

- 高野 愛. 秋田県において15年ぶりに確認されたアカツツガムシ媒介性つつが虫病と感染推定地におけるツツガムシの生息状況調査. 第16回リケッチア研究会. 2009年11月. 東京.
- 松谷峰之介, 東慶直, 小川基彦, 花岡希, 川端寛樹, 倉根一郎, 安藤秀二, 岸本寿男, 白井睦訓. 日本紅斑熱の原因菌 *Rickettsia japonica* の全ゲノム配列解析. 第16回リケッチア研究会. 2009年11月. 東京.
 - 花岡希, 松谷峰之介, 川端寛樹, 山本正悟, 藤田博己, 坂田明子, 東慶直, 小川基彦, 岸本寿男, 白井睦訓, 倉根一郎, 安藤秀二. 病原性 *Rickettsia japonica* グループにおける特異的 ORF の同定と検出系への応用. 第16回リケッチア研究会. 2009年11月. 東京.
 - 藤田博己, 高田伸弘, 矢野泰弘, 及川陽三郎, 川端寛樹, 安藤秀二, 坂田明子, 高野愛. 国内のキチマダニから分離された *Rickettsia canadensis* について. 第16回リケッチア研究会. 2009年11月. 東京.
 - 佐藤寛子, 柴田ちひろ, 佐藤了悦, 斉藤博之, 安部真理子, 斉藤志保子, 高橋守, 藤田博己, 角坂照貴, 高田伸弘, 川端寛樹, 高野 愛. 秋田県における古典的つつがむし病患者の症例とツツガムシの生息状況調査の経過報告. 第55回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2009年10月. 帯広.
 - 安藤秀二, 藤田博己, 坂田明子, 矢野泰弘, 大竹秀男, 及川陽三郎, 角坂照貴, 黒澤昌啓, 川端寛樹, 高田伸弘. 仙台市での *Rickettsia heilongjiangensis* 感染症例の発見と保有マダニ調査. 第55回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2009年10月. 帯広.
 - 伊東拓也, 高田伸弘, 藤田博己, 坂田明子, 安藤秀二, 川端寛樹, 高野愛. 日本北端地域におけるマダニ媒介性病原体の調査. 第55回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2009年10月. 帯広.
 - 藤田博己, 高田伸弘, 安藤秀二, 川端寛樹, 高野 愛, 坂田明子. 青森県における紅斑熱のベクター調査. 第55回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2009年10月. 帯広.
 - 高野 愛, 川端寛樹, 武藤麻紀, 小笠原由美子, 藤田博己, 鶴見みや古, 渡邊治雄. 国内で初めて見いだされた回帰熱ボレリアの感染性に関する研究. 第55回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2009年10月. 帯広.
 - 川端寛樹, 武藤麻紀, 高野 愛, 小笠原由美子, 藤田博己, 鶴見みや古, 増沢俊幸, 宮本健司, 渡邊治雄. Multi-locus sequence typing 法による国内野生鳥類由来ボレリアと北海道患者由来ボレリアの遺伝子型別解析. 第55回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2009年10月. 帯広.
 - 今内覚, 村瀬優介, 山田慎二, 肥田野新, 伊東拓也, 川端寛樹, 小沼操, 大橋和彦. シュルツェマダニにおけるライム病ボレリア伝播関連遺伝子の同定. 第148回日本獣医学会学術集会. 2009年9月. 鳥取.
 - 肥田野新, 今内覚, 村瀬優介, 山田慎二, 伊東拓也, 川端寛樹, 小沼操, 大橋和彦. シュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) 由来 Salp16 様遺伝子の同定と発現解析.

第 148 回日本獣医学会学術集会. 2009 年 9 月. 鳥取.

- 高野 愛, 藤田博己, 角坂照貴, 今内覚, 田島朋子, 武藤麻紀, 小笠原由美子, 川端寛樹, 渡邊治雄. 国内産爬虫類寄生性マダニから見いだされたボレリアとそのマダニ体内での動態. 第 148 回日本獣医学会学術集会. 2009 年 9 月. 鳥取.
- 山内健生, 田原研司, 金森弘樹, 川端寛樹, 新井 智, 片山 丘, 藤田博己, 矢野泰弘, 高田伸弘, 板垣朝夫. 島根県の日本紅斑熱汚染地域におけるマダニ相. 日本昆虫学会第 69 回大会. 2009 年 10 月. 三重.
- 高田伸弘, 藤田博己, 安藤秀二, 川端寛樹, 矢野泰弘, 高野 愛, 岸本壽男. 仙台市内河川敷にみるネズミ分布相の特性—広東住血線虫や紅斑熱感染環との絡み—. 第 61 回日本衛生動物学会大会. 2009 年 4 月. 香川.
- 矢野泰弘, 高田伸弘, 岩崎博道, 藤田博己, 角坂照貴, 及川陽三郎, 田原研司, 山本正悟, 本田俊郎, 平良勝也, 安藤秀二, 川端寛樹, 岸本壽男. 環東シナ海の島嶼に分布するツツガムシ, 疫学的な連関は? 第 61 回日本衛生動物学会大会. 2009 年 4 月. 香川.
- 藤田博己, 大竹秀男, 矢野泰弘, 安藤秀二, 川端寛樹, 岸本壽男, 坂田明子, 高田伸弘. 宮城県で確認できたマダニとマダニ保有リケッチア. 第 61 回日本衛生動物学会大会. 2009 年 4 月. 香川.
- 藤田博己, 高田伸弘, 矢野泰弘, 馬原文彦, 川端寛樹, 安藤秀二, 岸本壽男, 坂田明子. 四国のマダニ類における紅斑熱群リケッ

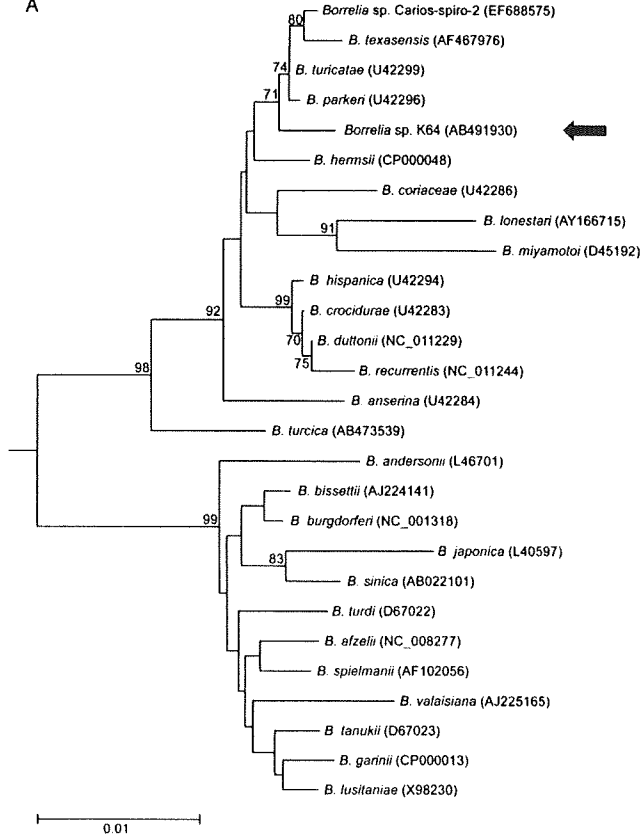
チアの分離状況. 第 61 回日本衛生動物学会大会. 2009 年 4 月. 香川.

- 大橋典男, 千屋誠造, 船戸豊彦, 塩尻正明, 高野愛, 川端寛樹, 安藤秀二, 岸本壽男. 国内初の新興感染症「ヒトアナプラズマ症」2 症例について. 第 83 回日本感染症学会総会 2009 年 4 月. 東京
- 安藤秀二, 黒澤昌啓, 坂田明子, 藤田博己, 矢野泰弘, 高野愛, 川端寛樹, 花岡希, 斉藤若奈, 岸本壽男. 仙台市で確認された新しい紅斑熱リケッチア症. 第 83 回日本感染症学会総会 2009 年 4 月. 東京
- 小泉信夫, 谷川力, 林英治, 赤尾信明, 川端寛樹, 渡邊治雄. 東京都で発生したレプトスピラ症とドブネズミのレプトスピラ保有状況. 第 83 回日本感染症学会総会 2009 年 4 月. 東京

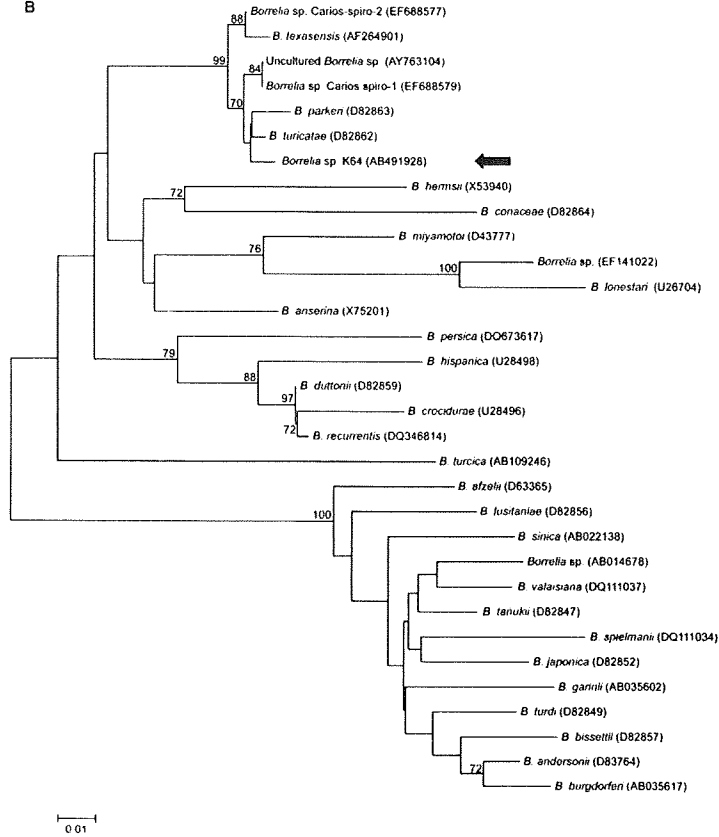
H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む.)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

A



B



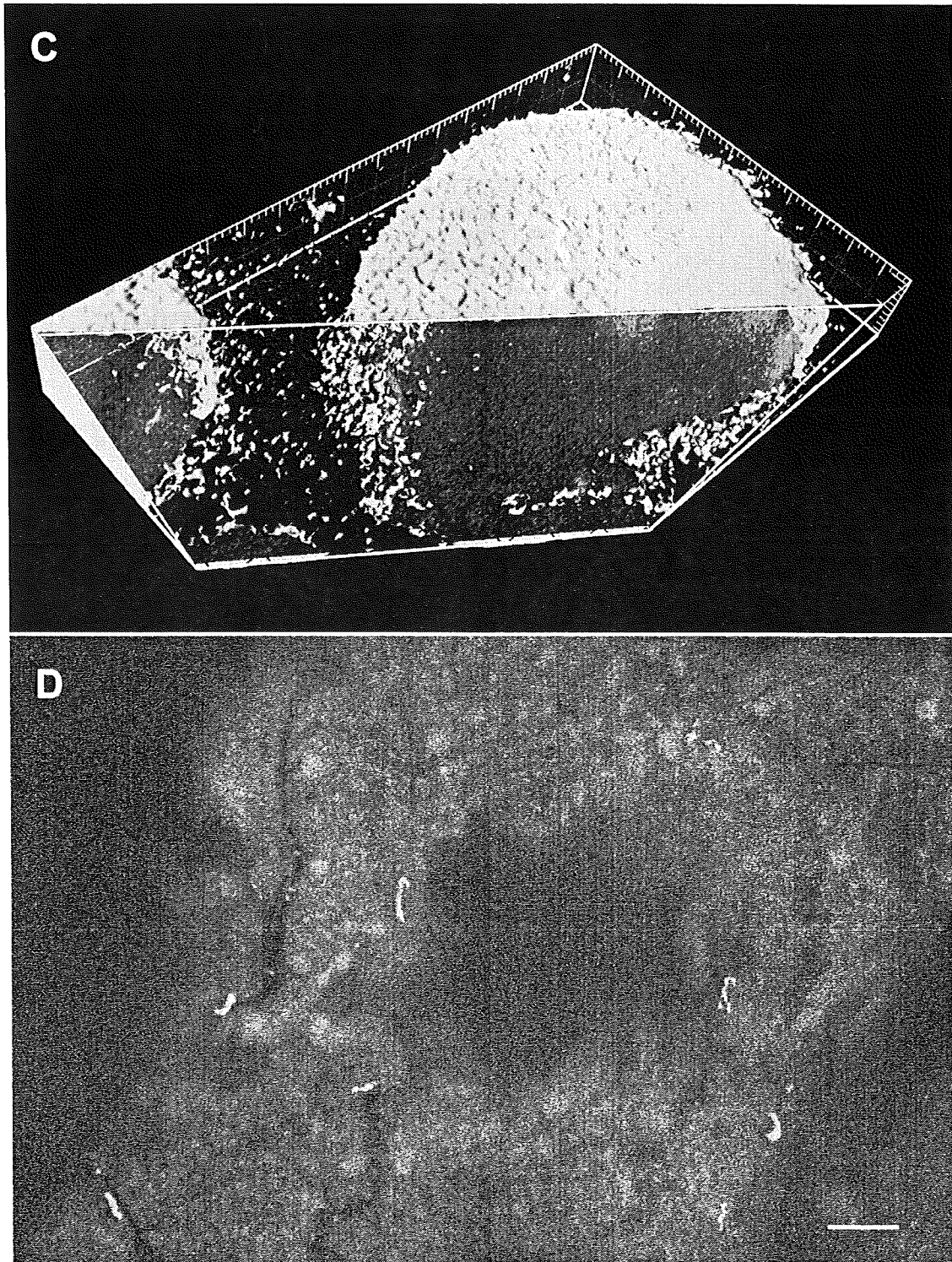


図1. *16SrRNA* 遺伝子(A)および *flaB* 遺伝子(B)配列による本研究で見出されたボレリア(*Borrelia* sp. K64)の系統解析. 矢印は *Borrelia* sp. K64 を示す. マダニ唾液腺内(C), および中腸内(D)に見出された *Borrelia* sp. K64 (赤はボレリアを示す)

表 1. 本研究で使用した oligonucleotide primer 一覧

Primer	Sequence (5'-3')*1
マダニ mitochondrion 16S rRNA 遺伝子	
mtrs(1)	5'-CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG-3'
mtrs(2)	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCAAGTA-3'
ボレリア <i>glpQ</i> 遺伝子	
glpQ-F2 (1st-step)	5'-CCATTARTYATAGCTCACAGRGG-3'
glpQ-R2 (1st-step)	5'-CAAGGTCCRATTCCRTCR-3'
glpQ-F3 (2nd-step)	5'-CATACGCTTATGCYTTRGGMGCTGA-3'
glpQ-R3 (2nd-step)	5'-GCAACCTCTGYCATACCTTCTTSTG-3'
ボレリア <i>flaB</i> 遺伝子	
BflaPAD (1st-step)	5'-GATCARGCWCAAYATAACCAWATGCA-3'
BflaPDU (1st-step)	5'-AGATTCAAGTCTGTTTTGGAAAGC-3'
BflaPBU (2nd-step)	5'-GCTGAAGAGCTTGGAATGCAACC-3'
BflaPCR (2nd-step)	5'-TGATCAGTTATCATTCTAATAGCA-3'
ボレリア 16S rRNA 遺伝子	
rrs-F1	5'-ATAACGAAGAGTTTGATCCTGGCT-3'
rrs-F2	5'-GGTGTAAAGGGTGGAATCTGTTG-3'
rrs-F3	5'-TTTCGTGACTCAGCGTCAGT-3'
rrs-R4	5'-AAAGGAGGTGATCCAGCCRCAC-3'

*1: M(A+C), W (A+T), R (A+G), Y (C+T), S(G+C)をそれぞれ示す.

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

全国衛生微生物技術協議会ジフテリアレファレンスセンター

日本小動物獣医師会

研究協力者のリスト添付

研究要旨

昨年度までに国内ではジフテリア様症状を呈する5名の患者からジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* が分離された。患者の環境調査は実施されず、感染経路に愛玩動物があることが疑われていた。平成21年2月に東京都内で6例目患者発生が確認され、初めて患者自宅の詳細な環境調査を実施した。調査の結果、患者が発症する以前に自宅に集まる野良猫の1匹が風邪様症状を呈してクシャミ、鼻水を飛散していたことを確認し、その後、患者に同菌が感染した結果、咽頭炎等が発現したことが判明した。野良猫の咽頭等数カ所から患者と遺伝子型が一致する菌を分離し、さらに親猫と同居の子猫の鼻水からも同菌を分離した。この調査結果により発症野良猫から人が感染し、さらに猫から同居猫の感染も確認した。

地方自治体の動物愛護センターに搬入された犬または猫の咽頭スワブおよび屠畜場に搬入された牛または豚の咽頭スワブ等から菌分離調査を実施した結果、数カ所の自治体の愛護センターの猫と犬よりジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* が分離された。しかし、現在までに畜産動物からの菌分離は陰性であった。

国内6例目の患者発生事例に基づき、本菌による患者発生状況と情報提供の通知が結核感染症課長から各衛生担当者におこなわれ、さらに新聞報道もあったため、任意の開業獣医師の協力を得て調査した結果、複数の地域において一般家庭で飼育している猫から当該菌を分離し、多頭飼いの同居猫にはジフテリア抗毒素を保有し過去の感染既往も疑う例もあった。さらに野生動物と接触機会の多い猟犬についてジフテリア抗毒素保有状況を調査した結果、複数の地域の猟犬において抗体陽性犬を確認した。これら猟犬で菌分離の追跡調査を実施した結果、同居犬の2頭からジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* を分離した。

現在までの調査結果を総括すると、野外活動時間の多い犬や猫は本菌を保菌または感染している可能性が高く、動物間では菌の伝播がおこり感染が成立する。感染動物では排菌量が多いために、免疫力が低下している人は感染を起こす危惧がある。

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* (*C. ulcera*

n s^{tox+}) 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. 調査対象地区と動物

(1) 地方自治体の衛生研究所の研究協力者が研究調査の協力依頼を調整できた所轄の愛護動物センターにおける犬猫、または屠畜場での牛豚、または開業獣医師へ来院した犬猫等について実施した。今年度、上記いずれかの調査を実施した自治体は、栃木県、神奈川県、富山県、大阪府、愛媛県、岡山県、山口県および大分県である。検査実施に際して、検体の採取、運搬および検査方法については各衛生研究所で調整と試験をお願いした。菌分離試験に用いる培地の作製にあつては、各組織による選択培地調整による試験のバラツキを最小限にするために、荒川変法血液培地および DSS 培地は、生培地を特別注文したものを配布して実施した(株:日研生物医学研究所)。

(2) 日本小動物獣医師会所属の開業医院の協力の下、診療・診察に訪れた犬猫のうちで、風邪様症状(クシャミ、鼻水等)を呈している動物を対象として調査を実施した。検査に際して、菌分離は大阪府公衛研、血清中のジフテリア抗毒素定量と菌の最終同定は感染研で実施した。

(3) 獣医科大学との共同研究として、岐阜大学柳井研究室では 2009 年に西日本の猟犬の血清中の病原体調査としてジフテリア抗毒素定量を血清疫学調査を実施した。血中抗毒素が陽性犬にあつては猟師の承諾を得て菌分離と再採血による抗毒素価測定を実施した。また、大阪府立大学 小崎俊司教室では、2009 年 6 月から 2010 年 1 月まで大阪府及び奈良県の乳房炎罹患牛の生乳、並びに同大獣医臨床セン

ターを受診したネコ、並びにと場より採取した肉用牛の咽頭スワブ、および動物園のサルとペンギンの咽頭拭い液からの菌分離検査を実施した。

2. 検体の採取、保存および輸送

愛護センターでの犬および猫からの採材は安楽死処分直後、咽頭ぬぐい液をシードスワブ γ 3 号(栄研化学)で採取、培養検査開始まで 4°C で保存した。検体の菌分離は、採取当日に分離培養を開始したが、週末を挟む場合は翌月曜日まで 3 日間 4°C で保存、その後分離培養を開始した。

と畜場での採材は、と殺後すみやかに咽頭等をシードスワブ γ 3 号で採取、培養検査開始まで 4°C で保存した。また、乳房炎、関節炎、皮膚炎等の患部は切開後、同様にぬぐい液を採取した。

開業獣医医院での検体採取は、咽頭や鼻水等をシードスワブ γ 2 号で採取し、1 週間に一度の割合で試験組織に輸送した。輸送までは 4°C で保存した。また、必要に応じて採血し、分離した血清は同様に輸送までは 4°C で保存した。

3. 培地および培養方法

培養は検体をヒツジ血液寒天培地および亜テルル酸カリウム添加活性炭末加ヒツジ血液寒天培地(以下、K 培地)に塗抹、血液寒天培地は 18~24 時間後、K 培地は 24 または 48 時間後に疑われる集落について性状を検査した。同定は DSS 培地による糖分解性状のスクリーニング、カタラーゼ試験、ウレアーゼ試験を実施した後、api Coryne(bioMérieux)を用いて確定した。なお、各衛研の研究協力者の経験的技術と知識の違いにより、出現したコロニーをエーゼで掻き取り(Sweep 法)、DNA を抽出し PCR を実施するか、または疑われる黒色コロニーをグループ毎(Mix 法)にリアルタイム PCR で毒素遺伝子検出する方法を組み合わせて実施する場合もある。菌の毒素産生性の同定は毒素遺伝子の A サブユニットを特異的に増幅するプライマーを用いた PCR、

Elek 法および培養細胞法を使い分けて確認した。

4. 分離菌株の解析

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) PFGE は制限酵素: Sfi I、泳動装置: CHEF-DR II (Bio RaD)、1.5%ゲル、泳動条件は14℃、6 V/cm、5-20sec 18hrs、1-5sec 14hrs で行った。結果はUPGAMA法で解析した。

ジフテリア毒素遺伝子の解析: PCR、Elek 法および培養細胞法で毒素産生が確認できた菌株について、その毒素遺伝子の全領域を増幅するプライマーを用いPCRを実施、増幅産物の塩基配列を決定した。

(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一般診療の一環として実施したが、患犬・猫の飼い主へインフォームドコンセントをおこない同意を得た後に実施した。

C. 研究結果

(1) 本年度に実施した地方自治体の衛生研究所を中心とする所轄の愛護動物センターの犬猫、屠畜場での牛豚、または開業獣医師との研究調査結果は以下に示す。なお、各自自治体の名称は行政対応上の問題が生ずる恐れもあり、匿名化して示す。

1) A 県の調査

県内各地から捕獲または引き取られて愛護センターに収容された犬 76 匹の咽頭スワブを検査した結果、*C. ulcerans* 及びジフテリア毒素遺伝子は検出されなかった。

2) B 県の調査

開業獣医医院の協力を得て一般家庭の飼い猫(鼻炎) 32 匹の咽頭拭い液、防除計画により捕獲されたアライグマは 55 匹、飼育レース鳩の 6 羽および公園に生息するドバト 20 羽からの菌分離調査を実施した。その結果、飼い猫 2 匹から *C. ulcerans* T_{ox}^{+} を検出した。その他、調査した動物からは *C. ulcerans* 及びジ

フテリア毒素遺伝子は検出されなかった。

3) C 県の調査

県内各地から捕獲または引き取られて愛護センターに収容された猫 78 匹の咽頭スワブを検査した結果、*C. ulcerans* 及びジフテリア毒素遺伝子は検出されなかった。

4) D 県の調査

県内各地から捕獲または引き取られて愛護センターに収容された犬 63 匹、猫 29 匹の合計 92 匹の口腔ふきとり検体を調査した結果、5 検体の犬由来株から *C. ulcerans* T_{ox}^{+} を分離した。また、この 5 検体を含め犬の 8 検体及び猫の 1 検体からジフテリア毒素遺伝子を検出した。感染経路の調査として、施設環境のふきとり検査(26 検体)やマダニ(100 検体)から遺伝子検査を行ったが、*C. ulcerans* 及びジフテリア毒素遺伝子は検出されなかった。

5) E 県の調査

県内各地から捕獲または引き取られて愛護センターに収容された犬 50 匹と猫 51 匹の咽頭スワブを検査した結果、犬 1 匹と猫 4 匹から *C. ulcerans* T_{ox}^{+} を分離した。

6) F 県の調査

県内の開業獣医師 11 医院で診察を受けたイヌ 36 頭(健康 24 頭、病気 12 頭)、ネコ 27 匹(健康 23 匹、病気 4 匹)の咽頭スワブを検査した結果、*C. ulcerans* 及びジフテリア毒素遺伝子は検出されなかった。

7) G 県内

各地から捕獲または引き取られて愛護センターに収容された犬 11 匹の咽頭スワブと猫 2 匹の耳垢を検査した結果、*C. ulcerans* 及びジフテリア毒素遺伝子は検出されなかった。

8) G 県の調査

捕獲あるいは放棄された犬 27 検体、猫 85 検体の咽頭スワブと、健康な牛の外耳内部の 30 検体および鼻腔内部のスワブ 35 検体、牛病畜の関節液 16 検体と乳汁 15 検体、それに開業獣医の猫の咽頭スワブ 36 検体について実施した。その結果、放棄された猫 5 検体(5.9%)から *C. ulcerans* T_{ox}^{+} が検出された。

(2) 日本小動物獣医師会所属の開業医院での

調査結果

1) 香川県内の獣医医院との調査結果：県内13ヶ所の開業獣医医院の協力を得て、平成21年11-22年1月に風邪様症状を呈した犬猫の鼻水、咽頭拭い液等、猫85匹、犬10匹の菌分離および血中ジフテリア抗毒素を測定した。その結果、4病院に来院した7匹から *C. ulcerans*^{S⁺} が分離された。また、ジフテリア抗毒素価抗体は11匹が0.03-0.81単位と陽性であった。4匹の菌分離と8匹が抗毒素陽性の猫は、多頭飼いの同一飼育者で飼育する同居猫であった。

2) 静岡県の開業獣医師の調査結果：慢性鼻炎症状を呈する家庭猫（日本猫、15歳、雄）の鼻汁より、*C. ulcerans*^{S⁺} が分離同定された。

(3) 獣医科大学との共同研究調査結果

1) 岐阜大学 柳井徳磨研究室：野生動物と接する機会の多い猟犬について、岐阜県、三重県、富山県、滋賀県、広島県、香川県、高知県、宮崎県および熊本県の9地域獣医会の協力を得て合計154頭から採血し、血中ジフテリア抗毒素価を培養細胞法により定量した。その結果、広島県で2頭、宮崎県で5頭および熊本県で6頭の合計13頭がジフテリア抗毒素価1mL中に0.03-0.6単位と陽性であった。陽性犬を飼育する宮崎県と熊本県の猟師の同意を得て、各猟師保有の同居犬を含めて菌分離試験を実施した結果、抗毒素価が陰性の同居犬2頭から *C. ulcerans*^{S⁺} を分離同定した。

2) 大阪府立大学の調査

2009年6月から2010年1月まで大阪府及び奈良県の乳房炎罹患牛の生乳75検体、および大阪府立大学生命環境科学部獣医臨床センターを受診したネコ3匹、と場より採取した肉用牛124検体、動物園のサル22検体、およびペンギン5匹の咽頭拭い液 合計229検体の菌分離試験を実施した。その結果、229検体のうち、DSS 培地による糖分解性状が陽性であった25コロニーについて api Coryne による同定を行った。*C. ulcerans* は陰性であった

が、分離したコリネ属菌のうちで *C. jeikeium* が9株と最も多く、*C. accolens*, *C. striatum* が各2株、*C. argentoratense* が1株であった。

(4) その他の調査結果

国内実験用サルでの調査：国内で飼育・繁殖された無症状の実験用カニクイザル62頭の咽頭拭い液を採材し、そのうち7頭から *C. ulcerans*^{S⁺} が分離された。サル由来毒素産生性株は、ヒト由来株とは異なる2つの遺伝子型に分けられた。

D. 考察

愛護センター収容の犬・猫および猟犬からジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* を分離し、同居している他の個体の臨床所見より、犬から犬または猫から猫への菌の拡散（不顕性感染）を確認した。さらに、疫学調査を実施した結果、ジフテリア様症状を呈した患者から本菌を分離し、患者は自分が感染する以前から自宅の野良猫が風用症状を呈していることを確認している。患者と野良猫から菌は遺伝子額的な解析で同一なことも確認した。さらに、分離した親猫同居の発症子猫からも本菌を分離した。

開業獣医師に来院した有症猫から本菌を分離し、一般家庭の猫に感染していることを確認した。当該猫は数ヶ月以前より鼻水と体調不良により他の獣医師で加療中であった。6例目の患者報告と関係機関への厚生労働省結核感染症課長通知からの感染例提供と情報提供の呼びかけ、さらに本疾患の危険性の新聞報道により、開業獣医師、地方衛生部での関心が高まったことで疫学調査が容易かつ拡大された。動物での感染実態と人環境の菌分布調査を実施することで、*C. ulcerans* によるジフテリア症の感染経路、予防対応が可能となる。

C. ulcerans と *C. diphtheriae* の生化学的な相違点は、*C. ulcerans* は Phospho Lipase D を産生すること、アミノ酸配列の解析から毒素遺伝子については *C. diphtheriae* とは異なる

ることが明らかとなった。*C. diphtheriae* の産生するジフテリア毒素の作用は、心筋炎や後麻痺と関連が明らかであるが、*C. ulcerans* の Phospho Lipase D との病原性は不明であり、今後の研究が必要である。

PFGE および毒素遺伝子の解析結果でヒト分離株とイヌ分離株が一致した事実は人への感染にイヌの介在が疑われる。現在のところ、野外での活動時間が長いイヌとネコからの菌分離が確認されており、ヒトへの感染経路に愛玩動物の関与が疑われる場合の犬や猫では、皮膚炎、風邪様症状が観察されており、飼い主の管理が求められる。

一般家庭で飼育する猫には、特に冬場では鼻水、クシャミは日常的に観察される。これらの猫は猫白血ウイルスが陽性であることも多く、これら猫は免疫力が低下していることも指摘されている。一般的にコリネ属菌は皮膚等の一般細菌叢として分離され、*C. ulcerans* もこれら細菌叢の一部として存在している可能性もある。本症のような猫の中に *C. ulcerans*^{Tox+} が潜在している可能性が示されたことは、特に免疫のないヒトへの感染に注意を要すると考えられた。

E. 結 論

1. 国内 6 例目のジフテリア様疾患患者から *C. ulcerans*^{Tox+} を分離し、患者自宅の環境調査で、自宅に集まる野良猫の 1 匹が風邪様症状を呈してクシャミ、鼻水を飛散していたために自分が感染しないように注意していたが、その後咽頭炎等が発現したことが判明した。野良猫から患者と遺伝子型が一致する菌を分離し、さらに子猫からも同菌を分離した。
2. 地方衛生研究所の研究協力者の調整可能な各自治体の動物愛護センターに搬入された犬または猫の咽頭スワブおよび屠畜場に搬入された牛または豚の咽頭スワブ等から菌分離調査を実施した。その結果、数カ所の自治体の愛護センターの猫より *C. ulcerans*^{Tox+} が分離された。

3. 国内 6 例目の患者発生事例に基づき、本菌による患者発生状況と情報提供の通知が結核感染症課長から各衛生担当者におこなわれた。これにより、日本小動物獣医師会、香川県獣医師会の感染症部会および任意の開業獣医師と共同調査を実施した。その結果、複数の地域において一般家庭で飼育している猫から当該菌を分離し、多頭飼いの同居猫にはジフテリア抗毒素を保有し過去の感染既往も確認した。
4. 野生動物と接触機会の多い猟犬についてジフテリア抗毒素保有状況を調査した結果、複数の地域の猟犬において陽性犬を確認した。これら猟犬で菌分離の追跡調査を実施した結果、同居犬の 1 頭から *C. ulcerans*^{Tox+} を分離した。
5. 畜産動物の調査として、海外では牛の乳房炎乳からの報告もあり、近畿地区で協力の得られた乳房炎罹患牛の生乳 75 検体からの菌分離は、いずれも陰性であった。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表
 - (1) Honma Y, Yoshii Y, Watanabe Y, Aoki N, Komiya T, Iwaki M, Arai H, Arakawa Y, Takahashi M, Kimura H. : A Case of Afebrile Pneumonia Caused by Non-Toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. Jpn J Infect Dis. 62(4):327-9. 2009
 - (2) Katsukawa C, Kawahara R, Inoue K, Ishii A, Yamagishi H, Kida K, Nishino S, Nagahama S, Komiya T, Iwaki M, Takahashi M. : Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* Isolated from the Domestic Dog for the First Time in Japan. Jpn J Infect Dis. 62(2):171-2. 2009

- (3) 本間康夫、吉井裕子、小宮貴子、高橋元秀：ジフテリア毒素非産生 *C. diphtheriae* が検出された3症例の検討 新潟県臨床検査技師会誌 49. 4. 平成21年

2. 学会発表

- (1) 高橋元秀、小宮貴子、山本明彦、岩城正昭、見理 剛：国内の犬・猫のジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* 保菌状況 日本獣医師会学会年次大会 平成22年1月 宮崎
- (2) 勝川千尋、山岸寛明、河井昭男、石井篤嗣、西野俊治、山本隆司、長濱伸也、小宮貴子、岩城正昭、高橋元秀：犬におけるジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* 保菌状況調査 日本獣医師会学会年次大会 平成22年1月 宮崎
- (3) 小川 高、三島浩享、新家俊樹、杉山寛治、神田 隆、高橋元秀：鼻汁より毒素原性 *Corynebacterium ulcerans* が分離された家庭猫の1例 日本獣医師会学会年次大会 平成22年1月 宮崎
- (4) T. Komiya, A. Yamamoto, M. Iwaki, T.

Kenri, Y. Noguchi, A. Tsunoda, Y. Arakawa and M. Takahashi: A human *C. ulcerans* case: isolation of the pathogen from the patient and from a cat. ELEVENTH INTERNATIONAL MEETING OF THE EUROPEAN LABORATORY WORKING GROUP ON DIPHTHERIA, ELWGD & THIRD ANNUAL MEETING OF DIPHTHERIA SURVEILLANCE NETWORK (DIPNET) 7-9 OCT. 2009 RIGA, LATVIA

- (5) 勝川千尋、山岸寛明、石井篤嗣、西野俊治、河井昭男、山本隆司、長濱伸也、小宮貴子、岩城正昭、高橋元秀：大阪府内の犬におけるジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* の保菌状況と分離菌株の解析 平成21年度日本獣医公衆衛生学会（近畿）

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

平成 21 年度研究組織：協力者（敬称略）

国立感染症研究所：小宮貴子、岩城正昭、山本明彦、見理 剛（細菌第二部）、平井明香、網康至、須崎百合子（動物管理室）

栃木県：今井一穂、船渡川圭次（栃木県保健環境センター 微生物部）、佐伯貴之、新堀精一（栃木県動物愛護指導センター）

神奈川県：渡辺祐子（神奈川県衛生研究所）、動物保護センター

静岡県：杉山寛治、神田 隆（静岡県環境衛生科学研究所）、小川 高、三島浩享、新家俊樹（小川動物病院）

大阪府：勝川千尋（大阪府立公衆衛生研究所）、大阪府動物愛護畜産課、上利尚大（岐阜大学 応用生物科学部）、大阪府下獣医科医院；鶴山台動物病院、ひらの動物病院、エイムペットクリニック、クッキー動物病院、いしづか動物病院、のぞみ野動物病院、まつおか動物病院、たんぼぼ動物病院、さつき台動物病院、さとう動物病院、大下動物病院、北千里動物病院、リーフ動物病院

富山県：木全恵子、磯部順子（富山県衛生研究所）、廣田昌幸（富山県動物管理センター）

岡山県：中嶋洋、岸本壽男、橋本英典、東正秋、藤原慎一（岡山県環境保健センター）、安井正広、井戸司（岡山県食肉衛生検査所）、木本有美（春名動物病院）、木口修（木口犬猫病院）、赤木敏文（児島動物病院）、瀧本良幸（タキモト動物病院）、鳥越秀二（鳥越動物病院）

山口県：富永 潔、野村恭晴、矢端順子（山口県環境保健センター）

愛媛県：烏谷竜哉、浅野由紀子、田中 博（愛媛県衛生環境研究所）

大分県：若松正人、緒方喜久代（大分県衛生環境研究センター）、濡木真一（大分大学医学部附属病院）

東京医科歯科大学：野口佳裕、角田篤信、喜多村 健（耳鼻咽喉科）

大阪府立大学大学院：幸田知子、伊藤広記、向本雅郁、小崎俊司（生命環境科学研究科 獣医感染症学教室）

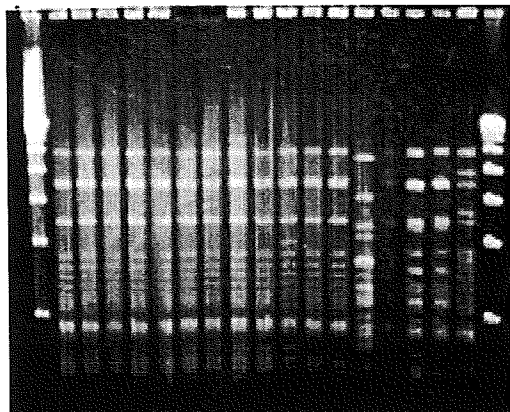
岐阜大学：柳井徳磨、朝倉亜紀（応用生物科学部獣医病理学教室）

平成21年度に実施した調査結果

都道府県	対象施設	対象動物	材料	調査数	菌陽性数	抗体陽性数
A	動物管理センター	犬	咽頭スワブ	76	0	ND
B	獣医師会 畜産課	猫	咽頭スワブ	32	2	ND
		アライグマ	咽頭スワブ	55	0	ND
		ハト		26	0	ND
C	動物管理センター	猫	咽頭スワブ	78		ND
D	動物管理センター "	犬	咽頭スワブ	63	5	ND
		猫	咽頭スワブ	29		ND
E	動物管理センター "	犬	咽頭スワブ	50	1	ND
		猫	咽頭スワブ	51	4	ND
F	獣医師会 "	犬	咽頭スワブ	36	0	ND
		猫	咽頭スワブ	27	0	ND
G	動物管理センター "	犬	咽頭スワブ	11	0	ND
		猫	耳垢	2	0	ND
H	獣医師会 動物管理センター " と畜場	猫	咽頭スワブ	36	0	ND
		犬	咽頭スワブ	27	0	ND
		猫	咽頭スワブ	85	5	ND
		牛	鼻腔スワブ等	65	0	ND
静岡県	獣医師会	猫	鼻水等	1	1	1
香川県	獣医師会 "	猫	鼻水等	85	7	
		犬	鼻水等	10	0	11
岐阜大 (西日本)	猟師	猟犬	鼻腔スワブ等	154	2	13
大阪府立大 (大阪府、 奈良県)	保健所	乳用牛	乳	75	0	ND
	獣医臨床センター	猫	咽頭スワブ	3	0	ND
	食肉流通センター	肉用牛	咽頭スワブ	124	0	ND
	動物園	サル	咽頭スワブ	22	0	ND
		ペンギン	咽頭スワブ	5	0	ND

PFGEによる6例目患者と親ネコ、仔ネコ由来菌株の比較

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



M: DNAラムダラダーマーカー

- 1: 患者
- 2: 親ネコ
- 9: 仔ネコ
- 10: 千葉ヒト由来1
- 11: 千葉ヒト由来2
- 12: 岡山ヒト由来
- 13: 大分ヒト由来

└ 242.5 kb
└ 194.0
└ 145.5
└ 97.0

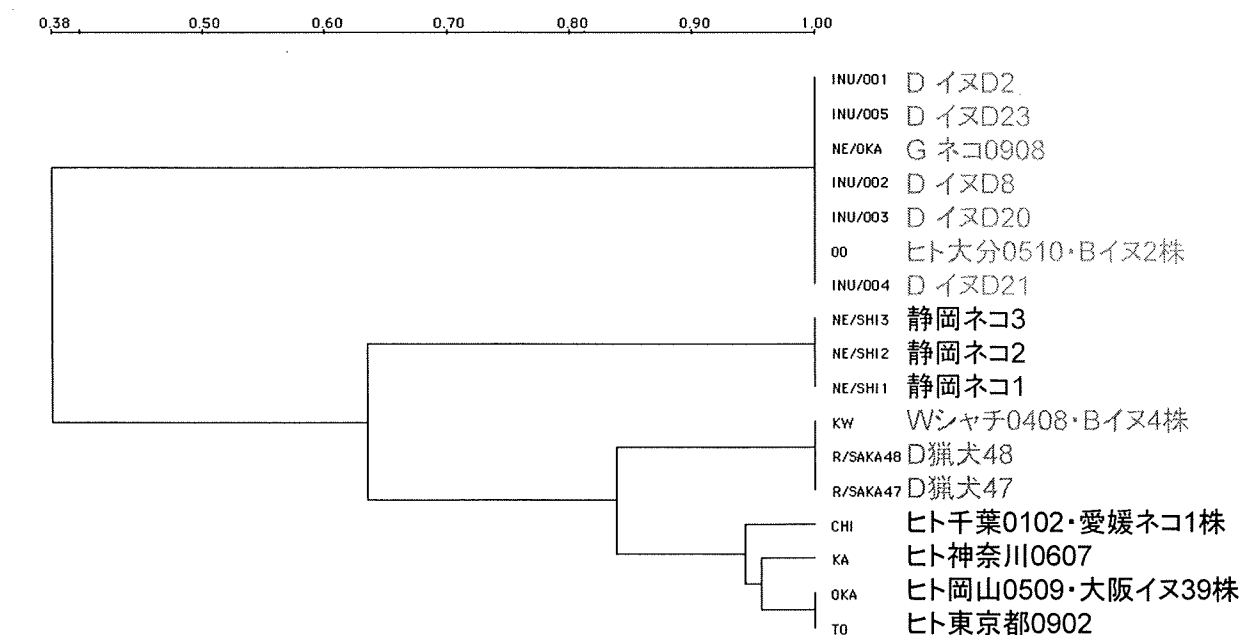
└ 48.5

No.1, 2, 9は100%同じタイプであり
No.10,11,12の千葉・岡山株とほぼ同じタイプであった。

BIO-RAD CHEF DR II 制限酵素 Sfi I

患者、親ネコ、仔ネコの3菌株の遺伝子タイプが一致したことから
ネコが感染源である可能性が高いとみられた。

本年までに分離されたジフテリア毒素産生性 *C.ulcerans* の PFGE 系統樹



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

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

研究分担者	今岡 浩一	国立感染症研究所	獣医科学部	第1室長
研究分担者	木村 昌伸	国立感染症研究所	獣医科学部	研究員
研究分担者	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。野生動物におけるブルセラ症の存在を確認するために、日本各地から野生イノシシおよびニホンジカの血液サンプルを入手し、家畜ブルセラ菌 (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) とイヌブルセラ菌 (*B. canis*) に対する抗体保有状況をマイクロプレート凝集反応 (MAT) により検討した。これまでに入手したイノシシ 334 サンプル中、家畜ブルセラ菌に対し 2 サンプル (0.6%) が、*B. canis* に対し 32 サンプル (9.6%) が、それぞれ抗体陽性を示した。ニホンジカ 97 サンプルについては、*B. canis* に対し 1 サンプル (1.0%) が抗体陽性を示した。抗体陽性サンプルは、*B. canis* を抗原として用いたウェスタンブロッティング (WB) でも陽性を示した。さらに、血液サンプルから DNA を抽出し、標的遺伝子の異なる 4 セットのブルセラ特異的プライマーを用いた PCR を実施した。抗体陽性サンプルでは、イノシシで 21/34、ニホンジカで 1/1 が 4 セットのプライマーのいずれかで陽性となった。増幅産物のシーケンスを確認したところ *B. canis* 遺伝子と 100% 配列が一致した。

血液サンプルから MAT、WB により抗ブルセラ抗体を検出し、さらに PCR と産物のシーケンスによりブルセラ特異的遺伝子も検出された。国内のイノシシとニホンジカのブルセラ属菌感染が示唆されるが、確定には、他菌との交差反応の確認も含め、さらに検証が必要である。

A. 研究目的

ブルセラ症 (brucellosis) 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重要な人獣共通感染症である。

近年、国内では、2002 年に千葉、2007 年に広島、2008 年に福井でウシブルセラ病とされたウシが報告されているが、菌が分離されたケー

スはない。したがって国内では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診断されるウシが報告される。仮に、家畜ブルセラ菌が国内に、依然、存在していると考えれば、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。事実、米国ではバッファローなど野生動物が、家畜への感染源となっているところもある。そこで、ブルセラ属菌の宿主

となりうる、国内の野生イノシシおよびニホンジ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。

なお、ヒト症例については、日本国内では感染症法による患者の届出が始まって以来、現在までに15例の報告がある(表1)。このうち家畜ブルセラ菌に感染した5例は、すべて輸入感染例であり、国内家畜からの感染例は報告されていない。国内感染とされる物はすべて *Brucella canis* 感染症例である。

B. 研究方法

1. 血液サンプルの採取：今年度は、四国4県を中心に、大日本猟友会の協力によりイノシシもしくはニホンジカの血液サンプルを収集した。サンプルの採取と回収の方法は昨年度の報告に準じた。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。

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：家畜ブルセラ菌 (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) については、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 (*B. abortus* 死菌液、農業・生物系特定産業技術研究機構) を、*B. canis* については、犬ブルセラ病診断用菌液 (*B. canis* 死菌液、北里研究所) を用いて、0.005% サフラニン加凝集反応用菌液を調整した。イノシシおよびニホンジカサンプル血清 (液量 25 μ l) を 96 穴 U 底マイクロプレート上で 10 倍から 2 倍段階希釈し、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。家畜ブルセラ菌に対しては、保湿環境で 37℃、18-24 時間反応させた後に、40 倍希釈以上で凝集像の確認された物を陽性と判定した。*B. canis* に対しては、50℃、24 時間反応させた後に、160 倍希釈以上で凝集像の確認された物を陽性と判定した。また、*B. canis* 抗原濃度を OD600 = 2.5 (家畜ブルセラ菌検査

と同条件) としたときの反応も同様に検討した。この場合は 40 倍以上で凝集像の確認された物が陽性となる (図 1)。

3. ウェスタンブロッティング (WB) による抗ブルセラ抗体の検出：*B. canis* 浮遊液を 0.5% n-lauroylsarcosine 溶液に調整し、室温で 24 時間反応後、遠心 (3,000 xg, 15min.)、さらに上清を超遠心 (100,000 xg, 72h) し、その上清を抗原 (SE: lauroylsarcosine extract) とした。SE は同量のサンプルバッファーと混合、加熱処理 (99℃, 5min) し、SDS-PAGE で泳動 (10 μ g/well) 後、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。ブロッキング済みの PVDF 膜に 250 倍希釈した陽性対照イヌ血清、イノシシ血清を 1 時間反応後、2 次抗体として anti-Dog IgG-HRP IgG (KPL)、anti-Pig IgG-HRP IgG (BETHYL) を 1 時間反応させた。発色には、EzWestBlue (ATTO) を用いた。

4. PCR によるブルセラ特異的遺伝子の検出：血清または血球より SepaGene (三光純薬) を用いて DNA を抽出し、テンプレートとした。*B. canis* の *omp2*、*omp31* 遺伝子を標的とした 4 セットのプライマーを用いることで公衆衛生上重要なブルセラ 4 菌種 (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis*) が識別可能な PCR 法 (今岡ら 2003) によりブルセラ遺伝子の検出を行った。

5. PCR 産物のシーケンス確認：PCR 産物を泳動後、アガロースゲルからバンド (増幅産物) を切り出し、GPX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Bio-Science Corp.) で精製した。精製済みテンプレートを BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) で処理し、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いてシーケンスを解析した。

C. 研究結果

1. 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。イノシシは18県から2005-6年シーズン98頭、2007-8年68頭、2008-9年87頭、2009-10年34頭（1/12現在）の合計334頭、ニホンジカは14県から2007-8年38頭、2008-9年58頭、2009-10年1頭（1/12現在）の合計97頭であった。

2. MATによる検査結果：家畜ブルセラ菌に対しては、愛媛県と鹿児島県のそれぞれイノシシ1サンプルが抗体陽性を示し、全体ではイノシシ334頭のうち2頭（0.6%）が、家畜ブルセラ菌に対し抗体陽性となった。ニホンジカのサンプルはすべて1:10以下であり、家畜ブルセラ菌に対する抗体は確認されなかった（表2）。*B. canis* に対しては、溶血による擬陽性を排除するため抗原濃度をOD600=0.7で検査し、陽性となったサンプルを抗原濃度OD600=2.5でさらに確認判定した。その結果、イノシシ334頭のうち32頭（9.6%、10県）、ニホンジカ97頭のうち1頭が*B. canis* に対し抗体陽性となった（表2）。

3. WBによる検査結果：イノシシサンプルのうち、家畜ブルセラ菌に対する抗体陽性の2サンプルと*B. canis* 抗体陽性12サンプルについて、SEとの反応性を検討した。*B. canis* 抗体陽性の1サンプルを除く13サンプルで特異的な13-kD付近のバンドが認められた（図2）。

4. PCRによるブルセラ特異的遺伝子の検出：*B. canis* に対し抗体陽性となったイノシシ32サンプル中21サンプルが、4つのプライマーセットのうちいずれかで陽性となった。また、そのうち5サンプルで*B. canis* と同一の3種の増幅パターンが確認された（表3、図3）。家畜ブルセラ菌抗体陽性の2サンプルからは、ブルセラ特異的遺伝子は検出されなかった。ニホンジカの*B. canis* 抗体陽性の1サンプルは、*B. canis*

の増幅パターンを示した（表3、図3）。

5. PCR増幅産物のシーケンス確認：PCRで*B. canis* の増幅パターンを示したイノシシ1サンプルについて各増幅産物のシーケンスを確認したところ、ブルセラ属内で保存性の高い*bcs31* の増幅領域では100%ブルセラ属菌の配列と一致した。*omp31* の増幅領域の配列は、*B. abortus* を除くブルセラ属菌と100%一致した。*omp2* の増幅産物は、*B. canis* と*B. suis* の配列と100%一致した（図4）。

D. 考察

B. canis の凝集反応では溶血サンプル中のヘモグロビンが擬陽性をもたらすことが知られている。そこで、抗原濃度を上げることにより溶血の影響を排除し最終判定とした（図1）。今回の検討において国内の野生イノシシ血液334サンプルにおいて家畜ブルセラ菌対し2サンプル（0.6%）が、*B. canis* 対し32サンプル（9.6%）が抗体陽性を示した。とくに四国4県では、*B. canis* 対し19/94（20.2%）と高い陽性率を示した。また、家畜ブルセラ菌抗体陽性の2サンプルはそれぞれ愛媛県と鹿児島県由来であった。家畜ブルセラ菌と*B. canis* それぞれに対する陽性サンプルをWBで確認したところ抗ブルセラ抗体特異的なサイズのバンドが検出された。家畜ブルセラ菌陽性サンプルからは、ブルセラ特異的遺伝子は検出されなかったが、*B. canis* 抗体陽性サンプルは、PCRで*B. canis* の増幅パターンを示し、増幅産物のシーケンスは、*B. canis* の配列と100%一致した。国内では*B. canis* の存在は、イヌ繁殖施設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おり、国内感染による患者も報告されている（表1）。今回、イノシシとニホンジカの血液サンプルよりMAT、WBにより抗*B. canis* 抗体を検出し、さらにPCRと産物のシーケンスにより*B. canis* 特異的遺伝子を検出した。イノシシ2

サンプルからは MAT と WB により抗家畜ブルセラ菌抗体も検出されたが、ブルセラ特異的遺伝子は検出されなかったことから、交差反応の可能性もあり、さらに検証が必要である。今後は、菌分離も視野に入れ IFA、ELISA などの手法も用いて国内の野生イノシシ、ニホンジカのブルセラ属菌感染について、検討をすすめることが必要であると考え。また、より特異的な抗体検査法の開発も必要であり、現在、ブルセラ特異的抗原の組み替えタンパクを作成中で、今後は、組換えタンパクを用いた検証も行う予定である。

E. 結論

血液サンプルから MAT、WB により抗 *B. canis* 抗体を検出し、さらに PCR と産物のシーケンスにより *B. canis* 特異的遺伝子が検出されたことで国内のイノシシとニホンジカの *B. canis* 感染が示唆された。今回の検討では、家畜ブルセラ菌抗体陽性のイノシシ2サンプルからは、ブルセラ特異的遺伝子は検出されなかった。これについては交差反応も考えられるが、家畜ブルセラ菌感染を否定することもできない。また、四国4県のサンプルからの検出率が他地域より高い理由も不明である。ブルセラ属菌は、公衆衛生上、重要な人獣共通感染症の原因菌であり、さらなる検討が必要であると考え。

F. 健康危害情報

なし。

G. 研究発表等

1. 論文発表等

(1) 今岡浩一. 犬ブルセラ症の現状と課題. 日本獣医師会誌, 62(1): 5-12, 2009

(2) 今岡浩一. ブルセラ症の最近の話題. モダンメディア, 55(3): 76-85, 2009

(3) 今岡浩一, 高橋英之. エルシニア症. in : ズーノーシスハンドブック (岸本寿男, 山田章雄 監修), メディカルサイエンス社, pp.118-120, 2009

(4) 今岡浩一. ブルセラ症. in : ズーノーシスハンドブック (岸本寿男, 山田章雄 監修), メディカルサイエンス社, pp.156-158, 2009

(5) 今岡浩一. ブルセラ症 -人・家畜・犬-. 獣医畜産新報, 62(6): 457-461, 2009

(6) 内田幸憲, 鎌倉和政, 後藤郁夫, 杉本昌生, 山本和正, 丸山総一, 福士秀人, 今岡浩一, 岸本壽男, 吉川泰弘. 動物病院勤務者の人獣共通感染症にかかわる健康調査. 獣医畜産新報, 62(6): 485-487, 2009

(7) 今岡浩一. 犬, 猫由来細菌感染症. 獣医学雑誌, 13(1): 65-70, 2009

2. 学会発表・講演等

(1) 今岡浩一, 野村篤史, 今西一, 木村昌伸, 鈴木道雄, 山田章雄, 志水英明. *Brucella canis* 感染症例とその背景, 事後対応. 第83回日本感染症学会総会, 東京, 2009年4月, 感染症学雑誌 83:S233, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表1) ブルセラ症の国内事例 (感染症法指定後、1999.4.1~2009.1.31)

診断年月	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
					<i>abortus</i>	<i>canis</i>	
2002.1	東京都	不明	ペットの犬	発熱、食欲不振	—	陽性	(-)
2005.6	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	陽性	陽性	<i>melitensis</i>
2005.12	長野県	国内	不明	発熱、筋肉痛、腹痛	—	陽性	(-)
2006.2	東京都	エジプト	不明 (吸入疑い)	発熱、頭痛、肝脾腫	陽性	—	<i>melitensis</i>
2006.6	長野県	イタリア	不明	発熱、筋肉痛	—	陽性	(-)
2006.7	北海道 (エジプト人)	エジプト	経口 (ミルク)	発熱、頭痛	陽性	—	(<i>abortus</i>)
2006.9	長野県	長野県	不明	発熱、脾腫	—	陽性	(-)
2006.10	宮城県	宮城県	不明	発熱、中枢神経症状	—	陽性	(-)
2007.4	大阪府	大阪府	イヌ	リンパ節腫脹、倦怠感	—	陽性	(-)
2008.6	埼玉県	埼玉県	飼い犬	発熱、関節炎、筋炎	—	陽性	(-)
2008.7	静岡県 (ペルー人)	ペルー	経口感染	発熱、痛み、全身倦怠感	陽性	—	(<i>abortus</i>)
2008.8	愛知県	愛知県	繁殖犬	発熱、脾腫、肝腫大	—	陽性	<i>canis</i>
2008.8	愛知県	愛知県	繁殖犬	発熱	—	陽性	<i>canis</i>
2009.4	埼玉県	埼玉県	繁殖犬	(無症状病原体保有者)	—	陽性	(-)
2009.10	東京都 (インド人)	インド	経口 (チーズ)	発熱、脾腫、リンパ節腫脹、 関節炎、肝腫大	陽性	陽性	<i>melitensis</i>

*: 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。BAは40倍、BCは160倍以上が陽性。

表2) サンプルプロファイルと抗体陽性数

イノシシ (*Sus scrofa leucomystax*)

地域	その他	2005-06 (12-2月)	2007-08 (11-1月)	2008-09 (11-1月)	2009-10 (11-1月 12日)	合計	抗体陽性	
							<i>B. abortus</i>	<i>B. canis</i>
千葉		14	7	5		26	0	2
長野		2		1		3	0	1
静岡		32	8	13		53	0	6
滋賀	8					8	0	0
岐阜	19					19	0	0
愛知	20			1		21	0	0
三重			2	4		6	0	0
兵庫		5	1	3		9	0	0
鳥取		1	7	8		16	0	0
広島		14	3	5		22	0	1
徳島			3	4	8	15	0	2
香川			5	6	18	29	0	4
愛媛			11	14	6	31	1	8
高知		14	3	2	2	19	0	5
熊本		12	9	8		29	0	1
大分		3	4	2		9	0	0
宮崎			3	4		7	0	0
鹿児島		1	2	7		10	1	2
合計	47	98	68	87	34	334	2 (0.6%)	32 (9.6%)

ニホンジカ (*Cervus nippon*)

地域	2007-08 (11-1月)	2008-09 (11-1月)	2009-10 (11-1月 12日)	合計	抗体陽性	
					<i>B. abortus</i>	<i>B. canis</i>
北海道	6	11		17	0	0
岩手	3	8		11	0	0
栃木	6	5		11	0	0
千葉	2	3		5	0	0
静岡	2	2		4	0	0
長野	5	11		16	0	0
兵庫		1		1	0	0
広島	2	3		5	0	0
徳島	3	2		5	0	0
愛媛			1	1	0	0
熊本		4		4	0	1
大分	1	2		3	0	0
宮崎	5	5		10	0	0
鹿児島	3	1		4	0	0
合計	38	58	1	97	0	1 (1.0%)

表3) PCRによる遺伝子検出の結果

標的遺伝子 プライマーセット	<i>bcp31</i>	<i>omp2</i>		<i>omp31</i>
	B4/B5	JFP/JPRab	JPF/JPRca	1A/1AS
<i>B. canis</i>	+	-	+	+
<i>B. abortus</i>	+	-	+	-
<i>B. melitensis</i>	+	+	-	+
<i>B. suis</i>	+	+	+	+

イノシシ

	3	<i>omp2</i>			
		B4/B5	JFP/JPRab	JPF/JPRca	1A/1AS
05	21	-	-	-	-
	27	-	-	+	-
	32	+	-	+	+
	37	+	-	+	-
	63	+	-	+	+
	80	+	-	+	-
	85	+	-	-	-
	93	-	-	-	-
07	4	-	-	+	-
	8	-	-	-	-
	20	+	-	-	-
	49	-	-	-	-
	60	-	-	+	-
	62	+	-	+	-
	63	-	-	-	-
	68	-	-	-	-

	3	<i>omp2</i>			
		B4/B5	JFP/JPRab	JPF/JPRca	1A/1AS
08	13	+	-	-	-
	21	-	-	+	-
	24	+	-	-	-
	25	+	-	+	+
	28	+	-	-	-
	31	-	-	+	+
	33	-	-	-	-
	61	+	-	+	+
	70	+	-	+	+
	85	+	-	-	+
09	87*	-	-	-	-
	18	-	-	-	-
	19*	-	-	-	-
	21	+	-	-	-
	22	+	-	+	-
	34	-	-	-	-

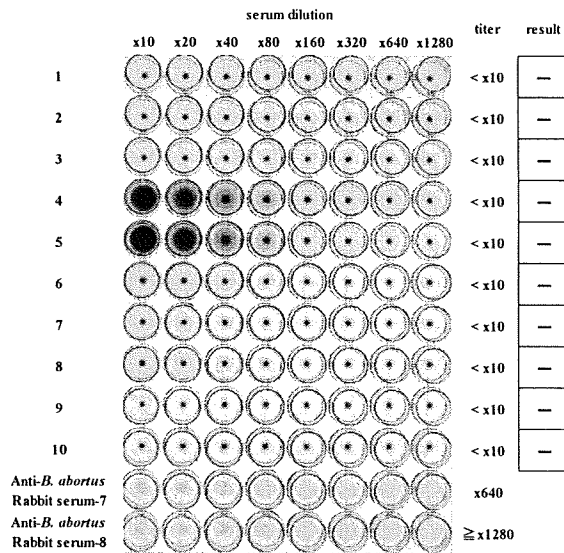
*: 家畜ブルセラ菌抗体陽性、イヌブルセラ菌抗体陽性

シカ

	3	<i>omp2</i>			
	B4/B5	JFP/JPRab	JPF/JPRca	1A/1AS	
08	50	+	-	+	+

図1) MATによる抗体検出

B. abortus (OD600 = 2.5)



B. canis (OD 600 = 2.5)

