

Q 熱コクシエラの生態系における感染リスク評価に関する研究

研究分担者	岸本壽男 岡山県環境保健センター	所長
研究協力者	木田浩司 岡山県環境保健センター 保健科学部	研究員
	葛谷光隆 同	専門研究員
	濱野雅子 同	専門研究員
	中嶋 洋 同	科長
	藤井理津志 同	部長
	福士秀人 岐阜大学応用生物科学部獣医学科獣医微生物学講座	教授
	大屋賢司 同	准教授

研究要旨 Q 熱コクシエラの生態系における感染リスク評価に関する研究の一環として、昨年に引き続き、ウシにおける *Coxiella burnetii* の抗体保有率および遺伝子検出率について検討した。これまでにヒト、イヌ、ネコを対象に疫学調査を実施したが、抗体陽性率は過去に報告された値と比較して低かった。しかし昨年、北海道の5牧場のウシ431頭について疫学調査を実施したところ、陽性率は10.4%であり、一定の感染リスクが疑われた。そこで、今回は津山市食肉処理センターに全国から搬入された食用ウシを対象に、抗体疫学調査と遺伝子疫学調査を実施した。検体については岡山県食肉衛生検査所の協力を得て、2009年から2010年に津山市食肉処理センターへ食用として搬入されたウシ266頭(健康牛141頭及び病畜125頭)から採取した血清と全血を対象とした。血清抗体価は、昨年同様に抗原として *C. burnetii* 感染BGM細胞を用い、間接蛍光抗体法にて測定し、封入体と細胞質内粒子の染色像を確認したものを陽性、封入体みの染色像を確認したものを擬陽性とした。遺伝子検出は全血から抽出したDNAを用いてReal-time PCRで実施した。その結果、血清抗体価陽性を示した検体はなく、遺伝子も全検体陰性であった。抗体価の擬陽性は3%程度に見られたが、健康牛、病畜の差はなく、地域別、年度別でも大きな差は認めなかった。擬陽性の判定については、*C. burnetii* に特異的な抗体とは判定できないため、今回の結果からは、国内の食用ウシの *C. burnetii* 侵淫率は低く、感染リスクとしては高くないものと考えられた。今後さらにウシの数を増やして検討するとともに、他の家畜や野生動物についても検討することが必要と考えられた。

A. 研究目的

Q 熱はヒトでは特異的な症状が認められず、インフルエンザ様疾患、肺炎、肝炎等、多彩な病状を示すが、動物では一般に無症状とされる人獣共通感染症である。起因菌は *Coxiella burnetii*(以下 *C. burnetii*)であり、感染症法では4類感染症に分類されるが、

本邦での実態は未だ不明な点が多く、感染リスク評価が求められている。そこで、ヒト、家畜を含む動物並びに環境における本病原体の存在様式を明らかにすることを目的とした。すなわち①ヒト、ペット、家畜、野生動物、環境におけるQ熱コクシエラ感染の実態調査。②国内における本病原体の

存在様式、感染源、感染経路の解明。③過去の疫学データとの比較検証と現在の感染リスクの評価。これまでにヒト、ペットとしてのイヌ、ネコ、家畜としてのウシを対象に疫学調査を実施したが、ウシについては北海道で飼育されている個体のみの調査であったことから、本年度は津山市食肉処理センターに全国から搬入された食用ウシを対象に、抗体疫学調査と遺伝子疫学調査を実施した。対象牛の都道府県別内訳を表1-1に、種別内訳を表1-2に、性別内訳を表1-3に示した。

B.研究方法

1) Q熱に関する血清疫学調査

岡山県食肉衛生検査所の協力により、2009年から2010年に津山市食肉処理センターに搬入された食用ウシのうち、健康牛141頭及び病畜125頭(計266頭)について、血清を採取した。血清中の抗*C.burnetii*抗体は、*C.burnetii*感染細胞をスライドグラスに固定したもの(オリエンタル酵母(株)作製*C.burnetii*感染BGM細胞)を抗原とした間接蛍光抗体法により検出した。一次抗体として、リン酸緩衝液(PBS)で128倍希釈したウシ血清を37°Cで30分間反応させた。PBSで5分間2回洗浄後、PBSで200倍希釈したFITC標識抗ウシIgG(cappel)を37°Cで30分間反応させた。PBSで5分間2回洗浄後、蛍光顕微鏡で観察した。判定は、蛍光顕微鏡で封入体と細胞質内粒子の染色像を確認したものを陽性(128倍以上)とし、封入体のみが染色されたものは偽陽性、いずれも染色されないものを陰性とした。

2) Q熱に関する遺伝子疫学調査

遺伝子検出用の検体は、血清と同じく岡山県食肉衛生検査所の協力により、健康牛141頭及び病畜125頭(計266頭)について、血清と同時に採材した全血を用いた。Qiagen DNA mini kitを使用してDNAを抽出し、Real-time PCR法による遺伝子疫学調査を実施した。

*C.burnetii*のReal-time PCR法は、Klee(2006)らの報告をもとに、既存分離株において保存性の高い領域であるIsocitrate dehydrogenase (icd) geneをターゲットに、Primer及びTaqman probeは、それぞれicd-439F=CGTTATTTTACGGGTGTGCCA(439-459), icd-514R=CAGAATTTTCGCGGAAAATCA(494-514), icd-464TM=FAM-CATATTCACCTTTTCAGGCGTTTTGACCG-TAMRA(464-492)を使用した(Genbank accession no. AF146284)

また、一昨年度の検討で良好な結果が確認された合成Oligo=CGTTATTTTACGGGTGTGCCAAGCCCGGTCAAAAACGCCTGAAAAGGTGAATATGGTGATTTTCCGCGAAAATTCTG(439-514)をInternal controlとして、定量分析を行った。

C.研究結果

1) Q熱に関する血清疫学調査

間接蛍光抗体法による抗体価測定の結果を図2に示した。陽性(128倍以上)の個体は認めなかったが、擬陽性は2009年の健康牛で1(1.5%)、病畜2(4.0%)、計3(2.6%)。2010年の健康牛で3(4.0%)、病畜3(4.0%)、計6(4.0%)であった。擬陽性を示した個体の一覧を表3に示した。畜種はすべてホルスタインであったが、性差、症状による差及び

地域差は特に認められなかった。

2) Q 熱に関する遺伝子疫学調査

Real-time PCR 法による *C.burnetii* 遺伝子検出は 266 検体すべて陰性であった。

D.考察

今年度は、岡山県を中心に、全国で飼育された食用ウシを対象として調査を行ったが、血清抗体価陽性を示した検体はなく、遺伝子も全検体陰性であった。抗体価の擬陽性は全体の 3%程度にみられたが、健康牛、病畜の差はなく、地域別、年度別でも大きな差は認めなかった。擬陽性の判定については、*C.burnetii* に特異的な抗体といえないため、今回の結果では、ウシの *C.burnetii* 抗体保有率は低いと考えられた。また *C.burnetii* の遺伝子は検出されなかった。このことから、本調査の対象個体は、少なくとも検体採取時点では感染していなかったと考えられた。昨年の北海道の放牧牛の結果を勘案すると、ウシの *C.burnetii* 感染率には地域差がみられ、一定の感染リスクが疑われる地域があるものの、食用ウシ全体の感染リスクについては低いと考えられた。

C.burnetii は反芻動物の胎盤で大量に増殖すると言われているが、一般にと畜場に搬入されるウシは妊娠していない。このことが、今回の調査における検出率が低かった原因である可能性は否定できない。しかしながら、*C.burnetii* の遺伝子が食用個体から未検出であったことは、人獣共通感染症の予防という観点からは望ましい結果であった。生態系での感染様式を解明するためには、今後さらにウシの数を増やして検討するとともに、野生動物やダニについての検討も必要と

考えられ、今後の課題である。

E.結論

食肉処理場に全国から搬入された食用ウシを対象に、*C.burnetii* の抗体保有率および遺伝子検出率について検討した。その結果、血清抗体価陽性を示した検体はなく、遺伝子も全検体陰性であった。抗体価の擬陽性は 3%程度に見られたが、健康牛、病畜の差はなく、地域別、年度別でも大きな差は認めなかった。擬陽性の判定については、*C.burnetii* に特異的な抗体とは判定できないため、今回の結果からは、国内の食用ウシの *C.burnetii* 侵淫率は低く、感染リスクとしては高くないものと考えられた。今後さらにウシの数を増やして検討するとともに、他の家畜や野生動物、ダニについても検討予定である。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

木田浩司、葛谷光隆、濱野雅子、藤井理津志、岸本壽男、福士秀人、大屋賢司. 食肉処理場に搬入された牛の Q 熱コクシエラ汚染実態調査. 第3回日本リケッチア臨床研究会・第18回リケッチア研究会合同研究発表会. 大津市

論文発表は特になし

表1-1 津山市食肉処理センターへ搬入された食用牛(都道府県別)

	2009年	2010年	合計	総計	
健康牛	岡山県	20	46	66	141
	広島県	3	5	8	
	島根県	4	7	11	
	鳥取県	3	—	3	
	北海道	10	—	10	
	山形県	6	1	7	
	福島県	1	1	2	
	新潟県	1	6	7	
	栃木県	5	—	5	
	静岡県	1	—	1	
	長野県	—	1	1	
	愛知県	7	—	7	
	三重県	—	5	5	
	滋賀県	2	—	2	
	兵庫県	1	—	1	
	香川県	—	1	1	
	徳島県	—	1	1	
	大分県	1	—	1	
	長崎県	1	—	1	
	沖縄県	—	1	1	
病畜	岡山県	46	65	111	125
	鳥取県	3	3	6	
	島根県	—	2	2	
	北海道	—	3	3	
	新潟県	—	1	1	
	京都府	1	—	1	
	兵庫県	—	1	1	

表1-2 津山市食肉処理センターへ搬入された食用牛(畜種別)

	健康牛	病畜	合計
ホルスタイン	95	101	196
和牛	27	4	31
ジャージー	8	18	26
F1	11	2	13
合計	141	125	266

表1-3 津山市食肉処理センターへ搬入された食用牛(性別)

	健康牛	病畜	合計
めす	119	124	243
おす	0	0	0
去勢	22	1	23
合計	141	125	266

表2 間接蛍光抗体法による*C.burnetii*に対する抗体価

	陽性	擬陽性	陰性	合計
健康牛	0	4	137	141
病畜	0	5	120	125
合計	0	9	257	266

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 間接蛍光抗体法における擬陽性個体

	畜種	性別	症状	満年齢	産地
健康牛	ホルスタイン	めす		4	岡山県
	ホルスタイン	めす		4	三重県
	ホルスタイン	めす		3	広島県
	ホルスタイン	去勢		1	新潟県
病畜	ホルスタイン	めす	フレグモーネ	5	岡山県
	ホルスタイン	めす	第4胃変位	2	岡山県
	ホルスタイン	めす	肝炎	7	岡山県
	ホルスタイン	めす	関節炎	4	岡山県
	ホルスタイン	めす	関節炎	4	北海道

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

国内生態系におけるライム病ボレリアの維持伝播経路に関する研究

研究分担者	川端寛樹	国立感染症研究所 室長
研究協力者	石畝史	福井県衛生環境研究センター
	藤田博己	大原綜合病院
	高田伸弘、矢野泰弘	福井大学
	増澤俊幸	千葉科学大学
	中尾稔	旭川医科大学
	伊東拓也	北海道立衛生研究所
	及川陽三郎	金沢医科大学
	Kyle Taylor、坪田敏男、今内覚	北海道大学
	川森文彦	静岡県環境衛生科学研究所
	三上稔之、熊谷邦彦	青森県環境保健センター
	高野愛、安藤秀二、花岡希、本田尚子、 渡邊治雄、大西真	国立感染症研究所

研究要旨:

国内でのライム病病原体 *Borrelia garinii* の高感度 DNA 型別解析から、1) 国内に存在する *B. garinii* は 2 群(*B. garinii* ST-group A, *B. garinii* ST-group B) に大別できること、2) 患者由来株の約 84% は *B. garinii* ST-group B であること、3) 野鼠由来株はすべて *B. garinii* ST-group B であること、さらに、4) 患者分離株の約半数が野鼠によって保菌されている *B. garinii* と同じ DNA 型であることが明らかとなった。以上のことから、我が国においては、ライム病ボレリア *B. garinii* 感染例の少なくとも半数は野鼠由来である可能性が示唆された。

A. 研究目的

ライム病はボレリア属細菌による感染症で、病原体ボレリアは、野生動物を保菌宿主とし、マダニによって媒介されることでヒトへの感染が成立する。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。

我が国では、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。国内感染のライム病患者は、遊走性紅

斑を主訴とする皮膚症状を呈し、また皮膚病変部からは病原細菌である *B. garinii* が分離される。他方、米国で問題となっている *B. burgdorferi*、欧州では *B. garinii* 同様ライム病起因菌となっている *B. afzelii* はほとんど見出されない。

欧州では *B. garinii* の多くは鳥類によって維持・伝播されることが次第に明らかとなってきている。一方、我が国では欧州同様 *B. garinii* がライム病起因菌であることが示されてきたが、生態系における *B. garinii* の維持伝播経路については不明な点が多い。

そこで本研究では、我が国におけるライム病ポレリアのヒトへの感染経路遮断を最終目的として、我が国における *B. garinii* の生態系における維持伝播経路究明を開始した。

B. 研究方法

我が国における *B. garinii* の生態系における維持伝播経路を調べるために、1) *B. garinii* の媒介マダニであるシュルツエマダニ (*Ixodes persulcatus*) より分離された *B. garinii* 15 株、2) ヒト患者皮膚病変部由来 *B. garinii* 19 株、3) 国内野鼠由来 *B. garinii* 18 株を研究に用いた。野鼠由来株の内訳は、*Myodes rufocanus bedfordiae* (エゾヤチネズミ) 由来 10 株、*Apodemus speciosus* (アカネズミ) 由来 8 株である。これら *B. garinii* 52 株は、高感度 DNA 型別法である Multi-locus sequence typing (MLST) 法により DNA 型別を行い、それぞれの DNA 型 (Sequence type; ST) をデータベース (<http://borrelia.mlst.net/>) と照合、解析を行った。使用した *B. garinii* 菌株は、研究協力者らと協力して分離、収集した。これら *B. garinii* 株を BSK 培地にて 32°C 孵卵器にて静置培養後、

常法に従って DNA 抽出した。抽出した DNA を鑄型とし、Margos らの方法に従って PCR を行い、増幅 DNA を得た。得られた DNA は精製後塩基配列を決定し MLST 解析に用いた。

(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 DNA 型別により、国内分離 *B. garinii* 株は 2 群に大別された。大別されたそれぞれを *B. garinii* ST-group A、*B. garinii* ST-group B とし結果を表 1 にまとめた。国内でライム病ポレリアを伝播するマダニとして、シュルツエマダニが知られている。本マダニからは *B. garinii* ST-group A、*B. garinii* ST-group B が分離される一方、患者由来株の 84% および野鼠由来株のすべてが *B. garinii* ST-group B であった。患者および野鼠分離株においては *B. garinii* ST-group B が見出される頻度が有意に高いことが Fisher の正確検定によっても確認された ($P > 0.05$)。加えて、国内患者由来 19 株中 9 株 (47%) は野鼠由来株と同一の DNA 型 (ST128, ST131, および Untypable の一部) であった。

D. 考察

国内でのライム病病原体 *B. garinii* の MLST 解析から、1) 国内に存在する *B. garinii* は 2 群 (*B. garinii* ST-group A、*B. garinii* ST-group B) に大別できること、2) 患者由来株の 80% 以上は *B. garinii* ST-group B であること、3) 野鼠由来株はすべて *B. garinii* ST-group B であること、さらに、4) 患者分離株の約半数が野鼠分離株で見出さ

れた DNA 型と一致することが明らかとなった。国内患者株内で最も多く見出された DNA 型は ST131 である。この DNA 型は、北海道で捕獲されたエゾヤチネズミの膀胱より分離された株と一致するとともに、MLST データベースに登録されている、NT29 株(長野県シュルツェマダニ由来株)とも一致した。このことは、国内に分布する *B. garinii* の一部は少なくとも野鼠を保菌宿主とし、シュルツェマダニにより伝播されることを示している。また ST131 や ST128 などの DNA 型は中国で分離された *B. garinii* 株(JW-1 株、NMK3 株)とも一致している。このことは、*B. garinii* ST-group B は日本のみならず中国でもライム病起因菌となっている可能性が考えられた。一方で、約 15% の患者分離株が *B. garinii* ST-group A に型別された。これら DNA 型はその保菌動物は現在不明である。Nakao らによれば、野鳥寄生性のシュルツェマダニ幼虫からは *B. garinii* が検出されることが報告されている (Nakao et al. 1994)。また欧州では、我が国に分布する *B. garinii* ST-group A と近縁の *B. garinii* 株が野鳥により保菌されていることが明らかにされつつ有る。このことから *B. garinii* ST-group A の自然界での保菌宿主は鳥類である可能性が考えられた。

E. 結論

我が国においては、ライム病ボレリア *B. garinii* 感染例の少なくとも半数は野鼠由来 *Borrelia* 株と同一 ST であり、また全体の 80% 以上が ST-group B であることが明らかとなった。このことから、国内に分布するヒト病原性 *B. garinii* は欧州とは異なり野鼠によって環境中で維持、伝播されている可

能性が強く示唆された。

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) 川端寛樹, 高野 愛, 伊東拓也, 石畝史, 高田伸弘, 中尾稔, 増沢俊幸, 藤田博己, 渡邊治雄, 大西真. 多領域 DNA 配列解析によって推定された国内におけるライム病ボレリア病原体 *Borrelia garinii* の維持・伝播経路: 第 56 回日本衛生動物学会北日本支部大会、札幌 (2010.10)
- 2) Takano A, Goka K, Une Y, Fujita H, Shiino T, Watanabe H, Ohnishi M, Kawabata H. Isolation and characterization of a novel *Borrelia* group of tick-borne borreliae from imported reptiles and their associated ticks. 12th International Conference on Lyme borreliosis and other tick-borne diseases. Slovenia, September 2010.

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. 国内分離 *B. garinii* 株の DNA 型別。[]内にはデータベースで見出された ST 番号を示した。データベースに未登録の DNA 型については、Untypable(A1)から Untypable(B11)までそれぞれ示した。

分離材料	ST-group A	ST-group B
患者由来 (19 株)	J-21 [ST127], J-38 [ST127], J-37 [Untypable(A6)] (3 株、15.8%)	Hiratsuka [ST128], J-17 [ST128], J-32 [ST131], J-33 [ST131], J-34 [ST131], J-35 [ST131], HH1 [Untypable(B1)], J-20T [Untypable(B2)], J-15 [Untypable(B3)], J-39 [Untypable(B5)], J-16 [Untypable(B6)], J-41 [Untypable(B7)], J-14 [Untypable(B9)], J-18 [Untypable(B9)], J-40 [Untypable(B11)], J-42 [Untypable(B11)], (16 株、84.2%)
	NP76 [ST127], NT31 [ST134], NP81 [Untypable(A1)], NT25 [Untypable(A2)], HT59 [Untypable(A3)], HP1 [Untypable(A4)], NP4 [Untypable(A5)], NP8 [Untypable(A7)], HP3 [Untypable(A8)], HT18 [Untypable(A9)], HkIP2 [Untypable (A10)], (11 株、73.3%)	N346 [Untypable(B4)], NT24 [Untypable(B9)], FujiP2 [Untypable(B9)], HkIP1 [Untypable(B11)], (4 株、26.7%)
野鼠由来 (18 株)	なし	FiEE11 [ST122], FsAE2 [ST128], sai6B [ST128], HkCR1 [ST131], HkCR5 [ST131], HkCR6 [ST131], HkCR11 [ST131], HkCR12 [ST131], HokkaidoAS7B [Untypable(B7)], ASF [Untypable(B7)], HkCR7 [Untypable(B7)], FsAE1 [Untypable(B8)], sai7B [Untypable(B9)], sai8E [Untypable(B9)], HkCR3 [Untypable(B10)], HkCR4 [Untypable(B10)], HkCR9 [Untypable(B10)], HokkaidoCRB35B [Untypable(B10)], (18 株、100%)

厚生労働科学研究費補助金（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

研究分担者	今岡 浩一	国立感染症研究所	獣医科学部	第1室長
研究協力者	木村 昌伸	国立感染症研究所	獣医科学部	主任研究官
研究協力者	鈴木 道雄	国立感染症研究所	獣医科学部	主任研究官

研究要旨： ブルセラ症 (brucellosis) はブルセラ属菌 (Genus *Brucella*) による人獣共通感染症である。

1) 国内の野生イノシシおよびシカの血液サンプルを用いたこれまでの調査から、イヌブルセラ菌 (*B. canis*) に対する抗体を保有するものが認められている。今回、四国地方を中心に、イノシシにおけるブルセラ属菌に対する抗体の保有状況を検討したところ、これまでと同様、2010-11年シーズンのサンプルでも11/109のイノシシで*B. canis*に対して凝集が認められた。家畜ブルセラ菌 (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) に対しても1/109で凝集が認められた。また、血液培養により、ブルセラ属菌特異的遺伝子 (*bcs31*) 陽性分離株を得たが、これは、*Achromobacter* 属の菌であり、ブルセラに対する抗体とは反応性を持たなかった。したがって、イノシシに見られるブルセラ属菌反応性抗体は、本菌に対する交差反応ではなかった。すなわち、イノシシがブルセラ属菌に感染し、これに対する抗体を獲得している可能性は否定できなかった。

2) ブルセラ属菌特異的な抗体検出法を開発するため、ウエスタンブロッティングにより特異的反応を示したタンパクを分離し、そのアミノ酸配列 (104aa) を決定した。配列から、このタンパクの抗原部位を解析し、抗原性を持つと考えられる5種類のオリゴペプチドを作成し、その抗原性の解析を現在も継続中である。また、同時に、このタンパクの組換えタンパクを作成中である。

1) 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

A. 研究目的

ブルセラ症 (brucellosis) は世界中で毎年50万人を超える新規患者が発生しており、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、重要な人獣共通感染症である。国内では、感染症法によって4類感染症 (全数把握) に指定された1999年4月1日以降、2010年12月31日現在までに、ブルセラ症患者16例が届け出られている (表1)。そのうち6例は家畜ブルセラ菌 (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) である*B. melitensis*感染4例、*B. abortus*感染2例であったが、すべて国外を推定

感染地域とした、いわゆる輸入患者であった。残り10例のうち、国内を推定感染地域とする9例は*B. canis*感染であると考えられている。

国内では、家畜における家畜ブルセラ菌感染は、感染家畜の摘発・淘汰が功を奏し、現在は清浄化していると考えられている。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、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やりとりが起こっている様子は認められない。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、存在しているとする、野生動物が維持している可能性も考えられる。一方、*B. canis*については、国内のイヌの2～5%程度が抗体を持っていることが、確認されている。このように、*B. canis*は国内に定着しており、野生動物での保菌も考えられる状況にある。

これまでの我々の調査により、国内のイノシシで*B. canis*に対する抗体を持つものや、血中にブルセラ属菌特異的遺伝子を保有するものが認められている。そこで、今回、過去に抗体保有の報告があった四国地方を中心に、ブルセラ属菌の宿主となりうる野生イノシシの血液サンプルを入手し、ブルセラ属菌の保菌状況やブルセラ属菌に対する抗体の保有状況を検討した。

B. 研究方法

1. 血液サンプルの採取： 大日本猟友会の協力の下、イノシシの血液サンプルを採取してもらった。保冷して輸送・回収した血液は当室にて血清を分離し、測定まで-40℃に保管した。

2. マイクロプレート凝集反応 (MAT) による抗ブルセラ抗体の検出： 家畜ブルセラ菌に対する抗体は、ブルセラ病診断用菌液 (農業・生物系特定産業技術研究機構) を、*B. canis* に対する抗体は、ブルセラ・カニス凝集反应用菌液

(北里研究所) を用いて検出した。イノシシ血清を96穴U底マイクロプレート上で10倍から2倍段階希釈し、これにサフラニンを加えて調整した菌液を同量加える。家畜ブルセラ菌に対しては、保湿環境で37℃、18～24時間反応させた後に、40倍希釈以上で凝集像の確認された物を陽性と判定した。*B. canis* に対しては、50℃、24時間反応させた後に、160倍希釈以上で凝集像の確認された物を陽性と判定した。

3. ブルセラ属菌特異的遺伝子の検出と菌分離： 抗体陽性となったイノシシの血液よりDNAを分離し、ブルセラ属菌特異的DNAを*bcs31*、*omp2* (*abortus* type および *canis* type) もしくは *omp31* を標的として、PCRにより検出した。

また、血液をATCC488 brothで培養した。血液培養液については、その一部をPCRによるブルセラ属菌特異的遺伝子の検出に用いた。陽性となった培養液については菌分離を試みた。分離された菌は、当該遺伝子ならびに16S rRNA 遺伝子シーケンスを行った。また、ブルセラ属菌等で免疫したウサギ抗血清との反応性を調べた。

C&D. 研究結果と考察

1. サンプルの採取状況： 表2に過去のものも含めたサンプル・プロフィールを示した。イノシシは18県から2005年以前47頭、2005-6年シーズン98頭、2007-8年68頭、2008-9年87頭、2009-10年41頭、2010-11年109頭 (1/1現在) の合計450頭であった (表2)。

2. MATによる抗体検査： 家畜ブルセラ菌に対しては、3検体 (愛媛2、鹿児島1) が陽性を示した。その他の検査したサンプルはすべて1:10未満であり、抗体は確認されなかった。*B. canis* に対しては、検査したイノシシ450頭のうち42頭 (9.3%) が陽性を示した。特に四国地

区では、2010-11 年分は、家畜ブルセラ菌に対して 1/109 (0.9%)、*B. canis* に対して 11/109 (10.1%) が陽性を示した。調査開始からの合計では、家畜ブルセラ菌に対して 2/212 (0.9%)、*B. canis* に対して 29/212 (13.7%) 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 42 サンプル中 25 サンプルが、4 つのプライマーセットのうちいずれかで陽性となった。また、そのうち 5 サンプルで *B. canis* と同一の 3 種の増幅パターンが確認された (表 4)。家畜ブルセラ菌抗体陽性の 3 サンプルからは、ブルセラ特異的遺伝子は検出されなかった。PCR で *B. canis* の増幅パターンを示したサンプルについて各増幅産物のシーケンスを確認したところ、ブルセラ属内で保存性の高い *bcbp31* の増幅領域では 100%ブルセラ属菌の配列と一致した。*omp31* の増幅領域の配列は、*B. abortus* を除くブルセラ属菌と 100%一致した。*omp2* の増幅産物は、*B. canis* と *B. suis* の配列と 100%一致した。すなわち、*B. canis* の保菌が強く疑われた。

4. 血液培養および菌分離：血液培養後に 10 サンプルが *bcbp31* に対する PCR で陽性を示した (表 5)。このうち、3 サンプルは *omp2* (*canis* type) でも陽性となった。また、*bcbp31* に対する PCR でのみ、陽性を示す菌株が 2 株、分離された (表 5、図 1)。当該イノシシは、どちらも MAT による抗体検査で陰性の個体であった (表 4)。それぞれの分離菌株について、*bcbp31* 増幅領域および 16S rRNA 遺伝子のシーケンスを行った (図 2)。その結果、いずれも *Achromobacter xylosoxidans* と一致した。*A. xylosoxidans* は、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌で脱窒素細菌である。土壌、水系環境に存在し、病原性は弱いと見られるが日和見的に菌血症、心内膜炎、髄膜炎、肺炎を起こすことがあり、病院感染上も問題になることがある。

A. xylosoxidans をイノシシが保菌していることが示されたことより、本菌がブルセラ属菌に対して交差反応を示す可能性を調べた。百日咳菌で免疫したウサギ血清は弱い交差反応を示したが、ブルセラ属菌で免疫したウサギ血清は反応しなかった (図 3)。従って、イノシシに見られた抗体は、本菌に対する抗体の交差反応ではないことが示唆された。

E. 結論

今回の検討では、野生イノシシにおいて *B. canis* に対して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 10%が陽性を示した。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のイヌの抗体検査などにより確認されており、国内感染による患者も報告されている。ブタは一般に抵抗性であるとされているが、*B. canis* に軽度感染し、抗体を持つ可能性は否定できない。ブルセラ属菌の遺伝子検出に広く用いられている *bcbp31* に対するプライマーで交差増幅する菌が分離されたが、この菌は抗体の交差反応は示さなかった。また、*bcbp31* 以外の領域は増幅されなかった。よって、本菌がイノシシに見られる抗ブルセラ抗体の元になっている可能性は否定された。さらに検証を続ける必要があり、また、そのためには、より特異的な検査法の開発も必要である。

2) ブルセラ特異的抗体検査法の比較とブルセラ属菌特異的抗体検出法の作成に関する研究

A. 研究目的

一般にブルセラ症の診断では試験管凝集反応 (TAT) が用いられるが、検査に必要な血清量が多く、煩雑であるため、一度に多くのサンプルを検査することが難しい。そこで、我々は

これに替わる方法として、マイクロプレート凝集反応 (MAT) を報告し、実施してきた。今回は、イヌブルセラ病の各種血清学的診断法を比較検討した。比較した検査法は、一般に広く用いられている TAT、市販されており入手可能なイムノクロマト法 (ICA) と蛍光抗体法 (IFA)、さらに in house テストとして MAT とウェスタンブロット法 (WB) の全 5 種である。

B. 研究方法

1. サンプル： 静岡県内の某イヌ繁殖施設 (以下、K: kennel) における *B. canis* アウトブレイク時のイヌ血清 109 検体と K 市動物愛護センター (以下、H: healthy) の非感染イヌ血清 60 検体、計 169 検体を用いた。

2. 抗体検査方法： TAT および MAT は、ブルセラ・カニス凝集反应用菌液 (北里研究所) を用いて先の報告に基づいて実施した。ICA は Anigen Rapid C Brucella Ab Test Kit (Anigen Animal Genetics Inc.) を入手し、付属のプロトコールに従い実施した。被検血清をサンプル Well に 20 μ l 添加し、20 分後にコントロールラインの形成を確認し、テストラインの有無により判定した。IFA は Brucella canis FA substrate slide (VMRD Inc.) を入手し、付属のプロトコールに従い実施した。抗原 (*B. canis* 菌体) 固着スライドに 1:200 に希釈した被検血清を反応後、FITC-labeled anti-Dog IgG を反応させる。菌体の蛍光を、結果は蛍光顕微鏡下で判定した。

3. ウェスタンブロッティング法 (WB)： *B. canis* 浮遊液を 0.5% n-lauroylsarcosine 溶液に調整し、室温で 24 時間インキュベーションした後、遠心 (3,000 xg, 15min) し、さらに上清を超遠心 (100,000 xg, 72h) した後の上清を抗原 (SE: n-lauroylsarcosine extract) とした。SE は同量のサンプルバッファと混合、加熱処理 (99 $^{\circ}$ C, 5min) し、SDS-PAGE で泳動後、

polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。ブロッキング済みの PVDF 膜に 1:250 希釈した陽性対照イヌ血清、サンプルイヌ血清を 1 時間反応後、2 次抗体として anti-Dog IgG-HRP IgG (KPL) を 1 時間反応させた。発色には、EzWestBlue (ATTO) を用いた。結果は、バンドの確認により、陽性・陰性を判定した。

4. 検査結果の統計学的解析： それぞれの検査結果間の κ 係数 (kappa coefficient) を求めて比較した。

5. 合成ペプチドの作成： WB によりブルセラ特異的と考えられたタンパクについて、アミノ酸シーケンスを行った。得られたシーケンスについて、Protein database でタンパクを同定した。そのシーケンスに基づき、抗原性 (Hoop/Woods antigenicity、Protein antigenicity、Protrusion Index antigenicity、Welling antigenicity)、親水性および疎水性 (Kyte/Doolittle hydrophobicity、von Heijne hydrophilicity)、二次構造 (Chou Fasman 2 $^{\circ}$ structure、Robson Garnier 2 $^{\circ}$ structure) を解析し、5 種類の合成ペプチドを作成した。

C & D. 研究結果と考察

1. TAT によるスクリーニング： K 群のイヌについては、サンプル量が少なかったため、1:160 からの測定とした。51 頭が 1:160 以上の陽性を示し、58 頭が 1:160 未満の陰性であった。H 群は 1:20 から測定し、すべて陰性で、1:20 未満であった。

2. TAT とその他の検査法の比較： TAT と ICA、IFA、MAT の結果には、それぞれ比較的高い相関が見られた ($\kappa = 0.76 - 0.83$)。ただ、TAT 陰性のうち、それぞれ 15、19、13 検体が陽性を示した (表 6 上)。また TAT 以外の 3 法、ICA、IFA、MAT 間の相関は、非常に高かった ($\kappa =$

0.93) (表6下)。すなわち、ICA、IFA、MATはTATよりも感度が高いことが示された。

広く用いられるTATと比較してICA、IFA、MATは、イヌブルセラ病の診断に十分な感度と特異性を持つことが明らかとなった。

3. WBとその他の検査法の比較： K群109検体では、WBと他の4法との相関は低かった($\kappa = 0.29 - 0.49$)。これはK群のTAT陰性58検体での相関の低さ($\kappa = 0.32-0.46$)によると考えられた。一方、K群でTAT陽性の51検体とH群60検体では、WBと他の検査法の結果は、ほぼ一致($\kappa = 0.97-0.98$)した(表7)。

WBでは、他の検査法では陰性となったアウトブレイク時の検体の多くが陽性となった。これは、WBが高感度であるため抗体価の低い検体でも検出可能であったことによると考えられる。繁殖施設におけるアウトブレイクでは、WB以外の検査法では、低抗体価の感染動物を見逃す可能性があり、注意する必要があることが示された。

4. WBによるブルセラ特異的抗原の検索： より特異性、感度の高い検査法を開発するために、WBにより、ブルセラ特異的抗原の検索を行った。その結果、11~12kDのタンパクに特異性が認められた(図4)。このタンパクについて、アミノ酸シーケンスを行ったところ、104aaのブルセラ属菌Hypothetical proteinと一致した。さらに、このタンパクの抗原部位検索を行い、抗原性を持つと考えられた領域内に、5種類の合成ペプチドを作成した(図5)。現在、別途、アミノ酸配列から塩基配列を決定し、その領域を増幅するプライマーを作成し、フルサイズの組換えタンパクを作成中である。

E. 結論

現在、最も広く用いられているTATは簡便さや感度において、MAT、ICA、IFAに劣ること

が示された。また、WBとの比較により、MAT、ICA、IFAでもアウトブレイクが起こっている施設内では、抗体価の低い感染イヌを見逃す可能性が示された。従って、より特異性や感度に優れた方法の開発が必要であることが明らかとなった。

現在、我々は、合成ペプチドを作成し、その特異性と感度を検証している。また、フルサイズの組換えタンパクも作成中である。今後も、さらに、両者について検討を加えて、高感度特異的診断法の開発を行う予定である。

1) & 2)

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表等

1. 論文発表等

(1) Nomura,A., Imaoka,K., Imanishi,H., Shimizu,H., Nagura,F., Maeda,K., Tomino,T., Fujita,Y., Kimura,M. and Stein,GH. Human *Brucella canis* infection diagnosed by blood culture. *Emerg. Inf. Dis.*, 16(7):1183-1185, 2010

(2) 今岡浩一. 犬を飼うときに気をつけたい感染症. in: チャイルドヘルス, 診断と治療社, 13(8): 567-570, 2010

2. 学会発表・講演等

(1) 今岡浩一. 日本におけるブルセラ症の現状: 特別講演. 第47回レプトスピラ・シンポジウム, 東京, 2010年3月

(2) 木村昌伸, 今岡浩一, 鈴木道雄, 山田章雄. イヌブルセラ病抗体検査法の評価. 第150回日本獣医学会学術集会, 帯広, 2010年9月

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、1999.4.1～2010.12.31）

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
				abortus	canis	
2002.1	不明	ペットの犬	発熱、食欲不振	—	陽性	(-)
2005.6	シリア	経口	発熱、皮疹、脾腫、関節痛他	陽性	陽性	<i>melitensis</i>
2005.12	国内	不明	発熱、筋肉痛、腹痛	—	陽性	(-)
2006.2	エジプト	不明(吸入疑い)	発熱、頭痛、肝脾腫	陽性	—	<i>melitensis</i>
2006.6	イタリア	不明	発熱、筋肉痛	—	陽性	(-)
2006.7	エジプト(外国人)	経口	発熱、頭痛	陽性	—	(<i>abortus</i>)
2006.9	国内	不明	発熱、脾腫	—	陽性	(-)
2006.10	国内	不明	発熱、中枢神経症状	—	陽性	(-)
2007.4	国内	イヌ	リンパ節腫脹、倦怠感	—	陽性	(-)
2008.6	国内	飼い犬	発熱、関節炎、筋炎	—	陽性	(-)
2008.7	ペルー(外国人)	経口感染	発熱、痛み、全身倦怠感	陽性	—	(<i>abortus</i>)
2008.8	国内	繁殖犬	発熱、脾腫、肝腫大	—	陽性	<i>canis</i>
2008.8	国内	繁殖犬	発熱	—	陽性	<i>canis</i>
2009.10	インド(外国人)	経口	発熱、脾腫、リンパ節腫脹、関節炎他	陽性	陽性	<i>melitensis</i>
2010.4	ペルー(外国人)	経口?	発熱、腹痛、腰痛(腸腰筋膿瘍)	陽性	陽性	<i>melitensis</i>
2010.6	国内	不明	発熱	—	陽性	(-)

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.)	2010-11 (July.-Jan.)	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	29	44
香川			5	6	18	45	74
愛媛			11	14	11	32	68
高知		14	3	2	4	3	26
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	109	450

表3) MATによる抗ブルセラ抗体検出

Locality	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	44	0	6
香川	74	0	6
愛媛	68	2	10
高知	26	0	7
熊本	29	0	1
大分	9	0	0
宮崎	7	0	0
鹿児島	10	1	2
合計	450	3 (0.7%)	42 (9.3%)

B. abortus
(2/212, 0.9%)

B. canis
(29/212, 13.7%)

表4) 抗体陽性検体血中ブルセラ遺伝子のPCRによる検出

年度	No.	捕獲地	標的遺伝子※)			
			1	2	3	4
05	3	高知	-	-	-	-
	21	高知	-	-	-	-
	27	鹿児島	-	-	+	-
	32	広島#	+	-	+	+
	37	静岡	+	-	+	-
	63	千葉#	+	-	+	+
	80	静岡	+	-	+	-
	85	静岡	+	-	-	-
	93	高知	-	-	-	-
07	4	千葉	-	-	+	-
	8	鹿児島	-	-	-	-
	20	熊本	+	-	-	-
	49	愛媛	-	-	-	-
	60	愛媛	-	-	+	-
	62	愛媛	+	-	+	-
	63	愛媛	-	-	-	-
	68	愛媛	-	-	-	-
08	3	高知	-	-	-	-
	13	香川	+	-	-	-
	21	長野	-	-	+	-
	24	静岡	+	-	-	-
	25	静岡#	+	-	+	+
	28	徳島	+	-	-	-
	31	徳島	-	-	+	+
	33	愛媛	-	-	-	-
	61	愛媛#	+	-	+	+
	70	静岡#	+	-	+	+
	85	愛媛	+	-	-	+
87	鹿児島@	-	-	-	-	

年度	No.	捕獲地	標的遺伝子※)			
			1	2	3	4
09	19	愛媛@	-	-	-	-
	21	香川	+	-	-	-
	22	香川	+	-	+	-
	34	高知	-	-	-	-
	13	愛媛	-	-	-	-
10	14	香川	-	-	-	-
	52	徳島	+	-	+	-
	57	徳島	-	-	-	-
	73	愛媛@	-	-	-	-
	77	高知	-	-	-	-
	78	高知	-	-	-	-
	87	徳島	-	-	-	-
	90	徳島	-	+	-	+
	93	香川	+	-	-	-
	94	愛媛	-	-	-	-
100	香川	-	-	-	+	

陽性対象菌株の反応パターン

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

※) 1 : *bcsp31*
 2 : *omp2* (*abortus* type)
 3 : *omp2* (*canis* type)
 4 : *omp31*

☐ PCR陽性
 @) 抗*B. abortus*抗体陽性
 #) *B. canis*とPCRパターンガー致

表 5) 血液培養液によるブルセラ遺伝子の PCR による検出

No.	地域	<i>bcs31</i>	<i>omp2</i> (<i>abortus</i> type)	<i>omp2</i> (<i>canis</i> type)	<i>omp31</i>	菌分離
10	香川	+	-	-	-	+
12	香川	+	-	+	-	-
18	香川	+	-	-	-	-
30	徳島	+	-	-	-	-
45	香川	+	-	-	-	-
50	徳島	+	-	-	-	+
61	徳島	+	-	+	-	-
67	徳島	+	-	+	-	-
73	愛媛	+	-	-	-	-
78	高知	+	-	-	-	-

図 1) *bcs31* プライマーで陽性を示す分離株 (#10, #50 分離株)

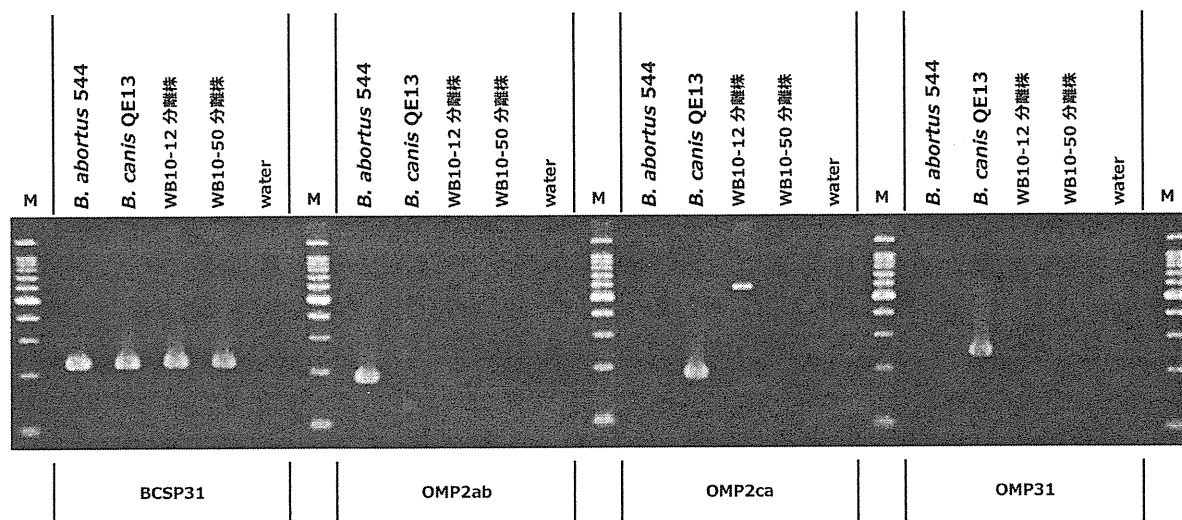


図2) 分離株のシーケンス

BCSP31
Primer
領域

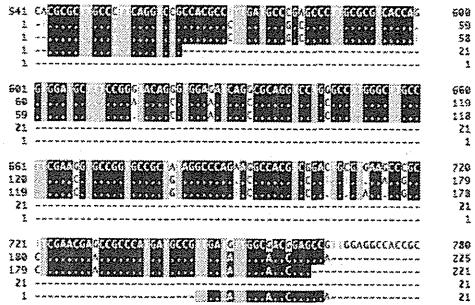
```

Achromobacter xylosoxidans AB CP002287 REGION- 73175..74134
WB10-50_B4-B5_INVERT
WB50-12_B4-B5_INVERT
B5
B4_INVERT

Achromobacter xylosoxidans AB CP002287 REGION- 73175..74134
WB10-50_B4-B5_INVERT
WB50-12_B4-B5_INVERT
B5
B4_INVERT

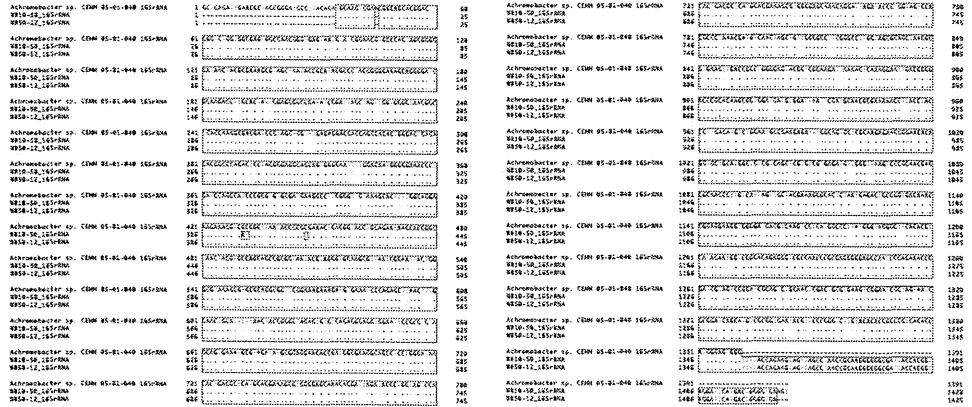
Achromobacter xylosoxidans AB CP002287 REGION- 73175..74134
WB10-50_B4-B5_INVERT
WB50-12_B4-B5_INVERT
B5
B4_INVERT

Achromobacter xylosoxidans AB CP002287 REGION- 73175..74134
WB10-50_B4-B5_INVERT
WB50-12_B4-B5_INVERT
B5
B4_INVERT
    
```



16S rRNA
領域

[GENETYX-MAC: Multiple-Alignment]
Date: 2010.11.28



Achromobacter xylosoxidansと一致

図3) 分離菌株のブルセラ属菌等免疫ウサギ血清に対する反応性 (ELISA 法)

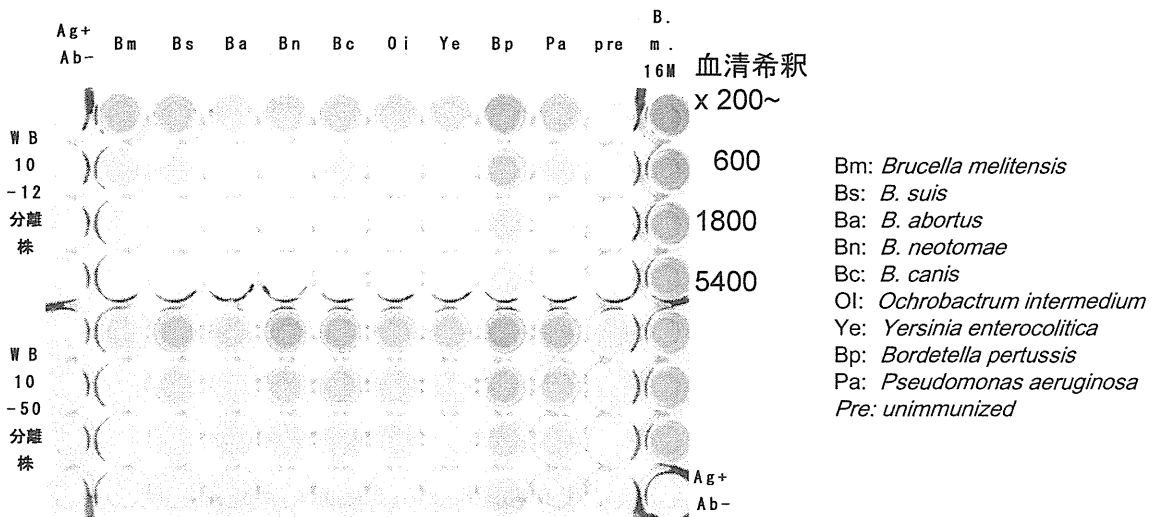


表6) TAT、MAT、ICA、IFAの相関

MAT				ICA				IFA						
	-	+	t		-	+	t		-	+	t			
	-	103	15	118		-	99	19	118		-	105	13	118
TAT	+	0	51	51	TAT	+	0	51	51	TAT	+	0	51	51
	t	103	66	169		t	99	70	169		t	105	64	169
	κ value	0.81				κ value	0.76				κ value	0.83		

ICA				IFA				IFA						
	-	+	t		-	+	t		-	+	t			
	-	98	5	103		-	101	2	103		-	99	0	99
MAT	+	1	65	66	MAT	+	4	62	66	ICA	+	6	64	70
	t	99	70	169		t	105	64	169		t	105	64	169
	κ value	0.93				κ value	0.93				κ value	0.93		

表7) WBとTAT、MAT、ICA、IFAの相関

WB				WB							
	-	+	κ value		-	+	κ value				
TAT	K	-	19	39	0.32	MAT	K	-	18	25	0.42
		+	1	50	0.98			+	2	64	0.97
	H	-	59	1	0.98		H	-	59	1	0.98
ICA	K	-	18	21	0.46	IFA	K	-	18	27	0.40
		+	2	68	0.97			+	2	62	0.97
	H	-	59	1	0.98		H	-	59	1	0.98

K : Kennel dogs, H : Healthy dogs