

3. 我が国における人獣共通感染症に関する認知

3.1 獣医師を対象としたアンケートの実施

日本小動物獣医師会の全面的な協力を得て、同会に所属する獣医師(約 5500 人)を対象に、人獣共通感染症が疑われる症例に遭遇した経験の有無、ペット飼育者における人獣共通感染症に関する認知度やその場合の対応、獣医師と医師の連携の必要性等について、アンケート調査を行った(添付資料1)。アンケートは、同獣医師会の会報(JSAVA NEWS 平成 16 年 1 月号¹¹)に同封して配布され、回収はファックスおよびインターネット上に開設した専用回答ページにて行った。

アンケート回収の締め切りは 2 月 20 日の予定であったが、設問数が多かったためか回収数が思うように伸びず、締め切りを3月末まで延長した。回収数は 242 件(3 月 3 日現在)である。現在解析中であるため、本報告書においては、一部の結果のみ報告するにとどめる。

3.1.1 人獣共通感染症が疑われる動物の症例への遭遇頻度

人獣共通感染症に関係すると思われる動物の症例にどのくらい遭遇しますか？

①1日複数例 ②1日1例程度 ③週に1例程度 ④たまに ⑤あまりない

Q. 7 人獣共通感染症が疑われる動物の症例への遭遇頻度

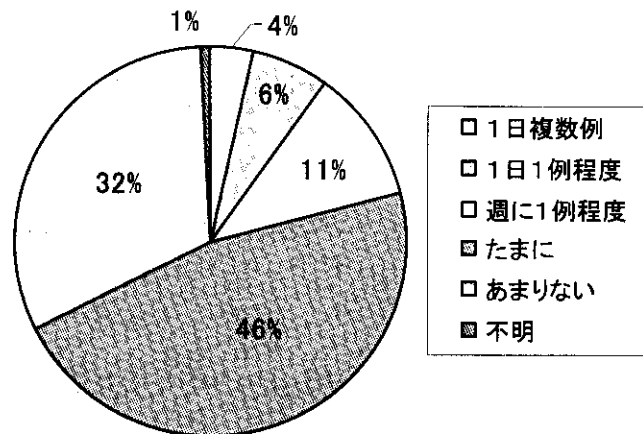


図 3.1-1 Q7の回答

3.1.2 人への感染を引き起こしたと思われる状況の遭遇経験

実際に人への感染を引き起こしたと思われる状況に遭遇したことがありますか？

①はい ②いいえ

Q. 8 人への感染を引き起こしたと思われる状況の遭遇経験

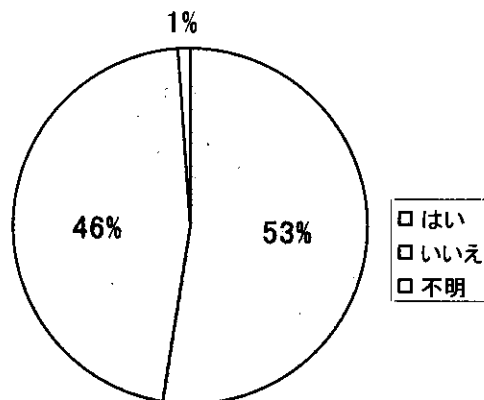


図 3.1-2 Q8の回答

3.1.3 平均的飼い主における人獣共通感染症の認知度

平均的な動物の飼い主の人獣共通感染症に対する認知度はどのくらいですか？

①よく知っている ②飼育している動物に関してはよく知っている ③基本的なことは知っている
④あまり知らない ⑤全く知らない

Q. 11 平均的飼い主における人獣共通感染症の認知度

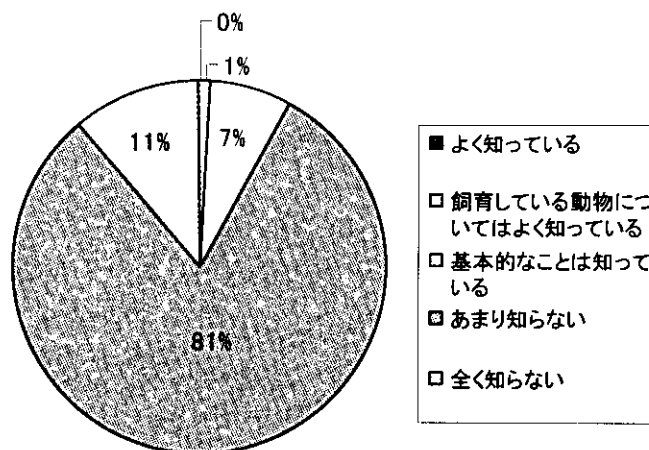


図 3.1-3 Q11の回答

3.1.4 飼い主から人獣共通感染症について質問や相談を受けた経験の有無

飼い主から人獣共通感染症について相談や質問を受けたことがありますか？

①はい ②いいえ

Q. 12 飼い主から人獣共通感染症について
相談や質問を受けた経験の有無

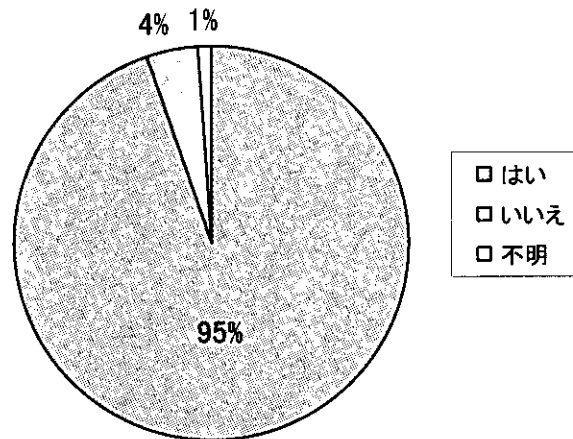


図 3.1-4 Q12 の回答

3.1.5 結果と考察

人獣共通感染症が疑われる動物の症例への遭遇頻度については、21%の獣医師が週に1例以上遭遇しているという結果となった。たまたま遭遇するという回答を含めると、合わせて67%にまで上り、全体の3分の2以上を占める。一方で実際に人への感染を引き起こしたと思われる症例に遭遇した獣医師は半分強であるという結果となったが、獣医師と医師の両方が情報交換を行えば、さらに高まる可能性があるだろう。

平均的な飼い主における人獣共通感染症の認知度については、「よく知っている」と答えた回答はゼロであった。「飼育している動物についてはよく知っている」という回答でさえ1%であり、92%の飼い主はあまり、あるいは全く知らないという状況が浮かび上がった。また、飼い主から人獣共通感染症について相談や質問を受けた経験の有無を尋ねた設問では、95%が経験有りとの回答であった。人獣共通感染症に関して、獣医師から情報を得ようという姿勢は飼い主にもあるが、獣医師からみれば基本的な知識に欠けすぎている状況のようであった。

3.1.6 その他のコメントについて

人獣共通感染症に関して、獣医師と医師の連携の必要性等に対する記述回答を求めたところ、「医師との連携や情報交換のシステムが是非とも必要」、「互いの情報不足があり双方が勉強すべき」、「地方にも情報が欲しい」等、多数のそして建設的な意見が得られた。

以下に、一部の例を示す。今後、詳細な解析に取り組む予定である。

○動物の検査をわれわれ獣医師が確実に実施し、確定診断できるようにする。そして医師に知らせ、また医師からも疑わしい場合には獣医師に知らせるといった情報交換が必要。

○中央でのシンポジウムではなく、地元での話し合いの場が必要。現段階では知り合いの医師や看護師に資料を渡したりしているが、市町村単位での取り組みが必要と感じる。

○感染症法の改正により、われわれ獣医師にも、人の健康に関し責務が生じてきました。その責務を負う上で、獣医師だけでは、非常に重荷であり、やはり医師との連携がなければ成り立たない。お互い誤解がないよう、意志の疎通を計っていきたい。

○人獣共通感染症に関する情報を正しく認識していない医師の存在に驚かされる事があるので、勉強してほしい。獣医師としては、人に感染した場合の人の症状、検査方法などについての知識が無いので知りたい。

3.2 新聞からの情報発信数

新聞検索において、“ペット”および“人獣共通感染症”というキーワードで検索される記事の件数について調べた。記事件数は、世間の関心を反映している一つの指標として考えられる。新聞検索には日経テレコンを用い、全国紙および地方紙の計 55 紙を対象とした。結果を下記に示す。

ペットで検索される記事数は 1994 年以降、単調に増加しており、ペット飼育数や飼育率の増加などと同じ傾向である。一方人獣共通感染症で検索される記事数は、2000 年以降、急激に増えていたことが明らかとなった。件数が増加している 1998 年の主な記事は、アライグマ等の移入動物関連(9 件)と Q 熱(4 件)であった。

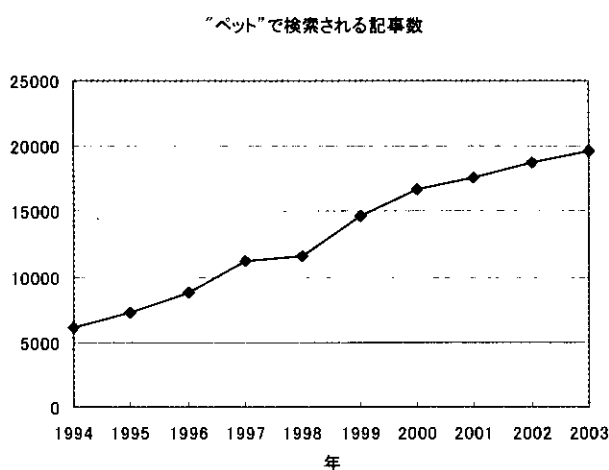


図 3.2-1 新聞記事の件数『ペット』

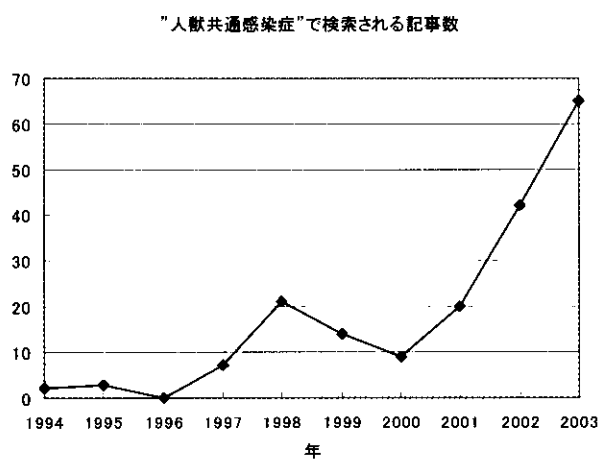


図 3.2-2 新聞記事の件数『人獣共通感染症』

4. 我が国におけるペット愛好者のペットとの接し方

4.1 ペット愛好雑誌編集者へのヒアリング

ペット愛好雑誌に携わっている編集者に対して、家庭内で飼育されるペットとペット愛好者一般の動向について、ヒアリングを行った。

①ペット愛好者の傾向と雑誌編集(アニファ)の方針

ペット愛好者には、動物にさわりたいとじり回したい人と、少し距離をおき見ただけで嬉しいと感じる人と、2通りのタイプがあるようだ。動物の種類によって、人間からの接触を受け入れる動物とそうではない動物があり、また同じ種類の動物であっても個体によって個性は大きく違うようだ。

雑誌の編集においては、動物がいやがるようなことを飼い主にさせないように気を配っている。例えば、読者からの投稿写真も他の人がまねをしたら良くないようなことは、掲載しないようにしている。我々は、動物のための本作りをコンセプトにしており、飼い主に厳しく、動物に良くないことは決してさせない、という意識で記事作りを行っている。

②創刊後15年を通じた変化

15年前は、ウサギ、フェレット、ハムスター等は、ここまで一般化するとは思われていなかった。フェレットはちょうど15年前頃輸入が始まり、また干支の兔によりウサギの飼育が話題になる等で、小動物の飼育者が増えてきた。また、飼い主の意識や知識も以前に比べてずいぶん高まっていると感じる。

③ペットショップの傾向について

ペット業界は不況知らずといわれることもあるが、決してそんなことはない。5, 6年前からペットショップの淘汰が始まっており、やはりきちんとした店が残っていると感じている。

④ペット飼育可マンションについて

ペット飼育可のマンションが増えてくると、むしろ小動物よりも犬猫の飼育率が高くなっていくと考える。小動物愛好者の中には、本当は犬猫を飼いたいけど禁止されているので小動物を飼うことにした、という人もおり、マンションに移って小動物と一緒に犬や猫を飼い始める人もいる。

⑤その他

これから規制等をしっかりさせていくべきなのは、犬猫、特に犬のブリーダーではないか。犬は、需要・市場が大きいだけでなく、犬種の流行り廃りが激しいため、ある犬種が流行し始めると、通常のブリードでは追いつかなくなり、無理な交配がとたんに増える。不健康な犬が多くなると、伝染病流行の危険性も高まるのではないだろうか。学会、獣医師会にもぜひ考えてもらいたい問題である。

4.2 ペット共生住宅の動向

平成 15 年には、犬の室内飼育率が屋外飼育率を超えたという調査結果(2.1.1参照)もあり、もはや犬は外で飼うものではなく、同じ空間を共有する対象となっている。これは、ペット共生マンションの数が、近年著しく増加したことも関係すると考えられ、本項にてその動向を取り上げることとした。

近年、管理規約においてペット飼育を許可するマンションは、新規供給の 19%まで達したという。不動産経済研究所調べにおいても、首都圏のペット飼育可マンションは下記に示すように急増している¹²。特に集合住宅では、戸建て住宅に比べて高気密・高断熱化が進んでおり、相対的にも狭い空間の中で人間と動物が暮らすことになるため、今後、人間と動物の物理的距離がますます小さくなっていくことは、間違いない。

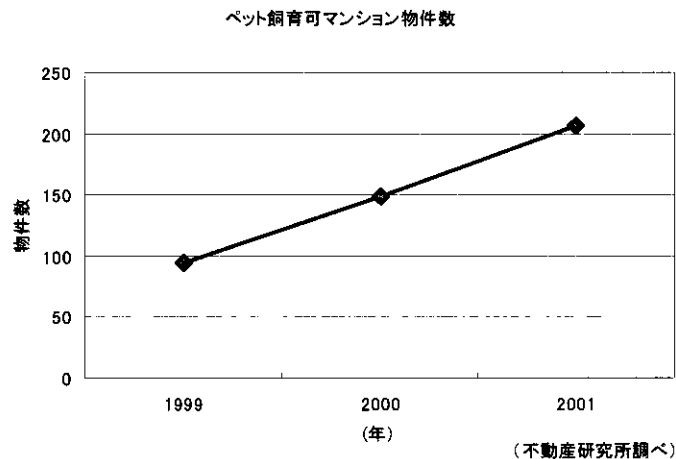


図 4.2-1 ペット飼育可能マンションの物件数推移

札幌市のマンションにおけるペット飼育状況を調査した結果¹³によれば、調査を行った 48 棟の中でペット飼育が“許可されていた”のは 1 棟だけであり、“許可されていない”のが 27 棟、“黙認している”が 20 棟であったという。犬が飼育されているマンション(無許可で飼育しているものも含む)は 48 棟中 32 棟あり、犬の匹数は合計で 188 匹と集計された。

犬の飼育が許可されていないマンションでは、飼い主は人目をさげなければならず、狂犬病予防接種に連れ出すことも容易ではないだろう。また、そもそも犬を外に連れ出さないのであれば予防接種も不要と考える飼い主もいるはずである。このような飼育状況があることも、犬の登録数や狂犬病予防接種率を下げている要因の一つとなっているのではないだろうか。

また、上記調査を行った獣医師は、マンションの室内換気やペットの衛生指導、飼育者のマナー向上等の必要性を指摘していた。これは、人獣共通感染症防止の面からも重要なことであろうと思われる。

5. まとめ

本調査においては、まず、我が国におけるペット飼育に関する検討として、犬の飼育数について推計を行った。この結果、平成 12 年には、我が国に1000万頭程度の犬がおり、現在は、さらに増加していると考えられた。一方、犬の登録数から算出される予防接種率は 78.2% (平成 13 年度) であるが、飼育数から推定すると 46.0% まで低くなっている可能性を指摘した。

我が国における人獣共通感染症に関する認知についての検討では、獣医師を対象としたアンケートの解析結果の一部を先行して示した。残りの項目についても、追って解析をすすめる予定である。ここでは、人獣共通感染症が疑われる動物の症例に、週に 1 例以上遭遇している獣医師が 2 割程度もいること、獣医師からみた平均的飼い主における人獣共通感染症の認知度は、大変低いことが明らかとなった。また、記述回答を求めた設問では多くの建設的意見が寄せられた。

ペット愛好雑誌編集者へのヒアリングでは、ペット飼育許可マンションの増加により、犬猫の飼育率がさらに上がるだろうという見解や、犬のブリーダーについての問題提起が得られた。

ペット共生住宅の動向についても取り上げ、都内におけるペット共生住宅の供給数は、近年増加していること、高气密・高断熱となるマンションの室内でペットを飼育するのであれば、換気や衛生管理がますます重要となってくる点について述べた。

今回の調査において印象深かったのは、臨床獣医師から得た回答において、医師との連携強化や中央および地方行政等に対する情報交換システム作りの要望が非常に強かったということである。これらの意見をうまく集約できるよう工夫し、アンケートの解析を進めたいと考える。

今後は、獣医師へのヒアリングによる、ペット愛好者における動物とのリスクの高い接触例の収集や、ペット愛好者へのアンケートなどを実施し、具体的なペットとの接触内容やその頻度などについて検討を行っていきたいと考える。

参考文献

- 1 「狂犬病予防法に基づく犬の登録頭数と予防注射頭数等について」、(厚生労働省統計情報)、平成 15 年 1 月 23 日 (<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kenkou/etc/t0726-1.html>)
- 2 犬猫飼育率 全国調査・ペットフード産業実態調査、ペットフード工業会、(<http://www.jppfma.org/shiryu/tyosa-set.html>)
- 3 動物愛護に関する世論調査(平成 12 年 6 月実施)、総理府 (<http://www8.cao.go.jp/survey/h12/aigo/index.html>)
- 4 動物愛護に関する世論調査(平成 15 年 7 月実施)、総理府 (<http://www8.cao.go.jp/survey/h15/h15-doubutu/index.html>)
- 5 国立公衆衛生院(書誌情報入手依頼中)
- 6 ペットポータル(<http://www.petportal.jp/mt/>)
- 7 「平成 10 年度 輸入動物及び媒介動物由来人獣共通感染症の防御対策に関する総合的研究」、厚生省科学研究費報告書
- 8 「2001 年版アニマル国勢調査」、アニファ 2002 年 2 月号、Vol.68、スタジオ・エス(株)発行
- 9 「2002 年度版アニマル国勢調査」、アニファ 2003 年 2 月号、Vol.80、スタジオ・エス(株)発行
- 10 「2002 年度版アニマル国勢調査」、アニファ 2004 年 1 月号、Vol.91、スタジオ・エス(株)発行
- 11 JSAVA NEWS、平成 16 年 1 月発行、No.104
- 12 「ペット共生マンション8 ペット共生住宅の最新動向」、藤原利彦著、2002 年
- 13 「マンション(共同住宅)におけるペットの飼育状況について」、さっぽろ獣医師会狂犬病予防対策委員会石狩支部、北海道獣医師会雑誌、2003 年
- 14 「ペットとあなたの健康」、東京都立駒込病院小児科高山直秀編、人獣共通感染症勉強会著、株式会社メディカ出版、1999 年 4 月 10 日
- 15 「人に伝染る(うつる)ペットの病気」、兼島孝著、株式会社実業之出版社、2002 年 11 月 12 日
- 16 「ペット感染症が危ない！～あなたと動物(ペット)を守る正しい知識」、岡部信彦著、PHP 研究 2002 年 10 月 15 日
- 17 「危ない！ペットとあなたを感染症が襲う」、伊東彰仁監修、株式会社ワニマガジン、2003 年 8 月 1 日
- 18 ペット産業年鑑シリーズ ペットデータ年鑑2002」、原田隆発行、株式会社野生社、2002 年 1 月 20 日
- 19 「ペット共生マンション1 ペット共生型集合住宅の現状と将来」、玉田弘毅著、2002 年
- 20 「ペット共生マンション3 ペットに関する2つの調査結果と考察について マンション管理とペットの関わり」、富田路よう著、2002 年

イヌおよびネコによる咬傷とそれが原因となる感染症に関する研究

分担研究者 荒島 康友 日本大学医学部臨床検査医学講座 助手

研究要旨：今回、イヌ咬傷の現状のアンケート調査、文献調査等の結果から、咬傷事故が減少しているとの広報とは逆に増加を示唆するデータ、および咬傷から感染症の症状に移行したと考えられたものが119例中7例（5.9%）確認された。また、新しいPCR分析法のジェノパターン法の検討結果から、本法が *Pasteurella* 属菌の同定・疫学調査に有用であると考えられた。

A. 研究目的

イヌ、ネコ咬傷の現状把握のためのアンケート調査、および咬傷後の感染症の最も多い原因菌であるパスツレラ属菌の新しい同定方法の開発を行った。

B. 研究方法

アンケート調査は、インターネットにより調査を行い、データを集計し、解析を行った。また、新しい同定方法として、ジェノパターン法（株）アドジーン社：使用試薬・機器は表1、図1に示した）を用い、パスツレラ属菌の同定、疫学調査を行った。

（倫理面への配慮）

個人データの管理をし、データの漏洩等に配慮を行った。

C. 研究結果

アンケート調査の結果、回答者数226人（男性31人：平均42.51才、女性195人：平均35.74才）であった。

イヌ咬傷事故の原因となったイヌの所有者は、他人が116人（51.3%）、受傷者自身98人（43.4%）、その他12人（5.3%）であった。また、イヌ咬傷として役所に届け出をされた人数は、1. 病院、自分、家族による届け出が10人（4.4%）、2. 無回答、不明が10人（4.4%）、3. 届けでなかったが206人（91.2%）であった。さらに、イヌ咬傷事故の原因となった要因は、1. イヌの性格が原因と考えられたものが101人（43.5%）、2. 受傷者の知識不足が82人（35.3%）、3. アクシデントによるものが36人（15.9%）であった。

遺伝学的な同定法では、1. 同時再現性・日差再現性の波形一致率が93.45、95.91であった（図2,3,表2,3）。2. 臨床分離 *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) 10株の波形パターンが国際標準菌株 (P-1457) を標準株とした場合、波形一致率が80%以上であった（図4）。3. *P. multocida* と他の *Pasteurella* 属菌との波形パターン比較では、波形パターンおよび波形一致率ともに判別が容易であった（図5）。4. *P. multocida* と他の一般的な病原菌との波形パターンおよび波形一致率は判別が容易であった（図6-1,2）。5. 患者由来 *P. dagmatis* と飼育ネコ由来株との波形一致率が100%と同一であ

った(図7)。7. 患者膿由来 *P. multocida* と3頭の飼育ネコ由来株では1頭のネコの株が良好な波形一致率を示した(図8-1, 2)。

D. 考察

アンケート調査の結果から、イヌ咬傷事故の原因となったイヌの所有者は、他人が51.3%、受傷者自身が43.4%で、飼育犬によるものが当初の予定より多かった。

また、イヌ咬傷として役所に届け出を行った人数が4.4%から推測すると、公表されている件数の約20倍のイヌ咬傷事故が存在すると考えられた。

さらに、イヌ咬傷事故の原因となった要因が、1. イヌの性格の43.5%と、2. 受傷者の知識不足35.3%を併せると約85%であり、このイヌの性格と受傷者の知識については、獣医師と相談することや、アドバイスをもらうこと、また、飼育解説書を読むことで、十分予防が可能になってくると思われた。

E. 結論

今回の新しい同定・疫学調査は、ジェノパターン法を用いることで、1. 同時再現性、日差再現性が良好であったこと、および2. 臨床分離 *P. multocida* 株の波形パターンが国際標準菌株 (P-1457) を標準株とした場合、波形一致率が80%以上と良好であったこと、3. *P. multocida* と他の *Pasteurella* 属菌との波形パターン比較で、波形パターンおよび波形一致率ともに判別が容易であったこと、4. *P. multocida* と他の一般的な病原菌との波形パターンおよび波形一致率は判別が容易であったこと、さらに5. 患者由来 *P. dagmatis* と飼育ネコ由来株との波形一致率が100%と同一であったこと、6. 患者膿由来 *P. multocida* と3頭の飼育ネコ由来株では1頭のネコの株が良好な波形一致率を示したこと、7. 従来のPCR法

と異なり発ガン物質を必要としないこと、以上から、ジェノパターン法は *Pasteurella* 属菌の同定、および菌種の疫学調査・研究に有効と思われた。

F. 健康危害情報

特になし。

G. 研究発表等

学会発表

荒島康友：平成15年度ヒトと動物の共通感染症都民公開シンポジウム：ヒトとペットの身近な共通感染症、2004、2月。

荒島康友：平成15年度第3回国立感染症研究所学会公開シンポジウム「愛玩動物由来感染症」：イヌ咬傷（パスツレラ症）、2004、3月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

表1)

ジェノパターン法〔(株)アドジーン〕

使用試薬・機器

使用キット:細菌同定用ユニバーサルキット

・FXプライマー/UP2Rプライマー(ユニバーサルプライマー)

・専用バッファーミックス

(Taqポリメラーゼ、基質、バッファー、サイバーグリーン)

使用機器:qPCR機 Opticon1〔エムジェイジャパン(株)〕

波形解析ソフト:ジェノマスター

図1) ジェノパターン法プロトコール

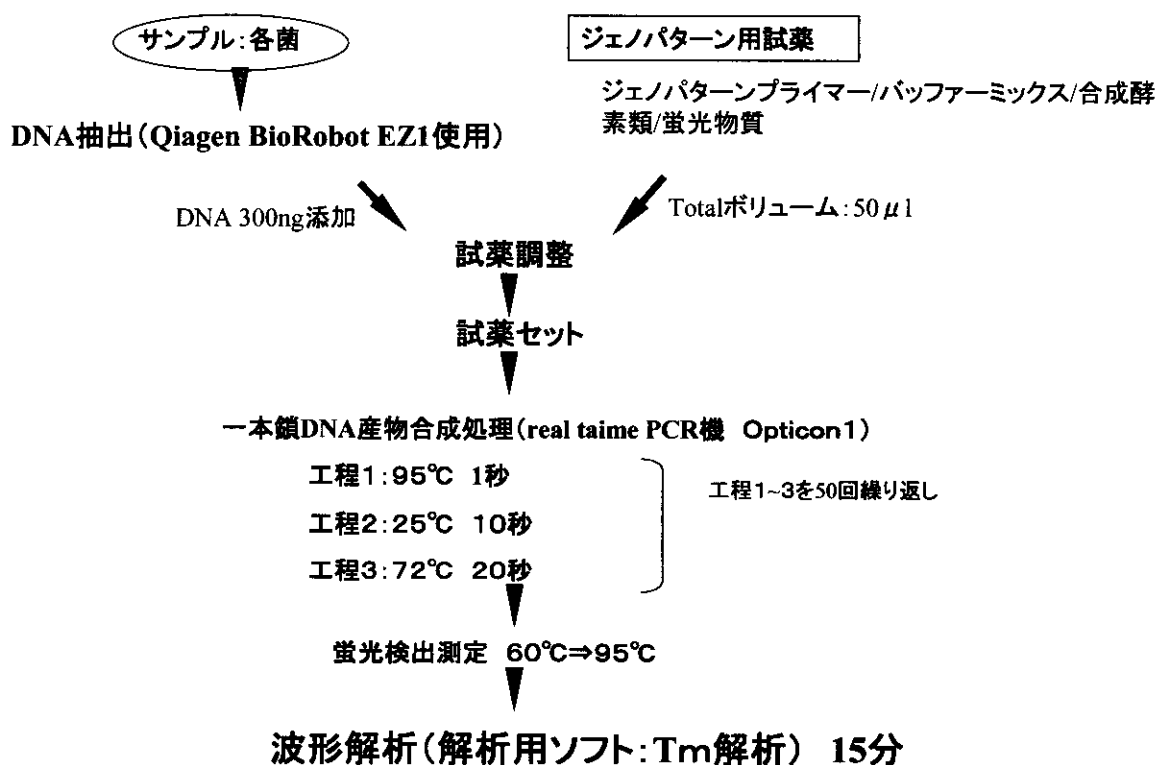


表2) 同時再現性(n=10)

Well	Type	Label	Tm (-dI/dT max)	波形一致率
A1	Sample	P.multocida	85.6	96.05
A2	Sample	P.multocida	85.6	96/05
A3	Sample	P.multocida	85.6	94.24
A4	Sample	P.multocida	85.6	94.24
A5	Sample	P.multocida	85.6	96.05
A6	Sample	P.multocida	85.4	92.11
A7	Sample	P.multocida	85.4	92.11
A8	Sample	P.multocida	85.4	90.79
A11	Sample	P.multocida	85.4	92.11
A12	Sample	P.multocida	85.2	90.78
		平均值	85.48	93.45
		標準偏差	0.1327	93.45±2.03

表3) 日差再現性 計5回各n=3

1回目	Well	Type	Label	Tm (-dI/dT max)	波形一致率
	B1	Sample	P.multocida	85.6	90.79
	B2	Sample	P.multocida	85.6	94.74
	C1	Sample	P.multocida	85.6	89.47
2回目					
	B1	Sample	P.multocida	85.6	96.05
	B2	Sample	P.multocida	85.6	96.05
	C1	Sample	P.multocida	85.6	96.05
3回目					
	B1	Sample	P.multocida	85.6	96.05
	B2	Sample	P.multocida	85.6	96.05
	C1	Sample	P.multocida	85.6	96.05
4回目					
	B1	Sample	P.multocida	85.6	96.05
	B2	Sample	P.multocida	85.6	92.11
	C1	Sample	P.multocida	85.6	96.05
5回目					
	B1	Sample	P.multocida	85.6	96.05
	B2	Sample	P.multocida	85.6	96.05
	C1	Sample	P.multocida	85.6	96.05
		平均值			95.91
		標準偏差			95.91±2.14

図2)

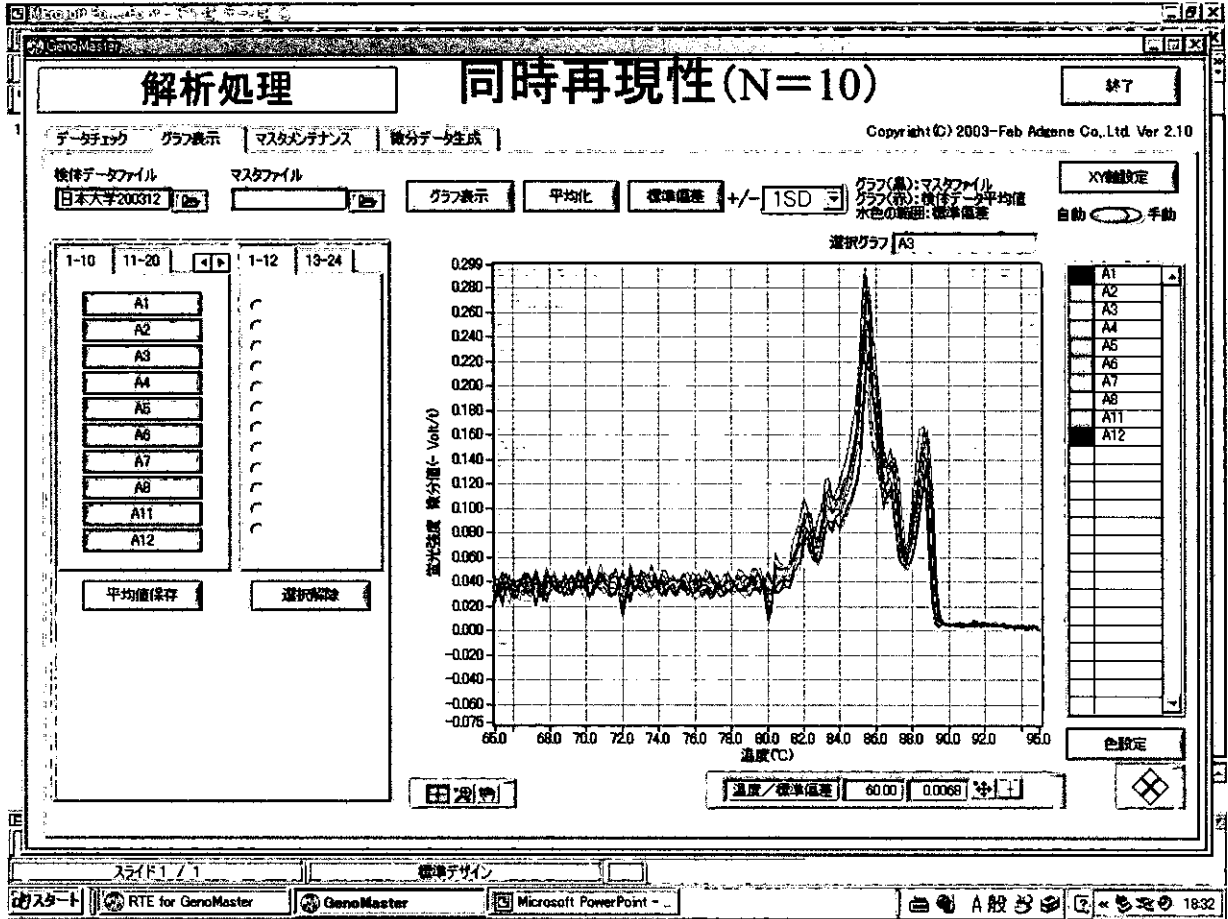


図3)



図4) 臨床由来*P. multocida*の波形パターン

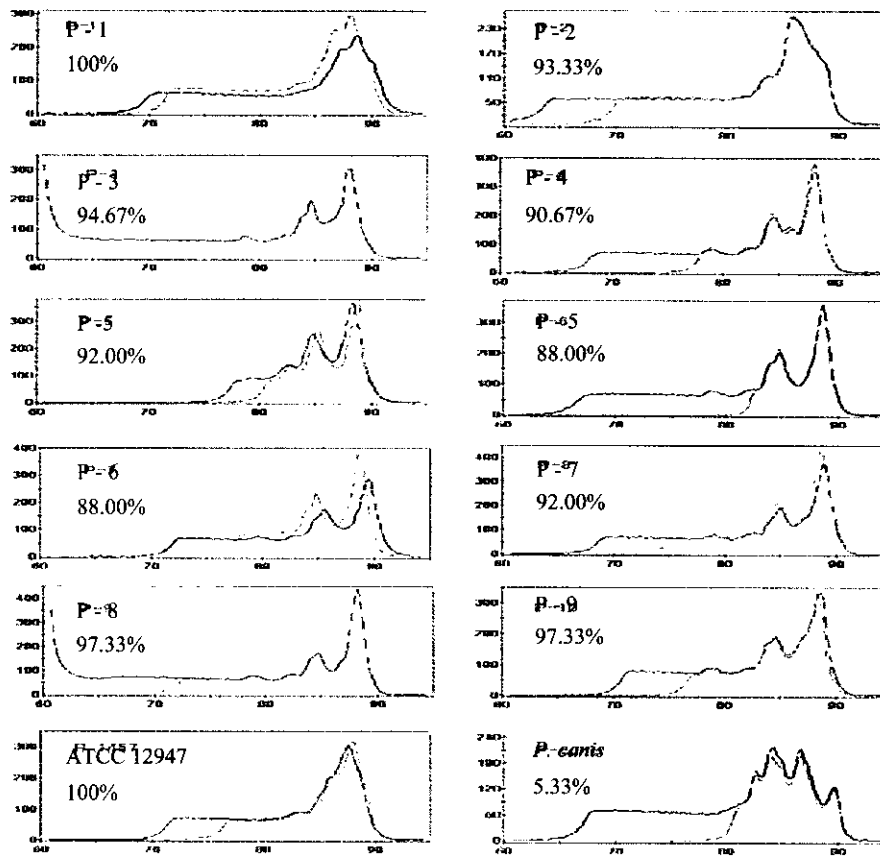


図5) *Pasteurella multocida*と他の*Pasteurella*属菌種との比較検討

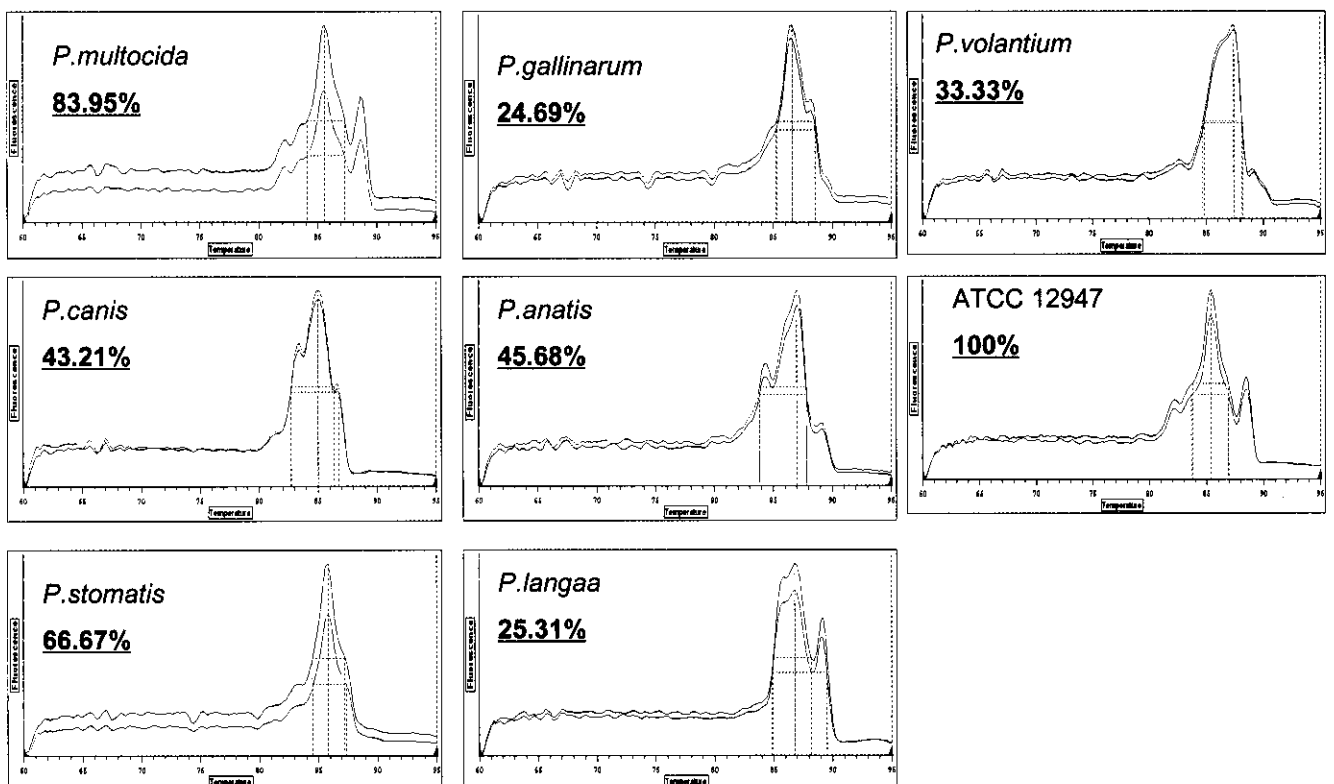


図6-1) *Pasteurella multocida*と一般病原菌との比較検討

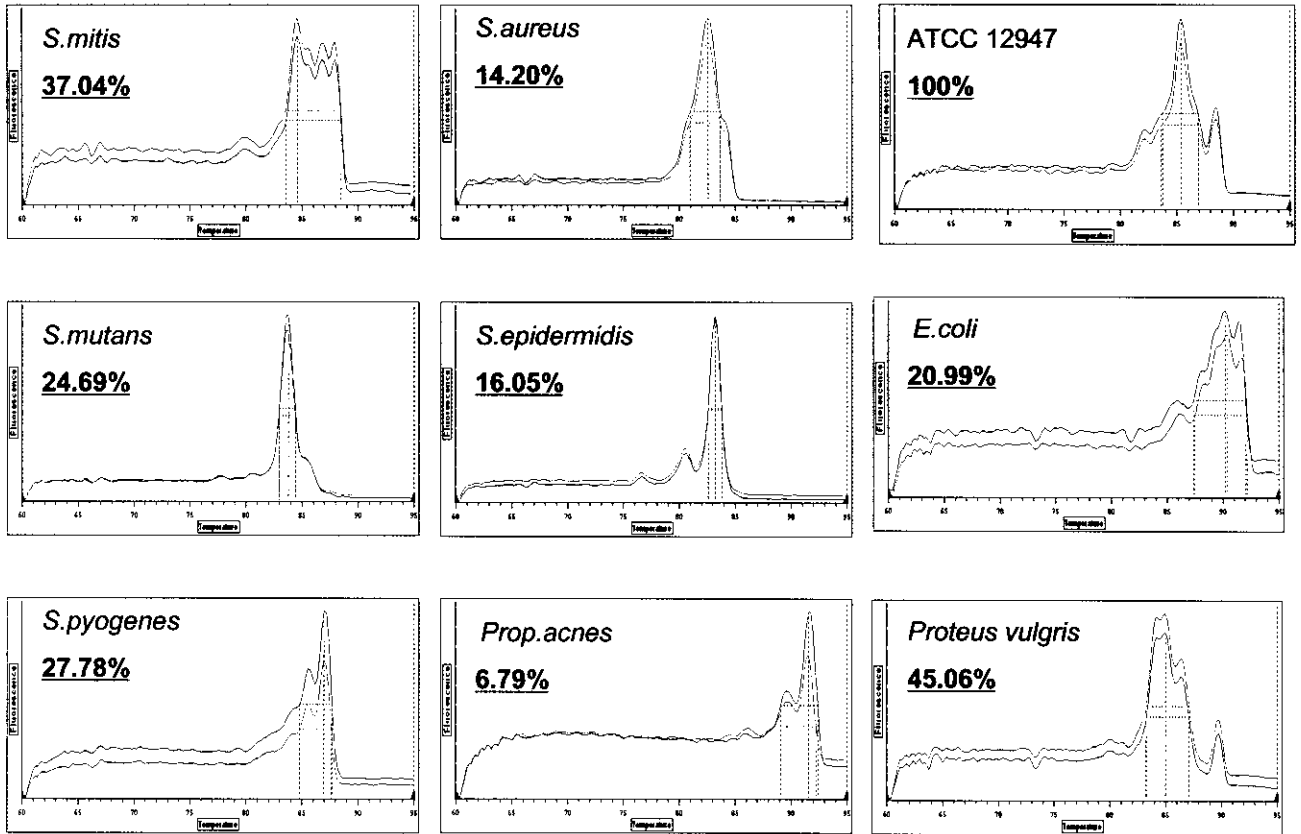


図6-2) *Pasteurella multocida*と一般病原菌との比較検討

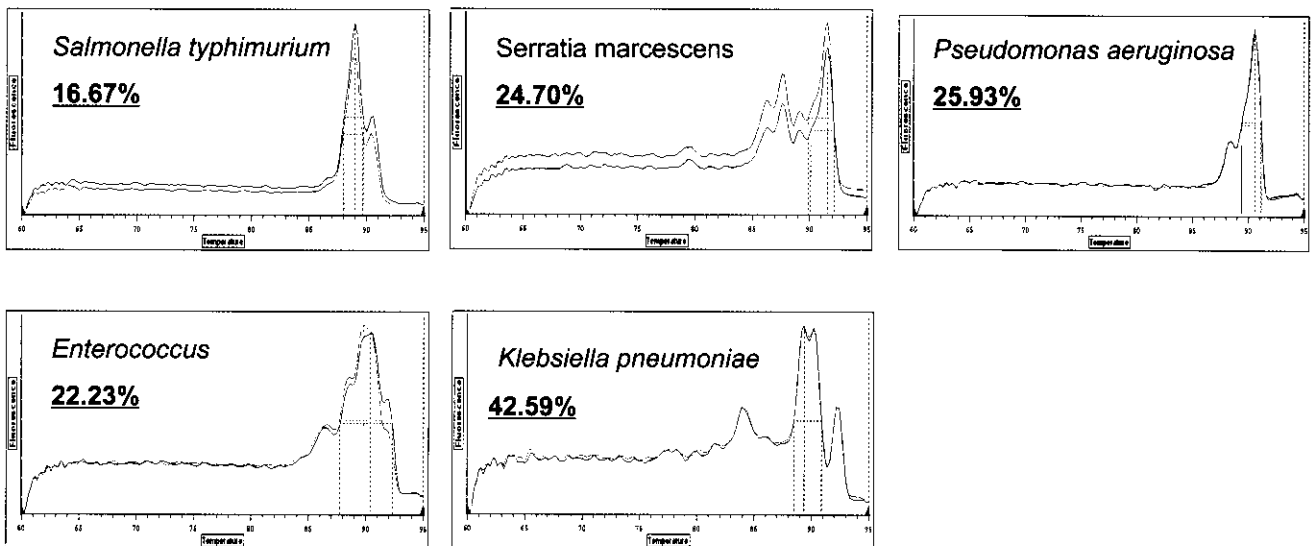
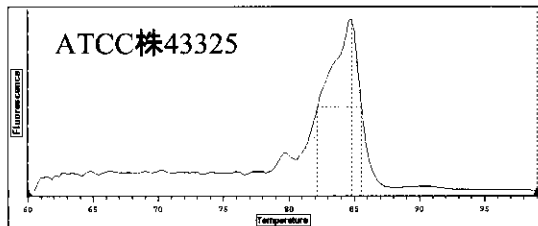
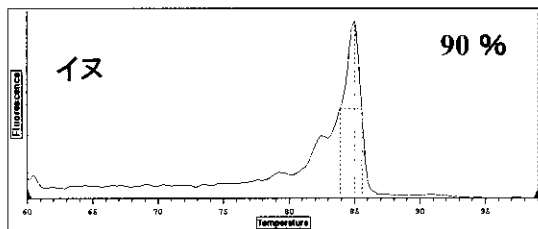
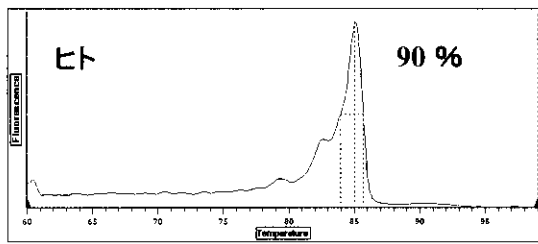
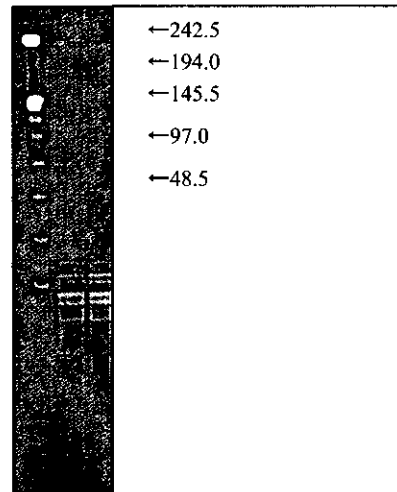


図7) 患者由来*P.dagmatis*と飼育ネコ由来株との
ジェノパターン法とPFGE法との比較

ジェノパターン法 (FXプライマー) PFGE法



M 1 2 1:ヒト、2:イヌ

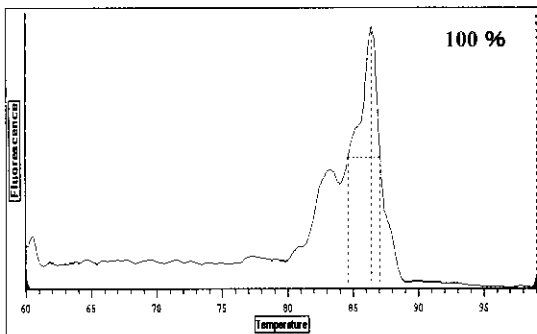


泳動条件

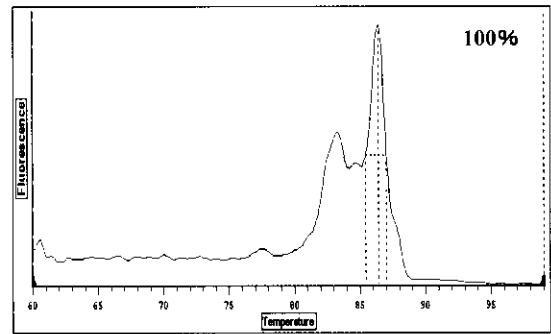
- 1) 制限酵素: Spe I
- 2) パルスタイム① 20秒 12時間
- 3) パルスタイム② 5~17秒 17時間
- 4) 電圧 150V
- 5) 泳動温度 10°C
- 6) アガロースゲル 1%

図8-1) 患者膿由来 *P.multocida*と飼育ネコ由来株の比較
(UPプライマー)

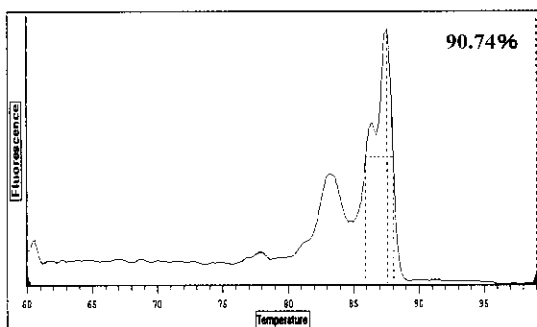
ヒト



ネコ2



ネコ1



ネコ3

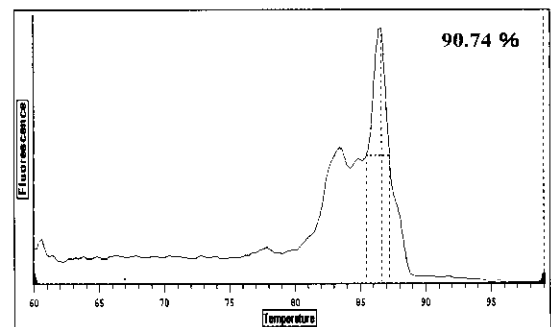
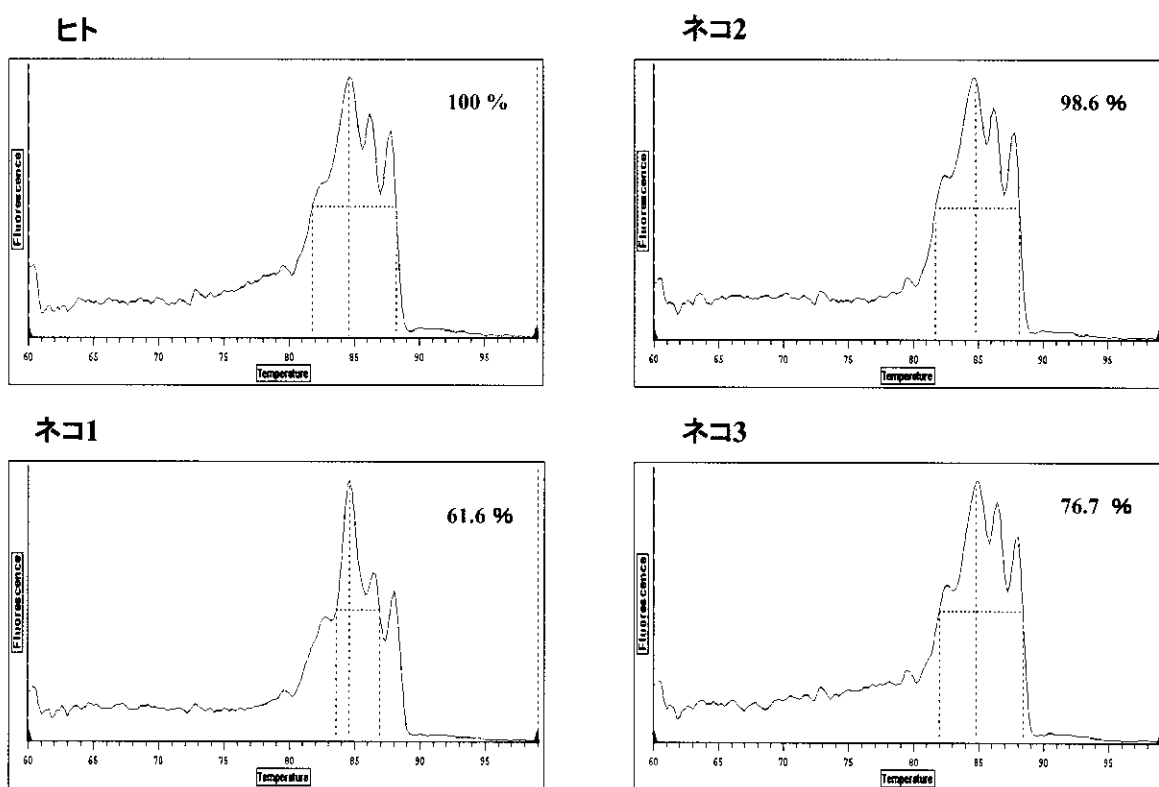


図8-2) 患者膿由来 *P.multocida*と飼育ネコ由来株の比較
(FXプライマー)



ブルセラ属菌の菌種同定のための特異的 PCR 法の開発に関する研究

分担研究者 今岡 浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官
協力研究者 木村 昌伸 国立感染症研究所 獣医科学部 第一室研究員

研究要旨：ブルセラ属菌 (*B. abortus* (以下 *BA*)、*B. melitensis* (*BM*)、*B. suis* (*BS*)、*B. canis* (*BC*)) の菌種を同定するための PCR 法を開発した。プライマーは、細胞表面タンパク (BCSP31: プライマーセット B4/B5) および外膜タンパク (OMP2: 同 JPF/JPR2ab, JPF/JPR2ca, OMP31: 同 1S/1AS) 領域遺伝子中に 4 セット設定した。PCR 反応条件は共通となるよう検討した。*BA* は B4/B5、JPF/JPR2ab で検出され、*BM* は B4/B5、JPF/JPR2ab、1S/1AS で、*BC* は B4/B5、JPF/JPR2ca、1S/1AS で検出される。また、*BS* は B4/B5、JPF/JPR2ab、JPF/JPR2ca、1S/1AS すべてで検出される。このように、4 種のプライマーセットを用いることによりブルセラ属菌のうちヒトに感染しうる主要 4 菌種を同定することが可能となった。

A. 研究目的

感染症法で 4 類に指定されているブルセラ症 (Brucellosis) はブルセラ属菌 (genus *Brucella*) による動物由来感染症である。ヒトで主に感染報告があるのは *B. melitensis* (自然宿主: ヤギ、ヒツジ) (以下 *BM*)、*B. abortus* (ウシ) (*BA*)、*B. suis* (ブタ) (*BS*)、*B. canis* (イヌ) (*BC*)、*B. maris* (海洋動物) の 5 菌種で、感染家畜およびイヌなど愛玩動物との接触やその汚染製品の摂取により感染する。ほかには *B. ovis* (ヒツジ)、*B. neotomae* (齧歯類) がある。一般に動物では流産の原因となるが、ヒトでは、軽症の場合は風邪様であるが、特徴的な発熱 (間欠熱、波状熱)、長期にわたる全身倦怠感を示すことがある。

日本では、ヒトブルセラ症は *BM* と *BA* 感染の散発例が過去に報告されている程度で、現在は両疾患については清浄化していると考えられ

るが、愛玩動物であるイヌからの感染によるヒトの *BC* 感染例が近頃報告された。*BC* については、1971 年に輸入ビーグル犬によると思われる、繁殖コロニーでの発生があり全国に波及し、現在でも国内のイヌの数%が感染していると考えられているにもかかわらず、イヌおよびヒトでの近年の感染状況は把握されていない。

また、現在の診断の中心は試験管内凝集反応による抗体検出や、菌分離、特異的遺伝子検出のための PCR であるが、現在広く用いられている PCR では、ブルセラ属菌の菌種を同定するには至っていない。

そこで、本研究ではヒトに感染しうる代表的な 4 種のブルセラ属菌 (*BA*, *BM*, *BS*, *BC*) を鑑別・同定するための PCR の開発を行った。

B. 研究方法

1) 供試菌株：ブルセラ属菌は、*BA* 544、*BA*

Takanashi、*BM16M*、*BMHagiwaraB1*、*BS1330*、*BSS-13*、*BCQE13* (動物衛生研究所より分与)、*BCIto0311* (新分離株) の8株を用いた。また、特異性の検討のために、*Bruceella* 属以外の *Y. pestis* など Fig. 3 に示した16株を陰性対照として実験に用いた。

2) DNA の調整：各々の菌株をヒツジ血液寒天培地等で培養し、その培養コロニーから菌を集め煮沸後、DNA を SepaGene (三光純薬) を用いてプロトコールに従い分離精製した。

3) プライマーの設定：プライマーは、細胞表面タンパク (BCSP31) に特異的な B4/B5 (Baily ら) (増幅長:224bp) を、また外膜タンパク (OMP) のうち、OMP2 領域で JPF (Leal-Klevezas ら) に対して *BA* に特異的な JPR2ab (186bp) と *BC* に特異的な JPR2ca (187bp) を新たに設定し、さらに OMP31 領域で 1S/1AS (249bp) を新たに設定した (Fig. 1)。

4) PCR 条件の検討：簡便に検出を行うために、puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (#27-9558-01、Amersham Bioscience) を用いることとした。PCR 反応条件はすべてのプライマーセットで共通となるよう検討した。また、特異性を検討するために、アニーリング温度を 55-67°C まで検討した。

C. 研究結果

1) PCR 条件の検討と反応の特異性：PCR の反応条件は、PCR Beads 一つに対して、Sense および Antisense プライマーを 0.4μM で使用することで良好な結果が得られた (Fig. 2)。また、アニーリングの温度は、55-62°C の範囲では、ブルセラ属菌以外の菌で特異的 PCR 産物とそのサイズは異なるものの非特異的バンドが認められるものがあったため、65°C に設定した (Fig. 2)。65°C では、非特異的バンドは消失した。Fig. 3 に上記反応条件で PCR を行った結果のうち、OMP2-ab (JPF/JPR2ab) および OMP2-ca (JPF/JPR2ca) のデータを示した。OMP2-ab で

は、*BA*、*BM*、*BS* でのみ特異的増幅が、また、OMP2-ca では、*BC* および *BS* でのみ増幅が認められ、非特異的バンドは検出されなかった。BCSP31 (B4/B5) および OMP31 (1S/1AS) でも非特異的バンドは、検出されなかった (データは示さず)。

2) 検出感度の検討：BCSP31、OMP31、OMP2-ab、OMP2-ca それぞれについて、検出感度の検討を行った。BCSP31 および OMP2-ab および OMP2-ca では 2.5pg まで検出が可能であった (Fig. 4)。

3) 各菌種における検出パターン：4種類のプライマーセットを用いて、ブルセラ属菌の反応パターンを検討した。B4/B5 はブルセラ属菌すべてで検出された。JPF/JPR2ab では *BA*、*BM*、*BS* が、JPF/JPR2ca では *BS*、*BC* が検出された。1S/1AS では *BM*、*BS*、*BC* が検出された。すなわち *BA* は B4/B5、JPF/JPR2ab で検出され、*BM* は B4/B5、JPF/JPR2ab、1S/1AS で、*BC* は B4/B5、JPF/JPR2ca、1S/1AS で検出された。また、*BS* は B4/B5、JPF/JPR2ab、JPF/JPR2ca、1S/1AS すべてで検出された (Fig. 5)。

D. 考察

ブルセラ属菌の菌種を同定するための PCR 法を開発した。プライマーは、細胞表面タンパク (BCSP31) に特異的な B4/B5、外膜タンパク (OMP) のうち、OMP2 領域で Sense プライマー JPF に対して *BA* 特異的配列 (JPR2ab) と *BC* 特異的配列 (JPR2ca) を新たに設定し、さらに OMP31 領域で 1S/1AS を新たに設定した。アニーリング温度を 65°C に設定することで、ブルセラ属菌以外では非特異的増幅反応は起こらなかった。

BA は B4/B5、JPF/JPR2ab で、*BM* は B4/B5、JPF/JPR2ab、1S/1AS で、*BC* は B4/B5、JPF/JPR2ca、1S/1AS で、また *BS* は B4/B5、JPF/JPR2ab、JPF/JPR2ca、1S/1AS すべてで検出され、4種の菌で特徴的な反応パターンを示した。*BA* は OMP31 を欠くため、1S/1AS では増幅されず、そ