

学 位 論 文 題 名

Studies on prevalence, transmission and rapid
detection of Lyme disease spirochetes in the Far East

（極東地域におけるライム病ボレリアの分布、伝播および迅速検出法に関する研究）

学位論文内容の要旨

ライム病はボレリア属スピロヘータ *Borrelia burgdorferi*, *B. garinii*, および *B. afzelii* によるマダニ媒介性の人畜共通感染症である。本症は1982年にアメリカ合衆国コネチカット州ライム地方で病原体が確認された新興感染症（Emerging infectious disease）で、現在までに北半球のほとんどの地域で病原体、媒介マダニ、保菌動物、さらに年間数万人に及ぶ感染者が確認されている。日本では1987年に長野で第1例が認められ、これまでに北海道および長野を中心に100例を越す患者が確認されている。

本研究では、日本を含む極東地域におけるライム病ボレリアの分布、媒介マダニにおける病原体の伝播様式、および病原体の迅速検出法について検討した。

I. 極東地域におけるライム病ボレリアの分布

1987年に日本でライム病ボレリアが分離されて以来、中国、韓国および極東ロシアでライム病ボレリアの存在が確認されてきた。日本では、ボレリア、媒介マダニ、保菌動物、および患者の発生と分布について詳細に調べられている。一方、日本を除く極東地域に分布するライム病ボレリア種はまだ十分に明らかにされていない。そこで極東ロシアおよび韓国において、媒介マダニや保菌動物の疫学的調査を行った。

1. 極東ロシアにおけるライム病ボレリアの調査

1995年5月にハバロフスク、ウラジオストックおよびユジノサハリンスクでマダニおよび野生齧歯類を調査した。採取したシュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) のボレリア保有率は平均で26.6%であった。分離された菌のうち、62.2%が *Borrelia garinii*、11.6%が *B. afzelii* と同定された。また、保菌動物はハントウアカネズミ (*Apodemus peninsulae*) およびタイリクヤチネズミ (*Clethrionomys rufocanus*) で、感染率は平均で20.8%、分離菌種は46.9%が *B. garinii* および12.5%が *B. afzelii* と同定された。

2. 韓国におけるライム病ボレリアの調査

1997年5月に韓国・忠州でマダニを調査した。採取したタネガタマダニ (*Ixodes nipponensis*) のボレリア保有率は66.7%であった。分離された菌は81.3%が *B. afzelii*、18.8%が *B. garinii* と同定された。韓国ではタネガタマダニから *B. afzelii* および *B. afzelii* 類似のボレリアが分離されているが、*B. garinii* が分離されたのは今回が初めてである。

II. 自然界におけるボレリアの伝播

ヒトを含む哺乳動物や鳥類は病原体保有マダニが吸血することによりライム病に感染する。また媒介マダニは感染動物を吸血して初めて病原体を受け取る。このような自然界におけるマダニ←→脊椎動物間での双方向のボレリア伝播以外の様式について、日本や極東におけるライム病ボレリアのベクターであるシュルツェマダニを用いて検討した。

1. マダニの再吸血行動とボレリア伝播

マダニが吸血途中で宿主の死亡などにより吸血が継続できなくなった場合を想定して以下の実験を行った。シュルツェマダニ幼虫および若虫のマウスでの吸着期間は3～4日間である。そこで幼虫または若虫を曝露して1・2日後にマウスを殺すと、幼・若虫ともに宿主が死亡して3時間後から離脱が始まり、翌日にはすべての個体が宿主から離脱していた。これら吸血途中マダニを新たなマウスに暴露すると再吸血行動が見られ、飽血個体を飼育すると正常吸血個体と同様に次発育期へ脱皮した。また、ボレリア感染マウスを途中吸血した幼虫が未感染マウスを再吸血する際にボレリアをマウスへ伝達することも確認された。

2. 媒介マダニ間の伝播

ボレリア感染若虫と未感染幼虫を同時にマウスに吸着させ、飽血した幼虫を回収し若虫まで発育させてボレリア伝播の有無を調べた。その結果、若虫と幼虫を一緒に吸血させた群ではボレリアの伝播が起こることを明らかにした。一方、若虫と幼虫をそれぞれ頭皮と背皮に別々に吸血させた群では伝播は見られなかった。

シュルツェマダニではライム病ボレリアが経卵伝播しないため、幼虫は感染している野生齧歯類を吸血して初めて病原体を受け取るが、今回の結果から、宿主の皮膚を介して保菌若虫から未感染幼虫へボレリアが伝播する経路も存在することが明らかとなった。

Ⅲ. ライム病ボレリアの迅速検出と同定法の開発

ライム病の診断は、臨床症状、マダニ刺咬既往歴、血清診断、培養検査などの結果から総合的に判断して行われているが、国際的な診断の基準化はまだ確立されていない。現時点では遊走性紅斑部組織の培養によるボレリア分離がもっとも確実な診断法である。しかし本菌の培養には数週間を要する欠点があり、分離された菌の同定も培養後に行われていたため、迅速な検出および同定法の開発が待たれていた。

そこでボレリア鞭毛遺伝子を標的としたPCR法で感染を判定し、増幅産物の制限酵素切断片長多型 (RFLP) により起因菌種の特定制定も行うことができる迅速なライム病診断法について検討した。

皮膚組織では1回のPCR増幅でシグナルが検出できないため、1回目は鞭毛遺伝子約1,000bp中の800bpを、2回目はさらにその内側の580bpを増幅するNested法を用いた。はじめにボレリアを感染させたマウス皮膚から抽出したDNAを用いてNested PCRを行い、増幅産物のRFLPから起因菌を決定した。また、培養法とPCR法による検出感度の比較も行った。同様に遊走性紅斑の出現でライム病が疑われた患者の生検皮膚組織からの検出も試みた。

その結果、すべての感染マウスから増幅シグナルが得られ、それらのRFLPは感染源のボレリア種と一致した。また培養およびPCRとも検出感度に差異がないことが確認された。臨床例では11例中7例で増幅シグナルが得られ、RFLPからいずれも *Borrelia garinii* に分類された。なお、本法で用いたプライマーセットはすべてのボレリア種をユニバーサルに検出および同定できることが確認されている。また、サンプルのDNA抽出から感染の有無および感染ボレリア種の特定制定までの作業は2日間で終了した。

以上の結果から、日本と極東ロシアでは *Borrelia garinii* が主に分布し、シュルツェマダニが主要なベクターで、アカネズミとヤチネズミが保菌動物である点が類似していること、韓国ではタネガタマダニが *B. afzelii* を高率に保有していることが明らかになった。また脊椎動物・媒介マダニ間でのボレリア伝播以外に、マダニの再吸血行動に伴う伝播やマダ

二間における伝播が起こりうることを示された。さらに、ボレリア鞭毛遺伝子を標的としたPCR-RFLP法が、すべてのライム病ボレリアに対する迅速な検出および同定法として国際的にも応用可能であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	神谷正男
副査	教授	喜田宏
副査	教授	高島郁夫
副査	助教授	奥祐三郎

学位論文題名

Studies on prevalence, transmission and rapid detection of Lyme disease spirochetes in the Far East

(極東地域におけるライム病ボレリアの分布、伝播および迅速検出法に関する研究)

申請者は極東地域におけるライム病ボレリアの分布、媒介マダニにおける病原体の伝播様式、および病原体の迅速検出法について検討した。

1) 1995年5月にハバロフスク、ウラジオストックおよびユジノサハリンスクでマダニおよび野生齧歯類を調査した。採取したシュルツェマダニのボレリア保有率は平均で26.6%、分離菌種の62.2%が*Borrelia garinii*、11.6%が*B. afzelii*であった。保菌動物はハントウアカネズミおよびタイリクヤチネズミで、感染率は20.8%、分離菌種は46.9%が*B. garinii*、12.5%が*B. afzelii*であった。

2) 1997年5月に韓国でマダニを調査した。採取したタネガタマダニのボレリア保有率は66.7%、分離菌種の81.3%が*B. afzelii*、18.8%が*B. garinii*であった。また、タネガタマダニから*B. garinii*が初めて分離された。

3) ボレリア感染マウスに幼虫または若虫を曝露後、飽血する前にマウスを殺すと自然離脱が観察された。これら吸血途中マダニを未感染マウスに曝露すると再吸血行動が見られ、その際にマウスへのボレリア伝播が認められた。

4) ボレリア感染若虫と未感染幼虫を同時にマウスに吸血させ、幼虫へのボレリア伝播の有無を調べた結果、宿主の皮膚を介した保菌若虫から未感染幼虫へのボレリア伝播が認められた。

5) 鞭毛遺伝子を標的としたPCR-RFLPによるボレリアの検出および同定法について検討した。実験感染マウスおよび臨床サンプルいずれを用いても標的配列の増幅シグナルが得られ、RFLP解析から感染源のボレリア種を特定することができた。本法は従来の培養法とも検出感度に差がなく、2日間で結果が得られた。

以上のように、申請者は極東におけるライム病ボレリアの分布および媒介マダニ種など

を明らかにし、マダニの再吸血行動による伝播や媒介マダニ間での伝播が起こりうることを示した。さらにボレリア属全種類を検出し同定することができる迅速な検出系を確立した。これらの知見や検出系は今後のライム病研究の進展に大いに寄与するものと思われる。よって審査員一同は申請者佐藤雪太氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格が十分にあるものと認めた。