

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

国内分離ライム病ボレリア遺伝子データベースの構築

研究分担者	川端寛樹	国立感染症研究所 室長
研究協力者	藤田博己	大原総合病院
	高田伸弘	福井大学
	伊東拓也	北海道立衛生研究所
	今内覚	北海道大学
	高野愛、大久保(佐藤)梢	国立感染症研究所
	中本 敦	岡山県環境保健センター

研究要旨:

国内でのライム病ボレリアの高感度 DNA 型別解析法による遺伝子データベース構築作業を継続的に
行った。本年度は新たに26株についてデータベースへの登録を行った。また、中国、モンゴルを含むア
ジア地域で共通の DNA 型が存在することも明らかとなった。

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
国でも、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。

本疾患の制御には、自然界における病原体の
分布状況の把握とそこからの感染経路の遮断が

重要であり、このためには精度の高い病原体同
定法が必要である。また、近年渡り鳥等の移動に
付随した非人為的病原体の拡散も指摘されてお
り、多国間での病原体比較解析において、基準と
なるものさし(国際標準)の導入も求められていた。
近年 Margos らはボレリアの多領域 DNA 配列型
別法(Multilocus sequence typing 法、以下 MLST
法と略す)を開発し、これが前記疫学解析を行う
上で解像能が高いことから、国際標準として用い
ることを提唱した(Margos et al. 2008, 2009)。また
我々も昨年度までの研究により、国内における病
原体疫学調査に本法が有効であることを示してき
た。そこで本研究では、国際標準法に準拠した国
内ボレリアの DNA 型別データベースを充実させ、
多国間での疫学解析に必要な情報を提供すると

ともに、我が国では患者はほとんど見出されませんが、欧州では患者数が見出される *B. afzelii* 等についてもデータベース構築を開始した。

B. 研究方法

ボレリア分離のため、北海道、長野県において野鼠の捕獲、およびマダニ採取を協力研究者とともに行った。捕獲された野鼠は安楽殺後無菌的に膀胱を採取し培養に用いた。マダニは体表面をエタノール消毒後、内容物を取り出し培養に供した。ボレリアの培養には BSK-H 培地を用い、32°Cで2ないし3週間培養を行った。培養されたボレリアは常法に従い DNA 抽出し、Takano らの方法に従って種同定後、Margos らの方法に従って、8 遺伝子の塩基配列を決定しそれぞれの sequence type (以下 ST) を決定した (Margos et al. 2008)。得られた DNA 情報は *Borrelia* MLST database (<http://borrelia.mlst.net>) に登録し世界の研究者へ情報発信を行った。

(倫理面からの配慮について)

該当しない。

C. 研究結果

野鼠およびマダニより26株のボレリア分離に成功した。分離ボレリアは Takano らの方法により *B. afzelii* 4 株、*B. garinii* 20 株、および *B. japonica* 2 株に分けられた。北海道で捕獲された野鼠からは ST131 (meman As11 株および Mr17 株) の他、新規 ST418 (meman As13 株) が分離された。長野県で捕獲された野鼠からは *B. garinii* および *B. japonica* が各 1 株分離されたが、これらはこれまでに知られていない ST であった。 *Ixodes*

persulcatus からは *B. garinii* 17 株および *B. afzelii* 3 株が分離された。*B. garinii* 17 株の内、ST131 が 4 株、ST375 が 3 株、新規 ST420 が 3 株見出された。*B. afzelii* は全てこれまで報告の無い新規 ST であった。*I. ovatus* より分離された *B. japonica* は長野県の野鼠より分離された株と近縁であったが異なる ST に分類された。

D. 考察

ST131 は野鼠の他、これまでに国内患者、中国、モンゴルの *I. persulcatus* からも分離されていることから、ヒトに病原性があり、かつアジアに広域分布している可能性が示された。本 ST は 1990 年代に長野県で採取された *I. persulcatus* からも分離されており、国内にも広く浸潤していると考えられる。昨年度の本研究で ST375 は北海道で捕獲された野鼠から分離されていることから、本 ST は野鼠からマダニへ伝播されていると考えられた。ST376、ST384、ST387 は国内患者からも分離されており本マダニが病原体伝播に関与していることが強く示された。

一方、本研究で広域型ボレリアであることが明らかとなった ST131 の拡散方法については不明であるが、これは 1) ST131 に感染した野鳥類が移動した、2) ST131 を保菌したマダニが野鳥類などに寄生し移動した、もしくは 3) その両方、が考えられた。

E. 結論

国際標準に準拠した我が国におけるライム病ボレリアの MLST データベースを作成するとともに、近隣諸国で分離されているライム病ボレリアが我が国でも見出されることを明らかにした。

- F. 健康危険情報
なし
- G. 研究発表
1.論文発表
- 1) Takano A, Nakao M, Masuzawa T, Takada N, Yano Y, Ishiguro F, Fujita H, Ito T, Ma X, Oikawa Y, Kawamori F, Kumagai K, Mikami T, Hanaoka N, Ando S, Honda N, Taylor K, Tsubota T, Konnai S, Watanabe H, Ohnishi M, Kawabata H. Multi-locus sequence typing implicates rodents as the main reservoir host of human pathogenic *Borrelia garinii* in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*. 49: 2035-2039, 2011.
- 2) 伊東拓也, 高田伸弘, 藤田博己, 川端寛樹, 中本敦, 赤松達矢, 安藤秀二, 大久保(佐藤) 梢, 高野 愛, 小笠原由美子. 礼文島におけるマダニ類及びダニ媒介性病原体の調査. 第57回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2011年10月. 山形
- 3) 川端寛樹, 多田有希, 高野 愛, 佐藤梢, 大西真. 我が国におけるライム病の現状と疫学解析. 第153回日本獣医学会学術集会. 2012年3月. 大宮.
- 4) 佐藤 梢, 後藤みなみ, 村井厚子, 柳井徳麿, 高野 愛, 川端寛樹. 猟犬における抗ライム病ボレリア抗体の保有状況. 第153回日本獣医学会学術集会. 2012年3月. 大宮.
- 2.学会発表
- 1) 川端寛樹, 高野 愛, 中尾稔, 増沢俊幸, 高田伸弘, 矢野泰弘, 石畝史, 藤田博己, 伊東拓也, 及川陽三郎, 川森文彦, 熊谷邦彦, 三上稔之, 花岡希, 安藤秀二, 本田尚子, カイルテイラー, 坪田敏男, 今内覚, 渡邊治雄, 大西真. マダニ媒介性のライム病病原体 *Borrelia garinii* の維持伝播サイクルに関する研究. 第63回日本衛生動物学会大会. 2011年4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. 本年度に新たに分離したボレリア株の由来とその sequence type(ST)番号.

株名	ボレリア種	ST	分離材料	採取地
meman As 11	<i>Borrelia garinii</i>	131	<i>Apodemus speciosus</i>	Memambetsu, Hokkaido
meman As 13	<i>Borrelia afzelii</i>	418	<i>A. speciosus</i>	Memambetsu, Hokkaido
Mr 17	<i>B. garinii</i>	131	<i>Myodes rufocanus bedfordiae</i>	Wakkanai, Hokkaido
kaminae Ip 1	<i>B. garinii</i>	387	<i>Ixodes persulcatus</i>	Wakkanai, Hokkaido
tonbetsu lo 7	<i>Borrelia japonica</i>	419	<i>Ixodes ovatus</i>	Tonbetsu, Hokkaido
rebun 8	<i>B. garinii</i>	131	<i>I. persulcatus</i>	Rebun Island, Hokkaido
rebun 9	<i>B. garinii</i>	131	<i>I. persulcatus</i>	Rebun Island, Hokkaido
rebun 20	<i>B. garinii</i>	427	<i>I. persulcatus</i>	Rebun Island, Hokkaido
horobetsu 5	<i>B. garinii</i>	376	<i>I. persulcatus</i>	Horobetsu, Hokkaido
horobetsu 8	<i>B. garinii</i>	131	<i>I. persulcatus</i>	Horobetsu, Hokkaido
sarufutsu 2	<i>B. garinii</i>	375	<i>I. persulcatus</i>	Sarufutsu, Hokkaido
sarufutsu 3	<i>B. garinii</i>	375	<i>I. persulcatus</i>	Sarufutsu, Hokkaido
konnai 1	<i>B. garinii</i>	420	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
konnai 2	<i>B. garinii</i>	420	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
konnai 3	<i>B. afzelii</i>	421	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
konnai 8	<i>B. afzelii</i>	422	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
konnai 10	<i>B. garinii</i>	420	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
konnai 14	<i>B. garinii</i>	423	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
konnai 15 clone5	<i>B. garinii</i>	428	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
konnai 17 clone1	<i>B. garinii</i>	131	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
konnai 17 clone3	<i>B. afzelii</i>	424	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
konnai 20	<i>B. garinii</i>	384	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
konnai 25	<i>B. garinii</i>	375	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
konnai 26	<i>B. garinii</i>	429	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
takamine As 5	<i>B. garinii</i>	425	<i>A. speciosus</i>	Mt. Asama, Nagano
myogi As 11	<i>B. japonica</i>	426	<i>A. speciosus</i>	Karuizawa, Nagano

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

猟犬を歩哨動物としたライム病ボレリアの血清疫学調査

研究分担者	川端寛樹	国立感染症研究所 室長
研究協力者	大久保(佐藤)梢、高野 愛 後藤みなみ、村井厚子、柳井徳麿	国立感染症研究所 岐阜大学

研究要旨:

猟犬を歩哨動物としたライム病ボレリアの血清疫学調査を行った。ライム病非流行地と考えられている南九州などにおいても猟犬から抗ボレリア抗体が見出された。一方、ウエスタンブロット法による抗体検索では、猟犬の在住地域により反応する抗原が異なる傾向が見られた。これは猟犬が感染したボレリア種が地域によって異なるためと考えられた。

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。このため、病原体を保有かつ伝播するマダニの分布を調べることは、地域毎のライム病感染リスクを評価するうえで重要である。しかしながら、マダニの病原体保有率や野生動物の病原体感染率等は地域、季節等によって変動することが知られている。また、調査実施者がマダニ刺咬を受ける可能性があること、さらには調査対象となる野生動物からの病原体曝露の危険性もあり、調査実施時にこれらリスクを低減することも必要である。

近年、イヌがボレリアに対して感受性が高いこと、加えてマダニ刺咬を受けやすいことから、イヌを歩哨動物とする病原体ボレリアの環境モニタリ

ングが海外で試みられてきている。そこで本研究では、マダニの曝露機会が高いと考えられる猟犬を歩哨動物として、その血中抗ボレリア抗体保有状況を調べた。

B. 研究方法

抗ボレリア抗体測定のため、猟犬血清 506 検体を収集した。猟犬血清は柳井らより分与を受けた。血清中の抗ボレリア抗体測定は、一次スクリーニングとして Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (以下 ELISA 法と略す) にて抗ボレリア IgG 抗体価を測定し、陽性と判定された検体についてはウエスタンブロット法(以下 WB 法と略す)による確認を行った。ELISA 法は recomWell Borrelia canis IgG (Mikrogen, Germany) を用いた。WB 法には recomBlot Borrelia canis IgG (Mikrogen) を用いた。試験は各検査キット添付の手順書に従って行っ

た。感染ボレリア種の同定を目的として、ボレリア分離のため、鹿児島県および沖縄県で猟犬 84 頭から採血し、その全血約 0.1ml を BSK-H 培地に接種し 32°C で 3 週間培養した。

(倫理面からの配慮について)

該当しない。

C. 研究結果

猟犬血清 506 検体のうち、ELISA 法にて 134 検体(26.5%)が抗ボレリア IgG 抗体陽性と判定され、うち 83 検体(16.4%)が WB 法により陽性が確認された。WB 法による地域別での抗体陽性率は、北信越地方で 10.3%、東海地方で 21.8%、中国・四国地方で 6.5%、南西諸島を除く九州地方で 23.5%、南西諸島では 12.6%であった。

それぞれのボレリア抗原に対する陽性率は地域毎に異なり、ライム病患者が散見される北信越地方および東海地方などでは抗 VlsE 抗体陽性率が高い傾向が見られた。これに対して、南西諸島を含む九州地方では抗 VlsE 抗体の陽性率が低下する一方で P100 抗原に対する抗体陽性率が上昇する傾向が見られた。

イヌ全血 84 検体からのボレリア培養を鹿児島県以南の地域において試みたが、いずれの全血からもボレリアは培養されなかった。

D. 考察

イヌを歩哨動物とする病原体環境モニタリングは、マダニ媒介性感染症のサーベイランス手法として世界的に用いられている。特に欧米では、ライム病患者発生地域におけるイヌの抗体保有率が高いこと等から、その歩哨動物として可能性が

示されている(Goossens et al 2001, Rand et al. 2011)。米国における大規模な疫学調査では、ライム病流行地域におけるイヌの抗体陽性率は 4.0-11.6%である一方、ライム病患者の罹患率が低い地域では 1.0-1.4%であることが示されている(Bowman et al. 2009)。本研究では、猟犬の抗ボレリア抗体陽性率はこれと比較して高かったが、これは愛玩動物と比較して猟犬はマダニの曝露機会が高いためである可能性が考えられた。一方、地域間でボレリア抗原に対する反応性に違いが見られた。特に九州以南の地域では、それ以外の地域と比較して反応抗原に違いが見出された。これは各地域に浸潤しているボレリア種が異なることが一因として考えられたが、血液からのボレリア分離培養は全て陰性であったため、感染種の同定にはいたらなかった。

E. 結論

ヒトでのライム病非流行地と考えられる西日本においても抗ボレリア抗体陽性検体が見出された。一方でその感染ボレリア種の同定には至らなかった。今後は北海道等ライム病流行地での調査が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Takano A, Nakao M, Masuzawa T, Takada N, Yano Y, Ishiguro F, Fujita H, Ito T, Ma X, Oikawa Y, Kawamori F, Kumagai K, Mikami T, Hanaoka N, Ando S, Honda N, Taylor K,

Tsubota T, Konnai S, Watanabe H, Ohnishi M, Kawabata H. Multi-locus sequence typing implicates rodents as the main reservoir host of human pathogenic *Borrelia garinii* in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*. 49: 2035-2039, 2011.

2.学会発表

- 1) 川端寛樹, 高野 愛, 中尾稔, 増沢俊幸, 高田伸弘, 矢野泰弘, 石畝史, 藤田博己, 伊東拓也, 及川陽三郎, 川森文彦, 熊谷邦彦, 三上稔之, 花岡希, 安藤秀二, 本田尚子, カイルテイラー, 坪田敏男, 今内覚, 渡邊治雄, 大西真. マダニ媒介性のライム病病原体 *Borrelia garinii* の維持伝播サイクルに関する研究. 第63回日本衛生動物学会大会. 2011年4月. 東京.
- 2) 伊東拓也, 高田伸弘, 藤田博己, 川端寛樹, 中本敦, 赤松達矢, 安藤秀二, 大久保(佐藤)梢, 高野 愛, 小笠原由美子. 礼文島における

マダニ類及びマダニ媒介性病原体の調査. 第57回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2011年10月. 山形

- 3) 川端寛樹, 多田有希, 高野 愛, 佐藤梢, 大西真. 我が国におけるライム病の現状と疫学解析. 第153回日本獣医学会学術集会. 2012年3月. 大宮.
- 4) 佐藤 梢, 後藤みなみ, 村井厚子, 柳井徳磨, 高野 愛, 川端寛樹. 猟犬における抗ライム病ボレリア抗体の保有状況. 第153回日本獣医学会学術集会. 2012年3月. 大宮.

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. ELISA 陽性 134 検体における、各ボレリア抗原に対する反応性

地域	ELISA 陽性数	P39 陽性数 (陽性率)	P100 陽性数 (陽性率)	VlsE 陽性数 (陽性率)
北信越	11	1 (9.1%)	6 (54.5%)	9 (81.8%)
東海	64	11 (17.2%)	30 (46.9%)	50 (78.1%)
中国・四国	9	0	4 (44.4%)	8 (88.9%)
九州 (南西諸島を除く)	28	1 (3.6%)	20 (71.4%)	15 (53.6%)
南西諸島	22	3 (13.6%)	15 (68.2%)	5 (22.7%)
合計	134	16 (11.9%)	75 (56.0%)	87 (64.9%)

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

ブルセラ症等に関する研究

（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）

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*) の感染を原因とする人獣共通感染症である。欧米では、毎年のように、家畜ブルセラ菌のリザーバーである有蹄類の野生動物が感染源となり家畜にブルセラ病が発生したとする報告がされる。とくに近年では、欧州の野生イノシシが広範囲に渡りブルセラ菌に感染していることが確認され、家畜への伝播が懸念されている。

我々の、野生イノシシの血液サンプルを用いたこれまでの調査から、国内野生イノシシのイヌブルセラ菌 (*B. canis*) に対する抗体保有が疑われている。本年度も、四国地方を中心に、イノシシ血液サンプルを収集した。MAT 法によりブルセラ属菌に対する抗体保有を検討したイノシシ血液は、前年までと合計で 543 サンプルとなった。イヌブルセラ菌 (*B. canis*) に対しては、全国で 11.0% (60/543)、うち四国では 15.4% (47/305)、家畜ブルセラ菌 (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) に対しては、全国 0.6% (3/543)、うち四国では 0.7% (2/305) が、それぞれ陽性であった。

さらに、MAT 法により血清陽性となったサンプルについて PCR 法によりブルセラ特異的遺伝子の検出を行ったところ、25 サンプルが、陽性を示し、そのうち 5 サンプルがイヌブルセラ菌 (*B. canis*) 型の陽性パターンを示した。それらイヌブルセラ菌型陽性の増幅バンドのシーケンスは、3 つの異なる遺伝子座においてブルセラ属菌遺伝子と配列が一致した。しかし、ブルセラ SE 抗原を用いたウェスタンブロッティング法で、MAT 陽性サンプルの再検討を実施したところ、明らかに陽性と判定されるものは無かった。

遺伝子検出の結果から、一部のイノシシはイヌブルセラ菌に感染していたと考えられる。しかし、MAT 陽性例 (イヌブルセラ菌陽性、家畜ブルセラ菌陽性) は、より高感度で特異性の高い WB 法では、全て陰性であり、現時点では、他のグラム陰性菌との交叉反応によるものである可能性を否定できない。さらなる検討が必要と考える。

A. 研究目的

ブルセラ症 (brucellosis) は、重要な人獣共通

感染症である。世界中で毎年50万人を超える患者が新規に発生しており、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。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、2011年12月31日現在までに、ブルセラ症患者18例の届け出がされている（表1）。そのうち7例は家畜ブルセラ菌（*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*）である*B. melitensis*感染5例、*B. abortus*感染2例であった。それらは、すべて推定感染地域を国外とする輸入症例である。残り11例のうち、国内を推定感染地域とする10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・淘汰の結果、現在は浄化している。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。ただし、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伝播が起こっているとする報告はなく、菌も分離されない。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、存在しているとすれば、野生動物によって維持されている可能性もある。一方、*B. canis*は国内に定着しており、全国のイヌの2~5%程度が抗体を持っていることが確認されている。*B. canis*については、野生動物による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。前年に引き続き、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： 大日本猟友会及び各地猟友会の協力を得て、同会会員にイノシシの血液サンプルの採取を依頼した。サンプルは、

保冷して輸送し、回収した血液は当室にて血清を分離して測定まで-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同量の菌液を加える。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*については、溶血による擬陽性を排除する目的でブルセラ・カニス凝集反应用菌液(OD=1.0)をOD=2.5に濃縮し使用し、保湿環境で50℃、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。

3. ブルセラ属菌特異的遺伝子の検出と菌分離： MAT法で、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*bcs31*、*omp2* (abortus typeおよび*canis* type)、*omp31* 遺伝子を標的として、PCRにより検出した。

また、血液は、ブルセラ選択サプリメント（関東化学）を添加した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 146 頭、2011-12 年 56 頭 (1/1 現在) の合計 543 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 543 頭のうち 60 頭 (11.0%) が陽性を示した。

四国地区のみでは、2011-12 年分は、*B. canis* に対して 13/56 (23.2%) 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 2/305 (0.7%)、*B. canis* に対して 47/305 (15.4%) 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 60 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全く検出されなかった。

PCR で *B. canis* と同一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、この配列を欠く *B. abortus* を除いた、他のブルセラ属菌と 100%一致した。*omp2* の増幅産物は、*B. canis* 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： 本年度のサンプルで血液培養後の PCR の結果、*bcsp31*、*omp2* プライマーで陽性を示すものは無かったが、10 サンプルが *bcsp31* プライマーでのみ陽

性となった。これは、前回報告したグラム陰性菌 *A. xylosoxidans* による交叉反応と考えられた。*A. xylosoxidans* は、環境菌として知られており、血液採取時の混入が疑われるが、イノシシが保菌していた可能性も否定できない。しかし、本菌とブルセラ属菌の交叉反応の検討結果では、ブルセラ属菌で免疫したウサギ血清は本菌には反応しなかった。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叉反応ではないことが確認された。

5. ウェスタンブロッティング： MAT 陽性血清 (家畜ブルセラ陽性 3 サンプル、イヌブルセラ陽性 60 サンプル) について *B. canis* SE2-1 分画を抗原としたウェスタンブロッティング法で再検討を行った。

B. melitensis, *B. abortus*, *B. canis* に対するウサギ抗血清で、11kDa 付近に見られる特異的なバンド (hypothetical protein BMEI0805) の有無を指標に判定した (図 1)。

イノシシ血清での一例を図 1 に示す。陽性標準である *B. canis* ウサギ免疫血清と *B. canis* 感染イヌ血清では、11kDa 付近に陽性バンドが出現しているが、ウサギ、イヌそれぞれの陰性標準血清とイノシシ血清では、このバンドを確認できない (図 1)。

結果は、MAT 陽性のイノシシ血清のについては、全てがウェスタンブロッティング法では、陰性であった。

6. ELISA： MAT 陽性血清について ELISA 法で検討した。抗原としてブルセラ属 4 菌種 (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis*) およびブルセラ属菌の主要抗原である LPS の相同性が高く、交叉反応が予想されるグラム陰性菌として *Y. enterocolitica* (O9) の計 5 菌種のホルマリン不活化菌体を用いた。一例を図 2 に示す。5 菌種、それぞれの抗原に対し、標準血清として用いたウサギ免疫血清では、陽性および陰性標準で OD 値に大きな差がみられ抗ブルセラ抗

体の検出系として十分に機能することが示されたが、イノシシ血清では MAT 陽性および陰性のサンプルで OD 値に違いが見られなかった。イノシシ血清に対しては、抗原の変更や blocking ELISA、competitive ELISA 法の検討など、実験系の改善が今後の課題である。

E. 結論

本年度に収集した野生イノシシサンプルにおいても *B. canis* に対して MAT 法で、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 23% が陽性を示した。全国では、前年までとの合計で 543 頭中、60 頭 (11.0%) が陽性となった。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でのイヌの抗体検査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。今回、新たに実施した、ウェスタンブロッティング法での検討では、陽性を示すものは見つからなかったが、一部のイノシシ血液サンプルからは、ブルセラ特異的 DNA が増幅されている。生物種としてイノシシと同種であるブタは、イヌブルセラ菌に対し、抵抗性とされるが、野生イノシシが、*B. canis* に軽度感染し、抗体を持つ可能性は否定できない。

また、前年分までとの合計 543 頭中で、家畜ブルセラ菌に対し抗体陽性の 3 例については、ブルセラ特異的 DNA が増幅されておらず、ウェスタンブロッティング法でも陰性であったことから、現時点では、他のグラム陰性菌との交叉反応を否定できない。しかし野生イノシ

シで家畜ブルセラ菌の保有が疑われることは、畜産業はもとより公衆衛生上も大きな懸念材料となる。確証を得るために、さらなる検討が必要と考える。

謝辞： 今回の調査に関してイノシシサンプル採取にご協力いただいた皆様に感謝いたします。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表等

2. 学会発表・講演等

(1) 泉田さゆり, 峯田有美子, 浅井蓉子, 長原正静, 今岡浩一. *Brucella melitensis* による腸腰筋膿瘍の 1 症例. 第 22 回日本臨床微生物学会総会, 岡山, 2011 年 1 月

(2) Koichi Imaoka. Brucellosis in Japan. 8th Japan-Taiwan Symposium on Antibiotics resistance and Foodborne Disease, Tokyo, Oct. 12-14, 2011

(3) Koichi Imaoka. Bacterial infection from dogs and cats – Brucellosis and *Capnocytophaga canimorsus* infection-. Workshop I: Zoonoses transmitted from pet animals in daily life. The 2nd International Conference on Animal Care in KOBE 2012, Kobe, Feb. 18-19, 2012

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、1999.4.1～2011.12.31)

報告年	推定 感染地	推定感染経路	症 状	血清抗体検査		菌分離
				BA	BC	
2002	不明	ペットの犬	発熱、食欲不振	—	陽性	(-)
2005	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	国内	不明	発熱、筋肉痛、腹痛	—	陽性	(-)
2006	エジプト	不明 (吸入疑い)	発熱、頭痛、肝脾腫	陽性	—	<i>melitensis</i>
2006	イタリア	不明	発熱、筋肉痛	—	陽性	(-)
2006	エジプト	経口 (ミルク)	発熱、頭痛	陽性	—	(<i>abortus</i>)
2006	長野県	不明	発熱、脾腫	—	陽性	(-)
2006	宮城県	不明	発熱、中枢神経症状	—	陽性	(-)
2007	大阪府	イヌ	リンパ節腫脹、倦怠感	—	陽性	(-)
2008	埼玉県	飼い犬	発熱、関節炎、筋炎	—	陽性	(-)
2008	ペルー	経口感染	発熱、痛み、全身倦怠感	陽性	—	(<i>abortus</i>) 血液PCR(+)
2008	愛知県	繁殖犬	発熱、脾腫、肝腫大	—	陽性	<i>canis</i>
2008	愛知県	繁殖犬	発熱	—	陽性	<i>canis</i>
2009	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>
2010	ペルー	経口? (チーズ)	発熱、胃腸炎、腹痛、腰痛(腸 腰筋膿瘍)	陽性	陽性	<i>melitensis</i>
2010	栃木県	不明	発熱	—	陽性	(-)
2011	中国	山羊?	発熱、頭痛、後頭部痛	陽性	—	<i>melitensis</i>
2011	島根県	不明	発熱、脊椎炎	—	陽性	(-)

表2) 検査対象イノシシー覧

地域	Others	2005-06 (Dec.-Feb.)	2007-08 (Nov.-Jan.)	2008-09 (Nov.-Jan.)	2009-10 (Nov.-Jan.)	2010 (Jan.- Mar.)	2011 (Apr.- Dec.)	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	41	3	59
香川			5	6	18	59	24	112
愛媛			11	14	11	39	29	104
高知		14	3	2	4	7		30
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	146	56	543

表3) MATによる抗ブルセラ抗体検出

地域	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	59	0	10	<i>B. abortus</i> (2/305, 0.7%)
香川	112	0	15	
愛媛	104	2	14	
高知	30	0	8	
熊本	29	0	1	<i>B. canis</i> (47/305, 15.4%)
大分	9	0	0	
宮崎	7	0	0	
鹿児島	10	1	2	
合計	543	3 (0.6%)	60 (11.0)	

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	-	-	-	-	
07	4	千葉	-	-	+	-	
	8	鹿児島	-	-	-	-	
	20	熊本	+	-	-	-	
	49	愛媛	-	-	-	-	
	60	愛媛	-	-	+	-	
	62	愛媛	+	-	+	-	
	63	愛媛	-	-	-	-	
	68	愛媛	-	-	-	-	
08	3	高知	-	-	-	-	
	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	-	-	-	-		
09	18	香川	-	-	-	-	@
	19	愛媛	-	-	-	-	
	21	香川	+	-	-	-	
	22	香川	+	-	+	-	@
	34	高知	-	-	-	-	

年度	No.	捕獲地	標的遺伝子 ※)				
			1	2	3	4	
10	13	愛媛	-	-	-	-	
	14	香川	-	-	-	-	
	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	-	-	-	+		
11	2	徳島	-	-	-	-	
	5	愛媛	-	-	-	-	
	18	愛媛	-	-	-	-	
	19	愛媛	-	-	-	-	
	20	香川	-	-	-	-	
	22	香川	-	-	-	-	
	23	香川	-	-	-	-	
	24	香川	-	-	-	-	
	33	香川	-	-	-	-	
	36	香川	-	-	-	-	
	44	香川	-	-	-	-	
53	香川	-	-	-	-		
54	香川	-	-	-	-		

陽性対照菌株の反応パターン

<i>B. canis</i>	+	-	+	+
<i>B. abortus</i>	+	+	-	-

※)

	1	2	3	4
<i>bcsp31</i>				
<i>omp2</i> (<i>abortus</i> type)				
<i>omp2</i> (<i>canis</i> type)				
<i>omp31</i>				

PCR陽性

@ 抗*B. abortus*抗体陽性

*B. canis*と陽性パターンが一致

図1) ウェスタンブロッティング法によるブルセラ特異的抗体の検出

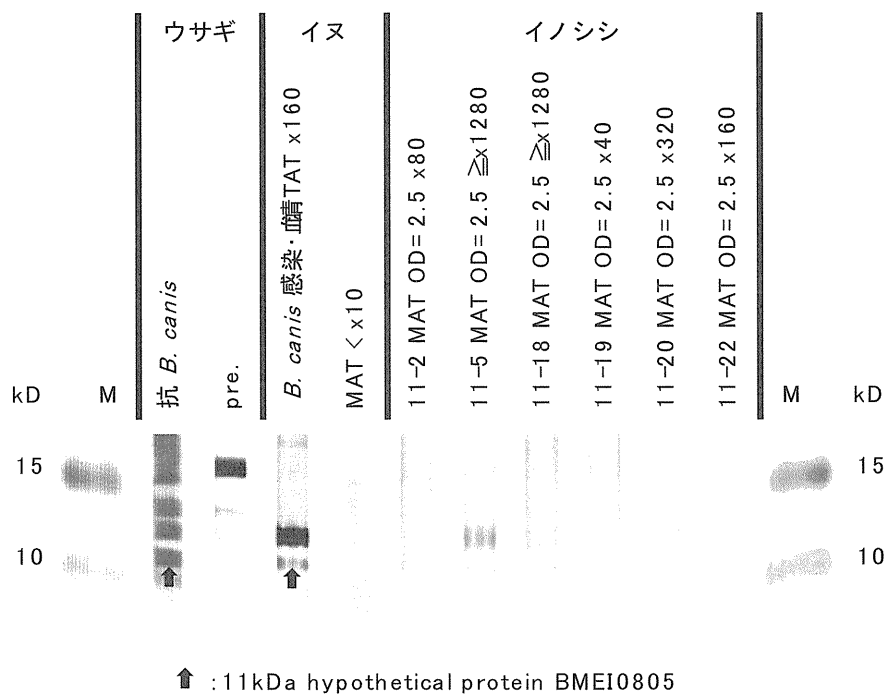
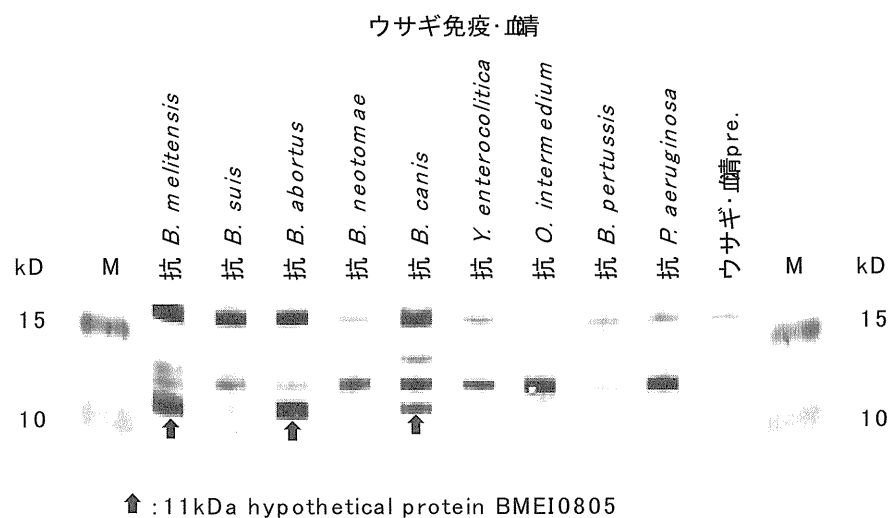
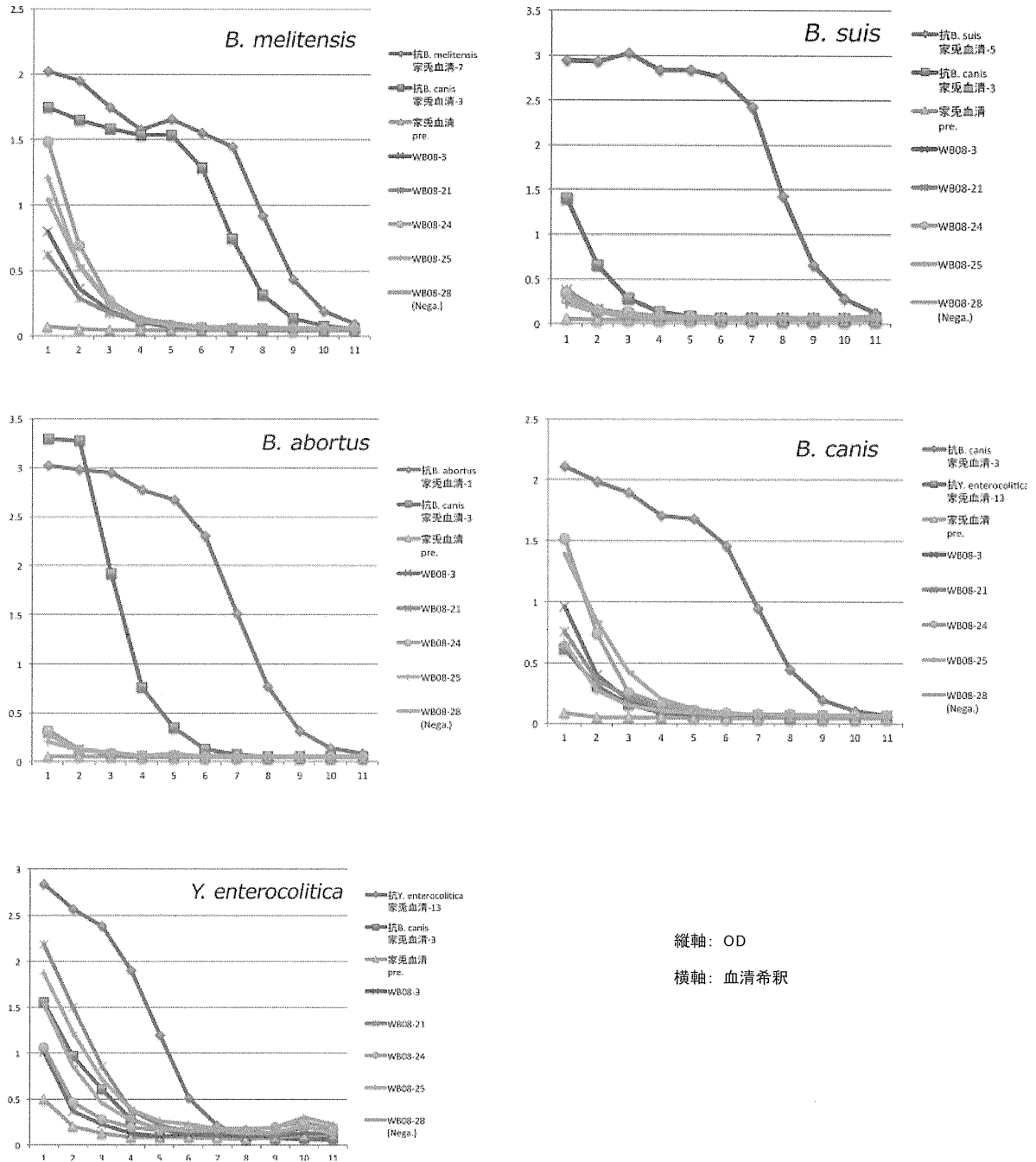


図2) ELISA による抗ブルセラ抗体の検出



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

コリネバクテリウムに関する研究

分担研究者

山本 明彦（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1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。患者の環境調査において飼いネコ、イヌ及びヤギから *Corynebacterium* 属菌が分離された。

10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及び血清ジフテリア抗毒素抗体価測定を実施した結果、4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、また抗毒素は1箇所2検体が陽性を示した。

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イヌ、ネコからの感染リスクが高いことが考えられる。また、畜産動物の検体については血清ジフテリア抗毒素価測定を実施した結果、2検体で陽性を示した。

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。我が国では千葉県で、ジフテリア様患者からジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* が初発症例として分離され、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。しかし、初発症例を含めてその環境調査は不十分であった。

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。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し、人と動物へのリスク評価を実施する。

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1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行なった。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) 人での菌分布調査

国内2都道府県3箇所の耳鼻咽喉科病院について、咽頭痛や偽膜など *C. ulcerans*^{Tox+} 感染が疑われる患者からの菌分離を目指した。

(3) 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とネコ、または開業獣医師へ来院したイヌと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、川崎市、東京都、富山県、大阪府、大阪市、徳島県、岡山県、静岡県および滋賀県である。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、荒川変法血液寒天培地および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) 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2011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の血清疫学調査を実施した。また、大阪府立大学小崎俊司教室では、分離菌についてPFGE法よりも解析能力のよい分子疫学手法の開発を実施した。

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。可能な検体については採血して血清分離しジフテリア抗毒素価を測定した。

食肉検査場でのウシの採材は、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。可能な検体については採血して血清分離し、ジフテリア抗毒素価を測定した。

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珪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、荒川変法血液寒天培地）に塗抹、血液寒天培地は18～24時間後、荒川変法血液寒天培地は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で毒素遺伝子を検出する方法を組み合わせる場合もある。菌の毒素原性はジフテリア毒素遺伝子の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、寒天内沈降反応のElek法および培養細胞法で確認した。

4. ジフテリア抗毒素価の測定

Vero細胞を用いた培養細胞法で測定した。血清検体と標準ジフテリア抗毒素（単位既知）をそれぞれ2倍連続希釈し、一定量のジフテリア試験毒素を加えて中和反応させたのちに、Vero細胞と混合して播種して4日間培養し、ジフテリア毒素の中和能を細胞への毒性として細胞の50%死亡をEnd pointとして、標準ジフテリア抗毒素のEnd pointから、各血清検体の抗毒素価を算出する。

5. 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℃、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。

6. *C. ulcerans*^{Tox+}の全ゲノム解析

感染研のゲノム解析センターの協力を得て、日本で初めて人から分離された 0102 株の全ゲノム解読を行なった。

(倫理面への配慮)

人での菌分布調査については、国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会にて、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。

C. 研究結果

(1) ジフテリア様患者の調査は以下の 1 名について実施した。

滋賀県大津赤十字病院より細菌第二部第三室に *C. ulcerans* の分離確認と毒素産生の確認試験依頼があった（国内ヒトの症例の 9 例目）。担当医師から以下の情報を得た。滋賀県在住の 50 歳代の女性である。4 月 16 日ころよりのどの痛み、風薬を飲むが 18 日になっても好転せず却って痛みが増す。近くの医者を受診するが、大津赤十字病院耳鼻咽喉科を紹介される。のどに偽膜が形成されていた。ウルセランスを疑いエリスロマイシンによる治療を開始。症状好転する。偽膜も薄れてきて 5 月初めにはほとんど消失した。この偽膜を細菌検査室にての培養により *C. ulcerans* が検出された。この菌は、PFGE 法による分子疫学的解析により、2005 年に大分県で患者より分離された菌と同じタイプであった。（図 1）

患者の環境調査により、夫と息子 2 人と同居、患者宅は琵琶湖西岸に位置し、琵琶湖畔に面している。母屋と患者夫が営む金型作製の小屋が立地している。敷地は雑草がうっそうと茂っていた。それぞれの建物内外にイヌが 7 匹、ネコが 14 匹、ヤギ 2 匹は別の小屋に飼育されていた。ネコは家の内外を自由に出入りしている。患者及び家族の協力を得て、すべての飼育動物から口内スワブ及び体表拭き取り検体を採取し菌分離検査をおこなった。

患者夫及びその息子 2 人の咽頭スワブも採取した。すべての検体について、*C. ulcerans* が検出されなかったが、患者家族及びイヌ 1 匹、ネコ 2 匹及びヤギから、*Corynebacterium* 属菌が検出された。（滋賀県衛生科学センター、大津赤十字病院、感染研細菌第二部）

(2) 人での菌分離調査

国内 3 箇所の耳鼻咽喉科のうち、2 病院にて対象となる患者がそれぞれ 2 人及び 5 人認められた。どちらも *C. ulcerans* は検出されなかった。このうち 1 病院の 5 人については、ジフテリア抗毒素価を測定し 3 人に 0.01 単位以上の抗毒素が認められた。（表 1）

(3) 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とネコ、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。（表 2）

1) SG 県の調査

動物愛護センターの協力で収集した口腔スワブ 54 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。

2) TS 県の調査

動物愛護管理センターの収容ネコ 88 匹について保菌状況を調査した。結果、6 匹から菌が検出され保菌率は 6.8%であった。なお、分離した菌株はすべて毒素産生遺伝子を保有していた。調査したネコの内訳は目やに、鼻水等風邪様症状を呈していた個体 10 匹、その他の臨床症状を呈した個体 6 匹、無症状の個体 72 匹であり、菌が分離されたのは無症状の個体 5 匹及び下顎膿瘍の認められた個体 1 匹であった。*C. ulcerans* に感染したネコの症状は、一般的に目やに、鼻水等の風邪様症状と報告されているが、今回の調査では風邪様症状のネコから菌は検出されなかった。この理由として、風邪様症状のネコの母数が少ないことが考えられる。一方、現在までの人での感染事例では、発症しているネコからの感