

カ、イノシシ腎臓からの DNA 抽出

ネズミ、イヌの腎臓およびイヌ尿から、コルトフ培地を用いてレプトスピラの分離培養を行った。培養は 30°C で 3 ヶ月間行い、一週間ごとに暗視野顕微鏡下でレプトスピラの増殖の有無を観察した。

大日本猟友会の協力により 1 道 8 県からシカ腎臓 32 検体、また 11 県からイノシシ腎臓 45 検体を採取し(表 1), DNeasy Tissue Kit (Qiagen)を用いて DNA 抽出を行った。

2. レプトスピラ *flaB* 遺伝子配列解析

レプトスピラ分離株より上記キットを用いて抽出した染色体 DNA および上記 1 のシカ、イノシシ腎臓抽出 DNA を鋳型として、特異的プライマーを用いて *flaB* 遺伝子の増幅を行い(*flaB*-PCR; シカ、イノシシ検体については nested PCR), その塩基配列の決定を行った。また培養開始 24 時間後のネズミおよびイヌ腎臓培養上清およびイヌ尿から遠心分離により沈殿を回収し、沈殿から上記キットを用いて DNA 抽出, *flaB*-nested PCR を行った。

3. パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)による制限酵素長鎖断片のパターン解析

対数増殖期のレプトスピラ菌体を低融点アガロースに封入しゲルブロックとした。ゲルブロックをリゾチーム, Proteinase K, 制限酵素 *Not I* で処理し、このブロックを 6V/cm, パルスタイム 10-60 秒, 14°C で 20 時間泳動を行った。

4. レプトスピライムノグロブリン様(Lig)タンパク質を抗原とした ELISA

96 ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに GST/LigA-mC あるいは GST を 100 ng (TBS; 20 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5 で調製)添加し、4°C で 1 晩吸着させた後、20 mg/ml BSA/TBST で 37°C 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング溶液を除去後、BSA/TBST で 50 倍希釈したブタ血清 100 μ l

を加え 37°C 2 時間インキュベーションし、200 μ l の TBST で 3 回洗浄を行った。その後 BSA/TBST で 2000 倍希釈した 2 次抗体(HRP 標識ヤギ抗ブタ IgG)を 100 μ l 加え、37°C 1 時間インキュベーションし、上述の通りに洗浄を行った。洗浄後、ABTS 溶液を各ウェル 100 μ l 加えて室温で発色させ、405 nm で吸光度を測定した。

5. 顕微鏡下凝集試験(MAT)

96 穴マイクロタイタープレートに、PBS で希釈したブタ血清と、被検レプトスピラ培養液(これまで国内で報告のある 15 血清型)をそれぞれ 25 μ l ずつ加え、37°C, 3 時間インキュベートした後、暗視野顕微鏡下で観察を行った。陰性対照と比較して、凝集していないフリーの菌数が 50%以下になっている場合を陽性とした。

結果および考察

1. シカおよびイノシシ腎臓からのレプトスピラ遺伝子の検出

大日本猟友会の協力により採取したシカおよびイノシシ腎臓からレプトスピラ遺伝子 *flaB* の検出を行った。およそ 30 mg の切片を腎臓皮質部分 2 ヶ所から切り出し、DNA 抽出, *flaB*-PCR を行い、どちらか一方からでも増幅産物が得られた場合を陽性個体と判定した。その結果、シカ腎臓 32 検体中 2 検体(6.3%)から、またイノシシ 45 検体中 7 検体(15.6%)から *flaB* が検出された(表 1)。増幅された *flaB* の塩基配列を決定したところ、腎臓に定着していたレプトスピラ種は *L. interrogans* (6 検体)および *L. borgpetersenii* (3 検体)であることが明らかになった(表 1 および図 1)。昨年度の北海道および岩手、千葉、三重、広島、鹿児島各県での同様の調査では、シカ腎臓のすべておよびイノシシ腎臓の 88% から *flaB* 遺伝子が検出された。これと比較し、本年度の検出率は昨年度よりもかなり低くなっている。シカやイノシシのレプトスピラ保有率が、年

により変動があるのか、またその変動は何に影響されているのかを調査を継続して明らかにしていく。また本年度初めて調査を行った静岡、島根、熊本県でもイノシシからレプトスピラ遺伝子が検出されていることから、国内の広範囲のシカ、イノシシがレプトスピラを保有していることが明らかになった。このことは、これら野生動物の狩猟を行う人や、それらを加工・調理する人は、レプトスピラ感染のハイリスクグループであることを示唆しており、これらの人々への注意喚起および感染防止策の教育を行うことが重要である。またこれらのハイリスクグループの人々および猟犬におけるレプトスピラ感染の実態把握を行うことも今後の課題であると考えられた。

2. ネズミのレプトスピラ保有状況

以下の地域でネズミの捕獲を行い腎臓からレプトスピラの分離を試みた。

ドブネズミ

a) 東京都板橋区 15 匹

b) 東京都中央区 2 匹

クマネズミ

c) 埼玉県川越市 20 匹

これらのうち、a)の4匹およびb)の1匹の腎臓からレプトスピラが分離された(図1)。また分離はできなかったものの、b)の9匹(レプトスピラが分離できた個体を含む)の腎臓培養上清中に *flaB* 遺伝子が検出された。b)のネズミから分離されたレプトスピラは、これまで東京都で分離されたレプトスピラと同様に、重症レプトスピラ症であるワイル病の起因血清型 Copenhageni あるいは Icterohaemorrhagiae と血清学的に同定された。また *flaB* の塩基配列および PFGE における *NotI* の切断パターンもこれらの血清型と同一であった(図2)。また昨年度ひたちなか市および銚子のドブネズミから分離されたレプトスピラの *NotI* の切断パターンも同一で

あった(図2)。一方 a)のネズミから分離されたレプトスピラは増殖が非常に遅く血清学的な同定は現時点ではできていないが、*flaB* の塩基配列はワイル病起因 2 血清型とは異なり、これまでに平塚、横浜、焼津のドブネズミから検出された *L. interrogans* と同一であった(図1)。これまでにレプトスピラ症患者から、本 *flaB* タイプのレプトスピラが検出された事はなく、本菌の人への病原性は不明であるが、今後レプトスピラ症の血清診断パネルに本菌を加え、人の感染状況を明らかにしていく。また 2006 年も東京都では 3 例のワイル病の発生があり、患者は職場にネズミが出没する場所で労働者(2 例)、あるいは自宅にネズミが出没する人であり、ネズミが感染原因となっていることが強く示唆された。ネズミがレプトスピラ感染のリスクであること、可能な限りのネズミの駆除あるいは侵入防止策をとることの重要性を喚起する必要がある。

3. ブタレプトスピラ症の血清診断における LigA-ELISA の有用性の評価

ブタのレプトスピラ抗体の簡便な検出のために、Lig タンパク質を抗原とした ELISA の評価を行った。SFP ブタ 8 頭の血清を陰性コントロールとしてカットオフ値を 0.18 (OD 405 nm 平均値プラス 3 標準偏差)と設定した。沖縄県のブタ血清 154 検体の測定を行った結果、32 検体(20.8%)が陽性となった。一方同検体をレプトスピラ症血清診断の標準法である MAT により抗体検出を行ったところ、12 検体(7.8%)でレプトスピラ抗体が検出された(カットオフ値 80 倍。陽性血清型 Castellonis; 6, Autumnalis; 3, Pyrogenes; 2, Poi; 1)。MAT の結果との比較により LigA-ELISA の有用性に関するインデックスを求めたところ、感度 33.3%、特異度 82.1%、陽性的中率 13%、陰性的中率 94.7%となった。

これまでレプトスピラに感染したヒト、イヌおよびウマ血清中に Lig タンパク質に対する抗体が検出されている。今回、ブタのレプ

トスピラ抗体の検出に LigA-ELISA を応用したが、これまでわれわれがヒトレプトスピラ症患者で行った LigA-ELISA の結果に比べて、感度および陽性的中率が非常に低いことが明らかとなった。本調査に用いたブタは、流産を起こしたブタ血清 15 検体を含むものの、レプトスピラ感染が確定している個体ではなく、健常個体の血清であるために、レプトスピラ感染が確定している患者や患畜での成績と単純に比較することはできないが、ブタの血清診断に用いにはやはり感度が低いことが問題であると考えられた。今後ブタでの簡便な血清診断法の開発のための新たな診断抗原の探索を行う必要がある。

4. 東京都引き取りおよび捕獲・収容犬のレプトスピラ保有状況

イヌはレプトスピラの保菌動物として知られており、愛玩動物として人との距離も近いこと、その感染実態を明らかにすることは非常に重要である。東京都動物愛護相談センターに引き取られた、あるいは捕獲・収容されたイヌ 110 匹の腎臓および 97 匹の尿からレプトスピラの分離を試みたが結果は陰性であった。また 127 匹の腎臓培養上清および 101 匹の尿からレプトスピラ遺伝子の検出も試みたがすべて陰性であった。今後さらに調査頭数を増やし、正確な保有状況を明らかにしていきたい。

学会発表

1. 小泉信夫, 新田芳樹, 渡辺治雄. レプトスピライムノグロブリン様タンパク質を抗原とした ELISA の有用性. レプトスピラシンポジウム, 石川, 2006 年.

表 1. 捕獲シカ, イノシシの *flaB*-PCR の結果

都道府県	動物	検体数	<i>flaB</i> -PCR 陽性数	<i>flaB</i> 塩基配列による 種の同定
北海道	シカ	4	1	<i>L. borgpetersenii</i>
岩手県	シカ	6	0	
栃木県	シカ	6	0	
千葉県	イノシシ	5	0	
静岡県	イノシシ	11	1	<i>L. interrogans</i>
長野県	シカ	4	0	
	イノシシ	3	0	
三重県	イノシシ	3	1	<i>L. interrogans</i>
兵庫県	シカ	2	0	
	イノシシ	1	0	
広島県	イノシシ	5	0	
島根県	イノシシ	5	1	<i>L. interrogans</i>
高知県	イノシシ	2	0	
大分県	シカ	3	0	
	イノシシ	2	0	
熊本県	シカ	3	0	
	イノシシ	5	3	<i>L. interrogans</i>
宮崎県	シカ	3	0	
鹿児島県	シカ	1	1	<i>L. borgpetersenii</i>
	イノシシ	3	1	<i>L. borgpetersenii</i>

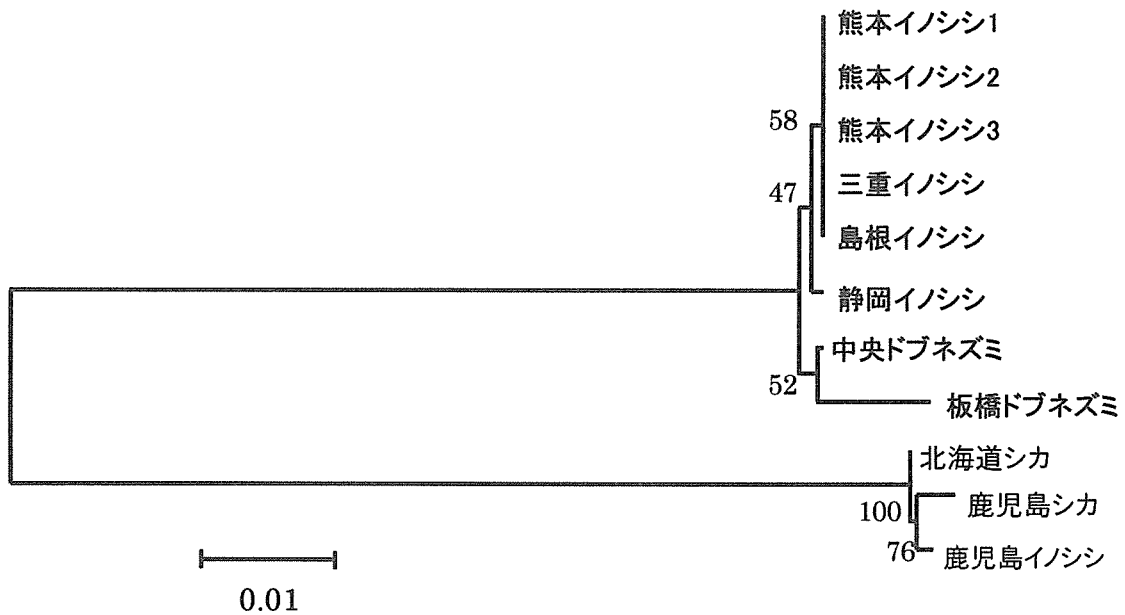


図 1. レプトスピラ *flaB* 部分塩基配列に基づく系統樹

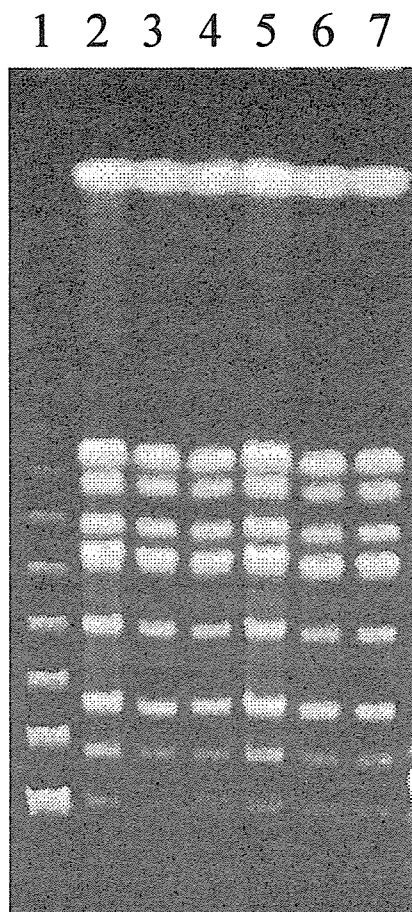


図 2. ドブネズミ分離株および血清型 Copenhageni, Icterohaemorrhagiae 標準株の *Not I* 切断パターン
 レーン 1; ラムダマーカー, 2; Icterohaemorrhagiae 標準株(RGA), 3; Copenhageni 標準株 (M20), 4; 中央区ドブネズミ分離株, 5; ひたちなか市分離株, 6; 銚子市分離株 3, 7; 銚子市分離株 8.

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

日本分離野兔病菌の PCR 法による簡易型別

分担研究者	棚林 清	国立感染症研究所	獣医科学部	室長
協力研究者	藤田 修	国立感染症研究所	獣医科学部	主任研究官
	堀田明豊	国立感染症研究所	獣医科学部	研究員
	宇田晶彦	国立感染症研究所	獣医科学部	研究員
	山本美江	国立感染症研究所	獣医科学部	研究員

研究要旨：野兔病菌 *Francisella tularensis* の亜種である *F. tularensis* subsp. *tularensis* (Type A) と *F. tularensis* subsp. *holarctica* (Type B) を簡易に鑑別できる ISFtu2 および PPI-helicase 遺伝子領域の PCR 法を用いて国内にて分離された 32 株について検討した。すべての菌株は、*F. tularensis* subsp. *holarctica* (Type B) であることが明らかとなり、日本国内に分布する野兔病菌は Type B であると考えられた。

A. 研究目的

野兔病の起原菌としては、野兔病菌 (*F. tularensis*) のうち、強病原性の *F. tularensis* subsp. *tularensis* (Type A) や、病原性がやや弱い subsp. *holarctica* (Type B) が主に分離されている。Type A は主に北米に分布し、一部ヨーロッパで少数分離されている。一方、Type B は北米、ヨーロッパ、日本を含むユーラシアに広く分布するとされている。これら 2 亜種はグリセロール発酵性の有無などの生化学的性状や分離地域などにより分類されてきた。しかしながら生化学性状試験は煩雑で時間を要するばかりでなく、本菌の増殖性は一般に遅く明瞭な反応を示さない場合がある。

また、抗原性はほぼ同一であり容易に区別することは困難である。近年ゲノム解析の結果、両亜種間で異なる領域が存在することが明らかになってきたことで、PCR 増幅断片のサイズを比較することで簡易に区別することができるようになった。

本邦において、野兔病は近年まれになった動物由来感染症であるが、過去には東北地方や関東地方で患者の発生があった。また、分離された野兔病菌は Type B であるとされてきたが、日本国内分離株の中には弱いながらグリセロール発酵性を示すものがあると報告があり型別には注意が必要となる。

本研究では日本国内で分離された多数の

野兎病菌について PCR 法を応用した簡易型別法による解析を実施し、日本国内に存在する野兎病菌が Type B であることを検証することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 供試菌株

1926 年から 1989 年に日本国内で、ヒトのリンパ節や潰瘍、ノウサギやヒミズ、およびダニから分離された野兎病菌 34 株を用いた (表 1)。また、Type A および type B の標準株として Schu 株、38 株および LVS 株を用いた。いずれもユーゴンチョコレート寒天培地にて増殖させ、ゲノム DNA を抽出した。いずれの菌株も大原総合病院大原研究所藤田博己博士より分与された。

(2) 型別 PCR Type B 株に存在する *ISFtu2* を含む領域を増幅するプライマーセットおよび Peptidyl-prolyl *trans*-isomerase and putative RNA helicase (*PPI-helicase*) 遺伝子領域を増幅するプライマーセットは報告にあった塩基配列を基にオリゴ DNA を合成して用いた (*ISFtu2*: Petersen *et al.* EID 10: 419-425, 2004、*PPI-helicase*: Goethert *et al.* JCM 42: 4968-4973, 2004)。PCR による DNA 断片の増幅反応は、1ng の抽出 DNA を鋳型に上述のプライマーセットおよび ExTaq ポリメラーゼを用い、94°C, 2 分間処理後、94°C, 30 秒、55°C, 30 秒、72°C, 60 秒で 35 サイクル、さらに 72°C, 5 分間反応させた。増幅 DNA は 1.5% または 2% アガロースゲルでの電気泳動に供した。

ISFtu2 領域の PCR 増幅断片は Type A で

は 390 塩基対、Type B では 1249 塩基対である。また、*PPI-helicase* 領域では Type A が 250 塩基対、Type B が 220 塩基対である。

B. 結果

(1) 標準菌株での型別 PCR

Type A 標準株である Schu および 38 株、Type B の LVS について *ISFtu2* および *PPI-helicase* 遺伝子領域の PCR により増幅された DNA 断片は Type A では 390 塩基対であるのに対して Type B では 1249 塩基対であり容易に区別することが出来た (図 1-A)。また、*PPI-helicase* 領域の PCR での増幅断片は、Type A で 30 塩基対だけ Type B より大きく両者間の鑑別が可能であった (図 1-B)。

(3) 日本分離株の型別

国内分離株 34 株について *ISFtu2* および *PPI-helicase* 遺伝子領域の PCR を実施し、アガロース電気泳動によりサイズを比較した。*ISFtu2* 領域ではすべての菌株で 1249 塩基対の増幅断片が観察され Type B と判定された (図 2)。また、*PPI-helicase* 領域の PCR ではすべてで 220 塩基対の増幅がみられ、Type B の野兎病菌であると判定された (図 3)。これらの結果から、日本で野兎病の原因となったのは type B の野兎病菌であり、これまで報告されているように日本国内には Type B の野兎病菌が分布していると考えられた。

C. 考察

野兎病菌の種・亜種・株の分類は、地理

的、生物学的あるいは生化学的特性により行われてきた。また、16SリボゾームRNA遺伝子、外膜蛋白質(*fopA*)または主要膜蛋白質(*tuI4*)遺伝子を対象としたPCR法による遺伝子検出法が開発され、検出や属種の同定は簡易にできるようになった。また、亜種の分類は生化学的性状により行われるがゲノムの解析が進展したことによりPCRを用いた簡易なType AとBの型別法が開発された。

本研究では、既報のプライマーセットを用いてIS*Ftu2*あるいは*PPI-helicase*の遺伝子領域のPCR型別を標準株で実施したところ容易に増幅バンドの差が判定できることがわかった(図2)。この方法を用いて日本国内で野兔病患者やノウサギなどの動物から分離された菌株34株について実施したところすべての菌株はType Bであると判定された(図2, 3)。

グリセロール発酵試験では判定までに時間を要することや、Type A菌で見られるグリセロール発酵試験陽性の性状がType Bとされる日本分離株の中には弱い反応を示すものがあることで判定に注意を要するが、今回実施したいずれの領域の型別PCRでは、明確に区別することができた。

国内野兔病患者はType B 野兔病菌に感染していたことが確認された。また、他の動物から分離された菌株も含め、調べた全株がType Bであったことから、これまで報告されてきたように日本国内にはType Bの野兔病が分布していると考えられる。今後、国内で野兔病が分離された場合、本法を応

用することにより迅速に型別することが可能である。しかしながら、Type Bの海外株との区別はできないし、同属の*F. novicida*はType A菌と区別できないなど、さらに詳細な分子疫学的手法での解析は必要となる。

D. 結論

野兔病菌 *Francisella tularensis* の亜種である *F. tularensis* subsp. *tularensis* (Type A) と *F. tularensis* subsp. *holarctica* (Type B) を簡易に鑑別できる IS*Ftu2* および *PPI-helicase* 遺伝子領域の PCR 法を用いて国内にて分離された 32 株について検討した。すべての菌株は、Type B であることが明らかとなり、これまでの報告のように日本国内には Type B の野兔病菌が分布していると考えられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

- 1) Fujita O., Tatsumi M., Tanabayashi K., Yamada A. Development of a real-time PCR for detection and quantification of *Francisella tularensis*. Jpn J Infect Dis, 59: 46-51 (2006)
- 2) Hotta A., Uda A., Fujita O., Tanabayashi K., and Yamada A. Preparation of Monoclonal Antibodies for Detection and Identification of *Francisella tularensis*. Clin Vaccine Immunol, 14: 81-84 (2007)

- 3) 棚林 清 野兔病 獣医感染症カラー
アトラス第2版 (見上彪 監修:105-106
文永堂出版 (2006)
- 4) 藤田 修、堀田明豊、棚林 清 野兔病
感染症週報第22週 : 15-18 (2006)
- 5) 堀田明豊、棚林 清 特集:家畜と野生
動物における人と動物の共通感染症 野兔
病 獣医畜産新報 56 : 644-648 (2006)

学会発表

- 1) Fujita O., Uda A., Hotta A., Okutani
A., Inoue S., Tanabayashi K., Yamada A.
Genotypic diversity of *Francisella*
tularensis subspecies *holarctica*
strains isolated in Japan. 5th
International Conference on Tularemia,
Wood Hole, MA, USA. Nov. 2006
- 2) Hotta A., Uda A., Fujita O.,
Tanabayashi K., Yamada A. Preparation of
monoclonal antibodies for detection and
identification of *Francisella*
tularensis. 5th International Conference
on Tularemia, Wood Hole, MA, USA. Nov.
2006
- 3) Tanabayashi K., Fujita O., Hotta A.,
Uda A., Yamada A. PCR based typing on the
Francisella tularensis isolated in Japan.
5th International Conference on Tularemia,
Wood Hole, MA, USA. Nov. 2006

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1: 本研究で用いた日本国内分離野兔病菌

No. Isolate	Year	Prefecture	Origin	No. Isolate	Year	Prefecture	Origin
1 Kato	1989	Yamagata	Human I. n.*	18 Himizu	1983	Fukushima	Jpn. shrew-mole
2 Yama	1957	Fukushima	Tick	19 TH	1954	Fukushima	Tick
3 Miura	1975	Miyagi	Human ulcer	20 Memoto	1960	Iwate	Human I. n.
4 Ebina	1950	Miyagi	Human I. n.	21 Jap	1926	Fukushima	Human I. n.
5 Ootake	1982	Miyagi	Tick	22 Tsuchiya	1958	Fukushima	Human I. n.
6 Yato107	1979	Fukushima	Hare	23 Yato11	1952	Chiba	Hare
7 Nikaido	1984	Fukushima	Human I. n.	24 Shinomura	1974	Iwate	Human ulcer
8 Sami	1980	Akita	Human I. n.	25 Kawamata	1964	Iwate	Human I. n.
9 Chiba	1980	Aomori	Human I. n.	26 Takahashi	1978	Akita	Human I. n.
10 Azumaya	1981	Akita	Human I. n.	27 Aichi	1979	Akita	Human I. n.
11 Kokuchi	1981	Yamagata	Human I. n.	28 Tateyama	1978	Aomori	Human I. n.
12 Mitsuo	1983	Miyagi	Human ulcer	29 TI	1954	Fukushima	Tick
13 Kikuchi	1982	Fukushima	Human I. n.	30 Ito	1984	Fukushima	Human ulcer
14 Suzushichi	1982	Yamagata	Human I. n.	31 Hitosu	1983	Miyagi	Human ulcer
15 Naomatsu	1968	Akita	Human I. n.	32 Murayama	1979	Yamagata	Human I. n.
16 Yato96	1968	Akita	Hare	33 Hashimoto	1951	Fukushima	Human I. n.
17 Oniwa	1954	Fukushima	Hare	34 Sashige	1971	Yamagata	Human I. n.

Human I. n.*: Human lymph node

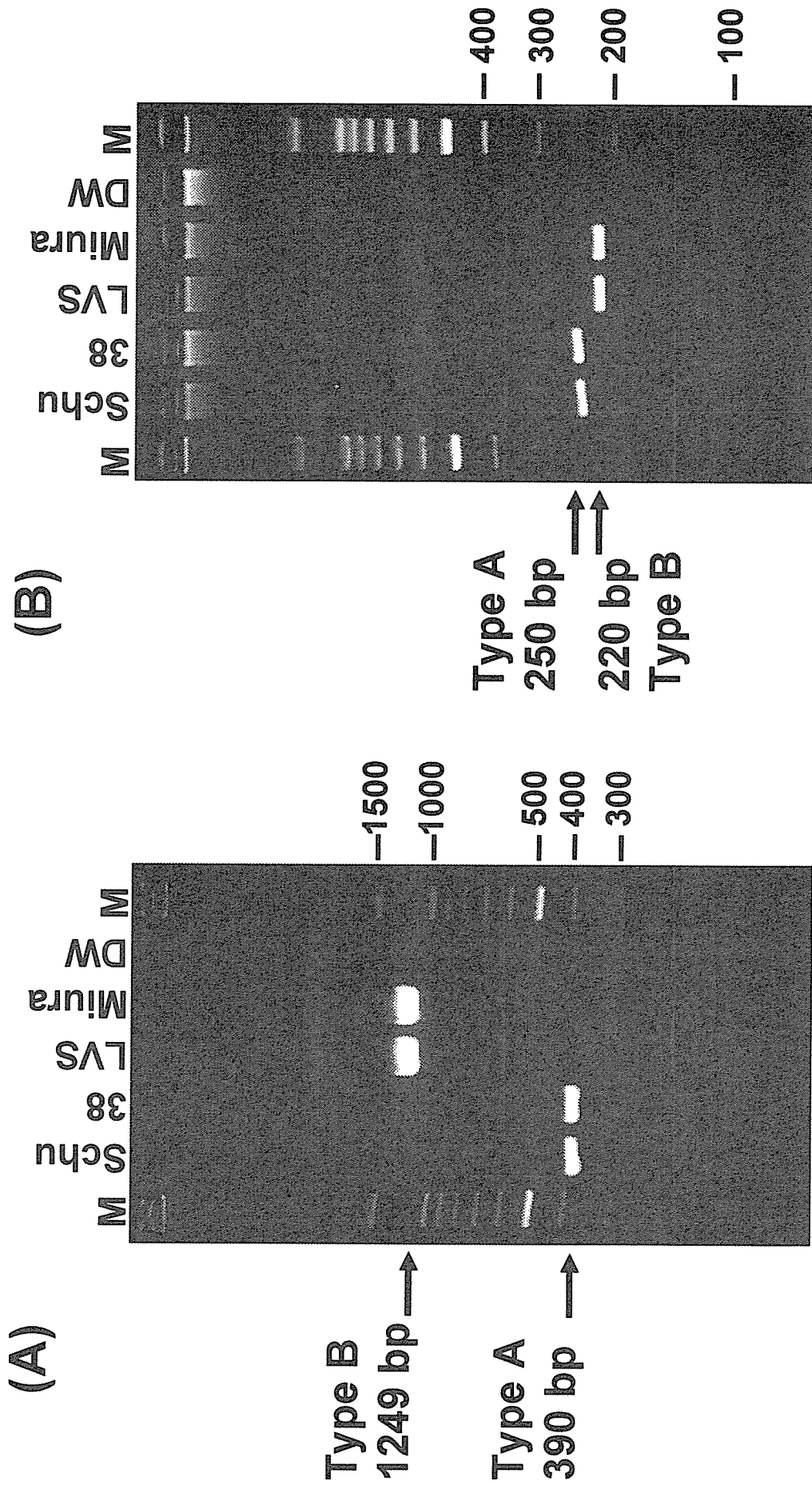


図 1：標準菌株におけるISFtu2 (panel A) 領域およびand PPI-helicase (panel B) のPCR産物の電気泳動像。

Schuおよび38はtype A。LVSはtype B。Miuraは日本国内分離株。
 DW：陰性コントロール lane M：DNAサイズマーカー

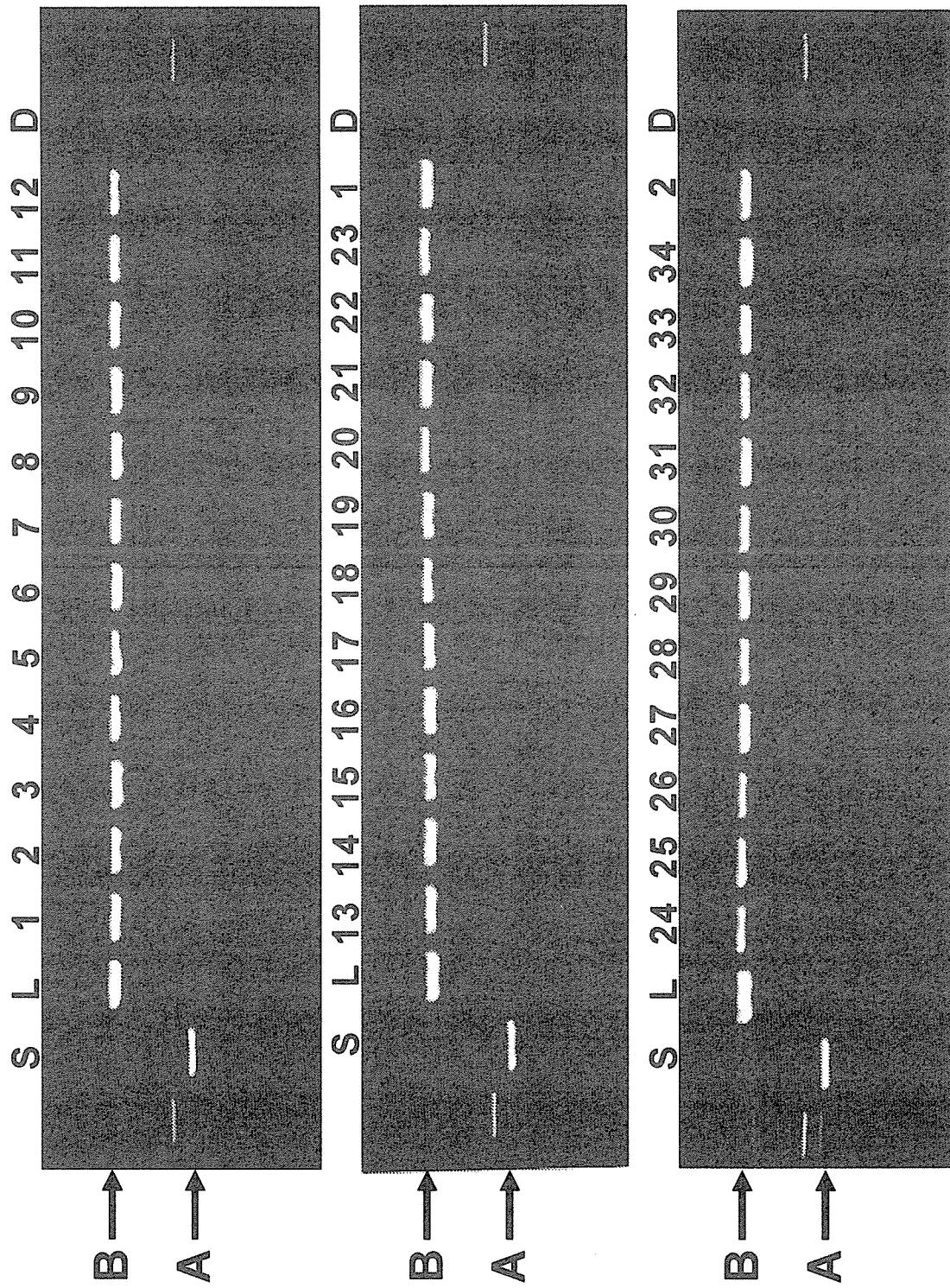


図2：日本分離菌株におけるIS*Ftu2*領域のPCR増幅DNA断片の電気泳動像
 各レーンの番号は表1の分離菌株の番号を示す。
 レーンS, Schu; レーンL, LVS; レーンD, 蒸留水

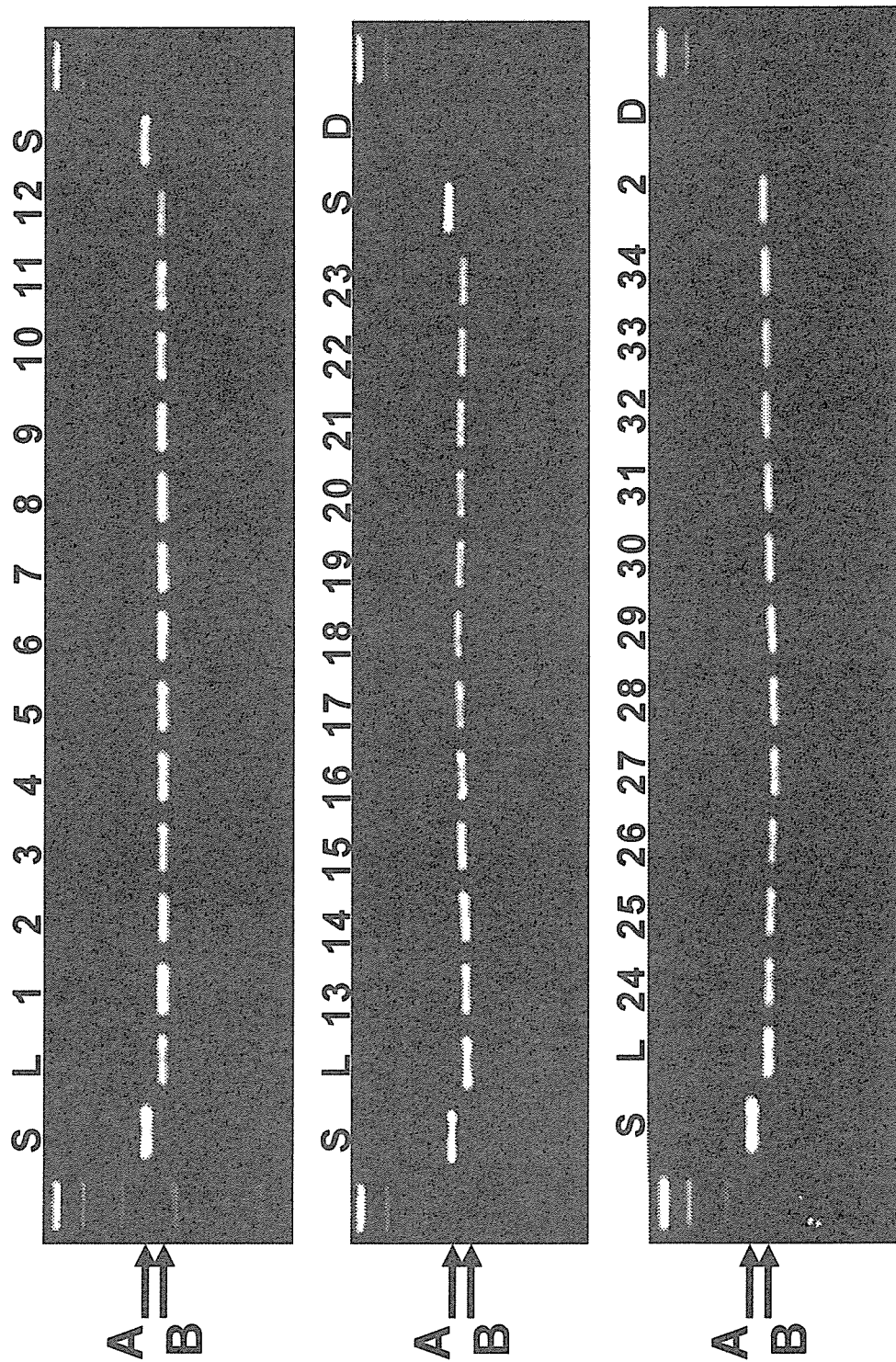


図3：日本分離菌株における*PPI-heLicase*領域のPCR増幅DNA断片の電気泳動像
 各レーンの番号は表1の分離菌株の番号を示す。
 レーンS, Schu; レーンL, LVS; レーンD, 蒸留水

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

国内生息野生動物における野兎病の血清抗体調査

分担研究者	堀田明豊	国立感染症研究所	獣医科学部	研究員
協力研究者	藤田 修	国立感染症研究所	獣医科学部	主任研究官
	宇田晶彦	国立感染症研究所	獣医科学部	研究員
	山本美江	国立感染症研究所	獣医科学部	研究員
	棚林 清	国立感染症研究所	獣医科学部	室長

研究要旨：動物由来感染症である野兎病の起因菌、*Francisella tularensis* のヒトへの感染源はノウサギを主とする野生動物である。しかし国内生息の野生動物の *F. tularensis* 感染状況は明らかでない。本研究では採血用濾紙を用い、ノウサギの血液検体を収集し、抗 *F. tularensis* 抗体の検出を試みた。また分与された野生ラットおよびツキノワグマの血清についても同様の検査をした。酵素抗体法または微量凝集試験によるスクリーニングにて、ノウサギ検体 123 例中 4 例、野生ラット検体 97 例中 2 例、ツキノワグマ検体 62 例中 14 例が陽性とされた。これら陽性であった 20 例中ツキノワグマ由来の 4 例はウエスタンプロット法において *F. tularensis* 特異的抗原であるリポ多糖体に強く反応した。これらのツキノワグマは過去に *F. tularensis* に感染した可能性が示唆され、現在も国内の野生動物に *F. tularensis* が分布すると推された。さらに動物種や数を増やして調査する必要がある。

A. 研究目的

Francisella tularensis は動物由来感染症のひとつ、野兎病の起因菌である。近年日本では野兎病の発生報告は無いが、過去には東北地方を中心に多数発生していた。感染源はノウサギやダニを主とする野生動物とされている。現在国内に生息する野生動物の *F. tularensis* 感染状況は明らかでない。感染源となる動物の疫学調査は野兎病の動向や *F. tularensis*

の感染環の解明に重要である。

本研究では国内生息の野生動物の *F. tularensis* 感染状況を明らかにする目的で、社団法人大日本猟友会の協力により得られた野生ノウサギの血液検体や、分与された野生ラットおよびツキノワグマの血清などの野生動物由来血液から抗 *F. tularensis* 抗体の検出を試みた。

B. 研究方法

(1) 野生ノウサギの血液の収集

ノウサギの血液検体は（社）大日本猟友会の協力者より郵送されたノウサギの血液を吸収させた採血用濾紙（東洋濾紙）123片（青森、秋田、岩手、山形、福島、新潟、高知、宮崎および鹿児島）の9県由来）から得た（表1）。これらノウサギは協力者により狩猟または害獣駆除目的で2005年2月から4月、2005年12月から2006年4月に捕殺された。全ノウサギ個体に著変は無かったとされている。

(2) 野生ノウサギ血液抽出液の回収

採血用濾紙の血液吸収部を1.5 ml チューブに入れ、800 μ l の0.1% Tween 20 加リン酸緩衝液（PBS）（PBST）にて4℃にて浸漬し、血液成分を抽出した。濾紙片を除去後、12,000 rpm にて5分遠心し、その上清を20倍希釈血液抽出液として-80℃に保存した。

(3) 他の野生動物血清検体

野生ラット（ドブネズミ 89例およびクマネズミ 8例）97例（2000～2002年、北海道由来）は北海道大学荻和博士に分与された。ツキノワグマ 62血清（1999～2005年、岩手県由来）は岩手大学青木博士より分与された（表2）。

(4) 抗原

Francisella tularensis 日本分離株の Yama 株、*Francisella novicida* U112 株および *Francisella philomiragia* の 029 株は財団法人大原総合病院付属大原研究所藤田博士より分与された。

Brucella canis、*Brucella melitensis*、*Brucella suis* および *Yersinia enterocolitica* 抗原は国立感染症研究所今岡博士より分与された。*Haemophilus influenzae*、*Klebsiella pneumoniae*、*Pasteurella aerogenes* および *Escherichia coli* は本研究室所有の購入株である。

F. tularensis はユーゴンチョコレート寒天培地で37℃、3日間培養後、1%フォルマリンにて不活化した。リポ多糖体（LPS）の精製には LPS Extraction Kit（iNtRON BIOTECHNOLOGY）を用いた。対照精製 LPS として大腸菌 O26 由来 LPS（Wako）を用いた。

(5) 酵素抗体法（ELISA）

全検体についてスクリーニング検査として ELISA を行った。不活化菌懸濁液（OD_{600nm} = 2.5）を PBS で 20 倍希釈し、ELISA 用 96 穴平底マイクロプレート各穴に 100 μ l を分注し、37℃にて16時間吸着させた。PBSTにて洗浄後、3%スキムミルク（雪印）含有 PBST にて1時間ブロッキングした。ノウサギ血液抽出液については20倍希釈液を最終希釈50、100および200倍として、ラットおよびクマ血清については100、200および400倍に希釈して37℃にて1時間感作させた後、洗浄して二次抗体を37℃にて1時間反応させた。二次抗体として、ノウサギ検体にはペルオキシダーゼ標識抗ノウサギ IgG 抗体（Zymed）、

ラット血清にはペルオキシダーゼ標識抗ラット IgG 抗体 (Santa Cruz Bio)、クマ血清にはペルオキシダーゼ標識プロテイン A (Pierce) を用いた。発色は 2,2'-アジノージ (3-エチルベンゾチアゾリン-6-サルファネート) 用い、吸光度 (OD 405nm) を測定した。陰性対照として正常ウサギ血清または正常ラット血清 (Pierce) を用いた。

(6) 微量凝集試験 (MA)

OD₆₀₀ 値 1.0 に調製した不活化菌懸濁液をサフラニンで着色し抗原液とした。96 穴丸底マイクロプレートにて抗原液と血清希釈液を各 25 μ l 混合、攪拌し、37 $^{\circ}$ C に静置した。16 時間後に凝集像が認められた検体を陽性とした。

(6) ウエスタンブロット (WB)

F. tularensis 全菌体抗原または精製 LPS を Laemmli サンプルバッファー (Bio-Rad) 中にて煮沸処理し、12.5% のポリアクリルアミドゲル (ATTO) で電気泳動後、PVDF メンブランに転写した。ブロッキング後、400 倍希釈した血液抽出液または 1000 倍希釈した血清と反応させた。二次抗体は ELISA と同様に反応させ、DAB によって発色した。

C. 結果

(1) ELISA

全検体が示した OD 値の 2 倍以上の OD 値を示した検体を陽性とした。ノウサギ血液抽出液を測定したところ、123

例中 6 例を陽性と判定した。野生ラット血清では 97 例中 2 例、クマ血清では 62 例中 7 例が他検体と比較して有意に高い反応を呈した (表 3)。

(2) MA

クマ血清 62 例中、容量十分で混濁が無い 48 例を MA に供した。40 倍希釈以上で凝集像を呈した 2 例を陽性とした。陽性検体の凝集価はそれぞれ 40 倍が 1 例、80 倍が 1 例であった (表 3)。

(3) WB

ELISA または MA にて陽性と判定された検体について精製 LPS に対する反応を WB により検出した。ツキノワグマの 4 例は LPS 特異的な梯子状バンドを呈した (表 3 および図 1)。

(4) 他菌種との反応

WB にて陽性と判定された検体について *F. tularensis* 以外の 10 菌種との反応を ELISA により検査した。ツキノワグマ血清 4 例は非 *F. tularensis* 株の 10 菌株および大腸菌 O26 由来精製 LPS との強い反応は認められなかった。

D. 考察

山間部に生息する野生動物のサンプル収集は非常に困難である。本研究ではノウサギ捕獲経験者に簡便に血液を採取し輸送できる事を目的に、採血用濾紙を用いた。

(社) 大日本猟友会会員の協力により本法にて野生ノウサギ 123 羽分の血液検体を得られた。また体表に付着していたダニ 561

匹を60羽のノウサギから収集できた。これらは今後、野生動物に潜む病原体の検索に有用な試料と成り得る。

ヒトの野兎病の血清診断は多くはMAによって行われる。また近年では同時にWBによる*F. tularensis* のLPSに対する反応を確認している報告が多い。動物における野兎病の血清抗体調査はヒトの血清診断と同様に行われている。しかしMAは感度が低い、不純物を含む検体では凝集像の判定が困難などの問題点もある。今回用いた検体のうち、ノウサギ検体は血液抽出液であり、ラット血清は容量が少なかった。また一部のクマ血清は溶血していた。このため、スクリーニングにMAおよびELISAを用いた。スクリーニングにて陽性と判定された20検体のうち、クマ由来4例（全てELISA陽性、MA力価は80、40、20および10倍）は*F. tularensis* 精製LPSと強く反応し、特徴的な梯子状バンドを呈した。またこれら陽性検体4例は大腸菌由来LPSや他の菌種に反応しなかった。これらの結果はヒトの血清診断基準においても野兎病と診断されうる。このためこれら検体の由来のクマは過去に*F. tularensis* 感染歴があったと考えられた。

ノウサギおよびラットについては明確な陽性例が認められなかった。スクリーニングにて陽性と判定された6例はLPSに反応しなかった。このためこれら検体のELISAにおける反応は交差反応や非特異反応である可能性がある。それら検体の由来地域に

従来の野兎病発生地域でない高知も含まれることから、今後はリケッチアなど他の菌との反応を検査する必要がある。また動物種による免疫応答の相異に関わる可能性があるため、各動物種への実験感染も必要と思われる。

ノウサギは日本における野兎病の主な感染源である。大原らは過去に野生ノウサギから菌分離を試み、外見上健全なノウサギ97羽のうち2羽から*F. tularensis*を分離している。今回はノウサギ123羽の血液から抗体検出を試みたが陽性される個体は認められなかった。これはノウサギの自然界での寿命が1-3年と短いこと、*F. tularensis* に対し非常に感受性が高く、感染すると多くは斃死することなどが原因として考えられる。今後は同時に収集されたノウサギの体表付着ダニからの*F. tularensis* 遺伝子検出を進めたい。

ラット類は*F. tularensis*に対し感受性が低く、感染しても症状が現れるが回復するとされている。ロシアやヨーロッパでは野兎病の感染源として注意されている。近年のブルガリアにおける野兎病流行時にも感染源として調査され、22%がPCR陽性であった（Christova & Gladnishka, 2005）。今回供試したラット検体は主に北海道の港湾施設で捕獲された個体由来であった。北海道における野兎病の発生報告は数例のみだが、ロシアなどから迷入したラット類も含まれる可能性がある。今回、陽性検体は認められなかったが今後も継続的

に調査したい。

クマは日本で最大の哺乳類で自然界における寿命は25年程度である。これまで国内でクマが感染源として疑われたヒトの野兔病が6例で報告されている（大原ら）。一般的には*F. tularensis* に抵抗性があり、感染するが症状が現れることは少ないと考えられている。今回陽性となったクマは全て岩手県由来で1999から2003年に捕獲されたクマであるが、詳細なデータは不明である。ツキノワグマは本州全域および四国に生息している。近年は各地で害獣駆除の目的で多数の個体が捕殺されているが、これらの血清抗体調査は国内の野生動物における*F. tularensis* の分布の指標になり得るだろう。

これまで野生動物における野兔病の血清抗体調査はアメリカやヨーロッパでいくつか報告されている。アメリカでは陽性率10%以上の報告が多く、特にクマ類では30%以上と非常に高い。一方ヨーロッパではノウサギ、ヤマネコ、イノシシなどで調査されているが、陽性率は8%未満である。今回の結果、日本の野生動物の陽性率は非常に低く、ヨーロッパの野生動物の感染状況に近く、アメリカのそれとは大きく異なると考えられた。これらの相異の原因はそれぞれの地域に分布する菌株や、生息する動物種の相異に起因することも考えられる。

Mayer (1958) はある地域のゲツ歯類の1%以上が*F. tularensis* に感染しないと通

常ヒトの野兔病の発生はないとしている。

近年国内では野兔病の発生はないこと、供試検体数が少なかったことなどのため、不明な点が多く残るが、野生動物には現在も*F. tularensis* が存在すると考えられた。今後詳細を解析するため、陽性検体が得られた地域を重点的に、非健常なノウサギ等の存在の有無等の調査、土や水などの環境物質からの*F. tularensis* の菌分離や遺伝子検出など、生物学的ならびに分子生物学的な研究も必要である。またツキノワグマが動物の屍体を食す習性があることから、同様にノウサギを食す猛禽類の血清抗体調査も興味深い。今後も継続的な研究を行なう事はヒトおよび野生動物における*F. tularensis* の感染状況の把握、感染環などの解明に役立つと思われる。

E. 結論

ノウサギを主とした日本生息の野生動物の血液検体 282 例を検査した結果、4 個体のツキノワグマが過去に *F. tularensis* に感染したと考えられた。このことから野外には *F. tularensis* に感染した動物が存在すると考えられ、野兔病の感染源になる得ると推された。更に広範囲の地域の動物の血清調査を行い、*F. tularensis* の感染状況や感染環などを解析したい。これらのデータは国内の野兔病対策に有効である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

誌上発表

1) Fujita O., Tatsumi M., Tanabayashi K., Yamada A. Development of a real-time PCR for detection and quantification of *Francisella tularensis*. Jpn J Infect Dis, 59: 46-51(2006)

2) Hotta A., Uda A., Fujita O., Tanabayashi K., and Yamada A. Preparation of Monoclonal Antibodies for Detection and Identification of *Francisella tularensis*. Clin Vaccine Immunol, 14: 81-84 (2007)

3) 棚林 清 野兎病 獣医感染症カラーアトラス第2版 (見上彪 監修) 文永堂出版 (2006)

4) 藤田 修、堀田明豊、棚林 清 野兎病 感染症週報第 22 週 : 15-18 (2006)

5) 堀田明豊、棚林 清 特集 : 家畜と野生動物における人と動物の共通感染症 野兎病 獣医畜産新報 56 : 644-648 (2006)

学会発表

1) Fujita O., Uda A., Hotta A., Okutani A., Inoue S., Tanabayashi K., Yamada A. Genotypic diversity of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* strains isolated in Japan. 5th International Conference on Tularemia, Wood Hole, MA, USA. Nov. 2006

2) Hotta A., Uda A., Fujita O., Tanabayashi K., Yamada A. Preparation of monoclonal antibodies for detection and identification of *Francisella tularensis*. 5th International Conference on Tularemia, Wood Hole, MA, USA. Nov. 2006

3) Tanabayashi K., Fujita O., Hotta A., Uda A., Yamada A. PCR based typing on the *Francisella tularensis* isolated in Japan. 5th International Conference on Tularemia, Wood Hole, MA, USA. Nov. 2006

4) 藤田 修、バイオセーフティの観点から見た病原細菌－野兎病、第6回日本バイオセーフティ学会学術集会、11月、2006

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 猟友会の協力のもと収集されたノウサギの血液および体表付着ダニ

地域	04年度				05年度				計
	体表付着ダニ		血液		体表付着ダニ		血液		
	ダニ	宿主*	ダニ	宿主	ダニ	宿主	ダニ	宿主	
青森	-	-	10	0	0	0	10	0	0
秋田	13	3	8	1	1	1	21	4	3
岩手	-	-	11	0	0	0	11	0	0
山形	-	-	12	0	0	0	12	0	0
福島	-	-	8	0	0	0	8	0	0
新潟	19	174	16	112	15	15	35	286	34
高知	-	-	12	138	10	10	12	138	10
宮崎	-	-	3	9	2	2	3	9	2
鹿児島	-	-	11	70	11	11	11	70	11
計	32	177	21	91	330	39	123	507	60

*: ダニが採取されたノウサギの数を示す