

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780307

研究課題名（和文） エゾリスとノミ、リケッチアの疫学的関係の解明

研究課題名（英文） Epidemiological survey of *Rickettsia* species from fleas infested with red squirrels (*Sciurus vulgaris orientis*)

研究代表者

松本 高太郎 (MATSUMOTO KOTARO)

帯広畜産大学・畜産学部・講師

研究者番号：90455709

研究成果の概要（和文）：

北海道十勝管内ののべ 66 個体のエゾリスから、血液 41 検体、脾臓 29 検体、及び体表のノミ 475 匹を採取した。エゾリスの血液及び脾臓からはリケッチア属細菌は検出されなかったが、種の同定が可能であったノミ 342 匹のうち 69 匹（20.2%）からリケッチアが検出された。4 種類の遺伝子の部分配列を決定し、これらは全て *Rickettsia felis* と近縁であった。また、ノミ 15 匹からリケッチア属細菌の分離を試み、うち 1 匹からリケッチア属細菌の分離に成功した。

研究成果の概要（英文）：

Forty one blood, 29 spleen, and 475 flea samples were taken from a total of 66 red squirrels in Tokachi region, Hokkaido. No rickettsial agent were detected from blood and spleen samples, however, 69 (20.2%) of 342 flea samples of which tick species were identified were positive for *Rickettsia* species. Partial sequences of 4 genes of detected rickettsiae were determined, which were close to *Rickettsia felis*. Fifteen fleas were used for isolation of rickettsiae, and rickettsial agent was successfully isolated from one flea.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：エゾリス、ノミ、リケッチア

## 1. 研究開始当初の背景

リケッチア属細菌はグラム陰性の偏性細胞内寄生細菌であり、マダニやノミ、シラミといった吸血節足動物をベクターとする。現在までにヒトに病原性を持つリケッチアとして、*Rickettsia rickettsii* や *R. conorii* といったマダニ媒介性紅斑熱群リケッチアや、*R. prowazekii* のようなシラミ媒介性のチフス群リケッチアが報告されてきた。近年の分子生物学的手法および細胞培養法の発達により、症例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。これらのリケッチアは、発見当初は病原性が不明であったものの、1984 年から 2005 年までに 11 の種・亜種がヒトに病原性を持つことが明らかになっており、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。

ノミによって媒介されるリケッチアとしては *R. felis* と *R. typhi* が知られている。*R. felis* は新興感染症として知られるノミ媒介性紅斑熱の病原体であり、1994 年に最初の患者がアメリカで報告されて以降、メキシコ、ブラジル、フランス、ドイツ、タイ、チュニ

ジアでも発生が報告されている。分子疫学的な調査では、南北アメリカ大陸、ヨーロッパ、アフリカ、東南アジア、ニュージーランドの、主にネコノミから検出されており、世界中に分布していると考えられている。我が国のノミから *R. felis* を検出したという報告は未だなされていない。

エゾリスは北海道全域の平野部から亜高山帯の森林や森に生息しており、都市部においても公園で姿をよく見かける、北海道では人に最も身近な野生動物である。エゾリスに寄生するノミについては、*Monopsyllus indages indages* や *Aenigmopsylla grodekovi*、*Neopsylla acanthina*、*Tarsopsylla octodecimdentatus* が報告されており、エゾリス 12 個体から 125 匹のノミが採取されたという報告もある。現在までこれらのノミが人体を刺咬した例は報告されていないが、ネコノミやネズミノミ類は人体刺咬を行うことが知られており、また北海道ではスズメ寄生ノミがイヌを介してヒトに刺咬加害した例が報告されている。エゾリスがヒトに最も身近な野生動物であること、1 個体あたりのノミ寄生数が少なくないこと、そして近年自然を志向する人々が増えており、エゾリスの生息場所と人の行動圏が重なる機会が多いことから、エゾリスに寄生しているノミが直接的に、もしくはイヌなどの伴侶動物を介して間接的にヒトに加害する可能性は少なくないと考えられる。

我々は、交通事故により帯広畜産大学動物医療センターに搬入されたエゾリスより *A. grodekovi* を含むノミ 5 個体を採取し、全ての個体から PCR 法によりリケッチア属細菌を検出した。このリケッチア属細菌について *gltA* 遺伝子および *rpoB* 遺伝子の一部を解析した結果、ノミ媒介性紅斑熱の病原体である *R. felis* と最も近縁であることが明らかとなった。また、「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」(若手(B)、平成 21~22 年度、科学研究費補助金)において、北海道内のイヌの血液より、エゾリス由来ノミから検出されたものと非常に近縁なリケッチア属細菌が検出されたことから、このリケッチアのヒト生活圏への浸潤が疑われた。しかしながら、このリケッチアの保有宿主やベクターは不明であり、また、このリケッチア属細菌は分離されていないため、血清を用いた疫学調査を行おうとしてもできない状況にある。

## 2. 研究の目的

我が国では現在まで、マダニのリケッチア保有状況については多くの調査がされてきたが、ノミについては調べられていない。北海道内ではエゾリス寄生ノミからリケッチア属細菌が検出されたが、その分布やベクタ

ーについては不明であり、分離がなされていないことから疫学調査を行うための抗原も用いることが出来ない。本研究の目的は、北海道のエゾリスおよびその寄生ノミのリケッチア保有状況を調べることでリケッチアの保有宿主やベクターを明らかにし、また今後の疫学調査への応用を視野に入れて、ノミ由来リケッチア属細菌を分離することにある。

## 3. 研究の方法

シャーマントラップを用いてエゾリスを捕獲し、イソフルラン麻酔下で血液および体表のノミを採取した。麻酔から覚めた後、エゾリスは捕獲場所にて放獣した。また、交通事故にあったエゾリス死体を受け入れ、体表のノミ、血餅、および脾臓を採取した。捕獲場所または事故死体を回収した場所を記録した。

血液、血餅、および脾臓から、市販のキットを用いて DNA を抽出し、*gltA* 遺伝子を標的としたリケッチア属特異的 nested-PCR を行った。また、PCR が陽性であった検体については、PCR 産物を精製し、ダイレクトシーケンスにより遺伝子配列を決定した。得られた配列について、BLAST により検索を行い、既知のリケッチア種との配列の比較を行った。また、陽性検体については 16SrRNA、*gltA* (より長い配列)、*ompB*、*geneD*、および *rpoB* 遺伝子の配列解析を試み、系統学的解析を行った。

ノミについては、体表の一部に傷を付けてから市販のキットを用いて DNA を抽出した。残ったノミの外骨格を用いて形態学的分類を行い、属もしくは種を決定した。DNA サンプルについては、血液や脾臓と同様、リケッチア属特異的 nested-PCR を行い、ノミのリケッチア属細菌保有状況を解析した。

一部のノミは DNA 抽出には供さず、XTC-2 細胞を用いたリケッチア分離に用いた。ノミの表面をエタノールで消毒後、培地で 2 回すすいでエタノールを取り除いた。ノミの虫体を 1.5ml チューブにいれ、ホモジェネートしたものを XTC-2 細胞の培養上清に添加した。細胞培養上清から DNA を抽出し、*gltA* 遺伝子を標的としたリケッチア属特異的 PCR を行うことでリケッチア属細菌の分離を確認した。

## 4. 研究成果

北海道十勝管内の 4 自治体および釧路管内の 1 自治体より、捕獲もしくは事故死体の受入れによりのべ 66 個体のエゾリスを採取し、血液 41 検体、脾臓 29 検体、および体表のノミ 475 匹を採取した。エゾリス 55 個体からノミが採取され (83.3%)、エゾリス 1 個体あたりの平均ノミ寄生数は約 7.2 匹であった。またエゾリス 1 個体から最多で 58 匹のノミ

が採取された。このことから、エゾリスの多くがノミに寄生されており、個体によっては非常に多数のノミに寄生されていることが示された。

エゾリスの血液、血餅および脾臓から抽出した DNA をリケッチア属特異的 nested-PCR にかけてが、リケッチアは検出されなかった。このことから、エゾリスのリケッチア属細菌の保有宿主としての役割は大きくないものと考えられた。

エゾリスから採取されたノミのうち、342 匹について形態学的な分類を行った結果、272 匹は *Monopsyllus* 属、69 匹は *Aenigmopsylla grodekovi*、1 匹は *Ctenophthalmus* 属であった (図 1、2)。ノミから抽出した DNA 検体についてリケッチア属特異的 nested-PCR を行ったところ、*Monopsyllus* 属ノミでは 14.3%、*A. grodekovi* では 43.5% が陽性であった (図 2)。これらのことから、エゾリスに寄生しているノミについて、*Monopsyllus* 属が優勢であるものの、リケッチア属細菌を高率に保有するノミは *A. grodekovi* であることが示された。

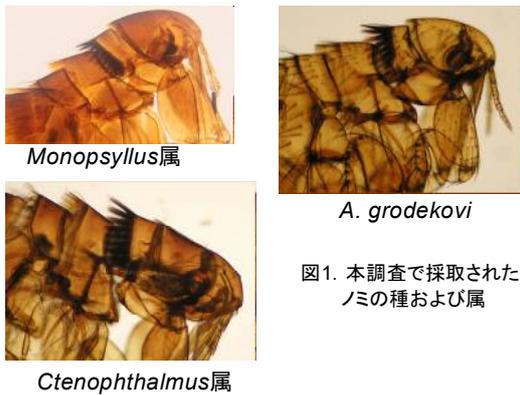


図1. 本調査で採取されたノミの種および属

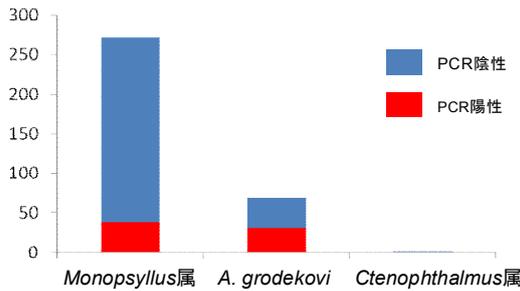


図2. ノミの属・種の個体数、およびノミの属・種ごとのリケッチア属特異的PCR陽性数

ノミから得られた PCR 産物の配列決定を行い、321bp の *gltA* 遺伝子配列が得られた。*Monopsyllus* 属から得られた配列と *A. grodekovi* から得られた配列は 1 塩基が異なっており、これらはリケッチア属細菌の既知の種としては *Rickettsia felis* と最も配列が類似していた (99.4-99.7%) (図 3)。これらのことから、エゾリスから検出されたリケッチア属細菌は *R. felis* と近縁であること、

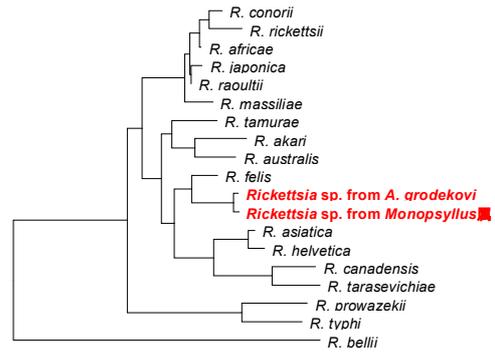


図3. リケッチア属細菌の *gltA* 遺伝子の部分配列 (321bp) を基に Neighbor-Joining 法にて作成した系統樹

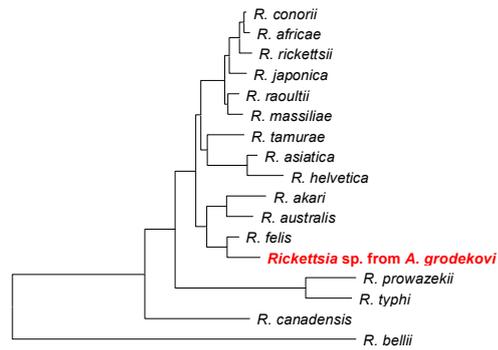


図4. リケッチア属細菌の *ompB* 遺伝子の部分配列 (2,051bp) を基に Neighbor-Joining 法にて作成した系統樹

*Monopsyllus* 属が保有するリケッチアと *A. grodekovi* が保有するリケッチアは異なる株である可能性があること、が示された。また、リケッチア属細菌の検出されたノミは十勝管内の 1 自治体、および釧路管内の 1 自治体から採取されたことから、このリケッチア属細菌が道内に広く分布している可能性が示された。

*Monopsyllus* 属ノミから検出されたリケッチア属細菌について、より長い *gltA* および *ompB* 遺伝子の部分配列を決定し、既知の種の配列と比較した結果、*R. felis* と最も類似していることが明らかとなった (98.8%-99.7%)。また、*A. grodekovi* から検出されたリケッチア属細菌の *gltA*、*ompB*、16SrRNA、*rpoB* および *geneD* 遺伝子の部分配列を決定し、既知種との比較を行った結果、*R. felis* と最も類似していた (95.1%-99.6%) (図 4)。複数種類の遺伝子配列を解析した結果、全ての配列が *R. felis* に近縁であったことから、エゾリス寄生ノミの保有するリケッチア属細菌は *R. felis* に近縁であることが明らかとなった。しかしながら、Pierre-Edouard ら (2003) が示した条件と比べるとその配列類似性は同種といえるほど高くないことから、エゾリス由来ノミのリケッチア属細菌は *R. felis* とは異なる種である可能性が考えられた。

ノミ 15 匹を個体毎にホモジェネートした

ものを XTC-2 細胞の培養上清に加え、リケッチア属細菌の分離を試みた。*A. grodekovi* 由来の 1 匹のサンプルで、培養上清がリケッチア属特異的 PCR に陽性を示した。分離されたリケッチア株は、これまでの系統解析から新規リケッチア種である可能性が示唆され、さらなる系統解析を行う必要がある。また、分離されたリケッチア株は、病原性の解明および疫学調査への応用が期待される。

#### 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 2 件)

①池川晃世、松本高太郎、猪熊壽. エゾリス及びその寄生ノミのリケッチア保有状況調査. 第 58 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. 2012 年 10 月 6 日. 旭川

②松本高太郎、池川晃世、猪熊壽. エゾリス寄生ノミのリケッチア属細菌保有状況調査. 第 154 回日本獣医学会学術集会. 2012 年 9 月 16 日. 盛岡

#### 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・講師

研究者番号：9 0 4 5 5 7 0 9

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：