

平成 30 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「野生鳥獣由来食肉の安全性確保とリスク管理のための研究」

分担研究報告書

野生鳥獣の異常の確認方法等に関する研究

「細菌汚染の実態調査」

研究協力者 安藤匡子（鹿児島大学共同獣医学部病態予防獣医学講座）

**研究要旨** 狩猟される野性シカ、イノシシにはマダニなど吸血性の外部寄生虫が認められ、マダニはヒトに病原性を示すコクシエラ科、リケッチア科、アナプラズマ科細菌を含む多数の病原体を保有する。マダニに刺咬された動物はヒト病原体のレゼルボアとなる可能性がある。そこで、シカ、イノシシにおけるこれら細菌の保有状況を調査した。コクシエラ科およびリケッチア科細菌は検出されなかった。アナプラズマ科細菌は、シカ 12 頭およびイノシシ 6 頭から検出された。検出されたアナプラズマ科細菌遺伝子は、ヒトや家畜の病原アナプラズマに近縁のものがあり、国内では未報告の種もあった。更に、イノシシ及びシカにおける異常所見に関するデータも収集した。

#### A. 研究目的

コクシエラ科、リケッチア科、アナプラズマ科細菌は、マダニおよび野生動物が保有することが知られているが、国内の大型動物についての情報は少ない。ヒトが野生動物肉の喫食による可能性は不明である。しかし、狩猟動物の取り扱い過程において動物に付着していたマダニに吸着されたり、解体時に血液などと接触することにより暴露する可能性が考えられる。そこで、マダニが保有するコクシエラ科、リケッチア科、アナプラズマ科細菌がシカ、イノシシに感染しているからかにすることを目的とした。

#### B. 研究方法

##### 1) 検査臓器資料

山口県および鹿児島県より狩猟および有害鳥獣として捕獲されたシカ 43 頭、イノシシ 40 頭、アナグマ 35 頭から脾臓を回収した。脾臓は Sucrose-phosphate-glutamate 液で乳剤化し、一部から DNA を抽出した。

##### 2) コクシエラ科、リケッチア科、アナプラズマ科細菌の遺伝子検出と種の同定

種特異的遺伝子を標的としたプライマーを用い、リアルタイム PCR でスクリーニング検出し、nested PCR にて検出確認した。PCR 産物はダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定し、BLAST 検索、各細菌種の代表株との系統解析を行った。

##### 4) 野生獣における異常所見の収集

鹿児島県で捕獲されるシカ、アナグマに関して、解体の際に異常所見が認められた場合、写真撮影を行った。その一部は、岡林先生に病理所見を見ていただいた。

#### C. 研究結果

1) コクシエラ科およびリケッチア科細菌は検出されなかった（表 1）。

2) アナプラズマ科細菌は、シカ 12 頭（27.9%）、イノシシ 6 頭（12.5%）、アナグマ 10 頭（28.6%）から遺伝子が検出された（表 1）。

3) 得られた PCR 産物から、シカ由来 6 株、イノシシ由来 5 株、アナグマ由来 9 株の塩基配列が得られた。イノシシ由来 2 株、シカ・イノシシ・アナグマ由来各 1 株、アナグマ由来 6 株は、塩基配列がそれぞれ 100% 一致した。

4) 検出した *groEL* 遺伝子の BLAST 検索結果（表 2）。2 株が病原性が明らかな菌種と高い相同性を示した。イノシシ由来 1 株が *Ehrlichia ruminantium* と 95%、アナグマ由来 1 株が *Anaplasma phagocytophilum* と 96% の相同性であった。病原性は不明であるが、シカ由来 1 株が *Candidatus Ehrlichia shimanensis* と 100%、アナグマ由来 1 株が *Candidatus Ehrlichia khabarensis* と 94% の相同性であった。

5) アナプラズマ科細菌代表株との系統解析(groEL 遺伝子、230bp)の結果(図1)、7つのクレードに分かれた。国内で検出報告のないクレードに含まれる株、マダニからのみ検出されヒト・動物への感染性が不明なクレードに含まれる株があった。

#### D. 考察

1) *Anaplasma phagocytophilum* は、ヒト顆粒球性アナプラズマ症の起原菌であり、国内でも患者が報告されており、国内野生動物(シカ、イノシシ)からの遺伝子検出報告がある。海外では主にシカがレズルボアであるとされているが、日本ではシカ以外の動物もレズルボアになっている可能性が示された。

2) しかし、*A. phagocytophilum* と最も高い相同性であった株から得られた遺伝子配列は短かった(230bp)。アナプラズマ科細菌は、菌種間の相同性が高いことが知られており、今回得られた株を *A. phagocytophilum* と判断するにはさらなる検証が必要である。

3) 日本国内では未検出のアナプラズマ科細菌が検出され、多様なアナプラズマ科細菌が潜在することが示された。

4) マダニからのみ検出されていたアナプラズマ科細菌が動物から検出され、それらは哺乳動物への感染性を持つことが示唆された。

5) 検出されたアナプラズマ科細菌について、種を決定するために、他の遺伝子を確認する必要がある。

#### E. 結論

1) シカ、イノシシ、アナグマがアナプラズマ科細菌を保有することが示された。

2) ヒトに病原性がある *A. phagocytophilum* に近縁の株がアナグマから検出された。

3) ヒトがマダニ媒介感染症の起原細菌にベクターを介さずに感染するか不明であるが、野生動物が病原体を保有することが明らかになったことから取り扱う際には注意が必要である。

4) 遺伝子検出されたアナプラズマ科細菌が、哺乳動物に感染し病原性を有するか、検討する必要がある。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Sato H, Murai H, Ishida S, Fujita H, Andoh M, Ando S. Three human cases of tick bite associated with spotted fever group *Rickettsia* in Akita Prefecture, the northern part of Honshu, Japan. *Med Entomol Zool.* 69(2):49-54. 2018.

2) Yada Y, Talactac RM, Kusakisako K, Hernandez PE, Galay LR, Andoh M, Fujisaki K, Tanaka T. Hemolymph defensin from the hard tick *Haemaphysalis longicornis* attacks Gram-positive bacteria. *J Invertebrate Pathology.* 156:14-18. 2018

##### 2. 学会発表

1) 中村昂紀、米満研三、高野愛、前田健、安藤匡子「野生動物におけるコクシエラ科、リケッチア科、アナプラズマ科細菌の検出」第161回日本獣医学会学術集会(茨城:つくば国際会議場)2018年9月11日.

2) 中村昂紀、安藤匡子「野生動物からのコクシエラ科、リケッチア科、アナプラズマ科細菌の遺伝子検出」第25回リケッチア研究会(東京:国立感染症研究所), 2018年12月14日.

3) 池田智行、中村昂紀、安藤匡子「*Candidatus Neorhlichia mikurensis* 分離の試み」第25回リケッチア研究会(東京:国立感染症研究所), 2018年12月14日.

##### 3. 講演会

1) 安藤匡子「食べた〜い!〜食欲が起こす人獣共通感染症〜」平成30年度岡山県獣医師会公衆衛生講習会,(岡山:ピュアリティまきび),平成31年2月1日.

2) 安藤匡子「マダニ媒介性ズーノーシス」鹿児島小動物臨床フォーラム 2019年大会,鹿児島(鹿児島大学),平成31年2月3日.

#### 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. 実用新案登録

なし

表 1 . 野生動物からのマダニ媒介性感染症起因細菌の遺伝子検出。

| 科    | コクシエラ科             | アナプラズマ科                                   | リケッチア科              |                         |
|------|--------------------|---|---------------------|-------------------------|
| 種    | <i>C. burnetii</i> | <i>Anaplasma</i> 属/<br><i>Ehrlichia</i> 属 | <i>Rickettsia</i> 属 | <i>O. tsutsugamushi</i> |
| 遺伝子  | <i>com1</i>        | <i>groEL</i>                              | <i>gltA</i>         | 47kDa                   |
| シカ   | 0                  | 12/43 (27.9%)                             | 0                   | 0                       |
| イノシシ | 0                  | 6/40 (12.5%)                              | 0                   | 0                       |
| アナグマ | 0                  | 10/35 (28.6%)                             | 0                   | 0                       |
| 合計   | 0                  | 28/118<br>(23.7%)                         | 0                   | 0                       |

表 2 . 検出した *groEL* 遺伝子の BLAST 検索結果。

|      | 株数 | 各株の相同性の最も高い配列                           | 相同率 (%)   |
|------|----|---|-----------|
| シカ   | 1  | <i>Candidatus Ehrlichia shimanensis</i> | 100%      |
|      | 1  | <i>Anaplasma</i> sp.                    | 99%       |
|      | 4  | <i>Ehrlichia</i> sp.                    | 94 ~ 99%  |
|      |    | 病原性不明                                   |           |
| イノシシ | 1  | <i>Ehrlichia ruminantium</i>            | 95%       |
|      | 2  | <i>Anaplasma</i> sp.                    | 99%       |
|      | 2  | <i>Ehrlichia</i> sp.                    | 99 ~ 100% |
|      |    | 牛の水心嚢                                   |           |
|      |    | ヒト・動物のアナプラズマ症                           |           |
| アナグマ | 1  | <i>Anaplasma phagocytophilum</i>        | 95%       |
|      | 1  | <i>Candidatus Ehrlichia khabarensis</i> | 95%       |
|      | 6  | <i>Anaplasma</i> sp.                    | 96%       |
|      | 1  | <i>Ehrlichia</i> sp.                    | 94%       |
|      |    | 病原性不明                                   |           |

図1.シカ、イノシシ、アナグマ由来アナプラズマ科細菌 *groEL* 遺伝子 (230bp) 系統樹。



