

率が低いことが確定診断の妨げとなっている。室温で、ポテト・デキストロース寒天培地，血液寒天培地，1%ブドウ糖添加ブレイン・ハート・インフュージョン寒天培地などを使用し，4週間まで観察することを推奨する。一般に真菌培養に適しているといわれているサブロー寒天培地は推奨できない。また材料をブレイン・ハート・インフュージョン液体培地に浮遊させ，振盪培養後，平板培地に接種すると菌分離率が向上するとも言われている。

菌が分離されない場合，病理組織や化膿創からの膿汁から DNA を抽出して，遺伝子診断をすることも可能である。現在のところ ribosomal RNA 遺伝子の internal transcribed spacer (ITS) 1-5.8S-ITS2 の領域を検出する系が確立している (図 4)。

ヒストプラズマ症は感染症法で規制されている真菌感染症ではないが，輸入例だけでなく国内感染例が疑われる報告もあることから，日本に存在する最も危険な真菌感染症として今後の対策が重要である。

3) オクロコニス症

臨床症状，養鶏場でのニワトリの大量死の原因となることから，今，話題の高病原性トリインフルエンザとの鑑別も問題となる，新興真菌症である。

菌学

黒色真菌の一種である *Ochroconis gallopava* の集落は薄い羊毛状，表面は暗赤褐色，裏面は赤紫褐色の色素を拡散するのが特徴で，他の黒色真菌との鑑別点となる。また，37-42℃での発育は良好で，25℃ではむしろ発育は抑制される。最高発育温度は 48℃である (図 5)。

菌糸は褐色，分生子は二細胞性である。本菌の名称は分類学的に変遷があり，1964 年に *Diplorhinotrichum gallopavum*，1968 年に *Dactylaria gallopava* とされてきたが，1983 年に新属 *Ochroconis* が提唱され，*O. gallopava* となった。1987 年に提唱された *Dactylaria constricta* もしくは *Dactylaria constricta* var. *gallopava* は，*O. gallopava* の別称で現在はほとんど使われていないが，臨床的にはダクチラリア症 (dactylariasis) として記載されている場合もある。また，菌名に関しては *Ochroconis gallopavum* を提唱している研究グループもある。

疫学と臨床

環境中では廃コールドールや温泉，炭坑の杭，原子力発電所排水等の高温で pH の低い環境から分離されている。鳥類では産業動物のニワトリ，シチメンチョウ，ウズラなどで脳炎や肺炎による大量死が発生している他，野生鳥類でもフクロウ，ヘラサギなどの脳炎が知られている。またネコの脳炎も複数例が報告されている。さらにヒトに対しては 1986 年に呼吸器疾患の症例が確認されて以来，脳炎，肺炎，心内膜炎，内眼炎，皮下膿瘍等 31 例が報告されている。アメリカ合衆国に分離例が多く，南アフリカ共和国，オーストラリア，カナダ，イギリス，オランダ，中国などから報告され，我が国でもヒト 3 症例が確認されている。本症の問題点は免疫不全患者に重篤な脳炎，致命的な全身感染を引き起こすばかりでなく，健常者にも発症していることである。

診断

最も重要なことは原因菌を分離同定することである。本菌の分離を目的とする

場合、抗生物質を添加した培地を用い、42℃で培養することを推奨する。1-2週間で培地中に赤褐色の色素を拡散した直径数ミリの褐色の集落が観察できる。分生子の観察のためには25℃で2-3週間培養し、かき取り標本を用いる。また、患者生検組織やパラフィンブロックに包埋された組織からDNAを抽出してribosomal RNA 遺伝子のD1/D2領域をLAMP法により特異的に検出することも可能である(図6)。

D. 考察および E. 結論

本研究プロジェクトを通じて、上記、3疾患に関しては迅速診断が可能となった。臨床現場への応用も既に始まっている。

F. 健康危険情報

1. ヒストプラズマ症は我が国に存在する最も危険度の高い(レベル3)の真菌症である。
2. オクロコニス症はニワトリ、シチメンチョウ等で大量死が発生している。今、流行中のトリインフルエンザとの鑑別診断でニューカッスル病や家禽コレラ、家禽ペストなどは考慮されているが、オクロコニス症は組み込まれていない。複合感染の可能性も考えて欲しい。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kamei K, Sano A, Kikuchi K, Makimura K, Niimi M, Suzuki K, Uehara Y, Okabe N, Nishimura K, Miyaji M: The trend of imported mycoses in

Japan. J Infect Chemother 9: 16-20, 2003.

- 2) Miyaji M, Sano A, Sharmin S, Kamei K, Nishimura K: The role of chlamydospores of *Paracoccidioides brasiliensis*. Jpn J Med Mycol 44: 133-138, 2003.
 - 3) Sharmin S, Kishi F, Sano A, Kamei K, Nishimura K, Miyaji M: Direct invasion of bones by highly pathogenic fungi in an *in vitro* model and its ecological significance. Jpn J Med Mycol 44: 17-23, 2003.
 - 4) Sharmin S, Ohori A, Sano A, Kamei K, Yamaguchi M, Takeo K, Uno J, Nishimura K, Miyaji M: *Histoplasma capsulatum* variety *duboisii* isolated in Japan from an HIV-infected Ugandan patient. Jpn J Med Mycol 44: 299-306, 2003.
 - 5) Ueda Y, Sano A, Tamura M, Inomata T, Kamei K, Yokoyama K, Kishi F, Ito J, Mikami Y, Miyaji M, Nishimura K: Diagnosis of histoplasmosis by detection of the internal transcribed spacer region of fungal rRNA gene from a paraffin-embedded skin sample from a dog in Japan. Vet Microbiol 94: 219-224, 2003.
 - 6) Takahashi Y, Sano A, Takizawa K, Fukushima K, Miyaji M, Nishimura K: The epidemiology and mating behavior of *Arthroderma benhaniae* var. *erinacei* in household four-toed hedgehogs (*Atelerix albiventris*) in Japan. Jpn J Med Mycol 44: 31-38, 2003.
- ##### 2. 学会発表
- 1) Endo S, Komori T, Ricci G, Sano A,

- Yokoyama K, Ohori A, Kamei K, Franco M, Miyaji M, Nishimura K: Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. Frontier Studies and International Networking of Genetic Resources in Pathogenic Microorganisms, 21-22 Nov, Proceedings of International Symposium—Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, Japan, Abstract p. 29, 2003.
- 2) Ohori A, Sano A, Yarita K, Yamaguchi M, Kamei K, Nishimura K, Miyaji M: Morphological, physiological, and molecularbiological studies of *Ochroconis gallopava* isolated in Japan. Frontier Studies and International Networking of Genetic Resources in Pathogenic Microorganisms, 21-22 Nov 2003, Proceedings of International Symposium—Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, Japan p. 52, 2003.
- 1) Sharmin S, 大堀 陽, 佐野文子, 亀井克彦, 山口正視, 竹尾漢治, 宇野潤, 宮治 誠, 西村和子: ウレアーゼ活性を呈した *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*. 真菌症フォーラム第4回学術会議, 抄録集 pp. 38-39, 2003.
- 2) 稲福和宏, 宮里 肇, 金森志奈子, 中里 巖, 細川 篤, 山本雄一, 佐野文子: 皮膚プロトテコーシスの一例. 第47回日本医真菌学会総会, 真菌誌44 (増刊1号): 77, 2003.
- 3) 遠藤成朗, 小森隆嗣, G. Ricci, 佐野文子, 横山耕治, 大堀 陽, Franco M, 宮治 誠, 西村和子: LAMP法を用いた *Paracoccidioides brasiliensis* の特異的遺伝子 gp43 検出による同定. 日本菌学会第47回大会, 講演要旨集 p. 78, 2003.
- 4) 佐野文子, 村田佳輝, 上田八千代, 猪股智夫, 亀井克彦, 西村和子: 本邦におけるイヌのヒストプラズマ症の疫学. 第3回人と動物の共通感染症研究会学術集会, 講演要旨集 p. 10, 2003.
- 5) 佐野文子, 村田佳輝, 鎗田響子, 岩崎利郎, 猪股智夫, 亀井克彦, 西村和子: イヌの皮膚ヒストプラズマ症の1例. 第47回日本医真菌学会総会, 真菌誌44 (増刊1号): 76, 2003.
- 6) 小森隆嗣, 佐野文子, 鎗田響子, 亀井克彦, 西村和子: *Histoplasma capsulatum* の D1/D2 領域における種内多型. 第47回日本医真菌学会総会, 真菌誌44 (増刊1号): 102, 2003.
- 7) 大堀 陽, 佐野文子, 遠藤成朗, 横山耕治, 亀井克彦, 西村和子, 宮治誠: ヒト肺感染症より分離された *Ochroconis gallopava* について. 第24回関東医真菌懇話会, 抄録集 p. 8, 2003.
- 8) 大堀 陽, 佐野文子, 遠藤成朗, 横山耕治, 亀井克彦, 西村和子, 宮治誠: ヒト肺感染症より分離された *Ochroconis gallopava* について. 日本菌学会第47回大会, 講演要旨集 p. 34, 2003.
- 9) 大堀 陽, 佐野文子, 遠藤成朗, 横山耕治, 鎗田響子, 亀井克彦, 山口正視, 西村和子: ヒト肺感染症より分離された *Ochroconis gallopava* について. 第47回日本医真菌学会総会, 真菌誌44 (増刊1号): 90, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

上記 3 疾患の遺伝子診断法は千葉大学発明
届けに申請中。

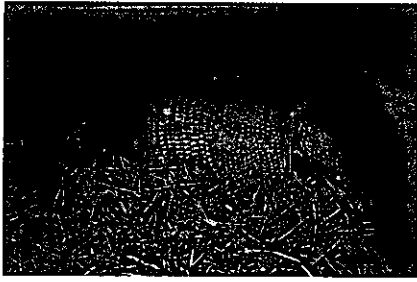


図 1) ココノオビアルマジロ,
(*Dasykus novemcinctus*)

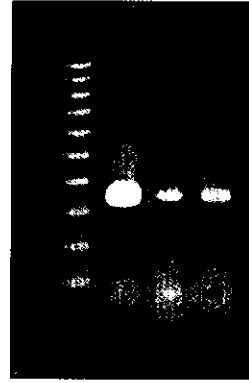
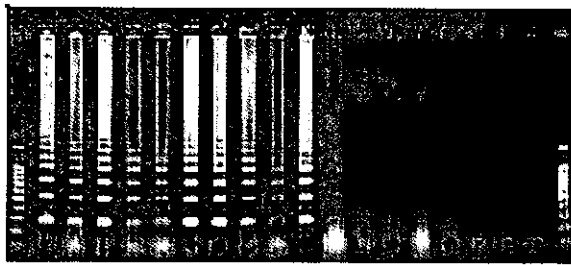


図 4) 1. マーカー, 2. 菌体, 3. 4. 病理組織から検出されたバンド.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
図 2) LAMP 法により検出された gp43 遺伝子. ラダーバンドとして出現するのが特徴. 13-19 は他の病原真菌.

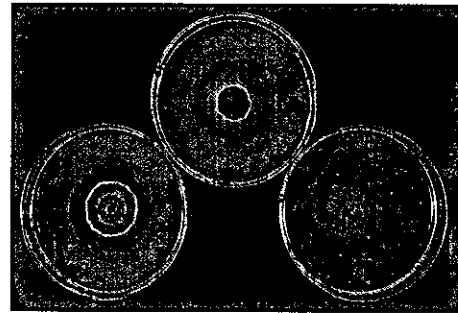


図 5) *Ochroconis gallopava* の集落, 8 日間培養, 左から 42, 37, 25°C で培養.

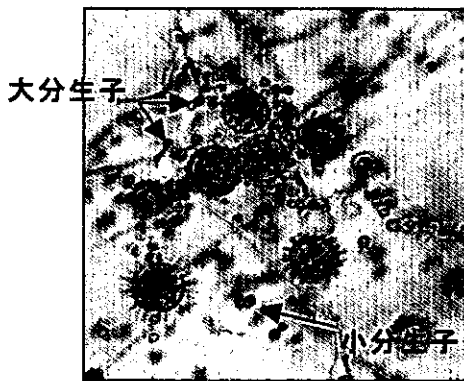
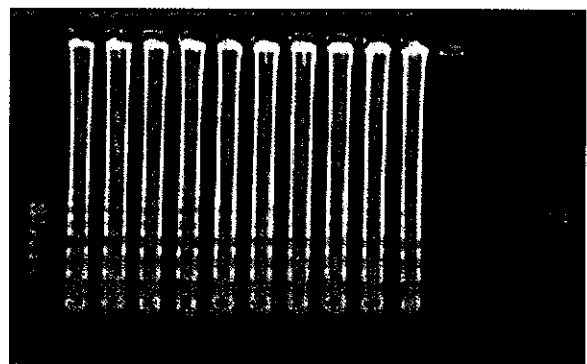


図 3) *Histoplasma capsulatum* の大小分生子.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
図 6) LAMP 法により検出された *Ochroconis gallopava* 遺伝子. 12-14 は他の病原真菌.

猫ひっかき病の発生状況と愛玩動物のバルトネラ感染症の調査ならびに
予防・診断法の開発に関する研究

分担研究者 丸山 総一 日本大学生物資源科学部 助教授

研究要旨：1. 日本の猫から分離された *Bartonella henselae* の6株と、アメリカの猫および人から分離された2株について遺伝子型、ならびに抗原性の多様性について検討したところ、日本の *B. henselae* 分離株は type I が主流で、多様なゲノムプロファイルを有していることが明らかとなった。また、日本人 CSD 患者血清は 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した。さらに、猫血清も、日本分離株に対して高い陽性率を示した。

2. IFA 法に代わる高感度で、簡便な抗 *B. henselae* 抗体の検出法として ELISA 法の開発を行った。その結果、*B. henselae* 菌体外膜蛋白を抗原とした ELISA 法では、CSD を疑う人血清 30 検体すべてに対し IFA 法に比べ検出感度が高く、より簡便で高感度の血清診断法になりうることが示唆された。今後、本 ELISA 法を用いて、*B. henselae* 感染のより広範な血清学的調査を実施し、CSD の疫学を解明していく必要があると思われる。

1. *Bartonella henselae* の遺伝子型と抗原性の比較

A. 研究目的

猫ひっかき病 (Cat scratch disease: CSD) の病原体が *Bartonella henselae* であることが判明して以来、本菌には複数の遺伝子型や血清型があることが明らかにされてきた。本研究では、日本の猫から分離された *B. henselae* の6株と、アメリカの猫および人から分離された2株について遺伝子型、ならびに抗原性の多様性について検討した。

B. 研究方法

日本の猫から分離された 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、PCR 法を用いた 16S rRNA 遺伝子配列による分類 (type I, type II) を行った。さらに各分離株のゲノム DNA を制限酵素 *Sma* I, *Not* I, *Eag* I で切断し、ゲノムプロファイルをパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) により比較した。

CSD を疑う日本人患者血清 28 例について、前述の *B. henselae* 8 株を抗原とした間接蛍光抗体法 (IFA) とウエスタンブロッティング (WB) により各分離株間の抗原性の比較を検討した。さらに、日本の飼育猫血清 76 例を用い、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。

C. 研究結果

16S rRNA による分類を行ったところ、すべての日本の猫分離株と Houston-1 株は type I に、アメリカの猫から分離された U4 株は type II に分類された。PFGE では、すべての株が異なるゲノムプロファイルを示した (図 1)。また、日本の猫分離株のゲノム DNA の大きさは 1.75 ~ 2.13Mbp (Not I) であった。それぞれの抗原を用いて、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は、すべての日本の猫分離株に対し、U4 株に比べて有意に高い陽性率を示した ($P < 0.05$) (表 1)。

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。日本の猫分離株である i6-1 抗原に対する抗体の陽性率はアメリカ分離株の Houston-1 株に比べ有意に高い値を示した ($P < 0.05$) (表 2)。

D. 考察

本研究により、日本の *B. henselae* 分離株は type I が主流で、多様なゲノムプロファイルを有していることが明らかとなった。IFA では、CSD を疑う日本人患者血清は 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、*B. henselae* の各株には多くの抗原的差異があり、人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が明らかとなった。現在、世界的に *B. henselae* の抗体検出にはアメリカ分離株である Houston-1 株を抗原とした IFA が用いられている。今後、株ごとに抗原的差異があることを考慮し、至適な抗体検出系を確立する必要があると考えられる。

2. ELISA 法による *Bartonella henselae* 感染に対する血清学的診断法の確立

A. 研究目的

CSD の原因菌である *B. henselae* の感染に対する血清学的診断方法として広く用いられている IFA 法は 1) 抗原プレートの作製が煩雑である、2) 操作が煩雑で一度に多数の検体を処理できない、3) 判定に熟練を要する、などの問題点がある。したがって IFA 法に代わる血清学的診断法の開発が望まれている。本研究では、IFA 法に代わる高感度で、簡便な抗 *B. henselae* 抗体の検出法として ELISA 法の開発を試みた。

B. 研究方法

B. henselae 16SrRNA Type I の Houston-1 株、i6-1 株、Type II の U4 株、沖 6-1 株を実験に用いた。ELISA 用抗原は、各 4 株から調整した 0.5%ホルマリン固定菌体抗原、菌体の超音波破碎抗原、Tween 20 菌体蛋白可溶性抗原、菌体外膜蛋白 (Outer Membrane Protein: OMP) 抗原の 4 種類について検討した。

蛋白濃度を $1 \mu\text{g/ml}$ に調整した抗原を ELISA

プレートに100 μ lずつ添加し、4 $^{\circ}$ Cで一昼夜静置し固相化した。5%スキムミルク加PBS-T200 μ lで4 $^{\circ}$ C、一昼夜ブロッキングを行った。1%スキムミルク加PBS-Tで階段希釈(1:400~1:25,600)した血清試料(1次抗体)100 μ lを各ウェルに添加し、37 $^{\circ}$ C、1時間反応後、洗浄した。ついで1%スキムミルク加PBS-Tで1,000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗体(2次抗体)を100 μ lずつ加え、37 $^{\circ}$ C、1時間反応させた。洗浄後、発色基質溶液を100 μ l加え、発色を行った。発色後の抗体価測定は陰性対照をスミルノフ棄却検定した値に基づいて行った。

C. 研究結果

Houston-1株の各抗原について、同株で免疫したウサギ血清(IFA抗体価2,048倍)を用いて比較したところ、OMP抗原が最も特異的に反応し、ELISA抗体価12,800倍を示した。次にIFAで陽性を示した猫血清(IFA抗体価256倍)および人血清(IFA抗体価512倍)と4株のOMP抗原を用い、2社、5種類のELISAプレートを用いて検討した。各ELISAプレートにより発色程度に差が認められ、ポリスチレン製アミノタイプ官能基を持つプレート(MS-8696F)を用いた場合に最も非特異的反応が少なく、かつ高感度に特異抗体が検出された。本プレートを用いて*B. henselae*分離株4株から調整したOMP抗原を用いてELISAを行ったところ、猫血清のELISA抗体価は800倍(沖6-1株、i6-1株)~3,200倍(U4株)、人血清のELISA抗体価は1,600倍であった。これより、抗*B. henselae*抗体は、4株のOMPを抗原とするELISA法により同様に検出可能であることが判明した。

次に、Houston-1株のOMP抗原を用いたELISAで(OMP)、IFA法で陽性を示したCSD患者の血清30検体の抗体価を測定した。これらの血清のELISA法とIFA法によるIgG抗体価から、両血清診断法の感度を比較した。その結果、CSD

患者血清の抗*B. henselae*抗体価は、IFA法で1:64~1:512を示したのに対し、ELISA法ではいずれの血清も1:100~1:1,600と高い価を示した(図2)。

D. 考察

OMPを抗原としたELISA法では、すべての検体に対しIFA法に比べ検出感度の方が高かったことから、より簡便で高感度の血清診断法になりうることが示唆された。今後、本ELISA法を用いて、*B. henselae*感染のより広範な血清学的調査を実施し、CSDの疫学を解明していく必要があると思われる。

G. 研究発表等

研究論文

1. Kabeya, H., Tsunoda, E., Maruyama, S., and Mikami, T. 2003. Immune responses of immunocompetent and immunocompromised mice experimentally infected with *Bartonella henselae*. *J. Vet. Med. Sci.* 65:479-484
2. Kabeya, H., Maruyama, S., Hirano, K., and Mikami, T. 2003. Cloning and expression of *Bartonella henselae* sucB gene encoding an immunogenic dihydrolipoamide succinyltransferase homologous protein. *Microbiol. Immunol.* 47(8):571-576.
3. Hara, H., Ito, K., Akimoto, M., Suzuki, H., Asai, S., and Maruyama, S. 2003. Detection of *Bartonella henselae* DNA using polymerase chain reaction assay in patient with cat scratch disease. *Acta Derm Venereol.* 83: 67-68.
4. 丸山総一, 壁谷英則, 見上彪(2003):人と動物の*Bartonella*感染症(猫ひっかき病を中心として), 日獣会誌56:209-217.
5. Maruyama, S., Izumikawa, K., Miyashita, M., Kabeya, H., Mikami, T., Yamanouchi,

H., Sasaki, E., Yoshida, H., and Izumikawa, K. 2004. First isolation of *Bartonella henselae* type I from a cat-scratch disease patient in Japan and its molecular analysis. Microbiol. Immunol. 48(2):103-109.

関連著書

1. 分担執筆:丸山総一(2004):猫ひっかき病, 畜産の研究58:136138.
2. 分担執筆:神山恒夫, 山田章雄編「動物由来感染症—その診断と対策」(猫ひっかき病) 2003年4月, 新興貿易(株)医書出版部, 東京

学会発表

1. 佐々木栄祐, 早川友一郎, 泉川公一, 泉川欣一, 原耕平, 丸山総一, 吉田博(2003):本邦で初めて病原体(*Bartonella henselae*)が分離された猫ひっかき病の1例, 第77回感染症学会総会(福岡)
2. 丸山総一, 大矢勇一郎, 上田幸孝, 直井昌之, 鯉江洋, 壁谷英則, 見上彪(2003):犬におけるBartonella属菌の感染状況について, 平成14年度日本獣医公衆衛生学会年次大会(沖縄)
3. 平野晃司, 壁谷英則, 丸山総一, 見上彪(2003):*Bartonella henselae* *sucB* 遺伝子のクローニング, 第135回日本獣医学会(東京, 東京大学)

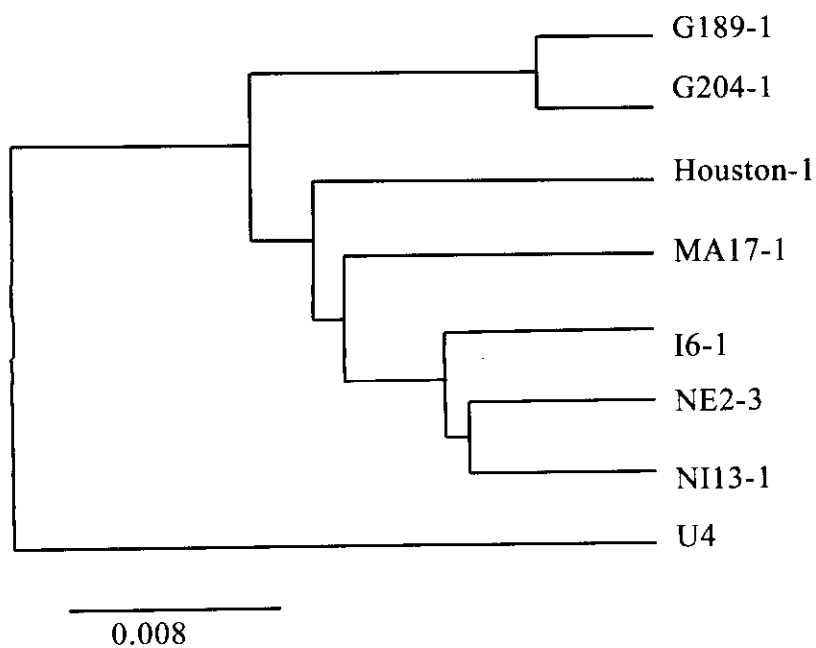


図 1. *Not* I, *Sma* I および *Eag* I で消化して得られた PFGE パターンから作成された *B. henselae* 分離株の系統樹 (UPGMA 法)。

表 1. CSD 患者血清に対する各分離株の抗体陽性率

株名	16S rRNA	検体数	陽性数	(%)
I6-1	type I	28	19	(67.9)*
NE2-3	type I	28	18	(64.3)*
G189-1	type I	28	17	(60.7)*
G204-1	type I	28	17	(60.7)*
NI13-1	type I	28	18	(64.3)*
MA17-1	type I	28	17	(60.7)*
Houston-1	type I	28	15	(53.6)
U4	type II	26	8	(30.8)

表 2. 飼育猫血清に対する各分離株の抗体陽性率

株名	16S rRNA	検体数	陽性数	(%)
I6-1	type I	76	20	(26.3)*
Houston-1	type I	76	10	(13.2)
U4	type II	76	15	(19.7)

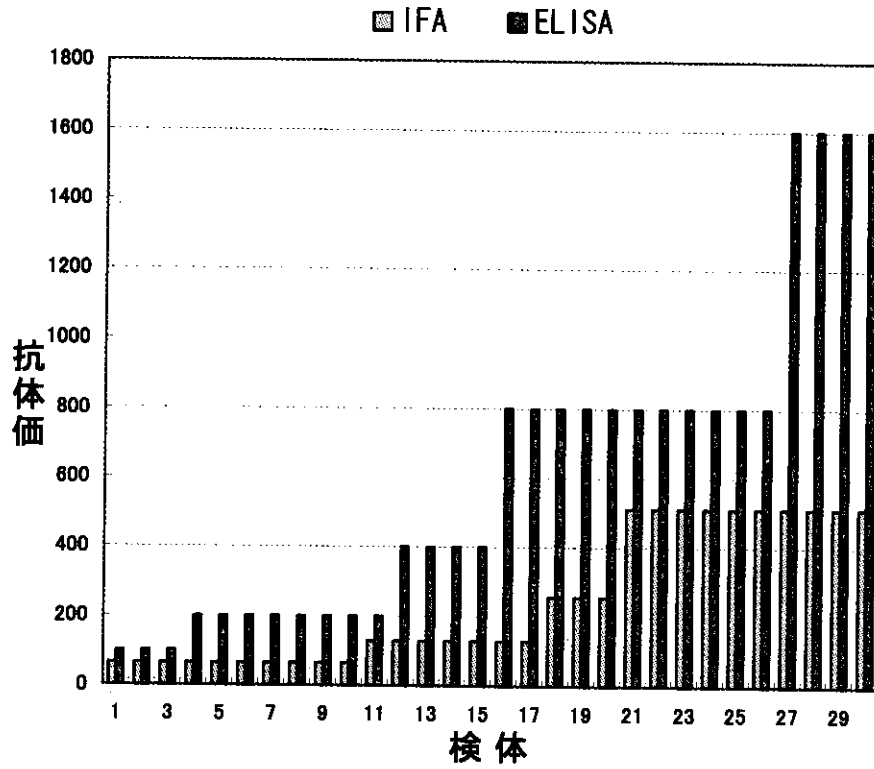


図 2. IFA 抗体価と ELISA 抗体価の比較