

200829024A

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 田 章 雄

平成21 (2009) 年 3 月

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 田 章 雄

平成21（2009）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に関する研究

岸本壽男-----7

2. 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-----14

3. コリネバクテリウムに関する研究

高橋元秀-----23

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-----32

5. 生態系における野兎病菌の維持様式に関する研究

棚林 清-----37

6. 野生動物の感染症に関する研究：ペンギン目の感染症病変

柳井徳磨-----42

7. 野生動物の感染症に関する研究：愛玩・展示鳥における鳥抗酸菌症のサーベイ、特に *Mycobacterium genavense* 感染について

柳井徳磨-----53

8. 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-----63

9. 研究成果の刊行に関する一覧-----79

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

研究代表者 山田章雄 国立感染症研究所獣医学部長

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。今年度のQ熱に関する研究では新たに確立した方法を用い、イヌ血清1098検体およびネコ血清582検体について、抗体保有率を検討するとともに、イヌ血液からの抽出DNAサンプル986検体についてQ熱コクシエラ遺伝子の検出を試みた。その結果、イヌでは*C. burnetii* DNAが検出された検体はなかったが、イヌの抗体保有率は2.1%、ネコでは6.2%であった。これらの成績はイヌ、ネコのQ熱伝播への関与はこれまで考えられていた程ではなく、健康なペットからヒトへの感染リスクは必ずしも高くはない可能性が示唆された。ライム病ボレリアについては昨年度に引き続き捕獲鳥類からのボレリアDNAの検出を行い、野生鳥類の移動に付随して、拡散しやすいマダニ種とこれを媒介種とするボレリア種が存在することを初めて明らかにした。コリネバクテリウムに関しては大阪府の動物愛護センターに収容されていたイヌのほぼ10%にジフテリア毒素産生性コリネバクテリウムの感染が確認されたが、これらの動物はすべて外見上健康であった。また、菌が検出されたイヌの由来に共通性がなく、得られた菌のPFGEパターンがすべて一致したことから、収容施設内で感染拡大があったものと考えられた。野生動物、産業動物ではこれまでのところ菌の存在は確認されていない。ブルセラ症については、昨年引き続き、国内で捕獲されたイノシシ、シカについてブルセラ菌の保有状況調査を継続したが、スムーズ型の菌に対しては、陽性個体は見いだされなかった。しかし、*B. canis*に対する抗体を保有しているかに見える個体が見いだされたことから、更なる調査の必要性が確認された。野兔病に関しては、本病で斃死したノウサギが発見された場所を中心とし、野生小動物、ダニ、湖沼水、土壌などからの菌検出を試みた。その結果土壌検体および湖沼水の検体から野兔病菌DNAが検出された。今後も調査を継続し、生態系での本菌の存在・維持様式を検討する予定である。また、国内の動物園等で飼養されるペンギン目を人獣共通感染症のセンチネルとして利用することができるかを検討するための初期情報となる、ペンギンの感染症について検討したところ、トリマラリアおよびアスペルギルス症が多く認められることが分かった。これらの基本情報を元にこの鳥種をセンチネルとできるかさらに検討を重ねる予定である。また、ヒトにおいては日和見感染ではあるものの、AIDS患者で問題とされる鳥抗酸菌症について、その病態と感染経路を検討した。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昨年度に引き続き継続した。今年度は目的によって3種類のプロトタイプを試作し、自治体等の担当者との協議し、改良点などを解析した。これらの検討結果を基に最終年度で完成させることとしている。

研究分担者

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学部長
今岡浩一 国立感染症研究所獣医学部長
棚林 清 国立感染症研究所獣医学部長

研究協力者

(社)大日本猟友会

その他は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

今年度は、*C. burnetii* DNA の簡便な定量可能検出法として Real time PCR 法を確立した。従来の Nested PCR 法と比較したところ、感度は同等であったが定量可能であることと簡便な点でより優れていた。また、nested PCR における positive control によるコンタミネーションの問題を解決するため、リコンビナントプラスミド positive control を作成した。これらの方法を応用し、イヌ血液からの抽出 DNA986 検体について *C. burnetii* DNA 検出を行ったが、すべて陰性であった。また、イヌ血清 1098 検体と、ネコ血清 582 検体について抗体価測定を行ったところ、イヌでは 2.1%、ネコでは 6.2% の抗体保有率を示した。これらの成績はヒトの Q 熱においてイヌ、ネコの関与は以前の報告ほど高率ではなく、健康なペットからヒトへの感染リスクも低い可能性が示唆された。

(2) ボレリアに関する研究

昨年度に引き続き、ボレリアの浸潤地域拡大への野鳥の関与の実態を探るための全国規模調査を行った。野鳥 50 種以上から採取したマダニ 1,250 個体中 87 個体(7.0%)から *Borrelia* DNA

が検出された。この内、ライム病病原体である *B. garinii* は 52 個体 (59.8%) であった。また、野鳥寄生幼ダニから分離ボレリア 49 株について、鞭毛抗原遺伝子 *flaB* による系統解析を行ったところ、欧州のボレリアと極めて近縁なボレリアが国内にも浸潤していることが明らかとなった。野鳥を介して欧州のボレリアが我が国に侵入した可能性が考えられる。一方、分布が国内に限局する *B. japonica* の媒介ベクターであるヤマトマダニは野鳥から見いだされなかったことから、野鳥類の移動に付随して拡散しやすいマダニ種とこれを媒介種とするボレリア種が存在すると考えられた。

(3) コリネバクテリウムに関する研究

今年度は大阪府の動物愛護センター収容のイヌ 399 頭中 40 頭から菌が分離された。菌の糸状解析結果と収容施設の管理状況調査結果から、本菌はイヌ間で容易に伝播することが明らかとなった。これらのイヌから分離した菌株は過去にジフテリア様症状を呈したヒトから分離された株と遺伝学的に近縁であることが確認された。宮城県、群馬県および岡山県においてイヌ、ネコ、ウシについて PCR および菌分離を試みたがいずれも陰性であった。また、乳房炎などの徴候を有するウシでも菌検出はできなかった。宮城県のブタ 103 頭中 7 頭に疑わしい遺伝子が検出されたため、シーケンスでの確認を検討中である。

(4) 野生動物の感染症に関する研究

飼育下のペンギンは種々の感染症に抵抗性が低いとされる。したがって、鳥インフルエンザやウエストナイル熱の侵入に際して最初の感染鳥類の一つになることが予想されるが、病勢鑑定のための病理学的背景データは十分に蓄積されていない。そこで 2000 年から 2008 年に岐阜大学に送付されたペンギン目 54 例について病理組織学的検索を行ったところ、死因として最も多かったのは、鳥マラリア症およびアスペルギルス症を含む感染症であった。また、換羽や育雛の時期の疾病発生率が高かったことから、これらの時期における免疫力の低下が重篤な疾病発生に関わっていると考えられた。一方、我が国の愛玩鳥あるいは動物園展示鳥類における鳥抗酸菌症の病態と感染経路について検索した。過去に鳥抗酸菌症と診断された 16 例の全例に *Mycobacterium (M) genavense* 感染の特徴とされる巣状～瀰漫性の肉芽腫性病変が認められ、*M. avium* 感染の特徴とされる乾酪壊死を伴う肉芽腫は認められなかった。PCR でも 10 例中

8例で *M. genavense* (MG)感染が示唆された。ウスニキバトに集団発生した鳥抗酸菌症 23例の検索では、全例で肺感染が認められ、エアロゾルによる経気道感染が示唆された。免疫不全患者への鳥抗酸菌の感染を考慮して、鳥類における感染状況を把握する必要がある。

(5) ブルセラ症に関する研究

昨年度に続き、国内の野生イノシシおよびシカにおけるブルセラ菌に対する抗体の保有状況を検討した。家畜ブルセラ菌に対する抗体は昨年度と同様検出されなかったが、イヌブルセラ菌に対する抗体が77頭中4頭のイノシシ及び52頭中1頭のシカで認められた。国内にイヌブルセラ菌が定着していることを考えるとイノシシ及びシカで認められた陽性反応がイヌブルセラ菌に対する真性の反応かそれとも非特異的の反応や他の細菌との交差反応であるかなど、さらなる検討が必要である。

(6) 野兔病に関する研究

本研究期間中に数例の野兔病患者発生が報告されるとともに、猟友会により野兔病菌感染ノウサギが発見された。そこで周辺地域における小型野生哺乳類、ダニ、ならびに水、土壌からの野兔病菌の分離、ゲノム DNA の検出を試みた小型哺乳類では血清学的検索も行った。小型哺乳類は菌分離、ゲノム DNA 検出とも陰性で、野兔病菌に対する抗体も検出されなかったが、周辺の土壌から野兔病菌ゲノム DNA が検出された。また、水1検体から DNA が検出された。今後も更なる調査により自然環境での野兔病菌維持様式を検討する必要があると考えられた。

(7) 狂犬病に関する研究

昨年度に引き続き狂犬病発症が疑われるイヌの解剖手技習得に必要なモデル・教材として(1)解剖手順習得モデル、(2)実技取得モデル、(3)脳モデルのプロトタイプを作成した。これらのモデルについて自治体等関係機関の現場担当者等とともに、改良点や課題点について検討を行った。

D. 考察

Q熱に関しては検査法の精度を改良することにより、これまでの報告は過大評価である可能性を示すとともに、国内においてはイヌ・ネコの本疾患の伝播における役割は従来考えられていたよりも低い可能性が示された。更なる野外調査が確認のために必要である。一方、野鳥の調査により、シュルツエマダニはヤマトマダニより野鳥への寄生率が高く、またこのマダニ種か

らは広域性ボレリアが効率に検出されることが明らかになった。即ち特定のボレリアが特定のダニによって鳥類を介し分布域を拡大している可能性を示すことができた。今後例数を増やし確認する必要がある。コリネバクテリウムウルセランスについては、本菌のヒトへの感染源としてのブタの関与の程度を今後明らかにする必要がある。ブルセラ症に関しては野外で捕獲されたイノシシ、シカでイヌブルセラ菌に対する抗体陽性の個体が検出された。これが真にイヌブルセラ菌の感染によるものであるか、それとも何らかの原因による交差反応であるかなどを明らかにする必要がある。近年ヒトとノウサギで野兔病菌の感染例が見いだされたことは本菌が日本の生態系で維持されていることを意味している。特に感染のウサギの発見された場所の調査により、土壌あるいは水系の関与が強く示唆された。今後はどのような機構で本菌が自然界で維持されているかさらに詳細に検討する必要がある。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順調に進んでいる。最終年度に実用化できる見通しである。

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昨年度に引き続き実施した。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 紙上発表

1. Hanaoka N, Sakata A, Takano A, Kawabata H, Watanabe H, Kurane I, Kishimoto T, Ando S. Development of a pUC19-based recombinant plasmid to serve as a positive control in PCR for *Orientia tsutsugamushi*. *Microbiology Immunology*. (Accepted)
2. Takada N, Fujita H, Kawabata H, Ando S, Sakata A, Takano A, Chaithong U. *Rickettsia japonica* in Thailand. *Emerging*

- Infectious Diseases. (Accepted)
3. Takano A, Ando S, Kishimoto T, Fujita H, Kadosaka T, Nitta Y, Kawabata H, Watanabe H. Novel *Ehrlichia* sp. found in *Ixodes granulatus* infested to rodents in Okinawa, Japan. *Microbiology and Immunology*. (In press)
 4. Kimura, M., Imaoka, K., Suzuki, M., Kamiyama, T. and Yamada, A. Evaluation of a Microplate Agglutination Test (MAT) for Serological Diagnosis of Canine Brucellosis. *J. Vet. Med. Sci.*, 70:707-709, 2008
 5. Seto Y, Komiya T, Iwaki M, Kohda T, Mukamoto M, Takahashi M, and Kozaki S.: Properties of corynebacterium attachment site and molecular epidemiology of *Corynebacterium ulcerans* isolated from humans and animals in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 61(2):116-22. 2008
2. 学会発表
 1. 高野 愛, 藤田博己, 安藤秀二, 川端寛樹, 渡邊治雄. 野生鳥類を主とした国内生態系におけるボレリアの存在様式と病原体拡散に関するリスクの検討. 第82回日本細菌学会総会. 2009年3月. 愛知.
 2. 大橋典男, 鳥日図, 高蛙, 川森文彦, 高野愛, 川端寛樹, 安藤秀二, 岸本壽男. 国内初の新興感染症「アナプラズマ症」について. 第82回日本細菌学会総会. 2009年3月. 愛知.
 3. 井上 快, 壁谷英則, 川端寛樹, 宇根有美, 吉川泰弘, 丸山総一. 小型哺乳類を自然宿主とする病原性 *Bartonella* 属菌の生態に関する研究. 第147回日本獣医学会学術集会. 2009年3月. 栃木.
 4. 岡田玲奈, 木花いづみ, 武藤麻紀, 高野愛, 川端寛樹, 渡邊治雄. ライム病の一例. 第823回日本皮膚科学会東京地方会. 2009年1月. 神奈川.
 5. 川端寛樹, 高野 愛, 渡邊治雄. 実験室内に病原体の姿を探る. 第63回日本衛生動物学会西日本支部大会 (教育講演). 2008年11月. 神戸.
 6. 大橋典男, 高蛙, 鳥日図, 川森文彦, 千屋誠造, 安藤秀二, 川端寛樹, 岸本壽男. 新興感染症「アナプラズマ症」患者の発見. 第26回日本クラミジア研究会・第15回リケッチア研究会合同学術集会. 2008年11月. 岐阜.
 7. 安藤秀二, 坂田明子, 宇根有美, 五箇公一, 藤田博己, 花岡 希, 高野 愛, 川端寛樹, 岸本壽男. 輸入爬虫類が病原体を持ち込むリスクに関する考察. 第26回日本クラミジア研究会・第15回リケッチア研究会合同学術集会. 2008年11月. 岐阜.
 8. 岸本壽男, 安藤秀二, 猪熊壽, 岩崎博道, 大橋典男, 岡部信彦, 川端寛樹, 倉田毅, 高田伸弘, 堤寛, 田原研司, 藤田博己, 古屋由美子, 山本正吾. リケッチア感染症の早期警鐘システム構築・国内実態調査及び早期診断体制の確立に向けた現状と課題. 第26回日本クラミジア研究会・第15回リケッチア研究会合同学術集会. 2008年11月. 岐阜.
 9. 安藤秀二, 坂田明子, 鶴見みや古, 尾崎清明, 藤田博己, 花岡希, 高野 愛, 川端寛樹, 渡邊治雄, 岸本壽男. 鳥類に関連するマダニ類からのリケッチアの検出. 第146回日本獣医学会学術集会. 2008年9月. 宮崎.
 10. 高野 愛, 鶴見みや古, 尾崎清明, 藤田博己, 安藤秀二, 川端寛樹, 渡邊治雄. 野生鳥類を主とした国内生態系におけるボレリアの存在様式と病原体拡散に関するリスクの検討. 第146回日本獣医学会学術集会. 2008年9月. 宮崎.
 11. 森 亜紀奈, 今内 寛, 山田慎二, 今村彩貴, 伊東拓也, 川端寛樹, 小沼 操, 大橋 和彦. シュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) 唾液腺由来免疫抑制因子の同定および発現解析. 第146回日本獣医学会学術集会. 2008年9月. 宮崎.
 12. 下長根藍, 井上 快, 壁谷英則, 川端寛樹, 高田伸弘, 林谷秀樹, 丸山総一. わが国の野鼠における *Yersinia enterocolitica* の保有状況と分離株の *gyrB* 遺伝子系統解析. 第146回日本獣医学会学術集会. 2008年9月. 宮崎.
 13. 鶴見みや古, 尾崎清明, 藤田博己, 坂田明子, 武藤麻紀, 高野愛, 山内健生, 川端寛樹, 安藤秀二, 岸本壽男. 鳥類外部寄生虫からの病原体の検出—鳥類標識調査を主とした外部寄生虫採集—. 日本鳥学会 2008年度大会. 2008年9月. 東京.
 14. 藤田博己, 安藤秀二, 川端寛樹, 坂田明子, 高野 愛. 福島県のハシブトマダニとタネガタマダニからのリケッチア分離例. 第60

- 回日本衛生動物学会大会。2008年4月。栃木。
15. 本田俊郎, 藤田博己, 蔵元強, 御供田陸代, 角坂照貴, 高田伸弘, 矢野泰弘, 川端寛樹, 高野 愛, 山本正悟, 田原研司, 及川陽三郎。鹿児島県トカラ列島のマダニ相とマダニ保有病原体の調査。第60回日本衛生動物学会大会。2008年4月。栃木
 16. 本田俊郎, 角坂照貴, 川端寛樹, 高野 愛, 藤田博己, 蔵元強, 御供田陸代, 高田伸弘, 矢野泰弘, 山本正悟, 田原研司, 及川陽三郎。鹿児島県トカラ列島の野鼠類と野鼠保有病原体の調査。第60回日本衛生動物学会大会。2008年4月。栃木
 17. 川端寛樹, 坂田明子, 安藤秀二, 高野 愛, 渡辺治雄, 鶴見みや古, 尾崎清明, 藤田博己。国内生態系における *Borrelia* 属細菌の拡散に関与する宿主鳥類と媒介マダニ。第60回日本衛生動物学会大会。2008年4月。栃木。
 18. 川端寛樹, 高野 愛, 安藤秀二, 花岡希, 坂田明子, 藤田博己, 河村好章, 清島真理子, 角坂照貴, 渡辺治雄。マダニ刺咬例調査によって見いだされた新しいボレリア感染症。第82回日本感染症学会総会 2008年4月。島根
 19. 田原研司, 藤田博己, 新井 智, 矢野泰弘, 高田伸弘, 片山 丘, 川端寛樹。島根県におけるダニ媒介性感染症の実態と病原体の浸淫状況。第82回日本感染症学会総会 2008年4月。島根
 20. 勝川千尋, 小宮貴子, 岩城正昭, 高橋元秀: 本邦で初めてイヌから分離されたジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* 第81回日本細菌学会総会 平成20年3月京都
 21. Takako Komiya, Shin-ichi Nureki, Shoji Asakura, Masaaki Iwaki, Yoshichika Arakawa and Motohide Takahashi. Recent *Corynebacterium ulcerans* cases in Japan. Ninth ELWGD & Diphtheria Surveillance Network (DIPNET), October 2008, Athens (Greece).
 22. 小宮貴子, 岩城正昭, 荒川宜親, 高橋元秀, 畑中 章生, 角田篤信: 参考症例 *Corynebacterium ulcerans* 感染症、第19回日本臨床微生物学会総会 2008
 23. 「ペンギンの背景病変」柳井徳麿, 中村涼子, 村上麻美, 酒井洋樹, 柵木利昭, 加納壘, 村田浩一。日本内科学アカデミー・日本獣医臨床病理学会 2009年大会 (2009年東京)
 24. 奥谷晶子, 井上智, 今岡浩一, 山田章雄。Pyrosequencingによる炭疽菌, ペスト菌およびブルセラ属菌の迅速同定法の確立。第146回日本獣医学会学術集会, 宮崎, 2008年9月
 25. 内田幸憲, 鎌倉和政, 後藤郁夫, 杉本昌生, 福士秀人, 丸山総一, 岸本壽男, 今岡浩一, 吉川泰弘。動物病院勤務者の人獣共通感染症にかかわる健康調査。第8回人と動物の共通感染症研究会学術集会, 東京, 2008年11月
 26. 「*Mycobacterium genavens* 感染が疑われた鳥抗酸菌症およびアスペルギルス症を併発したシロムネオオハシの1例」福田真弓, 柳井徳麿, 酒井洋樹, 柵木利昭, 福士秀人, 加納壘, 長谷川篤彦, 森康行, 長嶺隆。第145回日本獣医学会学術集会 (2008年相模原)
 27. 「ウスユキバト (*Geopelia cuneata*) 飼育群における抗酸菌感染事例」福田真弓, 柳井徳麿, 酒井洋樹, 柵木利昭, 森康行。第12回鳥類臨床研究会大会 (2008年東京)
 28. H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。) なし

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に関する研究

研究分担者 岸本壽男 国立感染症研究所 ウイルス第一部第五室 室長
研究協力者 吉 林 台 国立感染症研究所 ウイルス第一部第五室 研究員
猪熊 壽 帯広畜産大学畜産学部獣医学科 教授
花岡 希 国立感染症研究所ウイルス第一部第五室 リサーチレジデント
安藤秀二 国立感染症研究所 ウイルス第一部第五室 主任研究官

研究要旨 今年度は、ペットとしてのイヌ、ネコにおける Q 熱の感染状況を把握し、ヒトへの感染リスクを評価することを目的とした。まず、*C. burnetii* DNA を定量可能で簡便な Real time PCR 法を確立し、従来の Nested PCR 法と比較検討を行った。感度は同等であったが Real time PCR 法が定量可能で簡便な点でより優れていた。また、従来の nested PCR を施行する際の positive control によるコンタミネーションの問題を解決するため、確認検証が可能なリコンビナントプラスミド positive control を作成した。これらの方法を応用し、ペットの Q 熱に対する感染状況を、血液サンプルからの DNA 検出と抗体保有率で調査した。イヌでは 28 都道府県で採取された 1098 頭の血清 1098 検体と、うち 25 都道府県の血液からの抽出 DNA サンプル 986 検体を用いた。また、ネコでは 30 都道府県で採取された 582 匹の血清サンプルについて抗体価測定を行った。イヌでは *C. burnetii* DNA が検出された検体はなかった。イヌでは 2.1% の抗体保有率を示し、ネコでは 6.2% の抗体保有率を示した。今回の調査ではいずれもこれまでの報告より低い抗体保有率を示したことから、イヌ、ネコにおける Q 熱の関与は以前の報告ほど高率ではなく、健康なペットからヒトへの感染リスクも高くない可能性が示唆された。

A. 研究目的

本邦における Q 熱は 4 類感染症として重要であるが、不明な点が多い。ペットからの感染が疑われる例や非典型例が多いとされていたものの、感染経路や実態の解明はほとんどなされていない。特に、*Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) の生態系での存在様式については全く不明であるため、家畜を含む動物並びに環境、人で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。すなわち①ヒト、ペット、家畜、野生動物、環境、における Q 熱コクシエラ感染の実態調

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過去の疫学データとの比較検証と、現在の感染リスクの評価。を目指した。

今年度は、*C. burnetii* のペット(イヌ、ネコ)におけるヒトへのリスク評価を目的に、血液、血清を用いた全国レベルでの疫学調査を計画した。

B. 研究方法

1) *C. burnetii* DNA に対する定量かつ簡便な検索方法の検討と確立

まず動物サンプルからの正確で簡便な *C. burnetii* DNA の検出法について検討した。

Klee(2006)らの報告を基に、ターゲットになる76bpの塩基を合成し、Taqman MGB プローブを用いて、*C. burnetii* の *icd* ゲノムをターゲットとした Real time PCR 系を作成し、合成 Oligo-*icd*439~514 を用いて、定量化分析を行った。

2)Nested PCRのPositive controlとするリコンビナントプラスミドの作成

外膜蛋白の *com1* ゲノムをターゲットした Nested PCRで検出されるPCR産物サイズが 1st 500bpと2nd 437bpであるが、これに対して、同じPCRシステムの中で、産物が 1st 620bp、2nd 580bpになるリコンビナントプラスミドpUC19_Qposiを作成し、*C. burnetii* DNAスクリーニングに際してコンタミネーションを確認検証可能になることを目指した。

3)Real time PCRとNested PCRの検出効率の比較検討

Real time PCR及びNested PCRで合成 Oligo及びリコンビナントプラスミドを用いて、其々の方法で理論的に検出できるコピー数を測定するとともに、*C. burnetii* DNAを用いて、検出効率について検討した。

4)Q熱に関する遺伝子疫学調査

遺伝子検出用の検体は、個人開業動物病院及び大学動物病院の協力を得て、イヌについてのみ収集されたものを用いた。検体は 25 都道府県(北海道、青森、宮城、栃木、東京、神奈川、静岡、山梨、愛知、福井、滋賀、大阪、京都、奈良、和歌山、兵庫、島根、高知、福岡、大分、熊本、長崎、宮崎、広島、茨城等)で収集されたイヌの血液 DNA サンプル 986 検体を用いた。DNA サンプルを採取したイヌの年齢に関しては、子犬期(1 M-1 歳)71 匹、成犬期(2-6 歳)251 匹、中高齢期(7-10)324 匹、高齢期(11-17 歳)147 匹、年齢不明が 193 匹。性別に関しては、メ

ス 390 匹、オス 343 匹、性別不明 163 匹であった。

今回検討した Real time PCR 法を用いて、*C. burnetii* DNA のスクリーニングを行い、陽性あるいは非特異反応が疑われたものについては Nested PCR を実施し確認した。

5)Q熱に関する血清疫学調査

材料としては、イヌに関しては、28 都道府県からの血清 1098 検体を使用した。ネコについては、30 都道府県(宮城、福岡、山梨、奈良、宮崎、香川、長野、沖縄、北海道、兵庫、新潟、千葉、福島、熊本、長崎、山口、鳥取、大阪、三重、青森、埼玉、神奈川、徳島、静岡、愛知、和歌山、福井、京都、栃木、東京等)からの血清 582 検体を使用した。

イヌの年齢に関しては、子犬期、成犬期、中高齢期、高齢期、年齢不明がそれぞれ 71 匹、371 匹、365 匹、149、142 匹で、性別は、メス 414 匹、オス 467 匹、性別不明が 217 匹であった。

ネコの年齢構成に関しては、成長期(1 M-1 年)83 匹、青年期(2-5 年)163 匹、中高年期(6-10 年)159 匹、高齢期(11-15)118 匹、老年期(16-20)39 匹、年齢不明が 20 匹で、性別はメス 248 匹、オス 307 匹、性別不明が 27 匹であった。

測定法は抗原として *C. burnetii* Nine-mile 株を用いる IFA 法を用いて抗体をスクリーニングし、その分布状況から cut off を設定、抗体保有検体については Western blot(WB)法を用いて特異抗体を確認した。

(倫理面への配慮)

本研究に用いた全検体は飼い主の承認を得た上で実施している。また、遺伝子組み換え操作についても当機関の遺伝子組み換え審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1) *C. burnetii* DNA に対する定量かつ簡便な検索方法の検討と確立

C. burnetii の icd ゲノムをターゲットとした Real time PCR に関する、定量化分析では、理論的検出限界コピー数は3コピーであった。

2) Nested PCR の Positive control とするリコンビナントプラスミドの作成

作成したリコンビナントプラスミドは、理論的検出限界コピー数が 12.5 コピーであった。

3) Real time PCR と Nested PCR の検出効率の比較検討

C. burnetii DNA 希釈系列を用いた検出限界の比較では、Real time PCR の 1:4 に対して、Nested PCR では 1:2 を示し、Real time PCR の検出感度はほぼ同等であると考えられた。

4) Q 熱に関する遺伝子疫学調査: Real time PCR を用いて、25 都道府県からのイヌの血液 DNA サンプル 986 検体に対して、*C. burnetii* DNA のスクリーニングを行い、陽性あるいは非特異反応が疑われたものについて Nested PCR を実施し確認した。その結果、*C. burnetii* の DNA が検出されたサンプルは認められなかった。

5) Q 熱に関する血清疫学調査

イヌの血清について IFA を実施した結果、1098 検体のうち熊本、和歌山、宮城、福井、神奈川、宮崎、京都、長崎、奈良、大分、千葉、高知の 12 県からの 22 検体については、1:64~512 (1:64 は 8 検体、1:128 は 9 検体、1:256 は 4 検体、1:512 は 1 検体) の抗体を保有し、全検体の 2% で陽性を示した。更に WB 法を用いて 27KDa バンドを基準とし確認した結果、イヌの IFA 陽性血清では抗体価 1:

256 以上の全検体が WB 法でも陽性を示したものの、1:128 及び 1:64 では一部が陽性、一部が陰性結果を示した (表 1、図 1)。

また、ネコの血清サンプル 582 検体のうち福島、熊本、長崎、山口、鳥取、大阪、三重、青森、埼玉、神奈川、徳島、宮崎、福岡、愛知、宮城、長野、沖縄、兵庫、新潟、千葉、和歌山、京都、栃木、東京の 24 都道府県からの 35 検体については、1:128~2048 (1:128 は 2 検体、1:256 は 10 検体、1:512 は 15 検体、1:1024 は 7 検体、1:2048 は 2 検体) の抗体を保有し、全検体の 6.2% で陽性を示した。WB 法でネコの IFA 陽性検体を検討したところ、IFA 抗体価が 1:1024 以上の検体が WB でも全て陽性、抗体価 1:128 以下の検体では WB 全て陰性、1:256~1:512 の検体では一部が陽性、一部が陰性を示した (表 2、図 2)。WB の感度についてはさらに検討する必要があると考えられた。

疾患等バックグラウンドについては、イヌに関しては、記録不全、相当数のサンプルにおいて、年齢不明であったが、高齢期 (11~17 歳) のイヌの抗体保有率が高い傾向を示した (表 3)。ネコに関しては詳細な記録があり、疾患別に検討したところ、子宮蓄膿症に高い保有率を示したほかは、疾患との関連が認められなかった (表 4)。ただし頭数が少ないため、関連について有意の有無は不明であり、今後検討の必要があると考えられた。

年齢別では、成長期 (1 ヶ月~1 歳) のネコが高い抗体保有率を示し、青年期、中高齢期、高齢期までに抗体保有率が減少する傾向を示した (表 5)。

D. 考察

本研究では、*C. burnetii* 遺伝子スクリーニ

ングにおける Real time PCR 法は Nested PCR 法より簡便でかつ検出効率の優れた方法であることを確認し、更に、実際のスクリーニング検査に応用した。遺伝子組み換え法を用いて作成したリコンビナントプラスミドは、Nested PCRを用いた *C.burnetii* 遺伝子検査におけるコンタミネーションの確認検証を可能にする有効な方法であることが示された。

イヌの血液 DNA サンプルに対して *C.burnetii* DNA の検出を Real time PCR 法で試みたが、全てのサンプルが陰性であり、抗体陽性のものでも *C.burnetii* DNA は検出されなかった。

血清抗体の調査の結果、イヌでは 2.1% の抗体保有率を示し、ネコでは 6.2% の抗体保有率を示した。今回の調査ではいずれもこれまでの報告(10-15%)より低い抗体保有率を示した。

ただし、これまでの報告では、*C.burnetii* 血清抗体保有率の判定に対して、基準とする cut off 値の設定についての検討が示されていないため、単純に比較はできないものの、現時点のイヌ、ネコにおける Q 熱の抗体保有は高率ではなく、ヒトへの感染リスクも高くない可能性が示唆された。

今回の検討の限界と、今後の課題として以下の点が挙げられる。

WB では高い抗体価を示した検体では陽性が確認できたが、低値では検出できないものもあり、それが WB の感度あるいは非特異反応によるものなのかの検証が必要。さらに抗体陽性が過去の感染既往なのか、また、ペットの分娩、流産、疾患等との関連についての調査が必要と考えられる。

今後は、家畜(ウシ、ヒツジ)、野生動物(シカ、アライグマ)での調査と、環境要因としてダニ等の保菌状況等をさらに把握する必要

がある。これらのことから、*C.burnetii* の自然界の生態系における存在様式を明らかにし、人への感染リスクの客観的な評価につなげたい。

E. 結論

2) *C.burnetii* 検査法の改良として、*C.burnetii* 遺伝子検査において、定量可能で、迅速、簡便な方法である Real time PCR 検査法を確立し、従来の Nested PCR 法とほぼ同等の検出感度で、より効率が高いことを示した。

2) *C.burnetii* 遺伝子検査における、コンタミネーション防止のため、Nested PCR 法での Positive control に用いるリコンビナントプラスミドを作製した。

3) 全国のイヌ・ネコにおける、*C.burnetii* の感染率及び抗体保有率について、基本状況を把握した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

表 1: イヌの血清抗体保有状況(n=1098)

IFA希釈倍率	1:512	1:256	1:128	1:64
IFA(陽性数)	1	5	9	8
WB(陽性数)	1	5	7	5
全検体中の%	0.1	0.46	0.82	0.73
カットオフ値にした場合の%	0.1	0.55	1.37	2.09

図1: イヌの血清IFA抗体分布状況

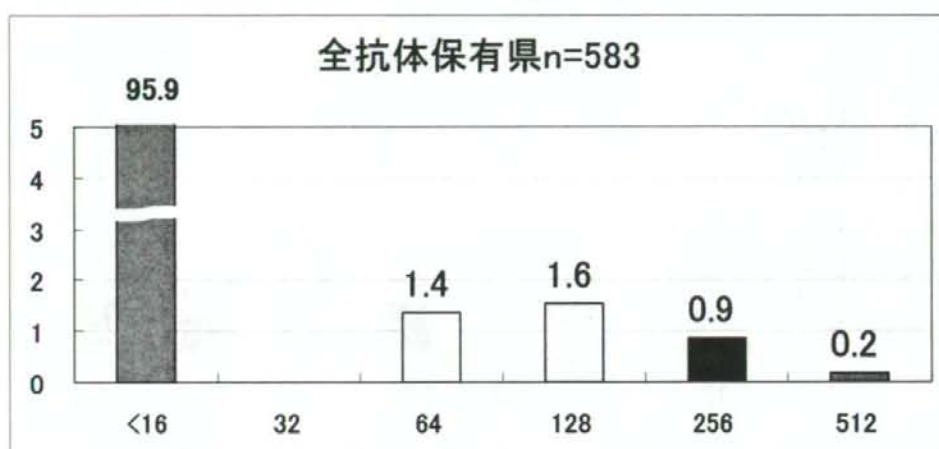


表 2:ネコの血清抗体保有状況(n=582)

希釈倍率	1:2048	1:1024	1:512	1:256	1:128
IFA(陽性数)	2	7	15	10	2
WB(陽性数)	2	7	9	7	0
全検体中の%	0.34	1.21	2.58	1.72	0.34
カットオフ値にした場合	0.34	1.55	4.12	5.84	6.19

図 2:ネコの IFA 抗体分布状況

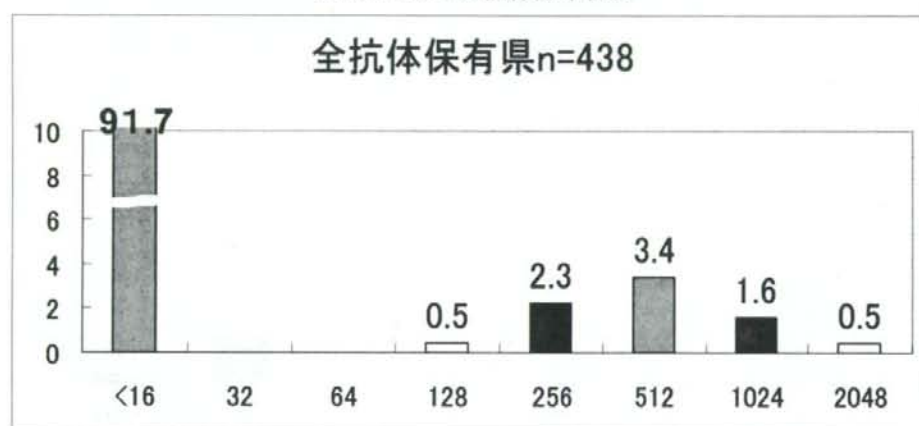


表3:イヌの年齢別抗体保有率

年齢別	子犬期 (1M~1Y)	成長期 (2~6Y)	中高齢期 (7~10Y)	高齢期 (11~17Y)	年齢不明
総数	71	371	365	149	142
陽性数	0	4	3	6	5
%	0	1.1	0.8	4.0	3.5

表4:ネコの疾患別分類

疾患別	泌尿器疾患	消化器疾患	ウイルス感染	ダニ等寄生虫	子宮蓄膿症	心臓血管疾患	外傷	健康	不明
罹患総数	66	65	83	19	2	8	31	214	60
IFA 陽性数	5	5	4	2	1	1	1	13	3
%	7.58	7.69	4.82	10.53	50.00	12.50	3.23	6.07	5.0

表5:ネコの年齢別抗体保有率

年齢別	成長期 (1M~1Y)	青年期 (2~5Y)	中高年期 (6~10Y)	高齢期 (11~15Y)	老年期 (16~20Y)	年齢不明
総数	83	163	159	118	39	20
陽性数	10	6	5	1	2	1
%	12	3.7	3.1	0.8	5.1	5

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)

協力研究者 武藤麻紀, 高野 愛, 小笠原由美子, 渡辺治雄(国立感染症研究所・細菌第一部)
坂田明子, 安藤秀二, 岸本壽男, 倉根一郎(国立感染症研究所・ウイルス一部)
鶴見みや古, 尾崎清明(山階鳥類研究所)
藤田博己(大原総合病院付属研究所)
角坂照貴(愛知医科大学)
清島真理子(大垣市民病院)
和田康夫(赤穂市民病院)
馬場俊一(ばば皮ふ科医院)
千種雄一(獨協医科大学)
田原研司(島根県保健環境科学研究所)
山内健生(富山県衛生研究所)

研究要旨

昨年度に引き続き、国内生態系、特に野生鳥類生態系による病原体拡散に関するリスク評価のための基礎データ収集を全国規模で行った。この結果は研究対象であるボレリアのみならず、ウエストナイルウイルスやダニ脳炎ウイルス、紅斑熱リケッチア症、アナプラズマ感染症など他病原体についても同様に、“野生鳥類を介した病原体拡散リスクの評価”に応用できる可能性がある。

1. 野生鳥類の捕獲は国内 31 都道府県で行った。50 種以上の野生鳥類より採取されたマダニ 1,376 個体中のうち、インターナルコントロール-PCR(マダニ mt-rs PCR)陽性の 1,250 個体について病原体検索を行い、87 個体(7.0%)で *Borrelia* DNA が検出された。この内、ライム病病原体 *B. garinii*(52 個体, 59.8%)および病原性不明のライム病群ボレリア *B. turdi* (28 個体, 32.2%)が主な野生鳥類寄生マダニ保有のボレリアとして見いだされた。
2. ライム病ボレリア種は媒介マダニにおいて経卵感染しないとされている。このことから、間接的にはあるが、マダニ幼虫保有ボレリアを調べることで、野生鳥類が感染しているボレリア種を知ることができる。本研究では、野生鳥類寄生幼虫から見いだされたボレリア 49 株について、鞭毛抗原遺伝子 *flaB* による系統解析を行った。結果、欧州で見いだされるボレリアと同タイプのボレリアが国内にも浸潤していることが明らかとなった。このことは欧州と日本の間で近い過去、もしくは現在もボレリアの移動があった、もしくはあることを示すとともに、これらボレリアが野生鳥類に感染、維持されていることから、野生鳥類を介したボレリアの広域拡散の可能性が強く示唆された。
3. 海外では見いだされないが国内で広く分布しているボレリア *B. japonica* とその媒介ベクターであるヤマトマダニは、野生鳥類からは見いだされなかった。このことから野生鳥類の移動に付随して拡散しやすいマダニ種とこれを媒介種とするボレリア種が存在することが初めて明らかとなった。

Borrelia lonestari 類似の STARI 型ボレリアによる感染症が疑われた症例を、国内で初めて見いだした。今後、抗体検査などの病原体診断法の確立が必要であると考えられた。

野生鳥類を主とした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

A. 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の国内における生態系内での存在様式を調べること、また、存在様式から想定できる病原体の非人為的拡散に関するリスク因子を明らかにすることを目的として平成19年度に引き続き、以下研究を行った。

B. 方法

I. 非人為的拡散モデルの選定

I-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把握されてきていること、また媒介するベクターも把握されているためである。

I-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、恒常的に野生鳥類の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、鳥類標識調査にて捕獲された野生鳥類、斃死体および傷病保護された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*rns*遺伝子(*mt rns*)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

国内野生鳥類種寄生マダニから見出されたボレリア種

昨年度同様に野生鳥類寄生マダニを採取し、検討を行った。昨年度採取マダニと合わせ、国内31都道府県において、野生鳥類683羽に寄生していたマダニ1,376個体を採取し、内*mt rns*-PCRにてDNA抽出、精製が確認できた1,250検体について病原体検出を試みた(図1)。各々の野生鳥類捕獲地、寄生マダニ種は表1および表2に示した。試験に供したマダニ1,250検体のうち87検体(7.0%)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3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59.8%を占有した。またこの他に*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* と野生鳥類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、広域拡散に野生鳥類種が関与している可能性が示された。

ライム病ボレリア種は媒介マダニにおいても経卵感染をしないとされている。このことから、間接的にはあるが、マダニ幼虫保有ボレリアを調べることで、野生鳥類が感染しているボレリア種を知ることができる。本研究では、野生鳥類寄生幼虫から見いだされたボレリア 49 株については、鞭毛抗原遺伝子 *flaB* による系統解析を行った(図 2)。結果、欧州で見いだされるボレリアと同タイプのボレリアが国内にも浸潤していることが明らかとなった。このことは欧州と日本の間で近い過去、ボレリアの移動があったことを示すとともに、これらボレリアが野生鳥類類に感染していることから、野生鳥類類を介したボレリアの広域拡散があった可能性が極東諸国で初めて示された。

また、植生上から採取されるマダニ相と野生鳥類寄生マダニ種には大きな違いが見いだされた(表2)。このことは、特定のマダニ種が、野生鳥類の移動により移動・拡散していることを示している。*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、野生鳥類寄生種として、*B. japonica* および *I. ovatus* は見出されなかった。このことは *B. japonica* は生態系では野生鳥類以外の吸血動物と *I. ovatus* 間で維持、伝播されていると考えられる。

Southern tick associated rash illness (STARI)型ボレリア感染が疑われた症例

米国で見いだされた南部ダニ紅斑病(STARI)型ボレリアが国内に浸潤している可能性がある。以下症例について簡単に記載する。見出されたボレリア種は回帰熱ボレリア近縁ではあるが、これまでにその存在が知られていない新しい種のボレリアであると考えられた。本ボレリアはマダニの唾液腺からも検出されたことから、患者への感染が成立していたと考えられる。患者は軽度のleukopenia, thrombocytopeniaをとまう39-40°Cの発熱、刺咬部位の腫脹、発赤、関節痛、腰痛を呈した。抗体の検索等は行なわれていない。

近年ライム病、回帰熱とも異なる。またライム病抗体検査では陰性となる新しいボレリア感染症 Southern tick-associated rash illness (STARI) が米国で報告されている(Varela et al. 2004)。本症例の刺咬マダニはライム病ボレリアを媒介するマダニ種とは異なること、見出されたボレリア種は鞭毛抗原遺伝子 *flaB* の配列から STARI 起因菌と近縁であったことから、本邦においても、*Haemaphysalis* 属マダニ刺咬による STARI-like な感染症が存在する可能性が考えられた。また、本菌に類似のボレリアが鳥寄生マダニより見いだされていることから(表 3)、今後、自然界での移動、伝播サイクルについても検討が必要である。

E. 結論

1. 鳥寄生マダニ保有ボレリアとして、ライム病原体 *B. garinii* およびライム病群ボレリアである *B. turdi* が主に見いだされた。本ボレリアはユーラシア大陸で見出されるボレリア種と一部共通であり、このことは野生鳥類の移動に付随して本病原体が近年拡散してきていることが推測された。