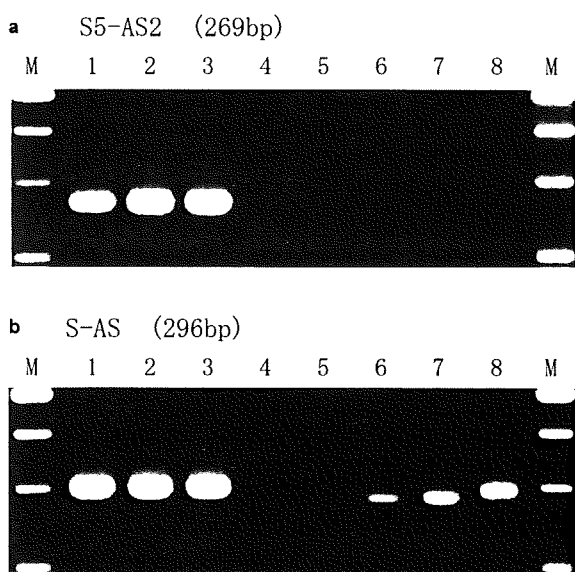


Detection of *Streptobacillus* spp. by PCR



**Fig. 1.** Specificity of PCR amplifications using (a) S5-AS2 primers and (b) S-AS primers. M, size marker. Lanes 1–3, *S. moniliformis* (ATCC14647, 49567, and 49940). Lanes 4–7, *Fusobacterium* spp. (*F. equinum* JCM11174, *F. necrophorum* JCM3718, *F. nucleatum* GTC 04469, and *F. varium* JCM3721). Lane 8, *Leptotrichia buccalis* JCM12969.

**Sequence analysis of the 16S rRNA gene**

The nucleotide sequences of the 16S rRNA genes were determined for four isolates from *R. norvegicus* (DDBJ Accession nos. AB330754, AB330755, AB330756, and AB330757), and they were compared with that of the ATCC14647 strain of *S. moniliformis*. A high degree of homology (99.7–99.9%) was observed among them. In contrast, three isolates from *R. rattus* (AB330758, AB330759, and AB330760) were more distantly related, and the homology level was low (97.8–98.3%). Sequence homology between isolates from *R. norvegicus* and *R. rattus* varied from 97.6 to 98.5%. These sequence variations were mostly observed in the region at nucleotide positions 1 to 300 in the 16S rRNA gene (Fig. 3).

**DISCUSSION**

Feral rats are reservoirs for several zoonotic agents besides *Streptobacillus*, such as *Leptospira*, *Coxiella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Toxoplasma*, and Hantavirus (14, 15), and are implicated in the transmission of these pathogens to humans in urban environments (16). *S. moniliformis* bacteria are indigenous to the oral cavity of rats and cause rat-bite fever in infected humans (17). *S. moniliformis* infection of



**Fig. 2.** Typical cotton-puff-like colonies (a) and Gram stain (b) of an isolate from *R. norvegicus*. The bacteria were cultured in ATCC medium 488 broth under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> (24 hr, 37 °C).

	DDBJ Accession No.	0	37-49	62-69	129-34	159-64	173-5	185-10	253
ATCC14647			TATGTATGAAATG	CATAGACT	AGAAAT	GTAGTA	CTA	GGAGAG	T
ATCC49567			*****	*****	*****	*****	***	*****	*
ATCC49940			*****	*****	*****	*****	***	*****	*
	AB330754		*****	*****	*****	*****	***	*****	*
<i>R. norvegicus</i>	AB330755		*****	*****	*****	*****	***	*****	*
isolates	AB330756		*****	*****	*****	*****	***	*****	*
	AB330757		*****	*****	*****	*****	***	*****	*
	AB330758		A****TAATT*AC	GT**AGAG	G****C	A**TA*	A**	TA*TTT	G
<i>R. rattus</i>	AB330759		*****TAATT***	G***AGAG	*****	*A***G	**T	*****	G
isolates	AB330760		*****TAATT***	G***AGAG	*****	*A***G	**T	*****	G

	355	430-1	792-4	938	956	981	1112	1122	1153	1234-5	1376	1401	1408	1444
A	GA	GTG	G	A	T	C	G	-	TC	-	C	G		
*	**	***	*	*	*	*	*	-	**	T	*	*		
*	**	***	*	*	*	*	*	-	**	T	*	*		
*	**	***	*	*	*	*	*	T	**	T	*	*		
*	**	***	*	G	*	*	*	-	-*	T	-	-		
*	**	***	*	*	*	*	*	-	-*	T	-	*		
*	**	***	*	*	*	*	*	-	-*	T	*	*		
C	**	***	*	*	C	T	A	T	**	T	*	*		
*	AG	A*-	A	*	C	*	*	T	-A	T	-	-		
*	AG	A*-	A	*	C	*	*	T	-A	T	-	-		

Fig. 3. 16S rRNA sequence comparison among isolates and ATCC strains. The 16S rRNA gene from ATCC strain 14647 was used as the reference sequence. The nucleotides that differ from those of the reference sequence are shown. The asterisk and minus in the columns show concordance and deletion with a reference, respectively.

humans has been reported worldwide (2). More than 200 cases of rat-bite fever have been documented in the USA (4). Feral rats, as well as those kept as pets or in schools, are considered to be the source animals (11). Two fatal cases of rat-bite fever were recently reported in the USA after exposure to *R. norvegicus* (17).

In the present study, we designed new primers that amplify the 16S rRNA gene of *Streptobacillus* spp. more specifically than previously designed primers (6) (Fig. 1, Table 2). The use of PCR with the newly designed primers to detect bacteria showed that *Streptobacillus* spp. was highly prevalent among feral rats in urban regions. Of

Detection of *Streptobacillus* spp. by PCR

66 captured *R. norvegicus*, 61 (92%) tested positive for *Streptobacillus*, whereas a lower proportion (58%, 30/52) of *R. rattus* was shown to carry the bacteria (Table 1).

We also attempted to isolate *Streptobacillus* spp. using ATCC 488 agar plate containing colisin nalidixic acid and sulfamethoxazole-trimethoprim under anaerobic conditions. Isolation of bacteria was hampered because of the presence of numerous bacterial colonies of non-*Streptobacillus* spp. that were resistant to the antimicrobials. Therefore, only seven isolates could be obtained from more than 1000 colonies grown from 91 PCR-positive oral swabs.

Biochemical examinations showed that seven isolates were nearly identical to three reference ATCC strains of *S. moniliformis* (Table 4). However, the results of H<sub>2</sub>S production (7), nitrate reduction (7, 18), and acid production from xylose (18, 19) did not agree with previous results. This discrepancy might have resulted from the fastidious nature of these organisms and from the use of different basal media (7).

Sequence analysis of the 16S rRNA gene suggested that at least two different types were present among isolates (Fig. 3). It was also suggested that different species of the genus *Rattus* (*R. norvegicus* and *R. rattus*) might harbor different types of bacterial strains. Because the rats were captured in the urban area of Tokyo and its vicinity, where two species of rats were sympatric, the presence of distinct bacterial strains in different species of rats was probably due to co-evolution of the bacteria with their hosts rather than to differences in the geographical distribution of the bacteria. It might be intriguing to study whether there would be any differences in pathogenicity among bacteria maintained by different species of rats. However, to ascertain whether different types of bacteria are taxonomically *S. moniliformis*, more detailed genotypic (e.g. DNA/DNA homology) as well as phenotypic characterization of the isolates in question is necessary.

Although the absence of *Streptobacillus* spp. is not a prerequisite for SPF rats raised as laboratory experimental animals, none of the SPF rats were found to be infected with *Streptobacillus* spp. when tested using PCR. Because individuals handling laboratory rats might be exposed to the organism more frequently than the general public, rats raised in the conventional environment should be tested for the presence of bacteria.

## ACKNOWLEDGMENT

This work was supported in part by a grant for Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

## REFERENCES

- Will L.A. (1994) Rat-bite fever. In: Beranand G.W., Steele J.H., eds. *Handbook of Zoonoses*, 2nd edn. London: CRC Press, pp. 231–42.
- Wullenweber M. (1995) *Streptobacillus moniliformis*, a zoonotic pathogen, taxonomic considerations, host species, diagnosis, therapy, geographical distribution. *Lab Anim* 29: 1–15.
- Washburn R.G. (2004) *Streptobacillus moniliformis* (rat-bite fever). In: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R., eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6th edn. New York, NY: Churchill Livingstone, pp. 2708–10.
- Elliott S.P. (2007) Rat bite fever and *Streptobacillus moniliformis*. *Clin Microbiol Rev* 20: 13–22.
- Andre J.M., Freydiere A.M., Benito Y., Rousson A., Lansiaux S., Kodjo A., Mazzocchi C., Berthier J.C., Vandenesch F. and Floret D. (2005) Rat bite fever caused by *Streptobacillus moniliformis* in a child: human infection and rat carriage diagnosed by PCR. *J Clin Pathol* 58: 1215–6.
- Boot R., Oosterhuis A., Thuis H.C. (2002) PCR for the detection of *Streptobacillus moniliformis*. *Lab Anim* 36: 200–8.
- Greenwood J.R., Harvey S.M. (2006) *Streptobacillus moniliformis*. In: Dworkin M., Falkow M., Rosenberg S.E., Schleifer K.H., Stackebrandt E., eds. *The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria, Volume 7, Proteobacteria*. New York, NY: Springer, pp. 983–5.
- Imaoka K., Kimura M., Suzuki M., Kamiyama T., Yamada A. (2007) Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. *Jpn J Infect Dis* 60: 137–9.
- Shimoda Y., Kato N., Morita N. (2000) Phylogenetic analysis of a bacterium by sequencing its 16S ribosomal RNA gene. *Shimadzu Review* 57: 121–32 (in Japanese).
- Albedwawi S., LeBlanc C., Shaw A., Slinger R.W. (2006) A teenager with fever, rash and arthritis. *CMAJ* 175: 354.
- Graves M.H., Janda J.M. (2001) Rat-bite fever (*Streptobacillus moniliformis*), a potential emerging disease. *Int J Infect Dis* 5: 151–5.
- Rygg M., Bruun C.F. (1992) Rat bite fever (*Streptobacillus moniliformis*) with septicemia in a child. *Scand J Infect Dis* 24: 535–40.
- Torres L., López A.I., Escobar S., Marne C., Marco M.L., Pérez M., and Verhaegen J. (2003) Bacteremia by *Streptobacillus moniliformis*: first case described in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22: 258–60.
- Hirschhorn R.B., Hodge R.R. (1999) Identification of risk factors in rat bite incidents involving humans. *Pediatrics* 104: 1–6.
- Webster J.P. (1996) Wild brown rats (*Rattus norvegicus*) as a zoonotic risk on farm in England and Wales. *Commun Dis Rep CDR Rev* 6: 46–9.
- Easterbrook J.D., Shields T., Klein S.L., Glass G.E. (2005) Norway rat population in Baltimore, Maryland, 2004. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5: 296–9.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2005) Fatal rat-bite fever, Florida and Washington, 2003. *MMWR* 53: 1198–202.
- Cohen R.L., Wittler R.G., Faber J.E. (1968) Modified biochemical tests for characterization of L-phase variants of bacteria. *Appl Microbiol* 16: 1655–62.
- Edwards R., Finch R.G. (1986) Characterisation and antibiotic susceptibilities of *Streptobacillus moniliformis*. *J Med Microbiol* 21: 39–42.



## 痂皮のPCRにより *Streptobacillus moniliformis* を検出した鼠咬症の一例

(Vol.28 p 226-227: 2007年8月号)

鼠咬症(Rat-bite fever)は、鼠などに咬まれ *Streptobacillus moniliformis* や *Spirillum minus* に感染することにより、特徴的な皮疹・発熱・関節痛をきたす稀な全身性感染症である。今回、その特徴的な皮疹より鼠咬症を疑い、痂皮のPCRにより *S. moniliformis* を検出した一例を報告する。

症例: 74歳、女性。

初診日: 2007年5月7日。

主訴: 四肢・顔面の紅斑、関節痛。

家族歴: 特記なし。

既往歴: 47歳時に子宮筋腫にて子宮、卵巣摘出。72歳時に左腎細胞癌のため左腎摘出。

現病歴: 2007年4月27日自宅で鼠(頭胴長15cm)に右手の第2、3指を咬まれる(図1)。5月2日より関節痛、筋痛、全身倦怠感が出現。5月7日に四肢に紅斑が出現し、当院を受診。

初診時現症: 体温37.0°C、全身倦怠感。手掌・足底を含む四肢末梢側優位に、大豆大までの軽度浸潤を触れる紅斑が多発(図2)。上肢では紅斑は癒合傾向を示し、顔面は額部を中心にびまん性紅斑。皮疹に掻痒感等の自覚症状はなし。四肢の大小関節痛・腰背部痛・筋把握痛。結膜に充血はなく、口腔内にコプリック斑や、舌に白苔の付着はなし。頸部・鼠径等の表在リンパ節は触知できず。

血液検査所見: WBC 11,500/mm<sup>3</sup> (好中球84.7%、好酸球0.2%、好塩基球0.1%、単球2.1%、リンパ球12.9%)、Hb 12.5g/dl、Plt 15.4万/mm<sup>3</sup>、CRP4.22mg/dl。肝、腎機能、電解質に明らかな異常値は認めず。2007年5月7日麻疹IgM(EIA)0.13、麻疹IgG(EIA)11.7、5月16日麻疹IgG(EIA)13.8。

血液培養: 陰性(5月8日)。

病理組織学的所見: 初診時に上肢の紅斑部より皮膚生検を実施。真皮の血管周囲に軽度のリンパ球浸潤。真皮に接する皮下脂肪織では一部の血管周囲にリンパ球、好中球の高度な集簇。

治療および経過: 5月8日夜に悪寒・戦慄とともに39°C台の発熱が出現。刺し口ははっきりしなかったが、山中での作業をしていたことから日本紅斑熱やつつが虫病を疑い、ミノサイクリン(MINO)200mg/日を開始。5月12日より解熱し、四肢・顔面の紅斑は消滅し、手掌・足底に点状紫斑が残存。関節痛は腰背部のみが残存。鼠に咬まれた既往より鼠咬症の可能性も考え、国立感染症研究所にて、リケッチアの検査とともに *S. moniliformis* の16S-rRNA遺伝子特異的PCRを実施。その結果、鼠咬部痂皮(図1)より *S. moniliformis* 遺伝子を検出。臨床経過も含め、鼠咬症と診断し、MINO 200mgを14日間投与。以降は、発熱なかったが腰背部痛のみが持続。6月9日になり、再度38°C台の発熱。血液培養陰性だが、鼠咬症の再燃と考え、6月11日よりMINO 200mg/日の投与を開始。しかし熱型が改善しないため、13日よりピペラシリン(PIPC)4g/日へ変更。変更後、熱型・腰背部痛は徐々に改善し、16日には解熱。PIPCを10日間継続し、軽快退院。外来にて経過観察しているが現在のところ再燃なし。

考察: 鼠咬症は *S. moniliformis* や *S. minus* による人獣共通感染症である。 *S. moniliformis* は好気性あるいは通性嫌気性のグラム陰性桿菌で、一部の齧歯目の口腔内常在菌として存在し、咬傷や引っかき傷より感染する。2~10日の潜伏期を経て、高熱、多発関節痛、筋痛、皮疹と全身に症状が出現する。文献的には、関節痛は肘、膝、腰背部など大関節が中心であり、皮疹は手掌、足底を中心とした紅斑であり、膿瘍を伴うものもあるとされる。

本症例では、発症まで6日間、発熱は間欠的で、悪寒、戦慄を伴い、急性期のインフルエンザを思わせるほどの重篤感を伴った。皮疹は、手掌、足底を含む四肢の末梢優位に、大豆大の紅斑が出現した(図2)。紅斑は癒合傾向を示

し、消退後は紫斑となった。他疾患と比べ、特異的な皮疹のため、一度経験すれば、皮疹と詳細な病歴摂取により診断可能と実感した。多発関節痛は、入院当初は動けないほどの痛みであった。

一般に、*S. moniliformis* の分離培養は、血液・関節液から可能であるが、特殊な培地を必要として困難ことが多い。近年では、PCRで患者の体液より*S. moniliformis* 遺伝子の検出により診断されることもある。本症例では、血液からは検出されなかったものの、鼠咬部痂皮のPCRで*S. moniliformis* 遺伝子を検出し、確定診断にいたった。

治療は、ペニシリン系の抗菌薬が第一選択であり、テトラサイクリンも有効とされる。自然治癒する場合もあるが、心内膜炎、心筋炎、脳炎、深部膿瘍などを合併した場合高い死亡率を有する。また、治療が完全でないと再発する場合があるとされる。自験例では、当初、リケッチア感染症も疑っていたためMINOを投与し、いったん軽快するも、再燃した。ペニシリンに変更後は、熱型も著明に改善し、残存していた腰背部痛も軽快した。海外の文献では1カ月投与を行っている症例もあり、抗菌薬の種類、使用量、使用期間に関しては、臨床経過をみながらの注意深い判断が必要だろう。

近年、本邦では鼠咬症の症例報告はほとんどない。理由として、衛生環境の改善や内服抗菌薬の薬効向上が挙げられる。しかし、一般に知られていない疾患であるため、中毒疹とされている例もあると思われる。重篤化する危険性のある疾患のため、初期診断が大切であり、鑑別診断に上げるべき疾患である。

山梨大学皮膚科

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

国立感染症研究所獣医科学部 木村昌伸 今岡浩一



[今月の表紙へ戻る](#)

[IASRのホームページに戻る](#)

[Return to the IASR HomePage\(English\)](#)

**IASR** *Infectious Agents Surveillance Report*

HOME IDSC

ホームへ戻る

## Short Communication

# Simultaneous Detection of the Genus *Brucella* by Combinatorial PCR

Koichi Imaoka\*, Masanobu Kimura, Michio Suzuki, Tsuneo Kamiyama and Akio Yamada

Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan

(Received December 22, 2006. Accepted February 6, 2007)

**SUMMARY:** We have developed a combinatorial polymerase chain reaction (PCR) procedure to identify four major species of the genus *Brucella* simultaneously. Four pairs of primers targeting the genes encoding a cell surface protein (*BCSP31*) and outer membrane proteins (*omp2b*, *omp2a* and *omp31*) were prepared. PCR using these primers gave rise to specific patterns of amplification for each *Brucella* spp. examined in this study. *B. abortus* could be identified when fragments of *BCSP31* and *omp2b/2a* were amplified by *B. abortus*-specific primers. *B. melitensis* could be identified by the amplification of fragments of *BCSP31*, *omp2b/2a* and *omp31* using pair of primers B4/B5, JRF/JPR-ab and *omp31*. Identification of *B. canis* could be achieved when the amplicons of *omp2b/2a* were detected by *B. canis*-specific primers, as could the identification of *BCSP31* and *omp31*. If specific amplifications occurred using all pairs of primers, the strain was identified as *B. suis*. Combinatorial PCR reported here thus appeared to be an ideal method of identifying *Brucella* spp., the causative pathogen of human brucellosis.

Brucellosis, a zoonosis caused by bacteria belonging to the genus *Brucella*, is endemic in various parts of the world, especially in countries of the Mediterranean region, Asia, Africa and South America (1-3). Among the species of the genus *Brucella*, the four major causative agents of human brucellosis are *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* and *B. canis*, although their natural hosts are usually confined to goats and sheep, cattle, pigs and dogs, respectively (1-3). Moreover, some species of the genus *Brucella* are considered to be potential agents for bioterrorism (4).

Microbiological, serological and molecular techniques are commonly used for the diagnosis of brucellosis (1,2,5). Microbiological tests such as the isolation of bacteria from host tissues or blood cultures followed by bacteriological characterization remain important, although they are tedious and time-consuming (2,5). The most widely used serological tests, i.e., tube agglutination tests using inactivated *B. abortus* or *B. canis* as antigens, show some degree of cross-reaction with other bacterial strains (1,2). Moreover, it is difficult to serologically distinguish the species within the genus *Brucella* using the tube agglutination test (1,2).

Among molecular techniques, polymerase chain reaction (PCR) is one of the most useful tools for the diagnosis of brucellosis. It has been reported that identification of the genus *Brucella*, but not of the species within the genus, can be performed by PCR using primers targeting highly conserved regions such as the *BCSP31* (6) or 16S-rRNA (7). As regards the differentiation of species and/or biovars of *Brucella* within the genus, several laboratories have reported PCR procedures using highly specific primers and/or stringent assay conditions. For example, it was reported that *B. abortus* could be distinguished from *B. melitensis* by species-specific PCR targeting IS711 using primers designed based on the nucleotide sequences of *B. abortus* (8,9). *B. suis* could also be discriminated from *B. abortus* using primer pairs designed according to *B. suis*-specific sequences (10). Furthermore, identification

of *B. canis* could be accomplished by using specific primers designed to amplify *virB2* (11).

In Japan, the prevalence of brucellosis is quite low, but cases of *B. melitensis* infection have recently been reported (12,13). It remains possible that some people in Japan currently suffer from brucellosis, since canine brucellosis caused by *B. canis* still exists in this country. Therefore, a reliable diagnostic system capable of distinguishing between the four species of the genus *Brucella*, including *B. canis*, remains necessary. In the present study, we attempted to develop a PCR approach that could be used to identify the four major species of the genus *Brucella* simultaneously using newly designed primers.

Here, we used 11 strains belonging to the genus *Brucella* and 23 strains of non-*Brucella* bacteria (Table 1). *Brucella* strains were cultured on sheep blood agar plates and the DNA was isolated using SepaGene (Sanko Junyaku, Tokyo, Japan) according to the protocol supplied by the manufacturer. DNA from non-*Brucella* strains was also prepared.

Isolated DNA was amplified using puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare Bio-Science Corp., Piscataway, N.J., USA) by PCR consisting of initial denaturation at 95°C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 65°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min, followed by a final extension at 72°C for 7 min.

The primers designed and used for the simultaneous identification of four major *Brucella* spp. are listed in Table 2. The results are shown in Fig. 1 and summarized in Table 1. A pair of primers, B4/B5, was previously reported to amplify a 224-bp DNA fragment from a gene encoding a 31-kDa cell surface protein (*BCSP31*) that is well conserved in all *Brucella* spp. (M20404) (6). We have confirmed that this pair of primers is specific for the genus *Brucella*, since no PCR product was detected when DNA from bacteria other than *Brucella* spp. was used as templates (Table 1). The gene encoding *Brucella* major outer membrane protein 2 (*omp2*) has two related regions, *omp2b* and *omp2a*, and these two regions are 85% homologous and oriented in opposite directions (U26438) (14). Leal-Klevezas et al. reported that a 193-bp fragment could be amplified with a pair of primers, JPF/JPR, from *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*, but not from

\*Corresponding author; Mailing address: Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan. Tel: +81-3-5285-1111 ext. 2622, Fax: +81-3-5285-1179, E-mail: imaoka@nih.go.jp

Table 1. Bacterial strains used in this study and the results of PCR

Species	Strain	<i>BCSP31</i>	<i>omp2b</i>		<i>omp2a</i>		<i>omp31</i>
		B4/B5	JPF/JPR-ab	JPF/JPR-ca	JPF/JPR-ab	JPF/JPR-ca	1S/1AS
<i>Brucella abortus</i>	544 <sup>1)</sup>	+	+	-	+	-	-
<i>Brucella abortus</i>	Takanashi <sup>1)</sup>	+	+	-	+	-	-
<i>Brucella abortus</i>	125 <sup>2)</sup>	+	+	-	+	-	-
<i>Brucella melitensis</i>	16M <sup>1)</sup>	+	+	-	+	-	+
<i>Brucella melitensis</i>	HagiwaraB1 <sup>1)</sup>	+	+	-	+	-	+
<i>Brucella melitensis</i>	TWCC40430 <sup>3)</sup>	+	+	-	+	-	+
<i>Brucella melitensis</i>	H17-298 <sup>4)</sup>	+	+	-	+	-	+
<i>Brucella suis</i>	1330 <sup>1)</sup>	+	+	-	-	+	+
<i>Brucella suis</i>	S-13 <sup>1)</sup>	+	+	-	-	+	+
<i>Brucella canis</i>	QE13 <sup>1)</sup>	+	-	+	-	+	+
<i>Brucella canis</i>	Shizuoka03 <sup>5)</sup>	+	-	+	-	+	+
<i>Yersinia pestis</i>	Yrcka	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia pestis</i>	A1122	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Pa2369 (O3)	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Pa9571 (O5)	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Pa12986 (O8)	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Pa177 (O9)	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	319	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus anthracis</i>	PAII	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	NBRC3466	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	3	-	-	-	-	-	-
<i>Francisella tularensis</i>	LVS	-	-	-	-	-	-
<i>Coxiella burnetii</i>	Nine Mile	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	DH5 alpha	-	-	-	-	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	Type B	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC13883	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC15315	-	-	-	-	-	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ATCC27294	-	-	-	-	-	-
<i>Pasteurella aerogenes</i>	ATCC27883	-	-	-	-	-	-
<i>Pasteurella multocida</i>	ATCC12947	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC29247	-	-	-	-	-	-
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	ATCC14647	-	-	-	-	-	-
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	ATCC49187	-	-	-	-	-	-
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	ATCC49687	-	-	-	-	-	-

<sup>1)</sup> Bacterial strains were supplied from National Institute of Animal Health, Tsukuba, Ibaraki, Japan.

<sup>2)</sup> Heat-inactivated bacteria, which was commercially available, was obtained from National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Ibaraki, Japan as an antigen for a tube agglutination test.

<sup>3)</sup> A new isolate from blood of an imported brucellosis patient was supplied from Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan.

<sup>4)</sup> A new isolate from blood of an imported brucellosis patient was supplied from Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Tokyo, Japan.

<sup>5)</sup> A new isolate from a piece of liver of an aborted puppy was isolated in our laboratory.

Table 2. Primers designated in this study

Target gene	Primer name	Sequence	Target length	GenBank accession	Location
<i>BCSP31</i>	B4 (S) <sup>1)</sup>	5'-Tgg CTC ggT TgC CAA TAT CAA	224 bp	M20404	789-809
	B5 (AS) <sup>1)</sup>	5'-CgC gCT TgC CTT TCA ggT CTg		M20404	1012-992
<i>omp2</i>	JPF (S) <sup>2)</sup>	5'-gCg CTC Agg CTg CCg ACg CAA	186 bp	U26438	2110-2130
	JPR-ab (AS)	5'-CAT TgC ggT Cgg TAC Cgg Ag		U26438	2295-2276
	JPR-ca (AS)	5'-CCT TTA CgA TCC gAg CCg gTA		U26439	2296-2276
<i>omp31</i>	1S (S)	5'-gTT CgC TCg ACg TAA CAg CTg	249 bp	AF366073	218-238
	1AS (AS)	5'-gAC CgC Cgg TAC CAT AAA CCA		AF366073	446-466

Primers 1) and 2) were prepared according to reference 6 and 8, respectively. Others were newly designated in this study.

*B. canis* (15). In this study, we designed two novel antisense primers, JPR-ab and JPR-ca, which are specific for *B. abortus* (U26438) and *B. canis* (U26439), respectively. In *B. abortus* and *B. melitensis*, it was observed that 186-bp fragments from both *omp2b* and *omp2a* regions were amplified by PCR with the pair of primers, JPF/JPR-ab. In contrast, since the

nucleotide sequences of target regions of *B. canis* differ from those of *B. abortus* and *B. melitensis*, the *B. canis* fragments *omp2b* and *omp2a* were amplified only when the JPR-ca primer was used together with the JPF primer. On the other hand, since the sequences of amplicons of *omp2b* and *omp2a* of *B. suis* (U26443) are identical to those of *B. abortus* and

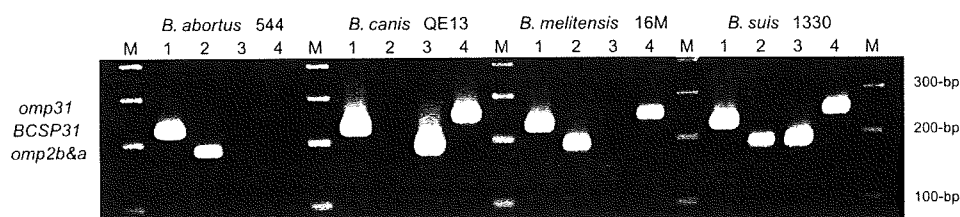


Fig.1. Detection patterns of four major biovars of *Brucella* spp. by four pairs of primers. Lane 1, BA/B5; 2, JPF/JPR-ab; 3, JPF/JPR-ca; 4, 1S/1AS; M. Size marker.

*B. canis*, respectively, fragments were obtained by PCR using either the JPF/JPR-ab or JPF/JPR-ca primers. As shown in Fig. 1, PCR using a pair of primers, JPF/JPR-ab, amplified a 186-bp fragment from *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*, but not from *B. canis*, while the primers JPF/JPR2-ca amplified a 187-bp fragment from *B. canis* and *B. suis*. A pair of primers 1S/1AS was designated to amplify a 249-bp fragment from the *omp31* gene encoding another *Brucella* outer membrane protein. However, due to the presence of a large deletion in the *omp31* gene of *B. abortus* (14,16), primers 1S/1AS did not amplify the fragment from *B. abortus* (Table 1).

These results demonstrated that four species of *Brucella* could be successfully identified by combinatorial PCR using four sets of primers (Fig. 1). *B. abortus* could be identified when the amplification of fragments of *omp2b* and *omp2a* by *B. abortus*-specific primers (JRF/JPR-ab) took place, moreover, *B. abortus* could also be identified based on the amplification of *BCSP31* by B4/B5 primers. *B. melitensis* could be identified by the amplification of fragments of *BCSP31* and *omp31* as well as *omp2b* and *omp2a* by a pair of primers, JRF/JPR-ab, and *omp31*. In contrast, identification of *B. canis* could be achieved if *BCSP31* and *omp31* were amplified and if the amplicons of *omp2b* and *omp2a* were detected by *B. canis*-specific primers (JRF/JPR-ca), but not by *B. abortus*-specific primers (JRF/JPR-ab). In cases when specific amplifications occurred using all pairs of primers, the strain was identified as *B. suis*. In this study, we included 23 bacteria belonging to genera other than *Brucella* spp. Since the PCR series reported here did not amplify any fragments from these 23 non-*Brucella* bacteria, this method appears to be highly specific for the genus *Brucella*. Moreover, this PCR also amplified specific sequences from mouse tissue homogenates and blood experimentally spiked with *B. abortus* or *B. canis* (data not shown). The PCR detection limit was observed to be approximately 1 pg of DNA (data not shown).

Since multiplex PCR has been used for the simultaneous detection of several pathogens, we also attempted to establish a multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. However, the detection limit of that multiplex approach was inferior to that of the PCR reported here, most likely due to the competitive consumption of ingredients among amplicons (data not shown). Additionally, multiplex PCR using the primer pairs, B4/B5, JPF/JPR-ab and 1S/1AS, did distinguish *B. abortus* and *B. canis* from other *Brucella* spp., but *B. melitensis* could not be differentiated from *B. suis*. In contrast, using the primer pairs, B4/B5, JPF/JPR-ca and 1S/1AS, we were able to distinguish *B. abortus* and *B. melitensis* from the other species by multiplex PCR, although *B. canis* and

*B. suis* could not be differentiated in this manner (Table 1). From these results, we concluded that it was more practical to perform combinatorial PCR rather than a multiplex PCR to identify the genus *Brucella* at the species level.

Although we tested a limited number of biovars belonging to each *Brucella* spp., it appears likely that the method reported here will enable the reliable identification of the four major species of the genus *Brucella* which infect human beings.

## REFERENCES

- Corbel, M.J. (1997): Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.*, 3, 213-221.
- Shapiro, D.S. and Eong, J.D. (1999): *Brucella*. p. 625-631. In P.R. Murray et al. (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington, D.C.
- Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., et al. (2006): The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.*, 6, 91-99.
- Franz, D.R., Jahrling, P.B., Friedlander, A.M., et al. (1997): Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. *JAMA*, 278, 399-411.
- Bricker, B.J. (2002): PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet. Microbiol.*, 90, 435-446.
- Baily, G.G., Krahn, J.B., Drasar, B.S., et al. (1992): Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.*, 95, 271-275.
- Romero, C., Gamazo, C., Pardo, M., et al. (1995): Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 615-617.
- Bricker, B.J. and Halling, S.M. (1994): Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 32, 2660-2666.
- Hamdy, M.E.R. and Amin, A.S. (2002): Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. *Vet. J.*, 163, 299-305.
- Fayazi, Z., Ghadersohi, A. and Hirst, R.G. (2002): Development of a *Brucella suis* specific hybridization probe and PCR which distinguishes *B. suis* from *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.*, 84, 253-261.
- Kim, S., Lee, D.S., Suzuki, H., et al. (2006): Detection of *Brucella canis* and *Leptospira interrogans* in canine semen by multiplex nested PCR. *J. Vet. Med. Sci.*, 68, 615-618.
- Kikuchi, K., Takimura, T., Takase, K., et al. (2005): A brucellosis case due to *Brucella melitensis* infected during a travel to Syria, June 2005. *Infect. Agents Surveillance Rep.*, 26, 273-274 (in Japanese).
- Nakamura-Uchiyama, F., Frumiya, N. and Onishi, K. (2006): A brucellosis case infected in Egypt, February 2006. *Infect. Agents Surveillance Rep.*, 27, 125-126 (in Japanese).
- Cloekaert, A., Vizcaino, N., Paquet, J.Y., et al. (2002): Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet. Microbiol.*, 90, 229-247.
- Leal-Klevezas, D.A., Martinez-Vazquez, I.O., Lopez-Merino, A., et al. (1995): Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 3087-3090.
- Vizcaino, N., Verger, J-M., Grayon, M., et al. (1997): DNA polymorphism at the *omp-31* locus of *Brucella* spp.: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers. *Microbiology*, 143, 2913-2921.





## ブルセラ症(1999年4月～2007年3月31日現在)

(Vol.28 p 227-228: 2007年8月号)

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。ヒトに感染する菌種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や、それらからのエアロゾルの吸入による。授乳、性交などによるヒト-ヒト感染もありうるが、極めてまれである。潜伏期は通常1～3週間であるが、時に数カ月に及ぶこともある。軽症の場合、単なる感冒様症状のこともある。通常、症状は他の熱性疾患と似ているが、筋・骨格系への影響が強く、全身的な疼痛・倦怠感や、間欠熱・波状熱といった特徴的な熱型を示すこともある。これらの症状は数週間～数カ月、数年に及ぶこともある。*B. canis* (自然宿主:イヌ)もヒトに感染することがあるが一般に症状は軽く、気がつかないケースも多い。感染イヌは流産を起こすが、その流産胎子、胎盤、汚物や、尿、精液などへの接触により感染する。

本疾患は世界中で発生している。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が、実際の患者数はその10～25倍以上と推定されている。地域的には、特に西アジア、中東、地中海沿岸、アフリカ、中南米、カリブ海諸国などに多い。日本では家畜対策(摘発・淘汰)が功を奏し、清浄化していると考えられ、従って家畜から感染する可能性は低い。ただし、イヌでは2～5%前後が*B. canis*の感染歴を持つとされている。

わが国では従来、本疾患は届出の対象ではなかったため、発生状況は正確に把握されていなかった。しかし、1999年4月1日施行の感染症法で4類感染症に指定され、診断したすべての医師に届出が義務づけられた。それ以降、2007年3月31日現在までに届出は8例みられているが、2005年2例、2006年5例と、近年に集中している(表)。これは実際に患者数が増加したことよりも、むしろ診断の際にブルセラ症が考慮されるようになったためと考えられる。

国外を推定感染地域とする4例のうち、血液培養により菌が分離同定されて、*B. melitensis*感染が確定された2例(表中#2、4)は、いずれも海外で感染したものである。1例はシリアでの羊肉の喫食によると考えられ(IASR 26: 273-274, 2005参照)、もう1例はエジプトでの環境からのエアロゾル吸入による可能性が最も疑われている(IASR, 27: 125-126, 2006参照)。*B. abortus*感染が確定された1例(表中#6)は海外で感染・発症し、治療を受けたが、国内で再燃したと考えられており、感染原因としてエジプトでのミルクの摂取が推定されている。このように、本疾患は輸入感染症として注意する必要がある。

国内を推定感染地域とする3例は、いずれも*B. canis*に対する抗体が検出されているが、3例ともに明らかなイヌとの接触歴は認められなかった。

ブルセラ症の症状には特徴的なものがなく、診断には血清抗体測定や菌分離などの病原診断が欠かせない。血清診断は通常、*B. abortus*や*B. canis*を抗原とした試験管内凝集反応が行われ、民間の臨床検査機関でも可能であるが、凝集抗体価がそれぞれ1:40、1:160以上の時に陽性と判断される(従来、抗原がいずれであっても160倍以上の抗体価をもって届出の対象とされていたが、2007年4月に*B. abortus*については40倍以上を対象とすることに変更された)。*B. melitensis*、*B. suis*感染が疑われるときでも、*B. abortus*を抗原とした抗体の検出を行う。菌種の特定には菌分離が必要であり、血液や骨髄の培養が行われるが、抗菌薬がすでに投与されていて分離できないことが多い。これまでの報告でも、特に国内での感染が疑われる3例ではすべて菌が分離されておらず、病原診断は凝集反応陽性によりなされている。しかも、1例(表中#3)を除き、単血清での陽性結果で診断されているが、血清抗体のみで確定診断するにはペア血清を用いることが望ましい。また、PCR法による病原体遺伝子診断も可能であり、国立感染症研究所獣医科学部に依頼が可能である。

国立感染症研究所獣医科学部第一室 今岡浩一  
国立感染症研究所感染症情報センター第二室



[今月の表紙へ戻る](#)



[IASRのホームページに戻る](#)



[Return to the IASR HomePage\(English\)](#)

## **IASR** *Infectious Agents Surveillance Report*

**HOME IDSC**

[ホームへ戻る](#)

表. ブルセラ症の報告症例 (1999.4.1~2007.3.31)

症例 番号	感染推定 年月	発病 年月	診断 年月	性	年齢	報告 都道府県	推定 感染地	推定 感染経路	症 状	血清抗体検査 *	菌分離
1	記載なし	記載なし	2002.1	女	40代	東京都	不明	ペットの犬	発熱、食欲不振	BA(-)、BC(+)	(-)
2	記載なし	2005.6	2005.6	女	30代	東京都	シリア	経口 (羊肉)	発熱、皮疹、脾腫、 腹部リンパ節腫大、 関節痛	BA(+)、BC(+)	<i>B. melitensis</i>
3	記載なし	2005.10	2005.12	男	10代	長野県	国内 (都道府県名 情報なし)	不明	発熱、筋肉痛、 腹痛	BA(-)、BC(+)	(-)
4	記載なし	2006.2	2006.2	男	50代	東京都	エジプト	不明 (エアロゾル 吸入疑い)	発熱、頭痛、 肝脾腫	BA(+)、BC(+)	<i>B. melitensis</i>
5	2006.3	2006.5	2006.6	女	20代	長野県	イタリア	不明	発熱、筋肉痛	BA(-)、BC(+)	(-)
6 **	2005.9	2006.7	2006.7	女	20代	北海道	エジプト	経口(ミルク)	発熱、頭痛	BA(+)、BC(-)	<i>B. abortus</i>
7	2006.1	2006.5	2006.9	女	60代	長野県	長野県	不明	発熱、脾腫	BA(-)、BC(+)	(-)
8	2006.8	2006.9	2006.10	女	70代	宮城県	宮城県	不明	発熱、 中枢神経症状	BA(-)、BC(+)	(-)

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

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

**IASR**

Infectious Agents Surveillance Report

### Ⅲ. 平成20年度総括・分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)  
総括研究報告書

動物由来感染症の生態学的アプローチによるリスク評価等に関する研究

研究代表者 山田章雄 国立感染症研究所獣医科学部長

研究要旨 国内における存在が明らかではあるが、その浸淫状況の把握が不完全である動物由来感染症として、Q熱、ボレリア感染症、野兔病、ブルセラ症、コリネバクテリウムウルセランス感染症を取り上げ、生態系における存在様式を明らかにすることを目的とした。今年度のQ熱に関する研究では新たに確立した方法を用い、イヌ血清 1098 検体およびネコ血清 582 検体について、抗体保有率を検討するとともに、イヌ血液からの抽出 DNA サンプル 986 検体について Q 熱コクシエラ遺伝子の検出を試みた。その結果、イヌでは *C. burnetii* DNA が検出された検体はなかったが、イヌの抗体保有率は 2.1%、ネコでは 6.2% であった。これらの成績はイヌ、ネコの Q 熱伝播への関与はこれまで考えられていた程ではなく、健康なペットからヒトへの感染リスクは必ずしも高くはない可能性が示唆された。ライム病ボレリアについては昨年度に引き続き捕獲鳥類からのボレリア DNA の検出を行い、野生鳥類の移動に付随して、拡散しやすいマダニ種とこれを媒介種とするボレリア種が存在することを初めて明らかにした。コリネバクテリウムに関しては大阪府の動物愛護センターに収容されていたイヌのほぼ 10% にジフテリア毒素産生性コリネバクテリウムの感染が確認されたが、これらの動物はすべて外見上健康であった。また、菌が検出されたイヌの由来に共通性がなく、得られた菌の PFGE パターンがすべて一致したことから、収容施設内で感染拡大があったものと考えられた。野生動物、産業動物ではこれまでのところ菌の存在は確認されていない。ブルセラ症については、昨年引き続き、国内で捕獲されたイノシシ、シカについてブルセラ属菌の保有状況調査を継続したが、スムーズ型の菌に対しては、陽性個体は見いだされなかった。しかし、*B. canis* に対する抗体を保有しているかに見える個体が見いだされたことから、更なる調査の必要性が確認された。野兔病に関しては、本病で斃死したノウサギが発見された場所を中心とし、野生小動物、ダニ、湖沼水、土壌などからの菌検出を試みた。その結果土壌検体および湖沼水の検体から野兔病菌 DNA が検出された。今後も調査を継続し、生態系での本菌の存在・維持様式を検討する予定である。また、国内の動物園等で飼養されるペンギン目を人獣共通感染症のセンチネルとして利用することができるかを検討するための初期情報となる、ペンギンの感染症について検討したところ、トリマラリアおよびアスペルギルス症が多く認められることが分かった。これらの基本情報を元にこの鳥種をセンチネルとできるかさらに検討を重ねる予定である。また、ヒトにおいては日和見感染ではあるものの、AIDS 患者で問題とされる鳥抗酸菌症について、その病態と感染経路を検討した。一方、国内には存在しないが、海外からの侵入が危惧される狂犬病の診断体制構築における基盤技術としてのイヌの剖検、特に脳幹部の採材を滞りなく行うための教材として、イヌの頭部解剖モデルの作成を昨年度に引き続き継続した。今年度は目的によって 3 種類のプロトタイプを試作し、自治体等の担当者と協議し、改良点などを解析した。これらの検討結果を基に最終年度で完成させることとしている。

研究分担者

岸本寿男 国立感染症研究所ウイルス 1 部室長  
川端寛樹 国立感染症研究所細菌第 1 部室長  
高橋元秀 国立感染症研究所細菌第 2 部室長  
柳井徳磨 岐阜大学農学部教授  
井上 智 国立感染症研究所獣医科学部室長  
今岡浩一 国立感染症研究所獣医科学部室長  
棚林 清 国立感染症研究所獣医科学部室長

研究協力者

(社) 大日本猟友会

その他は各分担研究報告書に記載

A. 研究目的

野兔病、ブルセラ症などは国内の環境の変化、衛生状態の向上などにより感染者の報告は極めて少なくなっている。しかし、これまでの我々や他のグループの調査から、依然として国内にこれらの病原体が存続していると考えられるにもかかわらず、その実態は不明な点が多く、リスクの正しい評価ができていない。また、Q 熱においても、典型的な患者報告が極めて少なか

ったが、最近典型的な患者の発生が報告された。従って、国内に存在することは間違いないが、その存在様式等はやはり不明な点が多い。ジフテリア毒素産生コリネバクテリウムウルセランス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指摘されているが、その実態はやはり不明な点が多い。また、ライム病ボレリア、レプトスピラなどに関してもその生態系における国内での存在様式を明らかにする必要がある。本研究はこれらの点を踏まえ、動物由来感染症の病原体の生態系における存在様式を精査し、そのリスク評価を改めて行う。一方、国内への侵入が憂慮される狂犬病について、国内侵入をいち早く察知するために不可欠な診断技術向上のため、実習用モデルの試作を行う。一方、狂犬病侵入のリスクが他地域よりも高い可能性のある地域で、交通事故死したような野生動物に関して、脳組織を狂犬病検査に供するようなモデルシステムの構築を試みる。

## B. 研究方法

病原体あるいは抗体の検出は個々の報告書に記載した方法による。

## C. 研究結果

### (1) Q 熱に関する研究

今年度は、*C. burnetii* DNA の簡便な定量可能検出法として Real time PCR 法を確立した。従来の Nested PCR 法と比較したところ、感度は同等であったが定量可能であることと簡便な点でより優れていた。また、nested PCR における positive control によるコンタミネーションの問題を解決するため、リコンビナントプラスミド positive control を作成した。これらの方法を応用し、イヌ血液からの抽出 DNA986 検体について *C. burnetii* DNA 検出を行ったが、すべて陰性であった。また、イヌ血清 1098 検体と、ネコ血清 582 検体について抗体価測定を行ったところ、イヌでは 2.1%、ネコでは 6.2% の抗体保有率を示した。これらの成績はヒトの Q 熱においてイヌ、ネコの関与は以前の報告ほど高率ではなく、健康なペットからヒトへの感染リスクも低い可能性が示唆された。

### (2) ボレリアに関する研究

昨年度に引き続き、ボレリアの浸潤地域拡大への野鳥の関与の実態を探るための全国規模調査を行った。野鳥 50 種以上から採取したマダニ 1,250 個体中 87 個体(7.0%)から *Borrelia* DNA

が検出された。この内、ライム病病原体である *B. garinii* は 52 個体 (59.8%) であった。また、野鳥寄生幼ダニから分離ボレリア 49 株について、鞭毛抗原遺伝子 *flaB* による系統解析を行ったところ、欧州のボレリアと極めて近縁なボレリアが国内にも浸潤していることが明らかとなった。野鳥を介して欧州のボレリアが我が国に侵入した可能性が考えられる。一方、分布が国内に限局する *B. japonica* の媒介ベクターであるヤマトマダニは野鳥から見いだされなかったことから、野鳥類の移動に付随して拡散しやすいマダニ種とこれを媒介種とするボレリア種が存在すると考えられた。

### (3) コリネバクテリウムに関する研究

今年度は大阪府の動物愛護センター収容のイヌ 399 頭中 40 頭から菌が分離された。菌の糸状解析結果と収容施設の管理状況調査結果から、本菌はイヌ間で容易に伝播することが明らかとなった。これらのイヌから分離した菌株は過去にジフテリア様症状を呈したヒトから分離された株と遺伝学的に近縁であることが確認された。宮城県、群馬県および岡山県においてイヌ、ネコ、ウシについて PCR および菌分離を試みたがいずれも陰性であった。また、乳房炎などの徴候を有するウシでも菌検出はできなかった。宮城県のブタ 103 頭中 7 頭に疑わしい遺伝子が検出されたため、シーケンスでの確認を検討中である。

### (4) 野生動物の感染症に関する研究

飼育下のペンギンは種々の感染症に抵抗性が低いとされる。したがって、鳥インフルエンザやウエストナイル熱の侵入に際して最初の感染鳥類の一つになることが予想されるが、病勢鑑定のための病理学的背景データは十分に蓄積されていない。そこで 2000 年から 2008 年に岐阜大学に送付されたペンギン目 54 例について病理組織学的検索を行ったところ、死因として最も多かったのは、鳥マラリア症およびアスペルギルス症を含む感染症であった。また、換羽や育雛の時期の疾病発生率が高かったことから、これらの時期における免疫力の低下が重篤な疾病発生に関わっていると考えられた。一方、我が国の愛玩鳥あるいは動物園展示鳥類における鳥抗酸菌症の病態と感染経路について検索した。過去に鳥抗酸菌症と診断された 16 例の全例に *Mycobacterium (M) genavense* 感染の特徴とされる巣状～瀰慢性の肉芽腫性病変が認められ、*M. avium* 感染の特徴とされる乾酪壊死を伴う肉芽腫は認められなかった。PCR でも 10 例中

8例で *M. genavense* (MG)感染が示唆された。ウズキバトに集団発生した鳥抗酸菌症 23例の検索では、全例で肺感染が認められ、エアロゾルによる経気道感染が示唆された。免疫不全患者への鳥抗酸菌の感染を考慮して、鳥類における感染状況を把握する必要がある。

#### (5) ブルセラ症に関する研究

昨年度に続き、国内の野生イノシシおよびシカにおけるブルセラ属菌に対する抗体の保有状況を検討した。家畜ブルセラ菌に対する抗体は昨年度と同様検出されなかったが、イヌブルセラ菌に対する抗体が 77 頭中 4 頭のイノシシ及び 52 頭中 1 頭のシカで認められた。国内にイヌブルセラ菌が定着していることを考えるとイノシシ及びシカで認められた陽性反応がイヌブルセラ菌に対する真性の反応かそれとも非特異的反応や他の細菌との交差反応であるかなど、さらなる検討が必要である。

#### (6) 野兎病に関する研究

本研究期間中に数例の野兎病患者発生が報告されるとともに、猟友会により野兎病菌感染ノウサギが発見された。そこで周辺地域における小型野生哺乳類、ダニ、ならびに水、土壌からの野兎病菌の分離、ゲノム DNA の検出を試みた小型哺乳類では血清学的検索も行った。小型哺乳類は菌分離、ゲノム DNA 検出とも陰性で、野兎病菌に対する抗体も検出されなかったが、周辺の土壌から野兎病菌ゲノム DNA が検出された。また、水 1 検体から DNA が検出された。今後も更なる調査により自然環境での野兎病菌維持様式を検討する必要があると考えられた。

#### (7) 狂犬病に関する研究

昨年度に引き続き狂犬病発症が疑われるイヌの解剖手技習得に必要なモデル・教材として (1) 解剖手順習得モデル、(2) 実技取得モデル、(3) 脳モデルのプロトタイプを作成した。これらのモデルについて自治体等関係機関の現場担当者等とともに、改良点や課題点について検討を行った。

#### D. 考察

Q 熱に関しては検査法の精度を改良することにより、これまでの報告は過大評価である可能性を示すとともに、国内においてはイヌ・ネコの本疾患の伝播における役割は従来考えられていたよりも低い可能性が示された。更なる野外調査が確認のために必要である。一方、野鳥の調査により、シュルツエマダニはヤマトマダニより野鳥への寄生率が高く、またこのマダニ種か

らは広域性ボレリアが効率的に検出されることが明らかになった。即ち特定のボレリアが特定のダニによって鳥類を介し分布域を拡大している可能性を示すことができた。今後例数を増やし確認する必要がある。コリネバクテリウムウルセランスについては、本菌のヒトへの感染源としてのブタの関与の程度を今後明らかにする必要がある。ブルセラ症に関しては野外で捕獲されたイノシシ、シカでイヌブルセラ菌に対する抗体陽性の個体が検出された。これが真にイヌブルセラ菌の感染によるものであるか、それとも何らかの原因による交差反応であるかなどを明らかにする必要がある。近年ヒトとノウサギで野兎病菌の感染例が見いだされたことは本菌が日本の生態系で維持されていることを意味している。特に感染のウサギの発見された場所の調査により、土壌あるいは水系の関与が強く示唆された。今後はどのような機構で本菌が自然界で維持されているかさらに詳細に検討する必要がある。野生動物の感染症は多数に及びそのうちヒトに対して重要なものは抗体調査および抗原・遺伝子検索で検出を試みることになるが、リスク評価にまでつなげることは難しいかも知れない。従って、猟犬あるいは野生動物関係者の血清学的調査で曝露を含めたリスク評価ができる可能性がある。来年度以降はこの点に焦点を絞りたい。狂犬病診断のためのイヌ頭部モデルの作成は順調に進んでいる。最終年度に実用化できる見通しである。

#### E. 結論

国内での存在は明らかにされているがその存在様式が不明な動物由来感染症について実態調査を昨年度に引き続き実施した。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 紙上発表

1. Hanaoka N, Sakata A, Takano A, Kawabata H, Watanabe H, Kurane I, Kishimoto T, Ando S. Development of a pUC19-based recombinant plasmid to serve as a positive control in PCR for *Orientia tsutsugamushi*. *Microbiology Immunology*. (Accepted)
2. Takada N, Fujita H, Kawabata H, Ando S, Sakata A, Takano A, Chaithong U. *Rickettsia japonica* in Thailand. *Emerging*

Infectious Diseases. (Accepted)

3. Takano A, Ando S, Kishimoto T, Fujita H, Kadosaka T, Nitta Y, Kawabata H, Watanabe H. Novel *Ehrlichia* sp. found in *Ixodes granulatus* infested to rodents in Okinawa, Japan. *Microbiology and Immunology*. (In press)
4. 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.*, 70:707-709, 2008
5. Seto Y, Komiya T, Iwaki M, Kohda T, Mukamoto M, Takahashi M, and Kozaki S.: Properties of corynebacterium attachment site and molecular epidemiology of *Corynebacterium ulcerans* isolated from humans and animals in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 61(2):116-22. 2008
2. 学会発表
  1. 高野 愛, 藤田博己, 安藤秀二, 川端寛樹, 渡邊治雄. 野生鳥類を主とした国内生態系におけるボレリアの存在様式と病原体拡散に関するリスクの検討. 第82回日本細菌学会総会. 2009年3月. 愛知.
  2. 大橋典男, 鳥日図, 高蛙, 川森文彦, 高野愛, 川端寛樹, 安藤秀二, 岸本壽男. 国内初の新興感染症「アナプラズマ症」について. 第82回日本細菌学会総会. 2009年3月. 愛知.
  3. 井上 快, 壁谷英則, 川端寛樹, 宇根有美, 吉川泰弘, 丸山総一. 小型哺乳類を自然宿主とする病原性 *Bartonella* 属菌の生態に関する研究. 第147回日本獣医学会学術集会. 2009年3月. 栃木.
  4. 岡田玲奈, 木花いづみ, 武藤麻紀, 高野愛, 川端寛樹, 渡邊治雄. ライム病の一例. 第823回日本皮膚科学会東京地方会. 2009年1月. 神奈川.
  5. 川端寛樹, 高野 愛, 渡邊治雄. 実験室内に病原体の姿を探る. 第63回日本衛生動物学会西日本支部大会 (教育講演). 2008年11月. 神戸.
  6. 大橋典男, 高蛙, 鳥日図, 川森文彦, 千屋誠造, 安藤秀二, 川端寛樹, 岸本壽男. 新興感染症「アナプラズマ症」患者の発見. 第26回日本クラミジア研究会・第15回リケッチア研究会合同学術集会. 2008年11月. 岐阜.
  7. 安藤秀二, 坂田明子, 宇根有美, 五箇公一, 藤田博己, 花岡 希, 高野 愛, 川端寛樹, 岸本壽男. 輸入爬虫類が病原体を持ち込むリスクに関する考察. 第26回日本クラミジア研究会・第15回リケッチア研究会合同学術集会. 2008年11月. 岐阜.
  8. 岸本壽男, 安藤秀二, 猪熊壽, 岩崎博道, 大橋典男, 岡部信彦, 川端寛樹, 倉田毅, 高田伸弘, 堤寛, 田原研司, 藤田博己, 古屋由美子, 山本正吾. リケッチア感染症の早期警鐘システム構築・国内実態調査及び早期診断体制の確立に向けた現状と課題. 第26回日本クラミジア研究会・第15回リケッチア研究会合同学術集会. 2008年11月. 岐阜.
  9. 安藤秀二, 坂田明子, 鶴見みや古, 尾崎清明, 藤田博己, 花岡希, 高野 愛, 川端寛樹, 渡邊治雄, 岸本壽男. 鳥類に関連するマダニ類からのリケッチアの検出. 第146回日本獣医学会学術集会. 2008年9月. 宮崎.
  10. 高野 愛, 鶴見みや古, 尾崎清明, 藤田博己, 安藤秀二, 川端寛樹, 渡邊治雄. 野生鳥類を主とした国内生態系におけるボレリアの存在様式と病原体拡散に関するリスクの検討. 第146回日本獣医学会学術集会. 2008年9月. 宮崎.
  11. 森 亜紀奈, 今内 覚, 山田慎二, 今村彩貴, 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*) 唾液腺由来免疫抑制因子の同定および発現解析. 第146回日本獣医学会学術集会. 2008年9月. 宮崎.
  12. 下長根藍, 井上 快, 壁谷英則, 川端寛樹, 高田伸弘, 林谷秀樹, 丸山総一. わが国の野鼠における *Yersinia enterocolitica* の保有状況と分離株の *gyrB* 遺伝子系統解析. 第146回日本獣医学会学術集会. 2008年9月. 宮崎.
  13. 鶴見みや古, 尾崎清明, 藤田博己, 坂田明子, 武藤麻紀, 高野愛, 山内健生, 川端寛樹, 安藤秀二, 岸本壽男. 鳥類外部寄生虫からの病原体の検出—鳥類標識調査を主とした外部寄生虫採集—. 日本鳥学会 2008年度大会. 2008年9月. 東京.
  14. 藤田博己, 安藤秀二, 川端寛樹, 坂田明子, 高野 愛. 福島県のハシブトマダニとタネガタマダニからのリケッチア分離例. 第60



- 回日本衛生動物学会大会. 2008年4月. 栃木.
15. 本田俊郎, 藤田博己, 藏元強, 御供田睦代, 角坂照貴, 高田伸弘, 矢野泰弘, 川端寛樹, 高野 愛, 山本正悟, 田原研司, 及川陽三郎. 鹿児島県トカラ列島のマダニ相とマダニ保有病原体の調査. 第60回日本衛生動物学会大会. 2008年4月. 栃木
  16. 本田俊郎, 角坂照貴, 川端寛樹, 高野 愛, 藤田博己, 藏元強, 御供田睦代, 高田伸弘, 矢野泰弘, 山本正悟, 田原研司, 及川陽三郎. 鹿児島県トカラ列島の野鼠類と野鼠保有病原体の調査. 第60回日本衛生動物学会大会. 2008年4月. 栃木
  17. 川端寛樹, 坂田明子, 安藤秀二, 高野 愛, 渡辺治雄, 鶴見みや古, 尾崎清明, 藤田博己. 国内生態系における *Borrelia* 属細菌の拡散に関与する宿主鳥類と媒介マダニ. 第60回日本衛生動物学会大会. 2008年4月. 栃木.
  18. 川端寛樹, 高野 愛, 安藤秀二, 花岡希, 坂田明子, 藤田博己, 河村好章, 清島真理子, 角坂照貴, 渡辺治雄. マダニ刺咬例調査によって見いだされた新しいボレリア感染症. 第82回日本感染症学会総会 2008年4月. 島根
  19. 田原研司, 藤田博己, 新井 智, 矢野泰弘, 高田伸弘, 片山 丘, 川端寛樹. 島根県におけるダニ媒介性感染症の実態と病原体の浸淫状況. 第82回日本感染症学会総会 2008年4月. 島根
  20. 勝川千尋, 小宮貴子, 岩城正昭, 高橋元秀: 本邦で初めてイヌから分離されたジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* 第81回日本細菌学会総会 平成20年3月 京都
  21. Takako Komiya, Shin-ichi Nureki, Shoji Asakura, Masaaki Iwaki, Yoshichika Arakawa and Motohide Takahashi. Recent *Corynebacterium ulcerans* cases in Japan. Ninth ELWGD & Diphtheria Surveillance Network (DIPNET), October 2008, Athens (Greece).
  22. 小宮貴子, 岩城正昭, 荒川宜親, 高橋元秀, 畑中 章生, 角田篤信: 参考症例 *Corynebacterium ulcerans* 感染症、第19回日本臨床微生物学会総会 2008
  23. 「ペンギンの背景病変」柳井徳磨、中村涼子、村上麻美、酒井洋樹、柵木利昭、加納壘、村田浩一。日本内科学アカデミー・日本獣医臨床病理学会 2009年大会 (2009年東京)
  24. 奥谷晶子, 井上智, 今岡浩一, 山田章雄. Pyrosequencingによる炭疽菌, ペスト菌およびブルセラ属菌の迅速同定法の確立. 第146回日本獣医学会学術集会, 宮崎, 2008年9月
  25. 内田幸憲, 鎌倉和政, 後藤郁夫, 杉本昌生, 福士秀人, 丸山総一, 岸本壽男, 今岡浩一, 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. 第8回人と動物の共通感染症研究会学術集会, 東京, 2008年11月
  26. 「*Mycobacterium genavens*感染が疑われた鳥抗酸菌症およびアスペルギルス症を併発したシロムネオオハシの1例」福田真弓、柳井徳磨、酒井洋樹、柵木利昭、福士秀人、加納壘、長谷川篤彦、森康行、長嶺隆。第145回日本獣医学会学術集会 (2008年相模原)
  27. 「ウスユキバト (*Geopelia cuneata*) 飼育群における抗酸菌感染事例」福田真弓、柳井徳磨、酒井洋樹、柵木利昭、森康行。第12回鳥類臨床研究会大会 (2008年東京)
  - 28.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む.)  
なし

## Q 熱コクシエラの生態系における感染リスク評価に関する研究

研究分担者 岸本壽男 国立感染症研究所 ウイルス第一部第五室 室長  
研究協力者 吉 林 台 国立感染症研究所 ウイルス第一部第五室 研究員  
猪熊 壽 帯広畜産大学畜産学部獣医学科 教授  
花岡 希 国立感染症研究所ウイルス第一部第五室 リサーチレジデント  
安藤秀二 国立感染症研究所 ウイルス第一部第五室 主任研究官

研究要旨 今年度は、ペットとしてのイヌ、ネコにおける Q 熱の感染状況を把握し、ヒトへの感染リスクを評価することを目的とした。まず、*C. burnetii* DNA を定量可能で簡便な Real time PCR 法を確立し、従来の Nested PCR 法と比較検討を行った。感度は同等であったが Real time PCR 法が定量可能で簡便な点でより優れていた。また、従来の nested PCR を施行する際の positive control によるコンタミネーションの問題を解決するため、確認検証が可能なリコンビナントプラスミド positive control を作成した。これらの方法を応用し、ペットの Q 熱に対する感染状況を、血液サンプルからの DNA 検出と抗体保有率で調査した。イヌでは 28 都道府県で採取された 1098 頭の血清 1098 検体と、うち 25 都道府県の血液からの抽出 DNA サンプル 986 検体を用いた。また、ネコでは 30 都道府県で採取された 582 匹の血清サンプルについて抗体価測定を行った。イヌでは *C. burnetii* DNA が検出された検体はなかった。イヌでは 2.1% の抗体保有率を示し、ネコでは 6.2% の抗体保有率を示した。今回の調査ではいずれもこれまでの報告より低い抗体保有率を示したことから、イヌ、ネコにおける Q 熱の関与は以前の報告ほど高率ではなく、健康なペットからヒトへの感染リスクも高くない可能性が示唆された。

### A. 研究目的

本邦における Q 熱は 4 類感染症として重要であるが、不明な点が多い。ペットからの感染が疑われる例や非典型例が多いとされていたものの、感染経路や実態の解明はほとんどなされていない。特に、*Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) の生態系での存在様式については全く不明であるため、家畜を含む動物並びに環境、人での実態について調査を行い、国内における本病原体の存在様式を明らかにすることを目的とした。すなわち①ヒト、ペット、家畜、野生動物、環境、における Q 熱コクシエラ感染の実態調

査。②国内における本病原体の存在様式、感染源、感染経路の解明。③過去の疫学データとの比較検証と、現在の感染リスクの評価。を目指した。

本年度は、*C. burnetii* のペット(イヌ、ネコ)におけるヒトへのリスク評価を目的に、血液、血清を用いた全国レベルでの疫学調査を計画した。

### B. 研究方法

1) *C. burnetii* DNA に対する定量かつ簡便な検索方法の検討と確立

まず動物サンプルからの正確で簡便な *C. burnetii* DNA の検出法について検討した。

Klee(2006)らの報告を基に、ターゲットになる76bpの塩基を合成し、Taqman MGB プローブを用いて、*C. burnetii* の *icd* ゲノムをターゲットとした Real time PCR 系を作成し、合成 Oligo-*icd*439~514 を用いて、定量化分析を行った。

#### 2)Nested PCRのPositive controlとするリコンビナントプラスミドの作成

外膜蛋白の *com1* ゲノムをターゲットとした Nested PCR で検出される PCR 産物サイズが 1st 500bp と 2nd 437bp であるが、これに対して、同じ PCR システムの中で、産物が 1st 620bp、2nd 580bp になるリコンビナントプラスミド pUC19\_Qposi を作成し、*C. burnetii* DNA スクリーニングに際してコンタミネーションを確認検証可能になることを目指した。

#### 3)Real time PCRとNested PCRの検出効率の比較検討

Real time PCR 及び Nested PCR で合成 Oligo 及びリコンビナントプラスミドを用いて、其々の方法で理論的に検出できるコピー数を測定するとともに、*C. burnetii* DNA を用いて、検出効率について検討した。

#### 4)Q 熱に関する遺伝子疫学調査

遺伝子検出用の検体は、個人開業動物病院及び大学動物病院の協力を得て、イヌについてのみ収集されたものを用いた。検体は 25 都道府県(北海道、青森、宮城、栃木、東京、神奈川、静岡、山梨、愛知、福井、滋賀、大阪、京都、奈良、和歌山、兵庫、島根、高知、福岡、大分、熊本、長崎、宮崎、広島、茨城等)で収集されたイヌの血液 DNA サンプル 986 検体を用いた。DNA サンプルを採取したイヌの年齢に関しては、子犬期(1M-1 歳)71 匹、成犬期(2-6 歳)251 匹、中高齢期(7-10)324 匹、高齢期(11-17 歳)147 匹、年齢不明が 193 匹。性別に関しては、メ

ス 390 匹、オス 343 匹、性別不明 163 匹であった。

今回検討した Real time PCR 法を用いて、*C. burnetii* DNA のスクリーニングを行い、陽性あるいは非特異反応が疑われたものについては Nested PCR を実施し確認した。

#### 5)Q 熱に関する血清疫学調査

材料としては、イヌに関しては、28 都道府県からの血清 1098 検体を使用した。ネコについては、30 都道府県(宮城、福岡、山梨、奈良、宮崎、香川、長野、沖縄、北海道、兵庫、新潟、千葉、福島、熊本、長崎、山口、鳥取、大阪、三重、青森、埼玉、神奈川、徳島、静岡、愛知、和歌山、福井、京都、栃木、東京等)からの血清 582 検体を使用した。

イヌの年齢に関しては、子犬期、成犬期、中高齢期、高齢期、年齢不明がそれぞれ 71 匹、371 匹、365 匹、149、142 匹で、性別は、メス 414 匹、オス 467 匹、性別不明が 217 匹であった。

ネコの年齢構成に関しては、成長期(1M-1 年)83 匹、青年期(2-5 年)163 匹、中高年齢期(6-10 年)159 匹、高齢期(11-15)118 匹、老年期(16-20)39 匹、年齢不明が 20 匹で、性別はメス 248 匹、オス 307 匹、性別不明が 27 匹であった。

測定法は抗原として *C. burnetii* Nine-mile 株を用いる IFA 法を用いて抗体をスクリーニングし、その分布状況から cut off を設定、抗体保有検体については Western blot(WB)法を用いて特異抗体を確認した。

#### (倫理面への配慮)

本研究に用いた全検体は飼い主の承認を得た上で実施している。また、遺伝子組み換え操作についても当機関の遺伝子組み換え審査委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

### 1) *C. burnetii* DNA に対する定量かつ簡便な検索方法の検討と確立

*C. burnetii* の icd ゲノムをターゲットとした Real time PCR に関する、定量化分析では、理論的検出限界コピー数は3コピーであった。

### 2) Nested PCR の Positive control とするリコンビナントプラスミドの作成

作成したリコンビナントプラスミドは、理論的検出限界コピー数が 12.5 コピーであった。

### 3) Real time PCR と Nested PCR の検出効率の比較検討

*C. burnetii* DNA 希釈系列を用いた検出限界の比較では、Real time PCR の 1:4 に対して、Nested PCR では 1:2 を示し、Real time PCR の検出感度はほぼ同等であると考えられた。

4) Q 熱に関する遺伝子疫学調査: Real time PCR を用いて、25 都道府県からのイヌの血液 DNA サンプル 986 検体に対して、*C. burnetii* DNA のスクリーニングを行い、陽性あるいは非特異反応が疑われたものについて Nested PCR を実施し確認した。その結果、*C. burnetii* の DNA が検出されたサンプルは認められなかった。

### 5) Q 熱に関する血清疫学調査

イヌの血清について IFA を実施した結果、1098 検体のうち熊本、和歌山、宮城、福井、神奈川、宮崎、京都、長崎、奈良、大分、千葉、高知の 12 県からの 22 検体については、1:64~512 (1:64 は 8 検体、1:128 は 9 検体、1:256 は 4 検体、1:512 は 1 検体) の抗体を保有し、全検体の 2% で陽性を示した。更に WB 法を用いて 27KDa バンドを基準とし確認した結果、イヌの IFA 陽性血清では抗体価 1:

256 以上の全検体が WB 法でも陽性を示したものの、1:128 及び 1:64 では一部が陽性、一部が陰性結果を示した(表 1、図 1)。

また、ネコの血清サンプル 582 検体のうち福島、熊本、長崎、山口、鳥取、大阪、三重、青森、埼玉、神奈川、徳島、宮崎、福岡、愛知、宮城、長野、沖縄、兵庫、新潟、千葉、和歌山、京都、栃木、東京の 24 都道府県からの 35 検体については、1:128~2048 (1:128 は 2 検体、1:256 は 10 検体、1:512 は 15 検体、1:1024 は 7 検体、1:2048 は 2 検体) の抗体を保有し、全検体の 6.2% で陽性を示した。WB 法でネコの IFA 陽性検体を検討したところ、IFA 抗体価が 1:1024 以上の検体が WB でも全て陽性、抗体価 1:128 以下の検体では WB 全て陰性、1:256~1:512 の検体では一部が陽性、一部が陰性を示した(表 2、図 2)。WB の感度についてはさらに検討する必要があると考えられた。

疾患等バックグラウンドについては、イヌに関しては、記録不全、相当な数のサンプルにおいて、年齢不明であったが、高齢期(11~17 歳)のイヌの抗体保有率が高い傾向を示した(表 3)。ネコに関しては詳細な記録があり、疾患別に検討したところ、子宮蓄膿症に高い保有率を示したほかは、疾患との関連が認められなかった(表 4)。ただし頭数が少ないため、関連について有意の有無は不明であり、今後検討の必要があると考えられた。

年齢別では、成長期(1ヶ月~1歳)のネコが高い抗体保有率を示し、青年期、中高齢期、高齢期までに抗体保有率が減少する傾向を示した(表 5)。

## D. 考察

本研究では、*C. burnetii* 遺伝子スクリーニ