

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	沖縄本島(H17.1.11-1.15)
18	184-8	クマネズミ寄生 <i>I.granulatus</i> 由来	沖縄本島(H16.10.21)
19	066-5	脱皮 <i>I.granulatus</i> (♀)由来	沖縄本島(H17.1.11-1.15)
20	210-1	産卵後 <i>I.granulatus</i> (♀)由来	沖縄本島(H17.10.10-10.15)
21	210-6	脱皮 <i>I.granulatus</i> (♀)由来	沖縄本島(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* 近縁種は野鼠組織の内、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。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 *Borrelia valaisiana* 近縁種と推定された。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* 近縁種であったことから、本マダニが *Borrelia valaisiana* 近縁種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。

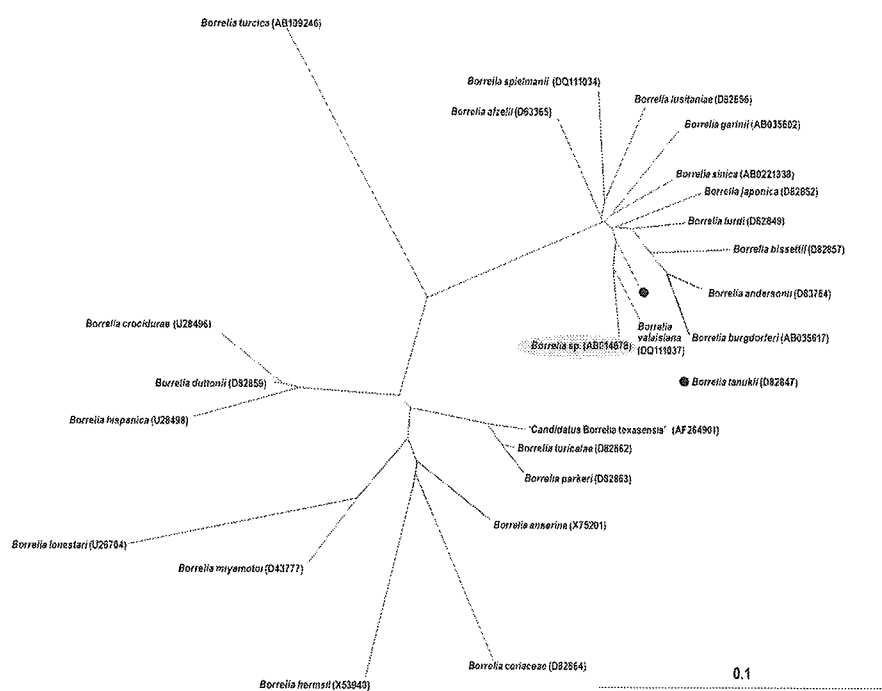


Fig. 4. 鞭毛遺伝子塩基配列に基づいた徳之島分離 Borrelia 株の系統解析. 徳之島分離株は黒塗で示した Borrelia sp. 10MT 株 (AB014678)と98%以上の相同性が見出された.

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	engorged- <i>I. granulatus</i>		254	173, 52, 29	107, 51, 43, 24, 22, 7
066-5	<i>I. granulatus (flat)</i>		254	173, 81	150, 58, 24, 22
210-1	engorged- <i>I. granulatus</i>		254	173, 81	150, 58, 24, 22
210-6	<i>I. granulatus (flat)</i>		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

表 5 続き

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

南西諸島で分離された *Borrelia valaisiana* 近縁種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*) から病原体 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 (Tibial-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。

<結果と考察>

ボレリア接種マウスの踵関節の腫脹度を Fig.5 に示す。感染性株接種の場合、接種後約 10 日前後に一過的に強度の関節腫脹が見られ、緩やかに緩解へ向かう。この時期に、ボレリア菌体は関節周囲組織へ浸潤し、同時に炎症細胞 (主に好中球) の強度浸潤が観察される (Kawabata et al. 2004)。また、感染 20 日以降、関節腫脹が緩解した後、病原体ボレリアは組織内に定着、持続的に病原体が見出される。一方で、非感染性株では、関節周囲への病原体浸潤および関節腫脹は見られない。沖縄県で野鼠耳介組織より分離された *Borrelia* 3 株中 2 株で、経度の関節腫脹が見られたが、統計処理の結果、有意の上昇とはされなかった。また接種後 28 日目の解剖による病原体分離においても、病原体は何れの臓器からも分離されなかった。

本ボレリアは沖縄県で捕獲された野鼠耳介組織から分離された株であり、また低経代株であることから、実験マウスモデルにおいても、感染性が維持されていると考えられた。しかしながら、使用したボレリア 3 株でマウス臓器から病原体の再分離がなされなかったことから、1) 感染は起こるが、一過的であり、長期間にわたる持続感染は起こらない、もしくは 2) 実験に供したマウスには感染しない可能性が考えられた。一方で、沖縄本島及び徳之島では、野鼠耳介組織のみならず膀胱からも本ボレリアが分離されている。米国では RIS 領域によりマウスへの病原性に有意差が見られるとする報告がある。従い、これら膀胱由来株は耳介由来株とは何らかの遺伝的相違があり、その結果、深部組織への侵入が高まっている可能も考えられた。しかしながら現時点で、米国のような RIS 領域と病原性の相関を示す差は、沖縄分離ボレリア膀胱由来株 (= 全身移行株) および耳介分離株では見出されていない。近年、ボレリアの宿主決定には、宿主補体への抵抗性が重要であることが示されている。本 *Borrelia* のマウス補体系への抵抗性は不明であり、今後、これらボレリアの宿主補体への抵抗性について調べる等が必要であろう。

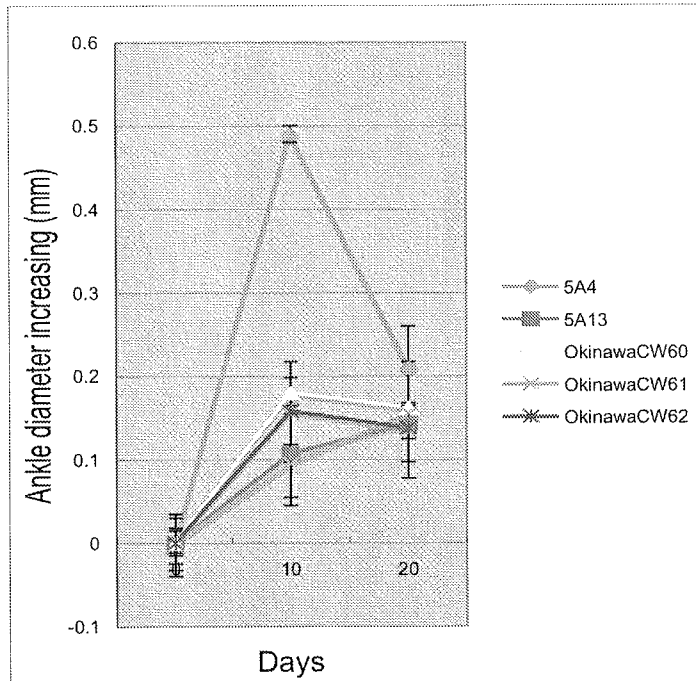


Fig. 5. Ankle diameter increase following inoculation of C3H/HeN mouse with *Borrelia* strains. Mice were five weeks age at the time of infection and were inoculated in the right hind footpad with 1×10^5 *Borrelia* organisms in 50 μ l of BSK-II medium. Infectious clone (B31 5A4) and non-infectious clone (B31 5A13) were used as control in this study.

小児顔面神経麻痺患者におけるライム病の可能性に関する疫学調査

<背景>

ライム病、特に神経ボレリア症起因性のボレリア感染症はヘルペスウイルスの再活性化とともに、国内外を問わず不明顔面神経麻痺の要因となっていることが指摘されている。しかしながら国内における小児における顔面神経麻痺と感染症との因果関係については不明の部分が多い。そこでライム病流行地域である北海道において、小児における顔面神経麻痺の要因を追求するとともに鑑別すべき感染症について疫学調査を行った。

<方法>

小児の急性期顔面神経麻痺 30 例について、血清、及び唾液を材料とした病原体検索を行った。すなわち、唾液中のヘルペスウイルス(HSV-1)、Varicella-zoster ウイルス(VZV)を PCR 法により検出した。またベア血清はライム病ボレリア、ムンプスウイルスに対する抗体測定に供した。

<結果>

VZV による Ramsay Hunt 症候群 2 例においては VZV の再活性化が血清学的にも確認された。また血清学的、もしくは唾液からの PCR により、帯状疱疹を伴わない VZV 再活性化が 30 例中 9 例で見出された。すなわち 37%(11/30) では VZV の再活性化が顔面神経麻痺の要因である事が示唆された。年齢階層による VZV 再活性化による顔面神経麻痺は 5 才未満と比較して 6-15 歳で優位に多い傾向が見られた ($P=0.023$)。一方で、ライム病流行地域である北海道においてもライム病抗体陽性を示す例は見出されなかった。

<まとめ>

欧米ではライム病ボレリア感染に起因する神経疾患が多発している。その臨床症状は神経根炎、顔面神経麻痺、髄膜炎などである。これまで本邦において患者から分離されたボレリア種はすべて *B.garinii* である。*B.garinii* は欧州で神経ライム症の要因となっている事が示されていることから、本邦でも不明神経疾患の起因菌である可能性が危惧されている。

同じく病原性を示すライム病ボレリアとして本邦に浸潤が確認されている *B.afzelii* はマダニ、野鼠のみから分離されている。また *B.turdi*, *B.tanuki*, *B.japonica* はその病原性は不明である。

感染症法施行後の国内でのライム病患者発生動向調査によれば、61例中35例(57%)が北海道での報告となっており、国内でのライム病流行地域となっている(図2)。これは、この地域では、本州と異なり、人口密集地である平野部においてライム病媒介マダニである *Ixodes persulcatus* が見出されるためと推察されている。

本研究では神経ライム症の一症状である顔面神経麻痺を指標として、小児における神経ライム症の有無を調査してきたが、現在までにライム病ボレリア起因性の顔面神経麻痺患者は見出されていない。成人を対象とした場合でもライム病性顔面神経麻痺は低頻度であることから(Furuta et al. 2001)、1)本邦に浸潤しているライム病ボレリアは欧米のライム病ボレリアと比較して神経症状を引き起こさない、もしくは2)人種差によりヒト側の感受性が異なるため、国内の患者ではその臨床症状が緩和されている可能性が考えられる。

<今後の課題>

この問題を解決するためには、さらなる疫学調査および基礎的研究の両面でのアプローチが必要である。疫学的には本邦で分離されるボレリアと同様の型が *I. persulcatus* を介して浸潤していて、かつ欧州人種が居住するモスクワ以東における疫学調査を行う事で、結論の一部が見出される可能性がある。

病原体側の解析では、疾患の原因となる病原体遺伝子の同定が早急に行われる必要がある。本研究班主任の増沢は、*B. garinii* は *I. persulcatus* からのみ分離される *B. garinii*(アジア型)と欧州で *I. ricinus*, *I. persulcatus* 両者から分離される *B. garinii*(欧州型)に遺伝型別できることを明らかにしている(Masuzawa. 2004)。このことは *B. garinii* は多様な集団であり、かつ未知の因子によって媒介マダニとの親和性が決定されている可能性を強く示唆している。同様に考えるのであれば、*B. garinii* のうちの一部がヒトに対して強い病原性を有している可能性を考える事が出来る。我々は、国内で患者から分離された株を用い、マウス感染モデルによる病原性の強弱を、アジア型 *B. garinii* と欧州型 *B. garinii* で比較したが、少なくとも関節炎発症を指標とした病原性の強弱はアジア型、欧州型間で差が見出されなかった(データ未公表)。今後は患者由来株と環境分離株間でその病原性の強弱を比較する事で、未知の病原性因子を同定できれば、強病原性ボレリアの分布と発症危険地域の認識が可能になるかもしれない。

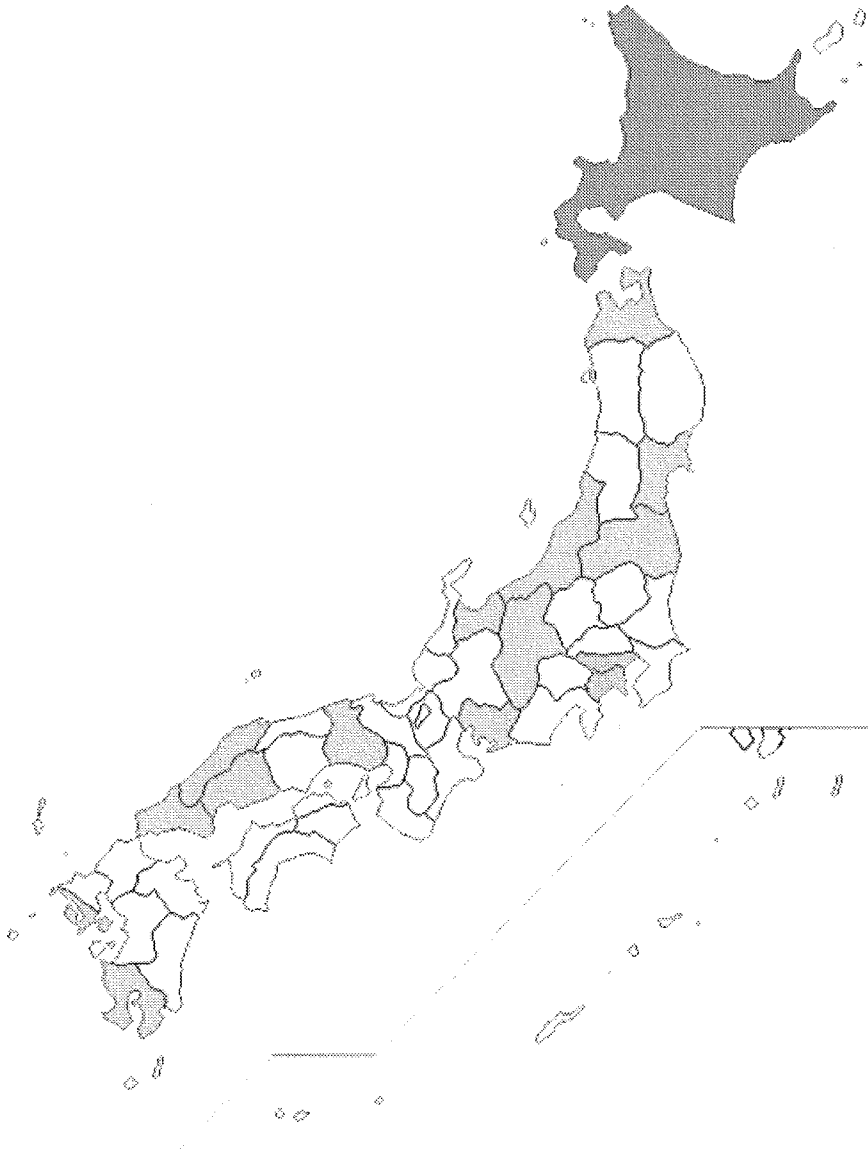


図 6.感染症法施行後の各都道府県ライム病患者報告数(2003 年度まで)。赤は 10 例以上の地域を示す

種子島におけるライム病ボレリア

国内に分布するライム病ボレリアには, *Borrelia garinii*, *B. afzelii* の病原性ボレリア 2 種, 病原性が不明な *B. japonica*, *B. valaisiana*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. miyamotoi* の 5 種, 計 7 種に加え, 新しい種と考えられる *B. valaisiana* 近縁種が南西諸島で見出されている。これらボレリアの分布は九州以北と南西諸島で異なり, 九州以北では沖縄で見出される *B. valaisiana* 近縁種は見出されていない。一方で, *B. valaisiana* 近縁種は 2005 年, ヒト患者から病原体 DNA が検出され, 今後ヒト感染種として注意が必要である可能性がでてきた。そこで本研究では, 鹿児島県, 大原研究所が主となって, *B. valaisiana* 近縁種の北限を調査すべく, 野鼠捕獲調査, およびマダニからの病原体分離を試みた。

[方法]

2005 年 3 月, 種子島において常法に従い, 野鼠捕獲, 病原体分離を行った。捕獲された野鼠種および捕獲頭数は以下の通りである。

ヒメネズミ 3 頭(♂2, ♀1)

アカネズミ 24 頭(♂13, ♀11)

分離ボレリアの DNA 型別には 23SrDNA - 5SrDNA intergenic spacer(RIS)領域の sequence typing 法を用いた。

[結果および考察]

捕獲された野鼠 27 頭中 10 頭で野鼠耳介よりボレリアが分離された。分離ボレリアの DNA 型別により分離株 10 株はいずれも *Borrelia tanukii* もしくは *B.tanukii* に近縁な種であると推定された。RIS 領域の塩基配列をもとに系統解析を行い、結果を Fig.7 に示した。また分離株の一部は SDS-PAGE による protein profile および単クローン抗体による反応性を調べ、結果を Fig.8 に示した。

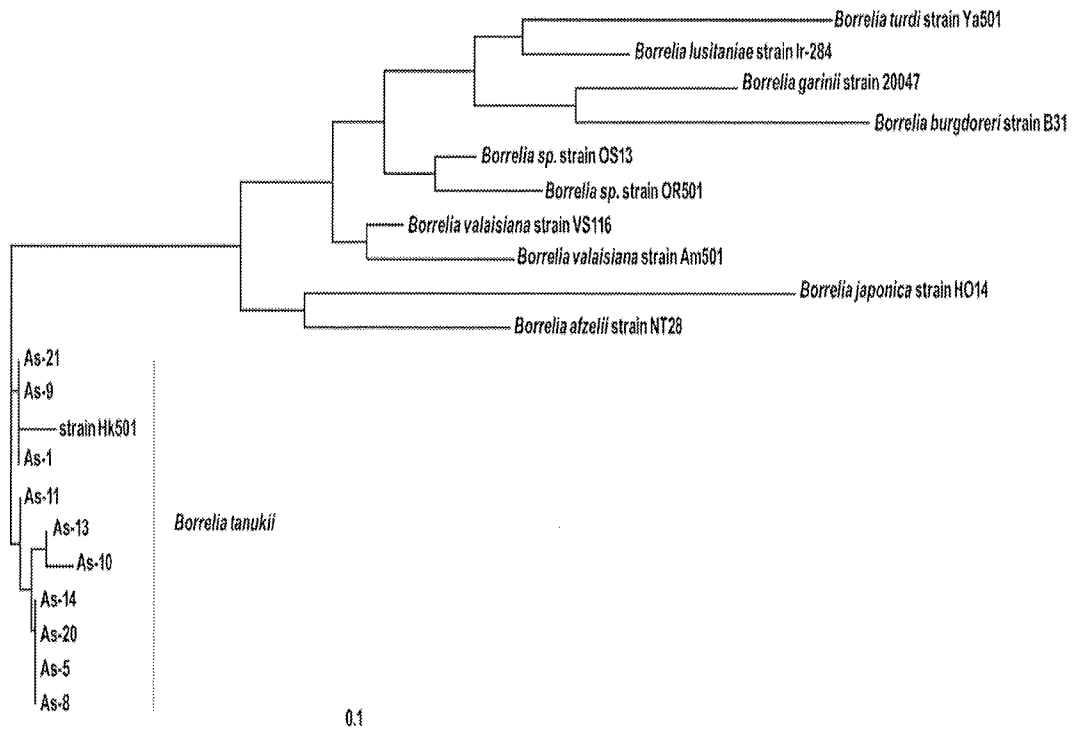


Fig.7. RIS 領域 sequencing による種子島分離株の DNA 型別

分離されたボレリアは *B.tanukii* の標準株である Hk501 と NJ 法(open gap penalty=10, gap extension penalty=0.1)とクラスターを形成した。また SDS-PAGE による protein profile によって OspC と目される約 25kDa 抗原に数 kDa の範囲での差異が認められるが、H5332 によって検出される OspA はほぼ同一サイズであることが明らかとなった。また H9724 に反応するフラジェリン抗原(FlaB)もライム病群ボレリアに特徴的な 41kDa であることが明らかとなった。この他結果は示さないが、*Ixodes turdus* より *B.turdi* が一株分離されている(strain 047-3)。

一方捕獲野鼠からは南西諸島、アジア各国で見出される *B.valaisiana* 近縁種は分離されなかった。*Borrelia* 種は *Rickettsia* 種と比較して、媒介宿主であるマダニ種とほぼ 1:1 の関係が成立する。即ち、マダニの生息域と *Borrelia* 種の存在域が overlap することがフィールド調査結果から強く示唆されている。種子島は *B.valaisiana* 近縁種が dominant である沖縄県と直接接しているわけではないが、比較的近距离に位置する。しかしながら種子島で *B.valaisiana* 近縁種が見出されなかったことは、種子島では、沖縄地方と比較して *Ixodes granulatus* が優先種ではない可能性が考えられた。

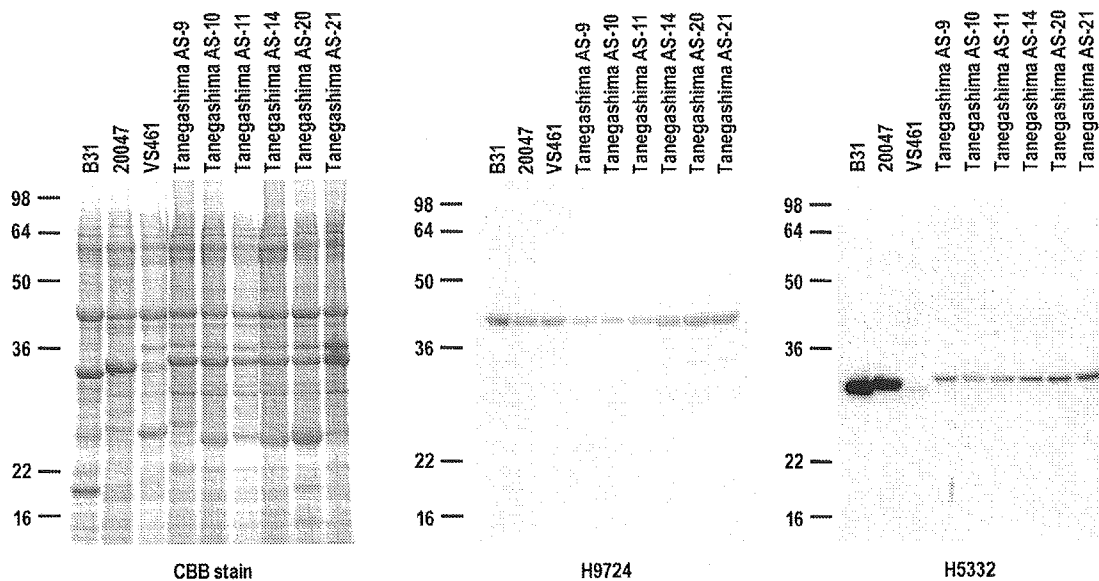


Fig.8. 種子島で分離されたボレリア 6 株と単クローン抗体(H9724, H5332)との反応性

回帰熱の国内浸潤に関する実地調査・推定媒介ダニの同定と病原体検出

回帰熱は人畜共通のスピロヘータ感染症で *Ornithodoros* 属ダニやシラミによって媒介される。本邦では戦後回帰熱発生報告はなされていないが、世界のグローバル化によりいつ輸入感染が起こってもおかしくない状況にある。一方で国内には、これまで伊豆諸島や奄美諸島の限られた地域で *Ornithodoros* 属ダニの存在が報告されているが、これらダニによる感染の危険性については全く評価がなされていなかった。

そこで本研究では、これらダニの捕獲を行い病原体保有の有無を調べるとともに、このダニの吸血源である渡り鳥の血液からの病原体検出も行った。

<方法・調査地>

本邦での *Ornithodoros sawaii*(サワイカズキダニ)の棲息地である、奄美諸島・ハンミヤ島にてダニ捕獲調査を行った。ダニはオオミズナギドリ巣穴内巣材よりツルグレン法にて回収した。回収したダニは無菌的に半割し中腸類を材料として全 DNA をアルカリ法にて抽出、PCR またはダニミトコンドリア DNA 塩基配列決定用サンプルとした。残りの半割片は BSK 培地によるボレリア培養に供した。ボレリア検出用の PCR では *flaB* 遺伝子の一部を増幅する DNA primer を用い、nested PCR による高感度検出法を行っている。またこれと平行して、保菌宿主動物と推定されたオオミズナギドリの血液を採取、ボレリア検出のため BSK 培地にて培養を行った。

<結果・考察>

本邦で *Ornithodoros* 属ダニとされているダニは、*O. capensis*(クチビルカズキダニ)および *O. sawaii*(サワイカズキダニ)の2種類が知られている。クチビルカズキダニは伊豆諸島でその存在が見出されており、サワイカズキダニは奄美諸島・ハンミヤ島にてその存在が知られている。今回ハンミヤ島にて捕獲したサワイカズキダニ 25 頭およびオオミズナギドリからはボレリア培養、核酸検出ともすべて検出限界以下(陰性)であった。

我々が行ってきた 1999 年以降の伊豆諸島における病原体調査では、PCR 法および培養法による試験では、保菌宿主と考えられるクロアシアホウドリ、媒介ダニと思われるクチビルカズキダニともに、ボレリアは陰性(検出限界以下)であったこと、また形態学的には *Ornithodoros* 属ダニではあるが、ミトコンドリア DNA の塩基配列決定では、このダニは *Carios* 属ダニであることを明らかにしてきた。本年度研究においても、奄美諸島にて捕獲したダニすべてについて、属の同定をミトコンドリア DNA 塩基配列決定によって行ったが、これらダニもすべて *Carios capensis* もしく

は *C. capensis* の亜種に分類されることが明らかとなった。*Carios* 属からのボレリア分離・検出は現在まで報告がないことから、本邦におけるクチビルカズキダニ、サワイカズキダニ刺咬による回帰熱ボレリア感染の可能性は極めて低いことが推察された。

<結論>

国内棲息のクチビルカズキダニ、サワイカズキダニは渡り鳥を吸血源としているが、今のところこれらダニ刺咬による回帰熱ボレリア感染の可能性は極めて低い。(今後このダニがボレリア媒介能を有しないことが実験的に証明されることが望ましい。)

<結語>

1. 国内におけるシラミ媒介性回帰熱ボレリアのリスク評価を行う必要がある。
2. 特に海外からの輸入例対応のための実験室診断法の開発・整備に重点を置くべきと考える。

ライム病重症化・慢性化メカニズム解析のための遺伝学的ツール開発: マウス関節炎モデルによる関節炎重症化と相関するボレリア遺伝子領域の検索

ライム病ボレリアは人獣共通の細菌感染症で、全世界で年間数万人が感染しているとされる。その重篤かつ多彩な病態から予防・治療といった臨床面での研究が先行した一方で、ボレリア自身の病原性は遺伝学的ツールが確立されていなかったために未だに不明な部分が多い。我々も現在まで、ボレリアの病原性遺伝子の転写制御・機能解析を *E. coli*-background で行ってきたが、いずれも *Borrelia*-background での実験系が確立されていなかったため、十分な解析が行えたとは言い難い状況であった。

近年、ようやく数種類の *E. coli*-*Borrelia* シャトルベクターが開発されたが、一方でその形質転換頻度・効率は High-passage 株で高頻度である一方、Low-passage 株に至っては極めて低頻度であり、病原性解析などを行うための遺伝学的ツールとしての機能が十分ではなかった。また病原性株では形質転換後の非病原化が問題となっていた。従い、これらシャトルベクターを用いた *Borrelia* 形質転換効率の改善および非病原化の抑制が課題であった。

そこで我々は病原性株では形質転換が成功しないことに着目、病原性に関与するプラスミド上に何らかの形質転換を制限する遺伝子が存在すると考えた。これらプラスミド欠落株での形質転換効率がプラスミド非欠落株に比べ約 20-40 倍もの頻度であったこと、さらに遺伝子導入制限因子(制限修飾遺伝子)と推定した bbe02 破壊株では非破壊株に比較して約 40 倍の形質転換頻度の改善が見られたことから、この遺伝子が形質転換を制限している因子であることを立証した。さらに形質転換後においても、形質転換株はマウスに対しても感染性を失っておらず、これまで不可能であった *in vivo* でのボレリア因子の機能解析が可能であることを世界で初めて明らかにした。

ついでこのシステムの応用のためには、まずマウスなどの実験動物による病態再現モデルが必要である。本邦で入手可能であったマウスについては、主任研究者である増沢らが 1994 年に、ddY slc, C3H/HeN slc など純系、非近交系マウスで試行し、足蹠接種による強度炎症像を確認した一方で、足蹠接種法以外では関節炎誘導が見出されなかったことを報告していた。このことから、これらマウスによるライム関節炎など重症化に関与する因子の解析・評価は不可能と考えられていた。そこで我々はさらに数カ所の国内実感動物供給元より純系の C3H/HeN マウスを入手、C3H/HeN Crij マウスでライム病の重症化の指標とされるマウス関節炎モデルが再現できることを確認した。これはマウス側に何らかの関節炎を増悪させる因子が有ることを示している。またこのモデルを用い、bbe02 破壊株でも同様に親株同様の関節炎が誘導できることを関節および足蹠腫脹度、関節病理にて確認した。

現在まで、感染性を指標としたボレリアの病原性を調べる研究は多いが、その重症度を定量化した成績は少ない。我々は bbe02 破壊の結果得られた各種変異株のうち数種類について、関節炎増悪を指標とした重症度を定量化しているが、これまでに約 56kb の遺伝子領域の欠失と関節炎の減弱が相関していることを示す結果を得ている。今

後はこの他の重症化相関領域の特定と遺伝子同定を計るとともに、その機能を明らかにする。またこれまで得られた国内分離株についても同様の系でその重症度を定量化することで、国内感染例では関節炎などの重症化した病態が見出されないことについてもその原因を分子生物学的に明らかにしていく予定である。

全国規模での野鼠におけるレプトスピラ保菌調査

全国規模での野鼠におけるレプトスピラ保菌調査(2003)

南西諸島におけるレプトスピラ症の実態解明に関する研究

本邦では、1970年代以降衛生環境の向上により、保菌野鼠等の尿により汚染された環境からの直接感染例は減少傾向にある一方で、水のレジャー等による感染例が増加傾向にある。特に年間を通じて温暖な気候にある沖縄諸島では、八重山諸島・西表島(1999)、沖縄本島(2003)等、河川でのレジャー(リバーカヤック、小学生の川遊びなど)に起因するレプトスピラ症の集発事例が報告されている。また世界的に見ても、マレーシアでのトライアスロン大会における集団感染事例等、同様のケースが発生する傾向にある。

一方で沖縄諸島と同様に温暖な気候にある奄美諸島では、これまでレプトスピラ症の発生は報告されていなかったため、環境中の病原体汚染についてその実態は全く不明であった。

そこで本研究では、この地域でのレプトスピラ症病原体の浸潤の有無、及び侵淫している病原体の種類を明らかにするために、現地で病原体保菌動物と考えられる野鼠の捕獲調査を実施した。

<調査方法・地域>

調査では、かご型トラップにより、ドブネズミ、クマネズミなどのラット類捕獲を試みた。希少保護動物が存在するため、シャーマントラップ、圧殺型トラップの使用は許可されていない。捕獲されたラットは麻酔下採血後、安楽殺し、腎臓(レプトスピラ)、膀胱(ボレリア)、脾臓(エーリキア、野兎病菌、ペスト菌など)、肝臓(E型肝炎ウイルス)を摘出、各種培養試験、核酸検出試験などに供した。調査地域は、奄美諸島・与路島(鹿児島県大島郡瀬戸内町)内で地域内住居近辺の草地、牧草地、畑地などで野鼠捕獲を行った。調査は6日間行った。分離されたレプトスピラ株については種の同定、血清型同定・Pulse field ゲル電気泳動法による typing を行った。

<結果>

トラップ設置回数のはべ 366 回におよび、これによりクマネズミ(*Rattus rattus*)19 個体を捕獲した(捕獲率 5.2%)。このうち腎臓より7株(保菌率 36.8%)のレプトスピラを分離した。これら分離株はすべて血清型 Javanica であり、PFGE-type は沖縄本島で分離された株と一致した。HEV については凍結肝臓組織をサンプルとした RT-PCR 法を行ったが、すべて検出限界以下であった。ELISA 法による HEV 抗体については未試験である。またこの他の臓器からは方法で示した病原体は現時点で分離されていない。

<考察>

これまでレプトスピラ感染例が報告されていない奄美諸島でレプトスピラなどの病原体調査を行い、1)これら地域に棲息するラット類が高度にレプトスピラを保菌していること、2)沖縄などで分離されるレプトスピラ株と血清型、PFGE 型が一致する病原体がこの地域にも浸潤していることを初めて明らかにした。

(1)病原体の汚染頻度について

季節間推移、複数地点での調査を行っていないため、一概に汚染頻度の高低を述べることは困難ではあるが、2000-2002 年度に国内各地で行ってきた野鼠のレプトスピラ保菌調査では、全国平均での病原体分離陽性率は約 3%であり、また沖縄地方に限っても約 4.5%であったことから、調査地域での病原体汚染は全国的に見ても高い水準にある可能性が高いと推定された。

(2) 浸潤レプトスピラの種類

この地域で見出されたレプトスピラは *Leptospira borgpetersenii* serover Javanica であり、病原性レプトスピラに属している。また沖縄における患者からもこの血清型のレプトスピラが分離されており、今後この地域で、この病原性レプトスピラ感染患者を発生させる可能性は極めて高いと考えられる。

<結論>

今後この地域でもレプトスピラ症患者の発生が報告される可能性が高い。この際、血清診断の抗原として、九州・本州などで見出されるレプトスピラ株よりはむしろ、沖縄型レプトスピラ株を診断抗原として用いる必要があるだろう。

<結語>

1. 近年水のレジャーを振興しているこの地域では、沖縄諸島同様に、水のレジャーに起因するレプトスピラ症発生が今後危惧される。
2. レプトスピラ株の迅速 typing 法の検討は、感染地の推定、感染源の特定など疾病対策を進める上で極めて重要である。これは既存の方法である患者血清を用いた感染血清型推定、感染病原体の培養による血清型同定は迅速性に欠ける上、これら操作が煩雑であり、かつ試験材料の維持管理が難しいことから、限られた施設で行うことが出来ないためである。本研究班ではこれまでに PCR 法による種レベルでの同定法を確立してきたが、今後は subspecies レベルでの迅速 typing 法の確立を急ぐべきであると考え。特に、核酸増幅法をベースにした Multi Locus Sequence Typing (MLST) 法等は今後検討すべきである。

全国規模での野鼠におけるレプトスピラ保菌調査(2004)

国内でのレプトスピラ浸潤の実態を把握する目的で、当研究班では野生動物(特に野鼠類)の病原性レプトスピラ保菌状況を調査してきた。今年度はこれまで調査が行われていなかった地域を重点地域として、野鼠捕獲、病原体分離培養を行った。

<調査地域>

北海道、青森県、山形県、福島県、長野県、福井県、兵庫県、島根県(含隠岐島)、徳島県、鹿児島県(含屋久島、トカラ列島中之島)沖縄県(西表島)にて野鼠捕獲調査を行った。

<捕獲野鼠種類>

捕獲された野鼠はアカネズミ、ヒメネズミ、スミスネズミ、クマネズミ、ドブネズミ、ジネズミ類、ハツカネズミ類である。クマネズミ、ドブネズミ、ハツカネズミをのぞき、いずれも捕獲申請に基づき捕獲を行った。

<捕獲調査都道府県名と捕獲野鼠数(レプトスピラ陽性個体数)、図1>

北海道:28(0), 青森:41(0), 山形:14(0), 福島:2(0), 長野:52(3, 5.8%), 福井:10(0), 兵庫:3(0), 島根(内、隠岐島:15):96(1, 1.0%), 徳島:6(0), 鹿児島:61(0)(内、屋久島:9、トカラ列島中之島:45), 沖縄西表島:2(0)

捕獲野鼠数 315 頭, 陽性個体数 4 頭

<病原体分離結果>

レプトスピラ: 捕獲野鼠 315 頭中 4 頭(分離陽性率=1.3%)で病原性レプトスピラが分離された。分離種 flaB 遺伝子塩基配列決定により長野分離 3 株は *Leptospira interrogans* と同定された。島根分離株は未同定である。分離陽性個体はいずれもアカネズミであった。

ライム病ボレリア: 徳島、鹿児島で捕獲された野鼠より病原体分離を試み、捕獲野鼠 1 頭耳組織より *Borrelia japonica* が分離された。この他分担研究者である藤田、大橋、高橋はそれぞれリケッチア属、フランシセラ属、エーリキア属、エルシニア属細菌について検出を試みている。また共同研究者である丸山らは、捕獲野鼠 315 頭の内

試験に供した 25 頭中 14 頭から *Bartonella* 属細菌を分離した。これらの解析結果は各分担研究者の報告書を参照されたい。

<考察>

1970 年代以前は、レプトスピラ症は毎年流行が見られ、かつ年間数百人の死亡者をだした極めて重要な動物由来感染症である。近年は衛生環境の向上などにより患者数は減少傾向にあり、どちらかといえば「過去の感染症」という認識がなされているようである。一方で、沖縄県では本島、先島諸島で夏場における水のレジャーを原因とする集団発生事例が見出される事、かつての流行地域である宮城県でも、野鼠の保菌状況は未だに高いレベルで推移している事、また東南アジア等世界各地では洪水に起因する大流行が繰り返されている事から、今後何らかの社会的インフラの破綻(災害など)があった場合、再興しうるとの認識が必要であろう。

全国規模での野鼠におけるレプトスピラ保菌調査(2005)

国内でのレプトスピラ浸潤の実態を把握する目的で、当研究班では野生動物(特に野鼠類)の病原性レプトスピラ保菌状況を調査してきた。今年度はこれまで調査が行われていなかった地域を重点地域として、野鼠捕獲、病原体分離培養を行った。

<調査地域>

北海道、青森県、福井県、島根県、徳島県、鹿児島県、沖縄県にて野鼠捕獲調査を行った。

<捕獲野鼠種類>

捕獲された野鼠はアカネズミ、ヒメネズミ、スミスネズミ、クマネズミ、ドブネズミ、ジネズミ類、ハツカネズミ類である。クマネズミ、ドブネズミ、ハツカネズミをのぞき、いずれも捕獲申請に基づき捕獲を行った。

<捕獲調査都道府県名と捕獲野鼠数(レプトスピラ陽性個体数)>

北海道:53(1)、青森:14(0)、福井:14(0)、島根:6(0)、鹿児島:45(0)、沖縄:12(2)

捕獲野鼠数 144 頭、陽性個体数 3 頭、陽性率 2.1%

<病原体分離結果>

レプトスピラ:捕獲野鼠 144 頭中 3 頭(分離陽性率=2.1%)で病原性レプトスピラが分離された。分離種 *flaB* 遺伝子塩基配列決定により北海道分離 1 株は *Leptospira borgpetersenii* と同定された。沖縄分離株は未同定である。

この他分担研究者である藤田、大橋、高橋はそれぞれリケッチア属、フランシセラ属、エーリキア属、エルシニア属細菌について検出を試みている。また共同研究者である丸山らは、昨年度分与した野鼠肝臓、もしくは血液より各種 *Bartonella* 属細菌を見出している。*Bartonella* 属細菌は塹壕熱、ネコひっかき病にくわえ、心内膜炎、眼結膜炎などの要因になることが知られている。本調査で見出された *Bartonella* 属細菌は *rpoB* 遺伝子解析等から *B.grahamii*、*B.taylorii*、もしくはこれらの近縁種であると考えられる。

<考察>

1970 年代以前は、レプトスピラ症は毎年流行が見られ、かつ年間数百人の死亡者をだした極めて重要な動物由来感染症である。近年は衛生環境の向上などにより患者数は減少傾向にあり、どちらかといえば「過去の感染症」という認識がなされているようである。一方で、沖縄県では本島、先島諸島で夏場における水のレジャーを原因とする集団発生事例が見出される事、かつての流行地域である宮城県でも、野鼠の保菌状況は未だに高いレベルで推移している事、また東南アジア等世界各地では洪水に起因する大流行が繰り返されている事から、今後何らかの社会的インフラの破綻(災害など)があった場合、再興しうるとの認識が必要であろう。

論文発表・著書

1. Botkin DJ, Abbott A, Howell JK, Mosher M, Stewart PE, Rosa PA, Kawabata H, Watanabe H, Norris SJ. Transposon Mutagenesis of Infectious *Borrelia burgdorferi* B31: a Pilot Study. (SUBMITTED)
2. Jiang XG, Nie YX, Li XW, Xiao YC, Kam KM, Kawabata H, Watanabe H, Xu JG: Construction of database for the genetic identification of *Leptospira interrogans* by pulsed-field gel electrophoresis. (SUBMITTED)
3. Kawabata H, Sakakibara S, Imai Y, Masuzawa T, Fujita H, Tsurumi M, Sato F, Takano A, Nogami S, Kaneda K, Watanabe H: First record of *Leptospira borgpetersenii* isolation in the Amami Islands, Japan. **Microbiology and Immunology**. (SUBMITTED)
4. Kawabata H, Ando S, Kishimoto T, Kurane I, Takano A, Nogami S, Fujita H, Tsurumi M, Nakamura N, Sato F, Takahashi M, Ushijima Y, Fukunaga M, Watanabe H. First detection of *Rickettsia* in soft-bodied ticks associated with seabird, Japan. **Microbiology and Immunology**. (In Press)
5. Naitou H, Kawaguchi D, Nishimura Y, Inayoshi M, Kawamori F, Masuzawa T, Hiroi M, Kurashige H, Kawabata H, Fujita H, Ohashi N.: Molecular Identification of Ehrlichia Species and 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' from Ticks and Wild Rodents in Shizuoka and Nagano Prefectures, Japan. **Microbiology and Immunology**. 50: 45-51, 2006.
6. Furuta Y, Ohtani F, Aizawa H, Fukuda S, Kawabata H, Bergström T.: Varicella-zoster virus reactivation is an important cause of acute peripheral facial paralysis in children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. 24: 97-101, 2005.
7. Kawabata H, Norris SJ and Watanabe H. BBE02 disruption mutants of *Borrelia burgdorferi* B31 have a highly transformable, infectious phenotype. **Infection and Immunity**. 72(12):7147-7154, 2004.
8. Masuzawa T, Hashimoto N, Kudeken M, Kadosaka T, Nakamura M, Kawabata H, Koizumi N, Imai Y: New genomospecies related to *Borrelia valaisiana*, isolated from mammals in Okinawa archipelago, Japan. **Journal of Medical Microbiology**. 53: 421-6, 2004.
9. Güner ES, Watanabe M, Hashimoto N, Kadosaka T, Kawamura Y, Ezaki T, Kawabata H, Imai Y, Kaneda K, Masuzawa T: *Borrelia turcica* sp. nov., isolated from hard tick, *Hyalomma aegyptium* in Turkey. **International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology**. 54(5):1649-1952, 2004.
10. Hirano M, Ding X, Li TC, Takeda N, Kawabata H, Koizumi N, Kadosaka T, Goto I, Masuzawa T, Nakamura M, Taira K, Kuroki T, Tanikawa T, Sata T, Watanabe H and Abe K. Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. **Hepatology Research**. 1-5, 2003.
11. Koizumi N, Kawabata H, Watanabe H.: Probable laboratory contamination of clinical specimens with *Leptospira meyeri*. **Microbiology and Immunology**. 47(4), 305-306, 2003.

12. Ushijima Y, Keirans JE, Oliver Jr JH, Tsurumi M, Kawabata H, Watanabe H, Fukunaga M.: Mitochondrial sequence variation in *Carios capensis* (NEUMANN), a parasite of seabirds, collected on Torishima island in Japan. **Journal of Parasitology**. 89(1), 196-198, 2003.
13. 川合さなえ, 山中新也, 藤沢智美, 清島真理子, 川端寛樹. 遊走性紅斑を呈したライム病. 西日本皮膚科. 67(6), 599-603, 2005.
14. 御供田睦代, 中山浩一郎, 吉國謙一郎, 石谷完二, 新川奈緒美, 蔵元口, 宮田義彦, 本田俊郎, 藤田博己, 高田伸弘, 川端寛樹. 鹿児島県内の野鼠及びダニ類の調査について. 鹿児島県環境保健センター所報. 67-70, 2005.
15. 本田俊郎, 中山浩一郎, 吉國謙一郎, 石谷完二, 新川奈緒美, 蔵元口, 川元孝久, 藤田博己, 斎藤あつ子, 矢野泰弘, 高田伸弘, 川端寛樹: 鹿児島県で捕獲した野鼠からの病原体検索. 鹿児島県環境保健センター所報. 67-70, 2004.
16. 中村正治, 平良勝也, 大野惇, 増澤俊幸, 角坂照貴, 川端寛樹, 小泉信夫, 藤田博己. 沖縄県におけるレプトスピラの保菌動物調査. 日本獣医師会雑誌. 57(5), 321-325, 2004.
17. 増沢俊幸, 金田一秀, 角坂照貴, 小泉信夫, 川端寛樹, 中村正治, 平良勝也, 今井康之: ライム病の存在が予期されなかった沖縄で見出されたライム病関連ボレリアの性状. 獣医畜産新報. 57(8), 662-664, 2004.
18. 川端寛樹, 渡辺治雄, 多田有希, 木村幹男: ライム病血清診断に関する注意の呼びかけ. 病原微生物検出情報. 25(8), 2004.
19. 川端寛樹: 節足動物媒介性感染症と媒介動物のインターフェイス: cutting edge. ダニ類研究班会報. 2005.
20. 川端寛樹: ライム病とボレリアの遺伝子改変技術. 日本細菌学会ニュース. 2005.
21. 川端寛樹: ライム病. 感染症. 家庭医学大全科. 法研(株). pp 2718-2719, 2004.
22. 川端寛樹: 回帰熱. 感染症. 家庭医学大全科. 法研(株). pp 2719-2720, 2004.
23. 川端寛樹: レプトスピラ症(ワイル病). 感染症. 家庭医学大全科. 法研(株). pp 2772-2773, 2004.
24. 川端寛樹: ライム病. 感染症の辞典. pp 251-253, 2004.
25. 川端寛樹: 回帰熱. 感染症の辞典. pp 40-41, 2004.
26. 川端寛樹: ライム病. 理解して実践する感染症診療・投薬ガイド. 総合臨床増刊. 52, 533-540, 2003.
27. 川端寛樹, 小泉信夫, 渡辺治雄: レプトスピラ症、動物由来感染症—その診断と対策. 227-231, 2003.

学会発表・講演

1. Masuzawa T, Sakakibara S, Kawabata H, Imai Y. Classification of *Leptospira* Reference Strains Based on DNA Gyrase B Subunit Gene Sequences. International Leptospirosis Society 4th Scientific Meeting. Thailand, Nov. 2005.
2. Takano A, Kishimoto T, Ando S, Satou K, Arakawa K, Ogawa M, Nogami S, Kawabata H, Fujita H Prevalence of *Borrelia*, *Ehrlichia* and *Rickettsia* in ticks(Acari:Ixodidae), Japan. The 1st Scientific Meeting of the Asian Zoo & Wildlife Medicine 2005. Thailand. Oct. 2005.
3. Kawabata H and Watanabe H. Establishment of transformable/infectious Lyme disease *Borrelia burgdorferi* B31: Retention of lp25 in *bbe02* disrupted mutants. The Gordon Research Conference, The Biology of Spirochetes. Ventura, CA, USA. Jan. 2004
4. 田原研司, 保科 健, 新井 智, 辻 正義, 川端寛樹, 角坂照貴, 藤田博己, 矢野泰弘, 高田伸弘. 島根県下に生息する野ネズミからの *Babesia microti* SSU rRNA 遺伝子の検出. 日本衛生動物学会大会. 2006 年 4 月.
5. 齋藤幹, 川端寛樹, 小泉信夫, 藤田博己, 高野愛, 渡邊治雄. 海外での *Borrelia valaisiana* 近縁種感染によるライム病輸入例. 第 43 回レプトスピラシンポジウム. 2006 年 3 月.
6. 川端寛樹, 高野愛, 渡邊治雄. 非組換え抗原型ライム病血清診断キットの標準化. 第 43 回レプトスピラシンポジウム. 2006 年 3 月.
7. 川端寛樹, 新田芳樹, 角坂照貴, 藤田博己, 御供田睦代, 本田俊郎, 増沢俊幸, 河村好章, 江崎孝行, 高野愛, 渡邊治雄. 南西諸島における *Borrelia valaisiana* 近縁種の浸潤. 第 43 回レプトスピラシンポジウム. 2006 年 3 月.
8. 三宅浩行, 山口全一, 加藤理子, 馬場俊一, 藤田博己, 川端寛樹, 齋藤範夫. フタトゲチマダニ若虫刺咬症の小児例. 日本皮膚科学会東京地方会. 2006 年 1 月.
9. 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. 2005 年 11 月.
10. 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. 日本細菌学会関東支部会. 2005 年 10 月.
11. 川端寛樹. ライム病とボレリアの遺伝子改変技術. 日本細菌学会関東支部会. 2005 年 10 月.
12. 安藤秀二, 高野 愛, 鶴見みや古, 仲村 昇, 佐藤文男, 高橋 守, 岸本寿男, 野上貞雄, 川端寛樹, 藤田博己. *Carios* 属ダニの病原体ベクターとしてのリスク評価. リケツチア研究会. 2005 年 10 月.
13. 高野 愛, 岸本寿男, 安藤秀二, 佐藤梢, 荒川香南子, 小川基彦, 野上貞雄, 川端寛樹, 藤田博己. 日本国内で採取されたマダニにおけるライム病病原体ボレリアの浸潤状況. 日本野生動物医学会. 2005 年 9 月.

14. 高野 愛, 鶴見みや古, 仲村 昇, 佐藤文男, 高橋 守, 岸本寿男, 安藤秀二, 野上貞雄, 川端寛樹, 藤田博己. *Carios* 属から見出された *Rickettsia*. 第 13 回 SADI(ダニと疾病のインターフェイスに関するセミナー). 2005 年 9 月.
15. 田原研司, 板垣朝夫, 川端寛樹, 角坂照貴, 藤田博己, 矢野泰弘, 高田伸弘. 島根県におけるつつがむし病の発生状況と *Orientia tsutsugamushi* の流行株. 島根県獣医学会. 2005 年 8 月
16. 矢野泰弘, 田原研司, 板垣朝夫, 藤田博己, 角坂照貴, 川端寛樹, 高田伸弘. 隠岐諸島および島根県本土域におけるツツガムシ病の疫学的特性. 日本衛生動物学会大会. 2005 年 6 月.
17. 石畝史, 高田伸弘, 藤田博己, 矢野泰弘, 溝口二郎, 田原研司, 川端寛樹, 増沢俊幸. 島嶼を含む列島各地におけるライム病関連ボレリアの調査, 2004 年の成績と考察. 日本衛生動物学会大会. 2005 年 6 月.
18. 佐々木年則, 佐々木次雄, 久保田真由美, 川端寛樹, Poudel, S.K.S., 星野啓太, 比嘉由紀子, 伊澤晴彦, 冨田隆史, 澤邊京子, 荒川宜親, 小林睦生. 再興感染症としての壱塚熱および回帰熱に対する疫学的試み. 日本衛生動物学会大会. 2005 年 6 月.
19. 藤田博己, 川端寛樹, 小泉信夫, 角坂照貴, 新田芳樹. 沖縄本島のミナミネズミマダニからの紅斑熱群リケッチア分離例. 日本衛生動物学会大会. 2005 年 6 月.
20. 新田芳樹, 柳田千夏, 川端寛樹, 小泉信夫, 藤田博己, 角坂照貴. *Leptospira flaB* nested PCR の検討と野外応用. 第 42 回レプトスピラシンポジウム. 2005 年 4 月.
21. 丸山総一, 井上快, 山田直樹, 壁谷英則, 見上彪, 佐藤雪太, 川森文彦, 大橋典男, 増沢俊幸, 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. 日本獣医学会学術集会. 2005 年 3 月.
22. 川合さなえ, 山中新也, 藤沢智美, 清島真理子, 川端寛樹. 遊走性紅斑を呈したライム病の 1 例. 日本皮膚学会東海地方会. 2004 年 12 月.
23. 川端寛樹. 野生齧歯類とレプトスピラ症. 学術フロンティア「人獣共通感染症のサーベイランスと制御」シンポジウム. 2004 年 11 月.
24. 川端寛樹. ダニと鳥の感染症: ダニに起因する感染症. 日本鳥学会 2004 年度大会. 2004 年 9 月.
25. 川端寛樹. 細菌・ウイルスが引き起こす人獣共通感染症. 山階鳥類研究所セミナー. 2004 年 7 月.
26. 川端寛樹, 藤田博己, 榊原省司, 増沢俊幸, 鶴見みや古, 渡邊治雄. 奄美諸島における回帰熱, レプトスピラ調査. 第 12 回 SADI(ダニと疾病のインターフェイスに関するセミナー). 2004 年 6 月.

27. 増澤俊幸,渡邊むつみ,Ece S. Guner,角坂照貴,河村好章,江崎孝行,川端寛樹,今井康之,金田一秀. 回帰熱ボレリアとライム病ボレリアの中間に位置する新種 *Borrelia turcica* の性状. 第 41 回レプトスピラシンポジウム.2004 年 4 月.
28. 川端寛樹,渡邊治雄. 制限修飾遺伝子破壊株による形質導入とその感染性. 第 41 回レプトスピラシンポジウム.2004 年 4 月.
29. 榊原省司,増沢俊幸,川端寛樹. *gyrB* 解析によるレプトスピラ血清型推定法の開発.第 41 回レプトスピラシンポジウム.2004 年 4 月.
30. 川端寛樹,榊原省司,今井康之,増澤俊幸,藤田博己,渡邊治雄. 奄美諸島におけるレプトスピラの浸潤.第 41 回レプトスピラシンポジウム.2004 年 4 月.
31. 増澤俊幸,渡邊むつみ,河村好章,川端寛樹,今井康之,金田一秀,江崎孝行: 回帰熱ボレリアとも,ライム病ボレリアとも異なる新規なボレリア *Borrelia turcica* sp. nov. . 日本細菌学会総会(大阪). 2004 年 4 月.
32. 増澤俊幸,角坂照貴,小泉信夫,川端寛樹,中村正治,平良勝也,今井康之:ライム病の存在が予期されなかった沖縄で見出されたライム病関連ボレリアの性状.第3回人と動物の共通感染症研究会(東京).2003 年 11 月
33. 川端寛樹,渡辺治雄:ライム病ボレリア推定制限・修飾遺伝子破壊による感染性株の形質転換法確立.第 86 回日本細菌学会関東支部会(横浜).2003 年 10 月
34. 川端寛樹:ポストゲノムにおけるライム病研究新戦略と展望-ライム病ボレリア遺伝子改変技術の現状.第 11 回 SADI(ダニと疾病のインターフェイスに関するセミナー)(長野).2003 年 9 月
35. 川端寛樹,足立拓也,相楽裕子,渡辺治雄:ライム病の輸入例.第 40 回レプトスピラシンポジウム.2003 年 4 月.
36. 川端寛樹,渡辺治雄:ライム病ボレリアの New type-restriction/modification system: 遺伝子導入可能な感染性ボレリア作成の可能性について.第 40 回レプトスピラシンポジウム.2003 年 4 月.
37. 増沢俊幸,角坂照貴,川端寛樹,小泉信夫,後藤郁夫,中村正治:レプトスピラ病疫学調査結果 最終報告.第 40 回レプトスピラシンポジウム.2003 年 4 月.
38. 小泉信夫,星野真西,谷川力,牧野敬,川端寛樹,黒木俊郎,渡辺治雄:野生動物のレプトスピラ保有状況調査 - 東京都内ドブネズミ及びアライグマの場合-.第 40 回レプトスピラシンポジウム.2003 年 4 月.

病原性レプトスピラのタンパク質抗原の探索

分担研究者 小泉信夫 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官
研究協力者 鈴木悟 共立製薬先端技術開発センター 研究開発一部二課 研究員
研究協力者 村上保人 共立製薬先端技術開発センター 研究開発一部二課 課長
研究協力者 岸雅彦 共立製薬先端技術開発センター 研究開発一部 部長

レプトスピラ抗原 Lig タンパク質の同定

マウス感染血清およびヒト患者血清を用いたイムノスクリーニングにより、レプトスピラ抗原遺伝子 *ligA-m*, *ligB-m* を同定した (accession nos. AB098516, AB098517). *ligA-m*, *ligB-m* 遺伝子の ORF には、約 90 アミノ酸の繰り返し配列がそれぞれ 12 個と 11 個存在し、N 末端の 6 個の繰り返し配列はお互いに 93% の相同性が認められた一方で、C 末端側の相同性は 40% 以下と低いことがわかった。これらの繰り返し配列は相同性検索の結果から、病原細菌の接着因子にみられる細菌イムノグロブリン様ドメインであることが明らかになり (pfam02368,, smart00635), すでに *L. interrogans* serovar Pomona で同定されていた LigA と高い相同性を示した。

さまざまな病原性、非病原性レプトスピラにおける *lig* 遺伝子の存在をサザンブロット解析により調査した結果、調査した病原性レプトスピラ 10 株すべてにおいて *lig* 遺伝子の存在が確認されたが、非病原性レプトスピラでは確認されなかった。

LigA-m は [³H]-パルミチン酸による *in vivo* 標識を行った結果、リポタンパク質であると考えられた。また proteinase K 消化により、LigA-m は細胞表面に露出していることが示唆された。

Lig タンパク質はマウス、ハムスターにおいて感染防御免疫を誘導する

LigA-m, LigB-m が感染防御抗原として機能するかを明らかにするために、C3H/HeJ マウスを用いた感染防御試験を行った。感染防御実験の結果、LigA-m, LigB-m にはそれぞれ感染防御能があることが明らかになった。また 2 種類の Lig タンパク質で高度に保存されている N 末端領域と、保存性の低い C 末端領域のどちらが感染防御に機能するかを調査するために、それぞれの領域の組換えタンパク質を作製し、C3H/HeJ マウスに免疫、血

清型 *Manilae* による感染防御試験を行った結果、相同性の高い N 末端領域に強い感染防御能があることが明らかになった。また *LigA-m*、*LigB-m* が同定された血清型 *Manilae* とは異なる血清型 *Icterohaemorrhagiae* に対しても、完全長あるいは N 末端領域のみでも感染防御免疫を誘導できることが明らかになった。さらに他のレプトスピラ症モデル動物であるハムスターでも *LigA-m* 免疫により、マウスでの効果に比べると弱いもののハムスターにおいても感染防御免疫を誘導できることが明らかになった。感染後生存したマウスはすべて腎臓にレプトスピラが定着していたが、ハムスターでは 4 頭中 2 頭でレプトスピラが腎臓に定着しない *sterilizing immunity* が誘導された。

レプトスピラ症患者血清中には *Lig* タンパク質に対する抗体が存在する

L. interrogans serovar *Manilae* に感染した患者血清中の *LigA-m*、*LigB-m* に対する抗体価は、健常人の血清中の抗体価に比べて有意に高かった。また *Manilae* 以外の血清型のレプトスピラに感染した患者の回復期血清中の *LigA-m*、*LigB-m* に対する抗体価は、急性期血清中の抗体価と比較して有意に上昇していた。

今後の課題

本研究によって、マウス、ハムスターに対して感染防御免疫を誘導できるレプトスピラ抗原 *Lig* タンパク質を同定することができた。*lig* 遺伝子は多くの病原性レプトスピラに相同遺伝子が存在し、さまざまな血清型に感染したレプトスピラ症患者血清中には、*Lig* タンパク質に対する抗体が産生されていることも明らかになった。レプトスピラ症に対する現行のワクチンは、血清型に特異的な効果しかなく、多くの血清型に有効な新たなワクチンの開発が急務となっている。本研究により、*Lig* タンパク質は広範囲のレプトスピラ血清型感染に有効なワクチンに有用な抗原となる可能性が示唆された。

他の研究グループによる最新のレプトスピラ症研究から、これまでレプトスピラ感染に対する免疫は液性免疫、すなわち抗体が担っているとされてきたが、細胞性免疫の重要性が明らかとなり、*Th1* 免疫の確立が持続感染の阻止に重要であることが明らかとなった。またレプトスピラ抗原 *Hap1/LipL32* の免疫誘導について、免疫方法の違いによりその感染防御効果が異なることが示された。今後は、より効果の高い *Lig* タンパク質の免疫方法を確立してハムスターでの感染防御効果の増強を検討するとともに、さらに他のレプトスピラ感染モデル動物(イヌなど)での感染防御実験も行い、*Lig* タンパク質の有用性をさらに検証していく必要がある。