

図4) WBによるブルセラ特異的抗原の検出

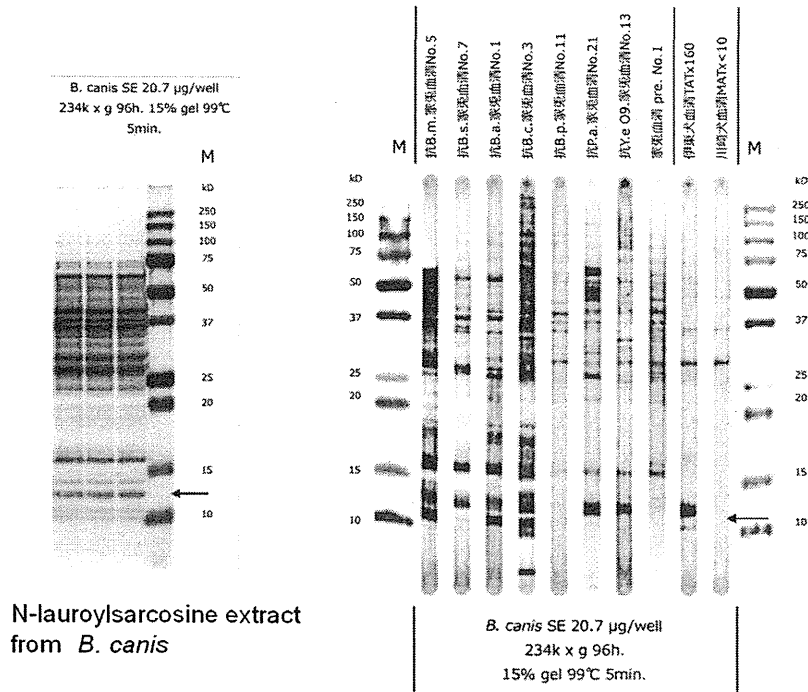
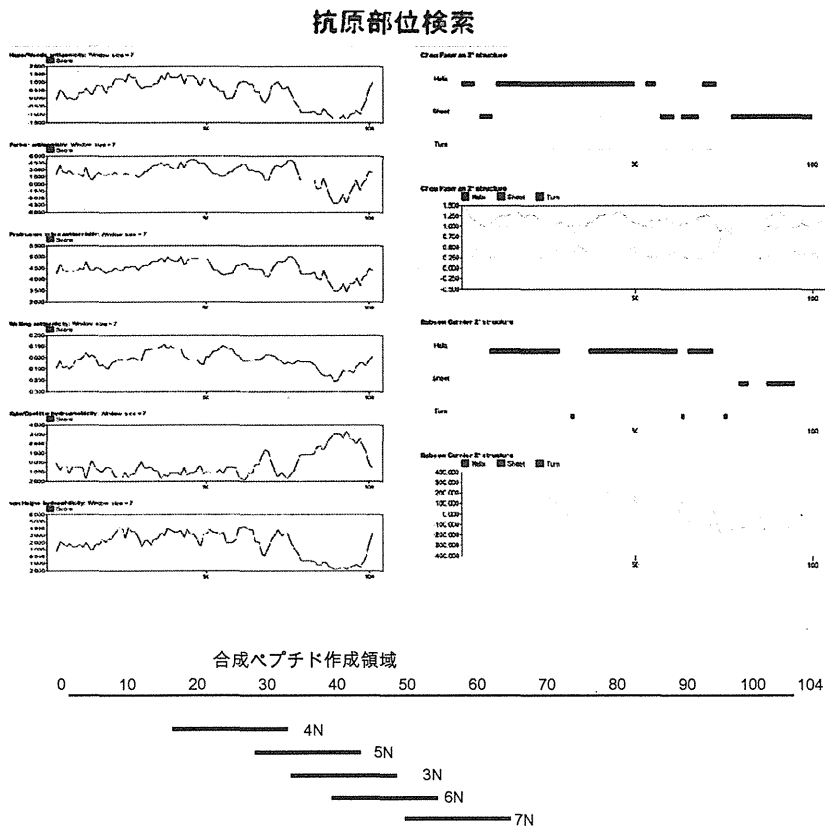


図5) 分離タンパクの抗原部位の検討と合成ペプチド作成



コリネバクテリウムに関する研究

分担研究者

高橋元秀（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。両患者の環境調査において飼いネコから患者と遺伝子型が一致する *C. ulcerans*^{Tox+} が分離された。

9カ所の地方自治体の動物愛護センター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を実施した結果、5カ所の愛護センターのネコとイヌより *C. ulcerans*^{Tox+} が分離された。一方、名古屋市の動物病院におけるネコの調査では、1匹から *C. ulcerans* が分離されたが、ジフテリア毒素非産生性であった。

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高い。感染した動物からは動物への菌の伝播がおり感染が成立する。感染動物では排菌量が多いために、免疫力が低下している人はイヌ、ネコにおいては感染リスクが高いことが考えられる。しかし、現在までに限られた畜産動物の検体については当該菌は陰性である。

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ある。2001年千葉県で、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された。その後、3例の患者からの菌分離事例では当局への報告が遅れたこと、*C. ulcerans* 感染に関して感染症法での位置づけがないために行政を中心とした疫学・環境調査ができていない。

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、その自然界における実態を把握する必要がある。過去に実施したイエネコでの限られた調査では明確な結論が得られなかったため、調査対象を更に拡大し、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3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おこなった。必要により、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) 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・ネコ、または開業獣医師へ来院したイヌ・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、富山県、大阪府、愛媛県、岡山県、および大分県である。

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。菌分離試験に用いる培地の作製にあつては、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、荒川変法血液培地および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) 名古屋市の日本小動物獣医師会所属の開業医院の協力の下、診療・診察に訪れたイヌ・ネコのうちで、風邪様症状(クシャミ、鼻水等)を呈している動物を対象として調査を実施した。検査に際して、菌分離は大阪大学微生物病研究所 検査センター、菌の最終同定は感染研で実施した。

3) 獣医科大学との共同研究として、岐阜大学柳井研究室では2010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定量の血清疫学調査を実施した。血中抗毒素が陽性イヌにあつては猟師の承諾を得て菌分離と再採血による抗毒素価測定を実施した。また、大阪府立大学 小崎俊司教室では、大阪府及び奈良県の乳房炎罹患牛の生乳並びにと場より採取した肉用牛の咽頭スワブからの菌分離検査を実施した。

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。

と畜場での採材は、と殺後すみやかに咽頭等をシードスワブγ3号で採取、培養検査開始まで4℃で保存した。また、乳房炎、関節炎、皮膚炎等の患部は切開後、同様にぬぐい液を採取した。

開業獣医医院での検体採取は、咽頭や鼻水等をシードスワブ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末加ヒツジ血液寒天培地(以下、K培地)に塗抹、血液寒天培地は18~24時間後、K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で毒素遺伝子検出する方法を組み合わせて実施する場合もある。菌の毒素産生性の同定は毒素遺伝子のAサブユニットを特異的に増幅するプライマーを用いたPCR、Elek法および培養細胞法を使い分けて確認した。

4. 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℃、6V/cm、5-20sec 18hrs、1-5sec 14hrsで行った。結果はUPGAMA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。

(倫理面への配慮)

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。また、獣医師会を通じた調査では一般診療の一環として実施したが、患イヌ・ネコの飼い主へインフォームドコンセントをおこない同意を得た後に実施した。

C. 研究結果

(1)ジフテリア様患者の調査は以下の3名について実施した。

1) 横浜市衛生研究所より感染症情報センターへ *C. ulcerans* 分離の報告があった(国内ヒトの症例の7例目)。担当医師から以下の情報を得た。神奈川県在住の HIV 加療中の 50 歳代の男性である。6 月 7 日、飼ネコの胸部に膿瘍を発見、この膿瘍は自壊して排膿したため、イソジンで洗って排膿した。このとき、ネコに左腕を引っ掻かれた。6 月 17 日より左前胸部に腫脹を自覚した。19 日左腋窩の腫脹を自覚した。6 月 21 日 38.2 度の発熱が出現したため、6 月 22 日通常通院している横浜市民病院を受診し、腋窩リンパ節が 3cm 程度に腫脹しており、穿刺排膿を施行した。この膿を細菌検査室にて染色したところ、Gram 染色陽性の桿菌が検出されたので、*Nocardia* 属菌の感染を疑って、ミノマイシン 100mgx2 回/日処方された。気道症状なし。6 月 28 日、同病院検査室にて培養より *C. ulcerans* が検出された。

6 月 29 日再外来受診時に腋窩リンパ節が 4cm 程度に腫大しており、エリスロマイシン 1200mg (300mgx4 回/日) 処方した。この膿瘍は 7 月 6 日には縮小し始めた。7 月 21 日まで 1 ヶ月間抗生物質を投与し、軽快。膿瘍は小豆大まで縮小した。8 月 10 日には、ほとんど腫れは引いた。その後増悪なし。

患者の環境調査により、妻と娘と同居、とくに用事がない場合は、自宅で過ごしている。自宅には飼いネコが 7 匹家の家内外を自由に行き来している。さらに隣の家のネコが 3 匹患者宅に居ついていた。材料採取した 8 匹の口内スワブと傷や鼻水を呈するネコは菌分離検査をおこなった。患者及びその娘の咽頭スワブも採取した。患ネコは約半数が口内の炎症や鼻水、膿瘍などが観察された。同居家族の咽頭スワブからは *C. ulcerans* は検出されなかった。一方で、複数いる飼いネコのうち 1 匹の鼻汁及び口腔内スワブより、*C. ulcerans*^{Tox+} を分離した。この分離菌は、

PFGE 解析の結果、ヒト由来株とネコ由来株は同じタイプであった。更にこれらの株は、ヒト岡山株と同じタイプであった。これらの結果より患者は飼いネコより *C. ulcerans*^{Tox+} 感染が起きたと推定された。(神奈川県横浜市衛生研究所、横浜市民病院、感染症情報センター、感染研細菌第二部)

2) ジフテリア疑い患者の発生が担当医師(愛里病院内科の蛭川医師)から情報提供があった。患者は 75 歳 男性で入院中である。7 月 30 日初診時、3 ヶ月前から顔の腫れあり、右目の腫れ、2 週間前より物が飲み込めない状態であった。ミノマイシン投与とニューキノロン系点眼薬を処方。腫れている眼脂を検査した結果(検査会社へ外注) *Corynebacterium. spp.* の報告を受けた。菌は検査会社で廃棄されたために当室での菌種の同定には、至らなかった。8 月 9 日に再度、眼脂と咽頭について検査したが菌は検出されなかった。この時期より、右目が開けられないほど腫れ、首が強度の腫れが観察され、食事が不能、薬も飲み込めない。8 月 10 日に所轄保健所の要請で血清と咽頭スワブを採取し、当室で菌分離検査を実施したが、関連菌は検出されなかった。臨床症状よりジフテリアを疑いジフテリアウマ抗毒素の 2 万単位を同夜投与した。同時に血清病予防のためにステロイドおよびセフチゾキシムを処方した。11 日の朝に開眼を確認するとともに首の腫れも改善した。しかし、この時期より四肢の麻痺が出現し、長期の入院加療となったが、右目や首の腫れがほとんど消えた。10 月 27 日時点で、車いすを使用するまで回復した。なお、11 月 15 日の血清中のジフテリア抗毒素価を定量した結果、培養細胞法およびウサギ皮内試験法ともに検出レベル以下であった。

患者は簡易宿泊所を住居とし、家主はネコの親と 2 匹の子供の合計 3 匹ほど飼育していて家の内外に常時出入りしていた。親ネコが高齢で鼻水を出していて風邪症状を呈していた。これらのネコの菌分離調査はできなかったが、地区の公園にいた 4 匹のネコの体表及び口内スワブを採取した。また、周辺に集まってい

た3羽のハトの糞を採取した。これらは、PCRによるジフテリア毒素遺伝子検査を行ったが、すべて陰性であった。(東京都健康安全研究センター、足立区愛里病院、感染研細菌第二部)

3) ジフテリア疑い患者の発生が担当医師(土浦協同病院耳鼻科の畑中医師)から情報提供があった。患者は51歳の女性で、風邪症状が増悪後、嚥下困難を呈し咽頭に典型的な白い偽膜を観察した。GPR(グラム染色陽性桿菌)が病院の検査室で分離された。当室で当該菌の道程試験で*C. ulcerans*^{Tox+}を確認した。治療はエリスロマイシン投与を行い入院7日目に退院した。患者の環境調査で、風邪症状を呈する飼いネコ(13歳オス去勢済み)の目やに咽頭スワブから*C. ulcerans*^{Tox+}を分離した。しかし、治療後の患者とその夫の咽頭スワブの検査は陰性であった。分離菌についてPFGEによる解析を行った結果、患者分離株と飼いネコからの分離株のPFGEパターンが一致した。更にこれらの株は、ヒト岡山株と同じタイプであった。また、飼いネコの血清中には、抗ジフテリア毒素抗体が検出された(0.02IU/mL)。

なお、患者飼いネコを診察している長島動物病院の協力を得て、風邪様症状を示すネコ3頭から口内スワブや鼻ぬぐい液を採取して検査した結果、菌分離に陰性であった。(土浦協同病院耳鼻科、長島動物病院、感染研細菌第二部)

(2) 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・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。

1) YO 県の調査

牛病畜(関節炎および乳房炎)の関節液および乳汁の計10検体と、耳鼻咽喉科でのヒトの咽頭スワブ1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。ヒトの検体については

もう少し採取できると考えていたが、ジフテリア様疾患を疑う患者が少なかったものと思われる。今後、患者の調査に当たっては、より広範囲な地域と諸症状について患者検体を採取する必要があると考える。

2) OS 県の調査

菌分離調査として動物管理指導センターおよび6ヶ所の動物病院のネコ214匹の咽頭または鼻腔スワブの検査の結果、毒素非産生性菌を含み7匹から*C. ulcerans*を分離した。野生シカ51匹の鼻腔スワブの検査結果はすべて陰性であった。また、ネコについては197匹、野生シカは8匹について、血清中のジフテリア抗毒素を測定した結果、16匹(動物管理センター12、動物病院4)のネコが陽性であった。

動物管理指導センター収容ネコでは毒素遺伝子保有株分離率は3.2%、開業獣医医院受診ネコでは3.3%であり、県内の収容ネコ及び一般家庭飼育ネコともに一定の割合で*C. ulcerans*^{Tox+}を保有していることが明らかとなった。また、血清中抗毒素保有調査では、収容ネコ及び一般家庭飼育ネコともに8.0%以上の個体で抗毒素を保有しており、過去に*C. ulcerans*^{Tox+}感染した疑いのあるネコの存在も明らかとなった。ネコにおいては*C. ulcerans*^{Tox+}が潜在している可能性があり、今後*C. ulcerans*^{Tox+}分離陽性個体及び抗毒素陽性個体の周辺環境調査を行なう必要があると考えられる。

3) KT 県の調査

菌分離およびPCR試験によるスクリーニングとして、開発した*C. ulcerans*のDLT遺伝子、p1D遺伝子ならびに*C. pseudotuberculosis* p1D遺伝子の特異的に検出するリアルタイムPCR法により、調査動物(計56検体)について検査を実施した。その結果、56検体中1検体から*C. ulceans*のDLT、p1D遺伝子が検出され、1検体から*C. ulceans*のp1D遺伝子のみが検出された。DLT、p1D遺伝子が検出された1検体からは菌が分離された。しかし、p1D遺伝子のみ検出された1検体からは、菌の分離はできなかった。p1D遺伝子のみ陽性とな

った検体は、DLT 非産生 *C. ulcerans* の可能性も残されているが、リアルタイム PCR の検出サイクル数や融解曲線から、DNA 量が他の検体に比べ少なく、かつ凍結保存されていた検体だったため、菌が分離できなかったものと推定された。なお、56 検体から *C. pseudotuberculosis* は検出されなかった。

4) YT 県の調査

昨年度に引き続き動物管理センターに引き取られたネコの咽頭スワブおよび動物病院に診療・診察に訪れた風邪様症状を呈したネコ 80 匹およびイヌ 2 匹の鼻汁について調査した。その結果、これらの検体からジフテリア毒素遺伝子、および *C. ulcerans*^{Tox+} は検出されなかった。

5) HE 県の調査

昨年度に引き続き愛護センターのイヌ及びネコを調査した。5～12 月にかけてそれぞれ 124 頭の検査を行った結果、イヌ 3 頭 (2.4%) 及びネコ 8 頭 (6.5%) から計 11 株の *C. ulcerans* を分離した。ネコから分離された 8 株中 2 株は、毒素原性試験では陰性であった。分離された動物の収容月は、5 月 2 頭、7 月 2 頭、8 月 2 頭、10 月 3 頭、12 月 2 頭であり、時期による分離率の差は認められなかった。また、収容地域を東、中、南の 3 地域に分けて分離率を比較したが、それぞれ 3.6%、1.5%、8.2% と有意差はみられず、県下全域に広く分布していると考えられた。

また、飼育環境の汚染状況を把握するため、飼育施設内の拭き取り調査を行った。8～11 月にかけて 160 件の拭き取り検査を行った結果、7 件 (4.4%) から毒素原性ウルセランスが分離された。使用中のネコケージの検出率が 12.5% (6/48) と高く、使用中のイヌケージは 3.1% (1/32) であった。なお、未使用ケージ、通路、床の計 80 件からウルセランスは検出されなかった。

6) NK 県の調査

菌分離調査として動物保護センターに搬入されたイヌ 55 頭およびネコ 19 頭の口腔スワブ合計 74 匹について行った。今回用いた選択平板培地上に発育した菌株について PCR 試験

を実施した結果は、すべてジフテリア毒素遺伝子陰性であった。

7) SO 県の調査

菌分離調査として動物病院 6 ヶ所のネコ 11 匹の鼻汁等の検査結果は 1 匹から *C. ulcerans*^{Tox+} を分離した。陽性ネコは室内外の出入り自由の飼育環境であった。香川県の 4 ヶ所の動物病院のネコ 25 匹の鼻汁等の検査結果は 6 匹から *C. ulcerans*^{Tox+} を分離した。陽性となったネコの環境調査として室内の 10 ヶ所のふき取り検体は陰性であった。また、菌陽性の 6 匹はジフテリア抗毒素価の上昇が認められた。他 2 県の 2 動物病院のネコ 71 匹の鼻汁等の検査結果は 2 匹から *C. ulcerans*^{Tox+} を分離した。陽性 2 匹は同一飼い主であり、陽性 2 頭と同一飼い主の 12 頭中 5 頭に抗体陽性を認めた。

K 市の 1 動物病院のネコ 2 匹の鼻汁等の検査結果は 2 匹から *C. ulcerans*^{Tox+} を分離し、環境調査でこたつの拭き取りから菌を分離した。しかし、家族 3 名の咽頭スワブは陰性であった。分離菌 2 株中 1 株はニューキノロン系薬剤に中間を示した。2 株は PFGE で同一パターンを示し、また中間を示した菌は耐性に関連する遺伝子変異も認められたことから、治療中に耐性化したことが推測される。

8) KT 県の調査

昨年度に引き続き愛護センターの 54 匹のイヌを調査した結果、培地上に出現した菌は colony PCR を行ったが全て陰性であった。また、動物病院はイヌ 8 頭、ネコ 28 匹についても同様に colony PCR を実施したが、全て陰性であった。

9) IO 県の調査

愛護センターのイヌ 22 匹およびネコ 37 匹の咽頭スワブおよび抑留犬舎の飲み水 14 検体の検査を実施した。その結果、イヌ 3 匹から 3 株の *C. ulcerans*^{Tox+} を分離し、4 匹 (菌分離の 3 匹を含む) は PCR 陽性であった。また、ネコ 1 匹は PCR 陽性であったが、菌は分離できなかった。これらの動物は捕獲地域に共通性はなく、外見上健康であり、病変等は見られなかった。PFGE による菌株の解析で

は、2 株は大分県ヒト由来株と、1 株は岡山県ヒト由来株と同一のパターンを示した。環境調査として抑留犬舎の飲み水を検査した結果、2 検体より PCR 陽性となったが、菌は分離できなかつた。2 検体は採材時期は異なるが、菌が分離されたイヌが収容されていた犬舎の飲み水である。

1 0) 平成 22 年 8 月 21 日から 10 月 8 日の間、名古屋市 16 区の名古屋市獣医師会会員病院で飼ネコの咽頭ぬぐい液もしくは鼻汁の 96 匹について調査した。各病院で採取した検体は輸送まで 1 週間分まとめて冷蔵保存した。菌分離は大阪大学微生物病研究所の検査センター、菌の最終同定は当室で実施した。調査の結果、96 検体のうち、1 検体で *C. ulcerans* が分離されたが、ジフテリア毒素原性試験は陰性であり、全てにおいて *C. ulcerans*^{Tox+} は検出されなかつた。

1 1) 獣医科大学との共同研究調査結果

①岐阜大学 柳井徳磨研究室：野生動物と接する機会の多い猟犬について、静岡県、長野県、三重県、新潟県、長野県および岐阜県の 6 地域獣医会の協力を得て合計 146 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、静岡県で 4 頭、三重県で 6 頭および新潟県で 1 頭の合計 11 頭がジフテリア抗毒素価 1mL 中に 0.01-0.23 単位と陽性であった。陽性犬を飼育する三重県の猟師の同意を得て、各猟師保有の同居犬を含めて 9 匹について菌分離試験を実施した結果、抗毒素価が陽性 (0.06 単位) の皮膚病の紀州犬 1 頭の口腔内から *C. ulcerans*^{Tox+} を分離・同定した。しかし、同犬の体表ぬぐい検体は、および他の 8 匹は陰性であった。

②大阪府立大学の調査

昨年度に引き続き畜産分野の調査として、乳汁 48 検体、食肉センターにおいて 130 匹のウシの咽頭スワブを検査した。*C. ulcerans* はウレアーゼ陽性であることに注目し、今年度は菌分離過程の初期にウレアーゼ試験を行った。その結果、昨年度同様に最も多くの *C.*

jeikeium (ウレアーゼ陰性) が分離されたが、昨年度分離された他のコリネ菌種は分離されなかつた。従って *C. ulcerans* は分離されなかつた。

1 2) その他の調査結果

国内実験用サルでの調査：国内で飼育・繁殖された無症状の実験用カニクイザル 68 頭の咽頭スワブを検査したところ、9 頭から *C. ulcerans*^{Tox+} が分離された。PFGE 解析ではサル由来株はヒト由来株とは異なるグループに分類された。またサル由来株 9 株のうち 7 株が一致し、このグループと他の 2 株は 94-95% の相同性を示した。毒素遺伝子解析ではサル由来の全株で塩基配列が一致した。

D. 考 察

C. ulcerans^{Tox+} が分離された県での飼育環境として飼育施設内 160 件の拭き取り調査の結果、7 件から *C. ulcerans*^{Tox+} が分離されている。使用中のネコケージおよびイヌケージから検出したが、未使用ケージ、通路、床の計 80 件からは検出されなかつた。また、異なる県での調査では、菌分離陽性のイヌを管理している飲料水からジフテリア毒素遺伝子が PCR で確認されている。イヌやネコの唾液等により飼育環境が汚染され、感染が広がる可能性が明らかとなった。ケージの洗浄が適切に行われていれば、施設内での菌の拡散防止は可能と考えられる。

名古屋市における飼いネコの調査で *C. ulcerans*^{Tox+} がの保菌率は低いとも推測されるが、今回調査されたネコの約 64% が室内飼いであり、約 55% が同居動物以外の動物との接触がない。また、約 62% で症状のない健康なネコから検体が採取されていることから、今回のように名古屋市内の動物病院に来院するネコを主体とした調査ではなく、屋外で生活するネコや咳やくしゃみ、鼻汁といった風邪様症状を呈したネコを主体とする調査を行えば今回とは違った調査結果が得られるかもしれないとも推測される。今回の調査では全例陰性であったものの、動物病院で勤務する

獣医師は *C. ulcerans*^{Tox+} がの存在を十分に認識し、飼い主に対しても啓蒙していく必要性があると思われる。

OS 県におけるネコの血清中のジフテリア抗毒素価測定の結果、動物病院および愛護センターにおいても、約 10% の割合で陽性となっている。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、局所での増殖にとともに産生した毒素が刺激となって抗体を誘導したと考える。過去の異なる地域での約 200 匹のイヌ・ネコの血清の調査では陰性であったことを考えると、本菌の国内分布は一様でないことが考えられる。KT 県における過去 3 年間にわたる愛護センターおよび動物病院におけるネコの菌分離調査では、当該菌は 1 株も分離されていないことも、地域限局性を示す根拠である。

一般家庭で飼育するネコの調査では、複数の地域で当該菌の分離が確認されている。特に鼻水、クシャミが観察されている個体からの菌分離は高いようである。当該菌の単独感染ではなく、ネコ白血球ウイルスが陽性である例感染例も確認されている。国内 8 例の感染患者がすべて 50 歳以上であること、関節リウマチ治療に伴う免疫抑制剤の投与中に感染した例など、ホスト側の免疫低下も感染リスクを高める要因と考えられる。

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。

E. 結 論

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、広範囲に本

菌が分布していることが確認された。菌が分離された地域では 2 年間に同様の調査結果が得られているため、このような地域では当該菌が常在していることを示している。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、ジフテリア症状を呈する患者 2 例の環境調査で、いずれの患者でも飼いネコが感染源として疑われており、風邪用の有症ネコからはヒトへの感染リスクは高いことが確認された。なお、本調査の成果が行政に反映され *C. diphtheriae* 感染によるジフテリアの届出基準に、*C. ulcerans* 感染に対する注意・啓蒙を含む内容が追記された（厚生労働省健康局結核感染症課長 健感発 0114 第 1 号平成 23 年 1 月 14 日）

F. 健康危険情報

なし¹

G. 研究発表

1. 論文発表

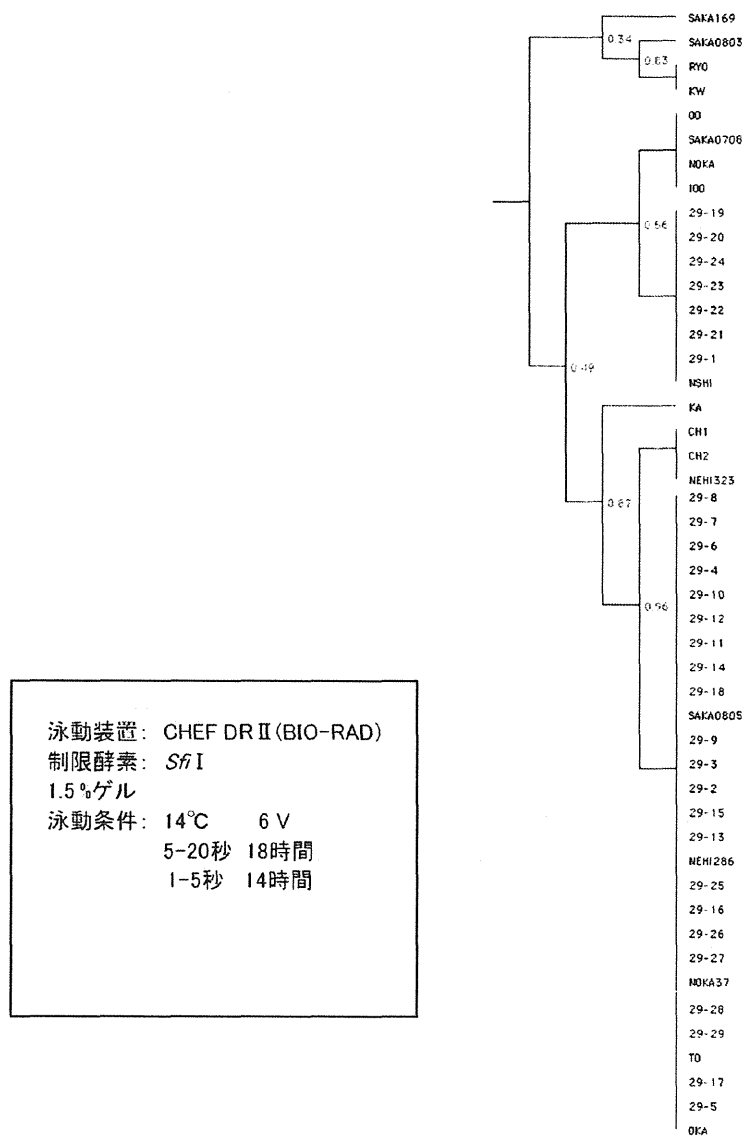
- (1) Komiya T, Seto Y, De Zoysa A, Iwaki M, Hatanaka A, Tsunoda A, Arakawa Y, Kozaki S, Takahashi M. : Two Japanese *Corynebacterium ulcerans* isolates from the same hospital: ribotype, toxigenicity and serum antitoxin titre. J Med Microbiol. 59(Pt 12):1497-504. 2010
- (2) Iwaki M, Komiya T, Yamamoto A, Ishiwa A, Nagata N, Arakawa Y, Takahashi M. : Genome organization and pathogenicity of *Corynebacterium diphtheriae* C7(-) and PW8 strains. Infect Immun. 78(9):3791-800. 2010
- (3) Hall AJ, Cassidy PK, Bernard KA, Bolt F, Steigerwalt AG, Bixler D, Pawloski LC, Whitney AM, Iwaki M, Baldwin A, Dowson CG, Komiya T, Takahashi M, Hinrikson HP, Tondella

- ML. : Novel *Corynebacterium diphtheriae* in domestic cats. *Emerg Infect Dis.* 16(4):688-91. 2010
- (4) 高橋元秀 : ジフテリア毒素原性 *Corynebacterium ulcerans* の感染症、日本獣医師会雑誌 63 p813-818、2010
- (5) 畑中章生、鎌田知子、田崎彰久、本田圭司、山本明彦、小宮貴子、高橋元秀 : 茨城県で初めて確認されたコリネバクテリウム・ウルセランスによるジフテリア症例、国立感染症研究所病原微生物検出情報 Vol. 32 p. 19-20: 2011年1月号
- (6) 吉村幸浩、山本明彦、小宮貴子 : 飼い猫の排膿に伴って、経皮的に腋窩リンパ節に膿瘍を生じたことが強く疑われる *C. ulcerans* 感染症の例、国立感染症研究所病原微生物検出情報 Vol. 31 p. 331: 2010年11月号
- (7) 高橋元秀 : イヌ・ネコにおけるジフテリア毒素産生 *Corynebacterium ulcerans* の保菌調査状況、国立感染症研究所病原微生物検出情報 Vol. 31 p. 203-204: 2010年7月号
- (8) 若松正人 人見 徹 成松浩志 緒方喜久代 小河正雄、小宮貴子 : 大分県におけるイヌ・ネコの *C. ulcerans* 保菌状況、国立感染症研究所病原微生物検出情報 Vol. 31 p. 204-205: 2010年7月号
- (9) 烏谷竜哉、浅野由紀子、田中 博、武智拓郎、土井光徳、佐々木俊哉、木村琴葉、岩崎 靖、勇 孝徳、望月昌三、豊嶋千俊、小宮貴子 : 愛媛県におけるイヌ・ネコの *C. ulcerans* 保菌状況、国立感染症研究所病原微生物検出情報 Vol. 31 p. 205-206: 2010年7月号
- (10) 中嶋 洋、大島律子、石井 学、岸本寿男、木本有美、木口 修、赤木敏文、瀧本良幸、鳥越秀二、勝川千尋、小宮貴子 : 岡山県におけるイヌ・ネコの *C. ulcerans* 保菌状況、国立感染症研究所病原微生物検出情報 Vol. 31 p. 206-207: 2010年7月号
2. 学会発表
- (1) 朝倉亜希, 柳井徳磨, 酒井洋樹, 久保正仁, 山田章雄, 今岡浩一, 高橋元秀, 安藤秀二, 今岡信夫, 川端寛樹, 木村昌伸。西日本を中心にした猟犬の感染症に関する調査研究。第16回日本野生動物医学学会(福岡), 2010年9月, 要旨集 p92
- (2) 柳井徳磨, 朝倉亜紀, 酒井洋樹, 高橋元秀, 今岡浩一, 今泉信夫, 安藤秀二, 川端寛樹, 木村昌伸, 山田章雄。 猟犬を用いた野外感染症のモニタリング。平成22年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会(岐阜), 2011年2月, 要旨集 p309
- (3) 野口佳裕、小宮貴子、山本明彦、高橋元秀、角田篤信 : *Corynebacterium ulcerans* 感染症の1例、第111回日本耳鼻咽喉科学会総会, 仙台、2010年5月
- (4) 小川 高、三島浩享、新家俊樹、杉山寛治、神田 隆、高橋元秀 : 鼻汁よりジフテリア毒素原性 *Corynebacterium ulcerans* を分離した家庭猫の1例、第150回日本獣医学学会総会、宮崎、2010年4月
- (5) 渡部友芸、伊藤 彩、楠山美保、杉本直樹、小宮貴子、山本明彦、高橋元秀、荒川宜親 : *Corynebacterium striatum* による誤嚥性肺炎の一例、第22回日本臨床微生物学界総会、岡山、2011年1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. 22年度 *C.ulcerans* 調査状況

都道府県	種類	機関	検体採取	検体数	菌分離数	備考
YO	ヒト	ASクリニック	咽頭スワブ	1	0	
	牛	食肉検査所	関節液、乳汁	10	0	
OS	ネコ	動物愛護センター	咽頭スワブ	154	5	PCRのみ陽性: 2検体 毒素非産生: 1検体
	ネコ	動物病院(6ヶ所)	鼻汁、咽頭スワブ 等	60	2	
	野生シカ	有害野生鳥獣捕獲動物	鼻腔スワブ	51	0	
	ネコ	動物愛護センター	血清: 抗毒素価	150	12	血清中抗毒素陽性数
	ネコ	動物病院(6ヶ所)	血清: 抗毒素価	47	4	
	野生シカ	有害野生鳥獣捕獲動物	血清: 抗毒素価	8	0	
KT	ネコ	動物病院(1ヶ所)	鼻汁等	9	-	遺伝子検出2、うち菌分離1
	ネコ	不明	目脂、鼻汁 等	37	1	
	ネコ		口内、体表 等	7	-	
	ハト	環境調査	糞便	3	-	
YT	ネコ	動物愛護センター	咽頭スワブ	65	0	
	ネコ	動物病院	鼻汁	15	0	
	イヌ	動物病院	鼻汁	2	0	
HE	イヌ	動物愛護センター	咽頭スワブ	124	3	<i>C.amycolatum</i> 検出
	ネコ	動物愛護センター	咽頭スワブ	124	8	<i>C.amycolatum</i> 検出
	イヌケージ	動物愛護センター	拭き取り	48	1	
	ネコケージ	動物愛護センター	拭き取り	80	6	
	通路、床	動物愛護センター	拭き取り	32	0	
NK	イヌ	動物愛護センター	口腔スワブ	55	0	
	ネコ	動物愛護センター	口腔スワブ	19	0	
SO	ネコ	動物病院(A 6ヶ所)	鼻汁	11	1	陽性: 出入り自由の飼育環境
	ネコ	動物病院(B 2ヶ所)	鼻汁、目やに	12	0	
	イヌ	動物病院(B 1ヶ所)	耳垢他	5	0	
	ネコ	動物病院(C 1ヶ所)	鼻汁他	8	6	菌陽性の6個体は抗毒素価の上昇が認められた。
	飼育環境	動物病院(C 1ヶ所)	飼育部屋	10	0	
	ネコ	動物病院(D,E 2ヶ所)	鼻汁 等	71	2	陽性2検体は同一飼い主。陽性2頭と同一飼い主の12頭中5頭に抗体陽性を認めた。
	イヌ	動物病院(E 1ヶ所)	鼻汁	1	0	
	ネコ	動物病院(F 1ヶ所)	鼻汁	2	2	
	飼育環境	動物病院(F 1ヶ所)	飼育部屋	6	1	こたつから検出
	家族	動物病院(F 1ヶ所)	咽頭	3	0	
KT	イヌ	動物愛護センター	咽頭スワブ	54	0	
	イヌ	動物病院(10ヶ所)	陰部周囲、鼻汁等	8	0	
	ネコ	動物病院(10ヶ所)	眼脂、鼻汁 等	28	0	
IO	イヌ	動物愛護センター	咽頭スワブ	22	3	PCR: 4陽性
	ネコ	動物愛護センター	咽頭スワブ	37	0	PCR: 1陽性
	飼育環境	動物愛護センター	抑留犬舎の飲み水	14	0	PCR: 2陽性
大阪府大	ウシ	奈良NOSAI	乳汁	7	0	<i>Corynebacterium urealyticum</i>
		動物病院	乳汁	41	0	
		食肉検査所	咽頭スワブ	130	0	<i>C. glucuronolyticum</i> <i>C. urealyticum</i>
岐阜大	猟犬	静岡県、長野県、三重県、新潟県、長野県および岐阜県の猟師宅	血清: 抗毒素価	146	11	
			咽頭スワブ	9	1	
名古屋市獣医師会	ネコ	動物病院(16ヶ所)	咽頭スワブ、鼻汁	96	1	毒素非産生株

図1. 本年度分離された一部の *C. ulcerans* の PFGE 解析



平成 22 年度研究組織：協力者リスト（敬称略）

国立感染症研究所：小宮貴子、岩城正昭、山本明彦、見理 剛（細菌第二部）、平井明香、網康至、須崎百合子（動物管理室）

東京都：畠山 薫、藤元琢也、奥野ルミ、貞升健志（東京都健康安全研究センター 微生物部）

栃木県：今井一穂、船渡川圭次（栃木県保健環境センター 微生物部）、佐伯貴之、新堀精一（栃木県動物愛護指導センター）、矢部真人（後藤愛犬病院）

神奈川県：古川一郎（神奈川県衛生研究所）

静岡県：杉山寛治、神田 隆、高橋奈緒美（静岡県環境衛生科学研究所）、小川 高（小川動物病院）、保科麻衣子（静岡県動物管理指導センター）

大阪府：勝川千尋（大阪府立公衆衛生研究所）、大阪府下獣医科医院；佐伯潤（鶴山台動物病院）、石塚泰雄（いしづか動物病院）、坪井幸博（いしづか動物病院）

富山県：木全恵子、磯部順子（富山県衛生研究所）、廣田昌幸（富山県動物管理センター）、保田信一（ドリトル動物病院）

岡山県：中嶋洋（岡山県環境保健センター）、久道 萌（岡山県食肉衛生検査所）、秋定 健（川崎病院耳鼻咽喉科）秋定久仁子（秋定クリニック）

香川県：県内小動物獣医師会開業獣医医院；長崎淳一（善通寺犬猫病院）、長町暢也（オレンジ動物病院）、砂川一浩（砂川犬と猫の病院）

愛媛県：烏谷竜哉、浅野由紀子、田中 博（愛媛県衛生環境研究所）

大分県：若松正人、緒方喜久代（大分県衛生環境研究センター）、上杉美穂（大分市保健所）、濡木真一（大分大学医学部附属病院）

東京医科歯科大学：野口佳裕、角田篤信、喜多村 健（耳鼻咽喉科）

土浦協同病院：畑中章生、鎌田知子、田崎彰久、本田圭司

横浜市立市民病院：吉村幸浩（感染症内科）

大阪府立大学大学院：幸田知子、伊藤広記、向本雅郁、小崎俊司（生命環境科学研究科 獣医感染症学教室）

岐阜大学：柳井徳磨、渡邊 祐（応用生物科学部獣医病理学教室）

兵庫県：山本博誠（愛動物病院）

千葉県：伊東彰仁（イトウペットクリニック）

金沢県：福島渉（福島獣医科医院）

名古屋市：名古屋市獣医師会会員 16 区病院；杉方 保毅、小島 健治、酒井 直治、伊藤夏樹、渡辺 泰夫、大藪 一雄、鷺塚 貞長、高市英之、小川 幸哉、菅沼 英人、湯木正史、中村昌弘、桑原康人、森 典夫、石川 寛剛、司馬健吉

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

猟犬における感染症抗体保有状況に関する研究：中部地区を中心として

研究分担者 柳井徳磨 岐阜大学応用生物科学部 教授

研究協力者 今岡浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 室長
川端寛樹 国立感染症研究所 細菌第一部 室長
高橋元秀 国立感染症研究所 細菌第二部 室長
棚林 清 国立感染症研究所 獣医科学部 室長
安藤秀二 国立感染症研究所 ウイルス第一部 室長
小泉信夫 国立感染症研究所 細菌 室長
木村昌伸 国立感染症研究所 獣医科学部 研究員
野上貞雄 日本大学生物資源科学部 教授
村井厚子 岐阜大学連合大学院獣医学研究科 大学院生
山田奈美 岐阜大学連合大学院獣医学研究科 大学院生
渡邊 祐 岐阜大学応用生物科学部 学生

研究要旨 猟犬は、野外でダニ媒介感染症を始め種々の病原体に暴露される機会が多い。そのため、各地の猟犬の病原体を調べることで、地域ごとの野外感染症、特に人獣共通感染症の種類と分布についてモニタリングが可能である。各地に存在する野外人獣共通感染症の存在を把握することで、人が野外活動する際の感染症リスク評価とその予防が可能になる。今回、中部地方を中心とした5県(三重、岐阜、新潟、長野および静岡)の13地域で猟犬142例から採血し、血清を用いてジフテリア、ボレリア、ブルセラ、野兔病、破傷風およびトキソプラズマについて抗体検査を行った。

ジフテリア症では、11/142 (7.7%) 例に陽性がみられ、志摩市の陽性個体からは毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* が分離された。レプトスピラ症では、多くの個体が高い抗体価を示し、猟犬における同感染症の流行が疑われた。ライム病ボレリアでは、63/142 例が陽性を示し、流行地の新潟、長野以外に三重県および静岡県でも高い陽性率がみられた。ブルセラ症では、*Brucella canis* が5/142 例みられた。トキソプラズマ症では、28/142 例が陽性を示した。野兔病と破傷風は全例とも陰性であった。今回、複数病原体が92/142 例にみられ、そのうち2種以上の重複感染は41例であった。ジフテリア感染が猟犬でしばしば認められたことから、犬が保菌している可能性がある。ライム病では流行地とされる長野に加え、三重県および静岡県でも高い発生傾向がみられたが、それらは病原性を有する菌株かを確認する必要がある。今後さらに他の地域に調査を広げることで、全国的なこれらの野外を中心とした感染症の疫学情報の収集に貢献することが期待できる。

A.研究目的

猟犬は狩猟のパートナーとして山林に入り、野生動物を狩るため、山間部に多く存在するダニへの暴露や野生動物との接触の機会が多くなる。そのため、ダニ媒介性の感染症や野生動物由来感染症の発症リスクが高くなることが予想される。また、猟犬を介して人にこれらの感染症が伝播する可能性も考えられる。したがって、猟犬におけるダニ媒介性の感染症や野生動物由来感染症を調べることは、これらの感染症の保有状況や地理的分布を知ることができ、人への伝播の可能性についても推測する手助けとなる。

今回は、岐阜県、三重県、静岡県、長野県および新潟県の5県の猟犬142頭を対象とし、ダニ媒介性疾患であるライム病、犬を介する可能性がある人獣共通感染症であるレプトスピラ感染症、ブルセラ症およびジフテリア感染症などについて抗体調査を行った。

B.研究方法

(1) 材料

中部地区を中心とした5県にて猟犬142頭について採血し、各種の感染症の抗体価を調査した。採血した土地の内訳は、岐阜県不破郡関ヶ原町2頭、同県養老郡養老町2頭、下呂市10頭、関市板取7頭、新潟県十日町市8頭、長野県中野市4頭・同県下伊那郡20頭、静岡県浜松市17頭、掛川市5頭、静岡市5頭、伊豆市22頭、三重県津市20頭、志摩市20頭であった。抗凝固剤としてEDTAを使用し、分析までの間 -80°C で保存した。凍結前に一部を使用して、血液塗抹標本作製した。採

血に際して、各猟犬の所有者より、狩猟対象、狂犬病予防歴、ワクチン接種歴、ノミやダニの予防の有無について聴取した。

(2) 採血方法

ヘパリンナトリウム加の抗凝固処理をしたシリンジを使用し、橈側皮静脈より、それぞれの猟犬から約6.5 ml採血した。採取した血液のうちの約6 mlは真空採血管（ベノジェクト® II 真空採血管，TERUMO®）へ容れ遠心し、血清を分離した。採血した血液のうち、約0.5 mlの血液を用いて、血液塗抹標本作製した。リッケチア感染症、レプトスピラ感染症、ライム病ボレリア感染症、およびジフテリア感染症についての血清を用いた検査を、それぞれ国立感染症研究所の安藤秀二室長、今泉信夫室長、川端寛樹室長、高橋元秀室長が分担しそれぞれ測定した。

1) ジフテリア症

被験血清を 56°C 30分非動化処理し、組織培養用マイクロプレートへ入れた後、細胞用培養液で2倍段階希釈系列を2組作製した。一方の希釈系列には、VERO細胞浮遊液を加え、 37°C 4日間培養した後被験血清コントロールとした。同様に、標準ジフテリア抗毒素の希釈系列を作製した。ジフテリア試験毒素（毒素活性量 $12\text{CD}_{50}/\text{well}$ ）を両希釈系列に一定量添加し、 37°C 30分間孵卵器内で中和反応させた。その後、VERO細胞浮遊液を加え、 37°C 4日間培養した。標準ジフテリア抗毒素End point（細胞が約50%増殖したwellを設定）を 0.0036 IU/ml と設定し、被験血清抗毒素価を算出した。

陽性を示したものの内、三重県志摩市における5頭 (No. 88, 89, 93, 99 および 100) について、再現性を確認するために、再び採血を実施し、同様に抗毒素価を算出するとともに、陽性犬およびその同居犬の口腔内、体毛、皮膚スワブも採取し、亜テール酸カリウム加血液寒天培地、および DSS 培地で培養後、api Coryne キットを用いた菌同定試験および Elek 法によるジフテリア毒素産生能試験を実施した。

2) レプトスピラ症

ELISA によるスクリーニング検査を実施した。96 ウェルマイクロプレート (EIA/RIA 96well plate, Coostar) の各ウェルに GST/Lig-mC, または GST を 100ng (TBS:20mM Tris,0.15M NaCl, pH7.5 で調整) 添加し、4°C で一晩吸着させた。0.05% の Tween20 を容れた TBS (TBST) で溶解した 20mg/ml の BSA を、200 μ l/well を容れて、室温で 2 時間ブロッキングし、その後 BSA solution を除去した。10mg/ml BSA を含む TBST により 100 倍希釈した犬血清サンプルを、総量 100 μ l/well になるよう加え、室温で 1 時間半静置した。その後、血清は 200 μ l/well TBST で micromixer を使用して攪拌、3 回リンスを行い、10mg/ml BSA 含有 TBST により 2000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗犬 IgG ヤギ溶液を 100 μ l/well 添加し、室温で 1 時間インキュベーションし、2,2'-azino-bis (3-ethylbenzo-6-thiazoline sulfonic acid) (ABTS) solution (1-Step ABTS, Thermo Scientific) を 100 μ l/well 加え、十分な色が得られるまで静置した。

Microtiter-plate reader で各々の well の 405nm 吸光度 (OD) を測定した。各々のサンプルについて、GST/LigA-mC と GST の well 両吸光度を測定し、これらの差 [(GST/LigA-mC) - GST] を算出した。

3) ライム病ボレリア

recomWELL Borrelia canis IgG (Mikrogen, Martinsried, Germany) を用いて、マニュアルに従い Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) を実施後、吸光度を測定した。Cut-off コントロール平均値の 1.2 倍 (0.69) より大きい値を陽性とした。

4) ブルセラ症

マイクロプレート凝集反応 (MAT) による抗ブルセラ抗体検出を実施した。家畜ブルセラ菌 (*B. abortus*) については、ブルセラ病診断用菌液 (*B. abortus* 99 もしくは 125 株の加熱死菌液、農業・食品産業技術総合研究機構) を 10 倍に希釈したものを、*B. canis* については犬ブルセラ病診断用菌液 (*B. canis* 死菌液、北里研究所) を用いて、菌液 50 容とフェイバー G (日水、0.25% サフラニン溶液) 1 容を混合し、0.005% サフラニン加凝集反应用菌液を調整した。猟犬サンプル血清 (液量 25 μ) 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、これに調整した菌液を同量加え、20 秒程度緩やかに振とうした。*B. abortus* に対しては、保湿環境で 37°C、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ものを陽性と判定した。*B. canis* に対しては 50°C 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ものを陽性と判定した。

5) 野兔病

① 微量凝集反応 (MA)

抗原として *F. tularensis* spp. *holrtractica*, 日本分離 Yama 株 (Eugon チョコレート寒天培地にて 37°C 3 日間培養) を用いた。これを 0.5% フォルマリン生理食塩水で不活化し、生理食塩水で OD560 値 1 に調整した。これに 0.25% サフラニン染色液 (日水製薬株式会社 “フェイバー G”) を 1/50 量添加し、抗原着色した。さらに被験犬血清を生理食塩水で 5~40 倍まで 2 倍段階で希釈した。また、陽性および陰性対照血清にはウサギ免疫血清、正常ウサギ血清を使用した。凝集反応を U 底 96 穴プレート上で行い、血清希釈液 25 μ l に等量の抗原菌液を添加し、振とう混和後、37°C で 16 時間感作させた。菌凝集の認められた最高希釈倍数の逆数を凝集抗体価とした。各サンプル 2 列希釈し、凝集像が認められたサンプル、および凝集像が不明瞭なサンプルについてはさらにウェスタンブロット法にて確認検査した。

② ウェスタンブロット法 (WB)

野兔病菌 Yama 株の精製リポ多糖体を SDS-PAGE 後、トランスブロット (BIORAD 社) にて PVDF 膜 (ミリポア社) に転写した。転写後、PVDF 膜を 3% スキムミルク加 PBST (0.1% Tween20 含有 PBS) でブロッキングし、1% スキムミルク加 PBST で 200 倍希釈した被検血清と室温で 1 時間反応させた。PBST で 3 回洗浄後、HRP 標識 anti-canine Ig-G 抗体を反応させた。

3,3-diaminobenzidinetetrahydrochloride で 10 分間発色させ、リポ多糖体特有梯子状バンドが認められたサンプルを陽性と判断した。

6) 破傷風

破傷風抗体測定キット (化血研, 日本) を使用して、KPA 法: ポリアミノ酸粒子凝集反応により凝集反応法で測定した。

7) トキソプラズマ

抗トキソプラズマ抗体検出を行うにあたり、ラテックス凝集試験 (Toxocheck-MT, 栄研化学, 日本) を使用した。凝集反応はプラスチック製丸底 96 穴プレートにおいて、被験血清を添付の緩衝液で 2 倍段階希釈し、反応列とし、各反応列にラテックス乳剤 (抗原) を 25 μ l ずつ入れ、攪拌し、湿箱に入れ室温で一晩静置した。判定はリーディングミラーを用いて行い、64 倍希釈以上において凝集が観察されたサンプルを陽性とした。

8) 犬由来感染症

1) バベシア症

○PCR: 18S rDNA の 1665bp を増幅するために設計された Universal canine Babesia. 特異的プライマーセット (B18S-F, B18S-R) を使用。また、*B. gibsoni* の P18 遺伝子の 182bp を増幅するために設計された *B. gibsoni* 特異的プライマーセット (Bg.Pd3, Bg.Pd4) を使用。

① 感度決定 Universal canine Babesia PCR

ポジティブコントロールと分子病態学教室実習犬抽出 DNA から、感染率約

2.5%, 1.25%, 0.25%, 0.125%, 0.025%, 0.0125%の希釈系列を作製した。感度決定 Universal canine Babesia PCR は、ミリ Q 中に、テンプレート 1 μl , 各々プライマー 1 μl , dNTP 5 μl , Ex-Taq 0.25 μl , $\times 10$ バッファー 5 μl を入れ、全 50 μl で実施された。PCR は、94°C 30 秒間変性、55°C 2 分間アニーリング、そして 72°C で 2 分間伸展の 1 サイクルを 30 回繰り返した。PCR 生成物の内、10 μl を 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、エチレンブロマイドにより染色した。

②全サンプル Universal canine Babesia PCR

全サンプル DNA 濃度を、抽出された DNA 濃度の内最も薄い 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に統一するために各々ミリ Q により希釈を実施した。PCR は、ミリ Q 中に、テンプレート 2.5 μl , 各々プライマー 1 μl , dNTP 5 μl , Ex-Taq 0.25 μl , $\times 10$ バッファー 5 μl を入れ、全 50 μl で実施された。PCR は、94°C 30 秒間変性、55°C 2 分間アニーリング、そして 72°C で 2 分間伸展の 1 サイクルを 30 回繰り返した。PCR 生成物の内、10 μl を 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、エチレンブロマイドにより染色した。

③感度決定 *B. gibsoni* PCR

ポジティブコントロールと分子病態学教室実習犬抽出 DNA から、感染率 2.5%, 1.25%, 0.25%, 0.125%, 0.025% および 0.0125% の希釈系列を作製した。PCR は、ミリ Q 中に、テンプレート (ポジコンについても 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に希釈したものを使用) 2.5 μl , 各々プライマー 1 μl , dNTP 5 μl , Ex-Taq 0.25 μl , $\times 10$ バッファー 5

μl を入れ、全 50 μl で実施された。PCR は、94°C 30 秒間変性、54°C 1 分間アニーリング、そして 72°C で 1 分間伸展の 1 サイクルを 30 回繰り返し、最後に 72°C で 5 分間伸展させた。PCR 生成物の内、10 μl を 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、エチレンブロマイドにより染色した。

④ Universal canine Babesia PCR 陽性サンプル *B. gibsoni* PCR

Universal canine Babesia PCR (②) 陽性サンプルについて、*B. gibsoni* PCR を実施した。PCR は、ミリ Q 中に、テンプレート 2.5 μl , 各々プライマー 1 μl , dNTP 5 μl , Ex-Taq 0.25 μl , $\times 10$ バッファー 5 μl を入れ、全 50 μl で実施された。PCR は、94°C 30 秒間変性、54°C 1 分間アニーリング、そして 72°C で 1 分間伸展の 1 サイクルを 30 回繰り返し、最後に 72°C で 5 分間伸展させた。PCR 生成物の内、10 μl を 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、エチレンブロマイドにより染色した。

⑤血液塗抹標本の観察

採取した全血の一部から、血液塗抹標本を作製し、定法に従いライト・ギムザ染色を実施し、光学顕微鏡で観察し虫体検出を行った。感染率 1% を、5% 危険率の可能性で検出するために、各標本 300 個以上の赤血球観察を実施した。

2) 犬フィラリア症

市販キット (ソロステップ CH, HESA, 米国) を用いて、血清 3 滴 (約 115 μl) を検査デバイスのサンプル注入口に滴下し、5 分静置後に表示窓中の検査結果 (赤色ラインの出現) を読み取った。

C.研究結果

1) ジフテリア症

142頭の猟犬の内、11頭(7.7%)が陽性を示した。その内訳は、新潟県十日町市で1/8頭(No.28)、静岡県静岡市で1/5頭(No.53)、伊豆市で3/22頭(No.129, 132 および 142)、三重県志摩市で6/20頭(No.88, 89, 93, 95, 99 および 100)の陽性例が認められた。三重県の陽性例の内、再採血が可能な5頭(No. 88, 89, 93, 99 および 100)については再検査を実施したところ、いずれも高い抗体価が再確認され、No.88の口腔内からは*C. ulcerans*が分離同定され、毒素の産生が認められた。

2) レプトスピラ症

LigA に対する抗体価の結果によると大部分において高値が認められた。特に岐阜県、三重県および静岡県からのサンプルで抗体陽性例が多く認められた。

3) ライム病ボレリア

142頭の猟犬の内、63頭(44.4%)が陽性を示した。岐阜県養老1/2頭(No.3)、下呂市4/10頭(No.6, 8, 10 および 13)、関市板取1/7頭(No.15)、新潟県十日町市4/8頭(No.23, 26, 27 および 28)、長野県中野市2/4頭(No.31 および 32)、下伊那郡3/20頭(No.108, 111 および 117)、静岡県浜松市5/17頭(No.34, 36, 38, 40 および 47)、静岡市5/5頭(No.51, 52, 53, 54 および 55)、掛川市3/5頭(No.56, 58 および 59)、伊豆市11/22頭(No.121, 123, 124, 125, 127, 131, 132, 135, 137, 140 および 141)、三重県津市9/20頭(No. 61, 63, 64,

65, 68, 69, 77 および 79) 志摩市15/20頭(No. 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 92, 94, 95, 97, 98, 99 および 100)で認められた。

4) ブルセラ

B.abortus に対しては、いずれも10倍よりも小さく全て陰性であった。これに対して、*B.canis* に対しては5頭(3.5%)を陽性と判断した。岐阜県下呂市2/10頭(No.9 および 12)、関市板取1/7頭(No.19)、静岡県掛川市1/5頭(No.59)、長野県下伊那1/20頭(No.110)が陽性例として認められた。

5) 野兔病

微量凝集反応法(MA)により、岐阜県養老2頭(No.3,4)、下呂市1頭(No.5)、静岡県静岡市2頭(No.39 および 40)、伊豆市3頭(No.113, 118 および 121)、三重県津市5頭(No.63, 70, 73, 75 および 76)および志摩市2頭(No.85 および 89)の計15サンプルが10倍で不明瞭な凝集像を呈し、他のサンプルはいずれも10倍未満であった。不明瞭な反応を呈した15サンプルについては、ウェスタンブロット法で特異抗原に対する反応が認められなかったことより、全サンプルを陰性と判断した。

6) 破傷風

全142サンプルにおいて、血清中抗破傷風抗体は測定レベル以下(0.0005単位)であったため陰性と判断した。

7) トキソプラズマ

142頭の猟犬の内、28頭(19.7%)が陽性と判断された。岐阜県養老郡養老町

2/2頭(No.3および4), 下呂市3/10頭(No.6, 7および10), 関市板取2/5頭(No.16および18), 静岡県浜松市2/17頭(No.39および43), 静岡市1/5頭(No.55), 伊豆市9/22頭(No.123, 127, 128, 132, 134, 136, 137, 139および142), 三重県津市3/20頭(No.61, 75および77), 三重県志摩市6/20頭(No.81, 82, 83, 85, 88および97)が陽性例として認められた。

8) 犬由来感染症

1) バベシア症

*B. gibosni*を示す182bpのバンドが、全10サンプル(No.82, 83, 84, 85, 87, 89, 90, 96, 99および100)において認められた。また、強く陽性バンドの検出されたサンプルを除いて、全サンプルにおいて同一の大きさの由来不明バンドが検出された。血液塗抹標本の観察では、142サンプル中、標本状態から判定可能であったのは134サンプルであった。これらの内、2サンプル(No.81および85)において、バベシア虫体が認められた。PCRで陽性と判断された10例はいずれも三重県志摩市の一猟師宅の猟犬であった。

2) 犬フィラリア症

142頭の猟犬の内、37頭(26.1%)がフィラリア抗原陽性であった。岐阜県不破郡関が原2頭(No.1および2), 養老郡養老町2頭(No.3および4), 下呂市6頭(No.5, 8, 9, 11, 12および13), 静岡県静岡市1頭(No.55), 同県伊豆市11頭(No.124, 126, 127, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 141および142) (同地区の50%), 三重県志摩15頭(No.83, 84, 85, 86, 87, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 99および100) (同地区の

75%)が陽性例として認められた。

D. 考察

今回の研究では、検索した猟犬142頭中、バベシア感染犬11頭(7.7%)および犬フィラリア症37頭(26.0%)以外に、*C. ulcerans*感染犬11頭(7.7%), ポレリア感染犬63頭(44.4%), ブルセラ感染犬5頭(3.5%), トキソプラズマ感染犬28頭(19.7%)が認められた。野兔病および破傷風は、検索した中部地方に由来する猟犬には認められなかった。

陽性犬の中には、病原体が1頭に対して1種類のみ認められる犬から、最高で4種類の重複感染が認められる犬まで感染の様式は様々であった。今回調査した病原体による感染が1種類以上認められた猟犬は、全92頭(64.8%)であった。また、その中で2種類以上の病原体に重複感染している猟犬は41頭(28.8%)であった。

1) ジフテリア症：特に *Corynebacterium ulcerans* について

人におけるジフテリア症とは感染症法で2類感染症に指定されており、*Corynebacterium (C.) diphtheriae*の感染により生じる上気道粘膜疾患である。最近 *C. ulcerans*においてもジフテリア毒素産生能を有した菌株が最近注目されており、人に感染した場合ジフテリア様疾患を引き起こすことが報告されている。これはジフテリア菌の毒素原性βファージが *C. ulcerans*に溶原化して、人に感染発症したものと考えられている。*C. ulcerans*は広く常在しており、化膿性炎症の原因となる。日本でも数例報告があり、以前から犬および猫が感染源となることが示唆さ

れていた。昨年と今回実施した猟犬における本菌の保有率調査においても、広く抗体陽性例が認められ、毒素産生株が昨年度は宮崎市で、今回は三重県志摩市で分離されたことから猟犬も人への感染源になる可能性がある。

2) レプトスピラ症

レプトスピラ属菌による人獣共通感染症である本症は、人ではワイル病や秋疫といわれる病名で知られており、日本においても1970年代前半までは年間50名以上の死亡例が報告されていた。げっ歯類を始め、多くの野生動物や家畜、ペットなどの腎臓で保菌され、尿中に排泄される。人ではこの尿で汚染された水や土、または尿との直接的接触によって皮膚を通して感染する。また、レプトスピラ汚染水や食物を飲食したことによる感染例も見られる。犬のレプトスピラ症は、症状から不顕性型、出血型、黄疸型に区別され、大部分の感染犬が不顕性であり、長期間に渡り尿中に菌を排出するため他の犬や人への感染源となる。血清型 *canicola* と *icterohaemorrhagiae* によるものが多く、黄疸や腎炎症状等を引き起こす。猟犬の間では未だにしばしば問題となる感染症の一つであり、三重県、静岡県、岐阜県から猟犬サンプルにおいて高い抗体価を示す例が認められた。今回、検査側の2次抗体やプレートのロットが変わったことによりバックグラウンドが高くなっている可能性もあるので、再度、条件検討を行い、併せて血清型の同定が必要と考えられた。

3) ライム病ボレリア

マダニ媒介性のライム病ボレリアの感染によって引き起こされるライム病はアメリカ東海岸やヨーロッパに発症例が多く、最近日本においても北海道や東北地方等の寒冷地で増加しつつある。日本ではシユルツェマダニやヤマトダニが媒介するといわれ、感染した場合、健康犬は発症しにくいのが老犬や幼犬など免疫力の低い犬では発症し、最も一般的に認められる症状としては多発性関節炎が挙げられる。ただし国内では関節炎が認められることは少なく、神経症状が主体である。人では、皮膚、神経、循環器、筋骨格系に各々多様な症状を呈するが、ライム病に唯一特徴的病態として、マダニ刺傷部皮膚における遊走性紅斑が認められる（犬では認められない）。媒介者であるマダニは草原や森林において生息しているため、山野に侵入する猟犬は感染する可能性が非常に高いといえる。前回の調査では患者の発生がない熊本および宮崎で抗体陽性例が高率に認められ、病原性の無いか、弱毒の菌株の存在が疑われていた。今回も、流行地とされる新潟県十日町市(4/8)、長野県中野市(2/4)、下伊那郡(3/20)に加え、静岡県浜松市(5/17)、静岡市(5/5)、掛川市(3/5)、伊豆市(11/22)、三重県津市(9/20)、志摩市(15/20)で高い陽性率を示したことから、菌株の同定が必要と考える。

4) ブルセラ症

犬のブルセラ症は感染症法で4類感染症に指定されており、*Brucella (B.) canis* によって引き起こされる人獣共通感染症である。ブルセラ菌の抗体調査によると、現在でも1~6%の犬が感染歴を持つとさ