

ブルセラ症の診断法の開発に関する研究  
（含、台湾 CDC への検査法の移転と検証）

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。世界では日本や台湾など一部の国を除いて、多くの国々で家畜における感染が知られ、家畜衛生ひいては人の公衆衛生上も大きな問題となっている。

日本では、現在、家畜における家畜ブルセラ菌感染は清浄化しており、同菌に感染する患者も輸入患者に限られている。台湾においても感染家畜の報告はなく、また、患者も過去 33 年間報告されていなかった。しかしながら、今年初めに輸入患者が 2 例が報告された。そこで、今年度は、日台における共同研究の端緒として、台湾 CDC におけるブルセラ症検査体制構築のために、抗体検出法として日本で標準的に用いられている試験管内凝集反応 (TAT) と我々の作成したマイクロプレート凝集反応 (MAT) を、遺伝子検出法として同じく我々の作成した Combinatorial PCR を移転し、診断技術の共有を行った。また、本方法を用いて、技術移転時にすでに報告されていた 3 例の輸入患者の同定を行った。さらに、その後、本方法により新たに 2 名の患者が台湾 CDC において同定された。台湾 CDC におけるブルセラ症の検査診断体制の構築および、患者診断に寄与した。

その他、凝集反応では非特異的反応が起こりうるということが知られていることから、診断用の抗原を検討し、より特異的で簡便な方法の確立を試みた。

#### A. 研究目的

ブルセラ症 (Brucellosis) は世界では、毎年新規患者が 50 万人以上発生していると言われる重要な人獣共通感染症であり、日本では感染症法によって 4 類感染症（全数把握）に指定されている。人に感染するものは病原性の強い順に *Brucella melitensis*、*B. suis*、*B. abortus*、*B. canis* があるが、このうち前 3 つはすべて家畜が自然宿主となっている。

国内の家畜はこれら家畜ブルセラ菌に対して清浄であり、国内の家畜から感染するリスクはない。感

染症法によりブルセラ症が 4 類感染症に指定された 1999 年 4 月 1 日以降の感染者 7 例はすべて輸入感染例である (表 1)。その内訳は、*B. melitensis* 感染が 5 例、*B. abortus* 感染が 2 例で、最初の 2 例を除き残りの 5 例はすべて外国人であり、それぞれの母国で感染し日本国内で発症・診断されている。一方、*B. canis* は犬を自然宿主とし、現在も国内の、3~5% のイヌが感染歴を持つと考えられている。ごくまれに人にも感染することもあり、国内では、犬ブルセラ症患者 11 例が届け出られている (表 2)。

台湾では、1987 年に最後の感染例 (実験室感染)

が報告されて以降、患者の報告はなかった。国内の家畜でもブルセラ感染報告はなく、状況としては日本と非常に似通っている。ところが、台湾CDCにおいては、ブルセラ症の診断方法を確立すべく、我々と共同研究を行うこととなっていた矢先の、今年5月に、2例の輸入患者（北アフリカ、マレーシア）が報告され、7月にさらに1例、マレーシアからの輸入患者が報告された。そこで、今年度は、日本において実施している検査診断法について、必要な抗原、陽性抗体、遺伝子検査用プライマー他を持参して台湾CDCに赴き、台湾で見つかった患者検体を用いた検証や、同技術の台湾CDCへの移転を行った。

## B. 研究方法

1. 提試検体：台湾において確認された3名の患者および、その検査に従事し感染リスクがあったと考えられた者1名の血清。合計4検体。

2. 試験管凝集反応（TAT）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を測定するためのTATは、*B. abortus* 凝集反应用菌液（農業・食品産業技術総合研究機構）を用い、添付のプロトコールに従い実施した。すなわち血清サンプルを5倍から2倍段階希釈し、凝集反应用菌液を等量加え、37℃、18～24時間感作後、サンプルの最終希釈倍数1:40以上で50%以上の凝集を示すものを陽性と判定した。イヌブルセラ菌に対する抗体は、*B. canis* 凝集反应用菌液（北里研究所）を用いた。すなわち血清サンプルを10倍から2倍段階希釈し、凝集反应用菌液を等量加え、50℃、24時間感作後、サンプルの最終希釈倍数1:160以上で50%以上の凝集を示すものを陽性と判定した。

3. マイクロプレート凝集反応（MAT）：家畜ブルセラ菌に対する抗体を測定するためのMATは、*B. abortus* 凝集反应用菌液と0.25%サフラニン染色液を50:1の比率で混合し、抗原とした。96穴U底プレートを用い、サンプルをフェノール加生理食塩水で5倍から2倍段階希釈し、同量の凝集反应用抗

原を混合・攪拌し、37℃、18～24時間感作後、凝集反応を判定した。抗イヌブルセラ菌抗体については、*B. canis* 凝集反应用菌液を同様に用いたが、サンプルはリン酸緩衝生理食塩水で10倍から2倍段階希釈し、同量の凝集反应用抗原を混合・攪拌し、50℃、24時間感作後、凝集反応を判定した。肉眼で凝集像が確認されたものを陽性と判定した。

### 3. Combinatorial PCRによるブルセラ遺伝子の検出：

このPCRでは、4セットのプライマーによる増幅パターンの違いにより、ヒトに感染しうる主要4菌種を鑑別することが可能である。

今回は、患者血清の量が少なかったため、DNAを抽出し検査することができなかった。そこで、我々の持参した、陽性対照コントロールDNA等を用いて、台湾CDCに検査法を実際に実施・検証してもらった。

4. ブルセラ属菌特異的抗原の検討と組換えタンパクの作成：ブルセラ菌およびブルセラ属菌との交叉反応が知られているグラム陰性菌を免疫した家兎血清を用いて*B. canis* N-Lauroylsarcosine extract 2-1分画を抗原としたウェスタンブロットティング法を実施した。特異的な反応を示すタンパクを確認したので、これについてSDS電気泳動後、抽出・精製し、アミノ酸配列を決定した。それを元に、同タンパクの遺伝子配列を決定し、pColdTFベクターに組み込み大腸菌で発現させた。

作成した組み換えタンパクを抗原としてウェスタンブロットティングを行い、その特異性を検討した。

## C&D. 研究結果と考察

1. 試験管凝集反応（TAT）による抗ブルセラ抗体の検出：*B. abortus* を抗原として用いた場合、No.1～3の検体はそれぞれ、1:160以上を示し、陽性であった。No.4は1:10未満で陰性となった。図1)には、抗原*B. abortus*、血清希釈1:40の結果を示している。一方、*B. canis* を抗原に用いた場合は、いずれの検体

も 1:160 未満の陰性であった。No.1~3 はいずれも確かに家畜ブルセラ菌に感染していることが確認された。また、No.4 は現時点では感染していないことがわかった。

2. マイクロプレート凝集反応 (MAT) : 当初、総反応液量 50ul の系で実施したが、視認性がやや悪かった。そこで、100ul にして追試験も行った。*B. abortus* を抗原として用いた場合、No.1~3 の検体はそれぞれ、1:160、1:320、1:160 を示し、陽性であった。No.4 は 1:10 未満で陰性となった (図 2)。一方、*B. canis* を抗原に用いた場合は、1:80、1:40、1:80、1:20 未満と、いずれの検体も 1:160 未満の陰性であった。以上の結果より、No.1~3 はいずれも確かに家畜ブルセラ菌に感染していることが確認された。また、No.4 では感染は確認されなかった。*B. melitensis* 感染の場合は、*B. canis* に対しても (陽性までとはいかないまでも) 反応性を示すことがある。このことから、本 No.1~3 の患者は、*B. melitensis* 感染と思われた。

3. Combinatorial PCR によるブルセラ遺伝子の検出: 予定される通りの結果が得られたので、問題なく我々の方法は、台湾でも実施可能で、PCR によるブルセラ特異的遺伝子検出法の共有は完了した。

4. ブルセラ属菌特異的抗原の検討と組換えタンパクの作成: 家兔免疫血清を用いて *B. canis* N-Lauroylsarcosine extract 2-1 分画を抗原としたウェスタンブロッティング法を実施した。3 種のブルセラ菌 (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. canis*) の抗血清でのみ反応が見られ、のこり 2 種のブルセラ菌、およびブルセラ属菌との交叉反応が知られているグラム陰性菌に対する抗血清、さらに無処置の家兔血清では、反応が見られない分子量 10kDa 付近のバンドに注目し、SDS 電気泳動後、同タンパクを抽出・精製し、アミノ酸配列を決定した。

それを元に、同タンパクの遺伝子配列を決定し、pColdTF ベクターに組み込み大腸菌で発現させ、HiStag 精製により回収し、制限酵素で目的部位を切

断後、SDS-PAGE で泳動、発現タンパクのシーケンスを確認した。

*B. canis* 感染イヌ血清を使用し、作成した組み換えタンパクを抗原としてウェスタンブロッティングを実施した。TAT 陽性のイヌ血清にのみ作成タンパクの分子量 11.5kDa 付近にバンドが出現した。作成した組み換えタンパクが、抗ブルセラ抗体を特異的に反応することが示された。

## E. 結論

今回、日本で用いられている抗体検査法及び遺伝子検出法について、それぞれ日本から抗原、陽性対照血清等を持参し、台湾 CDC と検査法の共有を行った。その検査法の検証は、まず我々がデモンストレーションを行い、その後、台湾 CDC 担当者がこれを再試する形式で、実際に台湾で確認された患者サンプルを用いて行った。日本国内と同様に台湾でも有効な検査法であることが明らかとなった。日本では、感染症法における届出基準による検査法として TAT が記されていることと、民間の臨床検査機関でも TAT が保険適用下で実施されていることから、TAT が、患者診断に主として用いられている。しかしながら、TAT は使用する抗原や抗体の量が多く、また溶血の影響を受けやすいことが知られている。一方、台湾ではブルセラ症に対する検査法が規定されておらず、今回の結果も良好であったことから、100ul 系の MAT を使用するよう、台湾 CDC に対して提案した。後日 (9、10 月) になって、本検査法を用いて、4 例目の患者 (3 例目と同一地域・マレーシアへの渡航歴あり) および 5 例目の患者 (中国への渡航歴あり) が、確定診断された。このことから、本検査法の有用性と台湾 CDC への技術移転が良好に行われたことがわかった。また、台湾では、2012 年 2 月 7 日より、ブルセラ症が新たに届出疾患となった。

台湾では、日本と同じく家畜ブルセラ菌は国内の家畜からは清浄化していると考えられる。そのため、今後も家畜ブルセラ菌感染患者は輸入感染者であると思われる。ただ、日本と同様に、台湾国内のイヌ

でもイヌブルセラ菌感染が認められることから、ヒトへの感染も起きていることが疑われる。今後は、日本の状況を元に、台湾においては見逃されていると思われるイヌブルセラ菌感染患者の特定も行っていく必要があると思われる。

MAT を含めて凝集反応は、時折、非特異的の反応が見られることがある。そこで、それに代わる検査法を開発するために特異的抗原の作成を試みている。現在までに、作成した組換えタンパクが、ブルセラ菌に感染したイヌの診断には有効である結果が得られている。今後、本組換えタンパクが、ヒトの診断に応用できるか、また、家畜ブルセラ菌感染にも適用可能かを検証する必要がある。さらに、今後は、組み換えタンパクの精製度を高め、ELISA、また、より簡便な検査法である IC (immunochromatographic assay) への応用を検討している。

#### 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

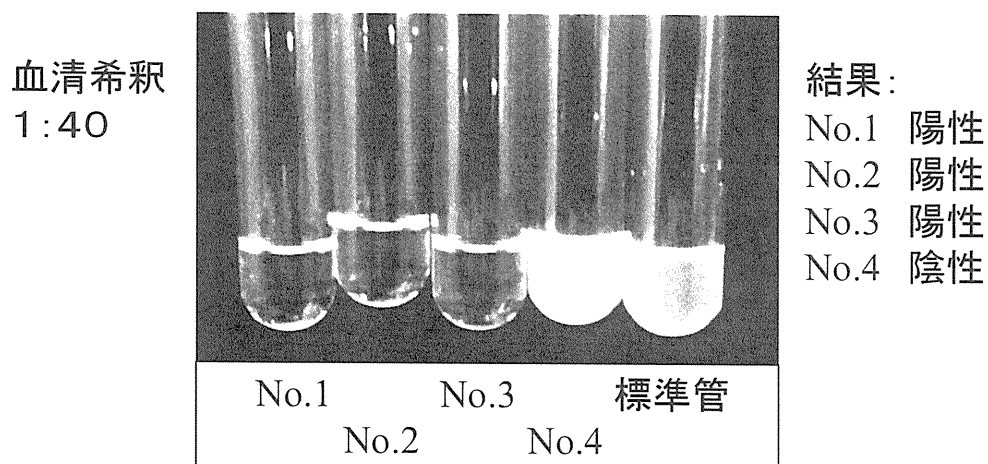
表1) 国内の家畜ブルセラ属菌感染事例 (感染症法指定後、1999.4.1～2012.1.31)

| 診断年月    | 年齢  | 報告<br>都道府県     | 推定<br>感染地 | 推定<br>感染経路   | 症 状                     | 血清抗体検査  |       | 菌分離                            |
|---------|-----|----------------|-----------|--------------|-------------------------|---------|-------|--------------------------------|
|         |     |                |           |              |                         | abortus | canis |                                |
| 2005.6  | 30代 | 東京都            | シリア       | 経口<br>(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>              |
| 2006.2  | 50代 | 東京都            | エジプト      | 不明<br>(吸入疑い) | 発熱、頭痛、肝脾腫               | 陽性      | —     | <i>melitensis</i>              |
| 2006.7  | 20代 | 北海道<br>(エジプト人) | エジプト      | 経口<br>(ミルク)  | 発熱、頭痛                   | 陽性      | —     | ( <i>abortus</i> )             |
| 2008.7  | 60代 | 静岡県<br>(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> )<br>血液PCR(+) |
| 2009.10 | 10代 | 東京都<br>(インド人)  | インド       | 経口<br>(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>              |
| 2010.4  | 40代 | 愛知県<br>(ペルー人)  | ペルー       | 経口?<br>(チーズ) | 発熱、胃腸炎、腹痛、腰痛<br>(腸腰筋膿瘍) | 陽性      | 陽性    | <i>melitensis</i>              |
| 2011.11 | 40代 | 新潟県<br>(中国人)   | 中国        | 山羊?          | 発熱、頭痛、後頭部痛              | 陽性      | —     | <i>melitensis</i>              |

表2) 国内のイヌブルセラ菌感染事例 (感染症法指定後、1999.4.1～2012.1.31)

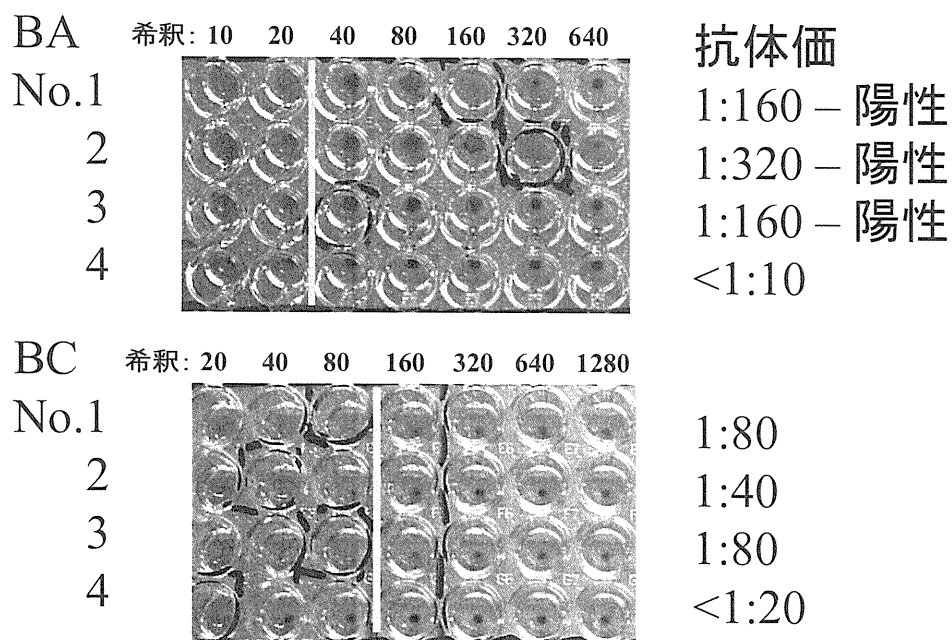
| 発生年  | 報告患者数 |
|------|-------|
| 2002 | 1     |
| 2005 | 1     |
| 2006 | 3     |
| 2007 | 1     |
| 2008 | 3     |
| 2010 | 1     |
| 2011 | 1     |

図1) 試験管凝集反応 (TAT) による家畜ブルセラ菌特異的抗体の検出



No.1~3 : 患者、No.4 : 感染疑い者、標準管 : 比濁管

図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



BA : 使用抗原 *B. abortus*、1:40 以上が陽性

BC : *B. canis*、1:160 以上が陽性

図3) *B. canis* N-Lauroylsarcosine extract 2-1 に対する免疫ウサギ血清の反応性 (western blotting)

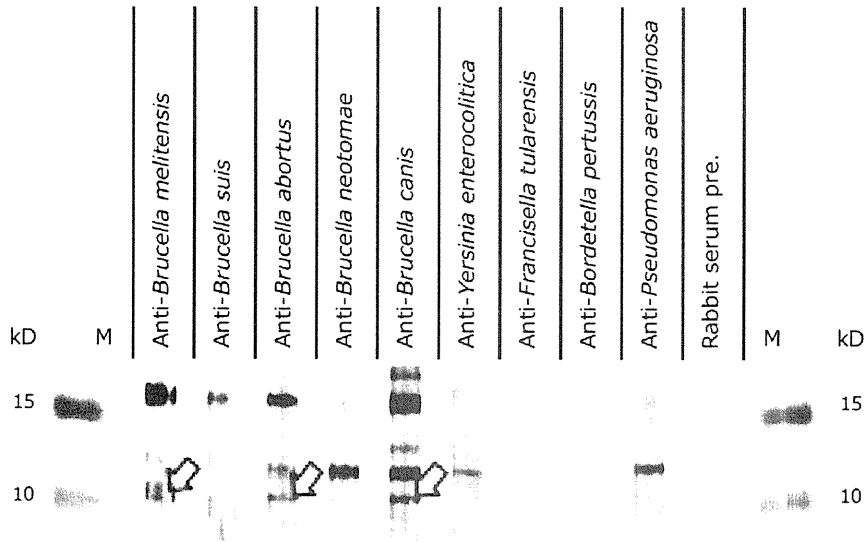
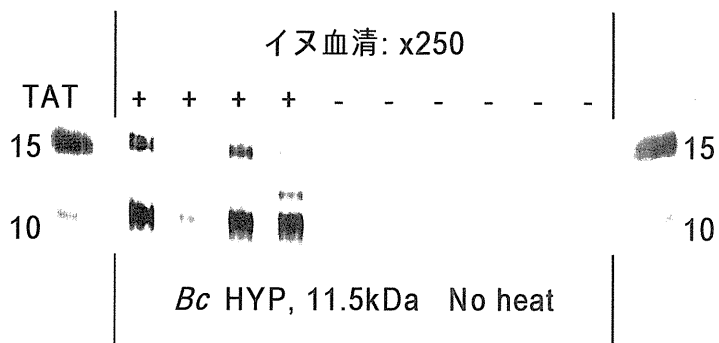
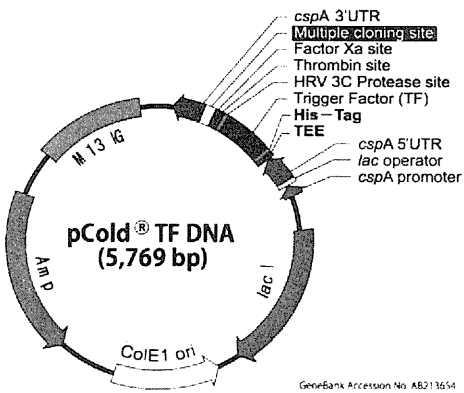


図4) 標的タンパク発現プラスミドの構築と組み換えタンパクの特異性の確認



台湾および石垣島の渡り鳥飛来地における疾病媒介蚊調査

研究分担者 津田良夫 国立感染症研究所  
研究協力者 金 京純 国立感染症研究所

渡り鳥飛来地に生息する疾病媒介蚊に着目して、台湾と石垣島の水田地帯で媒介蚊採集を行った。調査はドライアイストラップを用いた成虫調査による。台湾の調査地では 13 種類、石垣島の調査地では 18 種類の蚊が採集され、このうち 9 種類が共通していた。優占種 6 種の中で両地域に共通していたのは、コガタアカイエカとヨツホシイエカであった。媒介蚊相の違いは、調査地の周辺環境の違いを反映しており、集落が隣接する台湾の調査地では、人工容器に発生するヒトスジシマカとネッタイエカが多かった。台湾調査地に隣接する水田地帯での幼虫採集によって、分類学的な再検討が必要とされる *Cx. annulus* と思われるサンプルが 2 サンプル得られた。幼虫の形態は *Cx. vishnui* と区別できず、分子生物学的手法を用いた詳しい検討が必要である。採集された成虫からの蚊媒介性病原体の検出を実施しているが、分析は継続中で結果は得られていない。

#### A. 研究目的

台湾はわが国の南西諸島の最南端（与那国島）から西方約 110 km に位置する大きな島である。地理的に近い位置にある与那国島、西表島、石垣島などと台湾の間には、動物相や植物相に高い類似性が見られる。疾病媒介蚊に関して種類相を比較すると、台湾（132 種類）と我が国（120 種類）の種類相の 1/4（46 種類）が共通している。しかしながら、媒介蚊相の類似性をさらに詳しく検討していくと、種類相の類似性はヤブカ属で最も低く 14%、ハマダラカ属は 20%、イエカ属の類似性は最も高く 68% である。このように台湾と我が国の生物相にはよく似た側面がある一方で、その類似度合いは生物のグループによって様々に異なっている。

台湾と我が国の疾病媒介蚊や蚊によって媒介される病原体の間には、どのような遺伝的類縁関係があるかを明らかにし、蚊によって媒介される病原体の流行予測や監視に役立てることを目的として、共同研究を開始した。

本研究は渡り鳥飛来地に生息する疾病媒介蚊に着目して、台湾と石垣島の媒介蚊相を比較した。また、蚊媒介性病原体として日本脳炎ウイルスと鳥マラリア原虫をターゲットとして、これら病原体の蚊からの検出と遺伝学的解析を目的として行った。

#### B. 研究方法

台湾における現地調査：2011 年 2 月に台湾北部の渡り鳥飛来地を視察した結果、台湾北東部宜蘭県の渡り鳥飛来地（蘇澳、無尾港水鳥保護区）を調査地に選定した。渡り鳥が飛



来する 2011 年 5 月と 9 月に現地調査を実施した。成虫調査は 1kg のドライアイス誘引源とするトラップ 10 台を設置して、連続した 2 日間採集を行った。捕獲された成虫は毎日回収し、台湾 CDC の実験室に持ち帰って種類同定を行った。サンプルはその後の分析のために冷凍で保存した。分類学的再検討が必要な *vishnui* グループの蚊は、水田地帯で幼虫を採集し、実験室で成虫まで飼育して形態観察に必要な幼虫の脱皮殻と成虫標本を収集した。これらの幼虫脱皮殻と成虫標本に基づいて形態分類を行い、コガタアカイエカおよび *Cx. vishnui* あるいは *Cx. annulus* と分類された個体について、分子分類学的検討を行っている。

石垣島における現地調査：台湾北東部の蚊相と比較するために石垣島南部の水田地帯で、2011 年 6 月と 8 月に現地調査を実施した。成虫調査はドライアイストラップ 15 台を用いて、連続した 3 日間行った。

蚊からの病原体の検出：台湾の調査で捕獲されたコガタアカイエカ成虫サンプルは、台湾 CDC で日本脳炎ウイルスの分離を試みている。それ以外の成虫サンプルを用いて、現在鳥マラリア原虫の検出を継続している。

#### C. 研究結果

台湾の現地調査によって採集された蚊の種類とその個体数を表 1 にまとめて示した。サンプルの損傷のため種まで同定できなかった 3 個体を除いて、合計 13 種類の蚊が採集された。5 月の採集ではミナミハマダライエカ、ネッタイエカ、カラツイエカの 3 種が優占種で、全体の 76% を占めていた。9 月の採集では優占種の変化が見られ、最も個体数が多かったのは、コガタアカイエカで、ついでヒトスジシマカであった。湿地や塩性湿地に発

生するアシマダラヌマカ、ヨツホシイエカが 9 月に増加していた。

石垣島の現地調査結果を表 2 に示した。合計 18 種類の蚊が採集された。6 月の優占種はコガタアカイエカ、ムラサキヌマカ、ヴィシュヌイエカで全体の 78% を占めていた。9 月の優占種はヴィシュヌイエカとシロハシイエカ、コガタアカイエカ、ヨツホシイエカで、全体の 90% を占めていた。

今回調べた台湾と石垣島の調査地の蚊相を比較すると、共通種は 9 種類であった。捕獲総数が多い上位の 6 種類を比較すると、コガタアカイエカとヨツホシイエカの 2 種が両調査地に共通する優占種であった。

台湾の調査地に隣接する水田地帯で約 200 個体のイエカ幼虫を採集した。これらの幼虫を持ち帰り、個体飼育して幼虫の脱皮殻と羽化した成虫を対にした標本を作成した。幼虫での死亡が多く、対の標本が得られたのは 37 個体であった。イエカの形態的特徴は幼虫期に現れるので、幼虫によって種類を同定した後、羽化した成虫の形態観察を行った(表 3)。その結果、コガタアカイエカ、ミナミハマダライエカ、カラツイエカ、ツノフサカの一種、および *vishnui* グループ (*Cx. vishnui* or *Cx. annulus*) が同定された。台湾産のイエカ類で分類学的な再検討が必要とされる *Cx. annulus* と思われるサンプルは 2 個体得られた。幼虫の形態的特徴では、*Cx. vishnui* と区別できなかった。典型的な形態的特徴を有するコガタアカイエカと *Cx. annulus* の成虫サンプルは現在遺伝的解析を実施している。

#### D. 考察

石垣島の調査地の方が採集された種類数が多かった。これは、石垣島の調査地域が台湾の調査地に比べて大きく、水田だけでなく背

後の山脚部や海岸に分布する水域を含んでいるためと考えられる。調査地の環境条件による違いは、ヒトスジシマカとネッタイエカの構成比率にも表れていた。台湾の調査地は隣接する集落があり、人為的環境に多く発生するヒトスジシマカやネッタイエカが優占種に含まれていた。このような媒介蚊相の違いや調査地の環境条件の違いは、蚊が媒介している病原体の種類にも反映されていると思われる。本研究が目的としていた台湾と日本の蚊媒介性病原体の遺伝的関係を検討するのに適したサンプルが得られたように思われる。しかしながら、病原体に関する分析は継続中であり、結果はまだ得られていない。

#### E. 結論

台湾北東部と石垣島南部の現地調査を実施し、22種類の疾病媒介蚊が採集された。このうち

両地域で共通して採集された種類はコガタアカイエカ、ヨツホシイエカなど9種類であった。蚊相の違いには調査地の環境条件の違いが、反映されていた。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

表 1. 台湾北東部宜蘭県の渡り鳥飛来地（蘇澳、無尾港水鳥保護区）における疾病媒介蚊調査結果：ドライアイストラップによる 2011 年 5 月と 9 月の調査結果

| 種 類                                   | 5 月 | 9 月 | 合計    |
|---------------------------------------|-----|-----|-------|
| コガタアカイエカ <i>Cx. tritaeniorhynchus</i> | 46  | 519 | 565   |
| ネッタイエカ <i>Cx. quinquefasciatus</i>    | 112 | 49  | 161   |
| ヒトスジシマカ <i>Ae. albopictus</i>         | 13  | 147 | 160   |
| ミナミハマダライエカ <i>Cx. mimetics</i>        | 133 | 18  | 151   |
| カラツイエカ <i>Cx. bitaeniorhynchus</i>    | 80  | 10  | 90    |
| ヨツホシイエカ <i>Cx. sitiens</i>            | 0   | 69  | 69    |
| アシマダラヌマカ <i>Ma. uniformis</i>         | 1   | 37  | 38    |
| クシヒゲカ的一种 <i>Cx. sasai/kyotoensis</i>  | 23  | 5   | 28    |
| ムラサキヌマカ <i>Ma. crasipes</i>           | 0   | 27  | 27    |
| オオクロヤブカ <i>Ar. subalbatus</i>         | 16  | 5   | 21    |
| シロハシイエカ <i>Cx. pseudovishnui</i>      | 0   | 2   | 2     |
| サキジロカクイカ <i>Cx. fuscanus</i>          | 0   | 2   | 2     |
| イエカ的一种 <i>Cx. sp</i>                  | 2   | 0   | 2     |
| イエカ <i>vishnui</i> group              | 1   | 0   | 1     |
| フタクロホシチビカ <i>Ur. novobscura</i>       | 1   | 0   | 1     |
| 合 計                                   | 428 | 890 | 1,318 |

表2 石垣島南部の渡り鳥飛来地における疾病媒介蚊調査結果：ドライアイストラップによる2011年6月と8月の調査結果

| 種 類                                   | 6 月 | 8 月   | 合計    |
|---------------------------------------|-----|-------|-------|
| コガタアカイエカ <i>Cx. tritaeniorhynchus</i> | 428 | 650   | 1,078 |
| ヴィシュヌイエカ <i>Cx. vishnui</i>           | 118 | 898   | 1,016 |
| シロハシイエカ <i>Cx. pseudovishnui</i>      | 76  | 669   | 745   |
| ヨツホシイエカ <i>Cx. sitiens</i>            | 0   | 469   | 469   |
| アシマダラヌマカ <i>Ma. uniformis</i>         | 16  | 230   | 246   |
| ムラサキヌマカ <i>Ma. crasipes</i>           | 139 | 11    | 150   |
| ヒトスジシマカ <i>Ae. albopictus</i>         | 59  | 22    | 81    |
| カラツイエカ <i>Cx. bitaeniorhynchus</i>    | 15  | 12    | 27    |
| リバーシマカ <i>Ae. riversi</i>             | 13  | 0     | 13    |
| クロフクシヒゲカ <i>Cx. nigropunctatus</i>    | 5   | 6     | 11    |
| オオクロヤブカ <i>Ar. subalbatus</i>         | 6   | 1     | 7     |
| ネッタイエカ <i>Cx. quinquefasciatus</i>    | 3   | 3     | 6     |
| ヤブカの種類 <i>Ae. spp</i>                 | 1   | 6     | 7     |
| コガタハマダラカ <i>An. minimus</i>           | 0   | 6     | 6     |
| ハマダラナガスネカ <i>Or. anopheloides</i>     | 2   | 3     | 5     |
| キンイロヤブカ <i>Ae. vexans nipponii</i>    | 0   | 3     | 3     |
| シナハマダラカ <i>An. sinensis</i>           | 1   | 0     | 1     |
| ハラグロカニアナチビカ <i>Ur. yaeyamana</i>      | 1   | 0     | 1     |
| 合 計                                   | 883 | 2,989 | 3,872 |

表3 台湾北東部宜蘭県の水田地帯で採集されたイエカ属幼虫より得られた成虫の形態分類による同定結果

| 種 類  | 個体数 |
|--|-----|
| コガタアカイエカ <i>Cx. tritaeniorhynchus</i>                          | 14  |
| コガタアカイエカ (吻付け根に白鱗を欠く)  | 9   |
| ミナミハマダライエカ <i>Cx. mimetics</i>                                 | 10  |
| * <i>Vishnui</i> グループ <i>Cx. vishnui</i> or <i>Cx. annulus</i> | 2   |
| カラツイエカ <i>Cx. bitaeniorhynchus</i>                             | 1   |
| ツノフサカの種類 <i>Lophoceraomyia spiculatus</i>                      | 1   |

\*詳しい分類学的再検討を要する種類.

## 百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* に特異的な LAMP 検出系の開発

研究分担者 蒲地 一成 国立感染症研究所 細菌第二部 室長

**研究要旨** アジアにおける百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* の流行状況を調査するため、*B. holmesii* に特異的な LAMP 検出系の開発を行った。*B. holmesii* の *recA* 遺伝子を標的に 5 種類の LAMP プライマーを作製し、67°C で 1 時間の遺伝子増幅系を構築した。本法の感度と特異性を検討した結果、検出限界は 50 fg genomic DNA/tube を示し、*B. holmesii* 以外の *Bordetella* 族細菌を検出しなかった。また、臨床検体を用いた評価により、本法は既報のリアルタイム PCR 法と同等な臨床感度を持つことが示された。このことから、開発した LAMP 検出系は *B. holmesii* の特異的検出に有効であると判断された。国立感染症研究所では開発した LAMP キットを地衛生研究所 28 施設に配布し、国内における *B. holmesii* の病原体サーベイランスを開始した。

### 研究協力者

大塚菜緒（国立感染症研究所・細菌第二部）

鱒坂裕美（同上）

柴山恵吾（同上）

吉野修司（宮崎県衛生環境研究所）

河野喜美子（同上）

IS481 は百日咳菌以外に *B. holmesii* も保有するため、本法は百日咳菌と *B. holmesii* を区別出来ないという欠点がある。近年では *B. holmesii* の *recA* と IS481 の両者を標的とする duplex リアルタイム PCR 法が開発され、百日咳菌と *B. holmesii* の鑑別が可能となった。ただし、リアルタイム PCR 法は高価なリアルタイム PCR 装置を必要とすることから、病院検査室といった一般の検査室での実施は困難である。

近年、病原体の簡便な検査法として loop-mediated isothermal amplification (LAMP) を用いた遺伝子検査が多くの感染症で開発されている。LAMP 法は目視判定が可能であり、高価な PCR 装置を必要としない利点を持つ。そこで、本研究ではアジアにおける *B. holmesii* サーベイランスの実施を目的に、*B. holmesii* に特異的な LAMP 法の開発を行った。

### A. 研究目的

*Bordetella holmesii* は 1995 年に米国 CDC により命名された新しい百日咳類縁菌であり、免疫系に基礎疾患を持つ患者に感染し、敗血症・心内膜炎などの起原菌となる。近年では、基礎疾患を持たない青年・成人にも感染し、百日咳と同様な臨床像（咳嗽）を引き起こすことが知られている。これまで *B. holmesii* の症例報告は主に米国に限られていたが、2009 年にわが国でも初の成人感染例が確認された。その後、2011 年の宮崎県で発生した百日咳集団感染事例では 6 例の感染者が認められ、世界で初めてヒト-ヒト感染の可能性が指摘された。これらの感染事例は *B. holmesii* がアジア地域に広がっていることを示唆するが、その感染実態は明らかとなっていない。

百日咳の主要な起原菌は百日咳菌であり、その実験室診断には百日咳菌の挿入配列 IS481 を標的とするリアルタイム PCR が世界的に用いられている。しかし、

### B. 研究方法

プライマー設計：Primer Explorer V4 ソフトウェアを用いて *B. holmesii* の *recA* 遺伝子 (216-425 bp, GenBank, AF399661) に対し 5 種類の LAMP プライマーを設計した (表 1)。LAMP プライマーは HPLC 精製グレードのものを Invitrogen 社に合成依頼した。

LAMP 反応系：LAMP 反応は Loopamp DNA 増幅試薬キット（栄研化学）を用い、25  $\mu$ l の反応系に 12.5  $\mu$ l

の reaction mixture、1 µl の *Bst* DNA polymerase、40 pmol の BH-FIP と BH-BIP プライマー、5 pmol の BH-F3 と BH-B3 プライマー、20 pmol の BH-LB プライマーを添加した。DNA 検体 (4 µl) は 95°C で 5 分間加熱し、急冷後添加した。増幅反応は 67°C で 1 時間行い、吸光度 650 nm の増加を濁度計 LA-320C (栄研化学) により測定した。

検出感度の検討 : *B. holmesii* ATCC51541 のゲノム DNA を調製し、100 pg から 1 fg まで連続希釈した DNA を供試した。

特異性の検討 : *B. holmesii* (5 株)、百日咳菌 (9 株)、パラ百日咳菌 (4 株)、気管支敗血症菌 (1 株)、*Bordetella hinzii* (1 株)、*Bordetella avium* (1 株) のゲノム DNA を供試した。

臨床検体 : 宮崎県の百日咳集団感染事例で採取された患者鼻腔 DNA 検体 ( $n = 88$ ) を供試した。

リアルタイム PCR : 既報の方法を一部改変し、VIC 標識された TaqMan MGB プローブを用いた (Guthrie et al., J Clin Microbiol, 48:1435-7)。

(倫理面への配慮)

患者検体は連結可能匿名化し、研究協力者ならびに研究分担者には患者個人が特定出来ないよう配慮した。また、患者の個人情報情報を削除し、倫理上問題が発生しないよう配慮した。

## C. 結果

*B. holmesii* ATCC51541 の DNA を用いて LAMP 検出系の感度を検討したところ、遺伝子増幅は 10 fg DNA/tube まで認められた (図 1)。しかし、10 fg DNA/tube では再現性を得ることが難しく、臨床分離株を用いた検討から検出限界は 50 fg DNA/tube と判断された (表 2)。次に *Bordetella* 族細菌 6 菌種 21 株を用いて本法の特異性を評価したところ、*B. holmesii* 以外の *Bordetella* 族細菌は 1 ng/tube という高濃度でも検出されず、本法は *B. holmesii* に特異的であることが示された (表 2)。

患者 DNA 検体を用いて本法の臨床感度を評価したところ、既報のリアルタイム PCR 法で陽性となった 6 患者検体はすべて陽性と判定された。同様にリアルタイム PCR 法で陰性となった 82 検体はすべて陰性と判

定され、その一致度は 100% を示した。

## D. 考察

過去に米国とカナダで実施された大規模調査では百日咳様患者の 0.1~0.3% に *B. holmesii* が検出され、本菌が百日咳の起因菌となることが示された。最近のフランスの調査では、IS481 リアルタイム PCR 法で百日咳と診断された青年患者の 20% に *B. holmesii* 遺伝子が検出されている。これらのサーベイランスデータは、近年 *B. holmesii* 感染が世界的に広がるとともに、百日咳菌と *B. holmesii* の鑑別の必要性を指摘している。本研究で開発した LAMP 検出系は簡便に *B. holmesii* を検出できることから、*B. holmesii* の診断とサーベイランスに有用な手段となることが期待される。

国立感染症研究所では開発した LAMP キットを地方衛生研究所 28 施設に配布し、2012 年から *B. holmesii* の国内サーベイランスを開始した。これまでの調査から、*B. holmesii* は乳児から成人まで幅広い年齢層に感染することを確認した。しかし、成人患者に占める *B. holmesii* 感染の割合は不明であり、今後アジア地域を含めた大規模調査が必要である。国立感染症研究所では平成 24 年度から台湾 CDC と共同して *B. holmesii* の病原体サーベイランスを進める予定である。

## E. 結論

百日咳類縁菌 *B. holmesii* の病原体サーベイランスを目的に、*B. holmesii* に特異的な LAMP 検出系を開発した。本キットを地方衛生研究所 28 施設に配布し、*B. holmesii* の国内サーベイランスを開始した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Otsuka N, Han HJ, Toyozumi-Ajisaka H, Nakamura Y, Arakawa Y, Shibayama K, Kamachi K. Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Japan. PLoS ONE, 2012; 7(2): e31985.
- 2) Suzuki T, Kataoka H, Ida T, Kamachi K, Mikuniya T.

Bactericidal activity of topical antiseptics and their gargles against *Bordetella pertussis*. J Infect Chemother, in press.

## 2. 学会発表

- 1) 蒲地一成. 百日咳の実験室診断, 困難な青年・成人患者の診断. 第60回日本感染症学会東日本地方学術集会・第58回日本化学療法学会東日本支部総会合同地方会, 平成23年10月, 山形.
- 2) 大塚菜緒, 吉野修司, 豊泉(鯉坂)裕美, 大平文人, 蒲地一成. 百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* に特異的な LAMP 検出系の開発. 第60回日本感染症学会東日本地方学術集会・第58回日本化学療法学会東日本支部総会合同地方会, 平成23年10月, 山形.

- 3) 大塚菜緒, 吉野修司, 河野喜美子, 豊泉(鯉坂)裕美, 柴山恵吾, 蒲地一成. LAMP法を用いた百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* 検出系の開発. 第94回日本細菌学会関東支部総会, 平成23年10月, 東京.

## H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得: LAMP法を用いた百日咳菌遺伝子検出方法およびこの方法に用いるプライマーセット. 特許第4806749号.
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

Table 1. LAMP primers for *Bordetella holmesii* detection

| Primer | Type   | Sequence (5' to 3')                       |
|--------|--------|---|
| BH-F3  | F3     | GCTCTCCCAGATCGAAAAGC                      |
| BH-B3  | B3c    | TCGGCGATGACCTGCA                          |
| BH-FIP | F2-F1c | CAGCGAACC GG TGGAAACGAATGCGCTACGGCGACAATG |
| BH-BIP | B1-B2c | ATTGGGCGTGGGTGGTCTGCCGTGTCAGCGTGGTCTTGC   |
| BH-LB  | LB     | GTCGTAGAAATCTACGGCCCCG                    |

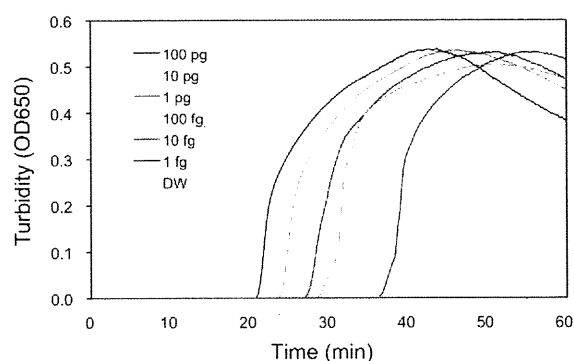


Fig. 1. Analytical sensitivity of LAMP for detection of *Bordetella holmesii* genome. Total DNA from *B. holmesii* ATCC 51541 was serially diluted from 100 pg to 1 fg, and amplified by LAMP. Amplification was monitored by a Loopamp real-time turbidimeter. OD650 = optical density at 650 nm.

Table 2. Specificity of *Bordetella holmesii*-LAMP assay

|                                  | Strain             | Genomic DNA/tube | Amplification <sup>a</sup> |
|----------------------------------|--------------------|------------------|----------------------------|
| <i>Bordetella holmesii</i>       | BH1 <sup>b</sup>   | 50 fg            | +                          |
|                                  | BH2 <sup>b</sup>   | 50 fg            | +                          |
|                                  | BH3 <sup>b</sup>   | 50 fg            | +                          |
|                                  | BH4 <sup>b</sup>   | 50 fg            | +                          |
|                                  | BH5 <sup>b</sup>   | 50 fg            | +                          |
| <i>Bordetella pertussis</i>      | Tohama             | 1 ng             | -                          |
|                                  | Yamaguchi          | 1 ng             | -                          |
|                                  | BP256 <sup>c</sup> | 1 ng             | -                          |
|                                  | BP257 <sup>c</sup> | 1 ng             | -                          |
|                                  | BP258 <sup>c</sup> | 1 ng             | -                          |
|                                  | BP259 <sup>c</sup> | 1 ng             | -                          |
|                                  | BP260 <sup>c</sup> | 1 ng             | -                          |
|                                  | BP289 <sup>c</sup> | 1 ng             | -                          |
|                                  | BP290 <sup>c</sup> | 1 ng             | -                          |
| <i>Bordetella parapertussis</i>  | BAA-587            | 1 ng             | -                          |
|                                  | ATCC15237          | 1 ng             | -                          |
|                                  | ATCC15311          | 1 ng             | -                          |
|                                  | BPP01 <sup>d</sup> | 1 ng             | -                          |
| <i>Bordetella bronchiseptica</i> | R05 <sup>e</sup>   | 1 ng             | -                          |
| <i>Bordetella hinzii</i>         | ATCC51730          | 1 ng             | -                          |
| <i>Bordetella avium</i>          | ATCC35086          | 1 ng             | -                          |

<sup>a</sup> Turbidity assay with a 60-min reaction.

<sup>b</sup> Isolated from patients in a pertussis outbreak, 2010–2011.

<sup>c</sup> Isolated from patients in the period 2004–2005.

<sup>d</sup> Isolated from a patient in 2002.

<sup>e</sup> Isolated from a rabbit in 1995.



**Genetic relationship of vector mosquitoes and the vector-borne  
pathogens between Taiwan and Japan**

Hwa-Jen Teng<sup>1</sup>, Pei-Yun Shu<sup>1</sup>, Tsai-Ling Liao<sup>1</sup>, Pei-Feng Wang<sup>1</sup>, Cheo Lin<sup>1</sup>, Yoshio Tsuda<sup>2</sup>, Tomohiko Takasaki<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Research and Diagnostics Center, Centers for Disease Control, Taipei, Taiwan

<sup>2</sup> National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

E-mail:

Hwa-Jen Teng: [hjteng@cdc.gov.tw](mailto:hjteng@cdc.gov.tw)

Pei-Yun Shu: [pyshu@cdc.gov.tw](mailto:pyshu@cdc.gov.tw)

Tsai-Ling Liao: [tll@cdc.gov.tw](mailto:tll@cdc.gov.tw)

Pei-Feng Wang: [cubalibre@cdc.gov.tw](mailto:cubalibre@cdc.gov.tw)

Cheo Lin: [lincheo@cdc.gov.tw](mailto:lincheo@cdc.gov.tw)

Yoshio Tsuda: [tsudayso@nih.go.jp](mailto:tsudayso@nih.go.jp)

Tomohiko Takasaki: [takasaki@nih.go.jp](mailto:takasaki@nih.go.jp)

Corresponding author: Hwa-Jen Teng

Mailing address: No.161, Kunyang St., Nangang Dist., Taipei City 115, Taiwan  
(R.O.C.).

Tel.: +8862-26531075; fax: +8862-26519632

E-mail address: [hjteng@cdc.gov.tw](mailto:hjteng@cdc.gov.tw)

Keywords: Dengue, Japanese encephalitis, dengue serotypes, *Culex tritaeniorhynchus*,  
Taiwan

## **Abstract**

This is a 3-year project to understand genetic relationship of vector mosquitoes and the vector-borne pathogens between Taiwan and Japan. The first year was focused on mosquito collections in Taiwan to study the avian malaria infection in migrating birds' areas led by Dr. Yoshio Tsuda and information sharing of mosquito-borne diseases. A CDC web site is available to download the epidemiology data of dengue and Japanese encephalitis (JE) from 1998, in which JE is an endemic disease and dengue is not considered endemic in Taiwan. The constant importation of multiple dengue viruses (DENVs) from the neighboring Southeast Asian countries is suggested to be responsible for the local outbreaks that occur each year. To reduce the introduction of DENVs and their local spread, Taiwan CDC has established laboratory-based dengue surveillance system for early identification of imported cases and monitoring the local transmissions of multiple DENV strains circulated in Taiwan. We presented our surveillance results of dengue cases in Taiwan in 2011. A total of 157 confirmed imported dengue cases were identified. The travelers were arriving from 10 countries in Western Pacific, Southeast Asia, and the Indian subcontinent. From the acute phase serum samples of imported dengue cases, 31 DENV-1, 26 DENV-2, 9 DENV-3, and 11 DENV-4 strains were isolated. For local dengue outbreaks in Taiwan, a total of 1,545 dengue cases were laboratory confirmed with 22 cases of dengue hemorrhagic fever (DHF). Epidemiological study showed that 9 different DENV strains (2 DENV-1, 4 DENV-2, and 3 DENV-3) were circulated in Kaohsiung City, Pingtung County, Penghu County, Tainan City, and Taipei City. Phylogenetic analyses of E gene sequences of DENVs isolated from indigenous and imported dengue cases showed that epidemic DENVs circulated in Taiwan in 2011 might be introduced from Southeast Asia and Central America.

## Introduciton

Mosquito-borne diseases are emerging and re-emerging in many areas of the world, especially in tropical and subtropical areas (Gubler, 1998). Without human vaccines or effective mosquito control, these mosquito-borne diseases have increased extensively in numbers and territory. In Taiwan, the important mosquito-borne diseases include Japanese encephalitis (JE), dengue, and malaria, of which only JE at present is known as an endemic disease. Routine surveillance on these diseases, including human cases and mosquito vectors, has been conducted. Since 1968, vaccination of children has become an annual nationwide campaign in Taiwan to prevent human JE infections. After that, only sporadic JE human cases are reported each year. Dengue fever in Taiwan is a travel-related disease because travelers carry dengue virus from endemic areas into the island (Shu et al., 2009). Later, this virus will pass to *Aedes* mosquitoes, and cause small or medium local outbreaks of dengue (Huang et al., 2007). Since 1973, a small number (<84) of imported cases were detected for malaria every year (DOH, 1991; Taiwan CDC, 1992-2009). Additionally, 2 imported chikungunya cases were detected in 2007 (Shu et al., 2008).

Of the 132 mosquito species that have been identified in Taiwan, *Aedes aegypti* (L.), *Ae. albopictus* (Skuse), *Ae. vexans vexans* (Meigen), *Anopheles minimus* Theobald, *Anopheles sinensis* Wiedemann, *Culex tritaeniorhynchus* Giles, *Cx. annulus* Theobald, *Cx. fuscocephalus* Theobald, *Cx. quinquefasciatus* Say, *Cx. pipiens* form *molestus* Forskal, and *Mansonia uniformis* (Theobald), are disease vectors of Taiwan or other countries. Among them, *Ae. aegypti* L. and *Ae. albopictus* Skuse, associated with human dwellings, are the principal vectors of dengue in Taiwan. The former species geographically distributed to areas south of the North Tropic of Cancer (Lien, 1978; Huang and Chen, 1986; Teng et al., 1996). This species is more important in the epidemiology of dengue in southern Taiwan. *Aedes albopictus* is distributed throughout the island, below an elevation of 1,500 m above the sea level. This mosquito is responsible for epidemics of dengue in those areas without *Ae. aegypti*, such as the small outbreaks (less than 20 cases) in Taipei County, Taichung City, and Taipei City.

In Taiwan, *Culex tritaeniorhynchus* Giles, *Cx. annulus* Theobald (one of *Culex vishnui* group), and *Cx. fuscocephala* Theobald are the main vectors of Japanese encephalitis (Rosen et al., 1989; Cates and Detels, 1969; Wang et al., 1962). Pigs served as the amplifier host in the transmission cycle of the JE virus (Hurlbut, 1964), with a rather high infection rate (over 50%) across the island each summer. Among the 15 Anopheline species that are found in Taiwan, *Anopheles minimus* Theobald is regarded as the principal (perhaps the only) malaria vector (Lien, 1991). The

distribution of this species covered the entire island in surveys from 1955-1957, but is now confined to southern and eastern Taiwan (DOH, 1991; Teng et al., 1998).

Japan is an island country in East Asia, which is located in the north of Taiwan. Both islands are in the route of migrating birds. In Taiwan, Genotype I of Japanese encephalitis virus (JEV) were first detected in 2008 in mosquitoes collected in Guandu Nature Park and Ilan County, which are abundant with migratory birds (Huang et al. 2010). Later, this genotype is gradually replacing the original genotype III Island wide. *Culex pipiens form molestus* (one of *Cx pipiens* group) was documented its invasion to northern Taiwan in 1996 (Lien et al.). Therefore, to study the genetic relationship of vector mosquitoes and vector-borne pathogens between Taiwan and Japan can provide basic information on the possible transmission route of invasions and the risk of vector-borne infectious diseases. Understanding the epidemiological situations of the diseases and the phenotypic and genotypic characteristics of viruses contributes to the development of new strategies for control and prevention. This information is important for evidence-based control policy-making. Therefore, the objective of this project is to study the Genetic relationship of vector mosquitoes and the vector-borne pathogens between Taiwan and Japan.