

症および動物媒介疾患－ 治療

2004;86:29-34.

12. 赤尾信明, 安藤勝彦, 中村(内山)ふくみ, 川中正憲. ホタルイカ生食による旋尾線虫幼虫移行症の発生動向 1995～2003. 病原微生物情報 2004;25

13. 赤尾信明. 気になる病気 旋尾線虫症. 日経ヘルス 2004;7:35.

14. 飯野弘之, 並木美夏, 永井祐喜子, 酒井勤, 神前賢一, 吉利 尚, 鎌田芳夫, 赤尾信明. トリアムシノロン併用硝子体手術が有効であった眼トキソカラ症の1例. 新しい眼科 2004;21:385-388.

15. 北山沙知, 兵地信彦, 木島敏樹, 岩井安芸, 高沢亮治, 松岡 陽, 大塚幸宏, 矢野雅隆, 増田 均, 藤井靖久, 川上 理, 小林剛, 木原和徳, 赤尾信明 日本人に発症したビルハルツ住血吸虫症の1例. 泌尿器科紀要 2004;50:191-194.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当項目なし

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

動物由来回虫感染症の国内における実態把握に関する研究

分担研究者 赤尾信明

東京医科歯科大学大学院国際環境寄生虫病学分野

研究要旨:動物由来回虫感染症の国内発生の実態把握のために、平成 16 年から 3 年間にわたって、新たに開発した迅速抗体検査法を用いて調査した。その結果、濾紙採血用紙で採取された検体は 66 検体で、そのうち 1 検体がイヌ回虫幼虫排泄物抗原に対する抗体が陽性、3 検体は疑陽性と判定された。また、眼型トキソカラ症患者血清中の抗原特異的 IgE 抗体を測定することにより偽陰性率が低下し、血清診断の精度が向上することが示唆された。また、plate-ELISA で IgE 抗体のみ陽性の 3 検体を用いてイヌ回虫幼虫排泄物抗原の IgE 反応抗原分画を検討したところ、これら 3 検体はいずれも 29KDa 分画を強く認識していた。

A. 研究目的

動物由来回虫感染症は人獣共通寄生虫感染症のひとつで、動物に寄生する回虫の幼虫が、ヒトを含む非好適宿主内に侵入して起きる疾患である。中でもイヌやネコの腸管に寄生する回虫によって起きるイヌ・ネコ回虫症(トキソカラ症)は、我々の身近に暮らす動物から感染する寄生虫疾患として、数多くの臨床例が報告されてきた。診断は、イヌやネコとの密接な接触歴や公園の砂場での砂の誤飲、あるいはこれらの回虫幼虫が潜んでいる偶発中間宿主(ニワトリやウシ)の肝臓や生肉の生食歴などと好酸球増多症や持続する発熱、ぶどう膜炎などの臨床症状に加え、血清中の特異抗体検査によっておこなわれてきた。しかし、イヌ・ネコ回虫幼虫に対する抗体検査はこれまで、plate-ELISA 法や dot-ELISA 法によりおこなわれ、特異抗原のみならず各種の試薬や機器を必要とし、さらに結果を得るまでに数時間を要するなど、必ずしも容易に実施できるものではなかった。また、トキソカラ症を疑った医師が抗

体検査を依頼する場合にも、検体の採取や送付に困難が伴い、国内で発症するトキソカラ症の実態を正確に把握することは困難であった、本研究では、トキソカラ症の血清診断のための検体採取とその輸送、検体検査法を簡便化し、容易にトキソカラ抗体検査が実施できるシステムを構築することを目指した。

B. 研究方法

1. 濾紙採血検体と簡易迅速抗体検査キット(ToxocaraCHEK)を用いたトキソカラ抗体検査
ストリップ型採血用濾紙(東洋濾紙)を用いて患者から採血された検体は十分乾燥させた後、小さなビニール袋に入れて通常の封筒に入れて郵送された。到着後、直ちに血液が吸着した部分を細切し、容量 0.5mL のエッペンドルフチューブに入れた。このチューブの底に小さな穴を開け、パラフィルムでシールしたあと、リン酸緩衝液(pH7.2)0.2mLを加え室温で1時間放置して血清成分を抽出した。その後、容量 1.5mL の中部にこの症チューブを挿入して

7500rpm5 分間遠心して外側のチューブに回収される血清成分を回収し、1:5 希釈血清として検査に用いた。

抗体検査は、我々が開発したイヌ回虫幼虫排泄物を抗原とした迅速抗体検出キット (ToxocaraCHEK) を用いて実施した(1, 2)。検査は 1:5 希釈血清と 1:25 希釈血清について行い、1:25 希釈血清で陽性反応が見られたものを抗体陽性、1:5 希釈では陽性であるが 1:25 では陰性であったものを疑陽性と判定した。

検査した検体は平成 16 年度 30 検体、平成 17 年度 36 検体の合計 66 検体である。

2. 全国の医療機関から検査依頼のあった症例

平成 6 年から平成 17 年 12 月までに東京医科歯科大学国際環境寄生虫病学分野にトキソカラ症が疑われ抗体検査の依頼のあった 475 検体について、検査依頼時に提供された患者情報を基にその年齢分布を調査し、トキソカラ症の好発年齢について検討した。

3. トキソカラ症患者血清中の幼虫排泄物特異的 IgE 抗体の検出

臨床的に眼トキソカラ症と診断された患者 105 名の血清を用いて、血清中の幼虫排泄物 (LES) 特異的 IgE 抗体をアビチン結合抗ヒト IgE・ビオチンシステムで検出した。抗原特異的 IgG 抗体はペルオキシダーゼ結合抗ヒト IgG 抗体を用いて検査した。同時に臨床的に健康な 30 名の成人女性の血清を対照として用い、これらの血清が示す吸光度の平均+3 標準偏差以上を陽性吸光度と判定した。

また、眼トキソカラ症患者のうち、経時的に血清の採取できた 25 例について IgG 抗体と IgE 抗体の消長を追跡した。

C. 研究結果

1. 濾紙採血用紙を用いたトキソカラ抗体保有状況

平成 16 年度と 17 年度に依頼のあった合計 66 検体の年度別男女別のトキソカラ抗体検査結果を表 1 に示す。2 年間に感作した検体は代男性 10 検体、女性 56 検体で、平均年齢は男性 59.0(範囲 16-76)、女性 42.1(範囲 0-79 歳)であった。

表 1 平成 16～17 年度に依頼のあった検体のトキソカラ抗体検査結果

年度	検査人数	性別	陽性	疑陽性	陰性
16	30	男性 6	0	0	6
		女性 24	1	0	23
17	36	男性 4	0	0	4
		女性 32	0	3	29
	66		1	3	62

66 検体中、平成 16 年度に検査した 1 検体が、1:25 希釈血清でも陽性反応を認めた。患者は

兵庫県在住の51歳女性で、顔面および両手に咬傷を認めた例であった。また、現在イヌ1頭を飼育していた。さらに詳しい検査を希望する場合には血清を送るよう依頼したが以後連

絡はなかった。また、1:25 倍希釈血清では陰性で、1:5 希釈血清で陽性であったものが3検体みられた。

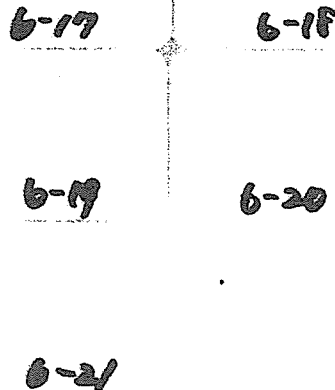


図 1 1 : 25 希釈血清で陽性反応を認めた例 (6-18) と陰性例 (6-17, 6-19~21)

2. 全国の医療機関からトキソカラ抗体検査依頼のあった症例の集計

トキソカラ症が疑われ、東京医科歯科大学医歯学総合研究科国際環境寄生虫病学分野に依頼のあった症例を平成 6 年から平成 17 年度にわたり集計し、その年齢構成を調査した。調査機関の 12 年間に検査依頼のあった件数は 475 症例(再検査を含まず)で、その臨床症状により内臓型トキソカラ症(図 2a)と眼型トキソカラ症(図 2b)に分類して集計した。

79 例の内臓型トキソカラ症患者では、10 歳未満の幼小児群と 40~49 歳群の 2 群にピークを持ち分布を示したが、眼トキソカラ症患者 396 名の集計では 30 歳から 69 歳までの群にピークを持つ分布を示した。これは今まで、内臓型や眼型を問わず、トキソカラ症は幼小児

に多く発症する感染症であるという従来の定説を覆すものであった。内臓型トキソカラ症 79 例のトキソカラ抗体検査結果を表 2 に示す。臨床的に内臓型トキソカラ症が疑われた患者の抗体陽性率は約 23%とであった。また、抗体陽性率には男女間の性差はみられなかった。一方、臨床的に眼型トキソカラ症と診断された 105 名の血清抗体結果を表 3 に示す。これらの成人例の多くで、ウシやニワトリ肝臓の生食、生肉の生食歴があり、これらの食品を介した感染がトキソカラ症を惹起していると考えられた(3, 4)。

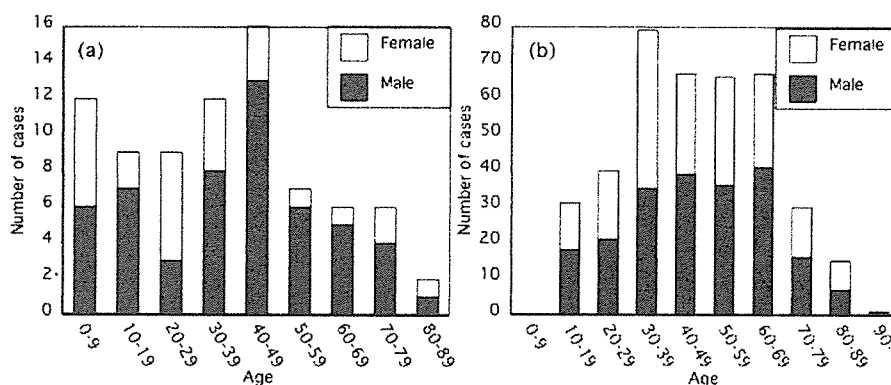


図2 過去12年間に東京医科歯科大学に検査依頼のあった内臓型トキソカラ症(a)と眼型トキソカラ症(b)患者の年齢分布

表2 臨床的に内臓型トキソカラ症が疑われた79名の抗体検査結果

	女性 (26検体)	男性 (53検体)	合計 (79検体)
抗体陽性者	6 (23.0%)	12 (22.6%)	18 (22.8%)
抗体陰性者	20	41	61

表3 臨床的に眼型トキソカラ症と診断された105名の特異IgG, IgE抗体検査結果

どちらも陰性	どちらかが陽性	IgG抗体のみ陽性	IgE抗体のみ陽性	どちらも陽性
82 (78.1%)	23 (21.9%)	12 (11.4%)	3 (2.9%)	8 (7.6%)

イヌ回虫幼虫排泄物抗原特異的 IgE 抗体を IgG 抗体と同時に測定した場合、新たに3症例が陽性と判定され、わずかではあるが抗体陽性率が向上した。

表3で、特異 IgE 抗体のみが検出された3検体を用いて、イヌ回虫幼虫排泄物抗原特異的 IgE 分画を同定した(図3)。IgE 抗体のみと反応した3検体はいずれもイヌ回虫幼虫排泄物抗原分画中の29KDa分画を強く認識していた。

3. イヌ回虫幼虫排泄物抗原特異的 IgE 抗体分画の同定

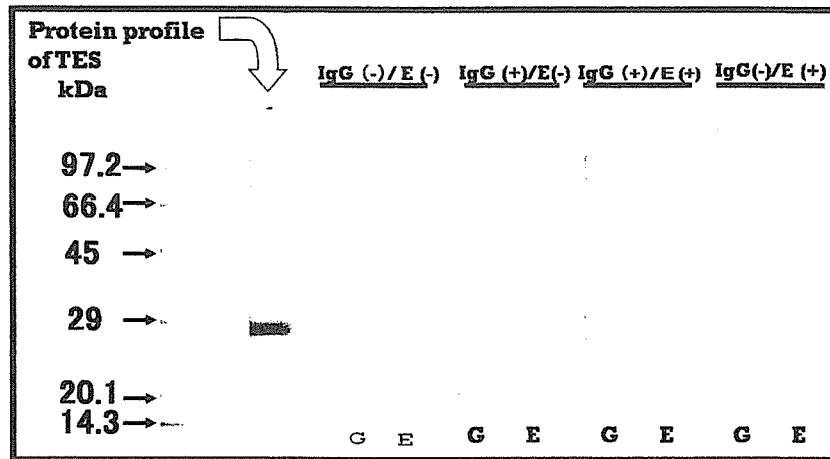


図3 患者血清中のIgE抗体と特異的に反応するイヌ回虫幼虫排泄物抗原分画の同定(左端は分子量マーカー)

D. 考察

採血用濾紙で採取され、乾燥ののち郵送された検体を用いることによって、遠心分離器などの特殊な装置を用いることなく、かつ輸送コストも低額に抑えることが出来、いつでも誰でもが利用できる抗体検査システムを導入することが出来た。このシステムを過去2年間にわたり実施したところ、66検体中1検体(1.5%)でトキソカラ抗体陽性者を見いだすことが出来た。疑陽性者(3検体)を含めると抗体陽性率は6%となり、これまで報告されている潜在的な抗体陽性者率とほぼ同じ値が得られた(5)。

またこれまで我々が過去12年間にわたって実施してきたトキソカラ抗体検査成績から、トキソカラ症患者はこれまで報告されてきたように、幼児に多くみられる寄生虫症ではなく、成人にも多く発症するものであることが明らかになった。特に、ウシやニワトリの肝臓や生肉(刺身)からの感染が疑われる症例の増加していることが明らかになった。今後とも、『食品由来寄生虫症』としてのトキソカラ症に注意する必要があると考えられた。

トキソカラ症は臨床症状から内臓型と眼型に

分けることが出来る。内臓型の場合、末梢血中の好酸球増多と血清中のIgG抗体は著明に上昇し、診断は用意であるが、眼型の場合では臨床的にはぶどう膜炎などの特殊な症状を認めるが、好酸球増多や血清抗体の上昇は必ずしも認めない場合が多かった。そこで、IgG抗体に加えIgE抗体についても測定したところ、66症例中3症例は血清中にIgE抗体のみが検出された。これらの3症例は通常のIgG抗体のみの検査では陰性と判定されるものであったことを勘案すると、IgE抗体も同時に測定することによって、偽陰性率が3%程度改善することを示していた。IgE抗体の測定にはこれまでと同様3時間程度の時間を必要とし、3分間で結果が得られる迅速診断キットに比べ時間を要することから、IgE抗体検査をルーティンに実施するには今後、より簡便なIgE抗体検査システムの開発が必要であろう。

E. 結論

濾紙採血法により、過去2年間に66検体をトキソカラ抗体迅速診断キットで検査したところ1検体が陽性、3検体が疑陽性と判定された。ま

た、患者血清中の IgE 抗体を測定することにより血清反応による抗体陽性率が向上することが期待された。

F. 健康危険情報

該当項目なし

G. 研究文献

- (1) Akao N, Chu AE, Tsukidate S, Fujita K. A rapid and sensitive screening test for the detection of anti-*Toxocara* larval ES antigens. *Parasitol. Int.* 1997;46(3):189-195.
- (2) Dubinsky P, Akao N, Reiterova K, Konakova G. Comparison of the sensitive screening kit with two ELISA sets for detection of anti-*Toxocara* antibodies. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000;31(2):394-8.
- (3) Morimatsu Y, Akao N, Akiyoshi H, Kawazu T, Okabe Y, Aizawa H. A familial case of visceral larva migrans after ingestion of raw chicken livers: appearance of specific antibody in bronchoalveolar lavage fluid of the patients. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75(2):303-6.
- (4) Aragane K, Akao N, Matsuyama T, Sugita M, Natsuaki M, Kitada O. Fever, cough, and nodules on ankles. *Lancet* 1999;354(9193):1872.
- (5) 近藤力王至, 赤尾信明, 大山卓昭. 環境と寄生虫 トキソカラ症の感染の背景から. 予防医学 1993;35:35-45.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当項目なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

国内の患者発症例報告に基づく動物由来感染症の実態把握及び今後の患者症例報告
収集と検索システムの開発に関する研究

分担研究報告書

動物由来ウイルス・クラミジア・リケッチア感染症の症例収集と分析

分担研究者 福士 秀人 岐阜大学応用生物科学部獣医学講座教授

研究要旨：ウイルス，クラミジアおよびリケッチアを病因とする動物由来感染症の実態把握を目的として調査研究を行った。抗体検査法を改良するために，濾紙採血法を検討した。既知の抗血清およびヒト血液を用い，基礎的な実験を行い，濾紙採血法の有用性を確認した。クラミジアの検出では，健康鳥491検体，感染症の疑いの鳥71検体について調べ，健康鳥の5.4%，感染症の疑いの鳥の7.6%からオウム病クラミジアが検出された。ろ紙採血法による抗体検査では，2005年に14検体について検索し，抗体価50倍以上の検体が5例みられた。これらの検体について鳥との接触が明記されていた検体は2例であった。2006年においてはオウム病抗体測定では抗体価10倍が3例，10倍未満が31例であった。Q熱抗体測定ではいずれの検体もIgGが20倍未満，IgMが10倍未満であった。クラミジアおよびその抗体検出，さらにQ熱抗体の検出において検査方法を確立することができた。

A. 研究目的

オウム病は古くから知られる人獣共通感染症である。1999年4月より第4類に指定され，人の発生状況が把握できるようになった。しかし，感染源である鳥類に関しては，ほとんどデータがない。1980年代に疫学的な報告がなされたが，その後はなく，現状は不明である。近年，オウム病の届け出数は増加している。これが，オウム病の実際の発生が増加しているためかどうかは必ずしも明確ではない。一方，リケッチア性人獣感染症の一つにQ熱コク

シエラ感染症がある。Q熱は我が国においても近年，患者が報告されるようになったが，その実態は未だに不明である。特に抗体保有率については報告者により大きな差がある。

そこで，そこで，我が国における鳥類のオウム病クラミジア保有状況を把握するため，2003年4月より2004年1月において鳥類のクラミジア保有状況を調べた。さらに臨床現場からの検体輸送を改良する目的で，濾紙採血法を検討し抗体検出を行った。

B. 研究方法

クラミジア検出：輸入卸売りおよび小売り業者からの依頼検体，動物病院からの依頼検体および展示施設からの依頼検体を材料とした。生鳥は糞便ないしクロアカの拭い液を検査材料とした。死亡鳥は脾臓ないし肝臓を検査材料とした。これらの検体約0.1gからセパジーン（三光純薬）によりDNAを抽出した。クラミジアの検索は主要外膜タンパク質遺伝子（MOMP）を標的とするPCRによった（Rajeshら，2006）

ろ紙採血法：既知の抗血清およびヒト血液を用い，濾紙採血血清との抗体価を比較した。ウサギ高度免疫血清として抗6BC血清および抗Ca110血清を，ヒト血液として抗体陽性患者血液，血清および健康者血液，血清を用いた。検体希釈液にはPBS-0.5%BSAを用いた。FITC標識抗ウサギ抗体およびFITC標識抗ヒトIgG（Fab'）₂抗体を2次抗体として用いた。

血清ないし血液を濾紙に吸収させ，乾燥後，1mlの希釈液で溶出した。この溶出液を1:10溶液とした。（濾紙はおよそ100 μ lが吸収されるとされているため）。1:10溶出液を段階希釈し，明らかな蛍光を示す最高希釈倍数の逆数を抗体価とした。

クラミジア感染細胞抗原は *Chlamydomonas psittaci* Ca110 感染HeLa細胞および *Chlamydomonas pneumoniae* TW183感染HeLa細胞をメタノール固定し，抗原とした。また，精製基本小体を抗原と

して微量間接蛍光抗体法（MIF）によりオウム病抗体測定およびコクシエラ感染細胞を抗原とした間接蛍光抗体法によりQ熱抗体価を測定した。

C. 研究結果

1. 我が国の鳥類におけるクラミジア保有率：健康鳥ないし感染症が疑われた病鳥，491および71検体について検索したところ，それぞれ25検体（5.4%）および5検体（7.6%）からクラミジアが検出された（図1）。施設別にみると動物病院7.9%，動物販売業者5.6%および展示施設3.1%であった（図2）。斃死鳥では感染症が疑われた59検体中13検体（28.3%）からクラミジアが検出されたが，他の原因が疑われ，剖検を依頼された27検体ではクラミジアは検出されなかった（図3）。クラミジアが検出された鳥種は様々であったが，オカメインコ，セキセイインコおよびゴシキセイガイインコからの検出数ならびに検出率が高かった（表1）。

2. ろ紙採血法

2-1. 既知の抗血清および血液を用いた濾紙法における抗体価変動の検討

ろ紙採血法がオウム病クラミジア抗体検査に使用可能かどうかを検討した（表2）。高度免疫血清の場合には濾紙吸収による抗体価の低下はみられなかったが，ヒト検体では512倍の抗体価が濾紙吸収-乾燥-溶出操作により400倍となり，やや低下した。また，同じ個人の血液について濾紙

吸収-乾燥-溶出操作を行ったところ抗体価は50倍と判定され、ほぼ1/10となった。この結果から、抗体価が減少する可能性はあるが、おおむね使用可能であると判断した。

2-2. ヒト血液検査結果

濾紙採血法で採取され郵送された検体についてオウム病抗体価を測定した。

2005年度は14検体について検索したところ、抗体価50倍以上の検体は5検体で、うち1検体は200倍以上であった(表3)。鳥との接触歴が見られた検体は2検体であったが、これらの血液の提供者にオウム病の症状は記載されていなかった。2006年度は34例について検索したが、3例が10倍で他の31例は10倍未満であった。

2006年度はオウム病に加え、Q熱抗体も検索した。その結果、34検体いずれも20倍未満(IgG)および10倍未満(IgM)であった。

D. 考察

これらの結果から、我が国における鳥類のクラミジア保有率は約6%であることがわかった。今回検索した動物販売業者からの依頼検体の多くは輸入個体であるが、陽性率は5.6%と、従来の比率とほぼ同様であった。

現在の日本への輸入鳥数および国内での生産数は約20万羽であり、10数年前に比較し、10分の1以下になっている。クラミジア保有率に変化はないことから、市販さ

れている鳥におけるクラミジア保有鳥の絶対数は減少していると考えられる。

一方、人のオウム病の届け出数は年々増加している。これはオウム病の発生が増加しているというよりも、医師のオウム病に対する認識が広がっているためであると考えるのが妥当であろう。しかしながら、展示施設では鳥類のオウム病は未だに発生がみられることから、予防および発生時の迅速な対応が必要である。オウム病の感染源としては野外のドバトも重要な保菌動物であることが知られている。したがって、展示鳥類および野生鳥類については引き続き調査が必要である。

このような調査を現場で対応するために、信頼性の高い病原体検出のための簡易診断法が必要である。今後さらに人における症例の収集を含めた調査を継続し、我が国におけるオウム病について常に状況を把握し、その結果を公表していくことにより、医師および獣医師の認識を広めることが発生予防および発生時の治療を迅速に行うためにも必要である。

濾紙採血法で採取した検体において通常の血清や血液とほぼ同様の抗体検出感度および特異性であることが示された。しかしながら、今回は採血後できるだけ迅速に抗体測定を実施したため、保存性については検討しなかった。また、実際のオウム病患者に由来する検体を得ることができなかったため、診断における有用性につ

いても検討はできなかつた。

今年度の調査ではオウム病およびQ熱抗体を検出することはできなかつたが、ろ紙採血法により検査ができる可能性は示された。オウム病抗体では10倍例が見受けられたが、トリとの接触をもつ患者は1例のみで、一般状態は健康であった。抗体価10倍については陽性とみなすのは困難である。いずれかの疑い例2例についても今回は陰性であった。オウム病抗体についてはおおむね5%の保有率であることがわかっている。また、以前のコクシエラ抗体調査報告では0.8から3.3%であるとされており、今回の検体数ではいずれも検出できなかったことが考えられた。今後さらに例数を増やし調査することが必要である。

本研究の実施中に神戸市花鳥園で開園を目前にして従業員3名を患者とするオウム病の集団発生があった。発生原因としては鳥の導入における検疫の不備および鳥ならびに従業員におけるオウム病対策の欠如があげられている。このような集団発生では迅速な診断が拡大防止に必要であり、本研究成果も今後のオウム病発生時における対策の一環として有用であると考えられた。

E. 結論

我が国の愛玩鳥におけるオウム病クラミジア保有率は約6%であり、従来の比率とほぼ同様であった。今後、さらに人の症例もふくめた調査を継続するとともに、信頼

性の高い簡易診断法の開発が必要である。

オウム病抗体測定における濾紙採血法の有用性が示された。今後、さらに野外検体数を増やし、有用性の確認を行う必要がある。

オウム病抗体およびコクシエラ抗体の測定にろ紙採血法が使える可能性が示されたが、今後さらに例数を増やして調査を進める必要がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

Chahota, R., Ogawa, H., Mitsuhashi, Y., Ohya, K., Yamaguchi, T., Fukushi, H.

Genetic diversity and epizootiology of *Chlamydochlamydia psittaci* prevalent among the captive and feral avian species based on VD2 region of ompA gene.

Microbiol Immunol. 50:663-678, 2006.

表1. 鳥種別クラミジア保有率

鳥種	検査羽数	陽性数	陽性率 (%)
オカメインコ	44	7	16
セキセイインコ	30	4	13
ゴシキセイガイインコ	37	4	11
チャガシラハネナガ	22	1	5
コバタン	24	1	4
ネズミガシラハネナガ	38	1	3
ヨウム	103	2	2

表2. ろ紙採血法における予備試験結果

検体		C. psittaci抗原	C. pneumoniae抗原
抗6BC*	血清	10000	<1000
	ろ紙溶出液	10000	<1000
抗Ca110*	血清	10000	<1000
	ろ紙溶出液	10000	<1000
検体1 (ヒトA)	血清	512	
	ろ紙溶出液	400	
	ろ紙溶出液(全血)	50	
検体2 (ヒトA)	血清	128	<32
	ろ紙溶出液	100	<10
検体3 (ヒトB)	血清	<100	
	ろ紙溶出液	<100	

*C. psittaci 6BCおよびCa110株に対するウサギ免疫血清. ろ紙溶出液は血清をろ紙にしみ込ませ、乾燥後に溶出. ヒトAの検体1については全血をしみ込ませたろ紙からの溶出液も調べた.

表 3. 2005年度における濾紙抽出法によるオウム病抗体検査結果

検体番号	年齢	ペットの飼育(飼育数)		鳥との接触	主要症状	抗体価
		現在	過去			
1	41	犬(1), 猫(1), 鳥(3)	犬, 猫, 鳥	文鳥, カナリア	なし	<10
2	25	なし	なし	なし	なし	10
3	31	なし	犬(1), 猫(1)	なし	なし	10
4	25	なし	犬(1)	なし	なし	50
5	26	なし	犬(1)	なし	なし	<10
6	30	犬(1)	猫(1)	なし	なし	50
7	29	なし	猫(2), うさぎ(10以上)	なし	腹部発疹	200<
8	33	なし	犬(1)	カナリア	なし	50
9	30			文鳥(2)		50
10	26	ハムスター(1)	なし	なし	なし	50
11	36	猫(1)	ハムスター(1)	文鳥	なし	<10
12	32	なし	犬(1)	インコ(健康状態良好)	なし	<10
13	38					10
14	32					<10

空欄はデータなし. いずれも女性.

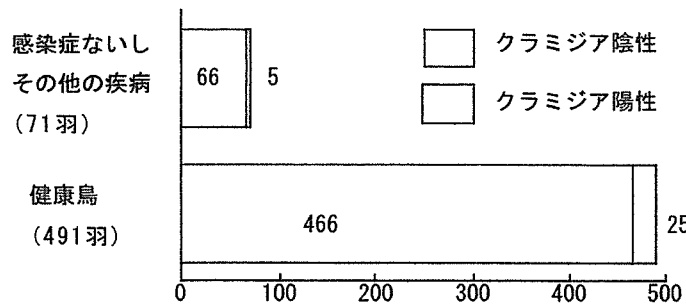


図 1. 感染症ないしその他の疾病が疑われた鳥および健康鳥におけるオウム病クラミジア保有状況. 数字は羽数.

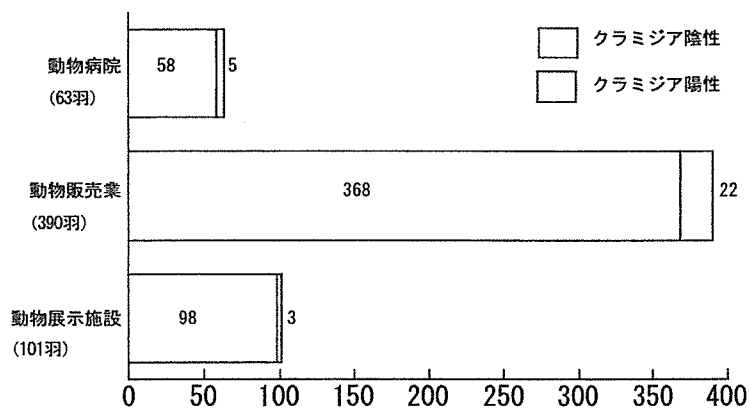


図 2. 依頼施設別のクラミジア陽性数. 数字は羽数.

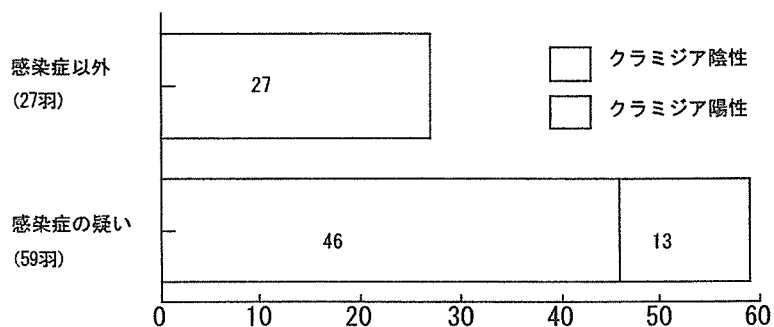


図 3. 被検体の健康状態別クラミジア陽性数. 数字は羽数.

厚生労働科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）分担研究報告書

国内の患者発症例報告に基づく動物由来感染症の実態把握及び今後の患者症例報告収集と検索システムの開発に関する研究（主任研究者 高山直秀）

動物由来細菌感染症の症例収集と分析及び諸検査 I.

分担研究者 丸山総一 日本大学生物資源科学部 助教授

研究要旨

野外において核酸サンプルを採取、保存する FTA カード（ワットマン社）ならびにトキソプラズマラテックス凝集反应用血液保存濾紙の有用性について検討した。FTA カードはサンプル固定処理が非常に簡便であり、また、軽量でかさばらず持ち運びにも支障がないことから、有用な道具であると思われた。また、ラテックス凝集反应用いてトキソプラズマ抗体を測定する場合、血液を冷却保存できないような条件下においても、シリカゲルの存在下であれば血液保存濾紙でも抗体価の低下を長期間抑制できるものと思われた。

また、3 週間の発熱、視力低下を主訴に来院した 11 歳、男児の髄液ならびに血液から PCR 法により *Bartonella henselae* の DNA 遺伝子を検出した事例を経験した。

A. 研究目的

医学・獣医学における感染症の疫学研究では、野外で人や動物の血液を採取し、病原体遺伝子（＝核酸）やその抗体を検出することによって、感染状況や病原体の種類を調査することがある。採取した血液は速やかに処理することが望ましいが、現場では保冷剤の確保や固定等の処理が難しく、病原体（核酸を含む）が死滅したり、抗体が失活したり、また、大量の試料を処理できない場合が多い。そこで、本研究では、常温で病原体の遺伝子や抗体を安全かつ安定した状態で保存・輸送する方法について検討した。

また、3 週間の発熱、視力低下を主訴に来院した 11 歳、男児の髄液ならびに血液から PCR 法により *Bartonella henselae* の DNA 遺伝子を検出した事例を経験したので、その概要について報告する。

B. 研究方法

実験 1

Whatman 社製の FTA カードシリーズは、直接血液をカード上に滴下することによって、血液中の核酸をカード上に固定して室温保存・輸送することが可能なように開発された製品である。そこで、本実験では、野外で採取した鳥血液を本製品で保存し、PCR 法により鳥住血原虫の遺伝子の検出を試みた。

【材料および方法】

肉用鶏 42 羽から血液を採取し、顕微鏡観察用に薄層塗沫標本を作製するとともに、一部は FTA クラシックカードに約 100 μ l 滴下して風乾した。薄層塗沫標本はギムザ染色を行い、光学顕微鏡下で原虫の有無を確認した。

室温で 1 ヶ月間保存した FTA カードから、HARRIS MICRO-PUNCH™ で直径 2mm のディスクを切り出し、マニュアルに従って DNA テ

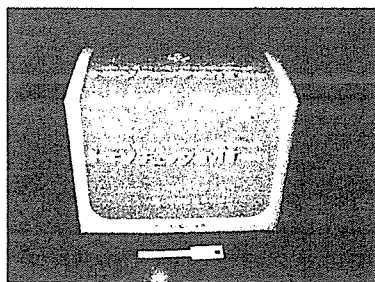
ンプレートを作製した。PCR 法は、鳥類の住血原虫 3 属 (*Plasmodium*, *Haemoproteus*, および *Leucocytozoon*) のミトコンドリアチトクローム b 遺伝子の一部を増幅するプライマーセット (2 セット) を用いて、遺伝子増幅を行った。

実験 2

トキソプラズマ抗体が陽性の猫血液を採血濾紙に吸着させ、種々の異なる条件下で保存した際の抗体価の変動について検討した。

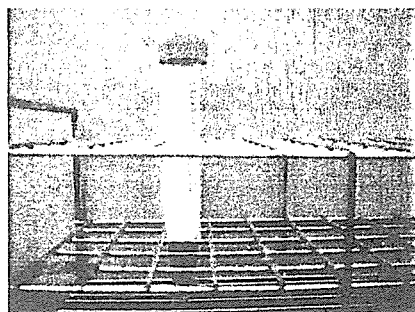
【材料および方法】

1) トキソプラズマ抗体陽性 (抗体価 1:64 ~ 1:1024) の猫血液 100 μ l を採血濾紙 (写真 1) にしみこませ、37°C, 40 分間乾燥させた。



(写真 1)

2) 乾燥した濾紙を尖底プラスチックチューブにシリカゲルを約 2g 入れた状態 (シリカゲル有り, 写真 2), または, シリカゲルは入れずに濾紙をチューブに直接入れた状態 (シリカゲル無し) で密栓し, 37°C, 25°C, 4°C, および -80°C 下で, それぞれ 3, 6, 12 ヶ月間保存した。



(写真 2)

3) トキソプラズマ抗体価は、ラテックス凝集反応キット (トキソチェック MT; 栄研科学) を用い、付属の手順書に従って測定した。

C. 研究結果および考察

実験 1 : いずれの鶏サンプルにおいても、顕微鏡下では血液原虫を検出できなかった。また、PCR においても鳥原虫の遺伝子増幅産物は検出されなかった。これより、今回のサンプルは鳥類の血液原虫に感染していなかったことが示唆された。

なお、FTA カードへのサンプル固定処理そのものは非常に簡便であり、また、軽量でかさばらず持ち運びにも支障がなかったことから、野外において核酸サンプルを採取する道具として適していると思われた。

今後、種々の病原体陽性血液を FTA カードに滴下・保存し、抽出したサンプルを用い、それぞれの遺伝子を検出する PCR 法の感度について検討する必要があると思われた。

実験 2 : シリカゲル有り, 25°C の保存条件では、少なくとも 6 ヶ月間はトキソプラズマ抗体価が保持された。シリカゲル有り, 37°C の保存条件下でも、6-3 ヶ月間はトキソプラズマ抗体価の減少を抑えることができた。

シリカゲル無しでは、多くのサンプルのトキソプラズマ抗体価は減少した (表 1)。これより、シリカゲルの存在下では、低温保持しなくとも、抗体価の減少を抑えることができると思われた。

血清を含む血液の溶出程度を見るため、溶出液の吸光度を波長 280nm で測定したところ、シリカゲル無しの条件で、吸光度の低下が著しかった。シリカゲル有りの条件では、保存した濾紙から溶出した試料の吸光度は、37°C で徐々に低下したが、他のシリカゲル有りのサンプルでは、保存温度、期間に関わらず、吸光度に有意な違いは見られなかった。シリカゲル無しで、

4°Cで保存した濾紙では、保存期間が長くなる
とともに吸光度の減少が認められた。トキソプ
ラズマ抗体価は、血液の溶出程度と一致してい
た。

以上から、ラテックス凝集反応を用いてトキ
ソプラズマ抗体を測定する場合、血液を冷却保
存できないような条件下においても、シリカゲ
ルの存在下で抗体価の低下を長期間抑制でき
るものと思われた。

症例報告：髄液中に *Bartonella henselae* DNA を
検出した猫ひっかき病の1例

11歳、男児。3週間の発熱、視力低下を主
訴に来院。肝内に多発性病変と、眼底に macula
star formation を認め、CRP の上昇 (4.3mg/dl) 、
赤沈の亢進 (125mm, 2h) を認めた。血液・髄
液の一般細菌培養は陰性であったが、血清抗体
検査で *Bartonella henselae* IgM 抗体が 1:20、IgG
抗体は 1:1024<といずれも陽性であった。PCR
法で血液及び髄液から *B. henselae* の DNA を検
出したため、猫ひっかき病と診断した。*B.*
henselae は特殊な培養方法、発育に長期間を要
すること、赤血球内に菌が存在すること等から、
分離培養が極めて困難な細菌である。また、リ
ンパ節症の症例では、90%近くが本菌に対する
抗体陽性を示すものの、培養で *B. henselae* が
分離される例は極めて少ない。さらに、本菌に
よる脳症は CSD の発病から数週間後に発症す
るために、多くは事前に抗生剤を投与されてい
ることも分離率が低い一因と考えられる。*B.*
henselae 感染症が疑われる症例では、培養・血
清抗体価の測定に加え、PCR を実施すること
で *B. henselae* DNA を検出することが可能とな
り、さらに中枢神経系合併症の発症機序の解明
に役立つものと思われる。

D. 結論

FTA カードはサンプル固定処理が非常に簡

便であり、また、軽量でかさばらず持ち運びに
も支障がないことから、野外において核酸サン
プルを採取する道具として適していると思わ
れた。また、ラテックス凝集反応を用いてトキ
ソプラズマ抗体を測定する場合、血液を冷却保
存できないような条件下においても、シリカゲ
ルの存在下で抗体価の低下を長期間抑制でき
るものと思われた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Jittapalapong, S., Sangvaranond, A.,
Pinyopanuwat, N., Chimnoi, W., Khachaeram,
W., and Maruyama, S. 2005. Seroprevalence
of *Toxoplasma gondii* infection in domestic
goats in Satun Province, Thailand. *Vet.*
Parasitol. 127: 17-22.
- 2) Verdida, R. A., Hara, O. A., Xuan, X.,
Fukumoto, S., Igarashi, I., Zhang, S., Dong, J.,
Inokuma, H., Kabeya, H., Sato, Y., Moritomo,
T., Maruyama, S., Claveria, F., and Nagasawa,
H. 2004. Serodiagnosis of *Babesia gibsoni*
infection in dogs by an improved
enzyme-linked immunosorbent assay with
recombinant truncated P50. *J. Vet. Med. Sci.*
66(12): 1517-1521.
- 3) Morita, Y., Maruyama, S., Kabeya, H.,
Boonmar, S., Nimsupan, B., Nagai, A.,
Kozawa, K., Nakajima, T., Mikami, T., and
Kimura, H. 2004. Isolation and phylogenetic
analysis of *Arcobacter butzleri* in ground
chicken meat and environmental water in
Japan and Thailand. *Microbio. Immunol.*
48(7):527-533.
- 4) Shinozaki, Y., Shiibashi, T., Yoshizawa, K.,

- Murata, K., Kimura, J., Maruyama, S., Hayama, Y., Yoshida, H. and Nogami, S. 2004. Ectoparasites of the Pallas, *Callosciurus erythraeus*, introduced to Japan. *Med. Vet. Entomol.* 18:1-3.
- 5) Shinozaki, Y., Yoshizawa, K., Murata, K., Shiibashi, T., Kimura, J., Maruyama, S., Hayama, Y., Yoshida, H. and Nogami, S. 2004. The first record of sucking louse, *Neohaematopinus callosciuri*, infesting Pallas squirrels from Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 66(3): 333-335.
- 6) Maruyama, S., Izumikawa, K., Miyashita, M., Kabeya, H., Mikami, T., Yamanouchi, H., Sasaki, E., Yoshida, H., and Izumikawa, K. 2004. First isolation of *Bartonella henselae* type I from a cat-scratch disease patient in Japan and its molecular analysis. *Microbiol. Immunol.* 48(2):103-109.
- 7) Kabeya, H., Maruyama, S., Morita, Y., Ohsuga, T., Ozawa, S., Kobayashi, Y., Abe, M., Katsube, Y., and Mikami, T. 2004. Prevalence of *Arcobacter* species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan. *Int. J. Food Microbiol.* 90(3): 303-308.
- 8) 鈴木幹啓, 西原秀宏, 柴田丈夫, 丸山総一 (2004) : 髄液中に *Bartonella henselae* DNA を検出した猫ひっかき病の1例. *小児科臨床* 57: 2131-2135.
- 9) 森田幸雄, 壁谷英則, 石岡大成, 阪脇廣美, 長井 章, 鈴木宣夫, 中林良雄, 丸山総一 (2004) : 家畜および市販ひき肉における *Arcobacter*, *Campylobacter*, *Salmonella* の分布状況. *日獣会誌* 57:393-397.
- 10) 山内寛嗣, 泉川欣一, 久松貴, 良永倫子, 佐々木栄祐, 泉川公一, 早川友一郎, 原 耕平, 丸山総一, 大谷博, 下川功 (2004) : 犬が感染源と考えられた *Bartonella henselae* 感染症の1例. *感染症誌* 78(3) : 270-273.
- 11) 丸山総一 (2004) : 猫ひっかき病, モダンメディア 50(9):203-211.
2. 学会発表
- 1) Sathaporn Jittapalapong, Nongnuch Pinyopanuwat, Wissanuwat Chimnoi, Soichi Maruyama, Philippe Brouqui, Hisashi Inokuma and Roger W. Stich. 2004. Serological Prevalence of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophila* in stray cats in Bangkok, Thailand. Joint international tropical medicine meeting, 2004. (29 November 1 December, 2004). Thailand (Bangkok).
- 2) Maruyama, S., Kabeya, H., Yanai, K., Kawanami, K., Morita, Y., Mikami, T. and Jittapalapong, S. 2004. Prevalence of *Bartonella* species among cats and dogs in Bangkok metropolitan areas, Thailand. The 4th International Conference on *Bartonella* as Emerging Pathogens (August 24, Sept1, 2004). Sweden (Uppsala)
- 3) Kabeya, H., Sase, M., Yamashita, M., Mikami, T., and Maruyama, S. 2004. Predominant Th2 immune responses against *Bartonella henselae* in naturally infected cats. The 4th International Conference on *Bartonella* as Emerging Pathogens (August 24, Sept1, 2004). Sweden (Uppsala)
- 4) Rodolfo Verdida, Olga Hara, 玄学南, 福本晋也, 猪熊壽, 壁谷英則, 佐藤雪太, 森友忠昭, 丸山総一, 長澤秀行 (2004) : Serodiagnosis of *Babesia gibsoni* infection in dogs by an improved enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant truncated P50. 第138回日本獣医学会 (北海

- 道, 北大)
- 5) 岡西広樹, 梅原玉青, 神谷美沙子, 田崎泉美, 三澤昭裕, 壁谷英則, 丸山総一, 見上彪(2004): *Bartonella henselae*投与SPF猫における菌血症と分離株のゲノムDNAの推移. 第138回日本獣医学会 (北海道, 北大)
- 6) 梅原玉青, 岡西広樹, 壁谷英則, 丸山総一, 見上彪(2004): *Bartonella henselae*実験感染SPF猫における液性及び細胞性免疫応答. 第138回日本獣医学会 (北海道, 北大)
- 7) 山崎朗子, 碓屋美加子, 佐瀬真紀子, 壁谷英則, 丸山総一, 見上彪(2004): *Bartonella henselae*感染に対する猫及びマウスの免疫応答の相違について. 第138回日本獣医学会 (北海道, 北大)
- 8) 長田真理子, 佐多辰, 谷川力, 加藤行男, 壁谷英則, 丸山総一, 泉谷秀昌, 渡邊治雄,
- 黒木俊郎(2004): クマネズミから分離された*Salmonella Typhimurium*の毒力の比較. 第137回日本獣医学会 (神奈川, 日本大学)
- 9) 稲村嘉之, 高木恵美, 山下将哉, 田崎泉, 神谷美沙子, 三澤昭裕, 壁谷英則, 丸山総一, 見上彪(2004): *Bartonella henselae*持続感染猫分離株のゲノムの多様性と主要抗原遺伝子解析. 第137回日本獣医学会 (神奈川, 日本大学)
- G. 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

表1 各条件下で保存した採血濾紙中のトキソプラズマ抗体価の変化

猫No. (抗体価)	保存期間 (月)	シリカゲル有り				シリカゲル無し			
		37℃	25℃	4℃	-80℃	37℃	25℃	4℃	-80℃
1 (1:64)	3	32	64	64	64	<32	<32	32	64
	6	32	32	64	64	<32	<32	<32	64
	12	<32	32	64	64	<32	<32	<32	32
2 (1:64)	3	32	32	64	64	<32	<32	64	32
	6	32	32	64	64	<32	<32	32	32
	12	<32	<32	32	32	<32	<32	<32	32
3 (1:128)	3	64	64	128	128	<32	<32	64	64
	6	32	64	64	128	<32	<32	32	64
	12	<32	64	128	128	<32	<32	<32	128
4 (1:1024)	3	256	512	512	512	<32	256	256	512
	6	256	512	512	1024	<32	64	128	1024
	12	128	256	512	512	<32	<32	<32	1024

厚生労働科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）分担研究報告書

国内の患者発症例報告に基づく動物由来感染症の実態把握及び今後の患者症例報告収集と検索システムの開発に関する研究（主任研究者 高山直秀）

動物由来細菌感染症の症例収集と分析及び諸検査 II.

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

平成 17 年度ならびに平成 18 年度に、医療現場において猫ひっかき病およびトキソプラズマ症の検査用に採材した血液を血液採取用濾紙に滴下し、常温で郵送された試料について、*Bartonella henselae* および *Toxoplasma gondii* の抗体を測定した。*B. henselae* 抗体陽性率は平成 17 年度は 15.2% (5/33) , *T. gondii* 抗体陽性率は 5.0% (2/40) であった。平成 18 年度の *B. henselae* 抗体陽性率は 4.2% (2/48) , *T. gondii* 抗体陽性率は 7.1% (4/56) であった。また、平成 18 年度は、採血用濾紙の *B. henselae* 抗体保存性を検討する目的で、*B. henselae* 抗体陽性人血清 (IFA 抗体価 128 倍～256 倍) を濾紙に滴下、乾燥させ、3 日～10 日間常温で保存し、抗体価の推移を測定したところ、保存 3 日目に 9 検体中 6 検体の抗体価が 128～64 倍となった。

A. 研究目的

猫ひっかき病 (Cat-scratch disease; CSD) は、グラム陰性多型性桿菌の *Bartonella henselae* が原因菌で、わが国では、感染症法に類型されていないものの、医療の現場では最も多くみられる人獣共通感染症の一つである。

一方、トキソプラズマ症は、*Toxoplasma gondii* 原虫が原因で、多くは不顕性感染であるが、まれに脈絡網膜炎やリンパ節炎、妊婦では死流産などを引き起こすことが知られている。

いずれも、猫が重要な病原巣であり、近年、ペットの猫あるいは免疫不全患者の増加とともに、注目されている人獣共通感染症である。

本研究では、平成 17 年度および平成 18 年度に、医療現場で猫ひっかき病およびトキソプラズマ症の検査のために採材した血液を血液採取用濾紙に滴下し、常温で郵送されたものから血清成分を抽出し、*B. henselae* および *T. gondii* の抗体を測定した。

さらに、平成 18 年度は、トキソプラズマ症の血清診断ですでに実績のある採血用濾紙の CSD 血清診断への臨床応用を目的として、IFA 法で *B. henselae* 抗体陽性ヒト血清を採血用濾紙に滴下し、乾燥させた試料の経時的な抗体価の推移についても検討した。

B. 研究方法

【材料および方法】

濾紙血液は平成 17 年度 (平成 17 年 9 月～平成 18 年 3 月) は猫ひっかき病検査用に 33 検体、トキソプラズマ症検査用に 40 検体を、平成 18 年度 (平成 18 年 4 月～12 月) は猫ひっかき病検査用に 48 検体、トキソプラズマ症検査用に 56 検体をそれぞれ採材した。各検体については、動物の飼育歴、接触歴についても聞き取り調査を行った。

猫ひっかき病の抗体測定は間接蛍光抗体法を用いた。56°C、30 分間で非働化した被検人