

原株と Ni-CE 株の末梢感染性の違いに主にウイルス P 遺伝子が関連することが判明した(図 1)。さらに、マウスを用いた検討により、筋肉内接種後、西ヶ原株及び CE(NiP)株が Ni-CE 株よりも効率よく末梢神経に感染することが判明した。さらに、*in vivo* 及び *in vitro* 実験系の両者において、西ヶ原株及び CE(NiP)株が Ni-CE 株よりも効率よく筋肉細胞で増殖することが確認された。すなわち、西ヶ原株の P 蛋白質が筋肉細胞におけるウイルスの増殖を支持し、結果として末梢神経のウイルス感染を促進する機能を有していることが強く示唆された。

そこで本年度は、より詳細な機序の解明を目的として、マウス運動神経細胞の分離培養系(細胞体と軸索末端を別々の区画で培養した初代神経細胞)を用いて、神経軸索末端からの CE(NiP)株及び Ni-CE 株の感染能を比較した。さらに、IFN 拮抗蛋白質として知られる P 蛋白質の機能(Brzózka et al. J Virol. 2005 他)に着目し、西ヶ原株、CE(NiP)株及び Ni-CE 株の感染筋肉細胞における IFN 関連遺伝子の発現量を比較した。

## B. 研究方法

マウス運動神経細胞の分離培養系は、以下のように作製した。まず、ICR マウスの子宮より摘出した 13 日目胚から脊髄を採取し、背根部を除去したものをトリプシン処理することで運動神経細胞を得た。これらの神経細胞を、ポリジメチルシロキサンを用いて作製したマイクロ流体プラットフォーム(図 2)の細胞体側の太流路内に播種した。細胞体側のウェルには 120  $\mu$ /ウェル、軸索末端側のウェルには 140  $\mu$ /ウェルの培養液を満たし(軸索末端側の培養液が細胞体側に逆流し

ないことを予め確認)、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で細胞を培養した。培養 5 日目に細流路に入り込んだ軸索が、その末端を反対側の太流路内に伸長していることを確認した後に、以下の実験に使用した。

CE(NiP)株及び Ni-CE 株の軸索末端からの感染能を比較する目的で、上記の方法で作製した分離培養系の軸索末端側のウェルに  $1 \times 10^6$  FFU の GFP 遺伝子組換え CE(NiP)株あるいは Ni-CE 株 [それぞれ CE(NiP)-GFP 株、Ni-CE-GFP 株] を接種した。ウイルス接種 24、36 および 48 時間後に、蛍光顕微鏡下で神経細胞体における GFP シグナルを観察し、撮影した。撮影された画像に基づき、細胞体側の太流路における GFP 陽性細胞の割合を算出した。

西ヶ原株、CE(NiP)株及び Ni-CE 株に感染した筋肉細胞における IFN 関連遺伝子の発現量を比較する目的で、マウス骨格筋由来 G-8 細胞及び C2C12 細胞に各株を moi=1 にて接種した。接種 24 時間後に、感染細胞から RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いた逆転写反応を行った。得られた cDNA を鋳型として、リアルタイム PCR 法(TaqMan 法)により各種 IFN 関連遺伝子(*Ifn- $\beta$* 、*Mx1* 及び *Oas1*)の定量を行った。なお、*Gapdh* 遺伝子についても定量を行い、内在性コントロールとして使用した。1 条件あたり 3 ウェルの細胞を用いて実施し、*Gapdh* 遺伝子に対する各々の遺伝子の相対発現量の平均値及び標準誤差を算出した。

(倫理面からの配慮について)

マウス運動神経分離培養系の作出のための動物実験は岐阜大学動物実験委員会によって承

認された。(動物実験承認番号:12090)。GFP 遺伝子組換えウイルスを用いた実験は、文部科学大臣の確認後に実施している(22 受文科振第 2170 号)。また、本実験は、岐阜大学組換え DNA 安全委員会の承認を得ている(22 岐大術産 第 7 号の 30)。

### C. 研究結果

軸索末端からの神経細胞へのウイルス感染能を検討する目的で、Ni-CE-GFP 株または CE(NiP)-GFP 株を神経細胞の軸索末端に接種し、GFP シグナルを観察した。その結果、いずれの株を接種した神経細胞においても、その細胞体で明瞭な GFP シグナルが観察された(図 3A)。GFP 陽性細胞の割合は、いずれの株においても、最初に GFP シグナルが確認された接種後 24 時間以降、経時的に増加した(図 3B)。以上より、Ni-CE 株は CE(NiP)株と同様、軸索末端から神経細胞に感染する能力を有していることが示され、その能力に顕著な差がないことが示唆された。

西ヶ原株及び CE(NiP)株感染 G-8 細胞における *Iffn-β* 遺伝子の発現量は、Ni-CE 株感染細胞に比べて有意に低く( $p < 0.05$ )、それぞれ約 1/47 及び 1/10 であった(図 4A)。また、各株感染 C2C12 細胞における *Iffn-β* 遺伝子の発現量についても同様に、西ヶ原株及び CE(NiP)株感染細胞における発現量は、Ni-CE 株感染細胞に比べて有意に低かった( $p < 0.05$ ) (図 4B)。以上より、西ヶ原株及び CE(NiP)株は、感染筋肉細胞において、Ni-CE 株よりも効率良く IFN 産生を抑制することが示された。

西ヶ原株及び CE(NiP)株を感染させた G-8 細胞における *Mx1* 遺伝子の発現量は、Ni-CE 株感

染細胞に比べて有意に低く( $p < 0.05$ )、それぞれ約 1/74 及び 1/14 であった(図 5A)。また、各株感染 G-8 細胞における *Oas1* 遺伝子発現量についても同様に、西ヶ原株及び CE(NiP)株感染細胞における発現量は、Ni-CE 株感染細胞に比べて有意に低かった( $p < 0.05$ ) (図 5B)。以上より、西ヶ原株及び CE(NiP)株は、感染筋肉細胞において、Ni-CE 株よりも効率良く IFN 誘導遺伝子の発現を抑制することが示された。

### D. 考察

以前、強い末梢感染性を有する西ヶ原株及び CE(NiP)株が、弱い末梢感染性を有する Ni-CE 株よりも効率よく筋肉細胞で増殖することを示した。このことは、西ヶ原株 P 蛋白質が筋肉細胞におけるウイルス増殖に重要であることを示すと同時に、そのウイルス増殖が末梢神経の感染を成立させる上で重要な役割を担っていることを示唆している。

一方で、西ヶ原株 P 蛋白質が軸索末端からのウイルス感染を直接的に促進している可能性も挙げられる。しかし、狂犬病ウイルスの粒子構造、ならびに末梢神経への本ウイルスの侵入及び軸索輸送の機序を考慮した場合、この可能性は極めて低いことが予想された。すなわち、狂犬病ウイルス P 蛋白質は、ヌクレオカプシドの構成要素としてウイルス粒子の内部に位置している。一方、狂犬病ウイルスはヌクレオカプシドではなくウイルス粒子として軸索輸送される(Klingen et al., J. Virol. 2008)。理論上、軸索末端からのウイルスの侵入及び軸索輸送の過程で、P 蛋白質がウイルス粒子の外側に露出されることはないと考えられるため、上記の過程において P 蛋白質が末梢

神経の感染に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

この点を実験的に検証するため、本研究では、マウス運動神経細胞の分離培養系を用いて、CE(NiP)株及び Ni-CE 株の軸索末端からの感染能力を比較した。その結果、上記の予想と一致して、両株とも軸索末端から神経細胞に感染する能力を有していることが確認された(図 3)。以上より、西ヶ原株 P 蛋白質が軸索末端からの神経細胞の感染を直接的に促進しているのではなく、筋肉におけるウイルス増殖を促進した結果、間接的に末梢神経の感染効率を高めていることが強く示唆された。

本研究により、西ヶ原株及び CE(NiP)株に感染した培養筋肉細胞では、Ni-CE 株感染細胞よりも *Irf-β* 遺伝子の発現量が低いことが明らかとなった(図 4)。これと一致して、IFN によって発現誘導されることが知られる *Mx1* 及び *Oas1* 遺伝子でも同様の結果が得られた(図 5)。狂犬病ウイルスの P 蛋白質は、IRF-3 のリン酸化を阻害することにより IFN の誘導を阻害することが知られていることから(Brzózka et al. J Virol. 2005)、西ヶ原株 P 蛋白質とは対照的に、Ni-CE 株 P 蛋白質が筋肉における IRF-3 阻害能を欠落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)の P 蛋白質は、その IFN 拮抗作用を介して、筋肉細胞でのウイルス増殖を支持し、結果として末梢神経の感染効率を高めていることが強く示唆された。

L. 健康危険情報  
該当なし

#### M. 研究発表

##### 1.論文発表

Yamaoka S, Ito N, Ohka S, Kaneda S, Nakamura H, Agari T, Masatani T, Nakagawa K, Okada K, Okadera K, Mitake H, Fujii T, Sugiyama M. Involvement of the rabies virus phosphoprotein gene in neuroinvasiveness. J. Virol. 2013. 87:12327-12338.

##### 2.学会発表

11) Yamaoka S, Ito N, Nakagawa K, Okada K, Okadera K, Sugiyama M. Rabies virus phosphoprotein gene functions to facilitate viral neuroinvasion by viral replication in muscle. XV International Conference on Negative Strand Viruses, Granada, Spain (2013. 6)

12) 山岡理子、伊藤直人、大岡静衣、金田祥平、中村寛子、岡田和真、岡寺康太、藤井輝夫、杉山誠:狂犬病ウイルスの末梢神経感染機序における P 遺伝子の役割: 第 61 回日本ウイルス学会、神戸(2013, 11)

13) 岡田和真、伊藤直人、山岡理子、岡寺康太、杉山誠:狂犬病ウイルス P 蛋白質アイソフォーム(P3~P5)は病原性に関与す

る:第61回日本ウイルス学会、神戸(2013,

11)

2. 実用新案登録

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

3. その他

1. 特許取得

なし

なし

| ウイルス株   | ゲノム構成             | 末梢感染性 |
|---------|-------------------|-------|
| 西ヶ原     | N   P   M   G   L | ++    |
| Ni-CE   | □   □   □   □   □ | -     |
| CE(NiP) | □   ■   □   □   □ | +     |

図1. 本研究で使用したウイルス株

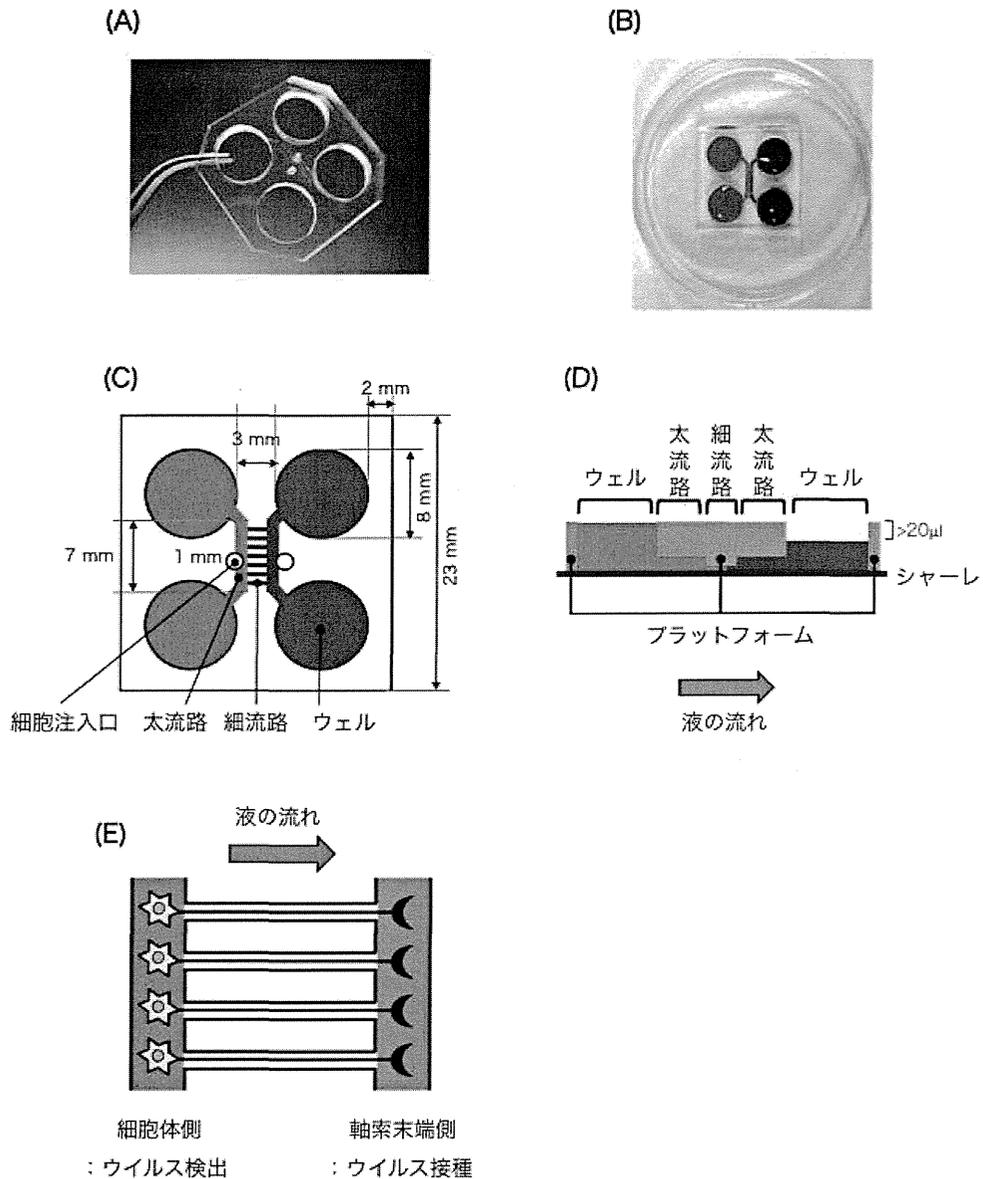


図2 神経細胞分離培養系マイクロ流体システムの外観及び模式図

(A) マイクロ流体システムに用いたプラットフォーム。(B) マイクロ流体システムの上からの外観。ウェルには、赤色または青色の色液を満たした。(C) プラットフォームの模式図。(D) マイクロ流体システムの断面の模式図。両側ウェル間において $20\mu\text{l}$ 以上の液量差が存在すれば、液の移動は静水圧により厳密に制御可能であることを確認した。(E) プラットフォームに播種された神経細胞の模式図。左側の太流路内に播種された細胞は、その軸索末端を反対側の太流路内へと伸長する。

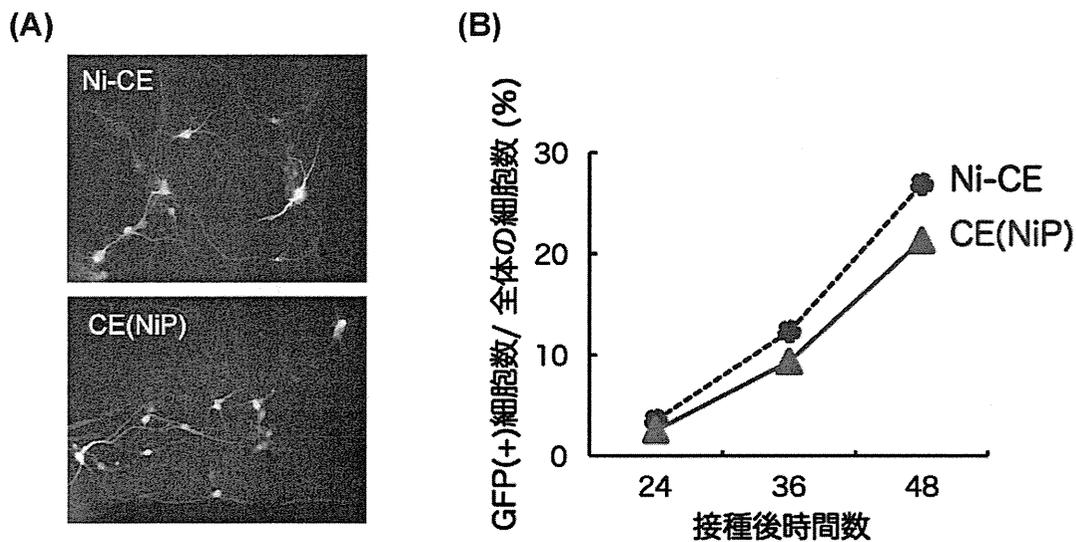


図3. マウス運動神経細胞の分離培養系を用いた軸索末端からの感染能の比較

(A) 接種後 48 時間において細胞体に確認された GFP シグナル

(B) GFP 陽性細胞の割合の経時的変化

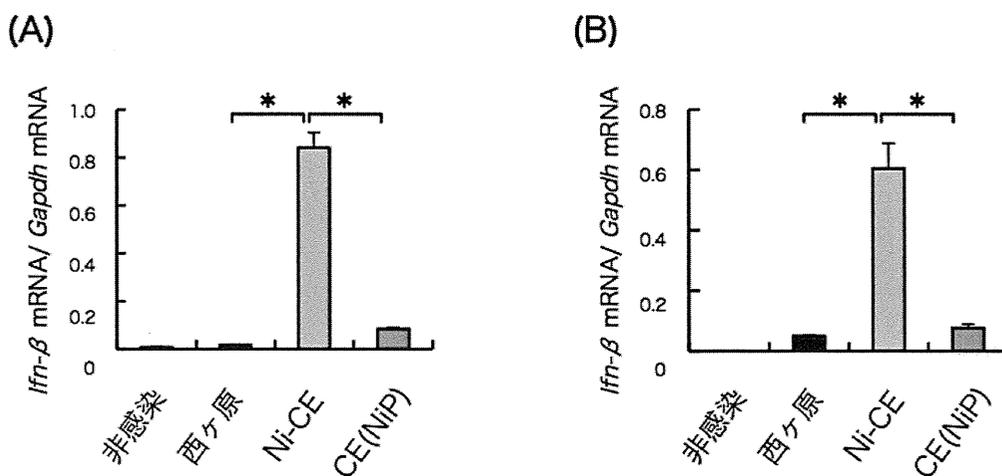
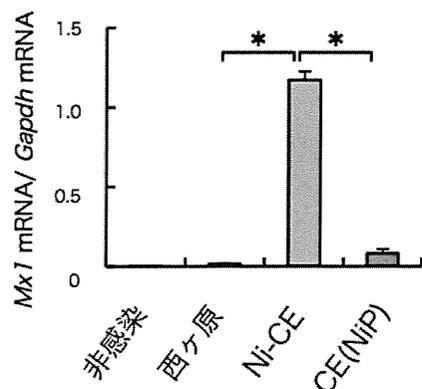


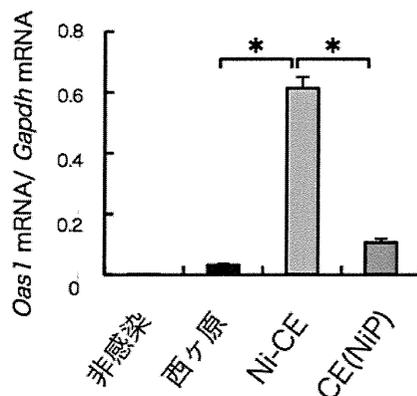
図4 各株を接種した培養筋肉細胞における *Ifn-β* 遺伝子の発現量

(A) G-8細胞、(B) C2C12細胞に西ヶ原株、Ni-CE株またはCE(NiP)株をMOI=1で接種し、接種24時間後に感染細胞における *Ifn-β* 遺伝子発現量をリアルタイムPCRにて定量した。ウイルス希釈液のみを接種したものを非感染とした。エラーバーは標準誤差を示す (n=3)。\*: $p < 0.05$

(A)



(B)



### 図5 各株を接種した培養筋肉細胞におけるIFN誘導遺伝子の発現量

G-8細胞に西ヶ原株、Ni-CE株またはCE(NiP)株をMOI=1で接種し、接種24時間後に感染細胞における (A) *Mx1*、(B) *Oas1* 遺伝子発現量をリアルタイムPCRにて定量した。ウイルス希釈液のみを接種したものを非感染とした。エラーバーは標準誤差を示す (n=3)。\*: $p < 0.05$

ブルセラ症の診断法の開発  
(無尾類からの新規ブルセラ属菌の分離と解析)

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 宇根 有美 麻布大学 獣医学部 獣医学科 教授

**研究要旨:** 外国産および在来種の無尾類 5 種 14 個体について、ブルセラ属菌の遺伝子検出と菌分離を実施したところ、イエアマガエル、デニスフロッグからのそれぞれ 1 株、計 2 株が分離された。これら、分離株 2 株は、Combinatorial-PCR、多座遺伝子解析(MLSA9)の結果、いずれも新規のブルセラ属菌であった。また、9 座連結による系統樹解析により、家畜ブルセラ菌、イヌブルセラ菌、Marine Brucella のクレードとは異なり、*B. inopinata*、既報の無尾類分離株 2 株と共に単系統クレードを構成することが明らかとなった。今回の分離菌株は、*B. inopinata* 近縁の新規ブルセラ属菌である可能性が示された。

最近縁である *B. inopinata* は患者より分離されたことがあり、ヒトに感染しうる考えられている。今回分離された新規のブルセラ属菌については、ヒトや家畜等の動物への感染リスクを明らかにするためにも、その抗原性、薬剤耐性、生化学性状等、さらに詳細な分析が必要である。

#### A. 研究目的

ブルセラ属菌を起炎菌とするブルセラ症は、世界中の多くの国と地域で未だ主要な人獣共通感染症である。近年では、海棲哺乳類由来のブルセラ菌(Marine Brucella)や、novel ブルセラと称される新種のブルセラ属菌が、齧歯類、食肉類、霊長類、さらにヒト患者からも分離されている(表 1)。

一昨年後半には、無尾類に由来する新たなブルセラ属菌が、米の異なるグループにより相次いで報告され、ヒトと家畜への感染の可能性が示唆された(Eisenberg et al 2012、Fischer et

al. 2012)。我が国にも種々の外国産無尾類がペットトレードを通じ毎年、多数輸入販売されている。また、実験用の *Xenopus* とは別種の外国産無尾類の国内商業ブリーダーが複数存在し、相当数の生産個体がペット市場に供給されているものと思われる。

そこで、外国産および在来種の無尾類の生体サンプルについて、ブルセラ属菌の遺伝子検出と菌分離を実施し、それら無尾類のブルセラ属菌保有の有無およびヒトと他の動物への伝播の可能性を検討した。

#### B. 研究方法

国内 2 カ所の両生類飼育施設で発生した、黒色真菌症のアウトブレイク時に採取された外国産および在来種の無尾類 5 種 14 個体の臓器サンプル 32 検体を用いた(表 2)。

検体は、ビードビーターで粉碎後、一部を菌分離に使用し、残りのサンプルから DNA を抽出した。

ブルセラ特異的遺伝子検出は、当室で実施している、ブルセラ症の原因となる家畜ブルセラ菌 3 種とイヌブルセラ菌、計 4 種を簡易的に識別可能な Combinatorial-PCR 法(4 プライマーセット: bcsp31 1 セット、omp2 2 セット、omp31 1 セット)を実施した(表 2)。

菌分離は、粉碎後の検体をブルセラ選択サプリメント(関東化学 SR83)添加 20%ウマ血清入り ATCC488 ブロスで培養、適宜、BHI プレートにサブカルチャーし、発育してきたコロニーを釣菌し、分離株については、Combinatorial-PCR 法により確認した。さらに分離株については多座遺伝子解析(MLSA 9、Whatmore et al. 2007)による同定を行った。MLSA 9 に用いた DNA マーカーおよびプライマー配列は表 3 に示す。MLSA9 は、4 種の家畜ブルセラ菌、*B. canis*、*B. neotomae*、および Marine Brucella を 1~27 のシーケンスタイプ(ST)に識別し菌種と生物型を決定することができる。また、これら 9 座合計 4396bp の配列を用いて系統樹解析を行い、分離株のブルセラ属中での系統発生上の位置を確認した。

### C. 研究結果

Combinatorial-PCR の結果、検体番号 10-4、10-5(イエアメガエル)、14-1(デニスフロッグ)が複数のプライマーセットで、検体番号 11-5(種不明)が、BCSP31 プライマーのみで、それぞれ陽性を示した(図 1)。

菌は、検体番号 10-5(イエアメガエル、大腿骨・骨髄)、14-1(デニスフロッグ、肝臓)から、各 1 株、計 2 株が分離された。分離株のコロニーは、どち

らも白から乳白色を呈するスムーズ型であった。分離株はブルセラ特異的 PCR 陽性であり、2 株ともに *B. suis*、*B. neotomae* と同様の陽性パターンを示した(図 2)。これらのことから、分離された株は、ブルセラ属菌であると判断された。

次に、今回、無尾類より分離された 2 株、に Eisenberg らの無尾類分離株 2 株(2012)の配列データを加え MLSA9 によるタイピングを行った。その結果、今回の無尾類分離株 2 株は、互いに全く同じパターンを示し、既知の ST のいずれとも異なっており、*B. inopinata*、*B. microti* および Eisenberg らの無尾類分離株 2 株に近縁の新規のブルセラ属菌であると考えられた(表 4)。

9 遺伝子座のシーケンス(計 4396bp)による系統樹解析でも同様に、今回の無尾類分離株 2 株は、家畜ブルセラ菌、イヌブルセラ菌、Marine Brucella のクレードと離れて *B. inopinata*、Eisenberg らの無尾類分離株 2 株と共に単系統クレードを構成することが明らかとなった(図 3)。

### D. 考察

外国産および在来種の無尾類 5 種 14 個体の生体サンプル 32 検体について、ブルセラ属菌の遺伝子検出と菌分離を実施したところ、イエアメガエル、デニスフロッグからのそれぞれ 1 株、計 2 株が分離され、特異的 PCR によりブルセラ属菌と判定された。

さらに、多座遺伝子解析(MLSA9)の結果、分離株 2 株は互いに全く同じパターンを示したものの、既に知られている 1-27 のシーケンスタイプ(ST)のいずれとも一致しなかった。その中で、最も近いシーケンスタイプを有していたのは、2012 年に報告された Eisenberg らの無尾類分離株 2 株と 2005 年に米国でヒト患者から分離された *B. inopinata* BO1 の 3 株であり、9 座連結(4396bp)による系統樹解析でもこれらとともに単系統クレードを形成した。以上のことより、今回の分離菌株は、*B. inopinata* 近縁の新規ブルセラ属菌である可能性が示された。

これら 2 菌種に対するウサギ抗血清を作成し、それぞれに対する反応性を ELISA で検討した。その結果、いずれもホモでは強い反応性を示すのに対し、ヘテロでは反応性の明らかな減弱が認められたことから(データは示さず)、これら 2 菌種には明らかな抗原性の違いがあると推測された。これについては、今後、さらに検討を加えていく予定である。

分離株 10-5 が分離されたイエアメガエル (*Litoria caerulea*) は、オセアニア原産、樹上棲種で、日本では、主に野生捕獲個体とごく少数の飼育下で繁殖された個体が輸入、流通している。分離株 14-1 の宿主であったデニスフロッグ (*Polypedates dennysii*) は、東南アジア原産、樹上棲である。野生捕獲個体が輸入、流通する。

遺伝子解析の結果、今回のブルセラ分離株に、*B. inopinata* とともに最近縁であった Eisenberg らの無尾類分離株 2 株は、いずれもアフリカ大陸南部に広く分布する地上性の大型種、アフリカウシガエル (*Pyxicephalus adspersus*) に由来する。

イエアメガエルとデニスフロッグ(どちらもアマガエル科)とアフリカウシガエル(アフリカウシガエル科)は無尾類中で系統上の位置が隔たっており、地理的にも東南アジア、オセアニアとアフリカに隔たった分布域をもっている。さらに、それら無尾類分離株と同じクレードの *B. inopinata*(宿主不明)は、北アメリカ大陸で分離されている。よって、これらのブルセラ属菌の共通祖先は、無尾類を宿主として共進化を遂げ分布を広げたと考えることもできる。

*B. inopinata* は、患者から分離され、ヒトに感染しうることが知られている。今回の系統解析の結果から、*B. inopinata* に、きわめて近縁であった我々の無尾類分離株 2 株と Eisenberg らの無尾類分離株 2 株についても、ヒトと他の動物に対し病原性をもつ可能性がある。

## E. 結論

本研究において、2 種の無尾類からの分離株

2 株は、いずれも新規のブルセラ属菌であった。

ブルセラ属菌が分離された 2 種の無尾類、さらに独、米のグループがブルセラ属菌を分離したそれぞれ別種の無尾類(ムシクイオオクサガエル・アフリカウシガエル)は、いずれも日本に輸入され、国内のペット市場を通じて販売され、広く飼育されている。今回の分離株はいずれも、ヒトに感染しうる *B. inopinata* にブルセラ属菌中で最近縁であった。未だ無尾類由来のブルセラ属菌によるヒト症例の報告は、ないものの、飼育者への感染も起こりえるのではないかと懸念される。これら感染リスクを明らかにするためにも、無尾類分離株の抗原性、薬剤耐性、生化学性状等、さらに詳細な分析が必要である。

また、今回、遺伝子解析に用いた MLSA9 では、我々と Eisenberg らの無尾類分離株を含む *B. inopinata* 類におけるクレード内での種の境界を決定するには、遺伝子データが不足している。新たな DNA マーカーを用いることも考えられるが、フルゲノムでの比較が必要かつ有効かもしれない。

## \* 参考文献

1. De BK, Stauffer L, Koylass MS, Sharp SE, Gee JE, Hesel LO, Steigerwalt AG, Vega R, Clark TA, Daneshvar MI, Wilkins PP, Whatmore AM. 2008. Novel Brucella strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. J Clin Microbiol. 46, 43-9.
2. Eisenberg T, Hamann HP, Kaim U, Schlez K, Seeger H, Schauerte N, Melzer F, Tomaso H, Scholz HC, Koylass MS, Whatmore AM, Zschöck M. 2012. Isolation of potentially novel Brucella spp. from frogs. Appl Environ Microbiol. 78, 3753-5.
3. Fischer D, Lorenz N, Heuser W, Kämpfer P, Scholz HC, Lierz M. 2012. Abscesses associated with a Brucella inopinata-like bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*). J Zoo Wildl Med. 43, 625-8.

4. Whatmore AM, Perrett LL, MacMillan AP. 2007. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiol.* 20, 7-34.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表等

##### 1. 論文発表等

(1) 今岡浩一. 犬ブルセラ症ー特集・診断シリーズ・感染症. in : SA Medicine, インターズー, pp.53-56, 2013

##### 2. 学会発表等

(1) Koichi Imaoka. Development of diagnostic methods for brucellosis - Sero-epidemiology of *Brucella canis* infection in dogs in Japan. 10th Japan-Taiwan Symposium on Antibiotics resistance and Foodborne Disease, Tokyo, Sep. 12-13, 2013

(2) 鈴木道雄, 中藤学, 度会雅久, 木村昌伸, 堀内基広, 長谷耕二, 飛梅実, 阿戸学, 森川茂, 山田章雄, 大野博司, 今岡浩一. *Brucella abortus*は腸管パイエル板からの侵入にM細胞上のプリオン蛋白質 (PrPc) を利用する. 第155回日本獣医学会学術集会, 東京, 2013

(3) 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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表 1 : ブルセラ属菌と主なホスト

| Brucella sp.            | Main Host                                   |                  |
|-------------------------|---|------------------|
| <i>B. melitensis</i>    | caprine, ovine                              | Classic Brucella |
| <i>B. abortus</i>       | Bovine                                      |                  |
| <i>B. suis</i>          | porcine, wild boar, hare, caribou, reindeer |                  |
| <i>B. canis</i>         | canine                                      |                  |
| <i>B. ovis</i>          | ovine                                       |                  |
| <i>B. neotomae</i>      | desert wood rat ( <i>Neotoma lepida</i> )   |                  |
| <i>B. pinnipedialis</i> | Seal  | Marine Brucella  |
| <i>B. ceti</i>          | Dolphin, Porpoise, Whale                    |                  |
| <i>B. microti</i>       | common vole ( <i>Microtus arvalis</i> )     | Novel Brucella   |
| <i>B. inopinata</i>     | unknown                                     |                  |
| NVSL 07-0026            | baboon ( <i>Papio</i> sp.)                  |                  |
| F965                    | Red fox ( <i>Vulpes vulpes</i> )            |                  |

表 2 : 無尾類検体のプロファイルとブルセラ特異的 PCR と菌分離の結果  
 + : PCR 陽性、◎ : ブルセラ属菌分離

| サンプル No. | 動物種                                    | 原産地                                | 体重    | 頭胴長  | 性別 | 臓器       | PCR sample No. | PCR result      |        |        |       | 菌分離 |   |   |
|----------|--|------------------------------------|-------|------|----|----------|----------------|-----------------|--------|--------|-------|-----|---|---|
|          |  |                                    |       |      |    |          |                | Brucella primer |        |        |       |     |   |   |
|          |  |                                    |       |      |    |          |                | BCSP31          | Omp2ab | Omp2ca | Omp31 |     |   |   |
| 1-5      | ヒキガエル ( <i>Bufo japonicus</i> )        | Japan                              | 55.33 | 8.7  | ♀  | 大腿骨 (骨髓) | 1              |                 |        |        |       |     |   |   |
| 2-5      | ヒキガエル ( <i>Bufo japonicus</i> )        | Japan                              | 70.64 | 9.3  | ♀  | 大腿骨 (骨髓) | 2              |                 |        |        |       |     |   |   |
| 3-5      | サビトマトガエル ( <i>Dyscophus guineti</i> )  | Madagascar                         | 92.98 | 9.7  | ♀  | 大腿骨 (骨髓) | 3              |                 |        |        |       |     |   |   |
| 4-5      | ヒキガエル ( <i>Bufo japonicus</i> )        | Japan                              | 65.03 | 10.3 | ♀  | 大腿骨 (骨髓) | 4              |                 |        |        |       |     |   |   |
| 5-5      | イエアメガエル ( <i>Litoria caerulea</i> )    | New Guinea, Australia, New Zealand | 74.75 | 9.5  | ♂  | 大腿骨 (骨髓) | 5              |                 |        |        |       |     |   |   |
| 6-5      | サビトマトガエル ( <i>Dyscophus guineti</i> )  | Madagascar                         | 96.5  | 9.6  | ♀  | 大腿骨 (骨髓) | 6              |                 |        |        |       |     |   |   |
| 7-1      | サビトマトガエル ( <i>Dyscophus guineti</i> )  | Madagascar                         | 37.81 | 6.2  | ♂  | 肝        | 7              |                 |        |        |       |     |   |   |
| 7-2      |  |                                    |       |      |    | 腎        | 8              |                 |        |        |       |     |   |   |
| 7-4      |  |                                    |       |      |    | 心        | 9              |                 |        |        |       |     |   |   |
| 7-5      |  |                                    |       |      |    | 大腿骨 (骨髓) | 10             |                 |        |        |       |     |   |   |
| 8-1      | ヒキガエル ( <i>Bufo japonicus</i> )        | Japan                              | 24.83 | 7    | ♂  | 肝        | 11             |                 |        |        |       |     |   |   |
| 8-2      |  |                                    |       |      |    | 腎        | 12             |                 |        |        |       |     |   |   |
| 8-3      |  |                                    |       |      |    | 脾        | 13             |                 |        |        |       |     |   |   |
| 8-4      |  |                                    |       |      |    | 心        | 14             |                 |        |        |       |     |   |   |
| 8-5      |  |                                    |       |      |    | 大腿骨 (骨髓) | 15             |                 |        |        |       |     |   |   |
| 9-1      | サビトマトガエル ( <i>Dyscophus guineti</i> )  | Madagascar                         | 21.69 | 6.3  | ♂  | 肝        | 16             |                 |        |        |       |     |   |   |
| 9-2      |  |                                    |       |      |    | 腎        | 17             |                 |        |        |       |     |   |   |
| 9-4      |  |                                    |       |      |    | 心        | 18             |                 |        |        |       |     |   |   |
| 9-5      |  |                                    |       |      |    | 大腿骨 (骨髓) | 19             |                 |        |        |       |     |   |   |
| 10-3     | イエアメガエル ( <i>Litoria caerulea</i> )    | New Guinea, Australia, New Zealand | 9.81  | 6    | ♂  | 脾        | 20             |                 |        |        |       |     |   |   |
| 10-4     |  |                                    |       |      |    | 心        | 21             | +               |        |        | +     |     |   |   |
| 10-5     |  |                                    |       |      |    | 大腿骨 (骨髓) | 22             | +               | +      | +      | +     | +   | + | ◎ |
| 11-5     | 種不明                                    | 不明                                 | 2.18  | 4.4  | ♀  | 大腿骨 (骨髓) | 23             | +               |        |        |       |     |   |   |
| 12-1     | サビトマトガエル ( <i>Dyscophus guineti</i> )  | Madagascar                         | 66.58 | 8.3  | ♀  | 肝        | 24             |                 |        |        |       |     |   |   |
| 12-2     |  |                                    |       |      |    | 腎        | 25             |                 |        |        |       |     |   |   |
| 12-4     |  |                                    |       |      |    | 心        | 26             |                 |        |        |       |     |   |   |
| 12-5     |  |                                    |       |      |    | 大腿骨 (骨髓) | 27             |                 |        |        |       |     |   |   |
| 13-5     | サビトマトガエル ( <i>Dyscophus guineti</i> )  | Madagascar                         | 35.96 | 6.8  | ♂  | 大腿骨 (骨髓) | 28             |                 |        |        |       |     |   |   |
| 14-1     | デニスフロッグ ( <i>Polypedates dennysi</i> ) | China, Laos, Burma, Vietnam.       | 72.22 | 8.8  | ♂  | 肝        | 29             |                 | +      | +      | +     | ◎   |   |   |
| 14-2     |  |                                    |       |      |    | 腎        | 30             |                 |        |        |       |     |   |   |
| 14-4     |  |                                    |       |      |    | 心        | 31             |                 |        |        |       |     |   |   |
| 14-5     |  |                                    |       |      |    | 大腿骨 (骨髓) | 32             |                 |        |        |       |     |   |   |



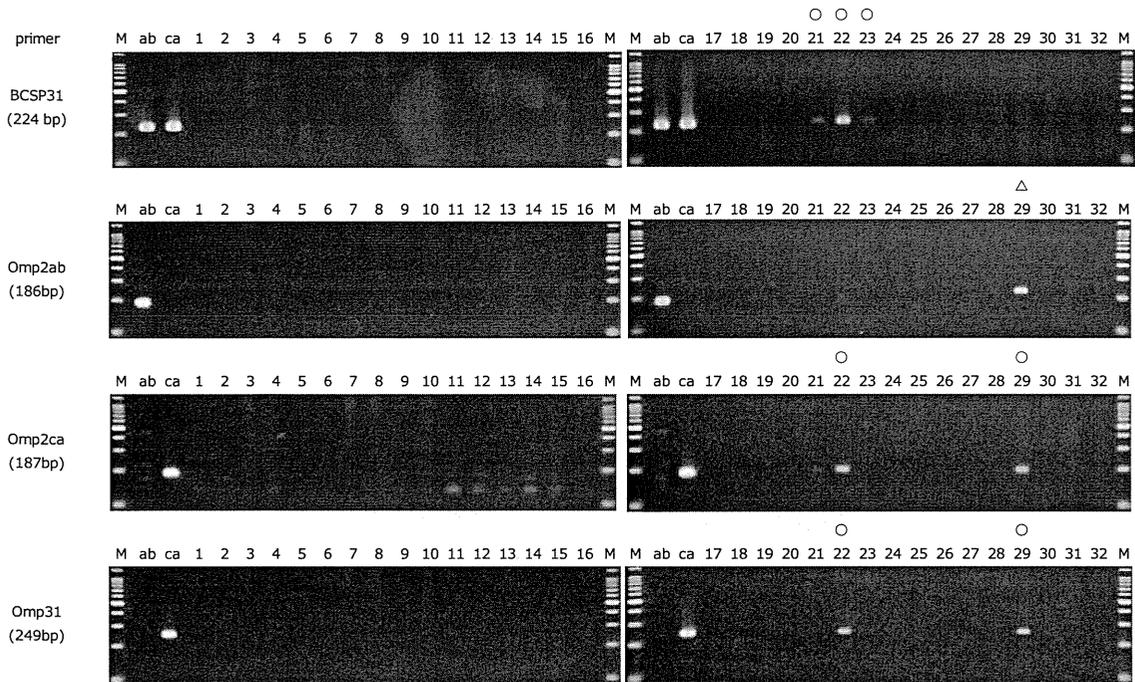


図1:無尾類32検体のブルセラ属特異的PCR(4プライマーセットによるコンビネーション) ab: *B. abortus*、ca: *B. canis*、○: 陽性、△: 非特異

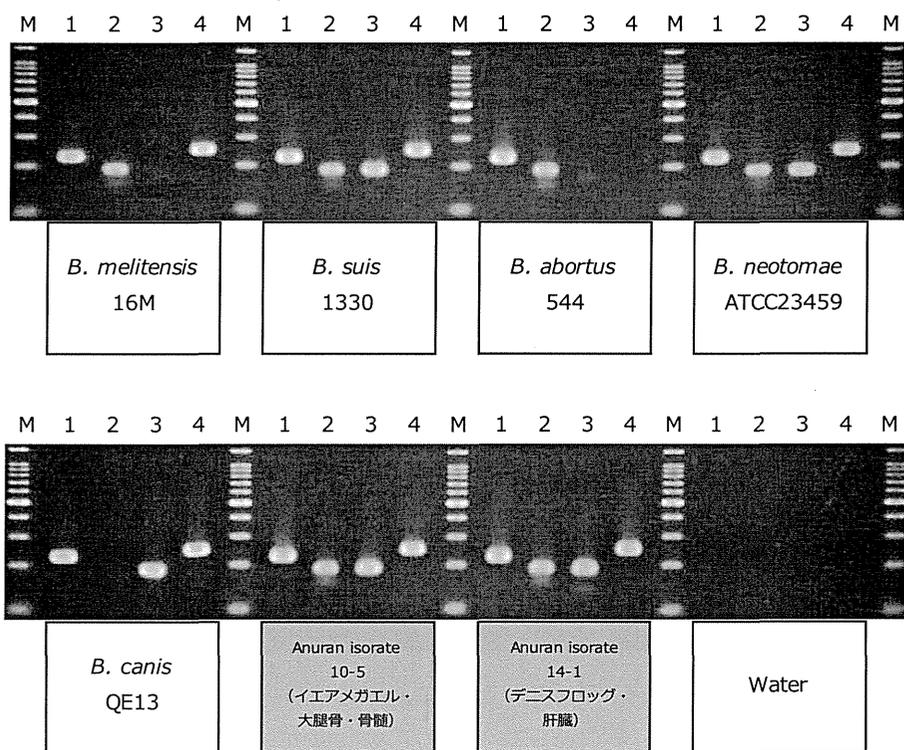


図 2: 分離株、2 株のブルセラ特異的 PCR

M. Marker、1. BCSP31(224 bp)、2. Omp2ab (186bp)、3. Omp2ca (187bp)、4. Omp31 (249bp)

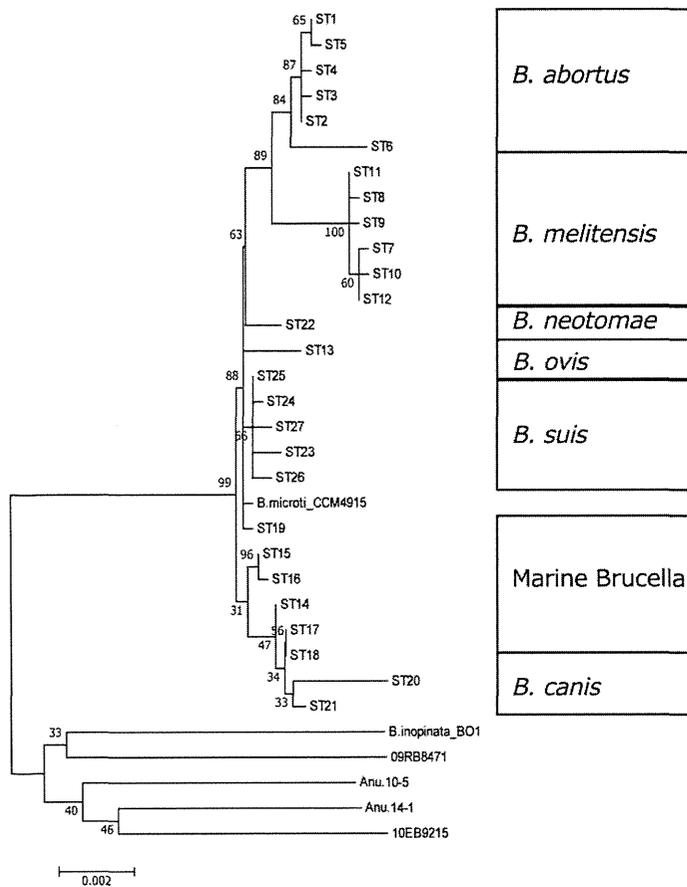


図 3:9 遺伝子座(4396bp)による連結系統樹

10-5: イエアメガエル分離株、14-1: デニスフロッグ分離株、09PB8471, 10EB9215: アフリカウシガエル分離株 (Eisenberg et al. 2012)

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の発生予防に関する研究

－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:捕獲した 15 頭の野生のニホンザルの 4 頭(26.7%)から塹壕熱の病原体である *Bartonella quintana* が分離された。各個体の血中菌数は 50~12,000CFU/ml(平均 525CFU/ml)と、高い菌血症状態であったにもかかわらず、無症状であったことから、ニホンザルは本菌の自然病原巣の一つである可能性が示唆された。また、分離株の遺伝子解析の結果、ヒトおよびサルの種類ごとに独自の遺伝子性状を有する *B. quintana* が分布することやニホンザルには固有の *B. quintana* が存在することが明らかとなった。

A. 研究目的

第一次世界大戦時に流行した塹壕熱の起原菌である *Bartonella quintana* は、ヒトに発熱、心内膜炎、細菌性血管腫症などを引き起こすことが知られている。本菌はヒトが自然宿主であると考えられていたが、近年、米国に輸入されたアジア産の飼育カニクイザルと中国の飼育アカゲザルから、それぞれ *B. quintana* が分離されたことから、サルも本菌の自然宿主である可能性が示唆された。しかしながら、野生のサルならびにわが国に棲息するニホンザルが *B. quintana* を保有しているかについては、全く不明の状態である。そこで本研究では、捕獲した野生のニホンザルにおける *B. quintana* の保有状況について検討するとともに、ヒト分離株とサル分離株の遺伝子性状を比較し、サルが *B. quintana* の自然宿主であるかについて検討した。

B. 研究方法

2012年6月~2013年7月の間に、和歌山県で

捕獲された野生ニホンザル 15 頭から血液を採取した。サルの血液 100 $\mu$ l を 5% 兔血液加チヨコレート寒天培地に塗抹し、35 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 下で 1 カ月間培養した。培地上に発育した *Bartonella* を疑うコロニー数から血中菌数を測定した。分離株は、コロニー形態、発育日数ならびにグラム染色性(陰性)から *Bartonella* 属菌と推定した。分離された *Bartonella* 属菌から無作為に 3 株を選択し、2 つのハウスキーピング遺伝子領域(*gltA* および *rpoB*)と 16S-23S rRNA 遺伝子間領域(ITS)の塩基配列に基づいて分離株の菌種を同定した。さらに、菌種同定された 3 株から代表の 1 株を選択し、9 つのハウスキーピング遺伝子領域(*atpF*, *bqtR*, *ftsZ*, *gap*, *gltA*, *groE*, *nlpD*, *ribE*, *rpoB*)を用いた Multi-Locus Sequence Typing(MLST)法によって得られた配列から遺伝子型(Sequence Type: ST)を決定した。さらに、ニホンザル分離株(4 株)と既報のアカゲザル(37 株)、カニクイザル(16 株)およびヒト分離株(16 株)の塩基配

列から、各 ST タイプの 9 遺伝子領域の連結塩基配列に基づく系統解析を行った。

(倫理面からの配慮について)

研究対象のニホンザルは、全て管理捕獲された個体であり、捕獲した個体は適切な麻酔下のもと、安楽殺した後に血液を採取した。

### C. 研究結果

今回捕獲したニホンザルの 26.7%(4/15)から *Bartonella* 属菌が分離され、分離株の細菌学的性状ならびに遺伝子性状から全て *B. quintana* と同定された。また、各個体の血中菌数は 50~12,000CFU/ml(平均 525CFU/ml)であった(表 1)。

ニホンザル分離株の *gltA*, *rpoB* ならびに ITS の塩基配列は、中国の飼育アカゲザルを由来とする *B. quintana* RM-11 株と同一であるか、または非常に高い相同性(≥99.0%)を示した(表 2)。

MLST 法では、分離株はいずれも新規の ST22 に型別され、連結塩基配列に基づく系統解析では、ニホンザル、アカゲザル、カニクイザルおよびヒト分離株はそれぞれ独立した 4 つのクラスターを形成した(図 1)。

### D. 考察

本研究により、野生のニホンザルは 26.7%(4/15)と高率に *Bartonella* 属菌を保有していることが初めて明らかとなった。さらに、ニホンザルの *Bartonella* 属菌の平均血中菌数は 525CFU/ml( $0.5 \times 10^2 \sim 1.2 \times 10^4$ CFU/ml)であった。*gltA*, *rpoB* および ITS 領域の相同性解析の結果、ニホンザル分離株はヒト由来の *B. quintana* Fuller<sup>T</sup> 株や中国のアカゲザルを由来とする *B. quintana* RM-11 株と一致もしくは非常に高い相同性値(≥97.0%)を示したことから、これ

ら分離株はいずれも *B. quintana* であることが明らかとなった。さらに、ニホンザル分離株は解析した 3 領域において、*B. quintana* Fuller<sup>T</sup> 株に比べ、*B. quintana* RM-11 株により高い相同性を示したことから、他のマカク属のサル由来の *B. quintana* に非常に近縁であることも明らかとなった。

今回 *B. quintana* が分離されたニホンザルは高い菌血症状態であったにもかかわらず、無症状であったこと、ニホンザル分離株はサルを由来とする *B. quintana* に近縁であったことから、サルも *B. quintana* の自然宿主である可能性が示唆された。

MLST 法を用いて、ニホンザル分離株の ST を決定したところ、各ニホンザルから無作為に選択した 4 株は、全て同一の ST であり、新規の ST22 であることが明らかとなった。さらに、MLST 法に基づいて 22 タイプの ST を系統解析したところ、ST1~22 は 4 つの独立したクラスターを形成し、それぞれ分離されたヒトあるいはサルの種類ごとに ST が分類された。今回、ニホンザルから分離された *B. quintana* 株はこれまでに報告のない新規の ST であり、また系統解析でもニホンザル独自のクラスターを形成したことから、ヒトおよびサルの種ごとに固有の遺伝子性状を有する *B. quintana* を保有している可能性が示唆された。しかしながら、本研究に用いたニホンザル由来の *B. quintana* は 4 株と非常に少なかったこと、ニホンザルの採材地域が和歌山県のみであったことから、今後、より広い地域のニホンザルから *B. quintana* の分離を試み、ST を決定し、系統解析を行う必要があると考えられた。

### E. 結論

野生のニホンザルは 26.7%と壱塚熱の病原体

である *B. quintana* を高率に保有していることが初めて明らかとなった。*B. quintana* を保有していたニホンザルは高い菌血症状態であったにもかかわらず、無症状であったことから、本菌の自然病原巣である可能性が示唆された。

#### N. 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ニホンザルを原因とする *B. quintana* の感染にも注意を払う必要があると思われる。

#### O. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sato, S., Kabeya, H, Shigematsu Y., Sentsui, H., Une, Y., Minami, M., Murata, K., Ogura, G., and Maruyama, S. 2013. Small Indian mongooses and masked palm civets serve as new reservoirs of *Bartonella henselae* and potential sources of infection for humans. Clin. Microb. Infect. 19:1181-1187.
- 2) ateno, M., Nishio, T., Sakuma, M., Nakanishi, N., Izawa, M., Asari, Y., Okamura, M., Maruyama, S., Miyama, T. S., Setoguchi, A. and Endo, Y. 2013. Molecular epidemiological survey of *Bartonella*, *Ehrlichia* and *Anaplasma* infections in Japanese Iriomote and Tsushima leopard cats. J. Wildl. Dis. 49(3): 646-652.
- 3) ai, Y., Malania, L., Alvarez Castillo, D., Moran, D., Boonmar, S., Chanlun, A., Suksawat, F., Maruyama, S., Knobel, D., and Kosoy, M. 2013. Global distribution of *Bartonella*

infections in domestic bovine and characterization of *Bartonella bovis* strains using multi-locus sequence typing. Plos One. 8(11): e80894.

##### 2. 学会発表

- 14) 佐藤真伍, 武野侍那子, 壁谷英則, 大橋正孝, 大竹正剛, 丸山総一, わが国の鹿における *Bartonella* のベクターの検討. 第156回日本獣医学会学術集会(岐阜大学, 2013年9月21日).
- 15) 有本千波, 根岸あかね, 佐藤真伍, 壁谷英則, 辻本 元, 遠藤泰之, 坂田義美, 市川康明, 丸山総一. わが国の猫における *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae* および *Chlamydophila felis* DNA の検出状況. 第156回日本獣医学会学術集会(岐阜大学, 2013年9月21日).
- 16) 藤永洋平, 國吉奏慧, 壁谷英則, 佐藤真伍, 市川康明, 丸山総一. 犬, 猫とその外部寄生虫からの *Rickettsia* および *Bartonella* の検出状況について. 第156回日本獣医学会学術集会(岐阜大学, 2013年9月21日).
- 17) 佐藤真伍, 壁谷英則, 重松幸典, 宇根有美, 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13回人と動物の共通感染症研究会学術集会(感染研, 2013年11月2日)

#### P. 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