

D-0801 非意図的な随伴侵入生物の生態リスク評価と対策に関する研究

(5) 輸入動物に随伴するマダニ類の生態リスク評価に関する研究

国立感染症研究所

細菌第一部 第四室 川端 寛樹

〈研究協力者〉 国立感染症研究所 安藤 秀二
 国立感染症研究所 高崎 智彦
 国立感染症研究所 西條 政幸
 国立感染症研究所 高野 愛
 国立感染症研究所 黒田 誠
 国立感染症研究所 関塚 剛史
 国立感染症研究所 椎野 禎一郎
 国立感染症研究所 大西 真
 国立感染症研究所 渡邊 治雄
 大原総合病院附属研究所 藤田 博己
 愛知医科大学 角坂 照貴
 山口大学 佐藤 宏
 麻布大学 宇根 有美
 麻布大学 島田 優一郎
 国立環境研究所 五箇 公一

平成20～22年度合計予算額 18,500千円（うち、平成22年度予算額 5,500千円）

予算額は、間接経費を含む

[要旨] これまでに哺乳類等の輸入に随伴した病原体の国内侵入に関して、いくつかの研究がなされてきている一方、過去7年間で400万頭以上もの輸入実績がある爬虫類とその寄生マダニに関してはほとんど調査がなされていない。そこで2008年度は、爬虫類および寄生マダニを介した病原微生物の国内侵入実態を明らかにすることを目的とし、海外から輸入された爬虫類、およびスリランカの野生爬虫類から外部寄生ダニを採材し病原体検出、分離を行った。これら試験材料からは、新種ボレリア及び*Borrelia turcica*等のボレリア細菌を検出した。2009年度は国内への侵入・拡散の有無を調べる目的で、国内天然記念物であるセマルハコガメ寄生性のマダニについてサーベイランスを行った。これらマダニからは、輸入爬虫類から見出されたボレリア種と近縁のボレリア種が見出された一方で、海外からの持ち込みを示唆する知見は今のところ得られていない。他方、これらボレリアのマダニ体内動態解析を行い、本種ボレリアと近縁関係にあるヒト病原体回帰熱ボレリアが宿主転換をし、媒介宿主域を拡大させた可能性が明らかとなった。そこで2010年度には媒介宿主域拡大に関与した遺伝子同定のため、*B. turcica*のゲノム同定と回帰熱ボレリアとの比較ゲノム解析を試みた。

[キーワード] 国際貿易、侵入種、爬虫類、マダニ、ボレリア、宿主転換

1. はじめに

微生物は、自然界での非人為的移動（鳥の渡りなど）によってこれまで拡散し、多様な生態系の中で適合、定着してきたが、20世紀以降、交通手段の発達、物資の輸出入の増大に比例して人為的な微生物移動が、急速に、頻繁になり、また通常は起こりえない遠距離の移動が起るようになってきた。近年では、SARSウイルスの感染者の航空機移動に付随した急速な多国間拡大なども報告される一方で、北米産プレーリードックの輸出に付随した野兔病菌の移動など、愛玩動物などの移動によっても、危険な病原体の移動も認められている。このような公衆衛生の観点から、本邦を含め世界各国で生物の輸入規制強化が図られてきている。加えて、アメリカではマダニ媒介性の感染症の一種、ウシ心水病病原体が爬虫類に寄生したマダニによってアフリカより侵入、定着し、畜産業に打撃を与えた事件がよく知られている (Burridge MJ, 2002)。本邦でも、これら爬虫類等を含む野生動物の輸入に随伴した病原体保有マダニの侵入が見出されていることから、早急に、輸入動物随伴性の節足動物がもたらす、公衆衛生上および生態系へ与えるリスクの評価を行う必要がある。

そこで本研究では、本邦ではこれまで全く顧みられなかった、爬虫類等を含む輸入動物随伴性節足動物であるマダニとマダニ媒介性細菌等に焦点をあて、これらの随伴微生物について国内侵入の実態調査を第一に行う。調査で分離された微生物については実験的に生体への感染リスクについて評価を行う。さらに微生物が媒介宿主を拡大させる遺伝学的因子を、分子生物学的手法を用いて明らかにし、公衆衛生上および生態系へ与えるリスク拡大の可能性についても検証する。

2. 研究目的

- ・ペット用に大量輸入されている動物、特に輸入に関する法規制がほとんどない爬虫類に寄生するマダニ類の国内持ち込み実態を明らかにする。
- ・マダニの分類を行うとともに、それらが媒介する感染症病原体の保有状況を解明する。
- ・得られた病原体の系統解析を行い、サブテーマ1国立環境研究所と連携してデータベース化をはかるとともに、その病原学的特性を明らかにする。
- ・外来マダニ類および保有病原体の検出法を開発、マニュアル化を目指す。
- ・微生物の宿主転換に関する知見を得る。

3. 研究方法

(1) 爬虫類、寄生マダニからのボレリアの検出

1) 輸入爬虫類、寄生マダニからのボレリアの検出

本研究では、トーゴ、ガーナ、スーダン、ザンビア、マダガスカル、ウズベキスタン、スリナム、ロシア、ヨルダンから輸入された爬虫類、およびスリランカの野生爬虫類から外部寄生ダニを採材した（図1、2）。試験した輸入爬虫類 (*Testudo graeca* など計17頭) を安楽殺後、皮膚、全血、心臓、筋肉、および膀胱を無菌的に採取しボレリア培養に使用した。寄生マダニは、解剖可能な成虫、若虫の生個体については実体顕微鏡下で解剖後、中腸組織、唾液腺、およびマダニ体液を含むその他の組織についてボレリアの培養、およびPCR法によるボレリアDNAの検出に使用し

た。

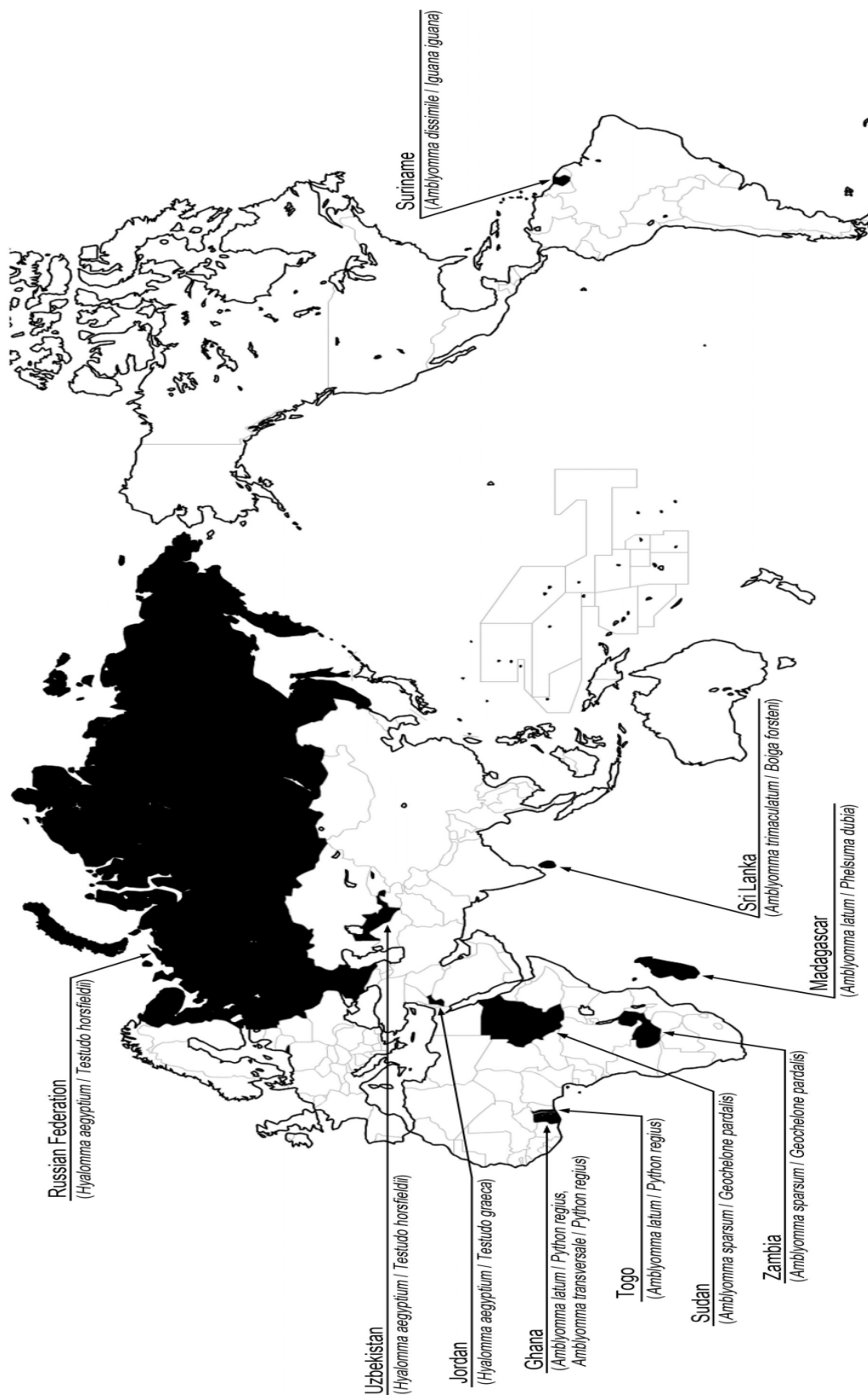


図1. 本研究で病原体検索に使用した輸入爬虫類、外部寄生虫種（輸出国別）



図2. ギリシャリクガメに寄生したイボマダニ (宇根有美博士のご厚意による)
解剖不可能な若虫、幼虫、または死個体についてはマダニ全組織からDNA抽出を行いPCR法によるボレリアDNAの検出に使用した。ボレリアの培養にはBSK培地を用い、34℃にて培養を行った。PCRのためのDNA抽出はDNA Tissue kit (キアゲン) をもちい、常法に従ってDNA抽出・精製を行った。PCRおよび増幅DNAの塩基配列決定に使用したプライマーは表1に示した。

表1. 本研究で用いたボレリアの検出および増幅DNAの塩基配列決定に用いたPCRプライマー一覧

増幅遺伝子	プライマー名	塩基配列 (5' -3')	参考文献
<i>Borrelia flaB</i>	BflaPAD	GATCA (G/A) GC (T/A) CAA (C/T) ATAACCA (A/T) ATGCA	Sato et al. 1997
	BflaPBU, nest	GCTGAAGAGCTTGGAAATGCAACC	
	BflaPCR, nest	TGATCAGTTATCATTCTAATAGCA	
	BflaPDU	AGATTCAAGTCTGTTTTGGAAAGC	
<i>Borrelia 16SrRNA</i>	rrs-F1 (3-26)	ATAACGAAGAGTTTGATCCTGGCT	In this study
	rrs-F2 (682-703)	GGTGTAAGGGTGGAAATCTGTTG	
	rrs-R3 (749-768)	TTTCGTGACTCAGCGTCAGT	
	rrs-R4 (1542-1520)	AAAGGAGGTGATCCAGCC (A/G) CACT	
<i>Borrelia gyrB</i>	gyrB 3'	GGCTCTTGAAACAATAACAGACATCGC	Schwan et al. 2005
	gyrB 5'	GGTTTATGAGTTATGTTGCTAGTAATATTCAAGTGC	
	gyrB 5' +3	GCTGATGCTGATGTTGATGG	
	gyrB 5' NIID1	ATGA (A/G) TTATGTTGCTAGTAA (C/T) ATTC	In this study
	gyrB 5' -1 NIID	GGACTTCATGG (A/T) GTTGG (A/T) ATTC	
	gyrB 3' NIID1	AG (C/T) GCATT (A/C) TG (C/T) TCAATAAATTCT	
	gyrB 3' NIID2	TC (C/T) TAAC (C/T) TCATC (C/T) TCTATT	
	gyrB 3' NIID3	AAGAA (G/C) T (C/T) CTAAC (C/T) TCATC	
	gyrB3' -1 NIID	TCAACATTAAGCAT (C/T) TT (A/C/G) CCCCA	
gyrB3' -3 NIID	ACC (C/T) CTTGAAAAAGT (C/T) TGTC		
Tick mt <i>rrs</i>	mtrrs(1)	CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG	Ushijima et al. 2003

2) 国内爬虫類寄生マダニからの病原体分離、検出

2009年度には西表島に棲息するリクガメよりカメキララマダニを採取し、1-1) に示した方法と

同様にボレリアの分離、検出を行った。西表島のリクガメの一部は天然記念物に指定されていることから、これらリクガメからの組織採取は行っていない。また文化庁より天然記念物現状変更許可を受けて調査研究は行われた（図3）。

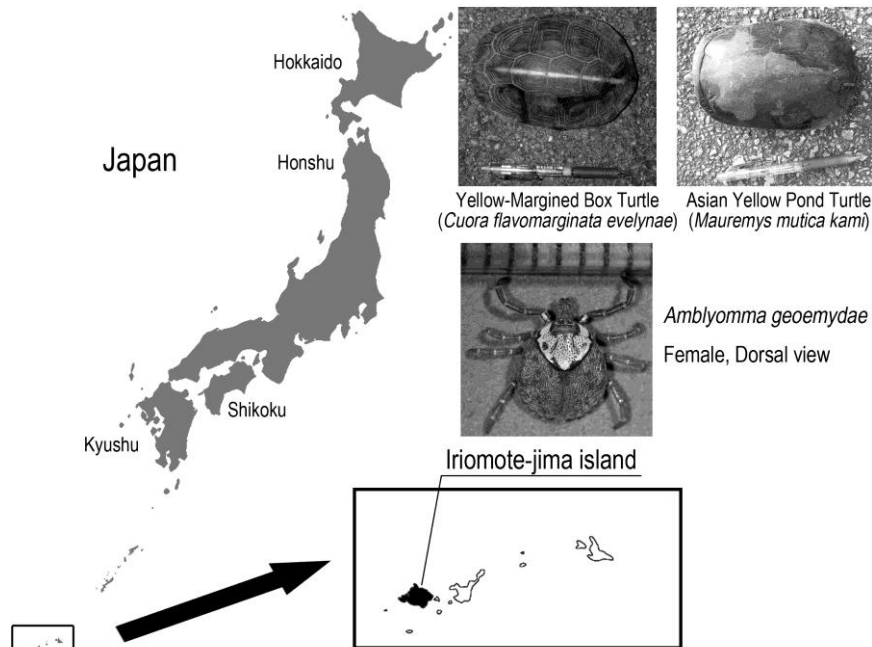


図3．本研究で病原体検索に用いた西表島産マダニ (*Amblyomma geoemydae*)。

(2) ボレリア株の遺伝学的解析

1) 遺伝学的系統解析

得られたDNA配列はMEGA4ソフトウェアを用いた。CLUSTAL-W(Ver. 1.6)により配列を整列後 (Open gap penalty=15、Gap extension penalty=6.66)、近隣結合法(NJ法)により系統樹を作成した。Bootstrap試験はKimura-2-parameterによる塩基置換モデルに基づき試行した。

2) 16SrRNA遺伝子 - 23SrRNA遺伝子間の遺伝子構造

16SrRNA遺伝子 - 23SrRNA遺伝子間の遺伝子構造はライム病ボレリア、回帰熱ボレリアを区別する上で重要である。そこで本研究では、*B. turcica*など本研究で見いだされたボレリアについてこの領域の遺伝子配列をPCRダイレクトシーケンスにより決定し、回帰熱ボレリア、ライム病ボレリアと遺伝子構成について比較した。

(3) ボレリアのマダニ体内分布

病原体ボレリアがマダニの唾液腺内部へ侵入することが吸血源動物への伝播に必須である。そこで本研究では、共焦点レーザー顕微鏡を用いマダニ唾液腺組織中のボレリアを蛍光免疫染色により検出するとともに、イメージング解析によりボレリアの唾液腺組織内での局在を調べることにした。方法はFisherら (Fisher 2005) に若干の変更を加えボレリア検出を行った。

(4) 病原体感染モデル

1) 爬虫類モデル

ボレリアの爬虫類感染モデルは確立されていない。そこで本研究ではアメリカ国内での繁殖個体、ケヅメリクガメ (*Geochelone sulcata*, 60-150g) を暫定的に感染モデルとして用いた。*B. turcica* 接種株としてはIST7株、Tick83S株、Tortoise4M1株もしくはTortoise5BL01株、*Borrelia* sp. GP type としてはTortoise13BL01株、Tortoise14H1株、Tortoise14M1株もしくはTortoise19S1株を用いた。これら分離株をBSK培地にて増菌後、1個体当たり 2×10^3 - 1×10^6 *Borrelia*細胞を腹腔内に接種した。実験は2匹1群で行い、培地接種群、未接種群を陰性対照として用いた。

2) マウスモデル

マウス感染実験には回帰熱ボレリア、ライム病ボレリアの実験感染モデルであるC3H/HeNマウス(5週令♀)を用いた。接種株はIST7株、T14H1vir株clone 1、およびBF-17株を用いた。陽性対照として*Borrelia burgdorferi* B31 clone 5A4株(感染性株)、陰性対照として*B. burgdorferi* B31 clone 5A13株を用いた。*B. burgdorferi* B31 clone化株はテキサス大学Norris博士より分与を受けた。

(5) パルスフィールド電気泳動法(PFGE)によるケヅメリクガメからの再分離株解析

PFGEはPeiら(Pei 2008)の方法に従って行った。ゲノムDNA切断には制限酵素*Bss*HIもしくは*Mlu*Iを用いた。

(6) 爬虫類より見出されるボレリアの特異的検出

上記、(2) 2) 16SrRNA遺伝子 - 23SrRNA遺伝子間の遺伝子構造解析から見出された爬虫類ボレリア特異的遺伝子を標的としたPCRプライマー(*glvA*-F: 5' -ATGGTACAAACAATGCAAAAAGTTCGGAAGTGC-3', 14-F1: 5' -GGAAACTATAATTGCCCCAA-3')を作成し、その感度および特異性を調べた。アニーリング温度は、57°Cで行った。

(7) 爬虫類から見出されるボレリアのゲノム解析

パルスフィールド電気泳動法により、*Borrelia turcica*標準株であるIST7株の chromosomal DNA を分取し、物理的に断片化後、HiSeq (Illumina)を用いてde novo シークエンスを行った。得られた配列はcontig作成後、direct sequencingによりgap closingを行った。得られた完全長DNA配列はorf推定後それぞれについてblastPによる相同性検索を行った。またLipoP、TMHMMなどのアルゴリズム解析によりSignal peptidase切断箇所、膜貫通ドメイン数解析をおこなった。

(8) リケッチア、エーリキア、アナプラズマ等ダニ媒介性細菌の検出

(1) で用いたマダニ材料を用い、*Rickettsiae* (*Rickettsia*属、*Anaplasma*属、*Ehrlichia*属)のDNA検出を試みた。*Rickettsia*属細菌の検出は17kDa抗原遺伝子-PCR(Anderson et al, 1989), *gltA*-PCR(Mediannikov et al 2004)、ompA-PCR(Noda et al. 1997)を用いた。また*Anaplasma*属細菌の検出はKimらの方法(Kim et al 2002)に従って行った。*Ehrlichia*属細菌の検出にはInayoshiらの方法(Inayoshi et al. 2004)に準じて行った。

(9) クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの検出

(1) で用いたマダニ材料の内、RNAが回収できた11検体、およびリクガメ血液16検体をクリミア・コンゴ出血熱ウイルスゲノム検出に用いた。検体は、QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) を用いてウイルスRNAを抽出後、Ready-To-Go RT-PCR Beads (GE Healthcare) を用いてRT-PCRを行った。5 μ lの抽出RNAをtemplateとし、各50pmolのプライマー (CCHF-F2とCCHF-R3) を計50 μ l (0.5mlチューブ) RT-PCR法を行った。逆転写は42°C30分、95°C5分、PCRの反応条件は35サイクルの (95°C30秒、52°C30秒72°C30秒)、72°C5分である。さらにPuReTaq™ Ready-To-Go PCR beads (GE Healthcare) を用いてnested-PCRを行った。1 μ lのRT-PCR産物をtemplateとし、各50pmolのプライマー (CCHF-F3とCCHF-R2) を計50 μ l (0.5mlチューブ) で上と同様の反応条件でPCRを行った。

(10) フラビウイルスの検出系作成と輸入検体からのウイルスゲノム検出

フラビウイルスNS5遺伝子内で保存されている領域に新規にprimerを設計し、デング出血熱ウイルス (4株)、日本脳炎ウイルス (2株)、ウエストナイルウイルス (2株) など蚊媒介性ウイルス7種12株、ダニ媒介性ウイルス3種3株を用い、感度を測定した。またこのプライマー (FVX7fおよびFVX12r) を用い、(1) で用いたマダニ材料の内、RNAが回収できた検体についてウイルスゲノム検出を試みた。

(11) 輸入爬虫類より見出されたトリパノソーマ原虫の同定

ボレリア培地中に見出された輸入ヘビ血液由来トリパノソーマ原虫の同定を試みた。ボレリア細菌培養用のBSK培地4mlに0.1mlのボールパイソン血液を加えて32°Cで静置培養していたところ、17日目から上鞭毛体の集合がみられるようになった。これら原虫を集め、定法によりDNAを抽出し、18S~5.8SリボソームRNA遺伝子 (rDNA)、およびglycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 遺伝子 (gGAPDH) について塩基配列を検討した。

4. 結果・考察

(1) 輸入爬虫類および寄生マダニにおけるボレリア保菌率

本研究では、試験した17頭の輸入爬虫類のうち12頭でボレリア感染がみいだされた。*Testudo*属リクガメより分離されたボレリアは*Borrelia turcica*と同定された。また*Geochelone*属リクガメより分離されたボレリアは、*B. turcica*と類縁の新種*Borrelia* (*Borrelia* sp. GP-type)であった。これらボレリアはリクガメの皮膚組織のみならず血液から高率で分離された。このことはライム病ボレリア、回帰熱ボレリア同様、本ボレリアもリクガメ体内で菌血症を起こしていることを示している (図4)。また本ボレリアは筋肉、膀胱といった結合組織を多く含む部位からも分離されたことから、感染ボレリアはリクガメに全身感染を起こしていること、またライム病ボレリアと同様に、結合組織を含む臓器に何らかの因子を介して定着し、慢性の感染を引き起こしている可能性が考えられた。

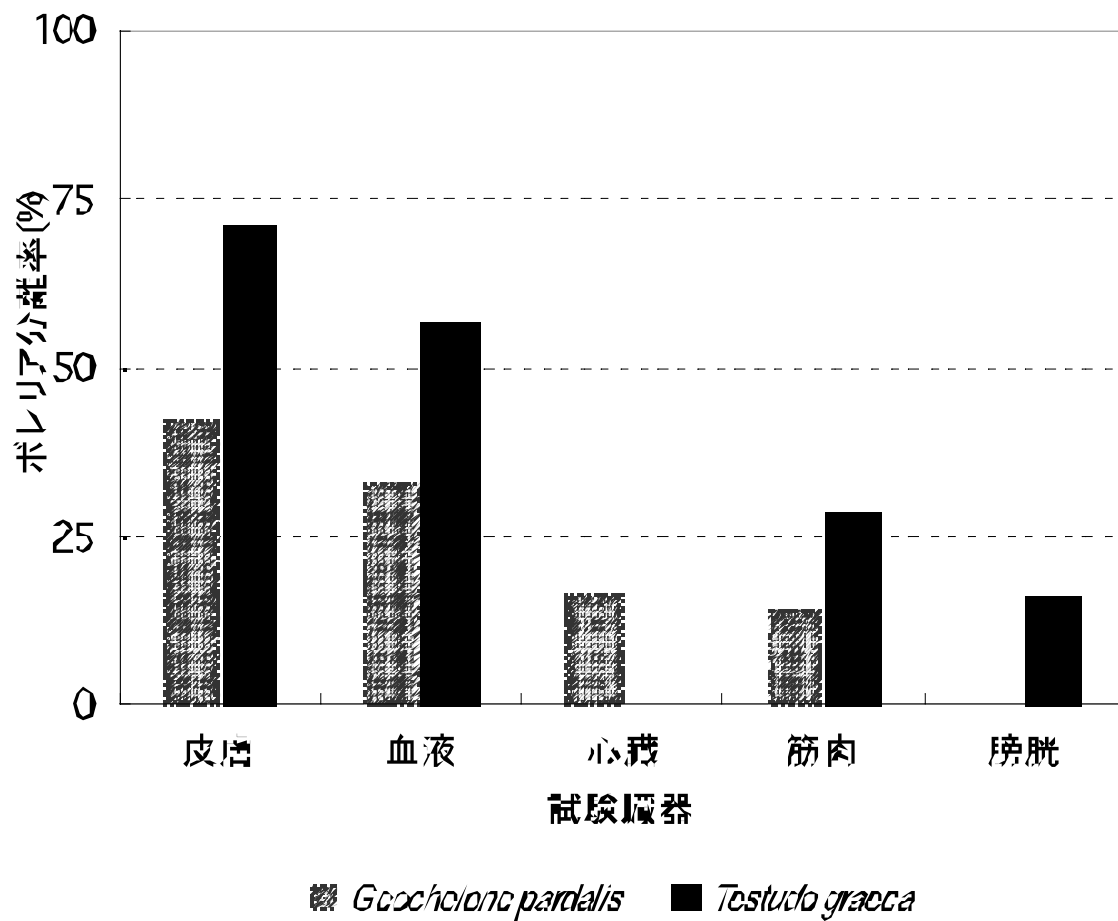


図4. 自然感染リクガメの各臓器におけるボレリア分離陽性率

爬虫類寄生マダニとして *Amblyomma latum*, *Amblyomma transversale*, *Amblyomma sparsum*, *Amblyomma dissimile*, *Amblyomma trimaculatum*, および *Hyalomma aegyptium* が見いだされた。これらマダニのうち、*A. dissimile* を除く 2 属 5 種では、そのボレリア陽性率は、DNA 検出、分離ともに 60% 以上であった。一方で、母数は少ないが、*A. latum* のボレリア陽性率は寄生動物種、輸入国などによって異なる可能性が考えられた。このことは動物輸出国、輸入動物種、また感染している微生物種の組み合わせによりその汚染率が異なる可能性を示唆している（図5）。

PCR法による各マダニのボレリアDNA陽性率 (%)

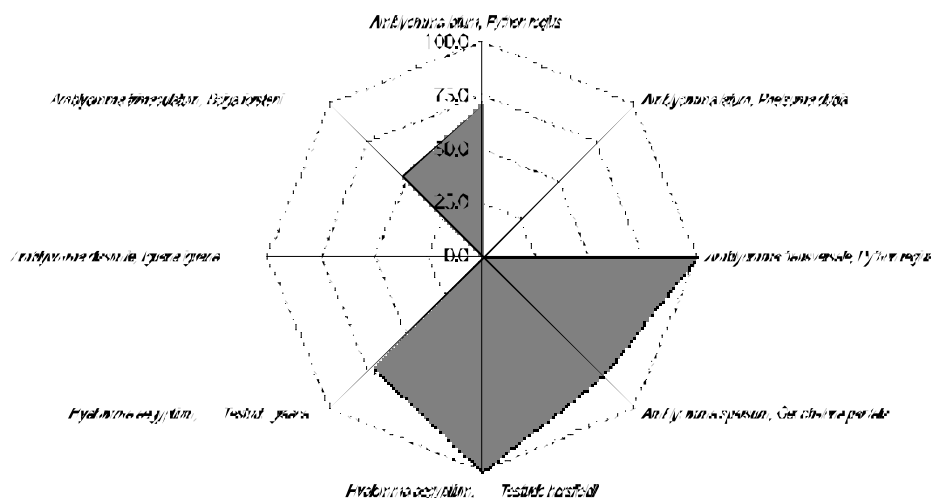


図5. 爬虫類寄生マダニのボレリアDNA陽性率

上記ボレリア細菌が外来性爬虫類および外来性マダニの侵入にともない国内侵入、定着している可能性が危惧されたことから、2009年度には天然記念物であるセマルハコガメ寄生性のカメキララマダニに焦点を絞り、病原体分離検出を試みた。その結果、西表島産リクガメ寄生のカメキララマダニ228個体中72個体より上記ボレリアに類似のボレリア (*Borrelia* sp. tAG) が検出された (表2)。

表2. 西表島でリクガメ寄生性マダニの各ステージにおける *Borrelia* sp. tAG陽性率

Tick stage	Number of ticks	REP <i>Borrelia</i> (<i>Borrelia</i> sp. tAG) positive ticks* ¹ (Prevalence, %)
Larva	124	31 (25)
Nymph	76	30 (39.47)
Male	7	3 (42.86)
Female	21	8 (38.1)
Total	228	72 (31.58)

(2) ボレリア株の遺伝学的解析

1) house-keeping遺伝子による検出ボレリアとその系統解析

検出されたボレリアに関して、house-keeping遺伝子である16SrRNA遺伝子、鞭毛抗原遺伝子 (*flaB*)、およびgyrase Bサブユニット遺伝子 (*gyrB*) について塩基配列を決定し、各々の近縁関係を調べた。この結果から、本研究で見いだされた新種爬虫類由来ボレリア (GP-type、BF-type、ST-typeおよびtAG-type) はいずれも *B. turcica* と類縁であり、*B. turcica* と monophyletic な一群を形成すること、またライム病群ボレリア、回帰熱ボレリアとは独立した一群であることから (図6および表

3) 、我々は新型のボレリア、爬虫類ボレリア (REP *Borrelia*) の存在を提唱した。

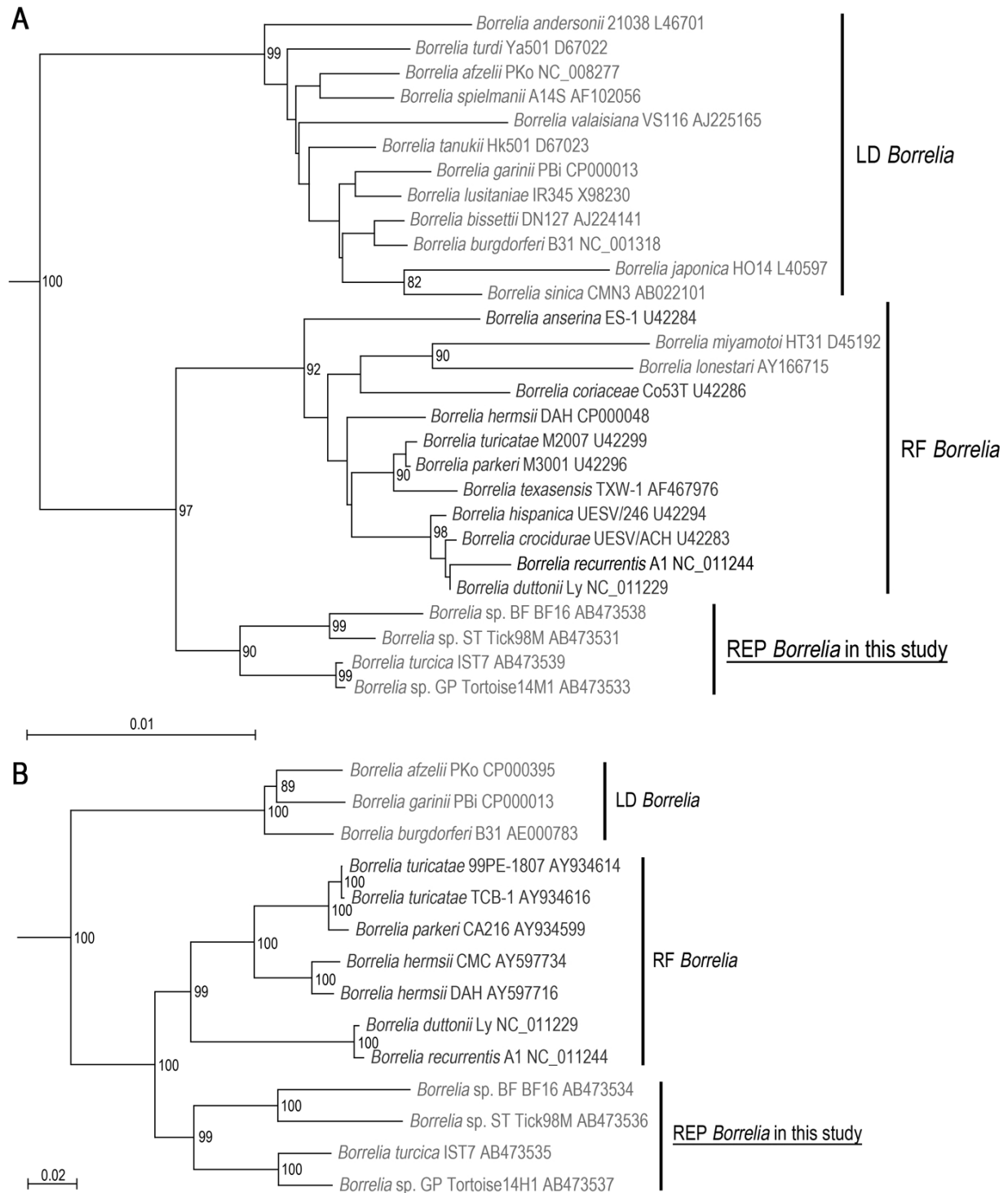


図6. *16S rRNA*(A)および*gyrB*(B)による代表的な株による系統解析

表3. 16SrRNA、gyrB塩基配列による相同性一覧

A. Similarity matrix; 16SrRNA

		<i>B. turcica</i>	<i>Borrelia</i> sp. GP-type Tortoise14M 1	<i>Borrelia</i> sp. BF-type BF-16	<i>Borrelia</i> sp. ST-type Tick98M
REP <i>Borrelia</i>					
<i>B. turcica</i>	IST7 (AB473539)				
<i>Borrelia</i> sp. GP-type	Tortoise14M1 (AB473533)	99.93%			
<i>Borrelia</i> sp. BF-type	BF-16 (AB473538)	98.79%	98.72%		
<i>Borrelia</i> sp. ST-type	Tick98M (AB473531)	98.99%	98.93%	99.40%	
LD <i>Borrelia</i>					
<i>B. burgdorferi</i>	B31 (AE000783)	97.32%	97.25%	96.78%	97.18%
RF <i>Borrelia</i>					
<i>B. hermsii</i>	DAH (CP000048)	98.52%	98.59%	97.99%	98.05%

B. Similarity matrix; gyrB

		<i>B. turcica</i>	<i>Borrelia</i> sp. GP-type Tortoise14M1	<i>Borrelia</i> sp. BF-type BF-16	<i>Borrelia</i> sp. ST-type Tick98M
REP <i>Borrelia</i>					
<i>B. turcica</i>	IST7 (AB473535)				
<i>Borrelia</i> sp. GP-type	Tortoise14M1 (AB473537)	95.80%			
<i>Borrelia</i> sp. BF-type	BF-16 (AB473534)	87.04%	87.10%		
<i>Borrelia</i> sp. ST-type	Tick98M (AB473536)	87.36%	87.79%	90.32%	
LD <i>Borrelia</i>					
<i>B. burgdorferi</i>	B31 (AE000783)	81.22%	81.22%	79.85%	79.89%
RF <i>Borrelia</i>					
<i>B. hermsii</i>	DAH (AY597716)	87.16%	87.27%	84.47%	84.46%

2) 16SrRNA遺伝子 - 23SrRNA遺伝子間の遺伝子構成の解析、およびmRNAの発現

これまで回帰熱ボレリアは16SrRNA遺伝子 - 23SrRNA遺伝子間領域に、ライム病ボレリアでは見いだされない、外来性因子であると考えられているhypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 遺伝子 (*hpt*)、adenylosuccinate synthetase 遺伝子 (*purA*)、および adenylosuccinate lyase 遺伝子 (*purB*)を有していることが知られている。そこで本研究では *B. turcica* IST7株、および*Borrelia* sp. BF-typeのBF-16株について本領域のprimer walking法

によるダイレクトシーケンスを行い、その遺伝子構成を調べた。その結果、本ボレリアでは回帰熱の遺伝子構成に加え、新たにmaltose-6'-phosphate glucosidase 遺伝子 (*glvA*) および phosphotransferase system maltose-specific enzyme IICB component 遺伝子 (*glvC*) の存在を見いだした (図7)。本遺伝子がボレリアにどのようなphenotypeを付与するのかについては不明である。*hpt*, *purAB*は回帰熱ボレリアにおいてプリン体合成に関与し、結果として高レベルでのボレリア菌血症 (10^8 cells/ml) を引き起こすことが知られている。今回発見されたボレリアについても、爬虫類血液からボレリアが分離されたことから同様の機能を有している可能性が高い。またPCRおよびSouthern hybridization解析により、これら遺伝子群は今回見いだされたREP *Borrelia*群内で高度に保存されていると考えられた。

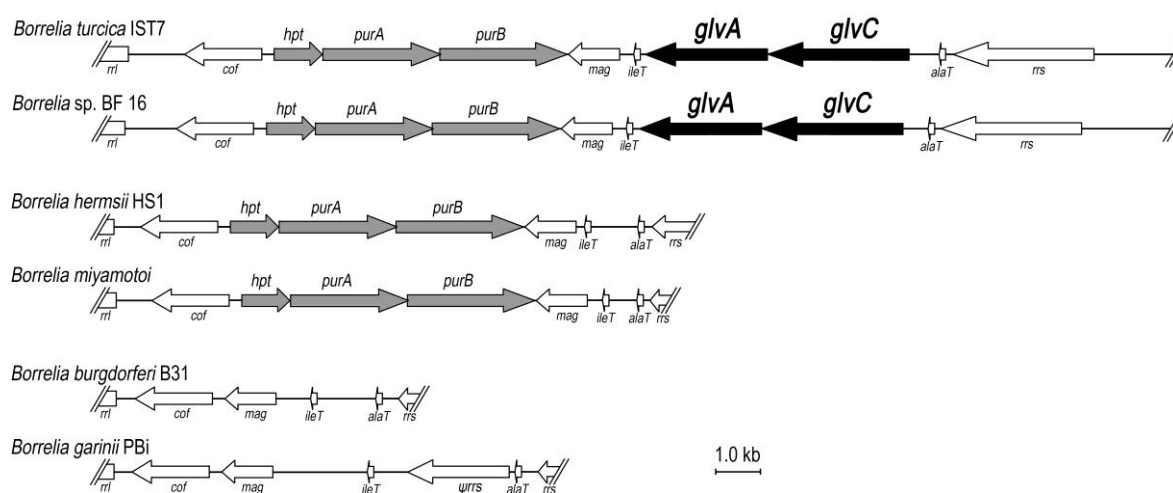


図7. 16SrRNA遺伝子 - 23SrRNA遺伝子間の遺伝子構造

(3) マダニ体内でのボレリアの分布

本研究では共焦点レーザー顕微鏡を用い、唾液腺内に侵入したボレリアの観察を行った。実験に使用した唾液腺組織は、二房存在する唾液腺組織の内、一方でボレリアDNAが検出されたマダニを用いた。他方の唾液腺にてボレリアDNAが検出されたマダニ個体については、唾液腺組織内に侵入しているボレリア像が観察された。一方でボレリアDNAが検出されなかったマダニ個体では唾液腺組織ではボレリアが観察されなかった。このことは、ボレリアが唾液腺組織内へ侵入し、既に感染のための準備ができていること、すなわち本マダニがこれらボレリアの好適ベクターである可能性が強く示唆された (図8)。すなわち、これらマダニのみの移入によっても本ボレリアが国内侵入しうること、さらには本ボレリアに感受性のある国内棲息動物にこのマダニが吸血することでボレリア感染が引き起こされる可能性を示している。加えて2009年度では、国内で見出されたマダニについて脱皮前後でのボレリアの体内動態についても調べ、本ボレリアが、ライム病ボレリア同様、吸血個体においてのみ、唾液腺内に見出されることを明らかにした (図9)。

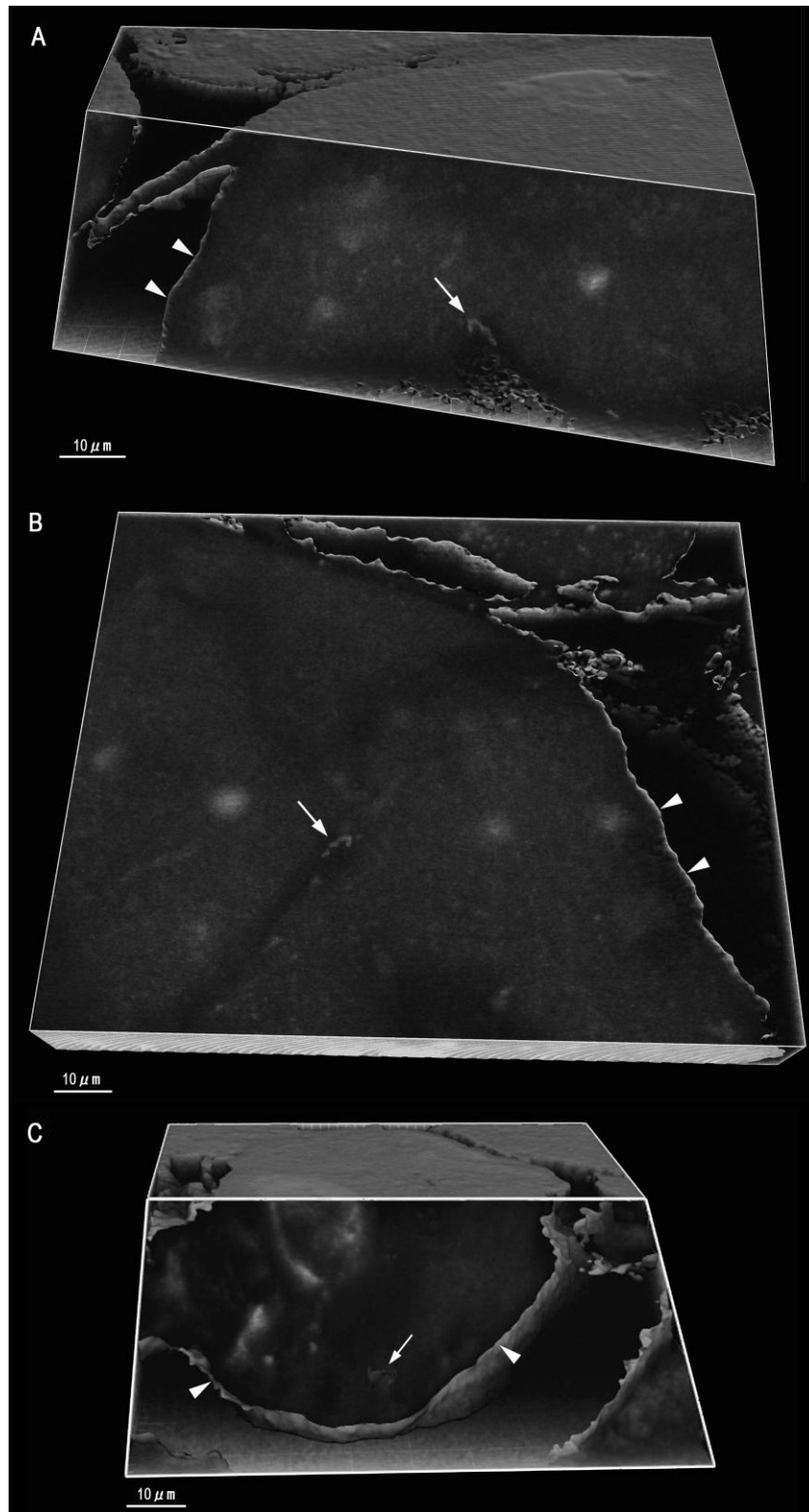


図8. マダニ唾液腺内ボレリア。矢印はボレリア（赤）、小三角は唾液腺小胞膜を示す。

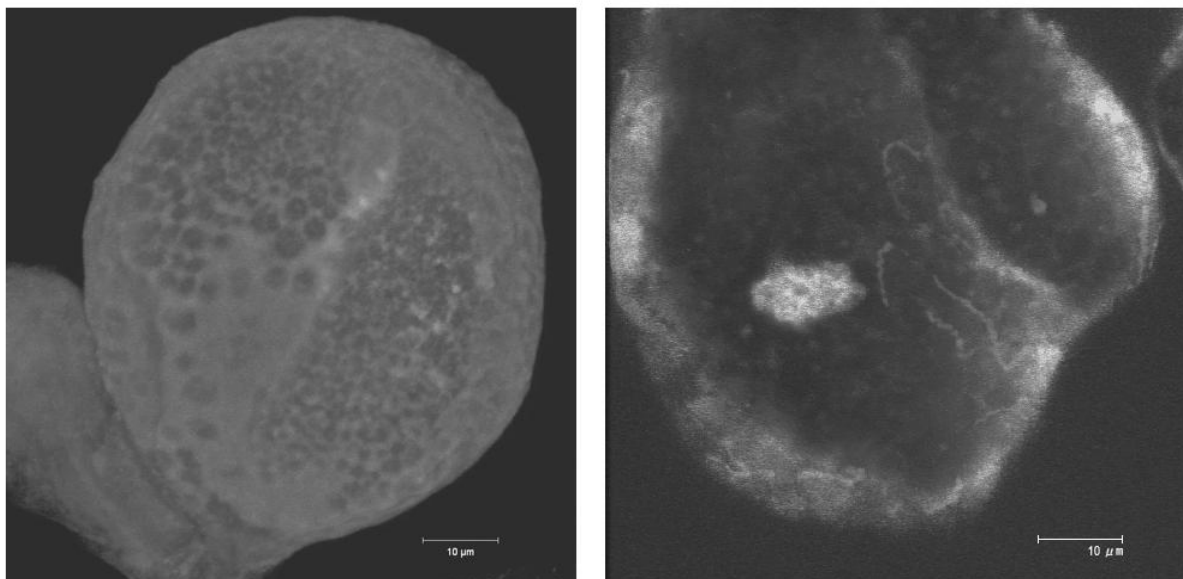


図9. 吸血前後におけるマダニ唾液腺内のREP *Borrelia* (左は脱皮後のマダニ唾液腺、右は吸血後のマダニ唾液腺。赤はボレリアを示す。)

(4) ボレリア感染実験

1) ケツケリクガメを用いた感染実験

使用したボレリア株の内Tortoise14H1株、およびTortoise19S1株が接種リクガメより再分離された。またこれら株をclone化し再接種後、回収されたボレリアと合わせPFGE解析を行った。その結果これら再分離株は、PFGE解析により接種株と同様の制限酵素切断パターンを示したことから、これらボレリア株はケツケリクガメに感染すること、また感染モデルになる可能性があることが明らかとなった(図10)。

2) マウス感染実験

ライム病ボレリア感染モデルは関節炎等の再現性が高いC3H/HeN マウスが頻繁に用いられている。また回帰熱ボレリアの菌血症モデルにもC3H/HeNマウスが用いられており、本ボレリアにおいてもC3H/HeN マウス感染モデルが適用できるか否かを評価した。しかしながら感染4週間後にはこれら爬虫類ボレリア接種マウスでは一部で抗体の上昇が確認されたものの、ボレリアは再分離されなかった。また関節炎等の症状も見いだされなかった。近年、吸血宿主へのボレリア感染には補体成分であるH因子結合タンパク質(BbCRASP、erpなど)が必要であり、さらには、これら因子によって動物種特異的な血清耐性が付与される可能性が示されている。本ボレリアについては、今後血清耐性を付与するボレリア遺伝子について検索を行うこと、またそれら遺伝子産物に対する生化学的アプローチがまずは必要であると考えられる。

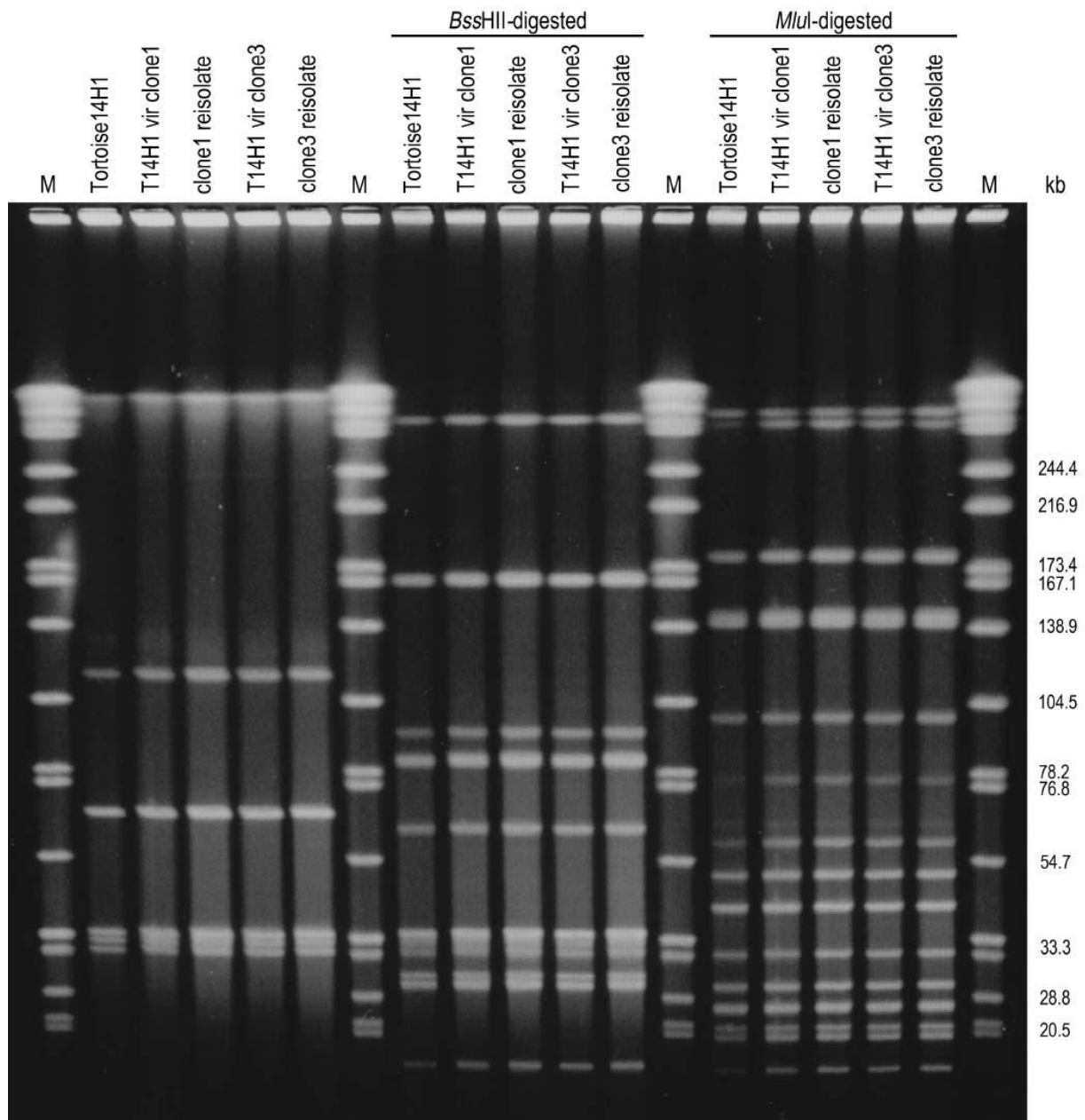


図10. ケヅメリクガメ感染実験株と再分離株のPFGEによる解析

(5) ボレリアのvector-switching

これまで、世界には回帰熱の原因となる回帰熱ボレリア群 (*B. hermsii*, *B. turicatae*など)とライム病の原因となる*B. burgdorferi sensu lato*が存在するとされていた。それぞれのボレリア群は*Ornithodoros*属 (ヒメダニ) ダニなどの軟ダニ、硬ダニである*Ixodes*属マダニによって媒介されること、またそれぞれのボレリアと媒介マダニの間には特異性の高い関係が形成されていること (=vector competence) から、ボレリアは媒介マダニの進化とともに共進化してきたと考えられてきた。このため、発見当初は、本ボレリア群は*Borrelia lusitaniae* (ライム病群ボレリアの一種。硬ダニによって媒介され、トカゲを感染宿主とする) に近縁のボレリアと推定された。しかしながら、本研究で発見された爬虫類群ボレリアは各種遺伝子の解析から*B. lusitaniae*と擬似

の生態学的地位 (niche) を有しながらも、その由来は *B. lusitaniae* とは全く異なることが明らかになった。爬虫類ボレリアを加えた系統解析では、①爬虫類ボレリアと回帰熱ボレリアは祖先を共通にするボレリアであること、また②マダニの18SrRNA遺伝子配列をもとにした系統解析と比較し、これら爬虫類ボレリアが存在することで既存のボレリアとマダニの共進化モデルに不整合性が生じると考えられた。本研究でみいだされた爬虫類ボレリアの発見 (2008年度)、ならびに2009年度研究で明らかとなった、マダニ体内でのREP *Borrelia* のマダニ体内動態解析から、共進化モデルの不整合性は回帰熱ボレリアの祖先が遺伝子水平伝播などにより何らかの外來性因子を獲得した結果、vector-switchingを起こしてvector域を広げてきた可能性により説明が可能であると考えられた。このことは、節足動物媒介性感染症の伝播システムを理解する上で極めて重要な発見であり、またボレリアの分布拡大戦略として、vector-switchingが有効であったことを示唆している (図11)。

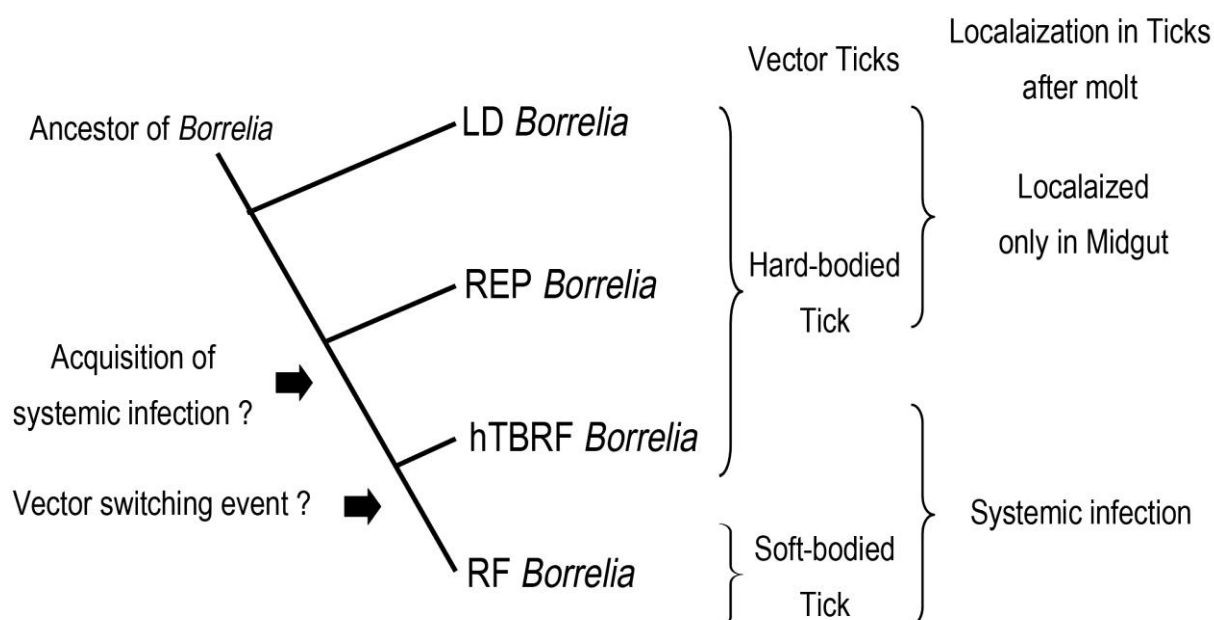


図11. 本研究から示されたボレリアの進化とvector switching (概略図)。LD *Borrelia*はライム病ボレリア、REP *Borrelia*は爬虫類ボレリア、hTBRF *Borrelia*は*Borrelia miyamotoi*等の回帰熱群ボレリアの一部で硬ダニによって媒介される一群、RF *Borrelia*は回帰熱ボレリアを示す。))

(6) REP *Borrelia*の特異的検出系の確立

16SrRNA遺伝子 - 23SrRNA遺伝子間の遺伝子構成の解析をもとに、2009年度にはREP *Borrelia* 特異的遺伝子である *gIvC* を標的としたPCR法を新たに開発し、その感度、特異性を調べた。その結果、本PCRはREP *Borrelia* では100%の感度を示すこと、またライム病ボレリア3株、回帰熱ボレリア2株では増幅産物が見られないことから、その特異性は極めて高いことが示された (Takano et al. manuscript in preparation)。

(7) 爬虫類から見出されるボレリアのゲノム解析

Borrelia turica 基準株である IST7 株は 954, 496 bp、GC 含量 29. 6%、推定 orf 数は 884 であった (表 4)。

またゲノム全体を1kb毎に区切りそれぞれの領域での他種ボレリアゲノムとの相同性を示した(図12)。

表4. 本研究で決定された*B. turcica*ゲノム (chromosomal DNA)

	<i>B. turcica</i>	<i>B. duttonii</i>	<i>B. reccurentis</i>	<i>B. burgdorferi</i>	<i>B. garinii</i>	<i>B. afzelii</i>
Chromosome size (bp)	954,496	931,674	930,981	910,725	904,246	905,394
Chromosome GC %	29.6	27.6	27.5	28.6	28.3	28.3
Chromosome ORF number	884	820 (2)	800 (20)	851 (7)	832 (8)	856 (6)
Ribosomal RNAs	3	3	3	6	5	5
Transfer RNAs	34	32	32	18	31	33

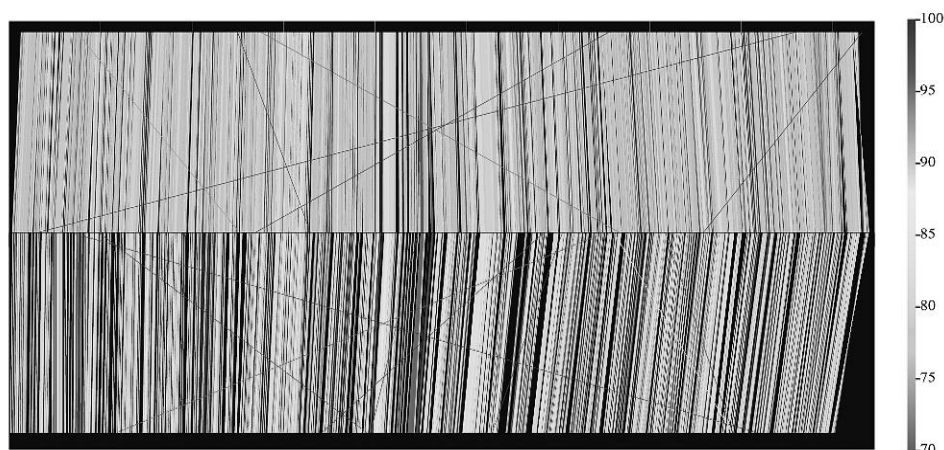


図12. *B. turcica* IST7株と*B. duttonii* Ly株 (上段)および*B. burgdorferi* B31株 (下段)とのゲノム全体における相同性

これらorfはlipoPプログラムによりその局在が推定され、特にマダニや宿主動物体内での生存に深く関与すると考えられるシグナルペプチダーゼ切断部位が存在すると推定されたorfは82、膜貫通ドメインを有するタンパク質は113と推定された。このうち*B. turcica*に特異的orfは44であり、シグナルペプチダーゼ-I切断部位が存在すると推定されたorfは2、膜貫通ドメインを有することが推定されたorfは5、細胞質に存在するタンパク質をコードすると推定されたorfは37であった(表5)。 - 112 -このうち18orfは多属細菌に類似配列が見出される一方、細菌には見出されないorfも16存在した。これらはウイルス等に由来する可能性が考えられた。また*B. turcica*との比較ゲノム解析により、節足動物へ全身感染する回帰熱群ボレリアに特異的であるorfが4見出された。これらorfの内、BDU_0357はLipoPアルゴリズムにより膜タンパク質であることが推定された。本orfの機能は未知であるが、回帰熱群ボレリアに特異的であることから、この遺伝子が上記形質付与に関与している可能性が考えられた。

表5. LipoP 1.0解析によるタンパク質の局在推定 (2011年3月31日現在)

	全orf	<i>B. turcica</i> 特異的orf
Cytoplasmic	689	37
SPaseI-cleaved proteins	51	2
Lipoproteins (SPaseII-cleaved proteins)	31	0
Transmembrane proteins	113	5
Total	884	44

(8) リケッチア、エーリキア、アナプラズマ等ダニ媒介性細菌の検出

試験に供した76 検体中33 検体からリケッチア遺伝子がまた6検体からエーリキア遺伝子が検出された(表6)。各種リケッチア遺伝子(*ompA*, *gltA*)についても系統解析を行うことにより様々なリケッチア種をこれらのダニ類が保有していることが示された。結果の1例を図13に示した。特にアフリカより輸入されたリクガメ寄生の*Amblyomma sparsum*等からヒト病原性リケッチアである*R. africae*近縁種が見出された。またエーリキア属細菌の*groEL*遺伝子配列に基づく系統解析から、本研究で見出されたエーリキア属細菌はヒト病原体である*Ehrlichia chaffeensis*である可能性が強く示唆された(図14)。

表6. 本研究で見出された輸入爬虫類寄生マダニにおけるリケッチア、エーリキア細菌保菌率

Country	Host species	Tick species	<i>Rickettsi</i> <i>a</i>	<i>Ehrlichi</i> <i>a</i>
Africa				
Republic of Ghana	<i>Python regius</i>	<i>Amblyomma latum</i>	0/4	0/4
		<i>Amblyomma transversale</i>	15/17	0/17
Republic of Madagascar	<i>PheIsuma dubia</i>	<i>Amblyomma latum</i>	1/1	0/1
Republic of the Sudan	<i>Geochelone pardalis babcocki</i>	<i>Amblyomma sparsum</i>	0/2	0/2
Republic of Togo	<i>Python regius</i>	<i>Amblyomma latum</i>	0/3	0/3
Republic of Zambia	<i>Geochelone pardalis babcocki</i>	<i>Amblyomma sparsum</i>	7/17	4/17
South America				
Republic of Suriname	<i>Iguana iguana</i>	<i>Amblyomma dissimile</i>	0/3	0/3
Central Asia				
Republic of Uzbekistan	<i>Testudo horsfieldii</i>	<i>Hyalomma aegyptium</i>	1/1	0/1
Russian Federation	<i>Testudo horsfieldii</i>	<i>Hyalomma aegyptium</i>	0/2	0/2
Near and Middle East				
Hashemite Kingdom of Jordan	<i>Testudo graeca</i>	<i>Hyalomma aegyptium</i>	1/11	2/11
South Asia				
Democratic Socialist Republic of Sri Lanka	<i>Boiga forsteni</i>	<i>Amblyomma trimaculatum</i>	8/15	0/15
Total			33/76 (43.4%)	6/76 (7.9%)

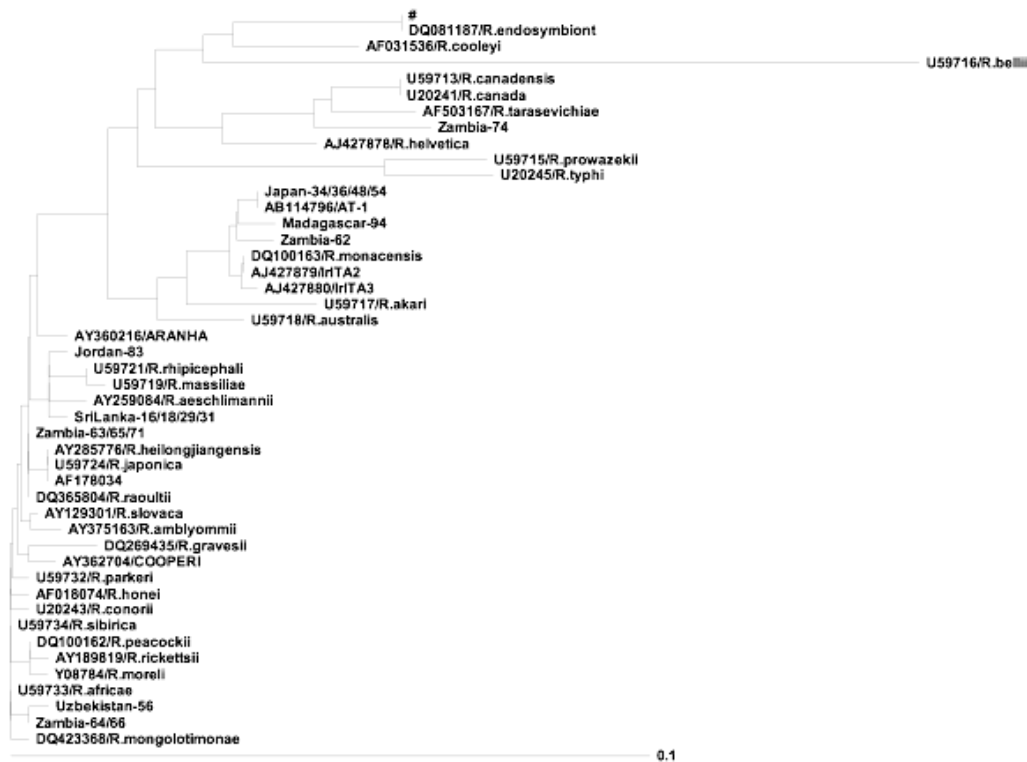


図13. 本研究で見出されたリケッチア属細菌の *gltA* 遺伝子配列に基づく系統解析



図14. 本研究で見出されたエーリキア属細菌の *groEL* 遺伝子配列に基づく系統解析

(9) クリミア・コンゴ出血熱ウイルスおよびフラビウイルスの検出系作成と輸入検体からのウイルスゲノム検出

フラビウイルスNS5遺伝子保存領域を増幅するプライマー(FVX7fおよびFVX12r)を用い、その感度および検出限界を調べた。フラビウイルス10種15株を用いた範囲では、感度は100%であり、かつ検出限界は5PFUであった。この方法を用い輸入爬虫類寄生性マダニからのウイルスゲノム検出を

試みたがいずれも検出限界以下であった。また同様にクリミア・コンゴ出血熱ウイルスゲノム検出も検出限界以下であった。

(10) 輸入爬虫類より見出されたトリパノソーマ原虫 (図15)

18S rDNAの後半1,445塩基配列を、データバンクに登録される *T. varani* (AJ005279、AJ223572) と比較すると、4塩基を除いて一致し、99.7%の相同性であった。gGAPDHの900塩基配列については、*T. varani* (AJ620261) と2塩基を除いて一致し98.7%の相同性であった。今回のヘビ感染例について、宿主血液中のトリパノソーマの形態学的観察は実施できていないが、18S rDNAおよびgGAPDHの高い相同性から、*T. varani*の感染が強く示唆された。ガーナ産クロコビコブラ (*Naja nigricollis*) から *T. voltariae* Macfie, 1919の記載もあり、爬虫類寄生種の異同性について遺伝学的な再確認が望まれる。

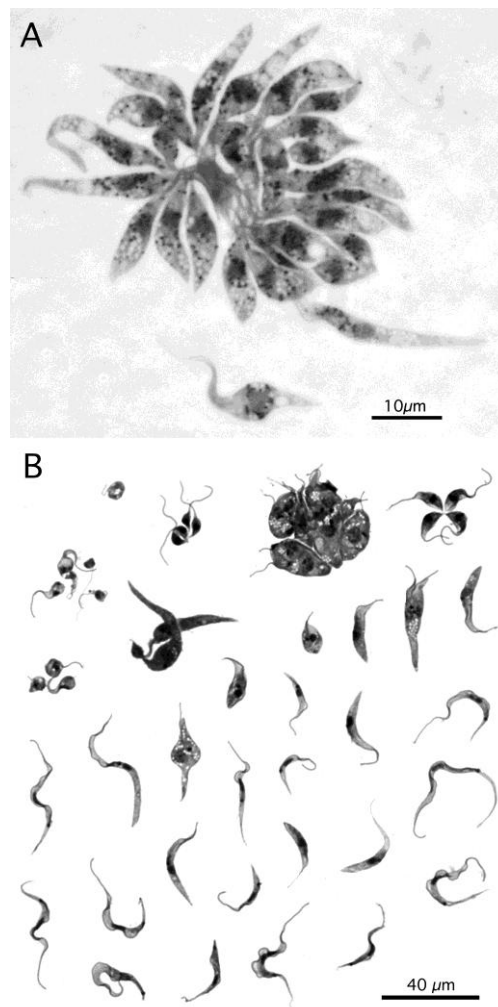


図15. 本研究で輸入爬虫類より検出されたトリパノソーマ属原虫（共同研究者佐藤宏博士のご厚意による）。

財務省統計によれば、輸入爬虫類数は年間30万頭以上であり、ボレリアをはじめいくつかの病

原体の侵入が危惧される。本研究では、佐藤、宇根らと共同で、ガーナより輸入されたヘビの一種、ボールパイソン全血よりトリパノソーマ原虫を見いだした。これは、ヘビ全血が混入したボレリア培地で生育が見られたが、ボレリア培地単独では、原虫の増殖は見られなかった。分離されたトリパノソーマは、*18S rDNA*、*gGAPDH*遺伝子の塩基配列、形態同定から、*Trypanosoma varani* Wenyon、1908であると考えられた。本トリパノソーマ国内侵入が確認されたのは、おそらく初めてのことであるが、国内生態系への浸潤、定着、また病原性などについては今後の検討課題であると考えられる。また研究参画者の安藤は、*Rickettsia*、*Ehrlichia*、*Anaplasma*属細菌のDNA検出法を確立させるとともに、本試験に供したマダニからリケッチア的一种 *Rickettsia africae* に近縁のリケッチアDNAを検出している (Ando S et al. manuscript in preparation)。*R. africae* は African pox の起原菌であることから、今後、人体へのリスク評価などを進める必要がある。さらには新たな環境下、vector-switchingにより媒介動物種が変化することで、吸血動物への未知のダメージが生じる可能性（固有の生態系中の貴重な生物資源が失われてしまう可能性など）もあり得ることから、本研究による輸入爬虫類に関するモニタリングを継続することで、公衆衛生学的、生態学的リスク評価を進める一方で、このvector-switchingのメカニズム解明を進める必要があると考えられた。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

輸入爬虫類および寄生マダニから新型ボレリアが発見され、REP *Borrelia* として世界に初めて提唱した。寄生マダニ体内のボレリア動態を詳細に分析した結果、本ボレリアがマダニの吸血時にマダニ唾液腺へ移行することから、その伝播動態はライム病ボレリアと同様であることが明らかとなった。さらにボレリアと宿主マダニ類のDNA系統解析を行った結果、ボレリアの進化過程において、回帰熱ボレリアがvector-switchingにより新たな媒介宿主に適応したことが示された。これは既存のvector-competenceの破綻がおこることで、節足動物媒介性感染症が突如として、あらたな地域で定着、流行する可能性を示唆しており、科学的にそのメカニズムを解明することは公衆衛生上、予防医学上、また生態学的も極めて重要な意義が有ると思われた。

(2) 地球環境政策への貢献

現在法的措置が一切ない輸入爬虫類の病原体モニタリングの重要性を提起した。国としての病原体侵入防御システムである検疫体制の必要性を示すとともに、輸入規制に関する科学的エビデンスを提供した。また、検疫のための特異的検出システムも開発した。

6. 引用文献

- 1) Anderson BE, & Tzianabos T (1989). Comparative sequence analysis of a genus-common rickettsial antigen gene. *J Bacteriol* 171: 5199-5201.
- 2) Ando, S. et al. Manuscript in preparation.
- 3) BurrIDGE MJ, Simmons LA, Peter TF, & Mahan SM (2002). Increasing risks of introduction of heartwater onto the American mainland associated with animal movements. *Ann N Y Acad*

- Sci 969: 269-274.
- 4) Fisher MA, Grimm D, Henion AK, Elias AF, Stewart PE, & Rosa PA, Gherardini FC (2005). *Borrelia burgdorferi* sigma54 is required for mammalian infection and vector transmission but not for tick colonization. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 5162-5167.
 - 5) Inayoshi M, Naitou H, Kawamori F, Masuzawa T, & Ohashi N (2004). Characterization of Ehrlichia species from Ixodes ovatus ticks at the foot of Mt. Fuji, Japan. Microbiol Immunol 48:737-745.
 - 6) Kim HY, Mott J, Zhi N, Tajima T, & Rikihisa Y (2002). Cytokine gene expression by peripheral blood leukocytes in horses experimentally infected with *Anaplasma phagocytophila*. Clin Diagn Lab Immunol 9:1079-1084.
 - 7) Mediannikov OY, Sidelnikov Y, Ivanov L, Mokretsova E, Fournier PE, Tarasevich I, & Raoult D (2004). Acute tick-borne rickettsiosis caused by *Rickettsia heilongjiangensis* in Russian Far East. Emerg Infect Dis. 10: 810-817.
 - 8) Noda H, Munderloh UG, & Kurtti TJ (1997). Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. Appl Environ Microbiol. 63: 3926-3932.
 - 9) Pei Y, Terajima J, Saito Y, Suzuki R, Takai N, Izumiya H, Morita-Ishihara T, Ohnishi M, Miura M, Iyoda S, Mitobe J, Wang B, & Watanabe H (2008). Molecular characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates dispersed across Japan by pulsed-field gel electrophoresis and multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. Jpn J Infect Dis 61: 58-64.
 - 10) Sato Y, Konishi T, Hashimoto Y, Takahashi H, Nakaya K, Fukunaga M, & Nakao M (1997). Rapid diagnosis of lyme disease: Flagellin gene-based nested polymerase chain reaction for identification of causative *Borrelia* species. Int J Infect Dis 2: 64-73.
 - 11) Schwan TG, Raffel SJ, Schrupf ME, Policastro PF, Rawlings JA, Lane RS, Breitschwerdt EB, & Porcella SF (2005). Phylogenetic analysis of the spirochetes *Borrelia parkeri* and *Borrelia turicatae* and the potential for tick-borne relapsing fever in Florida. J Clin Microbiol 43: 3851-3859.
 - 12) Takano, A. et al. Manuscript in preparation.
 - 13) Ushijima Y, Oliver JH Jr, Keirans JE, Tsurumi M, Kawabata H, Watanabe H, & Fukunaga M. (2003) Mitochondrial sequence variation in *Carios capensis* (Neumann), a parasite of seabirds, collected on Torishima Island in Japan. J Parasitol 89: 196-198.

7. 国際共同研究等の状況
特に記載すべき事項はない。

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) Sato H, Takano A, Kawabata H, Une Y, Watanabe H, & Mukhtar MM (2009). *Trypanosoma cf. varani* in an imported ball python (*Python regnus*) from Ghana. **Journal of Parasitology** 95:1029-1033. (PMID: 20050011, DOI: 10.1645/GE-1816.1)
- 2) Takano A, Muto M, Sakata A, Ogasawara Y, Ando S, Hanaoka N, Tsurumi M, Sato F, Nakamura N, Fujita H, Watanabe H, & Kawabata H (2009). Relapsing fever spirochete in seabird tick, Japan. **Emerging Infectious Diseases** 15: 1528-1530.
- 3) Takano A, Goka K, Une Y, Shimada Y, Fujita H, Shino T, Watanabe H, & Kawabata H (2010). Isolation and characterization of a novel *Borrelia* group of tick-borne *borreliae* from imported reptiles and their associated ticks. **Environmental Microbiology** 12: 134-146.

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 川端寛樹 (2008) ボレリア・ブルクドルフェリ抗体. Medical Technology 別冊「新・臨床検査項辞典」医歯薬出版. pp664-665.
- 2) 川端寛樹 (2009) ボレリア感染症. 今日の治療指針. 医学書院. pp142-143.
- 3) 高野 愛, 渡邊治雄, 川端寛樹 (2009) 生活と環境. 地球温暖化とダニ媒介性感染症. 日本環境衛生センター. 54(4), 22-27.

(2) 口頭発表 (学会)

- 1) Kawabata H, Takano A, Watanabe H. : 4th International Infection Control Conference of Theodore Bilharz Research Institute (2008) “Lyme disease and other tick-borne infectious diseases.”
- 2) Takano A, Kawabata H, Watanabe H, Shino T, Goka K, Une Y, Fujita H. : International Symposium on Mite & Whitefly (2008) “The reptile associated ticks and *Borrelia* from imported Reptiles.”
- 3) 川端寛樹, 高野 愛, 渡邊治雄 : 第 63 回日本衛生動物学会西日本支部大会 (教育講演) (2008) 「実験室内に病原体の姿を探る」
- 4) 安藤秀二, 坂田明子, 宇根有美, 五箇公一, 藤田博己, 花岡 希, 高野 愛, 川端寛樹, 岸本寿男. 輸入爬虫類が病原体を持ち込むリスクに関する考察. (2008) 第 26 回日本クラミジア研究会・第 15 回リケッチア研究会合同学術集会. 2008 年 11 月. 岐阜.
- 5) 高野 愛, 川端寛樹, 渡邊治雄, 藤田博己, 椎野貞一郎, 五箇公一, 宇根有美 : 第 53 回日本応用動物昆虫学会大会 (2009) 「爬虫類から見出された新規ボレリア : ボレリア-媒介節足動物間の coevolution に関する新見解」
- 6) 高野 愛, 藤田博己, 角坂照貴, 今内覚, 田島朋子, 武藤麻紀, 小笠原由美子, 川端寛樹, 渡邊治雄 : 第 148 回日本獣医学会学術集会 (2009) 「国内産爬虫類寄生性マダニから見いだされたボレリアとそのマダニ体内での動態」
- 7) 高野 愛, 藤田博己, 角坂照貴, 今内覚, 田島朋子, 五箇公一, 宇根有美, 川端寛樹, 渡邊治雄 : 第 149 回日本獣医学会学術集会 (2010) 「爬虫類および爬虫類寄生マダニより発見された新群のボレリアとその性状解析」
- 8) 高野 愛, 川端寛樹, 武藤麻紀, 藤田博己, 渡邊治雄 : 第 83 回日本細菌学会総会 (2010) 「国

内産爬虫類寄生性マダニから見いだされたボレリアとそのマダニ体内での動態」

- 9) 高野 愛, 川端寛樹, 藤田博己, 角坂照貴, 今内覚, 田島朋子, 渡邊治雄, 大西真: 第 56 回日本衛生動物学会北日本支部大会 (2010) 「ボレリア属細菌のマダニ体内動態と進化に関する研究」
- 10) Takano A, Goka K, Une Y, Fujita H, Shiino T, Watanabe H, Ohnishi M, Kawabata H. : 12th International Conference on Lyme borreliosis and other tick-borne diseases (2010) “Isolation and characterization of a novel *Borrelia* group of tick-borne borreliae from imported reptiles and their associated ticks.”
- 11) 高野 愛, 関塚剛史, 黒田誠, 大西真, 川端寛樹: 第 63 回日本衛生動物学会大会 (2011) 「マダニ媒介性の新型ボレリア *Borrelia turcica* の比較ゲノム解析」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。