

体の検出系として十分に機能することが示されたが、イノシシ血清では MAT 陽性および陰性のサンプルで OD 値に違いが見られなかった。イノシシ血清に対しては、抗原の変更や blocking ELISA、competitive ELISA 法の検討など、実験系の改善が今後の課題である。

E. 結論

本年度に収集した野生イノシシサンプルにおいても *B. canis* に対して MAT 法で、抗体陽性を示すものが確認された。特に、調査した四国地区では約 23% が陽性を示した。全国では、前年までとの合計で 543 頭中、60 頭 (11.0%) が陽性となった。国内では *B. canis* の存在は、イヌ繁殖施設におけるブルセラ病の流行や愛護センター等でのイヌの抗体検査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。今回、新たに実施した、ウェスタンブロッティング法での検討では、陽性を示すものは見つからなかったが、一部のイノシシ血液サンプルからは、ブルセラ特異的 DNA が増幅されている。生物種としてイノシシと同種であるブタは、イヌブルセラ菌に対し、抵抗性とされるが、野生イノシシが、*B. canis* に軽度感染し、抗体を持つ可能性は否定できない。

また、前年分までとの合計 543 頭中で、家畜ブルセラ菌に対し抗体陽性の 3 例については、ブルセラ特異的 DNA が増幅されておらず、ウェスタンブロッティング法でも陰性であったことから、現時点では、他のグラム陰性菌との交叉反応を否定できない。しかし野生イノシ

シで家畜ブルセラ菌の保有が疑われることは、畜産業はもとより公衆衛生上も大きな懸念材料となる。確証を得るために、さらなる検討が必要と考える。

謝辞： 今回の調査に関してイノシシサンプル採取にご協力いただいた皆様に感謝いたします。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表等

2. 学会発表・講演等

(1) 泉田さゆり, 峯田有美子, 浅井蓉子, 長原正静, 今岡浩一. *Brucella melitensis* による腸腰筋膿瘍の 1 症例. 第 22 回日本臨床微生物学会総会, 岡山, 2011 年 1 月

(2) Koichi Imaoka. Brucellosis in Japan. 8th Japan-Taiwan Symposium on Antibiotics resistance and Foodborne Disease, Tokyo, Oct. 12-14, 2011

(3) Koichi Imaoka. Bacterial infection from dogs and cats – Brucellosis and *Capnocytophaga canimorsus* infection-. Workshop I: Zoonoses transmitted from pet animals in daily life. The 2nd International Conference on Animal Care in KOBE 2012, Kobe, Feb. 18-19, 2012

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、1999.4.1～2011.12.31）

報告年	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	不明	ペットの犬	発熱、食欲不振	—	陽性	(-)
2005	シリア	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>melitensis</i>
2005	国内	不明	発熱、筋肉痛、腹痛	—	陽性	(-)
2006	エジプト	不明 (吸入疑い)	発熱、頭痛、肝脾腫	陽性	—	<i>melitensis</i>
2006	イタリア	不明	発熱、筋肉痛	—	陽性	(-)
2006	エジプト	経口 (ミルク)	発熱、頭痛	陽性	—	(<i>abortus</i>)
2006	長野県	不明	発熱、脾腫	—	陽性	(-)
2006	宮城県	不明	発熱、中枢神経症状	—	陽性	(-)
2007	大阪府	イヌ	リンパ節腫脹、倦怠感	—	陽性	(-)
2008	埼玉県	飼い犬	発熱、関節炎、筋炎	—	陽性	(-)
2008	ペルー	経口感染	発熱、痛み、全身倦怠感	陽性	—	(<i>abortus</i>) 血液PCR(+)
2008	愛知県	繁殖犬	発熱、脾腫、肝腫大	—	陽性	<i>canis</i>
2008	愛知県	繁殖犬	発熱	—	陽性	<i>canis</i>
2009	インド	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>melitensis</i>
2010	ペルー	経口? (チーズ)	発熱、胃腸炎、腹痛、腰痛(腸 腰筋膿瘍)	陽性	陽性	<i>melitensis</i>
2010	栃木県	不明	発熱	—	陽性	(-)
2011	中国	山羊?	発熱、頭痛、後頭部痛	陽性	—	<i>melitensis</i>
2011	島根県	不明	発熱、脊椎炎	—	陽性	(-)

表2) 検査対象イノシシ一覧

地域	Others	2005-06 (Dec.-Feb.)	2007-08 (Nov.-Jan.)	2008-09 (Nov.-Jan.)	2009-10 (Nov.-Jan.)	2010 (Jan.- Mar.)	2011 (Apr.- Dec.)	合計
千葉		14	7	5				26
長野		2		1				3
静岡		32	8	13				53
滋賀	8							8
岐阜	19							19
愛知	20			1				21
三重			2	4				6
兵庫		5	1	3				9
島根		1	7	8				16
広島		14	3	5				22
徳島			3	4	8	41	3	59
香川			5	6	18	59	24	112
愛媛			11	14	11	39	29	104
高知		14	3	2	4	7		30
熊本		12	9	8				29
大分		3	4	2				9
宮崎			3	4				7
鹿児島		1	2	7				10
合計	47	98	68	87	41	146	56	543

表3) MATによる抗ブルセラ抗体検出

地域	n	MAT (number of positive)		
		<i>B. abortus</i>	<i>B. canis</i>	
千葉	26	0	2	
長野	3	0	1	
静岡	53	0	6	
滋賀	8	0	0	
岐阜	19	0	0	
愛知	21	0	0	
三重	6	0	0	
兵庫	9	0	0	
島根	16	0	0	
広島	22	0	1	
徳島	59	0	10	<i>B. abortus</i> (2/305, 0.7%)
香川	112	0	15	
愛媛	104	2	14	<i>B. canis</i> (47/305, 15.4%)
高知	30	0	8	
熊本	29	0	1	
大分	9	0	0	
宮崎	7	0	0	
鹿児島	10	1	2	
合計	543	3 (0.6%)	60 (11.0)	

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	-	-	-	-	
	4	千葉	-	-	+	-	
07	8	鹿児島	-	-	-	-	
	20	熊本	+	-	-	-	
	49	愛媛	-	-	-	-	
	60	愛媛	-	-	+	-	
	62	愛媛	+	-	+	-	
	63	愛媛	-	-	-	-	
	68	愛媛	-	-	-	-	
	3	高知	-	-	-	-	
08	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	-	-	-	-		
09	18	香川	-	-	-	-	@
	19	愛媛	-	-	-	-	
	21	香川	+	-	-	-	
	22	香川	+	-	+	-	@
	34	高知	-	-	-	-	

年度	No.	捕獲地	標的遺伝子 ※)				
			1	2	3	4	
10	13	愛媛	-	-	-	-	
	14	香川	-	-	-	-	
	52	徳島	+	-	+	-	
	57	徳島	-	-	-	-	
	73	愛媛	-	-	-	-	
	77	高知	-	-	-	-	@
	78	高知	-	-	-	-	
	87	徳島	-	-	-	-	
	90	徳島	-	+	-	+	
	93	香川	+	-	-	-	
94	愛媛	-	-	-	-		
100	香川	-	-	-	+		
11	2	徳島	-	-	-	-	
	5	愛媛	-	-	-	-	
	18	愛媛	-	-	-	-	
	19	愛媛	-	-	-	-	
	20	香川	-	-	-	-	
	22	香川	-	-	-	-	
	23	香川	-	-	-	-	
	24	香川	-	-	-	-	
	33	香川	-	-	-	-	
	36	香川	-	-	-	-	
	44	香川	-	-	-	-	
53	香川	-	-	-	-		
54	香川	-	-	-	-		

陽性対照菌株の反応パターン

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

	1	2	3	4
※)	<i>bcs</i> p31	<i>omp</i> 2 (<i>abortus</i> type)	<i>omp</i> 2 (<i>canis</i> type)	<i>omp</i> 31

PCR陽性

@ 抗*B. abortus*抗体陽性

*B. canis*と陽性パターンが一致

図1) ウェスタンブロッティング法によるブルセラ特異的抗体の検出

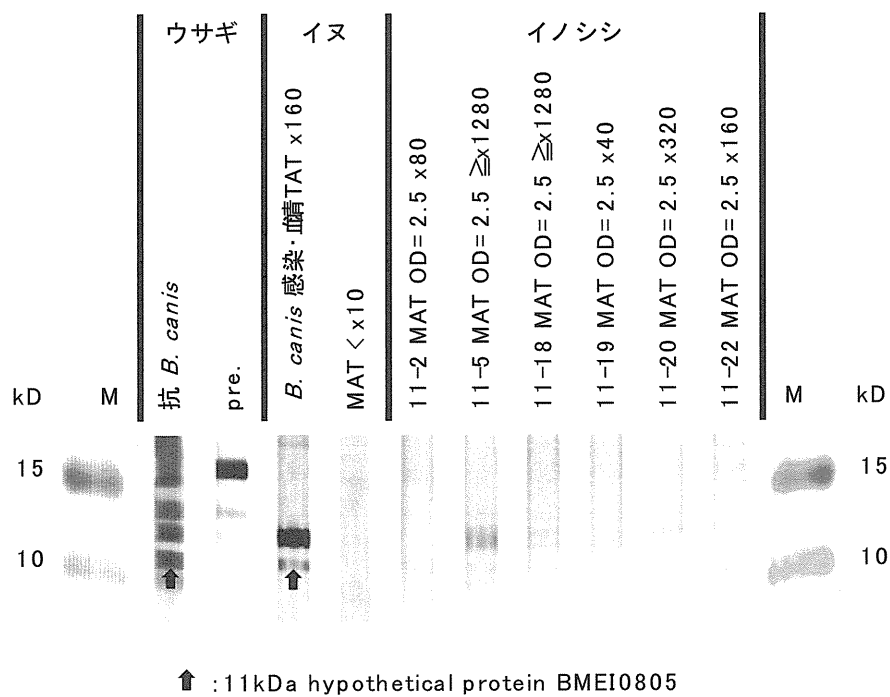
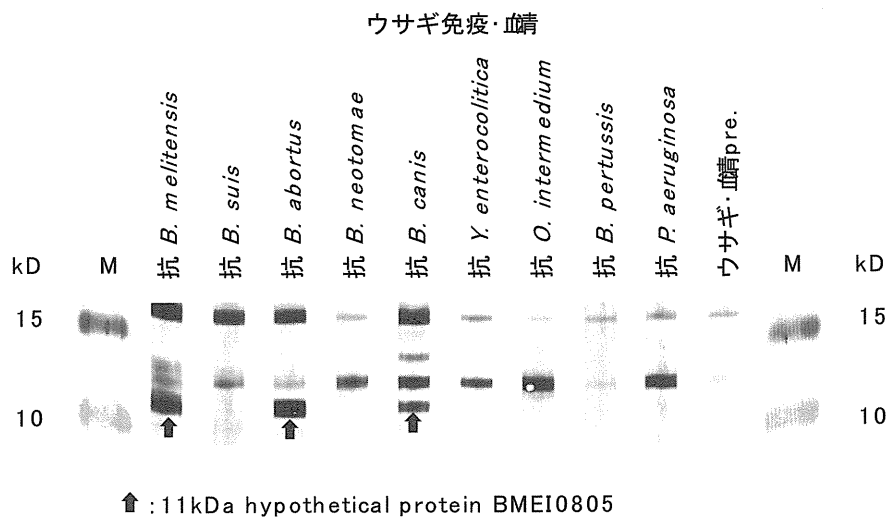
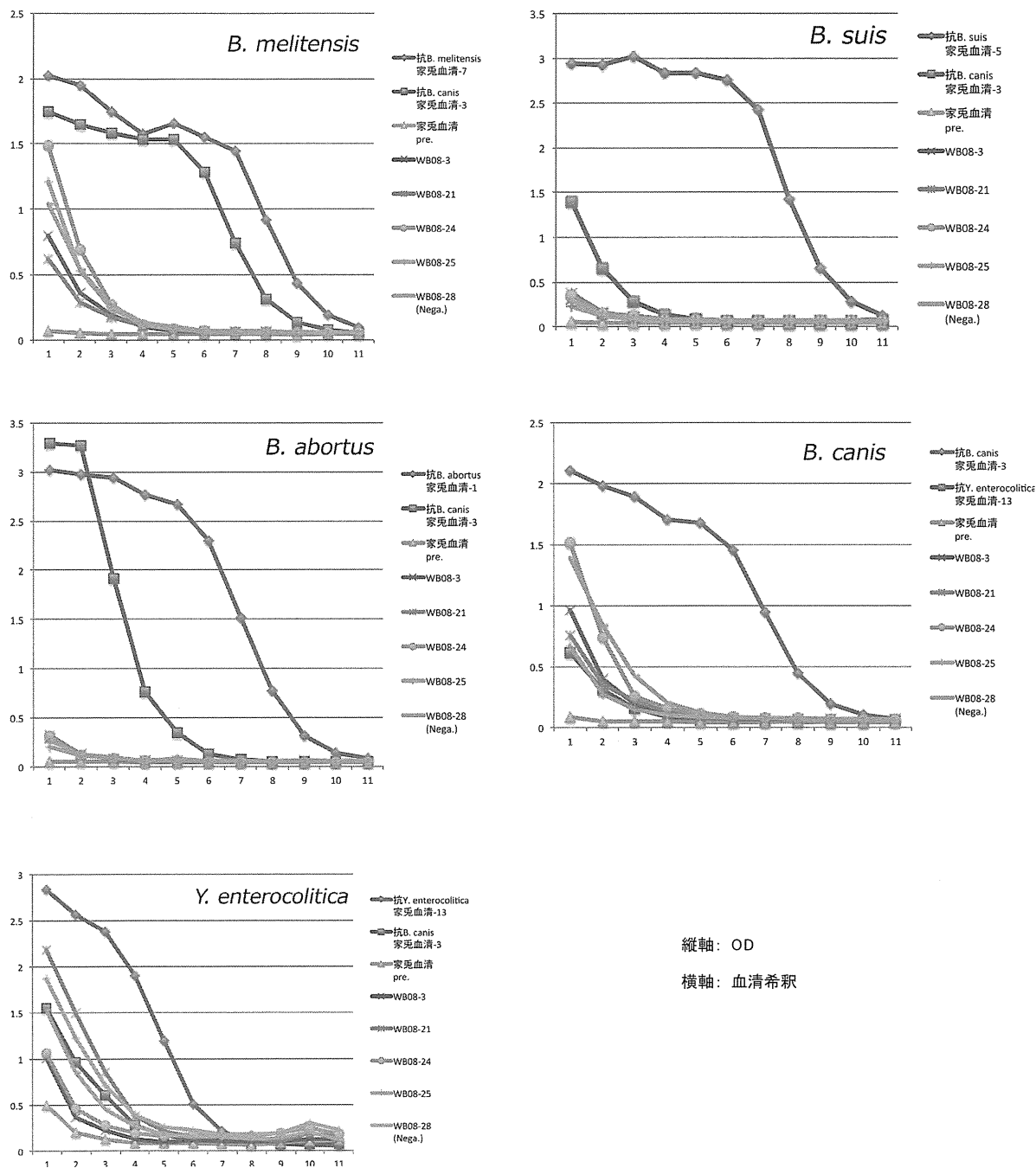


図2) ELISA による抗ブルセラ抗体の検出



分担研究報告書

コリネバクテリウムに関する研究

分担研究者

山本 明彦（国立感染症研究所 細菌第二部）

研究協力者

別紙のリスト添付

研究要旨

今年度、新たにジフテリア様症状を呈する1名の患者からジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* (*C. ulcerans*^{Tox+}) が分離された。患者の環境調査において飼いネコ、イヌ及びヤギから *Corynebacterium* 属菌が分離された。

10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及び血清ジフテリア抗毒素抗体価測定を実施した結果、4カ所の愛護センターのネコとイヌより *C. ulcerans*^{Tox+} が分離され、また抗毒素は1箇所2検体が陽性を示した。

今年度までの調査結果では、野外活動時間の多いイヌやネコは本菌を保菌または本菌に感染している可能性が高い。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、ネコからの感染リスクが高いことが考えられる。また、畜産動物の検体については血清ジフテリア抗毒素価測定を実施した結果、2検体で陽性を示した。

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。我が国では千葉県で、ジフテリア様患者からジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* が初発症例として分離され、結核感染症課から本菌が分離された場合は報告する旨の通知がされた。しかし、初発症例を含めてその環境調査は不十分であった。

C. ulcerans^{Tox+} 感染はジフテリアに極めて類似する病態を呈し、動物から感染する可能性が国内外の感染報告から指摘されているが、その実態は不明な点が多く、その自然界における実態を把握する必要がある。生態系でどのように維持されているか、菌の分布、疫学等の調査により明らかにし、人と動物へのリスク評価を実施する。

B. 研究方法

1. 調査対象

(1) 感染患者の病原体診断と環境調査: 今年度ジフテリア様症状を呈した1名の患者が医療機関で確認された。医師と患者の同意を得たのち、患者からの病原体確認および患者の環境調査を行なった。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) 人での菌分布調査

国内2都道府県3箇所の耳鼻咽喉科病院について、咽頭痛や偽膜など *C. ulcerans*^{Tox+} 感染が疑われる患者からの菌分離を目指した。

(3) 動物の菌分布調査

1) 地方自治体の衛生研究所の研究協力者が研究調査の協力依頼を調整できた所轄の愛護動物センターにおけるイヌとネコ、または開業獣医師へ来院したイヌとネコ等について実施した。今年度、上記いずれかの調査を実施し

た自治体は、栃木県、神奈川県、川崎市、東京都、富山県、大阪府、大阪市、徳島県、岡山県、静岡県および滋賀県である。検査実施に際して、検体の採取、運搬および検査方法については各衛生研究所で調整と試験をお願いした。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、荒川変法血液寒天培地および DSS 培地は、生培地を特別注文したものを配布して実施した（株：日研生物医学研究所）。

2) 獣医科大学との共同研究として、岐阜大学柳井研究室では 2011 年に猟イヌの血清中の病原体調査としてジフテリア抗毒素の血清疫学調査を実施した。また、大阪府立大学 小崎俊司教室では、分離菌について PFGE 法よりも解析能力のよい分子疫学手法の開発を実施した。

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 γ 3 号（栄研化学）で採取、培養検査開始まで 4℃で保存した。検体の菌分離は、採取当日に分離培養を開始したが、週末を挟む場合は翌月曜日まで 3 日間 4℃で保存、その後分離培養を開始した。可能な検体については採血して血清分離しジフテリア抗毒素価を測定した。

食肉検査場でのウシの採材は、と殺後すみやかに咽頭等をシードスワブ γ 3 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。可能な検体については採血して血清分離し、ジフテリア抗毒素価を測定した。

開業獣医医院での検体採取は、咽頭や鼻水等をシードスワブ γ 2 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垂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、荒川変法血液寒天培地）に塗抹、血液寒天培地は 18~24 時間後、荒川変法血液寒天培地は 24 または 48 時間後に疑われる集落について性状を検査した。同定は DSS 培地による糖分解性状のスクリーニング、カタラーゼ試験、ウレアーゼ試験を実施した後、*Api coryne* (bioMérieux) を用いて確定した。なお、各衛研の研究協力者の経験的技術と知識の違いにより、出現したコロニーをエーゼで掻き取り (Sweep 法)、DNA を抽出し PCR を実施するか、または疑われる黒色コロニーをグループ毎 (Mix 法) にリアルタイム PCR で毒素遺伝子を検出する方法を組み合わせる場合もある。菌の毒素原性はジフテリア毒素遺伝子の A サブユニットを特異的に増幅するプライマーを用いた PCR、寒天内沈降反応の Elek 法および培養細胞法で確認した。

4. ジフテリア抗毒素価の測定

Vero 細胞を用いた培養細胞法で測定した。血清検体と標準ジフテリア抗毒素(単位既知)をそれぞれ 2 倍連続希釈し、一定量のジフテリア試験毒素を加えて中和反応させたのちに、Vero 細胞と混合して播種して 4 日間培養し、ジフテリア毒素の中和能を細胞への毒性として細胞の 50%死亡を End point として、標準ジフテリア抗毒素の End point から、各血清検体の抗毒素価を算出する。

5. 分離菌株の解析

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) PFGE は制限酵素: Sfi I、泳動装置: CHEF-DR II (Bio Rad)、1.5%ゲル、泳動条件は 14℃、6 V/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。

6. *C. ulcerans*^{Tox+}の全ゲノム解析

感染研のゲノム解析センターの協力を得て、日本で初めて人から分離された 0102 株の全ゲノム解読を行なった。

(倫理面への配慮)

人での菌分布調査については、国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会にて、動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の審査許可を受けて行われた。

C. 研究結果

(1) ジフテリア様患者の調査は以下の 1 名について実施した。

滋賀県大津赤十字病院より細菌第二部第三室に *C. ulcerans* の分離確認と毒素産生の確認試験依頼があった（国内ヒトの症例の 9 例目）。担当医師から以下の情報を得た。滋賀県在住の 50 歳代の女性である。4 月 16 日ころよりのどの痛み、風薬を飲むが 18 日になっても好転せず却って痛みが増す。近くの医者を受診するが、大津赤十字病院耳鼻咽喉科を紹介される。のどに偽膜が形成されていた。ウルセランスを疑いエリスロマイシンによる治療を開始。症状好転する。偽膜も薄れてきて 5 月初めにはほとんど消失した。この偽膜を細菌検査室にての培養により *C. ulcerans* が検出された。この菌は、PFGE 法による分子疫学的解析により、2005 年に大分県で患者より分離された菌と同じタイプであった。（図 1）

患者の環境調査により、夫と息子 2 人と同居、患者宅は琵琶湖西岸に位置し、琵琶湖畔に面している。母屋と患者夫が営む金型作製の小屋が立地している。敷地は雑草がうっそうと茂っていた。それぞれの建物内外にイヌが 7 匹、ネコが 14 匹、ヤギ 2 匹は別の小屋に飼育されていた。ネコは家の内外を自由に出入りしている。患者及び家族の協力を得て、すべての飼育動物から口内スワブ及び体表拭き取り検体を採取し菌分離検査をおこなった。

患者夫及びその息子 2 人の咽頭スワブも採取した。すべての検体について、*C. ulcerans* が検出されなかったが、患者家族及びイヌ 1 匹、ネコ 2 匹及びヤギから、*Corynebacterium* 属菌が検出された。（滋賀県衛生科学センター、大津赤十字病院、感染研細菌第二部）

(2) 人での菌分離調査

国内 3 箇所の耳鼻咽喉科のうち、2 病院にて対象となる患者がそれぞれ 2 人及び 5 人認められた。どちらも *C. ulcerans* は検出されなかった。このうち 1 病院の 5 人については、ジフテリア抗毒素価を測定し 3 人に 0.01 単位以上の抗毒素が認められた。（表 1）

(3) 動物の菌分布調査

地方自治体の衛生研究所を中心とする所轄の愛護動物センターのイヌとネコ、または動物病院との研究調査結果は以下に示す。なお、各自治体の名称は行政対応上の問題が生ずる恐れもあり、匿名化して示す。（表 2）

1) SG 県の調査

動物愛護センターの協力で収集した口腔スワブ 54 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。

2) TS 県の調査

動物愛護管理センターの収容ネコ 88 匹について保菌状況を調査した。結果、6 匹から菌が検出され保菌率は 6.8%であった。なお、分離した菌株はすべて毒素産生遺伝子を保有していた。調査したネコの内訳は目やに、鼻水等風邪様症状を呈していた個体 10 匹、その他の臨床症状を呈した個体 6 匹、無症状の個体 72 匹であり、菌が分離されたのは無症状の個体 5 匹及び下顎膿瘍の認められた個体 1 匹であった。*C. ulcerans* に感染したネコの症状は、一般的に目やに、鼻水等の風邪様症状と報告されているが、今回の調査では風邪様症状のネコから菌は検出されなかった。この理由として、風邪様症状のネコの母数が少ないことが考えられる。一方、現在までの人での感染事例では、発症しているネコからの感

染が疑われている事例が多い。このことから、人へのリスクを考えていくうえで、次に必要なステップとして、臨床症状のあるネコからの菌分離とそのネコに接触した人の調査（抗体調査・菌分離等）が考えられた。

3) TC 県の調査

動物愛護指導センター等のイヌ・ネコを対象としている。動物愛護センターよりイヌの咽頭スワブ 82 検体、県内の動物病院よりネコの鼻汁 1 検体、イヌ皮膚炎より 1 検体を調査した。その結果、*C. ulcerans* の分離はなく、他のコリネバクテリウム属菌 5 株（4 種）を検出した。

4) SO 県の調査

動物管理指導センターに保護または引き取られたイヌの咽頭スワブ 101 検体と血清 100 検体、野生シカ捕獲に使われた猟イヌ 9 頭の鼻腔または咽頭スワブ 9 検体とその血清および捕獲された野生のシカ 16 頭の鼻腔スワブと 5 頭分の血清について調査した。その結果、PCR、菌分離はすべて陰性であった。血清については動物管理指導センターの 100 検体中 1 検体が、シカ 5 検体中 1 検体がジフテリア抗毒素価陽性を示した。

5) OS 県の調査

市内の動物管理センターに収容されたイヌ 21 頭およびネコ 40 頭を調査した結果、ネコ 4 頭から本菌を分離した。分離菌はいずれも DLT 遺伝子、PLD 遺伝子を保有し、典型的な生化学性状を示した（API Coryne: *C. ulcerans* 99.7% ID）。いずれも所有者の無いネコ（野良ネコ）であった。メスが 2 頭、オスが 2 頭で、概年齢は 3 ヶ月齢～10 歳程度が 3 頭、10 歳以上が 1 頭であった。栄養状態、健康状態不良のネコが 3 頭であったが、鼻水、くしゃみ等の呼吸器症状は認められなかった。4 株とも 7 月～8 月に分離したが、菌陽性の 4 頭は別々の区で保護された後、個別のゲージに収容されていたため、施設内感染の可能性は低いと考えられた。

県内の野鳥 151 検体について調査を行なった。その結果、*C. ulcerans* の分離はなく、他のコリネバクテリウム属菌 10 株を検出し

た。

6) TK 県の調査

作成したリアルタイム PCR 法により、2ヶ所の動物病院より集めたイヌ 17 検体、ネコ 47 検体のスワブ検体（64 検体）について検査を行った。その結果、64 検体中 2 検体で *C. ulcerans* の p 1 D 遺伝子のみ検出され、この 2 検体からは毒素非産生 *C. ulcerans* が分離された。また、64 検体からは、*C. pseudotuberculosis* の p 1 D 遺伝子は検出されなかった。

7) TY 県の調査

動物管理センターに引き取られたネコの咽頭スワブ 41 検体、および鼻汁スワブ 5 検体について調査した。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。

8) KG 県の調査

本年度の調査は、昨年度に引き続き動物保護センターに搬入された概ね健康なネコおよびイヌについて実施し、菌分離およびジフテリア毒素遺伝子は陰性であった。今年度は新たに動物病院に来院した有症のネコおよびイヌの検体について調査を実施し、これまでにネコ 3 検体イヌ 5 検体について調査した結果、菌分離およびジフテリア毒素遺伝子はいずれも陰性であった。

市内の動物愛護センターよりイヌ、ネコ 4 5 検体の鼻咽頭スワブ及び血清について検査した。その結果、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。また、ジフテリア抗毒素価も検出限界未満であった。

9) OK 県の調査

県内の食肉検査所に置いて、搬入される肉用ウシについて、腎臓、筋肉、乳房スワブ 3 検体と血清 34 検体を採取した。その結果、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。しかし、ジフテリア抗毒素価は 2 頭からそれぞれ、0.0072 と 0.46 単位の抗体が検出された。

10) 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イヌについて、愛知県、鹿児島県、沖縄県、新潟県および長崎県の島嶼部地域獣医会の協力を得て合計 196 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、新潟県で 1 頭、鹿児島県で 8 頭および沖縄県で 4 頭の合計 13 頭がジフテリア抗毒素価 0.01-0.24 単位で陽性であった。

②大阪府立大学の調査

大阪府立大学 小崎俊司教室では、分離菌について PFGE 法よりも解析能力のよい分子疫学手法を検討した。候補として、Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) 法を検討した。この方法は、フィンガープリント法の一つで、EcoRI と MseI でゲノムを切断し、断端が EcoRI サイトと MseI サイトに挟まれたフラグメントのみを増幅して、電気泳動分離および蛍光検出することで遺伝子型別を行う方法である。この方法は、検査に要する日数が PFGE 法の半分程度であり、克つ、フラグメントが PFGE よりも多く、またフラグメントの長さが数値として系統樹作成ソフトに取り込めるため、より正確な系統樹が作成できる可能性がある。

11) *C. ulcerans*^{Tox+}の全ゲノム解析

感染研のゲノム解析センターの協力を得て、日本で初めて人から分離された 0102 株の全ゲノム解読を行なった。その結果、3 つのプロフェージ領域を含み総塩基長 2579188 塩基であった。見出された特徴として、① *C. pseudotuberculosis* と類似した構成であって、*C. diphtheriae* とは違いが大きかった。②プロフェージ領域の構造は非常に特徴的であった。③ *C. diphtheriae* の接着因子 spaABC pili と高いホモロジーを示す領域は見出されなかった。④ *C. diphtheriae* で invasin とされる DIP1281 領域と 65%程度 のホモロジーを示す領域が見出された。⑤表現形質から予想されていた病原因子 phospholipase D (pId) の遺伝子の存在が確認された。

D. 考 察

国内 9 症例目の人での *C. ulcerans*^{Tox+} 感染症が滋賀県で発見された。患者は 50 代で基礎疾患を持たないが血中ジフテリア抗毒素価が低い人であり、その環境としてイヌやネコなどの動物をペットとして飼育していた。このことから今までの人での症例での共通点として、ジフテリア毒素へ感受性の人 が飼育動物から感染が起きていることが推察された。ただし、少数で室内飼育されている動物からはほとんどこの病原体が検出されることがない事実から、この飼育動物は家の内外を歩き来できるような飼育をされていることが必要であり、何らかの戸外に生息する生物との接触からこの病原体を家庭内に持ち込んでいる可能性がある。

そこで、これら人に接触する可能性のある動物での *C. ulcerans*^{Tox+} の汚染状況を調査する目的で、昨年より行われている各地の愛護センターや動物病院の患畜での調査は、昨年とは異なる地域に拡大して行われたが、複数の地域から分離された。 *C. ulcerans*^{Tox+} は環境中に一定の割合で生存していてその環境中に入ってきた動物を汚染している可能性が考えられるが、どの動物が高い保菌率を維持しているのかは、菌の分離効率がどのくらい明らかではない現状では言及できない。

昨年から行われている猟イヌの血清調査で、調査地域が全く異なる本年も昨年と同様にジフテリア抗毒素価が陽性であった。また、本年 S0 県におけるネコや鹿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、陽性動物が検出されている。抗毒素の証明は過去にジフテリア毒素産生菌が感染して、局所での増殖にともない産生した毒素が刺激となって抗体を誘導したと考える。この血清からのジフテリア抗毒素価検出による *C. ulcerans*^{Tox+} 汚染状況の把握は今後有用な手段となると考えられる。

一般的にコリネ属菌は皮膚等の一般細菌叢として分離され、*C. ulcerans* もこれら細菌叢の一部として存在している可能性もある。今年度の動物病院のネコを対象とした調査で

C. ulcerans^{Tox+}だけでなく、ジフテリア毒素非産生の *C. ulcerans* も分離されている。一般家庭で飼育する鼻水を呈するネコの中に *C. ulcerans*^{Tox+} が潜在している可能性が示されたことは、特に免疫力の低下した高齢者、ジフテリアトキソイド接種後 20 年以上を経過したヒトは、当該菌の感染には注意を要する。

最後に、これまでに全国各地から分離された *C. ulcerans*^{Tox+} の地域との関連性を調べる上で、今までは PFGE 法によっていた。そのため、滋賀で分離された菌の遺伝子型が大分で分離された株と同様であるという結果を得ていた。これは、PFGE 法による解析精度の問題のある可能性がある。この可能性を検証するためにも、今年度新たな分子疫学手法として、検討を開始した AFLP 法の解析能力に期待したい。また、我が国の初発症例の全ゲノム解析が可能となったことから、より短時間で検出できる簡便な *C. ulcerans*^{Tox+} の同定法の開発にも期待が高まる。

E. 結論

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

本年度、調査動物に関して血清を採取してジフテリア抗毒素価を測定することにより *C. ulcerans*^{Tox+} 分布調査が可能となることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Katsukawa C, Komiya T, Yamagishi H, Ishii A, Nishino S, Nagahama S, Iwaki M, Yamamoto A, Takahashi M. : Prevalence of *Corynebacterium ulcerans* in dogs in Osaka, Japan.: J Med Microbiol. 61(Pt 2): 266-273. 2012

2. 学会発表

- (1) 畠山 薫、藤元 琢也、奥野 ルミ、貞升 健志、甲斐 明美、山本明彦、高橋元秀。 *Corynebacterium ulcerans* の遺伝子検査法の検討。第 23 回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会（宇都宮）。2011 年 2 月。
- (2) 吉村幸浩、立川夏夫、山本明彦、小宮貴子。 *Corynebacterium ulcerans* による腋窩リンパ節膿瘍の一例。第 85 回日本感染症学会（東京）、2011 年 4 月
- (3) 岡本その子、内藤秀樹、船渡川圭次、今井一穂、佐伯貴之、小宮貴子、山本明彦、高橋元秀：栃木県内のイヌ・ネコにおける *Corynebacterium ulcerans* の保有状況調査、第 49 回栃木県公衆衛生学会総会、宇都宮、2011 年 9 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

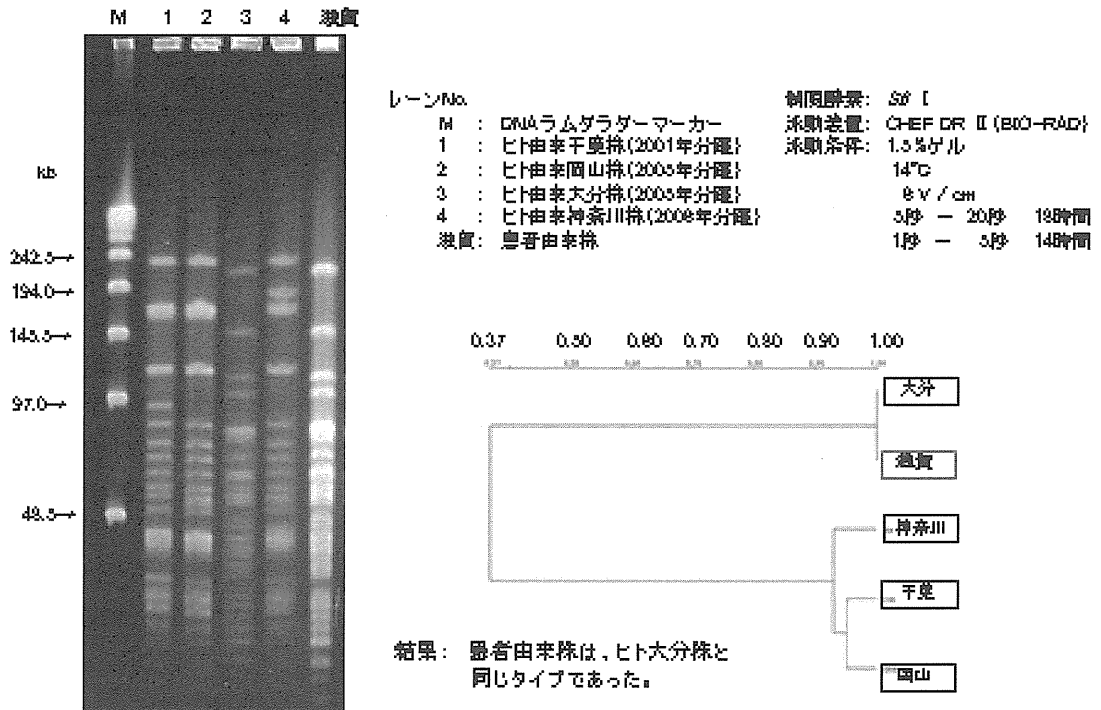
表 1. 人での菌分布調査結果

スワブ採取年月日	患者コード番号	性別	年齢	臨床経過	ジフテリアトキソイドワクチン接種歴	備考	ジフテリア(U/mL)
H23.9.26	1	F	41	平成23年9月25日から咽頭痛、開口障害で26日紹介	施行	のら猫を餌付け	0.163
				受診。左扁桃に白苔付着、左扁桃周囲にも腫脹を認			
				めた。入院治療中である。			
2011/9/26	2	M	21	平成23年9月23日から38度台発熱あり、26日から咽	施行	猫1匹飼育	0.0288
				頭痛を認め当科受診。両口蓋扁桃は腫脹し白苔付			
				着、顎下部リンパ節の腫脹を認めた。入院治療中で			
				ある。			
2011/10/8	3	M	35	平成23年10月6日から39.6度の発熱、咽頭痛、嚥下時	不明		0.0407
				痛あり、10月8日近医受診し急性扁桃炎と診断。			
				入院治療の必要について紹介受診。			
2011/10/13	4	M	39	平成23年10月11日に発熱(40度)、咽頭痛で	不明		検出レベル以下
				当院内科受診。抗菌薬処方されるも軽快せず、両側			
				扁桃に白苔が付着していた。10月13日に当科紹介			
				となる。			
2011/10/24	5	M	32	平成23年10月22日から咽頭痛、発熱(40℃)で近医	施行	犬飼育	検出レベル以下
				受診し扁桃炎を指摘され24日に当院受診となる。			
				口蓋扁桃は高度発赤腫脹し、白苔の付着を認めた。			
				通院治療中である。			

表 2. 平成 23 年動物の菌分離調査結果

地域	調査動物	機関	検体採取	検体数	菌分離数	ジフテリア抗毒素陽性	備考
SG県	イヌ	動物保護管理センター	口腔スワブ	54	1		現在、検査中
TS県	ネコ	動物愛護管理センター	咽頭スワブ	88	6		全てジフテリア毒素遺伝子PCR陽性
TG県	イヌ	動物愛護指導センター	咽頭スワブ	82	0		他のコリネ属:5株(4種)検出
	ネコ	動物病院(10ヶ所)	鼻汁	1	0		
	イヌ	同上	皮膚炎	1	0		
SO県	イヌ	動物管理指導センター	咽頭スワブ	101	0		
	同上	同上	血清	100		1	未検査(凍結保存)
	イヌ(猟犬)	シカ捕獲作業	鼻腔または咽頭スワブ	9	0		
	同上	同上	血清	9		0	未検査(凍結保存)
	シカ	シカ捕獲作業	鼻腔	16	0		
	同上	同上	血清	5		1	未検査(凍結保存)
OS県	イヌ	動物管理センター	咽頭スワブ	21	0		
	ネコ	動物管理センター	咽頭スワブ、鼻汁	40	4		
TK県	イヌ	動物病院(2箇所)	鼻汁、皮膚炎、咽頭、口腔内等	17			
	ネコ			47	2		遺伝子検出2、菌分離2
TY県	ネコ	動物管理センター	咽頭スワブ	41	0		
	ネコ	動物管理センター	鼻汁スワブ	5	0		
KG県	イヌ	動物管理センター	咽頭スワブ	43	0		
	ネコ	動物管理センター	咽頭スワブ	27	0		
OS県	野鳥	野外	咽頭・喉頭スワブ	151	0		
OK県	ヒト	食肉検査所	腎臓、筋肉、乳房スワブ	3	0		
			血清	34		2	

図1. 本年度人から（9症例目）分離された *C. ulcerans* の PFGE 解析



平成 23 年度研究組織：協力者リスト（敬称略）

栃木県保健環境センター 岡本その子、内藤秀樹、船渡川圭次、佐伯貴之、矢部真人

東京都健康安全研究センター 畠山 薫、久保田寛顕、奥野ルミ、貞升健志、井出 治
加藤敦子

神奈川県衛生研究所 古川一郎、石岡慎也、岡本浩介、水谷達二

川崎市衛生研究所 小嶋由香

静岡県環境衛生科学研究所 杉山寛治、神田 隆、高橋奈緒美

富山県衛生研究所 木全恵子、磯部順子、廣田昌幸

大阪府立公衆衛生研究所 勝川千尋

大阪市立環境科学研究所 梅田 薫、阿部拓人、畠山理沙、木村吉秀

岡山県環境保健センター 中嶋 洋、狩屋英明、岸本壽男、橋本英典、近藤 真
東 正秋、藤原慎一

滋賀県衛生科学センター 河野智美、梅原成子、佐野哲也

東京医科歯科大学 野口佳裕、角田篤信、喜多村 健

岐阜大学 柳井徳磨、渡邊 祐、朝倉亜紀

大阪府立大学 幸田知子、伊藤広記、向本雅郁、小崎俊司

川崎医科大学 秋定 健、兵 行儀、與田茂利、黒川幸徳、山根一和

信楽園病院 本間康夫

国立感染症研究所 小宮貴子、岩城正昭、見理 剛、山本明彦

平井明香、網 康至、須崎百合子、高橋元秀

関塚 剛、竹内 史彦、黒田 誠

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

猟犬における感染症抗体保有状況に関する研究：島嶼部を中心として

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 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

後藤みなみ 岐阜大学連合大学院獣医学研究科 学生

今岡浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 室長

棚林 清 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

山本明彦 国立感染症研究所 細菌第二部 室長

井上 智 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

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と考える。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、島嶼部および半島部（渥美半島、佐渡島、対馬、大隅半島、種子島、屋久島、奄美大島、沖縄本島および石垣島）の猟犬計 196 頭について、各種の感染症の血清抗体調査を行った。過年度の西日本および中部地方の調査に引き続き、今回の島嶼部においてもジフテリア症、破傷風、ブルセラ症、トキソプラズマ症、レプトスピラ症およびボレリア症に関する調査を実施した。

ジフテリア抗毒素は佐渡島、大隅半島、奄美大島、沖縄本島および石垣島で、抗ブルセラ抗体は佐渡島、種子島、奄美大島、沖縄本島および石垣島で少数例検出された。抗トキソプラズマ抗体はほとんどの検索地で比較的高頻度に検出された。抗レプトスピラ抗体、フィラリア抗原などは渥美半島以外の地域でそれぞれ高頻度に検出された。ヘパトゾーンおよびバベシアは、いずれも渥美半島および佐渡島を除く地域で陽性例が認められ、屋久島ではヘパトゾーンの陽性個体が 26/28 (92.9%) と高率に認められた。破傷風抗毒素および野兎病抗体は検出されなかった。島ごとに感染状況が異なることから（ブルセラなど）、島嶼部における感染症のリスク評価には、島ごとの個別調査が必要であると考えられる。

A. 研究の目的

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、島嶼部および半島部の猟犬 196 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。本研究は、2009 年度に実施した“西日本を中心にした猟犬の感染症に関する調査研究”および 2010 年度に実施した“中部地方を中心とした猟犬の保有病原体に関する調査研究”に継続した全国的な猟犬の人獣共通感染症の抗体調査の一環である。

B. 研究方法

(1) 材料

検索材料は、2011 年 3 月から 9 月にかけて 5 県 9 地域の島嶼部および半島部の猟犬 196 頭（愛知県渥美半島 14 頭、鹿児島県奄美大島群 37 頭、新潟県佐渡市 17 頭、長崎県対馬 20 頭、鹿児島県種子島 20 頭、鹿児島県屋久島 28 頭、鹿児島県大隅半島 25 頭、

沖縄県石垣島 29 頭および沖縄本島 6 頭）の血液を採取した。これらの猟犬は日常的に山林に入り込む機会を有しており、性別は、雄 106 頭、雌 90 頭であった。年齢は、5 ヶ月齢～13 歳までであった。

採血した血液は、抗凝固剤として EDTA を使用し、血清を分離後、分析までの間 -80℃ で保存した。凍結前に一部を使用して、血液塗抹標本を作製した。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、血液塗抹標本を作製した。採取した血清は、国立感染症研究所の山本明彦室長、棚林 清室長、今岡浩一室長、今泉信夫室長および川端寛樹室長が分担し、それぞれジフテリア感染症、野兔病、ブルセラ症、レプトスピラ感染症およびライム病ボレリア感染症について血清を用いた抗体検査をそれぞれ行った。

1) ジフテリア症

被験血清を 56℃ 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℃ 4 日間培養した後被験血清

コントロールとした。同様にして、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 12CD50/well）を両希釈系列に一定量添加し、37°C30 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°C4 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。

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,Coastar）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。ELISA および Western Blotting の両方が陽性のものを陽性例とした。

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°C24 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. *holractiva*, 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 (日本製薬株式会社 “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%