を検出することで、動物の捕獲を行うことなくマダニの宿主動物の推定が可能になると考えられる。さらに、マダニから SFTS ウイルスの検出を併せて行うことで SFTS ウイルスの感染環を把握し、リスク評価やその対策につなげる必要がある。

#### 【研究計画】

##### 1. マダニの採集と使用したマダニの内訳

マダニは県内の 15 地点 (地点 A~O) で採集した。採集はフランネル生地を用いた旗振り

法で行い、未吸血の若虫または成虫を使用した。本研究では 317 個体のマダニを採集し、そのうち 75 個体を動物遺伝子の検出に使用した。これに加えて、過去の我々の報告<sup>2)</sup>において採集したマダニの残余検体である 77 個体を動物遺伝子の検出に使用した（合計 152 個体）。

さらに動物遺伝子の検出に使用した 152 個体のうち、38 個体を SFTS ウイルスの検出に使用した。

使用したマダニの内訳は、キチマダニが 64 個体、フタトゲチマダニが 56 個体、ヤマアラシチマダニが 9 個体、タカサゴチマダニが 8 個体、ヒゲナガチマダニが 7 個体、タカサゴキラマダニが 5 個体、オオトゲチマダニが 3 個体であった。

## 2. マダニからの動物遺伝子の検出系の構築

マダニを Lysis buffer 中で破碎し（1 検体あたり、マダニ 1 個体）、このうちの半分の破碎液からフェノール・クロロホルム法により DNA 抽出を行った（残りの半分は後述の SFTS ウイルスの検出に使用した）。この抽出 DNA について、Wodecka ら（2014）<sup>3)</sup>におけるミトコンドリア 12s rRNA を対象としたプライマーセット（532f12s / 1102r12s、539f12s / 1105r12s）を使用し、nested PCR で動物遺伝子の検出を行った。また、実験室内コンタミネーションによりヒトの遺伝子が増幅されることを抑制するため、プライマーセットの増幅領域内でヒトの遺伝子に特異的な配列を持つペプチド核酸（PNA）を設計し、nested PCR の検出系に使用した。

nested PCR で遺伝子の増幅がみられた場合はダイレクトシーケンスを行い、BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)により動物種を推定した。

## 3. マダニからの SFTS ウイルスの検出

マダニの破碎液から Isogen II（ニッポンジーン）を用いて RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法により SFTS ウイルスの検出を行った<sup>4)</sup>。

### 【結果】

#### 1. 動物遺伝子の検出系の構築

Wodecka ら（2014）<sup>3)</sup>らのプライマーセットを用いた nested PCR の検出系について条件検討を行い、採集したマダニから動物遺伝子の検出を行ったところ、遺伝子の増幅がみられた。さらに、実験室コンタミネーションを抑えるために nested PCR の検出系に PNA を加えたところ、ヒトの遺伝子の増幅抑制がみられた（図 1）。その他の動物の遺伝子増幅に影響はみられなかった。

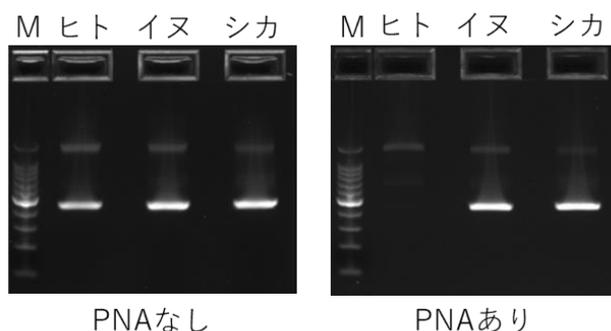


図1 PNAによるヒトの遺伝子の選択的増幅抑制

## 2. マダニからの動物遺伝子の検出結果

マダニ種別の動物遺伝子の検出結果を（表 1）に示した。152 検体のうち 65 検体（42.8%）から動物遺伝子が検出された。成長段階別では若虫が 83 検体のうち 26 検体（31.3%）、成虫が 69 検体のうち 39 検体（56.5%）で動物遺伝子が検出され、成虫の検出率の方が高かった。検出された動物遺伝子は、シカの 35 件が最も多く、次いでイヌの 14 件、テンの 3 件であった。

採集地点別の動物遺伝子の検出結果を（表 2）に示した。シカおよびイヌの検出頻度が多く、それぞれ 7 地点で検出された。地点 N と O の検体からは動物遺伝子は検出されなかった。

表 1 マダニ種別の動物遺伝子検出結果

		検体数	動物遺伝子 検出数	検出率 (%)	検出された動物遺伝子 (検出数)
キチマダニ	nym ph	43	10	23.3	シカ (14)、イヌ (4)、テン (3)、イノシシ (2)、アナグマ (1)、マガン (1)
	adu lt	21	15	71.4	
フタトゲチマダニ	nym ph	26	12	46.2	シカ (16)、イヌ (9)、アナグマ (1)、イタチ (1)、タヌキ (1)、カナヘビ (1)
	adu lt	30	17	56.7	
ヤマアラシチマダニ	nym ph	1	0	0.0	イタチ (1)
	adu lt	8	1	12.5	
タカサゴチマダニ	nym ph	8	2	25.0	タヌキ (1)、マガン (1)
ヒゲナガチマダニ	adu lt	7	3	42.9	シカ (1)、イヌ (1)、モグラ (1)
タカサゴキラマダニ	nym ph	5	2	40.0	シカ (1)、アカガエル (1)
オトゲチマダニ	adu lt	3	3	100.0	シカ (3)
合計	nym ph	83	26	31.3	シカ (35)、イヌ (14)、テン (3)、アナグマ (2)、イタチ (2)、タヌキ (2)、イノシシ (2)、マガン (2)、モグラ (1)、カナヘビ (1)、アカガエル (1)
	adu lt	69	39	56.5	
	total	152	65	42.8	

表 2 採集地点別の動物遺伝子検出結果

採集地点	検出された動物遺伝子											不検出	合計	
	シカ	イヌ	テン	アナグマ	イタチ	タヌキ	イノシシ	マガン	モグラ	カナヘビ	アカガエル			
A	15											1	16	
B	4	3											9	16
C	4	1			1								6	12
D	3	1		1					1				10	16
E	6												4	11
F		1	2				2	1					14	20
G		3						1					6	10
H						1							8	9
I						1					1		5	7
J			1		1								6	8
K	1	3											5	9
L		2		1									7	10
M	2												0	2
N													5	5
O													1	1
合計	35	14	3	2	2	2	2	2	1	1	1	87	152	

## 3. マダニからの SFTS ウイルスの検出結果

本研究で検査した 38 検体からは SFTS ウイルスは検出されなかった。過去の我々の報告<sup>2)</sup>で地点 B におけるフタトゲチマダニの 1 検体から SFTS ウイルスを検出したことを報告したが、このフタトゲチマダニからはイヌの遺伝子が今回検出された。

## 【考察と今後の課題】

本研究で使用したプライマーセットは脊椎動物を幅広く検出できるように設計されたものである。多様な動物種を検出できる一方で、ヒトの遺伝子に対する反応性があるため実験室内コンタミネーションによりヒトの遺伝子が増幅されることがある。ヒトの遺伝子が検出された場合、マダニ由来であるかコンタミネーションであるかを判断する必要があるが、自然環境におけるヒトの宿主としての可能性は低いことからコンタミネーションの場合がほとんどである。また、コンタミネーションが起こった場合、動物遺伝子の増幅がマスクされ、動物遺伝子の代わりにヒトの遺伝子が検出される可能性が考えられる。そこでヒトの遺伝子の増幅を抑えるためにヒトの遺伝子に特異的な配列を持つ PNA を設計して nested PCR の検出系に使用したところ、増幅抑制効果がみられた。一方で、他の動物種の遺伝子増幅には影響はみられなかった。これにより、ヒトを除く動物種の効率的な検出につながるものと考えられた。今回構築した検出系により動物遺伝子の検出を行ったところ、152 検体のうち、65 検体のマダニから動物遺伝子が検出され、検出率は 42.8%であった。動物遺伝子は 11 種類検出され、8 種類の哺乳類（シカ、イヌ、テン、アナグマ、イタチ、タヌキ、イノシシ、モグラ）、1 種類の鳥類（マガン）、1 種類の爬虫類（カナヘビ）、1 種類の両生類（アカガエル）と多様な動物種を検出することができた。検出率や動物種への反応性については、より検体数を増やして検討を行う必要があるが、宿主動物を推定するにあたって有効な検出系であると考えられた。

本研究で最も多く検出された動物遺伝子はシカであった。シカはマダニの主要な宿主であり、SFTS ウイルスの感染環において重要な動物である。今回、キチマダニ、フタトゲチマダニ、ヒゲナガチマダニ、タカサゴキララマダニの合わせて 35 検体からシカの遺伝子が検出された。調査地点別では地点 A から最も多くシカの遺伝子が検出された。この地域は県内でもシカの生息密度の高い場所<sup>5)</sup>であることから、マダニの主要な宿主となっていると考えられた。一方で、シカの生息が確認されていない地域（地点 F-H など）ではシカの遺伝子は検出されず、その他の動物種が検出された。しかし、検出数が少ないことから一部の宿主動物について推定する結果に留まると考えられた。また、SFTS ウイルスの感染環の把握を目的に SFTS ウイルスの検出を行ったが、本研究で使用した検体からは検出されなかった。しかしながら、過去の我々の報告<sup>2)</sup>で SFTS ウイルスが検出された個体の残余検体からイヌの遺伝子を検出することができた。一般的に、SFTS ウイルスの感染環においてイヌは主要なものではないため、偶発的な検出であると考えられるが、動物遺伝子と SFTS ウイルスの両方を検出できた例として重要なものであった。今後さらに検体数を増やして解析をし、県内の SFTS ウイルスの感染環の把握と対策につなげていきたいと考えている。

## 【参考文献】

- 1) 国立感染症研究所：重症熱性血小板減少症候群（SFTS）  
(<https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/sa/sfts.html>)
- 2) 小林孝行ら：平成 30 年度大同生命厚生事業団地域保健福祉研究助成報告書

([https://www.daido-life-welfare.or.jp/research\\_papers/2020/welfare\\_30.pdf](https://www.daido-life-welfare.or.jp/research_papers/2020/welfare_30.pdf))

3) Wodecka et al. : *Exp Appl Acarol.*, 62:543-555, 2014.

4) 国立感染症研究所：マダニからの SFTS ウイルス検出マニュアル

5) 福岡県第二種特定鳥獣（ニホンジカ）管理計画（第6期）

([https://www.pref.fukuoka.lg.jp/uploaded/life/626619\\_61203690\\_misc.pdf](https://www.pref.fukuoka.lg.jp/uploaded/life/626619_61203690_misc.pdf))

**【経費使途明細】**

使 途	金 額
消耗品費 (TE 飽和フェノール、ドデシル硫酸ナトリウム 他)	50,215 円
(ペプチド核酸合成 PNA-HS4 )	64,020 円
(ペプチド核酸合成 PNA-HS3 )	77,220 円
(ペプチド核酸合成 PNA-HS3 )	77,220 円
(デジタルマイクロスコープ 他)	31,325 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円