

20010719

厚生科学研究研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

回帰熱、レプトスピラ等の希少輸入細菌感染症の
実態調査及び迅速診断法の確立に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 増 澤 俊 幸

平成14(2002)年3月

目 次

I. 総括研究報告書

回帰熱、レプトスピラ等の希少輸入細菌感染症の実態調査及び迅速診断法の確立に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1

増澤俊幸（静岡県立大学・薬学部・助教授）

II. 分担研究報告書

1. 成田空港における野ネズミ類のペスト抗体調査・・・・・・・・・・・・・・ 14

神山恒夫（国立感染症研究所・獣医科学部・室長）

2. 米国におけるヒト及びプレーリードック等の野生げっ歯類におけるペスト感染調査報告・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 17

神山恒夫（国立感染症研究所・獣医科学部・室長）

3. 病原体レプトスピラ感染種の簡易同定法の確立、輸入・国内発生レプトスピラ感染例および回帰熱属ボレリア媒介ダニ刺咬症例に関する調査研究、およびレプトスピラ新規診断抗原・ワクチン開発に関する基礎研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 21

川端寛樹（国立感染症研究所・細菌部・研究員）

4. 名古屋市のネズミ類由来レプトスピラの血清学的、遺伝学的研究・・ 27

角坂照貴（愛知医科大学・医学部・講師）

5. 沖縄の野鼠由来レプトスピラの血清学的、遺伝学的研究・・・・・・・・・・ 32

角坂照貴（愛知医科大学・医学部・講師）

6. 宮城県、及び名古屋港で捕獲した野鼠のレプトスピラ保有状況と分離株の性状解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 37

後藤郁夫（名古屋検疫所・検疫専門官）

回帰熱、レプトスピラ等の希少輸入細菌感染症の実態調査 及び迅速診断法の確立に関する研究

主任研究者 増澤俊幸 静岡県立大学・薬学部・助教授

研究要旨

平成 13 年度までに、北海道から九州、沖縄に至る検疫所、衛生研究所、大学からなる全国的な野鼠のレプトスピラ保有状況調査体制の確立を行った。また、本年度はかつてのレプトスピラ流行地である宮城県、及び沖縄県本島および伊是名島で調査を実施した。前年度の調査結果も含めて、全調査を通じて野鼠 1204 匹からレプトスピラ 42 株（3.5%）を分離した。分離レプトスピラは日本に土着の最も重症型であるワイル病病原体血清型 *icterohaemorrhagiae* のほか、血清型 *autumnalis*（秋疫 A）、*hebdomadis*（秋疫 B）のほかに沖縄に固有の血清型 *javanica* を見出した。また、新たな知見としてこれまで沖縄土着と考えられた血清型 *javanica* を北海道の野鼠から見出した。また、これまでに患者 1 例のみが報告される血清型 *castellonis* を沖縄の野鼠から初めて分離した。さらには沖縄、名古屋、宮城でこれまで日本に存在が予想できない未同定血清型株を分離した。沖縄県、宮城県は今日でも侵淫地であり、感染防御が必要であることを示した。捕獲野鼠のレプトスピラ抗体疫学調査を実施し、レプトスピラ保有野鼠が棲息する同じ場所で捕獲した野鼠では高値を示したことから、環境のレプトスピラ汚染の指標となることを示唆した。レプトスピラ、ライム病症例の血清学的診断を実施した。これに関連して昨年 11 月に山口で開催された小児感染症学会において発表されたハムスターから小学生男児がレプトスピラの感染を受け重症化した症例は、当研究班の分担者、協力者の血清診断の結果、ラテックス凝集法によるレプトスピラ診断の偽陽性例である可能性を明らかにした。これをうけて年間 30 万頭以上輸入されると推定されるハムスターのレプトスピラ保有の有無を調べた。チェコ、並びに台湾産ハムスター 144 匹について培養を行い、途中経過ではすべて陰性であった。

前年度に続き沖縄本島野鼠からライム病関連ボレリアの培養に成功した。各種性状解析からこれまで台湾、韓国南部、中国揚子江流域、タイ、ネパールなど東アジアで見出された *Borrelia valaisiana* 関連群ボレリアであることを明かとした。本ボレリアは *Ixodes granulatus*（ミナミネズミマダニ）を媒介者とする可能性を明らかにした。

また、本ライム病診断のための ELISA システムを構築し、野鼠の血清疫学的解析に応用し、その有用性を確認した。本病原体の毒力をマウスに対する実験的感染により調べ、これまでのライム病ボレリアに比べて全身組織へ拡散、侵襲能の点で弱い可能性を示した。

病原体レプトスピラ感染種の簡易同定法の確立、輸入・国内発生レプトスピラ感染症例および回帰熱属ボレリア媒介ダニ刺咬症例に関する調査研究、および、レプトスピラ新規診断抗原・ワクチン開発に関する基礎研究を行い以下の知見を得た。1) レプトスピラ病の迅速診断法の確立を目的として、レプトスピラの鞭毛遺伝子(*flaB*)を特異的に増幅するプライマーを用い、その感度・特異性から、病原性レプトスピラの遺伝子検出に有用であることを明らかにした(平成 12 年度)。さらに本年度は、この検出ツールの生体試料への適用を見据えた反応条件・およびサンプル調製法の検討も行った。2) 地震発生後に井戸水を飲んだ事で、レプトスピラに感染し発症した患者一例を報告した。これに付随して、レプトスピラ感染に関する情報を病原微生物検出情報を通じて報告し、医療関係者を中心に注意を促した。3) マレーシア旅行中にレプトスピラに感染し、帰国後発症した患者一例を報告した。これに付随して、レプトスピラ感染に関する情報を病原微生物検出情報を通じて報告し、医療関係者を中心に注意を促した。4) 病原性レプトスピラに特異的な新規診断抗原・ワクチン開発を目的として、感染に伴ってのみ発現が誘導される遺伝子の同定を試みた。まずは従来の感染動物モデルに代わる、マウス致死モデルを構築した、感染に伴って発現が誘導されると考えられる遺伝子 44-2 を同定した。5) 回帰熱ボレリア媒介の可能性のある島産ダニ *Ornithodoros capensis* を遺伝学的に同定した。一方ボレリア属に特異的な PCR プライマーを用いダニのボレリア保有の有無を調べたが、増幅産物は得られなかった。

わが国は 1926 年以来ペストの国内発生はない。このため、海外からの侵入を監視することは防疫上きわめて重要である。今年度は、動物輸入量の最も多い成田空港内において野生齧歯類を捕獲し、ペスト菌に対する抗体保有状況を検査した。検査法として、アメリカ合衆国 CDC で標準化された間接血球凝集反応を用いた。捕獲した野鼠で検体の採取が可能であった 23 頭のうち、22 頭はアカネズミであった。残りの 1 頭は米国テキサス州から到着した航空機内で捕獲されたハツカネズミであった。検査の結果、全てのネズミは抗体価が $<1:8$ と判定され、ペスト抗体保有率は 0%であった。今後も継続して検査を行う必要性が指摘された。

米国における近年のペスト発生状況ならびに野生齧歯類等のペスト菌保菌動物の管理に関して、CDC および関連の米国連邦政府および州政府機関等で情報の収集と調査を行った。特に野生プレーリードッグはヒトに対してペストの感染源となる危険性が高いため、ペットとして飼育することに対して懸念が示された。わが国への野生齧歯類等の主な輸出州であるテキサス州における調査では、米国からわが国へ輸出される野生齧歯類等に関しては法令による健康管理は行われていないことが明らかとなった。プレーリードッグに関しては輸出前に行われる殺虫剤を用いたノミ駆除処理によるペスト感染の防止は困難であることが示された。調査の結果、わが国においては、ヒトに感染した場合に深刻な健康被害を与える人獣共通感染症の原因動物の輸入に対して厳重に監視を行い、法の範囲内で輸入制限を行うなどの措置が必要であると考えられた。

研究分担者

神山恒夫 国立感染症研究所・獣医科学部室長

川端寛樹 国立感染症研究所・細菌部・研究員

角坂照貴 愛知医科大学・講師

後藤郁夫 名古屋検疫所・検疫専門官

美成、河島英二、岩井雄二（広島検疫所）、網野豊、前田米太郎、高橋直樹（福岡検疫所）、伊東拓也（北海道衛生研究所）、河橋幸恵、山田文也、浦辺研一（埼玉県衛生研究所）、高島郁夫（北海道大学）、高田伸弘（福井医大）

研究協力者

小泉信夫（国立感染症研究所）、蔦宗俊明（名古屋検疫所）、中村正治、平良勝也（沖縄衛生研究所）、秋山和夫（塩釜保健所）、藤川和生、佐久本微笑、中溝芳行（小樽検疫所）、岩崎恵美子、長谷川隆、稲垣俊一、矢口哲治、野田孝政（仙台検疫所）、望月靖、木田中（新潟検疫所）、田中義枝、長谷山路夫（成田空港検疫所）、飛田克彦、大神田実、片山敦（名古屋検疫所清水支所）、仲田康男、大友雅人、江平俊治（名古屋検疫所四日市検疫所支所）、黒飛敏（関西空港検疫所）、内田幸憲、鎌倉和政、多賀賢一郎、林昭宏（神戸検疫所）、内田晃亘、出水

A. 研究目的

レプトスピラ症、回帰熱、ペストはいずれもげっ歯類を保有体とする細菌感染症である。これらは近年日本では患者が激減した、あるいは全く報告されない感染症である。しかし、これらの感染症は世界的にはきわめて重要であり、未だ多くの患者が報告され、重大な被害をもたらしている。レプトスピラ (*Leptospira*) は九州大学の稲田、井戸により1915年に世界に先駆けて日本で初めて患者より発見され、純培養された。古くから日本ではレプトスピラ症は秋疫、用水病などの名で呼ばれる風土病として恐れられていた。1970年代まで年間数十人の死亡例が報告されていたが、近年では農業の機械化等の農業様式や

生活様式の変化に伴い、急激に減少した。しかし、その一方で 1999 年に沖縄県八重山諸島で十数名が川などで感染した事例や、1998 年にアメリカで大雨後の増水した湖で行われたトライアスロン大会に参加した多くの選手が感染した事例もあり、水辺でのレジャーやスポーツ時の感染が懸念されている。

回帰熱ボレリアはオルニソドロス属ダニによって媒介される人畜共通の細菌感染症である。本邦では戦後回帰熱患者発生の報告はないとされている。一方で我々の調査で、伊豆諸島・鳥島では形態学的にオルニソドロス属ダニに分類されるダニクチビルカズキダニ (*Ornithodoros capensis*) が生息していることが明らかになった。そこで本研究では、このダニが遺伝学的に真の *Ornithodoros* 属ダニであるのか否かについて、および回帰熱属ボレリア保有の有無について調査をおこなった。

ペストはグラム陰性小桿菌であるペスト菌 (*Yersinia pestis*) の感染による急性熱性感染症で、1 類感染症に指定される危険度の高い病原体である。本来、ペストは野生げっ歯類を保菌・増幅動物とする人獣共通感染症で、保有体動物を吸血したノミによってヒトへ伝播する。ヒトへの伝播の多くはノミを介して行われるが、最近では感染源としてのネコの役割も注目されている。ペスト菌に感染したネコは口腔内に膿瘍を形成して、咬傷、唾液、および咳等によってヒトへの感染源となり得る。世界的にはペストの患者数は徐々に増加しつつあり、流行地域も南アフリカ・マダガスカル、インド、東南アジア、中国、北米、南米と広範囲にわたっている。わが国におけるもっとも新しい患者発生は 1926 年に横浜で発生した 8 名である。また、動物におけるペストの発生も報告されていない。しかしその反面、一般の国民はもとより、医師、獣医師、および公衆衛生従事者の間においてもペストに関する注意や知識はきわめて乏しくなった。

また、わが国にはペスト常在地で捕獲された野生げっ歯類がペットとして多数輸入されているが検疫や輸入規制は行われていない。

現代の世界規模の交通網の拡大により、保有体げっ歯類を介して海外からこれら病原体の侵入が危惧されている。そこで本研究では港湾、並びに都市部で野鼠の捕獲を実施し、これら野鼠の当該病原体の保有状況を明らかにする。また、米国よりペットとして輸入されるプレーリードッグ等のペスト菌保有状況を調べ、侵入のリスクを疫学的に分析するとともに、リスクに応じた侵入防止対策を検討する。さらに、疫学調査と並行して分離された病原体について、血清学的、分子生物学的性状解析を行い、その由来を追跡し進入経路を解明し、防疫対策の確立に資する。分離された病原体株をもとに、迅速な血清診断法、遺伝子診断法、予防ワクチンの開発研究、さらには病原性発現の分子機構の解析を行う。

B. 研究方法

1. レプトスピラ、および回帰熱、ライム病ボレリアの分離培養. 図 1 に示した調査機関の協力のもとで野鼠の捕獲を行った。また、本年度はかつてのレプトスピラ流行地である宮城県（栗原郡瀬峰町、遠田郡田尻町、塩竈市塩釜港）、及び沖縄県本島（国頭村、名護市、大宜味村、大里村、那覇市）および伊是名島で調査を実施した。レプトスピラの分離には、野鼠の腎臓乳剤をそれぞれ EMJH 培地もしくは Korthof 培地に接種し、30℃にて 1~3 カ月間培養した。回帰熱ボレリアの分離には野鼠の耳介、膀胱を BSKII 培地に接種し、1~3 カ月間培養した。この間 1 カ月ごとに暗視野顕微鏡で菌の増殖の有無を調べた。

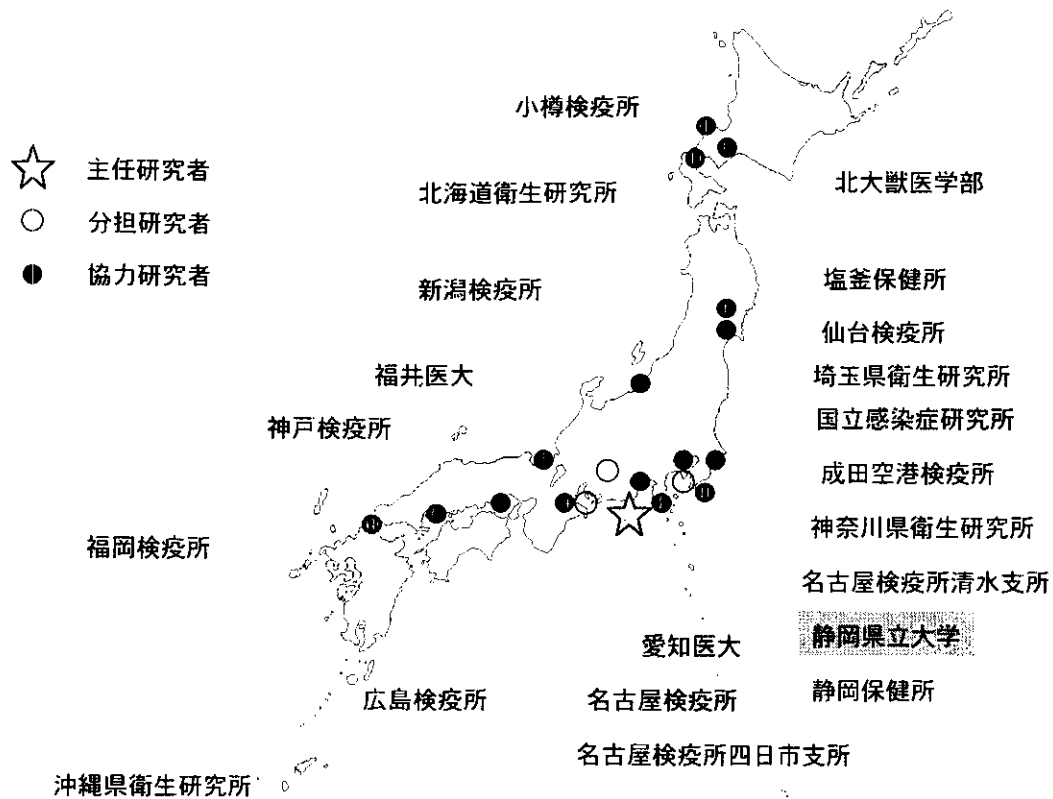


図1 厚生労働省科学研究費によるレプトスピラ分子疫学調査協力機関

2. レプトスピラ *flaB* および *gyrB* (トポイソメラーゼⅡ遺伝子) 配列解析に基づくレプトスピラ遺伝種の同定. レプトスピラ抽出 DNA を鋳型として、特異的プライマーを用いて、PCR 反応を行った。増幅産物を鋳型として、直接サイクルシークエンス反応を行い、塩基配列を決定した。シークエンスは Clustal W 法により整理し、Neighbor-Joining 法により系統樹を作製し、株の遺伝種の同定、血清型の推定を行った。

3. レプトスピラ血清型の同定と確認. 血清型特異的ウサギ抗血清と被検レプトスピラ培養液を反応させ、菌体の凝集により判定した (MAT)。対数増殖期のレプトスピラ菌体を低融点アガロースに封入し、制限酵素 *Not I* により生じた長鎖制限酵素断片をパルスフィールドゲル電気泳動で分析し、株の同異を調べ

た (LRFP 解析)。

4. レプトスピラ ELISA による血清疫学的解析. 捕獲野鼠血清のレプトスピラ抗体価を ELISA 法により調べた。抗原として、日本でこれまで流行が予想される血清型 *icterohaemorrhagiae*, *copenhageni*, *autumnalis*, *hebdomadis*, *australis*, *pyrogenes* および非病原性レプトスピラで各種血清型に交差反応することが知られる血清型 *patoc* の超音波破碎加熱死菌の上清を用いて ELISA を実施した。二次抗体にはペルオキシダーゼ標識抗マウス IgA+IgG+IgM ヤギ抗体 (KPL) を使用した。

5. 輸入ハムスターのレプトスピラ保有調査. 輸入ハムスター (チェコ産ゴールデンハムスター 42 頭、台湾産ゴールデンハムスター、ジャンガリアンハムスター 102 頭) について、レプトスピラ保有の有無を培養、並びに血清抗

体価の測定により行った。方法は前述の方法1、並びに4に準じた。

6. ボレリア分離株の種同定. 5S-23S rRNA intergenic spacer、鞭毛遺伝子 *flaB*、16SrRNA 遺伝子配列解析に基づくボレリアの遺伝種の同定を行った。ボレリア抽出 DNA を鋳型として、特異的プライマーを用いて、PCR 反応を行った。この増幅産物を鋳型として、直接サイクルシーケンス反応を行い、塩基配列を決定した。シーケンスは Clustal X 法により整列し、Neighbor-Joining 法により系統樹を作製し、株の遺伝種の同定を行った。

7. 沖縄のボレリアに対する血清診断システムの確立. 抗原として台湾の野鼠から見出された *B.valaisiana* 関連ボレリア TM1 株、および KR1 株を用いた。これを抗原とする ELISA と日本に存在するライム病ボレリア *B. garinii* HP1 株、*B. afzelii* PGau 株を抗原とした ELISA の感度、精度を沖縄野鼠血清を被検対象として比較した。

8. 沖縄由来ボレリアの病原性の検討. 5 週

齢 ddY マウス足蹠に沖縄由来 *B. valaisiana* 関連群ボレリア OS66/01 株、OM58/01 株を接種し、感染による足の腫脹を 3 日ごとに測定した。また、16 日後に解剖し、耳介と膀胱を BSKII 培地に接種し、1 カ月間培養し、ボレリア増殖の有無をしらべた。対象として病原性 *B. burgdorferi* 297 株を使用した。

倫理面への配慮

調査結果は直ちに防疫対策の確立にフィードバックした。動物に対しては「動物の保護と管理に関する法律」に基づき取り扱いを行った。動物からの材料の採取等を行う場合は国立感染症研究所実験動物取扱規程に準じて行った。

C. 研究結果

1. レプトスピラ調査システムの構築. 平成 13 年度までに野鼠のレプトスピラ保有状況調査については、北海道から九州、沖縄に至る検疫所、衛生研究所、大学からなる全国的調査体制の確立を行った (図 1)。また、本年度はかつての

表1. 日本における野鼠からのレプトスピラ分離状況 (2000.5月-2002.2月)

採獲県名	採獲調査地名	担当部署	採獲数(匹)	%養陽性数(匹)	培養陽性率 (%)
2000年					
北海道	白糠町	北海道衛生研究所	14	0	0.0
	幕別町	北海道大学	18	0	0.0
埼玉	桶川市、浦和市		5	0	0.0
	静岡	静岡市内	20	0	0.0
愛知	名古屋市内	愛知医大	166	11	6.6
	名古屋港	名古屋検疫所	57	0	0.0
兵庫	神戸港	神戸検疫所	9	0	0.0
沖縄	西表島、石垣島、那覇市、名護市	沖縄県衛生研究所	67	3	4.5
小計			356	14	3.9
2001年					
北海道	釧路市	小樽検疫所	19	0	0.0
	釧路市	小樽検疫所	2	0	0.0
	釧路市	小樽検疫所	18	0	0.0
	小樽市	小樽検疫所	122	0	0.0
宮城	上ノ国町、木古内町、北檜山町	北海道衛生研究所	17	3	17.6
	塩釜港	仙台検疫所	10	4	40.0
	石巻港	仙台検疫所	11	0	0.0
	仙台港	仙台検疫所	1	0	0.0
新潟	幌子町、瀬越町、岩出山町、古川市、塩釜市場	仙台保健所	1	0	0.0
	新潟市	新潟保健所	20	8	40.0
群馬	新潟市	新潟保健所	10	0	0.0
	万工島	新潟保健所	7	0	0.0
長野	片品村	福井医大	4	0	0.0
	軽井沢町	福井医大	4	0	0.0
埼玉	さいたま市	埼玉県衛生研究所	9	0	0.0
	千葉	成田空港	成田空港検疫所	41	0
静岡	清水港	清水検疫所	38	0	0.0
	愛知県	名古屋市内	愛知医大	110	3
三重	名古屋港	名古屋港検疫所	144	1	0.7
	四日市	四日市検疫所	2	1	50.0
福井	丸岡町	福井医大	3	0	0.0
	淡路島	福井医大	6	0	0.0
兵庫	神戸港	神戸検疫所	64	0	0.0
	神戸市六甲山地	福井医大	4	0	0.0
広島	呉港、宇品港	広島検疫所	3	0	0.0
	福岡	福岡検疫所	15	1	6.7
鹿児島	屋久島	福井医大	10	0	0.0
沖縄	とどろき、名護市、那覇市、大聖村、国頭村、大宜味	沖縄県衛生研究所	153	7	4.6
小計			848	28	3.3

レプトスピラ流行地である宮城県、及び沖縄県本島および伊是名島で調査を実施した。本年度848匹、前年度も含め1204匹を捕獲をした。これら野鼠からレプトスピラ42株（分離率3.5%）を分離した（表1）。

2. 分離レプトスピラの性状. 分離レプトスピラは遺伝種、血清型の同定を行った。日本に土着の最も重症型であるワイル病病原体血清型 *icterohaemorrhagiae* のほか、血清型 *autumnalis*（秋疫A）、*hebdomadis*（秋疫B）、このほかに沖縄に固有の血清型 *javanica*

清型株を分離した。*flaB* 解析からは病原性レプトスピラである *L. interrogans* と同定された。

3. *gyrB* 解析によるレプトスピラの血清型推定法の開発. 迅速に微量の培養からレプトスピラ血清型を推定する方法として *gyrB* の系統解析法の実用性を検討した。ユニバーサルプライマーセットを用いて、*gyrB* 部分配列約1200bpを増幅し、PCR直接シーケンス法により解析を行った。これまでに遺伝種の同定に利用してきた *flaB* 解析に比べ、*gyrB* では同じ株間でも遺伝子レベルで2倍以上変異がみられ多様性に富むことが明らかになり、血清型推定法として有用である可能性が示唆された。

4. 野鼠のレプトスピラ血清疫学的調査. 捕獲野鼠血清のレプトスピラ抗体価をELISA法により調べた。抗原として、日本でこれまで流行が予想される6血清型株間で反応性に違いはみられなかった。また、非病原性レプトスピラで各種血清型に交差反応することが知られる血清型 *patoc* を同じく使用したが、非特異反応が強く見られたことから、実用的ではないと判断した。そこで、血清型 *autumnalis* Akiyami A株を抗原としたELISAにより、各地で捕獲し野鼠血清との反応性を調べた。各種標識二次抗体の各種野鼠抗体との反応性を調べ、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgA+IgG+IgM抗体（KPL社）が幅広くげっ歯類の抗体反応することを確認し、以後の研究にはこれを使用した。また、食虫目に対してはこの抗血清は反応しないため、これらの血清については検討しなかった。

レプトスピラが分離された野鼠とされなかった野鼠間で有意な抗体価の違いはみられな

表2. 分離レプトスピラの遺伝学的、血清学的同定

調査施設	株名	遺伝種	血清型
北海道衛生研究所	HA1135	<i>L.interrogans</i>	<i>autumnalis</i>
北海道衛生研究所	HA1138	<i>L.interrogans</i>	<i>autumnalis</i>
宮城県調査	MA015	<i>L.interrogans</i>	<i>autumnalis</i>
宮城県調査	MA017	<i>L.interrogans</i>	<i>autumnalis</i>
沖縄調査	OM108	<i>L.interrogans</i>	<i>hebdomadis</i>
愛知医科大学	AC89	<i>L.interrogans</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>
愛知医科大学	AC109	<i>L.interrogans</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>
愛知医科大学	AC111	<i>L.interrogans</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>
愛知医科大学	AC113	<i>L.interrogans</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>
愛知医科大学	AC112	<i>L.interrogans</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>
愛知医科大学	AC105	<i>L.interrogans</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>
仙台検疫所	SR013	<i>L.interrogans</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>
仙台検疫所	SR014	<i>L.interrogans</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>
仙台検疫所	SR015	<i>L.interrogans</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>
仙台検疫所	SR016	<i>L.interrogans</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>
福岡検疫所	FR0146	<i>L.interrogans</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>
宮城県調査	MR0118	<i>L.interrogans</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>
宮城県調査	MR0120	<i>L.interrogans</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>
宮城県調査	MR0113	<i>L.interrogans</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>
宮城県調査	MR0114	<i>L.interrogans</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>
宮城県調査	MR0116	<i>L.interrogans</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>
沖縄調査	OR113 (01)	<i>L.borgpetersenii</i>	<i>javanica</i>
沖縄調査	OR116 (01)	<i>L.borgpetersenii</i>	<i>javanica</i>
沖縄調査	OR67 (01)	<i>L.borgpetersenii</i>	<i>javanica</i>
沖縄調査	OS80 (01)	<i>L.borgpetersenii</i>	<i>javanica</i>
沖縄調査	OM51 (01)	<i>L.borgpetersenii</i>	<i>javanica</i>
沖縄調査	OR63 (00)	<i>L.borgpetersenii</i>	<i>javanica</i>
沖縄調査	OS39 (00)	<i>L.borgpetersenii</i>	<i>javanica</i>
北海道衛生研究所	HC1108	<i>L.borgpetersenii</i>	<i>javanica</i>
沖縄調査	OM130 (01)	<i>L.borgpetersenii</i> ?	<i>Castellonis</i> ?
愛知医科大学	AC158	<i>L.interrogans</i>	Unknown
愛知医科大学	AC165	<i>L.interrogans</i>	Unknown
愛知医科大学	AC166	<i>L.interrogans</i>	Unknown
愛知医科大学	ACB-01	<i>L.interrogans</i>	Unknown
愛知医科大学	AC10-01	<i>L.interrogans</i>	Unknown
沖縄	OR36 (00)	<i>L.interrogans</i>	Unknown
宮城県調査	MR019	<i>L.interrogans</i>	Unknown
愛知医科大学	AC159	<i>L.interrogans</i>	Unknown
愛知医科大学	AC162	<i>L.interrogans</i>	Unknown
愛知医科大学	AC11-01	<i>L.interrogans</i>	Unknown
名古屋検疫所	NR01-1	<i>L.interrogans</i>	Unknown
名古屋検疫所	NR49	<i>L.interrogans</i>	Unknown

を見出した（表2）。また、新たな知見としてこれまで沖縄土着と考えられた血清型 *javanica* を北海道の野鼠から見出し、さらにはこれまで沖縄で1例患者が報告される血清型 *castellonis*、さらには沖縄、名古屋、宮城でこれまで日本に存在が予想できない未同定血

かった。これは野鼠は基本的に保有体であり、血液中にレプトスピラが出現せず、腎臓に定着するため、抗体の産生がみられないためと思われる。しかし、レプトスピラが分離された場所の野鼠と分離されない場所の野鼠では、前者では抗体価の高い野鼠が見出された事実から、本抗体測定により環境のレプトスピラ汚染状況を推定できると思われる。すなわち、汚染地では環境水中にレプトスピラがみられ、これと棲息する野鼠が接触することで抗体の産生が促されたものと考えられる。

5. 輸入ハムスターのレプトスピラ保有調査. 輸入ハムスター144 頭からレプトスピラは検出しなかった。しかしチェコ産ハムスターではやや抗体価が高く、生育環境がレプトスピラに汚染されている可能性が危惧された。

6. 沖縄の野鼠、ならびにマダニ由来ライム病ボレリアの性状. 本年度の沖縄調査で捕獲した野鼠 153 匹からボレリア 8 株(分離率 5.2%) の分離に成功した。由来は *Suncus murinus*, *Mus caroli*, *R. norvegicus* であった。また、野鼠に吸血中の *I. granulatus* (ミナミネズミマダニ) 2 個体からボレリアの分離に成功した。5S-23S intergenic spacer, *flaB*, 16SrRNA 遺伝子の配列解析を行い、このボレリアがこれまでに韓国南部、台湾、中国の揚子江流域、タイ、ネパールなど東アジアで分離される *B. valaisiana* 関連群のボレリアであることを明らかにした (図 2)。

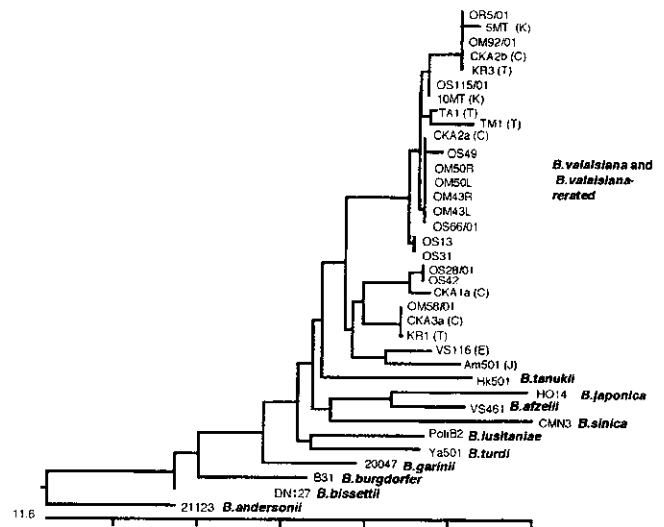


図2. 沖縄由来株の5S-23S intergenic spacer配列に基づく系統樹 *B. valaisiana* および関連群に属す株は、沖縄株は表示なしで、韓国由来株 (K)、台湾由来株 (T)、中国由来株 (C)、欧州由来株 (E)、その他の日本由来株 (J) で示した。

このボレリアは中国では *I. granulatus* により媒介されることが明かであるが、その他の地域でのベクターは不明であったが、今回野鼠吸血中のマダニではあるが、同じボレリアが分離されたことから、媒介者である可能性が強まった。本ボレリアの分類学的位置付けはいまだ確定しおらず、全ゲノム DNA ハイブリダイゼーションによる解析が必要である。現在、それに供すべき DNA 調製のためにボレリアの大量培養、さらに DNA の調製を進めている。

7. 沖縄由来ボレリアの病原性の検討. 病原性をマウスを用いて検討した。マウス足蹠接種により、10 日目から足蹠部の著しい腫脹を認め、感染による炎症が起こっていることを確認した。一方、未接種の足蹠、ならびに 60°C 加熱死菌体接種ではこの反応は見られず、この反応が感染による炎症反応であることが示唆された。感染より 16 日後に解剖し、耳介組織、膀胱を培養したが、ボレリアは検出されなかった。一方対象として行った強毒性 *B. burgdorferi* 297 株感染マウスでは、同組織からボレリアが培養されている。したが、沖縄の *B. valaisiana* 関連群のボレリアは、短期間の感染では全身的感染おこしていない可

能性が強く示唆された。このことから本病原体は感染局所での増殖にとどまり、全身的病変はおこさないものと推定された。

8. 沖縄由来ライム病関連ボレリアの診断システムの構築.

表 3 に示したように、沖縄の野鼠血清 27 検体は *B. valaisiana* 関連群ボレリア TM1 株、および KR1 株に対して強い反応性を示した。一方、ライム病ボレリア *B. afzelii* PGau 株、*B. garinii* HP1 株に対する反応性は弱かった。また、今回ボレリアが分離できた源河で捕獲した野鼠は特に沖縄の他の地域野鼠血清に比べ高い抗体価を示した。本システムの精度も高いことが示された。今後、住民を対象として、疫学的調査を展開し、その実態を明らかにする予定である。

表3. 沖縄由来野鼠のボレリア抗体保有率

検体数	検体数 (%)							
	平均吸光度(405nm)							
	<i>B. afzelii</i> PGau		<i>B. valaisiana</i> TM1		<i>B. valaisiana</i> KR1		<i>B. garinii</i> HP1	
陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	
27	6 (22)	21 (78)	18 (67)	9 (33)	20 (74)	7 (26)	6 (22)	21 (78)
	0.164	0.074	0.249	0.061	0.160	0.061	0.301	0.142

D. 考察

北海道から九州に至る検疫所、衛生研究所、大学からなる全国的調査体制を確立を確立することができた。全国の野鼠のレプトスピラ保有率は 3.5% であるが、名古屋、塩釜港、沖縄などきわめて保有率が高い地域があることが確認された。日本では今日もなおレプトスピラ症は我々の身近に存在し、いつ患者が発生してもおかしくない状況にあることを再確認するとともに、実態解明と監視体制の必要性を示唆した。患者の減少は、レプトスピラ病自体が無くなったのではなく、ヒトの生活様式の変化が原因であることを強く裏付けた。このことは、この生活様式が乱されるような状況下、たとえば災害時などではレプトスピ

ラ病の発生を危惧する必要があることを示している。事実、2000 年の鳥取西部地震では水道設備が壊れ、井戸水を飲用したヒトがレプトスピラ病を発病した事例を経験した。今後は捕獲頭数をさらに増やすことでより信頼性の高いデータを得ることができると考えている。

分離レプトスピラはこれまでより日本に土着の血清型のほかに、沖縄に固有の血清型と思われた *javanica* が北海道の野鼠から見出した。これまで沖縄で 1 例患者が報告される血清型 *castellonis* を初めて沖縄の野鼠から分離した。さらには沖縄、名古屋、宮城の野鼠からこれまで日本に存在が予想できない未同定血清型株を分離した。現在免疫ウサギ抗血清を作成中であり、今後交差凝集、交差吸収試験により血清型を決定予定である。このように今回の調査で、これまでの血清型分布の想定を全く覆すような事態となった。今後とも調査を継続することで、その全貌を明らかにしたい。

また、*gyrB* では同じ株間でも *flaB* に比べ 2 倍以上変異がみられたことから、従来血清型同定法に代わる迅速血清型推定方法として *gyrB* 解析が有用である可能性を示した。より株数を増やして、その有用性を検討中である。

また、超音波破碎菌体を抗原とする ELISA は血清型特異性を示さず、各種血清型抗体と交差反応した。しかし、野鼠のレプトスピラ保有の有無と抗体価の高低は関連が無く、血清疫学的調査には使用できない可能性が示された。これは基本的に野鼠は保有体であり、長期にわたりレプトスピラを腎臓に保有する。一方、抗体産生はこの状況下では誘導されないためと考えられ、長期にわたる保有体化が起こるものと推定される。一方で、レプトスピラ保有野鼠が棲息する場所では、環境中のレプトスピラ汚染からそこに場所に生息する野鼠では抗体価が高い傾向にあると考えられ、

ある程度まとまった数の検体について調べることでその場所のプトスピラ汚染を推定できることが示唆された。

輸入ハムスターチェコ産、台湾産の 144 匹についてレプトスピラ保有の有無を調査し、それを保有しないことを確認した。しかし、チェコ産ハムスターではやや抗体価が高い傾向がみられ、今後も継続した調査が必要と思われる。

沖縄由来ボレリアは東南アジア諸国にみられる *B. valaisiana* 関連群ボレリアであることを明らかにした。保有体が *R. norvegicus*, *M. caroli*, *S. murinus* など幅広く、一方媒介者は *I. granulatus* であることを明らかにした。本ボレリアに対する血清診断法開発のため超音波破碎ボレリア抗原を用いた ELISA を行った。ライム病ボレリア *B. garinii*, *B. afzelii* を抗原としたシステムでは、本ボレリアに対する抗体を検出できないことを明らかにし、一方台湾由来 *B. valaisiana* 関連群ボレリアを抗原とすることで、診断ができる可能性を野鼠血清を用いた検討で明らかにした。今後、本誌システムを用いて、患者の発掘、血清疫学的調査を行う予定である。

F. 健康危険情報

1. 坂本光男, 相楽裕子, 小泉信夫, 渡辺治雄: マレーシア・ボルネオ島で感染したレプトスピラ病の 1 例. 病原微生物検出情報 22(1): 5-6, 2001.
2. 青木智宏, 小泉信夫, 渡辺治雄: 自然災害時のレプトスピラ病. 病原微生物検出情報 22(7): 165, 2001.
3. 小泉信夫, 渡辺治雄, 青山岳子, 木下美由紀, 馬場俊一, 鈴木啓之, 増澤俊幸: 富士山で感染したライム病患者からのボレリアの分離. 病原微生物検出情報 22(10): 248, 2001.
4. 石崎有澄美, 小泉信夫, 渡辺治雄: ボル

ネオ島で感染したレプトスピラ病の 1 例. 病原微生物検出情報 22(10): 290, 2001.

5. 小泉信夫, 渡辺治雄. ラテックス凝集試験によるレプトスピラ抗体検査に関する注意の呼びかけ. 病原微生物検出情報 23(1): 13, 2002.

G. 研究発表

1. 発表論文

1. Masuzawa, T., Dancel, L. A., Miyake, M., and Yanagihara, Y. Serological analysis of human Leptospirosis in the Philippines. *Microbiol. Immunol.*, 45, 93-95 (2001)
2. Takada, N., Fujita, H., Yano, Y., Ishiguro, F., Iwasaki, H., and Masuzawa, T. First records of tick-borne pathogens, *Borrelia*, and spotted fever group rickettsiae in Okinawajima island, Japan. *Microbiol. Immunol.*, 45, 163-165 (2001)
3. Masuzawa, T., Pan, M.-J., Yu, Q., Kadosaka, T., Imai, Y., and Yanagihara, Y. Negative incidence of Lyme disease-related *Borrelia* spp. in Alishan, Taiwan. *Microbiol. Immunol.*, 45, 387-392 (2001)
4. Takada, N., Nakao, M., Ishiguro, F., Fujita, H., Yano, Y., and Masuzawa, T. Prevalence of Lyme disease *Borrelia* in ticks and rodents in northern Kyushu, Japan. *Med. Entomol. Zool.*, 52, 117-123 (2001)
5. Masuzawa, T., Naumov, R., Kudaken, M., and Kharitononkov I. Isolation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* in

- Moscow Province, Russia. Medical Parasitology and Parasitic Diseases (in Russian) 52, (2001)
6. Masuzawa, T., Takada, N., Kudiken, M., Fukui, T., Yano, Y., Ishiguro, F., Kawamura, Y., Imai, Y., and Ezaki, T. *Borrelia sinica* sp. nov., Lyme disease-related *Borrelia* isolated in China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51, 1817-1824 (2001)
 7. Takada, N., Masuzawa, T., Ishiguro, F., Fujita, H., Kudiken, M., Mitani, H., Fukunaga, M., Tsuchiya, KK., Yano, Y., and Ma, X. H. Lyme disease *Borrelia* in ticks and rodents in northwestern China. Appl. Environ. Microbiol., 67, 5161-5165 (2001)
 8. 増澤俊幸：日本のライムボレリア症 -媒介マダニ種と病態-. 総合臨床, 50, 551-554 (2001)
 9. 増澤俊幸：世界におけるライム病の実態と予防ワクチン. 化学療法の領域 17, 2110-2117 (2001)
 10. Miyamoto, K., and Masuzawa, T: Chapter 8. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Japan and East Asia. Lyme Borreliosis: Biology of the Agents and Epidemiology of the Disease (Gray, J., Khal, O., Lane, B., and Stanek, G., ed) CABI Publishing (UK) (in Press)
 11. 増澤俊幸：エーリキア症. 人獣共通感染症 (木村哲、喜田宏編集) 医薬ジャーナル社 (印刷中)
 12. 神山恒夫 エキゾチックアニマルと人獣共通感染症 健康教室 2001, 612:76-79.
 13. Kamiyama, T., Okabayashi, T., and Koura, M. Persistent presence of parasitized erythrocytes in the blood of hosts long after infection with *Babesia microti* followed by loss of infectivity. Third International Conference of Zoonoses, Oct. 12, 2001, The Netherlands.
 14. 神山恒夫 ネコひっかき病とバルトネラ感染 チャイルドヘルス 2002, 5: 54-57.
 15. Kawabata H, Dancel LA, Villanueva SYAM, Yanagihara Y, Koizumi N, Watanabe H: flaB-polymerase chain reaction (flaB-PCR) and its restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis are efficient tool for detection and identification of *Leptospira* spp. Microbiology and Immunology. 45, 497-496, 2001.
 16. Furuta Y, Kawabata H, Ohtani F, Watanabe H.: Western blot analysis for diagnosis of Lyme disease in acute facial palsy. Laryngoscope. 111, 719-723, 2001.
 17. 川端寛樹, 渡辺治雄. ライム病. ボレリアの病原性. 化学療法の領域. 17, 2118-2126, 2001.
 18. 小泉信夫, 渡辺治雄. レプトスピラ病. レプトスピラの病原性. 化学療法の領域. 17, 2160-2165, 2001.
 19. Iwamura T, Yoneyama M, Koizumi N, Okabe Y, Namiki H, Samuel CE, Fujita T: PACT, a double-stranded RNA

binding protein acts as a positivereregulator for type I interferon gene induced by Newcastle disease virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282(2): 515-523 2001.

20. 小泉信夫、渡辺治雄 ワイル病秋やみ混合ワクチン. ワクチンの事典 (印刷中)

21. Tomohiro Aoki, Nobuo Koizumi, and Haruo Watanabe. A case of leptospirosis probably caused by drinking contaminated well-water after an earthquake. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 54(6), 243-244, 2001.

2. 学会発表

1. 柳原保武、Sharon Y.A.M. Villanueva、Louella A. Dancel、増澤俊幸、鈴木克枝、今井康之、川端寛樹、小泉信夫、渡辺治雄：フィリピンでのレプトスピラ症の調査. 第38回レプトスピラシンポジウム (岡山) 2001年4月1日 (抄録 p.11-17)
2. 余勤、潘銘正、角坂照貴、川端寛樹、小泉信夫、中村正治、平良勝也、今井康之、増澤俊幸：台湾、並びに沖縄由来野鼠血清のライム病ボレリアに対する抗体価の検討. 第38回レプトスピラシンポジウム (岡山) 2001年4月1日 (抄録 p.21-22)
3. 増澤俊幸、鈴木克枝、今井康之、川端寛樹、小泉信夫、角坂照貴、後藤郁夫、中村正治、平良勝也、Sharon Y.A.M. Villanueva、渡辺治雄、柳原保武：日本を含む東アジアにおけるワイル病病原体レプトスピラの血清学的、遺伝学的同定. 第38回レプトスピラシンポジウム (岡山) 2001年4月1日 (抄録 p.23-24)
4. 内海宏之、兼城亜由子、清川典子、今井康之、増澤俊幸：ライム病ボレリア細胞接着分子としてのスフィンゴ糖質結合蛋白質 Gbp37 の機能解析. 第38回レプトスピラシンポジウム (岡山) 2001年4月1日 (抄録 p.25-26)
5. 増澤俊幸、川端寛樹、小泉信夫、今井康之：沖縄におけるライム病関連ボレリア種 *Borrelia valaisiana* の発見. 第74回日本細菌会総会 (岡山) 2001年4月3日 (抄録 p.327、ポスター賞授賞)
6. Pong Kian Chua, Jin-Won Song, Toshiyuki Masuzawa, Teruki Kadosaka, Nobuhiro Takada, Chiharu Morita, and Richard Yanagihara: Epizootiology of hantavirus infection in Japan. Hanta virus Conference, (Annecy, France) June 13-16 (2001)
7. 青山岳子、木下美由紀、馬場俊一、鈴木啓之、小泉信夫、増澤俊幸：ライム病の1例 富士山麓でのマダニ刺咬 第9回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー(SADI) (箱根) 2001年8月31日
8. 増澤俊幸、久手堅みどり、山田智香、橋本直弥、井嶋千栄、今井康之：モスクワ近郊におけるライム病ボレリア種とマダニ種との関連について. 第9回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー(SADI) (箱根) 2001年8月31日
9. 増澤俊幸、橋本直弥、井嶋千栄、今井康之：ライム病病原体ボレリア種と媒介マダニ種の特異性～モスクワ近郊における調査から～ 日本薬学会第15回微生物シンポジウム (東京) 2001年9月14日 (抄録 pp.122-123)

10. 増澤俊幸、高田伸弘、角坂照貴、今井康之：ユーラシアにおけるライム病関連ボレリアの分類と媒介マダニ種との関連 第 21 回微生物分類研究会(蒲郡) 2001 年 10 月 27 日 (抄録 p.27)
11. Kawabata H. Plasmid content determines the ability to transform Lyme disease *Borrelia* - Implication of DNA modification system in *B.burgdorferi*-.UT Pathology Seminar. Houston, TX, USA. Nov. 2001.
12. Lawrenz MB, Kawabata H, Norris SJ. Plasmid content determines the ability to transform *Borrelia burgdorferi*. Biology of Spirochete, Gordon Research Conference, Ventura, CA, USA. Jan. 2002.
13. 増澤俊幸、内海宏之、今井康之：ライム病ボレリア病原因子としてのスフィンゴ糖脂質結合蛋白質 Gbp37 日本薬学会第 122 年会 (千葉) 発表予定
14. 橋本直弥、今井康之、増澤俊幸：*Ixodes* 属マダニによる特異的ライム病ボレリア種の保持性 ～ロシア調査からの回答～ 第 75 回日本細菌学会総会(横浜) 発表予定
15. 生嶋昌子、山田文也、河橋幸恵、高岡正敏、草刈朋子、野見山薫、山中正義、千島和彦、藤来靖士、増澤俊幸：ライム病リスク群における感染状況調査。第 3 回埼玉県健康福祉研究発表会 (平成 14 年 3 月 15 日発表)

成田空港における野ネズミ類のペスト抗体調査

分担研究者：神山恒夫（国立感染症研究所、獣医科学部人獣共通感染症室）

研究協力者：長谷山路夫、太田周司（成田空港検疫所、衛生課）

研究要旨：わが国で最も動物輸入量の多い成田空港館内におけるネズミを捕獲し、ペストに対する抗体の保有率を検査した。検査法として、アメリカ合衆国 CDC で標準化された間接血球凝集反応を用いた。捕獲し検体の採取が可能であった 23 頭のネズミのうち、22 頭はアカネズミであった。残りの 1 頭は米国テキサス州から到着した航空機内で捕獲されたハツカネズミであった。検査の結果、全てのネズミは抗体価が $<1:8$ と判定され、ペスト抗体保有率は 0%であった。今後も継続して検査を行う必要性が指摘された。

A. 研究目的

ペストは本来野生齧歯類の感染症であり、これらに寄生するノミによって偶発的にヒトへも感染する人獣共通感染症である。原因菌である *Yersinia pestis* はノミ咬傷部から近傍のリンパ節へ侵入して増殖する。これが血流等を介して全身に回り敗血症を起こす場合もある。ペストによるヒトの死亡率は高く、治療を行わない場合には 50-60% の死亡率に達するといわれる。

わが国は 1926 年以来ペストの国内発生はないため、海外からの侵入を監視することが防疫上きわめて重要である。今年度は、動物輸入量の最も多い成田空港内において野生齧歯類を捕獲し、ペスト菌に対する抗体保有状況を検査した。

B. 研究方法

1. ペスト菌 F1 抗原の調製と感作赤血球の作製

国内における検査・監視体制を継続させるために、ペスト抗原の調製を行った。また、診断対象抗血清として抗ペスト全菌体ウサギ血清を作成した。ペスト菌の培養、F1 抗原の調製、および感作血球の作製は CDC の方法に準拠して行った。概要を次に述べる。

1 ペスト菌 A1122 株 (70 kb プラス

ミドを欠損した無毒株) をソイトンペプトン、およびマイオセートペプトン添加 BHI 寒天培地を用いて培養した。

- 2 37C、3 日間培養後、菌を生理食塩水に浮遊させ、ラバーポリスマンを用いて集菌した。
- 3 3 倍量の冷アセトンと混合した後 1 晩放置した。混合液の一部を生理食塩水で遠心洗浄した後 BHI 寒天培地 5 枚に接種した (各 0.1ml)。
- 4 24 時間後、細菌の発育がないことを確認した後、以下の操作を行った。
- 5 プフナー漏斗上で冷アセトンを用いて菌を洗浄し、粉末とした。
- 6 菌体粉末をトルエン飽和生理食塩水を用いて抽出した。
- 7 抽出物を硫酸アンモニウムを用いて分画沈殿を行い、最終的に 20-30% の硫酸アンモニウム飽和度で沈殿する分画を約 10 mg/ml に調整して F1 抗原とした。
- 8 グルタルアルデヒド固定ヒツジ赤血球をタンニン酸処理した後、F1 抗原による感作と正常ウサギ血清によるブロッキングを行った。

2. 対照抗血清の作成

国立感染症研究所細菌部によって作成されたペストワクチンを抗原としてニュージーランドホワイトウサギを過免疫し、31日後の血清を用いた。

3. HA 反応

マイクロプレートを用いて型の通り HA 反応を行った。反応は室温で 24 時間静置した後判定した。

4. 野ネズミの捕獲と検体の採取

成田空港敷地内に罠を仕掛けて野ネズミ 55 頭を捕獲した。捕獲した動物の内訳はアカネズミ 49 頭、ハタネズミ 2 頭、ハツカネズミ 2 頭、クマネズミ 1 頭、およびジネズミ 1 頭であった。ほとんどのネズミは捕獲器から回収する時点ですでに死亡していた。なおハツカネズミ 2 頭のうちの 1 頭は米国テキサス州から到着した航空機内で捕獲されたハツカネズミであった。

解剖によって血液または血餅を遠心管に採取することができたのはアカネズミ 23 頭とハツカネズミ 1 頭であった。これらの検体は遠心し、得られた血餅に同量の生理食塩水を加えて冷蔵庫内で一晚静置した。これらの遠心上清をペスト抗体測定用材料とした。各検体を 1:8 希釈を最小希釈倍数として希釈し、HA 抗体値を測定した。

C. 研究結果

得られた HA 抗体価を表 1 に示す。

検査が可能であったアカネズミ 23 頭とハツカネズミ 1 頭の全てが抗体価が <1:8 で、陰性と判断された。

表 1：成田空港で捕獲した野ネズミ類のペスト抗体価

番号	種	性別	HA 抗体値
#6	ハツカネズミ	♀	<1:8
#7	アカネズミ	♂	<1:8
#8	アカネズミ	♀	<1:8
#9	アカネズミ	♂	<1:8
#13	アカネズミ	♂	<1:8

#14	アカネズミ	♀	<1:8
#16	アカネズミ	♀	<1:8
#18	アカネズミ	♂	<1:8
#19	アカネズミ	♂	<1:8
#21	アカネズミ	♂	<1:8
#23	アカネズミ	♂	<1:8
#25	アカネズミ	♂	<1:8
#26	アカネズミ	♂	<1:8
#27	アカネズミ	♂	<1:8
#28	アカネズミ	♀	<1:8
#30	アカネズミ	♂	<1:8
#32	アカネズミ	♀	<1:8
#33	アカネズミ	♂	<1:8
#34	アカネズミ	♂	<1:8
#37	アカネズミ	♀	<1:8
#39	アカネズミ	♀	<1:8
#42	アカネズミ	♂	<1:8
#43	アカネズミ	♀	<1:8

D. 考察

ペストは「感染症予防法」で第一類感染症に指定され、検疫感染症としての取り扱ひも受けている。わが国では 1926 年、横浜で 8 名の患者が認められたのを最後に国内発生、輸入例とも報告されておらず、これまでペスト清浄状態が保たれている。

ペスト菌は野生齧歯類を自然宿主とし、ノミの咬傷によってヒトに伝播する。このため、いったん国内に侵入すると野ネズミ対策および衛生昆虫対策をも含んだ広範な対策が必要となり、公衆衛生的、経済的な対価は莫大なものとなる。従って、動物輸入港/空港における侵入阻止を目的とした監視活動はペストの防疫において重要な役割を果たしている。

動物輸入港/空港では海外から到着した船舶/航空機に潜んでいた動物や衛生昆虫が到着後、船舶や航空機から周辺環境に逃亡することは希ではない。事実、今回捕獲したハツカネズミ 2 頭のうちの 1 頭は米国テキサス州から到着した航空機内で発見されたものであった。これらの動物が周辺環境に逃亡して生存し続ける可能性は否定できないため、空港地域において監視活動を行う意義は高いと考えられる。

今回用いた HA 法による抗体検査は、対

象動物種を問わずに応用できることから、ペスト常在地であるアメリカ合衆国においても野生動物のペストスクリーニングに広く用いられている。しかし感染早期には十分な抗体産生が行われなため、HA法が適用できない場合もあると思われる。現在、これに変わる方法としてPCRによる検査法の条件を設定中であるので、今回用いた検体およびさらに次年度以降捕獲されるネズミ検体についても検査対象とする予定である。

今年度以降も、成田空港においてのネズミ類を捕獲して血清検査ならびにPCR法によってペスト菌およびペスト抗体の保有状況を監視してゆく必要がある。

E. 結論

成田空港館内で捕獲した野ネズミ 23 頭におけるペスト抗体の保有率を、アメリカ合衆国 CDC で標準化された間接血球凝集反応によって検査した。その結果、全てのネズミは抗体価が $<1:8$ と判定され、ペスト抗体保有率は0%と判断された。

今後も継続して検査を行う必要性が指摘された。

F. 健康機器情報

動物輸入港/空港では海外から到着した船舶/航空機に潜んでいた動物や衛生昆虫が到着後、船舶や航空機から周辺環境に逃亡することは希ではない。

これらの動物が周辺環境に逃亡して生存し続ける可能性は否定できないため、空港地域においてペスト監視活動を行う必要がある。

G. 研究発表

神山恒夫 エキゾチックアニマルと人獣共通感染症 健康教室 2001、612:76-79.

Kamivama, T., Okabayashi, T., and Koura, M. Persistent presence of parasitized erythrocytes in the blood of hosts long after infection with *Babesia microti* followed by loss of infectivity. Third International Conference of Zoonoses, Oct. 12, 2001, The

Netherlands.

神山恒夫 ネコひっかき病とバルトネラ感染 チャイルドヘルス 2002、5:54-57.

米国におけるヒトおよびプレーリードッグ等の野生げっ歯類におけるペスト感染調査報告

神山恒夫（国立感染症研究所獣医科学部）

調査要旨：米国における近年のペスト発生状況ならびに野生齧歯類等のペスト菌保菌動物の管理に関して、CDC および関連の米国連邦政府および州政府機関等で情報の収集と調査を行った。特に野生プレーリードッグはヒトに対してペストの感染源となる危険性が高いため、ペットとして飼育することに対して懸念が示された。わが国への野生齧歯類等の主な輸出州であるテキサス州における調査では、米国からわが国へ輸出される野生齧歯類等に関しては法令による健康管理は行われていないことが明らかとなった。プレーリードッグに関しては輸出前に行われる殺虫剤を用いたノミ駆除処理によるペスト感染の防止は困難であることが示された。調査の結果、わが国においては、ヒトに感染した場合に深刻な健康被害を与える人獣共通感染症の原因動物の輸入に対して厳重に監視を行い、法の範囲内で輸入制限を行うなどの措置が必要であると考えられた。

A. 研究目的

ペストはアフリカ、南北アメリカ、およびアジアに発生が多く、1999年にWHOに報告された患者数は14カ国から2603名で、このうち212名が死亡したとされている。1988年から10カ年の平均患者数は2547名（うち181名が死亡）で、明瞭な増加傾向は認められないものの、依然として大きな健康被害を与えている。患者の約75%はアフリカ諸国からの報告である。

アメリカ合衆国におけるペスト発生数は、全世界からWHOに報告されるペスト患者数のおよそ0.5%前後をしめるにすぎない。しかしわが国ではアメリカ合衆国でペストの感染源として重要視されている野生プレーリードッグ等をペットとして多数輸入している。このため、米国のペスト状況を的確に把握し、野生齧歯類の管理状況についても情報を把握しておく必要がある。本年はアメリカ合衆国CDCおよびテキサス州衛生部において米国におけるペスト発生・対策状況並びにプレーリードッグ等野生齧歯類におけるペストと輸出入管理について調

査を行った。

B. 調査期間、訪問先、面談者

2001年5月27日-6月7日

1. CDC ベクター介在疾病部（コロラド州フォートコリンズ）：Kennith Gage 博士、Michael Kosoy 博士、David T. Dennis 博士ほか。
2. テキサス州衛生部人獣共通感染症対策室（テキサス州オースチン）：Jane. C. Mahlow 博士、Ernest Oertli 博士ほか。
3. テキサス州動物衛生協会（テキサス州オースチン）：Terry Conger 博士、Max Coats 副理事長ほか。
4. USDA テキサス州事務所（テキサス州オースチン）：Richard Ferris 地域総括獣医補。

C. 調査結果

ペスト検査体制

CDC ベクター介在疾病部（DVD）はコロラド州フォートコリンズに置かれている。DVDにはDept. Bacterial Zoonosesなどの部門が含まれ、Dept. Bacterial Zoonose

には Section of Plague (室長 K. Gage 博士) などがある。

Section of Plague では、Y. pestis の細菌学的な研究の他、診断・治療法の開発、および疫学調査等を行っている。また、血清診断用の血球凝集反応とその阻止試験のための診断抗原等の製造も行っており、ここから全米の協力機関へ配布されている。このため、アメリカではペスト血清検査は統一的な方法で行うことが可能となり、検査機関どうしの技術的ばらつきを最小限に押さえることができる。発病初期の患者診断には血清検査は応用できないために、検体を CDC 送付して診断している。また動物のペストの培養による確定診断も CDC によって行われている。

ペストの疫学

アメリカでは 1900 年に香港からサンフランシスコに侵入したペスト菌が次第に各種の齧歯類に広がり、汚染地域が東へ向かって拡散した。現在はロッキー山脈東山麓を東限として合衆国西部を汚染している。患者数の多いのは、コロラド、ニューメキシコ、ユタ、およびアリゾナ州のいわゆる Four-corner States とその周辺の州である。

過去約 30 年間 (1970-2001 年 5 月) 米国において報告されたペスト患者の総数は 374 例で、年間約 10 名前後の患者数であるが発生数の年変動は大きく (1 例-40 例/年)、その主要原因は気候条件等によるノミやげっ歯類の数の変動であると考えられている。長期的な増加傾向または減少傾向は認められていない。最近では 1998 年に 9 例、1999 年に 8 例、2000 年に 6 名の患者が報告されている。2001 年は 5 月末現在発生はない。米国におけるペストの発生ピークが初夏であることを考えるとこれは異例な発生状況であるが、動物のペスト発生が減少しているとの証拠は得られていない。このように動物の感染とヒトの感染状況に直接の相関が認められないのは、ペストの疫学としてはきわめて希なケースと思われる。この不一致の原因については不明である。

最近における米国のペスト発生の注目すべき現象の一つとして、ネコを感染源とするヒトの感染例がみられることである。この 20 数年間で、平均、1 年に 1 名の割合で発生している。感染ネコによる咬傷やひっかき傷からの菌の侵入、および感染ネコからの飛沫によるエアロゾル感染もあると考えられている。この背景としては、齧歯類のペスト汚染地域への人間の生活圏拡大によって飼い猫の感染機会が増加していることがあげられる。

アメリカでは、動物のペストが発見されると、その周辺住民に対して郡政府の衛生部によって対策がとられる。郡衛生部は CDC および州衛生部からの助言を参考に、動物流行の状況、住民と動物との距離、ペットの状況などを考慮して対策の内容を定め郡政府の責任において実行する。

ペスト菌保菌動物

米国におけるペスト菌の保菌動物には各種齧歯類のほか種々の野生動物がある。このうち、いわゆる増幅動物としてはプレーリードッグが最も大きな役割を果たしていると考えられている。

プレーリードッグのペスト感受性はきわめて高く、感染コロニーの動物はほぼ全頭が死亡し、2-3 年後に新たにコロニーが作られる。

プレーリードッグは農場や放牧場に穴を掘り、これの穴にウシやウマが足を取られてけがの原因となることから、テキサス州をはじめ畜産を主要産業とする西部諸州においては害獣として扱われてきた。そのような悪印象のためか従来プレーリードッグは家庭での飼育対象とはなっていなかった。しかし、近年になってプレーリードッグをペット動物として飼育する人が徐々に現れてきている。連邦政府およびテキサス州には日本と同様にこれらの動物の飼育を制限する法令はない。

テキサス州では州の西側二分の一から三分の二の地域で、プレーリードッグやその他の野生動物にペストを始めとして各種の人獣共通感染症があり、時に人への感染源となっている。この 10 年程度の間、徐々に