

200931009A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 田 章 雄

平成22（2010）年3月

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 田 章 雄

平成22（2010）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-----9

2. 国内生態系内で新たに見出された回帰熱群ボレリアに関する研究

川端寛樹-----13

3. コリネバクテリウムに関する研究

高橋元秀-----21

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

今岡浩一-----30

5. 国内野生動物における *Francisella tularensis* (野兎病菌) の保有状況

棚林 清-----38

6. 日本国内で分離された野兎病菌のパルスフィールドゲル電気泳動法を用いた遺伝学的解析に関する基礎研究

藤田 修-----47

7. 猟犬における各種感染症抗体保有状況に関する研究：西日本を中心として

柳井徳磨-----50

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

資料-----68

9. 研究成果の刊行に関する一覧表-----83

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(インフルエンザ等新興・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科学部長

研究要旨 昨年度に引き続き国内では稀であったり、存在様式に不明な点の多い動物由来感染症を対象に研究を継続し以下の成績を得た。

- ① 5 牧場のウシ 431 頭における、Q 熱コクシエラ *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) に対する抗体の検出を試みた。平均 10.4%のウシが *C. burnetii* 抗体陽性と判定されたが、特定の牧場では陽性率が 28.4%で、他の牧場に比べて明らかに高かった。322 検体について Real-time PCR 法での遺伝子検出を実施したが、全て陰性であった。
- ② 新規に見出した回帰熱病原体類縁のボレリアについて解析した結果、本ボレリアは北米で回帰熱病原体として見出される *Borrelia turicatae*, *B. parkeri* と類縁であること、ならびに国内棲息の鳥類寄生マダニであるサワイカズキダニが媒介ベクターである可能性が高いことを明らかとした。
- ③ 愛護センター収容の犬・猫および猟犬からジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* (*C. ulcerans*) を分離するとともに、犬から犬または猫から猫への菌の拡散(不顕性感染)を確認した。また、ジフテリア様症状を呈した患者ならびに患者との接触が疑われた野良猫から本菌を分離し、両者が遺伝的に同一であることを PFGE および毒素遺伝子の解析から明らかにした。
- ④ 野生動物におけるブルセラ症の実態を野生イノシシおよびシカについて調査した。イノシシ 334 検体中、2 検体(0.6%)が家畜ブルセラ菌に対し、32 検体が(9.6%)がイヌブルセラ菌 *B. canis* に対し陽性だった。ニホンジカ 97 検体では、*B. canis* に対し 1 検体(1.0%)が抗体陽性だった。この検体はウエスタンブロットリング(WB)でも陽性であることが確認された。抗体陽性のイノシシ 34 頭中 21 頭からとニホンジカ 1 頭からブルセラ菌遺伝子が PCR 増幅されたが、いずれも *B. canis* 遺伝子と 100%配列が一致した。
- ⑤ 野生動物における野兎病菌浸潤状況を野生動物血液 1,011 検体、臓器 152 個体分、体表付着ダニ 38 個体分について調査した。臓器および体表付着ダニから菌分離およびゲノム DNA の検出を試みたところ、斃死ノウサギの臓器からのみ菌分離とゲノム DNA が検出された。抗野兎病菌抗体のスクリーニングにて 6 種の動物種(ツキノワグマ、ノウサギ、ホンダタヌキ、ハクビシン、ハタネズミ、ノスリ)で陽性が認められ、ウエスタンブロット法及び間接蛍光抗体法ツキノワグマ由来 9 検体の陽性が確認された。
- ⑥ また、日本国内分離野兎病菌株のパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)解析を行い、国内株が非常に高い遺伝的多型を有していること、日本分離株は海外由来株と明確に異なるバンドパターンを示し、両者の鑑別に PFGE が有用な手法の一つであることを示した。
- ⑦ 猟犬計 155 例について日本紅斑熱、ツツガムシ病、ライム病、ジフテリア症、レプトスピラ症およびヘパトゾーン症の病原体に対する抗体保有状況について調査を実施した結果、日本紅斑熱は 5/149 例、ツツガムシ病は 28/149 例、ジフテリア症は 13/153 例、ライム病ボレリアは 10/73 例、レプトスピラ症は 12/153 例、ヘパトゾーン症は 18/155 例で陽性となる個体が認められた。猟犬が国内における動物由来感染症の浸潤状況を把握するための有用な指標となりうる可能性が示唆された。
- ⑧ イヌ頭部モデル開発に関しては、主に解剖手技習得モデルの改良と、本モデルを利用した技術研修の試行を行った。その結果、開発したモデルと教材が自治体現場での狂犬病啓発と技術研修等に有用であると期待された

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
藤田 修 国立感染症研究所獣医科学部
主任研究官

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ことを目的とする。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。

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

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の一環として、本年度は、ウシにおける、*C.burnetii* の抗体保有率および遺伝子検出率について検討し、感染リスクの評価のための基本状況の把握を行った。検体提供について協力が得られた北海道の5牧場で飼育されるウシ431頭を対象にした。血清抗体価は、全

血と血清が同時に採取された4牧場(A,B,C,D)の322血清と、血清のみ採取された1牧場(E)の109検体を用いIFAを施行した。全体としては10.4%が*C.burnetii*抗体陽性と判定された。しかしながら、E牧場においては、陽性が28.4%と他の牧場に比べて非常に高い値を示した。E牧場を除いた4牧場における陽性の割合は4.3%であった。ウシ全血から抽出したDNA、計322検体についてReal-time PCR法にて遺伝子検出を実施したが、全検体陰性であった。抗体保有率が高かったE牧場のウシではDNAについては検討できなかったため、採材時点での感染の有無は不明であるが、過去に流行等があった可能性は否定できず、地域によっては一定の感染リスクは存在する可能性が示唆された。今後感染リスクの評価を適切に行うためには、さらにウシの検体を増やして詳細な検討を行うとともに、未だ不明な野生動物やダニ等の生態系での存在様式についても検討することが必要と考えられた。

(2) ボレリアに関する研究

昨年度までの調査研究の過程で、関西地方の渡り鳥コロニーに棲息するマダニの一種サワイカズキダニ(学名:*Carios sawaii*)より回帰熱ボレリアの遺伝子断片を見出した。国内では統計が存在する1956年以降、回帰熱症例の報告はなく、野生動物やマダニなどの環境材料からの回帰熱病原体の検出もなされていない。そこで本ボレリアの遺伝学的同定を行うとともに、サワイカズキダニにおける保菌率、およびサワイカズキダニのボレリア媒介種としての評価を行った。その結果検出されたボレリアは北米で回帰熱病原体として見出される*Borrelia turicatae*, *B. parkeri*と類縁であること、ならびに国内棲息の鳥類寄生マダニであるサワイカズキダニが媒介ベクターである可能性が高いことを明らかとした。

(3) コリネバクテリウムに関する研究

昨年度までに国内ではジフテリア様症状を呈する5名の患者からジフテリア毒素産生性*Corynebacterium ulcerans*が分離された。患者の環境調査は実施されずに、感染経路に愛玩動物があることが疑われていた。平成21年2月に東京都内で6例目患者発生が確認され、初めて患者自宅の詳細な環境調査を実施した。調査の結果、患者が発症する以前に自宅に集まる野良猫の1匹が風邪様症状を呈してクシャミ、鼻水を飛散していたことを確認し、その後、患者に同菌が感染した結果、咽頭炎等が発現したこと

が判明した。野良猫の咽頭等数カ所から患者と遺伝子型が一致する菌を分離し、さらに親猫と同居の子猫の鼻水からも同菌を分離した。この調査結果により発症野良猫から人が感染し、さらに猫から同居猫の感染も確認した。

地方自治体の動物愛護センターに搬入された犬または猫の咽頭スワブおよび屠畜場に搬入された牛または豚の咽頭スワブ等から菌分離調査を実施した結果、数カ所の自治体の愛護センターの猫と犬よりジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* が分離された。しかし、現在までに畜産動物からの菌分離は陰性であった。

さらに開業獣医師の協力を得て複数の地域で調査した結果、一般家庭で飼育している猫からも本菌を分離し、同居猫にはジフテリア抗毒素を保有し過去の感染既往も疑う例もあった。また、野生動物と接触機会の多い猟犬についてジフテリア抗毒素保有状況を調査した結果、複数の地域の猟犬において抗体陽性犬を確認した。これら猟犬で菌分離の追跡調査を実施した結果、同居犬の 2 頭からジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* を分離した。

現在までの調査結果を総括すると、野外活動時間の多い犬や猫は本菌を保菌または感染している可能性が高く、動物間では菌の伝播がおり感染が成立する。感染動物では排菌量が多いため、免疫力が低下している人は感染を起こす危険がある。

(4) ヒトの動物由来感染症への曝露の指標としての猟犬の応用に関する研究

猟犬は、山林を跋渉し野生鳥獣を捕獲することから、ダニ類への暴露や野生動物との接触の機会が多く、しばしば野生動物を生食することもある。そのため、ダニ媒介性感染症や野生動物由来人獣共通感染症のモニターのために有用であると考えられる。西日本を中心とした各県で飼育された猟犬計 155 例について、リケッチア(日本紅斑熱、ツツガムシ病)、ライム病、ジフテリア症、レプトスピラ症およびヘパトゾーン症の抗体保有状況について調査を実施した。日本紅斑熱は 5/149 例、ツツガムシ病は 28/149 例、ジフテリア症は 13/153 例、ライム病ボレリアは 10/73 例、レプトスピラ症は 12/153 例、ヘパトゾーン症は 18/155 例でそれぞれ陽性を示した。宮崎および熊本県など九州地方の猟犬が占める陽性割合は、日本紅斑熱は 60%、ツツガムシ病は 85.7%、ジフテリア感染症は 84.6%、レプトスピラ感染症は 66.7%、ヘパトゾーン感染症は 88.9%であり、各感染症とも九州地方を中心に

陽性個体が多くみられる傾向があった。このことは、野生動物を含めた他の動物における報告、媒介節足動物の分布、人でのこれらの疾病の発生状況とよく合致していた。したがって、本研究から猟犬は人獣共通感染症の有用な指標となりうると思う。今後さらに他の地域に調査を広げることで、全国的なこれらの野外を中心とした感染症の疫学情報の収集に貢献することが期待できると考える。

(5) ブルセラ症に関する研究

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。野生動物におけるブルセラ症の存在を確認するために、日本各地から野生イノシシおよびニホンジカの血液サンプルを入手し、家畜ブルセラ菌 (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) とイヌブルセラ菌 (*B. canis*) に対する抗体保有状況をマイクロプレート凝集反応 (MAT) により検討した。これまでに入手したイノシシ 334 サンプル中 2 サンプル (0.6%) が家畜ブルセラ菌に対し、32 サンプル (9.6%) が *B. canis* に対し抗体陽性を示した。ニホンジカ 97 サンプルについては、*B. canis* に対し 1 サンプル (1.0%) が抗体陽性を示した。抗体陽性サンプルは、ウェスタンブロットティング (WB) でも陽性を示した。さらに、血液サンプルから DNA を抽出し、標的遺伝子の異なる 4 セットのブルセラ特異的プライマーを用いた PCR を実施した。*B. canis* に対し抗体陽性サンプルでは、イノシシで 21/34、ニホンジカで 1/1 が 4 セットのプライマーのいずれかで陽性となった。増幅産物のシーケンスを確認したところ *B. canis* 遺伝子と 100% 配列が一致した。家畜ブルセラ菌抗体陽性サンプルからの遺伝子検出はできなかった。

国内のイノシシとニホンジカのブルセラ属菌感染が示唆されるが、確定には、他菌との交差反応の確認も含め、さらに検証が必要である。

(6) 野兎病に関する研究

本研究期間中に数例の野兎病患者発生が報告されるとともに、猟友会により野兎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、土壌からの野兎病菌の分離、ゲノム DNA の検出を試み、小型哺乳類では血清学的検索も行った。小型哺乳類では菌分離、ゲノム DNA 検出とも陰性で、野兎病菌に対する抗体も検出されなかったが、周辺の土壌から野兎病菌ゲノム 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兎病菌

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

精度の向上した検査法を用い、ウシ血清中のQ熱コクシエラに対するIgG抗体の保有調査をしたところ、平均10.4%が陽性だった。しかしいずれの検体からもコクシエラ遺伝子は検出されなかったことから、これらの抗体は過去の感染を示していると考えられた。特定の牧場において他よりも抗体陽性率が高い傾向が認められたことは、この牧場においてかつて流行があったことを示唆している。ヒトへのリスクをより正確に評価するためには、今後IgMの測定により、急性感染や最近の感染との関連も検討することに加えて、ウシの疾病との関連性の調査検討が重要である。

国内で記録が存在する1956年以降、初めて回帰熱ボレリアの存在が見出された。今後、健康被害の有無など疫学調査、さらには病原体の分離とその病原性についての解析が必要である。また、本ボレリアは渡り鳥類のコロニーから見出されたことから、生態系の中でのボレリアの存在様式に鳥類が関与している可能性も示唆された。

コリネバクテリウムウルセランスについては、PFGEおよび毒素遺伝子の解析結果でヒト分離株とイヌ分離株が一致したことから、ヒトの感染にイヌの介在が疑われる。一般的にコリネ属菌は皮膚等の一般細菌叢として分離され、*C. ulcerans*もこれら細菌叢の一部として存在している可能性もある。またネコ白血病ウイルスに感染しているネコでは免疫力が低下していることを考え合わせると、ネコ白血病等に罹患したネコが感染源になる可能性もあり、注意を要すると考えられた。

イノシシとニホンジカの血液サンプルよりMAT、WBにより抗*B. canis*抗体を検出し、さらにPCRと産物のシーケンスにより*B. canis*

特異的遺伝子を検出した。イノシシ2サンプルからはMATとWBにより抗家畜ブルセラ菌抗体も検出されたが、ブルセラ特異的遺伝子は検出されなかったことから、交差反応の可能性もあり、さらに検証が必要である。今後は、菌分離も視野に入れIFA、ELISAなどの手法も用いて国内の野生イノシシ、ニホンジカのブルセラ属菌感染について、検討をすすめることが必要であると考ええる。また、より特異的な抗体検査法の開発も必要である。

各種野生動物の抗野兎病菌抗体調査では、今回、初めて国内生息の野生動物から初めて野兎病菌に対する抗体を検出した。特にツキノワグマ由来9検体は3種の検査(MA、ELISAおよびIFA)にて陽性であったため、その由来動物は過去に野兎病菌に感染したと強く示唆された。抗体陽性検体由来動物は全て東北地方にて捕獲された動物であったことからヒトの症例同様、野兎病菌感染野生動物が東北地方に存在すると考えられた。野兎病菌感染が致死的となる野生げっ歯類やノウサギからの病原体検出では分離および核酸検出において斃死ノウサギのみが陽性となり、新しい野兎病菌分離株NVF1を得た。また、ノウサギや野ネズミなど野兎病菌に高感受性の動物種では健常個体からの野兎病菌や抗野兎病菌抗体の検出は困難と考えられた。

日本国内で分離された野兎病菌のPFGEによる型別を行うにあたり、まずこれら菌株に適した制限酵素の選択を行った。その結果、現在まで用いられていない新たな酵素を含む計7種の制限酵素が国内分離菌株の型別には有用であることが判明した。この全てが海外由来株との鑑別に有用である可能性が示唆された。これら7種の制限酵素を用いて多くの株でPFGE解析を実施し、各制限酵素の型別および海外株との鑑別診断に有用であるか検討が必要と考えられた。今回対象とした重要な感染症は、猟犬でもしばしば陽性個体が認められ、明らかな地域差が認められた。その多くはヒトでの患者の発症と比較的類似していた。特に日本紅斑熱、ツツガムシ病、ジフテリア症、ライム病ボレリア、およ

びレプトスピラ症にいずれにおいても明らかに地域差があった。特に陽性個体の発生率は、宮崎県および熊本県など九州地方の獵犬が占める割合が高く、日本紅斑熱は60%、ツツガムシ病は85.7%、ジフテリア感染症は84.6%、レプトスピラ感染症は66.7%、ヘパトゾーン感染症は88.9%であった。このことから獵犬は野外に由来する動物由来感染症の有用な指標となりうることを考える。今後さらに他の地域に調査を広げることで、全国的なこれらの野外を中心とした感染症の疫学情報の収集に貢献することが期待される。

今般開発した狂犬病診断のためのイヌ頭部モデルと教材は、自治体の現場での狂犬病啓発と技術研修等に対して効果があると期待され、本研究の目的である「狂犬病の診断技術向上のために必要となる解剖手技習得モデル・教材の開発」は自治体等における担当者への実技伝達のみならず、発生時を想定した意識啓発と動物由来感染症である狂犬病の感染源対策に対する危機管理意識の向上にも大いに貢献することが示唆された。

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、今後も同様な地道な調査研究が動物由来感染症対策における科学的根拠を提供するために極めて重要であることを示すことができた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 紙上発表

1. Takano A, Muto M, Sakata A, Ogasawara Y, Ando S, Hanaoka N, Tsurumi M, Sato F, Nakamura N, Fujita H, Watanabe H, Kawabata H. Relapsing fever spirochete in seabird tick, Japan. *Emerging Infectious Diseases*. 15: 1528-1530, 2009.
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. Honma Y, Yoshii Y, Watanabe Y, Aoki N, Komiya T, Iwaki M, Arai H, Arakawa Y, Takahashi M, Kimura H. : A Case of Afebrile Pneumonia Caused by Non-Toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae*. *Jpn J Infect Dis*. 62(4):327-9. 2009
5. Katsukawa C, Kawahara R, Inoue K, Ishii A, Yamagishi H, Kida K, Nishino S, Nagahama S, Komiya T, Iwaki M, Takahashi M. : Toxicogenic *Corynebacterium ulcerans* Isolated from the Domestic Dog for the First Time in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 62(2):171-2. 2009
6. 本間康夫、吉井裕子、小宮貴子、高橋元秀：ジフテリア毒素非産生 *C.diphtheriae* が検出された3症例の検討 新潟県臨床検査技師会誌 49.4. 平成21年
7. 今岡浩一. 犬ブルセラ症の現状と課題. 日本獣医師会誌, 62(1): 5-12, 2009
8. 今岡浩一. ブルセラ症の最近の話題. モダンメディア, 55(3): 76-85, 2009
9. 今岡浩一, 高橋英之. エルシニア症. in : ズーノーシスハンドブック (岸本寿男, 山田章雄 監修), メディカルサイエンス社, pp.118-120, 2009
10. 今岡浩一. ブルセラ症. in : ズーノーシスハンドブック (岸本寿男, 山田章雄 監修), メディカルサイエンス社, pp.156-158, 2009
11. 今岡浩一. ブルセラ症 一人・家畜・犬-. 獣医畜産新報, 62(6): 457-461, 2009
12. 内田幸憲, 鎌倉和政, 後藤郁夫, 杉本昌生, 山本和正, 丸山総一, 福士秀人, 今岡浩一, 岸本壽男, 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. 獣医畜産新報, 62(6): 485-487, 2009
13. 今岡浩一. 犬, 猫由来細菌感染症. 獣医疫

- 学雑誌, 13(1): 65-70, 2009
14. Park CH, Nakanishi A, Hatai H, Kojima D, Oyamada T, Sato H, Kudo N, Shindo J, Fujita O, Hotta A, Inoue S, Tanabayashi K. Pathological and Microbiological Studies of Japanese Hare (*Lepus brachyurus angustidens*) Naturally Infected with *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. *J Vet Med Sci.* 2009 71:1629-35
 15. 井上 智。(3) リッサウイルス感染症(四類感染症)。6 神経疾患。III 疾患別各論編。東京都 感染症マニュアル 2009。監修・東京都新たな感染症対策委員会。東京都福祉保険局。、262-263、2009
 16. 井上 智。ウイルス 狂犬病。ZONOSIS HANDBOOK (ズーノーシスハンドブック：医療関係者・獣医療関係者のための診断・治療ガイド)。監修：岸本寿男、山田章雄。Medical Science (メディカルサイエンス社)、41-43、2009
 17. 井上 智。ウイルス リッサウイルス感染症。ZONOSIS HANDBOOK (ズーノーシスハンドブック：医療関係者・獣医療関係者のための診断・治療ガイド)。監修：岸本寿男、山田章雄。Medical Science (メディカルサイエンス社)、75-76、2009
 18. Inoue S., Boldbaatar B., Sugiura N., Noguchi A., and Park C.-H. 2009. Rabies. In: *Animal Viruses* (Maeda A., ed.). RESEARCH SIGNPOST. (in press).
2. 学会発表
- 1) 岸本寿男、吉林台、猪熊 壽、花岡 希、坂田明子、小川基彦、安藤秀二、福士秀人、大屋賢司、矢野竹男、山田章雄。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。第 27 回日本クラミジア研究会・第 16 回リケッチア研究会合同学術集会。平成 21 年 11 月 7 日。東京
 - 2) 川端寛樹、高野 愛、藤田博己、武藤麻紀、渡邊治雄。MLST 法による国内野生鳥類由来ボレリアと北海道患者由来ボレリアの遺伝子型別解析。第 83 回日本細菌学会総会。2010 年 3 月。横浜。
 - 3) 高野 愛、藤田博己、角坂照貴、今内覚、田島朋子、五箇公一、宇根有美、川端寛樹、渡邊治雄。爬虫類および爬虫類寄生マダニより発見された新群のボレリアとその性状解析。第 149 回日本獣医学会学術集会。2010 年 3 月。東京。
 - 4) 高野 愛、川端寛樹、武藤麻紀、藤田博己、渡邊治雄。国内産爬虫類寄生性マダニから見いだされたボレリアとそのマダニ体内での動態。第 83 回日本細菌学会総会。2010 年 3 月。横浜。
 - 5) 佐藤寛子、柴田ちひろ、佐藤了悦、斎藤博之、安部真理子、齊藤志保子、高橋守、藤田博己、角坂照貴、高田伸弘、川端寛樹、高野 愛。秋田県において 15 年ぶりに確認されたアカツツガムシ媒介性つつが虫病と感染推定地におけるツツガムシの生息状況調査。第 16 回リケッチア研究会。2009 年 11 月。東京。
 - 6) 松谷峰之介、東慶直、小川基彦、花岡希、川端寛樹、倉根一郎、安藤秀二、岸本寿男、白井睦訓。日本紅斑熱の原因菌 *Rickettsia japonica* の全ゲノム配列解析。第 16 回リケッチア研究会。2009 年 11 月。東京。
 - 7) 花岡希、松谷峰之介、川端寛樹、山本正悟、藤田博己、坂田明子、東 慶直、小川基彦、岸本寿男、白井睦訓、倉根一郎、安藤秀二。病原性 *Rickettsia japonica* グループにおける特異的 ORF の同定と検出系への応用。第 16 回リケッチア研究会。2009 年 11 月。東京。
 - 8) 藤田博己、高田伸弘、矢野泰弘、及川陽三郎、川端寛樹、安藤秀二、坂田明子、高野 愛。国内のキチマダニから分離された *Rickettsia canadensis* について。第 16 回リケッチア研究会。2009 年 11 月。東京。
 - 9) 佐藤寛子、柴田ちひろ、佐藤了悦、斎藤博之、安部真理子、齊藤志保子、高橋守、藤田博己、角坂照貴、高田伸弘、川端寛樹、高野 愛。秋田県における古典的つつがむ虫病患者の症例とツツガムシの生息状況調査の経過報告。第 55 回日本衛生動物学会北日本支部大会。2009 年 10 月。帯広。
 - 10) 安藤秀二、藤田博己、坂田明子、矢野泰弘、大竹秀男、及川陽三郎、角坂照貴、黒澤昌啓、川端寛樹、高田伸弘。仙台市での *Rickettsia heilongjiangensis* 感染症例の発

- 見と保有マダニ調査. 第 55 回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2009 年 10 月. 帯広.
- 11) 伊東拓也, 高田伸弘, 藤田博己, 坂田明子, 安藤秀二, 川端寛樹, 高野愛. 日本北端地域におけるマダニ媒介性病原体の調査. 第 55 回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2009 年 10 月. 帯広.
 - 12) 藤田博己, 高田伸弘, 安藤秀二, 川端寛樹, 高野愛, 坂田明子. 青森県における紅斑熱のベクター調査. 第 55 回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2009 年 10 月. 帯広.
 - 13) 高野愛, 川端寛樹, 武藤麻紀, 小笠原由美子, 藤田博己, 鶴見みや古, 渡邊治雄. 国内で初めて見いだされた回帰熱ボレリアの感染性に関する研究. 第 55 回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2009 年 10 月. 帯広.
 - 14) 川端寛樹, 武藤麻紀, 高野愛, 小笠原由美子, 藤田博己, 鶴見みや古, 増沢俊幸, 宮本健司, 渡邊治雄. Multi-locus sequence typing 法による国内野生鳥類由来ボレリアと北海道患者由来ボレリアの遺伝子型別解析. 第 55 回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2009 年 10 月. 帯広.
 - 15) 今内覚, 村瀬優介, 山田慎二, 肥田野新, 伊東拓也, 川端寛樹, 小沼操, 大橋和彦. シュルツェマダニにおけるライム病ボレリア伝播関連遺伝子の同定. 第 148 回日本獣医学会学術集会. 2009 年 9 月. 鳥取.
 - 16) 肥田野新, 今内覚, 村瀬優介, 山田慎二, 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*) 由来 Salp16 様遺伝子の同定と発現解析. 第 148 回日本獣医学会学術集会. 2009 年 9 月. 鳥取.
 - 17) 高野愛, 藤田博己, 角坂照貴, 今内覚, 田島朋子, 武藤麻紀, 小笠原由美子, 川端寛樹, 渡邊治雄. 国内産爬虫類寄生性マダニから見いだされたボレリアとそのマダニ体内での動態. 第 148 回日本獣医学会学術集会. 2009 年 9 月. 鳥取.
 - 18) 山内健生, 田原研司, 金森弘樹, 川端寛樹, 新井智, 片山丘, 藤田博己, 矢野泰弘, 高田伸弘, 板垣朝夫. 島根県の日本紅斑熱汚染地域におけるマダニ相. 日本昆虫学会第 69 回大会. 2009 年 10 月. 三重.
 - 19) 高田伸弘, 藤田博己, 安藤秀二, 川端寛樹, 矢野泰弘, 高野愛, 岸本壽男. 仙台市内河川敷にみるネズミ分布相の特性一広東住血線虫や紅斑熱感染環との絡みー. 第 61 回日本衛生動物学会大会. 2009 年 4 月. 香川.
 - 20) 矢野泰弘, 高田伸弘, 岩崎博道, 藤田博己, 角坂照貴, 及川陽三郎, 田原研司, 山本正悟, 本田俊郎, 平良勝也, 安藤秀二, 川端寛樹, 岸本壽男. 環東シナ海の島嶼に分布するツツガムシ, 疫学的な連関は? 第 61 回日本衛生動物学会大会. 2009 年 4 月. 香川.
 - 21) 藤田博己, 大竹秀男, 矢野泰弘, 安藤秀二, 川端寛樹, 岸本壽男, 坂田明子, 高田伸弘. 宮城県で確認できたマダニとマダニ保有リケッチア. 第 61 回日本衛生動物学会大会. 2009 年 4 月. 香川.
 - 22) 藤田博己, 高田伸弘, 矢野泰弘, 馬原文彦, 川端寛樹, 安藤秀二, 岸本壽男, 坂田明子. 四国のマダニ類における紅斑熱群リケッチアの分離状況. 第 61 回日本衛生動物学会大会. 2009 年 4 月. 香川.
 - 23) 大橋典男, 千屋誠造, 船戸豊彦, 塩尻正明, 高野愛, 川端寛樹, 安藤秀二, 岸本壽男. 国内初の新興感染症「ヒトアナプラズマ症」2 症例について. 第 83 回日本感染症学会総会 2009 年 4 月. 東京.
 - 24) 安藤秀二, 黒澤昌啓, 坂田明子, 藤田博己, 矢野泰弘, 高野愛, 川端寛樹, 花岡希, 斉藤若奈, 岸本壽男. 仙台市で確認された新しい紅斑熱リケッチア症. 第 83 回日本感染症学会総会 2009 年 4 月. 東京.
 - 25) 小泉信夫, 谷川力, 林英治, 赤尾信明, 川端寛樹, 渡邊治雄. 東京都で発生したレプトスピラ症とドブネズミのレプトスピラ保有状況. 第 83 回日本感染症学会総会 2009 年 4 月. 東京.
 - 26) 高橋元秀, 小宮貴子, 山本明彦, 岩城正昭, 見理剛: 国内の犬・猫のジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* 保菌状況. 日本獣医師会学会年次大会 平成 22 年 1 月. 宮崎.
 - 27) 勝川千尋, 山岸寛明, 河井昭男, 石井篤嗣, 西野俊治, 山本隆司, 長濱伸也, 小宮貴子, 岩城正昭, 高橋元秀: 犬におけるジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* 保菌状況調査. 日本獣医師会学会年次大会 平成 22 年 1 月. 宮崎.
 - 28) 小川高, 三島浩享, 新家俊樹, 杉山寛治, 神田隆, 高橋元秀: 鼻汁より毒素原性 *Corynebacterium ulcerans* が分離された家

庭猫の1例 日本獣医師会学会年次大会
平成22年1月 宮崎

- 29) T. Komiya, A. Yamamoto, M. Iwaki, T. Kenri, Y. Noguchi, A. Tsunoda, Y. Arakawa and M. Takahashi: A human *C. ulcerans* case: isolation of the pathogen from the patient and from a cat. ELEVENTH INTERNATIONAL MEETING OF THE EUROPEAN LABORATORY WORKING GROUP ON DIPHTHERIA, ELWGD & THIRD ANNUAL MEETING OF DIPHTHERIA SURVEILLANCE NETWORK (DIPNET) 7-9 OCT. 2009 RIGA, LATVIA
- 30) 勝川千尋、山岸寛明、石井篤嗣、西野俊治、河井昭男、山本隆司、長濱伸也、小宮貴子、岩城正昭、高橋元秀：大阪府内の犬におけるジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* の保菌状況と分離菌株の解析 平成21年度日本獣医公衆衛生学会（近畿）
- 31) 今岡浩一、野村篤史、今西一、木村昌伸、鈴木道雄、山田章雄、志水英明. *Brucella canis* 感染症例とその背景、事後対応. 第83回日本感染症学会総会，東京，2009年4月，感染症学雑誌 83:S233, 2009
- 32) 朴天鎬、中西中、小山田敏文、佐藤久聡、進藤順治、藤田修、堀田明豊、棚林清。野兎病菌 (*Francisella tularensis*) に感染後死亡したノウサギに関する病理学的研究 第147回日本獣医学会学術集会 2009年4月（宇都宮市）
- 33) 朴天鎬、中西中、小山田敏文、佐藤久聡、進藤順治、工藤上、藤田修、堀田明豊、井上智、棚林清 野兎病菌に自然感染したトウホクノウサギ (*Lepus brachyurus angustidens*) の症例報告—野生動物の病理解剖の意義と感染リスク—第9回ヒトと動物の共通感染症研究会学術集会 2009年11月（東京）

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 | 岡山県環境保健センター | 所長 |
| 研究協力者 | 木田浩司 | 岡山県環境保健センター 保健科学部 | 研究員 |
| | 葛谷光隆 | 同 | 専門研究員 |
| | 濱野雅子 | 同 | 専門研究員 |
| | 中嶋 洋 | 同 | 科長 |
| | 藤井理津志 | 同 | 部長 |
| | 猪熊 壽 | 帯広畜産大学畜産学部獣医学科 | 教授 |
| | 福士秀人 | 岐阜大学農学部獣医学科獣医微生物学講座 | 教授 |
| | 大屋賢司 | 同 | 准教授 |

研究要旨 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の一環として、本年度は、ウシにおける、*C.burnetii* の抗体保有率および遺伝子検出率について検討し、感染リスクの評価のための基本状況の把握を行った。検体提供について協力が得られた北海道の5牧場で飼育されるウシ431頭を対象にした。血清抗体価は、全血と血清が同時に採取された4牧場(A,B,C,D)の322血清と、血清のみ採取された1牧場(E)の109検体を用いIFAを施行した。全体としては10.4%が*C.burnetii*抗体陽性と判定された。しかしながら、E牧場においては、陽性が28.4%と他の牧場に比べて非常に高い値を示した。E牧場を除いた4牧場における陽性の割合は4.3%であった。ウシ全血から抽出したDNA、計322検体についてReal-time PCR法にて遺伝子検出を実施したが、全検体陰性であった。抗体保有率が高かったE牧場のウシではDNAについては検討できなかったため、採材時点での感染の有無は不明であるが、過去に流行等があった可能性は否定できず、地域によっては一定の感染リスクは存在する可能性が示唆された。今後感染リスクの評価を適切に行うためには、さらにウシの検体を増やして詳細な検討を行うとともに、未だ不明な野生動物やダニ等の生態系での存在様式についても検討することが必要と考えられた。

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、不明な点が多く、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不明であるため、家畜を含む動物並びに環境、ヒトでの実態につ

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。これまでにヒト、ペットとしてのイヌ、ネコでの疫学調査を報告したが、本年度は、家畜としてのウシを対象に抗体疫学調査と、遺伝子疫学調査を実施した。

B. 研究方法

1) Q 熱に関する血清疫学調査

帯広畜産大学の協力により、北海道内の 4 牧場(A,B,C,D)で飼育されるウシから全血と同時に採取された 322 血清と、血清のみ採取された 1 牧場(E)の 109 検体を検体として用いた。血清中の抗 *C. burnetii* 抗体は、*C. burnetii* 感染細胞をスライドグラス上に固定したもの(オリエンタル酵母(株))を抗原とした間接蛍光抗体法(IFA)により検出した。一次抗体として、リン酸緩衝液(PBS)にて 128 倍希釈したウシ血清を 37°C で 1 時間反応させた。PBS にて 5 分 2 回洗浄後、FITC 標識抗ウシ IgG (cappel)を 37°C、1 時間反応させた。PBS にて 5 分 2 回洗浄後、蛍光顕微鏡にて観察した。封入体と細胞質内粒子の染色像の認められるものを陽性、封入体のみが染色されるものを擬陽性として判定し、擬陽性については *C. burnetii* 抗体とはみなさないこととした。カットオフ値を決定するための予備試験として、無作為に抽出した 32 検体について 1:32 から 1:256 希釈し、蛍光像を観察した。1:64 までは非特異的な反応がみられた。したがって今回は血清を 1:128 希釈し、本試験を実施した。

2) Q 熱に関する遺伝子疫学調査

遺伝子検出用の検体は、血清と同じく帯広畜産大学の協力により、北海道内 4 牧場(A,B,C,D)のウシから血清と同時に採材された全血を用い、そこから抽出した DNA、計 322 検体について Real-time PCR 法による遺伝子疫学調査を実施した。

C. burnetii の Real-time PCR 法は、

Klee(2006)らの報告をもとに、既存分離株において保存性の高い領域である Isocitrate dehydrogenase (*icd*) gene をターゲットに、Taqman probe による検出系で行った。Primer および Taqman probe は、それぞれ *icd*-439F= CGTTATTTTACGGGTGTGCC A(439-459),*icd*-514R=CAGAATTTTCGCG GAAAATCA(494-514),FAM-CATATTCAC CTTTTCAGGCGTTTTGACCG-TAMRA(464-492)を使用した(GenBank accession no. AF146284)。

また、昨年度の検討で良好な結果が確認された合成 Oligo-*icd*CGTTATTTTACGGGTGTGCCAAGCCCGGTCAAAACGCC TGAAAAGGTGAATATGGTGATTTTCCG CGAAAATTCTG (439-514) を Internal control として、定量分析を行った。

C. 研究結果

1) Q 熱に関する血清疫学調査

IFA の結果を表 1 に示した。全体としては 10.4%が *C. burnetii* 抗体陽性と判定された。しかしながら、E 牧場においては、陽性が 28.4%と他の牧場に比べて非常に高い値を示した。E 牧場を除いた 4 牧場における陽性の割合は 4.3%であった。

2) Q 熱に関する遺伝子疫学調査

Real-time PCR 法による *C. burnetii* 遺伝子検出は 322 検体すべて陰性であった。

D. 考察

ウシ血清から *C. burnetii* 抗体が数%検出された 4 牧場の抗体陽性のウシの全血 PCR では *C. burnetii* 遺伝子が検出されていない事、および今回測定した抗体が IgG 抗体であることから、この抗体は過去の感染を示唆するものと考えられる。北海道における

C. burnetii の抗体検出状況は、Yanase ら (Microbiol. Immunol. 41: 73-75. 1991) が 1 農場のウシ 364 頭中 28 頭 (7.7%) から検出したとの報告がある。彼らは抗体検出率に季節変動があったことや、抗体が少なくとも 5 ヶ月は維持される事も報告している。今回の結果は彼らの成績とほぼ一致するものであった。しかし 1 牧場 (E 牧場) においては、他と比較して顕著に検出率が高かった。これは過去に *C. burnetii* の集団感染等があった可能性を示すものかもしれないが、今回当該牧場におけるウシの健康状態の情報がないため、*C. burnetii* 感染と疾病との関連性は不明である。ヒトへのリスクをより正確に評価するためには、今後 IgM を追加測定し、急性感染や最近の感染との関連も検討することに加えて、ウシの疾病との関連性の調査検討が重要である。とくに *C. burnetii* は反芻動物の胎盤で大量に増殖することから、流産や出産時の胎盤の PCR は集団発生や実態を明らかにする上で重要なポイントとなる。また今回北海道のウシを調査したが、他の地域での調査も必要と考えられた。さらに生態系での感染様式の解明として、野生動物やダニについての検討も重要であり、今後の課題である。

E. 結論

北海道のウシにおける、*C. burnetii* の抗体保有率および遺伝子検出率について検討し、基本状況を把握した。全体として約 10% に過去の感染を示唆する IgG 抗体が検出され、過去の報告とほぼ同様であった。同時に遺伝子検出を施行した 4 牧場の全血検体では陽性例はなく、急性感染を示唆するものは認めなかったが、遺伝子検査が施行できなかった 1 牧場では抗体保有率が他に比

べて顕著に高く、牧場間で大きな差を認めた。このことから、地域によっては一定の感染リスクは存在する可能性が示唆された。今後さらにより詳細な検討が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 岸本寿男、吉林台、猪熊 壽、花岡希、坂田明子、小川基彦、安藤秀二、福士秀人、大屋賢司、矢野竹男、山田章雄。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。第 27 回日本クラミジア研究会・第 16 回リケッチア研究会合同学術集会。平成 21 年 11 月 7 日。東京

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 北海道内の牧場における Q 熱抗体調査成績

| | 陽性 | 擬陽性 | 陰性 | 計 |
|------|-----------|-----------|------------|-------------|
| A 牧場 | 8 (9.6) | 2 (2.4) | 73 (88.0) | 83 (100.0) |
| B 牧場 | 2 (2.2) | 9 (9.9) | 80 (87.9) | 91 (100.0) |
| C 牧場 | 1 (1.1) | 4 (4.4) | 86 (94.5) | 91 (100.0) |
| D 牧場 | 3 (5.3) | 3 (5.3) | 51 (89.5) | 57 (100.0) |
| E 牧場 | 31 (28.4) | 38 (34.9) | 40 (36.7) | 109 (100.0) |
| 総計 | 45 (10.4) | 56 (13.0) | 330 (76.6) | 431 (100.0) |

() 内は、%を示す。

陽性：封入体と細胞質内粒子の染色像を確認。擬陽性：封入体のみが染色。

国内生態系内で新たに見出された回帰熱群ボレリアに関する研究

研究分担者 川端寛樹（国立感染症研究所・細菌第一部）

研究協力者 鶴見みや古，仲間昇，佐藤文男，尾崎清明（山階鳥類研究所）
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，花岡希，安藤秀二，倉根一郎（同上・ウイルス一部）
阿戸学，渡辺恵理（同上・免疫部）
藤田博己（大原総合病院附属大原研究所）
大橋典男（静岡県立大学）

研究要旨

本年度までの3年間に渡って、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。この調査研究の過程で、新規に回帰熱病原体類縁のボレリアを見出したのでその生体リスクに関する評価を行った。

本ボレリアは、1) housekeeping 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析の結果から、北米で回帰熱病原体として見出される *Borrelia turicatae*, *B. parkeri* と類縁であること、2) 国内棲息の鳥類寄生マダニであるサワイカズキダニが媒介ベクターである可能性が高いことを明らかとした。

回帰熱群ボレリアの国内侵入が初めて明らかになったことで、今後そのリスク評価とサーベイランスの強化が重要であると思われる。

国内生態系内で新たに見出された回帰熱群ボレリアに関する緊急研究

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で、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年度より三年度に渡って、調査研究をおこなってきた。この過程で関西地方の渡り鳥コロニーに棲息するマダニの一種サワイカズキダニ（学名：*Carios sawaii*）より回帰熱ボレリアの遺伝子断片が見出された。国内では、統計が存在する1956年以降、回帰熱症例、および野生動物やマダニなどの環境材料からの回帰熱病原体の検出はなされていなかったことから、ボレリアの遺伝学的同定、本マダニの保菌率、およびボレリアの媒介種としての評価を行った。また検出されたボレリアの病原性を調べるためにマウスを用いた接種実験も試みた。

B. 方法

マダニ材料

マダニ材料は京都府沓島に生息する海鳥の一種オオミズナギドリ(*Calonectris leucomelas*)およびヒメクロウミツバメ(*Oceanodroma monorhis*)のコロニーより採集した。採集マダニは77頭(若虫55頭, オス11頭, およびメス11頭)である。これらマダニは形態学的同定後, 一部は病原体検出のためのDNA抽出材料とした。DNA抽出はDNeasy Blood&Tissue kit (Qiagen)を用いておこなった。抽出されたDNAはその抽出, 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。病原体検出のための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, *glpQ*遺伝子による確認PCRを行った。増幅DNAは常法に従い塩基配列を決定した。また見出されたボレリアの同定を目的としてボレリア16S rRNA遺伝子のDNA増幅, 塩基配列を行った。

採取マダニの一部は実体顕微鏡下解剖し, 唾液腺組織, および中腸組織を間接蛍光抗体法による病原体の免疫染色材料として用いた。

さらにボレリアDNAが検出されたマダニ組織の一部は, C3H/HeNマウスを用いた接種実験に使用した(感染症研究所動物実験承認番号108064)。

C. 研究結果 および D. 考察

採取マダニの同定

採取マダニは形態学的に *Carios* 属マダニと同定された。また mt *rrs* 遺伝子の塩基配列決定により遺伝学的にサワイカズキダニ(*Carios sawaii*)と同定された。

国内野生鳥類種寄生マダニから見出された回帰熱群ボレリア

マダニ mt *rrs*-PCR 陽性の77検体中, 25個体(若虫14個体, オス6個体, およびメス5個体)でボレリアDNAが検出された。これらボレリアの遺伝学的同定のために, ボレリアのhousekeeping遺伝子である, *flaB* 遺伝子および16S rDNA 遺伝子についてPCRを行い, 増幅DNAの塩基配列を決定し, 系統解析を行った。その結果, 本ボレリアは北米での回帰熱病原体である *Borrelia turicatae* および *Borrelia parkeri* と近縁のボレリア種(以降 *Borrelia* sp. K64)であることが明らかとなった(図1, AおよびB)。

サワイカズキダニによる本ボレリアの伝播の有無

これまでに, ボレリアはマダニ吸血により脊椎動物からマダニ中腸に感染後, マダニ体腔内に侵入したのち, 唾液腺へ移行し次の吸血源動物へ感染することが知られている。すなわち, マダニ唾液腺内部へボレリアが侵入していることは, そのマダニによって次の吸血源動物へボレリアが感染することを示している。そこで本研究では, ボレリア陽性マダニより唾液腺を採取し, その内部へのボレリア侵入を免疫組織染色および染色像の3D再構築をin silico解析により行った。その結果, 用いた唾液腺組織内に複数のボレリアが侵入していることが明らかとなった(図1C)。またマダニ中腸内でのボレリアの定着も確認され

たことから (図 1D), 本マダニが *Borrelia* sp. K64 の媒介マダニであることが強く示唆された。

純系マウス(C3H/HeN)を用いたボレリアの感染性評価の試み

これまで回帰熱ボレリアを含むボレリア属細菌の感染モデルとして純系マウス C3H/HeN を用いた実験が世界で広く行われている。そこで本研究では、ボレリアを含むマダニ組織をマウス皮下接種し、本ボレリアの分離および感染性評価を試みた。しかしながら、経時的採血、および接種 3 週間後の臓器からはボレリア DNA は検出されなかった。今後は免疫不全マウスなどを用いた感染実験系などを行いその病原性について明らかにする必要があると考えられた。

E. 結論

国内で記録が存在する 1956 年以降、初めて回帰熱ボレリアの存在が見出された。今後、健康被害の有無など疫学調査、さらには病原体の分離とその病原性についての解析が必要である。また、本ボレリアは渡り鳥類のコロニーから見出されたことから、生態系の中でのボレリアの存在様式に鳥類が関与している可能性も示唆された。

【謝辞】

マダニ採取にご協力頂きました、狩野清隆氏および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。またマダニ採取には厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業「リケッチア感染症の国内実態調査及び早期診断体制の確立による早期警鐘シス

テムの構築」研究班の協力を得ている。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Takano A, Muto M, Sakata A, Ogasawara Y, Ando S, Hanaoka N, Tsurumi M, Sato F, Nakamura N, Fujita H, Watanabe H, Kawabata H. Relapsing fever spirochete in seabird tick, Japan. **Emerging Infectious Diseases**. 15: 1528-1530, 2009.

2. 学会発表

- 川端寛樹, 高野 愛, 藤田博己, 武藤麻紀, 渡邊治雄. MLST 法による国内野生鳥類由来ボレリアと北海道患者由来ボレリアの遺伝子型別解析. 第 83 回日本細菌学会総会. 2010 年 3 月. 横浜.
- 高野 愛, 藤田博己, 角坂照貴, 今内寛, 田島朋子, 五箇公一, 宇根有美, 川端寛樹, 渡邊治雄. 爬虫類および爬虫類寄生マダニより発見された新群のボレリアとその性状解析. 第 149 回日本獣医学会学術集会. 2010 年 3 月. 東京.
- 高野 愛, 川端寛樹, 武藤麻紀, 藤田博己, 渡邊治雄. 国内産爬虫類寄生性マダニから見いだされたボレリアとそのマダニ体内での動態. 第 83 回日本細菌学会総会. 2010 年 3 月. 横浜.
- 佐藤寛子, 柴田ちひろ, 佐藤了悦, 斎藤博之, 安部真理子, 齊藤志保子, 高橋守, 藤田博己, 角坂照貴, 高田伸弘, 川端寛樹,