

200500657A

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

回帰熱、レプトスピラ等の希少輸入細菌感染症の
実態調査及び迅速診断法の確立に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 増 澤 俊 幸
千葉科学大学・薬学部

平成18年（2006年）3月

目 次

I. 総括研究報告書

- 回帰熱、レプトスピラ等の希少輸入細菌感染症の実態調査及び迅速診断法の
立に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
増澤俊幸（千葉科学大学・薬学部・教授）

II. 分担研究報告書

1. 国内における動物由来スピロヘータ感染症に関する研究・・・・・・・・ 11
川端寛樹（国立感染症研究所・細菌第一部・室長）
2. レプトスピラ抗原 Lig タンパク質免疫によるハムスターでの感染防御誘導に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 25
小泉信夫（国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官）
3. ネズミ類由来レプトスピラ調査(2005年)・・・・・・・・・・・・・・・・ 31
角坂照貴（愛知医科大学・医学部・講師）
4. Real time PCR 法を用いたペスト菌の迅速検出法に関する研究・・・・・・・・ 34
高橋英之（国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官）
5. 国内の *Ixodes* 属マダニが保有する *Anaplasma* 属菌に関する分子疫学的調査・44
大橋典男（静岡県立大学・環境科学研究所・助教授）
6. 国内各地の小型ほ乳類とマダニ類における野兎病菌と紅斑熱群リケッチアの検
索・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 52
藤田博己（大原総合病院附属大原研究所・主任研究員）
7. 塹壕熱・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 64
小林睦生（国立感染症研究所・昆虫医科学部・部長）
8. 日本の港湾区域に生息するネズミのレプトスピラ保有実態調査・・・・・・・・ 71
後藤郁夫（神戸検疫所・輸入食品・検疫検査センター・副統括検査官）
9. 2005 年度野外調査一覧・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 74
10. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・ 76

回帰熱、レプトスピラ等の希少輸入細菌感染症の実態調査 及び迅速診断法の確立に関する研究

主任研究者 増澤俊幸 千葉科学大学・薬学部・教授

研究要旨

1. 野鼠のレプトスピラ保有状況調査を展開し、これまでの未調査であった千葉県、茨城県県境の利根川河川敷、ならびに山間部の農地での野鼠の捕獲とレプトスピラの分離を行った。野鼠 40 匹中 2 匹 (2.5%) のアカネズミからレプトスピラを分離し、*Leptospira interrogans* serovar Autumnalis と同定した。これら野鼠は千葉県銚子市利根川河川敷で捕獲されており、これら周辺地域ではレプトスピラ症への注意が必要である。

2. 輸入げっ歯類のレプトスピラ保有実態の解明のために、動物を買い上げで調査した。その過程で動物輸入業者で、動物の飼育を担当した従業員 2 名からレプトスピラ症を疑う症例を見出した。血清学的、遺伝学的診断によりレプトスピラ症と診断した。2 例目の患者からの分離株は *L. interrogans* serovar Grippotyphosa と同定した。本血清型は国内では沖縄で患者が報告されるが、本土では保有体も含めてその存在は知られていないことから、輸入動物からの感染が予想された。この業者より買い上げで 8 種 86 匹の動物のレプトスピラ保有状況を調べていた。このうちアメリカモモンガ 10 匹中 5 匹の腎臓からレプトスピラの分離、同じく膀胱から PCR によるレプトスピラ鞭毛遺伝子の検出に成功した。分離株の遺伝学的、血清学的性解析、ならびに増幅産物の塩基配列解析から *L. interrogans* serovar Grippotyphosa と同定した。また、患者分離株とアメリカモモンガ分離株の鞭毛遺伝子、DNA ジャイレース B サブユニット遺伝子配列、ならびに全ゲノムの制限酵素断片長多型性解析パターンは同一であったことから、アメリカモモンガが感染源であることを強く示唆した。通常、レプトスピラ症は環境水、土壌などが感染源となることが多く感染源の特定に至ることは希である。輸入事例で感染源が特定できた事例はこれまで知られていない。本事例は、輸入動物を介した感染症の侵入があったことを示す特異で貴重な事例となった。

研究分担者

川端寛樹 国立感染症研究所・細菌部・室長

小泉信夫 国立感染症研究所・細菌部・主任研究官

角坂照貴 愛知医科大学・講師

高橋英之 国立感染症研究所・細菌部・主任研究官

大橋典男 静岡県立大学・環境科学研究所・助教授

藤田博己 大原総合病院附属大原研究所・主任研究員

小林睦生 国立感染症研究所・昆虫医科学部・部長

後藤郁夫 神戸検疫所・副統括検査官

研究協力者

岡本能弘(千葉科学大学・薬学部・助教授)、宇根有美(麻布大学・獣医学部・助教授)、吉川泰弘(東京大学大学院・農学研究科・教授)、太田周司(東京検疫所川崎支所・所長)、御供田睦代、蔵元強(鹿児島県環境保健センター)、本田俊郎(鹿児島県出水保健所)、田原研司、保科健(島根県保健環境科学研究所)、板垣朝夫(元島根県保健環境科学研究所)、溝口二郎(山形県衛生研究所)、高田伸弘、矢野泰弘(福井大学医学部)、高野愛、丸山総一、佐藤雪太、野上貞雄(日本大学生物資源科学部)木村浩一、伊東拓也(北海道衛生研究所)、新田芳樹(沖縄県家畜衛生試験場)、齋藤幹(東京大学医学部)、宮本健司(元旭川医科大学)、古田康(北海道大学医学部)、馬原文彦(馬原医院)、高橋守(川越高校)、鶴見みや古、佐藤文男、仲村昇(山階鳥類研究所)、岸本寿男、安藤秀二(国立感染症研究所・ウイルス一部)、阿部賢治(国立感染症研究所・感染病理)、山本正吾(宮崎県衛生研究所)、斉藤あつ子(神戸大学医学部)、福長将仁、牛島陽子(福山大学薬学部)、名古屋生活衛生センター、西宮市環境局環境衛生課(分担研究者 角坂照貴報告書参照)、全国の検疫所の協力者(分担研究者 後藤郁夫報告書参照)

目的

本研究班ではげっ歯類やマダニ等の動物媒介性感染症、具体的にはレプトスピラ症、回帰熱、ライム病、野兎病、ペスト、エーリキア症、壱塚熱などのバルトネラ感染症を包括的調査対象としている。本報告書では、主任者が担当したレプトスピラの調査研究結果について、中心に以下に述べる。

レプトスピラに関しては平成12～14年度に本研究課題にて、日本の現状を調査し、過去の調査からは全く予想しない血清型レプトスピラを見いだした。これらは海外から輸入された可能性もあるが、培養システム等の改良により新たに発見された可能性も考えられる。しかしながら、世界で分離された250あまりのレプトスピラ血清型基準株のコレクションを日本国内のいかなる施設も保有しない現状では、その血清型同定は困難を極めていた。そこで、前年度までにオランダ王立熱帯病研究所(レプトスピラ WHO コラボレーションセンター)で保存されるレプトスピラ分離株を入手し、DNA ジャイレースB サブユニット遺伝子(*gyrB*)配列のデータベースを完成した。本年はそのデータベースを用いて、野外分離株の血清型推定への応用を検討した。また、輸入動物を介したレプトスピラ症の発生を経験し、その感染源の特定に至った。

研究課題1 野鼠のレプトスピラ保有調査

A 研究目的

前年度までに全国北は北海道から南は沖縄に至る地域において野生齧歯類を捕獲し、レプトスピラの保有率を調査してきた。最終年度の本年度は、日本全国の野鼠の保有率調査を完結すべく、未調査地域を選び調査を行った。

B 研究方法

1 レプトスピラ保有野鼠の捕獲

千葉県、並びに茨城県の利根川流域周辺(銚子市塚本町利根川河川敷、銚子市宮原町利根川河川敷、旭市飯岡町塙田畑、東庄町小南東庄県民の森付近田畑、茨城県神栖市正福寺付近利根川河川敷、銚子市親田町付近田畑、銚子市川口町ウオッセ裏、同川口漁港)の野鼠のレプトスピラ保有調査を行った。捕獲野鼠からは、腎臓、脾臓、血液を採取し、この研究班の分担者に配布し、それぞれの病原体の検査に使用した。レプトスピラの分離には、野鼠の腎臓乳剤を2.5%非働化ウサギ血清を含むEMJH培地に接種し、30℃にて1～3カ月間培養した。この間1カ月ごとに暗視野顕微鏡で菌の増殖の有無を調べた。

2 gyrB 遺伝子配列解析

gyrB に特異的なプライマーUP1TL、UP2rTLを用い、94°Cで5分間前熱変性、さらに熱変性94°Cで30秒、アニーリング反応45°Cで1分間、伸長反応72°Cで90秒間、45サイクル繰り返し、最後に最終伸長反応を72°Cで10分間行った。PCR増幅産物をMontage™ PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore)を用いて精製し、これを鋳型として、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いてサイクルシーケンス反応を行った。シーケンス解析には、ポリマーはABI Prism POP-7™ (Applied Biosystems)、80cmのキャピラリーを用いABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems)により解析した。得られた配列をレプトスピラ基準株192株、およびこれまで国内で分離されたレプトスピラの配列と比較した。

C 研究結果と考察

表1にこの野鼠の腎臓培養の結果を示した。ドブネズミ、アカネズミ、ジネズミ計40匹中、アカネズミ2匹からレプトスピラが分離された(保有率5%)。いずれも千葉県側の利根川河川敷で捕獲されたアカネズミから分離され、gyrB解析より*L. interrogans*血清型Autumnalisと推定された(図1)。今回、銚子市川口

表1 利根川周辺地域の野鼠のレプトスピラ保有調査

捕獲数	アカネズミ			ジネズミ			ドブネズミ			計
	オス	メス	計	オス	メス	計	オス	メス	計	
千葉県	18(1)	18(1)	34(2)	0	1	1	1	1	2	37(2)
茨城県	2	1	3	0	0	0	0	0	0	3
計	2	1	3	0	1	1	1	1	2	40

括弧内はレプトスピラ保有数

漁港、銚子漁港にも罟を仕掛けたが、全く捕獲できなかった。最近の漁港はかなり衛生に注意して、野鼠の生息を封じ込めていることが伺えた。一方、漁港よりわずかに離れたウオッセ(観光土産販売所)近辺ではドブネズミが捕獲されたが、レプトスピラは検出なかった(その他の地域の野鼠捕獲調査結果については、研究分担者 川端、角坂、後藤の報告書参

照)。

研究課題2 輸入動物(アメリカモモンガ)に起因するレプトスピラ症感染事例の診断と感染源の特定

A 研究目的

レプトスピラ症は野生齧歯類等を保有体とするスピロヘータ感染症であり、感染症法上第4類に指定されている。レプトスピラは保菌動物腎臓に長期にわたり定着し、尿中に排出される。排出されたレプトスピラはヒトや動物に経皮あるいは経粘膜感染する。わが国には、家畜、ペット、実験動物及び展示動物などの多種多様な動物が、世界各国から輸入されている。これまで、イヌは狂犬病ウイルス、アフリカ産サルはエボラなどのウイルス性出血熱ウイルス、コウモリはニッパウイルスなど狂犬病関連ウイルス、マストミスはラッサ熱ウイルス、プレーリードッグはペスト菌、並びに野兔病菌の保有体であることが明らかであることから、国内への侵入を防ぐために、検疫措置や輸入禁止措置が執られてきた。一方、その他のほ乳類、鳥類、爬虫類などは何の検疫もなく国内に輸入されてきた。平成13年から15年にかけて輸入統計品目表が改正され、詳細な動物の輸入状況が把握できるようになり、この統計によると、平成14年げっ歯類は752,185匹輸入されていることがわかった。そのうちハムスター(678,793匹)やフェレット(27,418匹)は繁殖された動物だが、リス(57,540匹)やその他のげっ歯類(51,373匹)の多くは捕獲した野生動物と考えられる。その他、鳥類や爬虫類など、このような野生動物が十分な安全性を評価、確認されないまま日本に輸入され、愛玩用として販売されていた(2005年9月より、輸入動物に対する衛生証明書の提出が義務化)。輸入動物を介した感染症の海外からの侵入が危惧されていたが、今回、アメリカより輸入されたアメリカモモンガに起因するレプトスピラ症の発生を経験し、患者診断だけでなく、感染源の特定と分離レプトスピラの性状解析をおこなった。

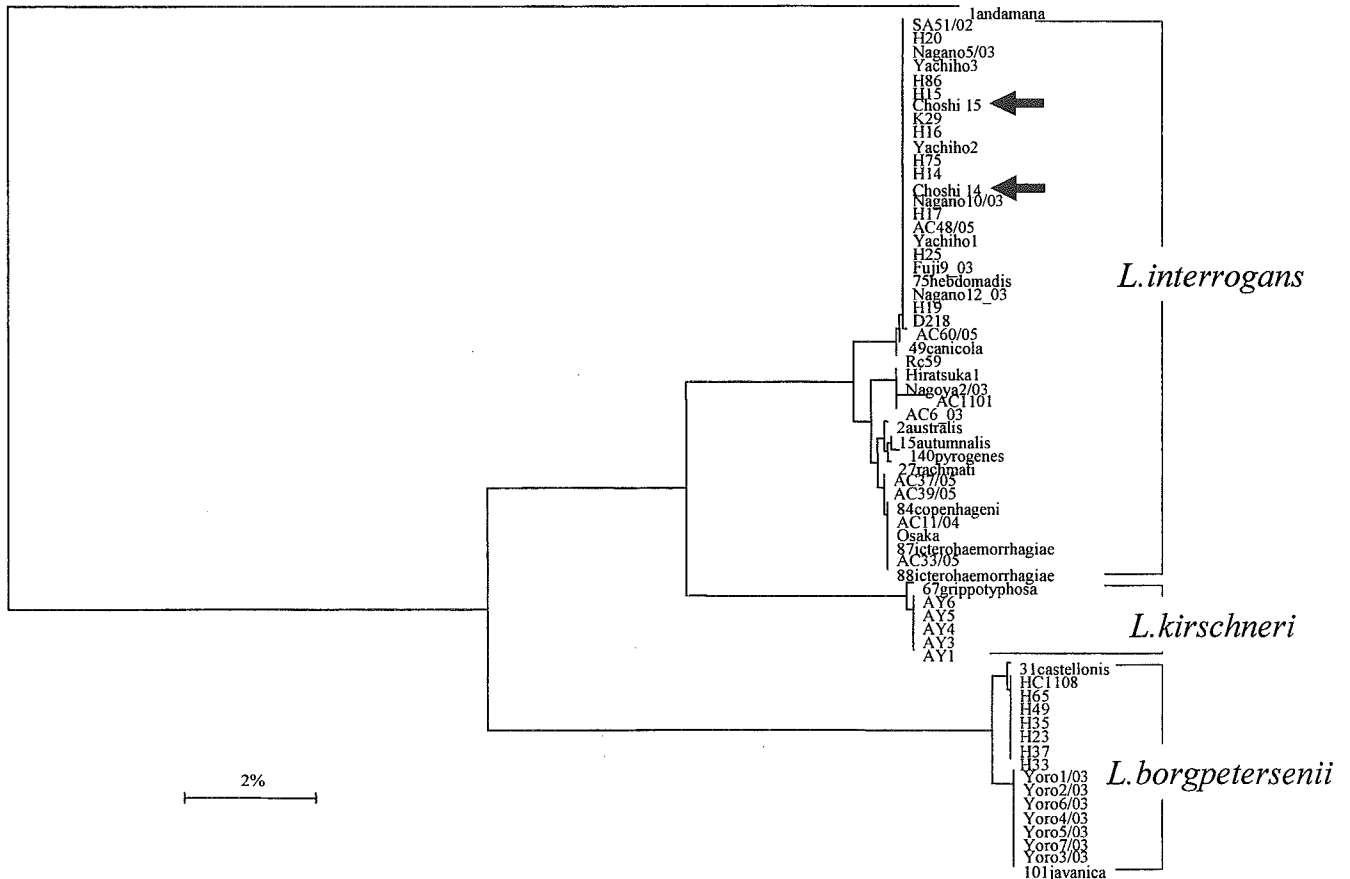


図1 千葉県、並びに茨城県利根川流域の野鼠由来レプトスピラ分離株の GyrB 系統解析

B 研究方法

1 レプトスピラの分離

患者全血、並びに血清は竹内隆浩医師(静岡済生会総合病院)、並びに塚越敬子医師(静岡済生会総合病院)より提供を受けた。げっ歯類の腎臓及び膀胱は宇根有美助教授(麻布大学獣医学部)より分与を受けた。この患者全血を1~10 μLを、齧歯類の腎臓は注射器を用いて乳剤とした後、非働化ウサギ血清 2.5%を添加した EMJH 培地中に接種し 30°Cで3ヵ月間培養した。その間 1 週間ごとに暗視野顕微鏡でレプトスピラの増殖の有無を確認した。

2 血清診断

患者、並びに輸入げっ歯類の血清診断は顕微鏡凝集試験(microscopic agglutination test; MAT)により行った。さらには確認のためにマイクロカプセル凝集試験(MCAT、日本凍結乾燥)、並びにDipstickキット

(PanBio)により確認を行った。

3 鞭毛遺伝子 (flaB) の PCR

QIAamp DNA mini kit (キアゲン)、または QuickGene-800DNA 抽出機(フジフィルム)を用いて

表2. gyrB and flaB 遺伝子PCR及び配列解析に使用したプライマー

Primer	Sequence (5'-3')	Position	Origin
UP1TL	CAYGCNGGNAARTTYGA	301-320	Ictero No. 1
UP2rTL	TCNACRTCNGCRCTCNGCTAT	1520-1502	Ictero No. 1
LgyrF	GGTCTTCCGGAGAAGATG	940-958	Ictero No. 1
LgyrF4	AAAGAAAAATTAGTGAACGC	1024-1043	Ictero No. 1
LgyrR	GAATTGAATTGAGGTTGAGG	1016-997	Ictero No. 1
LgyrR3	TTMCCNGGAAGVCCDCCHCC	1232-1213	Ictero No. 1
L-flaB-F1	CTCACCGTCTCTAAAGTTCAAC	35-57	Akiyami A
L-flaB-F2	TGTGCACAAGACGATGAAAGC	66-86	Akiyami A
FlaB-710F	GAATCTAGAATTCCGACGCCG	730-709	Akiyami A
L-flaB-R1	TGAATTCGGTTTCATATTTGCC	825-804	Akiyami A
L-flaB-R2	AACATTGCCGTACCACCTCTG	797-778	Akiyami A

(M= A or C, R=A or G, Y=C or T, V=A or C or G, N=A or C or G or T)

患者血清遠心沈渣、または全血、動物の膀胱組織および分離レプトスピラ株より PCR 用鋳型 DNA を調製した。これを PCR 試料とした。First PCR には、表 2 に示した L-flaB-F1 と L-flaB-R1 を用いた。PCR は熱変性 94°C で 30 秒、アニーリング反応 62°C で 30 秒間、伸長反応 72°C で 1 分間のサイクルを 40 サイクル繰り返し、最後に最終伸長反応を 72°C で 10 分間行った。nested PCR は first PCR 産物を鋳型とし、プライマー L-flaB-F2 と L-flaB-R2 のセット、または FlaB-710F と L-flaB-R2 のセットを用いて行った。PCR 反応は、94°C で 3 分間前熱変性を行った。さらに、熱変性 94°C で 15 秒、アニーリング反応 60°C で 30 秒間、伸長反応 72°C で 60 秒、または 15 秒間のサイクルを 30 サイクル繰り返し、最後に最終伸長反応を 72°C で 10 分間行った。前述 *gyrB* 配列解析と同様に増幅産物のシークエンス解析を行い、産物配列の確認と遺伝種の同定を行った。

4 *gyrB* のシークエンス解析

前述の方法で解析を行った。得られた配列をレプトスピラ基準株 192 株、およびこれまで国内で分離されたレプトスピラの配列と比較した。

5 パルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) による制限酵素長鎖断片長パターン (large restriction fragment pattern, LRFP) 解析

レプトスピラ培養液を遠心集菌し、1%低融点アガロース (InCert agarose, Bio-Rad) と混合し 4°C、30 分固化させた。EDTA-Sarkosyl 溶液中で、Proteinase K によりタンパク質を 50°C、1 晩消化した。ゲルプラグを 1×H buffer 150μL 中で 1 時間平衡化した後、15U の *Not I* 溶液中で 37°C、1 晩消化した。1.2%アガロースゲル (Pulsed Field Certified Agarose, Bio-Rad) にブロックをセットし、パルスフィールドゲル電気泳動装置 Gene Navigator System (Pharmacia) を用いて、200V、パルスタイム 10 秒で 5 時間、30 秒で 12 時間、60 秒で 7 時間の計 24 時間泳動した。泳動後、ゲルを

SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stains (Takara) で 1 時間染色後、長波長紫外線照射バンドの検出を行った。

C 研究結果と考察

1 患者症例

静岡市の動物輸入販売に携わる従業員 2 名 (29 歳男性、28 歳男性) が、発熱、腰痛及び倦怠感、さらには結膜黄疽、充血、乏尿、血尿を呈し静岡済生会総合病院を受診した。一例目の患者は 2005 年 4 月 22 日に、二例目は同年 6 月 1 日に発病した。臨床経過並びに動物との接触があったことから、レプトスピラ症を疑いストレプトマイシン 2g/日筋注による治療を行った。それぞれ約 1 週間の治療で回復し、退院となった。

2 診断

厚生労働科学研究費新興・再興感染症研究事業「輸入動物に由来する新興感染症侵入防止対策に対する研究」研究班 (主任研究者 吉川泰弘教授) の研究の一環として、この輸入業者より動物を買い上げ各種病原体の保有調査を実施して、その中でレプトスピラについても検索を行っていた。この輸入業者より買い上げた動物 8 種 (計 86 匹) のうち、アメリカモモンガ (*Glaucomys volans*) の腎臓培養では 10 匹中 5 匹よりレプトスピラの増殖を確認した。その他の試験した

表3 輸入動物からのレプトスピラの検出

輸入動物	腎臓培養	膀胱PCR
カイロトゲマウス	0/9	0/9
ハウスマウス (分類不明)	0/4	0/4
キンイロスパイニーマウス	0/13	0/13
アレチネズミ	0/9	0/9
デブスナネズミ	0/11	0/11
アメリカモモンガ	5/10	5/10
デグー (別業者より)	0/9	2/9
ピグミージェルボア	0/20	0/20
シマリス	0/10	0/10

輸入動物からは検出しなかった(表 3)。感染源としてアメリカモモンガを疑った。1 例目患者では、患者感染初期血清について *flaB* を標的とした PCR でレプトスピラ抗原陽性、さらにはアメリカモモンガ由来レプトスピラ分離株を抗原とする MAT では、受診時の血清抗体は陰性であったが、回復期血清は 800 倍の抗体価を示した(表 4)。2 例目患者では全血培養よりレプトス

ピラの分離に成功し、さらには全血 PCR により *flaB* の増幅を確認した。血清学的検査でも回復期血清は 200 倍希釈でアメリカモモンガ由来株に対して陽性反応を示した(表 4)。市販のレプトスピラ症診断キット MCAT、並びに Dipstic テストでもいずれも回復期血清では、陽性の診断結果が得られた。

表4 顕微鏡凝集試験(MAT)による患者血清診断結果

種名	抗 原		採血日	
	血清型	株	凝集抗体価	
1例目			4/24	5/9
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa?	AM1	<50	800
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa?	AM3	<50	800
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Moskva V	<50	100
2例目			6/2	6/15
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa?	AM3	<50	200
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Moskva V	<50	200

3 分離株の性状比較・鑑別・同定

2 例目の患者の全血より複数の培養を調製し、分離株を得た。代表的患者分離株 3 株、並びにアメリカモモンガ由来の 5 株は *flaB*、*gyrB* 配列解析(図 2)、および RFLP 解析(図 3)、各種血清型特異的ウサギ抗血清を用いた交差凝集試験(表 5)においても同一であることを確認した。同じ動物の膀胱凍結試料からも *flaB*-PCR により増幅産物を検出し、その配列は患者臨床材料、並びに患者分離株、アメリカモモンガ腎臓

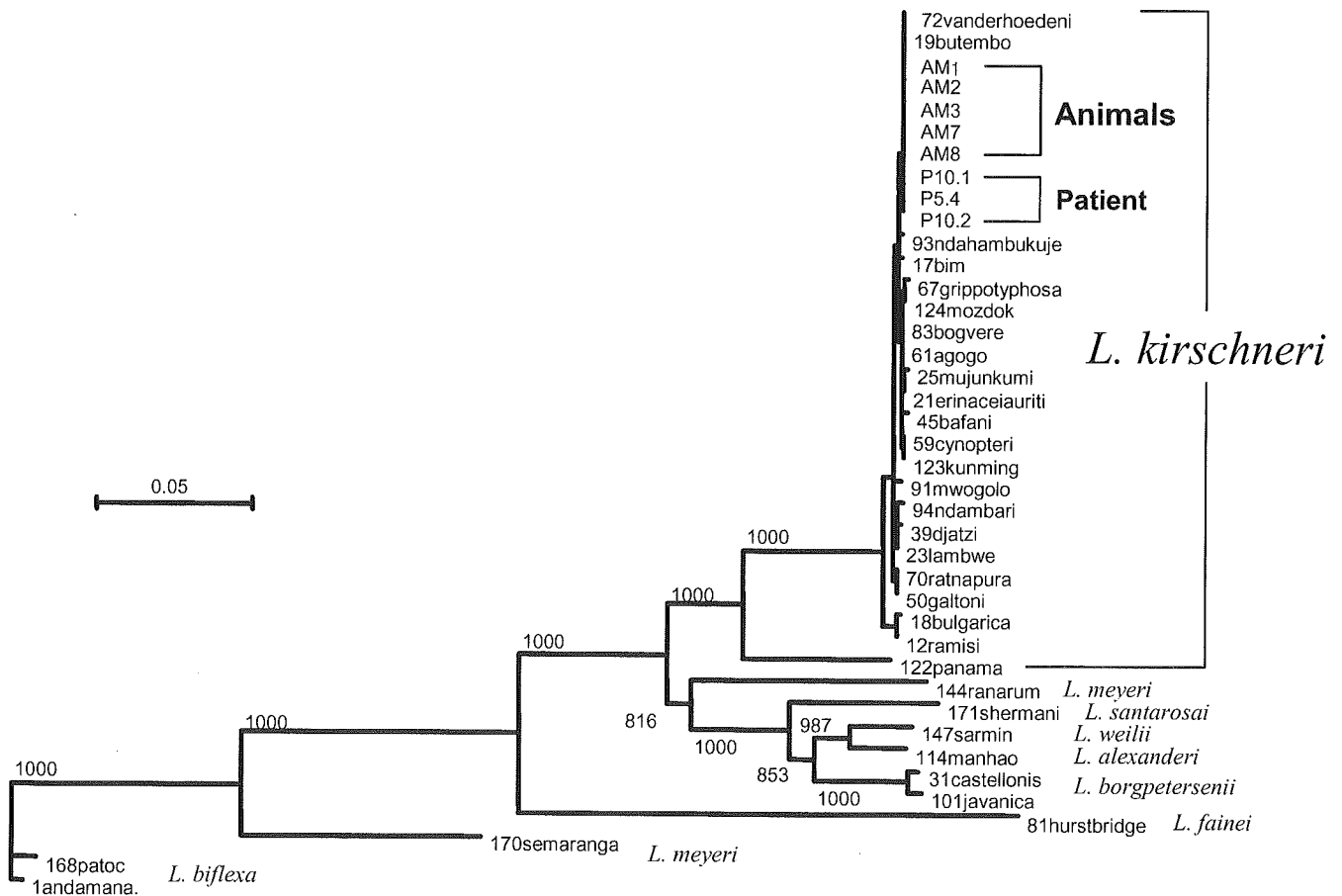


図2 *gyrB* 塩基配列解析に基づく患者、アメリカモモンガ分離株の遺伝種同定

分離株と完全に一致し、アメリカモモンガを介したレプトスピラ感染事例であったことを証明した。分離株は *Leptospira kirschneri* serovar (血清型) Grippytyphosa と同定した。この血清型は米国においては、イヌ、家畜、ヒトのレプトスピラ病起因血清型としてありふれた型である。偶然沖縄にも存在する血清型であったために、我々は免疫抗血清を保有してい

まで至る事例はきわめて希で、輸入動物を介した病原体侵入のリスクを評価する目的で調査を実施していたことが、この事例の全容を解明できた主因であると考えている。

D. 今後の展開

平成14年度財務省貿易統計によれば年間190万頭

以上もの動物が輸入され、齧歯類は75万頭を超えるという。日本は世界最大の動物輸入国でありながら、一方、エキゾチックアニマルの感染症対策におけるリスク評価は十分になされていなかった。各種輸入齧歯類のレプトスピラ保有状況の調査を実施し、その過程でアメリカモモンガを起源とするヒトレプトスピラ感染事例に遭遇した。輸

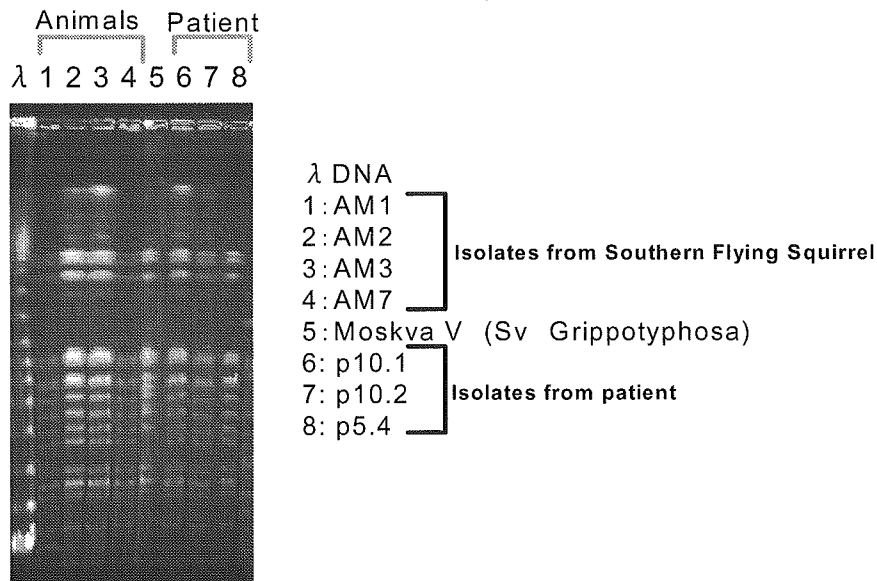


図3 患者、モモンガ分離株のゲノムDNAのRFLP解析

表5 交差凝集試験による患者、アメリカモモンガ分離株の血清型同定

Antisera	アメリカモモンガ分離株					患者分離株		
	AM1	AM2	AM3	AM4	AM7	p5.4	p10.1	p10.2
α-Grippytyphosa	6400	6400	6400	6400	6400	6400	3200	3200
α-Icterohaemorrhagiase	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
α-Copenhageni	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
α-Autumnalis	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
α-Hebdomadis	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
α-Australis	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
α-Javanica	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
α-Castellonis	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100

た。このような幸運が重なり血清型の同定に成功した。我々は過去にも輸入動物のアフリカヤマネがレプトスピラを保有している事実を明らかにしてきたが、今回輸入動物を介したヒトへの感染事例を経験すると共に、その感染源の特定に成功した。感染源の特定に

入動物を介した感染症の侵入が危惧されていたが、それが現実のものとなった。厚生労働省では、輸入動物を介した病原体の侵入を水際で抑えるために、2005年9月よりすべての輸入動物に対して衛生証明書の添付を義務づけた。煩雑な輸入手続きが増えた

にもかかわらず、昨年同期よりも輸入動物数はむしろ増加しているという(麻布大学 宇根有美先生 私信)。先の米国産牛肉輸入再開後にBSE危険部位を含む牛肉の輸入を摘発できたように、輸入動物に関しても適正に手続きが実施されているかを監視していく必要があると考える。

F 研究発表

発表論文

原著論文

1. Toshiyuki Masuzawa, Igor G. Kharitonov , Teruki Kadosaka, Naoya Hashimoto, Midori Kudeken, Nobuhiro Takada, Kazuhide Kaneda, and Yasuyuki Imai: Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated in Moscow province -a sympatric region for *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus*. *Int. J. Medical. Microbiol.* 26, 455-464 (2005)
2. Ece Güner, Mutsumi Watanabe, Teruki Kadosaka, Erdal Polat, Aysen Gargili, Aynur Gulanber, Norio Ohashi, Yasuyuki Imai, Kazuhide Kaneda, and Toshiyuki Masuzawa.: Seroepidemiology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in wild mice captured in Northern Turkey. *Epidemiol. Infect.* 133, 331-336 (2005)
3. Fubito Ishiguro, Nobuhiro Takada, Toshiyuki Masuzawa.: Molecular evidence of the dispersal of Lyme disease *Borrelia* from the Asian continent to Japan via migratory birds. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 58, 184-186 (2005)
4. Norio Ohashi, Megumi Inayoshi, Kayoko Kitamura, Fumihiko Kawamori, Daizoh Kawaguchi, Yuusaku Nishimura, Hirotaka Naitou, Midori Hiroi and Toshiyuki Masuzawa. : *Anaplasma phagocytophilum*-infected ticks, *Japan. Emerg. Infect. Dis.*, 11, 1780-1783 (2005)

5. Hirotaka Naitou, Daizoh Kawaguchi, Yuusaku Nishimura, Megumi Inayoshi, Fumihiko Kawamori, Toshiyuki Masuzawa, Midori Hiroi, Hideaki Kurashige, Hiroki Kawabata, Hiromi Fujita, and Norio Ohashi :Molecular identification and characterization of *Ehrlichia* species and '*candidatus* Neoehrlichia mikurensis' from ticks and wild rodents in Shizuoka and Nagano prefecture. *Microbiol. Immunol.* , 50, 45-51 (2006)

総説

増澤俊幸: 特集 これだけは知っておきたい国際感染症・ライム病・回帰熱. モダンフィジシャン 25, pp. 600-604 (2005)

学会発表

1. 増澤俊幸:新規ワクチン抗原の探索を目的としたライム病ボレリア発現プロテオーム解析と Oms28 発現に及ぼす温度の影響 2004US フォーラム 2005年3月2日(抄録 p.31)
2. 井上快、丸山総一、山田直樹、壁谷英則、佐藤雪太、湯川真嘉、大橋典男、増澤俊幸、川森文彦、角坂照貴、高田伸弘、藤田博己、小泉信夫、川端寛樹:日本の野鼠に分布する *Bartonella* 属菌と同定法の開発 第139回日本獣医学会(和光市) 2005年3月29日(抄録 p.186)
3. 増澤俊幸、野田ヶ谷汐里、久留戸涼子、樋坂光明、野沢龍嗣、今井康之:イヌ尿中からのレプトスピラ迅速検出法の開発 (東京)第42回レプトスピラシンポジウム 2005年4月3日(抄録番号2)
4. 山下昭広、村松芳貴、川森文彦、角坂照貴、榊原省司、増澤俊幸:静岡県内における犬のレプトスピラの保有状況について (東京) 第42回レプトスピラシンポジウム 2005年4月3日(抄録番号3)
5. 神村卓也、渡邊むつみ、今井康之、内藤博敬、

- 大橋典男、増澤俊幸:ライム病ボレリアのポーリンタンパク質 Oms28 の発現変動解析 (東京) 第 42 回 レプトスピラシンポジウム 2005 年 4 月 3 日(抄録番号 8)
6. 北邑かよ子、Zorana Orescanin、大橋典男、今井康之、Marija Milutinovic、増澤俊幸:セルビアモンテネグロと日本由来マダニからの p44 遺伝子をターゲットとした *Anaplasma phagocytophilum* の検出及びその性状解析 (東京) 第 42 回 レプトスピラシンポジウム 2005 年 4 月 3 日(抄録番号 9)
 7. 大橋典男、西村祐作、内藤博敬、丸山総一、壁谷英則、川森文彦、稲吉恵、増澤俊幸:日本国内の野鼠が保有する *Bartonella* 属菌の分類学的解析 第 78 回日本細菌会総会(東京)2005 年 4 月 4 日(抄録 p. 63)
 8. 内藤博敬、川口大蔵、大橋典男、稲吉恵、川森文彦、増澤俊幸:野鼠が保有する *Ehrlichia* 属菌および '*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis' に関する分子疫学的解析 第 78 回日本細菌会総会(東京)2005 年 4 月 4 日(抄録 p.64)
 9. 久留戸涼子、野澤龍嗣、増澤俊幸:病原菌レプトスピラの保有動物尿からの迅速定量検出法の開発 第 78 回日本細菌会総会(東京)2005 年 4 月 5 日(抄録 p. 174)
 10. Ece Sen, Toshiyuki Masuzawa, and Teruki Kadosaka. :*Borrelia burgdorferi* found in Turkey and Moscow, Russia on the border of Europe and Asia. Federation of European Microbiology Society (FEMS) Symposium, Tick-borne emerging and re-emerging pathogens and their infections. Diseases (Istanbul, Turkey) June 4, 2005 (Abstract pp.18-19)
 11. 増澤俊幸、渡邊むつみ、神村卓也、今井康之、内藤博敬、大橋典男:ライム病ボレリア発現プロテオーム解析と外膜タンパク質 Oms28 発現に及ぼす温度の影響 第 17 回微生物シンポジウム (東京)2005 年 9 月 3 日(抄録 pp.90-91)
 12. Toshiyuki Masuzawa, Yoshihiro Okamoto and Norio Ohashi: Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in east Asia and neighboring country and region. X th International Conference on Lyme borreliosis and Tick-borne Diseases (Vienna Austria) Sep. 11-15, 2005 (Abstract p.3)
 13. 増澤俊幸、岡本能弘、宇根有美、竹内隆浩、塚越啓子、川端寛樹、小泉信夫、吉川泰弘:輸入動物に起因するレプトスピラ症感染事例の診断と感染源の特定 第 88 回細菌学会関東支部総会(浜松)2005 年 10 月 21 日(抄録 p.39)
 14. 北邑かよ子、Zorana Orescanin、大橋典男、今井康之、Marija Milutinovic、増澤俊幸:セルビアモンテネグロ由来マダニからの *Anaplasma phagocytophilum* と *Borrelia burgdorferi* s. l. の検出及びその性状解析 第 88 回細菌学会関東支部総会(浜松)2005 年 10 月 21 日(抄録 p.38)
 15. Toshiyuki Masuzawa, Seiji Sakakibara, Hiroki Kawabata, and Yasuyuki Imai. Classification of *Leptospira* reference strains based on DNA gyrase B subunit gene sequences. 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society (Chiang Mai, Thailand) November 14-16 2005, (Abstract p.224)
 16. 宇根有美、増澤俊幸、太田周司、吉川泰弘:輸入愛玩用野生齧歯類のレプトスピラ保有状況と保菌動物の病理像 第 5 回人と動物の共通感染症研究会学術集会(東京)2005 年 11 月 5 日(抄録 p.19)
 17. 増澤俊幸、岡本能弘、宇根有美、竹内隆浩、塚越啓子、川端寛樹、小泉信夫、吉川泰弘:輸入動物(アメリカモモンガ)に起因するレプトスピラ症感染事例 第 5 回人と動物の共通感染症研究会学術集会(東京)2005 年 11 月 5 日(抄録 p.20)

危機管理情報

大輪達仁、長坂好洋、三木 朗:輸入動物(アメリカモモンガ)に由来するレプトスピラ症感染事例ー静岡市(概要)病原微生物検出情報 26, pp. 209-211 2005

厚生労働科学研究費補助金(新興再興感染症研究事業)
分担研究報告書(平成17年度)

国内における動物由来スピロヘータ感染症に関する研究

分担研究者 川端寛樹 (国立感染症研究所)

研究協力者

藤田博己	大原研究所(分担研究者)	角坂照貴	愛知医科大学(分担研究者)
後藤郁夫	神戸検疫所(分担研究者)	御供田睦代	鹿児島県環境保健センター
本田俊郎	鹿児島県出水保健所	田原研司	島根県保健環境科学研究所
保科健	島根県保健環境科学研究所	板垣朝夫	元島根県保健環境科学研究所
高田伸弘	福井大学医学部	矢野泰弘	福井大学医学部
丸山総一	日本大学生物資源科学部	木村浩一	北海道衛生研究所
伊東拓也	北海道衛生研究所	新田芳樹	沖縄県家畜衛生試験場
齋藤幹	東京大学医学部	小泉信夫	国立感染症研究所(分担研究者)

1. 海外での *Borrelia valaisiana* 近縁種感染によるライム病輸入例を報告した。沖縄地方を含む東アジアのほぼ全域で本ボレリアが見出されることから、今後これらの地域でも本種による感染事例が見出される可能性がある。
2. 南西諸島における *Borrelia valaisiana*-related の浸潤状況を前年度に引き続き調査した。本ボレリアが高頻度で野鼠耳介および膀胱から分離されている。
3. 本ボレリアの病原性についてマウス実験モデルにて調べた。
4. レプトスピラの全国野鼠保菌調査を行い、本年度は捕獲野鼠中2.1%でレプトスピラを検出した。

<概要> 感染症法に含まれる細菌感染症のうち、レプトスピラ症、回帰熱、リケッチア感染症(日本紅斑熱など)、野兔病、ライム病、ペストの6疾患、および法定は行われていないが海外では重要な感染症であるエーリキア・アナプラズマ感染症、バルトネラ感染症について、感染症研究所、地方衛生研究所、検疫所などの行政機関、大学・民間研究所間でネットワークを構築し、自然界の宿主である野ネズミおよび一部媒介節足動物の保菌調査を全国規模で展開してきた。分担研究者は、レプトスピラ症、ライム病、および回帰熱を中心に全国調査を行い、回帰熱は検出例がなく、国内での定着を疑わせる結果は得られていないこと、南西諸島でヒトへの感染が危惧されるボレリア種を主任研究者らとともに見出してきたこと、またレ

プトスピラでは、国内に広く病原体が浸潤、定着していることを明らかにしてきた。これに加え、リケッチアの海外からの侵入、エーリキア病原体の存在など、注目すべき結果が得られていることから、今後も未検出のものも含めて継続的調査が必要と考えられる。

1. 海外での *Borrelia valaisiana* 近縁種感染によるライム病輸入例

ライム病は鼠や小鳥などを保菌動物としマダニにより媒介されるスピロヘータ(ボレリア)による感染症である。これまでは欧州や北米を中心に発生が報告されているが、最近ではわが国でも報告が多い。今回海外旅行中にライム病に感染

し、患者の全血中からボレリア病原体を検出した症例を経験したので報告する。我々の知る限り、血液中からライム病病原体が検出されたのは日本で初めてである。

患者は74歳男性。もともと気管支喘息と洞機能不全症候群に対するペースメーカー植込み後にて東大医学部付属病院外来通院をされていた。蝶の採集のため2005年5月27日から6月7日までカンボジアに旅行に行き、さらにその後6月10日から6月13日まで同様の目的にてハバロフスクに出かけた。ハバロフスクから帰国後の6月17日頃より咳・38度台の発熱・咳・全身倦怠感・食欲不振が続いたため当院救急外来を受診。感冒の診断で clarithromycin を処方され帰宅となった。しかし、その後も発熱・咳が続き新たに全身の関節痛と下痢が出現したため6月24日外来受診し精査加療目的で入院となった。

入院時の身体所見では 37°C 台の発熱と咽頭痛と咳嗽を認めた。両側上下肢の関節痛を訴えるが明らかな発赤や腫脹はなく、皮疹などの皮膚症状も確認できなかった。採血データでは WBC 5500/ μ l, CRP 4.48mg/dl と炎症反応は認めるも白血球数の増加は認めなかった。下痢以外の感染のフォーカスは明らかではなく、輸液にて保存的に経過観察とした。その後も37度台の発熱と咳が続き、全身の関節痛が続いたため気道感染を考え6月27日より cefotiam を開始したが症状の改善は認められなかった。その後注意深く診察を行ったところ、右耳介に径 10mm の黒色の腫瘤を確認した (Fig.1)。本人の話ではハバロフスクから帰国した後の6月15日頃に気づき、気づいてから大きさは不変とのことであった。当院皮膚科の診察により、黒い腫瘤はマダニの虫体でマダニ刺咬症と考えられた。遊走性紅斑などの皮膚症状や神経症状は認められなかったが、全身の関節痛や発熱などインフルエンザ様症状から臨床的にライム病と診断した。このため6月29日から抗生剤を cefotiam から minocycline に変更したところ、開始後速やかに解熱し下痢や関節痛などの症状は消失した。マダニの虫体は自然落下し口器は残っていたものの皮膚には明らかな結節

などはなく、口器のみ抜去した。7月11日にはCRPも陰転化したため7月12日に退院とした。

国立感染症研究所にて病原体診断したところ、患者の全血と虫体からボレリアDNAが検出され、そのDNAは完全に一致した。さらにその相同性から *Borrelia valaisiana* 近縁種と診断された(表1)。また *B.burgdorferi*, *B.garinii*, *B.afzelii* を用いた血清診断では *B.garinii* に対し抗体反応が陽性であった (Fig.3)。刺咬マダニ種はマダニミトコンドリア *rrs* 遺伝子の塩基配列から *Ixodes persulcatus* (シュルツェマダニ) と推定された(表2)。また大原総合病院における抗体調査により、野兎病、ブルセラ症、日本紅斑熱、チフス熱、および Q 熱は否定的であった (data not shown)。

マダニに刺咬された記憶は本人にはないが、ハバロフスクでの蝶の採集の際に現地の人からダニがいると注意されていること、蝶の採取を終えて宿へ戻った際に友人のタオルにダニがついていることを見ていることから、ハバロフスクでのマダニに刺咬されたと思われる。実際シュルツェマダニはハバロフスクでは見出されるがカンボジアでは未記載のマダニで、国内のみならずロシアでのライム病ボレリア媒介種となっている。一方で *B.valaisiana* 近縁種は韓国、中国、タイなどの東南アジアおよび本邦南西諸島で見出されているが、ハバロフスクで見出されたことはない。またこれまでシュルツェマダニから *B.valaisiana* 近縁種が見出されたことはないことから、シュルツェマダニの *B.valaisiana* 近縁種の媒介能については不明である。

これらのことから、カンボジアで *B.valaisiana* 近縁種に感染後ハバロフスクでさらにシュルツェマダニに刺咬された可能性と、ハバロフスクでのシュルツェマダニ刺咬により *B.valaisiana* 近縁種に感染、ライム病を発症した可能性が考えられた。いずれの可能性も現時点では否定できないが、*B.valaisiana* 近縁種による感染症例は世界で初めてであり今後 *B.valaisiana* 近縁種に対しても注意が必要であることが示された。

これまで *B.garinii* 感染が見出されているハバロフスクなどシュルツェマダニの生息地域でのマダ

ニ刺咬には注意が必要であるとともに、*B.valaisiana* 近縁種の存在が確認もしくは推定されている、東南アジア、韓国や本邦南西諸島

などでも、ライム病媒介マダニの刺咬を受けないように注意する必要がある。

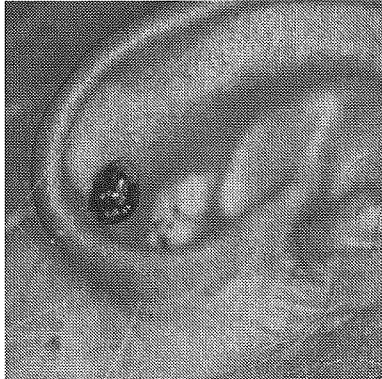


Fig.1

Borrelia valaisiana-related 感染が疑われたライム病症例。患者耳介に吸着マダニが見える。マダニ種はマダニミトコンドリア *rrs* 遺伝子の塩基配列により *Ixodes persulcatus* と遺伝子同定された。

flaB-nested PCR
M P N tick blood

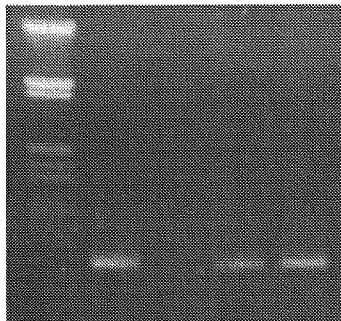


Fig.2.

flaB-nested PCR による患者血液および刺咬マダニからの *Borrelia* DNA の検出。1st-PCRでは BflaPAD(5'-GAT CAR GCW CAA YAT AAC CAW ATG CA-3') および BflaPDU(5'-AGA TTC AAG TCT GTT TTG GAA AGC-3') により PCR を行った。2nd-PCR(nested) BflaPBU(5'-GCT GAA GAG CTT GGA ATG CAA CC-3') BflaPCR(5'-TGA TCA GTT ATC ATT CTA ATA GCA-3')を使用し PCR した。増幅産物は 0.8% Agarose gel にて電気泳動後 EtBr バンドを検出した。

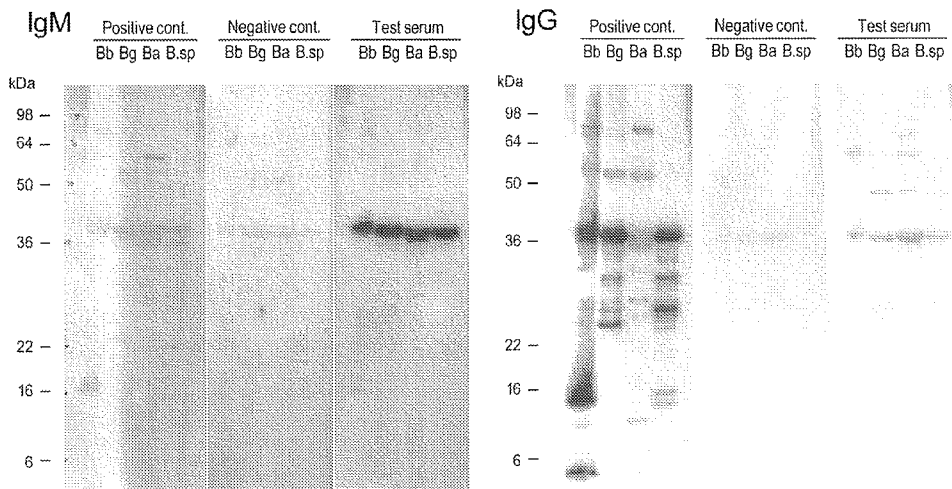


Fig.3.Western blotting による血清診断結果。

Bb:*B.burgdorferi* B31 株, Bg:*B.garinii* HP1 , Ba:*B.afzelii* P/Gau , B.sp.:*B. valaisiana*-related OkinawaCw60 .

表 1.患者全血およびマダニから検出された *Borrelia* DNA 塩基配列と相同性が高い DNA 配列の一覧.検出された *flaB* 遺伝子塩基配列の比較による.

Strain (accession no.)	Country	<i>Borrelia</i> sp.	Identities
Identities >97%			
CKA1 (AB022132)	China	<i>Borrelia valaisiana</i> -related	344/349 (98.6%)
OM58 (AB091705)	Okinawa, Japan	<i>Borrelia valaisiana</i> -related	331/336 (98.5%)
CMN1b (AB022134)	China	<i>Borrelia valaisiana</i> -related	343/349 (98.3%)
QLM4P1 (DQ188928)	China	<i>Borrelia valaisiana</i> -related	341/349 (97.7%)
QLT1P2 (DQ188927)	China	<i>Borrelia valaisiana</i> -related	341/349 (97.7%)
CKA3a(AB022135)	China	<i>Borrelia valaisiana</i> -related	340/349 (97.4%)
Identities <95%			
VS116 (DQ111037)	Switzerland	<i>Borrelia valaisiana</i>	279/293 (94.9%)
I-77(AF497995)	Czech Republic	<i>B.spielmani</i>	327/349 (93.7%)
ACA1(AB035613)	Sweden	<i>B.afzelii</i>	325/348 (93.4%)
lp90 (X75203)	Sweden	<i>B.garinii</i>	325/349 (93.1%)
B31 (AB035617)	US	<i>B.burgdorferi</i>	323/348 (92.8%)
NT112(D82853)	Japan	<i>B.japonica</i>	326/349 (93.4%)

表 2.マダニミトコンドリア 16SrRNA 遺伝子塩基配列による患者刺咬マダニ種の推定

Tick species	Accession No.	Identities
<i>Ixodes persulcatus</i>	AB073725	234/236 (99.2%)
<i>I. persulcatus</i>	AF549856	216/216 (100%)
<i>I. muris</i>	U95896	219/235 (93.2%)
<i>I. ricinus</i>	L34292	218/235 (92.8%)
<i>I. nipponensis</i>	AB006024	217/235 (92.3%)
<i>I. gibbosus</i>	AF549846	202/216 (93.5%)
<i>I. pavlovskyi</i>	AF549835	202/216 (93.5%)
<i>I.scapularis</i>	L43866	218/235 (92.8%)
<i>I.loricatus</i>	U95892	220/237 (92.8%)

2. 南西諸島における *Borrelia valaisiana*-related の浸潤

希少感染症における,病原体診断のためのリファレンス整備,簡易診断法開発を目的として,1)環境中の病原体調査を行った.調査は沖縄県,および鹿児島県にて行った.分担研究者以外に,沖縄県家畜衛生試験場,鹿児島県環境保健センター,

鹿児島県出水保健所および徳之島保健所の協力を得て,調査研究は行われた.

[方法] 沖縄県,および鹿児島県にて野鼠捕獲を行い,耳介,および膀胱を*Borrelia*培養に供した.沖縄調査(H17.1.11-1.15およびH17.10.10-10.15),徳之島調査(H17.11.23-11.28)で捕獲した野鼠類の一覧を表3に示した.

表 3.徳之島,沖縄本島, および石垣島における捕獲野鼠種一覧

野鼠種	(H17.11.23-11.28)	(H17.10.10-10.15)	(H17.10.10-10.15)	(H17.1.11-1.15)
クマネズミ	13	1	1	6
ワタセジネズミ	2	1	-	9
ジャコウネズミ	3	3	-	21
ドブネズミ	-	1	3	19
オキナワハツカネズミ	-	2	-	8
計	18	8	4	63
<i>Borrelia</i> 陽性個体数()	3 (16.7%)	6 (75.9%)	0 (0%)	7 (11.1%)

分離株の型別は 5S-23S rDNA intergenic spacer(RIS)領域の塩基配列決定に基づいた, *DraI* もしくは *MseI* 切断断片の DNA 多型性により行った(Masuzawa et al. 2004). 即ち, 分離株より常法に従って genomic DNA を抽出, 精製後 Masuzawa らの方法に従って RIS 領域の直接 sequencing を行い, *DraI* もしくは *MseI* 切断断片の DNA 多型性を調べ, 既報の Reference sequence と比較した.

また, 徳之島で分離された3株については, これまで徳之島での *Borrelia* 分離記録がなかったことから, 新規に 16SrRNA 遺伝子および *flaB* 遺伝子の直接塩基配列決定を行い, *Borrelia* 種同定を行った.

[結果と考察] 各野鼠臓器より分離された *Borrelia* 株の一覧を表 4 に示した.

表 4. *Borrelia* isolates in this study.

	<i>Borrelia</i> 株名	分離保菌動物	調査地及び調査日
1	Tokunoshima-RR12B05	クマネズミ膀胱由来	徳之島(H17.11.23-11.28)
2	Tokunoshima-CW14B05	ワタセジネズミ膀胱由来	徳之島(H17.11.23-11.28)
3	Tokunoshima-RR16E05	クマネズミ耳介由来	徳之島(H17.11.23-11.28)
4	Okinawa-SM1E05	ジャコウネズミ耳介由来	沖縄本島(H17.10.10-10.15)
5	Okinawa-SM3E05	ジャコウネズミ耳介由来	沖縄本島(H17.10.10-10.15)
6	Okinawa-CW4B05	ワタセジネズミ膀胱由来	沖縄本島(H17.10.10-10.15)
7	Okinawa-MC5B05	オキナワハツカネズミ膀胱由来	沖縄本島(H17.10.10-10.15)
8	Okinawa-RN6E05	クマネズミ耳介由来	沖縄本島(H17.10.10-10.15)
9	Okinawa-MC8B05	オキナワハツカネズミ耳介由来	沖縄本島(H17.10.10-10.15)
10	Okinawa-MC8E05	同上膀胱由来	沖縄本島(H17.10.10-10.15)
11	OkinawaSm-26	ジャコウネズミ耳介由来	沖縄本島(H17.1.11-1.15)
12	OkinawaMc-41	オキナワハツカネズミ耳介由来	沖縄本島(H17.1.11-1.15)
13	OkinawaSm-58	ジャコウネズミ耳介由来	沖縄本島(H17.1.11-1.15)
14	OkinawaCw-59	ワタセジネズミ耳介由来	沖縄本島(H17.1.11-1.15)
15	OkinawaCw-60	ワタセジネズミ耳介由来	沖縄本島(H17.1.11-1.15)
16	OkinawaCw-61	ワタセジネズミ耳介由来	沖縄本島(H17.1.11-1.15)
17	OkinawaCw-62	ワタセジネズミ耳介由来	(H17.1.11-1.15)
18	184-8	クマネズミ寄生 <i>I. granulatus</i> 由来	(H16.10.21)
19	066-5	脱皮 <i>I. granulatus</i> (♀)由来	(H17.1.11-1.15)
20	210-1	産卵後 <i>I. granulatus</i> (♀)由来	(H17.10.10-10.15)
21	210-6	脱皮 <i>I. granulatus</i> (♀)由来	(H17.10.10-10.15)

2000 年及び 2001 年に沖縄県内で行われた野鼠捕獲調査では *Borrelia* 陽性率は 7.4%(Masuzawa et al., 2004)であった。一方本調査では, 各地域での *Borrelia* 陽性率は徳之島 16.7%, 沖縄本島 18.3%, 石垣島 0%であり, 以前の調査と比較して高頻度で *Borrelia* が分離された(表 2)。また, 試験に供した野鼠膀胱組織からも *Borrelia* が分離された。これまで本邦で分離される *Borrelia valaisiana* 関連種は野鼠組織の内, 耳介以外から分離された例は

ないことから, 野鼠体内での血流を介した全身移行を起こさないと推定されてきたが, 本調査により野鼠においては, 本ボレリア種が全身感染を成立させることが初めて確認された。分離株の RIS 型別結果の一覧を表 5 に, また徳之島での分離株について 16SrRNA 遺伝子および *flaB* 遺伝子の塩基配列決定に基づくボレリア種同定結果を表 6 に示した。

表 5. RFLP analysis of the 5S–23S rDNA intergenic spacer of isolates from the Southwestern Islands and comparison with *B. valaisiana* found in Far-East Asia and Europe.

Strain	Source animal	Isolation organs	Amplicon (bp)	Restriction fragments by <i>DraI</i>	Restriction fragments by <i>MseI</i>
Okinawa-SM1E05	<i>Suncus murinus</i>	ear biopsy	254	173, 81	150, 58, 24, 22
Okinawa-SM3E05	<i>S. murinus</i>	ear biopsy	254	173, 81	150, 58, 24, 22
Okinawa-CW4B05	<i>Crocidura watasei</i>	bladder	254	173, 81	150, 58, 24, 22
Okinawa-RN6E05	<i>Ruttus norvegicus</i>	ear biopsy	254	173, 81	150, 58, 24, 22
Okinawa-MC8B05	<i>Mus caroli</i>	bladder	254	173, 81	150, 58, 24, 22
Okinawa-MC5B05	<i>M. caroli</i>	bladder	254	173, 52, 29	107, 67, 51, 22, 7
Okinawa-MC8E05	<i>M. caroli</i>	ear biopsy	246	144, 102	145, 59, 28, 14
Tokunoshima-RR12B05	<i>R. ruttus</i>	bladder	254	173, 81	150, 58, 24, 22
Tokunoshima-CW14B05	<i>C. watasei</i>	bladder	254	173, 81	150, 58, 24, 22
Tokunoshima-RR16E05	<i>R. ruttus</i>	ear biopsy	254	173, 81	107, 58, 43, 24, 22
184-8	<i>I. granulatus</i> (engorged)		254	173, 52, 29	107, 51, 43, 24, 22, 7
066-5	<i>I. granulatus</i> (flat)		254	173, 81	150, 58, 24, 22
210-1	<i>I. granulatus</i> (engorged)		254	173, 81	150, 58, 24, 22
210-6	<i>I. granulatus</i> (flat)		254	173, 52, 29	107, 67, 51, 22, 7
OkinawaMc-41	<i>M. caroli</i>	ear biopsy	254	173, 81	150, 58, 24, 22
OkinawaSm-58	<i>S. murinus</i>	ear biopsy	254	173, 81	150, 58, 24, 22
OkinawaCw-60	<i>C. watasei</i>	ear biopsy	254	173, 81	150, 58, 24, 22
OkinawaCw-61	<i>C. watasei</i>	ear biopsy	254	173, 81	150, 58, 24, 22
OkinawaCw-62	<i>C. watasei</i>	ear biopsy	254	173, 81	150, 58, 24, 22
Reference					
strain, (Country, Accession no.)					
5MT (Korea, AB013914)	<i>Ixodes</i> sp.		254	173, 81	107, 58, 43, 24, 22
KR3(Taiwan, AB037119)	<i>R.losea</i>		254	173, 81	107, 58, 43, 24, 22
10MT (Korea, AB013915)	<i>Ixodes</i> sp.		254	173, 81	150, 58, 24, 22
OS31 (Okinawa, AB091451)	<i>S. murinus</i>		254	173, 81	150, 58, 24, 22
TA1 (AB037121)			254	173, 81	150, 58, 24, 22
KR1(Taiwan, AB037118)	<i>M. formosanus</i>		246	144, 102	145, 59, 28, 14
CKA3a (China, AB022128)	<i>Apodemus agrarius</i>		246	144, 102	145, 59, 28, 14
OM58/01(Okinawa, AB091444)	<i>M. caroli</i>		246	144, 102	145, 59, 28, 14
OS42(Okinawa, AB091452)	<i>S. murinus</i>		253	144, 52, 29, 28	145, 51, 29, 21, 7
VS116(Switzerland, L30134)	<i>I. ricinus</i>		255	203, 52	174, 51, 23, 7
Am501(Aomori, D84402)	<i>I. columnae</i>		248	Not digested	168, 51, 23, 6

表 6. Sequencing analysis of *Borrelia* isolates from Tokunoshima Island, Kagoshima.

Strain	Gene	BLAST search
Tokunoshima-RR12B05 Tokunoshima-CW14B05	16SrRNA gene (1,265 bp)	(AB037125) <i>Borrelia</i> sp. TA1, Identities = 1262/1265 (99.76%) (AB091466) <i>Borrelia</i> sp. OS31, Identities = 1230/1234(99.68%) (AB037124) <i>Borrelia</i> sp. KR3, Identities = 1258/1265 (99.45%) (AB013674) <i>Borrelia</i> sp. 10MT, Identities = 1257/1265 (99.36%) (AB091467) <i>Borrelia</i> sp. OS42, Identities = 1226/1234 (99.35%) (X98232) <i>Borrelia valaisiana</i> , VS116, Identities = 1255/1265 (99.20%)
	<i>flaB</i> gene (403 bp)	(AB037130) <i>Borrelia</i> sp. TA1, Identities = 388/388 (100%) (AB014678) <i>Borrelia</i> sp. 10MT, Identities = 396/403 (98.26%) (AB091712) <i>Borrelia</i> sp. OS31, Identities = 381/388 (98.20%) (AB091713) <i>Borrelia</i> sp. OS42, Identities = 379/388 (97.68%) (AB037128) <i>Borrelia</i> sp. KR3, Identities = 379/388 (97.68%) (DQ111037) <i>Borrelia valaisiana</i> , VS116, Identities = 293/306 (95.75%)
Tokunoshima-RR16E05	16SrRNA gene (1,278 bp)	(AB037123) <i>Borrelia</i> sp. KR1, Identities = 1271/1273 (99.84%) (AB022140) <i>Borrelia</i> sp. CKA3a, Identities = 1271/1273 (99.84%) (X98232) <i>Borrelia valaisiana</i> , VS116, Identities = 1264/1273 (99.45%) (AB037124) <i>Borrelia</i> sp. KR3, Identities = 1264/1273 (99.45%) (AB091467) <i>Borrelia</i> sp. OS42, Identities = 1233/1242 (99.28%) (AB013674) <i>Borrelia</i> sp. 10MT, Identities = 1263/1273 (99.21%) (AB091466) <i>Borrelia</i> sp. OS31, Identities = 1232/1242(99.19%) (AB037125) <i>Borrelia</i> sp. TA1, Identities = 1261/1273 (99.06%)
	<i>flaB</i> gene (403 bp)	(AB014678) <i>Borrelia</i> sp. 10MT, Identities = 399/403 (99.01%) (AB091712) <i>Borrelia</i> sp. OS31, Identities = 382/388 (98.45%) (AB091713) <i>Borrelia</i> sp. OS42, Identities = 382/388 (98.45%) (AB037127) <i>Borrelia</i> sp. KR1, Identities = 382/388 (98.45%) (AB022135) <i>Borrelia</i> sp. CKA3a, Identities = 396/403 (98.26%) (AB037130) <i>Borrelia</i> sp. TA1, Identities = 379/388 (97.68%) (AB037128) <i>Borrelia</i> sp. KR3, Identities = 378/388 (97.42%) (DQ111037) <i>Borrelia valaisiana</i> , VS116, Identities = 294/307 (95.77%)

本調査研究により得られた *Borrelia* 株は未同定の 2 株(OkinawaSm-26, Okinawa Cw-59)をのぞき、全て *B. valaisiana*-related と推定された。また徳之島で分離された 3 株のうち、Tokunoshima-RR12B05、および Tokunoshima-CW14B05 では調べた範囲での 16SrRNA 遺伝子塩基配列および *flaB* 遺伝子塩基配列は 100%一致した。また *flaB* 遺伝子の系統解析結果(NJ 法, open gap penalty=10, gap extension penalty=0.1)ではこれら 3 株は *Borrelia* sp. 10MT 株 (Korea, *Ixodes* sp.由来)と同じブランチを形成した (Fig.4)。以上の結果から、徳之島には *Borrelia valaisiana* 近縁種が侵入定着していることが明らかとなった。

今回の調査では、野鼠寄生 *Ixodes granulatus* から本ボレリアが分離されている。*I. granulatus* はアジア大陸で広く見出され、韓国、中国、台湾等では本マダニより *Borrelia valaisiana* 近縁種が見出されている。一方で、本マダニは動物寄生中の吸血マダニとして採取されることがほとんどであるため、マ

ダニ中のボレリアが元々マダニ保有病原体であったか、吸血によりマダニが感染したもののかの判別が不可能であった。すなわち、本ボレリアが *I. granulatus* を媒介宿主としているか否かについては明確な結論は得られていなかった。本研究では沖縄県で野鼠吸着の飽血個体を採取、実験室内で脱皮個体を得ることに成功した。本マダニよりボレリア (strain 066-5 および strain 210-6) が分離されたこと、本 *Borrelia* は *Borrelia valaisiana*-related であったことから、本マダニが *Borrelia valaisiana*-related の媒介宿主である可能性が強く示唆された。一方で、本 *Borrelia* 類縁の *Borrelia valaisiana* 種は国内では *I. columnae* より分離記録が有ること、また欧州では *I. ricinus* から分離されることから、これらマダニ種もしくは近縁種でも伝播される可能性は否定出来ない。今後も本ボレリア種の伝播機構に関して研究が必要であると考えられる。

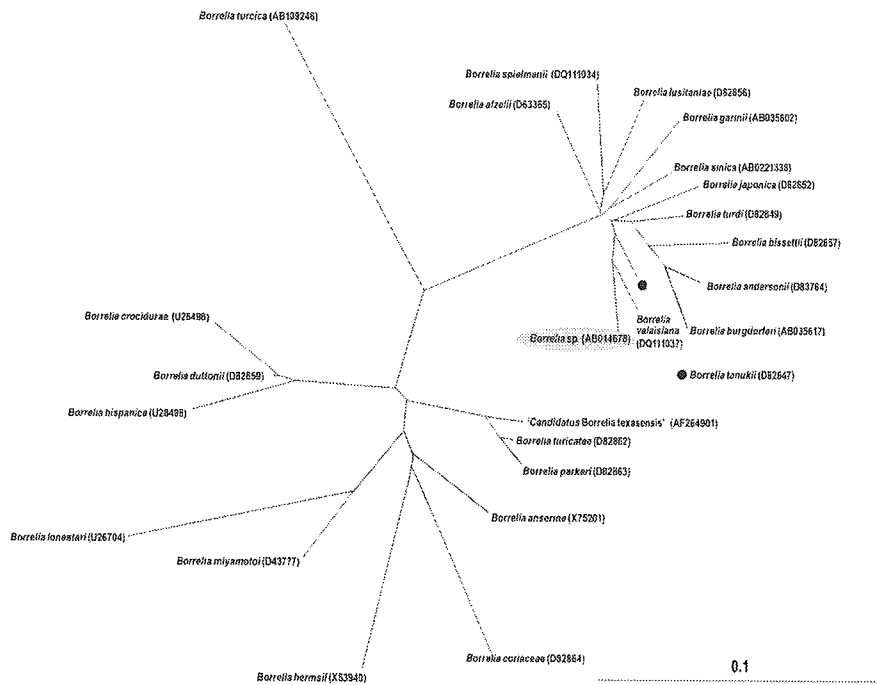


Fig. 4. 鞭毛遺伝子塩基配列に基づいた徳之島分離 *Borrelia* 株の系統解析. 徳之島分離株は黒塗で示した *Borrelia* sp. 10MT 株 (AB014678) と 98%以上の相同性が見出された.

3. 南西諸島で分離された *Borrelia valaisiana*-related の感染性に関する研究

2005年、海外渡航後 *Borrelia valaisiana* 近縁種に感染したと考えられた輸入症例が報告された。本症例は、特記すべき基礎疾患がない男性が、カンボジア、および極東ロシア渡航後、国内にてライム病を発症している。ライム病血清診断では感染種ボレリアの特定は出来ないが、本症例では Lyme 病ボレリア種である *Borrelia garinii* にたいして抗体陽性を示したこと、かつ全血、および刺咬マダニ (*Ixodes persulcatus*) から病原 DNA が検出されたことから、ライム病と確定した。

本症例における推定感染ボレリア種は、検出された *Borrelia* DNA の塩基配列から、南西諸島、東南アジア、中国、台湾、および韓国で endemic な *B. valaisiana* 近縁種と判定された。このため、本ボレリア種が感染性を有するか否かを確認する目

的で、マウス感染モデルによる、病原性の評価を国内分離ボレリアについて行った。

[方法] 使用菌株は OkinawaCw-60, OkinawaCw-61 および OkinawaCw-62 株の 3 株で、対照として米国マダニ由来 B31 株の病原株 (clone 5A4) および非病原株 (clone 5A13) を用いた。OkinawaCw-60, OkinawaCw-61 および OkinawaCw-62 株の 3 株は経代培養による弱毒化を防ぐために経代数は 6 代以内のものを使用した。使用マウスは C3H/HeN (日本クレア) で、接種菌数は 1×10^5 cells で、左足 footpad に接種した。使用マウス頭数は 5 頭以上で行い、ボレリア接種後 10 及び 20 日後に左足踵関節 (Tibital-joint) 部の腫脹度を計測した。次いで接種後 28 日目に接種マウスは安楽殺し、関節部組織、耳介、心臓、及び膀胱を BSK-H 培地にて培養した。