

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

国内生態系におけるライム病ボレリアの維持伝播経路に関する研究

研究分担者	川端寛樹	国立感染症研究所 室長
研究協力者	石畝史 藤田博己 高田伸弘、矢野泰弘 増澤俊幸 中尾稔 伊東拓也 及川陽三郎 Kyle Taylor、坪田敏男、今内覚 川森文彦 三上稔之、熊谷邦彦 高野愛、安藤秀二、花岡希、本田尚子、 渡邊治雄、大西真	福井県衛生環境研究センター 大原綜合病院 福井大学 千葉科学大学 旭川医科大学 北海道立衛生研究所 金沢医科大学 北海道大学 静岡県環境衛生科学研究所 青森県環境保健センター 国立感染症研究所

研究要旨:

国内でのライム病病原体 *Borrelia garinii* の高感度 DNA 型別解析から、1)国内に存在する *B. garinii* は 2 群(*B. garinii* ST-group A, *B. garinii* ST-group B)に大別できること、2)患者由来株の約 84%は *B. garinii* ST-group B であること、3)野鼠由来株はすべて *B. garinii* ST-group B であること、さらに、4)患者分離株の約半数が野鼠によって保菌されている *B. garinii* と同じ DNA 型であることが明らかとなった。以上のことから、我が国においては、ライム病ボレリア *B. garinii* 感染例の少なくとも半数は野鼠由来である可能性が示唆された。

A. 研究目的

ライム病はボレリア属細菌による感染症で、病原体ボレリアは、野生動物を保菌宿主とし、マダニによって媒介されることでヒトへの感染が成立する。世界では、*Borrelia burgdorferi*, *B. garinii*, および *B. afzelii* が病原体として知られている。欧米では年間数万人規模で患者が報告されており、

特に欧州では *B. garinii* 感染による神経ボレリア症が見出されるなど、患者発生数に加え、その重い病態のため重大な社会問題となっている。

我が国では、1999 年の感染症法施行後、主な流行地である北海道での 49 例を含む、計 122 例(2010 年 50 週時点)のライム病症例が報告されている。国内感染のライム病患者は、遊走性紅

斑を主訴とする皮膚症状を呈し、また皮膚病変部からは病原細菌である *B. garinii* が分離される。他方、米国で問題となっている *B. burgdorferi*、欧州では *B. garinii* 同様ライム病起因菌となっている *B. afzelii* はほとんど見出されない。

欧州では *B. garinii* の多くは鳥類によって維持・伝播されることが次第に明らかとなってきている。一方、我が国では欧州同様 *B. garinii* がライム病起因菌であることが示されてきたが、生態系における *B. garinii* の維持伝播経路については不明な点が多い。

そこで本研究では、我が国におけるライム病ボレリアのヒトへの感染経路遮断を最終目的として、我が国における *B. garinii* の生態系における維持伝播経路究明を開始した。

B. 研究方法

我が国における *B. garinii* の生態系における維持伝播経路を調べるために、1) *B. garinii* の媒介マダニであるシュルツエマダニ (*Ixodes persulcatus*) より分離された *B. garinii* 15 株、2) ヒト患者皮膚病変部由来 *B. garinii* 19 株、3) 国内野鼠由来 *B. garinii* 18 株を研究に用いた。野鼠由来株の内訳は、*Myodes rufocanus bedfordiae* (エゾヤチネズミ) 由来 10 株、*Apodemus speciosus* (アカネズミ) 由来 8 株である。これら *B. garinii* 52 株は、高感度 DNA 型別法である Multi-locus sequence typing (MLST) 法により DNA 型別を行い、それぞれの DNA 型 (Sequence type; ST) をデータベース (<http://borrelia.mlst.net/>) と照合、解析を行った。使用した *B. garinii* 菌株は、研究協力者らと協力して分離、収集した。これら *B. garinii* 株を BSK 培地にて 32°C 孵卵器にて静置培養後、

常法に従って DNA 抽出した。抽出した DNA を鋳型とし、Margos らの方法に従って PCR を行い、増幅 DNA を得た。得られた DNA は精製後塩基配列を決定し MLST 解析に用いた。

(倫理面からの配慮について)

該当しない。

C. 研究結果

MLST 法による DNA 型別により、国内分離 *B. garinii* 株は 2 群に大別された。大別されたそれぞれを *B. garinii* ST-group A、*B. garinii* ST-group B とし結果を表 1 にまとめた。国内でライム病ボレリアを伝播するマダニとして、シュルツエマダニが知られている。本マダニからは *B. garinii* ST-group A、*B. garinii* ST-group B が分離される一方、患者由来株の 84% および野鼠由来株のすべてが *B. garinii* ST-group B であった。患者および野鼠分離株においては *B. garinii* ST-group B が見出される頻度が有意に高いことが Fisher の正確検定によっても確認された ($P > 0.05$)。加えて、国内患者由来 19 株中 9 株 (47%) は野鼠由来株と同一の DNA 型 (ST128, ST131, および Untypable の一部) であった。

D. 考察

国内でのライム病病原体 *B. garinii* の MLST 解析から、1) 国内に存在する *B. garinii* は 2 群 (*B. garinii* ST-group A、*B. garinii* ST-group B) に大別できること、2) 患者由来株の 80% 以上は *B. garinii* ST-group B であること、3) 野鼠由来株はすべて *B. garinii* ST-group B であること、さらに、4) 患者分離株の約半数が野鼠分離株で見出さ

れた DNA 型と一致することが明らかとなった。国内患者株内で最も多く見出された DNA 型は ST131 である。この DNA 型は、北海道で捕獲されたエゾヤチネズミの膀胱より分離された株と一致するとともに、MLST データベースに登録されている、NT29 株(長野県シュルツェマダニ由来株)とも一致した。このことは、国内に分布する *B. garinii* の一部は少なくとも野鼠を保菌宿主とし、シュルツェマダニにより伝播されることを示している。また ST131 や ST128 などの DNA 型は中国で分離された *B. garinii* 株(JW-1 株、NMK3 株)とも一致している。このことは、*B. garinii* ST-group B は日本のみならず中国でもライム病起因菌となっている可能性が考えられた。一方で、約 15% の患者分離株が *B. garinii* ST-group A に型別された。これら DNA 型はその保菌動物は現在不明である。Nakao らによれば、野鳥寄生性のシュルツェマダニ幼虫からは *B. garinii* が検出されることが報告されている (Nakao et al. 1994)。また欧州では、我が国に分布する *B. garinii* ST-group A と近縁の *B. garinii* 株が野鳥により保菌されていることが明らかにされつつ有る。このことから *B. garinii* ST-group A の自然界での保菌宿主は鳥類である可能性が考えられた。

E. 結論

我が国においては、ライム病ボレリア *B. garinii* 感染例の少なくとも半数は野鼠由来 *Borrelia* 株と同一 ST であり、また全体の 80% 以上が ST-group B であることが明らかとなった。このことから、国内に分布するヒト病原性 *B. garinii* は欧州とは異なり野鼠によって環境中で維持、伝播されている可

能性が強く示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 川端寛樹, 高野 愛, 伊東拓也, 石畝史, 高田伸弘, 中尾稔, 増沢俊幸, 藤田博己, 渡邊治雄, 大西真. 多領域 DNA 配列解析によって推定された国内におけるライム病ボレリア病原体 *Borrelia garinii* の維持・伝播経路: 第 56 回日本衛生動物学会北日本支部大会、札幌 (2010.10)
- 2) Takano A, Goka K, Une Y, Fujita H, Shiino T, Watanabe H, Ohnishi M, Kawabata H. Isolation and characterization of a novel *Borrelia* group of tick-borne borreliae from imported reptiles and their associated ticks. 12th International Conference on Lyme borreliosis and other tick-borne diseases. Slovenia, September 2010.

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. 国内分離 *B. garinii* 株の DNA 型別。[]内にはデータベースで見出された ST 番号を示した。
データベースに未登録の DNA 型については、Untypable(A1)から Untypable(B11)までそれぞれ示した。

分離材料	ST-group A	ST-group B
患者由来 (19 株)	J-21 [ST127], J-38 [ST127], J-37 [Untypable(A6)] (3 株、15.8%)	Hiratsuka [ST128], J-17 [ST128], J-32 [ST131], J-33 [ST131], J-34 [ST131], J-35 [ST131], HH1 [Untypable(B1)], J-20T [Untypable(B2)], J-15 [Untypable(B3)], J-39 [Untypable(B5)], J-16 [Untypable(B6)], J-41 [Untypable(B7)], J-14 [Untypable(B9)], J-18 [Untypable(B9)], J-40 [Untypable(B11)], J-42 [Untypable(B11)], (16 株、84.2%)
	NP76 [ST127], NT31 [ST134], NP81 [Untypable(A1)], NT25 [Untypable(A2)], HT59 [Untypable(A3)], HP1 [Untypable(A4)], NP4 [Untypable(A5)], NP8 [Untypable(A7)], HP3 [Untypable(A8)], HT18 [Untypable(A9)], HkIP2 [Untypable (A10)], (11 株、73.3%)	N346 [Untypable(B4)], NT24 [Untypable(B9)], FujiP2 [Untypable(B9)], HkIP1 [Untypable(B11)], (4 株、26.7%)
野鼠由来 (18 株)	なし	FiEE11 [ST122], FsAE2 [ST128], sai6B [ST128], HkCR1 [ST131], HkCR5 [ST131], HkCR6 [ST131], HkCR11 [ST131], HkCR12 [ST131], HokkaidoAS7B [Untypable(B7)], ASF [Untypable(B7)], HkCR7 [Untypable(B7)], FsAE1 [Untypable(B8)], sai7B [Untypable(B9)], sai8E [Untypable(B9)], HkCR3 [Untypable(B10)], HkCR4 [Untypable(B10)], HkCR9 [Untypable(B10)], HokkaidoCRB35B [Untypable(B10)], (18 株、100%)

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

ブルセラ症等に関する研究

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
研究協力者	木村 昌伸	国立感染症研究所	獣医科学部	主任研究官
研究協力者	鈴木 道雄	国立感染症研究所	獣医科学部	主任研究官

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。

1) 国内の野生イノシシおよびシカの血液サンプルを用いたこれまでの調査から、イヌブルセラ菌 (*B. canis*) に対する抗体を保有するものが認められている。今回、四国地方を中心に、イノシシ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ところ、これまでと同様、2010-11年シーズンのサンプルでも11/109のイノシシで*B. canis*に対して凝集が認められた。家畜ブルセラ菌 (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) に対しても1/109で凝集が認められた。また、血液培養により、ブルセラ属菌特異的遺伝子 (*bcsp31*) 陽性分離株を得たが、これは、*Achromobacter* 属の菌であり、ブルセラに対する抗体とは反応性を持たなかった。したがって、イノシシに見られるブルセラ属菌反応性抗体は、本菌に対する交差反応ではなかった。すなわち、イノシシがブルセラ属菌に感染し、これに対する抗体を獲得している可能性は否定できなかった。

2) ブルセラ属菌特異的な抗体検出法を開発するため、ウエスタンブロッティングにより特異的反応を示したタンパクを分離し、そのアミノ酸配列 (104aa) を決定した。配列から、このタンパクの抗原部位を解析し、抗原性を持つと考えられる5種類のオリゴペプチドを作成し、その抗原性の解析を現在も継続中である。また、同時に、このタンパクの組換えタンパクを作成中である。

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

A. 研究目的

ブルセラ症 (brucellosis) は世界中で毎年50万人を超える新規患者が発生しており、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。国内では、感染症法によって4類感染症 (全数把握) に指定された1999年4月1日以降、2010年12月31日現在までに、ブルセラ症患者16例が届け出られている (表1)。そのうち6例は家畜ブルセラ菌 (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) である。*B. melitensis*感染4例、*B. abortus*感染2例であったが、すべて国外を推定

感染地域とした、いわゆる輸入患者であった。残り10例のうち、国内を推定感染地域とする9例は*B. canis*感染であると考えられている。

国内では、家畜における家畜ブルセラ菌感染は、感染家畜の摘発・淘汰が功を奏し、現在は清浄化していると考えられている。しかしながら近年、数年に1頭程度、ウシブルセラ病とされたウシが報告されている。ただ、発生は単発で、同居家畜はもとより、その他の家畜間でも感染のやりとりが起こっている様子は認められない。何らかの交差反応とも考えられるが、仮に、家畜ブルセラ菌が国内に、依然、存在しているとすると、野生動物が維持している可能性も考えられる。一方、*B. canis*については、国内のイヌの2～5%程度が抗体を持っていることが、確認されている。このように、*B. canis*は国内に定着しており、野生動物での保菌も考えられる状況にある。

これまでの我々の調査により、国内のイノシシで*B. canis*に対する抗体を持つものや、血中にブルセラ属菌特異的遺伝子を保有するものが認められている。そこで、今回、過去に抗体保有の報告があった四国地方を中心に、ブルセラ属菌の宿主となりうる野生イノシシの血液サンプルを入手し、ブルセラ属菌の保菌状況やブルセラ属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： 大日本猟友会の協力の下、イノシシの血液サンプルを採取してもらった。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℃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： 家畜ブルセラ菌に対する抗体は、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、*B. canis* に対する抗体は、ブルセラ・カニス凝集反应用菌液

(北里研究所) を用いて検出した。イノシシ血清を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、これにサフラニンを加えて調整した菌液を同量加える。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。

3. ブルセラ属菌特異的遺伝子の検出と菌分離： 抗体陽性となったイノシシの血液よりDNAを分離し、ブルセラ属菌特異的DNAを*bcbp31*、*omp2* (*abortus* type および *canis* type) もしくは *omp31* を標的として、PCRにより検出した。

また、血液をATCC488 brothで培養した。血液培養液については、その一部をPCRによるブルセラ属菌特異的遺伝子の検出に用いた。陽性となった培養液については菌分離を試みた。分離された菌は、当該遺伝子ならびに16S rRNA 遺伝子シーケンスを行った。また、ブルセラ属菌等で免疫したウサギ抗血清との反応性を調べた。

C&D. 研究結果と考察

1. サンプルの採取状況： 表2に過去のものも含めたサンプル・プロファイルを示した。イノシシは18県から2005年以前47頭、2005-6年シーズン98頭、2007-8年68頭、2008-9年87頭、2009-10年41頭、2010-11年109頭 (1/1現在) の合計450頭であった (表2)。

2. MATによる抗体検査： 家畜ブルセラ菌に対しては、3検体 (愛媛2、鹿児島1) が陽性を示した。その他の検査したサンプルはすべて1:10未満であり、抗体は確認されなかった。*B. canis* に対しては、検査したイノシシ450頭のうち42頭 (9.3%) が陽性を示した。特に四国地

区では、2010-11 年分は、家畜ブルセラ菌に対して 1/109 (0.9%)、*B. canis* に対して 11/109 (10.1%) が陽性を示した。調査開始からの合計では、家畜ブルセラ菌に対して 2/212 (0.9%)、*B. canis* に対して 29/212 (13.7%) が陽性であった (表 3)。

3. 血液中のブルセラ属菌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 42 サンプル中 25 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 4)。家畜ブルセラ菌抗体陽性の 3 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。PCR で *B. canis* の増幅パターンを示した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 *bcsp31* 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。すなわち、*B. canis* の保菌が強く疑われた。

4. 血液培養および菌分離：血液培養後に 10 サンプルが *bcsp31* に対する PCR で陽性を示した (表 5)。このうち、3 サンプルは *omp2* (*canis* type) でも陽性となった。また、*bcsp31* に対する PCR でのみ、陽性を示す菌株が 2 株、分離された (表 5、図 1)。当該イノシシは、どちらも MAT による抗体検査で陰性の個体であった (表 4)。それぞれの分離菌株について、*bcsp31* 増幅領域および 16S rRNA 遺伝子のシーケンスを行った (図 2)。その結果、いずれも *Achromobacter xylosoxidans* と一致した。*A. xylosoxidans* は、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌で脱窒素細菌である。土壌、水系環境に存在し、病原性は弱いと見られるが日和見的に菌血症、心内膜炎、髄膜炎、肺炎を起こすことがあり、病院感染上も問題になることがある。

A. xylosoxidans をイノシシが保菌していることが示されたことより、本菌がブルセラ属菌に対して交差反応を示す可能性を調べた。百日咳菌で免疫したウサギ血清は弱い交差反応を示したが、ブルセラ属菌で免疫したウサギ血清は反応しなかった (図 3)。従って、イノシシに見られた抗体は、本菌に対する抗体の交差反応ではないことが示唆された。

E. 結論

今回の検討では、野生イノシシにおいて *B. canis* に対して抗体陽性を示すものが確認された。特に、調査した四国地区では約 10%が陽性を示した。国内では *B. canis* の存在は、イヌ繁殖施設におけるブルセラ病の流行や愛護センター等のイヌの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。ブタは一般に抵抗性であるとされているが、*B. canis* に軽度感染し、抗体を持つ可能性は否定できない。ブルセラ属菌の遺伝子検出に広く用いられている *bcsp31* に対するプライマーで交差増幅する菌が分離されたが、この菌は抗体の交差反応は示さなかった。また、*bcsp31* 以外の領域は増幅されなかった。よって、本菌がイノシシに見られる抗ブルセラ抗体の元になっている可能性は否定された。さらに検証を続ける必要があり、また、そのためには、より特異的な検査法の開発も必要である。

2) ブルセラ特異的抗体検査法の比較とブルセラ属菌特異的抗体検出法の作成に関する研究

A. 研究目的

一般にブルセラ症の診断では試験管凝集反応 (TAT) が用いられるが、検査に必要な血清量が多く、煩雑であるため、一度に多くのサンプルを検査することが難しい。そこで、我々は

これに替わる方法として、マイクロプレート凝集反応 (MAT) を報告し、実施してきた。今回は、イヌブルセラ病の各種血清学的診断法を比較検討した。比較した検査法は、一般に広く用いられている TAT、市販されており入手可能なイムノクロマト法 (ICA) と蛍光抗体法 (IFA)、さらに in house テストとして MAT とウェスタンブロット法 (WB) の全 5 種である。

B. 研究方法

1. サンプル： 静岡県内の某イヌ繁殖施設 (以下、K: kennel) における *B. canis* アウトブレイク時のイヌ血清 109 検体と K 市動物愛護センター (以下、H: healthy) の非感染イヌ血清 60 検体、計 169 検体を用いた。

2. 抗体検査方法： TAT および MAT は、ブルセラ・カニス凝集反应用菌液 (北里研究所) を用いて先の報告に基づいて実施した。ICA は Anigen Rapid C Brucella Ab Test Kit (Anigen Animal Genetics Inc.) を入手し、付属のプロトコールに従い実施した。被検血清をサンプル Well に 20 μ l 添加し、20 分後にコントロールラインにの形成を確認し、テストラインの有無により判定した。IFA は Brucella canis FA substrate slide (VMRD Inc.) を入手し、付属のプロトコールに従い実施した。抗原 (*B. canis* 菌体) 固着スライドに 1:200 に希釈した被検血清を反応後、FITC-labeled anti-Dog IgG を反応させる。菌体の蛍光を、結果は蛍光顕微鏡下で判定した。

3. ウェスタンブロッティング法 (WB)： *B. canis* 浮遊液を 0.5% n-lauroylsarcosine 溶液に調整し、室温で 24 時間インキュベーションした後、遠心 (3,000 xg, 15min) し、さらに上清を超遠心 (100,000 xg, 72h) した後の上清を抗原 (SE: n-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 $^{\circ}$ C, 5min) し、SDS-PAGE で泳動後、

polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。ブロッキング済みの PVDF 膜に 1:250 希釈した陽性対照イヌ血清、サンプルイヌ血清を 1 時間反応後、2 次抗体として anti-Dog IgG-HRP IgG (KPL) を 1 時間反応させた。発色には、EzWestBlue (ATTO) を用いた。結果は、バンドの確認により、陽性・陰性を判定した。

4. 検査結果の統計学的解析： それぞれの検査結果間の κ 係数 (kappa coefficient) を求めて比較した。

5. 合成ペプチドの作成： WB によりブルセラ特異的と考えられたタンパクについて、アミノ酸シーケンスを行った。得られたシーケンスについて、Protein database でタンパクを同定した。そのシーケンスに基づき、抗原性 (Hoop/Woods antigenicity, Protein antigenicity, Protrusion Index antigenicity, Welling antigenicity)、親水性および疎水性 (Kyte/Doolittle hydrophobicity, von Heijne hydrophilicity)、二次構造 (Chou Fasman 2 $^{\circ}$ structure, Robson Garnier 2 $^{\circ}$ structure) を解析し、5 種類の合成ペプチドを作成した。

C & D. 研究結果と考察

1. TAT によるスクリーニング： K 群のイヌについては、サンプル量が少なかったため、1:160 からの測定とした。51 頭が 1:160 以上の陽性を示し、58 頭が 1:160 未満の陰性であった。H 群は 1:20 から測定し、すべて陰性で、1:20 未満であった。

2. TAT とその他の検査法の比較： TAT と ICA、IFA、MAT の結果には、それぞれ比較的高い相関が見られた ($\kappa = 0.76 - 0.83$)。ただ、TAT 陰性のうち、それぞれ 15、19、13 検体が陽性を示した (表 6 上)。また TAT 以外の 3 法、ICA、IFA、MAT 間の相関は、非常に高かった ($\kappa =$

0.93) (表6下)。すなわち、ICA、IFA、MATはTATよりも感度が高いことが示された。

広く用いられるTATと比較してICA、IFA、MATは、イヌブルセラ病の診断に十分な感度と特異性を持つことが明らかとなった。

3. WBとその他の検査法の比較： K群109検体では、WBと他の4法との相関は低かった($\kappa = 0.29 - 0.49$)。これはK群のTAT陰性58検体での相関の低さ($\kappa = 0.32 - 0.46$)によると考えられた。一方、K群でTAT陽性の51検体とH群60検体では、WBと他の検査法の結果は、ほぼ一致($\kappa = 0.97 - 0.98$)した(表7)。

WBでは、他の検査法では陰性となったアウトブレイク時の検体の多くが陽性となった。これは、WBが高感度であるため抗体価の低い検体でも検出可能であったことによると考えられる。繁殖施設におけるアウトブレイクでは、WB以外の検査法では、低抗体価の感染動物を見逃す可能性があり、注意する必要があることが示された。

4. WBによるブルセラ特異的抗原の検索： より特異性、感度の高い検査法を開発するために、WBにより、ブルセラ特異的抗原の検索を行った。その結果、11~12kDのタンパクに特異性が認められた(図4)。このタンパクについて、アミノ酸シーケンスを行ったところ、104aaのブルセラ属菌Hypothetical proteinと一致した。さらに、このタンパクの抗原部位検索を行い、抗原性を持つと考えられた領域内に、5種類の合成ペプチドを作成した(図5)。現在、別途、アミノ酸配列から塩基配列を決定し、その領域を増幅するプライマーを作成し、フルサイズの組換えタンパクを作成中である。

E. 結論

現在、最も広く用いられているTATは簡便さや感度において、MAT、ICA、IFAに劣ること

が示された。また、WBとの比較により、MAT、ICA、IFAでもアウトブレイクが起こっている施設内では、抗体価の低い感染イヌを見逃す可能性が示された。従って、より特異性や感度に優れた方法の開発が必要であることが明らかとなった。

現在、我々は、合成ペプチドを作成し、その特異性と感度を検証している。また、フルサイズの組換えタンパクも作成中である。今後も、さらに、両者について検討を加えて、高感度特異的診断法の開発を行う予定である。

1) & 2)

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表等

1. 論文発表等

(1) Nomura,A., Imaoka,K., Imanishi,H., Shimizu,H., Nagura,F., Maeda,K., Tomino,T., Fujita,Y., Kimura,M. and Stein,GH. Human *Brucella canis* infection diagnosed by blood culture. *Emerg. Inf. Dis.*, 16(7):1183-1185, 2010

(2) 今岡浩一. 犬を飼うときに気をつけたい感染症. in: チャイルドヘルス, 診断と治療社, 13(8): 567-570, 2010

2. 学会発表・講演等

(1) 今岡浩一. 日本におけるブルセラ症の現状: 特別講演. 第47回レプトスピラ・シンポジウム, 東京, 2010年3月

(2) 木村昌伸, 今岡浩一, 鈴木道雄, 山田章雄. イヌブルセラ病抗体検査法の評価. 第150回日本獣医学会学術集会, 帯広, 2010年9月

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、1999.4.1～2010.12.31)

診断年月	推定感染地	推定感染経路	症 状	血清抗体検査		菌分離
				abortus	canis	
2002.1	不明	ペットの犬	発熱、食欲不振	—	陽性	(-)
2005.6	シリア	経口	発熱、皮疹、脾腫、関節痛他	陽性	陽性	<i>mellitensis</i>
2005.12	国内	不明	発熱、筋肉痛、腹痛	—	陽性	(-)
2006.2	エジプト	不明 (吸入疑い)	発熱、頭痛、肝脾腫	陽性	—	<i>mellitensis</i>
2006.6	イタリア	不明	発熱、筋肉痛	—	陽性	(-)
2006.7	エジプト(外国人)	経口	発熱、頭痛	陽性	—	(<i>abortus</i>)
2006.9	国内	不明	発熱、脾腫	—	陽性	(-)
2006.10	国内	不明	発熱、中枢神経症状	—	陽性	(-)
2007.4	国内	イヌ	リンパ節腫脹、倦怠感	—	陽性	(-)
2008.6	国内	飼い犬	発熱、関節炎、筋炎	—	陽性	(-)
2008.7	ペルー(外国人)	経口感染	発熱、痛み、全身倦怠感	陽性	—	(<i>abortus</i>)
2008.8	国内	繁殖犬	発熱、脾腫、肝腫大	—	陽性	<i>canis</i>
2008.8	国内	繁殖犬	発熱	—	陽性	<i>canis</i>
2009.10	インド(外国人)	経口	発熱、脾腫、リンパ節腫脹、関節炎他	陽性	陽性	<i>mellitensis</i>
2010.4	ペルー(外国人)	経口?	発熱、腹痛、腰痛 (腰筋筋腫痛)	陽性	陽性	<i>mellitensis</i>
2010.6	国内	不明	発熱	—	陽性	(-)

表2) 検査対象イノシシー一覧

地域	Others	2005-06 (Dec.-Feb.)	2007-08 (Nov.-Jan.)	2008-09 (Nov.-Jan.)	2009-10 (Nov.-Jan.)	2010-11 (July.-Jan.)	合計
千葉		14	7	5			26
長野		2		1			3
静岡		32	8	13			53
滋賀	8						8
岐阜	19						19
愛知	20			1			21
三重			2	4			6
兵庫		5	1	3			9
島根		1	7	8			16
広島		14	3	5			22
徳島			3	4	8	29	44
香川			5	6	18	45	74
愛媛			11	14	11	32	68
高知		14	3	2	4	3	26
熊本		12	9	8			29
大分		3	4	2			9
宮崎			3	4			7
鹿児島		1	2	7			10
合計	47	98	68	87	41	109	450

表3) MATによる抗ブルセラ抗体検出

Locality	n	MAT (number of positive)		
		<i>B. abortus</i>	<i>B. canis</i>	
千葉	26	0	2	
長野	3	0	1	
静岡	53	0	6	
滋賀	8	0	0	
岐阜	19	0	0	
愛知	21	0	0	
三重	6	0	0	
兵庫	9	0	0	
島根	16	0	0	
広島	22	0	1	
徳島	44	0	6	<i>B. abortus</i> (2/212, 0.9%) <i>B. canis</i> (29/212, 13.7%)
香川	74	0	6	
愛媛	68	2	10	
高知	26	0	7	
熊本	29	0	1	
大分	9	0	0	
宮崎	7	0	0	
鹿児島	10	1	2	
合計	450	3 (0.7%)	42 (9.3%)	

表4) 抗体陽性検体血中ブルセラ遺伝子のPCRによる検出

年度	No.	捕獲地	標的遺伝子※)			
			1	2	3	4
05	3	高知	-	-	-	-
	21	高知	-	-	-	-
	27	鹿児島	-	-	+	-
	32	広島#	+	-	+	+
	37	静岡	+	-	+	-
	63	千葉#	+	-	+	+
	80	静岡	+	-	+	-
	85	静岡	+	-	-	-
	93	高知	-	-	-	-
	4	千葉	-	-	+	-
07	8	鹿児島	-	-	-	-
	20	熊本	+	-	-	-
	49	愛媛	-	-	-	-
	60	愛媛	-	-	+	-
	62	愛媛	+	-	+	-
	63	愛媛	-	-	-	-
	68	愛媛	-	-	-	-
	3	高知	-	-	-	-
08	13	香川	+	-	-	-
	21	長野	-	-	+	-
	24	静岡	+	-	-	-
	25	静岡#	+	-	+	+
	28	徳島	+	-	-	-
	31	徳島	-	-	+	+
	33	愛媛	-	-	-	-
	61	愛媛#	+	-	+	+
	70	静岡#	+	-	+	+
	85	愛媛	+	-	-	+
87	鹿児島@	-	-	-	-	

年度	No.	捕獲地	標的遺伝子※)			
			1	2	3	4
09	19	愛媛@	-	-	-	-
	21	香川	+	-	-	-
	22	香川	+	-	+	-
	34	高知	-	-	-	-
	13	愛媛	-	-	-	-
	14	香川	-	-	-	-
10	52	徳島	+	-	+	-
	57	徳島	-	-	-	-
	73	愛媛@	-	-	-	-
	77	高知	-	-	-	-
	78	高知	-	-	-	-
	87	徳島	-	-	-	-
	90	徳島	-	+	-	+
	93	香川	+	-	-	-
	94	愛媛	-	-	-	-
	100	香川	-	-	-	+

陽性対象菌株の反応パターン

	1	2	3	4
<i>B. canis</i>	+	-	+	+
<i>B. abortus</i>	+	+	-	-

※) 1 : *bcs*p31
 2 : *omp*2 (*abortus* type)
 3 : *omp*2 (*canis* type)
 4 : *omp*31

■ PCR陽性
 @) 抗*B. abortus*抗体陽性
 #) *B. canis*とPCRパターンが一致

表5) 血液培養液によるブルセラ遺伝子のPCRによる検出

No.	地域	<i>bcs</i> p31	<i>omp</i> 2 (<i>abortus</i> type)	<i>omp</i> 2 (<i>canis</i> type)	<i>omp</i> 31	菌分離
10	香川	+	-	-	-	+
12	香川	+	-	+	-	-
18	香川	+	-	-	-	-
30	徳島	+	-	-	-	-
45	香川	+	-	-	-	-
50	徳島	+	-	-	-	+
61	徳島	+	-	+	-	-
67	徳島	+	-	+	-	-
73	愛媛	+	-	-	-	-
78	高知	+	-	-	-	-

図1) *bcs*p31 プライマーで陽性を示す分離株 (#10, #50 分離株)

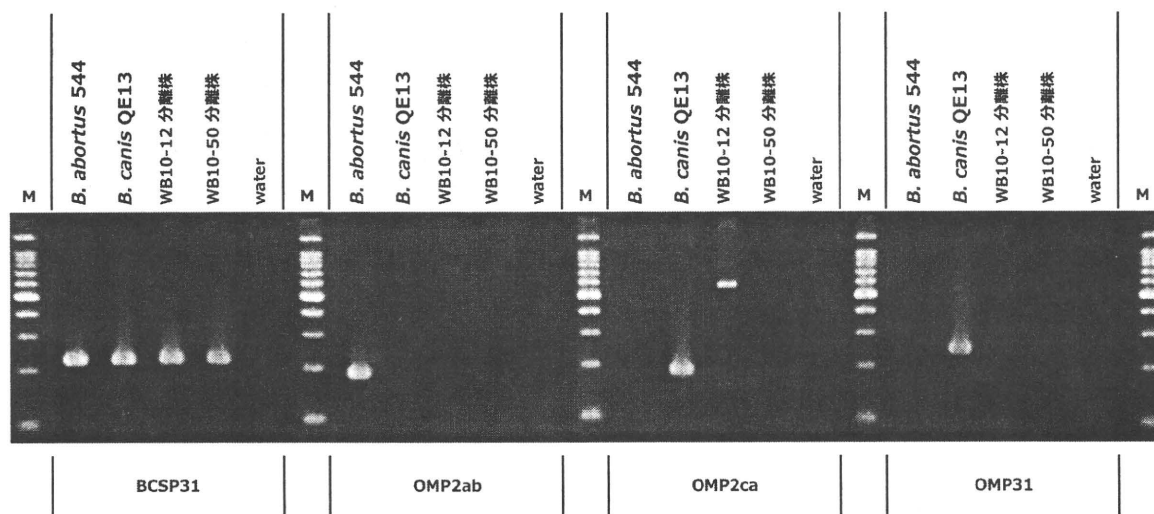


図2) 分離株のシーケンス

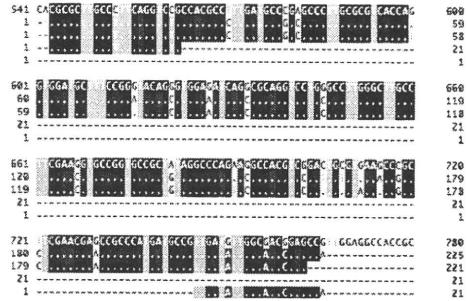
BCSP31
Primer
領域

Achromobacter xylosoxidans AB CP002287 REGION- 73175..74134
WB10-50_B4-B5_INVERT
WB50-12_B4-B5_INVERT
B5
B4_INVERT

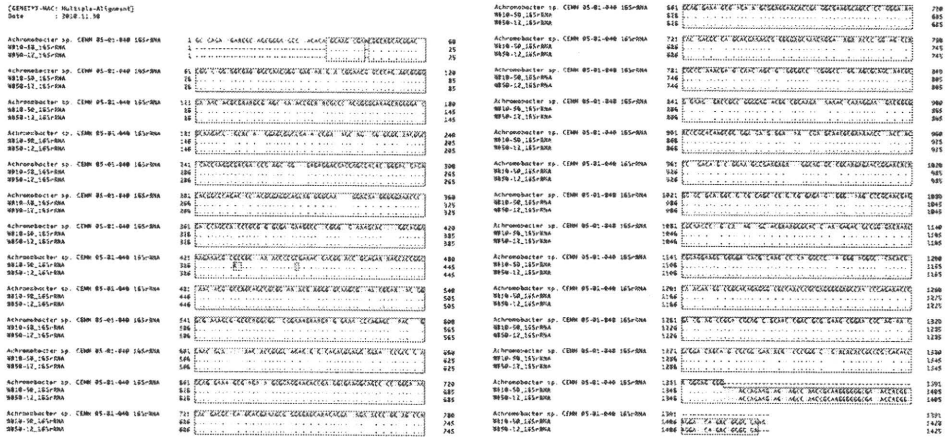
Achromobacter xylosoxidans AB CP002287 REGION- 73175..74134
WB10-50_B4-B5_INVERT
WB50-12_B4-B5_INVERT
B5
B4_INVERT

Achromobacter xylosoxidans AB CP002287 REGION- 73175..74134
WB10-50_B4-B5_INVERT
WB50-12_B4-B5_INVERT
B5
B4_INVERT

Achromobacter xylosoxidans AB CP002287 REGION- 73175..74134
WB10-50_B4-B5_INVERT
WB50-12_B4-B5_INVERT
B5
B4_INVERT



16S rRNA
領域



Achromobacter xylosoxidansと一致

図3) 分離菌株のブルセラ属菌等免疫ウサギ血清に対する反応性 (ELISA 法)

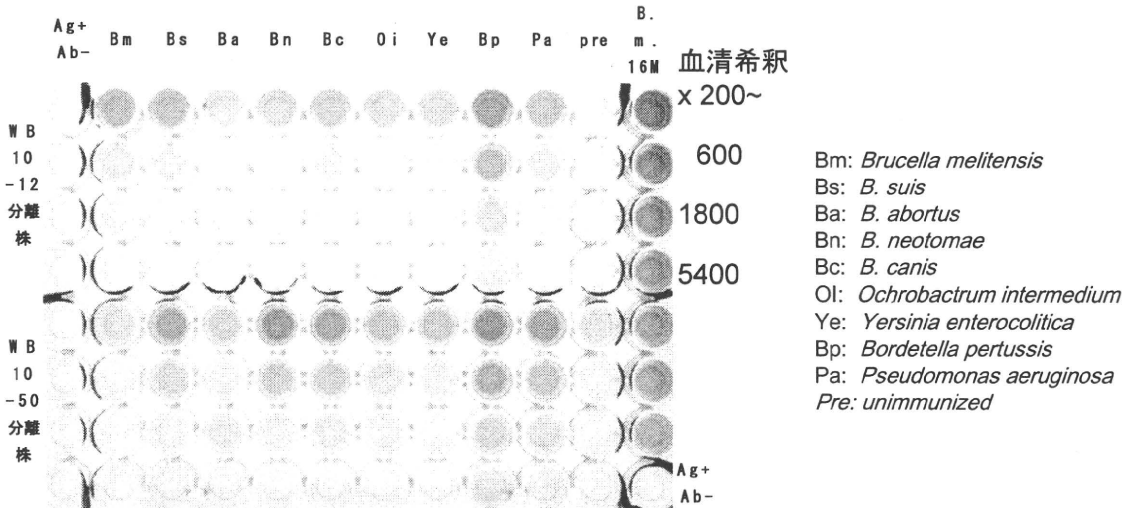


表6) TAT、MAT、ICA、IFA の相関

MAT				ICA				IFA						
	-	+	t		-	+	t		-	+	t			
	-	103	15	118		-	99	19	118		-	105	13	118
TAT	+	0	51	51	TAT	+	0	51	51	TAT	+	0	51	51
	t	103	66	169		t	99	70	169		t	105	64	169
	κ value	0.81				κ value	0.76				κ value	0.83		

ICA				IFA				IFA						
	-	+	t		-	+	t		-	+	t			
	-	98	5	103		-	101	2	103		-	99	0	99
MAT	+	1	65	66	MAT	+	4	62	66	ICA	+	6	64	70
	t	99	70	169		t	105	64	169		t	105	64	169
	κ value	0.93				κ value	0.93				κ value	0.93		

表7) WB と TAT、MAT、ICA、IFA の相関

WB				WB							
	-	+	κ value		-	+	κ value				
TAT	K	-	19	39	0.32	MAT	K	-	18	25	0.42
		+	1	50	0.98			+	2	64	0.97
	H	-	59	1	0.98		H	-	59	1	0.98

WB				WB							
	-	+	κ value		-	+	κ value				
ICA	K	-	18	21	0.46	IFA	K	-	18	27	0.40
		+	2	68	0.97			+	2	62	0.97
	H	-	59	1	0.98		H	-	59	1	0.98

K : Kennel dogs, H : Healthy dogs

図4) WB によるブルセラ特異的抗原の検出

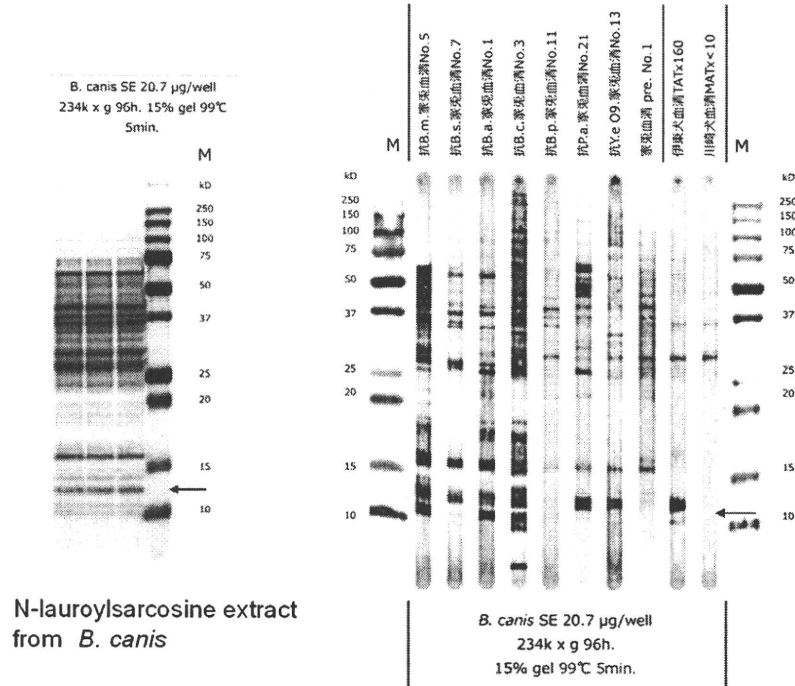
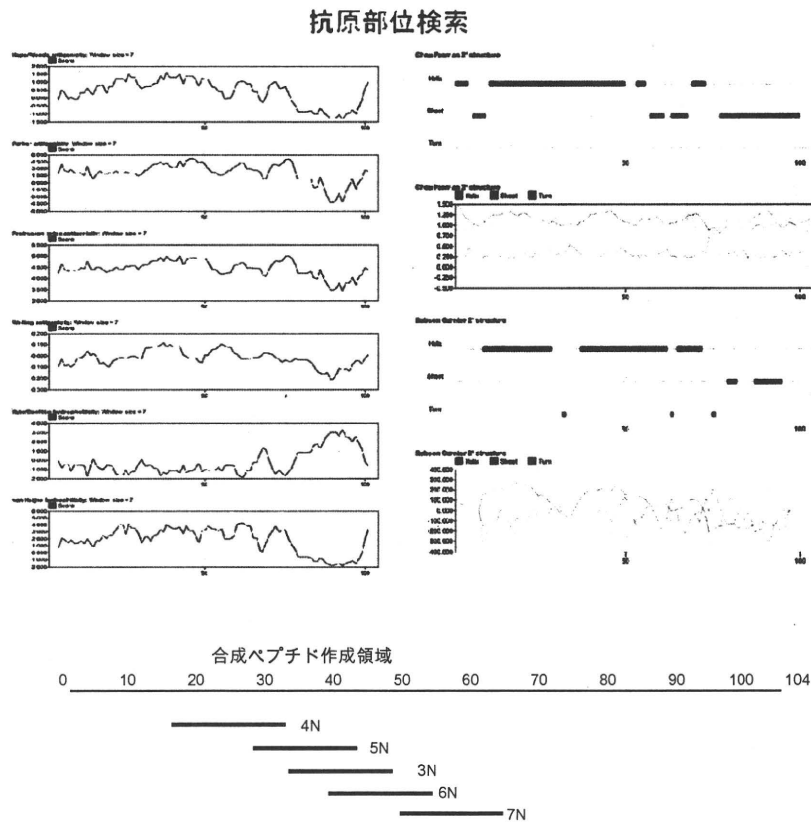


図5) 分離タンパクの抗原部位の検討と合成ペプチド作成



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

別紙のリスト添付

研究要旨

今年度、新たにジフテリア様症状を呈する2名の患者からジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* (*C. ulcerans*^{Tox+}) が分離された。両患者の環境調査において飼いネコから患者と遺伝子型が一致する *C. ulcerans*^{Tox+} が分離された。

9カ所の地方自治体の動物愛護センターに搬入されたイヌまたはネコの咽頭スワブ等について菌分離調査を実施した結果、5カ所の愛護センターのネコとイヌより *C. ulcerans*^{Tox+} が分離された。一方、名古屋市の動物病院におけるネコの調査では、1匹から *C. ulcerans* が分離されたが、ジフテリア毒素非産生性であった。

今年度までの調査結果では、野外活動時間の多いイヌやネコは本菌を保菌または本菌に感染している可能性が高い。感染した動物からは動物への菌の伝播がおり感染が成立する。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イヌ、ネコにおいては感染リスクが高いことが考えられる。しかし、現在までに限られた畜産動物の検体については当該菌は陰性である。

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。

C. ulcerans^{Tox+} 感染はジフテリアに極めて類似する病態を呈し、動物から感染する可能性が国内外の感染報告から指摘されているが、その実態は不明な点が多く、その自然界における実態を把握する必要がある。過去に実施したイエネコでの限られた調査では明確な結論が得られなかったため、調査対象を更に拡大し、生態系でどのように維持されているか、

菌の分布、疫学等の調査により明らかにする。

B. 研究方法

1. 調査対象

(1) 感染患者の病原体診断と環境調査: 今年度ジフテリア様症状を呈した3名の患者が医療機関で確認された。医師と患者の同意を得たのち、患者からの病原体確認および患者の環境調査をおこなった。必要により、患者および病院を所轄する自治体の衛生研究所との共同調査を実施した。

(2) 動物の菌分布調査

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イヌ・ネコ、または開業獣医師へ来院したイヌ・ネコ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、および大分県である。

検査実施に際して、検体の採取、運搬および検査方法については各衛生研究所で調整と試験をお願いした。菌分離試験に用いる培地の作製にあつては、各組織による選択培地調整による試験のバラツキを最小限にするために、荒川変法血液培地およびDSS培地は、生培地を特別注文したものを配布して実施した(株：日研生物医学研究所)。

2) 名古屋市の日本小動物獣医師会所属の開業医院の協力の下、診療・診察に訪れたイヌ・ネコのうちで、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、菌分離は大阪大学微生物病研究所 検査センター、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2010年に猟イヌの血清中の病原体調査としてジフテリア抗毒素定量の血清疫学調査を実施した。血中抗毒素が陽性イヌにあつては猟師の承諾を得て菌分離と再採血による抗毒素価測定を実施した。また、大阪府立大学 小崎俊司教室では、大阪府及び奈良県の乳房炎罹患牛の生乳並びにと場より採取した肉用牛の咽頭スワブ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

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

4. 分離菌株の解析

Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) PFGEは制限酵素:Sfi I、泳動装置:CHEF-DR II(Bio Rad)、1.5%ゲル、泳動条件は14℃、6V/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、患イヌ・ネコ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) ジフテリア様患者の調査は以下の 3 名について実施した。

1) 横浜市衛生研究所より感染症情報センターへ *C. ulcerans* 分離の報告があった(国内ヒトの症例の 7 例目)。担当医師から以下の情報を得た。神奈川県在住の HIV 加療中の 50 歳代の男性である。6 月 7 日、飼ネコの胸部に膿瘍を発見、この膿瘍は自壊して排膿したため、イソジンで洗って排膿した。このとき、ネコに左腕を引っ掻かれた。6 月 17 日より左前胸部に腫脹を自覚した。19 日左腋窩の腫脹を自覚した。6 月 21 日 38.2 度の発熱が出現したため、6 月 22 日通常通院している横浜市民病院を受診し、腋窩リンパ節が 3cm 程度に腫脹しており、穿刺排膿を施行した。この膿を細菌検査室にて染色したところ、Gram 染色陽性の桿菌が検出されたので、*Nocardia* 属菌の感染を疑って、ミノマイシン 100mgx2 回/日処方された。気道症状なし。6 月 28 日、同病院検査室にて培養より *C. ulcerans* が検出された。

6 月 29 日再外来受診時に腋窩リンパ節が 4cm 程度に腫大しており、エリスロマイシン 1200mg (300mgx4 回/日) 処方した。この膿瘍は 7 月 6 日には縮小し始めた。7 月 21 日まで 1 ヶ月間抗生物質を投与し、軽快。膿瘍は小豆大まで縮小した。8 月 10 日には、ほとんど腫れは引いた。その後増悪なし。

患者の環境調査により、妻と娘と同居、とくに用事がない場合は、自宅で過ごしている。自宅には飼いネコが 7 匹家の家内外を自由に行き来している。さらに隣の家のネコが 3 匹患者宅に居ついていた。材料採取した 8 匹の口内スワブと傷や鼻水を呈するネコは菌分離検査をおこなった。患者及びその娘の咽頭スワブも採取した。患ネコは約半数が口内の炎症や鼻水、膿瘍などが観察された。同居家族の咽頭スワブからは *C. ulcerans* は検出されなかった。一方で、複数いる飼いネコのうち 1 匹の鼻汁及び口腔内スワブより、*C. ulcerans*^{Tox+} を分離した。この分離菌は、

PFGE 解析の結果、ヒト由来株とネコ由来株は同じタイプであった。更にこれらの株は、ヒト岡山株と同じタイプであった。これらの結果より患者は飼いネコより *C. ulcerans*^{Tox+} 感染が起きたと推定された。(神奈川県横浜市衛生研究所、横浜市民病院、感染症情報センター、感染研細菌第二部)

2) ジフテリア疑い患者の発生が担当医師(愛里病院内科の蛭川医師)から情報提供があった。患者は 75 歳 男性で入院中である。7 月 30 日初診時、3ヶ月前から顔の腫れあり、右目の腫れ、2 週間前より物が飲み込めない状態であった。ミノマイシン投与とニューキノロン系点眼薬を処方。腫れている眼脂を検査した結果(検査会社へ外注) *Corynebacterium. spp.* の報告を受けた。菌は検査会社で廃棄されたために当室での菌種の同定には、至らなかった。8 月 9 日に再度、眼脂と咽頭について検査したが菌は検出されなかった。この時期より、右目が開けられないほど腫れ、首が強度の腫れが観察され、食事が不能、薬も飲み込めない。8 月 10 日に所轄保健所の要請で血清と咽頭スワブを採取し、当室で菌分離検査を実施したが、関連菌は検出されなかった。臨床症状よりジフテリアを疑いジフテリアウマ抗毒素の 2 万単位を同夜投与した。同時に血清病予防のためにステロイドおよびセフチゾキシムを処方した。11 日の朝に開眼を確認するとともに首の腫れも改善した。しかし、この時期より四肢の麻痺が出現し、長期の入院加療となったが、右目や首の腫れがほとんど消えた。10 月 27 日時点で、車いすを使用するまで回復した。なお、11 月 15 日の血清中のジフテリア抗毒素価を定量した結果、培養細胞法およびウサギ皮内試験法ともに検出レベル以下であった。患者は簡易宿泊所を住居とし、家主はネコの親と 2 匹の子供の合計 3 匹ほど飼育している。家の内外に常時出入りしていた。親ネコが高齢で鼻水を出している風邪症状を呈していた。これらのネコの菌分離調査はできなかったが、地区の公園にいた 4 匹のネコの体表及び口内スワブを採取した。また、周辺に集まってい

た3羽のハトの糞を採取した。これらは、PCRによるジフテリア毒素遺伝子検査を行ったが、すべて陰性であった。(東京都健康安全研究センター、足立区愛里病院、感染研細菌第二部)

3) ジフテリア疑い患者の発生が担当医師(土浦協同病院耳鼻科の畑中医師)から情報提供があった。患者は51歳の女性で、風邪症状が増悪後、嚥下困難を呈し咽頭に典型的な白い偽膜を観察した。GPR(グラム染色陽性桿菌)が病院の検査室で分離された。当室で当該菌の道程試験で*C. ulcerans*^{tox+}を確認した。治療はエリスロマイシン投与を行い入院7日目に退院した。患者の環境調査で、風邪症状を呈する飼いネコ(13歳オス去勢済み)の目やに咽頭スワブから*C. ulcerans*^{tox+}を分離した。しかし、治療後の患者とその夫の咽頭スワブの検査は陰性であった。分離菌についてPFGEによる解析を行った結果、患者分離株と飼いネコからの分離株のPFGEパターンが一致した。更にこれらの株は、ヒト岡山株と同じタイプであった。また、飼いネコの血清中には、抗ジフテリア毒素抗体が検出された(0.02IU/mL)。

なお、患者飼いネコを診察している長島動物病院の協力を得て、風邪様症状を示すネコ3頭から口内スワブや鼻ぬぐい液を採取して検査した結果、菌分離に陰性であった。(土浦協同病院耳鼻科、長島動物病院、感染研細菌第二部)

(2) 動物の菌分布調査

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イヌ・ネコ、または動物病院との研究調査結果は以下に示す。なお、各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) YO 県の調査

牛病畜(関節炎および乳房炎)の関節液および乳汁の計10検体と、耳鼻咽喉科でのヒトの咽頭スワブ1検体について調査した結果、ジフテリア毒素産生性のコリネバクテリウムは全例陰性であった。ヒトの検体については

もう少し採取できると考えていたが、ジフテリア様疾患を疑う患者が少なかったものと思われる。今後、患者の調査に当たっては、より広範囲な地域と諸症状について患者検体を採取する必要があると考える。

2) OS 県の調査

菌分離調査として動物管理指導センターおよび6ヶ所の動物病院のネコ214匹の咽頭または鼻腔スワブの検査の結果、毒素非産生性菌を含み7匹から*C. ulcerans*を分離した。野生シカ51匹の鼻腔スワブの検査結果はすべて陰性であった。また、ネコについては197匹、野生シカは8匹について、血清中のジフテリア抗毒素を測定した結果、16匹(動物管理センター12、動物病院4)のネコが陽性であった。

動物管理指導センター収容ネコでは毒素遺伝子保有株分離率は3.2%、開業獣医医院受診ネコでは3.3%であり、県内の収容ネコ及び一般家庭飼育ネコともに一定の割合で*C. ulcerans*^{tox+}を保菌していることが明らかとなった。また、血清中抗毒素保有調査では、収容ネコ及び一般家庭飼育ネコともに8.0%以上の個体で抗毒素を保有しており、過去に*C. ulcerans*^{tox+}感染した疑いのあるネコの存在も明らかとなった。ネコにおいては*C. ulcerans*^{tox+}が潜在している可能性があり、今後*C. ulcerans*^{tox+}分離陽性個体及び抗毒素陽性個体の周辺環境調査を行なう必要があると考えられる。

3) KT 県の調査

菌分離およびPCR試験によるスクリーニングとして、開発した*C. ulcerans*のDLT遺伝子、p1D遺伝子ならびに*C. pseudotuberculosis* p1D遺伝子を特異的に検出するリアルタイムPCR法により、調査動物(計56検体)について検査を実施した。その結果、56検体中1検体から*C. ulceans*のDLT、p1D遺伝子が検出され、1検体から*C. ulceans*のp1D遺伝子のみが検出された。DLT、p1D遺伝子が検出された1検体からは菌が分離された。しかし、p1D遺伝子のみ検出された1検体からは、菌の分離はできなかった。p1D遺伝子のみ陽性とな

った検体は、DLT 非産生 *C. ulcerans* の可能性も残されているが、リアルタイム PCR の検出サイクル数や融解曲線から、DNA 量が他の検体に比べ少なく、かつ凍結保存されていた検体だったため、菌が分離できなかつたものと推定された。なお、56 検体から *C. pseudotuberculosis* は検出されなかつた。

4) YT 県の調査

昨年度に引き続き動物管理センターに引き取られたネコの咽頭スワブおよび動物病院に診療・診察に訪れた風邪様症状を呈したネコ 80 匹およびイヌ 2 匹の鼻汁について調査した。その結果、これらの検体からジフテリア毒素遺伝子、および *C. ulcerans*^{J^{tox+}} は検出されなかつた。

5) HE 県の調査

昨年度に引き続き愛護センターのイヌ及びネコを調査した。5～12 月にかけてそれぞれ 124 頭の検査を行った結果、イヌ 3 頭 (2.4%) 及びネコ 8 頭 (6.5%) から計 11 株の *C. ulcerans* を分離した。ネコから分離された 8 株中 2 株は、毒素原性試験では陰性であった。分離された動物の収容月は、5 月 2 頭、7 月 2 頭、8 月 2 頭、10 月 3 頭、12 月 2 頭であり、時期による分離率の差は認められなかつた。また、収容地域を東、中、南の 3 地域に分けて分離率を比較したが、それぞれ 3.6%、1.5%、8.2% と有意差はみられず、県下全域に広く分布していると考えられた。

また、飼育環境の汚染状況を把握するため、飼育施設内の拭き取り調査を行った。8～11 月にかけて 160 件の拭き取り検査を行った結果、7 件 (4.4%) から毒素原性ウルセランスが分離された。使用中のネコケージの検出率が 12.5% (6/48) と高く、使用中のイヌケージは 3.1% (1/32) であった。なお、未使用ケージ、通路、床の計 80 件からウルセランスは検出されなかつた。

6) NK 県の調査

菌分離調査として動物保護センターに搬入されたイヌ 55 頭およびネコ 19 頭の口腔スワブ合計 74 匹について行った。今回用いた選択平板培地上に発育した菌株について PCR 試験

を実施した結果は、すべてジフテリア毒素遺伝子陰性であった。

7) SO 県の調査

菌分離調査として動物病院 6 ヶ所のネコ 11 匹の鼻汁等の検査結果は 1 匹から *C. ulcerans*^{J^{tox+}} を分離した。陽性ネコは室内外の出入り自由の飼育環境であった。香川県の 4 ヶ所の動物病院のネコ 25 匹の鼻汁等の検査結果は 6 匹から *C. ulcerans*^{J^{tox+}} を分離した。陽性となったネコの環境調査として室内の 10 ヶ所のふき取り検体は陰性であった。また、菌陽性の 6 匹はジフテリア抗毒素価の上昇が認められた。他 2 県の 2 動物病院のネコ 71 匹の鼻汁等の検査結果は 2 匹から *C. ulcerans*^{J^{tox+}} を分離した。陽性 2 匹は同一飼い主であり、陽性 2 頭と同一飼い主の 12 頭中 5 頭に抗体陽性を認めた。

K 市の 1 動物病院のネコ 2 匹の鼻汁等の検査結果は 2 匹から *C. ulcerans*^{J^{tox+}} を分離し、環境調査でこたつの拭き取りから菌を分離した。しかし、家族 3 名の咽頭スワブは陰性であった。分離菌 2 株中 1 株はニューキノロン系薬剤に中間を示した。2 株は PFGE で同一パターンを示し、また中間を示した菌は耐性に関連する遺伝子変異も認められたことから、治療中に耐性化したことが推測される。

8) KT 県の調査

昨年度に引き続き愛護センターの 54 匹のイヌを調査した結果、培地上に出現した菌は colony PCR を行ったが全て陰性であった。また、動物病院はイヌ 8 頭、ネコ 28 匹についても同様に colony PCR を実施したが、全て陰性であった。

9) IO 県の調査

愛護センターのイヌ 22 匹およびネコ 37 匹の咽頭スワブおよび抑留犬舎の飲み水 14 検体の検査を実施した。その結果、イヌ 3 匹から 3 株の *C. ulcerans*^{J^{tox+}} を分離し、4 匹 (菌分離の 3 匹を含む) は PCR 陽性であった。また、ネコ 1 匹は PCR 陽性であったが、菌は分離できなかつた。これらの動物は捕獲地域に共通性はなく、外見上健康であり、病変等はみられなかつた。PFGE による菌株の解析で