

表4 国内のフェレットにおけるフェレットコロナウイルス遺伝子陽性率

|               |    | 新規プライマー   |           |           |
|---------------|----|-----------|-----------|-----------|
|               |    | 陽性        | 陰性        | 計         |
| CoV<br>コンセンサス | 陽性 | 31        | 2         | 33 (41.8) |
|               | 陰性 | 13        | 33        | 46 (58.2) |
| 計             |    | 44 (55.7) | 35 (44.3) | 79        |

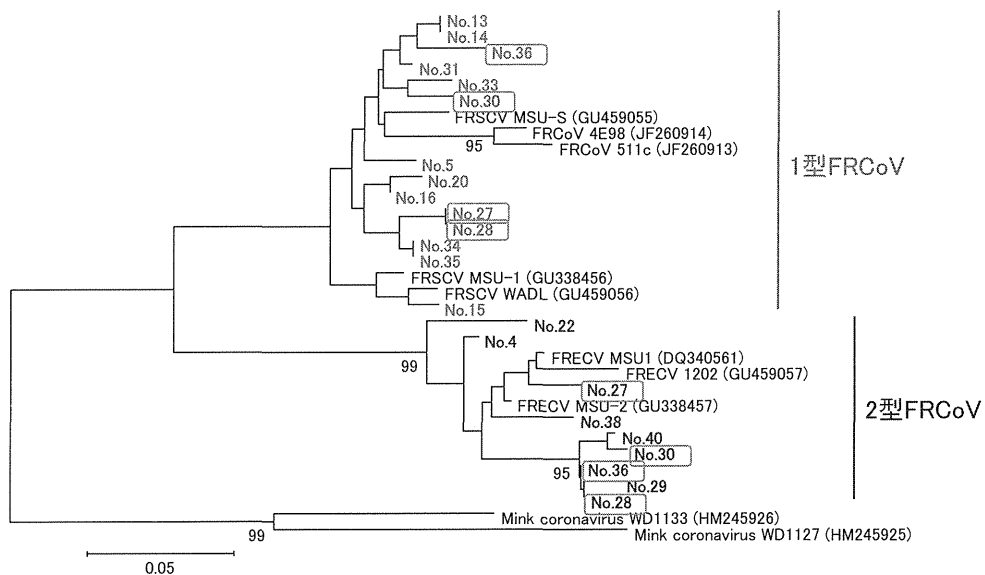


図6 型特異的領域を用いた系統解析

S遺伝子を元に系統樹を作成した。赤、青で色付けされているのが本研究中で検出された遺伝子である。緑色の線で囲まれた個体は1型、2型両方が検出された個体である。

表5 症状と型別の陽性率の比較

|         | 下痢・<br>軟便 | 高 $\gamma$ グロブリン<br>血症 | 腹腔内<br>腫瘤 | その他       |
|---------|-----------|------------------------|-----------|-----------|
| 陽性(%)   | 25 (73.5) | 5 (83.3)               | 7 (50.0)  | 17 (51.5) |
| 1型FRCoV | 17        | 2                      | 4         | 10        |
| 2型FRCoV | 7         | 1                      | 4         | 7         |
| 計       | 34        | 6                      | 14        | 33        |

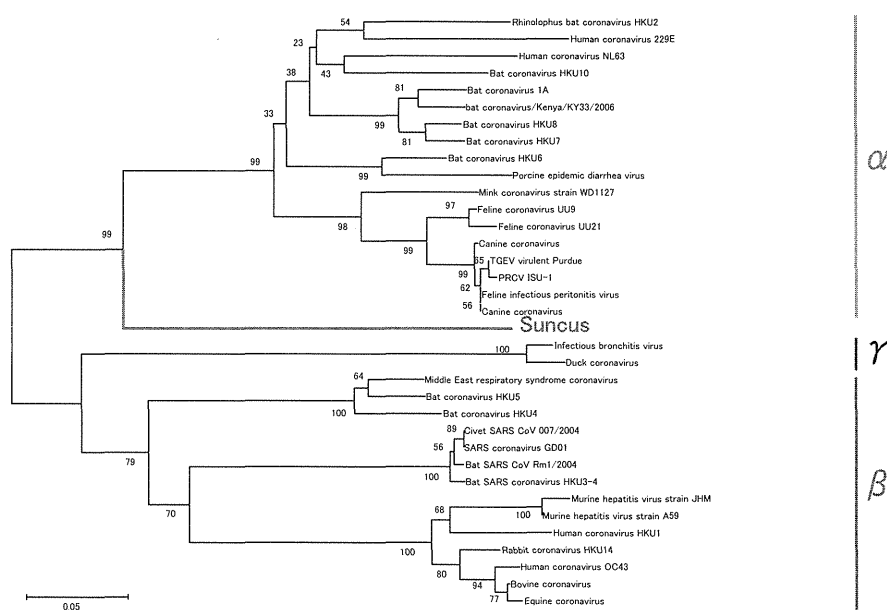


図7 スンクスから検出されたコロナウイルスの系統樹  
RdRp領域を元に系統樹を作成した。

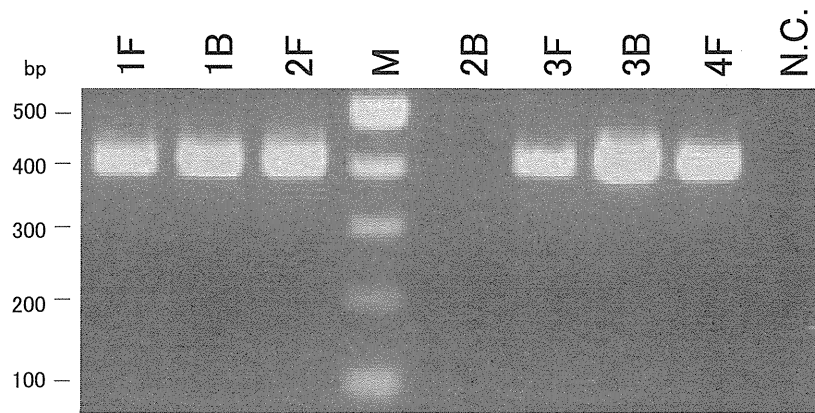


図8 スンクス由来コロナウイルスの高感度検出系  
399bp付近が目的のバンドである。M:マーカ、N.C.:陰性対照。

表6 スンクス由来コロナウイルスの体内分布

|    | No.1 | No.2 |         | No.1 | No.2 |
|----|------|------|---------|------|------|
| 大脳 | -    | -    | 腎臓      | -    | -    |
| 小脳 | -    | -    | 脾臓      | -    | -    |
| 食道 | -    | +    | 膵臓      | -    | -    |
| 胃  | -    | +    | 膀胱      | -    | -    |
| 小腸 | -    | +    | 胸腺      | -    | -    |
| 大腸 | +    | +    | 腸間膜リンパ節 | N.D. | +    |
| 気管 | -    | -    | 口腔スワブ   | -    | -    |
| 肺  | -    | -    | 直腸スワブ   | +    | +    |
| 心臓 | -    | -    | 血清      | -    | -    |
| 肝臓 | -    | -    |         |      |      |

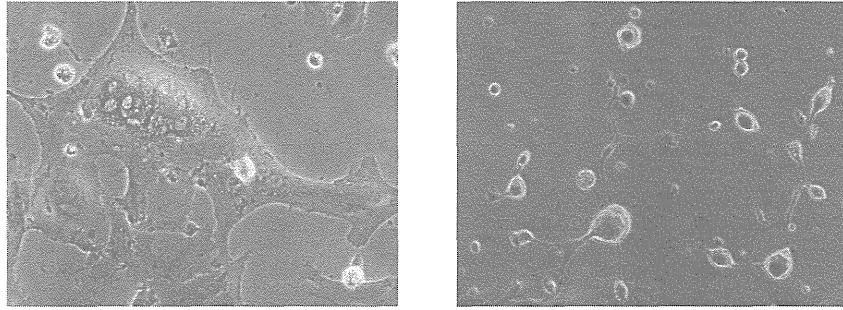


図9 カマイルカの初代腎臓細胞で認められたCPE

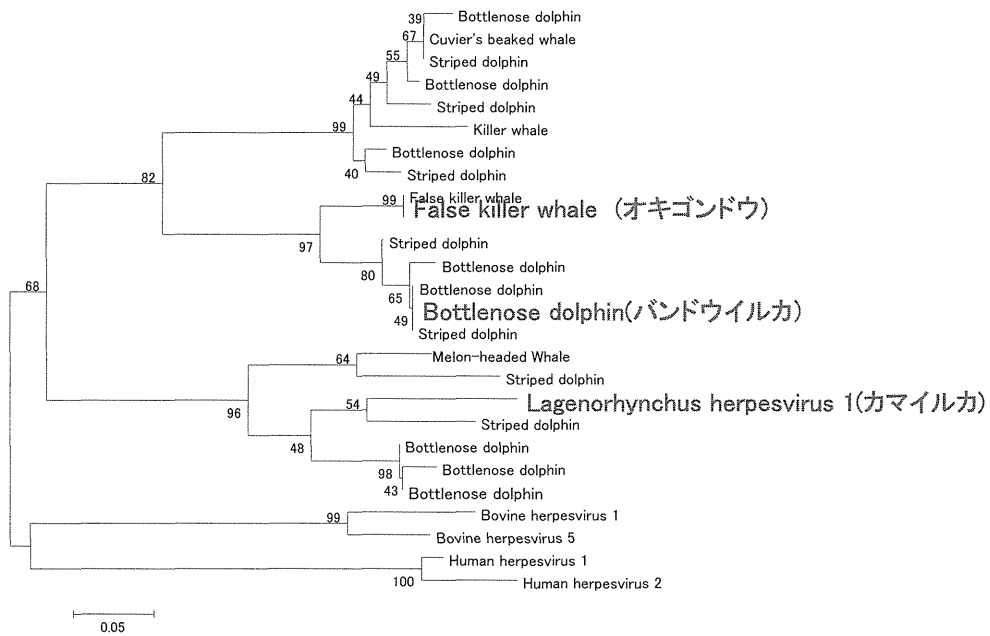


図10 鯨類のアルファヘルペスウイルスの系統解析  
DNAポリメラーゼ領域を元に系統樹を作成した。

動物由来感染症の対応に関する研究

分担研究課題：病原体媒介マダニの遺伝種同定法の確立

研究分担者：川端寛樹（国立感染症研究所細菌第一部）

研究要旨：日本国内に生息するとされる既知のマダニ 47 種中、採集できた 39 種について、可能な範囲で複数個体よりゲノム DNA を抽出し、*mt-rrs* の遺伝子配列を決定後、系統解析を行った。その結果、試験に用いた 39 種中 36 種(92.3%)は、DNA 配列により区別できることが明らかになった。他方、ダグラスチマダニ、ヤマトチマダニ、オオトゲチマダニの 3 種は区別ができなかった。以上の結果より、*mt-rrs* による遺伝学的同定法は形態学的同定法に対して、90%以上の感度を示したことから、今後、マダニ形態同定が困難な場合でもその迅速同定が可能になると思われる。本研究で決定した全ての配列は GenBank に登録を行い、公共利用を可能としている（Web 公開準備中）。

研究協力者：高野愛（山口大学准教授）、藤田博己（馬原アカリ研究所所長）、角坂照貴（愛知医科大学講師）、高橋守（川越高等学校）、山内健生（富山県衛生研究所主任研究官）、石畝史（福井県衛生環境研究センター）、高田伸弘（福井大学シニアフェロー）、矢野泰広（福井大学講師）、及川陽三郎（金沢医科大学講師）、本田俊郎（鹿児島県南薩地域振興局疾病対策係長）、御供田睦代（鹿児島県環境保健センター研究専門員）、角田隆（長崎大学講師）、鶴見みや古（山階鳥類研究所）、安藤秀二（国立感染症研究所室長）、安藤匡子（鹿児島大学准教授）、佐藤梢（国立感染症研究所協力研究員）

A. 研究目的：

a) マダニはライム病や日本紅斑熱などの起因病原体を伝播することから、人体刺咬例などのマダニの迅速同定法開発が急務とされている。加えて、マダニの同定は形態学的な手法が Gold standard であるが、虫体が保全されていない場合などは形態同定が困難である。このため、マダニ種同定の一助として、マダニミトコンドリア 16S rRNA 遺伝子 (*mt-rrs*) 配列の遺伝子データベースを構築し、DNA 配列をもとにした系統学的な解析を行うとともに、その遺伝学的同定法の感度を調べた。

## B. 研究方法：

マダニ DNA の調製：1985 年から 2013 年まで、植生上、動物の体表から採取されたマダニ 113 頭以上を試験に供した（表 1）。これらマダニは形態同定後、DNeasy tissue kit (Qiagen, Germany)を用いて DNA 抽出し試験に用いた。

PCR および増幅 DNA の塩基配列決定：DNA 増幅および塩基配列決定には以下の oligonucleotide primer を用いた (mt-rrs1: 5' -CTG CTC AAT GAT TTT TTA AAT TGC TGT GG-3' , mt-rrs2: 5' - CCG GTC TGA ACT CAG ATC AAG TA-3' )。PCR には、puRe Taq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare UK, Ltd., UK)もしくは EX-Taq (Takara Bio Inc., Japan) を用い、以下の条件で 30 cycles (10 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, and 30 sec at 72°C) PCR を行った。PCR 臓腑を、アガロースゲル電気泳動により確認した後、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) で DNA 精製後、各々の DNA primer により増幅 DNA の塩基配列を決定した。

系統解析：得られた塩基配列は、MEGA5.2 software (<http://www.megasoftware.net>) によりアライメント後、CLUSTAL-W (ver. 1.6) software により、neighbor joining (NJ) 法による系統解析を行った。bootstrap tests は Kimura 2-parameter distance method を採用し、pairwise deletion による解析を行った (open-gap penalty = 15, gap extension penalty = 6.66)。

## C. 研究成果：

本試験により、増幅長 401-416 bp の配列 (除く primer 配列) が得られ、国内マダニ 39 種より 113 sequence types が見いだされた (Table 1)。また、39 マダニ種の内 36 種は各々独立したブランチを形成し、系統学的に異なることが明らかとなった (図 1)。一方、*Haemaphysalis japonica* Warburton, *Haemaphysalis japonica douglasi* Nuttall および Warburton and *Haemaphysalis megaspinosa* Saito は同一ブランチ (相同性：99.3-99.8%) を形成し、遺伝学的に同系統であると考えられた。*Amblyomma geoemydae* (Cantor), *Haemaphysalis flava* Neumann, *Haemaphysalis longicornis* Neumann, *Ixodes asanumai* Kitaoka, *Ixodes persulcatus* Schulze, and *Ixodes turdus* Nakatsuji からは 6 sequence type 以上が得られ、種内変異は各々、92.9%~99.8%, 97.3%~99.8%, 99%~99.8%, 99%~99.8%, 99.3%~99.8% および 98.8%~99.8%であった。

## D. 考察：

マダニ媒介性感染症の感染経路を特定する上で、マダニを対象とした病原体調査は、公衆衛生上重要である。他方、マダニはその成育過程で2度変態しその形態を変化させる。加えて、我が国では7属47種のマダニがこれまで報告され、その全てを同定することは容易ではない。またマダニのヒト刺咬例の同定をよりベットサイドに近い

ところで行えることも重要であるが、虫体が完全に保存されていない場合（図2）、その形態同定は非常に困難である。本法は、マダニの形態同定を行うこと無く、その遺伝種を同定できる点で、形態同定法の代替法として位置づけできる。また、臨床やマダニ形態同定が行えない検査室においてもその応用が見込まれることに加え、Barcode of Life data System (BOLD)等の遺伝子データベースなどの国際標準にも合致していることから、国内のみならず海外での活用も見込まれる。他方、検体全てで塩基配列決定を行うことは、迅速性、多検体処理を困難にしており、今後はより簡便な方法の開発が望まれる。

#### E. 結論

マダニ媒介性感染症の感染経路を特定する上で、マダニを対象とした病原体調査は、公衆衛生上重要である。このために必要なマダニ種の遺伝子解析による同定法を開発した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1 論文発表

1) Takano A, Fujita H, Kadosaka T, Takahashi M, Yamauchi T, Ishiguro F, Takada N, Yano Y, Oikawa Y, Honda T, Gokuden M, Tsunoda T, Tsurumi M, Ando S, Andoh M, Sato K,

Kawabata H. Construction of a DNA database for ticks collected in Japan: application of molecular identification based on the mitochondrial 16S rDNA gene. *Med Entomol Zool. (in press).*

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

図1. マダニ mt-rrs 塩基配列に基づいた系統解析

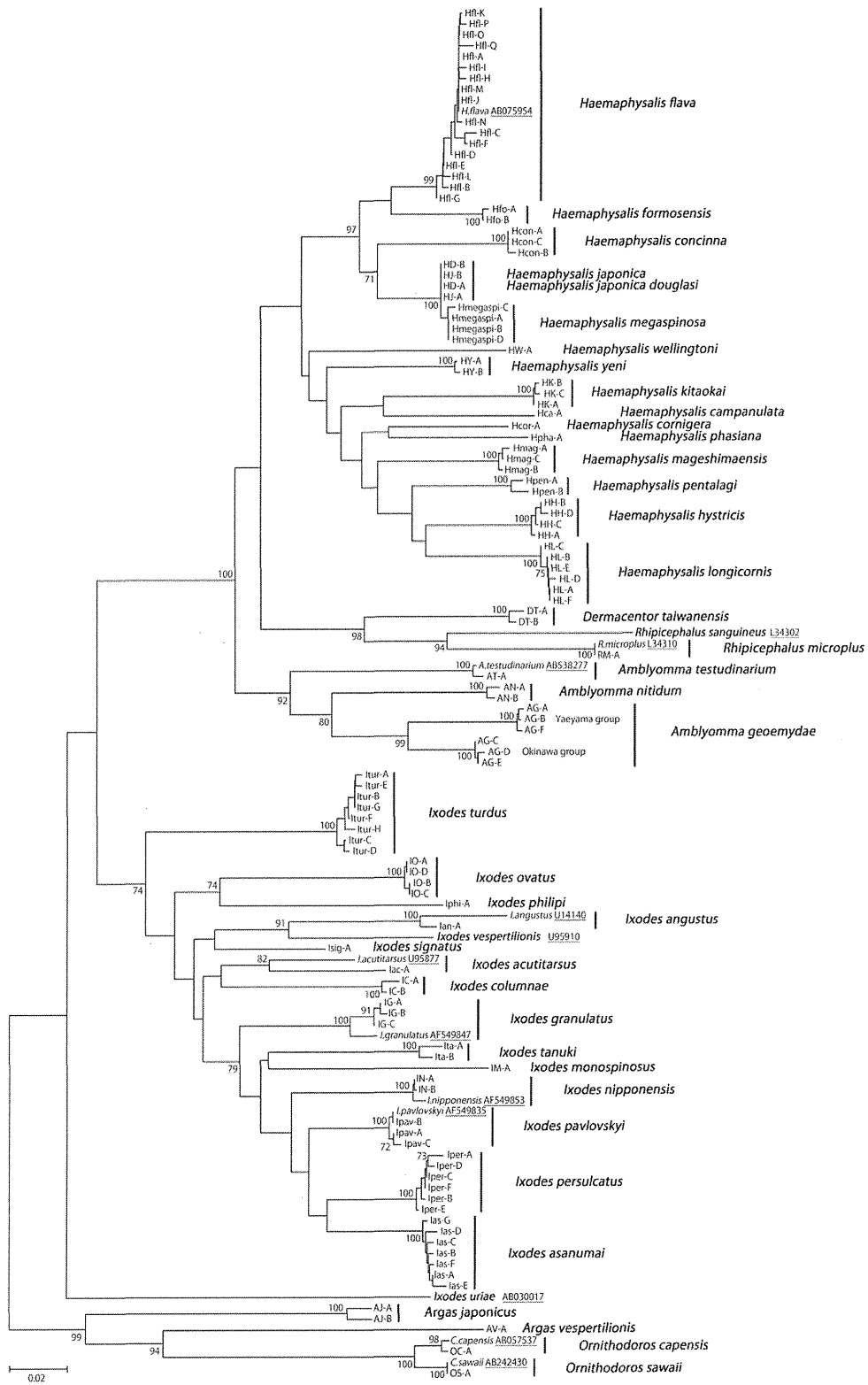




図2. 国立感染症研究所に同定依頼があったマダニ虫体

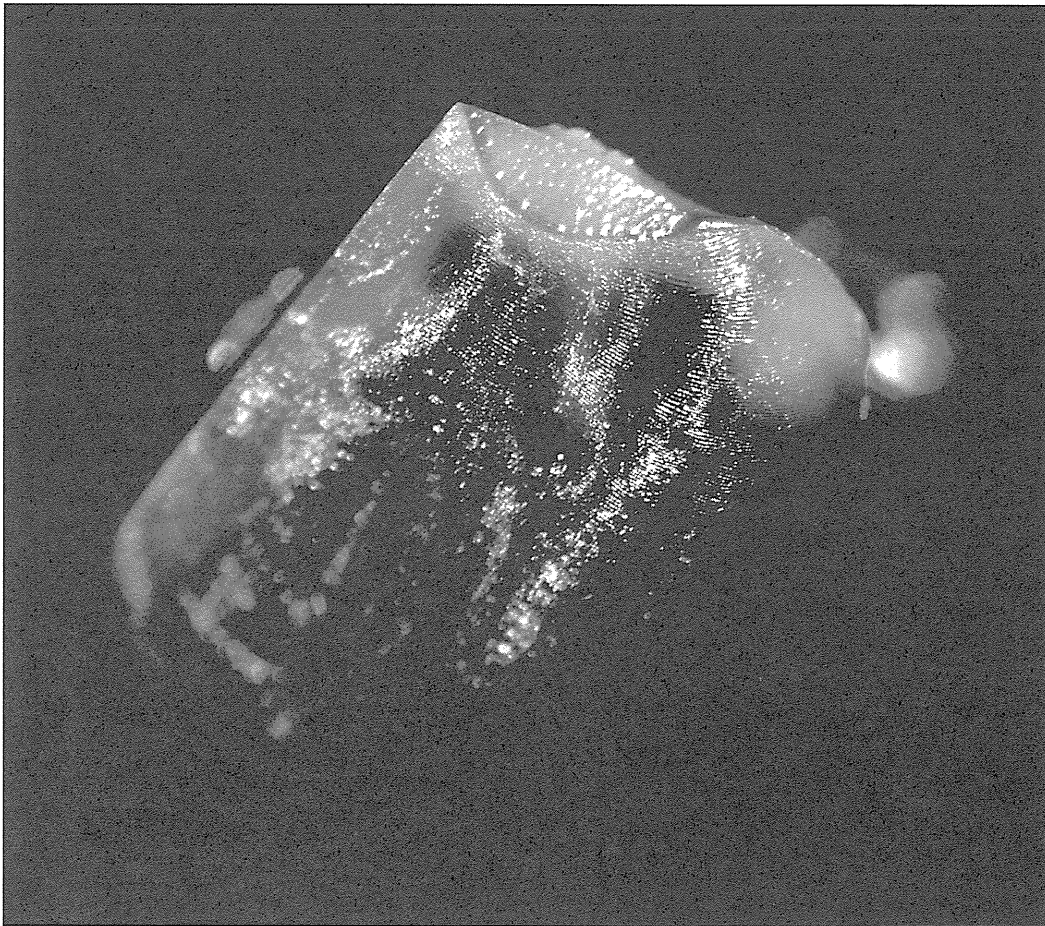


Table 1. List of tick species and sequence types.

| No | Tick species<br>[synonym]   | Tick Sequence<br>type | Tick<br>stage | Location  | Collected source<br>Host animals or Vegetation    | Sampling date<br>(year or yyyy.mm.dd) | Acc. No. |
|----|---|-----------------------|---------------|---|---|---------------------------------------|----------|
| 1  | <i>Argas japonicus</i> Yamaguti,  | AJ-A                  | Female        | Tahara, Tsuru-shi, Yamanashi                            | <i>Delichon urbica</i> (Bonaparte, 1850) *1       | 2006 *2                               | AB819156 |
|    | Clifford and Tipton, 1968   | AJ-B                  | Female        | Tahara, Tsuru-shi, Yamanashi                            | <i>Delichon urbica</i> (Bonaparte, 1850) *1       | 2006 *2                               | AB819157 |
| 2  | <i>Argas vespertilionis</i> (Latreille, 1796)<br>[ <i>Carios vespertilionis</i> ] | AV-A                  | Nymph         | Azumino, Matsumoto-shi, Nagano                          | <i>Eptesicus japonensis</i> Imaizumi, 1953 *3     | 2001.08.25                            | AB819158 |
|    |   | AG-A                  | Larva         | Haiminaka, Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa           | Vegetation  | 2004.12.05                            | AB819159 |
|    |   | AG-B                  | Larva         | Fukai, Ishigaki-shi, Okinawa                            | Vegetation  | 2004.12.06                            | AB819160 |
| 3  | <i>Amblyomma geoemydae</i><br>(Cantor, 1847)                                      | AG-C                  | Nymph         | Ada, Kunigami village, Kunigami-gun, Okinawa            | <i>Geoemyda japonica</i> Fan, 1931                | 2006.07.12                            | AB819161 |
|    |   | AG-D                  | Male          | Ada, Kunigami village, Kunigami-gun, Okinawa            | <i>Geoemyda japonica</i> Fan, 1931                | 2006.07.12                            | AB819162 |
|    |   | AG-E                  | Male          | Ada, Kunigami village, Kunigami-gun, Okinawa            | <i>Geoemyda japonica</i> Fan, 1931                | 2006.07.12                            | AB819163 |
|    |   | AG-F                  | Nymph         | Uehara, Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa              | <i>Cuora flavomarginata evelynae</i> (Gray, 1863) | 2010.06.14                            | AB819164 |
| 4  | <i>Amblyomma nitidum</i>  | AN-A                  | Female        | Kuroshima, Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa           | <i>Laticauda colubrina</i> (Schneider, 1799)      | 2011.04.22                            | AB819165 |
|    | Hirst and Hirst, 1910   | AN-B                  | Nymph         | Kuroshima, Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa           | <i>Laticauda colubrina</i> (Schneider, 1799)      | 2011.04.22                            | AB819166 |
| 5  | <i>Amblyomma testudinarium</i> Koch, 1844   | AT-A                  | Male          | Kuchinoshima, Toshima village, Kagoshima-gun, Kagoshima | Vegetation  | 2008.01.13                            | AB819167 |
| 6  | <i>Dermacentor taiwanensis</i>  | DT-A                  | Larva         | Ooya-cho, Yabu-shi, Hyogo                               | <i>Apodemus speciosus</i> (Temminck, 1844)        | 2007.11.04                            | AB819168 |
|    | Sugimoto, 1935  | DT-B                  | Larva         | Gosesan, Fukui-cho, Anan-shi, Tokushima                 | Vegetation  | 2007.11.10                            | AB819169 |
| 7  | <i>Haemaphysalis campanulata</i><br>Warburton, 1908                               | Hca-A                 | Male          | Aratano-cho, Anan-shi, Tokushima                        | <i>Canis lupus familiaris</i> Linnaeus, 1758      | 2004.07.30                            | AB819170 |
|    |   | Hcon-A                | Nymph         | Kushiro-shi, Hokkaido                                   | Vegetation  | 2010.07.29                            | AB819171 |
|    |   | Hcon-B                | Nymph         | Shibetsu-cho, Shibetsu-gun, Hokkaido                    | Vegetation  | 2010.07.30                            | AB819172 |
| 8  | <i>Haemaphysalis concinna</i> Koch, 1844  | Hcon-C                | Nymph         | Shibetsu-cho, Shibetsu-gun, Hokkaido                    | Vegetation  | 2010.07.30                            | AB819173 |
|    |   | Hcor-A                | Nymph         | Yagiumamawari, Minamiawaji-shi, Hyogo                   | Vegetation  | 2004.09.06                            | AB819174 |
| 9  | <i>Haemaphysalis cornigera</i> Neumann, 1897                                      | Hcor-A                | Nymph         | Yagiumamawari, Minamiawaji-shi, Hyogo                   | Vegetation  | 2004.09.06                            | AB819174 |

Table 1. Continued.

| No    | Tick species<br>[synonym]  | Tick Sequence<br>type | Tick<br>stage                            | Location   | Collected source<br>Host animals or Vegetation    | Sampling date<br>(year or yyyy.mm.dd)                  | Acc. No.   |
|-------|--|-----------------------|--|--|---|--|------------|
| 10    | <i>Haemaphysalis japonica</i> Warburton, 1908                    | HJ-A                  | Nymph                                    | Karouji, Oowani-machi, Minamitsugaru-gun, Aomori       | Vegetation  | 2004.07.29   | AB819200   |
|       |  | HJ-B                  | Nymph                                    | Matsukami, Fukaura-machi, Nishitsugaru-gun, Aomori     | Vegetation  | 2007.07.30   | AB819201   |
|       | <i>Haemaphysalis japonica douglasi</i>                           | HD-A                  | Female                                   | Furano-shi, Hokkaido                                   | Vegetation  | 2004.06.06   | AB819175   |
| 11    | Nuttall and Warburton, 1915<br>[ <i>Haemaphysalis douglasi</i> ] | HD-B                  | Nymph                                    | Asyoro-cho, Asyoro-gun, Hokkaido                       | Vegetation  | 2009.10.04   | AB819176   |
|       |  | Hfi-A                 | Nymph                                    | Nimyou, Kumakougen-cho, Kamiukena-gun, Ehime           | <i>Emberiza spodocephala</i> Pallas, 1776         | 2006.11.08   | AB819177   |
|       |  | Hfi-B                 | Nymph                                    | Oimatsu, Echizen-cho, Nyuu-gun, Fukui                  | <i>Turdus pallidus</i> Gmelin, 1789               | 2007.10.31   | AB819178   |
|       |  | Hfi-C                 | Larva                                    | Tahara, Tsuru-shi, Yamanashi                           | <i>Sympteticus soemmerringii</i> (Temminck, 1830) | 2006.09.21   | AB819179   |
|       |  | Hfi-D                 | Larva                                    | Tahara, Tsuru-shi, Yamanashi                           | <i>Sympteticus soemmerringii</i> (Temminck, 1830) | 2006.09.21   | AB819180   |
|       |  | Hfi-E                 | Nymph                                    | Karouji, Oowani-machi, Minamitsugaru-gun, Aomori       | Vegetation  | 2004.07.29   | AB819181   |
|       |  | Hfi-F                 | Nymph                                    | Yamada-machi, Kokurakita-ku, Kitakyusyu-shi, Fukuoka   | <i>Turdus pallidus</i> Gmelin, 1789               | 2007.11.27   | AB819182   |
|       |  | Hfi-G                 | Larva                                    | Oimatsu, Echizen-cho, Nyuu-gun, Fukui                  | <i>Turdus pallidus</i> Gmelin, 1789               | 2007.10.22   | AB819183   |
|       |  | Hfi-H                 | Larva                                    | Oimatsu, Echizen-cho, Nyuu-gun, Fukui                  | <i>Turdus pallidus</i> Gmelin, 1789               | 2007.10.22   | AB819184   |
|       |  | 12                    | <i>Haemaphysalis flava</i> Neumann, 1897 | Hfi-I  | Nymph   | Akusekijima, Toshima village, Kagoshima-gun, Kagoshima | Vegetation |
| Hfi-J | Nymph  |                       |  | Akusekijima, Toshima village, Kagoshima-gun, Kagoshima | Vegetation  | 2007.07.25   | AB819186   |
| Hfi-K | Nymph  |                       |  | Akusekijima, Toshima village, Kagoshima-gun, Kagoshima | Vegetation  | 2007.07.25   | AB819187   |
| Hfi-L | Nymph  |                       |  | Akusekijima, Toshima village, Kagoshima-gun, Kagoshima | Vegetation  | 2007.07.25   | AB819188   |
| Hfi-M | Nymph  |                       |  | Akusekijima, Toshima village, Kagoshima-gun, Kagoshima | Vegetation  | 2007.07.25   | AB819189   |
| Hfi-N | Nymph  |                       |  | Akusekijima, Toshima village, Kagoshima-gun, Kagoshima | Vegetation  | 2007.07.25   | AB819190   |
| Hfi-O | Nymph  |                       |  | Nakanoshima, Toshima village, Kagoshima-gun, Kagoshima | Vegetation  | 2007.07.26   | AB819191   |
| Hfi-P | Nymph  |                       |  | Nakanoshima, Toshima village, Kagoshima-gun, Kagoshima | Vegetation  | 2007.07.26   | AB819192   |
| Hfi-Q | Nymph  |                       |  | Kouchi, Yamamoto-cho, Mitoyo-shi, Kagawa               | Vegetation  | 2007.10.05   | AB819193   |

Table 1. Continued.

| No | Tick species  | Tick Sequence | Tick   | Location  | Collected source                            | Sampling date        | Acc. No. |
|----|---|---------------|--|---|---|----------------------|----------|
|    | [synonym]   | type          | stage  |   | Host animals or Vegetation                  | (year or yyyy.mm.dd) |          |
| 13 | <i>Haemaphysalis formosensis</i>                                  | Hfo-A         | Male   | Minami-cho, Kaifu-gun, Tokushima                        | Vegetation                                  | 2004.09.29           | AB819194 |
|    | Neumann, 1913   | Hfo-B         | Nymph  | Mihonoseki-cho, Matsue-shi, Simane                      | <i>Ficedula narcissina</i> (Temminck, 1835) | 2008.04.16           | AB819195 |
|    |   | HH-A          | Larva  | Mugiura, Mugi-cho, Kaifu-gun, Tokushima                 | Vegetation                                  | 2004.09.28           | AB819196 |
| 14 | <i>Haemaphysalis hystricis</i> Supino, 1897                       | HH-B          | Larva  | Mugiura, Mugi-cho, Kaifu-gun, Tokushima                 | Vegetation                                  | 2004.09.28           | AB819197 |
|    |   | HH-C          | Larva  | Mugiura, Mugi-cho, Kaifu-gun, Tokushima                 | Vegetation                                  | 2004.09.28           | AB819198 |
|    |   | HH-D          | Female                                       | Otoutojima, Ogasawara village, Tokyo                    | <i>Capra aegagrus</i> Erxleben, 1777        | 2007.06.24           | AB819199 |
|    |   | HK-A          | Female                                       | Nishiide, Ooizumi-cho, Hokuto-shi, Yamanashi            | Vegetation                                  | 2004.06.05           | AB819202 |
| 15 | <i>Haemaphysalis kitaokai</i><br>Hoogstraal, 1969                 | HK-B          | Female                                       | Tennyosan, Nishiide, Ooizumi-cho, Hokuto-shi, Yamanashi | Vegetation                                  | 2004.06.05           | AB819203 |
|    |   | HK-C          | Female                                       | Nishiide, Ooizumi-cho, Hokuto-shi, Yamanashi            | Vegetation                                  | 2004.06.05           | AB819204 |
|    |   | HL-A          | Nymph  | Shiriya, Higashidoori village, Shimokita-gun, Aomori    | Vegetation                                  | 2008.07.23           | AB819205 |
|    |   | HL-B          | Nymph  | Yagiumamawari, Minamiawaji-shi, Hyogo                   | Vegetation                                  | 2004.09.01           | AB819206 |
|    |   | HL-C          | Female                                       | Jindaiurakabe, Minamiawaji-shi, Hyogo                   | Vegetation                                  | 2004.09.01           | AB819207 |
| 16 | <i>Haemaphysalis longicornis</i><br>Neumann, 1901                 | HL-D          | Female                                       | Jindaiurakabe, Minamiawaji-shi, Hyogo                   | Vegetation                                  | 2004.09.01           | AB819208 |
|    |   | HL-E          | Female*4                                     | Chiba   | Unknown                                     | Unknown              | AB819209 |
|    |   | HL-F          | Nymph  | Shiriya, Higashidoori village, Shimokita-gun, Aomori    | Vegetation                                  | 2008.07.23           | AB819210 |
|    |   | Hmag-A        | Female                                       | Mageshima, Nishinoomote-shi, Kagoshima                  | Unknown                                     | 1999.05.01           | AB819211 |
|    |   | Hmag-B        | Male   | Mageshima, Nishinoomote-shi, Kagoshima                  | Unknown                                     | 1999.05.01           | AB819212 |
|    |   | Hmag-C        | Nymph  | Akusekijima, Toshima village, Kagoshima-gun, Kagoshima  | Vegetation                                  | 2007.07.25           | AB819213 |
| 17 | <i>Haemaphysalis mageshimaensis</i><br>Saito and Hoogstraal, 1973 | Hmegaspi-A    | Nymph  | Hirauchi, Yakushima-cho, Kumage-gun, Kagoshima          | Vegetation                                  | 2004.06.26           | AB819214 |
|    |   | Hmegaspi-B    | Nymph  | Hirauchi, Yakushima-cho, Kumage-gun, Kagoshima          | Vegetation                                  | 2004.06.26           | AB819215 |
|    |   | Hmegaspi-C    | Female*4                                     | Chiba   | Unknown                                     | Unknown              | AB819216 |
|    |   | Hmegaspi-D    | Nymph  | Uchiura, Kamogawa-shi, Chiba                            | Vegetation                                  | 2004.12.07           | AB819217 |
|    |   | 18            | <i>Haemaphysalis megaspinosa</i> Saito, 1969 |   |   |                      |          |

Table 1. Continued.

| No | Tick species<br>[synonym]                      | Tick Sequence<br>type | Tick<br>stage | Location  | Collected source<br>Host animals or Vegetation      | Sampling date<br>(year or yyyy.mm.dd) | Acc. No. |
|----|--|-----------------------|---------------|---|---|---------------------------------------|----------|
| 19 | <i>Haemaphysalis pentalagi</i>                 | Hpen-A                | Female*4      | Amamiooshima, Kagoshima                                 | <i>Pentalagus furnessi</i> (Stone, 1900)            | 2003.09.28                            | AB819218 |
|    | Pospelova-Shtrom, 1935                         | Hpen-B                | Male *5       | Amamiooshima, Kagoshima                                 | <i>Pentalagus furnessi</i> (Stone, 1900)            | 2003.09.28                            | AB819219 |
| 20 | <i>Haemaphysalis phasiana</i>                  | Hpha-A                | Female*4      | Shnan-ri, Haenam gun, South Korea                       | <i>Emberiza chrysophrys</i> Pallas, 1776            | 2007.05.04                            | AB819220 |
|    | Saito, Hoogstraal and Wassef, 1974             |                       |               |   |   |                                       |          |
| 21 | <i>Haemaphysalis wellingtoni</i>               | HW-A                  | Male          | Mihonoseki, Mihonoseki-cho, Matsue-shi, Simane          | <i>Emberiza variabilis</i> Temminck, 1835           | 2007.04.29                            | AB819221 |
|    | Nuttall and Warburton, 1908                    |                       |               |   |   |                                       |          |
| 22 | <i>Haemaphysalis yeni</i> Toumanoff, 1944      | HY-A                  | Nymph         | Anbou, Yakushima-cho, Kumage-gun, Kagoshima             | Vegetation  | 2004.06.26                            | AB819222 |
|    |  | HY-B                  | Female        | Koseda, Yakushima-cho, Kumage-gun, Kagoshima            | <i>Canis lupus familiaris</i> Linnaeus, 1758        | 2008.08.08                            | AB819223 |
| 23 | <i>Ixodes acutitarsus</i> (Karsch, 1880)       | Iac-A                 | Nymph         | Sai, Sai village, Shimokita-gun, Aomori                 | Vegetation  | 2008.07.23                            | AB819224 |
| 24 | <i>Ixodes angustus</i> Neumann, 1899           | Ian-A                 | Female        | Minato, Wakkanai-shi, Hokkaido                          | <i>Apodemus speciosus</i> (Temminck, 1844)          | 2008.06.14                            | AB819225 |
|    |  | Ias-A                 | Nymph         | Takarajima, Toshima village, Kagoshima-gun, Kagoshima   | <i>Ateuchosaurus pellopleurus</i> (Hallowell, 1861) | 2007.07.26                            | AB819226 |
|    |  | Ias-B                 | Nymph         | Takarajima, Toshima village, Kagoshima-gun, Kagoshima   | <i>Ateuchosaurus pellopleurus</i> (Hallowell, 1861) | 2007.07.26                            | AB819227 |
|    |  | Ias-C                 | Nymph         | Takarajima, Toshima village, Kagoshima-gun, Kagoshima   | <i>Ateuchosaurus pellopleurus</i> (Hallowell, 1861) | 2007.07.26                            | AB819228 |
|    |  | Ias-D                 | Nymph         | Nazekominato, Amami-shi, Kagoshima                      | <i>Turdus pallidus</i> Gmelin, 1789                 | 2006.12.17                            | AB819229 |
|    |  | Ias-E                 | Female        | Kuchinoshima, Toshima village, Kagoshima-gun, Kagoshima | Vegetation  | 2008.01.13                            | AB819230 |
|    |  | Ias-F                 | Female        | Kuchinoshima, Toshima village, Kagoshima-gun, Kagoshima | Vegetation  | 2008.01.13                            | AB819231 |
| 25 | <i>Ixodes asanumai</i> Kitaoka, 1973           | Ias-G                 | Male          | Kuchinoshima, Toshima village, Kagoshima-gun, Kagoshima | Vegetation  | 2008.01.13                            | AB819232 |
|    |  | IC-A                  | Nymph         | Oozasou, Fukushima-shi, Fukushima                       | Vegetation  | 2007.11.03                            | AB819233 |
|    |  | IC-B                  | Larva         | Niimachi, Kawamata-machi, Date-gun, Fukushima           | Vegetation  | 1985.11.21                            | AB819234 |
| 26 | <i>Ixodes columnae</i> Takada and Fujita, 1992 | IG-A                  | Female        | Okinawa   | <i>Rattus rattus</i> (Linnaeus, 1758)               | Unknown                               | AB819235 |
|    |  | IG-B                  | Female        | Okinawa   | <i>Rattus rattus</i> (Linnaeus, 1758)               | Unknown                               | AB819236 |
|    |  | IG-C                  | Female        | Chichijima, Ogasawara village, Tokyo                    | <i>Rattus rattus</i> (Linnaeus, 1758)               | 2007.07.30                            | AB819237 |
| 27 | <i>Ixodes granulatus</i> Supino, 1897          | IG-C                  | Female        | Chichijima, Ogasawara village, Tokyo                    | <i>Rattus rattus</i> (Linnaeus, 1758)               | 2007.07.30                            | AB819237 |

Table 1. Continued.

| No | Tick species<br>[synonym]                            | Tick Sequence<br>type | Tick<br>stage | Location   | Collected source<br>Host animals or Vegetation   | Sampling date<br>(year or yyyy.mm.dd) | Acc. No. |
|----|--|-----------------------|---------------|--|--|---------------------------------------|----------|
| 28 | <i>Ixodes monospinosus</i> Saito, 1968               | IM-A                  | Female        | Sai, Sai village, Shimokita-gun, Aomori                    | Vegetation                                       | 2007.09.23                            | AB819238 |
| 29 | <i>Ixodes nipponensis</i><br>Kitaoka and Saito, 1967 | IN-A                  | Nymph         | Koyamaike, Tottori-shi, Tottori                            | <i>Locustella ochotensis</i> (Middendorff, 1853) | 2007.06.04                            | AB819239 |
|    |  | IN-B                  | Nymph         | Koyamaike, Tottori-shi, Tottori                            | <i>Locustella ochotensis</i> (Middendorff, 1853) | 2007.06.04                            | AB819240 |
| 30 | <i>Ixodes ovatus</i> Neumann, 1899                   | IO-A                  | Female        | Nishiide, Ooizumi-cho, Hokuto-shi, Yamanashi               | Vegetation                                       | 2004.06.05                            | AB819241 |
|    |  | IO-B                  | Male          | Tennyosan, Nishiide, Ooizumi-cho, Hokuto-shi, Yamanashi    | Vegetation                                       | 2004.06.05                            | AB819242 |
|    |  | IO-C                  | Male          | Nishiide, Ooizumi-cho, Hokuto-shi, Yamanashi               | Vegetation                                       | 2004.06.05                            | AB819243 |
|    |  | IO-D                  | Female        | Karouji, Oowani-machi, Minamitsugaru-gun, Aomori           | Vegetation                                       | 2004.07.29                            | AB819244 |
| 31 | <i>Ixodes pavlovskyi</i> Pomerantzev, 1946           | Ipav-A                | Nymph         | Takaoka, Tomakomai-shi, Hokkaido                           | <i>Turdus cardis</i> Temminck, 1831              | 2008.08.10                            | AB819245 |
|    |  | Ipav-B                | Female        | Takaoka, Tomakomai-shi, Hokkaido                           | <i>Turdus cardis</i> Temminck, 1831              | 2008.08.10                            | AB819246 |
|    |  | Ipav-C                | Larva         | Takaoka, Tomakomai-shi, Hokkaido                           | <i>Turdus cardis</i> Temminck, 1831              | 2008.08.10                            | AB819247 |
|    |  | Iper-A                | Female        | Nishiide, Ooizumi-cho, Hokuto-shi, Yamanashi               | Vegetation                                       | 2004.06.05                            | AB819248 |
|    |  | Iper-B                | Female        | Nishiide, Ooizumi-cho, Hokuto-shi, Yamanashi               | Vegetation                                       | 2004.06.05                            | AB819249 |
|    |  | Iper-C                | Female        | Imaizumi, Nakadomari-machi, Kitatsugaru-gun, Aomori        | Vegetation                                       | 2004.08.02                            | AB819250 |
| 32 | <i>Ixodes persulcatus</i> Schulze, 1930              | Iper-D                | Nymph         | Imaizumi, Nakadomari-machi, Kitatsugaru-gun, Aomori        | Vegetation                                       | 2004.08.02                            | AB819251 |
|    |  | Iper-E                | Male          | Imaizumi, Nakadomari-machi, Kitatsugaru-gun, Aomori        | Vegetation                                       | 2004.08.02                            | AB819252 |
|    |  | Iper-F                | Nymph         | Takaoka, Tomakomai-shi, Hokkaido                           | <i>Turdus cardis</i> Temminck, 1831              | 2008.08.14                            | AB819253 |
|    |  | Iphi-A                | Female        | Minamigou, Mikurajima village, Tokyo                       | <i>Calonectris leucomelas</i> (Temminck, 1835)   | 2004.08.25                            | AB819254 |
| 34 | <i>Ixodes signatus</i> Birula, 1895                  | Isig-A                | Female        | Hamamatsu, Nemuro-shi, Hokkaido                            | <i>Larus schistisagus</i> Stejneger, 1884        | 2007.06.12                            | AB819255 |
|    |  | Ita-A                 | Female        | Ookubo, Higashinagura, Shitara-cho, Kitashitara-gun, Aichi | <i>Mustela itatsi</i> Temminck, 1844             | 2003.02.23                            | AB819256 |
| 35 | <i>Ixodes tanuki</i> Saito, 1964                     | Ita-B                 | Male          | Kuroda-cho, Toyota-shi, Aichi                              | <i>Nyctereutes procyonoides viverrinus</i>       | 2002.11.05                            | AB819257 |
|    |  |                       |               |  | Temminck, 1838                                   |                                       |          |

Table 1. Continued.

| No | Tick species<br>[synonym]  | Tick Sequence<br>type | Tick<br>stage | Location                                | Collected source<br>Host animals or Vegetation | Sampling date<br>(year or yyyy.mm.dd) | Acc. No. |
|----|--|-----------------------|---------------|---|--|---------------------------------------|----------|
| 36 | <i>Ixodes turdus</i> Nakatsuji, 1942   | Itur-A                | Nymph         | Kuchinoshima, Tomakomai-shi, Hokkaido   | Vegetation                                     | 2008.01.13                            | AB819258 |
|    |  | Itur-B                | Female        | Sekiya, Tyuuou-ku, Niigata-shi, Niigata | <i>Parus major</i> Linnaeus, 1758              | 2008.04.09                            | AB819259 |
|    |  | Itur-C                | Nymph         | Nara, Kihoku-cho, Kitauwa-gun, Ehime    | <i>Turdus pallidus</i> Gmelin, 1789            | 2007.09.29                            | AB819260 |
|    |  | Itur-D                | Nymph         | Takaoka, Tomakomai-shi, Hokkaido        | <i>Turdus cardis</i> Temminck, 1831            | 2008.05.13                            | AB819261 |
|    |  | Itur-E                | Female        | Sekiya, Tyuuou-ku, Niigata-shi, Niigata | <i>Turdus cardis</i> Temminck, 1831            | 2008.04.30                            | AB819262 |
|    |  | Itur-F                | Larva         | Hidaka-cho, Hidaka-gun, Wakayama        | <i>Turdus pallidus</i> Gmelin, 1789            | 2007.12.16                            | AB819263 |
|    |  | Itur-G                | Female        | Fusaheiwadai, Abiko-shi, Chiba          | <i>Turdus naumanni</i> Temminck, 1820          | 2004.01.05                            | AB819264 |
|    |  | Itur-H                | Female        | Fusaheiwadai, Abiko-shi, Chiba          | <i>Turdus naumanni</i> Temminck, 1820          | 2004.01.05                            | AB819265 |
| 37 | <i>Ornithodoros capensis</i> Neumann, 1901<br>[ <i>Carios capensis</i> ]           | OC-A                  | Male          | Mukojima, Ogasawara village, Tokyo      | <i>Puffinus pacificus</i> (Gmelin, 1789)       | 2008.08.22                            | AB819266 |
| 38 | Kitaoka and Suzuki, 1973<br><i>Ornithodoros sawaii</i><br>[ <i>Carios sawaii</i> ] | OS-A                  | Female        | Kutsujima, Maizuru-shi, Kyoto           | <i>Oceanodroma monorhis</i> (Swinhoe, 1867)    | 2007.08.25                            | AB819267 |
|    |  |                       |               |   |  |                                       |          |
| 39 | (Canestrini, 1888)<br>[ <i>Boophilus microplus</i> ]                               | RM-A                  | Male          | Ototojima, Ogasawara village, Tokyo     | <i>Capra aegagrus</i> Erxleben, 1777           | 2007.04.24                            | AB819268 |

\*1 Ticks were collected from the nest of *Delichon urbica*

\*2 Ticks were collected from August to September of 2006

\*3 Ticks were collected from under the nest of *Eptesicus japonensis*

\*4 Engorged ticks

\*5 Molted ticks

動物由来感染症の対応に関する研究

分担研究課題：動物由来細菌性腸管感染症の再興に向けた感染制御に関する研究

研究分担者：山田章雄（東京大学大学院農学生命科学研究科教授）

研究要旨：動物園で飼養されている哺乳類 106 種から分離した菌株 1184 株を対象にし、*Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157、*Bacillus coagulans* JCM 2257、*Staphylococcus aureus* JCM 2413、*Escherichia coli* JCM 5491 に対して抗菌活性を示す菌株を探索したところ、*L. lactis* subsp. *cremoris*、*L. lactis* subsp. *lactis*、*Enterococcus faecalis*、*E. hirae* の 4 菌種に属する 21 菌株を得ることができた。これらの菌株は培養上清を用いた試験においても抗菌活性を示したことから、新規バクテリオシンである可能性が高い。中には *Listeria monocytogenes* に対して抗菌活性を有する菌株が存在していたことから、動物由来の腸管感染症の起因菌に対する新たな制御法の開発につながる可能性がある。

研究協力者：平山和宏（東京大学大学院農学生命科学研究科准教授）、日高由貴（東京大学農学部）

A. 研究目的：

腸管出血性大腸菌、リステリア菌、カンピロバクターなどによる腸管感染症を制御するには、ヒトでの感染対策はもとより、本来の宿主である家畜を含む動物におけるこれらの菌の制御が極めて重要である。抗菌薬の動物での使用は薬剤耐性菌の出現を促す危険性があるため他の方策が求められており、家畜へのワクチン接種が公衆衛生的見地から試みられているものの、いまだその効果は不明である。ヒトにおいても抗

菌薬投与による発症後の治療が主体であり、予防的手段は生産段階あるいは消費段階での衛生管理に依存するところが大きい。本研究では健康なヒト及び動物の腸内細菌叢を構成する菌種から、これらの腸管病原性を有する病原体に対して抑制的に働く菌種を選択し、その抑制機構の解明と、これらの菌を応用した家畜腸内からの菌排除を含む予防法の開発を行うことを目的とする。

乳酸菌（lactic acid bacteria; LAB）は代謝産物として乳酸を産生する菌の総称であるが、チーズやヨーグルト、漬物などの発酵食品や乳酸菌飲料の生産に利用されるほか、動物や人の腸管内に常在菌として多数存在している。LAB は乳酸のほかにも酢酸やブ



ロピオン酸といった短鎖脂肪酸や嫌気条件下における  $H_2O_2$  など様々な物質を産生することが知られているが、バクテリオシン産生菌としても数多くの報告がある。バクテリオシンは、様々な細菌が産生するタンパク質またはペプチドで、抗菌活性を示す物質である。バクテリオシンの作用スペクトルは比較的狭く、主に近縁の細菌に対して殺菌作用を示すとされているが、中には広範囲の細菌にその作用を示すものもあり、抗菌物質としての実用化が期待されている。LAB は食品生産に利用されていることから極めて安全性が高く、LAB が産生するバクテリオシンは特に有用性が高いと考えられるが、現時点で安全性が確かめられ実用化されているバクテリオシンはナイシンのみである。

今年度は増加し続ける薬剤耐性菌への対抗策の一つとして新奇のバクテリオシンの探索を試みることにし、動物園で飼養される多彩な動物に由来する LAB からのバクテリオシン分離を試みた。

#### B. 研究方法：

上野動物園で飼養されている哺乳類 106 種から分離した菌株 1184 株を対象にした。一次スクリーニングは *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157、*Bacillus coagulans* JCM 2257、*Staphylococcus aureus* JCM 2413、*Escherichia coli* JCM 5491 を指標菌とした Direct 法を用い、阻止円 (Inhibition zone; IZ) の形成とその形状からバクテリオシン産生

性と思われる菌株 83 株を得た。このうちの 33 株について Spot-on-lawn 法を用いた二次スクリーニング実施し、培養上清による指標菌の発育阻害活性から、バクテリオシンの産生を確認した。二次スクリーニングで爆てりおしん賛成が確認できた菌株について、16SrDNA 塩基配列に基づく菌種の同定を行った。これらの菌株の作用スペクトルは、様々な腸内常在菌や病原菌を含む 17 菌種、32 株を指標菌として測定した。

#### C. 研究成果：

一次スクリーニングの結果、1184 株のうち 83 株をバクテリオシン産生性と判定した。動物種では、106 種中 47 種から分離された菌株がバクテリオシン産生性であった。そのうち、陽性コントロールとして用いたナイシン A 産生性の *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCD 0497 と同程度またはそれ以上の IZ を形成する菌株は 24 株であった。

二次スクリーニングでは上記 24 株を含む 33 株の培養上清の抗菌性を試験し、そのうち 21 株が IZ を形成することを確認した。これらの菌株は 11 の動物種から分離された。これらはすべて一次スクリーニングで直径 6.5mm を上回る IZ を形成した株であり、IZ 幅が 6.5mm 以下の菌株においては、二次スクリーニングに用いた Spot-on-lawn 法では IZ の形成は認められなかった。これら 21 菌株の菌種の同定を 16SrDNA の塩基配列を解読して行ったところ、*L. lactis* subsp. *cremoris*、*L. lactis* subsp. *lactis*、

*Enterococcus faecalis*、*E. hirae* の4種の菌種が同定できた。

さらに、抗菌スペクトルの測定を行ったところ、特に広い抗菌スペクトルを示す菌株は見つからなかったが、食品衛生上重要な *Listeria monocytogenes* に対して抗菌活性を有する菌株がキリンから分離された。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

#### D. 考察：

今回見出された菌株の産生するバクテリオシンが既知のものとは異なることを明らかにするためには、これらの菌の性状や抗菌スペクトルをさらに詳細に検討することにより、新たなバクテリオシンの発見につながる可能性が期待される。

#### E. 結論

多様な動物の常在菌の中に、新奇のバクテリオシンを産生する菌株が存在することが明らかになった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1 論文発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

##### 1. 特許取得

なし

動物由来感染症の対応に関する研究

分担研究課題：コリネバクテリウムに関する研究

研究分担者：山本明彦（国立感染症研究所・細菌第二部主任研究官）

研究要旨：ジフテリア様の症状を示すジフテリア毒素産生性の *Corynebacterium ulcerans* (*C. ulcerans*) による感染症について、呼吸器症状を示す新規 2 症例が報告され、同感染症の感染状況によっては、ジフテリア毒素に対する免疫が成立しないことが示唆された。また、キャリアとなる動物の 9 地域の検索でイヌからは検出されず、ネコの 4.5% から *C. ulcerans* が分離されることから、地域を問わずネコは *C. ulcerans* のキャリアの一つになっていることが示唆された。感染症法の位置づけが異なる *C. ulcerans*、*Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae*) および *C. pseudotuberculosis* を類縁の *Corynebacterium* 属菌から迅速簡易に鑑別診断できる方法として、マルチプレックス PCR 法を開発した。さらに、マウスを用いた *C. ulcerans* 感染モデルを作成した。本実験系によりマウスが *C. ulcerans* の宿主となりうることが示され、菌株間での感染力の相違も本実験系により検出できる可能性が示された。

研究協力者：岡本その子、内藤秀樹、舩渡川圭次、佐伯貴之、矢部真人（栃木県保健環境センター）、畠山薫、久保田寛頭、奥野ルミ、貞升健志、井出 治、加藤敦子（東京都健康安全研究センター）、小嶋由香（川崎市健康安全研究所）、古川一郎、石岡慎也、岡本浩介、水谷達二（神奈川県衛生研究所）、瀬戸順次、安孫子千恵子（山形県衛生研究所）、勝川千尋（大阪府立公衆衛生研究所）、梅田薫、阿部拓人、畠山理沙、木村吉秀（大阪市立環境科学研究所）、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（岡山県環境保健センター）、河野智美、梅原成子、佐野哲也（滋賀県衛生科学センター）、内田順子、有塚真弓、池本龍一、蔦田博也（香川県環境保健センター）、畠山敬、後藤郁男、山口友美（宮城県環境衛生センター）、青木敦子、嶋田直美（埼玉県衛生研究所）、柳井徳磨（岐阜大学）、秋定健、兵行儀、與田茂利、黒川幸徳、山根一和（川崎医科大学）、本間康夫（信楽園病院）、天尾弘実、藤平篤志、望月優（日本獣医生命科学大学）、小宮貴子、岩城正昭、平井明日香、網康至、

須崎百合子、高橋元秀、今岡浩一（国立感染症研究所）

#### A. 研究目的：

ジフテリアは、ジフテリア毒素を有する *C. diphtheriae* による細菌感染症である。高い死亡率と飛沫感染で広範囲に伝染することから、感染症法の 2 類感染症に分類されている。日本ではこの 10 年間患者の発生はない。この感染症は古くから知られる疾患で、ジフテリア毒素を不活化して作成したワクチン接種による防疫が全世界的に実施されている。2001 年よりジフテリア様の症状を示すジフテリア毒素産生性の *C. ulcerans* による感染症が、本邦でも報告されるようになった（表 1）。ジフテリア毒素を主要な病原因子とする *C. ulcerans* 感染症はヒトを含む哺乳動物が広く罹患する。ECDC の定義では、ヒトに特異的な *C. diphtheriae* 感染症とあわせ「ジフテリア」とされるが、本邦では *C. ulcerans* 感染症は感染症法の対象疾患ではない。患者発生時の迅速な対応が要求される 2 類感染症と分類される *C. diphtheriae* 感染症（ジフテリア）との鑑別診断が公衆衛生上の課題である。そこで、*C. ulcerans*、*C. diphtheriae* を類縁の *Corynebacterium* 属菌から迅速かつ簡易に鑑別する実験室診断法を開発することにより、行政対応の異なる 2 類感染症のジフテリアとウルセランス感染症との問題の解決を図ることを目指した。

同感染症は、これまでの症例報告から動物

由来感染症であるが、その実態が不明な点がある。そこで、国内の発生患者の症状や患者周辺の動物についての疫学調査を実施した。また、どの動物がその感染源となるのかについて協力研究者を中心に調査を実施した。さらに、実験動物を用いた感染モデルの作成を行ない、*C. ulcerans* 感染の実態解明と、感染源としての動物のリスク評価に役立てることを目的とした。

#### B. 研究方法：

##### 1) 新規発生患者周辺調査：

今年度ジフテリア様症状を呈した 2 名の患者が医療機関で確認された。医師と患者の同意を得たのち、患者からの病原体確認および患者の環境調査を行なった。さらに、患者および病院を所轄する自治体の衛生研究所との共同調査を実施した。

##### 2) 各地の動物からの菌分離、抗体調査：

###### 1. *C. ulcerans* の菌分離法：

被検体となる動物の口腔、鼻、背、耳、尾、腹部、尻、血液等のスワブを採取し、培養は検体をヒツジ血液寒天培地および亜テルル酸カリウム添加活性炭末加ヒツジ血液寒天培地（以下、荒川変法血液寒天培地）に塗抹、血液寒天培地は 18～24 時間後、荒川変法血液寒天培地は 24 または 48 時間後に疑われる集落について性状を検査した。同定は DSS 培地による糖分解性状のスクリーニング、カタラーゼ試験、ウレアーゼ試験を実施した後、*Api coryne*(bioMérieux)を