

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 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、*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(*tu14*)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 l. 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 l. n.
4 Ebina	1950	Miyagi	Human l. n.	21 Jap	1926	Fukushima	Human l. n.
5 Ootake	1982	Miyagi	Tick	22 Tsuchiya	1958	Fukushima	Human l. n.
6 Yato107	1979	Fukushima	Hare	23 Yato11	1952	Chiba	Hare
7 Nikaido	1984	Fukushima	Human l. n.	24 Shinomura	1974	Iwate	Human ulcer
8 Sami	1980	Akita	Human l. n.	25 Kawamata	1964	Iwate	Human l. n.
9 Chiba	1980	Aomori	Human l. n.	26 Takahashi	1978	Akita	Human l. n.
10 Azumaya	1981	Akita	Human l. n.	27 Aichi	1979	Akita	Human l. n.
11 Kokuchi	1981	Yamagata	Human l. n.	28 Tateyama	1978	Aomori	Human l. n.
12 Mitsuo	1983	Miyagi	Human ulcer	29 TI	1954	Fukushima	Tick
13 Kikuchi	1982	Fukushima	Human l. n.	30 Ito	1984	Fukushima	Human ulcer
14 Suzushichi	1982	Yamagata	Human l. n.	31 Hitosu	1983	Miyagi	Human ulcer
15 Naomatsu	1968	Akita	Human l. n.	32 Murayama	1979	Yamagata	Human l. n.
16 Yato96	1968	Akita	Hare	33 Hashimoto	1951	Fukushima	Human l. n.
17 Oniwa	1954	Fukushima	Hare	34 Sashige	1971	Yamagata	Human l. n.

Human l. n.*: Human lymph node

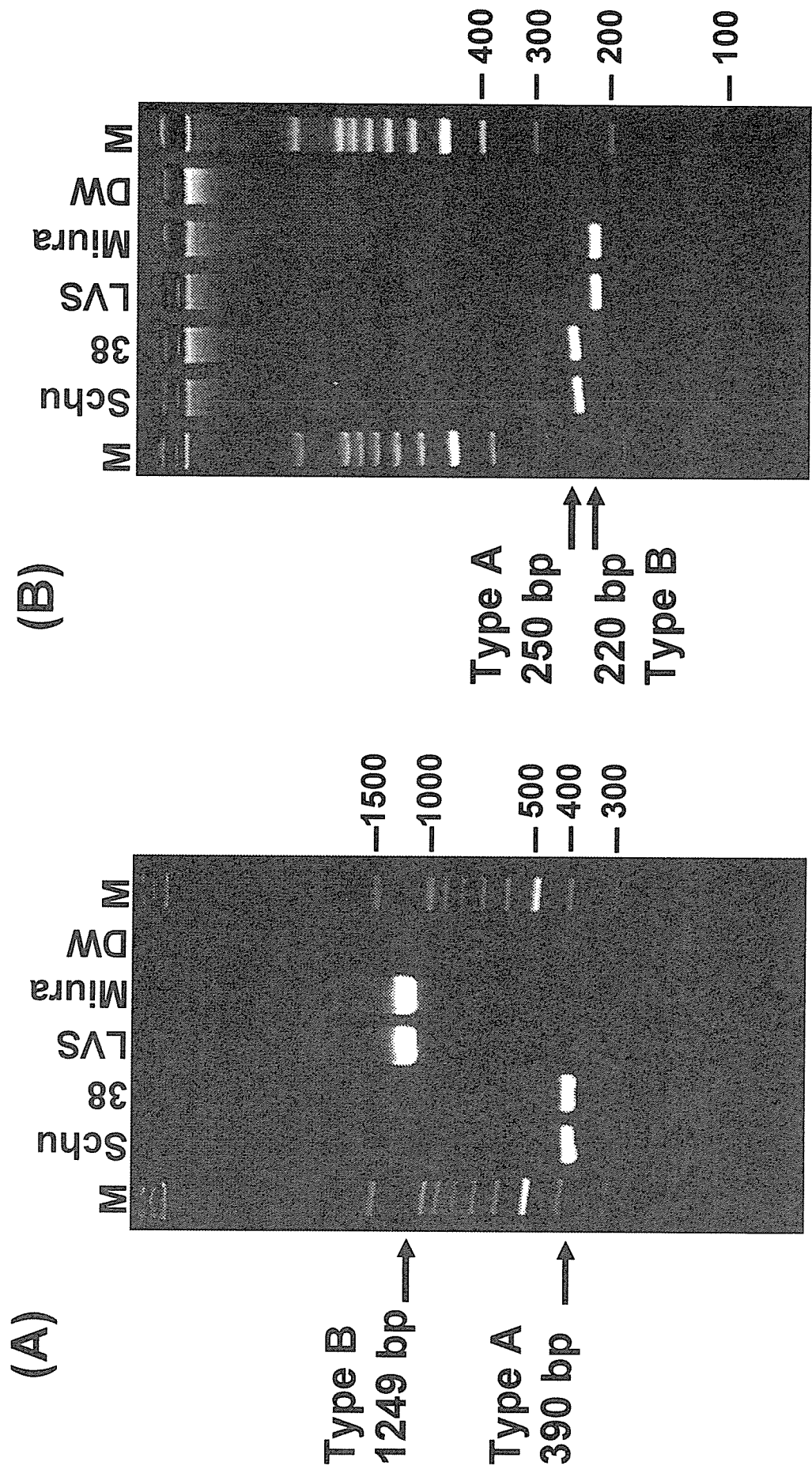


図 1 : 標準菌株における ISFtu2 (panel A) 領域および PPI-helicase (panel B) の PCR 産物の電気泳動像。

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 サイゼマーカー

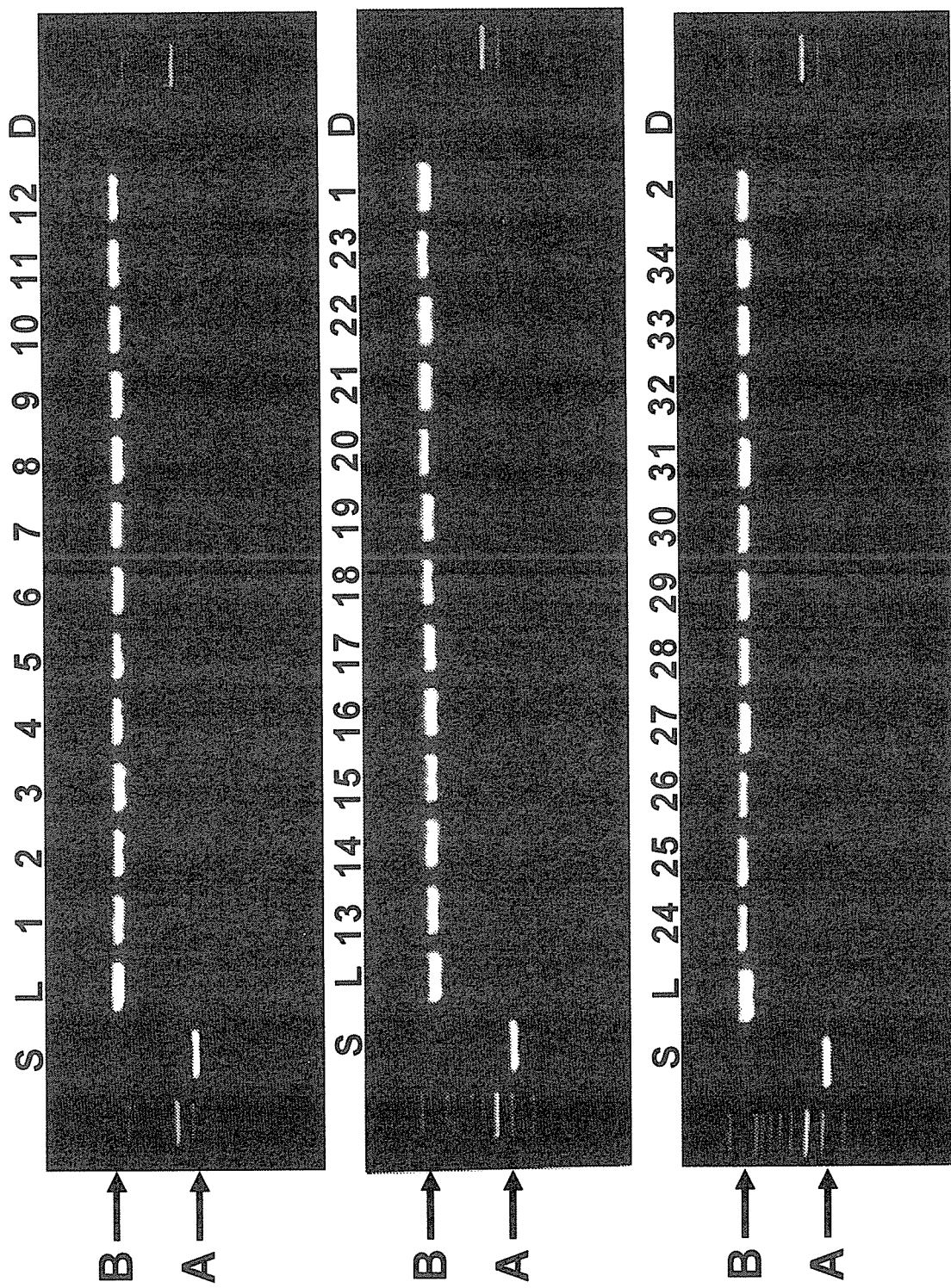


図2：日本分離菌株におけるISFtu2領域のPCR増幅DNA断片の電気泳動像
 各レーンの番号は表1の分離菌株の番号を示す。
 レーンS, Schu; レーンL, LVS; レーンD, 蒸留水

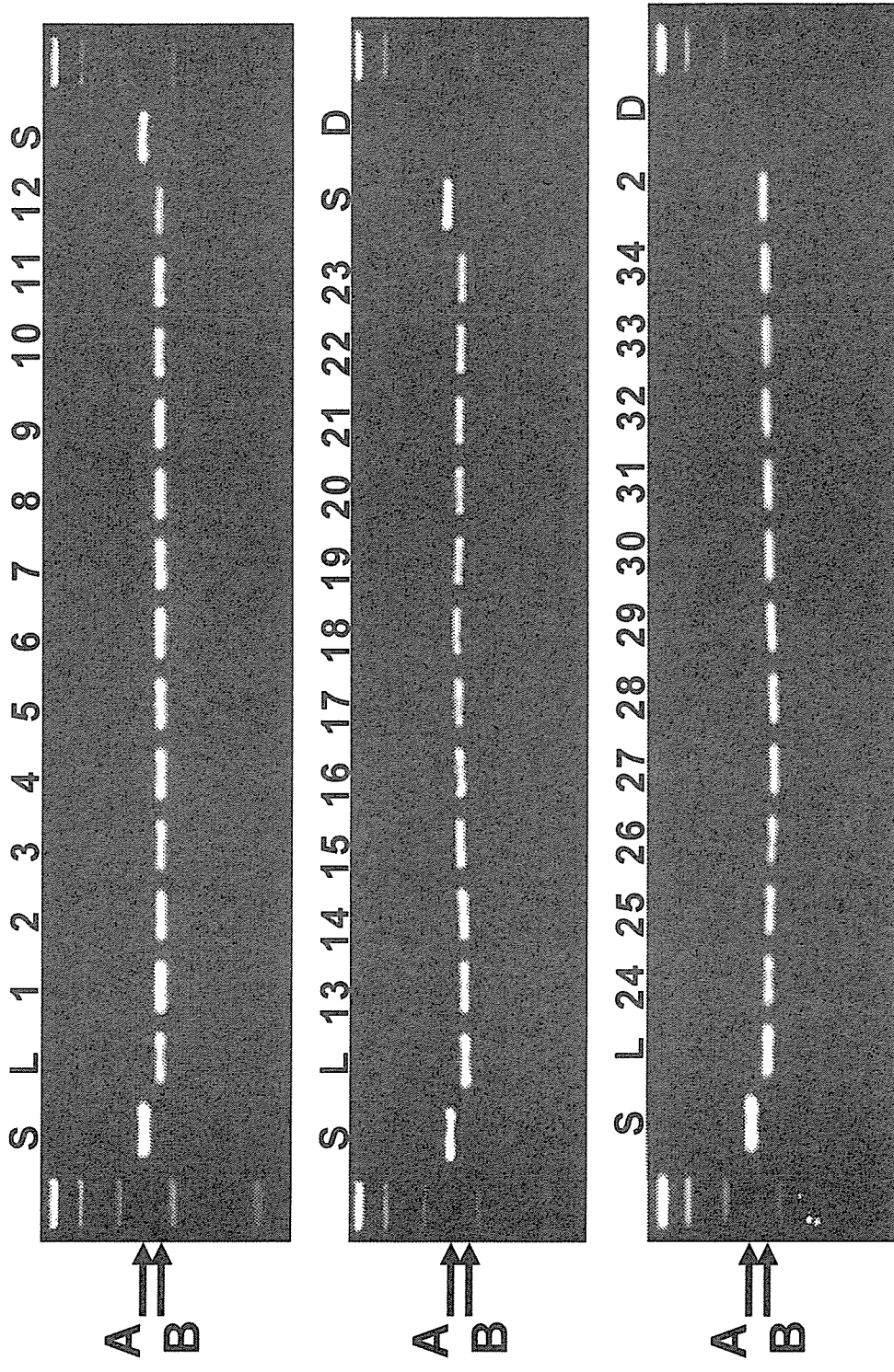


図3：日本分離菌株における*PPI-helicase*領域のPCR増幅DNA断片の電気泳動像
 各レーンの番号は表1の分離菌株の番号を示す。
 レーンS, Schu; レーンL, LVS; レーンD, 蒸留水

分担研究報告書

国内生息野生動物における野兔病の血清抗体調査

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兔病の起因菌、*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、野兔病の起因菌である。近年日本では野兔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兔病の動向や *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附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-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°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が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、そ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附着ダニ

地域	04年度				05年度				計
	血液		体表附着ダニ		血液		体表附着ダニ		
	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	2	8	1	1	21	4	3
岩手	-	-	-	11	0	0	11	0	0
山形	-	-	-	12	0	0	12	0	0
福島	-	-	-	8	0	0	8	0	0
新潟	19	174	19	16	112	15	35	286	34
高知	-	-	-	12	138	10	12	138	10
宮崎	-	-	-	3	9	2	3	9	2
鹿児島	-	-	-	11	70	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

表2 抗体調査に供試した検体

捕獲地	動物種			計	地域別 計
	ウサギ	ラット	クマ		
北海道	0	97	0	97	97
青森	10	0	0	10	
秋田	21	0	0	21	
岩手	11	0	62	73	159
山形	12	0	0	12	
福島	8	0	0	8	
新潟	35	0	0	35	
高知	12	0	0	12	
宮崎	3	0	0	3	26
鹿児島	11	0	0	11	
計	123	97	62	282	282

ウサギ : *Lepus brachyurus*

ラット : *Rattus norvegicus* および *Rattus rattus*

クマ : *Ursus thibetanus japonicus*

表3 各種動物における抗体調査結果

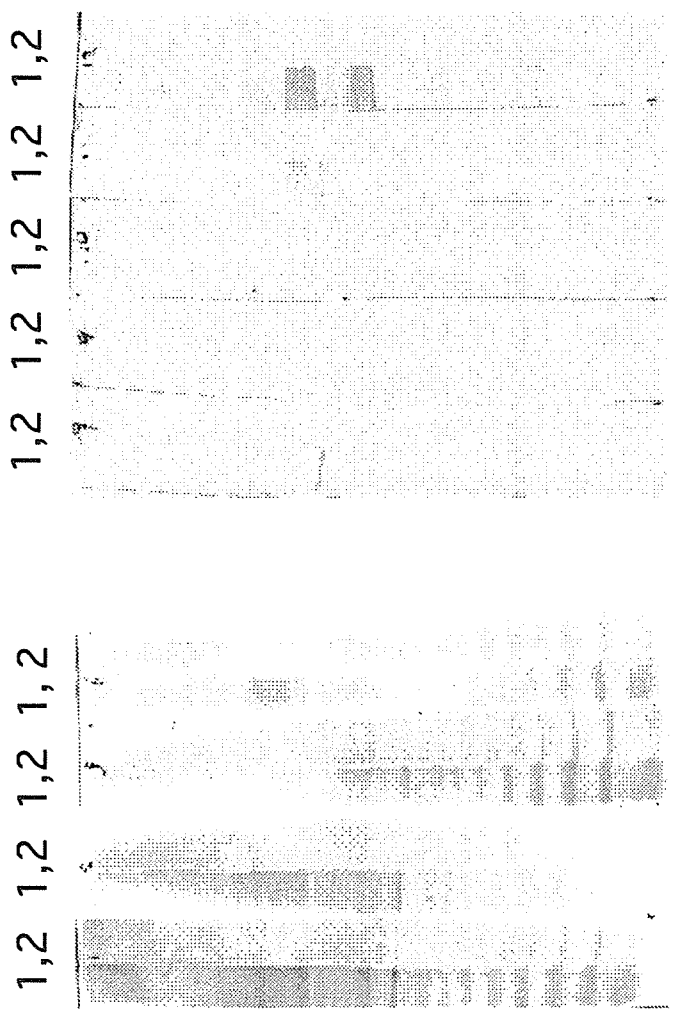
動物種	由来 地域	スクリーニング (陽性数/検体数)				WB	判定		
		ELISA		MA	判定				
ウサギ	青森	0	10	NT	0	10	0	0	
	秋田	0	21	NT	0	21	0	0	
	岩手	0	11	NT	0	11	0	0	
	山形	0	12	NT	0	12	0	0	
	福島	2	8	NT	2	8	0	0	
	新潟	3	35	NT	3	35	0	0	
	高知	1	12	NT	1	12	0	0	
	宮崎	0	3	NT	0	3	0	0	
	鹿児島	0	11	NT	0	11	0	0	
	小計	6	123	NT	6	123	0	0	
ラット	北海道	3	97	NT	3	97	0	0	
クマ	岩手	7	62	2	48	7	62	4	4

ELISA : 平均+2SD以上のOD値を示した検体を陽性とした。

MA : 凝集力価40倍以上を陽性とした。

WB: 精製LPSを抗原とした

NT: not tested



判定 + + + + + - - - - -
 クマ血清 (1000倍希釈) ウサギ血液 (100倍希釈)
 レーン1: *F. tularensis* 全菌体
 レーン2: *F. tularensis* 精製LPS

野生動物検体のウエスタンブロット像の一例

使用検体は全てスクリーニングにて陽性と判定された検体
 クマ検体は一樣にLPS様梯子状バンドを呈したが、ウサギ検体の反応は多様であった。

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

野兎病菌の亜種および株鑑別に有用な遺伝子マーカーの検討(続報)

分担研究者 藤田 修 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官

協力研究者 棚林 清 国立感染症研究所 獣医科学部 室長

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:野兎病の起因菌である *Francisella tularensis* の亜種や菌株の鑑別に有用な遺伝子マーカーの検討を行った。*F. tularensis* subsp. *holarctica* のゲノム DNA に存在する縦列反復配列構造を含む8領域について国内外由来の菌株を解析した結果、Ft-V2 と Ft-V4 の両領域で国内外由来株間に繰返し回数(アリアル数)や塩基配列に特徴があり、さらに Ft-M2 と Ft-M20 の2領域を併せて解析することで、国内株間での鑑別が可能となり、これらの領域は株の鑑別に有用な遺伝子マーカーになりうることを示唆された。

A. 研究目的

野兎病の起因菌として、野兎病菌(*F. tularensis*)のうち、主に北米に分布する強病原性の *F. tularensis* subsp. *tularensis* とユーラシア大陸から北米にかけて広く分布する病原性がやや弱い subsp. *holarctica* が主に分離されている。近年、国内の野兎病の発生は極めて稀だが、今後国内で野兎病菌が検出された場合、その感染源や感染経路を明らかにするために分離菌の亜種の鑑別や株の鑑別は、感染症対策のための疫学情報として重要である。我々は、国

内で分離された野兎病菌(subsp. *holarctica*)のゲノム DNA に存在する縦列反復配列(tandem repeat)領域の解析を行い、このうち2領域(Ft-V2 と Ft-V4)が国内外由来株間の鑑別に有用な遺伝子マーカーである事を報告した。

本研究では、さらに多くの *F. tularensis* subsp. *holarctica* の国内外分離株を解析し、国内株の遺伝子配列構造の特徴を調べ、また国内の分離株間の鑑別に有用な遺伝子マーカーの検討を行った。

B. 研究方法

Farlow ら(2001)が報告した縦列反復配列を含む 6 領域に加え、Johansson ら(2004)が報告した野兎病菌ゲノム DNA に存在する縦列反復配列の新たな 2 領域(Ft-M2 と Ft-M20)の計 8 領域を検討した。

国内外由来の subsp. *holarctica* 44 株(33 国内分離株と 11 海外株)について PCR 増幅とその塩基配列の解析を行い、各領域での国内株の配列の特徴を調べ、さらにこれらを外国株での結果と比較し、国内外株間および国内株間の区別に有用な領域を選択した。

C. 結果

解析した 8 箇所の縦列反復配列領域のうち 4 領域では、国内株と海外株のいずれにおいてもほぼ同じ繰返し配列数を有しており明瞭な差は認められなかった。一方、Ft-V2、Ft-V4、Ft-M2 と Ft-M20 の 4 領域において国内株と海外株間にそれぞれ特徴的な縦列反復配列構造が認められた(表 1)。

即ち、Ft-V2、Ft-M2 と Ft-M20 領域において海外株では各々 2 回、2 回および 3-4 回とほぼ均一の構造であったが、国内株間では 2-22(アリアル数:15)回、2-24(14)回および 3-18(9)回と変化に富んだ縦列反復配列構造を示した。

一方、Ft-V4 領域では、国内株の 2 株

(Kokuchi 株と Aichi 株)を除く全てが 3 回の縦列反復配列とほぼ均一構造だったのに対し、海外株で 10-21 回(アリアル数:8)の縦列反復配列と変化に富み、国内株とは明瞭な差が認められた。Ft-V4 の縦列反復配列は 3 アミノ酸残基(Asn-Lys-Asp)をコードしており、その塩基配列には異なるモチーフがある。塩基配列の解析の結果、ほとんどの国内分離株はモチーフ A (AACAAAGAC) が 1、モチーフ C (AATAAGGAT) が 2 の計 3 回の縦列反復配列だったのに対し、反復配列数が異なった Kokuchi 株ではモチーフ A が 4、モチーフ C が 13 の計 17 回、Aichi 株ではモチーフ A が 5、モチーフ C が 21 の合計 26 回の縦列反復配列だった。但し、同じ縦列反復配列数を有する海外株からこれらのモチーフの組合せ配列構造は認められなかった。

解析した 8 領域での全縦列反復配列数を基に平均距離法(UPGMA)を用いて系統樹を作成した(図 1)。その結果、国内株と Kokuchi 株と Aichi 株を含む海外株が各々異なるクラスターを形成していた。

D. 考察

野兎病菌の種・亜種・株の分類は、これまで地理的、生物学的あるいは生化学的特性により行われてきた。野兎病菌に特徴的な遺伝子配列が明らかになるに従い、16S リボゾーム RNA 遺伝子、