

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

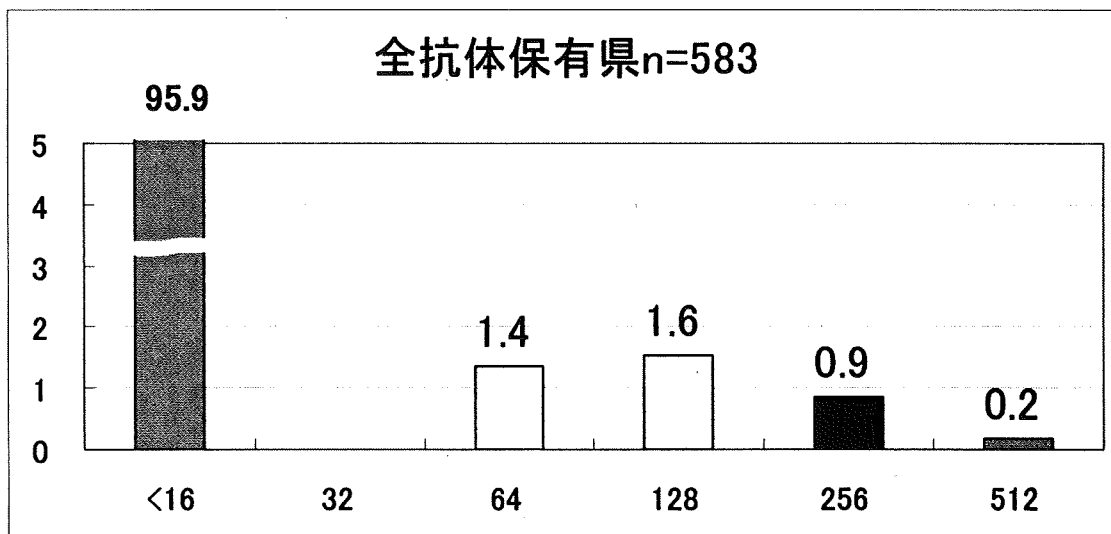


表 2:ネコの血清抗体保有状況(n=582)

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

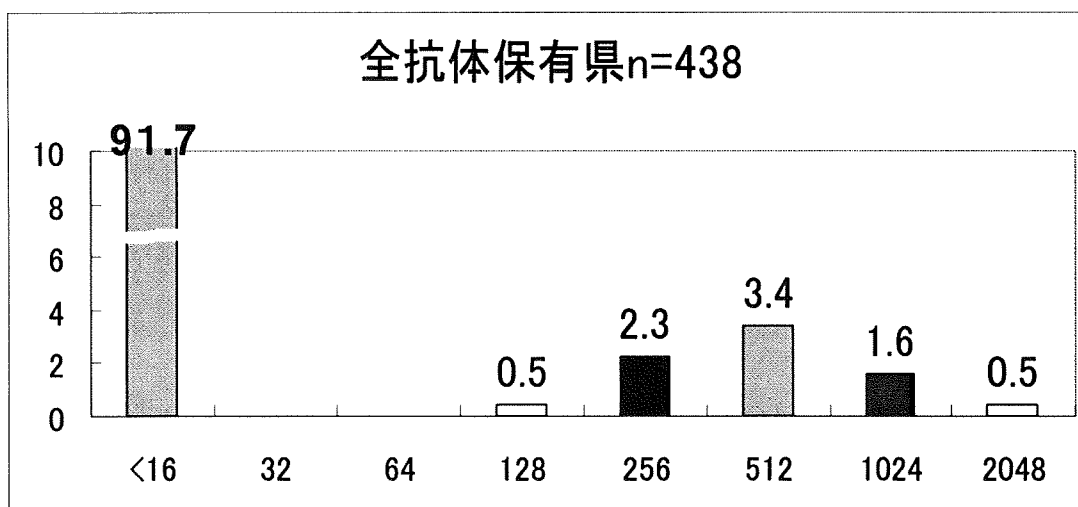


表3:イヌの年齢別抗体保有率

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(大原総合病院附属研究所)
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-rrs 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*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

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 rrs*-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*B. afzelii*、*B. turdj*、*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。抗体の検索等を行なわれていない。

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。

また一部の野生鳥類には本病原体が保有されていることが示された。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”に応用できると考えられる。

2. STARI 型ボレリア感染が疑われる症例を見いだした。今後、抗体検査などの病原体診断法の確立が必要である。

【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. 研究発表

1. 論文発表

- 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)
- Takada N, Fujita H, Kawabata H, Ando S, Sakata A, Takano A, Chaithong U. *Rickettsia japonica* in Thailand. **Emerging Infectious Diseases**. (Accepted)
- 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)

- Fujita H, Kadosaka T, Nitta Y, Ando S, Takano A, Watanabe H, Kawabata H. Isolation of *Rickettsia* sp. from *Ixodes granulatus*, Japan. **Emerging Infectious Diseases** 14: 1963-1965, 2008.

2. 学会発表

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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

- 研究会合同学術集会, 2008年11月, 岐阜.
- 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, 岸本寿男. 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.
 - 岸本寿男, 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.
 - 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, 岸本寿男. 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.
 - 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.
 - 森 亜紀奈, 今内 覚, 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.
 - 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.
 - 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.
 - 藤田博己, 安藤秀二, 川端寛樹, 坂田明子, 高野愛. 福島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.
 - 本田俊郎, 藤田博己, 藏元強, 御供田睦代, 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.
 - 本田俊郎, 角坂照貴, 川端寛樹, 高野愛, 藤田博己, 藏元強, 御供田睦代, 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.
 - 川端寛樹, 坂田明子, 安藤秀二, 高野愛, 渡邊治雄, 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.
 - 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

- 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
透状況. 第 82 回日本感染症学会総会 2008
年 4 月. 島根.

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

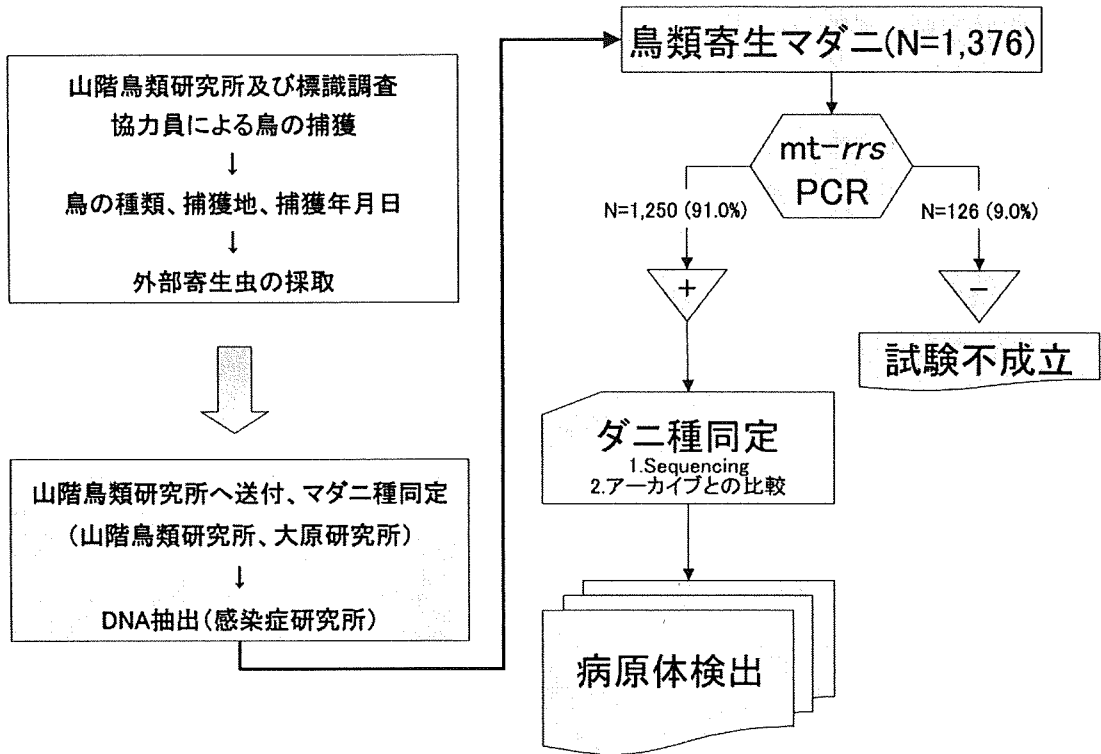


図 1. 病原体検索の流れ図

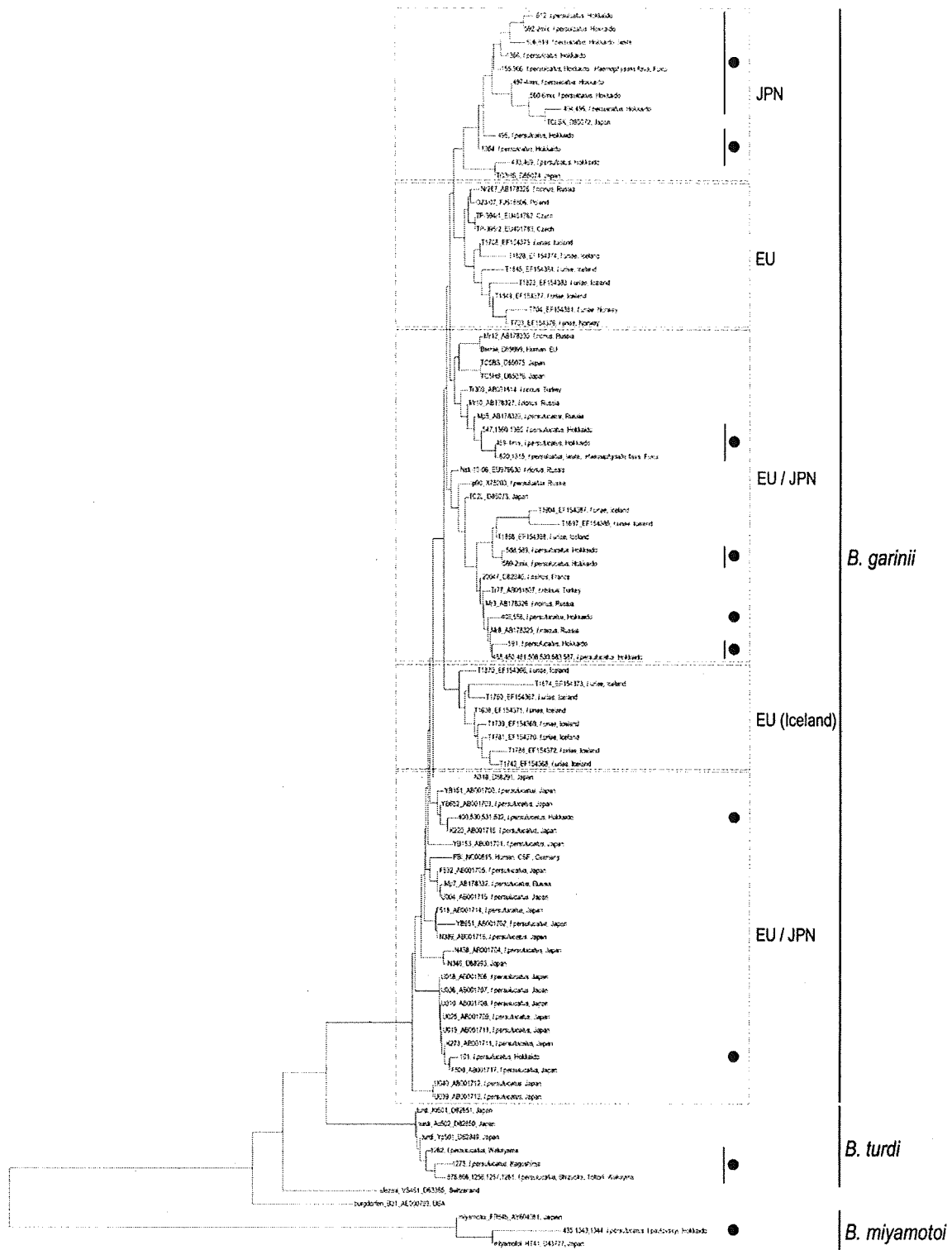


図2 野生鳥類寄生幼虫マダニより検出されたボレリアとその鞭毛抗原遺伝子(*flaB*)による系統解析
 ●は本研究で見いだされたボレリアを示す。EU: Russia(極東地域を含む), Poland, Czech, Iceland, Norway, Turkey, Germany, Franceを含むヨーロッパ諸国で検出されるボレリアを示した。EU(Iceland):Iceland以外の欧州諸国では報告の無いボレリアを示した。JPN: Japan 国内でこれまで報告があるボレリアを示した。

表 1. 野生鳥類寄生マダニの採取地と捕獲マダニ数、および病原体検索に用いたマダニ数

都道府県	捕獲マダニ数	病原体検索に用いたマダニ数*1
北海道	385	377
青森県	29	29
岩手県	58	39
宮城県	7	7
秋田県	3	3
福島県	3	3
茨城県	9	5
栃木県	4	4
千葉県	52	24
東京都	7	4
神奈川県	23	17
新潟県	17	17
石川県	1	1
福井県	244	241
山梨県	43	32
静岡県	5	5
愛知県	14	14
三重県	14	1
京都府	3	3
大阪府	10	9
兵庫県	10	10
和歌山県	111	111
鳥取県	54	54
島根県	54	52
広島県	3	3
愛媛県	55	53
福岡県	3	3
長崎県	52	49
宮崎県	5	5
鹿児島県	33	32
沖縄県	65	43
計	1,376	1,250

*1: Tick mt-rDNA 陽性の 1250 個体を病原体検索に用いた

表 2. 本研究で採取した野生鳥類寄生マダニおよび植生上から採取したマダニ種一覧

ダニ種	鳥寄生*1	植生上*2
<i>Amblyomma geoemydae</i>	2	4
<i>Amblyomma testudinarium</i>	3	1
<i>Argas japonicus</i>	43	0
<i>Argas sp.</i>	1	0
<i>Carios sp.</i>	7	0
<i>Haemaphysalis cornigera</i>	0	2
<i>Haemaphysalis flava</i>	414	12
<i>Haemaphysalis formosensis</i>	51	13
<i>Haemaphysalis fujiisana</i>	1	0
<i>Haemaphysalis hystrix</i>	30	23
<i>Haemaphysalis kitaokai</i>	0	8
<i>Haemaphysalis japonica</i>	1	12
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	6	28
<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	36	9
<i>Haemaphysalis mageshimaensis</i>	0	4
<i>Haemaphysalis phasiana</i>	1	0
<i>Haemaphysalis wellingtoni</i>	2	0
<i>Haemaphysalis yeni</i>	1	2
<i>Haemaphysalis sp.</i>	54	0
<i>Ixodes asanumai</i>	4	0
<i>Ixodes acutitarsus</i>	0	2
<i>Ixodes columnae</i>	2	0
<i>Ixodes monospinosus</i>	3	0
<i>Ixodes nipponensis</i>	7	0
<i>Ixodes pavlovskyi</i>	15	1
<i>Ixodes persulcatus</i>	387	46
<i>Ixodes philipi</i>	2	2
<i>Ixodes signatus</i>	1	0
<i>Ixodes turdus</i>	238	0
<i>Ixodes ovatus</i>	0	149
<i>Ixodes sp.</i>	64	0
計	1,376	318

*1: 野生鳥類寄生マダニとして採取された数(本研究)

*2: 植生上から採取されたマダニ数. Takano A et al. Novel *Ehrlichia* sp. found in *Ixodes granulatus* infested to rodents in Okinawa, Japan. *Microbiology and Immunology*, 2009. (In press) より改変

表 3. 本研究で見出されたボレリア種

Group/species	PCR 陽性数
Lyme group	
<i>B. afzelii</i>	1
<i>B. garinii</i>	52
<i>B. turdi</i>	28
STAR1 group	
<i>B. miyamotoi</i>	4
<i>Borrelia lonestari</i> - like	2
合計	87

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)
勝川千尋、河原隆二、井上 清 (大阪府立公衆衛生研究所)
山岸寛明、太田優、西野俊治 (大阪府犬管理指導所)
中嶋 洋、狩屋英明 (岡山県環境保健センター)
安井正広、難波泰治、片山真琴、井戸 司 (岡山県食肉衛生検査所)
小林知也、東 正秋、橋本英典、藤原慎一 (岡山県動物愛護センター)
畠山 敬、渡邊 節 (宮城県保健環境センター)、
吉岡幸信 (宮城県食肉衛生検査所)
森田幸雄、小澤邦寿 (群馬県衛生環境研究所)
松本寿男 (群馬県中央食肉衛生検査所)

研究要旨

1. 大阪府の犬管理指導所において 2006 年 12 月～2008 年 12 月の間に合計 648 頭を検査した結果、昨年 7 月に国内で初めてジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* を分離し、その後、本年度は 399 等の調査で 40 頭が菌分離が陽性であった。菌の解析結果と収容所の管理状況調査により、犬から犬への伝播は容易であることが明らかとなった。犬から分離した菌株は過去にジフテリア様症状の人から分離された株との遺伝子学的解析では、相同性において類似性が確認された。
2. 宮城県では調査対象の犬猫 (84 頭)、牛 (20 頭) は PCR および菌分離いずれも陰性であった。検査した豚 103 頭のうち 7 頭に疑わしい遺伝子が確認され、シーケンスでの配列を検討中である。
3. 群馬県では、34 頭の牛病畜 (主に乳房炎、関節炎) の調査結果、陰性であった。について検査を実施した結果、PCR および菌分離いずれも陰性であった。また、末期がん患者の気道偽膜から *C. jeikeium* を分離したが、PCR 法によるジフテリア毒素遺伝子は陰性であることを確認した。
4. 岡山県の調査は、10 頭の牛病畜 (乳房炎、関節炎)、10 頭の健康牛および 14 頭のイヌを実施したが、菌分離および PCR による毒素遺伝子いずれも陰性であった。

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. 調査対象地区と動物

- (1) 大阪府では昨年と同様に行政が収容した犬の調査を2008年4月から12月にかけて実施した。
- (2) 岡山県では行政が収容した犬およびと畜場の牛について2008年7月から10月の期間で菌分離調査を実施した。
- (3) 宮城県では行政が収容した犬猫およびと畜場の牛と豚について2008年7月から11月の期間で菌分離調査を実施した。
- (4) 群馬県ではと畜場の牛について2008年7月から11月の期間で菌分離調査を実施した。

2. 検体の採取、培養検査、同定

犬および猫からの採材は安楽殺処分直後、咽頭ぬぐい液をシードスワブγ3号(栄研化学)で採取、培養検査開始まで4℃で保存した。検体は採取当日に分離培養を開始したが、週末を挟む場合は翌月曜日まで3日間4℃で保存、その後分離培養を開始した。

と畜での採材はと殺後すみやかに咽頭、外耳および肛門周囲をシードスワブγ3号(栄研化学)で採取、培養検査開始まで4℃で保存した。また、乳房炎、関節炎、皮膚炎等の患部は切開後、同様にぬぐい液を採取した。

3. 培地および培養方法

培養は検体をヒツジ血液寒天培地および亜テルル酸カリウム・活性炭末加ヒツジ血液寒天培地(以下、K培地)に塗抹、血液寒天培地は18~24時間後、K培地は24、48、72時間後に疑われる集落について性状を検査した。同定はDSS培地による糖分解性状のスクリーニング、カタラーゼ試験、ウレアーゼ試験を実施した後、api Coryne(bioMérieux)を用いて確定した。また必要に応じて、毒素産生性は毒素遺伝子のAサブユニットを特異的に増幅するプライマーを用いたPCR、Elek法およ

び培養細胞法で確認した。PCRで増幅が認められない場合は、Bサブユニットを特異的に増幅するプライマーおよび毒素遺伝子の全領域を増幅するプライマーを用いてPCRを実施した。

4. 分離菌株の解析

Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) PFGEは制限酵素:Sfi I、泳動装置:CHEF-DR II(Bio RaD)、1.5%ゲル、泳動条件は14℃、6V/cm、5-20sec 18hrs、1-5sec 14hrsで行った。結果はUPGAMA法で解析した。

ジフテリア毒素遺伝子の解析: PCR、Elek法および培養細胞法で毒素産生が確認できた菌株について、その毒素遺伝子の全領域を増幅するプライマーを用いPCRを実施、増幅産物の塩基配列を決定した。

(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

本年度に実施した対象県と対象動物についての菌分離の結果を表1に示し、各県の成績は以下に示す。

(1) 大阪府の調査

4月から12月にかけて大阪府が収容した犬684頭中399頭から採材した。収容数に対する採材数の割合、約58%、一ヶ月の最低採材頭数、32頭、最大採材頭数、56頭、月平均、約44頭であった。培養検査の結果40頭から*C. ulcerans*が検出され、37頭からはジフテリア毒素産生性*C. ulcerans*、2頭からはジフテリア毒素非産生ジフテリア毒素産生*C. ulcerans*、1頭からはジフテリア毒素産生性*C. ulcerans*およびジフテリア毒素非産生*C. ulcerans*が同時に検出された。*C. ulcerans*が検出された犬40頭は外観上すべて感染を示す兆候を認めなかった。

ジフテリア毒素非産生株はAサブユニットを特異的に増幅するプライマー、Bサブユニットを特異的に増幅するプライマーおよび毒素遺伝子の全領域を増幅するプライマーを用いたPCRで増幅が認められず、Elek法でも陰性であった。検出菌株数の時系列推移を図1に示した。*C. ulcerans* 検出陽性例は4月4日から6月3日、7月15日から25日、9月16日から10月7日にかけての3期間に集中して認められた。

分離された*C. ulcerans* 41菌株の培養結果、性状および解析結果をまとめて表2に示した。培養検査においてK培地では41菌株すべてを分離できたが、血液寒天培地で分離できたのは3株のみであった。apiプロファイルはすべて一致。PFGEでも4月から9月15日までの分離株はすべて100%一致した。毒素遺伝子も4月から10月の分離株はすべて一致し、この型をtox0804型とした。11月の分離株はtox0804型とは異なり、2007年8月分離株と一致するtox0708型であった。

(2)岡山県では行政が収容した14匹の犬(雄8頭、雌6頭)について検査した結果、菌分離およびPCRともに陰性であった。と畜場に搬入された健康牛20頭の外耳および肛門周囲のふき取り検体の試験では菌培養とPCR試験結果は陰性であった。なお、コリネ属菌としては、5株の*C. glucuronolyticum*、1株の*C. urealyticum* および1株の*C. argentoratense*が分離された。病畜牛として診断された関節炎(ダウナー症候群、周囲炎を含む)の10頭の関節液および3頭の乳房炎の乳房組織および3頭の乳汁の検査結果は、すべて陰性であった。

(3)宮城県では行政(7管内)が収容した55匹の犬と29匹の猫(それぞれ仙南管内は8と1、塩釜管内は16と9、大崎管内は5と5、登米管内は9と1、石巻管内は5と5、栗原管内は7と3、気仙沼管内は5と5)の咽頭拭い液について調査した結果、菌分離およびPCRいずれも陰性であった。と畜場の20頭の牛

(産地は白石市は5、北海道は15)および豚(産地は登米市35、栗原市25、大崎市20、加美町10、石巻市5、福島市5および不明3頭)についての結果は菌分離はすべて陰性であった。豚についてはPCRの結果が同一農場から出荷された豚から採取した検体について擬陽性と判定された

(4)群馬県ではと畜場の病畜牛(乳房炎、関節炎、皮膚炎)34頭について調査した。34頭のうち22頭から分離された84集落(DSS培地の高層部が青色を呈した集落)についてジフテリア毒素遺伝子を検出するPCR法を試みたが、すべて陰性であった。

D. 考 察

大阪府での調査:2007年8月に犬からの国内初のジフテリア毒素産生性*C. ulcerans*の分離を受けて、その検出状況の季節変動を調査するため1年間を通じて犬の保菌検査を実施した(調査開始2007年11月27日、調査終了2008年12月26日)。平成19年度の調査(2007年11月27日から2008年3月31日)では検査総数176頭であり、3月に採取した4検体よりジフテリア毒素産生性*C. ulcerans*を分離した。菌が分離された4頭の飼い主はすべて同一であり4菌株(0803グループ)はPFGEパターンが100%一致、毒素遺伝子の塩基配列も100%一致したことから、飼育集団内の菌の伝播が明らかとなった。本年度の調査においては検査総数399頭のうち40頭から*C. ulcerans*を検出したが、11月の1頭の検出事例を除いてその検出状況は3つのピークを示した。個別のピークを詳細に検討すると、大阪府の収容する犬は府下全域(大阪市、堺市、東大阪市を除く)から集まっており、菌が検出された犬は特定の地域由来ではなかった。さらにPFGEパターンが一致、毒素遺伝子の塩基配列が一致することから、それぞれのピークは収容所内での感染が連続的に起こったことが原因ではないかと疑われた。また*C. ulcerans*が検出された犬はすべて外観上異常を認めなかった。犬の感染につ

いては口腔潰瘍の部位での *C. ulcerans* の増殖、飼い主への感染といった報告があるが、本事例では犬の犬歯が口腔を傷つけその部分で *C. ulcerans* が増殖している。これを創傷部への日和見感染として考えると、今回調査した犬では他の感染症例もほとんどないことから *C. ulcerans* の犬への病原性は非常に低いと考えられる。従って、密集した状況下で管理されている犬では無症状のうちに容易に犬から犬へと *C. ulcerans* が伝播されることが明らかとなった。

菌の検出時期は3月から11月であり、12月から2月の冬季には分離されなかった。分離されない時期が存在することは犬が *C. ulcerans* を恒常的に保有しているのではないことを示す。自然界では犬以外の動物間で *C. ulcerans* が維持されていることも考えられ、動物の野外での活動が活発になる時期、犬への伝播が起こることも考えられる。

分離菌の PFGE 解析では4月から9月15日までの分離株34株(0804グループ)はすべて100%一致した。犬から分離した菌では2007年7月の分離株(0708)は大分県で人から分離された菌株(0510)と100%一致していた。人の分離株との関連性を明らかにするため3月の犬由来0803グループ株とともに解析を行った結果(図2)、本年度の犬由来0804グループ株は岡山県で人から分離された菌株(0609)と100%一致した。その結果、千葉県人由来株(0102および0210)、神奈川県人由来株(0607)、岡山県人由来株(0509)および犬由来0804グループ株はほぼ同一グループであると判定された。これに対して犬由来0803グループ株は千葉グループとは若干異なっている。データでは示していないが本グループは和歌山でシャチから分離された菌株と近いパターンである。大分県人由来株(0510)および犬由来0708株は千葉グループおよび犬由来0803グループ株とは異なるPFGEパターンを示し、明らかに別系統であることが判明した。以上から、わが国の現在までに分離された株は3系統の *C. ulcerans* が存在することを確認した。

分離された *C. ulcerans* の毒素の遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列を比較した結果(表3)、大阪の犬由来株は2007年7月および2008年11月分離の tox0708 型、2008年3月に分離された4株の tox0803 型、本年度の調査で4月から10月に分離された tox0804 型の3型に分類された。それぞれのアミノ酸は最大1.07%の相違しか認められなかったのに対して、*Corynebacterium diphtheriae* に対しては5%前後の相違が認められた。この様に *C. ulcerans* の毒素遺伝子は1つのクラスターを形成することから、*C. diphtheriae* の毒素遺伝子とは異なった独自の進化を遂げてきたことが推測される。また、ジフテリア毒素産生遺伝子はファージによって伝達されることが報告されているが、今回の結果は種を超えての伝達は起こっていないことが明らかとなった。犬由来 tox0708 型菌は大分県人由来菌(0510)と犬由来 tox0804 型菌は人由来菌(0102、0210、0509、0607)と毒素遺伝子が100%一致しており、系統樹解析では PFGE とほぼ一致した傾向を示した(図3)。

調査対象が限られており、分離菌株数も少なく、多型性の程度も不明ではあるが、PFGE および毒素遺伝子の解析結果で人分離株と犬分離株が一致した事実は人への感染に犬が介在する可能性を示すものである。

なお、限局して少数の猫、牛、豚についても同様に調査実施したが、現在のところ菌分離は確認していない。

E. 結論

- (1) 昨年度、国内で初めて大阪府の野外収容犬からジフテリア毒素原性 *C. ulcerans* を分離、同定した。
- (2) 大阪府の追跡調査では、菌は調査地域内において継続的に複数の場所から収集した外見上は異常は認められなかったイヌから分離された。
- (3) 菌の分離時期は冬場は検出されず、3-7月が中心であった。
- (4) 分離した菌は分子生物学的、遺伝学的解析

で3グループに分類された。

(5) 解析結果と収容所内での管理状況調査により、イヌからイヌへの伝播は容易であることが明らかとなった。

(6) 過去にジフテリア様症状の人から分離された株の比較では、相同性において類似性も確認された。

(7) 3県で実施した畜産動物(牛:700頭、豚:100頭)の調査では、本菌は検出していない。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Seto Y, Komiya T, Iwaki M, Kohda T, Mukamoto M, Takahashi M, and Kozaki S.: Properties of coryneophage 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) 勝川千尋、河原隆二、井上 清、石井篤嗣、山岸寛明、木田一裕、西野俊治、長浜伸也、小宮貴子、岩城正昭、高橋本邦で初めてイヌから分離されたジフテリア

ア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* 病原微生物検出情報 29.2.2008

2. 学会発表

- (1) 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
- (2) 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).
- (3) 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

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

表1. 本年度のコリネバクテリウム属菌の分布調査実施状況

都道府県	対象動物	材料採取部位	調査数	陽性数		調査期間
				試験法	菌分離 PCR	
大阪府	犬:愛護センター	咽頭拭い液	399	40*1	—*2	20年4月～20年12月
	犬:愛護センター	咽頭拭い液	14	0	0	
岡山県	牛:と畜場 健康	外耳、肛門拭い液	20	0	0	20年7月～10月
	牛:と畜場 病畜	患部拭い液	16	0	0	
宮城県	犬:愛護センター	咽頭拭い液	55	0	0	20年7月～11月
	猫:愛護センター	咽頭拭い液	29	0	0	
	牛:と畜場	咽頭拭い液	20	0	0	
	豚:と畜場	咽頭拭い液	103	0	7 擬陽	
群馬県	牛:と畜場 病畜	患部拭い液	34	0	0	20年7月～11月

*1:毒素産生菌は37匹、毒素非産生菌は2匹、産生・非産生の両菌が1匹

*2:実施せず

表2. 分離された *C. ulcerans* 41 菌株の培養結果、性状および解析結果

採材日	イヌ個体番号	分離培地		api Coryne	toxPCR	Elek	PFGE	dit遺伝子			
		BA	K培地								
1	4/4	2008	-	129	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
2	4/11	2008	-	138	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
3	4/15	2008	-	139	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
4	4/15	2008	-	142	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
5	4/15	2008	-	145	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
6	4/15	2008	-	146	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
7	4/22	2008	-	148	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
8	4/22	2008	-	152	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
9	4/22	2008	-	154	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
10	5/2	2008	-	165	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
11	5/2	2008	-	168	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
12	5/2	2008	-	170	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
13	5/9	2008	-	171	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
14	5/9	2008	-	172	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
15	5/9	2008	-	175	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
16	5/13	2008	-	176	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
17	5/13	2008	-	177	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
18	5/13	2008	-	178	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
19	5/13	2008	-	179	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
20	5/13	2008	-	180	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
21	5/13	2008	-	181	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
22	5/13	2008	-	182	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
23	5/13	2008	-	183	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
24	5/20	2008	-	190	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
25	6/3	2008	-	219	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
26	6/3	2008	-	221	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
27	6/3	2008	-	224	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
28	7/15	2008	-	274	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
29	7/18	2008	-	277	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
30	7/22	2008	-	278	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
31	7/25	2008	-	280	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
32	7/25	2008	-	283	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
33	7/25	2008	-	285	—	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
34	9/16	2008	-	347	○	○	0111326	○	○	Okayama0607	0804
35	9/26	2008	-	358	—	○	0111326	—	—	未実施	0804
36	9/26	2008	-	358	—	○	0111326	—	—	未実施	—
37	9/26	2008	-	359	—	○	0111326	—	—	未実施	—
38	9/26	2008	-	360	—	○	0111326	—	—	未実施	—
39	9/26	2008	-	361	○	○	0111326	○	○	未実施	0804
40	10/7	2008	-	381	—	○	0111326	○	○	未実施	0804
41	11/25	2008	-	471	○	○	0111326	○	○	未実施	0708

表3. 分離した *C. ulcerans* の毒素の遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列の比較

	<i>C. ulcerans</i>			<i>C. diphtheriae</i>
	0708	0803	0804	NCTC13129
0708		98.93	99.11	94.82
0803	98.51		99.82	94.82
0804	98.57	99.70		95.00
NCTC13129	95.13	95.19	95.25	

イタリック: アミノ酸の相同性
ローマン: 塩基の相同性