

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	岡山県環境保健センター	所長
研究協力者	木田浩司	岡山県環境保健センター 保健科学部	研究員
	葛谷光隆	同	専門研究員
	濱野雅子	同	専門研究員
	中嶋 洋	同	科長
	藤井理津志	同	部長
	猪熊 壽	帯広畜産大学畜産学部獣医学科	教授
	福士秀人	岐阜大学農学部獣医学科獣医微生物学講座	教授
	大屋賢司	同	准教授

研究要旨 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の一環として、本年度は、ウシにおける、*C. burnetii* の抗体保有率および遺伝子検出率について検討し、感染リスクの評価のための基本状況の把握を行った。検体提供について協力が得られた北海道の5牧場で飼育されるウシ431頭を対象にした。血清抗体価は、全血と血清が同時に採取された4牧場(A,B,C,D)の322血清と、血清のみ採取された1牧場(E)の109検体を用いIFAを施行した。全体としては10.4%が*C. burnetii*抗体陽性と判定された。しかしながら、E牧場においては、陽性が28.4%と他の牧場に比べて非常に高い値を示した。E牧場を除いた4牧場における陽性の割合は4.3%であった。ウシ全血から抽出したDNA、計322検体についてReal-time PCR法にて遺伝子検出を実施したが、全検体陰性であった。抗体保有率が高かったE牧場のウシではDNAについては検討できなかったため、採材時点での感染の有無は不明であるが、過去に流行等があった可能性は否定できず、地域によっては一定の感染リスクは存在する可能性が示唆された。今後感染リスクの評価を適切に行うためには、さらにウシの検体を増やして詳細な検討を行うとともに、未だ不明な野生動物やダニ等の生態系での存在様式についても検討することが必要と考えられた。

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、不明な点が多く、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不明であるため、家畜を含む動物並びに環境、ヒトでの実態につ

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。これまでにヒト、ペットとしてのイヌ、ネコでの疫学調査を報告したが、本年度は、家畜としてのウシを対象に抗体疫学調査と、遺伝子疫学調査を実施した。

B. 研究方法

1) Q 熱に関する血清疫学調査

帯広畜産大学の協力により、北海道内の 4 牧場(A,B,C,D)で飼育されるウシから全血と同時に採取された 322 血清と、血清のみ採取された 1 牧場(E)の 109 検体を検体として用いた。血清中の抗 *C. burnetii* 抗体は、*C. burnetii* 感染細胞をスライドグラス上に固定したもの(オリエンタル酵母(株))を抗原とした間接蛍光抗体法(IFA)により検出した。一次抗体として、リン酸緩衝液(PBS)にて 128 倍希釈したウシ血清を 37°C で 1 時間反応させた。PBS にて 5 分 2 回洗浄後、FITC 標識抗ウシ IgG (cappel)を 37°C、1 時間反応させた。PBS にて 5 分 2 回洗浄後、蛍光顕微鏡にて観察した。封入体と細胞質内粒子の染色像の認められるものを陽性、封入体のみが染色されるものを擬陽性として判定し、擬陽性については *C. burnetii* 抗体とはみなさないこととした。カットオフ値を決定するための予備試験として、無作為に抽出した 32 検体について 1:32 から 1:256 希釈し、蛍光像を観察した。1:64 までは非特異的な反応がみられた。したがって今回は血清を 1:128 希釈し、本試験を実施した。

2) Q 熱に関する遺伝子疫学調査

遺伝子検出用の検体は、血清と同じく帯広畜産大学の協力により、北海道内 4 牧場(A,B,C,D)のウシから血清と同時に採材された全血を用い、そこから抽出した DNA、計 322 検体について Real-time PCR 法による遺伝子疫学調査を実施した。

C. burnetii の Real-time PCR 法は、

Klee(2006)らの報告をもとに、既存分離株において保存性の高い領域である Isocitrate dehydrogenase (icd) gene をターゲットに、Taqman probe による検出系で行った。Primer および Taqman probe は、それぞれ icd-439F= CGTTATTTTACGGGTGTGCC A(439-459),icd-514R=CAGAATTTTCGCG GAAAATCA(494-514),FAM-CATATTCAC CTTTTCAGGCGTTTTGACCG-TAMRA(464-492)を使用した(GenBank accession no. AF146284)。

また、昨年度の検討で良好な結果が確認された合成 Oligo-icdCGTTATTTTACG GGTGTGCCAAGCCCGGTCAAACGCC TGAAAAGGTGAATATGGTGATTTTCCG CGAAAATTCTG (439-514) を Internal control として、定量分析を行った。

C. 研究結果

1) Q 熱に関する血清疫学調査

IFA の結果を表 1 に示した。全体としては 10.4%が *C. burnetii* 抗体陽性と判定された。しかしながら、E 牧場においては、陽性が 28.4%と他の牧場に比べて非常に高い値を示した。E 牧場を除いた 4 牧場における陽性の割合は 4.3%であった。

2) Q 熱に関する遺伝子疫学調査

Real-time PCR 法による *C. burnetii* 遺伝子検出は 322 検体すべて陰性であった。

D. 考察

ウシ血清から *C. burnetii* 抗体が数%検出された 4 牧場の抗体陽性のウシの全血 PCR では *C. burnetii* 遺伝子が検出されていない事、および今回測定した抗体が IgG 抗体であることから、この抗体は過去の感染を示唆するものと考えられる。北海道における

C.burnetii の抗体検出状況は、Yanase ら (Microbiol. Immunol. 41: 73-75. 1991) が 1 農場のウシ 364 頭中 28 頭 (7.7%) から検出したとの報告がある。彼らは抗体検出率に季節変動があったことや、抗体が少なくとも 5 ヶ月は維持される事も報告している。今回の結果は彼らの成績とほぼ一致するものであった。しかし 1 牧場(E 牧場)においては、他と比較して顕著に検出率が高かった。これは過去に *C.burnetii* の集団感染等があった可能性を示すものかもしれないが、今回当該牧場におけるウシの健康状態の情報がないため、*C.burnetii* 感染と疾病との関連性は不明である。ヒトへのリスクをより正確に評価するためには、今後 IgM を追加測定し、急性感染や最近の感染との関連も検討することに加えて、ウシの疾病との関連性の調査検討が重要である。とくに *C.burnetii* は反芻動物の胎盤で大量に増殖することから、流産や出産時の胎盤の PCR は集団発生や実態を明らかにする上で重要なポイントとなる。また今回北海道のウシを調査したが、他の地域での調査も必要と考えられた。さらに生態系での感染様式の解明として、野生動物やダニについての検討も重要であり、今後の課題である。

E. 結論

北海道のウシにおける、*C.burnetii* の抗体保有率および遺伝子検出率について検討し、基本状況を把握した。全体として約 10% に過去の感染を示唆する IgG 抗体が検出され、過去の報告とほぼ同様であった。同時に遺伝子検出を施行した 4 牧場の全血検体では陽性例はなく、急性感染を示唆するものは認めなかったが、遺伝子検査が施行できなかった 1 牧場では抗体保有率が他に比

べて顕著に高く、牧場間で大きな差を認めた。このことから、地域によっては一定の感染リスクは存在する可能性が示唆された。今後さらにより詳細な検討が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 岸本寿男、吉林台、猪熊 壽、花岡希、坂田明子、小川基彦、安藤秀二、福士秀人、大屋賢司、矢野竹男、山田章雄.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.第 27 回日本クラミジア研究会・第 16 回リケッチア研究会合同学術集会.平成 21 年 11 月 7 日.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

表 1 北海道内の牧場における Q 熱抗体調査成績

	陽性	擬陽性	陰性	計
A 牧場	8 (9.6)	2 (2.4)	73 (88.0)	83 (100.0)
B 牧場	2 (2.2)	9 (9.9)	80 (87.9)	91 (100.0)
C 牧場	1 (1.1)	4 (4.4)	86 (94.5)	91 (100.0)
D 牧場	3 (5.3)	3 (5.3)	51 (89.5)	57 (100.0)
E 牧場	31 (28.4)	38 (34.9)	40 (36.7)	109 (100.0)
総計	45 (10.4)	56 (13.0)	330 (76.6)	431 (100.0)

() 内は、%を示す。

陽性：封入体と細胞質内粒子の染色像を確認。擬陽性：封入体のみが染色。

国内生態系内で新たに見出された回帰熱群ボレリアに関する研究

研究分担者 川端寛樹（国立感染症研究所・細菌第一部）

研究協力者 鶴見みや古，仲間昇，佐藤文男，尾崎清明（山階鳥類研究所）
武藤麻紀，高野 愛，小笠原由美子，渡辺治雄（国立感染症研究所・細菌第一部）
坂田明子，花岡希，安藤秀二，倉根一郎（同上・ウイルス一部）
阿戸学，渡辺恵理（同上・免疫部）
藤田博己（大原総合病院附属大原研究所）
大橋典男（静岡県立大学）

研究要旨

本年度までの3年間に渡って，国内生態系，特に野生鳥類生態系による病原体拡散に関するリスク評価のための基礎データ収集を全国規模で行った．この調査研究の過程で，新規に回帰熱病原体類縁のボレリアを見出したのでその生体リスクに関する評価を行った．

本ボレリアは，1) housekeeping 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析の結果から，北米で回帰熱病原体として見出される *Borrelia turicatae*, *B. parkeri* と類縁であること，2) 国内棲息の鳥類寄生マダニであるサワイカズキダニが媒介ベクターである可能性が高いことを明らかとした．

回帰熱群ボレリアの国内侵入が初めて明らかになったことで，今後そのリスク評価とサーベイランスの強化が重要であると思われる．

国内生態系内で新たに見出された回帰熱群ボレリアに関する緊急研究

A. 目的

感染症法規定疾患には動物由来感染症は50疾患が含まれているが，このうちの約半数は節足動物媒介性感染である．さらにマダニが媒介する疾患はペスト，クリミア-コンゴ出血熱など1類感染症を含む13疾患であり，公衆衛生上，重要な位置づけがなされている．

そこで本研究では，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の一環として，マダニが媒介する動物由来感染症の国内における生態系内での存在様式を調べることで，また，存在様式から想定できる病原体の非人為的拡散に関するリスク因子

を明らかにすることを目的として平成19年度より三年度に渡って，調査研究をおこなってきた．この過程で関西地方の渡り鳥コロニーに棲息するマダニの一種サワイカズキダニ（学名：*Carios sawaii*）より回帰熱ボレリアの遺伝子断片が見出された．国内では，統計が存在する1956年以降，回帰熱症例，および野生動物やマダニなどの環境材料からの回帰熱病原体の検出はなされていなかったことから，ボレリアの遺伝学的同定，本マダニの保菌率，およびボレリアの媒介種としての評価を行った．また検出されたボレリアの病原性を調べるためにマウスを用いた接種実験も試みた．

B. 方法

マダニ材料

マダニ材料は京都府沓島に生息する海鳥の一種オオミズナギドリ (*Calonectris leucomelas*) およびヒメクロウミツバメ (*Oceanodroma monorhis*) のコロニーより採集した。採集マダニは 77 頭 (若虫 55 頭, オス 11 頭, およびメス 11 頭) である。これらマダニは形態学的同定後, 一部は病原体検出のための DNA 抽出材料とした。DNA 抽出は DNeasy Blood&Tissue kit (Qiagen) を用いておこなった。抽出された DNA はその抽出, 精製を確認する目的で, マダニミトコンドリア DNA 上の *rrs* 遺伝子 (*mt rrs*) を増幅し, 電気泳動によって目的サイズの DNA 断片を確認した。また DNA 断片はその塩基配列を決定し, マダニ形態同定結果と照合を行った。病原体検出のための PCR ではボレリア *flaB* 遺伝子の一部を増幅するプライマーを用いた。*flaB*-PCR は nested-PCR により行った。PCR 陽性検体はコンタミネーションなどによる偽陽性を除外する目的で, *glpQ* 遺伝子による確認 PCR を行った。増幅 DNA は常法に従い塩基配列を決定した。また見出されたボレリアの同定を目的としてボレリア *16S rRNA* 遺伝子の DNA 増幅, 塩基配列を行った。

採取マダニの一部は実体顕微鏡下解剖し, 唾液腺組織, および中腸組織を間接蛍光抗体法による病原体の免疫染色材料として用いた。

さらにボレリア DNA が検出されたマダニ組織の一部は, C3H/HeN マウスを用いた接種実験に使用した (感染症研究所動物実験承認番号 108064)。

C. 研究結果 および D. 考察

採取マダニの同定

採取マダニは形態学的に *Carios* 属マダニと同定された。また *mt rrs* 遺伝子の塩基配列決定により遺伝学的にサワイカズキダニ (*Carios sawaii*) と同定された。

国内野生鳥類種寄生マダニから見出された回帰熱群ボレリア

マダニ *mt rrs*-PCR 陽性の 77 検体中, 25 個体 (若虫 14 個体, オス 6 個体, およびメス 5 個体) でボレリア DNA が検出された。これらボレリアの遺伝学的同定のために, ボレリアの housekeeping 遺伝子である, *flaB* 遺伝子および *16S rDNA* 遺伝子について PCR を行い, 増幅 DNA の塩基配列を決定し, 系統解析を行った。その結果, 本ボレリアは北米での回帰熱病原体である *Borrelia turicatae* および *Borrelia parkeri* と近縁のボレリア種 (以降 *Borrelia* sp. K64) であることが明らかとなった (図 1, A および B)。

サワイカズキダニによる本ボレリアの伝播の有無

これまでに, ボレリアはマダニ吸血により脊椎動物からマダニ中腸に感染後, マダニ体腔内に侵入したのち, 唾液腺へ移行し次の吸血源動物へ感染することが知られている。すなわち, マダニ唾液腺内部へボレリアが侵入していることは, そのマダニによって次の吸血源動物へボレリアが感染することを示している。そこで本研究では, ボレリア陽性マダニより唾液腺を採取し, その内部へのボレリア侵入を免疫組織染色および染色像の 3D 再構築を *in silico* 解析により行った。その結果, 用いた唾液腺組織内に複数のボレリアが侵入していることが明らかとなった (図 1 C)。またマダニ中腸内でのボレリアの定着も確認され

たことから (図 1D), 本マダニが *Borrelia* sp. K64 の媒介マダニであることが強く示唆された。

純系マウス(C3H/HeN)を用いたボレリアの感染性評価の試み

これまで回帰熱ボレリアを含むボレリア属細菌の感染モデルとして純系マウス C3H/HeN を用いた実験が世界で広く行われている。そこで本研究では、ボレリアを含むマダニ組織をマウス皮下接種し、本ボレリアの分離および感染性評価を試みた。しかしながら、経時的採血、および接種 3 週間後の臓器からはボレリア DNA は検出されなかった。今後は免疫不全マウスなどを用いた感染実験系などを行いその病原性について明らかにする必要があると考えられた。

E. 結論

国内で記録が存在する 1956 年以降、初めて回帰熱ボレリアの存在が見出された。今後、健康被害の有無など疫学調査、さらには病原体の分離とその病原性についての解析が必要である。また、本ボレリアは渡り鳥類のコロニーから見出されたことから、生態系の中でのボレリアの存在様式に鳥類が関与している可能性も示唆された。

【謝辞】

マダニ採取にご協力頂きました、狩野清隆氏および全国の鳥類標識調査協力員の皆様にご心より御礼申し上げます。またマダニ採取には厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業「リケッチア感染症の国内実態調査及び早期診断体制の確立による早期警鐘シス

テムの構築」研究班の協力を得ている。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Takano A, Muto M, Sakata A, Ogasawara Y, Ando S, Hanaoka N, Tsurumi M, Sato F, Nakamura N, Fujita H, Watanabe H, Kawabata H. Relapsing fever spirochete in seabird tick, Japan. **Emerging Infectious Diseases**. 15: 1528-1530, 2009.

2. 学会発表

- 川端寛樹, 高野 愛, 藤田博己, 武藤麻紀, 渡邊治雄. MLST 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 83 回日本細菌学会総会. 2010 年 3 月. 横浜.
- 高野 愛, 藤田博己, 角坂照貴, 今内覚, 田島朋子, 五箇公一, 宇根有美, 川端寛樹, 渡邊治雄. 爬虫類および爬虫類寄生マダニより発見された新群のボレリアとその性状解析. 第 149 回日本獣医学会学術集会. 2010 年 3 月. 東京.
- 高野 愛, 川端寛樹, 武藤麻紀, 藤田博己, 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 83 回日本細菌学会総会. 2010 年 3 月. 横浜.
- 佐藤寛子, 柴田ちひろ, 佐藤了悦, 斎藤博之, 安部真理子, 齊藤志保子, 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.

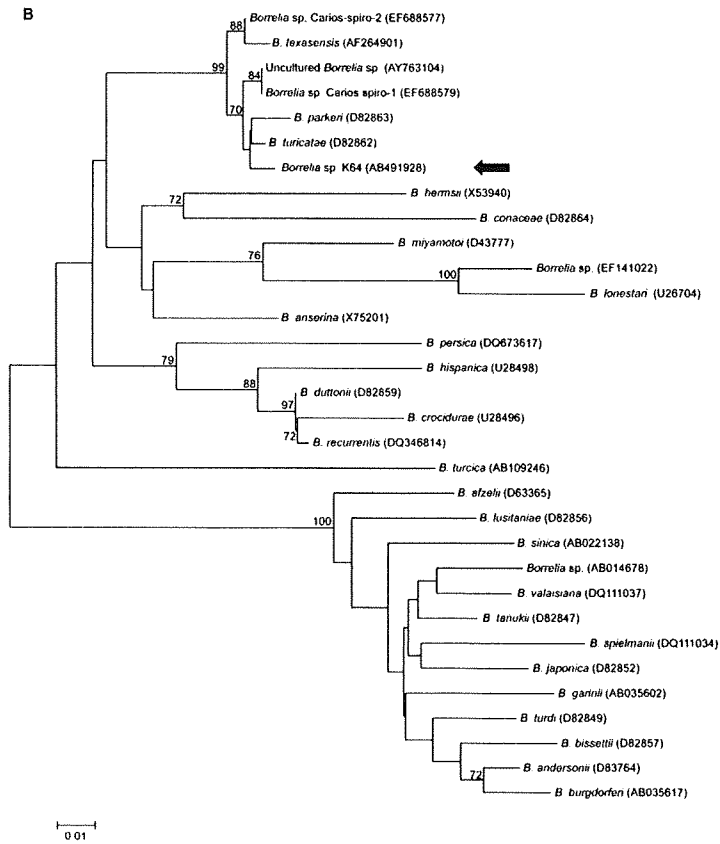
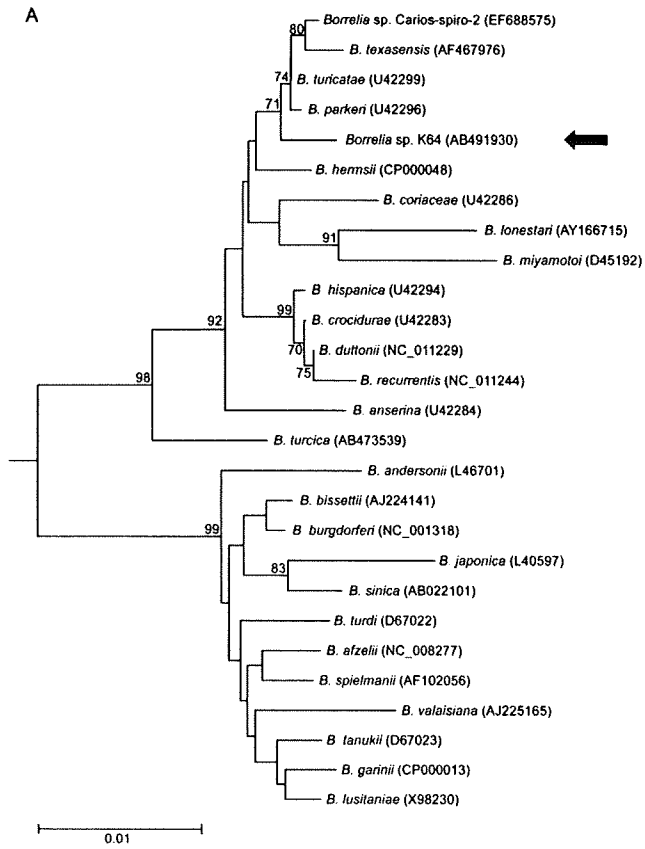
- 高野 愛, 藤田博己, 角坂照貴, 今内覚, 田島朋子, 武藤麻紀, 小笠原由美子, 川端寛樹, 渡邊治雄. 国内産爬虫類寄生性マダニから見いだされたボレリアとそのマダニ体内での動態. 第 148 回日本獣医学会学術集会. 2009 年 9 月. 鳥取.
- 山内健生, 田原研司, 金森弘樹, 川端寛樹, 新井 智, 片山 丘, 藤田博己, 矢野泰弘, 高田伸弘, 板垣朝夫. 島根県の日本紅斑熱汚染地域におけるマダニ相. 日本昆虫学会第 69 回大会. 2009 年 10 月. 三重.
- 高田伸弘, 藤田博己, 安藤秀二, 川端寛樹, 矢野泰弘, 高野 愛, 岸本壽男. 仙台市内河川敷に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, 齊藤若奈, 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



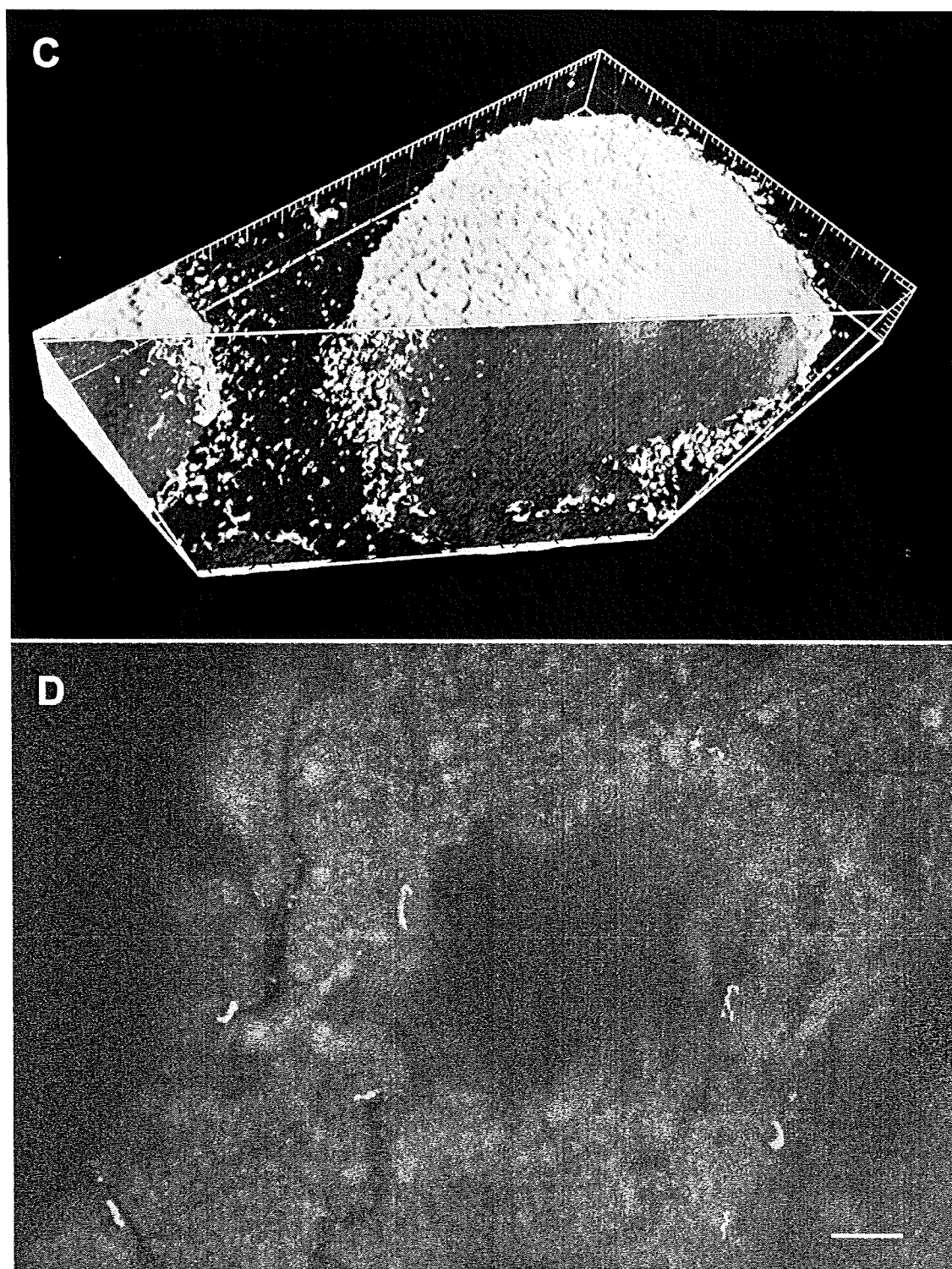


図1. *16SrRNA* 遺伝子(A)および *flaB* 遺伝子(B)配列による本研究で見出されたボレリア(*Borrelia* sp. K64)の系統解析. 矢印は *Borrelia* sp. K64 を示す. マダニ唾液腺内(C), および中腸内(D)に見出された *Borrelia* sp. K64 (赤はボレリアを示す)

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

Primer	Sequence (5'-3')*1
マダニ mitochondrion <i>16SrRNA</i> 遺伝子	
mtrrs(1)	5'-CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG-3'
mtrrs(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'-GCAACCTCTGYCATAACCTTCTTSTG-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 <i>16SrRNA</i> 遺伝子	
rrs-F1	5'-ATAACGAAGAGTTTGATCCTGGCT-3'
rrs-F2	5'-GGTGTAAGGGTGGAAATCTGTTG-3'
rrs-F3	5'-TTTCGTGACTCAGCGTCAGT-3'
rrs-R4	5'-AAAGGAGGTGATCCAGCCRCACT-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*

$n s^{Jox+}$) 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っては、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っ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γ3号(栄研化学)で採取、培養検査開始まで4℃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℃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γ3号で採取、培養検査開始まで4℃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γ2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℃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℃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垂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°C、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

開業獣医師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* *sTox+* 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* *sTox+* 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* *sTox+* 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、それに開業獣医師の猫の咽頭スワブ 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* *sTox+* 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*^{tox+}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*^{tox+}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*^{tox+}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*^{tox+}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病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*^{stox+} 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*^{stox+} 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*^{stox+} 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*^{stox+} 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：鳥谷竜哉、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)	獣師	猟犬	鼻腔スワブ等	154	2	13
大阪府立大	保健所 獣医臨床センター	乳用牛	乳	75	0	ND
		猫	咽頭スワブ	3	0	ND
(大阪府、 奈良県)	食肉流通センター 動物園	肉用牛	咽頭スワブ	124	0	ND
		サル	咽頭スワブ	22	0	ND
		ペンギン	咽頭スワブ	5	0	ND