

疾患名：クリプトコッカス症

検査方法	直接検査法による検出		PCR法による病原体の遺伝子の検出		ラテックス凝集反応による検出		培養検査による検出		検査依頼先の 確立の必 要性(必 要な場合 0 印)	貴施設に対する (過去における) 検査依頼						
	鼻髄拭い液、咽頭拭い液、血液、便	鼻髄拭い液、咽頭拭い液、血液、便	鼻髄拭い液、咽頭拭い液、血液、便	鼻髄拭い液、咽頭拭い液、血液、便	鼻髄拭い液、咽頭拭い液、血液、便	鼻髄拭い液、咽頭拭い液、血液、便	鼻髄拭い液、咽頭拭い液、血液、便	鼻髄拭い液、咽頭拭い液、血液、便		検査依頼先の 確立の必 要性(必 要な場合 0 印)	あった	まだない				
検査材料	貴施設における 検査対応(現在の)	不可の場合の検査依頼先	貴施設における 検査対応(現在の)	不可の場合の検査依頼先	貴施設における 検査対応(現在の)	不可の場合の検査依頼先	貴施設における 検査対応(現在の)	不可の場合の検査依頼先	可能	対応不可	なし	あり	あり	35	1	55
合計	12	53	18	25	6	58	18	31	5	60	18	32	12	53	17	26

疾患名：トキソプラズマ症

検査方法	分離・同定による病原体の検出		色素試験、ラテックス凝集反応、蛍光抗体法、酵素抗体法		オースト検査(ネコ科動物のみ)		検査依頼先の 確立の必 要性(必 要な場合 0 印)	貴施設に対する (過去における) 検査依頼								
	血液、血清	血液、血清	血液、血清	血液、血清	血液	便		検査依頼先の 確立の必 要性(必 要な場合 0 印)	あった	まだない						
検査材料	貴施設における 検査対応(現在の)	不可の場合の検査依頼先	貴施設における 検査対応(現在の)	不可の場合の検査依頼先	貴施設における 検査対応(現在の)	不可の場合の検査依頼先	可能	対応不可	なし	あり	あり	あり	36	4	55	
合計	2	63	17	34	12	53	11	31	13	52	13	31	13	52	13	31

疾患名：バベシア症

検査方法	血液塗抹標本の接眼による赤血球内の原虫像の検出		PCR法による病原体の遺伝子の検出		間接蛍光抗体法による抗体の検出		検査依頼先の 確立の必 要性(必 要な場合 0 印)	貴施設に対する (過去における) 検査依頼							
	血液	血液	血液、血清	血液、血清	血液、血清	血清		検査依頼先の 確立の必 要性(必 要な場合 0 印)	あった	まだない					
検査材料	貴施設における 検査対応(現在の)	不可の場合の検査依頼先	貴施設における 検査対応(現在の)	不可の場合の検査依頼先	貴施設における 検査対応(現在の)	不可の場合の検査依頼先	可能	対応不可	なし	あり	あり	あり	39	0	55
合計	7	58	16	32	3	62	18	33	0	65	18	36	39	0	55

疾患名：アライグマ回虫症

検査方法	剖検による幼虫断端の検出		dot-ELISA法又は蛍光抗体法による抗体の検出		検査依頼先の 確立の必 要性(必 要な場合 0 印)	貴施設に対する (過去における) 検査依頼									
	血清、脳液、暗内液	血清、脳液、暗内液	血清、脳液、暗内液	血清、脳液、暗内液		検査依頼先の 確立の必 要性(必 要な場合 0 印)	あった	まだない							
検査材料	貴施設における 検査対応(現在の)	不可の場合の検査依頼先	貴施設における 検査対応(現在の)	不可の場合の検査依頼先	可能	対応不可	なし	あり	あり	あり	あり	あり	38	1	56
合計	2	63	18	33	0	65	18	35	0	65	18	36	38	1	56

疾患名：イヌ・ネコ回虫症

検査方法	生検による幼虫断端の組織学的確認		回虫群集物に対する抗体の検出			糞施設に対する(過去における)検査依頼				
	検査材料		血清、硝子体液			検査依頼先の確立の必要性(必要な場合○印)	あった	まだない		
			糞施設における検査対応(現在の)	糞施設における検査対応(過去の)	不可の場合の検査依頼先					
	可能	対応不可	なし	あり	1	63	18	34	1	54
合計	4	60	19	31	1	63	18	34	1	54

疾患名：イヌ糸状虫症

検査方法	抗体の検出		X線による画像診断			糞施設に対する(過去における)検査依頼				
	検査材料		血清			検査依頼先の確立の必要性(必要な場合○印)	あった	まだない		
			糞施設における検査対応(現在の)	糞施設における検査対応(過去の)	不可の場合の検査依頼先					
	可能	対応不可	なし	あり	0	65	21	34	1	56
合計	1	64	19	35	0	65	21	34	1	56

疾患名：ウリザネ象虫症

検査方法	肛門検査による検出		検査依頼先の確立の必要性(必要な場合○印)		糞施設に対する(過去における)検査依頼		
	検査材料		肛門のセロファンテープによる採取物		検査依頼先の確立の必要性(必要な場合○印)	あった	まだない
			糞施設における検査対応(現在の)	不可の場合の検査依頼先			
	可能	対応不可	なし	あり	27	2	52
合計	16	49	14	27	27	2	52

表4) 国内の動物由来感染症患者報告数

感 染 症	2000年	2001年	2002年	2003年	2004年	2005年	2006年	2007年	主な病原菌・感染源動物			
	('00.1.3 -'00.12.31)	('01.1.1 -'01.12.30)	('01.12.31 -'02.12.29)	('02.12.30 -'03.12.28)	('03.12.29 -'05.1.2)	('05.1.3 -'06.1.1)	('06.1.2 -'06.12.31)	('07.1.1 -'07.12.30)	ペット	野生動物	家畜	
1類	エボラ出血熱	0	0	0	0	0	0	0		○		
	クリミア・コンゴ出血熱	0	0	0	0	0	0	0		○	○	
	ペスト	0	0	0	0	0	0	0	○	○	○	
	マールブルグ病	0	0	0	0	0	0	0		○		
	ラッサ熱	0	0	0	0	0	0	0		○		
	南米出血熱***	—	—	—	—	—	—	—	0		○	
2類	結核@***	—	—	—	—	—	—	20151	○		○	
	SARS*	—	—	—	0	0	0	0		○		
3類	細菌性赤痢@	843	844	699	473	594	553	483		○		
	腸管出血性大腸菌感染症@	3642	4435	3183	2999	3715	3589	3910			○	
4類	E型肝炎*	3	0	16	30	37	42	70		○	○	
	ウエストナイル熱**	0	0	0	0	0	1	0		○		
	エキノコックス症	22	15	10	20	26	20	20		○		
	黄熱@	0	0	0	0	0	0	0		○		
	オウム病	18	35	54	44	40	34	22	○	○		
	オムスク出血熱***	—	—	—	—	—	—	—	0		○	
	回帰熱	0	0	0	0	0	0	0		○		
	キャサスル森林病***	—	—	—	—	—	—	—	0		○	
	Q熱	24	42	47	9	7	8	2	7	○	○	○
	狂犬病	0	0	0	0	0	0	2	0	○	○	
	サル痘*	—	—	—	0	0	0	0	0	○	○	
	腎臓急性出血熱	0	0	0	0	0	0	0	0		○	
	西部ウマ脳炎***	—	—	—	—	—	—	—	0		○	
	ダニ媒介脳炎***	—	—	—	—	—	—	—	0		○	
	炭疽	0	0	0	0	0	0	0	0			○
	デング熱@	18	50	52	32	49	74	57	89		○	
	東部ウマ脳炎***	—	—	—	—	—	—	—	0		○	
	鳥インフルエンザ*	—	—	—	0	0	0	0	0		○	○
	ニパウイルス感染症***	—	—	—	—	—	—	—	0		○	○
	日本紅斑熱	38	40	36	52	66	62	45	98		○	
	日本脳炎	7	5	8	1	5	7	7	10			○
	ハンタウイルス肺症候群	0	0	0	0	0	0	0	0		○	
	Bウイルス病	0	0	0	0	0	0	0	0		○	
	鼻疽***	—	—	—	—	—	—	—	0			○
	ブルセラ症	0	0	1	0	0	2	5	1	○		○
	ベネズエラウマ脳炎***	—	—	—	—	—	—	—	0		○	○
	ヘンドラウイルス感染症***	—	—	—	—	—	—	—	0		○	○
発しんチフス	0	0	0	0	0	0	0	0		○		
野兔病*	—	—	—	0	0	0	0	0		○		
ライム病	12	15	15	5	5	8	13	12		○		
リッサウイルス感染症*	—	—	—	0	0	0	0	0		○		
リフトバレー熱***	—	—	—	—	—	—	—	0			○	
類鼻疽***	—	—	—	—	—	—	—	0			○	
レプトスピラ症*	—	—	—	1	18	17	24	34	○	○	○	
ロッキー山紅斑熱***	—	—	—	—	—	—	—	0		○		
5類	アmeerバ赤痢@	378	429	465	520	610	698	738		○		
	クリプトスポリジウム症@	3	11	109	8	92	12	14		○		
	ジアルジア症@	98	137	113	103	94	86	87		○		

(感染症発生動向、国立感染症研究所による)

\* 重症急性呼吸器症候群(病原体がSARSコロナウイルスであるものに限る)、痘そう、E型肝炎、A型肝炎、高病原性鳥インフルエンザ、サル痘、ニパウイルス感染症、野兔病、リッサウイルス感染症及びレプトスピラ症については、2003年11月5日からの数値である。

\*\* ウエストナイル熱(ウエストナイル脳炎を含む)の報告数については、2004年11月1日からの数値である。

\*\*\* 南米出血熱、結核、オムスク出血熱、キャサスル出血熱、西部ウマ脳炎、ダニ媒介性脳炎、東部ウマ脳炎、ニパウイルス感染症、鼻疽、ベネズエラウマ脳炎、ヘンドラウイルス感染症、リフトバレー熱、類鼻疽、ロッキー山紅斑熱の報告数については、2007年4月1日からの数値である。

@ 結核、細菌性赤痢、腸管出血性大腸菌症、黄熱、デング熱、アmeerバ赤痢、クリプトスポリジウム症、ジアルジア症に関しては、報告の大部分が動物由来以外の感染と思われる。

10. 2. *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	第一室長
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* の診断に主として用いられ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。われわれは、TAT に代わる抗体検出法として、より簡便で使用する抗原量、血清量も少なくすむマイクロプレート凝集反応（MAT）を検討し、その有用性を明らかにした。今回は、不活化 *B. canis* 菌体もしくはHSEを抗原として用いたELISAおよび、市販の迅速判定KIT（Anigen Rapid C *Brucella* Ab Test Kit）を入手し検討に加えた。

その結果、MAT と TAT では、試験結果に良好な相関が見られ（ $R^2=0.893$ ）、感度も MAT の方が良かった。Test Kit は MAT と同等の感度と特異性を示した。ELISA と MAT の相関はやや劣っていたが（ $R^2=0.635$ ）、スクリーニングには使用できそうであった。抗原の調整・選択を含めてさらに検討が必要であると考えられた。

#### 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。ヒトに感染するものは病原性の強いものから *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、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最初の報告である。我々の血清学的調査では、現在も3%前後が感染歴を持つと考えられている。流産の多発が見られるイヌ繁殖場では、

イヌブルセラ病の感染が確認されることがあり、最近では、静岡（2003年）、大阪（2006年）のイヌ繁殖場での大規模な感染・流行が知られている。

ごくまれにヒトにも感染することもあり、近年（2002年から2007年）では、国内で5例の *B. canis* 感染によると考えられるブルセラ症患者の報告がある。ヒトでの症状は比較的軽症で感染に気づかない場合もあるとされ、実際の感染者数は定かでない。

一般に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、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、マイクロプレート凝集反応（MAT）を報告してきた。今回は、MAT と

不活化 *B. canis* 菌体もしくは HSE を抗原として用いた ELISA および、市販の迅速判定 KIT (Anigen Rapid C Brucella Ab Test Kit) を比較検討した。

## B. 研究方法

1. イヌ血液サンプル： 2003 年に静岡県内の大規模イヌ繁殖施設で *B. canis* の集団感染が発生した際に採取された TAT 陽性 51 サンプルを含むイヌ血清 109 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. TAT および MAT： TAT は、*B. canis* 凝集反応用菌液 (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、凝集反応用菌液を加え、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 100 $\mu$ l である。MAT は、*B. canis* 凝集反応用菌液と 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 10 倍から 2 倍段階希釈し、同量の凝集反応用抗原を混合・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 10 $\mu$ l 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。

3. 抗体検査用市販 KIT： Anigen Rapid C Brucella Ab Test Kit (Anigen Genetics Inc.) を入手し付属のプロトコールに従い使用した。イヌ血液中の抗 *B. canis* 抗体検出を目的としたイムノクロマトグラフによる迅速診断キットである。血清、血漿もしくは全血をサンプル Well に 20 $\mu$ l 添加し、20 分後に反応対照およびテストラインが形成されるか否かを判定する。

4. ELISA：*B. canis* 凝集反応用抗原および HSE (Hot Saline Extract) の 2 種類の抗原を用いた。HSE は、*B. canis* QE13 株を Trypticase soy broth で 37°C、48 時間培養。培養液を遠心後、沈渣を PBS に浮遊し、オートクレーブ (121°C、30 分) 処理を行った。遠心後 (3000 xg、15 分) の上澄をさらに超遠心 (100,000 xg、6 時間) し、沈渣を D<sub>2</sub>O に再浮遊し作製した。抗原をマイクロプレートに固相化し、ブロッキング後、1:40 に希釈したサンプル血清を加えて反応させた。さらに、抗イヌ IgG-HRPO 抗体を反応させ、OPD を用いて発色を見た。

## C. 研究結果

1. MAT と TAT における特異性・検出感度の比較： 凝集反応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 陽性の 51 サンプルは、MAT においても全て陽性を示し、全体的に強い相関が見られた ( $R^2=0.893$ ) (図 1)。MAT では、TAT による抗体価が 80 倍を示したもののうち 15 サンプルで、160 倍もしくは 320 倍を示した。

2. 抗体検査用市販 KIT： Anigen Rapid C Brucella Ab Test Kit による検出結果 (図 2) と MAT による抗体価との比較を表 1 に示した。MAT 陽性 (抗体価 160 倍以上) の 66 サンプル中 65 サンプル (98.5%) が Test Kit で陽性を示した。MAT 陰性 43 サンプル中、Test Kit でも陰性となったのは 38 サンプル (88.4%) で、残り 5 サンプルは陽性の結果を示した。これら 5 サンプルも PCR により *Brucella* 特異的遺伝子が検出されており、やはり感染初期の個体ではなかったかと考えられたが、さらに詳細に検討が必要である。

3. ELISA の特異性・検出感度： 図 3 に HSE を抗原として用いた ELISA と MAT の比較を示

した。ELISA に用いた血清サンプルは一律、40 倍希釈なので、抗体価が高いサンプルでは ELISA の OD 価が頭打ちとなっている。したがって、全サンプルでの相関はやや低い数値 ( $R^2=0.635$ ) となった。しかしながら、MAT 抗体価 320 倍以下の 79 サンプルについて比較したところ良好な相関 ( $R^2=0.732$ ) が得られた。データは示さないが、全菌体を抗原に用いた場合にも HSE 抗原と同様の傾向が見られた。ただ、いずれにしても、MAT 陰性で ELISA 陽性と考えられ得る結果が多いので、さらに特異性の検討が必要である。

#### D. 考察

国内では、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、近年もイヌ繁殖コロニーでの集団発生 (2003、2006 年) が確認されている。最近 5 年間 (2002-2006 年) の我々の調査でも、2.8% (14/497) のイヌが抗体保有を示し、国内のイヌの感染が継続していることが確認された。

ヒトの *B. canis* 感染は、他の家畜ブルセラ菌と比べ、感染が成立しにくいとされている。また、感染発症してもその多くが軽微な感冒様症状であって感染に気づかないケースが主であるとされる。そのため実際のヒトで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。

MAT は使用するサンプル量も少なくすみ、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る。今回の検討で MAT と TAT の抗体価には良好な相関が見られた。また MAT では、TAT による抗体価が 80 倍を示したもののうち 15 サンプルで、160 倍もしくは 320 倍を示した。これら 15 サンプルは、血清より分離した DNA の PCR により *Brucella* 特異的遺伝子が検出されており、繁殖施設内での感染初期の個体ではなかったかと考えられた。したがって、MAT の方が TAT よりも感度もよく優れた検査方法であると考えられた。

市販 KIT の Anigen Rapid C *Brucella* Ab Test は、MAT 抗体価との比較で、十分な感度と特異性を示した。特別な機器を必要とせず、簡便な操作で、20 分間の反応で判定でき、高額のコストを別にすれば、少数サンプルの検査には有用であると考えられる。

ELISA は、MAT と同様に一度に多くのサンプルの処理が可能で、かつ必要なサンプル量も少なくすみ。さらに、TAT、MAT と異なり溶血サンプルや非動化したサンプル血清の検査が可能である。今回、不活化全菌体と HSE を抗原として用いて検討し、MAT と比較を行ったが、その特異性に関して、まだ問題があるように考えられた。

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*) も臨床検査には TAT が用いられている。TAT や MAT のような凝集反応では、たとえば *Yersinia enterocolitica* O9 のように他の細菌に対する抗体との交差反応が問題とされている。ELISA では、抗原の選択により、特異性を向上させることが可能である。今後、*B. canis* だけでなく *B. melitensis*、*B. suis*、*B. abortus* についても、より特異性を高めた ELISA を開発を行う予定である。

#### E. 結論

一般に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、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、マイクロプレート凝集反応 (MAT) を報告してきた。今回は、MAT と不活化 *B. canis* 菌体もしくは HSE を抗原として用いた ELISA および、市販の迅速判定 KIT を比較検討した。

その結果、MAT と TAT では、試験結果に良好な相関が見られ ( $R^2=0.893$ )、感度も MAT の方が良かった。Test Kit は MAT と同等の感度と特異性を示した。ELISA と MAT の相関はやや劣っていたが ( $R^2=0.635$ )、スクリーニングには使用できそうであった。抗原の調整・選択を含めてさらに検討が必要であると考えられた。

#### 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.*, 60:137-139, 2007

(2) Kimura, M., Imaoka, K., Suzuki, M., Kamiyama, T. and Yamada, A. Evaluation of a Microplate Agglutination Test (MAT) for Serological Diagnosis of Canine Brucellosis. *J. Vet. Med. Sci.*, 2008 (in press)

(3) 今岡浩一他. ブルセラ症 (1999年4月～2007年3月31日現在). in: 病原微生物検出情報, 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 28(8):227-228, 2007

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

図1) TAT と MAT による抗体価の相関

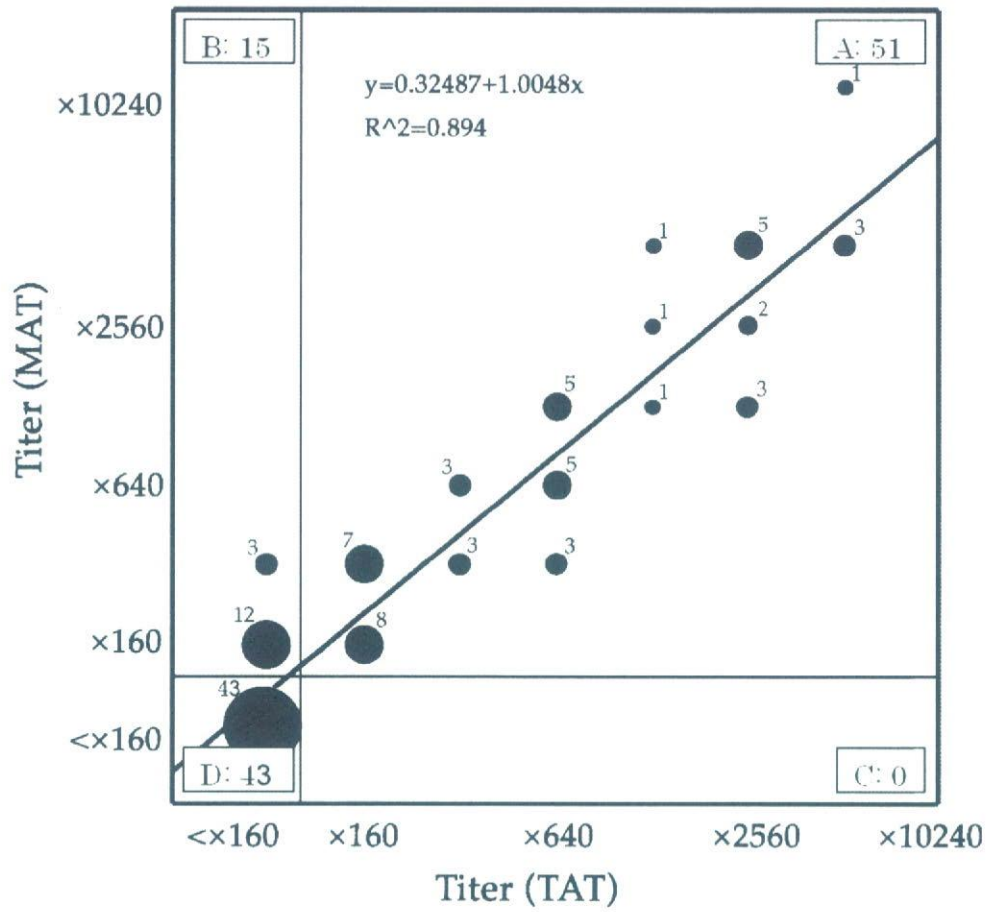


図2) 抗 *B. canis* 抗体検出キット

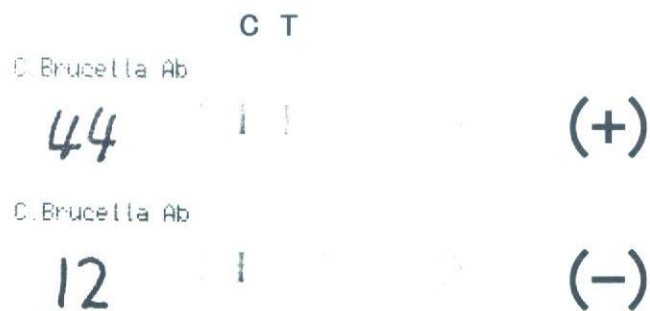
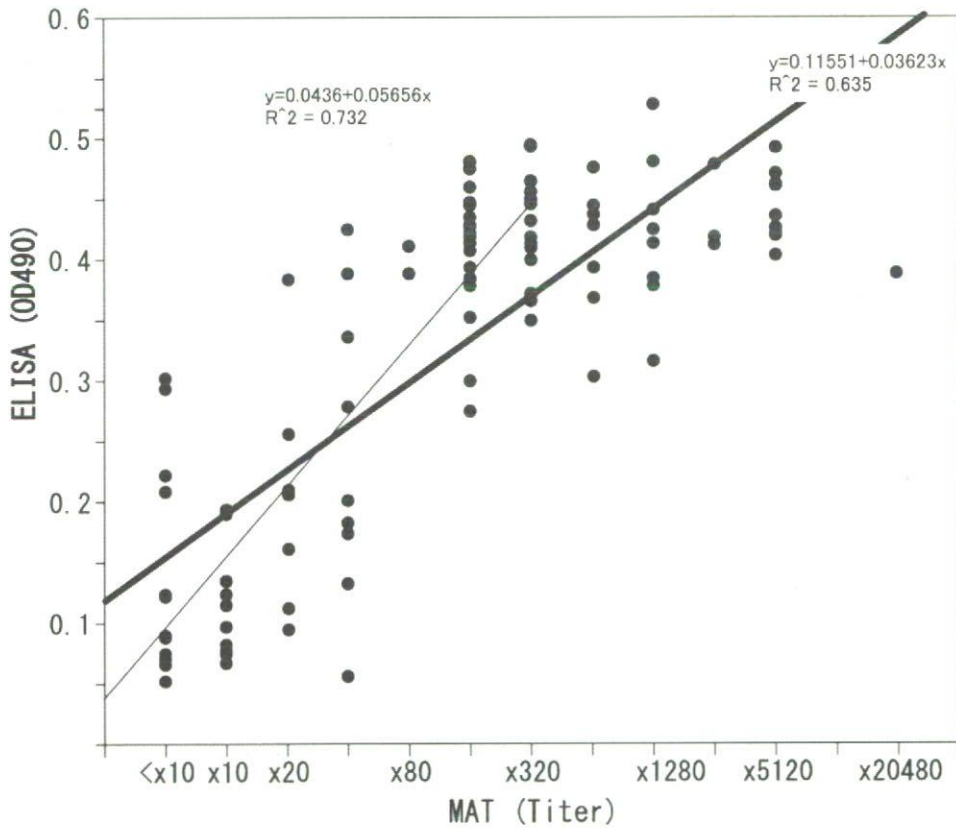




表1) 抗 *B. canis* 抗体検出キットと MAT の比較

	MAT Titer						Total	
	≤ x10	x20~ x40	x80	x160	x320	≥ x640		
Anigen C	+	0	2	3	19	16	30	70
	-	24	14	0	1	0	0	39
Total	24	16	3	20	16	30	109	

図3) HSE を抗原に用いた ELISA と MAT の比較



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

伴侶動物由来感染症に関する研究

### 10. 3. 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	第一室長
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

研究要旨： カプノサイトファーガ属菌はイヌやネコの口腔内に常在するグラム陰性桿菌であり、ヒトがイヌやネコに咬傷、掻傷を受け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ネコ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19年12月までの調査の結果、115検体中103検体（約90%）が遺伝子検査陽性であり、国内のネコは同属菌を高率に保有していた。このうち29検体から同菌を分離し、菌種の同定を行った。併せて、同様にネコ咬傷・掻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、115検体中105検体（約91%）が陽性であった。また、イヌ咬傷に伴って敗血症、多臓器不全を呈した患者から分離されたグラム陰性桿菌の同定を行い、同分離株が *C.canimorsus* であることを確認するとともに、咬んだ飼育犬から口腔内スワブを採取し、解析を行った。

#### A. 研究目的

カプノサイトファーガ属菌 (*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は *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・ネコは *C.canimorsus*、*C.cynodegmi* の2種を保有しており、ヒトがイヌやネコに咬傷、掻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、重篤な転帰を迎え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。

海外においてもペット動物の保有状況に関する報告は少ないが、35%のイヌ、25%のネコが保有しているという報告がある。日本においては、ペット動物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。本年度は、新たにネコでのカプトサイトファーガ属菌保有状況について、前年度のイヌと同様の手法で調査を行った。

さらに、同じくイヌ・ネコ咬傷感染症の原因菌の一つである *Pasteurella multocida* についても、併せてネコの保有状況を調査することとし、ネコ口腔内スワブ（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ネコの口腔内スワブサンプルの提供を受けた。平成 19 年 6 月から平成 19 年 11 月までに提供された計 115 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* および *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℃、7日間）、菌の分

離を行った。分離菌株は、ブロス培養からの検出に用いたのと同様の PCR 法を用いて *Capnocytophaga* spp. であることを確認するのに加え、*C.canimorsus* および *C.cynodegmi* それぞれの 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR 検査および生化学的性状検査によって菌種の同定を行った。

5. イヌ咬傷感染症例分離株の同定・解析： 自宅の飼育犬に左手を咬まれ、意識障害、チアノーゼの出現および各検査所見から、東京女子医大病院にて敗血症、多臓器不全と診断された症例について、その原因菌を同定する機会を得た。この患者（75 歳女性）の血液から分離されたグラム陰性桿菌について *C.canimorsus* 特異的 PCR 検査、16S rRNA 遺伝子の塩基配列のシーケンス解析および生化学的性状検査などを行った。

## 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 115 検体のうち 103 検体で *C.canimorsus*、*C.cynodegmi* 特異的遺伝子が検出され、検出率は約 90%であった（Table 1）。

2. *Pasteurella multocida* 特異的遺伝子の検出率： PCR 検査に供した計 115 検体のうち 105 検体で *P.multocida* 特異的遺伝子が検出され、検出率は約 91%であった（Table 2）。

3. *Capnocytophaga* spp. の分離： 計 29 検体から *Capnocytophaga* spp. 計 33 株を分離した。16S rRNA 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* 4 株、*C.cynodegmi* 23 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6株あった (Table 3)。今後より詳細な解析を進める予定である。

4. イヌ咬傷感染症例分離株の同定・解析結果： 東京女子医大病院にてイヌ咬傷感染症患者から分離されたグラム陰性桿菌の同定のため、*C.canimorsus* 特異的PCR検査、16S rRNA 遺伝子の塩基配列のシーケンス解析および生化学的性状検査などを行った結果、*C.canimorsus* と同定された。咬傷の原因となった飼育犬の口腔内拭い液についても調査し、菌の分離はできなかったが、スワブを培養したブロスの PCR 検査によって *C.canimorsus* 特異的遺伝子を検出した (Figure 1)。患者からの分離株と飼育犬口腔内スワブから得られた上記の PCR 増幅産物についてシーケンス解析した結果、塩基配列 (254bp) が完全に一致した。

#### D. 考察

*Capnocytophaga* spp. はイヌ・ネコの口腔内常在菌であり、ヒトがイヌ・ネコから咬傷・搔傷を受け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・ネコ咬傷感染症の原因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・ネコ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、我々が今回、イヌ咬傷感染症の患者からの分離菌株を同定した症例の他に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。今回、我々の確立した診断系を用いてカプトサイトファーガ症1例の確定診断に寄与することができたが、今後も症例の把握に努めていきたい。

ネコの口腔内には前年度まで調査したイヌと同様に、*Capnocytophaga* spp. が高率(約90%)に存在することを明らかにし、また約25%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、イヌでの調査と同様に、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、ネコの保有する *Capnocytophaga* spp. に関しても、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。

*Pasteurella multocida* については、ネコでの保有率を調査した結果、約91%のネコが同菌を保有していた。前年度までのイヌでの調査結果(28%)に比べてかなり高い保有率であった。パストレラ症についても、ネコ咬傷・搔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

ネコの口腔内には、*Capnocytophaga* spp. が高率に存在しており、日本国内において

もネコ咬傷・搔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、その実態をより詳しく明らかにしていきたい。

謝辞：本研究のうちヒト臨床検体についての物は、以下の先生方のご協力による。ここにあらためてご協力に深謝いたします。東京女子医科大学東医療センター救命救急センター 高橋春樹、中川隆雄。小児科・感染対策室 鈴木葉子。国立感染症研究所感染症情報センター 多田有希。(敬称略)

#### 参考文献

1 . 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

##### 1. 論文発表等

(1) 高橋春樹, 中川隆雄, 鈴木葉子, 鈴木道雄, 今岡浩一, 多田有希. *Capnocytophaga canimorsus* が分離された, 敗血症・多臓器不全で搬送され救命し得たイヌ咬傷の一例. in: 病原微生物検出情報, 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 28(10):299-300, 2007

(2) 今岡浩一. 犬にかまれた! どうしよう...~パスツレラ症, カプノサイトファーガ症, 狂犬病~. in: チャイルドヘルス, 診断と治療社, 10(11):768-771, 2007

##### 2. 学会発表等

(1) 鈴木道雄, 今岡浩一, 木村昌伸, 神山恒夫, 山田章雄. *Capnocytophaga*属菌のイヌにおける保有状況. 第143回日本獣医学会学術集会, つくば, 2007年4月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

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

	総検体数	陽性検体数	陽性率
平成 19 年度	115	103	90%

〈参考〉イヌでの同調査結果

	総検体数	陽性検体数	陽性率
平成 16～18 年 度	325	309	95%

Table 2) ネコ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 19 年度	115	105	91%

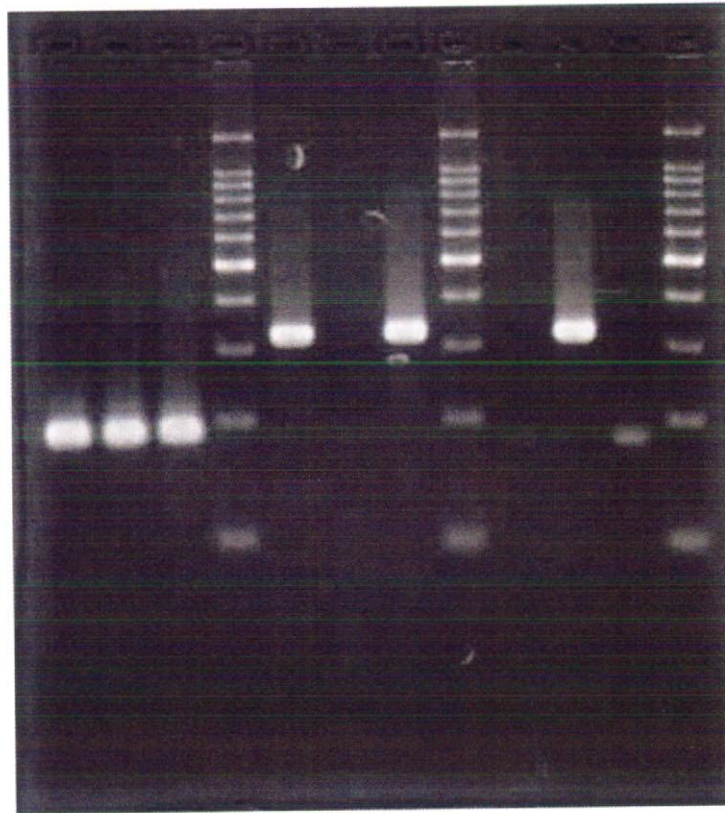
〈参考〉イヌでの同調査結果

	総検体数	陽性検体数	陽性率
平成 16～18 年 度	325	87	27%

Table 3) *Capnocytophaga* spp. 分離株の内訳

<i>C.canimorsus</i>	4
<i>C.cynodegmi</i>	23
other variants	6
total	33

Figure 1.



1 2 3 4 5 6 7 8 9

Figure: Result of PCR test

Primers

Lane 1-3: Primers set #1: specific for *Capnocytophaga* spp. in dog oral swab

Lane 4-6: Primers set #2a: specific for *Capnocytophaga canimorsus*.

Lane 7-9: Primers set #2y: specific for *Capnocytophaga cynodegmi*.

Sample and Positive controls

Lane 1,4,7: Positive control of *C.canimorsus* (ATCC35979)

Lane 2,5,8: Positive control of *C.cynodegmi* (ATCC49044)

Lane 3,6,9: 患者由来菌株

# 犬の口中細菌に注意

## カブノサイトファーガ感染症

### 95%保有 かまれて死亡例も

犬や猫がかんだり、引（東京）の今岡浩一室長が死亡するとされ、今岡つかいたりして感染するら厚生労働省研究班の調査は「犬にかまれたら「カブノサイトファーガ」 査で分かった。傷口をよく流水で洗う。

「カブノサイトファーガ」という菌を、約95% 免疫力の落ちている人 ひどい傷なら病院へ行診の人が保有しているこ が感染し、心内膜炎や敗 傷口をよく流水で洗う。き、事情を説明してほしとが、国立感染症研究所 血症を発症すると約30% いと注意を促している。

細菌に赤インクを含ませ、白紙に同じ文字を二つ書き、少し乾かします。おき瓶のふた二個の一つに水、もう一つに酢を少量入れます。スポイトを使い、



が崩れてしまう  
ず形も崩れない  
わってしまう



カブノサイトファーガ 感染、発症し、死亡した 試みたところ、成功した 感染症は、同様に犬から 例が報告されている。 のは約三分の一だった。

うつるパスツレラ菌に比 研究班は〇四一〇六 今岡さんによると、年 べて症例が少なく、世界 年、国内の動物愛護セン 間八十八万人が犬にかまれ ても一九七六―九四年に ターに収容された犬、百 なるなどで受診する米国で 文献報告されたのは約七 九匹の口から検体を採 も発症例は年に数件。「か 十例。国内では、〇〇 取。遺体の有無を調べ、 まれて傷を負う事故が年 二年末に長野県の女性 二百九十五匹がカブノサ 約六千件とされる日本で は、年に一例あるかどう イトファーガを持ってい ことは、年に一例あるかどう ことを確認した。 か」（今岡さん）

海外では、犬の保菌率 慢性的な持病などで免 を16―24%とする報告が 疫力が弱っていないれば あるが、この報告では検 発症の心配はほとんどな 体から菌を分離する方法 い。発症しても、ヘニン が使われ、検出率がかな リン系の抗生剤で治療で り低い。研究班が分離を ぎるといふ。

カブノサイトファ (かんきん)で、人間で ーガ 人間や動物 は歯周病に関係するとさ の口腔(こうくう)内に れる。感染し発症すると 常在するグラム陰性桿菌 発熱などを起す。



## 11. 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
	福士秀人	岐阜大学農学部獣医学科獣医微生物学	教授
	大屋賢司	同	助教
	野村彩朱	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

### 研究要旨:

本研究では、オウム病の早期診断体制の確立と、患者発生のコントロールを目的として以下の検討をすすめてきた。まずオウム病のより簡便な血清診断法として、*Chlamydophila psittaci*(*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。18年度の基礎的検討にひきつづき、19年度は、さらに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した。本法にてオウム病抗体陽性20検体を測定した結果、標準法のmicro-IF(MIF)法と高い相関性が認められた( $r=0.88$ )。一方、肺炎クラミジア抗体陽性血清では、本法の種特異性の高さが示唆された。また、改良した検体希釈液では、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。以上のことから本血清診断法の臨床的有用性は高いと考えられた。

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目的で、*C. psittaci*ゲノム配列の解読と比較解析を試みた。我が国において集団発生事例で分離されたMat116株を選定し、増殖と精製ゲノム配列の解読と比較解析に着手した。Mat116株ゲノムのDNAドラフト塩基配列は95コンティグ、総塩基数約1100kbpであった。この暫定配列を用い、*C. abortus*ゲノム配列との比較を行った所、それぞれに固有と思われる領域が複数見いだされた。現在、コードされる遺伝子についてアノテーションを行っており、今後は、*C. psittaci*Mat116株ゲノムDNAの完全塩基配列およびコードされる遺伝子を同定する予定である。全塩基配列決定後は、多種クラミジアゲノムとの詳細な比較解析を行い、オウム病の病態発現に関する病原因子の解明をめざす。

### A.研究目的

1. オウム病の簡便な血清診断法の臨床応用  
オウム病届出のための血清診断法のひとつ

であるmicro-IF(MIF)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。そこでより簡便な血清診断法として、*Chlamydophila*

*psittaci*(*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。18年度は、本法の基礎的検討のほか、オウム病患者血清を測定し、MIF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。

19年度は、この結果をもとに、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た。

## 2. *C. psittaci*ゲノム配列の解読と比較解析

*C. psittaci*感染により引き起こされるオウム病は、年間40例程が届け出られている4類感染症であり、その臨床上の重要性は高い。また通常トリからヒトへの感染でオウム病の発症をきたすが、その病原性や宿主特異性などについては不明な点が多く、その検討の基礎になるべきゲノム配列解読は報告されていない。そこで本研究では、*C. psittaci*ゲノム全塩基配列の解読と比較解析を行い、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した。最終的には、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、より効果的に防御免疫を誘導する新規予防法(ワクチン)開発、属・種特異的抗原の探索による簡易・迅速診断法の開発を視野に、オウム病を始めとしたクラミジア感染症の制御を確立したいと考えている。

まず18年度には、我が国において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*C. psittaci* Mat116

株を選定し、浮遊型マウスL細胞を用いて大量培養し、感染細胞および培養上清中の基本小体(EB)を蔗糖密度勾配法により精製した。精製したMat116株EBより、SDS-proteinase K-フェノール・クロロホルム法にてゲノムDNAを抽出した。本年度は、抽出したゲノムDNAを用いてゲノム配列を解読し、ライブラリーを作製することを目指した。

## B.研究方法

### 1. オウム病の簡便な血清診断法の臨床応用

対象としてオウム病抗体陽性血清20検体、正常人血清60検体、肺炎クラミジア抗体陽性血清40検体、STDクラミジア抗体陽性血清10検体を用いた。測定方法及び判定はIgG抗体をinclusion IFA法及びMIF法にて測定し、検体の希釈液は、一般的に用いられているPBSと、我々が改良した希釈液を用い、非特異反応の程度についても比較した。

なお、使用した血清については国立感染症研究所のヒトを対象とする医学研究に係る倫理審査の承認を受けている。(平成18年10月5日承認受付番号114)

### 2. *C. psittaci*ゲノム配列の解読と比較解析

Mat116株から抽出したDNAのRNase処理後のゲノムDNAを用いて、ライブラリーを作製し、次世代シーケンサーGenome Sequencer 20 systemにてゲノムのドラフト塩基配列を得ることを目指した。暫定塩基配列が得られた時点で他のクラミジアゲノム配列との比較を行うこととした。

## C. 研究結果

### 1. オウム病の簡便な血清診断法の臨床応用

本法でオウム病抗体陽性検体 20 例の検体を測定した結果、図 1 に示すように MIF 法と高い相関性が認められた ( $r=0.88$ )。一方、肺炎クラミジア抗体陽性血清では、ELISA 法 (ヒタザイム C.ニューモニエ:日立化成)にて Index 値が高値の検体でもオウム病 IFA 抗体価は低く、40 検体の中 35 検体は 64 倍以下であったことから本法の種特異性の高さが示唆された。蛍光顕微鏡下の観察に関しては、inclusion IFA は MIF に比較して判定が容易であった。また、改良した検体希釈液では、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。

20 年度は、さらに検体数を増やし、本法の有用性を引き続き検討する予定である。

### 2. *C. psittaci* ゲノム配列の解読と比較解析

図 2 に示すような方法で *C. psittaci* ゲノム配列の解読を行ったところ、Mat116 株ゲノム DNA ドラフト塩基配列は 95 コンティグ、総塩基数約 1100kbp であった。既読の *C. abortus*、*C. felis* ゲノムとの比較により、得られた Mat116 株ゲノムドラフト配列には 95 箇所程度のギャップが存在していることが推測された。得られたドラフト配列を元にギャップクローズを行った。その結果得られた Mat116 株の暫定全塩基配列は約 1,163kpbs であった。これは *C. pneumoniae* のゲノムサイズ (約 1,230 kbps) より小さいものの、クラミジア属である *C. trachomatis*、*C. muridarum* のゲノムサイズ (約 1,000 kbps) より大きく、動物由来クラミドフィラ属 (旧 *C. psittaci* 株) である *C. felis* (1,173 kbps)、*C.*

*abortus* (約 1,144 kbps)、*C. caviae* (1,173 kbps) と同程度であった。この暫定配列を用い、*C. abortus* ゲノム配列との比較を行った所、それぞれに固有と思われる領域が複数見いだされた。現在、コードされる遺伝子についてアノテーションを行っている。

20 年度には、*C. psittaci* Mat116 株ゲノム DNA の全塩基配列を決定する予定である。全塩基配列決定後は、多種クラミジアゲノムとの詳細な比較解析を行う。具体的には、株および種間において特異性の高い領域を探索し、特に代謝系酵素群や病原性遺伝子塊の保存・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* で解析する予定である。

## D. 考察

### 1. オウム病の簡便な血清診断法の臨床応用

本法で昨年度に追加して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、本法の種特異性の高さが示唆された。判定も比較的容易であった。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を再確認できた。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、健康人等の血清で、特異性や感度等の検討を進め、より確実に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

本研究の背景となるゲノム解読について

は以下のような現状にある。クラミジアは偏性細胞内寄生性原核生物であり、環状 2 本鎖 DNA を染色体とし、株によってプラスミドの保有の有無は異なる。クラミジアゲノムの全塩基配列は、現在までに性器クラミジア (*Chlamydia trachomatis*)、肺炎クラミジア (*Chlamydia pneumoniae*) を始めとして、*Chlamydia muridarum* (マウス)、*Chlamydia caviae* (モルモット)、*Chlamydia abortus* (反芻獣、鳥)、*Chlamydia felis* (ネコ) の 6 種において解読されている。ヒトの臨床医学上特に重要な *C. trachomatis*、*C. pneumoniae* に関しては、それぞれ 2 株 (D/UW-3/CX、A/HAR-13)、4 株 (TW-183、CWL029、AR139、J138) と複数の株が解読されており、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。それらのゲノム比較解析を通じ、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) の開発に繋がる事が期待されている。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 1,230 kbps と他種クラミジアより大きく、遺伝子数も他種クラミジアより多い。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。

その一方で、オウム病という重篤になりうる疾患でありながらこれまで *C. psittaci* の病原性や宿主特異性などについては不明な点が多く、その検討の基礎になるべき全ゲノム配列解読は報告されていなかった。これまで行った比較解析としては、他種クラミジア全

塩基配列との塩基配列比較により、*C. psittaci* に固有と思われる配列が示唆されている。人獣共通感染症の原因となるクラミジア株間においてゲノム長がいずれも同程度であるが、*C. pneumoniae*、*C. trachomatis* と異なることは、クラミジアの宿主域を考える上で非常に興味深い。

ただし今回得られた配列は暫定配列であり、これは 454 シーケンサーの特徴として同じヌクレオチドが連続する配列では解読精度が落ちるためである。そのため、塩基の欠損や解読時における人為的な付加が散在すると考えられる。これらの塩基の過不足は見かけ上のフレームシフトを生ずるため、確認が必要となる。この確認作業が必要な箇所は数百に上ると推測される。

次年度は、*C. psittaci* Mat116 株ゲノム DNA の完全塩基配列およびコードされる遺伝子を同定する予定である。全塩基配列決定後は、多種クラミジアゲノムとの詳細な比較解析を行う。すなわち、アノテーションにより明らかとなった遺伝子情報を元に *C. psittaci* の DNA チップを作製し、株および種間において特異性の高い領域の探索や感染細胞における遺伝子発現プロファイル解析を行う。特に代謝系酵素群や病原性遺伝子塊の保存・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* で解析することを目指している。

## 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 inclusion IFA の臨床応用について特異性、感度の検討と、