

別紙

平成 24 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、舩渡川圭次、増山知由、関口明子、福田幸男、
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、遠藤亜紀、岡本浩介、内田 茂、水谷達二

川崎市衛生研究所 小嶋由香、清水亜希子、佐藤弘康、西村悠貴、鈴木香奈子

静岡県環境衛生科学研究所 佐原啓二、道越勇樹、森 大典、村松芳貴、小川 高、増田
敏行、深澤隆司、谷 浩之

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

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、青木佳代、須藤正之、佐野哲也

香川県環境保健センター 内田順子、有塚真弓、池本龍一、蔦田博也、宮本孝子、関 和
美、

寺嶋由佳理、保田英彰、砂川一浩、麻野俊機、坪井利樹、千野和彦

長崎淳一、上田 勲、多田芽生

山形県衛生研究所 瀬戸順次、安孫子千恵子

宮城県保健環境センター 畠山 敬、後藤郁男、山口友美、木村葉子、齋藤香織、宮崎麻
由、

野地和高、建入茂樹

徳島県立保健製薬環境センター 下野生世、石田弘子、石川生代、矢野さやか

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

大阪府立大学 幸田知子、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

済生会新潟第二病院 小出 勝

日本歯科大学医科病院 菅原芳秋

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：東北地方を中心として

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

林 武志 岐阜大学連合大学院獣医学研究科 大学院生

濱野剛久 岐阜大学応用生物科学部獣医課程 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、東北地方（福島県、宮城県、岩手県、青森県、秋田県および山形県）の猟犬計 123 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、中部地方および島嶼部の調査に引き続き、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。

人獣共通感染症に関しては、ブルセラ症は福島で 1 例、山形県で 3 例の計 4 例の陽性例が認められた。トキソプラズマでは、先の報告と同様に各県とも高い陽性率で、検索例の 18% が陽性を示した。ジフテリア毒素では、青森で 1 例の陽性例が認められた。東北地方で問題となる野兔病は、今回検出されなかった。犬由来の感染で、宮城県で *Babesia (B) gibsoni* が 3 例にのみ検出された。また、ヘパトゾーン(*Hepatozoon canis*)について、全例とも陰性であった。犬フィラリア症では、検索した猟犬全体の約 30%で抗原が検出され、比較的高い陽性率であった。

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、東北地方の猟犬 123 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”，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”および 2011 年の“島嶼部を中心とした猟犬の保有病原体に関する研究”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、2012 年 6 月から 9 月にかけて東北 6 県の猟犬 123 頭（福島県 19 頭，宮城県 30 頭，岩手県 17 頭，青森県 26 頭，秋田県 11 頭，山形県 20 頭の猟犬から血液を採取した。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 58 頭，雌 64 頭，不明 1 頭であった。年齢は，1 歳～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 分非動化处理し，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。同様にして，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°C30 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°C4 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,Coastar）の各ウェルに GST/Lig-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、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、十分な色が得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°C24 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. *holrtractica*, 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 穴プレート上でを行い、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)

野兎病菌 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 倍希釈した被験血清と室温で 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°C30 秒間変性, 55°C2 分間アニーリング, そして 72°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, 10µl 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 0.02µg/µl 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 2.5µl, 各々プライマー1µl, dNTP 5µl, Ex-Taq 0.25µl, ×10バッファー5µl を入れ, 全 50µl で実施された。PCR は, 94°C30 秒間変性, 55°C2 分間アニーリング, そして 72°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, 10µl 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 0.02µg/µl に希釈したものを使用) 2.5µl, 各々プライマー1µl, dNTP 5µl, Ex-Taq 0.25µl, ×10バッファー5µl を入れ, 全 50µl で実施された。PCR は, 94°C30 秒間変性, 54°C1 分間アニーリング, そして 72°Cで 1 分間伸展の 1 サイクルを 30 回繰り返し, 最後に 72°Cで 5 分間伸展させた。PCR 生成物の内, 10µl 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 2.5µl, 各々プライマー1µl, dNTP 5µl, Ex-Taq 0.25µl, ×10 バッファー5µl を入れ, 全 50µl で実施された。PCR は, 94°C 30 秒間変性, 54°C1 分間アニーリング, そして 72°Cで 1 分間伸展の 1 サイクルを 30 回繰り返し, 最後に 72°Cで 5 分間伸展させた。PCR 生成物の内, 10µl 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 115µl) 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 120 頭中 1 頭 (0.8%) でジフテリア抗毒素陽性例が認められた。陽性例は青森県上北郡の鳥猟犬 (9 歳雌) であった。

2) レプトスピラ症

検索した 121 検体中 17 例 (14.0%) で

陽性が認められた。陽性例の検出された地域の内訳は、福島県：4/19 (21.1%)、宮城県：5/30 (16.7%)、岩手県：1/16 (6.3%)、青森県：3/25 (12%)、秋田県：0/11 (0%)、山形県：4/20 (20%)であった。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、福島県：4/19 (21.0%)、宮城県：4/30 (13.3%)、岩手県：0/16 (0%)、青森県：2/25 (8%)、秋田県：0/11 (0%)、山形県：1/20 (5%)であった。

3) ライム病ボレリア

検索した 121 頭中 59 頭 (48.8%) で陽性 (ELISA/WesternBlotting の両方が陽性のものを陽性とした) が認められた。陽性例が検出された地域の内訳は、福島県：12/19 (63.2%)、宮城県：11/30 (36.7%)、岩手県：11/16 (68.8%)、青森：10/25 (40%)、秋田県：5/11 (45.5%)、山形県：10/20 (50%)であった (詳細な解析は川端寛樹博士の報告を参照)。

4) ブルセラ症

検索した 112 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 4/112 (3.9%) であった。それぞれの地域における *B. canis* の検出率は、福島県：1/16 (6.3%)、宮城県：0/28 (0%)、岩手県：0/16 (0%)、青森県：0/23 (0%)、山形県：3/20 (15%) であった。陽性 4 例はいずれも鳥猟犬で福島県のセッター 1 例 (2 歳雌)、福島県のスパニエル 3 例 (10 歳雄, 10 歳雌, 5 歳雌) であった。

5) 野兔病

123 検体中に、野兔病菌 Yama 株に陽性を示すものはなかった。

6) 破傷風

採血した全 123 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 122 頭中 22 頭 (18%) で *Toxoplasma (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、福島県：3/19 (15.8%)、宮城県：6/30 (20%)、岩手県：3/17 (17.6%)、青森県：3/26 (11.5%)、秋田県：1/11 (9%)、山形県：6/20 (30%) 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
PCR による検出結果以下に示す。

1) PCR による *B. gibsoni* の同定

123 例中 3 例 (宮城県) で 2363bp 付近にバンドが認めらる陽性例がみられた。

2) PCR による Hepatozoon の同定

123 例中 660bp 付近にバンドが認められた例はなかった。

(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。122 頭中 38 頭 (31.1%) で Di 抗原が検出された。その内訳は、福島県：5/19 (26.3%)、宮城県：12/30 (40%)、岩手県：5/17 (29.4%)、青森県：10/25 (40%)、秋田県：3/11 (27.3%)、

山形県：3/20（15％）であった。

D. 考察

今回の東北地方における調査研究では、高い感染率を示したボレリア症（59/121：48.8％）、トキソプラズマ感染（22/122：18％）、レプトスピラ（17/121:14％）および犬フィラリア症（38/122：31.1％）以外に、*Corinebacterium (C.) ulcerans* 感染（1/120：0.8％）、ブルセラ感染（4/112：3.9％）が認められた。野兎病および破傷風は、検索した猟犬には認められなかった。

1) ジフテリア

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。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、同一飼いで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がある。前回の島嶼部における *C. ulcerans* 血清抗毒素価の保有状況では、奄美大島群（8.1％）、佐渡島（5.9％）、鹿児島大隅半島（20％）、石垣島（10.3％）および沖縄本島（16.7％）で比較的高い陽性率が確認された。また、以前に実施した宮崎、熊本および三重の調査では 20－30％と高い陽性率が認められた。それらと比較すると、今回の東北地方の陽性率（0.8％）は極めて低い。寒冷地では野外犬では *C. ulcerans* 血清抗毒素価の保有率が低い可能性が考えられるが、東北地方にも患者の発生がみられること（秋田県）、また、以北の北海道の調査を

行っていないことから、現時点で結論を下すことができなかった。

2) レプトスピラ

今回調査を行った、秋田県を除く、いずれの地域においても、秋田県を除き、比較的高い抗レプトスピラ抗体の陽性率が認められ、ワクチン接種歴がなく、かつ抗体価が陽性を示す個体が散見された。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。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、拡大する範囲は広いと考えられる。

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。今回の東北地方における陽性率（48.8％）は、比較的高く、山野で行動する猟犬と人は感染する可能性が非常に高いと考えられる。以前の調査でも、患者の発生がない熊本および宮崎、大隅半島、種子島、屋久島および石垣島で比較的高い陽性率（10-40％）が認められ、病原性の無いか、弱毒の菌株の存在が疑われていた（川端寛樹博士の報告を参照されたい）。

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 4/112 例（3.9％）認め

られた。こ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、山形県の陽性率(3/19:15.8%)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。

5) 野兎病

原因菌は *Francisella (F.) tularensis* (野兎病菌) 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。野兎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兎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、東北地方での本感染症、特に秋田県および青森県の兎猟犬に予測されたが、陽性例はなかった。さらに例数と採材個所を増やして検討する必要がある。

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。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、以前の岐阜、静岡、三重、長野、新潟における調査の平均陽性率19.7%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ことから、狩猟肉の喫食には十分に注意しなければならない。また、妊婦は狩猟肉に対する取り扱いに注意するとともに、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、PCRによる検出を試みた。全東北地方で *H. canis* は検出されず、宮城県でのみ *B. gibsoni* が検出された。

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、以前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。

犬由来の感染に関して、犬のバベシア症では、宮城県より *Babesia (B) gibsoni* が 3 例にのみ検出された。この結果と、既報告とを考え合わせると、東日本では、愛玩犬の内の特定犬種を中心に *B. gibsoni* の感染が存在していることが示唆された。

一方、*H. canis* については、東北地方では全例とも陰性であったことから、同原虫の北限が中部地方であるとの昨年度の調査結果を支持するものであった。

(2) フィラリア症

犬フィラリア症では、東北全県で検索した猟犬全体で約 30% に抗原が検出され、比較的高い陽性率であったが、以前の調査地における、ほぼ 30% 以上の陽性率とほぼ同等であった。東北地方の猟犬に関しても、フィラリアの予防という点に関しては問題があるが、これは猟犬が使役犬であること、蚊に咬まれる機会が多いことなどが考えられる。

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) 東北地方（福島県、宮城県、岩手県、青森県、秋田県、山形県）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、ライム病、トキソプラズマで高い抗体陽性例が検出された。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。

2) 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) 後藤みなみ, 濱野剛久, 水主川剛賢, 酒井洋樹, 高島康弘, 柳井徳磨, 今岡浩一, 川端寛樹, 山本明彦, 小泉信夫, 野上貞雄. 猟犬を指標とした野外感染症調査: 島嶼部, 半島部における調査. 第 18 回野生動物医学会大会. 2012 年 8 月. 十和田.

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 2012年度の採血と測定

・東北6県の猟犬全
123頭より採血

● 測定方法

- ・レプトスピラ ELISA
- ・ライム病ポレリア ELISA
- ・リケッチア 間接蛍光抗体法
- ・ジフテリア 培養細胞法による
抗毒素価の測定
- ・トキソプラズマ ラテックス凝集反応
- ・パベシア 血液塗抹標本の観察、
PCR、DNAシーケンス

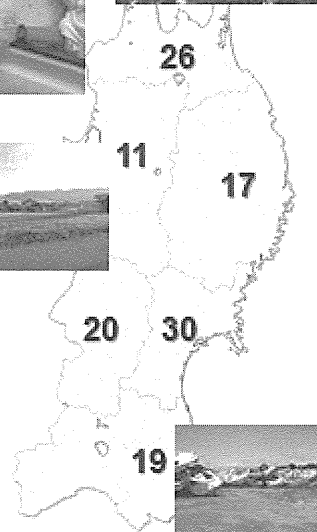


表1 2012東北各県猟犬の陽性率(1)

	抗トキソプラズマ抗体	野兔病 (Francisella tularensis)	ブルセラ抗体	ジフテリア 抗毒素抗体 【Corynebacterium ulcerans】	破傷風 抗毒素 抗体
青森	3/26(11.5%)	—	—	—	—
岩手	3/17(17.6%)	—	—	—	—
秋田	1/11(9%)	—	—	—	—
宮城	6/30(20%)	—	—	—	—
山形	6/20(30%)	—	3/20(15%)	1/20 (5%)	—
福島	3/19(15.8%)	—	1/16(6.3%)	—	—

表2 2012東北各県猟犬の陽性率(2)

	レプトスピラ	ボレリア抗体	フィラリア抗原 (<i>Dirofilaria immitis</i>)	バベシア (<i>Babesia gibsoni</i>)
青森	3/25(12%)	10/25 (40%)	10/25(40%)	—
岩手	1/16(6.3%)	11/16 (68.8%)	5/17(29.4%)	—
秋田	0/11	5/11 (45.5%)	3/11(27.3%)	—
宮城	5/30(16.7%)	11/30 (36.8%)	12/30(40%)	3/30(10%)
山形	4/20(20%)	10/20 (50%)	3/20(15%)	—
福島	4/19(21.1%)	12/19 (63.2%)	5/19(26.3%)	—

表3 主要野外病原体の陽性率の過去調査との比較

2012年	抗トキソプラズマ抗体	抗レプトスピラ抗体	フィラリア抗原	ジフテリア抗毒素抗体	ボレリア ELISA/Western
青森(26)	11.5	12.0	40.0	0	40.0
岩手(17)	17.6	6.3	29.4	0	68.8
秋田(11)	9.0	0	17.6	0	45.5
宮城(30)	20.0	16.7	40.0	0	36.7
山形(20)	30.0	20.0	15.0	5.0	50.0
福島(19)	15.8	21.1	26.3	0	63.2
全東北(123)	18.0	14.0	31.1	0.8	48.4
島嶼11'(196)	35.8	10.8	41.8	6.8	12.6
中部10'(142)	19.7	ND	26.0	7.7	44.3
西日本各地 09'(155)	ND	7.8	ND	8.4	19.4 (検出率:%)

競合 ELISA 法による多様な動物種に適用可能な野兎病菌抗体測定法の開発

研究分担者 棚林 清 国立感染症研究所獣医科学部第三室 室長
研究協力者 シャルマ ニークン*、堀田明豊、宇田晶彦、藤田修、山本美江（国立感染症研究所獣医科学部、*岐阜大学大学院連合獣医研究科）、溝口俊夫（福島県鳥獣保護センター）、進藤順治、朴天鎬、小山田敏文、畑井仁、工藤上（北里大学獣医学部）

研究要旨 野兎病の起因病原体である野兎病菌 (*Francisella tularensis*) は、非常に多くの動物種に感染するとされている。野生動物等の血清疫学調査では、多様な動物種に適用可能な抗体測定法が必要となることから、野兎病菌 LPS および抗 LPS モノクローナル抗体を抗原と標準抗体として各種動物由来血液検体に含まれる抗野兎病菌抗体による競合反応として測定する競合 ELISA (cELISA) を開発してきた。本研究では、野兎病患者血清について本 cELISA と間接 ELISA (iELISA) との相関性を検証するとともに、国内野生動物の血液 632 検体について cELISA および微量凝集反応 (MA) 法による野兎病菌抗体の検出を試みた。ヒト血清を cELISA と iELISA で調べた結果、本 cELISA 法は iELISA と高い相関を示してヒト血清抗体の測定が可能であった。また、野生動物血液検体を cELISA で調べた結果、ツキノワグマ(23/150)、ホンダタヌキ(3/21)抗体陽性が認められた。MA 法で検出されなかった検体にも cELISA 陽性検体が見いだされることから cELISA は MA 法より高感度で、動物種特異的標識二次抗体等を用いることなく野生動物の抗体測定に摘要できることから野生動物における野兎病の血清疫学調査のための手法として有用と考えられた。

A. 研究目的

野兎病菌は、代表的な動物由来感染症である野兎病の起因病原体である。本菌は、感染ノウサギやげっ歯類との直接接触、ダニや蚊等の吸血性節足動物の媒介、汚染食物や水、汚染塵芥の吸入等によりヒトに感染するとされている。日本での患者発生は近年まれであるが、これまでのヒトへの感染のほとんどがノウサギとの接触が原因となっている。しかしながら、本菌は非常に多数の動物種に感染が可能である事が知られており、各種動物での分布状況を調査解析し、本菌の生態系での維持様式やヒトへの感染リスクを評価するための基礎的情報を収集することは重要である。各種動物、特に野生動物における感染状況の調査では血清中の野兎病菌に対する抗体を検出する血清疫学調査は有効な手法と考えられる。このための抗体測定法としては、微量凝集反応 (MA) 法や ELISA 法などが用いられる。しかしながら、特に、野生動物から採取される検体においては、溶血していたり、少

量しか採取できないなどの困難さがある。また、通常の ELISA 法では酵素標識された動物種特異的イムノグロブリン抗体などが利用されるが、市販されている動物種は限られている。

本研究では、多様な種の動物における野兎病菌抗体を測定するための方法として競合 ELISA (cELISA) の開発をしてきた。本年度は、開発した cELISA の野兎病患者血清について iELISA との相関性を確認検証するとともに、国内各種野生動物の血液検体での野兎病菌抗体検出を試み、国内各種野生動物における野兎病の感染状況を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 野兎病菌抗体測定競合 ELISA (cELISA)

(1) 抗原および標準抗体：ELISA 用 96 穴プレートに固相化する野兎病菌の抗原は、chocolate agar II 培地 (Becton Dickinson 社) で培養した野兎病菌 NVF1 株より LPS

extraction kit (iNtRON Biotechnology 社) を用いてリポポリサッカライド(LPS)を精製して用いた。標準抗野兎病菌抗体は、LPS を認識するマウスモノクローナル抗体 (クローン M14B11) をビオチン標識 (T.K. Craft 社に委託) したものをを用いた。

(2) cELISA の反応：精製 LPS

(2.5 μ g/50 μ l/well) を 96 穴 ELISA プレートに加え 37 $^{\circ}$ C で 16~18 時間保温し固相化した。PBST (0.1%Tween20 加 PBS) での洗浄後、3%スキムミルク加 PBST でブロッキングした。1%スキムミルク加 PBST で希釈した検体 50 μ l を加え 37 $^{\circ}$ C、90 分間反応させ、PBST で洗浄後、ビオチン標識抗 LPS 抗体

(3.4mg/ml) 50 μ l を 37 $^{\circ}$ C、60 分間反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストربتアビジンおよび SureBlue reserve TMB MicroWell Peroxidase Substrate (KPL 社) を反応させ、固相抗原と反応した標準 LPS 抗体を発色させた。1N 塩酸で反応停止後 450nm の吸光度を測定した。

(3) 反応阻止率の算出：検体中の野兎病菌 LPS 抗体による標準抗 LPS 抗体の反応の阻止率(% inhibition)は、検体希釈液だけを事前に反応させた時の標準抗 LPS 抗体の吸光度を 100%とし、検体を反応させた場合の吸光度の割合を、以下の計算式により算出した。

$$1 - \left(\frac{\text{OD sample} - \text{OD Background}}{\text{OD standard} - \text{OD Background}} \right) \times 100$$

カットオフ値の決定は、ROC と TG-ROC カーブ解析 (Stat Flex software) から行った。ヒト血清の使用については国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会承認されたものである。

2. 間接 ELISA(iELISA)によるヒト血清抗体測定

精製 LPS を 50 μ l を 96 穴 ELISA プレートに加え 37 $^{\circ}$ C で 16~18 時間保温し固相化した、洗浄後 3%スキムミルク加 PBST でブロッキングした。1%スキムミルク加 PBST で希釈した(1:500) 検体 50 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C、60 分

間反応させた。洗浄後、1%スキムミルク加 PBST で希釈した(1:8000) ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG (ICN Pharmaceuticals, Cappel) 50 μ l を加えた後、37 $^{\circ}$ C、60 分間反応させた。発色反応と停止、吸光度の測定は cELISA と同様に行った。

3. 微量凝集反応(MA)

生理食塩水で 2 倍段階希釈した血清 25 μ l と等量のホルマリン不活化野兎病菌菌体浮遊液を 96 穴 U 底プレートにて混和し、37 $^{\circ}$ C で 18 時間保温し凝集の有無を判定した。抗体価は希釈倍数の逆数として表し 10 倍以上を陽性とした。

4. 各種野生動物由来血液検体の測定

収集または分与された国内野生動物由来血液のうち、主に、過去に野兎病の発生が多く報告されていた東北地方で捕獲された各種動物の検体 (表 1、ノウサギについては血清あるいは全血吸収ろ紙からの抽出液) 合計 632 検体の 100 倍希釈液について cELISA を行い、阻止率を算出した。カットオフ値の算出は、MA 陰性血液検体の cELISA での阻止率の平均値に 3 倍の標準偏差値を加えた値とし 40%以上を陽性とした。なお、血清については MA 法でも抗体価を測定した。

C. 研究結果

1. cELISA を用いたヒト血清の測定

野兎と診断されたヒト血清と陰性血清を cELISA で測定しその阻止率を図 1a に示した。さらにこれらの測定結果を ROC と TG-ROC カーブ解析し ROC カーブと TG-ROC カーブを図 1b と 1c にそれぞれ示した。ROC カーブの下領域は 0.98559 と算出され患者血清と陰性血清の区別が確実にできることがよく反映されていた。また、感度 (sensitivity) と特異性 (specificity) の TG-ROC カーブからカットオフ値を 8.5%に設定することが可能で、その場合の感度と特異性はそれぞれ 97.0%と 100%であった。また、iELISA ではカットオフ値 OD0.61 の場合、感度 94.1%、特異性 98.0%と算出され、cELISA は iELISA での測定と同等にヒト抗体を測定できることがわかった。さらに cELISA と iELISA の相関性を解析したとこ

ろ $R^2=0.8$, $r=0.906762$ と非常に高い相関性があった (図 2)。なお、本 cELISA はブルセラ菌やエルシニア菌などの免疫ウサギ血清との非特異反応は無いことは前年度までに確認されている。

2. 各種野生動物由来血液検体の測定

国内の各種野生動物血液 632 検体について、cELISA で測定した。野生動物における野兎病菌に対する標準的な陽性および陰性血清の調製は困難であることから、カットオフ値の設定は MA 法で測定できた検体の cELISA での阻止率の平均値に 3 倍の標準偏差値を加えた値で 40% とした。cELISA での阻止率の分布 (検体数) は図 3 に示した。

今回測定した野生動物由来血液検体での測定結果を表 1 にまとめた。ツキノワグマについては 150 検体中 23 検体および 18 検体が cELISA および MA で陽性となった。MA 陽性の 18 検体はすべて cELISA でも陽性であった。また、タヌキにおいては 21 検体中 3 検体で cELISA 陽性となり、この内 2 検体は MA でも陽性であった。小型げっ歯類 (ハタネズミ、ヒメネズミ、アカネズミ) では 2 検体が cELISA 陽性 (1 検体は MA でも陽性) であった。

一方、日本での野兎病患者の主な感染源動物とされるノウサギ 142 検体に陽性検体は認められなかった。また、ラット、ニホンザル、ハクビシン、キツネでも陽性検体は検出されなかった。さら、7 種の猛禽類 53 検体にも抗体陽性検体は認められなかった。

D. 考察

動物由来感染症のサーベイランスやモニタリングの結果は感染症対策立案のための重要な情報となる。そのためには、的確な検査法での調査が必要である。特に、人獣共通感染症においては感染源動物における調査も重要となる。本研究では動物由来感染のうち野兎病のヒトを含め各種動物での調査に有用な抗体検査法の開発とヒト検体での検証とその応用を試みた。

野兎病の抗体検査は通常 MA 法により実施され、簡易な方法である一方、非特異反応の可能性があること、検出感度が低いこと、

溶血が著しい検体では利用しにくい等の問題がある。また、iELISA 法は、多検体処理が可能で感度もよい方法であるが、利用できる標識二次抗体に制限がある。これらの問題を解決する抗体検出法として cELISA の開発を行ってきた。

本年度は開発した cELISA で感染歴の有無が既知のヒト血清について、cELISA と iELISA を用いて測定し有用性を検証した。本 cELISA のカットオフ値は低い値に設定することができ、iELISA と同等の感度と特異性で測定することが可能であり、高い相関性を示した (図 2) ことから、ヒト検体測定に応用できると考えられる。

本 cELISA でノウサギ、ツキノワグマ、野鼠等の野生動物の血液検体 632 検体を測定したところ、ツキノワグマ、タヌキ、小型げっ歯類で合計 28 検体が 40% 以上の阻止率を示した。MA 法で 10 倍以上の抗体価を示した 21 検体はすべて cELISA でも陽性であることがわかった。cELISA 陽性 MA 陰性 7 検体について別途ウエスタンブロット法での反応を確認したところ 6 検体は野兎病菌 LPS との反応で見られるはしご状のバンドが検出されたが、マウス検体では反応が見られなかった。野生マウスのそれぞれの測定法での結果の違いの原因は不明であるが、非特異反応あるいは測定法ごとで、野生マウス血清中の抗体が異なる抗原エピトープにを認識している可能性があることが考えられる。

ツキノワグマとタヌキで陽性個体が認められたことは、野生動物における野兎病菌感染の歩哨動物として、今後の血清疫学調査研究に有用な対象動物となると考えられる。ドイツではキツネにおいて効率に抗体を有していることが報告されており、本研究ではキツネの検体が少数であったことからさらに多数の検体について調査する必要があると思われる。本研究で新たな抗体測定を作出できたことやツキノワグマやタヌキに抗体陽性例が認められたことは、今後の野兎病菌の生態系での維持様式を解明するための研究やヒトへの感染リスク評価のための研究に重要な情報となる考えられる。

本研究に使用したヒト血清の使用に同意下さった皆様および動物検体の分与および収集に協力いただいた岩手大学青木美樹子先生、北海道大学荻和宏明先生、大日本猟友会および猟友会会員の皆様に感謝いたします。

E. 結論

野兎病菌抗体測定法として競合 ELISA を開発し、本方法がヒト血清抗体測定において iELISA 法と高い相関性を有して測定可能であることを検証することができた。また本方法で国内野生動物由来血液検体を測定した結果、ツキノワグマおよびタヌキに抗体陽性例が認められ自然界における野兎病菌の浸潤状況を調査するための歩哨動物となる可能性があることを明らかにできた。今後も本研究で開発された cELISA 法等の的確な抗体測定法を用いた野生動物における野兎病菌抗体保有状況の継続的な調査は野兎病のヒトへの感染リスク評価や野兎病菌の生態を明らかにするために重要と考えられる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Seroprevalence of tularemia in wild bears and hares in Japan. A. Hotta, K. Tanabayashi, Y. Yamamoto, O. Fujita, A.

Uda, T. Mizoguchi and A. Yamada Zoonoses and Public Health 59: 89-95. (2012)

Detection of *Francisella tularensis*-specific antibodies in patients with tularemia by a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay. N. Sharma, A. Hotta, Y. Yamamoto, O. Fujita, A. Uda, S. Morikawa, A. Yamada and K. Tanabayashi Clinical and Vaccine Immunology 20:9-16. (2013)

2. 学会発表

Seroprevalence of tularemia among various wild animals in Japan. N. Sharma, A. Hotta, K. Tanabayashi, Y. Yamamoto, O. Fujita, A. Uda, T. Mizoguchi, J. Shindo, C.-H. Park, N. Kudo, H. Hatai, T. Oyamada, S. Morikawa and A. Yamada. 7th International Conference on Tularemia, (2012年9月 コロラド)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

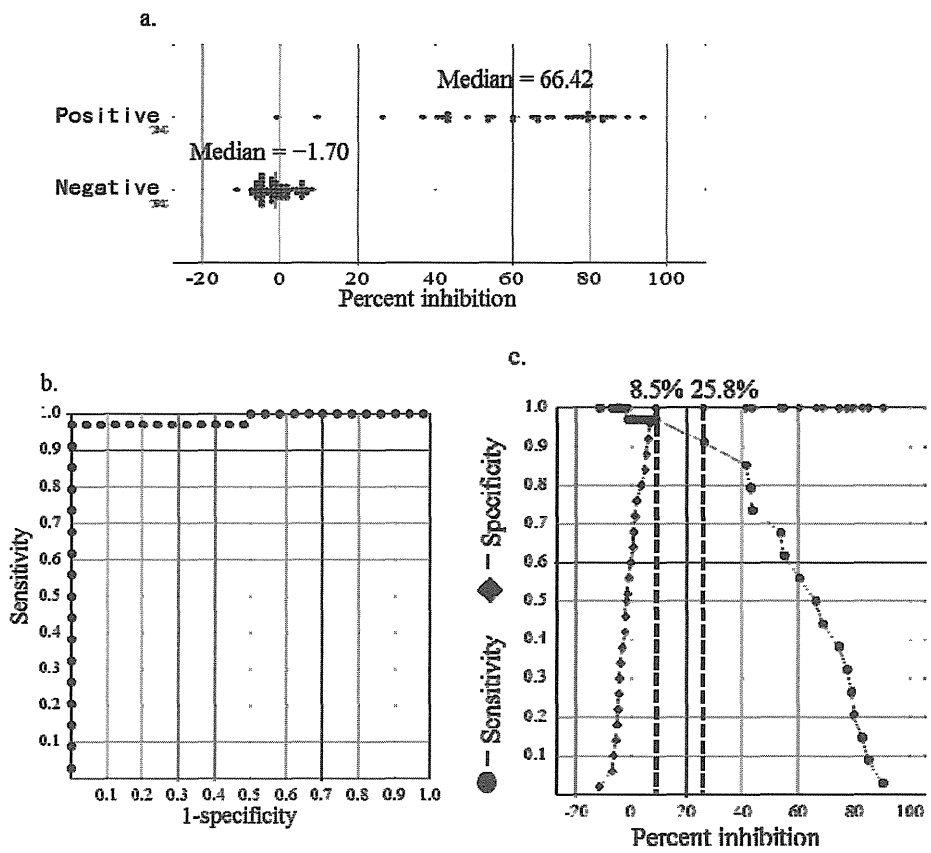


図 1. 競合 ELISA でのヒト血清抗体の野兔病菌 LPS 抗体反応阻止率の分布(a)と ROC (b) および TG-ROC (c) 解析

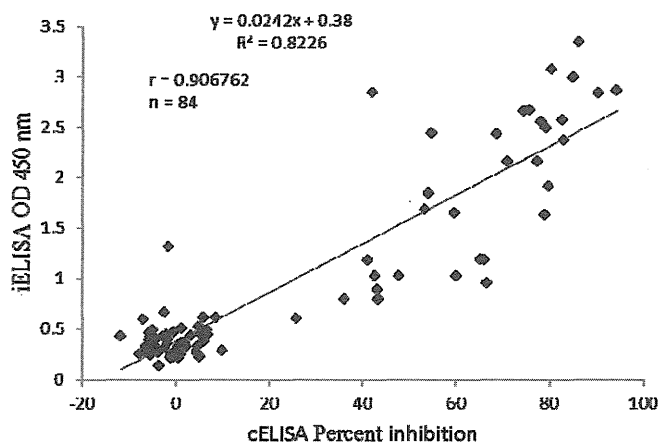


図 2. 野兔病菌抗体陽性および陰性ヒト血清の競合 ELISA と間接 ELISA 法での測定値の相関性

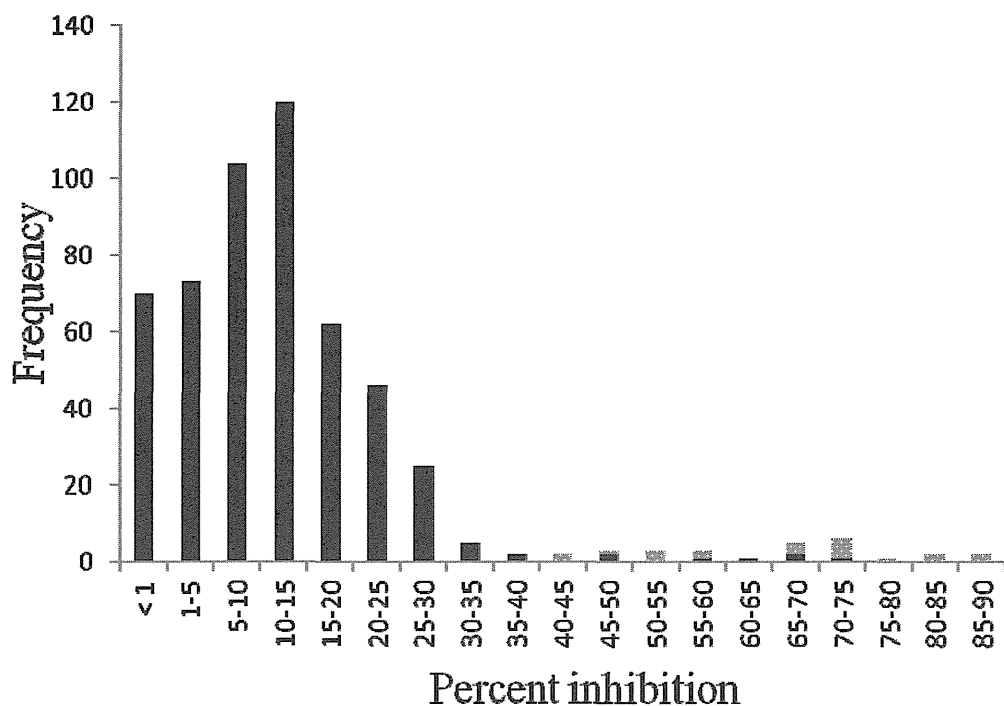


図 3. MA 陰性 (514 検体) および MA 陽性 (21 検体) の競合 ELISA での反応阻止率の分布

表 1. 各種野生動物由来血液検体の cELISA と MA 法による陽性数

野生動物種等	No. of samples	No. of positive	
		cELISA	MA
ノウサギ	142	0	0
ツキノワグマ	150	23	18
ニホンザル	26	0	0
ホンドタヌキ	21	3	2
ハクビシン	20	0	0
ホンドキツネ	3	0	0
小型げっ歯類 (アカネズミ、ハタネズミ、ヒメネズミ、トガリネズミ、ヒミズ)	120	2	1
ラット類 (クマネズミ、ドブネズミ)	97	0	0
猛禽類 (オジロワシ、ハヤブサ、トビ、ノスリ、サシバ、フクロウ、オオタカ)	53	0	0
合計	632	28	21

(検体は PBS にて 100 倍希釈)

野兔病菌の病原性に関わる遺伝子の同定

研究分担者 棚林 清 国立感染症研究所獣医科学部第三室 室長
研究協力者 宇田晶彦、藤田修、堀田明豊（国立感染症研究所獣医科学部）
関塚剛史、黒田誠（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター）

研究要旨 野兔病菌 (*Francisella tularensis*) はヒトに対して極めて高い感染性と致死性を有するグラム陰性桿菌である。本菌の感染および発症機序の解明は公衆衛生上極めて重要である。これまでに、*F. tularensis* subspecies *tularensis* SCHU 株由来の弱毒（マウス非致死性；SCHU P5）株および強毒性（マウス致死性；SCHU P9）株を作出し、この病原性の違いがゲノム塩基配列に依存すると考え両株の次世代シーケンス解析をおこなった。弱毒性および強毒株の比較検討の結果、野兔病菌ゲノム 190 万塩基の中で 1 塩基の違いが見つかった。この 1 塩基の違いは *pdpC* 遺伝子の中央部分に存在し、強毒性株では正常 PdpC タンパク質を発現できるのに対し、弱毒性株では約半分の大きさの異常型 PdpC タンパク質しか発現できない事が明らかとなり、PdpC タンパク質が病原性に関与している可能性が示唆された。そこで、強毒性株の *pdpC* 遺伝子破壊株およびその破壊株にプラスミドで *pdpC* 遺伝子を相補した株（相補株）を新たに作出し、マウスを用いて病原性を評価した。その結果、*pdpC* 遺伝子破壊株は病原性を消失したが、その相補株は病原性が復帰していた。以上の結果より、野兔病菌 *pdpC* 遺伝子は極めて重要な病原性を規定する遺伝子であることが明らかとなった。

A. 研究目的

野兔病はグラム陰性桿菌の野兔病菌 (*Francisella tularensis*) の感染によって引き起こされる人獣共通感染症で、アメリカ、フィンランドおよびスウェーデンでは毎年 100 人程度の患者が発生し、時に数百人にのぼることも報告されている。野兔病は、近年の日本において 1999 年に 1 例、2008 年に 5 例と稀であるが、散発的な発生が報告されている。ヒトへの伝播経路は感染動物との接触、吸血性節足動物による経皮感

染、汚染食物または水を摂取することによる経口感染、汚染空気を吸引することによる経気道感染が主な感染経路とされている。野兔病菌の中でも病原性が強い *F. tularensis* subspecies *tularensis* では数個から数百個の菌数で感染が成立し、無治療の場合の致死率は 30%とされている。

強い感染力と高い致死率を示す *F. tularensis* subsp. *tularensis* の感染および発症機序を解明する事は公衆衛生上非常に重要である。そこで、本研究では弱毒 (SCHU P5) 株をマウスを用いて継代し強

毒 (SCHU P9) 株を作出した (図 1A)。全ゲノム解析の結果、両株のゲノム配列は *pdpC* 遺伝子中央部の 1 塩基の差異しか存在しないが (図 1B)、マウスに対する病原性は明らかに異なっていた。そこで本年度は、強毒性株の *pdpC* 遺伝子破壊株およびその破壊株にプラスミドで *pdpC* 遺伝子を相補した株 (相補株) を新たに作出し、マウスを用いて病原性の評価を行った。

B. 研究方法

1. 菌株

野兔病菌株は、chemically defined medium (CDM) で 2 日間培養した後に 10% グリセロール溶液に懸濁し、-80°C で保管した。これらの培養は、biosafety level (BSL) 3 で取り扱った。

2. 野兔病菌 *pdpC* 遺伝子破壊株の作出

pdpC 遺伝子破壊株は TargeTron Gene Knockout System (シグマ社) および pKEK1140 プラスミド (Karl E. Klose 博士より分与。Appl Environ Microbiol. 2008; 74: 2619-2626) を用いて作出した。Targetron を用いて遺伝子破壊を行うにあたり、TargeTron Design Site (<http://www.sigma-genosys.com/targetron/>) に *pdpC* 遺伝子の塩基配列をアップロードし、得られた 3 種類のプライマー (IBS、EBS1d、EBS2) および EBSUniversal プライマーを用いてキット付属の鋳型イントロンを増幅した。尚 pKEK1140 プラスミドにクローニングする為に、IBS プライマーの *HindIII* 制限酵素サイトを *XhoI* サイトに置換した。得られた PCR 産物を *BsrGI*

および *XhoI* 制限酵素で処理し、同処理を行った pKEK1140 に挿入した (図 2A)。このプラスミドは大腸菌 DH5 α 株で増幅後、NucleoBond PC 100 (MACHEREY-NAGEL 社) を用いて回収した。本プラスミドは温度感受性野兔病菌用 ori (Ft ori) をコードしているため、30°C では増殖可能だが、37°C で培養するとプラスミドは増幅できない事が知られている。回収したプラスミドで野兔病菌強毒 (SCHU P9) 株をエレクトロポレーションを用いて形質転換し、カナマイシンを含むユーゴンチョコレート寒天培地で 30°C 5 日間培養した後、得られたコロニーを抗生物質を含まないユーゴンチョコレート寒天培地で 37°C で培養した。更に、得られた *pdpC* 遺伝子破壊株を CDM で増菌し、10% グリセロールを含む CDM に置換し -80°C で保管した。

3. マクロファージ様細胞株 J774.1 細胞における増殖能の確認

マウス由来マクロファージ様細胞株 J774.1 (理研バイオリソースセンターより購入) を 1 nM phorbolmyristate acetate (PMA)、10% FBS、50 μ g/ml ペニシリン G を含む RPMI1640 培地で 2 日間刺激したのち、10% FBS、50 μ g/ml ペニシリン G を含む RPMI 1640 培地で更に 2 日間培養した。野兔病菌株は moi=10 で細胞に添加した後、遠心 (1,000xg、10 分間) し、37°C 5% CO₂ 存在下で 1 時間インキュベートした。マクロファージに取り込まれなかった細菌を除去するために、培地で 4 回洗浄後、50 μ g/ml ゲンタマイシンを含む RPMI1640 培地で 1 時間培養し、さらに培地で 4 回洗浄した。