

マダニの吸血に伴う  
ライム病ボレリアの宿主転換  
(病原体の移行経路の解明)

(課題番号 07670269)

平成7年度～平成8年度科学研究費補助金 (基盤研究C2)

研究成果報告書



平成9年3月

研究代表者 中尾 稔

(旭川医科大学・医学部・助手)

## 目 次

はしがき	1
研究組織	2
研究経費	2
研究成果の概要	3~14

### 【研究発表】

学会誌等	15
口頭発表	16
原著原稿・別刷の掲載	17~59

## はしがき

ライム病はボレリア属スピロヘータに起因する全身性の細菌感染症である。本研究代表者は、日本にライム病が存在することが確認されて以来、病原体媒介者であるマダニを研究対象に選び、保菌動物との間での伝播経路を生態学的に調査してきた。従来の寄生虫学的な手法（マダニの同定や宿主上での寄生密度など）に加え、ネズミ・トリ・マダニ・患者など様々な培養材料からボレリアを分離し、rRNA遺伝子領域をサザンブロット法で解析することによりボレリアの遺伝的集団を特定した。その結果、シュルツェマダニがヒトへの媒介者であることが判明し、“ネズミ・シュルツェマダニ”と“トリ・シュルツェマダニ”の伝播サイクルが自然界に存在することを推測できた。シュルツェマダニが媒介するボレリアは 16S rRNA および鞭毛遺伝子の系統分類学的検討により、*Borrelia garinii* もしくは *Borrelia afzelii* に分類可能であることが判明し、両種とも患者から分離されている。また、他のマダニからも非病原性と考えられるボレリアが分離されており、ヤマトマダニからのものは *Borrelia japonica*、タヌキマダニからのものは *Borrelia tanukii*、アカコッコマダニからのものは *Borrelia turdae* と新種記載されている。

このように自然界のマクロな伝播経路や日本に分布するボレリアについての種の問題はほぼ解明できたが、マダニと脊椎動物との間でのボレリアの受け渡し、すなわちミクロな伝播経路の機序については不明な点が残されたままである。そこで、マダニと脊椎動物の体内におけるボレリアの存在様式と宿主間でのボレリアの移行経路を解明することを目的とし、科学研究費補助金の交付を受けた。

## 【研究組織】

研究代表者： 中尾 稔 （旭川医科大学・医学部・助手）

## 【研究経費】

平成7年度            1 4 0 0 千円

平成8年度            7 0 0 千円

---

合 計                2 1 0 0 千円

## マダニの吸血に伴うライム病ボレリアの宿主転換 (病原体の移行経路の解明)

ライム病ボレリアはマダニと脊椎動物の間で宿主転換しなければ、その生活環を維持できない。宿主転換はマダニの吸血時に、“マダニから脊椎動物へ”、“脊椎動物からマダニへ”というルートで行われる。この際、ボレリアは全く異なる環境に瞬時に適応する。また、ライム病ボレリアは回帰熱ボレリアと異なり、脊椎動物の流血中にほとんど出現しないため、皮膚組織での存在様式が“脊椎動物からマダニへ”のルートの解明の鍵となる。本研究では、病原体の“適応の生物学”という観点から、ふたつの宿主におけるライム病ボレリアの存在様式に着目し、微細形態学的調査を行い、病原体の移行経路について、その全体像を把握することを目的とした。平成7年度は脊椎動物におけるボレリアの存在様式、平成8年度はマダニにおけるボレリアの存在様式の解明を主な目標とした。また、研究を遂行していく途中で派生した課題「a) PCR法による皮膚からのボレリアの検出、b) 宿主にボレリア感染を成立させるマダニの咬着時間」についても研究を実施した。なお、以下に記す研究成果は、ボレリア（北海道の患者由来 *B. garinii* JEM6 株）、スナネズミ、マウス（BALB/c や ICR）、シュルツェマダニ *Ixodes persulcatus*（実験室コロニー）を用いて実施したものである。

### 【研究成果の概要】

#### 1) 脊椎動物におけるボレリアの存在様式

平成7年度は、脊椎動物の体内、特に皮膚におけるボレリアの存在様式に着目した。まず、超薄切片作成法と電子顕微鏡操作法を習得するこ

とに努めた。その後、感染マウスや感染スナネズミの皮膚や心臓で試料を作成し、観察に供した。しかし、感染初期（2週）・中期（4週）・後期（8週）と多数のサンプルを観察したが、いずれの組織からも微細形態学的にボレリアを発見することはできなかった。しかし、組織の一部は BSK 培地 (Barbour, 1984) で培養し、ボレリアが増殖することを確認したが、血液からボレリアを培養することは出来なかった。これらの結果から、組織でのボレリアは極度に低密度であることが推察された。そこで、1週間 BSK 培地の中に保った感染マウスの皮膚を用いて電顕試料を作成したところ、真皮結合組織のコラーゲン繊維に絡まるようにして存在するボレリアを多数確認した (図 1)。なお、Pachner *et al* (1995) は、心臓でのボレリアの局在を電顕的に証明している。この報告では、ボレリアは血管周囲やコラーゲン繊維に沿って遍在しており、この点からも皮膚におけるボレリアの局在部位、すなわちマダニへのボレリアの受け渡しの場は真皮結合組織であると予想できた。皮膚での局在を完全に証明できた結果ではないが、シュルツェマダニ幼虫や若虫のハイポストーム (皮膚に刺さり、体液を吸い上げる器官) の長さを考慮しても、無理のない推定と思われた。

#### 派生した課題： PCR法による皮膚組織からのボレリアの検出

感染動物の皮膚ではボレリアの密度が極端に低いことが予想できたため、その数の推定を PCR 法で試みた。分子生物学者の協力を得て、鞭毛遺伝子のシーケンスに基づき、nested PCR 用のプライマーを 4 種類作成した。この方法は 2 回 PCR を行うもので、最初の external primer set による PCR で得られた微量の産物を次の internal primer set による PCR で増感することができる。10mg の正常マウス皮膚にボレリアを  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10, 1 細胞と段階的に加え、DNA を抽出して、nested PCR を実施したところ、最初の PCR では  $10^4$  細胞を添加したサンプルのみ

微弱な増幅シグナルが得られた。2回目のPCRでは、 $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ 細胞を加えたサンプルで強いシグナルが得られた。感染マウスの皮膚では1回目のPCRでシグナルは全く得られず、2回目のPCRでシグナルが得られた。この結果から、感染マウスの皮膚 10 mg には  $10^3$  以下の範囲でボレリアが存在することが推測できた。なお、このPCR法は患者の迅速診断にも応用可能で、internal primer set で挟み込んだ増幅シーケンスには種特異的な制限酵素部位が存在するため、RFLPs によるボレリア種の同定も可能であった。なお、これらの方法や結果の詳細は研究発表・原著の項目に掲載した論文を参照されたい。

## 2) マダニにおけるボレリアの存在様式

マダニは幼虫・若虫・成虫の三つの発育期をもち、幼虫・若虫は一回だけ吸血し、脱皮して次発育期となる。平成8年度は、マダニの体内、特に中腸と唾液腺におけるボレリアの存在様式に着目した。感染スナネズミにボレリアフリーのシュルツェマダニ幼虫を暴露し、飽血幼虫を飼育して脱皮させ、ボレリア感染若虫を得た。この未吸血若虫の中腸と唾液腺の超薄切片を作成し、電顕観察を行った。唾液腺からはボレリアは全く観察されなかったが、中腸からは容易にボレリアが観察された。未吸血のマダニでは、ボレリアは中腸ルーメン内で微絨毛に接するように存在し(図2、3)、上皮細胞内に進入しているボレリアは観察されなかった。次に、正常マウスに感染若虫を吸血させ、吸血に伴うマダニ体内でのボレリアの存在様式を追跡した。若虫の吸血期間は3~4日であるため、吸血後1、2、3日と電顕サンプルを作成した。吸血後1日のサンプルではボレリアは数は多くないものの観察されたが、2~3日のサンプルではボレリアを発見することは困難となった。また、これらのサンプルで、中腸上皮細胞の間隙や細胞内に進入しているボレリアを発見することはできなかった。また、吸血中の唾液腺のサンプルも多数観

察したが、ボレリアを発見することはできなかった。

Zung *et al* (1989) は北米ライム病ボレリア *Borrelia burgdorferi sensu stricto* とダミンマダニ *Ixodes dammini* (*Ixodes scapularis* のシノニム) の実験系を用いて、吸血に伴うマダニ体内でのボレリアの移行経路を電顕的に観察した。その結果、吸血中のマダニでは中腸上皮細胞の間隙や細胞内に進入しているボレリアを観察できたことから、ボレリアは吸血に伴い、中腸ルーメンから体腔側へ脱出できることを示唆した。また、吸血中のマダニの唾液腺や duct からボレリアを発見し、唾液腺を經由して唾液と共にボレリアが宿主へ注入されることを類推した。また、Gern and Aeschlimann (1990) も *Ixodes ricinus* を用いた実験系で唾液腺経由説を唱えている。マダニの唾液は抗凝固作用や抗炎症作用をもつため (Ribeiro, 1987)、マダニの咬着部位でボレリアの感染を加速するかもしれない。

本研究では、多数のサンプルを観察したにも関わらず、移行途中のボレリアを観察できなかったが、吸血期間が長くなるほど中腸ルーメンからボレリアが観察されにくくなることを考慮すると、上記の研究者達の説のように、シュルツェマダニにおいてもボレリアは中腸ルーメンを急速に脱し、唾液腺経由で宿主に移行するのかもしれない。ただし、確実な証拠はなく、“宿主にボレリア感染を成立させるマダニの咬着時間”からその経路を類推するように研究計画を変更した。なお、Benach *et al* (1987) もダミンマダニ雌成虫の実験系において、吸血に伴う唾液腺へのボレリアの移行を組織学的に証明できていない。

派生した課題： ボレリア感染を成立させるマダニの咬着時間

組織学的にマダニにおけるボレリアの移行経路を証明することが困難であったため、マダニの吸血行動を利用し、ボレリアの移行経路を推定した。すなわち、マダニは他の吸血性節足動物と異なり、吸血終了まで



の時間が極端に長いことを利用し、マウスにボレリア感染が成立するための必要な時間（ボレリアが宿主に注入される時期）を調べると共に、吸血時間の異なる若虫から中腸や唾液腺を取り出し、蛍光抗体法によってボレリアの存在を確認した。

ICR マウス（雌、7週齢）の頭部に自作の feeding chamber (Sato and Nakao, 1997) を装着し、この中に3匹の感染若虫を入れた。若虫の咬着を見計らい、6・12・24・36・48時間後にマダニをピンセットで除去した。また、飽血群（>72時間後）も設定した。各群のマウスは2週間飼育後、剖検して両耳・心臓・膀胱を培養し、いずれかの培養材料がボレリア陽性であった場合、感染が成立したと判定した。表1に示すように、マウスの感染は若虫咬着後48時間から成立し、ボレリアが注入される時期はきわめて遅いことが判明した。また、各群から得たマダニを10匹ずつ解剖し、中腸と唾液腺をBSK培地に投入して、ボレリア培養陽性率を調べた（図4）。中腸の陽性率はほとんど変動しなかったことから、吸血が進行しても一部のボレリアは中腸に残存することが類推できた。一方、唾液腺の陽性率は48・72時間と増加し、ボレリアの唾液腺への移行を示唆した。この時期にはマウスの感染も成立することから、唾液腺経由でボレリアが宿主に注入されることが類推できた。また、唾液腺へ進入するボレリアの量的な変化を観察するため、未吸血・24・48・72時間吸血の若虫から唾液腺を取り出し、唾液腺全体をスライドグラスに張り付けた標本（ホールマウント標本、各群12匹の若虫から作成）と、唾液腺のホモジネート（10匹分の唾液腺をPBS 25 $\mu$ lでホモジネート）の一部をスライドグラスにスポットした標本を作成し、FITC標識抗ボレリア抗体を用いて、蛍光抗体法により観察した（図5）。ホールマウント標本ではボレリアが48時間以降に観察され、陽性率は次第に増加した。ホモジネート標本でマダニ1匹あたりの唾液腺のボレリア数を推定したところ、10細胞以下ときわめて

少なかった。

シュルツェマダニの若虫は吸血途中で宿主が死亡した場合、急速に死体を離脱し、次の宿主を再吸血する (Nakao and Sato, 1996)。この性質を利用し、以下の実験を行った。正常マウスに感染若虫を暴露し、24・48時間後にマウスを殺し、途中吸血若虫を得た。これらの若虫を3匹ずつ feeding chamber を用いてマウスに再吸血させ、12・24時間後にマダニを強制的に除去した。前記実験と同様にマウスの感染状況を調べたところ、途中吸血したマダニは短時間の咬着時間でもマウスにボレリアを注入していることが明らかとなった (表2)。この結果からも、マダニの吸血に伴い、ボレリアが宿主に注入される以前に、マダニ体内での移行などの準備期間が必要なことが強く示唆された。

次に、マウスの感染に必要なボレリア細胞数を推定した (表3)。未吸血の感染マダニ中腸をBSK培地で2週間培養し、初代分離株を所定の数に希釈して、マウスの皮下に注入した。マウスの感染は10細胞でも成立したことから、マダニによってマウスに注入されるボレリアはごく少数でも感染を惹起できると類推できた。この事実は、唾液腺から検出されるボレリア数が少なくても宿主の感染が成立するという事実と整合的であった。

### 3) 反省と今後の課題

研究担当者が1名であったため、研究開始当初は電顕試料作成の習得にかなりの時間を取られた。また、宿主の皮膚におけるボレリア細胞の密度を高く推定するなど、研究の甘さも目立った。しかし、試行錯誤を重ねる度に脊椎動物やマダニ体内でのボレリアの動きを漠然ではあるが、イメージできるようになった。今後は電顕観察にこだわらず、広い視野を得るために準超薄切片による観察を継続してゆきたい。“宿主にボレリア感染を成立させるマダニの咬着時間”の検討では、ボレリアが

宿主に注入されるまでにマダニ体内で準備期間が必要なことが類推できた。唾液腺へのボレリアの移行ばかりでなく、ボレリア自身の質的变化（休眠型から感染型ボレリアへの転換）も生じているかもしれない、この点も検討して行きたい。具体的には菌体表層蛋白（Osps）の発現をモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法で経時的に追跡して行きたい。なお、Schwan *et al* (1995) のデータはマダニが吸血を始めると、体内のボレリアが OspC 蛋白を発現することを暗示している。

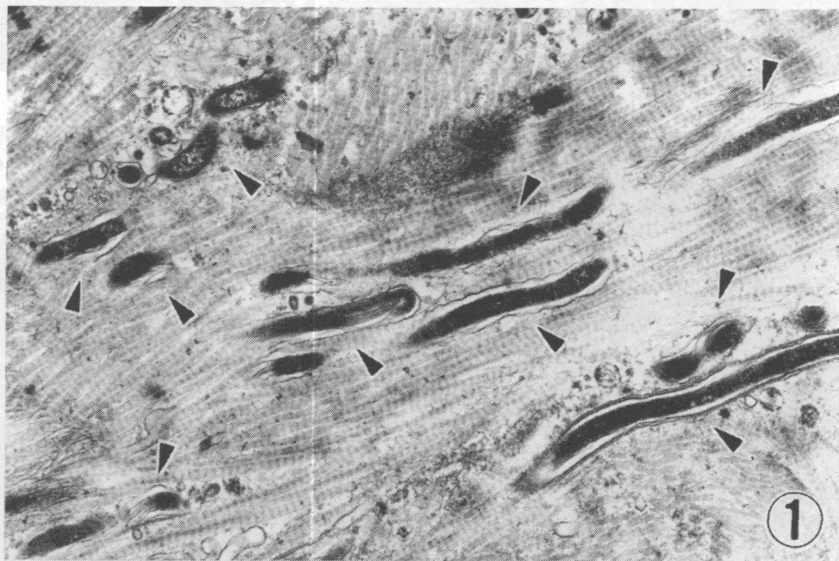


図1 マウスの真皮結合組織に観察されたボレリア  
B S K培地に投入した皮膚組織から電顕試料を作成  
矢印：ボレリア断面

若虫吸着後の時間 (hours)

ていじホ式はち寝睡つぐとーし調中の虫若ニママエツルエシ 8・5図  
図5 蛍光抗体法による唾液腺からのボレリア検出  
面積でいしホ：旧天  
ヒストグラム：ホールマウント標本のボレリア陽性率  
折れ線グラフ：若虫1匹あたりの推定ボレリア数

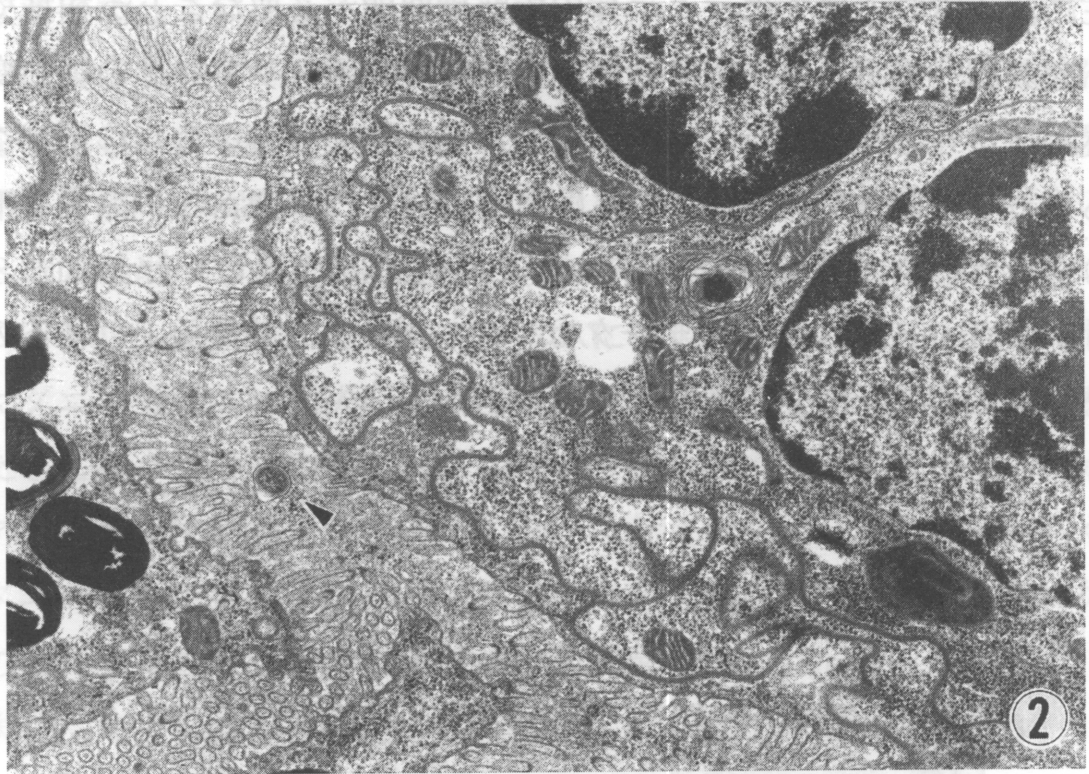


図 2・3 シュルツェマダニ若虫の中腸ルーメンに観察されたポレリア  
 矢印：ポレリア断面

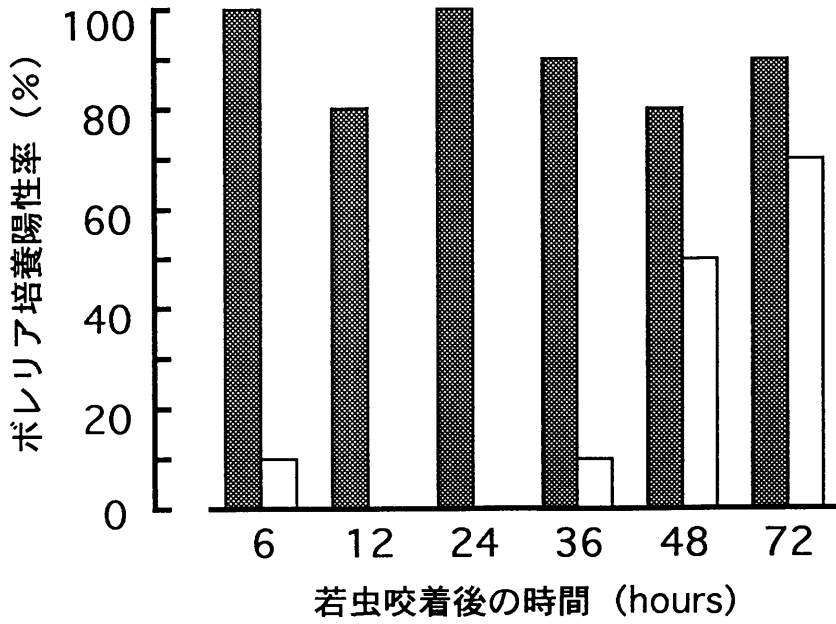


図4 若虫の中腸と唾液腺におけるボレリア培養陽性率の推移  
 黒ヒストグラム：中腸 白ヒストグラム：唾液腺

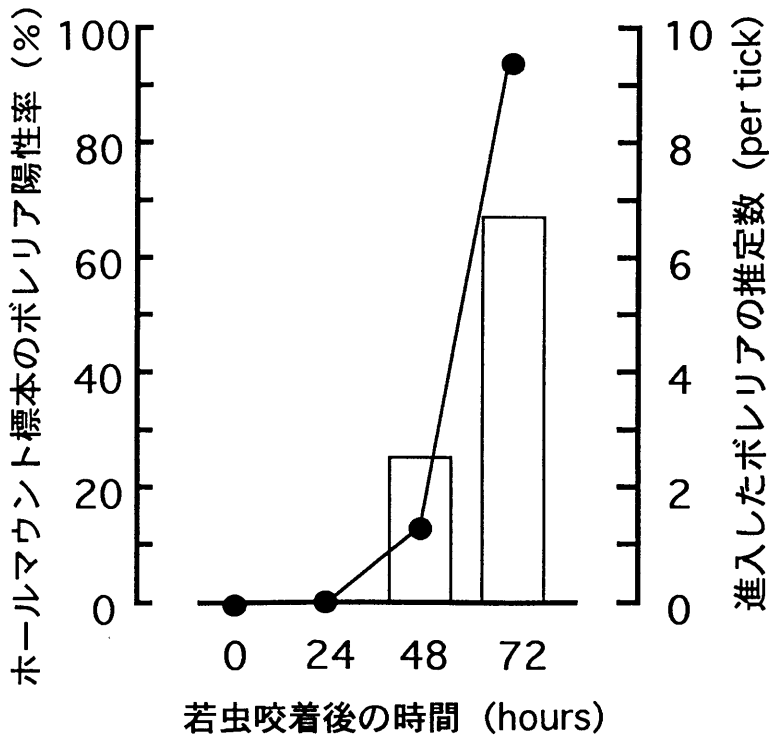


図5 蛍光抗体法による唾液腺からのボレリア検出  
 ヒストグラム：ホールマウント標本のボレリア陽性率  
 折れ線グラフ：若虫1匹あたりの推定ボレリア数

表1 マウスにボレリア感染が成立するための若虫咬着時間

感染若虫の 咬着時間	マウスのボレリア感染率* (陽性数/調査数)
6時間	0% (0/5)
12時間	0% (0/5)
24時間	0% (0/5)
36時間	0% (0/5)
48時間	80% (4/5)
>72時間	100% (5/5)

\* マウスのボレリア感染は培養によって判定

表2 若虫の再咬着によるマウスのボレリア感染

第1回咬着	再咬着の時間	再咬着されたマウスのボレリア 感染率* (陽性数/調査数)
なし	12時間	0% (0/5)
	24時間	0% (0/5)
24時間	12時間	0% (0/5)
	24時間	100% (5/5)
48時間	12時間	80% (4/5)
	24時間	100% (5/5)

\* マウスのボレリア感染は培養によって判定

表3 マウスの感染に必要なボレリア数

ボレリア数*	マウスのボレリア感染率** (陽性数/調査数)	
0	0%	(0/2)
10	60%	(3/6)
10 <sup>2</sup>	100%	(6/6)
10 <sup>3</sup>	100%	(6/6)
10 <sup>4</sup>	100%	(6/6)

\* 若虫中腸からの初代培養菌体を皮下接種

\*\* マウスのボレリア感染は培養によって判定

## 引用文献

- Barbour, A. G. 1984. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.* 57: 521-525.
- Benach, J. L. *et al.* 1987. Adult *Ixodes dammini* on rabbits: a hypothesis for the development and transmission of *Borrelia burgdorferi*. *J. Infect. Dis.* 155: 1300-1306.
- Gern, L. and Aeschlimann, A. 1990. Development of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* females during blood feeding. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 65: 89-93.
- Nakao, M. and Sato, Y. 1996. Refeeding activity of immature ticks of *Ixodes persulcatus* and transmission of Lyme disease spirochete by partially fed larvae. *J. Parasitol.* 82: 669-672.
- Pachner, A. R. *et al.* 1995. Localization of *Borrelia burgdorferi* in murine Lyme borreliosis by electron microscopy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52: 128-133.
- Ribeiro, J. M. C. 1987. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Ann. Rev. Entomol.* 32: 463-478.
- Sato, Y. and Nakao, M. 1997. Transmission of the Lyme disease spirochete, *Borrelia garinii*, between infected and uninfected immature *Ixodes persulcatus* during cofeeding on mice. *J. Parasitol.* 83: in press.
- Schwan, T. G. *et al.* 1995. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2909-2913.
- Zung, J. L. *et al.* 1989. Fine structural evidence for the penetration of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* through the gut and salivary tissues of *Ixodes dammini*. *Can. J. Zool.* 67: 1737-1748.



## 【研究発表】

### 学会誌等

- 1) Sato Y, Konishi T, Hashimoto Y, Takahashi H, Nakaya K, Fukunaga M, and Nakao M. 1997. Rapid diagnosis for Lyme disease: flagellin gene-based nested polymerase chain reaction for identification of causative *Borrelia* species. *Journal of Clinical Microbiology* (submitted for publication).
- 2) Sato Y and Nakao M. 1997. Transmission of the Lyme disease spirochete, *Borrelia garinii*, between infected and uninfected immature *Ixodes persulcatus* during cofeeding on mice. *Journal of Parasitology* (accepted for publication).
- 3) Konishi T and Nakao M. 1997. Antibiotic treatment in mice infected with Japanese *Borrelia garinii*: efficacy of ceftriaxone for eradicating the infection induced by *Ixodes persulcatus* tick bites. *Microbiology and Immunology* (accepted for publication).
- 4) Fukunaga M, Okada K, Nakao M, Konishi T, and Sato Y. 1996. Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease borreliae. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 898-905.
- 5) Nakao M, Uchikawa K, and Dewa H. 1996. Distribution of *Borrelia* species associated with Lyme disease in the subalpine forests of Nagano prefecture, Japan. *Microbiology and Immunology* 40: 307-311.

- 6) Nakao M and Sato Y. 1996. Refeeding activity of immature ticks of *Ixodes persulcatus* and transmission of Lyme disease spirochete by partially fed larvae. *Journal of Parasitology* 82: 669-672.

## 口頭発表

- 1) 中尾 稔 (1996)  
マダニとボレリアの相互関係 (2) *Ixodes pavlovskyi* のライム病ボレリアに対する感受性  
第33回レプトスピラシンポジウム (福岡市)
- 2) 中尾 稔、小西達也、佐藤雪太、福長将仁 (1996)  
鞭毛遺伝子の PCR-RFLP によるボレリア種の簡易識別  
第33回レプトスピラシンポジウム (福岡市)
- 3) 浜瀬亜希子、矢吹美英、中尾 稔、福長将仁 (1996)  
シュルツェマダニ *Ixodes persulcatus* の遺伝学的分類の試み  
第33回レプトスピラシンポジウム (福岡市)
- 4) 中尾 稔、佐藤雪太 (1996)  
シュルツェマダニ幼若虫の再吸血性とライム病ボレリア伝播  
第48回日本衛生動物学会大会 (福岡市)
- 5) 中尾 稔、矢吹美英、福長将仁 (1996)  
リボソームRNA遺伝子のスペーサー領域 (ITS2) 塩基配列から推定したライム病媒介マダニの系統関係  
第43回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会 (十和田市)