

図2) WB による抗体検出

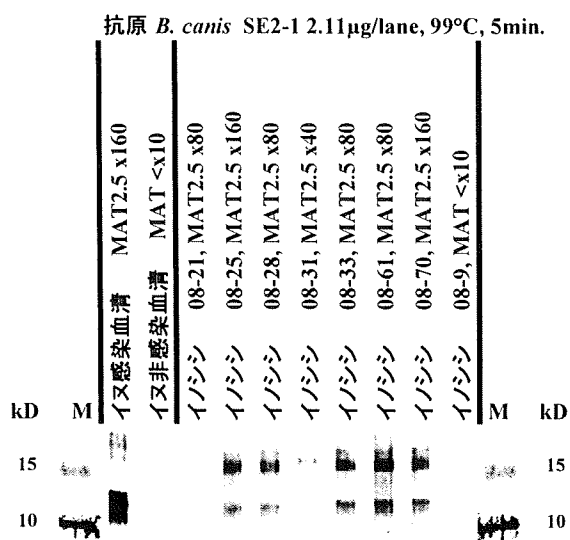


図3) PCR による遺伝子検出

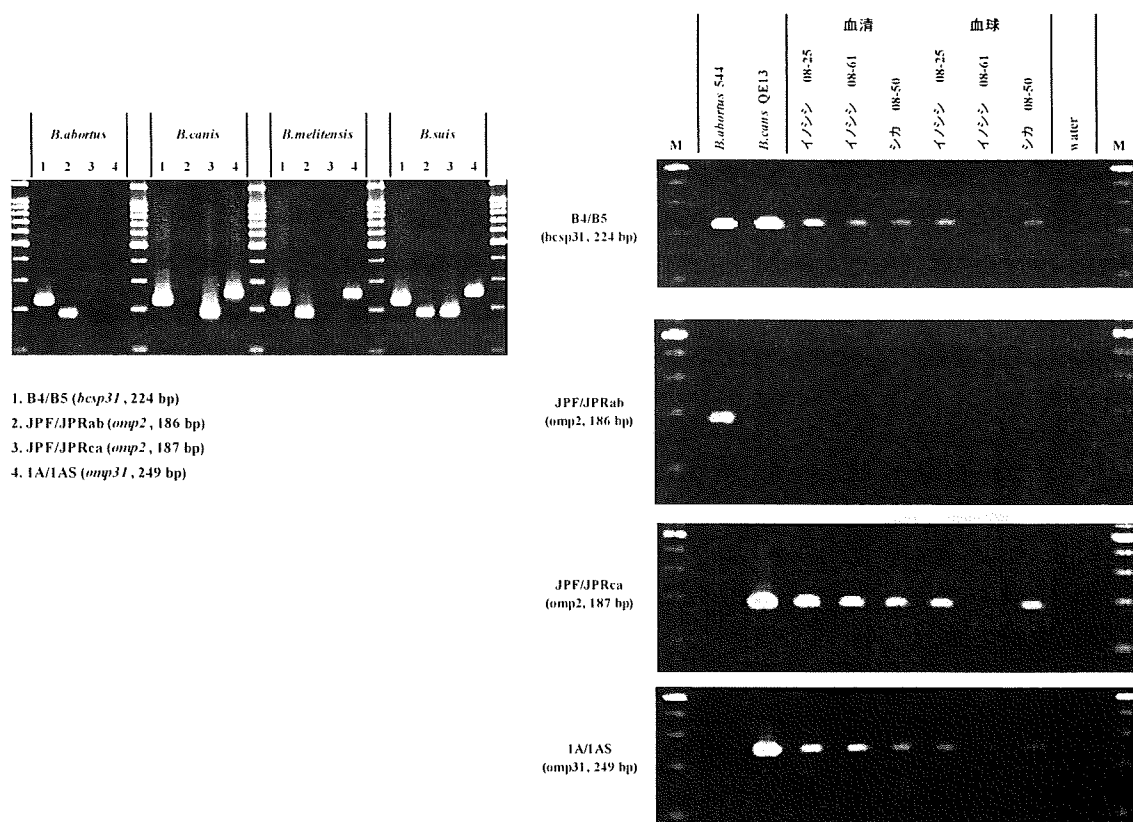
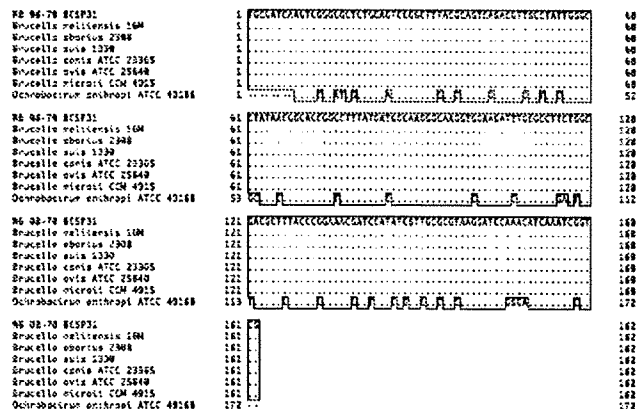
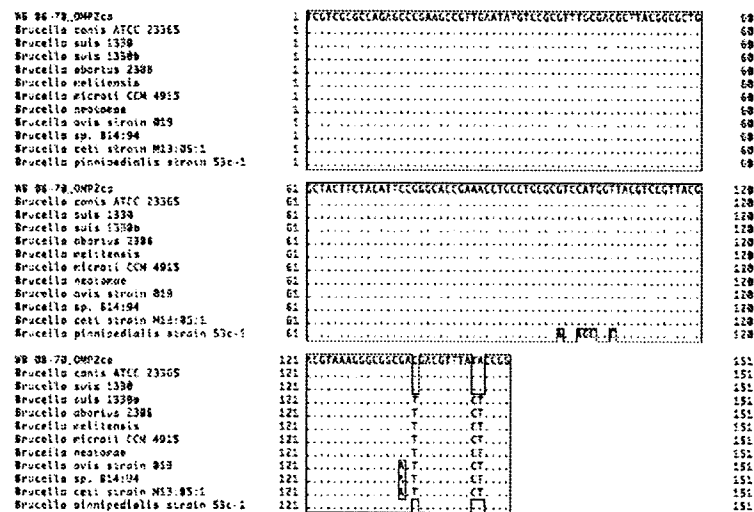


図4) PCR産物のシーケンス

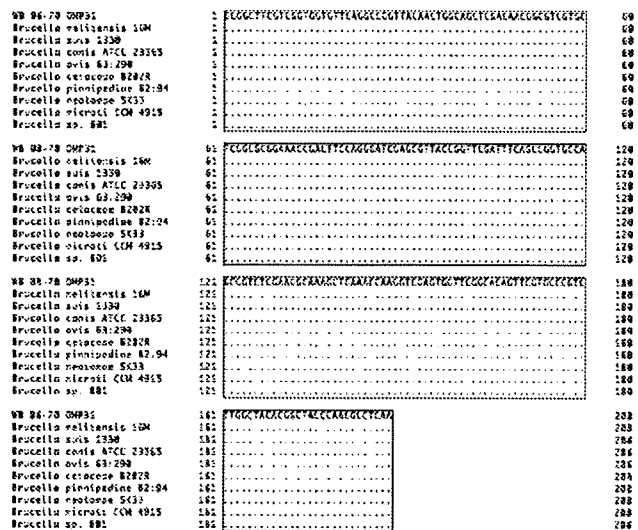
標的遺伝子: *bcsp31* (プライマー: B4/B5)



omp2 (JPJ/JPRca)



omp31 (IS/IAS)



国内野生動物における *Francisella tularensis*（野兔病菌）の保有状況

研究分担者 棚林 清 国立感染症研究所獣医科学部 室長
研究協力者 堀田明豊、山本美江、藤田修、宇田晶彦（国立感染症研究所獣医科学部）
進藤順治、朴天鎬、小山田敏文、畑井 仁、工藤 上（北里大学）
坪田敏男、荻和宏明（北海道大学）、青木美樹子（岩手大学）
溝口俊夫（福島県鳥獣保護センター）、中下留美子（首都大学東京）
中村幸子（兵庫県立大学）、片山敦司（野生動物保護管理事務所）

研究要旨 日本国内に生息する野生動物における野兔病菌浸潤状況の調査のため、野生動物血液 1,011 検体、臓器 152 個体分、体表付着ダニ 38 個体分を収集した。臓器および体表付着ダニについては野兔病菌の分離およびゲノム 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。血液検体での抗野兔病菌抗体の検出を試みたところ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、ホンドタヌキ、ハクビシン、ハタネズミ、ノスリ）で陽性が認められた。これらは全て東北地方由来個体であった。さらにこれら検体についてウエスタンブロット法及び間接蛍光抗体法で野兔病菌特異的反応を観察したところ、ツキノワグマ由来 9 検体が陽性を呈し、これらが過去に野兔病菌に感染したことが強く示唆された。国内生息野生動物から初めて野兔病菌に対する抗体を検出でき、その陽性個体の分布はヒトでの野兔病発生地域と同様、東北地方に多い傾向が認められた。ツキノワグマ 9 頭は全て 3 歳以上のオスであったため、今後ツキノワグマの生態と併せて野兔病菌の分布状況について解析した。一方、他の動物種由来検体は確定試験で明確な反応が認められず、陽性との判定に至らなかった。他の肉食動物種や斃死動物の調査が必要と考えられた。

A. 研究目的

Francisella tularensis（野兔病菌）は代表的な動物由来感染症である野兔病の起原菌で、ヒトでは急性熱性疾患を引き起こす。ノウサギやげっ歯類などの野生動物での感

染では致死的となる場合が多いとされている。本菌は北アメリカ、ヨーロッパ、ロシア、中央および東アジア、日本など北半球に広く分布し、190 種以上の動物種に感染する。国内におけるヒトの野兔病は近年ま

れだが、過去には東北地方を中心に約 1400 例報告されている。主な感染源はノウサギやダニだが、野生動物における本菌感染状況、野兔病菌の生存、分布状況や感染環についての詳細は不明である。

本研究では、野生動物における野兔病菌感染状況を調査解析し、国内の野兔病菌の分布を明らかにし、本菌のヒトへの感染リスクを評価するための基礎的情報を得ることを目的とした。

B. 研究方法

1. 検体収集

(1) 動物血液

動物血液 1,011 検体を収集した。動物種はノウサギ 293、ニホンツキノワグマ 431、ホンダタヌキ 20、ニホンザル 26、ハクビシン 20、イノシシ 20、ホンドキツネ 3、ラット類 97、野ネズミ類（アカネズミ、ハタネズミ、ヒメネズミおよびヒミズ）66、猛禽類（ノスリ、オオタカ、フクロウ、トビ、サシバ、オジロワシ）35 検体を含む。動物の捕獲地と頭数を表 1 に示す。

ノウサギおよびイノシシの血液全検体は大日本猟友会会員の協力により 2005 年 2 月から 2009 年 3 月の間に収集した。ツキノワグマ検体は 1998 年 7 月から 2007 年 12 月に捕獲したクマより得た。その他動物種検体は 2000 年から 2009 年の間に協力研究者により捕獲収集され提供されたものである。

(2) 動物臓器

152 個体分が収集された。動物種は秋田

県にかほ地方由来のノウサギ 43 個体および青森県下北地方の野ネズミ類 109 個体分の肝臓および脾臓または腎臓である(表 2)

(3) 動物付着ダニ

捕獲野生動物 156 個体の体表から採取したダニ 1-6 匹を 1 個体分の検体として菌分離およびゲノム DNA 検出に供した。

2. 方法

(1) 血液検体中の抗野兔病菌抗体の検出

スクリーニング試験としてノウサギ血液では酵素抗体法 (ELISA) を用いた。陽性は吸光度が全検体の値の平均+2SD 以上を示した場合とした。その他の動物種の検体のスクリーニング試験には微量凝集反応法 (MA) を用い、凝集価 10 倍以上を陽性とした。スクリーニング試験によって陽性とされた検体については特異的反応をウエスタンブロット法 (WB) および間接蛍光抗体法 (IFA) により確認した。WB では検体血清を 1,000 倍希釈して野兔病菌の全菌体抗原および精製リポ多糖体 (LPS) に反応させ、両抗原にて LPS 特有の梯子状の反応像を呈した検体を陽性とした。IFA では各検体を 20、40、80、160 倍希釈し、菌体に対する反応を蛍光顕微鏡下で観察し、40 倍以上で特異蛍光が認められたものを陽性とした。各種野生動物の抗体検出のための酵素 (HRP) 標識二次抗体は、ノウサギには抗ノウサギ IgG(H+L)、ラット類には抗ラット IgG、野ネズミ類には抗マウス IgG(H+L) を用いた。また、野ネズミでは HRP 標識 Protein A 及び Protein G も用いた。ツキノワグマに

はHRP標識ProteinAおよびProteinGを、ホンドタヌキ検体にはProtein A/Gを使用した。

(2) 臓器およびダニからの菌分離

各臓器の小片を1.5mlチューブに入れマイクロ乳棒にてすり潰し、ペニシリンおよびファンギゾンを追加したPBSで10-20%乳剤とした。ダニは各個体をディスポーサブルメスにて縦軸に沿い二分しその一片を50 μ lのPBSに入れマイクロ乳棒にてすり潰した。これらの検体乳剤をEugon羊血液加チョコレート寒天培地に塗布し、37°Cにて7日間培養した。

(3) 野兎病菌のゲノムDNA検出

乳剤化した臓器検体およびダニ検体を遠心し、その沈殿より市販核酸抽出キットを用いて抽出した。精製核酸をRNase処理後、そのDNA濃度を測定するとともにダニ自体のゲノムDNAをPCRにより増幅しDNAの回収を確認した。野兎病菌特異的ゲノムDNAの検出は*tu4*および*fopA*遺伝子領域DNAを増幅増幅検出するプライマー・プローブを用いたreal time PCR法にて行った。

C. 研究結果

1. 抗野兎病菌抗体の検出

MAによるスクリーニング試験でツキノワグマ24、野ネズミ類1、タヌキ2、ハクビシン1、猛禽類1の計29検体が10倍以上の凝集価を示した。ELISAではノウサギ

1検体が陽性となった(表3)。

スクリーニング試験で陽性とされた30検体について標識二次抗体またはProtein Aが市販されているノウサギとツキノワグマそれぞれ1検体と24検体についてWBおよびIFAにて特異抗体の検出を試みた。ツキノワグマではWBにて14、IFAにて9検体が陽性となった。両試験で陽性となった9頭のツキノワグマはすべて3歳以上の岩手県または福島県内で捕獲されたもので8頭がオス、他の1頭は性別不明であった(表4、5)。また、ノウサギ検体はWBおよびIFAでは特異反応が認められなかった(表3)。

2. 野兎病菌の分離

斃死している状態で発見されたノウサギの臓器(肝臓および脾臓)1個体について菌分離を実施したところ培養3日目までに多数の微小白色コロニーが認められた。発育した菌はグラム陰性小桿菌で、野兎病菌特異抗体に反応し、さらにPCR検査により野兎病菌と同定された(図1)。その他の捕獲ノウサギや野ネズミの臓器および動物に付着していたダニからは野兎病菌は分離されなかった。

3. 野兎病菌のゲノムDNA検出

先の斃死ノウサギ臓器(肝臓および脾臓)1個体由来検体より*fopA*および*tu4*両遺伝子領域のゲノムDNA断片が増幅された。しかし他の動物臓器および付着ダニでは野兎病菌特異的DNA断片が増幅されること

はなかった。

D. 考察

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多く存在すると考えられた。陽性が認められた岩手および福島県由来ツキノワグマ検体群について由来個体の性別と年齢について解析したところ、オスがメスと比較して有為に陽性数が高く、2歳以下のクマには陽性は認められなかった。ツキノワグマのオスはメスと比較して行動範囲が広く、仔グマは2歳まで母グマと行動を共にする。このため陽性率の差はクマ個体の行動範囲に関わる可能性が示唆された。これらのことから東北地方には野兎病菌が分布するが、その分布域は東北地方でも限局していると思われる。

野兎病菌感染が致死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。

今後は陽性個体が認められたツキノワグマをはじめ、タヌキ、ハクビシン、ノスリなどの雑食または肉食動物由来検体数を増やし調査する必要があると考えられた。また、陽性野生動物生息場所での土や水などの環境での野兎病菌の存在も合わせて調査し野兎病菌の生態系での維持様式を明らかにする調査研究も継続する必要があると思われる

E. 結論

日本国内生息の野生動物血液由来 1,011 検体、臓器 152 個体分、体表付着ダニ 156 個体分を収集し、野兎病菌の分離および特異的核酸断片の検出、および抗野兎病菌抗体の検出を試みた。斃死ノウサギ検体より新たに野兎病菌を分離できた。また国内の野生動物より初めて抗野兎病菌抗体が検出された。抗体陽性個体の分布はヒトの野兎病発生数が多い東北地方に多く分布すると考えられた。野生動物における野兎病疫学調査はツキノワグマなど寿命が長い雑食またはキツネ等の肉食動物種や斃死動物について解析を進める必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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. *holartica*. J Vet Med Sci. 2009 71:1629-35.

2. 学会発表

朴天鎬、中西中、小山田敏文、佐藤久聡、進藤眞台、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)

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— 朴天鎬、中西中、小山田敏文、佐藤久聡、進藤眞台、工藤上、藤田修、堀田明豊、井上智、棚林清。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

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1 供試血液検体の由来動物種と地域

	ノウサギ	ツキノワグマ	ホンドタヌキ	ニホンザル	ハクビシン	ホンドキツネ	イノシシ	ラット類	野ネズミ類	猛禽類	計
北海道								97			97
青森	35		1						66	12	114
秋田	78										78
岩手	13	62									75
山形	30										30
福島	15	34	19	26	20	3				23	140
茨城		17									17
東京		1									1
新潟	62										62
長野		52									52
山梨		8									8
岐阜		147									147
滋賀		20									20
京都		20									20
兵庫		59									59
鳥取		11									11
広島							20				20
高知	25										25
宮崎	12										12
鹿児島	23										23
計	293	431	20	26	20	3	20	97	66	35	1,011

猛禽類はオジロワシ、ハヤブサ、トビ、ノスリ、サシバ、フクロウおよびオオタカを含む。

表2 菌分離および核酸検出供試検体

検体	由来動物種	検体数	由来地
臓器	ノウサギ	43	秋田
	野ネズミ類	109	青森
小計		152	
体表付着ダニ	ノウサギ	23	秋田
	野ネズミ類	7	青森
	ホンドキツネ	1	青森
	アナグマ	1	青森
	イノシシ	3	徳島・広島
	ニホンジカ	3	徳島
小計		38	
合計		190	

検体数は由来動物個体数を表示した。

表3 抗野兎病菌抗体検査結果

動物種	検体数	MA	ELISA	WB	IFA	陽性 ¹
ツキノワグマ	431	24	NT	14	9	9
ノウサギ	293	NT	1	0	0	0
ラット類	97	0	NT	NT	NT	0
ノネズミ類	66	1	NT	0	NT	0
ニホンザル	26	0	NT	NT	NT	0
ホンドタヌキ	20	2	NT	1	NT	≦1
ハクビシン	20	1	NT	NT	NT	≦1
イノシシ	20	0	NT	NT	NT	0
ホンドキツネ	3	0	NT	NT	NT	0
猛禽類	35	1	NT	NT	NT	≦1
計	1,011	29	1	15	9	9

1: MAまたはELISAかつWBおよびIFA陽性の検体を陽性とした。

表4 ツキノワグマ検体の抗野兔病菌抗体検査結果

捕獲地域	検体数	MA	WB	FA	陽性率 (%)
岩手	62	16	13	8	12.9
福島	34	8	1	1	2.9
岐阜、兵庫、京都、長野、滋賀、 茨城、鳥取、山梨、東京	335	0	NT	NT	
計	431	24	14	9	2.1

MA: 凝集価10倍以上を陽性とした。

WB: 1000倍希釈検体にてLPSのバンドが認められた検体を陽性とした。

FA: 40倍以上を陽性とした

NT: 試験せず

表5 岩手および福島県捕獲ツキノワグマ個体の年齢と性別

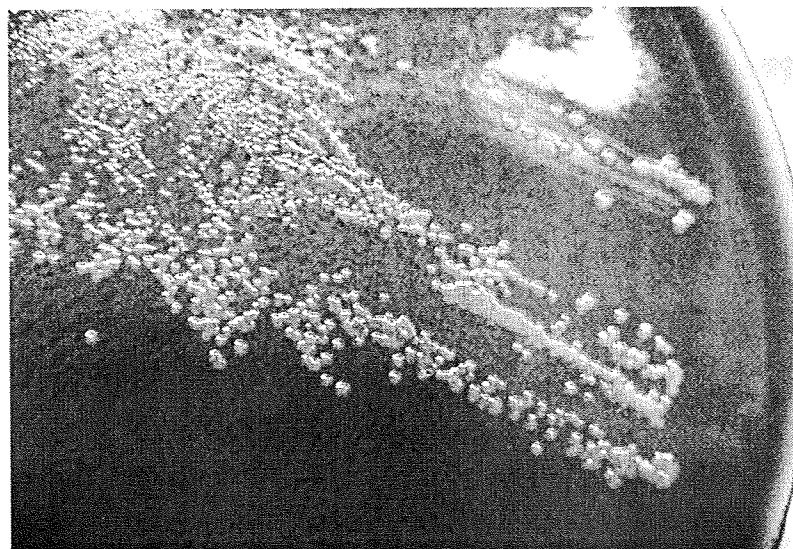
年齢	オス		メス		不明		計	
	陽性数 /n	%	陽性数 /n	%	陽性数 /n	%	陽性数 /n	%
<2	0/3		0/2		0/1		0/6	
3-5	4/20	20.0	0/17				4/37	10.8
6-9	2/16	12.5	0/8				2/24	8.3
10<	1/6	16.7	0/5				1/11	9.1
不明	1/8	12.5	0/6		1/4	25.0	2/18	11.1
計	8/53	15.1	0/38		1/5	20.0	9/96	9.4

脾臓

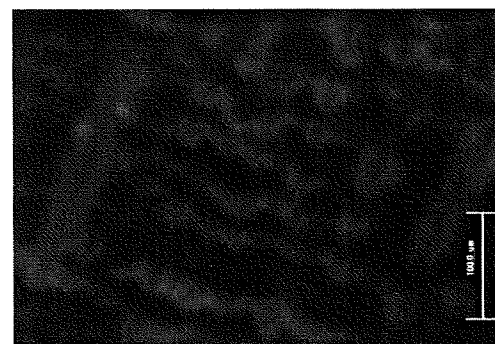


断面に針頭大白点多数

分離菌



グラム陰性小桿菌



抗*Francisella tularensis*
モノクローナル抗体陽性

図1 斃死ノウサギ脾臓と分離菌NVF1

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）
分担研究報告書

日本国内で分離された野兔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

研究分担者	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	棚林 清	国立感染症研究所	獣医科学部	室長
	宇田晶彦	国立感染症研究所	獣医科学部	主任研究官
	堀田明豊	国立感染症研究所	獣医科学部	主任研究官

研究要旨：日本国内に分布する野兔病菌 (*Francisella tularensis*) の遺伝的特性を明らかにする目的で、様々な制限酵素を用い日本国内分離株のパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)解析を行った。まず、PFGE 解析に利用可能な7種の制限酵素を選択し、これらを用いて解析した結果、北米やヨーロッパなどに分布する同亜種菌株と比較して国内株は非常に高い遺伝的多型を有している事が明らかとなった。さらに、今回用いた制限酵素の全てで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、両者間の鑑別に PFGE が有用な手法の一つであることが示唆された。

A. 研究目的

野兔病は、野兔病菌(*Francisella tularensis*) を原因菌とする急性熱性疾患である。野兔病の発生地域は、ほぼ北緯30度以北に一定の汚染地帯があり、その各地で毎年散発的に発生している。国内では主に東北地方の各県および関東地方（栃木、茨城、千葉）において発生している。病原体は自然界において野生動物と吸血性動物間で循環維持されているものと考えられている。日本国内に分布する野兔病菌は*F. tularensis*の亜種、*F. tularensis* subsp. *holarctica*で、現在までこの菌は野兔病患者以外にもダニ等の節足動物を含む様々な

野生動物から分離されている。これら分離菌の生化学的および遺伝学的性状等の基礎的情報は殆ど調べられておらず、まだ不明な点が多い。以前我々は日本国内で分離された野兔病菌株のタンデムリピート領域の解析を行った結果、海外由来の菌株とは全く異なる特異的な反復配列を持ち、さらにこれらは非常に高い遺伝的多型を有することを報告した。

本研究では野兔病菌の新たな遺伝学的特性特性を調べるために、パルスフィールド電気泳動法(PFGE)を用いた解析を行い、疫学調査の基礎的情報を得ると同時に、今後国内で野兔病が発生した時にその感染源を

特定する為に有用な手法を確立する事を目的とした。

B. 研究方法

(1) 野兎病菌株

本予備実験では、大原研究所藤田博己先生より分与された日本国内分離株 12 株と比較対象の海外由来株として Live Vaccine Strain を用いた。日本株は様々な分離地・分離年および分離宿主の菌株を選択した。

(2) PFGE

PFGE 解析は PulseNet 1-day standardization laboratory protocol (PulseNet, USA., CDC) を参考に一部変更して実施した。PFGE の泳動条件はパルスタイム 1.79 秒から 10.71 秒、6V/cm, 120° angle, 泳動時間 17.5 時間、泳動バッファー温度は 14°C に設定し、CHEF Mapper (Bio-Rad) により電気泳動を行った。

PFGE 解析に用いた制限酵素は *ApaI*, *BamHI*, *BglII*, *MluI*, *NgoMIV*, *NruI*, *PmeI*, *PvuI*, *SalI*, *SacII*, *TtHIIII*, *XhoI* の 12 種で、それらの有用性について検討した。

C. 結果

(1) 制限酵素

ApaI は 8 本以下のバンドしか認められず、また *NruI* と *XhoI* は 30 本以上とバンド数が多く解析が不可能であった。さらに、*NgoMIV* は酵素量が 100U/反応でもバンド消化が不十分なため野兎病菌の PFGE 解析には不適と判断した。

BamHI, *BglII*, *MluI*, *PmeI*, *PvuI*, *SalI*

および *SacII* の 7 制限酵素については、今回検索した全ての分離菌株で 40Kbp-194Kbp 間に 20-30 本のバンドが認められ、今後の野兎病菌の PFGE 解析には有用であると判断した。

(2) 日本国内分離株と海外株との鑑別

図に示すように *BamHI* による DNA 切断パターンは日本国内分離株と海外由来株間で明らかに異なっていた。その他の 6 酵素でも同様に両者間を鑑別できた。

D. 考察

感染症疫学の目的の一つは病原体の同定とその生態や伝播様式を解明することであり、これによりの確な感染症対策が可能となる。その手法の一つとしての PFGE は多くの細菌種・血清型で有用性のある菌株比較方法である。野兎病菌の亜種でヒトに対して最も病原性の強い北米に分布する *F.*

tularensis subsp. *tularensis* の型別法として PFGE は一般的に用いられている。一方、日本を含む北半球に広く分布する *F.*

tularensis subsp. *holarctica* の型別には PFGE は殆ど用いられていない。Garcia del Blanco ら (2002) らは、スペイン国内でヒトやノウサギなどから分離された菌株の型別には *XhoI* と *BamHI* の 2 酵素での PFGE の結果を併せて解析すると大きく 3 つのグループに分けられると報告している。さらに、北米由来の *F. tularensis* subsp. *holarctica* を *PmeI* で処理した後 PFGE 解析した結果、その殆どの菌株が同一のバンドパターンを示したと報告している (Kugeler ら, 2009)。また

北米株を *Sma*I, *Bam*HI, *Xho*I など で処理した結果、LVS と同様のバンドパターンを示したと報告している (Fey ら、2007)。

今回我々は、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。

今後本研究で選択した 7 種の制限酵素を用いて我々が所有する国内外の全野兎病菌株 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。

E. 結論

日本国内に分布する野兎病菌は北米からユーラシア大陸まで広く分布する

同じ亜種とは生化学的にも分子生物学的にも若干の相違があることが報告されてきた。今回我々は PFGE を用いて日本分離菌株の解析を行った結果、この手法でも国内菌株は海外株とは全く異なる特徴的なバンドパターンを示した。今後 PFGE でのデータをさらに蓄積し、国内で野兎病の集団的発生が起こった時や、患者や野生動物から野兎病菌が分離された時に、その感染源の特定に PFGE が有用な手法の一つになりうることを示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

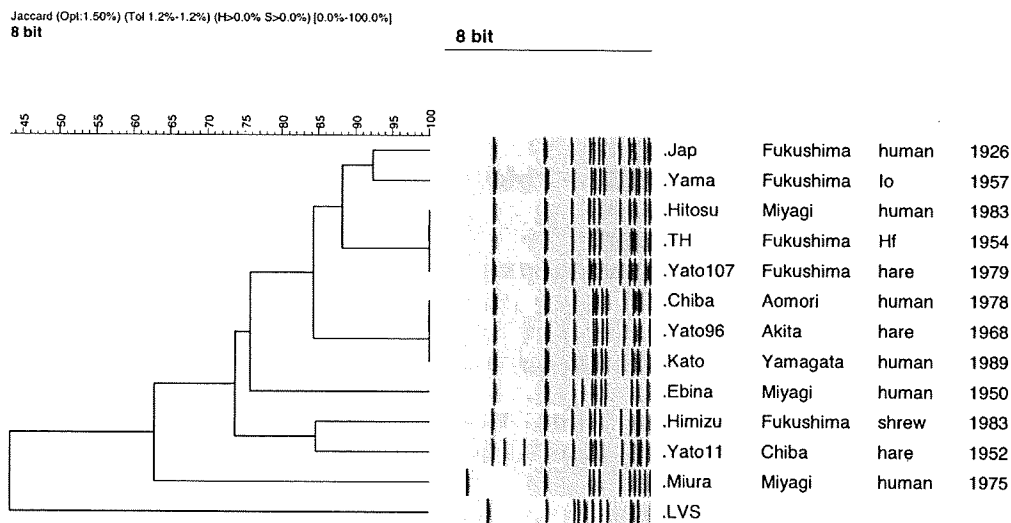


図. *Bam*HI 処理した野兎病菌についてのデンドログラム

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）分担研究報告書

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

研究分担者 柳井徳磨 岐阜大学応用生物科学部 教授
今岡浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 室長
川端寛樹 国立感染症研究所 細菌第一部 室長
高橋元秀 国立感染症研究所 細菌第二部 室長
井上 智 国立感染症研究所 獣医科学部 室長
安藤秀二 国立感染症研究所 ウイルス第一部 室長
小泉信夫 国立感染症研究所 細菌 室長
木村昌伸 国立感染症研究所 獣医科学部 研究員

研究協力者 久保正仁 岐阜大学連合大学院獣医学研究科 大学院生
朝倉亜紀 岐阜大学応用生物科学部 学生
伊藤桂子 岐阜大学応用生物科学部野生動物管理学研究センター技術員
高野 愛 岐阜大学連合大学院獣医学研究科 大学院生

研究要旨 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、しばしば野生動物の生食することもある。そのため、野生由来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。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できると考える。

A. 研究目的

猟犬は野生動物を狩るため、山間部に多

く存在するダニへの暴露や野生動物との接触の機会が多くなる。そのため、ダニ媒

介性の感染症や野生動物由来感染症の発症リスクが高くなることが予想される。また、猟犬を介して人にこれらの感染症が伝播する可能性も考えられる。したがって、猟犬におけるダニ媒介性の感染症や野生動物由来感染症を調べることは、これらの感染症の保有状況や地理的分布を知ることができ、人への伝播の可能性についても推測する手助けとなる。

今回は、岐阜県、三重県、富山県、滋賀県、広島県、香川県、高知県、宮崎県、熊本県の9県の猟犬155例を対象とし、ダニ媒介性疾患である日本紅斑熱、ツツガムシ病、ライム病およびヘパトゾーン感染症、犬を介する可能性がある人獣共通感染症であるレプトスピラ感染症およびジフテリア感染症について抗体調査を行った。

B.研究方法

(1) 材料

西日本を中心とした9県にて猟犬155例から採血し、各種の感染症の抗体価を調査した：岐阜県17例、三重県19例、富山県9例、滋賀県5例、広島県47例、香川県8例、高知県10例、宮崎県20例、および熊本県20例であった。犬種は、アイリッシュセッター1例、イングリッシュセッター2例、ウォーカーハウンド7例、ビーグル1例、ブリタニー・スパニエル6例、ブルーチックハウンド2例、プロットハウンド10例、ポインター14例、セッター種1例、紀州犬5例、四国犬1例、柴犬5例、北海道犬1例、および雑種犬99例であった。性別は、雄87例、雌61例、不明7例であった。平均年齢は約5歳(6ヶ月から15歳)であった。

各猟犬の所有者にインフォームド・コンセントを得た後に採血し、狩猟対象動物、狂犬病予防歴、ワクチン接種歴、ノミやダニの予防の有無についても聴取した。

(2) 採血方法

ヘパリンナトリウム加の抗凝固処理をしたシリンジを使用し、橈側皮静脈より、それぞれの猟犬から約6.5 ml採血した。採取した血液のうちの約6 mlは真空採血管(ベノジェクト® II 真空採血管, TERUMO®)へ容れ遠心し、血漿を分離した。採血した血液のうち、約0.5 mlの血液を用いて、血液塗抹標本を作製した。リケチア感染症、レプトスピラ感染症、ライム病ボレリア感染症、およびジフテリア感染症についての血漿を用いた検査を、それぞれ国立感染症研究所の安藤秀二室長、今泉信夫室長、川端寛樹室長、高橋元秀室長が分担しそれぞれ測定した。

1) リケチア

犬血漿中に存在する*R.japonica* および*O.tsutsugamushi* に対する抗体を検出するため、間接蛍光抗体法(Indirect Fluorescence Antibody Assay: IFA)を実施した。抗原には、*Rickettsia japonica* YH株、*Orientia tsutsugamushi* Kato型、Karp型、Gilliam型、Kuroki型、Kawasaki型を使用した。抗体価が40倍以上のものを陽性とした。

2) ジフテリア症

被検血漿を56°C30分非働化处理し、組織培養用マイクロプレートへ入れ、細胞用培養液で2倍階段希釈系列を2組作製した。希釈系列の一方は、VERO細胞浮遊液を加えて、37°C4日間培養し、被検血清コントロールとした。標準ジフテリア抗毒

素を上記と同様にして、希釈系列を作製した。ジフテリア試験毒素（毒素活性量 $12CD_{50}/well$ ）をもう一方の被検血清希釈系列と標準ジフテリア抗毒素希釈系列の各希釈系列に一定量添加し、 $37^{\circ}C$ 30分、孵卵器に入れて中和反応させた。その後、VERO 細胞浮遊液を加えて、 $37^{\circ}C$ 4日間培養した。標準ジフテリア抗毒素の End point を $0.0033 IU/ml$ と設定し、被検血清の抗毒素価を算出した。宮崎県および熊本県の陽性犬 7 頭について、再現性を確認するために、再び現地にて採血を行い上記と同様に抗毒素価を算出するとともに、陽性犬およびその同居犬の体毛、口腔内や皮膚スワブを採取し、亜テルル酸カリウム加血液寒天培地、および DSS 培地で培養後、api Coryne キットを用いた菌同定試験および Elek 法によるジフテリア毒素産生能試験を実施した。

3) ライム病

血漿について recomWELL Borrelia canis IgG (Mikrogen, Martinsried, Germany) を用いて、マニュアルに従い Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) を実施後、吸光度を測定した。Cut-off コントロールの平均値の 1.2 倍より大きい値 (0.4209) のものを陽性とした。

4) レプトスピラ症

ELISA によるスクリーニング検査を実施した。マイクロプレート (EIA/RIA 96 well plate, Costar) を $100 \mu l$ の $20 mM$ Tris, $0.15 M$ NaCl, pH 7.5 (TBS) に溶かし、 $100 ng/well$ の濃度に調整した GST/LigA-mC あるいは GST でコーティングして、 $4^{\circ}C$ にて一晩インキュベ

ートした。平均値 + 3 標準偏差 = 0.396 を Cut-off 値と設定し、 $OD > 0.369$ のサンプルを ELISA 陽性と判定した。 $OD > 0.1$ であった 15 サンプルは、Australis (秋疫 C), Autumnelis (秋疫 A), Canicola (犬型レプトスピラ病), Copenhageni, Hebdmadis (秋疫 B), Icterohaemorrhagiae (ワイル病) の 6 血清型について、顕微鏡下凝集試験 (MAT) を行い、80 倍以上を陽性と判定した。

5) ヘパトゾーン症

① 血液学的検索

作製した血液塗抹標本は、メタノール固定後、定法によりライト・ギムザ染色を行い、光学顕微鏡にて鏡検を行った。

② DNA 抽出と PCR 増幅

血球を使用滅菌処理した PBS にて 10 倍希釈し、 $10,000 rpm$, 1 分間遠心後、その沈渣からマニュアルに従って、Sepa Gene® (三光純薬) を用いて DNA を抽出し、 $25 \mu l$ の TE buffer に溶出し、使用するまで $-20^{\circ}C$ で保存した。プライマーは、ヘパトゾーン属の部分的な 18S rRNA 遺伝子の増幅に使用する、HepF (5 ATA-CAT-GAG-CAA-AAT-CTC-AAC 3) と HepR (5 CTT-ATT-ATT-CCA-TGC-TGC-AG 3) を使用した。PCR 増幅産物 $20 \mu l$ を、2% アガロースゲル電気泳動を行い、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) を使用して DNA の精製を行った。精製した DNA は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) と自動 DNA シーケンサー、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer

(Applied Biosystems) を用いて, forward と reverse の両方のダイレクトシーケンスを実施した。得られたシーケンスデータは, ABI sequencing analysis software で解析し, BLAST プログラムを用いて, GenBank のシーケンスデータと比較した。

C. 研究結果

1) リケッチア症

検索した猟犬 149 例のうち 5 例 (3.6%) が *R.japonica* に対して 40 倍以上の陽性抗体価を示した。*R.japonica* について県別に見ると, 広島県では 1 例 (2.1%) (No.56), 高知県では 1 例 (10%) (No.109), 宮崎県では 1 例 (5%) (No.128), 熊本県では 2 例 (10%) (No.138, 154) の陽性例が認められた。その他の県では *R.japonica* 陽性犬は見られなかった。

一方, 猟犬 149 例のうち, 28 例 (18.8%) が *O.tsutsugamusi* の少なくとも一つの血清型に対して 40 倍以上の陽性抗体価を示した。県別に見ると, 岐阜県では 2 例 (12.5%) (No.1, 9), 富山県では 1 例 (14.3%) (No.37), 広島県では 1 例 (2.1%) (No.95), 宮崎県では 16 例 (80%) (No.116~124, 127~129, 131, 132, 134, 135), 熊本県では 8 例 (40%) (No.140, 142, 143, 145~149) が陽性であった。血清型別では, Kato 型が 13 例 (8.7%), Karp 型が 12 例 (8.1%), Gilliam 型が 10 例 (6.7%), Kuroki 型が 14 例 (9.4%), Kawasaki 型が 27 例 (18.1%) であった。2 種類以上の血清型の上昇が見られたのは, 28 例中 18 例 (64.3%) であり, そのうち 6 例は 5 種類すべての血清型で抗体価が陽性を示した。複数血清型で抗体価が陽性であるもの

について, 最も抗体価が高い血清型を推定感染株 (ただし, 最も高い抗体価が二つ以上の血清型で見られる場合, 両方を採用する) とすると, 28 例中 22 例が Kawasaki 型, 9 例が Kuroki 型, 4 例が Karp 型, 2 例が Kato 型であった。

2) ジフテリア症

検索した 153 例中 13 例 (8.5%) が陽性を示した。広島県で 2 例 (4.3%) (No.90, 96), 宮崎県で 5 例 (25%) (No.117, 124, 126, 127, 134), 熊本県で 6 例 (30%) (No.145, 147, 150, 153~155) の陽性例が認められた。宮崎県および熊本県の陽性例 7 例 (No.145, 147, 117, 124, 126, 127, 134) について再検査を行ったところ, 前回と同様にジフテリア抗毒素価の上昇がみられた。また, 陽性を示した No.117 の犬との同居犬である No.120 の犬の体毛から *C.ulcerans* が分離され, この分離菌はジフテリア毒素産生能を有していた。No.145, 117, 127, 再検査時に初回時よりも抗毒素価の上昇が認められ, No.126 は抗毒素価が低下した。No.147, 124, 134 は初回時と再検査時で抗毒素価に変化はみられなかった。

3) ライム病

今回検査した 154 例中 30 例 (19.5%) が ELISA にて陽性であった。県別に見ると, 岐阜県 2 例 (12.5%) (No.12, 131), 三重県 3 例 (16.7%) (No.20, 21, 33), 富山県は 1 例 (11.1%) (No.42), 高知県 1 例 (10%) (No.108), 宮崎県 8 例 (40%) (No.116, 117, 119, 120, 125, 127, 130, 131), 熊本県 7 例 (35%) (No.136, 143, 146, 147, 149, 151, 154) が陽性を示した。

4) レプトスピラ症

対照を含めた 163 例中 12 頭が ELISA, MAT のうち少なくとも一方に陽性を示した。163 例中 7 例 (4.3%) が ELISA 陽性であった。広島県では 47 例中 3 例 (6.4%) (No.87, 89, 90), 宮崎県では 20 例中 1 例 (5%) (No.123), 熊本県では 20 例中 3 例 (15%) (No.147, 148, 149) が ELISA 陽性であった。その他の 6 県では, ELISA 陽性の犬は見られなかった。MAT においては, 15 例中 11 例 (73.3%) が陽性を示した。広島県では, 3 例 (No.84, 89, 90), 宮崎県では 3 例 (No.123, 126, 135), 熊本県では 5 例 (No.139, 147, 148, 149, 150) が陽性であった。陽性を示した血清型は, Australis が 2 例 (18.2%) (No.148, 135), Autumnalis が 1 例 (9.1%) (No.126), Hebmadis が 9 例 (81.8%) (No.84, 89, 90, 139, 147, 148, 149, 150, 123) であった。No.148 については, Australis および Hebmadis の 2 つの血清型に陽性を示した。No.84, 139, 150, 126, 135 の 5 例は, ELISA では陰性であったが, MAT では陽性となった。一方, No.87 は, ELISA では陽性であったが, MAT ではどの血清型にも陰性であった。ELISA, MAT のうち少なくとも片方で陽性であったものを合わせると, 広島県では 4 例 (8.5%), 宮崎県では 3 例 (15%), 熊本県では 5 例 (25%) がそれぞれ陽性であり, 九州地方で陽性個体が多く認められた ($P < 0.05$)。

5) ヘパトゾーン症

血液塗抹標本を鏡検したところ, 155 例中 11 例 (7.1%) (No.155, 121, 123, 124, 126, 127, 128, 129, 134, 135, 29) の

犬の好中球の細胞質内に, 細胞の 1/3 から 1/5 の割合を占める大型のカプセル様の構造物が認められた。このカプセル様の構造物は, 形態学的に, *H.canis* のガメトサイトに類似していた。

プライマーHepF/R をセットして PCR を行い, アガロースゲル電気泳動を実施したところ, 155 例中 15 例 (9.7%) (No.88, 137, 142, 146, 152, 153, 121, 124, 126, 127, 128, 129, 133, 134, 29) が陽性であり, これらの PCR 増幅産物のサイズは約 660 bp であった。これらの DNA シーケンスを実施したところ, *H.canis* (GenBank accession no.AF418558) に 97% 以上一致した。No.88, 137, 142, 146, 152, 153, 133 は, 血液塗抹上においては *H.canis* のガメトサイトは認められなかったが, PCR においては *H.canis* 感染陽性であった。一方で, 血液塗抹上で *H.canis* のガメトサイトが認められた No.155, 123, 135 の 3 例では, PCR では *H.canis* の感染は確認できなかった。血液塗抹標本の鏡検と PCR の結果から総合すると, 今回検索を行った猟犬 155 例中 18 例 (11.7%) がヘパトゾーンに感染していた。県別では, 三重県は 1 例 (5.3%) (No.29), 広島県は 1 例 (2.1%) (No.88), 宮崎県は 10 例 (50.0%) (No.121, 123, 124, 126, 127, 128, 129, 133, 134, 135), 熊本県は 6 例 (30.0%) (No.137, 142, 146, 152, 153, 155) であった。その他の 5 県では陽性の犬は認められなかった。

D. 考察

1) リケッチア症

紅斑熱群リケッチアのうち、わが国では *Rickettsia.japonica* 感染による日本紅斑熱が知られている。本症は人に全身性の紅斑と急な発熱、頭痛、倦怠感、リンパ節腫脹などを引き起こし、適切な治療が施されない場合、死亡することもあるが、本症の動物における感染、発症の報告はなく、本病原体の動物に対する症状は現在まで不明である。日本紅斑熱は九州、四国、本州では中国地方から関東地方まで、比較的温暖な太平洋岸沿いに発生している。今回の猟犬における調査でも、広島県、高知県、宮崎県においてそれぞれ 1 例ずつ、熊本県において 2 例の抗体価陽性の犬がみられ、岐阜県、三重県、富山県、滋賀県では陽性犬は認められなかった。このことは、西日本において日本紅斑熱の発生が多いことを支持する根拠となる。

今回のツツガムシの抗体調査では、*O.tsutsugamushi* に対して高い抗体価が認められた犬は、宮崎県、熊本県の九州地方で約 8 割強を占め ($P < 0.05$)、ツツガムシ病が九州で発生が多いことと一致していた。血清別に見ると、Kawasaki 型が最も多く、次いで Kuroki 型が多く認められる。九州では Kawasaki 型と Kuroki 型を保持するタテツツガムシの分布が多いとされており、九州地方のツツガムシ病の血清型も Kawasaki 型、次いで Kuroki 型が多いと言われている。今回の猟犬を用いた抗体調査においても、タテツツガムシの分布およびツツガムシ病の血清型の分布と類似した結果が得られた。単独の血清型のみでなく、複数の血清型の抗体価の上昇がみられた例が 6 割強存在し、特に宮崎県においてその傾向が強くみられた。

Gilliam 型については Kawasaki 型との交差性が認められており、今回も単独での抗体価の上昇はみられず、Kawasaki 型に伴って検出されており、これとの交差性が疑われた。Kuroki 型も Kawasaki 型と共に抗体価の上昇が認められ、この両血清型を保持するタテツツガムシが九州地方に多く分布することが関係している可能性がある。Kato 型と Karp 型では、それぞれ保持するツツガムシは、アカツツガムシおよびフトゲツツガムシである。複数の血清型で抗体価の上昇が認められた中でも、Kato 型および Karp 型に最も高い抗体価を示した犬もいるため、少数であるがこれらの血清型のツツガムシ病の発生の可能性やアカツツガムシ、フトゲツツガムシが九州地方の山間部に分布している可能性が考えられる。今回の猟犬の血清学的調査では、特に九州地方のツツガムシ病について、血清型別の発生状況および *O.tsutsugamushi* を保持するツツガムシの分布に関して、類似した結果が得られた。このことは、猟犬をはじめ犬やその他の動物における血清学的調査が、ツツガムシ病の発生状況について支持あるいは利用できる情報となる可能性がある。

2) ジフテリア症

我が国では、*C.ulcerans* の調査が宮城県、千葉県、大阪府、岡山県、大分県、福岡県の愛護センターまたは動物病院で行われており(国立感染症研究所)、そのうち大阪府の愛護センターにおいて国内で初めて犬から毒素産生性 *C.ulcerans* が分離されている。今回 9 県の猟犬を対象に調査を行ったところ、広島県、宮崎県、熊本県で高いジフテリア抗毒素価が得られた