

ヤマビルに吸血された動物同定システムに関する調査研究

齊藤志保子 八柳 潤 斎藤 博之

ヤマビルが吸血している動物を同定するためPCR法とサザンブロットハイブリダイゼーション法を導入した。1994年~1995年に秋田県内で捕獲されたヤマビルについて検査したところ、363匹中63匹に、PCRによる増幅断片が得られた。動物種については、ヒト・家兎の両者吸血が1匹、ヒトのみ吸血が2匹確認された。

キーワード：ヤマビル, PCR, サザンブロットハイブリダイゼーション

I はじめに

ヤマビルは古くから上小阿仁村の国有林の一部で生息が確認されていた。昭和50年代半ば頃から五城目町、井川町、昭和町、及び秋田市の東部に連なる出羽丘陵山麓地帯の国有林を中心に急速に生息域を広げ、一部の民有林や農耕地、集落内でも生息が確認されるようになった。林業関係者の被害が甚大であったため、昭和56年から営林局（署）が対策に取り組んで来たが、近年になって、広い範囲の民有林、井川町の大台キャンプ場などで被害が発生し、ついで集落内の一般住民に被害が広がった。このようなことから、「井川町ヤマビル駆除対策懇談会（平成元年）」が開催され、県としては平成5年に、庁内4部6課による現地検討会を行い、「ヤマビル被害総合対策事業」を実施するため庁内4部7課からなる「秋田県ヤマビル被害対策会議」を設置した。

当所では、ヤマビルの拡散防止対策を側面から支援することを目的として、県内において、ヤマビルが吸血対象としている動物を明らかにするため、ヤマビルが吸血している動物種同定システム開発とその方法による被吸血動物の解明について分担した。その分担調査研究として、1993年から1994年にフィールドで捕獲されたヤマビルについて被吸血動物を検査するとともに、実験室内で、吸血後の動物種検出可能期間について検討したので概略報告する。

II 材料・方法

1. 遺伝子学的方法による被吸血動物の同定

① PCR法

プライマー配列¹⁾は哺乳動物28SリボゾームRNAをコードする遺伝子を標的とした。反応条件は表1に示した。増幅対象とした遺伝子領域は、哺乳動物一般が共通している部分と、動物種ごとに異なる部分が混在している。プライマーはこの共通部分を認識するようにデザインされており、増幅した結果得られるD

NA断片はその内部に各動物特有の塩基配列を持つことになる。

凍結保存しておいた捕獲ヤマビルを細かく切り、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K 溶液で56°C60分消化し、体内に残っている血液から被吸血動物に由来する遺伝子を抽出し、PCRを行った後、4%アガロースゲルで電気泳動し、目的とするDNA増幅断片の有無を確認し、増幅断片を有する検体についてのみサザンブロットハイブリダイゼーションを行った。

表1 PCR反応条件

Denaturation	94°C	2 min
Annealing	51°C	3 min
Extension	72°C	2 min
Cycle	30	
Final extension	72°C	7 min

② サザンブロットハイブリダイゼーション法

ベーリンガー・マンハイム社のDIG-ELISA法のキットを用い、同定対象動物由来標識DNAとヤマビルのPCRで得られたDNA増幅断片との相同性を検討することにより動物種の同定を試みた。

DIG-ELISA法の原理：DNAはランダムプライムシステムによりジゴキシゲニン標識デオキシウリジン三リン酸（DIG-dUTP）で標識される。目的のDNAへのハイブリッド形成後、ハイブリッドは酵素標識抗体（抗ジゴキシゲニン-アルカリフォスファターゼ：抗DIG-ALP）を用いたELISA法により発色、発光反応で検出される。

ヤマビルの体内に残っていた血液より増幅したDNA断片から動物種を同定するために、同定対象動物（後述）の血液から同様の術式にて増幅したDNAをプローブとするサザンブロットハイブリダイゼーション

ンを行った。

プローブはランダムプライミングによりジゴキシゲニンでラベルした。ハイブリダイゼーションは×4 SSP E の条件で68℃1晩行い、アルカリフォスファターゼ発光系によるオートラジオグラフィーでバンドを検出した。

③ 同定対象動物

ヤマビルの生息地域に多数生息していると思われる動物(表3参照)のうち、アカネズミ、カモシカ、キジ、キツネ、クマ、タヌキ、テン、ノウサギ、ヒト、ヤマドリの10種、及び家兎(1994年の検体のみ)を同定対象動物とした。当所で飼育していた家兎、捕獲したアカネズミ以外は、林政課、大森山動物園、一般狩猟家の協力により、血液を入手した。

④ 検体：1994年6月～1995年10月に捕獲したヤマビルの検体とし、検査時まで-20℃で保存した。

表2 捕獲地域別検体数

	1994年	1995年	計
井川町	47匹	36匹	83匹
昭和町	23匹	35匹	58匹
五城目町	86匹	103匹	189匹
秋田市	30匹	3匹	33匹
合計	186匹	177匹	363匹

表3 ヤマビル採取場所でみられた動物など

五城目ヨモギ内沢	カモシカ(姿確認)、ウサギ、キツネ(足跡) カモシカ道、休息場所
五城目	タヌキ、キツネ、ウサギ(足跡)
五城目試験地	カモシカ、タヌキ、イタチ、ノウサギ ハタネズミ、クマ

2. 吸血後の被吸血動物同定可能期間に関する検討

① 求餌行動が活発なヤマビルにヒト及び家兎の血液を吸血させた。

家兎血液：保定した家兎の背部にヒルを吸着させ、自ら離れるまで放置した。

ヒト血液：新鮮な脱繊維血液をしみこませた脱脂綿から吸血させた。

なお、吸血前と吸血後のヤマビルの体重を測定した。

② 吸血後、1週間毎に12週間後までヒトおよび家兎吸血ヒルを2匹ずつ凍結保存した。凍結前にヤマビルの体重を測定した。

③ 前記のPCRおよびサザンブロットハイブリダイゼーション法により家兎、およびヒトを対象として同定の可否を検討した。

Ⅲ 結果

1. 被吸血動物の検索

PCRの結果およびサザンブロットハイブリダイゼーションの結果の一部は図1、2に示した。

① 吸血ヤマビルの検索

1994年捕獲ヤマビル186匹中40匹、1995年捕獲ヤマビル177匹中23匹、計363匹中63匹からDNAの増幅断片が検出された。対象動物の血液のPCRで増幅された遺伝子断片より分子量の小さいバンドがほとんどのヒルでみられた。また、その小さい分子量のバンドに加えてそれに近い分子量との2本のバンドがある同じパターンの検体が21みられた。それ以外のバンドを持つものは9検体みられた。

② 被吸血動物種の同定

①で検索した63匹のヤマビルについて被吸血動物種の同定を試みたところ、人及び家兎の両者の血液を吸血したとみられるものが1匹(1994年五城目町で捕獲)、ヒトを吸血したとみられるものが2匹確認された。それ以外の60匹については、10種の同定対象動物のいずれも吸血を確認できなかった。

2. 吸血後の被吸血動物同定可能期間の検討

今回使用した同定システムで、吸血後どれ位の期間まで被吸血動物を同定することが可能か検討した。ヒト血液を吸血したヤマビルでは最長10週間後まで、家兎血液を吸血したヤマビルでは最長11週間後まで同定が可能であった。なお、図3に示すように、同定可能期間はヤマビルの体重におよそ比例する傾向がみられた。

Ⅳ 考察

本調査に当たり、予備実験として、同定対象動物の各血液についてPCRを行ったところ、目的とする増幅断片が得られた。また、サザンブロットハイブリダイゼーションでの特異性も確認された。

ヤマビルのPCRでは、目的とするDNA増幅断片とは異なる分子量のものが認められ、このうち対象動物の血液の増幅断片に比べて、やや小さい増幅断片が63匹のヤマビル大半に検出された。それらの断片の分子量はほぼ同一であったことから、これらのヤマビルはある種の動物を吸血している可能性が高いものと考えられた。また、小さい分子量の増幅断片が2本認められた21検体については、吸血動物種によるのか、また2種の異なる動物を吸血したのか不明である。対象動物血液の増幅断片と類似した大きさの断片を持っていたのは9検体であった。

次に、ヤマビルのPCRの増幅断片について、吸血動物を同定するため、ヤマビル生息地域に比較的多く棲息していると考えられる10種類の動物を選定し、その標識

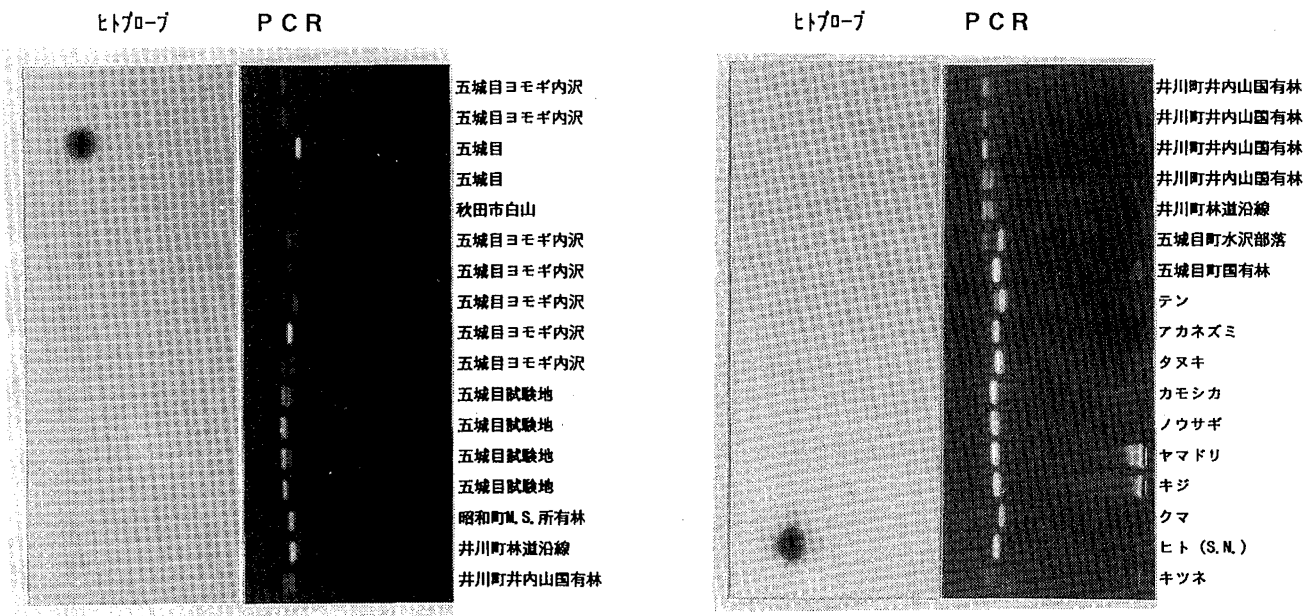


図1 PCRの電気泳動結果と DIG-ERISA 法によるハイブリダイゼーション（対象動物：ヒト）結果

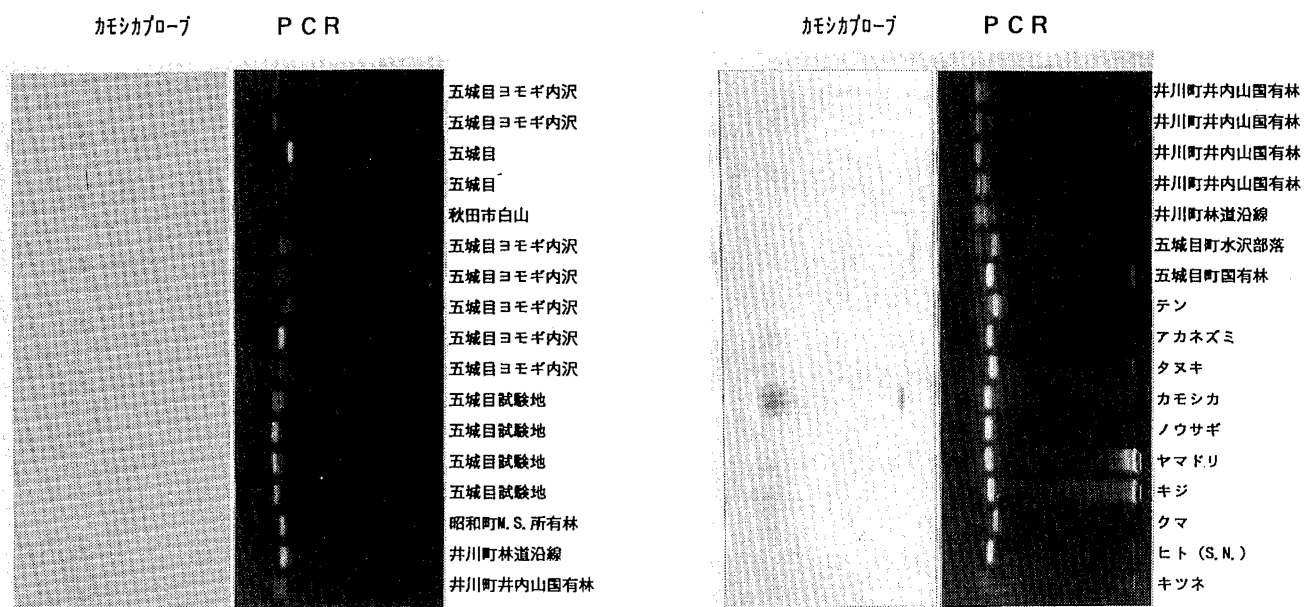


図2 PCRの電気泳動結果と DIG-ERISA 法によるハイブリダイゼーション（対象動物：カモシカ）結果

DNAを用いてサンプロットハイブリダイゼーションを行った。

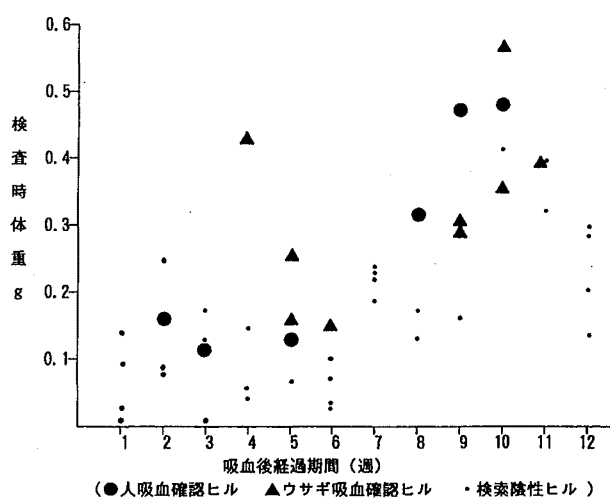
家兎・ヒト吸血が1匹、ヒト吸血が2匹確認されたが、それ以外の動物を吸血したヤマビルは確認できなかった。家兎とヒトの両者を吸血したとされた検体については、ヒトの標識DNAとのハイブリダイゼーションの結果がホモと同程度で明らかであったが、家兎の標識DNAでのハイブリダイゼーションではバックグラウンドが高かったことなどから、家兎の反応は非特異反応であった可能性も否定できない。ヒト吸血を確認されたヤマビルは捕獲の段階でヒト吸血が疑われていたり、ヒト吸血が確かな検体であった。吸血動物種が同定された3検体はPCRで対象動物血液の増幅断片と類似した分子量の明瞭なバンドが認められた9検体中の3検体であった。

ヤマビルの大発生が問題となっている千葉県南房総での調査ではホンシュウシカ、ニホンザル、ノウサギなどが生息域拡大に関与している可能性が示唆されている²⁾。県内では各種動物の中でもカモシカがヤマビルの生息域拡大の原因と疑われていたが、1993年捕獲ヒル検査に加え、1994年度に供試したヤマビルは、特に、カモシカの行動域から重点的に捕獲したものであったにもかかわらず、カモシカを吸血したヤマビルは全く検出されず、カモシカがヤマビルの主たる吸血対象動物である証拠は得られなかった。

今回使用した同定システムでは、吸血後、最長11週の間被吸血動物を同定することが可能であった。図3に示すように、検査時の体重とおよそ比例する傾向がみられたが、これは大きい固体は吸血量も多いことによるものと考えられた。

人為的に吸血させた場合、ヒルはほとんど動かず、血液成分の検出が不可能な時期になった頃には活動もやや活発になってくるが、求餌行動は顕著ではなく、フィールドでの吸血ヒルを捕獲するのは非常に困難だと思われる。今回検査に供したヤマビルはかなり活発な求餌行動がみられるものが多く、目的とした吸血まもないヤマビルは検体中に少なかったと考えられた。

図3 吸血後の被吸血動物同定可能期間



今後、この同定システムを用いて被吸血動物を検索していくには、吸血後時間のたっていないヤマビルを捕獲し検査に供すること、動物およびヤマビルについて生態学的な面も考慮しながら、新しい対象を検討することが必要と考えられた。

最後に、ヤマビル被害対策会議のメンバーであり、ヤマビルの捕獲及び生息動物の情報などにご協力いただいた藤岡誠氏、ヤマビル飼育その他の資料を提供いただいた林業センターの長枝昭彦氏に感謝します。また、対象動物の採血にご尽力いただいた大森山動物園の小松守氏に感謝します。

文 献

- 1) 第3回DNA診断フォーラム記録集。平成3年12月、DNA診断フォーラム世話人会
- 2) 吉葉繁雄, 他. 各地に蔓延中の山蛭バイオハザードの諸問題—南房総での環境医学的追跡を中心に—。平成4・5年度科学研究費補助金一般研究(C)研究成果報告書: 1994