

放置して血清成分を抽出した。その後、容量1.5mLのエピペンドルフチューブにこの小チューブを挿入して7500rpm4℃5分間遠心し、外側のチューブに回収される血清成分を回収した。回収した血清成分を含む検体を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、1:5希釈血清と1:25希釈血清について検査を行った。そして、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。

本年度検査の対象としたのは、東京都内の獣医科医院に勤務する獣医師ならびに動物看護士、トリマー及びその家族19名である。年齢、性別については結果の項目に記載した。

## 2. 国内医療機関から依頼のあったトキソカラ症抗体検査成績

平成20年4月1日から平成21年1月10日の間に、トキソカラ症が疑われ東京医科歯科大学国際環境寄生虫病学分野に抗体検査の依頼のあった症例は22名、27検体であった。その内訳は、血清は22検体、眼内液3検体、胸水1検体、気管支洗浄液1検体である。抗体検査はToxocaraCHEKを用いて実施した。判定結果は前項の濾紙採血検体検査と同様に行った。

## 3. 砂場を汚染する動物由来回虫卵のPCR法とLAMP法による検査

平成20年6月から平成21年1月に、東京都内及びその近郊の19公園の砂場33カ所

と都内ドックラン5施設から砂を採取し、トキソカラ属虫卵の汚染状況を調査した。砂場からの虫卵検出はショ糖浮遊法(文献)で行った。

検出された虫卵については分子遺伝学的手法を用いて虫種同定を試みた。即ち、虫卵1個ずつをチューブに取り、50mM NaOHによりDNAを抽出し、イヌ回虫5' AGTATGATGGGCGCGCCAAT3' /NC2 (5' TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT3')及びネコ回虫5' GGAGAAGTAAGATCGTGGCAGCGCT3' /NC2特異配列をプライマーとして用いたPCRを実施した。さらに、一部の虫卵についてはrDNAのITC2と28S領域を含む4種類の異なったプライマーを用いたLoop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)法も合わせて実施し、結果を比較した。

## 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20年度に濾紙採血検体を用いたトキソカラ抗体検査を実施した19名についての検査結果を表1に示す。19検体中1名が、1:25希釈血清でも陽性反応を示し、血清中のイヌ回虫幼虫排泄物抗原に体する抗体が陽性と判定された。また、陽性と判定された獣医師の父親(獣医師)と動物看護士(女性)とその配偶者が疑陽性と判定された。これらの3名についてはさらに精密検査の実施が可能である旨本人に連絡したが、そのご連絡はなかった。昨年も指摘したが、抗体陽性検体についての精密検査システムの構築が今後の課題として残された。

### 2. 国内医療機関から依頼のあった検体の

## 検査結果

平成20年4月1日から平成21年1月31日までにトキソカラ症を疑われ、抗体検査の依頼のあった症例は28症例34検体で、血清29検体、眼内液(硝子体液、前房水)3検体、胸水と気管支洗浄液がそれぞれ1検体であった。平均年齢は39.2歳で1歳の女児から71歳の男性まで広い年齢層に渡っていた。性別では男性は21名、女性11名、性別不明が2名で、男性が女性よりも1.9倍多かった。また、依頼診療科別では眼科から22症例26検体、内科系が6症例と眼科からの依頼が大多数を占めていた。トキソカラ抗体検査の結果を表2に示す。血清での陽性率は24.1%、眼内液では33%であった。血清検査で抗体陽性となった7症例のうち、内臓型トキソカラ症と診断された症例は4例、眼型は3例であった。

内臓型の4症例はいずれも奈良県立医科大学及びその関連病院の症例であった。いずれもウシの生肝臓生食歴があり、血液検査で好酸球増多及びIgE増加を認め、CTでは肺野に複数の小結節陰影やすりガラス陰影をとも枚、これらの病変の消失と出現が観察された。

### 3. 砂場を汚染する動物由来回虫卵の汚染状況調査とその分子生物学的種の同定

表3に、調査を実施した講演砂場と検査結果を示した。10仮称の公園の15箇所の砂場から砂を採取し、シヨ糖浮遊法で虫卵を回収した。その結果、8箇所の砂場から虫卵が検出された、また、検出された虫卵の143個の虫卵のうち140個の虫卵では幼虫包蔵卵にまで発育していた(図1)。

検出された虫卵107個を用いて虫種の同

定を行ったところ、DNAがうまく抽出された見地についてはすべてネコ回虫卵と同定された(表5)。さらに、PCR法とLAMP法を比較したところ、ネコ回虫卵DNAを対象としたPCR法での陽性率は66.2%、LAMP法で陽性率72.1%とLAMP法のほうが感度が高かった。また、LAMP法でもイヌ回虫DNAは検出されず、公園砂場から回収されたトキソカラ属回虫卵はネコ回虫卵であると推測された。

## E. 結論

濾紙採血検体を用いた平成20年度の調査において、イヌ・ネコ回虫の感染リスクの高い獣医師あるいは動物看護師を対象としたトキソカラ抗体検査で19名中1名が抗体陽性、3名が疑陽性と判定された。しかし、さらに詳細な検査を実施できなかった。システムとしてのトキソカラ抗体検査は確立されたが、陽性者に対してさらに詳細な検査を実施するための方策を今後検討していく必要があると考えられた。また、ウシ肝臓生食歴のある4例の内臓型トキソカラ症例が奈良県内で発生していたことが血清の抗体検査から明らかになった。今後発生の疫学的背景の追跡が必要であると考えられた。

## F. 健康危険情報

該当項目なし

## G. 研究論文

### 1. 発表論文

[1] 赤尾信明, 太田伸生. 動物由来回虫症. SA Medicine. 2008;10(5):64-9.

[2] 赤尾信明. イヌ回虫症. 化学療法の

領域. 2008;24(9):1351-7.

[3] 赤尾信明. ヒトのトキソカラ症と新しい動物モデル. 獣医寄生虫学雑誌. 2008;7(1):7-12.

[4] Yoshikawa M, Ouji Y, Nishiofuku M, Moriya K, Kasahara K, Mikasa K-i, Mizuno Y, Ogawa S, Akao N. Visceral toxocariasis from regular consumption of raw cow liver. Internal Medicine. 2008;47:1289-90.

[5] Yoshikawa M, Nishiofuku M, Moriya K, Ouji Y, Ishizaka S, Kasahara K, Mikasa K, Hirai T, Mizuno Y, Ogawa S, Maruyama H, Akao N. A familial case of visceral toxocariasis due to consumption of raw bovine liver. Parasitology International. 2008;57(4):525-9.

[6] Maeda T, Yamada H, Akao N, Iga M, Endo T, Koibuchi T, Odawara T, Iwamoto A, Fujii T. Unusual radiological findings of Fasciola hepatica infection with a huge cystic and multilocular lesions. Internal Medicine. 2008;47:449-52.

[7] Jin ZF, Akao N, Nobuta T, Ohta N. An improved method for recovery of muscle-stage larvae from mice infected with *Toxocara canis*. Journal of Parasitology. 2008;94(5):1164-5.

[8] Jin Z, Akao N, Ohta N. Prolactin evokes lactational transmission of larvae in

mice infected with *Toxocara canis*. Parasitology International. 2008;57(4):495-8.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当項目なし

表1. 平成20年度濾紙採血検体トキソカラ抗体検査

ID	年齢	性別	職業	結果
1	72	M	獣医師	疑陽性
2	66	F	動物看護師	陰性
3	35	M	建設業(配偶者が動物看護師)	疑陽性
4	35	F	動物看護師 獣医師	疑陽性
5	33	M	動物看護師	陽性
6	29	M	獣医師	陰性
7	29	F	獣医師	陰性
8	26	F	動物看護師	陰性
9	23	M	トリマー	陰性
10	6	F	動物看護師	陰性
11	5	F	幼稚園児(母が動物看護師)	陰性
12	21	M	幼稚園児(母が動物看護師)	陰性
13	21	M	トリマー	陰性
14	47	M	トリマー	陰性
15	40	F	運送業	陰性
16	55	F	ペットショップ開業	陰性
17	30	F	主婦	陰性
18	49	F	会社員	陰性
19	38	M	トリマー ペットショップ開業	陰性

表2. 東京医科歯科大学に依頼のあった34検体のトキソカラ抗体検査結果

	検査数	陽性	疑陽性	陰性
血清	29	7	3	19
眼内液	3	1	0	2
胸水	1	0	0	1
気管支洗浄液	1	0	0	1



図1 公園砂場から回収されたトキシカラ属回虫卵

表3 東京近郊砂場から検出されるトキシカラ属虫卵

	公園	検査結果	検出虫卵数
1	市川1	-	0
2	市川2	+	64
3	御茶ノ水1	-	0
4	御茶ノ水2A	-	0
5	御茶ノ水2B	+	8
6	御茶ノ水2C	+	2
7	御茶ノ水3	+	5
8	秋葉原1A	+	52
9	秋葉原1B	+	33
10	秋葉原1C	+	33
11	秋葉原2	-	0
12	秋葉原3	+	10
13	多摩1	-	0
14	多摩2	-	0
15	多摩3	-	0
16	川崎市1	+	2
17	川崎市2	+	1
18	川崎市3	+	1
19	墨田区1	-	0
20	墨田区2	-	0
21	江東区1	-	0
22	江東区2	-	0
23	品川区1	-	0

24	横浜市1	-	0
25	横浜市2	+	1
26	横浜市3	-	0
27	世田谷区1	+	3
28	世田谷区2	-	0
29	世田谷区3	-	0
30	横浜市4	-	0
31	横浜市5	-	0
32	横浜市6	+	62
33	川崎市4	+	26
TOTAL			303

表5 PCR法による検出虫卵の虫種同定

		検体番号					
		8, 9	16	17	18	32	33
検出虫卵数		85	2	1	1	62	26
PCRに供した虫卵数		68	2	1	1	28	11
結果	<i>T. canis</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>T. cati</i>	45	2	1	1	16	5
	不明	23	0	0	0	12	6

表6 PCR法とLAMP法による検出虫卵の比較

ネコ回虫		PCR	
		+	-
LAMP	+	44	5
	-	1	18
イヌ回虫		PCR	
		+	-
LAMP	+	0	0
	-	0	68

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
我が国における動物由来感染症の感染実態把握に資する研究  
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

研究分担者 福士 秀人 岐阜大学応用生物科学部獣医学講座教授

協力研究者 大屋 賢司 岐阜大学応用生物科学部獣医学講座助教

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。ろ紙採血法による抗体検査では，2008年度は10検体について検索した。オウム病と診断された検体はIgG抗体価20倍であった。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。E型肝炎抗体の測定では2007年度および2008年度の22検体いずれも陰性であった。オウム病抗体検査用抗原のクローニングを行った。その結果，抗体検査用抗原の候補としてPMPがあげられた。ELISA抗原としての有用性を検討するための準備を進めた。また，主として鳥の糞を対象とする病原体検出用リアルタイムPCRを確立できた。コクシエラ症（Q熱）外膜タンパク質com1を抗原とするELISAを開発しているが，確立には至らなかった。

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。近年，オウム病の届け出数は年間30例前後であるが，年により増減が見られる。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，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。

これまでに，臨床現場からの検体輸送を改良する目的で，濾紙採血法を確立し

た。本研究ではろ紙採血法により2008年度におけるオウム病およびQ熱抗体調査を実施した。さらに従来の微量蛍光抗体法と同等の抗体検査法を確立するため，新たなオウム病クラミジア抗原およびQ熱抗原の探索を行った。また，鳥類における定量的なクラミジア検出法を開発した。

B. 研究方法

クラミジア検出：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 $\mu$ 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。

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。

## 2. リアルタイムPCRによるクラミジア検出法の確立

オウム病クラミジアを定量的に検出するためリアルタイムPCR法の確立を行った。クラミジア外膜蛋白質omcB遺伝子において、Chlamydophila属内で高い相同性を示す領域を標的とした。コピー数を定量するため、pGEM-T vectorにomcB遺伝子を挿入したプラスミドを精製し、鋳型として検量線を作成した。*C. psittaci* Mat116株の基本小体 (EB) 10<sup>6</sup>感染単位を接種したトリ糞便から抽出したDNAを10倍段階希釈して検出感度の測定に用いた。検出系の特異性は一般細菌を用いて検討した。動物病院から提供されたトリ糞便を用いて、従来法と比較した。

## 3. コクシエラ外膜蛋白質Com1を抗原としたELISAによる抗体検出系の開発

*C. burnetii*ゲノムDNAから外膜タンパク

質遺伝子com1をPCRにより増幅し、定法にしたがい、GST融合タンパク質として大腸菌で発現させ、抽出精製した (GST-Com1)。以前の研究で得られた*C. burnetii* Nine Mile I相菌感染A/Jマウス血清、Priscilla株感染A/Jマウス血清およびヒト血清を系の評価に用いた。

## C. 研究結果

### 1. 2008年度におけるクラミジアおよびQ熱抗体保有率 (ろ紙採血法)

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。10検体について検査した結果、20倍2検体、10倍4検体、10倍未満4検体であった。このうち、オウム病と診断された検体は20倍 (IgG) であった。また、オウム病疑いとされた2検体はいずれも10倍であった。

Q熱抗体は検査した11検体いずれも陰性であった。

### 2. リアルタイムPCRによるクラミジア検出法の確立

構築したリアルタイムPCR法は定量的に10コピー以上がから検出できた。EBを接種したトリ糞便では反応系あたり100感染単位以上から検出できた。各種クラミジアDNAを鋳型とした場合、*C. psittaci*、*C. abortus* (反芻獣クラミジア)、*C. felis* (ネコクラミジア) を検出したが、*C. pn*



*eumonia*, *C. trachomatis*を始めとした他種クラミジアならびに腸内細菌科を始めとした一般細菌のDNAを鋳型とした場合、反応は認められなかった。動物病院から提供されたトリ糞便において、従来法で陽性を示した4検体は全て陽性を示し、陰性を示した14検体中5検体が陽性を示した。これらのコピー数は10コピー未満であった。

### 3. コクシエラ外膜蛋白質Com1を抗原としたELISAによる抗体検出系の開発

マウス感染血清をELISAで測定したところGST-com1では接種菌数が多かったマウスにおいて接種菌株に関わらず抗体応答が認められた。しかし、接種菌数が少ない場合にはIFA抗体応答が認められたが、ELISA抗体は検出されなかった。

## D. 考察

### 1. 2008年度におけるクラミジアおよびQ熱抗体保有率（ろ紙採血法）

現行の判定基準は「間接蛍光抗体法による抗体の検出（単一血清でIgM抗体の検出もしくはIgG抗体256倍以上、又はペア血清による抗体陽転もしくは抗体価の有意上昇）」となっており、現行の基準では今回の検体は、オウム病と診断された検体

を含むいずれも陰性となる。今回はIgMのデータが得られなかったが、さらに例数を重ね、診断基準の妥当性も含め、検討が必要であると考えられた。

### 2. リアルタイムPCRによるクラミジア検出法の確立

本年度に樹立したリアルタイムPCR法による、*C. psittaci* *ompB*遺伝子検出法は、従来の*ompA*領域を標的としたnested PCR法より約10倍高感度であった。*C. abortus*, *C. felis* DNAは増幅するものの、*C. pneumoniae*および*C. trachomatis*とは反応しなかったこと、さらに腸内細菌科を始めとした一般細菌は全て陰性であったことから本検出法の特異性が示された。以上より、本法を用いることにより、特に*C. pneumoniae*と*C. psittaci*の簡便な鑑別に有用であることが示唆された。また、本検出法では、クラミジアDNAを定量的に検出出来ることから、クラミジア罹患鳥の排菌量を定量的にとらえることが可能になった。ヒト検体の応用が今後の課題である。

### 3. コクシエラ外膜蛋白質Com1を抗原としたELISAによる抗体検出系の開発

*C. burnetii*感染A/Jマウス血清における抗体応答をCom1-ELISAにて検出することができた。しかしながら、今回検索し

たCom1-ELISAは感度の点でIF法に劣っていた。また、感染個体により応答性は異なる可能性が示された。Com1に対する抗体応答は感染動物や患者の感染経過により異なるとの報告もある。今後、検出系の検討が必要である。

#### E. 結論

ろ紙採血法による検索ではオウム病抗体およびQ熱抗体、いずれも陽性例は見いだせなかった。オウム病クラミジアの定量的検出法としてリアルタイムPCRを確立できた。Q熱抗体測定法としてのELISA法には課題が残された。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

・Ohya, K., Takahara, Y., Kuroda, E., Koyasu, S., Hagiwara, S., Sakamoto, M., Hisaka, M., Morizane, K., Ishiguro, S., Yamaguchi, T., Fukushi H.: "Chlamydomytila felis CF0218 is a novel TMH-family protein with potential as a diagnostic antigen for diagnosis of *C. felis* infection." *Clin. Vaccine Immunol.* 15: 1606-1615, 2008.

・Puolakkainen M., Lee A., Nosaka T., Fukushi H., Kuo C.-C., Campbell L.: "Retinoic acid inhibits the infectivity and growth of *Chlamydia pneumoniae* in epithelial and endothelial cells through different receptors." *Microb. Pathog.* 44: 410-416, 2008.

・Matsui T., Nakashima K., Ohyama T., Kobayashi J., Arima Y., Kishimoto T., Ogawa M., Cai Y., Shiga S., Ando S., Kurane I., Tabara K., Itagaki A., Nitta N., Fukushi H., Matsumoto A., Okabe N.: "An outbreak of psittacosis in a bird park in Japan." *Epidemiol. Infect.* 136: 492-495, 2008.

##### 学会発表

・大屋賢司, 福士秀人: "ネコクラミジアCF0218の性状解析と感染診断用抗原としての有用性." 第81回日本細菌学会総会, 2008 (京都).

・塩田幸弘, 大屋賢司, 福士秀人: "Real-time PCR法によるオウム病クラミジア遺伝子検出法の開発." 第146回日本獣医学会学術集会, 2008 (宮崎).

・大屋賢司, 前田貞俊, 山口剛士, 福士秀人: “感染特異抗体検出による, ネコクラミジア *Chlamydia felis* の血清疫学調査.” 第26回日本クラミジア研究会, 2008 (岐阜).

義, 野村彩朱, 矢野竹男, 平井克哉, 福士秀人: *Coxiella burnetii* 外膜蛋白質 Com1 の診断用抗原としての有用性: 第147回日本獣医学会, 宇都宮 (2009.4) (発表予定)

・奥田秀子, 大屋賢司, 安藤匡子, 小宮智

表 . 2008年度におけるろ紙抽出法によるオウム病抗体検査結果

番号	年齢	主要症状	臨床診断	ペットの飼育			抗体価
				現在(飼育数)	過去(飼育数)	鳥との接触	
1	67	咳・発熱・痰	オウム病疑い	セキセイインコ 1羽		セキセイインコ	10
2	87	咳	肺炎	文鳥 1羽	犬 1匹	なし	10未満
3	52	咳	オウム病	インコ	インコ		20
4	13	微熱・咳・咽頭痛	気管支炎	文鳥 2羽	文鳥 2羽(5年間)		20
5	76	咳・発熱	4~5日前より咳・痰・発熱	犬 1匹 文鳥 1羽	なし	文鳥	10未満
6	14	咳がらみ痰		コザクラインコ 2羽	インコ 7羽程度	あり	10
7	14	高熱・筋肉痛・倦怠感	オウム病疑い	小桜インコ 2羽	小桜インコ 2羽	小桜インコ 2羽	10
8	51	咳・痰・熱	肺炎	インコ 2羽	なし	なし	10
9	63	咳・筋肉痛		セキセイインコ 1羽	あり	セキセイインコ	10未満
10	60	咳・喉の痛み・微熱		インコ 1羽	犬 1匹	インコ	10未満

我が国における動物由来感染症の感染実態把握に資する研究  
動物由来細菌感染症の症例収集と分析及び諸検査

研究分担者 丸山 総一 日本大学生物資源科学部・教授

研究要旨: 犬や猫を病原巣とする *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii*, *B. henselae*, *B. koehlerae*, *B. clarridgeiae* は、人に心内膜炎や猫ひっかき病を引き起こすことが知られている人獣共通感染症起因菌である。これら *Bartonella* 属菌の検出には、現在、血液培養法や PCR 法が用いられているが、判定までに長期間を要し、また高額な機器類も必要となるため、臨床現場での迅速診断には適していない。そこで本研究では、臨床現場において *Bartonella* 属菌を簡便かつ迅速に検出する新たな遺伝子診断法の開発を目的とし、Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法について検討した。上記 *Bartonella* 属菌 4 種の標準株および周辺環境細菌等 14 種を用い、*Bartonella* 属菌に特異的なループプライマーを設計し、LAMP 法の至適反応条件および特異性について検討した。今回開発した LAMP 法による *Bartonella* 属菌の検出は、*B. henselae*, *B. koehlerae*, *B. clarridgeiae* で 60 °C, *B. vinsonii subsp. berkhoffii* で 63 °C による LAMP 反応が最も効率的であり、また他の細菌での遺伝子増幅が認められないことから、本 LAMP 法が特異的に上記 *Bartonella* 属菌 4 種を検出することが可能であり、簡便かつ迅速な臨床現場において有用な遺伝子診断法であると思われた。

A. 研究目的

犬や猫等のペットを病原巣とする *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii*, *B. henselae*, *B. koehlerae*, *B. clarridgeiae* は、人に心内膜炎や猫ひっかき病を引き起こすことが知られている。現在、病原巣である動物からの *Bartonella* 属菌の検出法として、血液からの分離培養法が用いられているが、判定までに長期間を要し、さらに DNA 増幅装置、DNA シーケンサー等の高額な機器

類も必要となるため、臨床現場での迅速診断には適していない。そこで本研究では、臨床現場において、犬猫が保有する *Bartonella* 属菌の DNA を簡便かつ迅速に検出する遺伝子診断法の開発を目的として、近年 PCR 法に代わる新たな迅速遺伝子検出法として注目されている Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法について検討した。

## B. 研究方法

4種の *Bartonella* 属菌 (*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. henselae*, *B. koehlerae*, *B. clarridgeiae*)の標準株から、Instagene Matrix (Bio Rad)を用いて DNA を抽出した。LAMP 法プライマー設計支援ソフトウェア(栄研化学)を用い、上記 4 菌種の *rpoB* 領域をそれぞれ特異的に増幅するプライマーとループプライマーを設計した。LAMP 反応は、60℃, 63℃, および 65℃で 1 時間行い、至適反応温度を検討した。また、特異性の検討には、上記 *Bartonella* 属菌 4 種に加え、*Bartonella* 属菌の類縁菌 3 種 (*Brucella abortus*, *Chlamydophila felis*, *Coxiella burnetii*)、周辺環境に広く分布する病原細菌として 11 種 (*Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Salmonella Enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus*)、および *B. henselae* 分離株 5 株、*B. clarridgeiae* 分離株 3 株より抽出した DNA をそれぞれ用いた。さらに、上記の *Bartonella* 属菌 4 種の標準菌株を  $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^2$  cell/ $\mu$ l まで希釈し、100℃で 5 分間、10 分間、および 15 分間それぞれ加熱処理したサンプルを用いて LAMP 反応を行い、サンプル処理条件と検出感度についても検討した。

## C. 研究結果

今回検討した LAMP 法の至適反応温度は、*B. henselae*, *B. koehlerae*, *B. clarridgeiae* で 60℃, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* では 63℃で最も効率良く *rpoB* 遺伝子の増幅が確認されたことから、以降の実験では至適 LAMP 反応条件として 60℃, 1 時間を採用した。特異性の検討では、分離株を含む各 *Bartonella* 菌種は、それぞれ特異的な増幅が確認されたものの、他の類縁菌および周辺環境病原菌での増幅は認められなかった。さらに、ループプライマーを加えて LAMP 反応を行ったところ、検討した *Bartonella* 4 菌種のいずれにおいても、増幅ピークに達する時間が 7 ~ 15 分間短縮され、いずれも約 45 分間で反応ピークに達した。加熱処理条件の検討では、100℃ 10 分間の加熱処理を行ったサンプルにおいて最も良い感度が得られ、検出限界は *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, および *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* で  $2.0 \times 10^1$  cell/ $20 \mu$ l, *B. koehlerae* で  $2.0 \times 10^2$  cell/ $20 \mu$ l であった。

## D. 考察

今回開発した LAMP 法は、加熱菌体サンプルを用いることにより、いずれも標的とする *Bartonella* 属菌の DNA が特異的かつ短時間で増幅することが可能であり、さらに特別な機器を必要としない本法は、従来の PCR 法と比較しても、簡便かつ迅速診断法であり、臨床現場に応用可能な新たな遺伝

子診断法であると思われた。今後、被検血液を直接用いるなど DNA 抽出を介さないより簡便な LAMP 法の開発および、その陽性判定法の改良についてさらなる検討を行う必要があると考えられた。

#### E. 結論

本研究で開発した LAMP 法は、現行の診断法と比較して、簡便かつ迅速な診断法であり、臨床現場において、犬猫等のペットが保有する *Bartonella* 属菌を特異的に検出する遺伝子診断法となることが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Sakano, C., Morita, Y., Shiono, M., Yokota, Y., Mokudai, T., Sato-Motoi, Y., Noda, A., Nobusaka, T., Sakaniwa, H., Nagai, A., Kabeya, H., Maruyama, S., Yamamoto, S., Sato, H., and Kimura, H. 2009 Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars (*Sus scrofa leucomystax*) and pigs in Gunma Prefecture, Japan. J. Vet. Med. Sci. 71:

21-25.

#### 2. 著書

1) 分担執筆, 日本の食を科学する(酒井健夫, 上野川修一監修), III 食と安全, 9. 食中毒とその予防 p77-88, 朝倉書店(東京) 2008.6

2) 分担執筆, 人と動物の共通感染症とその予防, ライフステージから見た犬と猫の健康管理(猪熊壽編) p109-131, IBS 出版(東京) 2008. 2

#### 3. 学会発表

1) 志村七子, 壁谷英則, 橋本岳樹, Michael Kosoy, 丸山総一: *Bartonella elizabethae* 感染マウスにおける菌血症とその動態に関する因子の検討, 第 145 回日本獣医学会, 麻布大

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

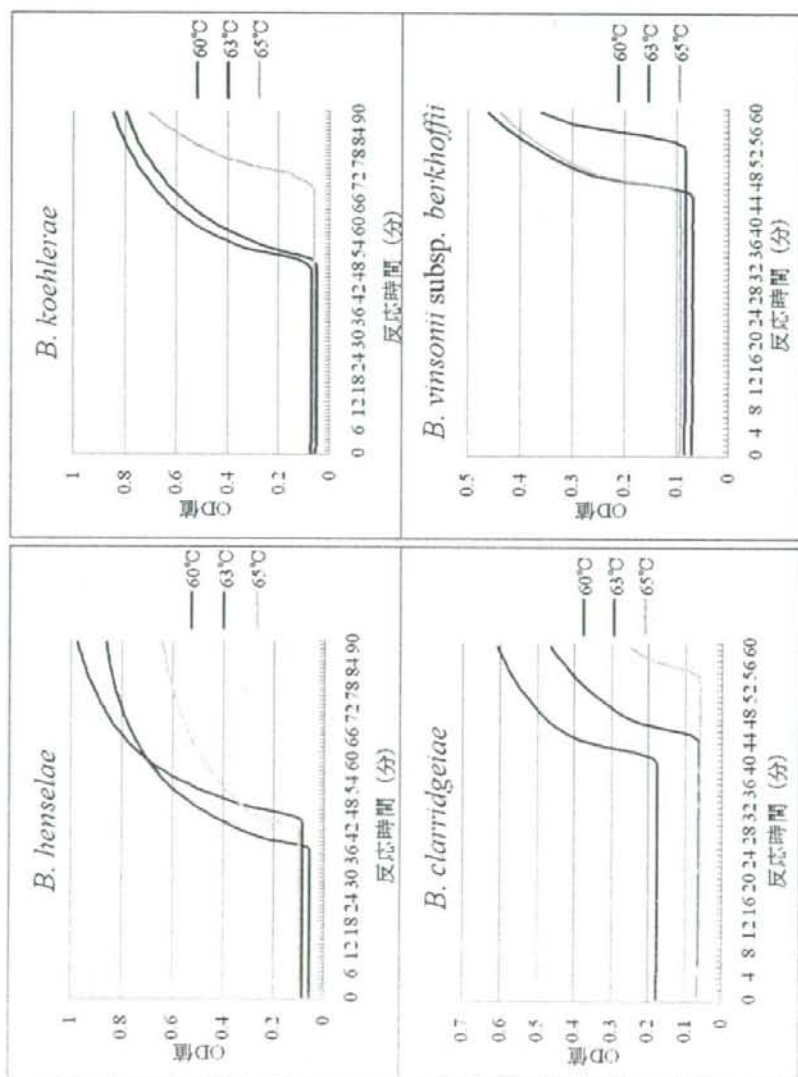


図1. 各種特異的プライマーセットを用いた LAMP 法による *B. henselae*, *B. koehlerae*, *B. clarridgeiae* および *B. vinsonii subsp. Berkhoffii* の DNA 増幅曲線

*B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae*, *B. vinsonii subsp. berkhoffii* の特異的プライマーセットについて、それぞれ標的とする *Bartonella* 菌種の標準株から抽出した DNA を用い、60°C (青線)、63°C (赤線)、65°C (緑線) の各反応温度条件で LAMP 反応を行った。

表 1. 菌種特異的 LAMP 法の特異性の検討

	Bartonella 属菌*1						類縁菌*2	病原細菌*3
	B. h		B. k	B. c	B. v. b			
プライマー セット	H1	16-1 U4 神名	タイ	C-29 H2 大 京	タイ	93-CO1	B. a C. f C. b	E. c C. j C. c P. m S. a S. e Y. e Y. p B. c C. p V. p
B. h & B. k rpoB	+	+	+	+	-	-	-	-
B. c rpoB	-*	-	-	-	+	+	-	-
B. v. b rpoB	-	-	-	-	-	+	-	-

\*1 B. h : *B. henselae*  
 H1 : Houston-1 株  
 神名 : 神奈川 14-1 株  
 名 : 名古屋 54-1 株  
 タイ : タイ SC333-1 株  
 B. k : *B. koehlerae*  
 B. c : *B. clarridgeiae*  
 H2 : Houston-2  
 大 : 大阪みなせ AH M11-1-1  
 京 : 京都ダクタリ AH 19-1  
 タイ : タイ SD236-2  
 B. v. b : *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*

\*2 B. a : *Brucella abortus*  
 C. f : *Chlamydia felis*  
 C. b : *Coxiella burnetii*

\*3 E. c : *Escherichia coli*  
 S. e : *Salmonella enteritidis*  
 C. j : *Campylobacter jejuni*  
 C. c : *Campylobacter coli*  
 P. m : *Pasteurella multocida*  
 S. a : *Staphylococcus aureus*  
 S. e : *Staphylococcus epidermidis*  
 Y. e : *Yersinia enterocolitica*  
 Y. p : *Yersinia pseudotuberculosis*  
 B. c : *Bacillus cereus*  
 C. p : *Clostridium perfringens*  
 V. p : *Vibrio parahaemolyticus*

\*4 + : 増幅の認められたもの  
 - : 増幅の認められなかったもの



表 2. 開発した LAMP 法の至適条件

		プライマーセット			
		B.h&B.k rpoB		B.c rpoB sec.	B.v.b rpoB
標的とする <i>Bartonella</i> 菌種		<i>B. henselae</i>	<i>B. koehlerae</i>	<i>B. clarridgeiae</i>	<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>
標的とした遺伝子領域		<i>rpoB</i> 領域			
混合塩基数		3 個	0 個	0 個	0 個
試薬の組成	RM	12.5μl	12.5μl	12.5μl	12.5μl
	DW	1.5	2.5	2.5	2.5
	Primer				
	F3 (5μM)	1	1	1	1
	B3 (5μM)	1	1	1	1
	FIP*1	2	1	1	1
	BIP*1	1	1	1	1
	LoopF	1	1	1	1
	LoopB	1	1	1	1
	Bst DNA Polymerase	2	2	2	2
菌体サンプル	2	2	2	2	
計		25μl	25μl	25μl	25μl
サンプル処理条件		100℃・10 分間の加熱処理			
反応温度・反応時間		60℃・120 分			
判定法		リアルタイム濁度測定装置 LA-320C			
検出限界		10 <sup>1</sup> 個/μl	10 <sup>2</sup> 個/μl	10 <sup>1</sup> 個/μl	10 <sup>1</sup> 個/μl

\*1: B.h&B.k rpoB: 80μM, B.c rpoB, B.v.b rpoB: 40μM

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
「我が国における動物由来感染症の感染実態把握に資する研究」

国産狂犬病ワクチンを用いた WHO 方式による狂犬病曝露前免疫の検討：

第 2 報

研究分担者 高山 直秀 東京都立駒込病院小児科  
研究分担者 菅沼 明彦 東京都立駒込病院感染症科  
協力研究者 柳澤 如樹 東京都立駒込病院感染症科

研究要旨 本邦での狂犬病曝露前免疫は、組織培養不活化ワクチン 1 回量 1.0ml を 4 週間隔で 2 回、その後 6-12 ヶ月後に 1 回皮下注射する方式が標準である。この方式では、多くの渡航者にとって、時間的な制約から 3 回の基礎免疫を完了することは極めて困難である。WHO では曝露前免疫を行う方法として、初回接種日を 0 日として、0, 7, 28 日に狂犬病ワクチンを接種すること推奨している (WHO 方式)。昨年度に引き続き、同意を得た健康成人 25 名を対象に、国産の狂犬病ワクチンを WHO 方式で接種した。2 回目接種 3 週間後には、21 例が 0.5EU/ml 以上となり、3 回目接種 2 週間後には全員の抗体価が 0.8 EU/ml 以上であり、21 例は 2.0EU/ml 以上であった。重篤な有害事象は認めなかった。国産狂犬病ワクチンは WHO 方式で接種しても安全かつ有効であることが再度確認できた。

A. 研究目的

世界保健機関 (WHO) は、狂犬病流行地において動物による咬傷を受けた場合、抗狂犬病免疫グロブリン (RIG) の投与と組織培養不活化ワクチン接種による曝露後発症予防を勧告している。一方、曝露前免疫を受けていれば、RIG の投与は不要となる。RIG は世界的に不足しており、入手が容易でないうえ、日本では市販されていない。曝露後免疫の効果を確実にするうえで、狂犬病曝露前免疫を行っておくことは重要である。

本邦での狂犬病曝露前免疫は、組織培養不活化ワクチン 1 回量 1.0ml を 4 週間隔で 2 回、その後 6-12 ヶ月後に 1 回皮下注射する方式が標準である (標準法)。しかし、多くの渡航者は本邦の標準法で 3 回の基礎

免疫を完了することは困難であり、狂犬病ワクチンを 2 回接種して出国している。

WHO は 0, 7, 28 日に組織培養不活化狂犬病ワクチンを接種することを推奨している (WHO 方式)。この方式によれば、1 ヶ月間で基礎免疫を完了することができる。我々は昨年度に、同意を得た 26 例の健康成人に国産狂犬病ワクチンを WHO 方式で接種し、狂犬病曝露前免疫の有効性と安全性を確認した。今年度もさらに 25 症例に WHO 方式による曝露前免疫を実施して、その有効性と安全性を検討した。

B. 研究方法

これまで狂犬病ワクチンの接種歴がなく、接種を希望した東京都に勤務する健康な獣医師 25 人を対象として、本調査の日

的、調査項目、接種ワクチンと予想される副反応について文書、および口頭で説明し、WHO方式による狂犬病曝露前免疫を行うことの同意を得た。

ワクチンは、化学及血清療法研究所（化血研）製組織培養不活化狂犬病ワクチンのロットRB06とRB07を用いた。被接種者には、接種後の発赤、腫脹、疼痛、掻痒感などの自覚症状の有無について観察して、次回接種時および採血時に報告するように依頼した。

血中抗狂犬病抗体価は、2回目接種直前（7日目）、2回目接種3週間後（28日目）、および3回目接種後2週間（42日目）に測定した。抗体価は、化血研臨床検査センターに依頼して、PlateliaR rabies kit（BIO-RAD Laboratories）を用いて、ELISA法で測定した。

## C. 研究結果

### 1. 接種対象者

接種対象者25名のうち、男性は13名、女性は12名であった。年齢分布は、20代が5名、30代が4名、40代が9名、50代が7名で、平均年齢は42.5 ± 10.9歳であった。

### 2. 血中抗狂犬病抗体価

初回狂犬病ワクチン接種7日後の抗体価は25例全例が0.5EU/ml未満で陰性であった。2回目接種3週間後（28日目）の抗体価は、4例を除いて、0.5 EU/ml以上に上昇した。抗体価の範囲は、0.5 - 2.4 EU/mlであり、抗体陽性者の幾何平均値は1.0 EU/mlであった。3回目接種後2週間（42日目）には、28日目の検査で0.5 EU/ml以下であった4例も含めて、全例の抗体価が0.8EU/ml以上で陽性となった。抗体価の

範囲は0.8 - 17.3 EU/mlで、幾何平均値は3.2 EU/mlであった（図1）。

### 3. 接種後の局所および全身症状

0-7-28日のワクチン接種期間中に、延べ75回のワクチン接種のうち58回の接種後に副反応が確認できた。接種部位に発赤・痒みを認めた例は、17例、腫脹を認めた例は5例、圧痛を認めた例は2例、疼痛を訴えた例が1例、しこりを認めた例は1例であり、リンパ節腫脹、頭痛を訴えた例が各1例あった。

## D. 考察

3回目のワクチン接種終了後2週間（42日目）で測定した血中抗狂犬病抗体価は、全例が発症防御レベル（0.5 IU/ml）を超えており、本法は有効と考えられた。接種部位の発赤や腫脹は見られたものの、重大な副反応は認められず、安全性も問題はないと考えられた。

2006年11月、国内で36年ぶりに相次いで輸入狂犬病患者が発生した。交通手段の発達により、日本から数時間で狂犬病常在地に渡航できることを考えると、今後も輸入狂犬病患者が発生する可能性はある。本邦でRIGの入手が困難である以上、曝露後免疫をより確実にして、狂犬病犠牲者をなくすためには、狂犬病曝露前免疫を行うことが重要である。WHO方式による狂犬病曝露前免疫は、短期間で基礎免疫を完了することができる有用な接種方式であり、昨年度と今回の調査により国産の狂犬病ワクチンをWHO方式で接種しても、その効果や安全性は高いことが明らかになった。出国までに時間が限られた狂犬病常在地への渡航者には、WHO方式による曝露前免疫を勧めてよいと考える。

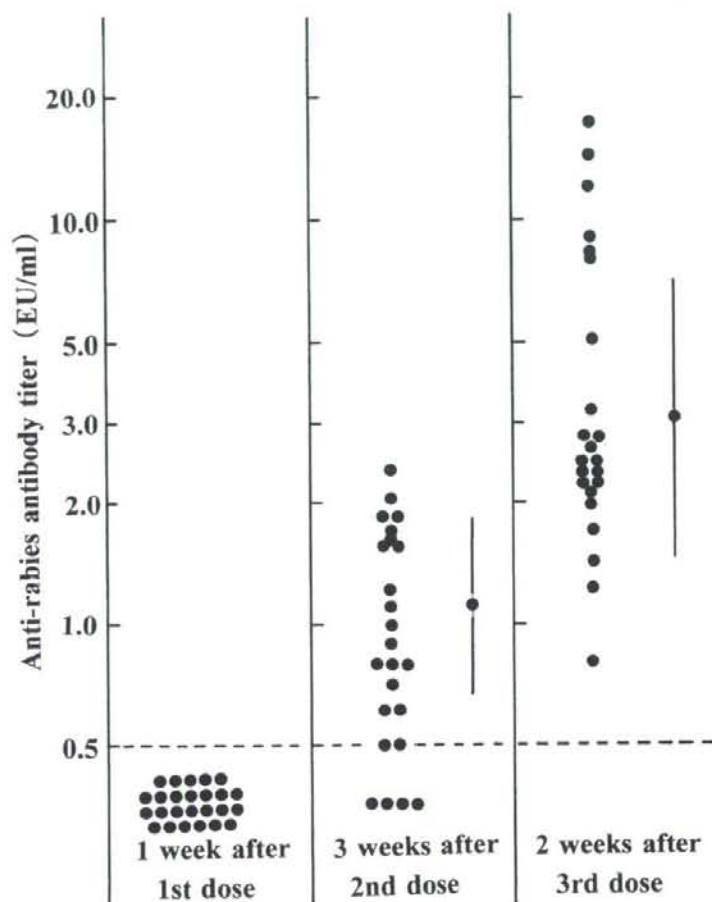


図1. 狂犬病ワクチン接種後の狂犬病 ELISA 抗体価  
 黒丸は個人の狂犬病中和抗体価，黒丸とそれを貫く縦線は  
 中和抗体価の幾何平均値±SDを示す。横破線はWHOの  
 定める発症防御レベルを示す。