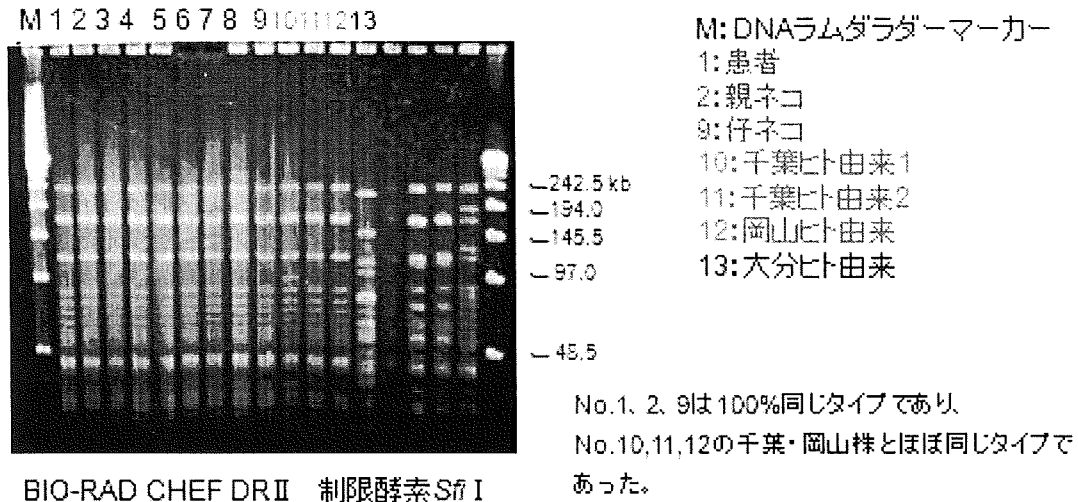
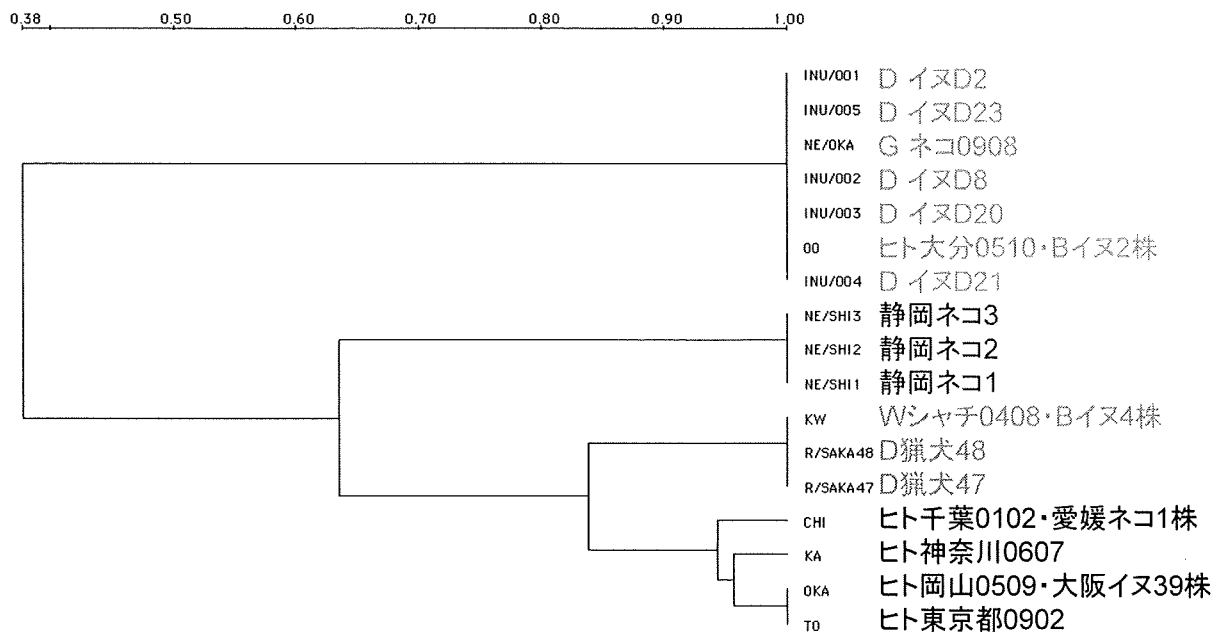


PFGEによる6例目患者と親ネコ、仔ネコ由来菌株の比較



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

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



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

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

研究分担者	今岡 浩一	国立感染症研究所	獣医科学部	第1室長
研究分担者	木村 昌伸	国立感染症研究所	獣医科学部	研究員
研究分担者	鈴木 道雄	国立感染症研究所	獣医科学部	研究員

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

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

A. 研究目的

ブルセラ症 (brucellosis) は世界中で発生しており、特に家畜での対策が不十分な地域では、年間数百～数千症例のヒト患者が報告されている重要な人獣共通感染症である。

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

スはない。したがって国内では清浄化していると考えられているが、上記のようにまれにブルセラ病と診断されるウシが報告される。仮に、家畜ブルセラ菌が国内に、依然、存在していると考え、家畜間での感染のやりとりは認められないことから、野生動物が維持している可能性も考えられる。事実、米国ではバッファローなど野生動物が、家畜への感染源となつているところもある。そこで、ブルセラ属菌の宿主

となりうる、国内の野生イノシシおよびニホンジカの血液サンプルを入手し、家畜ブルセラ菌に対する抗体の保有状況を検討した。

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

B. 研究方法

1. 血液サンプルの採取：今年度は、四国4県を中心に、大日本猟友会の協力によりイノシシもしくはニホンジカの血液サンプルを収集した。サンプルの採取と回収の方法は昨年度の報告に準じた。保冷して輸送・回収した血液は当室にて血清を分離し、測定まで-40℃に保管した。

2. マイクロプレート凝集反応 (MAT) による抗ブルセラ抗体の検出：家畜ブルセラ菌 (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) については、試験管内凝集反応 (TAT) に用いられるブルセラ病診断用菌液 (*B. abortus* 死菌液、農業・生物系特定産業技術研究機構) を、*B. canis* については、犬ブルセラ病診断用菌液 (*B. canis* 死菌液、北里研究所) を用いて、0.005% サフラニン加凝集反応用菌液を調整した。イノシシおよびニホンジカサンプル血清 (液量 25 μ l) を 96 穴 U 底マイクロプレート上で 10 倍から 2 倍段階希釈し、これに調整した菌液を同量加え、20 秒程度緩やかに振盪する。家畜ブルセラ菌に対しては、保湿環境で 37℃、18~24 時間反応させた後に、40 倍希釈以上で凝集像の確認された物を陽性と判定した。*B. canis* に対しては、50℃、24 時間反応させた後に、160 倍希釈以上で凝集像の確認された物を陽性と判定した。また、*B. canis* 抗原濃度を OD600 = 2.5 (家畜ブルセラ菌検査

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

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

4. PCR によるブルセラ特異的遺伝子の検出：血清または血球より SepaGene (三光純薬) を用いて DNA を抽出し、テンプレートとした。*Bcsp31*, *omp2*, *omp31* 遺伝子を標的とした 4 セットのプライマーを用いることで公衆衛生上重要なブルセラ 4 菌種 (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis*) が識別可能な PCR 法 (今岡ら 2003) によりブルセラ遺伝子の検出を行った。

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

C. 研究結果

1. サンプルの採取状況： 表2にサンプル・プロファイルを示した。イノシシは18県から2005-6年シーズン98頭、2007-8年68頭、2008-9年87頭、2009-10年34頭（1/12現在）の合計334頭、ニホンジカは14県から2007-8年38頭、2008-9年58頭、2009-10年1頭（1/12現在）の合計97頭であった。

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

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

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

の増幅パターンを示した（表3、図3）。

5. PCR 増幅産物のシーケンス確認： PCR で *B. canis* の増幅パターンを示したイノシシ1サンプルについて各増幅産物のシーケンスを確認したところ、ブルセラ属内で保存性の高い *bcbp31* の増幅領域では100%ブルセラ属菌の配列と一致した。*omp31* の増幅領域の配列は、*B. abortus* を除くブルセラ属菌と100%一致した。*omp2* の増幅産物は、*B. canis* と *B. suis* の配列と100%一致した（図4）。

D. 考察

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

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

E. 結論

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

F. 健康危害情報

なし。

G. 研究発表等

1. 論文発表等

- (1) 今岡浩一. 犬ブルセラ症の現状と課題. 日本獣医師会誌, 62(1): 5-12, 2009
- (2) 今岡浩一. ブルセラ症の最近の話題. モダンメディア, 55(3): 76-85, 2009
- (3) 今岡浩一, 高橋英之. エルシニア症. in: ズーノーシスハンドブック (岸本寿男, 山田章雄 監修), メディカルサイエンス社, pp.118-120, 2009
- (4) 今岡浩一. ブルセラ症. in: ズーノーシスハンドブック (岸本寿男, 山田章雄 監修), メディカルサイエンス社, pp.156-158, 2009
- (5) 今岡浩一. ブルセラ症 一人・家畜・犬一. 獣医畜産新報, 62(6): 457-461, 2009
- (6) 内田幸憲, 鎌倉和政, 後藤郁夫, 杉本昌生, 山本和正, 丸山総一, 福士秀人, 今岡浩一, 岸本壽男, 吉川泰弘. 動物病院勤務者の人獣共通感染症にかかわる健康調査. 獣医畜産新報, 62(6): 485-487, 200935.
- (7) 今岡浩一. 犬, 猫由来細菌感染症. 獣医疫学雑誌, 13(1): 65-70, 2009

2. 学会発表・講演等

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

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

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

*: 試験管内凝集反応。抗原として*B.abortus* (BA) または*B.canis* (BC) を使用。BAは40倍、BCは160倍以上が陽性。

表2) サンプルプロファイルと抗体陽性数

イノシシ (*Sus scrofa leucomystax*)

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

ニホンジカ (*Cervus nippon*)

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

表3) PCRによる遺伝子検出の結果

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

イノシシ

イノシシ	血清番号	<i>bcp31</i>	<i>omp2</i>		<i>omp31</i>
		B4/B5	JFP/JPRab	JPF/JPRca	1A/1AS
05	3	-	-	-	-
	21	-	-	-	-
	27	-	-	+	-
	32	+	-	+	+
	37	+	-	+	-
	63	+	-	+	+
	80	+	-	+	-
	85	+	-	-	-
	93	-	-	-	-
07	4	-	-	+	-
	8	-	-	-	-
	20	+	-	-	-
	49	-	-	-	-
	60	-	-	+	-
	62	+	-	+	-
	63	-	-	-	-
68	-	-	-	-	

bcp31 *omp2* *omp31*
B4/B5 JFP/JPRab JPF/JPRca 1A/1AS

イノシシ	血清番号	<i>bcp31</i>	<i>omp2</i>		<i>omp31</i>
		B4/B5	JFP/JPRab	JPF/JPRca	1A/1AS
08	3	-	-	-	-
	13	+	-	-	-
	21	-	-	+	-
	24	+	-	-	-
	25	+	-	+	+
	28	+	-	-	-
	31	-	-	+	+
	33	-	-	-	-
	61	+	-	+	+
	70	+	-	+	+
	85	+	-	-	+
87*	-	-	-	-	
09	18	-	-	-	-
	19*	-	-	-	-
	21	+	-	-	-
	22	+	-	+	-
	34	-	-	-	-

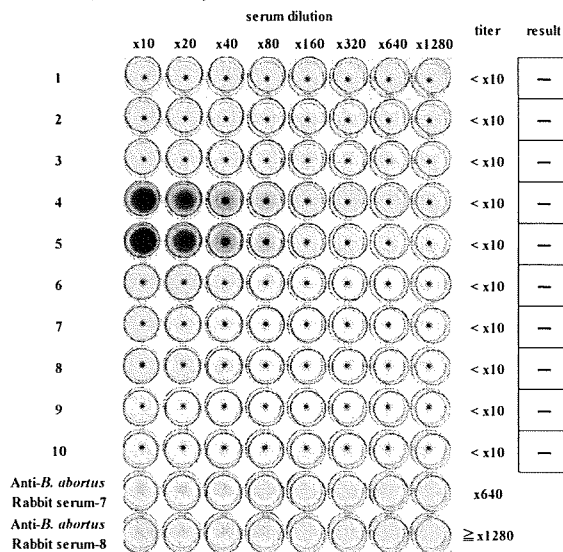
*: 家畜ブルセラ菌抗体陰性、イヌブルセラ菌抗体陰性

シカ

シカ	血清番号	<i>bcp31</i>	<i>omp2</i>	<i>omp31</i>
08	50	+	-	+

図1) MATによる抗体検出

B. abortus (OD600 = 2.5)



B. canis (OD 600 = 2.5)

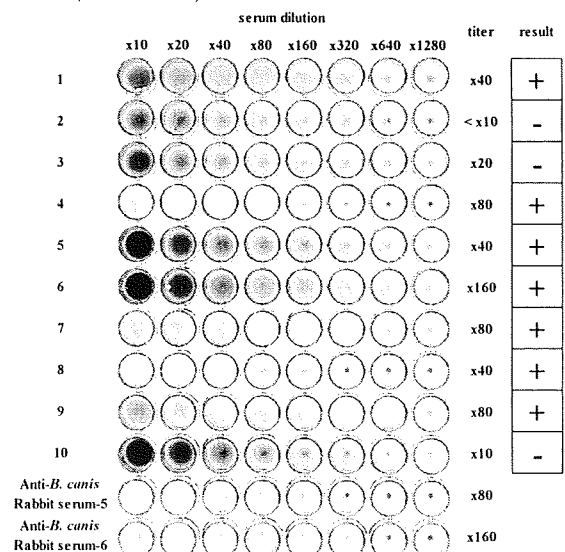


図2) WB による抗体検出

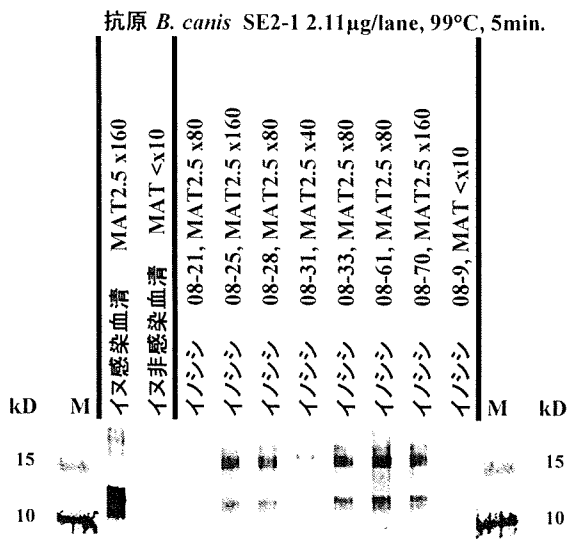


図3) PCR による遺伝子検出

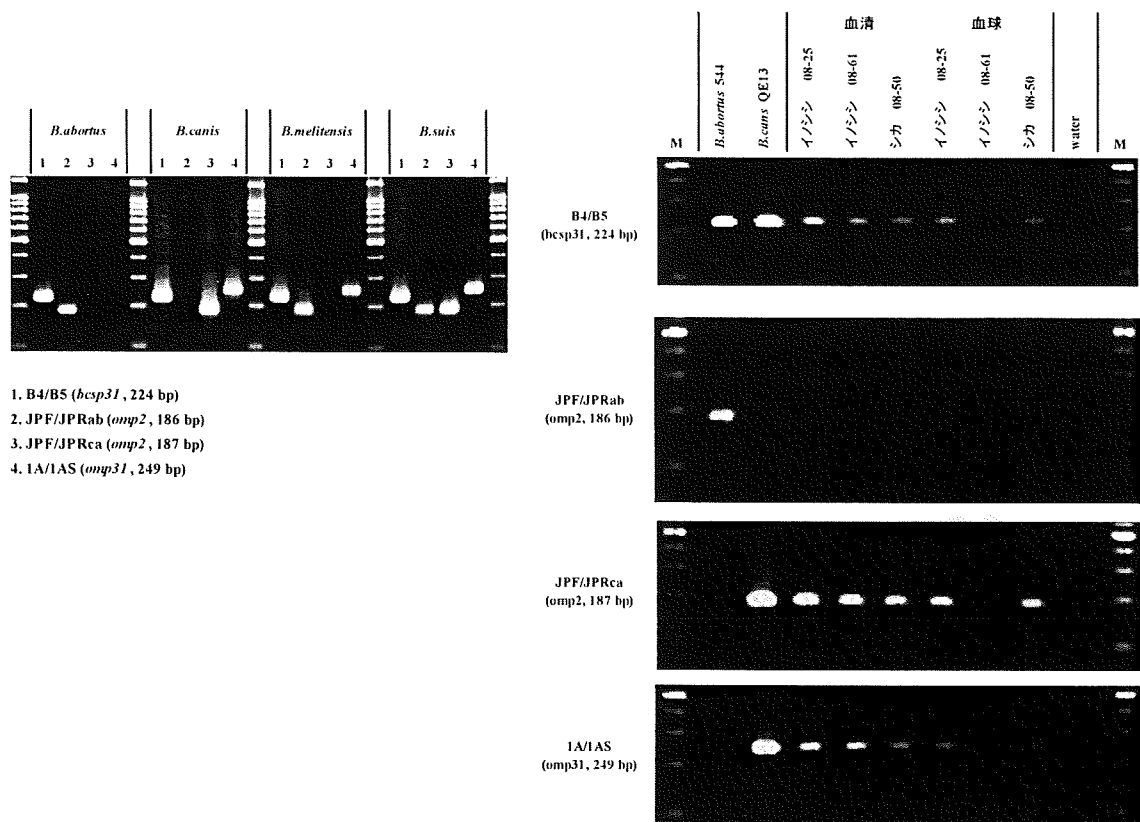
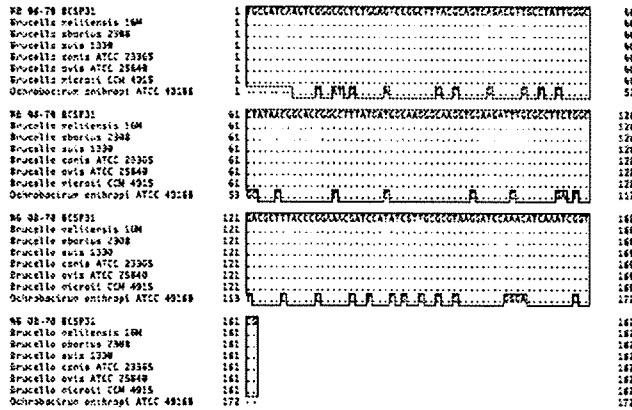
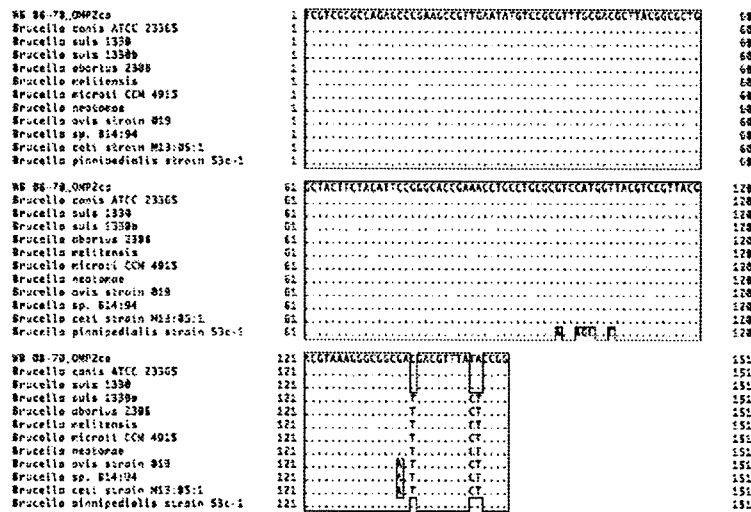


図4) PCR産物のシーケンス

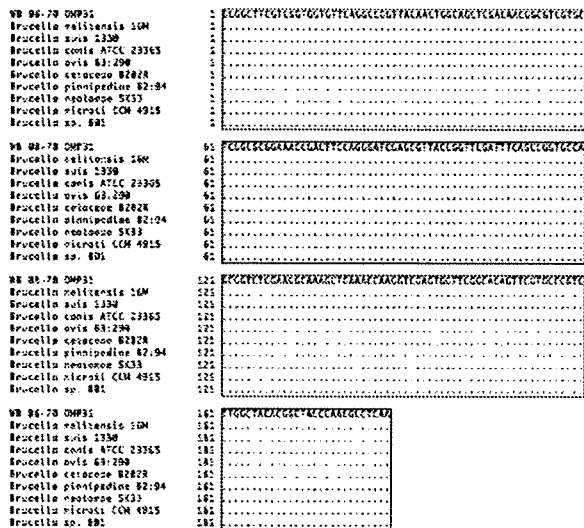
標的遺伝子: *bcsp31* (プライマー: B4/B5)



omp2 (JPF/JPRca)



omp31 (IS/IAS)



厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

国内野生動物における *Francisella tularensis*（野兔病菌）の保有状況

研究分担者 棚林 清 国立感染症研究所獣医科学部 室長
研究協力者 堀田明豊、山本美江、藤田修、宇田晶彦（国立感染症研究所獣医科学部）
進藤順治、朴天鎬、小山田敏文、畑井 仁、工藤 上（北里大学）
坪田敏男、苅和宏明（北海道大学）、青木美樹子（岩手大学）
溝口俊夫（福島県鳥獣保護センター）、中下留美子（首都大学東京）
中村幸子（兵庫県立大学）、片山敦司（野生動物保護管理事務所）

研究要旨 日本国内に生息する野生動物における野兔病菌浸潤状況の調査のため、野生動物血液 1,011 検体、臓器 152 個体分、体表付着ダニ 38 個体分を収集した。臓器および体表付着ダニについては野兔病菌の分離およびゲノム DNA の検出を試みたところ、斃死ノウサギの臓器からのみ菌分離とゲノム DNA が検出された。血液検体での抗野兔病菌抗体の検出を試みたところスクリーニングにて 6 種の動物種（ツキノワグマ、ノウサギ、ホンダタヌキ、ハクビシン、ハタネズミ、ノスリ）で陽性が認められた。これらは全て東北地方由来個体であった。さらにこれら検体についてウエスタンブロット法及び間接蛍光抗体法で野兔病菌特異的反応を観察したところ、ツキノワグマ由来 9 検体が陽性を呈し、これらが過去に野兔病菌に感染したことが強く示唆された。国内生息野生動物から初めて野兔病菌に対する抗体を検出でき、その陽性個体の分布はヒトでの野兔病発生地域と同様、東北地方に多い傾向が認められた。ツキノワグマ 9 頭は全て 3 歳以上のオスであったため、今後ツキノワグマの生態と併せて野兔病菌の分布状況について解析した。一方、他の動物種由来検体は確定試験で明確な反応が認められず、陽性との判定に至らなかった。他の肉食動物種や斃死動物の調査が必要と考えられた。

A. 研究目的

Francisella tularensis（野兔病菌）は代表的な動物由来感染症である野兔病の起原菌で、ヒトでは急性熱性疾患を引き起こす。ノウサギやげっ歯類などの野生動物での感

染では致死的となる場合が多いとされている。本菌は北アメリカ、ヨーロッパ、ロシア、中央および東アジア、日本など北半球に広く分布し、190 種以上の動物種に感染する。国内におけるヒトの野兔病は近年ま

れだが、過去には東北地方を中心に約 1400 例報告されている。主な感染源はノウサギやダニだが、野生動物における本菌感染状況、野兎病菌の生存、分布状況や感染環についての詳細は不明である。

本研究では、野生動物における野兎病菌感染状況を調査解析し、国内の野兎病菌の分布を明らかにし、本菌のヒトへの感染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. 検体収集

(1) 動物血液

動物血液 1,011 検体を収集した。動物種はノウサギ 293、ニホンツキノワグマ 431、ホンダタヌキ 20、ニホンザル 26、ハクビシン 20、イノシシ 20、ホンダキツネ 3、ラット類 97、野ネズミ類（アカネズミ、ハタネズミ、ヒメネズミおよびヒミズ）66、猛禽類（ノスリ、オオタカ、フクロウ、トビ、サシバ、オジロワシ）35 検体を含む。動物の捕獲地と頭数を表 1 に示す。

ノウサギおよびイノシシの血液全検体は大日本猟友会会員の協力により 2005 年 2 月から 2009 年 3 月の間に収集した。ツキノワグマ検体は 1998 年 7 月から 2007 年 12 月に捕獲したクマより得た。その他動物種検体は 2000 年から 2009 年の間に協力研究者により捕獲収集され提供されたものである。

(2) 動物臓器

152 個体分が収集された。動物種は秋田

県にかほ地方由来のノウサギ 43 個体および青森県下北地方の野ネズミ類 109 個体分の肝臓および脾臓または腎臓である(表 2)

(3) 動物付着ダニ

捕獲野生動物 156 個体の体表から採取したダニ 1・6 匹を 1 個体分の検体として菌分離およびゲノム DNA 検出に供した。

2. 方法

(1) 血液検体中の抗野兎病菌抗体の検出

スクリーニング試験としてノウサギ血液では酵素抗体法 (ELISA) を用いた。陽性は吸光度が全検体の値の平均+2SD 以上を示した場合とした。その他の動物種の検体のスクリーニング試験には微量凝集反応法

(MA) を用い、凝集価 10 倍以上を陽性とした。スクリーニング試験によって陽性とされた検体については特異的反応をウエスタンブロット法 (WB) および間接蛍光抗体法 (IFA) により確認した。WB では検体血清を 1,000 倍希釈して野兎病菌の全菌体抗原および精製リポ多糖体 (LPS) に反応させ、両抗原にて LPS 特有の梯子状の反応像を呈した検体を陽性とした。IFA では各検体を 20、40、80、160 倍希釈し、菌体に対する反応を蛍光顕微鏡下で観察し、40 倍以上で特異蛍光が認められたものを陽性とした。各種野生動物の抗体検出のための酵素 (HRP) 標識二次抗体は、ノウサギには抗ノウサギ IgG(H+L)、ラット類には抗ラット IgG、野ネズミ類には抗マウス IgG(H+L) を用いた。また、野ネズミでは HRP 標識 Protein A 及び Protein G も用いた。ツキノワグマに

はHRP標識ProteinAおよびProteinGを、ホンドタヌキ検体にはProtein A/Gを使用した。

(2) 臓器およびダニからの菌分離

各臓器の小片を1.5mlチューブに入れマイクロ乳棒にてすり潰し、ペニシリンおよびファンギゾンを追加したPBSで10・20%乳剤とした。ダニは各個体をデイスパーサブルメスにて縦軸に沿い二分しその一片を50 μ lのPBSに入れマイクロ乳棒にてすり潰した。これらの検体乳剤をEugon羊血液加チョコレート寒天培地に塗布し、37 $^{\circ}$ Cにて7日間培養した。

(3) 野兎病菌のゲノムDNA検出

乳剤化した臓器検体およびダニ検体を遠心し、その沈殿より市販核酸抽出キットを用いて抽出した。精製核酸をRNase処理後、そのDNA濃度を測定するとともにダニ自体のゲノムDNAをPCRにより増幅しDNAの回収を確認した。野兎病菌特異的ゲノムDNAの検出は*tu14*および*fopA*遺伝子領域DNAを増幅増幅検出するプライマー・プローブを用いたreal time PCR法にて行った。

C. 研究結果

1. 抗野兎病菌抗体の検出

MAによるスクリーニング試験でツキノワグマ24、野ネズミ類1、タヌキ2、ハクビシン1、猛禽類1の計29検体が10倍以上の凝集価を示した。ELISAではノウサギ

1検体が陽性となった(表3)。

スクリーニング試験で陽性とされた30検体について標識二次抗体またはProtein Aが市販されているノウサギとツキノワグマそれぞれ1検体と24検体についてWBおよびIFAにて特異抗体の検出を試みた。ツキノワグマではWBにて14、IFAにて9検体が陽性となった。両試験で陽性となった9頭のツキノワグマはすべて3歳以上の岩手県または福島県内で捕獲されたもので8頭がオス、他の1頭は性別不明であった(表4、5)。また、ノウサギ検体はWBおよびIFAでは特異反応が認められなかった(表3)。

2. 野兎病菌の分離

斃死している状態で発見されたノウサギの臓器(肝臓および脾臓)1個体について菌分離を実施したところ培養3日目までに多数の微小白色コロニーが認められた。発育した菌はグラム陰性小桿菌で、野兎病菌特異抗体に反応し、さらにPCR検査により野兎病菌と同定された(図1)。その他の捕獲ノウサギや野ネズミの臓器および動物に付着していたダニからは野兎病菌は分離されなかった。

3. 野兎病菌のゲノムDNA検出

先の斃死ノウサギ臓器(肝臓および脾臓)1個体由来検体より*fopA*および*tu14*両遺伝子領域のゲノムDNA断片が増幅された。しかし他の動物臓器および付着ダニでは野兎病菌特異的DNA断片が増幅されること

はなかった。

D. 考察

各種野生動物の抗野兎病菌抗体調査では、今回、初めて国内生息の野生動物から初めて野兎病菌に対する抗体を検出した。特にツキノワグマ由来9検体は3種の検査(MA、ELISAおよびIFA)にて陽性であったため、その由来動物は過去に野兎病菌に感染したと強く示唆された。抗体陽性検体由来動物は全て東北地方にて捕獲された動物であったことからヒトの症例同様、野兎病菌感染野生動物が東北地方に多く存在すると考えられた。陽性が認められた岩手および福島県由来ツキノワグマ検体群について由来個体の性別と年齢について解析したところ、オスがメスと比較して有為に陽性数が高く、2歳以下のクマには陽性は認められなかった。ツキノワグマのオスはメスと比較して行動範囲が広く、仔グマは2歳まで母グマと行動を共にする。このため陽性率の差はクマ個体の行動範囲に関わる可能性が示唆された。これらのことから東北地方には野兎病菌が分布するが、その分布域は東北地方でも限局していると思われる。

野兎病菌感染が致死となる野生げっ歯類やノウサギからの病原体検出では分離および核酸検出において斃死ノウサギのみが陽性となり、新しい野兎病菌分離株NVF1を得た。また、ノウサギや野ネズミなど野兎病菌に高感受性の動物種では健常個体からの野兎病菌や抗野兎病菌抗体の検出は困難と考えられた。

今後は陽性個体が認められたツキノワグマをはじめ、タヌキ、ハクビシン、ノスリなどの雑食または肉食動物由来検体数を増やし調査する必要があると考えられた。また、陽性野生動物生息場所での土や水などの環境での野兎病菌の存在も合わせて調査し野兎病菌の生態系での維持様式を明らかにする調査研究も継続する必要があると思われる。

E. 結論

日本国内生息の野生動物血液由来 1,011 検体、臓器 152 個体分、体表付着ダニ 156 個体分を収集し、野兎病菌の分離および特異的核酸断片の検出、および抗野兎病菌抗体の検出を試みた。斃死ノウサギ検体より新たに野兎病菌を分離できた。また国内の野生動物より初めて抗野兎病菌抗体が検出された。抗体陽性個体の分布はヒトの野兎病発生数が多い東北地方に多く分布すると考えられた。野生動物における野兎病疫学調査はツキノワグマなど寿命が長い雑食またはキツネ等の肉食動物種や斃死動物について解析を進める必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
Park CH, Nakanishi A, Hatai H, Kojima D, Oyamada T, Sato H, Kudo N, Shindo J, Fujita O, Hotta A, Inoue S, Tanabayashi K. Pathological and Microbiological

Studies of Japanese Hare (*Lepus brachyurus angustidens*) Naturally Infected with *Francisella tularensis* subsp. *holartica*. J Vet Med Sci. 2009 71:1629-35.

2. 学会発表

朴天鎬、中西中、小山田敏文、佐藤久聡、進藤眞台、藤田修、堀田明豊、棚林清。野兎病菌 (*Francisella tularensis*) に感染後死亡したノウサギに関する病理学的研究 第 147 回日本獣医学会学術集会 2009 年 4 月 (宇都宮市)

野兎病菌に自然感染したトウホクノウサギ (*Lepus brachyurus angustidens*) の症例報

告—野生動物の病理解剖の意義と感染リスク— 朴天鎬、中西中、小山田敏文、佐藤久聡、進藤眞台、工藤上、藤田修、堀田明豊、井上智、棚林清。第9回ヒトと動物の共通感染症研究会学術集会 2009 年 11 月 (東京)

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
3. その他
なし

表1 供試血液検体の由来動物種と地域

	ノウサギ	ツキノワグマ	ホンドタヌキ	ニホンザル	ハクビシン	ホンドキツネ	イノシシ	ラット類	野ネズミ類	猛禽類	計
北海道								97			97
青森	35		1						66	12	114
秋田	78										78
岩手	13	62									75
山形	30										30
福島	15	34	19	26	20	3				23	140
茨城		17									17
東京		1									1
新潟	62										62
長野		52									52
山梨		8									8
岐阜		147									147
滋賀		20									20
京都		20									20
兵庫		59									59
鳥取		11									11
広島							20				20
高知	25										25
宮崎	12										12
鹿児島	23										23
計	293	431	20	26	20	3	20	97	66	35	1,011

猛禽類はオジロワシ、ハヤブサ、トビ、ノスリ、サシバ、フクロウおよびオオタカを含む。

表2 菌分離および核酸検出供試検体

検体	由来動物種	検体数	由来地
臓器	ノウサギ	43	秋田
	野ネズミ類	109	青森
小計		152	
体表付着ダニ	ノウサギ	23	秋田
	野ネズミ類	7	青森
	ホンドキツネ	1	青森
	アナグマ	1	青森
	イノシシ	3	徳島・広島
	ニホンジカ	3	徳島
小計		38	
合計		190	

検体数は由来動物個体数を表示した。

表3 抗野兎病菌抗体検査結果

動物種	検体数	MA	ELISA	WB	IFA	陽性 ¹
ツキノワグマ	431	24	NT	14	9	9
ノウサギ	293	NT	1	0	0	0
ラット類	97	0	NT	NT	NT	0
ノネズミ類	66	1	NT	0	NT	0
ニホンザル	26	0	NT	NT	NT	0
ホンドタヌキ	20	2	NT	1	NT	≦1
ハクビシン	20	1	NT	NT	NT	≦1
イノシシ	20	0	NT	NT	NT	0
ホンドキツネ	3	0	NT	NT	NT	0
猛禽類	35	1	NT	NT	NT	≦1
計	1,011	29	1	15	9	9

1: MAまたはELISAかつWBおよびIFA陽性の検体を陽性とした。

表4 ツキノワグマ検体の抗野兔病菌抗体検査結果

捕獲地域	検体数	MA	WB	FA	陽性率 (%)
岩手	62	16	13	8	12.9
福島	34	8	1	1	2.9
岐阜、兵庫、京都、長野、滋賀、茨城、鳥取、山梨、東京	335	0	NT	NT	
計	431	24	14	9	2.1

MA: 凝集価10倍以上を陽性とした。

WB: 1000倍希釈検体にてLPSのバンドが認められた検体を陽性とした。

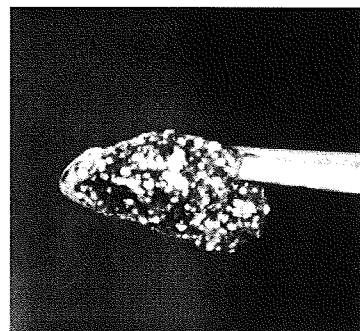
FA: 40倍以上を陽性とした

NT: 試験せず

表5 岩手および福島県捕獲ツキノワグマ個体の年齢と性別

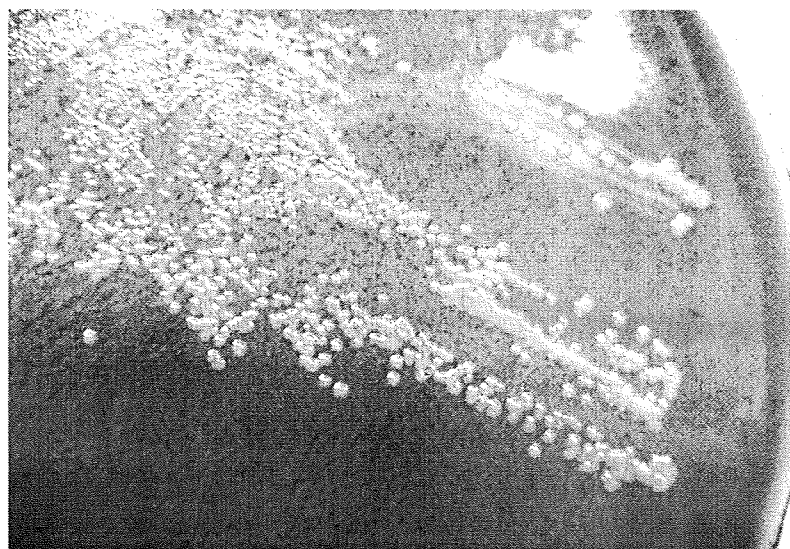
年齢	オス		メス		不明		計	
	陽性数 /n	%	陽性数 /n	%	陽性数 /n	%	陽性数 /n	%
<2	0/3		0/2		0/1		0/6	
3-5	4/20	20.0	0/17				4/37	10.8
6-9	2/16	12.5	0/8				2/24	8.3
10<	1/6	16.7	0/5				1/11	9.1
不明	1/8	12.5	0/6		1/4	25.0	2/18	11.1
計	8/53	15.1	0/38		1/5	20.0	9/96	9.4

脾臓

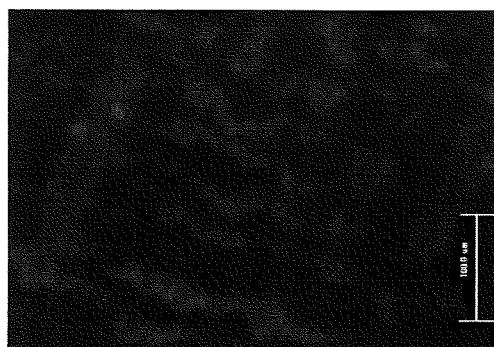


断面に針頭大白点多数

分離菌



グラム陰性小桿菌



抗*Francisella tularensis*
モノクローナル抗体陽性

図1 斃死ノウサギ脾臓と分離菌NVF1

分担研究報告書

日本国内で分離された野兔病菌のパルスフィールドゲル電気泳動法を用いた
遺伝学的解析に関する基礎研究

研究分担者	藤田 修	国立感染症研究所	獣医科学部	主任研究官
研究協力者	棚林 清	国立感染症研究所	獣医科学部	室長
	宇田晶彦	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	主任研究官

研究要旨：日本国内に分布する野兔病菌 (*Francisella tularensis*) の遺伝的特性を明らかにする目的で、様々な制限酵素を用い日本国内分離株のパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)解析を行った。まず、PFGE 解析に利用可能な7種の制限酵素を選択し、これらを用いて解析した結果、北米やヨーロッパなどに分布する同亜種菌株に比較して国内株は非常に高い遺伝的多型を有している事が明らかとなった。さらに、今回用いた制限酵素の全てで日本分離株は海外由来株と明確に異なるバンドパターンを示し、両者間の鑑別に PFGE が有用な手法の一つであることが示唆された。

A. 研究目的

野兔病は、野兔病菌(*Francisella tularensis*) を原因菌とする急性熱性疾患である。野兔病の発生地域は、ほぼ北緯30度以北に一定の汚染地帯があり、その各地で毎年散発的に発生している。国内では主に東北地方の各県および関東地方（栃木、茨城、千葉）において発生している。病原体は自然界において野生動物と吸血性動物間で循環維持されているものと考えられている。日本国内に分布する野兔病菌は*F. tularensis*の亜種、*F. tularensis* subsp. *holarctica*で、現在までこの菌は野兔病患者以外にもダニ等の節足動物を含む様々な

野生動物から分離されている。これら分離菌の生化学的および遺伝学的性状等の基礎的情報は殆ど調べられておらず、まだ不明な点が多い。以前我々は日本国内で分離された野兔病菌株のタンデムリピート領域の解析を行った結果、海外由来の菌株とは全く異なる特異的な反復配列を持ち、さらにこれらは非常に高い遺伝的多型を有することを報告した。

本研究では野兔病菌の新たな遺伝学的特性特性を調べるために、パルスフィールド電気泳動法(PFGE)を用いた解析を行い、疫学調査の基礎的情報を得ると同時に、今後国内で野兔病が発生した時にその感染源を

特定する為に有用な手法を確立する事を目的とした。

B. 研究方法

(1) 野兎病菌株

本予備実験では、大原研究所藤田博己先生より分与された日本国内分離株 12 株と比較対象の海外由来株として Live Vaccine Strain を用いた。日本株は様々な分離地・分離年および分離宿主の菌株を選択した。

(2) PFGE

PFGE 解析は PulseNet 1-day standardization laboratory protocol (PulseNet, USA., CDC) を参考に一部変更して実施した。PFGE の泳動条件はパルスタイム 1.79 秒から 10.71 秒、6V/cm, 120° angle, 泳動時間 17.5 時間、泳動バッファー温度は 14°C に設定し、CHEF Mapper (Bio-Rad) により電気泳動を行った。

PFGE 解析に用いた制限酵素は *ApaI*, *BamHI*, *BglII*, *MluI*, *NgoMIV*, *NruI*, *PmeI*, *PvuI*, *SalI*, *SacII*, *TtHIII*, *XhoI* の 12 種で、それらの有用性について検討した。

C. 結果

(1) 制限酵素

ApaI は 8 本以下のバンドしか認められず、また *NruI* と *XhoI* は 30 本以上とバンド数が多く解析が不可能であった。さらに、*NgoMIV* は酵素量が 100U/反応でもバンド消化が不十分のため野兎病菌の PFGE 解析には不適と判断した。

BamHI, *BglII*, *MluI*, *PmeI*, *PvuI*, *SalI*

および *SacII* の 7 制限酵素については、今回検索した全ての分離菌株で 40Kbp-194Kbp 間に 20-30 本のバンドが認められ、今後の野兎病菌の PFGE 解析には有用であると判断した。

(2) 日本国内分離株と海外株との鑑別

図に示すように *BamHI* による DNA 切断パターンは日本国内分離株と海外由来株間で明らかに異なっていた。その他の 6 酵素でも同様に両者間を鑑別できた。

D. 考察

感染症疫学の目的の一つは病原体の同定とその生態や伝播様式を解明することであり、これによりの確な感染症対策が可能となる。その手法の一つとしての PFGE は多くの細菌種・血清型で有用性のある菌株比較方法である。野兎病菌の亜種でヒトに対して最も病原性の強い北米に分布する *F. tularensis* subsp. *tularensis* の型別法として PFGE は一般的に用いられている。一方、日本を含む北半球に広く分布する *F. tularensis* subsp. *holarctica* の型別には PFGE は殆ど用いられていない。Garcia del Blanco ら (2002) らは、スペイン国内でヒトやノウサギなどから分離された菌株の型別には *XhoI* と *BamHI* の 2 酵素での PFGE の結果を併せて解析すると大きく 3 つのグループに分けられると報告している。さらに、北米由来の *F. tularensis* subsp. *holarctica* を *PmeI* で処理した後 PFGE 解析した結果、その殆どの菌株が同一のバンドパターンを示したと報告している (Kugeler ら, 2009)。また