

表2. 静岡県におけるマダニ採集状況

マダニの種類	♀	♂	若虫	幼虫	採取数
<i>Haemaphysalis flava</i>	240	196	747		1,183
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	56	19	574		649
<i>Haemaphysalis kitaokai</i>	78	62			140
<i>Haemaphysalis formosensis</i>	4	8	90		102
<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	7	2	73		82
<i>Haemaphysalis hystrioides</i>	8	5	12		25
<i>Ixodes ovatus</i>	102	99			201
<i>Ixodes turdus</i>	10		81	7	98
<i>Ixodes persulcatus</i>	4	10	22		36
<i>Ixodes nipponensis</i>		3	1		4
<i>Ixodes monospinosus</i>	1	1			2
<i>Amblyomma testudinarium</i>		1	32	6	39
<i>Dermacentor taiwanensis</i>	3	2			5
計	513	408	1,632	13	2,566

表3. 静岡県のマダニからの紅斑熱群リケッチア *gltA* 遺伝子の検出

マダニの種類	検体数	PCR陽性数 (%)
<i>Haemaphysalis flava</i>	294	36 (12.2)
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	104	49 (47.1)
<i>Haemaphysalis kitaokai</i>	71	8 (11.3)
<i>Haemaphysalis formosensis</i>	29	11 (37.9)
<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	11	8 (72.7)
<i>Haemaphysalis hystrioides</i>	14	10 (71.4)
<i>Ixodes ovatus</i>	142	37 (26.1)
<i>Ixodes persulcatus</i>	14	6 (42.9)
<i>Ixodes turdus</i>	11	1 (9.1)
<i>Ixodes nipponensis</i>	3	3 (100.0)
<i>Ixodes monospinosus</i>	2	1 (50.0)
<i>Amblyomma testudinarium</i>	30	11 (36.7)
<i>Dermacentor taiwanensis</i>	1	0
計	726	181 (24.9)

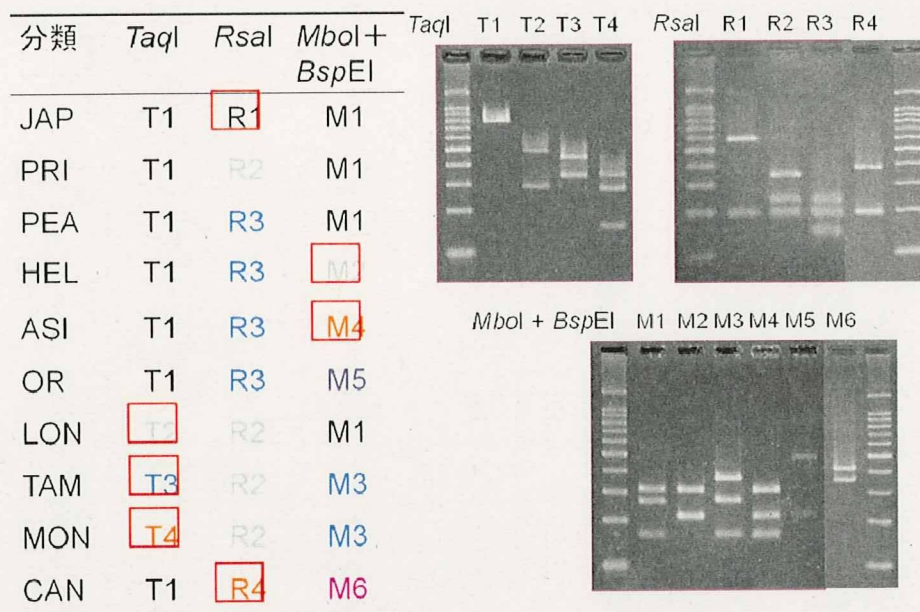


図4. PCR-RFLPによるPCR産物 (*gltA*) のタイピング

表4. 静岡県のマダニから検出された*gltA*遺伝子の分類

Type	該当菌種等	マダニ検体No.*
JAP	<i>R. japonica</i> , <i>R. heilongjiangensis</i> 類似	6, 48, 49, 64, 65, 67, 70, 150 168, 228, 230, 242, 261
PRI	<i>Candidatus R. principis</i> 類似	13, 41, 71, 164, 183
PEA	<i>R. peacockii</i> 類似	200, 201, 214
HEL	<i>R. helvetica</i> 類似	107, 385, 396
ASI	<i>R. asiatica</i> 類似	173, 176, 252, 444, 141
OR	類似菌種なし	356
LON	LON type	4, 186, 274, 277, 212
TAM	<i>R. tamurae</i> 類似	151, 157
MON	<i>R. monacensis</i> 類似	354, 217
CAN	<i>R. canadensis</i> 類似	35, 37

\* 黒字：2008年採集、赤字：2009年採集

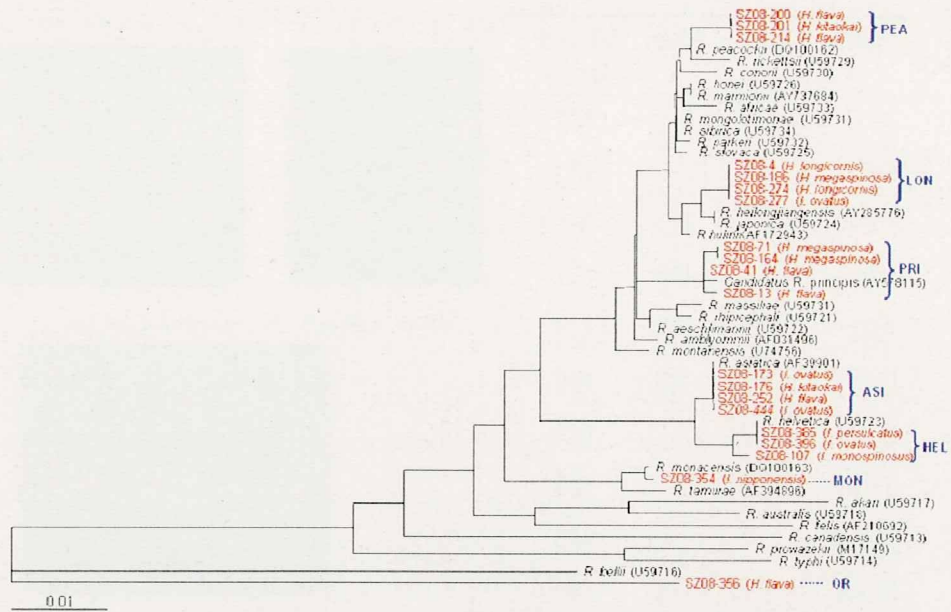


図5. マダニから検出された*gltA*遺伝子の系統樹解析 (2008採集)

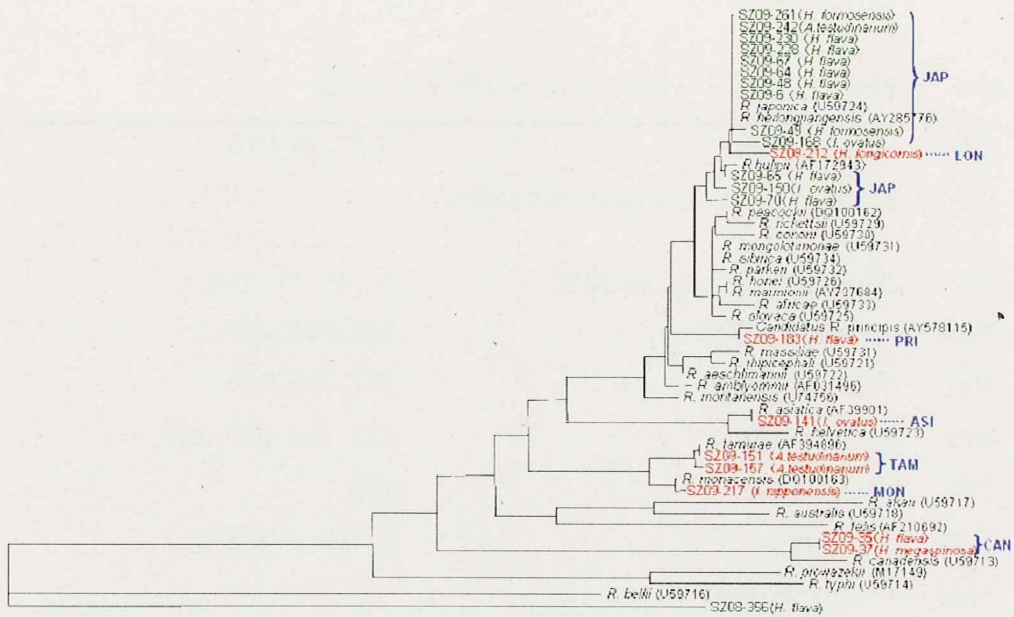


図6. マダニから検出された*gltA*遺伝子の系統樹解析 (2009採集)

表5. マダニからの紅斑熱群リケッチア分離状況

マダニの種類	♀	♂	若虫	計	分離数
<i>Haemaphysalis flava</i>	3	2	3	8	0
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	1		2	3	0
<i>Haemaphysalis formosensis</i>	3	3	1	7	0
<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>			3	3	0
<i>Haemaphysalis hystrix</i>	1	2	2	5	1(♂)
<i>Ixodes ovatus</i>	5	5		10	0
<i>Ixodes persulcatus</i>	1	1	4	6	0
<i>Dermacentor taiwanensis</i>		1		1	1(♂)
計	14	14	15	43	2

分離株は2株とも *gltA* 遺伝子 (710bp) が *R. japonica* と100%一致。

マダニ採集期間は2009年6月～9月、培養細胞はL929とHL-60を使用。

伴侶動物、家畜および野生動物におけるダニ媒介性細菌感染症に関する研究

研究分担者	猪熊 壽	帯広畜産大学畜産学部臨床獣医学研究部門	教授
研究協力者	松本高太郎	帯広畜産大学畜産学部臨床獣医学研究部門	助教
	横山直明	帯広畜産大学原虫病研究センター	准教授
	近藤誠司	北海道大学北方圏フィールド科学センター	教授
	秦 寛	北海道大学北方圏フィールド科学センター	准教授
	鈴木正嗣	岐阜大学生物資源科学部	教授
	佐鹿万里子	岐阜大学大学院連合獣医学研究科	大学院生
	吉本 薫	帯広畜産大学畜産学部獣医学科	学生
	竹内俊彦	帯広畜産大学畜産学部獣医学科	学生
	斎藤 亨	帯広畜産大学畜産学部獣医学科	学生
	佐々木広美	帯広畜産大学畜産学部獣医学科	学生
	藤澤哲郎	帯広畜産大学畜産学部獣医学科	学生

研究要旨：我が国の医学領域で問題となっているダニ媒介性細菌感染症、とくにリケッチア目細菌について、伴侶動物、家畜および野生動物の感染状況を調査した。1. 伴侶動物のダニ媒介性細菌感染状況調査（1）全国の犬 1427 頭の末梢血から DNA を収集し、欧米で問題となっている *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* をはじめとするアナプラズマ科細菌の感染状況を PCR により調査したところ、*E. canis*, *A. platys*, *A. phagocytophilum* については陽性が得られなかったが、13 頭 (0.9%) が *Anaplasma bovis* 陽性を示し、同病原体が犬にも感染することが示された。（2）全国の猫末梢血 1773 検体から DNA を抽出し、病原性リケッチアおよびアナプラズマ科細菌の感染状況調査を開始した。2. 家畜のダニ媒介性細菌感染状況調査（1）北海道十勝地方で飼育される牛のうち、何らかの臨床症状を呈して帯広畜産大学に搬入された病畜の DNA および血清 280 検体を採取した。（2）北海道十勝地方で放牧されている健康牛 80 頭は PCR 検査により *A. phagocytophilum* および *A. bovis* は陰性であった。（3）北海道日高地方で放牧されている牛のうち、2007 年から *A. phagocytophilum* または *A. bovis* 感染が認められている 5 頭のうち *A. bovis*-PCR 陽性の 1 頭は、2009 年にも継続的に *A. bovis* 陽性を示したが臨床症状は認められなかった。3. 野生動物のダニ媒介性細菌感染状況調査（1）北海道十勝地方のエゾシカ脾臓を採取し、*A. phagocytophilum* 感染状況を PCR 法により調査したところ、27 検体中 10 検体 (37%) が陽性を示した。（2）北海道のアライグマ末梢血 210 検体を収集し、分子生物学的方法によりエーリキア/アナプラズ

Pマの検出を試みたところ、210検体中8検体(3.8%)が陽性を示した。PCR産物の遺伝子解析では6検体で*A. bovis*と相同性の高い遺伝子が検出された。(3)近年日本紅斑熱患者が急増している熊本県上天草地方において保菌動物として疑われているイノシシの疫学的役割を解明するため、地元猟友会と協力してイノシシの血液および寄生マダニサンプルを収集した。

#### A. 研究目的

近年、我が国では新規リケッチア性病原体として、紅斑熱群リケッチア、アナプラズマ属細菌(*Anaplasma* spp. *Ehrlichia* spp.)が次々と検出または分離されている。しかし、それらの感染症のベクター、保菌動物など疫学的状況については不明な点が多く、また獣医学領域における意義 - 家畜への病原性などが不明である。そこで、本研究では、我が国のリケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症について、獣医学領域からアプローチし、伴侶動物、家畜および野生動物の疫学的役割を明らかにするとともに、伴侶動物や家畜における病原性を明らかにすることを目的としている。本年度は次の項目について研究を実施した。

##### 1. 伴侶動物のダニ媒介性細菌感染症調査

###### (1) 犬のアナプラズマ科細菌感染状況調査

近年欧米では犬のアナプラズマ科細菌として*E. canis*, *A. platys*, *A. phagocytophilum*感染症が問題となっているが、我が国における犬の感染実態は明らかではない。そこで本年度の研究では我が国の犬におけるアナプラズマ科細菌の感染状況を明らかにすることを目的とした。

###### (2) 猫の病原性リケッチアおよびアナプラズマ科細菌感染状況調査

猫にもマダニが寄生し、人の生活環境内へマダニを持ち込むリスクがあるものの、猫についてはリケッチア類感染状況調査が調べられていない。そこで、本年度は我が国の猫における病原性リケッチアおよびアナプラズマ科細菌感染状況を明らかにすることを目的とした。

##### 2. 家畜のダニ媒介性細菌感染状況調査

これまでの調査により北海道の牛から*A. phagocytophilum*および*A. bovis*の遺伝子断片が検出されたが、これらの牛に対する病原性、感染状況等は不明である。本年度の研究では北海道で飼養されている健康牛および病牛の*A. phagocytophilum*および*A. bovis*の感染状況および病原性を明らかにすることを目的とした。

##### 3. 野生動物のダニ媒介性細菌感染状況調査

今年度は近年生息数が増加傾向にある野生動物アライグマおよびエゾシカを対象にリケッチア類の感染状況を明らかにすることを目的とする。また、動物病院に搬入される病傷野生動物を対象にリケッチア類の感染状況を調査する。さらに近年日本紅斑熱患者が急増している熊本県上天草地方において保菌動物と疑われているイノシシの疫学的役割を解明することを目的とする。

## B. 研究方法

### 1. 伴侶動物のダニ媒介性細菌感染状況調査

① 犬のアナプラズマ科細菌感染疫学調査：全国の小動物開業獣医師から得られた犬の末梢血 1427 検体から DNA を抽出し、主要なアナプラズマ科細菌感染状況を PCR により調査した。

② 全国の動物病院に依頼し、猫末梢血を収集し、DNA を抽出した。また、リアルタイム PCR を用いて、病原性リケッチアおよびアナプラズマ科細菌の感染状況の調査を開始した。

### 2. 家畜のダニ媒介性細菌感染状況調査

① 北海道の病牛のダニ媒介性細菌感染状況調査：北海道十勝地方で飼育される牛のうち、何らかの臨床症状を呈して帯広畜産大学に搬入された病畜血液採取を開始した。

② 北海道の健康放牧牛のダニ媒介性細菌感染状況調査：北海道十勝地方の放牧地で飼養される健常牛 80 頭の血液を採取し、*A. phagocytophilum* および *A. bovis* の感染状況を PCR 法により調査した。

③ 北海道日高地方で放牧されている牛のうち、以前から *A. phagocytophilum* または *A. bovis* 感染が認められているものについて、その臨床症状および感染状況を経時的に観察した。

### 3. 野生動物のダニ媒介性細菌感染状況調査

① 北海道十勝地方の放牧地周辺にて捕獲されたエゾシカの脾臓 27 検体を採取し、*A. phagocytophilum* 感染状況を PCR 法により調査した。

② 2007～2008年に収集された北海道道央部のアライグマ末梢血 699 検体を材料に、nested-PCRにより病原性リケッチアの検出を試みた。

③ 帯広畜産大学動物医療センターに搬入された病傷野生エゾリス 1 個体から採取されたノミ類 4 検体について病原性リケッチアの感染状況を nested PCR により検索した。

③ 熊本県上天草地方において、地元猟友会と協力してイノシシの血液、血清および寄生マダニサンプルを収集中である。またイノシシ血液については PCR および IFA により病原性リケッチアの検出を試みた。なお、コントロールとして、非流行地である福岡県大牟田市のイノシシ材料も収集し、同様に病原性リケッチアの検出を試みた。

## C. 研究結果

### 1. 伴侶動物のダニ媒介性細菌感染状況調査

① 犬のアナプラズマ科細菌感染に関する疫学調査：全国の犬末梢血 1427 検体から抽出された DNA を材料に、*E. canis*, *A. platys*, *A. phagocytophilum* および *A. bovis* の感染状況を PCR により調査したところ、*E. canis*, *A. platys*, *A. phagocytophilum* については陽性が得られなかったが、*A. bovis* に対して 13 頭 (0.9%) が陽性を示した。なお、陽性犬ではリケッチア感染症を疑わせる臨床症状はみられなかった。

② 全国の動物病院の協力をもとに、1773 検体の猫末梢血から DNA を収集した。2月15日現在、北海道、東北の7道県 280 頭の病原性リケッチア感染スクリーニングが終了したが、陽性3検体を得られている。

## 2. 家畜のダニ媒介性細菌感染状況調査

① 北海道の病牛のダニ媒介性細菌感染状況調査：北海道十勝地方で飼育される牛のうち、何らかの臨床症状を呈して帯広畜産大学に搬入された病畜の DNA および血清 280 検体を採取した。

② 北海道の健康放牧牛のダニ媒介性細菌感染状況調査：北海道十勝地方の放牧地で飼養される健全牛 80 頭の *A. phagocytophilu* および *A. bovis* の感染状況を PCR 法により調査したが、陽性検体は検出されなかった。

③ 北海道日高地方で放牧されている牛のうち、2007 年から *A. phagocytophilum* または *A. bovis* 感染（末梢血 PCR 陽性）が認められている 5 頭のうち *A. bovis*-PCR 陽性の 1 頭は、2009 年にも継続的に *A. bovis* 陽性を示したが臨床症状は認められなかった。残りの 4 頭は 2009 年には陰性を示した。

## 3. 野生動物のリケッチア類感染状況調査

① 北海道十勝地方の放牧地周辺にて捕獲されたエゾシカの脾臓を採取し、*Anaplasma phagocytophilu* の感染状況を PCR 法により調査したところ、27 検体中 10 検体（37%）が陽性を示した。

② 北海道道央部のアライグマ末梢血 699 検体を収集し、病原性リケッチアの感染状況を nested PCR により検索したところ、13 検体（1.9%）が陽性を示した。遺伝子解析の結果、*Rickettsia japonica* または *R. heilongjiangensis*、*R. felis*、*R. helvetica* と高い相同性を示すものが、それぞれ 1、1、10 検体得られた。残り 1 検体は解析不能であ

った。

③ 北海道帯広市のエゾリス 1 個体から採取されたノミ類 4 検体について病原性リケッチアの感染状況を検索したところ、4 検体とも陽性を示した。*gltA* 遺伝子 439bp の配列が得られ、*Rickettsia felis* と 97.3% の相同性を示した。

④ 10 月 31 日から 2 月 15 日までに熊本県上天草地方のイノシシ 17 頭の末梢血および血清を採取し、病原性リケッチアの感染状況を nested PCR により検索したが、陽性結果は得られなかった。また IFA により *R. japonica* に対する抗体価を測定したところ、640 倍 3 頭、320 倍 3 頭、160 倍 5 頭、80 倍 3 頭、40 倍 3 頭、40 倍未満 0 頭であった。なお、非流行地の材料として福岡県大牟田市で採取されたイノシシ 19 頭では、PCR は全頭陰性、IFA 抗体価は 320 倍 1 頭、160 倍 2 頭、80 倍 5 頭、40 倍 4 頭、40 倍未満 7 頭であった。上天草地方のイノシシ寄生マダニはタカサゴチマダニが最も優勢で、次いでタカサゴキラマダニ、キチマダニであった。

## D. 考察

### 1. 伴侶動物のダニ媒介性細菌感染状況調査

① 犬のアナプラズマ科細菌感染に関する疫学調査：全国の犬 1427 頭の *E. canis*、*A. platys*、*A. phagocytophilum* は PCR 陰性であったことから、欧米では犬の主要な病原体アナプラズマ科細菌として知られているこれらの細菌は日本には蔓延していないことが考えられた。なお、今回 *A. bovis* に対して 13 頭（0.9%）が陽性を示し、同病原体が犬にも感染し、保菌動物となる可能性が示唆された。



なお、病原性については不明である。

② 全国の猫 1773 検体の DNA を収集して、病原性リケッチアおよびアナプラズマ科細菌の感染状況調査を実施中である。猫に関する調査は本邦初である。

## 2. 家畜のダニ媒介性細菌感染状況調査

① 北海道の病牛のダニ媒介性細菌感染状況調査：今年度は検体の収集で終了したため、来年度実際の感染状況調査を実施する予定である。

② 北海道の健康放牧牛のダニ媒介性細菌感染状況調査：健康牛からは *A. phagocytophilu* および *A. bovis* の PCR 陽性検体は得られなかった。これは、夏季放牧中の牛には小型ピロプラズマ病対策のため殺マダニ剤が頻繁に散布されており、マダニの寄生が比較的少ないことが原因と考えられる。

③ 2007 年から *A. phagocytophilum* または *A. bovis* 感染が認められている 5 頭の牛を継続的に観察したところ、*A. bovis*-PCR 陽性の 1 頭は、2009 年も陽性を示したが、臨床症状は認めらず、我が国における *A. bovis* の病原性は強くないものと思われた。残りの 4 頭は、今回の調査では PCR 陰性であり、臨床症状も認められなかった。

## 3. 野生動物のリケッチア類感染状況調査

① 北海道十勝地方の野生エゾシカの *A. phagocytophilu* 感染状況は 27 検体中 10 検体 (37%) が陽性であり、これは日高地方のエゾシカの *A. phagocytophilu* 感染率 45% と有意差が見られなかったが、放牧牛に比べると非

常に高い陽性率である。上記 2 ② で述べたように、牛での感染率が低いのは対照的であるが、これはマダニ寄生率と関係があると考えられた。

② 北海道のアライグマ末梢血 699 検体から *R. heilongjiangensis* または *R. japonica* と近縁なものが 1 検体、*R. felis* と近縁なものが 1 検体、また *R. helvetica* と近縁なものが 10 検体検出された。アライグマがこれらの病原性リケッチアの保菌動物となる可能性が考えられた。今後、寄生マダニ等についての調査が必要である。

③ 北海道帯広市のエゾリス 1 個体から得られたノミ類について、検査した 4 個体全てで *R. felis* に近縁なリケッチアの保有が認められた。エゾリスがリケッチアの保菌動物となる可能性が考えられ、今後、エゾリスおよびその外部寄生虫についての調査が必要である。

④ 熊本県上天草地方のイノシシ末梢血からは病原性リケッチアの遺伝子は検出されなかった。しかし、*R. japonica* に対する抗体価は非流行地域のイノシシと比べると、高い傾向を示していた。これらの結果より、イノシシは紅斑熱リケッチアには感作されるが、保菌動物としての役割は大きくないことが予想される。今後より体系的な調査が必要である。

## E. 結論

### 1. 伴侶動物のダニ媒介性細菌感染状況調査

欧米では犬の主要な病原体アナプラズマ科細菌として知られている *E. canis*, *A. platys*, *A. phagocytophilum* について、我が国の飼

育犬では感染率が低いことが推測された。新知見として、犬も *A. bovis* に感染し、保菌動物となる可能性が示唆された。

## 2. 家畜のダニ媒介性細菌感染状況調査

北海道の健康放牧牛からは *A. phagocytophilu* および *A. bovis* の PCR 陽性検体は得られなかった。これは小型ピロプラズマ病対策のため殺マダニ剤が牛に対して頻繁に散布されており、マダニ寄生が野生動物等と比較して少ないことが原因と考えられた。また、感染牛の経時的観察から、我が国の *A. phagocytophilu* および *A. bovis* の牛に対する病原性は強くないものと推測される。

## 3. 野生動物のリケッチア類感染状況調査

### 北海道十勝地方の野生エゾシカの

*A. phagocytophilu* 感染状況は 27 検体中 10 検体 (37%) であった。北海道のアライグマ末梢血から *R. heilongjiangensis* (または *R. japonica*)、*R. felis*、*R. helvetica* とそれぞれ近縁なものが検出され、アライグマがこれらの病原性リケッチアの保菌動物となる可能性が考えられた。熊本県上天草地方のイノシシは *R. japoanica* に対する抗体を保有しているものの、末梢血からは病原性リケッチアの遺伝子は検出されず、*R. japoanica* の保菌動物としての役割は大きくないと考えられた。

## F. 健康危険情報

とくになし

## G. 研究発表 (2009 年 4 月～)

### 1. 論文発表

(1) Matsumoto K, Inokuma H. Identification of spotted fever group Rickettsia species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of the Sca4 gene. *Vector Borne Diseases* 9 (6): 747-749 (2009)

(2) Tagawa M., Matsumoto K., Yokoyama, N., Inokuma, H. Comparison of two hemoplasma species on hematological parameters in cattle. *The Journal of Veterinary Medical Science* 72(1): 113-115 (2010)

(3) Yoshimoto, K., Matsuyama, Y., Matsuda, H., Sakamoto, L., Matsumoto, K., Yokoyama, N., Inokuma, H. Detection of *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* DNA from nymphs and larvae of *Haemaphysalis megaspinoza* in Hokkaido, Japan. *Veterinary Parasitology* 160 (1-2):170-172 (2010)

(4) 坂田義美、市川康明、猪熊 壽. 特異的抗体検出キットを利用した犬の *Ehrlichia canis* および *Anaplasma phagocytophilum* 感染に関する全国的血清疫学調査. *日本獣医師会雑誌* 62(12): 952-955 (2009)

(5) 猪熊 壽. 牛の新しい住血微生物 - アナプラズマ感染症. *獣医畜産新報* 62(5): 377-382 (2009)

(6) 猪熊 壽. 小動物に寄生するマダニと人獣共通感染症. 特集「マダニが媒介する小動物と人の共通感染症」. *獣医畜産新報* 62(12):981-986 (2009)

(7) 猪熊 壽. リケッチア感染症. 特集「マダニが媒介する小動物と人の共通感染症」  
獣医畜産新報 62(12):981-986 (2009)

## 2. 学会発表

(1) 松山雄喜、早川大輔、松本高太郎、横山直明、猪熊 壽. 放牧牛の *Anaplasma phagocytophilum* 感染におけるエゾシカとマダニの役割. 第 147 回日本獣医学会講演 要旨集, p. 277. 宇都宮 (2009. 4. 3)

(2) 吉本 薫、松山雄喜、松田浩典、坂本礼央、太田奈保美、水野大介、秦 寛、松本高太郎、横山直明、猪熊 壽. 牛放牧地で採取したオオトゲチマダニからの *Anaplasma phagocytophilum* および *Anaplasma bovis* の検出. 第 147 回日本獣医学会講演要旨集, p. 277. 宇都宮 (2009. 4. 3)

(3) 竹内俊彦、松本高太郎、横山直明、片桐慶人、大城 守、座喜味聡、川森文彦、大橋典男、猪熊壽. 沖縄県与那国島における新規エーリキア属細菌の検出. 第 148 回日本獣医学会講演要旨集, p. 190. 鳥取 (2009. 9. 26)

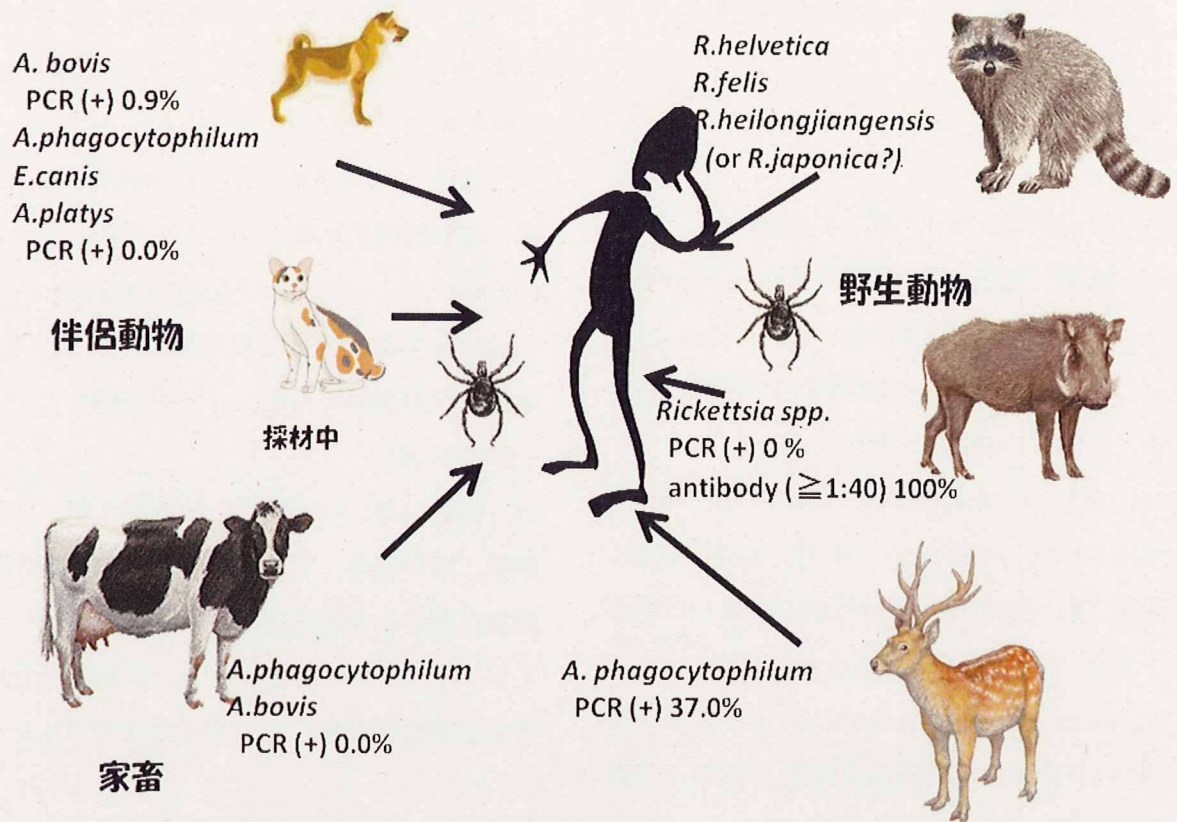
(4) 佐鹿万里子、阿部 豪、松本高太郎、猪熊 壽. 北海道のアライグマ末梢血からの紅斑熱群リケッチア DNA の検出. 第 148 回日本獣医学会講演要旨集, p. 234. 鳥取 (2009. 9. 27)

(5) 松田浩典、坂本礼央、吉本 薫、竹内俊彦、松山雄喜、松本高太郎、猪熊 壽. *Rickettsia japonica* の犬に対する病原性および日本紅斑熱感染症における犬の疫学的役割の検討. 第 148 回日本獣医学会講演要旨集, p. 258. 鳥取 (2009. 9. 26)

(6) 坂本礼央、坂田義美、市川康明、松本高太郎、猪熊 壽. 犬のアナプラズマ科病原体感染に関する全国的分子疫学的調査. 第 148 回日本獣医学会講演要旨集, p. 259. 鳥取 (2009. 9. 26)

(7) 猪熊 壽、松本高太郎、坂田義美、市川康明. 種特異的抗体検出キットを利用した犬の *Ehrlichia canis* および *Anaplasma phagocytophilum* 感染の全国的疫学調査. 第 148 回日本獣医学会講演要旨集, p. 259. 鳥取 (2009. 9. 26)

(8) 猪熊 壽、坂本礼央、松本高太郎、市川康明、坂田義美. 犬のアナプラズマ科病原体感染に関する全国的調査. 第 27 回日本クラミジア研究会・第 16 回リケッチア研究会合同研究発表会抄録集, P19. 東京 (2009. 11. 7)



獣医学領域におけるダニ媒介性細菌感染症サーベイランス【要約】

## 各種野生動物を対象とするリケッチアに関する血清疫学的調査

研究分担者	鈴木正嗣	岐阜大学応用生物科学部獣医学講座
研究協力者	本井祐太	岐阜大学大学院連合獣医学研究科博士課程
	猪熊 壽	帯広畜産大学畜産学部臨床獣医学研究部門
	竹内俊彦	帯広畜産大学畜産学部獣医学科
	齋藤 亨	帯広畜産大学畜産学部獣医学科
	川端寛樹	国立感染症研究所・細菌第一部
	高野 愛	国立感染症研究所・細菌第一部, 岐阜大学大学院連合獣医学研究科博士課程
	田澤道弘	知床財団羅臼地区担当次長
	石名坂 豪	知床財団羅臼地区事業係
	横山真弓	兵庫県森林動物研究センター主任研究員
	森光由樹	兵庫県森林動物研究センター研究員
	辻 知香	兵庫県森林動物研究センター, 岐阜大学大学院連合獣医学研究科博士課程
	安田 亮	島根県美里町役場産業振興課

研究要旨 野生動物を材料にリケッチアの感染状況調査を実施した。1. イノシシの紅斑熱群リケッチア感染状況調査：紅斑熱群リケッチアに対する抗体が確認され、地域間で抗体陽性率が異なることから、野生のイノシシが紅斑熱群リケッチアに感染する可能性が示された。しかし、病原体遺伝子が検出されなかったことから、紅斑熱群リケッチアに対する感受性は高くはないことが示唆された。2. 北海道知床地方におけるマダニの紅斑熱群リケッチア保有状況調査：分子生物学的検索により、北海道知床地方のマダニにおいても *Rickettsia tarasevichiae* および *Rickettsia* sp. Hj126 近縁種などの紅斑熱群リケッチアを保有していることが明らかとなった。3. ツキノワグマの紅斑熱群リケッチア感染状況調査：紅斑熱群リケッチア遺伝子が検出されたことから、紅斑熱群リケッチアが広範な野生動物種に浸潤していることが示唆された。

### A. 研究目的

本研究では野生動物の分布や生息環境との関連性に注目した疫学調査を目指している。分担者らに関わる既存の採材ネットワークとも連携し、各種野生動物から得られた血液、血清、マダニ類（植生上からの採

集を含む）を横断的に活用しリケッチア感染状況を網羅的に調査する。これにより、従来は地域あるいは研究者ごとに異なる方法で行われてきた野生動物の疫学調査に対し「標準的な手法」を提示するとともに、リケッチアの感染環を解明する上で重要な

検査項目を提示する。最終的には、得られた成果の地域間比較や生息環境との関連性等を精査することで、リケッチア症の流行に関わる野生動物の関与様式を解明する。

## B. 研究方法

本年度は以下の項目について調査した。

### 1. イノシシの紅斑熱群リケッチア感染状況調査

#### (1) イノシシの紅斑熱群リケッチア抗体保有状況

2006～2009年に兵庫県、島根県、沖縄県において捕獲されたイノシシ141検体の血清を用いて紅斑熱群リケッチアの血清疫学検査を実施した。スクリーニングは *Rickettsia japonica* Aoki 株に感染した細胞を抗原として用いた間接蛍光抗体法(IFA法)を用いて行い、抗体価40倍以上を陽性とした。

#### (2) イノシシからのリケッチア類遺伝子検出

2007～2009年に大阪府において捕獲されたイノシシ50検体の血液を多く含む肝臓組織からDNAを抽出し、エーリキア属およびアナプラズマ属の病原体を検出できるスクリーニングPCR(EHR16D/EHR16R)を用いてエーリキア/アナプラズマの保有状況を調査した。また、紅斑熱群リケッチアを検出するためのnested PCR(1段階目 RpCS.877p/1273r, 2段階目 RpCS.896f/1258n)により、その保有状況を明らかにした。

### 2. 北海道知床地方におけるマダニの紅斑熱群リケッチア保有状況調査

2007年7月に北海道の知床地方の植生から旗振り法によって得られたマダニについて形態学的検索後にDNAの抽出を行い、Ushijimaらの方法(Ushijima et al.(2003) J.Parasitol)に従いマダニミトコンドリアDNAの16SrRNA遺伝子領域の配列の直接シーケンスを行い種を特定した。続いて紅斑熱群リケッチアを検出するためのnested PCR(17kDa:1段階目 R1/R2, 2段階目 Rr17.61p/492n, *gltA*:1段階目 RpCS.877p/1273r, 2段階目 RpCS.896f/1258n)により、その保有状況を明らかにした。

### 3. ツキノワグマの紅斑熱群リケッチア感染状況調査

2009年6月～9月に岐阜県と京都府で捕獲されたツキノワグマ7検体の血液からDNAを抽出し、上記の研究方法2に示すnested PCRにより紅斑熱群リケッチアの保有状況を検索した。

## C. 結果

### 1. イノシシの紅斑熱群リケッチア感染状況調査

#### (1) イノシシの紅斑熱群リケッチア抗体保有状況(表1-3)

間接蛍光抗体法によるスクリーニングの結果、兵庫県では42検体中16頭(38.1%)、島根県では45検体中17頭(37.8%)、沖縄県では54検体中10頭(18.5%)が陽性を示した。

#### (2) イノシシからのリケッチア類遺伝子検出

50検体のすべてで陰性であった。

## 2. 北海道知床地方におけるマダニの紅斑熱群リケッチア保有状況調査 (表4、図1)

知床地方で 68 個体のマダニ類を捕集した。その成ダニ 14 個体 (2 属 3 種) のうち、3 個体から紅斑熱群リケッチア遺伝子が検出された。羅臼町で得られたシュルツェマダニ 1 個体から *Rickettsia tarasevichiae* が検出され、また羅臼町のヤマトマダニ 1 個体と斜里町のダグラスチマダニ 1 個体から *Rickettsia* sp. Hj126 と相同性の高い遺伝子が検出された。

## 3. ツキノワグマの紅斑熱群リケッチア感染状況調査

岐阜県で捕獲された 5 検体のうち、2 検体から紅斑熱群リケッチア遺伝子が検出された。遺伝子解析により、このうち 1 検体の 17kDa 蛋白遺伝子領域の配列は *Rickettsia* sp. Hj126 と高い遺伝子相同性を示し、他の 1 検体は *Rickettsia canadensis* に近縁な配列を示した。京都府で捕獲された 2 検体は共に陰性であった。

## D. 考察

### 1. イノシシの紅斑熱群リケッチア感染状況調査

IFA によるスクリーニングで兵庫県では 42 検体中 16 頭 (38.1%) (表 1)、島根県では 45 検体中 17 頭 (37.8%) (表 2)、沖縄県では 54 検体中 10 頭 (18.5%) (表 3) が陽性を示した。このことから、イノシシも紅斑熱群リケッチアに感染する可能性が示された。一方で、大阪府で捕獲されたイノシシの肝臓から抽出された DNA からはリケッチア類が検出されなかった。そのため、

紅斑熱群リケッチアに対する感受性は低く、イノシシは保菌動物としてではなく、むしろ紅斑熱群リケッチアを保有するマダニの「移動手段」ならびに「吸血源」としての機能を果たしていることが示唆された。しかし熊本県の天草地方においては、日本紅斑熱の初発生時期とイノシシの生息数の増加時期が一致しており、イノシシの保菌動物としての可能性が指摘されている。したがって、今後も遺伝子検出を含む精査を続けていく必要があると考えられる。

### 2. 北海道知床地方におけるマダニの紅斑熱群リケッチア保有状況調査

分子生物学的検索により、北海道知床地方のマダニも *Rickettsia tarasevichiae* や *Rickettsia* sp. Hj126 近縁種などの紅斑熱群リケッチアを保有していることが明らかとなった。近年、北海道ではマダニ類の重要な宿主であるエゾシカの生息数が増加し、市街地への進入事例も頻発している。そのため、都市型野生動物管理 (urban wildlife management) の観点からも、エゾシカやマダニ類のリケッチア症感染リスクを検討する必要がある。

### 3. ツキノワグマの紅斑熱群リケッチア感染状況調査

岐阜で捕獲された 5 検体のうち、2 検体から紅斑熱群リケッチア遺伝子が検出された。このことから、ツキノワグマも紅斑熱群リケッチアに感染する可能性が示唆された。ツキノワグマは餌資源の豊凶などにより行動範囲に年変化が見られるため、人間の生活圏への出没頻度も年によって大きく変動する。今後、紅斑熱群リケッチアの感

染環に関するツキノワグマの役割について明らかにするとともに、感染リスクの年次変動との関連性について検討する必要があるかも知れない。

#### E. 結論

野生のイノシシにおいて紅斑熱群リケッチアの抗体が検出された。さらに、野生のツキノワグマにおいても紅斑熱群リケッチア遺伝子が検出された。これまでは大型の野生動物として主にシカが研究対象とされてきたが、本研究によりイノシシやツキノワグマなど他の野生動物についてもサーベイランスを行う必要性が示された。今後は、個々の野生動物種がリケッチアの感染環にどのような役割を果たしているかを解明し、生息状況や人を含めた各動物間の相互関係をモデル化し、紅斑熱群リケッチア症の発生子防に貢献したいと考えている。

#### F. 健康危機情報

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

##### 3. その他

なし



表 1 兵庫県に生息するイノシシのリケッチア抗体検査の結果

検査頭数	抗体価 (IgG)						陽性数
	<40	40	80	160	320	640 $\leq$	
42	26	10	4	1	1	0	16
割合 (%)	61.9	23.8	9.52	2.38	2.38	0	38.1

※2007年～2009年捕獲

表 2 島根県美郷町に生息するイノシシのリケッチア抗体検査の結果

検査頭数	抗体価 (IgG)						陽性数
	<40	40	80	160	320	640 $\leq$	
45	28	12	5	0	0	0	17
割合 (%)	62.2	26.7	11.1	0	0	0	37.8

※2006年捕獲

表 3 沖縄県西表島に生息するリュウキュウイノシシのリケッチア抗体検査の結果

検査頭数	抗体価 (IgG)						陽性数
	<40	40	80	160	320	640 $\leq$	
54	7	6	3	1	0	0	10
割合 (%)	81.5	11.1	5.6	1.9	0	0	18.5

表4 知床地方で採集されたマダニ成虫における紅斑熱リケッチア遺伝子の検出

Sample No.	マダニ類 種名	性別	捕獲場所	同定されたリケッチア	ホモロジー(%)
1	ヤマトマダニ	♀	羅臼町		
2	ヤマトマダニ	♀	羅臼町		
3	ヤマトマダニ	♀	羅臼町		
4	ヤマトマダニ	♀	羅臼町		
5	ヤマトマダニ	♀	羅臼町		
6	ヤマトマダニ	♀	羅臼町	<i>Rickettsia</i> sp. Hj126 (17kDa)	99.7
7	ヤマトマダニ	♀	羅臼町		
8	シュルツエマダニ	♀	羅臼町	<i>Rickettsia tarasevichiae</i> ( <i>gltA</i> )	100
9	ダグラスチマダニ	♀	斜里町	<i>Rickettsia</i> sp. Hj126 (17kDa)	99.7
10	ダグラスチマダニ	♀	斜里町		
11	ダグラスチマダニ	♀	斜里町		
12	ダグラスチマダニ	♂	斜里町		
13	ダグラスチマダニ	♀	斜里町		
14	ダグラスチマダニ	♀	斜里町		

※2009年7月採集

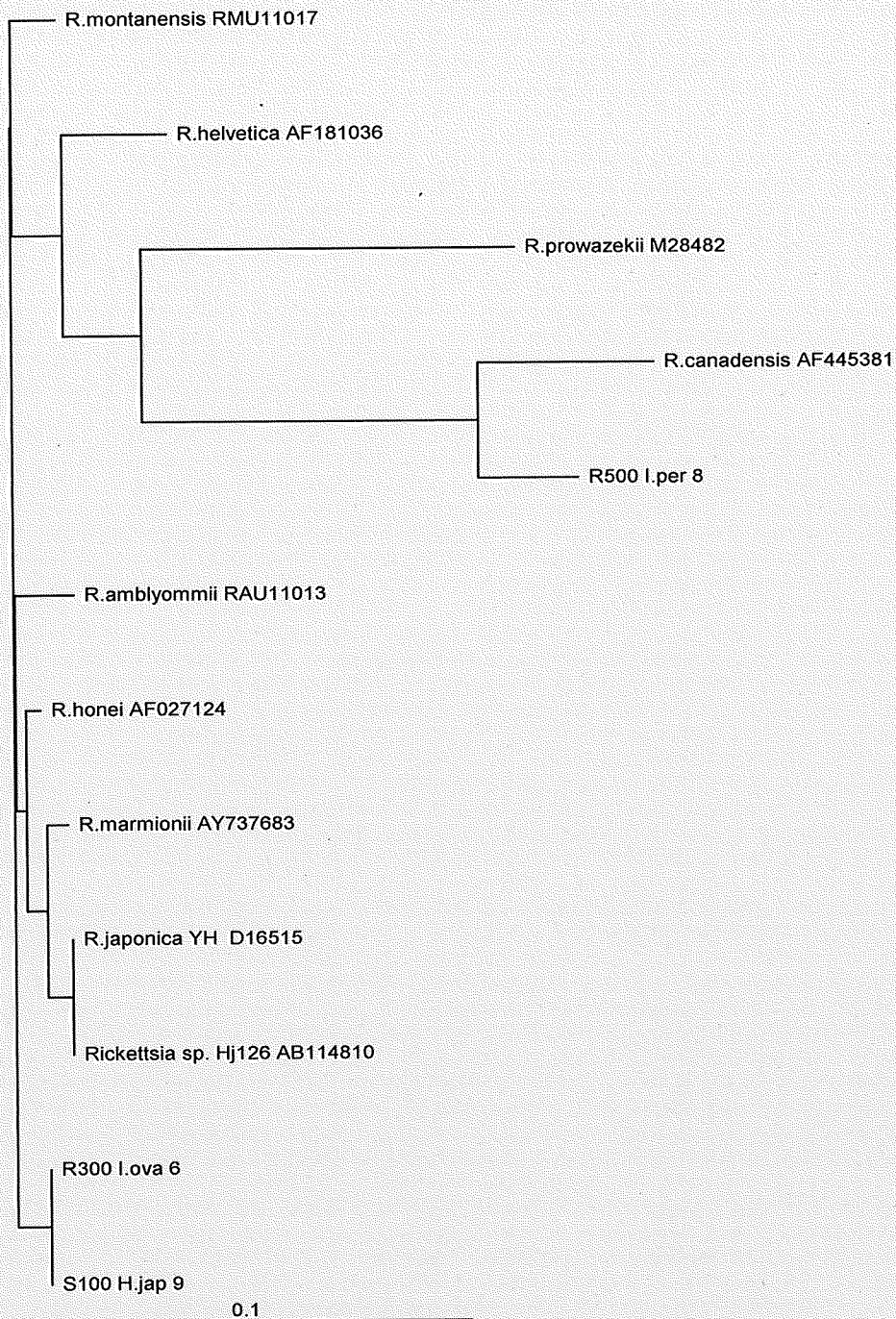


図 1. 知床で採集されたマダニから検出された紅斑熱群リケッチアの系統樹  
17kDa 蛋白遺伝子領域の配列を比較した。  
アセンションナンバーの含まれているものは参考株として使用。

## リケッチア症重症化に関する臨床および基礎的検討

研究分担者	岩崎博道	(福井大学医学部 准教授)
研究協力者	高田伸弘	(福井大学医学部 准教授)
	池ヶ谷諭史	(福井大学医学部 助教)
	田居克規	(福井大学医学部 大学院生)
	田原研司	(島根県保健環境科学研究所 専門研究員)
	玉置幸子	(医療法人洗心会 玉置病院)
	上田孝典	(福井大学医学部 教授)

### 研究要旨

我が国では近年、新興リケッチア感染症・日本紅斑熱の報告数が急増し、発生地域の広がりも認められる。日本紅斑熱の治療としては、テトラサイクリン系薬剤に加えニューキノロン系薬剤併用が有用である例が報告され、つつが虫病との最大の相違点として認識される。リケッチア症全般にわたる、重症化の客観的な評価、ならびに有効な治療法の確立が急務であり、本研究ではこの目的を達するための検討を行っている。

これまでに臨床所見を確認し得たつつが虫病(31例)と日本紅斑熱(23例)において、重症度を従来より用いている重症度スコア(Iwasaki et al, J Clin Microbiol, 1997)をもとに比較した。つつが虫病では8例(25.8%)が、日本紅斑熱では10例(43.5%)が、それぞれ重症度2以上に相当し、日本紅斑熱がつつが虫病より重症度が高いことが示された。また重症度を2以上(重症群)と2未満(軽症群)に分け比較すると、急性期の血中TNF- $\alpha$ 濃度はいずれの疾患においても有意に重症群が高く、TNF- $\alpha$ が重症度を示す指標となりうることが示唆された。

*in vitro* 実験系において、minocycline (MINO)が単球系細胞(THP-1)において、TNF- $\alpha$ 産生を濃度依存性に抑制することが示された。つつが虫病における普遍的なMINOの有効性が、本薬剤の有する本来の抗菌活性の他に宿主側のサイトカイン産生を制御し、過剰な生体防御反応を抑止することに起因することが推測された。日本紅斑熱ではMINOのみでは十分な有効性が得られない症例があり、テトラサイクリン系薬剤に加えニューキノロン系薬剤の併用が有効性を高めることが報告されてきた。この点について、実験系でMINO + ofloxacin (OFLX)によるTNF- $\alpha$ に与える影響を検討したが、OFLXによる相乗的な抑制効果は確認できなかったことより、併用効果は抗リケッチア活性の直接的な増強によることが推測された。しかし、MINOによるIP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ およびMIP-1 $\beta$ の産生制御が実験的に明らかとなったことより今後はTNF- $\alpha$ のみならず他のケモカインを含むサイトカイン産生修飾についても検討する必要がある、生体防御に及ぼす、単球・マクロファージ系細胞の影響について、今後明らかにしていきたい。