

原著

兵庫県西宮市におけるマダニの*Babesia*属原虫保有状況調査

長野基子、大森志保、斎藤あつ子

兵庫医療大学薬学部

Survey of *Babesia* Parasites of Hard Ticks Collected in Nishinomiya, Hyogo

Motoko NAGANO-FUJII, Shiho OHMORI, Atsuko SAITO-ITO

School of Pharmacy, Hyogo University of Health Sciences

抄 録

*Babesia*属原虫は、マダニ媒介性赤血球内寄生原虫で、種々の動物が自然宿主となり、ヒトには、限られた種が人獣共通感染症を起こす。健康人にヒトバベシア症を起こすのはネズミ寄生種の*Babesia microti*にはほぼ限られる。ヒトバベシア症は、長らくアメリカ合衆国の一部の地域に限局して流行があったが、近年、日本を含めアジア地域でも散発的な発生がある。日本の野ネズミには、4種類の遺伝子型(合衆国型、神戸型、大津型、長野型)の*B. microti*が寄生していることが示されている。今回、2012年3月～2017年3月に兵庫県西宮市で採取されたマダニについて、唾液腺から抽出したDNAを用いて、PCRおよびPCR産物の塩基配列解析により*Babesia*属原虫保有状況を調査した。採取されたマダニは、*Ixodes ovatus* (ヤマトマダニ) 123匹、*Dermacentor taiwanensis* (タイワンカクマダニ) 8匹、*Amblyomma testudinarium* (タカサゴキララマダニ) 8匹、*Ixodes turdus* (アカコッコマダニ) 3匹、*Haemaphysalis flava* (キチマダニ) 194匹、*Haemaphysalis formosensis* (タカサゴチマダニ) 8匹、*Haemaphysalis hystrix* (ヤマアラシチマダニ) 72匹、*Haemaphysalis* (チマダニ) 属10匹であった。このうち、*I. ovatus* 11匹に、大津型*B. microti*が確認された。また、*I. ovatus* 1匹、*H. flava* 2匹、*H. hystrix* 1匹に*Babesia*属原虫と推定される3種類の原虫が確認され、そのうち2種類はこれまで報告のないものであった。

本調査で、既知、または未知の*Babesia*属原虫が、生活圏近くのマダニから高率に確認されたことから、周辺の野生動物にこれら原虫が寄生していることが示唆された。

新たな人獣共通感染症が発生する可能性を念頭においた、マダニおよび野生動物の*Babesia*属原虫感染状況の調査の継続が重要であると考えられる。

キーワード：*Babesia*、マダニ媒介性、赤血球内寄生原虫、small subunit ribosomal RNA 遺伝子(SSUrDNA)、人獣共通感染症

I はじめに

*Babesia*属原虫は、孢子虫類ピロプラズマ目バベシア科バベシア属のマダニ媒介性の赤血球内寄生原虫で、種々の動物にバベシア症を引き起こし、獣医学領域では最重要寄生虫の一つである。100を超える種が様々な動物から見つかっているが、ヒトを自然宿主とする種は存在しない。しかし、ネズミ寄生種である *Babesia microti*、ウシ寄生種である *Babesia divergens* とその近縁種 (*Babesia venatorum* や *Babesia crassa* など)、偶蹄類を宿主とする *Babesia duncani* とその近縁種 (いわゆる WA1/CA1 型原虫) など一部の種は、人獣共通感染症を起こす。*B. divergens* とその近縁種及び WA1/CA1 型原虫によるヒトバベシア症は、ほぼ脾臓摘出者のみに起こるが、激しい貧血などを来したほとんどが致死性である。一方、免疫正常者にもヒトバベシア症を引き起こすのはほぼ *B. microti* に限るとされ、典型例では発熱、脾腫、貧血などマラリアによく似た症状を呈し、不顕性から重症、まれに致死に至ることもある。*B. microti* によるヒトバベシア症は長らくアメリカ合衆国の東海岸沿岸地域および上中西部の限局した地域で流行しており、これらの地域では、特に不顕性感染している献血者からの輸血血液を介した輸血後感染が医療上の問題となってきた¹⁻²⁾。ところが、1990年代頃より、アジア地域でもヒトバベシア症と思われる患者が散見されるようになり、1999年に私達は日本初となるヒトバベシア症の患者を兵庫県神戸市で確認した。本症例は日本土着の野ネズミに寄生する *B. microti* に不顕性感染していた献血者からの輸血後感染であった。この病原原虫の small subunit ribosomal RNA 遺伝子 (SSUrDNA) 配列は合衆国流行地由来の *B. microti* の SSUrDNA とは完全には一致せず (一致率 99.2%)、合衆国の *B. microti* の SSUrDNA 型を合衆国型とよび、神戸で確認した *B. microti* を神戸型とよぶこととした³⁻⁴⁾。以来、私達は日本の野ネズミと媒介マダニの疫学調査を行っており、その結果、日本の野ネズミに寄生する *Babesia* 属原虫には少なくとも神戸型、大津型、長野型、合衆国型の4つの SSUrDNA 型があることが確認された⁵⁻⁶⁾。日本の野ネズミの疫学調査では、これまでに、神戸型は淡路島、青森県、島根県など限られた地域の *Apodemus speciosus* (アカネズミ)、*Apodemus argenteus* (ヒメネズミ) に、大津型は広く全国の *A. speciosus*、*A. argenteus*、*Myodes (Clethrionomys) rufocanus* (タイリクヤチネズミ)、*Microtus montelli*

(ハタネズミ) などの野ネズミや *Crocidura dsinezumi* (ニホンジネズミ) や *Sorex unguiculatus* (オオアシトガリネズミ) などの食虫目にも寄生が確認された。長野型は長野県の *Eothenomys andersoni* (ヤチネズミ) のみに、合衆国型は北海道の *A. speciosus*、*A. argenteus*、*M. rufocanus*、*Clethrionomys rutilus* (ヒメヤチネズミ) などに寄生が確認されている⁵⁻⁹⁾。一方、マダニの疫学調査では、*Ixodes ovatus* (ヤマトマダニ) から大津型 *B. microti* が、*Ixodes persulcatus* (シユルツェマダニ) から合衆国型 *B. microti* が検出されている^{5, 10-11)}。

2012年に、西宮市環境衛生課より私達の研究室に、西宮市のマダニ保有微生物に関する調査依頼があり、西宮市で採取されたマダニについて *Babesia* 属原虫の保有状況の調査を開始した。本報告では、2012年3月～2017年3月に採取されたマダニについての調査結果を示す。

II 方法

1. マダニの採取と鑑別

2012年3月～2017年3月に、兵庫県西宮市において、旗振り法にて採取されたマダニ計426匹について、形態学的特徴から、高田の方法に従い、種を鑑別した¹²⁾。さらに、下記のピロプラズマ目原虫検出PCRで陽性を示したマダニについては、高野らの方法に従い、唾液腺DNAから、マダニのミトコンドリアDNAの一部を増幅し、種の鑑別を行った¹³⁾。

2. ピロプラズマ目原虫検出PCR

形態学的にマダニの種の鑑別をした後、80%エタノールに約5分間浸漬したマダニの背甲板を剥離し、唾液腺を摘出し、MagExtractor-Genome- (TOYOBO, Japan) を用いて使用説明書に従い、唾液腺からDNAを抽出した。

全ての唾液腺DNAサンプルについて、ピロプラズマ目原虫検出PCRを行った。ピロプラズマ目原虫全般の SSUrDNA に特異的かつ共通の塩基配列をもとに作製した CF2 と CR1 のプライマー (図1) を用い¹⁴⁾、50 μ L の系で、*TaKaRa Ex Taq™* HS (TaKaRa Bio, Japan) 1.25 U、dNTPs (最終濃度各 0.2 mM)、プライマー (最終濃度各 0.5 μ M)、鋳型 DNA 1 μ L の反応液を 95°C 5 分、[94°C 20 秒、(1.0°C / 秒の温度変化)、55°C 40 秒、72°C 60 秒] \times 40 サイクル、72°C 5 分、25°C 5 分の条件にて PCR を行い、1.5% Agarose ゲル

で電気泳動し、ピロプラズマ目原虫の有無を確認した。

3. *B. microti*検出PCRと塩基配列・遺伝子型の決定

ピロプラズマ目原虫検出PCRで陽性バンドが検出されたDNAサンプルについては、DNAが不足していた2015年度の1サンプルを除いて、*B. microti*を特異的に検出するBab1とBab4のプライマー（図1）を用い¹⁵⁾、50 μ Lの系で、Ampli Taq Gold™ DNA Polymerase (Thermo Fischer Scientific, USA) 1 U、dNTPs（最終濃度各0.2 mM）、プライマー（最終濃度各0.5 μ M）、鋳型DNA1 μ Lの反応液を95℃ 9分、[95℃ 60秒、(1.0℃ /秒の温度変化)、55℃ 40秒、72℃ 40秒] \times 45サイクル、72℃ 5分、25℃ 5分の条件でPCRを行った。陽性PCR産物をゲルから切り出しMagExtractor -PCR & Gel Clean up- (TOYOBO)でDNA抽出し、BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fischer Scientific)を用いて塩基配列を解析し、*B. microti*の遺伝子型を決定した。

4. ピロプラズマ目SSUrDNA全長増幅PCRと塩基配列の決定

ピロプラズマ目原虫検出PCR陽性で、*B. microti*検出PCR陰性であったDNAサンプルについては、真核生物のSSUrDNAのほぼ両端で保存された領域に対するプライマーAn1、Bn1ならびにピロプラズマ目原虫検出PCRで用いたCF2に加えて、ピロプラズマ目原虫のSSUrDNAに特異的かつ共通の塩基配列をもとに作製されたCR2を用いて、An1-CR2、CF2-Bn1のプライマーセット（図1）でPCRを行い、SSUrDNAのほぼ全長を増幅した¹⁴⁾。

また、ピロプラズマ目原虫検出PCR陽性で、*B. microti*検出PCR陽性であったDNAサンプル10のうち2サンプルについても、ピロプラズマ目SSUrDNA全長増幅PCRを行った。

An1-CR2、CF2-Bn1 PCR産物をゲルから切り出し、上記と同じ方法でSSUrDNA全塩基配列を決定した。塩基配列の決定には増幅に用いたAn1、CR2、CF2、Bn1の他、SSUrDNAに保存された塩基配列を元に作製されたCF1、CR1、MF、MR、NF、KRプライマー

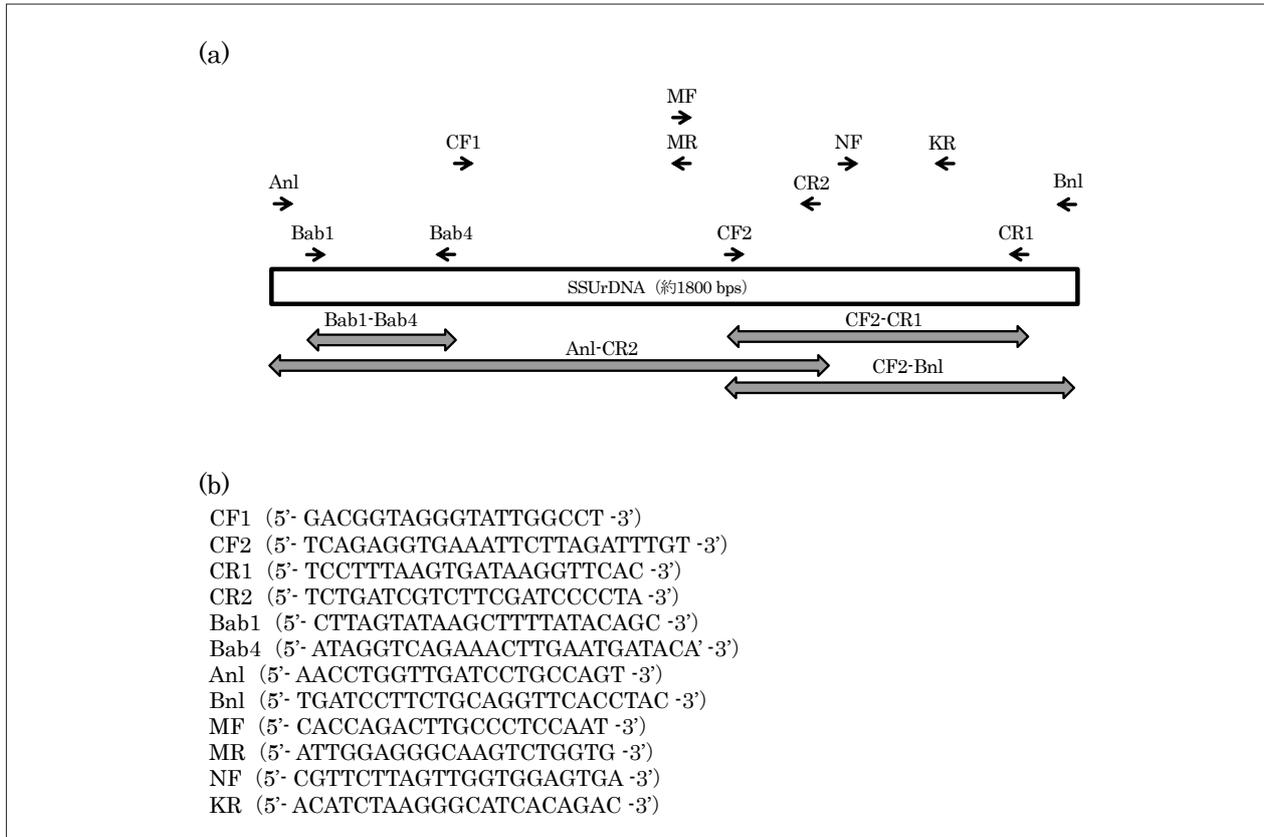


図1. PCRおよび塩基配列解析のために用いたプライマー情報

(a) プライマーおよびPCR産物のSSUrDNA上の位置

(b) 各プライマーの塩基配列

を用いた。Anl-CR2、CF2-Bnl PCR産物の塩基配列が明確に決定できなかったサンプルについては、Anl-CR1、CF1-Bnlなどのプライマーセットの組み合わせでPCR増幅したもので塩基配列を確定した。

Ⅲ 結果

2012年度の*I. ovatus* 6匹中の1匹、*Haemaphysalis hystricis* (ヤマアラシチマダニ) 1匹中の1匹、2014年度の*I. ovatus* 24匹中の7匹、*Haemaphysalis flava* (キチマダニ) 52匹中の1匹、2015年度の*I. ovatus* 67匹中の4匹と2016年度の*H. flava* 32匹中の1匹がCF2-CR1プライマーセットを用いたピロプラズマ目検出PCRで陽性を示した(表1)。ピロプラズマ目検出PCR陽性全サンプル(ただし、2015年度の*I. ovatus* 1匹を除く)について、Bab1-Bab4プライマーセットを用いた*B. microti*検出PCRを行ったところ、2012年度の*I. ovatus* 1匹、2014年度の*I. ovatus* 6匹、2015年度の*I. ovatus* 3匹が陽性であった。Bab1-Bab4 PCR産物の塩基配列を解析したところ、*I. ovatus* から得られた塩基配列は全て大津型*B. microti*のSSUrDNA配列の相当部分と100%一致した。なお、このうち2012年度と2014年度のサンプル1つずつ計2つのサンプルについてはSSUrDNA全長の塩基配列を決定したところ、2サンプルとも大津型*B. microti*と100%一致した。

ピロプラズマ目検出PCR陽性で、*B. microti*検出PCRで陰性だった2014年度の*I. ovatus* 1匹、2014年度と2016年度の*H. flava* 2匹、2012年度の*H. hystricis* 1匹、計4匹のサンプルについては、Anl-CR2および

CF2-BnlのプライマーセットによりPCR増幅することができ、*I. ovatus*と*H. flava*については、PCR産物の塩基配列を解析することにより、SSUrDNA全長の塩基配列を決定でき、*Babesia*属原虫由来であると推定された。*H. hystricis*については、塩基配列の解析から、CF2-BnlによるPCR産物は、*Babesia*属原虫由来であると推定されたが、Anl-CR2によるPCR産物は、マダニ由来の産物であると推定された。*I. ovatus* 1匹、*H. flava* 2匹、*H. hystricis* 1匹から得られた塩基配列は互いに異なり、*H. flava* 2匹から得られたものは同一であった。

Ⅳ 考察

2012年3月から2017年3月に西宮市で採取された*I. ovatus* 123匹中11匹に大津型*B. microti*の遺伝子を検出したが、いずれのマダニからも神戸型、合衆国型、長野型の遺伝子は検出されなかった。また、*I. ovatus* 123匹中1匹、*H. flava* 194匹中2匹、*H. hystricis* 72匹中1匹については、*B. microti*以外の*Babesia*属原虫を保有していると推定される結果を得た。なお、*I. ovatus*、*H. flava*、*H. hystricis*は、異なるSSUrDNAを持つ*Babesia*属原虫を保有しており、*I. ovatus*、*H. flava*から見つかったものは、それぞれ私達が和歌山県のテンおよびアライグマに認めた*Babesia*属原虫のSSUrDNAと同一であった(論文投稿準備中)。*H. hystricis*から見つかったものは、SSUrDNA後半のみの解析であるが、この部分については台湾の家ネコに認められた*Babesia hongkongensis*のSSUrDNAと

表1. 西宮市のマダニの*Babesia*属原虫保有状況

マダニ科		<i>Babesia microti</i> 陽性数 ^{*1} /ピロプラズマ目検出PCR陽性数/総数				
		2012年度	2013年度	2014年度	2015年度	2016年度
マダニ属 (126匹)	<i>Ixodes ovatus</i> (123匹)	1/1/6	0/0/3	6/7/24	4 ^{*2} /4/67	0/0/23
	<i>Ixodes turdus</i> (3匹)	0/0/1		0/0/1	0/0/1	
カクマダニ属(8匹)	<i>Dermacentor taiwanensis</i> (8匹)			0/0/5	0/0/3	
キララマダニ属(8匹)	<i>Amblyomma testudinarium</i> (8匹)	0/0/1		0/0/3	0/0/4	
	<i>Haemaphysalis flava</i> (194匹)	0/0/5	0/0/22	0/1/52	0/0/83	0/1/32
チマダニ属 (284匹)	<i>Haemaphysalis formosensis</i> (8匹)		0/0/2	0/0/1	0/0/3	0/0/2
	<i>Haemaphysalis hystricis</i> (72匹)	0/1/1	0/0/4	0/0/6	0/0/39	0/0/22
	<i>Haemaphysalis</i> spp. ^{*3} (10匹)	0/0/10				

^{*1} Bab1-Bab4 PCR産物の塩基配列解析またはCF2-CR1 PCR産物の塩基配列解析により、*B. microti*の保有が確認された数。

^{*2} CF2-CR1 PCR産物の塩基配列解析により、*B. microti*の保有が確認された1匹を含む。

^{*3} 形態学的に*Haemaphysalis*属ダニ種と同定されたもの。

完全に一致した¹⁶⁾。世界的にも、媒介マダニから*B. hongkongensis*が検出されたという報告はない。また、我が国では、これまで*B. hongkongensis*寄生哺乳動物の報告はない。前半部分の解析結果が待たれるが、興味深い結果と考えている。

西宮市のマダニからは大津型が*I. ovatus*の約10%と非常に高率に検出された。*B. microti*は今回*I. ovatus*のみに見つかった。このことから、この地域では、野ネズミと*I. ovatus*の間で大津型*B. microti*の感染サイクルが密に回っていると推定される。実際、大津型*B. microti*は六甲山近辺を含め広く全国の種々の野ネズミおよび食虫目に寄生が確認されており、マダニでは*I. ovatus*から検出されている⁵⁻⁶⁾。

また今回、*B. microti*以外の3種類の*Babesia*属原虫が*I. ovatus*、*H. flava*、*H. hystricis*から検出された。本報告で見つかった*B. microti*以外の3種類の*Babesia*属原虫が、*I. ovatus*、*H. flava*、*H. hystricis*に見つかったという報告は調べた限りではなかった。*Babesia*属原虫の伝播に参与する新しいマダニ種が見つかった可能性がある。

これまで大津型*B. microti*および今回見つかった*Babesia*属原虫がヒトバベシア症を起こした報告はないが、近年、人と動物の生活圏がどんどん近づいていると言われており、今後、人獣共通感染症を起こすものが出てくる可能性は否定できず、引き続きマダニの*Babesia*属原虫の感染調査を行っていきたい。

V 謝辞

マダニの採取および鑑別と唾液腺の摘出に関しては、兵庫県西宮市環境局環境衛生課の方々にご協力いただきました。

塩基配列の解析などでは、河合敦子氏、武井京子氏の協力を得ました。

本研究は部分的に、兵庫医療大学教育助成金（平成29年度）、神戸大学バイオシグナル総合研究センターにおける共同利用研究（283001、193001）、武田記念臨床研究助成2005からの助成を受け行われたものです。

文献

- 1) Homer, M.J.; Aguilar-Delfin, I.; Telford, S.R. 3rd et al. Babesiosis. *Clin Microbiol Rev.* 2000, 13(3), 451-469.
- 2) Krause, P.J. Human babesiosis. *Int J Parasitol.* 2019, 49(2), 165-174.
- 3) Saito-Ito, A.; Tsuji, M.; Wei, Q. et al. Transfusion-acquired, autochthonous human babesiosis in Japan: isolation of *Babesia microti*-like parasites with hu-RBC-SCID mice. *J Clin Microbiol.* 2000, 38(12), 4511-4516.
- 4) 斎藤あつ子, ライ シバクマラ, 何深一, 神前昌敏, 辻正義, 石原 智明. 本邦におけるヒトへの*Babesia*寄生のはじめての証明. *感染症学雑誌.* 1999, 73(11), 1163-1164.
- 5) Saito-Ito, A.; Yano, Y.; Dantrakool, A. et al. Survey of Rodents and Ticks in Human Babesiosis Emergence Area in Japan: First Detection of *Babesia microti*-Like Parasites in *Ixodes ovatus*. *J Clin Microbiol.* 2004, 42(5), 2268-2270.
- 6) Saito-Ito, A.; Kasahara, M.; Kasai, M. et al. Survey of *Babesia microti* infection in field rodents in Japan: records of the Kobe-type in new foci and findings of a new type related to the Otsu-type. *Microbiol Immunol.* 2007, 51(1), 15-24.
- 7) Tabara, K.; Arai, S.; Kawabuchi, T. et al. Molecular survey of *Babesia microti*, *Ehrlichia* species and *Candidatus neoehrlichia mikurensis* in wild rodents from Shimane Prefecture, Japan. *Microbiol Immunol.* 2007, 51(4), 359-367.
- 8) Tsuji, M.; Wei, Q.; Zamoto, A. et al. Human babesiosis in Japan: epizootiologic survey of rodent reservoir and isolation of new type of *Babesia microti*-like parasite. *J Clin Microbiol.* 2001, 39(12), 4316-4322.
- 9) Zamoto, A.; Tsuji, M.; Kawabuchi, T. et al. U.S.-type *Babesia microti* isolated from small wild mammals in Eastern Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci.* 2004, 66(8), 919-926.
- 10) Yano, Y.; Saito-Ito, A.; Anchalee, D. et al. Japanese *Babesia microti* cytologically detected in salivary glands of naturally infected tick *Ixodes ovatus*. *Microbiol Immunol.* 2005, 49(10), 891-897.
- 11) Zamoto-Niikura, A.; Morikawa, S.; Hanaki, K.I. et al. *Ixodes persulcatus* Ticks as Vectors for the *Babesia microti* U.S. Lineage in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2016, 82(22), 6624-6632.
- 12) 高田伸弘. 病原ダニ類図譜. 金芳堂. 1990, 216p.
- 13) Takano, A.; Fujita, H.; Kadosaka, T. et al. Construction of a DNA database for ticks collected in Japan: application of molecular identification based on the mitochondrial 16S rDNA gene. *Med Entomol Zool.* 2014, 65(1), 13-21.
- 14) Dantrakool A.; Somboon P.; Hashimoto T. et al. Identification of a New Type of *Babesia* Species in Wild Rats (*Bandicota indica*) in Chiang Mai Province, Thailand. *J Clin Microbiol.* 2004, 42(2), 850-854.
- 15) Persing D.H.; Mathiesen D.; Marshall W.F. et al. Detection of *Babesia microti* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992, 30(8), 2097-2103.
- 16) Wong, S.S.Y.; Poon, R.W.S.; Hui, J.J.Y. et al. Detection of *Babesia hongkongensis* sp. nov. in a free-roaming *Felis catus* cat in Hong Kong. *J Clin Microbiol.* 2012, 50(8), 2799-2803.