

ができた。一方、PCR 法では肝臓 1g 中に 30 隻入れた場合にも回虫 DNA を検出する事ができなかった (表 2)。

また、幼虫 1 隻から効率よく DNA を抽出するための至適 NaOH の量を検討したところ、表 3 に示すように、LAMP 法を行った場合には、Falcon tube に 10mL の NaOH 添加でも虫体 DNA が感出された。PCR 法の感度は LAMP 法に較べ低かった。

さらに、ウシ肝臓 5 g に幼虫を添加し、人工胃液で消化後に DNA 抽出を行い、PCR 法と LAMP 法による幼虫 DNA 検出を行ったところ、LAMP 法では幼虫 1 隻から DNA を検出することが出来た (表 4)。

#### 5. 肝臓白斑症を有するウシ血清中のイヌ回虫幼虫排泄物抗体検査

屠畜検査時の肉眼検査において、肝臓白斑症と診断された 54 頭のウシから採取された血清について、ELISA 法により血清中のイヌ回虫幼虫排泄物抗原に対する抗体を測定した。54 頭の血清抗体分布は二峰性を示し、うち 9 頭は極めて高い吸光度を示した (図 4)。

#### 6. 国内医療機関から依頼のあったトキソカラ抗体検査結果

昨年度の報告書作成後、我々の研究室で実施したトキソカラ抗体検査依頼件数は延べ 53 検体であった。このうち、トキソカラ抗体が陽性と判定された症例は 12 検体であった。この中には脊髄腫瘍が疑われ、末梢血中の好酸球増多を呈した 2 例の患者が含まれていた。これら 2 症例は寒天ゲル内二重拡散法でも非常に強い沈降線を認めた (図 5)。

濾紙採血によって検体を採取して抗体検査を行った 9 検体については、いずれもトキソカラ抗体は陰性であった。

#### D. 考察

トキソカラ属虫卵に汚染された砂場の検査では、1 砂場からどの程度のサンプルを採取するかがしばしば問題になる。サンプリング数を多くすればするほど正しい汚染状況を把握することが出来るが、これまでの顕微鏡を用いて直接虫卵を確認する方法では検査に非常な労力と時間を要し、1 砂場当たり 3, 4 カ所から採取した砂を混ぜて検査をしたとしても、この方法でも 1 砂場を検査するには 3, 4 日の日数を必要としていた。

本年度の研究事業では砂場の虫卵汚染度を明らかにするために、2 カ所の砂場について虫卵の水平分布と垂直分布について調査した。その結果、砂場に分布する虫卵は表層から多く回収されることが明らかになり、砂のサンプリングには表層のみを対象に行えばよいことが判明した。また、虫卵の汚染をより短時間に、かつ正確に知る方法として、幼虫特異 DNA 検出手技を確立した。この新しい検査手法については現在アメリカ寄生虫学雑誌に投稿中である。

今回、砂場から回収された虫卵はそのほとんどが幼虫包蔵卵であった (図 6)。その為、これらの虫卵が感染力を保持しているか否かについてマウスを用いて検討したところ、砂場由来回虫卵を投与されたマウス 3 頭共に好酸球数の増加、血清抗体の上昇が確認され、感染力を持った虫卵が砂場に散布されていることが確認された。また、3 頭中 2 頭の大脳から幼虫が 3 隻回収された。昨年度に実施した PCR 検査では、砂場から見つかる虫卵の PCR 法による検査で、検査に供した虫卵はすべてネコ回虫卵であると報告した。しかし、砂場から回収された虫卵をすべて PCR 法で検査することは不可能であった。即ち、昨年度の研究で PCR 法に供した虫卵数は検出できた虫卵の約半数 (56%) で、さらにその内 DNA

を抽出し得たものは 37 %に過ぎず、検査されていない虫卵についてはその虫種は不明であった。

今年度の調査においては検出された虫卵をマウスに投与し、中枢神経系に移行した幼虫を対象に PCR 法を実施することによって、砂場を汚染する動物由来回虫にイヌ回虫卵が混入していないかを確認する方法を確立した。これは、従来から、ネコ回虫幼虫は非固有宿主体内では中枢神経系しづらいが、イヌ回虫幼虫は筋肉へ移行する幼虫数と同程度の割合で大脳に移行することが知られていることを利用している 1)。

今回、大脳に移行した 3 隻の幼虫を顕微鏡下に回収し、PCR 法を行ったところ、いずれの幼虫もイヌ回虫であることが確認できた。即ち、砂場を汚染しているトキソカラ属虫卵の多くはネコ回虫卵であるが、少数ながらイヌ回虫卵も含まれていることを証明することが出来た。これまでの多くの調査では、砂場から見つかる虫卵の大きさ、卵殻表面のピットホールの数などの形態の特徴からネコ回虫卵であるとされてきた。今回の報告で述べた手法を用いることによって、砂場におけるイヌ回虫卵の汚染状況を正確に把握することが可能であると考えられる。

トキソカラ症の感染源としては、砂場を汚染する虫卵だけではなく、待機宿主となるニワトリやウシの生肉、生肝の生食による感染経路も重要である 2, 3)。そこで、市販されているこれらの肝臓を調査するための基礎的検討を行った。PCR 法では肝臓に予め 30 隻のイヌ回虫幼虫を混入させておいても幼虫 DNA を検出することは出来なかったが、LAMP 法では肝臓 5 g あたり 1 隻の幼虫の混入でも確実に検出することが出来た。今後、肝臓白斑症と診断され、血清中のトキソカラ抗体が上昇していた個体を対象に、虫種特異的 DNA 検出を実施

していく予定である。

本研究期間において確立した、砂場からの幼虫 DNA 検出手技ならびに待機宿主肝臓からの幼虫 DNA 検出手技により、トキソカラ症の疫学情報がさらに蓄積されていくことが期待される。

#### E. 結論

3 年間にわたる研究において、濾紙採血検体によるトキソカラ抗体検査法を確立し、一般臨床家からの検査依頼に対応できるようになった。また、トキソカラ症の感染源である砂場の虫卵や待機宿主からの幼虫検出の新たな検査手技を確立することが出来た。

#### F. 健康危険情報

該当項目なし

#### G. 引用文献

- [1] 織田清. 移行性幼線虫症の研究, 特に猫蛔虫と犬蛔虫について. 京都府医大誌. 1976; 517-532.
- [2] 酒井健二, 岡島泰一郎, 大内和弘. 鶏肝の生食により発症したと考えられる内臓幼虫移行症の 1 例. 内科. 1983;51:963-7.
- [3] Yoshikawa M, Nishiofuku M, Moriya K, Ouji Y, Ishizaka S, Kasahara K, Mikasa K, Hirai T, Mizuno Y, Ogawa S, Maruyama H, Akao N. A familial case of visceral toxocariasis due to consumption of raw bovine liver. *Parasitology International*. 2008;57:525-9.

#### H. 発表論文

- [1] 赤尾信明. 肝イヌ回虫症. 日本臨牀. 2010; 印刷中.
- [2] 赤尾信明. creeping disease の原因となる寄生虫. 皮膚科診療カラーアトラス: 講談社; 2010. 印刷中
- [3] Katarina M, Kumagai T, Akao N, Ohta N.

Loop-mediated isothermal amplification assay for detection and discrimination of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs directly from sand samples. *Journal of Parasitology*. 2010; 投稿中.

[4] Ayi I, Akao N. Evaluation of a new anti-*Entamoeba histolytica* antibody detection kit - INSTANTTMCKEK-Amoeba. *Ghana Medical Journal*. 2010;投稿中.

[5] 赤尾信明. ヒトの犬・猫回虫症 犬や猫の回虫がヒトに感染するとどうなるか?. *Clinic Note*. 2009;52 (November):66-68.

[6] 赤尾信明. 小児のイヌ・ネコ回虫症 (トキシカラ症). *小児科臨床*. 2009;62(4):697-702.

[7] 赤尾信明. 原虫感染症の検査. 感染症専門医テキスト. 東京: 南江堂; 2010.印刷中

[8] 赤尾信明. 寄生虫感染症の検査. 感染症専門医テキスト. 東京: 南江堂; 2010.印刷中

[9] 赤尾信明. イヌ回虫症 (トキシカラ症). 岸本寿男, 山田章雄編. *ズーノーシスハン*

ドブック. 東京: メディカルサイエンス社; 2009. p. 83-85.

[10] 菅沼真澄, 七戸和博, 友田弥里, 鈴木晟幹, 赤尾信明, 太田伸生. 動物から感染するヒトの回虫症. *臨床福祉ジャーナル*. 2009;6(1):39-43.

[11] 大友弘士, 赤尾信明. 抗微生物薬の治療効果の判定 2.マラリア. *検査と技術*. 2009;37(10増刊号):977-982.

[12] Koizumi N, Muto M, Tanikawa T, Mizutani H, Somura Y, Hayashi E, Akao N, Hoshino M, Kawabata H, Watanabe H. Human leptospirosis cases and the prevalence of rats harbouring *Leptospira interrogans* in urban areas of Tokyo, Japan. *Journal of Medical Microbiology*. 2009;58:1227-1230.

I. 知的財産権の出願・登録状況  
該当項目なし

表 1 用いたプライマーの配列 (左が5' 末端, 右が3' 末端)

P C R	Tcan :	AGTATGATGGGCGCGCCAAT	
	Tcat :	GGAGAAGTAAGATCGTGGCACGCGT	
	NC2 :	TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT	
L A M P	イ ヌ 回 虫	B3 :	CTGGAGGCCGTATCGTGA
		F3 :	TGTGATTAACGCGCAAGGT
		BIP :	TCGCACAAGAAATGGCTGT
			CGTAGCAACGCAACATACTCA
		FIP :	CCTTGGCAAGGTACGCTGT
		ACATGTGGTGCATTCGGTGAG	
	ネ コ 回 虫	B3 :	GCGCATTCTTCTTCAAGCA
		F3 :	CCACGTACCTTGCCAAGAC
		BIP :	ACGATATGGCCTCCAGCAA
			GCCGATGACGTTACCTCCAACC
FIP :		GGAACACATACGCCAATGGC	
	CATGCACAAGAAATCGCTGTCTG		

表2 砂場から回収された虫卵の感染力

	脳(隻)	肝臓(隻)	心臓・肺(隻)	筋肉(隻)	検出総数(隻)	好酸球(%)
イヌ回虫卵感	12	3	0	23	38	12.0
染群	32	1	0	48	81	9.5
	22	0	1	33	56	14.5
砂場由来	2	0	0	72	74	4.0
虫卵感染群	0	0	0	76	76	9.0
	1	0	0	81	82	6.5
非感染群						2.5
						0.5
						2.0

表3 幼虫1隻からのDNA抽出を行うときのNaOH量の検討

PCR trial	Eppendorf tube Falcon tube					
NaOH	1 ml	1 ml	5 ml	10 ml	25 ml	50 ml
1st trial	+	-	+	-	-	-
2nd trial	+	+	-	-	-	-
3rd trial	+	+	+	+	-	-
LAMP trial	Eppendorf tube Falcon tube					
NaOH	1 ml	1 ml	5 ml	10 ml	25 ml	50 ml
1st trial	+	+	+	+	+	+
2nd trial	+	+	+	+	-	-
3rd trial	+	+	+	+	+	+

表4 ウシ肝臓5gからの幼虫DNA検出

添加幼虫数	5時間消化		人工胃液を途中で1回交換	
	LAMP	PCR	LAMP	PCR
0	-	-	-	-
1	+	-	+	-
2	+	-	+	-
3	+	-	+	-
4	+	-	+	-
5	+	-	+	-
30	+	-	+	-

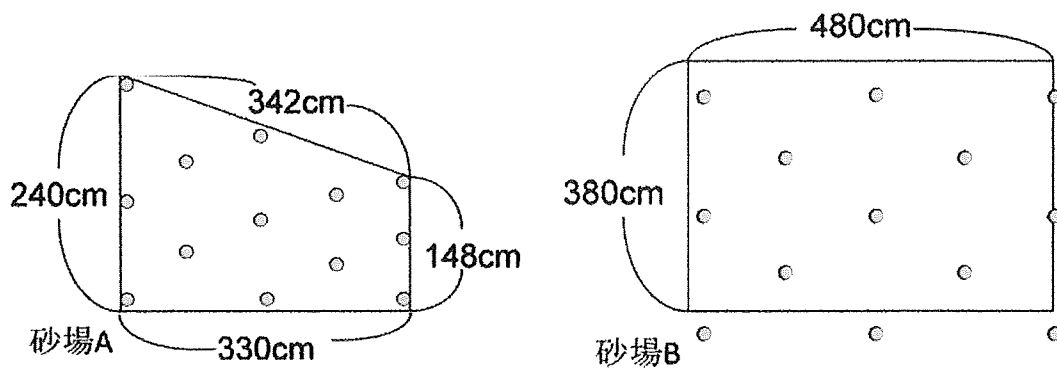


図 1.

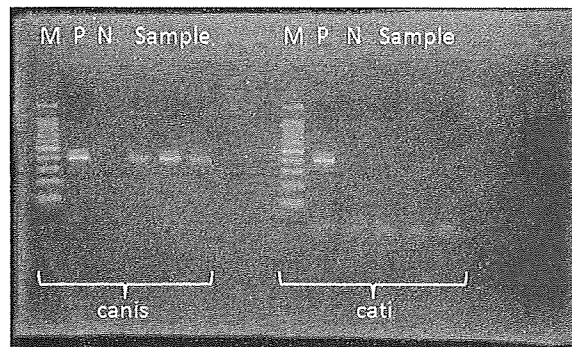


図3. 砂場から出た虫卵をマウスに感染させ脳内移行していた幼虫のPCR法による虫種同定 (M: マーカー, P: ポジティブコントロール, N: ネガティブコントロール)

(図 2 は次頁参照)

砂場 A

表層

129		555		363
	429		479	
244		2368		353
	328		404	
507		374		182

浅層

38		50		92
	880		144	
3		1192		163
	412		137	
983		317		338

中層

1		0		5
	24		27	
0		15		9
	1085		97	
1942		262		2

深層

1		0		0
	6		3	
1		0		3
	3019		63	
21		7		1

砂場 B

表層

306		276		3159
	185		85	
774		379		290
	269		47	
123		139		532

浅層

86		12		229
	252		419	
75		156		44
	152		47	
282		6		56

中層

5		2		365
	1		0	
5		7		1
	0		0	
0		1		2

深層

0		7		5
	1		1	
0		0		16
	0		0	
0		1		4

図 2. 砂場 A と B において、砂サンプル採取の深さと検出された回虫卵数

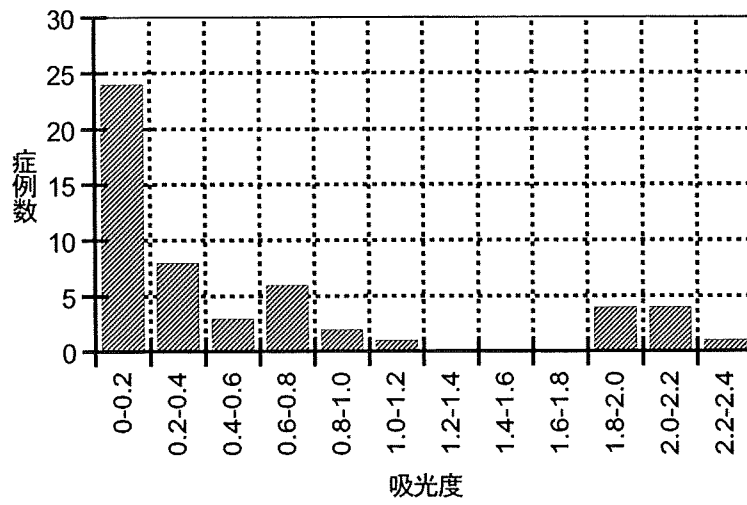


図 4. 肝臓白斑症のウシ血清中のイヌ回虫特異抗体

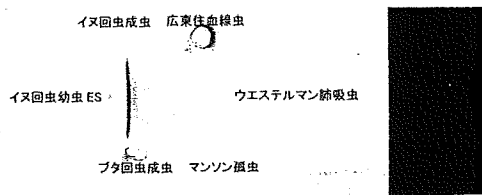


図 5 脊髄トキソカラ症患者の寒天ゲル内二重拡散法

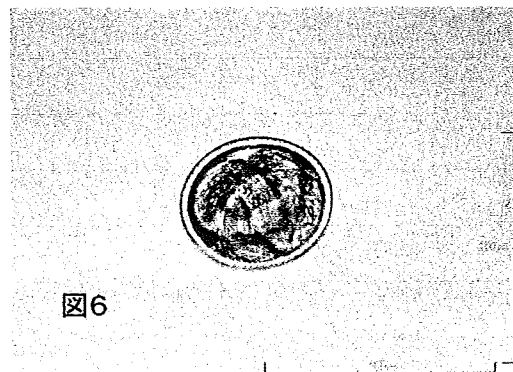


図 6. 砂場から回収された幼虫包蔵卵

厚生科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
「我が国における動物由来感染症の感染実態把握に資する研究」  
分担研究報告書

動物由来ウイルス・クラミジア・リケッチア感染症の症例収集と分析

研究分担者 福士 秀人 岐阜大学応用生物科学部獣医学講座教授  
協力研究者 大屋 賢司 岐阜大学応用生物科学部獣医学講座准教授

研究要旨 ウイルス，クラミジアおよびリケッチアを病因とする動物由来感染症の実態把握を目的として調査研究を行った。濾紙採血法による抗体検査では，2007 から 2009 年度においてオウム病，Q 熱および E 型肝炎抗体をそれぞれ 22，30，35 検体について検索した。オウム病と診断された検体は 1 検体で IgG 抗体価 20 倍であった。Q 熱抗体測定では IgG 抗体価 20 倍以上 4 検体であったが，他の検体はいずれも IgG 抗体価 32 倍未満，IgM 抗体価 16 倍未満であった。E 型肝炎抗体はいずれも陰性であった。オウム病抗体検査用抗原のクローニングを行った。その結果，抗体検査用抗原の候補として PMP があげられた。ELISA 抗原としての有用性を検討するための準備を進めた。また，主として鳥の糞を対象とする病原体検出用リアルタイム PCR を確立できた。コクシエラ症（Q 熱）外膜タンパク質 com1 を抗原とする ELISA を開発した。濾紙採血法を用いた抗体検索が可能である事が示され，今後の診断および調査に活用できると結論した

#### A. 研究目的

偏性細胞内寄生体を病原体とする人獣共通感染症としてオウム病，Q 熱および E 型肝炎などが知られている。オウム病は古くから知られる人獣共通感染症である。近年，オウム病の届け出数は年間 30 例前後であるが，年により増減が見られる。Q 熱は我が国において，その実態は未だに不明である。特に抗体保有率については報告者により大きな差がある。またイノシシやブタ肉を感染源としたウイルス性肝炎として E 型肝炎が注目されている。

これまでに，臨床現場からの検体輸送を改良する目的で，濾紙採血法を確立した。

本研究では濾紙採血法により上記 3 疾患の抗体調査を実施した。さらに従来の微量蛍光抗体法と同等の抗体検査法を確立するため，新たなオウム病クラミジア抗原および Q 熱抗原の探索を行った。また，鳥類における定量的なクラミジア検出法を開発した。

#### B. 研究方法

##### 1. クラミジアおよび Q 熱抗体保有率（濾紙採血法）

クラミジア検出：血清ないし血液を濾紙に吸収させ，乾燥後，1ml の希釈液で溶出した。この溶出液を 1:10 溶液とした。（濾紙



はおよそ 100 $\mu$ l が吸収されるとされているため)。1:10 溶出液を段階希釈し、明らかな蛍光を示す最高希釈倍数の逆数を抗体価とした。2009 年度は 16 倍希釈から段階希釈し、抗体価を測定した。

精製基本小体を抗原として微量間接蛍光抗体法 (MIF) によりオウム病抗体測定およびコクシエラ感染細胞を抗原とした間接蛍光抗体法により Q 熱抗体価を測定した。

## 2. クラミジア診断用抗原の探索

オウム病クラミジアの血清診断用抗原を探索した。*C. psittaci* Mat116 株感染マウス血清を用いて、*C. psittaci* ライブラリースクリーニングを行った。陽性クローンについて、コードされる遺伝子の塩基配列解析を行った。得られた遺伝子 *pmp* については、定法に従い、大腸菌を用いて組換え蛋白質を作製し、ウエスタンブロット、ELISA により反応性を検討した。

## 3. リアルタイム PCR によるクラミジア検出法の確立

オウム病クラミジアを定量的に検出するためリアルタイム PCR 法の確立を行った。クラミジア外膜蛋白質 *omcB* 遺伝子において、*Chlamydomonas* 属内で高い相同性を示す領域を標的とした。コピー数を定量するため、pGEM-T vector に *omcB* 遺伝子を挿入したプラスミドを精製し、鋳型として検量線を作成した。*C. psittaci* Mat116 株の基本小体 (EB) 106 感染単位を接種したトリ糞便から抽出した DNA を 10 倍段階希釈して検出感度の測定に用いた。検出系の特異性は一般細菌を用いて検討した。動物病院から提供されたトリ糞便を用いて、従来法と比較した。

## 4. コクシエラ外膜蛋白質 ComI を抗原とした ELISA による抗体検出系の開発

*C. burnetii* ゲノム DNA から外膜タンパク質遺伝子 *comI* を PCR により増幅し、定法にしたがい、GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させ、抽出精製した (GST-ComI)。以前の研究で得られた *C. burnetii* Nine Mile I 相菌感染 A/J マウス血清、Priscilla 株感染 A/J マウス血清およびヒト血清を系の評価に用いた。

## C. 研究結果

### 1. クラミジアおよび Q 熱抗体保有率 (濾紙採血法)

#### 2007 から 2009 年度におけるクラミジアおよび Q 熱抗体保有率 (濾紙採血法)

濾紙採血法で採取され郵送された検体についてオウム病抗体価を測定した (表 1)。のべ 22 検体について検査した結果、32 倍 1 検体、20 倍 3 検体、16 倍未満 18 検体であった。このうち、オウム病と診断された検体は 20 倍 (IgG) であった。IgG32 倍検体は以前にオウム病に罹患した患者からの検体であった。この検体は IgM16 倍未満であった。オウム病疑いとされた 2 検体はいずれも 10 倍であった。

Q 熱抗体および E 型肝炎抗体は検査した 30 検体および 25 検体いずれも陰性であった。

### 2. クラミジア診断用抗原の探索

オウム病クラミジア感染マウス血清を用いたライブラリースクリーニングの結果、多型膜蛋白質 (Pmp) をコードするクローンを得ることができた。大腸菌を用いて作製した組換え Pmp は、ELISA およびウエスタンブロット双方で、オウム病クラミジア感染マウス血清および不活化オウム病クラミジア免疫ウサギ血清と反応した。

### 3. リアルタイム PCR によるクラミジア検出法の確立

構築したリアルタイム PCR 法は定量的に 10 コピー以上がから検出できた。EB を接種したトリ糞便では反応系あたり 100 感染単位以上から検出できた。各種クラミジア DNA を鋳型とした場合、*C. psittaci*, *C. abortus* (反芻獣クラミジア), *C. felis* (ネコクラミジア) を検出したが、*C. pneumonia*, *C. trachomatis* を始めとした他種クラミジアならびに腸内細菌科を始めとした一般細菌の DNA を鋳型とした場合、反応は認められなかった。動物病院から提供されたトリ糞便において、従来法で陽性を示した 4 検体は全て陽性を示し、陰性を示した 14 検体中 5 検体が陽性を示した。これらのコピー数は 10 コピー未満であった。

#### 4. コクシエラ外膜蛋白質 Com1 を抗原とした ELISA による抗体検出系の開発

マウス感染血清を ELISA で測定したところ GST-com1 では接種菌数が多かったマウスにおいて接種菌株に関わらず抗体応答が認められた。しかし、接種菌数が少ない場合には IFA 抗体応答が認められたが、ELISA 抗体は検出されなかった。

#### D. 考察

##### 1. クラミジアおよび Q 熱抗体保有率 (濾紙採血法)

現行の判定基準は「間接蛍光抗体法による抗体の検出 (単一血清で IgM 抗体の検出もしくは IgG 抗体 256 倍以上、又はペア血清による抗体陽転もしくは抗体価の有意上昇)」となっている。現行の基準では今回の検体は、オウム病と診断された検体を含んだいずれの検体も陰性と判定される。以前にオウム病と確定診断された検体では IgG 抗体価が 32 倍であったが、IgM は 16 倍未満であった。このデータからオウム病抗体は低いながらも数年間にわたって保持される事が示唆された。さらに例数を重ね、

診断基準の妥当性も含め、検討が必要であると考えられた。

Q 熱に関しては抗体陽性例は見いだされなかった。今回の結果と近年の届け出数が数件であることとを考慮すると、我が国における Q 熱の発生数は非常に少ないと考えられる。また、動物との関連性も明確ではない。診断法も確定していないことも問題である。課題は多いが、人獣共通感染症としての重要度はそれほど高くないと考えられた。

##### 2. クラミジア診断用抗原の探索

本研究で得られた血清診断用抗原候補 Pmp は、クラミジア種間における相同性も 30% 程度と低く、また免疫原性も保持していることから、新規診断抗原として有用であると考えられる。今後は、患者血清等を用いた、有用性の更なる検討が必要である。

##### 3. リアルタイム PCR によるクラミジア検出法の確立

本年度に樹立したリアルタイム PCR 法による、*C. psittaci* omcB 遺伝子検出法は、従来の ompA 領域を標的とした nested PCR 法より約 10 倍高感度であった。*C. abortus*, *C. felis* DNA は増幅するものの、*C. pneumoniae* および *C. trachomatis* とは反応しなかったこと、さらに腸内細菌科を始めとした一般細菌は全て陰性であったことから本検出法の特異性が示された。以上より、本法を用いることにより、特に *C. pneumoniae* と *C. psittaci* の簡便な鑑別に有用であることが示唆された。また、本検出法では、クラミジア DNA を定量的に検出出来ることから、クラミジア罹患鳥の排菌量を定量的にとらえることが可能になった。ヒト検体の応用が今後の課題である。

##### 4. コクシエラ外膜蛋白質 Com1 を抗原とし

た ELISA による抗体検出系の開発

*C. burnetii* 感染 A/J マウス血清における抗体応答を Com1-ELISA にて検出することができた。しかしながら、今回検索した Com1-ELISA は感度の点で IF 法に劣っていた。また、感染個体により応答性は異なる可能性が示された。Com1 に対する抗体応答は感染動物や患者の感染経過により異なるとの報告もある。今後、検出系の検討が必要である。

#### E. 結論

濾紙採血法を用いた抗体検索が可能である事が示され、今後の診断および調査に活用できると結論した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Russell-Lodrigue, KE., Andoh, M., Poels, MW., Shive, HR., Weeks, BR., Zhang, GQ., Tersteeg, C., Masegi, T., Hotta, A., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., McMurray, DN., Samuel, JE.: *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever. *Infect. Immun.* 77 : 5640-5650, 2009
- 2) Fukushi, H., Inoue, K., Saito, L., Ohya, K., Sashihara, N., Yamaguchi, T., Hirai, K.: Survival rates of *Coxiella burnetii* in mayonnaise and constituents. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 62 : 481-484, 2009
- 3) Ohya, K., Takahara, Y., Kuroda, E., Koyasu, S., Hagiwara, S., Sakamoto, M., Hisaka, M., Morizane, K., Ishiguro, S., Yamaguchi, T., Fukushi H.: "*Chlamydomonas felis* CF0218 is a novel TMH-family protein with potential as a diagnostic antigen for diagnosis of *C. felis*

infection." *Clin. Vaccine Immunol.* 15: 1606-1615, 2008.

4) Puolakkainen M., Lee A., Nosaka T., Fukushi H., Kuo C.-C., Campbell L.: "Retinoic acid inhibits the infectivity and growth of *Chlamydia pneumoniae* in epithelial and endothelial cells through different receptors." *Microb. Pathog.* 44: 410-416, 2008.

5) Matsui T., Nakashima K., Ohyama T., Kobayashi J., Arima Y., Kishimoto T., Ogawa M., Cai Y., Shiga S., Ando S., Kurane I., Tabara K., Itagaki A., Nitta N., Fukushi H., Matsumoto A., Okabe N.: "An outbreak of psittacosis in a bird park in Japan." *Epidemiol. Infect.* 136: 492-495, 2008.

#### 学会発表

- 1) 大屋賢司, 福士秀人: "ネコクラミジア CF0218 の性状解析と感染診断用抗原としての有用性." 第 81 回日本細菌学会総会, 2008 (京都).
- 2) 塩田幸弘, 大屋賢司, 福士秀人: "Real-time PCR 法によるオウム病クラミジア遺伝子検出法の開発." 第 146 回日本獣医学会学術集会, 2008 (宮崎).
- 3) 大屋賢司, 前田貞俊, 山口剛士, 福士秀人: "感染特異抗体検出による, ネコクラミジア *Chlamydomonas felis* の血清疫学調査." 第 26 回日本クラミジア研究会, 2008 (岐阜).
- 4) 奥田秀子, 大屋賢司, 安藤匡子, 小宮智義, 野村彩朱, 矢野竹男, 平井克哉, 福士秀人: *Coxiella burnetii* 外膜蛋白質 Com1 の診断用抗原としての有用性: 第 147 回日本獣医学会, 2009 宇都宮.

表1.

疾病	抗体価	2007	2008	2009	合計
オウム病	10未満	3	4		7
	10	2	4		6
	20		2		2
	40				
	80				
	IgG 10未満/IgM 10未満			4	4
	IgG 10/IgM 10未満			1	1
	IgG 20未満/IgM 10未満				
	IgG 20/IgM 10未満			1	1
	IgG 32未満/IgM 16未満				
	IgG 32/IgM 16未満			1	1
	合計	5	10	7	22
Q熱	10未満				
	10				
	40				
	80				
	IgG 20未満/IgM 10未満	5	6	3	14
	IgG 32未満/IgM 16未満	2	1	8	11
	IgG 32/IgM 16未満			1	1
	IgG 20未満/IgM 10未満 (封入体 (+))		4		4
合計	7	11	12	30	
E型肝炎	基準値以下	12	22	1	35

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）  
「我が国における動物由来感染症の感染実態把握に資する研究」  
分担研究報告書

動物由来細菌感染症の症例収集と分析及び諸検査

研究分担者 丸山 総一 （日本大学生物資源科学部・教授）

研究要旨 猫ひっかき病（Cat-Scratch Disease；CSD）の新たな血清診断法として、組換蛋白を用いた ELISA について検討した。ウエスタンブロット（WB）解析により判明した、CSD 患者血清において有意に高率で反応する抗原蛋白について、二次元電気泳動法、質量分析法により解析したところ、熱ショック蛋白（GroEL）、セリンプロテアーゼ（SP）、および外膜蛋白 43（OMP43）であることが明らかとなった。本研究では、各蛋白を大腸菌を用いて発現し、*B. henselae* サルコシン可溶化抗原（Whole）を含め、それぞれ抗原として用いた ELISA を実施した。Whole 抗原を用いた ELISA の感度は IFA に対し 95.0 % で、特異度は 95.3 % であった。組換え GroEL、および SP を抗原とした ELISA 法の感度はそれぞれ 10 %、85 % となり、特異度は 100 %、97.7 % となった。また、組換え GroEL、SP の判定成績を組み合わせると、感度 90 %、特異度 97.7 % となった。今後、OMP43 を加え、より感度および特異度の高い ELISA 用診断抗原の組み合わせについて検討する必要がある。

#### A. 研究目的

従来、CSD の血清診断には間接蛍光抗体（IFA）法が用いられているが、手技や判定が煩雑であり、*Chlamydomyxa* 属、*Coxiella* 属などの近縁の病原体との交差反応も報告されている。本研究では、より簡便で特異的な血清診断法の開発を目的として、*B. henselae* 特異抗原を解析し、組換蛋白を抗原として用いた ELISA の開発を行った。

#### B. 研究方法

IFA で 128 倍以上を示した CSD 患者血清（CSD 群：21 検体）、ならびに健常者血清（健常群：44 検体）と *B. henselae* Houston-1 株（：H1）抗原を用いて WB 解析を行い、CSD 群において特異的に検出される抗原蛋白を推定し、二次元電気泳動法、質量分析法によ

り同定した。同定された蛋白と他の *B. henselae* H1 特異抗原である *groEL*、セリンプロテアーゼの各遺伝子をそれぞれ pET-32a ベクターに挿入し、大腸菌（BL21 株）を用いて発現させ、各 Trx 融合組換蛋白を精製し、ELISA 抗原とした。さらに、H1 サルコシン可溶化抗原（Whole）も併せて検討した。カットオフ値は[健常者群の平均値+標準偏差×3]とした。さらに、CSD の臨床症状を有しているものの、IFA では陰性と診断された人の血清（偽 CSD 群：68 検体）について、ELISA により再評価した

#### C. 研究結果

二次元電気泳動法および質量分析法により、健常者群に比べ CSD 群で有意に高い割合で検出される抗原は、GroEL、SP、および

OMP43であることが明らかとなった。

本研究において使用したヒト血清 133 検体中 12 検体 (CSD 群 1 検体, 健常群 1 検体, 疑 CSD 群 10 検体) が Trx と反応したため, 成績から除外した。

Whole 抗原を用いた ELISA の感度は IFA に対し 95.0 % で, 特異度は 95.3 % であった。同様に, 組換え GroEL, SP を抗原とした ELISA の感度はそれぞれ 10 %, 85 % 特異度は 100 %, 97.7 % であった。また, 組換え GroEL, SP の判定成績を組み合わせると, 感度 90 %, 特異度 97.7 % となった (表 1)。

偽 CSD 群において, ELISA OD 値がカットオフ値を上回る検体は, Whole 抗原では 58 検体中 24 検体, SP 抗原では 58 検体中 27 検体に認められたが, GroEL 抗原では認められなかった (表 2)。OMP43 については, 現在組換え蛋白の発現, ならびに精製を継続している。

#### D. 考察

Whole 抗原を用いた ELISA の感度は 95.0 % となり各組換え蛋白抗原を用いた ELISA の感度を上回ることが判明した。一方, 特異度は組換え抗原蛋白で 97.7 ~ 100 % と Whole 抗原の 95.3 % を上回っていた。これらの結果から, CSD 群の患者血清は, 個体間で認識する抗原蛋白が異なるため, それぞれ組換え抗原蛋白単独では, 十分な感度を得ることが困難であると考えられた。そこで, それぞれの組換え蛋白抗原による判定成績を組み合わせさせた結果, 特異度が 97.7% と高いまま, 90 % まで感度を上げることができた。このことから組換え蛋白抗原を組み合わせることで, 感度および特異度の高い ELISA 診断抗原として応用できる可能性が示唆された。

CSD の臨床症状を示すものの, IFA で陰性と判定された偽 CSD 群では, Whole 抗原では 58 検体中 24 検体, SP 抗原では 27 検体が, それぞれ陽性を示した。本研究で使用した

偽 CSD 群は, いずれも発熱や, リンパ節腫脹などの臨床症状を示した患者から採取されたものであり, また, ELISA の感度, ならびに特異度の高さから, Whole 抗原および SP 抗原で陽性となった検体は, いずれも各抗原を認識する抗体が含まれていると考えられる。以上の成績から, 従来の IFA は ELISA に比べて感度が低く, CSD を発症しているにも関わらず, 陰性と判定される可能性が示唆された。

今後, OMP43 や未同定の抗原蛋白を組換え蛋白として作製し, GroEL, や SP を含めた複数の蛋白を組み合わせさせた抗原を用いることにより, さらに感度, 特異度の高い ELISA の開発が期待できるものと思われる。

今後, 臨床現場で応用可能なイムノクロマトグラフィーなどによる簡易診断法を確立することが望まれる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Jittapalpong, S., Sittisan, P., Sakpuaram, T., Kabeya, H., Maruyama, S. and Inpankaew, T. 2009. Coinfection of *Leptospira* spp and *Toxoplasma gondii* among stray dogs in Bangkok, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 40(2):247-52.

##### 2. 著書

1. 分担執筆, サウンダース小動物臨床マニュアル第 3 版 (長谷川篤彦監訳), 2. 感染症 第 19 章 全身性細菌感染症 P 191-203, 文永堂出版 (東京), 2009. 4. 25.

2. 丸山総一 猫ひっかき病 小児科臨床 2009 ; 62 : 703-708

3. 丸山総一 トキソプラズマ症 小児科臨床 2009 ; 62 : 717-720

4. 丸山総一 猫ひっかき病 岸本寿男, 山田章雄編 ズーノーシスハンドブック, Medical Science 社 東京 138-140, 2009.

3. 学会発表

井上 快, 壁谷英則, Michael Y. Kosoy, Bai Ying, George Smirnov, Dorothy McColl, Harvey Artsob, 丸山総一: 野鼠由来 *Bartonella grahamii* の進化系統と地理的起源. 日仏獣医学会第40回研究例会, 恵比寿 (2009.3.13)

4. 講演・シンポジウム

1. 2009年12月7日(月), 麻布大学動物病院研修医講習会「ペットと人獣共通感染症」

2. 2009年10月19日(月), 住友化学(株), 「ペットと人獣共通感染症ーペットと楽しく暮らすために」

3. 2009年9月16日(水), 韓国ソウル大学 「Situation of *Bartonella* infections in Japan: from humans to rodents」

4. 2009年8月7日(金), 動物医薬品協同組合夏期研修会, 「ペットと人獣共通感染症

ーペットと楽しく暮らすために」, 五反田ゆうぼうと

5. 2009年5月16日(土), 千里ライフサイエンス市民公開講座 第54回「家庭で気をつけないといけない“うつる病気(感染症)” 「ペットから人にうつる病気ーペットと楽しく暮らすために」

6. 2009年2月10日(火), 県央四市学校飼育動物連絡協議会, 平成20年度教師と獣医師との合同学習会「注意すべき人と動物の共通感染症～学校飼育動物を中心として～」, 大和市勤労福祉会館

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

厚生科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
「我が国における動物由来感染症の感染実態把握に資する研究」  
分担研究報告書

0-1-6ヵ月皮下接種方式による狂犬病抗体価の検討

分担研究者 高山直秀 東京都立駒込病院小児科  
協力研究者 柳澤如樹 東京都立駒込病院感染症科

研究要旨 2006年11月に国内で相次いで輸入狂犬病患者が発生したのち、狂犬病ワクチンの需要が急増し、全国的に狂犬病ワクチンが品不足に陥った。このため、厚生労働省は、緊急避難的に狂犬病曝露前免疫が制限する方針を示した。しかし狂犬病曝露後免疫を確実にするうえで、狂犬病曝露前免疫を受けておくことは重要である。狂犬病常在地であるタイでは、一人当たりの狂犬病ワクチン接種量を減量した皮下接種法（タイ赤十字方式）が広く用いられている。今年度、我々は国産の狂犬病ワクチンを用いて、同意を得た健康成人9名に対し、日本の標準法に従い0, 1, 6ヵ月目に狂犬病ワクチン0.1mLを左右前腕に皮下接種した。2回目接種後の抗体価の幾何平均は2.6 EU/mLであった。3回目接種直前の抗体価は、7例で0.5 EU/mL未満と低下を認めたが、3回目接種後の抗体価の幾何平均は3.6 EU/mLと上昇を認めた。皮下接種法と同様に、2回目接種後時間経過とともに抗体価の低下は認められたが、十分な追加免疫効果がみられたので、皮下接種法の有効性に問題はないと考えられた。

A. 研究目的

2006年11月に国内で相次いで輸入狂犬病患者が発生したのち、狂犬病ワクチンの需要が急増した。しかし、需要の増加が供給を上回っていたため、緊急避難的に狂犬病曝露前免疫が制限された。世界保健機関(WHO)は、狂犬病流行地において動物による咬傷を受けた場合、狂犬病免疫グロブリン(RIG)の投与と組織培養不活化ワクチン接種による曝露後発病予防を勧告しているが、曝露前免疫を受けていればRIGの投与が不要になる。RIGは入手が容易でないため、曝露後発病予防を確実なものにするためには、狂犬病曝露前免疫を普及させることが重要である。我が国における狂犬病ワクチンの生産量は少なく、急な増産ができないことに鑑みれば、ワクチ

ンが不足する事態に備えて、少量のワクチンでも高い効果を上げることができる接種法の検討が必要である。

狂犬病常在地であるタイでは、一人当たりの狂犬病ワクチン接種量を減量した皮下接種法（タイ赤十字方式）が広く用いられ、曝露前免疫にも採用されている。我々は、国産の狂犬病ワクチンを4週間隔で2回皮下接種する方式で、発症防御レベルまで狂犬病抗体価の上昇が認められたことを報告した。今回、日本の標準的な狂犬病ワクチンの接種時期である0, 1, 6ヵ月目にワクチンを皮下接種し、狂犬病曝露前免疫の効果と安全性を調査した。

B. 研究方法



## 1.対象

本調査の目的、調査項目、接種ワクチンと予測される副反応について文書、および口頭で説明をして、同意が得られた医療関係者9例(男性7例、女性2例;平均年齢30.1 ± 4.3歳)を対象とした。

## 2.接種ワクチン

化学及血清療法研究所製の組織培養不活化狂犬病ワクチンロットRB02およびRB03を、第1回目および2回目接種時に用いた。第3回目接種時には、ロットRB04およびRB05を用いた。狂犬病ワクチンは溶解液1mL溶解した後、その0.1mLずつを左右前腕に皮内注射した。

## 3.局所および全身反応

全例について、皮内接種15分後の接種局所における膨疹、発赤を視診で確認し、掻痒感の有無を質問した。さらに、次回接種時および採血時に前回注射による局所の腫脹、発赤、疼痛、掻痒感の自覚症状の有無について問診した。

## 4.抗体検査

狂犬病ワクチンは0, 1, 6カ月目に接種し、採血は2回目接種2-3週間後と3か月後、また3回目接種直前および接種2-3週後の計4回行った。酵素抗体法(ELISA)による抗体価はPLATELIA™ RABIES KIT II (Bio-Rad Laboratories, France)を、中和抗体価は迅速蛍光フォーカス抑制試験法(RFFIT)を用いて測定をした。

## 倫理面への配慮

本研究を実施するに当たっては、東京都立駒込病院に設置された倫理委員会に計画書を提出して審議を依頼し、その了承を得た。また、調査結果及び血液検査の結果を集計するに当たってはすべての個人情報排除して行った。

## C. 研究結果

## 1.血中狂犬病抗体価

ELISA法を用いた抗体価の測定結果を表1に示す。ワクチンを2回接種した2-3後の抗体価は全例で上昇しており、幾何平均は2.6 EU/mL(1.0-5.5 EU/mL)であった。2回目接種3か月後の抗体価は全例で低下しており、3回目接種直前には7例で0.5 EU/mL未満であった。3回目接種2-3週後の抗体価は全例で上昇しており、幾何平均は3.6 EU/mL (0.9-13.6 EU/mL)であった。

RFFIT法を用いた中和抗体価の測定結果を表2に示す。ワクチンを2回接種した2-3後の抗体価は全例で上昇しており、幾何平均は5.2 IU/mL(2.6-13.7 IU/mL)であった。2回目接種3か月後の抗体価は全例で低下しており、3回目接種直前には3例で0.5 IU/mL未満であった。3回目接種2-3週後の抗体価の幾何平均は3.0 IU/mL (0.7-18.0 IU/mL)と上昇を認め、全例発症防御レベルの0.5 IU/mLを超えていた。症例5は3回目接種前後で抗体価の変化が認められなかった。

## 2.接種後の局所反応および全身症状

ワクチン接種15分後、局所の発赤を呈したものは1例、腫脹を認めたものは4例、疼痛を認めたものは0例、掻痒感を認めたものは1例であった。局所の発赤は、数日間残ったと報告したものがあつたが、発熱、頭痛、倦怠感などの全身症状を報告した例はなかった。

## D. 考察

本邦での狂犬病曝露前免疫は、組織培養不活化ワクチン1回量1.0 mLを4週間隔で2回、その後6-12ヶ月後に1回皮下注射する方式が標準である。しかしワクチン供給不足の状況において、1人に1回量1.0 mLを投与すれば、短期間にワクチンが枯渇して、實際上狂犬病ワクチン接種が不可能となるであろう。そのため我々は以前、接種量を減量しても効果が得られる方法として皮内接種法を考案し、4週間隔で2回皮内接種することで十分な抗体価の上昇が認め

られたことを報告した。今回の小規接種試験では、狂犬病ワクチン2回接種後、時間経過とともに抗体価の低下が認められた。この傾向は、国産の狂犬病ワクチンを用いて、高山らが考案した皮内・皮下併用法（狂犬病ワクチン0.1mLを左右前腕に1か所ずつ皮内注射し、残りを上腕1か所に皮下注射する接種法）でも同様に認められている。しかし、狂犬病抗体価が発症防御レベルを満たさなくなった場合でも、3回目接種後に十分な抗体価の上昇が認められ、追加免疫効果が確認された。また、全身症状を呈する重篤な副反応は認められなかった。

今回の検討では、狂犬病ワクチン3回目接種後、ELISA法で測定した抗体価の上昇は全例で認められた。しかし3回目接種後、RFFIT法を用いた中和抗体価の上昇は1例（症例5）で認められなかった。また、中和抗体価の幾何平均が2回目接種後よりも3回目接種後が低値であった。狂犬病抗体価は、中和抗体価を用いるのが標準的で、WHOは0.5 IU/mL以上を発症防御レベルと定めている。本例において、中和抗体価の上昇が認められなかった原因は明らかでないが、中和抗体価と強い相関を持つELISA法で

の抗体価は上昇していたため、実際には中和抗体価は上昇していたのではないかと推測される。加えて、2回目接種3カ月後で中和抗体価が0.5 IU/mL未満であったのかかわらず、3回目接種直前には0.7 IU/mLと上昇していた点を鑑みると、測定時における手技的な問題も否定できない。

我が国における狂犬病ワクチンの生産量は、定期接種のワクチンに比べれば非常に少なく、急激な需要の増大が起これば、狂犬病ワクチンが不足する事態は避けられない。しかし、狂犬病は一旦発病すると有効な治療法はなく、現時点では狂犬病ワクチンの投与が唯一の発病予防策である。加えて、狂犬病ワクチンによる曝露後発病予防の効果を確実にするためには、RIGが入手困難である以上、曝露前免疫を提供することが極めて重要である。今回検討した皮内接種方式は、接種量が通常の5分の1と少ないにも関わらず、効果が認められ、かつ副作用も軽微であった。小規模接種試験であるため、今後はより多くの被接種者を対象として、更なる検討を行う価値がある。

表1 ELISA法を用いた抗体価の推移

症例	2回目接種	2回目接種	3回目接種	3回目接種
	2-3週間後	3か月後	直前	2-3週間後
1	1.1	0.5	< 0.5	1.9
2	5.5	1.5	0.5	2.1
3	1.6	0.7	< 0.5	3.1
4	1.0	< 0.5	< 0.5	2.0
5	3.7	0.5	< 0.5	0.9
6	3.6	0.8	< 0.5	3.8
7	5.5	0.9	0.5	13.6
8	3.3	0.9	< 0.5	13.4
9	2.5	< 0.5	< 0.5	6.4
幾何平均 (E U/mL)	2.6			3.6
範囲 (EU/mL)	1.0 - 5.5			0.9 - 13.6

表2 RFFIT法を用いた中和抗体価の推移

症例	2回目接種	2回目接種	3回目接種	3回目接種
	2-3週間後	3か月後	直前	2-3週間後
1	3.5	1.5	< 0.5	1.5
2	6.0	1.5	0.7	2.0
3	2.6	1.5	0.7	2.6
4	4.6	0.7	< 0.5	2.0
5	4.6	< 0.5	0.7	0.7
6	7.9	1.2	0.7	2.6
7	13.7	1.5	0.7	6.0
8	4.6	2	0.7	18.0
9	4.6	0.7	< 0.5	6.0
幾何平均 (IU /mL)	5.2			3.0
範囲 (IU/mL)	2.6 - 13.7			0.7 - 18.0

厚生科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
「我が国における動物由来感染症の感染実態把握に資する研究」  
分担研究報告書

WHO接種スケジュールに従った国産狂犬病ワクチン皮内接種方式の検討

分担研究者 高山直秀 東京都立駒込病院小児科  
協力研究者 柳澤如樹 東京都立駒込病院感染症科

研究要旨 WHOは狂犬病ワクチンが不足する地域では、皮内接種法を採用して、ワクチン液を節約することを勧めている。昨年度は国産狂犬病ワクチンをWHO接種スケジュールに従い、0.1mLを2か所皮内接種することで、狂犬病抗体価が上昇することを報告した。今年度は、この方式をより多くの被接種者を対象として検討したことに加え、同スケジュールで0.1mLを1か所皮内接種する方式を合わせて検討した。国産狂犬病ワクチン0.1mL1か所皮内接種することに同意を得た11例(A群)および、0.1mLを2か所皮内接種することに同意を得た22例(B群)を対象とした。ワクチンは0, 7, 28日に接種し、採血を7, 28, 42日目に施行し、狂犬病抗体価を測定した。A群では、42日目には、全例抗体価が0.5 EU/mL以上となり、幾何平均値は3.5 EU/mLであった。B群では42日目には、全例抗体価が0.5 EU/mL以上となり、幾何平均値は2.9 EU/mLであった。小規模な接種試験ではあるが、狂犬病ワクチン0.1mLを1か所皮内接種する方式は、0.1mLを2か所皮内接種する方式と同等の効果があると考えられた。

A. 研究目的

2006年11月に国内で相次いで輸入狂犬病患者が発生したのち、狂犬病ワクチンの需要が急増した。しかし、需要の増加が供給を上回っていたため、緊急避難的に狂犬病曝露前免疫が制限された。WHOは、狂犬病流行地において動物による咬傷を受けた場合、狂犬病免疫グロブリン(RIG)の投与と組織培養不活化ワクチン接種による曝露後発症予防を勧告しているが、曝露前免疫を受けていればRIGの投与が不要になる。RIGは入手が容易でないため、狂犬病曝露前免疫を普及させることが重要である。我が国における狂犬病ワクチンの生産量は少なく、急な増産ができないことに鑑みれば、ワクチンが不足する事態に備えて、少量のワクチンでも高い効果を上げることができる接種法の検討が必要である。

狂犬病常在地であるタイでは、一人当たりの狂犬病ワクチン接種量を減量した皮内接種法(タイ赤十字方式)が広く用いられている。国産の狂犬病ワクチンを用いての皮内接種法については、WHO接種スケジュールに従い0-7-28日に皮内接種する方式がすでに試験され、有効で安全であることが示されている。しかし、この方式はワクチン液0.1mLを2か所皮内注射するものであり、同スケジュールで0.1mLを1か所皮内接種する方式での有効性は検討されていない。今回我々は、狂犬病ワクチン0.1mL1か所皮内接種方式と0.1mL2か所皮内接種方式を比較した。

B. 研究方法