

れている。近年では 2003 年に犬繁殖場で流産の多発が見られ、ブルセラ菌が関与していたことが判明した。今回、猟犬の 3.5% が陽性を示したが、通常の範囲内と考える。猟犬は、自然交配をさせている場合があるので、引き続き調査する必要がある。

#### 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。症状としては、発熱、食欲不振、心拍数および呼吸数増加などが見られ、慢性経過を辿る場合が多いが病原体のタイプによっては高死亡率を示す場合もある。感染動物との直接接触又は保菌ダニやアブなどベクターによる刺咬により感染する。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、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

トキソプラズマ症は、*Toxoplasma gondii* によって引き起こされる原虫性疾患である。人を含め、多くの哺乳類と鳥類に寄生するため、人獣共通感染症として重要であり、医学・公衆衛生面からも注目される。

猟犬がトキソプラズマに対する抗体を保有している場合、最も可能性が高い感染経路として猟対象獣(イノシシ等)の肉を生食することが挙げられる。猟犬のトキソプラズマ抗体保有率を調査することは、野生動物の抗体保有率に関しておおよその推定が可能であり、同じ狩猟肉を調理し食す機会が多いと考えられる猟師に対するリスクを予め推定し、必要があれば警告することができる。今回の調査でも、19.7%と比較的高い陽性率が認められた。中でも岐阜県養老郡養老町(2/2)、下呂市(3/10)、関市板取(2/5)、伊豆市(9/22)、三重県志摩市(6/20)で陽性率が高い値を示したが原因についてさらに調査する必要がある。

#### 8) 同居感染の重要性

病原体は犬にのみ感染が認められるバベシア症およびフィラリア症、人獣共通感染症の原因となるジフテリア症、ライム病、

レプトスピラ症、ブルセラ症など様々な感染症の高い抗体価が認められ、各々の感染症の地理的分布に偏りが認められた。また、これら多種類の病原体の陽性個体の検出状況から、特定の場所で顕著に高い病原体保有と複数の病原体に感染している状況が確認された。ほぼ同じ地理的に同じ場所にありながら、病原体の保有状況が全く異なる場所が存在したことから、感染要因は地理的要因のみでなく、飼育環境も大きな感染要因と考えられた。飼育環境要因の中では「放し飼い」と犬でのバベシア症感染が重要で、同じ猟師宅内での感染症拡大を容易にしたと考えられた。特に *C. ulcerans*, レプトスピラ、ライム病等の様に猟犬から猟犬、さらに人間へと感染する可能性がある人獣共通感染症のコントロールでは同居感染の防止が重要と考えられた。

#### E. 結論

1) 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。

2) 三重県志摩市の猟犬から高い抗体価が再確認され、1例の口腔内からは毒素産生性 *C. ulcerans* が分離同定された。同居犬同士で同じ検査で陽性を示す例もしばしば認められたことから、① 感染個体から同居犬への水平感染の可能性(ジフテリア、レプトスピラ)、② 行動範囲においてダニ類媒介感染症の感染リスク(ライム病ボレリア)、③ 野生動物の生食による感染リ

スク(トキソプラズマ)が考えられた。

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、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) 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

#### H. 知的財産権の出願登録状況(予定を含む)

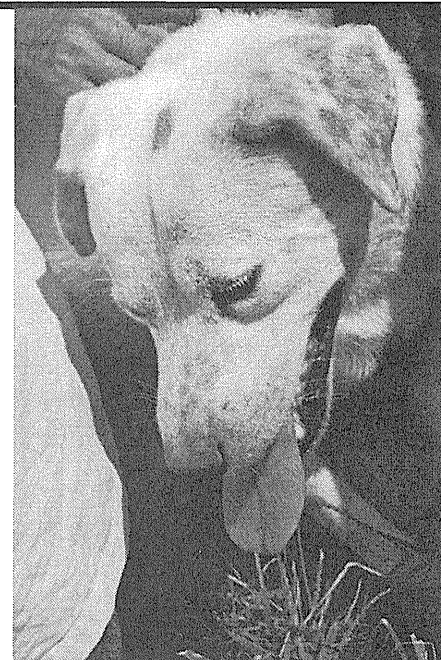
##### 1. 特許取得 なし

##### 2. 実用新登録 なし

##### 3. その他 なし

## 猟犬における感染症抗体保有状況に関する研究：中部地区を中心として

- ・ 猟犬は狩猟のパートナーとして野生鳥獣の捕獲に貢献
- ・ ダニ媒介性の感染症、野生動物由来感染症のリスクが高い可能性
- ・ 保有状況、地理的分布、  
⇒ 人への伝播の可能性の推測



本研究では：

レプトスピラ症，ライム病，リケッチア症，ジフテリア症，トキソプラズマ症，野兎病，破傷風，犬由来バベシア症およびフィラリア症を調査

## 材料および方法

### ● 材料

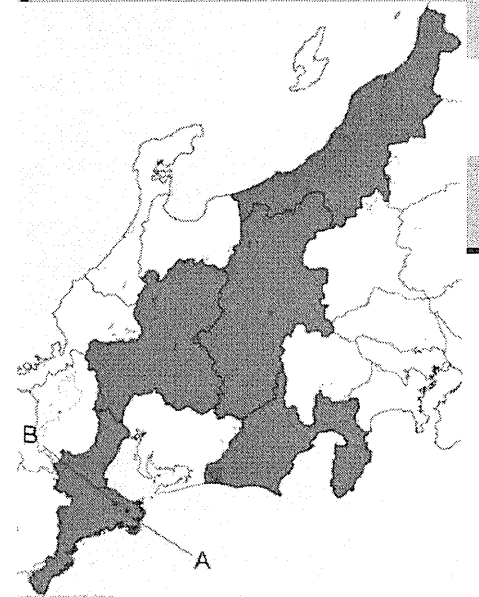
猟犬計142頭から採血した血液

- 血液塗抹標本、血清

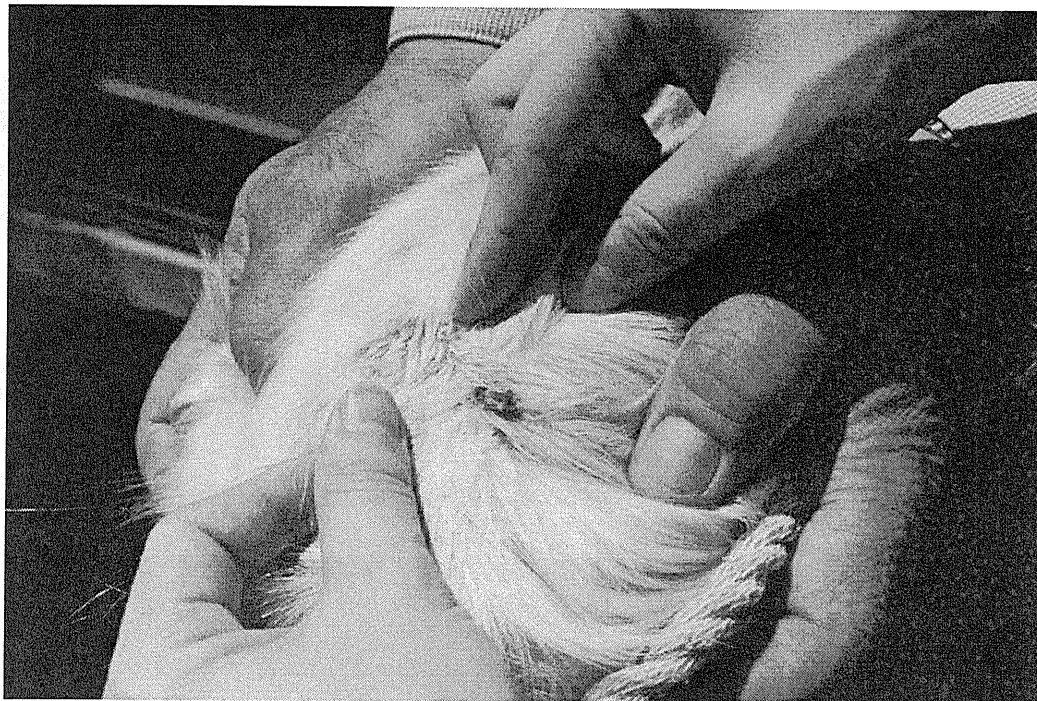
### ● 方法

- ・ レプトスピラ            ELISA
- ・ ライム病ボレリア    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
- ・ バベシア                血液塗抹標本の観察、  
                                 PCR、DNAシーケンス

地域	頭数
岐阜	21頭
三重	40頭
長野	24頭
新潟	8頭
静岡	49頭
計	142頭



## 山野を跋渉；多数のダニの寄生



## 猟犬におけるリスク

野生動物との接触(格闘)



野鼠の侵入

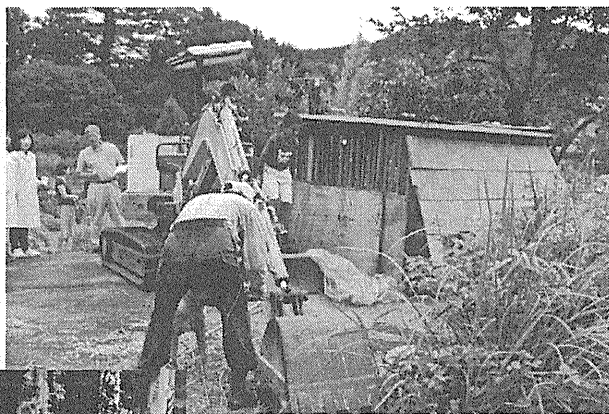
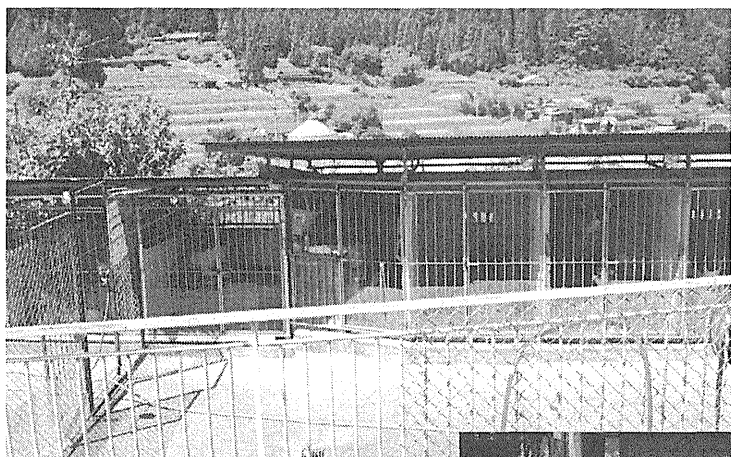
野生獣(しし肉)の生肉の生食

猟犬は愛玩犬とは異なる生活環境

(一種の消耗品)

# 種々の猟犬が飼育される





飼育環境も  
様々である



**獵犬の採血：技術が必要**



## ジフテリア症（高橋元秀先生と共同）

- *Corynebacterium diphtheriae* の感染による上気道粘膜疾患
- 最近、*C. ulcerans* が人のジフテリア類似疾患の原因菌として問題化
- 人への感染に動物が関与している可能性

被検血清を56°C30分非働化処理し、組織培養用マイクロプレートへ入れ、細胞用培養液で2倍階段希釈系列を2組作製した。希釈系列の一方は、VERO細胞浮遊液を加えて、37°C4日間培養し、被検血清コントロールとした。標準ジフテリア抗毒素を上記と同様にして、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）をもう一方の被検血清希釈系列と標準ジフテリア抗毒素希釈系列の各希釈系列に一定量添加し、37°C30分、孵卵器に入れて中和反応させた。その後、VERO細胞浮遊液を加えて、37°C4日間培養した。標準ジフテリア抗毒素のEnd pointを0.0033 IU/mlと設定し、被検血清の抗毒素価を算出した。

## ジフテリア検査結果2010

### 県別にみた陽性数

陽性数 11/142(7.7%)

岐阜県 0/21

三重県 6/40

志摩市 6/20(30%)

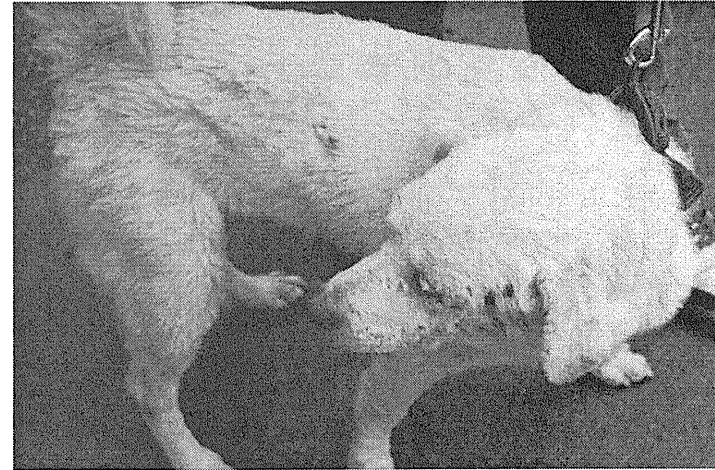
静岡県 4/49

静岡市 1/5

伊豆市 3/22(13.6%)

長野県 0/24

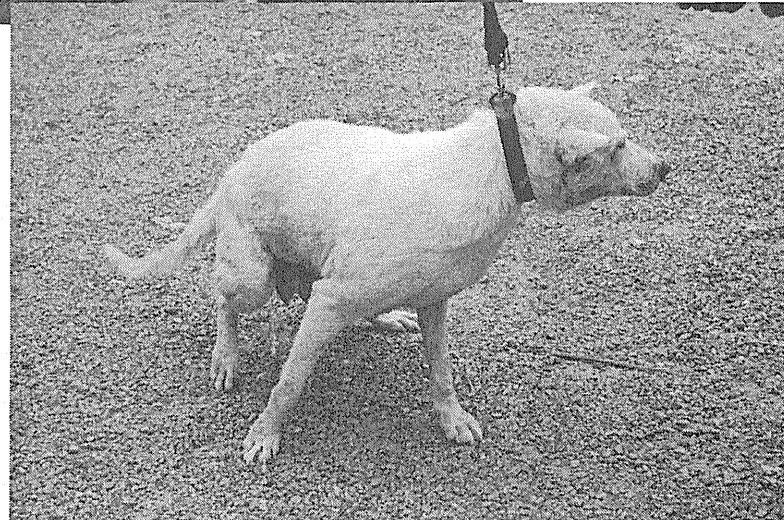
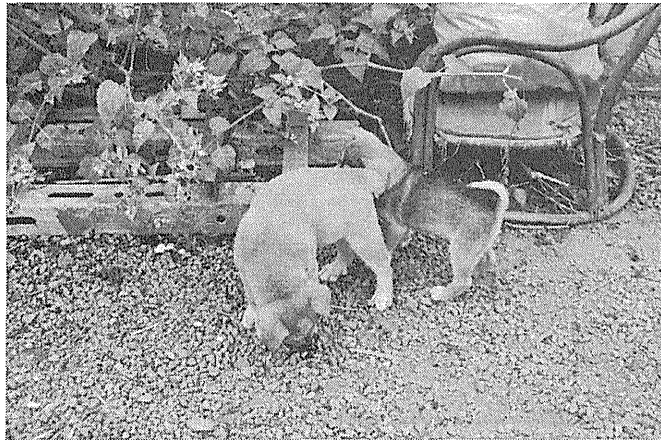
新潟県 1/8 (十日町市)



三重県志摩市陽性個  
体(No.88)から毒素  
産生性 *C.ulcerans*  
分離

## 三重県志摩市 での菌採取

毒素産生性C.  
*Ulcelance*が  
分離された。



## レプトスピラ症(川端・小泉先生)

- *Leptospira interrogans*
- 散発的に国内で発生
- 動物の腎臓に定着、尿中へ排泄
- 尿で汚染された水、土壌との接触により感染
- 犬では多くは不顕性感染
- 血清型

Autumnalis (秋疫A)、Hebdomadis (秋疫B)

Australis (秋疫C)、Icterohaemorrhagiae (ワイル病)

Canicola (犬型レプトスピラ病)、Copenhageni

聞き取り : 浜松市, 伊豆市で過去に感染例・流行

# 2010レプトスピラ検査結果

陽性率 73/142(51.4%)

岐阜県 6/21 関市板取 3/7

新潟県十日町市 1/8

長野県 11/24 伊那郡 11/20

静岡県 22/49 静岡市 5/5

掛川市 4/5, 伊豆市 11/22

三重県 32/40 津市 17/20

志摩市 15/20

GST 1以上, LigA/GSTが1以上を陽性とした。

陽性対照

1) GST 1.2391, LiGA/GST 1.7538

2) GST 1.195, LiGA/GST 1.6934



県別にみたレプトスピラ検査陽性率

さらに検討する必要がある

## ライム病(川端先生と共同)

- *Borrelia burgdorferi*、*B.afzelii*、*B.garinii*
- ボレリア菌を保有したシュルツェマダニの刺咬により感染
- ノネズミや野鳥が保菌
- 北海道、長野県方面に多く発生
- 犬ではほとんどが不顕性感染
- **2009年の調査では九州に高い陽性率**

recomWELL *Borrelia canis* IgG (Mikrogen, Martinsried, Germany) を用いて、マニュアルに従ってEnzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) を実施後、吸光度を測定した。Cut-offコントロールの平均値の1.2倍より大きい値 (0.4209) のものを陽性とした。

## 2010年 ライム病抗体の調査 (川端先生)

陽性率 63/142 (44.4%)

岐阜県 6/21 下呂市 4/10

新潟県十日町市 4/8

長野県 5/24 中野市 2/4

静岡県 24/49 浜松市5/17 静岡 5/5 掛川市  
4/5 伊豆市 11/22

三重県 24/40 津市 9/20 志摩市 15/20

2009年度の調査と同様，温暖な地方に高い陽性率がみられ，患者の分布との一致がないことから，それらの種類を同定し，病原性との関連を明らかにする必要がある。

## 2010の結論

- レプトスピラ症、ライム病、ジフテリア症、トキソプラズマ症についての検査を実施
  - それぞれ陽性個体が検出された
- 温暖な地方において陽性個体が多い傾向
  - 人においても感染リスクが高い可能性
  - 猟犬がこれらの感染症の疫学情報の収集に貢献

今後は、他の地域での調査、媒介節足動物、野生動物、人との関連性についてのさらなる検査が必要



## 考察

- 温暖な三重県, 静岡県に陽性個体が多い傾向  
さらに、同居犬同士で同じ検査に陽性  
→ ① 感染個体から同居犬への水平感染の可能性
  - レプトスピラ、
- ② 行動範囲において感染リスクが高い可能性
  - ライム病ボレリア、リケッチア

人においてもこれらの感染症のリスクが高い恐れ

# 猟犬を用いた野外感染症のハザード マップの作製を検討



ジフテリア, ライム病, レ  
プトスピラ, リケッチア症,  
etc

## 野兎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、山本美江（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）株を作出し、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。

### A. 研究目的

野兎病菌 (*Francisella tularensis*) は野兎病を引き起こすグラム陰性の桿菌であり、樹状細胞やマクロファージ等の細胞内で増殖する細胞内寄生菌である。ヒトへの野兎病菌伝播は、ダニや蚊等の吸血昆虫媒介による皮下感染型と、本菌汚染食物あるいは水を介する経口感染型、汚染エアロゾル吸引による経気道感染型、付着した皮膚から侵入する経皮感染型に大別される。経気道感染型の場合、10 個 (CFU; colony forming units) 以下、その他の場合でも極微量の菌体で感染が成立し、罹患者は 3 日程度の潜伏感染期を経て、悪寒、波状熱、関節痛等を伴う症状を示す。本菌の中で最も病原性が高いとされる北米亜種の *F. tularensis* subsp. *tularensis* (Type A) 感染未治療者における致死率は、3 割程度との報告がある。この極めて高い感染性と罹患者の重症化を理由に、本菌はバイオテロに使用される危惧も持たれており、病原性発現機序の解明は極めて重要であると思われた。

野兎病菌の病原性に関する研究を開始するにあたり、藤田博己博士（大原研究所、福島市）より分与され、人口培地で継代維持された SCHU P0 株を実験用マウスに接種し病原性確認試験を行ったところ弱毒性 ( $10^6$  CFU > LD<sub>50</sub>) であることが明らかとなった。そこで強毒性株を得るた

めに、マウスでの継代を行い、5 代継代マウス脾臓より弱毒性 SCHU P5 ( $10^6$  CFU > LD<sub>50</sub>) および 9 代継代マウスより強毒性の SCHU P9 株 ( $10^3$  CFU < LD<sub>50</sub>) を新たに分離した。これら 3 株は遺伝子背景が酷似していると考えられるにも関わらず、マウスに対する病原性が著しく異なることから、3 株の遺伝子配列の比較を行うことで病原因子の同定を試みた。

### B. 研究方法

#### 1. 菌株

野兎病菌 SCHU P0 株は、chocolate II agar (BD, Sparks, MD) で 37°C 3 日間、または chemically defined medium (CDM) で 2 日間培養した後に 10% グリセロール溶液に浮遊させ、-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. マウスにおける病原性確認

7 から 12 週齢のマウス (C57BL/6<sup>♂</sup>) は日本 SLC から購入した。これらのマウスに各種菌量のそれぞれの野兎病菌株を腹腔内接種しその生残性を観察した。なお、マウス感染実験は国立感染症研究所動物実験委員会の承認を受け BSL3 で実施した。

#### 3. 全ゲノム配列の解読

CDMで培養したSCHU P0、P5、P9株は、SepaGeneを用いて核酸を抽出し、RNaseを用いて4°Cで3日間処理、フェノール/クロロホルム処理およびエタノール沈殿を行い、ゲノムDNAを得た。ゲノムDNAサンプルは、DNA sample prep kit (Illumina, San Diego, CA)、GA II using the Illumina Sequencing kit (ver. 3)を用いてIllumina Genome Analyzer IIで解析を行い、既報のSCHU S4株の塩基配列にmapさせた。

#### 4. PCRとDNAシーケンス

野兎病菌 *pdpC* 遺伝子の塩基配列を確認するために、PCRおよびシーケンス解析を行った。使用したプライマーは表1に示した。Pathogenicity islandを跨ぐPCRでは *LA Taq*(Takara, Shiga, Japan)を、*pdpC* 遺伝子の増幅には *Ex Taq*(Takara, Shiga, Japan)を用い、GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer, Foster City, CA)で増幅を行った。増幅産物はBigDye version 3.1 terminator cycle sequencing kits (Applied Biosystems, Foster City, CA)と3130 DNA sequencer (Applied Biosystems)を用いて塩基配列を決定した。

#### 5. ウェスタンブロット解析

対数増殖期で回収した野兎病菌をSDS-PAGEサンプル緩衝液で可溶化した。熱処理したタンパク質サンプルは、12.5%のアクリルアミドゲルで電気泳動後、PVDF膜に転写した。膜上のPdpCタンパク質の検出は、2万倍希釈した抗PdpCポリクローナル抗体(Dr. Celliより分与; NIH, NIAID, Hamilton, MT)と2万倍希釈したプロテインA-HRP複合体(Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)、およびECL Plus reagents (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)を用いて特異的に化学発光させた。画像はVersaDoc 5000 Imaging System (Bio-Rad)で取得した。

### C. 研究結果

#### 1. 弱毒および強毒株の樹立

野兎病菌の病原因子の同定を試みるにあたり、SCHU P0株の病原性確認試験を行った。10<sup>6</sup> CFUをマウス腹腔内接種した結果、既存の報告とは異なりSCHU P0株はマウス非致死性弱毒株である事が明らかになりマウス継代によるSCHU P0株の強毒化を試みた。この結果、継代9代目においてマウスに対する明らかな強毒化

が観察された。これらの現象を踏まえて、継代5代目および9代目のマウス脾臓より、SCHU P5株およびP9株を分離した。分離した両株の病原性を確認する為に、高(10<sup>6</sup> CFU)および低(10<sup>3</sup> CFU)濃度でマウスに接種した結果、SCHU P0、P5株高濃度接種群のマウスは2週間生存したのに対し、SCHU P9株は低濃度接種群のマウスでも全て死亡した(図1)。この結果により弱毒性SCHU P0、P5株および強毒性SCHU P9株の樹立が確認された。

#### 2. 弱毒および強毒性株の全ゲノム配列の比較

弱毒および強毒性株の病原性の違いに関わる遺伝子を明らかにするために、SCHU P0、P5、P9株の全ゲノム配列の解読し比較解析を行った。この結果、190万塩基対におよびゲノム配列の中で、2重にコードされている*pdpC* 遺伝子ORFの1塩基に差異が見つかった(表2)。この1塩基の違いにより、弱毒性野兎病菌ではストップコドンに伴うフレームシフトがおこり、約半分の大きさのPdpCタンパク質しか生合成できないことが予測された(図2A-D)。

弱毒および強毒株で生合成されるPdpCタンパク質の大きさを確認する為にウェスタンブロットを用いて解析を行った。この結果、弱毒性野兎病菌では約半分の大きさのPdpCタンパク質しか検出されなかったが、強毒性野兎病菌では全長のPdpCタンパク質が検出された。

以上の事より、野兎病菌 *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(図2E)。

### D. 考察

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。

野兎病菌 PdpC は、これまでのところ他のタンパク質とホモロジーを有さない機能未知のタンパク質で、病原性関連を明確化した報告は