

表 3.本研究で回収されたマダニ種の一覧

| Tick species | Total | PCR examined |
|----------------------------|--------------------------|--------------|
| <i>Argas</i> | 32 | 32 |
| <i>Argas japonicus</i> | 32 | 32 |
| <i>Haemaphysalis</i> | 225 | 196 |
| <i>Haemaphysalis flava</i> | 170 (75.2*1) | 153 |
| <i>H. formosensis</i> | 9 | 8 |
| <i>H. fujisawa</i> | 1 | 1 |
| <i>H. japonicus</i> | 1 | 1 |
| <i>H. longicornis</i> | 5 | 5 |
| <i>H. megaspinosa</i> | 37 (16.4 ¹) | 27 |
| <i>H. phasiana</i> | 1 | 1 |
| <i>Haemaphysalis sp.</i> | 1 | |
| <i>Ixodes</i> | 393 | 296 |
| <i>Ixodes asanumai</i> | 4 | 4 |
| <i>I. nipponensis</i> | 2 | 2 |
| <i>I. pavlovskyi</i> | 4 | 4 |
| <i>I. persulcatus</i> | 327 (83.2 ¹) | 237 |
| <i>I. signatus</i> | 1 | 1 |
| <i>I. turdus</i> | 53 (13.5 ¹) | 46 |
| <i>I. monospinosa</i> | 2 | 2 |
| <i>Ornithodoros</i> | 9 | 9 |
| <i>Ornithodoros sawaii</i> | 2 | 2 |
| <i>Ornithodoros sp.</i> | 7 | 7 |
| Not determined | 1 | 1 |

*1:各マダニ属内でのマダニ種の占有率

表 4.本研究で見出されたボレリア種(*flaB*, 16SrDNA 配列による)

| Group/species | PCR 陽性数 |
|---|---------|
| Lyme disease group | |
| <i>B. afzelii</i> | 1 |
| <i>B. garinii</i> | 26 |
| <i>B. turdi</i> | 3 |
| STAR1 group | |
| <i>B. miyamotoi</i> | 2 |
| <i>Borrelia sp. (B. lonestari-like)</i> | 1 |
| Relapsing Fever group | |
| <i>Borrelia sp. (B. parkeri-like)</i> | 1 |
| Undetermined | 3 |

コリネバクテリウムに関する研究

分担研究者 高橋元秀 (国立感染症研究所 細菌第二部)

研究協力者

小宮貴子、岩城正昭、山本明彦、見理 剛 (国立感染症研究所 細菌第二部)

瀬戸幸路、幸田知子、向本雅郁、小崎俊司 (大阪府立大学生命環境科学部)

勝川千尋、河原隆二、井上清 (大阪府立公衆衛生研究所)

石井篤嗣、山岸寛明、木田一裕、西野俊治 (大阪府犬管理指導所)

長濱伸也 (大阪府健康福祉部)

大阪府獣医師会 泉南支部の先生方

研究要旨

2001年以降に国内の動物から分離された *C. ulcerans* の細菌学および分子生物学的性状解析をおこなった。過去にヒトおよび動物から分離された *C. ulcerans* は、*C. ulcerans* の産生する毒素と *C. diphtheriae* が産生する毒素とは異なるが、本菌に感染した動物由来菌とヒト患者由来菌は遺伝学的に類似していることが確認された。また、2001年以降国内ではジフテリア様症状を呈する5例の患者からジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* が分離され、患者の環境調査で犬、猫の関与が疑われている。愛護センター等で管理されている犬の調査を実施した結果、大阪府犬管理指導所の1匹の犬から毒素産生性 *C. ulcerans* が分離された。犬が飼育されていた地域の環境調査として地区獣医師会28開業獣医師の協力を得て咽頭スワブ等から採取した218検体を検査したが、菌の分離、PCR試験で陽性の検体は得られなかった。

A. 研究目的

ジフテリアは *C. diphtheriae* に起因する急性呼吸器疾患である。2001年千葉県で、ジフテリア様患者からジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* が分離され、結核感染症課から本菌が分離された場合は報告する旨の通知がされた。その後、3例の患者からの菌分離事例では当局への報告が遅れたこと、*C. ulcerans* 感染に関して感染症法での位置づけがないために行政を中心とした疫学・環境調査ができていない。

ジフテリア毒素産生 *C. ulcerans* 感染はジフテリアに極めて類似する病態を呈し、動物から感染する可能性が国内外の感染報告から指摘されているが、その実態は不明な点が多く、その自然界における実態を把握する必要

がある。過去に実施したイエネコでの限られた調査では明確な結論が得られなかったため、調査対象を更に拡大し、生態系でどのように維持されているか、菌の分布、疫学等の調査により明らかにする。

B. 研究方法

1. わが国で過去に分離された人由来と動物由来の *C. ulcerans* について産生毒素の性状、毒素遺伝子の比較、および PFGE や ribotyping による菌の比較をおこなった。

・ 供与菌 ; *C. ulcerans* は ATCC 51799、ヒト患者由来菌 (5株 ; 0102、0211、0509、0510、0607)、動物由来菌 (3株 ; シヤチ由来 Ran および 0-9、ライオン由来 lion) を用いた (Table 1)。 *C. diphtheriae* は PW8 および

ATCC700971 を用いた。

・ 分離菌の同定、性状解析および毒素産生性；分離菌の同定は Api Coryne および 16S リボソーム RNA の解析をおこなった。ジフテリア様毒素 (DLT) 産生性は Elek 試験および細胞培養法で試験した。 *dlt* 遺伝子の検出は Nakao らの方法[1] によりおこなった。フォスホリパーゼ D (PLD) 産生性はヒツジ赤血球に対するブドウ球菌スフィンゴミエリナーゼ C 阻害活性を測定した。 *pld* 遺伝子の検出はこれまでに報告されている *C. ulcerans* ATCC739 (GenBank accession number, L16585) より作製した primer (pldFw および pldRv; Table 2) を用いておこなった。

・ 毒素遺伝子解析；各毒素特異的な primer (toxFw および toxRv, GenBank accession number, AB304278 より作製；または pldFw および pldRv; Table 2) により増幅された PCR 産物の塩基配列を決定した。遺伝子解析は GENETYX-MAC 10.0 および DNASIS-Mac v3.2 を用いておこなった。

・ Ribotyping および Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)； Ribotyping は De Zoysa らの方法[2] によりおこなった。PFGE はヒツジ血液寒天培地上のコロニーを洗浄後、PIV buffer (1 M NaCl, 10 mM Tri-HCl, pH7.5) に浮遊させ、1.6% SeaKem Gold Agarose (Lonza Group Ltd.) と等量混合して作製した plug を用いた。Plug は lysis buffer (6 mM Tris-HCl, pH7.5, 1 M NaCl, 0.1 M EDTA, 0.5% Briji 58 [Sigma-Aldrich], 0.2% deoxycholate [Wako Pure Chemical Industries, Ltd.], 0.5% sodium lauroyl sarcosine [Sigma-Aldrich], 1 mg/ml lysozyme [Nacalai Tesque]) で 37°C、18 時間処理した後、proteolysis buffer (0.5 M EDTA, pH 8.0, 1% sodium lauroyl sarcosine [Sigma-Aldrich], 2 mg/ml Proteinase K [30 U/mg, Nacalai Tesque]) により 37°C、48 時間処理した。 *Sfi*I (New England BioLabs Inc.) を用いて plug 中の DNA を切断後、1% agarose gel 中で 0.5X Tris-borate-EDTA buffer を用いて泳動した。泳動は CHEF Mapper (Bio-Rad) を用いて、14°C、30.27 時間、6 V/cm、パル

スタム 0.47 秒、泳動角度 120° の条件でおこなった。PFGE 解析は Finger printing II (Bio-Rad) を用いておこなった。

・ 分離菌の attachment site (*attB* site) の解析；分離菌の全 DNA を *Bam*HI (Takara Bio Inc.) 処理し、1% agarose gel を用いて 1X Tris-acetate-EDTA buffer 中で 25 V、14 時間泳動し、Hybond-N+ に転写した。DNA を固定後 DIG PCR synthesis kit (Roche Diagnostics) により作製した DIG 標識 *dlt*、*pld*、*attB* site プロブ (20 ng/ml) をそれぞれ反応させ、アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (Roche Diagnostics) および CDP-Star (GE Healthcare) を用いてバンドの検出をおこなった。*AttB* site 遺伝子解析は、*dlt* 内の primer (CURFw; Table 1) および *attB* site の primer (*attBRv*; Table 1) を用いて増幅した PCR 産物の塩基配列を決定することによりおこなった。

2. 2007 年 8 月、大阪府犬管理指導所に収容されたイヌよりジフテリア毒素を産生する *C. ulcerans* が検出された。厚生労働省健康局結核感染症課及び日本獣医師会の協力を得て大阪府獣医師会長への調査研究要請を願い、大阪府獣医師会所轄内の獣医科病院（個人経営）を平成 19 年 11 月 1 日から平成 20 年 1 月末までの間に、診療・治療で訪れたイヌより検体として、血液採取（血清分離）、咽頭拭い液および皮膚炎・潰瘍等の病巣があればその拭い液を採取し、コリネバクテリウム属の分離調査を実施した。血清はジフテリア抗毒素価測定、咽頭拭い液、皮膚炎潰瘍部の拭い液は PCR によるジフテリア毒素遺伝子の検出をおこなった。

（倫理面への配慮）

動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の審査許可を受けて行われた。また、獣医師会を通じた調査では患犬の飼い主へインフォームドコンセントをおこない、同意書への署名を記録として残した。

C. 研究結果

1. 過去の国内ヒト由来、動物由来の *C. ulcerans* の各種性状および毒素遺伝子の解析では、分離されたヒト患者由来菌 (0102, 0210, 0509, 0510, 0607) およびシャチ由来菌 (Ran, 0-9)、ライオン由来菌 (lion) は、すべてウルセランス菌であり、PLD を産生していた。ライオン由来菌は *dlt* を保持していなかったが、他の分離菌は DLT を産生していた (Table 3)。ヒト患者由来 4 株の分離菌の *dlt* は、ドイツで分離された A6361 (GenBank accession number, AY141014) と一致していた。本研究で用いた DLT 産生菌の持つ *dlt* は、分離菌内で 98.5% 以上の相同性を持っているのに対し、*tox* (ジフテリア毒素 (DT) 遺伝子, GenBank accession number, K01722) とは 95.1% の相同性を示した (Table 4)。DLT と DT で異なるアミノ酸残基は受容体結合領域に局在していた。*pld* は供与菌内で 95% 以上の相同性を示した (Table 5)。

Ribotyping および PFGE 解析結果は、供与菌は 6 つの ribotype (A, B-1, B-2, C-1, C-2, D; Fig. 1) と 4 つの PFGE パターン (P1, P2, P3, P4; Fig. 2) に分類された (Fig. 3)。PFGE 解析において分離菌 0102 および 0210 (相同性 99.4%)、または Ran および 0-9 (相同性 96.5%) はそれぞれ類似していた。

分離菌の *attB* site の解析結果は、*dlt* プロンプと *attB* site プロンプを用いて Southern hybridization をおこなったところ、*dlt* と *attB* site が同一 fragment 上に存在することが示された。*pld* プロンプで反応するバンドは *attB* site プロンプで反応するバンドと一致しなかった (Fig. 4)。シークエンス解析から *dlt* の下流に *attB* site が存在することが明らかとなった (Fig. 5)。

2. 大阪府が収容したイヌ 65 頭の咽頭ぬぐい液を血液寒天培地および亜テルル酸カリウム、羊血液、活性炭未加培地を使用し、*C. ulcerans* と疑われる集落について DSS 培地 (自家製) に移植、純培養および性状検査をおこなった。2007 年 8 月 7 日に採取した 4 頭中 1 頭の咽頭

ぬぐい液から *C. ulcerans* と疑われる菌が分離された。イヌは雑種、雌、体重約 20kg であり、外観上、健康状態は良好であった。

(1) 生化学的性状検査では、DSS 培地でのブドウ糖分解、ショ糖非分解、グラム染色は陽性カタラーゼ陽性、尿素分解能を確認した。api Coryne 同定キット (bioMerieux) では、アルカリフォスファターゼで非典型反応、*C. ulcerans* の同定確率は 87.2%、それに次ぐ *C. pseudotuberculosis* は 12.5% であり、強く *C. ulcerans* を示唆する成績であった。

(2) 細菌学的検査では、グラム陽性の短桿菌、コリネ属特有のコンマ状、V 字状の染色像が観察された。毒素産生性は毒素遺伝子の検出 (PCR)、Elek 法、VERO 細胞培養法で、いずれも陽性であった。過去に国内で分離された株を含めてジフテリア毒素産生性を Vero 細胞で測定した結果を表 6 に示す。

(3) 分子生物学的解析は、16S リボソーム RNA 遺伝子解析では、*C. ulcerans* と *C. pseudotuberculosis* の遺伝子の塩基配列も両者は酷似した結果となった。そこで *rpoB* 遺伝子および *hsp65* 遺伝子の部分塩基配列決定法で菌種の推定を行ったところ、両遺伝子からは *C. ulcerans* と推定された。これらの結果から分離菌は若干非典型性状を示すが、*C. ulcerans* であると同定した。

(4) 毒素遺伝子：全塩基配列を決定、構成アミノ酸をジフテリア菌の毒素と比較結果、全 560 アミノ酸のうち 28 アミノ酸に変異が認められ、相同性は 95% であった。

大阪府獣医師会の協力を得た調査では、避妊、去勢手術等の健康な個体の咽頭からは 182 検体、有症犬 (咽頭とともに皮膚の炎症 23 例、鼻汁等 4 匹、その他 9 匹) から 36 検体の合計 218 検体を採取した。28 ヶ所の動物病院名と検体の採取日および菌検査とジフテリア毒素遺伝子の検出結果を表 7 に示す。検体採取は 11 月 15 日から 2 月 1 日の間実施した。備考に示すような症状を確認した個体からも検体採取して検査した。28 病院の菌検出および毒素遺伝子の検査結果はすべて陰性であった。

D. 考 察

過去にヒトおよび動物から分離された *C. ulcerans* の各種解析結果では、分離菌の *dlt* は、これまでに報告されている *dlt* と高い相同性を持つ一方でジフテリア毒素遺伝子 (*tox*) との相同性は比較的 low、ジフテリア毒素 (DT) と異なるアミノ酸残基は DLT の特徴であると考えられた。今回試験した分離菌がすべて *pld* を保持しておりその相同性が比較的高かったことから、*pld* が *C. ulcerans* のマーカーとなりうる可能性が示された。シャチ由来の 2 株は遺伝子レベルで非常に類似しており、同一の菌である可能性が高いと考えられた。二頭のシャチは同一プールにおいて飼育されていたことから、*C. ulcerans* が水を介するなどして伝播したと考えられる。ライオン由来菌は同一動物園で分離されたシャチ由来菌よりもヒト患者由来菌と遺伝学的に類似していたことから、わが国においても *C. ulcerans* に感染した動物がヒトの *C. ulcerans* 感染症に関与している可能性も考えられる。しかしながら供与菌数が少ないことや十分な疫学的解析が行えなかったことから明確な因果関係は示すことができず、今後さらなる研究が必要であると考えられる。また分離された *C. ulcerans* においては *C. diphtheriae* と同様な機構によって corynephage の溶原化が起こり、*dlt* が伝播しているものと考えられる。

大阪府の動物病院の調査結果は菌分離およびジフテリア毒素遺伝子はすべて陰性であったことは、この地区から保護されていた犬管理指導所のイヌから分離したジフテリア毒素を産生する *C. ulcerans* の市中への拡散は、濃厚かつ広範囲におこっていないものと考えられる。今回の調査対象犬は主に家庭内で飼育・

管理されていたために、通常の行動が野外である野良犬等での調査も今後対象としたい。なお、採取した血清のジフテリア抗毒素価については現在試験中である。

E. 結 論

1 : 過去にヒトおよび動物から分離された *C. ulcerans* を細菌学的、分子生物学的および遺伝学的な解析結果では、*C. ulcerans* が産生する毒素 (DLT) は *C. diphtheriae* が産生する毒素 (DT) と異なる性状を持つ可能性があること、わが国においても動物間で本菌の伝播がおこっていること、本菌に感染した動物由来菌とヒト患者由来菌が遺伝学的に類似していることを確認した。

2 : 2007 年 8 月、大阪府犬管理指導所に保護されたイヌよりジフテリア毒素を産生する *C. ulcerans* を分離した。イヌが飼育されていた地区の 28 名開業獣医師の協力のもと、218 頭の飼い犬の咽頭部の調査結果は、菌分離と PCR 試験 (毒素遺伝子) 結果はすべて陰性であった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

Table 1 Clinical isolates of *Corynebacterium ulcerans* from Japan^a

| Isolates | Date of isolation | Age(years)/sex | Source | Clinical details |
|-----------------------------------|-------------------|----------------|-------------|--------------------------------|
| Isolated from human | | | | |
| 0102 | 2001/Feb | 52/F | Throat swab | Sore throat |
| 0210 | 2002/Oct | 54/M | Throat swab | Sore throat |
| 0509 | 2005/Sep | 57/M | Throat swab | Fever, partitis |
| 0510 | 2005/Oct | 51/M | Lung | Lung lesion |
| 0607 | 2005/Nov | 58/F | Throat swab | Pseudomembrane |
| Isolated from killer whale | | | | |
| Ran | 2004/Aug | 16/F | Blood, Lung | Bacteremia, Purulent pneumonia |
| O-9 | 2004/Sep | 15-16/M | Blood, Lung | Bacteremia, Purulent pneumonia |
| Isolated from lion | | | | |
| lion | 2005/Dec | 6/M | Blood | Sepsis |

^a Abbreviations: female (F) and male (M).

Table 2 Synthetic oligonucleotide primers for preparation

| Primer | Sequence (5' -3') ^a | Position (base) |
|---|----------------------------------|-----------------------------|
| For <i>pld</i> detection | | |
| pldFw | AACATCTCTCCGTGAAAAAT | -157 to -137 ^a |
| pldRv | AGCTCAATCGCACCGTTGTC | 1,165 to 1,180 ^a |
| For <i>dlt</i> sequence analysis | | |
| toxFw | CCATGTAACCAATCTATCAA | -179 to -159 ^b |
| toxRv | GTGCGCCCGGAGGGA | 1,720 to 1,735 ^b |
| For attB site detection | | |
| CURFw | CGCGGATCCGCGTACTCTCCGGG CA | 833 to 851 ^b |
| attBRv | CCGCAAGCACGAAGAAACCCAGC CCACA | attB site |

^a Position are based on *Corynebacterium ulcerans* ATCC739 (GenBank accession number, L16585). ^b Position are based on *C. ulcerans* 0102 (GenBank accession number, AB304278).

Table 3 Detection of the toxin in *C. ulcerans* and *C. diphtheriae* by PCR, cytotoxicity and phospholipase D activity

| Isolates | DLT | | PLD | | |
|------------------------------------|-------------------------------|-------|-----------|---------------------------|-----|
| | Cytotoxicity ^a | | Elek test | PLD activity ^b | |
| | PCR (CD ₅₀ /25 µl) | test | | | PCR |
| <i>Corynebacterium ulcerans</i> | | | | | |
| ATCC [®] 517 99 | - ^c | ND | - | + | 20 |
| 0102 | + | 362 | + | + | 40 |
| 0210 | + | 256 | + | + | 80 |
| Ran | + | 256 | + | + | 20 |
| O-9 | + | 362 | + | + | 20 |
| lion | - | ND | - | + | 160 |
| 0509 | + | 512 | + | + | 40 |
| 0510 | + | 512 | + | + | 80 |
| 0607 | + | 256 | + | + | 320 |
| <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | | | | | |
| PW8 | + | 3,200 | + | - | ND |
| ATCC7009 71 | + | 128 | + | - | ND |

^a Cytotoxic activity in culture supernatant was measured by pH color change methods. ^b *Staphylococcal* sphingomyelinase C inhibition activity in culture supernatant. ^c Positive (+), negative (-), not detected (ND).

Table 4 Homologies of nucleotide and deduced amino acid sequences of diphtheria-like toxin produced from *Corynebacterium ulcerans*

| Isolates | % Homology for nucleotide (roman) and deduced amino acid (<i>italic</i>) sequence ^a | | | | |
|----------|--|--------------|--------------|--------------|------------------------------------|
| | <i>Corynebacterium ulcerans</i> | | | | <i>Corynebacterium diphtheriae</i> |
| | 0102 | O-9 | 0510 | A6381 | DT |
| 0102 | | <i>100.0</i> | <i>99.10</i> | <i>100.0</i> | <i>95.00</i> |
| O-9 | 99.70 | | <i>99.10</i> | <i>100.0</i> | <i>95.00</i> |
| 0510 | 98.57 | 98.51 | | <i>99.10</i> | <i>94.82</i> |
| A6381 | 100.0 | 99.70 | 98.57 | | <i>95.00</i> |
| DT | 95.18 | 95.24 | 95.18 | 95.18 | |

^a Sequences were aligned using GENETYX-MAC 10.0, and percent identity was determined by DNASIS-Mac v3.2 without gaps as the denominator.

Table 5 Homologies of nucleotide and deduced amino acid sequences of phospholipase D produced from *Corynebacterium ulcerans*

| Isolates | % Homology for nucleotide (roman) and deduced amino acid (<i>italic</i>) sequence ^a | | | | | | |
|-------------------------|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | ATCC [®] 51799 | 0102 | O-9 | lion | 0510 | 0607 | ATCC736 |
| ATCC [®] 51799 | | <i>99.69</i> | <i>97.39</i> | <i>99.02</i> | <i>97.72</i> | <i>99.02</i> | <i>98.04</i> |
| 0102 | 98.05 | | <i>98.74</i> | <i>99.67</i> | <i>97.72</i> | <i>99.67</i> | <i>98.04</i> |
| O-9 | 96.75 | 96.96 | | <i>97.06</i> | <i>98.37</i> | <i>97.06</i> | <i>98.74</i> |
| lion | 98.16 | 99.89 | 97.07 | | <i>98.74</i> | <i>100.0</i> | <i>98.37</i> |
| 0510 | 96.96 | 97.18 | 98.18 | 97.29 | | <i>98.74</i> | <i>98.37</i> |
| 0607 | 99.05 | 99.78 | 96.98 | 99.89 | 97.18 | | <i>98.37</i> |
| ATCC736 | 97.40 | 96.86 | 96.10 | 96.96 | 98.26 | 96.86 | |

^a Sequences were aligned using GENETYX-MAC 10.0, and percent identity was determined by the DNASIS-Mac v3.2 without gaps as the denominator. ^b GenBank accession number; ATCC[®]51799, AB304281; 0102, AB304282; O-9, AB304283; lion, AB304284; 0510, AB304285; 0607, AB304286.

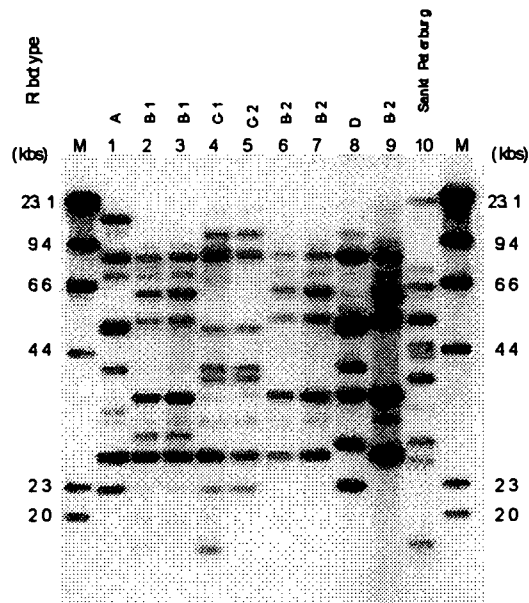


Fig. 1 *BstEII*-digested rRNA gene profiles of *C. ulcerans* isolates.

Lane M, molecular size standard (sizes are indicated on the left); *lane 1*, ATCC[®]51799; *lane 2*, 0102; *lane 3*, 0210; *lane 4*, Ran; *lane 5*, O-9; *lane 6*, lion; *lane 7*, 0509; *lane 8*, 0510; *lane 9*, 0607; *lane 10*, *Corynebacterium diphtheriae* ATCC 700971.

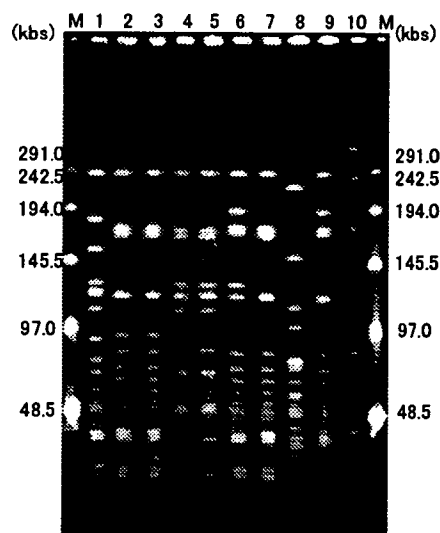


Fig. 2 *Sfi*I-digested PFGE profiles of *C. ulcerans* isolates. Lane M, lambda concatemer as a size standard (size are indicated on the left); lane 1, ATCC[®]51799; lane 2, 0102; lane 3, 0210; lane 4, Ran; lane 5, O-9; lane 6, lion; lane 7, 0509; lane 8, 0510; lane 9, 0607; lane 10, *Corynebacterium diphtheriae* ATCC 700971.

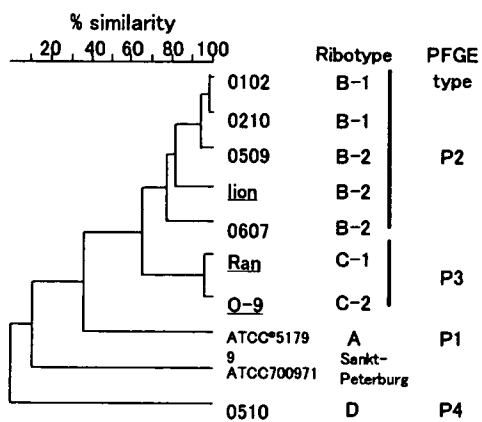


Fig. 3 Dendrogram showing the genetic relationship of *C. ulcerans* isolates in Japan. The isolates obtained from animals are underlined.

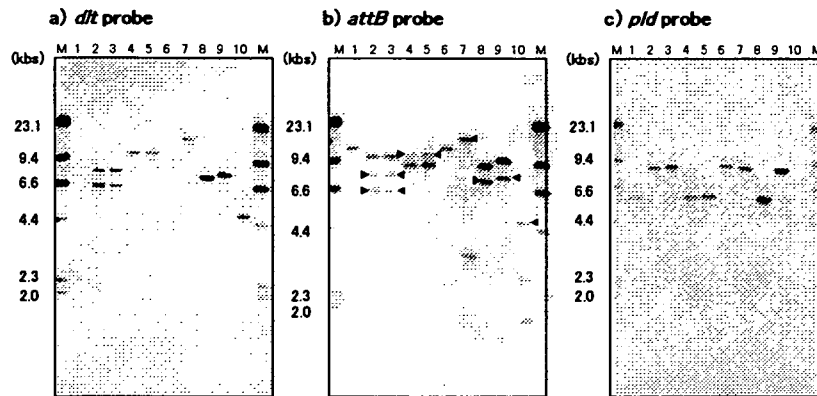


Fig. 4 Southern hybridizations of *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium diphtheriae* genomic DNA with DIG-labeled a) *dlt*, b) *attB* site and c) *pld* specific probes. Lane M, DIG-labeled molecular size standard; lane 1, ATCC[®]51799; lane 2, 0102; lane 3, 0210; lane 4, Ran; lane 5, O-9; lane 6, lion; lane 7, 0509; lane 8, 0510; lane 9, 0607; lane 10, *Corynebacterium diphtheriae* ATCC 700971. The arrow heads indicate the bands that may be the same in *dlt* fragments.

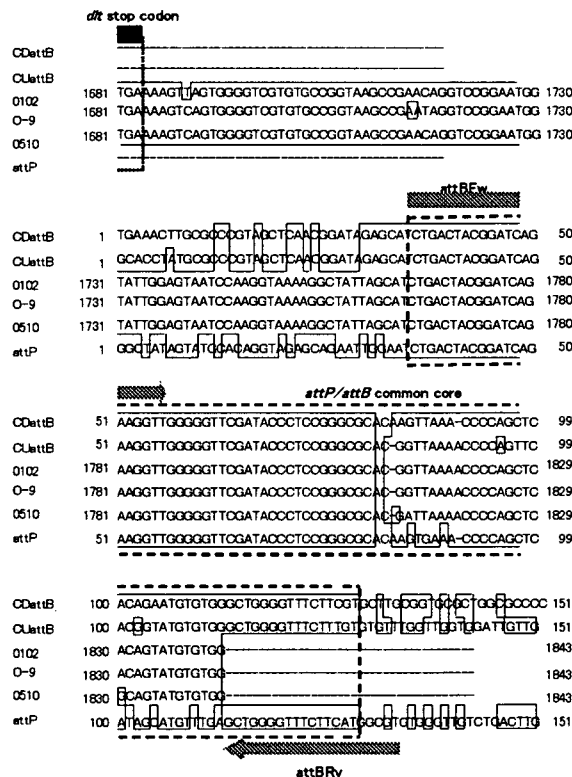


Fig. 5 Alignment of the nucleotide sequences of attachment site genes from *C. ulcerans* isolates 0102, O-9, 0510, *C. ulcerans attB*-related site, *C. diphtheriae attB*-related site, and corynephage-gamma DNA for the *attP* site.

表 6. 分離株の Vero 細胞変性活性の比較

| 分離株名 | CD ₅₀ /25 μL *1 | 1IU/mL Diph-AT 中和*2 |
|---------|----------------------------|---------------------------|
| 0102 | 1 1 | 完全中和 |
| 0210 | 5 | 3 CD ₅₀ /25 μL |
| 0509 | 4 | 完全中和 |
| 0510 | 6 4 | 完全中和 |
| 0607 | 1 6 | 完全中和 |
| Ran | 8 | 完全中和 |
| 0-9 | 5 1 2 | 完全中和 |
| イヌ 0708 | 1 6 | 完全中和 |

*1: レフレル培地で 3 日培養した凝固水の 25 μL 中の細胞毒性

*2: 凝固水に標準ジフテリア抗毒素の 1 IU/mL を添加した中和試験

試験で毒性が検出された場合はジフテリア抗毒素で中和しきれない毒素が
産生されたことを示す

表7.大阪府泉南地区の動物病院における*C.ulcerans*の調査結果

(1)

| 病院名 | 検体番号 | 検体採取日 | 菌検査 培養結果 | 毒素遺伝子 検査結果 | 備考 |
|----------|------|--------|-------------|---------------|--------------|
| 加藤動物病院 | 1 | 11月22日 | 陰性 | 陰性 | |
| 加藤動物病院 | 2 | 11月22日 | 陰性 | 陰性 | |
| 加藤動物病院 | 3 | 11月30日 | 陰性 | 陰性 | |
| 加藤動物病院 | 4 | 12月4日 | 陰性 | 陰性 | |
| 加藤動物病院 | 5 | 12月5日 | 陰性 | 陰性 | |
| 加藤動物病院 | 6 | 12月6日 | 陰性 | 陰性 | |
| 加藤動物病院 | 7 | 12月7日 | 陰性 | 陰性 | |
| 加藤動物病院 | 8 | 12月11日 | 陰性 | 陰性 | |
| きむら動物病院 | 1 | 11月15日 | 陰性 | 陰性 | |
| きむら動物病院 | 2 | 11月16日 | 陰性 | 陰性 | |
| きむら動物病院 | 3 | 11月23日 | 陰性 | 陰性 | |
| きむら動物病院 | 4 | 12月10日 | 陰性 | 陰性 | |
| きむら動物病院 | 5 | 1月12日 | 陰性 | 陰性 | |
| きむら動物病院 | 6 | 1月21日 | 陰性 | 陰性 | |
| きむら動物病院 | 7 | 1月22日 | 陰性 | 陰性 | |
| きむら動物病院 | 8 | 1月24日 | 陰性 | 陰性 | |
| アーサー動物病院 | 1 | 11月16日 | 陰性 | 陰性 | (病:皮膚、皮膚の発赤) |
| アーサー動物病院 | 1 | 11月16日 | 陰性 | 陰性 | |
| アーサー動物病院 | 2 | 11月18日 | 陰性 | 陰性 | |
| アーサー動物病院 | 3 | 11月19日 | 陰性 | 陰性 | (病:皮膚、発赤) |
| アーサー動物病院 | 3 | 11月19日 | 陰性 | 陰性 | |
| アーサー動物病院 | 4 | 11月25日 | 陰性 | 陰性 | |
| アーサー動物病院 | 5 | 11月28日 | 陰性 | 陰性 | |
| アーサー動物病院 | 6 | 11月29日 | 陰性 | 陰性 | |
| アーサー動物病院 | 7 | 12月1日 | 陰性 | 陰性 | |
| アーサー動物病院 | 7 | 12月1日 | 陰性 | 陰性 | (病:皮膚、膿皮症) |
| アーサー動物病院 | 8 | 12月8日 | 陰性 | 陰性 | |
| アーサー動物病院 | 8 | 12月8日 | 陰性 | 陰性 | (病:皮膚) |
| いしづか動物病院 | 1 | 1月4日 | 陰性 | 陰性 | |
| いしづか動物病院 | 2 | 1月4日 | 陰性 | 陰性 | |
| いしづか動物病院 | 3 | 1月7日 | 陰性 | 陰性 | |
| いしづか動物病院 | 4 | 1月7日 | 陰性 | 陰性 | |
| いしづか動物病院 | 5 | 1月8日 | 陰性 | 陰性 | |
| いしづか動物病院 | 5 | 1月8日 | 陰性 | 陰性 | (病:皮膚) |
| いしづか動物病院 | 6 | 1月10日 | 陰性 | 陰性 | |
| いしづか動物病院 | 7 | 1月9日 | 陰性 | 陰性 | |
| いしづか動物病院 | 8 | 1月11日 | 陰性 | 陰性 | |
| さとう動物病院 | 1 | 11月24日 | 陰性 | 陰性 | (病:皮膚潰瘍、腫瘍) |
| さとう動物病院 | 1 | 11月24日 | 陰性 | 陰性 | |
| さとう動物病院 | 2 | 12月27日 | 陰性 | 陰性 | |
| さとう動物病院 | 2 | 12月27日 | 陰性 | 陰性 | (病:歯髄) |
| さとう動物病院 | 3 | 1月19日 | 陰性 | 陰性 | |
| さとう動物病院 | 4 | 1月19日 | 陰性 | 陰性 | |
| さとう動物病院 | 5 | 1月19日 | 陰性 | 陰性 | |
| さとう動物病院 | 6 | 1月24日 | 陰性 | 陰性 | |
| さとう動物病院 | 7 | 1月25日 | 陰性 | 陰性 | |
| さとう動物病院 | 8 | 1月26日 | 陰性 | 陰性 | |
| 奥田動物病院 | 1 | 11月29日 | 陰性 | 陰性 | |
| 奥田動物病院 | 2 | 12月4日 | 陰性 | 陰性 | |
| 奥田動物病院 | 3 | 12月5日 | 陰性 | 陰性 | |
| 奥田動物病院 | 4 | 12月14日 | 陰性 | 陰性 | |
| 奥田動物病院 | 5 | 12月14日 | 陰性 | 陰性 | |
| 奥田動物病院 | 6 | 12月18日 | 陰性 | 陰性 | |
| 奥田動物病院 | 7 | 12月27日 | 陰性 | 陰性 | |
| 奥田動物病院 | 8 | 12月27日 | 陰性 | 陰性 | |
| 奥田動物病院 | 9 | 12月27日 | 陰性 | 陰性 | |
| 奥田動物病院 | 10 | 12月27日 | 陰性 | 陰性 | |
| カナイ動物病院 | 1 | 11月28日 | 陰性 | 陰性 | |
| カナイ動物病院 | 2 | 11月28日 | 陰性 | 陰性 | |
| カナイ動物病院 | 3 | 12月4日 | 陰性 | 陰性 | |
| カナイ動物病院 | 4 | 12月8日 | 陰性 | 陰性 | |
| カナイ動物病院 | 5 | 12月12日 | 陰性 | 陰性 | |
| カナイ動物病院 | 6 | 12月12日 | 陰性 | 陰性 | |
| カナイ動物病院 | 7 | 12月14日 | 陰性 | 陰性 | |
| カナイ動物病院 | 8 | 12月18日 | 陰性 | 陰性 | |

| 病院名 | | | 菌検査 培養結果 | 毒素遺伝子 検査結果 | 備考 |
|-----------|------|--------|-------------|---------------|---------------|
| | 検体番号 | 検体採取日 | | | |
| リーフ動物病院 | 1 | 1月7日 | 陰性 | 陰性 | |
| リーフ動物病院 | 2 | 1月7日 | 陰性 | 陰性 | |
| リーフ動物病院 | 3 | 1月11日 | 陰性 | 陰性 | |
| リーフ動物病院 | 4 | 1月21日 | 陰性 | 陰性 | |
| リーフ動物病院 | 5 | 1月21日 | 陰性 | 陰性 | |
| リーフ動物病院 | 6 | 1月21日 | 陰性 | 陰性 | |
| リーフ動物病院 | 7 | 1月21日 | 陰性 | 陰性 | |
| リーフ動物病院 | 8 | 1月24日 | 陰性 | 陰性 | |
| たんぼぼ動物病院 | 1 | 11月24日 | 陰性 | 陰性 | (病:両脇に発赤) |
| たんぼぼ動物病院 | 1 | 11月24日 | 陰性 | 陰性 | |
| たんぼぼ動物病院 | 2 | 11月24日 | 陰性 | 陰性 | |
| たんぼぼ動物病院 | 3 | 11月26日 | 陰性 | 陰性 | |
| たんぼぼ動物病院 | 4 | 12月4日 | 陰性 | 陰性 | |
| たんぼぼ動物病院 | 5 | 12月5日 | 陰性 | 陰性 | |
| たんぼぼ動物病院 | 6 | 12月17日 | 陰性 | 陰性 | |
| たんぼぼ動物病院 | 7 | 12月18日 | 陰性 | 陰性 | |
| たんぼぼ動物病院 | 8 | 12月22日 | 陰性 | 陰性 | |
| クローバー動物病院 | 1 | 11月15日 | 陰性 | 陰性 | (病:皮膚、細菌性皮膚炎) |
| クローバー動物病院 | 2 | 11月16日 | 陰性 | 陰性 | |
| クローバー動物病院 | 3 | 11月30日 | 陰性 | 陰性 | |
| クローバー動物病院 | 4 | 12月4日 | 陰性 | 陰性 | |
| クローバー動物病院 | 5 | 12月6日 | 陰性 | 陰性 | |
| クローバー動物病院 | 5 | 12月6日 | 陰性 | 陰性 | |
| クローバー動物病院 | 6 | 12月9日 | 陰性 | 陰性 | |
| クローバー動物病院 | 6 | 12月9日 | 陰性 | 陰性 | |
| クローバー動物病院 | 7 | 12月14日 | 陰性 | 陰性 | |
| クローバー動物病院 | 7 | 12月14日 | 陰性 | 陰性 | |
| クローバー動物病院 | 8 | 12月17日 | 陰性 | 陰性 | |
| クローバー動物病院 | 8 | 12月17日 | 陰性 | 陰性 | |
| 岡本獣医科病院 | 1 | 11月20日 | 陰性 | 陰性 | |
| 岡本獣医科病院 | 2 | 11月21日 | 陰性 | 陰性 | |
| 岡本獣医科病院 | 3 | 11月26日 | 陰性 | 陰性 | |
| 岡本獣医科病院 | 4 | 12月1日 | 陰性 | 陰性 | |
| 岡本獣医科病院 | 5 | 12月7日 | 陰性 | 陰性 | |
| 岡本獣医科病院 | 6 | 12月10日 | 陰性 | 陰性 | |
| 岡本獣医科病院 | 7 | 12月11日 | 陰性 | 陰性 | |
| 岡本獣医科病院 | 8 | 12月25日 | 陰性 | 陰性 | |
| 岡本獣医科病院 | 9 | 12月25日 | 陰性 | 陰性 | |
| 岡本獣医科病院 | 10 | 12月26日 | 陰性 | 陰性 | |
| フレンド動物病院 | 1 | 11月28日 | 陰性 | 陰性 | (病、アトピー様皮膚症状) |
| フレンド動物病院 | 1 | 11月28日 | 陰性 | 陰性 | |
| フレンド動物病院 | 2 | 12月18日 | 陰性 | 陰性 | |
| フレンド動物病院 | 3 | 12月19日 | 陰性 | 陰性 | |
| フレンド動物病院 | 3 | 12月19日 | 陰性 | 陰性 | |
| フレンド動物病院 | 4 | 12月25日 | 陰性 | 陰性 | |
| フレンド動物病院 | 5 | 1月5日 | 陰性 | 陰性 | |
| フレンド動物病院 | 6 | 1月7日 | 陰性 | 陰性 | |
| フレンド動物病院 | 7 | 1月8日 | 陰性 | 陰性 | |
| フレンド動物病院 | 8 | 1月21日 | 陰性 | 陰性 | |
| 矢野動物病院 | 1 | 1月8日 | 陰性 | 陰性 | |
| 矢野動物病院 | 2 | 1月8日 | 陰性 | 陰性 | |
| 矢野動物病院 | 3 | 1月8日 | 陰性 | 陰性 | |
| 矢野動物病院 | 4 | 1月8日 | 陰性 | 陰性 | |
| 矢野動物病院 | 5 | 1月15日 | 陰性 | 陰性 | |
| 矢野動物病院 | 6 | 1月15日 | 陰性 | 陰性 | |
| 矢野動物病院 | 7 | 1月20日 | 陰性 | 陰性 | |
| 矢野動物病院 | 8 | 1月26日 | 陰性 | 陰性 | |
| アトム動物病院 | 1 | 11月27日 | 陰性 | 陰性 | |
| アトム動物病院 | 2 | 12月4日 | 陰性 | 陰性 | |
| アトム動物病院 | 3 | 12月10日 | 陰性 | 陰性 | |
| アトム動物病院 | 4 | 12月17日 | 陰性 | 陰性 | |
| アトム動物病院 | 5 | 12月17日 | 陰性 | 陰性 | |
| アトム動物病院 | 6 | 12月17日 | 陰性 | 陰性 | |
| アトム動物病院 | 7 | 1月31日 | 陰性 | 陰性 | |
| アトム動物病院 | 8 | 1月31日 | 陰性 | 陰性 | |

| 病院名 | 検体番号 | 検体採取日 | 菌検査 培養結果 | 毒素遺伝子 検査結果 | 備考 |
|--------------|------|--------|-------------|---------------|-------------|
| あすなろ動物病院 | 1 | 11月20日 | 陰性 | 陰性 | (病:子宮内の膿) |
| あすなろ動物病院 | 2 | 11月21日 | 陰性 | 陰性 | |
| あすなろ動物病院 | 3 | 11月30日 | 陰性 | 陰性 | |
| あすなろ動物病院 | 4 | 12月12日 | 陰性 | 陰性 | |
| あすなろ動物病院 | 6 | 12月15日 | 陰性 | 陰性 | |
| あすなろ動物病院 | 5 | 12月14日 | 陰性 | 陰性 | |
| あすなろ動物病院 | 5 | 12月14日 | 陰性 | 陰性 | |
| あすなろ動物病院 | 7 | 12月21日 | 陰性 | 陰性 | |
| あすなろ動物病院 | 8 | 1月16日 | 陰性 | 陰性 | |
| あすなろ動物病院 | 8 | 1月16日 | 陰性 | 陰性 | (病:皮膚) |
| あすなろ動物病院 | 9 | 1月26日 | 陰性 | 陰性 | |
| 熊取動物病院 | 1 | 11月20日 | 陰性 | 陰性 | |
| 熊取動物病院 | 2 | 12月5日 | 陰性 | 陰性 | |
| 熊取動物病院 | 3 | 1月15日 | 陰性 | 陰性 | |
| 熊取動物病院 | 3 | 1月15日 | 陰性 | 陰性 | |
| 熊取動物病院 | 4 | 1月17日 | 陰性 | 陰性 | |
| 熊取動物病院 | 5 | 1月17日 | 陰性 | 陰性 | |
| 熊取動物病院 | 6 | 1月17日 | 陰性 | 陰性 | |
| 熊取動物病院 | 7 | 1月21日 | 陰性 | 陰性 | |
| 熊取動物病院 | 8 | 1月22日 | 陰性 | 陰性 | |
| 泉南動物病院 | 1 | 12月11日 | 陰性 | 陰性 | |
| 泉南動物病院 | 2 | 12月13日 | 陰性 | 陰性 | |
| 泉南動物病院 | 3 | 12月15日 | 陰性 | 陰性 | |
| 泉南動物病院 | 4 | 12月18日 | 陰性 | 陰性 | |
| 泉南動物病院 | 5 | 12月19日 | 陰性 | 陰性 | |
| 泉南動物病院 | 6 | 12月20日 | 陰性 | 陰性 | |
| 泉南動物病院 | 7 | 1月15日 | 陰性 | 陰性 | |
| 泉南動物病院 | 8 | 1月30日 | 陰性 | 陰性 | |
| カムイアニマルクリニック | 1 | 12月14日 | 陰性 | 陰性 | (病:皮膚) |
| カムイアニマルクリニック | 2 | 12月17日 | 陰性 | 陰性 | |
| カムイアニマルクリニック | 3 | 12月21日 | 陰性 | 陰性 | |
| カムイアニマルクリニック | 3 | 12月21日 | 陰性 | 陰性 | |
| カムイアニマルクリニック | 4 | 12月25日 | 陰性 | 陰性 | |
| カムイアニマルクリニック | 5 | 1月8日 | 陰性 | 陰性 | |
| カムイアニマルクリニック | 5 | 1月8日 | 陰性 | 陰性 | |
| カムイアニマルクリニック | 6 | 1月16日 | 陰性 | 陰性 | |
| カムイアニマルクリニック | 7 | 1月27日 | 陰性 | 陰性 | |
| カムイアニマルクリニック | 7 | 1月27日 | 陰性 | 陰性 | (病:皮膚) |
| カムイアニマルクリニック | 8 | 2月1日 | 陰性 | 陰性 | |
| すがの犬猫病院 | 1 | 1月16日 | 陰性 | 陰性 | (病:皮膚) |
| すがの犬猫病院 | 2 | 1月17日 | 陰性 | 陰性 | |
| すがの犬猫病院 | 3 | 1月23日 | 陰性 | 陰性 | |
| すがの犬猫病院 | 4 | 1月24日 | 陰性 | 陰性 | |
| すがの犬猫病院 | 5 | 1月25日 | 陰性 | 陰性 | |
| すがの犬猫病院 | 6 | 1月29日 | 陰性 | 陰性 | |
| すがの犬猫病院 | 7 | 1月30日 | 陰性 | 陰性 | |
| すがの犬猫病院 | 7 | 1月30日 | 陰性 | 陰性 | |
| すがの犬猫病院 | 8 | 1月30日 | 陰性 | 陰性 | |
| 尾崎動物病院 | 1 | 1月28日 | 陰性 | 陰性 | (病:鼻汁) |
| 尾崎動物病院 | 2 | 1月28日 | 陰性 | 陰性 | |
| 尾崎動物病院 | 3 | 1月28日 | 陰性 | 陰性 | |
| 尾崎動物病院 | 4 | 1月28日 | 陰性 | 陰性 | |
| 尾崎動物病院 | 5 | 1月29日 | 陰性 | 陰性 | |
| 尾崎動物病院 | 6 | 1月29日 | 陰性 | 陰性 | |
| 尾崎動物病院 | 7 | 1月29日 | 陰性 | 陰性 | |
| 尾崎動物病院 | 7 | 1月29日 | 陰性 | 陰性 | |
| 尾崎動物病院 | 8 | 1月29日 | 陰性 | 陰性 | |
| ミズホ動物病院 | 1 | 11月16日 | 陰性 | 陰性 | (病:可視粘膜の蒼白) |
| ミズホ動物病院 | 2 | 11月16日 | 陰性 | 陰性 | |
| ミズホ動物病院 | 3 | 11月16日 | 陰性 | 陰性 | |
| ミズホ動物病院 | 4 | 11月20日 | 陰性 | 陰性 | |
| ミズホ動物病院 | 5 | 12月3日 | 陰性 | 陰性 | |
| ミズホ動物病院 | 5 | 12月3日 | 陰性 | 陰性 | |
| ミズホ動物病院 | 6 | 12月12日 | 陰性 | 陰性 | |
| ミズホ動物病院 | 7 | 12月18日 | 陰性 | 陰性 | |
| ミズホ動物病院 | 7 | 12月18日 | 陰性 | 陰性 | (病:皮膚) |
| ミズホ動物病院 | 8 | 12月25日 | 陰性 | 陰性 | |

| 病院名 | 検体番号 | 検体採取日 | 菌検査 | 毒素遺伝子 | 備考 |
|----------|------|--------|------|-------|-------------|
| | | | 培養結果 | 検査結果 | |
| 大宮動物病院 | 1 | 11月24日 | 陰性 | 陰性 | (病:皮膚) |
| 大宮動物病院 | 3 | 11月27日 | 陰性 | 陰性 | |
| 大宮動物病院 | 3 | 11月27日 | 陰性 | 陰性 | (病:皮膚) |
| 大宮動物病院 | 2 | 11月29日 | 陰性 | 陰性 | (病:皮膚) |
| 大宮動物病院 | 4 | 1月30日 | 陰性 | 陰性 | |
| 大宮動物病院 | 4 | 1月30日 | 陰性 | 陰性 | (病:) |
| 柿原犬猫病院 | 1 | 11月28日 | 陰性 | 陰性 | |
| 柿原犬猫病院 | 1 | 11月28日 | 陰性 | 陰性 | (病:結膜、涙目) |
| 柿原犬猫病院 | 2 | 11月28日 | 陰性 | 陰性 | |
| 柿原犬猫病院 | 2 | 11月28日 | 陰性 | 陰性 | (病、結膜、食欲減退) |
| 柿原犬猫病院 | 3 | 12月14日 | 陰性 | 陰性 | |
| 柿原犬猫病院 | 3 | 12月14日 | 陰性 | 陰性 | (病:鼻) |
| 柿原犬猫病院 | 4 | 12月14日 | 陰性 | 陰性 | |
| 柿原犬猫病院 | 4 | 12月14日 | 陰性 | 陰性 | (病:鼻) |
| 柿原犬猫病院 | 5 | 12月14日 | 陰性 | 陰性 | |
| 柿原犬猫病院 | 5 | 12月14日 | 陰性 | 陰性 | (病:傷?) |
| 柿原犬猫病院 | 6 | 1月7日 | 陰性 | 陰性 | |
| 柿原犬猫病院 | 6 | 1月7日 | 陰性 | 陰性 | (病:肛門周囲) |
| 柿原犬猫病院 | 7 | 1月17日 | 陰性 | 陰性 | |
| 柿原犬猫病院 | 7 | 1月17日 | 陰性 | 陰性 | (病:皮膚、外傷部) |
| 柿原犬猫病院 | 8 | 1月31日 | 陰性 | 陰性 | |
| 柿原犬猫病院 | 8 | 1月31日 | 陰性 | 陰性 | (病:結膜) |
| ピア動物病院 | 1 | 1月21日 | 陰性 | 陰性 | |
| ピア動物病院 | 2 | 1月21日 | 陰性 | 陰性 | |
| ピア動物病院 | 3 | 1月21日 | 陰性 | 陰性 | |
| ピア動物病院 | 4 | 1月21日 | 陰性 | 陰性 | |
| ピア動物病院 | 5 | 1月22日 | 陰性 | 陰性 | |
| ピア動物病院 | 6 | 1月22日 | 陰性 | 陰性 | |
| ピア動物病院 | 7 | 1月23日 | 陰性 | 陰性 | |
| ピア動物病院 | 8 | 1月25日 | 陰性 | 陰性 | |
| まつおか動物病院 | 1 | 1月19日 | 陰性 | 陰性 | |
| まつおか動物病院 | 2 | 1月19日 | 陰性 | 陰性 | |
| まつおか動物病院 | 3 | 1月21日 | 陰性 | 陰性 | |
| まつおか動物病院 | 4 | 1月22日 | 陰性 | 陰性 | |
| まつおか動物病院 | 5 | 1月25日 | 陰性 | 陰性 | |
| まつおか動物病院 | 6 | 1月26日 | 陰性 | 陰性 | |
| まつおか動物病院 | 7 | 1月26日 | 陰性 | 陰性 | |
| まつおか動物病院 | 8 | 1月26日 | 陰性 | 陰性 | |
| まつおか動物病院 | 9 | 1月28日 | 陰性 | 陰性 | |
| さつき台動物病院 | 1 | 11月17日 | 陰性 | 陰性 | |
| さつき台動物病院 | 2 | 11月19日 | 陰性 | 陰性 | |
| さつき台動物病院 | 3 | 11月26日 | 陰性 | 陰性 | |
| さつき台動物病院 | 4 | 11月29日 | 陰性 | 陰性 | |
| さつき台動物病院 | 4 | 11月29日 | 陰性 | 陰性 | (病:皮膚) |
| さつき台動物病院 | 5 | 12月1日 | 陰性 | 陰性 | |
| さつき台動物病院 | 6 | 12月6日 | 陰性 | 陰性 | |
| さつき台動物病院 | 7 | 12月13日 | 陰性 | 陰性 | |
| さつき台動物病院 | 8 | 12月14日 | 陰性 | 陰性 | |
| アロ一動物病院 | 1 | 11月19日 | 陰性 | 陰性 | |
| アロ一動物病院 | 2 | 11月21日 | 陰性 | 陰性 | |
| アロ一動物病院 | 3 | 11月22日 | 陰性 | 陰性 | |
| アロ一動物病院 | 4 | 12月4日 | 陰性 | 陰性 | |
| アロ一動物病院 | 5 | 12月20日 | 陰性 | 陰性 | |
| アロ一動物病院 | 6 | 12月25日 | 陰性 | 陰性 | |
| アロ一動物病院 | 7 | 1月11日 | 陰性 | 陰性 | |
| アロ一動物病院 | 8 | 1月28日 | 陰性 | 陰性 | |

国内野生イノシシ・シカにおける抗 *Brucella* 抗体の保有状況に関する研究

分担研究者 今岡 浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 第1室長
協力研究者 木村 昌伸 国立感染症研究所 獣医科学部 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 研究員

研究要旨： ブルセラ症 (brucellosis) はブルセラ属菌 (Genus *Brucella*) による人獣共通感染症である。国内では感染家畜の摘発・淘汰が功を奏し、家畜では清浄化していると考えられているが、まれにブルセラ病とされるウシが報告される。家畜間での感染のやりとりは認められないことから、野生動物が維持している可能性も考えられる。そこで、今回、国内の野生イノシシおよび日本シカの血液サンプルを入手し、家畜ブルセラ菌に対する抗体の保有状況を MAT により検討したが、保有は確認されなかった。今後、さらに例数を増やして検討をすることと、より感度が高く、特異的な検査法の開発が必要であると考えられた。

A. 研究目的

ブルセラ症 (brucellosis) はブルセラ属菌 (Genus *Brucella*) による人獣共通感染症である。ヒトに感染する家畜ブルセラ菌は病原性の強い順に、*B. melitensis* (自然宿主: ヤギ、ヒツジ)、*B. suis* (ブタ)、*B. abortus* (ウシ) である。これら家畜の持つブルセラ菌のヒトへの感染は、感染動物の加熱 (殺菌) 処理していない生乳およびそれから作ったチーズ、食肉の喫食や、死体・流産時の汚物・汚染物などとの接触、またエアロゾルの吸入による。本疾患は世界中で発生しており、特に家畜での対策が不十分な地域では、年間数百～数千症例のヒト患者が報告されている。さらに、他の疾患との鑑別が難しく、実際はその10～25倍もの患者がいると考えられており、公衆衛生上の大きな問題となっている。

近年、国内では、家畜ブルセラ病はほとんど発生していないが、2001年に福島、2002年に千葉、そして今年、広島でウシブルセラ病とさ

れたウシが報告されている (表1)。国内では感染家畜の摘発・淘汰が功を奏し、清浄化していると考えられているが、上記のようにまれにブルセラ病とされるウシが報告される。家畜ブルセラ菌が国内に、依然、存在していると考えると、家畜間での感染のやりとりは認められないことから、野生動物が維持している可能性も考えられる。一昨年、四国の野生イノシシから、高率にブルセラ菌に対する抗体が検出されたとの報告もある。

日本国内では、感染症法による患者の届出が始まって依頼、現在までに9例の報告がある。このうち家畜ブルセラ菌に感染したケースは、すべて輸入感染例と考えられており、国内での家畜からの感染例は報告されていない。しかしながら、前述の事象が事実であるならば、公衆衛生学的にも無視できない問題になってくる。そこで、今回、国内の野生イノシシおよび日本シカの血液サンプルを入手し、家畜ブルセラ菌に対する抗体の保有状況を検討した。

B. 研究方法

1. 血液サンプルの採取： 2007-8年シーズンに大日本猟友会の協力の下、イノシシもしくは日本シカの血液サンプルを採取してもらった。サンプルの採取と回収の方法について、図1に示したが、サンプル送付とともに、動物種、性別、体重、推定年齢、捕獲地を記録ラベルに記入して同封してもらった。保冷して輸送・回収した血液は当室にて血清を分離し、測定まで-40℃に保管した。さらに、別途、2005-6年シーズンのイノシシ血清（先に大日本猟友会の協力下で採取した物）を、感染研ウイルス第2部より入手した。また、岐阜大学および西三河家畜保健衛生所より、イノシシ血清の分与を受けた。

2. マイクロプレート凝集反応（MAT）による抗ブルセラ抗体の検出： 試験管内凝集反応（TAT）に用いられるブルセラ病診断用菌液（農業・生物系特定産業技術研究機構）をもとに、0.005%サフラニン加10倍希釈菌液を調整する。イノシシおよび日本シカサンプル血清（液量25μl）を96穴U底マイクロプレート上で10倍から2倍段階希釈する。これに、調整した菌液を同量加え、20秒程度緩やかに振盪する。保湿環境で37℃、18〜24時間反応させた後に判定する。40倍希釈以上で凝集像の確認された物を陽性と判定する。ブルセラ病診断用菌液は、*B. abortus* から作成されており、いわゆる smooth type LPSを持つブルセラ属菌（*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*）に対する抗体検出に使用される。

C. 研究結果

1. 国内の家畜におけるブルセラ病の発生状況： 文献及び統計報告をもとに、国内の家畜ブルセラ症の発生状況を調査した。ウシブルセラ病（*B. abortus*）は、1916年に最初に国内で分離され、1950年代に多発した。その後、徹底した摘発・淘汰により、近年では散発にとどま

っている（表1）。過去の発生は輸入牛に起因すると考えられているが、近年の感染経路等については不明である。ブタブルセラ病（*B. suis*）は、1936年から神奈川や千葉の養豚場で流行したが、1940年に神奈川県下の1種豚の報告を最後に発生を見ない。ヤギ・ヒツジブルセラ病（*B. melitensis*）は、海外では最も重要なブルセラ病であるが、国内では報告は見あたらない。

2. サンプルの採取状況： 表2にサンプル・プロファイルを示した。合計で、イノシシは17県から213頭、日本シカは11道県から38頭であった。特に昨年、イノシシで抗体検出の報告があった四国のうち、高知県は17サンプル、愛媛県が11サンプルであった。

3. MATによる検査結果： 図2に検査例を示す。検査したイノシシ血清サンプルが、#1〜10、ウサギを免疫して作成した陽性対照血清が下2行である。図に示されたように、陽性対照血清では、1:320、1:640まで凝集像が確認されるのに対して、検査サンプルは、すべて1:10希釈でも凝集像は確認されなかった。同様に、検査したイノシシおよび日本シカのサンプルすべて1:10未満であり、ブルセラ属菌に対する抗体は確認されなかった。

D. 考察

今回の検討では、野生イノシシや日本シカにおいて家畜ブルセラ菌に対する抗体の保有は確認されなかった。保有の報告があった高知県、愛媛県においても、特に先の報告と今回の採取地域が重なっている高知県四万十川上流域のイノシシにおいても保有は確認されなかった。しかしながら、今回の検討では、各地域での個体数が十分ではなく、さらに検体数を増やして確認する必要があると思われる。また、国内ではイヌブルセラ菌の存在は、イヌでのブルセラ病の流行や抗体検査などにより確認されてい

る。ブタは抵抗性であるとされているが、イヌブルセラ菌に対する抗体も検討する必要があるかもしれない。また、ブルセラ属菌の検出(培養、PCRなど)を試みることも考えられる。

今回は MAT により抗体測定を実施したが、これは TAT と同様に、*B. abortus* の不活化全菌体を抗原として使用している。この抗原に含まれる smooth type LPS はエルシニア菌との明らかな交差反応があるため、特異性に少々難があるとも言われている。そこで、今後は、より感度が高く、特異的な検査法を開発する必要があると思われる。

E. 結論

野生イノシシや日本シカにおいてブルセラ属菌に対する抗体の保有は確認されなかった。例数を増やして検討をすることと、より感度が高く、特異的な検査法の開発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) 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。

表1) 国内のウシブルセラ病の発生状況

B.abortus

1916:最初分離

1972-2001:23頭

| 年 | 発生数 | 91 | 0.2/100万頭 | 01 | 1(福島) |
|----|-----------|----|-----------|----|-------|
| 82 | 0.2/100万頭 | 92 | 0 | 02 | 1(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 | 07 | 1(広島) |
| 88 | 0 | 98 | 0 | | |
| 89 | 0.2/100万頭 | 99 | 0 | | |
| 90 | 0.2/100万頭 | 00 | 0 | | |

1953~:B.abortus 多発

ジャージー種乳牛の輸入(オーストラリア、ニュージーランドなど)

1957:FAO/WHOブルセローシスセンター設置。

摘発・淘汰の徹底(1947-1972:4596頭)。

表2) サンプル・プロファイル

イノシシ

2005-06(12-2月) — 猟友会

| 地域 | 検体数 |
|-----|-----|
| 千葉 | 14 |
| 静岡 | 32 |
| 長野 | 2 |
| 兵庫 | 5 |
| 島根 | 1 |
| 広島 | 14 |
| 高知 | 14 |
| 熊本 | 12 |
| 大分 | 3 |
| 鹿児島 | 1 |
| 合計 | 98 |

イノシシ

2007-08(11-2月) — 猟友会

| 地域 | 検体数 |
|-----|-----|
| 千葉 | 7 |
| 静岡 | 8 |
| 三重 | 2 |
| 兵庫 | 1 |
| 島根 | 7 |
| 広島 | 3 |
| 徳島 | 3 |
| 香川 | 5 |
| 愛媛 | 11 |
| 高知 | 3 |
| 熊本 | 9 |
| 大分 | 4 |
| 宮崎 | 3 |
| 鹿児島 | 2 |
| 合計 | 68 |

シカ

2007-08(11-2月) — 猟友会

| 地域 | 検体数 |
|-----|-----|
| 北海道 | 6 |
| 岩手 | 3 |
| 栃木 | 6 |
| 千葉 | 2 |
| 静岡 | 2 |
| 長野 | 5 |
| 広島 | 2 |
| 徳島 | 3 |
| 大分 | 1 |
| 宮崎 | 5 |
| 鹿児島 | 3 |
| 合計 | 38 |

イノシシ

| 地域 | 採取年 | 検体数 |
|-------|--------------------|-----|
| 滋賀県* | 1991-92 (12-1月) | 8 |
| 岐阜県* | 1991-92 (12-1月) | 7 |
| 岐阜県* | 2003 (6-9月) | 12 |
| 愛知県** | 2006 (9-10月) | 20 |

* 岐阜大学より分与

** 西三河家畜保健衛生所より分与

図1) サンプル採取方法

イノシシ・シカ血液サンプルの採取と送付方法

- 発泡スチロールボックスに、
20ml シリンジ、50ml チューブ（採血管入り）2本、
50ml シリンジ（予備）、記録用紙、手袋、返信用伝票
が入っています。
- イノシシ・シカを採血するときに、付属の 20ml シリンジに血液を採ります。
予備の 50ml チューブを利用して構いません。
(50ml チューブに血液を採る。
その後、チューブの血液を 20ml シリンジに移す。)
- 採血管を取り出し、ふたを開け、採った血液を採血管（2本）に、
八分目まで入れてください。
(シリンジから血液を入れる。50ml チューブから直接入れる。
どちらでも、やりやすい方で、採血管に血液を入れてください。)
- 採血管のふたをしっかりと閉めます。
- 採血管を軽く 7-8 回、上下に転倒して、血液を混ぜてください。
- 採血管を 50ml チューブに戻し、ふたを閉めます。
- 50ml チューブ（2本）を容積立てに立てます。
- 記録ラベルに採取日・場所などを記入します。
- チューブと記録ラベルを発泡スチロールボックスに入れて、ふたをします。
- ふたに沿ってアルリと粘着テープでシールします。
必要なら、十字にテープを貼って補強してください。
- 同時の着払い伝票を使って、冷蔵便（4℃）で送ってください。
(配達指定日は平日になるようお願いいたします。)

*ボックスの外側に血液が付着しないようご注意ください。

記録用紙 [イノシシ・シカ] (犬で開ってください)

[オス・メス]

| | | | |
|------|--------|----|---|
| 種別 | kg | 種別 | 才 |
| 採取日 | 月 日 | | |
| 採取場所 | 県市町村 | | |
| | 地区 | | |
| | メッシュ番号 | | |
| 採取者 | 責任者氏名 | | |
| | 同 住 所 | | |
| | 協力者氏名 | | |
| | 協力者氏名 | | |

図2) MATによる検出例

