

を Factor XA もしくは HRV3C を用いて TF を切断し、His-tag を目印として、目的組換えタンパクを抽出し、WB を行い、その特異性を検討した。

6. 組換えベクターの改変： TF を目的の組換えタンパクから酵素切断する際の困難さと、TF が非特異をもたらす可能性が示唆された(私信)ので、HYP を組み込んだベクターを改変し、TF 遺伝子を除去した。本ベクターを大腸菌で発現 (HYP3) させ、WB 法でその特異性を検討した。

7. 2D 電気泳動： SE 抗原を定法に従って二次元電気泳動を行った。それを膜に転写し、*B. canis* 感染イヌ血清、ブルセラ属菌以外のグラム陰性菌免疫ウサギ血清を用いて、WB 法による特異性の検討を行った。

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 県から合計 543 頭であった。シカは 2013.1 現在、79 頭分集まっている(検討結果は、報告書提出には間に合わず)。

2. MAT による抗体検査： 家畜ブルセラ菌に対しては、3 検体が陽性を示した。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、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 種のブルセラ遺伝子のうちいずれかで陽性となり、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、100%ブルセラ属菌の配列と一致し、すなわち、*B. canis* の保菌が強く疑われた。

4. WB 法による抗体検出：*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. canis* に対する免疫家兎抗血清で、11kDa 付近に見られる特異的なバンドの有無を指標に判定した(図 1)。陽性標準である *B. canis* 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)。WB 法では、MAT 陽性のイノシシ血清については、全てが陰性であった。

5. リコンビナント抗原 (HYP) の作成と検証： 11kDa 付近に見られるタンパクは、ブルセラ属菌特異的な hypothetical protein BMEI0805 であった。pCold TF ベクターに組み込み(図 2)、発現、精製した組換えタンパクは、感染イヌ血清では特異的反応を示したが、免疫ウサギ血清では、ブルセラ属菌だけでなく、エルシニア菌など他の菌で免疫した血清とも交差反応を示した。

6. ベクターの改変、再発現と検証： 改変後のベクターを用いて作成した組換えタンパクは、11kDa 付近に認められ (HYP3)、良好な発現が確認された(図 4)

WB 法で検討したところ *B. canis* 感染及び非感染のイヌ血清に対しては、良好な特異性が得られたが、免疫ウサギ血清については、依然としてブルセラ属菌以外のグラム陰性菌に対する反応が見られた(図 5)。

7. 2D 電気泳動による抗原の再確認： 非特異的反応の原因を特定するため、ブルセラ SE 抗原を 2D 泳動後、WB 法で抗原タンパクの特異性の再度の確認を行った。その結果、SDS では 11kDa 付近に、PI 値の異なる、少なくとも 3 箇所スポットを持つことが確認された。WB の結果、*B. canis* 感染イヌ血清では、その 3 つのスポットすべてに反応が認められたが、エルシニア菌、オクロバクトラム菌を免疫したウサギ血清は、同じく 11kDa 付近の PI 値=8 付近に反応が認められた (図 6)。

E. 結論

国内の野生イノシシ血液サンプルにおいて *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、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で確認されている。国内感染による患者も報告されている。さらに特異性の高い WB 法の検討では、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、*B. canis* 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、イノシシ血清合計 543 サンプル中で、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、WB 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であると考えられる。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。

新たなブルセラ属菌特異的な抗体検出法のた

めに、リコンビナント抗原を作成し、グラム陰性菌各種に対する免疫ウサギ血清で WB 法を行ったが、非特異反応がみられた。これは、目的とする特異的タンパク (11kDa) と同サイズで PI 値の異なる別種のタンパク、または同サイズの強い抗原性をもつコンピテントセル由来のタンパクによるものではないかと考えている。そこで、PI 値=6 付近に認められた特異的なタンパクに焦点を絞り検討を継続している。また、昆虫細胞等、大腸菌を用いない発現系への移行も検討しているところである。

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

1. 論文・総説等

(1) 麻生さくら, 渡部信栄, 中村望, 細貝みゆき, 今岡浩一, 野本優二, 手塚貴文, 塚田弘樹. 血液培養から分離された *Brucella melitensis* の一症例. 医学検査, 61(5): 902-907, 2012

(2) Nakato,G., Hase,K., Suzuki,M., Kimura,M., Ato,M., Hanazato,M., Tobiume,M., Horiuchi,M., Atarashi,R., Nishida,N., Watarai,M., Imaoka,K. and Ohno,H. Cutting Edge: *Brucella abortus* exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. J. Immunol., 189:1540-1544, 2012

(3) 今岡浩一, 木村昌伸. 日本におけるブルセラ症—感染症法施行前 (1999 年 3 月 31 日) まで—. in : 病原微生物検出情報, 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 33(7): 186-187, 2012

(4) 今岡浩一, 鈴木道雄, 慕蓉蓉. 台湾におけるブルセラ症—33 年ぶりの患者報告と届出疾

患へー. in : 病原微生物検出情報, 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 33(7): 193-194, 2012

(5) 今岡浩一, 木村昌伸, 勝川千尋. ブルセラ症-ブルセラ症検査マニュアル-2012. in : 病原体検査マニュアル (国立感染症研究所、地方衛生研究所全国協議会 編) , [http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/brucellosis_2012.pdf], 2012

(6) 今岡浩一. ブルセラ症の現状. in : 化学療法の領域, 医薬ジャーナル社, 28(12): 138-148, 2012

2. 学会発表・講演等

(1) Gaku Nakato, Koji Hase, Michio Suzuki, Masanobu Kimura, Manabu Ato, Misaho Hanazato, Minoru Tobiume, Motohiro Horiuchi, Ryuichiro Atarashi, Noriyuki Nishida, Masahisa Watarai, Koichi Imaoka, Hiroshi Ohno. Cellular prion protein on Peyer's patch M cells could serves as an invasive receptor for *Brucella abortus*. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity (第11回あわじしま感染症・免疫フォーラム), Awaji, Sep. 11-14, 2012

(2) 鈴木道雄, 中藤学, 度会雅久, 木村昌伸, 堀内基広, 長谷耕二, 飛梅実, 阿戸学, 森川茂, 山田章雄, 大野博司, 今岡浩一. ブルセラアボルトスは腸管パイエル板からの侵入にM細胞上のプリオン蛋白質 (PrPC) を利用する. 第155回日本獣医学会学術集会, 東京, 3月28-30日, 2013

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、1999.4.1~2012.12.31)

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	病原体
				abortus	canis		
2002.1	東京都?	ペットの犬	発熱、食欲不振	—	陽性	(-)	<i>B. canis</i>
2005.6	シリア (Travel to)	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>B. melitensis</i>
2005.12	長野県?	不明	発熱、筋肉痛、腹痛	—	陽性	(-)	<i>B. canis</i>
2006.2	エジプト (Travel to)	不明 (吸入疑い)	発熱、頭痛、肝脾腫	陽性	—	(+)	<i>B. melitensis</i>
2006.6	(イタリア)	不明	発熱、筋肉痛	—	陽性	(-)	<i>B. canis</i>
2006.7	エジプト (Visit from)	経口 (ミルク)	発熱、頭痛	陽性	—	(-)	<i>B. abortus</i>
2006.9	長野県	不明	発熱、脾腫	—	陽性	(-)	<i>B. canis</i>
2006.10	宮城県	不明	発熱、中枢神経症状	—	陽性	(-)	<i>B. canis</i>
2007.4	大阪府	イヌ	リンパ節腫脹、倦怠感	—	陽性	(-)	<i>B. canis</i>
2008.6	埼玉県	飼い犬	発熱、関節炎、筋炎	—	陽性	(-)	<i>B. canis</i>
2008.7	ペルー (Visit from)	経口	発熱、腰背部痛、全身倦怠感	陽性	—	(-)	<i>B. abortus</i>
2008.8	愛知県	繁殖犬	発熱、脾腫、肝腫大	—	陽性	(+)	<i>B. canis</i>
2008.8	愛知県	繁殖犬	発熱	—	陽性	(+)	<i>B. canis</i>
2009.4	埼玉県	繁殖犬	(無症状病原体保有者として届出)	—	陽性	(-)	<i>B. canis</i>
2009.10	インド (Visit from)	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>B. melitensis</i>
2010.4	ペルー (Visit from)	経口 (チーズ)	発熱、胃腸炎、腹痛、腰痛(腸腰筋膿瘍)	陽性	陽性	(+)	<i>B. melitensis</i>
2010.6	栃木県	不明	発熱	—	陽性	(-)	<i>B. canis</i>
2011.11	中国 (Homecoming to)	不明 (吸入疑い)	発熱、頭痛、後頭部痛	陽性	—	(+)	<i>B. melitensis</i>
2011.11	島根県	不明	発熱、中枢神経症状(脳脊髄炎)	—	陽性	(-)	<i>B. canis</i>

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 (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
香川	112	0	15
愛媛	104	2	14
高知	30	0	8
熊本	29	0	1
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)

B. abortus
(2/305, 0.7%)

B. canis
(47/305, 15.4%)

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	-	-	-	-
	99	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	+	-	+	+
09	85	愛媛	+	-	-	+
	87	鹿児島	-	-	-	-
	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	+	-	-	-
11	94	愛媛	-	-	-	-
	100	香川	-	-	-	+
	2	徳島	-	-	-	-
	5	愛媛	-	-	-	-
	16	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>	+	+	-	-

※)

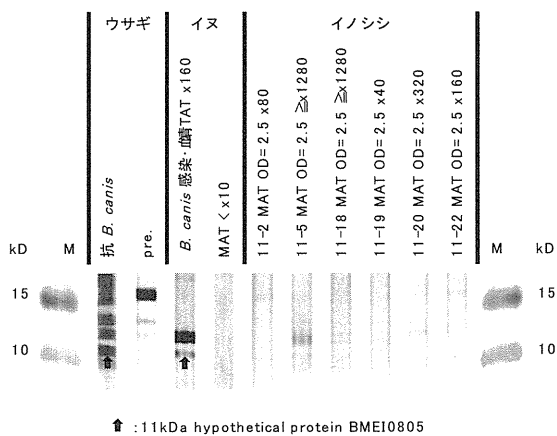
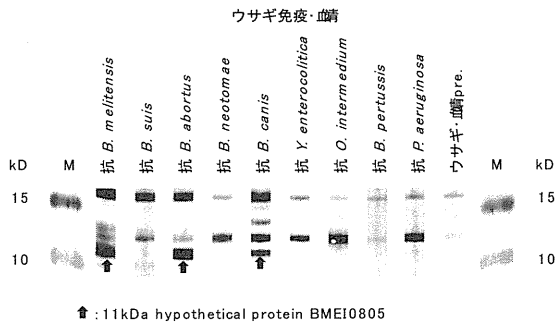
1	2	3	4
<i>bcspp31</i>	<i>omp2 (abortus type)</i>	<i>omp2 (canis type)</i>	<i>omp31</i>

PCR陽性

@ 抗*B. abortus*抗体陽性

*B. canis*と陽性パターンが一致

図1) SE 抗原を用いた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



(11kDa 付近にブルセラ特異的バンドが認められる

—その後の解析で Hypothetical protein BMEI0805 と同定)

図2) 組換えタンパクの作成

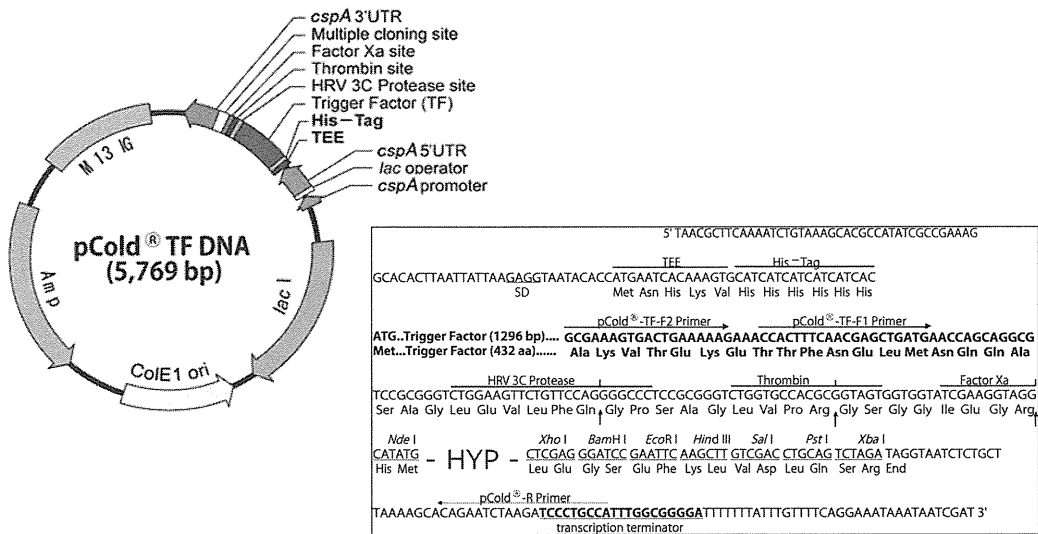


図3) TF を酵素切断後の Hypothetical Protein の反応

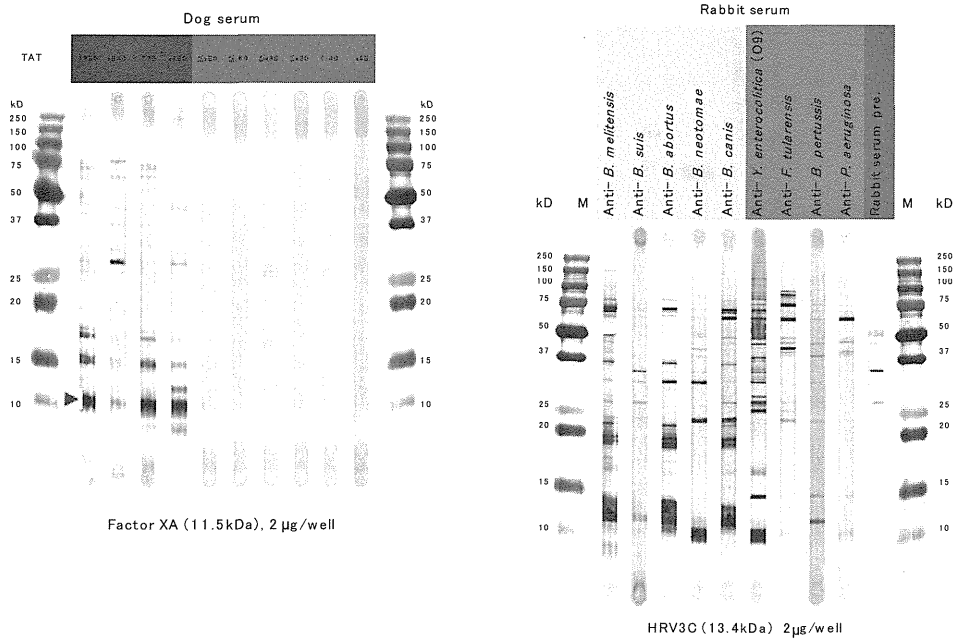


図4) 組換えベクターの改変 (TF の除去) と改変後のベクターによる組換え Hypothetical protein (HYP3)

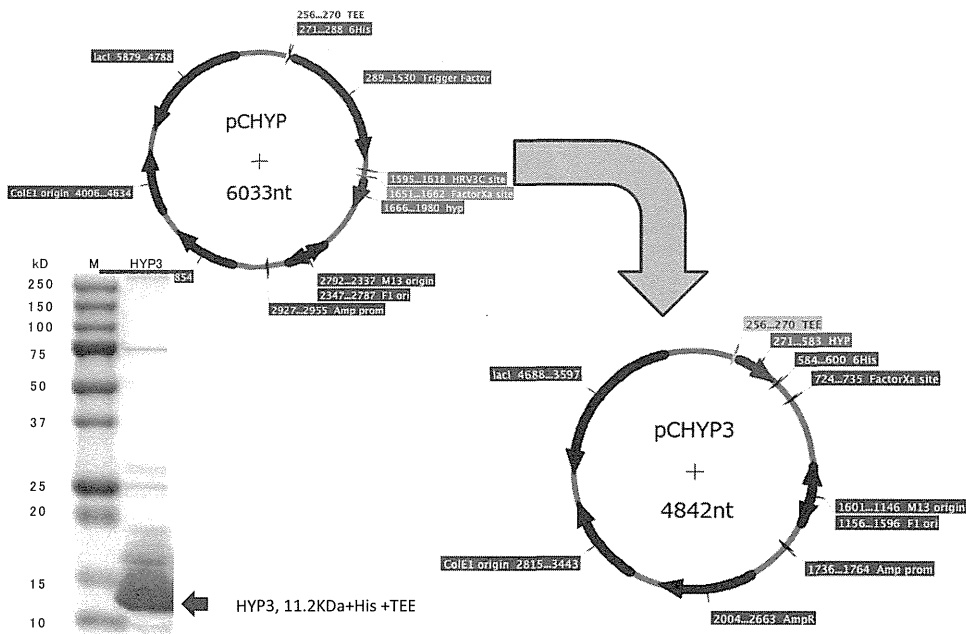


図5) HYP3の反応性

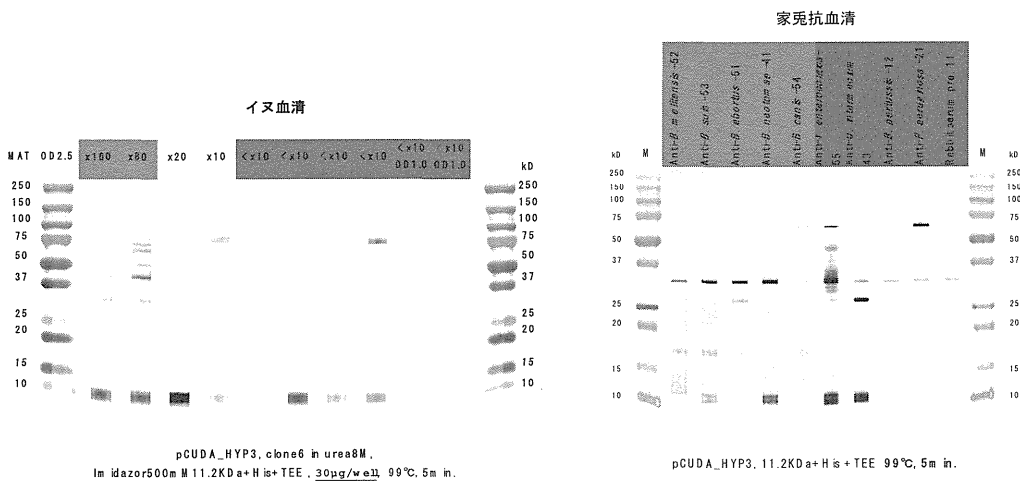
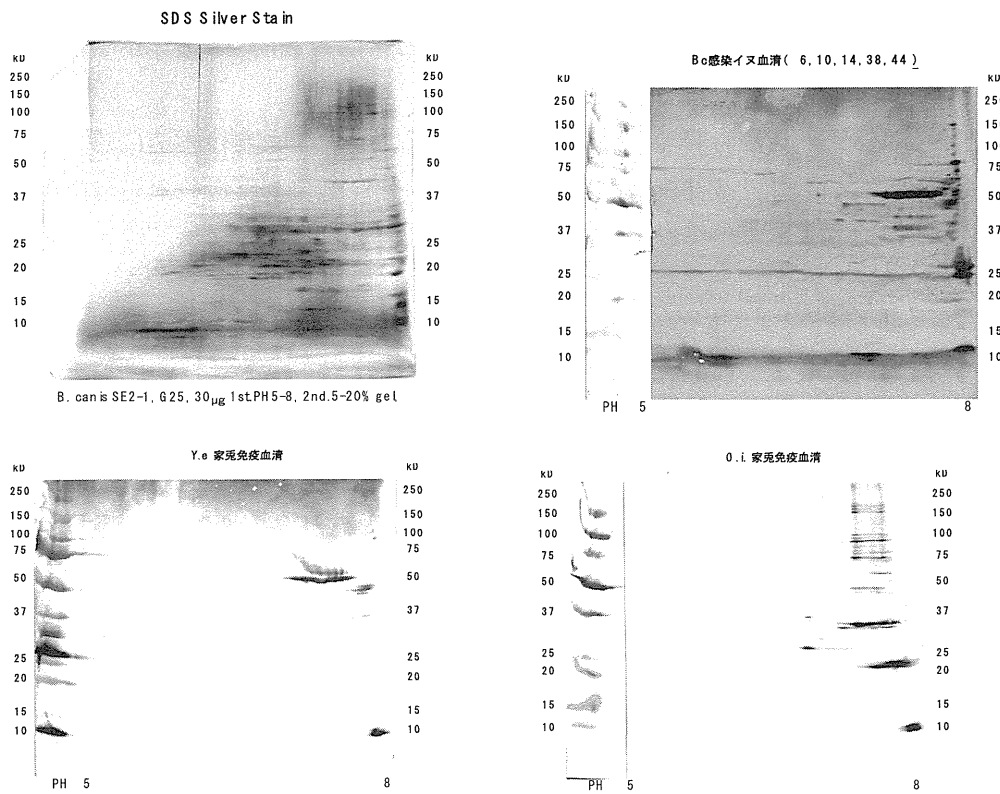


図6) 2D 電気泳動による SE 抗原の解析と WB



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 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。患者の環境調査において飼いネコ及びイヌから *Corynebacterium* 属菌が分離された。また、患者家族のジフテリア抗毒素抗体価が高かった。これらの症例は、今まで報告されたような呼吸器症状ではなくリンパ節膿瘍や皮下膿瘍の症例であった。

12 カ所の地方自治体の動物愛護センターや動物病院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+} 8 株が分離され、また抗毒素は 5 箇所 28 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懸念される。しかも外見上健康な動物が保有していた。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、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。

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、その感染力と重篤性から 2 類感染症に指定されている。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今回も発出された。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2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。さらに、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1都道府県の小児科受診からランダムに抽出した50人について、気道材料を採取し、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、または開業獣医医院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、香川県、山形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。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、菌分離試験に用いる培地については、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は、2大学と実施した。岐阜大学・柳井研究室では2012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として、AFLP法の開発と検討を行った。

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、咽頭や体表などの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。

開業獣医医院での検体採取は、咽頭や鼻水をシードスワブ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未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て実施する場合もあった。菌の毒素原性はジフテリア毒素遺伝子のAサブユニット相当部分の一部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日間培養した。部分中和により細胞の50%が死亡する各検体の希釈倍率を標準抗毒素のそれと比較し、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°C、6 V/cm、5-20sec 18hrs、1-5sec 14hrsで行った。結果はUPGMA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、日本で初めてヒトから分離された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2症例について実施した。今年度の症例は、今まで報告されたような呼吸器症状ではなくリンパ節膿瘍や皮下膿瘍の症例であった。

1例目は、香川県R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10例目)。担当医師から以下の情報を得た。香川県在住の33歳の男性。2011年12月ころより右上腕部に無痛性腫瘍を自覚したが、徐々に縮小し消失した。しかし、2012年1月初旬に同部に再度腫瘍が出現。増大傾向にあったため近医受診。加療目的にてR病院紹介となった。来院時、呼吸器症状、咽頭症状は認めず。右腋窩に直径25mm大の平滑なリンパ節を触知した。血液検査値はWBC12800、CRP5.51と炎症所見を示していた。悪性リンパ腫が否定できなかったため右腋窩リンパ節生検を行い、摘出標本を病理検査・細菌検査に提出した。リンパ節摘出時、リンパ節内部より壊死・膿汁様排出液を認めた。感染性のものが疑われたため、細菌学的検査を依頼し*C.ulcerans*が確認された。エリスロマイシン(EM)を投与した。以後、右腋窩のリンパ節膿瘍は退縮し、EM投与開始10日目にはほぼ改善した。この菌は、PFGE法による分子疫学的解析により、2005年に岡山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、妻と同居、ペットに関する問診を行ったところ、家の内外を行き来する犬3匹がよく行き来する妻の実家で飼育していることが判明した。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。患者妻及びその義母、義父、義兄の咽頭スワブも採取した。*C.ulcerans*は検出されなかったが、患者の家族から*Corynebacterium*属菌が検出され、妻のジフテリア抗毒素価が高値を示した。

2症例目は、山形県衛生研究所より照会があった(国内ヒトの症例の11例目)。担当医師から以下の情報を得た。山形県在住の37

歳の女性。2011年12月初旬、右肘内側の腫脹、搔痒感が出現、次第に熱感と腫脹が増強し、12月中旬、近医を受診、軟部腫瘍の疑いで精査目的にS病院を紹介された。初診時、右肘内側に発赤、局所熱感、疼痛を伴った約4cmの弾性硬、可動性のない腫瘤を認めた。Tinel signは認めなかった。血液検査ではWBC 7,500/mm³、CRP 2.3 mg/dlと軽度の炎症所見を示した。MRIT1強調画像で筋肉と等輝度、T2強調画像で不均一に高輝度、造影T1強調画像で辺縁が造影される腫瘤を認めた。穿刺吸引を行ったが、培養で細菌は検出されず、悪性細胞も認めなかった。発症から1か月の経過で次第に右手指のしびれが見られるようになってきた。2012年1月確定診断と疼痛緩和のため腫瘤切除術を行った。その際、腫瘤の周囲皮下組織に炎症を認め、剥離する際に腫瘤内から膿が出てきた。腫瘤の病理検査を行い、中心壊死を伴った膿瘍であった。手術時に採取した膿を培養したところ、グラム陽性短桿菌を認めた。起因菌はジフテリア毒素産生性の*C. ulcerans*であると確定された。この菌は、PFGE法による分子疫学的解析により、2006年に神奈川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、夫と娘2人と同居、ペットに関する問診を行ったところ、家の内外を行き来するネコ6匹を飼育していることが判明した。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。患者の娘2人の咽頭スワブと血液を採取した。*C. ulcerans*は検出されなかったが、ネコ2匹から*Corynebacterium*属菌が検出され、DT2期の予防接種を受けていない娘のジフテリア抗毒素価が高値を示した。

(論文発表(2))

(2)人での菌分離調査

OS府の小児科受診者の気道材料のうち、50人分について菌分離を試みたが、*C. ulcerans*は検出されなかった。

(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1)

1) KG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68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。動物病院のネコから採取した血清1検体がジフテリア抗毒素が検出された。

2) YG県の調査

県内全域を網羅する形で選定した20ヶ所の動物病院の協力を得て、ネコ187匹のジフテリア抗毒素価を測定したところ、2匹が陽性となった(0.651IU/ml、0.230IU/ml)。抗毒素価陽性ネコ及び同居ネコ計12匹から採取した咽頭拭い液からウルセランス菌の分離を試みたが、いずれも菌分離陰性であった。今回、抗毒素陽性となったネコの自宅ではいずれも複数のネコが飼われていた(5匹および7匹)ことから、多頭飼育が抗毒素価陽性に関連している可能性が推察された。

3) SO県の調査

動管センターのイヌ116頭を調査した結果、PCRでは1頭で陽性であったが菌分離はできなかった。動物病院のイヌ5頭、ネコ33頭を調査した結果、菌分離はされずPCRは全て陰性であった。

4) TS県の調査

県内でネコが集団で生息している地域7カ所(AからG地域)について、保菌状況及び抗毒素抗体の保有状況を調査した。その結果、

それぞれの地域におけるネコの保菌状況は、E 地域 4.8%(3/26)、G 地域 22.2%(2/9)であり、残り 5 地域からは検出されなかった。しかし、抗毒素抗体の保有率は、E 地域 19.2%(5/26)、G 地域 22.2%(2/9)の他、A 地域 3.2%(1/31)、B 地域 6.3%(1/16)、F 地域 28.6%(4/14)と多くの地域で認められた。なお、これら陽性ネコはすべて、外見上健康であった。

5) SG 県の調査

動物保護管理センターに収容されたイヌおよびネコの保菌状況を調査した。イヌおよびネコ合計 67 検体を検査した結果、1 検体でジフテリア毒素遺伝子陽性を確認したが、菌は分離されなかった。また、県内の獣医科医院で受診したネコの保菌状況を調査した。合計 34 検体を検査した結果、2 検体でジフテリア毒素遺伝子陽性を確認した。このうち、1 検体からジフテリア毒素産生性ウルセランスが分離されたが、残り 1 検体から菌は分離されなかった。

6) MG 県の調査

動物愛護センターの協力で、各保健所から搬入された犬 55 匹、猫 48 匹を調査の対象とした。塗抹平板を PCR でスクリーニングした結果、県北西部の保健所管内から搬入された成猫（♀）1 匹から DT 遺伝子が検出された。単離した菌は生化学試験等で *C. ulcerans* と同定された。

7) OS 市の調査

動物管理センターに収容されたイヌ 41 頭、およびネコ 21 匹の保菌状況を調査した。イヌはすべて菌陰性であり、5 月に調査したネコ 1 匹(4.7%)から *C. ulcerans* を検出した。菌陽性ネコは、老年（10 歳以上）のメスで、栄養状態は普通だが衰弱していた。鼻水、くしゃみ等の呼吸器症状は認められなかった。所有者有（飼育されていた）のネコであるが、飼育形態は不明で外飼いの可能性もある。分

離菌は *C. ulcerans* に典型的な生化学性状（API Coryne: *C. ulcerans*99.7% ID）を示し、DLT 遺伝子陽性、PLD 遺伝子陽性であった。さらに、ドブネズミの調査も実施した（ドブネズミの採取はもともと繁殖調査を目的としたものである）。採取場所はヒトの出入りの少ない埋め立て地である。9 匹調査して、すべて菌陰性であった。

8) TK 都の調査

リアルタイム PCR 法により、調査対象動物のスワブ 10 検体について検査を行ったが、*C. ulcerans* の p1D 遺伝子、DLT 遺伝子、および *C. pseudotuberculosis* の p1D 遺伝子は検出されず、また、*Coryne* 属菌も分離されなかった。

9) TG 県の調査

動物愛護指導センター等のイヌ・ネコを対象とし、咽頭スワブ及び血清を採取している。調査の結果、咽頭スワブからジフテリア毒素遺伝子は検出されなかった。*C. ulcerans* の分離はなく、他のコリネバクテリウム属菌 5 株（2 種）を検出した。血清については、動物病院の協力で採取したネコ血清 1 検体がジフテリア抗毒素価陽性を示した。さらに動物愛護センターにて保管してあった過去に採血したイヌ血清 568 検体について測定したところ 9 検体が抗毒素価陽性であった。

10) KS 市の調査

愛護センターのイヌ 2 検体、ネコ 29 検体について、咽頭スワブからの菌分離を目指したが陽性の検体はなく、また全 31 件中 18 件においては抗毒素検査を実施済みであり、全て検出レベル以下という結果であった。なお、昨年度の検体のうち抗毒素検査が未実施であった 30 検体についても同様に検査を実施し検出レベル以下という結果であった。

11) KN 県の調査

県内の動物病院の協力を得てイヌ 18 検体、

ネコ 8 検体より菌分離を目指したが、すべて陰性であった。

1 2) 獣医科大学との共同研究調査結果

①岐阜大学 柳井研究室

野生動物と接する機会の多い猟イヌについて、福島県、宮城県、山形県、秋田県、岩手県および青森県の地域獣医会の協力を得て合計 123 頭から採血し、血中ジフテリア抗毒素価を培養細胞法により定量した。その結果、青森県の 1 頭がジフテリア抗毒素価 0.0144 単位で陽性であった。

②大阪府立大学の調査

大阪府立大学 小崎教室では、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を検討した。候補として、Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) 法を検討した。この方法は、フィンガープリント法の一つで、EcoRI と MseI でゲノムを切断し、断端が EcoRI サイトと MseI サイトに挟まれたフラグメントのみを増幅して、電気泳動分離および蛍光検出することで遺伝子型別を行う方法である。この方法を用いて現在までに当研究班で分離された *C.ulcerans*130 株について、解析を行い図 2-1,2-2 に示した。

(4) *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。その結果、3 つのプロファージ領域を含み総塩基長 2,579,188 塩基であった。見出された特徴として、① *C.ulcerans*0102 株は *C. pseudotuberculosis* ときわめて似通っていた。その一方で *C. diphtheriae* ゲノムとの間には、そのようなゲノム全体にわたる類似性が見いだされなかった。②毒素遺伝子をコードする (Tox+) プ

ロファージ領域の構造は非常に特徴的であり、*C. diphtheriae* の (Tox+) プロファージ領域とはホモロジーがほとんど見いだされなかった。両菌種の (Tox+) プロファージが異なる期限を持つことが示唆された。③ *C. diphtheriae* の接着因子 spaABC pili と高いホモロジーを示す領域は見出されなかった。④ *C. diphtheriae* で *invasin* とされる DIP1281 領域と 65%程度のホモロジーを示す領域が見出された。⑤表現形質から予想されていた病原因子 phospholipase D (pld) の遺伝子の存在が確認された。(論文発表 (1))

D. 考 察

国内 10、11 症例目のヒトでの *C.ulcerans*^{Tox+} 感染症が香川県および山形県で見出された。患者は 30 代で基礎疾患を持たない健常人あり、その環境としてイヌやネコなどの動物をペットとして飼育していた。これら発生した症例は、菌が分離された部位についても、呼吸器ではなくリンパ節や皮下膿瘍であって今までの *C.ulcerans*^{Tox+} 感染が起きたヒトでの症例とは異なるものであった。この 2 人の感染者の感染前の抗体価は測定していないが、流行予測調査によると 30 歳台のジフテリア毒素抗体価平均は、ジフテリア発症阻止可能なレベルにあるので、この点からもこの世代に発症したことは特徴的であった。今後、分離された *C.ulcerans*^{Tox+} の解析でその感染特性が異なる菌であることが明らかになると予想される。飼育動物からの感染の可能性は、本年度調査した 2 症例でも推察された。ただし、少数で室内飼育されている動物からはほとんどこの病原体が検出されることがない事実から、この飼育動物は家の内外を行き来できるような飼育をされていることが必要であり、何らかの戸外に生息する生物との接触からこの病原体を家庭内に持ち込んでいる可能性

がある。

そこで、これら人に接触する可能性のある動物での *C.ulcerans*^{tox+} の汚染状況を調査する目的で、一昨年より行われている各地の愛護センターや動物病院の患畜での調査は、昨年とは異なる地域に拡大して行われたが、複数の地域から分離された。今回のヒト症例が発生した2つの地域についても調査を行うことができ、ジフテリア毒素抗体価を有するイヌやネコが同地域に生息することを確認した。

C.ulcerans^{tox+} は環境中にある一定の割合で生存していてその環境中に入ってきた動物を汚染している可能性が考えられるが、どの動物が高い保菌率を維持していて汚染源の元凶となっているのかは、現状では言及できない。昨年から行われている猟犬の血清調査で、調査地域が全く異なる本年も昨年と同様にジフテリア抗毒素価が陽性であった。また、動物病院および愛護センターにおいても、陽性動物が検出されている。抗毒素の証明は過去にジフテリア毒素産生菌が感染して、局所での増殖にともない産生した毒素が刺激となって抗体を誘導した結果である可能性がある。この血清からのジフテリア抗毒素価検出による *C.ulcerans*^{tox+} 汚染状況の把握に今後も有用な手段となると考えられる。

一般的にコリネ属菌は皮膚等の一般細菌叢として分離され、*C.ulcerans* もこれら細菌叢の一部として存在している可能性もある。今年度の動物病院のネコを対象とした調査で *C.ulcerans*^{tox+} だけでなく、ジフテリア毒素非産生の *C.ulcerans* も分離されている。一般家庭で飼育する鼻水を呈するネコの中に *C.ulcerans*^{tox+} が潜在している可能性が示されたことは、特に免疫力の低下した高齢者、ジフテリアトキソイド接種後20年以上を経過したヒトは、当該菌の感染には注意を要する。本年度に発生した患者の特性から、健常

者であっても感染の機会があることが示唆された。

最後に、これまでに全国各地から分離された *C.ulcerans*^{tox+} の地域との関連性を調べるために、今までは PFGE 法によっていた。その結果、香川県及び山形県で分離された菌の遺伝子型は岡山県及び神奈川県で分離された株と同様であるという結果を得ていた。これは、PFGE 法による解析精度の問題のある可能性がある。この可能性を検証するためにも、今年度新たな分子疫学手法として、検討を開始した AFLP 法を実施した結果、高い解析能力と簡易で客観的な手法であることが確認された。また、我が国の初発症例の全ゲノム解析が可能となったことから、より短時間で検出できる簡便な *C.ulcerans*^{tox+} の同定法の開発にも期待が高まる。

E. 結 論

昨年とは異なる複数地域の愛護センターのイヌまたはネコから *C.ulcerans*^{tox+} が分離され、一定の割合で広範囲に本菌が分布していることが確認された。動物病院の調査でも *C.ulcerans*^{tox+} が分離されており、鼻汁等の風邪様症状を呈する一般家庭のネコは注意が必要である。

本年度、調査動物に関して血清を採取してジフテリア抗毒素価を測定することにより *C.ulcerans*^{tox+} 分布調査に役立てる可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Sekizuka T, Yamamoto A, Komiya T, Kenri T, Takeuchi F, Shibayama K,

Takahashi M, Kuroda M and Iwaki M: *Corynebacterium ulcerans* 0102 carries the gene encoding diphtheria toxin on a prophage different from the *C. diphtheriae* NCTC 13129 prophage, BMC Microbiol. 2012 May 14; 12: 72.

- (2) Urakawa T, Seto J, Yamamoto A, Nakajima T, and Goto S, Subcutaneous abscess formation in the upper extremity caused by toxigenic *Corynebacterium ulcerans* J Med Microbiol [Epub ahead of print]
- (3) 鎌田知子、畑中章生、田崎彰久、本多圭司、角田篤信、喜多村健； 茨城県で発見されたコリネバクテリウム・ウルセランスの1症例、日本耳鼻咽喉科学会会報 115 巻7号 682-686・2012年
- (4) 木全恵子、嶋 智子、金谷潤一、磯部順子、嶋 一世、廣田昌幸、保田信一、綿引正則、佐田徹太郎。ネコにおけるジフテリア毒素産生型 *Corynebacterium ulcerans* および *Corynebacterium* 属菌保有状況調査 (2010-2011) 第2報、富

山県衛生研究所年報 第35号
139-142・2012年

2. 学会発表

- (1) 畠山理沙、梅田薫、阿部拓人、松村国彦、小笠原準、小宮貴子、岩城正昭、山本明彦、長谷篤、真田秀一。大阪市のイヌ・ネコにおけるジフテリア毒素産生性コリネバクテリウム・ウルセランス保菌状況調査。平成24年度獣医近畿地区学会、2012年10月。
- (2) 河野智美、須藤正之、佐野哲也、山本明彦、梅原成子、青木佳代、石川和彦。滋賀県内のイヌ・ネコにおけるジフテリア毒素産生性コリネバクテリウム・ウルセランスの分布調査結果。第43回滋賀県公衆衛生学会、2013年2月

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

表 1. 平成 24 年動物の菌分離調査結果

地 域	調査動物	機 関	採取検体	検体数	菌分離	抗体陽性	備 考
KG県	イヌ	動物病院、動物管理指導所他	咽頭、耳、体表スワブ	68匹	0		
	ネコ	動物病院	咽頭スワブ	1匹	0	1	
YG県	ネコ	動物病院(20ヶ所)	血清	187	0	2	多頭飼育(それぞれ5匹および7匹飼育)
SO県	イヌ	動物管理指導センター	咽頭スワブ	116	0		PCR:1陽性
	イヌ	動物病院(3ヶ所)	鼻腔、咽頭	5	0		
	ネコ	動物病院(4ヶ所)	鼻腔、咽頭、眼脂	33	0		
TS県	ネコ	動物愛護管理センター	咽頭スワブ	121	5	13	県内のネコ集団で生息地域7カ所の保菌状況及び抗毒素抗体保有状況を調査。外見上健康であったネコより菌は2地域から検出され、抗毒素抗体は5地域で認められた。
SG県	イヌ	動物保護管理センター	口腔	39	0		
	ネコ	動物保護管理センター	口腔	28	0		PCR:1陽性
	ネコ	獣医科医院	咽頭、口腔、鼻腔、肛門、	34	1		PCR:2陽性
MG県	イヌ	動物愛護センター	咽頭スワブ	55	0		
	ネコ	動物愛護センター	咽頭スワブ	48	1		<i>C. ulcerans</i> 検出 県北西部より搬入された
OS市	イヌ	動物管理センター	咽頭スワブ	41	0		
	ネコ	動物管理センター	咽頭スワブ・目やに	21	1		
	ドブネズミ	環境科学研究所	咽頭(口腔内)スワブ	9	0		
TK都	ネコ	動物病院	鼻汁、皮膚炎	2	0		
	ネコ	不明	鼻汁	8	0		
TG県	イヌ	動物愛護指導センター	咽頭スワブ	37	0	0	他のコロナ属:5株(2種)検出
	イヌ	同上	膿、皮膚擦過	2	0	0	
	イヌ	同上	血清	28	0	0	
	ネコ	動物病院(10ヶ所)	皮膚炎	1	0	0	
	ネコ	動物病院	無症状・血清	3	0	1	採血後死亡のために菌検査はできなかった
	イヌ	動物愛護指導センター	血清(H14-17)	568		9	過去に採血した血清
KS市	イヌ	愛護センター	咽頭スワブ	2	0	0	
	ネコ	愛護センター	咽頭スワブ	29	0	0	
KN県	イヌ	動物病院	咽頭スワブ	18	0		
	ネコ	動物病院	咽頭スワブ	8	0		

図1. 本年度人から（10、11症例目）分離された *C.ulcerans* の PFGE 解析

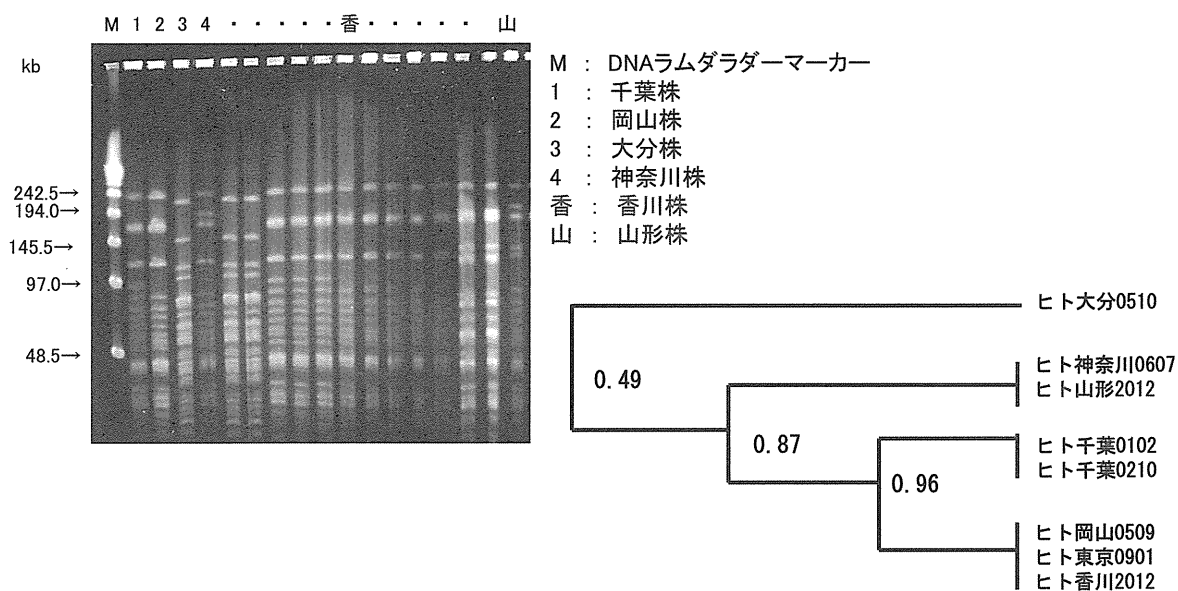


図 2-1. PFGE 法による *C.ulcerans* 解析



図 2-2. AFLP 法による *C.ulcerans* 解析

