

201225010B

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

ワンヘルス理念に基づく動物由来 感染症制御に関する研究

平成22年度～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者 山 田 章 雄

平成25（2013）年3月

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

ワンヘルス理念に基づく動物由来 感染症制御に関する研究

平成22年度～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者 山 田 章 雄

平成25 (2013) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告書	
ワンヘルス理念に基づく動物由来感染症制御に関する研究	
山田章雄-----	1
II. 平成 22 年度総括・分担研究報告書-----	7
III. 平成 23 年度総括・分担研究報告書-----	171
IV. 平成 24 年度総括・分担研究報告書-----	295

I. 総合研究報告書

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）
総合研究報告書

ワンヘルス理念に基づく動物由来感染症制御に関する研究

研究代表者 山田章雄 東京大学大学院教授

研究要旨 本研究では「One Health」理念を念頭に置きつつ、分野横断的なアプローチにより、動物由来感染症の制御に深く関連する、診断、予防、治療について研究を深めること並びにこれらの病原体の病原性発揮の機構を知ることが目的とし、以下の成績を得た。

- ① (1) 家畜の調査：2009～2012年に食肉処理された全国のウシ525頭から *Coxiella burnetii* 遺伝子は検出されず、うち300頭については抗体陰性であった（残りは現在検証中）。また、日高地方の放牧ウマ87頭からは *C. burnetii* 遺伝子は検出されなかった。
(2) ペットの調査：全国のネコ1762匹の全血からは *C. burnetii* 遺伝子は検出されなかった。
(3) 野生動物の調査：ヌートリア148頭及び野ネズミ133頭からは *C. burnetii* 遺伝子は検出されなかった。
(4) 宿主の調査：宿主と目されるマダニ802匹からは *C. burnetii* 遺伝子は検出されなかった。
(5) 以上から、国内における *C. burnetii* 感染リスクは高くないものと考えられた。
- ② (1) ライム病ボレリアの型別法で国際標準法となりつつある Multiple loci sequence typing 法により、臨床分離株を含む国内分離株93株についてデータベースを構築するとともに、ヒトへの病原体感染経路を分子疫学的手法により明らかにした。
(2) ライム病ボレリア群の国内浸潤実態を、猟犬を歩哨動物としたサーベイランス手法を開発、実施した。
- ③ (1) 各種検査法の感度、特異性を比較し、ICA、IFA、MATの有用性を示した。またWBが高感度であり抗体価の低い場合も検出できると考えられた。WB以外の検査法では、低抗体価の感染動物を見逃す可能性があることが明らかとなった。
(2) 国内野生イノシシにおいて、凝集反応でイヌブルセラ菌に対する抗体陽性を示す少数個体が見つかった。遺伝子検出の結果からも、国内野生イノシシの一部がイヌブルセラ菌に感染歴を有すると考えられた。抗体陽性、遺伝子陰性の検体は、WB法で全て陰性だったことから他のグラム陰性菌との交叉反応によるものと思われた。
(3) WBにより同定したブルセラ特異的抗原のアミノ酸・遺伝子解析を行いオリゴペプチド、およびフルサイズの組換えタンパクを作成した。組換えタンパクを用いたWB法で、イヌ血清では特異性が認められたが、各種グラム陰性菌に対するウサギ免疫血清については十分な特異性は得られなかった。そこで原因を特定するために2D泳動後、WB法を実施したところ、ウサギ血清においては、作成抗原と、ほぼ同サイズの組み換え用大腸菌由来と考えられるタンパクに対する反応が起こっていることが推察された。
- ④ (1) *C. ulcerans* ヒト5症例の環境調査により、イヌ・ネコ等の動物からヒトへの感染経路を確認した。
(2) イヌ、ネコ、家畜、猟犬、実験用サルまでの *C. ulcerans* 感染や保菌の拡大を確認した。
(3) 我が国で初のヒト分離ジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* の全ゲノムの解読に成功した。
- ⑤ 猟犬をセンチネルとした人獣共通感染症の種類と分布に関するモニタリングを実施した。中部地方、島嶼部および半島部、ならびに東北地方において計461例の猟犬における血清疫学調査の結果、ジフテリア毒素陽性例は中部で11/142例、島嶼部では少数散見されたが東北地方では1例のみだった。レプトスピラは流行地に一致して高いLigAに対する抗体価が認められた。ライム病では各地で高い陽性率がみられた。トキソプラズマ抗体は20%～100%と高頻度に検出され、特に沖縄で高い頻度だった。抗ブルセラ抗体は各地で少数例検出された。破傷風抗毒素、野兎病は検出されなかった。
- ⑥ これまで野兎病菌LPSおよび抗LPSモノクローナル抗体を用いた競合ELISA(cELISA)の開発を試みてきたが、今年度は、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) 法による野兔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、両者は高い相関を示し、ヒト血清抗体の測定に応用可能なことが明らかとなった。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)、ホンダヌキ(3/21)で陽性個体が認められた。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 法より高感度であることが確認された。動物種特異的標識二次抗体等を用いる必要のない本法は、野生動物における野兔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。

- ⑦ (1)野兔病菌抗体検出競合 ELISA 法を開発し、多様な野生動物で調べたところツキノワグマとタヌキで抗体陽性が検出された。
 (2)マウスでの病原性発現に野兔病菌 pdpC 遺伝子が強く関与していることを明らかにした。
- ⑧ (1)公共データベース上にあるエキノコックス遺伝子データについて、発現候補領域を検出するための遺伝子予測を行い、その結果にもとづきマイクロアレイ用プローブの設計と選別を行った。
 (2)エキノコックス幼虫の人工培養系について成虫型への分化が効率よく誘導されるよう改良した。
 (3)成虫型へ分化誘導したエキノコックス幼虫をマイクロアレイ解析を行って変動遺伝子を抽出し、各処理上位 20 位までの発現変動を示した遺伝子群について qRT-PCR により発現を確認した。
 (4)発現量の大きな遺伝子群の特徴として、成虫型分化の初期段階のそれは細胞接着関連の糖タンパクや上皮成長因子に、分化終了段階のそれは糖や脂質の膜輸送ならびに代謝にそれぞれ関与しているものが抽出されたと考えられた。
- ⑨ (1)狂犬病対策に必要な飼育犬頭数把握を、国勢調査基本集計を利用した数値補正をペットフード協会の調査に対して行い、世帯数推計による飼育犬推定法を提案することができた。
 (2)わが国の土壌から分離される *Bacillus cereus* group について MLST 解析を行い、大きく 3 クラスターに分類されることを示した。一部の *Bacillus cereus* で溶血反応の弱い株があり、これらは遺伝型が食中毒や敗血症由来の *Bacillus cereus* と非常に近縁であることを明らかにした。
 (3)抗ニパウイルス (NiV) IgM 抗体検出 ELISA を NiV 感染/非感染 Vero 細胞の不活化抗原を用いて構築し、NiV 患者血清および健康者血清を利用して抗 NiV IgM 抗体の検出が可能であることを示した。
 (4)狂犬病ウイルスの抗-P タンパク scFv にビオチン化ペプチドを挿入して大腸菌内でビオチン化 scFv の発現に成功した。本 scFv を利用して、二次抗体を使用しない特異性の高い簡易な抗原検出法を確立することが可能になった。
- ⑩ (1)ヒト狂犬病症例に対する治療法に関する文献収集とその検討を行った。
 (2)狂犬病曝露前免疫の曝露後発症予防に対する効果を検討した。
 (3)狂犬病曝露後免疫における接種回数を減じた接種方法の有効性を検討した。
 (4)狂犬病ワクチン皮内接種法の検討を行い、その有効性及び安全性を示した。
 (5)ヒト狂犬病報告例、ヒト狂犬病治療法を併せ、ヒト狂犬病資料集としてまとめた。

研究分担者

岸本壽男 国立感染症研究所ウイルス 1 部室長
 川端寛樹 国立感染症研究所細菌第 1 部室長
 高橋元秀 国立感染症研究所細菌第 2 部室長
 山本明彦 国立感染症研究所細菌第 2 部主任研究官
 柳井徳磨 岐阜大学農学部教授
 井上 智 国立感染症研究所獣医科学部室長
 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
 森嶋康之 国立感染症研究所寄生動物部主任研究官
 菅沼明彦 都立駒込病院医長

A. 研究目的

動物由来感染症は世界に 200 以上存在し、その病原体は 850 種を超える。新興感染症の殆どは動物由来感染症であるのみならず、現時点でヒトに特化した感染症もすべてが動物に由来すると言っても過言ではない。動物由来感染症は自然生態系との関与が大きく、その制御にはヒトへの視点からのみでなく、家畜、野生動物さらにはそれらを取り巻く環境への視点が欠かせない。近年提唱されている「One Health」の基本的考え方である。本研究では「One Health」理念を念頭に置きつつ、分野横断的なアプローチ

により、動物由来感染症の制御に深く関連する、診断、予防、治療について、これまで対象としてきた感染症を中心に研究を深める。一方で国内では稀となったり、その存在がはっきりと確認されてなかったような動物由来感染症について、その実態を明らかにすべく、モニタリングあるいはサーベイランスを実施する。具体的にはライム病、ブルセラ症、野兎病、Q熱、コリネバクテリウムウルセランス感染症、エキノコックス症、狂犬病について、これらの研究を実施する。また、野生動物に接触する機会の多い職業に従事する者の血清疫学調査を行い、リスクを評価する。これらの研究によって国内に存在する動物由来感染症に関する情報の整備が可能となり、これにより新興感染症の発生があった場合にいち早く検出することが可能になると考えられる。

B. 研究方法

病原体あるいは抗体の検出は個々の報告書に記載した方法による。

C. 研究結果

(1) Q熱に関する研究

Q熱は、感染症法では4類感染症に分類される人獣共通感染症であるが、ヒトでは特異的な症状が認められず、インフルエンザ様疾患、肺炎、肝炎等、多彩な病状を示す一方、動物では一般に無症状とされる。感染症発生動向調査事業における患者数は2002年から2003年がピークで、それぞれ40人を超えていた。しかし、近年は発生が極めて稀で、起病菌である *Coxiella burnetii* の国内における実態は未だ不明な点が多い。そこで、本病原体の侵淫状況を明らかにし、ヒトへの感染リスクを評価するため、これまでにヒト、伴侶動物であるイヌ、ネコ、家畜であるウシ、さらに宿主と目されるマダニを対象に疫学調査を実施してきた。その結果、これらの抗体保有率及び *C. burnetii* 遺伝子の検出率は、1990年代の報告と比較して全て低値を示した。これまでに、遺伝子疫学調査として家畜1313頭、ペット2748頭、野生動物281頭及びマダニ1365匹の合計5,707検体について *C. burnetii* の遺伝子検索を実施してきたが、感染個体は確認できなかった。これらのことを勘案すると、現時点において、国内の *C. burnetii* の侵淫度は低く、ヒトへの感染リスクは非常に低いものと考えられた。しかしながら、現在も毎年数名の患者が報告されており、海外の流行

地域からの輸入感染も懸念されることから、今後も検査体制やサーベイランス体制を維持していくことが必要であると考えられる。特に、北海道地方では *C. burnetii* が侵淫している可能性があるため、継続した調査が必要だが、検査診断を実施できる施設が少ないため、地方衛生研究所等の検査体制ネットワークの構築が必要であると考えられる。

(2) ボレリアに関する研究

ライム病は野生鳥獣によって保菌され、マダニによって媒介される、節足動物媒介性細菌感染症である。国内で報告される患者数は多くはないが、感染症発生動向調査による解析では、国内感染患者でも欧米で見出されるような神経症状を呈する重症例が散見されることから、国民の健康を維持する上で、その重要性は決して低い訳ではない。本研究では、国内患者より分離された病原体ボレリアの感染経路を、世界標準となりつつある、MLST解析により調べた。患者由来株等88株のMLST解析から、国内では、野鼠によって保菌されるライム病ボレリアがシニツェマダニによって伝播されること、また野鼠種間でもヒトから分離されるSTの感染率が異なる可能性が示唆された。これら野鼠のpopulationの変動が、患者発生動向に影響を与えるか否かについて結論づけることはできないが生態系における特定の野鼠種の寡占化によって、環境中で病原性の強いボレリアの割合が高まる可能性がある。

(3) コリネバクテリウムに関する研究

現在までに国内11名のジフテリア様患者からジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* が分離され、その多くで飼育動物中に皮膚炎、病的な犬、猫が確認された。そこで、患者周辺の環境調査を実施したところ、患者周辺の動物からの感染の可能性を示唆する成績が得られた。また開業獣医師及び愛護センター等の管理動物を調査したところ、5-7%の動物が菌を保有していることを明らかにした。畜産動物等についても現在調査中であるが、その結果を待って、*C. Ulcerans* 感染症のヒトや動物へのリスク評価の実施を目指したい。

(4) ヒトの動物由来感染症への曝露の指標としての猟犬の応用に関する研究

猟犬は狩猟の際に山野に入り、野生動物やダニ類、汚染した土壌や水などの自然環境に接触の機会が多いので、野外の人獣共通感染症の歩哨動物として有用と思われる。本研究でリスク評価の対象としては野外感染症はジフテリア、ボ

レリア, レプトスピラ, リケッチア, トキソプラズマ, 日本紅斑熱, ツツガムシ, 野兎病, ブルセラ症など多岐にわたる。本研究で用いた猟犬は, 2009 年度に西日本各地で収集した 155 例, 次いで 2010 年度の中中部地方 142 例, 2011 年度の西南諸島を中心とした島嶼部の猟犬 197 例, 2012 年度の東北地方 123 例につき血清抗体調査を行った。一般に猟犬から採血することは危険を伴うことなどから, 現在までにほとんど調査されていない。今回, 岐阜大学チームは野生動物医学のネットワークを活用しつつ, 遠隔地の一つ一つ出向き, 猟師さんと十分なコミュニケーションを取ることで, 猟犬からの採血が容易に行われた。代表的な野外感染症, トキソプラズマ, レプトスピラ, 犬フィラリア症, ジフテリア症, ボレリア症について紹介する。トキソプラズマは, 1980 年以降, ネコでは抗体陽性率が 5~6%とされているが, イヌで実際に疫学調査を行った報告は乏しい。イノシシで高い陽性率が報告されているが, 今回猟犬でも同様に全国的に高い陽性率が得られたが, 特に沖縄など温暖な地方で高い傾向がみられた。野生動物の肉の生食との関連が疑われる。レプトスピラでは, 表に示すように, やや地域により大きな変動がみられ, 流行との関連が疑われた。犬フィラリアは, 猟犬では常に高い感染が認められ, 媒介蚊の密度の高い南西諸島では特に高い感染がみられた。フィラリア調査は猟師さんに感謝されるサービスであった。ジフテリアは, 過去の疫学調査において, 抗毒素価を用いたものと菌分離もしくは PCR を行ったものとに分かれる。抗毒素価を用いたものは, ほぼ昨年・一昨年のものでのみのため, その平均を示す。また, 宮崎・熊本・広島で高く, 去年は静岡, 三重で高かったが, それ以外の地域は陰性であった。宮崎・熊本・三重は 20-30%であったので, それと比較すると, 東北では全体に低い感染率を示した。北海道を含めさらに調査する必要がある。ボレリア症では, 宮崎, 静岡に加え, 鹿児島でもある程度高い陽性率が得られたが, 東北全体で極めて高い陽性率がみられた。これも流行地の北海道を含めて調査する必要がある。その他野兎病, 破傷風については陽性例は認められていない。北海道を含めて全国からの検体が確保できた段階で, 野外感染症のハザードマップの作成を実施する予定である。

(5) ブルセラ症に関する研究

我々のこれまでの調査から, 国内野生イノシシのイヌブルセラ菌 (*B. canis*) に対する抗体保有

が疑われている。四国地方を中心に, 国内の野生イノシシ血液, 合計 543 サンプルを収集し, マイクロプレート凝集反応 (MAT) 法によりブルセラ属菌に対する抗体保有を検討した。イヌブルセラ菌 (*B. canis*) に対しては, 全国で 11.0% (60/543), うち四国では 15.4% (47/305), 家畜ブルセラ菌 (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) に対しては, 全国 0.6% (3/543), うち四国では 0.7% (2/305) が, それぞれ陽性であった。さらに, MAT 法陽性血清について PCR 法によりブルセラ特異的遺伝子の検出を行ったところ, 25 サンプルが, 陽性を示し, そのうち 5 サンプルがイヌブルセラ菌 (*B. canis*) 型の陽性パターンを示した。それらイヌブルセラ菌型陽性の増幅産物の遺伝子配列は, 3 つの異なる遺伝子座においてブルセラ属菌遺伝子と配列が一致した。しかし, ブルセラの n-lauroylsarcosine 抽出 (SE) 抗原を用いたウェスタンブロッティング (WB) 法での MAT 陽性サンプルの再検討では, 明らかに陽性と判定されるものは無かった。遺伝子検出の結果から血清陽性イノシシの一部はイヌブルセラ菌に対する感染歴を有していたと考えられる。しかし, より高感度で特異性の高い WB 法では, MAT 陽性例 (イヌブルセラ菌陽性, 家畜ブルセラ菌陽性) は, 全て陰性であり, 現時点では, 他のグラム陰性菌との交叉反応によるものである可能性を否定できない。さらなる検討が必要と考える。そこで, 新たなブルセラ属菌特異的な抗体検出法を開発するため, 家兎抗ブルセラ血清でブルセラ SE 抗原を用いた WB 法で 11kDa 付近に見られる特異的なバンドからタンパクを抽出し, そのアミノ酸ならびに遺伝子配列を決定し (hypothetical protein BMEI0805), 組換えタンパクの作成を行い, その特異性の検証を実施している。

(6) 野兎病に関する研究

野兎病菌はヒト及び多種類の動物に感染するが国内での野生動物での感染状況は明らかでない。そこで多種類の野生動物に適用可能な抗体検査法として抗野兎病菌 LPS モノクローナル抗体を用いた競合 ELISA を開発することを試みた。その結果感度よく多種類の動物検体を測定可能な競合 ELISA を確立した。本法を用い各種野生動物での血清疫学的調査を実施したところ, 野生哺乳類・鳥類 632 検体中, ツキノワグマ (23/150)・タヌキ (3/21) で陽性となった。これらの動物を野兎病の浸淫をはかる歩哨動物として利用できる可能性が示された。一方当研究室に

分与された野兎病菌 SCHU 株 (Type A) は本来強毒株であるとされているにも拘わらず弱毒性を示した。この原因を探るためマウスで継代したところ病原性が復帰し強毒性となった。この両者の全遺伝子配列を比較したところ、*pdpC* 遺伝子の方に相違が認められた。そこで強毒株を用いてこの遺伝子を欠損した菌株を作出したところ、病原性の低下が認められ、更にここで得られた病原性の弱まった株に *pdpC* 遺伝子をプラスミドで供給したところ、再び強毒化した。この成績から野兎病菌の病原性発現には PdpC 蛋白が重要であることが明らかになった。

(7) エキノコックスに関する研究

エキノコックスの幼虫 (原頭節) には環境によって異なる 2 つのステージに発育するという特徴がある。すなわち、イヌなど終宿主の体内では成虫に分化してヒトへの感染源となる一方、ヒトなど中間宿主に感染すると幼虫に再分化して増殖を行い、強い病原性を発揮することから、この幼虫の二方向性の分化がエキノコックス症における対策や治療の重要な介入点と考えられる。本研究では、このエキノコックスの二方向性の分化能に着目し、特に今回はエキノコックス幼虫を *in vitro* 条件下で成虫方向へ分化誘導し、マイクロアレイ解析をおこなって発現に変動がみられる遺伝子群を抽出した。クラスター解析の結果、成虫型へ分化誘導したエキノコックスの分化は前期と後期の 2 つのクラスターに大別されていた。それぞれをアノテーション情報にもとづいて解釈すると、分化前期では膜融合や上皮成長因子など寄生虫の形態変化や形態形成に関わる遺伝子群の多く発現し、分化後期では糖やアミノ酸の膜輸送など栄養吸収に関わる遺伝子群の発現亢進が起こることが明らかとなった。

(8) 炭疽菌に関する研究

土壌中で芽胞を形成する細菌の中でも炭疽菌と共通の病原性遺伝子を保有しうるセレウス菌を含む *Bacillus cereus* group の分布に着目して調査を行った。よる菌分離を行った。分離された菌は菌種特異的 *gyrB* 遺伝子プライマーで菌種を同定した。分離した菌から DNA を抽出して 7 種の遺伝子の塩基配列を解読して Multilocus Sequence Typing (MLST) を行ったところ、MLST 系統解析の結果、3 つのクラスターに分類された。一部の土壌由来のセレウス菌は、食中毒や敗血症由来のセレウス菌と非常に近縁なクラスターを形成するものがあつた。環境由来のセレウス菌がヒトに食中毒や敗血症を起こす

可能性、リスクを明らかにすることで、公衆衛生対策に寄与することができる。

(9) 狂犬病に関する研究

1) 大腸菌による大量生産が可能な scFv を検出用抗体に用いることにより、簡便かつ低コストで実施できる狂犬病ウイルス抗原検出法 (DRIT) を開発することを目的とし、狂犬病ウイルス (RABV) P 蛋白質に特異的に反応する scFv をファージディスプレイライブラリーより選択した。精製 scFv をビオチン標識キットで標識、あるいは scFv 遺伝子を、ビオチン化蛋白質発現ベクターにクローニングし、大腸菌内で naturally-biotinylated (NB)-scFv として発現させたところ、ビオチン標識した精製 scFv により、RABV 感染マウス脳よりウイルス抗原を検出できた。一方、NB-scFv が RABV-P と特異的に結合することはウエスタンブロッティングで確認できたが、NB-scFv の発現量が低く、DRIT ではウイルス抗原を検出できなかった。scFv を DRIT に利用できることが確認できたので、今後は NB-scFv の効率的な発現系を構築し、より高感度な DRIT の確立を目指す。

2) 狂犬病治療に関する資料の収集を行い、ミルウオーキープロトコル (MRP) の改訂と報告された救命例の追加をし、「狂犬病の治療」の改訂版 (2012 年版) を作成した。狂犬病ワクチンの効果的な接種法を明らかにするため曝露後免疫 4 回接種法について検討したが、抗体陽転率が不十分であり現状は実施困難であることが示された。これまでに報告された「狂犬病の治療」及び「ヒト狂犬病症例」をまとめ冊子「狂犬病資料集」を作成、関連機関へ配布した。

D. 考察

3 年間に亘りワンヘルス理念に基づきどのように動物由来感染症の制御するかについて考察を深める予定で研究をスタートした。ワンヘルス理念はヒトの医療、動物の医療、環境保全に関わるエキスパートが分野横断的に協働、強調、協力することによって、動物由来感染症特に、新興感染症の問題を解決していこうとするものであり、現況では理念を如何にして実践していくかが問われている。分野横断的取り組みにおいても、病原体の診断法の確立は絶対に必要なものであり、特に、高感度であるばかりでなく、低コストで、余り煩雑でない診断法の確立は急務である。しかし、人獣共通感染症の数は膨大であるだけでなく、対象動物も多彩で、この部分がワンヘルスの観点からもボトルネックであ

ることは疑いない。この状況を打開するには地道な研究が望まれている。このような診断法の確立により、各種動物におけるサーベイランスやモニタリングがはじめて可能になり、それぞれの疾患のリスク評価と施策のプライオリタイズーションが可能となる。本研究では我が国に存在することが明らかにも拘わらず現状で公衆衛生上どの程度の負荷を持つかがはっきりしない疾患を主に対象として、上記の考え方で研究を進めた。その結果、現時点ではいずれの疾患についても、現状でのリスクはさほど大きなものではないことが明らかになった。しかし、これらの疾患のなかには海外には依然として存在していたり、野生鳥獣の移動に伴い海外からの侵入あるいは国内での分布拡大が予測されるものも存在していた。従って、公衆衛生上のプライオリティが極めて高いとは言えなくとも、これらの疾患に対する診断技術の継承と野生動物でのモニタリング等は継続する必要があると考えられる。モニタリング等に関しては費用対効果を考慮しつつ、対象動物の絞り込み、調査期間の設定等を検討する必要がある。また、ワンヘルス理念は人獣共通感染症の負荷がさほど大きくない我が国においては受け入れられる速度も、程度も諸外国と比較し、極めて遅々としているが、日本が新興感染症のホットスポットである東南アジア諸国、東アジア諸国と強い経済的関係を構築していく上では極めて重要な理念であり、この地域で先導的立場を築いていくことは極めて重要であると考えられる。

E. 結論

国内での存在は明らかにされているがその存在様式が不明な動物由来感染症について検査法を確立し、我が国の自然界におけるこれら病原体の存在様式に関する実態調査を継続した。その結果様々な動物が動物由来感染症の伝播に関与していることが確認されたが、どの動物が真のリザーバーであるか未だに不明なものもあり、今後の調査研究の継続がわが国における動物由来感染症のリスクを評価するためには不可欠である。そのためにはワンヘルスの理念を実践に移して行くことが重要である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

各年度報告書に記載

Ⅱ. 平成22年度総括・分担研究報告書

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）
総括研究報告書

ワンヘルス理念に基づく動物由来感染症制御に関する研究

研究代表者 山田章雄 国立感染症研究所獣医科学部長

研究要旨 本研究では「One Health」理念を念頭に置きつつ、分野横断的なアプローチにより、動物由来感染症の制御に深く関連する、診断、予防、治療について研究を深めることを目的とし、以下の成績を得た。

- ① 2009年から2010年に津山市食肉処理センターに全国から搬入された食用ウシ266頭(健康牛141頭及び病畜125頭)を対象に、抗体疫学調査と遺伝子疫学調査を実施した。血清抗体価は、*C.burnetii*感染BGM細胞を抗原とした間接蛍光抗体法にて測定し、封入体と細胞質内粒子の染色像を確認したものを陽性、封入体のみの染色像を確認したものを擬陽性とした。遺伝子検出は全血から抽出したDNAを用いたReal-time PCRによった。その結果、血清抗体陽性を示した検体はなく、遺伝子も全て陰性であった。抗体の擬陽性は3%程度に見られたが、健康牛、病畜の差はなく、地域別、年度別でも大きな差は認めなかった。擬陽性の判定については、*C.burnetii*に特異的な抗体とは判定できないため、今回の結果からは、国内の食用ウシの*C.burnetii*侵淫率は低く、感染リスクとしては高くないものと考えられた。今後さらにウシの数を増やして検討するとともに、他の家畜や野生動物についても検討することが必要と考えられた。
- ② 国内でのライム病病原体 *Borrelia garinii* の高感度DNA型別解析から、1)国内に存在する *B. garinii* は2群(*B. garinii* ST-group A, *B. garinii* ST-group B)に大別できること、2)患者由来株の約84%は *B. garinii* ST-group B であること、3)野鼠由来株はすべて *B. garinii* ST-group B であること、さらに、4)患者分離株の約半数が野鼠によって保菌されている *B. garinii* と同じDNA型であることが明らかとなった。以上のことから、我が国においては、ライム病ボレリア *B. garinii* 感染例の少なくとも半数は野鼠由来である可能性が示唆された。愛護センター収容の犬・猫および猟犬からジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* (*C.ulcerans*)を分離するとともに、犬から犬または猫から猫への菌の拡散(不顕性感染)を確認した。また、ジフテリア様症状を呈した患者ならびに患者との接触が疑われた野良猫から本菌を分離し、両者が遺伝的に同一であることをPFGEおよび毒素遺伝子の解析から明らかにした。
- ③ 四国地方を中心に、イノシシにおけるブルセラ属菌に対する抗体の保有状況を検討したところ、これまでの知見と一致し、11/109のイノシシで *B. canis* に対して凝集が認められた。*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* に対しても1/109で凝集が認められた。また、血液培養により、ブルセラ属菌特異的遺伝子(*bcbp31*)陽性分離株を得たが、これは、*Achromobacter* 属の菌であり、ブルセラに対する抗体とは反応性を持たなかった。したがって、イノシシに見られるブルセラ属菌反応性抗体は、本菌に対する交差反応ではなかった。すなわち、イノシシがブルセラ属菌に感染し、これに対する抗体を獲得している可能性は否定できなかった。一方、ブルセラ属菌特異的な抗体検出法を開発するため、ウエスタンブロッティングにより特異的反応を示したタンパクを分離し、そのアミノ酸配列(104aa)を決定した。配列から、このタンパクの抗原部位を解析し、抗原性を持つと考えられる5種類のオリゴペプチドを作成し、その抗原性を解析中である。また、同時に、このタンパクの組換えタンパクを作成中である。
- ④ ジフテリア様症状を呈する2名の新たな患者からジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* (*C.ulcerans*^{Tox+})が分離した。いずれの患者もネコを飼養しており、飼いネコからも患者と遺伝子型が一致する *C.ulcerans*^{Tox+} が分離された。また、9カ所の地方自治体の動物愛護センターに搬入されたイヌまたはネコの咽頭スワブ等について菌分離調査を実施した結果、5カ所の愛護センターのイヌまたはネコより *C.ulcerans*^{Tox+} が分離された。一方、名古屋市の動物病院におけるネコの調査では、1匹から *C.ulcerans* が分離されたが、ジフテリア毒素非産生性であった。以上の調査結果は、野外活動時間の多いイヌやネコが本菌を保菌または本菌に感染している可能性が高いことを示唆

している。しかしながら、限られた調査数ではあるものの、畜産動物の検体について当該菌は陰性だった。

- ⑤ 中部地方を中心とした5県(三重、岐阜、新潟、長野および静岡)の13地域で猟犬142例から採血し、血清を用いてジフテリア、ボレリア、ブルセラ、野兔病、破傷風およびトキソプラズマについて抗体検査を行った。ジフテリア症では、11/142(7.7%)例に陽性がみられ、志摩市の陽性個体からは毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* が分離された。レプトスピラ症では、多くの個体が高い抗体価を示し、猟犬における同感染症の流行が疑われた。ライム病ボレリアでは、63/142例が陽性を示し、流行地の新潟、長野以外に三重県および静岡県でも高い陽性率がみられた。ブルセラ症では、*Brucella canis* が5/142例みられた。トキソプラズマ症では、28/142例が陽性を示した。野兔病と破傷風は全例とも陰性であった。今回、複数病原体が92/142例にみられ、そのうち2種以上の重複感染は41例であった。ジフテリア感染が猟犬でしばしば認められたことから、犬が保菌している可能性がある。ライム病では流行地とされる長野に加え、三重県および静岡県でも高い発生傾向がみられたが、それらは病原性を有する菌株かを確認する必要がある。今後さらに他の地域に調査を広げることで、全国的なこれらの野外を中心とした感染症の疫学情報の収集に貢献することが期待できる。
- ⑥ 野兔病菌 (*Francisella tularensis*) の病原性発現機序を解明する目的で *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)株を作出し、野兔病菌の病原性を規定する遺伝子の検索を試みた。全ゲノム DNA シークエンス解析の結果、190万塩基対におよぶゲノム配列の中で、*pdpC* 遺伝子上にのみ1塩基の挿入/欠損が見つかった。この配列の差異により、強毒性株では正常な PdpC タンパク質が発現されるが、弱毒株では1塩基欠失に伴うフレームシフトによって約半分の大きさの PdpC タンパク質しか生合成できていないことが明らかとなった。このことから、野兔病菌 *pdpC* 遺伝子は病原性発現に深く関与している可能性が示唆された。
- ⑦ ヒトの感染時における早期診断システムの確立ならびに感染源となる動物での寄生虫の発育を阻害する分子標的治療薬の開発を目的とし、エキノコックスの各発育ステージに特異的に発現する遺伝子群を網羅的に同定するために次年度以降に計画しているトランスクリプトーム解析に使用する DNA マイクロアレイのデザインと合成を行った。
- ⑧ 土壌中の *Bacillus cereus* group 菌種群の網羅的検索および分離同定と炭疽菌芽胞および炭疽菌との鑑別法の確立を行うため、国内各地から土壌を採取・収集した。今後、詳細な遺伝学的同定および細菌学的分類を行っていく予定である。
- ⑨ 狂犬病ウイルス蛋白質を特異的に認識する single chain variable fragment (scFv) を、応用した Direct, rapid immunohistochemical test (DRIT) 法の有効性と課題について検証した。scFv は、クローンごとに反応性に差が見られたものの、ウイルス感染マウス脳の塗抹標本からウイルス蛋白質を特異的に認識することが明らかとなった。
- ⑩ 国内には、狂犬病の治療、院内感染対策に関する資料が非常に乏しいことから文献調査により、狂犬病救命例、院内感染対策について暫定的にまとめた。また、今回、何らかの接種法により狂犬病曝露前免疫を受けた者における曝露後発症予防への効果を検討した。曝露前発症予防として2回または3回の狂犬病ワクチン接種が既に行われ、曝露後発症予防(4例)、追加接種(1例)を希望したものの者について、接種終了2週間後に狂犬病抗体価を測定した。その結果、全例に有意な抗体産生を得られたことが確認された。一方、2009年に米国は曝露後免疫を原則4回接種へ減量を決めた。本研究では、米国における曝露後免疫の変更について、その背景や根拠をまとめた。
- ⑪ わが国における飼育犬頭数の推計精度を高めることを目的として、推定手法に関する検討を行った。一般社団法人ペットフード協会が実施している「全国犬・猫飼育実態調査」では様々なバイアスが発生しており、これを補正すると総飼育犬頭数は10067千頭となり、オリジナルの「全国犬・猫飼育実態調査」結果11861千頭より15.1%低いものとなった。一方、「全国犬・猫飼育実態調査」における1世帯あたりの平均飼育頭数は上方・下方両者のバイアスが相殺し、結果としては偏りの少ない推定値となっていると考えられる。

研究分担者

岸本寿男 国立感染症研究所ウイルス 1 部室長
川端寛樹 国立感染症研究所細菌第 1 部室長
高橋元秀 国立感染症研究所細菌第 2 部室長
柳井徳磨 岐阜大学農学部教授
井上 智 国立感染症研究所獣医科学部室長
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
森嶋康之 国立感染症研究所寄生動物部主任研究官
菅沼明彦 都立駒込病院医長

研究協力者

(社)大日本猟友会
その他は各分担研究報告書に記載

A. 研究目的

動物由来感染症は世界に 200 以上存在し、その病原体は 850 種を超える。新興感染症の殆どは動物由来感染症であるのみならず、現時点でヒトに特化した感染症もすべてが動物に由来すると言っても過言ではない。動物由来感染症は自然生態系との関与が大きく、その制御にはヒトへの視点からのみでなく、家畜、野生動物さらにはそれらを取り巻く環境への視点が欠かせない。近年提唱されている「One Health」の基本的考え方である。本研究では「One Health」理念を念頭に置きつつ、分野横断的なアプローチにより、動物由来感染症の制御に深く関連する、診断、予防、治療について、これまで対象としてきた感染症を中心に研究を深める。一方で国内では稀となったり、その存在がはっきりと確認されてなかったような動物由来感染症について、その実態を明らかにすべく、モニタリングあるいはサーベイランスを実施する。具体的にはライム病、ブルセラ症、野兔病、Q 熱、コリネバクテリウムウルセランス感染症、エキノコックス症、狂犬病について、これらの研究を実施する。また、野生動物に接触する機会の多い職業に従事する者の血清疫学調査を行い、リスクを評価する。これらの研究によって国内に存在する動物由来感染症に関する情報の整備が可能となり、これにより新興感染症の発生があった場合にいち早く検出することが可能になると考えられる。

B. 研究方法

病原体あるいは抗体の検出は個々の報告書に記

載した方法による。

C. 研究結果

(1) Q 熱に関する研究

Q 熱コクシエラの生態系における感染リスク評価に関する研究の一環として、昨年引き続き、ウシにおける *Coxiella burnetii* の抗体保有率および遺伝子検出率について検討した。これまでにヒト、イヌ、ネコを対象に疫学調査を実施したが、抗体陽性率は過去に報告された値と比較して低かった。しかし昨年、北海道の 5 牧場のウシ 431 頭について疫学調査を実施したところ、陽性率は 10.4% であり、一定の感染リスクが疑われた。そこで、今回は津山市食肉処理センターに全国から搬入された食用ウシを対象に、抗体疫学調査と遺伝子疫学調査を実施した。検体については岡山県食肉衛生検査所の協力を得て、2009 年から 2010 年に津山市食肉処理センターへ食用として搬入されたウシ 266 頭(健康牛 141 頭及び病畜 125 頭)から採取した血清と全血を対象とした。血清抗体価は、昨年同様に抗原として *C.burnetii* 感染 BGM 細胞を用い、間接蛍光抗体法にて測定し、封入体と細胞質内粒子の染色像を確認したものを陽性、封入体のみの染色像を確認したものを擬陽性とした。遺伝子検出は全血から抽出した DNA を用いて Real-time PCR で実施した。その結果、血清抗体価陽性を示した検体はなく、遺伝子も全検体陰性であった。抗体価の擬陽性は 3% 程度に見られたが、健康牛、病畜の差はなく、地域別、年度別でも大きな差は認めなかった。擬陽性の判定については、*C.burnetii* に特異的な抗体とは判定できないため、今回の結果からは、国内の食用ウシの *C.burnetii* 侵淫率は低く、感染リスクとしては高くないものと考えられた。今後さらにウシの数を増やして検討するとともに、他の家畜や野生動物についても検討することが必要と考えられた。

(2) ボレリアに関する研究

国内でのライム病病原体 *B. garinii* の MLST 解析から、1) 国内に存在する *B. garinii* は 2 群 (*B. garinii* ST-group A, *B. garinii* ST-group B) に大別できること、2) 患者由来株の 80% 以上は *B. garinii* ST-group B であること、3) 野鼠由来株はすべて *B. garinii* ST-group B であること、さらに、4) 患者分離株の約半数が野鼠分離株で見出された DNA 型と一致することが明らかとなった。国内患者株内で最も多く見出さ

れたDNA型はST131である。このDNA型は、北海道で捕獲されたエゾヤチネズミの膀胱より分離された株と一致するとともに、MLSTデータベースに登録されている、NT29株（長野県シュルツェマダニ由来株）とも一致した。このことは、国内に分布する*B. garinii*の一部は少なくとも野鼠を保菌宿主とし、シュルツェマダニにより伝播されることを示している。またST131やST128などのDNA型は中国で分離された*B. garinii*株(JW-1株、NMK3株)とも一致している。このことは、*B. garinii* ST-group Bは日本のみならず中国でもライム病起因菌となっている可能性が考えられた。一方で、約15%の患者分離株が*B. garinii* ST-group Aに型別された。これらDNA型はその保菌動物は現在不明である。Nakaoらによれば、野鳥寄生性のシュルツェマダニ幼虫からは*B. garinii*が検出されることが報告されている(Nakao et al. 1994)。また欧州では、我が国に分布する*B. garinii* ST-group Aと近縁の*B. garinii*株が野鳥により保菌されていることが明らかにされつつある。このことから*B. garinii* ST-group Aの自然界での保菌宿主は鳥類である可能性が考えられた。

(3) コリネバクテリウムに関する研究

新たにジフテリア様症状を呈する2名の患者からジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* (*C. ulcerans* *Tox*⁺) を分離した。両患者の環境調査において飼いネコから患者と遺伝子型が一致する *C. ulcerans* *Tox*⁺ が分離された。

9カ所の地方自治体の動物愛護センターに搬入されたイヌまたはネコの咽頭スワブ等について菌分離調査を実施した結果、5カ所の愛護センターの猫と犬より *C. ulcerans* *Tox*⁺ が分離された。一方、名古屋市の動物病院におけるネコの調査では、1匹から *C. ulcerans* が分離されたが、ジフテリア毒素非産生性であった。

今年度までの調査結果では、野外活動時間の多いイヌやネコは本菌を保菌または本菌に感染している可能性が高い。感染した動物からは動物への菌の伝播がおこり感染が成立する。感染動物では排菌量が多いために、免疫力が低下している人はイヌ、ネコにおいては感染リスクが高いことが考えられる。しかし、現在までに限られた畜産動物の検体については当該菌は陰性である。

(4) ヒトの動物由来感染症への曝露の指標としての猟犬の応用に関する研究

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である。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、中部地方を中心とした5県(三重、岐阜、新潟、長野および静岡)の13地域で猟犬142例から採血し、血清を用いてジフテリア、ボレリア、ブルセラ、野兔病、破傷風およびトキソプラズマについて抗体検査を行った。

ジフテリア症では、11/142 (7.7%) 例に陽性がみられ、志摩市の陽性個体からは毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* が分離された。レプトスピラ症では、多くの個体が高い抗体価を示し、猟犬における同感染症の流行が疑われた。ライム病ボレリアでは、63/142例が陽性を示し、流行地の新潟、長野以外に三重県および静岡県でも高い陽性率がみられた。ブルセラ症では、*Brucella canis* が5/142例みられた。トキソプラズマ症では、28/142例が陽性を示した。野兔病と破傷風は全例とも陰性であった。今回、複数病原体が92/142例にみられ、そのうち2種以上の重複感染は41例であった。ジフテリア感染が猟犬でしばしば認められたことから、犬が保菌している可能性がある。ライム病では流行地とされる長野に加え、三重県および静岡県でも高い発生傾向がみられたが、それらは病原性を有する菌株かを確認する必要がある。今後さらに他の地域に調査を広げることで、全国的なこれらの野外を中心とした感染症の疫学情報の収集に貢献することが期待できる。

(5) ブルセラ症に関する研究

ブルセラ症 (brucellosis) はブルセラ属菌 (Genus *Brucella*) による人獣共通感染症である。

1) 国内の野生イノシシおよびシカの血液サンプルを用いたこれまでの調査から、イヌブルセラ菌 (*B. canis*) に対する抗体を保有するものが認められている。今回、四国地方を中心に、イノシシにおけるブルセラ属菌に対する抗体の保有状況を検討したところ、これまでと同様、2010-11年シーズンのサンプルでも11/109のイノシシで *B. canis* に対して凝集が認められた。家畜ブルセラ菌 (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) に対しても1/109で凝集が認められた。また、血液培養により、ブルセラ属菌特異的遺伝子 (*bcspr31*) 陽性分離株を得たが、これは、

Achromobacter 属の菌であり、ブルセラに対する抗体とは反応性を持たなかった。したがって、イノシシに見られるブルセラ属菌反応性抗体は、本菌に対する交差反応ではなかった。すなわち、イノシシがブルセラ属菌に感染し、これに対する抗体を獲得している可能性は否定できなかった。

2) イヌブルセラ病の各種血清学的診断法（一般に広く用いられている TAT、市販されており入手可能なイムクロマト法 (ICA)、蛍光抗体法 (IFA)、in house テストとして MAT とウェスタンブロット法 (WB) の 5 種) の比較を行い、広く用いられる TAT と比較して ICA、IFA、MAT は、イヌブルセラ病の診断に十分な感度と特異性を持つことが明らかにした。また、ブルセラ属菌特異的な抗体検出法を開発するため、ウェスタンブロッティングにより特異的応を示したタンパクを分離し、そのアミノ酸配列 (104aa) を決定した。この配列から、このタンパクの抗原部位を解析し、抗原性を持つと考えられる 5 種類のオリゴペプチドを作成し、その抗原性の解析を現在も継続中である。また、同時に、このタンパクの組換えタンパクを作成中である。

(6) 野兎病に関する研究

野兎病菌 (*Francisella tularensis*) は、ヒトや動物に高い感染性と致死性を示し、その病原性発現機序を解明する事は極めて重要である。本研究では、*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) 株を作成し、野兎病菌の病原性を規定する遺伝子の検索を試みた。弱毒および強毒性株の全ゲノム DNA シークエンス解析と比較の結果、190 万塩基対におよぶゲノム配列の中で、*pdpC* 遺伝子上にのみ 1 塩基の挿入/欠損が見つかった。この配列の差異により、強毒性株では正常な PdpC タンパク質が発現されるが、弱毒株では 1 塩基欠失に伴うフレームシフトによって約半分の大きさの PdpC タンパク質しか生合成できていないことが明らかとなった。このことから、野兎病菌 *pdpC* 遺伝子は病原性発現に深く関与している可能性が示唆された。

(7) エキノコックスに関する研究

ヒトの感染時における早期診断システムの確立ならびに感染源となる動物での寄生虫の発育を阻害する分子標的治療薬の開発を目的とし、エキノコックスの各発育ステージに特異的に発現する遺伝子群を網羅的に同定するために次年度

以降に計画しているトランスクリプトーム解析に使用する DNA マイクロアレイのデザインと合成を行った。

(8) 炭疽菌に関する研究

土壌中の *Bacillus cereus* group 菌種群の網羅的検索および分離同定と炭疽菌芽胞および炭疽菌との鑑別法の確立を行うため、国内各地から土壌を採取・収集した。今後、詳細な遺伝学的同定および細菌学的分類を行っていく予定である。

(9) 狂犬病に関する研究

1) 狂犬病ウイルス蛋白質を特異的に認識する single chain variable fragment (scFv) を、応用した Direct, rapid immunohistochemical test (DRIT) 法の有効性と課題について検証した。scFv は、クローンごとに反応性に差が見られたものの、ウイルス感染マウス脳の塗抹標本からウイルス蛋白質を特異的に認識することが明らかとなった。

2) 国内には、狂犬病の治療、院内感染対策に関する資料が非常に乏しいことから文献調査により、狂犬病救命例、院内感染対策について暫定的にまとめた。また、今回、何らかの接種法により狂犬病曝露前免疫を受けた者における曝露後発症予防への効果を検討した。曝露前発症予防として 2 回または 3 回の狂犬病ワクチン接種が既に行われ、曝露後発症予防 (4 例)、追加接種 (1 例) を希望したものの者について、接種終了 2 週間後に狂犬病抗体価を測定した。その結果、全例に有意な抗体産生を得られたことが確認された。一方、2009 年に米国は曝露後免疫を原則 4 回接種へ減量を決めた。本研究では、米国における曝露後免疫の変更について、その背景や根拠をまとめた。

3) わが国における飼育犬頭数の推計精度を高めることを目的として、推定手法に関する検討を行った。一般社団法人ペットフード協会が実施している「全国犬・猫飼育実態調査」では様々なバイアスが発生しており、これを補正すると総飼育犬頭数は 10067 千頭となり、オリジナルの「全国犬・猫飼育実態調査」結果 11861 千頭より 15.1% 低いものとなった。一方、「全国犬・猫飼育実態調査」における 1 世帯あたりの平均飼育頭数は上方・下方両者のバイアスが相殺し、結果としては偏りの少ない推定値となっていると考えられる。

D. 考察

今年度は、岡山県を中心に、全国で飼育され

た食用ウシを対象として調査を行ったが、血清抗体価陽性を示した検体はなく、遺伝子も全検体陰性であった。抗体価の擬陽性は全体の 3%程度にみられたが、健康牛、病畜の差はなく、地域別、年度別でも大きな差は認めなかった。擬陽性の判定については、*C. burnetii* に特異的な抗体といえないため、今回の結果では、ウシの *C. burnetii* 抗体保有率は低いと考えられた。また *C. burnetii* の遺伝子は検出されなかった。このことから、本調査の対象個体は、少なくとも検体採取時点では感染していなかったと考えられた。昨年の北海道の放牧牛の結果を勘案すると、ウシの *C. burnetii* 感染率には地域差がみられ、一定の感染リスクが疑われる地域があるものの、食用ウシ全体の感染リスクについては低いと考えられた。

C. burnetii は反芻動物の胎盤で大量に増殖すると言われているが、一般にと畜場に搬入されるウシは妊娠していない。このことが、今回の調査における検出率が低かった原因である可能性は否定できない。しかしながら、*C. burnetii* の遺伝子が食用個体から未検出であったことは、人獣共通感染症の予防という観点からは望ましい結果であった。生態系での感染様式を解明するためには、今後さらにウシの数を増やして検討するとともに、野生動物やダニについての検討も必要と考えられ、今後の課題である。

我が国においては、ライム病ボレリア *B. garinii* 感染例の少なくとも半数は野鼠由来 *Borrelia* 株と同一 ST であり、また全体の 80%以上が ST-group B であることが明らかとなった。このことから、国内に分布するヒト病原性 *B. garinii* は欧州とは異なり野鼠によって環境中で維持、伝播されている可能性が強く示唆された。

複数地域の愛護センターのイヌまたはネコから *C. ulcera n s^{Tox+}* 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。菌が分離された地域では 2 年間に同様の調査結果が得られているため、このような地域では当該菌が常在していることを示している。動物病院の調査でも *C. ulcera n s^{Tox+}* 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、ジフテリア症状を呈する患者 2 例の環境調査で、いずれの患者でも飼いネコが感染源として疑われており、風邪用の有症ネコからはヒトへの感染リスクは高いことが確認

された。

中部地方を中心とした各県の猟犬につき、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、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。コリネバクテリウムウルセランスに関しては三重県志摩市の猟犬から高い抗体価が再確認されるとともに、1 例の口腔内からは毒素産生性 *C. ulcerans* が分離同定された。また、同居犬同士で同じ検査で陽性を示す例がしばしば認められたことから、主要な感染経路として① 感染個体から同居犬への水平感染（ジフテリア、レプトスピラ）、② 行動範囲におけるダニ類媒介感染（ライム病ボレリア）、③ 野生動物の生食による感染（トキソプラズマ）等が考えられた。以上のことからこれらの感染症のヒトへの感染リスクを予想するうえで、猟犬が罔動物として有用であると考えられる。

野生イノシシにおいて *B. canis* に対して抗体陽性を示すものが確認された。特に、調査した四国地区では約 10%が陽性を示した。国内では *B. canis* の存在は、イヌ繁殖施設におけるブルセラ病の流行や愛護センター等のイヌの抗体検査などにより確認されており、国内感染による患者も報告されている。ブタは一般に抵抗性であるとされているが、*B. canis* に軽度感染し、抗体を持つ可能性は否定できない。ブルセラ属菌の遺伝子検出に広く用いられている *bcs₃₁* に対するプライマーで交差増幅する菌が分離されたが、この菌は抗体の交差反応は示さなかった。また、*bcs₃₁* 以外の領域は増幅されなかった。よって、本菌がイノシシに見られる抗ブルセラ抗体の元になっている可能性は否定された。さらに検証を続ける必要があり、また、そのためには、より特異的な検査法の開発も必要である。最も広く用いられている TAT は簡便さや感度において、MAT、ICA、IFA に劣ることが示された。また、WB との比較により、MAT、ICA、IFA でもアウトブレイクが起こっている施設内では、抗体価の低い感染イヌを見逃す可能性が示された。従って、より特異性や感度に優れた方法の開発が必要であることが明らかとなった。現在、我々は、合成ペプチドを作成し、その特異性と感度を検証している。また、フルサイズの組換えタンパクも作成中である。今後も、さらに、両者について検討を加えて、高感度特異的診断法の開発を行う予定である。

野兎病菌の病原性を司る遺伝子は、トランスポゾンを用いた遺伝子破壊株を作出し、貪食細胞を用いた菌株の増殖性をもってスクリーニングされてきた。しかし、この手法では動物の体内でのみ病原性を発揮する病原性遺伝子の検索は不可能である。そこで本研究でこの問題を避けるため、マウスを用いた継代により弱毒性株から強毒性株の作出し、これらの全ゲノム配列比較により病原遺伝子の同定を試みた。この結果、弱毒および強毒性株の比較において、190万塩基対におよぶゲノムの中で *pdpC* 遺伝子 ORF にのみ 1 塩基の差異が見つかった。*pdpC* 遺伝子は病原性に深く関与している可能性が示唆されたが、その機構については今後の更なる解析が必要である。

エキノコックスの原頭節が示す二方向性分化は、従来から研究者の強い関心を集め、*in vivo* あるいは *in vitro* の実験によってその現象としての特徴が報告されてきた。しかしながら、どのような機序によって分化が制御されているのかはまだ明らかにされておらず、発育ステージに特異的に発現する遺伝子群の網羅的な同定を試みる解析は本研究が世界で初めて試みられることとなる。本研究が目指している原頭節の分化関連遺伝子群の特定は、エキノコックス症の感染予防や治療において以下のような新たな展開につながることを期待される。すなわち、中間宿主では原頭節から原頭節へと向かう分化を阻害できれば、有効な化学療法剤への応用が期待できる。また、終宿主では原頭節から成虫への分化を阻害できれば、中間宿主への伝播を根絶が可能となるであろう。

土壌検体から *Bacillus* 属菌と思われる菌を培養し分離することができることが確かめられた。土壌検体の遺伝学および細菌学的分離・同定を順次行っている目処がたったため、土壌の採取地域数を増やすために各地方衛生研究所への協力をお願いする予定である

狂犬病ウイルス検出において、ビオチン標識 scFv を DRIT 法に利用可能であることが確認できた。測定が簡便で、高価な蛍光顕微鏡を必要としない DRIT 法と、培養細胞や動物免疫を用いずに再生産が可能な scFv を組み合わせることで、狂犬病流行地域における有効な検査系として期待できる。今後は、感度の向上をはかる

とともに、多くの野外検体に応用することで、特異性の検証も行う必要があると考える。

これまでヒト狂犬病に対して、様々な治療法が試みられているが、現時点では有効性が確立されたものは存在しない。また、これまで報告された救命例においても、感染ウイルスの毒性や宿主の免疫反応が予後に影響した可能性が指摘されている。今後もヒト狂犬病臨床例の検討と、狂犬病に関する基礎的研究の推進がヒト狂犬病治療の検討に不可欠である。また、日本方式の曝露前 2 回接種者は、3 回接種者と同様に、曝露後免疫後に防御抗体価を大きく上回る結果を示した。十分な接種機会が得られない場合でも、日本方式による 2 回接種が、曝露前免疫として推奨可能であると思われた。曝露前免疫及び曝露後発症予防完遂後の再曝露では、いずれも海外に準じた 2 回接種により対応可能であることが示唆された。

イヌネコの飼育頭数の実態把握に関して本研究で行った評価から、「全国犬・猫飼育実態調査」を用いた総飼育頭数の推計にあたって、以下が提言できる。①「補助変量として用いられている世帯総数」については、住民基本台帳ベースではなく、国勢調査の一般世帯ベースにとともに、沖縄県を含め、20 歳未満や 70 歳以上のみで構成される世帯についても考慮することが望ましい。②「1 世帯あたりの平均飼育頭数」については、現在の値も偏りが少ないと考えられることから、補正を行う必要性は大きいものではないが、今後もバイアスの動向等に関する検証を続けていくことが必要である。③なお、今回提案した推計方法については、種々の不確実な要素が含まれていることや、改善可能と考えられる点があることから、これを確定的なものとして捉えるのではなく、今後も検討を続けていく必要があると考える。また、本研究の研究成果を活かす観点からも、政府統計において、今後、大規模な無作為抽出標本調査による飼育犬頭数実態把握の実施が望まれる。

E. 結論

国内での存在は明らかにされているがその存在様式が不明な動物由来感染症について実態調査を実施した。その結果様々な動物が動物由来感染症の伝播に関与していることが確認された。今後も地道な調査研究を継続し、我が国の動物由来感染症の生態学的側面を明らかにしたい。

F. 健康危機情報 特になし

G. 研究発表

1. 紙上発表

- (1) Komiya T, Seto Y, De Zoysa A, Iwaki M, Hatanaka A, Tsunoda A, Arakawa Y, Kozaki S, Takahashi M. :Two Japanese *Corynebacterium ulcerans* isolates from the same hospital: ribotype, toxigenicity and serum antitoxin titre. J Med Microbiol. 59(Pt 12):1497-504. 2010
- (2) Iwaki M, Komiya T, Yamamoto A, Ishiwa A, Nagata N, Arakawa Y, Takahashi M.:Genome organization and pathogenicity of *Corynebacterium diphtheriae* C7(-) and PW8 strains. Infect Immun. 78(9):3791-800. 2010
- (3) Hall AJ, Cassiday PK, Bernard KA, Bolt F, Steigerwalt AG, Bixler D, Pawloski LC, Whitney AM, Iwaki M, Baldwin A, Dowson CG, Komiya T, Takahashi M, Hinrikson HP, Tondella ML.:Novel *Corynebacterium diphtheriae* in domestic cats. Emerg Infect Dis. 16(4):688-91. 2010
- (4) 高橋元秀 : ジフテリア毒素原性 *Corynebacterium ulcerans* の感染症、日本獣医師会雑誌 63 p813-818, 2010
- (5) 畑中章生、鎌田知子、田崎彰久、本田圭司、山本明彦、小宮貴子、高橋元秀 : 茨城県で初めて確認されたコリネバクテリウム・ウルセランスによるジフテリア症例、国立感染症研究所 病原微生物検出情報 Vol.32 p.19-20: 2011年1月号
- (6) 吉村幸浩、山本明彦、小宮貴子 : 飼い猫の排膿に伴って、経皮的に腋窩リンパ節に膿瘍を生じたことが強く疑われる *C.ulcerans* 感染症の例、国立感染症研究所病原微生物検出情報 Vol.31 p.331: 2010年11月号
- (7) 高橋元秀 : イヌ・ネコにおけるジフテリア毒素産生 *Corynebacterium ulcerans* の保菌調査状況、国立感染症研究所 病原微生物検出情報 Vol. 31 p.203-204: 2010年7月号
- (8) 若松正人 人見 徹 成松浩志 緒方喜久代 小河正雄、小宮貴子 : 大分県におけるイヌ・ネコの *C. ulcerans* 保菌状況、国立感染症研究所 病原微生物検出情報 Vol. 31 p.204-205: 2010年7月号
- (9) 烏谷竜哉、浅野由紀子、田中 博、武智拓郎、土井光徳、佐々木俊哉、木村琴葉、岩崎 靖、 勇 孝徳、望月昌三、豊嶋千俊、小宮貴子 : 愛媛県におけるイヌ・ネコの *C. ulcerans* 保菌状況、国立感染症研究所 病原微生物検出情報 Vol. 31 p.205-206: 2010年7月号
- (10) 中嶋 洋、大島律子、石井 学、岸本寿男、木本有美、木口 修、赤木敏文、瀧本良幸、鳥越秀二、勝川千尋、小宮貴子 : 岡山県におけるイヌ・ネコの *C. ulcerans* 保菌状況、国立感染症研究所 病原微生物検出情報 Vol. 31 p.206-207: 2010年7月号
- (11) Nomura,A., Imaoka,K., Imanishi,H., Shimizu,H., Nagura,F., Maeda,K., Tomino,T., Fujita,Y., Kimura,M. and Stein,G.H. Human *Brucella canis* infection diagnosed by blood culture. Emerg. Inf. Dis., 16(7):1183-1185, 2010
- (12) 今岡浩一. 犬を飼うときに気をつけたい感染症. in: チャイルドヘルス, 診断と治療社, 13(8): 567-570, 2010
- (13) Akiko Okutani, Tsuyoshi Sekizuka, Bazartseren Boldbaatar, Akio Yamada, Makoto Kuroda, Satoshi Inoue. Phylogenetic typing of *Bacillus anthracis* isolated in Japan by multiple locus variable-number tandem repeats and the comprehensive single nucleotide polymorphism. Journal of Veterinary Medical Science. 2010;72(1):93-97
- (14) Ben Hatano, Takayuki Maki, Takeyuki Obara, Hitomi Fukumoto, Kohsuke Hagiwara, Yoshitaro Matsushita, Akiko Okutani, Boldbaatar Bazartseren, Satoshi Inoue, Tetsutaro Sata, Harutaka Katano. LAMP using a disposable pocket warmer for anthrax detection, a highly mobile and reliable method for anti-bioterrorism. Japanese Journal of Infectious Disease.2010;63:36-40.
- (15) Serizawa M, Sekizuka T, Okutani A, Banno S, Sata T, Inoue S, Kuroda M.

Genomewide screening for novel genetic variations associated with ciprofloxacin resistance in *Bacillus anthracis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jul;54(7):2787-92.

- (16) Kuroda M, Serizawa M, Okutani A, Sekizuka T, Banno S, Inoue S. Genome-wide SNP-typing method for species-strain identification of *Bacillus anthracis* among *B. cereus* group species. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Aug.2010,48(8):2821-2829

- (17) 菅沼明彦、高山直秀、柳澤如樹、西村昌晃. 狂犬病曝露前免疫の曝露後発症予防に対する効果. *感染症学雑誌* 84 (4) : 474-475, 2010

2. 学会発表

- 1) 木田浩司、葛谷光隆、濱野雅子、藤井理津志、岸本壽男、福士秀人、大屋賢司. 食肉処理場に搬入された牛の Q 熱コクシエラ汚染実態調査. 第 3 回日本リケッチア臨床研究会・第 18 回リケッチア研究会合同研究発表会. 大津市
- 2) 川端寛樹, 高野 愛, 伊東拓也, 石畝史, 高田伸弘, 中尾稔, 増沢俊幸, 藤田博己, 渡邊治雄, 大西真. 多領域 DNA 配列解析によって推定された国内におけるライム病ボレリア病原体 *Borrelia garinii* の維持・伝播経路: 第 56 回日本衛生動物学会北日本支部大会、札幌(2010.10)
- 3) Takano A, Goka K, Une Y, Fujita H, Shiino T, Watanabe H, Ohnishi M, Kawabata H. Isolation and characterization of a novel *Borrelia* group of tick-borne borreliae from imported reptiles and their associated ticks. 12th International Conference on Lyme borreliosis and other tick-borne diseases. Slovenia, September 2010
- 4) 朝倉亜希, 柳井徳磨, 酒井洋樹, 久保正仁, 山田章雄, 今岡浩一, 高橋元秀, 安藤秀二, 今岡信夫, 川端寛樹, 木村昌伸. 西日本を中心にした猟犬の感染症に関する調査研究. 第 16 回日本野生動物医学会(福岡), 2010 年 9 月, 要旨集 p92
- 5) 今岡浩一. 日本におけるブルセラ症の現状: 特別講演. 第 47 回レプトスピラ・シン

ポジウム, 東京, 2010 年 3 月

- 6) 木村昌伸, 今岡浩一, 鈴木道雄, 山田章雄. イヌブルセラ病抗体検査法の評価. 第 150 回日本獣医学会学術集会, 帯広, 2010 年 9 月
- 7) *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* SCHU 株の強毒性に関わる遺伝子の同定. 宇田晶彦, 関塚剛史, 藤田修, 黒田誠, 堀田明豊, 山本美江, 棚林清, 山田章雄. 第 33 回日本分子生物学会年会, 2010 年 12 月 (神戸)
- 8) *pdpC* gene determines the virulence of *Francisella tularensis*. K Tanabayashi, A Uda, T Sekizuka, O Fujita, M Kuroda, A Hotta, Y Yamamoto, N Sugiura, and A Yamada. 1st International One Health Congress, 2011 年 2 月 (Melbourne)