

機関番号:32525

研究種目:基盤研究(B)(海外)

研究期間:2008~2010

課題番号:20406011

研究課題名(和文) ユーラシアにおけるマダニ媒介性細菌ライム病ボレリアとアナプラズマの共感染実態解明

研究課題名(英文) Current status and co-infection of Lyme disease borrelia and human granulocytic Anaplasma in Eurasia.

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

研究成果の概要(和文):トルコ、イルクーツク、台湾におけるヒト顆粒球アナプラズマの分布状況とライム病ボレリアとの共感染頻度の解明を目的として、マダニ、野鼠について分子疫学的調査を行った。トルコとイルクーツクの試料から両病原体を検出したが、共感染率は5%以下であった。トルコのアナプラズマはセルビアやモスクワで検出されたものと一致した。イルクーツクのものは、一部が日本のマダニ由来のものと近縁であった。台湾の野鼠試料からヒト顆粒球アナプラズマとウシ型アナプラズマを検出した。

研究成果の概要(英文): Distribution of *Anaplasma phagocytophilum* and coinfection of *A. phagocytophilum* and Lyme disease *Borrelia* spp. in Turkey, Irkutsk, and Taiwan were examined. Both pathogens were detected from tick collected in Turkey and Irkutsk. The co-infection rate in ticks were less than 5%. P44 protein sequences of *A. phagocytophilum* detected in Turkey were in the same genetic lineage of these detected from Serbia and Moscow in Russia. On the other hand, some of the protein detected in Irkutsk were similar to those from ticks in Japan. *A. phagocytophilum* and *Anaplasma bovis* were detected from rodents in Taiwan.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	7,200,000	2,160,000	9,360,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード:アナプラズマ、ライム病、ボレリア、マダニ、マダニ媒介性感染症

1. 研究開始当初の背景

ライム病(Lyme disease)は、1982年に発見されたマダニ媒介性のライム病ボレリア(*Borrelia burgdorferi sensu lato*、以下*Borrelia*)の感染に起因する新興の人畜共通

感染症である。北米や欧州を中心に年間10万人程度のライム病患者が発生している。これまでの研究代表者らの研究グループの調査から、東アジアからヨーロッパに至るユーラシアにおいて、ライム病ボレリア種、なら

びに媒介マダニ種、またその保有率などが明らかになってきた。

ヒト顆粒球アナプラズマ *Anaplasma phagocytophilum* は本来ヒツジやウマに感染する家畜伝染病病原体として認知されていたが、ヒトに対する病原性は知られていなかった。1994年に米国で初めてのヒト感染例が見いだされ、マダニ媒介性の新興感染症として注目された。その後、ライム病ボレリアとの共感染と、それに伴う病態の重症化、複雑化などが明らかになってきた。一方で、ユーラシアにおける *A. phagocytophilum* の分布や *Borrelia* との共感染の有無などは、全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、ユーラシアにおいて未だ分布の明らかになっていない *A. phagocytophilum* の分布状況の解明と、*Borrelia* との共感染頻度の解明を目的として、分子疫学的に調査を行った。トルコのマダニ、リクガメ、野鼠、イルクーツクのマダニ、台湾のマダニ、野鼠の捕獲調査を行い、PCR法を用いた *A. phagocytophilum* と *Borrelia* の検出を試みた。検出された試料に関しては各遺伝子の配列に基づき遺伝系統解析と種の同定を行った。

3. 研究の方法

(1) 試料 2008年から2010年にかけてトルコ、2009年にシベリア地方に位置するイルクーツク、1999年と2009年に台湾において野外調査を行った。

トルコでは、Istanbul及びブルガリア国境付近のKirkklareliで採取されたマダニ、2009年にIstanbulで、2010年にギリシャ国境付近のEdirneで採取された野鼠、リクガメ、マダニを使用した。野鼠は *Apodemus sylvaticus* (モリアカネズミ)、*Apodemus agrarius* (セスジネズミ)、*Apodemus*

flavicollis (キクビアカネズミ)、*Crocidura suaveolens* (コジネズミ) の4種、リクガメ種は *Testudo graeca* (ギリシャリクガメ)、マダニ種は *Ixodes ricinus* (ヒツジマダニ)、*Hyalomma aegyptium*、*Rhipicephalus bursa* の3種であった。野鼠は脾臓と血液、リクガメは血液、マダニは全組織を試料としてアナプラズマとボレリアの検出を行った。

イルクーツクでは2009年に共同研究者であるMaxim Khasnatinov博士(東シベリア科学センター)から、イルクーツク近郊のMurino及びKochergatで採取された *Ixodes persulcatus* (シュルツマダニ) から抽出された249匹分のDNAの提供を受けた。

台湾では1999年に潘銘正教授(国立台湾大学、現台中科技大学)の協力のもと、台湾本島の台中近郊と中国の厦門に面した金門島で野鼠の採取を、2009年に台中近郊で野鼠と野鼠に付着していたマダニを採取した。1999年の試料の内訳は野鼠が *Rattus losea* (コキバラネズミ)、*A. agrarius*、*Mus formosanus*、*Bandicota indica* (オニネズミ)、*Suncus murinus* (ジャコウネズミ) の5種81匹、2009年は野鼠が *R. losea*、*A. agrarius*、*Mus caroli* (オキナワハツカネズミ)、*B. indica*、*S. murinus*、*C. suaveolens* の6種57匹と、マダニ *Ixodes granulatus* (ミナミネズミマダニ)、*Rhipicephalus sanguineus* (クリイロコイタマダニ)、*Haemaphysalis bandicota*、*Amblyomma testudinarium* (タカサゴキララマダニ) の4種63匹であった。これらの野鼠は脾臓、マダニは全組織を試料として検出を行った。

(2) 病原体遺伝子の検出 QuickGene DNA tissue kit S (FUJIFILM) を使用し試料からDNAを抽出した。ライム病ボレリアは5S-23S rRNA 遺伝子 intergenic spacer (IGS) を標

的とした PCR 反応を行った。得られた増幅産物は、制限酵素 *Mes I* または *Dra I* で切断した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色して、制限酵素断片長多型性解析により、ボレリア種の同定を行った。アナプラズマの検出には、アナプラズマ属細菌特異的 16S rRNA (*rrs*)、並びに *A. phagocytophilum* 特異的 *p44* 遺伝子の PCR による検出を行った。PCR 反応後、増幅を確認するためにアガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した。

(3) シークエンス解析 *p44* 遺伝子増幅産物は TA クローニングを行った後に、その他の増幅産物は直接シークエンス解析に使用した。すなわち、pT7Blue-2 T-Vector、および DNA Ligation kit を用いて、*p44* 遺伝子 PCR 増幅産物を TA クローニングし、*Escherichia coli* DH5 α 株コンピテントセルに形質転換した。形質転換体より鋳型 DNA を増幅し、シークエンス反応は BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いて行った。蛍光キャピラリーシークエンサー 3130 Genetic Analyze を使用し、塩基配列を得た。得られた配列データは GENETYX[®] Ver. 10 遺伝情報処理ソフトウェアを用いて解析し、塩基配列を決定した。また、一部試料は北海道システムサイエンスに解析を依頼した。Lasergene[®] MegAlign Software を使用して、Clustal W アルゴリズムにより得られた DNA 塩基配列およびアミノ酸配列を整列し、近接結合法により系統樹を作成した。

4. 研究成果

(1) トルコの試料の結果 アナプラズマ属特異的 *rrs* 遺伝子は 2008 年のマダニ 23 検体 (23/250、9.2%)、*A. phagocytophilum* 特異的 *p44* 遺伝子は、マダニ 24 検体 (24/250、9.6%)、ボレリア特異的 IGS はマダニ 49 検体

(49/250、18.8%) から検出された。一方、2009、2010 年の試料からは検出されなかった。

rrs 遺伝子の塩基配列に基づき遺伝系統解析を行い、21 検体は米国や欧州の *A. phagocytophilum* の配列と 100%一致、または 99%以上の高い相同性を示した。一方、残りの 2 検体の相同性は 96.1%と低かった。IGS の塩基配列に基づきボレリア種の同定を行った。22 検体は *Borrelia lusitaniae* と、5 検体が *Borrelia afzelii* と、10 検体がユーラシア型 *Borrelia garinii*、1 検体がアジア型 *B. garinii* に近縁なもの、4 検体が *Borrelia valaisiana* と同定された。今回検出された *Borrelia* のうち *B. lusitaniae* が最も多く全体の 59.9%を占めていた。

両病原菌共に Istanbul と Kirklareli で検出されたが、*Anaplasma* の検出率は明らかに Kirklareli で高く、*Borrelia* の検出率は Istanbul が若干高い値となった。また、共感染していたマダニは 3 検体で、共感染率 1.2% (3/250) であった。

(2) イルクーツク試料の結果 アナプラズマ属細菌特異的 *rrs* 遺伝子はマダニ *I. persulcatus* 13 検体 (13/246、5.3%) から検出された。12 検体 (12/112、10.7%) は Kochergat のマダニから検出され、残りは Murino のマダニ 1 検体 (1/134、0.7%) から検出された。一方、*A. phagocytophilum* 特異的 *p44* 遺伝子は 15 検体 (15/246、6.1%) から検出された。*p44* 遺伝子の検出したマダニは全て Kochergat で採集されたマダニであり、この地域の検出率は 13.4%であった。

イルクーツクのマダニから検出された *rrs* 遺伝子は欧米の *A. phagocytophilum* の配列と 100%一致した。*Borrelia* の IGS は 51 検体 (51/246、20.7%) から検出された。IGS の RFLP 解析を行ったところ、44 検体 (44/51、

92.2%) がアジア型 *B. garinii*、残る 4 検体 (4/51, 7.8%) はアジア型 *B. garinii* とユーラシア型 *B. garinii* の共感染であることがわかった。

A. phagocytophilum と *Borrelia* は Murino と Kochergat の両地域から検出されたが、その検出率には大きな差が見られた。すなわち、*Borrelia* の検出率は両地域間で差はなかったが、*A. phagocytophilum* の検出率は Kochergat が明らかに高いことが示された。両病原体に共感染していたマダニは 4 検体で、共感染率 1.6% であった。共感染を起こしたマダニが採集された地域は全て Kochergat であり、共感染していた *Borrelia* 種はすべてアジア型 *B. garinii* であった。この地域での共感染率は 3.8% であった。

(3) 台湾の試料の結果

アナプラズマ属特異的 *rrs* 遺伝子は 1999 年の台中の野鼠 10 検体 (10/43, 23.3%)、金門島の野鼠 14 検体 (14/38, 36.8%) から、2009 年の野鼠 13 検体 (13/57, 22.8%) から検出された。一方、マダニ試料からは検出されなかった。

rrs 遺伝子の塩基配列に基づき遺伝系統解析を行った。12 検体は中国で検出された *A. phagocytophilum* の配列と 100% 一致、または 99% 以上の高い相同性を示した。一方で、これらの検体は米国などで検出された *A. phagocytophilum* とは 99.7% の相同性を示したが、異なるクラスターを形成した。一方、残りの 25 検体は *Anaplasma bovis* とクラスターを形成し、相同性は 97.1~99.5% と高かった。結果として、1999 年の台中の野鼠 1 検体 (1/43, 2.3%) から *A. phagocytophilum*、9 検体 (9/43, 20.9%) から *A. bovis*、金門島の野鼠 6 検体 (6/43, 15.8%) から *A. phagocytophilum*、8 検体 (8/43, 21.1%) から

A. bovis が検出され、2009 年の野鼠 5 検体 (5/57, 8.8%) から *A. phagocytophilum*、8 検体 (8/57, 14.0%) から *A. bovis* が検出された。*A. phagocytophilum* は金門島における検出率が、台中における検出率よりも高かったのに対して、*A. bovis* は調査地域による検出率の差は見られなかった。感染の確認された野鼠のうち、*A. phagocytophilum* に感染していた 91.7% (11/12)、*A. bovis* に感染していた 72.0% (18/25) の野鼠種は *R. losea* であった。一方、台湾のすべての検体からは *A. phagocytophilum* 特異的な *p44* 遺伝子は検出されなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Toshiyuki Masuzawa, Yoshiyuki Uchishima, Takashi Fukui, Yoshihiro Okamoto, Maki Muto, Nobuo Koizumi, and Akio Yamada: Detection of *Anaplasma phagocytophilum* from wild boars and deer in Japan. Japanese Journal of Infectious Diseases (in press)
2. Ai Takano, Minoru Nakao, Toshiyuki Masuzawa, Nobuhiro Takada, Yasuhiro Yano, Fubito Ishiguro, Hiromi Fujita, Takuya Ito, Xiaohang Ma, Yozaburo Oikawa, Fumihiko Kawamori, Kunihiro Kumagai, Toshiyuki Mikami, Nozomu Hanaoka, Shuji Ando, Naoko Honda, Kyle Taylor, Toshio Tsubota, Satoru Konnai, Haruo Watanabe, Makoto Ohnishi, and Hiroki Kawabata: Multilocus sequence typing implicates rodents as main reservoir host of human-pathogenic *Borrelia garinii* in Japan. Journal of Clinical Microbiology, 49, 2035-2039 (2011)
3. Ece Sen, Yoshiyuki Uchishima, Yoshihiro Okamoto, Takashi Fukui, Teruki Kadosaka, Norio Ohashi, Toshiyuki Masuzawa: Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks from Istanbul metropolitan area and rural Trakya (Thrace) region of North western Turkey. Ticks and tick-borne diseases, 2, 94-98 (2011).
4. Snezana Tomanovic, Zeljko Radulovic, Toshiyuki Masuzawa, Marija

- Milutinovic, Ljubisa Stnisavljevic: Potential infectivity of *Anaplasma phagocytophilum* strains in *Ixodes ricinus* ticks from Serbia. Acta Veterinaria Hungarica, 58, 231-242 (2010).
5. Snezana Tomanovic, Zeljko Radulovic, Toshiyuki Masuzawa, Marija Milutinovic: Coexistence of emerging bacterial pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in Serbia. Parasite, 17, 211-217 (2010).
 6. Wurutu, Ozawa Y, Gaowa, Kawamori F, Masuda T, Masuzawa T, Fujita H, Ohashi N. Structural analysis of a *p44/msp2* expression site of *Anaplasma phagocytophilum* in naturally infected ticks in Japan. Journal of Medical Microbiology. 58, 1638-44. (2009)
 7. Kharitonov IG, Masuzawa T, Okamoto I, Fukui T, Trifonov IV, Reznikov IuP, Rumiantsev AG. Assessment of rate of infection with agents of bacterial infections in ticks captured on one of the Moscow park terrains (in Russian) Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 3, 14-17 (2009).

[学会発表] (計 10 件)

1. Toshiyuki Masuzawa, Ece Sen, Yoshiyuki Uchishima, Yoshihiro Okamoto, Takashi Fukui, Teruki Kadosaka, and Norio Ohashi: 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
2. 増澤俊幸、内島祥由紀、岡本能弘、福井貴史、Ece Sen、Maxim Khasnatinov: イルクタークとトルコにおける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54回日本薬学会関東支部会 (八王子) 2010年10月2日
3. 川端寛樹、高野愛、伊東拓也、石畝史、高田伸弘、中尾稔、増沢俊幸、藤田博己、渡邊治雄、大西真: 多領域 DNA 配列解析によって推定された国内におけるライム病ボレリア病原体 *Borrelia garinii* の維持・伝播経路. 第56回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会 (札幌) 2010年10月2日
4. 内島祥由紀、増澤俊幸、岡本能弘、福井貴史、角坂照貴、大橋典男、Ece Sen、Maxim Khasnatinov トルコとイルクタークにおけるヒト顆粒球アナプラズマ、並びにライム病ボレリアの検出 第22回微生物シンポジウム (高槻) 2010年9月4日
5. 内島祥由紀、増澤俊幸、岡本能弘、福井貴史、角坂照貴、Ece Sen: トルコ国内からの人獣共通感染症病原微生物の検出 第47回レプトスピラシンポジウム (東京) 2010年3月26日
6. 内島祥由紀、増澤俊幸、岡本能弘、福井貴史、角坂照貴、Ece Sen: トルコのアナプラズマ検出 第18回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー (佐渡市) 2010年6月11日
7. 川端寛樹、武藤麻紀、高野愛、小笠原由美子、藤田博己、鶴見みや古、増沢俊幸、宮本健司、渡邊治雄. Multi-locus sequence typing 法による国内野生鳥類由来ボレリアと北海道患者由来ボレリアの遺伝子型別解析. 第55回日本衛生動物学会北日本支部大会. (帯広) 2009年10月3日
8. 増澤俊幸、岡本能弘、岡野江里子、川谷慶太: マダニ媒介性感染症病原体(ライム病ボレリアとヒト顆粒球アナプラズマ)の地理的分布と多様性 第21回微生物シンポジウム (福山) 2009年9月3日
9. 内島祥由紀、Ece Sen、角坂照貴、大橋典男、岡本能弘、福井貴史、増澤俊幸: トルコの *Ixodes ricinus* からの *Anaplasma phagocytophilum* の検出 第17回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー (大野) 2009年6月13日
10. Keita Kawatani, Toshiyuki Masuzawa, Marija Milutinovic, Takashi Fukui, and Yoshihiro Okamoto: Detection of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in host-seeking adult *Ixodes ricinus* ticks collected in Serbia. International Crisis Management Symposium on CBRN and Emerging Infectious Diseases (Choshi, Japan). September 13-16, 2008 (Abt. p.72)

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

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

角坂 照貴 (KADOSAKA TERUKI)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：90109760

岡本 能弘 (OKAMOTO YOSHIHIRO)

千葉科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：40261036

福井 貴史 (FUKUI TAKASHI)

千葉科学大学・薬学部・助教

研究者番号：10453482