

令和3年度～令和5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）
（分担）研究報告書

野生動物のククシエラ科、リケッチア科、アナプラズマ科細菌の保有状況に関する研究

研究分担者 鈴木康規（北里大学獣医学部）
研究協力者 安藤匡子（鹿児島大学共同獣医学部）

研究要旨：ククシエラ科、リケッチア科、アナプラズマ科細菌は、全身感染を起こす人獣共通感染症の起因病原体である。マダニがベクターとなる感染症も含まれる。野生動物をジビエとして処理・加工する際には動物の内臓や血液に直接接触する可能性があり、吸着しているマダニと接触する可能性もある。人への感染対策のために、野生動物におけるこれら細菌の保有状況を調査した。内臓（脾臓）、血液、吸着マダニから遺伝子検出を行い配列解析を行った。アナプラズマ科細菌が特定の地域のシカから高率に研究されたが、同地域のマダニからは検出されなかった。ククシエラ科、リケッチア科、アナプラズマ科細菌には多くの菌種が存在し、病原性が不明なものも多いため、継続した保有状況調査は重要である。野生動物の取り扱いの際には、通常的生活では存在しない病原体に暴露される可能性があり、基本的な感染防御対策を徹底する必要がある。

A. 研究目的

野生鳥獣を食肉利用するためには、狩猟・運搬・処理・解体等の工程があり、野生鳥獣の血液や外部寄生虫（特にマダニ）を介する人獣共通感染症の病原体に暴露される可能性がある。感染防止対策のためには病原体の存在を把握する必要がある。そこで、Q熱を起こすククシエラ科、日本紅斑熱やつつが虫病を起こすリケッチア科、アナプラズマ症を起こすアナプラズマ科細菌の保有状況を調査する。これらの細菌はマダニが保有する場合もあるため、捕獲した野生動物個体に寄生していたマダニ、野生動物の捕獲地域の植生から採集したマダニも調査対象とした。

ククシエラは宿主域が広く、海外では野生動物からの検出も報告されている。国内の野生動物における保有調査は古く、新しい情報が必要である。リケッチアは、日本紅斑熱患者の報告数の増加とシカやイノシシの生息域・個体数増加に関連するという報告があり、特に注意が必要である。アナプラズマは、国内に

様々な種が存在することは確認されているが、人や動物への病原性など明らかではないことが多い。しかし近年、諸外国でマダニ媒介性疾患が疑われるものの確定診断されない症例の中に *Anaplasma capra* など新興アナプラズマ症があることが報告されており、注視する必要がある。このような背景から、本研究の調査を行った。

B. 研究方法

1) 野生動物の脾臓および血液

2018年から2023年にかけて、鹿児島県において狩猟または有害鳥獣として捕獲された野生動物（シカ、ニホンザル、アナグマ）から採集した。シカは鹿児島県屋久島町のジビエ加工施設、アナグマは鹿児島県阿久根市のジビエ加工施設において解体される際に脾臓（あるいは肝臓）および血液を採材した。ニホンザルは食用には利用されないが、シカ・イノシシと同じ地域内に生息するため研究対

象とし、南日本野生動物保護管理センター・浅井隆之獣医師が捕獲した際に採材した。

2) マダニ

マダニは、ジビエ加工施設に搬入された動物に吸着／付着していた個体を採集した。屋久島においてはシカの生息行動範囲内（世界遺産登録地、国立公園地域、原生自然環境保全地域を除く）でハタ振り法にて植生上のマダニを採集した。マダニ種は形態学的に同定した。

3) DNA 抽出

動物の脾臓は SPG 液にて乳剤を作成し、その一部から DNA を抽出した。脾臓乳剤と血液は High pure PCR template kit (Roche) を用いた。マダニは外皮を消毒後に破碎し、アルカリ法にて抽出した。

4) 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

コクシエラは、*comI* および 16S rRNA 遺伝子をターゲットにした。リケッチアは、リケッチア科リケッチア属 *gltA* および 17kDa 外膜タンパク質遺伝子を、リケッチア科オリエンチア属は 47kDa 外膜タンパク質遺伝子をターゲットにした。アナプラズマは、*groEL* および 16S rRNA 遺伝子をターゲットにした。全て既報の PCR プライマーを用いた。

5) 塩基配列解析

得られた増幅産物は精製し、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。NCBI の web ツールにより blast 検索を行った。MEGA X を用いて Neighbor-joining 法で系統樹解析を行った。

(倫理面への配慮)

承認、届出、確認等が必要な研究に該当しない。

C. 研究結果

1) 野生動物およびマダニにおける細菌遺伝子保有状況

動物からアナプラズマ科細菌遺伝子が検出され、特に屋久島のシカ（ヤクシカ）（脾臓 89.5%、血液 77.8%）において高い保有率であった（表 1）。アナグマからも検出されたが（脾臓 1/1; 100%、血液 4/8; 50.0%）、サンプル数が少ないため保有率については判

断できなかった（表 1）。リケッチア科細菌はアナグマの（血液 4/8; 25.0%）、コクシエラ科細菌はニホンザル（血液 1/30; 3.3%）であった（表 1）。

マダニからは、リケッチア科リケッチア属細菌が屋久島のヤクシカ吸着マダニ (1/108; 0.9%) および植生マダニ (3/41; 7.3%) から検出された。コクシエラ科細菌はヤクシカ吸着マダニ (10/108; 9.3%) および植生マダニ (1/41; 2.4%) が検出された（表 2）。アナプラズマ科は検出されなかった。アナプラズマ陽性であった動物個体に吸着（吸血）していたマダニからもアナプラズマは検出されなかった。

オリエンチア属細菌はいずれのサンプルからも検出されなかった。

2) 野生動物が保有する細菌遺伝子の塩基配列決定および解析

増幅された PCR 産物はダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。得られた配列を blast 検索した結果、最も相同性の高い配列は令和 4 年度報告書の表 4~7 に示したとおりである。

コクシエラ科細菌については、16S rRNA 遺伝子のみ塩基配列が決定されたが、Q 熱の診断に用いられる外膜タンパク質 *comI* 遺伝子の配列は決定できなかった。Blast 検索では、本研究のマダニからの配列全てがマダニ共生菌と相同性が高く、100%一致する配列もあった。系統樹においても、人や動物に病原性を示す *Coxiella burnetii* ではなく、マダニ共生菌と判定した。

リケッチア科細菌の配列は、アナグマの血液から検出された配列ならびにマダニから検出された配列ともに、マダニ共生菌と考えられる配列と 99~100%の相同性でありマダニ共生菌と考えた。系統樹から紅斑熱群に属すると考えられたが、紅斑熱群リケッチアにも病原性がないことが明らかになった種があり病原性については不明である。

今回の調査では、アナプラズマ科細菌が動物サンプルから最も多く検出された。相同性検索と系統樹から、国内外で動物が保有する種と近縁であることが明らかになったが、人に顆粒球アナプラズマ症を起こす *Anaplasma phagocytophilum* とは異なった。ヤクシカが高

率に保有するアナプラズマは *Anaplasma capra* であると考えられた。

アナプラズマ遺伝子検出において、*groEL* と 16S rRNA 遺伝子の二つの遺伝子配列が得られたサンプルは、アナグマ脾臓 1 サンプル、ヤクシカ脾臓 5 サンプル、ヤクシカ血液 3 サンプルであった。また、脾臓と血液の両方から遺伝子配列が得られたのは、ヤクシカ 5 頭であった。

3) アナプラズマ保有ヤクシカ個体の臓器における病理組織学的検索

いくつかのヤクシカ個体については以前の研究班において主要臓器の組織病理を観察した。そこで、研究協力者の岡林佐知博士に依頼し、アナプラズマ保有個体に共通する病変など再度確認したが、アナプラズマ菌体やその感染を疑う所見は認められなかった。

D. 考察

本研究の対象細菌は、培養が困難であるために分離試験がほとんど行われていない細菌である。リケッチア症の診断には抗体検査が行われるが、紅斑熱群リケッチアでは抗体が交叉反応するため野生動物の保有種の特特定は困難である。コクシエラは感染の有無にかかわらず抗体保有者がいることが明らかになっていることから野生動物の単回検査からの抗体保有率の解釈は難しい。アナプラズマは菌種や株により抗原性に大きな差があることから抗体検査そのものが国内では普及していない。これらの感染症においては PCR 検査が一般に普及し、現在では人での急性期における診断にも用いられている。本研究で行った野生動物やマダニにおけるこれら細菌遺伝子の検出率をみると、野生動物を扱う人々の作業には大きな危険が伴っているように考えられる。しかし、実際には病原性細菌の他に、低病原性あるいは非病原性の近縁種が多く存在し、これらが同時に検出されていることを理解する必要があることが示された。

アナプラズマについては、ヤクシカが高率に保有していることが明らかになった。これは他の地域のシカと比較しても高い結果である。過去に当研究室で同じ方法で調査した九州・中国地方のシカでは陽性率は 27.9%

(12/43 頭) であり、他の報告と大きな差はなかった。ヤクシカから検出されたアナプラズマの特徴は、同一の遺伝子配列が多く 1 菌種または 1 株がヤクシカ (屋久島) において伝播していることが推測される。また、いずれの配列も日本、中国、韓国で検出された配列と相同性が高く、この地域に固有の種である可能性が考えられた。病理組織学的には共通する所見はなかったため、ヤクシカに対する病原性は低く、不顕性に感染が維持されているのかもしれない。しかし、*Anaplasma capra* の病原性については明確に示されていないため、今後、人と動物の両方への影響を明らかにする必要がある。海外では家畜や野生動物だけでなく人からの検出報告があったが病原性は不明瞭であった。しかし、マダニ媒介性感染症が疑われつつ確定診断に至らなかった症例からレトロスペクティブに *A. capra* が検出され、人に病原性を示すことが報告された。屋久島は世界遺産登録されており、ヤクシカは保護区域と人居住地を行き来していることから、環境保全と人への健康危害対策の両方から重要な課題である。

本研究ではニホンザルからは対象細菌はほとんど検出されなかった。日本紅斑熱とつつが虫病の患者報告が多い地域で採材していることから、興味深い結果である。

アナグマの血液からマダニ共生菌と考えられる配列が検出されたが、同一個体の脾臓からは検出されなかった。リケッチアは経験的に血液よりも脾臓からの検出率が高いことが知られており、アナプラズマも同様に考えている。本研究ではアナグマ個体に吸着していたマダニは調べることができなかったが、体内に注入されたマダニ共生菌が殺菌・排除される過程に一時的に血液中に存在したのかもしれない。人においても診断目的の PCR で非病原性リケッチアが検出され検査精度が問題視されたり、新興感染症と捉えられたりすることがある。人でもマダニ刺咬と基礎疾患などが重なった場合に日和見感染のようにマダニ共生菌が一時的に体内に存在する状態になる可能性を示唆する結果である。

コクシエラ科細菌は病原性のある *C. burnetii* は検出されなかった。マダニ共生菌である *Coxiella* spp. は比較的新しく存在が

認められ、その抗原性は *C. burnetii* と交叉する可能性が高く、Q 熱の疫学情報を難しくしていると考えている。

E. 結論

ジビエとして利用される動物も含めて野生動物はリケッチア科、アナプラズマ科細菌を保有している。保有菌種の病原性については明らかではないが、内臓だけでなく血液にも存在することから、日常的に基本的な感染対策を徹底する必要がある。

動物種、地域により保有率に差があることが明らかになったため、保有状況の調査は継続するべきである。特に動物の移動が制限されていたり、出入が著しい地域は注意が必要である。

本研究で高率に検出された *A. capra* と考えられるアナプラズマ科細菌を含めて、病原性を含む性状解析を行うために分離株を得る必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Galay R, Llaneta CR, Faye Monreal MK, Armero A, Baluyut AB, Regino CM, Sandalo KA, Vidina B, Talactac M, Tapawan L, Mojares MC, Alvarez C, Mago E, Encarnacion N, Andoh M, Tanaka T. Molecular prevalence of *Anaplasma marginale* and *Ehrlichia rhipicephalus* (*Boophilus*) microplus ticks from southern Luzon, Philippines. *Front Vet Sci.* 8: 746705, 2021
- Asai T, Usui M, Sugiyama M, Andoh M. A survey of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* prevalence in wild mammals in Japan using antimicrobial-containing media. *J Vet Med Sci.* 84(12): 1645-1652, 2022.
- Gotoh Y, Takano A, Andoh M, Kasama K, Nakamura K, Ando S, Hayashi T. Phylogenetic position and low genomic diversity of "*Candidatus*

Rickettsia kotlanii" inferred by complete genome sequences of two Japanese isolates. *Microbiol Immunol.* 67(6): 275-280, 2023

- Suzuki Y, Ishitsuka T, Takagi M, Sasaki Y, Kakuda T, Kobayashi K, Kubota H, Ono HK, Kabeya H, Irie T, Andoh M, Asakura H, Takai S. Isolation and genetic characterization of *Staphylococcus aureus* from wild animal feces and game meats. *Folia Microbiol.* 69(2):347-360, 2024.

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- 安藤匡子, Kwon MyoungHyun, 明石尚美, 本田俊郎. 甌島列島におけるリケッチア感染症のベクター調査. 第73回日本衛生動物学会大会, オンラインライブ開催 (鹿児島大学), 2021年4月16~18日
- 池田智行, Kwon MyoungHyun, 明石尚美, 安藤匡子. ヤクシカの大腸菌: 食中毒起因因子と薬剤耐性について. 第9回屋久島学ソサエティ, オンライン開催, 2021年12月4-5日
- 後藤真優, 浅井隆之, 安藤匡子. 鹿児島県の野生動物におけるアナプラズマ症, リケッチア症, Q熱起因菌細菌の遺伝子保有状況. 第165回日本獣医学会学術集会, オンラインライブ開催 (麻布大学), 2022年9月6日
- 浅井隆之, Kwon MyoungHyun, 明石尚美, 後藤真優, 安藤匡子. 鹿児島県の野生ニホンザルにおける薬剤耐性大腸菌の保有状況. 第165回日本獣医学会学術集会, オンラインライブ開催 (麻布大学), 2022年9月7日
- 浅井鉄夫, 臼井優, 杉山美千代, 安藤匡子. 抗菌剤含有培地を用いた野生哺乳動物における薬剤耐性大腸菌の分布. 第24回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 神奈川県川崎市 LiSE 川崎生命科学・環境研究センター, 2022年10月14日

- 6) 後藤真優, 安藤匡子. 屋久島のマダニとそのコクシエラ、リケッチア、アナプラズマ保有状況. 第74回日本寄生虫学会南日本支部大会第71回日本衛生動物学会南日本支部大会合同大会, 産業医科大学 (福岡県北九州市), 2022年10月29-30日
- 7) 安藤匡子. 人の感染症大流行 (コロナ禍) とダニ媒介性人獣共通感染症 (リケッチア症). 第13回日本リケッチア症臨床研究会 (特別講演、依頼), 滋賀県立県民交流センター・ピア座淡海, 2023年2月4-5日
- 8) 安藤匡子. Q熱とその起因菌 *Coxiella burnetii*. 第97回日本感染症学会総会・学術講演会・第71回日本化学療法学会学術集会合同学会, 日本熱帯医学会ジョイントシンポジウム「人獣共通感染症研究の魅力と今後の展望」, パシ

フォコ横浜 (神奈川県), 2023年4月28-30日

3. 講演会

- 1) 安藤匡子. マダニが関連する人獣共通感染症. 第67回兵庫県公衆衛生獣医師総会・第48回研修会, 兵庫県中央労働センター, 2023年10月28日

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図表

表 1. 野生動物およびマダニからの細菌遺伝子検出
ND：検査せず

動物	臓器	サンプル数	遺伝子検出数 (%)			
			コクシエラ	リケッチア	オリエンチア	アナプラズマ
ヤクシカ	脾臓	19	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	17 (89.5%)
	血液	9	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	7 (77.8%)
ニホンザル	脾臓	30	1 (3.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
アナグマ	脾臓	1	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)
	血液	8	0 (0.0%)	2 (25.0%)	0 (0.0%)	4 (50.0%)
マダニ	全組織	125	11 (8.8%)	9/125 (7.2%)	ND	0 (0.0%)

表 2. 屋久島のシカ（ヤクシカ）およびマダニからのアナプラズマ科細菌の検出

動物		サンプル数	陽性数	(%)
シカ（ヤクシカ）	脾臓	19	17	(89.5)
	血液	9	7	(77.8)
マダニ	シカ寄生（吸血）	66	0	(0.0)
	植生	41	0	(0.0)