

平成 2 6 年度
動物由来感染症予防体制整備事業報告書

平成 2 7 年 3 月
岐阜県健康福祉部生活衛生課

目次

はじめに	1
1 事業の目的	1
2 事業の内容	1
(1) 事業の概要	1
(2) 事業の実施状況	2
3 動物由来感染症発生動向調査結果	4
(1) トキソプラズマ症	4
(2) E型肝炎	5
(3) 重症熱性血小板減少症 (SFTS)	6
(4) 日本紅斑熱	8

はじめに

近年、少子高齢化及び核家族化の進む中、動物を家族の一員として飼養する飼い主が増え、人と動物との関わりもより密接になっています。人と動物との距離が近くなればなるほど、動物が持つ病原体が人に感染して引き起こされる動物由来感染症のリスクは高まります。また、最近では、重症熱性血小板減少症候群（SFTS）や鳥インフルエンザなどの新しい動物由来感染症が出現し、それらに感染する患者の増加も危惧されています。

これらの動物由来感染症を予防するためには、家庭で飼養されている動物、すなわちペット等の病原体保有状況を把握することが大変重要です。そこで、岐阜県では、今年度からペット（イヌ及びネコ）における動物由来感染症発生動向調査を行い、その結果を関係機関及び関係者で共有することにより、ペットの適正な飼養方法などを含めた動物由来感染症予防の正しい知識の普及啓発を進めていきたいと考え、本事業に取り組むこととしました。

1 事業の目的

岐阜県内で飼養されているペットの病原体保有状況を調査・分析し、動物由来感染症に関する正しい知識を普及することにより、動物由来感染症の予防及び発生時の適切かつ迅速な対応を促進します。

（平成26年度の目標）

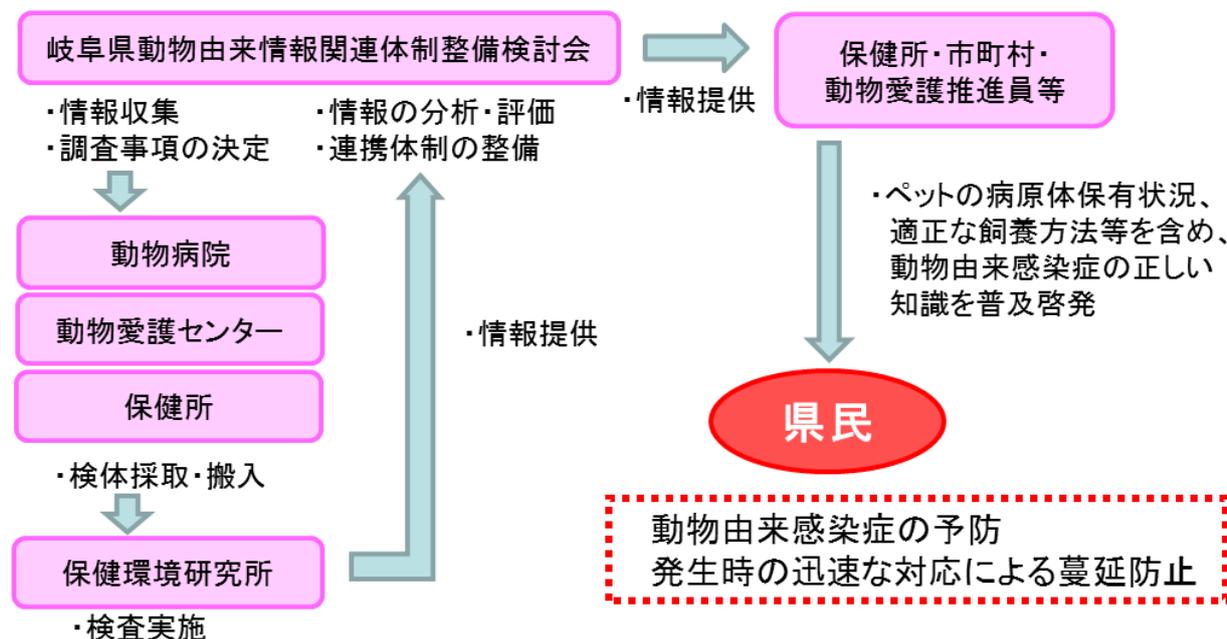
これまで県では、ペットにおける動物由来感染症の調査が行われていなかったため、事業初年度である今年度は、検体の採取や検査体制の確立を目標とします。

2 事業の内容

（1）事業の概要

有識者による岐阜県動物由来情報関連体制整備検討会で調査事項や検査体制の検討を行い、県内の動物病院、動物愛護センターで検体採取をし、保健環境研究所で検査を実施します。検査で得られた情報を前述の検討会において評価・分析し、県民へ動物由来感染症の正しい知識等を普及啓発することで、動物由来感染症の予防及び発生時の迅速な対応に役立てます。

○ 動物由来感染症発生動向調査



(2) 事業の実施状況

ア 岐阜県動物由来感染症情報関連体制整備検討会について

① 開催状況

【第1回】

日時：平成26年8月5日（月）
 場所：県庁6階6南3会議室
 議題：動物由来感染症予防体制整備事業について
 最近の動物由来感染症の動向について
 動物由来感染症発生動向調査実施方法について
 狂犬病発生対応マニュアル（案）について

【第2回】

日時：平成27年3月6日（金）
 場所：県庁6階6南2会議室
 議題：動物由来感染症発生動向調査結果について
 狂犬病発生対応マニュアルについて

② 検討会参加者

所属	職名	氏名
岐阜大学医学部附属地域医療医学センター	教授	村上啓雄
岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科	教授	杉山 誠
人獣共通感染症学研究室		
一般社団法人岐阜県医師会	常務理事	矢嶋茂裕
公益社団法人岐阜県獣医師会	会長	近藤信雄
岐阜県保健環境研究所	所長	加藤樹夫
岐阜県健康福祉部保健医療課	課長	有賀玲子
岐阜県動物愛護センター	所長	村瀬繁樹
岐阜県健康福祉部生活衛生課	課長	樋口行但

イ 動物由来感染症発生動向調査事業について

① 調査対象の選定

a 調査対象感染症

調査対象感染症	選定理由
トキソプラズマ症	・過去には食肉衛生検査所において家畜、家禽の調査が行われているが、ペットについては調査が行われていない。
E型肝炎	・妊婦が感染した場合、劇症化しやすいという報告があり注意を要する。 ・イヌ及びネコからもHEV抗体が検出された報告があるが、県内の状況は不明である。
重症熱性血小板減少症候群（SF TS）	・県内では現在までに患者の発生は報告されていないが、県内で採取されたマダニからウイルス遺伝子が、狩猟犬の血清から抗体が検出されている。 ・県内で飼養されているペットについてこれまで検査されていない。
日本紅斑熱	・県内では現在までに患者の発生は報告されていないが、近隣の三重県では毎年30件前後の報告がある。 ・県内で飼養されているペットについてこれまで検査されていない。

b 調査対象動物等

感染症	動物	検体	検査法	検体数
トキソプラズマ症	イヌ・ネコ	血清	抗体検査	110
E型肝炎	イヌ・ネコ	血清	遺伝子検査	111
重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)	イヌ・ネコ	血清	抗体検査	111
		マダニ	遺伝子検査	69
日本紅斑熱	イヌ・ネコ	マダニ	遺伝子検査	69

(血清検体数の違いは検体量不足のため実施できない検査が生じたため)

② 調査地点

県内5圏域(岐阜市を除く)の動物病院及び動物愛護センター計53か所で検体を採取

動物病院 52施設

圏域	施設数
岐阜	5施設
西濃	23施設
中濃	9施設
東濃	13施設
飛騨	2施設

動物愛護センター 1施設

圏域	施設数
中濃	1施設

③ 調査時期

平成26年5月～平成27年2月

検体採取期間：平成26年5月～平成26年10月

検査実施期間：平成26年11月～平成27年2月

④ 役割分担

実施内容	実施施設等
検体採取	動物病院、動物愛護センター
飼養状況調査	動物病院、動物愛護センター
検体搬送	保健所、動物愛護センター
検査実施	保健環境研究所
調査結果の情報提供	動物病院(飼い主へ情報提供) 動物愛護センター(譲渡者へ情報提供) 生活衛生課(県ホームページでの情報提供)

ウ 調査結果の分析・評価

第2回検討会で実施

エ 情報提供

検体を採取したイヌ及びネコの飼い主に対して検査結果を通知

報告書を作成し、県ホームページに掲載するとともに、保健所・市町村・動物愛護推進員に情報提供

3 動物由来感染症発生動向調査結果

◎検査材料

県内で飼養されているイヌ・ネコであり、県内動物病院に来院した患畜および県動物愛護センターに収容された個体から採取された血液を血清分離し、凍結した状態で搬入した。また、患畜等にダニが付着していた場合については、そのダニも検体として搬入した。なお、動物病院採取の検体については、飼い主から検査に同意が得られた場合にのみ検体を採取し、ダニ検体については、1個体に複数のダニが付着していた場合でも、ダニ1検体としてカウントした。

表1 動物由来感染症発生動向調査搬入検体

検体	動物種、性別						合計	検体	飼養環境					
	イヌ			ネコ					イヌ			ネコ		
	オス	メス	小計	オス	メス	小計			屋外	屋内	未	屋外	室内	未
血清	31	28	59	27	24	51	111	血清	22	17	20	32	9	11
ダニ	27	29	56	9	4	13	69	ダニ	27	21	8	8	1	4

ネコ血清1について性別記載なし

未:未記載

イヌ血清5頭分は同一個体から2検体ずつ採取

(1) トキソプラズマ症

ア 背景

トキソプラズマ症の病原体であるトキソプラズマ原虫は、ほぼすべての温血動物に感染し、人の場合、トキソプラズマのシストを含む食肉を加熱不十分で喫食したり、ネコの糞便に含まれるオーシストを経口的に摂取することで感染する。

多くの場合、症状は現れないか、軽度の急性感染症状を呈する。免疫不全者には重篤な症状を引き起こし、また、妊娠中の女性が感染すると、胎児に重篤な症状をもたらす先天性トキソプラズマ症の原因となる。

本県ではこれまで家畜、家禽のトキソプラズマ抗体調査を行ったことはあるが、イヌ及びネコの状況を調査したことがないことから、県内で飼養されているイヌ及びネコの血清中の抗体保有状況を調査することとした。

イ 調査材料及び調査方法

エンザイグノストBトキソプラズマ/IgG(シーメンズ)を基本にして、二次抗体をHRP標識抗ヒトIgGからHRP標識Protein A/Gに置き換えて使用した。凍結保存しておいた血清検体を解凍し、室温に戻したうえで、検査を開始した。検体を添付の検体希釈液で20倍希釈し、あらかじめ200 μ Lの検体希釈液を入れておいたウェルに希釈検体をそれぞれ20 μ Lずつ分注し、37 $^{\circ}$ C、60分間インキュベート、添付の洗浄液でウェルを4回洗浄した後、HRP標識Protein A/G(イヌ:25,600倍希釈、ネコ:51,200倍希釈)を加え、37 $^{\circ}$ C、60分間インキュベートした。反応後、再度ウェルを添付の洗浄液で4回洗浄し、クロモゲン(基質)溶液50 μ Lを加え、遮光した状態で20 $^{\circ}$ C、30分反応させた。反応終了後、反応停止液を加え、450nmで吸光度を測定した。

判定は各ウェルの吸光度から陰性コントロールの吸光度を差し引き、0.1を超えたものを陽性とし、0.05以下のものを陰性とした。

ウ 検査結果

イヌ 58 検体（53 匹）のうち 14 検体（11 匹）でトキソプラズマ抗体陽性、3 検体で判定保留（1 検体（メス）は検体量が不足検査不能）、ネコ 52 検体（52 匹分）のうち 7 検体（7 匹）で抗体陽性と判定された。

エ 考察

今回はイヌで 20.7%、ネコで 13.5%の個体からトキソプラズマ抗体が検出された。抗体陽性となった個体を室内・屋外の飼養環境別にみると、屋外もしくは自由飼い（未記載も含む）のイヌ 8 匹、ネコ 6 匹で抗体陽性であり、室内飼いであってもイヌで 4 匹、ネコで 1 匹が抗体陽性となった。Nogami らの報告によると 1997 年に国内 17 都道府県で採取されたネコ血清 800 検体中 48 検体（6%）でトキソプラズマ抗体陽性という結果が得られているが、今回はこの結果に比べて非常に高い陽性率であった。また、地域的には飛騨保健所管内で全て陰性、その他の地域ではイヌ・ネコいずれかで陽性個体が見られた。引き続き検査を行うことにより、県内におけるペットの抗体陽性率を監視するとともに、ペットからの感染予防の啓発を行う必要がある。

（参考）

家畜家禽のトキソプラズマ抗体調査

平成 24 年に、岐阜県食肉衛生検査所においてウシ、ウマ、ブタ、ニワトリのトキソプラズマ抗体調査を実施している。

この調査では、ブタだけでなく、ウシからもトキソプラズマ抗体が検出されている。

表 2 トキソプラズマ抗体検出結果

家畜家禽種	検査数	陽性数	陽性率
ウシ	370	24	6.5%
ウマ	43	0	0%
ブタ	155	8	5.2%
ニワトリ	183	0	0%

（2）E 型肝炎

ア 背景

E 型肝炎の病原体である E 型肝炎ウイルスは、ブタ、シカ、イノシシなどの多くの動物に感染することが知られており、ウイルスに汚染された食物、水等を摂取することによって感染する。

多くの場合、感染しても症状が現れないが、発症した場合、発熱・悪心・腹痛等の消化器症状や肝腫大、肝機能の悪化が顕れる。大半の場合、安静により治癒するが、まれに劇症化する場合がある。特に妊婦が妊娠後期に感染すると劇症化しやすく、また、高齢者も劇症化しやすいと言われている。

イヌやネコといった身近な動物からも E 型肝炎ウイルス抗体が検出されたという報告があるが、これまで、県内におけるウイルスの保有状況は不明であったことから、県内で飼養されているイヌ及びネコの血清中の E 型肝炎ウイルスの保有状況を調査することとした。

イ 調査材料及び調査方法

凍結保存の血清検体を解凍し、そのままウイルス RNA の抽出を行った。検体 140 μ L に対し、QIAamp Viral RNA Mini Kit (キアゲン) を用いて RNA 抽出を行い、E 型肝炎検査マニュアル (国立感染症研究所発行) に記載されているリバープライマー (HEV-R2) を用いて逆転写反応を行った。得られた cDNA を鋳型に HEV-F1/HEV-R2 プライマーセットを用いて 1st PCR を、HEV-F2/HEV-R1 プライマーセットを用いて nested PCR を行い、特異的増幅産物 (378 bp) が有無を確認した。

ウ 検査結果

111 検体 (106 匹分) 全て E 型肝炎ウイルス遺伝子は検出されなかった。

エ 考察

国内で感染が疑われる E 型肝炎については、その殆どが遺伝子型 G3 および G4 であり、ブタやイノシシ、シカ肉の喫食が原因と推定される事例が 7 割以上を占めている (IASR 記事 2014 年 1 月掲載「E 型肝炎 2005～2013 年」)。一方、同 IASR 記事「動物由来 E 型肝炎ウイルス ; E 型肝炎ウイルスの多様性」によると、イヌやネコから抗 E 型肝炎ウイルス抗体が検出された例はあり、E 型肝炎ウイルスもしくは E 型肝炎様ウイルスがイヌやネコにも感染することが示唆されている。ただし、これらのウイルスの殆どは細胞培養系が確立されておらず、ヒトへの病原性は不明である。国内ではイヌやネコの肉を食べる習慣はないため、肉の喫食による感染の可能性は殆どないが、排せつ物等の取扱いには注意する必要があると考えられる。一方、これまでにこれらの動物からウイルス遺伝子が検出された例はなく、今回の検査結果も同様の結果となった。

(3) 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)

ア 背景

SFTS は 2011 年に初めて特定された SFTS ウイルスにより引き起こされる新しい感染症で、ウイルスを保有しているマダニに刺咬されることで感染する。

主な症状は、発熱、消化器症状 (食欲低下、嘔吐、下痢) 等が認められ、重症化すると死亡することがある。

SFTS 患者は平成 26 年 7 月現在、西日本の 15 県から報告されているが、本県内からは報告されていない。しかし、本県内で採取されたマダニから SFTS ウイルス遺伝子が、狩猟犬の血清から SFTS ウイルス抗体が検出されており、県内に SFTS ウイルスが分布していることが明らかになっている。

動物は SFTS ウイルスに感染しても発病せず、また、感染した動物から人へ感染したという報告はないが、動物に付着し持ち込まれたマダニが人を刺咬することにより感染する可能性が考えられる。

このことから、県内で飼養されているイヌ及びネコに付着したマダニのウイルス保有状況を調査することとした。

イ 調査材料及び調査方法

① 血清検体における抗体検査

血清検体を 56℃、30 分間で非働化を行い、検査に用いた。

SFTS 抗原 (SFTSV-inf-Huh7 cell lysates) 及び mock 抗原 (mock-inf

Huh7 cell lysates) でコーティングした 96 穴プレートに 1:100、1:400、1:1600、1:6400 に段階希釈した検体を 100 μ L ずつ分注した。室温で 1 時間以上反応させた後、ウェルを洗浄し、ペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗体を 100 μ L ずつ分注し、さらに室温で 1 時間以上反応させた。ウェルを洗浄した後、ABTS 溶液を 100 μ L ずつ加え、室温で 30 分発色させた後、405nm での吸光度を測定した。

判定は S F T S 抗原の吸光度から mock 抗原の吸光度を差し引き、0.25 を超えたものを陽性と判定した。

② ダニ検体からのウイルス遺伝子検査

ダニ 69 検体中 68 検体について検査を行った (1 検体は検査不可能)。国立感染症研究所獣医科学部が作成した「マダニからの SFTS ウイルス検出マニュアル」に従い検査を実施した。

a ダニからの S F T S ウイルス RNA の抽出

1.5 mL チューブに 1/4" Ceramic Sphere (MP Biomedicals) 1 個、Garnet Matrix A Bulk (MP Biomedicals) 小さじ 1 杯程度、ISOGENE II (NipponGene) 1 mL を加えて、ダニ破砕チューブを作製した。マダニは実体顕微鏡により各個体からの採取数と吸血の有無を記録後、ダニ破砕チューブに入れて、FastPrepTM FP120 (フナコシ) で 5.0 m/sec、30 秒破砕した。

破砕後のチューブに 0.4 mL の DEPC treated Water (NipponGene) を加えて遠心後、分取した上清に 5 μ L の p-Bromoanisole を加え、再度遠心し、上清を分取した。上清分取後に残った沈澱は日本紅斑熱の検査に供した。分取した上清に等量の 2-プロパノール及び 5 μ L の希釈済みエタ沈メイト (NipponGene) を加えて混和、遠心を行った。上清を除去し、残った沈澱を 75%エタノールで 2 回洗浄、乾燥した後、20 μ L の DEPC treated Water で沈澱を溶解して抽出 RNA 検体とした。

b リアルタイム RT-PCR

RNA-directTM Realtime PCR Master Mix (TOYOBO) を使用し、反応液を調整した。低コピーの陽性コントロールを検出するため、国立感染症研究所の助言に従い、反応液はマニュアル記載液量の 2.5 倍量で調整した。陽性コントロールプラスミドは 1E+7 / 2 μ L から 1E+1 / 2 μ L の段階希釈系列を作製した。

ウ 検査結果

血清検体の抗体検査は全て陰性であり、検査可能であった 68 のダニ検体からもウイルス遺伝子は検出されなかった。

エ 考察

2013 年 8 月掲載の IASR 記事「<速報>重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルスの国内分布調査結果 (第一報)」によると県内飼養の猟犬 1 頭において抗 SFTS ウイルス抗体陽性とされており、続く 2014 年 2 月掲載の同記事「<速報>重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルスの国内分布調査結果 (第二報)」では、県内採取のマダニ類からウイルス遺伝子が検出されていることから県内にもウイルスを保有するダニの存在が示されている。今回、イヌ・ネコ血清において抗ウイルス抗体陽性となった検体はなく、付着していたダニからもウイルス遺伝子が検出されなかったことから、ウイルスを保有するダニは人里付近にはまだ殆どおらず、山中もしくは今回の調査対象地点から外れた地域に生息していると推察される。

(参考)

野生獣の SFTS ウイルス保有状況調査

今年度、公益社団法人岐阜県獣医師会が実施した野生獣衛生地域対策推進モデル事業で採材された野生獣（シカ）の血清及び付着したダニ等を分与いただき、SFTS ウイルスの保有状況を調査した。

この調査では、ウイルス抗体は検出されなかったが、シカ 3 頭から採取されたダニ等 28 検体のうち 2 検体（2 頭から採取）から SFTS ウイルス遺伝子が検出された。

表 5 SFTS ウイルス抗体検出結果

動物種	検体数	陽性数	陽性率
シカ	28	0	0%

表 6 SFTS ウイルス遺伝子検出結果

動物種	検査頭数 (検体数)	陽性頭数 (陽性検体数)	陽性率
シカ	3	2	66.6%
(ダニ等)	(28)	(2)	(7.1%)

抗体検出及び遺伝子検出は国立感染症研究所で実施

(4) 日本紅斑熱

ア 背景

日本紅斑熱は、日本紅斑熱リケッチアに感染して起こる感染症で、病原体を保有するマダニに刺咬されることで感染する。

主な症状は、頭痛、発熱、倦怠感を伴って発症する。適切な治療により回復するが、治療が遅れると重症化することがある。

西日本を中心に患者が報告されているが、これまで県内では発生は確認されていない。

しかし、近隣の三重県において毎年 30 例前後の報告がされており、本県においても注意をする必要がある。

このため、県内で飼養されているイヌ及びネコに付着したマダニの日本紅斑熱リケッチアの保有状況を調査することとした。

イ 調査材料及び調査方法

a リケッチア DNA の抽出

ダニからの SFTS ウイルス RNA 抽出操作時における、p-Bromoanisole を添加、遠心後の沈澱から ISOGENOME (NipponGene) を用いて DNA を抽出した。

b PCR

抽出した DNA をテンプレートとして、リケッチア感染症診断マニュアル（国立感染症研究所発行）に従って、日本紅斑熱リケッチア（*Rickettsia japonica*）の 17-kDa 膜タンパク質遺伝子を標的とした PCR を実施した。電

気泳動の結果、目的遺伝子が増幅したと思われる検体について、紅斑熱群リケッチアの 17-kDa 膜タンパク質遺伝子を標的とした PCR を実施し、両方の検査で特異的遺伝子増幅がみられた検体について日本紅斑熱陽性とした。また、遺伝子増幅が確認された検体については、PCR 増幅産物を用いたダイレクトシーケンスにより遺伝子配列を決定し、得られた配列を DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の BLAST 検索により紅斑熱群リケッチア遺伝子かどうかの確認を行った。

ウ 検査結果

検査可能であった 68 のダニ検体の検査では、日本紅斑熱リケッチア 17-kDa 膜タンパク質遺伝子が特異的に増幅される検体はなかったが、イヌおよびネコ各 1 匹から採取された 2 検体において紅斑熱群リケッチア 17-kDa 膜タンパク質遺伝子の特異的増幅が見られた。ダイレクトシーケンスで決定した遺伝子配列を用いた BLAST 検索の結果、既に登録されている紅斑熱群リケッチア遺伝子と高い相同性があるとされ、増幅された遺伝子が紅斑熱群リケッチア遺伝子であると確認された。

エ 考察

岐阜県感染症情報センターのまとめによると県内もしくは県内を推定感染地とする日本紅斑熱患者は今のところ発生していない。当所における発生動向調査検査事業で搬入された日本紅斑熱を含むリケッチア感染症疑い患者から採取された検体は 2005 年から 2014 年の 10 年間で 11 人分 32 検体（輸入感染症疑いを除く）あったが、全て日本紅斑熱を含む紅斑熱群リケッチア遺伝子は検出されていない。一方、今回の検査において日本紅斑熱ではないが、紅斑熱群リケッチア遺伝子陽性検体が存在したことから、県内にも紅斑熱群リケッチアが存在している可能性が高まった。島根県感染症情報センターのまとめによると、全国での日本紅斑熱患者発生状況では、岐阜県を含む 11 道県でのみ患者未発生であり（島根県感染症情報センターHP つつが虫、日本紅斑熱）、隣県においては三重県で毎年 30 例と多くの患者発生があるなど、いつ本県での患者発生がみられてもおかしくない状況にある。ただし、三重県での調査によると、三重県内での患者発生は一部地域のみで局在しており、日本紅斑熱リケッチアを有するダニは局所的に存在していることが示唆されている（2010 年 5 月掲載 IASR 記事「三重県における日本紅斑熱発生状況と対応」）。

謝辞

動物由来感染症発生動向調査にあたり、SFTS 検査についてご指導いただきました国立感染症研究所森川部長、宇田先生、木村先生に深謝します。