

1. Nakamura M, Taira K, Itokazu K, Kudaka J, Asato R, Kise T, Koizumi N. Sporadic cases and an outbreak of leptospirosis probably associated with recreational activities in rivers in the northern part of Okinawa Main Island. *Journal of Veterinary Medical Science* 68(1): 83-85 2006.
2. Koizumi N, Watanabe H. Leptospirosis vaccines: Past, present, and future. *Journal of Postgraduate Medicine* 51(3): 210-214 2005.
3. 坂本光男, 加藤哲朗, 佐藤文哉, 吉川晃司, 吉田正樹, 柴孝也, 小野寺昭一, 保科定頼, 小泉信夫, 渡辺治雄. インドネシア・バリ島で感染した *Leptospira botgpetersenii* 血清型 Sejroe によるレプトスピラ症の 1 例. *感染症学雑誌* 79(4): 294-298 2005.
4. 小泉信夫, 渡辺治雄. レプトスピラ症. *モダンフィジシャン* 25(5): 606-609 2005.
5. 小泉信夫, 渡辺治雄. レプトスピラ. *日本臨床増刊号 広範囲血液・尿化学検査 免疫学的検査* 214-216 2005.
6. Masuzawa T, Hashimoto N, Kudeken M, Kadosaka T, Nakamura M, Kawabata H, Koizumi N, Imai Y. New genomospecies related to *Borrelia valaisiana*, isolated from mammals in Okinawa archipelago, Japan. *Journal of Medical Microbiology* 53(5):421-426 2004.
7. Koizumi N, Watanabe H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine* 22 (11-12): 1545-1552 2004.
8. 小泉信夫 レプトスピラ症 感染症の事典 267-268 国立感染症研究所学友会編 朝倉書店 2004
9. 小泉信夫, 渡辺治雄 レプトスピラ症 日本医師会雑誌臨時増刊号 132(12): 180-181 2004
10. 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 183-193 日本ワクチン学会編 朝倉書店 2004
11. 増澤俊幸, 金田一秀, 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 獣医畜産新報 57(8): 662-664.
12. 中村正治, 平良勝也, 大野惇, 増澤俊幸, 角坂照貴, 川端寛樹, 小泉信夫, 藤田博巳 沖縄県におけるレプトスピラ保菌動物調査 日本獣医師会雑誌 57 (5): 321-325 2004
13. 小泉信夫, 渡辺治雄 日本におけるレプトスピラ感染症の現状 日本醫事新報 4175: 97-98 2004
14. 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.
15. Koizumi N, Watanabe H. Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. *FEMS Microbiology Letters* 226 (2): 215-219 2003.
  16. 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.
  17. 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.
  18. Koizumi N, Kawabata H, Watanabe H. Probable laboratory contamination of clinical specimens with *Leptospira meyeri*. *Microbiology and Immunology* 47 (4): 305-306 2003.
  19. 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.
  20. 小泉信夫, 渡辺治雄 ワイル病. *化学療法の領域* 20(2): 220-223 2004.
  21. 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.
  22. 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. 小泉信夫, 渡辺治雄 レプトスピラ感染防御抗原 Lig タンパク質の解析. 第 77 回日本細菌学会総会. 大阪, 2004 年 4 月.
2. 小泉信夫, 大部宏子, 谷川力, 牧野敬, 林栄治, 渡辺治雄 ドブネズミおよびアライグマ分離レプトスピラの性状解析. 第 41 回レプトスピラシンポジウム. 大阪, 2004 年 4 月.
3. 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
4. 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

5. 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.

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症）  
分担研究・総括報告書（平成 15～17 年度）

ネズミ類が保有するレプトスピラ

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	千葉科学大学・薬学部・教授
研究分担者	川端寛樹	国立感染症研究所・細菌第一部
研究分担者	小泉信夫	国立感染症研究所・細菌第一部
研究分担者	高橋英之	国立感染症研究所・細菌第一部
研究分担者	藤田博巳	大原総合病院附属大原研究所
研究協力者	名古屋市生活衛生センター	
研究協力者	名古屋市健康福祉局・中村保健所	
研究協力者	瀧幾子・弓指孝博	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	川森文彦	静岡県環境衛生研究所
研究協力者	山下昭広	静岡県動物管理指導センター
研究協力者	西宮市環境局環境衛生課	

研究要旨

レプトスピラ症は、主にネズミ類の尿中に排泄された病原性レプトスピラの経皮感染で発生する。患者数が減少した今日でも、海外からの未知血清型の侵入が危惧されることから、我が国のレプトスピラの疫学調査を実施しておくことは重要である。そこで 2003 年度から 3 年間、名古屋市、大阪市、兵庫県西宮市、静岡県山間部、岐阜県山間部、京都府山間部のネズミ類のレプトスピラ保有状況を調査し、分離された株の遺伝子種および血清型について解析した。

3 年間に捕獲されたネズミ類 319 匹 から 9 株のレプトスピラを分離した。*gyrB* 遺伝子解析および顕微鏡凝集試験（MAT）によりドブネズミ由来の 6 株は *Leptospira interrogans*（5 株は血清型 *Icterohaemorrhagiae* あるいは *Copenhageni*、1 株は未同定）と同定された。アカネズミ由来の 2 株は *Leptospira interrogans* 血清型 *Hebdomadis* (Akiyami B) と同定された。ヒメネズミ由来の 1 株は *Leptospira interrogans*（血清型 未同定）と推定された。

研究目的

レプトスピラ症の多くは、ネズミ類を感染源に発生すると考えられ、国内では 1970 年代まで年間数十名のレプトスピラ感染による死亡例が報告されてきた。近年では農業の機械化などにより患者数、死亡例数は減少しているが、今なお水と接するレジャーなどを機会に全国で毎年のように患者が発生している。

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、患者から分離・培養されたレプトスピラと診断用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。そのため、患者発生地域内に分布する正確な血清型の情報が不可欠となる。そこで、我が国で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り、2000 年度から 3 年間、ネズミ由来レ

プトスピラ保有状況を全国規模で調査してきた。ここでは、その後実施された2003年から2005年度までのネズミ由来レプトスピラ保有状況を名古屋市を中心に報告する。

都市部（名古屋市、大阪市、西宮市）では、マンホール、街路樹帯、住宅敷地内で捕獲されたイエネズミ類と、また都市部に隣接する里山（名古屋市名東区、守山区、愛知県東部、浜松市周辺）、山間部（岐阜県恵那市、京都府大江町）で捕獲されたノネズミ類からレプトスピラの分離を試みた。

2003年、2004年、2005年度の調査期間中に319匹のドブネズミ、クマネズミ、アカネズミ、ヒメネズミ等を金網カゴ、シャーマントラップで捕獲し9株のレプトスピラを分離し、これらの分離株について *gyrB* 遺伝子解析および顕微鏡凝集試験（MAT）により血清型の同定を行った。

#### 倫理面への配慮

愛知医科大学医学部動物実験委員会の承諾を得て、実験動物管理運営規定ならびに動物保護と管理に関する法律に基づいて行われた。

#### 材料・方法

##### 1. レプトスピラの分離・培養法

調査ではネズミ類の腎臓から Korthof 培地、EMJH 培地のどちらかで分離培養した。

##### 2. 使用菌株

名古屋市（マンホール、住宅敷地内）、大阪市（街路樹帯）で捕獲されたイエネズミ類（ドブネズミ）から分離された6株と名古屋市（里山）、岐阜県（山間部）で捕獲されたノネズミ類（アカネズミ、ヒメネズミ）から分離された3株を使用した（Table 1）。

##### 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。

#### 4. 顕微鏡凝集試験（MAT）

96穴丸底プレートにPBSで倍々希釈したウサギ抗血清と被検レプトスピラ培養液を加え37°C、2時間インキュベートした後、暗視野顕微鏡にて観察し、菌体の50%以上の凝集を示す最大希釈倍率を力価とした。

#### 結果

##### 1. ネズミ類からのレプトスピラ分離状況

2003年4月から2005年2月まで約3年間に名古屋市内（中川区、中村区、東区、港区、南区、熱田区、北区、千種区、名東区、守山区、瑞穂区）、大阪市（北区、浪速区）、西宮市のマンホール、住宅敷地内で生け捕り用金網カゴで捕獲されたドブネズミ *Rattus norvegicus* 118匹、クマネズミ *Rattus rattus* 15匹から、また名古屋市、愛知県東部、静岡県浜松市周辺地区、岐阜県恵那市小野川、京都府大江町で捕獲されたノネズミ類（アカネズミ、ヒメネズミ、スミスネズミ、ジネズミ、ヒミズ）186匹から分離を試みた。

115匹のドブネズミの腎臓より6株のレプトスピラが分離された。名古屋市の里山で捕獲されたアカネズミからは2株のレプトスピラを分離したが、愛知県東部、静岡県浜松市周辺、京都府大江町で捕獲されたノネズミ類からは分離されなかった（Table 1）。兵庫県西宮市のドブネズミからは分離されなかった。

##### 2. *gyrB* 遺伝子配列および顕微鏡凝集試験に基づく種の同定

塩基配列に基づく系統樹および顕微鏡凝集試験から、名古屋市のドブネズミより分離された AC11/04、AC33/05、AC37/05、AC39/05 株は、*Leptospira interrogans* 血清型 *Icterohaemorrhagiae* あるいは *Copenhageni* と同定されたが、Nagoya2/03の血清型は同定できなかった。

**Table 1** 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
Nagoya2/03	天白区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・EMJH	<i>L. interrogans</i>	未同定
AC11/04	中村区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・EMJH	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae
AC33/05	港区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae or Copenhageni
AC37/05	港区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae or Copenhageni
AC39/05	港区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae or Copenhageni
Osaka1-60	浪速区・街路樹帯	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae or Copenhageni
AC6/03	岐阜県恵那市・草地	<i>Apodemus argenteus</i>	腎臓・EMJH	<i>L. interrogans</i>	未同定
AC48/05	名東区・草地	<i>Apodemus speciosus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis
AC60/05	名東区・草地	<i>Apodemus speciosus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis

**Table 2** ドブネズミのレプトスピラ保有状況 (名古屋市)

年度	捕獲数	分離株数	分離率 (%)
2000	141	6	4.2
2001	99	8	8.0
2002	84	6	7.1
2003	21	1	4.7
2004	15	1	6.6
2005	29	3	10.3

大阪市のドブネズミから分離された Osaka1-60 は *Leptospira interrogans* 血清型 Icterohaemorrhagiae あるいは Copenhageni と同定された。

名古屋市の里山で捕獲されたアカネズミから分離された AC48/05、AC60/05 は *Leptospira interrogans* 血清型 Hebdomadis (Akiyami B) と同定された。

岐阜県恵那市小野川で捕獲されたヒメネズミから分離された AC6/03 の血清型は

同定できなかった。

### 3. ドブネズミのレプトスピラ保有状況

2000年から2005年度までの6年間にわたり調査された名古屋市内のドブネズミのレプトスピラ保有状況を Table2 に示した。名古屋市内のドブネズミは4%–10%の保有率を示した。季節性はなく一年を通じて分離された。分離されたネズミは、最低体重が129g(平均196g)と成獣であった。同一地域で捕獲されたネズミから複数の株が分離されることも度々あった。

### 考察

*gyrB* 遺伝子配列に基づく解析により、ドブネズミ由来分離株は全て *L.interrogans* と同定された。Nagoya2/03を除く5株は、血清型 Icterohaemorrhagiae あるいは Copenhageni と同定された。しかし、2002年にドブネズミから分離された AC02-2 株のように血清型 Autumnalis も稀に分離されることもある。血清型 Icterohaemorrhagiae あるいは

Copenhageni は、国内に広く分布する重症型レプトスピラ症 (Weil 病) の起因菌で、致命率が高く、他の血清型に比べ都市部での発生率が高いことが知られている。名古屋、大阪市内の調査でもこれらを裏付けるように、血清型 Icterohaemorrhagiae あるいは Copenhageni と推定される株が分離される結果となった。分離されたネズミを捕獲した環境は、ヒトとの接触が非常に多い繁華街であるため、危険性の周知と感染への予防策を考える必要がある。

6 年間の調査から、同一場所で複数の株が分離される事が度々あり、都心においてもレプトスピラ汚染地点が点在することを示している。これらから、都心では、生息密度が高く、低層に生息するドブネズミが保菌動物として重要な役割をはたしていると考えられる。他地域の調査では、水田や畑地においてはクマネズミが優占で、これらを感染源とした感染も起きていると考えられる。

都心から離れた里山地域、山間地では、アカネズミ等の小形のネズミ類も保菌動物として重要であるとされている。2003 年度からの調査でも岐阜県と名古屋市郊外で 3 株の *Leptospira interrogans* を分離した。名古屋市郊外のアカネズミから分離した 2 株は、血清型 Hebdomadis (Akiyami B) で、これらは秋疫、用水熱、七日熱等と呼称される秋季レプトスピラ症の起因菌である。

近年、国内のレプトスピラ症患者は、生活様式の変化により減少しているが、3 年間の調査結果で明らかなように発症すれば重症化する血清型 Icterohaemorrhagiae あるいは Copenhageni が都市部のドブネズミを中心に存在することが改めて示された。

その他、培養初期には検出できるが、EMJH、Korthof 培地で増殖しないレプトスピラがドブネズミの腎臓に存在することが明らかになった。これらは、解析するまでの菌量が得られないために未同定であり、これらの病原性も不明である。現在、日本で使用されている顕微鏡凝集試験 (MAT) 用血清診

断試薬は hebdomadis、icterohaemorrhagiae、autumalis、australis、canicola、pyrogenes の 6 血清型が抗原として使用されているため、未同定株がこれらの抗原で検出できるか、病原性の確認と共に重要である。

2003 年 11 月の感染症法改正でレプトスピラ症は感染症法 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を考えると、これらの海外流行株が国内に侵入することも十分に考えられ、診断抗原の充実と早期診断法の開発が不可欠である。

## 参考資料

### ネズミの捕獲とレプトスピラの分離方法

#### 1. ネズミの捕獲

ドブネズミ、クマネズミは生け捕り式金網カゴで捕獲する。家屋内での捕獲は、粘着トラップも使用できるが、死亡することがあるために早めに剖検し腎臓を摘出する。アカネズミやハツカネズミの捕獲には、シャーマントラップが有効である。沖縄に生息するジャコウネズミはシャーマントラップで効率良く捕獲できる。

都市部で捕獲する場合、トラップの設置場所は道路高架下や公園内の植え込み帯がよい。繁華街では、管理者の協力が得られればマンホール内での捕獲が最も確実に広範囲に調査できる。

#### 2. 麻酔

換気に注意を払いエーテル、クロロホルム、炭酸ガスを使用し安楽死させる。エーテルは引火性が強いため注意。

#### 3. 採血

心臓採血し血清を保存しておく。皮膚を 70~100%エタノールで清拭する。ハツカネズミやアカネズミなどの小形のネズミの採血には 1ml の注射筒と 26 ゲージの注射針を使用する。ドブネズミやクマネズミ等の 70g 以上のネズミの採血には 2.5ml の注射筒と

21-24 ゲージの注射針で採血する。

#### 4. 腎臓の摘出

解剖用具は皮膚用と臓器摘出用を区別して使用する。100ml ビーカーを2つ用意して100%エタノールを各々に100ml 入れ、皮膚用と臓器摘出用に分けてハサミとピンセット投入して消毒しておく。臓器摘出用にはハサミとピンセットを4-5組入れておく。最初は5分程度おいて消毒する。その後は、ローテーションして使用する。皮膚切開用と同一の器具を使用して腎臓を摘出すると真菌のコンタミの原因となるので区別して使用すること。ピンセットやハサミに少量のエタノールが付着していても組織片を培地に投入すれば希釈されるので分離への影響はない。野外調査の時には、エタノールはボトルに回収、保管し再使用する。2-3回は使用し、その後は皮膚の清拭用に使用する。

#### 5. 腎臓の破碎と培地への接種

皮膚を切開後、臓器摘出用のハサミとピンセットで腎臓を摘出する。150gまでのネズミは片側を1個、それ以上のネズミは半分くらいを目安として摘出し、内筒を抜いた2.5mlの注射器の外筒の中に摘出した腎臓を投入する。内筒を装着して培地に入ったチューブ内へ組織を押し出す。注射筒内に組織が残っていても適量が培地中に注入されれば良い。注射針は付けない。

#### 6. 培養

培養温度は30℃とする。翌朝、培地の上清0.5ml(水面近くから)を新しい培地に移植し培養を続ける。

#### 7. 検出

滅菌したパスツールピペットで培養液をとり、その一滴をスライドグラス上に滴下し、カバーグラスをかけ、暗視野顕微鏡で200倍、400倍で観察する。一週間後から週に一回程度観察し、最低でも1ヶ月は観察を続ける。保菌していれば回転運動するレプトスピラを検出できる。

#### 発表論文

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. Tamura<sup>1</sup>, H. Urakami<sup>1</sup>, Y. Makisaka<sup>1</sup>, S. Koyama<sup>1</sup>, M. Fukuhara<sup>1</sup> 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.
6. Masuzawa T., Hashimoto N, Kudeken M, Kadosaka T., Nakamura M, Kawabata H., Koizumi N and Imai Y. New genomospecies related to *Borrelia valaisiana*, isolated from mammals in Okinawa archipelago, Japan. *Journal of Medical Microbiology* 53, 421-426. (2004)
7. Takahashi M, Misumi H, Urakami H, Nogami S, Kadosaka T., Misumi M, Matsumoto I. Trombidiosis in cats caused by the bite of the larval trombiculid mite *Helenicula miyagawai* (Acari: Trombiculidae). *Vet Rec.* 154(15):471-472. (2004)



8. Guner ES, Watanabe M, Hashimoto N, Kadosaka T, Kawamura Y, Ezaki T, Kawabata H, Imai Y, Kaneda K, Masuzawa T. *Borrelia turcica* sp. nov., isolated from the hard tick *Hyalomma aegyptium* in Turkey. *Int J Syst Evol Microbiol*. Sep;54(5):1649-1652. (2004)
9. 中村正治・平良勝也・大野 惇・増澤俊幸・角坂照貴・川端寛樹・小泉信夫・藤田博己. 沖縄県におけるレプトスピラの保菌動物調査. 日本獣医師会雑誌 第 57 巻 (5) : 321-325, 2004
10. 増澤俊幸・金田一秀・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. 獣医畜産新報 57 巻 (8 号) : 662-664, 2004
11. Guner ES, Watanabe M, Kadosaka T, Polat E, Gargili A, Gulanber A, Ohashi N, Kaneda K, Imai Y, Masuzawa T. Seroepidemiology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in wild mice captured in northern Turkey. *Epidemiol Infect*. 2005 Apr;133(2):331-6.
12. Masuzawa T, Kharitononkov IG, Kadosaka T, Hashimoto N, Kudeken M, Takada N, Kaneda K, Imai Y. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated in Moscow province--a sympatric region for *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus*. *Int J Med Microbiol*. 2005 Jan;294(7):455-64.
13. Shintoku Y., Kimura E., Kadosaka T., Hasegawa H., Kondo S., Itoh M., Islam MZ. *Strongyloides ratti* infection in the large intestine of wild rats, *Rattus norvegicus*. *J. Parasitol*. 2005 91(5):1116-1121.

#### 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
4. 増澤俊幸、渡邊むつみ、Ece S. Guner、角坂照貴、河村好章、江崎孝行、川端寛樹、今井康之、金田一秀. 回帰熱ボレリアとライム病ボレリアの中間に位置する新種 *Borrelia turcica* の性状. 第41回レプトスピラシンポジウム. 平成16年4月4日 (大阪)
5. 日本の野鼠に分布する *Bartonella* 属菌と同定法の開発. 井上快, 丸山総一, 山田直樹, 壁谷英則, 佐藤雪太, 湯川真嘉, 大橋典男, 増澤俊幸, 川森文彦, 角坂照貴, 高田伸弘, 藤田博己, 小泉信夫. 日本獣医学会. 2005. 3. 29 (和光)
6. *Leptospira* flaB nested PCR の検討と野外応用. 新田芳樹, 柳田千夏, 川端寛樹, 小泉信夫, 藤田博己, 角坂照貴. 第42回レプトスピラシンポジウム、2005. 4. 3 (東京)
7. 静岡県内における犬のレプトスピラ保有状況について. 山下昭広, 村松芳貴, 川森文彦, 角坂照貴, 榊原省司, 増澤俊幸. 第42回レプトスピラシンポジウム、2005. 4. 3 (東京)
8. 沖縄本島のミナミネズミマダニからの紅斑熱群リケッチア分離例. 藤田博己, 川端寛樹, 小泉信夫, 角坂照貴, 新田芳樹. 日本衛生動物学会. 2005. 6. 2. (札幌)
9. 1999年から2004までに愛知医科大学で同定されたマダニ刺咬症. 角坂照貴, 木村英作. 日本衛生動物学会、2005. 6. 2 (札幌)
10. 隠岐諸島および島根県本土域におけるツツガムシ病の疫学的特性. 矢野泰弘, 田原研司, 板垣朝夫, 藤田博己, 角坂照貴, 川端寛樹, 高田伸弘. 日本衛生動物学会、2005. 6. 3 (札幌)
11. 島根県におけるつつが虫病の発生状況と *Orientia tsutsugamushi* の流行株. 田原研司, 板垣朝夫, 川端寛樹, 角坂照貴, 藤田博己, 矢野泰弘, 高田伸弘. 島根県獣医学会. 2005. 8.

厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

総合研究報告書

ペスト菌の(迅速)検出法の確立に関する研究

分担研究者 高橋英之 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

- ・ 国内で分離された野鼠からの培養によるペスト菌の検出
- ・ LAMP 法を用いたペスト菌の迅速診断法の開発
- ・ TaqMan real time PCR 法を用いたペスト菌の迅速診断法の開発

国内で分離された野鼠からのペスト菌検出の試み

平成 15 年度に全国で捕獲された 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。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。その結果、マッコンキー寒天培地で生育可能な菌が 3 個体の脾臓から検出され、以下の項目に関して

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

の生化学的性状を検査した。しかし、東京都で捕獲された野鼠の脾臓から検出された菌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以外の雑菌 (*Pseudomonas* 属等) であることが明らかとなった。残りの 2 菌種は富士山麓で捕獲された野鼠の脾臓からの分離株であるが、生化学的性状検査の結果、大腸菌 (*Escherichia coli*) 及び *Serratia liquefaciens* であり、どれもペスト菌ではないと同定された。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。また、本研究によりペスト菌の培養法による検出系と生化学的性状検査によるペスト菌の国内での同定を確立した。

#### LAMP 法を用いたペスト菌の迅速診断法の開発

プレート上の菌体を PBS に懸濁後、熱及び遠心処理した上清を粗抽出 DNA 溶液として用い、LAMP 法による検出系の開発を行なった。*Yersinia* 属菌の中でもペスト菌のみが保持するプラスミノゲンアクティベーター遺伝子 (*pla*) を LAMP 法のターゲットとし、以下のプライマーと栄研化学株式会社の DNA 増幅試薬キット (製品コード LMP201) を用いて行なった。

F3: TTG AGC TTA TAC CGG AAA CTT C

B3: CGG TAC CAT AAT AAC GTG AGC C

FIP: CGA TAC TGG CCT GCA AGT CCA AAA GGA GTG CGG GTA ATA GGT T

BIP: AAA TTC AGC GAC TGG GTT CGG GGG ATG TCT TCT CAC GGA AAG T

---

2×reaction mix.            12.5 µl

Promer: FIP(40 mM)        1 µl

          BIP(40 mM)        1 µl

          F3(20 mM)          1 µl

          B3(20 mM)          1 µl

*Bst* DNA polymerase        1 µl

Distilled Water            6.5 µl

---

UV 照射を用いて目視で DNA の増幅を確認する場合には栄研化学株式会社の蛍光・目視検出試薬キット (製品コード LMP221) を用いて LAMP 反応液中に添加した。反応液を汎用 0.2 ml PCR チューブ内に調製後、鋳型 DNA を 1 µl 反応液に添加し、Gene Amp PCR system 9700 (Perkin Elmer) を用いて 65°C×60 分のインキュベーション後 80°C×10 分処理して反応を停止させた。増幅した DNA は 1.5%アガロースゲル、もしくは UV 照射による目視により確認した (図 1)。LAMP 法をペスト菌の検出に適用し、その系の確立を試みた結果、

- 1) ペスト菌の検出が 60 分の反応後に蛍光・目視によって迅速に判別可能

- 2) ペスト菌株に対しては普遍的に陽性を示し、ペスト菌の近縁菌である *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* では陰性を示し、ペスト菌特異的に検出可能
- 3) 理論的には反応液中に1菌体分のDNAが存在すれば検出可能  
と最終診断まで30~60分で終了される簡便、安価で且つ感鋭敏なペスト菌の検出系が確立された。

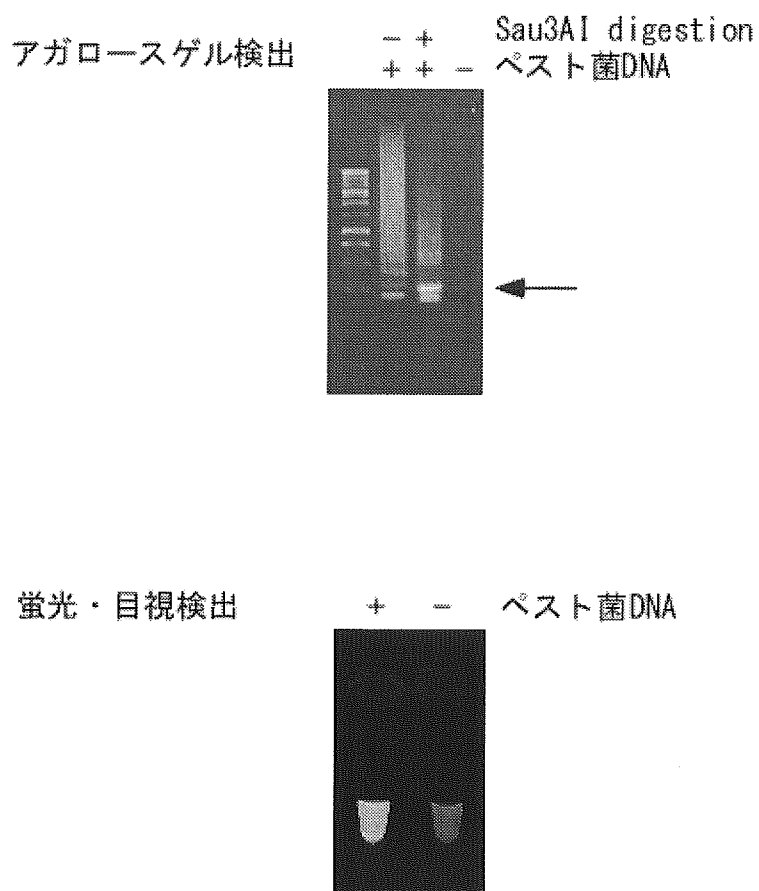


図1 LAMP法によるペスト菌検出例

- A. 反応液0.4  $\mu$ l分を1.5%アガロースゲル及びEtBr染色によってDNAを検出した。増幅領域内に制限酵素部位が1ヶ所存在するSau3AIにより処理すると増幅したDNAが等間隔に切断され、矢印のバンドの長さ収束されることから目的通りのDNA増幅が起こり、特異的にペスト菌のDNAを検出していると考えられた。
- B. 蛍光・目視試薬を添加してLAMP反応を行ない、反応後UV照射により増幅DNAを可視化した。増幅した場合にはしない場合と比べて優位に蛍光量が異なり、目視でも十分に確認できた。

### TaqMan real time PCR 法を用いたペスト菌の迅速診断法の開発

プレート上の菌体を PBS に懸濁後、熱及び遠心処理した上清を粗抽出 DNA 溶液として用い、TaqMan real time PCR 法による検出系の開発を行なった。検出系のターゲットとしては *pla*、*inv*、*yopM*、*cafI* の 4 種の遺伝子及びペスト菌特異的 DNA 領域 3a をペスト菌の検出用に選定し、反応及び検出を ABI PRISM 7000 にて行なった。反応液は以下のような組成で 1 遺伝子を 1 反応 (1 チューブ) で検出した。

TaqMan Universal Master Mix (2X)	12.5 $\mu$ l
F primer (9 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ l
R primer (9 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ l
FAM-labelled probe (2 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ l
template DNA	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	4 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ l

PCR チューブを ABI PRISM 7000 にセットし、下記プロトコールにより PCR 反応を行なった。反応は Absolute determination モードにてリアルタイムで検出した。

50°C × 2min  
95°C × 10min  
95°C × 15sec  
60°C × 1min. } 40 サイクル

その結果、TaqMan real time PCR 法によって *pla*、*inv*、*yopM*、*cafI* 及びペスト菌特異的 DNA 領域 3a を検出し、総合的にペスト菌を同定可能となった (図 2)。さらには *Yersinia pseudotuberculosis* 及び *Yersinia enterocolitica* を検出・想定する系としても機能することが明らかとなった (図 2)。この系を用いることにより 10<sup>2</sup> 菌体程度であれば優位に病原性 *Yersinia* 属菌の同定が一時間以内で検出・同定可能となった。

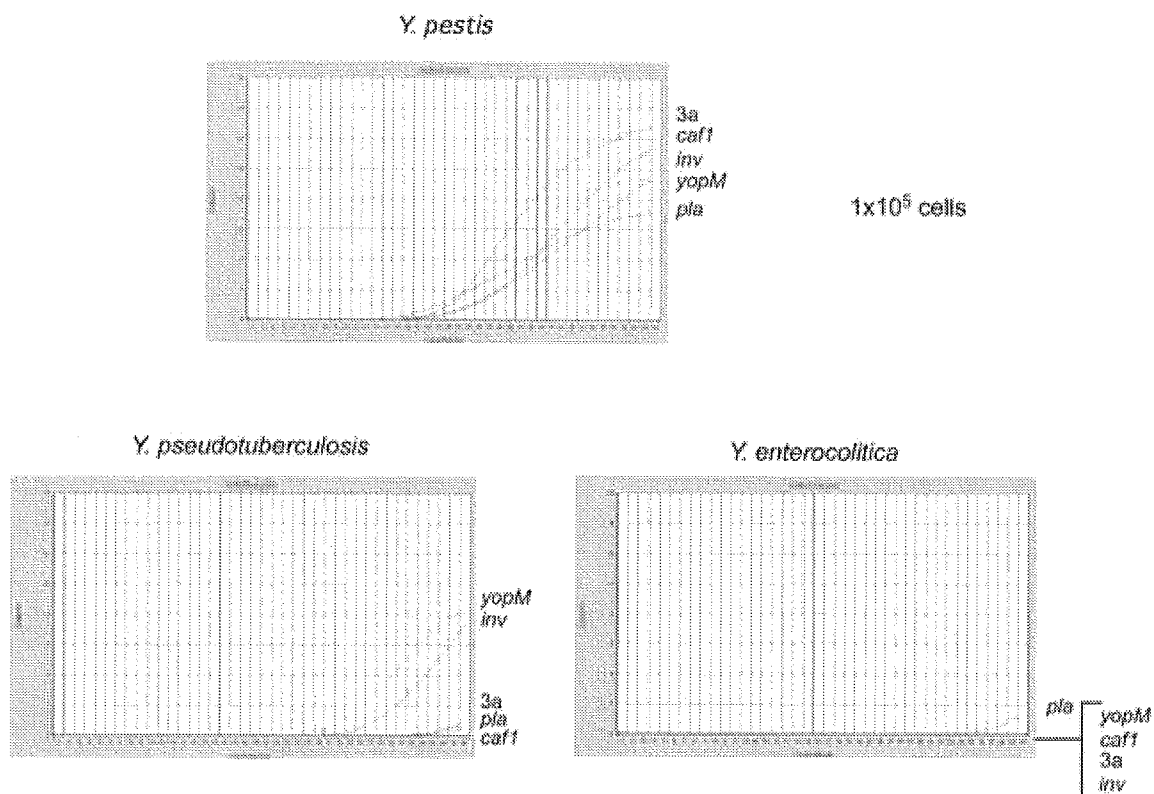


図2 病原性Yersinia 属菌の real time PCR 法による検出結果

検出はすべての反応を一度に表示するモードで表示した。

ペスト菌 (*Y. pestis*) はすべての遺伝子プローブによる検出で陽性を示した。

仮性結核菌 (*Y. pseudotuberculosis*) は *yopM* 及び *inv* 遺伝子を保持するため、2 プローブに対して陽性反応が確認された。

*Y. enterocolitica* ではどのプローブにおいても陽性反応は検出されなかった。

<健康危機管理情報>

特になし

<著書>

特になし

<研究発表>

特になし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書（平成 15 年度～平成 17 年度）

我が国における *Ehrlichia* 属菌、*Anaplasma* 属菌、および *Bartonella* 属菌の分子疫学調査

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  
川森文彦 静岡県環境衛生科学研究所・微生物部・主幹  
稲吉 恵 静岡県環境衛生科学研究所・微生物部・副主任  
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

我々は、静岡県内で捕獲したヤマトマダニ (*Ixodes ovatus*) から ddY マウスを用いて *Ehrlichia* 属菌の分離を行った。その結果、米国のヒト単球エーリキア症病原体の *Ehrlichia chaffeensis* と類似の *Ehrlichia* 属菌を得ることに成功し (Shizuoka 株)、この Shizuoka 株が実験用マウスに強い病原性を示すことを明らかにした。また野生動物の分子疫学調査から、この Shizuoka 株の保菌動物が野鼠 (*Apodemus* 属と *Eothenomys* 属) であることも見出した。さらに、これらの野鼠からは *Neohelichia* 属菌も検出された。この *Neohelichia* 属菌の病原性については現在のところ不明である。

一方で、静岡県、山梨県、長野県内で *Ixodes* 属マダニ (シュルツェマダニとヤマトマダニ) を捕獲し、そのマダニ DNA から *A. phagocytophilum* の *p44* 遺伝子を PCR 検出することに成功した。また、捕獲マダニの全組織を実験用マウスに腹腔内投与し、そのマウスの脾臓 DNA から *A. phagocytophilum* の *p44* 遺伝子を検出した。その後、増幅産物をクローニングし、塩基配列を解読して系統樹解析を行った結果、シュルツェマダニとヤマトマダニからの *A. phagocytophilum* の *p44* 遺伝子は系統樹のそれぞれ異なるクラスターに位置することが判明し、さらに日本の *p44* 遺伝子は米国あるいは英国の *p44* 遺伝子と 85.6% 以上の高い相同性を示すものと 73.1% 以下の相同性を示すものが存在することが判った。16S rRNA 遺伝子の解析では、我が国には米国のヒトに感染するアナプラズマ症病原体と極めて近似の *A. phagocytophilum* が存在することが判明した。

他方、静岡県と長野県で捕獲した野鼠からおおよび *Bartonella* 属菌の存在を見出し、*gltA* 遺伝子の RFLP 解析から少なくとも 5 つの遺伝子型 (Type I から Type V) が存在することを見出した。その *gltA* の塩基配列を解読したところ、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。

以上、本研究により、我々は我が国にヒトに感染症を引き起こす可能性のある *Ehrlichia* 属菌、*Anaplasma* 属菌、あるいは *Bartonella* 属菌の存在を明らかにし、今後の診断法確立に向けての情報を提供することに成功したと考える。

## 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、その病原体はヒト単球/マクロファージに感染する *Ehrlichia chaffeensis* およびヒト顆粒球に感染する *Anaplasma phagocytophilum* である。いずれの病原体も偏性寄生性細菌で、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しており、ヒトが *Ehrlichia* や *Anaplasma* を保有するマダニに刺されると発症する。本症は 1990 年代に発見された新興感染症で、1991 年に *E. chaffeensis* が、1996 年に *A. phagocytophilum* が相次いで発見された。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 が検出されている。我が国では、*E. chaffeensis* と類似の *Ehrlichia* 属菌が青森県、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。そこで、本研究はマダニや野鼠が保有する *Ehrlichia* 属菌および *Anaplasma* 属菌について調査し、その実態を解明することを目的とした。

一方、*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に付くシラミを中心に調査を行っている。*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、最近では、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。そこで我々は、我が国の野鼠が保有する *Bartonella* 属菌についても調査した。

## 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マダニや野鼠の捕獲を行った。捕獲したマダニの一部は全組織あるいは唾液腺から DNA 抽出を行った。一方で、マダニ組織ホモジナイズの乳液を免疫抑制剤 (シクロホスファミド) 処理した ddY マウスの腹腔内に投与して、9~14 日後に脾臓を摘出し DNA を抽出した。野鼠の場合は、採取した血液と脾臓から DNA を抽出した。次に Nested PCR により、抽出した DNA から *Ehrlichia* 属菌の *omp-1* 外被膜蛋白遺伝子、*Anaplasma* 属菌の *p44* 外被膜蛋白遺伝子、*Bartonella* 属菌の *gltA* 遺伝子、さらにこれら細菌の 16S rRNA 遺伝子の検出を行った。そして、得られた増幅 DNA をクローニングし、クローンの塩基配列を解読して、系統樹解析を行った。

*Ehrlichia* 属菌については、分離に用いた ddY 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 (マウスに対する毒性試験)。



## C. 研究結果および考察

### 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*) から ddY マウスを用いて *Ehrlichia* 属菌の分離を試み、PCR 法によりマウスの脾臓中の病原体の DNA 検出を行った。その結果、ヤマトマダニを投与した ddY マウスから *Ehrlichia* 属菌の *omp-1* 遺伝子と 16S rRNA 遺伝子の検出に成功した。16S rRNA 遺伝子の塩基配列を基にして系統樹解析を行ったところ、我々が得た *Ehrlichia* 属菌 (*Ehrlichia* sp. Shizuoka 株) はこれまでに報告のある国内の *Ehrlichia* 属菌 (*Ehrlichia* sp. HF565 株、Anan 株、および *E. muris*) と近縁関係にあることが判明した (図 1)。相同性を基にした遺伝学的関係では、Shizuoka 株は国内の *Ehrlichia* 属菌の中で最も米国のヒトエーリキア症病原体 (*E. chaffeensis*) と近いことが判った。また、Shizuoka 株を感染させたマウスの脾臓ホモジネートをさらに 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結果、Shizuoka 株投与マウスは、いずれも投与後 10 日以内に 5 匹すべてが死亡した。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。

一方で、静岡県と長野県で捕獲した野鼠 (*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 *Ehrlichia* 属菌の 16S rRNA 遺伝子の検出を行った。その結果、いずれの鼠種からも *Ehrlichia* 属菌が検出され、さらに *Neoehrlichia* 属菌も検出された。そして、得られた 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を基に系統樹解析を行ったところ、これらの細菌は *Ehrlichia* sp. Shizuoka 株と同一細菌 (相同性 100%, FN147)、*E. muris* AS145 株の近縁細菌 (相

同性 99.9%, FN2619)、*Neoehrlichia mikurensis* IS58 株と同一細菌 (相同性 100%, FIN686)、また *N. mikurensis* Schotti 株の近縁細菌 (相同性 99.6%, Nagano21) であることが判明した (図 2)。すなわち、この結果は *Ehrlichia* sp. Shizuoka 株の保菌動物が野鼠であることを示唆している。尚、*Neoehrlichia* 属菌の病原性については現在のところ不明である。

### 2. 静岡県内のマダニが保有する *Anaplasma* 属菌の分子遺伝学的性状について

PCR により、*Ixodes* 属マダニの全組織と唾液腺から *A. phagocytophilum* の *p44* 遺伝子の検出を試みた。その結果、123 匹中 20 匹のマダニが陽性を示し、また、マダニ投与マウスの PCR では 15 匹中 1 匹が陽性を示した (表 1)。系統樹解析においては、シュルツェマダニとヤマトマダニの *A. phagocytophilum* の *p44* 遺伝子はそれぞれ異なるクラスターに位置することが判明し、さらに日本の *p44* 遺伝子は米国あるいは英国の *p44* 遺伝子と 85.6% 以上の高い相同性を示すものと 73.1% 以下の相同性を示すものが存在することが判った (図 2)。以上、我が国には日本固有の *A. phagocytophilum* が存在することが示唆された。さらに、*p44* 遺伝子で PCR 陽性を示した 1 匹のマウスについて、16S rRNA 遺伝子の解析を行った結果、得られた 6 個の 16S rRNA 遺伝子クローンは、それぞれの間で 99.3~99.6% の相同性が認められ、米国の *A. phagocytophilum* human agent とは 99.6~99.8% の相同性が見られた。増幅した 16S rRNA 遺伝子をダイレクトシーケンスした場合、その塩基配列は米国の human agent のものと同一であった。つまり、我が国においてもヒトに感染する可能性のある *A. phagocytophilum* が存在すると考える。

### 3. 野鼠中に存在する *Bartonella* 属菌について

捕獲した野鼠の血液から DNA を抽出し、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、*gltA* 遺伝子の RFLP 解析を行ったところ、野鼠中の *Bartonella* 属菌には少なくとも 5 つの遺伝子型 (Type I から Type V) が存在することが判明した。これらの *gltA* 遺伝子をクローニングし、組み換えクローンの塩基配列を決定して系統樹解析を行った (図 3)。その結果、得られた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、この結果は 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。

### D. 総括

1. 米国のヒトエーリキア症病原体 (*E. chaffeensis*) と最も遺伝的に近い *Ehrlichia* sp. Shizuoka 株を分離同定することに成功し、またこの Shizuoka 株が実験マウスに対して強い病原性を示すことを明らかにした。さらに、Shizuoka 株の媒介動物がヤマトマダニ (*I. ovatus*) であり、保菌動物が *Apodemus* 属および *Eothenomys* 属の野鼠であることが判明した。
2. 国内の *Ixodes* 属マダニ (シュルツエマダニとヤマトマダニ) が *A. phagocytophilum* を保有していることを初めて明らかにした。この *A. phagocytophilum* は我が国固有のものや米国のヒト病原体とほぼ同一のものが混在することも判明した。
3. 国内の野鼠は、極めて高い頻度で *Bartonella* 属菌に感染していることを明らかにした。この *Bartonella* 属菌は 1 固体の野鼠にも様々な遺伝型のもものが共感染していた。これらの *Bartonella* 属菌の中にはヒトに病原性を示すものとほぼ同一のもの、または近似のもものが含まれていることが明らかとなった。

### E. 危機管理情報

「国内に生息するマダニからのアナプラズマ属菌の検出」, 国立感染症研究所感染症情報センター, 病原微生物検出情報 (Infectious Agents Surveillance Report [IARS]), Vol. 27, p 44-45, 2006 年 2 月号

### 発表論文等

1. Lin, Q., Rikihisa, Y., Ohashi, N., Zhi, N.: Mechanisms of variable *p44* expression by

- Anaplasma phagocytophilum*. *Infect Immun*. **71**, 5650-5661 (2003)
2. Inayoshi, M., Naitou, H., Kawamori, F., Masuzawa, T., Ohashi, N.: Characterization of *Ehrlichia* species from *Ixodes ovatus* ticks at the foot of Mt. Fuji, Japan. *Microbiol Immunol*. **48**, 737-45 (2004)
  3. Gunasekara, D., Fujii, Y., Rusuvai, E., Yoshiie, K., Ohashi, N., 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)
  4. Rikihisa, Y., Zhang, C., Kanter, M., Cheng, Z.H., Ohashi, N., 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 Clin Microbiol*. **42**, 3823-3826 (2004)
  5. Ohashi, N., Inayoshi, M., Kitamura, K., Kawamori, F., Kawaguchi, D., Nishimura, Y., Naitou, H., Hiroi, M., Masuzawa, T.: *Anaplasma phagocytophilum*-infected ticks, Japan. *Emerg Infect Dis*. **11**, 1780-1783 (2005)
  6. Güner, E.S., Watanabe, M., Kadosaka, T., Polat, E., Gargili, A., Gulamber, A., Ohashi, N., Kaneda, K., Imai, Y., Masuzawa, T.: Seroepidemiology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in wild mice captured in northern Turkey. *Epidemiol Infect*. **133**, 331-336 (2005)
  7. Naitou, H., Kawaguchi, D., Nishimura, Y., Inayoshi, M., Kawamori, F., Masuzawa, T., Hiroi, M., Kurashige, H., Kawabata, H., Fujita, H., Ohashi, N.: Molecular Identification of *Ehrlichia* species and '*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis' from ticks and wild rodents in Shizuoka and Nagano Prefectures, Japan. *Microbiol Immunol*. **50**, 45-51 (2006)
  8. Ohashi, N. (他38名、17番目): Comparative Genomics of Emerging Human Ehrlichiosis Agents. *PLoS Genet*. **2**, 208-223 (2006)
  9. Niu, H., Rikihisa, Y., Yamaguchi, M., Ohashi, N.: Differential expression of VirB9 and VirB6 during the life cycle of *Anaplasma phagocytophilum* in human leucocytes is associated with differential binding and avoidance of lysosome pathway. *Cell Microbiol*. **8**, 523-534 (2006)
  10. 大橋典男: エーリキア症とアナプラズマ症, 日本細菌学会関東支部ニュース, 第46号, p. 9-10, 2005年10月

11. 大橋典男：国内に生息するマダニからのアナプラズマ属菌の検出, 国立感染症研究所感染症情報センター, 病原微生物検出情報 (Infectious Agents Surveillance Report [IARS]), Vol. 27, p. 44-45, 2006年2月号
- 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. 日本細菌学会第 76 年会 (熊本), 2003 年 4 月
  2. 稲吉恵, 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), 2002 年 9 月
  3. 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), 2002 年 9 月
  4. 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
  5. 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
  6. 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
  7. 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
  8. 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
  9. Norio Ohashi, Megumi Inayoshi, Fumihiko Kawamori, Hiroataka 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