

学 位 論 文 要 旨

氏名 SUPRIYONO

題 目 : Surveillance of vector-borne diseases in Indonesia
(インドネシアにおける節足動物媒介性感染症の疫学調査研究)

論文要旨 :

Vector-borne diseases (VBDs) are threats to humans and animals and many microorganisms including pathogens were reported in the vectors. The roles of these microorganisms have been still unknown. To assess the risk of VBDs, I investigated the prevalence of mosquito- and tick-borne pathogens in ticks and mosquitoes collected in Indonesia.

In Chapter 1, tick-borne bacteria were surveyed in *Amblyomma varanense* ticks fed on lizard, a water monitor (*Varanus salvator*). The water monitor is a common reptile, that was found in city areas and bred as pet animals in Indonesia and the other Asian countries. A total of 23 ticks (21 males, one female and one nymph) were collected from one *V. salvator*. According to the morphological features and molecular analysis based on mt-*rrs*, all ticks were identified as *Am. varanense*. DNA fragments of *Anaplasma* spp. were detected in four (17.4%) ticks by PCRs targeting both the 16S rRNA and 60-kDa heat shock protein genes. One of four was closely related with *Anaplasma* sp. detected from sheep in China. The others were related with *Anaplasma* sp. detected from ticks infesting birds in Taiwan. Borrelial DNA fragments were detected in 22 (95.7%) ticks by PCR targeting borrelial flagellin gene. Thirty strains of *Borrelia* sp. were isolated from midguts and/or salivary glands. All strains belonged to the reptile-associated borreliae. Rickettsial DNA fragments were detected from five (21.7%) ticks by PCR targeting both the 17-kDa antigen and citrate synthase genes. The detected *Rickettsia* was classified into spotted fever group of *Rickettsia* and identical with Candidatus *Rickettsia sepangensis*.

In Chapter 2, I conducted surveillance of mosquito-borne viruses at several sites in Indonesia during 2016–2018 for risk assessment of arbovirus infection and analysis of virus biodiversity in mosquito populations. I collected 10,015 mosquitoes comprising 11 species from 4 genera. Major mosquito species

(別紙様式第 3 号)

collected in this study were *Culex quinquefasciatus*, *Aedes albopictus*, *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes aegypti* and *Armigeres subalbatus*. The collected mosquitoes were subjected for virus isolation using two mammalian cell lines, Vero and BHK-21, and one mosquito cell line, C6/36. Seventy-two pools showed clear CPEs in C6/36 cells. Using RT-PCR and next generation sequencing approaches, these isolates were identified as insect flaviviruses (Cell fusing agent virus, *Culex flavivirus*, *Aedes flavivirus*) (family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*), Banna virus (family *Reoviridae*, genus *Seadornavirus*), new permutotetravirus (designed as Bogor virus) (family *Permutotetraviridae*, genus *Alphapermutotetravirus*), and alphamesoniviruses 2 and 3 (family *Mesoniviridae*, genus *Alphamesonivirus*).

In conclusion, novel findings were obtained by surveillance of microorganisms in mosquitoes and ticks in Indonesia. Ticks on water monitor, *Am. Varanense*, harbored several tick-borne bacteria (*Anaplasma* spp., *Borrelia* spp. and *Rickettsia* spp.). This result suggested that the reptiles living close to humans and the infesting ticks possessed variety of unknown bacteria. In addition to the potential pathogenic viruses, Banna virus, Indonesian mosquitoes harbored several insect-specific viruses such as Cell fusing agent virus, *Culex flavivirus*, *Aedes flavivirus*, Bogor virus, alphamesoniviruses 2 and 3. Although the pathogenicity and biology of these detected viruses and bacteria are unclear, it was guessed that these arthropod-specific microorganisms might interact with pathogenic microorganisms inside the vectors. This large surveillance of VBDs provides basic information for the prevention and control of emerging and re-emerging diseases in Indonesia.

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Supriyono
審査委員	主査：国立感染症研究所獣医科学部 獣医科学部長 前田 健
	副査：山口大学 教授 早坂 大輔
	副査：鹿児島大学 教授 田仲 哲也
	副査：山口大学 准教授 高野 愛
	副査：山口大学 准教授 下田 宙
題目	Surveillance of vector-borne diseases in Indonesia (インドネシアにおける節足動物媒介性感染症の疫学調査研究)
審査結果の要旨： 本論文では、節足動物媒介性感染症に関するリスク分析のために、本人の出身国であるインドネシアにおける蚊媒介性並びにマダニ媒介性病原体の分離・検出並びにその遺伝系統学的解析を行った。第一章ではマダニ媒介性細菌、第二章では蚊媒介性ウイルスについて報告した。 第一章では、インドネシアで捕獲したミズオオトカゲ、 <i>Varanus salvator</i> 、に咬着したマダニ、 <i>Amblyomma varanense</i> 、におけるマダニ媒介細菌について調査を行った。このトカゲは都市部に存在して、インドネシアではペットとして飼育されている。1頭のミズオオトカゲの皮膚に咬着した23匹のマダニ（オス21匹、メス1匹、若ダニ1匹）を採集した。形態的特徴ならびにミトコンドリアのリボゾーマル RNA(rRNA)遺伝子の解析により、すべてが <i>Amblyomma varanense</i> であることが確認された。マダニより DNA を回収し、各種細菌に対する PCR を実施した。アナプラズマ属菌の 16S rRNA 並びに 60-kDa ヒートショック蛋白質の遺伝子を検出する PCR を実施した結果、4匹（17.4%）のマダニからアナプラズマ属菌の遺伝子が検出された。1種類のアナプラズマ属菌は中国のヒツジから検出された菌に近縁であり、残り3種類のアナプラズマ属菌は台湾のトリに咬着したマダニから検出された菌に近縁であった。次に、ボレリア属菌の鞭毛遺伝子を標的とした PCR を実施した結果、22匹（95.7%）からボレリア属菌の遺伝子が検出された。更に、ボレリア属菌はマダニの中腸及び唾液腺から30株分離することに成功した。遺伝子解析により、分離されたすべてのボレリア属菌は爬虫類関連ボレリア(reptile-associated borreliae)に系統的に属していることが確認された。リケッチア属菌を検出するために 17kDa 抗原とクエン酸シンターゼ遺伝子を標的とした PCR を実施した結果、5匹(21.7%)よりリケッチア属菌が検出された。検出されたリケ	

ツチアは紅斑熱群リケッチアに分類される *Rickettsia sepangensis* であることが確認された。上記の結果により、哺乳動物のみならず都市部に生息する爬虫類からも人獣共通感染症を引き起こす可能性があるマダニ媒介性細菌の検出することに成功した。

第二章では、節足動物媒介性ウイルスのリスク分析のために 2016 年から 2018 年にかけてインドネシアで蚊媒介性ウイルスの調査を実施した。4 属 11 種に属する計 10,015 匹の蚊の採集を行った。主な蚊の種類は、ネッタイエカ *Culex quinquefasciatus*、ヒトスジシマカ *Aedes albopictus*、コガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus*、ネッタイシマカ *Aedes aegypti*、オオクロヤブカ *Armigeres subalbatus* であった。捕集された蚊から哺乳動物由来培養細胞 Vero 細胞と BHK-21 細胞、蚊由来培養細胞 C6/36 細胞を用いてウイルス分離を実施した。プールした蚊の抽出物を接種した 27 の C6/36 細胞で細胞変性効果が認められた。RT-PCR と次世代シーケンス解析により分離されたウイルスは昆虫フラビウイルス (Cell fusing agent ウイルス、*Culex* フラビウイルス、*Aedes* フラビウイルス) (family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*)、Banna ウイルス (family *Reoviridae*, genus *Seadornavirus*)、新規ペルムトウイルス (Bogor ウイルス) (family *Permutotetraviridae*, genus *Alphapermutotetravirus*)、アルファメソニウイルス 2 と 3 (family *Mesoniviridae*, genus *Alphamesonivirus*) であった。上記の結果により、インドネシアの蚊が保有するウイルスを網羅的に同定することに成功した。Banna ウイルスは人獣共通感染症の可能性が示唆されているが、それ以外は蚊を自然宿主とするウイルスである可能性が高い。しかし、これらの昆虫ウイルスは人獣共通感染症を引き起こすウイルスの増殖抑制など蚊体内での関連が示唆されており、今後の解析が期待される。

以上のように、本研究成果は先に挙げた 2 つの課題、①マダニにおける細菌の同定、②蚊におけるウイルスの同定、によりインドネシアの節足動物における網羅的な微生物の同定に成功した。本研究は公衆衛生上の意義も大きい。節足動物媒介感染症が社会問題となっているインドネシアにおける網羅的な節足動物由来微生物の解析により、節足動物由来微生物の研究基盤の確立に成功した意義が大きいと評価される。今後のインドネシアにおける節足動物媒介感染症の研究の発展に大きく寄与する研究であると評価された。

以上により、本論文は博士 (獣医学) の論文として、妥当なものであると判断された。