

ペットについては、イヌ及びネコを対象とした。イヌの抗体保有率は 2.1% (23/1098) であり 1996 年に神田らによって報告された 16.6% よりも低く、またネコの抗体保有率は 6.2% (36/582) であり、これも同報告の 18.8% よりも低かった。*C.burnetii* 遺伝子検出率についてはイヌ、ネコともに 0% (0/986, 0/1762) であり、調査時点では感染個体はいなかったと考えられた。

家畜については、北海道の牧場ウシ、全国の食用ウシ及び北海道の牧場ウマを対象とした。北海道の牧場ウシにおける抗体保有率は 10.5% (45/430) であったが、*C.burnetii* 遺伝子検出率は 0% (0/661) であった。全国の食用ウシにおける抗体保有率は 3.7% (21/565) であったが、*C.burnetii* 遺伝子検出率は 0% (0/565) であった。これらの結果から、牧場ウシ、食用ウシともに、過去の感染が疑われる個体が存在するものの、調査時点では感染個体はいなかったと考えられた。また、Htwe らの報告 (1992) では日本のウシの抗体陽性率は 46.6% であった。血清疫学調査に用いた間接蛍光抗体法で陽性と判定する血清希釈倍数は、我々は 128 倍であるが、Htwe らは 16 倍と低い。しかし、このことを考慮しても、現在のウシの感染率は 1990 年代と比較して低いと考えられた。

野生動物については、岡山県のヌートリア 148 頭及び野ネズミ 133 頭を対象としたが、いずれも *C.burnetii* 遺伝子検出率は 0% で、感染個体はいなかった

と考えられた。平井らの報告 (1992) では野ネズミからの抗体は検出されていないが、ヌートリアの 12.5% で検出されている。今回の調査ではヌートリア及び野ネズミの血清疫学調査を実施できておらず、今後の課題である。

宿主については、マダニを対象に岡山県で 802 匹、北海道で 563 匹捕集したが、*C.burnetii* 遺伝子検出率は 0% (0/1365) であり、宿主の特定には至らなかった。Ho らは岐阜県の牧場で採集したマダニ約 250 匹の 15 プール検体中 4 検体から *C.burnetii* を分離した (1995)。我々の調査と比較して高い検出率であり、当時の調査地の *C.burnetii* 侵淫度が高かった可能性が考えられた。

これまで我々の実施してきたヒト、ペット、家畜、野生動物及び宿主と目されるマダニにおける疫学調査の結果と 1990 年代の報告を比較し、総合的に勘案すると、現時点においては、国内の *C. burnetii* の侵淫度は低く、ヒトへの感染リスクは非常に低いものと考えられた。しかしながら、現在も毎年数名の患者が報告されており、また感染既往と思われる抗体陽性牛も特定の地域に偏っているということではなく、一定の割合で全国に存在することも示唆された。さらに海外の流行地域からの輸入感染も懸念されることから、今後も検査体制とサーベイランス体制を維持していくことが必要であると考えられる。

E. 結論

食用ウシ 565 頭の *C. burnetii* に対す

る抗体保有率は 3.7%であり、過去の感染が疑われる個体が存在するものの、調査時点では感染個体はいなかったと考えられた。これまで、遺伝子疫学調査として家畜 1313 頭、ペット 2748 頭、野生動物 281 頭及びマダニ 1365 匹の合計 5,707 検体について *C. burnetii* の遺伝子検索を実施したが、感染個体は確認できなかった。これらのことから、現時点において、国内の *C. burnetii* の侵淫度は低く、ヒトへの感染リスクは非常に低いものと考えられた。しかしながら、現在も毎年数名の患者が報告されており、海外の流行地域からの輸入も懸念されることから、今後も検査体制とサーベイランス体制を維持していくことが必要である。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1)岸本寿男、木田浩司:Q 熱 特集ペットからの感染症 小児科.54:73-80:2013.

2)木田浩司、中本敦、城ヶ原貴通、溝口嘉範、葛谷光隆、濱野雅子、中嶋 洋、藤井理津志、福士秀人、大屋賢司、猪熊壽、岸本壽男. 本邦における Q 熱コクシエラの感染実態と宿主の調査. 第 20 回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー. 阿南市

表1 津山市 Tと畜場へ搬入された食用ウシ(都道府県別)

	2009年	2010年	2011年	2012年	合計	総計
岡山県	20	46	45	39	150	
広島県	3	5	4	2	14	
島根県	4	7	6	7	24	
鳥取県	3	—	3	3	9	
北海道	10	—	4	2	16	
山形県	6	1	2	—	9	
福島県	1	1	—	—	2	
新潟県	1	6	1	—	8	
栃木県	5	—	—	—	5	
静岡県	1	—	—	—	1	
長野県	—	1	1	3	5	
愛知県	7	—	2	2	11	
岐阜県	—	—	1	2	3	291
三重県	—	5	—	5	10	
滋賀県	2	—	—	—	2	
京都府	—	—	—	1	1	
兵庫県	1	—	5	7	13	
香川県	—	1	—	—	1	
愛媛県	—	—	1	—	1	
徳島県	—	1	—	1	2	
高知県	—	—	—	1	1	
大分県	1	—	—	—	1	
長崎県	1	—	—	—	1	
沖縄県	—	1	—	—	1	
岡山県	46	65	61	67	239	
鳥取県	3	3	4	1	11	
島根県	—	2	—	—	2	
愛媛県	—	—	1	—	1	
高知県	—	—	—	1	1	
北海道	—	3	5	4	12	274
新潟県	—	1	—	2	3	
愛知県	—	—	3	—	3	
京都府	1	—	—	—	1	
兵庫県	—	1	—	—	1	

表2 間接蛍光抗体法による食用ウシの *C.burnetii* に対する抗体測定

	陽 性	擬陽性	陰 性	合 計
健康牛	7	10	274	291
病 畜	14	17	243	274
合 計	21	27	517	565

陽性 : 封入体と細胞質内粒子の染色像を確認 擬陽性 : 封入体のみ染色

表3 岡山県のマダニにおける *Coxiella burnetii* 遺伝子検出率

マダニ種	個体数	検出率(%)
<i>Haemaphysalis flava</i> (キチマダニ)	463(91)	0
<i>Haemaphysalis hystrix</i> (ヤマアラシチマダニ)	39(16)	0
<i>Haemaphysalis longicornis</i> (フタトゲチマダニ)	147(32)	0
<i>Haemaphysalis formosensis</i> (タカサゴチマダニ)	2	0
<i>Haemaphysalis kitaokai</i> (ヒゲナガチマダニ)	6	0
<i>Haemaphysalis megaspinosa</i> (オオトゲチマダニ)	41(2)	0
<i>Ixodes turdus</i> (アカコッコマダニ)	34(3)	0
<i>Ixodes ovatus</i> (ヤマトマダニ)	22(3)	0
<i>Ixodes nipponensis</i> (タネガタマダニ)	6(3)	0
<i>Amblyomma testudinarium</i> (タカサゴキララマダニ)	37(30)	0
<i>Dermacentor taiwanensis</i> (タイワンカクマダニ)	5	0
合 計	802(165)	

括弧内に今年度調査したマダニの匹数を示した

表4 北海道のマダニにおける *Coxiella burnetii* 遺伝子検出率

マダニ種	個体数	検出率(%)
<i>Ixodes persulcatus</i> (シュルツエマダニ)	160	0
<i>Ixodes ovatus</i> (ヤマトマダニ)	221	0
<i>Haemaphysalis douglasi</i> (ダグラスチマダニ)	182	0
合 計	563	

表5 本研究における抗体保有率及び遺伝子検出率の既報との比較

		ヒト	ペット		家畜		野生動物		宿主	
		動物病院 従事者	イヌ	ネコ	牧場ウシ (北海道)	食用ウシ (全国)	牧場ウマ	ヌートリア	野ネズミ	マダニ
抗体保有率 (国内)	本研究	0.6 % (2/304)	2.1 % (23/1098)	6.2 % (36/582)	10.5 % (45/430)	3.7 % (21/565)	ND	ND	ND	ND
	既報	37 % (67/181) 石原ら1998	16.6 % (50/301) 神田ら1996	18.8 % (57/304) 神田ら1996	—	46.6 % (262/562) Htweら1992	—	12.5 % (4/32) 平井ら1992	0 % (0/54) 平井ら1992	—
遺伝子検出率 (国内)	本研究	ND	0 % (0/986)	0 % (0/1762)	0 % (0/661)	0 % (0/565)	0 % (0/87)	0 % (0/148)	0 % (0/133)	0 % (0/1365)
	既報	—	—	—	33.9 % (21/62)生乳 松村ら1996	—	—	—	—	26.7 % (4/15) 平井ら1995

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の Multilocus sequence typing による型別データベースの構築
と自然界における病原体維持に関する研究

研究分担者	川端寛樹	国立感染症研究所 室長
研究協力者	高田伸弘	福井大学
	伊東拓也	北海道立衛生研究所
	Kyle Taylor, 坪田敏男, 今内覚	北海道大学
	大久保（佐藤）梢	国立感染症研究所
	中尾稔	旭川医科大学
	高野愛	山口大学
	石畝史	福井県衛生環境研究センター

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。本年度までに解析が終了した国内分離株は計 88 株に達した。またこれら解析結果から、国内患者由来株の大多数を占める *Borrelia garinii* では、ST128, ST131, ST362 の 3 つの ST 型が患者分離株の 43% を占有すること、またこれら ST は自然界では *Myodes rufocanus bedfordiae*, *Apodemus speciosus*, *A. argenteus* から見出されることが明らかとなった。特に *M. rufocanus bedfordiae* から分離された 9 株は、いずれも患者から分離された株と一致することが明らかとなった。

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が潜在する患者数はさらに多いと考えられている。本疾患の感染予

防対策として、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、昨年度同様に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、その感染経路について科学的根拠を示すことを目的として研究を行った。

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（Takano et al.

2011）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）。また、過去に分離された株を旭川医科大学より分与を受け MLST 解析に供した。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

MLST 法による解析に使用した *B. garinii* 株は計 88 株である。これらの分離都道府県は、各々、北海道(58 株)、長野県(25 株)、福島県(2 株)、神奈川県(1 株)、福井県(1 株)、静岡県(1 株)であり、その由来は、患者分離 33 株、野鼠由来 25 株、*Ixodes persulcatus* 由来 20 株および *I. pavlovski* 由来 10 株である。

1) 患者由来株(33 株)で優先する ST は ST131(22%)、ST128 (12%)、ST362(9%)であり、これら主要 3ST で患者分離株全体の 43%を占有することが明らかとなった。

2) マダニ由来株(30 株)では、患者由来株と同一の ST(ST127, ST371, ST375, ST385)をしめす 6 株が *I. persulcatus* より分離された一方で、残り 24 株は患者由来株とは一致しない ST であった。特に *I. pavlovski* より分離された 10 株はすべて患者由来株とは異なる ST であった。

3) 野鼠由来株(25 株)の内, 18 株(72%)は患者由来株と同一 ST であった. 特に患者由来株の主要 3 ST である ST131, ST128, ST362 の野鼠分離株での占有率は, *Myodes rufocanus bedfordiae* で 56%, *Apodemus speciosus* で 33%, *A. argenteus* で 25% であった.

D. 考察

我々は国内におけるライム病患者は 80%以上で *B. garinii* ST-B 型であることを報告してきたが, これら ST-B 型の内, 特定の ST 感染例が多いことが本研究で明らかになった. ST128 は北海道, 長野県および神奈川県 (推定感染地は新潟県) の患者より分離されていること, また本 ST は長野県, 福島県で捕獲された野鼠より分離されていることから, 本 ST が国内に広く分布すること, また野鼠によって保有されるボレリアがマダニ刺咬によりヒトへ伝播されていることが明らかとなった. ST131 は国内患者の他, 中国やモンゴルの *I. persulcatus* から分離されているが, 本研究では北海道で捕獲された *M. rufocanus bedfordiae* から高率で分離された. また ST362 は患者由来株のみで見出される ST であるが, この ST は ST-B 型に含まれることから, 上記 2 ST 同様に野鼠等によって保菌されていると推定された.

他方, *I. pavlovski* から分離された 10 株は, すべて患者や野鼠から高率で分離される ST-B 型とはことなる系統に分類された. *I. pavlovski* は鳥類より吸血する傾向があるとされることから, 本マダニ種が保菌するボレ

リアは鳥類由来であると考えられる.

E. 結論

国内ライム病患者は野鼠が保菌し, *I. persulcatus* により伝播される *B. garinii* に感染していることが明らかとなった. 特に国内で発生する患者の約 40% が, 野鼠によって保菌される *B. garinii* のなかの 3 つの ST に感染, 発症していることから, これらを保菌する野鼠の増減はライム病発生頻度に大きな影響を与える可能性があるとして推定された.

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) カイル テイラー, 川端寛樹, 今内 覚, 下鶴倫人, 高野 愛, 坪田敏男. 北海道の野生下におけるボレリア種の維持, 小型哺乳類とダニの関係について. 第 58 回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2012 年 10 月. 旭川.
- 2) 後藤みなみ, 濱野剛久, 水主川剛賢, 酒井洋樹, 高島康弘, 柳井徳磨, 今岡浩一, 川端寛樹, 山本明彦, 小泉信夫, 野上貞雄. 猟犬を指標とした野外感染症調査: 島嶼部, 半島部における調査. 第 18 回野生動物医学会大会. 2012 年 8 月. 和田..

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

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

東北地方の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	国立感染症研究所	協力研究員
	後藤みなみ、村井厚子、柳井徳麿	岐阜大学	応用生物科学部
	高野 愛	山口大学	共同獣医学部

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継続的に行った。ライム病を伝播するシュルツェマダニが生息する東北地方では供試した猟犬血清のうち、ウェスタンブロット法によりその 48.8%で抗ライム病抗体陽性と判定された。北信越地方以南の抗体陽性率は 23.5%以下であることから、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する血清疫学調査は、病原体浸潤地域を調べる上で有用であると考えられる。

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。本年度は、昨年度までの西日本を中心とした調査研究に続いて、東北地方で、猟犬血清を採取しその抗体保有頻度を調べた。

B. 研究方法

抗ボレリア抗体測定のため、猟犬血清 121 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、猟犬より採血した全血約 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 121 検体のうち、ELISA 法にて 106 検体(87.6%)が抗ボレリア IgG 抗体陽性もしくはボーダーラインと判定され、うち 59 検体(48.8%)が WB 法により陽性であることが確認された(表 1)。昨年度までに抗ボレリア抗体陽性と判定された検体は東北以外の地域では 16.4%であり (H23 年度分担報告書参照) 東北地方では猟犬の抗ボレリア IgG 抗体陽性率は有意に高いことが示された (表 2)。イヌ全血からのボレリア培養を試みたが、いずれの全血からもボレリアは培養されなかった。またイヌの年齢、性差などを指標にした χ^2 乗検定を行い、イヌの加齢とあわせて抗体陽性率が上昇する傾向も見

られた (表 3)。

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。また、本研究では、東北地方で、有意に抗ボレリア抗体陽性率が高いことが示された。これは病原体保有マダニの生息地が寒冷地であることと (主に中部山岳地帯、東北) と一致している。また、5 歳未満の若犬と比較して 10 歳以上の老犬で抗体陽性率が高いことは、加齢に従って病原体保有マダニへの曝露頻度が上昇するためと考えられた。

E. 結論

イヌなどのライム病ボレリアの感受性が高い動物種で、かつマダニの曝露頻度が高い動物を歩哨動物として、ヒト病原体の浸潤実態を把握する手法は有効であり、ヒトの公衆

衛生対策を立案する上で重要な知見である
と考えられる。

H. 健康危険情報

なし

I. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

- 3) 後藤みなみ, 濱野剛久, 水主川剛賢, 酒
井洋樹, 高島康弘, 柳井徳磨, 今岡浩一,
川端寛樹, 山本明彦, 小泉信夫, 野上貞
雄. 猟犬を指標とした野外感染症調査:
島嶼部, 半島部における調査. 第 18 回
野生動物医学会大会. 2012 年 8 月. 十
和田.

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. 東北地方で収集された猟犬血清 121 検体におけるボレリア抗体陽性率

都道府県	試験数	ELISA 陽性数(陽性率)	ウエスタンブロット法による陽性検体数	試験数に対する抗体陽性率(%)
青森	25	20 (80%)	10	40
秋田	11	9 (81.8%)	5	45.5
岩手	16	14 (87.5%)	11	68.8
山形	20	18 (90%)	10	50
宮城	30	18 (60%)	11	36.7
福島	19	14 (73.7%)	12	63.2
合計	121	93 (76.9%)	59	48.8

表 2. 東北地方と東北地方以外の地域で採血された猟犬血清間における抗ボレリア抗体陽性率の相違に関する χ^2 検定成績

猟犬在住地域(n=627)

観測度数	Positive	Bordeline/Negative	Total
東北	59	62	121
東北以外	83	423	506
	142	485	627
期待度数	Positive	Bordeline/Negative	Total
東北	27.40350877	93.59649123	121
東北以外	114.5964912	391.4035088	506
	142	485	627
χ^2	Positive	Bordeline/Negative	Total
東北	36.43103758	10.66640688	47.09744446
東北以外	8.711769856	2.550662515	11.26243237
	45.14280744	13.21706939	58.35987683
P=	2.12478E-13		

表 3. 各パラメータによる統計学的解析

a)性別 (n=603)

観測度数	Positive	Borderline	Negative	Total
オス	67	43	208	318
メス	73	45	167	285
	140	88	375	603
期待度数	Positive	Borderline	Negative	Total
オス	73.83084577	46.4079602	197.761194	318
メス	66.16915423	41.5920398	177.238806	285
	140	88	375	603
χ^2	Positive	Borderline	Negative	Total
オス	0.631991324	0.250262943	0.53009969	1.412353957
メス	0.705169266	0.279240758	0.591479654	1.575889679
	1.33716059	0.529503701	1.121579345	2.988243636
P=	0.224445622			

b)犬齢 (若犬<5y、成犬 5-10y、老犬>10y)

b-1)若犬 VS 老犬(n=379)

観測度数	Positive	Borderline	Negative	Total
若犬	65	48	212	325
老犬	20	7	27	54
	85	55	239	379
期待度数	Positive	Borderline	Negative	Total
若犬	72.88918206	47.16358839	204.9472296	325
老犬	12.11081794	7.836411609	34.05277045	54
	85	55	239	379
χ^2	Positive	Borderline	Negative	Total
若犬	0.85388794	0.014833146	0.242704286	1.111425372
老犬	5.139140382	0.089273562	1.460720239	6.689134184
	5.993028322	0.104106708	1.703424525	7.800559556
P=	0.020236249			

b-2)老犬 VS 成犬(n=280)

観測度数	Positive	Borderline	Negative	Total
成犬	54	32	140	226
老犬	20	7	27	54
	74	39	167	280
期待度数	Positive	Borderline	Negative	Total
成犬	59.72857143	31.47857143	134.7928571	226
老犬	14.27142857	7.521428571	32.20714286	54
	74	39	167	280
χ^2	Positive	Borderline	Negative	Total
成犬	0.549427683	0.008637233	0.20115559	0.759220506
老犬	2.299456599	0.036148419	0.841873396	3.177478415
	2.848884283	0.044785652	1.043028986	3.936698921
P=	0.139687225			

b-3)若犬 VS 成犬(n=551)

観測度数	Positive	Borderline	Negative	Total
若犬	65	48	212	325
成犬	54	32	140	226
	119	80	352	551
期待度数	Positive	Borderline	Negative	Total
若犬	70.19056261	47.18693285	207.6225045	325
成犬	48.80943739	32.81306715	144.3774955	226
	119	80	352	551
χ^2	Positive	Borderline	Negative	Total
若犬	0.383839924	0.014009772	0.092294747	0.490144444
成犬	0.551982192	0.020146797	0.132724747	0.704853736
	0.935822116	0.034156569	0.225019494	1.194998179
P=	0.550185883			

c) ワクチン接種歴(n=627)

観測度数	Positive	Borderline	Negative	Total
経験あり	80	45	218	343
経験なし	62	44	178	284
	142	89	396	627
期待度数	Positive	Borderline	Negative	Total
経験あり	77.68102073	48.68740032	216.6315789	343
経験なし	64.31897927	40.31259968	179.3684211	284
	142	89	396	627
χ^2	Positive	Borderline	Negative	Total
オス	0.069227525	0.279269812	0.008644059	0.357141396
メス	0.0836093	0.337287132	0.010439832	0.431336264
	0.152836825	0.616556943	0.019083891	0.78847766
P=	0.67419302			

d) 狩猟対象(n=584)

観測度数	Positive	Borderline	Negative	Total
哺乳類	91	63	276	430
鳥類	45	23	86	154
	136	86	362	584
期待度数	Positive	Borderline	Negative	Total
哺乳類	100.1369863	63.32191781	266.5410959	430
鳥類	35.8630137	22.67808219	95.45890411	154
	136	86	362	584
χ^2	Positive	Borderline	Negative	Total
哺乳類	0.833703128	0.001636575	0.335673817	1.171013519
鳥類	2.327872369	0.004569658	0.937271047	3.269713074
	3.161575497	0.006206233	1.272944863	4.440726593
P=	0.108569659			

e)犬種(n=624)

観測度数	Positive	Borderline	Negative	Total
純血種	97	56	229	382
雑種	44	33	165	242
	141	89	394	624
期待度数	Positive	Borderline	Negative	Total
純血種	86.31730769	54.48397436	241.1987179	382
雑種	54.68269231	34.51602564	152.8012821	242
	141	89	394	624
χ^2	Positive	Borderline	Negative	Total
純血種	1.322097711	0.042183665	0.616954853	1.98123623
雑種	2.086947627	0.066587439	0.973870884	3.127405949
	3.409045338	0.108771104	1.590825737	5.108642179
P=	0.077744996			

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
および *Brucella* 特異的組換えタンパクの作出）

研究分担者	今岡 浩一	国立感染症研究所	獣医科学部	第一室長
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、家畜ブルセラ菌のリザーバーである有蹄類の野生動物を感染源とする家畜のブルセラ病の流行が報告がされ、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。

1) 国内の野生イノシシ血液、合計 543 サンプルを収集し、マイクロプレート凝集反応 (MAT) 法によりブルセラ属菌に対する抗体保有を検討したところ、イヌブルセラ菌 (*B. canis*) に対しては、11.0% (60/543)、家畜ブルセラ菌 (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) に対しては、全国 0.6% で (3/543) が陽性であった。陽性血清について PCR 法により 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産物の遺伝子配列は、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。これらの結果から血清陽性イノシシの一部はイヌブルセラ菌に対する感染歴を有していたと考えられる。

2) 日本ではブルセラ属菌に対する抗体検査は凝集反応が一般に用いられが、上述したように他の菌との交差反応も考えられる。そのため、より特異的な抗原を用いた、新たな抗体検出法を開発する必要がある。そこで、まず、ブルセラ SE 抗原を用いた WB 法を実施し、ブルセラ免疫ウサギ血清に特異性を示す 11kDa 付近に見られるバンドに注目した。ついで、このタンパクを抽出し、そのアミノ酸ならびに遺伝子配列を決定し、hypothetical protein BMEI0805 であることが明らかとなった。このタンパクについて、pCold TF ベクターを用いて組換えタンパクの作成を行い、その特異性を検討したところ、感染イヌ血清については十分であったが、ブルセラ属菌以外のグラム陰性菌で免疫したウサギ血清と非特異的反応も見られた。本反応は、大腸菌由来のタンパクによるものと考えられた。また、TF (Trigger factor) を除去したベクターも作成し検討を加えたが、免疫ウサギ血清の非特異的反応の除去には至らなかった。そこで、あらためて SE 抗原を二次元電気泳動により展開し、確認したところ、サイズが同一で PI 値の異なるところ (PI 値=8) に交差反応を示すタンパクが見つかった。ただ、PI 値=6 付近にブルセラ感染イヌ血清特異的なものが認められたことから、本タンパクに焦点を絞り検討を継続している。

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、2012年12月31日現在までに、ブルセラ症患者19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12例は、国内を推定感染地域とする*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、現在は清浄化している。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。

国内のイノシシ血液サンプルを収集し、イヌブルセラ菌、家畜ブルセラ菌、それぞれに対する抗体保有を検討した。また、日本ではブルセラ属菌に対する抗体検査は凝集反応が一般に用いられるが、他の菌との交差反応も認められることがある。そのため、より特異的な抗原を用いた、新たな抗体検出法を開発する必要がある。そこで、より特異的な抗原となり得る組換えタンパクの作成を行った。

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。また、過去にシカについても検討を行ったが、今年度、これまで調査していなかった福岡、島根、和歌山で、大日本猟友会の協力を得て、シカ血液サンプルについて依頼した。

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、既報に基づき実施した。

3. ブルセラ属菌特異的遺伝子の検出： 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*bcsp31*, *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。

4. ウェスタンブロッティング（WB）法による抗ブルセラ抗体の検出： *B. canis* の0.5% n-lauroylsarcosine 抽出抗原を作成し（SE: lauroylsarcosine extract）、MAT陽性血清60サンプルについてWB法で検討を行った。

5. リコンビナント抗原の作成： ブルセラSE抗原を用いたWB法を実施し、ウサギ抗ブルセラ血清に特異性を示す11kDa付近に見られるバンドに注目した。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、ブルセラ特異的hypothetical protein BMEI0805（HYP）と同定した。pCold TFベクターに組み込み大腸菌で発現させ、組換えタンパクを精製した。作成した組み換えタンパク