

表1. 爬虫類(カメ)の病原体保有状況

試料番号	ID	動物	由来	体重	備考
1	KT-1	ミドリガメ	神奈川-1	8.58g	脂肪肝
2	KT-2	ミドリガメ		9.22g	脂肪肝
3	KT-3	ミドリガメ		8.60g	脂肪肝
4	KT-4	ミドリガメ		8.07g	脂肪肝
5	KT-5	ミドリガメ		8.49g	肝正常色・肺肝変化
6	KT-6	ミドリガメ	神奈川-2	7.89g	脂肪肝
7	KT-7	ミドリガメ		7.78g	脂肪肝
8	KT-8	ミドリガメ		7.50g	脂肪肝
9	KT-9	ミドリガメ		6.46g	見かけ上病変なし
10	KT-10	ミドリガメ		8.73g	皮膚病変
11	OH-1	ミドリガメ	沖縄-1	6.9g	首・顎汚い
12	OH-2	ミドリガメ		7.7g	
13	OH-3	ミドリガメ		8.0g	
14	OH-4	ミドリガメ		8.1g	
15	OH-5	ミドリガメ		9.2g	
16	OH-6	ミドリガメ	沖縄-2	8.7g	
17	OH-7	ミドリガメ		9.5g	
18	OH-8	ミドリガメ		8.9g	
19	OH-9	ミドリガメ		8.1g	
20	OH-10	ミドリガメ		8.3g	
21	OH-11	ミドリガメ	沖縄-3	10.7g	
22	OH-12	ミドリガメ		7.9g	
23	OH-13	ミドリガメ		9.5g	腹甲の変形あり
24	OH-14	ミドリガメ		5.7g	
25	OH-15	ミドリガメ		9.0g	
26	OH-16	ミドリガメ	沖縄-4	8.5g	
27	OH-17	ミドリガメ		7.5g	
28	OH-18	ミドリガメ		7.2g	
29	OH-19	ミドリガメ		g	死亡
30	OH-20	ミドリガメ		9.5g	
31	OH-21	ミドリガメ	沖縄-5	9.3g	
32	OH-22	ミドリガメ		10.2g	
33	OH-23	ミドリガメ		10.0g	
34	OH-24	ミドリガメ		8.6g	
35	NH-1	ミドリガメ		長崎-1	9.5g
36	NH-2	ミドリガメ	11.1g		
37	NH-3	ミドリガメ	9.4g		
38	NH-4	ミドリガメ	8.4g		
39	NH-5	ミドリガメ	8.6g		
40	NH-6	ミドリガメ	長崎-2	8.8g	
41	NH-7	ミドリガメ		8.5g	
42	NH-8	ミドリガメ		10.4g	
43	NH-9	ミドリガメ		9.0g	
44	NH-10	ミドリガメ		7.9g	
45	NH-11	ミドリガメ	長崎-3	11.7g	
46	NH-12	ミドリガメ		12.0g	尾切れ先端のみ
47	NH-13	ミドリガメ		7.2g	尾切れ
48	NH-14	ミドリガメ		8.9g	
49	NH-15	ミドリガメ		9.7g	尾なし
50	NH-16	ミドリガメ	長崎-4	9.1g	甲羅軟らかい
51	NH-17	ミドリガメ		7.3g	
52	NH-18	ミドリガメ		7.8g	白斑
53	NH-19	ミドリガメ		7.4g	左下眼瞼白斑
54	NH-20	ミドリガメ		8.4g	
55	NH-21	ミドリガメ	長崎-5	6.7g	頭部白点
56	NH-22	ミドリガメ		6.9g	
57	NH-23	ミドリガメ		6.5g	甲羅非常に軟らかい
58	NH-24	ミドリガメ		6.7g	甲羅変形
59	NH-25	ミドリガメ		g	死亡

試料番号	ID	動物	由来	体重	備考
60	SK-1	ミドリガメ	WC	1453g	
61	SK-2	ミドリガメ		1700g	
62	SK-3	ミドリガメ		1021g	
63	SK-4	ミドリガメ		649g	
64	SK-5	ミドリガメ		315g	
65	SK-6	ミドリガメ		285g	
66	SK-7	ミドリガメ		304g	
67	TE-1	カミツキガメ	個人愛好家	4.5Kg	
68	TE-2	カミツキガメ		4.1Kg	
69	TE-3	カミツキガメ		3.9Kg	
70	KH-1	ワニガメ	WC	11Kg	37cm
71	KH-2	ワニガメ		7Kg	33cm
72	KH-3	カミツキガメ		6Kg	30cm
73	KH-4	カミツキガメ		4Kg	30cm
74	KH-5	ミドリガメ		1.6Kg	21cm
75	KH-6	ミドリガメ		1.45Kg	20cm
76	KH-7	ミドリガメ		1.05Kg	19.5cm
77	OP-1	ミドリガメ	大阪-1	9.0g	
78	OP-2	ミドリガメ		9.3g	
79	OP-3	ミドリガメ		8.3g	
80	OP-4	ミドリガメ		8.9g	
81	OP-5	ミドリガメ		7.7g	
82	OP-6	ミドリガメ	大阪-2	8.5g	
83	OP-7	ミドリガメ		7.3g	
84	OP-8	ミドリガメ		8.5g	
85	OP-9	ミドリガメ		8.0g	
86	OP-10	ミドリガメ		8.1g	
87	OP-11	ミドリガメ	大阪-3	7.7g	
88	OP-12	ミドリガメ		5.5g	
89	OP-13	ミドリガメ		6.9g	
90	OP-14	ミドリガメ		5.7g	
91	OP-15	ミドリガメ		6.6g	
92	OP-16	ミドリガメ	大阪-4	9.2g	
93	OP-17	ミドリガメ		9.4g	
94	OP-18	ミドリガメ		9.8g	
95	OP-19	ミドリガメ		9.5g	
96	OP-20	ミドリガメ		8.7g	
97	OP-21	ミドリガメ	大阪-5	9.2g	
98	OP-22	ミドリガメ		7.9g	
99	OP-23	ミドリガメ		11.1g	
100	OP-24	ミドリガメ		9.2g	
101	OP-25	ミドリガメ		7.8g	
102	AH-1	ミドリガメ	秋田-1	g	
103	AH-2	ミドリガメ		9.0g	
104	AH-3	ミドリガメ		9.3g	
105	AH-4	ミドリガメ		8.9g	
106	AH-5	ミドリガメ		8.3g	
107	AH-6	ミドリガメ	秋田-2	10.2g	
108	AH-7	ミドリガメ		8.8g	
109	AH-8	ミドリガメ		7.4g	
110	AH-9	ミドリガメ		10.5g	
111	AH-10	ミドリガメ		9.4g	
112	AH-11	ミドリガメ	秋田-3(WC)	731.0g	
113	AH-12	ミドリガメ		226.6g	
114	AH-13	ミドリガメ		226.1g	

表2. 臓器別の抗酸菌検出状況

	検体数	陽性数	皮膚	肝臓	肺	腸管
成体 <sup>※</sup>	20	9(45.0%)	8(40.0%)	2(10.0%)	0	1(5.0%)
幼体	94	78(83.0%)	75(79.8%)	29(30.9%)	17(18.1%)	25(26.6%)
合計	114	87(76.3%)	83(72.8%)	31(27.2%)	17(14.9%)	26(22.8%)

※WC(野外捕獲個体)または個人愛好家由来

表3. 由来別の抗酸菌検出状況

	皮膚	肝	肺	腸	保有 <sup>※</sup>	TOTAL
KT	10	8	7	6	10	10
AH	11	5	0	7	12	13
SK	3	0	0	0	3	7
TE	3	1	0	0	3	3
KH	1	0	0	1	1	7
NH	14	3	5	4	16	25
OP	21	7	0	6	21	25
OH	20	8	6	3	21	24
計	83	32	18	27	87	114

※皮膚、肝、肺、腸のいずれかで抗酸菌を保有していた個体の頭数

表4. 分離菌株数

	皮膚	肝	肺	腸	計
KT	27	11	17	10	65
AH	12	6	0	9	27
SK	3	0	0	0	3
TE	4	1	0	0	5
KH	1	0	0	1	2
NH	17	3	4	5	29
OP	33	8	0	7	48
OH	30	9	9	3	51
計	127	38	30	35	230

表5. 抗酸菌同定結果

選し番号	ID	臓器	同定結果
1	KT1	皮膚	<i>Mycobacterium</i> sp.
		皮膚	<i>Mycobacterium</i> sp.
		皮膚	<i>M.terrae</i> III
2	KT2	肝	<i>M.fortuitum</i>
		肝	<i>M.terrae</i> III
		肝	<i>M.terrae</i> III
3	KT3	肺	<i>Mycobacterium</i> sp.
		肺	<i>Mycobacterium</i> sp.
		肺	<i>M.fortuitum</i>
4	KT4	肺	<i>M.terrae</i> III
		皮膚	<i>M.terrae</i> III
		皮膚	<i>M.terrae</i> III
5	KT5	皮膚	<i>M.terrae</i> III
		皮膚	<i>M.terrae</i> III
		皮膚	<i>M.terrae</i> III
6	KT6	皮膚	<i>M.terrae</i> III
		肝	<i>M.terrae</i> II
		肺	<i>M.terrae</i> II
7	KT7	肺	<i>M.terrae</i> II
		肺	<i>M.terrae</i> II
		肺	<i>M.terrae</i> II
8	KT8	皮膚	<i>M.terrae</i> II
		肝	<i>M.terrae</i> II
		肺	<i>M.terrae</i> II
9	KT9	皮膚	<i>M.terrae</i> II
		肝	<i>M.terrae</i> II
		肺	<i>M.terrae</i> II
10	KT10	皮膚	<i>M.terrae</i> II
		肺	<i>M.terrae</i> II
		肺	<i>M.terrae</i> II
11	AH1	皮膚	<i>M.terrae</i> II
12	AH2	皮膚	<i>M.terrae</i> II
13	AH3	皮膚	<i>M.terrae</i> II
14	AH4	皮膚	<i>M.terrae</i> II
15	AH5	皮膚	<i>M.terrae</i> II
16	AH6	皮膚	<i>M.terrae</i> II
17	AH7	皮膚	<i>M.terrae</i> I
18	AH8	皮膚	<i>M.terrae</i> I
19	AH9	皮膚	<i>M.terrae</i> I
20	AH10	皮膚	<i>M.terrae</i> II
21	AH12	皮膚	<i>M.terrae</i> II
22	AH13	肝	<i>M.terrae</i> II
23	SK2	皮膚	<i>M.terrae</i> II
24	SK5	皮膚	<i>M.terrae</i> II
25	SK7	皮膚	<i>M.terrae</i> I
26	TE1	皮膚	<i>M.terrae</i> I
27	TE2	皮膚	<i>M.terrae</i> I
28	TE3	皮膚	<i>M.terrae</i> I
29	KH2	皮膚	<i>M.terrae</i> I
30	NH1	皮膚	<i>M.terrae</i> I
31	NH5	皮膚	<i>M.terrae</i> I
32	NH7	皮膚	<i>M.terrae</i> I
33	NH8	皮膚	<i>M.terrae</i> I
34	NH9	皮膚	<i>M.terrae</i> I
35	NH10	皮膚	<i>M.terrae</i> I
36	NH13	皮膚	<i>M.terrae</i> I
37	NH14	皮膚	<i>M.terrae</i> I
38	NH16	皮膚	<i>M.terrae</i> I

選し番号	ID	臓器	同定結果
39	NH17	皮膚	<i>Mycobacterium</i> sp.
		肺	<i>M.terrae</i> II
		肺	<i>M.terrae</i> II
40	NH19	皮膚	<i>M.terrae</i> II
41	NH20	皮膚	<i>M.terrae</i> II
42	NH21	皮膚	<i>M.terrae</i> II
43	NH23	皮膚	<i>M.terrae</i> II
44	NH24	皮膚	<i>M.terrae</i> II
45	NH25	皮膚	<i>M.terrae</i> II
46	OP2	皮膚	<i>M.terrae</i> II
47	OP3	皮膚	<i>M.terrae</i> II
48	OP4	皮膚	<i>M.terrae</i> II
49	OP5	皮膚	<i>M.terrae</i> II
50	OP6	皮膚	<i>M.terrae</i> II
51	OP7	皮膚	<i>M.terrae</i> II
52	OP8	皮膚	<i>M.terrae</i> II
53	OP9	皮膚	<i>M.terrae</i> II
54	OP10	皮膚	<i>M.terrae</i> II
55	OP11	皮膚	<i>M.terrae</i> II
56	OP12	皮膚	<i>M.terrae</i> II
57	OP13	皮膚	<i>M.terrae</i> II
58	OP14	皮膚	<i>M.terrae</i> II
59	OP15	皮膚	<i>M.terrae</i> II
60	OP16	皮膚	<i>M.terrae</i> II
61	OP17	皮膚	<i>M.terrae</i> II
62	OP18	皮膚	<i>M.terrae</i> II
63	OP19	皮膚	<i>M.terrae</i> II
64	OP22	皮膚	<i>M.terrae</i> II
65	OP24	皮膚	<i>M.terrae</i> II
66	OP25	皮膚	<i>M.terrae</i> II
67	OH1	皮膚	<i>M.terrae</i> II
68	OH2	皮膚	<i>M.terrae</i> II
69	OH3	皮膚	<i>M.terrae</i> II
70	OH4	皮膚	<i>M.terrae</i> II
71	OH5	皮膚	<i>M.terrae</i> II
72	OH6	皮膚	<i>M.terrae</i> II
73	OH7	皮膚	<i>M.terrae</i> II
74	OH8	皮膚	<i>M.terrae</i> II
75	OH9	皮膚	<i>M.terrae</i> II
76	OH10	皮膚	<i>M.terrae</i> II
77	OH11	皮膚	<i>M.terrae</i> II
78	OH12	皮膚	<i>M.terrae</i> II
79	OH13	皮膚	<i>M.terrae</i> II
80	OH14	皮膚	<i>M.terrae</i> II
81	OH15	皮膚	<i>M.terrae</i> II
82	OH16	皮膚	<i>M.terrae</i> II
83	OH17	皮膚	<i>M.terrae</i> II
84	OH19	皮膚	<i>M.terrae</i> II
85	OH21	皮膚	<i>M.terrae</i> II
86	OH22	皮膚	<i>M.terrae</i> II
87	OH24	皮膚	<i>M.terrae</i> II

## ミシシippアカミミガメの *Salmonella* 保有調査

分担研究者：宇根有美 麻布大学獣医学部病理学研究室  
研究協力者：黒木俊郎 神奈川県衛生研究所微生物部腸管系細菌グループ  
石原ともえ 神奈川県衛生研究所微生物部腸管系細菌グループ  
吉川泰弘 東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物学研究室  
太田周司 東京検疫所川崎支所  
協力機関：長崎県（長崎県西彼保健所、長崎衛生公害研究所）  
長崎市（長崎保健環境試験所）  
沖縄県（沖縄動物管理センター、沖縄県衛生研究所、  
沖縄県中央食肉衛生検査所）  
秋田県（秋田県動物管理センター）

### 研究要旨：

爬虫類に由来すると推測される重篤な *Salmonella* 症が近年発生していることから、爬虫類の *Salmonella* 保有が再び注目されている。本研究では、ペットとして市販されているミシシippアカミミガメの *Salmonella* 保有を調査した。結果、成体では31個体中3個体（9.7%）から、幼体は93個体中69個体（74.2%）から *Salmonella* が検出された。現在、*Salmonella* 症の発生を予防するために、必ずしも十分な対策が取られているとはいえない。特に小児をはじめ高齢者、免疫機能の低下した患者等では重症例の危険性が高いことから、販売業者および一般飼育者に対するペット由来 *Salmonella* 症の注意喚起と取扱いにおける衛生概念の啓発が重要であり、さらに販売されるミシシippアカミミガメのものに対する対策をたてる必要があると考えられる。

### A. はじめに

愛玩用カメが感染源と考えられる *Salmonella* 症については、米国において1960～1970年代、家庭で飼育している愛玩用カメが感染源となる事例が多発したことから調査や研究が行われた<sup>1-4)</sup>。本邦においても、1975年6月と7月に、広島県呉市と広島市において各1例ずつの幼児の重篤な *Salmonella* 症の発生が報告された<sup>5,6)</sup>。この症例はいずれも、本邦で初めての家庭で飼育されていた愛玩用ミドリガメ（アカミミガメ：*Trachemys scripta elegans* の幼体）が感染源と解明された事例であった。

本事例が引き金となり、当時の広島市衛生研究所中森らと国立予防衛生研究所（現国立感染症研究所）坂崎らが中心となり、疫学的背景の究明を目的として市販の愛玩用カメの *Salmonella* 保菌調査が実施され、この結果、高率な保菌状況が解明され公衆衛生上きわめて危険であるとの指摘がなされた<sup>6)</sup>。

2005年、千葉県で愛玩用カメが感染源と考えられる2事例の *Salmonella* 症が報告された<sup>10)</sup>。まず、3月に1歳児が *Salmonella* 髄膜炎に罹患した事例、ついで10月には6歳児が *Salmonella* 腸炎と敗血症を併発し

た事例が報告された。10月の事例ではカメを飼育していた水槽から患児から分離された血清型と同じ *Salmonella* が検出されている。

愛玩用カメを感染源とする *Salmonella* 症があらためて問題となっていることから、われわれは、愛玩用ミドリガメ（ミシシッピアカミミガメ）を中心に爬虫類の *Salmonella* 保菌状況を調査した。

## B. 材料と方法

### 1) カメ

ミシシッピアカミミガメは、秋田県、神奈川県、大阪府、長崎県および沖縄県のペット販売店19店舗より、幼体93匹を購入した。成体31匹は公園の池に生息する個体や飼育個体等を調査の対象とした。

カメに致死性の麻酔あるいは断首を施した後、全頭の腸管と内容物および肝臓を、雌の成体の一部では卵、幼体の一部では卵黄を取り出した。培養に供するまで冷蔵保存した。

カメが飼育されていた容器の水と池の水も *Salmonella* 分離の対象とした。

### 2) *Salmonella* の分離

*Salmonella* の分離方法の概略を図1に示した。成体の試料は指頭大を10倍量程度になるように30mlのBuffered Peptone Water (BPW: Oxoid) に、幼体では小豆大から大豆大の試料を5mlのBPWに接種し、いずれも36°Cで20~22時間培養した。飼育容器の水は10倍量のBPWを加え、同様に36°Cで20~22時間前培養を行った。培養後、それぞれの試料の培養液1mlをハーナ・テトラチオン酸塩培地10mlに接種して、42°Cで18~20時間選択増菌培養し、その培養液1白金耳をSS寒天培地（栄研器材）とESサルモネラ培地II（ESII：栄研器材）に接種し、36°Cで20~22時間分離培養した。培養後、*Salmonella* 様集落としてSS寒天培地では硫化水素産生性の黒色集落を、ESサルモネラ培地IIではやや乾燥した桃色集落

を釣菌し、TSI培地、SIM培地、リシン脱炭酸試験培地およびVP試験用培地を用いて従来法に準じて *Salmonella* の同定を実施した。

*Salmonella* 様集落については確認培地として、TSI培地、SIM培地、リシン脱炭酸試験培地およびVP試験用培地を用い、生化学的性状を調べて *Salmonella* と同定した。ついで、サルモネラ診断用免疫血清（デンカ生研）によりO型別およびH型別を行い、血清型名を決定した。また、血清型別不能菌株に関しては、従来法・IDテストEB-20（日水製薬）およびAPI20E（バイオメリュー）を用いて亜種の鑑別を行った。

## C. 結果

成体では31個体中3個体（9.7%）から *Salmonella* が検出された。検出された成体は、野外採取個体の2個体および池に生息していた1個体であった。幼体は93個体中69個体（74.2%）から *Salmonella* が検出された。成体では *Salmonella* はすべて腸管（および内容物）から検出され、肝臓からは検出されなかった。これに対して、幼体では腸管からは38個体（40.9%）、腸管および肝臓からは28個体（30.1%）、肝臓からは3個体（3.2%）で *Salmonella* が検出された。したがって、腸管から検出されたのは66個体（71.0%）で検出69個体の95.7%を占めた。これに対して、肝臓からは31個体（33.3%）で、検出69個体の44.9%であった（表1）。

幼体を購入した19店舗のうち18店舗で *Salmonella* 検出個体が販売されていた。各店舗で購入した5個体（2店舗では4個体）における検出率は0~100%であったが、100%であった店舗が9店舗と最も多く、次いで60%が4店舗、80%が3店舗、20%が2店舗の順であった。

検出された血清型は由来（店舗）により異なっていたが、亜種Iが51株検出されており、*S. Montevideo* がもっとも多く24

検体から、*S. Litchfield* 5 検体、*S. Newport* 5 検体、*S. Poona* or *S. Farmsen* 4 検体、*S. Typhimurium* および *S. Newport* (Bardo) が 3 検体、*S. Thompson* および *S. Sandiego* が 2 検体、また、04:i:—、*S. Lagos* および *S. Litchfield* (Pakistan) がそれぞれ 1 検体から検出された。一方、亜種 I 以外の *Salmonella* が 35 株検出されており、これらの菌株については現在型別試験中である (表 2)。成体では、野生の 2 個体から *S. Litchfield* と亜種 II が検出され、また、池に生息していた 1 個体からは *S. Newport* が検出された (表 3)。

飼育水と池の水からは、カメ個体分離株とほぼ一致する血清型の *Salmonella* が 18 検体のうち 14 検体 (77.8%) から検出され、*S. Lagos* は飼育水でのみ検出された。また、このうち定量した 2 検体の菌数は、それぞれ、 $>1100\text{cfu}/100\text{ml}$ 、 $460\text{cfu}/100\text{ml}$  と、飼育水中に高濃度に *Salmonella* が含まれていた。

#### D. 考察

本調査では、市販のミシシippアカミミガメの幼体を中心に、*Salmonella* の保有状況を改めて調査した。その結果、幼体では 93 個体中 69 個体 (74.2%) と非常に高率に *Salmonella* が検出された。これに対して成体では 31 個体中 3 個体 (9.7%) と低い保有率を示した。さらに、飼育水からは高率に *Salmonella* が分離 (18 検体中 14 検体、77.8%) され、また、菌量が非常に多く ( $>1100\text{cfu}/100\text{ml}$ 、 $460\text{cfu}/100\text{ml}$ )、飼育水中に高濃度に *Salmonella* が含まれていることが分かった。このことから、飼育水は *Salmonella* スクリーニング検査の対象として非常に有用であると考えられ、一方、公衆衛生上のリスクが非常に高いと言える。

米国においては 1960 年代～1970 年代に実際にカメによる *Salmonella* 感染が証明され、その後、カメに関する *Salmonella* についての詳細な調査と感染防止対策がと

られて現在に至っている<sup>7-9)</sup>。これに対してわが国ではほとんど対策が取られてこなかった。1975 年の広島県での事例<sup>6)</sup>で中森らはつぎのように記述している。

「しかし、これに反し、わが国では近年アメリカから大量の愛玩用の‘ミドリガメ’が輸入され、市販されているが、病原微生物についての本格的調査はなく、まったくの野放し状態で販売されているのが実情である。近年、*Salmonella* 症は年々増加の傾向にあるが、愛玩用のカメの高率な *Salmonella* 保菌は、その飼育者が感受性の高い幼児であるだけに、嚴重な感染防止対策が要求されるのは当然であろう。本報ではわが国初の確認事例とその疫学的背景を紹介し、ペット対策の基礎資料としたい。」この記述以降も、本邦では 30 有余年にわたってミドリガメの輸入規制はなされていない。

爬虫類、特にミシシippアカミミガメの *Salmonella* 保有は以前から調査が行われ、高率に保有していることが報告されている。カメは亜種 III や IV を保有しているが、ヒトに病原性を有する亜種 I も保有することが知られている。今回の調査でも *Salmonella* 亜種 I の保有率は 47.3% と非常に高率であった。*Salmonella* を保有することは前述したとおり以前から知られ、爬虫類との関連性が強い *Salmonella* 症の報告も数多くある。米国 FDA では小型カメが *Salmonella* 症の原因となることを懸念して、1975 年以降、商業目的による 4 インチ以下のカメの販売を禁止している。この販売禁止令により、小児における *Salmonella* 症は毎年およそ 10 万例が予防されたと推定している。

わが国では、平成 17 年 12 月 22 日付けで厚生労働省健康局結核感染症課長通達 (健感発第 1222002 号) が各都道府県に通達され、改めてミドリガメ等の爬虫類を原因とする *Salmonella* 感染症についての注意が喚起された。また、動物愛護法では、動物の販売時に販売主は客に対して販売動物が

らの動物由来感染症の危険性について説明しなければならないと定められている。こうした対策はペットとして爬虫類を飼育する飼育者に対するものであるが、*Salmonella* 症の発生を予防するためには必ずしも十分な対策であるとはいえない。特に小児をはじめ高齢者、免疫機能の低下した患者等では重症例の危険性が高いことから、販売業者および一般飼育者に対するペット由来 *Salmonella* 症の注意喚起と取扱における衛生概念の啓発が重要であり、さらに販売されるミシシippアカミミガメそのものに対する対策をたてる必要があると考えられる。

#### E. 文献

- 1) Williams, L. P. and Helsdon, H. L. : Pet turtles as a cause of human salmonellosis. J. Amer. Med. Assoc., 192, 347-351, 1965
- 2) Rosenstein, B. J., Russo, P. and Hinchliffe, M. C. : A family outbreak of salmonellosis traced to a pet turtle. New England J. Med., 272, 960-961, 1965
- 3) Lamm, S. H. et al. : Turtle-associated salmonellosis. I. An estimation of the magnitude of the Problem in the United States, 1970-1971. Amer. J. Epidemiol., 95, 511-517, 1972
- 4) Altman, R. et al. : Turtle-associated salmonellosis. II. The relationship of pet turtles to

salmonellosis in children in New Jersey. 95. 518-520, 1972

- 5) 中森純三、西尾隆昌：都市下水系における *Salmonella* の汚染実態、広島県衛生研究所・公害研究所研究報告。22. 22~25、1975
- 6) 中森純三ら：愛玩“ミドリガメ”関連サルモネラ症、臨床と細菌 3(1) : 88-94、1976、東京
- 7) 21 CFR 1240. 62. Turtles Intrastate and intrastate requirements.
- 8) Cohen ML et al., : Turtle-associated salmonellosis in the United States : effect of public health action, 1970 to 1976. JAMA 243, 1247-1249, 1980

F. 健康危機管理情報  
なし

G. 研究発表  
誌上发表  
なし

学会発表  
なし

図1 カメの検体からの *Salmonella* 検出法

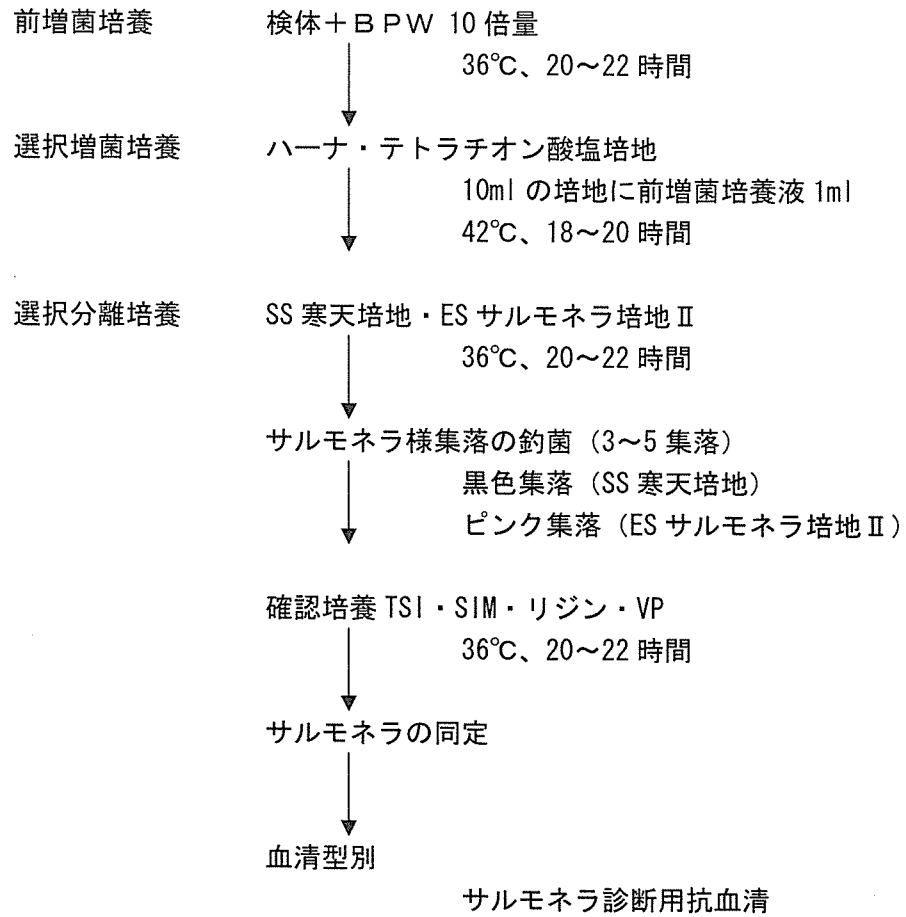


表1 ミシシippアカミミガメの部位別の *Salmonella* 検出状況

	検体数	陽性数	腸管のみ	腸管・肝臓	肝臓のみ
成体	31	3 (9.7%)	3 (9.7%)	0	0
幼体	93	69 (74.2%)	38 (40.9%)	28 (30.1%)	3 (3.2%)



表2 ミシシippアカミガメ幼体からの *Salmonella* の検出

販売店	検体数	陽性数	血清型名
F	5	4	Poona or Farmsen (4)
飼育水			Poona or Farmsen >1100cfu/100ml
G	5	3	Montevideo (3)、OUT (BGIII) (1)
飼育水			Montevideo 460cfu/100ml
H	5	4	OUT (BGIV or BGIII) (4)
飼育水			Sandiego、Thyphimurium、Montevideo、OUT
I	5	3	Sandiego (1)、OUT (BGIII) (2)
飼育水			Montevideo
J	5	4	Thyphimurium (3)、04 : i : - (1)
飼育水			不検出
K	5	1	Montevideo (1)
飼育水			Montevideo
L	5	5	Montevideo (1)、OUT (4)
飼育水			不検出
M	4	4	Montevideo (4)
N	5	0	不検出
O	5	5	Thompson (2)、OUT (5)
飼育水			Thompson、OUT
P	5	5	Montevideo (5)、OUT (1)
飼育水			Montevideo、Newport
Q	4	4	Litchfield (4)、OUT (3)
飼育水			Litchfield (Pakistan)、OUT、
R	4	5	Montevideo (5)
飼育水			Montevideo
S	5	5	Montevideo (5)
飼育水			Montevideo、Sandiego
T	5	3	OUT (3)
飼育水			Lagos、OUT
U	5	5	Newport (2)、OUT (4)
飼育水			Newport (Bardo)、Litchfield
V	5	3	Newport (2)、OUT (1)
飼育水			Newport (Bardo)、OUT
W	5	5	OUT (5)
飼育水			OUT、Newport (Bardo)
X	5	1	Litchfield (1)
飼育水			Montevideo
合計	93	69	亜種 I : 51、その他 : 35

表3 ミシシippアカミミガメ成体からの *Salmonella* 検出

検体	検体数	由来	陽性数	血清型名
A	11	不明	0	
B	7	野外	2	Litchfield (1)、OUT (BG II) (1)
C	3	野外	0	
D	7	野外	1	Newport (1)
		池の水		Newport
E	3	個人飼育	0	
合計	31		3	

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

翼手目由来のウイルス感染症の疫学的解明

分担研究者 吉川 泰弘 （東京大学大学院 農学生命科学研究科 教授）  
協力研究者 大松 勉 （東京大学大学院 農学生命科学研究科）

研究要旨

翼手目（以下、コウモリ）は、狂犬病ウイルスをはじめニパウイルス・ヘンドラウイルスなど、人に対して重篤な症状を示す感染症の媒介動物もしくは自然宿主であることが明らかになっている。さらに bat-SARS-CoV やエボラ出血熱ウイルスなども分離されており、コウモリを由来とする感染症の報告は増加している。しかしコウモリに関しては、免疫機能をはじめとする基礎研究は進んでおらず、感染症媒介動物としての評価は行われていない。そこでエジプトルーセットオオコウモリ及びデマレルーセットオオコウモリを対象として、系統解析を中心とした生物学的背景とウイルス制御に関わる因子について解析を行った。生物学的背景を検索した結果、ミトコンドリア DNA からはコウモリは偶蹄目・奇蹄目・食肉目などからなる群と近縁であり、CD4、IgFcRn、IFN- $\alpha$ 、 $\beta$ などの免疫関連因子も同様の結果であった。さらに、IgG 抗原エピトープの類似性からは蛋白レベルにおいてもコウモリが単系統であることが示唆された。また、ウイルス制御関連因子として、腹腔内温度変化、飼育コウモリにおける脾臓の病理学的検索、in vitro におけるコウモリ type I IFN 下流因子の同定を行なった。腹腔内体温については日内変動が他動物種に比べ大きいことがわかった。脾臓の病理組織学的検索においては 22 個対中 9 個体で反応性変化が認められた。さらに、コウモリ腎由来初代培養細胞を作成しコウモリ肺由来株化細胞と poly(I:C)およびコウモリ type I IFN に対する反応性を検索したところ肺由来株化細胞においてはどちらに対しても type I IFN mRNA の発現が見られず、これらが両細胞間でのウイルス感受性の差を誘導する可能性が示唆された。

A. 研究目的

コウモリは 2003 年に輸入禁止措置が取られるまで年間数百頭が飼育・愛玩動物として輸入されてきた。さらに、そのエコーロケーション能力、系統進化、食性、生殖機能などに特徴を持つ動物種としても注目され研究も進められてきた。しかし一方で、

ヘンドラウイルス、ニパウイルスや狂犬病ウイルスを含めたリッサウイルスなどヒトに重篤な症状を示す病原体を媒介することが明らかとなり、さらに bat-SARS-CoV やエボラ出血熱ウイルスなども分離され、コウモリを由来とする感染症の報告が近年増加している。このように注目を集めているコ

ウモリではあるが、その免疫機能をはじめとする生体機能に関しては未だ不明な点が多い。コウモリを感染症媒介動物として評価していく上では、その免疫機能だけではなく系統樹、生態系、生活環境、食性、生理的機能などの基礎情報を明らかにし、それらを総合的に解析していく必要がある。しかし近年の感染症研究はウイルスの病原性評価が主体であり、媒介動物の特性に注目した研究は少ない。そこで本研究においてはコウモリの基礎情報として、その遺伝学的背景、免疫因子の特徴および生理的機能を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. ミトコンドリア DNA および免疫関連因子の遺伝子解析

本研究における実験対象動物としてルーセットオオコウモリを用いる上で、遺伝学的背景を明らかにすることは重要である。そこでエジプトルーセットオオコウモリ肝臓より抽出した DNA を用いて direct sequencing 法および shotgun sequencing 法によりミトコンドリア DNA 全塩基配列を決定した。コウモリは、分布や定位、食性、解剖学的特徴などから大きくオオコウモリとココウモリに分類される。今回、研究対象として用いたルーセットオオコウモリは小型コウモリの特徴であるエコーロケーション能を有している唯一のオオコウモリである。

また、コウモリ由来感染症について研究する上でコウモリの免疫関連分子の同定は必須である。しかし、これまでそれらに関する報告はほとんどない。そこでエジプト

及びデマレルーセットオオコウモリ脾臓由来 mRNA から cDNA を作成し、免疫機能に関与する CD4、IgFcR について蛋白コード領域の全長塩基配列を決定し解析を行った。また、IFN- $\alpha$ 、 $\beta$  についてはデマレルーセットオオコウモリ肝臓由来 DNA を用いて蛋白コード領域の同定を行い解析した。また、細胞表面因子についてはアミノ酸配列の比較を行った。

### 2. IgG 抗原エピトープの類似性の検索

これまで中和抗体法を用いた疫学調査は行われてきたが、感染媒体としてコウモリを評価していくためにはより広範囲な疫学調査が必要とであり、そのために抗コウモリ抗体を用いた ELISA system の開発は必須である。そこで、ELISA system に必要となる抗オオコウモリ IgG 抗体を作成し、その特異性について競合 ELISA 法により検索した。対象血清としては、翼手目 3 種 (N=6)、霊長目 4 種 (N=5)、食肉目 1 種 (N=4)、食虫目 2 種 (N=9) を用いた。

### 3. 免疫器官の病理学的・免疫組織化学的検索

コウモリの免疫器官に関する病理学的評価を行なった報告はほとんどなく、今後疫学調査や感染実験を行っていく上でその免疫器官の正常状態を明らかにすることは重要である。そこでわが研究室で飼育しているオオコウモリ 22 個体の脾臓の病理学的検索を行いその反応性変化について病理学的評価を行なった。また著変の見られない個体について、それぞれ抗 CD3、BLA-36、Iba-1 抗体を用いて免疫染色を行い、T 細胞、B 細胞、マクロファージの局在を検索した。

#### 4. テレメーターを用いた腹腔内温度変化の解析

体温は病原体に対する生体防御機構としても重要な作用を示す生理的因子である。しかし、コウモリの体温に関する報告はほとんどない。そこで、デマレルーセットオオコウモリ腹腔内にテレメーターを挿入し体温変化について検索を行った。

#### 5. コウモリ細胞におけるウイルス制御因子の動態解析

type I IFN は自然免疫に関与する因子であり、様々な抗ウイルス因子を誘導する。これまで、他動物種においてはウイルス動態と type I IFN の関連について検索がされてきたがコウモリに関する検索は行われていない。まず、基礎情報としてコウモリ腎臓由来初代培養細胞(BPKCs)と肺由来株化細胞(Tb-1 Lu)に対して type I IFN 誘導剤である poly(I:C)およびコウモリ細胞由来 type I IFN を処置し、type I IFN mRNA の発現を検索した。

### C・D. 研究結果・考察

#### 1. ミトコンドリア DNA を用いた系統解析

系統解析の結果、ルーセットオオコウモリはオオコウモリの中で最も早く小型コウモリより分岐し、特にキクガシラコウモリ上科群から分岐した可能性が示唆された。また、コウモリは食肉目・偶蹄目・奇蹄目からなる群と近縁であるという説を支持する結果であった。また、免疫関連因子についてもそれぞれ食肉目や偶蹄目などとの近縁性が示唆された (Fig. 1)。

細胞表面因子である CD4 や IgFcRn のアミノ酸配列を用いた比較したところ、コウモリ特異的もしくはコウモリとイヌ・ネコにしか見られない挿入配列があった。また CD4 の Ig-like C2 domain においてはコウモリ CD4 ではネコやブタ、イヌ CD4 と同様ジスルフィド結合を形成しない可能性が示唆され、ヒトやマウスなどとは異なる三次元構造を有し、感染病原体や MHC classII との結合や T 細胞の活性に影響を及ぼす可能性が示唆された (Fig. 2)。

#### 2. IgG 抗原エпитープの類似性の検索

エジプトルーセットオオコウモリ血清より Protein G column を用いてコウモリ IgG を精製し、それをウサギに 3 回免疫することで抗オオコウモリ IgG ウサギポリクローナル抗体を得た。それを Western Blotting 法を用いて 150kd 付近の 1 本のバンドに反応する事を確認した。本抗体を用いて、霊長目、食肉目および食虫目の IgG 抗原エピトープの類似性について検索を行った結果、本抗体はコウモリを含めたコウモリ全般にのみ高い特異性を示し、本抗体が抗汎コウモリ抗体として使用できることが明らかとなった (Fig. 3)。

#### 3. 免疫器官の病理学的・免疫組織化学的検索

飼育オオコウモリ 22 個体について、HE 染色による病理学的評価を行った。評価項目としては、1) 濾胞増生、2) 白脾髄胚中心の明瞭化、3) 赤脾髄リンパ球の増生、4) starry sky 像の有無について検索を行った。その結果 22 個体中 9 個体で反応性変化が認められた。そのうち 4 個体で中等度も

しくは高度な濾胞増生が、8 個体で中等度の胚中心の明瞭化が認められた (Table 1)。また著変の見られなかった個体における免疫染色の結果、T 細胞・B 細胞・マクロファージはマウスなどと同様な分布を示した (Fig. 4)。これらの結果より、肺中心の明瞭化が見られた 8 個体においては B 細胞の活性化が起きている可能性が考えられ、これがなんらか感染によるものか等について今後免疫染色や病原体分離などを行いより詳細な解析を行っていく。

#### 4. テレメーターを用いた腹腔内温度変化の解析

オオコウモリはラットに比べ日内変動の幅が大きく暗期では平均 39°C 近くあり、時に 40°C を超える事もあった (Fig. 5)。この事からコウモリ体内におけるウイルス増殖は体温変化により影響を受ける可能性が示唆された。

#### 5. コウモリ細胞におけるウイルス制御因子の動態解析

poly(I:C) 処置 3 時間後において BPKCs では IFN- $\beta$  mRNA の発現が確認されたのに対し、Tb-1 Lu では mRNA 発現は確認されなかった。また、コウモリ細胞由来 type I IFN 処置後の経時的な type I IFN mRNA の発現を観察したところ、BPKC において 8 時間後をピークとした IFN- $\alpha$  の、4 時間後をピークとした IFN- $\beta$  の発現が見られたが、Tb-1 Lu の発現は認められなかった。poly(I:C) は TLR3、RIG-1、MAD5 等により認識され、また type I IFNs は IFN レセプターにより認識され type I IFNs 発現を誘導するが、Tb-1 Lu ではこのメカニズムが破綻している可能性があり、

ウイルス感染実験における正常な細胞反応を見るために BPKC が有用性であることが示された。

#### E. 結論

これまでの解析により、遺伝学的な偶蹄目・奇蹄目・食肉目などとの近縁性が示唆されたが、タンパク分子構造や体内温度などコウモリ特有の特徴を持つことも明らかになった。さらに、獲得免疫に関わる脾臓や自然免疫に関わる type I IFN 発現などの基礎情報も得られたことから、今後さらにコウモリの基礎研究を進めることによりコウモリ由来感染症の疫学的な解明を進めていく。

#### F. 研究危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 学会発表

1) 大松勉・吉川欣亮・石井寿幸・久和茂・宇根有美・吉川泰弘

ミトコンドリア DNA 塩基配列を用いたルーセットオオコウモリの系統分類

日本獣医学会、岩手大学、2001 年 10 月

2) 大松勉・吉川欣亮・石井寿幸・久和茂・宇根有美・吉川泰弘

ミトコンドリア DNA 全塩基配列を用いた翼手目の系統分類

日本進化学会、中央大学、2002 年 8 月

3) 大松勉・西村順裕・石井寿幸・寺尾恵治・久和茂・吉川泰弘

翼手目免疫分子の特性解析について

日本獣医学会、北海道大学、2004 年 9

月

- 4) 大松勉・渡辺俊平・西村順裕・石井寿幸・寺尾恵治・遠矢幸伸・久和茂・明石博臣・吉川泰弘

翼手目の特性について ―系統的・免疫学的・分子生物学的検索―

人と動物の共通感染症研究会、JA ホール、2005年11月

- 5) 大松勉・渡辺俊平・川口友浩・朴銀庭・石井寿幸・桑原正貴・遠矢幸伸・久和茂・明石博臣・吉川泰弘

翼手目の特性について、

実験動物学会、神戸、2006年5月

## 2. 論文発表

- 1) Omatsu T, Ishii Y, Kyuwa S, Milanda EG, Terao K, Yoshikawa Y.

Molecular evolution inferred from immunological cross-reactivity of immunoglobulin G among Chiroptera and closely related species.

*Exp Anim.*, JALAS, 52(5): 425-8.; 2003

- 2) Omatsu T, Nishimura Y, Bak EJ, Ishii Y, Tohya Y, Kyuwa S, Akashi H, Yoshikawa Y.

Molecular cloning and sequencing of the cDNA encoding the bat CD4.

*Vet Immunol Immunopathol.*, ELSEVIER, 111(3-4); 309-13.; 2006.

## H. 知的財産権の出願・登録情報

なし





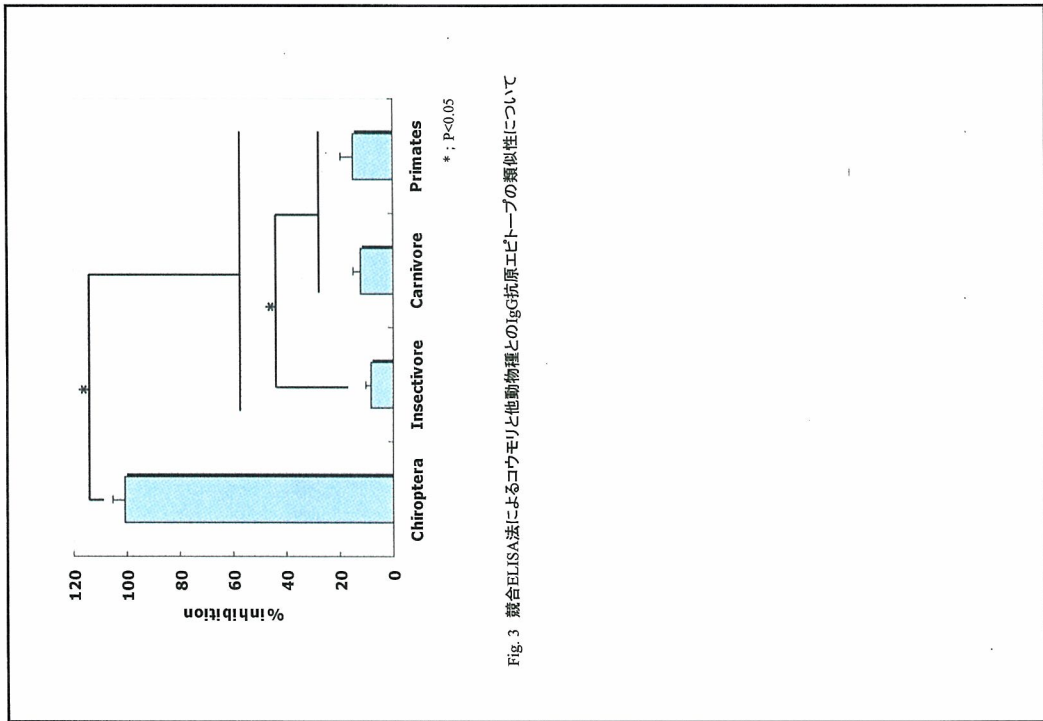


Fig. 3 競合ELISA法によるコウモリと他動物種とのIgG抗原エпитオプの類似性について

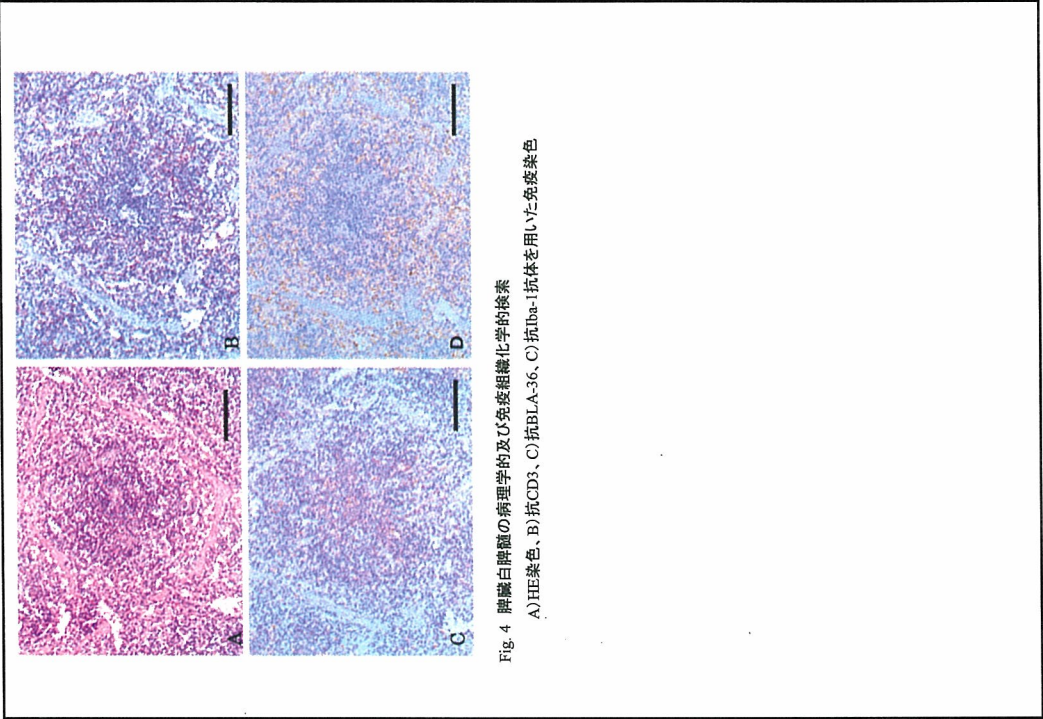
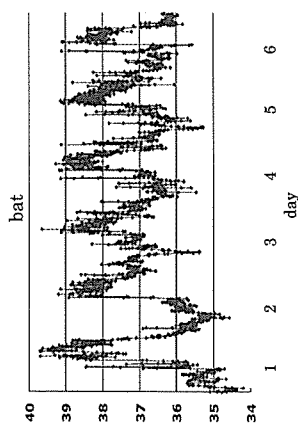
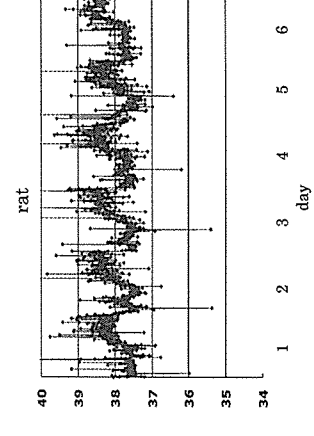


Fig. 4 脾臓白脾髄の病理学的及び免疫組織化学的検索  
 A) HE染色, B) 抗CD3, C) 抗BLA-36, D) 抗Iba-1抗体を用いた免疫染色



(A)



(B)

Fig. 5 テレメータを用いたコウモリ腹腔内温度の検索

Table 1 飼育コウモリ脾臓の病理学的評価

No. of bats	the	hypertrophic	the	starry
	follicular	germinal	proliferation	sky
	hyperplasia	centers	of immune	
			cells in red	
			pulp	
	Lab. Megachiroptera			
1	0	2	0	-
2	-1	0	0	+
3	0	2	0	+
4	0	0	0	-
5	0	0	0	+
6	0	1	0	-
7	-1	0	0	-
8	0	1	0	-
9	0	0	0	-
10	0	0	0	-
11	-1	0	-1	-
12	0	1	0	-
13	1	2	0	-
14	3	1	0	-
15	0	2	0	-
16	2	0	1	-
17	1	2	1	-
18	2	2	-1	-
19	0	2	1	-
20	2	0	0	-
21	1	2	0	-
22	1	1	1	-

3. 重症、2. 中等度、1. 軽度、0. 著変なし、+：陽性、-：陰性

国内におけるブルセラ症（**Brucellosis**）患者報告に関する調査研究

分担研究者	今岡 浩一	国立感染症研究所	獣医科学部	主任研究官
協力研究者	神山 恒夫	国立感染症研究所	獣医科学部	第一室長
協力研究者	多田 有希	国立感染症研究所	感染症情報センター	主任研究官

研究要旨：ブルセラ症（**Brucellosis**）はブルセラ属菌（genus *Brucella*）による人獣共通感染症である。我が国におけるヒトのブルセラ症は、1999年4月1日施行の感染症法で4類感染症に指定され、診断した医師に届出が義務づけられるまで、届出対象疾患ではなかったため発生状況は正確に把握されていなかった。今回、日本におけるブルセラ症患者発生状況について、感染症法指定以前は過去の文献により、指定以降は届出情報をもとに調査した。また、併せて動物における発生状況も検討した。

その結果、1933年に初めて報告されて以来、1999年3月までに58例の報告があった。このうち*B. abortus*は国内感染が多いが、*B. melitensis*や*B. suis*は海外からの帰国者や実験室感染が主であった。1999年4月1日以降、届出は8例あったが、2005年2例、2006年5例と近年に報告が集中していた。これは患者数が増加したと考えるよりも、むしろ診断の際にブルセラ症が考慮されるようになったためかもしれない。*B. melitensis*感染者の2例は海外で感染し国内で発症したもので、*B. abortus*感染者1例は海外で感染・発症し、治療を受けたが、国内で再燃したと考えられた。これらの推定感染地域はシリア、エジプトなどで、汚染食品の喫食あるいは環境からのエアロゾルの吸入により感染したと考えられた。このように輸入感染症の1つとして注意しておく必要がある。一方、*B. canis*感染と推定された者のうち3例は海外渡航歴もなく、イヌとの接触歴も定かでなく、従って感染経路は不明であった。日本では、家畜対策が功を奏し、清浄化していると考えられるので、現在は国内で家畜から*B. melitensis*、*B. abortus*や*B. suis*に感染する可能性は低い。ただし、イヌでは現在でも2~5%前後が*B. canis*に感染歴を持つと考えられており、イヌからヒトへの感染に注意する必要がある。

A. 研究目的

ブルセラ症（**Brucellosis**）はブルセラ属菌（genus *Brucella*）による人獣共通感染症で

ある。ヒトに感染する代表的なものは、ヒトに対する病原性の強い順に *B. melitensis*（自然宿主：ヤギ、ヒツジ）、*B. suis*（ブタ）、*B. abortus*（ウシ）、*B. canis*（イヌ）の4菌種で

ある。ヒトへの感染は感染動物の加熱(殺菌)処理していない生乳およびそれから作ったチーズ、食肉の喫食や、死体・流産時の汚物・汚染物などへの接触やそれらからのエアロゾルの吸入による。授乳、性交などによるヒト-ヒト感染があり得るが、極めてまれである。潜伏期は、通常1-3週間だが、時に数ヶ月におよぶこともある。症状は、軽症では単に風邪様である。他の熱性疾患と似ているが筋・骨格系への影響が強く、全身的な疼痛・倦怠感や、間欠熱・波状熱といった特徴的な発熱を示すこともある。これらの症状は数週間から数ヶ月、数年に及ぶこともある。ただし、*B. canis* 感染は、一般に症状は軽く、感染しても気がつかないケースも多い。

世界中で発生し、特に家畜のブルセラ対策が不十分な地域では、年間、数百-数千症例のヒト患者が報告される。ただ、症状が軽い時は、「原因不明熱」とされることも多く、実際の患者数は報告の10-25倍以上と推定されている。

日本では従来、届出の対象ではなかったため発生状況は正確に把握されていなかった。しかし、1999年4月1日施行の感染症法で4類感染症に指定され、診断した医師に届出が義務づけられた。日本ではヒト・動物のブルセラ症ともにまれであるが、近年、届出患者が見受けられるようになった。そこで、届出対象になる以前については文献を、以降については「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」(以下、「感染症法」)に基づいて届け出られた情報をもとに、国内での発生状況について調査を行った。

## B. 調査研究結果

1. 世界における発生状況： 図1に、国際獣疫事務局(OIE)、Multiannual Animal Diseases Status より得たデータをもとに、家畜およびヒトにおけるブルセラ症の2000-

2004年における発生状況を示した。1)で見られるように世界中で多くのヒトブルセラ症患者が恒常的に発生している。2)から4)に家畜におけるブルセラ症発生状況を示した。2)は*B. abortus*、3)は*B. melitensis*、4)は*B. suis*による。家畜においても世界中の多くの国で発生していることが示され、特に西アジア、中東、地中海沿岸、アフリカ、中南米、カリブ海諸国などに多いことがわかる。それぞれの図を比較すると、家畜で発生している地域でヒトブルセラ症患者も認められることがわかる。

2. 日本における家畜での発生状況： 日本における家畜ブルセラ症の発生について家畜疾病発生動向等を参考に調査した。表1に、ウシにおける*B. abortus* 感染の発生状況を示した。1916年に最初に分離されて以来、頻繁に発生が見られ、特に1953年から輸入牛が原因と考えられる流行があった。しかし、日本では摘発・淘汰の徹底により1982年以降は表に示したようにほとんどその発生が認められなくなった。*B. melitensis* 感染については、日本での発生報告はなかった。*B. suis* 感染は、やはり輸入種豚が原因と考えられる養豚場での流行が1936、1938年に見られたが、1940年の報告を最後に発生していない。このように日本では、家畜伝染病予防法に基づく家畜対策が功を奏し、それぞれ清浄化していると考えられる。

一方、イヌにおける*B. canis* 感染は1971年に実験動物用ビーグル犬繁殖施設で、やはり輸入イヌが原因と考えられる集団発生が報告された。その当時、イヌの*B. canis* に対する抗体調査が実施され、それらの報告をまとめるとイヌにおける抗体保有率は8.8%となっている(伊佐山, 獣医畜産新報, 47:97, 1994)。その後、現在に至るまで時折、イヌ繁殖施設での集団発生が認められ、2003年には静岡県で、また2006年には大阪府で発