

- 1: 1×10^5 bacteria
 2: 1×10^4 bacteria
 3: 1×10^3 bacteria
 4: 1×10^2 bacteria
 5: 1×10^1 bacteria
 6: 1×10^0 bacteria
 7: negative control

図3 LAMP法によるペスト菌の検出限界

電気泳動及び蛍光・目視検出共にペスト菌を理論的には1菌体を検出した。

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

静岡県および長野県の野鼠が保有する *Ehrlichia* 属菌、'*Candidatus Neoehrlichia*'属菌、
および *Bartonella* 属菌に関する分子疫学的調査

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	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）
	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
	廣井みどり	静岡県環境衛生科学研究所・微生物部・技師

研究要旨

静岡県と長野県で捕獲した野鼠が保有する *Ehrlichia* 属菌、'*Candidatus Neoehrlichia*'属菌、および *Bartonella* 属菌の分子疫学的調査を行った。91 匹の野鼠の脾臓から *Ehrlichia* 属および '*Candidatus Neoehrlichia*'属菌の 16S rRNA 遺伝子を PCR で増幅し、その塩基配列を調べたところ、5 匹の野鼠から *Ehrlichia* sp. Shizuoka 株（保菌率 5.5%）が、2 匹から *E. muris* AS145 株の近縁細菌（保菌率 2.2%）が、また 8 匹から '*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*' IS58 株（保菌率 8.8%）が、さらに 6 匹から '*Candidatus N. mikurensis*' Schotti 株の近縁細菌（保菌率 6.6%）が検出され、計 21 匹の野鼠にはいずれかの細菌が感染していることが明らかとなった（保有率 23.0%）。*Ehrlichia* sp. Shizuoka 株は、国内の *Ehrlichia* 属菌の中で、米国のヒト単球エーリキア症病原体の *E. chaffeensis* と最も近い関係にある細菌であり、ヒトへの病原性が懸念されている細菌である。一方、78 匹の野鼠の血液から *Bartonella* 属菌の *gltA* 遺伝子の検出を試みたところ、47 匹で PCR 陽性を示し、高い保有率（60.3%）であることが判明した。これらの *Bartonella* 属菌は *gltA* の RFLP 解析から少なくとも 5 つの遺伝子型（Type I から Type V）が存在することが判った。さらに、*gltA* の塩基配列から Type I は *B. phoceensis* と、Type II はヒトに視神経網膜炎を引き起こす *B. grahamii* と、また Type III は *B. taylorii* とそれぞれ近縁の *Bartonella* 属菌であることが判明した。また、Type IV はヒトに心内膜炎を引き起こす *B. elizabethae* および *B. grahamii* と近縁で、Type V は既存のいずれの *Bartonella* 属菌とも遠い関係にあるため、新種の可能性が高いと考える。このように、我々は昨年度の調査で発見した性状不明の *Bartonella* 属菌の中に、ヒトに病原性を示す *Bartonella* 属菌と遺伝的に近縁のものが含まれていることを明らかにした。現在、これらの野鼠から *Bartonella* 属菌の分離を進めており、今後は分離株についての解析を行うとともに、さらなる疫学的調査を行う必要があると考える。

A. 研究目的

アナプラズマ科 (family *Anaplasmataceae*) には、*Ehrlichia* 属、'Candidatus Neoehrlichia' 属、*Anaplasma* 属が存在する。これらはいずれも食細胞や上皮細胞に感染する偏性寄生性細菌で、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する生活環を保持している。アナプラズマ科細菌の中には新興感染症の病原体である *Ehrlichia chaffeensis* や *Anaplasma phagocytophilum* が知られており、米国をはじめ諸外国で注目を集めている。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 *Ehrlichia* sp. HF545 株や *Anan* 株が青森県、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、新興感染症との関連性が俄かに注目されるようになった。我々は、昨年度の調査で、富士山麓のマダニから実験用マウスを用いて *E. chaffeensis* と遺伝的に最も近い、新規の *Ehrlichia* sp. Shizuoka 株の分離に成功し報告した。今回は、保菌哺乳動物と考えられる野鼠を対象にアナプラズマ科細菌の分子疫学的調査を行った。

一方で、野鼠が保有する *Bartonella* 属菌についても調査した。*Bartonella* 属菌は、現在、22 種 3 亜種が存在し、歴史的に *B. bacilliformis* (カリオン病) や *B. quintana* (塹壕熱) が知られている。塹壕熱については、当研究班の小林らが国内のホームレス者に付くシラミを中心に調査を行って

る。*Bartonella* 属菌の中では、新興感染症「猫ひっかき病」病原体である *B. henselae* が良く知られており、国内においても飼い猫の 7%ほどが感染しているといわれている。しかし、近年、野生哺乳動物から次々と新種の *Bartonella* 属菌が発見され、ヒトに病原性を示すものが判明してきた。特に、げっ歯類では、これまでに 12 種が見出され、その中でヒトに対して病原性を示すものとして *B. grahamii* が視神経網膜炎を、*B. elizabethae* が心内膜炎を、また *B. vinsonii* sp. *arupensis* が菌血症や発熱を引き起こすことが報告されている。よって、近年、げっ歯類の *Bartonella* 属菌の疫学調査が極めて重要となってきた。我々は、昨年度の調査において、富士山麓の野鼠中に性状不明の *Bartonella* 属菌を発見したことを報告した。本年度は、これら野鼠中の *Bartonella* 属菌の *gltA* 遺伝子を詳細に解析することにより、ヒトに病原性を示す *Bartonella* 属菌との遺伝的関係を推測すると共に、野鼠の保菌状況を調査した。

B. 研究方法

静岡県内の富士山麓と伊豆半島天城山系、および長野県の妙義荒船山系と浅間山麓の森林地帯で野鼠の捕獲を行った。捕獲した野鼠の血液および脾臓より DNA を抽出し、Nested PCR により、*Ehrlichia* 属菌、'Candidatus Neoehrlichia' 属菌、*Anaplasma* 属菌、あるいは *Bartonella* 属菌の遺伝子検出を行った。アナプラズマ科細菌の検出のためには、16S rRNA 遺伝子検出用プライマー、*Ehrlichia* 属菌に特異的な *omp-1* 外被膜蛋白遺伝子検出用プライ

マー、および *Anaplasma* 属菌に特異的な *p44* 外被膜蛋白遺伝子検出用プライマーを用いて脾臓 DNA から各種遺伝子の検出を行った。そして、PCR 陽性を示した検体について、1.4 kb の 16S rRNA 遺伝子を増幅し、その制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析と塩基配列決定を行った後、系統樹解析を行った。また、*Bartonella* 属菌の場合は、野鼠の血液 DNA から *gltA* (クエン酸合成酵素遺伝子) を標的とした PCR によりスクリーニングを行った後、RFLP 解析を行った。そして、増幅された *gltA* をクローニングして塩基配列を決定し、それぞれの組み換えクローンの系統樹解析を試みた。

C. 研究結果

1. 静岡県と長野県の野鼠が保有するアナプラズマ科細菌の検出

静岡県と長野県で捕獲した計 91 匹の野鼠 (*Apodemus argenteus* [ヒメネズミ], *A. speciosus* [アカネズミ], *Eothenomys smithii* [スミスネズミ], *E. andersoni* [ヤチネズミ]) について、それらの脾臓 DNA から 16S rRNA 遺伝子、*omp-1* 遺伝子および *p44* 遺伝子を標的とした PCR によりアナプラズマ科細菌の検出を行い、その後 16S rRNA 遺伝子の RFLP と塩基配列から菌種の同定を行った (表 1)。その結果、野鼠の脾臓 91 検体中、7 検体から *Ehrlichia* 属菌が検出された。7 検体中の 5 検体は *Ehrlichia* sp. Shizuoka 株と同一細菌 (相同性 100%) で、2 検体は *E. muris* AS145 株の近縁細菌 (相同性 99.9%) であった。また、野鼠の脾臓 91 検体中 14 検体から '*Candidatus Neoehrlichia*' 属菌が検出され、そのうちの 8 検体が '*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*' IS58 株と同一細菌 (相同性 100%) で、また 6 検体が '*Candidatus N. mikurensis*' Schotti 株の

近縁細菌 (相同性 99.6%) であった (表 2)。よって、野鼠の保菌率は *Ehrlichia* sp. Shizuoka 株では 5.5%、*E. muris* AS145 株の近縁細菌では 2.2%、'*Candidatus N. mikurensis*' IS58 株では 8.8% および Schotti 株の近縁細菌では 6.6% であり、91 匹中 21 匹の野鼠にいずれかの細菌が感染していることが明らかとなった (23.0%)。これらのアナプラズマ科細菌の系統学的位置を図 1 に示す。ここで、*Ehrlichia* sp. Shizuoka 株 (Fuji-14/19/34/41 と Nagano-7 を含む) は、*Ehrlichia* sp. HF565 株、Anan 株、HI2000 のクラスター内に位置した。この菌株は、国内の *Ehrlichia* 属菌株の中で最もヒト単球エーリキア症病原体の *E. chaffeensis* と近縁関係にあり、マウスに対して強病原性を示すことからヒトへの病原性が懸念される *Ehrlichia* 属菌である (発表論文 1)。また、*E. muris* はマウスに脾腫を引き起こし、3 つの遺伝子型 Variants (AS145, NA-1, I-268) が存在することが知られている。これらと今回発見した AS145 株の近縁細菌 (Fuji-26 と Nagano-19) の 16S rRNA 遺伝子 (1.4 bp) を詳細に比較したところ、AS145 株の 91 番目で塩基置換が存在した (表 3)。これは Fuji-26 と Nagano-19 が新たな遺伝子型 Variant である可能性を示唆する。一方、'*Candidatus N. mikurensis*' の場合も遺伝子型 Variants が 3 種類 (TK4456 or Rattus, IS58, Schotti) 存在し、これらと Nagano-21/22/28/30/33 の塩基配列を比較したところ、最も近い Schottii 株と 5 つの塩基置換が存在した (表 4)。さらに、系統樹解析を行ってみると、Nagano-21/22/28/30/33 は明らかに Schottii 株とは距離があり、これらも新規の遺伝子型 Variant であることが明らかとなった (図 2)。

Table 1. Analysis of *Ehrlichia* species and '*Candidatus* *N. mikurensis*' infected in wild mice by PCR, RFLP, and sequencing

Wild mice	No. of wild mice captured	No. of PCR-positive spleens		RFLP patterns (16S rRNA)			Sequence analyses (16S rRNA)			
		<i>omp-1s</i>	16S rRNA	<i>p44</i>	<i>Ehrlichia</i> -related	' <i>Neohrllichia</i> '-related	Others	<i>Ehrlichia</i>	' <i>Neohrllichia</i> '	Others
(Shizuoka, Fuji area)										
<i>A. argenteus</i>	19	2	4	0	2	2	0	2	2	0
<i>A. speciosus</i>	24	1	6	0	4	2	0	2	2	2
<i>E. smithii</i>	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0
(Shizuoka, Izu area)										
<i>A. argenteus</i>	8	0	3	0	0	3	0	0	2	1
<i>A. speciosus</i>	5	0	2	0	0	0	2	0	0	0
<i>E. smithii</i>	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0
(Nagano)										
<i>A. argenteus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. speciosus</i>	27	2	12	0	1	10	1	1	7	3
<i>E. andersoni</i>	5	1	3	0	1	1	1	1	0	1
Total	91	7	32	0	9	19	4	7	14	7

Table 2. Closest relatives, sources, and locations in the identified monocytic ehrlichiae and 'Candidatus N. mikurensis'

Organism ID	Closest relatives based on 16S rRNA sequences	Identity (%)	Source	Location of collection
<i>(Ehrlichia spp.)</i>				
Fuji-14	<i>Ehrlichia</i> sp. Shizuoka	100	<i>A. argenteus</i>	Shizuoka
Fuji-19	<i>Ehrlichia</i> sp. Shizuoka	100	<i>E. smithii</i>	Shizuoka
Fuji-26	<i>E. muris</i> AS145 ^T	99.9	<i>A. argenteus</i>	Shizuoka
Fuji-34	<i>Ehrlichia</i> sp. Shizuoka	100	<i>A. speciosus</i>	Shizuoka
Fuji-41	<i>Ehrlichia</i> sp. Shizuoka	100	<i>A. speciosus</i>	Shizuoka
Nagano-7	<i>Ehrlichia</i> sp. Shizuoka	100	<i>A. speciosus</i>	Nagano
Nagano-19	<i>E. muris</i> AS145 ^T	99.9	<i>E. andersoni</i>	Nagano
<i>('Candidatus Neoehrlichia' sp.)</i>				
Fuji-6	'Candidatus N. mikurensis' IS58	100	<i>A. argenteus</i>	Shizuoka
Fuji-9	'Candidatus N. mikurensis' IS58	100	<i>A. speciosus</i>	Shizuoka
Fuji-18	'Candidatus N. mikurensis' IS58	100	<i>A. argenteus</i>	Shizuoka
Fuji-25	'Candidatus N. mikurensis' IS58	100	<i>A. speciosus</i>	Shizuoka
Izu-8	'Candidatus N. mikurensis' IS58	100	<i>E. smithii</i>	Shizuoka
Izu-9	'Candidatus N. mikurensis' IS58	100	<i>A. argenteus</i>	Shizuoka
Izu-13	'Candidatus N. mikurensis' IS58	100	<i>A. argenteus</i>	Shizuoka
Nagano-6	'Candidatus N. mikurensis' IS58	100	<i>A. speciosus</i>	Nagano
Nagano-21	'Candidatus N. mikurensis' Schotti	99.6	<i>A. speciosus</i>	Nagano
Nagano-22	'Candidatus N. mikurensis' Schotti	99.6	<i>A. speciosus</i>	Nagano
Nagano-28	'Candidatus N. mikurensis' Schotti	99.6	<i>A. speciosus</i>	Nagano
Nagano-30	'Candidatus N. mikurensis' Schotti	99.6	<i>A. speciosus</i>	Nagano
Nagano-32	'Candidatus N. mikurensis' Schotti	99.6	<i>A. speciosus</i>	Nagano
Nagano-33	'Candidatus N. mikurensis' Schotti	99.6	<i>A. speciosus</i>	Nagano

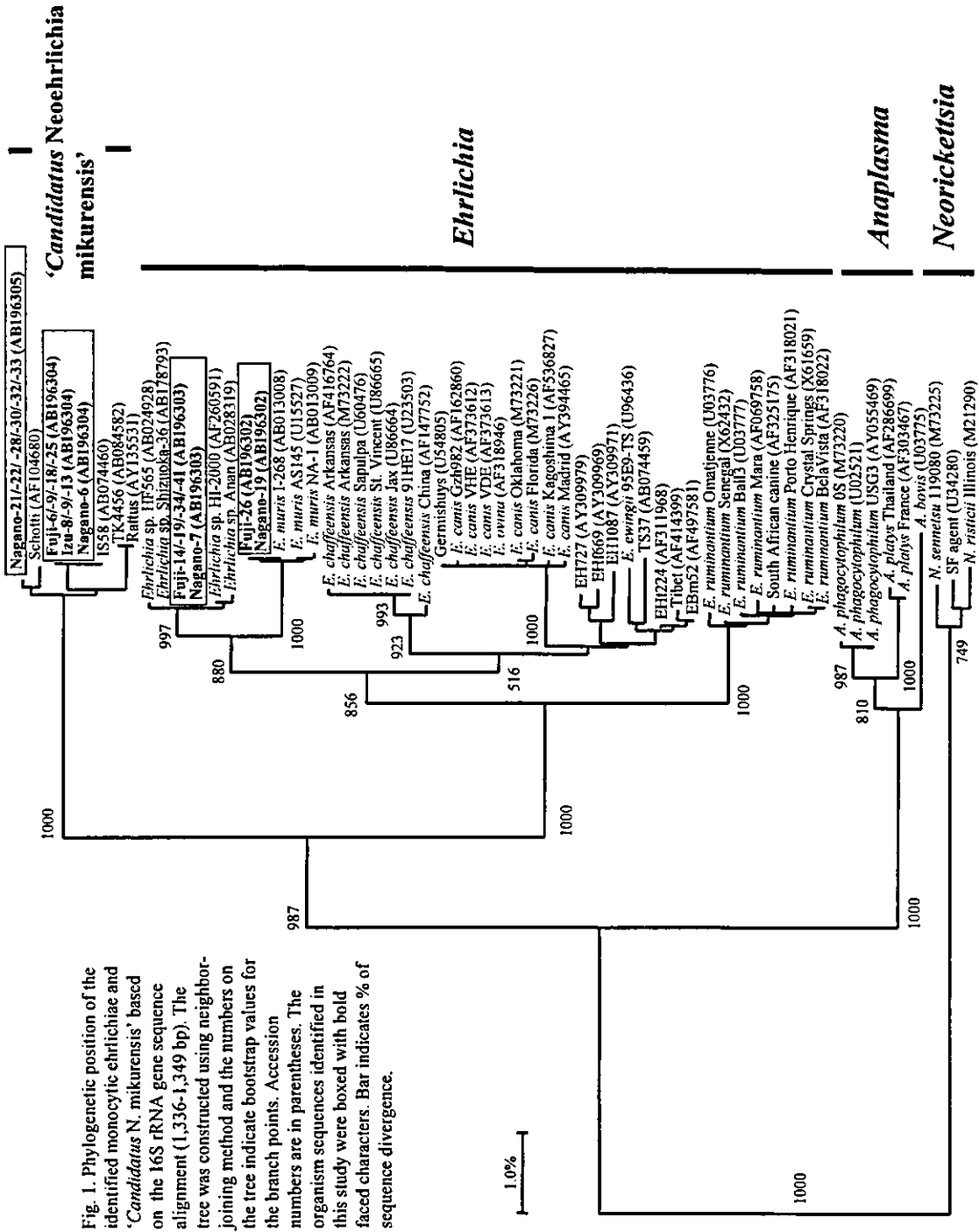


Fig. 1. Phylogenetic position of the identified monocytic ehrlichiae and 'Candidatus *N. mikurensis*' based on the 16S rRNA gene sequence alignment (1,336-1,349 bp). The tree was constructed using neighbor-joining method and the numbers on the tree indicate bootstrap values for the branch points. Accession numbers are in parentheses. The organism sequences identified in this study were boxed with bold faced characters. Bar indicates % of sequence divergence.

Table 3. Nucleotide differences of 16S rRNA gene sequences among *E. muris* strain variants

<i>E. muris</i> genetic variants	Nucleotide position ^a				
	91	320	371-372	816	
AS145 ^T	C	G	— ^b	C	
NA-1	C	C	— ^b	C	
I-268	T	G	G	— ^b	
Fuji-26	T	G	— ^b	C	
Nagano-19	T	G	— ^b	C	

^a The nucleotide position of 16S rRNA gene based on the 1,428-bp sequence of *E. muris* AS145^T reported by Wen et al. (*Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 250-254, 1995).

^b Dashes indicate nucleotide gaps in 16S rRNA gene sequence comparison.

Table 4. Nucleotide differences of 16S rRNA gene sequences among strain variants of '*Candidatus* N. mikurensis'

' <i>Candidatus</i> N. mikurensis' genetic variants	Nucleotide position ^a																	
	35	36	38	50	52	54	136	202	210	378	540	544	545	565	766	895	914	933
TK4456 ^k	G	T	G	A	C	G	A	A	A	G	C	T	C	A	A	A	T	T
Rattus	G	T	G	A	C	G	A	A	A	G	C	T	C	A	A	A	T	T
IS58	A	C	G	A	T	G	G	G	G	T	C	T	T	G	G	A	C	T
Schottii	G	C	G	G	G	A	G	A	G	A	T	C	T	A	A	G	C	T
Nagano-21/-22/-28/-30/-32/-33	G	C	A	A	T	A	G	A	G	A	T	C	T	A	A	A	C	C

^a The nucleotide position of 16S rRNA gene based on the 1,395-bp sequence of '*Candidatus* N. mikurensis' TK4456^k reported by Kawahara et al. (*Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1837-1843, 2004).

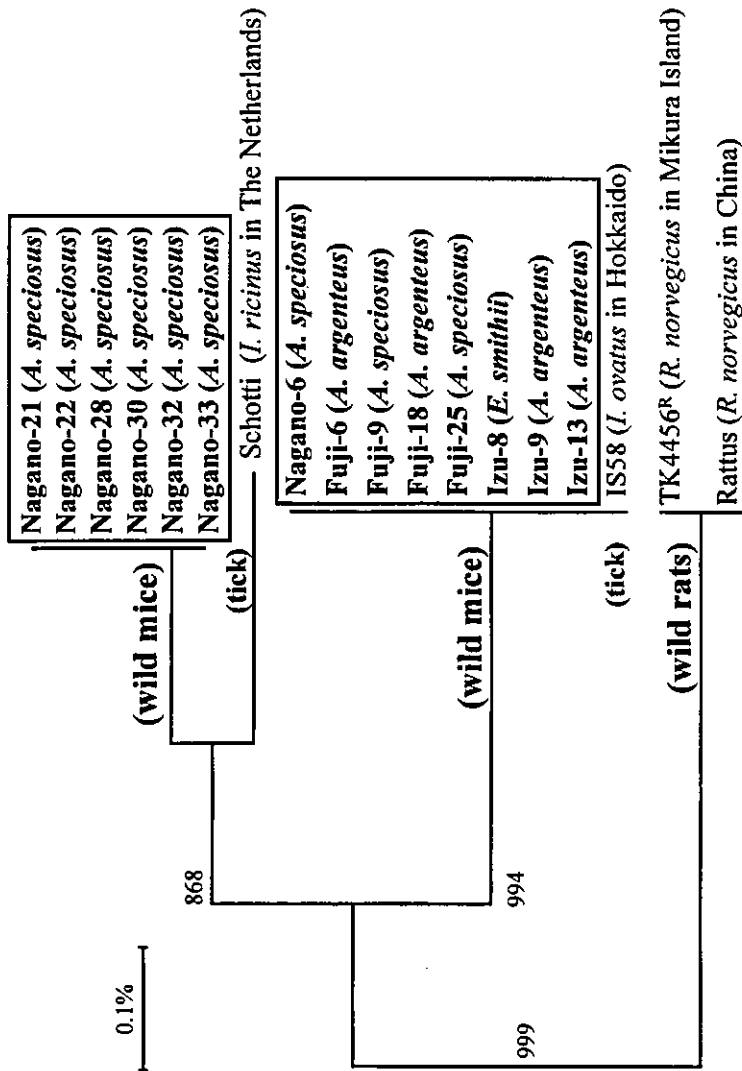


Fig. 2. Phylogenetic relationship of the members of '*Candidatus* N. mikurensis' based on the 16S rRNA gene sequence alignment. The tree was constructed using the neighbor-joining method and the numbers on the tree indicate bootstrap values for the branch points. The organism sequences identified in this study were boxed with the boldfaced characters. The species of sources in parentheses.

今回の野鼠での調査では、*p44* 遺伝子の PCR 陽性の検体はなく、*Anaplasma* 属菌は検出されなかった。しかし、最近我々はマダニの中から直接 PCR により *p44* 遺伝子の増幅を試み、ヒト顆粒球アナプラズマ症病原体である *A. phagocytophilum* の *p44* 遺伝子の検出に遂に成功し、我が国にヒト感染性の *Anaplasma* 属菌が存在することを初めて明らかにした。次年度は、極めて困難とされるこの細菌のマダニからの分離に挑み、それらの分子遺伝学的性状解析や分布状況などの解明にも努める所存である。

2. 野鼠中に存在する *Bartonella* 属菌について

静岡県内の野鼠の血液から DNA を調製し、PCR により *Bartonella* 属菌の *gltA* 遺伝子の検出を行った。その結果、78 匹中 47 匹で *Bartonella* 属菌の *gltA* 遺伝子が検出され、野鼠の保菌率が極めて高いことが判明した (60.3%)。次に、13 匹の PCR 陽性の検体を選び、*gltA* の RFLP 解析を行った結果、野鼠中の *Bartonella* 属菌には少なくとも 5 つの *gltA* 遺伝子の遺伝子型 (Type I から Type V) が存在することが判明した (図 3)。これらの遺伝子型をさらに詳細に解析するため、増幅した *gltA* 遺伝子をクローニングし、それぞれの野鼠検体あたり数個から 10 個程度までの組み換えクローンを任意に選択して、それらの塩基配列を決定し、系統樹解析を行った (図 4)。その結果、合計 52 個の組み換えクローンは 5 つの遺伝子型のクラスターを形成し、RFLP 解析の結果と一致した。ここで、Type I の遺伝子型は *B. phoceensis* (相同性 96.9~97.5%) と、Type II はヒトに視神経網膜炎を引き起こす *B. grahamii* (相同性 96.6%)

と、また Type III は *B. taylorii* (相同性 97.2~98.2%) とそれぞれ近縁関係にあることが判明した。また、Type IV はヒトに心内膜炎を引き起こす *B. elizabethae* (94.0~94.2%) および *B. grahamii* (94.6~94.8%) と近縁関係にあり、Type V は既存のいずれの *Bartonella* 属菌とも異なる新種の可能性が高いことが判った。一方、ヒメネズミからは Type I, II, V が、アカネズミからは Type IV が、またスミスネズミからは Type III が検出され、野鼠種と遺伝子型の関連性が認められた (図 4)。さらに、1 匹のヒメネズミから Type I と II が、また別の 1 匹のヒメネズミから Type II と Type V が検出され、異なる遺伝子型の共感染も存在していることが明らかとなった。

今後は他のハウスキーピング遺伝子群の詳細な解析から明確な菌種名を決定するとともに、これらの野鼠から *Bartonella* 属菌の分離を進め、それら分離株の遺伝子型を解析する予定である。

D. 考察

米国ではヒト単球エーリキア症およびヒト顆粒球アナプラズマ症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、我が国ではほとんど調査されておらず、しかもこれらの病原体が偏性寄生性細菌で分離が極めて困難なため、国内の情報が極端に少ない。危機管理情報の観点から、これらの実態を解明するためには、本研究のような野外調査からの情報蓄積が極めて重要である。今回、保菌動物の一つと考えられる野鼠を対象に調査した。検出された *Ehrlichia* sp. Shizuoka 株は、米国のヒトエーリキア症の病原体と最も近い遺伝的関係にあり、ヒトへの病原性が懸念されているものであ

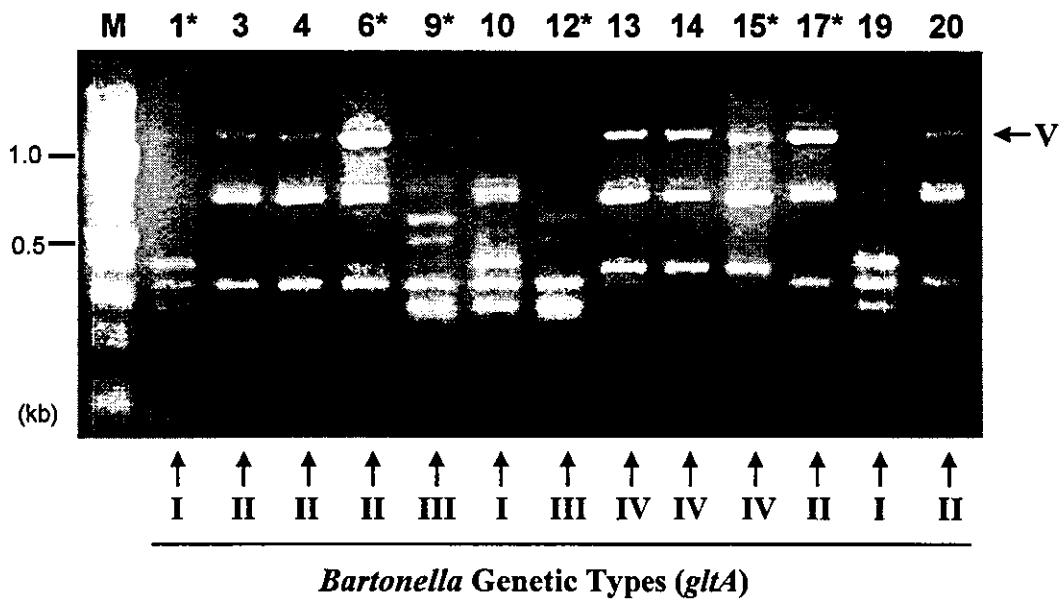
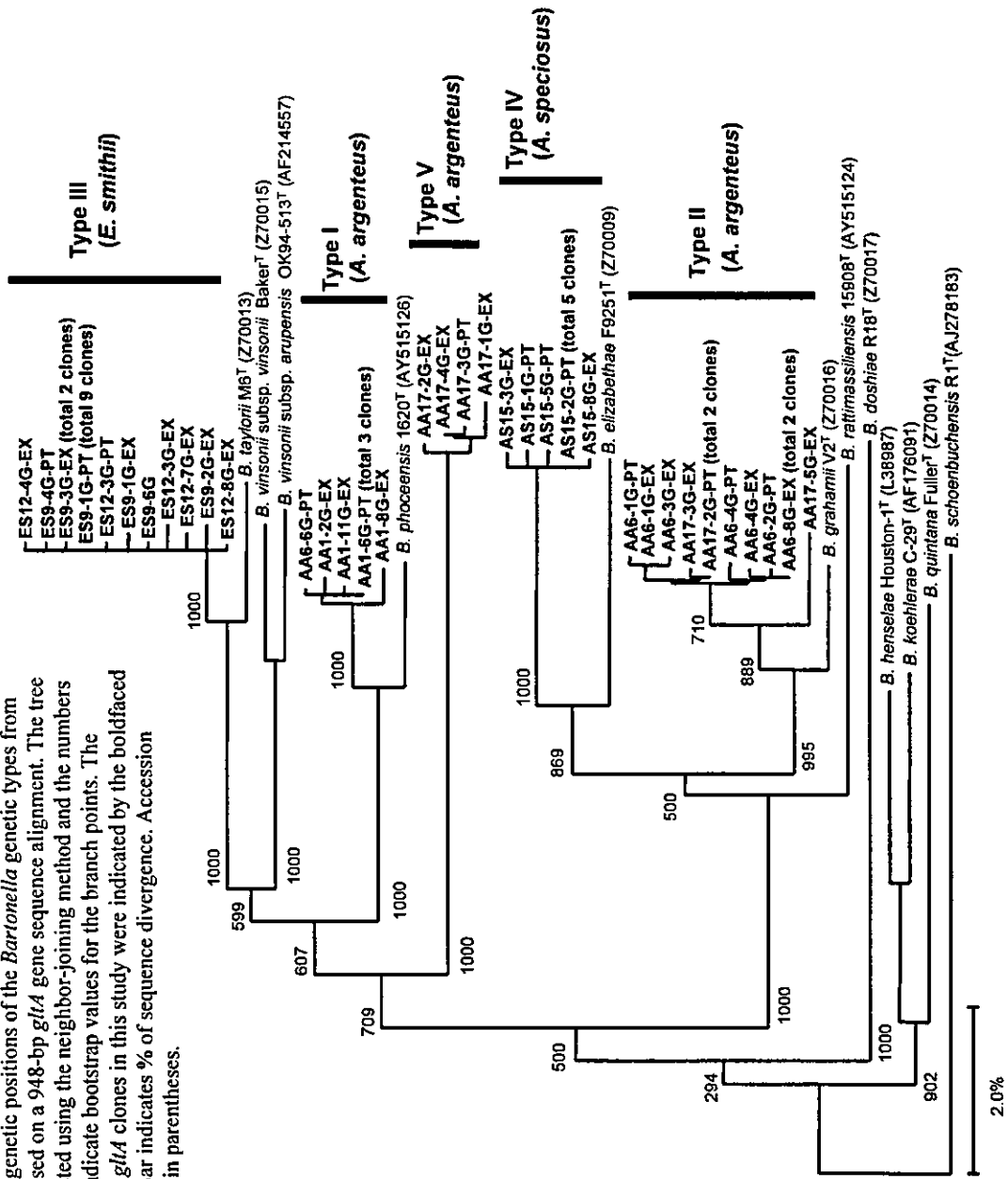


Fig. 3. RFLP analysis of *gltA* gene amplified from wild mouse blood captured in Japan. The amplified DNAs (948 bp) were digested with *Sph* I restriction enzyme. Numbers at top of a panel indicated wild mouse ID and the numbers with asterisks show selected amplicon for sequencing. Five kinds of *Bartonella* genetic types are indicated by "I" to "V" at bottom or right side of the panel. Molecular standard markers were indicated by 'M'.

Fig. 4. Phylogenetic positions of the *Bartonella* genetic types from wild mice based on a 948-bp *gltA* gene sequence alignment. The tree was constructed using the neighbor-joining method and the numbers on the tree indicate bootstrap values for the branch points. The recombinant *gltA* clones in this study were indicated by the boldfaced characters. Bar indicates % of sequence divergence. Accession numbers are in parentheses.



る。昨年度の調査からこの菌株がヤマトマダニによって媒介されることが判っていたが、保菌動物種は不明であった。今回の調査で *Ehrlichia* sp. Shizuoka 株の保菌動物が野鼠であることが初めて明らかとなった。また、*E. muris* の新規遺伝子型 Variant の存在も判明した。

一方、'*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*' は 2004 年に *Ehrlichia* 属から分類学的に配置換えされた新しい属菌種で、ラットにより一時的な分離に成功したことが報告された。しかし、継代的に維持することは極めて困難なようであり、ヒトに対する病原性もいまだ不明である。国内では、これまで伊豆諸島の御蔵島のドブネズミからと北海道のヤマトマダニからのみ検出されたことが報告されていた。今回の我々の調査では、'*Candidatus N. mikurensis*' は本州の野鼠に高頻度に感染していることが判明し、さらに新たな遺伝子型 Variant も存在することが明らかとなった。

Bartonella 属菌においては、1990 年代に「猫ひっかき病」の病原体である *B. henselae* が発見されて以来、欧米で続々と新種の *Bartonella* 属菌が発見され、それらの中に新興感染症と密接に関係しているものが見出されてきた。最近では、特に心内膜炎の約 3% が新種の *Bartonella* 属菌によるものではないかと欧州では考えられており、極めて重要視されている。これまでにげっ歯類から発見された *Bartonella* 属菌の中で、ヒトに病原性を示すものがすでに 3 種類判明しており、今回我々が発見した *gltA* を基にした 5 つの遺伝子型の中にもヒトに病原性を示す *Bartonella* 属菌と遺伝的に類似するものが含まれていた。現在、国内での *Bartonella* 感染症は「猫ひっかき病」と「塹壕熱」がわずかに調べられているの

みであるが、今後は野生動物を自然病原巣とする *Bartonella* 属菌にも着目する必要があると考える。我々は、このような新規の *Bartonella* 属菌について、野外調査と分子遺伝学的解析から基礎的知見を蓄積し、危機管理情報として提供していきたいと考える。

E. 研究論文

発表論文

1. Inayoshi, M., Naitou, H., Kawamori, F., Masuzawa, T., and Ohashi, N. Characterization of *Ehrlichia* species from *Ixodes ovatus* ticks at the foot of Mt. Fuji, Japan. *Microbiol. Immunol.* 48, 737-745 (2004)
2. Gunasekara, D., Fujii, Y., Rusuvai, E., Yoshiie, K., Ohashi, N., and Nakamura, M. Human monocytic cells upregulate superoxide-generating activity and mRNAs for its components in response to heat-stable and heat-unstable factors released to medium conditioned with *Ehrlichia chaffeensis* infected THP-1 cells. *Acta Med. Nagasaki* 49, 39-44 (2004)
3. Rikihisa, Y., Zhang, C., Kanter M., Cheng Z. H., Ohashi, N., and Fukuda, T. Analysis of *p51*, *groESL*, and the major antigen P51 in various species of *Neorickettsia*, an obligatory intracellular bacterium that infects trematodes and mammals. *J. Clinical. Microbiol.* 42, 3823-3826 (2004)

学会発表

1. 西村祐作, 大橋典男, 内藤博敬, 稲吉恵, 川森文彦, 増澤俊幸: 富士山麓の野

- 鼠が保有する *Bartonella* 属菌について.
日本細菌学会第 77 年会 (大阪) 2004 年 4 月
2. 渡邊むつみ, 内藤博敬, 大橋典男, 今井康之, 増澤俊幸: ライム病ボレリアのベクターおよび宿主内発現が想定されるタンパク質のプロテオーム解析. 日本細菌学会第 77 年会 (大阪) 2004 年 4 月
 3. 内藤博敬, 西村祐作, 川口大蔵, 大橋典男: ヒトエーリキア症病原体の感染細胞におけるプロテオーム解析. 日本細菌学会第 77 年会 (大阪) 2004 年 4 月
 4. 渡邊むつみ, 内藤博敬, 大橋典男, 今井康之, 増澤俊幸: ライム病ボレリアのベクターおよび宿主内発現が想定されるタンパク質のプロテオーム解析. 第 41 回 レプトスピラ・シンポジウム (大阪) 2004 年 4 月
 5. Toshiyuki Masuzawa, Kayo Kitamura, Norio Ohashi, Yasuyuki Imai, E.S. Guner : Tick-transmitted pathogens found in Turkey, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum* (HGE agent) and novel species of *Borrelia*. On Strategies for Research and Control of Tick and Tick-borne Diseases, In Particular to Tick-Bioactive Molecules (TBM) Affecting Transmission of Tick-borne Diseases (Obihiro) Aug, 2004
 6. Norio Ohashi, Megumi Inayoshi, Fumihiko Kawamori, Hirotaka Naitou and Toshiyuki Masuzawa: Characterization of *Ehrlichia* species from *Ixodes ovatus* in Shizuoka prefecture, Japan. On Strategies for Research and Control of Tick and Tick-borne Diseases, In Particular to Tick-Bioactive Molecules (TBM) Affecting Transmission of Tick-borne Diseases (Obihiro) Aug, 2004
 7. 大橋典男 : 日本の野鼠が保有する *Bartonella* 属菌の分子遺伝学的性状について. 第 22 回 日本クラミジア研究会、第 11 回 日本リケッチア研究会 (岡山) 2004 年 10 月
 8. 川口大蔵, 内藤博敬, 増澤俊幸, 大橋典男: 静岡県および長野県の野鼠が保有するエーリキア細菌の検出と分子遺伝学的解析. 平成 16 年度 日本薬学会東海支部例会 (静岡) 2004 年 12 月
 9. 内藤博敬, 西村祐作, 川口大蔵, 大橋典男: 細胞内寄生性細菌の宿主応答プロテオミクス. 第 27 回 日本分子生物学会 (神戸) 2004 年 12 月
 10. 渡邊むつみ, 神村卓也, 内藤博敬, 大橋典男, 金田一秀, 今井康之, 増澤俊幸: プロテオーム解析によるライム病ワクチン候補物質の探索. 第 27 回 日本分子生物学会 (神戸) 2004 年 12 月

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）分担研究報告（平成16年度）

国内各地の小型哺乳類とマダニ類における野兔病菌と紅斑熱群リケッチアの検索
—2004年3月～2005年1月のフィールド調査の結果—

分担研究者 藤田博己 大原総合病院附属大原研究所

共同研究者 川端寛樹, 小泉信夫 (分担研究者, 国立感染症研究所), 角坂照貴 (分担研究者, 愛知医科大学), 新田芳樹 (沖縄県家畜衛生試験場), 高田伸弘, 矢野泰弘 (福井大学), 本田俊郎 (鹿児島県出水保健所), 御供田睦代, 蔵元 強 (鹿児島県環境保健センター), 山本 進, 野田伸一 (鹿児島大学), 山本正悟 (宮崎県衛生環境研究所), 馬原文彦 (馬原医院), 田原研司, 板垣朝夫 (島根県保健環境科学研究所), 斎藤あつ子 (神戸大学), 鈴木和男 (和歌山県, ふるさと自然公園センター), 藤本和義 (埼玉医科大学短期大学), 伊東拓也 (北海道衛生研究所), 磯貝恵美子 (北海道医療大学), 増澤俊幸 (主任研究者, 静岡県立大学)

要旨

前年度に引き続き, 2004年3月から2005年1月までに, 国内各地において, 野鼠類を中心とした小型哺乳類とマダニ類を採集し, 野兔病菌と紅斑熱群リケッチアについて, 培養細胞と一部培地を用いた分離によって保有状況を調査した. 採集した小型哺乳類, 9属12種330頭のうち, 病原体分離の結果は, 野兔病菌では0/319, 紅斑熱群リケッチアでは0/305で, いずれも陰性であった. 検査過程で, 一部の供試個体からは *Bartonella* 属の未同定細菌とトリパノソーマ科原虫が分離された. マダニ類は, 小型哺乳類と植生上から4属21種4,147個体を採集した. マダニ類からの病原体分離は, 野兔病菌では0/884ですべて陰性, 紅斑熱群リケッチアでは, 42/1,081の陽性率であった. 分離42株は, 病原性の種類が *Rickettsia japonica* 3株と *Rickettsia helvetica* 6株, 未命名で病原性不明種が *Rickettsia* sp. ATタイプ (*Rickettsia tamurai*と新種記載・命名予定) 10株と *Rickettsia* sp. LONタイプ18株および未同定の不明種5株からなる. このうちの不明種は, 国内では初確認の種類に型別され, オーストラリアや東南アジアに分布する病原性紅斑熱群の *Rickettsia honei*に酷似する.

目的

野兔病と紅斑熱群リケッチア症は世界中に広く発生が知られる疾患である. 野兔病は近年, 国外の常在地から輸入ペット動物とともに病原体が日本国内に持ち込まれる可能性が危惧されている. また紅斑熱は, 海外での感染が推定され, 帰国後に診断・

治療された例がある. 両疾患はともに国内にも常在するので, 輸入例との鑑別が重要な課題となるが, その基礎的データとなるべき国内における病原体の実態はほとんど解明されていない. したがって, 当面は輸入例監視の一方で, 国内における当該病原体の調査を併行しなければならないのが実

情である。本研究では、昨年度に引き続き、国内各地における野兎病菌と紅斑熱群リケッチアについて、小型哺乳類とマダニ類における保有状況把握のための野外調査を実施した。

調査の地域、期間および担当者

沖縄県（西表島、石垣島），2004年3-5日：
高田，藤田

沖縄本島，2004年10月22日，2005年1月
11-15日：新田，小泉，川端，角坂，
藤田

鹿児島県トカラ列島中之島，2004年10月
30-31日：蔵元，高田，川端，藤田

鹿児島県屋久島，2004年6月25-27日：
本田，山本正悟，御供田，高田，矢野，
斎藤，川端，角坂，藤田

鹿児島県黒島，2004年3月9-10日：本田，
藤田

鹿児島県垂水市，2004年3月11日，19日，
5月23日，24日：本田，山本 進，藤田

鹿児島県（高山町，内之浦町），2004年4
月15日：山本 進，野田

宮崎県（宮崎市，日南市，田野町，青井岳），
2004年5月21-23日：山本正悟，本田，
藤田

徳島県（阿南市，日和佐町，牟岐大島），2004
年7月30日，8月18日，19日，9月20
日，27-30日：川端，小泉，馬原，藤田

島根県（隠岐諸島，雲南市，横田町，仁多
町，松江市），2004年11月18-25日：
田原，板垣，高田，矢野，川端，角坂，
藤田

奈良県奈良公園，2004年4月3日：磯貝

奈良県旧柳生街道，2004年5月3日：藤本

和歌山県田辺市，2004年4月18日：鈴木
長野県（軽井沢町八風山，美笹温泉，布施
川源流），2004年5月1-3日：高田，
藤田

青森県（阿闍羅山，白神山地，津軽山地），

2004年7月29日-8月2日：高田，斎藤，
川端，藤田

青森県青森市城ヶ倉，2004年8月12日：
藤田

北海道（札幌市，千歳市），2004年6月17
-19日：高田，伊東，藤田

北海道穂別町，2004年6月20日：磯貝

方法

野鼠類はシャーマントラップまたはケー
ジトラップを用いて生け捕りした。

捕獲動物は，麻酔死させた後に剖検して
検査材料を採取した。野兎病菌，紅斑熱群
リケッチアともに，分離材料には肝臓，脾
臓，血液のいずれかを用いた。

マダニ類の採集は，植生上から白色フラ
ンネル布によるハタズリ法で行うとともに，
一部については，宿主体表から摘出採集し
た。

分離は個体別に行った。分離は，野兎病
菌，紅斑熱群リケッチアともに，材料乳剤
を培養細胞L929に接種し，病原体の増殖を
確認する方法によった。ただし，一部の材
料からの野兎病菌分離には，ユーゴン寒天
（DIFCO）に血液を添加した血液寒天培地も
併用した。

野鼠類からの病原体分離結果（表1）

南西諸島の西表島から北海道の札幌市に
至る20の調査地域において捕獲・採集した
小型哺乳類は，ジャコウネズミ，ワタセジ
ネズミ，ジネズミ，ハタネズミ，ヤチネズ
ミ，タイリクヤチネズミ，カヤネズミ，ヒ
メネズミ，アカネズミ，オキナワハツカネ
ズミ，クマネズミおよびドブネズミの9属
12種，合計330頭である。このうち，野兎
病菌の分離は0/319，紅斑熱群リケッチア
は0/305ですべて陰性の結果であった。一
方，その他の微生物として，*Bartonella*属
と推測される細菌が沖縄本島のジャコウ

表 1. 日本各地の野鼠類からの病原体分離結果

種 類	採集数	陽性数/検査数		
		野兎病菌	紅斑熱群リクツチ?	その他
南西諸島				
沖縄県西表島 04-05. XII. 2004				
ジャコウネズミ	1	0/1	0/1	
クマネズミ	1	0/1	0/1	
沖縄県沖縄本島 12-15. I. 2005				
ジャコウネズミ	21	0/21	0/21	Bartonella 14/21
ワタセジネズミ	9	0/9	0/9	
クマネズミ	6	0/6	0/6	
ドブネズミ	19	0/19	0/19	
オキナワハツカネズミ	8	0/8	0/8	
鹿児島県トカラ列島中之島 31. X. 2004				
アカネズミ	41	0/35	0/33	Trypanosoma 3/33
クマネズミ	3	0/3	0/3	
ジネズミ	1	0/1	0/1	
鹿児島県屋久島 26-27. VI. 2004				
アカネズミ	1	0/1	0/1	
クマネズミ	3	0/2	0/2	
ドブネズミ	3	0/3	0/3	
鹿児島県黒島 10. III. 2004				
アカネズミ	1	0/1	0/1	

南西諸島 合計	118	0/111	0/109	

鹿児島県本土域				
垂水市新御堂 24. V. 2004				
ジネズミ	1	0/1	0/1	
アカネズミ	6	0/6	0/6	

鹿児島本土域 合計	7	0/7	0/7	

徳島県				
日和佐町 29. IX. 2004				
アカネズミ	5	0/5	0/5	
阿南市新野町				

アカネズミ	1	0/1	0/1	
<hr/>				
徳島県 合計	6	0/6	0/6	
<hr/>				
島根県				
隠岐島島後隠岐島町 20. XI. 2004				
ヒメネズミ	2	0/2	0/2	
アカネズミ	6	0/5	0/4	
隠岐島島前海士町 (中ノ島) 21. XI. 2004				
アカネズミ	7	0/7	0/6	
雲南市 22. XI. 2004				
アカネズミ	17	0/17	0/1	
横田町 (山県, 五反田) 23. XI. 2004				
ジネズミ	1	0/1	-	
カヤネズミ	1	0/1	-	
ヒメネズミ	1	0/1	0/1	
アカネズミ	22	0/22	0/17	Bartonella 1/17
仁多町馬馳 23. XI. 2004				
アカネズミ	6	0/6	0/6	
ドブネズミ	1	0/1	0/1	
松江市 (本庄, 新庄町) 24. XI. 2004				
ジネズミ	4	0/4	0/4	
カヤネズミ	1	0/1	0/1	
ハタネズミ	1	0/1	0/1	
アカネズミ	26	0/26	0/23	
<hr/>				
島根県 合計	96	0/95	0/84	
<hr/>				
長野県				
軽井沢町八風山 02. V. 2004				
ヤチネズミ	4	0/4	0/4	
ヒメネズミ	6	0/6	0/6	
アカネズミ	10	0/10	0/10	Trypanosoma 2/10
美笹温泉 03. V. 2004				
ヒメネズミ	2	0/2	0/2	
アカネズミ	3	0/3	0/3	
布施川源流 03. V. 2004				
ヤチネズミ	4	0/4	0/3	
ヒメネズミ	5	0/5	0/4	
<hr/>				

長野県 合計	34	0/34	0/33		
<hr/>					
青森県					
白神山地 31.VII, 01.VIII.2004					
ハタネズミ	1	0/1	0/1		
ヒメネズミ	10	0/10	0/10		
アカネズミ	20	0/17	0/17		
津軽山地 02.VIII.2004					
ヒメネズミ	2	0/2	0/2		
アカネズミ	8	0/8	0/8	Trypanosoma	1/8
<hr/>					
青森県 合計	41	0/38	0/38		
<hr/>					
北海道					
札幌市（平和の滝、宮城の沢） 18 & 19.VI.2004					
タイリクヤチネズミ	2	0/2	0/2		
ヒメネズミ	4	0/4	0/4		
アカネズミ	22	0/21	0/21	Trypanosoma	3/22
<hr/>					
北海道 合計	28	0/28	0/28		

ネズミから 14/21 および島根県横田町のアカネズミから 1/17 の分離率で見いだされたほか、トリパノソーマ科の原虫が以下の 4 地域のアカネズミから分離された：トカラ列島中之島（3/33）、長野県軽井沢（2/10）、青森県津軽山地（1/8）、北海道札幌（3/22）。

マダニ類からの病原体分離結果（表 2）

マダニ類の採集は、ほぼ小型哺乳類の捕獲作業と併行したが、単独に実施した地域も含まれるため、調査地域はそれよりも多い 35 となった。採集したマダニ類は、タカサゴキララマダニ、カメキララマダニ、タイワンカクマダニ、ツリガネチマダニ、キチマダニ、タカサゴチマダニ、ヤマアラシチマダニ、ヤマトチマダニ、ヒゲナガチマダニ、フタトゲチマダニ、オオトゲチマダ

ニ、キジチマダニ、イエンチマダニ、ハシブトマダニ、ミナミネズミマダニ、タネガタマダニ、ヤマトマダニ、シュルツエマダニ、タヌキマダニ、アカコッコマダニおよび *Ixodes* sp. LY の 4 属 21 種、合計 4,147 個体である。なお、未命名種の *Ixodes* sp. LY はタヌキマダニの幼虫と推定されているがまだ証明されていないので、ここでは暫定的に独立種として扱った。採集個体のうち、タイワンカクマダニ幼虫、ミナミネズミマダニおよびツリガネチマダニのすべてとフタトゲチマダニの一部は宿主動物から採集したものである。

野兔病菌は検査した 884 個体がすべて分離陰性であった。

紅斑熱群リケッチアは 1,081 個体を検査し、広い範囲の地域から合計 42 の分離陽性例が見いだされた。なおこれらの分離株に