

みられています。また *B. miyamotoi* 感染症例群では、11% (95%信頼区間: 2-20%) の患者で周期性の熱発がみられています。熱発の間隔は平均 9 日 (2-14 日) で、再帰回数は 1 ないし 2 回とされています。

表 1. ロシアで流行している回帰熱の臨床情報

	回帰熱 (<i>B. miyamotoi</i> 感染症)	ライム病 (<i>B. garinii</i> 感染症)
マダニ刺咬から発症までの日数	12-16 日 (平均 15 日)	7-13 日 (平均 10 日)
発症から受診までの日数	2 日以内	2-9 日 (平均 5 日)
遊走性紅斑	9 %	91 %
発熱	98 %	67 %
頭痛	89 %	57 %
倦怠感	98 %	86 %
悪寒	35 %	10 %
筋痛	59 %	52 %
関節痛	28 %	29 %
吐気	30 %	10 %
嘔吐	7 %	5 %
頸部硬直	2 %	0 %

出典: Platonov AE et al. Emerg Infect Dis. 2011 17: 1816-1823.

【用語説明】

回帰熱媒介動物	回帰熱ボレリア
回帰熱ボレリアは、野山や家屋内、鳥類の営巣地、洞窟に生息する吸血性のオルニソドロス属ダニ、シラミ、または一部のイクソデス属ダニによって媒介・伝播されます。オルニソドロス属ダニは家鼠やコウモリ、鳥類を吸血源とするとされています。我が国ではシュルツェ・マダニ (<i>I. persulcatus</i>) が回帰熱ボレリアを媒介すると思われます。 <i>I. persulcatus</i> は本州中部以北の山間部に棲息し、北海道では平地でもよく見られます。	回帰熱病原体ボレリアは、北米ではボレリア・ハーマシー (<i>B. hermsii</i>) 等、アフリカでは <i>B. duttonii</i> 、中央アジアではボレリア・パーシカ (<i>B. persica</i>) 等が見出されます。ロシアで流行している回帰熱病原体はボレリア・ミヤモトイ (<i>B. miyamotoi</i>) で、我が国でもシュルツェ・マダニや野鼠から本病原体が検出されています。

【ボレリア感染症(ライム病、回帰熱)に関する相談窓口】

ボレリア感染症に関する問い合わせ、および情報の受付窓口は以下の機関になっております。

国立感染症研究所 細菌第一部 川端 寛樹

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

TEL:03-4582-2682, FAX:03-5285-1163

E-mail: kbata@nih.go.jp

平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる技術・情報の体系化に関する研究
分担研究報告書

ダニ媒介性病原体の伝播機序の解明と制御法の開発

研究分担者 今内 覚

北海道大学大学院獣医学研究科 准教授

研究要旨：

マダニは熱帯から温帯にかけて広く分布しており、日本でも人をはじめ多くの動物にウイルス、細菌、リケッチア、原虫などの病原体を伝播している。これまでの研究において、種々のダニ媒介性病原体が引き起こす病態が分子レベルで解明され、制圧にむけたワクチン開発など行われているが、有効な予防、治療法が確立されていない病原体も多い。また、これら多くの病原体はベクターであるマダニ体内でも増殖し、伝播するためさらにその制圧を困難にしている。マダニは宿主に吸着すると 10～14 日間吸血を続け、その間に唾液腺から多種の生理活性物質を動物体内に注入し吸血を持続する、すなわち、血管拡張因子、抗血液凝固因子、接着因子、組織溶解因子および免疫抑制因子などである。病原体の伝播にはダニの唾液が重要な役割を担い、マダニが吸血して数日で、マダニ唾液腺内の病原体が唾液とともに動物体内に注入されて感染が成立する、現在、マダニに対するコントロール法として殺ダニ剤による駆除が一般的であるが、殺ダニ効果には限界が有り、使用薬剤に対する耐性ダニの出現や薬剤散布による環境汚染、畜産製品への薬剤残留等が問題点として指摘されている、そこで、低コストであり、殺ダニ剤使用による環境汚染や薬剤耐性ダニの出現のリスクが少ない抗ダニワクチンの開発が注目されている。抗ダニワクチンとは、ダニ由来因子を抗原として宿主に免疫し、マダニの吸血を阻害することで、病原体の伝播・拡散を防ぐことを目的としたワクチンである。また、複数種のマダニ由来因子を抗原に用い、多くの種類のマダニを標的としたワクチンは、より効果的に病原体伝播を防ぐことが可能であると考えられている。欧米では一部市販化されその抗ダニ効果も実証されている。ダニ媒介性病原体の伝播機序を解明することで、病原体伝播に関与する因子の同定がなされれば、新規抗ダニワクチンなどの新規制御法の開発へ寄与することが可能になる。そこで本研究では、本邦におけるヒトのライム病ボレリア (*Borrelia garinii* および *B. afzelii*) の唯一のベクターであるシュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) の病原体伝播関与因子の同定を行ったので報告する。

A. 研究目的

I. persulcatus は本邦におけるヒトのライム病ボレリア (*Borrelia garinii* および *B. afzelii*) の唯一のベクターである。北米に分布するシカダニ (*I. scapularis*) は同じくライム病ボレリア (*B. burgdorferi*) を媒介し、ダニ中腸内のボレリアレセプターが同定されている。そのレセプターは、ボレリア菌の表面蛋白 Outer surface protein A (OspA) に結合することから Tick receptor for OspA (TROSPA) と呼ばれている。また、15-kDa *I. scapularis* salivary gland protein (Salp15) はボレリア菌の表面蛋白 OspC に結合し、抗体の結合を阻害することでボレリアの伝播を助長することが報告されている。そのほかにもダニが分泌する免疫抑制因子などは宿主の獲得免疫・自然免疫両方を抑制し、ダニの吸血維持に適した環境を作り出していると同時にダニ媒介性の病原体の侵入や定着を促進していることが明らかにされている。一方、このような因子を抗体によって阻害したり RNA 干渉法によって遺伝子発現を抑えるとダニの吸血や病原体の伝播が阻害されることも報告されている。本研究は、病原体の生存および伝播促進に関わるマダニ由来因子の機能を阻害することで、病原体の伝播阻止を主な目的としたワクチン開発を目的とする。

今年度は、ライム病患者が出た地区でのダニにおけるライムボレリア感染率を報告すると同時に同地区のダニより *B. garinii* および *B. afzelii* を分離した。一方、*I. persulcatus* 実験室株を樹立し、成ダニをハムスターに吸血させ、中腸および唾液線から RNA を抽出し cDNA を合成した後、*I. persulcatus* のダニ中腸内のボレリアレセ

プター Tick receptor for OspA (TROSPA) および免疫抑制因子 Salp15, *I. persulcatus* immunosuppressor (IPIS), Sialostatin L2 (SL2) 遺伝子の同定ならびに機能解析を行った。一方、病原体伝播に関与するとされる cystatin の遺伝子をコイタマダニ (*Rhipicephalus appendiculatus*) から同定した。

B. 方法と材料

1. ライム病患者が出た地区で *I. persulcatus* を採取し PCR 法によってライム病ボレリア (*B. garinii* および *B. afzelii*) および *Anaplasma phagocytophilum* (*A. phagocytophilum*) の検出を行った。*B. garinii* および *B. afzelii* については分離培養を行いダニ因子との関係についての実験に供した。
2. 研究室で樹立された実験室株の成ダニをハムスターに吸血させ、中腸および唾液線から RNA を抽出し cDNA を合成した後、PCR を行ない TROSPA, *I. persulcatus* immunosuppressor (IPIS), Sialostatin L2 (sL2) および cystatin 遺伝子配列を決定した。得られた情報を基にそれぞれの組換えダニ蛋白を作製し機能解析を行った。

C. 結果

1. ライム病患者地区における分子疫学調査
 - 1) ライム病患者が出た地区で *I. persulcatus* を採取しライム病ボレリアの陽性率を調査した結果、*B. garinii* は 33.8%, *B. afzelii* は 4.9% で 4.2% の共感染が認められた。さらにこれらのライム病ボ

レリア陽性ダニの3.9%がヒト顆粒球アナプラズマ症の起病病原体である *A. phagocytophilum* と重複感染していた。

2) ライム病ボレリア陽性ダニから分離培養を行い *B. garinii* および *B. afzelii* 野外株を得た。

2. ダニ因子の同定と機能解析

1) 得られた *I. persulcatus*-TROSPA 遺伝子の ORF は 483 塩基で、160 アミノ酸をコードしており、*I. scapularis*-TROSPA との相同性は 88.2%であった。発現解析を行った結果、*I. persulcatus*-TROSPA は中腸で発現し吸血によって発現が亢進した。

2) *I. persulcatus*-Salp15 遺伝子の ORF は 399 塩基で、*I. scapularis*-Salp15 とのアミノ酸配列相同性は、68.2%であった。また、組換え *I. persulcatus*-Salp15 を作製し、各種ボレリアとの結合能を Far-western blotting 法ならびに蛍光抗体法で解析した。その結果、北海道分離株をはじめ *B. garinii*、*B. afzelii* および *B. burgdorferi* 標準株 OspC と結合した。また、組換え *I. persulcatus*-Salp15 を添加することで、抗ボレリア菌抗血清による溶解作用に抵抗性を示した。

3) *I. ricinus* の免疫抑制因子 IRIS 様遺伝子を *I. persulcatus* 2 種類の配列が得られ、それぞれ *Ixodes persulcatus immunosuppressor -1, 2* (*Ipis*-1、2) 遺伝子と命名した。*Ipis*-1、2 遺伝子の全長は *IRIS* 遺伝子と同じく 1,134bp であった。また *IRIS* 遺伝子との相同性を比較すると、*Ipis*-1 は 95.5%、*Ipis*-2 は 95.4%であり、予想アミノ酸配列を *Iris* と比較すると、*Ipis*-1 は 94.4%、*Ipis*-2 は 96.6%の相同性を示した。*Ipis*-1、*Ipis*-2 とともにセルピ

ンに特徴的なドメインである s3a ドメイン、RCL ドメイン、serpin signature を持ちセルピンファミリーに属すると考えられた。組換え *Ipis* はウシリンパ球の増殖を有意に抑制した。

4) RACE 法により得られたシュルツェマダニ *Sialostatin L2*(*sL2*) 遺伝子と、シカダニ *sL2* 遺伝子を比較した結果、ORF はともに 420bp であり、アミノ酸配列は 87.2%と高い相同性を示した。発現解析の結果から、*sL2* 遺伝子は唾液腺特異的に発現しており、全発育ステージおよび全吸血ステージで発現していることが確認された。組換え *Ipis* はウシリンパ球からの IFN- γ 産生を有意に抑制した。

5) 病原体伝播に関与するとされる cystatin の遺伝子を *Rhipicephalus appendiculatus* から同定した結果 ORF は 423 塩基で、155 アミノ酸をコードしており吸血の際に宿主へ打ち込まれる暴露型抗原であった。

D. 考察

これまでの機能解析の結果から、これらの因子がマダニの吸血に重要な役割を担っていることが確認された。特に免疫抑制因子は宿主免疫において重要なリンパ球や好中球の機能を阻害しダニが固着した部位を中心とした局所免疫応答を抑制することで、ダニの吸血の開始や維持に大きく寄与している可能性が示唆される。近年、北米に分布する *I. scapularis* において、ダニの吸血局所における免疫応答を抑制することで病原体伝播を助長する因子が同定され、同因子を抑制すると病原体伝播率が抑えられることも報告されている。今後は、今回得

られた *I. persulcatus* 由来の免疫抑制因子の機能をはじめとしたダニの吸血戦略をさらに解明することで、病原体伝播を効率よく阻害できるような抗ダニワクチンの開発を進めたい。

E. 結論

今年度は、ライム病ボレリア (*B. garinii* および *B. afzelii*)、ヒト顆粒球アナプラズマ症の起病病原体である *A. phagocytophilum* および回帰熱ボレリア (*B. miyamotoi*) のダニにおける分子疫学調査を行い高度の感染率を認めた。今後も調査を継続するとともに新規制御法の樹立について検討していく予定である。来年度以降は、病原体伝播の機序解明のためにこれまでに得られたダニ由来因子をはじめその他の因子の詳細な機能解析を行う予定である。

(倫理面からの配慮について)
該当しない。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Konnai, S., Yamada, S., Imamura, S., Nishikado, H., Githaka, W.N., Ito, T., Takano, A., Kawabata, H., Murata, S., Ohashi, K. 2012. Identification of TROSPA homologue in *Ixodes persulcatus*, Schulze, the specific vector for human Lyme borreliosis in Japan, *Ticks Tick Borne Dis.*, 3: 75-77.
- 2) Murase, Y., Konnai, S., Githaka, W.N,

Hidano, A., Taler, K., Ito, T., Takano, A., Ando, S., Kawabata, H., Tsubota, T., Murata, S., Ohashi, K. 2013. Prevalence of Lyme borrelia in *Ixodes persulcatus* ticks from an area with a confirmed case of Lyme disease. *J. Vet. Med. Sci. in press.*

3) Imamura, S., Konnai, S., Yamada, S., Parizi, L.F., Githaka, N., Vaz, I. da S. Jr., Murata, S., Ohashi, K. 2013. Identification and partial characterization of a gut *Rhipicephalus appendiculatus* cystatin. *Ticks Tick Borne Dis.*, 4: 138-144

4) Parizi, L.F., Githaka, N.W., Logullo, C., Konnai, S., Masuda, A., Ohashi, K., da Silva, Vaz, Jr. I. 2012. The quest for a universal vaccine against ticks: Cross-immunity insights, *Vet. J.*, 194: 158-165.

5) Taylor, K.R., Takano, A., Konnai, S., Shimozuru, M., Kawabata, H., Tsubota, T. 2013. Differential tick burdens may explain differential *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii* infection rates among four, wild, rodent species in Hokkaido, Japan, *J. Vet. Med. Sci. in press.*

6) Taylor, K.R., Takano, A., Konnai, S., Shimozuru, M., Kawabata, H., Tsubota, T. 2013. *Borrelia miyamotoi* Infections among Wild Rodents Show Age and Month Independence and Correlation with *Ixodes persulcatus* Larval Attachment in Hokkaido, Japan. *Vector Borne Zoonotic Dis. in press.*

7) de Abreu, L.A., Calixto, C., Waltero, C.F., Pita, B., Githaka, N.W., Seixas, A.,

Parizi, L.F., Konnai, S., da Silva, Vaz. I. Jr., Ohashi, K., Logullo, C. 2013. The conserved role of the AKT/GSK3 axis in cell survival and glycogen metabolism in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo tick cell line BME26. *BiochimBiophysActa. in press.*

2. 学会発表

- (1) 今内 覚, 川端 寛樹, 伊東 拓也, 高野 愛, 安藤 秀二, 村田 史郎, 大橋 和彦. シュルツェマダニ由来因子の病原体伝播における機能解析. 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. (2012年7月10日). 阿南市
- (2) 高田春奈, 今内 覚, NaftalyGithaka, 伊勢崎政美, 伊東拓也, 安藤秀二, 川端寛樹, 村田史郎, 大橋和彦. シュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) 唾液腺由来免疫抑制因子 sL2 の同定および発現解析. 第154回獣医学会. (2012年9月28日). 盛岡市
- (3) 今内 覚, 川端 寛樹, 伊東 拓也, 高野 愛, 安藤 秀二, 村田 史郎, 大橋 和彦. シュルツェマダニにおける病原体伝播関連因子の同定. 第58回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会. (2012年10月6日). 旭川市

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる技術・情報の体系化に関する研究
分担研究報告書

アナプラズマ症を中心とした関連感染症の実態解析と診断法の確立

研究分担者 大橋典男 静岡県立大学 食品栄養科学部 教授

研究協力者 吉川悠子 静岡県立大学 食品栄養科学部 助教
川森文彦 静岡県環境衛生科学研究所 微生物部 部長
池ヶ谷朝香 静岡県環境衛生科学研究所 微生物部 主査
高娃(コウワ) 日本予防医学協会・リサーチレジデント
呉東興(ウヅン) 静岡県立大学大学院博士課程 2 学年
高田伸弘 福井大学 医学部

研究要旨

アナプラズマ症は、リケッチア目、アナプラズマ科に属する *Anaplasma phagocytophilum* により引き起こされるリケッチア関連感染症で、新興感染症として位置付けられている。本年度、我々がこれまでに見出した高知県でのアナプラズマ症およびそれと日本紅斑熱との混合感染の患者について、米国 CDC の雑誌 *Emerging Infectious Diseases* に掲載し、これにより *A. phagocytophilum* が関与する感染症が国内にも存在することが世界的に認知された。さらに、アナプラズマ症と日本紅斑熱との混合感染が明らかになったことから、日本紅斑熱発生地のマダニが *A. phagocytophilum* も保有する可能性が示唆され、これまで日本紅斑熱流行地の西日本地域におけるマダニについて調査してきた。その結果、約 3.0%のマダニが *A. phagocytophilum* を保有することが明らかとなり、これに関しても *Emerg. Infect. Dis.* に掲載した。アナプラズマ症に関しては、*A. phagocytophilum* が抗原変異を引き起こすことから、血清診断が難しく、現在、その改善法を模索している。また、最近、欧州や中国において、マダニ媒介性細菌の *Neorhlichiamikurensis* のヒトへの感染が確認されたことから、この細菌の分子疫学調査も開始した。

A. 研究の背景と目的

我々は、国内におけるマダニ媒介性アナプラズマ症の実態を明らかにするため、これまで患者の探索や保有マダニ種の同定などに努めてきた。そして、過去にリケッチア感染症が疑われた高知県の 2 名の患者にお

いて、*Anaplasma phagocytophilum* の感染が疑われ、これに関して詳細な解析を進めてきた。その結果、1 名はアナプラズマ症で、もう 1 名は日本紅斑熱との混合感染であることが確認された。得られた研究成果は米国 CDC の雑誌 *Emerging Infectious Diseases*

に掲載されたので、ここに要約し報告する。また、上述のように、アナプラズマ症と日本紅斑熱との混合感染の存在が確認されたことから、日本紅斑熱の発生地、つまり西日本地域のマダニが *A. phagocytophilum* を保有している可能性が示唆された。そこで、長年、西日本を中心にマダニを採集し、*A. phagocytophilum* を含むリケッチア関連細菌群の分子疫学的解析を進めてきた。その研究成績も、*Emerg. Infect. Dis.* に掲載されたので、ここに要約し報告する。

アナプラズマ症に関しては、*A. phagocytophilum* が抗原変異を引き起こすことが知られている。したがって、*A. phagocytophilum* を抗原とした血清診断が難しい。現在、その改善法を模索しており、それについても、ここで紹介する。さらに、最近、欧州や中国で、マダニ媒介性細菌 *Neorhlichiamikurensis* のヒトへの感染、「ネオエーリキア症」が確認された。この細菌は、最初、日本の御蔵島の野ネズミで発見されたが、国内でのヒトへの感染症例はまだ報告がない。日本国内にも患者が潜在している可能性があるため、我々は、まず、野ネズミやマダニからの *N. mikurensis* の遺伝子検出を開始した。

B. 研究方法

1. リケッチア関連細菌群の遺伝子検出

リケッチア関連細菌群の遺伝子検出のためには、*A. phagocytophilum* では 44 kDa の外膜蛋白質群をコードする *p44* 遺伝子群または 16S rDNA を、紅斑熱群リケッチアでは *gltA* 遺伝子を、*Ehrlichia* 属菌では *p28* 遺伝子群を、また *N. mikurensis* では *groEL* 遺伝子を標的遺伝子とした

Single または Nested PCR を行った。

2. 血清中の抗体検出

蛍光抗体 (IFA) 法の抗原として、*A. phagocytophilum* を HL60 細胞あるいは THP-1 細胞に感染させ培養したもの、および *R. japonica* や *Orientia tsutsugamushi* を L929 細胞で培養したものを用いた。また、Western blot 法では、*A. phagocytophilum* に感染した THP-1 細胞、非感染 THP-1 細胞、および組換え P44-1 蛋白質を抗原として用いた。

3. 組換え蛋白質の作製

P44 外膜蛋白質の部分配列をコードする DNA を化学合成し、昆虫無細胞系で蛋白質を発現させるベクターに組込んだ。現在、昆虫無細胞系における蛋白発現の検討を進めている。

C. 研究結果および考察

1. 日本国内におけるアナプラズマ症患者について

高知県において、日本紅斑熱が疑われた過去の血液検体について、紅斑熱群リケッチア 16S rDNA、*O. tsutsugamushi* 16S rDNA、および *A. phagocytophilum* *p44* 遺伝子群の検出を試みたところ、2 名の患者から *A. phagocytophilum* *p44* 遺伝子群が検出された。得られた *p44* の増幅産物を TA-cloning し、これらのクローンの塩基配列を決定した結果、いずれも米国の患者由来株と同一または相同性の高い配列であることが判明した。2 名の患者うちの 1 名は、紅斑熱群リケッチアの 16S rDNA も検出され、その配列は日本紅斑熱を引き起こす *Rickettsia japonica* と同一

であった。さらに、後述するように、蛍光抗体法(IFA)を改良した血清診断や Western blot 法により、*A. phagocytophilum* に対する抗体の検出を試みたところ、いずれの患者においても IgM および IgG の双方で *A. phagocytophilum* の特異抗原蛋白質との反応が見られた。また、1名の患者では *R. japonica* に対する抗体も検出された。つまり、この2名の患者のうち1名は *A. phagocytophilum* の感染で、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。

(発表論文添付資料1)

2. アナプラズマ症の血清診断法についての検討

欧米では、アナプラズマ症の血清診断は、一般に HL-60 細胞に感染させた *A. phagocytophilum* を抗原とした IFA 法が用いられている。我々もこれまで HL-60 感染細胞を抗原として IFA を行ってきたが、抗体陽性血清を見出すことができなかった。しかし、最近、THP-1 細胞に感染させた *A. phagocytophilum* を IFA 用抗原として使用したところ、上記2名の高知県の患者血清が *A. phagocytophilum* 抗体陽性を示すことが明らかとなった。これは、HL-60 細胞で培養した *A. phagocytophilum* と THP-1 細胞で培養した *A. phagocytophilum* では、その抗原性に差異があることを示唆している。*A. phagocytophilum* は、菌体表面に P44 外膜蛋白質群を発現している。この蛋白質群はゲノム上に 113 個の相同性遺伝子 (*p44*multigene family) が存在し、*A. phagocytophilum* は生体内で、*p44* の異なる

遺伝子種を交換して抗原変異を引き起こすことが知られている。しかし、細胞培養系では、生体内での免疫系のバイアスが存在しないため、この抗原変異は起こらないと考えられる。したがって、HL-60 細胞で培養した *A. phagocytophilum* と THP-1 細胞で培養した *A. phagocytophilum* の抗原性の差異は、組織培養細胞の種類の違いによる *A. phagocytophilum* の selection、つまり異なる P44 蛋白質種を発現している *A. phagocytophilum* が優占的に増殖したことによるものと思われた。そこで、この仮説を検証するため、RT-PCR 法により、HL-60 細胞と THP-1 細胞に感染した *A. phagocytophilum* の発現している *p44* 遺伝子種を mRNA レベルで解析した。その結果、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 (P44-47 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 蛋白質種を菌体表面に発現している *A. phagocytophilum* が存在していることが実証された。つまり、日本の患者は P44-47 や P44-60 と結合する抗体が産生されている可能性が高く、THP-1 感染細胞を抗原として利用すれば、血清診断が容易になる可能性が示唆された。(発表論文添付資料1)

3. アナプラズマを含むリケッチア関連細菌群の分子疫学的解析について

上述のように、高知県の1名の患者が *A. phagocytophilum* と *R. japonica* の混合感染であることが明らかとなった。つまり、

日本紅斑熱の発生地におけるマダニが *A. phagocytophilum* も保有している可能性が示唆された。そこで、西日本地域を中心に、ここに生息するマダニが保有するリケッチア関連細菌群の分子疫学調査を行った。リケッチア関連細菌群としては、紅斑熱リケッチア、*A. phagocytophilum*、および *Ehrlichia* 属菌を対象とした。また、調査地域は、静岡県、三重県、和歌山県、鹿児島県、長崎県（五島列島）と沖縄県（本島と与那国島）である。これらの地域で、合計 827 匹のマダニを採集した。得られたマダニは 1 匹ずつ解剖し唾液腺を摘出して、DNA 抽出を行い、上記のリケッチア関連細菌群の遺伝子検出を行った。その結果、採集した 827 匹のマダニのうち、181 匹のマダニから紅斑熱群リケッチアの *gltA* 遺伝子 (21.9%)、25 匹のマダニから *A. phagocytophilum* の *p44* 遺伝子群 (3.0%)、また 2 匹のマダニから *Ehrlichia* 属菌の *p28* 遺伝子群 (0.2%) が検出された。紅斑熱群リケッチアの *gltA* 遺伝子については、ほぼ全長の 1.1 kb の配列を解読し系統樹解析を行った。その結果、これらのリケッチアはこれまで報告のある *R. japonica*、*R. tamurae*、*Rickettsia* sp. LON および *Rickettsia* sp. Hf151 が主であることが判った。また、181 匹中 9 匹 (5.0%) のマダニからは、*R. raoultii* あるいは *R. principis* と近縁の紅斑熱リケッチアが検出された。*R. raoultii* は、欧州やロシアにおいて Dermacentor マダニが媒介し壊死性紅斑リンパ節症を引き起こすことが知られており、本研究ではタカサゴチマダニ (*Haemaphysalis formosensis*) からその近縁リケッチアが検出された。また、25

匹のマダニから検出された *A. phagocytophilum p44* 遺伝子群は、解析の結果、米国のヒト患者分離株からの *p44* 遺伝子群と同一または類似するものが検出された。さらに、2 匹のマダニから得られた *Ehrlichia* 属菌の *p28* 遺伝子群は既存の *Ehrlichia* 属菌と低い相同性 (67%~85%) を示すことから、新種の *Ehrlichia* 属菌である可能性が示唆された。(発表論文添付資料 2)

以上のように、アナプラズマ症が発見された西日本地域において、*A. phagocytophilum* を保有するマダニが存在することが証明された。

4. アナプラズマ症の簡易血清診断法の確立への検討

上述のように、日本国内のアナプラズマ症患者の血清中には、THP-1 細胞で培養した *A. phagocytophilum* で発現している P44-47 と P44-60 の外膜蛋白質と結合する抗体が産生されている可能性が示唆された。我々は、静岡県の不明熱患者 4 名においても、THP-1 細胞で培養した *A. phagocytophilum* 抗原と反応する抗体が存在することを見出している。そこで、アナプラズマ症の簡易血清診断法の確立を目指して、P44-47 と P44-60 の組換え蛋白質の作製を開始した。我々はすでに P44-1 を発現する大腸菌を有しており、これも Western blot 法による血清診断に利用している。しかし、ヒト血清には大腸菌に対する抗体が存在するため、大腸菌で発現させた組換え蛋白質では蛋白精製を行っても非特異反応が強く、Western blot 法以外の ELISA 法やドットプロット法での利

用が困難である。そこで、P44-47 と P44-60 については、非特異反応が少ないと推察される昆虫無細胞系システムでの発現を試みることにした。そして、現在、抗原性エピトープと推測される配列を含む P44-47 と P44-60 について、コドン利用率を考慮に入れた部分配列を化学合成し、これを昆虫無細胞系発現ベクター pTD1 に組込んだ。現在、この組換えプラスミドを用いて、昆虫無細胞系での蛋白質発現の検討を進めている。

5. 野ネズミやマダニからの *N. mikurensis* の遺伝子検出

N. mikurensis は、最初、日本の御蔵島に生息する野ネズミで発見された。その後、欧州で、*N. mikurensis* のヒトへの感染が確認され、さらに最近、中国でもネオエーリキア症の患者が発見された。よって、日本国内にも患者が潜在する可能性が考えられる。そこで、国内の野ネズミやマダニからの遺伝子検出を開始した。本年度は、過去に淡路島で捕獲・採集した野ネズミやマダニについて、*N. mikurensis* の *groEL* 遺伝子の検出を試みた。その結果、18 匹中 2 匹 (11.1%) のアカネズミが陽性を示し、その配列解析から、最近、中国黒竜江省で見つかったヒト患者からのものと同一の配列を有していることが判った (表 1)。マダニの場合は、成虫と若虫の 145 個体および幼虫のプール 4 検体の計 149 検体を調査した。その結果、*N. mikurensis* は検出されなかったが、*R. tamurae*、*R. principis*、および *Rickettsia LON* が検出された。今後は、ネオエーリキア症も視野に入れた患者探索や野外調

査に努める。

D. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Ohashi, N., Gaowa, Wuritu, Kawamori, F., Wu, DX., Yoshikawa, Y., Chiya, S., Fukunaga, K., Funato, T., Shiojiri, M., Nakajima, H., Hamazu, Y., Takano, A., Kawabata, H., Ando, S. and Kishimoto, T.: Human granulocytic anaplasmosis, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 289-292 (2013)
- 2) Gaowa, Ohashi, N., Aochi, M., Wuritu, Wu, DX., Yoshikawa, Y., Kawamori, F., Honda, T., Fujita, H., Takada, N., Oikawa, Y., Kawabata, H., Ando, S. and Kishimoto, T.: Rickettsiae in ticks, Japan, 2007-2011. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 338-340 (2013)
- 3) Ybañez, A.P., Sato, F., Nambo, Y., Fukui, T., Masuzawa, T., Ohashi, N., Matsumoto, K., Kishimoto, T., and Inokuma, H.: Survey on Tick-Borne Pathogens in Thoroughbred Horses in the Hidaka District, Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **75**, 11-15 (2013)
- 4) Shinohara, M., Uchida, K., Shimada, S., Tomioka, K., Suzuki, N., Minegishi, T., Kawahashi, S., Yoshikawa, Y., and Ohashi, N.: Application of a simple method using minute particles of amorphous calcium phosphate for recovery of norovirus from cabbage, lettuce, and ham. *J. Virol. Methods* **187**, 153-158 (2013)
- 5) 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)
- 6) Hiroi M., Yamazaki F., Harada T.,
Takahashi N., Iida N., Noda Y., Yagi M.,
Nishio T., Kanda T., KawamoriF.,
SugiyamaK., Masuda T., Hara-Kudo Y.,
and Ohashi N.:Prevalenceof
extended-spectrum
 β -lactamase-producing *Escherichia coli*
and *Klebsiella pneumoniae* in
food-producing animals.*J. Vet. Med.*
Sci. **74**, 189-195 (2012)
- 7) Hiroi M., Takahashi N., Harada T.,
Kawamori F., Iida N., Kanda T.,
Sugiyama K., Ohashi N., Hara-Kudo Y.,
and Masuda T.:Serotype, Shiga toxin
(Stx) type, and antimicrobial resistance of
Stx-producing *Escherichia coli* isolated
from humans in Shizuoka Prefecture,
Japan (2003-2007). *Jpn. J. Infect. Dis.* **65**,
198-202 (2012)
- 8) Hiroi M., Matsui S., Kubo R., Iida N.,
Noda Y., Kanda T., Sugiyama K.,
Hara-Kudo Y., and Ohashi N.:Factors for
occurrence of extended-spectrum
 β -lactamase-producing *Escherichia coli*
in broiler.*J. Vet. Med. Sci.*,**74**, 1635-1637
(2012)
2. 学会発表
- 1) 大橋典男「発掘されつつあるアナプラ
ズマ症やエーリキア症とその媒介動
物」第64回日本衛生動物学会大会（上
田）2012年3月31日
- 2) 村上陽一、志智大介、川森文彦、大橋
典男「ヒト顆粒球アナプラズマ症の疑
いが持たれた1例」第217回日本内科学
会東海地方会（浜松）2012年6月16日
- 3) 川森文彦、池ヶ谷朝香、小柳純子、山
田俊博、長岡宏美、大橋典男「One-tube
nested PCR法による紅斑熱群リケッチ
アの検出」第20回ダニと疾患のインタ
フェースに関するセミナー（SADI）
第20回記念大会「日本紅斑熱発見の地
にて再び」（阿南）2012年7月6-8日
- 4) Ohashi N., Yoshikawa Y., and Masuzawa
T.: Overview of tick-associated
Rickettsiales 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, Sep.
27 (2012)
- 5) Masuzawa T., Ohashi N., Khasnatinov M.A.,
Danchinova G.A., Ivanov L.I., Fukui T.,
Okamoto Y., Pan M.J., and Koizumi N.:
Comparative study 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, Sep.
27 (2012)

会合同研究発表会（大津）2012年12月
9日

- 6) 渡邊卓哉、武地大維、齊藤一仁、西尾
信一郎、川森文彦、大橋典男「ヒト顆
粒球アナプラズマ症が疑われた2例」
第55回日本感染症学会中日本地方学
術集会（福岡）2012年11月5日
- 7) 大橋典男、高娃、呉東興、烏日図、吉
川悠子、川森文彦「近年のアナプラズ
マを中心としたリケッチア関連細菌
群の調査概要」第5回日本リケッチア
症臨床研究会・第19回リケッチア研究

- E. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得:なし
 2. 実用新案登録:なし
 3. その他:なし

表1. 淡路島の野鼠からのリケッチア関連細菌の遺伝子検出

サンプル番号	サンプルID	場所	ネズミ種性	<i>A. phagocytophilum</i> 16S rDNA (human)	<i>A. phagocytophilum</i> 16S rDNA (deer type)	<i>A. bovis</i> 16S rDNA	<i>A. centrale</i> 16S rDNA	<i>Rickettsia</i> <i>gltA</i>	<i>N. mikurensis</i> <i>groEL</i>
1	Am1	谷山	As ♂成越	-	-	-	-	-	-
2	Am2	谷山	As ♀若	-	-	-	-	-	-
3	Am3	谷山	As ♀成	-	-	-	-	-	-
4	Am4	谷山	As ♂成越・死	-	-	-	-	-	-
5	Bm1	小路谷	As ♀成	-	-	-	-	-	-
6	Bm2	小路谷	As ♀成	-	-	-	-	-	-
7	Bm3	小路谷	As ♀成越	-	-	-	-	-	-
8	Bm4	小路谷	As ♀成・死	-	-	-	-	-	-
9	Bm5	小路谷	As ♀成・死	-	-	-	-	-	-
10	Cm1	湊里	As ♀成越	-	-	-	-	-	-
11	Cm2	湊里	As ♀成越	-	-	-	-	-	-
12	Cm3	湊里	As ♂成越	-	-	-	-	-	-
13	Cm4	湊里	As ♂成越・死	-	-	-	-	-	+
14	Cm5	湊里	As ♀若・死	-	-	-	-	-	-
15	Cm6	湊里	As ♀成・死	-	-	-	-	-	-
16	Cm7	湊里	As ♂成・死	-	-	-	-	-	-
17	Cm8	湊里	As ♀若・死	-	-	-	-	-	-
18	Cm9	湊里	As ♂若・死	-	-	-	-	-	+

A: *Anaplasma*, N: *Neoehrlichia*

表2. 淡路島におけるマダニからのリケッチア関連細菌の遺伝子検出

マダニの種類	<i>N. mikurensis</i> <i>groEL</i>	<i>Rickettsia</i> <i>gltA</i>	リケッチア種
<i>H. flava</i>	0/58 (0%)	4/58 (6.9%)	<i>Rickettsia principis</i>
<i>H. hystricis</i>	0/6 (0%)	0/6 (0%)	
<i>H. longicornis</i>	0/54 (0%)	47/54 (87.0%)	<i>Rickettsia</i> LON
<i>A. testudinarium</i>	0/10 (0%)	2/10 (20%)	<i>Rickettsia tamurae</i>
<i>I. turdus</i>	0/3 (0%)	0/3 (0%)	
<i>H. megaspinosa</i>	0/18 (0%)	0/18 (0%)	
合計	0/149*	53/149	

N: *Neoehrlichia*

* 145個体(成虫、若虫)および4プール(幼虫)の計149検体

Human Granulocytic Anaplasmosis, Japan

Norio Ohashi,¹ Gaowa,¹ Wuritu,
Fumihiko Kawamori, Dongxing Wu,
Yuko Yoshikawa, Seizou Chiya,
Kazutoshi Fukunaga, Toyohiko Funato,
Masaaki Shiojiri,² Hideki Nakajima,³
Yoshiji Hamauzu, Ai Takano, Hiroki Kawabata,
Shuji Ando, and Toshio Kishimoto

We retrospectively confirmed 2 cases of human *Anaplasma phagocytophilum* infection. Patient blood samples contained unique *p44/msp2* for the pathogen, and antibodies bound to *A. phagocytophilum* antigens propagated in THP-1 rather than HL60 cells. Unless both cell lines are used for serodiagnosis of rickettsiosis-like infections, cases of human granulocytic anaplasmosis could go undetected.

Japanese spotted fever (JSF) and scrub typhus, which are caused by infection with *Rickettsia japonica* and *Orientia tsutsugamushi*, respectively, are common rickettsioses in Japan (1). National surveillance (<http://idsc.nih.go.jp/idwr/CDROM/Main.html> [in Japanese]) indicates that JSF occurs frequently in central and western Japan and that scrub typhus is present throughout Japan, except in Hokkaido. In JSF- and scrub typhus-endemic areas, cases of non-JSP and non-scrub typhus disease with rickettsiosis-like fever have often been reported. And, human infection with *R. heilongjiangensis*, a spotted fever group (SFG) rickettsia, has been identified in Japan (2). Furthermore, *Anaplasma phagocytophilum* has been detected in *Ixodes persulcatus* and *I. ovatus* ticks, and *Ehrlichia chaffeensis* has been detected in deer (3–6). More recently, we identified *A. phagocytophilum* infection in ticks (*Haema-*

physalis formosensis, *H. longicornis*, *H. megaspinosa*, and *Amblyomma testudinarium*) from central and western Japan, the JSF-endemic areas of the country (7,8). We conducted this retrospective study to determine the cause of non-JSP and non-scrub typhus disease in 2 men in western Japan who had rickettsiosis-like fever.

The Study

In 2002–2003 in Kochi Prefecture, western Japan, 2 men sought medical care for rickettsiosis-like signs and symptoms. Case-patient 1 (61 years old) sought care for fever (39.2°C), chills, and malaise 10 days after traveling to the mountains (day 0, the day of symptom onset). His physician prescribed cefdinir (300 mg/day). By day 3, signs and symptoms had not improved and an erythematous rash on his trunk had spread; the physician suspected infection with *R. japonica* or *O. tsutsugamushi*. The patient was hospitalized and intravenously administered minocycline (200 mg/day). Results (and reference values) for laboratory tests (day 3) follow: leukocytes, 5.8×10^9 cells/L ($3.5\text{--}9.2 \times 10^9$ cells/L); thrombocytes, 225×10^9 cells/L ($155\text{--}365 \times 10^9$ cells/L); aspartate aminotransferase, 59 U/L (<38 U/L); alanine aminotransferase, 61 U/L (<36 U/L); and C-reactive protein, 12.1 mg/dL (<0.3 mg/dL).

Case-patient 2, a 73-year-old lumberjack, sought medical care for fever (39.2°C), headache, and malaise (day 0, the day of symptom onset). On day 4, a disseminated maculopapular rash was noticed, especially on the trunk and lower limbs; JSF or scrub typhus infection was suspected. The patient was hospitalized and intravenously administered minocycline (200 mg/day). Results for laboratory tests (day 4) follow: leukocytes, 6.4×10^9 cells/L; aspartate aminotransferase, 100 U/L, alanine aminotransferase, 45 U/L; and C-reactive protein, 17.2 mg/dL.

In 2003, blood clots and serum samples from the 2 patients were transferred from Kochi Institute of Health to the University of Shizuoka, where they were stored at -20°C until a retrospective analysis could be performed. DNA was extracted from the blood clots, and nested PCR was performed, as described (3,9), to detect SFG rickettsiae 16S rDNA, *O. tsutsugamushi* 16S rDNA, *A. phagocytophilum p44/msp2*, and *Ehrlichia* spp. *p28/omp-1* (Table 1). To avoid DNA contamination, we performed PCR, electrophoresis, and cloning were performed in separate laboratories. As a negative control, nested PCR without DNA template samples was performed for each sample. PCR detected *A. phagocytophilum p44/msp2* multigenes in acute-phase blood clots from both case-patients, and SFG

Author affiliations: University of Shizuoka and Global Center of Excellence Program, Shizuoka City, Japan (N. Ohashi, Gaowa, Wuritu, F. Kawamori, D. Wu, Y. Yoshikawa); Kochi Institute of Health, Kochi City, Japan (S. Chiya, K. Fukunaga); Shizuoka Institute of Environment and Hygiene, Shizuoka City (F. Kawamori); Muroto Hospital, Muroto, Japan (T. Funato); Kochi Prefectural Aki Hospital, Aki City, Japan (M. Shiojiri, H. Nakajima); Chu-gei Clinic, Aki District, Japan (Y. Hamauzu); National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan (A. Takano, H. Kawabata, S. Ando); and Okayama Prefectural Institute for Environmental Science and Public Health, Okayama, Japan (T. Kishimoto)

¹These authors contributed equally to this article.

²Current affiliation: Ehime Prefectural Central Hospital, Matsuyama, Ehime, Japan.

³Current affiliation: Kochi Medical School, Nankoku, Kochi, Japan.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1902.120855>

Table 1. Results of PCR for select rickettsial organisms for 2 men with human granulocytic anaplasmosis, Kochi Prefecture, Japan*

Days after symptom onset†	Nested PCR result‡			
	SFG rickettsia 16S rDNA	<i>Orientia tsutsugamushi</i> 16S rDNA	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> p44/msp2	<i>Ehrlichia</i> sp. p28/omp-1
Case-patient 1				
3	Negative	Negative	Positive	Negative
19	Negative	Negative	Negative	Negative
Case-patient 2				
4	Positive	Negative	Positive	Negative
11	NA	NA	NA	NA

*SFG, spotted fever group; NA, not available.

†After in-hospital treatment with minocycline (200 mg/d), both case-patients improved clinically and were discharged on days 20 and 12, respectively, after symptom onset.

‡Before being used in PCR, blood clots from the patients were homogenized by using BioMasher (Nippi Inc., Tokyo, Japan) and treated overnight with 100 U of streptokinase (WAKO Pure Chemical Industries Ltd, Osaka, Japan). DNA then was extracted by using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA). Multiplex nested first-step PCR for SFG rickettsiae and *O. tsutsugamushi* was performed by using the following primers: RO-1F (5'-CCGTAAACGATGAGTGCTAGA-3') and RO-R1 (5'-CCGAGAACGTATTCACCGC-3'). Multiplex nested second-step PCR for SFG rickettsiae 16S rDNA was performed by using the following primers: R-2F (5'-GAAGATTCTCTTTCGGTTTCGC-3') and R-2R (5'-GTCTTGCTCCCTCTGTGTAAT-3'). Multiplex nested second-step PCR for *O. tsutsugamushi* 16S rDNA was performed by using the following primers: O-2F (5'-GACATGGTAGTCCGAAATG-3') and O-2R (5'-TGCAATCCGAAGTACTGATACC-3'). *A. phagocytophilum* p44/msp2 was amplified by using primers p3726, p4257, p3761, and p4183, and *Ehrlichia* spp. p28/omp-1 was amplified by using primers conP28-F1, conP28-R1, conP28-F2, and conP28-R2, as described (3,9).

rickettsia 16S rDNA was amplified from a sample from case-patient 2 (Table 1).

Amplicons of p44/msp2 were subjected to TA cloning (TA Cloning Kit; Life Technologies, Grand Island, NY, USA), and randomly selected recombinant clones were sequenced and analyzed phylogenetically (Figure 1). A total of 28 p44/msp2 clones from case-patient 1 shared 27.5%–100% similarity with each other and were widely dispersed in the tree. The 40 clone sequences from case-patient 2 shared 97.5%–100% similarity with each other and grouped into a single cluster. Using Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), we compared the sequences with those in GenBank; 27 previously identified p44/msp2 variants from human isolates and ticks collected in Japan were identified as the closest relatives to p44/msp2 cloned from the 2 patients. We included the 27 variants in the tree; however, some were widely separated from the related clones (Figure 1). For case-patient 2, the 389-bp sequence of the 16S rDNA amplicon (determined by direct sequencing) was 100% identical to that of *R. japonica* YH (GenBank accession no. AP011533).

Serologic evidence of infection was demonstrated by using indirect immunofluorescence assay (IFA) and Western blot analysis as described (10,11). In IFAs, IgM and/or IgG from serum samples from the case-patients reacted with *A. phagocytophilum* cultured in THP-1 rather than HL60 cells, and seroconversion was stronger in convalescent-phase serum samples (Table 2). IgG titers against *R. japonica* were also higher in convalescent-phase samples from case-patient 2. Western blot analysis further confirmed the specific reaction to the 44-kDa outer membrane proteins (P44s) of *A. phagocytophilum* cultured in THP-1 cells and/or to the recombinant P44-1 (rP44-1) in serum samples (Figure 2, Table 2). However, using the same serum samples, we could not detect P44 antigens of *A. phagocytophilum* propagated in HL60 cells (data not shown), supporting the IFA result.

In central and western Japan, most cases of tickborne infectious and febrile disease have been reported as JSF (1,13), and *R. japonica* has been frequently detected in ixodid ticks in these areas. We found *A. phagocytophilum* infection in

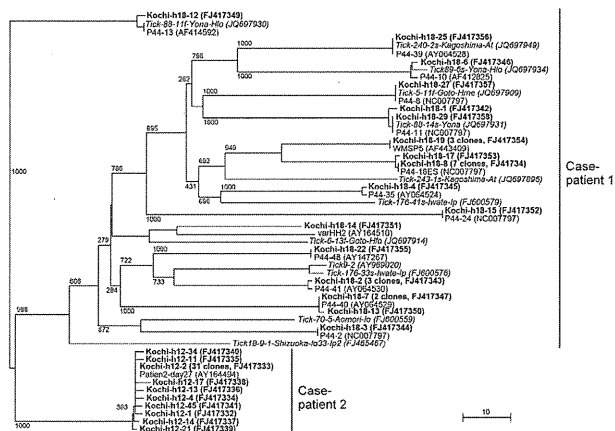


Figure 1. Phylogenetic analysis of *Anaplasma phagocytophilum* p44/msp2 multigenes detected in blood from 2 men in Kochi Prefecture, Japan. Each p44/msp2 PCR product was cloned (TA Cloning Kit; Life Technologies, Grand Island, NY, USA) into the PCR2.1 vector, after which recombinant clones were randomly selected and the DNA inserts were sequenced. The tree was constructed on the basis of the 117–133 aa sequences of the p44/msp2 genes by using the neighbor-joining method. The closest relatives to sequences for the 2 case-patients are included in the tree. Those sequences have been published in GenBank: patient2-day27 (obtained from a US patient); P44-2, P44-8, P44-10, P44-11, P44-13, P44-18E, P44-28, P44-35, P44-39, P44-40, P44-41, P44-48, varHH2, and WMSP5 are from human isolates; and 44-kDa outer membrane proteins are from ticks collected in Japan. **Boldface** font indicates the 28 p44/msp2 genes from case-patient 1 and the 40 from case-patient 2. Numbers on the tree indicate bootstrap values for branch points. Scale bar indicates the percent of sequence divergence. Data in parentheses indicate the number of p44/msp2 clones with identical sequences and the sequence accession numbers.

Table 2. Detection of IgM and IgG in serum samples from 2 men with human granulocytic anaplasmosis, Kochi Prefecture, Japan*

Days after symptom onset	Antibody titers, IgM/IgG†			
	<i>R. japonica</i> , cultured in L929 cells‡	<i>O. tsutsugamushi</i> , cultured in L929 cells§	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> , propagated in	
			HL60 cells	THP-1 cells
Case-patient 1				
3	<20/<20	<20/<20	<20/<20	80/<20
19	<20/<20	<20/<20	<20/<20	320/80
Case-patient 2				
4	<20/<20	<20/<20	20/<20	40/40
11	<20/320	<20/<20	<20/<20	160/80

*All Western blot testing using recombinant P44-1 antigen detected IgM and IgG; the antigen reacted with all sera tested, as shown in Figure 2.

†Determined by using indirect immunofluorescence assay.

‡*Rickettsia japonica* strain YH.

§*Orientia tsutsugamushi* strains Gilliam, Karp, Kato, and Kawasaki.

several species of ticks, and at least 3 species (*H. formosensis*, *H. longicornis*, and *I. ovatus*) seem to be associated with *R. japonica* and *A. phagocytophilum* (7,8). National surveillance during 1999–2010, showed that JSF was endemic in Kochi Prefecture during 1999–2004. More recently, JSF-endemic areas are Mie, Kagoshima, Wakayama, and Kumamoto Prefectures rather than Kochi Prefecture. Our survey demonstrating the presence of *A. phagocytophilum*-infected ticks in Mie and Kagoshima Prefectures (8) indicates that there is a risk for dual infection with *R. japonica* and *A. phagocytophilum* in JSF-endemic areas of Japan.

A. phagocytophilum cultured in HL60 cells is generally used as a source of antigen for serodiagnosis of human anaplasmosis. Our findings show, however, that titers of antibody against *A. phagocytophilum* propagated in THP-1 cells were higher than those propagated in HL60 cells. We further analyzed the transcription of *p44/msp2* multigenes encoding P44 repertoires (major antigens of *A. phagocytophilum*) in infected HL60 and THP-1 cells by using reverse transcription PCR followed by TA cloning as described (7). The analyses showed that a transcript from the *p44-60* gene and another from the *p44-47* gene (75% and 25% of transcripts tested, respectively) were dominantly expressed in *A. phagocytophilum* propagated in THP-1 cells but not in HL60 cells; several transcript species other than *p44-60* and *p44-47* of *p44/msp2* multigenes were expressed in *A. phagocytophilum* propagated in HL60 cells (data not shown). A previous proteomic study supported the variety of P44 repertoires produced by *A. phagocytophilum* in HL60 cells (14). The difference of *p44/msp2* expression between HL60 and THP-1 cell cultures may reflect the discrepancy of antibody titers obtained by IFAs. Furthermore, in IFAs using infected THP-1 antigens, IgM titers tended to be higher than IgG titers, even in convalescent-phase serum samples. These patients probably produced IgG reactive with P44 species other than P44-60 and P44-47 that were dominantly expressed in *A. phagocytophilum* propagated in THP-1 cells; Western blot analysis showed that IgG in patients strongly bound to recombinant P44-1 rather than P44s (probably including P44-60 and P44-47) of *A. phagocytophilum* propagated in THP-1 cells. Thus, cases of hu-

man anaplasmosis could go undiagnosed if only infected HL60 cells, and not THP-1 cells, are used as antigen for serodiagnosis of rickettsiosis-like infections, as is currently done when using IFAs.

Conclusions

We documented 2 cases of human granulocytic anaplasmosis in Japan, 1 with and 1 without JSF coinfection.

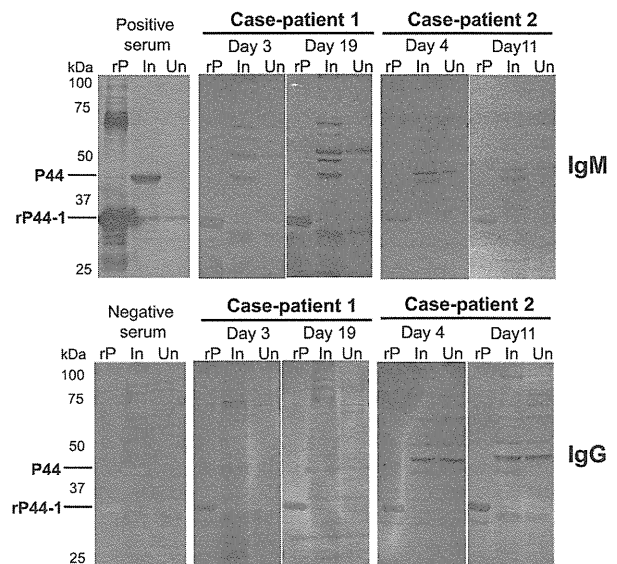


Figure 2. Western blot analyses, using recombinant P44-1 protein (rP44-1) and *Anaplasma phagocytophilum*-infected THP-1 cells as antigens, of serum samples from 2 men, case-patients 1 and 2, who had *A. phagocytophilum* infection, Kochi Prefecture, Japan. The *Escherichia coli*, which produced rP44-1, was kindly provided by Yasuko Rikihisa (Ohio State University, Columbus, OH, USA). The rP44-1 and the rabbit hyperimmune serum (positive control serum) were prepared as described (11,12). Results for a negative control (human serum sample) are included. The primary human serum samples tested were diluted 200- to 400-fold; rabbit serum sample (positive control) was diluted 2,000-fold. The goat antihuman IgG and IgM alkaline phosphatase conjugates (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) were used as secondary antibodies. Days represent days after symptom onset. rP, rP44-1 antigen; In, infected THP-1; Un, uninfected THP-1 cells.

To avoid misdiagnosing cases of human anaplasmosis, we recommend that *A. phagocytophilum* propagated in THP-1 and in HL60 cells be used as antigens for the serodiagnosis of rickettsiosis-like infections.

This work was supported in part by grants for Research on Emerging and Reemerging Infectious Diseases from the Association for Preventive Medicine of Japan and from the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare (H18-Shinkou-Ippan-014, H21-Shinkou-Ippan-006, and H24-Shinkou-Ippan-008); N.O. received a grant for the Global Center of Excellence Program from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology.

Dr Ohashi is a professor in the Laboratory of Microbiology, Department of Food and Nutritional Sciences, School of Food and Nutritional Sciences, Graduate School of Integrated Pharmaceutical and Nutritional Sciences, University of Shizuoka, Japan. His primary research interests are molecular biology, ecology, and epidemiology of zoonotic parasites, especially tickborne and foodborne pathogens.

References

1. National Institute of Infectious Diseases, Ministry of Health, Labour and Welfare. IASR (Infectious Agents Surveillance Report). Scrub typhus and Japanese spotted fever in Japan, 2006–2011 [cited 2012 May 31]. <http://idsc.nih.gov/jp/iasr/31/363/tpc363.html>
2. Ando S, Kurosawa M, Sakata A, Fujita H, Sakai K, Sekine M, et al. Human *Rickettsia heilongjiangensis* infection, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:1306–8. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1608.100049>
3. Ohashi N, Inayoshi M, Kitamura K, Kawamori F, Kawaguchi D, Nishimura Y, et al. *Anaplasma phagocytophilum*-infected ticks, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1780–3. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1111.050407>
4. Wurutu, Gaowa, Kawamori F, Aochi M, Masuda T, Ohashi N. Characterization of *p44/msp2* multigene family of *Anaplasma phagocytophilum* from two different tick species, *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ovatus*, in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2009;62:142–5.
5. Wurutu, Ozawa Y, Gaowa, Kawamori F, Masuda T, Masuzawa T, et al. Structural analysis of a *p44/msp2* expression site of *Anaplasma phagocytophilum* in naturally infected ticks in Japan. *J Med Microbiol.* 2009;58:1638–44. PMID: 19713360
6. Kawahara M, Tajima T, Torii H, Yabutani M, Ishii J, Harasawa M, et al. *Ehrlichia chaffeensis* infection of sika deer, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:1991–3. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1512.081667>
7. Gaowa, Wurutu, Wu D, Yoshikawa Y, Ohashi N, Kawamori F, et al. Detection and characterization of *p44/msp2* transcript variants of *Anaplasma phagocytophilum* from naturally infected ticks and wild deer in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2012;65:79–83.
8. Gaowa, Aochi M, Ohashi N, Wurutu, Wu D, Yoshikawa Y, et al. *Rickettsia*-related pathogens in ticks, central to western Japan [letter]. *Emerg Infect Dis.* 2013;19:338–40.
9. Inayoshi M, Naitou H, Kawamori F, Masuzawa T, Ohashi N. Characterization of *Ehrlichia* species from *Ixodes ovatus* ticks at the foot of Mt. Fuji, Japan. *Microbiol Immunol.* 2004;48:737–45.
10. Heo EJ, Park JH, Koo JR, Park MS, Park MY, Dumler JS, et al. Serologic and molecular detection of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* (human granulocytic ehrlichiosis agent) in Korean patients. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3082–5. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.8.3082-3085.2002>
11. Zhi N, Ohashi N, Rikihisa Y, Horowitz HW, Wormser GP, Hechemy K. Cloning and expression of the 44-kilodalton major outer membrane protein gene of the human granulocytic ehrlichiosis agent and application of the recombinant protein to serodiagnosis. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1666–73.
12. Ohashi N, Zhi N, Zhang Y, Rikihisa Y. Immunodominant major outer membrane proteins of *Ehrlichia chaffeensis* are encoded by a polymorphic multigene family. *Infect Immun.* 1998;66:132–9.
13. Mahara F. Japanese spotted fever: report of 31 cases and review of the literature. *Emerg Infect Dis.* 1997;3:105–11. <http://dx.doi.org/10.3201/eid0302.970203>
14. Lin M, Kikuchi T, Brewer HM, Norbeck AD, Rikihisa Y. Global proteomic analysis of two tick-borne emerging zoonotic agents: *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*. *Front Microbiol.* 2011;2:24. Epub 2011 Feb 17.

Address for correspondence: Norio Ohashi, Laboratory of Microbiology, Department of Food and Nutritional Sciences, School of Food and Nutritional Sciences, Graduate School of Integrated Pharmaceutical and Nutritional Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan; email: ohashi@u-shizuoka-ken.ac.jp



Scan this QR Code with your smartphone and enjoy listening to our podcasts about the latest emerging infectious diseases.

<http://wwwnc.cdc.gov/eid/podcasts.htm>



were typical of lymphangitis-associated rickettsiosis, and most cases of rickettsioses in southern France in the spring are caused by *R. sibirica mongolitimonae*. Clustered cases of SFG rickettsiae infection have been reported in Europe, including southern France (3,6). In 2007, *R. conorii* and *R. massiliae* infections in humans were reported (3). In 2010, cases for which we were unable to discriminate between *R. conorii* and *R. massiliae* infections occurred in a family (6). In these 2 studies, clustered cases of SFG rickettsiosis involved *Rh. sanguineus* ticks. Clustered cases appeared to be related to an increase in aggressiveness of ticks toward humans during warmer periods (3). In our study, no correlation was identified with warmer weather.

R. sibirica mongolitimonae is most frequently associated with *Hyalomma* spp. ticks (1,2,4). However, 1 case of infection with this bacterium was associated with *Rh. pusillus* ticks collected in Portugal (7); DNA from this bacteria was also identified in an *Rh. pusillus* tick collected from a mongoose. The European wild rabbit is the primary host of *Rh. pusillus* ticks. However, these ticks have been found on wild carnivorous animals, dogs, and domestic cats (8); these ticks can bite humans (8). Moreover, *R. massiliae* and *R. sibirica mongolitimonae* were found in *Rh. pusillus* ticks from Spain (9), and SFG rickettsiae were found in ticks from Sardinia (10). Therefore, *Rh. pusillus* ticks appear to be an emerging vector for *R. sibirica mongolitimonae* in Europe.

**Sophie Edouard,
Philippe Parola,
Cristina Socolovschi,
Bernard Davoust,
Bernard La Scola,
and Didier Raoult**

Author affiliation: Aix-Marseille Université, Marseille, France

DOI: <http://dx.doi.org/eid1902.120863>

References

1. Fournier PE, Gouriet F, Brouqui P, Lucht F, Raoult D. Lymphangitis-associated rickettsiosis, a new rickettsiosis caused by *Rickettsia sibirica mongolitimonae*: seven new cases and review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2005;40:1435–44. <http://dx.doi.org/10.1086/429625>
2. Socolovschi C, Barbarot S, Lefebvre M, Parola P, Raoult D. *Rickettsia sibirica mongolitimonae* in traveler from Egypt. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:1495–6. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1609.100258>
3. Parola P, Socolovschi C, Jeanjean L, Bitam I, Fournier PE, Sotto A, et al. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2:e338. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000338>
4. Mediannikov O, Diatta G, Fenollar F, Sokhna C, Trape JF, Raoult D. Tick-borne rickettsioses, neglected emerging diseases in rural Senegal. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4:pii:e821. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000821>
5. Renvoisé A, Rolain JM, Socolovschi C, Raoult D. Widespread use of real-time PCR for rickettsial diagnosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;64:126–9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00899.x>
6. Renvoisé A, Delaunay P, Blanchouin E, Cannavo I, Cua C, Socolovschi C, et al. Urban family cluster of spotted fever rickettsiosis linked to *Rhipicephalus sanguineus* infected with *Rickettsia conorii* subsp. *caspia* and *Rickettsia massiliae*. *Ticks Tick Borne Dis* 2012; 3:389–92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.008>
7. de Sousa R, Barata C, Vitorino L, Santos-Silva M, Carrapato C, Torgal J, et al. *Rickettsia sibirica* isolation from a patient and detection in ticks, Portugal. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:1103–8. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1207.051494>
8. Santos-Silva MM, Beati L, Santos AS, de Sousa R, Nuncio MS, Melo P, et al. The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): an update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Exp Appl Acarol*. 2011;55:85–121. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-011-9440-x>
9. Toledo A, Olmeda AS, Escudero R, Jado I, Valcarcel F, Casado-Nistal MA, et al. Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from central Spain. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;81:67–74.
10. Satta G, Chisu V, Cabras P, Fois F, Masala G. Pathogens and symbionts in ticks: a survey on tick species distribution and presence of tick-transmitted microorganisms in Sardinia, Italy. *J Med Microbiol*. 2011;60:63–8. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.021543-0>

Address for correspondence: Didier Raoult, Unité des Rickettsies, Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Émergentes, Centre National de la Recherche Scientifique–Institut de Recherche pour le Développement, Unités Mixtes de Recherche 6236, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 27 Blvd Jean Moulin 13385 Marseille Cedex 05, France; email: didier.raoult@gmail.com

Rickettsiae in Ticks, Japan, 2007–2011

To the Editor: Japanese spotted fever (JSF), caused by *Rickettsia japonica*, is the most prevalent tick-borne infectious disease in Japan (1), occurring most frequently in central and western regions (<http://idsc.nih.go.jp/idwr/CDROM/Main.html> [in Japanese]). Cases of unknown fever with rickettsiosis-like symptoms not associated with JSF have been reported in JSF-endemic regions of Japan (2). Several spotted fever group (SFG) rickettsiae (*R. japonica*, *R. heilongjiangensis*, *R. helvetica*, *R. tamurae*, *R. asiatica*, *Candidatus R. tarasevichiae*) and other related *Rickettsia* spp. have been identified in Japan (1,3–6). Human infections with *R. heilongjiangensis* and *R. tamurae* have been confirmed (3,5), and *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*, known human pathogens, have been detected in ticks and deer in Japan. We conducted this study to determine the risk in central and western Japan for human exposure to ticks harboring SFG rickettsiae, *A. phagocytophilum*, or *Ehrlichia* spp.

In 2007–2011, we collected 827 *Haemaphysalis*, *Amblyomma*, and *Ixodes* spp. ticks (392 adults, 435 nymphs) by flagging vegetation in the prefectures of Shizuoka, Mie, Wakayama, Kagoshima, Nagasaki (Goto Island), and Okinawa (the main island and Yonaguni Island) (Technical

Appendix Figure 1, wwwnc.cdc.gov/EID/article1/12-0856-Techapp/.pdf). We extracted DNA from the salivary glands of each tick and performed PCR to amplify *gltA*, 16S rDNA, and *ompA* of SFG rickettsiae. To detect *A. phagocytophilum* and *Ehrlichia* spp., we performed nested PCR targeting the *p44/msp2* and *p28/omp-1* multigenes, respectively.

PCR *gltA* screening revealed SFG rickettsiae in 181 (21.9%) of the 827 ticks (Table). We obtained nearly full-length (1.1-kb) *gltA* sequences and classified them into 5 groups by phylogenetic analyses (Technical Appendix Figure 2). Sequences for groups 1 (prevalence 1.0%) and 2 (prevalence 3.2%) were identified as *R. japonica* YH (GenBank accession no. AP011533) and *R. tamurae* (GenBank accession no. AF394896), respectively (Table). Group 3 (prevalence 15.1%) sequences were identical to that of *Rickettsia* sp. LON (GenBank accession no. AB516964). The sequence for group 4 (prevalence 1.6%) was closely related to that for *R. raoultii* strain Khabarovsk (98.8% similarity), and a part of the sequence (342 bp) was identical to that of *Rick-*

ettsia sp. Hf 151 (GenBank accession no. AB114815). Group 5 consisted of 4 newly identified rickettsiae (Technical Appendix Figure 2). Of these 4 rickettsiae, 3 (Mie311, Goto13, and Mie334) were closely related to *R. raoultii* strain Khabarovsk (98.0% identity) and 1 (Mie201) was similar to *Candidatus R. principis* (99.7% identity).

We further analyzed the 16S rDNA and *ompA* in *gltA*-positive tick samples. The 16S rDNA and *ompA* for group 1 samples shared 100% identity with 16S rDNA and *ompA* of *R. japonica* YH (AP011533). The 16S rDNA of group 2 was identical to that of *R. tamurae* (AY049981). In groups 3–5, some of the specific amplicons in 16S rDNA or *ompA* could be detected; their sequences were confirmed to be similar (but not identical) to those of several known rickettsial sequences.

We amplified the *p44/msp2* amplicons of *A. phagocytophilum* from 25 (3%) of 827 ticks (Table). By cloning (TA Cloning Kit; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and sequencing these amplicons, we obtained and identified 60 new TA-clone sequences (366–507 bp) for *p44/msp2* (GenBank

accession nos. JQ697880–JQ697950); these sequences may include a potentially novel *Anaplasma* species. (7). *Ehrlichia p28/omp-1* was detected from 2 (0.2%) of the 827 ticks. Of 5 TA-clone sequences (284–315 bp) obtained from the 2 ticks, 2 from an *A. testudinarium* tick (GenBank accession nos. JQ697886 and JQ697887) shared 83.3%–86.7% similarity with *E. ruminantium* Gardel Map-1 (GenBank accession no. YP196842), and 3 from an *H. longicornis* tick (GenBank accession nos. JQ697888–JQ697890) showed the closest relationship to *E. ewingii omp-1–15* (67%–73% similarity; GenBank accession no. EF116932).

We identified the tick species associated with *R. japonica* as *H. formosensis*, *H. hystricis*, and *H. cornigera*, and another study reported an association with *Dermacentor taiwanensis*, *H. flava*, *H. longicornis*, and *I. ovatus* (4). In our study and previous studies, the tick species associated with *A. phagocytophilum* in Japan were identified as *H. formosensis*, *H. longicornis*, *H. megaspinoza*, *A. testudinarium*, *I. ovatus*, and *I. persulcatus* (8). Thus, it appears that 3 tick species (*H. formosensis*, *H. longicornis*, and *I.*

Table. PCR survey results for *Haemaphysalis*, *Amblyomma*, and *Ixodes* spp. ticks tested for rickettsiae, central and western Japan, 2007–2011*

Tick species	No. ticks tested	Total no. (%) ticks positive	No. (%) ticks positive for					<i>A. phagocytophilum</i> <i>p44/msp2</i>	<i>Ehrlichia</i> <i>p28/omp-1</i> §
			<i>Rickettsia gltA</i> , by species group†						
			Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5		
<i>H. formosensis</i>	224	6 (2.7)	1 (0.4)	0	0	0	5 (2.2)	18 (8)	0
<i>H. hystricis</i>	97	19 (19.6)	6 (6.1)	0	0	13 (13.4)	0	0	0
<i>H. longicornis</i>	294	119 (40.5)	0	0	119 (40.5)	0	0	2 (0.7)	1 (0.4)‡
<i>H. flava</i>	55	6 (10.9)	0	0	2 (3.6)	0	4 (7.3)	0	0
<i>H. kitaokai</i>	10	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. megaspinoza</i>	18	4 (22.2)	0	0	4 (22.2)	0	0	1 (5.6)	0
<i>H. cornigera</i>	11	1 (9.1)	1 (9.1)	0	0	0	0	0	0
<i>A. testudinarium</i>	112	26 (23.2)	0	26 (23.2)	0	0	0	3 (2.7)	1 (0.9)
<i>A. geoemydae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>I. ovatus</i>	5	0	0	0	0	0	0	1 (20.0)	0
Total	827	181 (21.9)	8 (1.0)	26 (3.1)	125 (15.1)	13 (1.6)	9 (1.1)	25 (3.0)	2 (0.2)

*DNA was extracted from the salivary glands of each tick by using the DNeasy Mini Kit (QIAGEN Sciences, Germantown, MD, USA) and used as a template for PCR. The newly identified sequences of *gltA*, 16S rDNA, *ompA*, *p44/msp2*, and *p28/omp-1* in this study were deposited into GenBank under accession nos. JQ697880–JQ697959. *A. phagocytophilum*, *Anaplasma phagocytophilum*.

†The PCR primers used, *gltA*-Fc (5'-CGAAGCTTACCGCTATTAGAATG-3') and *gltA*-Rc (5'-CTTTAAGAGCGATAGCTTCAAG-3'), were designed in this study. Groups: 1, *Rickettsia japonica* YH (GenBank accession no. AP011533); 2, *R. tamurae* (GenBank accession no. AF394896); 3, *Rickettsia* sp. LON-13 (GenBank accession no. AB516964); 4, *Rickettsia* sp. Hf151; 5, other rickettsiae.

‡PCR primers of p3726 (5'-GCTAAGGAGTTAGCTTATGA-3'), p3761 (5'-CTGCTCTT[G]GCCAA(AG)ACCTC-3'), p4183 (5'-CAATAGT[C/T]TTAGCTAGTAACC-3'), and p4257 (5'-AGAAGATCATAACAAGCATTG-3') were used for detection of *p44/msp2*.

§PCR primers conP28-F1 (5'-AT[C/T]AGT[G/C]AAA[A/G]TA[T/C][A/G]T[G/A]CCAA-3'), conP28-F2 (5'-CAATGG[A/G]T[A/G]GG[T/C]CC[A/C]AGA[A/G]TAG-3'), conP28-R1 (5'-TTA[G/A]AA[A/G]G[C/T]AAA[C/T]CTT[G]CCTCC-3'), and conP28-R2 (5'-TTCC[T/C]TG[A/G]TA[A/G]G[A/C]AA[T/G]TTTAGG-3') were used to detect *p28/omp-1*.