

研究要旨:間接蛍光抗体法を用い、ヒトおよびネコの抗体調査を実施した。ヒトでは 34 検体について検索したが、全て陰性であった。ネコでは 714 検体中 90 検体が抗体価 16 倍以上であった。ヒトにおける Q 熱抗体保有率について再検討する必要がある。

A. 研究目的

Q 熱は *Coxiella burnetii* を起因菌とする人獣共通感染症である。感染動物は軽症ないし不顕性そのまま乳中や尿に病原体を排出するとされている。野外ではダニが媒介動物となっている。ヒトは病原体を含む病原体が含まれた粉塵の吸入や非加熱乳製品の摂食などにより感染し、インフルエンザ様症状から気管支炎、肝炎、髄膜炎、心内膜炎等の病態を示す。慢性型の心内膜炎の致死率は高いとされている。我が国では4類感染症に指定され、全数届け出感染症となっている。統計開始後は毎年 10 例から 20 例が届け出られてきたが、ここ数年は届け出数が一桁台となり減少している。届け出数が減少している理由は不明である。諸外国では Q 熱の発生は家畜の流産や汚染畜産物の摂取など原因が明確な場合が多いが、我が国における Q 熱の発生原因は特定されない場合が多く、諸外国とは異なる疫学的様相を呈している。昨年度までに我々は Q 熱抗体検出法について感染細胞を抗原とする間接蛍光抗体法を確立した。本年度はヒトの依頼検体ならびに動物病院に来院したネコについて本法を応用し Q 熱抗体の検出を試みた。

B. 研究方法

[被検血清]ヒト血清 37 検体を用いた。採血後、ろ紙にしみ込ませ送付された。研究室に到着後、滅菌蒸留水 0.1ml に浸し、血液を抽出後、抗体検出に用いた。ネコ血清は血清分離後、-20 度に保存した。

[間接蛍光抗体法] *C. burnetii* Nine Mile II 相菌を BGM 細胞で培養し、スライドガラス上に固定し、抗原とした。被検血清を PBS にリポソーム、界面活性剤を添加した希釈液で希釈した。37 度で 1 時間反応後、洗浄し、エバンスブルーを添加した2次抗体溶液を反応させた。反応終了後、洗浄し、観察した。ネコでは 16 倍以上を陽性とした。

(倫理面からの配慮について)

用いたヒト血清は Q 熱抗体検出を行うことについて承諾を得ており倫理面での問題はない。ネコ血清も同様に問題はない。

C. 研究結果

1. ヒト血清における Q 熱抗体

ヒト:今回用いた検体は男性3検体、女性 31 検体であった。年齢は 8 歳から 86 歳であった(20 歳未満 3 検体;20 から 29 歳 16 検体;30 から 39 歳 8 検体;40 から 49 歳 3 検体;50 から 59 歳 1 検体;60 歳以上 2 検体;不明 1 検体)。また、現在ないし過去における犬、猫、小鳥などの飼育歴を持つ検体は 31 検体であった。何らかの症状を訴えた検体は4検体、Q 熱が疑われた検体は 1 検体であった。採血は7施設において行われたが、29 検体は2施設における検体であった。被検血清について IgG および IgM 抗体を測定したが、全て 20 倍未満であった。

2. ネコ血清における Q 熱抗体

43 自治体の動物病院に種々の理由で来院したネコについて抗体の検出を行った。714 検体中 41 検体が 16 倍, 27 検体が 32 倍, 13 検体が 64 倍, 5 検体が 128 倍で, 抗体価 16 倍以上の検体は 90 検体(12.6%)であった。

D. 考察

昨年度までに確立した抗体検出法により一般人および患者からの Q 熱抗体検出を行ったが, 陽性検体は検出されなかった。これまでの報告では我が国における抗体保有率は 0.8%から 3.3%とされている。今回は検体数が少なかったため検出されなかったものと考えられるが, 検体の大半が 2 施設に由来することから地域的に偏りがあったためかもしれない。今後さらに検体を増やし, 抗体保有率を明らかにする必要がある。また, 届け出数が減少している背景には診断法が確立していないことも影響している可能性があり, 臨床医がより簡便に利用できる診断法を開発する必要もあると考えられる。

ネコについては 6.7%, 32.3%および 18.8%という報告がある。今回の成績はおおむねこれまでの抗体保有率と同等であると考えられる。抗体価とそれぞれの個体の症状との関連性については明らかにできなかった。今後は飼い主における抗体保有との関連性を探る必要がある。

E. 結論

昨年度までに確立した非特異反応がほとんどみられない間接蛍光抗体法によりヒトおよびネコ血清について Q 熱抗体を検索した。今後さらに検体数を増やし検討する必要がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

野生齧歯類および節足動物に由来する感染症の診断，疫学および予防に関する研究

わが国の野鼠における *Bartonella* 属菌とアライグマにおけるエーリキア・アナプラズマ感染状況

分担研究者 丸山総一 日本大学生物資源科学部・教授

研究要旨：昨年度に引き続き北海道，長野県，島根県，鹿児島県，沖縄県で捕獲した野生齧歯類における *Bartonella* 属菌の保菌状況について検討した。今回，調査した野鼠の 54.2% (83/153) から *Bartonella* 属菌が分離された。アカネズミの *Bartonella* 感染率は，62% (75/121) で，このうち *B. grahamii* が 84% (63/75)，*B. tribocorum* が 2.7% (2/75) から分離された。ヒメネズミの感染率は 50% (4/8) で，*B. grahamii* が 50% (2/4) から分離された。エゾヤチネズミでは，*B. taylorii* が 23.5% (4/17) から分離された。

さらに，神奈川県下で野生化した 187 頭のアライグマのエーリキアおよびアナプラズマ感染状況を血清学的に検討したところ，1 頭 (0.5%) が *Ehrlichia canis* に，3 頭 (1.6%) が *E. chaffeensis* に，1 頭 (0.5%) が *Anaplasma phagocytophilum* に感染していることが明らかとなった。

A. 研究目的

Bartonella 属菌 20 種 3 亜種のうち，7 種 2 亜種が人獣共通感染症の病原体であることが報告されている。特に，齧歯類に分布する *Bartonella* 属菌のうち，*B. grahamii* は視神経網膜炎，*B. elizabethae* が心内膜炎，*B. vinsonii* subsp. *arupensis* が菌血症と発熱を人に引き起こすことが明らかとなっている。しかしながら，日本国内における齧歯類の *Bartonella* 属菌の感染状況は全く明らかにされていない。そこで昨年度に引き続き，わが国の野生齧歯類における *Bartonella* 属菌の保菌状況について検討した。

また，わが国にペットとして輸入されたア

ライグマ (*Procyon lotor*) 個体が放逐され，各地で野生化し自然繁殖するようになり，日本固有の野生生物の生態系や人の生活に悪影響を及ぼすようになった。さらに，アライグマは北米では狂犬病の伝播に関わる野生動物として重要視されているが，わが国のアライグマにおける人獣共通感染症，特にリケッチアの罹患状況についてはほとんど不明の状態である。そこで，神奈川県下で野生化したアライグマのエーリキアおよびアナプラズマ感染状況についても血清学的に検討した。

B. 研究方法

2003 年 8 月～2005 年 8 月にかけて北海道，長野県，島根県，鹿児島県，沖縄県下で捕獲

した野鼠 153 頭（アカネズミ 121 頭，ヒメネズミ 8 頭，エゾヤチネズミ 17 頭，オキナワハツカネズミ 7 頭）を本研究に用いた。それぞれの野鼠から採取した血液を 5%ウサギ血液加 Heart Infusion Agar (HIA) 培地に塗抹し，35°C，5%CO₂ 下で 2 週間培養した。分離株については，*rpoB*，*gltA* の各遺伝子領域を標的とした PCR により *Bartonella* 属菌であることを確認した。さらに，分離株の *rpoB*，*gltA* の各遺伝子領域の塩基配列をダイレクト DNA シーケンス法により決定し，既存種の塩基配列と比較して種の同定を行った。

2001 年 10 月から 2002 年 9 月にかけて神奈川県下で捕獲されたアライグマ 187 頭（成獣 145 頭，幼獣 42 頭）の血清について，*Ehrlichia canis*，*E. chaffeensis* ならびに *Anaplasma phagocytophilum* の感染状況を間接蛍光抗体法 (IFA) により検討した。IFA 法の二次抗体は抗アライグマウサギ血清，三次抗体は FITC 標識抗ウサギーヤギ抗体を用いた。

(倫理面からの配慮について)

特になし

C. 研究結果

今回，野鼠の 54.2% (83/153) から *Bartonella* 属菌が分離された。捕獲した県別にみた野鼠の保菌率は，島根県の 19% (8/42) から長野県の 80.9% (17/21) であった。沖縄県のオキナワハツカネズミからは *Bartonella* 属菌は分離されなかった。アカネズミの *Bartonella* 感染率は，62% (75/121) で，*B. grahamii* が 84% (63/75)，*B. tribocorum* が 2.7% (2/75) の陽性個体から分離された。ヒメネズミの感染率

は 50% (4/8) で，*B. grahamii* が 50% (2/4) から分離された。エゾヤチネズミでは，*B. taylorii* が 23.5% (4/17) から分離された。また PCR-RFLP の結果，島根県，鹿児島県で捕獲した 3 頭のアカネズミが異なる *Bartonella* 属菌に混合感染していることが明らかとなった。さらに *Bartonella* 属菌に感染していたアカネズミの 17.3% (13/75)，ヒメネズミの 50% (2/4) から，既存の種とは異なる塩基配列を示す *Bartonella* 属菌 2 菌種が分離された。これらの 2 菌種の 16S rDNA，*ftsZ*，*groEL*，*ribC* の各遺伝子領域の塩基配列の相同性は既存の種のものと比較しても低く，新種の *Bartonella* 属菌である可能性が示唆された。

187 頭のアライグマのエーリキアおよびアナプラズマ感染状況を血清学的に検討したところ，1 頭 (0.5%) が *Ehrlichia canis* に，3 頭 (1.6%) が *E. chaffeensis* に，1 頭 (0.5%) が *Anaplasma phagocytophilum* に感染していることが明らかとなった。

E. 結論

日本国内に生息する野鼠のうち，特にアカネズミやヒメネズミは *Bartonella* 属菌を高率に保有している事が明らかとなった。また，分離された *Bartonella* 属菌の多くは人に対し視神経網膜炎を引き起こす *B. grahamii* で，未だ人に対する病原性の不明な *B. tribocorum*，*B. taylorii*，および新種と思われる *Bartonella* 属菌 2 菌種も保菌していた。また，3 頭のアカネズミは複数の *Bartonella* 属菌に混合感染していることが明らかとなった。さらに，エゾヤチネズミからは *B. taylorii* のみが分離さ

れたことから、感染している *Bartonella* 種とエゾヤチネズミとの間には高い宿主特異性があるものと思われた。

神奈川県都市部に生息しているアライグマは低率ながらも *E. chaffeensis*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* に感染していることが明らかになった。

F. 健康危険情報

Apodemus 属の野鼠は人に対し視神経網膜炎を引き起こす *B. grahamii* を高率に保菌していることが明らかとなった。また、神奈川県都市部にも *E. chaffeensis*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* が分布している可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Jittapalpong, S., Rungphisutthipongse, O., Maruyama, S., Schaefer, J. J., and Stich, R. W. : Detection of *Hepatozoon canis* in stray dogs and cats in Bangkok, Thailand. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1081: 479-488, 2006.
- 2) Kabeya, H., Yamasaki, A., Ikariya, M., Negishi, R., Chomel, B. B., and Maruyama, S.: Characterization of Th1 activation by *Bartonella henselae* stimulation in BALB/c mice: Inhibitory activities of interleukin-10 for the production of interferon- γ in spleen cells. *Vet. Microbiol.* 119: 290-296, 2007.
- 3) Inokuma H, Makino T, Kabeya H, Nogami S, Fujita H, Asano M, Inoue S, Maruyama S.: Serological survey of *Ehrlichia* and *Anaplasma* infection of feral raccoons (*Procyon lotor*) in Kanagawa Prefecture, Japan. *Vet Parasitol.* 2007

(in press)

- 4)丸山総一, 注目される人獣共通感染症—細菌性人獣共通感染症「野兔病」, 化学療法の領域, 22: 937-942, 2006.

2. 学会発表

- 1) 井上 快, 丸山総一, 壁谷英則, 瀧川裕一郎, 谷原 光, 佐藤雪太, 川森文彦, 増澤俊幸, 角坂照貴, 高田伸弘, 藤田博己, 川端寛樹: わが国の *Rattus* 属の齧歯類における *Bartonella* 属菌の分布. 第 142 回日本獣医学会, 山口(2006, 9)
 - 2) Inoue, K., Maruyama, S., Kabeya, H., Yamada, N., Sato, Y., Yukawa, M., Ohashi, O., Masuzawa, T., Kawamori, F., Kadosaka, T., Takada, N., Fujita, H., Koizumi, N., and Kawabata, H. Prevalence of *Bartonella* species among wild rodents in Japan and the genetical typing of the isolates. Joint Meeting American Society of Rickettsiology (2006, 9, USA).
 - 3) Kabeya, H. and Maruyama, S. Cytokine production profiles in the experimentally *Bartonella henselae* infected cats. Joint Meeting American Society of Rickettsiology (2006, 9, USA).
 - 4) Maruyama, S. and Kabeya, H. Situation of *Bartonella* infection in Japan: from humans to rodents. Symposium on Bartonellae as emerging zoonoses and emerging pathogens.(2006, 9. School of Veterinary Medicine, UC Davis and the WHO/PAHO collaborating center on new emerging zoonoses)
- #### H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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

野生げっ歯類及びダニ類に由来する感染症の予防、診断及び疫学に関する研究

病原性 *Yersinia* の感染防御抗原の特定ならびに免疫磁気ビーズ法による検出法に関する研究

分担研究者 林谷 秀樹 東京農工大学大学院共生科学技術研究院 助教授

研究要旨：病原性 *Yersinia* (*Yersinia enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis*) が共通して菌体表面に発現する菌体外膜タンパクである YadA が感染防御抗原であるかをマウスを用いて検討した。YadA を菌体に発現した *Y. pseudotuberculosis* 死菌または YadA を含む菌体の分画をマウスに皮下投与後、同じ生菌を経口投与した場合、マウスは感染致死から免れることから、YadA はマウスに対する病原性 *Yersinia* の感染防御抗原であり、ワクチンとしても応用可能であると思われた。さらに、YadA に対する抗体を用いた免疫磁気ビーズ法（IMS 法）を開発し、病原性 *Yersinia* の検出を試みた結果、開発した IMS 法は広く病原性 *Yersinia* の検出が可能であり、迅速かつ検出感度も高かったことから、環境材料などからの病原性 *Yersinia* の分離に有効なツールであると思われた。

A. 研究目的

食中毒起因菌である *Yersinia enterocolitica* と仮性結核菌 *Yersinia pseudotuberculosis* は、腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌であり、野生げっ歯類を、自然界における主たるレズルボアとする代表的な人獣共通感染症原因菌として知られている¹⁾。本年度は病原性 *Yersinia* である *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* の野生げっ歯類における生態や疫学を解明していくための研究の一環として、これら病原体の防除を図る目的でワクチンの開発を進めるため、これら病原性 *Yersinia* が 37°C で培養したときに共通して

菌体表面に発現する菌体外膜タンパクである YadA に注目し、YadA が感染防御抗原であるかをマウスを用いて検討するとともに、YadA に対する抗体を用いた免疫磁気ビーズ法を開発し、病原性 *Yersinia* の検出感度などを調べ、その有効性を検討した。

B. 研究方法

1. マウスにおける感染防御抗原としての YadA の検討

1) 供試菌株

供試菌株として、*Y. pseudotuberculosis* 血清型 4b を用いた。

2) YadA を発現した死菌ならびに YadA 分画の

作製

供試菌を液体培地に接種し、37°Cで一晩振盪培養後、ホルマリンを加えて殺菌した。その後、3,000回転で10分間遠心後上清を捨て、沈査を滅菌生理食塩水に浮遊させた。この遠心と滅菌生理食塩水への浮遊を3度繰り返し、最終的に滅菌生理食塩水で1mg/mlの濃度に調整したものをホルマリン死菌とした。また、供試菌を液体培地に接種し、37°Cで一晩振盪培養後、遠心し上清を捨てて得られた菌体を超音波で破碎し、100,000回転で30分間超遠心後、YadAの含まれる分画を集め、YadA分画とした。

3) 供試動物

供試動物として、BALB/cマウス(5週齢、オス)を用いた。マウスは3群に分け、一群にはホルマリン死菌(以下、死菌群)、一群にはYadAの分画(以下、サブユニット群)を皮下投与した。また、1群にはホルマリン死菌を経口投与した(以下、経口投与群)。皮下投与群ならびに経口投与群のいずれも初回投与後、42日目に2回目の投与を行った。いずれの群とも2回目の投与後28日目に 10^9 CFU/mlに調整した供試菌を経口投与し、以後、経時的に排菌と死亡状況を観察した。なお、コントロール群として、無処置のマウスを用いた。

2. YadA に対する抗体を用いた免疫磁気ビーズ (IMS) 法による病原性 *Yersinia* の分離

1) 供試菌株

供試菌株として、*Y. enterocolitica* 血清型 03、05、27、08 および 09 の 4 株、これらから病原性プラスミドが欠落したもの 4 株ならびに *Y. pseudotuberculosis* 血清型 1b および 4b の 2 株の計 10 株を用いた。

2) YadA に対する抗体の作成

1.-2) と同様に YadA を発現させた *Y. enterocolitica* 08 の菌体から YadA を分離・精製し、これを抗原としてウサギに接種し、YadA に対するウサギ抗血清を作製した。この抗血清は、Protein G 結合アフィニティークロマトグラフィーにより、YadA に対する IgG 抗体のみを含む血清に精製した。その後、この抗血清と抗ウサギ IgG 羊血清を結合させた市販の免疫磁気ビーズ Dynabeads[®] M-280 Sheep anti-Rabbit IgG (Dyna1) を結合させたものを YadA に対する免疫磁気ビーズとした。

3) 免疫磁気ビーズを用いた IMS 法による病原性 *Yersinia* の回収

(1) 生理食塩水に接種した場合

供試菌株を 37°C で培養後、滅菌生理食塩水で 10 倍段階希釈し、 $10^0 \sim 10^3$ CFU/ml の菌量となるように菌液を調整した。その後、作製した YadA に対する免疫磁気ビーズを用いて各菌量の菌液の 1ml ずつを 25 μ l の免疫磁気ビーズの入ったマイクロチューブに加え、4°C で 60 分間 Sample Mixer で穏やかに混和させた後、PBS バッファーで 2 回洗浄した。最終的に免疫磁気ビーズは 1 ml の PBS バッファーに

懸濁したものを、trypticase soy agar (TSA) (BD) に 0.1 ml ずつ塗抹し、25°C で 48 時間培養後、発育してきたコロニーの数をカウントした。

2) 河川水に接種した場合

9 倍量に濃縮した河川水に、供試菌を $10^1 \sim 10^5$ CFU/ml の菌量となるように加えた。そして、3)-(1)と同様に YadA に対する抗体を用いた IMS 法で河川水から接種した供試菌を回収した。分離培地としては CIN 培地 (OXOID) を用いた。なお、河川水の総生菌数および大腸菌群の平均値は、それぞれ 2.6×10^4 および 25 CFU/ml であった。

C 研究結果

1. YadA の感染防御効果

生菌投与後 42 日間の観察期間を通じ、死菌群ではマウス 14 匹中 10 匹 (71.4%) が生残した。また、サブユニット群では 7 匹中 7 匹 (100.0%) が生残した。しかし、経口投与群では 7 匹中 2 匹 (25.6%) が生残しただけであった。また、皮下投与群ならびに経口投与群のいずれも生菌投与後 14-35 日間の排菌が認められた。一方、コントロール群は 8 匹全例が生菌投与後 14 日以内に死亡した。

2. YadA を用いた IMS 法の成績

Y. enterocolitica 08 から作製した YadA に対する抗体を用いた IMS 法により、滅菌生理食塩水に病原性 *Y. enterocolitica* および *Y.*

pseudotuberculosis を接種した場合、いずれの菌株も菌量が $10^1 \sim 10^2$ CFU/ml まで検出することが可能であった。一方、病原性プラスミドが脱落し、YadA を発現していない *Y. enterocolitica* 4 菌株はいずれも 10^4 CFU/ml でも検出することはできなかった。また、河川水に接種した場合は、YadA を発現した病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* は、いずれも菌量が $10^2 \sim 10^3$ CFU/ml の時まで検出された。

D. 考察

YadA は病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* が保有する約 70kb の病原性プラスミドにコードされていることが知られており、分子量 180~240 kDa の菌体外膜タンパクである。YadA はすべての病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* に共通して存在することが知られており、頭 (head domain) および脚 (stalk domain) の部分から成る棒つきキャンディー (lollipop) 状の構造を持ち、感染初期において腸粘膜への付着と侵入に関与すると考えられている²⁾。今回、*Y. pseudotuberculosis* 4b で YadA を菌体表面に発現した死菌または YadA を含む菌体の断面をマウスに皮下投与後、同じ生菌を経口投与した場合、腸管定着は完全には阻止できなかったが、42 日間の観察期間を通じ、死菌投与マウスでは 71.4% が、サブユニット投与マ

ウスでは 100%が死亡することなく生残したことから、YadA は *Y. pseudotuberculosis* の感染防御抗原であり、ワクチンとして効果があることが確認された。なお、これまでにパイロット的研究として、飼育サルに *Y. pseudotuberculosis* 感染症が多発している数箇所のサル飼育施設の協力を得て、飼育するリスザル約 500 頭に YadA を発現した *Y. pseudotuberculosis* 4b 死菌をワクチンとして皮下接種し、そのワクチン効果を検討しているが、これまでのところワクチンを接種したリスザルからは *Y. pseudotuberculosis* 発症例が出ておらず、また、副作用もみられないことから、YadA はリスザルでも病原性 *Yersinia* の感染防御抗原となっており、ワクチンとして有効であると考えられる。なお、リスザルでの経験から、YadA はどの血清型の菌株から作製したものでも、*Y. pseudotuberculosis* の他の血清型や病原性 *Y. enterocolitica* に対して効果を持つものと思われるが、これらのことについては、今後マウスを用いて詳細に検討する予定である。

これまでに、IMS 法を用いて病原性 *Y. enterocolitica* を分離する試みはいくつか報告されているが、この場合、磁気ビーズに結合させる抗体として病原性 *Y. enterocolitica* の O 抗原に対する特異抗体を用いており、この方法では標的とする特定の O 抗原を持つ菌しか分離できない^{3,4)}。病原

性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* を環境中などから広くかつ効率よく分離するためには、これら病原性 *Yersinia* に共通して存在する抗原に対する抗体を作製し、IMS 法を行うことが必要である。YadA は病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* に共通して菌体表面に発現されることから、今回、YadA に対する抗体を作製し、それを用いた IMS 法により、病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* を検出する系を開発した。その結果、作製した YadA に対する抗体を用いた IMS 法により、病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* のいずれも、生理食塩水に菌を接種した場合には 10^2 CFU/ml 以上、河川水に菌を接種した場合には 10^3 CFU/ml 以上の菌量ですべての供試菌を回収することができた。YadA の抗原性は、病原性 *Y. enterocolitica* では、血清型特異的であったとの報告⁵⁾もみられるが、今回、*Y. enterocolitica* 08 から作製した YadA に対する抗体を用いた IMS 法は、病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* を広く分離することが可能であった。したがって、今回開発した YadA に対する抗体を用いた IMS 法はこれら病原性 *Yersinia* を環境材料などから検出する際の有効なツールになり得るものと思われた。

参考文献

- 1) Butler, T. In: Palmer, S. R., Soulsby, L. and Simpson, D. I. H. [eds] Zoonoses. pp. 281-293. Oxford University Press, Oxford, UK. 1998.
- 2) Hoiczyk, E., et al., EMBO J. 19, 5989-5999, 2000.
- 3) Kapperad, G., et al., Appl. Environ. Microbiol. 59, 2938-2944, 1993.
- 4) Koujitani E., et al., J. Vet. Med. Sci. 68, 195-199, 2006.
- 5) Mack, D., et al., Med. Microbiol Immunol. 180, 205-211, 2001.

E. 結論

病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* が産生する菌体外膜タンパクである YadA は、マウスの感染防御抗原であり、ワクチンとしても有効であると思われた。また、YadA に対する抗体を用いた免疫磁気ビーズ法は、病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* を広く分離することが可能であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究論文

1. 発表論文

- 1) 岩田剛敏, 宇根有美, Alexandre Tomomitsu

Okatani, 加藤行男, 中臺文, 林谷秀樹: サルから分離された *Yersinia pseudotuberculosis* の病原性状, 獣畜新報 59: 300-301, 2006.

- 2) Koujitani E., Horisaka T., Okatani A. T., Nomura Y., Iwata T., Hara-Kudo Y., Kumagai S. and Hayashidani H.: Immuno-magnetic separation and agar layer methods for the isolation of Freeze-Injured *Yersinia enterocolitica* 0:8 from Water. J. Vet. Med. Sci. 68, 195-199, 2006.

2. 学会発表

- 1) Iwata, T., Une, Y., Okatani, A. T., Kato, Y., Nakadai, A., Hirota, Y., and Hayashidani, H. Virulence characteristics of *Yersinia pseudotuberculosis* isolated from breeding monkeys in Japan. 9th International Congress on *Yersinia*. Kentucky (2006. 10)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

野生げっ歯類及び節足動物に由来する感染症の診断、疫学及び予防に関する研究

分担研究項目：バベシア症の診断法の開発と疫学

分担研究者 辻 正義 酪農学園大学獣医学部実験動物学教室 助教授

研究要旨： 北海道野幌の原始林近くで2002年から2004年に交通事故で死亡した6匹のエゾリス (*Sciurus vulgaris orientis*) における *Babesia microti* 様原虫の保有状況を調査した。6匹のリスのうち3匹が18S rRNA と β -tubulin 遺伝子を標的とした nested PCR で陽性となった。増幅した PCR 産物の塩基配列の調査と赤血球内の原虫の形態により3匹のリスは *Babesia microtii* 様原虫に感染していることが示された。本原虫の遺伝子型は過去に各種野性動物で報告されてきた原虫の型とは異なることが判明した。本報告はリス科における *Babesia microtii* 様原虫の存在の最初の報告である。

A. 研究目的

Babesia microti は野生げっ歯類を主な自然宿主とする赤血球寄生原虫で、ヒトのバベシア症の主要な病原体としても知られている。ヒトにおける主な流行地は、米国北東部で、この地域ではシロアシマウス (*Peromyscus leucopus*) とシカマダニ (*Ixodes scapularis*) の間でバベシア原虫の感染サイクルが成立しており、ヒトはキャンプやハイキング等の野外活動中にマダニに刺されることにより偶発的に感染する。わが国でも、1999年に国内初のヒトバベシア症例が見つかり、レゼルボアとなる野生動物および媒介マダニに関する野外疫学調査が我々のグループを中心に進められて

いる。現在までの研究で、わが国には米国のものとはタイプの異なる日本固有の *B. microti* 様原虫（穂別タイプおよび神戸タイプ）が分布していること、穂別タイプが国内優占種であること、アカネズミ (*Apodemus speciosus*) が最も高頻度に原虫を保有しレゼルボアとしての中心的役割を担っていること、および、*Ixodes ovatus* や *Ixodes persulcatus* が媒介マダニであることなどが判明している。アカネズミ以外の野生げっ歯類としては、エゾヤチネズミ、ミカドネズミ、ハタネズミ、また、食虫目のトガリネズミからも *B. microti* 様原虫が分離あるいは検出されている。これらの野

ネズミ類（野生小型哺乳動物）から検出されるバベシア原虫は、いわゆる「狭義の *Babesia microti*」とその地理的変異種（あるいは亜種）として一括されるべきものであるのに対し、近年、米国では「広義の *Babesia microti*」と呼ばれる従来から知られているものとは進化系統的に若干隔たりのある *B. microti* 様原虫がアライグマ、キツネ、スカンクなどの食肉目（ネコ目）動物から続々と報告されるようになった。今回、エゾリス 6 匹の材料を入手できたので *B. microti* 様原虫の検出を試みた。

B. 研究方法

調査対象としたエゾリスは 2004 年から 2006 年に野幌森林公園の近くで、交通事故で死亡した 6 匹である。死亡固体の心臓より血液を採取した。血液から DNA を抽出し、*B. microti* の 18SrRNA と β -tubulin 遺伝子に特異的なプライマーを用いて nested PCR を行った。増幅 DNA について塩基配列の決定を行った。

c. 研究結果

6 匹のリスのうち 3 匹で 18SrRNA 遺伝子を標的とした nested PCR が陽性となった。この 3 匹は β -tubulin についても陽性となった。これら 3 匹から増幅した DNA の配列はすべて同一で、3 匹は同一の *B. microti* 様原虫に感染していたことを示していた。 β -tubulin の塩基配列の比較では、エゾリス由来の *B. microti* 様原虫は他の *B.*

microti 様原虫と明らかに異なることが判明した。

2 匹の血液塗抹標本のギムザ染色により検査したところ、赤血球中の原虫は *Babesia* 種に特徴的な染色像を示した。

D. 考察

この研究で、我々はリス科に *B. microti* 様原虫が存在する最初の分子生物学的証拠を示した。系統学的に、エゾリスの原虫は人のバベシア感染の主な原因となる米国型の *B. microti* に最も近かった。このことは、今回新しく発見されたエゾリスの原虫が人獣共通感染症の原因となるかどうかは今後調べなければならないが、エゾリスが人のバベシア症の病原巣動物となりうることを示唆している。

E. 結論

本研究で、北海道に生息するエゾリスが、*B. microti* 様原虫を保有しており、さらに米国型 *B. microti* に最も近縁であった。今後、エゾリスが *B. microti* の人への病原巣動物としての可能性につき調査する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsuji, M., Zamoto, A., Kawabuchi, T.,

Kataoka, T., Nakajima, R., Asakawa, M., Ishihara, C. *Babeshia microti*-like parasites detected in Eurasian red squirrels (*Sciurus Vulgaris orientis*) in Hokkaido, Japan. J. Vet Med. Sci. 68(7):643-646, 2006

2. 学会発表

- 1) 陣内理生、辻正義、長田翔伍、川渕貴子、的場洋平、浅川満彦、石原智明：北海道のアライグマから検出された *Babeshia* 原虫の進化系統解析：第 142 回日本獣医学会、山口（2006.9）
- 2) 川渕貴子、竹村由希、的場洋平、浅川満彦、辻正義、石原智明：北海道のアライグマからの *Babeshia* 様原虫の分離：第 142 回日本獣医学会、山口（2006.9）
- 3) 藤澤幸平、辻正義、川渕貴子、竹村由希、的場洋平、浅川満彦、中出哲也、内田佳子、石原智明：北海道のアライグマから分離された *Babeshia microti* 様原虫のイヌ赤血球への順化：第 142 回日本獣医学会、山口（2006.9）

分担研究報告書

野生げっ歯類及びダニ類に由来する感染症の予防、
診断及び疫学に関する研究

分担研究項目 ダニ媒介性脳炎ウイルスの病原性

分担研究者 岩崎琢也 (東京都神経科学総合研究所)

研究要旨

TBEV のマウス感染モデルにおいて、感染ルートにより脳炎発症、致死量に違いがみられた。特に経鼻接種では摂取量依存的に病原性発症がみられたが、皮下接種においては病原性発症と接種量は相関しなかった。

A. 研究目的

ダニ媒介性脳炎ウイルスの病原性の接種ルートによる違いをマウスモデルにより比較する。

実験委員会に計画を申請し、承認を得た後に実施する。ウイルスを用いた実験は P-3 実験室において行う。

B. 研究方法

5週令メス C57BL/6J マウスに TBEV Oshima 株を 10^{-2} ~ 10^7 pfu/mouse で皮下および経鼻にて接種後、体重変化、症状、生死について18日間観察した。

C. 研究結果

皮下、経鼻感染マウスともに感染後6日後までは体重減少、症状などは観察されなかった。

皮下接種後のマウスにおいて感染後7-10日にかけて明らかな体重変化、脳炎症状がみられはじめ、感染後9日目より致死性がみられた。注目すべきことに、ウイルス接種による体重変化、症状、生存率は接種量に依存しなかった。特に 10^2 ~ 10^6 pfu 接種郡の間では摂取量と脳炎発症、生存率に逆転現象がみられた。

(倫理面への配慮)

ヒトの血清と剖検材料の採取はインフォームドコンセントに基づき行い、成績の公表は氏名を伏せて実施する。本研究における動物実験は各研究機関に属する動物

一方、経鼻接種においては摂取量依存

的に体重変化、症状、生存率の変化がみられた。すなわち 10^7 , 10^6 pfu 接種群では感染後7-8日目から体重減少、脳炎症状がみられ、感染後14-16日目にはすべてのマウスが死に至った。それらに比べ 10^5 , 10^4 pfu 接種群では発症、致死がそれぞれ3-4日、5-6日遅れてみられた。 10^3 pfu 以下の接種群では発症がみられなかった。

D. 考察

TBEV のマウス感染モデルにおいて、感染ルートにより脳炎発症、致死量に違いがみられた。特に経鼻接種では摂取量依存的に病原性発症がみられたが、皮下接種においては病原性発症と接種量は関連しなかった。これらの結果から、TBEV のマウスにおける病原性に関しては接種ルートにより異なる脳炎発症機構が考えられた。特に最初のウイルス感染臓器・細胞、増殖、それらに続く免疫反応に違いがあると考えられる。また、これまでのワクチン防御試験、ウイルス変異体の病原性の比較等の研究においては主に皮下接種が用いられてきたが、発症が摂取量に依存し

ないこと、50%致死量の100倍量でもすべてのマウスは致死にならないことなどから、それらの試験には経鼻接種の方が比較しやすいことが考えられる。今後このウイルス感染マウスモデルを用いて脳炎発症機構の解明を行うことは非常に有意義である。

C. 健康危険情報

なし

D. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

E. 知的財産の出願・登録状況

あれば記入してください。

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告書

野生齧歯類および節足動物に由来する感染症の診断、疫学および予防に関する研究

分担研究項目: 回帰熱の診断と疫学 - 回帰熱ボレリアの抗原解析

分担研究者 福長 将仁 福山大学薬学部 教授

研究要旨: ベクターダニならびにスナネズミを宿主モデル動物としてみちい、回帰熱ボレリアの伝達実験を行った。ボレリアを腹腔内投与されたスナネズミ血液中では間歇的に菌血症が起こり、ボレリアの回帰増殖が確かめられた。菌血症時にベクターダニを宿主に刺咬させることにより、ボレリアは高率に伝達され、少なくとも3ヶ月間ダニ体内で安定に維持された。またボレリアを獲得したダニ刺咬によりスナネズミにボレリア感染が起こり、この場合も効率的にボレリアが伝達されて回帰現象も観察された。回帰熱流行地ではヒトを宿主としてボレリアの trans-stadial transmission が起こることを実験室で再現できた。しかしボレリア保有ダニの卵にはボレリアの伝達 trans-ovarial transmission が起こらず、地中海沿岸に分布している *B. crocidurae* とは異なる性状が明らかになった。このことは約7回のダニの吸血すべてをボレリア保有血液として産卵させた場合でも同じで、孵化した幼虫においてボレリアは全く認められなかった。我々の東アフリカの調査地(タンザニア、ドドマ)におけるダニのボレリア保有率は約50%であり、5歳以下の有熱児童は11%、健康児童でもボレリア保有率が4%であることと併せて考えると、乳幼児がリザーバーとなって頻回のダニ刺咬のいずれかにおいてボレリアを獲得、保有維持されていることが推測された。

回帰熱ボレリアの回帰現象の原因となる抗原蛋白 variable major protein, vmp にはふたつのファミリーがあり、一方は分子量約22万の variable small protein, vsp で、他方は分子量36~38万の variable large protein, vlp である。本研究では菌血症を起こして増殖してくるボレリアのそれぞれ抗原性の異なる抗原蛋白 *B. turicatae* の vspE、*B. duttonii* の vlpP、vlpL、vlpX の部分アミノ酸配列を特定、プローブを作成して遺伝子をクローンした。このうちの vlpP については免疫抗体を用いながらエピトープをおよそ5アミノ酸にまで絞り込んだ。ついでこれらの抗原蛋白を大量発現、精製して立体構造を決定するために結晶解析をおこなった。本研究期間内に vspE の構造を解明することができ、この分子は2量体分子でボレリア膜表面に存在していることが明らかになった。

A. 研究目的

回帰熱は乾燥地域のダニ媒介感染症で、東ア

フリカではマラリアに次いで患者が多く、乳幼児

の死亡率が高い。シラミ媒介性の回帰熱はボレリ

アがコロモシラミに適応したもので、ダニ媒介性回帰熱よりも致死率が高く、現在でもときに難民キャンプなどで集団発生する。現在国内に患者発生はないが、路上生活者の増加や有機塩素系殺虫剤の使用停止とあいまってシラミ保有率が上昇していることから、輸入感染症として今後警戒が必要になってくるとされる感染症のひとつである。

本研究では、東アフリカタンザニアにおけるボレリア臨床分離株と、この地域に分布する媒介ダニを用い、スナネズミを宿主としたボレリア伝達実験を行って、未だに明らかにならなかった経卵感染の有無を確かめた。また、昨年度から引き続き感染防御ワクチンの創製を目標として、ボレリアの回帰増殖の直接原因である抗原蛋白質 variable major protein, vmp のエピトープ解析ならびに蛋白質の立体構造解析を同時に行うことによって、抗原構造を明らかにして感染防御ワクチン創製につなげようとするものである。

B. 研究方法

1. ボレリア伝達実験

回帰熱ボレリア *Borrelia duttonii* は幼児患者由来株 Ly の経代数の少ないものを BSK-II 培地で培養し、対数増殖期のものを用いた。ベクターとしては、回帰熱流行地である東アフリカ一帯に分布するヒメダニ *Ornithodoros moubata* の実験室飼育株を用いた。ダニの飼育には家兎血液を月一回吸血させながら 24℃で集団飼育した。*O. moubata* は孵化後、吸血せずに幼虫 larva から脱皮して若虫 nymph となる。その後吸血と脱皮を繰り返し(5~7回)成熟したのち雌は産卵する。ボレリア伝達実験には、この間の若虫 N1~N7 を用い

た。ダニのボレリア保有の有無は、ボレリア鞭毛遺伝子をターゲットとした PCR およびダニ中腸の培養によって確認した。

スナネズミは自家繁殖し、生後 6~12 ヶ月以内の約 120g のものをダニ刺咬あるいは菌血症の観察にもちいた。ボレリア感染は $1 \times 10^1 \sim 10^5$ 細胞を腹腔内接種し、血液中のボレリアは尾静脈血液を一滴取り、暗視野顕微鏡観察した。ダニ刺咬時スナネズミはネンブータルで麻酔し、スナネズミ一匹あたりダニは5匹とした。ボレリア感染ダニならびに感染スナネズミは逃げ出すことがないように密閉容器で飼育し、安全性には確実を期した。感染実験は隔離した施設で登録者のみが行い、ダニ飼育も密閉容器を用い、実験には周囲を粘着シートで囲んだバット内で作業を行った。

2. 抗原蛋白質の同定、遺伝子のクローニングおよび組換え遺伝子の作成と蛋白発現、精製

回帰増殖したボレリア抗原蛋白質の同定と遺伝子のクローニング法を要約すると次のようである。抗原蛋白質 vsp または vlp は SDS-PAGE で分離したゲル断片から抽出し、この蛋白質の部分アミノ酸配列を決定する。ついでアミノ酸から推定される塩基配列にしたがってプライマーを合成、PCR プロダクトを作成、これをプローブとして用いすでに作成してあるボレリアゲノムライブラリーから遺伝子をクローニングした。遺伝子の細胞膜にアンカーしていると考えられる部分は除き、GST 融合蛋白質として発現させた。

これらの組換え蛋白質の作成と免疫抗体の作成あるいは免疫プロットングについてはすでに報告の通りであり、抗原性の解明とエピトープの解析は前年の報告書の通りである。つづく蛋白質の結

晶化と3D構造解析は広島大学理学部片柳助教により遂行された。解析はスプリングエイトの大型放射光施設を利用した。

(倫理面からの配慮について)

動物実験は本学の実験動物委員会の取り決めに従って行った。

C. 研究結果

ボレリアを腹腔内接種したスナネズミ血液中には2〜3日後、ボレリアがあらわれ菌血症が認められた。細胞数は接種菌数に依存し 10^5 接種したとき視野あたり数十(約 10^4 /ml)あたり観察され、ほぼ4日間隔で3回回帰が起こった後消失した。動物は菌血症時も立毛やうずくまりはなく病的な症状は認められず、ボレリア消失後再度の接種では感染はおこらなかった。

菌血症時、ダニ刺咬によりボレリアは効率的にダニに伝達され、N1 で約 80%、N3 では 100%の高率であった。これらのダニを 24°Cで保存したところ少なくとも3ヶ月間は安定に保有された。このボレリア保有ダニをスナネズミに刺咬させたところ、高率にボレリアの伝達が起こった。しかし腹腔接種の場合に比較して血液中のボレリア出現の遅延がおこり最初の菌血症は刺咬後7日目であった。この場合も3回の回帰を経てボレリアは血液中から消失した。

ダニは一回の刺咬でボレリアを獲得でき、安定に保有することが確かめられた。このダニを数回の吸血脱皮を経験させて産卵させ、卵中のボレリアの有無、さらに孵化後の N1 のボレリア保有を確かめたが、ボレリアの経卵伝達は全くおこらなかった。

ボレリアの回帰初期に出現する抗原蛋白は *B. turicatae* では vspE、*B. duttonii* では vlpP、vlpL、vlpX などである。これらの中で vlpP のエピトープ部分は前年の報告書の通りであるが、本年はこれらの蛋白を大量発現、精製し構造解析を行った。このうち vspE と vlpP の結晶が得られ、vspE の3D構造が明らかになった。

立体構造では長い4本と短い1本の α らせんとそれらを結ぶループ構造からなり、二量体の蛋白質であった。すでに vlpP においてエピトープ解析を行っており、このエピトープ部分はループ領域に相当することが明らかになった。vlpP の3D構造は得られていないが、これらの結果から推定すると、vlpP は一分子で vspE と基本的には同じ構造をしていると考えられる。またこれらの抗原蛋白のループ領域の塩基配列は可変領域であるために、この領域が抗原エピトープとなっていることには整合性がある。

D. 考察

タンザニアの調査地(首都ドドマ近郊ブミ村)において、住民は日干し煉瓦または土壁の住居に暮らしている。この土壁や土間の土にはいくつもの穴があって、ダニを掘り出して採集することができる。屋間ダニはこれらの穴に隠れ、夜間はい出して牛皮などを敷いて就寝するヒトを刺咬吸血する。吸血時間は約 30 分、痛みやかゆみはないのでダニ刺咬が気づかれることはないものと考えられる。これらの家屋から採集したダニのボレリア保有率は約 50%と高率であり、同村の5歳以下の健康乳幼児 300 名中ボレリア保有率は 4%、有熱乳幼児 50 名あまりの血液では 11%であった。

本実験結果から、ボレリアの経卵感染はなく、

ダニが7回程度吸血すること、また同地の齧歯類のボレリア保有は知られていないこと(共同研究者 A. Talbert の調査による)などをあわせて考察すれば、これらの乳幼児がボレリアのリザーバーとなっていることが考えられる。また、大人は回帰熱ボレリアに対する抗体を獲得しているために感染が成立しない。有熱感者のマラリア感染率は28%と高く、ボレリアと同時感染も多く認められた。しかし年間を通して平均的にボレリア感染が見られるのに対して、マラリア感染は雨期(3~5月)に集中しているので、季節的要因も加味して判断すべきである。地中海沿岸に分布する *B. crocidurae* については経卵感染が知られており、また野生の齧歯類もこの種のボレリアを保有している報告がある。*B. duttonii* についてもダニ卵中にボレリアが観察されたという報告もあるが、我々の結果からは経卵感染は起こらなかった。ダニは吸血後塩類に富む分泌物を出し、この中にはボレリアが存在し、これが卵に付着している場合にはPCRでボレリア陽性になることがある。

ボレリアの抗原蛋白 vmp はボレリア菌体の外膜表面に突きだしており、宿主免疫の標的となる。ボレリアはこの抗原蛋白遺伝子を次々変換して、新しい抗原タイプのボレリアが増殖、菌血症を起こすときに発熱することが知られている。この蛋白遺伝子にはふたつのファミリーがあり、分子量22万の vsp グループと36~38万の vlp グループがある。本研究では vspE が2量体で抗原蛋白を形成していることが明らかになったが、vlpP や vlpL などのアミノ酸配列情報を勘案して考えると、vlp では一分子でこの抗原分子を形成していることが考えられる。我々が研究対象としている Ly 株で20種類以上の vlp 遺伝子を同定しているのに

対して vsp 遺伝子は2種のみである。これらのことから、vsp 遺伝子がタンデムにリピートすることにより vlp 遺伝子ができ、ついで多様な遺伝子を持つように進化してきたと考えることができる。ボレリアの宿主との折衝において抗原蛋白をどのように進化させてきたか、あるいは適応という面からも興味深いものがある。

抗原エピトープに関しては、 α らせん構造にはなく、 α らせんからなるリボン構造をつなぐループ領域に抗原エピトープがあることが明らかになった。今後この領域のヴァリエーションをしらべて、いくつかのタイプのエピトープを抗原として免疫を惹起するために用いれば多くの抗原タイプのボレリアの感染予防を目的とするワクチンが構築できる可能性がある。

E. 結論

タンザニア調査地における回帰熱ボレリアは乳幼児がリザーバー、ヒメダニ *O. moubata* がベクターとなる。このダニと *B. duttonii* の組み合わせにおいて経卵感染は起こらず、ボレリアの伝達は trans-stadial transmission のみにより起こる。

抗原蛋白 vspE は2量体で構成され、抗原エピトープは α らせん構造をつなぐループ領域および立体的にフリーなC末端に存在する可能性がきわめて高い。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tabuchi, N., Tomodo, K., Kawaguchi, H.,