

1. 齧歯類：2003? 2005 年 5 月の間に輸入された愛玩用野生齧歯類 26 種、512 匹を 4 つの業者から輸入後、可能な限り短期間に搬入し、採血、安楽死して、検査材料を採取し、分子生物学的、細菌学的及び病理学的にレプトスピラの保有状況を検討した。腎臓は菌の分離培養と病理学的検査に、尿を含む膀胱は PCR 法による菌特異遺伝子の検出に用いた。なお、同時に輸入・購入した食虫目ミミナガハリネズミ（アフリカ産）1 種 10 匹もあわせて調査を行った（合計 27 種 522 匹 表 1）。

DNA の抽出：QIAamp DNA mini kit（キアゲン）、または QuickGene - 800DNA 抽出機（フジフィルム）を用いて齧歯類の膀胱組織および分離レプトスピラより PCR 用鋳型 DNA を調製した。

PCR 法：DNA 抽出後、L-*flaB* プライマーを用いた PCR 法で鞭毛遺伝子 *flaB* 遺伝子を検出した。

細菌培養：腎臓をホモジナイズ後 EMJH 培地にて 30°C 2~4 週間培養した。

分離レプトスピラ株の性状解析：*flaB* 並びに DNA ジャイレース B サブユニット遺伝子 *gyrB* のシーケンス解析とパルスフィールドゲル電気泳動による全ゲノム制限酵素 *Not I* 断片長多形性解析（RFLP）を行った。

血清型の判定：培養された菌の血清型を判定するために、血清型特異的ウサギ抗血清を用いた交差凝集試験（顕微鏡凝集試験）を行った。

病理組織学的検査：ホルマリン固定、パラフィン包埋後 3  $\mu$ m に薄切。ヘマトキシリン・エオジン染色、ワーシースターリー染色と抗 *L. kirschneri* 抗体による免疫染色を

行った。

2. ヒト：患者血清または全血及び尿を採取し、分子生物学的及び細菌学的にレプトスピラの確認および感染源の特定を行った。

DNA の抽出：QIAamp DNA mini kit（キアゲン）、または QuickGene - 800DNA 抽出機（フジフィルム）を用いて全血、血清及び尿より PCR 用鋳型 DNA を調製した。

PCR 法：DNA 抽出後、L-*flaB* プライマーを用いた PCR 法で鞭毛遺伝子 *flaB* 遺伝子を検出した。

細菌培養：全血を EMJH 培地にて 30°C 2~4 週間培養した。

分離レプトスピラ株の性状解析：*flaB* 並びに DNA ジャイレース B サブユニット遺伝子 *gyrB* のシーケンス解析とパルスフィールドゲル電気泳動による全ゲノム制限酵素 *Not I* 断片長多形性解析（RFLP）を行った。

血清型の判定：培養された菌の血清型を判定するために、血清型特異的ウサギ抗血清を用いた交差凝集試験（顕微鏡凝集試験 microscopic agglutination test ; MAT）を行った。また、MAT にてペア血清抗体価を測定した。

## C. 結果

1. 齧歯類 26 種 512 匹のレプトスピラ陽性率は平均 6.1%、種類別陽性率は 4? 60%であった（表 1）。その年度別内訳は 2003 年 5/144(3.5%)で、アフリカヤマネ 5/10(*L. kirschneri*[LK])。2004 年菌は培養されなかったが、PCR 法で 18/176(10.2%)が陽性となり、アフリカチビネズミ 8/20(*L. borgpetersenii*[LB]、*L. noguchii*)、

ヒメミユビトビネズミ 1/8、オオミユビトビネズミ 1/16 (*L. intrrogans*[LI])、シナイスナネズミ 1/4 ([LB])、カイロトゲマウス 2/20 ([LB]、*L. weilii*)、バナナリス 2/20 ([LI])、シマリス 1/20 ([LB])、アメリカアカリス 2/19 ([LI])。2005 年 8/203 (3.9%)、培養でアメリカモモンガ 5/10 ([LK])、PCR 法でアメリカモモンガ 5/10、デグー 2/9 ([LK] [LI]) が陽性となった。以上、検索した 26 種類のうち 11 種類の齧歯類がレプトスピラを保有しており、5 種類の菌種が確認された。産地別ではアフリカ/中近東産齧歯類 14 種中 6 種 (アフリカヤマネ、アフリカチビネズミ、ヒメミユビトビネズミ、オオミユビトビネズミ、シナイスナネズミ、カイロトゲマウス)、北南米産齧歯類 6 種中 3 種 (アメリカアカリス、アメリカモモンガ、デグー) アジア 6 種類中 2 種 (バナナリス、シマリス) と、明瞭な地域偏向はなかった。しかし、意外なことに樹上性齧歯類 7 種中 5 種 (アフリカヤマネ、バナナリス、シマリス、アメリカアカリス、アメリカモモンガ) がレプトスピラを保有していた(写真 1)。アメリカモモンガから分離された菌の血清型を顕微鏡凝集試験で調べたところ、Grippotyphosa であった。アフリカヤマネから菌は分離されたが、血清型を特定するに至らなかった。血清型の判明したアメリカモモンガについて、Grippotyphosa に対する血清抗体価を測定したところ、10 匹中菌を保有していた 1 匹のみが陽性 (100 倍) となった。しかしながら、他の菌保有個体 5 匹は抗体を有しておらず、菌が検出できなかった 2 匹に 100 倍以下 (陰性) の弱い反応がみられた。

病理学的所見：培養で陽性となった動物の腎臓、主として近位尿細管内に種々の程度に細線維状の菌が観察された。濃厚感染例では、HE 染色でも管内に密集、充満する菌が確認できた。病変としては、軽度な好中球浸潤が間質や管腔内に巣状に散在し、一部にリンパ球浸潤もあったが、菌の存在と必ずしも一致していなかった。免疫染色では、アメリカモモンガとアフリカヤマネの尿細管内に密集する菌が陽性となった(写真 2 と 3)。

## 2. ヒト

1) 発生状況：2005 年 3 月、アメリカ・テキサスから、静岡市の動物輸入業者がアメリカモモンガ 129 頭を輸入した。その後、同輸入業者の飼育・販売に携わる従業員 2 名 (29 歳男性、28 歳男性) が、2005 年 4 月 22 日と同年 6 月 1 日にそれぞれ発症し、静岡済生会総合病院を受診した。発病前の動物の管理については、一例目の患者はマスクをしていたものの、半袖の T シャツといった軽装で、動物に直接触れない給餌などの際は手袋をせず、アメリカモモンガを飼育中のケージで、前腕に擦過傷を負ったり、し尿等の飛沫が跳ねたりする飼育状況であった。その後、同施設において殺処分するまでの間、未出荷のアメリカモモンガを保管・飼養していたところ、二例目が発症した。初発患者調査の際に、保健所から衛生指導を受け、アメリカモモンガの取り扱い時には長袖、手袋を着用していたが、発病の一週間ほど前の作業中、手袋に穴があき、その際にレプトスピラに汚染されたし尿等に接触、感染した可能性があると考えられた。(模式図 1)

2) 臨床経過：静岡市の動物輸入販売に携わる従業員 2 名 (29 歳男性、28 歳男性) が、発熱、腰痛及び倦怠感、さらには結膜黄疸、充血、乏尿、血尿を呈し静岡済生会総合病院を受診した。一例目の患者は 2005 年 4 月 22 日に、二例目は同年 6 月 1 日に

発病した(表 2)。臨床経過並びに動物との接触があったことから、レプトスピラ症を疑いストレプトマイシン 2g/日筋注による治療を行った。それぞれ約 1 週間の治療で回復し、退院となった。2 名とも、血液培養や PCR 法により、レプトスピラ陽性が確定され、主治医から静岡市保健所にレプトスピラ症の 4 類感染症発生届出がなされた。3) 検査結果：ヒトの症例では、1 例目患者は、患者感染初期血清について、PCR でレプトスピラ鞭毛抗原 *flaB* 陽性を示し、アメリカモモンガ由来レプトスピラ分離株を抗原とする MAT では、受診時の血清抗体は陰性であったが、回復期ペア血清は 800 倍の抗体価を示した。2 例目患者では全血培養よりレプトスピラの分離に成功し、さらに全血 PCR により *flaB* の増幅を確認した。血清学的検査でも、回復期ペア血清は 200 倍希釈でアメリカモモンガ由来株に対して陽性反応を示した(表 4)。

患者、並びにアメリカモモンガ由来の 5 株は *flaB*、*gyrB* 配列解析、およびゲノム RFLP 解析(模式図 2)、各種血清型特異的ウサギ抗血清を用いた交差凝集試験(表 4)においても同一であることを確認した。同じ動物の膀胱凍結試料からも *flaB*-PCR により増幅産物を検出し、その配列は患者臨床材料、並びに患者分離株、アメリカモモンガ腎臓分離株と完全に一致し、アメリカモモンガを介したレプトスピラ感染事例であったことを証明した<sup>3)</sup>。分離株は *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa と同定した。この血清型は米国においては、イヌ、家畜、ヒトのレプトスピラ病起因血清型としてありふれたタイプであり、日本では沖縄に存在する。

なお、ハンタウイルスについては、荻和宏明先生が 2 名の患者について、次のような検査を行い、ハンタウイルス感染を否定した。

- ・急性期と回復期の血清につき、Hantaan(HTN)、Seoul(SEO)、Puumala(PUU)、Sin Nombre(SN)、Thottapharayam(TPM) 型のヌクレオキャプシド蛋白に対して IgG 抗体と IgM 抗体を ELISA 法を用いて測定した。その結果、急性期および回復期のいずれにおいても IgG 抗体は検出されなかった。

- ・急性期の尿と血液を材料とした PCR も実施したが、いずれも陰性であった。

#### 4) 患者発生時の対応

分担研究者は、4 月 25 日業者より腎不全患者(第 1 例)発生の連絡を受け、臨床症状からレプトスピラ感染症あるいは腎症候性出血熱を疑い、レプトスピラについては研究協力者である増澤俊幸先生(千葉科学大学)、ハンタウイルスについては、荻和宏明先生(北海道大学)に協力を要請すると同時に、原因は特定されていないが腎不全の患者の発生があったことを厚生労働省に連絡した。増澤俊幸先生より患者が入院した静岡済生会総合病院担当医師への協力要請がなされ、病原体検出の作業が開始された。以下は、レプトスピラ症と診断された後の行政の対応である(病原微生物検出情報：Vol. 26, No. 8 (No. 306) pp17 (209) 2005 年 8 月発行)。

##### (1) 静岡市保健所の対応

1 例目の届出を受けた市保健所は、2005 年 5 月 6 日より、静岡市動物指導センターとともに、動物取扱い業者への聞き取り、施設への立ち入り等の調査を行い、患者を除く従業員 5 名の健康状態、施設の状況及び動物の保管状況を確認した。この結果、従業員で健康に異常のある者はおらず、また、保管施設の床は次亜塩素酸ナトリウムで消毒・清掃されており、ドブネズミが入ってこないような対策が取られていること

が確認された。

当該施設には、アメリカモモンガの他、サバクトビネズミ、コビトトビネズミ、デブスナネズミ、カイロトゲマウス、アレチネズミ、キンイロスパイニーマウス、バルチスタンコミミトビネズミ等の齧歯類が飼育されていたが、アメリカモモンガとその他の齧歯類の動物の飼育場所は区画で分かれていた。これらの動物について検査のためのサンプリングを行い、アメリカモモンガの飼育場所のふき取り検体及び一部返品されてきたアメリカモモンガの尿について、レプトスピラの検査を行ったところ、アメリカモモンガの検体から*L. kirschneri*のDNAが検出された。

厚生労働科学研究費新興・再興感染症研究事業「輸入動物に由来する新興感染症侵入防止対策に対する研究」研究班(主任研究者 吉川泰弘教授)の研究の一環として、レプトスピラ症患者発生以前より、この輸入業者から動物を買い上げ、各種病原体の保有調査を実施し、その中でレプトスピラについても検索を行っていた。この輸入業者より買い上げた動物8種(計86匹)について 厚生労働科学研究の研究データの一部を掲載する。

なお、アメリカモモンガは米国から、その他アメリカモモンガ以外のげっ歯類は、エジプトやパキスタンから輸入されたもので、野生の動物を捕獲して出荷していたことが聞き取り調査により判明している。

アメリカモモンガについては、検討の上、5月26日に動物取り扱い業者に対して、法第29条の規定に基づく殺処分の措置命令を行った。

## (2) 厚生労働省の対応

2005年5月6日、静岡市から4類感染症発生届出の報告を受け、同市に対し、積極的疫学調査を指示した。5月25日には、静岡市から、患者が感染したと推定されるレプトスピラとアメリカモモンガ保菌レプトスピラの血清型が一致したこと、アメリカモモンガの出荷先及び数が厚生労働省に報告された。厚生労働省では、アメリカモモンガはレプトスピラの保菌動物であり、抗生物質投与による治療で尿から病原体が検出されなくなった場合でも、完全に除菌される保証がないと考えられたこと、出荷先が複数の自治体(6自治体)にわたっていたこと、さらに、出荷されたアメリカモモンガが同じロットであったことから、レプトスピラ症の感染が拡大する危険性を踏まえ、5月27日付で、結核感染症課長名で、アメリカモモンガが出荷されていた自治体に対し、法第63条の2の規定に基づき、積極的疫学的調査を実施するとともに、法第29条に基づく動物の殺処分を指示した。動物取り扱い業者の施設に保管されていたアメリカモモンガ108頭(出荷先からの返品16頭を含む。研究に使用済みの10頭は除く)は、6月2日に動物指導センター立会いの下、炭酸ガスで安楽殺後、焼却された。

## (3) 出荷先の自治体の対応

アメリカモモンガは、当該動物輸入業者が129頭輸入しており、うち37頭が出荷されていた(うち16頭は後に輸入業者へ返品、10頭は研究に使用済み、2頭は死亡、9頭は販売中または販売済みであった)。出荷先となった6自治体では、静岡市保健所からの連絡及び厚生労働省の通知を受け、それぞれ法第15条の規定に基づく積極的疫学調査が行われた。その結果、調査により全てのアメリカモモンガについて、販

売経過、現況等が把握された。出荷されていたそれぞれのアメリカモモンガについては、各自治体担当職員が当該所有者に十分な説明を行った上で、法第 29 条の規定に基づくアメリカモモンガの殺処分の命令を行い、全て殺処分されたことが確認された。なお、これらアメリカモモンガからレプトスピラに感染した者は確認されなかった。

#### D. まとめ

我が国には、様々な種類の動物が大量に輸入されており、専門家がこれらの動物の危険性について指摘していたが、実際の保有率やその危険性に対する科学的資料が乏しかった。しかし、各種輸入動物の病原体保有調査を継続することによって、これらの動物のレプトスピラ保有率が明らかとなり、さらに、これらの動物を感染源とするヒトのレプトスピラ症の発生を経験し、輸入動物の危険性が科学的に実証された。感染源の特定にまで至る事例はきわめて稀で、輸入動物を介した病原体侵入のリスクを評価する目的で調査を実施していたことが、この事例の全容を解明できた主因であると考えている。

レプトスピラ症は野生齧歯類等を宿主とするスピロヘータ感染症であり、保菌動物の腎臓に長期にわたり定着し、尿中にレプトスピラを排出する。排出されたレプトスピラは経皮あるいは経粘膜感染する。日本では、1970 年代前半までは年間 50 名以上の死亡例が報告されていたが、近年では衛生環境の向上などにより患者数は著しく減少した。一方、海外では、レプトスピラ症の流行は全世界的に起こっており、最近報告された事例だけでも、ブラジル、ニカラグアなどの中南米、フィリピン、タイなどの東南アジア等の熱帯～亜熱帯の国々で、大規模な集団発生があり、特にタイでは毎年数千人規模の大流行が続いている。これらの国では、身近に多くの保菌動物がいることが原因であると推測される。

今回の調査では、世界各国から愛玩用として輸入された齧歯類を対象としたが、アフリカ産が 26 種類中 14 種類を占め、アフリカから多種類の動物が輸入されていることが明らかになった。また、レプトスピラ症は、世界各地で発生しており、それを反映してか、各エリアの齧歯類からレプトスピラが検出され、明瞭な地域偏向は見られなかった。

動物の生態により樹上性と地上性と区分して保有率を比較したところ、対象とした樹上性齧歯類 7 種類のうち 5 種類とレプトスピラを保有している種類が多かった。樹上性の齧歯類は、通常、生息している樹上で排尿をする。飼育下でもケージの網や椀に掴まって排尿する。必然的に尿は、上から下へ、ケ? ジ外に滴り落ちたり、あるいはミストになる。このため、保菌動物の取り扱いには、一層注意を払う必要がある。

2005 年 9 月より輸入動物届出法により、野生動物の輸入が著しく制限され、新たに持ち込まれる病原体や感染症については対策がとられた。しかし、輸入される動物の種類は多少なりとも変わったものの、昨年同期よりも輸入動物数は増加していること、また、すでに輸入された動物および外来種として定着している動物についても、レプトスピラとその保菌動物との関連を鑑みると同様に検討する必要がある。

いずれにしても、動物、特に愛玩用動物を介した動物由来感染症のコントロールのためには、今後もこのようなモニタリングを継続する必要がある。また、このような調査により得られた情報を迅速に、関係機関(輸入貿易商、ペットショップ、自治体

など) に配信し、感染症拡大防止のための適切な動物の取り扱いを周知させる必要がある。これらのことから、感染源の特定及び感染源に対する適切な措置を速やかに行うことが重要であることが再認識された。

表1 輸入野生齧歯類におけるレプトスピラ保有状況

産地	種類	全頭数	Leptospira		菌種	血清型
			陽性数	保有率		
ア フ リ カ ・ 中 近 東	フトオアレチネズミ	15	-	-		
	アレチネズミ	9	-	-		
	アフリカヤマネ	10	5	50%	<i>L. kirschneri</i>	不明
	アフリカチビネズミ	20	8	40%	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. noguchii</i>
	ヒメミユビトビネズミ	8	1	13%		
	オオミユビトビネズミ	16	1	6%	<i>L. interrogans</i>	
	シナイスナネズミ	4	1	25%	<i>L. borgpetersenii</i>	
	カイロトゲマウス	29	2	7%	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. weilii</i>
	ハウスマウス	4	-	-		
	キンイロスパイニーマウス	13	-	-		
	デブスナネズミ	11	-	-		
	フサオジャービル	10	-	-		
	ミミナガハリネズミ	10	-	-		
	ゼブラマウス	11	-	-		
ア ジ ア	ピグミージェルボア	69	-	-		
	バナナリス	30	2	7%	<i>L. interrogans</i>	
	エゾリス	20	-	-		
	タイリクモモンガ	26	-	-		
	シマリス	49	1	4%	<i>L. borgpetersenii</i>	
	ダウリアハタリス	10	-	-		
北 南 米	リチャードソングリス	40	-	-		
	コロンビアジリス	30	-	-		
	ジュウサンセンジリス	10	-	-		
	アメリカアカリス	19	2	11%	<i>L. interrogans</i>	
	デグー	29	2	7%	<i>L. kirschneri</i>	<i>L. interrogans</i>
	アメリカモモンガ	10	6	60%	<i>L. kirschneri</i>	Grippityphosa
合計		512	31		5菌種	



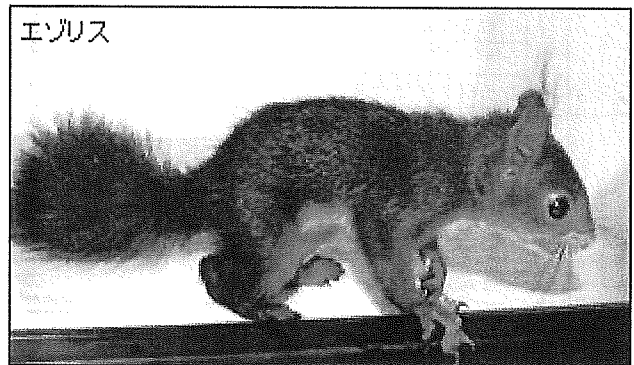
アメリカモモンガ



タイリクモモンガ



アカリス



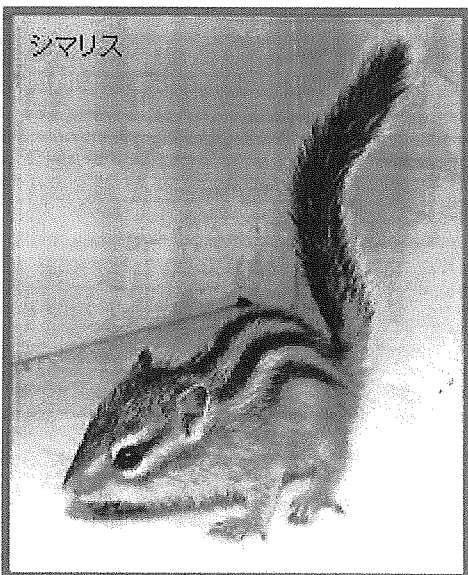
エゾリス



バナナリス



アフリカヤマネ



シマリス

### 写真1

検査対象とした樹上性げっ歯類

樹上性齧歯類7種類のうち  
5種類(赤粹)からレプトスピラが検出された。



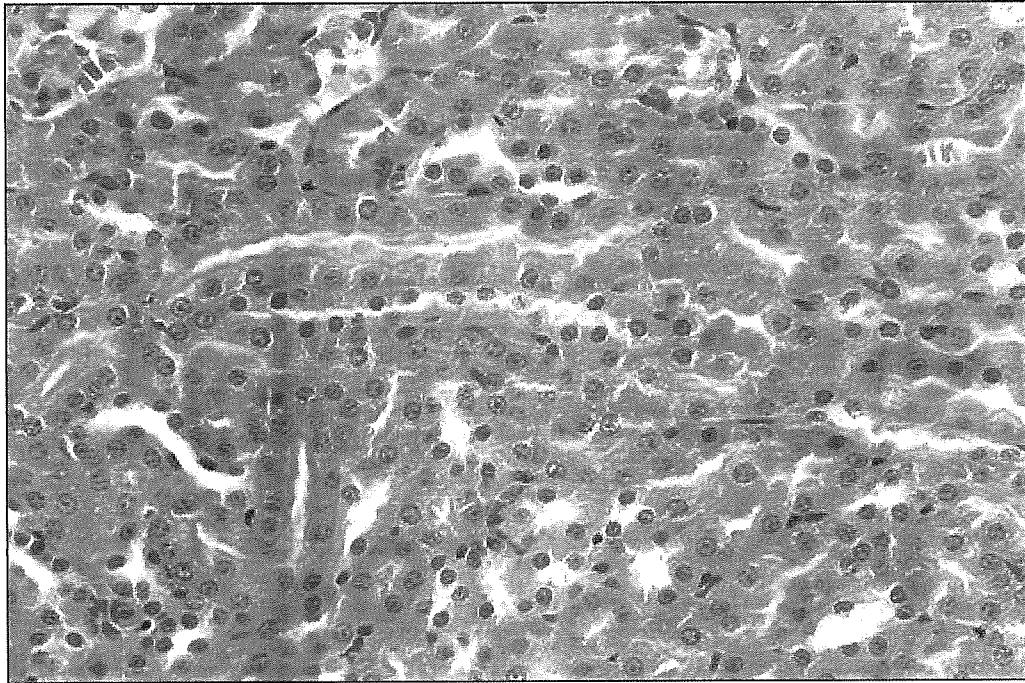


写真2 アフリカヤマネ、腎臓皮質  
尿細管内を縁取るように弱好塩基性の菌が観察される、(HE染色)

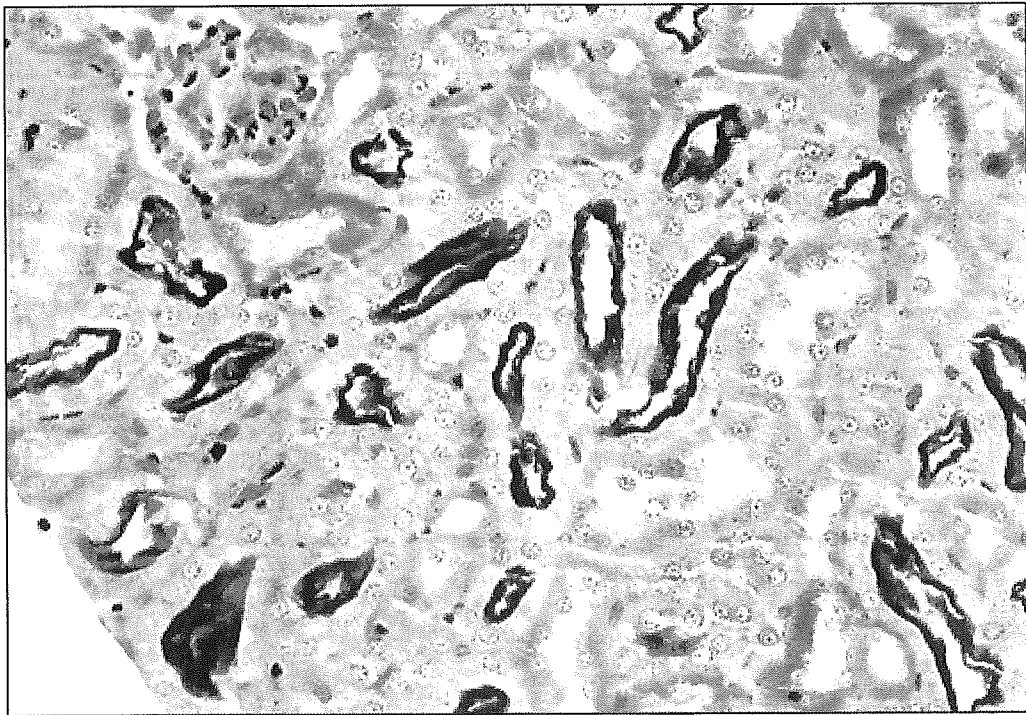


写真3 アフリカヤマネ、腎臓皮質(写真2と同一例)  
菌が黒褐色に染め出されている、(ワースターリー染色)

表. 2 レプトスピラ患者のプロフィール

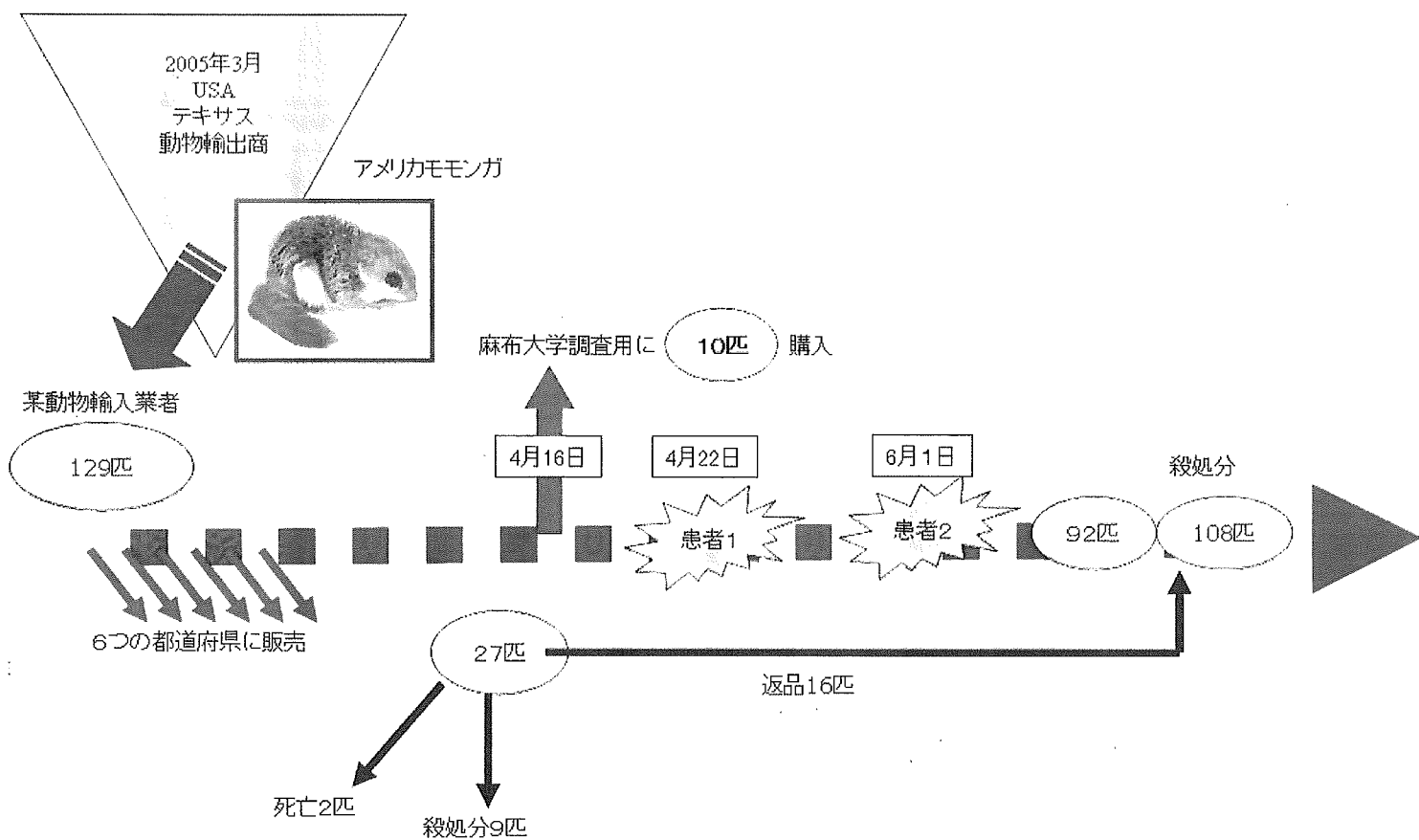
項目	患者1 (29歳・男性)	患者2 (28歳・男性)
発症	4月22日	6月1日
入院	4月24日	6月1日
退院	5月2日 (9日間)	6月11日 (11日間)
症状	結膜黄疸、充血 乏尿、血尿 40°C 越す発熱 関節痛、腰痛、倦怠感 嘔吐 急性腎不全 (BUN44 mg/dl, Cr2.8 mg/dl) GOT591 IU/L, GPT1071 IU/L	結膜充血 血尿 (入院2日目) 微熱～高熱 関節痛
感染	マスクを装着 半袖のTシャツ 手袋はしていない ケージで前腕部擦過傷 尿尿の飛沫	長袖 手袋 発症の1週間前に手袋に穴

表. 3 顕微鏡凝集試験 (MAT) による患者血清診断結果

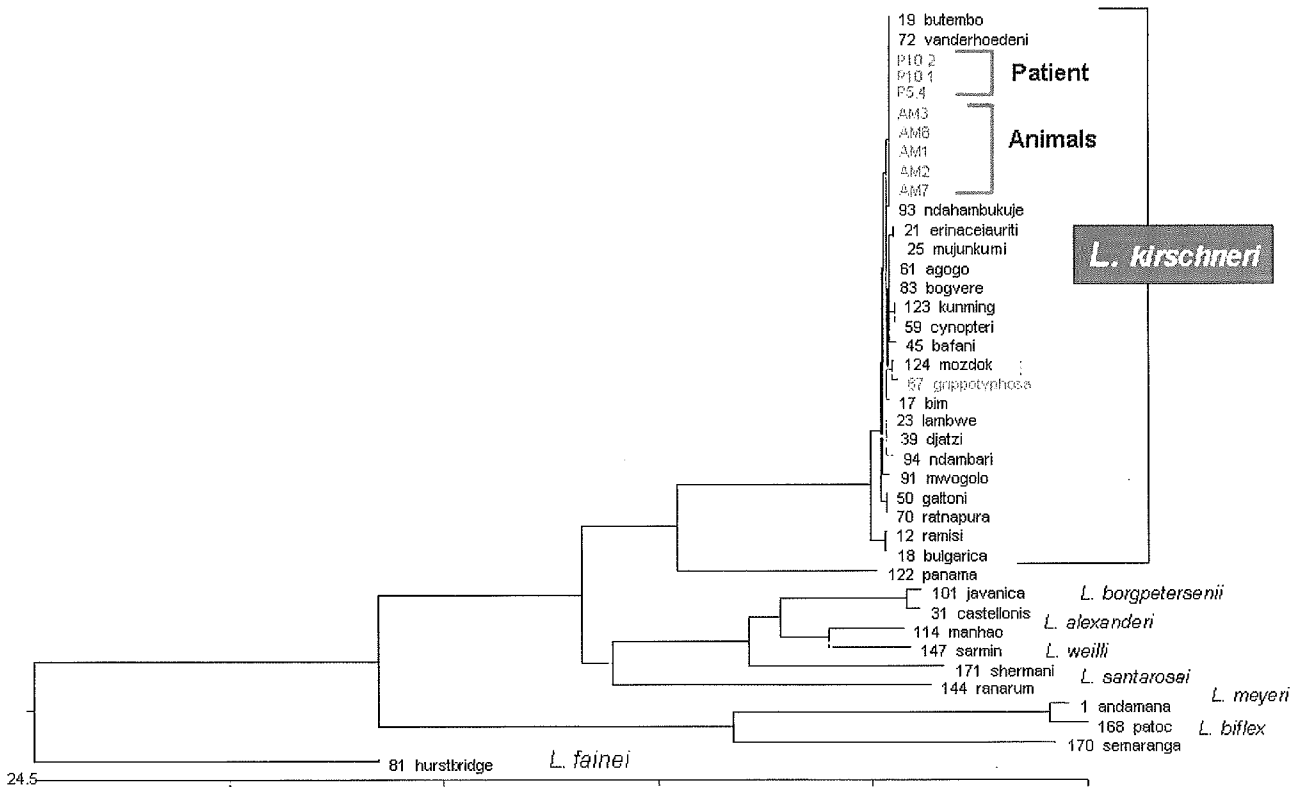
種名	抗 原		採血日	
	血清型	株	凝集抗体価	
1例目			4/24	5/9
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa?	AM1	<50	800
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa?	AM3	<50	800
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Moskva V	<50	100
2例目			6/2	6/15
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa?	AM3	<50	200
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Moskva V	<50	200

表. 4 交差凝集試験による患者、アメリカモモンガ分離株の血清型同定

Antisera	アメリカモモンガ分離株					患者分離株		
	AM1	AM2	AM3	AM4	AM7	p5.4	p10.1	p10.2
<i>α</i> -Grippotyphosa	6400	6400	6400	6400	6400	6400	3200	3200
<i>α</i> -Icterohaemorrhagiase	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
<i>α</i> -Copenhageni	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
<i>α</i> -Autumnalis	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
<i>α</i> -Hebdomadis	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
<i>α</i> -Australis	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
<i>α</i> -Javanica	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
<i>α</i> -Castellonis	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100



模式図. 1



模式図. 2 *gyrB* 塩基配列解析に基づく患者、アメリカモモンガ分離株の遺伝種同定

平成 17 年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症対策研究事業）

研究班研究課題：輸入動物に由来する新興感染症侵入防止対策に関する研究

分担者研究課題：輸入動物 ー特に爬虫類、鳥類、食肉類、霊長類由来感染症に関する研究ー

分担研究報告書：

リスザルの *Yersinia pseudotuberculosis* ワクチンの臨床実験に関する研究

分担研究者：宇根有美 麻布大学獣医学部病理学研究室

研究協力者 林谷秀樹 東京農工大学獣医衛生学研究室

国内展示施設ではエルシニア症が散発あるいは集団発生しており、自験例だけでも 15 施設、65 例の発生がある。動物のエルシニア症の原因菌である *Yersinia pseudotuberculosis* (Y. p) は人獣共通感染性の病原体で、サル類に強い病原性を示し、リスザルでの流行が目立つ。このため、展示施設におけるリスザルのエルシニア症の発生を抑えることを目的として、Y. p 死菌ワクチンを作製し、その有効性を臨床実験で検討した。2003? 2006 年の 4 年間、10 施設、延べ 905 匹のリスザルを対象として、抗体検査とワクチン接種を行った。その結果、ワクチンを接種したリスザルには、1 匹もエルシニア症の発生が認められなかった。よって、今回用いたワクチンはリスザルにおけるエルシニア症発生阻止に有効であると結論づけた。

## A. 背景

### I エルシニア属菌の概要

腸内細菌科に属する通性嫌気性グラム陰性桿菌で、4℃以下でも発育可能な低温発育性を有し、11 菌種に分類されている。病原性をもつエルシニア属菌としては、以下の 3 菌種がよく知られており、*Y. pestis* はペストの原因菌で、現在日本には存在しない。*Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* はともに、ヒトと動物に急性腸管感染症を引き起こし、後者は動物の肝臓や脾臓に結核結節に類似した病変を形成する仮性結核の原因菌として知られている。一般にエルシニア症は *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* によっておこる感染症を意味する。両菌種は、哺乳類、鳥類および爬虫類など 75 種以上の動物から検出されている。*Y. pseudotuberculosis* は、齧歯類や鳥類に不顕性に感染し、腸管内で増殖して糞便とともに環境中に排泄され、食物や飲水を汚染する。これを介して経口的に感染することが最も多い。ヒトの感染例の多くは、沢水や井戸水の飲水によって生じているが、これは本菌が、冷たく、きれいな水の中では長期間生息可能で、感染性を保持し続けることに関係している。

ヒトおよび動物のエルシニア症の発生には、保菌動物が深く関わっており、欧米では、ノウサギ、齧歯類および鳥類が注目されている。実際、21 種類もの野鳥から分離されたという報告や、フランスやイギリスでは、野鳥の糞によって汚染された野菜による感染も報告されている。日本では、鳥類から分離されることは少なく、渡り鳥のアオジとハクセキレイからの分離例、259 羽の野鳥を対象として 4 羽 (2.8%) のカモ類からの分離例および東京都内に生息するカラス 145 羽を対象として 7 羽

(4.8%)から分離した報告があるのみである。哺乳類における分離率は、ブタ2.3%、イヌ1.8%、ネコ3.2%、ネズミ1.8%で、島根県で行われた野ネズミを除く狩猟対象哺乳類610頭を対象とした調査では、タヌキ14.1%、シカ3.7%、テン2.9%、ノウサギ1.4%の割合で検出されている。また、最近、イノシシ131頭を対象とした調査では5頭4%から本菌が分離されており、先述の野生動物に加え、イノシシの保菌動物としての可能性が指摘されている。

## II サル類の *Y. pseudotuberculosis* 感染症 (以下エルシニア症と略す)

サル類は *Y. pseudotuberculosis* に対して感受性が高く、アメリカ、ヨーロッパおよび日本において、多くの集団発生が報告されている。その種類は多岐にわたっており、原猿類のショウガラゴから各種の新世界ザルや旧世界ザル、類人猿のテナガザルやチンパンジーにもみられる。多くは動物園での発生であるが、アメリカでは霊長類研究センターでも流行して問題となった。マカカ属の発生が1事例しかないことを除けば、日本でも状況は同じで、ロリス科ショウガラゴ、オナガザル科サバンナモンキー、スーテイマンガベ、ブラッザモンキー、パタスモンキー、マンドリル、クロザル、オマキザル科フサオマキザル、リスザル、テナガザル科シロテナガザル、フクロテナガザル、オラウータン科チンパンジーの報告がある。これらの中ではリスザルの報告が多いが、これは飼育施設数と頭数が多いことや飼育環境によるものと考えられる。なお、集団発生の規模からすると1974年に報告された9年間連続発生した41頭のパタスモンキーの事例が最も大規模であった。また、サル類のエルシニア症の報告は、現在のところ、関東以西に限られているが、保菌動物の分布やヒトのエルシニア症の発生状況から考えると、どの地域であっても発生の可能性がある。サル類より分離される *Y. pseudotuberculosis* の血清型は、欧米ではヒトや他の動物から分離される血清型と同様で1型と2型がほとんどで、少数例が3型であった。日本では、パタスモンキー、クロザル、ブラッザモンキー、チンパンジーから3型が、サバンナモンキー、スーテイマンガベ、フサオマキザルから1b型、チンパンジーから6型が分離されている。自験例を含めてリスザルでは、4b型が最も多く3施設、1b型と6型が各1施設から分離されている。

## III リスザルのエルシニア症

サルの種類による個々の発生状況、臨床症状および病理像に大きな相違は認められないが、我が国では、リスザルにおけるエルシニア症の発生件数および死亡頭数が、諸外国と比較して、格段に多く、動物衛生および公衆衛生上、十分に注意すべき疾患と考えられる。ここに、リスザルのエルシニア症について、自験例を中心として述べる。

### B. 発生状況

リスザルのエルシニア症は、これまで発症の見られない場所に前触れなく突発的に発生する場合と、毎年あるいは周期的に反復して発生がみられる場合とがあった。臨床症状としては突然死、食欲・活力の低下、消化器症状(下痢、粘液便、粘血便、ときに嘔吐や血便)、下痢による被毛の汚染や死流産などが観察されている。以上の臨

床症状は特異性に乏しく、また多くの場合多頭飼育されているため、発症個体の異常に気が付かずに、かなり重篤な状態でみつかることがほとんどであり、治療の猶予のない場合が多い。年齢としては、若齢動物の感受性がより高く、かつ経過が早く重篤になりやすい。しかし、年齢に関わらず発症して死に至る事例もみられた。

### C. 研究の目的

人獣共通感染症であるエルシニア症が国内の数多くの展示施設の動物間、特にリスザルで流行し、そのコントロールに困難を極めていることから、本研究は、展示施設におけるリスザルのエルシニア症の発生、流行を阻止する方法の確立、特にワクチン開発を目的として臨床実験を行った。

### D. 材料と方法

国内の展示施設のうち、エルシニア症の発生経験をもつ施設あるいは発生する可能性がある施設で、最低年1回の捕獲、検査に協力可能な施設にワクチン接種の臨床実験を依頼し、承諾の得られた10施設において調査を行った。対象としたリスザルはコモンリスザル461匹とボリビアリスザル444匹で、2003年127匹、2004年155匹、2005年337匹、2006年286匹、延べ905匹である(表1)。

調査は、冬期にサルを獣舎に収容する施設が多いこと(捕獲が容易)、繁殖期、出産期および育児期に捕獲すると事故が起きやすいことなどから、毎年1月から3月にかけて実施した。

#### 作業内容/手順

関東に位置する大学近隣のK0とTHと採血技術を有する獣医師が常駐しているHCとH0(2006年のみ)の4施設を除き、以下の作業は、予め備品および消耗品を送付し、現地でおこなった。

- 1) 捕獲、個体(マイクロチップを判読)・性別の確認
- 2) 吸入麻酔(イソフルラン)
- 3) 体重測定
- 4) 外景検査(特に削瘦、下痢の有無など)
- 5) 採血(幼体1ml、成体2ml程度)、血清分離
- 6) 直腸スワブの採取(シードスワブ1号)
- 7) ワクチン皮下接種(0.2ml/匹)
- 8) マイクロチップの装着(装着がされていない個体について)
- 9) 覚醒

#### ワクチンの作成法

*Yersinia pseudotuberculosis* 血清型4bを液体培地に接種し、37°Cで24時間培養する。培養後、1%の濃度になるようにホルマリンを加え、1晩静置して死菌液とする。その後、培養液を5000rpmで10分間遠心した後、上清を捨て沈査を滅菌生理食塩水に浮遊させる作業を3回繰り返し、菌体を洗浄する。そして、最終的に菌体を



10 倍量の滅菌生理食塩水に浮遊させたものを接種用ワクチンとした。

#### 抗体価の測定

リスザルの血清を用いて、ELISA 法によりエルシニア菌体外蛋白 (Yops) に対する血中抗体の吸光度を測定した。抗原としては Yops を用いた。

〈方法〉

1. Yops を抗原として 1.0mg/ml でプレートに分注し、4℃で 24 時間静置。
2. 1%牛血清アルブミン (BSA) (KPL) をプレートに分注し、室温で 15 分静置。  
(反応液を捨て、使用時まで 4℃保存)
3. 非動化 (56℃、30 分) した被験血清を 80 倍希釈してプレートに分注し、25℃で 60 分静置。
4. Wash Solution (KPL) で 3 回洗浄。
5. ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体 F(ab')<sub>2</sub> (CooperBiomedical, Inc.) を 6000 倍希釈してプレートに分注し、25℃で 60 分静置。
6. Wash Solution で 5 回洗浄。
7. ABTS 溶液 (KPL) をプレートに分注して 25℃で 20 分静置した後、マイクロプレートリーダー (コロナ社) を用いて吸光度を測定。

#### 病性鑑定

調査協力機関で、観察期間中(ワクチン接種から次のワクチン接種までの期間)死亡したリスザルのうち、死因が明らかにエルシニア症でない場合を除いて、全てのリスザルを病理学および微生物学的に検索した。

#### E. 結果

調査協力機関におけるエルシニア症の発生状況とワクチン接種の効果

##### 1) GS 施設

この施設では、1つの大きなケージに 15 匹のリスザルが飼われ、別の場所に 3 匹のリスザルが個別飼育されていた。2002 年 4 月群飼育の 15 匹中 5 匹が、約 2 週間の間に次々と斃死した。4 匹目に死亡したリスザルが病性鑑定によりエルシニア症と診断されたため、直ちに同居サルに抗生剤の筋肉注射と経口投与を行い、他のサルの発症を抑えたため、死亡率は 33%に留まった。死亡したリスザルの臓器及び同居リスザルの直腸スワブから血清型 4b が分離された。エルシニア症と確定診断されたのは、2002 年のこの事例のみであったが、稟告によると、以前から数年おきに生まれた子ザルのほとんどが死亡していた。剖検を行った展示施設の獣医師によると、これらの子ザルには、今回の事例と類似の肉眼病変が観察されていた。

この施設におけるワクチン接種は 2003 年より 2005 年までの 3 年間に (2006 年は 3 月に実施予定) 3 回実施されており、これまでエルシニア症の発生はない。

##### 2) KO 施設

この施設では 3 つのケージに分けて 9? 21 匹飼育していたが、そのうちの 1 ケージにおいて 2003 年 11 月繁殖ローンにより導入して間もない、ワクチン未接種の成体サル 2 匹が 4 日間という短期間にエルシニア症で死亡した。しかし、同居していたワ

クチン接種、亜成体サル2匹は発症しなかった。また、他のケージでも、2004年9月に生まれたサルが同年の12月（ワクチン接種前）にエルシニア症で死亡した。これらの死亡したサルからはいずれも血清型4bが分離された。同居のワクチン接種サルでの発症はみられなかった。

### 3) TH 施設

この施設では、リスザルのエルシニア症の発生はないが、サンショクキムネオオハシが血清型4bで、少なくとも2羽死亡している。この2羽が病性鑑定によりエルシニア症と診断される以前に同居飼育の3羽も死亡しており、サンショクキムネオオハシは全滅した（2003年）。ワクチン接種は、2006年の1回のみで、現在までにエルシニア症の発生はないが、観察期間が短いため、有効性については不明である。

### 4) FU 施設

23年間に表2に示すように、細菌検査によってエルシニア症と確定された事例はリスザルを含む各種動物において、過去6回発生しており、最近の5年間はリスザル事例のみである。表の下段の合計数は、エルシニア症と確定されたものと肉眼的にエルシニア症（疑似）と診断されたものの合計で、21年間毎年流行が繰り返されていると推察される。この施設では、剖検所見に基づき疑似エルシニア症と診断すると全頭に抗生剤を投与し、流行を抑えている。この施設では、以前から血清型4bが分離されていたが、2003年に死亡したリスザルの臓器からは血清型7が分離されている。

この施設における調査は2003年から開始され、2003年は抗体調査のみ、2004年よりワクチン接種を始めた。毎回全頭から抗体価測定のために採血し（延べ435匹）、ワクチン接種は前年の抗体調査で抗体価の低い動物あるいは前年に生まれたリスクの高い動物を対象として延べ180匹に実施した。全頭に投与しないのは、1回のワクチン製造量に約70匹と限界があるためである。調査を始めてからのエルシニア症の発生は、2003年1月を最後に、2004年以降発生していない。なお、2005年に非病原性エルシニアである *Y. kristensinni* による致死例が1例あった。

### 5) HC 施設

リスザル11匹を飼育する施設で、2003～2004年にかけてエルシニア症が発生して、直腸スワブの細菌検査で *Y. p* 血清型4bが4匹から分離され、うち2匹が死亡した。2005年からワクチン接種を開始した。その後、エルシニア症の発生はない。

### 6) H0 施設

1990年にエルシニア症の発生があったが、最近では発生がない。2005年よりワクチン接種を開始した。その後、今日までエルシニア症の発生はない。

### 7) NB 施設

1985年頃リスザルにエルシニア症が集団発生し、その後、断続的に発生している。あまりにも多数のサルが死亡するため、定期的に抗生剤の投与を行っているが、以下のように抗生剤の休薬後に流行が起きている。1999年12月まで定期的に抗生剤投与を継続していたが、投与を中止した3ヶ月後の2000年3月と6月にエルシニア症が発生した。直ちに抗生剤の投与が再開され、発生は治まったが、抗生剤の投与中止後の12月から2001年3月にかけて発生がみられた。その後、2005年の調査の際にも、エルシニア症の集団発生があり、その際に採取した直腸スワブ46検体のうち8匹（17%）から血清型1bが分離され、ワクチン接種や抗生物質の甲斐なく、うち2匹

がエルシニア症で死亡した。この事例はワクチン接種のその時にすでにエルシニア症の集団発生が起きていた希有な事例である。この施設では、2005年ワクチン接種後に生まれた8匹の子ザルのうち6匹が死亡しており、剖検が実施できた子ザル全てが、肉眼的にはエルシニア症と診断された。この施設では、10月頃からエルシニア症の発生があるものと考えられ、ワクチン接種時期を早める必要がある。

#### 8) ST 施設

Y. p によるエルシニア症の発生は記録されていないが、2002～2003年にかけて45匹中5匹が死亡あるいは *Y. enterocolitica* 08 の集団発症を経験している。2004年よりワクチン接種を開始した。その後、今までエルシニア症の発生はない。

#### F. まとめ

展示施設におけるリスザルのエルシニア症の流行を抑えることを目的として、Y. p 死菌ワクチンを作製し、その有効性を臨床実験で検討した。2003? 2006年の4年間、10施設、延べ905匹のリスザルを対象として、抗体検査とワクチン接種を行った。その結果、ワクチンを接種したリスザルには、1匹もエルシニア症の発生がなかった。よって、今回用いたワクチンはリスザルにおけるエルシニア症発生阻止に非常に有効であると結論づけた。

今後の課題としては、以下のような項目について検討する必要がある。

1) ワクチン接種方法：現在用いている免疫原は皮下接種によって、有効な免疫を賦与している。しかし、皮下接種では、捕獲、保定が必要で、完全放し飼いのリスザル（捕獲の出来ないリスザル）には利用できない。また、たとえ捕獲可能であっても、捕獲時にサルが外傷を負ったり、ショックなどの事故が起きる可能性がある。さらに、野生動物を扱うために、時として保定等の作業をする人間に事故が起きることがある。このため、将来的には、サルにも人間にも負担のない方法、すなわち、経口投与可能なワクチンの開発が望まれる。

2) 免疫原の検討：上記で述べたように経口投与でも効果のある免疫原を開発する必要がある。また、現在の免疫原の生産には、多くの時間と労力が必要で、1回にリスザル約70匹分の免疫原しか生産できない。皮下接種の場合、個々の動物に確実に免疫原を接種できるが、経口投与は皮下接種に比べて、確実性が劣るため、免疫原を大量に用意する必要がある。よって、これまでよりも効率よく、大量に生産できる技術が求められる。

*Y. pseudotuberculosis* は、リスザルのみならず、多くのサル類に病原性を示し、また大型のサルの捕獲・保定はかなり困難で、サルにも人間にも非常に危険が伴う。これらの事から、1)、2)の課題が達成されると、大型サルへの応用も容易に可能となる。

3) ワクチン接種間隔の検討（抗体価の半減期）：現在、用いている免疫原の皮下接種で、得られた抗体がどの程度持続するのか、まだ検討が済んでいない。現在、野外での臨床実験では、年1回の接種で効果が得られている。野外では、ブースターとして働く、病原性エルシニア属細菌の暴露が起きている可能性もあり、そのため、効果が持続している事も考えられるが、その詳細を明らかにする必要がある。

表1 対象としたリスザルの内訳

	2006	2005	2004	2003	合計	
GS		14	13	15		
KO	13	21	11	9		
TH	13	10				
FU	113	113	106	103		
HC	8	7				
HO	5	5				
OP	70	93				
NB	34	46				
ST	30	27	25			
OK		11				
	286	347	155	127		915