

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.

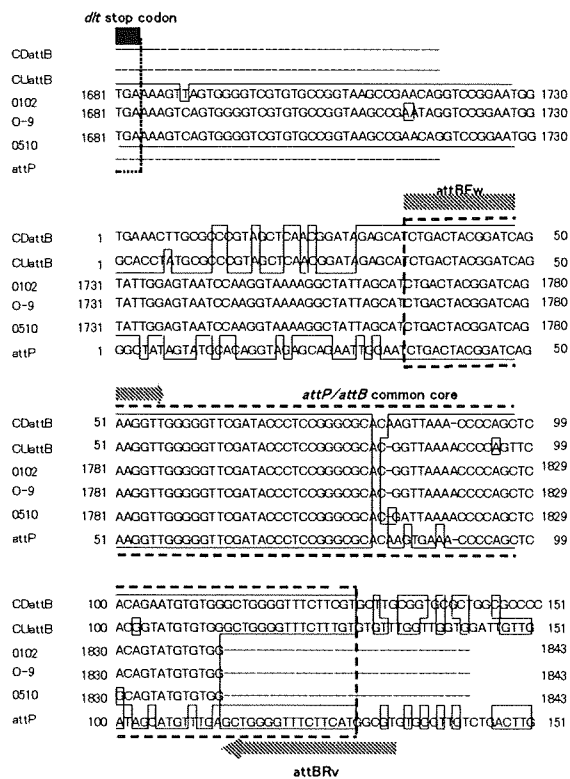


Fig. 5 Alignment of the nucleotide sequences of attachment site genes from *C. ulcerans* isolates 0102, O-9, 0510, *C. ulcerans attB*-related site, *C. diphtheriae attB*-related site, and corynephage-gamma DNA for the *attP* site.

表 6 . 分離株の Vero 細胞変性活性の比較

分離株名	CD ₅₀ /25 μ L *1	1IU/mL Diph-AT 中和*2
0102	1 1	完全中和
0210	5	3 CD ₅₀ /25 μ L
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 μ L 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	

(2)

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	
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	
たんぼ動物病院	1	11月24日	陰性	陰性	(病:両脇に発赤)
たんぼ動物病院	1	11月24日	陰性	陰性	
たんぼ動物病院	2	11月24日	陰性	陰性	
たんぼ動物病院	3	11月26日	陰性	陰性	
たんぼ動物病院	4	12月4日	陰性	陰性	
たんぼ動物病院	5	12月5日	陰性	陰性	
たんぼ動物病院	6	12月17日	陰性	陰性	
たんぼ動物病院	7	12月18日	陰性	陰性	
たんぼ動物病院	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、アピ-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	(病:結膜、涙目)
柿原犬猫病院	1	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	2	11月28日	陰性	陰性	
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	
アロー動物病院	1	11月19日	陰性	陰性	
アロー動物病院	2	11月21日	陰性	陰性	
アロー動物病院	3	11月22日	陰性	陰性	
アロー動物病院	4	12月4日	陰性	陰性	
アロー動物病院	5	12月20日	陰性	陰性	
アロー動物病院	6	12月25日	陰性	陰性	
アロー動物病院	7	1月11日	陰性	陰性	
アロー動物病院	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られると、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載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°C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25 µl）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°C、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:最初の分離

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

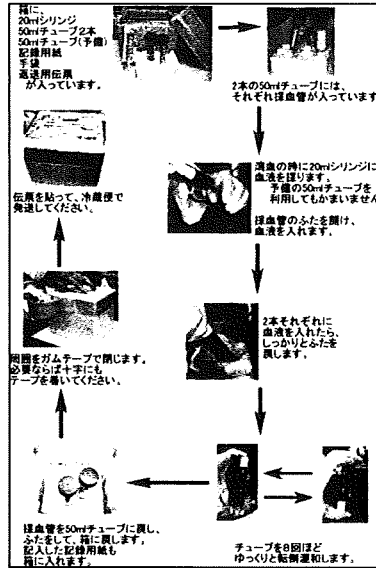
地域	採取年	検体数
滋賀県*	1991-92 (12-1月)	8
岐阜県*	1991-92 (12-1月)	7
岐阜県*	2003 (6-9月)	12
愛知県**	2006 (9-10月)	20

* 岐阜大学より分与

** 西三河家畜保健衛生所より分与

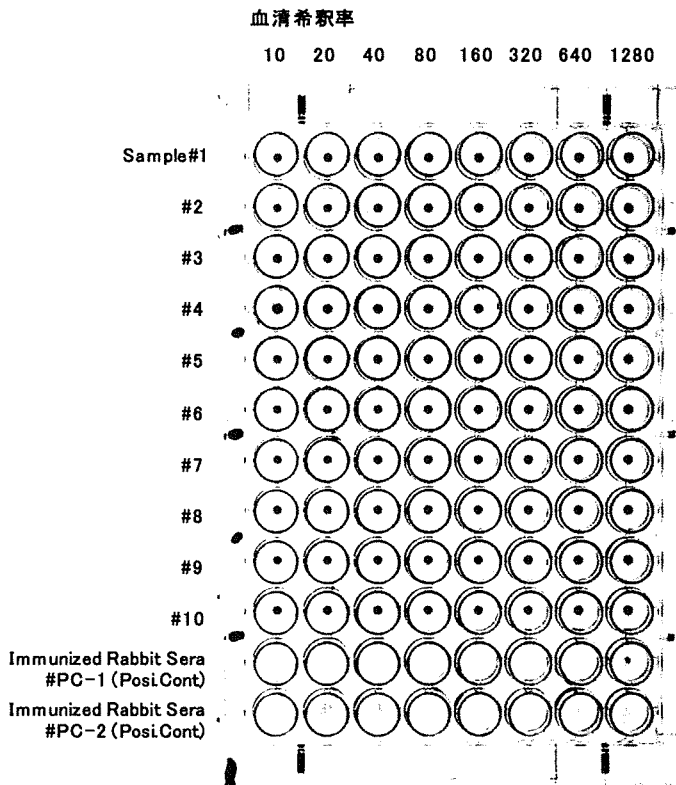
図1) サンプル採取方法

- イノシシ・シカ血液サンプルの採取と送付方法**
1. 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、返送用伝票
が入っています。
 2. イノシシ・シカを瀕血するときに、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。）
 3. 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。）
 4. 採血管のふたをしっかりと閉めます。
 5. 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。
 6. 採血管を 50ml チューブに戻し、ふたを閉めます。
 7. 50ml チューブ（2本）を容器立てに立てます。
 8. 記録ラベルに採取日・場所などを記入します。
 9. 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。
 10. ふたに沿ってグ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。
 11. 同封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にご注意ください。



記録用紙	[イノシシ・シカ]	(大で送ってください)
	[オス・メス]	
推定体重	kg.	推定年齢
採取日	月 日	才
採取場所	県市町村	
	地区	
	メッシュ番号	
採取者	責任者氏名	
	同居所	
	協力者氏名	
	協力者氏名	

図2) MAT による検出例



Streptobacillus moniliformis 検出法の確立と国内野生ラットにおける保有状況およびクマネズミ咬傷により鼠咬症が疑われた症例からの同定に関する研究

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
協力研究者	中込 大樹	山梨大学医学部附属病院皮膚科
協力研究者	出口 順啓	山梨大学医学部附属病院皮膚科
協力研究者	矢ヶ崎 晶子	山梨大学医学部附属病院皮膚科
協力研究者	原田 和俊	山梨大学医学部附属病院皮膚科
協力研究者	柴垣 直孝	山梨大学医学部附属病院皮膚科
協力研究者	島田 眞路	山梨大学医学部附属病院皮膚科 教授
協力研究者	谷川 力	イカリ消毒(株)技術研究所 所長

研究要旨： 鼠咬症原因菌の1つである *Streptobacillus moniliformis* の特異的検出法として特異的 PCR 法を確立した。本 PCR 法を用いて、国内野生ラット（ドブネズミおよびクマネズミ）の口腔内における *S. moniliformis* 保有状況の調査を行ったところ、ドブネズミで 92%、クマネズミで 58% が保菌していた。また、得られた野生分離株と ATCC 株を比較したところ、生化学性状は、全ての株間において良く一致していたが、16S-rRNA 遺伝子配列は、ドブネズミ株は ATCC 株とよく一致していたものの、クマネズミ株では変異が認められた。

クマネズミに咬まれた後、発熱、発疹等の症状を呈した鼠咬症が疑われる患者を検査する機会を得た。血液培養および患部からの菌の分離は出来なかったが、我々の開発した PCR 法により咬傷部痂皮から *S. moniliformis* 特異的遺伝子を検出した。また、患者サンプルおよび患者宅捕獲クマネズミの口腔スワブから増幅された *S. moniliformis* 特異的 16S-rRNA 遺伝子配列も一致していた。クマネズミ保有株による鼠咬症が確認された初めての報告である。

A. 研究目的

鼠咬症の原因菌の1つである *Streptobacillus moniliformis*（グラム陰性、多形性桿菌、好気性もしくは通性嫌気性）は主にラットの口腔内に存在する。ヒトにおける感染は、アメリカ大陸ほか、世界中で報告されている。ヒトへの感染経路は、感染ラットによる咬傷、接触、その他

汚染したものによる経口感染である。発熱、悪寒、筋肉痛、関節痛、四肢の斑状丘疹状発疹、敗血症性関節炎などが主な症状であり、治療を行わない場合の致死率は 10 %とされる。診断は、血液、関節液、発疹滲出液の培養によりおこなうが、栄養要求の厳しい細菌であり、培養には一般的な組成の培地による培養は困難である。感染時に有効とされる薬剤としては、ペ

ニシリン、アンピシリン、テトラサイクリンなどがある。

かねてより国内における鼠咬症の危険性の確認と診断法を確立する目的から、*S. moniliformis* 検出法の検討、および屋外と屋内の野生ラットにおける保菌状況の調査を行っている。今回、我々が野生ラットより分離した株と ATCC 株の生化学性状および 16S-rRNA の遺伝子配列を比較・検討した。

また、国内で発生した鼠咬症が疑われた 1 症例について、我々の開発した PCR 法の臨床診断における有用性を検証する機会を得た。

B. 研究方法

1. サンプル（口腔内スワブ）：野生ラットを捕獲し、口腔・咽喉頭スワブを、BD BBL カルチャースワブ・プラス（#212553）を用いて採取した。屋外捕獲ラットは、いずれもドブネズミ（*Rattus norvegicus*）であった。屋内捕獲ラットは、2 匹がドブネズミであったが、ほかはすべてクマネズミ（*Rattus rattus*）であった（表 1）。

2. サンプル処理と培養：スワブを ATCC medium 488 broth 1 ml に希釈し、10 µl を ATCC medium 488 agar で、37°C、5% CO₂ 存在下および微好気下で培養し、残りは ATCC488 broth 8 ml を用いて 37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。その後の分離培養は、colisin-nalidixic acid と sulfamethoxazole-trimethoprim を含む ATCC488 agar を用いて、嫌気条件下で行った。陽性対照菌株には、*S. moniliformis* ATCC14647 (Type strain)、ATCC49567、ATCC49940 株を用いた。

3. DNA の検出：培養後の ATCC488 broth および ATCC488 agar 上のコロニーから S5/AS2 プライマーを用いた PCR により *S. moniliformis* 特異的 16S-rRNA 遺伝子の検出を行った。分離株は、16S-rRNA のユニバーサルプライマー (27f、

1492r) と S5、AS2 を適宜組み合わせ、遺伝子解析を行った。

4. 分離株の生化学性状試験：ATCC 株 (3 株)、ラット分離株 (ドブネズミ由来 4 株、クマネズミ由来 3 株) について API20 (API Laboratory Products)、IDtest NF-18 (日水製薬株式会社)、BACTOLABO oxidase test (和光純薬工業株式会社) を用いて表 2 に示す検査項目について生化学性状の検査・比較を行った。

5. 鼠咬症例の解析：

患者：M 市在住、74 才、女性

経緯：自宅にて鼠（頭胴長 15 cm）に右手の第 2、3 指を咬まれた。

症状：咬傷後 5 日より発熱、関節痛、筋肉痛、全身倦怠感、10 日より四肢に紅斑が出現し病院を受診。血液培養は陰性。

PCR：急性期の患者血清、血清培養上澄、咬傷部痂皮から抽出した DNA をテンプレートとして S5/AS2 プライマーを用いた *S. moniliformis* 特異的 PCR を実施した。さらに患者宅においてトラップによりクマネズミ 2 頭を捕獲し、口腔スワブサンプルを採取し ATCC488 broth にて培養後、上澄から DNA を抽出し、同じく PCR を実施した。

16S-rRNA 遺伝子のシーケンス：PCR 陽性であった患者咬傷部痂皮および患者宅捕獲クマネズミ口腔スワブ培養から *S. moniliformis* 特異的 16S rRNA 遺伝子断片を増幅しシーケンス解析を実施し、2 つの遺伝子断片の配列を比較した。さらに ATCC 株、野生ラット分離株の 16S rRNA 遺伝子配列と比較検討を行った。

C. 研究結果

1. 野生ラットにおける保菌率：我々の開発した PCR 法によるドブネズミおよびクマネズミの口腔内における *S. moniliformis* 保有状況は、ドブネズミで 92%、クマネズミで 58% と高率で

あった(表1)。

2. 遺伝子解析： 分離株の16S-rRNAの遺伝子配列を比較したところ、ドブネズミはATCC14647株(Z35305)と高い相同性を示した。一方、クマネズミはドブネズミと異なる配列を示し、またクマネズミの中でも2種類の株があった。

3. 生化学的性状の比較： エスクリン加水分解性においてATCC49940株に不一致がみとめられたが、それ以外の検査項目では、ATCC3株と野生ラット分離7株の全ての株間で良く一致した結果を示した(表2)。

4. 患者からの検出： 患者咬傷部痂皮より*S. moniliformis*特異的遺伝子が検出された(図1)。血清その他の検体からは検出されなかった。また、患者咬傷部痂皮および患者宅捕獲クマネズミの口腔スワブ培養から増幅された*S. moniliformis*特異的16S-rRNA遺伝子のシーケンスは100%一致した。さらに、それら2つの遺伝子断片とATCC株、野生ラット分離株の配列を比較したところクマネズミ分離株の1亜系と100%一致した。

D. 考察

ヒトの*S. moniliformis*感染は世界中で知られ、米国だけでも200例以上の報告があり2003年には、2例の死亡例が発生している。今回の調査により国内の野生ラットが*S. moniliformis*を高率に保菌していることが確認された。近年では、これら野生ラットが都市の住宅地、飲食店街等へ侵入することによる衛生被害が問題になってきている。そのため、我が国でも、今後、野生ラットによる咬症、飲食物の汚染を原因とするヒトの*S. moniliformis*感染が懸念される。

今回の症例では血液培養が、陰性であっても患者生体サンプルのPCRにより鼠咬症の診断

がなされた。本研究において開発した*S. moniliformis*特異的PCRは鼠咬症の臨床診断に有効であることが示された。

ドブネズミとクマネズミそれぞれの分離株の生化学的性状は、ATCC株とよく一致していたが、16S rRNA遺伝子シーケンスの検討からドブネズミとクマネズミでは保菌している*S. moniliformis*株が異なっていることが明らかとなった。ドブネズミ咬傷及びドブネズミ保有株によると考えられる鼠咬症例は、近年も複数報告があるが、クマネズミおよびクマネズミ関連株による発症例は報告されておらず、クマネズミ保有株の病原性は不明であった。今回、患者と患者宅捕獲クマネズミより増幅された*S. moniliformis*特異的遺伝子断片のシーケンスが一致し、さらにクマネズミ分離株の1タイプのシーケンスとも一致した。患者はクマネズミ咬傷によりクマネズミ関連株に感染し鼠咬症を発症したと考えられる。屋外が主であるドブネズミの生息域に対し、クマネズミは、家屋内に棲んでおり、より人との接触機会が多いと考えられる。しかし鼠咬症例の原因ラットとしてはドブネズミのみ報告がある。今回の症例は鼠咬症原因菌としてクマネズミ関連株が確認された最初の鼠咬症例であり、今後、鼠咬症原因動物としてドブネズミだけでなくクマネズミにも注意する必要があるだろう。

E. 結論

国内の野生ラット(ドブネズミおよびクマネズミ)の*S. moniliformis*の保菌状況の調査を行い、高率に保菌していることを明らかにした。

また、今回の症例検討より、血液培養による菌検出が陰性であっても、われわれの開発したPCRによる診断が有効であることが示された。ドブネズミとクマネズミでは、保菌している*S. moniliformis*株が異なっており、またクマネズミ関連株による鼠咬症例は未報告で病原性についても不明であった。今回の症例の原因となっ

た *S. moniliformis* がクマネズミ関連株であることが確認されたことから、クマネズミ関連株も鼠咬症原因菌となることが明らかになった。ドブネズミよりも家屋内に生息することが多く、人と接触機会が多いクマネズミにも鼠咬症原因動物としての注意が必要である。

F. 健康危害情報

なし。

G. 研究発表等

1. 論文発表等

(1) Kimura,M., Tanikawa,T., Suzuki,M., Koizumi,N., Kamiyama,T., Imaoka,K. and Yamada,A. Detection of *Streptobacillus* spp. in feral rats by specific polymerase chain reaction.

Microbiol. Immunol., 52:1-7, 2008

(2) 中込大樹, 出口順啓, 矢ヶ崎晶子, 原田和俊, 柴垣直孝, 島田眞路, 木村昌伸, 今岡浩一. 痂皮のPCRにより *Streptobacillus moniliformis* を検出した鼠咬症の一例. 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(8):226-227, 2007

2. 学会発表等

(1) 中込大樹, 出口順啓, 矢ヶ崎晶子, 原田和俊, 柴垣直孝, 島田眞路, 今岡浩一, 木村昌伸. 鼠咬熱の1例. 第59回日本皮膚科学会山梨地方会, 甲府, 2007年9月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表1) 国内野生ラットにおける *S. moniliformis* 保菌状況

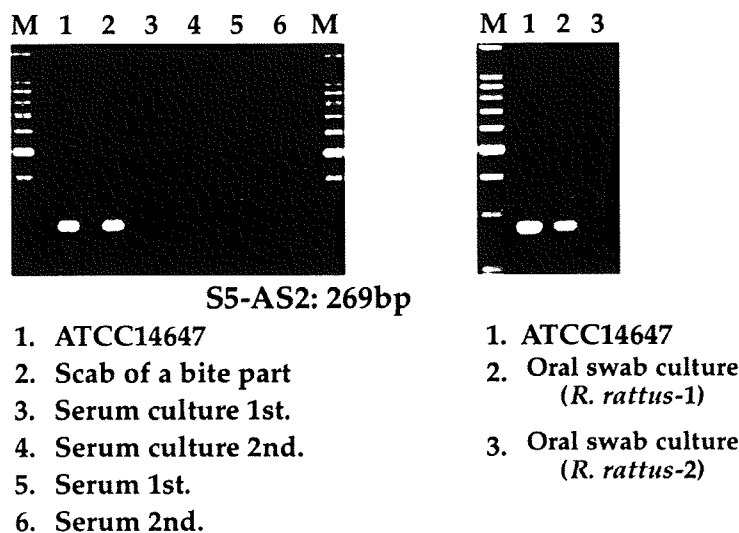
Feral rats	n	PCR Positive	%
Norway rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	66	61	92
Black rat (<i>Rattus rattus</i>)	52	30	58
Total	118	91	77

表 2) 野生ラットから新たに分離された *S. moniliformis* と ATCC 株の生化学的性状

Test	ATCC strains			<i>Rattus norvegicus</i> isolates				<i>Rattus rattus</i> isolates		
	14647	49567	49940	1	2	3	4	1	2	3
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetoin production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin fermentation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin in hydrolysis	-	-	+	-	-	W	W	-	-	-
Urea hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate utilization	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginin dihydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Beta-galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tryptophane deaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid produced from:										
Arabinose	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	W	+	+	W	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

W=weak reaction

図 1) 鼠咬症が疑われた患者および患者宅クマネズミからの *S. moniliformis* 特異的遺伝子の検出



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

国内生息ダニにおける野兔病菌保菌調査

分担研究者	棚林 清	国立感染症研究所	獣医科学部	室長
協力研究者	藤田 修	国立感染症研究所	獣医科学部	主任研究官
	堀田明豊	国立感染症研究所	獣医科学部	研究員
	宇田晶彦	国立感染症研究所	獣医科学部	研究員

研究要旨：国内のダニ類における野兔病菌 (*F. tularensis*) の保菌状況を知るために捕獲ノウサギに付着していたダニ 85 プール (317 匹) およびノウサギ捕獲地域で採集した自由生活ダニ 67 匹について本菌のゲノム DNA の検出を試みた。*fopA* 及び *tu14* 遺伝子領域のリアルタイム PCR ではノウサギ付着ダニの 70.1% 及び 71.8%、自由生活ダニの 55.2% 及び 67.2% に少量の DNA が検出された。しかし、菌分離はできなかったこと、過去に野兔病の発生がなかった地域のダニにも検出されること、また、検出率が非常に高いことなどから、今回検出された DNA 断片は *F. tularensis* あるいはダニに共生する本菌に非常に類似した菌由来の可能性が考えられ、今後、このような類似菌を確実に区別する方法を検討し精査する必要がある。

A. 研究目的

野兔病は、国内においてはノウサギを主な感染源とする典型的な動物由来感染症である。過去には関東地方から東北地方において患者の発生が認められたが、近年ほとんど発生の報告がない。起因菌である野兔病菌 (*Francisella tularensis*) は自然界においては吸血性節足動物、主にマダニ類を介して野生動物の間で維持されているものと考えられている。しかしながら、今日、本菌がノウサギやげっ歯類などの哺乳類、鳥類等の動物やダニ等の節足動物、また湖

沼河川等の環境でどのように存在するのかほとんど不明である。

本研究では日本国内で捕獲されたノウサギに付着していたダニ及び自由生活ダニにおける *F. tularensis* の保有状況を明らかにすることにより本菌の自然環境における存在状況を明らかにし、それらから直接またはノウサギ等の野生動物を介してヒトへ感染するリスクを評価するための基礎的情報を得ることを目的とした。

B. 研究方法

(1) ダニの収集

2005年から2007年に大日本猟友会の協力により捕獲されたノウサギの体表に付着していたダニを収集した。秋田県、新潟県、高知県、宮崎県及び鹿児島県において捕獲されたノウサギから合計317匹のダニを得た(表1)。また、新潟県において実際にノウサギが捕獲された場所及びその周辺の森林や藪で旗振り法による自由生活ダニ67匹を採取した。

(2) PCR 及びリアルタイム PCR による野兔病菌の検出及び塩基配列の解析

個々のダニまたは2から7匹をプールしたダニからのDNAの抽出は、液体窒素で凍結後粉碎し、DNeasy Tissue Kit (QIAGEN社)により行った。

(a) 各種細菌の16S rRNA 遺伝子を増幅するユニバーサルプライマーを用いてPCRを行い細菌由来DNAの増幅を行った。増幅されたDNAについてはTOPO TA cloning Kit (Invitrogen) を用いて大腸菌にクローニングし挿入DNA断片の塩基配列を決定しBLASTサーチして増幅されたDNAの由来菌の同定を行った。

(b) *F. tularensis* の高感度特異的ゲノム検出を行うために *fopA*, *tuI4*, 16S rRNA 遺伝子領域を増幅するリアルタイムPCRをライトサイクラーにより行った。

(c) リアルタイムPCRで増幅されたダニ抽出DNA検体についてその塩基配列を詳細に調べるために、*fopA*, 16S rRNA 遺伝子領域のnested-PCRを行い、増幅断片を大腸菌にクローニングした。挿入DNAの塩基配列を

決定し、*F. tularensis* subsp. *holarctica* の塩基配列と比較した。また、RD1(region of difference 1)領域のnested-PCR増幅断片については直接塩基配列の決定をして既報の塩基配列と比較した。

(3) ダニからの *F. tularensis* の分離培養

旗振り法により採取したダニについては体表を消毒後、二分割し、破砕後PBSを加えユーゴン・チョコレート寒天培地に接種し、37°Cで10日間培養した。

B. 結果

(1) PCR によるダニからの *F. tularensis* の検出

捕獲ノウサギ付着ダニ抽出DNAについてユニバーサルプライマーを用いた16S rRNA 遺伝子の増幅およびその塩基配列の解析を行った。15検体について、各検体12クローンの塩基配列をBLAST解析した。しかしながら、いずれのダニからも *Francisella* 属に分類される細菌は検出されなかった(表2)。また、*F. tularensis* 特異的PCRでも陽性となるバンドは認められなかった。

(2) リアルタイムPCRによる *F. tularensis* の高感度特異的ゲノム検出

高感度、特異的リアルタイムPCR(*fopA*、*tuI4*、16S rRNA 遺伝子領域)により捕獲ノウサギ付着ダニ抽出DNAについて検出を試みた。*fopA* 遺伝子では85検体中60検体(70.1%)、*tuI4* 遺伝子では61検体(71.8%)に陽性シグナルが検出された。また、16S rRNA 遺伝子領域では2年間の検

体すべてでシグナルが検出された(表3、図1)。採取年度により陽性率は異なった。*fopA*については増幅DNAのメルティングカーブ解析でも陽性対照と同一であった。しかし、検出されたDNA量は少量であった。

fopA、16S rRNA、RD1領域を増幅するnested-PCRを行い、その塩基配列をクローニングまたは直接決定し、登録されている塩基配列と比較した。16S rRNA遺伝子領域(996塩基対)では11検体を調べたところ99.5%一致していた。また、11検体の*fopA*領域(404塩基対)、7検体のRD-1領域(1056塩基対)増幅DNAの塩基配列は既知の菌株の配列と完全に一致していた。

(3) 自由生活ダニでの *F. tularensis* ゲノムの検出及び分離培養

ノウサギ捕獲周辺林野において夏季に旗振り法によるダニの捕獲し、そのダニからの抽出DNAについてリアルタイムPCRによる検出を試みた。67匹のダニのうち*fopA*遺伝子領域では37匹(55.2%)、*tul4*遺伝子領域では45匹(67.2%)で陽性だった。両遺伝子領域ともに検出された検体は33匹(49.3%)だった。これらのダニからの菌分離はできなかった。

C. 考察

野兎病菌 *F. tularensis* の生態系における存在状況を調べるために捕獲ノウサギに付着したダニおよび自由生活のダニについてPCRおよびリアルタイムPCRによる *F. tularensis* ゲノムDNAの検出並びに増幅DNA断片の塩基配列解析を行った。通常のPCR

法では、調べたすべてのダニまたはそのプールしたダニからは検出することができなかったが、高感度のリアルタイムPCR法では、検出されるDNA量は少ないながらも非常に高頻度に検出された。本研究で捕獲したダニは、過去に多くの野兎病が発生した秋田県も含まれるが、少数の発生しかない新潟県や全く発生報告がない高知県、宮崎県、鹿児島県において採取されたダニも含まれることは、本研究で用いたゲノム検出用のプライマーやプローブでは、ヒトや野生動物に野兎病を起こす *F. tularensis* あるいは本菌に類似するダニ寄生細菌を検出している可能性が考えられた。米国においてKugelerら(2005)は、ダニに寄生する *Francisella* 属類似菌 (*Francisella*-like endosymbionts) の存在を示しており、IS*Ftu2*、*tul4*、および *iglC* 領域を増幅するマルチターゲットリアルタイムPCRを行うことで *F. tularensis* とこれらの類似菌を区別できると報告している。この報告のプライマーとプローブで少数の国内ダニ抽出DNAの増幅を実施したところ *tul4* 領域ではDNA増幅は見られるもののサイズが異なることが認められ、*Francisella* 属類似菌の存在が示唆された。

今後、日本国内の他の遺伝子領域の塩基配列解析をするとともに、日本各地の多数のダニについて解析し、*F. tularensis* と類似菌との鑑別可能な手法を確立してダニにおける *F. tularensis* の保有状況を精査する必要があるものと考えられた。

D. 結論

日本国内の捕獲ノウサギに付着していたダニおよびノウサギ捕獲地域で採集した自由生活ダニについて野兎病菌 (*F. tularensis*) のゲノム DNA の検出を試みた。 *fopA* 及び *tu14* 遺伝子領域のリアルタイム PCR ではノウサギ付着ダニ自由生活ダニに少量ではあるが DNA が検出された。しかし、菌分離はできなかったこと、過去に野兎病の発生がなかった地域のダニにも検出されること、また、検出率が非常に高いことなどから、今回検出された DNA 断片は *F. tularensis* あるいはダニに共生する本菌に非常に類似した菌由来の可能性が考えられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1) Uda, A., Tanabayashi, K., Fujita, O., Hotta, A., Yamamoto, Y., and Yamada, A. Comparison of whole genome amplification methods for detecting pathogenic bacterial genomic DNA using microarray. Jpn. J. Infect. Dis. 60: 355-361 (2007)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし