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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：邱　永晋

審査委員

主査	教授	杉本　千尋
副査	教授	大橋　和彦
副査	教授	伊藤　公人
副査	准教授	山岸　潤也

学位論文題名

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）

マダニは、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吸血性節足動物である。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おり、マダニ保有微生物叢の全貌解明はマダニ媒介性新興感染症の出現予測や診断法開発に重要である。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。本学位論文は、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ならびに、次世代シーケンス技術を用いたマダニ保有微生物叢の網羅的解析に関する研究成果に基づき提出されたものである。

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* 特異的プライマーを使用した遺伝子増幅法(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。本成績では、1990 年代に実施された研究で明らかにされた人におけるコクシエラ細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が認められた。

マダニは吸血時に唾液を宿主に注入することから、唾液腺に存在する微生物は、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、第二章ではマダニ唾液腺における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 163 属に及ぶ細菌が検出され、マダニ種により細菌叢の構成が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。加えて、既知のマダニ媒介

性細菌であるリケッチアに関して、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、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、ショットガンシーケンス技術を用いたマダニ保有ウイルス叢の網羅的解析を、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)手法と組み合わせて行った。まず、マダニ乳剤を膜ろ過、遠心分画、核酸分解酵素処理により、ウイルスを含む画分を濃縮した。さらにその分画から調製された DNA あるいは cDNA 断片を次世代シーケンサー解析により塩基配列を決定した。得られた配列を BLAST で解析した結果、メスで 3.5%、オスで 6.7%のコンティグがウイルス由来と推定され、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られた。その中には、2014 年にニューヨークで採集された *Ixodes sucapularis* 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 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ことが示された。

このようにマダニが保有する細菌、ウイルス叢を網羅的に解析する技法を本研究で開発したが、このアプローチは蚊など他の節足動物が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。

よって，審査委員一同は，上記学位論文提出者 邱　永晋氏の学位論文は，北海道大学大学院獣医学研究科規程第６条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。