

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

動物由来感染症の生態学的アプローチ によるリスク評価等に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山 田 章 雄

平成20（2008）年3月

目 次

I. 総括研究報告書

動物由来感染症の生態学的アプローチによるリスク評価等に関する研究

山田章雄-----1

II. 分担研究報告書

1. Q熱コクシエラの生態系における感染リスク評価

岸本寿男-----5

2. 野生鳥類を主とした国内生態系におけるライム病ボレリア等の存在様式に関する研究

川端寛樹-----9

3. コリネバクテリウムに関する研究

高橋元秀-----19

4. 国内野生イノシシ・シカにおける抗 *Brucella* 抗体の保有状況に関する研究

今岡浩-----33

5. *Streptobacillus moniliformis* 検出法の確立と国内野生ラットにおける保有状況およびクマネズミ咬傷により鼠咬症が疑われた症例からの同定に関する研究

今岡浩-----38

6. 国内生息ダニにおける野兎病菌保菌調査

棚林 清-----43

7. 野生動物の感染症に関する研究 I. 猛禽類の死因と背景病変に関する病理学的研究

柳井徳磨-----51

8. 野生動物の感染症に関する研究 II. 野生ツキノワグマ (*Selenarctos thibetanus*) における

フィラリア症の病理及び分子生物学的研究

柳井徳磨-----74

9. 狂犬病の診断技術向上のための解剖手技習得モデル・教材の開発に関する研究

井上 智-----81

10. 狂犬病の診断技術向上に必要な検査系の開発に関する研究

井上 智-----98

11. 研究成果の刊行に関する一覧-----103

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
総括研究報告書

動物由来感染症の生態学的アプローチによるリスク評価等に関する研究

主任研究者 山田章雄 国立感染症研究所獣医科学部長

研究要旨 国内における存在が明らかではあるが、その浸淫状況の把握が不完全である動物由来感染症として、Q熱、ボレリア感染症、野兔病、ブルセラ症、コリネバクテリウムウルセランス感染症を取り上げ、生態系における存在様式を明らかにすることを目的とした。今年度はQ熱に関しては疫学調査に欠かせない抗体測定法の精度について検討し、市販キットでは偽陽性があることを明らかにした。ボレリアについては鳥類に付着したマダニによってその分布が拡大していること、これまでに国内では報告のなかった新種のボレリアの存在を明らかにした。コリネバクテリウムに関してはジフテリア毒素と抗原的に区別のできない毒素がウルセランスから産生されていること、ヒトの感染事例と関与が疑われたイヌからの分離菌が遺伝的に極めて近縁であることなどから、近辺のイヌにおける保菌状況を調査したが、陽性の個体は見いだせていない。国内で捕獲されたイノシシ、シカについてブルセラ属菌の保有状況を血清学的に調査したが、これまでのところ陽性個体は見いだされなかった。野兔病に関しては日本各地のマダニから野兔病特異的と考えられてきたプライマーを用いたPCRで陽性となる個体が発見された。これら陽性マダニの発見場所と患者発生頻度には関連が認められず、マダニに野兔病菌に極めて近縁な菌が保有されている可能性が高いと考えられた。また、国内の野生動物の保有する動物由来感染症の病原体についての基礎的情報を得る一環として、死亡鳥類、捕殺ツキノワグマについて調査したが、これまでのところ重要な病原体は検出されていない。一方、国内には存在しないが、海外からの侵入が危惧される狂犬病の診断体制構築における基盤技術としてのイヌの剖検、特に脳幹部の採材を滞りなく行うための教材として、イヌの頭部解剖モデルの作成を試みた。これまでに基本的な設計に必要な3Dイメージを固めることに成功している。

分担研究者

岸本寿男 国立感染症研究所ウイルス1部室長
川端寛樹 国立感染症研究所細菌第1部室長
高橋元秀 国立感染症研究所細菌第2部室長
柳井徳磨 岐阜大学農学部教授
井上 智 国立感染症研究所獣医科学部室長
今岡浩一 国立感染症研究所獣医科学部室長
棚林 清 国立感染症研究所獣医科学部室長

研究協力者

各分担研究報告書に記載

A. 研究目的

野兔病、ブルセラ症などは国内の環境の変化、衛生状態の向上などにより感染者の報告は極めて少なくなっている。しかし、これまでの我々や他のグループの調査から、依然として国内にこれらの病原体が存続していると考えられるにもかかわらず、その実態は不明な点が多く、リスクの正しい評価ができていない。また、Q熱においても、典型的な患者報告が極めて少なかったが、最近典型的な患者の発生が報告された。

従って、国内に存在することは間違いないが、その存在様式等はやはり不明な点が多い。ジフテリア毒素産生コリネバクテリウムウルセランス感染はジフテリアに極めて類似する病態を呈し、動物から感染する可能性が指摘されているが、その実態はやはり不明な点が多い。また、ライム病ボレリア、レプトスピラなどに関してもその生態系における国内での存在様式を明らかにする必要がある。本研究はこれらの点を踏まえ、動物由来感染症の病原体の生態系における存在様式を精査し、そのリスク評価を改めて行う。一方、国内への侵入が憂慮される狂犬病について、国内侵入をいち早く察知するために不可欠な診断技術向上のため、実習用モデルの試作を行う。一方、狂犬病侵入のリスクが他地域よりも高い可能性のある地域で、交通事故死したような野生動物に関して、脳組織を狂犬病検査に供するようなモデルシステムの構築を試みる。

B. 研究方法

病原体あるいは抗体の検出は個々の報告書に記

載した方法による。

C. 研究結果

(1) Q 熱に関する研究

ヒトの Q 熱抗体価測定法として市販の ELISA キットの性能を検討するため、市販 ELISA キットと、われわれの開発した非特異反応除去処理をした IFA 法を用い、健康人の保存血清をスクリーニングした結果を比較した。ELISA 法によって判定保留ならびに陽性と判定された検体について IFA 法で再検したところ、すべて判定保留以下となり、陽性検体は認めなかった。このことから ELISA 法の単独使用には注意が必要と考えられた。一方、家畜、ペット、野生動物、ベクターにおける Q 熱コクシエラの感染実態や存在についての調査を進めるにあたって、これらの検体の全国的な収集を行なった。これまでに約 1500 検体イヌ・ネコの血液、野生のシカの血液、ダニが得られたため、次年度の遺伝子検査に向けての DNA 抽出や、抗体測定用の抗原等を整備中である。

(2) ボレリアに関する研究

国内および韓国の鳥類 41 種より採取されたマダニ 660 個体中の種を決定したところ、*Ixodes persulcatus* (327 個体, 49.5%) ならびに *Haemaphysalis flava* (170 個体, 25.8%) が主な鳥類寄生マダニとして同定された。また、マダニ 536 個体中で病原体検索を行ったところ、37 個体から *Borrelia* DNA が検出された。このうち 26 個体 (70.3%) からライム病病原体 *B. garinii* が検出されたことから、鳥類 (野鳥) の移動に伴い、病原体を保有するマダニが拡散すること、及び、この拡散に重要なマダニの種ならびに病原体の一部を明らかにできた。また、アメリカで報告されている Southern tick associated rash illness (STARI) の病原体である *B. lonestari* に類似した病原体 DNA を *I. turdus* より検出した。さらに回帰熱ボレリア DNA を *Carios sawaii* より検出した。今後、鳥類の移動 (渡り) 経路と、寄生マダニ種、および病原体種との関連をさらに検討するとともに、患者発生の有無などの疫学情報を調査する予定である。

(3) コリネバクテリウムに関する研究

2001 年以降に国内の動物から分離された *C. ulcerans* の細菌学的小および分子生物学的性状解析をおこなった。過去にヒトおよび動物から分離された *C. ulcerans* は、遺伝学的に類似していることが確認された。また *C. ulcerans* の

産生する毒素と *C. diphtheriae* が産生する毒素とは抗原的には区別できないが、遺伝学的には異なっていることが明らかになった。2001 年以降国内ではジフテリア様症状を呈する 5 例の患者からジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* が分離され、患者の環境調査で犬、猫の関与が疑われている。愛護センター等で管理されている犬の調査を実施した結果、大阪府犬管理指導所の 1 匹の犬から毒素産生性 *C. ulcerans* が分離された。しかし、犬が飼育されていた地域の環境調査として地区獣医師会 28 開業獣医師の協力を得て咽頭スワブ等から採取した 218 検体を検査したが、菌の分離、PCR 試験で陽性の検体は得られなかった。

(4) 野生動物の感染症に関する研究

今年度は猛禽類とツキノワグマの感染症の基本的情報を得るため、主に病理学的に猛禽類の死因調査、有害鳥獣として捕殺されたクマの病原体保有状況調査を行った。今回の調査から、野生鳥類の死因は外傷、敗血症等であり、病理学的に感染症を疑わせるものは認められなかった。ツキノワグマではヒトに感染すると言われているフィラリア症が 17% 程度に認められた。

(5) ブルセラ症に関する研究

国内の野生動物におけるブルセラ菌の保有状況を知るために、大日本猟友会の協力により、国内の野生イノシシ 213 頭および日本シカ 38 頭の血液サンプルを入手し、ブルセラ菌に対する抗体の保有状況をマイクロ凝集反応試験により検討した。その結果いずれの野生動物においてもブルセラ菌の保有は確認されなかった。今後、さらに例数を増やして検討をすることと、より感度が高く、特異的な検査法の開発が必要であると考えられた。

(6) 野兎病に関する研究

国内のダニ類における野兎病菌 (*F. tularensis*) の保菌状況を知るために捕獲ノウサギに付着していたダニ 85 プール (317 匹) およびノウサギ捕獲地域で採集した自由生活ダニ 67 匹について本菌のゲノム DNA の検出を試みた。*fopA* 及び *tu4* 遺伝子領域のリアルタイム PCR ではノウサギ付着ダニの 70.1% 及び 71.8%、自由生活ダニの 55.2% 及び 67.2% に少量の DNA が検出された。しかし、菌分離はできなかったこと、過去に野兎病の発生がなかった地域のダニにも検出されること、また、検出率が非常に高いことなどから、今回検出された DNA 断片は *F. tularensis* あるいはダニに共生する本菌に非常に類似した菌由来の可能性が考えられ、今後、

このような類似菌を確実に区別する方法を検討し精査する必要がある。

(7) 狂犬病に関する研究

狂犬病の診断技術向上に必要な犬の解剖手技を可能にする実地教育・啓発教材として効果が期待される解剖モデル等を作成するために、これまで行ってきた診断解剖技術習得 DVD 制作および普及・啓発に使用した関連資料等を利用して、自治体関係機関の現場担当者等とともに実技習得に必要なモデル・教材の形状・素材・使用方法等の要素について情報集約を行い、モデル作成技術者と素材の検討および作成方法等について検討を行った。

(8) その他鼠咬症に関する研究、狂犬病の診断用抗体のバリデーションに関する研究も行われた。

D. 考察

初年度ではあるが、目的とした感染症についてある程度の情報が得られた。Q 熱に関しては抗体測定法の標準化がきわめて重要であることが明らかになったことから、精度の高い方法を用い、改めて動物のかかわりを検討していく必要がある。ボレリアに関してはその分布拡大に関与するまだにおよび鳥類の種の同定を継続する必要がある。ブルセラに関しては四国地方のイノシシに抗体陽性個体があるとの報告があることから、この地域での調査を継続し、実態を明らかにしたい。野兎病菌に極めて近縁な菌をマダニが保有している可能性が示されたが、この菌に関して、さらにヒトへの病原性を含めた解析が必要であると考えられる。コリネバクテリウムウルセランス感染症に関してはヒトの感染事例が少数ではあるが報告されている。いずれも動物の関与が示唆されてはいるもののこれまでのところ明確な証拠は得られていない。今後ともその実態を明らかにするための調査研究の継続が必要である。野生動物の感染症は多数に及びそのうちヒトに対して重要なものは抗体調査および抗原・遺伝子検索で検出を試みることになるが、リスク評価にまでつなげることは難しいかも知れない。従って、猟犬あるいは野生動物関係者の血清学的調査で曝露を含めたリスク評価ができる可能性があるため、来年度以降はこの点に焦点を絞りたい。狂犬病診断のためのイヌ頭部モデルの作成はその実現性のめどが立ったため実際の制作にかかる予定である。

E. 結論

国内での存在は明らかにされているがその存在様式が不明な動物由来感染症について実態調査を行った。Q 熱については調査のための方法論を確認した。その他については実際に調査を行い、部分的にはあるがその実態を明らかにした。今後調査研究を継続する。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. Imaoka, K., Kimura, M., Suzuki, M., Kamiyama, T. and Yamada, A. A. Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. *Jpn. J. Inf. Dis.*60, 137-139, 2007
2. Masanobu Kimura, Tsutomu Tanikawa, Michio Suzuki, Nobuo Koizumi, Tsuneo Kamiyama, Koichi Imaoka and Akio Yamada Detection of *Streptobacillus* spp. in feral rats by specific polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.* 52, 1-7, 2008.
3. Masanobu Kimura, Koichi Imaoka, Michio Suzuki, Tsuneo Kamiyama and Akio Yamada Evaluation of a microplate agglutination test (MAT) for serological diagnosis of canine brucellosis. *J. Vet. Med. Sci* (in press)

II. 分担研究報告書

Q熱コクシエラの生態系における感染リスク評価

分担研究者	岸本寿男	国立感染症研究所ウイルス第一部第五室	室長
協力研究者	安藤秀二	同	主任研究官
	小川基彦	同	主任研究官
	坂田明子	同	研究員
	花岡 希	同	流動研究員
	福士 秀人	岐阜大学応用生物科学部	教授
	大屋賢司	同	講師
	猪熊 壽	帯広畜産大学獣医学部	教授
	野村 彩朱	オリエンタル酵母(株)	研究員
	矢野 竹男	同	研究員

研究の要約: Q熱は重要な動物由来感染症であるが、本邦におけるQ熱コクシエラの生態系での存在様式の実態は不明である。本研究ではヒト、家畜、ペット、野生動物などの動物と、ダニ等のベクターを含む環境での本菌の実態について調査を行い、国内における本病原体の存在様式を明らかにすることを目的とした。本年度はまずヒトのQ熱抗体価測定法についての検討として、健康人の保存血清を用いてスクリーニングとしてのELISA法(キット)と、われわれの開発した非特異反応除去処理をしたIFA法との比較を行った。ELISA法によって判定保留ならびに陽性と判定された検体についてIFA法で再検したところ、すべて判定保留以下となり、陽性検体は認めなかった。このことからELISA法の単独使用には注意が必要と考えられた。今後、畜産関係者等ハイリスクグループとの比較が検討課題である。次に家畜、ペット、野生動物、ベクターにおけるQ熱コクシエラの感染実態や存在についての調査を進めるにあたって、これらの検体の全国的な収集を行なった。これまでに約1500検体イヌ・ネコの血液、野生のシカの血液、ダニが得られ、次年度の遺伝子検査に向けてのDNA抽出や、抗体測定用の抗原等を整備している。

A. 研究の目的

本研究の背景: Q熱は重要な動物由来感染症であり、患者の把握に関して、感染症法で第4類全数届出感染症として、動向調査の報告では、1999年から2006年まで毎年それぞれ12人、23人、40人、43人、9人、7人、8人、2人の患者が報告されている。外国の多発地域では主に家畜が感染原であるのに比べ、本邦で

はペットからの感染が疑われる例や感染経路が不明な例、また抗体上昇の乏しい非典型例が多いとされていた。最近では国内感染と思われる症例で、諸外国での報告に極めて近い臨床像と高抗体を示したものの、周辺の疫学調査でも感染源が不明でペットとの関連が否定的であった事例(三好ら: 道衛研所報 57, 2007)が報告されている。実態の解明が望

まれている。また本菌はさらにバイオテロにも用いられる可能性のある病原体であることから、実態把握が急務である。しかしながら、本邦におけるQ熱コクシエラのヒトや動物の調査は比較的古い過去のデータのみで、しかも検査法や判定基準が最近のものとは大きく異なるため、現在の実態と比較することは困難であり、現状は不明といわざるを得ない。したがって現時点で家畜を含む動物並びに環境、ヒトでの調査を行い、国内における本病原体の生態系での存在様式を明らかにする必要がある。またさらに本邦のQ熱については、客観性と再現性の高い診断システムの普及が不十分なことも問題である。この診断についても本研究の中で進展させる必要がある。

これらの背景や現状を踏まえて、本研究の目的として①ヒト、家畜、ペット、野生動物、環境(ベクターとしてのダニや環境汚染を含む)におけるQ熱コクシエラの実態調査。②国内における本病原体の存在様式、感染源、感染経路の解明。③過去の疫学データの検証と、検査法の検討。をあげた。

ヒトでの検討を行なうには、まずはQ熱患者の検体確保が重要であるが、最近では患者発生が少ないため確定患者の血清等の検体確保が非常に困難な状況にある。そこで本年度は、実態調査のための各種検体の収集を行ないつつ、保存血清を用いてヒトでの診断法、特にコクシエラ抗体測定と比較検討を行なった。

B.研究方法

材料:発熱等の症状のない健常人の保存血清163検体を用いた。男性68検体、女性95検体、年齢は10代～70代。

抗体測定法:

ELISA法はVIRCELL社のCOXIELLA

BURNETII ELISA IgGを用いて使用書に準じて全検体を測定した。

判定基準は、抗体のindex値IDが、<9は陰性、9-11は判定保留、>11は陽性とした。

IFA法はELISA法にて判定保留、あるいは陽性と判定された検体について施行した。検査は検査マニュアルのQ熱抗体検査法に準じて、Nine Mile株II相菌の感染細胞をスライドに固定したものを抗原とした間接蛍光抗体法にて実施した。

検体希釈液:非特異反応除去のための希釈液(BufferA)を使用。

二次抗体: Goat F(ab')₂ Anti-Human IgG, FITC, Cat #: AHI1308, BIOSOURCEをPBS-0.5%BSAにて200倍希釈。

判定は、200倍、400倍で鏡検し、封入体、細胞外粒子を確認(3箇所/1well観察)した。観察による染色のパターンの判断は、陽性判定:封入体及び細胞外粒子が染色されるもの。陰性判定1:封入体のみ染色され、細胞外粒子は染色されないもの。陰性判定2:封入体、細胞外粒子ともに染色されないもの。とした。そして、判定基準は、陽性:256倍以上、判定保留:64～128倍、陰性:64倍未満とした。

C.研究結果

スクリーニングとして用いたELISA法IgG抗体測定の結果は、判定保留8検体(8/163:4.9%)、陽性7検体(7/163:4.3%)であった。内訳は、判定保留でID値9が3検体、ID値10が5検体、陽性ではID値12と16がそれぞれ2検体、ID値14、15、18が各1検体であった。この計15検体について、IFA法のIgG抗体測定で再検し確認した。

その結果、ELISA法で判定保留とされた1検

体(ID値10)のIFA抗体価が32倍、またELISA陽性と判定された1検体(ID値16)のIFA抗体価が32倍で、残りも<32であり、結局すべて陰性であった。

D. 考察

今回の健常人血清については、IFA法ですべて陰性であったことから、対象検体にQ熱コクシエラの急性感染ならびに最近の感染を示唆する検体は認められなかった。またELISA法のキットでのスクリーニングで判定保留、陽性であった検体すべてがIFA法では陰性であったことから、ELISA法単独での判定には、非特異反応等による偽陽性が問題となることが再確認された。

一方で、われわれの非特異反応除去剤による処理を併用したIFA法の有用性も確認できた。したがってIFA法を報告基準に指定した2003年の改定以前の報告症例については、ELISA法のみでの診断例や臨床診断のみの症例も含まれており、以前のデータについては議論の余地が残されている。またELISA法は、現在でもスクリーニング法として海外を含め広く利用されているという現状があり、今回検討したELISAキット以外にも同様なキットが複数あり、本邦でも実際に取り寄せて抗体測定を行っている施設がある。以前のわれわれの検討でも同様なELISAキットでの測定値とIFA法との結果との乖離を経験している。現在のカットオフ値や判定基準を用いると臨床の現場で混乱を招く可能性があり、今後も引き続きIFA法との一致率、相関について検証を重ねていく必要があると考える。また今後、畜産関係者等ハイリスクグループとの比較が検討課題である。

次に家畜、ペット、野生動物、ベクター、環

境におけるQ熱コクシエラの感染実態や存在について調査をすすめるにあたっては、これらの検体の収集が欠かせない。現在全国で確保収集した個体からサンプルを採取し、今後の遺伝子検査、抗体測定等の準備を進めている。次年度には実際の検討成績を報告する予定である。

E. 結論

今回Q熱コクシエラに対する血清抗体価を測定した健常人血清については、IFA法ですべて陰性で、対象者にQ熱コクシエラの急性感染ならびに最近の感染を示唆する者は認められなかった。ELISA法単独での判定には、非特異反応等による偽陽性が問題となることが再確認された。Q熱の血清診断において、非特異反応除去剤使用の有用性が確認できた。

F. 健康危険情報

健康被害の情報はない。

G. 研究発表

- (1) 安藤秀二, 岸本寿男: バイオテロリズムとダニ媒介性感染症. 「ダニと新興再興感染症」柳原保武監修. 高田伸弘ほか編 全国農村教育協会, 249-255, 2007
- (2) 岸本寿男, 安藤秀二, 小川基彦: Q熱の現状と課題. 「ダニと新興再興感染症」柳原保武監修. 高田伸弘ほか編 全国農村教育協会, 205-217, 2007
- (3) 花岡 希, 安藤秀二, 坂田明子, 川端寛樹, 高野 愛, 岸本寿男, 倉根一郎: PCR法を用いたリケッチア症病原体検出法の改良 - コンタミネーション防止のためのポジティブコントロール作製 - 第25回日本クラミジア研究会・第14回リケッチア研究会合同

研究会, 2006年10月

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。

野生鳥類を主とした国内生態系におけるライム病ボレリア等の 存在様式に関する研究

分担研究者 川端寛樹(国立感染症研究所・細菌第一部・第四室・室長)

協力研究者 鶴見みや古(山階鳥類研究所・資料室・室長)
尾崎清明(山階鳥類研究所・標識調査室・室長)
藤田博己(大原総合病院付属研究所)
安藤秀二(国立感染症研究所・ウイルス一部・主任研究官)
坂田明子(国立感染症研究所・ウイルス一部・第五室・非常勤研究員)
岸本壽男(国立感染症研究所・ウイルス一部・第五室・室長)
倉根一郎(国立感染症研究所・ウイルス一部・部長)
高野 愛(国立感染症研究所・細菌第一部・第四室・協力研究員)
武藤麻紀(国立感染症研究所・細菌第一部・第四室・非常勤研究員)
渡辺治雄(国立感染症研究所・副所長 兼 同左・細菌第一部・部長)

研究要旨 鳥類(野鳥)捕獲は国内 23 道府県および韓国(国外)で、のべ 57 箇所で行った。鳥類 41 種より採取されたマダニ 660 個体中、*Ixodes persulcatus* (327 個体, 49.5%), *Haemaphysalis flava* (170 個体, 25.8%)が主な鳥類寄生マダニとして同定された。また、病原体検索を行ったマダニ 536 個体中、37 個体で *Borrelia* DNA が検出された。この内、ライム病病原体 *B. garinii* が(26 個体, 70.3%)であったことから、鳥類(野鳥)の移動に付随して拡散してきているマダニ種とこれを媒介種とする病原体種が一部明らかとなった。この他、アメリカで Southern tick associated rash illness(STARI)病原体である *B. lonestari* に類似の病原体 DNA を *I. turdus* より見出した。また回帰熱ボレリア DNA を *Carios sawaii* より見出した。今後、鳥類の移動(渡り)経路と、寄生マダニ種、および病原体種との関連をさらに検討するとともに、患者発生の有無などの疫学調査が急務である。

A. 研究目的

感染症法規定疾患には動物由来感染症は 50 疾患が含まれているが、このうちの約半数は節足動物媒介性感染である。さらにマダニが媒介する疾患はペスト、クリミア-コンゴ出血熱など 1 類感染症を含む 13 疾患であり、公衆衛生上、重要な位置づけがなされている。

そこで本研究では、「動物由来感染症の生態学的アプローチによるリスク評価等に関する研究」の一環として、マダニが媒介する動物由来感染症に関して、国内における生態系内での病原体の存在様式を調べることで、また、存在様式から想定できる病原体の拡散に関するリスク因子を明らかにすることを、主目的として以下研究を行

った。

B. 研究方法

1. 非人為的拡散モデルの選定

1-1. モデルとなる対象疾患、病原体の選定
対象疾患としてライム病、回帰熱などの病原体であるボレリアを調査対象として選定した。これは病原体の検出が比較的容易であること、国内における浸潤病原体種が有る程度把握されていること、また媒介するベクターも把握されているためである。

1-2. 生態学的調査対象

モデルとなりうる動物種として鳥類を選択した。これは病原体の非人為的拡散に、長距離を移

動する鳥類が関与する例が示されていること、また、国内においては、恒常的に鳥類標識調査に付随して生態学的調査が行われているため、調査研究対象の試料が得やすいためである。

II. マダニ寄生鳥類、マダニ、およびPCR法による病原体 DNA 検出

山階鳥類研究所が中心となって行っている、渡り鳥の標識調査にて捕獲された野生鳥類より寄生マダニを採取、病原体 DNA 検出材料とした。寄生マダニは大原総合病院附属研究所の藤田博己博士によって形態同定後、感染症研究所において DNA 抽出に供した。DNA 抽出は常法によって行った。DNA は抽出、精製を確認する目的で、マダニミトコンドリア DNA 上の *rrs* 遺伝子(*mt rrs*)を増幅し、電気泳動によって目的サイズの DNA 断片を確認した。また DNA 断片はその塩基配列を

決定し、マダニ形態同定結果と照合を行った。病原体検索のための PCR ではボレリア *flaB* 遺伝子の一部を増幅するプライマーを用いた。*flaB*-PCR は nested-PCR により行った。PCR 陽性検体はコンタミネーションなどによる偽陽性を除外する目的で、RIS 領域、*recA* 遺伝子などによる確認 PCR を行った。増幅 DNA は常法に従い塩基配列を決定した。

C. 研究結果 および D. 考察

I. 鳥類寄生マダニから見出されたボレリア種

国内 23 道府県、韓国において、鳥類寄生マダニ 660 個体を採取し、内 *mt rrs*-PCR にて DNA 抽出、精製が確認できた 536 検体について病原体検出を試みた(図1)。

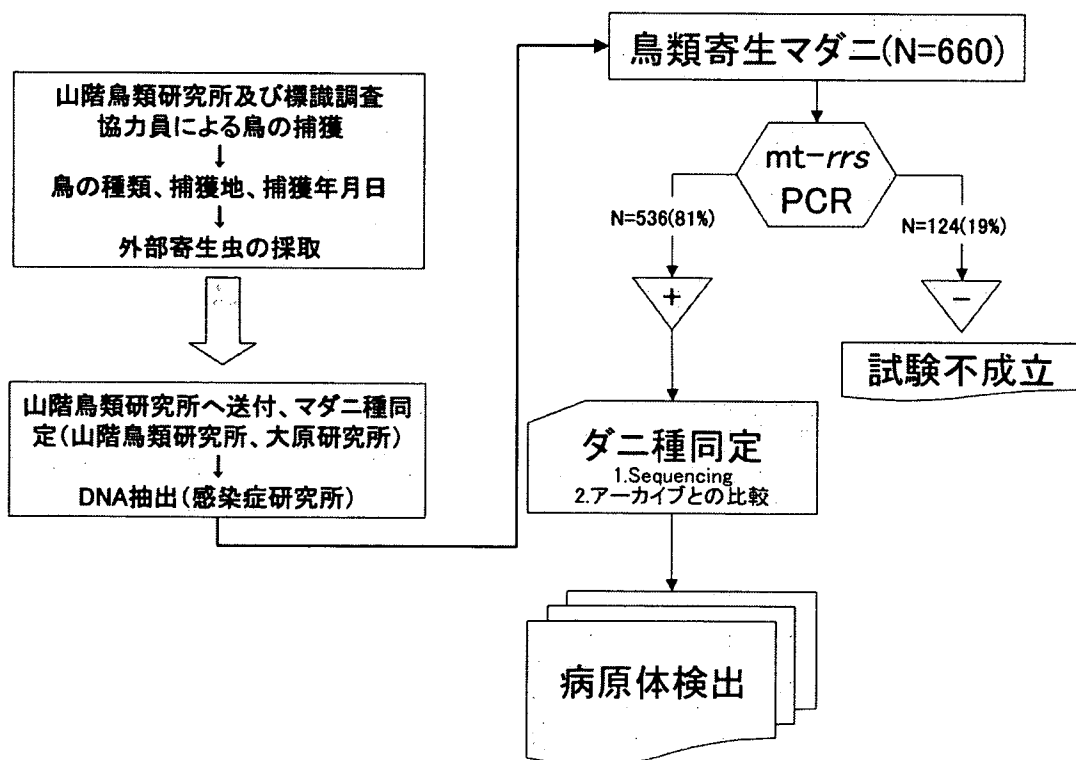


図 1. 病原体検索の流れ図

各々の鳥類捕獲地、捕獲鳥種、および採取された寄生マダニ一覧は表 1、表 2 および表 3 に示した。試験に供したマダニ 536 検体のうち 37 検体 (6.9%) でボレリア特異的 DNA が検出された。これら検出ボレリアは *flaB* 遺伝子の塩基配列、もしくは 16SrRNA 遺伝子の塩基配列から、表 4 に示すボレリア種であると同定された。見出された *Borrelia* 種は、*Borrelia garinii* が最も多く、検出 *Borrelia* 種の約 70% (26/37) を占有した。またこの他 *B. afzelii*, *B. turdi*, *B. miyamotoi* が見出された。国内でこれまで報告がなされている *Borrelia* 種は、*B. garinii*, *B. afzelii*, *B. japonica*, *B. valaisiana*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. valaisiana*-like (= *B. orientalis* sp. nov.), *B. miyamotoi* である。*B. garinii* は欧州においても *Ixodes ricinus*-野鳥間によって主に伝播、維持されていることが示されている。本研究においても、国内での *B. garinii* 維持、伝播、拡散に野生鳥類が関与していることが強く示唆された。*B. japonica* は *I. ovatus* によって媒介される国内占有種の一つであるが、本研究では *B. japonica* は見出されなかった。これは *B. japonica* は生態系では野鼠-

ovatus 間で維持、伝播されているためと考えられる。

B. miyamotoi は Southern tick associated rash illness (STARI) 病原体である *B. lonestari* と同群に含まれる非病原性ボレリアと考えられている。一方、本研究により *B. miyamotoi* とは異なる、*B. lonestari* と近縁のボレリアが米国以外で初めて検出された (図 2)。*B. lonestari* は BSK 培地による培養が困難とされることから、これまで国内のマダニからは分離培養の報告がなされていなかった可能性がある。今後公衆衛生上の問題となる可能性が極めて高いことから、何らかの方法による分離培養、およびボレリア株の病原性に関する評価が必要と考えられた。また京都府内の離島において米国の回帰熱ボレリアの一種と考えられる *B. parkeri* と極めて近縁のボレリアを *Carion sawaii* より見出した (図 2)。回帰熱ボレリアの検出は、先述の STARI 病原体同様、国内初である。今後、鳥類の移動 (渡り) 経路と、寄生マダニ種、および病原体種との関連を検討するとともに、患者発生の有無など病原体調査を行う必要がある。

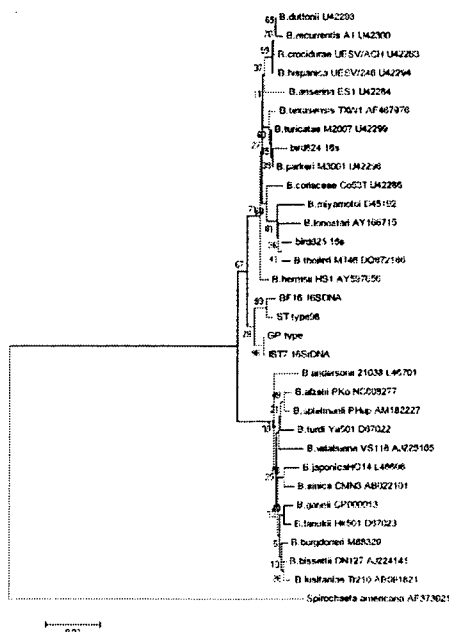


図 2. 回帰熱ボレリア(624)および STARI 型ボレリア(625)の 16SrDNA 配列による系統解析

II. マダニ寄生鳥類とボレリア拡散に関する可能性

試験に供したマダニ 536 個体の寄生鳥類は, *Emberiza spodocephala* (アオジ) 13.6%, *Anthus hodgsoni* (ビンズイ) 10.4%, *Turdus cardis* (クロツグミ) 9.3%, *Luscinia calliope* (ノゴマ) 9.1%などである (図 3). 一方で, 主なボレリア陽性マダニ寄生個体鳥種はクロツグミ, アオジ, *E. variabilis* (クロジ), *T. chrysolaus* (アカハラ)で, ボレリア DNA 陽性マダニにおける占有率は約 79%であった(図 4). これら鳥種は, 全マダニ寄生鳥種内の約 31%を占有するにとどまっておらず(図 3), *Turdus* 属や *Emberiza* 属鳥類が生態学的にボレリアの維持, 拡散に何らかの関与があると考えられた. そこで我々はそれぞれの鳥類とマダニ, および *Borrelia* の関係を以下, 数値化し, その影響の定量化を試みた.

鳥類による, 病原体ボレリアの
拡散係数 = A X B X C

- A: ボレリア陽性マダニの環境中への放出率
- B: マダニ寄生率 X 1 個体あたりの寄生数
- C: 全体の生息数

A X B: 一個体あたりのボレリア陽性マダニ数

A: 鳥種あたりのボレリア陽性マダニを field へ spray する率 = *Borrelia* 陽性率に比例 (鳥類寄生前に既に保有 + 保菌鳥類からの感染)

B: マダニ寄生率, 1 個体あたりの寄生数. マダニ寄生率, 1 個体あたりの平均寄生数は調査結果を参考とする.

C: 全体の生息数

全体の生息数. 各鳥種において標識のための捕獲効率が一定と仮定できる場合には, 捕獲数は全体の生息数を反映すると考えられる.

D: 移動距離/年 X 生存年数

さらに, 広域拡散を考慮するならば, 以下の因子も考慮に入れることで精度が向上すると考えられる. 鳥類の移動距離は '鳥類標識調査' をもとにした最大移動距離 (km) が一部鳥類に関して報告されている. 生存年数などは不明なため, 今回は考慮に入れていない.

A X B X C: 推定拡散係数は以下の通りである.

鳥種, 学名	係数(A X B)	係数
アカハラ <i>Turdus chrysolaus</i>	185.87	高
アオジ <i>Emberiza spodocephala</i>	130.11	
クロツグミ <i>Turdus cardis</i>	111.52	
クロジ <i>Emberiza variabilis</i>	74.35	
ビンズイ <i>Anthus hodgsoni</i>	37.17	低
シジュウカラ <i>Parus major</i>	37.17	
ヒメクロウミツバメ <i>Oceanodroma monorhis</i>	18.59	
マミチャジナイ <i>Turdus obscurus</i>	18.59	
ミヤマホオジロ <i>Emberiza elegans</i>	18.59	

これら鳥類において, *Borrelia* の拡散係数は, アカハラ(185.9), アオジ(130.1), クロツグミ(111.5), クロジ(74.3)で高値である一方, ビンズイ(37.2), シジュウカラ(37.2), ミヤマホオジロ(18.6)などでは低い値が算出された (図 5). 標識調査時の鳥類の捕獲効率は均一ではない可能性もあるが, クロジやアカハラとほぼ同一捕獲数であったにシマセンニュウ (*Locustella ochotensis*), シロハラ (*Turdus*

pallidus), ノゴマ(*Luscinia calliope*)では, ポレリア陽性マダニは見出されていないことから, これら高い拡散係数を示した鳥類が生態系内でのポレリアの保有, 維持, および拡散に特に関与していると推定された.

海鳥であるヒメクロウミツバメを除く, これら鳥類の主な共通点は, マダニ活動期(春-夏)に媒介マダニ棲息地域(北海道など)で活発に活動すること, およびクモ類, ミミズ等を捕食する, 即ち地上生活(媒介マダニに曝露)を生活環に組み入れていることである. このような生活環を持ち, さらに, ポレリアに感受性がある鳥種がポレリアの拡散に特に関与するようになったと考えられる. これら鳥種については, 移動距離が 3,000km を超える例が報告されていることから, 海外流行地からの病原体の溢漏, 遠距離播種(大陸との往来など)をも起こしうる可能性を示唆している. さらに, これら鳥類が何らかの環境因子により, 移動距離, 繁殖数が増加した場合, ポレリア保有マダニを生態系内で拡散させる可能性が高まるかもしれない.

近年, 節足動物媒介性の感染症において, 生態系に新たな病原体が移入された場合, 生態系内で急速に拡大することが知られている(チクングニヤ, ウエストナイル熱など). ポレリアにおいては, 生態学的に *Turdus* 属や *Emberiza* 属鳥類の一部がポレリアの維持, 拡散に何らかの関与があると考えられたが, 他感染症病原体においては, 今後検討が必要であろう.

E. 結論

1. 鳥寄生マダニ保有ポレリアとして, ライム病病原体 *B. garinii* が *dominat* であった. 本ポレリアは大陸で見出されるポレリア種と共通であり, この

ことは鳥類(野鳥)の移動に付随して本病原体が拡散してきていることが推測された.

2. これまで見出されたことのない, 不明のポレリアが検出された. 今後, これらポレリアについて, 鳥類の移動(渡り)経路と, 寄生マダニ種, および病原体種との関連をさらに検討するとともに, 患者発生の有無などの疫学調査が急務である.

【謝辞】

マダニ採取にご協力頂きました, 全国の鳥類標識調査協力員の皆様に心より御礼申し上げます.

F. 健康危機情報

なし

G. 論文発表

【発表論文, 著書】

1. Saito K, Ito A, Asashima N, Ohno M, Nagai R, Fujita H, Koizumi N, Takano A, Watanabe H, Kawabata H: Case report: *Borrelia valaisiana* infection in a Japanese man associated with traveling to foreign countries. *Am J Trop Med Hyg.* 2007. 77:1124-1127.
2. 川端寛樹. 回帰熱(回帰熱ポレリア感染症) relapsing fever. ダニと新興再興感染症. SADI 組織委員会編. 全国農村教育協会. 2007. pp201-203.
3. 川端寛樹, 高野愛, 渡邊治雄: ライム病. 「新感染症学(下)」-新時代の基礎・臨床研究-. 日本臨床. 2007. 62(3) 196-199.

【学会発表】

1. 鶴見みや古, 尾崎清明, 藤田博己, 川端寛樹, 安藤秀二, 高橋守. 鳥類標識調査における外部寄生虫採取調査.-2006年度調査結果および本年度経過報告-. 日本鳥類標識協会全国大会. 2007年12月. 東京
2. 高野愛, 安藤秀二, 坂田明子, 鶴見みや

古, 仲村昇, 佐藤文男, 高橋守, 岸本寿男, 倉根一郎, 渡邊治雄, 藤田博己, 川端寛樹. *Carios* 属ダニの病原体ベクターとしてのリスク評価. 日本衛生動物学会北日本支部会. 2007年9月. 仙台

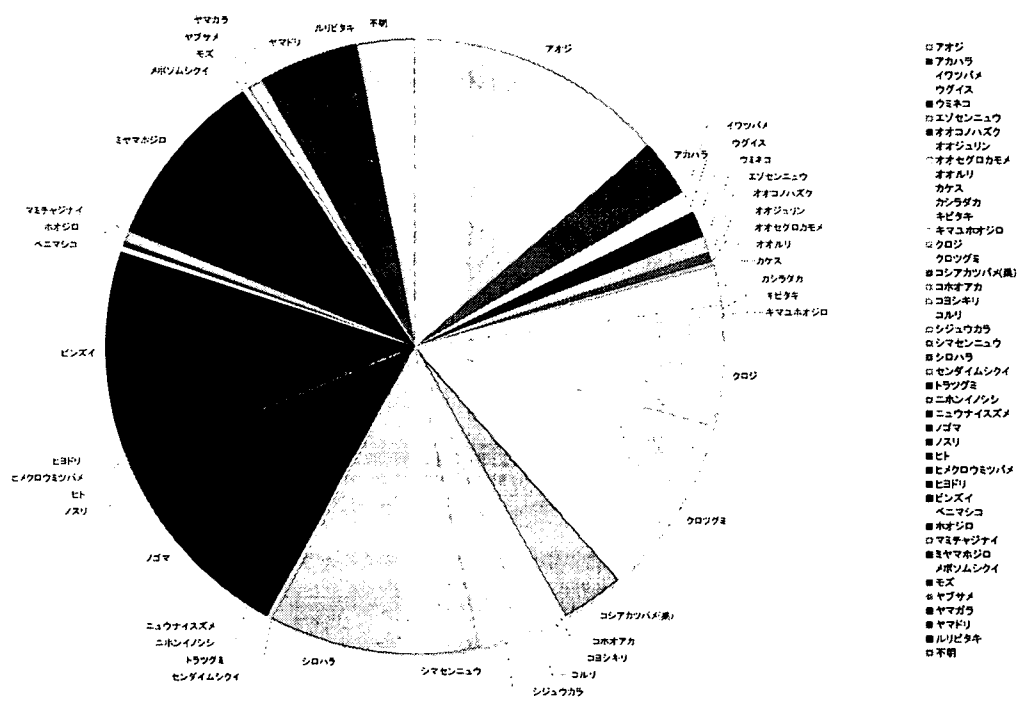


図 3. 病原体検索に用いたマダニ由来野鳥種とその割合

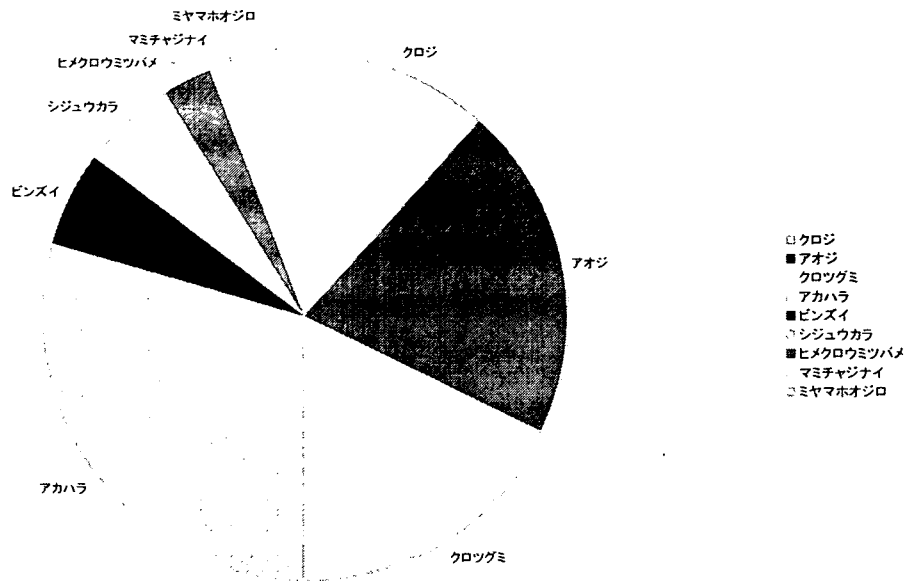
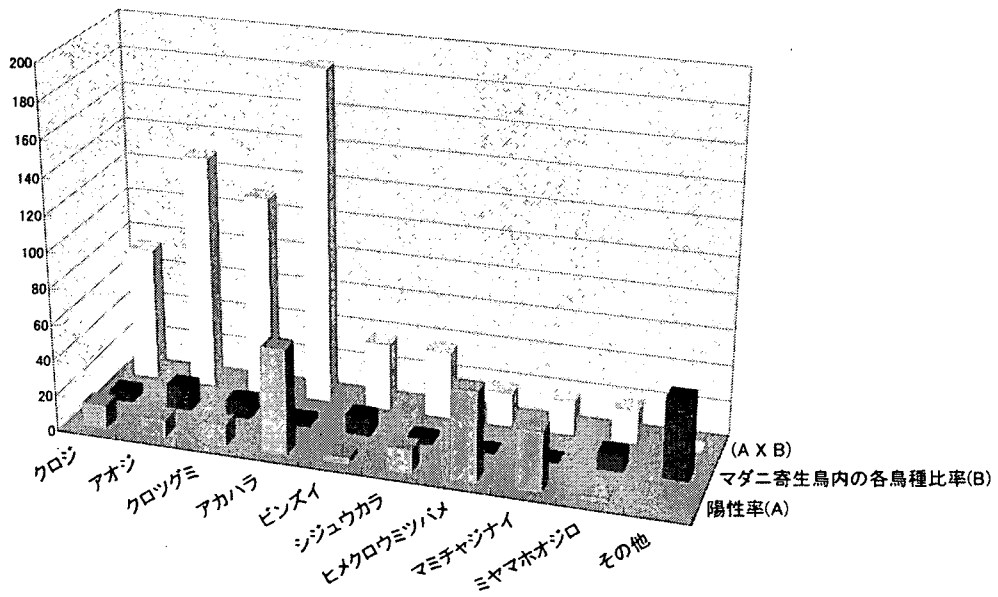


図 4.ボレリア陽性マダニの寄生宿主鳥類と内訳



■ 陽性率(A) ■ マダニ寄生鳥内の各鳥種比率(B) (A x B)

図 5.野生鳥類における *Borrelia* の生態系内維持・拡散に関与する可能性

表 1. 鳥類標識調査地域の一覧

都道府県	捕獲地	採取数	病原体検査数
北海道	北海道札幌市北区拓北 6 条 1 丁目 4-28	1	1
	北海道釧路市阿寒 阿寒国際ツルセンター	1	1
	北海道旭川市東旭川町	1	0
	北海道足寄郡足寄町中足寄	14	8
	北海道上川郡当麻町緑郷	2	2
	北海道苫小牧市植苗ウトナイ湖	24	24
	北海道幌泉郡えりも町歌別コロップ川	183	135
	北海道帯広市稲田	6	4
	北海道釧路市貝塚	10	8
	北海道札幌市藤野石山, 白川	3	3
	北海道阿寒郡鶴居村中雪裡	3	2
	北海道根室市浜松	1	1
	北海道浜頓別一級ステーション	13	5
	北海道厚岸郡浜中町北の沢	18	11
	北海道上川郡美瑛町望岳台	12	12
	北海道根室市川口(風連湖ステーション)	8	6
	不明	1	1
	北海道松前郡福島町千軒	3	2
	北海道松前町白神天狗山	31	30
	青森県	青森県八戸市鮫町蕪島	7
秋田県	秋田県にかほ市象潟町小滝字鎌立	3	3
岩手県	岩手県盛岡市下太田栗石川	7	6
	岩手県盛岡市玉山区外山姫神鳥獣試験地	2	2
	岩手県盛岡市下厨川鍋屋敷森林総研東北支所	45	26
福島県	福島県石川郡玉川村竜崎	3	3
新潟県	新潟県新潟市関谷海岸浜浦	1	1
	新潟県新潟市新鼻福島潟	4	4
茨城県	茨城県龍ヶ崎市大平	2	1
	茨城県日立市みかの原町	5	2
神奈川県	神奈川県愛甲郡清川村宮ヶ瀬	1	1
	神奈川県厚木市七沢自然保護センター	2	2
	神奈川県横浜市旭区上白根町	6	5
山梨県	山梨県都留市田原 3-8-1 都留文科大学	45	35
静岡県	静岡県下田市須崎爪木崎	4	4
愛知県	愛知県弥富市上野町弥富野鳥園	7	5
三重県	三重県日高郡日高町西山日ノ御碕	1	1
福井県	福井県丹生郡越前町織田地籍環境省鳥類観測ステーション	68	67
京都府	京都府南丹市(旧美山町)芦生	1	1
	京都府舞鶴市沓島	2	2
	京都府京都市左京区大文字山	2	2
大阪府	大阪府枚方市大字穂谷	1	1
	大阪府四条畷市(むろいけ園地)	5	5
兵庫県	兵庫県神戸市北区極楽茶屋東	1	1
	兵庫県三田市中内神内神橋	18	18
	兵庫県神戸市東灘区北2区六甲山頂	1	1
	兵庫県西脇市高松町	3	3
島根県	島根県出雲市灘分町斐伊川	1	1
鳥取県	鳥取県鳥取市湖山町南 4-101 鳥取大学	5	5
広島県	広島県広島市東区牛田山	1	1
愛媛県	愛媛県宇和島市鬼ヶ城	1	0
	愛媛県新居浜市大生院	5	5
長崎県	長崎県対馬市上県町弓ノ原仁田川	52	46
鹿児島県	鹿児島県大島郡宇検村湯湾岳	3	3
	鹿児島県奄美市名瀬大川河口	4	4
沖縄県	沖縄県名護市多野岳	2	2
	不明	3	3
韓国	韓国全羅南道新安郡黒山面	1	1
計		660	536

表 2. 捕獲鳥類寄生マダニ数

鳥種および学名	寄生マダニ数	病原体検査数
ヒメクロウミツバメ <i>Oceanodroma monorhis</i>	2	2
ノスリ <i>Buteo buteo</i>	1	1
ヤマドリ <i>Syrmaticus soemmerringii</i>	34	24
オオセグロカモメ <i>Larus schistisagus</i>	1	1
ウミネコ <i>Larus crassirostris</i>	7	7
オオコノハズク <i>Otus lempiji</i>	3	3
コシアカツバメ(巢) <i>Hirundo daurica</i>	18	18
イワツバメ <i>Delichon urbica</i>	3	3
ピンズイ <i>Anthus hodgsoni</i>	73	56
ヒヨドリ <i>Hypsipetes amaurotis</i>	1	1
モズ <i>Lanius bucephalus</i>	1	1
ノゴマ <i>Luscinia calliope</i>	66	49
コルリ <i>Luscinia cyane</i>	6	6
ルリビタキ <i>Tarsiger cyanurus</i>	3	3
トラツグミ <i>Zoothera dauma</i>	5	5
クロツグミ <i>Turdus cardis</i>	65	50
アカハラ <i>Turdus chrysolaus</i>	18	17
シロハラ <i>Turdus pallidus</i>	38	37
マミチャジナイ <i>Turdus obscurus</i>	3	3
ヤブサメ <i>Urosphena squameiceps</i>	4	4
ウグイス <i>Cettia diphone</i>	3	3
エゾセンニュウ <i>Locustella fasciolata</i>	4	4
シマセンニュウ <i>Locustella ochotensis</i>	23	23
コヨシキリ <i>Acrocephalus bistrigiceps</i>	1	1
メボソムシクイ <i>Phylloscopus borealis</i>	1	1
センダイムシクイ <i>Phylloscopus coronatus</i>	2	2
キビタキ <i>Ficedula narcissina</i>	4	4
オオルリ <i>Cyanoptila cyanomelana</i>	1	0
ヤマガラ <i>Parus varius</i>	1	1
シジュウカラ <i>Parus major</i>	16	15
ホオジロ <i>Emberiza cioides</i>	1	1
コホオアカ <i>Emberiza pusilla</i>	9	4
キマユホオジロ <i>Emberiza chrysophrys</i>	1	1
カシラダカ <i>Emberiza rustica</i>	23	9
ミヤマホジロ <i>Emberiza elegans</i>	57	51
アオジ <i>Emberiza spodocephala</i>	105	73
クロジ <i>Emberiza variabilis</i>	32	30
オオジュリン <i>Emberiza schoeniclus</i>	1	1
ベニマシコ <i>Uragus sibiricus</i>	2	2
ニュウナイスズメ <i>Passer rutilans</i>	1	1
カケス <i>Garrulus glandarius</i>	2	1
不明	18	17
計	660	536

Turdus 属、および *Emberiza* 属鳥類についてはハイライトで示した。