

機関番号：10105

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21780283

研究課題名（和文） 北海道内のリケッチア属細菌の分布とイヌへの病原性の解明

研究課題名（英文） Survey of pathogenicity of *Rickettsia* species on dogs and distribution of *Rickettsia* species in Hokkaido.

研究代表者

松本 高太郎 (Matsumoto Kotaro)

帯広畜産大学・畜産学部・助教

研究者番号：90455709

研究成果の概要（和文）：

北海道内の犬およびマダニを調査した結果、本邦で初めて犬血液からリケッチア属細菌のDNAが検出され、遺伝子解析により *Rickettsia felis* 近縁種であることがわかった。また、8.9%の犬で血清抗リケッチア抗体価が高値を示し、犬がリケッチアに高率に曝露されていることが明らかとなった。犬寄生マダニの24.0%がリケッチアを保有しており、犬がマダニを介して人の住環境にリケッチアを持ち込む可能性が示された。

犬から検出されたリケッチアの近縁種がエゾリス寄生ノミから検出され、犬へのリケッチア伝播にノミが関与している可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Dogs and ticks infected with dogs in Hokkaido were examined for *Rickettsia* species using PCR and IFA. The rickettsial agent was detected by PCR in one canine blood sample, and the sequence analysis of the PCR product showed that the obtained sequence was closely related to *R. felis*. Serological survey showed that 8.9% of dogs had high serum titer to *Rickettsia* species, which revealed that large number of dogs in Hokkaido was exposed to rickettsial agents. Twenty-four percent of ticks infested with dogs harbored rickettsial agents, which suggested that dogs may bring rickettsial agents in ticks to the human environment.

Rickettsia species closely related to the rickettsial agent detected in dog was also detected in the flea infested with the squirrel, *Sciurus vulgaris orientis*, which may suggest that the flea has some role in transmission of rickettsiae to dogs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 臨床獣医学

キーワード：イヌ、*Rickettsia felis*、シュルツェマダニ、*Rickettsia helvetica*、ノミ、ヤマトマダニ、エゾリス、'*Candidatus Rickettsia tarasevichiae*'

1. 研究開始当初の背景

リケッチア属細菌は偏性細胞内寄生細菌であり、マダニやシラミ、ノミといった吸血節足動物をベクターもしくは保有宿主とする。ヒトに病原性を有するものとしては、*Dermacentor andersoni* および *D. variabilis* マダニによって媒介される *Rickettsia rickettsii* (ロッキー山紅斑熱病原体)、クリイロコイタマダニ (*Rhipicephalus sanguineus*) により媒介される *R. conorii* (地中海紅斑熱病原体)、およびネコノミにより媒介される *Rickettsia felis* などが知られてきた。

犬とリケッチアの関係については、*R. rickettsii* および *R. conorii* が犬に発熱、元気消沈、食欲不振などの症状を起こすことが、また、犬がロッキー山紅斑熱の人住環境への侵入に対するセンサーとなる可能性が指摘されていることから、獣医学的および公衆衛生的に重要であるものの、未だ不明な点が多い。

日本国内では現在までに *R. asiatica*、*R. helvetica*、*R. japonica*、および *R. tamurae* の4種のリケッチア属細菌が分離されている。このうち *R. japonica* と *R. helvetica* はヒトへの病原性を持つことが報告されている。これらのリケッチアが犬に及ぼす影響についてはまだ報告がないが、急死した日本紅斑熱患者の飼い犬を剖検した際に、脾臓および腎臓からリケッチア抗原が検出されており、また日本紅斑熱患者の飼い犬から抗 *R. japonica* 抗体が検出されたことから、*R. japonica* が犬に病原性を持つ可能性が疑われている。

北海道にはヤマトマダニやシュルツェマダニ、フタトゲチマダニなどが分布しており、十勝地方にてシュルツェマダニから *R. helvetica* および '*Candidatus Rickettsia tarasevichiae*' が検出されている。リケッチア属細菌が犬におよぼす臨床症状としては発熱や食欲不振など非特異的なものが報告されているが、北海道でマダニ媒介性疾患として知られているライム病とは抗体検査やPCR法などの特異的な検査を行わない限り区別がつきにくい。そのため、マダニ寄生後の発熱等は全てライム病として認識され、リケッチアによる疾患が見落とされている可能性がある。

近年、分子生物学的手法および細胞培養法の発達により、症例からだけでなくマダニをはじめとした吸血節足動物からもリケッチ

ア属細菌が検出・分離されてきた。吸血節足動物由来のリケッチアは発見当初は病原性が不明であったものの、ヒトに病原性を持つことが明らかになったものも多く、吸血節足動物のリケッチア保有状況調査は重要な意味を持つと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は北海道におけるリケッチア属細菌の犬への浸潤状況および病原性の有無を明らかにすることである。そこで、リケッチアのベクターであるマダニに寄生された犬について、リケッチアの保有状況と臨床症状を調べることにした。また、犬感染リケッチア種のベクターを明らかにする目的で、犬寄生マダニおよび野生動物由来吸血節足動物のリケッチア保有状況もあわせて調査した。

3. 研究の方法

(1) マダニ寄生犬のリケッチア保有状況調査

帯広畜産大学動物医療センターおよび道内開業動物病院に依頼し、マダニ寄生犬から全血を採取し、同時に年齢、性別、品種、住所、体温、主訴といった患畜のデータを収集した。全血からDNAを抽出し、リケッチア属細菌の *gltA* 遺伝子に特異的な nested-PCR によりリケッチア属細菌の保有状況を調査した。陽性検体については、臨床症状について検討し、またDNA配列を決定して既知の遺伝子配列と比較し、系統学的位置を明らかにした。

(2) 犬寄生マダニのリケッチア保有状況の調査

(1)のマダニ寄生犬よりマダニを採取し、DNAを抽出後、リケッチア属細菌特異的 nested-PCR によりリケッチア属細菌を検出した。陽性検体についてはDNA配列を決定して種を明らかにした。

(3) 間接蛍光抗体法 (IFA) による犬血清の抗リケッチア抗体保有状況調査

帯広畜産大学動物医療センターおよび道内開業動物病院に依頼し、犬血清を収集し、*R. helvetica* 寄生 L929 細胞を用いた IFA 法により抗リケッチア抗体の保有状況を調査した。

(4) エゾリス寄生ノミからのリケッチア属細菌の検出

帯広畜産大学動物医療センターに交通事故により搬入されたエゾリス1匹からノミ5匹を採取した。ノミ1匹については種の同定

を行った後、残りの個体については同定を行わずに、DNAを抽出、リケッチア属細菌の *gltA* 遺伝子を nested-PCR にて検出した。陽性サンプルについては、系統学的位置の解析のために、さらに *rpoB* 遺伝子について PCR および配列解析を行った。得られた配列について既知の遺伝子配列と比較した。

4. 研究成果

(1) マダニ寄生犬のリケッチア保有状況調査

オホーツク管内の1動物病院、十勝管内の6動物病院、上川・空知管内の2動物病院、石狩管内の1動物病院、渡島管内の2動物病院から、マダニ寄生犬の血液162検体を収集した。血液検体からDNAを抽出し、リケッチア属細菌特異的 nested-PCR を行ったところ、1検体が陽性を示した (0.62%、1/162)。これは日本において犬からリケッチア属細菌が検出された初めての報告である。

リケッチアが陽性であった犬は、渡島管内で飼育されているヨークシャーテリア、雌、1歳であり、避妊手術の術前検査のために来院した。体温は38.0°Cで発熱などの臨床症状は認められず、このリケッチアが犬に対して病原性を持つ証拠は得られなかった。この犬に寄生していたのはシュルツェマダニ成ダニ雌であったが、この個体からはリケッチア属細菌が検出されず、犬から検出されたリケッチア属細菌のベクターは不明であった。

陽性 PCR 産物の配列を決定したところ、321bp の配列が得られ、既知のリケッチア種の遺伝子と比較したところ、*Rickettsia felis* の *gltA* 遺伝子と最も高い類似性を示した (97.2%)。 *R. felis* は全世界に分布しており、ネコノミがベクターであるとされている。また、リケッチア属細菌の *gltA* 遺伝子配列に基づいて作成した系統樹を作成したところ、*R. felis* と同じクレードに属したものの、新種である可能性が考えられた (図1)。このリケッチアが犬血液から検出されたことから、犬が保菌動物となる可能性が考えられた。

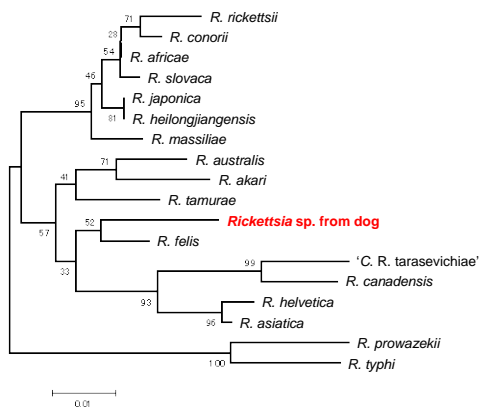


図1. リケッチア属細菌の *gltA* 遺伝子配列に基づいてNeighbor-Joining法にて作成した系統樹。"Rickettsia sp. from dog" が今回検出されたリケッチア属細菌。

(2) 犬寄生マダニのリケッチア保有状況および犬への影響の調査

マダニ寄生犬162頭より、マダニ171匹を採取した。採取したマダニの地域別採取数およびリケッチア属細菌保有状況を表1に示した。なお、シュルツェマダニとヤマトマダニの1匹ずつに成ダニ雄がいたのを除いて、全て成ダニ雌であった。

表1. マダニのリケッチア属細菌保有状況

地域	マダニ種	数(匹)	陽性数(%)		
			Rh*	Rt*	UR*
オホーツク	シュルツェマダニ	8	3 (37.5)	0 (0)	0 (0)
	ヤマトマダニ	3	0 (0)	0 (0)	0 (0)
十勝	シュルツェマダニ	64	14 (21.9)	11 (17.2)	1 (1.5)
	ヤマトマダニ	12	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	キチマダニ	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
上川・空知	シュルツェマダニ	23	4 (17.4)	4 (17.4)	2 (8.7)
	ヤマトマダニ	10	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	キチマダニ	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
石狩	シュルツェマダニ	5	0 (0)	1 (20)	0 (0)
	ヤマトマダニ	9	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ダグラスチマダニ	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
渡島	シュルツェマダニ	10	0 (0)	0 (0)	1 (10)
	ヤマトマダニ	24	0 (0)	0 (0)	0 (0)
合計	シュルツェマダニ	110	21 (19.1)	16 (14.5)	4 (3.6)
	ヤマトマダニ	58	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	キチマダニ	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ダグラスチマダニ	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)

*Rh: *R. helvetica*, Rt: '*C. R. tarasevichiae*', UR: 未分類リケッチア種

表1から、オホーツク、十勝および上川・空知ではシュルツェマダニが、石狩と渡島ではヤマトマダニが犬に寄生する主要なマダニであることが明らかとなった。また、シュルツェマダニの37.3%がリケッチアを保有していたが、ヤマトマダニ、キチマダニ、およびダグラスチマダニからはリケッチア属細菌は検出されなかった。

マダニ検体に対するPCRの結果から、シュルツェマダニは高率にリケッチアを保有しており (表1)、犬がマダニを介して人の生活環境にリケッチアを持ち込む可能性が示された。特に *R. helvetica* は人への病原性が報告されていることから、今回の所見は公衆衛生学的に重要である。

40頭の犬がリケッチア保有マダニに寄生されていた (うち1頭にはリケッチア保有マダニが2匹寄生していた)。リケッチアは犬に発熱、元気消沈、食欲不振を引き起こすとされているが、リケッチア保有マダニに寄生された犬のうち、39.5°C以上の発熱を示したのは *R. helvetica* 陽性マダニに寄生された1頭だけであり、この犬はワクチン接種目的で来院した際にマダニ寄生が見つかったもので、臨床的な異常は見られなかった。この犬の血液からはリケッチアは検出されなかった。また、*R. helvetica* 陽性マダニに寄生された1頭が元気消沈、食欲不振を示し、感染症を疑った獣医師がアンピシリンを投与したところ、翌日には状態が改善した。アンピシリンはリケッチアに有効とされており、また、犬の血液からリケッチアが検出されなかったため、患犬の臨床症状にリケッチアが

関与していたかどうかは不明であった。なお、この犬に寄生していたマダニはボレリア、エーリキア、アナプラズマは保有していなかった。

リケッチアはマダニを介して犬体内に侵入すると考えられるが、今回の調査ではリケッチア保有マダニに寄生された犬で、リケッチアが原因で臨床症状を示していると考えられる症例は認められなかった。このことから、今回の調査でマダニから検出された *R. helvetica*、'*C. R. tarasevichiae*' は犬に対して病原性を持たないか、持っているとしても非常に弱いものであると考えられた。

(3) 間接蛍光抗体法 (IFA) による犬血清の抗リケッチア抗体保有状況調査

北海道内の犬より採取した血清 224 検体について、*R. helvetica* を抗原とした IFA を行ったところ、20 検体 (8.9%) が 40 倍以上の抗体価を示した。しかしながら、これらの犬でリケッチアに関連していると考えられる症状を示したものはなかった。

今回の調査より北海道においても犬が紅斑熱群リケッチア保有マダニに曝露されるリスクがあることが考えられた。

(4) エゾリス寄生ノミからのリケッチア属細菌の検出

交通事故により帯広畜産大学動物医療センターに運び込まれたエゾリス 1 個体より、ノミ 5 匹を採取した。このうち、1 匹のノミについて種の同定を行ったところ、*Aenigmopsylla grodekovi* であった。ノミ 5 匹からそれぞれ DNA を採取し、前述のリケッチア属細菌特異的 nested-PCR を行ったところ、全て陽性を示し、得られた配列も全て犬で得られたものと一致した。このうち 1 検体について 1234bp の *gltA* 遺伝子と 3927bp の *rpoB* 遺伝子配列を決定したところ、*gltA* 遺伝子は *Rickettsia* sp. SGL01 と最も高い類似性を示し (98.5%)、既知の種については *R. felis* と最も高い類似性を示した (97.9%)。 *rpoB* 遺伝子については、*R. felis* と最も高

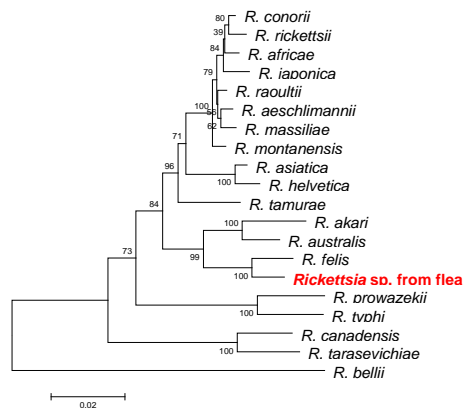


図2. リケッチア属細菌の *gltA* 遺伝子を基に Neighbor-joining 法により作成した系統樹。"Rickettsia sp. from flea" がノミから検出されたリケッチア属細菌。

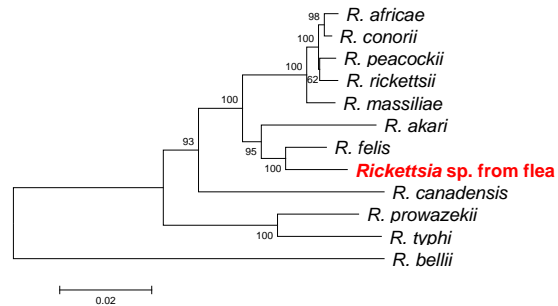


図3. リケッチア属細菌の *rpoB* 遺伝子を基に Neighbor-joining 法により作成した系統樹。"Rickettsia sp. from flea" がノミから検出されたリケッチア属細菌。

い類似性を示した (97.9%)。系統樹による解析では、*gltA* および *rpoB* の配列は療法とも *R. felis* に近縁であることが示された (図 2 および 3)。

エゾリス寄生ノミから検出されたリケッチア属細菌の *gltA* 遺伝子配列は、犬血液から検出された配列と一致したことから、犬へのリケッチア属細菌の伝播にノミが関与している可能性が考えられた。また、既知の種の中で最も近縁であった *R. felis* は人に病原性を持つことが知られているが、今回検出されたリケッチア属細菌の人のに対する病原性は不明である。今後、本リケッチア種の犬および人への病原性、分布について、さらなる調査が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

(1) 松本 高太郎、竹内 俊彦、猪熊 壽. 北海道の飼育犬からの *Rickettsia felis* 近縁種の検出. 第 151 回日本獣医学会. 平成 23 年 3 月 30 日. 東京農工大学、東京.

(2) 松本 高太郎、佐々木 広美、山内 健生、猪熊 壽. エゾリス由来ノミからのリケッチア属細菌の検出. 第 56 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 北日本支部合同大会. 平成 22 年 10 月 2 日. 北海道大学、北海道.

(3) 松本 高太郎、佐々木 広美、山内 健生、猪熊 壽. エゾリス由来ノミからのリケッチア属細菌の検出. 第 150 回日本獣医学会. 平成 22 年 9 月 16 日. 帯広畜産大学、北海道.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 高太郎 (Matsumoto Kotaro)

帯広畜産大学・畜産学部・助教

研究者番号：90455709

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：