

ライム病ボレリアに対する
マダニの感受性、
その鍵となる分子の探索

(課題番号 09670251)

平成9年度～平成10年度科学研究費補助金(基盤研究C2)

研究成果報告書

平成11年3月

研究代表者 中尾 稔

(旭川医科大学・医学部・助手)

目次

	ページ
はしがき	1
研究組織	2
研究経費	2
研究成果の概要	3 ~ 42

【研究発表】

学会誌等	43
口頭発表	43
別冊論文の掲載	44 ~ 53

はしがき

ライム病はボレリア属スピロヘータによる全身感染症で、*Ixodes* 属マダニが病原体媒介者となる。原因菌は *Borrelia burgdorferi sensu stricto*、*Borrelia garinii*、*Borrelia afzelii* の3種に分類され、北米大陸には *B. burgdorferi*、ヨーロッパには3種全てが分布する。日本では *B. garinii* と *B. afzelii* が分布し、シュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) が病原体媒介者となっている。これらの病原菌と遺伝的に近縁なボレリアも数種類発見されており、日本ではヤマトマダニ (*Ixodes ovatus*) から *Borrelia japonica*、タヌキマダニ (*Ixodes tanuki*) から *Borrelia tanukii*、アカコッコマダニ (*Ixodes turdus*) から *Borrelis turdae* が分離されている。しかし、これらのボレリアは人体への病原性が証明されていない。また、病原性のある *B. garinii* と *B. afzelii* はヨーロッパから極東までの旧北区タイガ地帯に広く分布しているが、日本とヨーロッパでは患者の症状に相違がみられる。実際、病原菌にも日本産とヨーロッパ産のものでは、染色体やプラスミドDNAの塩基配列に地理的変異が存在する。

ライム病を媒介するマダニは森林環境に生息し、野生動物を主要な宿主とするため、その分布に人為的な影響を受けにくく、ボレリアの分布もマダニの生息域に拘束されることになる。従って、現在の特徴的なボレリア種の分布は、太古からのマダニと保菌動物(レゼルボア)の進化・拡散と密接な関連があり、近年、若干の人為的攪乱も加わっているだろう。ボレリアは感染環の維持にマダニが欠かせないため、マダニの進化・拡散とともにボレリア自身も種分化を果たしたと推察できる。

本研究代表者は、マダニとボレリアの特異的な関係が、宿主・寄生体の共進化研究のモデルになると考え、マダニへのボレリア感染を数種類の組み合わせで行ってきた。結果は興味深いもので、通常の特異的な組み合わせではボレリアはマダニ体内に定着するが、非特異的な組み合わせではボレリアはマダニから排除されることもあった。では、この特異性のメカニズムはどのような分子により制御されているのであろうか。これを解明するため、科学研究費補助金の交付を受け、一連の実験を行い、マダニに取り込まれたボレリアの推移を観察した。

【研究組織】

研究代表者： 中尾 稔 (旭川医科大学・医学部・助手)

【研究経費】

平成 9年度 2,500 千円

平成10年度 700 千円

合 計 3,200 千円

ライム病ボレリアに対するマダニの感受性、その鍵となる分子の探索

【研究成果の概要】

ボレリア属スピロヘータを起因菌とするライム病が日本に存在することが判明して以来、約10年間、主に疫学的側面から自然界の伝播経路を研究してきた。これらを要約すると、1) シュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) を本邦のライム病ボレリアの媒介者 (ベクター) と特定した。2) 野鼠 (主にアカネズミ) や野鳥を保菌動物 (レゼルボア) と特定した。3) シュルツェマダニや患者から分離されたボレリアについて、rRNA や鞭毛遺伝子を検討し、*B. garinii* もしくは *B. afzelii* に帰属することを証明した。4) ヤマトマダニ (*Ixodes ovatus*) が特異的に非病原性と考えられる *Borrelia japonica* を保有することを日本全土で証明し、さらに、タヌキマダニ (*Ixodes tanuki*)、アカコッコマダニ (*Ixodes turdus*) がそれぞれ異なるボレリアを保有し、16S rRNA 遺伝子の系統分類学的解析により、これらを *Borrelia tanukii*、*Borrelia turdae* と新種記載した。5) シュルツェマダニは低率ながらも回帰熱ボレリアに関連した新種 *Borrelia miyamotoi* を保有することを示した、等である。これらの一連の研究により、“マダニは種ごとに特有のボレリアを保有する” という見解に至り、マダニとボレリアの共進化を強く意識するようになった。

このマダニとボレリアの相互関係を理解するためには、マダニのボレリア感受性に関して詳細な検討を加えなければならない。マダニは通常、その中腸ルーメンにボレリアを保有しており、長期間の休眠期間中も排除されることがない。マダニの吸血時にボレリアは活性化されるようで、中腸上皮細胞間隙から体腔へ離脱し、唾液腺を經由して脊椎動物の皮膚組織に注入される。従って感受性と司る機構として、マダニ側の要因、

もしくはボレリア側の要因の 2 者を想定する必要がある。本研究では、先ずボレリア側の要因に焦点を絞り、研究を進めた。

当初、着目したのはボレリアの菌体表層蛋白 (ospA もしくは ospB, outer surface protein) である。これらの分子は単一の 49kb 線状プラスミド (ミニクロモソームとも呼ばれる) にコードされており、ボレリアの種ごとにアミノ酸組成が異なる。また、この蛋白の機能は十分に解明されていないが、その名が示すとおり、菌体の表層を覆っているため、宿主細胞との接着や侵入などに重要な役割を担っていることが予想される。そこで、先ず、このプラスミドを人為的に他の種類のボレリアに導入・置換することにより、マダニへの感受性の変化を誘発することを着想した。実験モデルとして、北米に分布する *B. burgdorferi* 297 株と NCH-1 株に日本産 *B. garinii* JEM6 株の osp プラスミドを導入し、シュルツェマダニへの感受性試験を行うことを計画した。リスクな実験であるが、もし、この人為的に改変した *B. burgdorferi* がシュルツェマダニにおいて感受性とベクター能力を誘発すれば、この分子がマダニとボレリアの相互関係を支配していたと証明することができると思ったからである。

この実験を実施するためには、該当するプラスミドが脱落したミュータントを作製し、レシピエント細胞とする必要がある。そこで、*B. burgdorferi* 297 株と NCH-1 株を用いて、実験を試みた。ただし、ボレリアは BSK 培地という液体培地を用い、微好気条件下でしか培養できず、通常の寒天培地上にコロニーを生育させることができないため、幾多の困難があった。先ず、BSK 培地にアガロースを添加してゲル化させ、その上にボレリアを塗抹し、コロニーを形成するかを検討した。BSK ゲル化培地をデシケーターに入れ、中でロウソクを灯し、微好気条件を作り出した。3 週間、31℃で放置すると微少な透明のコロニーが形成されたため、これで、細胞をクローニングする条件は整った。

次に行ったことは、ボレリア株の長期継代である。ボレリアを BSK 培地で長期継代するとプラスミドが脱落し、感染性が失われることが報告されている。そこで、プラスミド脱落ミュータントを得るため、長期継代法を採用してみた。297 株と NCH-1 株を用い、3～4 日ごとに継代を繰り返し、定期的にマウスに接種して感染性を検討し、併せて SDS-PAGE 電気泳動法で osp 蛋白の発現を、パルスフィールド電気泳動法で該当する線状プラスミドの有無を観察した。297 株では、継代 32 回目にマウスへの感染性は失われたが、osp 蛋白の発現は継代 61 回目になっても継続しており、線状プラスミドの脱落も観察されなかった。NCH-1 株においても継代 31 回目でマウスへの感染性は失われたが、osp 蛋白は継代 60 回目でも発現しており、線状プラスミドも存在した。結局、長期継代法ではプラスミド脱落を誘導することはできなかったが、osp プラスミドは感染性とは関連していないことが判明した。

実験は失敗したが、osp プラスミドをボレリアに人為的に導入する手法（エレクトロポレーション法）を検討してみた。なお、これは遺伝子組み替え実験となるため、安全性を考慮し、ドナー・レシピエント細胞株とも長期継代で感染性が失われたものを用いた。*B. garinii* JEM6 株をドナーとして、パルスフィールド電気泳動法で DNA を展開した後、該当するプラスミドをゲルから取り出した。幸い、プラスミドのサイズがレシピエントのものやや異なったため、導入実験を行い、仮に成功したとしてもサイズのレシピエント細胞（297 株）に元からあるプラスミドと識別できることが予想された。しかし、エレクトロポレーションの条件を様々に変更しても 297 株に異種プラスミドを導入することはできなかった。従って、基礎的条件が整わないこととなり、将来的に異種プラスミド導入株を用いてマダニへの感染実験を実施する道が閉ざされてしまった。

そこで、実験計画を変更し、もう一度振り出しに戻って、マダニ体内

でのボレリアの挙動を詳細に観察することにした。行った実験は、1) マダニとボレリアの特異的組み合わせをミスマッチさせた場合、すなわち、本来マダニが保有しないボレリアを人為的にマダニに感染させたときのボレリアの推移（排除されるのか、定着するのか）、2) 特異的な組み合わせにおけるマダニ体内でのボレリアの量的推移と質的推移（osp 蛋白の発現と脊椎動物への感染性）、を検討した。また、若干、焦点がずれるが、ボレリアの地理的変異を詳細に裏付けるため、ブラキストン線で隔絶された北海道と長野をモデル地域として、シュルツェマダニの地理的変異とボレリアの地理的変異が相関するのかを遺伝子レベルで検討した。以下に、その結果を項目別に述べる。

1) ボレリアに対するマダニの感受性・ベクター能力試験

図1に示したように、マダニ類の発育は卵→幼虫→若虫→成虫（雌雄）から成り、幼虫は宿主体表面で3～4日間吸血し、飽血後離脱して休眠状態となり、やがて脱皮して若虫となる。幼虫と若虫は性的に未熟で外部形態から雌雄を判別することはできない。若虫も幼虫と同様の過程を経て成虫となり、雌成虫は産卵のために吸血する。感受性・ベクター能力試験は全て幼虫→若虫の発育過程で実施した。ここで重要となる点は、吸血とともにボレリアを取り込んだ飽血幼虫が休眠期を経て、脱皮して若虫となる発育過程で、ボレリアが脱皮を経て若虫まで持ち越された場合（経発育期感染），“感受性がある”と判定した。また、若虫にボレリアが持ち越された場合、そのマダニはベクターとして機能するのか検討した。以下に様々な組み合わせで行った実験結果を述べる。

a) ヤマトマダニに *B. garinii* を取り込ませた場合

ヤマトマダニ *I. ovatus* の野外採集個体は膨大な量を調べても、*B. japonica* しか保有していないことが証明されているため、このマダニが

B. japonica の特異的なベクターであることは明らかである。そこで、このマダニにシュルツェマダニをベクターとする *B. garinii* を取り込ませた。用いた分離株は全て患者由来株である。対照群としてシュルツェマダニにもこれらの分離株を取り込ませた。用いたマダニはヤマトマダニ・シュルツェマダニ両者とも野外採集個体に由来する F₁ 幼虫である。実験は感染性を保有する継代回数の少ない培養菌をスナネズミの腹腔に接種し、約 3 週後にマダニをネズミに暴露し、吸血させた。3~4 日で自然落下した飽血幼虫は湿度を保った飼育箱中で恒温下 (25℃) で飼育し、若虫へ脱皮させた。

表 1 に示したように、対照群のシュルツェマダニは落下直後の飽血幼虫でボレリアの取り込みが確認され、脱皮後の若虫においてもボレリアの持ち越しが観察された。なお、マダニの感染率が均一でないのは、吸血源としたスナネズミの皮膚でボレリアの密度が均一でないためと考えられた。一方、ヤマトマダニに *B. garinii* を取り込ませた場合では (表 2)、飽血直後の幼虫ではボレリアを保有していたものの、脱皮した若虫ではボレリアは全て排除されていた。

b) *Ixodes pavlovskyi* に *B. garinii* を取り込ませた場合

Ixodes pavlovskyi は極東ロシアに分布するマダニで、北海道にも局所的に分布するが、ボレリアの感染は証明されていない。しかし、シュルツェマダニとは極めて近縁な種類である (図 5)。このマダニを用いて、主に *B. garinii* に対する感受性を調査した。用いたボレリア株は JEM6, N456, JEM12, NR99h, JEM4 の 5 株である。このうち、NR99h は *B. afzelii* であるが、他は全て *B. garinii* である。マダニは野外採集個体に由来する F₁ 幼虫を用いた。マダニへの感染実験は、各ボレリア株を接種したスナネズミを吸血させることにより行った。表 3 に示したように、*I. pavlovskyi* 幼虫はいずれのボレリア株も吸血とともに体内に取り込むこ

とができた。JEM6株を取り込ませた場合、脱皮した若虫までにもボレリアは高率的に伝達された。一方、N456株・JEM12株の場合、幼虫へのボレリア取り込みは高率に観察されたが、脱皮を経由しての若虫への伝達はいっさい観察されなかった。N99h・JEM4株については低率ながら、若虫への伝達が観察された。若虫への伝達率が低い要因として、ボレリアを取り込んだ幼虫が死滅する可能性が考えられたため、幼虫の脱皮率を逐次記録したが、著明な脱皮率の低下は観察されなかった。従って、マダニが発育していく過程で一部のボレリア株では菌が淘汰されたと結論した。

次に脱皮した若虫を用いて、ベクター能力試験を実施した。この試験では、スナネズミに若虫を吸血させることにより、若虫がネズミにボレリアを伝達する能力があるのかを確認した。表4に示したように、確実にボレリアを保有した若虫が吸血したにも関わらず、スナネズミは1例もボレリアに感染しなかった。通常のシュルツェマダニ・*B. garinii*の組み合わせでは、若虫1匹でもスナネズミの感染は成立するので、これは予想外の結果であった。そこで、非好適なマダニに取り込まれたボレリアは死滅したか質的变化を遂げた可能性を考慮し、若虫からボレリアを再分離してみた(表5)。ボレリアは培地中で生育したことから、死滅の可能性は否定され、この再分離株をスナネズミに接種したところ、スナネズミの感染が成立したことから、感染性が失われた可能性も否定された。また、再分離株の蛋白構成をSDS-PAGEで観察したところ(図2)、初代分離株とほとんど同一であり、ウエスタンブロット法で、ospA蛋白に対するモノクローナル抗体H5332の反応性も観察したが、抗体との反応性の変化もみられなかった。

c) シュルツェマダニに *B. burgdorferi* を取り込ませた場合

シュルツェマダニ *I. persulcatus* は *B. garinii*、*B. afzelii* の好適宿主で

ある。このマダニに遺伝的に近縁な *B. burgdorferi* 297 株を取り込ませてみた。実験方法はこれまでと同様で、感染スナネズミの吸血により、ボレリアを実験室内飼育の F₁ 幼虫に取り込ませた。今回の実験では対照として、シュルツェマダニ・*B. garinii* (JEM6 株) の正常な組み合わせの一群も加えた。表 6 に示したように、シュルツェマダニ幼虫はあまり高率ではないものの、297 株を取り込み、感染率を低下させながらも若虫までボレリアを持ち越した。対照群では若虫までのボレリアの持ち越しは高率であった。ベクター能力をスナネズミを使って試験したところ、対照群の JEM6 株感染若虫は当然のごとくベクターとして機能したが、297 株感染若虫ではスナネズミは全く感染しなかった (表 7)。そこで、一部の 297 株感染若虫からボレリアを培養して再分離したところ、培養陽性であることからボレリアは死滅しておらず、この再分離株はスナネズミへの感染性も保有していた (表 8)。また、再分離株に特有の蛋白変異も観察できなかった (図 3)。

d) 韓国産 *I. nipponensis* に由来する *B. afzelii* をシュルツェマダニに取り込ませた場合

韓国産タネガタマダニ *I. nipponensis* 由来の *B. afzelii* を入手することができたので、日本産シュルツェマダニへの感染実験を試みた。タネガタマダニはシュルツェマダニと遺伝的にきわめて近縁 (図 5) で、シュルツェマダニも野外採集個体から *B. afzelii* が分離されているので、シュルツェマダニは韓国産 *B. afzelii* に対しても感受性およびベクター能力を発揮することが予想された。表 9・10 に示したように、韓国産 *B. afzelii* はシュルツェマダニに感受性があり、ベクターとしても機能した。

以上、幾つかのマダニ種とボレリア種の組み合わせ実験において、印象づけられたことを、図 4 に私見としてまとめた。この研究の発端は、

日本産のヤマトマダニ、タヌキマダニ、アカコッコマダニがそれぞれ特有の非病原性（？）ボレリアを保有することを確認したことであった。図5に示したように、これらのマダニはライム病ボレリアを媒介する *Ixodes ricinus* complex とは遺伝的に異なっており、マダニとボレリアの共進化を強く意識した。そこで、マダニへのボレリア感染実験を様々な組み合わせで繰り返すうち、マダニのボレリア感受性には吸血から脱皮への過程で排除と許容という2つの段階があり、感受性を持つマダニが必ずしもベクターとして機能しないということを発見した。では、何故、非好適なマダニ・ボレリアの組み合わせで、“感受性がある”と判定されたマダニがベクターとして機能しないのであろうか。マダニがベクターとして機能する場合、中腸内のボレリアは吸血にともなって、中腸壁を脱し、体腔に出て、唾液腺を経由して、脊椎動物へ注入される。ベクターとして機能しない要因として、1) 中腸壁を脱出できない、2) 中腸壁を脱出できるが唾液腺に侵入できない、3) 唾液腺に侵入できるが、その数が僅かなため、脊椎動物の感染を惹起できない、等が考えられる。いずれにしても、宿主細胞との接着や侵入などに重要な役割を果たす分子がボレリア細胞表面に存在し、この分子はボレリア種毎に異なるため、マダニとボレリアの特異的組み合わせが生じるのではないだろうか。

また、マダニとボレリアの好適な組み合わせにおいても、マダニに取り込まれたボレリアの量的・質的な変化を経時的に観察する必要性を痛感し、以下の実験を行った。

2) シュルツェマダニの発育過程におけるボレリアの量的質的変動

実験室内飼育シュルツェマダニ幼虫 (F₂) を用いて、*B. garinii* JEM6 株を感染させた ICR マウスもしくはスナネズミを吸血させ、飽血幼虫を 25℃で飼育した。経時的にマダニの PBS ホモジネートを作成し、スライ

ドグラスに塗沫してアセトン固定後、FITC 標識抗ボレリア抗体による蛍光抗体法で、ボレリアを染色し、個体毎のボレリア全量を推定した。また、経時的に複数のマダニをプールし、このホモジネートを ICR マウスに皮下接種してマウスへの感染性を調べた。マウスへの接種菌量についてもホモジネートの一部を蛍光抗体法により染色して概算した。

a) マダニ体内のボレリア量の経時的推移

図6に示したように、マウス吸血群では、飽血後3日のボレリア検出数はわずかであったが (21 ± 34 、平均 \pm 標準偏差)、その後、漸増し、脱皮直前の25日には $6,362 \pm 5,836$ となった。しかし、脱皮直後の若虫(40日)ではボレリア数は激減し、 $1,130 \pm 1,346$ となった。その後、70日ではボレリア数は漸減したが (271 ± 567)、120日になってもボレリアは淘汰されることはなかった。スナネズミ吸血群では飽血後3日より多数のボレリアが検出され ($1,298 \pm 2,000$)、その後、急増し、25日には $14,165 \pm 9,367$ に達した。しかし、脱皮直後の若虫(40日)では激減して、 $1,093 \pm 1,148$ となり、このレベルは90日になっても維持された。

ライム病ボレリアは回帰熱ボレリアと異なり、血中にボレリアが出現せず、皮膚に潜んでいるボレリアがマダニに取り込まれると考えられている。従って、皮膚におけるボレリアの密度が取り込み量に影響するだろう。今回の実験結果で取り込み量の値が大きくばらつくのも皮膚の密度が均一でないからと考えられる。マウス吸血群よりもスナネズミ吸血群で高値を示した理由も皮膚での密度がスナネズミで高かったことを反映したものと思われる。データのばらつきは大きいものの、マウス吸血群・スナネズミ吸血群ともに飽血幼虫の体内で休眠期間中にボレリアの増殖が起こり、脱皮を境に、若虫ではボレリア数が激減し、その後、増殖は起こらず、一定量が長期間体内に残存することが推測できた。

b) マダニ体内のボレリアの質的变化 (感染性の変化)

ボレリアの量的変化のデータを得るとともに、同様に経時的にマダニホモジネートを作成し、これをマウスに接種することにより、マダニ体内のボレリアの脊椎動物に対する感染性 (質的变化) を調べた。図7に示したように、飽血幼虫に取り込まれたボレリアの感染性には変化がみられ、飽血後3~6日のホモジネートには感染性がなく、9~13日と一部のマウスは感染し、25日のものでは接種量が多い ($11,286 \pm 4,481$) にも関わらず、感染しない例が観察された。脱皮直後の若虫ホモジネートでは一部のマウスが感染したが、以後、70、120、190日の若虫ホモジネートではマウスは一例も感染しなかった。190日目から若虫をマウスに暴露し、吸血1、2、3日目の若虫ホモジネートの感染性を調べたところ、吸血1日目からマウスは全例が感染した。スナネズミ吸血群においてもこの質的变化の傾向はほぼ同様で、図8に示したように、飽血後に幼虫体内で増殖しているボレリアにはマウスへの感染性はなく、脱皮直後の若虫体内のボレリアに若干感染性がみられたものの、以後、マウスへの感染性は失われ、若虫が吸血を開始すると、感染性は急激に復活した。

この実験はマダニのホモジネートをマウスへ接種するという乱暴な系である。マダニからBSK培地を用いて分離培養した菌は継代数が少ない限り、確実にマウスへ感染する。しかし、本研究代表者は以前に未吸血の感染マダニを培養せずにホモジネートのままマウスに接種したら、マウスが感染しなかったという事例を経験していた。そこで、このような実験系を着想した。しかし、接種量が各時期で均一にすることができないため、接種量のばらつきが実験結果に影響を与えることは否めない。ただし、培養菌体を用いた実験では、マウスに感染を成立させるのに必要な菌量は100細胞もあれば十分である (表11)。従って、今回の実験結果は、接種量に問題があるものの、マダニ体内の質的变化を反映

しているものと考えられる。特に、脱皮後に時間が経過した若虫では、マウス吸血群・スナネズミ吸血群ともに感染性が完全に失われており、これが吸血開始とともに急激に復活することは、吸血開始とともにマダニ体内のボレリアに急激な質的変化が生じていると結論しても良いだろう。このようにマダニの吸血行動が体内のボレリアの“活性化”の引き金となることはきわめて興味深く、菌体表層蛋白の発現にも変化が生じていることが予想されたため、以下の実験を行った。

c) 吸血中にみられるマダニ体内のボレリアの質的変化

上記実験のマウスもしくはスナネズミ吸血群に由来する JEM6 株感染若虫を用いた。これらをマウスに吸血させ、1、2、3日目と経時的に12匹ずつ吸血途中でマウスから引き離し、虫体ホモジネートを作成し、スライドグラスに塗抹して、アセトンで固定した。これらの標本を、FITC 標識抗ボレリア抗体（ポリクローナル抗体）による直接蛍光抗体法、菌体表層蛋白 ospA 特異的モノクローナル抗体 H5332 もしくは菌体表層蛋白 ospC 特異的モノクローナル抗体 G7 による間接蛍光抗体法で染色し、ボレリアを検出した。図 9 は各抗体による陽性率を示したもので、マウス吸血群・スナネズミ吸血群ともに吸血前の体内のボレリアは G7 抗体と反応しなかったが、吸血後 1 日目以降から反応するようになった。H5332 抗体およびポリクローナル抗体の反応性は吸血前・吸血中ともに観察された。このことから、吸血開始とともにボレリア菌体表面に ospC 蛋白が発現することが強く示唆された。

以上、マダニとボレリアの好適な組み合わせで、マダニ発育経過にともなうボレリアの量的質的変化を観察した結果、1) 飽血幼虫休眠期にボレリアの増殖があること、2) 脱皮を経て若虫となった時期にはボレリアは増殖せず、脊椎動物への感染性も失われていること、3) 若虫が

吸血を開始し、中腸内に血液成分が取り込まれるとボレリアの感染性が復活し、それと連動するように菌体表層蛋白の一部が発現すること、などが明らかとなった。今後は、マダニとボレリアの非好適な組み合わせにおいても、これらの現象を考慮し、特異性を決定する分子を追いつめなくてはならないだろう。

なお、今回の実験では、脱皮直後の若虫で急激に体内のボレリア数が減少することも明らかとなった。長年、マダニを飼育していると脱皮直後に多量の排便をすることに気がついていた（図10）ので、この減少原因を解明する実験も行った。

d) 脱皮直後のマダニの排便によるボレリアの排出

新たに JEM6 感染マウスにシュルツェマダニ幼虫を吸血させ、飽血幼虫を多数得た。しばらくは集団で飼育したが、脱皮直前に図11に示したようなチューブに36匹の幼虫を個別に入れ、湿潤下に飼育した。毎日、観察を行い、脱皮と排便を記録した。図11のようにチューブ内に便が認められた場合は、 $1\mu\text{l}$ のPBSに便を懸濁し、スライドグラスに塗抹し、アセトン固定し、排便が認められなくなるまで、この作業を繰り返した。便塗抹標本はFITC標識抗ボレリア抗体を用いた蛍光抗体法で染色して、ボレリアを検出し、その数もカウントした（図11）。表12には、便内にボレリアが認められた個体数とその排便回数をまとめた。また、排便終了後に観察した若虫のホモジネートを作成し、蛍光抗体法により体内に残存しているボレリア数を推定し、同一ロットのマダニにおける脱皮前の体内ボレリア数と比較した。糞便回数は平均約4回で、排便終了後のホモジネート検査で感染が確認された個体はすべて糞便中にボレリアを排泄していた。また脱皮前の幼虫と脱皮後の若虫の体内ボレリア数を比較すると、脱皮後では体内ボレリア数が脱皮前の約 $1/5$ に

減少していた。図 12 には、毎回の糞便で排泄されるボレリアの数を示した。最初の排便で多数のボレリアを排泄する個体が多かったが、徐々にボレリアを排泄する個体も存在した。この実験により、脱皮後にマダニ体内のボレリアが激減する理由は、便とともに排泄されるからであると証明することができた。この排泄現象は、過量なボレリアを捨て去ると合目的に解釈できるので、宿主・寄生体関係のバランスを考える上で、きわめて興味深い現象である。

以下に示す研究成果は、本研究計画と直接の関係性は少ないが、北海道と長野のシュルツェマダニが保有するボレリア (*B. garinii*, *B. afzelii*) に関して、16S rRNA および鞭毛遺伝子の塩基置換を観察したものである。マダニとボレリアの共進化を考える場合、地理的変異を詳細に観察する必要があると考え、実施した。

3) 北海道と長野のボレリアにみられる地理的変異

北海道と本州間の津軽海峡は生物分布の地理的障壁となり、この境界線はブラキストン線と呼ばれている。まず、北海道と長野産シュルツェマダニの地理的隔離を調査するため、マダニのミトコンドリア遺伝子の変異を調べることにした。調査対象は 16S rRNA 遺伝子で、マダニの 1 個体毎にこの部分配列 (457~459 bp) を PCR 法で増幅し、ダイレクトシーケンスした。

図 13 に示したように、わずか数塩基の塩基置換であったが、北海道と長野のシュルツェマダニを識別することができた。長野の 1 個体が北海道のものと共通であったが、他は明瞭に識別できている。従って、現在、北海道と長野のシュルツェマダニ個体群はほとんど交流がなく、別の個体群になっていることが推測できた。

次に表 13 に示したボレリア株を用いて、ボレリア側の地理的変異を

調べるため、16S rRNA (*rrs*) と鞭毛遺伝子 (*fla*) を調査した。*rrs* は 816 bp、*fla* は 600 bp の部分配列を PCR 増幅し、ダイレクトシーケンシングした。なお、使用した北海道・長野シュルツェマダニ由来ボレリア分離株は本研究者が分離培養した菌株コレクションから全て無作為に抽出したものである。

図 1 4 に示したように、*B. burgdorferi*、*B. garinii*、*B. afzelii* は *rrs*、*fla* の両遺伝子とも種ごとに独自のブランチを形成した。また、*B. garinii* と *B. afzelii* に着目し、ヨーロッパと日本産の菌株を比較すると、両遺伝子に共通の塩基配列がみられるものは存在しなかった。一方、北海道と長野産の *B. garinii* と *B. afzelii* には、同一の塩基配列を示す菌株が存在したが、一部の菌株では地域特異的と考えられるものも存在した。*B. garinii* は *B. afzelii* よりも多型性を示し、この傾向は *fla* 遺伝子で特に顕著であった。

以上の結果だけでは例数が少ないので、ボレリアの地域特異性を証明したことにはならない。しかし、1) ヨーロッパの *I. ricinus* が媒介するボレリアと日本のシュルツェマダニが媒介するボレリアは種が同一であるものの、塩基配列に共通性がみられないこと、2) 北海道と長野のシュルツェマダニが媒介するボレリアには、共通性を示すものが存在する一方で、地域特異的と考えられるものも存在すること、3) 北海道と長野のシュルツェマダニに遺伝的な隔離が生じているらしいこと、などを考慮すれば、今回の調査結果は、ボレリアは地域で特殊化する、すなわち、マダニとボレリアの共進化を暗示しているのではなかろうか。

以上、2年間の研究期間では、マダニとボレリアの特異性を決める分子を追いつめることはできなかったが、様々な付加的な情報を得ることができた。今後、この経験を生かし、自分なりの独自のベクター生物学を展開して行きたい。

表1 ライム病ボレリア患者分離株に対するシュルツェマダニの感受性

使用 分離株	菌株を接種した スナネズミの 個体番号 (感染状況)	用いたマダニ 幼虫コロニー	飽血幼虫への ボレリアの取り込み率 (陽性数/検査数)	脱皮若虫への ボレリアの持ち越し率 (陽性数/検査数)
JEM3	JEM3-1 (+)	<i>I.per.</i> -1	0% (0/10)	30% (3/10)
	JEM3-2 (+)	<i>I.per.</i> -1	30% (3/10)	20% (2/10)
JEM4	JEM4-1 (+)	<i>I.per.</i> -1	0% (0/10)	10% (1/10)
	JEM4-2 (+)	<i>I.per.</i> -1	0% (0/10)	20% (2/10)
JEM5	JEM5-1 (+)	<i>I.per.</i> -2	0% (0/10)	40% (4/10)
	JEM5-2 (+)	<i>I.per.</i> -2	90% (9/10)	80% (8/10)
	JEM5-3 (+)	<i>I.per.</i> -2	0% (0/10)	40% (4/10)
JEM6	JEM6-1 (+)	<i>I.per.</i> -2	100% (10/10)	100% (10/10)
	JEM6-2 (+)	<i>I.per.</i> -2	40% (4/10)	80% (8/10)
	JEM6-3 (+)	<i>I.per.</i> -2	80% (8/10)	80% (8/10)
	JEM6-4 (+)	<i>I.per.</i> -2	50% (5/10)	80% (8/10)
JEM7	JEM7-1 (+)	<i>I.per.</i> -3	10% (1/10)	10% (1/10)
	JEM7-2 (+)	<i>I.per.</i> -3	40% (4/10)	90% (9/10)
	JEM7-3 (+)	<i>I.per.</i> -3	0% (0/10)	70% (7/10)
JEM8	JEM8-1 (+)	<i>I.per.</i> -3	70% (7/10)	40% (4/10)
	JEM8-2 (+)	<i>I.per.</i> -3	60% (6/10)	50% (5/10)
	JEM8-3 (+)	<i>I.per.</i> -3	0% (0/10)	20% (2/10)
未感染 対照群	Cont-1 (-)	<i>I.per.</i> -1	0% (0/10)	0% (0/10)
	Cont-2 (-)	<i>I.per.</i> -2	0% (0/10)	0% (0/10)
	Cont-3 (-)	<i>I.per.</i> -3	0% (0/10)	0% (0/10)

注) 本実験ではボレリアを培養法で検出した。飽血幼虫は宿主からの自然脱落后48時間以内に検査し、若虫は脱皮後1~2ヶ月に検査した。使用した分離株は全て *B. garinii* で、北海道の患者に由来し、慢性遊走性紅斑の生検皮膚から分離したものである。

表2 ライム病ボレリア患者分離株に対するヤマトマダニの感受性

使用 分離株	菌株を接種した スナネズミの 個体番号 (感染状況)	用いたマダニ 幼虫コロニー	飽血幼虫への ボレリアの取り込み率 (陽性数/検査数)	脱皮若虫への ボレリアの持ち越し率 (陽性数/検査数)
JEM3	JEM3-3 (+)	<i>I.ova</i> -1	80% (8/10)	0% (0/10)
	JEM3-4 (+)	<i>I.ova</i> -1	80% (8/10)	0% (0/10)
JEM4	JEM4-3 (+)	<i>I.ova</i> -1	0% (0/10)	0% (0/10)
	JEM4-4 (+)	<i>I.ova</i> -1	20% (2/10)	0% (0/10)
JEM5	JEM5-4 (+)	<i>I.ova</i> -2	0% (0/10)	0% (0/10)
	JEM5-5 (+)	<i>I.ova</i> -2	10% (1/10)	0% (0/10)
JEM6	JEM6-5 (+)	<i>I.ova</i> -2	60% (6/10)	0% (0/10)
	JEM6-6 (+)	<i>I.ova</i> -2	80% (8/10)	0% (0/10)
JEM7	JEM7-4 (+)	<i>I.ova</i> -3	30% (3/10)	0% (0/10)
	JEM7-5 (+)	<i>I.ova</i> -3	20% (2/10)	0% (0/10)
JEM8	JEM8-4 (+)	<i>I.ova</i> -3	0% (0/10)	0% (0/10)
	JEM8-5 (+)	<i>I.ova</i> -3	0% (0/10)	0% (0/10)
	JEM8-6 (+)	<i>I.ova</i> -3	40% (4/10)	0% (0/10)
未感染 対照群	Cont-4 (-)	<i>I.ova</i> -1	0% (0/10)	0% (0/10)
	Cont-5 (-)	<i>I.ova</i> -2	0% (0/10)	0% (0/10)
	Cont-6 (-)	<i>I.ova</i> -3	0% (0/10)	0% (0/10)

注) 本実験ではボレリアを培養法で検出した。飽血幼虫は宿主からの自然脱落后48時間以内に検査し、若虫は脱皮後1~2ヶ月に検査した。

表3 *Ixodes pavlovskyi* のボレリア感受性試験

使用 分離株	菌株を接種した スナネズミの		飽血幼虫への		脱皮若虫への	
	個体番号 (感染状況)	用いたマダニ 幼虫コロニー	ボレリアの取り込み率 (陽性数/検査数)	脱皮率 (若虫数/飼育数)	ボレリアの持ち越し率 (陽性数/検査数)	
JEM6	JEM6-11 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak1	100% (12/12)	77% (54/70)	25% (3/12)	
	JEM6-12 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak4	100% (12/12)	54% (38/70)	100% (12/12)	
	JEM6-13 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak5	83% (10/12)	94% (66/70)	17% (2/12)	
	JEM6-14 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak7	100% (12/12)	64% (45/70)	25% (3/12)	
	JEM6-15 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak8	58% (7/12)	94% (66/70)	33% (4/12)	
	JEM6-16 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak10	83% (10/12)	90% (63/70)	50% (6/12)	
	JEM6-17 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak11	92% (11/12)	95% (52/55)	83% (10/12)	
	JEM6-18 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak12	100% (12/12)	97% (58/60)	58% (7/12)	
	JEM6-19 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak13	75% (9/12)	91% (64/70)	50% (6/12)	
	JEM6-20 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak15	75% (9/12)	77% (54/70)	67% (8/12)	
	JEM6-21 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak16	67% (8/12)	97% (68/70)	42% (5/12)	
N456	N456-1 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak3	50% (6/12)	81% (57/70)	0% (0/12)	
	N456-2 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak4	25% (3/12)	50% (35/70)	0% (0/12)	
	N456-3 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak5	50% (6/12)	90% (63/70)	0% (0/12)	
	N456-4 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak7	75% (9/12)	59% (41/70)	0% (0/24)	
	N456-5 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak8	75% (9/12)	96% (67/70)	0% (0/24)	
	N456-6 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak10	50% (6/12)	97% (68/70)	0% (0/12)	
	N456-7 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak12	67% (8/12)	90% (63/70)	0% (0/24)	
	N456-8 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak13	58% (7/12)	95% (57/60)	0% (0/24)	
	N456-9 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak15	42% (5/12)	93% (65/70)	0% (0/24)	
	N456-10 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak16	25% (3/12)	90% (63/70)	0% (0/12)	
JEM12	JEM12-1 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak4	8% (1/12)	67% (47/70)	0% (0/24)	
	JEM12-2 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak5	92% (11/12)	93% (65/70)	0% (0/24)	
	JEM12-3 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak7	25% (3/12)	65% (39/60)	0% (0/24)	
NR99h	NR99h-1 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak4	83% (10/12)	75% (45/60)	13% (3/24)	
	NR99h-2 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak7	92% (11/12)	82% (49/60)	0% (0/24)	
	NR99h-3 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak8	75% (9/12)	98% (59/60)	0% (0/24)	
JEM4	JEM4-11 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak4	42% (5/12)	90% (54/60)	4% (1/24)	
	JEM4-12 (+)	<i>I.pav.</i> -Ak8	25% (3/12)	97% (58/60)	0% (0/24)	

注) 本実験ではボレリアを蛍光抗体法で検出した。飽血幼虫は宿主からの自然脱落后48時間以内に検査し、若虫は脱皮後1~2ヶ月に検査した。使用した分離株は全て日本産のもので、NR99hは *B. afzelii* で、他は *B. garinii* である。

表4 *Ixodes pavlovskyi* のベクター能力試験

スナネズミ 個体番号	吸血させた若虫コロニー (感染株、感染率)	暴露した 若虫数	回収した 飽血若虫数	スナネズミの培養結果		
				右耳	左耳	心臓
1	<i>I.pav.</i> -Ak11 (JEM6 株, 83%)	12	10	—	—	—
2	<i>I.pav.</i> -Ak12 (JEM6 株, 58%)	12	8	—	—	—
3	<i>I.pav.</i> -Ak13 (JEM6 株, 50%)	12	8	—	—	—
4	<i>I.pav.</i> -Ak15 (JEM6 株, 67%)	12	9	—	—	—
5	<i>I.pav.</i> -Ak16 (JEM6 株, 42%)	12	11	—	—	—
6	<i>I.pav.</i> -Ak4 (JEM6 株, 100%)	20	10	—	—	—
7	<i>I.pav.</i> -Ak7 (JEM6 株, 25%)	20	14	—	—	—
8	<i>I.pav.</i> -Ak10 (JEM6 株, 50%)	20	14	—	—	—
9	<i>I.pav.</i> -Ak11 (JEM6 株, 83%)	16	12	—	—	—
10	<i>I.pav.</i> -Ak12 (JEM6 株, 58%)	20	10	—	—	—
11	<i>I.pav.</i> -Ak15 (JEM6 株, 67%)	20	17	—	—	—
12	<i>I.pav.</i> -Ak7 (N456 株, 0%)	12	8	—	—	—
13	<i>I.pav.</i> -Ak8 (N456 株, 0%)	12	8	—	—	—
14	<i>I.pav.</i> -Ak12 (N456 株, 0%)	12	7	—	—	—
15	<i>I.pav.</i> -Ak13 (N456 株, 0%)	12	7	—	—	—
16	<i>I.pav.</i> -Ak15 (N456 株, 0%)	12	9	—	—	—
17	<i>I.pav.</i> -Ak4 (JEM12 株, 0%)	20	16	—	—	—
18	<i>I.pav.</i> -Ak5 (JEM12 株, 0%)	20	7	—	—	—
19	<i>I.pav.</i> -Ak7 (JEM12 株, 0%)	20	13	—	—	—
20	<i>I.pav.</i> -Ak4 (NR99h 株, 13%)	20	12	—	—	—
21	<i>I.pav.</i> -Ak7 (NR99h 株, 0%)	20	15	—	—	—
22	<i>I.pav.</i> -Ak8 (NR99h 株, 0%)	20	17	—	—	—
23	<i>I.pav.</i> -Ak4 (JEM4 株, 4%)	20	11	—	—	—
24	<i>I.pav.</i> -Ak8 (JEM4 株, 0%)	20	16	—	—	—

注) スナネズミにボレリア感染若虫を暴露し、3週後にネズミの皮膚や内臓を培養して、感染の有無を判定した。ボレリア感染若虫コロニーは表3の実験から得た。使用した分離株は全て日本産のもので、NR99hは *B. afzelii* で、他は *B. garinii* である。

表5 *I. pavlovskyi* 若虫が保有している JEM6 株の培養結果

感染若虫 コロニー	培養した 若虫数	ボレリア培養 陽性数
<i>I.pav.</i> -Ak11	12	3 (25%)
<i>I.pav.</i> -Ak15	20	4 (20%)*

* 再分離した JEM6 株はスナネズミに腹腔接種したところ感染が成立し、ボレリア株の感染性が失われていないことを確認した。

表6 ライム病ボレリア北米分離株に対するシュルツェマダニの感受性

使用 分離株 (種)	菌株を接種した スナネズミの 個体番号 (感染状況)	用いたマダニ 幼虫コロニー	飽血幼虫への ボレリアの取り込み率 (陽性数/検査数)	脱皮若虫への ボレリアの持ち越し率 (陽性数/検査数)
297 北米株 (<i>B.b.</i>)	297-1 (+)	<i>I.per.</i> -NE2	8% (1/12)	8% (4/48)
	297-2 (+)	<i>I.per.</i> -NE4	50% (6/12)	29% (14/48)
	297-3 (+)	<i>I.per.</i> -NE6	42% (5/12)	8% (4/48)
	297-4 (+)	<i>I.per.</i> -NE10	75% (9/12)	42% (20/48)
	297-5 (+)	<i>I.per.</i> -NE12	33% (4/12)	0% (0/48)
JEM6 日本株 (<i>B.g.</i>)	JEM6-51 (+)	<i>I.per.</i> -NE2	67% (8/12)	67% (8/12)
	JEM6-52 (+)	<i>I.per.</i> -NE4	83% (10/12)	100% (12/12)
	JEM6-53 (+)	<i>I.per.</i> -NE6	83% (10/12)	100% (12/12)
	JEM6-54 (+)	<i>I.per.</i> -NE10	83% (10/12)	92% (11/12)
	JEM6-55 (+)	<i>I.per.</i> -NE12	67% (8/12)	100% (12/12)

注) 本実験ではボレリアを蛍光抗体法で検出した。飽血幼虫は宿主からの自然脱落后48時間以内に検査し、若虫は脱皮後1~2ヶ月に検査した。北米分離株はライム病患者由来で、対照とした日本由来株も患者に由来するものである。

B.b., *B. burgdorferi* sensu stricto; *B.g.*, *B. garinii*.

表7 シュルツェマダニの北米分離株に対するベクター能力試験

スナネズミ 個体番号	吸血させた若虫コロニー (感染株、感染率)	暴露した 若虫数	回収した 飽血若虫数	スナネズミの培養結果			
				右耳	左耳	心臓	膀胱
1	<i>I.per.</i> -NE4 (297株, 29%)	20	18	—	—	—	—
2	<i>I.per.</i> -NE4 (297株, 29%)	20	18	—	—	—	—
3	<i>I.per.</i> -NE4 (297株, 29%)	20	19	—	—	—	—
4	<i>I.per.</i> -NE4 (297株, 29%)	20	20	—	—	—	—
5	<i>I.per.</i> -NE4 (297株, 29%)	20	17	—	—	—	—
6	<i>I.per.</i> -NE4 (297株, 29%)	20	20	—	—	—	—
7	<i>I.per.</i> -NE10 (297株, 42%)	20	18	—	—	—	—
8	<i>I.per.</i> -NE10 (297株, 42%)	20	17	—	—	—	—
9	<i>I.per.</i> -NE10 (297株, 42%)	20	18	—	—	—	—
10	<i>I.per.</i> -NE10 (297株, 42%)	20	19	—	—	—	—
11	<i>I.per.</i> -NE10 (297株, 42%)	20	20	—	—	—	—
12	<i>I.per.</i> -NE4 (JEM6株, 100%)	10	10	+	+	+	+
13	<i>I.per.</i> -NE4 (JEM6株, 100%)	10	9	+	+	+	+
14	<i>I.per.</i> -NE10 (JEM6株, 92%)	10	9	+	+	+	+
15	<i>I.per.</i> -NE10 (JEM6株, 92%)	10	8	+	+	+	+

注) スナネズミにボレリア感染若虫を暴露し、3週後に皮膚や内臓を培養して、ネズミの感染の有無を検査した。使用したボレリア感染若虫コロニーは表5の実験から得た。

表8 シュルツェマダニ若虫が保有している 297 株の培養結果

感染若虫 コロニー	培養した 若虫数	ボレリア培養 陽性数
<i>I.per.</i> -NE4	12	8 (67%) *
<i>I.per.</i> -NE10	12	6 (50%) *

* 再分離した 297 株はスナネズミに腹腔接種したところ感染が成立し、ボレリア株の感染性が失われていないことを確認した。

表9 韓国産ボレリア株 *B. afzelii* を用いたシュルツェマダニの感受性試験

使用 分離株	菌株を接種した スナネズミの 個体番号 (感染状況)		用いたマダニ 幼虫コロニー	飽血幼虫への ボレリアの取り込み率 (陽性数/検査数)		脱皮若虫への ボレリアの持ち越し率 (陽性数/検査数)	
	KKU6	KKU6-1		(+)	<i>I.per.</i> -SB33	58%	(7/12)
KKU12	KKU12-1	(+)	<i>I.per.</i> -SB33	100%	(12/12)	25%	(3/12)

注) 本実験ではボレリアを蛍光抗体法で検出した。飽血幼虫は宿主からの自然脱落后16日目に検査し、若虫は脱皮後1~2ヶ月に検査した。使用した分離株はシュルツェマダニときわめて近縁なタネガタマダニから分離した。

表10 シュルツェマダニの韓国産ボレリア株に対するベクター能力試験

スナネズミ 個体番号	吸血させた若虫コロニー (感染株、感染率)	暴露した 若虫数	回収した 飽血若虫数	スナネズミの培養結果			
				右耳	左耳	心臓	膀胱
1	<i>I.per.</i> -SB33 (KKU6 株, 42%)	24	20	+	+	+	-
2	<i>I.per.</i> -SB33 (KKU6 株, 42%)	24	24	+	+	+	+
3	<i>I.per.</i> -SB33 (KKU12 株, 25%)	24	22	+	+	+	+
4	<i>I.per.</i> -SB33 (KKU12 株, 25%)	24	21	-	-	-	-

注) スナネズミにボレリア感染若虫を暴露し、3週後に皮膚や内臓を培養して、ネズミの感染の有無を検査した。使用したボレリア感染若虫コロニーは表7の実験から得た。

表 1 1 ICR マウスの感染に必要なボレリア数

ボレリア数	マウスのボレリア感染率 (感染個体 / 接種個体)	
0	0 %	(0 / 2)
1 0	6 0 %	(3 / 6)
1 0 2	1 0 0 %	(6 / 6)
1 0 3	1 0 0 %	(6 / 6)
1 0 4	1 0 0 %	(6 / 6)

注) JEM6 株培養菌体を皮下接種し、3 週後に皮膚・心臓・膀胱を B S K 培地で培養して、感染の有無を判定した。

表 1 2 脱皮直後の若虫の排便回数と排泄されるボレリア量

同一ロット幼虫 24 匹		実験群若虫 36 匹	
脱皮前ボレリア数 平均±SD (レンジ)	糞便内ボレリア 陽性個体 (%)	排便回数 平均±SD (レンジ)	排便終了後の体内ボレリア数 平均±SD (レンジ)
3,805±4,289 (0 - 16,470)	31 (86)	3.9±0.9 (2 - 6)	775±772 (0 - 2,480)

注) 実験に使用したマダニの同一ロットで、脱皮直前の休眠期幼虫のホモジネートを作成し、蛍光抗体法により脱皮前の体内ボレリア数を推定した。糞便を採集した実験群 36 匹については、排便回数、その期間、糞便内ボレリアの有無、および一部の若虫については、糞便内ボレリア数をカウントした。全ての若虫は、体が硬化し、排便が認められなくなった時期にホモジネートを作成し、体内残存ボレリア数を推定した。

表13 シークエンスに使用したボレリア株

ボレリア種	地域	調査株数	(内訳)
<i>B. garinii</i>	ヨーロッパ	7	
	北海道	32	(根室 22、富良野 10)
	長野	25	(美ヶ原 19、上高地 6)
<i>B. afzelii</i>	ヨーロッパ	7	
	北海道	7	(根室 5、富良野 2)
	長野	8	(美ヶ原 6、上高地 2)
<i>B. burgdorferi</i>	ヨーロッパ	1	
	北アメリカ	3	
	合計	90	

注) ボレリア分離株は全て1個体のシュルツェマダニ成虫から分離した。

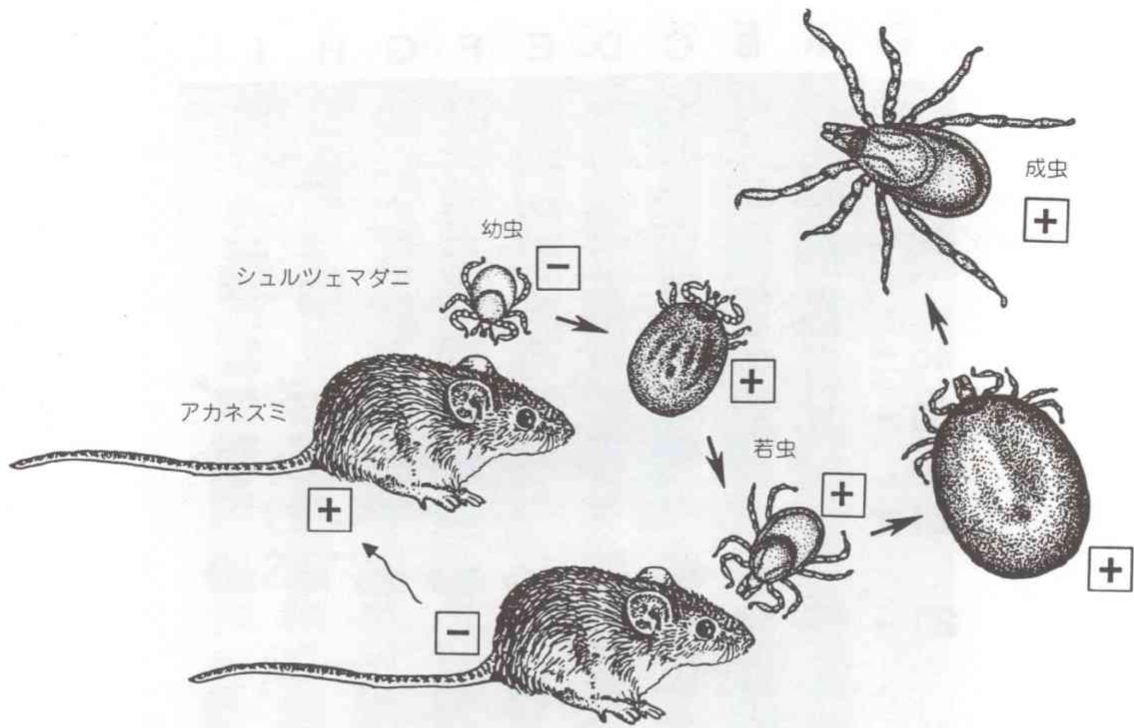


図1 ライム病ボレリアの伝播維持経路

注) マダニは卵→幼虫→若虫→成虫と発育する。幼虫・若虫は1回吸血し、飽血後、宿主から脱落し、休眠期を経て、脱皮して次発育期となる。雌成虫は産卵のために吸血する。通常、ボレリアは経卵巣感染により雌成虫から幼虫へと垂直伝達されないため、幼虫は吸血する際、感染した脊椎動物（ネズミやトリ）からボレリアを体内へ取り込む。取り込まれたボレリアは脱皮後の若虫にも伝達され（経発育期感染）、若虫が吸血する際に、脊椎動物にボレリアが戻される。この様にボレリアはマダニの吸血行動を利用し、脊椎動物とマダニ間で感染環を維持している。

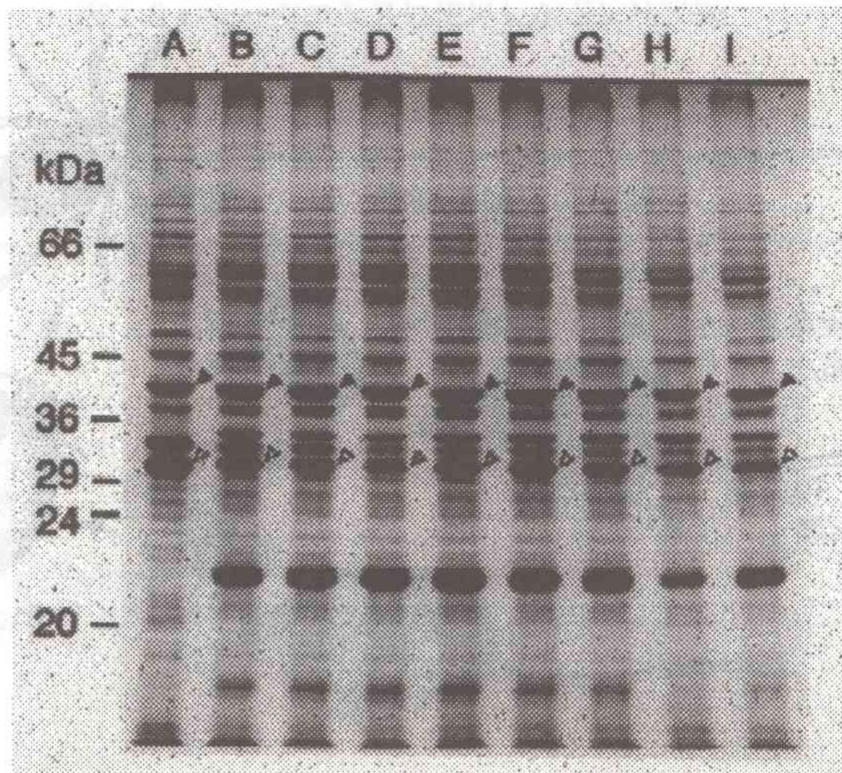


図2 *I. pavlovskyi* 若虫から再分離した JEM6 株の SDS-PAGE 蛋白プロフィール

レーン A、B31 北米分離株 (*B. burgdorferi sensu stricto*)

レーン B、JEM6 日本分離株 (*B. garinii*)

レーン C~I、*I. pavlovskyi* 若虫から再分離した JEM6 株

▼、鞭毛蛋白

▽、OspA 蛋白

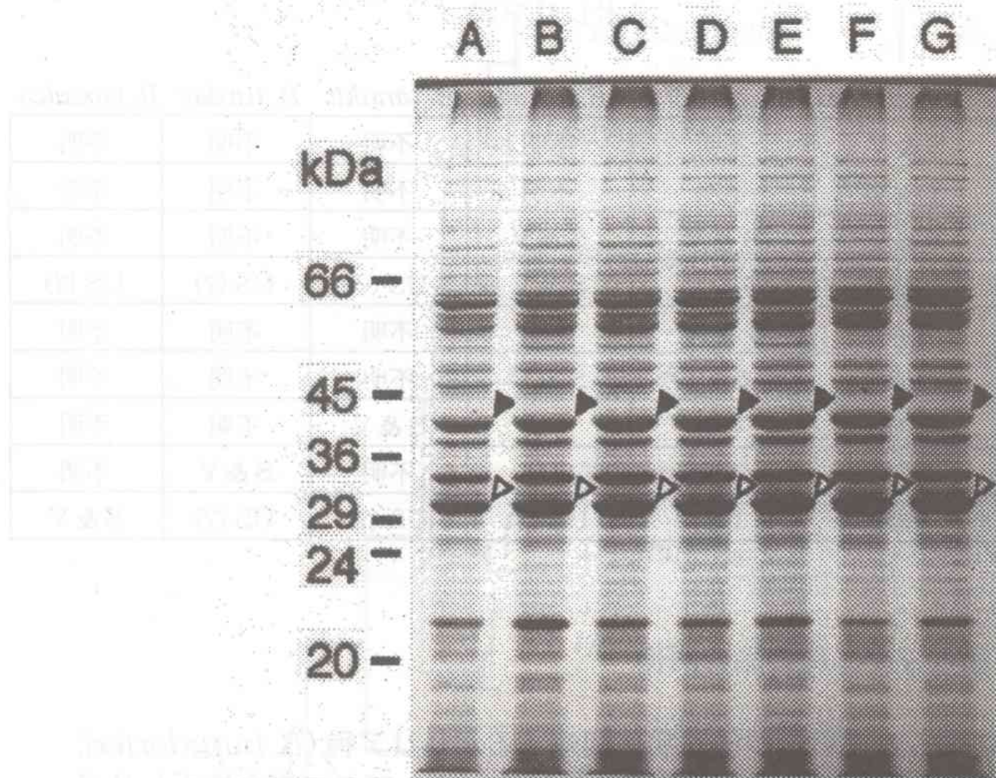


図3 シュルツエマダニ若虫から再分離した 297 株の SDS-PAGE 蛋白プロフィール

レーン A、297 北米分離株 (*B. burgdorferi sensu stricto*)

レーン B~G、シュルツエマダニ若虫から再分離した 297 株

▼、鞭毛蛋白

▽、OspA 蛋白

ボレリア種

マダニ種

	<i>B. burgdorferi</i>	<i>B. garinii</i>	<i>B. afzelii</i>	<i>B. tanukii</i>	<i>B. turdae</i>	<i>B. japonica</i>
<i>I. scapularis</i>	S & V	不明	不明	不明	不明	不明
<i>I. pacificus</i>	S & V	不明	不明	不明	不明	不明
<i>I. ricinus</i>	S & V	S & V	S & V	不明	不明	不明
<i>I. persulcatus</i>	S & IV	S & V	S & V	US (?)	US (?)	US (?)
<i>I. pavlovskyi</i>	不明	S & IV	不明	不明	不明	不明
<i>I. nipponensis</i>	不明	S & V (?)	S & V	不明	不明	不明
<i>I. tanuki</i>	不明	不明	不明	S & V	不明	不明
<i>I. turdus</i>	不明	不明	不明	不明	S & V	不明
<i>I. ovatus</i>	不明	US	US (?)	US (?)	US (?)	S & V

図4 ボレリア種とマダニ種の適合関係

注) 現在までに知られているライム病に関連するボレリア種 (*B. burgdorferi*, *B. garinii*, *B. afzelii*) と日本に分布する非病原性 (?) マダニ媒介性ボレリア種 (*B. tanukii*, *B. turdae*, *B. japonica*) の適合関係をまとめた。感染実験で確認できなかったものについては、野外採集マダニのボレリア分離状況から類推した。特に日本産シュルツェマダニは膨大な採集個体を調べており、*B. garinii* もしくは *B. afzelii* 以外のライム病関連ボレリアは確認されていない。ただし、回帰熱関連ボレリア (*B. miyamotoi*) は分離されている。また、ヤマトマダニに関しても、野外採集個体は *B. japonica* しか保有しない。

アルファベットの省略形の意味は以下に示した。

S & V, susceptible and competent vector

S & IV, susceptible and incompetent vector

US, unsusceptible

susceptible (感受性) とは経発育期感染が成立することを意味し、vector (媒介者) とは吸血時に脊椎動物にボレリアを伝達できることを意味する。

図5に示したように、*I. scapularis*, *I. pacificus*, *I. ricinus*, *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *I. nipponensis* は遺伝的にきわめて類似した同胞種で、通称、*I. ricinus complex* と呼ばれている。

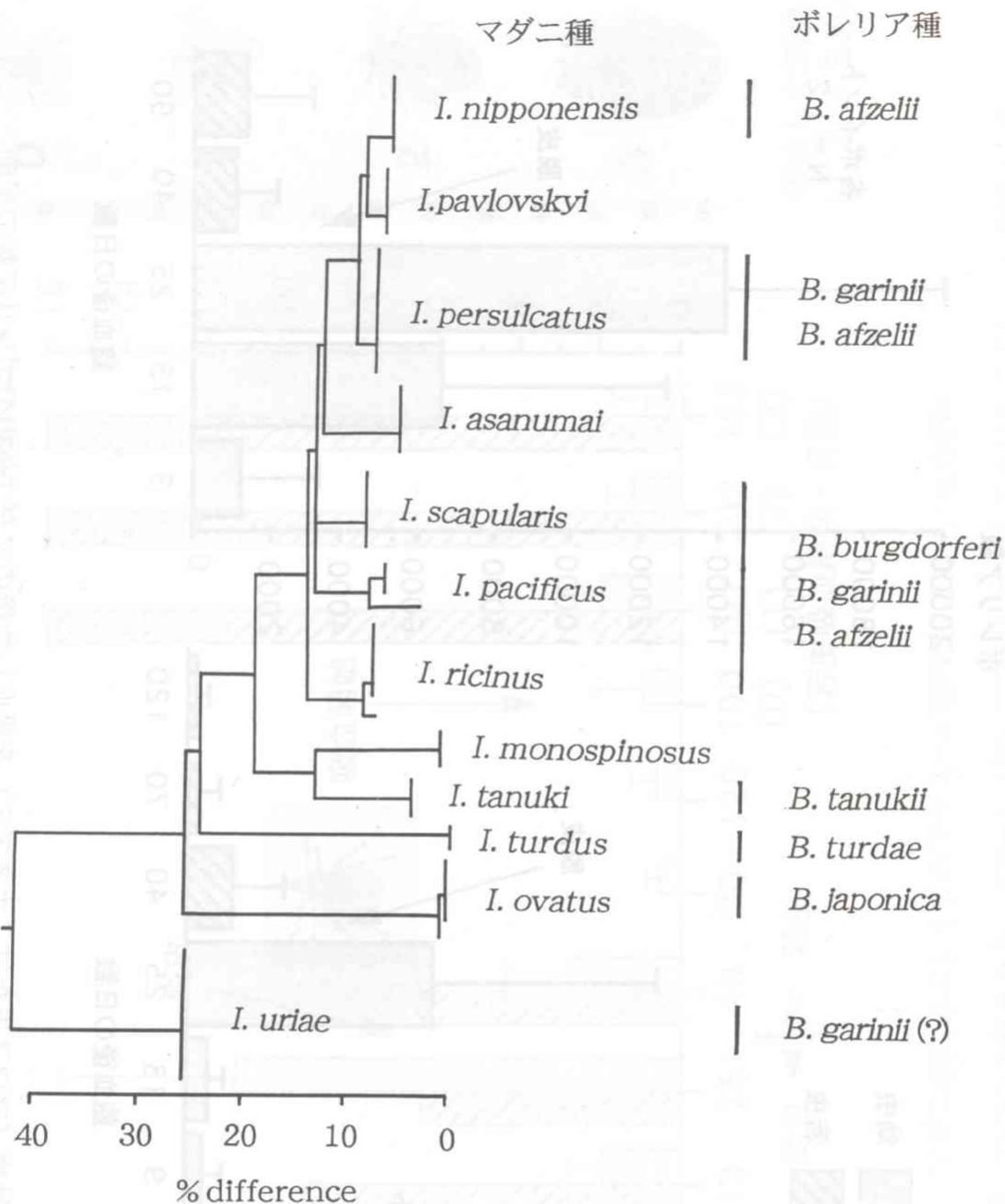


図5 ITS2領域の塩基配列から構築したマダニの系統樹 (NJ法)

注) マダニ種とボレリア種との相互関係が分かるように左側に対応するボレリア種を併記した。*I. ricinus* complexはITS2配列からも近縁種であることがわかり、このマダニ種群にライム病関連ボレリア3種 (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*) が密接に関連していることがわかる。なお、本図は福山大学・福長将仁教授から提供されたものである。

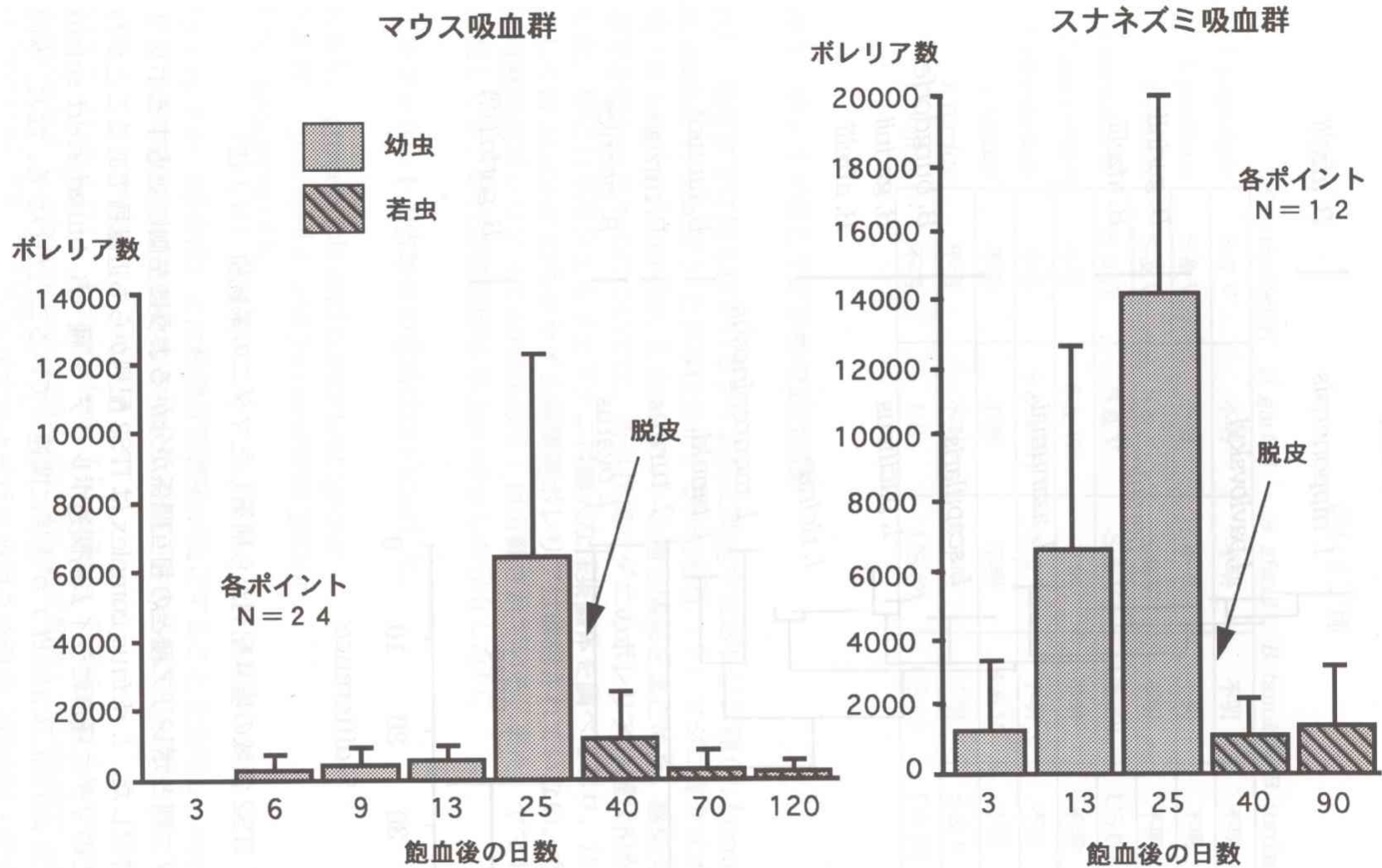


図6 感染動物（マウスまたはスナネズミ）を吸血した後のマダニ体内のボレリア数の変動

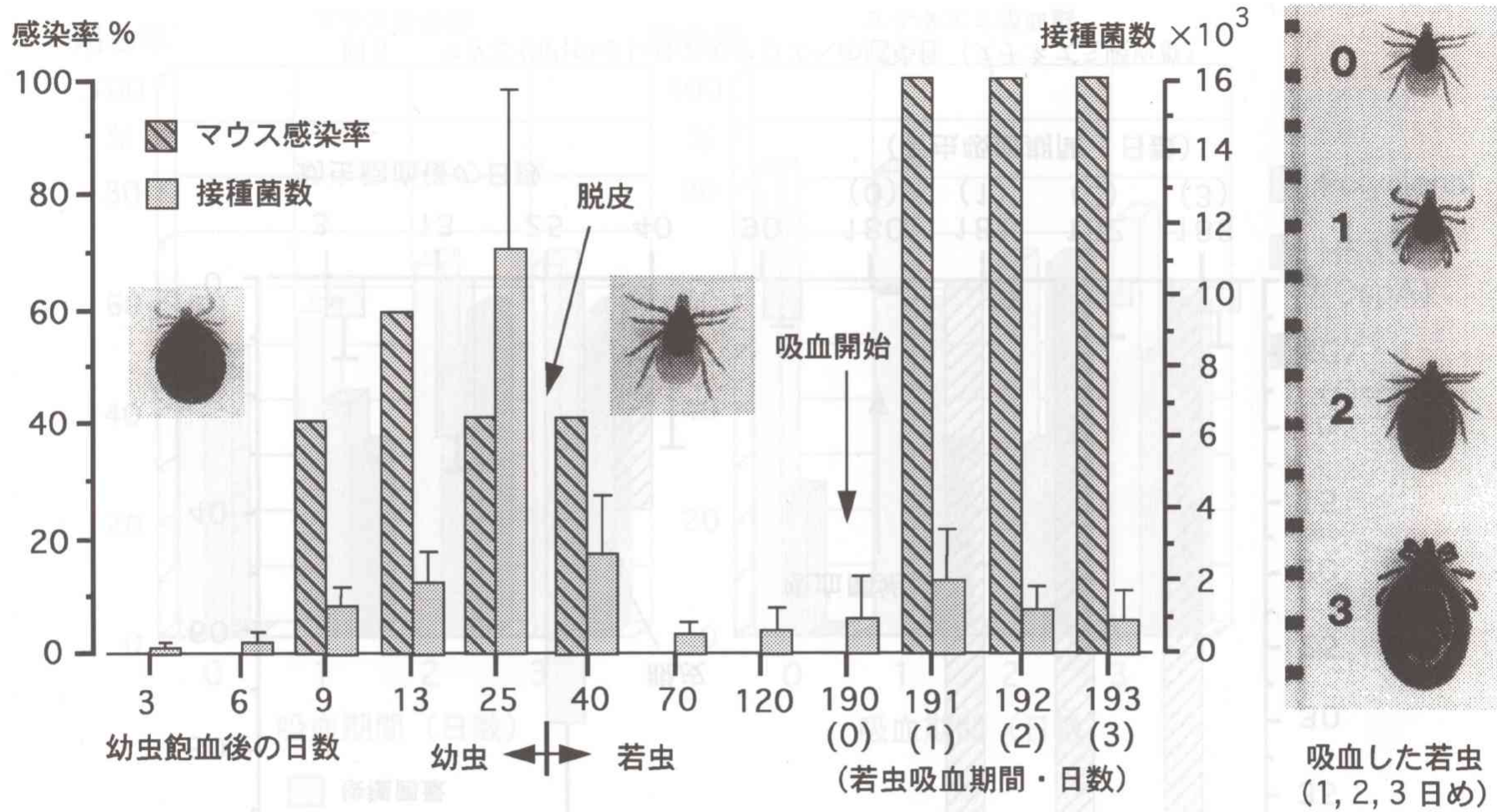


図7 マダニ体内のボレリアの Maus への感染性 (Maus 吸血群)

注) 各群 Maus は 5 頭。Maus 1 頭あたり、 $100 \mu\text{L}$ PBS でマダニ 6 匹をホモジナイズし、その $50 \mu\text{L}$ を皮下接種した。ホモジネートの一部はスライドグラスに塗抹し、蛍光抗体法で接種菌量を推定した。

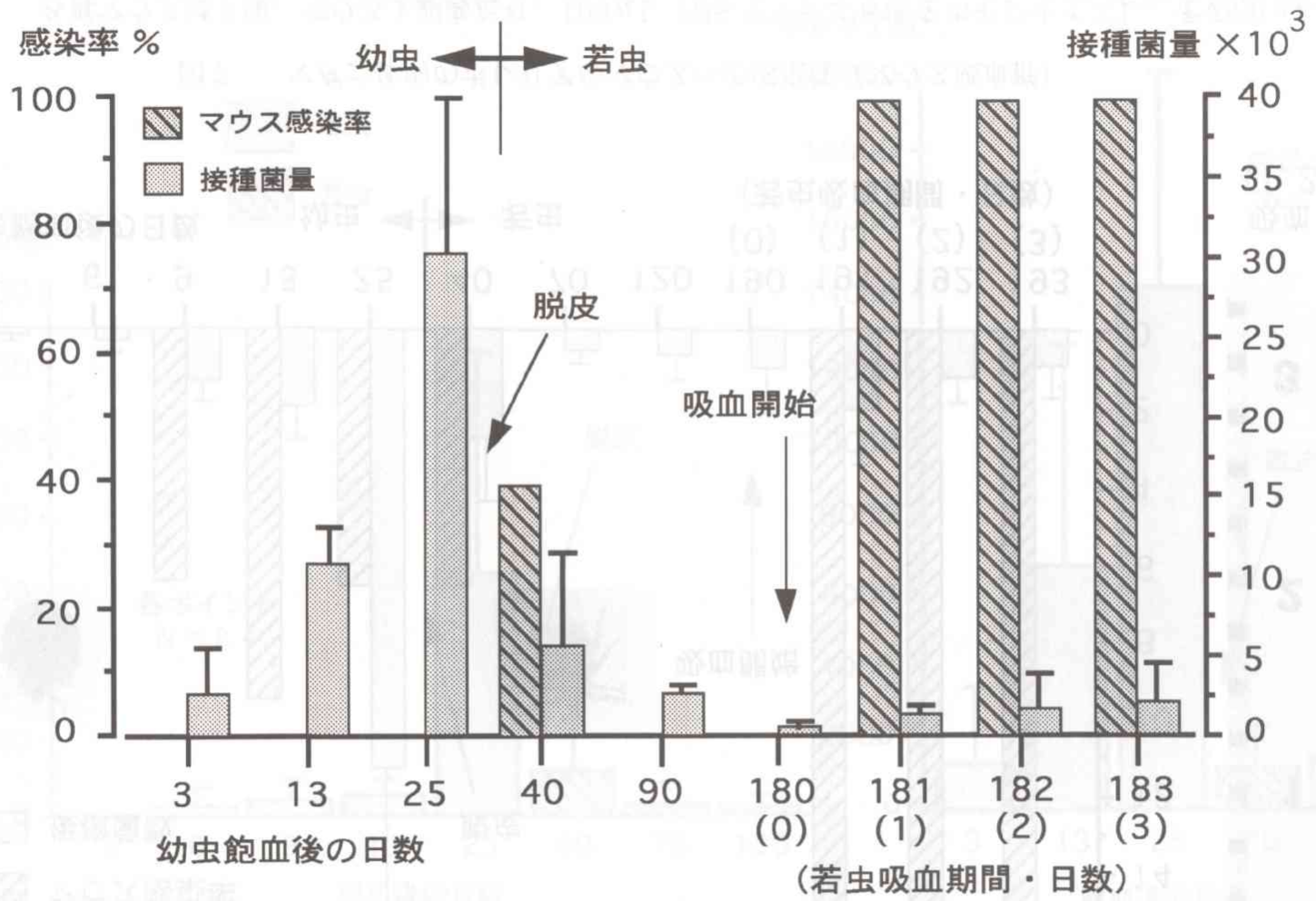


図8 マダニ体内のボレリアの Maus への感染性 (スナネズミ吸血群)

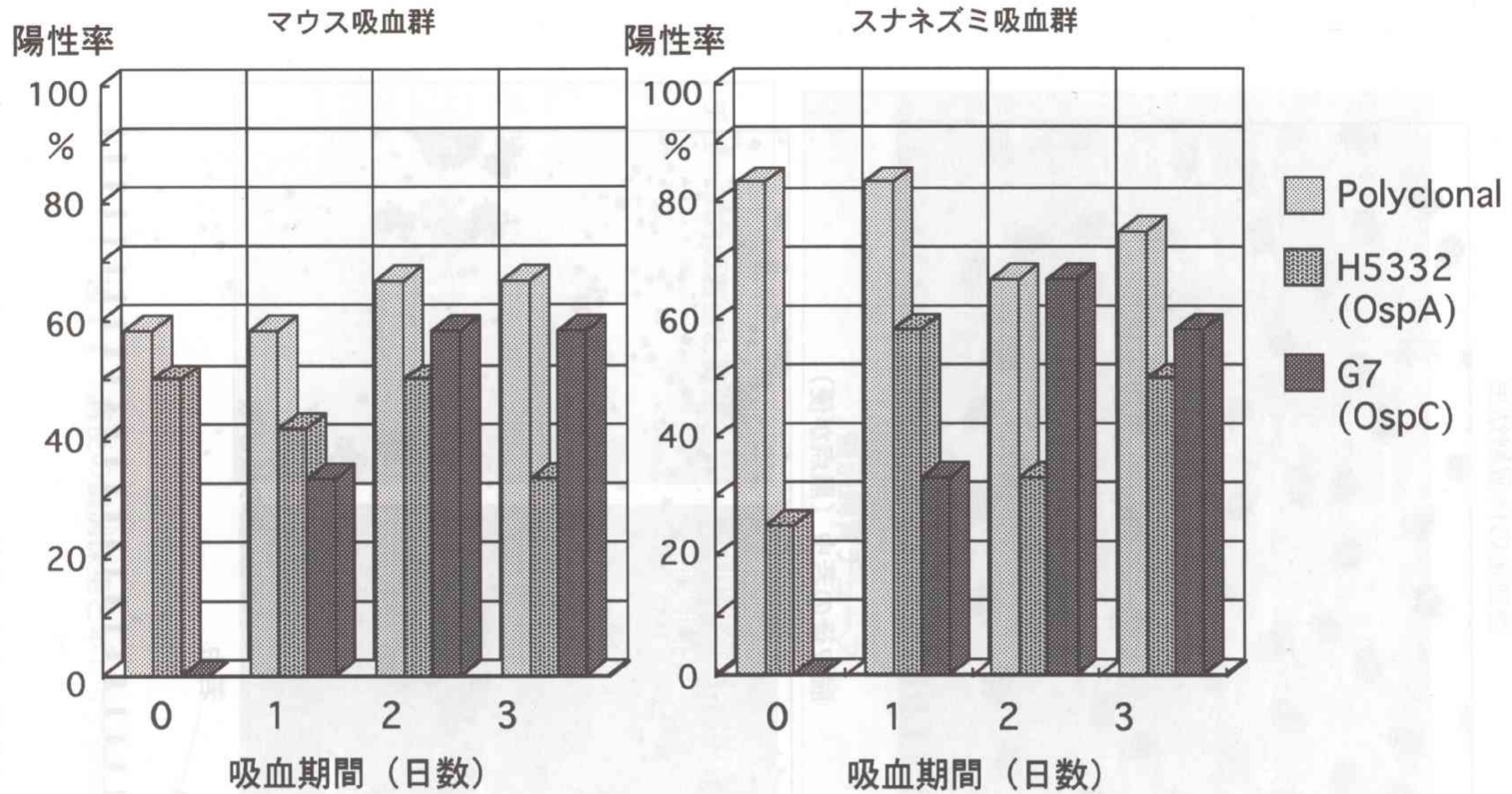
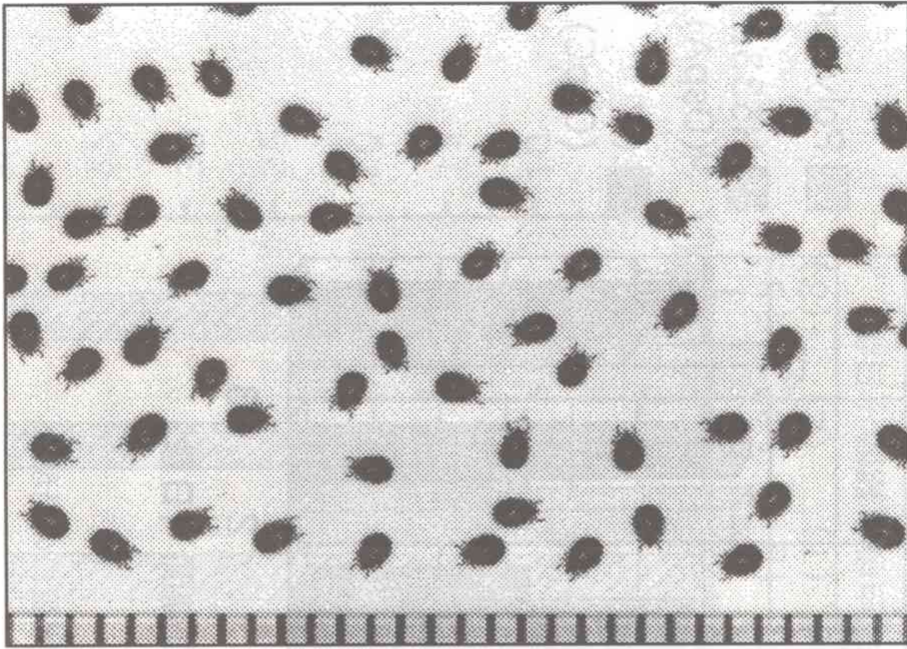


図9 若虫吸血時におけるボレリアの菌体表層蛋白の発現

注) 感染マウスもしくはスナネズミから幼虫時にボレリアを獲得した若虫を再びマウスに吸血させ、1、2、3日後に蛍光抗体法でボレリアの染色性を観察した(12マダニ/日)。

飽血後の休眠期幼虫



脱皮後の若虫（黒点が便）

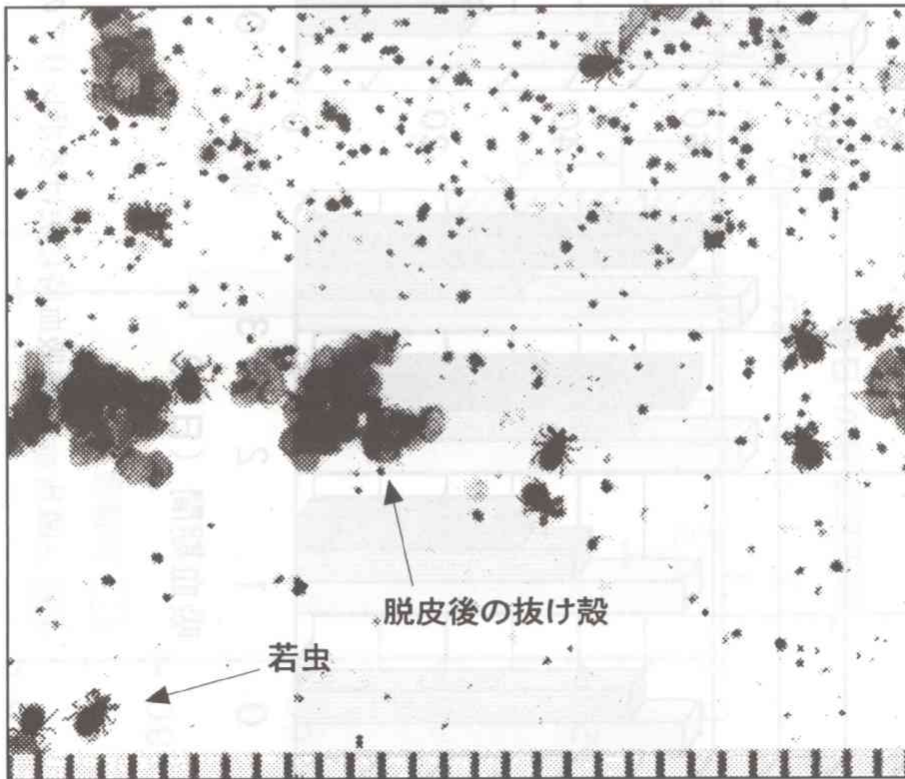


図10 脱皮直後の若虫の排便（スケール1目盛=1mm）

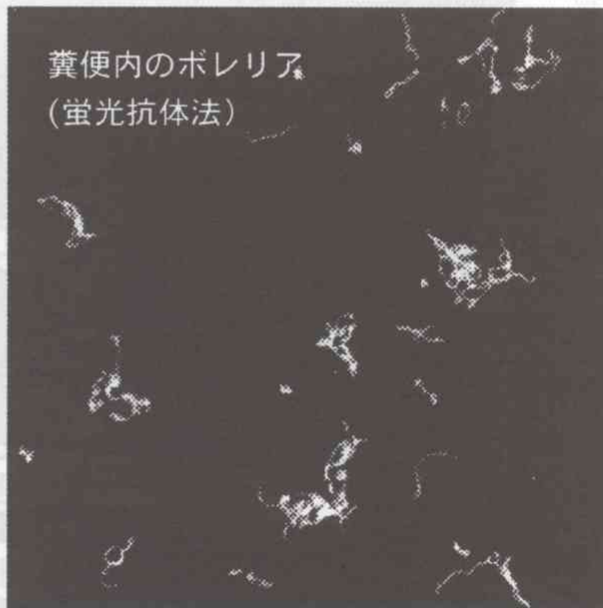
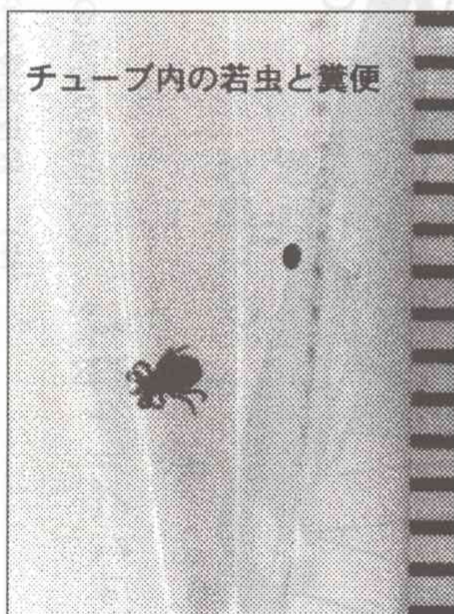
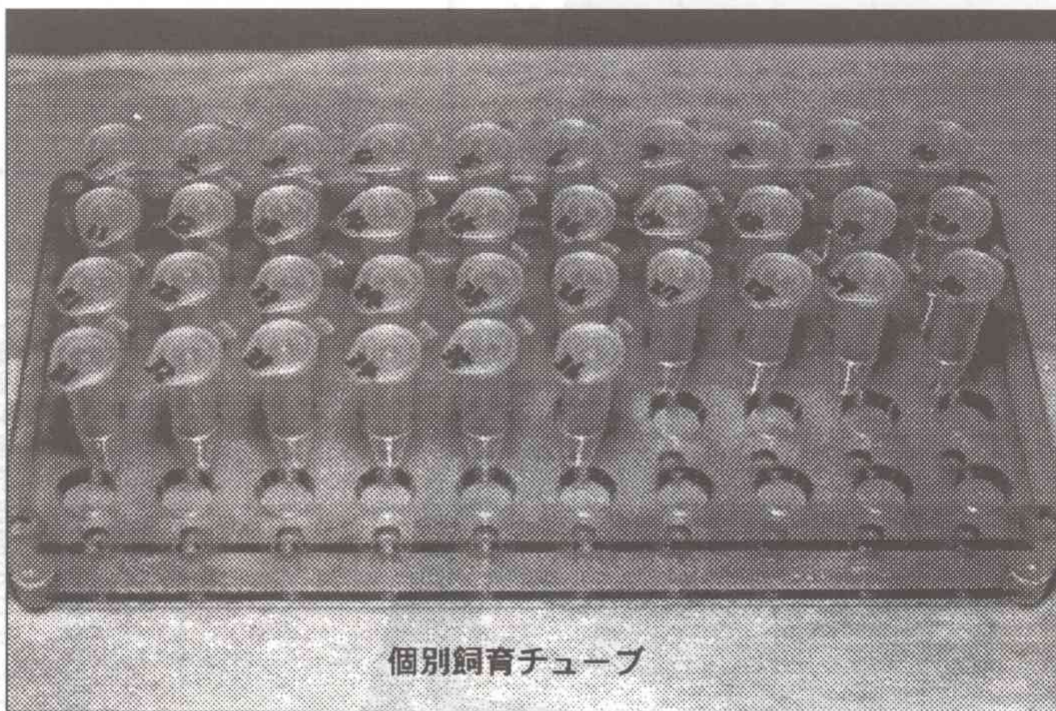


図11 糞便の個別採集とポレリア検出

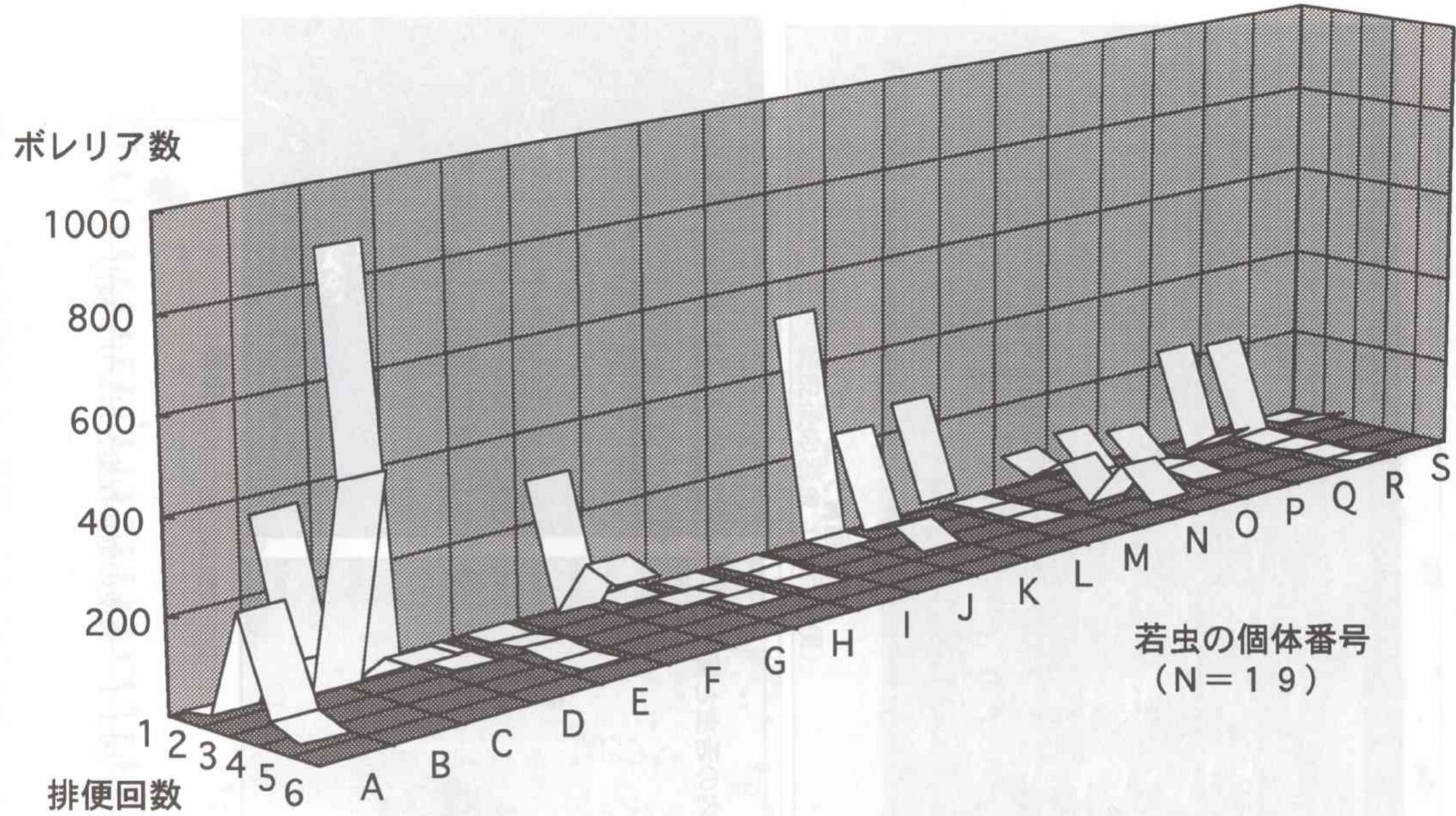


図12 脱皮直後の若虫の糞便の回数と排泄されるボレリア量

注) 脱皮直後から1~2日の間隔で便を採集し、ボレリア数は蛍光抗体法でカウントした。

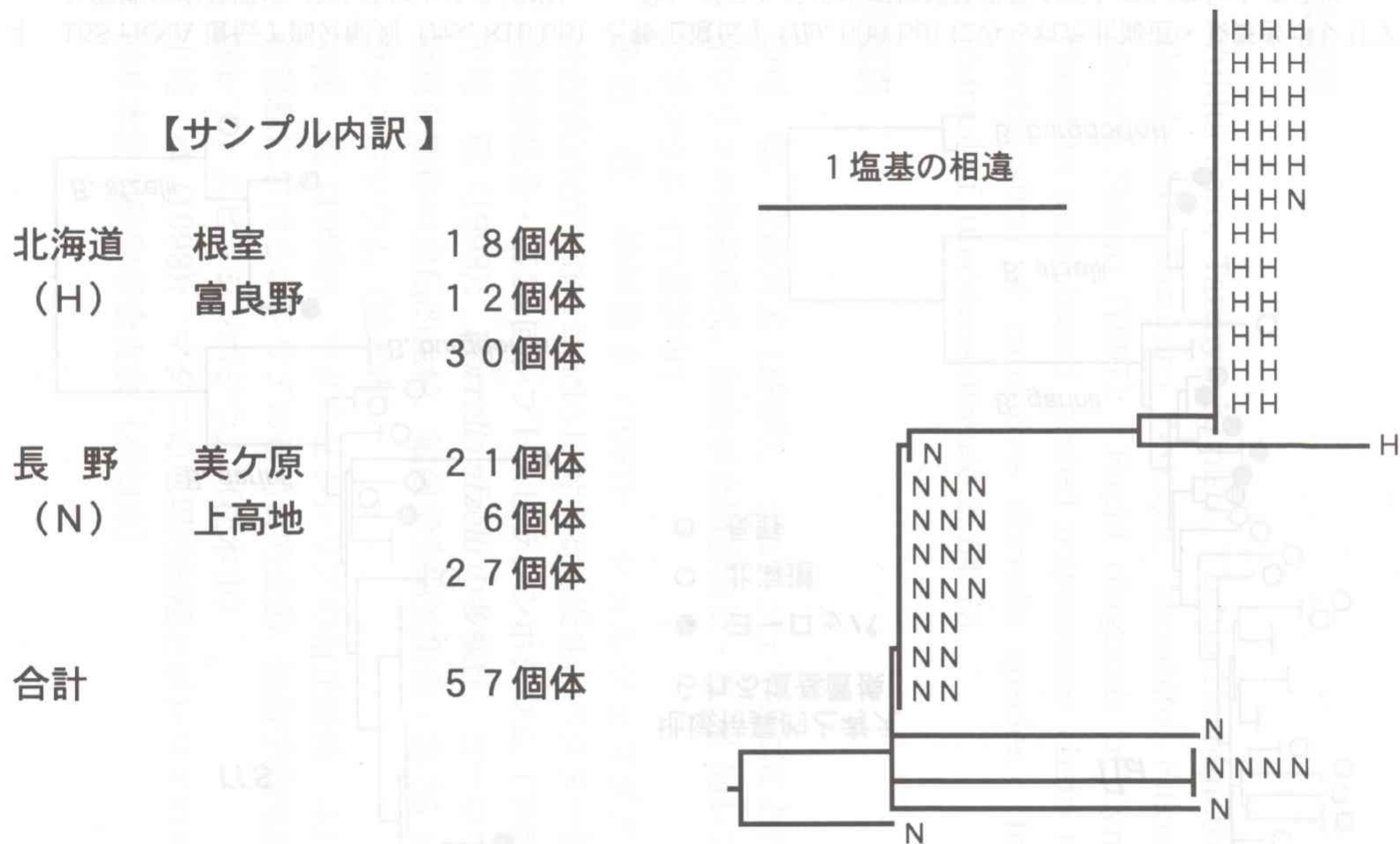


図 1 3 ミトコンドリア 16S rRNA 遺伝子部分配列 (457~459 bp) からみた北海道・長野産シュルツエマダニの相違

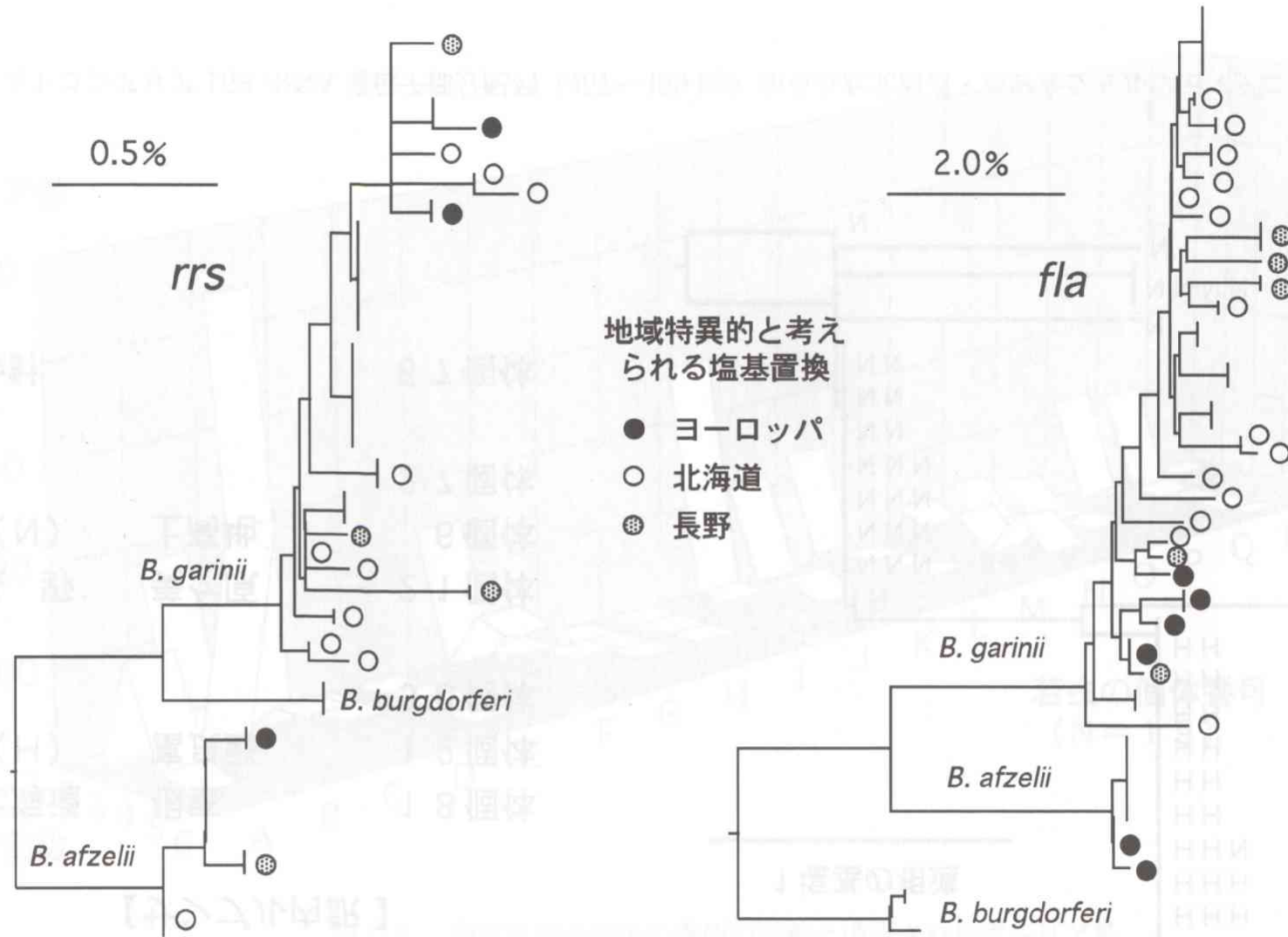


図 1 4 16S rRNA 遺伝子部分配列 (*rrs*, 816 bp) と鞭毛遺伝子 (*fla*, 600 bp) にみられた北海道・長野産ボレリア分離株の塩基置換 (NJ 法による系統樹) 注) プランチの中で地域特異性が示していないところは、北海道と長野で塩基配列が共通であった。

【研究発表】

学会誌等

- 1) Yukita Sato, Tatsuya Konishi, Yoshio Hashimoto, Hidetoshi Takahashi, Kazuhiro Nakaya, Masahito Fukunaga, and Minoru Nakao (1997): Rapid diagnosis of Lyme disease: Flagellin gene-based nested polymerase chain reaction for identification of causative *Borrelia* species. International Journal of Infectious disease 2: 64-73.

口頭発表

- 1) 中尾 稔、佐藤雪太 (1997): シュルツェマダニにおけるライム病ボレリアの伝播様式、細菌学会関連集会・第34回レプトスピラシンポジウム (宇都宮市)
- 2) 中尾 稔、増澤俊幸 (1997): シュルツェマダニの *Borrelia burgdorferi* sensu stricto に対する感受性とベクター能力、細菌学会関連集会・第34回レプトスピラシンポジウム (宇都宮市)
- 3) 中尾 稔 (1998): *Borrelia afzelii* の多様性、ヨーロッパ分離株と極東分離株の遺伝的比較、細菌学会関連集会・第35回レプトスピラシンポジウム (松本市)
- 4) 中尾 稔 (1998): マダニとボレリアの相互関係 4) マダニの発育過程におけるボレリアの量的質的変動、細菌学会関連集会・第35回レプトスピラシンポジウム (松本市)
- 5) 中尾 稔 (1998): マダニの地理的隔離とボレリアの特殊化、第50回日本衛生動物学会大会 (高知市)

注) 本報告書で示した研究成果は、今後、順次、学会誌に英文論文として投稿する予定である。