

頸部リンパ節炎などの症状を呈する患者も認められ、*C.burnetii* 感染により引き起こされる症状は多彩であることが示唆された。また、慢性疲労症候群様患者31.8%の血液中に*C.burnetii* 遺伝子を確認したが、検出率は一般健康人との間に明らかな有意差がありMINO投与により治療効果が確認されたことからPost Q fever fatigue syndromeの存在が示唆された。

一方、ウシにおいては生乳から36.8%、血液から50%と高率に*C.burnetii* が分離され、ウシの間にコクシエラ症が広く浸淫していることが示唆された。また、ウシでは不顕性感染が多いことが明らかになった。さらに、抗体検査の結果から、感染初期にはリケッチア血症を呈し、後に*C.burnetii* が乳汁中に移行する感染様式が存在する可能性が示唆された。

## E 結論

ヒトのコクシエラ症を臨床的に診断するためには、指標となる本症に特徴的な症状の把握が不可欠であるが、現段階では他の病原体による感染を否定したうえで本症の可能性を考えているのが現状である。本研究において*C.burnetii* 感染が引き起こす症状が多彩であること、さらに従来の典型的急性Q熱の症状以外にPostQ fever fatigue syndromeという新たなカテゴリーの症状が存在することが示唆された。この結果は、現段階では臨床診断に直結するものではないが、少なくとも医学領域における専門家へ啓蒙することで、これまで原因不明とされてきた疾患の中には*C.burnetii* 感染が含まれるという可能性を考えるための一助となるものであると思われる。また、今回の疫学的研究において、ヒトのコクシエラ症が全国的に存在していることが明確となった。今後、臨床症状や生化学的データから本症を疑うことができるような診断基準を把握するために、詳細な疫学調査を続行する必要があると思われる。さらに、本症の予防対策上感染源、感染経路の解明は必須の課題であるが、動物における不顕性感染が多いことは、本研究におけるウシの浸淫状況からも明らかであり、これら無症状の動物が感染源となり得る可能性は大きい。今後は、ヒトを含めた各種動物における*C.burnetii* の感染様式を明確にすることが重要であると思われる。加えて、不顕性感染の動物やヒトに対する治療方針を検討することは本症の蔓延を防ぐ意味で大き

な意味を持つものと考えられる。

## F 研究発表

### 1.論文発表

- 1) 長岡宏美、山本茂貴：犬と猫のコクシエラ症，獣医畜産新報，52:935-938,1999.
- 2) 長岡宏美、杉枝正明、秋山真人、仁科徳啓、赤羽荘資、山本茂貴：静岡県における犬および猫の *Coxiella burnetii* 感染症の疫学，日獣会誌，51:323-325,1998.
- 3) Nagaoka,H., Sugieda,M., Akiyama, M., Nishina,T., Akahane,S and Fujiwara, K. : Isolation of *Coxiella burnetii* from the vagina of feline clients at veterinary clinics. J.Vet. Med. Sci. 60:251-252, 1998.
- 4) Nagaoka,H., Sugieda,M., Nakamura, N., Yamamoto,S and Hirai,K. : Q fever in Japan. Proceedings of 2 nd International Symposium on Lyme Disease in Japan. 'Emerging and Re-emerging Disease Transmitted by Arthropod Vector and Rodents' (1997,10,Shizuoka)

### 2.学会発表

- 1) 長岡宏美：Q熱の分離・家族内感染例と感染経路、衛生微生物協議会第18回研究会(1997.7)
- 2) 長岡宏美、杉枝正明、秋山真人、仁科徳啓：Q熱の家族内感染例と感染経路の検討、平成9年度日本獣医公衆衛生学会・中部(1997.8)
- 3) 長岡宏美、杉枝正明、秋山真人、仁科徳啓：Q熱の家族内感染例と感染経路の検討、平成9年度日本獣医公衆衛生学会年次大会(1998.2)
- 4) 長岡宏美、佐原啓二、杉枝正明、山本茂貴：家畜盲腸内容物および糞便からのQ熱病原体遺伝子の検出、第126回日本獣医学会(1998.8)
- 5) 長岡宏美、杉枝正明、宮本秀樹、中村信也、山本茂貴：不定愁訴症候群患者からのQ熱病原体遺伝子の検出、平成10年度日本獣医公衆衛生学会年次大会(1999.2)
- 6) 長岡宏美、山本茂貴：イヌとネコのコクシエラ症(Q熱)、第127回日本獣医学会(1999.4)
- 7) 長岡宏美、佐原啓二、三輪好伸、杉枝正明、秋山真人、宮本秀樹、中村信也、山本茂貴：牛乳等におけるQ熱のリスクアセスメントに関する検討、第39回食品衛

生監視員協議会関東ブロック研修大会  
(1999.9)

- 8) 長岡宏美、佐原啓二、三輪好伸、杉枝正明、秋山真人、山本茂貴：ウシにおける *Coxiella burnetii* 感染様式に関する研究、第128回日本獣医学会 (1999.10)
- 9) 長岡宏美、佐原啓二、三輪好伸、杉枝正明、秋山真人、宮本秀樹、中村信也、山本茂貴：牛乳等におけるQ熱のリスクアセスメントに関する検討、平成11年度全国植皮衛生監視員研修会 (1999.11)
- 10) 長岡宏美、佐原啓二、三輪好伸、杉枝正明、秋山真人、原元彦、山本茂貴：*C.burnetii* 感染者の呈する症状についての一考察、第6回リケッチア研究会 (1999.11)
- 11) 長岡宏美、佐原啓二、三輪好伸、杉枝正明、秋山真人、山本茂貴：牛乳等における *C.burnetii* 汚染状況、平成11年度日本獣医公衆衛生学会年次大会 (2000.2)

#### G 知的所有権の取得

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 分担研究報告書

### ヒトおよび伴侶動物のQ熱の疫学的・診断的研究

分担研究者 小宮智義

#### 研究要旨

ネコを中心とした*Coxiella burnetii*に対する疫学調査を行った。その結果動物病院に来院しているネコでは14.2%、イヌでは10.7%の抗体陽性率を示し、ネコの1.3%、イヌの0.8%より遺伝子が検出された。一方生活様式の異なる野良ネコでは41.7%、韓国のネコでは8.6%の抗体陽性率を示した。このことより、*C. burnetii*は一般家庭に飼育されているネコやイヌに広く浸透しヒトへの重要な感染源となっていることが示唆された。また、ヒト、特にサルコイドーシス患者の*C. burnetii*に対する抗体保有率は49.4%を示し、肺胞洗浄液からも19.2%に遺伝子が検出された。原因不明の多臓器疾患であるサルコイドーシスに、*C. burnetii*の感染が何らかの要因になっている可能性が考えられた。

#### A. 研究目的

リケッチアの一種の感染によって起こる人獣共通感染症であるQ熱は、我が国でも近年広く浸透していることが示唆され、ヒトへの感染源としてコンパニオンアニマルも注目されている。そこで、我々はネコを中心とした*C. burnetii*に対する疫学調査を行い、我が国におけるネコやイヌの感染実態をさらに明らかにすることを目的とした。また、過去ヒトの疫学調査も多く行われてきている一方で、今回原因不明の多臓器疾患であるサルコイドーシス患者の血清等を得る機会があり、*C. burnetii*に対する抗体調査を行い疾患との関わりを検討した。

#### B. 研究方法

ネコおよびイヌの血清は動物病院由来、野良ネコの血清は、富山県と韓国由来のものをそれぞれ用いた。ヒトのサルコイドーシス患者血清は、横浜市立医大眼科より分与されたものを用いた。抗体調査はNine Mile株I相菌を抗原として常法により行い、抗体価64倍以上を陽性とした。同時*com1*遺伝子をターゲットとしたNested PCR法により遺伝子の検出を行った。

#### C. 研究結果

動物病院に来院し、別の検査目的で集められた血清を用いた。ネコでは14.2% (44/310)、イヌでは10.7% (27/252)の抗体陽性率を示し、ネコ1.3% (4/310)およびイヌ0.8% (2/252)より遺伝子が検

出された。また、生活様式の異なる富山県由来野良ネコでは41.7% (15/36)、韓国の野良ネコは8.6% (8/33)の抗体陽性率を示したが、遺伝子は検出できなかった。一方、サルコイドーシス患者では49.4% (44/89)の抗体陽性率を示したが、血清中からは遺伝子が検出されなかった。しかし、26例のサルコイドーシス患者の肺胞洗浄液 (BALF) 中、*com1*遺伝子は5例から (19.2%) 検出された。

#### D. 考察

今回の動物病院に何れかの理由で来院しているネコやイヌの疫学調査より、本菌はコンパニオンアニマルに広く浸透し、身近なヒトへの感染源となっていることが改めて示唆された。また、日本と韓国由来野良ネコの疫学調査と比較してみると、明らかに日本の野良ネコの抗体保有率が高く、生活様式や地域により差があることも示唆された。

サルコイドーシス患者の抗体陽性率は、既に報告されている健常者や感染機会が多い獣医師の抗体保有率に比べ明らかに高かった。サルコイドーシス患者の本菌の抗体保有率の高い理由は不明であるが、BALFより19.2%に遺伝子が検出されたことは、*C. burnetii*の侵入が発症に関与している可能性があると考えられた。

#### E. 結論

動物病院に来院しているネコやイヌ、野良ネコが高い抗体陽性率を示したことによ

り、一般家庭に飼育されている愛玩動物のネコやイヌに広くQ熱の病原体が浸透し、また自由な行動範囲を有する野良ネコにはさらに広く浸透し、ヒトへの重要な感染源の一つになっている可能性が示唆された。また、何らかの病原体の侵入と宿主の特異的免疫反応が関与しているサルコイドーシス患者に*C.burnetii* に対する高い抗体保有率と一部患者の肺胞洗浄液より遺伝子が検出されたことは、*C.burnetii* の感染が何らかの要因になっている可能性があるものと考えられ、将来の重要な研究課題であることが指摘される。

#### F. 研究発表

##### 1. 学会発表

- 1) 小宮智義、本川賢司、岡田 奨、荒井節夫、斎藤 博、相澤主税、福士秀人、平井克哉：コンパニオンアニマル(イヌ・ネコ)における*Coxiella burnetii*の血清疫学的調査、第127回日本獣医学会(1999)
- 2) 小宮智義、美 文日、坪島貞夫、本川賢司、岡田 奨、相澤主税、福士秀人、平井克哉：*Coxiella burnetii* (Q熱)の日本および韓国におけるネコの疫学調査、第128回日本獣医学会(1999)
- 3) 石原麻美、鳥山聖子、中村 聡、大野重昭、石田敬子、小野弘光、平賀洋明、磯買恵美子、小宮智義、平井克哉：サルコイドーシスとコクシエラ症(Q熱)、第53回日本臨床眼科学会(1999)
- 4) 石原麻美、鳥山聖子、中村 聡、大野重昭、石田敬子、小野弘光、平賀洋明、磯買恵美子、小宮智義、平井克哉：サルコイドーシスにおける抗*Coxiella*抗体保有率、第103回日本眼科学会総会(1999)

## 分担研究報告書

### Q熱の実験室診断法の基準および疫学に関する研究

分担研究者 萩原 敏且

#### 研究要旨

ヒトのQ熱は健康を脅かす重要な疾患であり、第四類全数届出感染症に指定された。当面の血清診断基準として、わが国および諸外国の発生報告を参考に、1) ペア血清では4倍以上の抗体価の上昇、2) シングル血清ではIgM抗体価1:16~32倍以上あるいはIgG抗体価1:128~256倍以上と定めた。この診断基準で、既に報告されている国内患者は全て陽性と診断された。この診断基準を基に、Q熱の検査依頼があった不明熱患者19名(うち13名ペア血清)について血清診断を行ったが、全て陰性であった。また、8名については併せてPCR法による遺伝子検出も行ったが陰性であった。さらに、虚血性心疾患患者、大学病院小児科に来院した呼吸器疾患患者および千葉県成人を対象とした疫学調査では、千葉県の成人500名中9名にのみ抗体が認められた。

#### A. 研究目的

ヒトのQ熱(コクシエラ症)は健康を脅かす重要な疾患であり、第四類全数届出感染症に指定された。しかし、Q熱の病像は多岐にわたっているために、臨床から本症を診断することは難し。そこで実験室診断が重要になるが、Q熱患者の血清抗体価が低いことや、PCR法による遺伝子検出の安定性が低いなどの問題点が指摘されている。本研究では、わが国の発生状況に適した血清診断の抗体価の基準を考察し、Q熱患者の症状および病態から疫学的に明らかにすることを目的としている。

#### B. 研究方法

##### 1. 感染症新法施行に伴う暫定的な血清診断基準の設定

我が国および諸外国の発生報告を参考に、分離もしくはPCRで陽性となった患者を全て網羅できるような基準を設定した。

##### 2. 不明熱患者におけるQ熱と臨床所見

平成10年度~11年度の間に12医療機関から不明熱患者としてQ熱の検査依頼があった19名(うち13名ペア血清)について血清診断を行った。血清診断は、精製*C. burnetii* IおよびII相菌抗原とする微量間接蛍光抗体法(MIF)により行った。

##### 3. 虚血性心疾患患者を対象とした疫学調査

##### 4. 大学病院小児科に来院した患者を対象とした疫学調査

##### 5. 千葉県の成人を対象とした疫学調査

それぞれを対象に、精製*C. burnetii* I

およびII相菌抗原とするMIFにより血清疫学調査を行った。

#### C. 研究結果

##### 1. 感染症新法施行に伴う暫定的な血清診断基準の設定

我が国におけるQ熱の当面の血清診断基準として、1. ペア血清で4倍以上の抗体価の上昇、2. シングル血清でIgM抗体価1:16~32倍以上あるいはIgG抗体価1:128~256倍以上と定めた。この診断基準で、既に報告されている国内患者は全て陽性と診断された。

##### 2. 不明熱患者におけるQ熱と臨床所見

19名全てに有意な抗体上昇が認められずQ熱と診断されなかった。また、8名については併せてPCR法による遺伝子検出も行ったが陰性であった。

##### 3. 虚血性心疾患患者を対象とした疫学調査

虚血性心疾患患者50名を対象に血清疫学調査を行った。その結果、16倍以上のIgM、IgGおよびIgA抗体価は全ての患者に認められなかった。

##### 4. 大学病院小児科に来院した患者を対象とした疫学調査

肺炎や気管支炎など呼吸器疾患で入院した小児271名のペア血清を対象に行った結果、40倍以上のIgM+G+A(whole)の抗体価は全ての患者に認められなかった。

##### 5. 千葉県の成人を対象とした疫学調査

千葉県の成人1500名を対象に血清疫学調査を行っている。現在途中経過であるが500名中9名に40倍以上のIg-wholeの抗体

価が認められた。  
(倫理面への配慮)

血清および検体の使用については患者および提供者の十分な理解を得た後、検査および研究に使用している。また、検査結果を含むプライバシーの保護には十分な配慮を行っている。

#### D. 考察

##### 1. 感染症新法施行に伴う暫定的な血清診断基準の設定

今回の診断基準は感染症新法施行に伴う暫定的なものであり、比較的広くQ熱患者をとらえられる基準になっている。しかし、その反面、偽陽性者をとらえる確率が高い。今後、患者のデータを蓄積し、わが国独自の基準を定める必要がある。

##### 2. 不明熱患者におけるQ熱と臨床所見

今回の結果は全て陰性であった。しかし、Q熱が疑われた12名の不明熱患者の臨床所見などをみると、頭痛が3名に(記入があった患者のみのデータ、以下同じ。)、呼吸器症状が2名に、肝機能障害が6名に、動物との接触が5名に、海外渡航歴が1名に、下痢が4名に認められた。原因不明の発熱があり、動物との接触あるいは肝機能障害があるケースなどで最も本症が疑われた。今後、Q熱の患者の症例を蓄積し、本病を疑うべき所見を明らかにし、臨床診断の指針にすべきであると考えている。

##### 3. 虚血性心疾患患者を対象とした疫学調査

*C. burnetii*が心内膜炎を起こすことが明らかになっているが、今回の結果からは虚血性心疾患とQ熱との関係を明らかにできなかった。今後、検体数(対象)を増やし、さらに検討する必要がある。

##### 4. 大学病院小児科に来院した患者を対象とした疫学調査

これまでQ熱と呼吸器疾患との関係が報告されているが、今回の結果からは小児の呼吸器疾患との関係を明らかにできなかった。今後、検体数(対象)を増やし、さらに検討する必要がある。

##### 5. 千葉県の成人を対象とした疫学調査

結果は途中経過であるが、40倍以上の抗体陽性者がみられたことで、千葉県におけるQ熱の発生状況や発生要因などについてさらに検討していく必要がある。

#### E. 結論

最適な診断法を改良し、さらに疫学調査

を行い、見落とされているQ熱患者の血清学的診断基準の改良が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 萩原敏且：Q熱の診断，衛生微生物技術協議会第20回研究会(1999)
- 2) 萩原敏且、小川基彦、志賀定禰、古屋由美子、吉田芳哉：Q熱の血清診断について，第6回リケッチア研究会(1999)
- 3) 古屋由美子、片山丘、原みゆき、吉田芳哉、今井光信、山本正悟、海保郁男、小川基彦、萩原敏且、小田紘：ELISAおよびIFによる*Coxiella burnetii*の抗体測定 -第2報-，第47回ウイルス学会学術集会

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

## 分担研究報告書

### ヒトのQ熱の疫学的研究

分担者研究者 小久保彌太郎

#### 研究要旨

東京都におけるヒトQ熱の感染状況を把握する目的で、インフルエンザ様疾患患者のうがい液30件、咽頭ぬぐい液96件、慢性疲労性疾患患者血漿52件および一般健康人血清89件の計267件を対象に、nested-PCRによる*com1*および*htpB*領域の*C.burnetii* 遺伝子の検出を試みた。その結果、インフルエンザ様疾患患者の咽頭ぬぐい液1例のみに*htpB*遺伝子を検出したが(*com1*領域検出できず)、その他の血清からは遺伝子検出ができなかった。また、*htpB*遺伝子検出例からA/Jマウスによる分離培養を試みたが分離できなかった。

#### A. 研究目的

*Coxiella burnetii* に起因するQ熱は、感染症新法（感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律）の第4類に分類され、全数届出疾病である。米国、オーストラリアおよびヨーロッパの諸外国では、畜産農家やと畜場関係者の集団感染例および出産時の動物からの感染例等が報告されており、公衆衛生上の問題となっている。しかし、わが国におけるQ熱感染例は、昨年の感染症発生動向調査では12例と少ない。また、これまでにインフルエンザ様疾患や異型肺炎患者から、本病原体が検出された報告および輸入感染症としての報告がみられるが、Q熱の発生状況や感染源・感染経路等の実態は明確にされていないのが現状である。

われわれは、東京都における*C.burnetii* の感染実態を把握する目的で、今年度は呼吸器系疾患および慢性疲労性疾患患者を対象に本菌の遺伝子の検出を試みたので、その成績を報告する。

#### B. 材料および方法

##### 1. 供試材料

供試した材料は、感染症発生動向調査を目的に1998年12月-3月に都内病院より搬入されたインフルエンザ様疾患患者の咽頭ぬぐい液96件、うがい液30件および慢性疲労性疾患の患者血漿52件である。さらに、一般健康者の血清89件を対象とした。

##### 2. 核酸の抽出およびPCR法

セパジーン（三光純薬）を用いて咽頭ぬ

ぐい液および血清（血漿）200ulからDNAを抽出し、*com1*および*htpB*領域のnested PCR法を行った。増幅産物はアガロースゲル電気泳動にて泳動し、特異バンドを認められたものを陽性とした。

##### 3. 塩基配列の決定

特異バンドの認められたものについては、アガロース電気泳動にて特異バンドを切り出し、ABI Model377を用いたdirect-sequencingにて塩基配列を決定した。

##### 4. 病原体の分離

nested-PCR法で陽性となった例については、免疫抑制剤（サイクロフォスファミド）を皮下注射し免疫不全状態を保持したA/Jマウスの腹腔内に検体200ulを投与し、*C.burnetii* 病原体の分離を試みた。（A/Jマウスの使用にあたっては、東京都立衛生研究所動物実験管理規定に従い実験を行った。

#### C. 結果

1. インフルエンザ様疾患患者由来の咽頭ぬぐい液における遺伝子検査の成績は、*htpB*領域のプライマーでは96件中1件から特異バンドが検出され、陽性と判定されたが、*Com1*領域のプライマーでは特異バンドは認められず、すべて陰性であった。検出されたPCR産物についてdirect-sequencingで塩基配列を決定し、Gen Bankに登録されているNineMileI相菌等の塩基配列とHomology検索を行ったところ、*C. burnetii*との相同性は47.8%と低い成績であった。また、その他の細菌との相同性は、*A.hydrophila*とは48.0%、

*Mycobacterium tuberculosis*とは47.3%、*Escherichia coli*とは44.0%であった。インフルエンザ様疾患患者由来のうがい液30件、慢性疲労性疾患患者由来の血液52件および健康人由来の血清89件における遺伝子検査はすべて陰性であった。

2. PCR検査で陽性となった咽頭ぬぐい液1件については、A/Jマウスを用いて *C.burnetii*の分離を試みたところ、マウスの脾臓等に変化は認められず、*C.burnetii*を分離することはできなかった。

#### D. 考察

今回、インフルエンザ様疾患患者由来の咽頭ぬぐい液96件、うがい液30件、慢性疲労性疾患患者由来の血漿52件および健康人由来血清89件について *C.burnetii* 遺伝子検査を行ったところ、咽頭ぬぐい液1件から *htpB* 遺伝子を検出した。しかし、遺伝子の塩基配列の解析で、*C.burnetii*との相同性が低かったこと、また、動物試験による菌分離では陰性であったことから、*C.burnetii* 感染者は全く認められないという結果であった。*C.burnetii*の遺伝子診断では、現在いくつかの遺伝子が標的とされているが、感度・特異性が定まっていないのが現状である。今回、*C.burnetii*遺伝子の検出率が極めて低率であったのは、都内における *C.burnetii* 感染者が本当に少ないのか、あるいは採用した遺伝子検査法に問題があるのか明らかにすることができなかった。静岡県などでは、インフルエンザ様疾患患者から高率に遺伝子が検出されていることを考えると、今後、間接蛍光抗体法による血清学的診断法を導入するなど検査法の検討が必要であり、その上でさらに、検査例数を増やして都内における *C.burnetii*の感染状況を把握していく必要があると思われる。



## 分担研究報告書

ヤマトマダニ (*Ixodes ovatus*) から分離されたエーリキアについて

分担研究者 川原 眞

### 研究要旨

1983年から1994年にかけて東北地方および四国で採取されたヤマトマダニ (*Ixodes ovatus*) から分離された7株のエーリキア (*Ehrlichia*) 様因子について調べた。これらの株を接種したマウスは、すべて血液中に*E. muris*に対する抗体を示し、抗原の一部類似性を示した。分離された7株中6株 (HF株) を接種したマウスは食欲不振、行動緩慢、体重減少などの症状を示し、10日以内に死亡した。一方、残りの一株 (Anan株) を接種したマウスは、顕著な症状を示さず死亡もしなかった。HF株を接種したマウスの脾臓を電子顕微鏡で観察すると、細胞質中の封入体中に多くのエーリキア様粒子が観察された。しかし、Anan株接種マウスにはそれら粒子を認めることができなかった。分離株の16S rRNAの遺伝子配列を決定し比較したところ、HF株はすべて同じであった。Anan株との相異は3塩基のみで、その相同率は99.7%であった。*E. chaffeensis* (human monocytic ehrlichiosis agent) および*E. muris*とは、それぞれ98.2および97.7%であった。また、HFおよびAnan株のGroEL amino acid配列を決定し、他の*Ehrlichia*と比較したところ、相同率は*E. chaffeensis* に対し99.0%、Anan株に対し98.5%、また、*Ehrlichia canis* に対し97.3%であった。これらの結果から、これらの分離株はヒトから分離された*E. chaffeensis* に遺伝学的に最も近いエーリキアであることが明らかとなった。これらの株は、マウスを用いた感染モデルの研究に極めて有益であると思われる。

#### A 研究目的

*Ehrlichia*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、単球や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。エーリキア症は、アメリカで重要な新興感染症として知られている。現在、ヒトに感染する*Ehrlichia*は5種類 [*E. chaffeensis*, HGE agent, *E. sennetsu*, Venezuelan human ehrlichia (VHE, a strain of *E. canis*), *E. ewingii*] が知られている。西日本やマレーシアで見つかる腺熱は*E. sennetsu*によって引き起こされる。アメリカで発生しているHuman monocytic ehrlichiosis (HME)は*E. chaffeensis*によって引き起こされる。VHEは南米のベネズエラで、症状を示さないヒトから分離された。ヨーロッパやアフリカで見ついているHMEは*E. chaffeensis*に近いエーリキアで引き起こされると考えられている。一方、北米やヨーロッパで多発しているHuman granulocytic ehrlichiosis (HGE)は家畜に感染する*E. equi*や*E. phagocytophila*と遺伝学的に類似しているHuman granulocytic *Ehrlichia*と呼ば

れるエーリキアで引き起こされる。また、昨年、*E. ewingii* (Canine granulocytic ehrlichia) によって引き起こされる新たなHGEがアメリカで発見された。

著者は、愛知県の山中で捕獲した野鼠 (*Eothenomys kageus*) からマウスの脾臓肥大因子を分離した。この因子について、形態学および抗原解析、また、16S rRNAの遺伝子配列等を調べ、この因子が、野鼠から分離された*Ehrlichia*として世界で最初の*Ehrlichia*であることを明らかにし、この*Ehrlichia*を*E. muris*と命名した。その後、東京都の山中からも多数の*E. muris*が分離され、*E. muris*が日本に広範囲に分布する可能性を示した。また、ヒトや多数の野生動物やペットの犬などにも*E. muris*に対する抗体が認められたことから、ヒトを含む多数の動物が*E. muris*もしくは類似した*Ehrlichia*に感染している可能性も考えられた。

一方、野鼠以外にもキチマダニ (*Haemaphysalis flava*) から*E. muris*を分離しているが、東北地方や四国で採取されたヤマトマダニ (*Ixodes ovatus*) から*Ehrlichia*様感染因子が分離された。今回、

これら分離株について形態的、抗原性、遺伝学的および病理学的解析を行い*E. muris* および他の*Ehrlichia*との比較を行うことを目的とした。

## B 研究方法

マダニからの*Ehrlichia*の分離:1993年4月、5月および1994年5月に福島県福島市庭坂で、1994年6月、7月に青森県大鰐町で、また、1994年5月に徳島県阿南市でflagging法を用い採取した。採取したマダニを1%イソジン加70%エタノール中で10分間攪拌して体表を消毒した。次に0.5%~1%子牛血清添加リン酸緩衝食塩水(pH7.2)で洗浄し、個体別あるいはプールしてホルスライドグラスや乳鉢を用いて磨砕し、SPG液 (SPG; 0.0038M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.0072M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.0049M L-glutamate, 0.218 M sucrose, pH 7.2) で乳剤とした。乳剤の濃度はマダニ1個体当たりSPG液約0.3mlとし、ddYマウスの腹腔内へ0.1~0.2ml/頭を接種した。

分離株の16S rRNA およびGroELの遺伝子配列:分離株 (HF565, HF568-1, HF568-2, HF639-2, HF642, HF652, Anan) 感染マウスの9日目もしくは10日目の脾臓の10%乳剤から、Blood kit (QIAGEN)を用いDNAを抽出した。16S rRNA遺伝子は既報 (Kawahara, M.ら1999. Comparison of *Ehrlichia muris* strains isolated from wild mice and ticks and serologic survey of humans and animals with *E. muris* as antigen. J. Clinical. Microbiol. 37: 1123-1129) に従いPCRを行い遺伝子配列を決定した。また、GroEL遺伝子のNested PCRおよび遺伝子配列の決定はSumnerらの方法

(Sumner J. 1997. PCR Amplification and comparison of nucleotide sequences from the *groESL* heat shock operon of *Ehrlichia* species. J. Clin. Microbiol. 35: 2087-2092) で行い、最終的にアミノ酸配列を決定した。これらの16S rRNA遺伝子配列およびアミノ酸配列とGenBankより得たいくつかの*Ehrlichia*の各配列をGENETYX-WIN Version 3.0を用いて比較解析した。GenBankより得たSequenceは下記の通りである。16S rRNA遺伝子配列: *E. chaffeensis*, M73222; *E. canis*, M73221; *E. ewingii*, M73227; *E. sennetsu*, M73225; *E. muris*, type strain AS145, U15527; strain I-268, AB013008;

strain NA-1, AB013009. GroELの遺伝子配列: *Bartonella bacilliformis*: Z15160, *Cowdria ruminantium*: U13638, *E. chaffeensis*: L10917, *E. sennetsu*: U88092, *E. coli*: X07850, HGE agent: U96728, *E. equi*: U96727, *E. canis*: U96731, *E. phagocytophila*: U96729。

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:ヤマトマダニから分離された株7株および*E. muris*の感染マウスの脾臓10%乳剤を、それぞれ5匹づつのBALB/cマウスの腹腔内および皮下に0.2 mlを接種し20日間観察し、マウスに対する病原性を*E. muris* (AS145: Strain: type strain, I-268, NA-1) 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Relative spleen size (Spleen weight / Body weight×100)を測定した。また、それぞれのマウスの血清中の*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ラベル抗マウスイムノグロブリンを用いた (Kawahara M.ら1999.

Comparison of *Ehrlichia muris* strains isolated from wild mice and ticks and serologic survey of humans and animals with *E. muris* as antigen. J. Clinical. Microbiol. 37: 1123-1129)。

電子顕微鏡による観察:分離株をマウスに感染させ、死亡直前の感染7日目と9日目に脾臓を採取し、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。

## C 研究結果

1983年から1994年にかけて東北地方の福島県で12株、1983年から1994年にかけて青森県で3株、1994年に四国の徳島県で1株の計16株がそれぞれの地方で採取されたヤマトマダニから分離された。福島県で分離された4株(HF565, HF568-1, HF568-2, HF639-2)、青森県で分離された2株(HF642, HF652)および徳島県で分離された1株 (Anan) について詳細を調べた。それら7株の10%脾臓乳剤をマウスに腹腔内接種すると、6株のHF株は感染後7日目から立毛、食欲不振、脱水症状、体重減少、行動緩慢などの症状を示し、8日から10日で死亡した。しかし、Anan株は*E.*

*muris*、同様、著名な症状を示さず、死亡も認められなかった。一方、これらの株を皮下接種し、20日まで観察した結果、死亡例は認められなかった。感染マウスの脾臓の大きさはNA-1が $2.81 \pm 0.51$ 、*E. muris* (AS145)が $2.68 \pm 0.22$ 、I-268が $2.41 \pm 0.32$ 、Ananが $1.96 \pm 0.34$ 、all HF strainsが $1.21 \pm 0.41 \sim 0.87 \pm 0.26$ であった。非感染マウスの脾臓の大きさは $0.42 \pm 0.04$ であった。

16S rRNAの1449塩基についてその配列を比較したところ、HF株間では100%一致した。また、Anan株とはわずか3塩基異なるのみであった。HF株は*E. chaffeensis*と19塩基、*E. muris*とは29塩基異なり、*E. chaffeensis*に最も近い株であった。GroELをコードする409個のアミノ酸配列を比較したところ、すべての株は*E. chaffeensis*、*E. muris*や*E. canis*のgenogroupに属していた。また、HF株と*E. chaffeensis*との違いは4個のアミノ酸で、Ananとの違いは6個で、HF株はAnanより*E. chaffeensis*に近かった。*E. muris*を抗原として、感染マウスの血液中の抗体を測定したところ*E. muris* AS145、I-268、NA-1、HF株、Anan株は $2.40 \pm 0.80 \sim 3.60 \pm 1.02$  ( $1/10 \log_2$ )を示した。

HF565株について、感染マウス脾臓を電子顕微鏡で観察したところ、monocytes、macrophages、eosinophilsの細胞室中に封入体が認められた。一方、neutrophilsには観察できなかった。封入対中に観察できる粒子は、一般的に丸く、長さが $0.4 \sim 1.0 \mu\text{m}$ 、幅が $0.2 \sim 0.7 \mu\text{m}$ を示した。それぞれの粒子は2重膜に包まれ、リボソームや網目状のDNA鎖が認められた。Anan株については、電子顕微鏡で観察することが出来なかった。

#### D 考察

16S rRNA遺伝子配列、GroELのアミノ酸配列、抗原性の比較、電子顕微鏡像の結果から、これら分離株、HF株、Anan株はgenogroup Iに属する*Ehrlichia*であり、アメリカで人から分離された*E. chaffeensis*に最も近い株であることが明らかとなった。*E. chaffeensis*は、マウスなどの実験動物に接種すると感染するものの、ほとんど症状を示さない。しかし、HF株はマウス

に感染し、ヒトのエーリキア症と類似した症状を示す。特に、HF株感染マウスの死亡前の、肝臓に広がった壊死の状況は、*E. chaffeensis*感染で致命的になった患者の肝臓の状況と酷似している。これらの点から新しく分離されたHF株は、ヒトのエーリキア症を研究する上で、重要な実験モデルとして考えられる。

Genogroup Iに属する*Ehrlichia*のVectorとして、*E. chaffeensis*の*Amblyomma americanum*、*E. canis*の*Rhipicephalus sanguineus*、*E. muris*のキチマダニ (*Haemaphysalis flava*) が明らかになっている。今回、分離された株はすべてヤマトマダニ (*Ixodes ovatus*) から分離されており、多種多様なダニが*Ehrlichia*を媒介している事を示している。ヤマトマダニは家畜など大型動物を吸血するとともに、人をも吸血するため、人を含めた十分な疫学調査が必要である。エーリキアはその遺伝子型から3グループ (Genogroup I、II、III) に分類されている。日本には2つのgenogroupの*Ehrlichia*が分離されている (Genogroup I、III)。最初に分離されたのはエーリキア・センネツ (*Ehrlichia sennetsu*) で、1950年代に九州地方の風土病である腺熱の患者から分離された。人から分離されたエーリキアとしては世界で初めてであった。さらに1962年に魚のボラに寄生する寄生虫：*Stellantchasmus falcatus* metacercariaからSF agentが分離されたが、それは*E. sennetsu*と同じグループ (Genogroup III) に属する*Ehrlichia*である事が明らかとなった。さらにgenogroup Iの*Ehrlichia*として*Ehrlichia muris*が分離された (Kawahara, M.ら, 1993. Characterization of ehrlichial organisms isolated from a wild mouse. J. Clin. Microbiol. 31: 89-96.)。

今回、ヤマトマダニから分離された*Ehrlichia*は、このgenogroup Iに属する。*E. phagocytophila*あるいはHuman granulocytic ehrlichiaなどが属するgenogroup II *Ehrlichia*は日本ではまだ見つかっていない。これらの*Ehrlichia*はライム病 (Lyme disease) を媒介するダニが関与しており、日本でもライム病患者が見つかっていることから、今後、詳しい調査が必要であると思われる。

## E 結論

エーリキア症は、1983年にヒトに感染する新種の*Ehrlichia*が見つかって以来、アメリカだけでなく世界的に注目されている新興感染症である。現在、ヨーロッパ各国、アフリカ、南米、アジア、さらにロシアからも患者や感染者が見つかり、世界的な広がりを見せている。日本では、*Ehrlichia sennetsu*患者以外のエーリキア症の患者は見つかっていない。しかし、野鼠やダニから新しい*Ehrlichia*を数多く分離し、日本にも多様な*Ehrlichia*が存在することを示した。日本では*Ehrlichia*に対する認識がまだ低く、今後、これらの感染症にも注意を喚起するとともに、検査体制を確立することが重要で、このことによって日本でもエーリキア感染症が発見される可能性が十分に考えられる。

## F 研究発表

- 1) 川原 眞：新興感染症としてのエーリキア症、*Medical Technology* 27: 1379-1380 1999.
- 2) 川原 眞：マダニが媒介するエーリキアについて、日本衛生動物学会東日本支部第39回例会(1999年1月)
- 3) Shibata, S., Kawahara, M., Rikihisa, Y., Fujita, H., Watanabe, Y., Suto, C. and Ito, T.: New *Ehrlichia* sp. closely related to *E. chaffeensis* isolated from *Ixodes ovatus* ticks in Japan. *J. Clin. Microbiol.* in press, 2000.

## 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 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19.0% (158/831)、鹿児島県下の捕獲犬2.8% (11/399)、福岡県下の捕獲犬1.9% (12/622)、飼育犬では山口市4.9%、徳島市2.3%、鹿屋市8.0%、沖縄県10.9%であり、我が国での *E. canis* の拡散が明らかにされた。 *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と著しく上昇した後に、94日後以降にPCRが陰性に転じた例は感染の経過中に *E. canis* が末梢血から臓器へ移行し、臓器に潜んでいた結果と考えられる成績を得た。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は *E. canis* が末梢血から消失していたためと考えられた。 *E. canis* 感染犬から胎児へ *E. canis* が垂直感染することを示唆する成績を得た。沖縄県下のヒトの血清1,011例について *E. canis* の抗体保有調査を実施した結果、全例陰性であった。

#### A. 研究目的

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* が存在することを証明したい。
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。
4. *E. canis* 感染犬において、感染経過中に末梢血より *E. canis* が消失する理由および *E. canis* の垂直感染の有無を解明したい。
5. *E. canis* のIFA抗原に陽性を示すイヌについて、 *E. muris*、 *E. risticii* などの共通抗原性を有するエリキア感染があるか否かを明らかにしたい。

#### 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 (オハイオ州立大学カ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 (オハイオ州立大学カ久泰子教授より分与された) に加えて5%CO<sub>2</sub> 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*の感染経過中に末梢血より*E. canis*が消失する理由の解明

*E. canis*を実験感染させたのちに、末梢血白血球を用いたPCRが陽性となり、感染の経過中にPCRが陰性に転じたビーグル犬の肝臓、脾臓等の臓器を用いてPCRを実施した。

(倫理面への配慮)

本研究に用いた検体は、いずれも倫理面に配慮して以下の通り採取したり、分与を受けた。

捕獲犬の血液は安楽死させたのちに採取し、飼育犬からの血清は動物病院で検査のために採取された血液の残りから分離し、分与されたものを用いている。一方、ヒトの血清は、すでに他の感染症の検査に供試後、凍結保存されていた711例と病院で検査に使用され廃棄される直前の検体350例の分与を受け、使用した。

*E. canis*感染あるいは*E. canis*分離に用いた実験犬では、臨床獣医師の協力を得て麻酔により無痛処置を施して供試した。

### 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、平成10,11年度に389頭について検査し、69頭の抗体陽性犬(17.7%)を新たに見い出した。これらを合計すると831頭中158頭(19.0

%)が*E. canis*の抗体陽性を示した。

平成11年度の本研究では、鹿児島県下の捕獲犬399頭について抗体保有検査を行い、11頭(2.8%)が*E. canis*の抗体陽性である成績を得た。平成11年度は、鹿屋市および沖縄県(浦添市、大里村)の飼育犬について*E. canis*の抗体保有調査を実施した。その結果、鹿屋市の飼育犬88頭中7頭(8.0%)が、沖縄県下の飼育犬110頭中12頭(10.9%)が、それぞれ*E. canis*の抗体陽性を示した。

#### (2)ヒトの抗体保有調査

平成10年度に本州在住のヒトの血清50例について*E. canis*の抗体検査を行い全例陰性の成績を得たが、平成11年度に沖縄県下在住のヒトの血清(ライム病の抗体検査に供試された検体等)1,011例について*E. canis*の抗体検査を行った結果、全例が陰性であった。

#### 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

平成10年度に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。

平成11年度にも、前年度同様の分離培養による*E. canis*分離を45検体の血液を用いて実施したが、*E. canis*分離を行うに至らなかった。

##### 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

平成10年度に、*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。

平成11年度に、3頭のビーグル犬を用いて前述と同様に*E. canis*分離を試みた。

#### (2) シェパードへの輸血による*E. canis*分離の試み

平成10年度に実施した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の検査を行ったが、*E. canis*の感染は成立しなかった。

#### 3. *E. canis*感染DH82細胞を用いた感染実験

平成10年度に、*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。

平成11年度には、上記*E. canis*感染94日後にPCRが陰性に転じた実験犬を用いて垂直感染の有無およびそれから摘出した胎児の血中抗体価について検査を実施した。*E. canis*感染191日後に本実験犬(IFA1:5,120、末梢血を用いたPCR陰性)を交配させたところ妊娠したので、*E. canis*感染251日後に帝王切開により8頭の胎児を摘出し、さい帯血を得た。母イヌは安楽死させ、血液、肝臓および脾臓の一部を採取した。臨床獣医師2人の協力を得て、出産予定日の3日程度早く帝王切開を実施したが、胎児が8頭と多く、未熟状態にあり手当のかいもなく、3日以内に全ての仔犬が死亡した。死亡した仔犬の肝臓および脾臓の一部を採取した。

*E. canis*感染251日後の母犬(IFA1:5,120、末梢血のPCR陰性)から得た肝臓および脾臓についてPCRを実施した結果、いずれの臓器でも陽性の成績が得ら

れた。本実験から帝王切開で摘出した胎児8頭のさい帯血清を用いたIFAで*E. canis*の抗体価は1:160から1:320を示した。なお、このときの母犬の血清(IgG)抗体価は1:5,120であった。

さい帯血について実施したPCRは全例陰性となったが、この理由の1つにさい帯血から十分な白血球(単球/マクロファージ)が得られなかったことが考えられる。胎児から得た肝臓と脾臓のPCRは全例が陽性を示した。

#### 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。

#### 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が懸念されていた。

#### 1. イヌにおける*E. canis*の抗体保有状況

イヌにおける*E. canis*の抗体保有調査を実施した結果、沖縄県下の捕獲犬では、831頭中158頭(19.0%)、福岡県下の捕獲犬では622頭中12頭(1.9%)、鹿児島県下の捕獲犬では399頭中11頭(2.8%)が*E. canis*の抗体陽性を示し、沖縄県下のイヌにとくに陽性率が高いことが判明した。この抗体陽性率の違いは、*E. canis*を媒介するクリイロコイタマダニを中心とするダニの生息状況の高い沖縄県下の*E. canis*感染犬と疑われる多くの捕獲犬が殺処分されていたり、本研究でも指摘されたように、感染の経過中に*E. canis*が末梢血中から臓器へ移

行し、末梢血中に存在しなくなることから、*E. canis*の拡散が抑制されて感染がこれ以上拡大しない可能性がある。

鹿児島県下の捕獲犬の抗体保有調査を平成11年度に初めて実施したが、*E. canis*の抗体陽性率は2.8%で福岡県の捕獲犬(1.9%)よりやや高い程度で徳島市(2.3%)の飼育犬の陽性率とほぼ同じであったことから、九州では未だ大きな感染の拡大は見られていないが、ダニの繁殖が増加すると*E. canis*感染が拡大する恐れもある。平成10年度に実施した研究で、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、*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。

平成11年度に、沖縄県と鹿屋市の飼育犬について、*E. canis*の抗体保有調査を実施した結果、沖縄県下のイヌでは110頭中12頭(10.9%)、鹿屋市のイヌでは88頭中7頭(8.0%)が抗体陽性を示した。沖縄県下の飼育犬の*E. canis*に対する抗体陽性率は、他県の捕獲犬や飼育犬の抗体陽性率よりも著しく高値を示し、これからも*E. canis*の抗体陽性犬の存在がダニの生息状況と深い関連があることが示唆された。一方、平成11年度に鹿屋市の飼育犬における*E. canis*の抗体保有状況を調査し、沖縄を除く他県の飼育犬よりも抗体陽性率が高い結果を得たが、これらはダニの認められたイヌから採取された血清のみについての調査結果

であり、そのために抗体陽性率が8.0%と高かったものと考えられる。

## 2. ヒトの*E. canis*抗体保有調査

本州在住のヒトの血清50例について平成10年度に実施した*E. canis*の抗体保有調査では全例が陰性であった。そこで、平成11年度にイヌでの*E. canis*抗体保有率が高く、しかもそれを媒介す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1,011検体について*E. canis*の抗体保有調査を実施した。この調査には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たヒトの血清を用いた。

沖縄県下のヒトの血清1,011例のうち711例は、ライム病の抗体検査に用いられた血清でダニとの接触する機会の多いヒトから提供されたものであったが、全例が*E. canis*の抗体陰性であった。幸い、我が国では、*E. canis*のヒトへの感染は見られないようであるが、アルジェリアのヒトからは*E. canis*が分離されているし、抗体保有者も見出されているので、今後も引き続きヒトの抗体保有調査を継続する必要がある。とくに、イヌでの*E. canis*抗体保有率の高い沖縄県においては調査を継続し、監視を続けるべきであると考えられる。

## 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。各県の動物愛護センターや畜犬管理センターでは、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と考えられた。本研究における*E. canis*の感染実験で見られたように、*E. canis*の感染の経過中に末梢血から*E. canis*が消失し臓器へ移行するために、抗体が陽性のイヌから*E. canis*を分離することができなかったものと考えられる。

平成10年度の研究で、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。

*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たことから、*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疑われた。

しかし、前述の平成11年度に実施した*E. canis*の感染実験の結果に見られたように、*E. canis*が感染の経過中に末梢血から消失することが、イヌを用いた*E. canis*分離を成功させない理由であろうと推察されるに至った。この点については、次年度の研究でさらに研究を進める予定である。

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し、*E. canis*が末梢血から臓器へ移行して臓器に潜むとの報告もある。これまでの本研究で末梢血からの*E. canis*分離が成功しない理由は、それが原因であろうと考えられ、現在保存中の*E. canis*のPCRが陽性を示す犬（末梢血のPCR陰性、IFA1：5,120を示す実験感染犬）の肝臓やこのイヌの胎児由来の臓器から*E. canis*分離を行い、この問題点を解明する計画である。

## 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19.0%（158/831）、福岡県下の捕獲犬が1.9%

（12/622）、鹿児島県下の捕獲犬が2.8%（11/399）、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）、鹿屋市の飼育犬が8.0%（7/88）および沖縄県下の飼育犬が10.9%（12/110）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が陰性に転じたが、接種251日後に摘出した肝臓、脾臓のPCRが陽性を示したことから*E. canis*感染経過中に*E. canis*が末梢血から臓器へ移行することが考えられた。

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*E. canis*が末梢血から臓器へ移行したことが強く推察された。

4. ELISAによって*E. canis*の抗体測定が可能であるとの成績を得たが、ELISAに用いる*E. canis*抗原の分離が困難であったため、実験レベルでの測定で止まっている。

5. 沖縄県下のヒト血清1,011例について*E. canis*の抗体検査を実施した結果、全例が陰性であったことから、幸い我が国では*E. canis*のヒトへの感染が見られないものと推察された。

## F. 研究発表

### 1. 発表論文

1) Inokuma, H., Yamamoto, S. and Morita, C. : 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, 1998.

2) 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

- 1) 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。
- 2) Yamamoto, S. , Ishida, Y., Jinbo, T. , Inokuma, H. , Tanahara, N. , Kiyuna, T. , Oshiro, S., Kikumine M. and Rikihisa, Y. : Detection of antibody to *Ehrlichia canis* in dogs by indirect fluorescent antibody test (IFA) in Japan. The 68th Annual Meeting of the Society for Applied Microbiology, 1999, 7, York, UK.

## 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

わが国の飼育猫の7.2% (50/690)が*Bartonella*属菌に感染しており(北海道0%~沖縄20.0%)、分離された*B. henselae*のほとんどがtype Iであった。また、日本の猫にも*B. clarridgeiae*が分布しており、*B. henselae*との混合感染もあることが初めて明らかになった。これより、猫ひっかき病の病原菌であるネコに対して、ワクチンの予防対策が必要であると思われた。さらに、アメリカとわが国で分離された*B. henselae* 8株のゲノムDNAパターンと抗原性の関係を検討したところ、ゲノムパターンは全て異なっており、そのサイズは1.75~2.13Mbpであることが明らかになった。株間のゲノムパターンと抗原性の関連性はみられなかったが、各株に抗原性の違いがあることが判明した。したがって、わが国に分布する株を用いた至適血清学的診断方法の開発が必要であると思われた。

#### A. 研究目的

猫ひっかき病 (Cat scratch disease: CSD) は、ネコにひっかかれたり、咬まれたりすることによって起こる人獣共通感染症である。ヒトはネコによる創傷を受けてから1~2週間後に軽い発熱と局所リンパ節の腫脹がみられ、局所の皮膚には丘疹や膿疱が形成される。HIV感染者や免疫機能の低下したヒトでは、非定型的な症状として脳症、眼症、細菌性血管腫、肝臓紫斑病などを引き起こすことが知られている。

近年、猫ひっかき病の原因菌として*Bartonella henselae*が、さらに新菌種の*B. clarridgeiae*がヒトに対して*B. henselae*と同様の症状を引き起こすことが明らかとなった。また、*B. henselae*は16S rRNAの遺伝子配列により2つの型 (type I, type II) に分類されることも報告されている。しかしながら、我が国におけるCSDの疫学、特に、本症の病原菌である猫における*Bartonella*属菌の感染状況については不明な点が多く残されている。そこで、本研究では、日本各地の飼育猫における本属菌の感染状況と*B. henselae*の16S rRNA遺伝子型について調査・検討した。さらに、本研究では、日本のネコから分離された*B. henselae*の6株とアメリカのネコおよびヒトより分離された2株についてパルスフィールド電気泳動法(PFGE)、間接蛍光抗体法(IFA)ならびにウェスタンブロッティング(WB)を用いて遺伝子型と抗原性の関連性について検討した。

#### B. 研究方法

1) 1995年1月から1998年7月にかけて、我が国の6市(札幌市;北海道, 仙台市;宮城県, 上越市;新潟県, 藤沢市;神奈川県, 京都市;京都府, 三田市;兵庫県), 4郡(三島郡;大阪府, 簸川郡;島根県, 始良郡;鹿児島県, 島尻郡;沖縄県)の10動物病院から、計690頭の猫血液を採取し、*Bartonella*属菌の分離を試みた。初代培養には7%兔血液加ハートインフュージョン寒天培地を用い、5%CO<sub>2</sub>, 35℃で約4週間培養した。形成されたコロニーから菌体のDNAを抽出し、PCR法により本属であることを確認すると共に、PCR産物の制限酵素*Hha* I, *Taq* Iによる切断パターンにより菌種を同定した。さらに*B. clarridgeiae*については、ゲノムDNAを制限酵素*Sma* I, *Asc* Iで切断し、PFGEにより同定した。また分離された*B. henselae*の16S rRNA遺伝子型(type I, type II)をPCR法を用いて検討した。

2) 日本の子から分離されたI6-1, NE2-3, MA17-1, NI13-1, G189-1, G204-1の各株とアメリカのAIDS患者ならびに猫からそれぞれ分離されたHouston-1(ATCC49882)株, U4株について、ゲノムDNAを制限酵素*Sma* I, *Not* I, *Eag* Iで切断し、PFGEによりそのパターンを比較、検討した。CSDを疑う日本人患者血清28例を用いてIFAとWBにより各分離株間の抗原性の違いを比較検討した。さらに、日本の飼育猫血清76例についても、I6-1

株, Houston-1株およびU4株を抗原としたIFAを行い, 猫抗体による各株に対する反応性を検討した。PFGEパターン, IFAならびにWBの成績から遺伝子型と抗原性の関係について検討した。

### C. 研究結果

1) 調査した690頭の猫のうち, 50頭(7.2%)から*Bartonella*属菌が分離された。性別にみた猫の*Bartonella*属菌の感染率は, 雄の7.7%(28/363), 雌の7.1%(21/297), 性別不明の3.3%(1/30)であった。各道府県の猫の感染状況は, 北海道0%(0/50), 宮城0%(0/50), 新潟2.0%(1/49), 神奈川5.3%(14/266), 京都16.0%(8/50), 大阪16.0%(8/50), 兵庫2.0%(1/50), 島根8.0%(2/25), 鹿児島12.0%(6/50), 沖縄20.0%(10/50)であった。猫の年齢別感染率は, 1歳未満で9.5%(12/126), 1~2歳未満で11.8%(14/119), 2~3歳未満で14.8%(9/61), 3歳以上で3.4%(11/325), 不明が6.8%(4/59)であった。3歳未満の猫の感染率は3歳以上のものに比べて有意に高かった( $P<0.01$ )。京都, 大阪, 沖縄の6例の猫から, *B. clarridgeiae*が分離された。大阪の猫1頭は, *B. henselae*と*B. clarridgeiae*に混合感染していることが明らかとなった。*B. henselae*の16S rRNA遺伝子型は, 沖縄の猫1頭より分離された株がtype IIであった以外, 全てtype Iであった。

2) PFGEでは, すべての株が異なるゲノムプロフィールを示し, 日本の猫分離株のゲノムDNAの大きさは1.75~2.13Mbpであった。*B. henselae* 8株を抗原として, CSDを疑う日本人患者血清28例についてIFAを行ったところ, Houston-1株では15例(53.6%), I6-1株では19例(67.9%), NE2-3株では18例(64.3%), G189-1株では17例(60.7%), G204-1株では17例(60.7%), MA17-1株では17例(60.7%), NI13-1株では18例(64.3%), U4株では8例(30.8%)が, それぞれ陽性を示した。type I株に対する抗体陽性率はtype II株に比べ有意に高い値を示した( $P<0.01$ )。また, CSDを疑う日本人患者血清の*B. henselae*抗体陽性率は, 日本の猫分離株を抗原として用いた場合, アメリカ猫分離株のU4を用いた場合より有意に高い値を示した( $P<0.05$ )。CSDを疑う患者血清を用いたWBでは, 血清によって反応する抗原タンパク質が異なることが明らかになった。飼

育猫の血清76例と日本猫分離株I6-1, アメリカAIDS患者分離株Houston-1, 猫分離株U4を用いてIFAを行ったところ, I6-1株では20例(26.3%), Houston-1株では10例(13.2%), U4株では15例(19.7%)がそれぞれ陽性を示した。日本の猫分離株I6-1に対する抗体陽性率はアメリカ分離株Houston-1に比べ有意に高い値を示した( $P<0.05$ )。

### D. 考察

今回の研究から, わが国の飼育猫は7.2%の割合で*Bartonella*属菌に感染しており, その感染率は, 北海道, 宮城, 新潟では低く, 関西以西の猫で高いことが明らかとなった。また, 3歳未満の猫では高い感染率であることが判明した。さらに, わが国の猫に分布する*B. henselae*の16S rRNA遺伝子型は, ほとんどがtype Iであり, 関西以西の猫に*B. clarridgeiae*の単独あるいは, *B. henselae*と*B. clarridgeiae*の混合感染も起きていることが初めて明らかになった。このように, 日本各地の飼育猫においても, *Bartonella*属菌の感染がみられたことや, 近年, わが国でも人の散発的なCSDの症例が多数報告されていることから, 今後, CSDの病原菌である猫に対するワクチン開発等の具体的な予防対策を確立する必要があると思われた。PFGEでは, アメリカとわが国で分離された*B. henselae*8株のゲノムDNAパターンは, 全ての株で異なっており, そのサイズは1.75~2.13Mbpであることが明らかになった。

日本人CSD患者血清はIFAでは*B. henselae* 16S rRNA型のtype II株よりもtype I株に, またアメリカ分離株より日本分離株に対し高い陽性率を示すことが明らかとなった。さらに, 日本の猫血清も, アメリカ分離株より日本分離株に対して高い陽性率を示すことが明らかとなった。また, IFAとWBを用いた成績から, *B. henselae*の各株には多くの抗原的差異があり, ヒトが本菌に感染した際, 様々な抗原タンパク質に対する抗体が産生されることも明らかとなった。

現在, 世界的に*B. henselae*の抗体検出にはアメリカのAIDS患者より分離されたHouston-1株を抗原としたIFAが用いられている。今回検討した8株については, ゲノムパターンと抗原性の間に関連性はみられなかったものの, 今後, CSDの血清学的診断には株ごとに抗原的差異があることを