

厚生省科学研究費補助金事業実績報告書

平成10年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症）  
研究事業報告書

各種動物における感染症病原体の保有実態の緊急研究

(H10-新興-61)

主任研究者

源 宣之

## 厚生科学研究費補助金研究報告書

平成 11 年 3 月 31 日

厚生大臣 宮下創平 殿

住 所 〒501-3107岐阜市加野1735-90  
フリカ・ナ ミナト ノ・マ研究者 氏 名 源 宣之  
(所属施設 岐阜大学農学部 )

平成 10 年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症 研究事業）に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名（課題番号）：各種動物における感染症病原体の保有実態の緊急研究(H10-新興-61 )

国庫補助金精算所要額：金 8,000,000 円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク  
(別添1のとおり)
2. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書 (別添2のとおり)
3. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書 (別添3のとおり)
4. 研究成果の刊行に関する一覧表

| 刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名） | 刊行年月日 | 刊 行 書 店 名  | 執筆者氏名                        |
|------------------------------|-------|------------|------------------------------|
| 日本獣医公衆衛生学雑誌                  | 投稿中   | 日本獣医公衆衛生学会 | 飯田 孝, 神崎政子, 渡部浩文, 宮崎奉之, 丸山 務 |

5. 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況

なし

別添1

厚生省科学研究費補助金総括研究報告概要版

研究費の名称＝厚生科学研究費

研究事業名＝厚生科学特別研究事業

研究課題名＝各種動物における感染症病原体の保有実態の緊急研究

国庫補助金精算所要額＝8,000,000円

研究期間（年度）＝1998

主任研究者名＝源 宣之（岐阜大学）

分担研究者名＝飯田 孝（東京都立衛生研究所）、高山直秀（東京都立駒込病院）

研究目的＝ 高度に医療技術の発達した今日でさえ、完全に撲滅できた感染症は天然痘の外ない。

天然痘の自然宿主は人であり、ワクチン接種を行うことにより人から人への感染環を立ち切ることに  
よって本病の根絶に成功した。一方、その他の感染症の場合、それらの病原体の本来の宿主が十分に  
解明されておらず、人や家畜での感染防御では病原体の抜本的排除に至っていないことを物語ってい  
る。したがって、病原体の自然宿主の特定、換え言すれば、病原体の自然界における感染環、生態を  
解明することは感染症の撲滅にとってきわめて重要なことと言える。そこで、本研究では新興・再興  
感染症の主体をなすと考えられる各種ズーノーシス病原体の感染環を明らかにすることを目的に、野  
生動物や検疫対象外の愛玩動物におけるツツガムシ病リケッチャ、狂犬病ウイルスおよび細菌（サル  
モネラ、大腸菌O157など）の保有状況を血清学的あるいは病原学的に調査する。すなわち、まず  
第一に、最近発生が全国的に拡大されているツツガムシ病リケッチャの大都市における侵淫状況をそ  
こに生息しているドブネズミの抗体調査およびリケッチャ遺伝子の検出から調べる。第二に、我が国  
における狂犬病ウイルスの保有の有無を、疑わしいあるいは原因不明の神経症状を示した種々の動物  
を積極的に探し出してウイルス学的検査を実施して調べる。

研究方法＝

1) ツツガムシ病リケッチャについては、名古屋市の都市地域に生息するドブネズミにおけるツツガ  
ムシリケッチャに対する抗体と脾臓からの遺伝子の検出を行う。検体は過去10年間に亘り収集し、  
保存しておいたものと現在収集中の材料である。材料の採集は名古屋市生活衛生センターの協力で行われ  
ている。抗体調査は間接蛍光抗体法で、リケッチャ遺伝子は56kDタンパク質をコードする遺伝子をPCR  
で増幅し検出する。

2) 狂犬病については、我が国の主要な都市で開業している獣医師との間に連絡網を構築して、狂犬病が疑われるイヌ、ネコ、コウモリなどの症例があれば、直ちに分担研究者高山に連絡すると同時に、採取した検体を大分医科大学実験動物施設に送付し、送付された検体については、研究協力を依頼した大分医科大学万年和明助教授が逆転写PCR(RT-PCR)によって狂犬病ウイルス遺伝子を狂犬病を疑う動物の脳組織から検出する。今回は少年の手を噛んだ飼育中のコウモリの材料で行った。

3) 東京都内のペットショップで販売されている、または家庭で飼育されているフェレット、プリードッグ、ハムスターなどの糞便及び飼育環境から主にサルモネラ、大腸菌0157などの病原菌の検索を菌の培養とPCRにより行なった。

#### 結果と考察＝

##### 1) 名古屋市に棲息するドブネズミにおけるツツガムシ病リケッチャの保有状況：

ドブネズミにおけるKarp, KatoおよびGilliam株に対するIFA抗体価はいずれの株に対する抗体価の分布も40倍を底とする二峰性を示したことから、抗体陽性限界を80倍とした。ドブネズミ959例のうち、いずれかの株で抗体陽性を示したのは22.9%であった。IFA抗体価が160倍以上の血清の66.7%がKarp株の特異蛋白をウエスタンブロットで検出し得たこと、また一部のIFA抗体陽性血清から中和抗体も検出されたことから、今回測定されたIFA抗体はきわめて特異性の高いことが伺われた。血清採取月別の抗体陽性率は秋から春にかけて高い群と春から夏にかけて高い群とがあり、それらの地域に棲息するツツガムシの種類が反映しているものと考えられた。抗体陽性率は中川区や北区などの西部地区と東部丘陵沿いに位置する昭和区で高い傾向が認められたが、抗体は名古屋市全域で確認された。しかし、これまでのところPCRによるリケッチャ遺伝子は検出されていない。これは材料の採取時期に問題があるのかもしれない。以上の成績から、名古屋市のドブネズミにおいてツツガムシ病リケッチャが広く侵淫しているものと思われた。

##### 2) 我が国に棲息しているコウモリからの狂犬病ウイルス検出の試み

自宅に迷い込んだコウモリを捕獲して虫かごに入れておいたところ、少年が虫かごに手を触れてコウモリに左示指を咬まれた。咬み傷から出血したため近医を受診して、傷の手当と破傷風トキソイドの接種を受けた。看護婦である母親が狂犬病を心配して東京都立駒込病院小児科高山に電話で問い合わせてきた。これに対して、これまで日本国内のコウモリから狂犬病ウイルスが分離されたことはないので、加害コウモリが国産のコウモリであることが証明できれば、狂犬病ワクチン接種による曝露後発病予防は必要がないが、コウモリは検疫の対象外なので、外国から合法的ないし非合法的に国内に持ち込まれたコウモリであれば、狂犬病の危険を否定できない。したがって、まず捕獲してあるコウモリの種類を確定するべきであると説明した。母親は数カ所の動物園に電話で問い合わせたのち、

種類を鑑別できそうな動物園にコウモリを持ち込んで鑑定を依頼した。しかし、動物園でもコウモリの鑑別同定できなかったため、当院を受診した。加害コウモリが外国由来のコウモリであることを否定できない以上、咬傷被害者の安全のため、狂犬病曝露後発病予防を実施することにし、同時にコウモリの脳に狂犬病ウイルスがいるか否かの検索を行った。

コウモリの脳組織をRT-PCRで検査したところ、狂犬病ウイルスRNAは陰性であった。RT-PCRの陰性結果報告が届いたため、少年に対して行っていたニワトリ胚細胞由来狂犬病不活化ワクチン接種による狂犬病曝露後免疫を4回目のワクチン接種を行って終了とした。その後少年は健康に過ごしている。

現在まで日本をはじめ東南アジアにいるコウモリから狂犬病ウイルスは分離されていないが、南北アメリカ大陸に棲むコウモリの一部は古典的狂犬病ウイルスを保有しており、こうしたコウモリに咬まれて狂犬病を発病した症例が米国では年平均3例弱報告されている。またコウモリが生息する洞窟に調査に入った研究者が飛沫となって洞窟内に漂うコウモリの唾液を吸い込で狂犬病を発病したとの報告もある。現在日本ではコウモリをペットとして飼育する人々が少なからずいるといわれている。日本でコウモリは検疫対象外の動物であるため、コウモリの狂犬病常在地などから狂犬病ウイルスや近縁のリッサウイルスを保有するコウモリが合法的に輸入されたり、非合法的に日本に持ち込まれる可能性がある。それゆえ、国内でコウモリに咬まれた場合であっても、加害コウモリが日本土着のコウモリであることが証明できないかぎり、咬傷被害者が狂犬病を発病する可能性を否定できない。

「狂犬病」という和病名からは想像しがたいが、コウモリに咬まれた場合にも狂犬病を発病する可能性があることを医療関係者は知っておく必要がある。また、コウモリによる咬傷被害者から相談を受けた場合には、コウモリの調査により狂犬病の可能性が否定されるまでは狂犬病曝露後発病予防を受けるように助言するべきである。

### 3) 各種動物における細菌の保有状況

1996年から1998年の10、11月に、東京都多摩地区のペットショップ及び一般家庭で飼育されていた26種類342匹の動物を対象に人獣共通感染症起因菌の保有調査を行った。その結果、8.2%(28/342)のペットから病原菌またはDNAを検出した。その内クラミジアが4.4%(15/432)で最も多く、次いでサルモネラの2.9%(10/342)、黄色ブドウ球菌の0.5%(2/342)、*L. monocytogenes*の0.2%(1/342)の順であった。腸管出血性大腸菌とエルシニアは検出されなかった。サルモネラは、は虫類からもっとも多く検出され、は虫類の飼育ではサルモネラによる人、特に小児への感染予防に重点をおいた飼育法を心掛けなければならないことが改めて確認できた。黄色ブドウ球菌は2株分離されたが、共にエンテロトキシン非産生株であった。しかし、ハムスターから分離した株は、人で熱傷様の皮膚症状を起こす表皮剥脱A型毒素を産生しており、菌が拡散するのを防ぐための衛生的な動物飼育の必要性が示唆さ

れた。クラミジアはさまざまな動物から毎年検出されたがその80% (12/15)は食肉目、げっ歯目の動物由来であり、それらの菌種はすべて人獣共通感染症起因菌の*C. psittaci*であった。

ペットショップで販売されていた動物の病原菌保有率は15.5% (11/71)で、一般家庭70軒で飼育されていた動物の8.6% (6/70)と比べて有意に高かった( $p < 0.05$ )。これらの店舗では動物相互の感染が起きていることが考えられた。そこで、そのことを証明するために、複数の動物から同じ血清型が分離されたサルモネラについて、RAPD法によるDNAのパターン分析を試みた。その結果、*S. Hvittingfoss*の3株はRAPDパターンが同じであったことから、本菌を保有していた2匹のカメレオンとイグアナは同じ由来の菌に感染していたことが明らかになった。

## 結 論

- 1) ツツガムシ病リケッチャが山野のみならず大都会においても広く侵淫していることが明らかとなった。
- 2) RT-PCRによるコウモリ脳の狂犬病ウイルス検査は陰性であったため、咬傷を受けた少年への狂犬病暴露後発病予防を科学的根拠をもって中止することが出来た。
- 3) 東京都内で飼育されているペットは人獣共通感染症のサルモネラを2.9%、黄色ブドウ球菌を0.5%、リステリア菌を0.2%、クラミジアを4.4%保有しており、飼育における衛生管理をより徹底する必要が明らかとなった。

本研究の成果は、これまでの感染症を根絶する上で必要な基礎的データを提供するとともに、新興・再興感染症の予防や発生予測にも繋がる。特に、島国の日本にとって輸入されてくる検疫対象外の小動物の調査は新病原体の侵入を遮断するための有効な手段といえる。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
総括研究報告書

各種動物における感染症病原体の保有実態の緊急研究

主任研究者 源 宣之 （岐阜大学農学部 教授）

研究要旨

第一に、最近発生が全国的に拡大されているツツガムシ病リケツチャの大都会における侵淫状況を名古屋市に生息しているドブネズミの抗体調査およびリケツチャ遺伝子の検出によって調べた。その結果、ドブネズミ959例中ツツガムシリケツチャの標準株であるKarp, KatoおよびGilliam株のいずれかで抗体陽性を示したのは22.9%で、名古屋市全域のドブネズミにおいてツツガムシリケツチャが広く侵淫しているものと思われ、この情報は都市部における本病の予防治療に役立つであろう。第二に、日本国内で少年の指を噛んだコウモリが狂犬病ウイルスに感染していないことを、加害コウモリの脳組織をRT-PCRによって検査して証明した。これにより、既に開始していた咬傷を受けた少年への狂犬病暴露後発病予防を科学的根拠をもって中止することが出来た。第三に、

分担研究者

飯田 孝 東京都立衛生研究所  
主任研究員

高山直秀 東京都立駒込病院  
小児科医長

A. 研究目的

高度に医療技術の発達した今日でさえ、完全に撲滅できた感染症は天然痘の外ない。天然痘の自然宿主は人であり、ワクチン接種を行うことにより人から人への感染環を立ち切ることによって本病の根絶に成功した。一方、その他の感染症の場合、それらの病原体の本来の宿主が十分に解明されておらず、人や家畜での感染防御では病原体の抜本的排除に至っていないことを物語っている。したがって、病原体の自然宿主の特定、換え言すれば、病原体の自然界における感染環、生態を解明することは感染症の撲滅にとってきわめて重要なことと言える。そこで、本研究では新興・再興感染症の主体をなすと考えられる各種ズーノーシス病原体の感染環を明らかにすることを目的に、野生動物や検疫対象外の愛玩動物におけるツツガムシ病リケツチャ、狂犬病ウイルスおよび細菌（サルモネラ、大腸菌O157など）の保有状況を血清学的あるいは病原学的に調査する。すなわち、まず第一に、最近発生が全国的に拡大されているツツガムシ病リケツチャの大都会における侵淫状況をそこに生息しているドブネズミの抗体調査およびリケツチャ遺伝子の検出から調べる。第二に、我が国における狂犬病ウイルスの保有の有無を、疑わしいあるいは原因不明の神経症状を示した種々の動物を積極的に探し出してウイルス学的検査を実施して調べる。また、本研究の成果は、これまでの感染症を根絶する上で必要な基礎的データを提供するとともに、新興・再興感染症の予防や発生予測にも繋がる。特に、島国の日本にと

って輸入されてくる検疫対象外の小動物の調査は新病原体の侵入を遮断するための有効な手段といえる。

B. 研究方法

1) ツツガムシ病リケツチャについては、名古屋市の都市地域に生息するドブネズミにおけるツツガムシリケツチャに対する抗体と脾臓からの遺伝子の検出を行う。検体は過去10年間に亘り収集し、保存しておいたものと現在収集中の材料である。材料の採集は名古屋市生活衛生センターの協力で行われている。抗体調査は間接蛍光抗体法で、リケツチャ遺伝子は56kDタンパク質をコードする遺伝子をPCRで増幅し検出する。

2) 狂犬病については、我が国の主要な都市で開業している獣医師との間に連絡網を構築して、狂犬病が疑われるイヌ、ネコ、コウモリなどの症例があれば、直ちに分担研究者高山に連絡すると同時に、採取した検体を大分医科大学実験動物施設に送付し、送付された検体については、研究協力を依頼した大分医科大学万年和明助教授が逆転写PCR(RT-PCR)によって狂犬病ウイルス遺伝子を狂犬病を疑う動物の脳組織から検出する。今回は少年の手を噛んだ飼育中のコウモリの材料で行った。

3) 東京都内のペットショップで販売されている、または家庭で飼育されているフェレット、プレリードッグ、ハムスターなどの糞便及び飼育環境から主にサルモネラ、大腸菌O157などの病原菌の検索を菌の培養とPCRにより行なった。

C. 研究結果

1) 名古屋市に棲息するドブネズミにおけるツツガムシ病リケツチャの保有状況：  
ドブネズミにおけるKarp, KatoおよびGillia

m株に対するIFA抗体価はいずれの株に対する抗体価の分布も40倍を底とする二峰性を示したことから、抗体陽性限界を80倍とした。ドブネズミ959例のうち、いずれかの株で抗体陽性を示したのは22.9%であった。IFA抗体価が160倍以上の血清の66.7%がKarp株の特異蛋白をウエスタンブロットで検出し得たこと、また一部のIFA抗体陽性血清から中和抗体も検出されたことから、今回測定されたIFA抗体はきわめて特異性の高いことが伺われた。血清採取月別の抗体陽性率は秋から春にかけて高い群と春から夏にかけて高い群とが認められた。抗体陽性率は中川区や北区などの西部地区と東部丘陵沿いに位置する昭和区で高い傾向が認められたが、抗体は名古屋市全域で確認された。しかし、これまでのところPCRによるリケッチャ遺伝子は検出されなかった。以上の成績から、名古屋市のドブネズミにおいてツツガムシ病リケッチャが広く侵淫しているものと思われた。

## 2) 我が国に棲息しているコウモリからの狂犬病ウイルス検出の試み：

自宅に迷い込んだコウモリを捕獲して虫かごに入れておいたところ、少年が虫かごに手を触れてコウモリに左食指を咬まれた。咬み傷から出血したため近医を受診して、傷の手当と破傷風トキソイドの接種を受けた。看護婦である母親が狂犬病を心配して東京都立駒込病院小児科高山に電話で問い合わせてきた。これに対して、これまで日本国内のコウモリから狂犬病ウイルスが分離されたことはないの、加害コウモリが国産のコウモリであることが証明できれば、狂犬病ワクチン接種による曝露後発病予防は必要がないが、コウモリは検疫の対象外なので、外国から合法的ないし非合法的に国内に持ち込まれたコウモリであれば、狂犬病の危険を否定できない。したがって、まず捕獲してあるコウモリの種類を確定するべきであると説明した。母親は数カ所の動物園に電話で問い合わせたのち、種類を鑑別できそうな動物園にコウモリを持ち込んで鑑定を依頼した。しかし、動物園でもコウモリの種類を鑑別同定できなかったため、当院を受診した。加害コウモリが外国由来のコウモリであることを否定できない以上、咬傷被害者の安全のため、狂犬病曝露後発病予防を実施することにし、同時にコウモリの脳に狂犬病ウイルスがいるか否かの検索を行った。コウモリの脳組織をRT-PCRで検査したところ、狂犬病ウイルスRNAは陰性であった。RT-PCRの陰性結果報告が届いたため、少年に対して行っていたニワトリ胚細胞由来狂犬病不活化ワクチン接種による狂犬病曝露後免疫を4回目のワクチン接種を行って終了とした。その後少年は健康に過ごしている。

## 3) 各種ペット動物における人獣共通感染症起因菌保有調査

1996年から1998年の10、11月に、東京都多摩地区のペットショップ及び一般家庭で飼育されていた26種類342匹の動物を対象に腸管出血性大腸菌O157、サルモネラ、エルシニア、黄色ブドウ球菌、*L. monocytogenes*及びクラミジアの保有調査を行

った。その結果、8.2%(28/342)のペットから病原菌またはDNAを検出した。その内クラミジアが4.4%(15/342)で最も多く、次いでサルモネラの2.9%(10/342)、黄色ブドウ球菌の0.5%(2/342)、*L. monocytogenes*の0.2%(1/342)の順であった。腸管出血性大腸菌とエルシニアは検出されなかった。

クラミジアの動物種別検出率はほ乳類が4.2%(13/306)、は虫類が5.6%(2/36)と有意な関連はなかったが、サルモネラは、ほ乳類で1.0%(3/306)、は虫類では19.4%(7/36)で有意な関連が認められた( $p<0.05$ )。黄色ブドウ球菌は1996年に一般家庭のハムスター及びペットショップのハリネズミから各1株計2株分離された。そのコアグラゼ型は食中毒事例で良く報告されるⅢ型とⅠ型であったが、食中毒の原因物質であるエンテロトキシン非産生株であった。しかし、ハムスターから分離した株は、人で熱傷様の皮膚症状を起こす表皮剥脱A型毒素を産生し、その菌培養液中の毒素濃度は50,000倍と高い値を示したことから、菌が拡散するのを防ぐための衛生的な動物飼育の必要性が示唆された。1997年ミーアキャットから*L. monocytogenes*が分離されたが、人および動物に髄膜炎や敗血症などを起こす頻度が極めて低い血清型1/2cの菌であった。

クラミジアはさまざまな動物から毎年検出されたがその80%(12/15)は食肉目、げっ歯目の動物由来であり、それらの菌種はすべて人獣共通感染症起因菌の*C. psittaci*であった。

ペットショップで販売されていた動物の病原菌保有率は15.5%(11/71)で、一般家庭70軒で飼育されていた動物の8.6%(6/70)と比べて高く、両者の間に有意な関連が認められた( $p<0.05$ )。店舗内での動物相互間の感染が起きているか否かを明らかにするために、複数の動物から同じ血清型が分離されたサルモネラについて、RAPD法によるDNAのパターン分析を試みた。その結果、*S. Enteritidis* 2株はRAPDパターンが異なっていた。しかし、*S. Hvitittingfoss*の3株はRAPDパターンが同じであったことから、*S. Hvitittingfoss*を保有していた2匹のカメレオンとイグアナは同じ由来の菌に感染していたことが明らかになった。

## D. 考 察

都会におけるツツガムシ病の動態を検討するために名古屋市に棲息するドブネズミにおけるツツガムシ病リケッチャに対する抗体を測定したところ、22.9%の抗体陽性個体の存在が確かめられた。今回検出されたIFA抗体はウエスタンブロットや中和抗体価でも裏付けられたことから、極めて特異性の高いものと思われた。この抗体陽性率は野ネズミのそれより高く、ドブネズミの方がツツガムシリケッチャに高感受性であることが伺われた。検体採集月別によって陽性率におおよそ二大別されたが、これは名古屋地域に棲息するツツガムシが少なくとも二種類存在することが考えられた。しかし、ツツガムシリケッチャ遺伝子は検出されず、検体の採取時期の難しさが伺われた。以上の成績から、ツツガムシリケッチャは山野のみならず大都会にも広く分布していることが明らかとな

った。

現在まで日本をはじめ東南アジアにいるコウモリから狂犬病ウイルスは分離されていないが、南北アメリカ大陸に棲むコウモリの一部は古典的狂犬病ウイルスを保有しており、こうしたコウモリに咬まれて狂犬病を発病した症例が米国では年平均3例弱報告されている。またコウモリが生息する洞窟に調査に入った研究者が飛沫となって洞窟内に漂うコウモリの唾液を吸い込で狂犬病を発病したとの報告もある。現在日本ではコウモリをペットとして飼育する人々が少なからずいるといわれている。日本でコウモリは検疫対象外の動物であるため、コウモリの狂犬病常在地などから狂犬病ウイルスや近縁のリッサウイルスを保有するコウモリが合法的に輸入されたり、非合法的に日本に持ち込まれる可能性がある。それゆえ、国内でコウモリに咬まれた場合であっても、加害コウモリが日本土着のコウモリであることが証明できないかぎり、咬傷被害者が狂犬病を発病する可能性を否定できない。

「狂犬病」という和病名からは想像しがたいが、コウモリに咬まれた場合にも狂犬病を発病する可能性があることを医療関係者は知っておく必要がある。また、コウモリによる咬傷被害者から相談を受けた場合には、コウモリの調査により狂犬病の可能性が否定されるまでは狂犬病暴露後発病予防を受けるように助言するべきである。

東京都内で飼育されていたペットは人獣共通感染症のサルモネラを2.9%、黄色ブドウ球菌を0.5%、*L. monocytogenes*を0.2%、クラミジアを4.4%保有していることが明らかになった。これまでの報告でも、は虫類、特に水棲ガメにおけるサルモネラの保有率が高いことは良く知られているがリクガメ、イグアナ、カメレオンなどでも本菌の保菌率の高いことがわかった。従って、は虫類の飼育ではサルモネラによる人、特に小児への感染予防に重点をおいた飼育法を心掛けなければならないことが改めて確認できた。ペットショップで販売されている動物の病原菌保有率は一般家庭のそれに比べて約2倍高く、その原因の1つに1996年から1998年までに同じペットショップで2回以上病原菌が検出された店舗が5店あることがあげられる。これらの店舗では動物相互の感染が起きていることが考えられた。そこで、そのことを証明するために、複数の動物から同じ血清型が分離されたサルモネラについて、RAPD法によるDNAのパターン分析を試みた。その結果、S. HvitittingfossではRAPDパターンが同じであったことから、本菌を保有していた2匹のカメレオンとイグアナは同じ由来の菌に感染していたことが明らかになった。同一店舗内ではあるが飼育ケージが異なり、直接接触する機会がないイグアナとカメレオンが同じ由来のサルモネラを保菌していたことで、飼育者の手指を介した感染あるいはサルモネラで汚染された餌による感染などが考えられた。

## E. 結 論

1) ツツガムシ病リケツチャが山野のみならず大都会においても広く侵淫していることが明らかと

なった。

2) RT-PCRによるコウモリ脳の狂犬病ウイルス検査は陰性であったため、咬傷を受けた少年への狂犬病暴露後発病予防を科学的根拠をもって中止することが出来た。

3) 東京都内で飼育されていたペットは人獣共通感染症のサルモネラを2.9% (10/342)、黄色ブドウ球菌を0.5% (2/342)、*L. monocytogenes*を0.2% (1/342)、クラミジアを4.4% (15/342) 保有していることが明らかになった。また、病原菌またはDNAが検出された28匹の動物は無症状であった。したがって、動物から人への感染を予防するためには、動物との過度な接触を避け、排泄物はすぐに処理する、動物に触れたら手を洗う、定期的に飼育ケージの清掃と消毒等を行うことが重要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 飯田 孝, 神崎政子, 渡部浩文, 宮崎奉之, 丸山 務: 各種ペット動物における人獣共通感染症起因菌保有調査.  
日本獣医公衆衛生学雑誌 投稿中

### 2. 学会発表

- 1) 水野恵子, 杉山誠, 源宣之, 山下照夫, 内藤一夫: 名古屋市のドブネズミにおける *Orientia tsutsugamushi* の抗体調査.  
第126回日本獣医学会 講演発表(1998)
- 2) 飯田 孝, 神崎政子, 宮崎奉之: 各種小動物における人畜共通感染症起因菌の保有調査.  
第126回日本獣医学会 講演発表(1998)

## G. 知的所有権の取得状況

なし。

## 我が国における輸入狂犬病の動向調査

分担研究者 高山直秀 東京都立駒込病院小児科

### 研究要旨

狂犬病が疑われるイヌ、ネコ、コウモリなどの狂犬病ウイルス検査を実施できるように、主要な都市で開業している獣医師との間に連絡網を構築し、検体を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法（RT-PCR）により検査する体制を整えた。たまたま国内で少年が指をコウモリに咬まれたので、加害コウモリの脳を RT-PCR によって検査して狂犬病ウイルスに感染していないことを証明した。これにより、すでに開始していた、咬傷を受けた少年への狂犬病曝露後発病予防を科学的根拠をもって中止することができた。さらに、狂犬病ウイルスが我が国に侵入しているか否かを知るためには、人間に咬傷を加えた動物ばかりでなく、狂犬病を疑わせるような行動異常を示す動物や死因不明の動物に対しても RT-PCR による狂犬病ウイルス検査を実施することが必要である。

### A. 研究目的

我が国において、動物の狂犬病もヒトの狂犬病も 1957 年以降、1970 年の輸入例の 1 例を除いて、発生の報告がない。しかしながら、発生の報告がないことと、実際に発生がないことは同じではない。我が国では狂犬病発生件数は医師および獣医師の届け出に基づいて公表されている。したがって、医師や獣医師に狂犬病の臨床経験がなければ、狂犬病を見逃し、届け出ることがないため、発生件数はゼロのままとなる可能性が大きい。こうした状況で狂犬病発生件数を知るためには、臨床診断のみに拠らず、疑わしい症例には積極的にウイルス学的検査を実施して、狂犬病ウイルス保有の有無を確認する必要がある。

### B. 研究方法

我が国の主要な都市で開業している獣医師との間に連絡網を構築して、狂犬病が疑

われるイヌ、ネコ、コウモリなどの症例があれば、ただちに分担研究者高山に連絡すると同時に、採取した検体を大分医科大学実験動物施設に送付し、送付された検体については、研究協力を依頼した大分医科大学万年和明助教授が下記の方法で狂犬病ウイルス検査を行うこととした。狂犬病ウイルス検査は逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法（RT-PCR）によって行った。すなわち、狂犬病ウイルス感染を疑う動物の脳組織などに、ウイルス遺伝子 RNA および感染細胞内で合成されたウイルスメッセンジャー RNA (mRNA) が存在すかどうかを RT-PCR 法で検出した。狂犬病ウイルス感染を疑う動物の脳などの組織の一部を乳剤とした後、フェノール・クロロホルムで細胞膜や蛋白成分を分解し、細胞の遺伝子やウイルス RNA をエタノール沈殿で回収する。この RNA を鋳型にして、狂犬病ウイルス N 蛋白をコードする遺伝子配列のうち、約 3

00塩基を挟む位置の20-24塩基配列のプライマーセットに、逆転写酵素を用いて第一次cDNA鎖を試験管内で合成する。次に、第一次DNAを鋳型にして、プライマーセットと耐熱性DNA合成酵素を用いて、ウイルス特異的2本鎖DNAを合成し、合成されたcDNAをポリアクリルアミドゲル電気泳動したのち、エチジウムブロマ이드で染色して観察した。RT-PCR陽性対照としては、狂犬病ウイルス株感染発症マウス脳乳剤を用いた。

### C. 研究結果

自宅に迷い込んだコウモリを捕獲して虫かごに入れておいたところ、少年が虫かごに手を触れてコウモリに左示指を咬まれた。咬み傷から出血したため近医を受診して、傷の手当と破傷風トキシノイドの接種を受けた。看護婦である母親が狂犬病を心配して東京都立駒込病院小児科高山に電話で問い合わせてきた。これに対して、これまで日本国内のコウモリから狂犬病ウイルスが分離されたことはないので、加害コウモリが国産のコウモリであることが証明できれば、狂犬病ワクチン接種による曝露後発病予防は必要がないが、コウモリは検疫の対象外なので、外国から合法的ないし非合法的に国内に持ち込まれたコウモリであれば、狂犬病の危険を否定できない。したがって、まず捕獲してあるコウモリの種類を確定するべきであると説明した。母親は数カ所の動物園に電話で問い合わせたのち、種類を鑑別できそうな動物園にコウモリを持ち込んで鑑定を依頼した。しかし、動物園でもコウモリの種類同定できなかったため、当院を受診した。加害コウモリが外国由来のコウモリであることを否定できない以上、咬傷被害者の安全のため、狂犬病曝露後発病予防を実施することにし、同時にコウモリの脳に狂犬病ウイルスがいるか否

かの検索を行った。

コウモリの脳組織をRT-PCRで検査したところ、狂犬病ウイルスRNAは陰性であった。RT-PCRの陰性結果報告が届いたため、少年に対して行っていたニワトリ胚細胞由来狂犬病不活化ワクチン接種による狂犬病曝露後免疫を4回目のワクチン接種を行って終了とした。その後少年は健康に過ごしている。

### D. 考察

現在まで日本をはじめ東南アジアにいるコウモリから狂犬病ウイルスは分離されていないが、南北アメリカ大陸に棲むコウモリの一部は古典的狂犬病ウイルスを保有しており、こうしたコウモリに咬まれて狂犬病を発病した症例が米国では年平均3例弱報告されている。またコウモリが生息する洞窟に調査に入った研究者が飛沫となって洞窟内に漂うコウモリの唾液を吸い込で狂犬病を発病したとの報告もある。現在日本ではコウモリをペットとして飼育する人々が少なからずいるといわれている。日本でコウモリは検疫対象外の動物であるため、コウモリの狂犬病常在地などから狂犬病ウイルスや近縁のリッサウイルスを保有するコウモリが合法的に輸入されたり、非合法的に日本に持ち込まれる可能性がある。それゆえ、国内でコウモリに咬まれた場合であっても、加害コウモリが日本土着のコウモリであることが証明できないかぎり、咬傷被害者が狂犬病を発病する可能性を否定できない。「狂犬病」という和病名からは想像しがたいが、コウモリに咬まれた場合にも狂犬病を発病する可能性があることを医療関係者は知っておく必要がある。また、コウモリによる咬傷被害者から相談を受けた場合には、コウモリの調査により狂犬病の可能性が否定されるまでは狂犬病曝露後発病予防を受けるように助言するべきであ

る。

#### E. 結論

今回は RT-PCR によるコウモリ脳の狂犬病ウイルス検査は陰性であったため、咬傷を受けた少年への狂犬病曝露後発病予防を科学的根拠をもって中止することができ、少年も保護者も狂犬病発病の不安を残さずにすんだ。このような検査は狂犬病曝露後

発病予防が必要か否かを決定するうえで不可欠であり、今後さらに検討を続ける。さらに、狂犬病ウイルスが我が国に侵入しているか否かを知るためには、人間に咬傷を加えた動物ばかりでなく、狂犬病を疑わせるような行動異常を示す動物や死因不明の動物に対しても RT-PCR による狂犬病ウイルス検査を実施することが必要である。

各種ペット動物における人獣共通感染症起因菌保有調査

国庫補助金精算所要額 2,000,000 研究期間 1998 年度

分担研究者 飯田孝 （都立衛生研究所）

**研究要旨** 東京都内で飼育されている犬猫以外の各種ペットの人獣共通感染症起因菌保有状況を調査して 8.2 % の動物から病原菌または DNA が検出された。加えて分子生物学的検出法により感染経路の解明も行い、ペットショップ内で動物間に感染が起きていることを明らかにした。

**A. 研究目的**

近年、イグアナ、プレーリードック、フェレットといったこれまで一般家庭で余り飼育されていなかった動物がペットとして飼育されるようになった。それらの多くが輸入動物で、年々増加の傾向にある。これらの動物は屋内飼育のものが多いため屋外飼育のペットに比べて、人獣共通感染症が発生し易い状況にある。しかし、現在ペットとして飼育されている犬猫以外の各種小動物が、どのような人獣共通感染症起因菌をどの程度保有しているのか、一部の動物を除いてほとんどわかっていない。そこで、動物から人、人から動物への感染を予防する目的で、ペットショップと一般家庭で飼育中の動物を対象に保有調査を行い、その実態を明らかにするとともに感染源の疫学的解析を試みた。

**B. 研究方法**

1996 年から 1998 年の 10、11 月に、東京都多摩地区のペットショップ 71 店舗及び一般家庭 70 軒で飼育されていたプレーリードック、フェレットなどの動物の糞便を用いて人獣共通感染症起因菌の保有調査を行った。調査は腸管出血性大腸菌 O157、サルモネラ、エルシニア、黄色ブドウ球菌、*L.monocytogenes* 及びクラミジアについて実施した。検査材料

である糞便は 9 倍量の生理食塩液で混和した細菌用検体液と 9 倍量の SPG (sucrose phosphate glutamine) で混和したクラミジア検体液とした。

**菌の分離・同定：**細菌用検体液 1ml をサルモネラはラパポート培地、エルシニアは PBS、*L.monocytogenes* は UVM 培地各 9ml に加え増菌後、それぞれ DHL、CIN 及びパルカムで分離した。黄色ブドウ球菌は卵黄加マンニット食塩寒天培地に直接細菌用検体液を塗抹して培地上に発育した集落を釣菌した。その後、サルモネラは血清型、黄色ブドウ球菌はコアグラゼ型、エンテロトキシン、表皮剥脱毒素、毒素性ショック症候群毒素 (TSST-1) の産生能及びメチシリン耐性 MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) を調べた。*L.monocytogenes* は家兎で作製した自家血清により血清型を決定した。

**免疫学的検査：**腸管出血性大腸菌 O157 は mEC 培地で増菌後、BHI 培地で再度増菌した液を 100 °C、10 分間煮沸して VIDAS (自動免疫蛍光測定装置) により検査した。

**分子生物学的検査：**VIDAS で陽性となり腸管出血性大腸菌 O157 の存在が疑われた検体は、PCR 法によりベロ毒素産生遺伝子を調べた。クラミジアはクラミジア検体液から

鋳型 DNA を作製し、この鋳型 DNA から Nested PCR を用いて調べた。得られた増幅産物はアガロースゲル電気泳動で確認した。クラミジアの種は Nested PCR 増幅産物を 8 種類の制限酵素 *Alu* I、*Hae* III、*Hind* III、*Mbo* I、*Pvu* II、*Sac* I、*Spa* I 及び *Dde* I で切断して、PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) により DNA 断片を展開して確認した。

複数の動物から分離された *Salmonella* Hvittingfoss と *S. Enteritidis* は GC 含量が 50-70 % の 5 種類のプライマーで RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法を行い、DNA 解析により菌の由来を調べた。

### C. 結果と考察

1996 年から 1998 年の 10、11 月に、東京都多摩地区のペットショップ及び一般家庭で飼育されていた 26 種類 342 匹の動物を対象に腸管出血性大腸菌 O157、サルモネラ、エルシニア、黄色ブドウ球菌、*L. monocytogenes* 及びクラミジアの保有調査を行った。その結果、8.2 % (28/342) のペットから病原菌または DNA を検出した。その内クラミジアが 4.4 % (15/432) で最も多く、次いでサルモネラの 2.9 % (10/342)、黄色ブドウ球菌の 0.5 % (2/342)、*L. monocytogenes* の 0.2 % (1/342) の順であった。腸管出血性大腸菌とエルシニアは検出されなかった。

クラミジアの動物種別検出率はほ乳類が 4.2 % (13/306)、は虫類が 5.6 % (2/36) と有意な関連はなかったが、サルモネラは、ほ乳類で 1.0 % (3/306)、は虫類では 19.4 % (7/36) で有意な関連が認められた ( $p < 0.05$ )。これまでの報告でも、は虫類、特に水棲ガメにおけるサルモネラの保有率が高いことは良く知られているがリクガメ、イグアナ、カメレオンなどでも本菌の保菌率の高いことがわかった。従って、は虫類の飼育ではサルモネラによる人、特に小児への感染予防に重点をおいた飼育法を心掛けなければならないことが改めて

確認できた。

黄色ブドウ球菌は 1996 年に一般家庭のハムスター及びペットショップのハリネズミから各 1 株計 2 株分離された。そのコアグラーゼ型は食中毒事例で良く報告される III 型と I 型であったが、食中毒の原因物質であるエンテロトキシン非産生株であった。しかし、ハムスターから分離した株は、人で熱傷様の皮膚症状を起こす表皮剥脱 A 型毒素を産生し、その菌培養液中の毒素濃度は 50,000 倍と高い値を示したことから、菌が拡散するのを防ぐための衛生的な動物飼育の必要性が示唆された。

1997 年ミーアキャットから *L. monocytogenes* が分離されたが、人および動物に髄膜炎や敗血症などを起こす頻度が極めて低い血清型 1/2c の菌であった。

クラミジアはさまざまな動物から毎年検出されたがその 80 % (12/15) は食肉目、げっ歯目の動物由来であり、それらの菌種はすべて人獣共通感染症起因菌の *C. psittaci* であった。

ペットショップで販売されていた動物の病原菌保有率は 15.5 % (11/71) で、一般家庭 70 軒で飼育されていた動物の 8.6 % (6/70) と比べて高く、両者の間に有意な関連が認められた ( $p < 0.05$ )。その原因の 1 つに 1996 年から 1998 年までに同じペットショップで 2 回以上病原菌が検出された店舗が 5 店あることがあげられる。これらの店舗では動物相互の感染が起きていることが考えられた。そこで、そのことを証明するために、複数の動物から同じ血清型が分離されたサルモネラについて、RAPD 法による DNA のパターン分析を試みた。その結果、*S. Enteritidis* 2 株は RAPD パターンが異なることから、由来が違う菌であることがわかった。しかし、*S. Hvittingfoss* の 3 株は RAPD パターンが同じであったことから、*S. Hvittingfoss* を保有していた 2 匹のカメレオンとイグアナは同じ由来の菌に感染していたことが明らかになった。同一店舗内では

あるが飼育ケージが異なり、直接接触する機会がないイグアナとカメレオンが同じ由来のサルモネラを保菌していたことで、飼育者の手指を介した感染あるいはサルモネラで汚染された餌による感染などが考えられた。

#### D. 結論

東京都内で飼育されていたペットは人獣共通感染症のサルモネラを 2.9 % (10/342)、黄色ブドウ球菌を 0.5 % (2/342)、*L.monocytogenes* を 0.2 % (1/342)、クラミジアを 4.4 % (15/432) 保有していることが明らかになった。これらの動物種の中には検疫をしないまま、わが国に輸入されてペットショップで売られているものがあることを考えると、さらに多くの病原体を対象とした動物の保有調査が必要である。今回、病原菌または DNA が検出された 28 匹の動物は無症状であり、飼育者が動物の状態から病原菌の保有を知ることは不可能に近い。そこで、動物から人への感染を予防するためには、動物との過度な接触を避け、排泄物はすぐに処理する、動物に触れたら手を洗う、定期的に飼育ケージの清掃と消毒等を行うことが重要である。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

各種ペット動物における人獣共通感染症起因菌保有調査

飯田 孝、神崎政子、渡部浩文、宮崎奉之  
日本獣医公衆衛生学雑誌 投稿中

##### 1. 学会発表

各種小動物における人畜共通感染症起因菌の保有調査

飯田 孝、神崎政子、宮崎奉之  
第 126 回獣医学会 1998 年

## 各種ペット動物における人獣共通感染症起因菌保有調査

飯田 孝<sup>1)</sup>，神崎政子<sup>1)</sup>，渡部浩文<sup>2)</sup>，宮崎奉之<sup>1)</sup>，丸山 務<sup>3)</sup>

- 1) 東京都立衛生研究所 (〒 169-0073 新宿区百人町 3-24-1)
- 2) 東京都衛生局環境衛生部獣医衛生課 (〒 163-8001 新宿区西新宿 2-8-1)
- 3) 麻布大学 環境保健学部 (〒 229-0006 相模原市淵野辺 1-17-71)

### 要 約

東京都多摩地区のペットショップ及び一般家庭で飼育されていたイグアナ，プレーリードック，カメレオンなどの愛玩動物における腸管出血性大腸菌 O157，サルモネラ，エルシニア，黄色ブドウ球菌，*Listeria monocytogenes* 及びクラミジアの保有調査を 1996 及び 1997 年の 10，11 月に行った．その結果，1996 年に調査した計 140 匹の動物の糞便のうち，サルモネラが 3 検体 (2.1%)，黄色ブドウ球菌が 2 検体 (1.4%)，クラミジアが 8 検体 (5.7%) から検出された．1997 年には，計 101 匹の糞便のうちサルモネラが 5 検体 (5.0%)，*L.monocytogenes* が 1 検体 (1.0%)，クラミジアが 4 検体 (4.0%) から検出された．

キーワード：エキゾチックアニマル，人獣共通感染症起因菌，保菌調査，野生動物

### A. 研究目的

近年，イグアナ，プレーリードック，フェレットといった，これまで一般家庭で飼育されていなかった動物がペットとして飼育されるようになった．その多くが輸入動物で，その数や種類は年々増加の傾向にある．こうした背景には犬や猫はスペースが狭くて飼えない，鳴き声が近所の迷惑になるなど，住宅事情によるものの外に飼育に手間がかからない動物，あるいは珍しい動物を飼ってみたいといった人が増えて来ることが考えられる．これらの動物は屋内飼育のものが多く，そのために屋外で飼育されているペット動物に比べて人の生活と密接に関わりを持つことから，人獣共通感染症が発生し易い状況にある．さらに，これから迎える少子高齢化社会では生活の伴侶としてのペット動物の需要が増すいっぽう

で，一般の人より免疫力が弱く，感染症に罹りやすい高齢者や幼児の人獣共通感染症起因菌による感染予防が重要な問題となってくる．

しかし，現在ペットとして飼育されている犬猫以外の各種小動物が，どのような人獣共通感染症起因菌を，どの程度保有しているのか，一部の動物を除いて[2，8]，ほとんどわかっていない．そこで，動物から人，人から動物への感染を予防する目的で，人獣共通感染症の中で人に食中毒を起こすことが知られている腸管出血性大腸菌 O157，サルモネラ，エルシニア，黄色ブドウ球菌及び食品媒介感染症起因菌として重要な *Listeria monocytogenes*，人に肺炎を起こすクラミジアについてペットショップと一般家庭で飼育中の動物を対象に保菌調査を行い，その実態を明らかにするととも

に、感染源の疫学的解析を試みた。

## B. 研究方法

1996 年及び 1997 年の 10, 11 月に、東京都多摩地区のペットショップ 54 店舗及び一般家庭 52 軒で飼育されていたイグアナ、フェレット、サルなど表 1 に示した動物の糞便を用いて腸管出血性大腸菌 O157, サルモネラ, エルシニア, 黄色ブドウ球菌, *L.monocytogenes* 及びクラミジアについて調査した。採取した動物の糞便は乾燥を防ぐために採便管 a) に寒天 b) を 17g/l 追加したキャリブレアー培地 5ml を入れ、固化したその培地上に載せて 4℃ で運搬した。検査は 6 時間以内に実施したが、採取した日に検査できなかった糞便は 4℃ に保存して 30 時間以内に検査した。1 匹の動物から採取した糞便を 1 検体としたが、動物によってはケージ内で 2 匹以上飼育していて糞便と個体を特定できなかったものがあったので、この糞便は 1 検体と数えた。採便管は 2 本用意し、1 本は細菌検査用、1 本はクラミジア検査用とした。細菌検査用糞便は重量を測定して、その 9 倍量の生理食塩液を加え、約 1 時間後に柔らかくなった糞便を混和して細菌用検体液とした。クラミジア検査用糞便は 50mg をマイクロ遠心チューブに取り、9 倍量の SPG (sucrose phosphate glutamine) を加えて、クラミジア用検体液とした。

a) サンプラテック, 大阪

b) Difco, USA

c) 栄研化学, 東京

d) デンカ生研, 東京

菌の分離・同定：サルモネラは細菌用検体液 1ml を 9ml のラパポート培地に加え、37℃, 48 時間増菌した。その培養液は、DHL

寒天培地 c) に画線塗抹して 37℃, 24 時間培養後に釣菌した。菌は TA (tryptose agar) 培地 b) で単離後、TSI 培地 c) でブドウ糖を発酵し、硫化水素の産生があり、LIM 培地 c) でリジン陽性、インドール陰性、運動性があり、シモンズ培地 c) でクエン酸を利用できたものをサルモネラとした。その後、TA 培地で増菌した菌を用いて、スライドガラス板凝集テストにより O 血清型及び試験管凝集テストにより H 血清型を決め、両血清型の結果を基にサルモネラの血清型を決定した。

エルシニアは細菌用検体液 1ml を 1/15M PBS (pH7.4) 9ml に加え、4℃ で 3 週間増菌した培養液をアルカリ処理 [4] した上で、CIN 寒天培地 b) に画線塗抹して 30℃, 24 時間培養後に釣菌した。菌は TA 培地で単離後 TSI 培地でブドウ糖、乳糖及び白糖のどちらか、又は両方の発酵が認められ、LIM 培地でリジン陰性、運動性がなく、クリステンゼンウレア培地 c) でウレアを分解した菌をエルシニアとした。

黄色ブドウ球菌は、細菌用検体液を卵黄加マンニット食塩寒天培地 c) にガラス棒で塗抹後 35℃, 18 時間培養して卵黄反応陽性、マンニット発酵、コアグララーゼ陽性、黄色色素を産生する菌を釣菌した。TA 培地で単離したブドウ球菌は、コアグララーゼ型別用免疫血清 d) によりコアグララーゼ型を決定した。エンテロトキシン、表皮剥脱毒素及び毒素性ショック症候群毒素 (TSST-1) の産生能は逆受身ラテックス試験 d) により調べた。また、メチシリン耐性 (MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) 試験はオキサリシンディスク e) を用いて行った。

*L. monocytogenes* は細菌用検体液 1ml を 9ml の UVM 培地 b) に加え 30℃, 48 時間増菌した後 PALCAM 寒天培地 f) に画線塗抹して 30℃, 48 時間培養後に釣菌した。

菌は TA 培地で単離後性状を調べラムノース発酵, キシロース, マンニトール非発酵で溶血性があり, 半流動普通寒天培地で 30℃ 培養して運動性が認められた菌を *L.monocytogenes* とした. 分離菌の血清型は家兎で作製した自家型別血清[3]を用いて決定した.

免疫学的検査: 腸管出血性大腸菌 O157 の検出は細菌用検体液 1ml を 9ml の mEC 培地 h) で 40℃, 24 時間培養後その 1ml を 3ml の BHI (brain heart infusion) 培地 b) に添加して 37℃ で 6 時間培養した液を 100℃, 10 分間煮沸して VIDAS g) により実施した.

分子生物学的検査: VIDAS で陽性となり腸管出血性大腸菌 O157 の存在が疑われた検体は, PCR 法によりベロ毒素産生遺伝子の検出を試みた. 検体は VIDAS の検査に用いた培養液を 13,000g, 10 秒間遠心分離した上清を使用した. 検査は腸管出血性大腸菌 VT 遺伝子検出用プライマー i) を用いて PCR 法で行った. DNA の増幅はサーマルサイクラー j) で最初 94℃, 1 分間反応させた後 55℃ で 1 分間, その後 72℃ で 1 分間の反応を 1 サイクルとして合計 35 サイクル行った. 得られた増幅産物は 1.5% アガロースゲルで 100V, 40 分間電気泳動 k) を行った. その後 1 μg/ml のエチジウムブロマイドで 40 分間染色した後 360nm の紫外線を照射して増幅産物を確認した.

クラミジアはクラミジア用検体液を 500g, 5 分間遠心分離して得た上清液を, さらに 13,000g, 30 分間遠心分離して沈渣を得た. これに 200 μg/ml のプロテナーゼ K 添加溶菌緩衝液 (50mM Tris HCl:pH8.4, 1mMEDTA, 0.5%Tween20) を加え 55℃, 2 時間反応して鋳型 DNA を作製した. この鋳型 DNA からクラミジアの主要外膜蛋白をコードする遺伝子 (*ompA*) を増幅する 2 組のプライマーを用いて Nested

PCR[10]を行った. その増幅産物は 1.5% アガロースゲル電気泳動により確認した

複数の動物から分離された *Salmonella* Hvittingfoss と *S.Enteritidis* は RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法[6]により DNA 解析を行った. プライマーは, GC 含量が 50-70% の 5 種類 (AP41,AP42,AP43,AP46,AP47) [6] を用いた.

—

e) ベクトン・デッキンソン, USA

f) Merck, ドイツ

g) VITECsystems, 日本ビオメリユー・バイテック, 東京

h) 極東製薬, 東京

i) タカラ酒造, 大津

j) PTC-200 Peltier Thermal Cycler, フナコシ, 東京

k) ミューピット, 第一化学, 東京

## C. 研究結果

1996 及び 1997 年の 10, 11 月に, 東京都多摩地区のペットショップ及び一般家庭で飼育されていた 241 匹の動物を対象に人獣共通感染症起因菌である腸管出血性大腸菌 O157, サルモネラ, エルシニア, 黄色ブドウ球菌, *L. monocytogenes* 及びクラミジアの保有調査を行った. 供試した動物種と数は, 表 1 に示した. 表 2 に分離又は検出した菌と菌を保有していた動物及びその飼育場所を示した. 1996 年は供試した 140 検体のうちサルモネラが 3 検体 (2.1%), 黄色ブドウ球菌が 2 検体 (1.4%), クラミジアが 8 検体 (5.7%) から検出された. 分離されたサルモネラ 3 株の血清型は *S. Virchow*, *S. Fluntern*, *S. Montevideo* であった. 1997 年は供試した 101 検体のうちサルモネラが 5 検体 (5.0%), *L. monocytogenes* が 1 検体 (1.0%), クラミ

ジアが 4 検体 (4.0 %) から検出された。分離されたサルモネラ 5 株の血清型は *S.Hvitvingfoss* が 3 株, *S.Enteritidis* が 2 株であった。

クラミジアは 12 例とも *C.psittaci* であった。なお、腸管出血性大腸菌 O157 及び *Y.enterocolitica* は検出されなかった。

黄色ブドウ球菌は一般家庭のハムスターからコアグラーゼⅢ型、ペットショップのハリネズミからⅠ型が分離された。表皮剥脱毒素は一般家庭のハムスターから 50,000 倍の凝集価を示す A 型毒素が検出されたが、ハリネズミから分離した菌は非産生株であった。これら 2 株は、TSST-1 及びエンテロトキシン非産生株で MRSA 株ではなかった。

ミーアキャットから分離した *L.monocytogenes* の血清型は 1/2C であった。

1996 年及び 1997 年に実施した 2 回の調査で 54 店舗のペットショップを検査し、14.8 % (8/54) の店舗から病原菌が検出された。いっぽう、一般家庭では 52 軒から 11.5 % (6/52) 病原菌が検出された。

ペットショップの動物から分離された菌の感染源を明らかにする目的で血清型が同じ *S.Hvitvingfoss* 3 株, *S.Enteritidis* 2 株を用いて、RAPD 法による DNA 解析を行った (図)。その結果、異なるペットショップで飼育されていたリスとモルモットから分離した *S.Enteritidis* は RAPD パターンが異なっていたが、同じペットショップで飼育されていた 2 匹のカメレオンとイグアナから分離された *S.Hvitvingfoss* は 3 株とも同じパターンを示し、菌の由来が同じであることがわかった。

#### D. 考 察

241 匹のペット動物を対象に人獣共通感染症起因菌の腸管出血性大腸菌 O157, サ

ルモネラ, エルシニア, 黄色ブドウ球菌, *L.monocytogenes* 及びクラミジアの保菌調査を行い、9.5 % (23/241) のペット動物から病原菌を検出した。その内クラミジアが 52.2 % (12/23) で最も多く、次いでサルモネラの 34.8 % (8/23), 黄色ブドウ球菌の 8.7 % (2/23), *L.monocytogenes* の 1 株 4.3 % (1/23) の順であった。クラミジアの動物種別検出率はほ乳類の 5.0 % (11/219) と、は虫類の 4.6 % (1/22) の間に有意な関連はなかったが、サルモネラは、ほ乳類の 1.4 % (3/219) と、は虫類の 22.7 % (5/22) の間に有意な関連が認められた ( $p<0.05$ )。これまでの報告でもは虫類、特に水棲ガメにおけるサルモネラの保菌率の高いことは良く知られているが [8] カメ (陸ガメ), イグアナ, カメレオンなどでも本菌の保菌率の高いことがわかった。従って、は虫類の飼育ではサルモネラによる人への感染予防に重点をおいた飼育法を心掛けなければならないことが改めて確認できた。

黄色ブドウ球菌は自然界に広く分布し、人や動物の化膿性疾患や食中毒の起因菌として公衆衛生および食品衛生において重要視されている [9]。この黄色ブドウ球菌が産生するコアグラーゼはⅠ～Ⅷ型に分類されているが、今回分離されたのはハムスター由来株がⅢ型、ハリネズミ由来株はⅠ型で、食中毒由来菌株によく見られる型であった。しかし、2 株とも食中毒の原因物質であるエンテロトキシンは産生しない株であったが、この内の 1 株は人で熱傷様の皮膚症状を起こす表皮剥脱 A 型毒素 [5] が一般家庭で飼育中のハムスターから分離された。この菌の毒素濃度は培養液で 50,000 倍と高い値を示したことから、このような菌を保有する動物の飼育は衛生的に行う必要がある。

*L.monocytogenes* は人および動物に髄膜炎や敗血症などを起こすことが知られてお

り、血清型は13に分類されている[1]。その中で4b,1/2a,1/2bの3血清型はリステリア症の患者から分離される菌の約90%を占めている[7]。しかし、今回ミーアキャットから分離された*L.monocytogenes*は患者から分離される割合の低い血清型1/2cの菌であった[7]。

クラミジアの検出率は5.0%(12/241)で、今回調査した病原細菌の中で検出率が最も高く、さまざまな動物から検出されたが中でも食肉目、げっ歯目の動物から75%(9/12)も検出されている。それらの菌種はすべて人獣共通感染症起因菌の*C. psittaci*であった。

今回実施したペットショップで販売されていた動物の病原菌保菌率は14.8%(8/54)で、一般家庭で飼育されていた動物の11.5%(6/52)の間に有意な差は認められなかった。

複数の動物から同じ血清型の菌が分離されたサルモネラについて、分子生物学的検査法の1つであるRAPD法によるパターン分析を試みた。その結果、*S.Enteritidis*の2株はRAPDパターンが異なり、2つの株の由来が異なっていることがわかった。しかし、*S.Hvitittingfoss*の3株は同じパターンを示したことから、*S.Hvitittingfoss*を保有していた2匹のカメレオンとイグアナは同じ由来の菌に感染していたことが明らかになった。飼育ケージが異なり、直接接触する機会がないイグアナとカメレオンが同じサルモネラを保菌していたことで、飼育者の手指を介した感染あるいはサルモネラで汚染された餌による感染などが考えられた。

今回調査した動物種の中には検疫をしないまま、わが国に輸入されてペットショップで売られているものがあることを考えると、さらに多くの病原体について保菌を明らかにする必要がある。また、病原菌が分離された23匹の動物は無症状であったこ

とから、飼育者が動物の状態を見て病原菌の保有を知ることは不可能に近い。そこで、ペットから人への感染を予防するためには、動物との過度な接触を避け、排泄物はすぐに処理する、動物に触れたら手を洗う、定期的に飼育ケージの清掃と消毒を行う等のことを実行することが重要である。

#### 文献

- [1] Fennema OR, Karel M, Sanderson GW, Tannenbaum SR, Walstra P, Whitaker JR : Foodborne Listeriosis. In Elliot TR, et al eds, 22-32, Dekker Inc Press, New York (1991)
- [2] 福島博,丸山務,金子賢一,井上正直 : 日獣会誌, 42, 829-840 (1989)
- [3] 飯田孝 : 臨床と微生物, 123, 699-702 (1996)
- [4] 金子誠二,神保勝彦,小久保彌太郎,松本昌雄,丸山 務 : 食衛誌, 25, 424-429 (1984)
- [5] Kondo I, Sakurai S, Sarai Y : Infect Immun., 8, 156-164 (1973)
- [6] Makino S, Okada Y, Maruyama T, Kaneko S, Sasakawa C : J clin Microbiol, 32, 65-69 (1994)
- [7] McLauchlin. J : Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 9, 210-213 (1990)
- [8] 岡崎留美,田中豊隆,小泉清明,池沢聖明,宇井昌生,高橋宗和,早野剛,神崎政子,丸山務,松本昌雄 : 日獣会誌, 38,452-455 (1985)
- [9] 食中毒予防必携, 厚生省生活衛生局監修, 41-49, 社団法人 日本食品衛生協会, 東京 (1998)
- [10] Takashima I, Imai Y, Itoh N, Kariwa H, Hashimoto N : Microbiol Immunol, 40, 21-26 (1996)