

PCR : CB12, 以後プライマー名で示す)について感度および特異性を検討した. 感度は, Nine Mile 株 2 相菌を粗精製後, 粒子数を計測, 10 倍段階希釈後それぞれの希釈液から DNA を抽出, PCR 法を行い検討した. また, 特異性は 12 種の細菌から抽出した DNA(国立感染研細菌部和田先生のご厚意による)を用いて PCR 法を行い検討した. 次に, IF 法による血清診断法を再検討した. まず, A 県 1000 名および B 県 1080 名の一般健康人を対象として, 血清診断法と同じ方法で精製 Nine Mile 株 2 相菌を抗原とし IgG 抗体の検出を行った. 得られた陽性血清に, C 県で Nine Mile 株 2 相菌感染 VERO 細胞を抗原として得られた陽性血清 24 例(32 倍以上)を加え, IF 法により精製抗原および感染細胞に対する反応をそれぞれ比較した. さらに, 陽性血清を粗精製 Nine Mile 株 2 相菌を抗原として用いたウエスタンブロッティング(WB)法により解析した.

C. 研究結果

PCR 法の感度は, ISF1R1-F2R1 = POM12-34 > CB12 の順に高く, 前者 2 つの方法ではアッセイあたり 2×10^2 個の, 後者では 2×10^3 個の菌検出が可能であった. また, 特異性をエクストラバンドの数でみると,

ISF1R1-F2R1 > CB12 > > POM12-34 の順に多く, CB12 と *Haemophilus influenzae* の反応では陽性コントロールと大きさが区別できないバンドがみられた. 次に, IgG 抗体の検出の結果, 陽性例(20 倍以上)は A 県で 15 例(1.5%)および B 県で 5 例(0.5%)であった. また, A および B 県の陽性血清と患者回復期血清(positive control)は IF 法で精製抗原および感染細胞と反応した. また, 感染細胞では細胞内に封入体状の, 細胞外には散在して蛍光粒子が観察された. 一方, C 県の陽性血清は精製抗原とは反応せず, 感染細胞内のみ封入体状の蛍光粒子が観察され, 細胞外にはみられなかった. WB 法により, A および B 県で抗体価が 40 倍以上の陽性 14 例, および C 県の陽性 24 例を解析した結果, 29kDa 外膜蛋白質付近に注目すると患者回復期血清, A および B 県の陽性血清および C 県の陽性血清+陰性血清の 3 群に分けることができた. 患者血清のみが 29kDa 外膜蛋白質(推定)に反応し, 前者 2 群には約 30~33kDa 位置に共通のスミア状バンドがみられた. また, C 県の陽性血清には他の陽性例と共通のバンドや陰性例では認められない特異的なバンドは認められず, 第 3 群内で陰性血清との区別は不可能であった.

(倫理面への配慮)

血清の使用については、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、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

PCR法の感度および特異性の検討の結果、POM12-34がもっとも優れていた。しかし、PCR産物の塩基配列を決定し確認するのであれば、ISF1R1-F2R1も有効であろう。また、いくつかの細菌で複数のエクストラバンドがみられたことは診断上注意すべきである。またIFおよびWB法による解析の結果、患者の回復期血清と同じ反応を示す例はなかった。これは、感染してからの経過時間の違いによるのか、あるいは他の病原体との交差反応によるのかもしれない。

E. 結論

PCRによる遺伝子検出およびIFによる血清診断ともに、感度および特異性の高い診断法を確立するため、さらに検討する必要がある。特に、実際、わが国でQ熱と診断された患者検体を用いて検討する必要があるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 小川基彦, 海保郁男, 山崎 勉, 安藤秀二, 石倉康宏, 岸本寿男: Q熱の遺伝子および血清診断法の再検討～途中経過報告～, 第7回リケッチア研究会(2000)
- 2) 小川基彦, 海保郁男, 山崎 勉, 岸本寿男: Q熱の遺伝子および血清診断法の再検討, 第75回日本感染症学会総会(2001)

G. 知的所有権の取得

なし

分担研究報告書

ヒトのQ熱の疫学的研究

分担研究者 小久保彌太郎

研究協力者 貞升健志、平田一郎、諸角 聖

研究要旨

ヒトQ熱は、感染症法第四類感染症に分類され、全数報告が義務付けられている疾患である。しかしながら、1999-2000年の日本におけるQ熱患者報告数は少ない。その原因として、*Coxiella burnetii*に感染しても抗体価の上昇しない症例が多く、血清診断の難しいことが挙げられる。

そこで、我々はマウスを用いて*Coxiella burnetii*感染実験を行い、抗体産生量およびサイトカイン産生量を測定することにより、感染時における免疫応答について解析を行った。

その結果、マウスにおける実験系では、感染後、抗体産生前に細胞性免疫や体液性免疫に関わる種々のサイトカインの産生が認められ、様々なサイトカインネットワークが形成されていることが示された。ヒトQ熱症例においても、同様の機序が働いている可能性があり、感染診断技術の確立およびQ熱病態解明への糸口になる可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒトQ熱は、全数報告が義務付けられる疾患であるが、診断基準が明確でないこともあり、症例の報告数は少ないまま推移している。すべての症例について報告されている訳ではない。その原因として、他の感染症と比較し、抗体価の上昇しない症例が多いことが挙げられる。そこで、我々はマウスにおける感染モデルを作成し、抗体産生機序の解明を目的に、抗体およびサイトカインを中心とした感染マーカーの検索を行った。

B. 材料および方法

1. 供試マウス

BALB/c系(CrSLC)マウス、♂5週齢105匹を使用し、*Coxiella burnetii* ninemileII相菌接種群、Cyclophosphamide(CY)処理群、CY+C.*burnetii*処理群(1群35匹)の

3群を使用した。

2. 接種菌液

C. burnetii ninemileII相菌をBGM細胞で培養し、採取した上清をPBSにて200倍希釈した液を接種菌液とした。

3. 観察

腹腔内菌液接種後、1, 3, 5, 7, 10, 14, 21日目に1群5匹ずつ採血後解剖し、脾臓、肝臓、腎臓重量を測定した。また、血清中のIgG, IgM抗体価を間接蛍光抗体法にて測定するとともに、血清中のサイトカイン量(IL-4, IL-6, IFN- γ , IL-12, IL-18)をELISA法(genzyme社製)にて測定した。

C. 結果

1. 体重あたりの臓器重量の変化

CY処理群と比較し、*C. burnetii*接種群、CY+*C. burnetii*処理群で脾臓重量比の増大が確認された。CY+*C. burnetii*処理群で最も脾臓重量が大となり、接種後10日目に最大となった。肝臓、腎臓は、各群に差は認められなかった。

2. *C. burnetii*接種群のサイトカイン産生量と抗体価の推移

IFN- γ は、接種後5日目から上昇が認められ、7日目に最大となり、10日目を最後に消失した。IL-12は接種後5日目および7日目に認められた。IL-18は5日目から21日目までわずかに認められた。IL-6は7日目のみに認められた。

IgMは7, 10, 14日目に上昇し(最大256倍)、21日目にはわずかに認められる程度であった。IgGは、10日目から上昇し、14日目に最大となった(最大950倍)。

3. CY+*C. burnetii*処理群

IFN- γ , IL-18, IL-12の産生量は*C. burnetii*を単独で接種した群と比較して増加し、IL-6, IgM, IgG抗体価は減少する傾向が認められた(IgM最大抗体価128倍、IgG最大抗体価512倍)。

D. 考察

今回、マウスを用いた*C. burnetii*腹腔内投与実験において、抗体上昇前に、IFN- γ を中心とした種々のサイトカインの上昇が認められ、*C. burnetii*に対する抗体産生時にも様々なメカニズムが介在していることが示唆された。

免疫応答には種々のサイトカインが関与し、細胞性免疫にはTh1系(IL-12, IL-18, IFN- γ 等)、体液性免疫にはTh2系のサイトカイン(IL-4, IL-6

等)が分泌されることが知られている。サイトカインが分泌された経緯を考察すると、まず、Th0細胞が*C. burnetii*感染により活性化し、IL-12が産生され、IL-12はTh1細胞を活性化し、活性化したTh1系細胞がIFN- γ を産生し、マクロファージを活性化する。活性化したマクロファージから、IL-12, IL-18が産生され、Th1系がさらに活性化される。結果として、接種7日目を最大に細胞性免疫系が活性化され、その後の脾臓腫大がおきたものと考えられた。

さらに、細胞性免疫の活性化後、なんらかの経緯により、Th0系細胞からIL-4が産生され、Th2系細胞が活性化され、活性化したTh2系細胞からIL-6が産生されることにより、B細胞系の活性化がみられ、IgMやIgGの抗体産生が接種10日目以降になされたものと考えられた。

また、免疫抑制剤であるCyclophosphamide(CY)処理により、IFN- γ , IL-18, IL-12の産生が亢進し、IL-6やIgM, IgGの抗体産生は抑制されたことから、CY処理により細胞性免疫の亢進、液性免疫の抑制が起きたことが示唆された。CYは、マウスによる*C. burnetii*分離の前処理薬として汎用されており、CYによるTh2系細胞の抑制が*C. burnetii*の分離するためには、有効に作用していることが示唆された。

今回用いた感染モデルでは、CY処理の有無に関わらずIgG抗体価が最大で500倍以上に上昇していることから、ヒトQ熱患者や慢性Q熱患者で抗体価の上昇が認められない理由として、単に採血時期が感染後早いためか、なんらかの原因でTh2

系細胞の抑制が起きた可能性が推察された。

Q熱診断としてのサイトカイン測定は、抗体産生前には補助的診断としては有効である可能性が示唆された。

E. 結論

マウスにおける実験系では、感染後、抗体産生前に細胞性免疫や液性免疫に関わる種々のサイトカインの産生が認められ、様々なサイトカインネットワークが形成されていることが示された。ヒトQ熱症例においても、同様の機序が働いている可能性があり、病態解明への糸口になる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 貞升健志、小宮智義、新開敬行、山崎 清、中村敦子、長谷川道弥、平田一郎、諸角 聖、相澤主税、山本茂貴、小久保彌太郎、鎌田信一：マウス腹腔内 *Coxiellaburnetii* 投与後の血清中サイトカイン量の推移、第7回リケッチア研究会(2000)

2) 小宮智義、相澤主税、日高康雄、貞升健志、平田一郎、福士秀人、平井克哉：一般病院外来初診時の臨床症状と *Coxiella burnetii* 血清診断について、第7回リケッチア研究会(2000)

3) 小宮智義、日高康雄、貞升健志、平田一郎、駒瀬勝啓、平井克哉：一般病院外来初診患者における *Coxiella burnetii* 陽性率とその臨床症状について、第75回日本感染症学会総会(2001)

日本およびアメリカで採取されたダニからのエーリキアの 検出及びライム病流行地である北海道における エーリキアの血清疫学的研究

分担研究者 川原 眞

研究要旨

日本のライム病流行地である北海道を含む日本の各地で採取されたダニ、およびアメリカで採取されたダニ、計 578 個体、339 サンプルについて、PCR あるいはマウスを用いて、エーリキアの検索を行った。その結果、12 サンプルのダニから *Ehrlichia* DNA を検出した。それらについてシーケンスを行ったところ、日本北部の北海道の *Ixodes(Dovatus)* から新たな *Ehrlichia* DNA を検出した。このエーリキアは L.M.Schouls らがオランダのダニから検出した *Ehrlichia* sp. (Journal Clinical Microbiology 37:2215-2222 1999) に最も相同性が高く 98.95% であった。また、日本の南西部に当たる島根県で採取された *Haemaphysalis(H)longicornis* から検出した *Ehrlichia* DNA も従来の報告株とは異なっており、*E.ewingii* に最も高い相同性 (99.12%) があった。日本の中間部に位置する岐阜県で採取された *I. persulcatus* からマウスで *Ehrlichia(E)muris* を分離した。この株は、従来の *E.muris* と性状が大きく異なっていた。また、北海道のヒトに食いついていた *I.persulcatus* から *E.muris* DNA が検出された。HF565 株 DNA は北海道および愛知県の *Iovatus* のみから検出された。一方、アメリカで採取された *I.scapularis* と *Dermacentor(D) variabilis* からはこれらのエーリキアは検出されなかった。また、*I.scapularis* から HGE agent (99.79%) が検出されたが、日本のダニからは検出されなかった。

北海道におけるライム病調査のため、病院を訪れた患者から集められた 414 名の血清サンプルについて、HGE agent および *E.muirs* を抗原として血清疫学調査を行なった。これらの血清で *E.muris* を抗原抗体陽性者が 4 人認められた。一方、HGE agent に対する抗体は認められなかった。

A 研究目的

エーリキアはリケッチア科に属する細胞内寄生細菌で、人や動物にエーリキア症を引き起こす重要な新興感染症である。日本では *E.sennetsu* がヒトに感染する

エーリキアとして世界で初めて分離された。その後、野鼠からアメリカで発見された *E.chaffeensis* と遺伝子が類似した *E.muris* が発見された。*E.muris* は愛知県や東京都に存在し、人を初め野生動物に抗体が存在する事が示された。さら

に、日本の東北地方あるいは四国で採取された *I. ovatus* ticks から *E. muris* とは異なる新たな *Ehrlichia* spp. が多数分離された。また、日本の最南端である沖縄の Brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) から *E. platys* の遺伝子が検出された。さらに、日本の犬の血液中に *E. canis* の抗体が存在することも明らかとなり、日本でも多種のエーリキアが存在する事が明らかとなった。今回、我々は、日本各地で、エーリキアのベクターであるダニを採取し、エーリキアの保菌実体を明らかにすると共に、さらにアメリカで採取されたダニについても、日本で発見されたエーリキアが存在する可能性について調査することを目的の一つとした。また、ライム病の病原体であるボレリアとエーリキアの HGE agent はベクターが同じダニである事から、ライム病流行地である北海道のヒト血清を用いて HGE agent を含むエーリキアの抗体調査を行うことを目的とした。

B 実験方法

ダニの採取

1995 年、1996 年および 2000 年に、128 個体の *I. ovatus*、53 個体の *I. persulcatus*、5 個体の *H. longicornis*、1 個体の *H. douglasi* が、日本の最北のライム病流行地である北海道で採取した。1995 年の 6 月、7 月に犬に付着していたダニを採取した。1996 年 6 月と 2000 年 6 月、7 月には旗擦り法で採取した。2000 年 4 月から 7 月には、ダニに咬傷された人が病院で摘出されたダニを検体として用いた。

2000 年 7 月に、北海道同様北東部に位置する秋田県で、11 個体の *H. flava*

と 1 個体の *I. ovatus* を旗擦り法で採取した。

1999 年 5 月、6 月に、愛知県、岐阜県で、42 個体の *I. persulcatus*、28 個体の *I. ovatus*、7 個体の *H. longicornis*、4 個体の *H. flava* を旗擦り法で採取した。

また、同様に 1998 年 6 月、1999 年 6 月に中央部に近い京都府で、44 個体の *H. Kitaokai*、15 個体の *H. longicornis*、8 個体の *Ixodes ovatus*、7 個体の *H. flava*、5 個体の *I. persulcatus*、を旗擦り法で採取した。

さらに、1999 年 6 月に日本の西部の島根県で、84 個体の *H. longicornis* が旗擦り法で採取した。日本で採取されたダニは、合計 443 個体であった。

一方、1999 年 6 月にアメリカのライム病および Human granulocytic ehrlichia (HGE) の流行地であるニューヨーク州で 123 個体の *I. Scapularis* が採取された。また、1999 年 7 月にオハイオ州で 12 個体の *Dermacentor variabilis* が採取された。

マウスによる分離および DNA の抽出

採取されたダニは 1 個体、もしくは 2~7 個体をプールして PBS あるいは SPK 液で、ガラスホールを用い乳剤にした。その一部、もしくはすべてを ICR 系マウスに接種するか、QIAamp blood kit を用い説明書に従い DNA を抽出した。抽出 DNA は使用されるまで -20℃ で保存された。

遺伝子増幅.

遺伝子検出は Nested PCR 法で *Ehrlichia* の 16S rRNA 遺伝子を検出した。用いられたプライマーは *E. muris* (アクセッション番号: EMU15527)

およびHF565 strain (アクセッション番号: AB024928) のシーケンスに基づき作成された6種類のプライマーが用いられた。また、HGE agentの検出に、Robert F. (Journal Clinical Microbiology 37 1999) らの論文に記載してあるプライマーが用いられた。PCR陽性産物はすべてQIAquick gel extraction kitで精製した後、シーケンス会社 (パイオロジカ) にシーケンスを依頼した。

*E. muris*およびHGEに対する抗体調査

1997年から2000年にかけて、北海道の病院を訪ねた患者の中で、ライム病の検査が必要な390人の患者の血清が集められた。年齢は2歳から95歳、男性170人、女性216人、不明4人であった。これらの患者の26%はボレリア抗体陽性で、27%はダニに刺された経験を持っていた。

抗体検査は、*E. muris*およびHE agentを抗原として間接蛍光交代法で行なわれた。抗体調査に必要な*E. muris*抗原は、Kawahara, Mら (J. Clin. Microbiol. 31:89-96. 1993) の方法に従い、また、HGE agent抗原はN. Zhi N.ら (J. Clin. Microbiol. 35:2606-2611. 1997) の方法に従って抗原を作成した。間接蛍光抗体法はKawahara, Mら (J. Clin. Microbiol. 37:1123-1129. 1999) の方法に従った。

C 結果

ダニからのエーリキアの検出

1995年6月7月に北海道で犬に付着していたダニ (*I. ovatus* 16個体、*I. persulcatus* 27個体、*H. longicornis* 5個体) から抽出されたDNAについて

PCRを行ったけれどもエーリキアは検出されなかった。

1996年6月に北海道で旗擦り方法で採取されたダニ (*I. ovatus* 57個体、*I. persulcatus* 9個体、*H. douglasi* 1個体)の乳剤マウスの腹腔内接種したが、エーリキアは分離できなかった。

1998年6月に京都府で旗擦り法で採取されたダニ (*I. ovatus* 1個体、*I. persulcatus* 2個体、*H. longicornis* 12個体、*H. kitaokai* 44個体)についてPCRを行ったが、エーリキアは検出されなかった。

1999年5月に岐阜県で旗擦り法で採取されたダニ (*I. ovatus* 20個体、*I. persulcatus* 42個体、*H. flava* 4個体)についてマウスを用いて分離を試みたところ *I. persulcatus* から1株の *E. muris* が検出された。この *E. muris* はマウスの病原性が弱く、継代が困難であった。

1999年6月に島根県で旗擦り法で採取されたダニ (*H. longicornis* 84個体) についてPCRを行ったところ1株のエーリキア遺伝子が検出された。この遺伝子についてシーケンスを行いホモロジー検索したところ、*E. ewingii* に最も高い相同性 (99.12%) があった。

1999年5月、6月に愛知県で旗擦り法で採取されたダニ (*I. ovatus* 8個体、*H. longicornis* 7個体) についてPCRで1個体のダニ (*I. ovatus*) からHF565 strainを検出した。

1999年6月に京都府で旗擦り法で採取されたダニ (*I. ovatus* 7個体、*I. persulcatus* 3個体、*H. longicornis* 3個体、*H. flava* 7個体) について、マウスおよびPCRでエーリキアの検出を試みたが検出されなかった。

2000年6月、7月に北海道で旗擦り法で採取されたダニ (*I. ovatus* 54 個体、*I. persulcatus* 6 個体) についてマウスによる分離およびPCRによる遺伝子検出をこころみたところ、*I. ovatus* から1株の HF565 strain と2株の新たなエーリキア遺伝子を検出した。この遺伝子をシークエンスしてホモロジー検索したところ、L.M.Schouls らがオランダのダニから検出した *Ehrlichia* sp. (Journal Clinical Microbiology 37:2215-2222 1999) に最も相同性が高く 98.95% であった。HF565 株とは 94.77%、*E. muris* とは 94.35%、*E. chaffeensis* とは 94.14%、HGE agent とは 94.13% の相同率であった。

2000年7月に秋田で旗擦り法で採取されたダニ (*I. ovatus* 1 個体、*I. persulcatus* 11 個体) についてマウスによる分離およびPCRを行ったが分離されなかった。

2000年4月にヒトに刺傷していたダニ (*I. ovatus* 1 個体)、2000年4月から7月に、同様にヒトに刺傷していたダニ (*I. persulcatus* 11 個体) が採取された。これらのダニについてPCR検索を行ったところ、*I. persulcatus* から1株の *E. muris* が検出された。

一方、1999年6月にアメリカのニューヨーク州で旗擦り法で採取されたダニ (*I. Scapularis* 123 個体) についてマウス及びPCRでエーリキアの検出を試みた。その結果、ダニ15グループの内、6グループからHGE agents を検出した。しかし、マウスでは検出できなかった。また、日本で検出されたエーリキアの種類は何も検出されなかった。

1999年7月にアメリカのオハイオ州で旗擦り法で採取されたダニ (*D. variabilis* 12 個体) についてPCRでエーリキアの検出を試みたが検出されなかった。

ヒト血清中の抗体調査

北海道におけるライム病調査のため、病院を訪れた患者から集められた390人の血清サンプルについて、HGE agent および *E. muris* を抗原として血清疫学調査を行なった。390人のうち男性が170人、女性が216人、不明が4人であった。年齢は70代が最も多く89人で、続いて60代が74人、50代が48人、80代が33人、40代が23人、30代17人、20代16人等と続いた。これらの患者の約30%はダニに刺されており、また、28%はDotblot methodでボレリア抗体陽性であった。これらの血清で *E. muris* を抗原とした場合4人が抗体陽性であった。抗体価は20倍~160倍であった。一方、HGE agent に対する抗体は認められなかった。

D 考察

私達は、日本に *E. sennetsu* 以外にダニ媒介性のエーリキアが存在する事を明らかにしてきた。*E. muris* や *Ehrlichia* spp. (HF strain)、*E. canis* 等が国内に存在する事が明らかになった。さらに、*E. platys* が沖縄など日本の南西部に存在する事も報告されている。今回、行った調査で578個体(339サンプル)ダニから合計12株のエーリキアを検出した。

北海道で採取された *I. ovatus* から検出された *Ehrlichia* DNA をシークエンスしたところ、このエーリキアは

L.M.Schouls らがオランダのダニから検出した *Ehrlichia* sp. (Journal Clinical Microbiology 37:1123-1129, 1999) に最も相同性が高く、このエーリキアが Genogroup 1 と 2 の中間に位置する新しいエーリキアであると考えられた。

また、日本の西部に当たる島根県で採取された *H.longicornis* から検出した *Ehrlichia* DNA も従来の報告株とは異なっており、*E.ewingii* に最も高い相同性があった。*E.wingii* は犬から発見されたエーリキアであるが、最近、ヒトからも検出されており注目されている。日本では *E.ewingii* の報告はない。

岐阜県で採取された *I.Persulcatus* から *E.muris* がマウスで検出された。*E.muris* はこれまで、*H.flava* から検出されているが、*I.persulcatus* から検出されたのは初めてである。この株は、マウスの脾臓を肥大させず、継代が困難であるなど、これまで報告された *E. muris* の正常とは大きく異なっていた。さらに北海道で病院に訪れた患者の皮膚に食い込んでいた *I.persulcatus* からも PCR で *E.muris* を検出した。これらのことから *H.flava* と共に *I.persulcatus* も *E.muris* のベクターの一つと考えられる。

また、北海道と愛知県で採取された *I. ovatus* から HF565 株の DNA を検出した。これらのエーリキアの 16S rRNA のシーケンスは従来の HF565 株と大きく異なっていなかった。HF565 株 DNA は、*I. ovatus* 以外のダニからは検出されなかった。

一方、アメリカで採取されたダニからエーリキアの検出を試みたところ、*I.Scapularis* から HGE agent が検出さ

れた。相同率は 99.79% であった。これらのダニはアメリカのニューヨーク州で採取されたが、この地方は HGE の流行地である。これらのダニから日本で検出されたエーリキアの検出を試みたが検出できなかった。*D.Variabilis* からは何も検出されていない。

HGE はライム病と密接なかわりがある。それは、ライム病の病原体であるボレリアを媒介するダニと HGE agent を媒介するダニが共通である事による。すなわちライム病流行地には HGE も流行している。最近、中国のライム病流行地で採取されたダニ (*I.persulcatus*) から、HGE agent が PCR で検出された。北海道はライム病の流行地である事から、HGE 患者の存在が想定され、北海道で採血されたヒト血清について抗体調査を行った。しかし、HGE 抗体は検出されなかった。一方、*E.muris* に対する抗体は 4 人から検出されたが、抗体価は低かった。なお、これらの患者の約 30% はダニに刺されており、また、これらの血清サンプルの 28% は Dotblot method でボレリア抗体陽性であった。前回、東京都の奥多摩地区のヒト血清について抗体調査を行ったところ、同様に抗体価が低いながらも抗体陽性者の存在を確認している (J. Clin. Microbiol. 37:1123-1129, 1999)。今回の陽性患者が *E. muris* に感染しているのか、あるいは他のエーリキア感染による交差反応なのか、あるいは非特異的反応なのか、今後さらに詳しい解析が必要である。

E 結論

日本およびアメリカの各地で採取された578個体(339サンプル)のダニから合計12株のエーリキアを検出した。2株はオランダで初めて検出された *Ehrlichia* DNA に類似し、相同率は98.95%であった。1株は *E.ewingii* DNA との相同率は99.12%であった。2株は HF565 strain、2株は *E. muris* であった。検出された *E. muris* の内、1株は病院を訪れた患者に刺傷していたダニから検出された。一方、アメリカで採取されたダニから6株の HGE agent が検出されたが、日本で検出された *E. muris* DNA や HF565 strain DNA は検出されなかった。

ライム病流行地である北海道の病院で採血された患者血清390人について、HGE および *E. muris* について抗体調査を行ったところ、HGE 陽性患者は認められなかったが、*E. muris* 抗体陽性者が4人認められた。

F 発表

1) 発表論文

Okada, H., T. Tajima, M. Kawahara, and Y. Rikihisa. Ehrlichial proliferation in endothelial cells and lethal liver necrosis in immunocompetent mice experimentally infected with HF strain most closely related to *Ehrlichia chaffeensis*. J. Comp. Pathol. 124:(In press) 2001

2 学会発表

1) 白田花子、岡田洋之、田島朋子、川原 眞、吉野知男、力久泰子
Ehrlichia chaffeensis 近縁エーリキア

株マウス接種実験での病理所見 第130回日本獣医学会学術総会(2000.10)

2) M. Kawahara, E. Isogai, C. Suto, S. Shibata, H. Fujita, T. You, Y. Nishioka, Y. Tsuji, Y. Rikihisa, Detection of 16S rRNA Genes of Several *Ehrlichia* spp. in Ticks in Japan and USA, and Serosurvey for Human Exposure to *Ehrlichia muris* and the HGE Agent in the Area Where Lyme Disease is Endemic. The 101st General Meeting of American Society for Microbiology May 23, 2001 Orlando, Florida (発表予定)

3) 楊 孝康、磯貝恵美子、磯貝浩、木村浩一、川原眞 ライム病を中心としたダニ媒介性疾患の現状 第74回日本細菌学会総会(2001.4) (発表予定)

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) で *Ehrlichia canis* (*E. canis*) に対する抗体が陽性を示した沖縄県下の捕獲犬70例 (1999年1月～2000年9月の間に採血した454検体中70例) のうち3例および鹿児島県下の捕獲犬11例 (1999年6月～1999年12月の間に採取した399検体中11例) のうち1例、合計4例が nested polymerase chain reaction (PCR) を用いた *E. canis* の16S rDNA 検出で陽性を示した。しかし、*E. muris* および *E. platys* の16S rDNA 検出のPCRは陰性であった。これらの *E. canis* のPCR陽性犬4例についてPCR産物 (389bp) の塩基配列の解析を行った結果、これら4検体はすべて同じ配列を示した。これは2000年に中国でPan *et al.*によって分離された *E. canis* の塩基配列と同一であり、これまでにアメリカで分離されているオクラホマ株とは一塩基のみ異なっていることが明らかとなった。一方、*E. canis* のIFA陽性を示した81例は、*E. muris* 抗原を用いたIFAで全例陰性であった。

A 研究目的

わが国のイヌにおいてもIFAで *E. canis* の抗体陽性例が存在することが、これまでの本研究で確認されている。しかし *E. canis* 分離が困難で未だ成功していないことおよび *E. canis* 検出のためのIFAとPCRの結果が一致しない例が多いことから、IFAとPCRの結果が不一致の原因の解明 (IFAの非特異反応の有無) およびPCR陽性犬4頭の白血球から得たPCR産物の塩基配列解析を目的として本研究を実施した。

B 研究方法

1. IFA

E. canis のIFA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) を塗抹したIFA用抗原スライドを調製して使用した。*E. muris* のIFAスライドは共同研究者の川原真博士より分与された。IFAは従来の方法で実施した。沖縄県下および鹿児島県下の捕獲犬853検体の血漿についてIFAによる *E. canis* の抗体調査を行い、陽性を示した検体81例については、*E. muris* 抗原を用いたIFAを実施すると共に *E. canis* と共通抗原性を有する *E. canis*、*E. muris* ならびに *E. platys* 検出のためのPCRを実施した。

2. PCR

E. canis の16S rDNA 検出のための nested PCRにはプライマーとして first PCRにECCおよびECB、second PCRに

ECAおよびHE-3を用いた。*E. muris*の16S rDNA検出のためのPCRにはEM87およびEM584、*E. platys*の16S rDNA検出のためのPCRにはPLATYS-FおよびPLATYS-Rをそれぞれ用いた。*E. canis*のPCRが陽性を示した検体については、PCR産物（389bp）の塩基配列の解析を行った。

（倫理面への配慮）

本実験に供試した捕獲犬の血液は、当該施設で安楽死させたイヌから採取し、動物愛護に十分配慮して本研究を実施した。

C 研究結果

*E. canis*を抗原としたIFAで、沖縄県下の捕獲犬454頭中70頭（15.4%）が抗体陽性を示した。これら*E. canis*のIFA陽性犬の血漿に加えて、平成11年度に採取した鹿児島県下の捕獲犬399頭の血漿のうち*E. canis*のIFA陽性を示した11例について、*E. muris*を抗原として用いたIFAを実施したところ、全例陰性であった。

次に、*E. canis*のIFA抗体陽性犬（沖縄県下の捕獲犬70頭および鹿児島県下の捕獲犬11頭）の白血球を用いて、*E. canis*、*E. muris*ならびに*E. platys*検出のためのPCRをそれぞれ実施した。その結果、沖縄県下の捕獲犬3頭と鹿児島県下の捕獲犬1頭が*E. canis*のPCRのみが陽性を示した。

そこで、*E. canis*のPCR陽性を示した4頭のイヌから得たPCR産物（389bp）の塩基配列の解析を行った。その結果、これら4検体はすべて同じ塩基配列を示した。これらは、2000年に中国でPan et

al.によって、分離された*E. canis*の塩基配列の一部と同一であり、アメリカで分離された*E. canis*オクラホマ株とは一塩基のみ異なっていた。

D 考察

これまでの本研究によって、わが国でも*E. canis*の抗体陽性犬が確認され、とくに沖縄県下の捕獲犬でその陽性率が著しく高い成績が得られた。しかし、*E. canis*の抗体陽性犬の白血球を用いた*E. canis*の16S rDNAを検出するPCRで陽性を示す例が著しく少なく、抗体検査とPCRの結果が不一致のものが多く認められた。この結果から、*E. canis*抗原を用いたIFAに非特異反応が生じていることが疑われ、非特異反応の有無を確認する目的で実施した*E. muris*抗原を用いたIFAおよび*E. canis*の抗体陽性犬の白血球を用いた*E. muris*ならびに*E. platys*のPCRの結果はすべて陰性であった。加えて、平成11年度に実施したヒトの抗体検査で、*E. canis*を抗原に用いたIFAで沖縄県下在住のヒトの血清1,011例すべてが陰性であり、*E. canis*と共通抗原性を有するヒトの*E. chaffeensis*感染による非特異反応の可能性もほぼ否定された。

これらの結果を併せて判断すると、これまでに*E. canis*と共通抗原性を有することが知られている前述の病原微生物以外に*E. canis*と共通抗原性を有する微生物感染の可能性あるいはIqbal and Rikihisa (1994)らが指摘しているように慢性の*E. canis*感染では*E. canis*感染細胞が血中から肝臓や脾臓などの臓器に集まり、血中に*E. canis*を見出すことができないうえに*E. canis*のPCR陰性例が多くなり、IFAの結果と一致しないこと

などが考えられた。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

リケッチアによる新興・再興感染症の疫学，診断および予防に関する研究

分担研究者 丸山 総一 日本大学・助教授

研究要旨：1,447頭の飼育猫について *Bartonella henselae*, *Toxoplasma gondii*, 猫免疫不全ウイルス(FIV)および猫白血病ウイルス(FeLV)の感染状況を血清学的に調査検討した。わが国の飼育猫の *B. henselae* 抗体陽性率は全体で8.8%(128/1,447)であった（宮城県の0%～沖縄県の24.0%）。年齢別陽性率は，1～2才＞で11.5%(34/295)，3才≤で7.2%(44/614)であった。さらに，ノミ寄生陽性の猫で13.5%(36/274)，室外飼育猫では14.5%(17/117)と，室内飼育猫の7%(24/344)，ノミ寄生陰性の猫の7.4%(39/530)に比べ有意に高かった。

*T. gondii*陽性率は5.7%(82/1,447)，FIV陽性率は9.6%(107/1,088)，FeLV陽性率は2.9%(32/1,088)であった。FIV陽性率は，雌の5.0%(26/523)に比べ雄では14.3%(81/565)と有意に高かったが，他の病原体では，雌雄間に有意差は認められなかった。*T. gondii*, FIV, FeLV陽性率は，加齢に伴い高くなり，ノミの寄生陽性の猫，室外飼育の猫で高い傾向が認められた。

猫における *B. henselae* の持続感染機構の解明を目的として，*B. henselae*に自然感染した3頭の猫の血中抗対価の推移，分離株の遺伝子性状ならびに蛋白質性状について検討した。本菌に自然感染した猫3頭全てにおいて，数ヶ月間隔で菌血症のピークが出現し，菌血症のピークに付随してIgG抗体価の上昇が認められた。各猫の菌血症のピークから分離された株の染色体DNAのプロフィールは，それぞれの猫のピークごとに異なっていた。また，検討した猫分離株の菌体タンパク質プロフィールも異なっていた。これより，*B. henselae* は猫体内で自らの遺伝子ならびに抗原性を変化させることにより，抗体の攻撃を回避している可能性が考えられた。

A. 研究目的

猫ひっかき病（Cat scratch disease: CSD）の病原体は長い間不明のまま推移してきたが，近年，本病の原因菌が *Bartonella henselae* であることが明らかとなった。しかしながら，わが国における本症の病原菌である猫の *B. henselae* 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 *B. henselae* の感染状況ならびに猫が関わる重要な3つの疾病 *Toxoplasma gondii*, 猫免疫不全ウイル

ス（FIV），猫白血病ウイルス（FeLV）の感染状況について血清学的に調査，検討した。

*B. henselae*に感染した猫は，ほとんど無症状のまま長期間持続感染するが，これがいかなる機序によるものか今だ解明されていない。そこで，本研究では，猫における *B. henselae* の持続感染機構の解明を目的として，自然感染猫より継続的に採血し，血中抗体価，菌数の推移，分離株の遺伝子性状ならびに蛋白質性状について検討した。

B. 研究方法

1) 各種病原体の抗体価の測定：1994年から1999年にかけて北海道から沖縄まで17道府県の24の動物病院で採材された飼育猫血清1,447検体を用いた。*B. henselae*に対する抗体価の測定は間接蛍光抗体法(IFA)を、*T. gondii*抗体価、FIV抗体、FeLV抗原の検出には、それぞれ市販のキットを使用した。

2) 猫における *B. henselae* 持続感染機構の解明：*B. henselae* に自然感染した猫3頭より2～4週間間隔で2年間にわたり、血中菌量、および *B. henselae* IgG 抗体価を測定した。さらに、分離株の染色体DNAの制限酵素 *Not I* による切断パターン(RFLP)をパルスフィールドゲル電気泳動を用いて測定し、染色体遺伝子変異の可能性を検討するとともに、ウェスタンブロットならびに二次元電気泳動法を用いて菌体蛋白質のプロフィールの異同を検討した。

C. 研究結果

1) わが国の飼育猫の *B. henselae* IgG抗体陽性率は全体で8.8%(128/1,447)であった(宮城県、大阪府の0%～沖縄県の24%)。雄の陽性率は7.8%(57/732)、雌は10.2%(70/689)で、雌雄間に有意差は認められなかった。1～2才の猫の陽性率は11.5%(34/295)と最も高く、3才≤では7.2%(44/614)と最も低かった。また、抗体陽性率はノミ寄生陰性猫の7.4%(39/530)、室内飼育猫の7%(24/344)であったのに対し、ノミ寄生陽性猫では13.5%(36/274)、室外飼育猫では14.5%(17/117)と有意に高かった。

T. gondii 抗体陽性率は5.7%(82/1,447)、FIV抗体陽性率は

9.6%(107/1,088)、FeLV抗原陽性率は2.9%(32/1,088)であった。FIV抗体陽性率は、雌の5.0%(26/523)に対して雄では14.3%(81/565)と有意に高かった。一方、*T. gondii*抗体陽性率は雄で6.1%(45/732)、雌で5.3%(37/689)、FeLV抗原陽性率は雄で3.7%(21/565)、雌で2.1%(11/523)と、雌雄間に有意差は認められなかった。*T. gondii*、FIV陽性率およびFeLV陽性率は、加齢に伴い高くなる傾向がみられた。これらの陽性率も *B. henselae* 抗体陽性率と同様にノミ寄生陽性の猫、室外飼育猫で高い傾向が認められた。とくに、室外飼育の猫のFIV抗体陽性率は15.0%(16/107)と、室内飼育の4.6%(14/307)に比べて有意に高い値を示した。

2) *B. henselae* に自然感染した猫3頭全てにおいて、数ヶ月間隔で2回の菌血症のピーク(ピーク1、ピーク2)が出現した。さらにこれらの菌血症のピークに付随したIgG抗体価の上昇が認められた。各猫の菌血症のピークから分離された株の染色体DNAのRFLPを比較したところ、ピーク1の分離株は各猫ごとにすべて同一のパターンを示したのに対し、ピーク2の分離株はピーク1のそれらと異なるパターンを示した。また、二次元電気泳動でも各ピークから分離された株の蛋白プロフィールに違いが見られた。

D. 考察

今回、日本の飼育猫における各病原体の陽性率は *B. henselae* で8.8%、*T. gondii* で5.7%、FIVで9.6%、FeLVで2.9%であった。雌雄別の *B. henselae* 陽性率に有意差はなかったが、FIVでは、雄で有意に高い値を示した。年齢別に見る

と、*B. henselae*では1歳以上3歳未満の若齢の猫で高い陽性率を示したのに対し、他の病原体では加齢とともに陽性率が高くなる傾向が見られた。飼育環境別に陽性率をみると、室外飼育、ノミの寄生陽性の猫は、全ての病原体に対して高い陽性率を示した。とくに、*B. henselae*では室外飼育とノミ寄生が陽性の猫で室内飼育、ノミ寄生陰性の猫に比べそれぞれ有意に高い陽性率が認められた。*B. henselae*はノミの腸管内で9日間生存可能であること、実験的にノミにより、本菌は猫から猫へ容易に伝播されることも証明されている。これらの事実ならびに今回の成績から、自然状態でもノミが猫間における本菌の伝播に深く関与している可能性が確認された。地域別の*B. henselae*抗体陽性率は宮城県の0%から、沖縄県の24.0%まで地域によりかなりの差があることが判明した。とくに、北の地域に比べ、沖縄のような南の地域で抗体陽性率が高い傾向が見られた。アメリカや日本では、猫の*B. henselae*抗体ならびに菌血症陽性率、ノミの寄生率は南の暖かい地域で高い傾向にあることが報告されており、気候の違いやノミ等の節足動物の分布が猫の本菌陽性率に関与している可能性が示唆されている。今回、日本の飼育猫の陽性率にも同様な傾向があることが明らかとなった。

本研究により、*B. henselae*株に自然感染した猫では、本菌は猫体内で増殖した後、特異抗体により菌の多くは排除されるが、数ヶ月後、抗体価は高く維持されているにもかかわらず再び菌数は増加することが明らかとなった。また、各菌血症のピーク時に分離された株の染色

体DNAのRFLPパターンならびに菌体蛋白の二次元電気泳動法パターンより、二つの菌血症のピーク間では異なる遺伝子プロファイルと蛋白プロファイルを有する株が出現していることが明らかとなった。このことは、*B. henselae*は猫の体内で自らの遺伝子を変異させることにより抗原性を変化させ、抗体の攻撃を回避している可能性を示しているものと思われる。

E. 結論

日本の飼育猫の*Bartonella henselae*感染状況を血清学的に検討したところ、8.8%（全国平均）が陽性で、ノミ寄生陽性、室外飼育、南西日本の猫で高いことが明らかとなった。さらに、*B. henselae*に自然感染した猫を用いた実験より、*B. henselae*は猫体内で自らの遺伝子ならびに抗原性を変化させることにより、抗体の攻撃を回避している可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maruyama, S., Sakai, T., Morita, Y., Tanaka, S., Kabeya, H., Boonmar, S., Poapolathep, A., Chalermchaikit, T., Chang, C-C., Kasten, R. W., Chomel, B. B., and Katsube, Y. Prevalence of *Bartonella* species and 16S rRNA Gene Types of *Bartonella henselae* from Cats in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (Accepted).
- 2) Maruyama, S., Kasten, W. R., Boulouis, H. J., Gurfield, A. N., Katsube, Y. and Chomel, B.B. 2001. Molecular Epidemiological

Analysis of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* isolates from domestic cats from the USA, France and Japan by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Vet. Microbiol.* (In press).

- 3) Takahashi, M., Nogami, S., Misumi, H., Maruyama, S., Shiibasi, T., Yamamoto, Y., and Sakai, T. 2001. Mange caused by *Sarcoptes scabiei* (Acari: Sarcoptidae) in wild raccoon dogs, *Nyctereutes procyonoides*, in Kanagawa Prefecture, Japan. *J. Vet. Med. Sci* (In press).
- 4) Maruyama, S., Kabeya, H., Nogami, S., Sakai, H., Suzuki, J., Suzuki, H., Sugita, H., and Katsube, Y. 2000. Three cases of cat scratch disease diagnosed by indirect immunofluorescence antibody test and/or polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Sci* : 62:1321-1324.

2, 学会発表

- 1) 伊礼充宏, 壁谷英則, 丸山総一 (2000) : 持続感染猫における *Bartonella henselae* の遺伝子的多様性第130回日本獣医学会 (大阪)
- 2) 壁谷英則, 小林葉子, 丸山総一 (2000) : PCR法による *Arcobacter* 属4菌種の同定法の開発, 第130回日本獣医学会 (大阪)
- 3) 小林葉子, 新井佐知子, 泉大樹, 壁谷英則, 森田幸雄, 丸山総一, 勝部泰次(2000) : 食肉および家畜における *Arcobacter* 属菌の検出状況, 第130回日本獣医学会 (大阪)
- 4) 丸山総一, 石岡慎也, 中尾るり子, 湯川真嘉, 壁谷英則, 勝部泰次,

石原加奈子, 松館宏樹, 山口剛士, 福士秀人, 平井克哉(2000) : 獣医療関係者および健常者における人獣共通感染症の血清学的感染状況の比較, 第129回日本獣医学会 (つくば)

- 5) 丸山総一, 篠原貴子, 野上薫, 壁谷英則, 酒井健夫, 森田幸雄, Amnart Poapolathep, Sumalee Boonmar, 勝部泰次(2000) : タイの猫における *Bartonella* 属菌の感染状況, 第129回日本獣医学会 (つくば)
- 6) 丸山総一, 中尾るり子, 石岡慎也, 壁谷英則, 酒井健夫, 田中茂男, 勝部泰次(2000) : 日本の飼育猫における *Bartonella henselae* 抗体保有状況, 第129回日本獣医学会 (つくば)
- 7) 丸山総一, 光真明子, 中川かほる, 壁谷英則, 勝部泰次 (2000) : 雑居ビルに生息するネズミのサルモネラ, エルシニア保菌状況, 第6回獣医疫学会 (つくば)

G. 的所有権の取得状況
なし

3年間にわたり、猫ひっかき病の疫学ならびに診断法に関する基礎研究を行い、以下の成績を得た。

平成10年度：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サイズは1.6MB～2.4MB，*B. clarridgeiae*のそれは約1.6MBであった。

平成11年度：前年度に引き続き全国的に日本の猫の*Bartonella*感染状況について調査・研究したところ，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であることが判明した。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巣である猫に対するワクチン開発など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重要な課題であると思われた。

平成12年度：1,447頭の飼育猫について*Bartonella henselae*，*Toxoplasma gondii*，猫免疫不全ウイルス(FIV)および猫白血病ウイルス(FeLV)の感染状況を血清学的に調査検討した。わが国の飼育猫の*B. henselae*抗体陽性率は全体で8.8%(128/1,447)であった（宮城県の0%～沖縄県の24.0%）。年齢別陽性率は，1～2才>で11.5%(34/295)，3才≤で7.2%(44/614)であった。さらに，ノミ寄生陽性の猫で13.5%(36/274)，室外飼育猫では14.5%(17/117)と，室内飼育猫の7%(24/344)，ノミ寄生陰性の猫の7.4%(39/530)に比べ有意に高かった。

*T. gondii*陽性率は5.7%(82/1,447)，FIV陽性率は9.6%(107/1,088)，FeLV陽性率は2.9%(32/1,088)であった。FIV陽性率は，雌の5.0%(26/523)に比べ雄では14.3%(81/565)と有意に高かったが，他の病原体では，雌雄間に有意差は認め

られなかった。*T. gondii*, FIV, FeLV陽性率は、加齢に伴い高くなり、ノミの寄生陽性の猫、室外飼育の猫で高い傾向が認められた。

猫における*B. henselae* の持続感染機構の解明を目的として、*B. henselae*に自然感染した3頭の猫の血中抗価の推移、分離株の遺伝子性状ならびに蛋白質性状について検討した。本菌に自然感染した猫3頭全てにおいて、数ヶ月間隔で菌血症のピークが出現し、菌血症のピークに付随してIgG抗体価の上昇が認められた。各猫の菌血症のピークから分離された株の染色体DNAのプロフィールは、それぞれの猫のピークごとに異なっていた。また、検討した猫分離株の菌体タンパク質プロフィールも異なっていた。これより、*B. henselae* は猫体内で自らの遺伝子ならびに抗原性を変化させることにより、抗体の攻撃を回避している可能性が考えられた。