

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 元年 5月 20日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19112

研究課題名(和文)節足動物媒介性感染症の新たな制御方法の確立に向けた細胞内寄生細菌の解析

研究課題名(英文)Microbial population analysis of vector arthropods for developing new control method of vector borne diseases

研究代表者

邱 永晋 (Qiu, Yongjin)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・博士研究員

研究者番号：00760985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、節足動物-共生細菌-病原体の三者の相互関係に着目した感染症の新しい制御・予防方法の確立に向けた情報基盤を構築するため、アフリカの吸血性節足動物が保有する細菌叢を網羅的に解析した。また、新規病原性細菌の分離も行った。19種258サンプルの節足動物を解析に供した。その結果、各サンプルで約100属を超える細菌群を検出した。また、節足動物から病原体の分離は成功しなかったが、吸血源のコウモリから新世界型回帰熱ボレリアグループに分類される新種の回帰熱ボレリアを分離した。本菌を *Candidatus Borrelia fainii* と命名することを提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、マダニ類を中心に19種258サンプルの節足動物の細菌叢を解析し、アフリカにおける節足動物が保有する細菌叢の情報基盤を構築した。節足動物の共生細菌を利用し感染症の制御方法は現在注目を浴びている手法である。細菌叢解析で得られた知見は、この新しい制御方法を開発するのに重要な情報をもたらす。また、本研究では新種の新世界型回帰熱ボレリアの分離に成功した。本菌は、アフリカ大陸(旧世界)で分離された唯一の新世界型回帰熱ボレリアである。本菌をより詳細に解析することで *Borrelia* 属細菌の分布・進化・系統分類に関する重要な知見が得られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project was to analyze the microbial population in several arthropod species and detect pathogens in Africa. Soft tick, hard tick, and lice were collected in several area in Zambia and subjected to high-throughput sequencing analysis based on 16S ribosomal RNA amplicons. More than 100 different bacterial genera were detected in each sample. In part of the pathogen detection, soft ticks and their blood host (Bats) were used for isolation of *Borrelia*. We successfully isolated *Borrelia* sp. from bats. Subsequent analysis revealed that the *Borrelia* sp. was belonged to New World relapsing fever borrelia even it was detected old world. We designated that new species of *Borrelia* as *Candidatus Borrelia fainii*.

研究分野：感染症

キーワード：マダニ 細菌叢 アフリカ ボレリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

吸血性節足動物は人や動物に重篤な疾病を引き起こす様々な病原体のベクターであり、多くの人の命を奪い、また、甚大な経済的損失をもたらしている。近年、節足動物の生息域の拡大に伴い、節足動物媒介性感染症も広がりを見せている。さらに、新興感染症の原因として新しい病原体が吸血性節足動物から相次いで発見されている。現在、節足動物媒介性感染症は世界的に重要な課題であり、その制御にはベクターを標的とした殺虫剤を使った対策が多用されている。しかし、薬剤耐性個体の出現や環境への影響が大きな問題となっており、新たな視点による制御・予防方法の確立が渴望されている。

節足動物は病原体の他にも様々な微生物を保有し、節足動物 - 共生細菌 - 病原体の三者は互いに影響を及ぼしながら存在している。特に細胞内寄生性の共生細菌は節足動物の代謝、生殖様式、病原体媒介能に影響を与えることが古くから知られている。さらに、近年人為的に細胞内寄生細菌と宿主の関係を変化させることで様々な現象が報告され始めた。

2. 研究の目的

本研究では、節足動物 - 共生細菌 - 病原体の三者の相互関係に着目した感染症の新しい制御・予防方法の確立に向けた情報基盤を構築するため、節足動物媒介性感染症の被害が深刻なアフリカ地域を対象とし、所属研究機関のザンビア海外拠点でアフリカの吸血性節足動物の収集を行う。そして、吸血性節足動物が保有する細菌叢を網羅的に解析すると共に、新規病原性細菌の検出を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

【節足動物の採集】

ザンビア共和国ザンビア大学獣医学部の Martin Simuunza 講師の協力で、ザンビア各地でマダニ（硬ダニ、軟ダニ）ならびにシラミを家畜体表ならびに植生上から集めた(図1)。

【サンプル処理】

マダニならびにシラミは、形態学的に種または属レベルで同定を行った。また、必要に応じてミトコンドリア配列を利用した種同定法方も用いた。節足動物の体表を消毒洗浄し、乳剤を作製した。TRIzol (Thermo Fisher 社) を用いて乳剤から DNA を抽出した。

【細菌叢解析】

各節足動物乳剤から抽出した DNA を材料に、原核生物 16S リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) の超可変領域を対象とした PCR を実施した。増幅産物を次世代シーケンサー (Illumina MiSeq) で解読し、シーケンス配列の相同性検索により含有する細菌種を特定した。

【*Borrelia* 属細菌の分離と同定】

軟ダニは、回帰熱を引き起こす *Borrelia* 属細菌の主要な媒介節足動物である。そこで軟ダニならびに軟ダニが生息する洞窟で捉えたコウモリの血液から BSK-M 培地を用いて分離を試みた。次世代シーケンサーの MiSeq を用いて分離された細菌のドラフトゲノム配列を取得し、Multi locus sequence analysis (MLSA) による系統学的解析を実施した。

4. 研究成果

解析サンプルは 258 サンプルで、19 種 (シラミ 1 種、軟ダニ 2 種、硬ダニ 16 種) に及んだ。ここでは代表例を 3 つ提示する。まず、ウシジラミ (*Haematopinus eurysternus*) の細菌叢は、平均 157 種の細菌属で構成されていた。上位細菌組成は図 2 のようであった。全てのサンプルで *Serratia* 属細菌が最優占細菌属として検出された。細胞内寄生細菌が検出できたのは 10 サンプル中 1 サンプルだけであった。

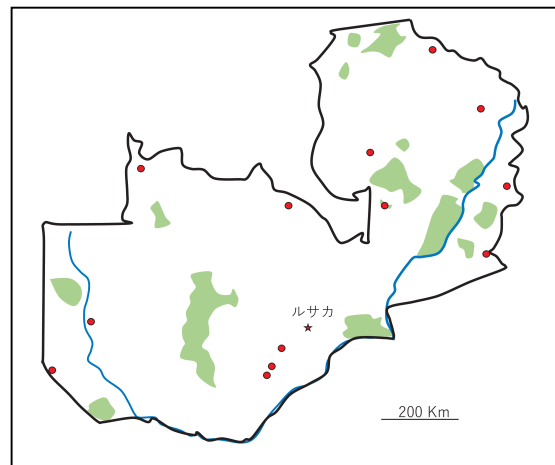


図 1 : サンプル採集地点

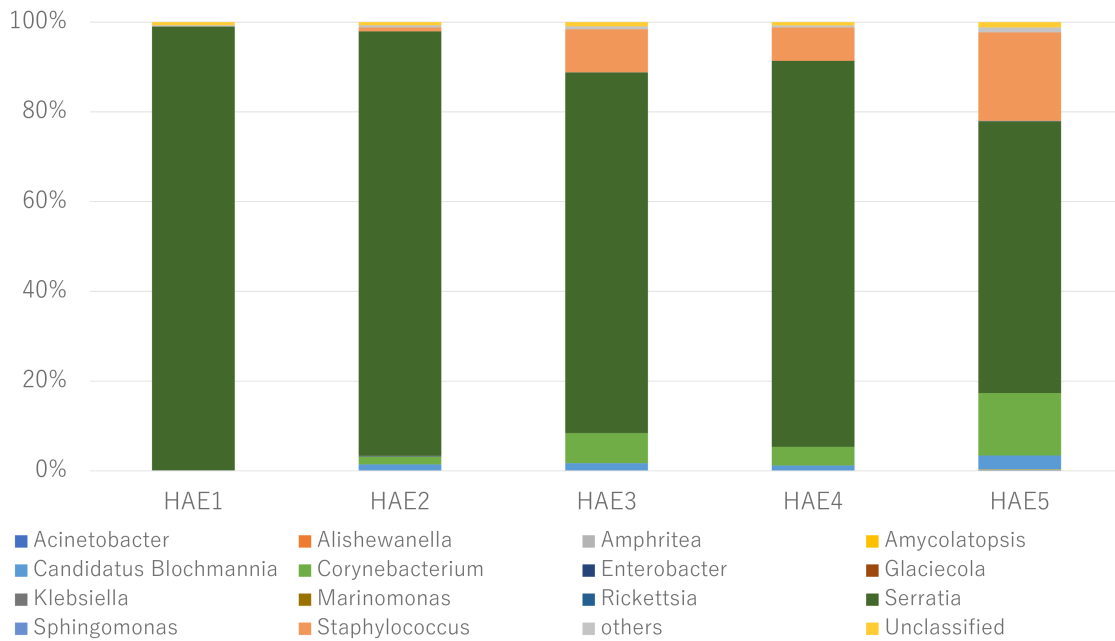


図 2 : *Haematopinus eurysternus* の細菌組成

軟ダニの *Argus walkerae* の細菌叢は、平均 130 種の再禁足で構成されていた。全てのサンプルで得られた配列の多くが属レベルでは同定できなかった (図 3)。また、細胞内寄生細菌が検出できたのは 10 サンプル中 8 サンプルであった。

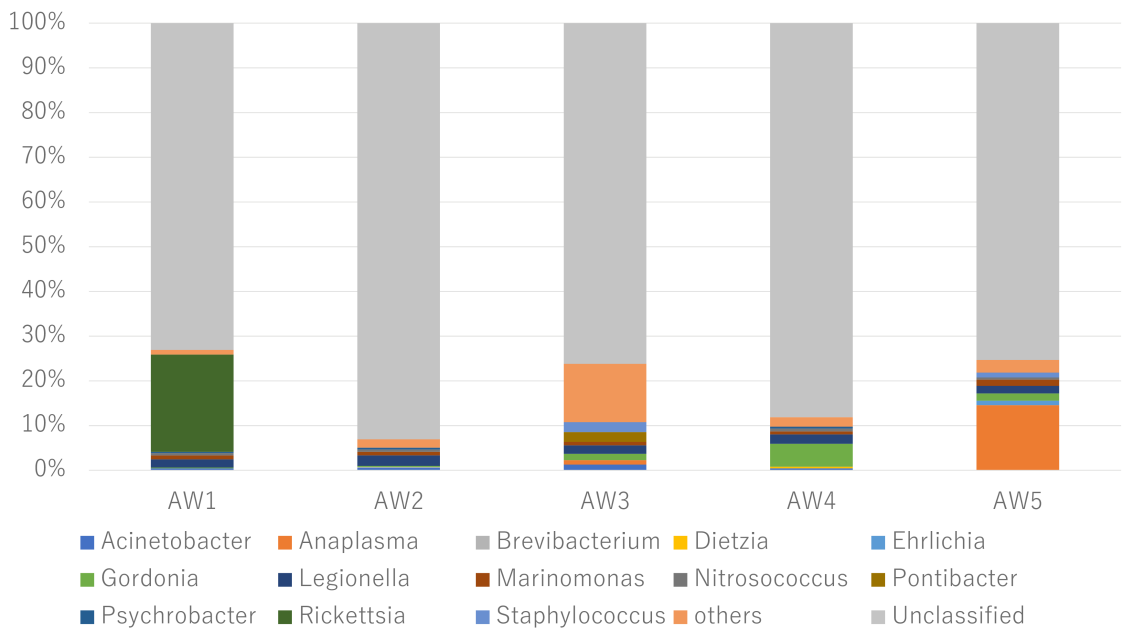


図 3 : *Argus walkerae* の細菌組成

硬ダニの *Amblyomma variegatum* の細菌叢は、平均 204 種の細菌属で構成されていた。上位細菌組成は、サンプルによって異なっていた (図 4) 細胞内寄生細菌が検出できたのは 58 サンプル中 35 サンプルであった。

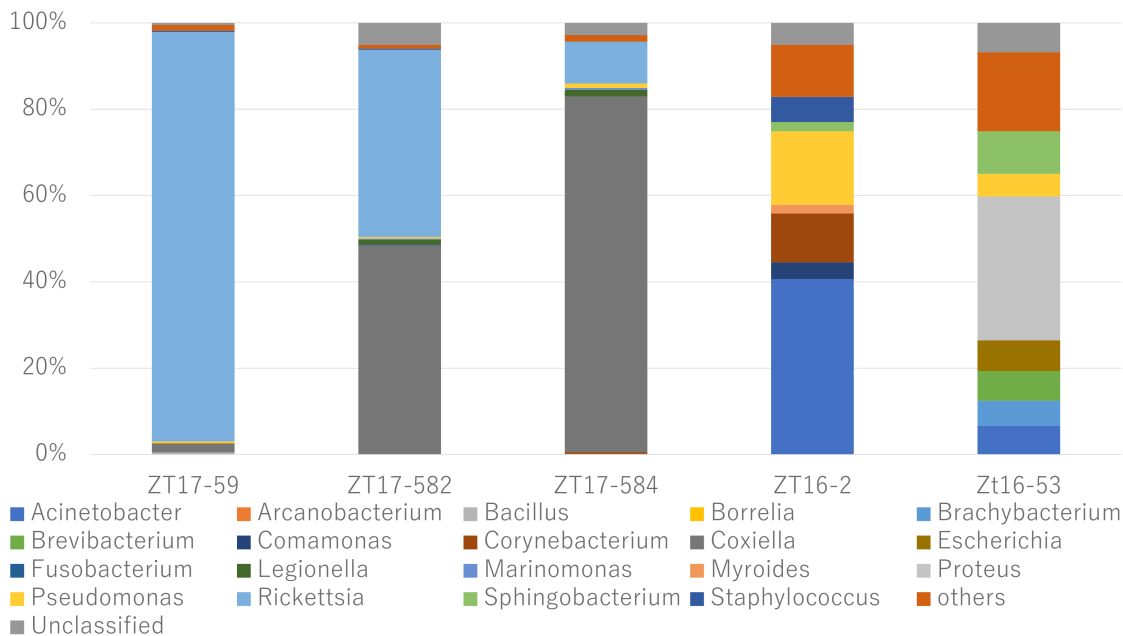


図 4 : *Amblyomma variegatum* の細菌組成

Borrelia 属細菌は、軟ダニからは分離できなかったがコウモリ (*Rousettus aegyptiacus*) から分離することに成功した。MLSA 解析により分離された *Borrelia* sp. は北米大陸に分布する新世界型回帰熱ボレリアグループに分類される新種であることが解った (図 5)。本菌を *Candidatus Borrelia fainii* と命名することを提唱した。

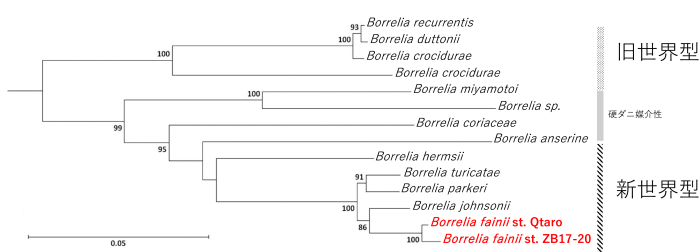


図 5 : *Borrelia* sp. の MLSA 解析

本研究ではアフリカのマダニ類を中心に細菌叢の解析を行った。また、新規病原体の分離に成功した。今後、サンプリング時期や手法を改良し、より多くのマダニ種や他の節足動物種の解析を行い、構築した情報基盤の拡大・拡充をはかる必要性が考えられた。また、本研究で発見した新規回帰熱ボレリアは、アフリカ大陸 (旧世界) で分離された唯一の新世界型回帰熱ボレリアである。本菌をより詳細に解析することで *Borrelia* 属細菌の分布・進化・系統分類に関する重要な知見が得られることが期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. [Qiu Y](#), Kajihara M, Harima H, Hang'ombe BM, Nakao R, Hayashida K, Mori-Kajihara A, Changula K, Eto Y, Ndebe J, Yoshida R, Takadate Y, Mwizabi D, Kawabata H, Simuunza M, Mweene A, Sawa H, Takada A, Sugimoto C. Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Trypanosoma* spp. detected from striped leaf-nosed bats (*Hipposideros vittatus*) in Zambia. *International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife*. [In press] 査読有
2. Thu MJ, [Qiu Y](#), Nakamura C, Sugimoto C, Katakura K, Isoda N, Nakao R. Isolation of Rickettsia, Rickettsiella, and Spiroplasma from questing ticks in Japan using arthropod cells. *Vector borne zoonotic diseases*. [In press] 査読有
3. [Qiu Y](#), Nakao R, Hang'ombe BM, Sato K, Kajihara M, Kanchela S, Changula K, Eto Y, Ndebe J, Sasaki M, Thu MJ, Takada A, Sawa H, Sugimoto C, Kawabata H. Human Borreliosis Caused by a

New World Relapsing Fever *Borrelia*-like Organism in the Old World. *Clinical Infectious Diseases*. [In press] 査読有

4. Qiu Y, Abe T, Nakao R, Satoh K, Sugimoto C. Viral population analysis of the taiga tick, *Ixodes persulcatus*, by using Batch Learning Self-Organizing Maps and BLAST search, *Journal of Veterinary Medical Science*. 2019. 81(3):401-410. 査読有
5. Thu MJ, Qiu Y, Matsuno K, Kakihara M, Mori-Kakihara A, Omori R, Monma N, Chiba k, Seto J, Gakuden M, Anode M, Oosako H, Katakura K, Takada A, Sugimoto C, Isoda N, Nakao R. Diversity of spotted fever group rickettsiae and their association with host ticks in Japan. *Scientific Reports*. 2019. 9(1):1500. 査読有
6. Qiu Y, Kaneko C, Kajihara M, Ngonda S, Simulund E, Muleya W, Thu MJ, Hang'ombe BM, Katakura K, Takada A, Sawa H, Simuunza M, Nakao R. Tick-borne haemoparasites and Anaplasmataceae in domestic dogs in Zambia. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2018. 9: 988-995. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Qiu Y, Nakao R, Hang'ombe BM, Sato K, Kajihara K, Kanchela S, Changula K, Eto K, Ndebe J, Sasaki M, Thu MJ, Takada A, Sawa H, Sugimoto C, Kawabata H. *Candidatus* *Borrelia fainii*, a New World relapsing fever *Borrelia*-like organism, the causative agent of human borreliosis in Zambia. The 3rd international joint symposium ~promotion of infectious diseases research cooperation between Africa and Japan toward science, technology and innovation~. Accra, Ghana, Nov., 2018.
2. Qiu Y, Kaneko C, Kajihara M, Simuunza M, Saasa N, Furumoto H, Ndebe J, Kapila P, Thu MJ, Hang'ombe BM, Takada A, Sugimoto C, Nakao R. Investigation of tick-borne bacterial and protozoan pathogens in domestic dogs, cattle, and ticks in Zambia, The 9th International Congress on Ticks and Tick-Borne Pathogens. Cairns, Australia, Aug., 2017.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。