

Ni-CE 株を接種したマウスの大腿筋では、このような明瞭なルシフェラーゼ活性の上昇は確認されなかった。

マウス骨格筋由来 G-8 細胞における西ヶ原株、Ni-CE 株および CE(NiP)株の多段階増殖を検討した結果、西ヶ原株および CE(NiP)株のウイルス力価が緩やかに上昇したのに対し、Ni-CE 株の力価は経時的に著しく減少した(図 4)。以上より、*in vivo* および *in vitro* の実験系の両者によって、西ヶ原株の P 遺伝子が筋肉細胞におけるウイルスの増殖性に重要な役割を果たすことが判明した。

D. 考察

本研究により、西ヶ原株の P 遺伝子が末梢神経侵襲性を高める機能を有することが明らかとなった(図 2)。P 遺伝子の翻訳産物(P 蛋白質)は、ウイルス粒子内部に存在するヌクレオカプシドを構成する。神経細胞に侵入後、狂犬病ウイルスがヌクレオカプシドではなく、ウイルス粒子の形態で軸索輸送されるという既報の知見(Klingen *et al.*, J. Virol., 2007)を考慮すると、ウイルス粒子内部の P 蛋白質が神経細胞へのウイルス吸着・侵入過程に直接関与するとは考えにくい。むしろ、P 蛋白質が筋肉におけるウイルスの増殖効率に関与していることが推測された。

そこで、筋肉細胞における各ウイルスの増殖を比較したところ、*in vivo* および *in vitro* の実験系の両者によって、P 遺伝子が筋肉におけるウイルス増殖性を決定することが明らかになった(図 3 および 4)。P 蛋白質は、ウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ(L 蛋白質)の共因子として、ウイルス RNA の転写・複製に必須な役割を果たす。また、ウイルスのインターフェロン(IFN)競合蛋白

質としての機能も有しており、感染細胞における IFN 誘導(Brzózka *et al.*, J. Virol., 2005)および IFN 応答(Vidy *et al.*, J. Virol., 2005)の両者を阻害することが知られている。したがって、筋肉細胞における西ヶ原株および Ni-CE 株の増殖性の違いに、これらの P 蛋白質機能が関与している可能性が考えられた。

E. 結論

以上の成績により、狂犬病ウイルス(西ヶ原株)は、その P 遺伝子機能により、筋肉において効率よく増殖し、結果として、高い効率で末梢神経に感染すると考えられた。

L. 健康危険情報

該当なし

M. 研究発表

1.論文発表

該当なし

2.学会発表

- 1) 山岡理子、伊藤直人、中川敬介、岡寺康太、杉山誠:狂犬病ウイルス P 遺伝子が関連する末梢感染性の解析:第 154 回日本獣医学会、盛岡(2012, 9)
- 2) 岡田和真、伊藤直人、中川敬介、山岡理子、岡寺康太、杉山誠:狂犬病ウイルスの病原性における P 蛋白質アイソフォームの重要性:第 154 回日本獣医学会、盛岡(2012, 9)
- 3) 山岡理子、伊藤直人、中川敬介、岡寺康太、杉山誠:狂犬病ウイルス P 遺伝子は

末梢感染性に関連する: 第 60 回日本ウイルス学会、大阪(2012, 11) 3. その他
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




ウイルス株	ゲノム構成	末梢感染性
西ヶ原		++
Ni-CE		-
CE(NiP)		+

図1. 本研究で使用したウイルス株

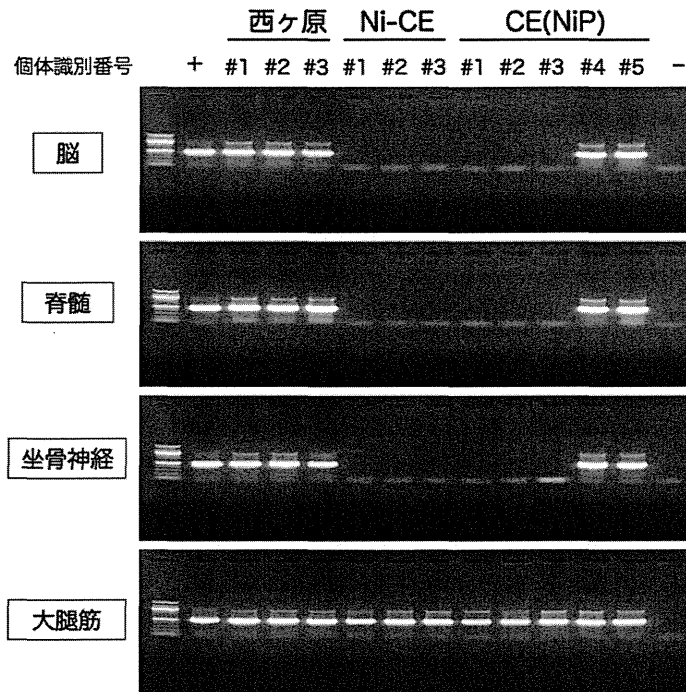


図2. マウス体内における各株の分布

+ : 陽性対照 (CVS株感染マウス脳)
 - : 陰性対照 (ウイルス希釈液接種マウス各組織)

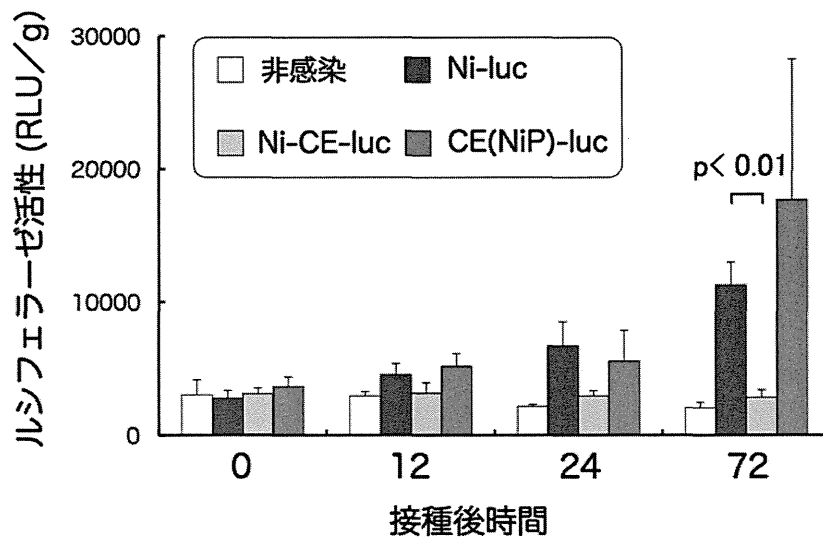


図3. マウス大腿筋における各株の増殖

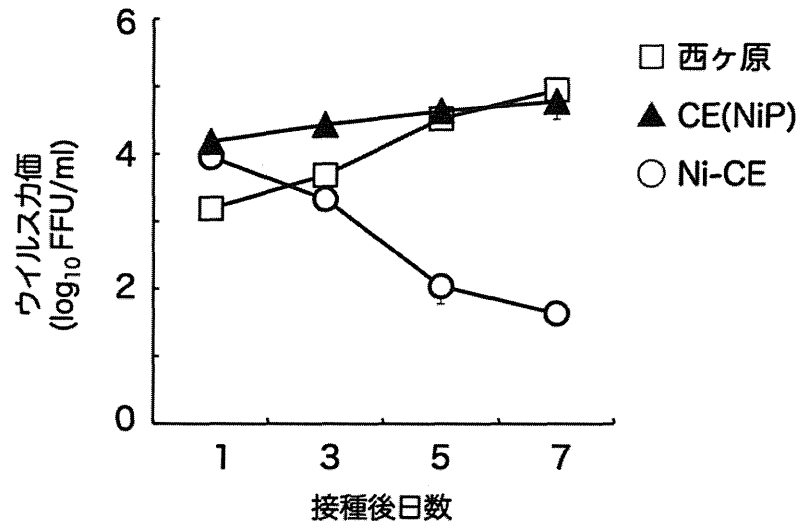


図4. マウス骨格筋由来G-8細胞における各株の増殖曲線

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

リアルタイム PCR 法による回帰熱実験室診断法に関する研究

研究分担者	川端 寛樹	国立感染症研究所 室長
研究協力者	高野 愛 大久保(佐藤)梢	山口大学共同獣医学部 国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨:

感染症法4類に規定される回帰熱は、2010年にウズベキスタンからの輸入例に加え、2012年にアルジェリアからの輸入例が見出された。回帰熱は抗菌薬による治療が遅れた場合、死に至る可能性もあることから、その迅速診断法の開発、普及が求められている。そこで本研究では、リアルタイム PCR 法を用いた迅速診断法の開発とその性能試験を行ったので報告する。

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。これまで回帰熱の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、まず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。

そこで本研究では、2010年の海外感染例報告を契機に地方衛生研究所などで回帰熱の検査を可能にする目的で、リアルタイム PCR 法による回帰熱ボレリア特異的 DNA 検出法の検証およびその標準化に関する検討を行った。

B. 方法と材料

【試験に用いたボレリア株とゲノム配列データ】
ライム病群ボレリア標準株13株、回帰熱ボレリア株4株、爬虫類型ボレリア32株である。またゲノム配列が解読された株についてはPCR法の感度特異性の *in silico* 解析に供した。

【使用した PCR プライマーおよびその反応条件】
本研究で試験した PCR プライマーおよびリアルタイム PCR 用の TaqMan®プローブの一覧、および反応条件を表1に示した。通常の PCR には Veriti® Thermal Cycler (Life technologies)を用いた。またリアルタイム PCR には Applied Biosystems 7000 リアルタイム PCR システム(Life technologies)を用いた。

【参照コントロールプラスミドの作成】

それぞれの PCR 法による DNA 検出感度を定量

するために、ボレリアゲノム DNA より鞭毛遺伝子等の全長、もしくは一部を pGEM®-T vector (Promega)にクローニングし参照コントロールプラスミドとした。本実験は国立感染症研究所組換え DNA 実験の承認を受けている(承認番号:機24-27 および機23-2)。

【血液培養レズンボトルからのリアルタイム PCR を用いた回帰熱ボレリア DNA の検出】

医療機関で体液中の細菌培養に用いられている BACTEC™ レズンボトルからボレリアを検出する方法を確立するために、レズンボトルに模擬的に回帰熱ボレリアを接種し、その検出感度を調べた。

1)小児用 BACTEC™ レズンボトル(BD 94F, 40ml 入り)に回帰熱ボレリアである *Borrelia miyamotoi* 培養株を各々 2×10^5 cells/ml, 2×10^4 cells/ml, 2×10^3 cells/ml, 2×10^2 cells/ml, 20 cells/ml, 2 cells/ml, および 0.2 cells/ml になるよう接種し、試験材料とした。陰性コントロールとしてボレリア株未接種のレズンボトル培養液を用いた。

2) 上記模擬培養液 1ml を分取し、遠心 (200 x g, 60 sec)によりレズンを除去した上澄液を得た。

3) 上記, 上澄液に含まれるボレリアを遠心 (15,000 x g, 10 min)により沈殿後, DNeasy Tissue&Blood kit(Qiagen)により DNA 抽出した。溶出 DNA 溶液量は 0.1ml である。

7) 各々の DNA 溶液 5ul を用い, 表 1 の *rrs*-TaqMan® probe(RF)法によりボレリア DNA を検出した。

C. 結果

【各々の DNA 検出法の性能】

各 DNA 検出系の性能について表 2 に結果を示し

た。 *gfpQ*-nested PCR では使用した回帰熱ボレリア株(含むゲノム配列データ)および爬虫類型ボレリア株すべてで増幅 DNA が確認もしくは *in silico* 解析で増幅可能であることが明らかとなった。他方, リアルタイム PCR 系では, すべての系でその特異性は 100%であったが, *flaB*-TaqMan® probe では, 回帰熱ボレリア群検出における感度は 50%であった。これまでに, ライム病ボレリアを伝播する *Ixodes* 属ダニのいくつかは, 回帰熱群ボレリアも保有することが知られてきている。このことから Barbour らによって報告された *rrs* 遺伝子を標的とするリアルタイム PCR 系も試行し, 試験を行った範囲では, ライム病ボレリアでは感度が 100%であること, また回帰熱ボレリアでも 95%の感度が得られることが明らかとなった。これに加え, Takano らによって開発された新型ボレリアである爬虫類型ボレリアに特異的な *gIvC* を標的としたリアルタイム PCR 法の感度が 94.7%であることも明らかにした。また *rrs*-TaqMan® probe(RF), *rrs*-TaqMan® probe(LD), および *gIvC*-TaqMan® probe のいずれのリアルタイム PCR 系で系に含まれる DNA コピー数が 10^8 - 10 コピーで定量可能であることも確認された。

【細菌検査材料を用いた模擬試験】

回帰熱の発熱は一過的であり, 必ずしもすべての症例で適切な検査材料(発熱期の血液など)が得られる訳ではない。そこで本研究では, 細菌検査用のカルチャーボトルを検査材料とする DNA 検出法について標準化作業を行った。本試験では, 細菌培養培地 1ml 中に細菌数が 20 以上の場合に検出可能であった。これは, 40ml の培地中に菌数が 800 個あれば検出可能であることを示している。

D. 考察

回帰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* などの他、およびシラミ媒介性の *B. recurrentis* が病原体として知られている。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、いわゆる周期性の熱発を主訴とする。これまでの報告では、菌血症を起こした患者の血液中には、通常 10^5 個以上の細菌が含まれることから、発熱期の患者材料から病原体を検出することは難しい作業ではない。一方、発熱期から無熱期へ移行した患者材料より病原体を検出することは、血液中の細菌数が極めて少ないことから難しいとされる。このため、高感度かつ特異的な検査法の確立と、その方法を医療機関から入手可能な様々な検査材料へ適用するための応用法の検証が必要である。回帰熱感染における抗体検査法が未確立であることから、本研究では、まずは高感度の病原体 DNA 検出法、および臨床現場に保存されている患者材料を含む検査検体からの病原体検出法の確立を行った。本研究では新規および既報の試験法についてその感度、特異性および検出限界の検証を行い、Barbour らによって報告された、*rrs*-TaqMan® probe(RF) 法、*rrs*-TaqMan® probe(LD) 法、および Takano らによって報告された *glvC*-TaqMan® probe 法の組み合わせにより、既知のボレリア属全般について、100%の確率でそのグループを特定でき、また、94.7%以上の感度で、細菌 DNA が 10 コピーでも検出できることを明らかにした。*rrs*-TaqMan®

probe 法は同一 tube 内で回帰熱ボレリアとライム病ボレリアを同時に検出できる点で、検査の迅速化が図れることもメリットである。また本研究で検出限界測定に使用した参照コントロールプラスミドは、地方衛生研究所等で検査を行うための陽性コントロールとして使用可能である。加えて、医療機関で血液や血清が保存されていない場合に、細菌試験用に使用した血液培養ボトルも検査材料として使用できることも示された。本方法では、患者血液 1ml 中に 800 コピーの病原体 DNA が存在する場合、培養液の 1ml を用いることで試験判定できることから、通常回帰熱では、本法は十分な検出感度を備えていると考えられる。また本研究では行っていないが、試験に用いる血液培養液量を増やす、もしくは抽出 DNA を濃縮することで、さらに検出感度を向上させることも可能であると考えられた。

E. 結論

我が国では 2010 年まで回帰熱症例が報告されていなかったことから、国内での検査体制は極めて脆弱である。一方で、2010 年に引き続き 2012 年にも回帰熱輸入症例が報告された。またロシアやアメリカでは新興回帰熱(*Borrelia miyamotoi* 感染症)が報告されている。回帰熱は治療の遅れにより、数%から 40%の確率で死に至る危険な感染症であり、一刻も早い検査体制の整備、医療現場への情報提供、国民への啓発活動が必要である。本研究では検査法の一つである核酸検出法の標準化とその応用法について検討を行った。今後はこれら成績をもとに検査マニュアルの作成配布を行い、検査体制の脆弱性対策を進める予定である。

(倫理面からの配慮について)

該当しない。

N. 健康危険情報

アルジェリアで回帰熱と診断された日本人男性の一例:IASR (報告予定)

O. 研究発表

1.論文発表

Takano A, Sugimori C, Fujita H, Kadosaka T, Taylor K, Tsubota T, Konnai S, Tajima T, Sato K, Watanabe H, Ohnishi M, Kawabata H. A novel Relapsing fever *Borrelia* sp. infects the salivary glands of the molted hard-bodied tick, *Amblyomma geoemydae*.

Ticks and Tick-borne Diseases. 3: 259-261, 2012.

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 DNA プライマーおよび TaqMan®プローブ, および反応条件.
A は通常の PCR 法, B はリアルタイム PCR 法に用いた, DNA プライマーもしくは TaqMan®プローブを各々示す.

A: Conventional PCR

Target group	Target gene-system	Oligonucleotides primers	Sequences	PCR condition
Universal (LD, RF, Rep)	<i>flaB</i> -nested PCR ¹⁾	BflaPAD (for 1st-PCR)	5'-GATCA(G/A)GC(T/A)CAA(C/T)ATAACCA(A/T)ATGCA-3'	1st-PCR (25-30 cycles)
		BflaPDU (for 1st-PCR)	5'-AGATTCAAAGTCTGTTTGGAAAGC-3'	94°C/30s→50°C/30s→72°C/30s
		BflaPBU (for 2nd-PCR)	5'-GCTGAAGAGCTTGAATGCAACC-3'	2nd-PCR (25-30 cycles)
		BflaPCR (for 2nd-PCR)	5'-TGATCAGTTATCATTCTAATAGCA-3'	94°C/30s→50°C/30s→72°C/30s
RF/Rep specific	<i>glpQ</i> -nested PCR ²⁾	glpQF2 (for 1st-PCR)	5'-CCATTA(A/G)T(C/T)ATAGCTCACAG(A/G)GG-3'	1st-PCR (25-30 cycles)
		glpQR2 (for 1st-PCR)	5'-CAAGGTCC(A/G)ATTCC(A/G)TC(A/G)-3'	94°C/30s→50°C/30s→72°C/30s
		glpQF3 (for 2nd-PCR)	5'-CATACGCTTATGC(C/T)TT(A/G)GG(A/C)GCTGA-3'	2nd-PCR (25-30 cycles)
		glpQR3 (for 2nd-PCR)	5'-GCAACCTCTG(C/T)CATACCTTCTT(G/C)TG-3'	94°C/30s→50°C/30s→72°C/30s

B: Realtime PCR

Target group	Target gene-system	Oligonucleotides	Sequences	PCR condition
RF specific	<i>flaB</i> -TaqMan® probe	Primer: MGB_92F	5'-GCTGGAGCACAAAGCTTCATG-3'	95°C/5s→60°C/31s, 40 cycles
		Primer: MGB_242R	5'-CCTGTGTGCCCCCTTC TTGA-3'	
		TaqMan® probe: MGB_P174	VIC-CTAATGTTGCAAATCTCTTT-MGB	
		Borrelia_16s_RT_F	5'-GCTGTAAACGATGCACACTTGGT-3'	
<i>rrs</i> -TaqMan® probe(RF) ³⁾		Borrelia_16s_RT_R	5'-GGCGGCACACTTAACACGTTAG-3'	95°C/5s→60°C/31s, 40 cycles
		BM_16s_VIC_MGB_Probe	VIC-CGGTACTAACCTTTCGATTA-MGB	
		Primer: tAG_glvC_MGB_F	5'-TGCATGTC TGCCATTATGTA-3'	
Rep specific	<i>glvC</i> -TaqMan® probe ⁴⁾	Primer: tAG_glvC_MGB_R	5'-CCACATAGGAATCCAATTCA-3'	95°C/5s→60°C/31s, 40 cycles
		TaqMan® probe:	FAM-TAGGAAACATGGGTACTGG-MGB	
LD specific	<i>rrs</i> -TaqMan® probe(LD) ³⁾	Borrelia_16s_RT_F	5'-GCTGTAAACGATGCACACTTGGT-3'	95°C/5s→60°C/31s, 40 cycles
		Borrelia_16s_RT_R	5'-GGCGGCACACTTAACACGTTAG-3'	
		BB_16s_FAM_MGB_Probe	FAM-TTCGGTACTAAC TTTTAGTTAA-MGB	

LD: Lyme disease borreliae (ライム病群ボレリア), RF: Relapsing fever borrelia (回帰熱群ボレリア), Rep: Reptile-associated borreliae (爬虫類型ボレリア)を各々示す. 1) Sato Y, et al. Int J Infect Dis. 1997; 2: 64-73, 2) Takano A, et al. Environ Microbiol Rep. 2011; 3:632-637, 3) Barbour AG, et al. Am J Trop Med Hyg. 2009; 81(6):1120-1131, 4) Takano et al. Tick Tick-borne Infect Dis. 2012; 3: 259-261.

表 2. それぞれの DNA 検出法による感度, 特異性, 検出限界, および定量性を示す DNA コピー数

	Conventional		Realtime			
	<i>flaB</i> -nested PCR	<i>gfpQ</i> -nested PCR	<i>flaB</i> -TaqMan@ probe	<i>rrs</i> -TaqMan@ probe(LD)	<i>rrs</i> -TaqMan@ probe(RF)	<i>glvC</i> -TaqMan@ probe
LD borreliae	13/13	0/13	0/13	13/13	0/13	0/13
RF borreliae	20/20	7月7日	2月4日	0/20	19/20	0/4
Rep borreliae	20/20	4月4日	0/32	0/20	0/10	18/19
Target borrelia group	All	RF only / RF&Rep	RF	LD	RF	Rep
Sensitivity (%)	100	100 / 100	50	100	95	94.7
Specificity (%)	NT ¹⁾	63.6 / 100	100	100	100	100
Quantity range (copies)	- ²⁾	- ²⁾	NT ¹⁾	10 to 10 ⁸	10 to 10 ⁸	10 to 10 ⁸

LD: Lyme disease borreliae (ライム病群ボレリア), RF: Relapsing fever borrelia (回帰熱群ボレリア), Rep: Reptile-associated borreliae (爬虫類型ボレリア)を各々示す.

1) NT: Not tested, 2) Impossible to determine a copy number by these PCR system.

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：沖縄県のマングース 63 頭，イリオモテヤマネコ 18 頭，長崎県のツシマヤマネコ 15 頭，千葉県および神奈川県の高クビシン 50 頭（千葉県；26 頭，神奈川県；24 頭）から *Bartonella* 属菌の分離を試みた。沖縄県のマングースの 15.9%（10/63）および千葉県の高クビシンの 3.8%（1/26）から *Bartonella* 属菌が分離され，その血中菌数はそれぞれ $3.0 \times 10^1 \sim 8.9 \times 10^3$ CFU/ml， 7.0×10^3 CFU/ml であった。一方，2 種のヤマネコから *Bartonella* 属菌は分離されなかった。マングース・高クビシン分離株の遺伝子解析の結果，各陽性個体から分離した 11 株全てが CSD の病原菌である *B. henselae* と同定された（相同性 99.6～100%）。MST 解析では，マングース・高クビシン分離株と今回解析した日本のネコ由来株は 8 つに型別され，全ての株が日本の CSD 患者由来株と同じ系統であった。マングース分離株の 2 株は沖縄のネコ由来の 2 株と，他の 2 株は CSD 患者由来の 8 株と同じ MST 型であったことから，マングース・ネコ間における *B. henselae* の伝播が起きているとともに，マングースと高クビシンは CSD の新たな感染源となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年，野生動物が保有する *Bartonella* 属菌による人の感染例が欧米を中心に報告されているが，わが国の野生動物における *Bartonella* 属菌の分布状況は未だ不明な点が多い。本研究では，野生のネコ亜目動物であるマングースおよび高クビシンにおける *Bartonella* 属菌の保菌状況ならびに分離株の遺伝子性状を解析し，人への感染リスクについて評価した。

B. 研究方法

2001 年 3 月～2012 年 2 月にかけて，管理

捕獲された沖縄県のマングース 63 頭と千葉・神奈川県の高クビシン 50 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 *Bartonella* 属菌の定量培養を行った。*Bartonella* 属菌を疑うコロニーから分離株と既存種のハウスキーピング遺伝子（16S rRNA, *ftsZ*, *gltA*, *groEL*, *ribC*, *rpoB*）の塩基配列を解析して BLAST 検索を行い，最も近縁な *Bartonella* 属菌種との相同性から菌種を同定した。さらに，9 つの遺伝子間領域を用

いた Multispacer typing (MST) 法によって分離株、猫ひっかき病 (CSD) 患者由来株、ならびに沖縄、千葉、神奈川、東京のネコ由来株を型別し、その病原的意義の解明を試みた。

(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猫科動物は、全て管理捕獲された個体である。また、マングース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

沖縄県のマングースの 15.9% (10/63) および千葉県のハクビシンの 3.8% (1/26) から *Bartonella* 属菌が分離されたが、2種のヤマネコから *Bartonella* 属菌は分離されなかった (表 1)。

マングース・ハクビシンの血中菌数はそれぞれ $3.0 \times 10^1 \sim 8.9 \times 10^3$ CFU/ml, 7.0×10^3 CFU/ml であったにもかかわらず、無症状であった。マングース・ハクビシンから分離された 11 株について、6つのハウスキーピング遺伝子の BLAST 検索を行ったところ、各分離株は *Bartonella henselae* と最も高い相同性 (相同性値; 99.6~100%) を示し、*B. henselae* と同定された (表 2)。

MST 法の結果、マングース由来の 10 株およびハクビシン由来の 1 株は 5つの MST 型 (MST 8, 14, 37, 58, 59) に分類され、全てが CSD 患者株と同じ系統に属した。マングース由来の 10 株のうち、2 株 (MST58) は沖縄のネコ由来の 2 株と、2 株 (MST14)

は CSD 患者由来の 8 株とそれぞれ同じ MST 型であった。

ハクビシン由来の 1 株は新規の MST 型 (MST59) であった (図 1)。

D. 考察

本研究で検討した野生のネコ亜目動物のうち、沖縄県で捕獲したマングースの 15.9% (10/63) と千葉県で捕獲したハクビシンの 3.8% (1/26) から *Bartonella* 属菌が初めて分離された。マングース・ハクビシンから分離された 11 株の 6つのハウスキーピング遺伝子の塩基配列は、いずれも CSD の起因菌である *Bartonella henselae* と最も高い相同性 (相同性値; 99.6~100%) を示したことから、マングースとハクビシンは *B. henselae* を保菌していることが初めて明らかとなった。今回検討した沖縄県のマングースの *B. henselae* 保菌率 (15.9%) は、同県のネコと同等であり、また、血液の保存方法の不備により、ハクビシンの *B. henselae* 保菌率 (3.8%; 1/26) は低く見積られた可能性があるものの、千葉県のネコと同等の保菌率であった。

B. henselae を保菌していたマングースとハクビシンの最大血中菌数はそれぞれ 8.9×10^3 CFU/ml, 7.0×10^3 CFU/ml であったが、各動物の臨床症状は確認されなかった。マングースとハクビシンの *B. henselae* の保菌率や血中菌数の成績、さらに陽性個体はいずれも臨床症状を示していなかったことなどから、これらの動物は *B. henselae* の自然宿主である可能性が示唆された。

MST 解析では、マングース・ハクビシン分離株と今回解析した日本のネコ由来株は

8つのMST型に分類され、全て系統1に分類された。また、マングース分離株の2株は沖縄のネコ由来の2株と、他の2株はCSD患者由来の8株と同じMST型であった。既報では、ほとんどの日本のネコおよび全てのCSD患者株は系統1に分類されたことから、マングースが保菌する*B. henselae*株は、いずれもヒトに対して病原性を有している可能性が考えられた。

ハクビシン分離と同じMST型の*B. henselae*株は、日本を含め欧米諸国のCSD患者株およびネコ分離株においても検出されていない。しかしながら、2001年に高知県において、ペットのハクビシンによる引っ掻き傷が原因となってCSDに罹患した患者が1例報告されていることから、ハクビシンはヒトに対しCSDを起こしうる*B. henselae*株を保菌している可能性が考えられる。

E. 結論

野生マングースやハクビシンが猫ひっかき病の病原体である*B. henselae*を保菌していたことから、ネコ科以外の野生ネコ亜目動物がCSDの新たな感染源となることが示唆された。

P. 健康危険情報

今後、わが国でその生息数がさらに増加し、有害鳥獣駆除事業等でヒトとの接触が増加すると考えられるマングースやハクビシンを原因とするCSDの発生にも注意を払う必要があると思われた。

Q. 研究発表

1. 論文発表

1. Sato, S., Kabeya, H., Miura, T., Suzuki, K., Bai, Y., Kosoy, M., Sentsui, H., Kariwa, H., and Maruyama, S. 2012. Isolation and phylogenetic analysis of *Bartonella* species from wild carnivores of the suborder *Caniformia* in Japan. *Vet. Microbiol.* 161: 130-136.
2. Tsunesumi, N., Sato, G., Iwasa, M., Kabeya, H., Maruyama, S., and Tohya, Y. 2012. Novel murine norovirus-like genes in wild rodents in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 74(9): 1221-1224.
3. Sato, S., Kabeya, H., Yamazaki, M., Takeno, S., Suzuki, K., Kobayashi, S., Souma, K., Masuko, T., Chomel, B. B., and Maruyama, S. 2012. Prevalence and genetic diversity of *Bartonella* species in sika deer (*Cervus nippon*) in Japan. *Com. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35 : 575-581.

2. 学会発表

- 4) Sato, S., Kabeya, H., Yamazaki, M., Takeno, S., Miura, T., Suzuki, K., Kobayashi, S., Soma, K., Masuko, T., Bai, Y., Kosoy, M., Sentsui, H., Kariwa, H., and Maruyama, S. Prevalence and genetic characterization of *Bartonella* in wildlife in Japan. 7th International conference on *Bartonella* as animal and human pathogens. (Raleigh, North Carolina, USA) April 25-28, 2012.
- 5) Chomel, B. B., McMillan-Cole, A. C., Kasten, R. W., Stuckey, M. J., Sato, S., Maruyama, S., Diniz, P.P.V.P., and

Breitschwerdt, E. B. *Bartonella* spp. infection in domestic dogs, jackals and red foxes in Iraq. 7th International conference on Bartonella as animal and human pathogens. (Raleigh, North Carolina, USA) April 25-28, 2012.

- 6) 佐藤真伍, 壁谷英則, 重松幸典, 宇根由美, 南 正人, 村田浩一, 小倉 剛, 丸山 総一. わが国のマングースおよびハクビシンから分離された *Bartonella henselae* の遺伝子性状解析. 第 154 回日本獣医学会学術集会, 岩手 (2012, 9)
- 7) 立野守洋, 西尾拓真, 佐久間暢人, 伊澤雅子, 中西 希, 浅利裕美子, 岡村麻生, 丸山 総一, 下川孝子, 瀬戸口明日香, 遠藤泰之. 日本産ヤマネコにおける節足動物媒介性疾患の分子疫学調査. 第 154 回日本獣医学会学術集会, 岩手 (2012, 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

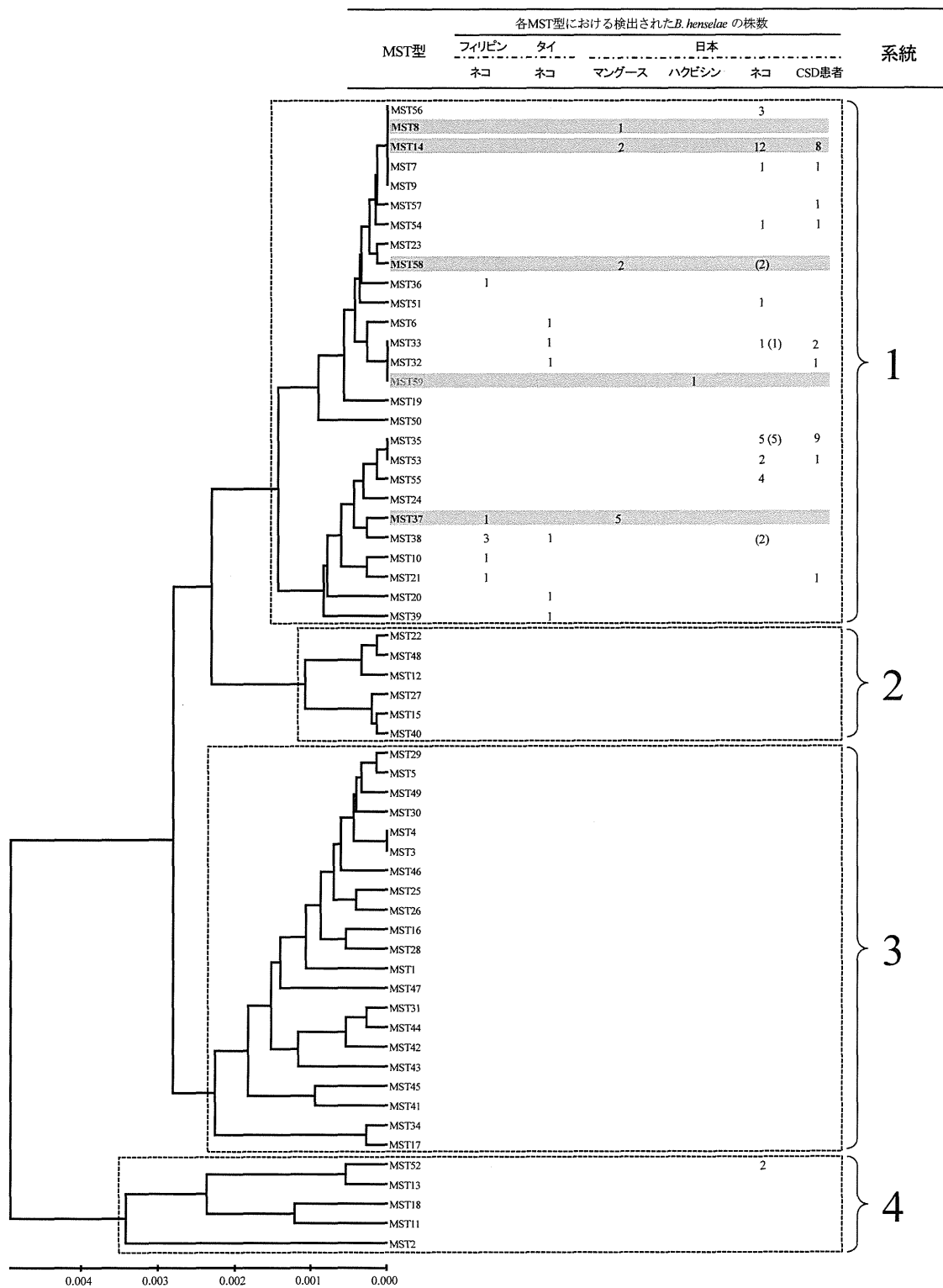
表 1. わが国の野生ネコ亜目における *Bartonella* 属菌の保菌率

動物種 (学名)	捕獲地域	検体数	陽性数 (%)
マンガース (<i>Herpestes auropunctatus</i>)	沖縄県	63	10 (15.9)
ハクビシン (<i>Paguma larvata</i>)	千葉県	26	1 (3.8)
	神奈川県	24	0
イリオモテヤマネコ (<i>Prionailurus bengalensis iriomotensis</i>)	沖縄県	18	0
ツシマヤマネコ (<i>Prionailurus bengalensis euptilurus</i>)	長崎県	15	0

表 2. マンダースおよびハクビシンにおける *Bartonella* 属菌の血中菌数と塩基配列相同性

動物種 と 検体 No.	血中菌数 (CFU/ml)	代表株名	<i>B. henselae</i> Houston-1 ^F の 5 遺伝子との相同性 (%)					
			16S rRNA (1,348bp)	<i>ftsZ</i> (788bp)	<i>gita</i> (312bp)	<i>groEL</i> (1,185bp)	<i>ribC</i> (621bp)	<i>rpoH</i> (825bp)
マンガース								
53	NT	HJ-53	100	99.9	100	100	100	99.6
54	NT	HJ-54	100	100	100	100	100	99.8
58	NT	HJ-58	100	100	100	100	100	99.8
90	8.0×10^4	HJ-90	100	100	100	100	100	99.8
91	3.0×10^4	HJ-91	100	99.9	100	100	100	99.6
106	3.0×10^4	HJ-106	100	100	100	100	100	99.8
107	5.9×10^3	HJ-107	100	99.9	100	100	100	99.6
108	8.9×10^3	HJ-108	100	100	100	100	100	99.8
109	5.0×10^2	HJ-109	100	99.9	100	100	100	99.6
111	1.2×10^3	HJ-111	100	99.9	100	100	100	99.6
ハクビシン								
18	7.0×10^3	PL-18	100	100	100	100	100	99.8

図1. 猫, CSD患者, マングースならびにハクビシン分離株の MST 型



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

東南アジアにおける *Salmonella* の保菌動物としてのヤモリの重要性に関する研究

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：東南アジア一帯に広く生息するヤモリが普遍的に *Salmonella* 属菌を保菌しているか否かを検証する目的で、ベトナム中部の Hue 市ならびにカンボジア北西部の Siem Reap 市において、野生ヤモリを捕獲し、*Salmonella* の保菌状況ならびにその血清型分布を検討した。その結果、ベトナム中部ならびにカンボジア北西部に生息するヤモリから *Salmonella* 属菌は、それぞれ 19.5%ならびに 17.3%の割合で分離された。また、分離された血清型は、両地域とも東南アジアでヒト患者からの分離頻度の高い *S. Weltevreden* の分離割合が最も高かった。これらのことから東南アジアにおいて、ヤモリは自然界における *Salmonella* 属菌の主要な保菌動物であり、人の *Salmonella* 感染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。

A. 研究目的

平成 22 年ならびに 23 年度の厚生労働省科学研究費補助金による調査研究で、ベトナム南部のメコンデルタに生息する野生ヤモリにおける *Salmonella* 属菌の保菌状況を検討した結果、ヤモリは、1) *Salmonella* 属菌を季節、地域および種に関わらず高率に保菌していること、2) 分離される血清型は本地域のヒト患者由来のものとよく一致していること、3) 高い菌量の *Salmonella* が糞便中に排菌されていること、4) 環境中に排出された糞便中で *Salmonella* は 6 週間生残したことなどが明らかになった。これらのことから、少なくとも本地域ではヤ

モリが *Salmonella* の重要な保菌動物のひとつであり、人への感染源になっている可能性が高いことが示された。しかし、これまでの調査研究は、ベトナム・メコンデルタに限局して実施されたものであり、これらの現象が、同種のヤモリの生息する他の東南アジア地域でも普遍的に観察されるのかは不明である。

そこで、本研究では、ヤモリがベトナムを含む東南アジアにおいて普遍的にサルモネラの保菌動物として重要な役割を果たしているかを明らかにする目的で、調査範囲をさらに拡大し、ベトナム中部ならびにカンボジア北西部において、ヤモリを捕

獲して *Salmonella* 属菌の保菌状況ならびにその血清型分布を検討した。

B. 材料と方法

1. 供試材料

供試検体として、2011～2012年にベトナム中部の Hue 市周辺ならびにカンボジア北西部の Siem Reap 市周辺で捕獲した野生のヤモリ 3種 411 検体の腸管内容物を用いた。なお、ベトナム中部では乾期（3～8月）と雨期（9～2月）に検体採取を行った。

2. *Salmonella* 属菌の分離、同定および血清型別方法

供試検体は 10ml の EEM 培地（栄研化学（株）：栄研）に接種した後、37℃で 24 時間増菌培養した。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、生物型別を行うとともに、市販のサルモネラ免疫血清（ゲンカ生研（株））を用い、血清型を決定した。

C. 研究結果

ヤモリから *Salmonella* 属菌は、ベト

ナム中部では 313 検体中 61 検体（19.5%）から、カンボジア北西部では 98 検体中 17 検体（17.3%）から分離された。また、ベトナム中部でのヤモリの *Salmonella* 属菌の保菌率を季節別にみると、乾期では 160 検体中 29 検体（18.1%）が、雨期では 153 検体中 32 検体（20.9%）が *Salmonella* 陽性であったが、季節間で保菌率に有意な差は認められなかった。また、ベトナム中部ならびにカンボジア北西部の両地域とも、ヤモリの種間で *Salmonella* 属菌の保菌率に有意な差は認められなかった。

ベトナム中部では *Salmonella* 陽性のヤモリ 61 検体からは、*Salmonella* 属菌 61 株が分離された。61 株中 29 株（47.5%）は市販免疫血清で 3 種類の血清型に型別された。*S. Weltevreden* が 19 株（31.1%）で最も多く、次いで *S. Brunei* が 8 株（13.1%）ならびに *S. Lexington* が 2 株（3.3%）であった。残りの 32 株（52.5%）は血清型別できなかつたが、20 株が生物群 IV、10 株が IIIa、1 株が V に生物型別され、1 株が型別不能であった。カンボジア北西部では、*Salmonella* 陽性のヤモリ 17 検体からは、*Salmonella* 属菌 17 株が分離された。17 株中 16 株（94.1%）は 1 種類の血清型に型別され、*S. Weltevreden* に同定された。

D. 考察

ベトナム中部ならびにカンボジア北西部に生息するヤモリから *Salmonella* 属菌はそれぞれ 19.5% ならびに 17.3% と高率に分離された。ベトナム中部ならびにカンボジア北西部はベトナム・メコンデルタから、直

線でそれぞれ約 800km ならびに約 450km 離れているが、いずれの地域においてもヤモリからは *Salmonella* 属菌がメコンデルタ (14.5%) とほぼ同じような割合で分離されたことから、ベトナム、カンボジアを含む東南アジアでは、ヤモリは普遍的に *Salmonella* 属菌の主要なレゼルボアになっている可能性が高いものと推測された。

ヤモリから分離された *Salmonella* 属菌の血清型は、ベトナム中部では *S. Weltevreden*、*S. Brunei* ならびに *S. Lexington* で、カンボジア北西部では *S. Weltevreden* であった。いずれの地域でも *S. Weltevreden* の割合が最も高く、特にカンボジア北西部では、分離株のほとんどが *S. Weltevreden* であった。*S. Weltevreden* はベトナムを含む東南アジアではヒトの *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。本血清型は、ベトナムに生息するヤモリが分布している沖縄県以外では、我が国ではほとんど検出されないが、近年東南アジアから輸入されたコショウから本血清型菌が分離されたことが報告されている。また、フィンランド、ノルウェーおよびデンマークでは、*S. Weltevreden* に汚染されたアルファルファによる集団食中毒の発生が報告されている。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、ヤモリは東南アジアでは広く人の *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る。現在までのところ、東南アジアにおいて *Salmonella* 属菌の保菌動物や汚染源としてのヤモリの重要性についてまだ注目されていないが、今後、これらの地域において、食品の安全を担保するためには、食品の加工場や処理場において、ヤモリを侵入させないなどの対策を講じる必要がある。また、我が国の沖縄県や鹿児島県南部の島々には、東南アジアに広く分布するホオグロヤモリが生息しており、近年その分布域を北へと拡大している。我々は沖縄県のホオグロヤモリから *S. Weltevreden* を分離しており、ホオグロヤモリの分布域の拡大に伴い、本血清型菌が日本本土に持ち込まれる可能性があるため、今後、継続的な調査・監視が必要であろう。

E. 結論

本研究により、少なくとも東南アジアにおいて、ヤモリは自然界における *Salmonella* 属菌の主要な保菌動物であり、人の *Salmonella* 症の感染源となっている可能性が高いことが判明した。

F 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 林谷秀樹, Ly, T.L.K., Nguyen N. T., Nguyen, T.D., 奥村水門, Nguyen N. T. 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. 2012. 獣畜新報

65, 372-373.

2) 林谷秀樹：エルシニア症. 小児科臨床 (増刊号) 2012. 65, 1337-1341.

3) 林谷秀樹：サルモネラ感染症、小児科 2013. 54, 27-36.

4) Okumura, M, Nakata, K., Taniguchi, T., and Hayashidani, H. Prevalence of *Salmonella* and *Yersinia* from Wild Black Rat (*Rattus rattus*) Living in Yanbaru area of Okinawa Island, Japan. J.Vet.Med. Sci. (in submitted)

2. 学会発表

1) 永田絵美、Vo Thi Minh Tam、長谷川瑞貴、Huynh Tan Loc、Ly Thi Lien Khai、林谷秀樹、ベトナム中部及びカンボジアに生息するヤモリにおけるサルモネラの疫学. 第 155 回日本獣医学会学術集会、東京 (2013. 3)

2) 長谷川瑞貴、永田絵美、Nguyen Thu Tam、Vo Thi Minh Tam、林谷秀樹、サルモネラの感染源としての野生ヤモリの重要性. 第 155 回日本獣医学会学術集会、東京 (2013. 3)

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