

# 高知県西部を中心としたマダニ相および重症熱性血小板減少症候群ウイルス調査

戸梶 彰彦・谷脇 妙・依光 昇子・高橋 富世・川崎 敏久

## The Survey of Ticks and Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome Virus in West Side Of Kochi Prefecture.

Akihiko TOKAJI, Tae TANIWAKI, Noriko YORIMITSU,  
Tomio TAKAHASHI, Toshihisa KAWASAKI

**【要旨】** 2014年12月～2017年1月の間、県西部においてマダニが保有する重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) について調査を実施した。採集したマダニ574匹 (221検体) についてSFTSV保有検査を実施した結果、4検体からSFTSVを確認した。マダニは冬季においては落ち葉の裏等でじっとしているがflagging法 (旗振り法) により1年中採集することができたことから、高知県においてはマダニによる人への吸血が1年中起こりうることが判明した。

また、SFTSV保有を確認できたマダニ4検体は、感染者が複数出ている地点での月1回の定点調査によるものであるが、各調査地点において3カ月以上継続してSFTSVを保有するマダニは確認できなかった。このことから、各地点で同一種のマダニ群がウイルスを保有しているのは2～3カ月間で、新たにウイルスを保有するマダニ群の侵入がある場合に継続してウイルス保有マダニが確認できるものと推測される。

本調査結果から、自然界から人へのウイルスの伝播は、ウイルスを保有している野生動物の行動域と人の行動域が同時期 (2～3カ月間) に重なった場合に起こり、マダニによる刺咬等によって感染が成立するものと思われる。高知県内のマダニが媒介する疾病予防は、人に有害なウイルスまたはリケッチアを保有している動物の分布を把握することが困難なこと、また冬季においてもマダニの刺咬があることから、季節や地域を限定しないマダニによる刺咬を防ぐ啓発が重要である。

key words : マダニ相、SFTS (Severe fever with thrombocytopenia syndrome)  
定点調査、SFTSV保有状況

### I はじめに

マダニ媒介性の重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) は、2013年1月に国内の患者が初めて確認された新興ウイルス感染症である。

高知県内においても2017年7月現在、患者数28名、死者4名が報告されている。SFTSウイルス (SFTSV) が分布する地域では、マダニとマダニに吸血される動物の間でSFTSVが循環・保持される仕組みが成立し

ている。ヒトはSFTSVを保有するマダニに咬まれることで感染する<sup>1)</sup>。

効果的な感染予防を立てるうえで、自然界においてSFTSVの生活環境を明らかにすることが非常に重要なことから、SFTS発生地域に生息するマダニ相とマダニのSFTSV保有状況調査を開始した。

今回、県西部において複数感染者が発生した地区を中心に調査を実施したので報告する。

## II 材料と研究方法

### 1) 調査期間と調査地

調査期間：2014年12月～2017年1月

県西部において感染者の報告があったA～C地点。

#### A 地点

2014年6月と8月に相次いで感染者の報告があった地点

#### B 地点

A地点から数km離れ、2015年9月感染者の報告があった地点の近隣

#### C 地点

2014年9月および2016年1月感染者の報告があった地点の近隣。2016年2月から調査ポイントに追加した。

各調査地点（半径約50mの範囲）において月1～2回の割合でマダニの採集を行った。

### 2) マダニの採集と同定

フランネル布を用いたflagging法（旗振り法）によって下草など植生上のマダニ類について成・若虫を採集した。採集時間は30分～1時間程度とした。採集マダニ類は高湿度を維持した容器にて持ち帰り、実体顕微鏡下で同定した。

### 3) SFTSVの検査

同定したマダニ574匹（成虫121匹、若虫453匹）について成虫は1匹ずつ、若虫は5～6匹をプールし1検体として、ウイルスRNAの抽出を行いSFTSV保有の有無と遺伝子解析を実施した。

#### (1) マダニからのウイルスRNAの抽出

1.5mlチューブ（バイオマッシャーII）にマダニを入れ、PBS（-）150 $\mu$ lを添加し、ホモジナイザーペッセルを用いてマダニを破碎した。マダニの内蔵液を浮遊させ、浮遊液の140 $\mu$ lを検体としてQIAamp Viral RNA mini kit（Qiagen）を用いてウイルスRNAを抽出した。

#### (2) リアルタイムPCR

既報に従ったプライマー、プローブを使用し、反応液はQuantiTect Probe RT-PCRキット（Qiagen）を使用した。反応は7500 Real-Time PCR System（Applied

Biosystem）を用いた（図1）。

＜試薬＞	
QIAGEN QuantiTect Probe RT-PCR 2× QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix QuantiTect RT Mix	
Primer	
SFTS-S3-237s	GCAACAAGATCGTCAAGGCATCAGG
SFTS-S2-400a	CCACTTGGACATGTGCTGCAGCA
Probe	
SFTSV-S2-317MGB	CTGGTTGAGAGGGCA
平成26年度4国連携施策 SFTSV検査技術研究会 平成26年9月11、12日 愛媛県立衛生環境研究所	
＜反応液の調整＞	
2× QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	12.500 $\mu$ l
SFTS-S3-237s (50 $\mu$ mol/ $\mu$ l)	0.200 $\mu$ l
SFTS-S2-400a (50 $\mu$ mol/ $\mu$ l)	0.200 $\mu$ l
SFTSV-S2-317MGB (10 $\mu$ mol/ $\mu$ l)	0.375 $\mu$ l
QuantiTect RT Mix	0.250 $\mu$ l
Rnase free Water	6.475 $\mu$ l
template (DNase処理RNA)	5.000 $\mu$ l
total	25.000 $\mu$ l
＜使用機器＞	
ABI PRISM 7500(Applied Biosystems)	
＜反応条件＞	
50°C30min→95°C15min→94°C15sec 60°C1min×50times(40cycles)	

図1 SFTSリアルタイムPCR

### (3) 遺伝子解析

マダニから抽出したウイルスRNAをonestep RT-PCRで増幅（図2）後、ダイレクトシーケンス法により3130 Genetic Analyzer（Applied Biosystem）を用いて塩基配列を決定した。

＜試薬＞	
Invitrogen OneStep RT-PCR 2× Reaction mix SS III RT/Platinum Taq Mix	
Primer	
SFTS NP-2F	CATCATTGTCTTTGCCCTGA
SFTS NP-2R	AGAAGACAGAGTTTCACAGCA
＜反応液の調整＞	
2× Reaction mix	12.5 $\mu$ l
SS III RT/Platinum Taq Mix	1.0 $\mu$ l
SFTS NP-2F (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
SFTS NP-2R (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
Rnase free Water	8.0 $\mu$ l
template (DNase処理RNA)	2.5 $\mu$ l
total	25.0 $\mu$ l
＜反応条件＞	
55°C30分→95°C2分→94°C30秒52°C30秒68°C30秒×45回→68°C5分→10°C∞	
厚生労働科学研究 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の診断等の対応方法に関する研究」班より	

図2 SFTS OneStep RT-PCR

## III 結果

### 1) 各採集地のマダニ相

#### A 地点

4月～9月の春夏季にはフタトゲチマダニの若、成虫、タカサゴチマダニの成虫が多くみられ、11月～3月の冬季にはタカサゴチマダニの若虫、ヒゲナガチマダニの成虫が多く見られた（表1）。



各地点総じて、初夏から夏季にはフタトゲチマダニ、冬季にはキチマダニが、また1年をとおしてタカサゴチマダニ、ヒゲナガチマダニが見られた。

## 2) リアルタイムPCR

採集したマダニ574匹（成虫121匹、若虫453匹）、242検体のSFTSV保有検査を実施した結果、2014年12月に採集したヒゲナガチマダニの成虫（♀）1匹\*

2016年3月に採集したフタトゲチマダニの若虫6匹のプール検体、同年4月に採集したフタトゲチマダニの若虫5匹のプール検体、また11月に採集したキチマダニの若虫4匹のプール検体から計4検体のSFTSV遺伝子が検出された（表1～3）。検出されたウイルスRNAは1検体あたり101～105であった（表4）。

\*最初の一例について、マダニの破碎処理は国立感染症研究所で行い、RNAの抽出は当所においてiosogen IIを用いた。

表4 検出されたウイルスRNAコピー数

マダニ採集日	Quantity( /5 $\mu$ l)	1検体あたりのコピー数		Ct
2014/12/24	2,796.00	( $\times 4$ )	11,184.00 (/20 $\mu$ l)	41.9495
2016/3/17	12,077.68	( $\times 12$ )	144,932.16 (/60 $\mu$ l)	28.15
2016/4/20	12,540.52	( $\times 12$ )	150,486.24 (/60 $\mu$ l)	28.87
2016/11/16	10.56	( $\times 12$ )	126.72 (/60 $\mu$ l)	39.12

## 3) 陽性コントロールによるコンタミネーションの有無の確認および遺伝子解析

リアルタイムPCR陽性検体については、増幅産物の塩基数を確認して陽性コントロールからのコンタミネーションが無いことを確認した。

2016年3月と4月にマダニから検出したウイルスRNA 2検体については、S分節の一部をonestep RT-PCR増幅後、塩基配列を解析することができた。この2検体の塩基配列は100%一致した。（図3）

## IV 考 察

平成29年7月における全国と高知県のSFSTの発生状況を見ると、宮崎県の43件に次いで本県は27件であり、鹿児島県と並んでSFST症例届出数が多い状況にある<sup>2)</sup>（図4）。また、これを県内保健所管内別で見ると、幡多保健所管内で届出が多いことが分かる（図5）。

自然界では数種のマダニからSFTSVが検出され、家畜や野生動物からは高い割合でSFTSVに対する抗体が検出されている<sup>3)</sup>。これは、マダニの成長過程において動物の吸血を必要とすることから、マダニが吸血活動することによってSFTSVが動物や人に伝播されるものと考えられている<sup>4)</sup>。中でも、フタトゲチマダニにより媒介されるSFTSVの広まりには、トラツグミやヤイロチョウなどの渡り鳥が一役買っているという報告がある<sup>4)</sup>。

また、野生の日本シカのSFTSV抗体保有率は、患者発生県で有意に高く、シカのSFTSV抗体陽性率と

患者数には相関があると報告されている<sup>3)</sup>。

このことから、SFTSVの拡散は、広域では渡り鳥が関与し、地域ではシカやイノシシなどの野生動物が関与しているものと考えられる。

野生シカの生息とSFTSV患者数の関係において、高知県鳥獣対策課が主体となって実施した野生シカ生息数モニタリング調査<sup>5)</sup>によるシカ生息密度指数（図6）と保健所管内別患者数（図5）の白地図を見比べたところ、数を指標とした場合、県西部では互いに一致しているものの、野生シカが多い県東部の中央東保健所管内では、患者届出数が0件と一致しておらず、この地域ではSFTSVの拡散が無かったものと思われる。この原因としては、シカの抗体保有率というよりもSFTSVを保有するシカの絶対数が少なかったためと考えられる。

今回の調査において、SFTSVの保有を確認できたマダニの4検体は、感染者が複数出ている2地点での継続した定点調査によるものであるが、各調査地点においてSFTSVを保有するマダニは1カ月または2カ月の間のみ確認でき、3カ月以上連続して確認することはできなかった（表1～3）。

このことから、各地点において同一種のマダニ群がウイルスを保有している期間は2～3カ月間で、定点に新たにウイルスを保有するマダニ群の侵入がある場合に、継続してウイルス保有マダニが確認できるものと推測される。

自然界から人の生活圏へのウイルスの伝播は、ウイルスを保有している野生動物の行動域と人の行動域が同時期に重った場合に起こり、マダニによる刺咬をはじめとする暴露によって感染が成立するものと思われ

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment.
.
.
dan i-3      CTCGAGGTAACAAGATCGTCAAGGCATCAGGGAAATGTCAACTCTGGGCTAAGAGGT 60.
dan i-16    CTCGAGGTAACAAGATCGTCAAGGCATCAGGGAAATGTCAACTCTGGGCTAAGAGGT 60.
*****

.
dan i-3      TGATGGCACTCCAAGAGAAATATGGGCTGGTTGAGAGGGCAGAAAC CAGGCTCTCAATCA 120.
dan i-16    TGATGGCACTCCAAGAGAAATATGGGCTGGTTGAGAGGGCAGAAAC CAGGCTCTCAATCA 120.
*****

.
dan i-3      CTCCTGTGAGGGTTGCACAGAGCCTCCCACTTGACATGTGCTGCAGCAGCAGCCCTAA 180.
dan i-16    CTCCTGTGAGGGTTGCACAGAGCCTCCCACTTGACATGTGCTGCAGCAGCAGCCCTAA 180.
*****

.
dan i-3      AGGAGTATCTCCAGTGGGGCCAGCTGT CATGAA CCTGAA GGTGAA AATTA TCCCCCTG 240.
dan i-16    AGGAGTATCTCCAGTGGGGCCAGCTGT CATGAA CCTGAA GGTGAA AATTA TCCCCCTG 240.
*****

.
dan i-3      AGATGATGTGCATGGCCTTTGGGTCCT GATTCCA ACTGCAGGGGT ATCTGAAGCCACAA 300.
dan i-16    AGATGATGTGCATGGCCTTTGGGTCCT GATTCCA ACTGCAGGGGT ATCTGAAGCCACAA 300.
*****

.
dan i-3      CGAAGACCCTGATGGAGGCTACTCCCT GTGGCAAGATGCCTTCACCAAGACTATCAATG 360.
dan i-16    CGAAGACCCTGATGGAGGCTACTCCCT GTGGCAAGATGCCTTCACCAAGACTATCAATG 360.
*****

.
dan i-3      TAAAGATGCGCGGAGCCAGCAGACAGAGGTTTCAACTCTTTCAGGGATCCCTCTCCATG 420.
dan i-16    TAAAGATGCGCGGAGCCAGCAGACAGAGGTTTCAACTCTTTCAGGGATCCCTCTCCATG 420.
*****

.
dan i-3      C 421.
dan i-16    C 421.
    
```

図3 2種のマダニ検体から得られた遺伝子の比較

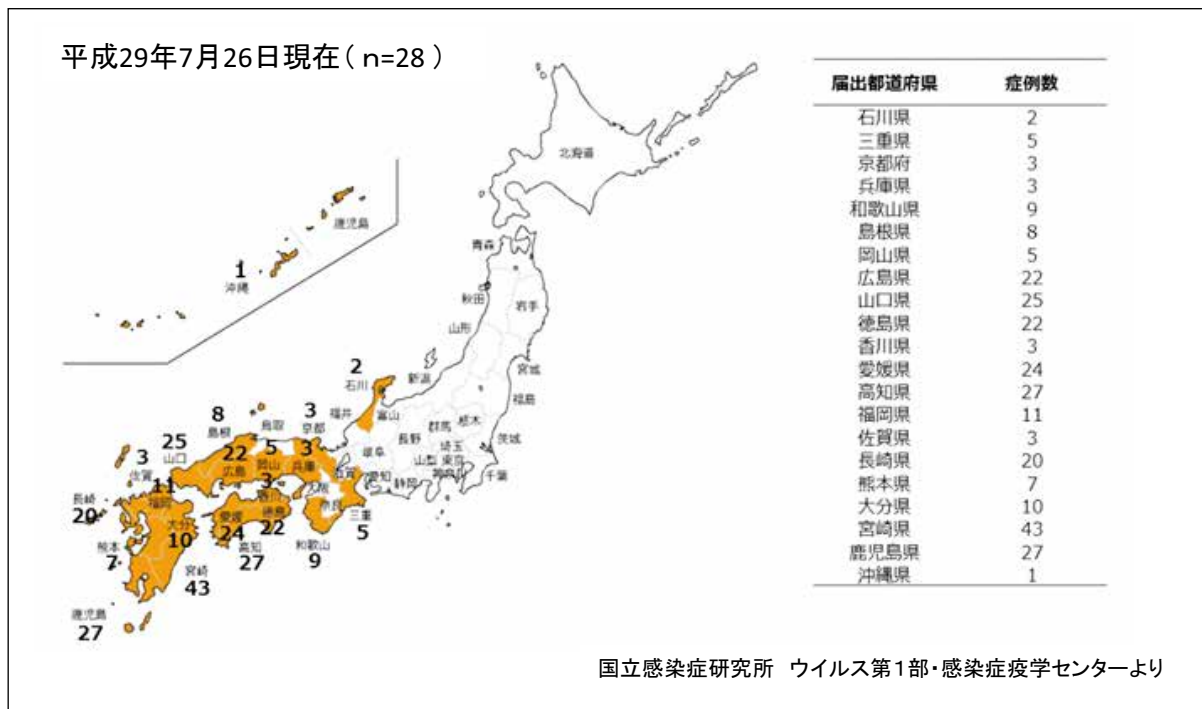


図4 SFTS症例の届出地域 (平成29年7月26日現在)

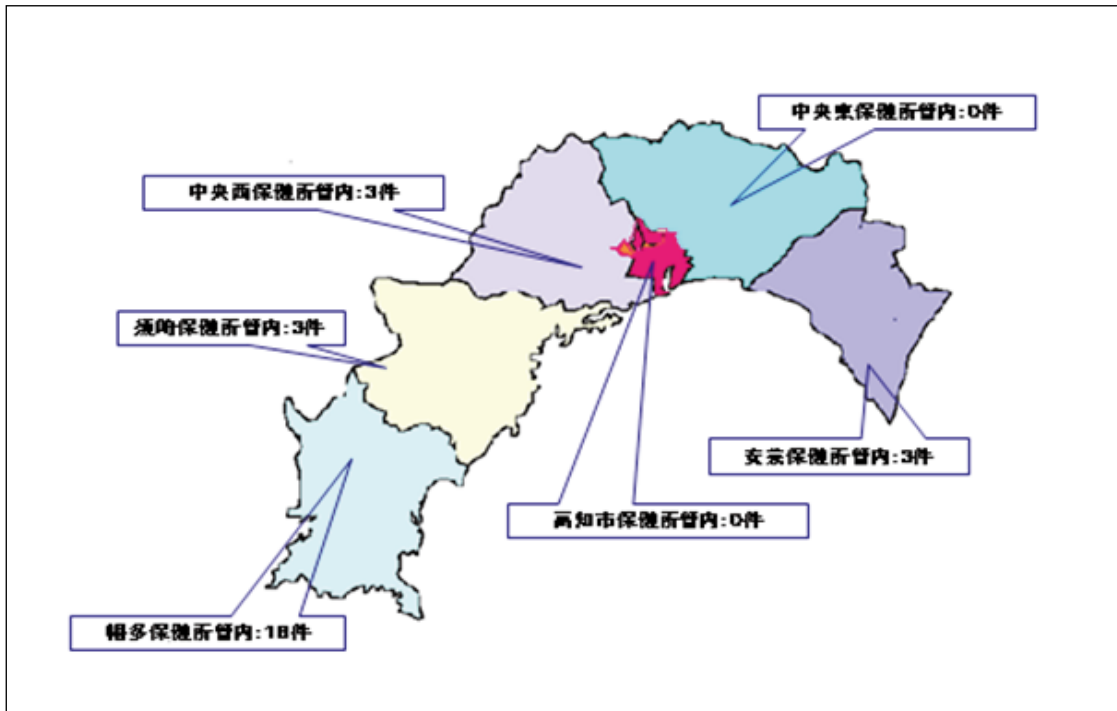


図5 SFTS発生件数（保健所管内別：平成29年7月末現在）

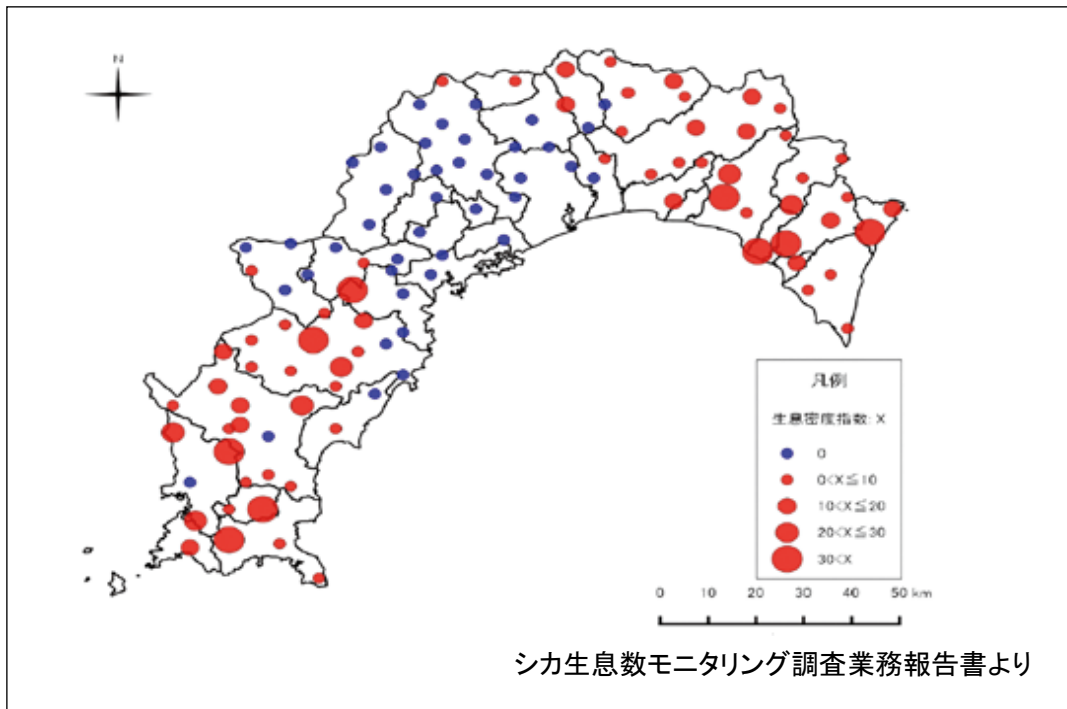


図6 シカの生息密度指数の分布（平成26年度）

る。

高知県内のマダニが媒介する疾病予防は、人に有害なウイルスまたはリケッチアを保有している動物の分布を把握することが困難であること、また冬季においてもマダニの刺咬があることから、季節や地域を限定せずマダニによる刺咬を防ぐ啓発が重要と考える。一方、地域を指定しての啓発は個人情報の拡散や風評被害に注意が必要である。

平成29年7月にはノラ猫による咬傷でSFTSを発症したことが疑われる事例が発生し、マダニの刺咬だけでなく感染動物の体液等からの感染が再認識させられたとともに、野生動物の行動域が人の生活圏に近づき人の感染の機会が増えているのではないかと危惧される。

## 文 献

- 1) 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の国内分布調査結果 (第1報): 病原微生物情報 (IASR) 速報2013年10月号
- 2) 国立感染症研究所 ウイルス第1部・感染症疫学センター
- 3) <特集>重症熱性血小板減少症候群 (SFTS): 病原微生物検出情報 (IASR) 月報Vol 37 2016年3月
- 4) 下島昌幸 平成28年度希少感染症診断技術研修会 重症熱性血小板減少症候群SFTS (ヒトを対象に)
- 5) 高知県中山間振興・交通部 鳥獣対策課 平成26年度シカ生息数モニタリング調査業務報告書