

令和元年6月27日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00569

研究課題名(和文) マダニ生息分布調査と次世代シーケンシングによる保有病原体の網羅的検出

研究課題名(英文) Tick prevalence investigation and determination of pathogens in the ticks

研究代表者

サトウ 恵 (SATO, MEGUMI)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：70601813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：2016年から2018年度の3年間で新潟県下においてマダニの採取を行った。マダニ種の分類を行い、それぞれの地域において現在分布しているマダニ種のおよその把握を行うことができた。新潟県で現在確認されたマダニ種は14種で、1950年代には見られなかった南方系のマダニ種も確認している。またマダニが保有しているリケッチア、ボレリアの検出を行い、それぞれに病原体の種特異性を確認した。検出されたリケッチアは*R. asiatica*, *R. helvetica*, *R. monacensis* の3種であった。ボレリアは*B. japonica*, *B. miyamotoi* また、種不明*Borrelia*属が検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1950年来、60年ぶりに新潟県において分布しているマダニ種のおよその状況が把握できた。病原体と媒介者(マダニ)間には種特異性があり、その地域において分布しているマダニ種を把握することにより、マダニ媒介性感染症の発生予測が可能となる。また60年間における、環境変化による、マダニ種の変化を把握し、今後気象変化や土地被覆、野生動物の動きとデータを併せることにより、今後のマダニの分布変化予測や、感染症の拡散予測などができる可能性があり、今後の展開も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Tick collection was conducted during 2016 to 2018, and tick prevalence Niigata prefecture was revealed. 10 tick species were recorded in this research. Some of them are ticks in hot area, and have never seen in Niigata in 1950's. Tick born diseases pathogens; *Rickettsia* spp. and *Borrelia* spp. detection was done, and host-pathogen specificity was observed. 3 species of *Rickettsia* were detected, namely *R. asiatica*, *R. helvetica*, *R. monacensis*. For *Borrelia*, *B. japonica*, *B. miyamotoi* and unknown species of *Borrelia* were detected from collected ticks.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マダニ ボレリア リケッチア

1. 研究開始当初の背景

(1) **マダニ媒介性感染症**：日本国内でみられる主なマダニ媒介性感染症病原体には 2013 年新興感染症として確認され、致死率の高さで注目を浴びた SFTS ウイルス(ブニヤウイルス科フレボウイルス属)：重症熱性血小板減少症候群、日本紅斑熱リケッチア (*Rickettsia japonica*)：日本紅斑熱、ボレリア属細菌 (*Borrelia garinii* 等)：ライム病などが挙げられる。マダニ媒介性感染症の多くは、患者が発生した時点でそれぞれの地方自治体にマダニの分布調査・病原体の保有の有無の確認が要請される事が多く(症例ベースの調査)、定例的な系統だった調査はほとんどの地域において行われていない。また、ほとんどの場合、発生した感染症のみについての状況把握が求められるため、発生後の数年間の限られた病原体のみの調査が行われているのが現状である。マダニ媒介性感染症の多くは西日本での報告が多かったが、近年それが東日本へも広がりを見せている。

(2) **マダニの分布**：マダニ媒介性の感染症は古くから存在が知られており、1960 年代頃まではマダニの分布調査などは全国各地で行われ、その地域に分布しているマダニの種類は把握されていた。マダニ媒介性感染症は他の感染症に比して発生数が少ないこと、またこれらの感染症の致死率は低いことなどから軽視されてきた。しかし近年、SFTS のような致死率の高い感染症が発生し、さらにリケッチアの患者数は増加し新興感染症として問題となってきた。日本では寄生虫学者が衛生動物(マダニ・蚊など)の調査を担ってきたが、多くの寄生虫症を撲滅してきた日本では寄生虫学者の数が減少の一途を辿り、医学科ですら寄生虫学者がいない大学も増え、マダニ採取や分類を出来る人材が非常に少なくなっているという課題が浮き彫りになっている。

(3) **環境変化とマダニとマダニ保有病原体への影響**：マダニ類は全て吸血性で、国内では約 50 種が知られており、ヤマトマダニ、シュルツェマダニ、フタトゲチマダニ、キチマダニ、タカサゴキララマダニ等が一般的に、春から秋にかけて、よくヒトを吸血する。近年、関東の温暖地から西南日本に多くみられるとされているタカサゴキララマダニが新潟県でも生息が確認された。1960 年からの 50 年間の環境変化(気候変動・土地被覆の変遷など)により、マダニの宿主となっているイノシシやシカなどの野生動物の食物となる植物の分布や野生動物自体の分布が変化し、またそれに伴いマダニの分布に変化が起こっている可能性がある。また、マダニの生息分布の変化によって、マダニ媒介性疾患の分布状況が変化している可能性が十分にありえる。この「環境」、「媒介生物」、「病原体」、「宿主」のそれぞれの分布は相関関係を調べれば、環境変化とマダニ媒介性感染症の関係を理解できる可能性がある。

2. 研究の目的

2015 年時点で、マダニ媒介性感染症として新興感染症である SFTS や再興感染症である日本紅斑熱リケッチアは近年発生率が増えており、媒介者であるマダニそしてマダニ保有病原体の分布状況、を把握することは感染のリスクを予測する上で重要である。エコヘルスは感染症を病原体、宿主、媒介生物、またそれらをとる環境全体の問題としてとらえる概念である。本研究においてはエコヘルスの概念をもとに、(1)マダニの分布状況を野生動物(イノシシ・シカ)の動向と共に把握し、(2)マダニ保有病原体の網羅的解析を行い、その遺伝子を保存、(3)環境変化(気候変動・土地被覆の変遷など)が与えるマダニの分布状況への影響を GIS を使用して検証し、マダニの採集・分類の技術の継承を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究においてはエコヘルスの概念をベースにマダニ(宿主)マダニ媒介性感染症(病原体)の現在の状況を知り、また環境変化がそれらの宿主、病原体へ及ぼす影響について検証することを目的としており、下記の 3 つの課題から構成される。

(1) 現在のマダニの分布状況を確認するために実際に新潟県・長野県において植生マダニの収集、種の同定を行い、過去のデータと比較する。

各年度、春と秋の天候の良い日に新潟県内代表地(上越、中越、下越より選出)において旗ざり法においてマダニの採取を行う * 比較検討のためにダニ採取がまだ可能な場所であれば過去(1960 年代)の採取場所を選定する。* 地元の猟友会などに野生動物(シカなど)から目撃情報を提供されているため、参考にする。

病原ダニ類図譜(高田伸弘著)や山口大学より提供されているマダニ同定用簡易マニュアル(高野愛著)などを使用しながら、形態学的に採取されたマダニを性別、成長ステージ(幼ダニ、若ダニ、成虫)種もしくは属まで分類を行う。* 長期的に保存できるレジンをういてマダニ標本を作成し、今後のマダニ分類に使用できる生物試料として保管する。* 必要に応じてペストロジー学会、日本衛生動物学会、国立感染症研究所、馬原アカリ医学研究所が開催する研修などを利用し、大学・新潟県自治体など数名態勢でマダニの収集から分類まで出来る体制を構築する。

(2) マダニ媒介性感染症(既知)に関しては特異的プライマーを用いた検索、またその他の病原体については遺伝子の網羅的解析などを行い、可能な限り把握する。

採取したマダニ標本から DNA と RNA を抽出する。成虫は 1 匹、幼ダニ・若ダニは 5 匹を

プールして 1 検体とする。2 mm 径のアルミナボールを使ったビーズクラッシャー処理によりマダニを破碎し、核酸抽出キットを用いた二層抽出により、DNA と RNA をそれぞれ抽出する。次に、検体ごとに病原体遺伝子を検出する。リケッチア属 (gl tA 遺伝子) , ボレリア属 (鞭毛抗原遺伝子) , パベシア (18S rRNA 遺伝子) , SFTS (SFTSV 遺伝子) について、各病原体に特異的プライマーを使って、PCR 増幅 (SFTS は RNA の逆転写 PCR および増幅) により検出する。また、検出された PCR 産物の塩基配列をサンガーシーケンサーで解読する。マダニの集団遺伝解析とマダニが吸血した宿主解析 (哺乳類) は、次世代シーケンシング解析による網羅的検出を行う。得られるマダニとマダニ宿主の塩基配列データを用いて、各種の遺伝的多様性の空間構造を評価する。地域間の遺伝的類似性 (遺伝子流動) に基づいて、マダニの拡大経路や地域間交流の空間パターンを評価し、マダニ種ごとの違いを主な宿主の行動生態等の観点から考察する。

(3) 環境変化 (天候や野生動物の移動など) がマダニ、マダニ保有病原体に与える影響について GIS を用いて評価する。

環境変化 (気候変動・土地被覆の変遷など) の状況を気象庁アメダスのデータベース、高解像度土地利用土地被覆図や国土地理院のホームページ (<http://nlftp.mlit.go.jp/ksj/>) や、また新潟県 (県・図書館など) から入手し、現在と過去の環境変化の状況を GIS を用いて比較、検討、視覚化 (mapping など) する。野生動物の分布状況を野生動物目撃情報 (新潟県) 、地元の猟友会、鳥獣保護員、市の農林業担当者、JA 職員からの情報に基づき、野生動物の数や種類を整理し、同じく GIS を用いマダニ、マダニ保有病原体と併せた情報を可視化する。*GIS によって可視化された情報は地方自治体にマダニの分布危険地帯 risk map などを作成し報告を行い、住民の感染症の防除に役立てる。

4. 研究成果

(1) 新潟県におけるマダニの分布状況

2016 年度から 2018 年度において新潟県下 38 地点においてマダニの採取を行った (Figure 1) 。2016 年から 2017 年において採取したマダニ種は 14 種 (*Haemophysalis longicornis*, *H. flava*, *H. megaspinosus*, *H. histricis*, *H. japonica*, *Haemophysalis* spp., *I. ovatus*, *I. nipponensis*, *I. persulcatus*, *I. monospinosus*, *I. columnae*, *I. turdes*, *Ixodes* spp. and *Dermacentor taiwanensis*) で、合計 4809 匹となった。1950 年代に採取されたマダニ種と比較し、比較的低温地域でとれるとされるマダニ種が減り、温帯地域でとれるとされているマダニ種が新たに採取されてきている。

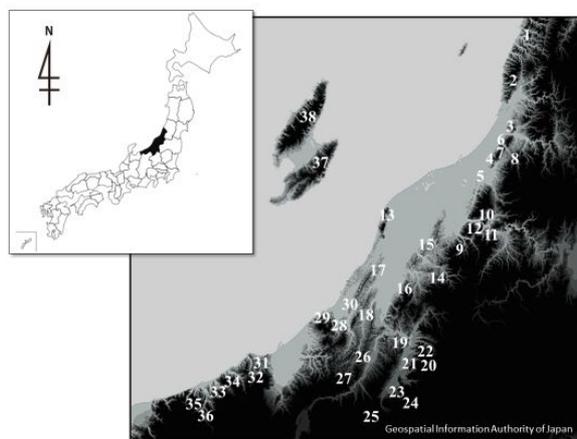


Figure 1. Tick collection sites in Niigata prefecture.

(2) 新潟県下採取マダニにおける病原体の保有状況

マダニ中のリケッチアの検出

Ixodes 属でリケッチアの保有率が高く、成虫では *I. monospinosus*; 4/12, *I. nipponensis*; 7/16, *I. ovatus*; 29/344 となった。また *H. flava* と *H. longicornis* においてもリケッチアが検出されている (Table 1) 。検出されたリケッチアは、マダニとの種特異性が見られ、*I. ovatus* からは *R. asiatica*, *I. monospinosus* からは *R. helvetica*, *I. nipponensis* からは *R. monacensis*, *H. flava* からは種不明の *Rickettsia* sp. が検出されており、その地域に分布しているマダニ種を把握することにより、今後発生するリケッチアが予測できる可能性が示唆された。

Table 1. Prevalence of Rickettsial genes detected from ticks by PCR

Tick species	No. positive / tested					
	adult				nymph*	larva*
	female	male	total	(%)		
<i>D. taiwanensis</i>	0 / 14	0 / 15	0 / 29	0.0	0 / 1	-
<i>H. flava</i>	0 / 145	2 / 161	2 / 306	0.7	9 / 202	1 / 31
<i>H. histricis</i>	0 / 2	-	0 / 2	0.0	0 / 1	-
<i>H. longicornis</i>	0 / 40	0 / 10	0 / 50	0.0	6 / 232	3 / 104
<i>H. megaspinosus</i>	0 / 2	0 / 1	0 / 3	0.0	-	-
<i>Haemaphysalis</i> spp.	0 / 1	0 / 1	0 / 2	0.0	0 / 1	0 / 11
<i>I. columnae</i>	-	-	-	-	-	0 / 2
<i>I. monospinosus</i>	3 / 11	1 / 1	4 / 12	33.3	0 / 1	0 / 1
<i>I. nipponensis</i>	2 / 4	5 / 12	7 / 16	43.8	7 / 10	0 / 2
<i>I. ovatus</i>	17 / 177	12 / 167	29 / 344	8.4	0 / 2	-
<i>I. persulcatus</i>	0 / 2	0 / 5	0 / 7	0.0	0 / 1	-
Total	22 / 398	20 / 373	42 / 771	5.4	22 / 451	4 / 151

*Shown by pool number

マダニ中の SFTS の検出

本研究において採取されたマダニから SFTS ウイルスは検出されなかった。

マダニ中のボレリア属の検出

遺伝子検体 1312 中、36 検体よりボレリアを検出した。*I. ovatus* から *B. japonica* (28 検体) と *B. miyamotoi* (2 検体) が検出され、*H. flava* と *H. longicornis* からは種不明の *Borrelia* sp. が検出された (Table 2)。*B. japonica* と *B. miyamotoi* は弱毒性とされてきたが、ライム病の起炎菌となりうるとの報告もあり、県内でのライム病との関連性を今後探る必要がある。また、*Haemophysalis* 属から検出されている *Borrelia* 種の特定、病原性などの確認も必要である。リケッチアと同様マダニとボレリア種との種特異性が考えられるため、今後県内でのライム病起炎菌の予測ができる可能性が示唆された。

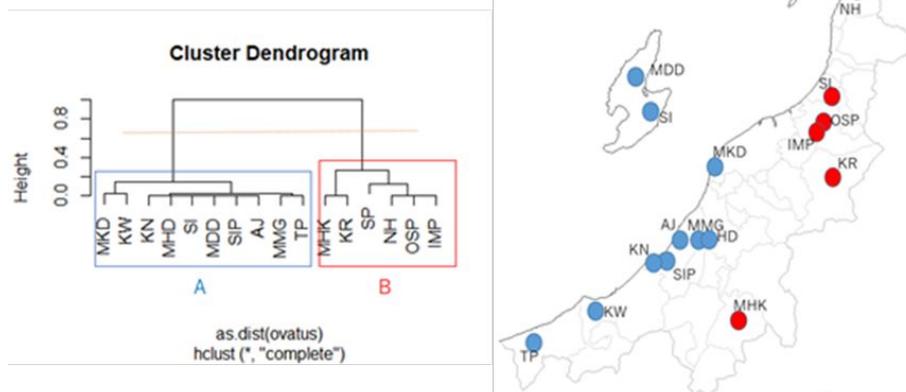
DNA No.	Tick collection Date	Tick collection Place	Host Tick spp. / Stage (sex)	<i>Borrelia</i> spp.
39	2016.05.10	下越 3	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
158	2016.06.08	下越 5	<i>I. ovatus</i> / Adult (M)	<i>B. japonica</i>
194	2016.10.10	下越 8	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
197	2016.06.15	中越 12	<i>I. ovatus</i> / Adult (M)	<i>B. japonica</i>
200	2016.06.15	中越 12	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
215	2016.06.28	中越 13	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
216	2016.06.28	中越 13	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
251	2016.07.20	中越 15	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
322	2016.11.21	下越 1	<i>H. flava</i> / Adult (M)	<i>Borrelia</i> sp.
111	2017.04.28	中越 1	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
214	2017.04.28	中越 2	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
303	2017.05.02	中越 3	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
314	2017.05.16	中越 4	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
359	2017.05.19	中越 5	<i>I. ovatus</i> / Adult (M)	<i>B. japonica</i>
366	2017.05.19	中越 5	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
374	2017.05.19	中越 5	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. miyamotoi</i>
377	2017.05.19	中越 5	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
380	2017.05.19	中越 5	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
509	2017.06.06	上越 6	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
512	2017.06.06	上越 6	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
513	2017.06.06	上越 6	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
516	2017.06.06	上越 6	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
564	2017.06.16	上越 7	<i>I. ovatus</i> / Adult (M)	<i>B. japonica</i>
577	2017.06.16	上越 7	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
582	2017.06.16	上越 7	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
585	2017.06.16	上越 7	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. miyamotoi</i>
587	2017.06.16	上越 7	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
650	2017.06.20	上越 8	<i>I. ovatus</i> / Adult (M)	<i>B. japonica</i>
651	2017.06.20	上越 8	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
653	2017.06.20	上越 8	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
656	2017.06.20	上越 8	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
663	2017.06.20	上越 8	<i>H. longicornis</i> / nymph	<i>Borrelia</i> sp.
679	2017.07.11	上越 9	<i>I. ovatus</i> / Adult (F)	<i>B. japonica</i>
776	2017.10.05	下越 10	<i>H. flava</i> / Adult (M)	<i>Borrelia</i> sp.
809	2017.10.05	下越 10	<i>H. flava</i> / nymph	<i>Borrelia</i> sp.
846	2017.10.27	下越 10	<i>H. longicornis</i> / nymph	<i>Borrelia</i> sp.
872	2017.11.22	下越 10	<i>H. longicornis</i> / nymph	<i>Borrelia</i> sp.

(3) 環境変化が与えるマダニとマダニ病原体への影響

結果(1)において、60年前に新潟県では見られなかった比較的温暖な地域にいるとされるマダニ種が近年見られるようになってきている。現在マダニ中において宿主の血液の検索を模索しており、それが出来た時点でマダニ、マダニ中の病原体、また宿主との関連性を検証していく予定である。これによって今後の気温変化や、土地の被覆、野生動物の動きなどと合わせることによりマダニの分布状況予測、またマダニ感染症の予測が出来る可能性があり、今後の

発展も期待できる基礎情報を本研究にて得ることが出来た。また、マダニの集団解析の結果より、本研究にて新潟県で採取した *I. ovatus* は2つの集団に分けられることが分かり、新潟県における *I. ovatus* の侵入は少なくとも2ルートあることが示唆された。今後このデータも野生動物の動向と併せて解析予定である。

Figure 4 マダニの集団遺伝解析と採取地



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件) 投稿準備中 3 件

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) 新井礼子, 加藤美和子, 青木順子, 池田董, 田村務, Marcello Otake Sato, サトウ恵. 新潟県の日本紅斑熱患者発生地域におけるマダニ保有リケッチア調査. 第68回日本衛生動物学会東日本支部大会(東京)2016.10
- (2) サトウ恵, 池田董, 渡辺幸三, Maria Angenica F. REGILME, Marcello Otake Sato, 新井礼子, 田村務. 新潟県におけるマダニ生息分布調査. 第86回日本寄生虫学会大会(札幌)2017.05
- (3) サトウ恵, 池田董, 渡辺幸三, Maria Angenica F. REGILME, Marcello Otake Sato, 新井礼子, 田村務. 新潟県において収集したマダニ類からのボレリア属 *Borrelia* spp. の検出. 第58回日本熱帯医学会大会(東京)2017.11
- (4) サトウ恵, 池田董, 渡辺幸三, Maria Angenica F. REGILME, Marcello Otake Sato, 新井礼子, 田村務. 新潟県において2016年から2017年の間に収集したマダニ類からのボレリア属 *Borrelia* spp. の検出. 第87回日本寄生虫学会大会(東京)2018.03
- (5) サトウ恵, 小柳愛佳, 石塚爽香, 池田董, 渡辺幸三, Maria Angenica F. REGILME, Marcello Otake Sato, 新井礼子, 田村務. 2017年度に新潟県において収集したマダニからのボレリア属 *Borrelia* spp. の検出. 第59回日本熱帯医学会大会(長崎)2018.11
- (6) Megumi SATO, Marcello Otake SATO, Sumire IKEDA, Kozo WATANABE, Maria Angenica F. REGILME, Reiko ARAI, Tsutomu TAMURA. Back to the field: Ticks species distribution after half century of environmental changes and the risk for tick-borne diseases in Niigata Prefecture, Japan. Joint International Tropical Medicine Meeting 2018 (Bangkok, Thailand) 2018.12

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 渡辺 幸三

ローマ字氏名: Watanabe Kozo

所属研究機関名: 愛媛大学

部局名: 理工学研究科

職名: 教授

研究者番号(8桁): 80634435

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 中尾 稔

ローマ字氏名: Nakao Minoru

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。