

利尻島におけるマダニ相と保有病原体の調査

新倉（座本）綾¹⁾・佐藤雅彦²⁾・川端寛樹¹⁾・大久保（佐藤）梢¹⁾・
安藤秀二¹⁾・石原智明³⁾・花木賢一¹⁾

¹⁾ 〒 208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1 国立感染症研究所

²⁾ 〒 097-0311 北海道利尻郡利尻町仙法志字本町 136 利尻町立博物館

³⁾ 〒 069-8501 北海道江別市文京台緑町 582 酪農学園大学

Investigation of Tick-borne Pathogens in Ticks on Rishiri Island, Hokkaido, Japan

Aya ZAMOTO-NIIKURA¹⁾, Masahiko SATO²⁾, Hiroki KAWABATA¹⁾, Kozue SATO-OKUBO¹⁾, Shuji ANDO¹⁾,
Chiaki ISHIHARA³⁾ and Ken-Ichi HANAOKI¹⁾

¹⁾National Institute of Infectious Diseases, Musashimurayama, Tokyo, 208-0011 Japan

²⁾Rishiri Town Museum, Senhoshi, Rishiri Is., Hokkaido, 097-0311 Japan

³⁾Rakuno Gakuen University Ebetsu, Hokkaido, 069-8501 Japan

Abstract. To investigate tick-borne pathogens including human babesiosis, ticks were collected by flagging vegetation in June, 2018, at 8 places on Rishiri Island. Collected ticks included 28 of *Ixodes pavlovskyi*, 20 of *I. persulcatus*, 5 of *Haemaphysalis japonica douglasi* and 1 of *H. flava*. *Babesia* sp. was not detected by PCR in any of ticks collected. On the other hand, the Lyme disease *Borrelia*, *Borrelia garinii*, and agents of the spotted fever group, *Rickettsia helvetica* and *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*, were detected in *I. pavlovskyi*, examined by PCR. *Ixodes persulcatus* contained *Bo. bavariensis*, *Bo. garinii*, *R. helvetica* and *Candidatus R. tarasevichiae*. Phylogenetic analysis based on the mitochondrial *COI* gene sequence of *I. pavlovskyi* revealed 2 distinct lineages. One of which was newly identified and closely related to the lineage consisting of Russian *I. pavlovskyi*.

はじめに

ヒトバベシア症はマダニ媒介性の動物由来感染症である。病因の *Babesia* 属原虫は、宿主動物の赤血球に感染し、増殖する。日本ではヒトバベシア症患者が 1999 年に初めて見つかり、原因が輸血感染であること、血液提供者の一人が不顕性感染していたこと、*Babesia microti* がその病因原虫であることが明らかとなった (*Ba. microti* Kobe と命名) (Wei *et al.*, 2001)。その後の全国各地の調査では、*Ba. microti* Kobe 以外にも、米国の流行株に遺伝的に近い *Ba. microti* US-lineage や、日

本固有の *Ba. microti* Hobetsu-lineage、欧州で散発的に患者の発生がある *Ba. divergens* 近縁原虫 (*Ba. divergens* Asia-lineage) など、新興感染症をひきおこす可能性がある原虫が次々と見つかってきている (Zamoto *et al.*, 2004; Tsuji *et al.*, 2001; Zamoto-Niikura *et al.*, 2014)。中でも北海道本島は、*Ba. microti* US-lineage, *Ba. microti* Hobetsu-lineage, *Ba. divergens* Asia-lineage が分離、検出されており、最も多様な原虫種が生息する地域となっているが、離島については不明である (Zamoto-Niikura *et al.*, 2012)。

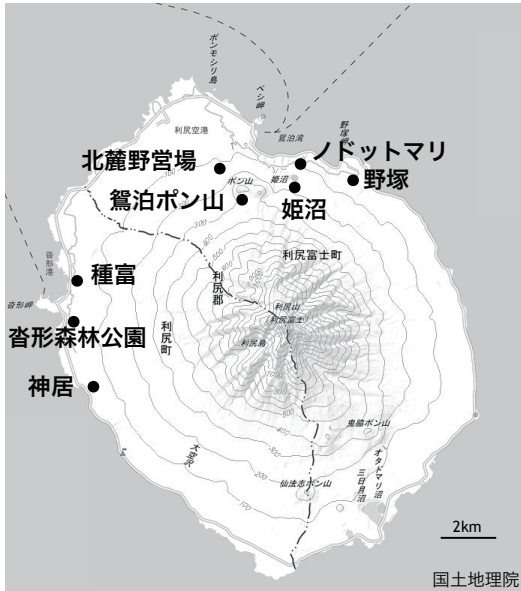


図 1. マダニ採集地。

利尻島において過去に行われたマダニ相の調査 (Yamauchi *et al.*, 2013) によると, *Ba. microti* US-lineage, *Ba. divergens* Asia-lineage のベクターとなっている *Ixodes persulcatus* (シュルツェマダニ) が記録されている。さらには, マダニ媒介性感染症の病因となるボレリアヤリケッチアが上記マダニから分離されており, バベシアも利尻島産のマダニから検出される可能性は十分考えられる。そこで本研究では, 利尻島が北海道の島嶼であること, また過去にマダニ媒介性細菌が分離されていることに着目し, マダニからのバベシア及び, ボレリアヤリケッチアの病原体検索を試みた。さらに, 分子生物学的手法による利尻産マダニの系統学的特徴についても探った。

方法

マダニ採集: 2018年6月1日から6月3日にか

けて旗ざり法にて植生上のマダニを採集した。採集個所は図1に示した。マダニは, 顕微鏡観察及びDNAの抽出を行うまで密閉容器に入れ4°Cで維持した。

マダニ種の同定: 肉眼および実体顕微鏡下 (ニコン SMZ645, 8x-50x) での観察によりマダニ種を同定した (高田, 1990; 江原, 1980)。*I. pavlovskyi* については中尾らの報告 (Nakao *et al.*, 1992) を参考にした。

ゲノム抽出: マダニ1匹を1.5mLプラスチックチューブに入れ, プラスチックホモジナイザーで破碎した。SDS, Proteinase Kを含むTNE bufferにて消化したのち, フェノール処理とエタノール沈殿によりDNAを精製した。共沈剤としてGlycoBlue (Invitrogen) を用いた。精製DNAを50 μ lのTEに溶解した。

病原体遺伝子の検出と同定: 表1に各病原体の検出方法を示した。PCR陽性検体については, 増幅産物のダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し, 病原体種を確定した。*Babesia* 属の検出については, *Babesia*, *Theileria* 属を含むPiroplasma目の原虫を広くターゲットとしたプライマーを用いた。

マダニミトコンドリアDNA増幅と配列決定: *Ixodes* 属マダニのミトコンドリアシトクローム脱水素酵素サブユニットI遺伝子 (*COI*) (Mitani *et al.*, 2007) の一部をPCRにより増幅した。プライマーは以下のように設定した。IxoCOI-F1 (5' -GARAGAGGAGCAGGRACAGGATGAAC)/ IxoCOI-R1 (5' -GTGTAATTGATCCTATAATTGCAAATACAGCTCC)。塩基配列は, 増幅産物のダイレクトシーケンスにより決定した (Eurofins genetics)。国際塩基配列データベース (INSDC) に登録・公開されている既知の配列を用いてマルチ

表 1. 検出方法

Pathogen	Specificity	Gene	Method
<i>Babesia</i>	Piroplasmida including <i>Babesia</i> spp.	18S rRNA	Conventional PCR
<i>Borrelia</i>	Lyme disease borreliae	16S rRNA and <i>flaB</i>	Realtime and Conventional PCR
	Relapsing fever borreliae	16S rRNA and <i>flaB</i>	Realtime and Conventional PCR
	Relapsing fever group <i>Borrelia</i> sp. in deer	16S rRNA and <i>flaB</i>	Realtime and Conventional PCR
<i>Rickettsia</i>	<i>Rickettsia</i> spp.	17k-Da	Conventional PCR
	<i>Rickettsia</i> spp.	<i>gltA</i>	Conventional PCR

表2. 旗ずり法により採集されたマダニ

採集場所	<i>I. pavlovskyi</i>	<i>I. persulcatus</i>	<i>H. japonica douglasi</i>	<i>H. flava</i>
杵形森林公園	3	4	0	1
野塚	19	3	0	0
姫沼	2	2	0	0
ノドットマリ	0	0	4	0
鴛泊ボン山	0	4	0	0
北麓野営場	1	1	1	0
神居	2	6	0	0
種富林道	1	0	0	0
合計	28	20	5	1

プリアライメント (Clustal W2.1) を行い (Larkin *et al.*, 2007), 近隣結合法 (NJ 法) により進化系統樹を作成した。ブートストラップ値を 1,000 とし, その他のパラメーターはデフォルト設定とした (DNA Databank of Japan, DDBJ).

結果

採集されたマダニは *Ixodes* 属 (*I. pavlovskyi* と *I. persulcatus*) が 89 % を占め, 残りは *Haemaphysalis japonica douglasi* あるいは *H. flava* であった (表 2).

PCR による病原体検出結果を表 3 に示した。Piroplasmida をターゲットとした PCR では *I. persulcatus* 1 検体, *Borrelia* および *Rickettsia* では, *I. pavlovskyi*, *I. persulcatus* の両種で陽性が検出された。マダニ 1 個体における上記病原体の

重複感染は認められなかった。

病原体の確定は PCR 増幅産物の塩基配列により行った。鴛泊ボン山の *I. persulcatus* から得られた Piroplasmida 18S rRNA 遺伝子の部分配列 (1,527bp) は, 既知のヒトバベシア症病原体 *Ba. microti* および *Ba. divergens* グループの配列とは一致しなかった。GenBank 登録配列に対する相同性検索 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1990) では, *Theileria* sp. dama gazelle AY735116.1 が最も近縁で (Identities 83%, Gaps 4%), 次いで *Theileria* sp. ex *Damaliscus lunatus*, *Ba. lengau*, *Ba. leo*, *Theileria separate*, *T. bicornis* であった。ライム病ボレリア陽性 2 検体は, *Borrelia* *flaB* の塩基配列に基づく進化系統解析により, *Bo. garinii* 及び *Bo. bavariensis* が同定された

表 3. PCR による病原体の検出

Target	Gene	Nos. PCR positive		Total
		<i>I. pavlovskyi</i>	<i>I. persulcatus</i>	
Piroplasmida including <i>Babesia</i> spp.	<i>18S rRNA</i>	0	1	1
Lyme disease borreliae ¹	<i>16S rRNA</i> and <i>flaB</i>	1	1	2
Relapsing fever borreliae	<i>16S rRNA</i> and <i>flaB</i>	0	0	0
Relapsing fever group <i>Borrelia</i> sp. in deer	<i>16S rRNA</i> and <i>flaB</i>	0	0	0
<i>Rickettsia</i> spp.	<i>gltA</i>	3	5	8
<i>Rickettsia</i> spp.	<i>17k-Da</i>	2	5	7
Examined		20	11	31

¹Bacterial genome copy number (per 5uL) in *I. pavlovskyi* and *I. persulcatus* were 21.09E+05 and 11.39E+04, respectively.

表 4. 病原体種の同定

病原体	<i>I. pavlovskyi</i>		<i>I. persulcatus</i>	
	陽性数	採集場所	陽性数	採集場所
Piroplasmida sp.	0		1	鴛泊ボン山
<i>Bo. bavariensis</i>	0		1	森林公園
<i>Bo. garinii</i>	1	野塚	0	
<i>R. helvetica</i>	2	森林公園, 野塚	3	森林公園, 野塚, 姫沼
<i>Candidatus R. tarasevichiae</i>	1	種富林道	2	森林公園, 姫沼

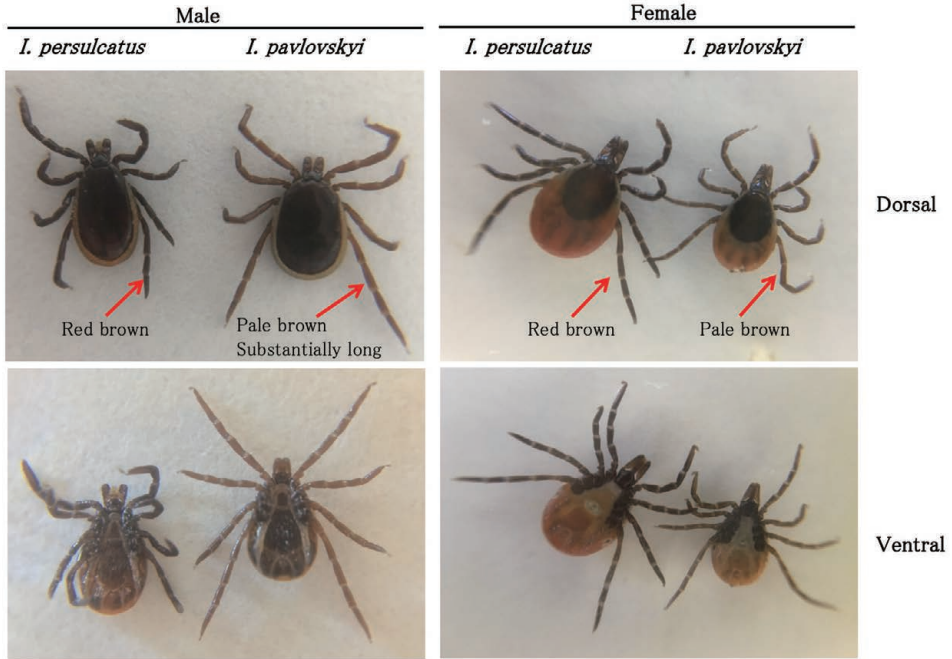


図2. *Ixodes persulcatus* 及び *I. pavlovskyi*.

(表4). *Rickettsia* 陽性8検体については, *gltA* の塩基配列に基づく進化系統樹による解析において5検体が *R. helvetica*, 3検体が *Candidatus R. tarasevichiae* と同定された(表4). さらに採集したすべてのマダニについて Piroplasmida をターゲット

とした PCR 検査を行ったが, ヒトバベシア症病原体は陰性だった.

次に, *I. persulcatus* および *I. pavlovskyi* (図2) のミトコンドリア *COI* 遺伝子の部分配列 (708bp) について, 既報の配列と比較し系統解析を行った

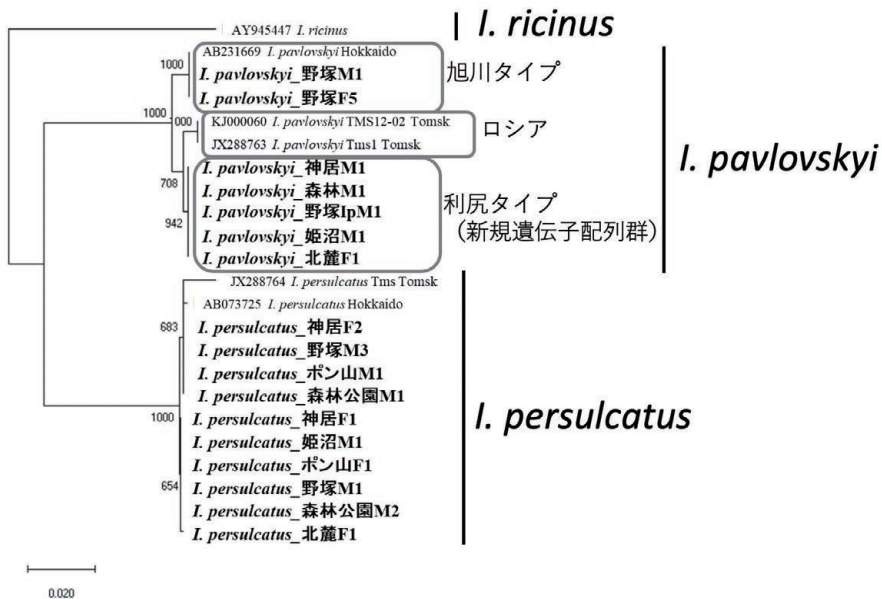


図3. マダニ *COI* 遺伝子部分配列 (708bp) に基づく進化系統樹.

本研究において決定した配列を太字で示した.

(bootstrap 1000) (図3). *I. pavlovskyi* では明確に (ブートストラップ値 100%) 2 系統に分かれ, 一方は既報のパブロフスキーマダニ *COI* 遺伝子配列 (AB231669) と一致 (旭川タイプ) し, 他方は新規の配列であった (利尻タイプ). タイプ間の塩基置換は 708 塩基中 8 か所 (1%) で, 28 検体のうち, 2 検体が旭川タイプ, 25 検体が利尻タイプであった. シークエンス波形の重複により 1 検体は解析できなかった.

考察

利尻島は大型動物が生息しないことから, マダニの分布密度は北海道本島に比べて低く, 調査数は限られた. 陰性だったヒトバベシア症病原体については, 調査数の拡大, 異なる調査方法を検討する必要がある. 一方, ライム系ボレリアやリケッチア症病原体は, 2007, 2008 年の山内らの調査 (Yamauchi *et al.*, 2013) と同様に, *Bo. garinii*, *R. helvetica*, *Candidatus R. tarasevichiae* が検出されただけでなく *Bo. bavariensis* が新たに検出された. これまで利尻島におけるライム病や紅斑熱の発生報告はないが, ハイリスクグループや医療従事者への情報提供などの対策が必要と思われる.

I. pavlovskyi はロシアに生息し, 同所的に採集される *I. persulcatus* と形態が類似している. 日本での初報告は, 北海道朝日町, 旭川市, 札幌市における中尾らの記録である (Nakao *et al.*, 1992). 生息密度は概して低く *Ixodes* 属成虫の 0.4 ~ 4% とみられるが (中尾, 2013; Takano *et al.*, 2014), 本調査対象の利尻島では全体の 61% を占めた. *I. pavlovskyi* 成虫の宿主はロシアでは鳥類とされており, 利尻島が多数の野鳥の繁殖, 休憩地であることが, 北海道本島とは異なる生息密度を有している要因の一つであると考えられる. 今回, *I. pavlovskyi* *COI* において, 既知の遺伝子群 (旭川タイプ) よりもロシア産に近い新規遺伝子群 (利尻タイプ) が検出された背景としても, 野鳥 (渡り鳥) の関与が考えられた. *I. pavlovskyi* 成ダニはヒト嗜好性も強いと考えられ, ヒト寄生例が札幌市内とロシアで報告されている (安藤ら, 2014;

Romanenko, 2011). 本研究では, *I. pavlovskyi* からライム病, 紅斑熱の原因となる病原体が検出されており, *I. persulcatus* とともに注意を要するマダニである. 日本を含め世界的に *I. pavlovskyi* に関する報告は乏しく, 病原体情報の蓄積, マダニの遺伝子タイピング, 病原体媒介性の解析等により公衆衛生学的重要性を明らかにしていくことが必要である.

謝辞

本研究は 2018 年度利尻島調査研究事業採択課題の共同研究として行われた. また, 本研究の一部は 大下財団の助成を受けて行った.

参考文献

- Altschul S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers & D. J. Lipman, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
- 安藤佐土美・松村和子・伊東拓也, 2014. パブロフスキーマダニによる刺咬症の 1 例, 日本皮膚科学会雑誌, 124: 1923-1925.
- DDBJ: <https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>
- Ehara, S., 1980. Family Ixodidae. In Ehara S. (ed), *Illustrations of the mites and ticks in Japan*. Zenkoku Noson Kyoiku Kyokai, Tokyo, Japan (In Japanese).
- Larkin M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson & D. G. Higgins, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.
- Mitani, H., M. Takahashi, M. Masuyama & M. Fukunaga, 2007. *Ixodes philipi* (Acari: Ixodidae): phylogenetic status inferred from mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene sequence comparison. *Journal of Parasitology*, 93: 719-722.
- Nakao, M., K. Miyamoto & S. Kitaoka, 1992. A

- new record of *Ixodes pavlovskyi* Pomerantzev from Hokkaido, Japan (Acari: Ixodidae) Japanese *Journal of Sanitary Zoology*, 43: 229–234.
- 中尾稔, 2013. 北海道における *Ixodes pavlovskyi* の採集記録. *Medical Entomology and Zoology*, 64: 113.
- Romanenko, V. N. & L. M. Kondratyeva, 2011. The degree of infestation of ixodid ticks, collected from humans, with the tick-borne encephalitis virus in the territory of tomsk and its environs. *Entomological Review*, 91: 1176–1180.
- Takada, N., 1990. A pictorial review of medical acarology in Japan. Kinpodo, Kyoto, Japan (In Japanese).
- Takano, A., K. Toyomane, S. Konnai, K. Ohashi, M. Nakao, T. Ito, M. Andoh, K. Maeda, M. Watarai, K. Sato & H. Kawabata, 2014. Tick surveillance for relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in Hokkaido, Japan. *PLoS One*, 9: e104532.
- Tsuji, M., Q. Wei, A. Zamoto, C. Morita, S. Arai, T. Shiota, M. Fujimagari, A. Itagaki, H. Fujita & C. Ishihara, 2001. Human babesiosis in Japan: epidemiologic survey of rodent reservoir and isolation of new type of *Babesia microti*-like parasite. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 4316–4322.
- Yamauchi, T., M. Satô, T. Ito, H. Fujita, N. Takada, H. Kawabata, S. Ando, A. Sakata & A. Takano, 2013. Survey of tick fauna and tick-borne pathogenic bacteria on Rishiri Island, off north Hokkaido, Japan. *International Journal of Acarology*, 39: 3–6.
- Wei, Q., M. Tsuji, A. Zamoto, M. Kohsaki, T. Matsui, T. Shiota, Telford S. R. 3rd & C. Ishihara, 2001. Human babesiosis in Japan: isolation of *Babesia microti*-like parasites from an asymptomatic transfusion donor and from a rodent from an area where babesiosis is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 2178–2183.
- Zamoto, A, M. Tsuji, T. Kawabuchi, Q. Wei, M. Asakawa & C. Ishihara, 2004. U.S.-type *Babesia microti* isolated from small wild mammals in Eastern Hokkaido, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66: 919–926.
- Zamoto-Niikura, A, M. Tsuji, K. Imaoka, M. Kimura, S. Morikawa, P. J. Holman & C. Ishihara, 2014. Sika deer carrying *Babesia* parasites closely related to *B. divergens*, Japan. *Emerging infectious diseases*, 20:1398–1400.
- Zamoto-Niikura, A, M. Tsuji, W. Qiang, M. Nakao, H. Hirata & C. Ishihara, 2012. Detection of two zoonotic *Babesia microti*, Hobetsu and U.S. lineages, respectively, in sympatric tick species, *Ixodes ovatus* and *Ixodes persulcatus*, in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 3424–3430.