

Table 2. Lyssavirus isolates used for genetic analysis

Virus name	Host	Country	Year	Accession no.
MGL 2	cattle	Mongolia (Govi-Altai) ¹⁾	2005	AB570995
MGL 5	red fox	Mongolia (Zavkhan)	2006	AB570996
MGL 10	cattle	Mongolia (Khuvsgul)	2006	AB570997
MGL 11	cattle	Mongolia (Zavkhan)	2006	AB570998
MGL 12	camel	Mongolia (Govi-Altai)	2006	AB570999
MGL 13	cattle	Mongolia (Zavkhan)	2008	AB571000
MGL 17	cattle	Mongolia (Zavkhan)	2006	AB571001
MGL 20	cattle	Mongolia (Zavkhan)	2006	AB571002
MGL 21	red fox	Mongolia (Zavkhan)	2008	AB571003
MGL 22	dog	Mongolia (Tuv)	2007	AB571004
MGL 23	camel	Mongolia (Govi-Altai)	2008	AB571005
MGL 24	cattle	Mongolia (Khuvsgul)	2008	AB571006
MGL 25	dog	Mongolia (Khuvsgul)	2008	AB571007
MGL 26	cattle	Mongolia (Zavkhan)	2006	AB571008
MGL 27	red fox	Mongolia (Zavkhan)	2006	AB571009
MGL 28	cattle	Mongolia (Zavkhan)	2006	AB571010
MGL 29	goat	Mongolia (Govi-Altai)	2008	AB571011
MGL 30	cattle	Mongolia (Khuvsgul)	2007	AB571012
MGL 31	cattle	Mongolia (Zavkhan)	2005	AB571013
MGL 32	red fox	Mongolia (Zavkhan)	2005	AB571014
MGL 33	camel	Mongolia (Govi-Altai)	2005	AB571015
MGL 34	wild cat	Mongolia (Govi-Altai)	2005	AB571016
MGL 35	sheep	Mongolia (Bayan-Ulgii)	2005	AB571017
MGL 36	dog	Mongolia (Ulaanbaatar)	2005	AB571018
Mongolia 3 ¹⁾	cattle	Mongolia (Zavkhan)	2006	EF614257
Mongolia 4 ¹⁾	wolf	Mongolia (Zavkhan)	2006	EF614256
Mongolia 6 ¹⁾	red fox	Mongolia (Govi-Altai)	2006	EF614254
Mongolia 7 ¹⁾	camel	Mongolia (Govi-Altai)	2006	EF614255
857r	raccoon dog	Russia	2004	AY352458
304c	steppe fox	Russia	2004	AY352459
248c	steppe fox	Russia	2004	AY352460
3561d	dog	Russia	2004	AY352481
686cattle	cattle	Russia	2004	AY352482
765w	wolf	Russia	2004	AY352483
409f	red fox	Kazakhstan	2004	AY352489
RV259	red fox	Kazakhstan	2004	AY352491
8684GRO	arctic fox	Greenland	1981	U22654
8618POL	raccoon dog	Poland	1985	U22840
9342EST	raccoon dog	Estonia	1999	U43432
9215HON	human	Hungary	1999	U43025
9202ALL	red fox	Germany	2005	U42701
9223FRA	red fox	France	1999	U43453
86107YOU	red fox	Yugoslavia	1999	U42703
8653YOU	wolf	Yugoslavia	1999	U42704
Guangxi_Y166	dog	China	2006	DQ666287
Guizhou_A148	dog	China	2006	DQ666291
Henan_Sq10	dog	China	2006	DQ666300
Hunan_Xx33	dog	China	2006	DQ666317
SKRRD0406CC	raccoon dog	South Korea	2004	DQ076126
Yokohama	human	Japan ⁴⁾	2006	AB573763
Kyoto	human	Japan ⁴⁾	2006	AB573762
NNV-RAB-H	human	India	2007	EF437215
SRL1145	buffalo	Sri-Lanka	1996	AB041969
8681IRA	dog	Iran	1995	U22482
9001FRA	dog	Guyana	1990	EU293113
Eth2003	wolf	Ethiopia	2003	AY500827
8721AFS	human	South Africa	1995	U22633
8480FX	red fox	Canada	1993	U03768
3789	skunk	USA	1998	AF461045
Chile	bat	Chile	1999	AF070450
pehm3230	human	Peru	1999	AF045166
Argentina	bat	Argentina	1997	EU293116
PV		Lab strain		M13215
CVS-11		Lab strain		AB069973
ERA		Lab strain		EF206707
ABL ²⁾	bat	Australia	2002	NC003243

¹⁾: described previously by Botvinkin et al., 2008 (10).

²⁾: Australian bat lyssavirus.

³⁾: Province of Mongolia.

⁴⁾: Japanese bitten by the dog in the Philippines.

▲表2 解析に用いられたリッサウイルス株

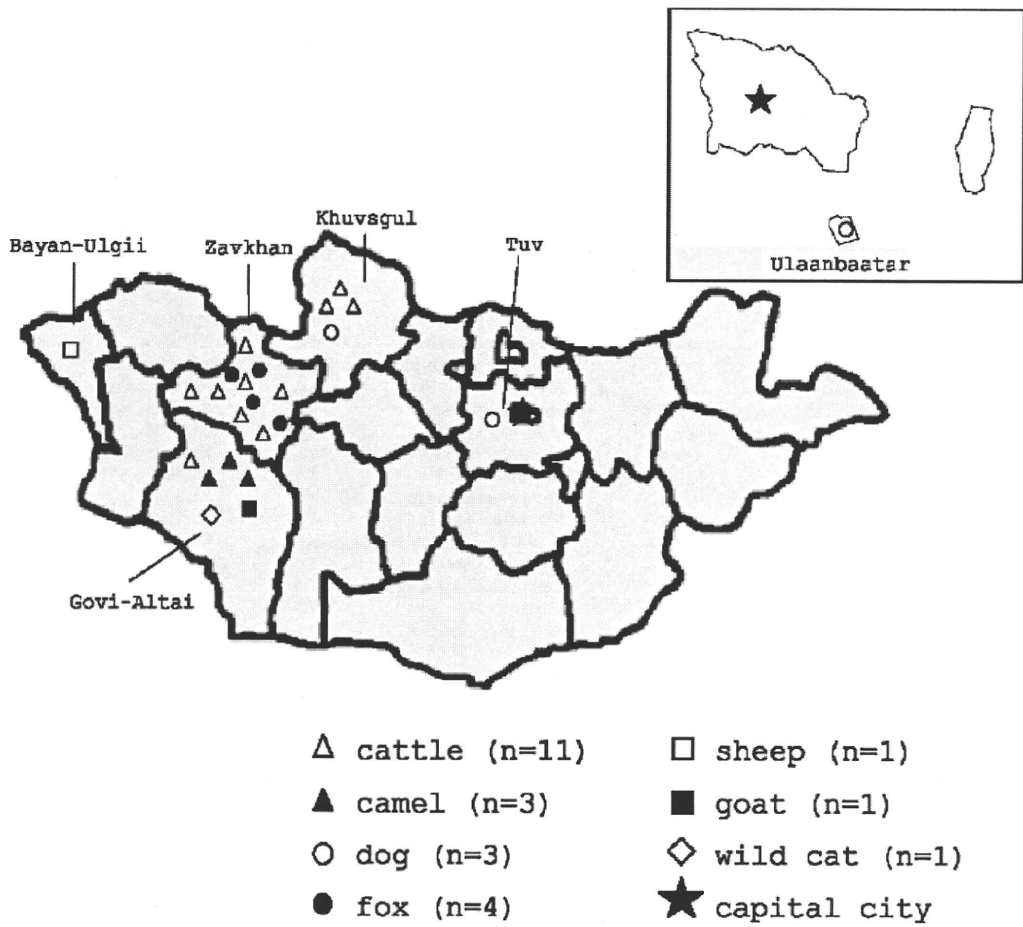


Fig. 1. Geographical distribution of the rabies viruses in Mongolia.

▲図1 モンゴルにおける狂犬病ウイルスの地理的分布

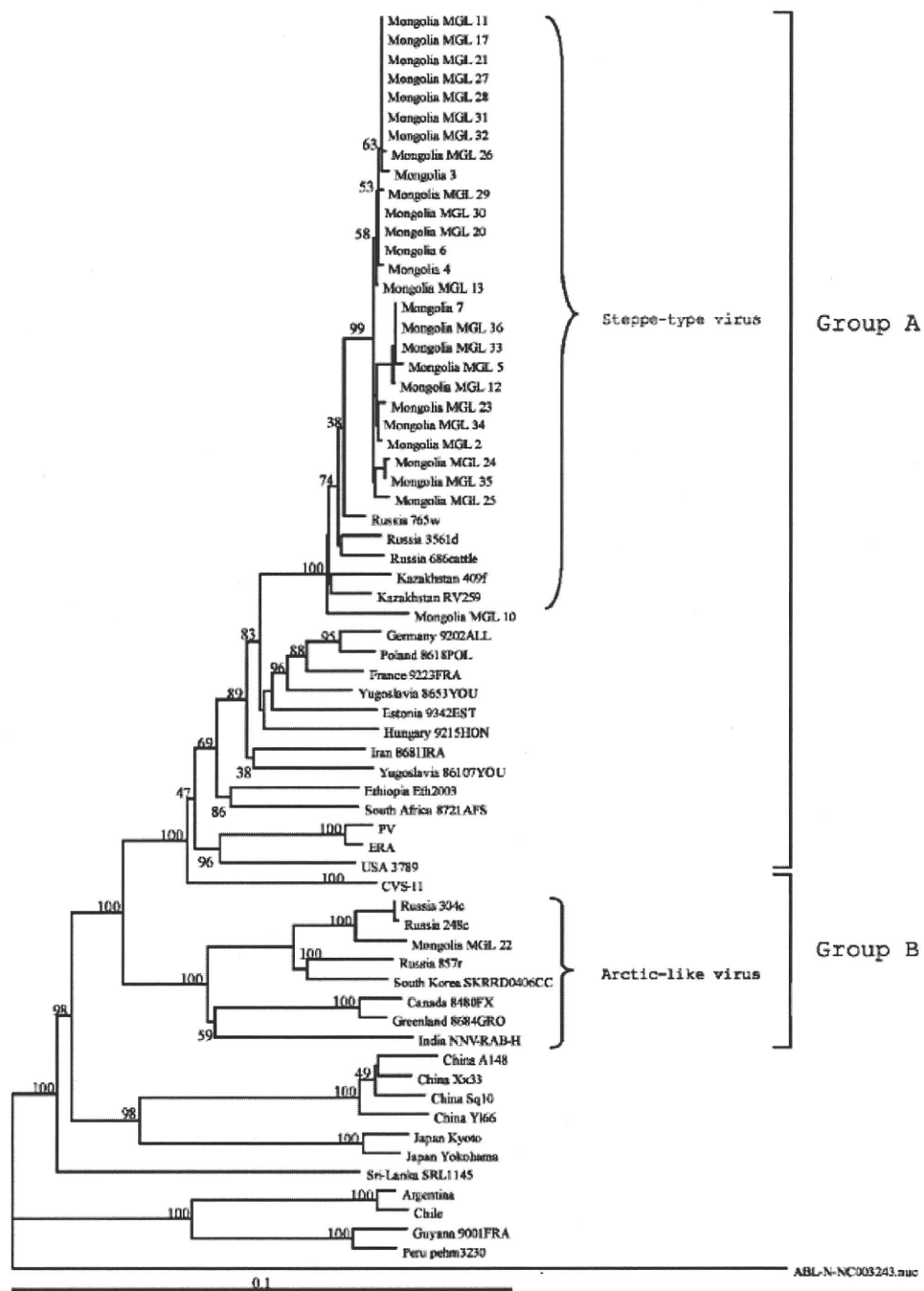


Fig. 2. Phylogenetic tree with complete sequences of N gene of rabies virus from Mongolia and other countries. ClustalX was used for sequence alignment and TreeView was used for drawing phylogenetic tree.

▲図2 モンゴルおよび他国で分離された狂犬病ウイルスの全 N 遺伝子配列に基づく系統樹解析

海外からの侵入が危惧される野生鳥獣媒介性感染症の疫学、診断・予防法等に関する研究

狂犬病の発症機序の解析と診断法開発

狂犬病ウイルスの末梢感染性に関与するウイルス遺伝子の同定

研究分担者: 伊藤直人 岐阜大学応用生物科学部・准教授

研究要旨: 狂犬病ウイルス固定毒の西ヶ原株は、高用量をマウスに筋肉内接種した場合に、致死的な感染を引き起こす。対照的に、その鶏胚馴化株の Ni-CE 株を同様に接種されたマウスは、全く症状を示さない。以上のように、両株の間には末梢感染性に明瞭な違いが認められるが、その機序は明らかにされていない。本研究では、両株の末梢感染性の違いを決定するウイルス遺伝子の同定を試みた。Ni-CE 株のゲノムに西ヶ原株由来の各遺伝子を保有する各種キメラウイルスをマウスに筋肉内接種した。その結果、西ヶ原株の P 及び N 遺伝子を保有するキメラウイルスに感染したマウス、それぞれ 5 匹中 4 匹及び 1 匹が発症し死亡した。以上より、西ヶ原株と Ni-CE 株の末梢感染性の違いに P 遺伝子が関連すること、ならびに N 遺伝子が関連する可能性が示された。

A. 研究目的

狂犬病ウイルスは、感染動物の唾液を介して創傷感染し、致死的な脳炎を引き起こす。すなわち、末梢組織から中枢神経系へのウイルスの侵入は病原性発現に必須である。しかし、本ウイルスの末梢感染機序はこれまで不明のままである。

狂犬病ウイルス固定毒の西ヶ原株とその継代株の Ni-CE 株は低用量(10^3 フォーカス形成単位 [FFU])のウイルスの脳内接種により、いずれもマウスを発症させる。一方、高用量(10^6 FFU)のウイルスを筋肉内接種した場合、西ヶ原株接種マウスが神経症状を示して死亡するのは対照的に、Ni-CE 株接種マウスは全く症状を示さない。このことは、西ヶ原株及び Ni-CE 株の末梢感染性に

違いがあることを示している。

本研究では、狂犬病ウイルスの末梢感染機序を解明することを最終目標として、西ヶ原株及び Ni-CE 株の中枢神経侵襲性を比較し、それぞれの末梢感染性との関連性を検証した。さらに、Ni-CE 株のゲノムに西ヶ原株由来の遺伝子を保有する各種のキメラウイルスを用いて、両株の末梢感染性の違いに関連するウイルス遺伝子の同定を試みた。

B. 研究方法

西ヶ原株及び Ni-CE 株の中枢神経侵襲性を検討するため、ddY マウス(4 週齢・雌、3 匹/群)の大腿筋に 10^6 FFU の各株を接種した。接種 5 日後

に採脳し、作製した 10%乳剤を用いて、脳における感染性ウイルスの存在をフォーカス・アッセイにより検証した。

西ヶ原株及び Ni-CE 株の末梢感染性の違いに関連するウイルス遺伝子を同定する目的で、Ni-CE 株のゲノムに西ヶ原株の N、P、M、G あるいは L 遺伝子を単独で保有するキメラウイルス [各々 CE(NiN) 株、CE(NiP) 株、CE(NiM) 株、CE(NiG) 株及び CE(NiL) 株] を 5 匹/群のマウスに上記の条件で筋肉内接種し、症状の推移を 14 日間観察した。

(倫理面からの配慮について)

本実験は岐阜大学動物実験委員会によって承認された。(動物実験承認番号:08119)

C. 研究結果

西ヶ原株接種群では、全ての個体の脳において、高い感染価のウイルス ($>10^8$ FFU/g) が検出された(図 1)。一方、Ni-CE 株接種群では、いずれの個体においても感染性ウイルスは検出されなかった ($<10^2$ FFU/g)。したがって、両株の異なる末梢感染性には、中枢神経侵襲性の違いが関与していることが示唆された。

各キメラウイルスの末梢感染性を検討した結果、CE(NiM) 株、CE(NiG) 株及び CE(NiL) 株接種群では、Ni-CE 株接種群と同様にいずれの個体も発症しなかった(図 2)。一方、CE(NiP) 株及び CE(NiN) 株接種群では、それぞれ 5 匹中 4 匹及び 1 匹が西ヶ原株接種マウスと同様の神経症状を示して死亡した。これらのことから、西ヶ原株と Ni-CE 株の末梢感染性の違いに P 遺伝子が関連すること、ならびに N 遺伝子が関連する可能性が

示された。

D. 考察

以前、ポリオウイルスや水疱性口炎ウイルスの末梢感染に対する生体防御に自然免疫が重要な役割を果たすことが報告されている(Lancaster et al., PLoS Pathog, 2010, Iannacone et al., Nature, 2010)。これに関連して、最近、私の研究室は、西ヶ原株が Ni-CE 株より効率的にインターフェロンの作用及び産生を阻害し、それぞれに P 及び N 蛋白質が関与することを報告した(Ito et al., J. Virol., 2010, Masatani et al., J. Virol., 2010)。以上より、西ヶ原株及び Ni-CE 株の異なる末梢感染性に、P 及び N 蛋白質の自然免疫回避能の違いが関与する可能性が考えられた。

E. 結論

狂犬病ウイルス西ヶ原株と Ni-CE 株の間で異なる末梢感染性には、P 及び N 遺伝子が関連することが示唆された。

N. 健康危険情報

なし

O. 研究発表

1. 論文発表

- I. Masatani, T., Ito, N., Shimizu, K., Ito, Y., Nakagawa, K., Abe, M., Yamaoka, S., Sugiyama, M.: Amino acids at positions 273 and 394 in rabies virus nucleoprotein are important for both evasion of host RIG-I-mediated antiviral response and pathogenicity. *Virus Res.* 155: 168-74, 2011.

2.学会発表

- 53) 山岡理子、清水健太、正谷達膳、中川敬介、伊藤直人、杉山誠: 狂犬病ウイルス Ni-CE 株の弱毒性状に関連するウイルス遺伝子の同定: 第 150 回日本獣医学会、帯広(2010, 9)
- 54) 正谷達膳、伊藤直人、中川敬介、山岡理子、杉山誠: 狂犬病ウイルス N 蛋白質がマウス脳内におけるインターフェロン応答及びウイルス感染動態に及ぼす影響: 第 150 回日本獣医学会、帯広(2010, 9)
- 55) 伊藤直人、正谷達膳、中川敬介、山岡理子、杉山誠: 狂犬病ウイルスのインターフェロン抵抗性及び病原性における P 蛋白質核外輸送シグナルの重要性: 第 150 回日本獣医学会、帯広(2010, 9)
- 56) 上利尚大、伊藤直人、正谷達膳、中川敬介、山岡理子、杉山誠: 狂犬病ウイルスの末梢感染性に関連する遺伝子の解析: 第 150 回日本獣医学会、帯広(2010, 9)
- 57) 伊藤直人、正谷達膳、中川敬介、山岡理子、安部昌子、杉山誠: 狂犬病ウイルス P 蛋白質核外輸送シグナルはインターフェロン抵抗性及び病原性に重要である: 第 58 回日本ウイルス学会、徳島(2010, 9)
- 58) Masatani, T., Ito, N., Shimizu, K., Ito, Y., Nakagawa, K., Abe, M., Yamaoka, S., Sugiyama, M.: A novel function of rabies virus nucleoprotein to evade activation of host antiviral response: U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program 44th Joint Working Conference on Viral Diseases. Sapporo (2010. 6)

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

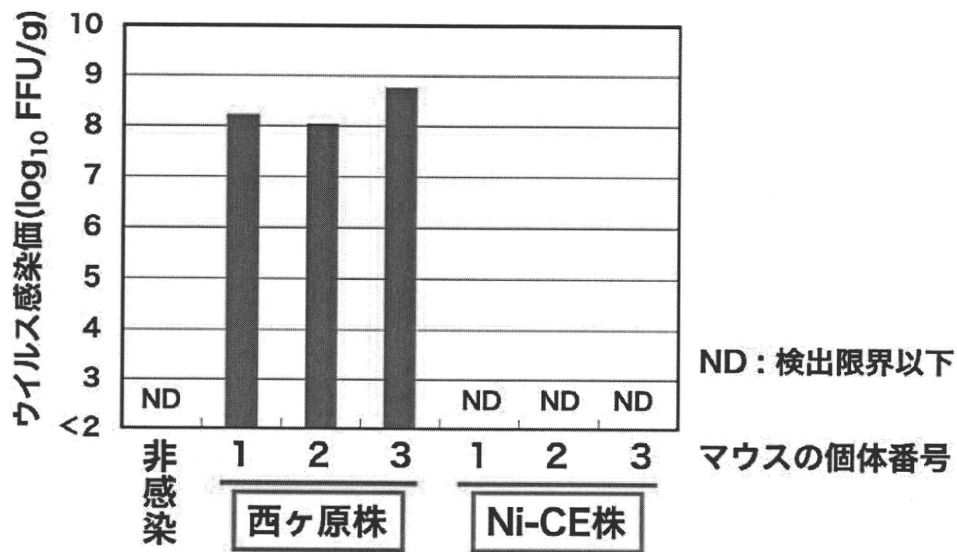


図1.狂犬病ウイルス各株を筋肉内接種されたマウスの脳における感染性ウイルスの検出

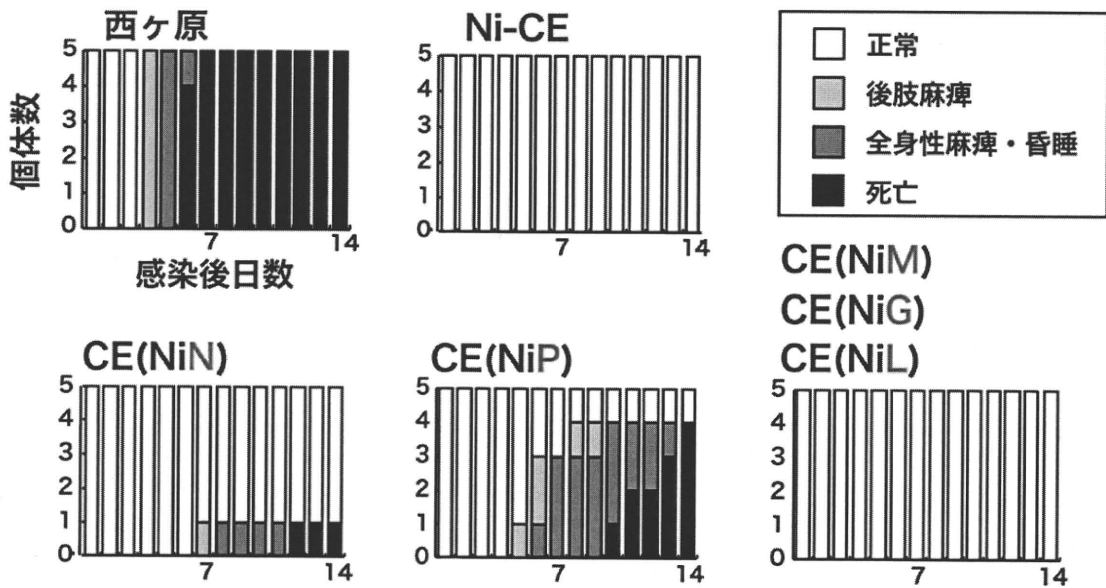


図2.各ウイルスを筋肉内接種されたマウスの症状の推移

海外からの侵入が危惧される野生鳥獣媒介性感染症の疫学、診断・予防法等に関する研究

バルトネラ感染症の疫学

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:わが国に生息する鹿(野生鹿 45 頭、飼養鹿 27 頭)とその外部寄生虫(マダニ 33 匹、シラミバエ 10 匹)について *Bartonella* 属菌の分布状況を検討した。鹿の血液と虫体をそれぞれ培養し、分離株の *gltA* 領域 (312bp)を標的としたPCR法およびDNAシーケンスにより系統解析を行った。さらに、マダニおよびシラミバエから *Bartonella* 属菌の DNA 検出を行った。野生鹿の 57.8% (26/45)から *Bartonella* 属菌が高率に分離されたのに対し、飼養鹿 (0/27)からは全く分離されなかった。マダニの 3% (1/33 検体)、シラミバエの 90% (9/10)から *Bartonella* 属菌が分離された。*gltA* 領域に基づく系統解析では、分離株は *B. capreoli*と同一または独立した2つのクレードを形成した。さらに、マダニ分離株の遺伝子型は寄生していた鹿の株と同一であったが、シラミバエ分離株では異なっていた。以上から、わが国の野生鹿は少なくとも2種の *Bartonella* 属菌を高率に保有し、シラミバエが鹿由来 *Bartonella* 属菌のベクターである可能性が示唆された。

A. 研究目的

わが国に生息する鹿とその外部寄生虫における *Bartonella* 属菌の保有状況を明らかにし、これら分離株と欧米の鹿由来株の分子系統学的関係を明らかにする。さらに、鹿の外部寄生虫であるマダニおよびシラミバエのベクターとしての可能性を検討する。

B. 研究方法

平成20年11月～平成22年3月に、北海道・奈良県・和歌山県で捕獲された野生鹿(エゾシカ19頭とホンシュウシカ26頭)、宮城県・愛知県の飼養鹿(ホンシュウシカ27頭)から血液を、奈良県の野生鹿からマダニ33匹とシラミバエ10匹を採取し

た。各試料から *Bartonella* 属菌を分離すると共に、*gltA* 領域 (312bp)の塩基配列から系統解析を行った。また、PCR法により、マダニとシラミバエの体内における *Bartonella* 属菌の DNA を確認した。

(倫理面からの配慮について)

研究対象となった野生鹿は全て管理捕獲された個体である。また、飼養鹿は動物園個体であり、動物管理者が、適切な麻酔下のもと、血液等を採取した後、覚醒させた。

C. 研究結果

野生鹿の 57.8% (26/45 検体)、マダニの 3% (1/33 検体)、シラミバエの 90% (9/10)から

Bartonella 属菌が分離された。PCR 法による *Bartonella* DNA の保有率は、マダニで 0% (0/33)、シラミバエで 100% (10/10)であった。

gltA 領域に基づく系統解析の結果、分離株は *B. capreoli* と同一 (系統 II) または独立した 2 つのクレード (系統 II) を形成した (図 1)。さらに、マダニ分離株の遺伝子型は寄生していた鹿の株と同一の遺伝子型であったが、シラミバエ分離株では異なっていた。

D. 考察

本研究により、わが国の野生鹿は少なくとも *B. capreoli* を含む 2 種の *Bartonella* 属菌を高率に保有していることが明らかとなった。また、*Bartonella* 属菌を保有していた野生鹿の多くに外部寄生虫が認められたのに対し、*Bartonella* 属菌が陰性の飼養鹿には認められなかったことから、鹿の *Bartonella* 属菌の水平伝播には外部寄生虫が関与していると考えられた。特に、マダニに比べ、シラミバエから *Bartonella* 属菌が高率に分離されると共にその DNA が検出されたこと、シラミバエから分離された株はそのシラミバエが寄生していなかった別の鹿の株と共通の遺伝子型を示したことから、シラミバエは鹿の *Bartonella* 属菌のベクターである可能性が強く示唆された。

E. 結論

わが国の野生鹿は高率に *Bartonella* 属菌を保有していることが初めて明らかとなった。近年、人に対して病原性を示す *Bartonella* 菌種が反芻類である羊から見ついているため、これら鹿由来株の公衆衛生上の意義を検討する必要があると思われる。

P. 健康危険情報

鹿が保有する *Bartonella* 属菌種の人に対する病原性は未知である。

Q. 研究発表

1. 論文発表

1. Inoue K, Kabeya H, Fujita H, Makino T, Asano M, Inoue S, Inokuma H, Nogami S, Maruyama S.: Serological survey of five zoonoses, scrub typhus, Japanese spotted fever, tularemia, Lyme disease, and Q fever, in feral raccoons (*Procyon lotor*) in Japan. 2010. Vector-Borne Zoonotic Dis. 2010. (in press)
2. Berglund EC, Ellegaard K, Granberg F, Xie Z, Maruyama S, Kosoy MK, Birtles RJ, Andersson SG : Rapid diversification by recombination in *Bartonella grahamii* from wild rodents in Asia contrasts with low levels of genomic divergence in Northern Europe and America. Mol Ecol. 2010. 19. 2241-55.
3. Inoue K, Kabeya H, Shiratori H, Ueda K, Kosoy MY, Chomel BB, Boulouis HJ, Maruyama S.: *Bartonella japonica* sp. nov. and *Bartonella silvatica* sp. nov., isolated from Apodemus mice in Japan. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. 60. 759-63.
4. Brinkerhoff R, Kabeya H, Inoue K, Bai Y, Maruyama S. : Detection of multiple *Bartonella* species in digestive and productive tissues of fleas collected from

sympatric mammals. ISME J. 2010.4. 955-8.

5. Kabeya H, Colborn JM, Bai Y, Lerdthusnee K, Richardson JH, Maruyama S, Kosoy YM: Detection of *Bartonella tamiiae* DNA in ectoparasites from rodents in Thailand and their sequence similarity with bacterial cultures from Thai patients. Vector-Borne Zoonotic Dis. 2010. 10. 429-34.

2.学会発表

- 59) 佐藤真伍、壁谷英則、山崎真梨、武野侍那子、鈴木和男、相馬幸作、増子孝義、小林信一、丸山総一: わが国の鹿における *Bartonella* 属菌の分布とそのベクターの検討: 第150回日本獣医学会、帯広(2010, 9)
- 60) 佐藤真伍、壁谷英則、小林信一、丸山総一: 奈良県の野生鹿が保有する *Bartonella* 属菌とそのベクターの検討: 第18回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー、佐渡(2010, 6)
- 61) 藤長悠太、井上快、壁谷英則、丸山総一: 愛玩用に輸入された小型哺乳類から分離された *Bartonella* 属菌の分類学的性状: 第150回日本獣医学会、帯広(2010, 9)

R. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

なし

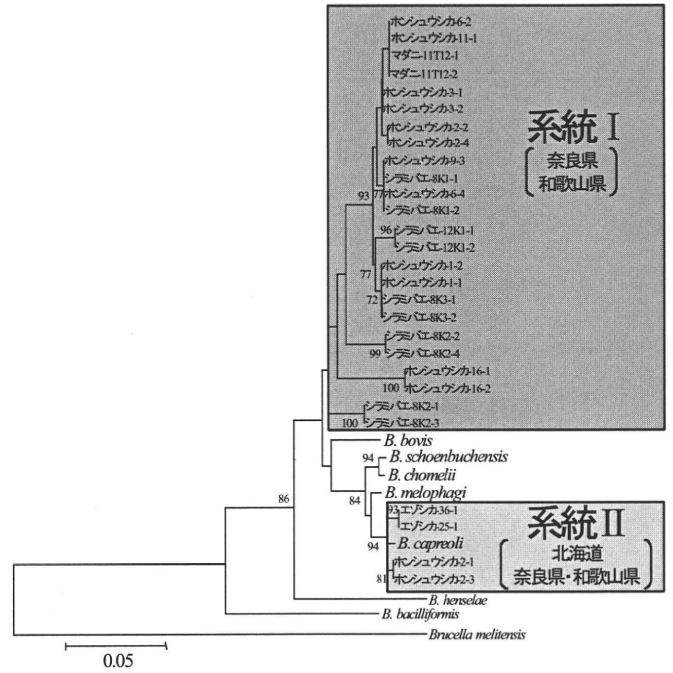
2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

図1 *gltA* 領域(312bp)に基づいた系統解析



系統 I : 既存種とは独立したクレードを形成

系統 II : *B. capreoli* とともにクレードを形成

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）

分担研究報告書

海外からの侵入が危惧される野生鳥獣媒介性感染症の疫学、診断・予防法等に関する研究

野生ヤモリにおけるサルモネラ保菌に関する疫学的研究

分担研究者 林谷秀樹

東京農工大学大学院・准教授

研究要旨：東南アジア等の熱帯や亜熱帯地方に高密度に生息するヤモリにおけるサルモネラ保有の実態を明らかにする目的で、ベトナム・メコンデルタにおいて野生のヤモリを捕獲し、その保有状況を調べた。その結果、*Salmonella* 属菌はヤモリ 456 検体中 95 検体（14.5%）から分離された。*Salmonella* 属菌の分離率は、ヤモリの種類、捕獲場所および捕獲地域により有意な差は認められなかった。ヤモリから分離された *Salmonella* の血清型は、本地域の人の *Salmonella* 感染患者から分離されたものと共通するものが多かった。これらのことから、ヤモリは自然界における *Salmonella* 属菌のレゼルボアであり、ベトナム・メコンデルタでは人の *Salmonella* 感染症の感染源となっている可能性が示された。

A. 研究目的

Salmonella 属菌は腸内細菌科に属するグラム陰性通性嫌気性桿菌で、哺乳類、鳥類、爬虫類および環境などに広く分布しており、食中毒ならびに人獣共通感染症の主要な原因細菌の一つとして知られている。厚生労働省の平成 21 年食中毒統計によると、*Salmonella* 属菌を病因物質とする食中毒の発生件数は 67 件で、*Campylobacter*、*Norovirus* に次いで第 3 位、患者数は 1,518 人で

Norovirus、*Campylobacter* およびウエルシュ菌に次いで第 4 位と上位を占めている。*Salmonella* 属菌が人に感染した場合、通常胃腸炎症状を示すにとどまるが、免疫機能の低い小児や高齢者などでは敗血症や髄膜炎などの重篤な症状を示し、時には死に至る例が報告されている。

爬虫類は *Salmonella* 属菌を比較的高率に保有していることが報告されており、ヤモリからも *Salmonella* 属菌を分離した報告

がみられる。ヤモリは東南アジアなどの熱帯・亜熱帯では高い密度で人の生活環境に生息しており、人のサルモネラ症の感染源になっている可能性が考えられるが、ヤモリにおける *Salmonella* 属菌の生態について検討した報告はみられない。また、近年、東南アジアからペットとしてヤモリが多数輸入されているが、現在、我が国では、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」（感染症法）において、爬虫類は輸入届け出の対象となっておらず、「絶滅のおそれのある野生動植物の種の国際取引に関する条約」（ワシントン条約）や「特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律」（外来生物法）に基づき、一部の爬虫類については輸入が規制されているものの、ほとんどのものは制限されることなく輸入されている。また、「動物の愛護及び管理に関する法律」（動物愛護法）で危険動物としてカミツキガメ、毒ヘビ、ワニなどの飼育が制限されているが、それ以外は特に規制がないのが現状である。しかし、近年、我が国では爬虫類に起因する人の *Salmonella* 症が散発している。このような背景のもと、本研究ではベトナム・メコンデルタにおいて野生のヤモリにおける *Salmonella* 属菌の保有状況や血清型などについて調査し、*Salmonella* の生態に果たすヤモリの役割について疫学

的に検討した。

B. 材料と方法

1. 供試材料

供試検体として、2008～2010年にベトナム南部に位置するメコンデルタのCan Tho市、Kien Giang県およびCa Mau県で捕獲した野生のヤモリ3種465検体の腸管内容物を用いた。

2. *Salmonella* 属菌の分離、同定および血清型別方法

供試検体は3mlの滅菌リン酸緩衝生理食塩水（Phosphate buffered saline, pH7.2, 以下、PBS）に浮遊させ、その1mlを10mlのEEM培地（栄研化学（株）：栄研）に接種した後、37℃で24時間前増菌培養した。その培養液1mlを10mlのハーナ・テトラチオン酸塩培地（栄研）に接種し、37℃で24時間増菌培養後、その1白金耳をDHL寒天培地（日水製薬（株）：日水）、brilliant green Agar（OXOID）ならびにMLCB寒天培地（日水）に画線塗抹し、37℃で24時間培養した。各分離培地上に発育してきた *Salmonella* 属菌を疑う典型的なコロニーから1～3個を釣菌し、それぞれをtrypticase soy agar（BD）を用いて純培養後、TSI寒天培地（日水）、LIM培地（日水）およびVP半流動培地（栄研）を用いて生化学性状試験を行った。*Salmonella* 属菌と同定された菌株については、市販のサルモネラ免疫血清（デ

ンカ生研(株))を用い、血清型を決定した。

C. 研究結果

ベトナム・メコンデルタで捕獲した野生ヤモリ 465 検体中 95 検体(14.5%)から *Salmonella* 属菌が分離された。この姿を季節別にみると、雨季(5~11月)では 230 検体中 31 検体(13.5%)、乾季(12~4月)では 186 検体中 32 検体(17.2%)から *Salmonella* 属菌が分離されたが、季節間では有意差は認められなかった。また、種別にみると、ホオグロヤモリ(*Hemidactylus frenatus*) 358 検体中 58 検体(16.2%)、ヒラオヤモリ(*Hemidactylus platyurus*) 250 検体中 33 検体(13.2%)およびオンナダケヤモリ(*Gehyra mutilata*) 38 検体中 4 検体(10.5%)から分離されたが、種間では分離率に有意差は認められなかった。また、地域別に分離率をみると、Can Tho 市では 416 検体中 63 検体(15.1%)、Kien Giang 県では 122 検体中 19 検体(15.6%)および Ca Mau 県では 108 検体中 13 検体(12.0%)から *Salmonella* 属菌が分離されたが、地域間で有意な差は認められなかった。

Salmonella 陽性のヤモリ 95 検体からは、*Salmonella* 95 株が分離された。95 株中 73 株は市販免疫血清で 10 種類の血

清型に型別された。*S. Weltevreden* が 39 株で最も多く、次いで *S. Lexington* が 11 株、*S. Newport* が 9 株、*S. Brunei* が 7 株、*S. Vejle* が 2 株、*S. Dabou*、*S. Strathcona*、*S. Agona* および *S. Hindmarsh* がそれぞれ 1 株であった。*S. Weltevreden* は調査した 3 地域いずれにおいても最も高頻度に分離された。

捕獲したヤモリのうち 92 検体は妊娠してメスヤモリで卵を体内に保有していたので、1 検体当たり 2 個の卵を無菌的に採取し *Salmonella* の分離を行ったところ、母ヤモリからは 14 検体(15.2%)から *Salmonella* 属菌が分離されたにも関わらず、体内の卵からは *Salmonella* 属菌はいずれも検体からも分離されなかった。

D. 考察

ベトナム・メコンデルタに生息する野生ヤモリから *Salmonella* 属菌は 14.7% と高率に分離された。*Salmonella* 属菌はヤモリの種類、捕獲地域および季節に関わらず分離されたことから、本地域ではヤモリは *Salmonella* 属菌の主要なレゼルボアになっているものと思われた。

ベトナム・メコンデルタのヤモリから分離された *Salmonella* 属菌の血清型のうち *S. Weltevreden*、*S. Newport*、*S. Bovismobificans* および *S. Agona* は、本地域の人の下痢患者からも分離されている血清型であり、分離された血清型は人とヤモリでは比較的共通していた。

特に *S. Weltevreden* はベトナムを含む東南アジアでは人の *Salmonella* 感染患者から高頻度に検出される主要な血清型として知られており、家畜、食品、環境などからの広く分離されるが、その自然界におけるレゼルボアは明らかになっていない。今回、*S. Weltevreden* はメコンデルタの100km以上離れた3地域において、ヤモリからいずれも高頻度に分離された。ヤモリはベトナムを含む東南アジアでは、人の生活環境周辺に高密度で生息しており、しばしば人の生活環境はヤモリの糞便に汚染されている。これらのことから、ヤモリは少なくともベトナム・メコンデルタにおいては、人の *Salmonella* 感染症、特に *S. Weltevreden* の主たる感染源になっている可能性が高いものと思われた。現在、ヤモリの糞便中の *Salmonella* 菌数や糞便中での *Salmonella* の生残性などについても検討中である。

ヤモリにおける *Salmonella* の生態を解明する一助として、ヤモリにおける *Salmonella* の感染経路を明らかにする目的で、妊娠した母ヤモリの体内の卵における *Salmonella* の汚染状況を検討したところ、母ヤモリが腸管内に *Salmonella* を保有していた場合でも、体内の卵からは *Salmonella* は全く検出されなかった。へビにおいても同様の現象が観察されており、母へビが *Salmonella* を保有していても体内の卵からは *Salmonella* は分離されないが、

しかし産卵・孵化した子へビからは母へビが *Salmonella* を保菌していた場合は、*Salmonella* が分離されることから、へビでは母子間で in egg ではなく、on egg で感染が起こっているものと推察されている。ヤモリでもへビと同様に母子間で on egg 感染が起こっているものと推察されるが、今後さらなる検討が必要である。

E. 結論

本研究により、ヤモリは自然界における *Salmonella* 属菌のレゼルボアであり、また、ベトナム・メコンデルタではヤモリは人の *Salmonella* 感染症の感染源となっている可能性が示された。

F 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ly, T. L. K., Tran, T. T. D., Nguyen, V. H., Tran, T. P., Iwata, T., Taniguchi, T., Ha, T. T., Hayashidani, H.: Isolation of *Salmonella* from flies in the Mekong Delta, Vietnam. J. Vet. Epidemiol. 2010. 14, 41-46.
- 2) Ly, T. L. K., Duong T. T. T., Nguyen T. T., Tran, T. P., Tran T. T. D., Nakadai, A., Iwata, T., Taniguchi, T., Ha T. T., Hayashidani, H.:

- Prevalence of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157 from acute diarrheic children in the Mekong Delta, Vietnam. J. Vet. Epidemiol. 2010. 14, 55-61.
- 3) Iwata, T., Une, Y., Nakamura, S., Taniguchi, T., Hayashidani, H. * Seroepidemiological survey of pathogenic *Yersinia* in breeding squirrel monkeys in Japan. J. Vet. Med. Sci. 2010. 72, 981-4.
- 4) Iwata, T. and Hayashidani H.: Yersiniosis in Breeding Monkeys in Japan, JARQ 45, 83-90, 2011.
- 5) Lee, K., Iwata, T., Nakadai, A., Kato, T., Hayama, S., Taniguchi, T., and Hayashidani, H.: Prevalence of *Salmonella*, *Yersinia* and *Campylobacter* spp. in feral raccoons (*Procyon lotor*) and masked palm civets (*Paguma larvata*) in Japan. Zoonoses Public Health. (in press) .
2. 学会発表
- 1) 奥村水門、中田勝士、林谷秀樹：沖縄・やんばる地域に生息するクマネズミにおける *Salmonella* と *Yersinia* の保有状況、第 10 回人と動物の共通感染症研究会学術集会、東京、2010 年 10 月
- 2) Hayashidani, H., Akiyama, T., Taniguchi, T., IWATA, T.: TaqMan-Based Real-Time PCR Method for Detection of *Yersinia pseudotuberculosis*, 10th International Symposium *Yersinia*, Recife, 2010 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

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)

分担研究報告書

海外からの侵入が危惧される野生鳥獣媒介性感染症の疫学、診断・予防法等に関する研究

欧州型ボレリア・ガリニの拡散に関する研究

研究分担者	川端 寛樹	国立感染症研究所 室長
研究協力者	石畝 史	福井県衛生環境研究センター
	増澤 俊幸	千葉科学大学
	高野 愛	国立感染症研究所
	井上 智	国立感染症研究所 (研究分担者)
	Sergey E. Tkachev	Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry
	苅和 宏明	北海道大学 (研究代表者)
	Viacheslav G. Morozov	Medical Company "Hepatolog" Incorporated
	矢野 泰弘	福井大学
	高田 伸弘	福井大学
	藤田 博己	大原総合病院
	Xiaohang Ma	Zhejiang University

研究要旨:

近年鳥類の移動により欧州型ボレリア・ガリニが長距離を移動した例、および広域拡散した例が海外で報告されるようになった。このことから、髄膜炎や脳炎など重篤な神経症状を引き起こす欧州型ボレリア・ガリニの分布について、わが国のみならず欧州近隣諸国において、その拡散を再調査する必要がでてきた。そこで本研究では、欧州で神経ボレリア症を引き起こしている欧州型ボレリア・ガリニについて、ロシアおよび中国での病原体ボレリア調査を開始した。今年度までの調査により、1)西欧諸国で欧州型ボレリア・ガリニを伝播するリシナスマダニの分布東端であるモスクワ市近郊において、高頻度で欧州型ボレリア・ガリニが見出されることを確認した。また、2)同地域で採取されたシュルツェマダニからも低頻度ながら欧州型ボレリア・ガリニを見出した。3)中国で野鼠から分離されたボレリア・ガリニはアジア型ボレリア・ガリニと推定された。このことは、リシナスマダニの分布東端まで欧州型ボレリア・ガリニが浸潤し、かつリシナスマダニとシュルツェマダニが同所的に棲息する地域では、シュルツェマダニを介する伝播サイクルに欧州型ボレリア・ガリニが入り込んだ可能性を示している。今後は、リシナスマダニが分布しないシベリア地域、中国においてさらなる調査を行う必要がある。

A. 研究目的

ライム病はスピロヘータの一種、ボレリア属細

菌による感染症で、欧米では年間数万人規模で

患者が報告されている。特に米国ではボレリア・

ブルクドルフェリ感染による関節炎が、また欧州では欧州型ボレリア・ガリニ感染による神経ボレリア症が見出されるなど、患者発生数に加え、その重い病態のため重大な社会問題となっている。

我が国では欧州同様ボレリア・ガリニがライム病起因菌であることが示されてきた一方で、23S-5SrRNA 遺伝子間 DNA 領域の制限酵素断片長多型性解析などの解析から、国内分離ボレリアは欧州のボレリア・ガリニとは遺伝学的に異なる可能性が指摘されてきた。また我が国ではボレリア・ガリニによる髄膜炎、脳炎など重度の神経ボレリア症の症例報告がないこと、また報告されてくる患者数も非常に少ないことから、国内に既存のボレリア・ガリニは神経症状を起こしにくい弱毒型ボレリアであると推定されている。

一方、欧州での調査報告では、欧州においてはボレリア・ガリニの多くは鳥類によって維持・伝播されることが次第に明らかとなってきた。さらに、これまでボレリア・ガリニが見出されなかった北米大陸においても、ボレリア・ガリニの侵入が確認されたことから(Smith RP Jr et al., 2006)、現在、世界各地で欧州型ボレリア・ガリニの拡散、侵入が危惧されている。

そこで本研究では、我が国への欧州型ボレリアの侵入を察知するために、欧州と我が国の間に位置する国・地域において浸潤しているボレリア細菌についてその実態を明らかにするとともに、我が国への欧州型ボレリア・ガリニ侵入リスクを評価することを目的とし研究を開始した。

B. 研究方法

欧州型ボレリア・ガリニの分布域を調べるために、1)極東ロシアから欧州東部に棲息するマダニ、野鼠よりボレリアを分離・検出し、2)高感度型別

法である Multi-locus sequence typing (MLST) 法によりボレリアの型別を行い、3)それぞれの Sequence type (ST)をデータベースと照合、解析を行った。使用したボレリア・ガリニ 32 菌株は、リシナスダニ(*Ixodes ricinus*)由来 25 株、シエルツエマダニ(*I. persulcatus*)由来 3 株、野鼠(*Apodemus uralensis*)由来 4 株であり、これらは共同研究者である千葉科学大学・増澤俊幸博士、福井県衛生環境研究センター・石畝史博士他より分与頂いた(表1)。

これらボレリア株を BSK 培地にて 32°C 孵卵器にて静置培養後、常法に従って DNA 抽出した。一部の株については、複数の菌種が混合していたため、Norris らの方法にて clone 化を行った。これら培養株より抽出した DNA を鋳型とし、Margos らの方法に従って PCR を行い、増幅 DNA を得た。得られた増幅 DNA は精製後塩基配列を決定し、データベース上にある配列を含めた上で MLST 解析に供した。

(倫理面からの配慮について)

該当しない。

C. 研究結果

分離されたボレリア 32 株について各々 8 loci の塩基配列、約 5kbp を決定し、国際 MLST データベースと照合した。この結果 32 株中 20 株が既報の ST と一致した。1)モスクワ近郊で採取されたリシナスダニ由来 24 株には、欧州型ボレリア・ガリニの ST である ST86(5 株)、ST94(1 株)、ST179(1 株)、ST180(2 株)、ST209(4 株)、ST244(4 株)、およびこれまで知られていない ST である Untypable STs(5 株)が含まれた。モスクワ近郊で

は欧州各国と同様に欧州型ボレリア・ガリニが優勢であると考えられた。また Untypable STs の 5 株 (Nr187-cl1, Nr215-cl1, Nr176-cl1, Nr309, Nr180-cl5) についてもその系統解析からは、欧州型ボレリア・ガリニであることが推定された(表1)。ドイツでリシナスマダニより分離された ZQ1 株も Untypable ST であったが、ST175 と近縁の欧州型ボレリア・ガリニと推定された。

一方、ST82(2 株)は欧州型ボレリア・ガリニとは異なるクラスターを形成したことから、欧州型かアジア型かは現在は不明である。

2)モスクワ近郊で採取されたシュルツェマダニ由来株(Np189)は ST86 であり、欧州で見出される欧州型ボレリア・ガリニと一致した。同 Mp7 株はそれぞれのクラスターより独立していた。

3)極東ロシアで分離されたシュルツェマダニ由来 1 株(Ip90)はそれぞれのクラスターより独立していた。また、中国国内の野鼠より分離されたボレリア 4 株これまで登録された ST とは一致しなかったが、それぞれアジア型ボレリア・ガリニと近縁であると考えられた。

4)欧州型ボレリア・ガリニの内、最も強毒型と考えられている ST84 および ST85 は今回の調査では見出されなかった。

D. 考察

モスクワ近郊で浸潤しているボレリア・ガリニ株は神経ボレリア症が報告されている国・地域で見出される欧州型ボレリア・ガリニ株と同じ ST 型が高頻度で見出された。STs86、180、209 は既にフランス、イギリス、ドイツ、ラトビアなど広範な地域でその存在が確認されている。この広域分布性は、リシナスマダニが鳥類に寄生すること、かつ欧州

型ボレリアが鳥類によって保菌されることと密接に関連すると思われる。またこれら ST のうち、ST86 はモスクワ近郊で採取されたシュルツェマダニからも分離されている(Np189 株)。シュルツェマダニも鳥類に寄生することが知られていることから、本 ST がシュルツェマダニの棲息地域にも拡散する可能性を示唆している。一方で、モスクワ以東の国・地域における欧州型ボレリア・ガリニの浸潤域は不明であり、今後はこれら地域における調査研究が望まれる。

E. 結論

ロシア、モスクワ近郊で分離された株から高頻度で欧州型ボレリア・ガリニを見出した。またモスクワ市近郊では、我が国でボレリア・ガリニを媒介するシュルツェマダニからも欧州型ボレリア・ガリニを見出した。今後はロシア、中国等西欧諸国と我が国の間に位置する国、地域における欧州型ボレリア・ガリニの侵入状況のモニタリングを行う必要が有る。

S. 健康危険情報

なし

T. 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.本研究で使用した菌株とその Sequence type (ST)

	菌株	由来	分離地	ST	欧州型/アジア型/不明
1	Nr119	<i>Ixodes ricinus</i>	Moscow, Russia	82	不明
2	Nr120	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	86	欧州型
3	Nr129	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	209	欧州型
4	Nr169	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	244	欧州型
5	Nr176-cl1	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	Untypable	欧州型(ST246 近縁)
6	Nr180-cl4	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	180	欧州型
7	Nr180-cl5	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	Untypable	欧州型(ST180 近縁)
8	Nr182-cl2	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	179	欧州型
9	Nr184	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	244	欧州型
10	Nr187-cl1	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	Untypable	欧州型(ST246 近縁)
11	Nr198	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	94	欧州型
12	Nr215-cl1	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	Untypable	欧州型(ST246 近縁)
13	Nr220	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	244	欧州型
14	Nr254	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	209	欧州型
15	Nr258	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	86	欧州型
16	Nr263	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	209	欧州型
17	Nr267	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	244	欧州型
18	Nr274	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	86	欧州型
19	Nr305	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	86	欧州型
20	Nr309	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	Untypable	欧州型(ST209 近縁)
21	Nr311	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	86	欧州型
22	Nr316	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	82	不明
23	Nr326	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	209	欧州型
24	Nr334	<i>I. ricinus</i>	Moscow, Russia	180	欧州型
25	ZQ1	<i>I. ricinus</i>	Germany	Untypable	欧州型(ST175 近縁)
26	Np189	<i>I. persulcatus</i>	Moscow, Russia	86	欧州型
27	Mp7	<i>I. persulcatus</i>	Moscow, Russia	Untypable	不明
28	Ip90	<i>I. persulcatus</i>	Khabarovsk, Russia	Untypable	不明
29	ChYAE2	<i>Apodemus uralensis</i>	Yakeshi, China	Untypable	アジア型(ST122 近縁)
30	CTA1b	<i>A. uralensis</i>	Urumqi, China	Untypable	アジア型(ST129 近縁)
31	CTA4a	<i>A. uralensis</i>	Urumqi, China	Untypable	アジア型(ST122 近縁)
32	CTA5b	<i>A. uralensis</i>	Urumqi, China	Untypable	アジア型(ST138 近縁)