

ライム病病原体の伝播機序とその病原性

(研究課題番号 05670218)

平成6年度科学研究費補助金(一般研究C)
研究成果報告書

平成7年3月

研究代表者 宮本健司
(旭川医科大学・助教授)

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
研 究 発 表		
(1) 原 著	-----	5
(2) 口 頭 発 表	-----	7
(3) 総 説 など	-----	11

はしがき

ライム病 (Lyme disease, Lyme borreliosis) は、米国北東部の子供達に発生した若年性リウマチ様関節炎の研究に端を発し、1982年に病原体のスピロヘータは、媒介者のマダニ (*Ixodes scapularis*= *I. dammini*) から検出された。その後、本種は新種の *Borelia burgdorferi* と報告され、野生動物が病原体保有獣の役割を演じる人獣共通感染症であることが判明した。現在患者は欧米諸国を中心に多発し、その症状は多彩である。

1992年パスツール研究所のグループは欧米間の患者の症状に差異を認める原因の一つに病原体が異なるという新説から *B. burgdorferi sensu stricto* に対し、*B. garinii* と *B. afzelii* の新種が提唱された。

一方、日本では1987年に初めて患者が長野県で発見された。その後、東北地方や北海道で患者発生が確認されている。我々は、1988年に旭川でマダニ寄生後に皮疹の出現した2例を経験して以来、本病の研究を開始した。日本での媒介者は、極東アジアにも棲息するシュルツェマダニ (*I. persulcatus*) が主要な役割を演じている。また、病原体はエゾアカネズミ、アカハラ、アオジなどが保有しており、マダニへの供給の役割を演じている。

患者、マダニ、小型野生動物などから分離されるボレリアは、*B. garinii* と *B. afzelii* のみで、*B. burgdorferi sensu stricto* は認められなかった。

これらボレリアの病原性を評価する方法は、世界中で定まっていない。これまで、若齢スナネズミの腹腔へシュルツェマダニ由来のボレリアを摂取すると、後肢関節の伸展が制限されて跛行を来すことが実験で示された。しかし、ヤマトマダニ由来の *B. japonica* ではこの現象が無く、病原性の評価に役立つものと、現在も検討中である。

これまでの研究結果から、日本、特に北海道におけるライム病発生の現状の一端が解明された。欧米諸国に見られる本病とはその発生要因は異なり、日本的な特徴を備える疾患と考えられる。これらの現象を近隣極東アジア諸国の本疾患と比較するための基礎データが蓄積されたものと信ずる。

研究組織

研究代表者：宮本 健司（旭川医科大学・助教授）

研究分担者：中尾 稔（旭川医科大学・助手）

研究分担者：福長 将仁（福山大学・薬学部・教授）

研究経費

平成5年度 1,300 千円
(1993)

平成6年度 800 千円
(1994)

計 2,100 千円

研究成果の概要

1989年に北海道の富良野で媒介者と推定されるシュルツェマダニとアカネズミから初めて *Borrelia burgdorferi sensu lato* の検出に成功した。このことから自然界における病原体の維持機構の解明を試みた。

1. 北海道産シュルツェマダニ由来の菌株の性状は米国の標準株 B31（以後 B31 と表す）と同一の蛋白プロフィールを示すものはない。また、すべての株に 41kDa の鞭毛蛋白は認められるが、OspA の存在しない株もあった。これらの事柄から日本産株の抗原的、遺伝的ヘテロゲニシティーは北米、ヨーロッパ、およびアジア産の株と著しく性質が異なることが判明した。
2. 北海道に発生した患者から分離した株は前に述べたシュルツェマダニ由来株と全く同様の性質を示し、患者からダニ標本は確認されていないが、本種ダニにより媒介されていることが推測された。
3. 全国各地で採取したヤマトマダニ由来の菌体 32 株を SDS-PAGE, PFGE, RFLP によるリボタイプ、サウザン、ハイブリット法により調べた。すべての分離株は同一な蛋白プロフィールとモノクローナル抗体への反応を示したが、プラスミドは少し変動する。これら株の遺伝的相同性は rRNA 遺伝子プローブを使用した遺伝子ハイブリダイゼーションで示された。調べた株間にはいかなる性状の相違も見られなく、RFLP パターンは *B. burgdorferi* と著しく異なることが判明した。そのため、今後は新たな遺伝種とするべきである。（現在、*B. japonica* と命名された）
4. シュルツェマダニとヤマトマダニの *B. burgdorferi* に対する感受性を明らかにした。人体由来株を感染させたスナネズミにクリーンな両種マダニ幼虫を吸血させると病原体は両者に取り込まれる。しかし、休眠後に若虫に発育したシュルツェマダニからは経期感染により移行した病原体を検出できるが、ヤマトマダニはすべて陰性であった。このことは媒介者は病原体を選択的に維持している。

5. 患者から分離した株を rRNA の RFLP と 16S rRNA 遺伝子の増殖用プライマーを用いた方法により *B. afzelii* 遺伝種と同定した。これまでシュルツェマダニやアカネズミから分離した菌体にも本遺伝種と同定されるものが認められ、本種はアカネズミ-シュルツェマダニのサイクルで維持されている。
6. *B. japonica* はアカネズミ（岩手・福島）、ジネズミ（福島）、エゾヤチネズミ（北海道）から分離されたことからこれら小型哺乳類がそれぞれの地域でボレリアの保有動物であった。北海道のエゾアカネズミからはこれまで本菌体は確認されていない。
7. 日本産ライム病々原体の *B. burgdorferi sensu lato* はシュルツェマダニにより伝播されているが、これら菌株の遺伝種レベルで検討すると *B. afzelii* はエゾアカネズミを主体とする小型哺乳動物、*B. garinii* はアカハラ、アオジがそれぞれ病原体保有動物の役割を演じていることがこれまでの疫学的調査から明らかとなった。唯、RFLP によるリボタイプIV群に分けられる菌株は両種動物から検出される。
8. エゾアカネズミから分離される菌体のリボタイプはⅢ群（*B. afzelii*）とIV群に分けられる。これら菌株をネズミの個体の分離材料（左右耳介・心筋・脾・膀胱）別に比較すると、少数例ではあるが、同一材料、または同一個体の各材料に、混合感染を認める例があった。このことは、動物の臓器に各遺伝種の親和性を認めることが推測される。
9. ライム病ボレリア（*B. burgdorferi*）の病原性を各種実験動物を用いて評価を試みた。マウス・ラット・ハムスターへの腹腔内感染ではそれぞれ感受性を認めるが、対照動物と比較して変化は見られなかった。一方、4週令スナネズミは感染後1週目より脛骨・足根骨関節の伸展に異常を起こし、跛行運動を確認した。このことから、幼若令スナネズミは病原性を評価するモデル動物となりうることを明らかにした。現在、病理組織学的変化を検討中である。ヤマトマダニ由来の *B. japonica* はスナネズミへの病原性は示さなかった。

(1) 原 著

- 1) M. Fukunaga, M. Sohnaka, Y. Takahashi, M. Nakao and K. Miyamoto: Antigenic and genetic characterization of *Borrelia* species isolated from *Ixodes persulcatus* in Hokkaido, Japan. J. Clin. Microbiol. 31(5): 1388–1391, 1993
- 2) M. Fukunaga, M. Sohnaka, M. Nakao and K. Miyamoto: Evaluation of genetic divergence of borrelial isolates from Lyme disease patients in Hokkaido, Japan, by rRNA. J. Clin. Microbiol. 31(8): 2044–2048, 1993
- 3) M. Nakao and K. Miyamoto: Long-tailed shrew, *Sorex unguiculatus*, as a potential reservoir of the spirochetes transmitted by *Ixodes ovatus* in Hokkaido, Japan. Jpn. J. Sanit. Zool. 44(3): 237–245, 1993
- 4) 鈴木王洋, 加藤友賀, 加瀬勝一, 伊藤 一, 片山幸太郎, 早坂浩二, 篠田 肇, 宮本健司, 中村治雄: 北海道におけるマダニ咬傷の実態調査. 防衛衛生 40(9): 341–347, 1993
- 5) 鈴木王洋, 加藤友賀, 加瀬勝一, 伊藤 一, 片山幸太郎, 篠田 肇, 宮本健司, 中村治雄: マダニ咬傷を受けた隊員の健康調査. 防衛衛生 40(10): 381–384, 1993
- 6) Y. Takahashi, M. Sohnaka, M. Nakao, K. Miyamoto and M. Fukunaga: Characterization of *Borrelia* species isolated from Ixodid ticks, *Ixodes ovatus*. Microbiol. Immunol. 37(9): 721–727, 1993
- 7) 橋本喜夫, 川岸尚子, 坂井博之, 松尾 忍, 飯塚 一, 梶田 哲, 岸山和敬, 水元俊裕, 宮本健司: 旭川医科大学および関連施設で過去4年間に経験したライム病の臨床像—ボレリア分離成功例を中心に. 臨床皮膚科 47(13):1153–1159, 1993
- 8) 坂井博之, 橋本喜夫, 松尾 忍, 飯塚 一, 中尾 稔, 宮本健司: 顔面神経麻痺を呈したライム病の1例. 日皮会誌 103(14): 1895–1899, 1993
- 9) K. Miyamoto, M. Nakao, H. Fujita and F. Sato: The ixodid ticks on migratory birds in Japan and the isolation of Lyme disease spirochetes from bird-feeding ticks. Jpn. J. Sanit. Zool. 44(4): 315–326, 1993
- 10) 宮本健司, 中尾 稔: 野鳥に寄生するマダニ類. 日本鳥類標識協会誌 8(1): 37–42, 1993

- 11) 久保信彦, 飯森洋史, 金丸峯雄, 進藤俊幸, 大久保周二, 中尾 稔, 宮本健司, 荒島康友, 川端真人, 河野均也: 山梨県のマダニのボレリア保有状況. 感染症学雑誌 68(1): 168-169, 1994
- 12) K. Miyamoto and M. Nakao: A study of ixodid tick bite sites on the human body in Hokkaido. Jpn. J. Sanit. Zool. 45(1):79-81, 1994
- 13) Y. Arimitsu, M. Seki, M. Nakao and K. Miyamoto: Comparison of antibody titers against Borrelial strains isolated in Japan by the microcapsule agglutination test for serological studies of early Lyme disease. Microbiol. Immunol. 38(4): 269-272, 1994
- 14) M. Nakao and K. Miyamoto: A distributional record of *Ixodes persulcatus* Schulze in Kyushu, southern Japan (Acari: Ixodidae). Jpn. J. Sanit. Zool. 45(2): 151, 1994
- 15) M. Nakao and K. Miyamoto: Susceptibility of *Ixodes persulcatus* and *I. ovatus* (Acari: Ixodidae) to Lyme disease spirochetes isolated from humans in Japan. J. Med. Entomol. 31(3): 467-473, 1994
- 16) M. Nakao, K. Miyamoto, M. Fukunaga, Y. Hashimoto and H. Takahashi: Comparative studies on *Borrelia afzelii* isolated from a patient of Lyme disease, *Ixodes persulcatus* ticks, and *Apodemus speciosus* rodents in Japan. Microbiol. Immunol. 38(6): 413-420, 1994
- 17) M. Fukunaga and Y. Takahashi: Pulsed field gel electrophoresis analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated in Japan and taxonomic implications with Lyme disease spirochetes. Microbiol. Immunol. 38(9): 747-751, 1994
- 18) M. Nakao, K. Miyamoto and M. Fukunaga: *Borrelia japonica* in nature: genotypic identification of spirochetes isolated from Japanese small mammals. Microbiol. Immunol. 38(10): 805-808, 1994
- 19) M. Nakao, K. Miyamoto and M. Fukunaga: Lyme disease spirochetes in Japan: enzootic transmission cycles in birds, rodents, and *Ixodes persulcatus* ticks. J. Infect. Dis. 170: 878-882, 1994
- 20) M. Nakao and K. Miyamoto: Mixed infection of different *Borrelia* species among *Apodemus speciosus* mice in Hokkaido, Japan. J. Clin. Microbiol. 33(2): 490-492, 1994

(2) 口頭発表

1) 中尾 稔, 宮本健司

日本におけるライム病ボレリアの多様性、その攪乱の生態学

④” シュルツェマダニ・アカネズミ” 伝播サイクルの実験室内再現

第 30 回レプトスピラ・シンポジウム (名古屋) 1993 年 3 月

2) 中尾 稔, 宮本健司

日本におけるライム病ボレリアの多様性、その攪乱の生態学

⑤ヤマトマダニ媒介性ボレリアの保菌動物に関する野外調査

第 30 回レプトスピラ・シンポジウム (名古屋) 1993 年 3 月

3) 中尾 稔, 宮本健司

日本におけるライム病ボレリアの多様性、その攪乱の生態学

⑥ヒト由来ボレリア株のマダニ類への感受性試験

第 30 回レプトスピラ・シンポジウム (名古屋) 1993 年 3 月

4) 高橋幸江, 福長将仁, 惣中雅子, 三淵一二, 中尾 稔, 宮本健司

ヤマトマダニ由来ボレリアについて

第 30 回レプトスピラ・シンポジウム (名古屋) 1993 年 3 月

5) 有光佳子, 関 昌明, 中尾 稔, 宮本健司

MCAT を用いたライム病ボレリア日本分離株と IRS 株との比較

第 30 回レプトスピラ・シンポジウム (名古屋) 1993 年 3 月

6) 高橋幸江, 三淵一二, 福長将仁, 中尾 稔, 宮本健司

シュルツェマダニの保有するボレリアの多様性

第 66 回日本細菌学会総会 (名古屋) 1993 年 3 月

7) 福長将仁, 惣中雅子, 高橋幸江, 三淵一二, 中尾 稔, 宮本健司

ヤマトマダニの保有するボレリアについて

第 66 回日本細菌学会総会 (名古屋) 1993 年 3 月

8) 惣中雅子, 福長将仁, 三淵一二, 中尾 稔, 宮本健司

リボソーム RNA 遺伝子構成によるボレリアの分類

第 66 回日本細菌学会総会 (名古屋) 1993 年 3 月

9) 福長将仁, 高橋幸江, 三淵一二, 中尾 稔, 宮本健司

ヤマトマダニの保有するボレリアについて

日本薬学会第 113 年会 (大阪) 1993 年 3 月

10) 宮本健司, 中尾 稔

日本産ボレリア菌体の *in vivo* における病原性の検討

第 67 回日本感染症学会総会 (東京) 1993 年 4 月

- 11)宮本健司
ライム病 (シンポジウム)
第 45 回日本衛生動物学会大会 (愛知) 1993 年 4 月
- 12)中尾 稔, 宮本健司
ヒト由来ボレリア株のマダニ類への感受性試験
第 45 回日本衛生動物学会大会 (愛知) 1993 年 4 月
- 13)中尾 稔, 宮本健司
食虫類がヤマトマダニ媒介性ボレリアの保菌動物である可能性
第 45 回日本衛生動物学会大会 (愛知) 1993 年 4 月
- 14)宮本健司, 中尾 稔
マダニ寄生部位の年齢構成群間における特徴について
第 40 回日本衛生動物学会北日本支部大会 (旭川) 1993 年 9 月
- 15)Kenji MIYAMOTO, Minoru NAKAO & Yoshio HASHIMOTO
Lyme disease in Japan
International Conference of Clinical Ecology(Asahikawa, Japan) September,
1993
- 16)揚村拓也, 高橋幸江, 三淵一二, 福長将仁
パルスフィールド電気泳動法による回帰熱ボレリアのゲノム構成
第 46 回日本細菌学会中国四国支部総会 (徳島) 1993 年 10 月
- 17)惣中雅子, 高橋幸江, 三淵一二, 中尾 稔, 宮本健司, 福長将仁
日本型ライム病ボレリアの RFLP-ribotyping と PCR プライマーセットによる分類学的位置づけ
第 46 回日本細菌学会中国四国支部総会 (徳島) 1993 年 10 月
- 18)橋本喜夫, 松尾 忍, 飯塚 一, 宮本健司
2 年間に遠軽厚生病院で経験したマダニ刺咬症 30 例の報告
日本皮膚科学会第 312 回北海道地方会 (札幌) 1993 年 12 月
- 19)小池且弥, 高橋英俊, 橋本喜夫, 中尾 稔, 宮本健司
Borrelia afzelii が分離されたライム病の 1 例
日本皮膚科学会第 313 回北海道地方会 (札幌) 1994 年 2 月
- 20)中尾 稔, 宮本健司, 福長将仁
日本で初めてライム病患者から分離された *Borrelia afzelii* について
第 67 回日本細菌学会総会 (東京) 1994 年 3 月

- 21) 福長将仁, 高橋幸江, 三淵一二, 中尾 稔, 宮本健司
パルス電気泳動によるライム病ボレリアのゲノムの解析
第 67 回日本細菌学会総会 (東京) 1994 年 3 月
- 22) 橋本喜夫, 飯塚 一, 中尾 稔, 宮本健司 (特別講演)
日本のライム病の臨床 - ボレリア分離成功症例を中心に
第 31 回レプトスピラ・シンポジウム (東京) 1994 年 3 月
- 23) 中尾 稔, 宮本健司, 福長将仁, 内川公人
日本におけるライム病ボレリアの多様性、その攪乱の生態学
⑦ シュルツェマダニ媒介性ボレリアの遺伝子型、そのレゼルボア特異性と地域別分離頻度
第 31 回レプトスピラ・シンポジウム (東京) 1994 年 3 月
- 24) 中尾 稔, 宮本健司
マダニとボレリアの相互関係
① ボレリア感染がシュルツェマダニの発育に及ぼす影響
第 31 回レプトスピラ・シンポジウム (東京) 1994 年 3 月
- 25) 高橋幸江, 惣中雅子, 揚村拓也, 福長将仁, 三淵一二, 中尾 稔, 宮本健司
シュルツェマダニ由来ボレリアの分子生物学的解析
1 PFGE による検討
第 31 回レプトスピラ・シンポジウム (東京) 1994 年 3 月
- 26) 高橋幸江, 惣中雅子, 揚村拓也, 福長将仁, 三淵一二, 中尾 稔, 宮本健司
シュルツェマダニ由来ボレリアの分子生物学的解析
2 小さい鞭毛蛋白を有するボレリアについて
第 31 回レプトスピラ・シンポジウム (東京) 1994 年 3 月
- 27) 高橋幸江, 惣中雅子, 揚村拓也, 福長将仁, 三淵一二, 中尾 稔, 宮本健司
分子生物学的アプローチによるライム病ボレリア伝播経路の解析
日本薬学会 114 年会 (東京) 1994 年 3 月
- 28) 宮本健司, 中尾 稔, 橋本喜夫
病原体が分離されたライム病 12 症例
第 68 回日本感染症学会総会 (長崎) 1994 年 4 月
- 29) 宮本健司, 中尾 稔
ライム病病原体のシリアンハムスターへの感染実験による病原性の検討
第 46 回日本衛生動物学会大会 (盛岡) 1994 年 4 月
- 30) 中尾 稔, 宮本健司, 福長将仁, 内川公人
シュルツェマダニ媒介性ボレリアの遺伝子型、そのレゼルボア特異性と地域別分離頻度
第 46 回日本衛生動物学会大会 (盛岡) 1994 年 4 月

- 31) Kenji MIYAMOTO, Minoru NAKAO, Yoshio HASHIMOTO & Hidetoshi TAKAHASHI
Isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from the skin biopsy samples of 12 Lyme borreliosis patients with erythema migrans
VI International Conference on Lyme Borreliosis (Bologna, Italy) June, 1994
- 32) Minoru NAKAO, Kenji MIYAMOTO & Masahito FUKUNAGA
The migratory birds of genus *Emberiza* and *Turdus* as potential reservoirs of *Borrelia garinii* in Japan
VI International Conference on Lyme Borreliosis (Bologna, Italy) June, 1994
- 33) Masahito FUKUNAGA & Yukie TAKAHASHI
PFGE analysis of borrelial isolates and taxonomic implications with Lyme disease agent
VI International Conference on Lyme Borreliosis (Bologna, Italy) June, 1994
- 34) 是木康代, 高橋幸江, 福長将仁
シュルツェマダニ由来ボレリアの鞭毛遺伝子解析
第 47 回日本細菌学会中国四国支部総会 (岡山) 1994 年 10 月
- 35) 是木康代, 浜瀬亜希子, 古美門徹朗, 福長将仁
ボレリア軸鞭毛遺伝子の解析
第 32 回レプトスピラシンポジウム (京都) 1995 年 3 月
- 36) 浜瀬亜希子, 岡田啓司, 高橋幸江, 福長将仁, 中尾 稔, 宮本健司
アカハラ由来ボレリアの分類学的帰属
第 32 回レプトスピラシンポジウム (京都) 1995 年 3 月
- 37) 高橋幸江, 福長将仁
回帰熱ボレリア様ボレリアのゲノムマップの作成
第 32 回レプトスピラシンポジウム (京都) 1995 年 3 月
- 38) 是木康代, 高橋幸江, 福長将仁, 中尾 稔, 宮本健司
ライム病媒介ベクターであるシュルツェマダニの保有する回帰熱様ボレリアについて
第 68 回日本細菌学会総会 (奈良) 1995 年 3 月
- 39) 福長将仁, 高橋幸江, 中尾 稔, 宮本健司
ボレリアの遺伝的多様性とマダニへの適応
日本薬学会第 115 年会 (仙台) 1995 年 3 月

(3) 総説など

- 1) 宮本健司, 橋本喜夫, 飯塚 一: ライム病症例から見るボレリアの分離と治療 化学療法の領域 10(11): 53-61, 1994
- 2) 福長将仁: ライム病ボレリアの抗原解析 化学療法の領域 10(11): 2067-2074, 1994
- 3) K. Miyamoto and M. Nakao: Background of *Lyme borreliosis* in Japan. Proceedings of the International Symposium on Lyme Disease in Japan 48-62, November, 1994
- 4) Y.Hashimoto, S. Matsuo, M. Nakao, K. Miyamoto and H. Iizuka: Clinical features of Lyme disease in Hokkaido, Japan. Proceedings of the International Symposium on Lyme Disease in Japan 168-182, November, 1994
- 5) 中尾 稔, 小西達也, 宮本健司: ライム病 救急医学 19(1): 64-65, 1994
- 6) M. Fukunaga, M. Sohnaka, I. Mifuchi, M. Nakao and K. Miyamoto: The Lyme disease spirochetes: Two novel enzootic transmission cycles in rodents, birds, and *Ixodes persulcatus* ticks. 平成5年度乳酸菌研究会に関する報告書 417-423, 1994