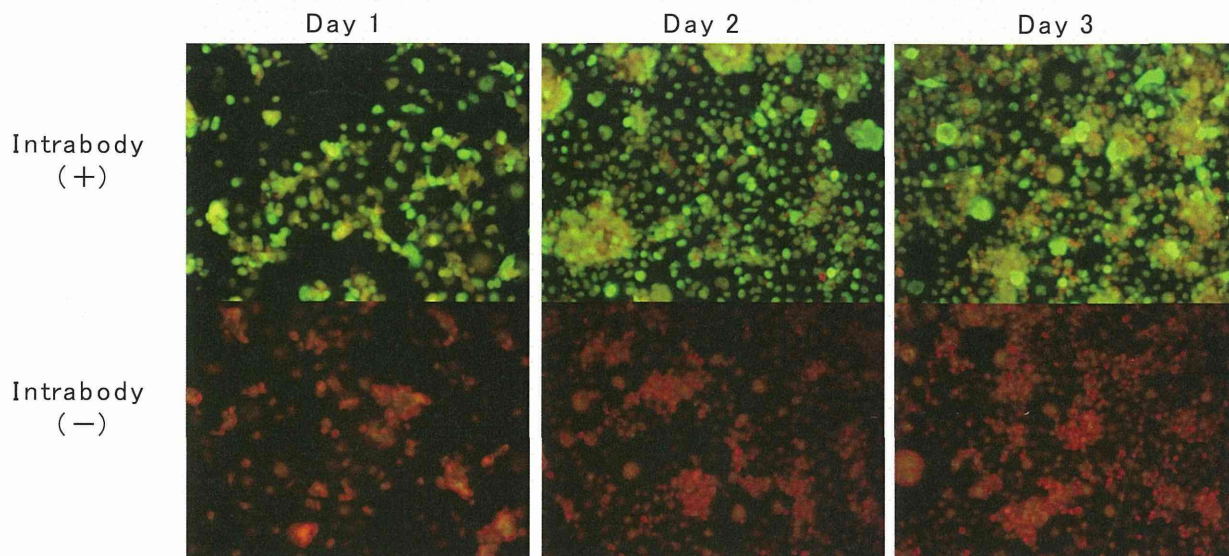


図1 : Intrabody発現プラスミド ( 抗RABV-P19/pCAGGS Hismyc) の MNA細胞 ( mouse neuroblastoma: マウス神経芽腫由来) への導入

<b>導入</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>・ Nucleofection法 ( LONZA社 Amaxa nucleofector-1 program T-24を使用)</li><li>・ 細胞 <math>2 \times 10^6</math>個に対して、DNA <math>10 \mu\text{g}</math>を導入</li></ul>
<b>発現確認</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>・ 1, 2, 3日後にホルマリン+0.4% TritonXで固定</li><li>・ マウス抗myc抗体/抗マウスIgG-FITC抗体 ( 0.002% evansblueでcounter stain)</li></ul>



「カプノサイトファーガを主とする伴侶動物等に  
由来する感染症に関する研究」

「カプノサイトファーガ・カニモルサス感染症に  
関する研究」

「イヌのレストスピラ症に関する研究」

「わが国の猫における *Bartonella* および  
*Chlamydophila felis* DNA 保有状況」

国立感染症研究所 今岡 浩一

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

カプノサイトファーガを主とする伴侶動物等に由来する感染症に関する研究

研究分担者	今岡 浩一	国立感染症研究所	獣医科学部	第一室長
研究協力者	鈴木 道雄	国立感染症研究所	獣医科学部	主任研究官
研究協力者	木村 昌伸	国立感染症研究所	獣医科学部	主任研究官
研究協力者	小泉 信夫	国立感染症研究所	細菌第一部	主任研究官
研究協力者	丸山 総一	日本大学	生物資源科学部	

獣医公衆衛生学研究室 教授

最も身近な愛玩動物であるイヌ・ネコに由来する感染症は数多く知られている（表1）。一般的に、動物からヒトへの病原体の伝播は、その距離が近いほど容易になるが、近年の傾向として、感染抵抗性の減弱した免疫学的弱者と考えられる高齢者の世帯でイヌ・ネコ飼育率が高くなってきている。これらの事実は、今後の高齢化社会でイヌ・ネコ由来感染症が重要な問題となることを示すと考えられる。

そこで我々はイヌ・ネコの口腔内常在菌であり、致死感染を起こすことが知られているカプノサイトファーガ・カニモルサスによる感染症に注目し、また、同じくイヌから感染するレプトスピラ、ネコ由来の代表的な感染症である猫引っ掻き病について、その現状・リスクおよび、それらを導き出すために必須である特異的検査法、病原性メカニズムの検討を行った。

1) カプノサイトファーガ・カニモルサス (*Capnocytophaga canimorsus*) は、ヒトがイヌやネコに咬傷・搔傷（以下、咬搔傷）を受けた際に傷口から感染する。継続して実施している患者の発生状況調査では、これまでに国内で計48例（うち死亡11例）を把握し、患者が中高年齢者中心であること、基礎疾患が無くても発症することが少なくないこと、国内ではネコ咬傷・搔傷を感染原因とする割合が海外より高いことなどを明らかにした。また、遺伝子配列比較による *C. canimorsus* の菌種同定の検討を行い、*gyrB* 遺伝子が有用であることを見いだした。さらに、イヌマクロファージ系細胞であるDH82細胞の培養上清が *C. canimorsus* の増殖を促進することを明らかにした。

2) レプトスピラ症は、病原性レプトスピラ (*Leptospira* spp.) の感染によっておこる人獣共通感染症である。イヌは、レプトスピラ感染後に病原体保有体となりヒトへの感染源となることが知られている。本研究ではイヌのレプトスピラ症の発生実態の解明およびレプトスピラ感染のリスク評価を目的として、レプトスピラ症疑いイヌの実験室診断および実験感染マウス尿中からの抗原検出法の開発・評価を行った。6県13頭のレプトスピラ症が確定した。3頭からレプトスピラが分離され、*L. interrogans* serogroup Australis (1頭) および *Hebdomadis* (2頭) と

同定された。また、12KDa のレプトスピラ属特異的糖脂質抗原を精製し、これに対するモノクローナル抗体を作成し、実験的にレプトスピラを感染させたマウス尿中からの抗原検出法を構築した。

3) 猫ひっかき病の原因菌である *Bartonella henselae* (Bh) と *B. clarridgeiae* (Bc) は猫を自然宿主とし、ネコノミによって伝播されることが知られている。また、猫クラミジア症の原因菌である *Chlamydomphila felis* (Cf) は、猫に結膜炎、鼻炎、上部気道炎や肺炎を引き起こすが、稀ではあるが、人にも結膜炎を起こすことがある。そこで本研究では、猫を原因とする人獣共通感染症の疫学解明の一環として、日本全国 47 都道府県の飼育猫の血液抽出 DNA 材料を用いて、*Bartonella* ならびに Cf の DNA 保有状況を検討した。*Bartonella* DNA の陽性率は 4.6% で、Bh が 2.2%、Bc が 1.5%、Bh + Bc が 0.8% であった。性別の陽性率は、オスで 4.6%、メスで 4.4%、年齢別では、1 歳未満が 6.4%、1 歳以上が 4.3% となり、1 歳未満で高い傾向を示した。飼育地域別の陽性率は、東日本の 2.3% に比べ西日本が 5.9% と有意に高い値を示した。Cf DNA 陽性率は、全体で 2.6% であったが、有意な性差・年齢差・地域差は見られなかった。

以下、それぞれの研究に関する詳細（カプノサイトファーガ・カニモルサス感染症に関する研究、イヌのレプトスピラ症に関する研究、猫における *Bartonella* および *Chlamydomphila felis* DNA 保有状況）を順に示す。

表 1) 代表的なイヌ・ネコ由来感染症

細菌	バルトネラ、レプトスピラ、カプノサイトファーガ、パスツレラ、イヌブルセラ、ブドウ球菌、連鎖球菌、フソバクテリア、サルモネラ、エルシニア、破傷風菌
ウイルス	狂犬病（日本にはない）
リケッチア	コクシエラ
原虫	トキソプラズマ、ジアルジア
寄生虫	（内部）エキノコックス、回虫、イヌ糸状虫、ウリザネ条虫、東洋眼虫
	（外部）ノミ、ダニ
真菌	皮膚糸状菌

## カプトサイトファーガ・カニモルサス感染症に関する研究

研究協力者 鈴木 道雄 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官  
研究分担者 今岡 浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 第一室長  
研究協力者 木村 昌伸 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官

### 研究要旨

カプトサイトファーガ属菌はイヌやネコの口腔内に常在するグラム陰性桿菌である。特に *Capnocytophaga canimorsus* が臨床的に重要で、ヒトがイヌやネコに咬傷・搔傷（以下、咬搔傷）を受けた際に傷口から感染する。本年度は、1) 国内臨床分離株の遺伝子シーケンス解析、2) 哺乳類培養細胞上清の *C. canimorsus* 増殖促進効果の解析、3) *C. canimorsus* 感染症患者発生状況の3点について研究を行った。前2点の実験的項目では、1) では *gyrB* 遺伝子が有用であること、2) ではイヌマクロファージ系細胞である DH82 細胞の培養上清が *C. canimorsus* の増殖を促進することを明らかにし、3) の検査診断および疫学的項目では、患者血清からの *C. canimorsus* 特異的 DNA 配列の検出による2例の診断を含め、今年度13例、累計48例（うち死亡例11例）の患者報告を把握し、患者が中高年齢者中心であること、基礎疾患が無くても発症することが少なくないこと、国内ではネコ咬搔傷の割合が海外より高いことなどを明らかにした。

### A. 研究目的

カプトサイトファーガ属菌 (*Capnocytophaga* spp.) はヒトや動物の口腔内に常在するグラム陰性桿菌である。イヌ・ネコは *C. canimorsus* (カニモルサス)、*C. cynodegmi* (サイノデグミ) の2種を保菌しており、公衆衛生的には *C. canimorsus* が重要である。ヒトがイヌやネコに咬傷・搔傷（以下、咬搔傷）を受けた際に感染するほか、傷口をなめられてなど非咬搔傷性の接触感染もある。発熱のほか、敗血症、腎不全、髄膜炎や播種性血管内凝固症候群 (DIC) など、局所症状よりも強い全身症状が現れることが特徴である。世界で300例ほどの患者が報告されている稀な疾患であるが、敗血症を発症したときの致死率は30%と、非常に危険な感染症である。

我々は、国内のイヌ・ネコにおける *Capnocytophaga* spp. の保菌状況を調査し、

高率に保菌（国内のイヌの74%、ネコの57%が *C. canimorsus* を保菌）していることを示した。また、同じく不明であった国内の患者発生状況についても、その発生状況の一端を明らかにしてきた。

現在も患者発生状況についての情報収集、診断系の適宜の改良、菌株の遺伝子解析を行っている。さらに、*C. canimorsus* の感染・発症メカニズムの解明のため、宿主の感染防御機構と *C. canimorsus* の保有する病原因子との関連について研究を進めている。

今年度は、以下の3点についての研究を進めた。

- 1) 国内臨床分離株の 16S rRNA および *gyrB* 遺伝子のシーケンス解析
- 2) 哺乳類培養細胞上清の *C. canimorsus* 増殖促進作用の解析
- 3) 医療機関等と連携した *C. canimorsus* 感染症患者発生状況の把握

## B. 研究方法

1. 国内臨床分離株の 16S rRNA および gyrB 遺伝子シーケンス解析：本年度新たに分与された、国内患者から分離された計 4 株の *C. canimorsus* 菌株について、16S rRNA および gyrB 遺伝子のシーケンス解析を行い、*C. canimorsus* 基準株・ATCC35979 株と比較した。

2. 哺乳類培養細胞上清の *C. canimorsus* 増殖促進作用の解析：イヌ由来マクロファージ系細胞である DH82 細胞を 10%FBS 加 D-MEM 培地で培養し、コンフルエント時に回収した上清を 0.22 $\mu$ m フィルターでろ過したものを *C. canimorsus* の培養系に添加して用いた。*C. canimorsus* の培養には、ベースとして 5%FBS 加 D-MEM 培地を用い、これに 0.005~50%の DH82 培養上清を添加した。1well あたり *C. canimorsus* 1.5 x 10<sup>4</sup> 個を接種し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養したのち、各培養条件における CFU を測定した。

また、同培養上清を 100°C60 分の熱処理あるいはアミコンウルトラフィルター(ミリポア社)で分子量 3kDa 以下に分画し、DH82 細胞培養上清に含まれる増殖促進因子の耐熱性と分子量について検討した。

3. 医療機関等と連携した *C. canimorsus* 感染症発生状況の把握：国内症例報告を医中誌、各種学会抄録集、ウェブサイトを検索して集めた。また、医療機関から我々のところに寄せられた患者情報を整理した。

## C. 研究結果

1. 国内臨床分離株の 16S rRNA および

gyrB 遺伝子シーケンス解析：本年度新たに分離された国内臨床分離株の 16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析の結果、*C. canimorsus* の基準株 ATCC35979 株とこれら 4 株の一致率は 98.09~99.01%であり、98.7%以上の一致率を示したのは 4 株中 2 株であった。同様に、最も近縁な種である *C. cynodegmi* の基準株 ATCC49044 株との一致率は 96.67~97.80%であった。4 株全てが、データベースに登録されている各菌種の基準株の中では ATCC35979 株との相同性が最も高かったが、同一菌種であると判定するのに他の方法での確認を必要とするとされる、97.0~98.7%の一致率の株が 2 株あった。これら 4 株の基準株との一致率の平均は 98.64%であった。

gyrB 遺伝子のシーケンス解析の結果、ATCC35979 株とこれら 4 株の一致率は 99.29~99.86%であり、全ての株が 99%以上と高い一致率を示した。一致率の平均は 99.56%であった。上記の結果は表 1 に、昨年度解析したものと合わせて掲載した。

2. 哺乳類培養細胞上清の *C. canimorsus* 増殖促進作用の解析：*C. canimorsus* はベースの 5%FBS 加 D-MEM 培地のみではほとんど増殖がみられなかったが、DH82 細胞培養上清の添加によって、*C. canimorsus* の増殖が用量依存的に促進された(表 2-1)。またこの DH82 細胞培養上清による *C. canimorsus* の増殖促進作用は、100°C60 分の熱処理で失活せず(表 2-2)、また 3kDa 以下の低分子のみに分画することによっても失われなかった(表 2-3)。

また、同じイヌ・ネコ由来 *Capnocytophaga* 属菌の *C. cynodegmi* はベースの 5%FBS 加 D-MEM 培地のみでも良好に増殖し、DH82 細胞培養上清を添加しても、さらなる増殖促進作用はみられなかった。一方、ヒト由来の *Capnocytophaga* 属菌

である *C. gingivalis* は、ベースの培地ではほぼ全く生育せず、DH82 細胞培養上清の添加によっても増殖の促進はみられなかった (表 2-4)。

3. 医療機関等と連携した *C. canimorsus* 感染症患者発生状況の把握： 本年度は検査依頼のあったもの、症例情報が寄せられたもの、症例報告の検索によるものを合わせて、13 例を新たに把握した (過年度の症例含む)。この中で、検査依頼があったうちの 2 例は、検査に使用できる検体が凍結保存の血清のみであったが、血清から DNA を抽出して PCR 検査を行うことにより検出に成功し、診断に結び付いた。PCR 検査の結果は、電気泳動の陽性バンドの塩基配列を解析することにより、それが確かに *C. canimorsus* に由来するものであることを確認した。

1993 年に最初の患者が報告されて以来、2012 年末までに、48 例 (イヌ咬搔傷 24 例、ネコ咬搔傷 13 例、動物との接触歴のみ 10 例、不明 1 例) を把握し、うち 11 例が死亡症例 (イヌ咬傷 3 例、イヌ搔傷 1 例、ネコ搔傷 4 例、動物との接触歴のみ 2 例、不明 1 例) であった (致死率 23%) (表 3-1, 3-2)。患者の年齢は 20~90 代で、40 代以上が 94% を占め、平均年齢は 62 歳であった。また、性別は男性 34 例、女性 14 例で男性が 71% を占めた (表 3-3)。症状は敗血症が 42 例と 90% 近くを占め、報告されている患者のほとんどが重症例であった (表 3-4)。一般的に基礎疾患のある人の方が、種々の感染症に対して感染・発症リスクは高くなると言われるが、本疾患では基礎疾患を有していた患者は 23/45 例と、ほぼ半数に止まっている (表 3-5)。

#### D. 考察

16S rRNA のシーケンス解析において、一般に基準株と 98.7% 以上の一致率であれば (かつ同程度の一致率である菌種が他になければ) 同一菌種の可能性が高いが、昨年度から解析したものと合わせて、一致率がそれを下回る株が 23 株中 8 株あった。一方で、*gyrB* 遺伝子の解析では昨年度解析した 1 株を除きすべて一致率 98% 以上で、一致率の平均値は 99.4% であり、最も近縁な種である *C. cynodegmi* 基準株の *C. canimorsus* 基準株との一致率が 73.4% であることから、菌種内での保存性が高い遺伝子であることが示された。16S rRNA 遺伝子は菌種の分類・同定の指標として使われることが多いが、昨年度から継続している解析においては、*C. cynodegmi* 基準株の *C. canimorsus* 基準株との一致率 98.59% を下回る株が 8/23 株あり、*C. canimorsus* においては、16S rRNA 遺伝子のみでは菌種の分類・同定に用いることは難しい一方で、*gyrB* 遺伝子は菌種同定に有用と考えられた。しかしながら *gyrB* 遺伝子は未だデータベース上に存在するデータが少なく、データ量の豊富な 16S rRNA 遺伝子の解析との併用が必要であると考えられた。

感染発症メカニズムの研究では、*in vitro* 実験で哺乳類培養細胞上清に *C. canimorsus* 増殖促進作用があることを見出した。この作用は *Capnocytophaga* 属菌の中でも今のところ *C. canimorsus* にのみ認められており、またこのような性質は他の細菌においてもこれまで報告されていない。哺乳類培養細胞上清中に含まれる増殖促進因子を同定し、これが発症メカニズムに関わる因子であるかどうか、今後より詳細な研究を進める予定である。

*C. canimorsus* 感染症は、世界で 300 例ほどの患者報告と、稀な感染症ではあるが、これまでの報告例において、敗血症や心内膜炎を発症したときの致死率は約 30% に

達している。しかしながら、これらの数字は、原因が特定されて学会等で報告された、重症例が大半を占める症例群についてのものであって、軽症例や原因の特定に至らなかった症例を含めた本感染症の全体像は明らかとなっていない。

国内では、我々が文献的に調査をした範囲では、1993年のイヌ咬傷から感染した敗血症例を最初として、これまでに48例を把握している。その約8割の38例が2008年以降の発生と、近年の患者が多いのは、臨床の現場で認知されるようになってきたことが大きいと思われる。我々の研究成果の雑誌、新聞への掲載あるいは研究所一般公開等での広報活動、また、厚生労働省からの情報提供などが、認知度向上の一助となったと考えられ、今後も同様の広報活動を継続し、情報を提供していくことが重要と考えられる。

さらに、情報提供とともに重要なのは、*C. canimorsus* の検査・同定法のさらなる改良であるが、分離培養の難しさから患者からの菌分離による検査・同定ができないことも多く、これが確定診断の壁となってきた面がある。これまでも菌分離のできない症例で、全血サンプルから抽出したDNAによるPCR検査で診断に至った例はあったが、血清サンプルによる検査は今年度が初めての実施であり、これら2例がともに確定診断に至ったことで、今後診断に難渋するケースで有用な検査法になると考えられた。さらに、血清は医療機関で比較的長期保存されているケースの多いサンプルであり、症例を過去に遡って診断することにも応用できると考えられた。

## E. 結論

国内でも *C. canimorsus* の感染・発症例が一定数存在することが明らかになって

きた。死亡例では医療機関を受診してから死亡までの時間が極めて短いケースがある一方、原因菌の同定には時間を要し、患者の容態はそれを待つに十分な時間がない。そのため医療機関では、敗血症に対して原因が特定されない状況で迅速かつ的確な救命医療を行う必要があり、そのために医療従事者はイヌ・ネコ咬傷感染症に関する十分な知識を得ておく必要がある。

今後、医療関係者をはじめ、一般市民や動物と接する機会の多い獣医療やペット関連業に従事する人々に対しても、それぞれの立場に応じた、咬傷を受けた際のリスクについての啓発活動を広く継続的に実施していくことが大切である。

我々の研究による、本感染症に関する科学的知見の集積は、これらの啓発活動における重要な基盤となるものであり、今後も継続して症例の情報収集に努め、薬剤感受性や本症例に特徴的な所見などの情報を蓄積していくことが大切であると考えられる。また、本感染症の発症メカニズムの解明のため、宿主の感染防御機構と *C. canimorsus* の有する病原因子の関係についての研究を進めることも重要な課題である。

発症メカニズム研究はまだその緒に就いたばかりであるが、解明のヒントとなる可能性のあるデータが出始めており、今後精力的に研究を進めていきたい。

## F. 健康危険情報

本感染症は、患者の平均年齢が高く、中高年齢者がハイリスクグループである。今後の高齢化社会を見込むと、今後、ますます注意が必要な感染症である。また、疾患に対する認知度は少しずつ上がってはきているものの、未だ十分であるとは言えない。今後、医療関係者や日常動物と接する飼い主、獣医療関係者、ペット動物関連業の従



事者を中心に、咬搔傷事故に伴う感染症のリスクについて、幅広く啓発していく必要があると考えられる。

## G. 研究発表等

### 1. 論文発表等

(1) 内藤亮, 瀧口恭男, 秋葉容子, 駿河洋介, 鈴木道雄, 今岡浩一. *Capnocytophaga sputigena*による肺化膿症の1例. 日本呼吸器学会誌, 2(2):157-161, 2013

(2) 鈴木道雄, 今岡浩一. カプノサイトファーガ・カニモルサス感染症. in: 別冊日本臨床 感染症症候群 第2版 新領域別症候群シリーズ24, 日本臨床社, pp.186-189, 2013

(3) 鈴木道雄, 今岡浩一. カプノサイトファーガ・カニモルサス感染症. in: 感染症内科, 科学評論社, 2(2), 2014 (in press).

### 2. 学会発表等

(1) 内藤亮, 瀧口恭男, 秋葉容子, 駿河洋介, 鈴木道雄, 今岡浩一. 当院で分離・同定

された*Capnocytophaga sputigena*感染症症例の検討. 第87回日本感染症学会学術講演会, 横浜, 2013年6月

(2) 今岡浩一. 犬猫から感染する動物由来感染症について～カプノサイトファーガ・カニモルサス感染症、ブルセラ感染症など～. 厚生労働省平成25年度動物由来感染症対策(狂犬病予防を含む)技術研修会 東京 2013年11月

(3) 杉山嘉史, 大河原愛, 木田沙緒里, 杵渕雅彦, 和泉彬彦, 原田ひろみ, 廣瀬春香, 米澤広美, 加藤英明, 宮島栄治, 鈴木道雄, 今岡浩一. 犬咬傷による*Capnocytophaga canimorsus*感染症の1例. 第25回日本臨床微生物学会総会, 名古屋, 2014年2月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表 1) *C. canimorsus* 国内臨床分離株の 16S rRNA および *gyrB* 遺伝子シーケンスの基準株との一致率

		ATCC35979株との一致率(%)		
		16S rRNA		<i>gyrB</i>
<i>C. canimorsus</i>	ATCC35979		100.00	100.00
	患者分離株	1	99.01	99.29 *2013
		2	98.94	99.33
		3	98.94	99.16
		4	98.89	100.00
		5	98.89	99.58
		6	98.89	98.24
		7	98.87	99.66
		8	98.87	99.57 *2013
		9	98.82	99.59
		10	98.82	99.33
		11	98.79	99.50
		12	98.75	99.42
		13	98.72	99.64
		14	98.68	99.64
		15	98.68	99.13
		16	98.58	99.86 *2013
		17	98.16	99.50
		18	98.09	99.50 *2013
		19	98.02	99.25
		20	97.85	99.37
		21	97.11	99.50
		22	97.01	99.67
	23	97.01	74.76	
<i>C. cynodegmi</i>	ATCC49044		98.58	73.41

表 2-1) DH82 細胞培養上清による *C. canimorsus* 増殖促進作用-1 (用量依存性)

Medium	DMEM+5%FBS						
Conditioned medium from DH82 cell	0%	0.005%	0.05%	0.5%	5%	50%	
<i>C. canimorsus</i> ATCC35979	1.5 x 10 <sup>4</sup> cells						
	0h	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	24h	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.045
							OD=600
		++	++	++	++	+++	+++
		+	+	++	++	+++	+++
		+	-	+	+	+++	+++
		-	-	-	+	++	+++
		-	-	-	-	+	+++
		-	-	-	-	+	++
		-	-	-	-	-	+
		-	-	-	-	-	+
							CFU/well*
							250
							2500
							25000
							2.5x10 <sup>5</sup>
							2.5x10 <sup>6</sup>
							2.5x10 <sup>7</sup>
							2.5x10 <sup>8</sup>
							2.5x10 <sup>9</sup>

\*最右欄の数字は、各希釈段階の二一1個が相当する元のwellの菌数を示す

表 2-2) DH82 細胞培養上清による *C. canimorsus* 増殖促進作用-2 (増殖促進因子の耐熱性)

Medium	DMEM+5%FBS				
Conditioned medium from DH82 cell	0%	50%	50%HT*		
<i>C. canimorsus</i> ATCC35979	1.5 x 10 <sup>4</sup> cells				
	0h	0.000	0.000	0.013	
	24h	0.000	0.020	0.047	
				OD=600	
				CFU/well†	
		+	+++	+++	250
		-	+++	+++	2500
		-	+++	+++	25000
		-	+++	+++	2.5x10 <sup>5</sup>
		-	++	++	2.5x10 <sup>6</sup>
		-	+	+	2.5x10 <sup>7</sup>
		-	+	+	2.5x10 <sup>8</sup>
		-	-	-	2.5x10 <sup>9</sup>

\*HT=Heat Treatment (100°C60min)

表 2-3) DH82 細胞培養上清による *C. canimorsus* 増殖促進作用-3 (増殖促進因子の分子量)

Medium	D-MEM				
Conditioned medium from DH82 cell	-	50%	<3kDa 50%		
<i>C. canimorsus</i> ATCC35979	1.5 x 10 <sup>4</sup> cells				
	0h	0.000	0.000	0.000	
	24h	0.000	0.007	0.000	
				OD=600	
				CFU/well†	
		++	+++	+++	250
		+	+++	+++	2500
		-	+++	++	25000
		-	+++	+	2.5x10 <sup>5</sup>
		-	++	+	2.5x10 <sup>6</sup>
		-	+	-	2.5x10 <sup>7</sup>

表 2-4) DH82 細胞培養上清による *Capnocytophaga* 属菌増殖促進作用(菌種による差異)

Medium	DMEM+5%FBS							
Conditioned medium from DH82 cell	-	50%	-	50%	-	50%		
Bacterial species	<i>C. canimorsus</i>		<i>C. cynodegmi</i>		<i>C. gingivalis</i>			
Inoculum dose	1.5 x 10 <sup>4</sup> cells							
	0h	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	24h	0.000	0.038	0.190	0.142	0.000	0.000	
							OD=600	
							CFU/well†	
		++	+++	+++	+++	++	++	250
		+	+++	+++	+++	-	+	2500
		-	+++	+++	+++	-	-	25000
		-	+++	+++	+++	-	-	2.5x10 <sup>5</sup>
		-	+++	+++	+++	-	-	2.5x10 <sup>6</sup>
		-	++	++	++	-	-	2.5x10 <sup>7</sup>
		-	-	+	+	-	-	2.5x10 <sup>8</sup>
		-	-	-	-	-	-	2.5x10 <sup>9</sup>

表 3-1) 患者発生状況

発生年	人数 ( 死亡数 )
1993	1
2002	1 (1)
2004	3 (1)
2006	2 (1)
2007	3 (1)
2008	7 (2)
2009	2
2010	5 (1)
2011	9 (2)
2012	5 (1)
2013	10(1)
	48(11)

表 3-4) 患者主症状

主症状	人数 ( 死亡数 )
敗血症	42 (10)
髄膜炎	1 (1)
意識障害	1
頭痛・発熱	1
創部膿瘍・腫脹	3

表 3-5) 患者の基礎疾患の有無

基礎疾患	人数 ( 死亡数 )
あり	23 (6)
なし	22 (5)

表 3-2) 患者感染経路

感染経路	人数 ( 死亡数 )
イヌ咬傷	23 (4)
イヌ掻傷	1 (1)
ネコ咬傷	5
ネコ掻傷	8 (4)
動物との接触	10 (1)
不明	1 (1)

表 3-3) 患者年齢構成

年齢 ( 代 )	男	女	全体	%
0	0	0	0	0.0
10	0	0	0	0.0
20	1	0	1	2.1
30	1	1	2	4.2
40	5	0	5	10.4
50	6	4	10	20.8
60	15	3	18	37.5
70	4	3	7	14.6
80	2	2	4	8.3
90	0	1	1	2.1
計	34	14	48	100.0

## イヌのレプトスピラ症に関する研究

研究協力者 小泉信夫 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

### 研究要旨

- 1) 11 都府県 36 頭のレプトスピラ症疑いイヌの実験室診断を行い、6 県 13 頭のレプトスピラ症が確定した。3 頭からレプトスピラが分離され、*L. interrogans* serogroup Australis (1 頭) および *Hebdomadis* (2 頭) と同定された。
- 2) レプトスピラ属特異的糖脂質抗原に対するモノクローナル抗体を用いて、実験的にレプトスピラを感染させたマウス尿中からの抗原検出法を構築した。

### A. 研究目的

レプトスピラ症は、病原性レプトスピラ (*Leptospira* spp.) の感染によっておこる人獣共通感染症である。イヌは感染急性期だけでなく、治療が行われない場合には保有体となり長期にわたってレプトスピラを尿中に排菌し、ヒトへの感染源となる可能性がある。そこでイヌのレプトスピラ症の発生実態の解明およびヒトへのレプトスピラ感染のリスク評価を目的に、レプトスピラ症疑いイヌの実験室診断および簡便な尿中抗原検出法の開発を行った。

### B. 研究方法

1. レプトスピラ疑いイヌの実験室診断：レプトスピラ症実験室診断は、コルトフ培地および EMJH 培地を用いた血液培養、*flaB*-nested PCR による血液・尿からの DNA 検出 (参考文献 1)、レプトスピラ 15 血清型を抗原とした顕微鏡下凝集試験による抗体検出 (ペア血清で 4 倍以上の抗体価上昇あるいは急性期抗体価 640 倍以上、参考文献 2) により行った。レプトスピラ分離株の種同定は *flaB* 遺伝子の部分塩基配列の決定により行った。また血清群の同定は、レ

プトスピラ標準抗血清を用いた MAT により行った。

2. モノクローナル抗体を用いた尿中抗原検出法の開発：

1) レプトスピラ属特異的 12 kDa 糖脂質抗原の部分精製：レプトスピラ (*L. interrogans* Fiocruz L1-130 株) の総脂質を Bligh-Dyer 法により抽出した。シリカカラム (Iatrobeads 6RS-8060) を用いてメタノール/クロロホルムの混合比を変えたステップワイズ法により 12 kDa 糖脂質抗原を部分的に精製した。

2) レプトスピラ属における 12 kDa 糖脂質抗原の発現：レプトスピラ 15 株の培養液 13 ml および他の細菌 (*B. afzelii*, *B. burgdorferi*, *L. pneumophila*, *N. gonorrhoeae*, *S. aureus*, *S. marcescens*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. sanguis*, UPEC) 培養液 2 ml (*B. afzelii* および *B. burgdorferi* は 13 ml) から Bligh-Dyer 法により総脂質を抽出した。クロロホルム層を回収、溶媒を留去後の残渣をサンプルバッファーに溶解し、SDS/PAGE およびモノクローナル抗体 1H6 (千葉科学大学・増澤博士より分与) を用いたイムノブロッティングを行った。

3)尿中 12 kDa 糖脂質抗原の検出: Fiocruz L1-130 株を感染させたマウス尿を経時的に採取し, 熱処理後 (100°C, 10 分間) に遠心上清(16000×g, 5 分間)を得た. 上清 100 μl を Bio-Dot SF (Bio-rad)を用いてニトロセルロース膜にブロットし, モノクローナル抗体 1H6 を用いたイムブロットングを行った.

\*参考文献

1. Koizumi N et al., Jpn J Infect Dis. 61:465, 2008.
2. Faine S et al. Leptospira and leptospirosis, 2nd edn. MediSci. 1999.

### C. 研究結果と考察

1. レプトスピラ感染疑いイヌの実験室診断: イヌは, ヒトと同様にレプトスピラ感染により急性発症する一方で, 感染後にレプトスピラ保有動物となりヒトへの感染源となる可能性がある. またイヌのレプトスピラ症は, ヒトに比べて容易に診断されることから, 当該地域のヒトのレプトスピラ感染リスクを評価するための歩哨動物となることも期待できる. そこで本研究では, レプトスピラ感染が疑われたイヌの実験室診断を行った.

本年度は表 1 にある 11 都府県 36 頭の実験室診断を行い, 6 県 13 頭がレプトスピラ症確定となった. 我々の調査では初めて広島県, 島根県から陽性例がみいだされた. レプトスピラは茨城, 福岡および鹿児島 の 3 県 3 頭から分離された. 茨城県でのレプトスピラの分離は初めてであった. 分離株は *flaB* 部分塩基配列からすべて *L. interrogans* であると推定された. また分離株の血清群は, Australis (1 頭) および Hebdomadis (2 頭) と同定された. 抗体が

検出された血清群は, Australis および Hebdomadis であった(表 1).

本調査のイヌのレプトスピラ急性感染が発生した 6 県のうち鹿児島県を除く 5 県では, 感染症法施行後ヒト症例の報告はない. しかしながら, ペットのレプトスピラ感染が起きていることから, これらの県でもヒトの生活圏に感染リスクが存在すること, またこれら地域でヒト患者が見逃されている可能性が示唆された. 今後当該地域の医師のレプトスピラ症に対する認識を向上させ, ヒトの感染実態の把握へとつなげていきたい.

イヌのレプトスピラ感染予防として, レプトスピラワクチンが存在する. しかしながら, 現行のワクチンは血清型に特異的な効果しかないとされている. 実際, 本調査でレプトスピラ症が確定したイヌの 69% はワクチンの接種歴があった. 感染レプトスピラは現行の多くのワクチンには含まれていない血清群 Australis あるいは Hebdomadis であり, 血清型に依存しない広範囲のレプトスピラ感染に有効で, 長期に効果が持続する新たなワクチンの開発が急務である.

2. モノクローナル抗体を用いた尿中抗原検出法の開発: イヌは急性期に尿中にレプトスピラを排出するだけでなく, 保有体となって長期間にわたってレプトを排出する可能性がある. そこで本研究では, モノクローナル抗体を用いたイムブロット法による尿中抗原検出系の開発を行った.

レプトスピラ症患者血清を用いたレプトスピラ抗原探索の過程で分子量約 12kDa の糖脂質抗原を同定し, この抗原を Bligh-Dyer 抽出法およびシリカカラムで部分精製を行った (図 1A). 一方, レプトスピラ全菌体を免疫して得たモノクローナル抗体のうち 1H6 がこの抗原を認識することが明らかと

なった (図 1B). このモノクローナル抗体を用いて 12kDa 糖脂質抗原の発現を調べた結果, 病原性・非病原性に関わらずレプトスピラ属で広く発現しているが (図 2), 試験に用いたレプトスピラ属以外の細菌 10 種では発現がみらず (データ未掲載), レプトスピラ属特異的抗原であることが明らかとなった. 続いて, 感染動物尿中からの抗原検出にモノクローナル抗体 1H6 が利用できるかを検討した. 実験的にレプトスピラを感染させたマウス尿を用いてスロットブロット法による検出系を構築したが, 検出限界は  $10^4$  レプトスピラ/反応系であった (図 3). レプトスピラ感染イヌの尿中へのレプトスピラの排菌量は  $30 \sim 1 \times 10^6$  レプトスピラ/ml との報告がある. 今後モノクローナル抗体の改変などにより検出感度を上げるとともに, 臨床現場でも実施可能な簡便なデバイスの開発を行っていく必要がある.

#### D. 研究発表等

##### 1. 論文発表等

(1) Koizumi N, Mizutani Muto M, Akachi S, Okano S, Yamamoto S, Horikawa K, Harada S,

Funatsumaru S, Ohnishi M. Molecular and serological investigation of *Leptospira* and leptospirosis in dogs in Japan. *J Med Microbiol* 62(4): 630-636, 2013

(2) 小泉信夫, 大西真. レプトスピラ症の現状. *獣医畜産新報*. 66(4):252-254, 2013

(3) 小泉信夫, 大西真, 安富一郎. 人獣共通感染症としてのレプトスピラ症. *臨床獣医*. 31(5):39-42, 2013

(4) 小泉信夫, 武藤麻紀, 大西真. コンパニオンアニマルにおけるレプトスピラ症. *SAC*. 172:17-22, 2013

##### 2. 学会発表等

(1) Mizutani Muto M, Koizumi N, Izumiya H, Ohnishi M. Molecular and serological investigation of *Leptospira interrogans* canine isolates and their influence on clinical features of leptospirosis in dogs. 8<sup>th</sup> Scientific Meeting of International Leptospirosis Society. 2013年10月.

#### E. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表 1. イヌのレプトスピラ症実験室診断結果

依頼先	検査頭数	陽性頭数	陽性犬種別		陽性犬ワクチン接種率 (%)	陽性犬死亡率 (%)	血清診断陽性頭数	血清診断陽性血清群 (陽性数)	分離頭数	分離株のレプトスピラ種およびレプトスピラ血清群 (陽性数)	PCR陽性頭数	陽性臨床検体 (陽性数)
			ペット	狩猟犬								
茨城県	4	1	1	0	100	0	0		1	<i>L. interrogans</i> 血清群 Hebdomadis	0	
千葉県	5	0	—	—	—	—	0		0		0	
東京都	3	0	—	—	—	—	0		0		0	
岐阜県	1	0	—	—	—	—	0		0		0	
大阪府	2	0	—	—	—	—	0		0		0	
兵庫県	1	1	1	0	100	0	1	Hebdomadis	0		0	
広島県	2	2	2	0	100	50	1	Australis	0		1	血液
島根県	1	1	0	1	0	0	1	Hebdomadis	0		0	
福岡県	12	5	4	0	80	80	1	Australis/Hebdomadis	1	<i>L. interrogans</i> 血清群 Hebdomadis	4	血液 (1) 尿 (1) 血液および尿 (2)
熊本県	1	0	—	—	—	—	0		0		0	
鹿児島県	4	3	2	1	33	33	2	Hebdomadis	1	<i>L. interrogans</i> 血清群 Australis	1	血液および尿
合計	36	13	10	2	69	50	6	Australis (1) Australis/Hebdomadis (1) Hebdomadis (3)	3	<i>L. interrogans</i> 血清群 Australis (1) 血清群 Hebdomadis (2)	6	血液 (2) 尿 (1) 血液および尿 (3)



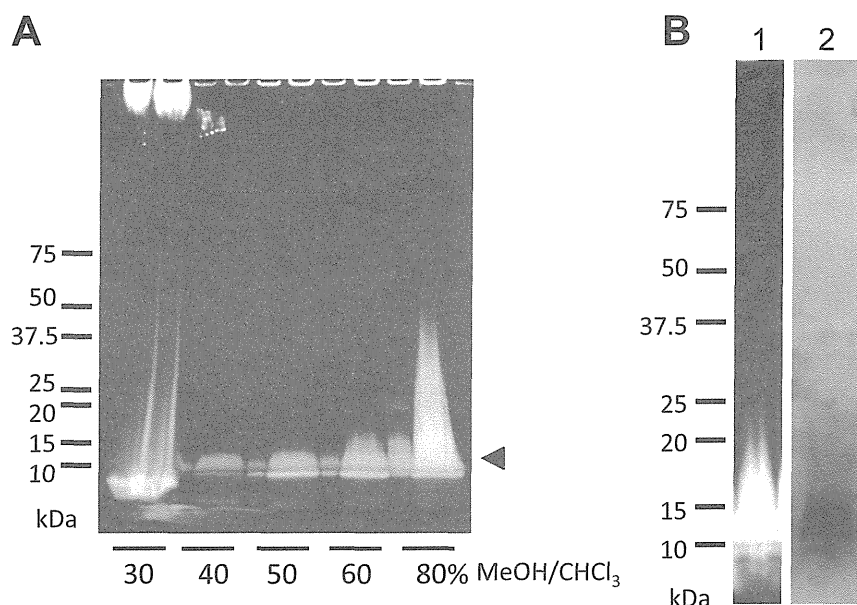


図 1. レプトスピラ属特異的 12 kDa 糖脂質抗原の部分精製.

A. シリカカラム精製後の各溶出画分の SDS/PAGE. 各溶出画分左レーン, サンプル量 2.5 $\mu$ l; 右, 25 $\mu$ l. ProQ Emerald 染色. B. 部分精製 12 kDa 抗原のモノクローナル抗体 1H6 を用いたイムノブロッティング.

レーン 1, ProQ Emerald 染色; 2, イムノブロッティング.

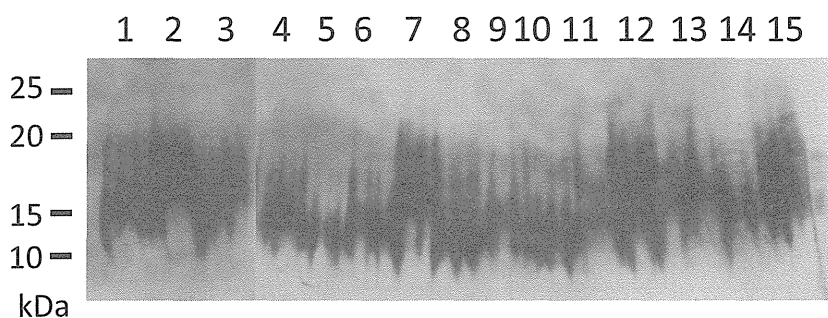


図 2. レプトスピラ属における 12 kDa 抗原の発現. モノクローナル抗体 1H6 を用いたイムノブロッティング.

レーン 1, *L. interrogans* serovar Autumnalis (Akiyami A); 2, *L. interrogans* Hebdomadis (Akiyami B); 3, *L. interrogans* Australis (Akiyami C); 4, *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae (Ictero No.1); 5, *L. interrogans* Canicola (Hond Utrecht IV); 6, *L. interrogans* Pomona (Pomona); 7, *L. interrogans* Hardjo (Hardjoprajitno); 8, *L. borgpetersenii* Poi (Poi); 9, *L. borgpetersenii* Tarassovi (Perepelitsin); 10, *L. noguchii* Panama (CZ214); 11, *L. biflexa* Patoc (Patoc I); 12, *L. weilii* Celledoni (Celledoni); 13, *L. fainei* Hurstbridge (BUT6<sup>T</sup>); 14, *L. noguchii* Louisiana (LSU 1945); 15, *L. santarosai* Shermani (1342 K). レーン 11 は非病原性レプトスピラ. それ以外は病原性レプトスピラ.

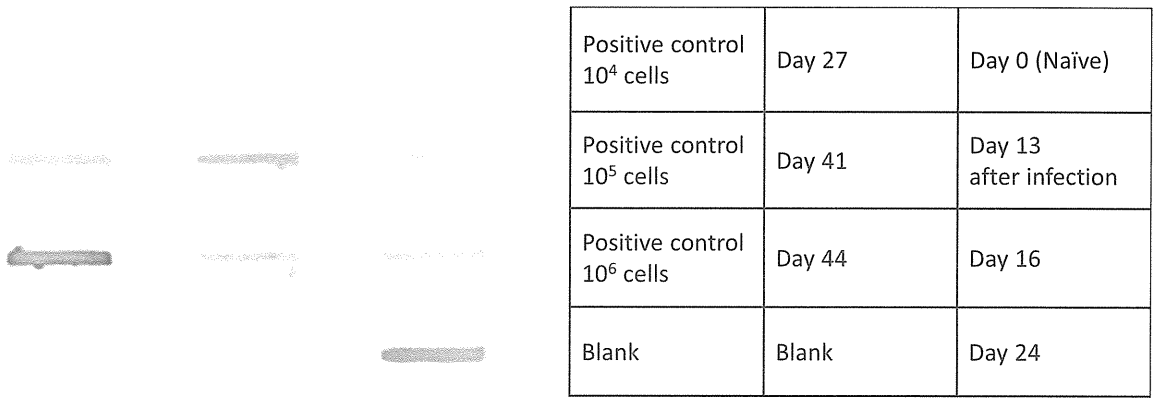


図 3. レプトスピラ感染マウス尿中 12 kDa 糖脂質抗原の検出.

マウス尿 100  $\mu$ l をニトロセルロース膜にブロットし, モノクローナル抗体 1H6 を用いてイムノブロッティングを行った.

## わが国の猫における *Bartonella* および *Chlamydia felis* DNA 保有状況

研究協力者 丸山 総一 日本大学 生物資源科学部  
獣医公衆衛生学研究室 教授

### A. 研究目的

猫ひっかき病の原因菌である *Bartonella henselae* (Bh) と *B. clarridgeiae* (Bc) は猫を自然宿主とし、ネコノミによって伝播されることが知られている。わが国の飼育猫における *Bartonella* の保菌状況は、2000年に10道府県を対象として検討されており、飼育猫の7.2% (50/690) が *Bartonella* を保有することが報告されている。また、2003年に17道府県の飼育猫を対象とした血清学的調査では、飼育猫の8.8% (78/1,447) が抗 *Bartonella* 抗体を保有することが示されている。しかしながら、いずれの研究も調査対象の地域が限定されているため、日本全国の猫における *Bartonella* の分布状況は明らかにされていない。

一方、猫クラミジア症の原因菌である *Chlamydia felis* (Cf) は、猫の粘膜上皮細胞に感染して結膜炎、鼻炎、上部気道炎や肺炎を引き起こし、持続感染期には単球にも感染することが知られている。また、稀ではあるが、Cfは人にも結膜炎を起こすことがあり、血清学的な調査では、猫と接触する機会の多い獣医師は一般人と比較し、抗 Cf 抗体保有率が高いことも報告されている。猫における Cf の感染状況は血清学的な研究から、野猫の45.5%、飼育猫の12.3% が Cf 抗体を保有していたことが報告されているものの、本菌に持続感染している猫については充分検討されていない。

そこで本研究では、猫を原因とする人獣共通感染症の疫学解明の一環として、日本全国47道府県の飼育猫の血液抽出 DNA

材料を用いて、*Bartonella* ならびに Cf の DNA 保有状況を検討した。

### B. 研究方法

2007～2008年に、47都道府県の動物病院に来院した1,754頭の飼育猫から血液を採取した。猫血液から市販のDNA抽出キットを用いてDNAを抽出し、16S-23S rRNA (ITS) 領域を標的とした nested-PCR を用いて *Bartonella* DNA を検出した。Cf については、まず、23S rRNA 領域を標的とした *Chlamydiaceae* 特異的 PCR を行い、陽性を示した猫について、Cf 特異的 PCR あるいは DNA シーケンス法によって Cf DNA が確認された個体を Cf DNA 陽性と判定した。*Bartonella* DNA 陽性率ならびに Cf DNA 陽性率は、猫の性別、年齢、飼育地域、外出状況、FIV・FeLV 感染の有無別、および Cf ワクチン接種歴別 (Cf DNA 陽性率のみ) に比較・検討した。

### C. 研究結果

今回検討したわが国の猫における *Bartonella* DNA の陽性率は4.6%で、Bhが2.2%、Bcが1.5%、Bh + Bcが0.8%であった。性別の陽性率は、オスで4.6%、メスで4.4%、年齢別では、1歳未満が6.4%、1歳以上が4.3%となり、1歳未満で高い傾向を示した。飼育地域別の陽性率は、東日本の2.3%に比べ西日本が5.9%と有意に高い値を示した。猫の外出日数別にみた陽性率は、0日で0%、1日で3.5%、2～6日で4.0%、7日で4.9%と、外出日数の増加とともに陽性

率が高くなった。FIV または FeLV 感染猫の *Bartonella* 陽性率はそれぞれ 6.4%, 7.7% で、それぞれの非感染猫の陽性率の 4.0%, 4.1% に比べ有意に高い値を示した (表 1)。Cf DNA 陽性率は、全体で 2.6% であった。性別の陽性率は、雄で 2.8%, 雌で 2.5%, 年齢別では、1 歳未満が 3.2%, 1 歳以上が 2.6% であった。飼育地域別の猫の陽性率は、西日本が 2.9%, 東日本が 2.2% であった。FIV あるいは FeLV 感染猫における Cf 陽性率はそれぞれ 2.0%, 2.4% となり、非感染猫の 2.8%, 2.7% と比較して有意差は認められなかった。猫の外出日数別に見た陽性率は、0 日で 0%, 1 日で 2.0%, 2~6 日で 1.8%, 7 日で 2.8% であった (表 1)。

#### D. 考察

今回検討したわが国の飼育猫における *Bartonella* DNA 陽性率は 4.6% (80/1,754) であった。2000 年の飼育猫を対象とした研究では、7.2% (50/690) から *Bartonella* が分離されているが、今回の陽性率が低かった原因として、検出方法あるいは調査地域を拡大したこと等が影響している可能性が考えられた。年齢別では、1 歳未満の猫は 1 歳以上の猫よりも高い値を示した。これより、若齢猫では初感染の個体が多く、*Bartonella* に対する特異免疫が確立されていない個体が多い可能性が推察された。また、西日本の猫は東日本のそれと比較して有意に高い陽性率を示した。温暖な気候の西日本ではベクターとなるネコノミが広く分布しており猫への寄生率が高いためと推察された。外出日数の増加に伴い陽性率が増加する傾向が見られた理由として、外出により *Bartonella* に感染した野猫との接触やネコノミの寄生を受ける機会が増加したためと考えられた。FIV あるいは FeLV に感染した猫では、これらが陰性の猫と比べ、

*Bartonella* DNA 陽性率が有意に高かった。これは、両ウイルスの伝播経路は *Bartonella* と同様に猫同士のけんかによる創傷感染であることが原因であると考えられた。

わが国の飼育猫の 2.6% から Cf DNA が検出された。欧州の調査では、眼疾患を有する猫の結膜スワブから高率 (14.3~39.0%) に Cf DNA が検出されている。また、Cf を実験感染させた猫では、感染 3 日目に結膜や瞬膜から本菌が分離されるものの、血液からはほとんど分離されない。一方、持続感染期には、Cf は猫の単球に感染し、血液中出现することから、本研究の猫の陽性率は持続感染期における猫の Cf 感染状況を反映していることが推察された。毎日外出する猫は、最も高い Cf 陽性率を示した。Cf は猫の分泌物を介して伝播することから、頻繁に外出する飼育猫は野猫との接触等により感染した可能性が高いと考えられた。猫の性別・年齢・飼育地域あるいは FIV、FeLV 感染と Cf DNA 陽性率の間に関連性は認められなかったが、Cf に対するワクチン接種歴の有る猫の陽性率は、接種歴の無い猫に比べ低かった。今後、本菌の感染標的部位である結膜の粘膜上皮細胞を含んだスワブを用いて、Cf の感染状況をより詳細に検討する必要があると思われた。

#### E. 研究発表等

##### 1. 論文発表等

(1) 微生物の簡易迅速検査法, 第 10 項 愛玩動物の感染症の簡易迅速診断, 株式会社テクノシステム (東京), 2013 年 11 月 16 日

(2) ペットからの感染症, トキソプラズマ症—小児科, 54(1); 37-41, 金原出版 (東京), 2013 年