

**Table 1. Protection of C3H/HeJ mice immunized with recombinant LigA-mΔN and LigB-mΔN<sup>a</sup>**

Immunogens	Exp.1		Exp.2	
	No. of survivors / total no. of animals tested <sup>b</sup>	Days to death	No. of survivors / total no. of animals tested <sup>b</sup>	Days to death
Naive	1/5	5, 5, 5, 5	0/11	4, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5
GST	0/5	5, 5, 5, 6, 6	2/5	4, 5, 5
LigA-mΔN <sup>c</sup>			9/10	6
LigB-mΔN <sup>d</sup>			9/10	5
LigA-mΔN + LigB-mΔN	5/5		5/5	

<sup>a</sup>Mice were challenged intraperitoneally with  $1 \times 10^6$  *L. interrogans* UP-MMC-NIID

<sup>b</sup>No. of mice survived at 21 days after challenge

<sup>c</sup>LigA-mΔN (aa 68 - 1,224)

<sup>d</sup>LigB-mΔN (aa 68 - 1,191)

続いて LigA-m がレプトスピラ菌体表面に露出しているか否かを, proteinase K (PK)消化により調査した. Fig. 2C に示すように, LigA-m は PK 処理により消失したが, ペリプラズに存在する Loa22 は変化が認められないことから, LigA-m は細胞表面に露出していることが示唆された.

#### 4. LigA-m, LigB-m はマウスにおいて感染防御を付与する

LigA-m, LigB-m が感染防御抗原として機能するかを明らかにするために, C3H/HeJ マウスを用いた感染防御試験を行った. 感染防御実験の結果, LigA-m, LigB-m には, それぞれ感染防御能があることが明らかになった (Table 1).

#### 5. レプトスピラ症患者血清中の LigA-m, LigB-m 抗体価の測定

*L. interrogans* serovar Manilae に感染した患者血清中の LigA-m, LigB-m に対する

抗体価は, 健常人の血清中の抗体価に比べて有意に高かった (LigA-mC:  $P < 0.001$ , LigB-mC:  $P < 0.03$ , Fig. 3). また serovar Manilae 以外の血清型のレプトスピラに感染した患者の回復期血清中の LigA-m, LigB-m に対する抗体価は, 急性期血清中の抗体価と比較して有意に上昇していた ( $P < 0.001$ , Fig. 4).

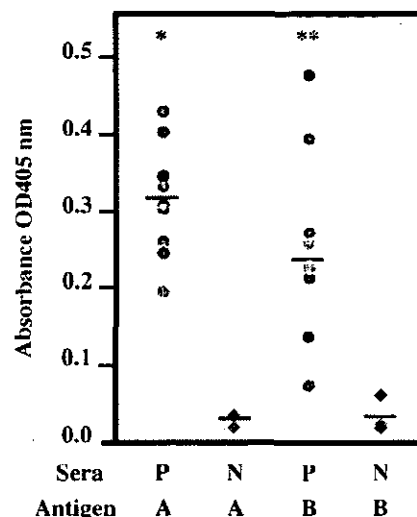


Fig. 3. IgG antibody responses in patients infected with serovar manilae and healthy (Dipstick, MCAT and MAT-negative) people (control group) to recombinant LigA-mC and LigB-mC as determined by ELISA. Absorbance (OD<sub>405</sub>) values were determined by (OD<sub>405</sub> value of GST/LigA-mC or LigB-mC) - (OD<sub>405</sub> value of GST). Circles and diamonds represent patient's serum samples (P, MAT titer > 400) and control serum samples (N), respectively. The same colors in circles or diamonds indicate the samples collected from the same individuals. A; LigA-m, B; LigB-m. \*,  $P < 0.001$ . \*\*,  $P < 0.05$  versus control sera (Student's *t*-test).

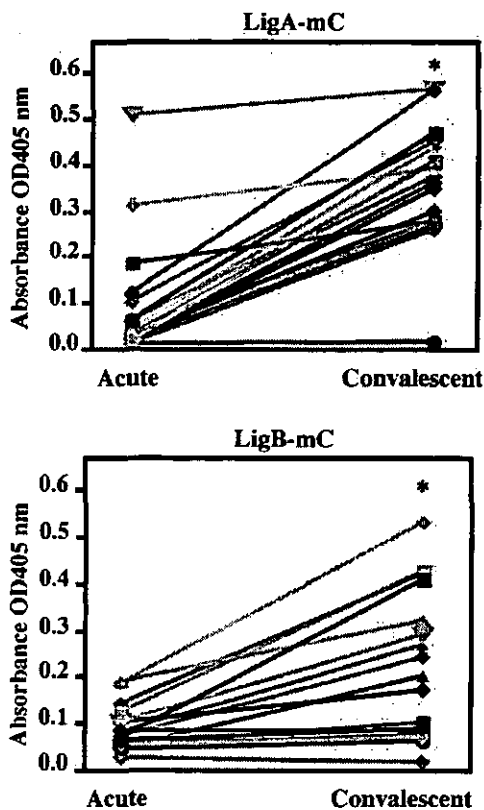


Fig. 4. LigA-m and LigB-m antibody titers in sera from patients with leptospiral infection other serovar than Manilae. We used serum samples that showed at least a 4-fold raise of titer against one serovar strain in paired sera by the MAT in this study. Each line which connects two spots represents the ELISA titer of acute and convalescent paired sera from an individual infected with serovar Autumnalis (■), Hebdomadis (●), Icterohaemorrhagiae (▲), Javanica (▼) or Pyrogenes (◆). Absorbance (OD<sub>405</sub>) values were determined by (OD<sub>405</sub> value of GST/LigA-mC or LigB-mC) - (OD<sub>405</sub> value of GST). The same colors in the figures of LigA-m and LigB-m indicate the samples collected from the same individuals. \*,  $P < 0.001$  versus acute sera (paired *t*-test).

#### 考察

本研究によって、レプトスピラタンパク質抗原 LigA-m, LigB-m を同定することができた。LigA-m は、レプトスピラ菌体表面に露出するリポタンパク質であることが示唆された。Lig タンパク質は、病原性レプトスピラにのみ存在し、また他の病原細菌の接着因子に存在する細菌イムノグロブリン様ドメインが存在することから、Lig タンパク質は、レプトスピラの病原性に関与し、細胞接着因子として機能している可能性が示唆された。

感染防御実験の結果から、Lig タンパク質はマウスにおいて感染防御能をもつことが明らかになった。レプトスピラ症に対する現行のワクチンは、血清型に特異的な効果しかなく、多くの血清型に有効な新たなワクチンの開発が急務となっている。サザンブロット解析の結果、*lig* 遺伝子は多くの病原性レプトスピラで保存されていることが明らかになった。さらに、異なる血清型に感染したレプトスピラ症患者血清中には、Lig タンパク質に対する抗体が産生されていることから、Lig タンパク質は、多くの血清型のレプトスピラ感染に有効な新たなワクチン原となりえることが考えられた。今後、他の血清型を用いて、また他の動物モデルも用いて感染実験を行い、Lig タンパク質の有用性を検証していくことが必要である。

#### 論文発表・著書

1. Koizumi N, Watanabe H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. Vaccine in press.
2. Hirano M, Ding X, Li TC, Takeda N, Kawabata H, Koizumi N, Kadosaka T, Goto I, Masuzawa T, Nakamura M, Taira K, Kuroki T, Tanikawa T, Watanabe H, Abe K. Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. Hepatology Research 27 (1): 1-5 2003.
3. Koizumi N, Watanabe H. Molecular

- cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. *FEMS Microbiology Letters* 226 (2): 215-219 2003.
4. 小泉信夫, 渡辺治雄, 梅澤和夫, 飯塚朝明, 猪口貞樹. PCRにより早期診断が行えたレプトスピラ病の1例. *感染症学雑誌* 77 (8): 627-630 2003.
  5. Koizumi N, Watanabe H. Identification of a novel antigen of pathogenic *Leptospira* spp. that reacted with convalescent mice sera. *Journal of Medical Microbiology* 52 (7): 585-589 2003.
  6. Koizumi N, Kawabata H, Watanabe H. Probable laboratory contamination of clinical specimens with *Leptospira meyeri*. *Microbiology and Immunology* 47 (4): 305-306 2003.
  7. 小泉信夫, 渡辺治雄 西表島のレプトスピラ症. *病原微生物検出情報* 24(12): 327 2003.
  8. 小泉信夫, 渡辺治雄 ワイル病. *化学療法の領域* 20(2): 220-223 2004.
  9. 小泉信夫, 渡辺治雄 人獣共通感染症としてのレプトスピラ病. *Infovets* 6(6): 18-21 2003.
  10. 川端寛樹, 小泉信夫, 渡辺治雄 レプトスピラ症. *動物由来感染症 その診断と対策* 227-231 2003.
- 学会発表
1. 増澤俊幸, 角坂照貴, 小泉信夫, 川端寛樹, 中村正治, 平良勝也, 今井康之 ライム病の存在が予期されなかった沖縄で見出されたライム病関連ボレリアの性状. 第3回人と動物の共通感染症研究会学術集会・東京, 2003年11月
  2. 林栄治, 赤尾信明, 小泉信夫, 谷川力, 藤田紘一郎 東京都心部における野ネズミの広東住血線虫の寄生状況と中間宿主の調査. 第63回日本寄生虫学会東日本支部大会. 横浜, 2003年10月
  3. 小泉信夫, 渡辺治雄 レプトスピラの新規抗原タンパク質の探索. 第76回日本細菌学会総会. 熊本, 2003年4月.
  4. 小泉信夫, 星野真西, 谷川力, 牧野敬, 林栄治, 川端寛樹, 黒木俊郎, 川中正憲, 田栗利紹, 渡辺治雄 野生動物のレプトスピラ保有状況調査・東京都内ドブネズミ及びアライグマの場合. 第40回レプトスピラシンポジウム. 福岡, 2003年3月.
  5. 小泉信夫, 渡辺治雄 病原性レプトスピラの新規リポタンパク質の同定. 第40回レプトスピラシンポジウム. 福岡, 2003年3月.
  6. 増澤俊幸, 角坂照貴, 川端寛樹, 小泉信夫, 後藤郁夫, 中村正治 レプトスピラ病疫学調査結果 最終報告. 第40回レプトスピラシンポジウム. 福岡, 2003年3月

本研究で使用した PCR プライマーの一覧表

プライマー名	配列(5'・3')	用途
iLigA-mF	CAAGTGCAAATGCGACATTCC	IPCR ( <i>ligA-m</i> )
iLigA-mR	TCCCGACTGCAATCGCCTTA	IPCR ( <i>ligA-m</i> )
iLigB-mF	CAGGGATATTTCTCTTCTG	IPCR ( <i>ligB-m</i> )
iLigB-mR	GCACGAATATGAGCTGTTCC	IPCR ( <i>ligB-m</i> )
LigF	CATGCCATGGGGAAGAAGATATTTTGTATTTTCGATTTTCC	サザンロット用 プローブ LigA-m/His <sub>6</sub> LigB-m/His <sub>6</sub>
LigR	CTAAGGTCGCAGTAATAGTCGT	サザンロット用 プローブ
LigA-mCF/GST	GCGCGGATCCACAGAGCAAGTCACCTGGA	GST/LigAm-C
LigA-mCR/GST	GCCGCTCGAGCTATGGCTCCGTTTTAATAGAGGC	GST/LigAm-C
LigB-mCF/GST	GCGCGGATCCACTCCGGCACAATTGATTTCC	GST/LigBm-C
LigB-mR	GGAAGATCTCTTGATACTACTAAGAGAAAAATCTGCGG	GST/LigBm-C LigB-m/His <sub>6</sub>
LigA-mR	GGAAGATCTTGGCTCCGTTTTAATAGAGGC	LigA-m/His <sub>6</sub>
GST-F	CATGCCATGGGGAAGAAGATATTTTGTATTTTCGATTTTCC	GST/His <sub>6</sub> His <sub>6</sub> /GST
pGEX sequencing primer	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	GST/His <sub>6</sub> His <sub>6</sub> /GST

下線は制限酵素サイト

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症）  
分担研究報告書

東海地方のネズミ類由来レプトスピラ調査（2003年）

研究分担者 角坂照貴 愛知医科大学・医学部・講師  
主任研究者 増澤俊幸 静岡県立大学・薬学部・助教授  
研究分担者 川端寛樹 国立感染症研究所・細菌第1部  
研究協力者 川森文彦 静岡県環境衛生研究所  
研究協力者 名古屋市生活衛生センター・感染症調査係

研究要旨

名古屋市内のイエネズミのレプトスピラ保有状況を2000年から3か年にわたり調査してきた。ここでは、その後に実施した2003年のネズミ類のレプトスピラ保有状況と、分離されたレプトスピラ株の解析結果について報告する。今回の調査地域は、名古屋市内、愛知県東部、岐阜県恵那市周辺、静岡県浜松市周辺で行なわれた。

イエネズミ28匹、ノネズミ63、食虫類6匹から分離された2株のレプトスピラは、*gyrB* 遺伝子解析を施行したが、血清型を推定することが出来なかった。名古屋市内のイエネズミ21匹から7株のレプトスピラを確認したが6株は培養が出来なかった。

研究目的

ネズミ類を感染源に発生していると思われるレプトスピラ症は、近年では生活様式の変化等により患者数、死亡例数は減少しているが、今なお毎年のように患者が発生している。今年度に改正された感染症法では、本症は全数把握感染症となり、患者の発生状況を監視できる体制ができた。しかし、感染源として重要なネズミ類のレプトスピラ保有状況の情報は乏しく、また、海外との交流が盛んになった現在では、海外からの未知血清型の国内への侵入も危惧されている。国内においても現在までに知られている血清型に加えて、新たな種、血清型の侵入を常に監視する必要がある。2000年からレプトスピラの全国調査が開始された。

レプトスピラ症は黄疸、出血、蛋白尿の他に多様な症状を呈するため診断が困難な場合もみられる。診断には、型特異的抗原を用いた顕微鏡凝集試験（MAT）が一般的であるが、全世界で250以上の血清型が知

られるため、使用する型特異的抗原を誤れば正確な診断ができない

レプトスピラは、多くの動物に感染し多様な症状を呈するが、ヒトへの感染源として重要なネズミ類においては、無症状であることが多く、これらが保菌動物として重要な役割をはたしている。イエネズミ類が多く生息する都心に加えて、山間部に生息するノネズミ類にも感染がみられるために、これらの調査も必要となってきた。

このため、名古屋市内の他に、愛知県東部、岐阜県恵那市周辺、静岡県浜松市周辺でノネズミも含めてネズミ類を捕獲してレプトスピラの分離調査を実施した。

材料・方法

1. レプトスピラの分離・培養法

2003年の調査ではネズミ類の腎臓からEMJH培地で分離・培養した。

## 2. 使用菌株

名古屋市内のマンホールで捕獲されたドブネズミ、岐阜県恵那市の山林内で捕獲されたヒメネズミから分離され、培養に成功した2株の分離株を使用した。

## 3. *gyrB* 遺伝子配列による解析

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、それぞれの遺伝子の PCR 反応を行ない、PCR で増幅した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、塩基配列を決定し解析した。

## 結果

### 1. ネズミ類からのレプトスピラ分離状況

2003年の1月から12月までの間に名古屋市内、愛知県小原村、新城市、岐阜県恵那市小野川、静岡県浜松市周辺で捕獲されたドブネズミ28、アカネズミ54、ヒ

メネズミ7、スミスネズミ2匹、食虫類6匹から分離を試みた。その結果、名古屋市内のマンホールで捕獲されたドブネズミから1株、岐阜県恵那市小野川の山林で捕獲されたヒメネズミから1株を分離した。

名古屋市内のマンホールでは、2003年6月から10月までに捕獲された21匹のドブネズミから6株の培養が継続できない株の存在が確認された。これらのレプトスピラは、培養開始の翌日から10日目に暗視野顕微鏡による検鏡で運動性、形態学的にレプトスピラと認められた。同地域で分離された1株を含めると21匹中7匹(33%)に感染が認められた(Table 1)。

### 2. *gyrB* 遺伝子配列に基づく種の同定

*gyrB* 遺伝子配列により、分離された2株の血清型の推定を試みたが、知られている配列と一致していない。培養が継続できなかった6株については解析ができなかった。

Table 1 東海地方のネズミ類から分離されたレプトスピラの遺伝子種および予測血清型

分離株	捕獲地	種類	分離臓器・培地	種	予測血清型
nagoya-2/03	天白区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・EMJH	未同定	未同定
aichi-6/03	岐阜県恵那市小野川	<i>Apodemus argenteus</i>	腎臓・EMJH	未同定	未同定
1*	名東区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・EMJH		
2*	名東区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・EMJH		
3*	名東区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・EMJH		
4*	北区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・EMJH		
5*	瑞穂区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・EMJH		
6*	瑞穂区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・EMJH		

\* 培養初期に顕微鏡的に感染が確認されたが、培養が継続できなかった。

## 考察

2003年に名古屋市のドブネズミと岐阜県恵那市小野川のヒメネズミから分離された2株は、*gyrB* 遺伝子配列による血清型の推定を試みたが、知られている配列と一致せず、推定することができなかった。2000年から始めた調査でも、血清型の推定に至らなかった株の存在を確認しており、国内に未知の血清型が存在することが示唆された。これらの株は、Korthof 培地や EMJH 培地での増殖率が低い。

2000年から始めた調査で、EMJH、Korthof 培養で培養が継続できないレプトスピラのネズミ類への感染を指摘していたが、2003年のネズミ類の調査でも、これらのレプトスピラが確認された。これらは、培養開始の翌日から10日目くらいまでに暗視野顕微鏡で検出できるが、その後消失する。保有動物であるネズミ類の腎臓に感染しているが、ヒトや家畜への感染性、病原性は全く不明であり、レプトスピラ感受性動物への感染性、病原性を確認する必要がある

と考える。今年の名古屋市内での検出率は30%を越えるために、早期から培地を検鏡して検出に勤める必要があると思われる。これらは、継続した培養ができないために血清型の解析は行われていない。

名古屋市内では、2000年からの調査で重症型レプトスピラ症(Weil病)の起原菌の1つである血清 icterohaemorrhagiae と血清型 autumnalis が分離されている。それに加え、今年度も未同定種が確認され、これらは従来の診断用レプトスピラ株と反応しないため、国内の検査機関ではこの株を検出できない可能性が高く、未同定株の病原性の確認と検出法の迅速な対応が急務である。

東海地方では、今年度から調査地域を拡げ、山間部に生息するノネズミ類も対象に調査してきた。岐阜県恵那市の山間部で分離された1株は、湿った地表が広がる沢筋で捕獲されたヒメネズミからであった。

レプトスピラ症は、今年度から感染症法の4類に加えられ患者の発生状況が監視できる体制がとられたが、近隣諸国でレプトスピラ症患者数が増大していることから考えると、これらの流行株が国内に侵入することも十分に考えられ、今後も調査地域を拡大して調査を実施する必要がある。

#### 論文

1. H. Misumi, M. Takahashi, T. Kadosaka, H. Urakami, M. Takahama, K. Lerdthusnee, M. Misumi, and I. Matsumoto. Comparative study of human dermatitis caused by the bites of unfed larval trombiculid mites, *Leptotrombidium pallidum* and *L. scutellare* (Acari: Trombiculidae). *Medical Entomology and Zoology*. 54(1): 201-204, 2003.
2. Yu Qiang, A. Tamural, H. Urakamil, Y. Makisakal, S. Koyama1, M. Fukuhara1 and T. Kadosaka. Phylogenetic Characterization of *Orientia tsutsugamushi* Isolated in Taiwan According to the Sequence Homologies of 56-kDa Type-Specific Antigen Genes. *Microbiology and Immunology*. Vol. 47(8): 577-583, 2003.
3. M. Hirano, Xin Dinga, Tian-Cheng Li, N. Takeda, H. Kawabata, N. Koizumi, T. Kadosaka, I. Goto, T. Masuzawa, M. Nakamura, K Taira, T. Kuroki, T. Tanikawa, H Watanabe, and K. Abe. Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. *Hepatology Research* 27(1) : 1-5, 2003.
4. E. S. Güner, N. Hashimoto, T. Kadosaka, Y. Imai and T. Masuzawa. A novel, fast-growing *Borrelia* sp. isolated from the hard tick *Hyalomma aegyptium* in Turkey. *Microbiology*, Vol. 149 (9): 2539-2544, 2003.
5. T. Kadosaka, and E. Kimura. Electron Microscopic Observations of *Orientia tsutsugamushi* in Salivary Gland Cells of Naturally Infected *Leptotrombidium pallidum* Larvae during Feeding. *Microbiology and Immunology*, Vol. 47(10) :727-733, 2003.

#### 学会発表

1. レプトスピラ病疫学調査結果 最終報告。  
増澤俊幸、角坂照貴、川端寛樹、小泉信夫、後藤郁夫、中村正治。  
第40回レプトスピラシンポジウム  
平成15年3月31日 福岡
2. 名古屋市内のネズミから分離されたレプトスピラ。  
角坂照貴、増澤俊幸、名古屋市生活衛生センター。第55回日本衛生動物学会大会 平成15年4月2日 大分
3. ライム病の存在が予期されなかった沖縄で見出されたライム病関連ボレリアの性状。  
増澤俊幸、角坂照貴、小泉信夫、川端寛樹、中村正治、平良勝也。第3回人と動物の共通感染症研究会学術集会 平成15年11月1日 東京

野鼠のペスト菌保菌に関する調査・研究

主任研究者 高橋英之 国立感染症研究所 細菌第一部 研究員

研究要旨

全国で捕獲された 114 匹の野鼠の摘出脾臓からのペスト菌の培養検出を行なった。その結果、ペストの陽性反応の出た個体は検出されなかった。

A. 研究目的

日本国内においては、過去50年以上ペスト患者の報告例はないことから国内での感染の危険性は極めて低いか全くないと考えられてきた。しかし一方で、2002年におけるプレーリードックの輸入に伴ったペストや野兔病の原因（若しくは起因）病原体侵入の危険性が注目された例を始めとして、今後、本邦において海外からの感染源（保菌動物）の侵入もしくは輸入に起因する輸入感染が想定される。さらにはバイオテロに使用可能な微生物あることから、危機管理体制の準備は最優先課題である。世界的にはホットスポットの一つであるアフリカで、WHOを中心にサーベイランス及び制圧対策を行なっているが、日本においてはペストに関する同定、検出、サーベイランスを含めた総合的な管理態勢は不十分であり、その充実が日本の感染症危機管理においても非常に有益かつ重要であると考えられる。本研究においては危機管理の観点から国内の小動物のペスト菌の保菌状況を調査すると共に現在の国内におけるペストに関する危機管理体制（同

定、検出、確定等）の整備・充実を試みた。

ペストの輸入感染の危険性はもはや排除できないと推測される現在においては、水際での防疫対策の有無が最も有効な行政対策として考えられる。本研究では同定・検出法の確立、およびレファレンス株の整備、2) リスク評価のための基礎資料となる現状の把握、を二つの大きな柱とする。以上の研究成果により、ペストの輸入感染事例に対して科学的、行政的に迅速な判断、対応が可能になると共に、将来的なペスト感染に関する防疫指針の基礎資料作成に貢献できると考えられる。

B. 研究方法

野鼠試料の回収

ノミによる鼠の全身感染が想定されるため、血液が集積される器官である脾臓を本研究のターゲットとした。本年度においては本研究班で実施された野鼠の捕獲とその調査で得られた野鼠の脾臓の一部の分与を受け、その試料を用いて解析を進めた。



## 菌の生育方法

ペスト菌の分離・選択に用いられるマッコンキー寒天培地を分離培地として用い、試料を塗布後、37℃、5% CO<sub>2</sub>、加湿条件下で培養した。コロニーの形成が認められたものに関しては血液寒天培地、Luria 培地、マッコンキー寒天培地に単一画線培養後、単一コロニーを形成した菌の生化学的性状の検査を実施した。

## 脾臓の処理

分与を受けた脾臓が一部の場合には 100 µl の滅菌リン酸バッファーと共に 滅菌処理した 1.5 ml エッペンドルフチューブ用のハンディホモジェナイザーで脾臓をすりつぶし、そのホモジェネートをマッコンキー寒天培地に塗布し、1週間培養した。分与を受けた脾臓が一個体分である場合には火炎による脾臓の表面の滅菌処理後、滅菌解剖ハサミとピンセットにより脾臓にスリットを入れ、その滑面をマッコンキー寒天培地に塗布し、1週間培養した。

## 培養陽性の確認

1週間の培養後、寒天培地を観察し、コロニーが形成されていない場合を陰性、コロニーが形成されている場合を陽性とした。正確にはマッコンキー寒天培地ではラクトース分解性をコロニーの赤白（赤：ラクトース代謝陽性、白：陰性）で判定出来、ペスト菌はラクトース非代謝性であるため、マッコンキー寒天培地上での菌の判定の一部が既に実施可能である。本研究において

はとりあえず得られた細菌はマッコンキー寒天培地上の色に係わらず単離し、その後の判別に移った。

## 菌の同定法

ペスト菌の生化学的性状を基にした同定は一般的には以下のような項目で行われている<sup>1) 2) 3)</sup>（カッコ内はペスト菌の反応）。

1. マッコンキー寒天培地（もしくは遠藤培地）での選択培養（培養陽性）
2. マッコンキー寒天培地におけるラクトース非代謝性（白色コロニーの形成）
3. グラム染色によるグラム陰性桿菌、さらに双極（桿菌の両端が顕著に染まる像）の確認
4. TSI 寒天培地によるグルコース、ラクトース、ショ糖の分解性  
（グルコース陽性、ラクトース及びショ糖陰性）
5. オキシダーゼ反応（陰性）
6. SIM 培地による以下の項目の確認  
@硫化水素(H<sub>2</sub>S)産生性（陰性）  
@インドールピルビン酸(IPA)産生性（陰性）  
@運動性（陰性）
7. VP 試験（アセチルメチルカルビノール）（陰性）
8. LIM 培地による lysine decarboxylase（陰性）及び運動性（陰性）の検査  
上記の確認をした後、さらに詳細な生化学的性状を検査する<sup>1) 3)</sup>。一方で抗 Fraction I 抗体を用いた間接抗体法等の免疫学的同定法や multiplex PCR による分子生物学的手

法<sup>4)</sup>によりペスト菌であることを確認する。

ペスト菌でないと判断された場合には ID テスト EB-20 (日水製薬) による簡易的な同定試験を実施し、菌種の同定を行なった。

### C. 結果

本研究班で実施された野鼠の捕獲とその調査で得られた一部の野鼠計 114 匹に関してその脾臓におけるペスト菌の潜在の可能性を培養検出を指標に検討した。その結果、三個体の培養が陽性となった。個体番号: 富士-5 から二種類のコロニーが得られたため、富士 5-1 と富士 5-2 と命名し、単一コロニーとして再分離後、生化学的性状を基にした同定試験に移った。

東京都 8 はマッコンキー寒天培地で小さいが、赤いコロニーを形成することからラクトース代謝性であり、さらにオキシダーゼ陽性であった。以上の結果から、東京都 8 の個体から分離された株は *Yersinia* 属を含めた腸内細菌のクライテリアには全く分類されないことからそれ以上の解析は進めなかった。

富士 5-2 はマッコンキー寒天培地で赤いコロニーを形成することからラクトース代謝性であったが、オキシダーゼ反応は陰性であった。また、短いながらもグラム染色像はグラム陰性桿菌であることが確認された。以上の結果は富士 5-2 が腸内細菌である可能性を示唆しているため、更に TSI、SIM、VP の各試験を実施した。その結果、

TSI: グルコース代謝—陽性

ラクトース、ショ糖代謝—陽性

SIM: H<sub>2</sub>S—陰性

IPA—陽性

運動性—陽性

であった。以上の結果から富士 5-2 から分離された株は少なくともペスト菌ではないことが判明した。その後の詳細な解析により、その菌は大腸菌 (*Escherichia coli*) であることが同定された。

富士 5-1 と富士 10 のグラム染色体像はいずれも富士 5-2 よりは少し長いグラム陰性桿菌であることが確認され、マッコンキー寒天培地で白いコロニーを形成(ラクトース非代謝性)、オキシダーゼ陰性であった。以上の結果は富士 5-2 と同様に *Yersinia* 属を含めた腸内細菌である可能性を示唆していたため、TSI、SIM、VP の各試験を実施した。その結果、富士 5-1 と富士 10 のいずれも

TSI: グルコース代謝—陽性

ラクトース、ショ糖代謝—陰性

SIM: H<sub>2</sub>S—陰性

IPA—陰性

運動性—陰性

であった。上記の結果は *Yersinia* 属細菌の特徴と合致したため、更に VP 試験を実施した。その結果、VP 陽性であることが判明し、ペスト菌が VP 陰性の性状を示すことと異なった。以上の結果から、個体番号富士 5-1 と富士 10 から分離された菌はペスト菌ではなく、*Klebsiella*、*Serratia* 等のグラム陰性桿菌群である可能性が高くなった。その後、ID テスト ED-20 による簡易同定試験を実施した結果、両株とも環境中に普遍に存在する *Serratia liquefaciens* と同定された。

最終的には野鼠 114 個体のうち、3 個体から

分離された 4 つの細菌株が分離されたが、いずれもペスト菌のクライテリアに分類された生化学的性状を示すものは無かったため、ペスト菌の検出はゼロと判断された。

#### D. 研究考察

本研究においては野鼠 114 個体の脾臓の全部もしくは一部におけるペスト菌の潜在の可能性を検討し、検出率はゼロであると結論付けられた。

三個体から四種類の独立した細菌が検出された。しかし、個体番号:富士 5-2 から分離された菌は大腸菌 (*Escherichia coli*)、富士 5-1 と富士 10 から分離された菌は *Serratia liquefaciens*、東京都 8 は *Pseudomonas* 属等に分類され、いずれも自然界に広く存在している菌であるため、脾臓摘出時、もしくは脾臓を処理し、プレートに塗布するまでの作業時に混入(コンタミネーション)した可能性が非常に高い。しかし、摘出数に対してコンタミネーションを起こしたケースは約 2.7% (3/114) と計算され、フィールドで無菌部位からの脾臓の摘出作業を実施している現状においてはむしろ純粋に無菌的に摘出作業が実施されていると判断され、この程度の雑菌の混入は免れないと考察される。以上の点から今後もペスト菌の培養検出を引き続き試みる場合にはコンタミネーションの可能性も考慮して実施する必要があるであろう。

一方で、培養検出ではやはり限界がある場合も推測される。現在においては PCR 法を用いた分子生物学的手法や抗体を用いた免疫学的手法を用いて細菌を 1 オーダーの単位で

検出可能である。そのことを踏まえ、来年度からは主に PCR 法を用いた動物組織からのペスト菌 DNA の検出方法の確立も試み、より精度の高いペスト菌の動物検体からの検出を実施する予定である。

#### E. 参考文献

1. J.G. Holt, n.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, S.T. Williams, Bergey's manual of determinative bacteriology, 9<sup>th</sup> edition, WAVERLY COMPANY, Baltimore, pp.189-252, 1994.
2. CDC, Basic Level A laboratory procedures for identification of *Yersinia pestis*. 2001.
3. 塚野尋子、高橋英之、ペスト診断マニュアル、地方衛生微生物研究会、2004.
4. Hiroko Tsukano, Ken-ichiro Itoh, Sosuke Suzuki and Haruo Watanabe. Detection and identification of *Yersinia pestis* by polymerase chain resction (PCR) using multiplex primers. *Microbiology and Immunology* 40 (10): 773-775, 1996.

#### F. 健康危機管理情報

特になし

#### G. 研究発表

特になし

#### H. 知的財産権の出願

特になし

野鼠個体表

1) 富士

検体番号	種類	性別	捕獲日	捕獲場所	培養検査	ベスト同定
1	アカネズミ	♂	2003年8月28日	高鉢	陰性	
2	アカネズミ	♀	2003年8月28日	高鉢	陰性	
3	アカネズミ	♂	2003年8月28日	高鉢	陰性	
4	アカネズミ	♂	2003年8月28日	高鉢	陰性	
5	ヒメネズミ	♂	2003年8月28日	高鉢	陰性	陰性
6	ヒメネズミ	♂	2003年8月28日	高鉢	陰性	
7	アカネズミ	♀	2003年8月28日	高鉢	陰性	
8	ヒメネズミ	♀	2003年8月28日	高鉢	陰性	
9	アカネズミ	♂	2003年8月28日	高鉢	陰性	
10	ヒメズ	♀	2003年8月28日	高鉢	陰性	陰性
11	アカネズミ	♀	2003年8月28日	西白塚	陰性	
12	ヒメネズミ	♂	2003年8月28日	西白塚	陰性	
13	アカネズミ	♂	2003年8月28日	西白塚	陰性	
14	ヒメネズミ	♂	2003年8月28日	西白塚	陰性	
15	ヒメネズミ	♀	2003年8月28日	西白塚	陰性	
16	アカネズミ	♂	2003年8月28日	西白塚	陰性	
17	アカネズミ	♂	2003年8月28日	西白塚	陰性	
18	ヒメネズミ	♂	2003年8月28日	水ヶ塚	陰性	
19	ア(スミス)ネズ	♂	2003年8月28日	水ヶ塚	陰性	
20	ヒメネズミ	♀	2003年8月28日	水ヶ塚	陰性	
21	ヒメネズミ	♂	2003年8月28日	水ヶ塚	陰性	
22	アカネズミ	♂	2003年8月29日	高鉢	陰性	
23	アカネズミ	♀	2003年8月29日	高鉢	陰性	
24	アカネズミ	♀	2003年8月29日	高鉢	陰性	
25	アカネズミ	♂	2003年8月29日	高鉢	陰性	
26	ヒメネズミ	♂	2003年8月29日	高鉢	陰性	
27	ヒメネズミ	♂	2003年8月29日	高鉢	陰性	
28	アカネズミ	♀	2003年8月29日	高鉢	陰性	
29	アカネズミ	♂	2003年8月29日	高鉢	陰性	
30	ヒメネズミ	♀	2003年8月29日	西白塚	陰性	
31	アカネズミ	♀	2003年8月29日	西白塚	陰性	
32	アカネズミ	♀	2003年8月29日	西白塚	陰性	
33	アカネズミ	♀	2003年8月29日	西白塚	陰性	
34	アカネズミ	♂	2003年8月29日	西白塚	陰性	
35	ヒメネズミ	♀	2003年8月29日	西白塚	陰性	
36	ヒメネズミ	♀	2003年8月29日	西白塚	陰性	
37	ヒメネズミ	♀	2003年8月29日	西白塚	陰性	
38	アカネズミ	♂	2003年8月29日	西白塚	陰性	
39	ヒメネズミ	♂	2003年8月29日	水ヶ塚	陰性	

2) 長野

検体番号	種類	性別	捕獲日	捕獲場所	培養検査
1	アカネズミ	♀	2003. 9. 16	日大軽井沢研究所西隣(軽井沢)	陰性
2	アカネズミ	♀	2003. 9. 16	日大軽井沢研究所西隣(軽井沢)	陰性
3	アカネズミ	♀	2003. 9. 16	日大軽井沢研究所西隣(軽井沢)	陰性
4	アカネズミ	♂	2003. 9. 16	日大軽井沢研究所西隣(軽井沢)	陰性
5	アカネズミ	♂	2003. 9. 16	八風山登山口(軽井沢八風郷上部左)	陰性
6	アカネズミ	♂	2003. 9. 16	八風山登山口(軽井沢八風郷上部左)	陰性
7	アカネズミ	♀	2003. 9. 16	八風山登山口(軽井沢八風郷上部左)	陰性
8	アカネズミ	♂	2003. 9. 16	川べり(御代田町ふるさと大橋、A地点)	陰性
9	アカネズミ	♀	2003. 9. 16	川べり(御代田町ふるさと大橋、A地点)	陰性
10	アカネズミ	♂	2003. 9. 16	川べり(御代田町ふるさと大橋、A地点)	陰性
11	アカネズミ	♀	2003. 9. 16	川べり(御代田町ふるさと大橋、A地点)	陰性
12	アカネズミ	♂	2003. 9. 16	川べり(御代田町ふるさと大橋、A地点)	陰性
13	アカネズミ	♀	2003. 9. 16	川べり(御代田町ふるさと大橋、A地点)	陰性
14	アカネズミ	♂	2003. 9. 16	川べり(御代田町ふるさと大橋、A地点)	陰性
15	アカネズミ	♀	2003. 9. 16	湯ノ丸中腹(奈良原東の沢筋)	陰性
16	アカネズミ	♂	2003. 9. 16	湯ノ丸中腹(奈良原東の沢筋)	陰性
17	ヤチネズミ	♂	2003. 9. 16	湯ノ丸中腹(奈良原東の沢筋)	陰性
18	ヤチネズミ	♀	2003. 9. 16	湯ノ丸中腹(奈良原東の沢筋)	陰性
19	ヤチネズミ	♂	2003. 9. 16	湯ノ丸中腹(奈良原東の沢筋)	陰性
20	ヤチネズミ	♂	2003. 9. 16	湯ノ丸中腹(奈良原東の沢筋)	陰性
21	アカネズミ	♂	2003. 9. 16	湯ノ丸中腹(奈良原東の沢筋)	陰性
22	アカネズミ	♀	2003. 9. 16	湯ノ丸中腹(奈良原東の沢筋)	陰性
23	アカネズミ	♀	2003. 9. 16	湯ノ丸中腹(奈良原東の沢筋)	陰性
24	アカネズミ	♀	2003. 9. 16	湯ノ丸中腹(奈良原東の沢筋)	陰性
25	ヤチネズミ	♀	2003. 9. 16	湯ノ丸中腹(奈良原東の沢筋)	陰性
26	アカネズミ	♀	2003. 9. 16	湯ノ丸中腹(奈良原東の沢筋)	陰性
27	アカネズミ	♀	2003. 9. 16	湯ノ丸中腹(奈良原東の沢筋)	陰性
28	アカネズミ	♀	2003. 9. 16	湯ノ丸中腹(奈良原東の沢筋)	陰性
29	アカネズミ	♂	2003. 9. 16	湯ノ丸中腹(奈良原東の沢筋)	陰性
30	アカネズミ	♀	2003. 9. 16	湯ノ丸中腹(奈良原東の沢筋)	陰性
31	ヒメネズミ	♂	2003. 9. 16	湯ノ丸中腹(奈良原東の沢筋)	陰性
32	アカネズミ	♂	2003. 9. 16	湯ノ丸中腹(奈良原東の沢筋)	陰性
33	アカネズミ	♀	2003. 9. 16	湯ノ丸中腹(奈良原東の沢筋)	陰性

## 3) 下田

検体番号	野鼠種	性別	捕獲日	場所	培養検査
1	クマネズミ	F	2004.2.20	河津町見高2316	陰性
2	クマネズミ	M	2004.2.20	河津町見高2316	陰性
3	クマネズミ	M	2004.2.20	東伊豆町奈良本1384	陰性
4	ドブネズミ	M	2004.2.20	東伊豆町総取355番地の乙	陰性
5	クマネズミ	不明	2004.2.21	下田市須原1277	陰性
6	クマネズミ	不明	2004.2.21	下田市須原1277	陰性
7	アカネズミ	F	2004.2.21	南伊豆町伊浜2727-3	陰性
8	アカネズミ	F	2004.2.21	南伊豆町伊浜2727-3	陰性
9	アカネズミ	不明	2004.2.21	南伊豆町伊浜2727-3	陰性

## 4) 東京都

	野鼠種	性別	捕獲日	場所	培養検査	ベスト同定
1	不明	不明	2003.4.24	新宿二丁目交番前	陰性	
2	不明	不明	2003.4.25	新宿二丁目交番前	陰性	
3	不明	不明	2003.4.26	靖国通り新宿二丁目側	陰性	
4	不明	不明	2003.4.27	新宿三丁目駅階段横	陰性	
5	不明	不明	2003.4.28	新宿三丁目駅階段横	陰性	
6	不明	不明	2003.6.24	豊島区要町三丁目千川駅周辺	陰性	
7	不明	不明	2003.6.24	豊島区要町三丁目千川駅周辺	陰性	
8	不明	不明	2003.6.24	豊島区要町三丁目千川駅周辺	推定陽性 不明	陰性
9	不明	不明	2003.6.24	豊島区要町三丁目千川駅周辺	陰性	
10	不明	不明	2003.6.24	豊島区要町三丁目千川駅周辺	陰性	
11	不明	不明	2003.6.24	豊島区要町三丁目千川駅周辺	陰性	
12	不明	不明	2003.6.24	豊島区要町三丁目千川駅周辺	陰性	
13	不明	不明	2003.6.24	豊島区要町三丁目千川駅周辺	陰性	
14	不明	不明	2003.3.24	豊島区要町三丁目千川駅周辺	陰性	
15	不明	不明	2003.6.24	豊島区要町三丁目千川駅周辺	陰性	
16	不明	不明	2003.6.24	豊島区要町三丁目千川駅周辺	陰性	
17	不明	不明	2003.6.24	豊島区要町三丁目千川駅周辺	陰性	
18	不明	不明	2003.6.24	豊島区要町三丁目千川駅周辺	陰性	

## 5) 千葉市

	野鼠種	性別	捕獲日	場所	培養陽性
1	不明	不明	2003.4.7	千葉県都賀・人家犬小屋近く	陰性
2	不明	不明	2003.4.7	千葉県都賀・人家犬小屋近く	陰性
3	不明	不明	2003.4.7	千葉県都賀・人家犬小屋近く	陰性
4	不明	不明	2003.4.7	千葉県都賀・人家犬小屋近く	陰性
5	不明	不明	2003.4.7	千葉県都賀・人家犬小屋近く	陰性
6	不明	不明	2003.4.12	千葉県都賀・人家犬小屋近く	陰性
7	不明	不明	2003.4.12	千葉県都賀・人家犬小屋近く	陰性
8	不明	不明	2003.4.7	千葉県都賀	陰性
9	不明	不明	2003.4.30	千葉県都賀	陰性
10	不明	不明	2003.5.21	千葉県都賀	陰性
11	不明	不明	2003.5.26	千葉県都賀	陰性
12	不明	不明	2003.5.29	千葉県都賀	陰性
13	不明	不明	2003.6.2	千葉県都賀	陰性
14	不明	不明	2003.6.11	千葉県都賀	陰性

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症）  
分担研究報告書

静岡県内のマダニや野鼠が保有するエーリキア細菌について

分担研究者 大橋典男 静岡県立大学・環境科学研究所・助教授

研究協力者 川森文彦 静岡県環境衛生科学研究所・微生物部・主査  
稲吉 恵 静岡県環境衛生科学研究所・微生物部・技師  
内藤博敬 静岡県立大学・環境科学研究所・助手  
増澤俊幸 静岡県立大学・薬学部・助教授（主任研究者）

研究要旨

静岡県内のマダニを捕獲し、実験用マウスを用いてエーリキア細菌の分離を試みた。その結果、ヤマトマダニの組織を投与したマウスの脾臓からエーリキア DNA が検出され、その解析を行ったところ、米国の *Ehrlichia chaffeensis* と類似のエーリキアであることが判明した（Shizuoka 株）。また、ヤマトマダニのエーリキア保有率は約 3% であると推測された。さらに、16S rRNA 遺伝子および *omp-1* 遺伝子の詳細な解析から、Shizuoka 株はこれまでに国内で発見されたエーリキア（HF565 株、Anan 株、*E. muris*）の中で最も米国の *E. chaffeensis* と近い関係にあることが判った。系統樹解析においては、国内のエーリキアは互いに近縁関係で、米国の *E. chaffeensis* とは離れた関係であった。また、マウスに対する病原性を調べた結果、Shizuoka 株は Balb/c マウスに対し強毒性を示すことが判明した。一方、野鼠の血液や脾臓 DNA から、性状不明のエーリキア IS58 株およびバルトネラ細菌が検出され、現在これらの病原体の性状解析を試みている。

A. 研究目的

「ヒトエーリキア症」および「ヒトアナプラズマ症」は、マダニが媒介する発熱性疾患で、その病原体は食細胞でのみ増殖する偏性寄生性細菌のエーリキアまたはアナプラズマである。いずれの病原体も野生哺乳動物とマダニの間を、マダニの刺咬を介してサイクルしており、ヒトがエーリキアやアナプラズマを保有するマダニに刺された場合に発症する。本症は 1990 年代に発見された新興感染症で、1991 年にヒトのマクロファージや単球に感染する *Ehrlichia chaffeensis* が、1996 年にヒトの顆粒球に感染する *Anaplasma phagocytophilum* が、その病原体として相次いで見出された。近年、ヨーロッパ諸国や韓国でこれらの病原

体に対する抗体陽性者が見つかっており、また中国ではマダニから *E. chaffeensis* や *A. phagocytophilum* と類似の病原体 DNA が検出された。我が国では、*E. chaffeensis* と類似のエーリキア細菌が青森県、福島県、東京都、愛知県、および徳島県の野鼠やマダニから見出されており、ヒトエーリキア症との関連性が俄かに注目されるようになった。しかし、国内の「ヒトエーリキア症」および「ヒトアナプラズマ症」の実態は未だ不明である。本研究は、これらの感染症の実態調査の一貫として、静岡県内に生息するマダニや野鼠が保有する病原体について調査した。また、この調査中に性状不明のバルトネラ細菌が野鼠の中に存在してい

ることを見出し、現在、このバルトネラについても詳細な性状解析を進めている。

## B. 研究方法

静岡県内（富士山麓、富士市、静岡市）の森林地帯でマダニおよび野鼠の捕獲を行った。捕獲したマダニは数匹ずつプールし、それをホモジナイズした後、雄 ddY マウスの腹腔内に投与した。9~14 日後、マウスの脾臓を摘出して Total DNA を調整した後、Nested PCR 法により *E. chaffeensis* と *A. phagocytophilum* の主要外被膜蛋白遺伝子 (*omp-1* multigene family および *p44* multigene family)、と 16S rRNA 遺伝子の検出を試みた。一方、野鼠の場合、採取した血液と脾臓から Total DNA を調整し、同様に Nested PCR を行った。得られた増幅 DNA は direct sequencing あるいは TA-cloning 後の sequencing により塩基配列を決定し、系統樹解析を行った。

次に、マダニから分離したエーリキアについて、Balb/c マウスに対する毒性試験を行った。方法は、分離に用いたマウスの脾臓をホモジナイズし、Balb/c マウスに腹腔内投与して、エーリキアの継代を行った後、その脾臓ホモジナイズをさらに 5 匹一群の Balb/c マウスに投与して、マウスの生存率を調査した。

## C. 研究結果

### 1. 静岡県内のマダニが保有するエーリキア細菌について

捕獲したヤマトマダニ (*Ixodes ovatus*) とシュルツェマダニ (*I. persulcatus*) がエーリキアやアナプラズマを保有するか否かを調査するため、まずこれらマダニからマウスを用いて病原体の分離を試み、PCR 法によりマウスの脾臓中の病原体 DNA の検出を行った。

Table 1. Nested PCR for ehrlichial DNA detections from mouse spleen DNAs inoculated with tick tissues of *I. ovatus* or *I. persulcatus*

Location	Total no. of ticks collected	Total no. of mice inoculated	No. of PCR-positive spleens			Positive rate of <i>omp-1</i> s in ticks (%)
			<i>omp-1</i> s	<i>p44</i> s	16S rRNA	
<i>(I. ovatus)</i>						
Foot of Mt. Fuji	138 (23 pools)	23	4	0	(4) <sup>a</sup>	2.9
Fuji city	40 (4 pools)	4	1	0	(1)	2.5
Shizuoka city	20 (2 pools)	2	1	0	(1)	5.0
Total	198	29	6	0	(6)	3.0
<i>(I. persulcatus)</i>						
Foot of Mt. Fuji	12 (4 pools)	4	0	0	ND <sup>b</sup>	0

<sup>a</sup> The numbers of *omp-1*-positive samples for 16S rRNA gene sequencing.

<sup>b</sup> Not done.

その結果、表1に示したように198匹の *I. ovatus* を投与した29匹のマウスのうち、6匹のマウスで *E. chaffeensis* の主要外被膜蛋白遺伝子 (*omp-1* multigene family) のPCR増幅産物を得ることができた。これにより、*I. ovatus* マダニの約3%がエーリキアを保有しているものと推察される。一方、*I. persulcatus* を投与したマウスからは増幅産物は得られなかった。同様に *A. phagocytophilum* の主要外被膜蛋白遺伝子 (*p44* multigene family) の検出も試みたが、すべて陰性であった(表1)。

次に、*omp-1* 陽性であった *I. ovatus* 投与マウス(6匹)の脾臓DNAからエーリキア(Shizuoka-16, -18, -30, -36, -37, -51株と命名)の約1.4 kbの16S rRNA遺伝子を増幅し、その増幅産物の塩基配列を決定した。

その結果、得られた6つの塩基配列は同一であったが、*E. chaffeensis* との間で18個の塩基置換(相同性98.8%)が認められた(表2)。これまで国内で分離されたエーリキア(HF565株、Anan株)と *E. chaffeensis* との塩基置換数は20個であることから、Shizuoka株が我が国のエーリキアの中で、最も米国のヒト単球エーリキアの *E. chaffeensis* に近いことが明らかとなった(表2)。さらに、これらの塩基配列とこれまで明らかにされたエーリキア細菌の16S rRNA遺伝子の塩基配列を基にして、系統樹を作成した結果、Shizuoka株は国内のエーリキア細菌と近縁関係にあり(HF565株、Anan株、続いて *E. muris*)、米国の単球エーリキアとは離れた関係にあることが判明した(図1)。

Table 2. Nucleotide differences of 16S rRNA gene sequences (1,385-1,389bp) among Shizuoka isolates and the closely related *Ehrlichia* spp.

Bacteria	Nucleotide position <sup>a</sup>											
	54	56	61	67-68	73	75	76	79	108	207	307	403
<i>E. chaffeensis</i>	G	T	A	- <sup>b</sup>	T	A	A	A	G	C	G	A
<i>Ehrlichia</i> sp. (Shizuoka 16, 18, 30, 36, 37, 51)	A	C	G	T	T	G	G	G	A	T	G	G
<i>Ehrlichia</i> sp. HF565	A	C	G	T	T	G	G	G	A	T	G	G
<i>Ehrlichia</i> sp. Anan	A	C	G	T	C	G	G	G	A	T	C	G
	459	561	953	955	959	973	1208	1353	1357	1395		
<i>E. chaffeensis</i>	T	G	T	C	T	T	A	C	A	C		
<i>Ehrlichia</i> sp. (Shizuoka 16, 18, 30, 36, 37, 51)	C	A	C	C	C	T	G	T	C	A		
<i>Ehrlichia</i> sp. HF565	C	A	C	- <sup>b</sup>	C	C	G	T	C	A		
<i>Ehrlichia</i> sp. Anan	C	A	C	C	C	T	G	T	C	A		

<sup>a</sup> The nucleotide positions of 16S rRNA genes based on 1,435-bp sequence of *E. chaffeensis*.

<sup>b</sup> Nucleotide gaps in 16S rRNA gene sequence comparison.



Fig. 1. Phylogram of *Ehrlichia* sp. Shizuoka isolates and the closely related *Ehrlichia* spp. based on 16S rRNA gene sequences (1,385-1,389 bp)

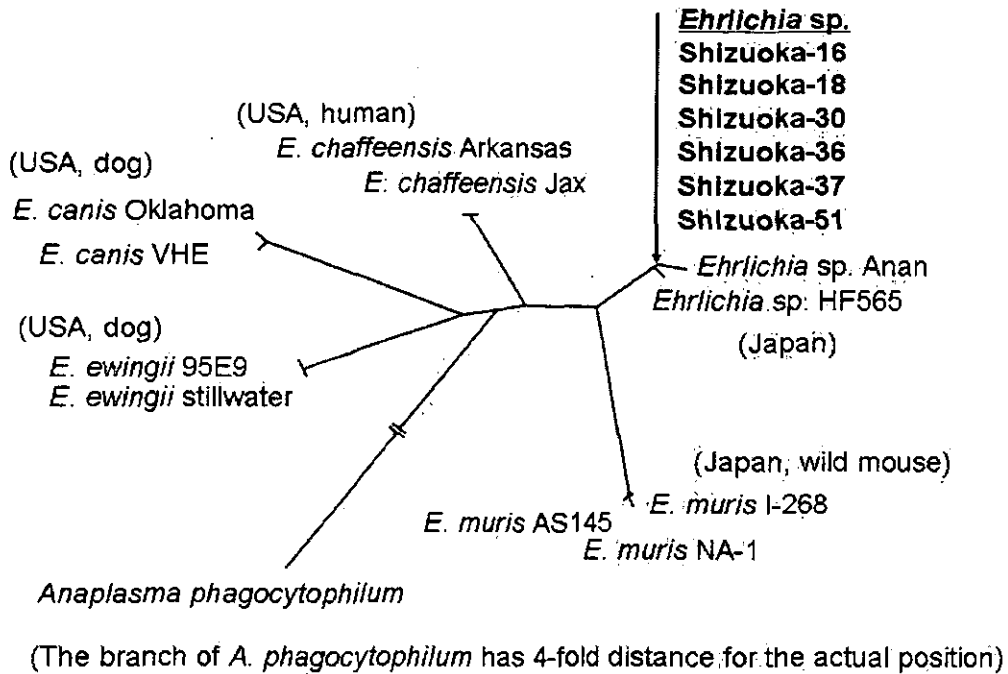
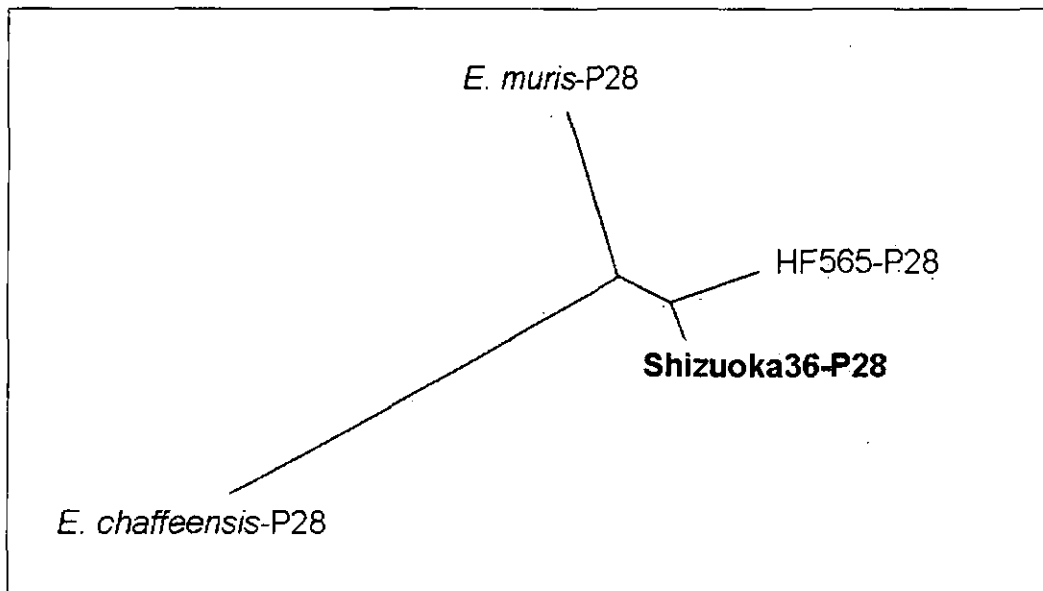


Fig. 2. Phylogenetic analysis of P28 orthologous proteins in *omp-1* multigene family among monocytic ehrlichiosis agents (82.1% - 96.0% amino acid identities between agents).



さらに、Shizuoka株、HF565株、*E. muris*のエーリキアの主要外被膜蛋白遺伝子群 (*omp-1* multigene family) のひとつである *p28* 蛋白遺伝子をPCR法により増幅後、それらの塩基配列を決定して、米国の *E. chaffeensis* のものも含めて系統樹解析を

行った。その結果、図2に示したように16S rRNA 遺伝子の場合と同様に、Shizuoka株は国内の株のHF565やAnanと近縁関係で、米国の *E. chaffeensis* とは離れた関係であることが確認できた。

## 2. Shizuoka 株のマウスに対する病原性について

Shizuoka 株のマウスに対する病原性を調査するため、Shizuoka-16 株および Shizuoka-51 株を感染させたマウスの脾臓ホモジネートを Balb/c マウスの5匹ずつにそれぞれを投与して、マウスの病状を観察した。その結果、これらの Shizuoka 株を投与したマウスは、いずれも投与後10日以

内に5匹すべてが死亡した(表3)。すなわち、この結果は Shizuoka 株がマウスに対して強毒性を有することを示している。なお、これまでの研究で HF565 株はマウスに対して強毒性を有し、*E. muris* は弱毒性を有することが知られており、今回対照として HF565 株と *E. muris* を用いた試験についても同様な結果が得られ、その事実が確認された(表3)。

Table 3. Toxicity of *Ehrlichia* sp. against mice

<i>Ehrlichia</i> sp.	Lethality of BALB/c (no. of mice dead / total no.) <sup>a</sup>	Relative spleen Size (g) <sup>b</sup>
Shizuoka-16	5 / 5	0.78 ± 0.16
Shizuoka-51	5 / 5	0.91 ± 0.18
HF565	5 / 5	0.82 ± 0.13
<i>E. muris</i> AS145	0 / 5	2.41 ± 0.44
No <i>Ehrlichia</i> (Normal mice)	0 / 5	0.37 ± 0.08

<sup>a</sup> No. of dead / total mice inoculated intraperitoneally with 10% homogenate of the spleens from other mice infected with respective isolates. The lethality was determined by observation by day 20 postinoculation.

<sup>b</sup> Spleen weights, in grams per 100 g of mice body weight.

さらに、各種エーリキア感染マウスの脾臓重量を測定した結果、Shizuoka-16 株、Shizuoka-51 株、および HF565 株では非感染マウスの 2~2.5 倍の脾臓肥大が観察され、*E. muris* では 6.5 倍の肥大が見られた。以上の研究成果から Shizuoka 株は HF565 株と近似の病原性を有することが判明した。

### 3. 野鼠中に存在するエーリキア細菌とバルトネラ細菌について

静岡県内で捕獲した 20 匹の野鼠 (*Apodemus argenteus*, *Apodemus speciosus*, *Eothenomys smithii*) について、血液および脾臓から Total DNA を調整した後、上述のようにエーリキアとアナプラズマの 16S rRNA 遺伝子、*omp-1* 遺伝子、*p44* 遺伝子の検出を PCR 法により試み、得られた増幅産物から病原体の同定を行った。その結果、一匹の *A. speciosus* からエーリキアの Shizuoka 株と IS58 株が検出され、2 匹の *E. smithii* から IS58 株が検出された。この IS58 株は、その 16S rRNA 遺伝子配列のみが川原らにより GenBank database に登録されており、エーリキアとアナプラズマの中間に位置する細菌と推定される。しかし、その詳細な性状は不明であり、我々は現在、マウスを用いた IS58 株の分離を検討中である。また、16S rRNA 遺伝子の解析において、13 匹の野鼠から性状不明のバルトネラ細菌の遺伝子が検出された。このバルトネラについても、現在、*gltA* 遺伝子や *Fetz* 遺伝子等を解析中であり、それらの系統樹解析から、このバルトネラの性状を明らかにする予定である。

### D. 考察

米国防疫センター (CDC) によると、米国ではヒトエーリキア症およびヒトアナプラズマ症は発見されて以来、その患者数が増加しており、リケッチア症と同様、届出感染症として位置付けられている。しかし、

我が国ではその実態がほとんど調査されておらず、しかも病原体が偏性寄生性細菌で分離が極めて困難であることから、これらの感染症についての国内の情報が極端に少ない。危機管理情報の観点から、これらの感染症の実態を解明するためには、本研究のようなフィールド調査からの情報蓄積が極めて重要であると考え。今回、マダニから分離した Shizuoka 株はその性状がこれまでに分離されたエーリキアと類似性を示していることが判明したが、野鼠から検出された IS58 株の性状については今後の課題である。また、近年、「猫ひっかき病」の病原体をはじめとする様々なバルトネラ細菌のヒトへの病原性が報告されていることから、今回、新たに発見した性状不明のバルトネラ細菌についても詳細な性状解析が必要と考え、現在、解析を進めている。

### E. 研究論文

#### 発表論文

1. Lin, Q., Rikihisa, Y., Obashi, N., and Zhi, N. Mechanisms of variable *p44* expression by *Anaplasma phagocytophilum*. *Infect. Immun.*, 71, 5650-5661 (2003)

#### 学会発表

1. 稲吉 恵, 内藤博敬, 川森文彦, 増澤俊幸, 大橋典男: 富士山麓のマダニ媒介性 *Ehrlichia*. sp について 第 76 回日本細菌学会 (熊本) 2003 年 4 月 1 日 (抄録 p. 248)
2. 大橋典男: ヒト顆粒球エーリキア症について—エーリキア症とライム病の混合感染 第 11 回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー [SADI] (軽井沢) 2003 年 9 月 13 日
3. 稲吉 恵, 内藤博敬, 川森文彦, 増澤俊幸, 大橋典男: 富士山麓に生息するヤマトマダニが保有するエーリキア細

菌について 第 11 回ダニと疾患のイ  
ンターフェースに関するセミナー  
[SADI] (軽井沢) 2003 年 9 月 14 日