



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

茨城県の犬に感染するAnaplasma phagocytophilumの分子疫学研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-07-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 福井, 祐一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/79366

学 位 論 文 要 約

氏 名 福 井 祐 一

題 目 茨城県の犬に感染する *Anaplasma phagocytophilum* の
分子疫学研究

Anaplasma phagocytophilum は偏性細胞内寄生細菌であり，マダニ媒介性人獣共通感染症を引き起こす。本感染症はヒトの医学領域では欧米のみならず日本でも感染症発症例が報告されている。獣医学領域でも欧米において反芻動物，馬，および犬の感染症として周知されている。日本ではこれまで野生動物および牛から *A. phagocytophilum* 遺伝子は検出されていたが発症個体は報告されていなかった。私は 2014 年に犬の感染症発症例を本邦で初めて発見したが，日本における本菌の臨床的特徴や分子生物学的性状，さらに犬の感染状況やベクターのマダニ種や保菌動物について不明であった。そこで本研究では，茨城県の犬に感染する *A. phagocytophilum* の分子疫学の解明を試みた。

第 1 章では *A. phagocytophilum* 感染症発症犬の臨床的特徴と原因菌の分子生物学的性状を解析した。2016～2018 年に茨城県つくば市および守谷市にて本感染症と診断した犬 6 例はいずれも元気消失，発熱および血小板数減少を認め，末梢血ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) にて本菌遺伝子が検出された。血液塗抹標本が保存されていた 2 例で本菌が好中球細胞質内で増殖して形成される桑実胚が確認された。全例とも抗菌剤治療により治癒し，回復期末梢血の PCR は陰転し，本菌に対する抗体価の上昇を認めた。初診時の血液が保存されていた 3 症例から得られた *A. phagocytophilum* 16S rRNA 遺伝子の系統解析では，欧米のヒト患者や犬から検出された *A. phagocytophilum* と相同性が高かった (99.3-99.7%)。また，本菌のクエン酸合成酵素遺伝子 *glta* およびヒートショックタンパク質遺伝子 *groEL* についても解析したところ，16S rRNA と同様に欧米株との高い相同性が確認された。発症犬 6 例の臨床症状，臨床病理学的所見および予後は欧米での報告と極めて類似しており，遺伝子配列も高い相同性を示したことから，日本の犬に感染する *A. phagocytophilum* は欧米のヒトや犬に感染する *A. phagocytophilum* に類似することが示唆された。

第2章では2016～2017年に茨城県の6軒の動物病院に来院した無症状の犬332頭の血液を対象に *Anaplasma* 属細菌の感染状況を調査した。蛍光抗体法(IFA)にて抗 *Anaplasma* 属抗体を検出するとともに、*Anaplasma* 科細菌特異的プライマーを用いたスクリーニング PCR を実施した。スクリーニング PCR 陽性例については *A. phagocytophilum* 特異的 nested PCR を実施するとともに遺伝子を解析した。IFA では血清が保存されていた328例中7例(2.1%)が陽性を示した。PCR では全血が保存されていた331例中8例(2.4%)が陽性を示したが、*A. phagocytophilum* 特異的 PCR ではうち1例が陽性であった。この陽性例の遺伝子解析では、第1章の発症犬由来 *A. phagocytophilum* 遺伝子と高い相同性(97.1%)を示した。本章の結果より、全国調査の IFA 結果(0.2%)よりも茨城県では高い抗体陽性率が認められ、また *A. phagocytophilum* に不顕性感染しているイヌの存在が明らかになった。

第3章では茨城県におけるマダニの *Anaplasma* 属細菌の感染状況を調査した。つくば市および守谷市の発症犬がマダニに刺咬されたと推察された場所において2016～2017年に旗振り法を用いてマダニを採取し、その種とマダニの発育ステージを同定後、*Anaplasma* 科細菌特異的 PCR を実施した。陽性例については16S rRNA の遺伝子を解析した。つくば市で採取したマダニ325匹では特異的 PCR は全ての個体で陰性だったが、守谷市で採取したマダニ759匹中26サンプルが陽性を呈した。うちフタトゲチマダニ幼ダニ3サンプルから第1章の発症犬由来 *A. phagocytophilum* 遺伝子と高い相同性(96.6-100%)を示す配列が検出された。本章の結果より、フタトゲチマダニが本菌のベクターであると考えられた。

第4章では *A. phagocytophilum* の保菌動物と考えられる野生小型哺乳動物の感染状況を調査した。2018年4～6月に茨城県と千葉県で捕獲されたネズミやモグラ11個体の脾臓からDNAを抽出後、*A. phagocytophilum* 特異的 nested PCR を実施して遺伝子解析を行った。11個体のうち茨城県土浦市のアカネズミ1個体から第1章の発症犬由来 *A. phagocytophilum* と99.8%の相同性を示す遺伝子配列を検出した。本章の結果より、アカネズミが茨城県における *A. phagocytophilum* の保菌動物であることが示唆された。

以上より本研究では、茨城県の犬に感染する *A. phagocytophilum* は欧米のヒトおよび犬由来に近縁な系統であり、臨床症状や臨床病理学的所見も極めて類似することが明らかとなった。また、流行地の茨城県の犬の調査から *A. phagocytophilum* の不顕性感染犬が存在することも明らかになった。さらに、同地域のフタトゲチマダニおよびアカネズミからも相同性の高い *A. phagocytophilum* 遺伝子が検出されたことから、我が国の流行地における *A. phagocytophilum* の分子疫学を解明することができた。

学 位 論 文 要 約

氏 名 FUKUI, Yuichi

題 目 Molecular and Epidemiological Survey for
Canine *Anaplasma phagocytophilum* Infection in Ibaraki, Japan
(茨城県の犬に感染する *Anaplasma phagocytophilum* の
分子疫学研究)

Anaplasma phagocytophilum is an obligate intracellular bacterium and tick-borne zoonotic pathogen. Human patients infected by *A. phagocytophilum* have been reported in the US, Europe, and Japan. The pathogen is also known to infect ruminants, horses, and dogs. In Japan, *A. phagocytophilum* DNA has been detected in various wild animals and cattle showing no symptoms. In 2014, the first clinical case of canine *A. phagocytophilum* infection, called canine granulocytic anaplasmosis (CGA), was detected. However, clinical manifestations, phylogenetic features, epidemiology, as well as the vectors and reservoirs of this pathogen in Japan remain unclear. Against this backdrop, this study aimed to clarify molecular and epidemiological characteristics of *A. phagocytophilum* from dogs in Ibaraki, Japan.

In Chapter 1, the clinical presentation and phylogenetic analysis of the pathogen from CGA dogs were investigated. From 2016 to 2018, six cases were diagnosed with CGA in Tsukuba and Moriya, Ibaraki Prefecture. All cases presented with depression, fever, thrombocytopenia, and positive PCR reaction for *A. phagocytophilum*, consistent with those previously reported in the US and Europe. In addition, intracytoplasmic inclusion bodies in neutrophils called morulae were detected in blood smears of two cases. Antibiotic treatment resulted in no symptoms, negative PCR results, and elevation of antibody titers in these cases. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene revealed that sequences of amplicons from three cases showed high identity (99.3-99.7%) to *A. phagocytophilum* detected from human and dogs in the US and Europe. Phylogenetic analysis of the citrate synthase gene (*gltA*) and heat shock protein gene (*groEL*) also revealed high similarities between this genotype and those in the US and Europe. These results suggest that the pathogen from CGA dogs in Ibaraki, Japan was nearly identical to strains of *A. phagocytophilum* from humans and dogs in the US and Europe.

In Chapter 2, the prevalence of *Anaplasma* infection in 332 dogs from Ibaraki was evaluated. An IFA assay against *Anaplasma* indicated that 7 of the 328 serum samples (2.1%) tested positive.

Screening by PCR analysis demonstrated that 8 of the 331 blood samples (2.4%) tested positive for the family Anaplasmataceae. Further analysis by *A. phagocytophilum*-specific nested PCR revealed that one dog with no symptoms was positive for *A. phagocytophilum* and the sequence was 97.1% identical to the *gltA* gene from the CGA dog in Chapter 1. Results indicated that the seropositive rate in this study was higher than that reported in a previous nationwide study in Japan (0.2%); it was also the first subclinical *A. phagocytophilum* infection reported in a dog in Japan.

In Chapter 3, the prevalence of *Anaplasma* infection in ticks from Ibaraki was investigated. Ticks were collected by flagging in vegetation in Tsukuba and Moriya, where CGA dogs were suspected to have been bitten by ticks, from 2016 to 2017. Ticks were morphologically identified to the species level and classified into various developmental stages, then molecularly examined for infection with the family Anaplasmataceae by PCR. Although no pools of the 325 ticks collected in Tsukuba tested negative, 26 pools of 759 ticks collected in Moriya tested positive for the screening PCR. Further analysis by sequencing 16S rRNA gene demonstrated that three pools of *Haemaphysalis longicornis* larvae tested positive for *A. phagocytophilum*, with sequences 96.6-100% identical to those from the CGA dog in Chapter 1. This suggests that *H. longicornis* is the candidate vector of *Anaplasma phagocytophilum* in Ibaraki.

In Chapter 4, the prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in small wild mammals suspected to be the reservoirs of the pathogen was examined. Eleven spleen samples from wild mammals including mice, rats, and moles were molecularly analyzed by *A. phagocytophilum*-specific nested PCR. One sample from a large Japanese field mouse (*Apodemus speciosus*) in Tsuchiura, Ibaraki was positive for *A. phagocytophilum*, and the sequence was 99.8% identical to the *gltA* gene from the CGA dog in Chapter 1, suggesting that *Apodemus speciosus* is the candidate reservoir of *Anaplasma phagocytophilum* in Ibaraki.

In conclusion, the present study revealed that *A. phagocytophilum* from CGA dogs in Ibaraki was clinically and molecularly similar to the strain from human and dogs in the US and Europe. Furthermore, the identical sequences were detected from a dog with a subclinical infection, *H. longicornis* ticks, and a large Japanese field mouse in Ibaraki. Collectively, these results portray the molecular epidemiological situation of *A. phagocytophilum* in an endemic area in Japan.