

多摩川流域におけるダニの生息分布調査
およびダニ媒介性人獣共通感染症調査

2017年

堀田 こずえ
東京大学 大学院農学生命科学研究科
獣医学専攻 獣医公衆衛生学教室

【背景と目的】

多摩川流域は緑豊かな環境で、広い河川敷や遊歩道があり、散歩やスポーツ、バーベキュー、花火大会などで多くの人が集まる場所となっている。また、都市地域における緑化の推進や、水質および水中生物、河川敷を含む河川環境の改善により、野生小中動物の棲息が確認され、その分布地域は首都圏中心部へと分布を広げている。これらの野生動物とヒトとの共存については、別の議論として、野生動物に寄生するマダニ類(害虫)も野生動物とともに生息域を都市部へと広げていると予想される。さらに従来、東日本に生息しているマダニ以外にも地球温暖化により、西日本に分布していたマダニの生息域が関東地方にも広がっている可能性がある。マダニ類は多くの感染症を媒介することで知られており、国内でも毎年 500 症例前後報告されるリケッチア症、ツツガムシ病、さらに新しく報告された重症熱性血小板減少症候群(SFTS)などがある。マダニ類の基本宿主は、ネズミ、マウス等の小型哺乳動物からタヌキ、イタチ、シカ等の中型哺乳動物で、宿主を待って茂みの葉の裏側に潜んでいる。

多摩川流域で、手入れがされていない植生の中にヒトが入ることは稀であると考え、一時的にペットの散歩、植物観察などで侵入することも考えられ、マダニに咬まれるリスクがある。これまで、多摩川流域においてダニ媒介性感染症例の報告は無いが、生息しているマダニが感染症病原体を保有している可能性はある。そこで、本研究は多摩川流域で安全かつ安心して人が集まり、生活を送るための情報を収集することを目的とし、多摩川流域におけるマダニの生息分布調査およびマダニが保有する感染症病原体調査を行う。

【材料と方法】

(1) サンプル収集

サンプルのダニ収集は2015年10月から2016年10月の期間に行った。多摩川流域の2つの地域(JR川井-御岳駅間遊歩道:北緯35°48'20.2" 東経139°10'36.2" 地点および東急東横線新丸子駅付近:北緯35°58'85.34" 東経139°66'45.48" 地点)において、旗振り法によって収集した。収集したダニの種の同定は立体顕微鏡下で形態的な分類学的基準(Ehara and Aoki 1980)を用いて行った。1つのチューブあたり、成虫と若虫はそれぞれ1匹ずつ、幼虫は1匹から5匹ずつを1検体として試験時まで-80℃で冷凍保存した。

(2) RNA 抽出および RT-PCR

サンプルを室温に戻した後、各チューブに 1/4” Ceramic Sphere (MP, USA) 1 つと Garnet Matrix A Bulk (MP, USA) を薬さじ 1 杯分に加え、BEAD CRUSHER (TAITEC, Japan) を用いてダニを粉砕、均質化した。ISOGEN (Nippongene, Japan) を用いて、説明書に従って Total RNA を抽出した。抽出して得られた RNA 20 μ l に対して、PrimeScript RT Master Mix Perfect Real Time (TaKaRa, Japan) 5 μ l を用いて cDNA を作成した。

(2.1) SFTS ウイルスの検出

nested PCR 法を行い、1 次反応ではプライマーとして SFTSV NP-2F および SFTSV NP-1Rd を、二次反応では SFTSV NP-1F および SFTSV NP-2R を用いた。反応条件は両者ともに、1 サイクルの 94°C-2 分、35 サイクルの 94°C-30 秒、52°C-30 秒、72°C-30 秒、1 サイクルの 72°C-5 分に設定した。(反応条件を示すときは最初の 1 サイクル 94°C-2 分および最後の 1 サイクル 72°C-5 分は共通するため、以下省略して表記する。)

(2.2) リケッチアの検出

gltA 遺伝子をターゲットとした nested PCR 法および 17-kDa 遺伝子をターゲットとした Semi-nested PCR 法により行った。前者ではプライマー Cs2d および CsEndr を一次反応 (45 サイクルの 94°C-30 秒、50°C-30 秒、72°C-30 秒) に、RpCS. 877p および RpCs. 1258n を二次反応 (45 サイクルの 94°C-30 秒、54°C-30 秒、72°C-30 秒) に用いた。後者では、R1 と R2 プライマーを一次反応 (45 サイクルの 94°C-30 秒、50°C-30 秒、72°C-30 秒) に、R1 および Rr17. 61p プライマーを二次反応 (40 サイクルの 94°C-45 秒、52°C-30 秒、72°C-45 秒) に用いた。

(2.3) フレボウイルスの検出

ポリメラーゼ遺伝子の一部分である L segment をターゲットとした TBPVL2759F および TBPVL3267R プライマーを用いた PCR によって試みた (40 サイクルの 94°C-30 秒、46°C-30 秒、72°C-30 秒)。またフレボウイルスの S segment の検出のために Semi-nested PCR 法を行い、一次反応 (40 サイクルの 94°C-30 秒、47°C-40 秒、72°C-60 秒) において PLBV Sseg1F および PLBV SsegR プライマーを、二次反応 (40 サイクルの 94°C-30 秒、45°C-40 秒、72°C-60 秒) において PLBV Sseg2F および PLBV SsegR プライマーを用いた。

(2.4) フラビウイルスの検出

NS5 遺伝子の増幅のために Semi-nested PCR 法を行い、cFD2 および MAMD プライマーを一次反応（25 サイクルの 94°C-1 分、53°C-1 分、72°C-1 分）に、cFD2 および FS778 プライマーを二次反応（35 サイクルの 94°C-1 分、54°C-1 分、72°C-1 分）に用いた。すべての PCR 反応は各プライマーを 1 pmol、cDNA を 2.5 μ l を含む 1x Go Taq Master Mix (TaKaRa, Japan) 25 μ l によって実行した。各プライマー配列および参考文献を別紙 1 に示す。

3、ゲノムシーケンスと分子系統学的解析

PCR 産物は QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) を用いて精製し、その遺伝子配列を ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer および ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit (Applied Biosystems) を利用して決定した。得られた複数の配列は ATGC および GENETYX-MAC ソフトウェアにより構築した。Reference 株の遺伝子配列として用いたリケッチア *gltA* および 17-kDa 遺伝子配列、フレボウイルスの L 分節と S 分節の部分的および全遺伝子配列は塩基配列データベース GenBank から入手した。分子系統樹は MEGA7 ソフトウェアにより最尤法を用いて作成した。(Kumar et al. 2016)

【結果】

(1) 多摩川流域に生息するマダニの分布調査

2015 年 10 月と 2016 年 3 月から 10 月の間、多摩川沿いの遊歩道にて、ダニの採集を行った。その結果、総数 551 匹、5 種類のマダニを採集した。その内訳は、オオトゲチマダニ 21 匹、キチマダニ 68 匹、フタトゲチマダニ 102 匹、ヒゲナガチマダニ 1 匹、ヤマトマダニ 2 匹、チマダニ幼虫 357 匹であった（表 1）。551 匹中、新丸子付近の多摩川河川敷で採集したマダニは 2015 年 10 月の 1 匹と 2016 年 9 月に 6 匹、10 月に 2 匹の合計 9 匹のみで、全て幼虫であった。奥多摩地域で採集されたマダニは、成虫ではキチマダニ（12 匹）とフタトゲチマダニ（7 匹）が多く、同様に若虫もキチマダニ（56 匹）とフタトゲチマダニ（95 匹）と多かった。本研究で採集した 5 種類のマダニの成虫は主に 3 月から 5 月に多く見られ、夏から秋にかけて幼虫が観察された。

表 1 多摩川流域において採集したマダニ種

月日	オオトゲチマダニ		キチマダニ			フタトゲチマダニ			ヒゲナガチマダニ			ヤマトマダニ			幼虫 チマダニ	合計	
	H. megaphysalis		H. flava			H. longicornis			H. kitaokai			I. ovatus					
	成虫		若虫	成虫		若虫	成虫		若虫	成虫		若虫	成虫				若虫
	雄	雌		雄	雌		雄	雌		雄	雌		雄	雌			
2015年10月	1			2		5									65(1) *	73(1) *	
2016年3月			4	1		9			3							17	
2016年4月			13	4	1	18			53	1			1			91	
2016年5月			1	3	1	7			17					1		30	
2016年6月						3			8							11	
2016年7月						5		4	12							21	
2016年8月						6		2	1						201	210	
2016年9月									1						12(6) *	13(6) *	
2016年10月			2			3	1								79(2) *	85(2) *	
計	1	0	20	10	2	56	1	6	95	1	0	0	1	1	0	357(8))*	551(9))*

* 括弧内の数字は新丸子付近の多摩川流域で採集したマダニの数

(2) マダニからの病原体遺伝子検出

マダニからの遺伝子抽出の際、成虫と若虫は1個体ずつ解析し、幼虫は1匹から5匹を1検体として扱い、検体総数は266とした。PCR法によりダニ媒介性病原体遺伝子検出の結果を表2に示す。フラビウイルスおよびSFTSウイルスは全て陰性であった。リケッチアの17kDa遺伝子は2検体から、gltA遺伝子は6検体から検出され、17kDa遺伝子と比較してgltA遺伝子検出感度が高かった。保有していたマダニはオオトゲチマダニの若虫2匹、キチマダニの若虫1匹、チマダニの幼虫をプールした3検体であった(表3)。また、フレボウイルスはキチマダニの若虫1匹で陽性となった。

表 2 マダニからのダニ媒介性病原体遺伝子検出結果

	フラビ ウイルス	SFTSV	リケッチア		フレボ ウイルス
			17kDa	gltA	
陽性数	0/266	0/266	2/266	6/266	1/266
陽性率	0%	0%	0.75%	2.25%	0.38%

表 3 病原体遺伝子が検出されたマダニ種

サンプル ID	34	37	38	104	218	253	260
採集月	2016年 3月	2016年 3月	2016年 3月	2016年 4月	2016年 8月	2016年 10月	2016年 10月
種	キチマダ ニ	オオトゲ チマダニ	オオトゲ チマダニ	キチマダ ニ	チマダニ	チマダニ	チマダニ
ステージ	若虫	若虫	若虫	若虫	幼虫 5匹	幼虫 5匹	幼虫 5匹

サンプル ID34：フレボウイルス陽性

サンプル ID37, 38, 104, 218, 253, 260：リケッチア陽性

(3) リケッチア遺伝子シーケンス解析結果

PCR法により増幅できた gltA 遺伝子の長さは 299bp~340bp と幅があったが、どの検体のシーケンスも *R. japonica* (AP017602)、*Candidatus R. Vini* (KX159436)、*Rickettsia spp.* Hf332 (AB114803) と 98.8% から 100% の相同性を示した。17kDa 遺伝子の 2 検体は、ともに 378bp が増幅され、*Rickettsia spp.* Hf332 (AB114804) と同一配列であった。

(4) フレボウイルス遺伝子系統樹解析結果

キチマダニの若虫から検出されたフレボウイルス L 分節遺伝子は 465bp 増幅され、遺伝子配列を比較すると Yongjia tick virus (KM817704) と 75.9%、Lesvos virus (KX452150) と 74.5%、Dabieshan tick virus (KM817666) と 74% の相同性を示した。相同性が高く、GenBank 上に S 分節の遺伝子配列が報告されている Yongjia tick virus (KM817764) と Dabieshan tick virus (KM817733) の遺伝子配列を元に S 分節を増幅するプライマーを新たに設計し PCR 法にて増幅したところ、553bp が増幅され、その遺伝子

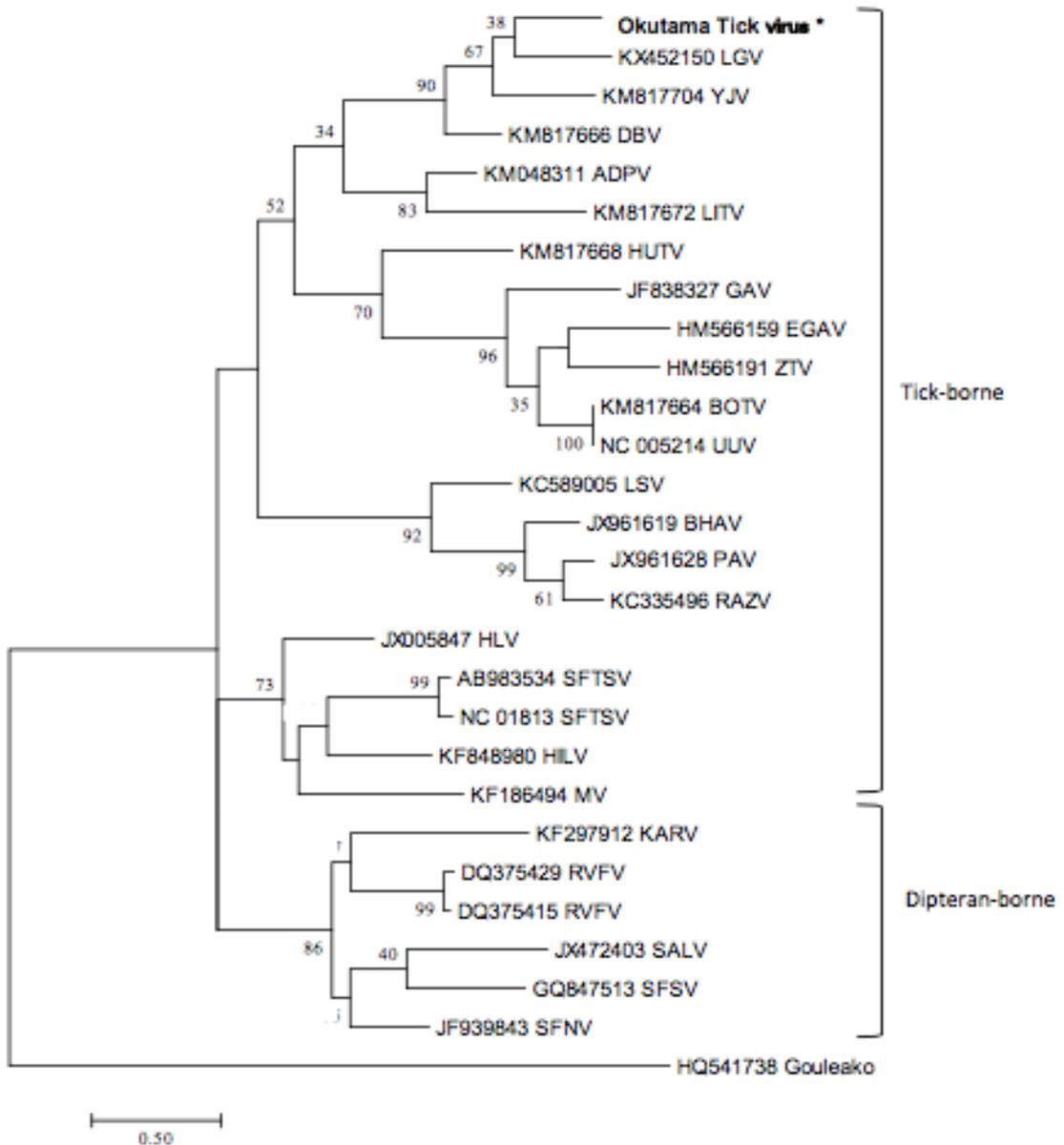
配列を決定した。この配列は、Yongjia tick virus と 76.1%、Dabieshan tick virus と 67.6%の相同性を示した（表4）。また、プレボウウイルスの Reference 株として主に用いられている Uukuniemi virus、SFTS virus、Bhanja virus とは L 分節遺伝子で 56%以下、S 分節遺伝子で 50%以下の相同性となった。さらに系統樹解析を行なった結果を図 1、2 に示す。相同性の結果と相関して、L 分節遺伝子は Yongjia tick virus、Lesvos virus、Dabieshan tick virus とのみ同じクラスターを形成し、S 分節遺伝子は Yongjia tick virus、Dabieshan tick virus と同じクラスターを形成する結果となり、他のプレボウウイルスとは遠い関係であった。

表 4 :

Reference strains	Identities of nucleotide (%)	
	L segment	S segment
Yongjia Tick Virus 1 strain YJ1-1	75.91 (353 / 465)	76.13 (421 / 553)
Lesvos virus strain Lesvos99-Greece-2015	74.62 (347 / 465)	NA*
Dabieshan Tick Virus strain D3	73.98 (344 / 465)	67.63 (374 / 553)
Uukuniemi virus	56.77 (264 / 465)	50.09 (277/553)
SFTS virus HB29	47.52 (221 / 465)	47.55 (263/553)
Bhanja virus strain IG690	49.68 (233 / 465)	48.28 (267/553)

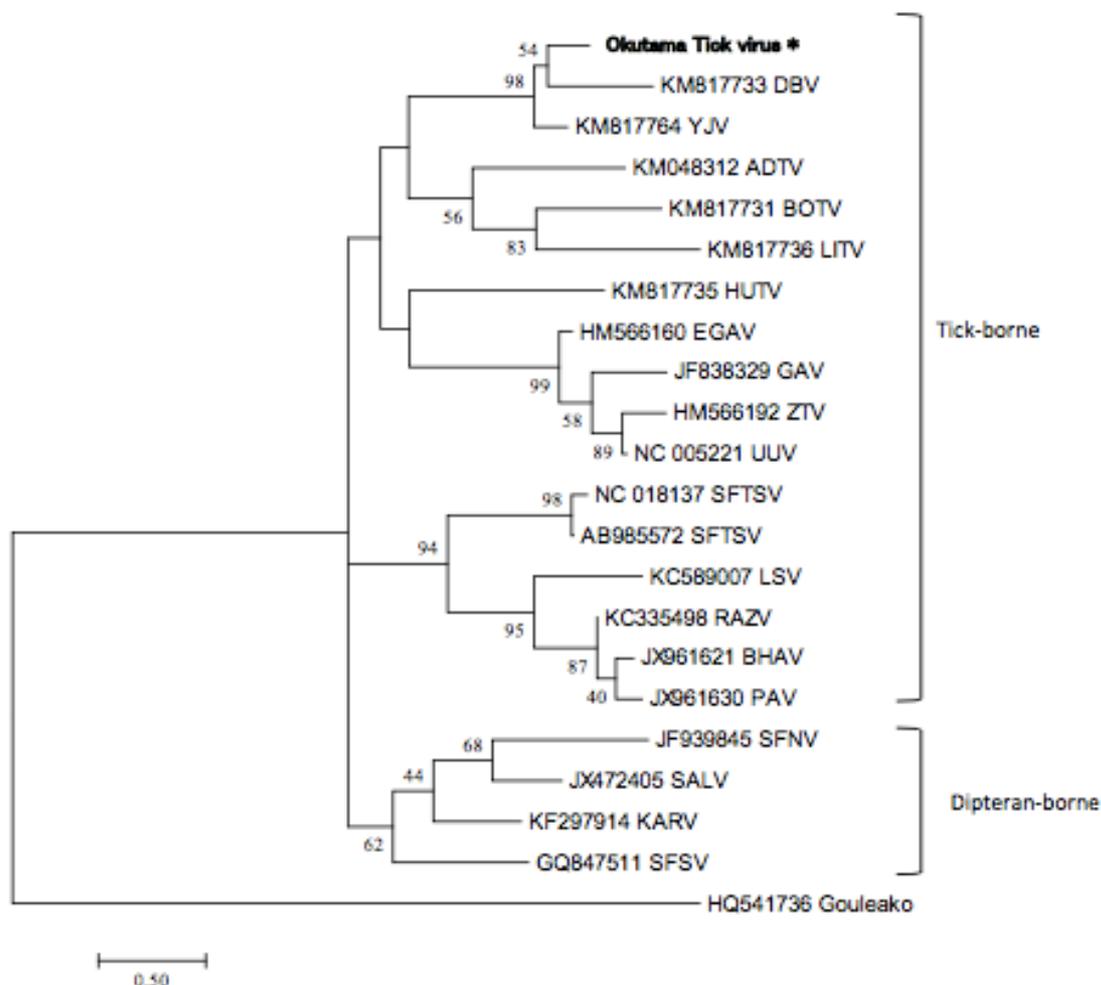
* not applicable

図1：フレボウイルスL分節遺伝子の系統樹解析



*本研究で遺伝子解析を行なった株

図 2 : フレボウイルス S 分節遺伝子の系統樹解析



*本研究で遺伝子解析を行なった株

【考察】

本研究の結果から、多摩川流域の遊歩道および河川敷にはマダニが生息していることが明らかとなった。しかし、奥多摩地域と比較して、定期的に雑草の除去を行なっている新丸子付近の河川敷では、マダニが一過性に増える卵から孵化した幼虫がやや多く採集されただけで、それ以外の成虫と若虫は観察されなかった。このことから、定期的な除草と枯葉の除去は、マダニが生息しにくい環境を作り出している可能性が高く、マダニの増殖を抑えていると考えられる。一方、奥多摩地域のサンプリング場所である JR 川井-御岳駅間の多摩川沿い遊歩道は四季折々の植生が楽しめ、自然の中を散策することが目的の場所であり、年に 1~2 回程度の除草を行なっているが自然を残す形となっていた。このため、マダニ採集を行なった春から秋にかけては毎月、マダニが採集でき、

その数も少ないとは言い難い状況であった。

これらのマダニから、マダニが媒介する可能性のある人獣共通感染症の病原体遺伝子を PCR 法にて検出した結果、リケッチアとフレボウイルス遺伝子が検出された。リケッチア症は西日本を中心に日本紅斑熱が発生しており、関東地方でも千葉県では報告がある。今回、検出されたリケッチア gItA 遺伝子は、日本紅斑熱を発症する *R. japonica* のほか、*Candidatus R. Vini*、*Rickettsia* spp. Hf332 株に高い相同性を示し、17-kDa 遺伝子は *Rickettsia* spp. Hf332 株と同一であった。両遺伝子とも増幅した塩基配列が 299~378bp とそれぞれの遺伝子の一部であるが、どちらの遺伝子も日本で報告されている Hf332 株と近縁である。Hf332 株のヒトへの病原性は明らかになっていないが、マダニに共生するリケッチアであると推測されている。ウイルス病原体の遺伝子検出では、SFTS ウイルスおよびダニ媒介性脳炎ウイルスを含むフラビウイルスの遺伝子は検出されなかったが、SFTS ウイルスを含むフレボウイルス属の L および S 分節遺伝子が増幅された。遺伝子解析の結果、中国で報告されている Yongjia tick virus、Dabieshan tick virus と昨年、ギリシャで報告された Lesvos virus と近縁であった。しかしながら、どの遺伝子とも 68%から 76%の相同性であり、新規フレボウイルス（これ以降、Okutama tick virus）の可能性がとても高いと考えられる。また、Yongjia tick virus、Dabieshan tick virus、Lesvos virus のヒトへの病原性は報告されていない。本研究では、各種病原体の遺伝子検出が目的であり、ウイルスの分離作業を行わなかったが、今後、Okutama tick virus の分離を行い、その病原性を調べる必要があると考える。フレボウイルスはヒトへの病原性を示さないウイルスが多く存在し、非病原性ウイルスである可能性が高い。しかし、非病原性ウイルスの場合、SFTS ウイルスの代替えウイルスとして使用できる可能性もあり、大変興味深いウイルスである。

本研究により、多くの人が訪れる多摩川流域にもマダニが多く生息しており、ヒトへの病原性は不明であるがリケッチアとフレボウイルスが検出された。これまで、多摩川流域において病原性病原体は確認されていないが、マダニに咬まれないよう植生への侵入警告や長袖長ズボンの着用奨励を行い、自然と人が共存できる工夫が必要であると考え。また、疫学調査は継続することに意義があり、同様の調査研究の蓄積を強く望む。

引用文献

Ehara, Shōzō and Aoki, Jun'ichi (1980), *Nihon danirui zukan = Illustrations of the mites and ticks of Japan* 562 p.

Eremeeva, M., Yu, X., and Raoult, D. (1994), 'Differentiation among spotted

- fever group rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA', *J Clin Microbiol*, 32 (3), 803-10.
- Katayama, T., et al. (1996), '[Spotted fever group rickettsiosis and vectors in Kanagawa prefecture]', *Kansenshogaku Zasshi*, 70 (6), 561-8.
- Matsuno, K., et al. (2015), 'Comprehensive molecular detection of tick-borne phleboviruses leads to the retrospective identification of taxonomically unassigned bunyaviruses and the discovery of a novel member of the genus phlebovirus', *J Virol*, 89 (1), 594-604.
- Mediannikov, O. Y., et al. (2004), 'Acute tick-borne rickettsiosis caused by *Rickettsia heilongjiangensis* in Russian Far East', *Emerg Infect Dis*, 10 (5), 810-7.
- Scaramozzino, N., et al. (2001), 'Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences', *J Clin Microbiol*, 39 (5), 1922-7.
- Williams, S. G., et al. (1992), 'Typhus and typhuslike rickettsiae associated with opossums and their fleas in Los Angeles County, California', *J Clin Microbiol*, 30 (7), 1758-62.
- Yoshikawa, T., et al. (2014), 'Sensitive and specific PCR systems for detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains and prediction of patient survival based on viral load', *J Clin Microbiol*, 52 (9), 3325-33.

別紙 1 : 本研究に使用したプライマー

Genes detected	Primers	Sequences (5'-3')	Product sizes (bp)	References
SFTS virus	SFTSV NP-2F	CATCATTGTCTTTGCCCTGA	420	Yoshikawa et al. 2014
	SFTSV NP-1Rd	TTCAGCCACTTCACCCGRA		
	SFTSV NP-1F	ATCGTCAAGGCATCAGGGAA	490	
	SFTSV NP-2R	AGAAGACAGAGTTCACAGCA		
Rickettsia 17kDa	R1	TCAATTCACAACCTTGCCATT	533-539	Katayama et al. 1996
	R2	TTTACAAAATTCTAAAAACC		
	Rr17.61p	GCTCTTGCAACTTCTATGTT	434	Williams et al. 1992
	R1	CATTGTTTCGTCAGGTTGGCG		
Rickettsia gltA	Cs2d	ATGACCAATGAAAATAATAAT	1251	Mediannikov et al. 2004
	CsEndr	CTTATACTCTCTATGTACA		
	RpCs.877p	GGGGCCTGCTCACGGCGG	382	Eremeeva et al. 1994
	RpCs.1258n	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA		
Phlebovirus L segment	TBPVL2759F	CAGCATGGGGICTIAGAGAGAT	514	Matsuno et al. 2015
	TBPVL3267R	TGIAGIATSCCYTGCATCAT		
Phlebovirus S segment	PLBV Sseg1F	CCTRCACATCTGCCGSGGGAC	710	
	PLBV SsegR	GTGMCCCAGTCTGTCCTAA		
	PLBV Sseg2F	GCGACGACATCACCCCTG	590	
	PLBV SsegR	GTGMCCCAGTCTGTCCTAA		
Flavivirus NS5	cFD2	GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC	237	
	MAMD	AACATGATGGGRAARAGRGARAA		
	cFD2	GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC	234	
	FS778	AARGGHAGYMC DGCHATH TGGT		

多摩川流域におけるダニの生息分布調査およびダニ媒介性人獣
共通感染症調査

(研究助成・学術研究VOL. 46—NO. 325)

著 者 堀田 こずえ

発行日 2017年11月

発行者 公益財団法人とうきゅう環境財団

〒150-0002

東京都渋谷区渋谷1-16-14 (渋谷地下鉄ビル内)

TEL (03) 3400-9142

FAX (03) 3400-9141

<http://www.tokyuenv.or.jp/>