

17. 愛知県内の日本紅斑熱患者発生地域におけるマダニ相及び *R. japonica* 保有状況調査

○土方 悠希、長谷川 晶子、石田 久仁子、小林 哲也、安井 善宏
(愛知県衛生研究所)

【研究の必要性と目的】

日本紅斑熱は、*Rickettsia japonica* (以下 *R. japonica*) に感染することで発症する紅斑熱群リケッチア症 (Spotted fever group Rickettsiae, SFGR) の1つで、ヒトは *R. japonica* を保有するマダニに刺咬されることで感染する。本疾患は、国内において、主に西日本を中心として流行しているが、その発生数及び発生エリアについては年々増加・拡大傾向にある。近年、キャンプや登山といったアウトドアブームにより、ヒトが野外でマダニと接触する機会が増えており、公衆衛生上注視すべき重要な感染症である。愛知県においても患者が増加傾向であるため、県内に *R. japonica* が侵淫している可能性が高いと考えられる。2021年に発生報告のあった県内患者7名のうち数名が同一地域においてマダニに刺咬され感染した可能性が高く当該地域は、高濃度に *R. japonica* 保有マダニが生息していると考えられるが、本地域を含む愛知県内のマダニ相及び *R. japonica* に関する調査については、これまで報告がなく、その侵淫状況は不明である。そこで本研究では、日本紅斑熱患者発生リスクが高いと考えられた地域におけるベクター側及び病原体側から感染リスク評価及び感染予防対策に資する基礎資料の作成を目的として、マダニの季節消長や種など生息状況と *R. japonica* 保有状況の関係を明らかにする。

【研究計画】

マダニの生息調査

2021年に県内で日本紅斑熱に罹患した複数名の推定感染地域においてフランネル生地を用いた flagging 法により2021年10月～2023年11月までの15か月間で植生マダニを採取し、生息する種類、季節消長を把握した(図1)。採取マダニについては、幼虫、若虫及び成虫を対象とした。若虫及び成虫については実体顕微鏡および光学顕微鏡下で同定を行い、形態学的に分類・集計をした。



図1.マダニの生息調査地 (A地点)

マダニからの病原体検出

1. 材料

採取したマダニ 4,059 個体 (成虫、若虫および一部の幼虫) を、成虫・若虫はマダニ

種ごとに成虫 1～6 個体・若虫 1～20 個体を、種判別をしていない幼虫は 7～100 個体をプールして 1 検体とし、300 検体を検査に供した。

2. *R. japonica* の検出

国立感染症研究所獣医科学部の「マダニからの SFTS ウイルス検出マニュアル」¹⁾ に準じ、虫体から ISOGENOME (NIPPON GENE) を使用して DNA 抽出を行った。*Rickettsia* 属共通のクエン酸合成酵素遺伝子領域 (*gltA*) 及び共通抗原である 17kDa タンパク質をコードする遺伝子領域 (17kDa) を対象とし、各 2 種のプライマー²⁾ を用いた nested PCR により遺伝子の検出を行った。2 領域において遺伝子が検出された検体をリケッチア陽性とし、陽性となった検体は、*gltA* 領域についてダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定後 BLAST 検索による同定を行った。一部の検体は、17kDa 領域についても遺伝子解析を実施した。

【実施内容・結果】

1. マダニの生息状況

マダニの生息調査は、2021 年 10 月から 2023 年 11 月にかけて、感染原因と推定されている地域 (A 地点) において合計 15 回実施し、植生上に生息するマダニ 4 属 9 種 4,186 個体を採取した。採取したマダニの内訳は、*Haemaphysalis flava* (キチマダニ) 561 匹 (60.9%)、*Haemaphysalis longicornis* (フタトゲチマダニ) 191 個体 (20.7%)、*Haemaphysalis kitaokai* (ヒゲナガチマダニ) 111 個体 (12.1%)、*Haemaphysalis hystricis* (ヤマアラシチマダニ) 25 個体 (2.7%)、*Amblyomma testudinarium* (タカサゴキララマダニ) 13 個体 (1.4%)、*Ixodes turdus* (アカコッコマダニ) 8 個体 (0.9%)、*Haemaphysalis megaspinosus* (オオトゲチマダニ) 7 個体 (0.8%)、*Dermacentor bellulus* (ベルルスカクマダニ) 4 個体 (0.4%)、*Ixodes nipponensis* (タネガタマダニ) 1 個体 (0.1%) の順に多く採取され、*H. flava*、*H. longicornis*、*H. kitaokai* で全体の 9 割以上を占めていた (表 1)。

2. マダニの季節消長

2021 年 10 月から 2022 年 9 月の A 地点におけるマダニの季節消長の結果は図 2 のとおりであり、捕獲数については、一人が 0.5H 捕獲作業をした場合の数値を示している。成虫及び若虫については、通年で確認された一方、幼虫は 1～2 月では確認されず、7～9 月にかけて急激な数の増加が認められた。そのため、幼虫の増加する 8～9 月における捕獲割合は、幼虫が 9 割以上を占めており、その他の時期では、成虫及び若虫による捕獲割合が多い傾向であった。また、優占種と考えられる *H. flava*、*H. longicornis*、*H. kitaokai* における季節消長の比較を図 3 に示す。*H. flava* の成虫は 3～6 月、若虫は 11～3 月にかけて多くの個体が確認された。*H. longicornis* の個体数は、成虫は 4 月、若虫は 5 月にピークを迎えており、11～3 月に存在を確認できなかった。*H. kitaokai* は、12～4 月にかけて成虫数が増加し 5～11 月では少量の個体数が散発的に確認できたが、若虫個体は一年を通してほとんど確認できなかった。

表 1. 採取したマダニの識別

species of tick	stage	collection date														total (%)	
		Oct-21	Nov-21	Dec-21	Jan-22	Feb-22	Mar-22	Apr-22	May-22	Jun-22	Jul-22	Aug-22	Sep-22	Jun-23	Oct-23		Nov-23
<i>H. flava</i>	adult	1	5	10	4	0	13	15	14	14	10	0	1	2	4	9	561 (60.9)
	nymph	16	52	61	53	29	97	7	28	15	2	2	2	10	2	83	
<i>H. longicornis</i>	adult	0	0	0	0	0	0	0	0	7	14	9	1	12	0	0	191 (20.7)
	nymph	11	0	0	0	0	0	56	16	5	18	9	5	24	4	0	
<i>H. kitaokai</i>	adult	1	1	5	15	7	29	32	2	0	3	0	0	7	0	7	111 (12.1)
	nymph	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>H. hystricis</i>	adult	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	13	0	0	25 (2.7)
	nymph	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0	0	0	1	0	0	
<i>A. testudinarium</i>	adult	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	1	1	0	1	0	13 (1.4)
	nymph	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	
<i>I. turdus</i>	adult	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	8 (0.9)
	nymph	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	
<i>H. megaspinosa</i>	adult	5	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7 (0.8)
	nymph	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>D. bellulus</i>	adult	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	4 (0.4)
	nymph	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>I. nipponensis</i>	adult	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.1)
	nymph	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
total		34	58	78	73	36	142	117	70	41	54	22	10	76	11	99	

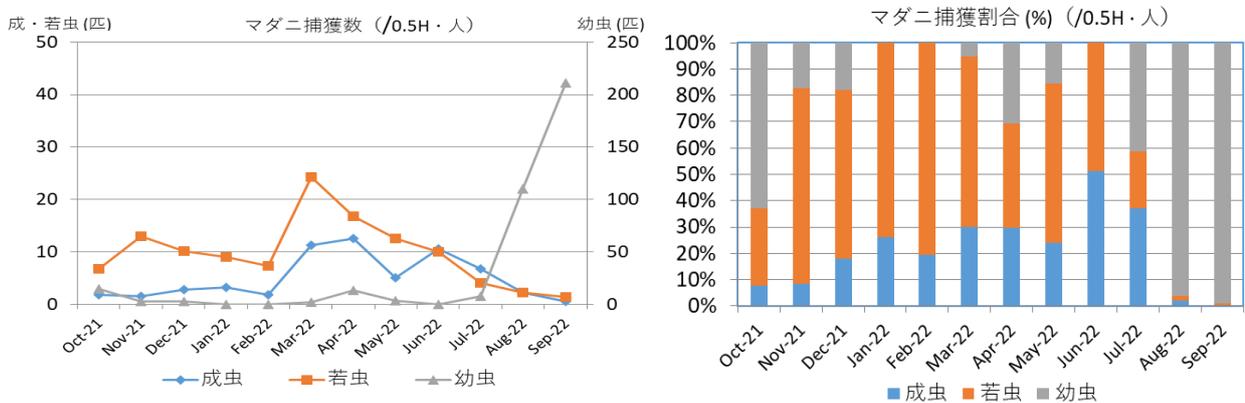


図 2. マダニの捕獲数および捕獲割合 (左: 個体数 右: 割合)

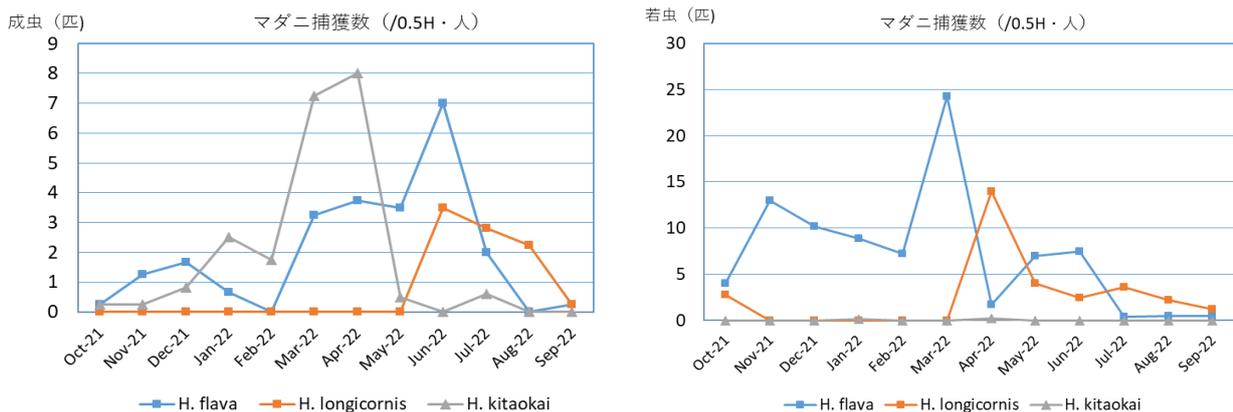


図 3. 優占種の捕獲数 (左: 成虫 右: 若虫)

3. マダニの病原体保有調査

遺伝子検査に供した 300 検体に対してリケッチア遺伝子の検出を行ったところ、122 検体においてリケッチア遺伝子を検出した。*gltA* 遺伝領域について 122 検体中 120 検体から塩基配列が得られ、シーケンス解析を実施したところ、10 のグループ (G1~10) に分類された (表 2)。各グループにおける一部の検体について 17kDa 遺伝子領域の塩基配列の追加解析を行い、Blast 検索により 2 領域ともに 100% の相同性を示した場合をその種

と同定した。その結果、*H. hystricis* (若虫) から得た 1 検体 (G10) は日本紅斑熱の原因となる *R. japonica* と同定した。さらに、G5 は *Candidatus Rickettsia jingxinensis*、G7 は *Rickettsia tamurae*、G8 は *Rickettsia monacensis* と同定された。

表 2. マダニ種ごとの *Rickettsia* 検出状況

マダニ種	検体数	陽性 検体数	陽性率 (%)	Grouping 内訳
<i>H. flava</i>	99	30	30.3	G2(10), G3(1), G4(13), G5(5)
<i>H. longicornis</i>	33	25	75.8	G4(5), G5(20)
<i>Haemaphysalis</i> 属 <i>H. kitaokai</i>	72	13	18.1	G1(2), G2(1), G3(2), G4(1) G5(3), G6(2), G7(1)
<i>H. hystricis</i>	19	6	31.6	G4(5), G10(1)
<i>H. megaspinoza</i>	7	0	0.0	
<i>Ixodes</i> 属 <i>I. turdus</i>	5	2	40.0	G8(1), G9(1)
<i>I. nipponensis</i>	1	1	100.0	G8(1)
<i>Dermacentor</i> 属 <i>D. bellulus</i>	3	0	0.0	
<i>Amblyomma</i> 属 <i>A. testudinarium</i>	6	2	33.3	G4(1), G9(1)
幼ダニ	55	43	78.2	G4(40), G5(3)
合計	300	122	40.7	

※G5, 7, 8, 10 2領域を対象としたBlast検索により、同リケッチア種に対して100%の相同性を示したもの。

G5 : *Candidatus Rickettsia jingxinensis*

G7 : *Rickettsia tamurae*

G8 : *Rickettsia monacensis*

G10 : *Rickettsia japonica*

G1,G2,G3,G4,G6,G9 : *Rickettsia* spp.

【考察と今後の課題】

マダニの生息調査では、4 属 9 種と多くの種類のマダニが日本紅斑熱の推定感染地域 (A 地域) に生息していることが明らかとなった。採取したマダニ種 (成・若虫) のうち *H. flava*、*H. longicornis*、*H. kitaokai* の 3 種が優占種であり、全体の 93.7% を占めていた。*R. japonica* の媒介種として、報告されている 3 属 8 種³⁾ のうち、*H. flava* や *H. longicornis*、捕獲数の少ないものの *H. hystricis*、*H. megaspinoza*、*D. taiwanensis* の 5 種が捕獲されたことは、この地域が *R. japonica* による感染症が発生するベクター側の要因を有する地域であると推察できる。

成長ステージごとに一定時間あたりの捕獲数を比較したところ、春先から初夏にかけて若虫及び成虫における捕獲数の増加が認められ、幼虫については秋に捕獲数がピークに達し、その後、急速に減少していた。マダニ種毎の比較では、*H. flava* や *H. longicornis* は若虫の捕獲数が春先にピークに達し、その数か月後の初夏に成虫の捕獲数がピークを迎えた。

一方、*H. kitaokai* の成虫捕獲数は、初冬から増加し始め春先にかけてピークに達した一般的なマダニの季節消長として、越冬した成虫が春先から初夏にかけて吸血・産卵することで、卵から孵化した幼虫が秋に大量に発生する⁴⁾。この幼虫が、吸血後に若虫の状態越冬し、春に発生するというパターンをとることが多いと言われているが、当該地域の *H. flava*、*H. longicornis* の季節消長は一致していると考えられた。また、上記 2 つの優占種と異なる季節消長を示した *H. kitaokai* も既報⁵⁾ と一致していた。*H. flava* については、季

節による捕獲数に差はあるが、通年捕獲される種であり、感染症に限らずマダニ刺咬症への対策も必要である。

病原体の検索において、*H. hystricis* の若虫 1 検体から *R. japonica* が検出された。*H. hystricis* は、*R. japonica* の分離例が多い種として報告されており³⁾ 感染症を媒介する可能性が高いマダニ種と考えられている。検出数は少ないものの、今回の *R. japonica* の検出結果は、当該地域において *R. japonica* が浸淫している可能性を十分に示唆するものである。

また、その他 SFGR の病原体として考えられている、*R. tamurae*、*R. monacensis* が検出された。*R. tamurae* については日本でのヒトへの感染事例⁶⁾があり、*R. monacensis* についてもヨーロッパや韓国において感染例が報告⁷⁾されているため、今後、当該地域において発生する可能性のあるリケッチア感染症として注意が必要である。

今回、植生マダニの生息状況及び *R. japonica* を含む SFGR 関連遺伝子の検索により、当該地域の感染リスク評価をすることができた。本調査で得られた基礎資料を基に、調査エリアを拡大し県内の状況を調査することで、エリアごとのマダニ媒介感染症の発生リスクを評価していきたい。

【参考文献】

- 1) 国立感染症研究所獣医科学部：マダニからの SFTS ウイルス検出マニュアル
- 2) 国立感染症研究所：リケッチア感染症診断マニュアル
- 3) 国立感染症研究所：日本紅斑熱リケッチア媒介マダニの国内分布状況
IASR41, 138-139, 2020
- 4) 高野愛：マダニの生態とマダニ媒介感染症，山口獣医学雑誌，42，1-8，2015
- 5) 高田伸弘，福田久子：医ダニ学図鑑－見える分類と疫学－，株式会社 北隆館，2019
- 6) Ando S. et al. : Human Rickettsia heilongjiangensis infection, Japan, Emerg Infect Dis, 16, 1306-1308 , 2010
- 7) Kim YS. et al. : First isolation of Rickettsia monacensis from a patient in South Korea, Microbiol Immunol, 61, 258-263, 2017

【経費使途明細】

使 途	金 額
【実験器具】	
シングルピペット(リファレンス 2 パック 3)	117,700 円
電気泳動装置 (Mupid-exU)	57,200 円
ゲルメーカーセット	6,358 円
【PCR 試薬および消耗品】	
Takara Ex Taq 250U	27,937 円
QuantumDye Terminator Cyclesequencing Kit V3.1	83,600 円
96well PCR plate 25 枚	6,655 円
振込手数料	550 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円

