

図1. *B. miyamotoi*分離株を用いた MLST 解析

得られた8遺伝子の塩基配列を結合し、合計約5,000の塩基配列を用いた系統樹を示した。モンゴル分離株計8株は全て北海道分離株計11株と100%一致した。他方、本州の *I. persulcatus* より分離された Y14T1 株は、北海道由来株およびモンゴル由来株とはわずかに異なる配列であった。なお、本州の *I. persulcatus* からは北海道由来株と同じ遺伝子型を持つ Y14T2 株も分離されたが、分離株として確立することが出来なかった。系統樹は近隣結合法を用いて作成し、Bootstrap 解析の結果は70%以上の確立で分岐することが支持された箇所のみ併記した。Scale bar の0.01は、1%の相違を示す。

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる技術・情報の体系化に関する研究
分担研究報告書

北海道におけるマダニ刺咬の現状に関する調査

| | | |
|-------|-------|------------------|
| 研究分担者 | 川端 寛樹 | 国立感染症研究所細菌第一部 |
| 研究協力者 | 兼古 稔 | 上富良野町立病院 |
| | 伊東 拓也 | 北海道立衛生研究所医動物グループ |
| | 佐藤 梢 | 国立感染症研究所細菌第一部 |

研究要旨

新興回帰熱は 2011 年以降、日本、ロシア、米国、オランダで患者報告がなされたマダニ媒介性の新しい感染症である。これまでに我が国では、遡及調査等により 3 例の報告がなされたが、その感染実態は不明である。そこで、本研究では、北海道 A 病院の協力のもと、北海道におけるマダニ人体刺咬について情報を収集するとともに、これらマダニから新興回帰熱病原体を含むボレリア DNA の検出を試み、病原体の感染リスクについて検討を行った。

A. 研究目的

2011 年に初めて報告された *Borrelia miyamotoi* 感染による新興回帰熱は、我が国で最も新しい感染症の一つである。*B. miyamotoi* は 1995 年に我が国で発見・同定されたボレリアで、発見当時はその病原性は不明であったが、2011 年のロシアでの感染例を皮切りに、アメリカ、オランダ、日本で患者が報告された。本ボレリア感染症の全容は未だ不明であるが、*Ixodes* 属マダニが病原体を伝播すると考えられている。そこで本研究では、北海道内のヒトのマダニ刺咬実態の現状を把握するため、ヒト寄生マダニ種および病原体の保有について調査を行った。

B. 研究方法

2014 年 5 月から 8 月までのマダニ活動期に、北海道の A 病院へマダニ刺咬症として受診した患者に吸着していた虫体 28 個体について、その 1) 寄生マダニ種の同定、2) 病原体保有の有無を調べた。寄生マダニ種の同定は、形態学的に行った。また *Borrelia* 属細菌の保有の有無については、リアルタイム PCR 法により行った。

(倫理面からの配慮について)

人体寄生マダニの同定と保有病原体の検索のみ行ったため、該当しない。

C. 研究結果

1) ヒト刺咬マダニ種

マダニ刺咬を受けた患者は 5 月後半から 8 月初旬に来院していた。マダニ刺咬例 24 例中 18 例(75.0%)がシュルツェマダニ刺咬例、2 例(8.3%)がシュルツェマダニとヤマトマダニの同時刺咬例、4 例(16.7%)がヤマトマダニ刺咬例であった。いずれの症例もマダニ成虫♀による刺咬例であった。また 2 例(8.3%)が複数マダニ個体の同時吸着を受けていた(表1)。

2) 吸血の状態

各々のマダニの吸血状態を推定した結果、飽血もしくは不完全飽血状態が 7 個体(25.0%)、未吸血もしくは吸血開始直後と考えられるマダニ個体は 21 個体(75.0%)であった。

3) 病原体の保有状況

各々のマダニのボレリア保菌率を表 2 に示した。ライム病群ボレリアの各々の保有率はシュルツェマダニ 40.9%、ヤマトマダニ 50.0%であった。またシュルツェマダニ1個体(3.6%)より回帰熱群ボレリア DNA が検出された。

D. 考察

これまでの我々の調査(2012-2013 年)では、北海道内での植生上のマダニのライム病ボレリア保有率は、シュルツェマダニ 31.7%(♀成虫 32.1%)、ヤマトマダニ 42.6%(♀成虫 40.9%)、パブロフスキーマダニ 15.4%(♀成虫 15.7%)であった。今回試験に供した、ヒト寄生シュルツェマダニおよびヤマトマダニ各々の保菌率は植生から採取されたマダニよりやや高値を示したが、ヒト寄生マダニ、植生上マダニ間でそのボレリア保菌率に有意差は見られなかった。またシュルツェマダニ1個体より回帰

熱群ボレリアが検出された。北海道における植生上シュルツェマダニの *Borrelia miyamotoi* 保有率はおよそ 2%であり、ライム病群ボレリア同様病原体保有マダニによる刺咬例が存在することが確認された。

調査を行った A 町は人口 1.1 万人の地方自治体である。これをもとに推計した場合、同様の地域における人口 10 万人当りのマダニ刺咬例数は 218 人/年と推定された。本刺咬率を北海道全体に一律に適用できる訳ではないが、北海道の全人口を 550 万人とすると、北海道全体で少なくとも年間 1.2 万人がマダニ刺咬を受けていることになる。これはオランダにおけるマダニ刺咬症例数の推計(Hofhuis A, et al. *Infectieziektebulletin*. 21(3): 84-87, 2010.)と比較しても高い数値ではない。この内、ライム病ボレリアや新興回帰熱を伝播すると考えられるシュルツェマダニの占有率は 75%であり、また、病原体が体内に移行したと考えられる「飽血もしくは不完全飽血状態」のマダニが全体の 25.0%を占めた。また、ライム病病原体、新興回帰熱病原体を保有するマダニの比率を各々 40.9%、3.6%とするならば、道内で年間およそ約 900 例のライム病ボレリア感染例および約 80 例の新興回帰熱症例が報告されることになる。しかしながら、感染症法による報告数はライム病が年間 10-20 例、新興回帰熱が 1-2 例で推移しており、本研究による推計と大きく乖離する。これは、1) マダニ刺咬により来院した患者の多くが予防的な抗菌薬投与を受けているため、実際に発症した患者数が低い水準で押さえられている可能性、ならびに、2) 臨床診断によりライム病(含む新興回帰熱)と診断したが、実験室診断を行わなかったため感染症法による報告義務が生じなかったこと等が原因として考えられた。今後は調査地点

を広げる等でより正確な実態把握を行う必要がある。

E. 結論

北海道ではマダニの病原体ボレリア保有率は高く、かつ病原体保有マダニによる曝露機会もあることがあらためて示された。本研究による推定患者数は実際の報告数より低い。この原因を明らかにすることで他地域(含む他国)でのダニ媒介性感染症の制御に有効な対策が立案できる可能性がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Murase Y, Konnai S, Yamada S, Githaka N, Isezaki M, Ito T, Takano A, Ando S, Kawabata H, Murata S, Ohashi K. An investigation of binding ability of *Ixodes persulcatus* Schulze Salp15 with Lyme disease spirochetes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** (Accepted)
- 2) Kutsuna S, Kawabata H, Ohmagari N. Imported Lyme disease. **Internal Medicine**. (In press)
- 3) Oda S, Kabeya H, Sato S, Shimonagane A, Inoue K, Hayashidani H, Takada N, Fujita H, Kawabata H, Maruyama S. Isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* 1B/O:8 in from *Apodemus* mice in Japan. **Journal of Wildlife Diseases** 51(1):260-264, 2015.
- 4) Lee K, Takano A, Taylor K, Sasika M, Shimozuru M, Konnai S, Kawabata H, Tsubota T. A Relapsing fever group *Borrelia* sp. similar to *Borrelia lonestari* found among wild sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) and *Haemaphysalis* spp. ticks in Hokkaido, Japan. **Ticks and Tick-borne Diseases** 5: 841-847, 2014.
- 5) Andoh M, Ogasawara Y, Sakata A, Ito T, Fujita H, Kawabata H, Ando S. Isolation of spotted fever group Rickettsia, *R. tamurae* and *Candidatus R. kotlanii*, from *Haemaphysalis megasinosae* in Japan. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases** 14(9):681-684, 2014.
- 6) Natsuaki M, Takada N, Kawabata H, Ando S, Yamanishi K. A case of tick-associated rash illness caused by *Amblyomma testudinarium*. **Journal of Dermatology** 41(9): 834-836, 2014.
- 7) Takano A, Toyomane K, Konnai S, Ohashi K, Nakao M, Ito T, Andoh M, Maeda K, Watarai M, Sato K, Kawabata H. Tick surveillance for relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in Hokkaido, Japan. **PLoS One** 9(8): e104532, 2014.
- 8) Sato K, Takano A, Konnai S, Nakao M, Ito T, Kaneko M, Koyama K, Ohnishi M, Kawabata H. Human *Borrelia miyamotoi* infection in Japan. **Emerging Infectious Diseases**. 20(8): 1391-1393, 2014.

- 9) Hidano A, Konnai S, Yamada S, Gitahi, N, Higuchi H, Nagahata H, Ito T, Kawabata H, Ando S, Takano A, Murata S, Isesaki M. Suppressive effects of nutrophil by Salp16 Iper, a salivary gland protein, from *Ixodes persulcatus* Schulze tick. **Insect Molecular Biology**. 23(4), 466-474, 2014.
- 10) Takano A, Fujita H, Kadosaka T, Takahashi T, Yamauchi T, Ishiguro F, Takada N, Yano Y, Oikawa Y, Honda T, Gokuden M, Tsunoda T, Turumi M, Ando S, Andoh M, Sato K, Kawabata H. Construction of a DNA database for ticks collected in Japan: application of molecular identification based on the mitochondrial 16S rDNA gene. **Medical Entomology and Zoology**. 65(1): 13-21, 2014.
2. 学会発表
- 1) 藤田信子, 藤田博己, 角坂照貴, 安藤秀二, 川端寛樹. 四国型恙虫病の媒介種トサツガムシの現況(予報). 第 69 回日本衛生動物学会西日本支部大会. 愛知, (2014.11)
- 2) 川端寛樹. 新興回帰熱病原体 *Borrelia miyamotoi* の病原性解析. 第 69 回日本衛生動物学会西日本支部大会. 愛知, (2014.11)
- 3) 梶田弘子, 岩渕香織, 高橋雅輝, 佐藤直人, 山内貴義, 斎藤幸一, 高野愛, 川端寛樹, 宇田晶彦, 森川茂. 岩手県におけるマダニの生息調査および病原体保有状況. 第 60 回日本衛生動物学会北日本支部大会・日本寄生虫学会北日本支部合同大会. 盛岡, (2014.10)
- 4) 川端寛樹, 今内覚, 高野愛, 中尾稔, 伊東拓也, 佐藤梢. 北海道におけるマダニ媒介性新興回帰熱病原体ボレリアの分布調査. 第 60 回日本衛生動物学会北日本支部大会・日本寄生虫学会北日本支部合同大会. 盛岡, (2014.10)
- 5) Kyunglee Lee, 高野 愛, Kyle Taylor, 左鹿万里子, 下鶴倫人, 今内 覚, 川端寛樹, 坪田敏男. A RF *Borrelia* sp. found among wild sika deer and *Haemaphysalis* ticks in Hokkaido. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 札幌, (2014.9)
- 6) 大場真己, 大松勉, 安藤秀二, 川端寛樹, 高野愛, 片山幸枝, 古谷哲也, 長井誠, 水谷哲也. コウモリマルヒメダニから分離された新規ブニヤウイルスについて. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 札幌, (2014.9)
- 7) 川端寛樹. ダニ媒介性細菌感染症の疫学および診断法. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 札幌, (2014.9)
- 8) 川端寛樹, 高野愛, 大西真. 後向きサーベイランスにより明らかとなった新興回帰熱の 2 例. 第 88 回日本感染症学会学術講演会. 福岡, (2014.6)
- 9) 岡恵子, 川端寛樹. スウェーデンで *Borrelia* 保有のマダニに咬着された 2 例. 第 30 回臨床皮膚科医会総会. 横浜, (2014.4)

- | | |
|------------------|--------|
| H. 知的財産権の出願・登録状況 | 特記事項なし |
| 1. 特許取得 | 3. その他 |
| 特記事項なし | 特記事項なし |
| 2. 実用新案登録 | |

表1. 北海道 A 病院を受診した人体刺咬マダニの病原体検出率

| 症例番号 | ダニ虫体 | | リアルタイム PCR | |
|------|----------|---------------|------------|------|
| | ダニの種類 | 吸血の有無 | ライム病群 | 回帰熱群 |
| 1 | シュルツェマダニ | 未吸血もしくは吸血開始直後 | - | - |
| 2 | シュルツェマダニ | 未吸血もしくは吸血開始直後 | + | - |
| 3 | シュルツェマダニ | 不完全飽血 | - | - |
| 4 | シュルツェマダニ | 未吸血もしくは吸血開始直後 | + | - |
| 5 | シュルツェマダニ | 未吸血もしくは吸血開始直後 | + | - |
| | ヤマトマダニ | 未吸血もしくは吸血開始直後 | - | - |
| 6 | ヤマトマダニ | 飽血 | - | - |
| 7 | ヤマトマダニ | 未吸血もしくは吸血開始直後 | + | - |
| 8 | ヤマトマダニ | 未吸血もしくは吸血開始直後 | + | - |
| 9 | ヤマトマダニ | 飽血 | + | - |
| 10 | シュルツェマダニ | 未吸血もしくは吸血開始直後 | + | - |
| 11 | シュルツェマダニ | 不完全飽血 | + | - |
| 12 | シュルツェマダニ | 吸血行動前 | - | - |
| 13 | シュルツェマダニ | 不完全飽血 | - | - |
| 14 | シュルツェマダニ | 飽血 | - | - |
| 15 | シュルツェマダニ | 未吸血もしくは吸血開始直後 | - | - |
| 16 | シュルツェマダニ | 未吸血もしくは吸血開始直後 | - | - |
| 17 | シュルツェマダニ | 未吸血もしくは吸血開始直後 | - | - |
| 18 | シュルツェマダニ | 不完全飽血 | - | - |
| 19 | シュルツェマダニ | 未吸血もしくは吸血開始直後 | + | + |
| | ヤマトマダニ | 未吸血もしくは吸血開始直後 | - | - |
| | シュルツェマダニ | 未吸血もしくは吸血開始直後 | + | - |
| | シュルツェマダニ | 未吸血もしくは吸血開始直後 | +/- | - |
| 20 | シュルツェマダニ | 未吸血もしくは吸血開始直後 | + | - |
| 21 | シュルツェマダニ | 未吸血もしくは吸血開始直後 | - | - |
| 22 | シュルツェマダニ | 未吸血もしくは吸血開始直後 | - | - |
| 23 | シュルツェマダニ | 未吸血もしくは吸血開始直後 | - | - |
| 24 | シュルツェマダニ | 未吸血もしくは吸血開始直後 | + | - |

表2. 人体寄生マダニの病原体ボレリア陽性率

| | ライム病群ボレリア | 回帰熱群ボレリア |
|----------|---------------|---------------|
| | 陽性数/試験数 (陽性率) | 陽性数/試験数 (陽性率) |
| シュルツェマダニ | 9/22 (40.9%) | 1/22 (4.5%) |
| ヤマトマダニ | 3/6 (50.0%) | 0/6 (0%) |

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる技術・情報の体系化に関する研究
分担研究報告書

新興回帰熱病原体 *Borrelia miyamotoi* の薬剤感受性

| | | |
|-------|-------|-------------------|
| 研究分担者 | 川端 寛樹 | 国立感染症研究所細菌第一部 |
| 研究協力者 | 佐藤 梢 | 国立感染症研究所細菌第一部 |
| | 高野 愛 | 山口大学共同獣医学部(研究分担者) |
| | 今内 覚 | 北海道大学獣医学部(研究分担者) |
| | 中尾 稔 | 旭川医科大学医学部 |
| | 伊東 拓也 | 北海道立衛生研究所医動物グループ |

研究要旨

新興回帰熱は 2011 年以降、日本、ロシア、米国、オランダで患者報告がなされたマダニ媒介性の新しい感染症である。これまでに、我が国では、遡及調査等により 2 例の報告がなされ、それぞれミノマイシン、ロセフィンによる治療がなされている。本研究では、これら薬剤に加え、実際に治療に使われる可能性がある抗菌薬に対する薬剤感受性を調べた。

A. 研究目的

2011 年に初めて報告された *Borrelia miyamotoi* 感染による新興回帰熱は、我が国で最も新しい感染症の一つである。*B. miyamotoi* は 1995 年に我が国で発見・同定されたボレリアで、発見当時はその病原性は不明であったが、2011 年のロシアでの感染例報告を皮切りに、アメリカ、オランダ、日本で患者が報告された。本ボレリア感染症の全容は未だ不明であるが、急性期には高度の菌血症を呈する場合があること、また、免疫抑制状態にあるヒトが感染した場合、慢性髄膜炎を呈すること等から、抗菌薬投与によるヤーリッシュ・ヘルクスハイマー反応 (JHR) を回避しつつ、

適切な抗菌薬投与が求められている。本研究では、新興回帰熱と混合感染する可能性があるライム病ボレリア治療に用いられる抗菌薬を中心に、適切な抗菌薬選択の基礎情報となる *B. miyamotoi* の In vitro 抗菌薬感受性を調べた。

B. 研究方法

1) 使用した細菌株

2012 年に北海道のマダニから分離された *B. miyamotoi* 5 株 (MYK1, MYK2, MYK3, MYK4, MYK5) を試験に供した。これら 5 株の植継数は 6 回以内である。対照となるライム病群ボレリアには、中尾らによりヒト皮膚組織より

り分離された *Borrelia bavariensis* J-14 株、*Staphylococcus aureus* ATCC29213 株を用いた。ボレリア株の培養には BSK-H 培地を用い、30°C で 1×10^6 - 1×10^7 /ml まで増殖させ試験に用いた。

2) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、Morgenstern らの方法 (Morgenstern et al. Antimicrob. Agents Chemother. 53: 1281-1284, 2009) に一部変更を加え行った。Minimal Inhibition concentrate (MIC) 測定は滅菌 96 穴 plate を用い行った。試験する抗生物質溶液を 0.2 μ m PES フィルターを用いて濾過滅菌し、BSK-H 培地に加え試験に用いた。抗生物質加 BSK-H 培地を、抗生物質を含まない BSK-H 培地で試験濃度の2倍になるよう段階希釈した。これら抗生物質加 BSK-H 培地 0.1ml に、 1×10^6 - 1×10^7 /ml まで増殖させた各ボレリア菌液を 0.1ml 加え、30°C で 72 時間培養した。培養は乾燥を防ぐ目的で、密閉コンテナ内で飽湿条件下で行った。72 時間経過後、それぞれの Well より菌液を採取し、BSK-H 培地で 20 倍に希釈後、運動性のある菌を生菌としてカウントした。それぞれの試験は3回繰返し行った。Minimal borreliacidal concentration (MBC) 測定は Morgenstern らの方法に従って行った。抗生物質の品質保証のための対照試験として、*S. aureus* ATCC29213 株を用い、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A7 に準拠して試験を行った。

3) 試験薬剤

ボレリア感染症の治療薬として広く用いられるペニシリン系の amoxicillin (AMPC)、セフェム系の cefuroxime axetil (CXM-AX)、ceftriaxone (CTRX)、テトラサイクリン系の doxycycline (DOXY)、minocycline (MINO)、および、回帰熱治療で推奨されるマクロライド系である erythromycin (EM)、clarithromycin (CAM) について試験を行った。

(倫理面からの配慮について)

該当しない。

C. 研究結果

1) 各ボレリア株に対する MIC、MBC 測定

B. miyamotoi 5 株、*B. bavariensis* J-14 株ならびに *S. aureus* ATCC29213 株の MICs、MBCs の一覧を表1に示した。対照試験での *S. aureus* ATCC29213 株の MICs は CLSI guideline の値とほぼ一致したことから、試験薬の品質が担保され、試験成立と判断した。テトラサイクリン系の抗生物質である DOXY、MINO に対する MICs は試験したボレリア株全てで、0.0313 - 0.25 μ g/ml であった。またセフェム系薬剤である CXM-AX、CTRX においても、その MICs は試験したボレリア株全てで、0.0313 - 0.5 μ g/ml であった。小児の回帰熱治療で用いられることがある、マクロライド系抗生物質の EM、CAM は使用したボレリア株全てで MICs は 0.002-0.0625 μ g/ml であった。他方、ペニシリン系薬剤である AMPC に対する感受性では、*B. miyamotoi* (1-16 μ g/ml) と *B. bavariensis* (0.0625-0.125 μ g/ml) でその MICs が異なる結果が得られた。*B. miyamotoi* の各抗生物質に対する MBCs は DOXY: 4-8 μ g/ml、MINO: 1-4 μ g/ml、EM:

1–8 µg/ml、CAM: 1–4 µg/ml、CXM-AX: 8–16 µg/ml、CTRX: 2–4 µg/ml であり、*B. bavariensis* J-14 株とほぼ同一の値を示した。他方、AMPC による MBCs は試験した全てのボレリア株で 16 µg/ml 以上であった。

D. 考察

これまでに *B. miyamotoi* 感染による新興回帰熱は、ロシア、オランダ、米国、日本で報告されている。これらの内、オランダの慢性髄膜炎症例では CTRX による治療が行われている。また、米国 *Anaplasma phagocytophilum* との共感染例では DOXY が治療薬として用いられた。我が国の 2 症例では、MINO もしくは CTRX による治療が行われいずれも治癒している。他方、米国の慢性髄膜炎症例では、CTRX 投与開始から 9 時間後に JHR が生じたため、ペニシリン G(2400 万単位/日)へと薬変更し、その治療効果が報告された (Gugliotta et al. NEJM 368: 240-245, 2013)。本研究において、あくまでも In vitro の成績ではあるが、ライム病ボレリアとほぼ同じ薬剤感受性が見られたコテトラサイクリン系薬剤ならびにセフェム系薬剤は、ライム病治療と同じ投薬量で治療効果が得られる可能性が高いと考えられた。他方、ライム病ボレリアである *B. bavariensis* J-14 株と *B. miyamotoi* 株間で AMPC に対する感受性の差異が見られた。米国での新興回帰熱症例ではペニシリン G による治療が成功していること、また、これまでに AMPC に対する感受性にライム病ボレリア株間で差があることが報告されていることから (Morgenstern et al. Antimicrob. Agents Chemother. 53: 1281-1284, 2009)、米国の *B. miyamotoi* と我が国の *B. miyamotoi* 間でペニシリン系薬剤に対する感受性が異なる可

能性もあると考えられた。In vitro での薬剤感受性が高いマクロライド系薬剤ではあるが、通常ライム病の治療には用いられない (Wormser GP et al. Clin Infect Dis. 43: 1089-1134, 2006.)。他方、9 歳以下の小児の回帰熱治療に限って、EM は 30-50kg/day で使用される (Shapiro ED. Principle and practice of pediatric infectious diseases. Long SS. et al ed. 1067-1069, 1997.)。本研究では EM に対し *B. miyamotoi* は感受性を示したことから、Shapiro の指標に従った投薬治療は可能かもしれない。近年欧州を中心に、感染予防のための、マダニ刺咬部へのマクロライド系抗菌薬である azithromycin 軟膏の使用が望まれている (Piesman J et al. Antimicrob Agents Chemother. 58: 348-351, 2014.) が、本抗生物質に対する感受性試験は今後の検討課題である。

E. 結論

今後、症例がおおく報告されるロシアや米国を中心に、新興回帰熱症例の積み重ねによる、抗菌薬治療のためのガイドラインが示されてくるものと思われる。これに先立ち、*B. miyamotoi* 株を世界に先駆けて分離し、その薬剤感受性を示した本研究結果は、今後のガイドライン作成のための礎となると考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Murase Y, Konnai S, Yamada S, Githaka N, Isezaki M, Ito T, Takano A,

- Ando S, Kawabata H, Murata S, Ohashi K. An investigation of binding ability of *Ixodes persulcatus* Schulze Salp15 with Lyme disease spirochetes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** (Accepted)
- 2) Kutsuna S, Kawabata H, Ohmagari N. Imported Lyme disease. **Internal Medicine**. (In press)
- 3) Oda S, Kabeya H, Sato S, Shimonagane A, Inoue K, Hayashidani H, Takada N, Fujita H, Kawabata H, Maruyama S. Isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* 1B/O:8 in from *Apodemus* mice in Japan. **Journal of Wildlife Diseases** 51(1):260-264, 2015.
- 4) Lee K, Takano A, Taylor K, Sasika M, Shimozuru M, Konnai S, Kawabata H, Tsubota T. A Relapsing fever group *Borrelia* sp. similar to *Borrelia lonestari* found among wild sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) and *Haemaphysalis* spp. ticks in Hokkaido, Japan. **Ticks and Tick-borne Diseases** 5: 841-847, 2014.
- 5) Andoh M, Ogasawara Y, Sakata A, Ito T, Fujita H, Kawabata H, Ando S. Isolation of spotted fever group Rickettsia, *R. tamurae* and *Candidatus R. kotlanii*, from *Haemaphysalis megasinosae* in Japan. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases** 14(9):681-684, 2014.
- 6) Natsuaki M, Takada N, Kawabata H, Ando S, Yamanishi K. A case of tick-associated rash illness caused by *Amblyomma testudinarium*. **Journal of Dermatology** 41(9): 834-836, 2014.
- 7) Takano A, Toyomane K, Konnai S, Ohashi K, Nakao M, Ito T, Andoh M, Maeda K, Watarai M, Sato K, Kawabata H. Tick surveillance for relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in Hokkaido, Japan. **PLoS One** 9(8): e104532, 2014.
- 8) Sato K, Takano A, Konnai S, Nakao M, Ito T, Kaneko M, Koyama K, Ohnishi M, Kawabata H. Human *Borrelia miyamotoi* infection in Japan. **Emerging Infectious Diseases**. 20(8): 1391-1393, 2014.
- 9) Hidano A, Konnai S, Yamada S, Gitahi, N, Higuchi H, Nagahata H, Ito T, Kawabata H, Ando S, Takano A, Murata S, Isesaki M. Suppressive effects of nutrophil by Salp16 Iper, a salivary gland protein, from *Ixodes persulcatus* Schulze tick. **Insect Molecular Biology**. 23(4), 466-474, 2014.
- 10) Takano A, Fujita H, Kadosaka T, Takahashi T, Yamauchi T, Ishiguro F, Takada N, Yano Y, Oikawa Y, Honda T, Gokuden M, Tsunoda T, Turumi M, Ando S, Andoh M, Sato K, Kawabata H. Construction of a DNA database for ticks collected in Japan: application of molecular identification based on the mitochondrial 16S rDNA gene. **Medical Entomology and Zoology**. 65(1): 13-21, 2014.

2. 学会発表

- 1) 藤田信子, 藤田博己, 角坂照貴, 安藤秀二, 川端寛樹. 四国型恙虫病の媒介種トサツツガムシの現況(予報). 第 69 回日本衛生動物学会西日本支部大会. 愛知, (2014.11)
- 2) 川端寛樹. 新興回帰熱病原体 *Borrelia miyamotoi* の病原性解析. 第 69 回日本衛生動物学会西日本支部大会. 愛知, (2014.11)
- 3) 梶田弘子, 岩渕香織, 高橋雅輝, 佐藤直人, 山内貴義, 斎藤幸一, 高野愛, 川端寛樹, 宇田晶彦, 森川茂. 岩手県におけるマダニの生息調査および病原体保有状況. 第 60 回日本衛生動物学会北日本支部大会・日本寄生虫学会北日本支部合同大会. 盛岡, (2014.10)
- 4) 川端寛樹, 今内覚, 高野愛, 中尾稔, 伊東拓也, 佐藤梢. 北海道におけるマダニ媒介性新興回帰熱病原体ボレリアの分布調査. 第 60 回日本衛生動物学会北日本支部大会・日本寄生虫学会北日本支部合同大会. 盛岡, (2014.10)
- 5) Kyunglee Lee, 高野 愛, Kyle Taylor, 左鹿万里子, 下鶴倫人, 今内 覚, 川端寛樹, 坪田敏男. A RF *Borrelia* sp. found among wild sika deer and *Haemaphysalis* ticks in Hokkaido. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 札幌, (2014.9)
- 6) 大場真己, 大松勉, 安藤秀二, 川端寛樹, 高野愛, 片山幸枝, 古谷哲也, 長井誠, 水谷哲也. コウモリマルヒメダニから分離された新規ブニヤウイルスについて. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 札幌, (2014.9)
- 7) 川端寛樹. ダニ媒介性細菌感染症の疫学および診断法. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 札幌, (2014.9)
- 8) 川端寛樹, 高野愛, 大西真. 後向きサーベイランスにより明らかとなった新興回帰熱の 2 例. 第 88 回日本感染症学会学術講演会. 福岡, (2014.6)
- 9) 岡恵子, 川端寛樹. スウェーデンで *Borrelia* 保有のマダニに咬着された 2 例. 第 30 回臨床皮膚科医会総会. 横浜, (2014.4)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特記事項なし
2. 実用新案登録
特記事項なし
3. その他
特記事項なし

表1. 各々の抗生物質に対する *B. miyamotoi* の薬剤感受性

| Strains or parameter | Cefuroxime | | Ceftriaxone | | Amoxicilline | |
|-------------------------------------|--------------|------|---------------|-----|--------------|-----|
| | MIC | MBC | MIC | MBC | MIC | MBC |
| <i>B. miyamotoi</i> | | | | | | |
| MYK1 | 0.125-0.5 | 16 | 0.0625 | 2-4 | 16-8 | >32 |
| MYK2 | 0.125-0.25 | 8-16 | 0.0625-0.125 | 2-4 | 8-4 | >32 |
| MYK3 | 0.125-0.25 | 16 | 0.0313-0.0625 | 4 | 8-4 | >32 |
| MYK4 | 0.125-0.25 | 16 | 0.0625-0.125 | 4 | 2-1 | >32 |
| MYK5 | 0.25-0.5 | 16 | 0.0313-0.0625 | 4 | 4-2 | >32 |
| Range | 0.125-0.5 | 8-16 | 0.0313-0.125 | 2-4 | 16-1 | >32 |
| <i>B. garinii</i> J14* ¹ | 0.0625-0.125 | 8 | 0.0313-0.0625 | 2 | 0.125-0.0625 | 16 |
| <i>S. aureus</i> ATCC 29213 | | | | | | |
| This study* ² | 0.5 | | 1 | | 1 | |
| CLSI MIC range* ³ | 0.5-2 | | 1-8 | | 0.5-0.12 | |

| Strains or parameter | Doxycycline | | Minocycline | | Erythromycin | | Clarithromycin | |
|-------------------------------------|--------------|-----|---------------|-----|---------------|-----|----------------|-----|
| | MIC | MBC | MIC | MBC | MIC | MBC | MIC | MBC |
| <i>B. miyamotoi</i> | | | | | | | | |
| MYK1 | 0.0625-0.125 | 8 | 0.0625 | 2 | 0.0313 | 2 | 0.0020-0.0078 | 2 |
| MYK2 | 0.0625-0.125 | 8 | 0.0313-0.0625 | 4 | 0.0156-0.0313 | 8 | 0.0020-0.0078 | 4 |
| MYK3 | 0.0625-0.125 | 4-8 | 0.0625 | 1-2 | 0.0156 | 4 | 0.0020-0.0078 | 4 |
| MYK4 | 0.0625-0.25 | 8 | 0.0625-0.125 | 2 | 0.0313 | 4 | 0.0039-0.0078 | 4 |
| MYK5 | 0.0625-0.125 | 4-8 | 0.0625 | 1-2 | 0.0313-0.0625 | 1-2 | 0.0078 | 1-2 |
| Range | 0.0625-0.25 | 4-8 | 0.0313-0.125 | 1-4 | 0.0156-0.0625 | 1-8 | 0.0020-0.0078 | 1-4 |
| <i>B. garinii</i> J14* ¹ | 0.125-0.25 | 8 | 0.0313-0.0625 | 4 | 0.0078 | 2 | 0.0020-0.0039 | 0.5 |
| <i>S. aureus</i> ATCC 29213 | | | | | | | | |
| This study* ² | 0.125 | | 0.0625 | | 0.5 | | 0.125 | |
| CLSI MIC range* ³ | 0.12-0.5 | | 0.12-1 | | 0.25-1 | | 0.12-0.5 | |

*1: *Borrelia garinii* strain J14 was isolated from human in Hokkaido, Japan.

*2: MIC testing condition was according to M7-A7-Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard-7th edition.

*3: MIC range of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 was designated as acceptable limits for quality control strain used to monitor accuracy of MIC of nonfastidious organisms.

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる技術・情報の体系化に関する研究
分担研究報告書

実験マウスを用いた新興回帰熱の感染病態解析

| | | |
|-------|--------|------------------------|
| 研究分担者 | 高野 愛 | 山口大学 共同獣医学部 |
| 研究協力者 | 阿戸 学 | 国立感染症研究所 免疫部 |
| | 松村 隆之 | 国立感染症研究所 免疫部 |
| | 長谷川 秀樹 | 国立感染症研究所 感染病理部 |
| | 川端 寛樹 | 国立感染症研究所 細菌第一部 (研究分担者) |
| | 佐藤 梢 | 国立感染症研究所 細菌第一部 |

研究要旨

昨年度までの研究により、新興回帰熱病原体 *Borrelia miyamotoi* のマウス感染実験において、菌株間でその感染性に違いが見られた。このことから本研究では、複数の *B. miyamotoi* 菌株を用い、マウスでの病態解析を行なった。その結果、1)北海道 *Ixodes persulcatus* 由来 *B. miyamotoi* クローン化株は、マウスに対し感染性が低下していた。また、2)本州 *Ixodes persulcatus* 由来 *B. miyamotoi* は、感染性が低いあるいはマウスへの感染成立に要する時間が異なる可能性が示唆された。感染性株のクローン化株で感染性が消失する現象はライム病ボレリア等でも知られているが、本ボレリアで感染性が低下した理由は不明である。また、*B. miyamotoi* 株間でもマウスに対する感染性が異なる可能性が示唆された。今後は、これら感染性の違いを引き起こす責任遺伝子の同定を行なうことで、病原性に関連する遺伝子(群)の同定が期待される。

A. 研究目的

Borrelia miyamotoi は 1995 年に Fukunaga ら¹⁾によってシエルツェマダニ *Ixodes persulcatus*、およびヒメネズミ *Apodemus argenteus*より分離された回帰熱群のボレリアである。2011 年および 2013 年に、ロシアおよび米国とオランダでそれぞれ回帰熱様感染症の病原体として新たに同定

された。さらに、本研究班において国立感染症研究所が行なった後向き疫学調査により、*B. miyamotoi* の国内感染事例が確認された(研究業績欄⁴⁾)。ロシアや米国のヒト感染患者では肝機能障害や髄膜刺激症状、菌血症による thrombocytopenia が報告されること、発症から来院までの期間が他の *Borrelia* 属感染症であるライム病などより比較的短いこと等か

ら、急速に全身症状が進行することが推定されており、今後、ヒトにおける本感染症の病態解明が急務である。

他方、*B. miyamotoi*は、*Ixodes scapularis*によって媒介される北米型、*Ixodes ricinus*によって媒介されるヨーロッパ型、そして日本やロシアにおいて *I. persulcatus*によって媒介されるシベリア-極東型に分けられる。この内、北米型 *B. miyamotoi* は免疫不全マウスでは感染が維持されるが C3H マウスなどの実験動物では感染が維持されないため、ヒト病態解析に適していないと考えられる²⁾。

昨年度までの研究により、*Borrelia miyamotoi* マウス感染実験により、菌株間で感染性に違いが見られた。そこで、本研究では、複数の菌株を用いて、マウスにおける *Borrelia miyamotoi* 感染時の病態解析を行った。

B. 研究方法

【マウスへの *B. miyamotoi* 接種】

<1回目>

C3H/HeNCrj マウス雌5週齢を用い、異なる10株 (Table1 参照)を接種

<2回目>

C57BL/6j マウス雌5週齢を用い、MYK1 親株、およびクローン化株 7 株、Y14T1 株 計9株 (Table2 参照)を接種

上記マウスに 2×10^5 cells 腹腔内接種を行った。接種後6日目に安楽殺後、全採血を行なった後に各臓器を摘出し試験に供した。本実験は山口大学動物使用委員会にて承認を受け実施された(承認番号 211 および 242)。

【*B. miyamotoi* 遺伝子の検出】

採取した各臓器から DNA を抽出後、*B.*

miyamotoi 遺伝子検出に供した。ボレリアの遺伝子検出は、一昨年度の報告書(分担研究者、川端寛樹)に記載したリアルタイム PCR 法に従って行なった。

【抗体検出】

B. miyamotoi 全菌体を抗原としたウエスタンブロット法にて血清中における抗ボレリア抗体の検出を行なった。一次抗体には、接種マウス血清を200倍希釈で使用した。また2次抗体にはペルオキシダーゼ標識の anti-mouse IgM+G 抗体を10,000倍に希釈して使用した。

C. 研究結果

昨年度までの研究により、感染5日目から10日目にかけて遺伝子が検出され、且つ抗体も5日目以降検出されたことから、本研究では感染6日目の検体を用いることとした。感染実験1回目では、北海道のマダニおよび野鼠由来の野外分離株、およびマウス感染実験による再分離株を実験に用いた。その結果、全血および肝臓より高率に *B. miyamotoi* の DNA が検出された。さらに2回目の実験においても、親株である MYK1 株を接種したマウスからは、*B. miyamotoi* の DNA が検出された一方、MYK1 株を段階希釈法にてクローン化した7株を接種したマウスからは、試験に供した全ての個体において *B. miyamotoi* の DNA は検出されなかった。また、本州のマダニより分離された Y14T1 株についても全ての個体において *B. miyamotoi* の DNA は検出されなかった。

ウエスタンブロット法による抗体検出の結果、
1)クローン化した MYK1 株感染マウス血清からは抗体が検出されたものの、親株である MYK1 株と比較すると反応性は低下していた(図1)。
2)北海道由来 *B. miyamotoi* 感染マウス血清からは抗ボレリア抗体が検出された一方、本州由

来 *B. miyamotoi* 感染マウス血清からはほとんど検出されなかった(図2)。

D. 考察

昨年 MYK1 株をクローニングした MYK1 G3 株を用いた実験により、G3 株では感染性が低下している可能性が示唆されたが、本年度の研究により、それ以外の全てのクローン化株7株においても、*B. miyamotoi* DNA は検出されず、クローニングにより感染性が低下した可能性が改めて強く示唆された。現在、再現性を見るために、マウス感染実験にてマウス脳組織より再分離された M1-2Br 株のクローニングを行っており、クローン化株の感染性の有無を確認する予定である。ライム病ボレリアでは経代とともにプラスミドの欠落が進行し、マウスへの感染性が失われることが報告されていることから³⁻⁵⁾、*B. miyamotoi* でも同様の現象が起った可能性が推定された。親株との間で欠損プラスミドや遺伝子の有無を確認することで、*B. miyamotoi* の感染性に関する因子を明らかにできる可能性がある。

本研究では、Y14T1 株(本年度の疫学調査にて本州産 *I. persulcatus* より分離)を接種したマウス臓器からは、*B. miyamotoi* DNA が検出されず、抗体もほとんど検出されなかった。このことから、1) Y14T1 株の感染性が北海道株と比較して低い可能性、もしくは 2) マウス体内での菌の増殖が遅いため、6 日目では検出限界以下だった可能性も否定できない。さらに、これまでに分離が確立された本州由来株は1株のみのため、今後分離株を増やし、北海道由来株との遺伝学的比較等を行う必要があると考えられた。

E. 結論

B. miyamotoi はクローニングにより感染性

が低下したクローンが優先的に選択されてくる可能性が示唆された。今後の研究においてマウスに対する病原性を規定する責任遺伝子の同定を行い、その病原メカニズム解明を行う必要があると考えられた。

引用論文

- 1) Fukunaga M, et al., Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. Int J Syst Bacteriol. 1995. 45: 804-810.
- 2) Hue F, et al., Chromosome sequence of *Borrelia miyamotoi*, an uncultivable tick-borne agent of human infection. Genome Announc. 2013. 1: e00713-13.
- 3) Masuzawa T, et al. Relationship between infectivity and OspC expression in Lyme disease *Borrelia*. FEMS Microbiol Lett. 1994. 123: 319-324.
- 4) Norris SJ, et al. High- and low-infectivity phenotypes of clonal populations of in vitro-cultured *Borrelia burgdorferi*. Infect Immun. 1995. 63: 2206-2212.
- 5) Purser JE and Norris SJ. Correlation between plasmid content and infectivity in *Borrelia burgdorferi*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000. 97(25): 13865-13870.

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Murase Y, Konnai S, Yamada S, Githaka N, Isezaki M, Ito T, Takano A, Ando S, Kawabata H, Murata S, Ohashi K. An investigation of binding ability of *Ixodes persulcatus* Schulze Salp15 with Lyme disease spirochetes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** (Accepted)
- 2) Lee K, Takano A, Taylor K, Sasika M, Shimozuru M, Konnai S, Kawabata H, Tsubota T. A Relapsing fever group *Borrelia* sp. similar to *Borrelia lonestari* found among wild sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) and *Haemaphysalis* spp. ticks in Hokkaido, Japan. **Ticks and Tick-borne Diseases** 5: 841-847, 2014.
- 3) Takano A, Toyomane K, Konnai S, Ohashi K, Nakao M, Ito T, Andoh M, Maeda K, Watarai M, Sato K, Kawabata H. Tick surveillance for relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in Hokkaido, Japan. **PLoS One** 9(8): e104532, 2014.
- 4) Sato K, Takano A, Konnai S, Nakao M, Ito T, Kaneko M, Koyama K, Ohnishi M, Kawabata H. Human *Borrelia miyamotoi* infection in Japan. **Emerging Infectious Diseases**. 20(8): 1391-1393, 2014.
- 5) Hidano A, Konnai S, Yamada S, Githaka N, Isezaki M, Higuchi H, Nagahata H, Ito T, Takano A, Ando S, Kawabata H, Murata S, Ohashi K. Suppressive effects of neutrophil by Salp16-like salivary gland proteins from *Ixodes persulcatus* Schulze tick. **Insect Molecular Biology**. 23(4), 466-474, 2014.
- 6) Takano A, Fujita H, Kadosaka T, Takahashi T, Yamauchi T, Ishiguro F, Takada N, Yano Y, Oikawa Y, Honda T, Gokuden M, Tsunoda T, Turumi M, Ando S, Andoh M, Sato K, Kawabata H. Construction of a DNA database for ticks collected in Japan: application of molecular identification based on the mitochondrial 16S rDNA gene. **Medical Entomology and Zoology**. 65(1): 13-21, 2014.

2. 学会発表

- 1) 川端寛樹, 高野 愛, 大西真. 後向きサーベイランスにより明らかとなった新興回帰熱の2例. 第88回日本感染症学会学術講演会. 2014.6.18-20. 福岡県福岡市
- 2) 高野 愛, Boldbaatar Bazartseren, Erdenechimeg Dashzeveg, Myagmarsukh Yondon, Gabriele Margos. モンゴル国北部にて採取したマダニにおける *B.miyamotoi* の疫学調査研究. 第157回日本獣医学会学術集会. 2014.9.9-12. 北海道札幌市
- 3) Kyunglee Lee, 高野 愛, Kyle Taylor, 左鹿万里子, 下鶴倫人, 今内 寛, 川端寛樹, 坪田敏男. A RF *Borrelia* sp. found

among wild sika deer and
Haemaphysalis ticks in Hokkaido.

第 157 回日本獣医学会学術集会.

2014.9.9-12. 北海道札幌市

- 4) 松本苑子, 橋野正紀, 鈴木 尋, 高野 愛, 藤田 修, 堀田明豊, 森川 茂, 高田伸弘, 渡邊健太, 清水 隆, 度会雅久. ダニにおける *Francisella tularensis* の全国的疫学調査. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 2014.9.9-12. 北海道札幌市

- 5) 大場真己, 大松勉, 安藤秀二, 川端寛樹, 高野 愛, 片山幸枝, 古谷哲也, 長井誠, 水谷哲也. コウモリマルヒメダニから分離された新規ブニヤウイルスについて. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 2014.9.9-12. 北海道札幌市

- 6) 下田 宙, 米満研三, 早坂大輔, 好井健太郎, 寺田 豊, 野口慧多, 鍬田龍星, 高野 愛, 前田 健. 国内の野生動物およびダニから新規フラビウイルスの検出. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 2014.9.9-12. 北海道札幌市

- 7) 浜崎千菜美, 鍬田龍星, 野口慧多, 寺田 豊, 下田 宙, 高野 愛, 鈴木和男, 森川 茂, 前田 健. 野生動物における SFTS ウイルス感染の疫学調査. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 2014.9.9-12. 北海道札幌市

- 8) 高野 愛. 野外活動中のマダニ対策について. 第 20 回日本野生動物医学会. 2014.9.16-18. 茨城県つくば市.

- 9) 梶田弘子, 岩渕香織, 高橋雅輝, 佐藤直人, 山内貴義, 斎藤幸一, 高野 愛, 川端寛樹, 宇田晶彦, 森川茂. 岩手県におけるマ

ダニの生息調査および病原体保有状況. 第 60 回日本衛生動物学会北日本支部大会・

日本寄生虫学会北日本支部合同大会.

2014.10.18 岩手県盛岡市

- 10) 川端寛樹, 今内覚, 高野 愛, 中尾稔, 伊東拓也, 佐藤梢. 北海道におけるマダニ媒介性新興回帰熱病原体ボレリアの分布調査. 第 60 回日本衛生動物学会北日本支部大会・日本寄生虫学会北日本支部合同大会. 2014.10.18 岩手県盛岡市

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

表 1. 感染実験（1回目）に用いた *B. miyamotoi* 株

| 菌株名 | 由来 | 採取場所 | 採取年他 |
|-------------------|-----------------------|------|--------------------------|
| MYK1 | <i>I. pavlovskyi</i> | 北海道 | 2012 |
| MYK2 | <i>I. persulcatus</i> | 北海道 | 2012 |
| MYK4 | <i>I. persulcatus</i> | 北海道 | 2012 |
| MYK5 | <i>I. persulcatus</i> | 北海道 | 2012 |
| Y13T1 | <i>I. persulcatus</i> | 北海道 | 2013 |
| HT31 ^T | <i>I. persulcatus</i> | 北海道 | 1990 |
| HT24 | <i>I. persulcatus</i> | 北海道 | 1990 |
| FR64b | <i>A. argenteus</i> | 北海道 | 1991 |
| M1-2Br | C57BL/6j マウス | | MYK1 株由来。2012 年度感染実験再分離株 |
| NB103-1 | <i>I. persulcatus</i> | 北海道 | 1991 |

表 2. 感染実験（2回目）に用いた *B. miyamotoi* 株

| 菌株名 | 由来 | 採取場所 | 採取年他 |
|----------|-----------------------|------|---------------|
| MYK1 | <i>I. pavlovskyi</i> | 北海道 | 2012 |
| MYK1 A11 | <i>I. pavlovskyi</i> | 北海道 | MYK1 株のクローン化株 |
| MYK1 B9 | <i>I. pavlovskyi</i> | 北海道 | MYK1 株のクローン化株 |
| MYK1 C7 | <i>I. pavlovskyi</i> | 北海道 | MYK1 株のクローン化株 |
| MYK1 D7 | <i>I. pavlovskyi</i> | 北海道 | MYK1 株のクローン化株 |
| MYK1 E6 | <i>I. pavlovskyi</i> | 北海道 | MYK1 株のクローン化株 |
| MYK1 F8 | <i>I. pavlovskyi</i> | 北海道 | MYK1 株のクローン化株 |
| MYK1 H5 | <i>I. pavlovskyi</i> | 北海道 | MYK1 株のクローン化株 |
| Y14T1 | <i>I. persulcatus</i> | 本州 | 2014 |

☒ 1.

Antigen; MYK1 whole, 1st Abs; B6 mice serum 1:200, 2nd Abs; Anti-Mouse IgG+M 1:10000

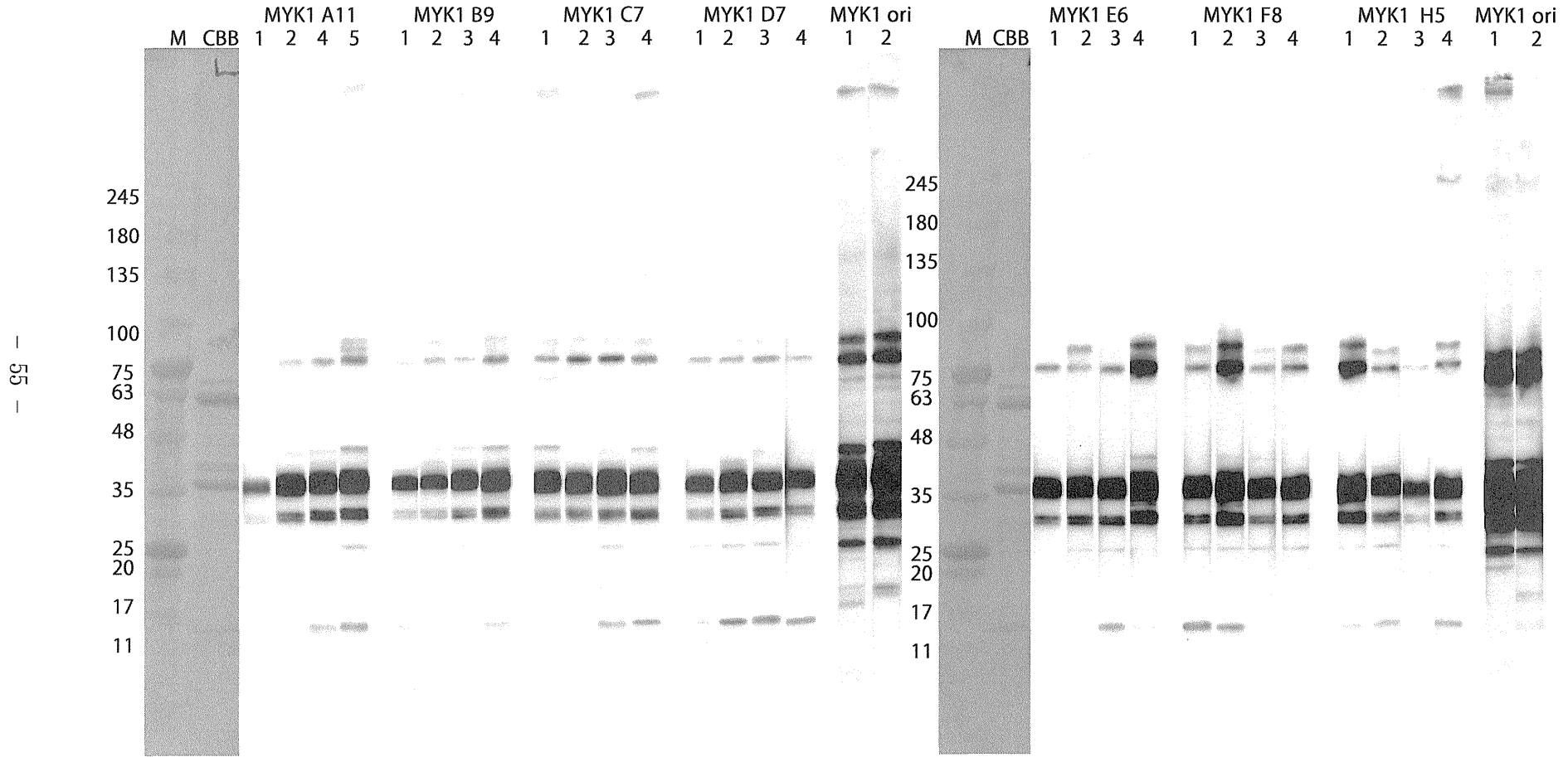
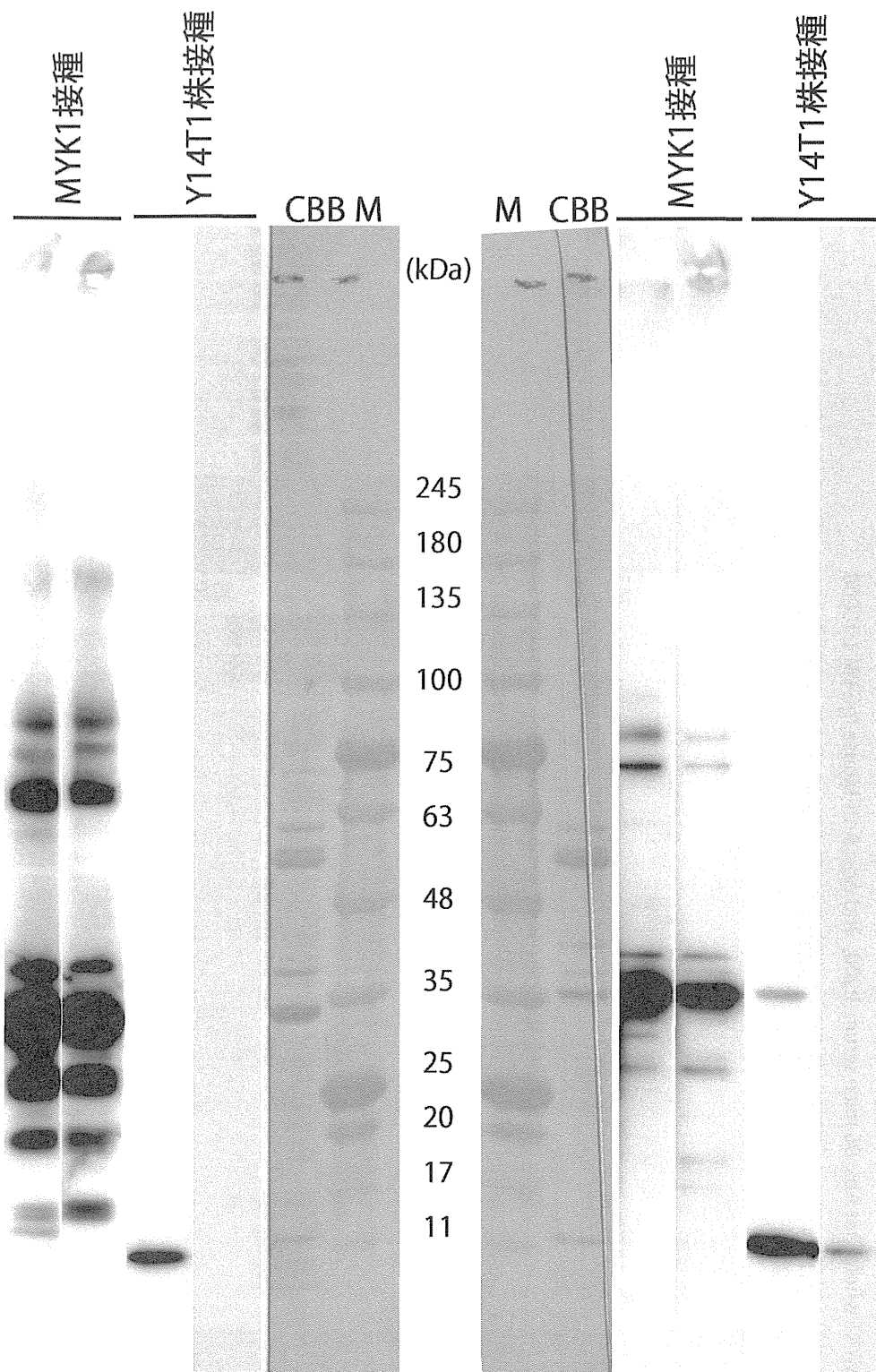


図2.

1次抗体：マウス血清1:200 2次抗体：Anti-Mouse IgG+M HRP



抗原：MYK1 (北海道株)全菌体

Y14T1 (本州株)全菌体