

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が示唆された。

## 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

Jaccard (Opt:1.50%) (Tot:1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%)[0.0%-100.0%]  
8 bit

8 bit

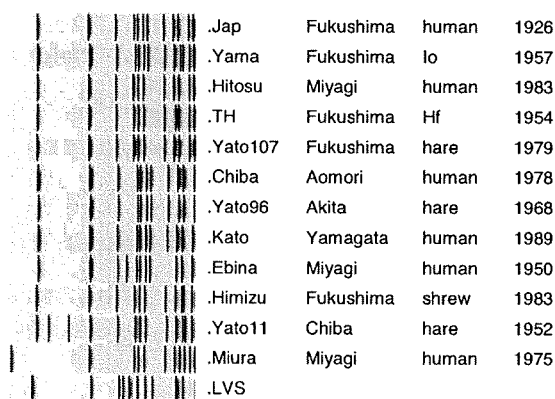
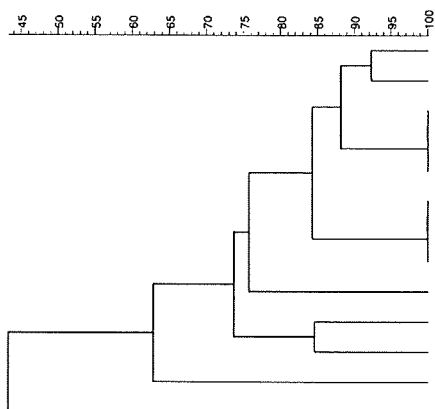


図. *Bam*HI 処理した野兎病菌についてのデンドログラム

## 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分非働化処理し、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  $12CD_{50}/well$ ）をもう一方の被験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、被験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, Hebdomadis (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), Hebdomadis 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 Hebdomadis 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

個体が認められた。特に、宮崎県および熊本県の九州地方で多くみられた ( $P < 0.05$ )。さらに、追跡調査を行った宮崎県、熊本県のうち、宮崎県で高いジフテリア抗毒素価が得られた犬と同居の犬から毒素産生性 *C.ulcerans* が分離された。宮崎県での犬からの毒素産生性 *C.ulcerans* の分離は初であり、本州に限らず九州においても存在することが明らかとなった。毒素産生性 *C.ulcerans* が分離された犬は初回のジフテリア抗毒素価は陰性を示した。この犬についての再検査は行っていないため、毒素産生性 *C.ulcerans* が分離されたこととジフテリア抗毒素価の関係性については不明である。しかし、この犬の同居犬のうちの 1 頭は、初回、再検査時いずれも高いジフテリア抗毒素価を示し、さらに再検査時の方が初回に比べ約 3 倍高い値を示した。このことから毒素産生性 *C.ulcerans* 分離時もこの犬が *C.ulcerans* の感染を示していた可能性がある。

### 3) ライム病

今回、岐阜県で 2 例、富山県、および高知県で各 1 例ずつ、三重県で 3 例、宮崎県で 8 例、熊本県で 7 例抗体価の上昇がみられた。西日本地域においても抗体価陽性例が認められたことから、東日本地域のみでなく西日本においても *B.burgdorferi* が広く分布する可能性が示唆された。三重県の陽性例 1 例がてんかん様症状を示した点について、*B.burgdorferi* 感染犬で神経症状が報告されていることから、*B.burgdorferi* 感染の関与の可能性もある。さらに症例数を増やし、猟犬を含めた犬の ELISA を用いた *B.burgdorferi* 抗体調査のデータを集積す

ることは、人のライム病の疫学を研究するうえで有用である。

### 4) レプトスピラ症

今回、猟犬においてレプトスピラの ELISA によるスクリーニング実施後、5 種類の血清型について MAT を実施した。広島県、宮崎県、熊本県の西日本地域において陽性を示す犬が認められた。IWAMOTO らが行った ELISA および MAT を用いたレプトスピラ抗体の全国的な調査では、今回陽性犬が見られなかった岐阜県、三重県、富山県、滋賀県、香川県においても陽性を示す犬が検出されている。今回は検索数が少なかったことが反映しているのかもしれない。広島県の陽性例 3 例および熊本県の 3 例は同じ猟師宅の猟犬であった。さらに、広島県の 3 例中 2 例および熊本県の 3 例すべては、MAT においてそれぞれ同じ血清型が陽性となった。この理由として、感染した個体から尿を介して他の個体へ伝播した可能性、あるいは猟犬の行動範囲において、その感染症の感染リスクが高い可能性が推察される。レプトスピラ抗体保有率を血清型ごとに見ると、広島県、宮崎県、熊本県のいずれも *Hebdomadis* に対する抗体陽性率が最も高く、その他は *Australis* と *Autumnalis* が 1 例ずつ認められるのみであった。IWAMOTO らは *Hebdomadis*, *Australis*, *Autumnalis* に対して陽性を示す犬は主に西日本に分布すると述べている。また、宮崎県の動物病院でレプトスピラ症と診断を受けた 6 例中 4 例が *Hebdomadis* に対する抗体が陽性であった。さらに、2006 年 8 月～9 月にかけて発生したレプトスピラ患者 8 人のうち、



MAT により *Hebdomadis* が 5 例、*Autumnalis*, *Australis*, *Poi* が各 1 例であり、この地域の野鼠からは *Hebdomadis* と *Autumnalis* のレプトスピラが分離されている。これらの事例と今回の調査で *Hebdomadis* に対する抗体陽性率が最も高かったこととは一致し、西日本において *Hebdomadis* 型のレプトスピラが多く分布していることが推測される。

ワクチンの接種歴について、2 例は 8 種混合ワクチン、1 例は 7 種混合ワクチン、2 例は何種のものか不明であるが混合ワクチン接種歴があり、残りの 7 例はワクチン接種を行っていなかった。日本での犬レプトスピラ不活化ワクチンに含まれている血清型は、*Interohaemorrhagiae*, *Canicola* の 2 種混合あるいは、*Hebdomadis* を含めた 3 種混合である。7 種混合ワクチンについては、おそらく 2 種類の血清型のレプトスピラが含まれていると推測される。しかし、8 種混合ワクチンについては 2 種混合あるいは 3 種混合なのか詳細は不明である。ワクチン接種により MAT においてその血清型の抗体価が、ワクチン未接種の犬に比べて高くなる可能性がある。しかし、今回、2 種と 3 種混合ワクチンのどちらにも含まれる *Interohaemorrhagiae* や *Canicola* に対する抗体価の上昇は検出されなかった。また、*Hebdomadis* に対する抗体価上昇の認められた犬の中にはワクチン未接種の犬が多く含まれる点からも、*Hebdomadis* 型のレプトスピラが西日本に多く分布している可能性が示唆される。このため、猟犬を含め、この地域において行動範囲の広い犬に対しては、*Hebdomadis* を含めた 3 種

のレプトスピラ血清型に対するワクチンを接種することが推奨される。猟犬でのレプトスピラ感染が疑われることより、同じ山に入りレプトスピラ保菌が知られているイノシシやシカを狩猟するハンターや、これらの動物の肉を食べる人々、猟犬と接触する人々はレプトスピラ感染のリスクが高くなるかもしれない。そのため、人でのレプトスピラ感染を防ぐためには、犬をはじめとする愛玩動物や野鼠、イノシシ、シカなどの野生動物のさらなるレプトスピラ感染調査を行うとともに、これらの動物と接触する機会のある人々に対する啓蒙を行う必要がある。

#### 5) ヘパトゾーン症

犬のヘパトゾーン症は、アピコンプレックス門のヘパトゾーン属原虫に感染したマダニを媒介して起こる疾患である。犬は *Hepatozoon canis* と *H.americanum* の両方に感染することが知られているが、日本で確認されているのは前者の方である。

日本において、犬のヘパトゾーン症は、山口県、福岡県、宮崎県、鹿児島県の西日本地域を中心に報告されてきた。今回の調査でも、宮崎県や熊本県の九州地方で *H.canis* 感染犬が多く認められ ( $P < 0.05$ )、広島県や三重県では 1 頭ずつみられた。岐阜県、富山県の中中部地方や滋賀県では、今回の調査から *H.canis* 感染犬は認められなかった。宮崎県では、採血を行った猟師宅の 5 軒中 3 軒 (60%) で *H.canis* 感染犬がみつきり、熊本県では 6 軒中 4 軒 (66.7%) であり、いずれも高率に感染犬が認められた。これらのことから、今回調査を行った宮崎県、熊本県の山間部には *H.canis* が蔓延している可能性がある。宮

崎県, 熊本県で *H.canis* 感染犬が見つかった猟師宅 7 軒中 4 軒 (57.1%) では, 同一家庭内で 3 例あるいは 4 例もの犬から *H.canis* が検出された。このことは, *H.canis* に感染したマダニの伝播が同一軒内の個体間で起きていた可能性, または, 個体同士で体を舐める時に, *H.canis* に感染したマダニを経口摂取した可能性が考えられる。

#### 6) 総合的考察

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猟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。このことから猟犬は野外に由来する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される。

#### E. 結論

1) 西日本を中心とした各県の猟犬につき, レプトスピラ症, ライム病, リケッチア症, ジフテリア症およびヘパトゾーン症についての抗体調査を実施したところ, それぞれの感染症に対する陽性個体がしばしば

検出された。

2) 各感染症とも九州地方に陽性個体が多い傾向がみられ, 同居犬同士で同じ検査で陽性を示す例もしばしば認められたことから, ① 感染個体から同居犬への水平感染の可能性(レプトスピラ, ヘパトゾーン), ② 行動範囲において感染リスクが高い可能性(ライム病ボレリア, リケッチア)が推測された。

3) 以上のことからヒトでの感染リスクを予想するうえで, 猟犬がこれらの感染症の疫学情報の収集に有用と思われる。

#### 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 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新登録 なし
3. その他 なし

Fig. 1 研究の背景, 目的

- ・ 猟犬は狩猟のパートナーとして  
野生鳥獣の捕獲に貢献
- ・ ダニ媒介性の感染症、野生動物  
由来感染症のリスクが高い可能性
- ・ 保有状況、地理的分布、  
人への伝播の可能性の推測



本研究では、  
リケッチア症(ツツガムシ病、日本紅斑熱)、ジフテリア症、  
レプトスピラ症、ライム病、犬のヘパトゾーン症を調査

Fig.2 材料および方法

● 材料

猟犬計155頭から採血した血液  
- 血液塗抹標本、血漿

● 方法

- ・ レプトスピラ ELISA、顕微鏡下凝集  
試験
- ・ ライム病ボレリア ELISA
- ・ リケッチア 間接蛍光抗体法
- ・ ジフテリア 培養細胞法による  
抗毒素価の測定
- ・ ヘパトゾーン 血液塗抹標本の観察、  
PCR、DNAシーケンス

地域	頭数
岐阜	17頭
三重	19頭
富山	9頭
滋賀	5頭
広島	47頭
香川	8頭
高知	10頭
宮崎	20頭
熊本	20頭

Fig. 3 *R. Japonica* 検査結果

陽性数(5)	
岐 阜	0
三 重	0
富 山	0
滋 賀	0
広 島	1
香 川	0
高 知	1
宮 崎	1
熊 本	2

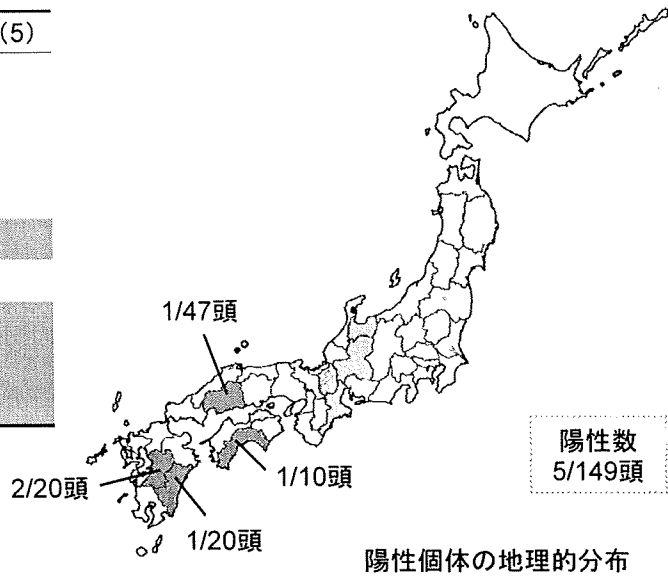
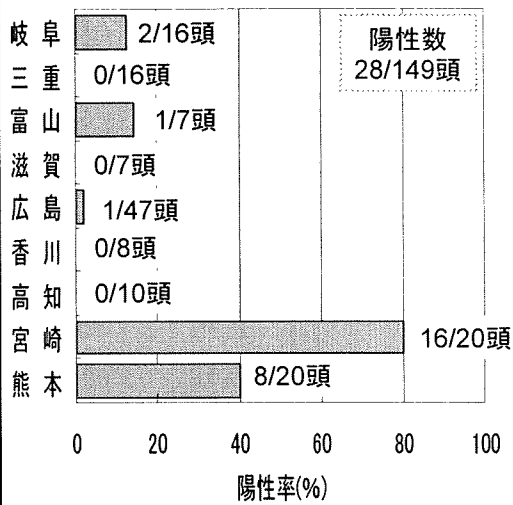
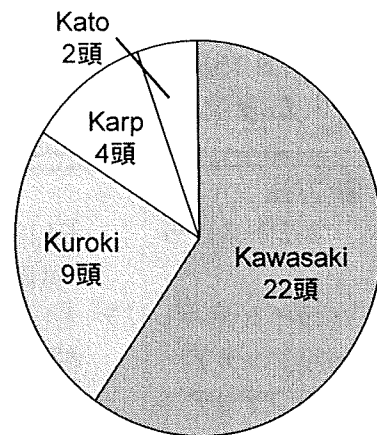


Fig.4 *O. tsutsugamushi* 検査結果

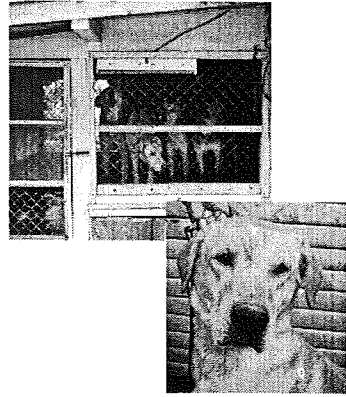
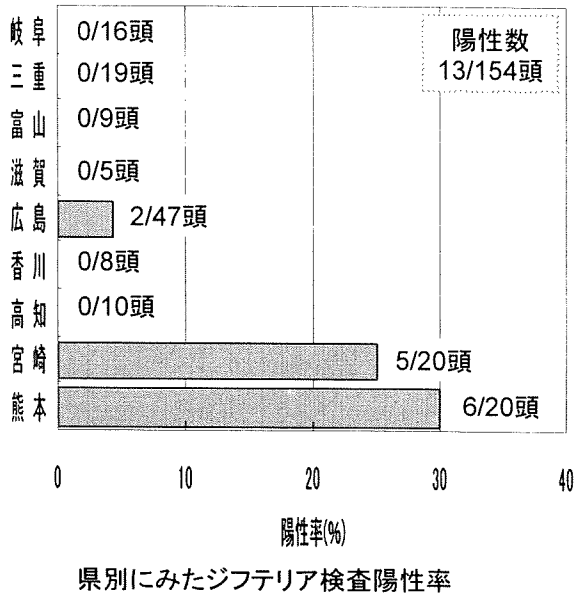


県別にみたツツガムシ病検査陽性率



陽性個体中の血清型別分布

Fig.5 ジフテリア検査結果



宮崎県の陽性個体の同居犬から毒素産生性 *C.ulcerans* 分離

Fig.6 ボレリア検査結果

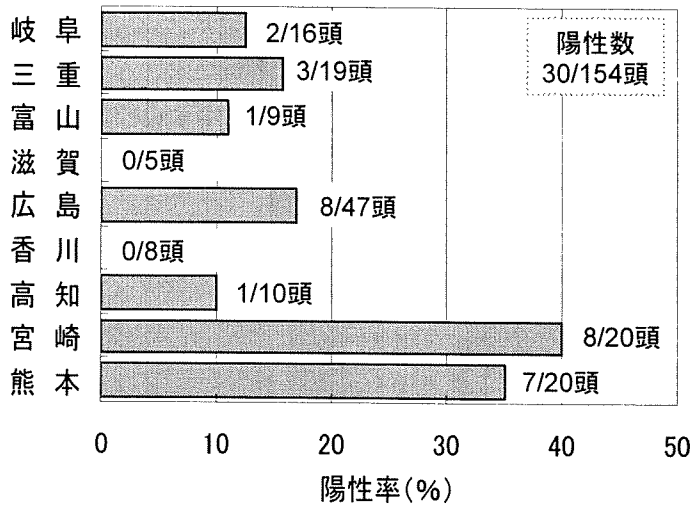


Fig.7 レプトスピラ検査結果

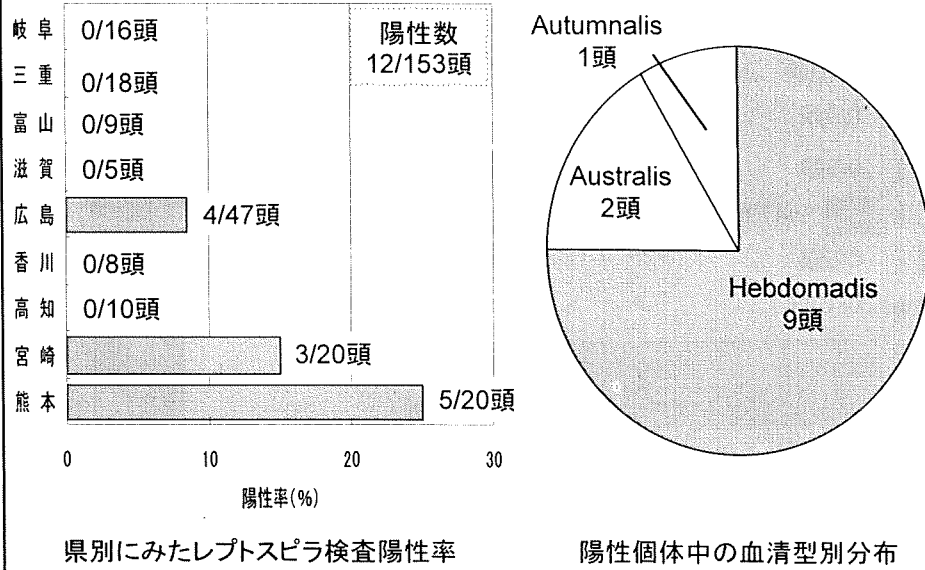
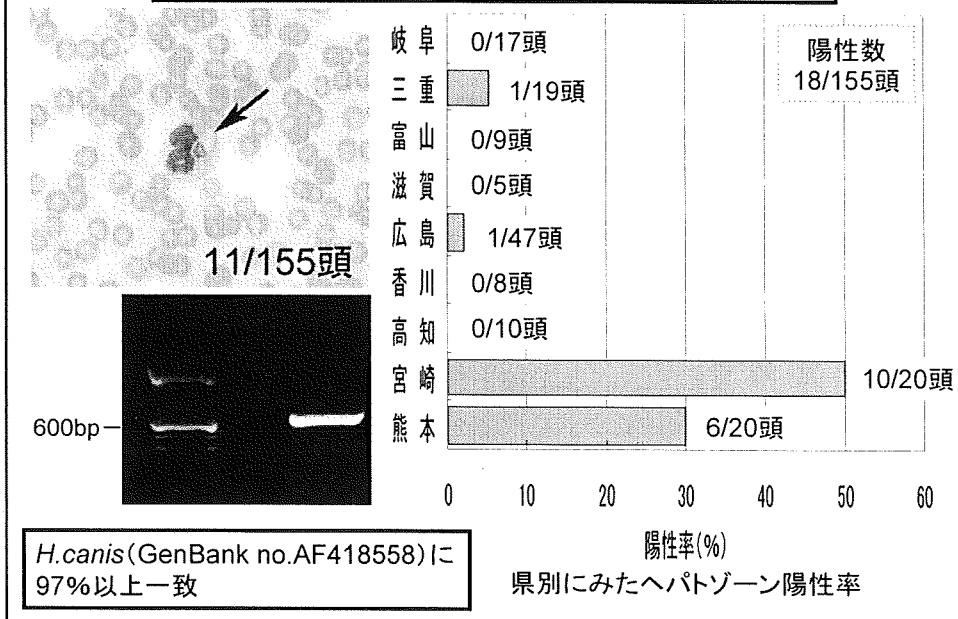


Fig.8 犬のヘパトゾーン検査結果



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（分担））研究報告書

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

分担研究者：井上 智	国立感染症研究所獣医科学部、室長
協力研究者：佐藤 克	国立感染症研究所獣医科学部、客員研究員
	佐藤獣医科病院、院長（狂犬病臨床研究会、会長）
	さいたま市動物愛護ふれあいセンター、愛護指導係
	株式会社モルフォバイオイメージング研究所
	株式会社モルフォバイオイメージング研究所
	日本獣医生命科学大学獣医放射線学教室、教授
	日本獣医生命科学大学獣医放射線学教室、助教
	ネオ・ベッツ VR センター、院長
	ネオ・ベッツ VR センター、獣医師
	兵庫県動物愛護センター、所長
	兵庫県健康生活部生活衛生課動物衛生係、主任
	兵庫県動物愛護センター動物管理事務所、課長補佐
	兵庫県動物愛護センター三木支所、主査
	徳島県保健福祉部生活衛生課、技術課長補佐
	徳島県動物愛護管理センター、技師
	岩手県北上保健所、食品薬務グループ、獣医師
	滋賀県健康福祉部生活衛生課・食の安全推進室
	東京都動物愛護相談センター城南島出張所、係長
	鳥取県衛生環境研究所、特別研究員
	鳥取県生活環境部公園自然課、衛生技師
	宮崎県衛生管理課、乳肉衛生担当
	宮崎県都城保健所衛生環境課、主査
	千葉県衛生研究所、主席研究員
	千葉県動物愛護センター、保護指導課
	鳥取県衛生環境研究所、特別研究員
	鳥取県生活環境部公園自然課、衛生技師
	鳥取県西部総合事務所生活環境局、係長
	島根県保健環境科学研究所、研究員
	島根県健康福祉部、食品衛生グループ
	北里大学獣医畜産学部獣医病理学教室
	国立感染症研究所ウイルス一部、室長
	国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官
	国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官
	国立感染症研究所獣医科学部、研究官

研究要旨：狂犬病は現在国内で発生していないが海外からの侵入が憂慮される動物由来感染症であることから国内に侵入した感染動物を早期に察知するためには診断技術向上に有効な実習用モデル・教育訓練教材等が必要不可欠である。平成 16 年（2005 年）度に行われた「我が国における狂犬病予防対策の有効性評価に関する研究（厚生労働科学特別研究事業）」では、狂犬病が疑われたイヌ等の病原体診断に必要な頭部の解剖法の普及・啓発が自治体における狂犬病対策の大きな課題と指摘された。そこで、本研究では自治体・大学・獣医臨床などの専門家による研究協力を得て狂犬病の診断技術向上のために必要な解剖手技習得モデルを開発した。今年度、技術研修を試行して自治体の公衆衛生領域への普及・啓発法、厚生労働行政における有効性について調査研究を行い、今回開発したモデルと教材を活用した自治体の現場での狂犬病啓発と技術研修等への波及効果が今後期待された。

## A. 研究目的

狂犬病は現在国内で発生していないが海外からの侵入が憂慮される動物由来感染症である。国内でイヌ等の動物が狂犬病を発症したと疑われた場合には自治体において当該動物の頭部を解剖して検査に必要な脳組織を摘出しなければならない。したがって、狂犬病の発症が疑われた動物について実験室内で病原体検査を行うためには脳組織検体の採材を可能にする頭部を解剖するなどの手技向上と技術伝達に必要な実習用モデル・教育訓練教材等が必要不可欠である。

本研究は、狂犬病の診断技術向上のために必要な解剖手技習得モデルと研修教材を開発して自治体の公衆衛生領域への普及・啓発法と厚生労働行政における有効性について調査研究することが目的である。

## B. 研究方法

狂犬病の診断技術向上のための解剖手技習得モデル・教材の開発にあたり、初年度（平成 19 年）と次年度（平成 20 年）は研修に使用する教材と解剖手技取得モデルのプロトタイプを製作した。今年度（平成 21 年）は量産型の解剖手技モデルを複数製作して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と研修教材の活用による自治体公衆衛生領域への普及・啓発法の開発と厚生労働行政における有効性について調査研究することとした。

- (1) 準量産型の解剖手技習得モデルの開発・改良・製作
- (2) 解剖手技習得モデル造形法の改良によるコスト削減
- (3) 解剖手技習得モデルの普及・啓発に関する調査

- (4) 解剖手技モデルを利用した技術研修の試行

## C. 研究結果

### (1) 準量産型の解剖手技モデルの開発・製作

平成 21 年（2009）9 月に量産型の解剖手技モデルに関する最終打ち合わせを行って仕様書を作成した（資料 1）。

前年度までは、解剖手技モデルを 3 体（解剖手技模型、骨切断模型、脳模型）予定していたが研修・実技の簡素化、製作コスト、現場での管理を考慮して、「解剖手技模型」と「骨切断模型」を融合して一体化した「解剖手技モデル」を作製することとした。これに「脳模型」を加えて「モデル一式（セット）」とした。

### (2) 解剖手技モデル造形法の改良によるコスト削減

量産型の解剖手技モデルの仕様を決めるにあたり自治体の研究協力者と意見交換を行ってきたが、今年度は広く関係各位からの情報を入手するために国・自治体等で毎年開催されている狂犬病の啓発研修会等で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と研修教材の普及・開発」について手技を含めて紹介（時に実演）しながら「解剖手技モデル」の活用法と改良等について現場の現状と担当者の意識調査を行った。

自治体の研修会等において「解剖手技モデル」の概要等の紹介・情報交換を行ってモデルへの高い関心が示されたが、今年度 9 月に量産型とした「モデル一式（セット）」の単価については購入価格が高く現行の自治体予算では入手が困難でないかとの意見を得た。



そこで、解剖手技習得モデルの造形法について改良を加えてコスト削減を検討した。「資料2」に改良前の「真空注型法」と改良後の「粉体造形法」についてその特性・製作方法・コスト等について比較した。

改良前の「真空注型法」は仕上がり・強度・耐久性において優れているが、改良後の「粉体造形」については製作にかかるコスト・時間が安価・簡便である。

自治体等での購入に際して製作コストを考慮すると改良後の「解剖手技取得モデル（粉体造形）」が推奨されるが、コスト削減等については自治体からの需要によって増減することが予想されるため、コスト削減等の方法については引き続き製作側と購入側による調整・検討等の打ち合わせが必要と考えられた。

補) 平成21年度に参加した研修会等

8月6日：狂犬病予防及び動物愛護関係協議会合同会議。九州地区獣医師会連合会。福岡県。

9月18日：宮崎県獣医師会公衆衛生講習会。宮崎県獣医師会・宮崎県総合保健センター。宮崎県。

11月6日：平成21年度 動物由来感染症対策（狂犬病を含む）技術研修会。厚生労働省健康局結核感染症課。東京都。

11月11日：外国犬不法上陸防止対策連絡会議。北海道根室保健福祉事務所。北海道。

11月13日：平成21年度 獣医職研修（初級）。東京都福祉保健局健康安全部。東京都。

12月3日：狂犬病講演会。福井県獣医師会。福井県。

### (3) 解剖手技習得モデルの普及・啓発に関する調査

平成21年度に参加した研修会等において自治体の担当者から「解剖手技モデル」の普及と啓発およびその活用法

に関する情報収集を行った。また、平成21年度動物由来感染症対策（狂犬病を含む）技術研修会（厚生労働省健康局結核感染症課）の前日に自治体担当者として「解剖手技習得モデル」の実践的な使用方法等についての意見交換を行った（平成21年（2009）11月5日、参加自治体：さいたま市、東京都、兵庫県、徳島県、宮崎県、滋賀県、鳥取県）。

上記、意見交換では事前に配布した「解剖手技習得モデルセット：取り扱い説明書（資料3）」に従って「解剖手技モデルセット一式」を利用した実技を行って各自治体での活用における課題点等について意見を集約した。現時点ではモデルを利用した解剖実技習得に課題点は見られなかったが現場での実践的な運用経験については引き続き知見を集める必要があると考えられた。

### (4) 解剖手技習得モデルを利用した技術研修の試行

前記、技術研修会前日の意見交換で議題に上がった現場での実践的な運用については、各自治体での技術研修を可能にするために研究班で製作した「解剖手技モデルセット」を全国動物管理関係事業所協議会（全動協）の6ブロック（北海道・東北、関東甲信越静、中部、近畿、中国・四国、九州）に配布した（資料4）。配布と同時に解剖手技習得に必要な「頭骨切断パーツ」の購入希望調査を行ったところ全国の自治体から189個（も）の製作依頼がモルフォバイオイメージング研究所に届いた。自治体における解剖手技習得モデルに対する「ニーズ」と「評価」が高いと判断された。

今回、平成22年2月26日に開催される「平成21年度狂犬病予防業務担当者会議（厚生労働省結核感染症課）」で「頭部解剖モデルの実技演習（準量産型解

剖手技モデル（犬解剖手技・骨切断モデル）の活用について）」を行う（資料5）。また担当者会議の前日に、現場での実際的な運用経験について知見等を集めるため解剖手技モデルを利用した技術講習への参加を希望した14自治体（前記全動協6ブロック：青森県；新潟県、茨城県、東京都、横須賀市、船橋市、栃木県、さいたま市、長野県；愛知県；奈良県；山口県、香川県；鹿児島県）の現場担当者と共に実技演習と調査アンケート等を行う（資料6）。

上記の技術研修では、各自治体で独自に研修を行うことを想定して作製した実技伝達を容易にするDVD教材を配布する。製作DVD「狂犬病検査に必要な解剖方法（安全で簡便な脳の取り出し方の1例）」の仕様書を「資料7」として本報告書に添付した。

#### D. 結論

平成18年（2006）11月に、ヒトの輸入狂犬病が京都と横浜で続けて2例発生した。発生が希少ではあるが病態が重篤で社会不安を引き起こしやすい狂犬病では「侵入リスクの低減」のみでなく「発生に備えた対策」の重要性が明らかにされた。また、これに先立って平成16年（2005年）度に行われた「我が国における狂犬病予防対策の有効性評価に関する研究（厚生労働科学特別研究事業）」では狂犬病が疑われたイヌ等の病原体診断に必要な頭部の解剖法の普及・啓発が自治体における狂犬病対策の大きな課題と指摘された。

本研究では、自治体・大学・獣医臨床などの専門家による研究協力を得て現在国内で発生してはいないが海外からの侵入が憂慮される狂犬病（動物由来感染症）について我が国に狂犬病が侵入した場合に感染動物の早期察知に必要な診断技術の向上に有効である解剖手技習得モデル（実習用）・教育訓練教材等の開発を行った。今年度は、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て自治体の公衆衛生領域に必要とされる狂犬病に関する科学知見と危機管理に必要な手技・実技について普及・啓発を行う方法、厚生労働行政におけるその有効性について調査研究を行った。

結果、開発した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波及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. 研究発表

##### 誌上発表

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

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

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

Inoue S., Boldbaatar B., Sugiura N., Noguchi A., and Park C. H. 2009. Rabies. In: Animal Viruses (Maeda A., ed.), RESEARCH SIGNPOST. (in press).

## 学会発表等

井上 智。狂犬病の予防(発生を想定した取り組み)。狂犬病予防及び動物愛護関係協議会合同会議。九州地区獣医師会連合会。ホテル日航福岡。2009年、8月6日、福岡市、福岡県

井上 智。狂犬病の発生を想定した取り組みについて。宮崎県獣医師会公衆衛生講習会。宮崎県獣医師会。宮崎県総合保健センター。2009年、9月18日、宮崎市、宮崎県

井上 智。人獣共通感染症について知る：社会人として知っておいて欲しいズーノシス。早稲田大学、規範科学総合研究所、レギュラトリーサイエンス教育講座(WT221シラバス(09後期))。2009年、10月29日、早稲田大学、東京都

井上 智。平成19年に徳島県で開催された狂犬病の国内発生を想定した実地訓練から学ぶ(有事の際に必要な行政対応における課題点とマニュアル整備等の意義)。平成21年度動物由来感染症対策(狂犬病を含む)技術研修会。厚生労働省健康局結核感染症課。2009年、11月6日、文京シビックホール(小ホール)、東京都

井上 智。狂犬病への取り組み(発生を想定した対応策)。外国犬不法上陸防止対策連絡会議。北海道根室保健福祉事務所。2009年、11月11日、根室市、北海道

井上 智。狂犬病への取り組み(発生を想定した対応について)。平成21年度獣医職研修(初級)。東京都福祉保健局健康安全部。2009年、11月13日、東京都都庁第一庁舎研修室、東京都

井上 智。海外における狂犬病の現状と課題について(狂犬病への取り組み-発生を想定した対応について)。狂犬病講演会。福井県獣医師会。2009年、12月3日、福井県職員会館、福井市、福井県

井上 智。人獣共通感染症-社会人として知っておい

て欲しいズーノシス。公衆衛生学 III。2009年、12月17日、東京農工大学、東京都

Inoue S. Research for rabies prevention in Japan. RITM-TOHOKU research collaboration workshop: working towards rabies control in the Philippines. RITM training center, Alabang, Muntinlupa city, the Philippines. April 29-30, 2009.

Inoue, S. Rabies. Core Curriculum for Zoonosis Control 2009. Global COE (Center of Excellence) Program "Establishment of International Collaboration Centers for Zoonosis Control", Global COE program Hokkaido University, Hokkaido, 31 August, 2009.

Inoue, S. Rabies in Japan. Country report. ASEAN plus three workshop on strengthening national rabies programmes. 7-8 September 2009, Hanoi, Vietnam.

Inoue, S. Rabies in Japan. Rabies in North-Eastern Asia countries. The second rabies in Asia conference (RIACON 2009). 9-11 September 2009, Hanoi, Vietnam.

## F. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 準量産型解剖手技モデル仕様書

2009年9月3日打ち合わせより

国立感染症研究所獣医科学部第二室  
株式会社モルフォバイオイメージング研究所

### モデル作製の概略

1. 前年度(平成20年)に作製した2種類のプロトタイプ(解剖手技模型、骨切断模型)を融合して一つの模型(以後「解剖手技モデル」と呼称)とし、別に脳模型を加えたものを1セットとする。
2. 解剖手技モデルのマスターモデルは3次元データによってモデリングを行い、光造形によって作製する。
3. 上記マスターモデルを注型によって複製し、全8セットを製作する。
4. 解剖手技モデルは、部位により、エポキシ樹脂もしくはウレタン樹脂によって成形する。
5. 解剖手技モデルの塗装は、コストを抑えるためプロトタイプに比べより簡便なものとする。
6. 換装パーツ、ダミー脳パーツなど、1セットに対して複数を製作する部品については、別紙一覧を参照のこと。
7. 脳模型は、光造形もしくはABS造形によって8セットを製作するが、どちらの方法を取るかは今後の打ち合わせによって決定する。
8. 脳模型の置き台などは、前年度モデルをマスターモデルとして注型で複製する。