帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2025 年 5 月 28 日

採択番号	2024 共同-10		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	白藤　梨可
研究課題名	ヒメダニ科 *Ornithodoros moubata* の人工吸血法による 回帰熱ボレリア *Borrelia duttonii* 感染実験系の樹立		
研究代表者	(ふりがな) 氏　名	所属部局等・職名	
	さとう こずえ 佐藤　梢	国立感染症研究所 細菌第一部・研究員	
研究分担者	かわばた ひろき 川端　寛樹	国立感染症研究所 細菌第一部・室長	
	きゅう えいしん 邱　永晋	北海道大学大学院獣医学研究院・客員研究員	
	しらふじ りか 白藤　梨可	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	2024 年 4 月 1 日　～　2025 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	ダニ媒介性感染症の病原体はダニの唾液腺に侵入・定着し，吸血行動中に唾液腺から分泌される唾液とともに哺乳類等の宿主に吐出される．ダニの唾液には宿主免疫を調節する生理活性物質が含まれるが，近年，ダニ媒介性の病原体の一部は，これらのダニ唾液成分の一部と結合することで宿主の免疫機構を回避し，感染を成立させることが明らかとなってきた．他方，ヒメダニの一種であるオルニソドロス属ダニが媒介する回帰熱群ボレリアについても，同様のメカニズムが存在する可能性があるが，これに関する研究は未だ報告がない上に，それらを調べる手法の開発も遅れている．そこで本研究では，オルニソドロス属ダニによる回帰熱群ボレリア伝播メカニズムの全容を明らかにすることを目的とし，その研究に着手するための研究基盤の樹立を行う．		
研究経過の概　要	マダニ科の唾液因子の研究から*O. moubata*の唾液成分は*B. duttonii*の伝播促進に関与している可能性があるが，その証明はなされていない．なぜなら，*B. duttonii*感染*O. moubata*の作出など，唾液因子が*B. duttonii*に与える伝播促進を調べる手法の開発が遅れているためである．そこで本研究では，帯広畜産大学で飼育管理している*O. moubata*を活用し，『***B. duttonii*感染*O. moubata*の作出***』を行った．*B. duttonii*感染*O. moubata*を作出するためには，[1] *O. moubata*が吸血時に*B. duttonii*を獲得し，経発育期感染を確認すること，加えて，[2] 経発育期感染した*O. moubata*が，次の刺咬・吸血するタイミングで*B. duttonii*を宿主に吐出，かつ感染を確認する必要が考えられた．そのために，以下の方法で研究を実施した．		

【方法と結果】

(1) 人工吸血法の基盤構築

*B. duttonii*は動物由来の血液より，運動性や増殖に影響を受けやすいため，人工吸血法の血液は，実験用血液として購入可能な動物血液2種（ウサギ，ウシ）を実験に供し，脱繊維血ならびに血清の選択を実施した．2種の脱線維血と血清を3:7の比率で混合した血液（以下，人工血と略）に，試験管培養し，菌数を調整した*B. duttonii*を添加後，34℃で1晩培養した．暗視野顕微鏡による観察の結果，*B. duttonii*は2種の人工血中で運動性が見られ増殖した．次に，人工吸血装置に人工血を各々加え，*O. moubata*に吸血させた．*O. moubata*は動物種に関わらず，吸血を始め，飽血後，3-4週間で脱皮し，次の発育期に移行した(Fig. 1).

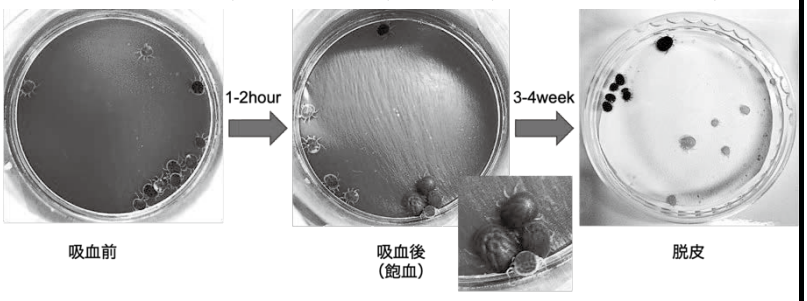

Fig.1 人工吸血装置による*O. moubata* の吸血

以上の結果から，2種の人工血は*B. duttonii, O. moubata*両方に適していた．一方，*B. duttonii*培養にウサギ血清を含んだ培地が利用されていることから，以下の実験から，ウサギ人工血を使用した．

(2) *O. moubata*が吸血時に*B. duttonii*を獲得し，経発育期感染を成立させるために，人工吸血法で*O. moubata*に*B. duttonii*を獲得させる吸入試験を実施した．

B. duttonii（1x10^{7}cell/ml)が添加された人工血を *O. moubata* 第 2 若ダニに吸血させ，経発育した *O. moubata* 第 3 若ダニ(11 個体)の DNA を抽出した．TaqMan MGB probe を用いた Real time-PCR 法で，各 DNA サンプルにおける *B. duttonii* 16S rRNA 遺伝子を検出した結果，*O. moubata* 第 3 若ダニの全てから見出された．増幅された DNA copy 数はおよそ 10^2-10^3copies/個体（最大約 10^6copies/個体）と算出され，*B. duttonii* が *O. moubata* 第 3 若ダニに定着していることが示唆された(Fig. 2).

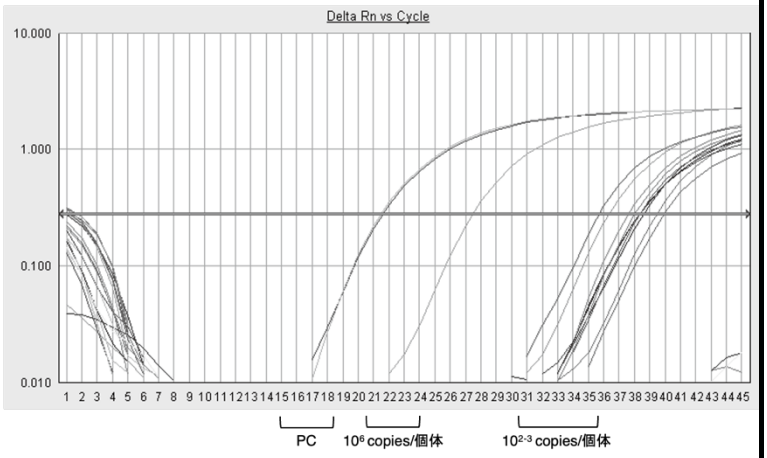

Fig. 2 *B. duttonii* 16S rRNA gene in *O. moubata* by Real-time PCR

以上の結果から，吸血時に全ての *O. moubata* が *B. duttonii* を獲得し，経発育期感染することが実証された．

(3) 経発育期感染した *O. moubata* が，次の発育期に移行するために刺咬・吸血するタイミングで *B. duttonii* を宿主に吐出，かつ感染を成立させるために，マウスへの *B. duttonii* 感染試験を実施した．

O. moubata 第 2 若ダニに *B. duttonii* を獲得させ，経発育した第 3 若ダニを C3H/HeN マウスの背部で刺咬・吸血させた．吸血後 1 日目，3 日目にマウス尾静脈から採血し，吸

	血後 7 日目に脾臓, 肝臓, ならびに血液を採取した. Real time-PCR 法により, 全ての臓器および血液の DNA サンプルから *B. duttonii* 16S rRNA 遺伝子は検出されなかった. さらに, Western Blot 法により吸血後 7 日目の血液から分離された血清からの *B. duttonii* 抗体も検出されなかった. 以上の結果から, 刺咬・吸血時に *O. moubata* からマウスへ *B. duttonii* の吐出, かつ感染は認められなかった. 【まとめと考察】 人工吸血法によって, *O. moubata* は吸血時に *B. duttonii* を獲得し, かつ経発育期感染が成立することが確認された. しかしながら, 吸血後に脱皮させた *O. moubata* からマウスへ, ボレリアの伝播は見られなかった. 本結果から, ボレリアは *O. moubata* の唾液腺まで到達できなかった可能性, もしくは, ボレリアは唾液腺まで到達できたが, 何らかの理由により, 唾液中に吐出されなかった可能性が考えられた. 今後の検討課題として, まず, 経発育期感染した *O. moubata* の体内で *B. duttonii* が唾液腺へ確実に侵入・生着できたかを確認する予定である. また, 他の回帰熱群ボレリアでは, 第 3 から 5 ないし 6 若ダニ期, および成ダニ期の病原体伝播や発育時に吸血回数を増やすことで唾液腺への侵入効率が高まる可能性もあることから, 実験に適切なダニ発育期の選択, ならびに, 人工吸血の回数や獲得させる病原体数を検討する.
研究成果の 発　表	なし