

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：32525

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23406012

研究課題名(和文) 東アジア共通性マダニが媒介する新興アナプラズマ症、紅斑熱群、ライム病の分子疫学

研究課題名(英文) Molecular epidemiology of tick borne-emerging infectious disease, Anaplasmosis, Spotted fever, and Lyme borreliosis in East Asian countries.

研究代表者

増澤 俊幸 (Masuzawa, Toshiyuki)

千葉科学大学・薬学部・教授

研究者番号：10181645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：マダニ媒介性細菌性感染症(ヒト顆粒球アナプラズマ症、回帰熱)病原体の日本を含む東アジアにおける野生動物と媒介マダニの保有状況を調査した。イルクーツク、ハバロフスク、モンゴルで採取したシュルツェマダニよりアナプラズマを検出した。高知で初めてHGA患者を発見し、極東ロシア由来病原体と近縁であることから大陸間からの拡散を示唆した。イルクーツク、ハバロフスクで初めて回帰熱病原体を検出した。台湾の野鼠からアナプラズマの変異株を見いだしたが、マダニから病原体は検出できなかった。

紅斑熱群病原体であるリケッチアのアルカリ抽出多糖体抗原を用いたDot-ELISA法は簡易診断法となることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The prevalence of human granulocytic anaplasmosis (HGA) agent, *Anaplasma phagocytophilum* and relapsing fever agent, *Borrelia miyamotoi*, in reservoir animals and vector ticks in East Asia, including Japan, were examined. *Anaplasma* was detected from *Ixodes persulcatus* ticks collected in Irkutsk, Khabarovsk, and Selenge in Mongolia. In Kochi Prefecture, Japan, two patients were confirmed retrospectively to be infected with *Anaplasma* and the agent detected was similar to those from ticks collected in far-east Russia. Relapsing fever-causing *Borrelia* was detected in ticks collected in Irkutsk and Khabarovsk, indicating that relapsing fever should be involved in the diagnosis of tick bite patients. Variant *Anaplasma* was detected in wild rodents captured in Taiwan. This agent has not been found in ticks collected in Taiwan and also China.

Polysaccharide antigen extracted from spotted fever *Rickettsia* under alkaline condition could be used as an antigen for Dot-ELISA-based serodiagnosis.

研究分野：医歯薬学A

科研費の分科・細目：細菌学(含真菌学)

キーワード：アナプラズマ ヒト顆粒球アナプラズマ症 ボレリア ライム病 ダニ媒介性感染症 シュルツェマダニ 紅斑熱

1. 研究開始当初の背景

ダニ媒介性感染症については国内ではあまり重要視されておらず、一方ロシア、中国では重大なダニ媒介性感染症の発生が報告されており、国内研究者はそのギャップを感じていた。しかし、2012年、重症熱性血小板減少症候群（SFTS）ウイルス、並びに新型回帰熱ボレリア *Borrelia miyamotoi* 感染国内症例が見いだされ、ダニ媒介性感染症調査の必要性が再認識されるに至った。我々は調査対象としてはヒト顆粒球アナプラズマ症の病原体 *Anaplasma phagocytophilum*、紅斑熱群リケッチア、新型ライム病および回帰熱ボレリアを中心として、当初の目的に従って東アジア地域で媒介マダニ、保有体野鼠の捕獲調査を行い実態解明を目指した。

2. 研究の目的

新興マダニ媒介性感染症に関する野外調査を東アジア地域（ロシア東部～中国～シナ海域～極東）で行う。調査対象はヒト顆粒球アナプラズマ症の病原体 *A. phagocytophilum*、紅斑熱群リケッチアの一種 *Rickettsia heilongjiangensis* や *Rickettsia helvetica*、新型ライム病ボレリア、これに加えて新型回帰熱ボレリア *Borrelia miyamotoi* を中心とする。その分布、媒介マダニ種と保有動物種の特異性と、保有率に関し分子疫学技法を用いて地域ごとの実態など地理病理学的特長を明らかにする。これらに対する分子生物学的、血清学的鑑別同定法、並びに血清診断法の整備を行なう。現地における感染リスク管理に資するとともに、日本への拡散に対して事前に診断、予防対策の構築をはかる。

3. 研究方法

ヒト顆粒球アナプラズマ、紅斑熱群リケッチア、ライム病ボレリア、新型回帰熱ボレリアの媒介マダニ、並びに保有動物における保有率の確定と感染リスクの評価を行う。調査地域としては、アジアにおける主要な媒介種であるシュルツェマダニ、イスカチマダニが棲息するシベリア（イルクーツク、ハバロフスク）から中国の北部地域、韓国、またミナミネズミマダニが棲息する韓国、台湾を含む東シナ海域を対象とする。調査チームを派遣し現地の協力者の支援のもと、野鼠並びに媒介マダニの採取を行う。得られた試料から、PCRにより各種病原体の検出を行う。保有実態、維持伝播サイクル、共感染実態解明を行う。さらに、国内においては、疑診患者血清の収集と血清学的診断を実施して、患者の発見と実態解明を行う。

（1）アナプラズマの検出：イルクーツク、ハバロフスク、モンゴルで採取された *Ixodes persulcatus* シュルツェマダニ 778 匹からアナプラズマ属は 16S rDNA、ライム病ボレリアは 5S-23S rDNA intergenic spacer (IGS)

を標的とする PCR により検出を行い、配列を決定し種の同定を行った。HGA 主要外被膜タンパク質遺伝子 *p44/msp2* 遺伝子を PCR 増幅し、さらに大腸菌に TA クローニングして、これを鋳型として DNA 配列を決定した。この配列を用いて既報の欧米あるいは日本由来配列との遺伝系統解析を行った。

（2）回帰熱ボレリアの検出：イルクーツクとハバロフスク、モンゴルで採取されたシュルツェマダニ 776 匹から 16Sr RNA 遺伝子を標的とした Taqman リアルタイム PCR により回帰熱ボレリアとライム病ボレリアをそれぞれ検出した。

（3）Dot-ELISA による紅斑熱群リケッチア症血清診断法開発：*Rickettsia japonica* よりアルカリ抽出した多糖 (APS) を抗原液とし、セルロース膜にスポットしたものを試験紙とした。被検血清は、日本紅斑熱と診断された患者の血清 12 検体を用いた。

（4）国内におけるアナプラズマ、紅斑熱群リケッチア感染者の探索：西日本地域の日本紅斑熱が多発している紀伊半島、九州地方、沖縄本島および与那国島で採取したマダニについて、これらが保有するリケッチア目細菌を *gltA* 遺伝子を標的とした PCR 法により解析を行った。アナプラズマ症が疑われる患者の探索を目的として、過去の不明熱患者血清を収集し、*p44* 遺伝子 PCR、並びに、蛍光抗体法 (IFA) および Western blot 法を用いた血清診断を行った。

4. 研究成果

（1）イルクーツク、ハバロフスク、モンゴルにおけるボレリアと HGA の保有率は、それぞれ 15%～55%、0～13%、共感染率は 0～4.7%であった。イルクーツクでは地域により HGA の保有率が大きく異なったが、ボレリアの保有率には違いがみられなかった。共感染率が低いことから、保有動物は両病原体で異なることが示唆された。16S rDNA 配列は欧米由来 HGA 配列と完全に一致した。多型性を示す *P44/msp2* 遺伝子配列解析から極東アジアのシュルツェマダニ由来配列には、日本のマダニ由来配列、並びに最近高知で見いだされた不明熱患者由来の配列と近縁なものが存在することが明らかとなり、ユーラシア大陸と日本の間で HGA の拡散があったことが示唆された。

（2）イルクーツクとハバロフスク由来マダニの回帰熱ボレリアの保有率はそれぞれ 2.9% (13/443)、2.9% (6/204) であり、ライム病ボレリアの保有率はそれぞれ 16.7% (74/443)、32.4% (66/204) であった。PCR 陽性となったマダニについて *flaB*、並びに 16SrDNA 配列解析により、*B. miyamotoi* を保有することを明らかとした。

（3）APS 抗原を用いた Dot-ELISA は、IgG および IgM 両抗体価を測定した場合、従来の IF や IP の結果を高い相関性を示した。APS

は、セルロース膜に吸着させた状態で長期間の冷蔵保存が可能であり、判定は目視で可能であるため、開発途上国などの調査先での検査が可能である。

(4) 紀伊半島(三重県、和歌山県)九州地方(鹿児島県、長崎県五島列島)沖縄本島および与那国島で採取したマダニ 743 匹中 167 匹から紅斑熱群リケッチアの *gltA* 遺伝子が検出され、*R. japonica*、*R. tamurae*、*Rickettsia* sp. LON が主であることが判った。また、今回の調査で、*R. raoultii* や *Candidatus R. principis* に近縁のリケッチアが国内に存在することも明らかとなった。一方で、743 匹中 25 匹のマダニから *A. phagocytophilum* *p44* 遺伝子群が検出された。系統樹解析では、これらの遺伝子群は米国のヒト患者由来株のものと同ーまたは高い相同性示すことから、ヒト感染型の *A. phagocytophilum* の可能性があるかと推察された。

高知県の 2 名の発熱性疾患の患者から *A. phagocytophilum* の特異遺伝子と抗体を検出した。それらの塩基配列はいずれも米国の患者由来株のものと同ーまたは相同性が高いことが判明した。血清診断を行ったところ、1 名は *A. phagocytophilum* の感染、もう 1 名は *A. phagocytophilum* と *R. japonica* の混合感染であることが明らかとなった。国内のアナプラズマ症患者の症例を初めて見いだした。

HL-60 細胞では *A. phagocytophilum* は様々な種類の *p44* mRNA を発現しているが、THP-1 細胞では主に 2 種類の *p44* mRNA (P44-47E と P44-60) が発現しており、組織培養細胞の種類の違いによって、異なる P44 蛋白種を発現している *A. phagocytophilum* が存在している可能性が高いことを突き止めた。さらに、診断抗原として、大腸菌を宿主とする *p44* 組換え蛋白質では、大腸菌由来蛋白質のコンタミネーションによる非特異反応が極めて強い。昆虫由来無細胞系発現システムを利用することで、この問題を解決することができた。今後のアナプラズマ症の血清診断に極めて役立つものと期待できる。

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(14 件)

1. Masuzawa T, Uchishima Y, Fukui T, Okamoto Y, Muto M, Koizumi N, and Yamada A: Detection of *Anaplasma phagocytophilum* from wild boars and deer in Japan. Japanese Journal of Infectious Diseases, 64 ,333-336 (2011) (査読有) org/10.7883/yoken.67.111
2. Gaowa, Wuritu, Wu D, Yoshikawa Y, Ohashi N, Kawamori F, Sugiyama K, Ohtake M, Ohashi M, Yamamoto S, Kitano T, Takada N, and Kawabata H: Detection and characterization of *p44/msp2* transcript variants of *Anaplasma phagocytophilum* from naturally infected ticks and wild deer in Japan, Jpn. J. Infect. Dis. 65, 79-83 (2012) (査読有)
3. Sen E, Uchijima Y, Kadosaka T, Ohashi N, Okamoto Y, Fukui T, and Masuzawa T. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks from Istanbul metropolitan area and rural Trakya (Thrace) region of Northwestern Turkey. Ticks Tick Borne Dis. 2, 94-98 (2011) (査読有)
4. Takano A, Fujita H, Kadosaka T, Konnai S, Tajima T, Watanabe H, Ohnishi M and Kawabata H : Characterization of reptile-associated *Borrelia* sp. in the vector tick, *Amblyomma geoemydae*, and its association with Lyme disease and relapsing fever *Borrelia* spp. Environ Microbiol Rep, 2011; 3: 632-637. (査読有)
5. Ohashi, N., Gaowa, Wuritu, Kawamori, F., Wu, D., Yoshikawa, Y., Chiya, S., Fukunaga, K., Funato, T., Shiojiri, M., Nakajima, H., Hamauzu, Y., Takano, A., Kawabata, H., Ando, S., Kishimoto, T. 2013. Human granulocytic Anaplasmosis, Japan. Emerg Infect Dis. 19, 289-292. (査読有)
6. Gaowa, Ohashi, N., Aochi, M., Wuritu, Wu, D., Yoshikawa, Y., Kawamori, F., Honda, T., Fujita, H., Takada, N., Oikawa, Y., Kawabata, H., Ando, S., and Kishimoto, T. Rickettsiae in ticks, 2007-2011 Japan. Emerg. Infect. Dis. 19, 338-340 (2013) (査読有)
7. 木村亜矢子, 米山 啓, 岸 宏久, 小豆畑康児, 角坂照貴, 高野 愛, 川端寛樹. フタトゲチマダニの幼虫および若虫による多発刺咬症の 2 例. 臨床皮膚科. 2012; 66(10):817-821. (査読有)
8. 夏秋 優, 高田伸弘, 高嶋 涉, 熊切正信, 川端寛樹, 佐藤 梢, 高野 愛 シュルツェマダニ刺症で環状紅斑を呈したがライム病ボレリア感染は確認できない症例について新たな見解 衛生動物 64:51-54. 2013
9. 及川陽三郎, 藤田博己, 矢野泰弘, 高田伸弘 紅斑熱群リケッチア症の簡易診断法としてのアルカリ多糖体抗原を用いた ELISA 法の検討 衛生動物 64:33-35, 2013.
10. Kawabata H, Takano A, Kadosaka T, Fujita H, Nitta Y, Gokuden M, Honda T, Tomida J, Kawamura Y, Masuzawa T, Ishiguro F, Takada N, Yano Y, Andoh M, Ando S, Sato K, Takahashi H, Ohnishi M. Multilocus sequence typing and DNA similarity analysis implicate

- Borrelia valaisiana*-related sp. isolated in Japan is distinguishable from European *B. valaisiana*. *J. Vet. Med. Sci.* 75:1201-1207, 2013. (査読有)
11. Takano I, Fujita H, Kadosaka T, Takahashi M, Yamauchi T, Ishiguro F, Takada N, Yano Y, Oikawa Y, Honda T, Gokuden M, Tsunoda T, Tsurumi M, Ando S, Andoh M, Sato K, Kawabata, H. Construction of a DNA database for ticks collected in Japan: application of molecular identification based on the mitochondrial 16SrDNA gene. *Med. Entomol. Zool.*65:13-21, 2014 (査読有)
 12. Masuzawa T, Uchishima Y, Fukui T, Okamoto Y, Pan MJ, Kadosaka T, Takada N. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma bovis* in Small Wild Mammals from Taichung and Kinmen Island, Taiwan. *Jpn J Infect Dis.*, 67: 111-114(2). 2014. (査読有)
 13. Takano A, Fujita H, Kadosaka T, Takahashi M, Yamauchi T, Ishiguro F, Takada N, Yano Y, Oikawa Y, Honda T, Gokuden M, Tsunoda T, Turumi M, Ando S, Andoh M, Sato K, Kawabata H. Construction of a DNA database for ticks collected in Japan: application of molecular identification based on the mitochondrial 16S rDNA gene. *Med. Entomol. Zool.*, 65(1); 13-21. 2014. (査読有)
 14. 夏秋 優, 高田伸弘, 高嶋渉, 熊切正信, 川端寛樹, 佐藤梢, 高野愛. シュルツエマダニ刺症で環状紅斑を呈したがライム病ボレリア感染は確認できない症例についての新たな見解. *衛生動物* 2013 ; 64 : 51-4
- 【学会発表】(計 19 件)
1. Ohashi N.: *Rickettsiales* bacteria in Japan., International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, Sep. 10 (2011)
 2. Gaowa, Wuritu, Aochi M., Kawamori F., Yoshikawa Y. and Ohashi N.: Molecular detection of *Rickettsiales* bacteria from ticks in western Japan., International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, Sep. 9 (2011)
 3. Wuritu, Wu D., Yoshikawa Y., Furukawa E., Murakami T., Minato C., Kawamori F., Ohtake M., Ohashi N.: Molecular epidemiological study of *Rickettsiales* bacteria in wild deer and mice in Shizuoka prefecture, Japan., International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, Sep. 9 (2011)
 4. Gaowa, Wuritu, Wu D, Furukawa E., Yoshikawa Y. Kawamori F. and Ohashi N.: First detection of *Anaplasma phagocytophilum* from human patients with febrile illness in Japan., The 4th International Conference on Health and Longevity Sciences, Shizuoka, Japan, Oct. 21 (2011)
 5. Gaowa, Aochi M., Wuritu, Kawamori F., Yoshikawa Y. and Ohashi N.: Molecular evidence of *Rickettsiales* bacteria in ticks, Japan., China-Japan Joint Meeting on Health Sciences, Hangzhou, China, Nov. 28 (2011)
 6. 及川陽三郎, 藤田博己, 矢野泰弘, 高田伸弘: 日本紅斑熱リケッチアより抽出したアルカリポリサッカライド抗原感作プレートを用いた酵素抗体法. 第 65 回日本衛生動物学会西日本支部大会. 倉敷市(2010.11.5). *衛生動物*, 62 (2): 152.
 7. 及川陽三郎, 藤田博己, 高田伸弘: 紅斑熱群リケッチア症の簡易診断用抗原としてのアルカリ抽出多糖体の有用性. 第 52 回日本熱帯医学会総会. 東京都 (2011.11.4).
 8. Masuzawa T, Sen E, Uchishima Y, Okamoto Y, Fukui T, Kadosaka T, and Ohashi N.: Molecular detection of tick-borne pathogens, *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*, from vector tick, *Ixodes ricinus*, collected in the Istanbul metropolitan area and rural Trakya (Thrace) region of Turkey. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo) 2011 年 9 月 7 日
 9. 及川陽三郎, 高田伸弘 紅斑熱における尿中抗原検出の試み 第 19 回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー、安芸太田町、2011. 11. 3-5.
 10. Masuzawa T, Ohashi N, Khasnatinov M, Danchinova D, Ivanov L, Fukui T, Okamoto Y, Pan M, Koizumi N.: Comparative research of *Anaplasma* in Japan and other countries. Russian Scientific conference with international participation “BASIC AND APPLIED ASPECTS OF INFECTIOUS PATHOLOGY”, devoted to 100-year anniversary of the Institute of epidemiology and microbiology SC FHHRP SB RAMS (Irkutsk, Russia), September 27-28, 2012
 11. Ohashi N, Yoshikawa Y, Masuzawa

- T: Overview of tick-associated bacteria in Japan. Russian Scientific conference with international participation “BASIC AND APPLIED ASPECTS OF INFECTIOUS PATHOLOGY”, devoted to 100-year anniversary of the Institute of epidemiology and microbiology SC FHHRP SB RAMS (Irkutsk, Russia), September 27-28, 2012
12. 増澤俊幸, 黒川宣仁, 黒川ゆりか, 江口憂里子, 神田実, 福井貴史, 岡本能弘, Leonid I. Ivanov: 極東ロシア・ハバロフスク由来 *Ixodes persulcatus* より検出された *Anaplasma phagocytophilum* の p44 遺伝系統解析 第 20 回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー(徳島) 2012 年 7 月 8 日
 13. 及川陽三郎, 藤田博己, 高田伸弘: 紅斑熱の抗体価測定法としての紅斑熱群リケッチアより抽出したアルカリ多糖抗原による Dot-ELISA の有用性, 第 53 回日本熱帯医学会, (帯広市) 2012 年 9 月 5 日 ~ 9 月 6 日
 14. 高田伸弘, 及川陽三郎, 石畝 史, Bataa, Jantsandoo, 大橋典男, 福井貴史, 増澤俊幸: チンギスハーンの国モンゴルでのマダニ媒介感染症の視察調査、特にアナプラズマ症の絡みから, 第 67 回日本衛生動物学会西日本支部大会, (伊勢市) 2012 年 10 月 20 日 ~ 21 日
 15. 益田翔, 増澤俊幸, 岡本能弘, 福井貴史, 大橋典男, Khasnatinov, M. A., Danchinova G. A., Ivanov, L. I., Jantsandoo Bataa, 及川陽三郎, 石畝史, 高田伸弘: 極東ロシア、モンゴルにおけるヒト顆粒球アナプラズマの検出. 第 21 回 SDAI (稚内) 2013 年 6 月 22 日
 16. 増澤俊幸, 益田翔, 宮井莉奈, 福井貴史, 岡本能弘, 大橋典男, Wuritu, 高田伸弘, Khasnatinov, M. A., Danchinova G. A., Ivanov, L. I., Bataa, J: 極東ロシア、並びにモンゴル由来マダニのヒト顆粒球アナプラズマとライム病ボレリアの共感染. 第 13 回人と動物の共通感染症研究会 (東京) 2013 年 11 月 2 日
 17. 増澤俊幸, 宮井莉奈, 益田翔, 川端寛樹, 高野愛, Maxim Khasnatinov, 大橋典男, 高田伸弘, Jantsandoo Bataa, 岡本能弘, 福井貴史: 極東ロシアとモンゴル由来シユルツェマダニの回帰熱ボレリアの保有状況: 第 51 回レプトスピラシンポジウム (東京) 2014 年 3 月 29 日
 18. 及川陽三郎, 高田伸弘, 矢野浩司, 山本正悟: 紅斑熱リケッチアのアルカリ抽出多糖抗原を用いた ELISA によるヒト血清のスクリーニング・テスト - タイ国で採集されたヒト血清について 第 65 回日本衛生動物学会大会 2013 . 4
 19. 夏秋 優. 臨床的に日本紅斑熱が疑われたが各種リケッチア抗体の上昇を認めなかった症例について. 第 6 回日本リケッチア症臨床研究会・第 20 回リケッチア研究会 合同研究発表会 2014.1.12 大津
- 【図書】(計 3 件)
1. 高田伸弘: 国内外のダニ媒介感染症における地理病理学の意義 衛生動物64・1-2, 2013
 2. 高田伸弘: 予期せぬ感染症との遭遇 . 2 . 医ダニ類の多様性, とくに各種感染症を媒介するマダニたち Clean Life 2014 年号・5-11, 2013.12
 3. 高田伸弘: わが国でも問題のベクター媒介性感染症 . 8 . 日本紅斑熱の発生状況と媒介マダニから見えてくる感染環 化学療法の領域 30・305-312 . 2014 . 2
- 【産業財産権】
なし
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
増澤俊幸 (MASUZAWA, Toshiyuki)
千葉科学大学・薬学部・教授
研究者番号: 10181645
 - (2) 研究分担者
高田 伸弘 (TAKADA, Nobuhiro)
福井大学・医学部・シニアフェロー
研究者番号: 90003409
 - (3) 研究分担者
大橋 典男 (OHASHI, Norio)
静岡県立大学・食品栄養学部・教授
研究者番号: 10169039
 - (4) 研究分担者
角坂 照貴 (KADOSAKA, Teruki)
愛知医科大学・医学部・講師
研究者番号: 90109760
 - (5) 研究分担者
及川 陽三郎 (OIKAWA, Yosaburo)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号: 10139785
 - (6) 研究分担者
夏秋 優 (NATSUAKI, Masaru)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 60208072