

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、残りもく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

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有る程度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、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)。

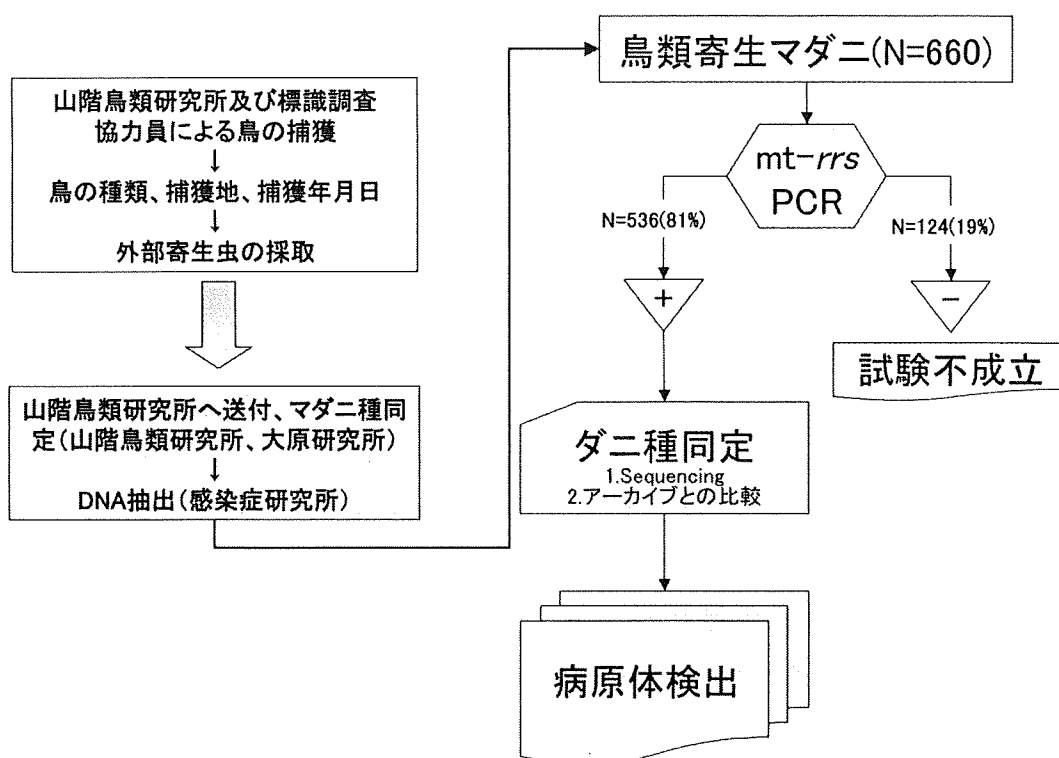


図 1. 病原体検出の流れ図

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-*I.*

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 *Carios 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關与する可能性

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、拡散に何らかの關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	
シジュウカラ <i>Parus major</i>	37.17	
ヒメクロウミツバメ <i>Oceanodroma monorthis</i>	18.59	低
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, ボ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ボレリアの保有, 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, ボレリアに感受性がある鳥種がボ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, ボ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). ボレリアにおいては, 生態学的に *Turdus* 属や *Emberiza* 属鳥類の一部がボレリアの維持, 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. 鳥寄生マダニ保有ボレリアとして, ライム病病原体 *B. garinii* が dominant であった. 本ボレリアは大陸で見出されるボ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, 不明のボレリアが検出された. 今後, これらボレリアについて, 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(回帰熱ボレリア感染症) 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

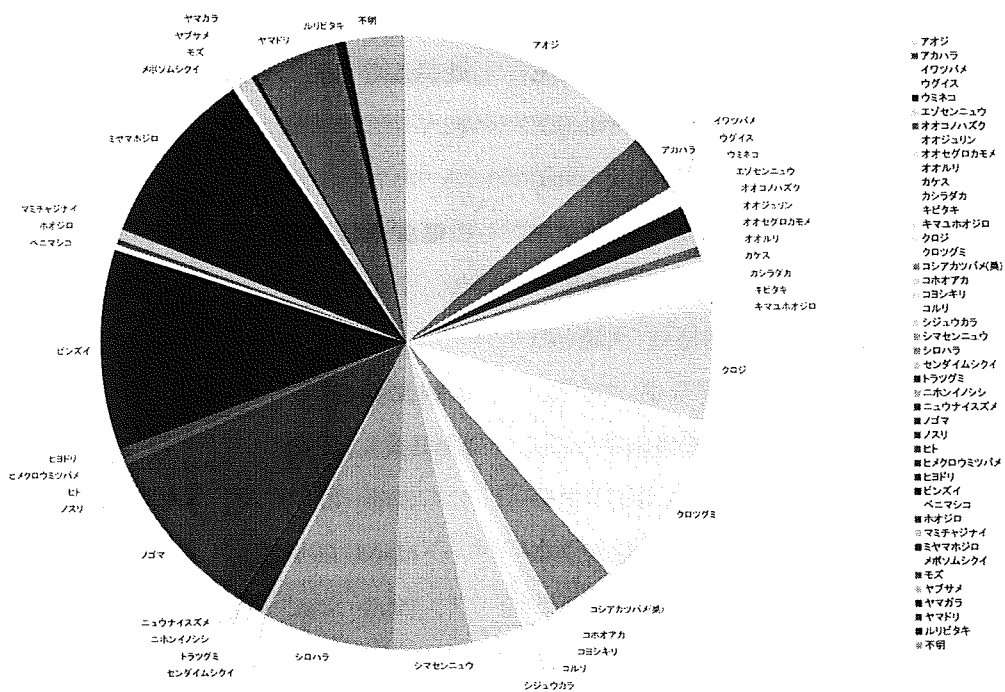


図 3.病原体検索に用いたマダニ由来野鳥種とその割合

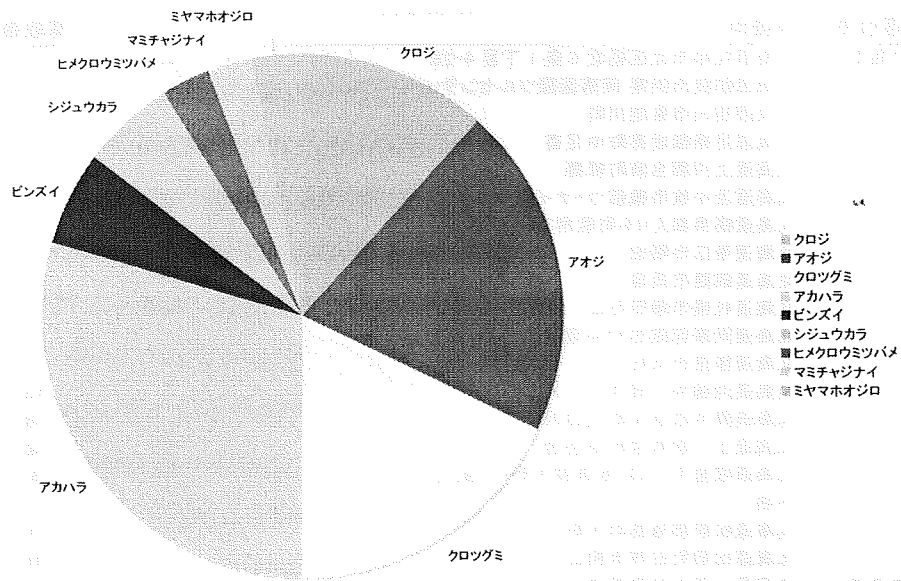


図 4.ボレリア陽性マダニの寄生宿主鳥類と内訳

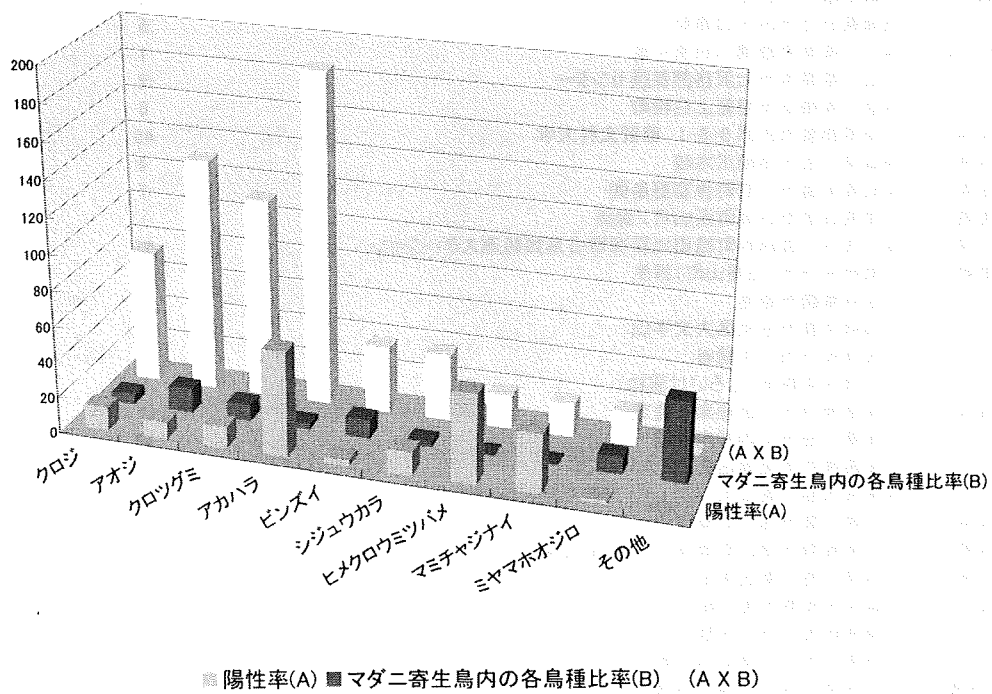


図 5.野生鳥類における *Borrelia* の生態系内維持・拡散に関する可能性

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(風蓮湖ステーション)	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	7
	秋田県	秋田県にかほ市象潟町小滝字鋒立	3	3
	岩手県	岩手県盛岡市下太田雫石川	7	6
		岩手県盛岡市玉山区外山姫神鳥獣試験地	2	2
福島県	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	
鳥根県	鳥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	
	愛媛県宇和島市鬼ヶ城	1	0	
愛媛県	愛媛県新居浜市大生院	5	5	
	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>Syrnaticus 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
ビンズイ <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
ニューナイスズメ <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.

表 3.本研究で回収されたマダニ種の一覧

Tick species	Total	PCR examined
Argas	32	32
<i>Argas japonicus</i>	32	32
<i>Haemaphysalis</i>	225	196
<i>Haemaphysalis flava</i>	170 (75.2*1)	153
<i>H. formosensis</i>	9	8
<i>H. fujisawa</i>	1	1
<i>H. japonicus</i>	1	1
<i>H. longicornis</i>	5	5
<i>H. megaspinosa</i>	37 (16.4 ¹)	27
<i>H. phasiana</i>	1	1
<i>Haemaphysalis</i> sp.	1	
<i>Ixodes</i>	393	296
<i>Ixodes asanumai</i>	4	4
<i>I. nipponensis</i>	2	2
<i>I. pavlovskyi</i>	4	4
<i>I. persulcatus</i>	327 (83.2¹)	237
<i>I. signatus</i>	1	1
<i>I. turdus</i>	53 (13.5 ¹)	46
<i>I. monospinosa</i>	2	2
<i>Ornithodoros</i>	9	9
<i>Ornithodoros sawaii</i>	2	2
<i>Ornithodoros</i> sp.	7	7
Not determined	1	1

*1:各マダニ属内でのマダニ種の占有率

表 4.本研究で見出されたボレリア種(*flaB*, 16SrDNA 配列による)

Group/species	PCR 陽性数
Lyme disease group	
<i>B. afzelii</i>	1
<i>B. garinii</i>	26
<i>B. turdi</i>	3
STARI group	
<i>B. miyamotoi</i>	2
<i>Borrelia</i> sp. (<i>B. lonestari</i> -like)	1
Relapsing Fever group	
<i>Borrelia</i> sp. (<i>B. parkeri</i> -like)	1
Undetermined	3

コリネバクテリウムに関する研究

分担研究者 高橋元秀 (国立感染症研究所 細菌第二部)

研究協力者

小宮貴子、岩城正昭、山本明彦、見理 剛 (国立感染症研究所 細菌第二部)
瀬戸幸路、幸田知子、向本雅郁、小崎俊司 (大阪府立大学生命環境科学部)
勝川千尋、河原隆二、井上清 (大阪府立公衆衛生研究所)
石井篤嗣、山岸寛明、木田一裕、西野俊治 (大阪府犬管理指導所)
長濱伸也 (大阪府健康福祉部)
大阪府獣医師会 泉南支部の先生方

研究要旨

2001年以降に国内の動物から分離された *C. ulcerans* の細菌学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、*C. ulcerans* の産生する毒素と *C. diphtheriae* が産生する毒素とは異なるが、本菌に感染した動物由来菌とヒト患者由来菌は遺伝学的に類似していることが確認された。また、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。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。

A. 研究目的

ジフテリアは *C. diphtheriae* に起因する急性呼吸器疾患である。2001年千葉県で、ジフテリア様患者からジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* が分離され、結核感染症課から本菌が分離された場合は報告する旨の通知がされた。その後、3例の患者からの菌分離事例では当局への報告が遅れたこと、*C. ulcerans* 感染に関して感染症法での位置づけがないために行政を中心とした疫学・環境調査ができていない。

ジフテリア毒素産生 *C. ulcerans* 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国内外の感染報告から指摘されているが、その実態は不明な点が多く、その自然界における実態を把握する必要

がある。過去に実施したイエネコでの限られた調査では明確な結論が得られなかったため、調査対象を更に拡大し、生態系でどのように維持されているか、菌の分布、疫学等の調査により明らかにする。

B. 研究方法

1. わが国で過去に分離された人由来と動物由来の *C. ulcerans* について産生毒素の性状、毒素遺伝子の比較、および PFGE や ribotyping による菌の比較をおこなった。

・ 供与菌 ; *C. ulcerans* は ATCC 51799、ヒト患者由来菌 (5株 ; 0102、0211、0509、0510、0607)、動物由来菌 (3株 ; シヤチ由来 Ran および 0-9、ライオン由来 lion) を用いた (Table 1)。 *C. diphtheriae* は PW8 および

ATCC700971 を用いた。

・ 分離菌の同定、性状解析および毒素産生性；分離菌の同定は Api Coryne および 16S リボソーム RNA の解析をおこなった。ジフテリア様毒素 (DLT) 産生性は Elek 試験および細胞培養法で試験した。 *dlt* 遺伝子の検出は Nakao らの方法 [1] によりおこなった。フォスホリパーゼ D (PLD) 産生性はヒツジ赤血球に対するブドウ球菌スフィンゴミエリナーゼ C 阻害活性を測定した。 *pld* 遺伝子の検出はこれまでに報告されている *C. ulcerans* ATCC739 (GenBank accession number, L16585) より作製した primer (pldFw および pldRv; Table 2) を用いておこなった。

・ 毒素遺伝子解析；各毒素特異的な primer (toxFw および toxRv、GenBank accession number, AB304278 より作製；または pldFw および pldRv; Table 2) により増幅された PCR 産物の塩基配列を決定した。遺伝子解析は GENETYX-MAC 10.0 および DNASIS-Mac v3.2 を用いておこなった。

・ Ribotyping および Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)； Ribotyping は De Zoysa らの方法 [2] によりおこなった。PFGE はヒツジ血液寒天培地上のコロニーを洗浄後、PIV buffer (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH7.5) に浮遊させ、1.6% SeaKem Gold Agarose (Lonza Group Ltd.) と等量混合して作製した plug を用いた。Plug は lysis buffer (6 mM Tris-HCl, pH7.5, 1 M NaCl, 0.1 M EDTA, 0.5% Brij 58 [Sigma-Aldrich], 0.2% deoxycholate [Wako Pure Chemical Industries, Ltd.], 0.5% sodium lauroyl sarcosine [Sigma-Aldrich], 1 mg/ml lysozyme [Nacalai Tesque]) で 37°C、18 時間処理した後、proteolysis buffer (0.5 M EDTA, pH 8.0, 1% sodium lauroyl sarcosine [Sigma-Aldrich], 2 mg/ml Proteinase K [30 U/mg, Nacalai Tesque]) により 37°C、48 時間処理した。 *Sfi*I (New England BioLabs Inc.) を用いて plug 中の DNA を切断後、1% agarose gel 中で 0.5X Tris-borate-EDTA buffer を用いて泳動した。泳動は CHEF Mapper (Bio-Rad) を用いて、14°C、30.27 時間、6 V/cm、パル

スタイム 0.47 秒、泳動角度 120° の条件でおこなった。PFGE 解析は Finger printing II (Bio-Rad) を用いておこなった。

・ 分離菌の attachment site (*attB* site) の解析；分離菌の全 DNA を *Bam*HI (Takara Bio Inc.) 処理し、1% agarose gel を用いて 1X Tris-acetate-EDTA buffer 中で 25 V、14 時間泳動し、Hybond-N+ に転写した。DNA を固定後 DIG PCR synthesis kit (Roche Diagnostics) により作製した DIG 標識 *dlt*、*pld*、*attB* site プローブ (20 ng/ml) をそれぞれ反応させ、アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (Roche Diagnostics) および CDP-Star (GE Healthcare) を用いてバンドの検出をおこなった。*AttB* site 遺伝子解析は、*dlt* 内の primer (CURFw; Table 1) および *attB* site の primer (*attBR*v; Table 1) を用いて増幅した PCR 産物の塩基配列を決定することによりおこなった。

2. 2007 年 8 月、大阪府犬管理指導所に収容されたイヌよりジフテリア毒素を産生する *C. ulcerans* が検出された。厚生労働省健康局結核感染症課及び日本獣医師会の協力を得て大阪府獣医師会長への調査研究要請を願い、大阪府獣医師会所轄内の獣医科病院 (個人経営) を平成 19 年 11 月 1 日から平成 20 年 1 月末までの間に、診療・治療で訪れたイヌより検体として、血液採取 (血清分離)、咽頭拭い液および皮膚炎・潰瘍等の病巣があればその拭い液を採取し、コリネバクテリウム属の分離調査を実施した。血清はジフテリア抗毒素価測定、咽頭拭い液、皮膚炎潰瘍部の拭い液は PCR によるジフテリア毒素遺伝子の検出をおこなった。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の審査許可を受けて行われた。また、獣医師会を通じた調査では患犬の飼い主へインフォームドコンセントをおこない、同意書への署名を記録として残した。

C. 研究結果

1. 過去の国内ヒト由来、動物由来の *C. ulcerans* の各種性状および毒素遺伝子の解析では、分離されたヒト患者由来菌 (0102, 0210, 0509, 0510, 0607) およびシャチ由来菌 (Ran, 0-9)、ライオン由来菌 (lion) は、すべてウルセランス菌であり、PLD を産生していた。ライオン由来菌は *dlt* を保持していなかったが、他の分離菌は DLT を産生していた (Table 3)。ヒト患者由来 4 株の分離菌の *dlt* は、ドイツで分離された A6361 (GenBank accession number, AY141014) と一致していた。本研究で用いた DLT 産生菌の持つ *dlt* は、分離菌内で 98.5% 以上の相同性を持っているのに対し、*tox* (ジフテリア毒素 (DT) 遺伝子, GenBank accession number, K01722) とは 95.1% の相同性を示した (Table 4)。DLT と DT で異なるアミノ酸残基は受容体結合領域に局在していた。*pld* は供与菌内で 95% 以上の相同性を示した (Table 5)。

Ribotyping および PFGE 解析結果は、供与菌は 6 つの ribotype (A, B-1, B-2, C-1, C-2, D; Fig. 1) と 4 つの PFGE パターン (P1, P2, P3, P4; Fig. 2) に分類された (Fig. 3)。PFGE 解析において分離菌 0102 および 0210 (相同性 99.4%)、または Ran および 0-9 (相同性 96.5%) はそれぞれ類似していた。

分離菌の *attB* site の解析結果は、*dlt* プロンプと *attB* site プロンプを用いて Southern hybridization をおこなったところ、*dlt* と *attB* site が同一 fragment 上に存在することが示された。*pld* プロンプで反応するバンドは *attB* site プロンプで反応するバンドと一致しなかった (Fig. 4)。シーケンス解析から *dlt* の下流に *attB* site が存在することが明らかとなった (Fig. 5)。

2. 大阪府が収容したイヌ 65 頭の咽頭ぬぐい液を血液寒天培地および亜テルル酸カリウム、羊血液、活性炭末加培地を使用し、*C. ulcerans* と疑われる集落について DSS 培地 (自家製) に移植、純培養および性状検査をおこなった。2007 年 8 月 7 日に採取した 4 頭中 1 頭の咽頭

ぬぐい液から *C. ulcerans* と疑われる菌が分離された。イヌは雑種、雌、体重約 20kg であり、外観上、健康状態は良好であった。

(1) 生化学的性状検査では、DSS 培地でのブドウ糖分解、ショ糖非分解、グラム染色は陽性カタラーゼ陽性、尿素分解能を確認した。api Coryne 同定キット (bioMerieux) では、アルカリフォスファターゼで非典型反応、*C. ulcerans* の同定確率は 87.2%、それに次ぐ *C. pseudotuberculosis* は 12.5% であり、強く *C. ulcerans* を示唆する成績であった。

(2) 細菌学的検査では、グラム陽性の短桿菌、コリネ属特有のコンマ状、V 字状の染色像が観察された。毒素産生性は毒素遺伝子の検出 (PCR)、Elek 法、VERO 細胞培養法で、いずれも陽性であった。過去に国内で分離された株を含めてジフテリア毒素産生性を Vero 細胞で測定した結果を表 6 に示す。

(3) 分子生物学的解析は、16S リボソーム RNA 遺伝子解析では、*C. ulcerans* と *C. pseudotuberculosis* の遺伝子の塩基配列も両者は酷似した結果となった。そこで *rpoB* 遺伝子および *hsp65* 遺伝子の部分塩基配列決定法で菌種の推定を行ったところ、両遺伝子からは *C. ulcerans* と推定された。これらの結果から分離菌は若干非典型性状を示すが、*C. ulcerans* であると同定した。

(4) 毒素遺伝子：全塩基配列を決定、構成アミノ酸をジフテリア菌の毒素と比較結果、全 560 アミノ酸のうち 28 アミノ酸に変異が認められ、相同性は 95% であった。

大阪府獣医師会の協力を得た調査では、避妊、去勢手術等の健康な個体の咽頭からは 182 検体、有症犬 (咽頭とともに皮膚の炎症 23 例、鼻汁等 4 匹、その他 9 匹) から 36 検体の合計 218 検体を採取した。28 ケ所の動物病院名と検体の採取日および菌検査とジフテリア毒素遺伝子の検出結果を表 7 に示す。検体採取は 11 月 15 日から 2 月 1 日の間実施した。備考に示すような症状を確認した個体からも検体採取して検査した。28 病院の菌検出および毒素遺伝子の検査結果はすべて陰性であった。

D. 考 察

過去にヒトおよび動物から分離された *C. ulcerans* の各種解析結果では、分離菌の *dlt* は、これまでに報告されている *dlt* と高い相同性を持つ一方でジフテリア毒素遺伝子 (*tox*) との相同性は比較的 low、ジフテリア毒素 (DT) と異なるアミノ酸残基は DLT の特徴であると考えられた。今回試験した分離菌がすべて *pld* を保持しておりその相同性が比較的高かったことから、*pld* が *C. ulcerans* のマーカーとなりうる可能性が示された。シャチ由来の 2 株は遺伝子レベルで非常に類似しており、同一の菌である可能性が高いと考えられた。二頭のシャチは同一プールにおいて飼育されていたことから、*C. ulcerans* が水を介するなどして伝播したと考えられる。ライオン由来菌は同一動物園で分離されたシャチ由来菌よりもヒト患者由来菌と遺伝学的に類似していたことから、わが国においても *C. ulcerans* に感染した動物がヒトの *C. ulcerans* 感染症に関与している可能性も考えられる。しかしながら供与菌数が少ないことや十分な疫学的解析が行えなかったことから明確な因果関係は示すことができず、今後さらなる研究が必要であると考えられる。また分離された *C. ulcerans* においては *C. diphtheriae* と同様な機構によって corynephage の溶原化が起こり、*dlt* が伝播しているものと考えられる。

大阪府の動物病院の調査結果は菌分離およびジフテリア毒素遺伝子はすべて陰性であったことは、この地区から保護されていた犬管理指導所のイヌから分離したジフテリア毒素を産生する *C. ulcerans* の市中への拡散は、濃厚かつ広範囲におこっていないものと考えられる。今回の調査対象犬は主に家庭内で飼育・

管理されていたために、通常の行動が野外である野良犬等での調査も今後対象としたい。なお、採取した血清のジフテリア抗毒素価については現在試験中である。

E. 結 論

1 : 過去にヒトおよび動物から分離された *C. ulcerans* を細菌学的、分子生物学的および遺伝学的な解析結果では、*C. ulcerans* が産生する毒素 (DLT) は *C. diphtheriae* が産生する毒素 (DT) と異なる性状を持つ可能性があること、わが国においても動物間で本菌の伝播がおこっていること、本菌に感染した動物由来菌とヒト患者由来菌が遺伝学的に類似していることを確認した。

2 : 2007 年 8 月、大阪府犬管理指導所に保護されたイヌよりジフテリア毒素を産生する *C. ulcerans* を分離した。イヌが飼育されていた地区の 28 名開業獣医師の協力のもと、218 頭の飼い犬の咽頭部の調査結果は、菌分離と PCR 試験 (毒素遺伝子) 結果はすべて陰性であった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
なし。

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

Table 1 Clinical isolates of *Corynebacterium ulcerans* from Japan^a

Isolates	Date of isolation	Age(years)/sex	Source	Clinical details
Isolated from human				
0102	2001/Feb	52/F	Throat swab	Sore throat
0210	2002/Oct	54/M	Throat swab	Sore throat
0509	2005/Sep	57/M	Throat swab	Fever, parotitis
0510	2005/Oct	51/M	Lung	Lung lesion
0607	2005/Nov	58/F	Throat swab	Pseudomembrane
Isolated from killer whale				
Ran	2004/Aug	16/F	Blood, Lung	Bacteremia, Purulent pneumonia
O-9	2004/Sep	15-16/M	Blood, Lung	Bacteremia, Purulent pneumonia
Isolated from lion				
lion	2005/Dec	6/M	Blood	Sepsis

^a Abbreviations: female (F) and male (M).

Table 2 Synthetic oligonucleotide primers for preparation

Primer	Sequence (5' -3') ^a	Position (base)
For <i>pld</i> detection		
pldFw	AACATCTCTCCGTGAAAAAT	-157 to -137 ^a
pldRv	AGCTCAATCGCACCGTTGTC	1,165 to 1,180 ^a
For <i>dlt</i> sequence analysis		
toxFw	CCATGTAACCAATCTATCAA	-179 to -159 ^b
toxRv	GTGCGCCCGGAGGGA	1,720 to 1,735 ^b
For attB site detection		
CURFw	CGCGGATCCGCGTACTCTCCGGGG CA	833 to 851 ^b
attBRv	CCGCAAGCACGAAGAAACCCAGC CCACA	attB site

^a Position are based on *Corynebacterium ulcerans* ATCC739 (GenBank accession number, L16585). ^b Position are based on *C. ulcerans* 0102 (GenBank accession number, AB304278).

Table 3 Detection of the toxin in *C. ulcerans* and *C. diphtheriae* by PCR, cytotoxicity and phospholipase D activity

Isolates	DLT			PLD	
	PCR (CD ₅₀ /25 µl)	Cytotoxicity ^a	Elek test	PCR	PLD activity ^b (U/ml)
<i>Corynebacterium ulcerans</i>					
ATCC [®] 51799	- ^c	ND	-	+	20
0102	+	362	+	+	40
0210	+	256	+	+	80
Ran	+	256	+	+	20
O-9	+	362	+	+	20
lion	-	ND	-	+	160
0509	+	512	+	+	40
0510	+	512	+	+	80
0607	+	256	+	+	320
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>					
PW8	+	3,200	+	-	ND
ATCC700971	+	128	+	-	ND

^a Cytotoxic activity in culture supernatant was measured by pH color change methods. ^b *Staphylococcal* sphingomyelinase C inhibition activity in culture supernatant. ^c Positive (+), negative (-), not detected (ND).

Table 4 Homologies of nucleotide and deduced amino acid sequences of diphtheria-like toxin produced from *Corynebacterium ulcerans*

Isolates	% Homology for nucleotide (roman) and deduced amino acid (<i>italic</i>) sequence ^a				
	<i>Corynebacterium ulcerans</i>			<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	
	0102	O-9	0510	A6361	DT
0102		100.0	99.10	100.0	95.00
O-9	99.70		99.10	100.0	95.00
0510	98.57	98.51		99.10	94.82
A6361	100.0	99.70	98.57		95.00
DT	95.18	95.24	95.18	95.18	

^a Sequences were aligned using GENETYX-MAC 10.0, and percent identity was determined by DNASIS-Mac v3.2 without gaps as the denominator.

Table 5 Homologies of nucleotide and deduced amino acid sequences of phospholipase D produced from *Corynebacterium ulcerans*

Isolates	% Homology for nucleotide (roman) and deduced amino acid (<i>italic</i>) sequence ^a						
	ATCC [®] 5179 ₉	0102	O-9	lion	0510	0607	ATCC736
ATCC [®] 5179 ₉		<i>99.69</i>	<i>97.39</i>	<i>99.02</i>	<i>97.72</i>	<i>99.02</i>	<i>98.04</i>
0102	98.05		<i>96.74</i>	<i>99.67</i>	<i>97.72</i>	<i>99.67</i>	<i>98.04</i>
O-9	96.75	96.96		<i>97.06</i>	<i>98.37</i>	<i>97.06</i>	<i>96.74</i>
lion	98.16	99.89	97.07		<i>98.74</i>	<i>100.0</i>	<i>98.37</i>
0510	96.96	97.18	98.18	97.29		<i>98.74</i>	<i>98.37</i>
0607	99.05	99.78	96.96	99.89	97.18		<i>98.37</i>
ATCC736	97.40	96.86	96.10	96.96	98.26	96.86	

^a Sequences were aligned using GENETYX-MAC 10.0, and percent identity was determined by the DNASIS-Mac v3.2 without gaps as the denominator. ^b GenBank accession number; ATCC[®]51799, AB304281; 0102, AB304282; O-9, AB304283; lion, AB304284; 0510, AB304285; 0607, AB304286.

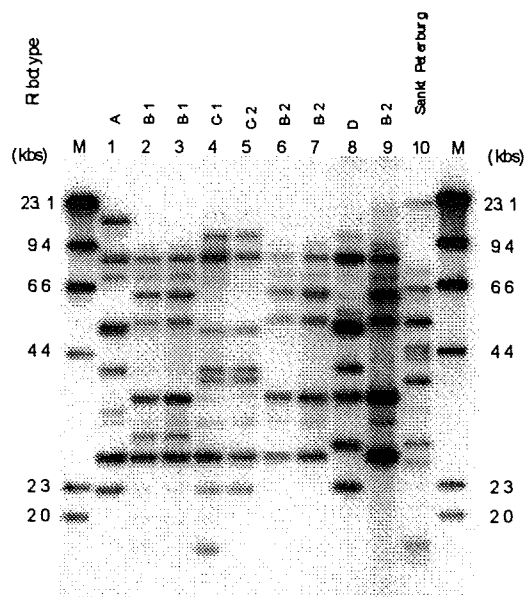


Fig. 1 *BstEII*-digested rRNA gene profiles of *C. ulcerans* isolates.

Lane M, molecular size standard (sizes are indicated on the left); *lane 1*, ATCC[®]51799; *lane 2*, 0102; *lane 3*, 0210; *lane 4*, Ran; *lane 5*, O-9; *lane 6*, lion; *lane 7*, 0509; *lane 8*, 0510; *lane 9*, 0607; *lane 10*, *Corynebacterium diphtheriae* ATCC 700971.

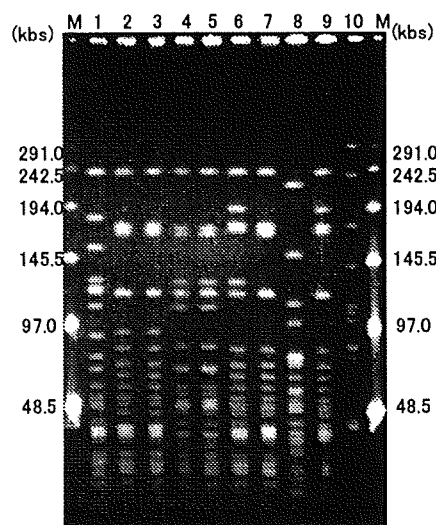


Fig. 2 *SfiI*-digested PFGE profiles of *C. ulcerans* isolates. Lane M, lambda concatemer as a size standard (size are indicated on the left); lane 1, ATCC[®]51799; lane 2, 0102; lane 3, 0210; lane 4, Ran; lane 5, O-9; lane 6, lion; lane 7, 0509; lane 8, 0510; lane 9, 0607; lane 10, *Corynebacterium diphtheriae* ATCC 700971.

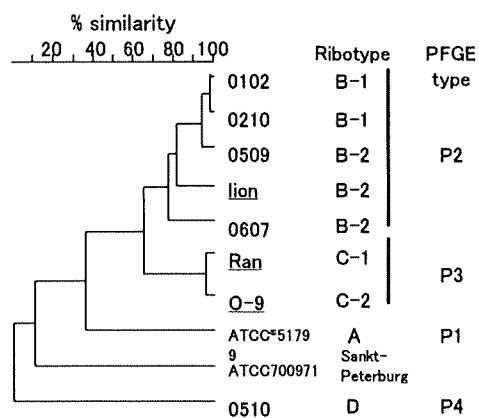


Fig. 3 Dendrogram showing the genetic relationship of *C. ulcerans* isolates in Japan. The isolates obtained from animals are underlined.