

の比較を行った。

B. 研究方法

マウスへの皮下投与によって西ヶ原株及び Ni-CE 株の末梢感染性を検討するため、ddY マウス(4 週齢・雌、5 匹/群)の左下腹部の皮下に 10^6 フォーカス形成単位 (FFU) の各株を接種した。接種後 14 日まで各マウスの症状を観察し、「正常」、「後躯の麻痺」、「全身性麻痺・昏睡」、「死亡」に分類した。

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皮下投与した。さらに、西ヶ原株の P 及び M 遺伝子を保有するキメラウイルス CE(NiPM)株を遺伝子操作系により確立し、その末梢感染性を同様に検討した。

西ヶ原株のゲノムに Ni-CE 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 Ni(CEN)株、Ni(CEP)株、Ni(CEM)株、Ni(CEG)株及び Ni(CEL)株] についても同様に皮下投与した。接種 14 日後における各感染マウスの発症率を算出した。

(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

西ヶ原株を皮下投与した場合、マウスは平均

4.4 日の潜伏期を経て、全個体(5/5 匹)が発症・死亡した(図1)。一方、Ni-CE 株を皮下投与したマウス群では、いずれの個体も発症せず、全個体(5/5 匹)が生存した。以上より、皮下投与を用いた場合でも、西ヶ原株と Ni-CE 株の間に明瞭な末梢感染性の違いが確認された。

両株の末梢感染性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各遺伝子を単独で組換えたキメラウイルス [CE(NiN)株、CE(NiP)株、CE(NiM)株、CE(NiG)株及び CE(NiL)株] をマウスに皮下投与し、症状の観察を行った。その結果、これらのキメラウイルス感染マウスに発症するものは確認できなかった(表1-1)。このことは、皮下投与による西ヶ原株と Ni-CE 株の末梢感染性の違いには複数の遺伝子に関連することを示している。

反対に、西ヶ原株のゲノムに Ni-CE 株の各遺伝子を組換えたキメラウイルス [Ni(CEN)株、Ni(CEP)株、Ni(CEM)株、Ni(CEG)株及び Ni(CEL)株] についても同様の実験を行った。その結果、Ni(CEN)株及び Ni(CEG)株を皮下投与したマウスが 100%発症した一方で、Ni(CEP)株、Ni(CEM)株及び Ni(CEL)株を皮下投与したマウスの発症率は、それぞれ 60%(3/5 匹)、60%(3/5 匹)及び 80%(4/5 匹)であった(図2、表 1-2)。これらの発症マウスは、いずれも神経症状を示した後に死亡した。以上より、皮下投与による西ヶ原株と Ni-CE 株の末梢感染性の違いには、P、M 及び L 遺伝子が主要に関連することが明らかとなった。

次に、これらの 3 遺伝子のうち、特に強い関連が示唆された P 及び M 遺伝子に着目し、Ni-CE 株のゲノムに西ヶ原株の P 及び M 遺伝子を保有するキメラウイルス CE(NiPM)株を作出した。本株

を皮下投与した場合のマウスの発症率を調べた結果、40%(2/5 匹)のマウスの発症が確認された(表 1-1)。以上のことから、皮下投与による西ヶ原株の末梢感染性に P 及び M 遺伝子が重要であることが確認された。

D. 考察

今回、筋肉内投与と同様に、皮下投与によっても西ヶ原株に末梢感染性があることが確認された。西ヶ原株を筋肉内投与されたマウスの潜伏期が平均で 3.0 日であったのに対し(前年度報告書)、皮下投与では 4.4 日と 1 日以上潜伏期の延長が認められた。筋肉には多数の神経繊維が密に分布しているため、筋肉内投与では皮下投与よりもウイルスが神経に侵入しやすいと考えられる。このことが皮下投与時の潜伏期の延長に関与していると考えられた。

予備試験の結果ではあるものの、今回、西ヶ原株を皮下投与されたマウスの中で、まれながら 2 週間以上の潜伏期を示す個体も確認された(データ未掲載)。このような不定な潜伏期は自然感染においても観察されることから(Jackson, Rabies 2nd edition, 2007)、皮下投与法を用いることにより、筋肉内投与よりも自然感染に近い状態で狂犬病ウイルスの末梢感染を再現できると考えられた。

筋肉内投与によって CE(NiP)株および CE(NiN)株を接種したした場合、各々 80%及び 20%のマウスに発症が確認される(昨年度報告書)(表 1-1)。一方、今回、CE(NiN)株、CE(NiP)株、CE(NiM)株、CE(NiG)株あるいは CE(NiL)株を皮下投与されたマウスに、いずれも発症個体は認められなかった。これらの成績も、上述のように、皮下投与では、

筋肉内投与に比べて狂犬病ウイルスの末梢感染が成立しにくいことを示している。また、皮下投与による末梢感染の機序が筋肉内投与によるものと異なることも示唆された。

西ヶ原株のゲノムに Ni-CE 株の各遺伝子を組換えた各種キメラウイルスの末梢感染性の解析により、皮下投与による西ヶ原株と Ni-CE 株の末梢感染性の違いに P、M 及び L 遺伝子が関連していることが明らかとなった。以前、西ヶ原株の P 蛋白質は、Ni-CE 株の同蛋白質よりも I 型インターフェロン・シグナル阻害能が強いことを報告した(Ito et al., J. Virol., 2010)。また、西ヶ原株の M 蛋白質は、Ni-CE 株の同蛋白質よりも効率よくアポトーシスを回避することもわかっている(Mita et al., Virus Res., 2008)。このような性状の違いが何らかの機序により西ヶ原株の末梢感染性に関与する可能性が考えられる。特に、P 遺伝子は、筋肉内投与による末梢感染性にも関連していることから(昨年度報告書)、投与法の違いにかかわらず、末梢感染性の成立に重要な役割を果たしていることが示唆された。今後、西ヶ原株の末梢感染性における L 蛋白質の重要性についても検証していく予定である。

E. 結論

今年度は、皮下投与による狂犬病ウイルス西ヶ原株と Ni-CE 株の末梢感染性の違いに、P、M 及び L 遺伝子が関連することを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Ito N, Mita T, Shimizu K, Ito Y, Masatani T, Nakagawa K, Yamaoka S, Abe M, Okadera K, Minamoto N, Sugiyama M. Amino Acid substitution at position 95 in rabies virus matrix protein affects viral pathogenicity. J Vet Med Sci. 2011. 73:1363–1366.

- 2) Yamaoka, S., Ito, N., Masatani, T., Abe, M., Nakagawa, K., Okadera, K., Sugiyama, M. All viral genes contribute to different pathogenicities of rabies virus Nishigahara and Ni-CE strains. XV International Congress of Virology, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (2011, 9).

2.学会発表

- 1) Nakagawa, K., Ito, N., Masatani, T., Abe, M., Yamaoka, S., Sugiyama, M. Generation of rabies virus strain attenuated by multiple mechanisms. XV International Congress of Virology, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (2011, 9).

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

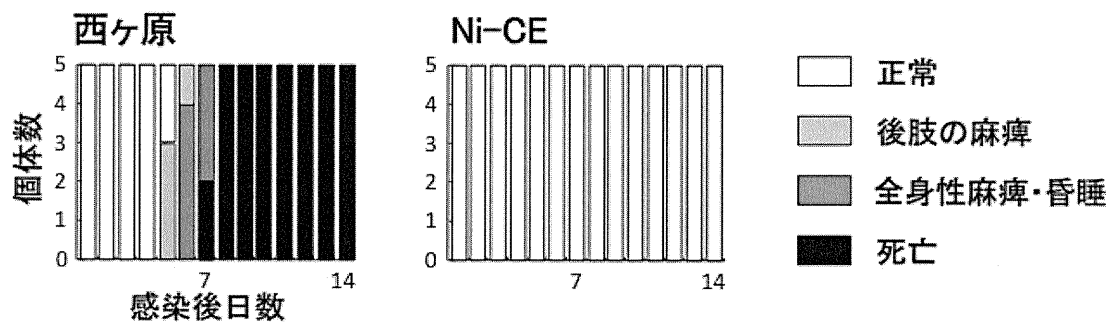


図1. 西ヶ原株及び Ni-CE 株を皮下投与されたマウスの症状の推移

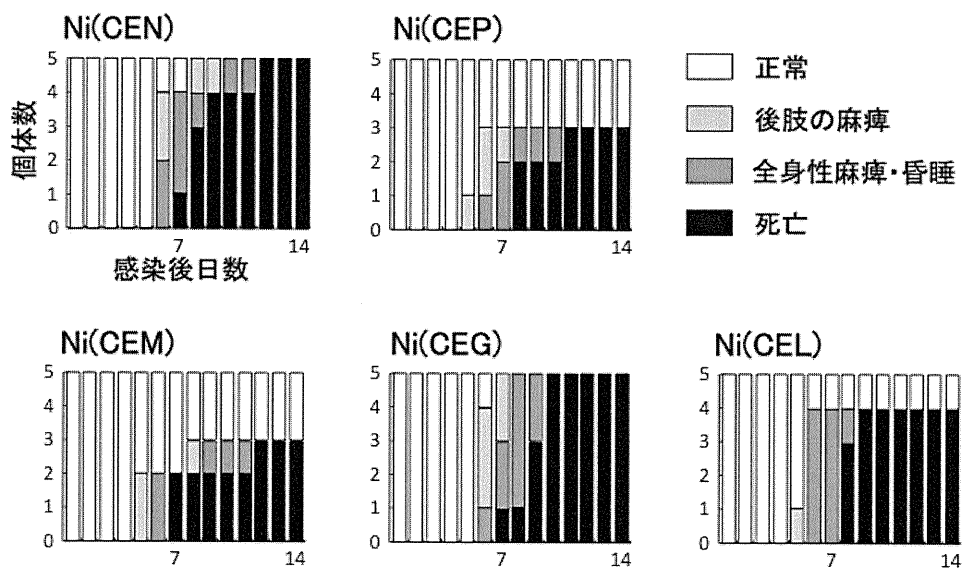


図2. 各キメラウイルスを皮下投与されたマウスの症状の推移

表1-1. 各ウイルス株に感染したマウスの発症率
















	ゲノム構成	筋肉内投与	皮下投与
	N P M G L		
西ヶ原		100%	100%
Ni-CE		0%	0%
CE (NiN)		40%	0%
CE (NiP)		80%	0%
CE (NiM)		0%	0%
CE (NiG)		40%	0%
CE (NiL)		0%	0%
CE (NiPM)		100%	40%

表1-2. 各ウイルス株に感染したマウスの発症率

	ゲノム構成	筋肉内投与	皮下投与
	N P M G L		
西ヶ原		100%	100%
Ni-CE		0%	0%
Ni (CEN)		100%	100%
Ni (CEP)		100%	60%
Ni (CEM)		100%	60%
Ni (CEG)		100%	100%
Ni (CEL)		100%	80%

分担研究報告書

輸入回帰熱症例の実験室診断について

研究分担者	川端 寛樹	国立感染症研究所 室長
研究協力者	忽那 賢志	奈良市立奈良病院
	笠原 敬, 三笠桂一	奈良県立医科大学附属病院
	高野 愛, 大西 真	国立感染症研究所

研究要旨:

感染症法4類に規定される回帰熱は、国内感染例はこれまで報告されていないが、海外渡航者の行動様式の変化等から、国外での感染の危険性が危惧されている。また、近年回帰熱病原体と非常に近縁な関係にあるボレリア属細菌も報告され、これと回帰熱ボレリアとの鑑別診断も重要な課題となってきた。そこで本研究では、回帰熱の実験室診断法の開発を進めるとともに、臨床現場との協力により海外輸入例の診断に成功したので報告する。

A. 研究目的

回帰熱は動物由来感染症の一種で、適切な治療が行われなかった場合、数%から40%程度の致死率が見られること、また妊婦が感染した場合、母子感染による胎児流産の頻度が上昇することから、アフリカ諸国等では極めて重要な感染症の一つとされている。我が国では国内感染例は知られていないことから、我が国での感染症対策としては、海外感染例の迅速検査手法を開発することが重要な課題である。

本研究では、海外感染例に対する検査体制の整備と実際の輸入例対応を進めているが、この過程で、2010年に実際に海外感染例の診断に成功したのでその1例を報告する。

B. 方法と材料

【症例概略】 患者は20歳女性で、主訴は周期性

の発熱と下肢痛であった。2010年9月1日から8日までの1週間ウズベキスタンのリシタンでボランティア活動をしていた。ウズベキスタン滞在中、寝ている間に右大腿を虫に噛まれたという。帰国後の9月12日に39℃の発熱と下肢痛を認め近医を受診し、感冒と診断され抗菌薬フロモックス(CFPN-PI)とロキソプロフェンを処方された(1度目の発熱)。発熱は3日程度で解熱したが、その後9月24日と10月4日にも同様の発熱と下肢痛が出現した(2度目、3度目の発熱)。この際、病院は受診せず残っていたCFPN-PIを内服し1日で解熱したという。その後、周期性の発熱の原因精査のため10月8日に市立奈良病院を受診した。初診時には解熱しており、自覚症状はなかった。身体所見では圧痛を伴う右頸部リンパ節腫大と右大腿内側に痂皮を認めた以外に異常所見

はなかった。下肢に関節の腫脹や筋把握痛は認められなかった。血液検査でも特に異常なく、血液培養を採取し経過観察とした。10月15日午後から再度発熱があり市立奈良病院を再受診した(4度目の発熱)。この際、発熱・全身倦怠感に加え軽度の頭痛と「両足がちぎれそう」という強い下肢痛の訴えがあった。身体所見は前回受診時と特に変わりなく、発熱時の皮疹や関節腫脹もみられなかった。周期性の発熱と海外渡航歴からマラリアを疑い血液塗末標本のギムザ染色を行ったがマラリア原虫は認めず、マラリア迅速検査キットを用いた迅速検査も陰性であった。またウズベキスタンで乳製品を食べていたことからブルセラ症を疑いブルセラ凝集反応検査も行ったが陰性であった。周期性の発熱の原因は依然不明であったが全身状態は良く、患者本人・家族も入院はせず外来でのフォローアップを希望されたため外来で経過観察を行うこととした。10月26日午後から発熱があり市立奈良病院を受診した(5度目の発熱)。発熱・全身倦怠感・下肢痛の訴えは変わらず、バイタルサインは血圧 112/70mmHg、脈拍数 90bpm、呼吸数 14/min、体温 39.8℃と比較的徐脈であった。CRP 19.45 mg/dl(当院初診時の無熱時は 2mg/dl 程度)WBC 5,450(Neut 55.7%, Lym 35.8%, Eos 4.4%, Mono 3.7%, 異型リンパ球なし)AST 26 IU/l, ALT 69 IU/l, その他 BUN/Cr, 電解質, CK など正常。身体所見では前回診られなかった所見として腹部触診上脾臓を触れ、腹部エコー検査上も脾腫(64mm×39mm)を認めた。4度目の発熱時同様、血液塗末標本のギムザ染色を施行しマラリア原虫は認められなかったがスピロヘータ様の菌体を認めたため回帰熱を疑い、入院の上ミノマイシン(MINO) 100mg×2/日の点

滴投与を開始した。確定診断のため、PCR法によるボレリア DNA の検出を行い、発熱期採血(10月15日, 10月27日)の好気および嫌気血液培養液、および無熱期採血(10月8日)の好気血液培養液よりボレリア DNA が検出された。検出された DNA の塩基配列決定により、感染ボレリア種は *Borrelia persica* と同定された。治療開始後に Jarisch-Herxheimer 反応は見られなかった。治療開始後、周期性の発熱は出現せず MINO は10日間で投与終了とした。

【検査方法】*Borrelia* DNA の検出は以下の方法により行った。

1) Culture Bottle(嫌気, 好気)培養液を用いた。2010.10.9*, 2010.10.15, 2010.10.27 採血血液の培養液を試験に供した。また、血清は 2010.10.15, 2010.10.27 採血のものを用いた。

Culture Bottle 培養液からの DNA 抽出・精製
培養液

↓

低速遠心(800rpm, 5min)→Resin 等除去

↓

上澄 10ml

↓

Promega Wizard Genomic DNA purification kit にて DNA 抽出, 精製を行った。DNA は TE 溶液 0.3m に懸濁させ、以下の反応に用いた。

血清からの DNA 抽出・精製

血清(1ml)

↓

高速遠心

↓

沈渣

↓

DNA 抽出には DNeasy tissue kit (Qiagen)を用い、添付プロトコールに従って DNA 抽出、精製を行った。DNA は蒸留水 60μl にて溶出させた。

2)PCR

2-1)使用 PCR プライマーの一覧を示す。

増幅対象および Primer 塩基配列(5' -3')

鞭毛構成遺伝子(flaB)

1st-PCR

BflaPAD : 5' -GAT CA(G/A) GC(T/A) CAA (C/T)AT AAC CA(A/T) ATG CA-3'

BflaPDU:5' -AGA TTC AAG TCT GTT TTG GAA AGC-3'

2nd-PCR(nested)

BflaPBU:5' -GCT GAA GAG CTT GGA ATG CAA CC-3'

BflaPCR:5' -TGA TCA GTT ATC ATT CTA ATA GCA-3'

()内はこれら塩基の mix であることを示す。

2-2)上記精製 DNA を、以下の PCR 反応の鋳型 DNA として使用した。反応組成は以下の通りである。

puReTaq PCR Ready-to use ビーズ:1

20 μ M forward primer 0.5 μ l (BflaPAD のみ 2μl)

20 μ M reverse primer 0.5 μ l

鋳型 DNA 2 μ l

dH2O up to 25 μ l

2-3)PCR cycle は以下の通りである。鞭毛遺伝子を標的にした PCR では、1st-PCR 溶液を鋳型として nested-PCR を行った。

1st-PCR: 95°C10sec, 50°C30sec, 72°C30sec (35 cycles) + 72°C2min(post elongation)

2nd-PCR: 95°C10sec, 50°C30sec, 72°C30sec (30 cycles) + 72°C2min(post elongation)

2-4)反応終了後、PCR 産物を 0.8%アガロースゲルにて電気泳動後、臭化エチジウムにて染色、ポラロイドフィルムにて写真撮影した。

3)増幅 DNA の塩基配列決定

陽性バンドが見出された検体については BflaPBU, BflaPCR にて塩基配列を決定した。決定した塩基配列をもとに回帰熱ボレリア、ライム病ボレリアの代表的な種との比較を行い、感染種の推定を行った。

C. 結果

Culture bottleおよび血清からボレリアDNAが検出された(図1)。発熱期採血の血液培養Culture bottleからは全ての検体よりボレリアDNAが検出された。また無熱期採血のCulture bottleの一部からもボレリアDNAが検出された。

検出されたDNA配列は以下の通りである。検出されたすべての検体で塩基配列は100%一致した。系統解析の結果、感染種は*B. persica*と同定された。

TGCAAAAATT AATACACCAA CTTCATTAAC
TGGGTCACAA GCTTCATGGA CATTAAGAGT
ACATGTGGGT GCAAATCAAG ATGAAGCAAT
TGCTATTAAT ATTTATGCAG CTAATGTTGC
AAATCTTTTC TCAGGTGAGG GTGCTCAACA
AGCAACTCAA AATCAGGAAG GAGTACAACC
AGCAGCAGCT CCAACTCAAG GTGGAATTAA
TTCTCCAGTT AATGTTACAA CTGCTGTTGA
TGCCAATGTT TCACTTACAA AAATAGAAGA
(270bp)

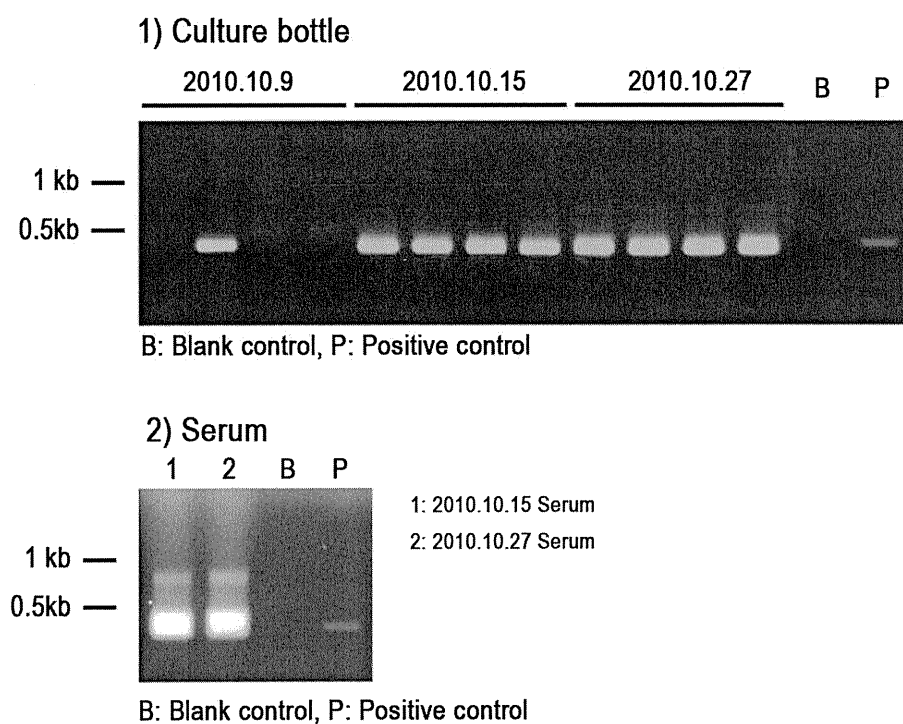


図1. 臨床検体からのボレリア DNA 検出

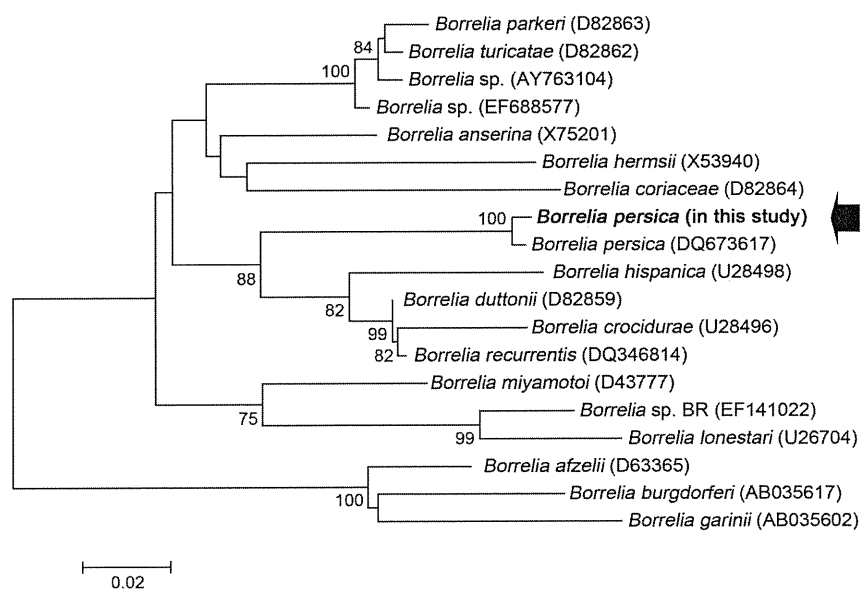


図2. 検出されたボレリア種の同定(*flaB* 遺伝子の塩基配列による)

D. 考察

回歸熱はスピロヘータの一種, ボレリア属細菌に

よる感染症で, マダニ媒介性の *B. turicatae*, *B. duttonii* など, およびシラミ媒介性の *B.*

reccurentis が病原体として知られている。第二次世界大戦中にはアフリカと欧州を併せて 50,000 名の死者を出したと推計されている。世界的にみて、アフリカ諸国での感染例が最も多く、北米や中近東などでも感染例が報告されている。また欧州等からアフリカへの海外渡航者でも感染例がしばしば報告されている。*B. persica* は北アフリカ、中近東、中央アジア、インドに分布し、近年流行が続いているイランでは *Ornithodoros tholozani* が媒介マダニと考えられている。回帰熱は、高いレベルでの菌血症による発熱期、および感染は持続しているものの菌血症を起こしていない、もしくは低レベルでの菌血症状態(無熱期)を交互に数回繰り返す、いわゆる周期性の発熱を主訴とする。一般的には、感染後 4-18 日(平均 7 日程度)の潜伏期を経て、菌血症による頭痛、筋肉痛、関節痛、羞明、咳などをともなう発熱、悪寒等により発症する(発熱期)。またこのとき点状出血、紫斑、結膜炎、肝臓や脾臓の腫大、黄疸がみられる場合もある。発熱期は 3-6 日続いた後、一旦解熱する(無熱期)。無熱期は通常 8 日程度続き、この間、血中からは菌はほとんど検出されないとされる。本研究では、無熱期での血液培養ボトルを用いた DNA 検出により病原体が検出されたが、検出感度は発熱期のほうが高いことが推定された。

抗菌薬による治療を行わない場合、その致死率はシラミ媒介性回帰熱では 4-40%、マダニ媒介性回帰熱では 2-5%とされている。病原体診断は病原体ボレリアの検出(塗抹標本のギムザ染色、アクリジン染色、免疫染色法など)、DNA 検出による。病原体の抗原変換機構により抗体検査による感染診断は難しいとされる。本研究では、

血液塗抹標本からもスピロヘータ様構造物がギムザ染色により検出されたが、他スピロヘータとの鑑別が難しいこと等から DNA 検出法による検査が有効であると考えられた。

病原体分離には BSK-II 培地を用いるが菌種によっては培養が困難な場合もある。本研究においてもボレリア属培養培地を用いて、回帰熱ボレリアの培養を試みたが、培養はされなかった(Data not shown)。*B. persica* は世界的に見ても分離成功例がなく、培養法の改良は今後の検討課題であると思われる。

E. 結論

我が国ではこれまで回帰熱症例が報告されていなかったことから、周期性の発熱を示した患者の内、海外渡航歴があった場合にはマラリアの鑑別が第一に行われる。しかしながら、本症例が示すように、マラリアの実験室診断が陰性の場合には回帰熱を鑑別対象として調べることが重要であると考えられた。また、地方衛生研究所等でも実施可能な高感度でかつ簡易な検査法の開発が急務である。

(倫理面からの配慮について)

該当しない。

F. 健康危険情報

1) 輸入回帰熱の 1 例: IASR 31(12), 358-359, 2010. <http://idsc.nih.gov/jp/iasr/rapid/pr3701.html>

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2.学会発表

1) 忽那賢志, 笠原敬, 高野 愛, 大西真, 川端寛
樹. ウズベキスタンからの輸入回帰熱の1例. 第
63 回日本衛生動物学会大会. 2011 年 4 月. 東
京.

2) 忽那賢志, 笠原敬, 三笠桂一, 高野 愛, 川端
寛樹. 本邦初の回帰熱症例. 第 85 回日本感染症
学会総会. 2011 年 4 月. 東京.

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

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:日本に棲息する野生イヌ亜目 1,205 頭 (アライグマ 1,008 頭、タヌキ 171 頭、ニホンアナグマ 15 頭、テン 8 頭、ニホンイタチ 2 頭、チョウセンイタチ 1 頭)の血液から *Bartonella* 属菌の分離を試みたところ、ニホンアナグマおよびテンのそれぞれ 1 頭が *Bartonella* 属菌を保有していることが初めて明らかとなった。各分離株のハウスキーピング遺伝子(16S rRNA, *ftsZ*, *gltA*, *groEL*, *ribC*, *rpoB*)と ITS 領域の塩基配列から系統解析を行った結果、アナグマおよびテン分離株はそれぞれ *B. clarridgeiae* および *B. washoensis* と近縁であったが、それぞれ独立したクレードを形成したことから、これらの動物は固有の *Bartonella* 属菌を保有していると考えられた。

A. 研究目的

北米の野生イヌ亜目(アライグマ、ハイイロギツネ、コヨーテ)は、高率に人の心内膜炎や不明熱の原因となる *Bartonella* 属菌を保有していることが報告されている。しかしながら、アジアの野生イヌ亜目における *Bartonella* 属菌の保有状況については全く不明の状態である。そこで、本研究では、日本固有の野生イヌ亜目動物と外来種のアライグマにおける *Bartonella* 属菌の保有状況ならびに分離株の遺伝子性状について検討した。

B. 研究方法

2008 年 6 月～2011 年 5 月にかけて、日本の野生イヌ亜目 1,205 頭 (アライグマ 1,008 頭、タヌキ 171 頭、ニホンアナグマ 15 頭、テン 8 頭、ニホンイタチ 2 頭、チョウセンイタチ 1 頭)から血液を採

取した。血液は EDTA 管に入れ凝固防止した後、検査まで -80°C で保存した。解凍後、溶血した血液の約 100 μl を、5%ウサギ血液加 Heart Infusion Agar に塗抹し、 35°C 、5% CO_2 下で 4 週間培養した。*Bartonella* 属菌を疑うコロニーから DNA を抽出し、*gltA* および *rpoB* 遺伝子領域を標的とした PCR 法により *Bartonella* 属菌と同定した。さらに 16S rRNA、*ftsZ*、*groEL*、*ribC* 遺伝子領域を加えた 6 遺伝子領域を連結した塩基配列による系統解析を行った。また、試料の血液から抽出した DNA を用いて、*gltA* および *rpoB* 遺伝子領域を標的とした PCR 法による *Bartonella* DNA 保有状況についても検討した。

(倫理面からの配慮について)

研究対象となった日本固有の犬科動物は、全て狩猟あるいは交通事故死した個体である。ま

た、アライグマは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により捕獲し、獣医師が適切な麻酔下のもと、不動化し、血液等を採取した後、安楽殺を行った。

C. 研究結果

ニホンアナグマの 1 頭 (1/15) およびテンの 1 頭 (1/8) からそれぞれ *Bartonella* 属菌が初めて分離された。一方、アライグマ、タヌキ、ニホンイタチ、チョウセンイタチからは *Bartonella* 属菌は分離されなかった。*gltA* および *rpoB* 遺伝子領域の相同性解析では、ニホンアナグマ分離株は *B. clarridgeiae* と最も高い相同性を示し、それぞれ 96.5%、95.6% であった。テン分離は *B. washoensis* と最も高い相同性を示し、両遺伝子領域の相同性はそれぞれ 97.1%、93.8% であった。また、6 遺伝子領域の連結配列から作成した系統樹では、両分離株は既存種とは異なるクラスターを形成し、各クラスターは高いブートストラップ値 (100%) で支持された (図 1)。

各動物の血液から抽出した DNA を用いた PCR 法では、アライグマの 1 頭 (0.1%; 1/1,008)、タヌキの 14 頭 (8.2%; 14/171)、ニホンアナグマの 1 頭 (6.7%; 1/15)、テンの 1 頭 (12.5%; 1/8)、から *Bartonella* 属菌の DNA が検出された (表 1)。系統解析の結果、検出された DNA は、既存の病原性 *Bartonella* と近縁種であった。

D. 考察

本研究により、わが国に生息する野生イヌ亜目のうち、ニホンアナグマおよびテンが *Bartonella* 属菌を保菌していることが初めて明らかとなった。6 遺伝子領域を用いた系統解析に

より、ニホンアナグマおよびテン分離株は、各動物に固有の新種である可能性が示唆された。アライグマとタヌキからは *Bartonella* 属菌は分離されなかったものの、病原種に近縁な DNA が検出された。米国のアライグマは、人に対して病原性を示す *B. rochalimae* を高率に保有していることから、今後、わが国のアライグマ、タヌキならびに他の野生イヌ亜目についても継続して *Bartonella* 属菌の分布を調査していく必要があると考えられた。

E. 結論

わが国の野生イヌ亜目の動物、特にニホンアナグマおよびテンは固有の *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* 菌種が米国の野生イヌ亜目から高率に見つかっているため、これら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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kabeya H, Inoue K, Izumi Y, Morita T, Imai S, Maruyama S. *Bartonella* species in wild rodents and the infested fleas in Japan. J. Vet. Med. Sci. 2011. 73(2): 1561-1567.
- 2) Pangjai D, Maruyama S, Boonmar S, Petkanchanapong W, Wootta W, Sawanpanyalert P. Seroprevalence of

- antibodies against *Bartonella hensalae* infection in cats and dogs along the northern borders of Thailand. Thai J Vet Med. 2011. 41(1): 95-98.
- 3) 壁谷英則, 丸山総一: 鹿が保有する腸管出血性大腸菌. 日本鹿研究 2011. 第2号: 15-19.
2. 学会発表
- 1) 尾田真也, 壁谷英則, 横山栄二, 平井晋一郎, 黒木俊郎, 小林信一, 相馬幸作, 増子孝義, 丸山総一: わが国の鹿における志賀毒素産生大腸菌の保有状況について: 第 152 回日本獣医学会学術集会, 大阪(2011, 9)
- 2) 白川 唯, 壁谷英則, 佐藤真伍, 尾田真也, 小林信一, 相馬幸作, 増子孝義, 藤田博己, 丸山総一: わが国の鹿科動物とその外部寄生虫におけるリケッチア DNA 保有状況: 第 152 回日本獣医学会学術集会, 大阪(2011, 9)
- 3) 壁谷英則, 田中麻菜世, 丸山総一. 猫, 犬に寄生した猫ノミからの *Rickettsia felis* および *Bartonella* 属菌の検出状況: 第 152 回日本獣医学会学術集会, 大阪(2011, 9)
- 4) 佐藤真伍, 壁谷英則, 三浦達弥, 鈴木和男, 泉對博, 苅和宏明, 丸山総一: わが国の野生犬亜目から分離された *Bartonella* 属菌の遺伝子性状: 第 152 回日本獣医学会学術集会, 大阪(2011, 9)
- 5) 佐藤真伍, 壁谷英則, 山崎真梨, 三浦達弥, 武野侍那子, 鈴木和男, 泉對博, 相馬幸作, 増子孝義, 小林信一, 苅和宏明, Michael Kosoy, Ying Bai, 丸山総一: わが国の野生動物に分布する *Bartonella* 属菌について: 第 11 回 人と動物の共通感染症研究会学術集会, 東京(2011, 11)
- 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 6 遺伝子領域に基づいたテンおよびアナグマ分離株の系統解析

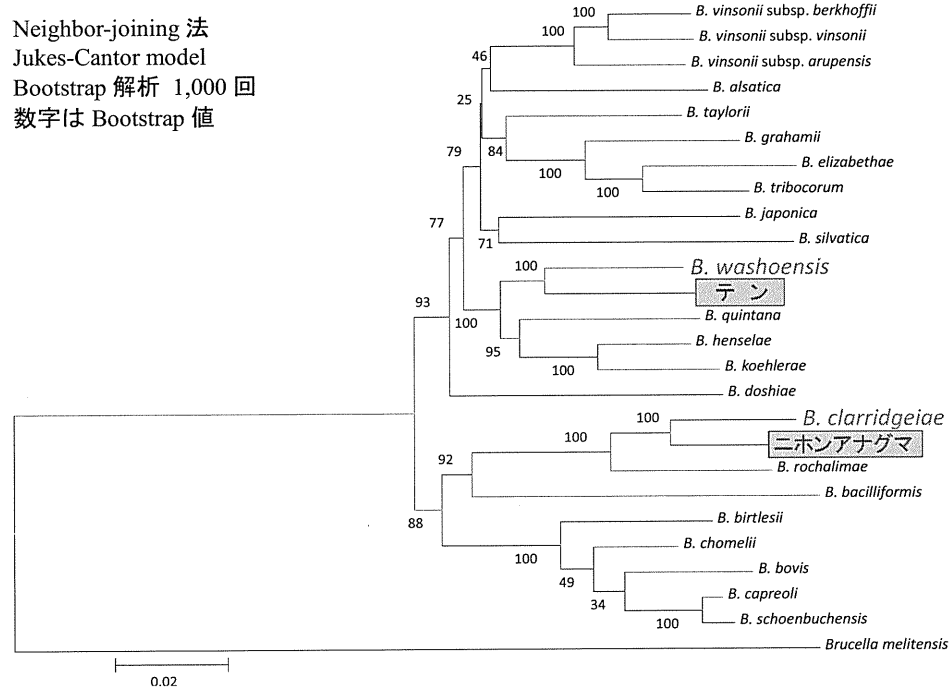


表 1. 各種犬亜目の血液における *Bartonella* DNA 検出状況 (PCR 法)

動物種	検体数	陽性数	
		<i>gltA</i>	<i>rpoB</i>
アライグマ	1,008	0	1
タヌキ	171	7	14
ニホンアナグマ	15	1	1
テン	8	1	0
ニホンイタチ	2	0	0
チョウセンイタチ	1	0	0

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
ベトナム・メコンデルタに生息する野生ヤモリならびにげっ歯類の *Salmonella* ならびに
Yersinia 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のサルモネラ保菌の公衆衛生学的・疫学的意義を明らかにする目的で、ベトナム・メコンデルタの野生のヤモリを捕獲し、糞便中への *Salmonella* 排菌量ならびに環境中に排泄された糞便中での *Salmonella* の生残性を検討した。その結果、ヤモリの糞便には *Salmonella* が 10^2 – 10^5 /g の菌量で排菌されていること、ならびに *Salmonella* は糞便中で6週間生残することが明らかになった。これらのことから、ヤモリは、ベトナム・メコンデルタにおいて *Salmonella* の保菌動物ならびに人や他の動物への感染源として、公衆衛生学的・疫学的に重要な役割を果たしているものと思われた。また、ベトナム・メコンデルタに生息する代表的野生げっ歯類であるコメクマネズミにおける *Salmonella* と *Yersinia* の保菌状況を検討した。その結果、*Salmonella* はコメクマネズミ 276 匹中 11 匹 (4.0%) から分離された。分離された *Salmonella* 12 株中 8 株が血清型別され、Bovismorbificans に 3 株が、Weltevreden、Infantis、Thompson、Oxford および Paratyphi B にそれぞれ各 1 株が型別された。*Yersinia* はコメクマネズミ 275 匹中 3 匹 (1.1%) から分離されたが、病原性 *Y. enterocolitica* ならびに *Y. pseudotuberculosis* は分離されなかった。これらのことから、コメクマネズミは、本地域においては *Salmonella* の重要な保菌動物であるが、病原性 *Yersinia* は保菌していないものと思われた。

A. 研究目的

平成 22 年度の厚生労働省厚生労働科学研究費補助金の調査で、ベトナム・メコンデルタに生息する野生ヤモリは、*Salmonella* を季節・地域および種に関わらず高率に保菌し、分離される血清型も本地域のヒト患者由来のものとよく一致していたことから、少なくとも本地域では

ヤモリが *Salmonella* の重要な保菌動物であり、人への感染源になっている可能性が示された。しかし、ヤモリが糞便中に *Salmonella* をどのくらいの菌量を排菌するのか、また、排泄された糞便中でどれくらい生存できるのかなどについては明らかにされておらず、ヤモリの果たす公衆衛生学的ならびに疫

学的重要性については、さらに検討の必要がある。また、ベトナム・メコンデルタではヘビ等の天敵の減少により、野生げっ歯類であるコメクマネズミが増加し、特に米の収穫時期には大繁殖し、農家にとって経済的に深刻な影響を与えている。一般的に野生げっ歯類は *Salmonella* や *Yersinia* のレゼルボアであることが知られているが、本地域における野生げっ歯類におけるこれら病原体の保菌状況にはほとんど検討されおらず、これら病原体の生態に野生げっ歯類が自然界で果たしている役割については明らかになっていない。

そこで、本研究では、ベトナム・メコンデルタのヤモリの糞便中のサルモネラ排菌量ならびに環境中に排出された糞便中の *Salmonella* の生残性を検討し、得られた結果から、*Salmonella* を保菌するヤモリの果たす公衆衛生的ならびに疫学的重要性について考察した。さらに、本地域の代表的野生げっ歯類であるコメクマネズミにおける *Salmonella* と *Yersinia* の保菌状況を調べた。

B. 材料と方法

1. ヤモリの糞便中への *Salmonella* の排菌量

1) 供試検体

供試検体として、ベトナム・メコンデルタで捕獲したヤモリ 100 匹から採取した腸内内容物を用いた。

2) 菌数の測定

供試検体を、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH7.2) で適当な濃度に希釈後、DHL 寒天平板培地(日水)ならびに MLCB 寒天平板培地(日水)に接種し、37℃で 24 時間培養後、培地上に発育してきた *Salmonella* と思われるコロニーの数をカウントするとともに、1 平板当たり 4 つのコロニーを釣菌し、生化学的検査ならびに抗血清を用いて *Salmonella* であることを確認した。

2. ヤモリの糞便中での *Salmonella* の生残性

1) 供試検体

供試検体として、ベトナム・メコンデルタで捕獲したヤモリ 100 匹から採取した腸内内容物を混合したものをを用いた。

2) 糞便中での *Salmonella* の生残性の測定

供試検体を滅菌した三角フラスコ (300ml) に入れ、綿栓でふたをして、室温で保存した。供試検体は、保存開始時ならびにその後は 1 週間ごとに 10 週目まで取りだし、PBS で希釈後、適当な濃度のものを DHL 寒天平板培地ならびに MLCB 寒天培地に接種し、37℃で 24 時間培養後、発育してきた *Salmonella* が疑われるコロニーをカウントするとともに、4 つのコロニーを釣菌し、生化学的検査ならびに抗血清を用いてサルモネラと同定した。また、増菌培地としてハーナーテトラチオン酸塩培地 (日水) も併用し、菌の有無を調べた。なお、実験は 2 回行った。

3. コメクマネズミにおける *Salmonella* と *Yersinia* の保菌状況

1) 供試検体

供試検体として、2011 年 8-12 月にベトナム

ム・メコンデルタの Angiang および Dongtap 省と Cantho 市の 2 省 1 市で捕獲したコメクマネズミ (*Rattus argentiventer*) 276 匹から採取した腸内内容物を用いた。

2) 菌の分離と同定

Salmonella の分離・同定は以下のように行った。供試検体をハーナーテトラチオン酸塩培地に接種し、37℃で 12-24 時間増菌培養後、その 1 白金耳を DHL 寒天平板培地ならびに MLCB 寒天平板培地に塗抹した。37℃で 24 時間好気培養後、発育してきた *Salmonella* を疑われるコロニーを 4 つ釣菌し、純培養後、生化学的検査で *Salmonella* と同定した。*Salmonella* と同定した菌株は生物型別を行うとともに、市販抗血清を用いて血清型別を行った。

Yersinia の分離・同定は以下のように行った。供試検体を PBS (pH 7.2) に接種し、4℃で 3-4 週間低温増菌培養した。増菌培養液は 0.4% KOH でアルカリ処理した後、その 1 白金耳を CIN 寒天平板培地 (BD) に接種し、25℃で 48 時間好気培養した。平板上に発育してきた *Yersinia* を疑われるコロニーを 4 つ釣菌し、純培養後、生化学的検査を行い *Yersinia* と同定した。*Yersinia* と同定された菌株は菌種を同定するとともに、市販抗血清を用いて血清型別を行った。

C. 研究結果

1. ヤモリの糞便中への *Salmonella* の排菌量の測定結果

供試したヤモリの糞便 100 検体中 11 検体から *Salmonella* が検出された。これら *Salmonella* 陽性のヤモリの糞便 11 検体中の

Salmonella の菌量は、最も少ないもので 7.1×10^2 /g、最も多いもので 2.8×10^5 /g であった。

2. ヤモリの糞便中での *Salmonella* の生残性の結果

ヤモリの糞便中でのサルモネラの生残性を実験的に調べた結果、室温 (25-30℃) に保存した場合、2 回の実験いずれの場合も *Salmonella* はヤモリの糞便から保存 6 週間後まで検出されたが、その後は検出されなくなった。

3. コメクマネズミからの *Salmonella* と *Yersinia* の分離結果

ベトナム・メコンデルタ 3 省で捕獲したコメクマネズミにおける *Salmonella* と *Yersinia* の保菌状況を検討した。*Salmonella* はコメクマネズミ 276 検体中 11 検体 (4.0%) から分離された。*Salmonella* は 11 検体から 12 株が分離され、うち 9 株は生物群 I に、3 株は生物群 IV に型別された。また、生物群 I に型別された 9 株のうち、8 株が血清型別され、Bovismorbificans に 3 株が、Weltevreden、Infantis、Thompspon、Oxford および Paratyphi B にそれぞれ各 1 株が型別された。

Yersinia はコメクマネズミ 276 匹中 3 匹 (1.1%) から分離された。しかし、分離された *Yersinia* はいずれも非病原性 *Yersinia* で病原性 *Y. enterocolitica* ならびに *Y. pseudotuberculosis* は全く分離されなかった。

D. 考察

1. ヤモリの糞便中への *Salmonella* の排菌数ならびにヤモリの糞便中での *Salmonella* の生残性

昨年度の調査で、ベトナム・メコンデルタに生息するヤモリは、季節、地域および種を問わず約15%程度と高率に *Salmonella* を保菌しており、また、分離された *Salmonella* の血清型は本地域の人の胃腸炎患者から検出された *Salmonella* の血清型とよく似ていた。これらのことから、ベトナム・メコンデルタにおいて、ヤモリは *Salmonella* の重要な保菌動物であり、人のサルモネラ症の感染源となっている可能性が高いことが明らかになった。そこで、ヤモリの *Salmonella* の保菌動物としての公衆衛生学的・疫学的重要性をより明らかにする目的で、ヤモリの糞便中への *Salmonella* の排菌数ならびにヤモリの糞便中での *Salmonella* の生残性について検討した。その結果、ヤモリの糞便中に *Salmonella* は 10^2 – 10^5 /g と比較的高い菌量が排菌されていること、ならびに環境中に排泄されたヤモリ糞便中では *Salmonella* は6週間に渡り生残することが明らかになった。本地域ではヤモリは高密度に人の生活環境に生息し、夜間のみならず昼間も住居の壁や天井を徘徊し、糞便をところ構わず排泄している。本研究で、*Salmonella* はヤモリの糞便中に高い菌量排菌され、しかも高い気温のもとでも糞便中に長期間生残することから、ヤモリは本地域で *Salmonella* の保菌動物ならびに感染源として、公衆衛生学的・疫学的に重要な役割を果たしている可能性が高いことが判明した。今後は、ヤモリ由来株と人患者由来株の間での遺伝学的

関連性や本地域のヤモリから特異的に高頻度に検出される血清型 Weltevreden の人や家畜に対する病原性などについて検討する必要がある。

2. 野生げっ歯類からの *Salmonella* と *Yersinia* の検出

ベトナム・メコンデルタの田園地帯には、コメクマネズミが広く分布し、米の収穫期に収穫された米を食べてしまうため、本地域の農家に多大な経済的損失を与え、大きな社会問題となっている。今回、本地域のコメクマネズミを捕獲し、*Salmonella* と *Yersinia* の保菌状況を検討した。その結果、*Salmonella* は4.0%と比較的高率に分離されたが、病原性 *Yersinia* は全く分離されなかった。

2002年にTranらは本地域のコメクマネズミにおける *Salmonella* の保菌状況を調査し、19.3%のコメクマネズミから *Salmonella* を分離したことを報告している。今回の成績はTranらの成績に比べると分離率が有意に低かった。また、分離された血清型は Weltevreden や Thompson など共通するものもみられたが、その姿は以前とは異なっていた。このような違いがみられた理由として、コメクマネズミの捕獲地域が必ずしも一致しないことのほか、この10年間におけるベトナムの著しい経済的発展によるメコンデルタの田園地帯の農業経営の変化などが影響している可能性が考えられるが、その詳細は明らかではなく、今後の検討課題となった。

今回、コメクマネズミからエルシニア症の原因菌として知られる *Y. enterocolitica* および

Y. pseudotuberculosis は全く検出されなかった。一般的に病原性 *Yersinia* である病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* は日本、欧米諸国、中国などのように寒帯から温帯に属する国々に広く分布しているが、亜熱帯や熱帯での報告は少ない。ベトナムにおいては、北部の中国との国境付近に *Y. pestis* が分布していることが報告されているが、病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* の分離報告はこれまでみられなかった。本調査でも非病原性の *Yersinia* は分離されたが、病原性 *Yersinia* は全く分離できなかった。また、現在、病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* の共通抗原である YOP を抗原として、捕獲したコメクマネズミの抗体価を ELISA で測定しているが、今のところ抗体陽性の個体は得られていないことから、少なくともベトナム南部のコメクマネズミには病原性 *Yersinia* は分布していないものと推察される。

コメクマネズミはメコンデルタの田園地帯に広く分布し、自然界において *Salmonella* の生態に重要な役割を果たしているものと考えられ、またその一部は食用にもなっていることから、公衆衛生学的な見地からも、今後も継続的な調査が望まれる。

E. 結論

ベトナム・メコンデルタに生息するヤモリは、高い菌量の *Salmonella* を糞便に排泄し、また、排泄された *Salmonella* は糞便中でも長期間に渡り生存できることから、本地域の

Salmonella の保菌動物ならびに人への感染源として、公衆衛生学的・疫学的に重要な役割を果たしているものと推察された。また、コメクマネズミは比較的高率に *Salmonella* を保菌していたが、病原性 *Yersinia* は保菌していなかった。

F 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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. 獣畜新報 64, 807-808, 2011.

2. 学会発表

1) 林谷秀樹, Ly Thi Lien Khai, Nguyen Trong, Nguyen Thuy Diem, 奥村水門, Nguyen Thu Tam, 竹原一明, ベトナム・メコンデルタに生息するヤモリにおけるサルモネラの重要性. 第 152 回日本獣医学会学術集会、大阪 (2011. 9)

2) 林谷秀樹, Ly Thi Lien Khai, Nguyen Trong, Nguyen Thuy Diem, 奥村水門, Nguyen Thu Tam, 竹原一明, ベトナム・メコンデルタに生息するヤモリにおけるサルモネラの疫学. 第 11 回人と動物の共通感染症研究会学術集会、東京 (2011. 11)

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