

図4 PCR検査結果(国立感染症研究所より)

実兄がブルセラ症に罹患していた。滞在中にヤギの肉や乳製品の摂取はなかったが、このような患者背景から感染の危険性は高かったと考えられる。

ブルセラ属菌は日本では家畜対策がなされているため、家畜から感染する可能性は低いが、家畜対策が不十分な地域への渡航や汚染食品等による輸入感染症としての注意が必要である¹⁾。海外渡航歴等がある場合はマラリアや腸チフス等の熱帯感染症と不明熱の鑑別が必要となってくる²⁾。ブルセラ症は症状や血液検査結果に特徴があるわけではないため患者情報や菌の分離が重要である。日本で報告されている2例の *B. melitensis* 感染例も血液培養から菌が分離されている^{3,4)}。血液培養は採取が容易にでき、早い段階で菌を分離することができるため、本症例のように不明熱が継続する場合は外来においても積極的な血液培養採取が望ましく有効である。

本例の塗抹検査では *Haemophilus influenzae* よりも小さなグラム陰性小桿菌が認められ、形態が特徴的であった。同定検査での生化学的性状反応が少なかった。検査を進めるなかで、菌の形態、海外渡航歴の有無、動物との接触等がある場合、ブルセラ属菌の可能性を考慮することも重要である。ブルセラ属菌を疑う際には培養日数の延長や、同定キットでの同定結果のみではなく追加試験として生化学的性状検査を行い確認することが必要である。また現在この菌を同定できる自動機器は VITEK 2 のみであり、他の同定キットでは誤同定の可能性もあるため、ブルセラ属菌の疑いがある時は総合的に判断し保健所や国立感染症研究所に同定依頼する。

本症例は当初、尿路感染症を疑い Ceftriaxone による治療が開始されていた。ブルセラ症治療では細胞内移行性の高い抗菌薬を含めた2剤併用が用いられ

る。ブルセラ属菌の疑いを速やかに臨床側へ報告することで Doxycycline と Gentamicin に抗菌薬変更がなされ、臨床に貢献できた。

またブルセラ属菌はヒト-ヒト感染の確率は非常に低いとされているが、院内感染対策チームと病棟と連携し、標準予防策の徹底を促すなど院内感染対策にも迅速に対応することができた。

V 結 語

今回血液培養から *B. melitensis* を分離した症例に対し適正な抗菌薬変更ができ、血液培養の有用性を改めて感じた。*B. melitensis* は感染症法で三種病原体に指定されており検査室感染の報告もある。検査室内は常に感染の危険と隣り合わせであるということ意識しなければならない。また検査を進めるうえでの患者情報や臨床症状など臨床側との情報共有が不

可欠であり、普段から連携を密にしていくことが重要である。

謝辞

菌株を解析して頂きました国立感染症研究所獣医科学部 木村昌伸先生、論文作成の際にご指導いただきました山田舞乃先生に深謝致します。

■文献

- 1) 今岡浩一：ブルセラ症の最近の話題, Modern Media 2009；55：18-27.
- 2) Imaoka K *et al.*：Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR, Jpn J Inf Dis 2007；60：137-139.
- 3) 今岡浩一：ブルセラ症(1999年4月～2007年3月31日現在), 病原微生物検出情報 2007；28：227-228.
- 4) 菊地 賢ほか：海外(シリア)で感染したブルセラ症事例, 病原微生物検出情報 2005；26：273-274.
- 5) 中村ふくみほか：エジプトで感染したブルセラ症事例, 病原微生物検出情報 2006；27：125-126.
- 6) 中国 CDC：中国におけるブルセラ症, 2001～2006年, 病原微生物検出情報 2007；28：228-229.

ブルセラ症の現状

Current trends in brucellosis

今岡 浩一*

ブルセラ症 (Brucellosis) はブルセラ属菌による世界的に重要な人獣共通感染症であり、毎年 50 万人以上の新規患者が報告されている。わが国では感染症法の四類感染症となった 1999 年 4 月 1 日以降、19 例が届出られ、うち 7 例は輸入例としての家畜ブルセラ菌感染、12 例は国内でのイヌブルセラ菌感染である。主症状は、発熱、倦怠感、関節痛など特徴が少なく、症状のみでは診断は困難である。診断はおもに血清抗体検査によるが、その他に、家畜ブルセラ菌感染症では、渡航歴と渡航先での喫食歴、動物との接触歴、イヌブルセラ菌感染症ではイヌとの接触歴など、感染機会の有無を把握することが重要である。治療には抗菌薬を用いるが、細胞内寄生菌のため長期間の投与が必要であり、しばしば再発もみられる。

Key Words : 輸入感染症 / 乳製品 / 不明熱 / 家畜 / 犬

I はじめに

ブルセラ症 (Brucellosis) はブルセラ属菌 (*Brucella* spp.) により引き起こされる人獣共通感染症である。特に、食料や産業面で家畜に依存度が強く、家畜でブルセラ病が発生している国や地域で多くの患者が発生している。公衆衛生面のみならず社会経済面でも重要な感染症のひとつである^{1)~4)}。

わが国では家畜のブルセラ病対策が功を奏し、家畜は清浄化している⁵⁾ ことから、家畜ブルセラ菌 (通常は、*Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella abortus*, *Brucella ovis* を言うが、*Brucella ovis* はヒトに感染しないことから、本稿では除外する) 感染患者も輸入患者に限られている。一方、イヌブルセラ菌 (*Brucella canis*) は国内に定着しており、イヌの 3~5% が感染歴をもっている。し

たがって、患者も国内のイヌから感染したと考えられる⁶⁾。

なお、ブルセラ症は感染症法 (感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律) による四類感染症として、診断した医師はただちに最寄りの保健所への届出が義務づけられている。

II ブルセラ属菌

紀元前 400 年頃のヒポクラテス著「Of the Epidemics」にブルセラ症と思われる疾患が記載されており、ヤギなどの家畜化にともない、古くからヒトの感染症として問題になっていたと考えられる。しかし、世界的に注目されたのは 19 世紀中頃のクリミア戦争当時、英国軍兵士のあいだでマルタ熱 (波状熱) が流行したことによる。1887 年、Bruce により、その原因菌として *B. melitensis* が分離され、その後、種々のブルセラ属菌

*国立感染症研究所・獣医科学部 第一室長 Koichi Imaoka

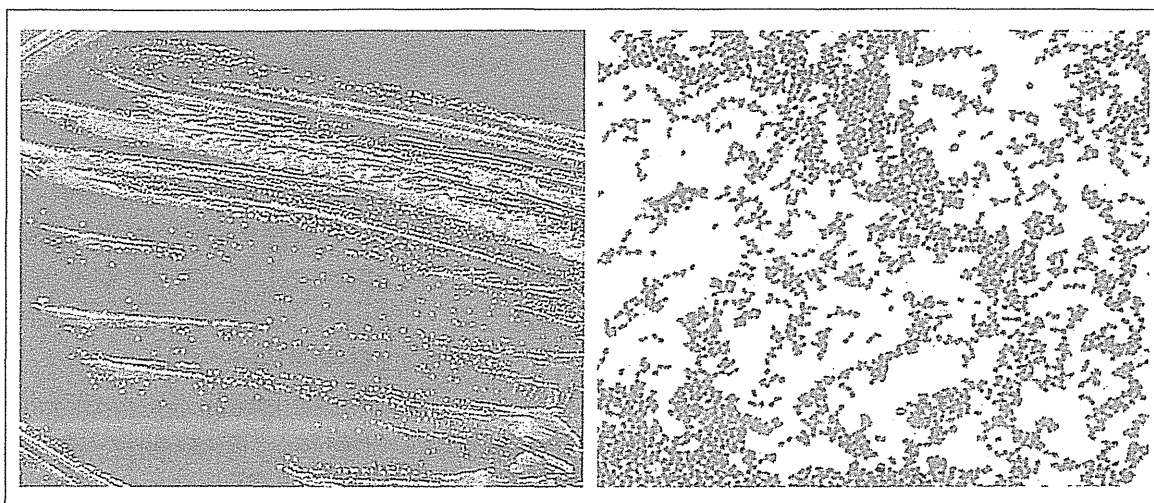


図1 羊血液寒天培地上の *B. canis* コロニーとグラム染色像

死流産イヌ胎仔より国立感染症研究所にて分離。

(筆者提供)

表1 ブルセラ属菌の種類

種	生物型・血清型	自然宿主	ヒトへの病原性
<i>B. abortus</i>	1-6, 9	ウシ, 水牛	あり
<i>B. melitensis</i>	1-3	山羊, めん羊, ラクダ	あり
<i>B. suis</i>	1, 3	ブタ, いのしし	あり
	2	ブタ, 野ウサギ	—
	4 (<i>B. rangiferi</i>)	トナカイ, カリブー	あり
	5	げっ歯目	—
<i>B. canis</i>	—	犬 (イヌ科)	あり
<i>B. pinnipedialis</i>	?	鯨脚類 (アザラシ, アシカ)	あり
<i>B. ceti</i>	?	クジラ目 (クジラ, イルカ)	あり

その他, ヒトへの病原性がない, もしくは定かでないもの:

B. ovis (羊, 家畜伝染病), *B. neotomae* (げっ歯目), *B. microti* (ハタネズミ, アカギツネ)
B. inopinata (?)

ヒトの感染が報告されているおもなものは, その病原性の順に, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis* の4菌種である。*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* は *B. ovis* とともに家畜伝染病予防法による家畜伝染病である。“Brucella” は *B. melitensis* を発見した Sir David Bruce にちなんで命名された。

(文献1, 8より改変)

が発見されるに至った。ブルセラ属菌は細胞内寄生性のグラム陰性、偏性好気性短小桿菌で、芽胞や鞭毛はもたない^{1)~3)} (図1)。

ブルセラ属菌でヒトの感染が報告されているお

もなものは, その病原性の順に, *B. melitensis* (自然宿主:ヤギ, ヒツジ), *B. suis* (ブタ), *B. abortus* (ウシ), *B. canis* (イヌ) の4菌種である (表1)。その他, 海産ほ乳類の, *B. pinnipedialis* (アザラシ),

B. ceti (クジラ, イルカ) もきわめてまれだが数例の患者報告があり, 2012年, 米国 CDC (疾病予防管理センター) より注意が提示された⁷⁾。その他, 患者報告がないものでは, 家畜衛生学的に問題となる *B. ovis* や, げっ歯目の, *B. neotomae*, *B. microti* などがある (表 1)。分類学上は *B. melitensis* ただ 1 菌種であり, 本来は *B. melitensis* biovar *melitensis* などと表される。しかしながら, 病原性の違いなど 1 菌種表記には問題も指摘されていることから, 従来菌種名がおもに使用されている^{1)~4) 8)}。

B. melitensis, *B. suis*, *B. abortus* は米国 CDC によるバイオテロに用いられ得る病原体カテゴリー B であり, 家畜への影響の大きさからアグリテロ

に用いられ得る病原体としても注意が必要である。わが国では, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis* はバイオセーフティーレベル 3 であり, 病原体管理上は三種病原体 (所持には厚生労働大臣への届出と, 施設が三種病原体等取扱施設基準を満たしていることが必要。病院や病原体等の検査機関が業務にともない所持することになった場合, 届出は不要だが, 十日以内に滅菌または三種病原体取扱施設への譲渡が必要<<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou17/03.html>>) に指定され, その取扱い・所持が厳密に管理されている。また, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. ovis* は家畜伝染病に指定されている。

表 2 感染の特徴と菌種による病型

感染の特徴		
潜伏期	1 ~ 3 週間, ときに数カ月	
症状	軽症では単に風邪様。筋肉・骨格系に及ぼす影響が強い	
発熱	午後・夕方~朝 (間欠熱)。ときに 40 度以上 波状熱: 間欠熱 (数週間) - 症状好転 (1 ~ 2 週間) - 間欠熱	
病気の期間	数週間~数カ月, ときに年余にわたる 治療が不完全な場合, 再発を起こしやすい	
菌種による病型		
菌種	症状・特徴	
家畜ブルセラ菌 (<i>B. melitensis</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. abortus</i>)	急性型	発熱, 悪寒, 倦怠感, 背部痛, 関節痛 ときに, 脾腫, リンパ節腫脹, 肝腫大
	慢性型	1 年以上にわたる発熱のくり返し (波状熱), 脱力感や慢性的な疲労感
	その他の病型 (Complication)	骨関節症状 (もっとも多い。なかでも仙腸骨炎が一般的) 心内膜炎 (心内膜炎は死亡原因の大半を占める) 肺炎, 脾炎, 精巣炎, ブドウ膜炎, 中枢神経障害など
イヌブルセラ菌 (<i>B. canis</i>)	風邪様 (発熱, 悪寒, 倦怠感)。まれに家畜ブルセラ菌感染様の症状 感染に気がつかない (発症しない) ことも多い	

潜伏期は長い場合は半年以上になることもあり, 感染源が確定できないことがある。わが国では, 家畜ブルセラ菌感染では急性型, イヌブルセラ菌感染では原因不明熱として見つかることが多い。

(文献 1 ~ 3, 9, 10 より)

III 感染の特徴と症状

通常、潜伏期は1～3週間であるが、ときに数カ月になることもある。症状に特異的なものはなく、軽症では単に風邪様である。総じて他の熱性疾患に似ているが、筋肉・骨格系に及ぼす影響が強く、全身的な疼痛、倦怠感を示す。発熱はおもに午後～夕方にかけて起こり、ときに40℃以上となることもあるが、発汗とともに朝には解熱する。このような発熱パターン(間欠熱)が数週間続いた後、症状の好転が1～2週間認められるが、ふたたび発熱をくり返すことがある(波状熱)。病気の期間は数週間～数カ月、年余に及ぶこともあり、非常に再発しやすい感染症としても知られる^{11)~31) 9) 10)} (表2)。

家畜ブルセラ菌感染では臨床症状により、急性型、慢性型に分けられ、その他、局所症状を示す

表3 *B. melitensis* 感染患者 500 人にみられた症状

症状	患者数	%
倦怠感	473	95
発熱	464	93
痛み	457	91
発汗	437	87
関節痛・背部痛	431	86
悪寒	410	82
頭痛	403	81
食欲減退	388	78
体重減少	326	65
脊髄の圧痛	241	48
便秘	234	47
腹痛	225	45
関節炎	202	40
睡眠障害	185	37
リンパ節腫脹	160	32

その他、脾腫(125)、肝腫(97)、中枢神経障害(20)、精巣上体炎・精巣痛(62/男性290)など

ヒトに対してもっとも病原性の強い *B. melitensis* 感染でも、その症状はインフルエンザ様である。わが国の症例でも同様であるが、腸腰筋膿瘍を呈した1症例が報告されている。

(文献1より改変)

場合がある。急性型では、発熱、悪寒、倦怠感、関節痛などを示し、脾腫、リンパ節腫脹、肝腫大を認めることもある。慢性型では発症後1年以上にわたって脱力感や疲労感が続く。その他、ときおり合併症として認められる局所症状は多岐にわたるが、骨関節症状がもっとも多く、なかでも仙腸骨炎が一般的である。その他、吸入感染による肺炎や、経口感染にともなう胃腸症状、ブドウ膜炎、発疹などの皮膚症状、まれに中枢神経障害を示すこともある。生殖器官では精巣炎や副精巣炎が認められる。ヒトもそのリスクはあると考えられているが、動物では一般的な流産については、他の感染症と比較してどうかは定かでない。未治療時の致死率は5%程度とされ、その大半は心内膜炎である^{11)~31)} (表2)。

B. melitensis 感染者にみられたおもな症状を表3に示したが、倦怠感、発熱、発汗、関節痛、悪寒など、これといった特徴的な症状はみられず、ひどい風邪様であることがわかる。すなわち、患者がまれにしか報告されないわが国では症状のみからブルセラ症を疑うことは難しい^{11)~31)}。

B. canis はヒトへの感染力が弱く、感染・発症しても気がつかない、もしくは軽い風邪様の症状を示すにとどまることが多い。ただ、濃厚感染例では家畜ブルセラ菌感染様の症状を示すこともある^{11)~13)}。

IV 感染経路

家畜ブルセラ菌は非常に感染しやすく、10～100個の菌で感染しうる。もっとも一般的な感染源は加熱不十分な汚染した乳や乳製品の喫食である。ブルセラ菌は環境・食品中で長期間、生残り、感染源となることが知られており、特に汚染ナチュラルチーズ中では数カ月も生残する。その他、加熱不十分な汚染食肉の喫食、感染動物との直接接触によっても感染する。流産胎仔やその際の汚物でも適度な温度と水分があれば、その中で菌は数カ月生残り、他の動物やヒトへの感染源となり得る。動物のブルセラ病対策が進んだ国では、海外の流行地域からの帰国者、危険食品の喫食者、および一部のハイリスク集団(酪農家、獣

表4 主要な感染経路

家畜ブルセラ菌感染症：輸入感染症としての注意が必要
①加熱不十分な乳・乳製品，食肉：もっとも一般的
②直接接触（感染動物，流産時の汚物，死流産胎仔） －ハイリスク者：酪農家，と畜場従業員，獣医師
③吸入感染（毛皮，粉塵）
④検査室，実験室感染
⑤ヒト－ヒト感染（性交，授乳）：まれ
<i>B. canis</i> 感染症：国内で感染しうる
①直接接触や吸入感染 （流産時の汚物，死流産胎仔，膈分泌物，尿，精液） －ハイリスク者：獣医師，ブリーダー，イヌ取扱・販売業者
②検査室，実験室感染
<i>B. melitensis</i> , <i>B. abortus</i> 感染は汚染（加熱殺菌の不十分な）乳・乳製品の喫食によることもっとも多い。 <i>B. suis</i> は“と殺時”に感染することが多い。感染動物は流産・死産を起こすことが多く，畜産農家ではその汚物の処理を通じて感染することも多い。（文献1～3，11より）

医師，と畜場従業員，実験室感染）に散発的に認められる。ヒト－ヒト感染は，授乳，性交，臓器移植による事例が報告されているがきわめてまれである^{11)~31)}（表4）。

イヌブルセラ菌は国内感染が主で，流産時の汚物や死流産胎仔中には非常に多く排菌され，主要な感染源となる。また，尿や精液中にも排菌され，一般飼育者の感染源になり得る³¹⁾¹¹⁾（表4）。

ブルセラ菌は安全キャビネットが一般的になるまでは，実験室・検査室感染がもっとも多かった細菌であった¹⁴⁾。通常の検査室で行う操作，すなわち血液培養など増菌培養，培養液の攪拌や遠心，継代培養，カタラーゼテストや，その他の生化学的性状検査を実施するだけでも，エアロゾルの発生や，予期せずこぼしてしまう危険性を高める。ただ，報告されている感染経路については試験管や血液培養ボトルの破損によるエアロゾルが原因と考えられるものは約20%程度と，思いのほか低い。大半は，たとえば培養プレートの臭いをかぐ，生菌を安全キャビネットの外で取扱う，手袋やマスクなどを着けていない，口でピペット操作をするなど不適切で危険な取扱いをしたことに起因している。特に，コロニー（培地）にお

いを嗅ぐという行為は生育している菌に関する情報を与えてくれる場合もあり，日常的に行われている可能性もあるが，このような行為は検査担当者に感染リスクをもたらす，予防投薬を行う結果に至る¹²⁾¹⁵⁾。

V 疫学

世界中で毎年50万人を越える家畜ブルセラ菌感染患者が新規に発生している。本症のおもな分布域は，中国，西アジア，中東，地中海地域，およびアフリカとラテンアメリカの一部等で，これらの地域では患者数は増加傾向にあるとされる。流行地で報告される発生数には大きな幅があるが，動物に対するブルセラ症対策が行われていない地域での報告が多い。すなわち，家畜での発生が多い地域に一致して患者も多くなっている^{11)~4)}。

中国では近年，主として*B. melitensis*による患者・患畜が急増し，報告患者は東北部を中心に年間3.5万人を越えている。新規患者は毎年4～8月に多いが，これは，ヒツジのように季節繁殖をする動物が原因である場合，患者発生はその出産シーズンの1～2カ月後にピークを迎えることによる¹⁶⁾。

家畜の発生が少ない米国でも患者が発生している。1940年代は *B. abortus* 感染者が多かったが、牛乳の殺菌処理の徹底などを含む根絶プログラムにより大幅に減少した。しかし、現在も毎年100名程度の患者が出ており、主としてメキシコなどから輸入・持ち込みされたソフトタイプのチーズによると思われる *B. melitensis* 感染者が多い。また米国では、野生豚（いわゆるイノシシは米国にはいない）の *B. suis* 感染、エルクやバイソンの *B. abortus* 感染など、野生動物の感染がヒトや家畜への感染源になりうるとして問題となっている¹⁷⁾。

一方、国内家畜対策が進み、家畜で発生のみられない台湾でも2011年に33年ぶりとなる患者が輸入例として5例報告された。うち3例はマレーシアのペナン島で加熱不十分なヤギ乳を喫食したことにより感染している¹⁸⁾。

ブルセラ症がわが国の感染症法により全数届出（四類感染症）となる以前（～1999年3月31日）の患者報告を文献調査したところ¹⁷⁾¹⁹⁾、最初の報告は1933年に西川が報告した京都での *B. abortus* 感染と思われる女性の症例であった。わが国では1916年に最初に菌が分離されて以降、牛の *B. abortus* 感染が広く流行していた⁵⁾。患者は牛乳を温めて飲用していたが殺菌目的の加熱は行っておらず、そのため感染したと考えられた。その後、1962年の鶴見の報告によると、1933～1962年のあいだに51例の症例報告があり、その内訳は、国外感染・発症後帰国が3例、検査等に従事した実験室感染が13例、その他、国内で感染したと推定されるものが35例であった。また、このうち6例が死亡したとされている。症状は、波状熱、全身倦怠感などで、死亡例は、心内膜炎、敗血症、脊椎ブルセラ症などであった。

その後も報告が散見されるが特異な感染事例として、母親が妊娠中にペルーで発症・治療（3週間の投薬）を受けた後、日本国内でその子どもが発症するといった症例（1995年）が報告されている。患児は1歳7カ月のときに発症（高熱）し、血液および骨髓液から *B. abortus* が分離された。異常早産・低出生体重ではあったが、出生時からそれまでには持続する発熱など明らかな異常はみ

られていなかった。ヒト-ヒト感染が疑われるが、その感染経路が先天性か経乳感染かは明らかにはなっていない。

B. melitensis は過去～現在まで国内の家畜で感染報告はないため、患者も海外で感染した輸入症例として報告されている。インドで感染した患者のケース（1980年）では検査担当者が検査室感染を起こしている。さらに1998年には、夫婦で感染する、まれな事例が報告されている。夫はイラク旅行の1カ月後より発症し、発症後3カ月目に検査したところ、抗体陽性であったことからブルセラ症と診断された。妻は夫の発症から約2カ月遅れて発症したが、妻には海外渡航歴がなく、本症例も非常にまれとされているヒト-ヒト感染であったと推定されている²⁰⁾。

感染症法により四類感染症として、診断した医師に全数届出が義務づけられた1999年4月1日以降、ブルセラ症患者は19例が届出られている³⁾（表5）。うち7例は家畜ブルセラ菌感染、12例は *B. canis* 感染である。現在では、家畜衛生対策（摘発と淘汰、輸入検疫など）の徹底によりわが国の家畜は清浄化している⁵⁾ ことから、家畜ブルセラ菌感染7例（*B. melitensis* 感染5例、*B. abortus* 感染2例）はすべて輸入症例である³⁾。

近年の特徴として、日本在住の外国人がブルセラ症流行地域である母国に帰国した際に感染してくるケースなど、外国人の症例が多い。症状は、一般的な発熱、頭痛、脾腫などだが、1例、特殊なケースとして腸腰筋膿瘍を示している¹⁵⁾。感染経路は乳製品の喫食が多いが吸入感染が疑われるものもある。*B. melitensis* 感染例ではいずれも菌が分離されているが、*B. abortus* 感染2例では菌が分離されていない。これは、*B. abortus* が培養時にCO₂を必要とするため一般的な血液培養（好気条件と嫌気条件）では菌の増殖が悪く、分離されにくいためと思われる。

残り12例は国内のイヌによる *B. canis* 感染である³⁾。わが国では1970年代に実験用イヌ繁殖施設でイヌブルセラ病が流行し、その後、ペット用のイヌにも流行が拡大した。結果、近年でもペット用イヌ繁殖施設では時折流行が認められて

表5 わが国の届出患者：1999年4月～2012年3月

家畜ブルセラ菌感染								
診断年	年齢	報告都道府県	推定感染地	推定感染経路	症状	血清抗体検査*		菌分離
						BA	BC	
2005	30代	東京都	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>
2006	50代	東京都	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	20代	北海道	エジプト (Visit from)	経口 (ミルク)	発熱、頭痛 (エジプトにて <i>B. abortus</i> 感染・治療歴あり) — 再発	陽性	—	(—)
2008	60代	静岡県	ペルー (Visit from)	経口	発熱、腰背部痛、全身倦怠感	陽性	—	(—) (PCR法で <i>B. abortus</i> 陽性)
2009	10代	東京都	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	40代	愛知県	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>
2011	40代	新潟県	中国 (Homecoming to)	不明 (吸入疑い)	発熱、頭痛、後頭部痛	陽性	—	(+) <i>B. melitensis</i>
イヌブルセラ菌感染								
診断年	年齢	報告都道府県	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	40代	東京都	東京都?	ペットの犬	発熱、食欲不振	—	陽性	(—)
2005	10代	長野県	長野県?	不明	発熱、筋肉痛、腹痛	—	陽性	(—)
2006	20代	長野県	(イタリア?)	不明	発熱、筋肉痛	—	陽性	(—)
2006	60代	長野県	長野県	不明	発熱、脾腫	—	陽性	(—)
2006	70代	宮城県	宮城県	不明	発熱、中枢神経症状	—	陽性	(—)
2007	40代	大阪府	大阪府	イヌ	リンパ節腫脹、倦怠感	—	陽性	(—)
2008	10代	埼玉県	埼玉県	飼い犬	発熱、関節炎、筋炎	—	陽性	(—)
2008	70代	愛知県	愛知県	繁殖犬	発熱、脾腫、肝腫大	—	陽性	(+) <i>B. canis</i>
2008	40代	愛知県	愛知県	繁殖犬	発熱	—	陽性	(+) <i>B. canis</i>
2009	30代	埼玉県	埼玉県	繁殖犬	(無症状病原体保有者として届出)	—	陽性	(—)
2010	60代	栃木県	栃木県	不明	発熱	—	陽性	(—)
2011	60代	島根県	島根県	不明	発熱、中枢神経症状(脳脊髄炎)	—	陽性	(—)

*試験管内凝集反応。抗原として *B. abortus* (BA) または *B. canis* (BC) 死菌体を使用。BA は 40 倍、BC は 160 倍以上が陽性

家畜ブルセラ菌感染 7 例はすべて輸入症例である。日本在住の外国人がブルセラ症流行地域である母国に帰国した際に感染してくるケースなど、外国人の症例が多い。*B. canis* 感染 12 例は国内のイヌから感染したと考えられる。

PCR：ポリメラーゼ連鎖反応

(文献3より改変)

いる。そのため現在、国内のイヌの3～5%が抗体陽性、すなわち感染歴をもっている⁶⁾¹⁷⁾。患者は大半が不明熱で抗体陽性のみによる診断だが、イヌ繁殖施設でのブルセラ病流行による従業員の急性感染例では菌も分離されている⁶⁾¹²⁾¹³⁾。

VI 検査・診断

臨床症状と感染機会の有無、細菌学的検査、血清学的検査、遺伝子の検出を組み合わせて行われる(図2)。

1. 抗体検査

ブルセラ症は多くの場合、慢性経過をたどり、有症状期(風邪様症状など)でもすでに抗体を保有していることが多い。また、細胞内寄生菌であるため“抗体陽性=保菌が疑われる”とも考えられ、抗体測定の診断意義はきわめて大きい^{11~3)}。そのため日常的な診断では多くの場合、まず血清診断

として試験管内凝集反応(SAT)³⁾¹⁷⁾が行われる。smooth-LPSをもつ家畜ブルセラ菌に対する抗体は*B. abortus*の死菌体、*B. canis*に対する抗体には*B. canis*の死菌体を用いる。野兎病菌、エルシニア菌、コレラ菌などとの交差反応に注意が必要であり、特に*Yersinia enterocolitica* O9と家畜ブルセラ菌はほぼ100%交差反応する。最近、ごくまれに日和見感染を起こす*Ochrobactrum intermedium*との交差反応も確認された。SATによる抗体検査は民間の臨床検査機関に保険適用で依頼が可能である³⁾。

2. 菌の分離同定

菌分離のための検査材料としては発熱時の、なるべく抗生物質投与前(急性期)の血液、リンパ節生検材料、骨髓穿刺材料などの無菌的に採取した組織、体液を用いる。菌数が少ないことが多いため増菌培養を実施する必要がある^{11~4)}。その場

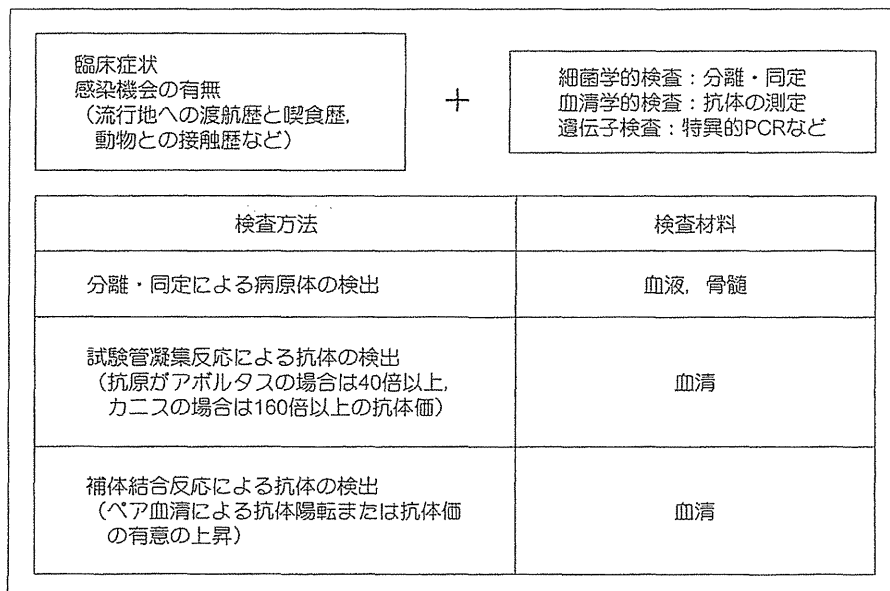


図2 ブルセラ症の診断と感染症法における届出基準

試験管凝集反応(SAT)による抗体の検出が診断では重要で、SATによる抗体検査は民間の臨床検査機関に保険適用で依頼が可能である。現状、補体結合反応は患者診断には利用されていない。

PCR：ポリメラーゼ連鎖反応

(厚生労働省ホームページ：「感染症法に基づく医師の届出について」 < <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/01-04-28.html> > より)

SAT (試験管内凝集反応)

合、*B. abortus* は生育に CO₂ を必要とすることから通常培養とともに炭酸ガス培養も実施する必要がある。最低 21 日間の培養が推奨されており、週に 2 回程度、分離培地で菌の分離を確認する。サブカルチャーでも 3 日以上で直径 1.5 ~ 2 mm と発育はやや遅い(図 1)。疑わしいコロニーはグラム染色を行い、その他、運動性・生化学的性状の検査を実施する。また、いわゆる生化学的性状検査キットや血液培養自動分析装置も菌の同定に用いられるが、まれに起こる他の菌であるとの誤判定は検査室感染のリスクを高めることになる。

3. 遺伝子検出

PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法を用いたブルセラ属菌特異的遺伝子の検出も診断や分離菌の同定に用いられる。ただし、血液からの遺伝子検出は基本的に菌血症を起こしていないと検出できな

いため、遺伝子検査が陰性であっても感染は否定できない。あくまでも補助的検査か分離菌の同定を目的として用いられるべきである。*B. abortus* 細胞表面タンパク抗原 BCSP31 をコードする遺伝子を標的とした PCR がもっとも広く用いられている²¹⁾。これは、すべてのブルセラ属菌に保存されている。その他、16S ribosomal RNA 遺伝子や IS711 領域遺伝子なども用いられる。我々は BCSP31 と 2 種類の外膜タンパク (OMP2, OMP31) 遺伝子を標的にした PCR を組み合わせて、ヒトに感染しうる主要 4 菌種を鑑別している^{3) 22)}。

VII 治療

2 剤併用が原則である^{1)~3) 23)} (表 6)。単剤での治療や治療が不十分な場合には再発のリスクが非常に高くなる。たとえば、ドキシサイクリン

表 6 ブルセラ症の推奨治療法

1. 成人：2 剤併用が原則 (テトラサイクリン系+アミノグリコシド系 / リファンピシン), 3 剤併用もあり	
ドキシサイクリン 100mg × 2 回 / 日, 6 週間	+ ゲンタマイシン (5 mg/kg/ 日, 7 ~ 10 日間, 静注 / 筋注) ストレプトマイシン (1 g × 1 回 / 日, 2 ~ 3 週間, 筋注) リファンピシン (15mg/kg (600 ~ 900mg) / 日, 6 週間, 経口) 上記のいずれかとの 2 剤併用
2. 8 歳未満の子ども：基本は ST 合剤	
トリメトプリム (8 mg/kg/ 日) + スルファメトキサゾール (40mg/kg/ 日) × 2 回 / 日, 6 週間	+ ゲンタマイシン (5 mg/kg/ 日, 7 ~ 10 日間, 静注 / 筋注) ストレプトマイシン (30mg/kg/ 日, 2 ~ 3 週間, 筋注) リファンピシン (15mg/kg/ 日, 6 週間, 経口) 上記のいずれかとの 2 剤併用
3. 妊婦	
リファンピシン (15mg/kg (600 ~ 900mg) / 日, 少なくとも 45 日間以上 または、トリメトプリム (8 mg/kg/ 日) + スルファメトキサゾール (40mg/kg/ 日) × 2 回 / 日, 6 週間	

ドキシサイクリン+ゲンタマイシンがもっとも推奨されている。可能ならば、ドキシサイクリン+ゲンタマイシン+リファンピシンの 3 剤併用がもっとも効果があるとされる。使用が長期間になるため副作用に対する注意が特に必要である。治療中断や中止は再発リスクを格段に高める。

(文献 1, 23 より改変)

PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法	DOXY (ドキシサイクリン)
RFP (リファンピシン)	SM (ストレプトマイシン)
GM (ゲンタマイシン)	ST (トリメトプリム-スルファメトキサゾール)
MIC (minimum inhibitory concentration ; 最小発育阻止濃度)	

(DOXY) 単独使用時の再発率は 10～20%にのぼるとされる。1986年のWHO 専門家委員会による成人に対する推奨療法は DOXY + リファンピシン (RFP) であった²¹⁾。しかし、RFP は血中からの DOXY のクリアランスを早め、脊椎炎などの局所合併症に対する治療効果が DOXY + ストレプトマイシン (SM) より劣っている。事実、エジプトで骨関節症状をともなう患者に DOXY + RFP を用いたところ、高率に再発がみられたとの報告もある²⁴⁾。ただ、SM には治療の中断や変更をもたらすような副作用もあることから、現在は DOXY + ゲンタマイシン (GM) が第一選択として推奨されている¹⁾²³⁾。しかしながら RFP は経口で使用できることから、その利便性も無視できない。いずれにしても、2剤 (DOXY + GM/RFP) もしくは3剤 (DOXY + GM + RFP) 併用 (より望ましい) が原則である^{1) 23)}。小児には ST (トリメトプリム-スルファメトキサゾール) 合剤 + GM の併用、妊婦には RFP または ST 合剤が推奨されている¹⁾。

ブルセラ属菌の *in vitro* における薬剤抵抗性に関しては、トルコにおける、セフトリアキソン、SM、RFP、クウェートやメキシコでの、RFP、ST 合剤などいくつかの報告があるが、感受性の低下したものの割合は問題となるほどには多くない。ただ 2012 年の報告²⁵⁾ に、1999～2007 年のあいだにエジプトで分離されたブルセラ属菌 355 株 (主として *B. melitensis*) に関するものがある。報告では、DOXY、GM、SM などに対する感受性の低下は認められなかったものの、2001 年以降、RFP に対して感受性の低下した株が増加し、218/270 (81%) が MIC (最小発育阻止濃度: minimum inhibitory concentration) ≥ 2 を示していた (通常は MIC ≤ 1)。これが世界中に普遍的な事象ではないとも考えられるが、RFP の使用時には注意が必要かもしれない。

VIII おわりに

ブルセラ症は家畜衛生対策が進んでいるわが国では稀少感染症であるが、世界ではいまだに重要な人獣共通感染症のひとつである。特に家畜ブル

セラ菌感染症については今後も輸入感染症として注意しておく必要があり、ブルセラ症の流行地域への渡航歴があり不明熱を示す患者については本症も疑いうる。渡航先での喫食歴、動物との接触歴など、感染機会の有無について詳細に把握することが重要である。また、ブルセラ症を疑いうる患者検体の検査依頼時には、その旨、検査室に連絡し、取扱いに注意を促すことが必要だろう。

万一、ブルセラ症と診断された (後日診断が確定する場合が多いが) 患者検体取扱時に曝露事故があった場合は、直接、病原体を取扱っていた者は予防投薬を受けたほうがよい。同室内にいた者については曝露の程度により判断するが、健康状態のフォローアップが必要である。予防投薬では通常、DOXY + RFP の 3 週間投与が用いられているが、事故直後ならびに 2 ないし 3 週間後の血清抗体検査の結果、抗体価の上昇が認められれば、さらに 3 週間、投薬を継続する。その後、定期的に最低 3 カ月間の血清抗体の検査や、必要に応じて血液培養など、細菌学的検査を実施する。感染の疑いが濃厚なときは事故直後から授乳・性交等は避ける必要がある。いずれにしても、検査に安全キャビネットを使用し、基本的な取扱いを守れば、それほど実験室・検査室感染のリスクは高くない。

文 献

- 1) Brucellosis in humans and animals. WHO/CDS/EPR/2006.7. WHO. 2006 < http://www.who.int/csr/resources/publications/deliberate/WHO_CDS_EPR_2006_7/en/ > .
- 2) Brucellosis. CDC. 2008 < <http://emergency.cdc.gov/agent/brucellosis/> > .
- 3) ブルセラ症 1999 年 4 月～2012 年 3 月. “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: 183-185, 2012 < <http://www.nih.go.jp/niid/ja/brucella-m/brucella-iasrtpc/2342-tpc389-j.html> > .
- 4) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2011. OIE. 2011 < <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/>

- terrestrial-manual/access-online/ > .
- 5) 星野尾歌織：国内の家畜ブルセラ病。“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 : 191-192, 2012 < <http://www.nih.go.jp/niid/ja/typhi-m/iasr-reference/2120-related-articles/related-articles-389/2323-dj3895.html> > .
 - 6) Kimura M, et al: Evaluation of a microplate agglutination test (MAT) for serological diagnosis of canine brucellosis. *J Vet Med Sci* 70 : 707-709, 2008.
 - 7) Sears S, et al: Human exposures to marine *Brucella* isolated from a harbor porpoise - Maine, 2012. “Morb Mortal Wkly Rep”. Centers for Disease Control and Prevention 61 : 461-463, 2012.
 - 8) Pappas G : The changing *Brucella* ecology : novel reservoirs, new threats. *Int J Antimicrob Agents* 36 : S8-S11, 2010.
 - 9) Pappas G, et al: The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 6 : 91-99, 2006.
 - 10) Memish ZA, Balkhy HH: Brucellosis and international travel. *J Travel Med* 11:49-55, 2004.
 - 11) Greene CE, Carmichael LE : Canine brucellosis. “Infectious diseases of the dog and cat” . Greene CE, ed (3rd ed). Elsevier, Inc., Canada. p369-381, 2006.
 - 12) 野村篤史ほか: *Brucella canis* 感染国内症例一名古屋市。“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 33:189, 2012 < <http://www.nih.go.jp/niid/ja/typhi-m/iasr-reference/2120-related-articles/related-articles-389/2321-dj3893.html> > .
 - 13) Nomura A, et al: Human *Brucella canis* infection diagnosed by blood culture. *Emerg Inf Dis* 16 : 1183-1185, 2010.
 - 14) Sewell DL : Laboratory-associated infections and biosafety. *Clin Microbiol Rev* 8 : 389-405, 1995.
 - 15) 森田さゆりほか: 腸腰筋膿瘍を呈した *Brucella melitensis* 輸入感染症例。“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 : 187-188, 2012 < <http://www.nih.go.jp/niid/ja/typhi-m/iasr-reference/2120-related-articles/related-articles-389/2320-dj3892.html> > .
 - 16) 国立感染症研究所国際協力室: 中国のブルセラ症疫学状況。“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 : 192-193, 2012 < <http://www.nih.go.jp/niid/ja/typhi-m/iasr-reference/2120-related-articles/related-articles-389/2325-dj3896.html> > .
 - 17) 今岡浩一: ブルセラ症の最近の話題. *モダンメディア* 55 : 76-85, 2009.
 - 18) 今岡浩一ほか: 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—。“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 : 193-194, 2012 < <http://www.nih.go.jp/niid/ja/typhi-m/iasr-reference/2120-related-articles/related-articles-389/2324-dj3897.html> > .
 - 19) 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—。“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 : 186-187, 2012 < <http://www.nih.go.jp/niid/ja/typhi-m/iasr-reference/2120-related-articles/related-articles-389/2319-dj3891.html> > .
 - 20) Kato Y, et al: Brucellosis in a returned traveler and his wife: probable person-to-person transmission of *Brucella melitensis*. *J Travel Med* 14 : 343-345, 2007.
 - 21) Baily GG, et al : Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg* 95 : 271-275. 1992.
 - 22) Imaoka K, et al : Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. *Jpn J Infect Dis* 60 : 137-139, 2007.
 - 23) Skalsky K, et al: Treatment of human brucellosis : systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Br Med J* 336 : 701-704, 2008.
 - 24) El Miedany YM, et al : Human brucellosis : do we need to revise our therapeutic policy ? *J Rheumatol* 30 : 2666-2672, 2003.
 - 25) Abdel-Maksoud M, et al : *In vitro* antibiotic susceptibility testing of *Brucella* isolates from Egypt between 1999 and 2007 and evidence of probable rifampin resistance. *Ann Clin Microb Antimicrob* 11 : 24, 2012.

Cutting Edge: *Brucella abortus* Exploits a Cellular Prion Protein on Intestinal M Cells as an Invasive Receptor

Gaku Nakato,^{*,†} Koji Hase,^{*,†} Michio Suzuki,[‡] Masanobu Kimura,[‡] Manabu Ato,[§] Misaho Hanazato,^{*,†} Minoru Tobiume,[¶] Motohiro Horiuchi,^{||} Ryuichiro Atarashi,[#] Noriyuki Nishida,[#] Masahisa Watarai,^{**} Koichi Imaoka,[‡] and Hiroshi Ohno^{*,†}

Brucella abortus is a Gram-negative bacterium causing brucellosis. Although *B. abortus* is known to infect via the oral route, the entry site in the gastrointestinal tract has been unclear. We found that *B. abortus* was selectively internalized by microfold cells (M cells), a subset of epithelial cells specialized for mucosal Ag uptake. During this process, colocalization of cellular prion protein (PrP^C) and *B. abortus* was evident on the apical surface as well as in subapical vacuolar structures in M cells. Internalization of *B. abortus* by M cells of PrP^C-deficient (*Prnp*^{-/-}) mice was greatly reduced compared with that in wild-type mice. Furthermore, an oral infection study revealed that translocation of *B. abortus* into the Peyer's patch was significantly lower in *Prnp*^{-/-} than in wild-type mice. These observations suggest that orally infected *B. abortus* invades the host through M cells by using PrP^C on the apical surface of M cells as an uptake receptor. *The Journal of Immunology*, 2012, 189: 1540–1544.

The mucosal surface of the gastrointestinal tract is continuously exposed to vast numbers of commensal microorganisms and sporadically to pathogens. In this context, GALT such as Peyer's patches (PPs) serve as sentinels for the recognition and initiation of the immune responses against those microbes (1). One of the unique features of GALT is the lack of afferent lymphatic ducts, which necessitates the sampling of luminal Ags across the mucosal epithelium. The luminal side of the GALT lymphoid follicles is covered by the dome-shaped follicle-associated epithelium (FAE), within which are microfold cells (M cells). M cells are a unique subset of epithelial cells that actively transport luminal macromolecules through transepithelial membrane

traffic, a process referred to as transcytosis (2, 3). Luminal contents transported via M cells are in turn captured by dendritic cells (DCs) residing beneath M cells to initiate mucosal immune responses, which ultimately leads to the production of Ag-specific IgA by B cells (1). Ag delivery through M cells is thus important for host defense. In contrast, the M cell-dependent Ag uptake process can be exploited by diverse pathogenic microbes, including *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) and *Yersinia enterocolitica* as a portal for host invasion (4). Proteins and/or oligosaccharides on the M-cell apical surface, including GPI-anchored proteins (5), are postulated to serve as receptors for these pathogens (6). In this regard, we have recently shown that the GPI-anchored protein gp2 (GP2) is specifically expressed on the apical plasma membrane of M cells and serves as an endocytic receptor for *S. Typhimurium* and *Escherichia coli* (7). We have also discovered that another GPI-anchored protein, cellular prion protein (PrP^C), is predominantly expressed on the M-cell apical surface among the intestinal epithelial cells (8), suggesting its role as a similar endocytic receptor.

Brucella abortus is a Gram-negative bacterium that causes brucellosis, a major zoonotic infection. Brucellosis manifests as undulant fever, arthritis, endocarditis, and meningitis in humans, as well as abortion and infertility in domestic and wild animals. *B. abortus* is a facultative intracellular pathogen that replicates within both phagocytic and nonphagocytic host cells (9). The organism is taken up by macrophages through a process involving initial movement on the cell surface and generalized membrane ruffling, leading to swimming internalization (10). The internalized *B. abortus* are enclosed by phagosomes with accumulated lipid rafts to form replicative vacuoles that do not fuse with lysosomes (11). The Type IV secretion system (T4SS) encoded by the *VirB* genes appears to

*Laboratory for Epithelial Immunobiology, Research Center for Allergy and Immunology, RIKEN, Kanagawa 230-0045, Japan; †Department of Supramolecular Biology, Graduate School of Nanobiosciences, Yokohama City University, Kanagawa 230-0045, Japan; ‡Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan; §Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan; ¶Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan; ||Laboratory of Prion Diseases, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Hokkaido 060-0818, Japan; *Department of Molecular Microbiology and Immunology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki 852-8523, Japan; and **Department of Veterinary Public Health, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515, Japan

Received for publication November 28, 2011. Accepted for publication June 11, 2012.

This work was supported in part by Grants-in-Aid for Young Scientists (B) (to K.H.), Scientific Research (B) (to H.O.), Scientific Research on Innovative Areas (to H.O.), and

Scientific Research in Priority Areas (to H.O. and K.H.) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, and Takeda Science Foundation (to K.H.).

Address correspondence and reprint requests to Dr. Hiroshi Ohno, Laboratory for Epithelial Immunobiology, Research Center for Allergy and Immunology, RIKEN, 1-7-22 Suehiro, Tsurumi, Kanagawa 230-0045, Japan. E-mail address: ohno@rcai.riken.jp

Abbreviations used in this article: DC, dendritic cell; FAE, follicle-associated epithelium; GP2, gp2; h, human; Hsp60, heat shock protein 60; m, mouse; M cell, microfold cell; PP, Peyer's patch; *Prnp*^{-/-}, PrP^C-deficient; PrP^C, cellular prion protein; T4SS, Type IV secretion system; WT, wild-type.

Copyright © 2012 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/12/\$16.00

be essential for replicative vacuole formation, because phagosomes containing a *virB* mutant strain of *B. abortus* fuse with lysosomes to form conventional phagolysosomes (12). The inhibition of phagolysosome formation by T4SS has thus been implicated as a mechanism for the intracellular survival of *B. abortus*. Of interest, *B. abortus* expresses heat shock protein 60 (Hsp60) on its cell surface, probably via T4SS-mediated secretion. The surface-expressed Hsp60 binds to the PrP^C on macrophages (13). This interaction facilitates macropinosome formation and subsequent intracellular replication of *B. abortus* within macrophages. Although the above-mentioned *in vitro* studies have revealed the intracellular survival mechanisms of *B. abortus*, the *in vivo* infectious route of this bacterium is still unclear. *B. abortus* is classified as a food-borne pathogen; however, it remains to be elucidated how this bacterium can translocate across the mucosal epithelial barrier.

In this article, we report that *B. abortus* is efficiently internalized only into M cells among intestinal epithelial cells, suggesting a role for M cells as an entry portal for this bacterium after oral infection. We also observed colocalization of PrP^C and *B. abortus* on the apical surface of M cells. Importantly, the translocation of *B. abortus* into PPs after oral administration was significantly reduced in PrP^C-deficient mice. These observations indicate that PrP^C on M cells serves as a major uptake receptor for *B. abortus* during oral infection.

Materials and Methods

Animals

BALB/c and C57BL/6 mice were purchased from CLEA Japan. *Prnp*^{-/-} mice (14) were backcrossed onto a C57BL/6 background. Other PrP^C-deficient (*Prnp*^{-/-}) mice (RBRC00437) were provided by RIKEN BioResource Center through the National BioResource Project of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (15). These mice were maintained under specific pathogen-free conditions. Animal experiments were approved by the Animal Research Committees of all institutions.

Recombinant mouse prion protein preparation

To obtain constructs for fusion proteins of mouse (m) PrP^C (mPrP^C) with the Fc segment of human (h) IgG₁ (hIgG₁) (mPrP-Fc), cDNA prepared from FAE was used as a template for PCR amplification. Primers used were as follows: 5'-CGGGATCCACCATGGCGAACCTTGGCTACT-3' (forward) and 5'-CGCTCGAGGGATCTTCTCCCGTCGTAATAG-3' (reverse) cDNA fragments were inserted into the BamHI/XhoI cloning sites of a pcDNA3 expression vector (Invitrogen) containing a fragment encoding the Fc segment of hIgG₁, to obtain mPrP-Fc. Recombinant protein was prepared as described (7).

In vitro Brucella spp. binding assay

A total of 0.25 μg mPrP-Fc or control hIgG-Fc proteins were immobilized in 96-well flat-bottom plates (Nunc) by incubation overnight at 4°C. After washing, the wells were incubated with 1% BSA in PBS for 2 h for blocking, and then incubated for 2 h with 1 × 10⁶ CFUs *B. abortus* 544 at 25°C. For Ab blocking, *B. abortus* were incubated with 0.5 μg/ml anti-Hsp60 Ab (Enzo Life Science) or isotype-matched control Ab (Jackson Immunolaboratory) for 15 min before binding assay. After washing five times with sterile PBS, genomic DNA was extracted from bound bacteria with a DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Quantitative PCR was performed to quantify copy numbers of *bcp31* (16), using the SYBR Premix Ex Taq and the Thermal Cycler Dice Real Time System (TAKARA).

Ligated intestinal loop assay

Mice were anesthetized with Avertin (0.4 mg/g) and placed on a warming pad during the procedure. Next, 50 μg/ml mPrP mAb (SAF-32; Cayman Chemical) or isotype-matched control IgG (BD Biosciences) was injected into the ligated intestinal loop containing PPs. After incubation for 30–60 min, PPs were excised and fixed with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) for 1 h at 4°C. Intracellular localization of primary Abs was probed with 10 μg/ml Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG Ab (Molecular Probes). The

specimens were further treated with 20 μg/ml Rhodamine *Ulex europaeus* agglutinin-1 (UEA-1) (Vector Laboratories).

To assess the blocking effect of anti-Hsp60 Ab on *B. abortus* uptake by M cells, 1 million GFP-*B. abortus* (17), *B. abortus* 544, and *B. abortus* 544 pretreated with anti-Hsp60 Ab were injected into a ligated intestinal loop of C57BL/6 or *Prnp*^{-/-} mice (14). After incubation, whole-mount specimens of PPs were immunostained with *B. abortus*-specific rabbit antisera (1:100 dilution) (17), together with anti-PrP mAb (44B1; Ref. 18) or GP2 mAb, followed by Alexa Fluor 594-conjugated anti-rat IgG. The specimens were analyzed with a DeltaVision Restoration deconvolution microscope (Applied Precision).

Evaluation of oral infection

C57BL/6 or *Prnp*^{-/-} mice (four mice per group), 8–10 wk old were anesthetized with isoflurane or 50 mg/kg sodium pentobarbital. Then, mice were inoculated intragastrically by gavage with 0.2 ml 0.1 M sodium bicarbonate containing 1 million *B. abortus* 544. After 4 h, PPs were dissected and incubated at 25°C in sterile PBS containing 20 μg/ml gentamicin for 30 min. The tissues were weighed and homogenized in sterile PBS. The homogenates were plated on Thayer–Martin Selective Agar (BD) to determine CFUs.

Statistics

Statistical analysis was performed with the Mann–Whitney *U* test. Differences were considered significant at *p* < 0.01.

Results and Discussion

PrP^C on M cells serves as an endocytic receptor

Given that PrP^C is a GPI-anchored protein highly expressed on the M-cell apical surface (8) and that diverse infectious agents often use GPI-anchored proteins to gain entry into host cells (5), we hypothesized that it serves as an endocytic receptor for Ag sampling by M cells. This possibility was first examined by means of an *in vivo* Ab-uptake assay. We injected an anti-PrP mAb into a ligated intestinal loop containing PPs, to explore whether the mAb bound to PrP^C on the M-cell surface is internalized into M cells. The subcellular localization of the mAb was analyzed by deconvolution microscopy to obtain high-resolution images. Serial X–Y images demonstrated that the PrP mAb was efficiently internalized into vesicular structures in the cytoplasm of M cells (Fig. 1A, 1B). Internalization of the PrP mAb was observed only in M cells, and not in the surrounding FAE cells. It is unlikely that the Ab uptake was mediated by a nonspecific pinocytotic pathway, because no internalization of an isotype-matched

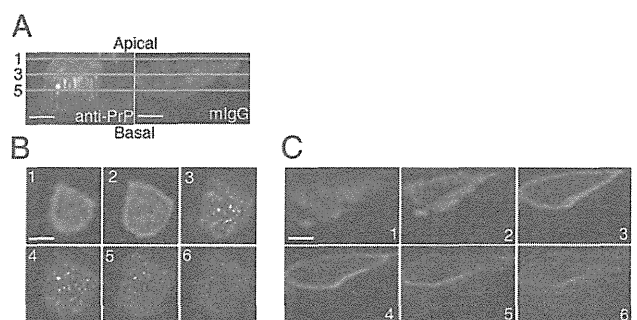


FIGURE 1. Anti-PrP mAb is taken up by murine PP M cells. A PrP mAb or isotype-matched control IgG (mIgG) was injected into the ligated intestinal loop. After incubation, PPs excised from the loop were subjected to whole-mount staining with fluorescent-conjugated secondary Ab to visualize the PrP mAb (green). The specimen was counterstained with UEA-1 (red) and then analyzed using DeltaVision deconvolution microscopy. (A) The X–Z image of the M cells. (B and C) Serial X–Y images from the apical (1) to the basal plasma membranes (6) of M cells shown in (A). The positions of X–Y images (1), (3), and (5) are indicated in (A). Scale bars, 5 μm.

control IgG took place at all (Fig. 1A, 1C). These observations suggest that PrP^C on M cells can serve as an endocytic receptor for the luminal constituents to which it can bind.

B. abortus are selectively taken up by M cells through interaction with PrP^C

Because PrP^C plays an important role in the uptake of *B. abortus* by macrophages (13), we examined whether this is also the case in M cells. Our in vitro binding assay using a rmPrP^C-hgG-Fc fusion protein (mPrP^C-Fc) confirmed the interaction between PrP^C and *B. abortus* (Fig. 2A). To further examine the interaction between PrP^C and Hsp60 on *B. abortus*, the bacteria were pretreated with anti-Hsp60 Ab before the binding assay. The binding efficiency of *B. abortus* to mPrP^C-Fc was profoundly impaired in anti-Hsp60-treated *B. abortus* compared with that in bacteria not treated or pretreated with isotype-matched control Ab. (Fig. 2B).

We then asked whether PrP^C expressed on M cells binds the bacterium. The ligated intestinal loop assay verified that *B. abortus* bound exclusively to M cells among epithelial cells in FAE and villous regions (Fig. 2C and data not shown). In addition, the X-Z images indicated that *B. abortus* were internalized into the cytoplasm of M cells, where colocalization of the *B. abortus* and PrP^C was evident (Fig. 2D). These results support the idea that *B. abortus* can be taken up by M cells through its interaction with PrP^C. To further confirm this possibility, we tested whether ablation of PrP^C affects the efficiency of *B. abortus* uptake by M cells. In the ligated intestinal loop assay, we found that the number of surface-bound *B. abortus* in PrP^C-deficient (*Prnp*^{-/-}) mice was less than half that in wild-type (WT) mice (Fig. 3A, 3B). Moreover, the internalization of *B. abortus* into M cells was

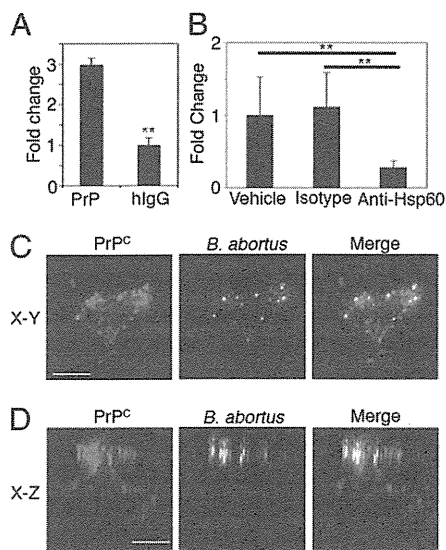


FIGURE 2. *B. abortus* bind to PrP^C in vitro and in vivo. (A and B) In vitro binding assay with rmPrP^C-Fc or control hlgG-Fc protein. *B. abortus* were pretreated with anti-Hsp60 Ab or isotype-matched control Ab before the interaction with the mPrP^C-Fc. Data are means and SE ($n = 3$). ** $p < 0.01$. (C and D) GFP-*B. abortus* were injected into the ligated intestinal loop of anesthetized C57BL/6 mice. After incubation, PPs excised from the loop were subjected to whole-mount staining with *B. abortus*-specific antisera (green) and PrP mAb (red), and then analyzed using a DeltaVision deconvolution microscope. The X-Y (C) and X-Z (D) images of M cells are shown. Scale bars, 5 μ m.

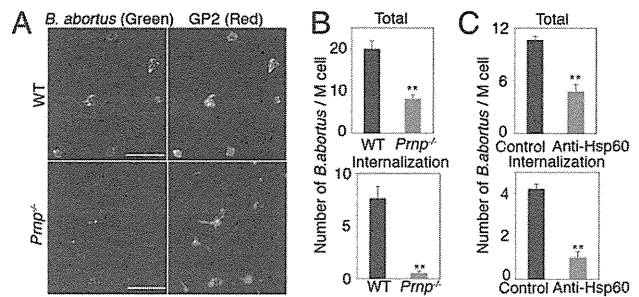


FIGURE 3. Decreased uptake of *B. abortus* by PP M cells in *Prnp*^{-/-} mice. (A) GFP-*B. abortus* were injected into the ligated intestinal loop of anesthetized WT or *Prnp*^{-/-} mice. After incubation, PPs excised from the loop were subjected to whole-mount staining with *B. abortus*-specific antisera (green) and GP2 mAb (red), and then analyzed using a DeltaVision deconvolution microscope. The X-Y images of FAE in WT mice (upper panels) and *Prnp*^{-/-} (lower panels) are shown. Scale bars, 20 μ m. (B) Quantitative analysis of the number of *B. abortus* associated with the apical surface of M cells and internalized into M cells between WT and *Prnp*^{-/-}. (C) Quantitative analysis of the number of *B. abortus* associated with the apical surface of M cells and internalized into M cells in the presence or absence of anti-Hsp60 Ab pretreatment. Data are expressed as the mean \pm SD of 15 different samples for each group. ** $p < 0.01$.

markedly reduced in *Prnp*^{-/-} compared with WT mice (Fig. 3B). We also examined the effect of anti-Hsp60 Ab on the interaction between PrP^C on M cell and *B. abortus*. Binding and internalization of *B. abortus* to M cells were decreased in anti-Hsp60-treated *B. abortus* (Fig. 3C). Taken together, these observations suggest an important role for PrP^C, via interaction with Hsp60 on the bacterial surface, in the entry of *B. abortus* into M cells.

B. abortus enters the host via M cells

To gain further evidence for PrP^C-dependent uptake of *B. abortus*, we performed oral infection with *B. abortus* in *Prnp*^{-/-} and WT mice. After oral administration, a substantial number of viable *B. abortus* organisms were detectable in PPs of WT mice; by contrast, the bacteria were nearly undetectable in *Prnp*^{-/-} mice (Fig. 4). Taken together with the above observations made with the ligated loop assay, this result underscores the biological significance of PrP^C in the uptake of *B. abortus*, as well as supports the idea that *B. abortus* enters the host through M cells, using PrP^C.

Prion protein is the causative agent of the transmissible spongiform encephalopathies. According to the “prion hypothesis,” the infectious isoform of prion protein, termed

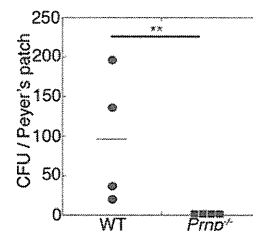


FIGURE 4. *B. abortus* infection through the gastrointestinal tract in WT and *Prnp*^{-/-} mice. C57BL/6 or *Prnp*^{-/-} mice were fed 1×10^6 CFU of *B. abortus*. After 4 h, bacterial translocation to Peyer's patches was examined. The horizontal solid line shows the average. Data are expressed as the mean \pm SD of four different samples for each group. Representative data of three independent experiments are shown. ** $p < 0.01$.

PrP^{Sc}, replicates by interacting with cellular PrP^C and mediating its conformational change into the disease-causing PrP^{Sc} (19). Compared with its well-defined pathological significance, the physiological function of PrP^C remains unclear. PrP^C is highly expressed not only by cells in the CNS but also by follicular DCs, mature myeloid cells, and activated T cells. This distribution suggests involvement of PrP^C in immune surveillance (20).

Our present study defines a novel role for PrP^C as an M-cell receptor for the uptake of pathogenic bacteria. PrP^C on macrophages has been reported to recognize surface-exposed Hsp60 of *B. abortus* and to facilitate internalization of the bacteria (13); however, Fontes et al. (21) reported a contradictory result. Using *Prnp*^{-/-} mice, they showed that *B. suis* infection is independent of PrP^C expression. By contrast, WT macrophages had a greater tendency to be infected with *B. abortus* than did *Prnp*^{-/-} macrophages, although no significant difference between WT and *Prnp*^{-/-} macrophages was found in intracellular multiplication of *B. abortus*. To shed more light on these observations, we performed oral infection with *Brucella* spp. in WT and *Prnp*^{-/-} mice. After oral administration, a substantial number of *B. suis* organisms were detectable in both WT and *Prnp*^{-/-} PPs (data not shown), whereas the translocation of *B. abortus* into PPs was significantly reduced in *Prnp*^{-/-} mice (Fig. 4). These data are consistent with the observation by Fontes et al. (21). In addition, these authors discussed the spatial proximity of *Brucella* spp. and PrP^C during the early stage of infection. In accordance, our ligated loop assay showed that the internalized *B. abortus* were surrounded by PrP^C in the cytoplasmic vacuolar compartment of M cells (Fig. 2D). Taken together, these results suggest that *B. abortus* is efficiently taken up by M cells in a PrP^C-dependent manner. However, *B. suis* might invade the host independently of PrP^C.

Interaction of PrP^C and Hsp60 family proteins has been demonstrated by several approaches, including a yeast two-hybrid screening as well as a pull-down assay (22). Our in vitro binding assay confirmed the interaction between PrP^C and Hsp60 on *B. abortus* (Fig. 2B). We also showed that PrP^C on M cells interacts with Hsp60 on *B. abortus* (Fig. 3C). Nevertheless, we cannot formally exclude an alternative and mutually not exclusive possibility that PrP^C on M cells acts as a scaffold to coordinate several proteins in a complex, with the complex mediating *B. abortus* internalization (23). The Hsp60 proteins have been recognized as immunodominant Ags of many microbes (24). Hsp60 normally resides in the bacterial cytoplasm, but the protein can be secreted via T4SS and expressed on the outer membrane of the bacteria. In fact, the presence of Hsp60 on the bacterial surface is not restricted to *B. abortus*. A similar phenomenon has also been shown for other bacteria (25–28). The exposure of Hsp60 on the surface appears to increase bacterial adherence to host cells. PrP^C expressed on the apical plasma membrane of M cells in the GALT thus may contribute to immunosurveillance on the mucosal surface by promoting transcytosis of bacteria that express Hsp60 at their surface. This idea is concordant with the observation that *H. pylori* translocation from the intestinal mucosa into PPs, possibly via the M cells, is essential for the induction of humoral and cellular immunity against this pathogen (29).

Accumulating evidence supports the idea that many infectious agents and their toxins use GPI-anchored proteins to gain entry into host cells (5). For example, CD48 on macrophages and mast cells contributes to phagocytosis of *E. coli* via FimH recognition (30). On the basis of our observations that PrP^C and GP2 proteins on the apical plasma membrane of M cells can serve as receptors (this study and Ref. 7), M cells also seem to use GPI-anchored proteins for intestinal immunosurveillance. In conclusion, our findings indicate that the PrP^C-dependent route of bacterial uptake by M cells can be exploited for *B. abortus* invasion into the host. Once *B. abortus* penetrate M cells, the bacteria are capable of surviving inside DCs, which accumulate beneath the M cells, by forming replicative vacuoles with subsequent systemic spread to other organs. This model offers a new insight into the pathogenesis of *B. abortus* infection, a disease that leads to significant economic losses for cattle and other domestic animals and, in turn, transmission to humans. The disruption of the Hsp60–PrP^C interaction on the mucosal surface may provide a useful therapeutic target for protection against *B. abortus* infection.

Acknowledgments

We thank P.D. Burrows for critical review of the manuscript and Y. Yamada for secretarial assistance.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Neutra, M. R., N. J. Mantis, and J. P. Kraehenbuhl. 2001. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* 2: 1004–1009.
- Bockman, D. E., and M. D. Cooper. 1973. Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix, and Peyer's patches. An electron microscopic study. *Am. J. Anat.* 136: 455–477.
- Owen, R. L. 1977. Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine: an ultrastructural study. *Gastroenterology* 72: 440–451.
- Sansonetti, P. J., and A. Phalipon. 1999. M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Semin. Immunol.* 11: 193–203.
- Shin, J. S., and S. N. Abraham. 2001. Glycosylphosphatidylinositol-anchored receptor-mediated bacterial endocytosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 197: 131–138.
- Clark, M. A., B. H. Hirst, and M. A. Jepson. 1998. M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect. Immun.* 66: 1237–1243.
- Hase, K., K. Kawano, T. Nochi, G. S. Pontes, S. Fukuda, M. Ebisawa, K. Kadokura, T. Tobe, Y. Fujimura, S. Kawano, et al. 2009. Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 462: 226–230.
- Nakato, G., S. Fukuda, K. Hase, R. Goitsuka, M. D. Cooper, and H. Ohno. 2009. New approach for m-cell-specific molecules screening by comprehensive transcriptome analysis. *DNA Res.* 16: 227–235.
- Gorvel, J. P., and E. Moreno. 2002. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.* 90: 281–297.
- Kim, S., M. Watarai, S. Makino, and T. Shirahata. 2002. Membrane sorting during swimming internalization of *Brucella* is required for phagosome trafficking decisions. *Microb. Pathog.* 33: 225–237.
- Celli, J., C. de Chastellier, D. M. Franchini, J. Pizarro-Cerda, E. Moreno, and J. P. Gorvel. 2003. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.* 198: 545–556.
- Comerci, D. J., M. J. Martinez-Lorenzo, R. Sieira, J. P. Gorvel, and R. A. Ugalde. 2001. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell. Microbiol.* 3: 159–168.
- Watarai, M., S. Kim, J. Erdenebaatar, S. Makino, M. Horiuchi, T. Shirahata, S. Sakaguchi, and S. Katamine. 2003. Cellular prion protein promotes *Brucella* infection into macrophages. *J. Exp. Med.* 198: 5–17.
- Sakaguchi, S., S. Katamine, N. Nishida, R. Moriuchi, K. Shigematsu, T. Sugimoto, A. Nakatani, Y. Kataoka, T. Houtani, S. Shirabe, et al. 1996. Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380: 528–531.

15. Kuwahara, C., A. M. Takeuchi, T. Nishimura, K. Haraguchi, A. Kubosaki, Y. Matsumoto, K. Saeki, Y. Matsumoto, T. Yokoyama, S. Itohara, and T. Onodera. 1999. Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* 400: 225–226.
16. Imaoka, K., M. Kimura, M. Suzuki, T. Kamiyama, and A. Yamada. 2007. Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60: 137–139.
17. Watarai, M., S. Makino, Y. Fujii, K. Okamoto, and T. Shirahata. 2002. Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell. Microbiol.* 4: 341–355.
18. Kim, C. L., A. Umetani, T. Matsui, N. Ishiguro, M. Shinagawa, and M. Horiuchi. 2004. Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies. *Virology* 320: 40–51.
19. Prusiner, S. B. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216: 136–144.
20. Isaacs, J. D., G. S. Jackson, and D. M. Altmann. 2006. The role of the cellular prion protein in the immune system. *Clin. Exp. Immunol.* 146: 1–8.
21. Fontes, P., M. T. Alvarez-Martinez, A. Gross, C. Carnaud, S. Köhler, and J. P. Liautard. 2005. Absence of evidence for the participation of the macrophage cellular prion protein in infection with *Brucella suis*. *Infect. Immun.* 73: 6229–6236.
22. Edenhofer, F., R. Rieger, M. Famulok, W. Wendler, S. Weiss, and E. L. Winnacker. 1996. Prion protein PrP^C interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. *J. Virol.* 70: 4724–4728.
23. Linden, R., Y. Cordeiro, and L. M. Lima. 2012. Allosteric function and dysfunction of the prion protein. *Cell. Mol. Life Sci.* 69: 1105–1124.
24. Kaufmann, S. H. 1990. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol. Today* 11: 129–136.
25. Hoffman, P. S., and R. A. Garduno. 1999. Surface-associated heat shock proteins of *Legionella pneumophila* and *Helicobacter pylori*: roles in pathogenesis and immunity. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 7: 58–63.
26. Frisk, A., C. A. Ison, and T. Lagergård. 1998. GroEL heat shock protein of *Haemophilus ducreyi*: association with cell surface and capacity to bind to eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 66: 1252–1257.
27. Ensgraber, M., and M. Loos. 1992. A 66-kilodalton heat shock protein of *Salmonella typhimurium* is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus. *Infect. Immun.* 60: 3072–3078.
28. Hennequin, C., F. Porcheray, A. Waligora-Dupriet, A. Collignon, M. Barc, P. Bourlioux, and T. Karjalainen. 2001. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology* 147: 87–96.
29. Kiriya, K., N. Watanabe, A. Nishio, K. Okazaki, M. Kido, K. Saga, J. Tanaka, T. Akamatsu, S. Ohashi, M. Asada, et al. 2007. Essential role of Peyer's patches in the development of *Helicobacter*-induced gastritis. *Int. Immunol.* 19: 435–446.
30. Baorto, D. M., Z. Gao, R. Malaviya, M. L. Dustin, A. van der Merwe, D. M. Lublin, and S. N. Abraham. 1997. Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic. *Nature* 389: 636–639.

ORIGINAL ARTICLE

Seroprevalence of Tularemia in Wild Bears and Hares in Japan

A. Hotta¹, K. Tanabayashi¹, Y. Yamamoto¹, O. Fujita¹, A. Uda¹, T. Mizoguchi² and A. Yamada¹

¹ Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan

² Fukushima Wildlife Rehabilitation Center, Otama, Fukushima, Japan

Impacts

- Serological assays for tularemia were performed with 431 Japanese black bears and 293 Japanese hares samples.
- All eight seropositive samples were originated from Japanese black bears from the Tohoku district, northeastern region of the Honshu, Japan.
- Japanese black bears can be used as a sentinel for tularemia.

Keywords:

Francisella tularensis; tularemia; wild animals; seroprevalence

Correspondence:

Akitoyo Hotta, DVM, PhD. Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan.
Tel.: +81 3 5285 1111; Fax: +81 3 5285 1179;
E-mail: ahotta@nih.go.jp

Received for publication November 30, 2010

doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01422.x

Summary

Tularemia is a zoonotic disease caused by *Francisella tularensis*. The distribution of the pathogen in Japan has not been studied well. In this study, seroprevalence of tularemia among wild black bears and hares in Japan was determined. Blood samples collected from 431 Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*) and 293 Japanese hares (*Lepus brachurus*) between 1998 and 2009 were examined for antibodies against *F. tularensis* by micro-agglutination test (MA) or enzyme-linked immunosorbent assay. By subsequent confirmatory tests using western blot (WB) and indirect immunofluorescence assay (IFA), eight sera from Japanese black bears were definitely shown to be seropositive. All of these eight bears were residents of the northeastern part of main-island of Japan, where human tularemia had been reported. On the other hand, no seropositive Japanese hares were found. These results suggest that Japanese black bears can serve as sentinel for tularemia surveillance and may help understand the distribution of *F. tularensis* throughout the country. This is the first report on detection of antibody to *F. tularensis* in black bears of Japan.

Introduction

Tularemia is a zoonotic disease caused by *Francisella tularensis*, highly infective, intracellular gram-negative coccobacilli. It is primarily a disease of wild animals: mainly lagomorphs and rodents. The disease occurs throughout the northern hemisphere including North America, Russia, Europe and Japan. In North America and Europe, 100–200 human tularemia cases are reported every year (Ellis et al., 2002). Humans are infected through contact with infected animals, arthropod bites, ingestion of contaminated water or food, and inhalation of infective aerosols (Ellis et al., 2002). The clinical type and severity of the disease is dependent on the route of infection. Predominant symptoms are high fever, enlarged lymph nodes, and ulcer at the site of bacterial entry (Ellis et al., 2002). In animals, the severity of the disease varies among species. In susceptible animals such as mice severe collapses are followed by a fatal septi-

caemia. Other animal species such as cats, dogs and cattle are relatively resistant to the infection (Hopla, 1974).

Understanding of the distribution of the pathogen in animal populations is of particular importance when studying zoonoses. The seroprevalence of *F. tularensis* in wild animals in North America and Europe has been reported for bears (Binninger et al., 1980; Chomel et al., 1998), hares (Mörner et al., 1988; Frölich et al., 2003), rabbits (Shoemaker et al., 1997; Berrada et al., 2006) and wild boars (Al Dahouk et al., 2005). These data are indispensable to assess the risk of future occurrence of tularemia in humans and domestic animals as well as to identify the natural reservoir of *F. tularensis*.

In Japan, tularemia was first reported in 1924, and approximately 1400 human cases have been reported since then (Ohara et al., 1991). The annual incidence of tularemia has decreased from the middle of the 1960s and it became extremely rare thereafter (Ohara et al., 1996).

Most of human cases occurred in the Tohoku district, the northeastern part of the largest island, Honshu, Japan. The pathogens had been isolated from humans, hares, ticks, and shrew-mole, and a number of wild animals (such as hare, bear, or squirrel) have been suggested to have epidemiological links to human infections (Ohara et al., 1996). However, epidemiological study on wild animals is scarce and the distribution of *F. tularensis* in environment is not well understood.

We developed several tools for diagnosis of tularemia, such as monoclonal antibodies (Hotta et al., 2007), and protocols for DNA amplification and detection (Fujita et al., 2006; Uda et al., 2007). We also reported molecular epidemiological characteristics of Japanese *F. tularensis* isolates (Fujita et al., 2008). In this study, to assess the potential risk of occurrence of tularemia by understanding the distribution of *F. tularensis* in wild animals, we investigated whether Japanese hares and black bears have specific antibodies against *F. tularensis*.

Materials and Methods

Blood samples

Sera or plasma from 431 wild Japanese black bears were collected from 11 prefectures, Iwate, Fukushima, Ibaraki, Yamanashi, Nagano, Gifu, Shiga, Kyoto, Hyogo, Tottori and Tokyo between 1998 and 2007 (Fig. 1).

Samples from 293 wild Japanese hares were collected from nine prefectures, Aomori, Iwate, Akita, Yamagata, Fukushima, Niigata, Kochi, Miyazaki and Kagoshima dur-

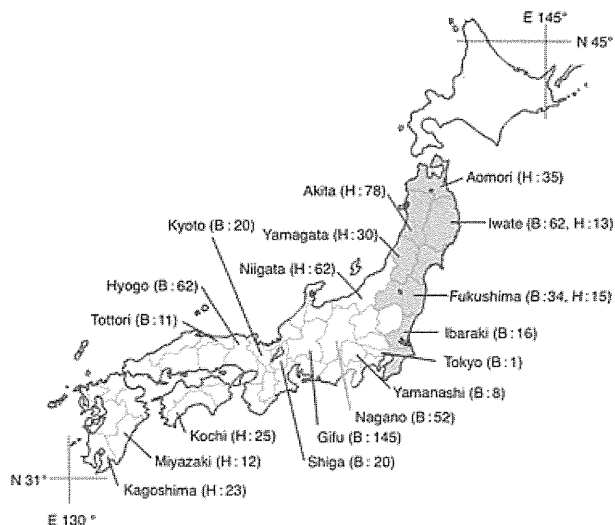


Fig. 1. Map of Japan showing the areas where samples were collected. The numbers of samples collected in each area was shown in parentheses (B, Japanese black bears; H, Japanese hares). The areas coloured grey are the prefectures where more than 50 cases of human tularemia have been reported previously (Ohara et al., 1996).

ing the winters (November–April) from 2005 to 2009 (Fig. 1). Apparently healthy wild Japanese hares were captured by licensed hunters. The blood samples were collected onto filter papers (Toyo-Roshi Ltd, Tokyo, Japan) or into plastic tubes. The filter papers were incubated with 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, containing 0.5% (vol/vol) Tween 20 at 4°C for 4 h on a rotator. After centrifugation at 13 000 g for 3 min, the supernatant was collected and stored at –80°C until use. Because the filter paper was designed to retain 250 µl of whole blood, resulting extracts were regarded as a 1 : 50 dilution of the sera (De Swart et al., 2001). Rabbit defibrinated blood (800 µl; Nippon Biotest Laboratories Ltd, Tokyo, Japan) mixed with the sera from *F. tularensis* immunized and normal rabbits (200 µl) were used as positive and negative control, respectively. The blood samples collected to tubes were ordinarily processed to obtain sera.

Bacterial antigens

Francisella tularensis (Yama strain), *Francisella novicida* (U112 strain), and *Francisella philomiragia* (029 strain) were kindly provided by Dr Hiromi Fujita, Ohara Research Laboratory, Fukushima, Japan. *Francisella tularensis* were propagated on Difco™ Eugon agar (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) with chocolate-ized 8% (vol/vol) sheep blood under the biosafety level 3 condition. *Francisella tularensis* LPS was purified using a LPS Extraction kit (iNtRON Biotechnology, Kyungki-Do, Korea) according to the protocol provided by the supplier. *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pasteurella aerogenes* were propagated in our laboratory as described previously (Hotta et al., 2007).

Micro-agglutination test (MA)

Sera or plasma samples from Japanese black bears and Japanese hares were screened by MA according to Sato et al. (1990). Twenty-five microlitres of 2-fold serial dilution of samples were mixed with an equal volume of antigen solution in wells of a round type micro-titre plate. Judgment was made after incubation at 37°C for 18 h. The agglutination titre was expressed as the reciprocal of the highest serum dilution showing a positive response to the antigens.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The extracts from the filter paper were screened by ELISA. Six micrograms of purified *F. tularensis* LPS was dispensed into wells of a flat type 96-well microtitre plate and the plate was incubated at 4°C overnight. After washing five times with PBS containing 0.1% (vol/vol) of Tween 20