

生している(厚生労働科学研究費補助金 新興再興感染症研究事業「愛玩動物の衛生管理の徹底に関する研究」平成15年度研究報告書ほか)。そのため、我々の検討でも(同、平成15~17年度研究報告書および本報告書ほか)国内のイヌは現在でも、2~5%の抗体保有率となっている。

3-1. 日本におけるヒトのブルセラ症発生状況(1999年3月まで): 届出対象疾患指定前の国内での発生状況について文献をもとに調査し、表2にまとめた。

国内での最初の症例報告は、1933年に西川(R-1)が報告した京都でのミルクによる*B. abortus*感染と思われる症例である。その後、1962年に鶴見(R-2)が1933~1962年までの報告を調査し、まとめて発表している。それによるとこの間に51例(R-1を含む)の報告があり、その内訳は国外感染・発症後帰国が3例、検査等に従事した実験室感染が13例、その他国内で感染したと推定されるものが35例である。また、このうち6例が死亡したとされている。原因菌種に関しては国外感染者や実験室感染者は*B. melitensis*や*B. suis*、国内感染者の多くは*B. abortus*と考えられている。症状は、波状熱、全身倦怠感などで、死亡例では心内膜炎、敗血症、脊椎ブルセラ症などがある。さらに、R-3やR-5のように渡航歴がなく国内で感染したと考えられる症例は*B. abortus*感染であった。また、*B. abortus*感染例で母親が妊娠中にペルーで感染・治療を受けた後、国内でその子供が発症するといった特異な症例も報告されている(R-6)。一方、*B. melitensis*感染では海外で感染し、国内で発症した例が報告されている(R-4, 7)。渡航先はインドとイラクで、いずれもブルセラの常在地域である。また、この患者の検査担当者が検査室感染を起こしている(R-4)。

*B. canis*感染に関しては文献上の報告は見

あたらなかった。しかし、前述のように1970年代に初めて国内のイヌ繁殖施設でイヌのブルセラ症が集団発生し、その当時実施されたヒトの*B. canis*に対する抗体調査の報告では、ヒトにおける抗体保有率は2.0%となっている(伊佐山, 獣医畜産新報, 47:97, 1994)。また、当時は*B. canis*に実験室感染した例が少なからずあったと伝えられている。

3-2. 日本におけるヒトのブルセラ症発生状況(1999年4月から): 届出対象疾患指定後の国内での発生状況を、国立感染症研究所感染症情報センターに届け出られた情報をもとに調査し、表3にまとめた(感染症発生動向調査週報(IDWR), 9(4):12, 2007より引用)。

届出は8例あるが、2005年2例、2006年5例と近年に報告が集中している。*B. melitensis*感染者2例(C-2, 4)は、海外で感染して国内で発症したもので、血液培養により菌が分離同定されている(病原微生物検出情報(IASR), 26(10):273, 2005、27(5):125, 2006)。*B. abortus*感染者(C-6)はエジプトで感染・発症し、治療を受けたが、国内で再燃したケースと考えられている。推定感染地域はシリア、エジプトなどで、汚染食品の喫食や汚染物の吸入などにより感染したと考えられている。症状は、発熱、筋肉痛、頭痛などであった。

一方、国内を推定感染地域とする3例(C-3, 7, 8)はいずれも、*B. canis*に対する抗体が検出されているが明らかなイヌとの接触歴はなく、感染経路は不明である。しかし、これらの患者からは1例も菌が分離されておらず、その病原診断は症状以外では、1例(C-3)を除き単血清での凝集反応陽性の結果による。

## C. 考察

ブルセラ症の症状には特徴的なものがないため、診断には血清診断や菌分離などの病原診断が欠かせない。血清診断は、通常、*B. abortus* や *B. canis* を抗原として試験管凝集反応が行われ、民間の臨床検査機関でも可能である。*B. melitensis*、*B. suis* 感染でも *B. abortus* を抗原として用いて抗体検出が行われる。凝集抗体価が、それぞれ 1:40、1:160 以上の時に陽性と判断するが、血清抗体のみでの確定にはペア血清を用いて信頼度を増す必要があると考える。血液や骨髄からの菌分離は、抗菌薬がすでに投与されているケースが多いため難しいが、最も重要である。菌種の検出・同定には PCR による遺伝子検査も可能である (Imaoka, K. et al., Jpn. J. Inf. Dis., 2007 (in press))。

先に述べたように、届出が近年に集中し、増加傾向が見受けられたが、このことは患者数が増加したと考えるよりも、むしろ診断の際にブルセラ症が考慮されるようになったためかもしれない。

日本では、家畜対策（摘発・淘汰）が功を奏し、家畜は清浄化していると考えられる。従って現在は、*B. melitensis*、*B. abortus* や *B. suis* に国内で家畜から感染する可能性は低いと思われる。事実、近年の *B. melitensis*、*B. abortus* 感染者はいずれも海外での感染であり、今後、輸入感染症の 1 つとして注意しておく必要がある。*B. canis* 感染については、

ヒトに感染する可能性は低く、また感染しても症状は軽く、さらに無症状であることも多いとされる。しかし、国内のイヌの 2~5% 前後が *B. canis* に感染歴を持つとされていること、また時折、イヌ繁殖施設において集団発生が見られることから、イヌの衛生管理を含めて注意しておく必要があると考えられる。

#### D. 健康危害情報

なし。

#### E. 研究発表等

##### 1. 論文発表等

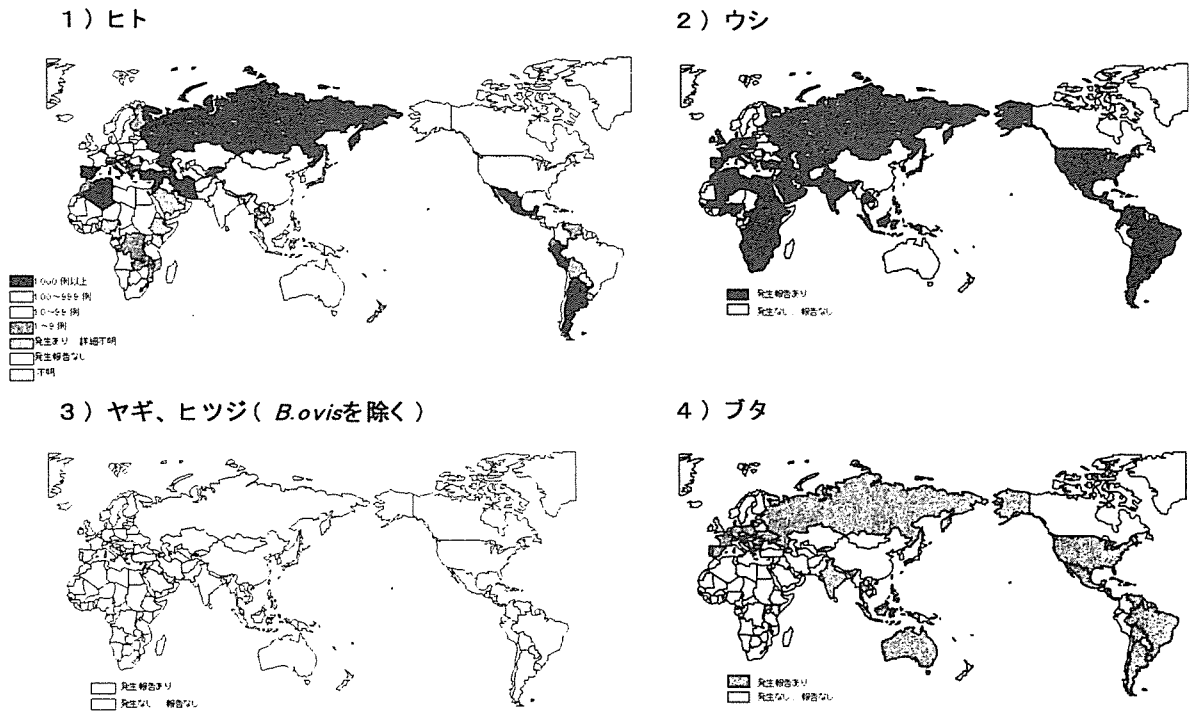
(1) Imaoka, K., Kimura, M., Suzuki, M., Kamiyama, T. and Yamada, A. Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. Jpn. J. Inf. Dis., 2007 (in press)

##### 2. 学会発表等

(1) 今岡浩一、「日本におけるブルセラ症」：シンポジウム V 「動物由来感染症」、衛生微生物技術協議会第 27 回研究会、札幌、2006。

図 1.

2000～2004年における、ヒトおよび家畜のブルセラ症



国際獣疫事務局(OIE), Multiannual Animal Diseases Status より改変

表1. 国内のウシにおける *B. abortus* の発生状況

1916 : 最初の分離

1953～ : *B. abortus* 多発 (オーストラリア、ニュージーランドなど)

1957 : FAO/WHOブルセロシスセンター設置。

摘発・淘汰の徹底 (1947-1972:4596頭)。

1972～2001 : 23頭

年	発生数	91	0.2/100万頭	01	1頭 (福島)
82	0.2/100万頭	92	0	02	1頭 (千葉)
83	0.2/100万頭	93	0	03	0
84	0	94	0	04	0
85	0	95	0.2/100万頭	05	0
86	0.6/100万頭	96	0	06	0
87	0	97	0		
88	0	98	0		
89	0.2/100万頭	99	0		
90	0.2/100万頭	00	0		

家畜疾病発生動向(動物衛生研究所ホームページ)よりデータ引用。

表2. 感染症法による届出疾患指定前におけるブルセラ症の発生状況（～1999.3.31）

報告番号	発生年	性(年齢等)	報告地	推定感染地	推定感染経路	症 状	同定(推定)菌種	菌分離等	報告者	引用文献
R-1	1932	女 (32)	京都	渡航歴無し	牛乳?	弛張熱、悪寒	( <i>abortus</i> )	凝集	西川	東京医事新誌, 2843: 1955-56, 1933
R-2	1932 ～1962	51例 (R-1症例を含む) (男34名、女17名、 うち6名死亡)		外地発症後帰国—3名 実験室感染—13名 その他—34名		波状熱、弛張熱、 悪寒、全身倦怠感 筋肉痛、心内膜炎	<i>melitensis</i> , <i>suis</i> , <i>abortus</i>		鶴見	日本伝染病学会雑誌(総説), 36: 201-04, 1962
R-3	1976	少女	島根	渡航歴無し	不明		<i>abortus</i>	菌分離	小久保	日本小児科学会雑誌, 101: 1067-70, 1997(内に引用)
R-4	1980 1981	— (検査従事者)	神奈川 神奈川	インド出張 検査室感染	不明 患者検体	発熱、慢性疲労 —	<i>melitensis</i> <i>melitensis</i>	菌分離 菌分離	伊佐山	日本細菌学雑誌, 37: 336, 1982
R-5	1993	男 (38)	札幌	渡航歴無し	不明	微熱、咳、胸痛	<i>abortus</i>	菌分離、PCR	高橋	Internal Medicine, 35: 310-14, 1996
R-6	1995	女兒 (1才7ヶ月)	静岡	妊婦ペルーで 感染	母 (授乳?)	発熱	<i>abortus</i>	菌分離	小久保	日本小児科学会雑誌, 101: 1067-70, 1997
R-7	1998 ”	男 (64、夫) 女 (60、妻)	東京 ”	イラク ”	不明 ”	発熱、脊髄炎 発熱、腰痛、鎖骨関 節炎	<i>melitensis</i> <i>melitensis</i>	菌分離、PCR 菌分離、PCR	寺田	臨床放射線, 44: 953-956

\* : Report No.

表3. 感染症法による届出疾患指定後におけるブルセラ症の報告症例 (1999.4.1~2007.1.31) #

症例番号	推定感染 年月	発病年月	診断年月	週	性	年齢	報告都道府 県	推定感染地	推定感染経路	症 状	血清抗体検査**	菌分離
C*-1	記載なし	記載なし	2002.1	1w	女	40代	東京都	不明	ペットの犬	発熱、食欲不振	BA-, BC+	(-)
C-2	記載なし	2005.6	2005.6	26w	女	30代	東京都	シリア	経口 (羊肉)	発熱、皮疹、脾腫、腹部リンパ節腫大、関節痛	BA+, BC+	<i>B. melitensis</i>
C-3	記載なし	2005.10	2005.12	51w	男	13才	長野県	国内 (都道府県名情報なし)	不明	発熱、筋肉痛、腹痛	BA-, BC+	(-)
C-4	記載なし	2006.2	2006.2	8w	男	50代	東京都	エジプト	不明 (エアロゾル吸入疑い)	発熱、頭痛、肝脾腫	BA+, BC+	<i>B. melitensis</i>
C-5	2006.3	2006.5	2006.6	22w	女	20代	長野県	イタリア	不明	発熱、筋肉痛	BA-, BC+	(-)
C-6***	2005.9	2006.7	2006.7	31w	女	20代	北海道	エジプト	経口 (ミルク)	発熱、頭痛	BA+, BC-	<i>B. abortus</i>
C-7	2006.1	2006.5	2006.9	39w	女	60代	長野県	長野県	不明	発熱、脾腫	BA-, BC+	(-)
C-8	2006.8	2006.9	2006.10	43w	女	70代	宮城県	宮城県	不明	発熱、中枢神経症状	BA-, BC+	(-)

# : 感染症発生動向調査週報 (IDWR, 9(4):12, 2007) より引用。

\* : Case No.

\*\* : 試験管内凝集反応。抗原として*B. abortus* (BA) または*B. canis* (BC) を使用。

\*\*\* : 過去に2005.9にエジプトにて発症、治療。今回は再燃と思われる。

*Brucella canis* 特異的抗体検出のための  
マイクロプレート凝集反応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
協力研究者	鈴木 道雄	国立感染症研究所	獣医科学部	第一室研究員

研究要旨：*Brucella canis* はイヌを自然宿主とし、流産や不妊等の原因となることが知られているが、きわめてまれにヒトにも感染する。現在の *B. canis* に対する抗体検査法は不活化 *B. canis* 菌体を抗原とした試験管内凝集反応（TAT）であるが、試験管を用いるため検査に必要な抗原量・血清量が多く、また一度に多くのサンプルを検査することも困難である。そこで、より少量の抗原・血清ですみ、また多くのサンプルを一度に検査することを可能にする、マイクロプレートを用いた凝集反応（MAT）を検討した。

K 市動物愛護センターより得た 497 サンプルおよび、別途入手したイヌブルセラ病陽性血清 51 サンプル、全 548 サンプルを用いて TAT および MAT を実施し、その検出率ならびに抗体価を比較した。その結果、91%の確立で陽性率が一致し、抗体価にも相関が見られた ( $R^2=0.934$ )。MAT は TAT に変わる優れた検出法であると考えられる。

#### A. 研究目的

ブルセラ症（Brucellosis）は世界では恒常的に発生している人獣共通感染症であり、日本では感染症法によって 4 類感染症（全数把握）に指定されている。ヒトに対するものは病原性の強さ順に *Brucella melitensis*、*B. suis*、*B. abortus* があるがこれらはすべて家畜が自然宿主となっている。一方、*B. canis* はイヌを自然宿主とし、イヌにおける流産や不妊等の原因となることが知られている。日本では、1972 年に米国から導入された繁殖用雄イヌを起源とする実験用ビーグル犬の繁殖コロニーにおける *B. canis* の集団発生の報告が最

初であり、以来、イヌ繁殖コロニーでの集団発生が時折、確認されている。ごくまれにヒトにも感染することもあるが、その症状は比較的軽症であることから感染に気づかない場合もあり、実際の感染者数は定かでない。そこで、現在のイヌにおける *B. canis* 感染状況を把握するため、イヌ血液を K 市動物愛護センターより入手し、*B. canis* の検査を実施した。

また、ブルセラ症の診断では試験管内凝集反応（TAT）が用いられるが、これは検査に必要な血清量が多く、煩雑であるため、一度に多くのサンプルを検査することが難しい。そこで、これに代わる方法として、マイクロ

プレートを用いたマイクロプレート凝集反応 (MAT) を検討した。

## B. 研究方法

1. イヌ血液サンプル： K市動物愛護センターは、イヌを何らかの事情で手放すための持ち込みへの対応および路上などでの保護・収容を行っている。平成 14～18 年度に K市動物愛護センターより、同施設に収容されたイヌの血液サンプル、各年度それぞれ 30、96、135、173、63 サンプルの提供を受けた。陽性血清 51 サンプルは、2003 年に静岡県内のイヌ繁殖施設において、イヌブルセラ病が集団発生したときの試験管内凝集反応 (TAT) による抗体陽性サンプルを用いた (厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業「愛玩動物の衛生管理の徹底に関する研究」平成 15 年度研究報告書参照)。

2. 試験管内凝集反応 (TAT) およびマイクロプレート凝集反応 (MAT)： TAT は、*B. canis* 凝集反应用菌液 (北里研究所) を用い添付のプロトコールに従い実施した。すなわち血清サンプルを 20 倍から 2 倍段階希釈し、凝集反應用菌液を加え、50°C、24 時間感作後、サンプルの最終希釈倍数 160 倍以上で 50%以上の凝集を示すものを陽性と判定した。必要血清量は原液で 100ul である。

MAT は、*B. canis* 凝集反應用菌液と 0.25% サフラニン染色液を 50:1 の比率で混合し、抗原とした。96 穴 U 底プレートを用い、サンプルをリン酸緩衝生理食塩水で 20 倍から 2 倍段階希釈し、同量の凝集反應用抗原を混合・攪拌し、50°C、24 時間感作後、凝集反応を判定した。必要血清量は原液で 5ul である。MAT は肉眼で凝集像が確認されたものを陽性と判定した。

## C. 研究結果

1. 動物愛護センターにおける *B. canis* 特異的抗体の保有状況： イヌの K市動物愛護センターにやってきた経緯は、持ち込みが約 60-70%を占めていた。

*B. canis* 特異的抗体を TAT により検討した。Table 1 に示したように、抗体陽性率は 2.8% (14/497) であった。年度別では、平成 14 年度 (期間が短い) は 0% (0/30)、15 年度は 3.1% (3/96)、16 年度は 4.4% (6/135)、17 年度は 1.2% (2/173)、18 年度は 4.8% (3/63) であった。抗体陽性イヌにおける抗体価は、1:160 が 9 頭、1:320 が 4 頭、1:640 が 1 頭であり、また、そのプロファイルは、持ち込みが 7 頭、保護・収容が 7 頭であり、オス 11 頭、メス 3 頭となっていた (Table 1)。

検査したすべての血液サンプルについて、*B. canis* 特異的遺伝子の検出および菌の分離を試みたが、いずれの検体からも分離や検出はされなかった。

2. MAT と TAT における特異性・検出感度の比較： 凝集反應用抗原に添付されているプロトコールに従い、抗体価 1:160 以上を陽性と判断すると、TAT、MAT とともに 65 サンプルが陽性を示した。静岡のサンプルではすべて一致したが、動物愛護センターのサンプルでは若干の不一致が認められた。その陽性一致率は 91% (59/65) であった (Table 2)。TAT および MAT の抗体価を比較したところ、良好な相関が認められ ( $R^2=0.934$ )、カットオフ値も 1:160 で良いと考えられた (Table 3、Fig. 1)。

## D. 考察

1972 年に最初にイヌ繁殖コロニーにおいて *B. canis* の集団発生が報告されて以来、イヌ繁殖コロニーでの集団発生が時折、確認されている。現在も、国内のイヌで感染が継続

していると考えられているが、国内におけるイヌの感染実態の調査は 1970 年代の報告が大半である。そこで、現在のイヌにおける *B. canis* 感染状況を把握するため、イヌ血液を K 市動物愛護センターより入手し、*B. canis* の検査を実施した。5 年間の調査で、2.8% の抗体保有率を示した。陽性を示したイヌ 14 頭のうち 7 頭は一般家庭で飼育されていたものであった。残りの 7 頭も保護・収容ではあるが、K 市の地理的要因から、いわゆる本当の野犬（自然繁殖しているもの）とは考え難く、これらもかつて飼育されていた可能性が強い。ヒトの *B. canis* 感染は、他の家畜ブルセラ菌と比べて弱く、感染も成立しにくいとされる。また、感染してもそれに気づかない、感染発症しても軽微な感冒様症状とされていて、実際の感染状況は不明である。ヒトへの感染は、感染イヌの血液、精液、胎盤との接触によるとされるが、尿から高率に菌分離が可能とする報告もある。一般的にハイリスクグループとして獣医師を含む動物病院勤務者、イヌ繁殖に携わるものなどがあるが、昨今、生活習慣の変化から、イヌの多くが室内で飼育され、ヒトとの接触密度が増している状況で、いわゆる高齢者や免疫抑制状態にある者での感染に留意する必要があると考えられる。

今回、新たに検討した MAT は、たとえば 20 倍希釈サンプルより検査する場合、1 サンプルの反応に必要な血清原液は 5 $\mu$ l であり、TAT の 1/20 であった。96 穴 U 底プレートを用いるため、操作も簡便で、マルチピペットの使用により短時間に多くのサンプルを処理することが可能であった。また、抗原をサフラニン染色しておくことにより TAT に比べ判定も容易であった。また、臨床現場で最も広く用いられている TAT と十分な相関性がえられ、血清量が少ない場合、あるいは、多数の検体を処理する場合に非常に有効な検査法であると考えられた。ただ、TAT、MAT

ともに、溶血したサンプルでは非特異的陽性反応が強く出ることが多く、判定が出来ない。さらに、凝集反応は交差反応などによる擬陽性が見られることもあるので、これに代わる ELISA 法なども開発する必要があるかもしれない。ヒトの公衆衛生上、より重要なブルセラ属菌 (*B. melitensis*、*B. suis*、*B. abortus*) も臨床現場では TAT が用いられている。今回は、*B. canis* に対する MAT であったが、今後、*B. melitensis*、*B. suis*、*B. abortus* についても、より特異性を高めた MAT や ELISA 法を開発する必要があると思われた。

## E. 結論

現在の *B. canis* に対する抗体検査法は不活化 *B. canis* 菌体を抗原とした試験管内凝集反応 (TAT) であるが、試験管を用いるため検査に必要な抗原量・血清量が多く、また一度に多くのサンプルを検査することも困難である。そこで、より少量の抗原・血清ですみ、また多くのサンプルを一度に検査することを可能にする、マイクロプレートを用いた凝集反応 (MAT) を検討した。全部で 548 サンプルを用いて TAT および MAT を実施し、その検出率ならびに抗体価を比較した。その結果、91% の確立で陽性率が一致し、抗体価にも相関が見られた ( $R^2=0.934$ )。MAT は TAT に変わる優れた検出法であると考えられる。今回は、*B. canis* に対する MAT であったが、ヒトの公衆衛生に対して、より重要なブルセラ属菌 (*B. melitensis*、*B. suis*、*B. abortus*) についても、より特異性を高めた MAT や ELISA 法を開発する必要があると思われた。

## F. 健康危害情報

なし。

## G. 研究発表等



1. 論文発表等

( 1 ) Imaoka,K., Kimura,M., Suzuki,M., Kamiyama,T. and Yamada,A. Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. Jpn.J.Inf.Dis., 2007 (in press)

2. 学会発表等

( 1 ) 今岡浩一、「日本におけるブルセラ症」：シンポジウム V 「動物由来感染症」、衛生微生物技術協議会第 27 回研究会、札幌、2006。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

Table 1) K市における *B.canis* に対する抗体の陽性率と陽性検体のプロフィール

年度	陽性率	犬種	抗体価	性別	年齢	健康状態	履歴
H14 (2003.2.25 ~3.28)	0% (0/30)	—					
H15	3.1% (3/96)	秋田	1:160	♀	5-10	良	持ち込み
		パピオン	1:160	♂	5-10	不良	持ち込み
		柴	1:320	♂	1-5	良	持ち込み
		雑種	1:160	♂	5-10	不良	保護・収容
		雑種	1:160	♂	10<	良	保護・収容
H16	4.4% (6/135)	オールドイングリッシュ	1:320	♀	2-5	良	持ち込み
		雑種	1:160	♂	2-5	良	保護・収容
		シーズー	1:320	♂	2-5	不良	持ち込み
		雑種	1:160	♂	5-10	良	保護・収容
H17	1.2% (2/173)	雑種	1:160	♂	1-5	良	保護・収容
		マルチーズ	1:320	♀	1-5	良	持ち込み
H18 (~ 2006.12.15)	4.8% (3/63)	マルチーズ	1:160	♂	5-10	良	保護・収容
		柴	1:640<	♂	10<	良	保護・収容
		柴	1:160	♂	—	—	持ち込み
Total	2.8% (14/497)						

抗体検出方法は TAT による。

Table 2) TAT および MAT による *B.canis* に対する抗体陽性数の比較

サンプル		TAT+	MAT+	Total
静岡 (TAT陽性検体)*		51	51	51
K市動物 愛護セン ター	H14	0	0	30
	H15	3	1	96
	H16	6	7	135
	H17	2	4	173
	H18	3	2	63
Total		65	65	548

\* : 2003年、静岡県内イヌ繁殖施設集団発生事例

Table 3) TAT および MAT による *B.canis* に対する抗体価の比較

測定方法および抗体価		TAT								
		20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120
MAT	20	412	7	3	1					
	40	32	4	3						
	80	4	10	5	1	1				
	160	2		1	10					
	320				12	4	3			
	640					5	5			
	1280						5	1	3	
	2560						1	1	2	
	5120							1	5	3
	10240									
	20480									1

Fig. 1) TAT および MAT による *B.canis* に対する抗体価の相関

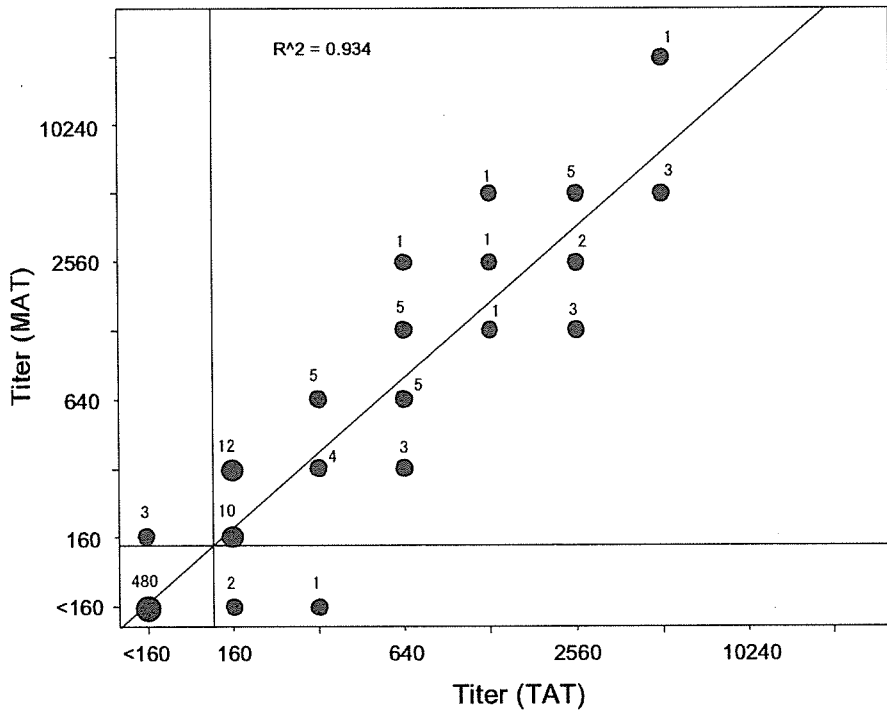


Fig.内の数字は検体数

カプノサイトファーガ属菌に関する疫学的調査・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	鈴木 道雄	国立感染症研究所	獣医科学部	第一室研究員
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
協力研究者	神山 恒夫	国立感染症研究所	獣医科学部	第一室長

研究要旨： カプノサイトファーガ属菌はイヌの口腔内に常在するグラム陰性桿菌であり、ヒトがイヌに咬まれた際に傷口から感染することなどによって種々の症状を呈し、発症した場合の死亡率は30%程度と比較的高い。日本国内におけるカプノサイトファーガ属菌のイヌでの保有状況について調査するため、K市動物愛護センターより口腔内拭い液を入手し、遺伝子検査および菌分離を行った。平成18年12月までの調査の結果、309検体中295検体（約96%）が遺伝子検査陽性であり、国内のイヌは同菌を高率に保有していた。このうち83検体から同菌を分離し、性状解析を行った。併せて、同様にイヌ咬傷による感染の原因となる *Pasteurella multocida* の遺伝子検査も実施した結果、309検体中86検体が陽性であり、保有率は約28%であった。

A. 研究目的

カプノサイトファーガ属 (*Capnocytophaga* spp.) はヒトや動物の口腔内に常在するグラム陰性桿菌であり、現在7種が知られている。ヒトの口腔内細菌として *C. ochracea* を始めとする5種があり、歯周病に関係するほか、時に日和見的に全身感染して心内膜炎、敗血症などを起こすことがある。一方、イヌは *C. canimorsus*、*C. cynodegmi* の2種を保有しており、ヒトがイヌに咬傷を受けた際に受傷部位から感染するほか、非咬傷性の接触感染もある。症状としては発熱のほか、敗血症、腎不全、髄膜炎や播種性血管内凝固症候群 (DIC) などを起こし死に至る例もある。これまで

世界的に患者の報告は多くないが、重篤な転帰を辿ることが比較的多く、発症した場合の死亡率は約30%とされている。

海外においてもイヌの保有状況に関する報告は少ないが、16～24%のイヌが保有しているという報告がある。日本においては、イヌにおける保有率調査やヒトでの臨床症例報告がほとんどなかったが、我々のこれまでの調査によって、国内のイヌが同属菌を高率に保有していることが明らかとなった。

さらに、同じくイヌ咬傷の原因菌の一つである *Pasteurella multocida* についても、併せてイヌの保有状況を調査することとし、イヌ口腔内スワブ（拭い液）をK市動物愛護センターより入手し、検査を実施した。

## B. 研究方法

1. 研究サンプル： K市動物愛護センターより同施設に収容されたイヌの口腔内スワブサンプルの提供を受けた。平成16年10月から平成18年12月までに提供された計309検体について下記の検索を行った。

2. *Capnocytophaga* spp.特異的遺伝子の検出： 口腔内スワブをハートインフュージョン液体培地で24時間培養し、遠心後に沈渣を蒸留水で溶解し、熱変成させてDNAを抽出した。*C.canimorsus*、*C.cynodegmi*の16S rRNA遺伝子に対する特異的プライマーを用いて、PCR法による遺伝子検出を行った。

3. *Pasteurella multocida* 特異的遺伝子の検出： 上記の抽出DNAを検体として、*P.multocida*のKMT1遺伝子に対する特異的プライマーを作成し、PCR法による遺伝子検出を行った。

4. *Capnocytophaga* spp.の分離： 口腔内スワブサンプルをハートインフュージョン液体培地に溶出させた後、5%ウサギ脱繊維血液加ハートインフュージョン寒天培地で嫌氣的に培養し(35°C、6-7日間)、菌の分離を行った。

分離菌株はPCR法を用いて*Capnocytophaga* spp.であることを確認した。PCR法による確認では16S rRNA遺伝子の検出に加えて、*C.canimorsus*のgyrB遺伝子特異的プライマーを用いた同遺伝子の検出を適宜行った。また、分離菌株の一部についてはシーケンサーを用いた塩基配列の解析を行った。さらに生化学的性状について市販の検査キットを用いて調べた。

## C. 研究結果

1. *Capnocytophaga* spp.特異的遺伝子の検出率： PCR検査に供した計309検体のうち295検体で*C.canimorsus*、*C.cynodegmi*特異的遺伝子が検出され、検出率は約96%であった(Table 1-1)。

新規に作成したプライマーセットによって*C.canimorsus*、*C.cynodegmi*両菌の鑑別が16S rRNA遺伝子のPCR検査によって可能になり、平成18年4月以降、計67検体について検査した結果、*C.canimorsus*は55検体陽性で保有率82%、*C.cynodegmi*は58検体陽性で保有率87%であり、72%(48検体)が両種とも陽性であった。(Table 1-2)

2. *Pasteurella multocida* 特異的遺伝子の検出率： PCR検査に供した計309検体のうち86検体で*P.multocida*特異的遺伝子が検出され、検出率は約28%であった(Table 2)。

3. *Capnocytophaga* spp.の分離： 計83検体から*Capnocytophaga* spp.計120株を分離した。16S rRNA遺伝子およびgyrB遺伝子のPCR検査および生化学的性状検査の結果から、*C.canimorsus*6株、*C.cynodegmi*67株を同定した。さらに、塩基配列が16S rRNA遺伝子の配列が*C.canimorsus*、*C.cynodegmi*のいずれとも若干異なる、バリエーション株が35株あった。分離株の一部については16S rRNA遺伝子を用いたシーケンス解析を行い、バリエーション株のうち33株はGenBankに登録されている*Capnocytophaga* sp.cp05.19と塩基配列がほぼ一致した(Table 1-3)。分離株の系統樹をNJ法を用いて作成した(Figure 1)。

残りの株についても今後解析を進める予定である。

## D. 考察

*Capnocytophaga* spp.はイヌの口腔内常在菌であり、ヒトがイヌに咬まれた際に傷口から侵入し、局所感染あるいは全身感染を引き起こす、いわゆるイヌ咬傷関連菌として位置づけられる。

ヒトにおける症例の報告は多くないが、慢性疾患に罹患している人、脾臓摘出手術を受けた人など、免疫力が低下している人の症例が多く、これらのいわゆる易感染性の人イヌと接する際には注意が必要であると考えられる。

また、国内でも感染例が報告されているが(参考文献1)、臨床現場での認知度の低さや菌の増殖が遅いことによる同定の困難さなどの要因から、確定診断に至っていない症例が存在することも考えられ、実際の症例数は現状把握されているよりも多い可能性がある。

昨年度の調査に引き続き、イヌの口腔内には *Capnocytophaga* spp.が高率に存在することを明らかにし、また約33%の検体から菌株を分離することができた。

*Capnocytophaga* spp.の診断法については、*C.canimorsus*、*C.cynodegmi*は16S rRNA 遺伝子の相同性が高いことに加えて、生化学的性状でも検査キットの項目では明確な区別ができず、両種の判別が困難であったが、16S rRNA 遺伝子を検出するプライマーを改良することによって *C.canimorsus*、*C.cynodegmi* それぞれを特異的に検出することが可能になった。一方で、この2菌種と極めて近いが16S rRNA 遺伝子の塩基配列の若干異なる株も分離されており、イヌの保有する *Capnocytophaga* spp.に関して、分離菌株について病原性を含めた解析を進めてその分類を明確にし、鑑別診断の精度を高めていくことが重要である。

また、ネコからの感染例の報告もあることから、ネコについての調査も今後の課題

である。

*Pasteurella multocida*については、イヌでの保有率を調査した結果、約28%のイヌが同菌を保有していた。パストツレラ症についても、イヌ咬傷による日和見的細菌感染症を総合的に検討するために今後も調査を継続したい。

## E. 結論

イヌの口腔内には、*Capnocytophaga* spp.が高率に存在しており、日本国内においてもイヌ咬傷による感染の潜在的リスクがあることが確認された。これまでヒトの症例の報告は多くないものの、発症した場合の死亡率は比較的高く、また症例について十分な把握ができていないことも考えられることから、今後、菌種レベルでの性状や病原性の解析を進めるとともに、ネコ等、イヌ以外の動物での調査を行うことも含め、その実態をより詳しく明らかにしていきたい。

参考文献： 菊池一美ら、*Capnocytophaga.canimorsus*による菌血症の1症例、日本臨床微生物学雑誌(2005) Vol.15 No.1 9-14.

## F. 健康危害情報

なし。

## G. 研究発表等

なし。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

**Table 1-1)** 口腔内スワブからの *C.canimorsus*, *C.cynodegmi* 特異的遺伝子検出率(1)

	総検体数	陽性検体数	陽性率
平成 16 年度	61	54	89%
平成 17 年度	181	176	97%
平成 18 年度	67	65	97%
計	309	295	95%

**Table 1-2)** 口腔内スワブからの *C.canimorsus*, *C.cynodegmi* 特異的遺伝子検出率(2)

C.ca	C.cy	検体数	
+	+	48	72%
+	-	7	10%
-	+	10	15%
-	-	2	3%
計		67	

＋：PCR 検査陽性、－：PCR 検査陰性

C.ca: *C.canimorsus*, C.cy: *C.cynodegmi*

**Table 1-3)** *Capnocytophaga* spp.分離株の内訳（既同定分）

<i>C.canimorsus</i>	6
<i>C.cynodegmi</i>	67
<i>C.sp.cp05.19</i>	33
other variants	2
total	108

**Table 2)** 口腔内スワブからの *P.multocida* 特異的遺伝子検出率

	総検体数	陽性検体数	陽性率
平成 16 年度	61	17	28%
平成 17 年度	181	45	25%
平成 18 年度	67	24	36%
計	309	86	28%





厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)  
分担研究報告書

オウム病の早期診断体制とコントロールに関する研究

分担研究者	岸本壽男	国立感染症研究所ウイルス第一部第五室	室長
協力研究者	安藤秀二	同	主任研究官
	坂田明子	同	研究員
	小川基彦	同	主任研究官
	福士秀人	岐阜大学農学部獣医学科獣医微生物学講座	教授
	大屋賢司	同	助手
	蔡 燕	オリエンタル酵母工業(株)長浜生物科学研究所	研究員
	矢野竹男	同	研究員
	中尾義喜	同	副所長

研究要旨: *C. psittaci* 感染により発症するオウム病は、感染症法にて 4 類感染症に指定されている全数把握疾患であり、その臨床上の重要性は高い。しかし報告のための血清診断法のひとつである micro-IF 法は、精製抗原の準備が煩雑で判定にも熟練を要するため扱いにくく、可能な施設は限られている。そこで本年度は、オウム病のより簡便な血清診断法として、*C. psittaci* 感染細胞を用いた間接蛍光抗体法 (inclusion IFA) の臨床応用について検討した。本法でオウム病患者血清を測定した結果、micro-IF 法と高い相関性が認められ、判定も容易であった。また、界面活性剤を添加した検体希釈液では、PBS に比べ、非特異反応によると思われるバックグラウンドを低下させることができた。今後、臨床検体を増やし特異性、感度の検討と、判定基準の設定を行い、臨床応用の有用性について検討をすすめる予定である。次にオウム病の病態発現に関する病原因子の探究を比較ゲノム解析の視点から行うためには、*C. psittaci* ゲノム配列の解読と比較解析が必要であるが、現時点で *C. psittaci* のゲノム配列は未解読である。そこで本年度は、我が国において集団発生事例で分離された Mat116 株、およびセキセイインコ由来 Budgerigar No. 1 株の 2 株を選定し、ゲノム配列の解読と比較解析に着手した。現在までに菌の増殖と EB 精製を終え、順次高純度ゲノム DNA の抽出を行いつつあり、今後解析を進める予定である。

## A. 研究目的

### 1. オウム病の簡便な血清診断法の臨床応用

オウム病は、*Chlamydophila psittaci* (*C. psittaci*) による人獣共通感染症であり、年間 40 例程度の発生が報告されている感染症法の 4 類指定疾患である。診断や治療の遅れ等で重症化し死亡することもある。しかしながら、これまでの届出例のほとんどは種の特定ができない補体結合反応 (CF 法) で診断、報告されており、必ずしも確定診断例ではない点が問題視されてきた。昨年 4 月に改正された届出基準では、抗体検査から CF 法が除外され、種の鑑別が可能な蛍光抗体法を用いることとなったが、実際に精製抗原を用いる micro-IF 法は、抗原の準備が煩雑で判定にも熟練を要するため扱いにくく、施行できる施設は限られている。そのため micro-IF 法に変わる簡便な方法の開発普及が求められている。この現状を踏まえ、*C. psittaci* 感染細胞を用いた間接蛍光抗体 (inclusion IFA) の臨床応用について検討した。

### 2. *C. psittaci* ゲノム配列の解読と比較解析

クラミジアのゲノムに関しては、現在までに性器クラミジア (*C. trachomatis*)、肺炎クラミジア (*C. pneumoniae*) を始めとして、*C. muridarum* (マウス)、*C. caviae* (モルモット)、*C. abortus* (反芻獣、鳥)、*C. felis* (ネコ) 等の他種動物を主要な宿主域とするクラミジアを含む 6 種において全塩基配列が決定されている。しかし

ながら *C. psittaci* 感染により生じるオウム病は、その臨床上的重要性は高いにもかかわらず、ゲノム配列は現時点で未解読である。そこで *C. psittaci* の病態発現に関する病原因子の探究を比較ゲノム解析の視点から行うために、ゲノム配列の解読と比較解析を行うこととした。これらから得られる知見から、我が国において発生したオウム病クラミジアの宿主特異性や病態発現機序の実像解明を目的とする。

## B. 研究方法

### 1. オウム病の簡便な血清診断法の臨床応用

抗原作成: スライドガラス上でモノレイヤーになった HeLa229 細胞に *C. psittaci* Cal10 株を接種し、31~44 時間培養後、アセトンで固定した。対象: オウム病確定患者 6 例 11 検体 (ペア 9 検体、シングル 2 検体) と、クラミジア抗体陰性血清 125 検体、肺炎クラミジア感染症患者血清 20 検体を用いた。測定方法および判定: IFA 法にて IgG 抗体を細胞内黄緑色蛍光の封入体を観察して判定し、64 倍を暫定カットオフ値とした。検体の希釈液は PBS と PBS に界面活性剤を添加したものを用い、健常人血清 9 検体の非特異反応の程度についても比較した。

### 2. *C. psittaci* ゲノム配列の解読と比較解析

ゲノム配列の解読と比較解析に供する株は、我が国において分離された株で、2001 年松江市の鳥展示施設に於けるヒト

への集団感染時に分離された Mat116 株、およびセキセイインコ由来 Budgerigar No.1 株の 2 株である。グループ内には、ネコクラミジア *C. felis* ゲノム配列の決定に参加した者もあり、2 株間および他種クラミジアゲノムとの比較解析は、それに準じて行う。株および種間において特異性の高い領域を探索し、特に代謝系酵素や病原因子の保存・多様性を検討し、各遺伝子産物の機能を遺伝学、細胞生物学的に *in vitro* で解析することとした。

### C. 研究結果

#### 1. オウム病の簡便な血清診断法の臨床応用

本法でオウム病患者 6 例の検体を測定した結果、全て 64 倍以上の陽性で、micro-IF 法と高い相関性が認められた ( $r=0.97$ )。一方、肺炎クラミジア患者血清では、ELISA 法(ヒタザイム C, ニューモニエ)にて Index 値高値の検体でもオウム病 IFA 抗体価は低く、20 検体の中 18 検体は 64 倍以下であった。また inclusion IFA は、micro-IF に比べて判定が容易であった。さらに、界面活性剤を添加した検体希釈液では、9 検体中 6 検体にて PBS のみで希釈した場合に比べ、非特異反応によると思われるバックグラウンドを低下させることができた。

#### 2. *C. psittaci* ゲノム配列の解読と比較解析

これまでに、*C. psittaci* Mat116 株精製 EB より高純度ゲノム DNA を抽出した。同

様に、Budgerigar No.1 株からもゲノム DNA 抽出を行い、2 株の fosmid ライブラリー作製、塩基配列の決定を行うための準備を進めている。

### D. 考察

#### 1. オウム病の簡便な血清診断法の臨床応用

本法でオウム病患者血清を測定した結果、micro-IF 法と高い相関性が認められ、判定も容易であった。また、これまで非特異反応によるバックグラウンドが判定を困難にしていたが、PBS に各種界面活性剤を添加して検討した結果、今回選択した界面活性剤を含む検体希釈液では、PBS に比べ、非特異反応をかなり低下させることができた。今後は、より多数のオウム病確定例、他のクラミジア感染症例、健常人等の血清で、特異性や感度等の検討を進め、より有用な臨床応用のための判定基準を作成したいと考えている。

#### 2. *C. psittaci* ゲノム配列の解読と比較解析

これまでにゲノム解析が終了しているクラミジアとしては、临床上重要な *C. trachomatis*、*C. pneumoniae* があり、それぞれ 2 株 (D/UW-3/CX、A/HAR-13)、4 株 (TW-183、CWL029、AR139、J138) と複数の株において解読が終了している。これら各種ゲノム解析および比較ゲノム解析により、クラミジアの進化、生理、病原性発現に関する様々な知見が得られ始めている。例えば、肺炎や持続感染により動脈硬化の原因となる *C. pneumoniae* ではゲノム全長が約 1.2 Mbp と他種クラミジア (約 1.0 Mbp) より大きく、蛋白質をコー

ドする推定 ORF も約 1,200 と他種クラミジア（約 900）より多い。これは、*C. pneumoniae* が他種クラミジアに比べ広域な組織嗜好性を示し、浸襲性も強いことを反映していると考えられている。またクラミジアは偏性細胞内寄生細菌であるため、分裂・増殖に必要な代謝系路の多くを宿主細胞に依存している。各種クラミジアゲノム配列の比較解析により、細胞内増殖に関する代謝酵素や病原因子の同定、種・株間における差異、それらの病態形成との関連が分子・個体レベルで明らかになりつつある。これらゲノム解析を通じ、遺伝子構造を含めたクラミジアの生物学的特徴を明らかにすることにより、新規治療法（ドラッグデザイン）、予防法（ワクチンデザイン）、迅速・簡易診断法（至適抗原の探索）の開発に繋がることが期待される。そこで本研究の目的である *C. psittaci* ゲノム配列の解読と比較解析から得られる知見から、以下の将来展望を考えている。まず我が国において発生したオウム病クラミジアの宿主特異性や病態発現機序の実像解明を試み、最終的には、①薬剤標的探索とドラッグデザインによる新規治療法開発、②より効果的に防御免疫を誘導する新規予防法としてのワクチン開発、③属・種特異的抗原の探索による簡易・迅速診断法の開発。これらを統合して、オウム病を始めとしたクラミジア感染症の征圧を目指したいと考えている。

#### E. 結論

1. オウム病の簡便な血清診断法の臨床応用

オウム病のより簡便な血清診断法として、*C. psittaci* 感染細胞を用いた間接蛍光抗体法（inclusion IFA）の臨床応用について検討した。本法でオウム病患者血清を測定した結果、micro-IF 法と高い相関性が認められ、判定も容易であった。また、界面活性剤を添加した検体希釈液では、PBS に比べ、非特異反応によると思われるバックグラウンドを低下させることができた。今後さらに臨床応用のための検討をすすめる必要がある。

#### 2. *C. psittaci* ゲノム配列の解読と比較解析

オウム病の病態発現に関する病原因子の探究を比較ゲノム解析の視点から行うため、我が国において分離された Mat116 株、およびセキセイインコ由来 Budgerigar No.1 株の 2 株を選定し、ゲノム配列の解読と比較解析に着手した。今後さらに研究を進める予定である。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表等

1. 岸本寿男、安藤秀二、小川基彦：オウム病および Q 熱一診断における現状と課題 カレントセラピー 24：98-100, 2006
2. 岸本寿男、安藤秀二、小川基彦：非定型肺炎の治療. クラミジア肺炎. Medical Practice 23:1953-1957, 2006
3. 岸本寿男、安藤秀二、小川基彦：培養できない非定型病原体-クラミジア, コクシエラなど. ベッドサイドで役立つ微生物検査ガイド. 河野 茂ほか編. 文光堂 2006;504-508