

分担研究報告書

日本紅斑熱の疫学的研究

分担研究者 森田 千春

研究要旨

流行地域における紅斑熱群リケッチア (SFGR) について血清学的、分子学的に疫学調査を行った。北海道では *Apodemus speciosus* (26.8%)、大阪では野生シカ (31%)、沖縄では放浪犬 (31%)・ヒト (45%)、インドネシアでは野生ネズミ (*Rattus* 属4種) に高い保有率でSFGR抗体が存在した。PCRにより大阪のシカ、および沖縄の放浪犬で特異的増幅がみられた検体は、シーケンシングの結果、*R. japonica* と非常に高い相同性を示した。また大阪、沖縄のマダニから何らかのSFGRが検出され、両地域におけるSFGRの侵淫が強く示唆される。北海道では *A. speciosus*, *Ixodes ovatus*, *I. persulcatus* でPCRによる特異的増幅が見られた。RFLP解析の結果、*A. speciosus* と *I. ovatus* で同じパターンが見られ、両者の間で感染環が成立している可能性がある。インドネシアの *R. norvegicus*, および数種のマダニがPCR陽性を示し、同地域においてヒトへの感染源の存在が示唆された。

研究目的

紅斑熱群リケッチア (SFGR) 症は主にマダニ媒介性の世界的に分布する疾病で、我が国でも関東以西の主に太平洋側で患者が報告されている。以前我々は非流行地域である北海道で野生齧歯類に、沖縄県で放浪犬に抗体の保有を認め、両地域におけるSFGRの侵淫を示唆した。一方、ヒトに非病原性のSFGRが欧米で報告されているが、その存在は我が国では不明である。今回は非流行地域におけるSFGRの実態を血清疫学的、分子疫学的に明らかにすることを目的とし、北海道、大阪、沖縄およびインドネシアを対象地として疫学調査を行った。

研究方法

〔北海道〕野生ネズミ (*Apodemus speciosus*, *A. argenteus*) の血清・脾臓、マダニ (*Ixodes ovatus*, *I. persulcatus*, *Haemaphysalis flava*) 〔大阪〕野生シカの血清・血液、マダニ (*Haemaphysalis* 属数種) 〔沖縄〕放浪犬・飼育犬・ヒトの血清、放浪犬の血液、

マダニ (*Rhipicephalus sanguineus*) 〔インドネシア〕野生ネズミ (*Rattus rattus diardii*, *R. norvegicus*, *R. exulans*, *R. tiomanicus*) の血清、マダニ (*Haemaphysalis* sp., *Boophilus microplus*, *Aponomma* sp., *Rhipicephalus* sp., 種不明) を被検材料とした。北海道、大阪、沖縄の血清抗体は、*Rickettsia japonica* YH株、インドネシアのそれは *R. conorii* Moroccan株を抗原とした間接蛍光抗体法で調査した。各材料からDNAを抽出し、プライマーRpCS.877p-1258n (RpCS), Rr190.70p-602n (Rr190) を用いてPCRを行い、増幅産物のRFLP解析とシーケンシングにより種の同定を行った。

研究結果

〔北海道〕抗体保有率は *A. speciosus* (27%, 44/164), *A. argenteus* (0%, 0/80) であった。RpCSを用いたPCRにより17検体 (*A. speciosus* 10, *I. ovatus* 6, *I. persulcatus* 1), Rr190により *I.*

persulcatus 1検体が陽性を示した。RFLP解析では、*A. speciosus*および*I. ovatus*は*R. japonica*様となり、*I. persulcatus*はそれとは異なっていた。〔大阪〕シカの31% (10/32) に抗体が認められた。Rr190を用いたPCRでは4検体が陽性を示し、その塩基配列は*R. japonica*と99%以上の相同性を示した。また2種のマダニ (*H. longicornis*, *H. flava*) でRr190により増幅が認められた。〔沖縄〕26% (136/517) のイヌが抗体陽性であり、放浪犬の陽性率 (31%, 132/430) は飼育犬 (5%, 4/87) より有意に高かった。ヒト血清は45% (74/164) と非常に高い抗体保有を示した。放浪犬血液は7検体でRpCSとRr190の両方により増幅が認められ、RFLP解析、シークエンシングの結果*R. japonica*に酷似していた。しかしマダニではRpCSのみで増幅が認められ、そのRFLP解析は既知のSFGRと異なっていた。〔インドネシア〕ネズミの68% (71/104) が抗体を保有し、その率には地域差が認められた (Jakarta ; 89%, 34/38, Bogor ; 56%, 37/66)。種別の抗体保有率は、*R. norvegicus* 100% (15/15), *R. tiomanicus* 100% (6/6), *R. exulans* 75% (6/8), および*R. r. diardii* 59% (44/75) であり、*R. norvegicus*と*R. tiomanicus*の保有率はともに*R. r. diardii*より有意に高かった。濾紙吸着野生ネズミ血液の溶出液からRpCS (35検体), Rr190 (3検体: 全て*R. norvegicus*) の使用により特異的増幅が見られた。マダニ (*Haemaphysalis* sp., *Aponomma* sp., 種不明) でもRpCS, Rr190により増幅が認められた。抗体陽性、PCR陽性を示した検体については、培養細胞を用いてリケッチア分離を試みている。

考察

北海道では以前の我々の調査結果と同様に、*A. speciosus*に抗体の保有が認めら

れ、*A. argenteus*に認められなかった。この結果は、同じ*Apodemus*属でありながら両者の生活スタイルの違いによるものと推察される。沖縄のイヌでも、放浪犬と飼育犬の生活環境の違いにより抗体陽性率に差が見られた。つまり*A. argenteus*よりも*A. speciosus*, また飼育犬よりも放浪犬はベクターと考えられるマダニとの接触機会が多いため、陽性率に差が見られたと思われる。大阪のシカで抗体保有が見られたことから、シカは野生齧歯類、イヌと共にSFGRの指標動物として重要であると考えられる。インドネシアでは郊外のBogorより都市部のJakartaで野生ネズミの抗体保有率が高く、また同地域に生息するマダニから特異的な増幅産物が検出されたことから、都市部においてSFGRのヒトへの感染が危惧される。北海道の検体でPCR-RFLPの結果から*R. japonica*様SFGRの存在が疑われ、*A. speciosus*と*I. ovatus*の間において感染環が成立している可能性がある。しかし*I. persulcatus*から検出されたSFGRの病原巣哺乳動物の存在は確認されていない。大阪のシカ、沖縄のイヌにおいてPCR-RFLPおよびシークエンシングの結果から、*R. japonica*に酷似するSFGRが検出された。このことは両地域にSFGRが存在し、シカおよびイヌがSFGRの重要な感染源であることを強く示唆している。沖縄県のマダニから未知のSFGRが検出され、ヒト血清においても抗体の保有が認められたことは、ヒト-マダニの感染環の成立が疑われる。

以上から各調査地域におけるSFGRを保有する哺乳動物、およびマダニの存在が示唆された。いずれの地域もいまだSFGR症患者の発生報告はないが、今回の調査で検出された抗体およびSFGR様リケッチアの詳細を明らかにすることが必要である。

結論

〔北海道〕*A. speciosus*でSFGRの抗体保

有, 特異的増幅産物が認められ, RFLP解析により同地域の*I. ovatus*から検出されたものと類似していた。同地域においてSFGRの感染環が存在している可能性がある。しかし*I. persulcatus*からはそれとは異なるSFGR様DNAが検出された。

[大阪府] 野生シカから抗体および特異的増幅産物が検出され, マダニでも特異的増幅が見られた。同地域にSFGRが存在し, SFGRの感染源としてシカが重要であると考えられる。

[沖縄県] ヒト, 放浪犬で高い抗体保有率を示した。放浪犬血液から*R. japonica*と非常に高い相同性をもつDNAが検出され, マダニからもSFGR様DNAが検出された。同地域におけるSFGRの存在, 感染源としてのイヌ, ベクターとしてのマダニの存在が強く示唆される。

[インドネシア] 都市部の野生ネズミで抗体保有率が高く, SFGRを保有するマダニが存在した。同地域におけるヒトへの感染の危険性が示された。

第46回日本ウイルス学会 (平成10年10月, 東京)

第5回リケッチア研究会 (平成10年10月, 新潟)

研究発表

1. 論文発表

・ Inokuma H., Yamamoto S., Morita C. 1998. Survey of Tick-Borne Disease in Dogs Infested with *Rhipicephalus sanguineus* at a Kennel in Okayama Prefecture, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 60: 761-763

・ Ima N. I., Okabayashi T., Ristiyanto, Enny W. L., Yanase T., Muramatsu Y., Ueno H., Morita C. 1998. Serosurvey of wild rodents for Rickettsioses (spotted fever, murine typhus and Q fever) in Java Island, Indonesia. *European J. Epidemiol.* (in press)

2. 学会発表

第126回日本獣医学会 (平成10年8月, 北海道)

分担研究報告書

リケッチャ症の分子診断法

分担研究者 福士秀人

研究要旨

*C. burnetii*の27KDa主要外膜タンパク質をコードする*Com1*遺伝子の塩基配列は、相同性が極めて高く、PCR用のプライマーとして遺伝子診断に応用できることが明らかになった。免疫反応用担体として開発されている、高比重複合粒子(HDP)に菌体成分を感作・調整し、高比重粒子凝集(HDPA)反応を開発した。この方法は、ヒト血清のHDPA抗体価とIF抗体価は高い相関を示し、HDPAの感度はペア血清と急性期血清ではHDPA抗体陽性とIF抗体陽性が100%一致した。IF抗体陰性検体の大部分はHDPAでも陰性であった。また、家畜や愛玩動物血清においても高い相関を示した。したがって、HDPA反応は高感度かつ特異的で、Q熱の迅速診断に応用できると考えられた。さらに、QpH1およびQpRSプラスミドのそれぞれに特異的な遺伝子からプライマーを設計し、患者血清を用いて遺伝子診断ができることを示した。

A. 研究目的

本研究の目的は、Q熱の従来確定診断に2~3週間を要していたが、酵素抗体による新しい血清診断法やDNAプローブによる新しい病原体検出法など早期確定診断法を開発することである。

B. 研究方法

早期確定診断法の開発

- 1) ヒトを含め哺乳動物および鳥類にも応用
- 2) 菌構成LPSおよび蛋白質による特異的血清診断法の開発
- 3) DNAプローブによる病原体検出法の確立

C. 研究結果・考察

Q熱の確定診断法としては *C. burnetii* の Nine Mile 株のI および II相菌を抗原に用いる微量間接蛍光抗体法 (MIF) が一般的に使用されている。わが国のQ熱患者は従来MIFによる抗体価測定に際して低い抗体価を示す例があり、II相菌によるMIFの感度について、日本のQ熱患者由来株を含め検討した結果、基本的には従来MIFと反応性に相異が認められなかった。以下に新しい診

断法の開発を示す。

1) 高比重粒子凝集 (HDPA) 反応

*C. burnetii*に対する抗体の検出は、凝集反応、補体結合反応、間接蛍光抗体法(IF)および酵素抗体法が用いられている。現在ではIF法が一般的であるが、繁雑さ、検体処理数、客観的判定、システム化などに問題点があり、簡便で迅速かつ的確な血清診断法が開発が望まれている。今回我々は、(株)トクヤマが免疫反応用担体として開発した高比重複合粒子(HDP)に菌体成分を感作・調整し、マイクロタイター法による高比重粒子凝集(HDPA)反応について、IF法と比較した。その結果、抗原の調整はNaOH-クロロホルム処理法で得られた抗原が最適であった。感作HDPによる本反応は *C. burnetii* 10株に対する実験動物感染耐過血清とNine Mile株IおよびII相由来精製死菌のウサギ免疫血清に高い凝集価を示した。また、発疹チフス、発疹熱、恙虫病およびオウム病の病原体に対するモルモット血清では全例が陰性であった。ヒト血清のHDPA抗体価とIF抗体価は高い相関を示し、HDPAの感度はペア血清と急性期血清ではHDPA抗体陽性とIF抗体陽性が100%一致し

た。シングル血清では81.6%一致した。IF抗体陰性検体の大部分はHDPでも陰性であった。両法は家畜や愛玩動物血清においても高い相関を示した。以上の成績から、HDP反応は高感度かつ特異的で、Q熱の迅速診断に応用できると考えられた。

2) 遺伝子診断 (PCR) 法

Com1遺伝子の塩基配列からプライマーを設計し、新しい遺伝子診断法を開発した。設計したNestedPCR用プライマーの特異性は *C. burnetii* 21株および他の微生物を用いて確認された。すなわち、*C. burnetii* 21株からは標的の438bpDNA断片が増幅され、他の微増幅されなかった。また、増幅産物は制限酵素SspIおよびSalIにより切断され、com1遺伝子特異的な塩基配列であることが確認された。さらに、開発したNestedら、また、IF陰性100血清中10例から、com1遺伝子断片が増幅された。以上の結果から、com1遺伝子を標的とするNested PCR法は、特異性が高く、*C. burnetii* の検出に有用であることが示唆された。

3) *C. burnetii* プラスミドによる遺伝子診断

C. burnetii プラスミドの検出は、Q熱患者からの81血清を用いて、QpH1およびQpRSプラスミドのそれぞれに特異的な遺伝子からプライマーを設計しNestedPCRによって行った。QpH1プラスミド特異的な塩基配列は81検体中40例(49.4%)から検出され、またQpRSプラスミド特異的な塩基配列は39例(29.6%)から検出された。また、5検体(8.6%)からはQpH1およびQpRSプラスミド特異的な塩基配列が同時に検出された。12検体(20.7%)からはQpH1およびQpRSプラスミド特異的な塩基配列が検出されなかった。以上の結果から、異なるプラスミドを保有する*C. burnetii* が日本にも侵淫していることが示唆された。また、患者血清からQpRSプラスミドを保有する*C. burnetii*が検出されたことは、慢性Q熱患者が日本にも広く存在することを示唆している。QpH1およびQpRSプラスミドが同時に検出されたことは、これまでに報告が

なく、QpH1およびQpRSプラスミド保有株の混合感染、あるいは2種類のプラスミドを保有する株による感染の可能性が考えられた。

D. 結論

*C. burnetii*の27KDa主要外膜タンパク質をコードするCom1遺伝子の塩基配列は、相同性が極めて高く、PCR用のプライマーとして遺伝子診断に応用できることが明らかになった。免疫反応用担体として開発されている、高比重複合粒子(HDP)に菌体成分を感作・調整し、高比重粒子凝集(HDPA)反応を開発した。この方法は、ヒト血清のHDPA抗体価とIF抗体価は高い相関を示し、HDPAの感度はペア血清と急性期血清ではHDPA抗体陽性とIF抗体陽性が100%一致した。IF抗体陰性検体の大部分はHDPでも陰性であった。また、家畜や愛玩動物血清においても高い相関を示した。したがって、HDPA反応は高感度かつ特異的で、Q熱の迅速診断に応用できると考えられた。さらに、QpH1およびQpRSプラスミドのそれぞれに特異的な遺伝子からプライマーを設計し、患者血清を用いて遺伝子診断ができることを明らかにした。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Nguyen, Sa V., To, H., Minamoto, N., Ogawa, M., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Evaluation of the high-density agglutination test for *Coxiella burnetii* antibodies in animals Clin. Diag. Lab. Immunol. 4: 676-680, 1997.

2) Zhang, G.Q., To, H., Nguyen, Sa V., Ogawa, M., Hotta, A., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Clinical evaluation of new polymerase chain reaction assay for detection of *Coxiella burnetii* in human serum samples. J. Clin. Microbiol. 36: 77-80, 1998.

3) Zhang, G.Q., To, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Evaluation of a recombinant 27-kDa outer membrane protein of *Coxiella burnetii* as an immunodiagnostic reagent. Microbiol. Immunol., 42: 423-428, 1998.

4) Zhang, G.Q., To, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.: Direct identification of *Coxiella burnetii* plasmids in human sera by nested polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., 36 : 2210-2213, 1998.

2. 学会発表

1) 張 国全、To Ho、山口剛士、福士秀人、平井克哉 : *Coxiella burnetii* 27kda外膜蛋白遺伝子 (Com1) の株間における塩基配列の比較解析、第122回日本獣医学会 (1996)

2) 張 国全、Nguyen, S.V、To Ho、山口剛士、福士秀人、平井克哉 : Q熱患者血清からPCR法による *Coxiella burnetii* プラスミドの検出、第122回日本獣医学会 (1996)

3) Nguyen, S.V、張 国全、To Ho、山口剛士、福士秀人、秋山真人、長岡宏美、平井克哉 : 動物血清からPCRによるコクシエラ症 (Q熱) の迅速診断、第122回日本獣医学会 (1996)

4) 大塚仁、Nguyen, S.V、山口剛士、福士秀人、野間昭夫、前原喬、中川正則、平井克哉 : 高比重粒子凝集反応によるQ熱 (コクシエラ症) の抗体調査、第121回日本獣医学会 (1996)

5) Nguyen, S.V、大塚仁、山口剛士、福士秀人、野間昭夫、前原喬、中川正則、平井克哉 : Q熱リケッチア抗体検出用高比重粒子凝集反応の開発、第121回日本獣医学会 (1996)

6) 張 国全、To Ho、福士秀人、平井克哉 : *Coxiella burnetii* 27KDa外膜蛋白 (Com1) の大腸菌における発現、第70回日本細菌学会 (1997)

7) 浅尾直幸、増澤俊幸、柳原保武、長岡宏美、秋山真人、平井克哉 : Q熱コクシエラ (*Coxiella burnetii*) の高感度遺伝子診断法、並びに株鑑別法の開発、第70回日本細菌学会 (1997)

8) 張 国全、To Ho、福士秀人、平井克哉 : *Coxiella burnetii* 27KDa外膜蛋白質 (Com1) の株間における塩基配列の比較解析、第70回日本細菌学会 (1997)

9) Nguyen, S.V、福士秀人、平井克哉 : Q熱抗体検出用高比重粒子凝集反応の開発、

分担研究報告書

イヌのエールリキア症の疫学的研究

分担研究者 山本静雄

研究要旨

間接蛍光抗体法 (IFA) によって検査したイヌの *Ehrlichia canis* (*E. canis*) に対する抗体保有率は、沖縄県下の捕獲犬で20.5%、山口市および徳島市における飼育犬でそれぞれ4.9%、2.3%であり、我が国での *E. canis* の拡散が示唆された。*E. canis* を人為的に感染させたビーグル犬でPCRが陽性で抗体価が1:10,240と著しく上昇したのちに、94日後以降にPCRが陰性に転じ、中和抗体が産生されたことが考えられた。さらに、*E. canis* のPCRが陽性を示す捕獲犬の血液を健康な6頭のビーグル犬、4頭のシェパードに輸血しても *E. canis* の感染が成立しなかったことから中和抗体の存在が強く疑われた。ELISAによって *E. canis* の抗体測定が可能な成績を得た。

A. 研究目的

研究分担者・山本は研究期間中に以下の点を明らかにしたい。

1. 日本各地のイヌおよびヒトの *E. canis* の抗体保有調査を行い、我が国における *E. canis* の感染、蔓延状況を明らかにすると同時に、それらから *E. canis* を分離し、我が国に *E. canis* が存在することを説明したい。

2. 分離した *E. canis* のDNA分析を行い、諸外国で分離されている *E. canis* との比較によってその侵入経路および病原性を明らかにしたい。

3. 併せてダニの *E. canis* 保有状況をPCRによって調査し、クリイロコイタマダニ以外で *E. canis* を媒介するダニの種類を特定したい。

B. 研究方法

1. 抗体保有調査

イヌおよびヒトの *E. canis* に対する抗

体は *E. canis* 感染DH82細胞 (オハイオ州立大学力久泰子教授より分与された) を培養し、これで調製した *E. canis* 感染DH82細胞の塗抹抗原を用いた間接蛍光抗体法 (IFA) によって実施した。

2. PCR

buffy coatから抽出したDNAをPCRによって *E. canis* に特異的な塩基配列部位を増幅し、得られたPCR産物は電気泳動によって確認した。

3. *E. canis* の分離

E. canis 分離は以下の2方法によって実施した。

1) DH82細胞を用いた *E. canis* の分離

1%EDTAを10%の割合に加えて採取したイヌの血液約20mlからファイコールパックで分離した白血球を未感染DH82細胞 (オハイオ州立大学力久泰子教授より分与された) に加えて5%CO₂ 下で10%FBSを加えたMEMを用いて培養し、分離培養を試みた。

2) 実験犬を用いた *E. canis* の分離

1% EDTA を 10% の割合に加えて採取した *E. canis* の抗体および PCR 陽性のイヌの血液を 6 頭のビーグル犬 (1~1.5 才の雌雄各 3 頭) に 1 頭当たり 100~150ml 輸血し、*E. canis* の感染を試みた。

血液と等量の Alsever 液に採取した *E. canis* の抗体および PCR 陽性のイヌの血液を 4 頭のシェパード (2 才の雌雄各 2 頭) に 1 頭当たり約 100ml を輸血することによって *E. canis* の分離を試みた。

4. クリイロコイタマダニを用いた *E. canis* の PCR

ダニを 0.01M 食塩加リン酸緩衝液、pH7.2 (PBS) で洗浄後、ダニ約 5g に対して 15ml の PBS を加え、これをホモジナイザーで破壊したのち、これを PCR による検査に用いた。

5. *E. canis* の抗体検出のための ELISA の開発

2% に Triton X-100 を添加した *E. canis* 感染 DH82 細胞を超音波処理後、Sephacryl S-300 でゲル濾過して得た *E. canis* 抗原を ELISA 用イムノプレートに吸着させ、1% 牛血清アルブミン (BSA) 加炭酸重炭酸ナトリウムでブロックして ELISA に用いた。標識抗体にはペルオキシダーゼ標識ウサギ抗イヌ IgG、IgM、IgA 抗体を、基質には ABTS をそれぞれ用いた。

C. 研究結果

1. *E. canis* の抗体保有状況

1) イヌの抗体保有率

沖縄県下の捕獲犬では、本研究実施前の抗体検査成績 (442 頭中 89 頭 (20.1%) が陽性であった) に加えて新たに 188 頭について検査し、40 頭の抗体陽性

犬 (21.3%) を見出した。これらを合計すると 630 頭中 129 頭 (20.5%) が *E. canis* の抗体陽性であった。

徳島市およびその周辺の飼育犬では、341 頭中 8 頭 (2.3%) が抗体陽性であり、その中でピロプラズマ陽性犬 36 頭では 3 頭 (8.3%)、それ以外のイヌでは 305 頭中 5 頭 (1.6%) が抗体陽性を示した。

山口市およびその周辺の飼育犬では、448 頭中 22 頭 (4.9%) が *E. canis* の抗体陽性を示した。そのうち屋外飼育犬は 303 頭中 19 頭 (6.3%) が *E. canis* の抗体陽性を示し、室内飼育犬 82 頭は全頭陰性であった。

2) ヒトの抗体保有調査

現在までに入手した本州在住のヒトの血清 50 例について *E. canis* の IFA を実施したが前例陰性であった。

2. *E. canis* 分離の試み

1) 未感染 DH82 細胞を用いた *E. canis* 分離の試み

本年度沖縄県下で採取した *E. canis* の抗体および PCR 陽性のイヌの白血球層を未感染 DH82 細胞で分離培養した結果、3 検体で培養細胞のギムザ染色ならびに培養細胞を塗抹抗原として用いた IFA で DH82 細胞内に *E. canis* を認めしたが、雑菌の混入のため *E. canis* を分離するに至らなかった。

2) 実験犬を用いた *E. canis* 分離の試み

(1) ビーグル犬への輸血による *E. canis* 分離の試み

E. canis の抗体および PCR 陰性の 6 頭のビーグル犬へ沖縄県で採取した *E. canis* の抗体ならびに PCR 陽性犬の血液を輸血した。その結果、1 頭で輸血 17 日

後からIgG抗体が陽性となり、17日後～31日後の間に抗体価1：320を示し、38日後より抗体価の低下が認められ、輸血65日後には抗体が陰性となった。他の5頭のビーグル犬では抗体産生が確認されなかった。

(2) シェパードへの輸血による*E. canis*分離の試み

本実験では沖縄県でAlsever液中に採取した*E. canis*の抗体およびPCR陽性犬の血液を4頭のシェパードに輸血し、*E. canis*の抗体とPCRの検査を継続中である。

3. *E. canis*感染DH82細胞を用いた感染実験

*E. canis*感染DH82細胞を正常なビーグル犬の静脈へ接種した結果、5日後よりIFAで抗体が陽性となり、18日後には抗体価が1：10,240を示した。その後、1：10,240の抗体価が94日後まで持続している。*E. canis*接種58日後には*E. canis*のPCRがまだ陽性であったが、94日後にはPCRが陰性に転じた。*E. canis*の抗体価が1：10,240であった接種58日後のビーグル犬の血液10mlを*E. canis*の抗体およびPCRが陰性の健康な別のビーグル犬に輸血した結果、輸血27日後に*E. canis*の抗体およびPCRが陽性を示した。

4. クリイロコイタマダニを用いた*E. canis*のPCR

平成10年9月～11月にかけて5カ所から採取したクリイロコイタマダニを用いて*E. canis*のPCRを実施したが、いずれも陰性であった。

5. ELISAによる*E. canis*の抗体検出 本実験で開発したELISAによって*E. canis*に対するIgGおよびIgM抗体の検出

が可能であったが、イムノプレートの吸着に用いる*E. canis*の至適可溶性抗原量に関する詳細な検討が必要であった。

D. 考察

*E. canis*は日本を除く世界各国でイヌから分離されており、外国ではヒトからも分離された例もある。しかし、我が国では未だイヌから*E. canis*が分離されておらず、イヌの抗体保有状況も十分に調査が行われていないのが現状である。本研究実施前の沖縄県における捕獲犬についての*E. canis*の抗体保有調査および*E. canis*を媒介するとされているクリイロコイタマダニの生息調査から、沖縄県下のイヌには*E. canis*感染が非常に強く疑われ、ヒトでもその抗体陽性例が存在する可能性も示唆されていた。

1. イヌの*E. canis*抗体保有状況

イヌにおける*E. canis*の抗体保有調査の結果、沖縄県下の捕獲犬では今回も本研究実施前の成績(20.1%)と同様の陽性率(21.3%)であったことは、*E. canis*感染犬と疑われる多くの捕獲犬が殺処分されているため、*E. canis*の拡散が抑制されて感染率がこれ以上に上がらないものと推察される。今回、山口市および徳島市とそれらの周辺における飼育犬にも、*E. canis*抗体陽性犬が見出され、沖縄県以外にもすでに*E. canis*感染が広がっていることが強く示唆された。特に、*E. canis*抗体陽性犬が徳島市の飼育犬ではダニが媒介するピロプラズマ症のイヌに高率に検出され、山口市の飼育犬では屋外飼育犬のみに抗体陽性犬が検出されたことは、*E. canis*がダニによって媒介されることを裏付ける成績の1つとみることができる。*E. canis*はクリイ

ロコイタマダニによって媒介されるとされているが、本州ではクリイロコイタマダニの生息実態が明らかにされておらず、フタトゲチマダニなどの他のダニによっても媒介される可能性が高い。これは*E. canis*がクリイロコイタマダニ以外のダニによって媒介される可能性が示されている外国の報告と矛盾しない。

2. ヒトの*E. canis*抗体保有調査計画

本州在住のヒトの血清50例について実施した*E. canis*の抗体保有調査では前例が陰性であった。そこで、イヌでの*E. canis*抗体保有率が高く、しかもそれを媒介することが明らかにされているクリイロコイタマダニが多数生息していることから、ヒトへの感染が最も懸念される沖縄県下在住のヒトの血清約1,000検体について*E. canis*の抗体保有調査を実施する予定である。その調査に沖縄県環境衛生研究所衛生科学部および沖縄県立中部病院より提供されるヒトの血清を用いることについては、すでに両機関の担当者の承諾を得ている。

3. *E. canis*の分離

日本のイヌからの*E. canis*分離は未だ成功していない。県の動物愛護センターで捕獲犬から*E. canis*分離に用いる血液を無菌的に採取することは、県条例やイヌの殺処分作業手順の関係で極めて困難であった。そのため、捕獲犬の血液から分離培養によって*E. canis*分離を試みた試験が、雑菌の混入が原因で失敗したものと考えられた。

10頭の実験犬（ビーグル犬6頭、シェパード4頭）へ*E. canis*の抗体およびPCR陽性犬の血液を輸血して*E. canis*の感染を成立させ、輸血液に混入していた雑菌が消滅した時期に感染の成立した実

験犬の血液から未感染DH82細胞を用いて*E. canis*の分離培養を企てた実験も成功していない。1頭のビーグル犬では輸血後に*E. canis*の抗体が約40日間出現したが、自然に消滅した。この原因は、*E. canis*が死んでいたか、あるいは後述するように、中和抗体が*E. canis*の感染を阻止しているためであろうと推察された。次回、実験犬を用いて*E. canis*分離の実験を行う際には、*E. canis*のPCR陽性犬の血液からファイコールパックを用いて白血球層を分離し、この単球内の*E. canis*に結合していると考えられる中和抗体を解離させる処置を施したのちに実験犬へ接種する方法を採用したい。

4. *E. canis*に対する中和抗体産生の確認

*E. canis*感染DH82細胞をビーグル犬に接種した実験で、*E. canis*の抗体価が著しく上昇し、*E. canis*のPCRも陽性となったイヌで、接種94日後にPCRが陰性となった。しかし、この実験犬が*E. canis*の抗体およびPCRが陽性であった接種58日後の血液10mlを輸血（接種）した別のビーグル犬では輸血21日後に*E. canis*の抗体およびPCRが共に陽性であることが確認されとことから、*E. canis*が血中に存在していたことは明らかである。それにも拘わらずこの実験犬で接種94日後に*E. canis*のPCRが陰性に転じたことは、中和抗体が産生され、*E. canis*の排除に関与したことが強く示唆される。

これまで*E. canis*の感染を受けたイヌではテトラサイクリンを用いた適切な治療が行われない限り、*E. canis*が自然に消失することはないとされていたが、今回の*E. canis*感染DH82細胞を用いた感

染実験ならびに*E. canis*分離を行うための捕獲犬の血液を用いた輸血実験の結果は、中和抗体の存在を強く示唆するものである。今後、*E. canis*に対する中和抗体産生の有無を明確にする必要がある。犬種によって*E. canis*に対する感受性に差異があることも指摘されていることから、感受性を考慮した犬種選択も併せて検討する予定である。

現在*E. canis*感染DH82細胞を接種して*E. canis*の抗体価が1:10,240に上昇し、PCRが陽性から陰性に転じたビーグル犬の血清中に中和抗体が存在するか否かを*in vivo*および*in vitro*で確認する計画である。また、この実験犬が*E. canis*のPCR陽性を示した時期の血液を輸血して*E. canis*の抗体およびPCRが陽性に転じた別なビーグル犬については、抗体価とPCRの結果の推移を詳細に観察して*E. canis*の消失時期を明らかにしたい。

E. 結論

1. イヌの*E. canis*に対する抗体保有率は、沖縄県下の捕獲犬が20.5% (129/630)、山口市・同周辺の飼育犬が4.9% (22/448)、徳島市・同周辺の飼育犬が2.3% (8/341)であり、*E. canis*感染が我が国でも広がりを見せていることが強く示唆された。

2. *E. canis*の人為的接種によって抗体およびPCRが陽性となったビーグル犬で、接種94日後にPCRが陰性に転じたことから*E. canis*に対しても中和抗体が産生される可能性が示唆された。

3. *E. canis*の抗体およびPCRが陽性の捕獲犬血液を輸血した実験犬では、10頭のうち1頭が1:320の抗体価を示したのみで、他は全く感染の兆しが認められな

かったことから、この場合にも中和抗体の存在とその関与が強く疑われた。

4. ELISAによって*E. canis*の抗体測定が可能と考えられる成績を得た。

F. 研究発表

1. 発表論文

H. Inokuma, S. Yamamoto, C. Morita: Survey of Tich-Borne disease in dogs infested with *Rhipicephalus sanguineus* at a kennel in Okayama prefecture, Japan., J. Vet. Med. Sci., 60: 761-763, 1998.

猪熊 壽、山本静雄、棚原憲実、喜友名 強、大城章信：沖縄島における犬のマダニ寄生およびマダニ媒介性疾患の感染状況. 日獣会誌, 51: 361-364, 1998.

2. 学会発表

猪熊 壽、山本静雄、森田千春、大蔵望美、大野耕一、大西堂文：ELISAにより検出される抗クリイロコイタマダニ抗体のマダニ媒介性疾患疫学調査への応用. 日本獣医学会, 1998, 8, 江別市。

分担研究報告書

野鼠およびキチマダニから分離された脾臓肥大因子の解析とヒトおよび動物における*E. muris*に対する血清疫学

分担研究者 川原 眞

研究要旨

東京都西多摩郡桧原村で*Orientia tsutsugamushi*の調査のために捕獲された野鼠より、マウスの脾臓を肥大させる感染性因子が分離された。また、*E. muris*が分離された愛知県足助町で採取されたキチマダニ(*Haemaphysalis flava*)から、同様に脾臓肥大因子が分離された。これらの脾臓肥大因子のマウスに対する病原性は*E. muris*感染マウスの症状と類似し、立毛、活動低下、食欲不振を示した。感染マウス腹腔内細胞を採取し、スライド標本を作成しDiff-Quik染色したところ、細胞質に1~3 μ の桑実様封入体が認められた。腹腔内細胞を電子顕微鏡で観察したところ細胞質に膜で囲まれた空胞内に長さ0.4~1.0 μ 、幅0.2~0.7 μ の電子密度の高い多形性の基本小体が多数認められた。これらの形態学的特徴はこれらの感染性脾臓肥大因子が*Ehrlichia*に属するものと考えられた。

分離株感染マウスの回復期血清を*E. muris*抗原と蛍光抗体反応させると80倍から320倍の抗体価を得た。また、*E. muris*およびそれぞれの分離株の抗血清を用い蛍光抗体法で交差反応を行ったところ、これらの分離株は*E. muris*の抗原性とほぼ一致した。

16S rRNAの塩基配列を比較した結果、*E. muris*とダニからの分離株は1塩基、*E. muris*と東京都の野鼠から分離された株は3塩基が異なるのみであった。以上の結果から、これらの株を*E. muris*と同定した。このことから*E. muris*は日本に広く分布している可能性が示された。また、キチマダニ(*Haemaphysalis flava*)から分離されたことから、このダニが*E. muris*のベクターの一つであると考えられた。

東京都で捕獲された野鼠の血清中の*E. muris*抗体を調べたところ、*E. muris*が分離された桧原村地区で捕獲された野鼠の抗体保有率は高かった(58%)が、周辺地区の日の出町、八王子市、青梅市で捕獲された野鼠の抗体保有率は低く(0~5%)、地域局在性(Hot spot)が認められた。また、同様に東京都で*Orientia tsutsugamushi*調査のため採取されたヒト血清中の*E. muris*抗体を調べたところ、抗体陽性者が認められた。日本でヒトの血清中に*E. sennetsu*以外の*Ehrlichia*の抗体が証明されたのはこれがはじめての報告である。

東海、中部地方のヒトおよび動物の抗体保有率を調査したところ、イヌ、クマ、サル、シカ、イノシシ、野鼠など各種動物に抗体が認められた。しかし、ヒトおよびドブネズミには認められなかった。

A 研究目的

エールリヒアはリケッチア科に属するグラム陰性の編性細胞内寄生細菌で、単球、顆粒球などの白血球に寄生し、ヒトおよび

家畜の重要な病原体であり、主にダニを介して媒介する。我々は、1983年愛知県の山中で捕獲された野鼠からエールリヒアを分離した。野鼠から初めて分離されたこのエ

ールリヒアは、その諸性状から新種のエールリヒアで *Ehrlichia muris* と命名した。*Ehrlichia* は16S rRNAのbase sequenceから3つのグループに別れる。1つはイヌに感染する *E. canis* や最近ヒトから分離された *E. chaffeensis* のグループで *E. muris* もこのグループに入る。日本では *E. muris* 以外に *E. canis* の抗体がイヌの血清中に確認されている。しかし、*E. chaffeensis* の存在は確認されていない。2つ目は、馬に感染する *E. equi* や新しく見つかったヒトに感染する Human granulocytic ehrlichiosis agent などがある。このグループの *Ehrlichia* は日本では確認されていない。3つ目は *E. sennetsu*、SF agent や *E. risticii* などがあり、*E. sennetsu* は日本で発見された *Ehrlichia* で九州や東南アジアにみられる。SF agent はボラに寄生する Fluke から見つかっており、*E. risticii* に類似している。

野鼠から分離された *E. muris* は、わずかに1株のみであり、その実態についてはまったく不明である。また、グループ1と2のエールリヒアはダニが vector であり、ダニによって媒介される。*E. muris* もダニによると考えられるが、明らかではない。今回、この *E. muris* の実態と vector について調査するとともに、ヒトおよび動物における血清疫学についても調べることを目的とした。

B 研究方法

野鼠およびダニからの *Ehrlichia* の分離

1992年11月に東京都西多摩郡桧原村で捕獲したアカネズミ(18匹)、ヒメネズミ(7匹)およびハタネズミ(1匹)、合計26匹の野鼠の脾臓10%乳剤(SPG液:0.0038M KH₂PO₄, 0.0072M K₂HPO₄, 0.0049M L-Glutamate, 0.218M Sucrose, pH 7.2)をddYマウスの腹腔内に0.2 ml接種した。接種後、15日まで観察し、マウスを開腹し脾臓の肥大の有無を観察した。

1994年6月から9月にかけて愛知県東加

茂郡足助町の山中で旗ふり法にてマダニを採取した。採取したマダニの中で最も多く採取されたキマチダニ若虫(10匹)を、それぞれddYマウスに吸着、吸血させ、飽血後10~20日後に解剖して、脾臓の肥大の有無を観察した。

分離株の病原性、脾臓肥大度および *E. muris* に対する抗体価の測定

E. muris、野鼠から分離された株10株、およびダニから分離された株5株の感染マウスの脾臓10%乳剤を、それぞれ2匹づつのBALB/cマウス腹腔内に0.2 ml接種し20日間観察し、マウスに対する病原性を *E. muris* 感染マウスと比較した。感染20日後に採血した後、開腹し脾臓を取り出し、その肥大度 (Spleen weight / Body weight x 100) を測定した。および抗原 *E. muris* に対する抗体価を間接抗体法で測定した。二次抗体としてFITCラベル抗マウスIgGを用いた。

E. muris と分離株間の抗原性の比較

E. muris、野鼠からの分離株4株(I-268, I-269, I-289, I-306)、ダニからの分離株1株(NA-1)、*E. sennetsu* のそれぞれをBALB/cマウスに感染させ、10日目にペリン添加Eagle液で腹腔内細胞を採取し、15-well multitest slide上で2時間培養し、冷アセトン固定の後、蛍光抗体用スライド抗原とし、使用まで-80℃で保存した。抗血清は、それぞれ感染10日目の脾臓の10%乳剤を、マウス腹腔内に4回接種し採血して作成した。反応は一次抗体(抗血清)、二次抗体(FITCラベル抗マウスIgG)とも37℃、1時間反応させた。抗体価は10倍希釈からスタートし、倍々希釈で特異蛍光を示した最高希釈倍率を抗体価とした。

光学顕微鏡および電子顕微鏡による観察

野鼠からの分離株(Strain I-268)およびダニからの分離株(Strain NA-1)をマウスに感染させ、感染10日目に腹水細胞を採取し、Diff-Quik試薬で染色し封入体の有無

を観察した。また、腹水細胞を既報

(Kawahara.M.ら1993.

Characterization of *ehrlichial* organisms isolated from a wild mouse. J. Clin. Microbiol. 31:89-96) に従い固定、包埋し電子顕微鏡で観察した。

分離株の16S rRNA のPCRおよび Sequence

野鼠からの分離株(Strain I-268)およびダニからの分離株(Strain NA-1)をマウスに感染させ、感染10日目に腹水を採取し、PBS液で遠心洗浄した後、1% sodium dodecyl sulfate (SDS)、および20mg/ml proteinase Kを含む TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA;pH8)で10%(wt/vol)乳剤にし、50°Cで2時間加温し、フェノール法でDNAを抽出した。

抽出したDNAを鋳型としユニバーサルプライマーEC9 (5'-AAGGATCCTACCTTGTTA CGACTT-3') と EC12(5'-AATCTAGAGTTT GATCMTGG-3', M=A or C)で94°C (1 min), 48°C (2 min), 66°C (1 min and 30 s)で3サイクル、88°C (1 min), 52°C (2 min), and 68°C (1 min and 30 s)で40サイクルの条件でサーマルサイクラーと GeneAmp reagentsを用いPCRを行った。PCR産物はPCR DNA purification systemを用い精製を行った。

精製したPCR産物をプライマーEC9、EC10(5'AATCTAGATTAGATACCCTDGTAGTCC-3', Where D=A, T, or G)、EC11 (5'-AAGGATCCGGACTACHAGGGTATCTAAT-3', Where H=C, T or A)、EC12 (5'-AATCTAGAGTTT GATCMTGG-3', M=A or C)、U396 (5'-GAAGGCCTTCGGGTTGTA-3'), U1124 (5'-GATAAACTGGAGGAAGGTGGG-3'), L297 (5'-AGACCGTATCTCAGTTCCAGT G-3'), L696 (5'-CAGTGTCAGTATCG

AACCAGA-3'), L1148 (5'-GGGCCGTGCTG ACTTGACATC-3')を用い、ABI PRISM Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kitで Sequenceを行った。

得られたSequenceをGenBank より得た、いくつかのEhrlichiaと比較検討した。GenBank より得た各Ehrlichiaの accession numberは下記の通りである。C. ruminsantium, X62432; E. chaffeensis, M73222; E. canis, M73221; E. ewingii, M73227; A. marginale, M60313; "E. bovis", U03775; E. platys, M82801; E. phagocytophila, M73220; E. equi, M73223; E. sennetsu, M73225; E. risticii, M21290; N. helminthoeca, U12457; W. pipientis, X61768; and R. rickettsii, M21293.

東京都の野鼠およびヒトの抗体調査

Ehrlichiaが分離された東京都西多摩郡 桧原村で1992年に捕獲した野鼠26匹、および、日の出村で1992年に27匹、八王子市で1992年に78匹、五日市市で1992年、1993年、1994年に捕獲した野鼠32匹、計163匹の野鼠血清について上記の方法に従いE. murisに対する抗体調査を行った。また、東京都で集められたヒト血清、五日市市の血清1487、青梅市の血清316についてE. murisに対する抗体調査を間接蛍光抗体法で行った。二次抗体としてFITCラベル抗マウスIgGおよび抗ヒトIgGを用いた。

ヒト及び動物の抗体調査

岐阜大学付属病院を訪れた様々な疾患を持つ患者の血清で検査後の余剰血清968、岐阜大学で集められた、イヌ血清499、クマ血清48、サル血清70、シカ血清20、イノシシ血清18、筑波大学で集められたイヌの血清200、名古屋市内で捕獲された野鼠(アカネズミ)の血清221、同様にドブネズミ血清327についてE. murisに対する抗体保有率を間接蛍光抗体法で調査した。二次抗体として次のようなFITCラベル血清を

用いた。ヒトに対しては抗ヒトIgG、イヌに対しては抗イヌIgG、サルに対しては抗サルIgG、野鼠に対しては抗マウスIgG、ドブネズミに対しては抗ラットIgG、イノシシ、クマ、シカに対してはプロテインAを使用した。

C 研究結果

野鼠およびダニからの *Ehrlichia* 分離

1992年に東京都西多摩郡桧原村で捕獲された野鼠26匹から *Ehrlichia* の分離を行ったところ、10匹から感染性脾臓肥大因子を分離した。分離された野鼠の内訳はアカネズミが9匹、ヒメネズミが1匹であった。

1994年に、*E. muris* が分離された足助町でキチマダニ (*Haemophysalis flava*)、フトゲマダニ (*H. longicornis*)、ヤマトマダニ (*Ixodes ovatus*)、タネガタマダニ (*I. nipponensis*) などのマダニを捕獲した。このうち最も多く採取された *H. flava* の若虫10匹をBALB/cマウスに吸着させたところ5匹のマウスから感染性脾臓肥大因子を分離した。

分離株の病原性および *E. muris* に対する抗体価の測定

野鼠から分離した脾臓肥大因子(10株)およびダニから分離した脾臓肥大因子(5株)をマウスに接種したところ、感染10日目頃から、軽度の立毛、活動低下、食欲不振などが観察されたが、死亡例は認められなかった。これらの症状は *E. muris* と一致していた。また、*E. muris* を抗原として、それぞれ20日目の血清中の抗体価を測定したところ、それぞれ80倍から320倍の抗体価を示した。

抗原性の比較

E. muris、野鼠からの分離株 (Strain I-268, I-269, I-289, I-306) およびダニからの分離株 (strain NA-1) のそれぞれの抗血清および抗原を用いて交差試験を行ったところ、*E. muris* の抗原性とほぼ一致した。光学顕微鏡および電子顕微鏡による観察

野鼠からの分離株 (Strain I-268) および

ダニからの分離株 (Strain NA-1) をマウスに感染させ、10日目の腹腔内細胞を Diff-quick 染色すると細胞質に1~3 μ の桑実様封入体が認められた。封入体を電子顕微鏡で観察すると細胞質に膜で囲まれた空胞内に長さ0.4~1.0 μ 、幅0.2~0.7 μ の電子密度の高い多形性の基本小体が多数認められた。

16S rRNA gene の塩基配列の比較

E. muris、NA-1、I-268の16SrRNA gene の塩基配列 (Fig. 4) を比較したところ、NA-1は1ヶ所331番のGがCに、I-268は3ヶ所、102番のTがCに、382番にGが挿入され、829番のCが欠落していた。互いのホモロジーは、何れも99.7%以上であった。また、お互いの系統樹における位置関係は同一のものであることを示唆していた。以上の結果から、分離株はすべて *E. muris* であると同定した。

東京都の野鼠およびヒトの抗体調査

東京都下4ヶ所で捕獲され野鼠から採血を行い、*E. muris* に対する抗体調査を行ったところ、*E. muris* が分離された桧原村の野鼠は抗体保有率が、58%(15/26)であった。抗体価はすべて80倍以上を示し、最高2560倍であった。一方、日の出村の野鼠の抗体保有率は0%(0/27)で、青梅市の野鼠も0%(0/32)であった。八王子で捕獲された野鼠の抗体保有率は5%(4/78)であったが、桧原村の野鼠と異なり抗体価は何れも160倍以下か、もしくは認められなかった。一方、東京都の五日市市および青海市で採血されたヒト血清の抗体調査を行ったところ陽性率は五日市市が1.1%(16/1487)で、青梅市が1.3%(4/316)であった。抗体価は五日市市が10~160倍で、青海市では10~160倍であった。

ヒトおよび動物の抗体調査

岐阜大学の動物病院で集められたイヌ血清の *E. muris* に対する陽性率は3.6%(18/499)であった。筑波大学の動物病院で集められたイヌ血清の陽性率は

5.5%(11/200)であり抗体価は10倍から2560倍であった。岐阜大学で集められた各種の動物血清中の陽性率は次の通りであった。サルは1.4%(1/70)、クマは2.1%(1/48)、シカは15%(3/20)、イノシシは17%(3/18)であり、抗体価は10倍から320倍であった。名古屋市内で捕獲された野鼠(アカネズミ)の陽性率は9.5%(21/221)であったのに対し、同じく名古屋市内で捕獲されたドブネズミには抗体は認められなかった(0/327)。また、岐阜大学付属病院で集められたヒト血清中には*E.muris*に対する抗体が認められなかった(0/968)。

D. 考察

今回、東京都西多摩郡で捕獲した野鼠から10株の感染性脾臓肥大因子を分離した。これらの因子は、病原性、電子顕微鏡像、血清反応、16S rRNA geneのbase sequenceの結果から、*E.muris*と同定した。*E.muris*が最初に見つかったのは、日本の中部地方の愛知県であるが、今回、はるか離れた(直線距離で約300 km)関東地方の東京都で、しかも、多数分離された事から、*E.muris*は、日本で広範囲に分布しているものと思われる。

一方、*E.muris*のVectorを調べる目的で、*E.muris*が分離された愛知県足助町でキチマダニを捕獲し、分離を試みたところ、感染性脾臓肥大因子を分離した。これらの因子は、野鼠からの分離株同様、その性状および16S rRNAのsequenceの結果から*E.muris*と同定した。*E.muris*がキチマダニから多数分離された事から、このダニが*E.muris*のVectorの一つになりうるものと思われた。

*E.muris*が分離された桜原村で捕獲された野鼠、日の出町、八王子市、青梅市のそれぞれで捕獲された野鼠の血清中の*E.muris*抗体を調べた。その結果、*E.muris*が分離された桜原村で捕獲された

野鼠の抗体保有率は高く(58%)、また、抗体価も高かった(80倍~2560倍)が、他の地区では、抗体が認められないか、抗体があっても、保有率(5%)、抗体価とも低かった(10倍~160倍)。この事は、*E.muris*が、特定の地域に局在して存在する事を示しており、*Orientia tsutsugamushi*同様、Hot spotが存在するものと思われた。一方、ヒトについて血清中の*E.muris*抗体の有無を、東京都五日市市および青梅市で集められた血清について調べた。その結果、抗体陽性検体を見出しけれども抗体保有率及び抗体価が低かった。*Ehrlichia*の各グループ間ではほとんど抗原がクロスしないことから、これら感染者は*E.muris*もしくは、共通抗原を有する近縁のグループ1に属する*Ehrlichia*に感染している可能性も十分に考えられる。*E.chaffeensis*やVHEはヒトから分離されており、今後、菌株の分離、nested PCR等を試みる必要がある。一方、岐阜大学病院で集められたヒト血清は抗体を所有していなかった。この事が地域特異性を意味するのか、検体採取方法の違いによりものかどうかはもう少し調査する必要があるように思われる。

本邦におけるイヌの血清中の*Ehrlichia canis*抗体調査の報告によると、九州地区のイヌの抗体保有率が1.9%で、抗体価は最高360倍である。我々の調査では、イヌの血清中の*E.muris*に対する抗体保有率は、岐阜地区で3.5%、筑波地区で5.5%であり抗体価も最高2560倍であり、イヌに感染する*Ehrlichia*が存在する事を裏付けているものと思われた。また、サル、クマ、シカ、イノシシなどもわずかではあるが抗体を所有していたが抗体価は低かった。これらの動物についてはも菌株の分離やnested PCR等を行う必要があるように思われた。名古屋市内で捕獲された野鼠は9.5%の抗体保有率を示したが、ドブネズミはまったく抗体を所有していなかった。名古屋市内の野鼠にも*E.muris*抗体が示された事は山間

部だけでなく都市部にも *Ehrlichia* の存在が示されているように思われた。 *E. muris* は実験的にラットに感染しなかったが、ドブネズミに抗体が認められなかったことはこの事と一致していた。

E. 結論

E. muris が愛知県だけでなく、愛知県から遠く離れた東京都でも多く分離されたことから、全国的に分布している可能性が示された。また、 *E. muris* がキチマダニから分離されたことから、キチマダニがベクターのひとつとして考えられた。さらに、ヒトを始めイヌや野生動物に *E. muris* 抗体が存在することから、 *E. muris* もしくはそれに類似する *Ehrlichia* が日本にも広く浸淫している可能性を考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kawahara, K., Suto, C., Rikihisa, Y., Shibata, S., Ito, T., Fujita, H. and Hira, K. : Comparison of *Ehrlichia muris* isolated from wild mice and ticks, and serologic evidence of human and animal exposure to *E. muris*. J. Clin. Microbiol. 印刷中、1999

2. 学会発表

1998年5月にアメリカのアトランタで開かれた第98回アメリカ細菌学会で発表した。

分担研究報告書

猫ひっかき病の疫学的研究

分担研究者 上野 弘志

研究要旨

1997年に著者は猫ひっかき病起因病原体 (*Bartonella henselae*) 様の細菌を米国で鹿から分離した。今回は日本における鹿のバルトネラ感染を調査した。濾紙吸着鹿血液21材料につき、リケッチア (RpCs) およびバルトネラ (BhCs) に特異的なプライマー2種類を用いPCR法で遺伝子の検出を試み、3例にバルトネラの2例にバルトネラとリケッチアに混合感染の疑いのある検体を発見した。また、105血清につき、鹿由来のバルトネラ菌株を抗原とし、蛍光抗体法で2例の抗体陽性血清を発見した。

A 研究目的

人の猫ひっかき病は、主に猫との外傷性の接触後に発症する。1992年に *Bartonella henselae* が本症の起因病原体と判明して以来、その疫学は猫と人を中心にして解明されてきた。近年バルトネラ属菌に関して野生動物の調査も活発化し、著者は1997年に米国カリフォルニア州のオグロジカの血液材料から高頻度に *B. henselae* 様の細菌を分離した。今回は日本の鹿のバルトネラ感染を調査した。

B 研究方法

1998年9月に一鹿牧場で35頭のエゾシカの全血各2mlをEDTA-tubeに採取し、*Bartonella*の分離を定法に従い行った。凍結保存した血液を融解後、遠心沈澱し、沈さを免血液加HI寒天平板培地に塗抹後、5%CO₂下で35℃、4週間培養した。疑わしい集落の同定は、生物性状の検査、バルトネラ属を含むリケッチア種を検出するRpCsプライマーを用いたPCR法による特異的増幅産物(約400bp)の確認により行った。前記35頭のすべての鹿から血清を分離した。これに加え、1992年と1993年に採取した鹿の血清70材料のIFA抗体価を測定した。本検査は、抗原として著者が

米国カリフォルニアの鹿から分離した一鹿菌株を、また二次抗体としてFITC標識の抗鹿IgGを用い、定法に従って行った。また、1998年にはニホンジカ21匹の濾紙吸着血液材料を材料として既述のRpCsプライマー及び *B. henselae* 等3種のバルトネラの遺伝子を特異的に増幅し、約380bpのDNA断片を生ずるBhCsプライマーを用いて濾紙吸着鹿血液中のバルトネラの存否を調査した。

C 研究結果

鹿血液35材料中27材料ではバルトネラは検出されなかった。残る8材料については現在培養中である。鹿血清材料のうち、1998年に採取した35材料のIFA抗体価はすべて64倍未満であり、抗体陰性だった。1995から96年に採取した70血清中、2血清が陽性であり、抗体価はともに256倍であった。濾紙吸着鹿血液21材料中、3材料でBhCsプライマーのみでバルトネラに特異的なサイズのDNA断片が検出された。また別の2材料では、RpCsではリケッチアにBhCsではバルトネラに特異的なサイズのDNA断片が検出された。

考察

今回の調査で、1998年に採取した一鹿牧場にはバルトネラに感染した鹿を発見できなかったため、そこではバルトネラの浸淫程度は低いと考えられた。しかし濾紙吸着血液材料では、BhCsプライマーでバルトネラに特異的なDNA断片が5材料

(14.3)あり、内2材料からは他のリケッチアとの混合感染の疑われるものも発見した。現在、BhCsプライマーで検出されたバルトネラに特異的なサイズのDNA断片につき、遺伝子配列の決定を試みており、1材料については塩基配列を決定し、塩基配列既知の細菌との相同性を比較した。その結果、今回検出された遺伝子は *Bartonella* sp.(strain N40)との相同性が68%と最も高く、次いで *B. elizabethae*(strain F9251)との相同性が高い(67%)こと、他の細菌との相同性が低いことが判明し、これらの鹿が未知の *Bartonella* に感染している可能性が示唆された。近年、本菌属の自然界での分布を知るための調査が進みつつあり、齧歯類など野生動物からの新菌種の分離報告もある。日本の鹿もそのようなバルトネラを保菌するかもしれない。今後は、鹿のバルトネラの感染様相を知るためには、今回 *Bartonella* との相同性の高いDNAの検出された鹿や抗体陽性鹿の生息地域で、バルトネラ感染について、より詳細な調査が必要と考えられる。

E 結論

日本の鹿における *Bartonella* の疫学調査を行った。一鹿牧場では感染例を発見できなかった。しかし、ニホンジカ21頭中5頭の血液にバルトネラまたはそれに近縁の遺伝子を確認した。また、バルトネラのIFA抗体保有鹿も発見した(2/105)。鹿のバルトネラの疫学を知るには、今後、バルトネラ感染鹿の存在する可能性のある地域で詳細な調査が必要であろう。

分担研究報告書

猫ひっかき病の疫学・診断

分担研究者 丸山総一

研究要旨

日本のペット猫、不要猫の血清について、間接蛍光抗体法で*B. henselae*抗体保有状況を調査したところ、471頭中43頭(9.1%)が*B. henselae*抗体(IgG)を保有していた。抗体陽性の猫は1歳以下～14才までみられたが、陽性率には雌雄差は見られなかった。関東地方の猫462頭中15頭(3.2%)から*B. henselae*が分離された。飼育猫200頭中10頭(5.0%)、不要猫174頭中5頭(2.9%)から菌分離されたが、新生子猫88頭からは分離されなかった。日本、アメリカ、フランスで分離された*Bartonella*株のDNAの異同をパルスフィールド電気泳動法を用いて解析したところ、日本の猫は複数*B. henselae*の株に、アメリカ、フランスの猫は*B. henselae*と新種の*B. clarridgeiae*に感染していることが明らかとなった。*B. henselae*の染色体DNAは1.6MB～2.4MB、*B. clarridgeiae*のそれは約1.6MBであった。

A.研究目的

猫ひっかき病 (Cat Scratch Disease:CSD) は、猫による外傷を受けた人が発症する人畜共通伝染病である。患者は、主として発熱、受傷部位の丘疹、潰瘍、局所リンパ節の腫脹を示すが、まれに、重篤な脳炎などを引き起こす場合がある。免疫不全の人が感染した場合、bacillary angiomatosis(細菌性血管腫)やbacillary peliosis(細菌性紫斑病)のような特殊な血管増殖性病変を皮膚や内臓に形成する。

CSDは長い間病原体不明の感染症として扱われてきたが、1990年代の前半に本症の病原体は新種の細菌*Bartonella henselae*による感染症であることが明らかにされた。さらに、近年の研究から本症の発生には地理的な差異があること、原因菌である*B. henselae*はいくつかの遺伝子型に分類されること、AIDS患者の飼育する猫から分離された新種の*B. clarridgeiae*も*B. henselae*と同様の病原性を有することが示唆されており、本症の背景はかなり複雑であるものと思われる。

わが国の猫ひっかき病研究は端についたばかりで、その疫学は不明の状態といっても過言ではない。本研究では、わが国における猫ひっかき病の疫学解明の基礎研究として、わが国の猫における*B. henselae*とその類縁菌の感染状況ならびに日本、フランス、アメリカ分離株の遺伝子性状について検討した。

B.研究方法

1)1994年5月から1995年6月にかけて、神奈川県および埼玉県の7カ所の動物病院より採取した総計471検体の飼育猫の血清について、*B. henselae*の感染状況を間接蛍光抗体法を用いて検討した。

2)1995年1月から1996年8月までの間、関東各県(神奈川県、埼玉県、群馬県)の猫462頭(飼育猫200頭、不要猫174頭、新生子猫88頭)から血液を採取し、*B. henselae*の分離を試みた。

3)日本、フランス、アメリカ収集した分離株のDNAの異同をPCR法ならびにパルスフィールド電気泳動法(Bio-Rad, CHEF DR-III)を用いて調べ、各国に分布する*B. henselae*ならびに*B. clarridgeiae*の遺伝子性状を分子疫学的に検討した。

C.研究結果

1)日本の飼育猫の471頭中43頭(9.1%)が*B. henselae*抗体(IgG)を保有していた。調査した。*B. henselae*に対する雄猫の抗体陽性率は12.9%、雌猫の5.2%であった。各病院ごとの猫の*B. henselae*抗体陽性率は0～19.5%であった。*B. henselae*抗体陽性の猫は1歳以下～14才までみられた。

2)関東地方の猫462頭中15頭(3.2%)の猫に感染が認められた。このうち、飼育猫200頭中10頭(5.0%)、不要猫174頭中5頭(2.9%)が陽性であった。性別にみると、雄猫168頭中7頭