福井県におけるマダニ類の分布相とライム・ボレリア保有状況

石畠 史¹⁾・飯田英侃¹⁾・波田野基一¹⁾・矢野泰弘²⁾・高田伸弘²⁾

¹⁾ 福井県衛生研究所 (〒910 福井市原目町 39-4)

²⁾ 福井医科大学免疫学・寄生虫学教室 (〒910-11 福井県吉田郡松岡町下合月 23)

(1992 年 2 月 29 日登載決定)

ABSTRACT

Tick fauna and the prevalence of Lyme *Borrelia* in Fukui Prefecture. Fubito ISHIGURO¹, Hidetada IIDA¹, Motoichi HATANO¹, Yasuhiro YANO² and Nobuhiro TAKADA² (¹ *Fukui Prefectural Institute of Public Health*, ² *Department of Immunology and Medical Zoology, Fukui Medical School*) *J. Acarol. Soc. Jpn.*, 1(1): 27-35, (1992).

To clarify the epidemiological situation of Lyme borreliosis in Fukui Prefecture, we surveyed tick fauna and the prevalence of the pathogen *Borrelia burgdorferi* (Bb) in 14 mountainous points of the Prefecture during April to July in 1991. In this time, 4 genera and 13 species (including 2 unassociated species) belonging family Ixodidae were found. Of these, most of the common species including *Ixodes ovatus* (Io) were collected throughout the hilly or lower mountainous areas, and the southern species, *Amblyomma testudinarium* and *Dermacentor taiwanensis* were recorded first in Fukui Pref. The famous northern species, *I. persulcatus* (Ip) was collected at higher mountains over 800 m.

A total of 307 adult ticks consisting of 4 genera and 9 species were individually examined to isolate *Borrelia*. As results, 32 and 3 Bb strains were isolated from Io (32/154=20.8%) and Ip (3/27=11.1%), respectively. While almost all of strains were positive to a monoclonal antibody (H5332: specific to outer surface protein A) by IFA, but 2 of 3 strains from Ip were not responsible. Additionally, one strain was first isolated from the nymphal stage of *Haemaphysalis flava*.

Key Words: tick fauna, geographical distribution, vertical distribution, *Borrelia burgdorferi*, Fukui Prefecture

はじめに

わが国に生息するダニ類のうち、ツツガムシ類については古くから数多くの調査報告が知られるが、マダニ類については、系統的な生態分布の調査はわずかにみられる程度である。しかし、近年わが国でも紅斑熱群リケッチア症(馬原, 1987)に続いて、ライム病(Kawabata *et al.*, 1987)の発生が確認されるに至り、それら病原体のベクターとしてのマダニ類の役割が注目されるようになってきたことから、その詳細な基礎調査が要求されつつある。

今回は、佐藤および宮本らが1989年に至り初めてマダニからライム病々原体 *Borrelia burgdorferi* (以下 Bb)を分離し(Miyamoto *et al.*, 1991)、これが全国的にも分布するらしいこと、また著者のひとり高田(1990, 1991)が福井県内において *Borrelia* 抗体価の調査を実施して森林組合員の約6%が陽性であること、およびライム病の疑診3例を見ていることなど

から、本県内にも本病原体の浸淫があると考え、マダニ類の分布相およびそれらの *Borrelia* 保有状況を調査したので報告する。

本研究を行うに当たり、貴重な助言をいただいた国立予防衛生研究所の森 守博士ならびにモノクローナル抗体を分与いただいた米国テキサス大学の Alan G. Barbour 博士に深謝する。なお、本研究の一部は平成3年度福井県獣医師会獣医学術研究助成金によった。

材料と方法

1. マダニ類の採集

1991年4月中旬～7月上旬に、福井県内の標高300～1,600mにおよぶ山岳地帯の14地点において、フランネル法(flagging)により未寄生期マダニ類の採集を行った(Fig.1)。各地点の植生はさまざまであるが、いずれも登山道を歩きながら両側の下草を布で払う方法によった。得られたマダニ類の個体は、*Borrelia* 分離のために中腸を採取した後に70%エタノールに保存、実体顕微鏡下で観察して高田(1990)の検索方法に従って同定した。また、若虫の全ておよび成虫の一部は、ガム・クロラル液でスライドグラスに封入して、北岡(1985)の検索表も参考にしてより詳細な形態学的検討に供した。

Fig. 1. A map of surveying points in Fukui Pref. Numbers indicating each point were used also in the following Tables.

1. Mt. Kariyasu	6. Mt. Kyogadake	11. Mt. Ochi
2. Mt. Johoji	7. Mt. Ropponhinoki	12. Mt. Hino
3. Katuyama	8. Mt. Arashima	13. Mt. Nosaka
4. Mt. Toritate	9. Mt. Heko	14. Mt. Hyakuri
5. Mt. Hoonji	10. Mt. Kunimi	

2. マダニ類からの *Borrelia* の分離

中腸の採取とそれからの *Borrelia* の分離は, Miyamoto *et al.* (1991) の方法を改変して行った。すなわち, 分離に供した成虫の全ておよび若虫の一部は, 3% 過酸化水素水で 20~30 分間振とう洗浄後, 70% エタノールに約 2~3 分間浸して体表面を殺菌した。次に, BSK II 培地を数滴ずつ入れた 2 穴スライドガラスの 1 穴に虫体を浸漬してアルコール分を除き, 次いで別の穴に移した。実体顕微鏡下で中腸を含む内臓を取り出して, BSK II 培地の入ったバイアル瓶に投入し, 32℃ に置いた。およそ 1~3 週間培養後 5,000 rpm 10 分間遠沈して, その沈渣から微分干渉顕微鏡にて菌体の検出を試みた。

3. 菌体の同定

分離できた菌体はギムザ染色により形態を確認する一方, アメリカ合衆国の Bb (B31 株) 由来のモノクローナル抗体(菌体表層蛋白特異的 H5332 とボレリア属鞭毛蛋白特異的 H9724)を用いて, Marjorie and Warren (1987) の方法に順じて間接蛍光抗体法 (IFA) を行ない同定した。

成 績

1. マダニ類の採集成績

1) 水平分布

採集できたマダニ類の種名と略号を Table 1 に示す。成虫として 4 属 10 種, 若虫として 2 属 7 種, 合計 4 属 13 種(成・若とも不明 1 種を含む)が採集できた。次に, 地点および種類別の採集数を Table 2 に示すと, 成虫は総計で 545 個体採集でき, そのうち Io は標高に関係なく 13 地点から 182 個体 (33.4%) と最も多く, Ip は県東部(奥越地方)山岳地帯の 6 地点のみ

Table 1. A list of ticks collected by flagging in Fukui Pref. in 1991

Genus <i>Amblyomma</i>	
<i>A. testudinarium</i>	(At)
Genus <i>Dermacentor</i>	
<i>D. taiwanensis</i>	(Dt)
Genus <i>Haemaphysalis</i>	
<i>H. flava</i>	(Hf)
<i>H. japonica</i>	(Hj)
<i>H. kitaokai</i>	(Hk)
<i>H. longicornis</i> *	(Hl)
<i>H. megaspinosa</i>	(Hm)
Genus <i>Ixodes</i>	
<i>I. monospinosus</i>	(Im)
<i>I. nipponensis</i> *	(In)
<i>I. ovatus</i>	(Io)
<i>I. persulcatus</i>	(Ip)
<i>I. sp. Mt. Arashima</i>	(IspA)
<i>I. sp. Mt. Johoji</i> *	(IspJ)

Abbreviations of specific name in parentheses.

* Only nymphal stage collected.

Table 2. Collecting records of ticks in mountainous areas of Fukui Pref. in 1991

Locality No.	Month	Altitude	At	Dt	Hf	Hj	Hk	Hi	Hm	Im	In	Io	Ip	IspA	IspJ	Total
1	5	550			5 (18)			(1)			(1)					5 (20)
2	5	500~1,050		3	10 (19)							10			(1)	23 (20)
3	4, 5	300~ 900			20 (112)	1					(2)	19	(2)			40 (116)*
4	6	1,000~1,300										28	1			29
5	6	1,000~1,350			1 (3)							12	2			15 (3)
6	6	1,100~1,600										3	5 (1)			8 (1)
7	6	800~1,200			(3)							7	2			9 (3)
8	7	800~1,500			(6)							61	19 (1)	1		81 (7)
9	7	1,400~1,500										2	3			5
10	5	600~ 650			11 (28)						(2)	9				20 (30)
11	5	600			13 (29)						(1)	7				20 (30)
12	6	300~ 800		1	3 (2)							3				7 (2)
13	6	300~ 900			9 (24)	4 (3)	3	(3)		32		8				56 (30)
14	5	400~ 930	1	5	8 (19)		162	(3)	1	37 (8)		13				226 (30)
Total			1	9	80 (263)	5 (3)	165	(7)	1	69 (8)	(6)	182	32 (4)	1	(1)	545 (292)

Numbers of nymphal stages in parentheses.

* Total number of ticks collected at 7 points in suburban area of Katuyama City.

から 32 個体 (5.9%) であった。また, Hf は Ip とは逆に比較的標高の低い 9 地点にみられ, Hk と Im は県南部若狭地方の 2 地点のみから得られた。その他, Dt は全域にわたる 3 地点から 9 個体, また At は県南部から 1 個体を採集できた。若虫は 292 個体採集できたが, Hf が最も多くて 11 地点から計 263 個体 (90.1%) にのぼったほかは, Hl が 3 地点から, In が 4 地点から, そして Ip が 3 地点からそれぞれ小数を得たにすぎない。幼虫はごく小数得ただけのため, 今回の成績には加えなかった。

2) 垂直分布

成虫の同一種類について標高別の採集頻度を示すと Table 3-1 のとおりである。Hf, Io および Ip の 3 種類以外は全て 1,000 m 以下で見出された。Io は 300~1,600 m の全ての高度帯に見られたが, 特に 1,000~1,400 m で高率に採集できた。Ip は 800 m 以上の高々度で採集された。一方, Hf はほとんどが 300~1,000 m の範囲で採集できた。また, これらを標高別の種構成としてみると (Table 3-2), 1,400 m 以上では Ip が全体の 65%, 1,000~1,400 m では Io が約 82% を占め, 600~1,000 m では Hk, Im などの 4 種類が約 15~31% の構成比で採集できた。

Table 3. Vertical distribution of ticks in Fukui Pref. in 1991

1. Vertical incidences of each of 7 tick species. (%)								2. Species constructions of ticks by different altitudes. (%)							
(m)								(m)							
1,400	10.8 62.5							1,400	35.0 65.0						
	2.2 56.9 35.1								0.9 81.9 16.2						
1,000	25.4	53.2	44.7	30.4	39.9	20.1	2.4	1,000	1.2	23.6	1.2	26.6	14.6	30.8	1.2
600	74.6	44.6	55.3	69.6	60.1	12.2		600	2.8	15.6	1.2	47.8	17.5	14.7	
300	Dt	Hf	Hj	Hk	Im	Io	Ip	300	Dt	Hf	Hj	Hk	Im	Io	Ip

2. *Borrelia* の分離

1) 地点別の分離状況

成虫として At 1 個体, Dt 8 個体, Hf 32 個体, Hj 5 個体, Hk 23 個体, Hm 1 個体, Im 56 個体, Io 154 個体および Ip 27 個体, 合計 307 個体から *Borrelia* の分離を試みたところ, Io と Ip からのみ分離確認できた (Table 4-1)。Io からは, 11/13 地点で分離でき, 雌雄での分離率に著差はなく合計で 32/154 (20.8%) であった。Ip からは, 2/6 地点で分離でき, これも雌雄で大差はなく 3/27 (11.1%) であった。この 2 種以外の成虫 126 個体からは全て陰性であった。以上のほか, Io と Ip から高率に分離できた第 7 地点で採集した Hf 若虫の 3 個体も分離に供したところ, 1 個体から分離できた (Fig. 2)。

分離状況を標高別に見ると, Io では個体数の少ない 1,400 m 以上を除き, 分離率はいずれも 20% 前後であった。Ip では 1,400 m 以上で約 18%, それ以下では約 6% であった (Table 4-2)。

2) 分離株の同定

成績を Table 5 に示すと, ボレリア属特異的モノクローナル抗体 H9724 には 128 倍~256 倍希釈でも分離株の全てが反応した。一方, 種特異的 H5332 にも 32 倍希釈で大半が陽性であったにもかかわらず, Ip 由来の 3 株中の 2 株は反応しなかった。

Table 4. Isolating records of *Borrelia* strains from adult ticks in Fukui Pref. in 1991

1. Geographical prevalences

Locality No.	<i>I. ovatus</i>			Positive rate	<i>I. persulcatus</i>			Positive rate
	M	F	Total		M	F	Total	
1								
2	3/ 9	0/ 1	3/10	30.0				
3	0/ 5	1/ 6	1/11	9.1				
4	2/ 8	4/16	6/24	24.0		0/ 1	0/ 1	—
5	1/ 1	0/ 6	1/ 7	14.3	0/ 1	0/ 1	0/ 2	—
6	0/ 1	1/ 1	1/ 2	50.0	0/ 3	0/ 1	0/ 4	—
7*	1/ 3	1/ 2	2/ 5	40.0	1/ 1	0/ 1	1/ 2	50.0
8	3/23	8/34	11/57	19.3	1/ 9	1/ 6	2/15	13.3
9		1/ 2	1/ 2	50.0	0/ 2	0/ 1	0/ 3	—
10	0/ 5	0/ 4	0/ 9	—				
11	0/ 5	0/ 2	0/ 7	—				
12		1/ 3	1/ 3	33.3				
13	1/ 3	1/ 3	2/ 6	33.3				
14	2/ 5	1/ 6	3/11	27.3				
Total	13/68	19/86	32/154	20.8	2/16	1/11	3/27	11.1

M: male, F: female. No. positive/No. examined

* Also nymphal stage of Hf was positive (1/3) in this point.

2. Vertical prevalences

(m)		
	2/ 6	2/11
	33.3	18.2
1,400	17/75	0/14
	22.7	—
1,000	9/52	1/ 2
	17.3	50.0
600	4/21	
	19.0	
300	Io	Ip

Fig. 2. *Borrelia* strain (HFS 268) isolated from *H. flava* nymph.
(Nomarski's differential interference microscopical feature)

Table 5. Identification of *Borrelia* strains isolated from ticks in Fukui Pref.

Strain isolated	Monoclonal antibody to B31 in USA	
	H5332 OspA-specific	H9724 Genus-specific
Strains from Ip		
IPS- 96	32	256
IPS-117	<32	128
IPS-119	<32	128
Strains from Io		
IOS- 80	32	256
IOS- 82	32	256
IOS-169	32	256
IOS-181	32	256
IOS-211	32	256
IOS-221	32	256
IOS-230	32	256
IOS-233	32	256
IOS-236	32	256
IOS-265	32	256
IOS-287	32	256
IOS-292	32	256
IOS-296	32	256
IOS-310	32	256
IOS-311	32	256
Strain from Hf		
HFS-268	32	256

Dilution levels titrated by IFA.

考 察

今回採集できた未寄生期マダニ類の種類は、不明種2種を含み成虫、若虫を合わせて4属13種であり、福井県のマダニ相の概略は知られたと思われる。このうち、HfおよびIoなど普通種の分布については従来の報告と同様であるが、南方系のAtとDtは今回が北限を伸ばす記録となった。また、北方系のIpは長野県と同様(Uchikawa *et al.*, 1991) 800 m 以下では見出されなかったが、本種に近似しながらも異なった形質を示す不明種IspA(成虫)とIspJ(若虫)については、北海道産の類似個体との比較を含めて今後の検討を要する。今回と同じフランネル法による採集成績として、例えば東北地方(高田・藤田, 1978)あるいは四国地方(Takada *et al.*, 1988)でのマダニ相と比較してみると、本県で見られた種類の中にはこの両地方と互いに共通する種を多く含むことがよく分かる。これは、本県が一般に動植物分布の北と南の接点をなすと考えられるように、北方系と南方系のマダニ類が交錯して生息するためと思われる。

一方、HkやImは大型獣の分布と関連すると思われるが、今回は若狭地方の野坂山地に濃厚な分布を見た。この地方に隣接する地域として、京都府中北部において中嶋ら(1992)は野生動物からHf, Hl, Hm, In, Ioなど3属8種をみているが、採集法による違いのためか、今回

の若狭地方で採集した4属9種と種構成の上でやや異なっている。しかし、それぞれの地域でしか採集されていない種についても今後の継続調査によって共通種はさらに増えると思われる。なお、今回は採集できなかったが、著者ら(1991)は別の調査で福井県とその周辺の野鼠から *I. angustus* と *I. tanuki* (以下 It)の幼・若虫を見出しているの、本県には少なくとも15種が確認されたことになる。

さて、各地におけるマダニ類成虫の Bb 保有率の調査結果をみると、宮本・中尾(1991)の報告では、北海道で Io が 9.6%, Ip が 15.5%, 福島県で Io が 25.5%, 高知県で Hf が 0%, Uchikawa *et al.* (1991)の報告では、長野県で Io が 25.1%, Ip が 21.3%, また佐藤(1991)の報告では、青森県で Io が 15.2%, Ip が 21.4%, Hf と In がともに 0% などである。本県における分離成績とこれらとを比較するのは、種々の要素があって一概に言えないが、Io の場合は各県のそれとは著差がないように思われた。ただ、Ip については供試個体数が少ないものの、他県よりもやや低率かと思われた。また、Io と Ip 以外の種からの分離報告として、中尾・宮本(1991)による It 成虫1個体が知られるが、今回 Hf の若虫1個体から分離し得たのは、*Haemaphysalis* 属としては本邦初記録と思われる。なお、この Hf 採集地点では Io と Ip の両種からも高率に分離されていて、この事実が何を意味するかは疫学的にも興味深い。ところで、標高別の分離状況については、Io の場合は全国的に生息分布するため病原体の分布も広範囲に及ぶことが予想され、実際に本県においても標高に関係なくほぼ県内全域に浸透するらしいことが確認できた。Ip については、個体数が少ないために断定はできないが、高山帯の方が保有率は高い傾向がみられた。これについては、さらに追加調査が必要と思われる。

Bb の抗原性については、中尾・宮本(1991)の報告によれば、Io 由来株の蛋白組成はほとんど均一で全て Bb 種特異的モノクローナル抗体 H5332 と反応するのに対し、Ip 由来株は 42.5% が H5332 と反応しなかったという。われわれの成績においても、Io 由来株全てが H5332 の 32 倍希釈まで反応したのに対し、Ip 由来3株中の2株は反応しないという結果を見た。そして、この2株が同一地点の Ip から分離されていることも興味深かった。今後は、本県内の Ip 由来株についても、その菌体表面蛋白の性状などを他県の分離株と比較検討する必要がある。なお、Masuzawa *et al.* (1991)が述べているように、本県内でもライム病患者の血清診断や血清疫学調査を行う場合は、今回分離できたような地元の株を抗原として用いる必要もあると思われる。

摘 要

福井県内におけるマダニ類の分布相を調べるとともに、それらのライム病病原体 *Borrelia burgdorferi* の保有状況を調査した。

1. 県内14地点で採集できた未寄生期マダニ類は、*Amblyomma testudinarium* (At), *Dermacentor taiwanensis* (Dt), *Haemaphysalis flava*, *H. japonica*, *H. kitaokai* (Hk), *H. longicornis*, *H. megaspina*, *Ixodes monospinosus* (Im), *I. nipponensis*, *I. ovatus* (Io), *I. persulcatus* (Ip) および不明種として *I. sp. Mt. Arashima* (成虫)と *I. sp. Mt. Johoji* (若虫)の計4属13種であり、成虫は545個体で若虫は292個体を数えた。

2. 南方系の At と Dt は今回で各々分布北限が伸び、北方系の Ip は 800 m 以下では見出されなかった。Hk と Im は大型獣の分布との関係で限局的に濃厚な分布を見た。

3. 4属9種の成虫307個体から *Borrelia* の分離を試みた結果、Io では 32/154 (20.8%), Ip では 3/27 (11.1%) で陽性であった。また、若虫では Hf 1個体からも分離できた。

4. 分離株の抗原性については、H5332 (*B. burgdorferi* 菌体表層蛋白特異的モノクローナル抗体)とH9724 (ボレリア属鞭毛蛋白特異的)に対して、Io由来株の全てとHf由来株がIFA陽性であったのに対し、Ip由来株3株中の2株はH5332に反応しなかった。

文 献

- Kawabata M., S. Baba, K. Iguchi, N. Yamaguti and H. Russell (1987): Lyme disease in Japan and its possible incriminated tick vector, *Ixodes persulcatus*. *J. Infect. Dis.*, 156: 854.
- 北岡茂男 (1985): マダニ科チマダニ属の未成熟期の検索. 家畜衛試研究報告, 88: 49-63.
- 馬原文彦 (1987): 日本紅斑熱. 大原綜合病院年報, 30(37): 83-91.
- Marjorie L. B. and H. Warren (1987): Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains isolated from *Ixodes pacificus* ticks in California. *J. Clin. Microbiol.*, 25(12): 2296-2301.
- Masuzawa T., Y. Okada, Y. Yanagihara and N. Sato (1991): Antigenic properties of *Borrelia burgdorferi* isolated from *Ixodes ovatus* and *Ixodes persulcatus* in Hokkaido, Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 29(8): 1568-1573.
- 宮本健司, 中尾 稔 (1991): ライム病の疫学. 感染炎症免疫, 21(2): 1-10.
- Miyamoto K., M. Nakao, N. Sato and M. Mori (1991): Isolation of Lyme disease spirochetes from an ixodid tick in Hokkaido, Japan. *Acta Trop.*, 49: 65-68.
- 中嶋智子, 足立雅彦, 鯉奈順子, 矢野治弥, 吉田幸雄, 松野喜六 (1992): 京都府における野生動物寄生マダニ類の調査. 衛生動物, 43(2): 印刷中.
- 中尾 稔, 宮本健司 (1991): ライム病ボレリア日本分離株における菌体表層蛋白の多様性と均一性. 感染症学雑誌, 65(増): 86.
- 佐藤允武 (1991): 青森県におけるライム病の検索. 希少感染症診断技術研修会資料: 28-29.
- 高田伸弘 (1990): 病原ダニ類図譜. 第1版: 105-132, 金芳堂, 京都市.
- 高田伸弘 (1991): ダニと病気. 日本医師会雑誌, 106(8): 1230-1235.
- 高田伸弘, 石畝 史, 矢野泰弘 (1991): 北と南の接点北陸地方におけるマダニ類の分布相とライム・ボレリア保有状況. 日本熱帯医学会雑誌, 19(増): 45.
- 高田伸弘, 藤田博己 (1978): 東北地方におけるマダニ類の研究 4. 過去 10 年間に於けるマダニ相調査の概観. 大原綜合病院年報, 21(28): 19-34.
- Takada N., H. Fujita, F. Mahara, T. Tada and W. H. Huang (1988): Surveys of natural cycle of Spotted Fever pathogens in Japan. *Proc. Sino-Jpn. Symp. Parasitic Zoonoses*, 185-192.
- Uchikawa K., K. Muramatsu, K. Miyamoto and M. Nakao (1991): An extensive prevalence of *Borrelia burgdorferi*, the etiologic agent of Lyme borreliosis, in Nagano Prefecture, Japan. *Jpn. J. Sanit. Zool.*, 42(4): 293-299.