

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07499

研究課題名（和文）マダニ媒介新興リケッチア目細菌群の潜在する感染リスクに関する総合的解明

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of the potential risk of tick-borne emerging infectious diseases caused by pathogenic Rickettsiales bacteria

研究代表者

大橋 典男 (Ohashi, Norio)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：10169039

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マダニ媒介新興リケッチア目細菌群の潜在する感染リスクの解明を目指した。得られた成果としては、(i)マダニには、複数の病原性リケッチア目細菌を保有する個体が存在し、それによる混合感染の発生が危惧されること、(ii)日本国内のマダニには、「エーリキア症」を引き起こす可能性のあるヒト感染型Ehrlichiaが潜在すること、(iii)日本紅斑熱における重症化リスクには、血液中のリケッチア量や日和見感染菌との混合感染が関与しているかもしれないこと、などである。本研究で得られた知見は、今後、国内のマダニ媒介感染症の制御や治療に大きく貢献するものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義としては、(i)マダニ1個体において、複数の病原性リケッチア目細菌の混在が明らかになったこと、(ii)日本国内のマダニには、ヒトに感染性を示すEhrlichia属菌が潜在していること、(iii)日本紅斑熱の重症化リスクには、血液中のリケッチア量や日和見感染菌との混合感染が関わっている可能性があること、などである。社会的意義としては、公衆衛生学上、啓発活動に役立つ知見が得られたこと、および日本紅斑熱の治療において、重症化を抑えるヒントとなる情報が得られたこと、などである。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the potential risk of tick-borne emerging infectious diseases caused by Rickettsiales bacteria, we analyzed comprehensively pathogenic Rickettsiales bacteria in ticks and blood in febrile patients with Japanese spotted fever by next-generation sequencing and qPCR. As a result, we found that (i) some individual ticks harbor multiple pathogenic Rickettsiales bacteria which may cause the mixed infections in humans, (ii) a candidate of human ehrlichiosis agent in ticks in Japan was successfully identified, and (iii) the amount of Rickettsia japonica in blood from febrile patients and/or the opportunistic infection by some facultative bacteria may be involved in the risk for severity of Japanese spotted fever. Thus, these results are expected to greatly contribute to the control and treatment of tick-borne infectious diseases caused by pathogenic Rickettsiales bacteria in Japan in the future.

研究分野：微生物学

キーワード：Rickettsiales Rickettsia japonica Japanese spotted fever Ehrlichia Tick

1. 研究開始当初の背景

リケッチア目細菌には、日本紅斑熱を引き起こす *Rickettsia japonica* およびアナプラズマ症を引き起こす *Anaplasma phagocytophilum* が知られている。さらに、エーリキア症を引き起こす *Ehrlichia* 属菌も存在している可能性がある。これらは、いずれもマダニにより媒介される。*Rickettsia* はマダニの卵を介して経卵伝播（垂直伝播）されるが、*Anaplasma* 属菌と *Ehrlichia* 属菌は保菌動物が野生哺乳動物で、マダニは媒介動物となる（水平伝播）。マダニには非病原性の *Rickettsia* も内在することから、マダニ内のこれらリケッチア目細菌群の総合的解析が求められる。また、エーリキア症は、リケッチア目に属する偏性細胞内寄生性のヒト感染型 *Ehrlichia* 属菌（米国では、*Ehrlichia chaffeensis*）の感染によるマダニ媒介新興感染症であるが、病原体の分離・培養が難しいことから、我が国ではほとんど調査されておらず、全く未知の感染症である。さらに、これまで日本紅斑熱の診断は行政的になされてはいるが、病態とリケッチア量との関係性は調べられておらず、重症化リスクの検討が必要とされる。

以上のような背景から、本研究では、マダニ媒介新興リケッチア目細菌群の潜在する感染リスクに関する総合的解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究は、マダニ媒介新興リケッチア目細菌群の潜在する感染リスクを検討するため、(1) マダニに内在するリケッチア目細菌群について網羅的解析により明らかにすること、(2) 日本国内のマダニに潜在するヒト感染型 *Ehrlichia* 属菌を解明すること、(3) 日本紅斑熱における重症化リスクについて検討すること、を目的とした。

3. 研究の方法

フィールドワークにより、マダニを採集し、種別を行った後、1個体ずつ解剖して、その全組織から DNA を抽出し実験に供した。また、日本紅斑熱の患者から血液検体 DNA および皮膚検体 DNA を得た。これらの検体の分子疫学的調査は、ION PGM System 次世代シーケンサー（NGS）を用いたメタ 16S 解析や qPCR により行った。

4. 研究成果

(1) マダニに内在するリケッチア目細菌群の網羅的解析

マダニに内在するリケッチア目細菌群を網羅的に調査するため、次世代シーケンサーを用いたメタ 16S 解析を行った。その結果、ヤマアラシチマダニにおいては、リケッチア目細菌として病原性 *R. japonica* あるいは非病原性 *Rickettsia* G4 のみを内在している個体、またこれらの *Rickettsia* と *Anaplasma* 属菌あるいは *Ehrlichia* 属菌を持ち合わせている個体も存在することが判った。特に、1個体は、病原性 *R. japonica*、非病原性 *Rickettsia* G4 および *Anaplasma* 属菌（微量のため種同定まではできなかった）の3種のリケッチア目細菌を保有していた。さらに別の1個体は、非病原性 *Rickettsia* G4 と *Anaplasma capra* と類似してるリケッチア目細菌を保有していた。*A. capra* は、中国で新たなアナプラズマ症の起原菌であるという報告がある。

以上の研究成果は、複数のリケッチア目細菌を保有するマダニにより、ヒトへの混合感染が起こる可能性を示唆するものと考えられる。

(2) 日本国内のマダニに潜在するヒト感染型 *Ehrlichia* 属細菌の探求

次に、国内におけるマダニが保有する *Ehrlichia* 属菌について、分子疫学的調査を行った。そして、PCR スクリーニングにより、フタトゲチマダニ、キチマダニ、ヤマアラシチマダニの3種のマダニから *Ehrlichia* 属菌の *p28* 遺伝子を検出することに成功した。さらに、これらのマダニ DNA から *Ehrlichia* 属菌の5つの遺伝子の配列を得ることに成功し、その結合配列を基にした系統分類手法を考案した。そして、検出された *Ehrlichia* 属菌が6つの新たな遺伝子型 (Genotype) に分類されることを明らかにした (Fig. 1)。その中のフタトゲチマダニから得られた Genotype 2 に含まれる *Ehrlichia* 属菌は、その 16S rDNA 配列が、最近、台湾で報告された2名のエーリキア症患者から検出された配列と一致したことから、この Genotype 2 は国内のエーリキア症を引き起こす遺伝子型である可能性が高いと考えられた。得られた研究成果は、これまで国内では不明であったエーリキア症についての実態解明に大きく貢献するものと考えられる。

(3) 日本紅斑熱における重症化リスクの検討

ここでは、日本紅斑熱患者の検体中の病原体を定量的に解析した。その結果、qPCR によって算出された血液および皮膚検体中の *R. japonica* コピー数と患者の予後の関係性を解析したところ、死亡患者の血液および皮膚中の *R. japonica* コピー数は、回復した患者のそれらの値と比較して、有意に高いことが認められた。次に、次世代シーケンサーを用いたメタ 16S 解析を行い、患者間細菌叢の相違と予後との関連性について検討した。その結果、回復した患者に比べ、死亡患者の皮膚中リケッチアの存在割合について有意な差が見られなかったが、死亡患者の血液中

のリケッチアの存在割合は有意に高いことが判った。また、1名の死亡患者の血液検体のみから *Staphylococcus saccharolyticus* を、もう1名の死亡患者の血液検体のみから *Enterobacter cloacae* を検出した。*S. saccharolyticus* は皮膚および粘膜に常在し、脊椎椎間板炎、感染性心内膜炎の発症の報告がある。*E. cloacae* は腸管内常在菌で、日和見感染症の主な原因菌の一つとして知られており、敗血症性関節炎、骨髄炎、感染性心内膜炎と菌血症などを引き起こし、死亡例の発生も報告されている。つまり、この2名の日本紅斑熱死亡患者においては、*S. saccharolyticus* または *E. cloacae* による日和見感染症を合併していて、これにより予後悪化につながった可能性があると考えられた。

以上、本研究より、日本紅斑熱患者における血液中のリケッチア量および日和見菌による混合感染の有無が重症化リスクと深く係わっているのかもしれないことが判明した。

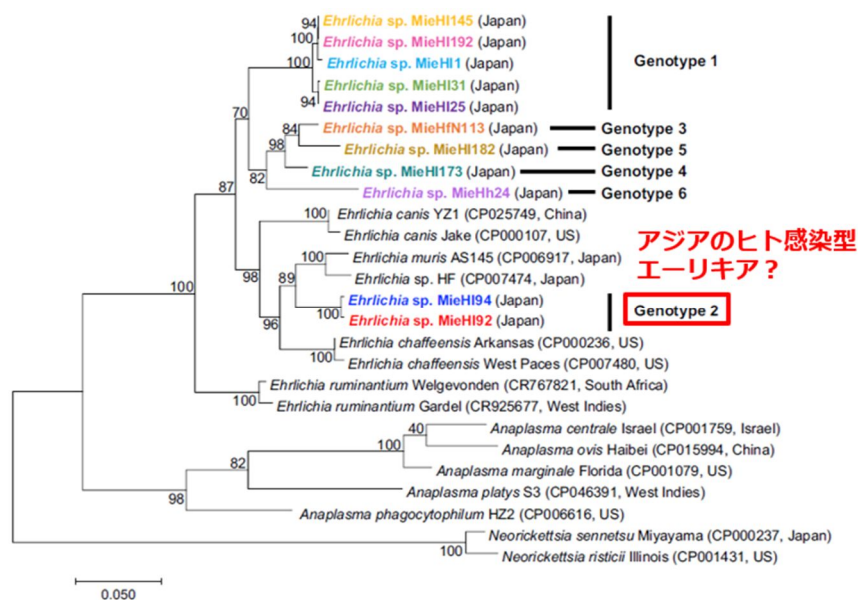


Figure 1. Core-partial-RGGFR-based phylogenetic analysis of uncultured *Ehrlichia* bacteria in Japan and cultured *Ehrlichia* species with genome sequence data.

< 引用文献 >

Peng, S. H., Yang, S. L., Ho, Y. N., Chen, H. F. & Shu, P. Y. Human case of *Ehrlichia chaffeensis* infection, Taiwan. *Emerg. Infect. Dis.* **25**, 2141–2143 (2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Su Hongru, Kubo Kenji, Sakabe Shigetoshi, Mizuno Shinsuke, Komiya Nobuhiro, Akachi Shigehiro, Fujita Hiromi, Sato Kozue, Kawabata Hiroki, Nagaoka Hiromi, Ando Shuji, Ohashi Norio	4. 巻 28
2. 論文標題 Serologic Evidence of Human Exposure to Ehrlichiosis Agents in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 2355 ~ 2357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3201/eid2811.212566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 KAWAKAMI Manri, IKEDA Fusao, FUJIOKA Shinichi, FUJITA Hiromi, KIDA Koji, OHASHI Norio	4. 巻 96
2. 論文標題 A Case of Human Granulocytic Anaplasmosis Suspected to be Complicated by Cholangitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Kansenshogaku Zasshi	6. 最初と最後の頁 29 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11150/kansenshogakuzasshi.96.29	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gaowa, Wulantuya, Sato Kozue, Liu Dan, Cui Yunhong, Yin Xuhong, Zhang Lihua, Li Hong, Wang Tingfu, Liu Rongxin, Wu Lijing, Lu Saixia, Gao Ting, Zhang Zitong, Cao Minzhi, Wang Guodong, Li Chunpu, Yan Dacheng, Ohashi Norio, Ando Shuji, Kawabata Hiroki	4. 巻 14
2. 論文標題 Surveillance of Borrelia miyamotoi-carrying ticks and genomic analysis of isolates in Inner Mongolia, China	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasites & Vectors	6. 最初と最後の頁 368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13071-021-04809-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Su Hongru, Onoda Eri, Tai Hitoshi, Fujita Hiromi, Sakabe Shigetoshi, Azuma Kentaro, Akachi Shigehiro, Oishi Saori, Abe Fuyuki, Ando Shuji, Ohashi Norio	4. 巻 11
2. 論文標題 Diversity unearthed by the estimated molecular phylogeny and ecologically quantitative characteristics of uncultured Ehrlichia bacteria in Haemaphysalis ticks, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-80690-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tai Hitoshi, Su Hongru, Takamoto Naoya, Fujita Hiromi, Takano Ai, Oishi Saori, Abe Fuyuki, Ando Shuji, Ohashi Norio	4. 巻 74
2. 論文標題 Growth Characteristics of Rickettsia species LON strains closely related to Rickettsia japonica isolated from Haemaphysalis longicornis ticks in mouse derived L929 and human-derived THP-1 host cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 102 ~ 109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2020.444	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Su H, Onoda E, Tai H, Fujita H, Sakabe S, Azuma K, Akachi S, Oishi S, Abe F, Ando S, Ohashi N	4. 巻 11
2. 論文標題 Diversity unearthed by the estimated molecular phylogeny and ecologically quantitative characteristics of uncultured Ehrlichia bacteria in Haemaphysalis ticks, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-80690-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tai H, Su H, Takamoto N, Fujita H, Takano A, Oishi S, Abe F, Ando S, Ohashi N.	4. 巻 74
2. 論文標題 Growth Characteristics of Rickettsia species LON strains closely related to Rickettsia japonica isolated from Haemaphysalis longicornis ticks in mouse derived L929 and human-derived THP-1 host cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Jpn J Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 102-109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2020.444	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshikawa Y, Sugimoto K, Ochiai Y, Ohashi N.	4. 巻 64
2. 論文標題 Intracellular proliferation of Anaplasma phagocytophilum is promoted via modulation of endoplasmic reticulum stress signaling in host cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol.	6. 最初と最後の頁 70-279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12770	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------