HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Epidemiological and bioinformatical analyses of tick-borne pathogens [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	邱, 永晋
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第11740号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59319
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yongjin_Qiu_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：邱　永晋
Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Epidemiological and bioinformatical analyses of tick-borne pathogens
（マダニ由来病原体に関する疫学ならびに生物情報科学的解析）

吸血性節足動物であるマダニは、その吸血行動により宿主にストレスを与えるだけでなく、様々なウイルス、細菌、原虫を媒介する獣医学ならびに公衆衛生学上極めて重要なベクター動物でもある。国際的な物流の発展ならびに地球環境の変化に起因してマダニの生息域は拡大の一途をたどっている。それに呼応するようにマダニ媒介性感染症の発生も拡大している。加えて、現在でも新興感染症の原因としてマダニから新規の病原体が発見されている。マダニ媒介性新興・再興感染症の出現予測や診断法開発には、マダニ保有微生物叢の全貌解明が重要である。しかし、自然界中の微生物の 99%以上は培養不可能あるいは困難であり、微生物の網羅的解析は通常の手法では難しい。本研究では、オランダ国内における流行や一部の途上国でのヒトにおける高い抗体保有率が報告など人獣共通感染症として再度注目され、マダニ関連細菌でもある Q 熱病原体（*Coxiella burnetii*）のアフリカにおける疫学的調査を手始めとして、培養過程を経ないで自然環境中に存在する微生物種や微生物叢を解析することが可能な次世代シーケンス技術を用い、マダニ保有微生物叢の網羅的解析を実施した。

第一章では、ザンビア共和国の Monze、Chongwe、Petauke、Chama の 4 ヶ所において採取したウシ並びにヤギの血液を用い *Coxiella burnetii* 特異的に検出する repetitive transposon-like element をターゲットとした遺伝子増幅法（PCR）により保有調査を行った。その結果、ザンビア共和国の家畜において本菌遺伝子が確認され、その陽性率は、サンプル採取地で異なりザンビア東部の Chama 地域のウシで 11.2%と最も高かった。本結果は、1990 年代に実施された研究で明らかにされた人における本菌に対する抗体調査と同様に、畜産業が盛んな地域でより高い遺伝子陽性率を示す傾向にあった。これまでにザンビア共和国における *C. burnetii* 遺伝子検出例はなく、ザンビア共和国においても本症は公衆衛生上、注意を払うべき疾病であることが示された。

マダニは、吸血を容易にするために唾液を吸血宿主に注入する。この時に、唾液腺に存在する微生物が唾液と共に吸血宿主に移行する可能性があり、唾液腺中微生物叢の解析は新興のマダニ媒介性感染症対策の先回り対策に有用な知見をもたらす。そこで、第二章では異なるマダニ種の唾液腺を材料に、その細菌叢の網羅的検索を 16S リボソーム DNA の PCR 増幅産

物（16S アンプリコン）解析手法を用いて行った。その結果、マダニ唾液腺から合計 163 属に及ぶ細菌が検出され、その細菌叢はマダニ種により異なることが明らかとなった。また、16S リボソーム DNA 全長における解析では、急性熱性疾患との関連が疑われるリケッチア目細菌に遺伝的に近い配列が検出された。さらに、既知のマダニ媒介性細菌であるリケッチアに関して、従来のクエン酸合成酵素遺伝子の検出による *gltA*-PCR 法と 16S アンプリコン解析手法を比較したところ、後者の方が検出感度が高いことが認められた。本研究の結果より、マダニ唾液腺には病原体を含む多様な細菌が存在していると考えられた。

上述のように、マダニ保有細菌叢解析の手法は確立できたが、マダニが保有・媒介する病原体にはウイルスも含まれる。そこで第三章では、マダニ保有ウイルス叢の網羅的解析をショットガンシーケンス技術と現在広く用いられているシーケンスアラインメントに基づく相同配列検索法である BLAST に加えて、連続塩基組成により帰属生物群を推定する一括学習型自己組織化マップ（Batch-Learning Self-Organizing Map, BLSOM）手法を組み合わせて行った。まず、効率的なウイルス遺伝子抽出のためにマダニ乳剤をフィルトレーション、遠心分画、核酸分解酵素処理し、ウイルスを含む画分の濃縮を行った。さらに、その分画から調製された DNA あるいは cDNA 断片の塩基配列を次世代シーケンサーにより決定した。得られた配列を *de novo* アセンブリしコンティグを得た。そのコンティグを BLAST で解析した結果、50%以上のコンティグが分類不可能であり、ウイルス由来と推定された配列は、メスで 3.5%、オスで 6.7%であった。それらはモノネガウイルス目、ブニヤウイルス科、ラブドウイルス科に属すると考えられた。その中には、2014 年にニューヨークで採集された *Ixodes scapularis* から検出されたブニヤウイルス科の South Bay virus ゲノムの L と S 分節に近い配列など次世代シーケンス技術により、その存在が明らかとなったマダニ関連ウイルスに類縁の配列が含まれていた。一方、BLSOM 解析では分類不可能のコンティグは極僅かであり、50%以上のコンティグがウイルス由来配列と推定され、それらは 43 種類のウイルス科に亘っていた。本研究の結果より、マダニ保有ウイルス叢は、極めて多様性に富むウイルス種から構成されている可能性が示唆された。

このように本研究でマダニが保有する細菌ならびにウイルス叢を網羅的に解析する技法を開発した。本研究で開発したアプローチは、蚊など他の節足動物が保有・媒介する病原体の検索にも応用できる手法である。さらに、これらの微生物がヒトを含む哺乳動物に病原性を発揮するかどうかについては、動物接種実験等を実施しなければならないと考えられるが、遺伝子情報を大規模に収集し、データベース化しておけば、新興感染症の出現予測や何らかの未知の感染症が発生した場合、病原体の迅速同定や診断法の迅速な開発に役立てることができよう。