

PCR-RFLP 法を中心とした分子生物学的マダニ同定法の検討

赤地重宏¹⁾、田沼正路³⁾、西中隆道¹⁾

¹⁾三重県保環研、³⁾三重県津保

【はじめに】

近年、日本国内において重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) や日本紅斑熱、ライム病、回帰熱等、マダニ類刺咬による感染症が注目されている。同時に、媒介動物であるマダニの生息状況や病原体の保有状況等の調査が並行して実施されることもあり、多くの場合、マダニ種の同定が不可欠となる。しかしながら、現在の形態学的種別同定法は熟練を要する点多く、経験の浅い技術者が着手することは困難と考えられる。そこで、形態学的同定法の補助手段として、PCR-RFLP 法を中心とした安価で簡易な分子生物学的な手法を検討した。また、同手法を用い、三重県で捕獲されたマダニの同定を試みた。

【材料および方法】

1) マダニ由来遺伝子

マダニ個体については平成 23 年～26 年に三重県において環境中に生息あるいは動物に付着し、捕獲後-80℃にて保管されていたものを使用した。環境中からのマダニの採取は 80cm 四方のネル生地による Flag 法を用い、一人の術者で 1 か所 30 分を目安に実施した(図 1)。動物に付着した個体については、獣害対策として捕殺されたニホンジカもしくはイノシシの皮膚に固着していたマダニを回収し使用した(図 1)。これらマダニより Instagene Matrix(Bio-Rad)を用い、ヒートブロック等を用いた熱抽出によりマダニ由来遺伝子(DNA)を抽出した(図 2)。

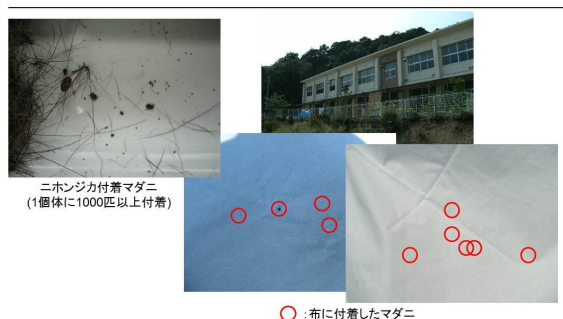


図 1 環境中および動物付着個体からのマダニの採取

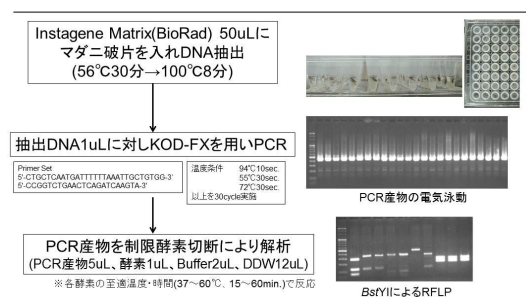


図 2 PCR 法による mt-*rrs* 遺伝子の増幅と RFLP

2) 制限酵素の選択

Takano ら既報(<http://jsmez.gr.jp/wordpress/japanese/ticks2014>)のマダニ科 7 属 39 種の mt-*rrs* 遺伝子配列に対し、New England Biolab 社の Web ツール(Nebcutter)等によって、RFLP 法により PCR 産物の切断パターンが種に応じ特徴的となる酵素を選択した(図 3)。その際、アガロースで電気泳動することを考慮し、切断パターンが比較的単純なものとなる酵素を優先的に採用した。

3) PCR-RFLP

抽出したマダニ由来遺伝子に対し、mt-*rrs* 遺伝子を標的とした PCR 法(KOD-FX(TOYOBO))を実施した。手法は Takano らの報告に基づき 5'-CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG-3' と 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCAAGTA-3' のプライマーセットを用い、94 10sec.、55 30sec.、72 30sec.、30cycle の条件で PCR を実施した。その後得られた PCR 増幅産物に対し選択した制限酵素を用い RFLP を実施し、PCR 産物切断パターンによりマダニ種を同定した(図 2)。

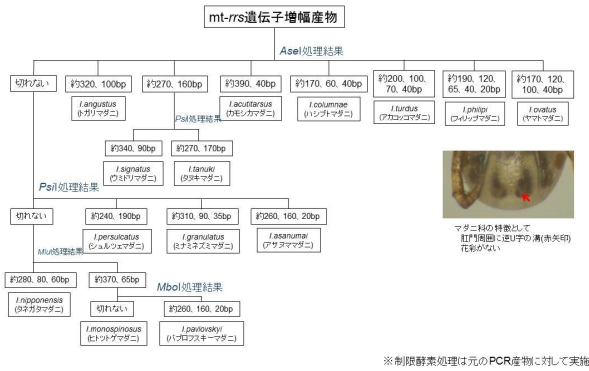


図6 マダニ科マダニ属同定

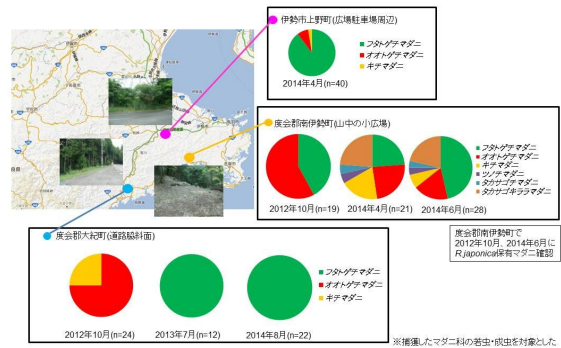


図7 伊勢志摩半島環境中マダニの季節消長

【考察】

マダニの形態学的同定は特徴の把握が困難な場合も多く、万人が実施するのは難しいと考えられる。今回実施した PCR-RFLP 法を用いた手法は安価かつ簡易であり、使用機材も PCR 法による遺伝子検出と大差ないため、PCR 法等の検査を実施している施設であれば即応用が可能であると考えられ、衛生研究所・保健所等でのマダニ同定に大いに役立つと思われる。一方、遺伝子学的同定と形態学的同定の結果に差が生じることは、マダニに限らず多くの生物で知られている。mt-rrs 遺伝子を用いた場合の形態学的同定との大きな乖離は現在のところ報告されていないが、Takano らの報告にはヤマトチマダニとダグラスチマダニは分類不能なこと、安易に BLAST 結果のみの一致率で決定すると誤同定の可能性があること等の指摘がある。これらの点から、現在のところは遺伝子学的同定法は形態学的同定法の補助手段と位置付けて考えるべきと思われる。

遺伝子学的手法を取り入れた結果、マダニ種の同定は非常に簡易なものとなり、三重県内のマダニ種の季節消長を把握するのが容易となった。また、日本紅斑熱多発地域のマダニより *R. japonica* 遺伝子が検出されており、病原体がマダニ内で保持されていることを伺わせる。今後、マダニ種の季節消長と日本紅斑熱患者発生との関係等、生物地理学的観点からの疾病の動態が検討可能になると考えられた。