

染が疑われている事例が多い。このことから、人へのリスクを考えていくうえで、次に必要なステップとして、臨床症状のあるネコからの菌分離とそのネコに接触した人の調査（抗体調査・菌分離等）が考えられた。

3) TC 県の調査

動物愛護指導センター等のイヌ・ネコを対象としている。動物愛護センターよりイヌの咽頭スワブ 82 検体。県内の動物病院よりネコの鼻汁 1 検体、イヌ皮膚炎より 1 検体を調査した。その結果、*C. ulcerans* の分離はなく、他のコリネバクテリウム属菌 5 株（4 種）を検出した。

4) SO 県の調査

動物管理指導センターに保護または引き取られたイヌの咽頭スワブ 101 検体と血清 100 検体、野生シカ捕獲に使われた猟イヌ 9 頭の鼻腔または咽頭スワブ 9 検体とその血清および捕獲された野生のシカ 16 頭の鼻腔スワブと 5 頭分の血清について調査した。その結果、PCR、菌分離はすべて陰性であった。血清については動物管理指導センターの 100 検体中 1 検体が、シカ 5 検体中 1 検体がジフテリア抗毒素価陽性を示した。

5) OS 県の調査

市内の動物管理センターに収容されたイヌ 21 頭およびネコ 40 頭を調査した結果、ネコ 4 頭から本菌を分離した。分離菌はいずれも DLT 遺伝子、PLD 遺伝子を保有し、典型的な生化学性状を示した（API Coryne: *C. ulcerans* 99.7% ID）。いずれも所有者の無いネコ（野良ネコ）であった。メスが 2 頭、オスが 2 頭で、概年齢は 3 ヶ月齢～10 歳程度が 3 頭、10 歳以上が 1 頭であった。栄養状態、健康状態不良のネコが 3 頭であったが、鼻水、くしゃみ等の呼吸器症状は認められなかった。4 株とも 7 月～8 月に分離したが、菌陽性の 4 頭は別々の区で保護された後、個別のゲージに収容されていたため、施設内感染の可能性は低いと考えられた。

県内の野鳥 151 検体について調査を行なった。その結果、*C. ulcerans* の分離はなく、他のコリネバクテリウム属菌 10 株を検出し

た。

6) TK 県の調査

作成したリアルタイム PCR 法により、2 ヶ所の動物病院より集めたイヌ 17 検体、ネコ 47 検体のスワブ検体（64 検体）について検査を行った。その結果、64 検体中 2 検体で *C. ulcerans* の p 1 D 遺伝子のみ検出され、この 2 検体からは毒素非産生 *C. ulcerans* が分離された。また、64 検体からは、*C. pseudotuberculosis* の p 1 D 遺伝子は検出されなかった。

7) TY 県の調査

動物管理センターに引き取られたネコの咽頭スワブ 41 検体、および鼻汁スワブ 5 検体について調査した。その結果、これらの検体からジフテリア毒素遺伝子、および *C. ulcerans* Tox+ は検出されなかった。

8) KG 県の調査

本年度の調査は、昨年度に引き続き動物保護センターに搬入された概ね健康なネコおよびイヌについて実施し、菌分離およびジフテリア毒素遺伝子は陰性であった。今年度は新たに動物病院に来院した有症のネコおよびイヌの検体について調査を実施し、これまでにネコ 3 検体イヌ 5 検体について調査した結果、菌分離およびジフテリア毒素遺伝子はいずれも陰性であった。

市内の動物愛護センターよりイヌ、ネコ 4 5 検体の鼻咽頭スワブ及び血清について検査した。その結果、ジフテリア毒素遺伝子、および *C. ulcerans* Tox+ は検出されなかった。また、ジフテリア抗毒素価も検出限界未満であった。

9) OK 県の調査

県内の食肉検査所に置いて、搬入される肉用ウシについて、腎臓、筋肉、乳房スワブ 3 検体と血清 34 検体を採取した。その結果、ジフテリア毒素遺伝子、および *C. ulcerans* Tox+ は検出されなかった。しかし、ジフテリア抗毒素価は 2 頭からそれぞれ、0.0072 と 0.46 単位の抗体が検出された。

10) 獣医科大学との共同研究調査結果

①岐阜大学 柳井徳磨研究室

野生動物と接する機会の多い猟イヌについて、愛知県、鹿児島県、沖縄県、新潟県および長崎県の島嶼部地域獣医会の協力を得て合計 196 頭から採血し、血中ジフテリア抗毒素価を培養細胞法により定量した。その結果、新潟県で 1 頭、鹿児島県で 8 頭および沖縄県で 4 頭の合計 13 頭がジフテリア抗毒素価 0.01-0.24 単位で陽性であった。

②大阪府立大学の調査

大阪府立大学 小崎俊司教室では、分離菌について PFGE 法よりも解析能力のよい分子疫学手法を検討した。候補として、Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) 法を検討した。この方法は、フィンガープリント法の一つで、EcoRI と MseI でゲノムを切断し、断端が EcoRI サイトと MseI サイトに挟まれたフラグメントのみを増幅して、電気泳動分離および蛍光検出することで遺伝子型別を行う方法である。この方法は、検査に要する日数が PFGE 法の半分程度であり、克つ、フラグメントが PFGE よりも多く、またフラグメントの長さが数値として系統樹作成ソフトに取り込めるため、より正確な系統樹が作成できる可能性がある。

11) *C. ulcerans*^{Tox+}の全ゲノム解析

感染研のゲノム解析センターの協力を得て、日本で初めて人から分離された 0102 株の全ゲノム解読を行なった。その結果、3 つのプロフェージ領域を含み総塩基長 2579188 塩基であった。見出された特徴として、① *C. pseudotuberculosis* と類似した構成であった。② *C. diphtheriae* とは違いが大きかった。③ プロフェージ領域の構造は非常に特徴的であった。④ *C. diphtheriae* の接着因子 spaABC pili と高いホモロジーを示す領域は見出されなかった。⑤ *C. diphtheriae* で invasin とされる DIP1281 領域と 65% 程度のホモロジーを示す領域が見出された。⑥ 表現形質から予想されていた病原因子 phospholipase D (pld) の遺伝子の存在が確認された。

D. 考 察

国内 9 症例目の人での *C. ulcerans*^{Tox+} 感染症が滋賀県で発見された。患者は 50 代で基礎疾患を持たないが血中ジフテリア抗毒素価が低い人であり、その環境としてイヌやネコなどの動物をペットとして飼育していた。このことから今までの人での症例での共通点として、ジフテリア毒素へ感受性の人飼育動物から感染が起きていることが推察された。ただし、少数で室内飼育されている動物からはほとんどこの病原体が検出されることがない事実から、この飼育動物は家の内外を行き来できるような飼育をされていることが必要であり、何らかの戸外に生息する生物との接触からこの病原体を家庭内に持ち込んでいる可能性がある。

そこで、これら人に接触する可能性のある動物での *C. ulcerans*^{Tox+} の汚染状況を調査する目的で、昨年より行われている各地の愛護センターや動物病院の患畜での調査は、昨年とは異なる地域に拡大して行われたが、複数の地域から分離された。 *C. ulcerans*^{Tox+} は環境中にある一定の割合で生存していてその環境中に入ってきた動物を汚染している可能性が考えられるが、どの動物が高い保菌率を維持しているのかは、菌の分離効率がどのくらいか明らかではない現状では言及できない。

昨年から行われている猟イヌの血清調査で、調査地域が全く異なる本年も昨年と同様にジフテリア抗毒素価が陽性であった。また、本年 S0 県におけるネコや鹿の血清中のジフテリア抗毒素価測定の結果、動物病院および愛護センターにおいても、陽性動物が検出されている。抗毒素の証明は過去にジフテリア毒素産生菌が感染して、局所での増殖にともない産生した毒素が刺激となって抗体を誘導したと考える。この血清からのジフテリア抗毒素価検出による *C. ulcerans*^{Tox+} 汚染状況の把握は今後有用な手段となると考えられる。

一般的にコリネ属菌は皮膚等の一般細菌叢として分離され、 *C. ulcerans* もこれら細菌叢の一部として存在している可能性もある。今年度の動物病院のネコを対象とした調査で

C. ulcerans^{T_{ox+}}だけでなく、ジフテリア毒素非産生の *C. ulcerans* も分離されている。一般家庭で飼育する鼻水を呈するネコの中に *C. ulcerans*^{T_{ox+}} が潜在している可能性が示されたことは、特に免疫力の低下した高齢者、ジフテリアトキソイド接種後 20 年以上を経過したヒトは、当該菌の感染には注意を要する。

最後に、これまでに全国各地から分離された *C. ulcerans*^{T_{ox+}} の地域との関連性を調べる上で、今までは PFGE 法によっていた。そのため、滋賀で分離された菌の遺伝子型が大分で分離された株と同様であるという結果を得ていた。これは、PFGE 法による解析精度の問題のある可能性がある。この可能性を検証するためにも、今年度新たな分子疫学手法として、検討を開始した AFLP 法の解析能力に期待したい。また、我が国の初発症例の全ゲノム解析が可能となったことから、より短時間で検出できる簡便な *C. ulcerans*^{T_{ox+}} の同定法の開発にも期待が高まる。

E. 結 論

昨年とは異なる複数地域の愛護センターのイヌまたはネコから *C. ulcerans*^{T_{ox+}} が分離され、広範囲に本菌が分布していることが確認された。動物病院の調査でも *C. ulcerans*^{T_{ox+}} が分離されており、鼻汁等の風邪様症状を呈する一般家庭のネコは注意が必要である。

本年度、調査動物に関して血清を採取してジフテリア抗毒素価を測定することにより *C. ulcerans*^{T_{ox+}} 分布調査が可能となることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Katsukawa C, Komiya T, Yamagishi H, Ishii A, Nishino S, Nagahama S, Iwaki M, Yamamoto A, Takahashi M. : Prevalence of *Corynebacterium ulcerans* in dogs in Osaka, Japan.: J Med Microbiol. 61(Pt 2): 266-273. 2012

2. 学会発表

- (1) 畠山 薫、藤元 琢也、奥野 ルミ、貞升 健志、甲斐 明美、山本明彦、高橋元秀。 *Corynebacterium ulcerans* の遺伝子検査法の検討。第 23 回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会（宇都宮）。2011 年 2 月。
- (2) 吉村幸浩、立川夏夫、山本明彦、小宮貴子。 *Corynebacterium ulcerans* による腋窩リンパ節膿瘍の一例。第 85 回日本感染症学会（東京）、2011 年 4 月
- (3) 岡本その子、内藤秀樹、船渡川圭次、今井一穂、佐伯貴之、小宮貴子、山本明彦、高橋元秀：栃木県内のイヌ・ネコにおける *Corynebacterium ulcerans* の保有状況調査、第 49 回栃木県公衆衛生学会総会、宇都宮、2011 年 9 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

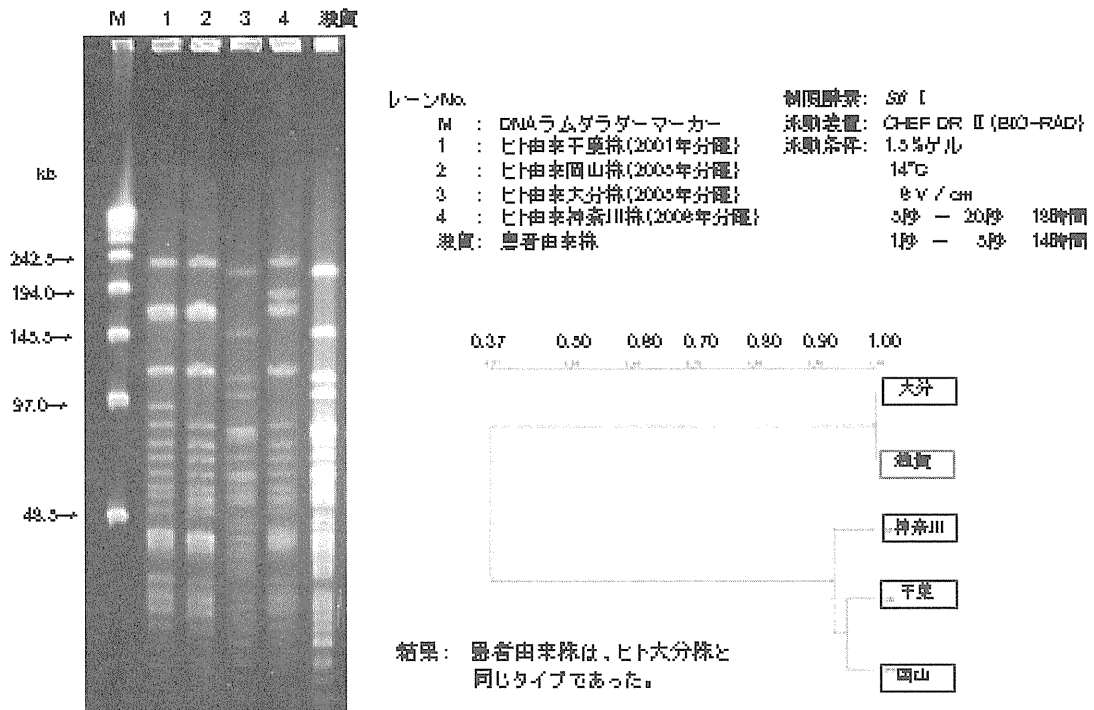
表 1. 人での菌分布調査結果

スワブ採取年月日	患者コード番号	性別	年齢	臨床経過	ジフテリアトキソイドワクチン接種歴	備考	ジフテリア (IU/mL)
H23.9.26	1	F	41	平成23年9月25日から咽頭痛、開口障害で26日紹介	施行	のら猫を餌付け	0.163
				受診。左扁桃に白苔付着、左扁桃周囲にも腫脹を認			
				めた。入院治療中である。			
2011/9/26	2	M	21	平成23年9月23日から38度台発熱あり、26日から咽	施行	猫1匹飼育	0.0288
				頭痛を認め当科受診。両口蓋扁桃は腫脹し白苔付			
				着、顎下部リンパ節の腫脹を認めた。入院治療中で			
				ある。			
2011/10/8	3	M	35	平成23年10月6日から39.6度の発熱、咽頭痛、嚥下時	不明		0.0407
				痛あり、10月8日近医受診し急性扁桃炎と診断。			
				入院治療の必要について紹介受診。			
2011/10/13	4	M	39	平成23年10月11日に発熱(40度)、咽頭痛で	不明		検出レベル以下
				当院内科受診。抗菌薬処方されるも軽快せず、両側			
				扁桃に白苔が付着していた。10月13日に当科紹介			
				となる。			
2011/10/24	5	M	32	平成23年10月22日から咽頭痛、発熱(40℃)で近医	施行	犬飼育	検出レベル以下
				受診し扁桃炎を指摘され24日に当院受診となる。			
				口蓋扁桃は高度発赤腫脹し、白苔の付着を認めた。			
				通院治療中である。			

表 2. 平成 23 年動物の菌分離調査結果

地域	調査動物	機関	検体採取	検体数	菌分離数	ジフテリア抗毒素陽性	備考
SG県	イヌ	動物保護管理センター	口腔スワブ	54	1		現在、検査中
TS県	ネコ	動物愛護管理センター	咽頭スワブ	88	6		全てジフテリア毒素遺伝子PCR陽性
TG県	イヌ	動物愛護指導センター	咽頭スワブ	82	0		他のコリネ属:5株(4種)検出
	ネコ	動物病院(10ヶ所)	鼻汁	1	0		
	イヌ	同上	皮膚炎	1	0		
SO県	イヌ	動物管理指導センター	咽頭スワブ	101	0		
	同上	同上	血清	100		1	未検査(凍結保存)
	イヌ(猟犬)	シカ捕獲作業	鼻腔または咽頭スワブ	9	0		
	同上	同上	血清	9		0	未検査(凍結保存)
	シカ	シカ捕獲作業	鼻腔	16	0		
	同上	同上	血清	5		1	未検査(凍結保存)
OS県	イヌ	動物管理センター	咽頭スワブ	21	0		
	ネコ	動物管理センター	咽頭スワブ、鼻汁	40	4		
TK県	イヌ	動物病院(2箇所)	鼻汁、皮膚炎、咽頭、口腔内等	17			
	ネコ			47	2		遺伝子検出2、菌分離2
TY県	ネコ	動物管理センター	咽頭スワブ	41	0		
	ネコ	動物管理センター	鼻汁スワブ	5	0		
KG県	イヌ	動物管理センター	咽頭スワブ	43	0		
	ネコ	動物管理センター	咽頭スワブ	27	0		
OS県	野鳥	野外	咽頭・喉頭スワブ	151	0		
OK県	ヒト	食肉検査所	腎臓、筋肉、乳房スワブ	3	0		
			血清	34		2	

図1. 本年度人から（9症例目）分離された *C. ulcerans* の PFGE 解析



平成 23 年度研究組織：協力者リスト（敬称略）

栃木県保健環境センター 岡本その子、内藤秀樹、舩渡川圭次、佐伯貴之、矢部真人
東京都健康安全研究センター 畠山 薫、久保田寛顕、奥野ルミ、貞升健志、井出 治
加藤敦子
神奈川県衛生研究所 古川一郎、石岡慎也、岡本浩介、水谷達二
川崎市衛生研究所 小嶋由香
静岡県環境衛生科学研究所 杉山寛治、神田 隆、高橋奈緒美
富山県衛生研究所 木全恵子、磯部順子、廣田昌幸
大阪府立公衆衛生研究所 勝川千尋
大阪市立環境科学研究所 梅田 薫、阿部拓人、畠山理沙、木村吉秀
岡山県環境保健センター 中嶋 洋、狩屋英明、岸本壽男、橋本英典、近藤 真
東 正秋、藤原慎一
滋賀県衛生科学センター 河野智美、梅原成子、佐野哲也
東京医科歯科大学 野口佳裕、角田篤信、喜多村 健
岐阜大学 柳井徳磨、渡邊 祐、朝倉亜紀
大阪府立大学 幸田知子、伊藤広記、向本雅郁、小崎俊司
川崎医科大学 秋定 健、兵 行儀、與田茂利、黒川幸徳、山根一和
信楽園病院 本間康夫

国立感染症研究所 小宮貴子、岩城正昭、見理 剛、山本明彦
平井明香、網 康至、須崎百合子、高橋元秀
関塚 剛、竹内 史彦、黒田 誠

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

猟犬における感染症抗体保有状況に関する研究：島嶼部を中心として

研究分担者 柳井徳磨 岐阜大学応用生物科学部 教授

研究協力者 野上貞雄 日本大学生物資源科学部 教授
村井厚子 岐阜大学連合大学院獣医学研究科 大学院生
後藤みなみ 岐阜大学連合大学院獣医学研究科 学生
今岡浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 室長
棚林 清 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
山本明彦 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

研究要旨 猟犬は、野外でダニ媒介感染症を始め種々の病原体に暴露される機会が多い。そのため、各地の猟犬の病原体を調べることで、地域ごとの野外感染症、特に人獣共通感染症の種類と分布についてモニタリングが可能と考える。各地に存在する野外人獣共通感染症の存在を把握することで、人が野外活動する際の感染症リスク評価とその予防が可能になる。今回、島嶼部および半島部（渥美半島、佐渡島、対馬、大隅半島、種子島、屋久島、奄美大島、沖縄本島および石垣島）の猟犬計 196 頭について、各種の感染症の血清抗体調査を行った。過年度の西日本および中部地方の調査に引き続き、今回の島嶼部においてもジフテリア症、破傷風、ブルセラ症、トキソプラズマ症、レプトスピラ症およびボレリア症に関する調査を実施した。

ジフテリア抗毒素は佐渡島、大隅半島、奄美大島、沖縄本島および石垣島で、抗ブルセラ抗体は佐渡島、種子島、奄美大島、沖縄本島および石垣島で少数例検出された。抗トキソプラズマ抗体はほとんどの検索地で比較的高頻度に検出された。抗レプトスピラ抗体、フィラリア抗原などは渥美半島以外の地域でそれぞれ高頻度に検出された。ヘパトゾーンおよびバベシアは、いずれも渥美半島および佐渡島を除く地域で陽性例が認められ、屋久島ではヘパトゾーンの陽性個体が 26/28 (92.9%) と高率に認められた。破傷風抗毒素および野兎病抗体は検出されなかった。島ごとに感染状況が異なることから（ブルセラなど）、島嶼部における感染症のリスク評価には、島ごとの個別調査が必要であると考えられる。

A. 研究の目的

猟犬は狩猟のパートナーとして山林に入り、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、島嶼部および半島部の猟犬 196 頭を対象とし、ダニ媒介性疾患であるライム病、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、ブルセラ症およびジフテリア感染症などについて抗体調査を行った。本研究は、2009 年度に実施した“西日本を中心とした猟犬の感染症に関する調査研究”および 2010 年度に実施した“中部地方を中心とした猟犬の保有病原体に関する調査研究”に継続した全国的な猟犬の人獣共通感染症の抗体調査の一環である。

B. 研究方法

(1) 材料

検索材料は、2011 年 3 月から 9 月にかけて 5 県 9 地域の島嶼部および半島部の猟犬 196 頭（愛知県渥美半島 14 頭、鹿児島県奄美大島群 37 頭、新潟県佐渡市 17 頭、長崎県対馬 20 頭、鹿児島県種子島 20 頭、鹿児島県屋久島 28 頭、鹿児島県大隅半島 25 頭、

沖縄県石垣島 29 頭および沖縄本島 6 頭）の血液を採取した。これらの猟犬は日常的に山林に入り込む機会を有しており、性別は、雄 106 頭、雌 90 頭であった。年齢は、5 ヶ月齢～13 歳までであった。

採血した血液は、抗凝固剤として EDTA を使用し、血清を分離後、分析までの間 -80°C で保存した。凍結前に一部を使用して、血液塗抹標本を作製した。採血に際して、各猟犬の所有者より、狩猟対象、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、血清を分離した。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。採取した血清は、国立感染症研究所の山本明彦室長、棚林清室長、今岡浩一室長、今泉信夫室長および川端寛樹室長が分担し、それぞれジフテリア感染症、野兔病、ブルセラ症、レプトスピラ感染症およびライム病ボレリア感染症について血清を用いた抗体検査をそれぞれ行った。

1) ジフテリア症

被験血清を 56°C 30 分非動化処理し、組織培養用マイクロプレートへ入れた後、細胞用培養液で 2 倍段階希釈系列を 2 組作製した。一方の希釈系列には、VERO 細胞浮遊液を加え、37°C 4 日間培養した後被験血清

コントロールとした。同様に、標準ジフテリア抗毒素の希釈系列を作製した。ジフテリア試験毒素（毒素活性量 12CD50/well）を両希釈系列に一定量添加し、37°C 30 分間孵卵器内で中和反応させた。その後、VERO 細胞浮遊液を加え、37°C 4 日間培養した。標準ジフテリア抗毒素 End point（細胞が約 50% 増殖した well を設定）を 0.0036 IU/ml と設定し、被験血清抗毒素価を算出した。

2) 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。96 ウェルマイクロプレート (EIA/RIA 96well plate, Coostar) の各ウェルに GST/LigA-mC, または GST を 100ng (TBS: 20mM Tris, 0.15M NaCl, pH7.5 で調整) 添加し、4°C で一晩吸着させた。0.05% の Tween20 を容れた TBS (TBST) で溶解した 20mg/ml の BSA を、200 μ l/well を容れて、室温で 2 時間ブロッキングし、その後 BSA solution を除去した。10mg/ml BSA を含む TBST により 100 倍希釈した犬血清サンプルを、総量 100 μ l/well になるよう加え、室温で 1 時間半静置した。その後、血清は 200 μ l/well TBST で micromixer を使用して攪拌し、3 回リンスを行い、10mg/ml BSA 含有 TBST により 2000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗犬 IgG ヤギ溶液を 100 μ l/well 添加し、室温で 1 時間インキュベーションし、2,2'-azino-bis (3-ethylbenzo-6-thiazoline sulfonic acid) (ABTS) solution (1-Step ABTS, Thermo Scientific) を 100 μ l/well 加え、十分な色が見られるまで静置した。Microtiter-plate reader で各々の well の 405nm 吸光度

(OD) を測定した。各々のサンプルについて、GST/LigA-mC と GST の well 両吸光度を測定し、これらの差 [(GST/LigA-mC) - GST] を算出した。

3) ライム病ボレリア

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 コントロール平均値の 1.2 倍 (0.69) より大きい値を陽性とした。ELISA および Western Blotting の両方が陽性のものを陽性例とした。

4) ブルセラ症

マイクロプレート凝集反応 (MAT) による抗ブルセラ抗体検出を実施した。家畜ブルセラ菌 (*B. abortus*) については、ブルセラ病診断用菌液 (*B. abortus* 99 もしくは 125 株の加熱死菌液、農業・食品産業技術総合研究機構) を 10 倍に希釈したものを、*B. canis* については犬ブルセラ病診断用菌液 (*B. canis* 死菌液、北里研究所) を用いて、菌液 50 容とフェイバー G (日水、0.25% サフラニン溶液) 1 容を混合し、0.005% サフラニン加凝集反应用菌液を調整した。猟犬サンプル血清 (液量 25 μ) を 96 穴 U 底マイクロプレート上で 10 倍から 2 倍段階希釈し、これに調整した菌液を同量加え、20 秒程度緩やかに振とうした。*B. abortus* に対しては、保湿環境で 37°C、18~24 時間反応させた後に 40 倍希釈以上で凝集像の確認されたものを陽性と判定した。*B. canis* に対しては 50°C 24 時間反応させた後に 160 倍希釈以上で凝集像の確認されたも

のを陽性と判定した。

5) 野兔病

① 微量凝集反応 (MA)

抗原として *F. tularensis* spp. *holractiva*, 日本分離 Yama 株 (Eugon チョコレート寒天培地にて 37°C 3 日間培養) を用いた。これを 0.5% フォルマリン生理食塩水で不活化し, 生理食塩水で OD560 値 1 に調整した。これに 0.25% サフラニン染色液 (日水製薬株式会社 “フェイバーG”) を 1/50 量添加し, 抗原着色した。さらに被験犬血清を生理食塩水で 5~40 倍まで 2 倍段階で希釈した。また, 陽性および陰性対照血清にはウサギ免疫血清, 正常ウサギ血清を使用した。凝集反応を U 底 96 穴プレート上で行い, 血清希釈液 25 μ l に等量の抗原菌液を添加し, 振とう混和後, 37°C で 16 時間感作させた。菌凝集の認められた最高希釈倍数の逆数を凝集抗体価とした。各サンプル 2 列希釈し, 凝集像が認められたサンプル, および凝集像が不明瞭なサンプルについてはさらにウェスタンブロット法にて確認検査した。

② ウェスタンブロット法 (WB)

野兔病菌 Yama 株の精製リポ多糖体を SDS-PAGE 後, トランスブロット (BIORAD 社) にて PVDF 膜 (ミリポア社) に転写した。転写後, PVDF 膜を 3% スキムミルク加 PBST (0.1% Tween20 含有 PBS) でブロッキングし, 1% スキムミルク加 PBST で 200 倍希釈した被検血清と室温で 1 時間反応させた。PBST で 3 回洗浄後, HRP 標識 anti-canine Ig-G 抗体を反応させた。3,3-diaminobenzidinetetrahydrochloride

で 10 分間発色させ, リポ多糖体特有梯子状バンドが認められたサンプルを陽性と判断した。

6) 破傷風

破傷風抗体測定キット (化血研, 日本) を使用して, KPA 法: ポリアミノ酸粒子凝集反応により凝集反応法で測定した。

7) トキソプラズマ

抗トキソプラズマ抗体検出を行うにあたり, ラテックス凝集試験 (Toxocheck-MT, 栄研化学, 日本) を使用した。凝集反応はプラスチック製丸底 96 穴プレートにおいて, 被験血清を添付の緩衝液で 2 倍段階希釈し, 反応列とし, 各反応列にラテックス乳剤 (抗原) を 25 μ l ずつ入れ, 攪拌し, 湿箱に入れ室温で一晩静置した。判定はリーディングミラーを用いて行い, 64 倍希釈以上において凝集が観察されたサンプルを陽性とした。

8) 犬由来感染症

(1) バベシア症

○PCR: 18S rDNA の 1665bp を増幅するために設計された Universal canine Babesia. 特異的プライマーセット (B18S-F, B18S-R) を使用。また, *B. gibsoni* の P18 遺伝子の 182bp を増幅するために設計された *B. gibsoni* 特異的プライマーセット (Bg.Pd3, Bg.Pd4) を使用。
① 感度決定 Universal canine Babesia PCR
ポジティブコントロールと分子病態学教室実習犬抽出 DNA から, 感染率約 2.5%, 1.25%, 0.25%, 0.125%, 0.025%, 0.0125%

の希釈系列を作製した。感度決定 Universal canine Babesia PCR は、ミリ Q 中に、テンプレート 1 μ l, 各々プライマー 1 μ l, dNTP 5 μ l, Ex-Taq 0.25 μ l, $\times 10$ バッファー 5 μ l を入れ、全 50 μ l で実施された。PCR は、94 $^{\circ}$ C 30 秒間変性, 55 $^{\circ}$ C 2 分間アニーリング, そして 72 $^{\circ}$ C で 2 分間伸展の 1 サイクルを 30 回繰り返した。PCR 生成物の内、10 μ l を 1.0%アガロースゲルで電気泳動し、エチレンブロマイドにより染色した。

②全サンプル Universal canine Babesia PCR

全サンプル DNA 濃度を、抽出された DNA 濃度の内最も薄い 0.02 μ g/ μ l に統一するために各々ミリ Q により希釈を実施した。PCR は、ミリ Q 中に、テンプレート 2.5 μ l, 各々プライマー 1 μ l, dNTP 5 μ l, Ex-Taq 0.25 μ l, $\times 10$ バッファー 5 μ l を入れ、全 50 μ l で実施された。PCR は、94 $^{\circ}$ C 30 秒間変性, 55 $^{\circ}$ C 2 分間アニーリング, そして 72 $^{\circ}$ C で 2 分間伸展の 1 サイクルを 30 回繰り返した。PCR 生成物の内、10 μ l を 1.0%アガロースゲルで電気泳動し、エチレンブロマイドにより染色した。

③感度決定 B. gibsoni PCR

ポジティブコントロールと分子病態学教室実習犬抽出 DNA から、感染率 2.5%, 1.25%, 0.25%, 0.125%, 0.025% および 0.0125% の希釈系列を作製した。PCR は、ミリ Q 中に、テンプレート (ポジコンについても 0.02 μ g/ μ l に希釈したものを使用) 2.5 μ l, 各々プライマー 1 μ l, dNTP 5 μ l, Ex-Taq 0.25 μ l, $\times 10$ バッファー 5 μ l を入れ、全 50 μ l で実施された。PCR は、94 $^{\circ}$ C 30 秒間変性, 54 $^{\circ}$ C 1 分間アニーリング, そして 72 $^{\circ}$ C で 1 分間伸展の 1 サイクルを 30

回繰り返した。最後に 72 $^{\circ}$ C で 5 分間伸展させた。PCR 生成物の内、10 μ l を 1.0%アガロースゲルで電気泳動し、エチレンブロマイドにより染色した。

④Universal canine Babesia PCR 陽性サンプル B. gibsoni PCR

Universal canine Babesia PCR (②) 陽性サンプルについて、B. gibsoni PCR を実施した。PCR は、ミリ Q 中に、テンプレート 2.5 μ l, 各々プライマー 1 μ l, dNTP 5 μ l, Ex-Taq 0.25 μ l, $\times 10$ バッファー 5 μ l を入れ、全 50 μ l で実施された。PCR は、94 $^{\circ}$ C 30 秒間変性, 54 $^{\circ}$ C 1 分間アニーリング, そして 72 $^{\circ}$ C で 1 分間伸展の 1 サイクルを 30 回繰り返した。最後に 72 $^{\circ}$ C で 5 分間伸展させた。PCR 生成物の内、10 μ l を 1.0%アガロースゲルで電気泳動し、エチレンブロマイドにより染色した。

⑤血液塗抹標本の観察

採取した全血の一部から、血液塗抹標本を作製し、定法に従いライト・ギムザ染色を実施し、光学顕微鏡で観察し虫体検出を行った。感染率 1% を、5% 危険率の可能性で検出するために、各標本 300 個以上の赤血球観察を実施した。

(2) 犬フィラリア症

市販キット (ソロステップ CH, HESA, 米国) を用いて、血清 3 滴 (約 115 μ l) を検査デバイスのサンプル注入口に滴下し、5 分静置後に表示窓中の検査結果 (赤色ラインの出現) を読み取った。

C. 研究結果

1) ジフテリア症

検索した 196 頭中 13 頭 (6.6%) でジフ

テリア抗毒素陽性例が認められた。これらの地域的な分布の内訳は、大隅半島：5/25 (20.0%)、沖縄本島：1/6 (16.7%)、石垣島：3/29 (10.3%)、奄美大島群：3/37 (8.1%)、佐渡島：1/17 (5.9%)、渥美半島：0/14 (0%)、対馬：0/20 (0%)、種子島：0/20 (0%) および屋久島：0/28 (0%) であった。No.26-28 (奄美大島群) と No.143, 144, 150 および 151 (大隅半島)、No.187-189 (石垣島) はそれぞれ同じ飼い主によって飼育されていた。

2) レプトスピラ症

検索した 196 検体中 42 例 (21.4%) で陽性が認められた。陽性例の検出された地域の内訳は、大隅半島：8/15 (53.3%)、石垣島：13/29 (44.8%)、渥美半島：4/14 (28.6%)、種子島：5/20 (25.0%)、対馬：4/20 (20.0%)、沖縄本島：1/6 (16.7%)、奄美大島群：4/37 (10.8%)、佐渡島：1/17 (5.9%)、屋久島：2/28 (7.1%) であった。ワクチンの接種率は 87/196 (44.4%) であり、地域ごとには渥美半島：13/14 (92.9%)、佐渡島 12/17 (70.6%)、沖縄本島：4/6 (66.7%)、石垣島：17/29 (58.6%)、大隅半島：13/25 (52.0%)、奄美大島群：18/37 (48.6%)、種子島：8/20 (40.0%)、対馬：2/20 (10.0%)、屋久島：28/28 (0.0%) であった。また、ワクチンの摂取歴がなく、抗レプトスピラ抗体が陽性であったのは、対馬：4/20 (20.0%)、種子島：4/20 (20.0%)、石垣島：5/29 (17.2%)、沖縄本島：1/6 (16.7%)、大隅半島：2/25 (8.0%)、屋久島：2/28 (7.1%)、佐渡島：1/17 (5.9%)、奄美大島群：1/37 (2.7%)、渥美半島：0/14 (0%) であった。また、No.1, 2 (渥美半

島) は過去にレプトスピラへの感染歴があったが、この 2 頭以外の同居犬は感染歴がなかった。

3) ライム病ボレリア

検索した 196 頭中 31 頭 (15.8%) で陽性 (ELISA/Western Blotting の両方が陽性のもを陽性とした) が認められた。陽性例が検出された地域の内訳は、屋久島：5/28 (17.8%)、沖縄本島：0/6 (0.0%)、対馬：1/20 (5.0%)、石垣島：6/29 (20.6%)、奄美大島群：1/36 (2.7%)、大隅半島：11/25 (44.0%)、種子島：4/20 (20.0%)、渥美半島：2/14 (14.2%) および佐渡島：1/17 (5.8%) であった。

4) ブルセラ症

196 検体中に、*B. abortus* に陽性を示すものはなかった。また、*B. canis* に陽性を示すものは 6/196 (3.0%) であった。それぞれの地域における *B. canis* の検出率は、沖縄本島：1/6 (16.7%)、佐渡島：2/17 (11.8%)、種子島：1/20 (5.0%)、石垣島：1/29 (3.4%)、奄美大島群：1/37 (2.7%)、渥美半島：0/14 (0%)、対馬：0/20 (0%)、屋久島：0/28 (0%)、大隅半島：0/25 (0%) であった。

5) 野兎病

196 検体中に、野兎病菌 Yama 株に陽性を示すものはなかった。

6) 破傷風

採血した全 196 サンプルにおいて、血清中破傷風抗毒素価が測定レベル以下 (< 0.0025U/ml) であったため、検索した全例

とも陰性と判断した。

7) トキソプラズマ

検索した 196 頭中 71 頭 (36.2%) で *Toxioplasma (T.) gondii* 陽性が認められた。陽性例が検出された地域の内訳は、屋久島:17/28 (60.7%), 沖縄本島:3/6 (50.0%), 対馬:8/20 (40.0%), 石垣島:11/29 (37.9%), 奄美大島群:12/37 (32.4%), 大隅半島:8/25 (32.0%), 種子島:6/20 (30.0%) 渥美半島:3/14 (21.4%) および佐渡島:3/17 (17.6%) であった。

8) 犬由来感染症

(1) バベシア症およびヘパトゾーン症

血液塗抹標本の観察および PCR による検出結果以下に示す。

1) 血液塗抹標本の観察

検索した 196 検体中、血液塗抹が厚くて観察に適さなかった 5 例を除外した 191 件を検索したところ、3 サンプル (3/191: 1.6%) で赤血球内に涙型の *Babesia (B.) gibsoni* 虫体と類似する物体が認められた。また、45 サンプル (45/191: 23.6%) で単球もしくは好中球内に *H. canis* のガメトサイトと類似するカプセル様の構造物が認められた。

2) PCR による Babesia, Hepatozoon の検出

① 196 検体中、84 例で 1665bp 付近に陽性バンドが認められた。また、濃い陽性バンドが認められたサンプル以外の陰性・陽性のサンプルには、総じて 1665bp よりもやや大きいバンドが認められた。1665bp 付近に陽性バンドを示した例数は、屋久島:

26/28 (92.9%), 大隅半島:15/25 (60.0%), 対馬:11/20 (55.0%), 種子島:10/20 (50.0%), 沖縄本島:3/6 (50.0%), 奄美大島群:16/37 (43.2%), 石垣島:4/29 (13.8%), 渥美半島:0/15 (0%) および佐渡島:0/17 (0%) であった。

②PCR による *B. gibsoni* の同定

上記の 84 例中、8 例で 2363bp 付近にバンドが認められた。それぞれの地域別の内訳は、沖縄本島:2/6 (33.3%), 奄美大島群:2/37 (5.4%), 対馬:1/20 (5.0%), 大隅半島:1/25 (4.0%), 屋久島:1/28 (3.6%), 石垣島:1/29 (3.4%), 渥美半島:0/15 (0%), 佐渡島:0/17 (0%) および種子島:0/20 (0%) であった。

③PCR による Hepatozoon の同定

84 例中、81 例で 660bp 付近にバンドが認められた。この中には、②で 2363bp 付近にバンドが認められた 8 例を含んでいた。これらの地域の内訳は、屋久島:26/28 (92.9%), 大隅半島:15/25 (60.0%), 対馬:11/20 (55.0%), 奄美大島群:16/37 (43.2%), 種子島:8/20 (40.0%), 沖縄本島:2/6 (33.3%), 石垣島:4/29 (13.8%), 渥美半島:0/15 (0%) および佐渡島:0/17 (0%) であった。

(2) 犬フィラリア症

ミクロフィラリアおよび *Dirofilaria immitis* (Di) 抗原陽性個体を示す。血液塗抹標本では、196 頭中 40 頭 (20.7%) でミクロフィラリアが観察された。その内訳は、沖縄本島:3/6 (50.0%), 対馬:9/20 (45.0%), 屋久島:12/28 (42.9%) 奄美大島:8/37

(21.6%), 鹿児島県大隅半島: 3/25 (12%), 石垣島: 3/29 (10.3%) 佐渡島: 1/17 (5.9%), 種子島: 1/20 (5%) および渥美半島 0/14 (0%) であった。また, 192 頭中 75 頭 (39.1%) で Di 抗原が検出された。その内訳は, 沖縄本島: 6/6 (100%), 屋久島: 15/27 (55.6%), 対馬: 9/19 (47.4%), 大隅半島: 10/25 (40%) 奄美大島: 14/36 (38.9%), 石垣島: 10/28 (35.7%), 種子島: 6/20 (30.0%), 佐渡島: 5/17 (29.4%) および渥美半島 0/14 (0%) であった。マイクロフィラリアと Di 抗原の両方が検出されたものは 38 例であった。また, ミクロフィラリアは検出されなかったものの, Di 抗原が検出されたものは 37 例であった。一方, Di 抗原が検出されなかったものの, ミクロフィラリアが検出されたものは 2 例であった。

各地域でフィラリア予防を行っている飼い主の数は, 石垣島: 8/12 (66.7%), 渥美半島: 1/2 (50%), 沖縄本島: 2/5 (40%), 種子島: 3/9 (33.3%), 大隅半島: 2/6 (33.3%), 屋久島: 2/9 (22.2%), 対馬: 1/6 (16.7%), 佐渡島: 2/14 (14.3%) および奄美大島: 0/13 (0%) であり, 全体で 28/196 (14.3%) であった。この内, フィラリアの予防薬を投与しているにも関わらず, ミクロフィラリアもしくは Di 抗原が検出されたものは 10/28 (35.7%) 例で, 同一の飼い主に飼育されていたものは 2 頭のみであった。

D. 考察

今回の島嶼部および半島部における調査研究では, 高い感染率を示したトキソプラズマ感染 (71/196 : 36.2%), ヘパトゾーン感染 (45/191 : 23.6%) および犬フィラリ

ア症 (75/192 : 39.1%) 以外に, *Corinebacterium (C.) ulcerans* 感染 (13/196 : 6.6%), ボレリア感染 (31/196 : 15.8%), ブルセラ感染 (6/196 : 3.0%) が認められた。野兎病および破傷風は, 検索した島嶼部および半島部に由来する猟犬には認められなかった。

1) ジフテリア

島嶼部の猟犬 196 頭について *C. ulcerans* の保有状況を調べたところ, 奄美大島群, 佐渡島, 鹿児島大隅半島, 石垣島および沖縄本島において高い血清抗毒素価を示す個体が確認された。動物において抗毒素価が高い場合には *C. ulcerans* への感染歴を最も疑うべきである。しかし, *C. diphtheriae* への感染の可能性が完全に排除できない以上, 最終的には *C. ulcerans* の分離を行うことが必要である。

今回, 血清抗毒素価の高かった個体は, 同一の飼い主に飼育されていることが多かった。したがって, 各地域での血清陽性率の違いが, そのまま汚染率を表しているとは判断するべきではないと考える。現在, *C. ulcerans* の感染には, 家畜やペットとの接触や, 未殺菌牛乳の摂取が関与していると考えられている。そのため, 同一飼い主に飼育されており, 生活環境が同一かつ, 互いに接触の機会が多い犬でそれぞれ血清抗毒素価が高いということは, 同居犬同士が互いの感染原となっている可能性を残している。

今後は, 血清抗毒素価が陽性であった犬を含め, その同居犬や飼い主についても *C. ulcerans* の分離を試み, 対象とされる犬の周囲における感染状況を明らかにする必

要がある。

2) レプトスピラ

今回調査を行ったいずれの地域においても、抗レプトスピラ抗体の陽性例が高頻度に認められた。渥美半島における陽性例は全てワクチン接種歴があるため、自然感染ではなくワクチン接種による抗体価の上昇が検出されたという可能性が高いとして除外した。渥美半島以外の調査地においては、ワクチン接種歴がなく、かつ抗体価が陽性を示す個体がしばしば認められた。これらは自然感染による抗体価の上昇である可能性が高いため、*Leptospira spp.*の分布の評価に使用可能と考えられる。今回、大隅半島における陽性率は8.0%であったが、過去の調査では鹿児島県は2通りの検出方法のいずれにおいても抗レプトスピラ抗体は陰性であった。ただし、同地域では2003～2005年の期間にヒトの感染報告例があることから、この地域に*Leptospira spp.*が新たに侵入したという可能性は低く、以前からの分布域であったと考える方が妥当である。また、沖縄本島・石垣島については、過去に鼠からのレプトスピラ分離例があり、今回も陽性例が検出されたことから、清浄地ではないと考えるべきである。また、対馬では昭和25年に患者が報告されているものの、近年になってからの報告例や分布調査はない。しかし、今回検出された4例のうち、No.85、86は同じ飼い主であったが、No.75、79はそれぞれ飼い主も居住地域も異なっていた。このように、同じ島内の離れた地域においても陽性例が検出されたことから、対馬にはレプトスピラが分布していると

考えられる。奄美大島群・佐渡島・種子島・屋久島については、これまでに同地域を対象としたレプトスピラの分布調査は実施されておらず、これまでに患者も報告されていない。しかし、レプトスピラは動物の尿中に排出され、それに汚染された土壌や水を介して感染するため、陽性個体が1例であっても拡大範囲は広いと考えられる。したがって、4例検出された種子島だけでなく、1例のみであった佐渡島についても、今までこれらの地域にレプトスピラが分布していたか否かに関わらず、同地域においてレプトスピラが拡大する可能性に留意すべきである。

3) ライム病ボレリア

マダニ媒介性のライム病ボレリアの感染によって引き起こされるライム病はアメリカ東海岸やヨーロッパに発症例が多く、最近日本においても北海道や東北地方等の寒冷地で増加しつつある。日本では健康犬は発症しにくいのが老犬や幼犬など免疫力の低い犬では発症し、最も一般的に認められる症状としては多発性関節炎が挙げられる。ただし国内では関節炎が認められることは少なく、神経症状が主体である。媒介者であるマダニは草原や森林において生息しているため、山野に侵入する猟犬は感染する可能性が非常に高いといえる。前回の調査では患者の発生がない熊本および宮崎で抗体陽性例が高率に認められ、病原性の無いか、弱毒の菌株の存在が疑われていた。今回も、患者の発生が無い大隅半島、種子島および屋久島、石垣島で高い陽性率が認められたために、菌株の同定を試みたが分離には至らなかった。

4) ブルセラ症

今回、*Burucella (B.) abortus* に陽性を示すサンプルは認められなかったが、*B. canis* に陽性を示すものが 6/196 例認められた。今回 *B. canis* に対して陽性例が認められた地域の内、奄美大島群 (1/37 : 2.7%)、種子島 (1/20 : 5.0%) および石垣島 (1/29 : 3.4%) の陽性率は国内における陽性率の平均 (2~5%) と概ね一致していたため、地域による差はあまりないと考えられる。また、佐渡島の陽性率 (2/17 : 11.8%) は東日本における 2006 年度の調査結果 (12.9%) と大きな差はない。

2009 年の調査時には鹿児島県においてイノシシの *B. abortus* および *B. canis* 陽性例が確認されており、大隅半島の猟犬の多くがイノシシ対象としていたことから、この地域の猟犬にはイノシシを介した *B. abortus* および *B. canis* 感染のリスクが依然として存在すると考える。そのため、鹿児島県については今後継続的に猟犬の抗体調査を実施することがイノシシからの家畜やヒトへの *B. abortus* や *B. canis* の感染防止に役立つと考えられる。

また、対馬および屋久島については、今までにブルセラ症の疫学調査に関する報告はない。この 2 地域が *B. canis* および *B. abortus* に陰性であったことは、これらの地域がブルセラ菌に汚染されていないということを示唆する知見の一つと考える。

5) 野兔病

原因菌は *Francisella (F.) tularensis* (野兔病菌) であり、犬を始めとし、猫、羊、豚、牛、馬、兎、げっ歯類等多種の動物に認められる。人への感染は、汚染吸血性節

足動物の刺咬、犬猫などの保菌動物による咬傷、またペットに寄生している汚染ダニなどをつぶした際に飛び散る汚染液体などにより起こる。野兔病菌は健常人の皮膚、粘膜をも通過し、容易に感染が成立することから注意が必要である。日本における人の野兔病はこれまで主に東北地方の各県と千葉県、茨城県で発生が認められ、多くの県で散発的発生が存在する。今回の調査では、前回と同様に陽性例は認められず、これは患者の発生とよく一致していた。

6) 破傷風

破傷風菌 *Clostridium tetani* 産生外毒素が原因となって発症する。破傷風菌は広く自然界に分布し、土壌病の原因となり、犬の体表が土で汚れた際に傷口から侵入し、体内で毒素を産生する。今回、山野を駆け回り、土壌中の菌に汚染される可能性の高い猟犬において、菌保有調査を行うことで日本における破傷風菌の分布を知ることが出来ると考えたが、陽性個体は認められなかった。これは感染が発生した場合、猟犬は容易に淘汰されるため、活動している猟犬には陽性例を欠く可能性がある。

7) トキソプラズマ

今回のトキソプラズマ症の調査では、採血を行った全ての地域において陽性例が検出された。また、これらの地域を比較すると、屋久島の陽性率が 60.7% とやや高かった。近年ではあまりトキソプラズマ症の実態調査は大規模に行われていないが、往年の実態調査では、犬の抗体保有率は 10~30% であった。また、昨年岐阜、静岡、三重、長野、新潟の調査を行った際には、調

査地の平均は 19.7%であった。これらの結果と比較しても、屋久島の陽性率は高い。一方で、佐渡島（3/17：17.6%）や渥美半島（3/14：21.4%）の陽性率は、昨年度の中部地区にかんする調査結果とほぼ同等であった。

いずれの調査地域においても抗トキソプラズマ抗体陽性犬が認められたことから、これらの地域はいずれも野生下に *T. gondii* が分布しているということが示唆される。したがって、陽性率が高かった屋久島は勿論のこと、その他の地域においても狩猟肉の喫食には十分に注意しなければならない。また、犬がオーシストを摂取し、それがそのまま糞便に排泄される場合や、毛皮に付着したオーシストから感染が成立する場合もあり、子供が犬と触れ合うことがリスクになるとも言われている。そのため、特に妊婦は、狩猟肉に対する取り扱いの注意のみならず、狩猟犬に対しても不用意な接触をしないように心がける必要がある。

8) 犬由来の感染症

(1) バベシアおよびヘパトゾーン症

Babesia (B.) gibsoni および *Hepatozoon (H.) canis* の両方について、光学顕微鏡を用いた虫体検出および PCR による検出を試みたところ、いずれの原虫も PCR による検出の方が感度が高かった。したがって、症状が発現するような重度感染例を臨床的に検査する場合は血液塗抹標本上で虫体検出が可能であるが、本調査のように極めて軽度の感染例を含めて調査したい場合には、PCR を用いた検出がより有用であると考ええる。

今回、渥美半島と佐渡島を除く調査地で

H. canis が検出され、同地域のうち種子島を除く場所で *B. gibsoni* が検出された。この様に、種子島以外の地域において 2 種の病原体が検出され、*B. gibsoni* に感染している個体の 89% が *H. canis* に混合感染しているということは、*B. gibsoni* を媒介するダニは、高い確率で *H. canis* も保有し、これらを同時に媒介するという可能性を示唆している。一般的に、*H. canis* のベクターはクリイロコイタマダニであるとされており、このダニは沖縄、石垣島および奄美地方の与論島以外にはほとんど分布していない。それにも関わらず、今回の調査では前述の地域以外で *H. canis* の分布が多くみられた。近年、他のチマダニ類やマダニ類がベクターとして働いている可能性が示唆されており、今回の結果はこの仮説を裏付けるものである。これらの中には *B. gibsoni* のベクターであるフタトゲチマダニやツリガネチマダニ、ヤマトマダニなども含まれる。

一方で、フタトゲチマダニやヤマトマダニは日本の広い地域で確認されているが、佐渡島や渥美半島のサンプルからは *B. gibsoni* および *H. canis* の陽性個体は検出されなかった。以前から近畿以西では *B. gibsoni* の感染が流行しているとされており、昨年の中部地方近辺の調査時には三重県のみで *B. gibsoni* が確認されている。また、過去の報告でも、岐阜県、富山県などの中部地方では *H. canis* の発生は認められていない。このことは、*H. canis* や *B. gibsoni* が依然として西日本のみに集中して分布しているということを示している。しかし、これらのベクターとなりうるダニが東日本にも広く分布しているということ

は、今後 *H. canis* および *B. gibsoni* の分布域がより北上していくという可能性を示唆している。

今回、特に屋久島では *H. canis* の陽性率が 92.9% と高く、きわめて多くの猟犬がダニ類に頻回暴露されていることが示唆された。このことは屋久島の猟犬はフタトゲチマダニなどによって媒介される他の疾病（人獣共通感染症を含め）に暴露されている可能性が高いということを示唆しているが、同時にこの地域において野外活動を行うヒトの暴露リスクも示している。屋久島においては猟犬を介して飼い主にこれらの疾病が伝播される可能性だけでなく、野外でこれらの疾病に直接感染しうる可能性があることから、ダニ媒介性の人獣共通感染症（*Borrelia* 他）についての調査を実施し、これらの疾病の分布がある場合には注意を喚起する必要がある。

(2) フィラリア症

今回、ミクロフィラリアの検出率と *Dirofilaria immitis* (Di) 抗原の検出率を比較すると、どの地域においても Di 抗原の検出率のほうが高かった。Di 抗原の検出率のほうが総じて高かったことと、一般的に、Di 抗原の検出のほうが感度・特異性ともに高いと言われているため、地域別の比較には Di 抗原による検出率を用いたほうが適切であると考えられる。Di 抗原が検出されたにも関わらず、ミクロフィラリアが検出されなかった個体が 37 例あった。これは、いわゆる“オカルト感染”であると考えられる。日本で広く確認されているフィラリアの種は *D. immitis* であるが、沖縄では *Dirofilaria repens* や *Dipetalonema*

reconditum などの他の糸状虫の検出例がある。しかし、今回確認された 2 例は、それぞれ奄美大島群および屋久島で検出されたものであるため、*D. immitis* 以外のフィラリアという可能性は低いのではないかと考えられる。また、この 2 例は成虫の駆除に関する既往歴がなく、フィラリアの臨床兆候も認められなかった。そのため、ごく少数の成虫が感染しており、それが死んだ場合と、抗原が抗体との複合体を形成している場合のいずれかである可能性が高い。今回の調査結果を考慮すると、*D. immitis* の分布調査には Di 抗原の検出と共に末梢血中のミクロフィラリア検出を実施するほうが、より正確な状況が把握できると考えられる。

渥美半島以外の調査地においては、犬糸状虫がほぼ 30% 以上の陽性率で認められた。犬における犬糸状虫の寄生率が高い場所では、ヒトのフィラリア症の発生率が高いという報告があることを考慮すると、これらの地域では野生動物およびヒトに感染するリスクがあると考えられる。

E. 結論

1) 南西諸島を中心とした島嶼部および半島部（渥美および大隅半島）の猟犬につき、ジフテリア症、レプトスピラ症、ライム病、トキソプラズマ症など重要人獣共通感染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高い抗体陽性例がしばしば検出された。島嶼部においては、島ごとに各感染症の陽性率に変動が認められた。

2) 屋久島など南西諸島の一部では、トキソプラズマ、ヘパトゾーンなどの感染症で

極めて高い陽性率が認められたことから、実際の患者の発生を含め、その原因とヒトに対する影響について再調査する必要がある。

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、前回の報告と同様に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

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表等

(1) 佐藤静香, 大井誠明, 側嶋絵里菜, 松本淳, 柳井徳磨, 村井厚子, 野中成晃, 堀井洋一, 野上貞雄. 猟犬のトキソプラズマ抗体保有状況. 第17回日本野生動物医学会(東京), 2011年9月, 要旨集 p108

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 材料および方法

