

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

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

東北地方の猟犬を歩哨動物としたライム病ボレリアの血清疫学調査

研究分担者	川端寛樹	国立感染症研究所 室長
研究協力者	大久保（佐藤）梢	国立感染症研究所 協力研究員
	後藤みなみ、村井厚子、柳井徳麿	岐阜大学 応用生物科学部
	高野 愛	山口大学 共同獣医学部

研究要旨：

猟犬を歩哨動物としたライム病ボレリアの血清疫学調査を継続的に行った。ライム病を伝播するシュルツェマダニが生息する東北地方では供試した猟犬血清のうち、ウエスタンブロット法によりその 48.8%で抗ライム病抗体陽性と判定された。北信越地方以南の抗体陽性率は 23.5%以下であることから、マダニの曝露機会が高いと考えられる猟犬を歩哨動物とする血清疫学調査は、病原体浸潤地域を調べる上で有用であると考えられる。

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。このため、病原体を保菌かつ伝播するマダニの分布を調べることは、地域毎のライム病感染リスクを評価するうえで重要である。しかしながら、マダニの病原体保有率や野生動物の病原体感染率等は地域、季節等によって変動することが知られている。また、調査実施者がマダニ刺咬を受ける可能性があること、さらには調査対象となる野生動物からの病原体曝露の危険性もあり、調査実施時にこれらリスクを低減することも必要である。

近年、イヌがボレリアに対して感受性が高いこと、加えてマダニ刺咬を受けやすいことから、イヌを歩哨動物とする病原体ボレリアの環境モニタリングが海外で試みられてきている。そこで本研究では、マダニの曝露機会が高いと考えられる猟犬を歩哨動物として、その血中抗ボレリア抗体保有状況を調べた。本年度は、昨年度までの西日本を中心とした調査研究に続いて、東北地方で、猟犬血清を採取しその抗体保有頻度を調べた。

B. 研究方法

抗ボレリア抗体測定のため、猟犬血清 121 検体を収集した。猟犬血清は柳井らより分与を受けた。血清中の抗ボレリア抗体測定は、

一次スクリーニングとして Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (以下 ELISA 法と略す) にて抗ボレリア IgG 抗体価を測定し、陽性と判定された検体についてはウエスタンブロット法 (以下 WB 法と略す) による確認を行った。ELISA 法は recomWell Borrelia canis IgG (Mikrogen, Germany) を用いた。WB 法には recomBlot Borrelia canis IgG (Mikrogen) を用いた。試験は各検査キット添付の手順書に従って行った。感染ボレリア種の同定を目的として、ボレリア分離のため、猟犬より採血した全血約 0.1ml を BSK-H 培地に接種し 32°C で 3 週間培養した。

(倫理面からの配慮について)
該当しない。

C. 研究結果

猟犬血清 121 検体のうち、ELISA 法にて 106 検体(87.6%)が抗ボレリア IgG 抗体陽性もしくはボーダーラインと判定され、うち 59 検体(48.8%)が WB 法により陽性であることが確認された(表 1)。昨年度までに抗ボレリア抗体陽性と判定された検体は東北以外の地域では 16.4%であり (H23 年度分担報告書参照) 東北地方では猟犬の抗ボレリア IgG 抗体陽性率は有意に高いことが示された (表 2)。イヌ全血からのボレリア培養を試みたが、いずれの全血からもボレリアは培養されなかった。またイヌの年齢、性差などを指標にした χ^2 乗検定を行い、イヌの加齢とあわせて抗体陽性率が上昇する傾向も見

られた (表 3)。

D. 考察

イヌを歩哨動物とする病原体環境モニタリングは、マダニ媒介性感染症のサーベイランス手法として世界的に用いられている。特に欧米では、ライム病患者発生地域におけるイヌの抗体保有率が高いこと等から、その歩哨動物として可能性が示されている (Goossens et al 2001, Rand et al. 2011)。米国における大規模な疫学調査では、ライム病流行地域におけるイヌの抗体陽性率は 4.0-11.6%である一方、ライム病患者の罹患率が低い地域では 1.0-1.4%であることが示されている (Bowman et al. 2009)。本研究では、猟犬の抗ボレリア抗体陽性率はこれと比較して高かったが、これは愛玩動物と比較して猟犬はマダニの曝露機会が高いためである可能性が考えられた。また、本研究では、東北地方で、有意に抗ボレリア抗体陽性率が高いことが示された。これは病原体保有マダニの生息地が寒冷地であることと (主に中部山岳地帯、東北) と一致している。また、5 歳未満の若犬と比較して 10 歳以上の老犬で抗体陽性率が高いことは、加齢に従って病原体保有マダニへの曝露頻度が上昇するためと考えられた。

E. 結論

イヌなどのライム病ボレリアの感受性が高い動物種で、かつマダニの曝露頻度が高い動物を歩哨動物として、ヒト病原体の浸潤実態を把握する手法は有効であり、ヒトの公衆

衛生対策を立案する上で重要な知見である
と考えられる。

H. 健康危険情報

なし

I. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

- 3) 後藤みなみ, 濱野剛久, 水主川剛賢, 酒井洋樹, 高島康弘, 柳井徳磨, 今岡浩一, 川端寛樹, 山本明彦, 小泉信夫, 野上貞雄. 猟犬を指標とした野外感染症調査: 島嶼部, 半島部における調査. 第 18 回 野生動物医学会大会. 2012 年 8 月. 十和田.

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. 東北地方で収集された猟犬血清 121 検体におけるボレリア抗体陽性率

都道府県	試験数	ELISA 陽性数(陽性率)	ウエスタンブロット法 による陽性検体数	試験数に対する 抗体陽性率(%)
青森	25	20 (80%)	10	40
秋田	11	9 (81.8%)	5	45.5
岩手	16	14 (87.5%)	11	68.8
山形	20	18 (90%)	10	50
宮城	30	18 (60%)	11	36.7
福島	19	14 (73.7%)	12	63.2
合計	121	93 (76.9%)	59	48.8

表 2. 東北地方と東北地方以外の地域で採血された猟犬血清間における抗ボレリア抗体陽性率の相違に関する χ^2 検定成績
 猟犬在住地域(n=627)

観測度数	Positive	Bordeline/Negative	Total
東北	59	62	121
東北以外	83	423	506
	142	485	627
期待度数	Positive	Bordeline/Negative	Total
東北	27.40350877	93.59649123	121
東北以外	114.5964912	391.4035088	506
	142	485	627
χ^2	Positive	Bordeline/Negative	Total
東北	36.43103758	10.66640688	47.09744446
東北以外	8.711769856	2.550662515	11.26243237
	45.14280744	13.21706939	58.35987683
P=	2.12478E-13		

表 3. 各パラメータによる統計学的解析

a)性別 (n=603)

観測度数	Positive	Borderline	Negative	Total
オス	67	43	208	318
メス	73	45	167	285
	140	88	375	603
期待度数	Positive	Borderline	Negative	Total
オス	73.83084577	46.4079602	197.761194	318
メス	66.16915423	41.5920398	177.238806	285
	140	88	375	603
χ^2	Positive	Borderline	Negative	Total
オス	0.631991324	0.250262943	0.53009969	1.412353957
メス	0.705169266	0.279240758	0.591479654	1.575889679
	1.33716059	0.529503701	1.121579345	2.988243636
P=	0.224445622			

b)犬齢 (若犬<5y、成犬 5-10y、老犬>10y)

b-1)若犬 VS 老犬(n=379)

観測度数	Positive	Borderline	Negative	Total
若犬	65	48	212	325
老犬	20	7	27	54
	85	55	239	379
期待度数	Positive	Borderline	Negative	Total
若犬	72.88918206	47.16358839	204.9472296	325
老犬	12.11081794	7.836411609	34.05277045	54
	85	55	239	379
χ^2	Positive	Borderline	Negative	Total
若犬	0.85388794	0.014833146	0.242704286	1.111425372
老犬	5.139140382	0.089273562	1.460720239	6.689134184
	5.993028322	0.104106708	1.703424525	7.800559556
P=	0.020236249			

b-2)老犬 VS 成犬(n=280)

観測度数	Positive	Borderline	Negative	Total
成犬	54	32	140	226
老犬	20	7	27	54
	74	39	167	280
期待度数	Positive	Borderline	Negative	Total
成犬	59.72857143	31.47857143	134.7928571	226
老犬	14.27142857	7.521428571	32.20714286	54
	74	39	167	280
χ^2	Positive	Borderline	Negative	Total
成犬	0.549427683	0.008637233	0.20115559	0.759220506
老犬	2.299456599	0.036148419	0.841873396	3.177478415
	2.848884283	0.044785652	1.043028986	3.936698921
P=	0.139687225			

b-3)若犬 VS 成犬(n=551)

観測度数	Positive	Borderline	Negative	Total
若犬	65	48	212	325
成犬	54	32	140	226
	119	80	352	551
期待度数	Positive	Borderline	Negative	Total
若犬	70.19056261	47.18693285	207.6225045	325
成犬	48.80943739	32.81306715	144.3774955	226
	119	80	352	551
χ^2	Positive	Borderline	Negative	Total
若犬	0.383839924	0.014009772	0.092294747	0.490144444
成犬	0.551982192	0.020146797	0.132724747	0.704853736
	0.935822116	0.034156569	0.225019494	1.194998179
P=	0.550185883			

c) ワクチン接種歴(n=627)

観測度数	Positive	Borderline	Negative	Total
経験あり	80	45	218	343
経験なし	62	44	178	284
	142	89	396	627
期待度数	Positive	Borderline	Negative	Total
経験あり	77.68102073	48.68740032	216.6315789	343
経験なし	64.31897927	40.31259968	179.3684211	284
	142	89	396	627
χ^2	Positive	Borderline	Negative	Total
オス	0.069227525	0.279269812	0.008644059	0.357141396
メス	0.0836093	0.337287132	0.010439832	0.431336264
	0.152836825	0.616556943	0.019083891	0.78847766
P=	0.67419302			

d) 狩猟対象(n=584)

観測度数	Positive	Borderline	Negative	Total
哺乳類	91	63	276	430
鳥類	45	23	86	154
	136	86	362	584
期待度数	Positive	Borderline	Negative	Total
哺乳類	100.1369863	63.32191781	266.5410959	430
鳥類	35.8630137	22.67808219	95.45890411	154
	136	86	362	584
χ^2	Positive	Borderline	Negative	Total
哺乳類	0.833703128	0.001636575	0.335673817	1.171013519
鳥類	2.327872369	0.004569658	0.937271047	3.269713074
	3.161575497	0.006206233	1.272944863	4.440726593
P=	0.108569659			

e)犬種(n=624)

観測度数	Positive	Borderline	Negative	Total
純血種	97	56	229	382
雑種	44	33	165	242
	141	89	394	624
期待度数	Positive	Borderline	Negative	Total
純血種	86.31730769	54.48397436	241.1987179	382
雑種	54.68269231	34.51602564	152.8012821	242
	141	89	394	624
χ^2	Positive	Borderline	Negative	Total
純血種	1.322097711	0.042183665	0.616954853	1.98123623
雑種	2.086947627	0.066587439	0.973870884	3.127405949
	3.409045338	0.108771104	1.590825737	5.108642179
P=	0.077744996			

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

ブルセラ症等に関する研究
（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
および *Brucella* 特異的組換えタンパクの作出）

研究分担者 今岡 浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 第一室長
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*) の感染を原因とする人獣共通感染症である。欧米では、家畜ブルセラ菌のリザーバーである有蹄類の野生動物を感染源とする家畜のブルセラ病の流行が報告がされ、近年では、欧州の野生イノシシが広範囲に渡りブルセラ菌に感染していることが確認され、家畜への伝播が懸念されている。

1) 国内の野生イノシシ血液、合計 543 サンプルを収集し、マイクロプレート凝集反応 (MAT) 法によりブルセラ属菌に対する抗体保有を検討したところ、イヌブルセラ菌 (*B. canis*) に対しては、11.0% (60/543)、家畜ブルセラ菌 (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) に対しては、全国 0.6% で (3/543) が陽性であった。陽性血清について PCR 法により 5 サンプルがイヌブルセラ菌 (*B. canis*) 型の陽性パターンを示した。それらイヌブルセラ菌型陽性の増幅産物の遺伝子配列は、3 つの異なる遺伝子座においてブルセラ属菌遺伝子と配列が一致した。これらの結果から血清陽性イノシシの一部はイヌブルセラ菌に対する感染歴を有していたと考えられる。

2) 日本ではブルセラ属菌に対する抗体検査は凝集反応が一般に用いられが、上述したように他の菌との交差反応も考えられる。そのため、より特異的な抗原を用いた、新たな抗体検出法を開発する必要がある。そこで、まず、ブルセラ SE 抗原を用いた WB 法を実施し、ブルセラ免疫ウサギ血清に特異性を示す 11kDa 付近に見られるバンドに注目した。ついで、このタンパクを抽出し、そのアミノ酸ならびに遺伝子配列を決定し、hypothetical protein BMEI0805 であることが明らかとなった。このタンパクについて、pCold TF ベクターを用いて組換えタンパクの作成を行い、その特異性を検討したところ、感染イヌ血清については十分であったが、ブルセラ属菌以外のグラム陰性菌で免疫したウサギ血清と非特異的反応も見られた。本反応は、大腸菌由来のタンパクによるものと考えられた。また、TF (Trigger factor) を除去したベクターも作成し検討を加えたが、免疫ウサギ血清の非特異的反応の除去には至らなかった。そこで、あらためて SE 抗原を二次元電気泳動により展開し、確認したところ、サイズが同一で PI 値の異なるところ (PI 値=8) に交差反応を示すタンパクが見つかった。ただ、PI 値=6 付近にブルセラ感染イヌ血清特異的なものが認められたことから、本タンパクに焦点を絞り検討を継続している。

A. 研究目的

ブルセラ症 (brucellosis) は、重要な人獣共通感染症である。世界中で毎年 50 万人を超え

る患者が新規に発生しており、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。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、2012年12月31日現在までに、ブルセラ症患者19例の届け出がされている（表1）。そのうち7例は家畜ブルセラ菌（*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*）である。*B. melitensis*感染5例、*B. abortus*感染2例であった。それらは、すべて推定感染地域を国外とする輸入症例である。残り12例は、国内を推定感染地域とする*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・淘汰の結果、現在は清浄化している。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。ただし、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伝播が起こっているとする報告はなく、菌も分離されない。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なら、野生動物によって維持されている可能性もある。一方、*B. canis*は国内に定着しており、全国のイヌの2～5%程度が抗体を持っていることが確認されている。*B. canis*については、野生動物による保菌も考えられる状況にある。

国内のイノシシ血液サンプルを収集し、イヌブルセラ菌、家畜ブルセラ菌、それぞれに対する抗体保有を検討した。また、日本ではブルセラ属菌に対する抗体検査は凝集反応が一般に用いられるが、他の菌との交差反応も認められることがある。そのため、より特異的な抗原を用いた、新たな抗体検出法を開発する必要がある。そこで、より特異的な抗原となり得る組換えタンパクの作成を行った。

B. 研究方法

1. 血液サンプルの採取： 大日本猟友会の協力を得て、同会会員にイノシシの血液サンプルの採取を依頼した。サンプルは、保冷して輸送し、回収した血液は当室にて血清を分離して測定まで-40℃に保管した。また、過去にシカについても検討を行ったが、今年度、これまで調査していなかった福岡、島根、和歌山で、大日本猟友会の協力を得て、シカ血液サンプルについて依頼した。

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・カニス凝集反応用菌液（北里研究所）を用いて、既報に基づき実施した。

3. ブルセラ属菌特異的遺伝子の検出： MAT法で、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*bcbp31*, *omp2*(*abortus* type および *canis* type)、*omp31* 遺伝子を標的として、PCRにより検出した。

4. ウェスタンブロットリング（WB）法による抗ブルセラ抗体の検出： *B. canis* の 0.5% n-lauroylsarcosine 抽出抗原を作成し（SE: lauroylsarcosine extract）、MAT 陽性血清 60 サンプルについて WB 法で検討を行った。

5. リコンビナント抗原の作成： ブルセラ SE 抗原を用いた WB 法を実施し、ウサギ抗ブルセラ血清に特異性を示す 11kDa 付近に見られるバンドに注目した。これについて SDS 電気泳動後、抽出・精製し、アミノ酸配列を決定し、ブルセラ特異的 hypothetical protein BMEI0805 (HYP) と同定した。pCold TF ベクターに組み込み大腸菌で発現させ、組換えタンパクを精製した。作成した組み換えタンパク

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

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

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

C & D. 研究結果と考察

1. サンプルの採取状況： 表2にサンプル・プロファイルを示した。イノシシは 18 県から合計 543 頭であった。シカは 2013.1 現在、79 頭分集まっている(検討結果は、報告書提出には間に合わず)。

2. MAT による抗体検査： 家畜ブルセラ菌に対しては、3 検体が陽性を示した。その他の検査したサンプルはすべて 1:10 未満であり、抗体は確認されなかった。*B. canis* に対しては、検査したイノシシ 543 頭のうち 60 頭 (11.0%) が陽性を示した。四国地区のみでは、家畜ブルセラ菌に対して 2/305 (0.7%)、*B. canis* に対して 47/305 (15.4%) が陽性であった(表3)。

3. 血液中のブルセラ属菌特異的遺伝子の検出：*B. canis* に対し抗体陽性となったイノシシ 60 サンプル中 25 サンプルが、4 種のブルセラ遺伝子のうちいずれかで陽性となり、そのうち 5 サ

ンプルで *B. canis* と同一の増幅パターンが確認された(表4)。家畜ブルセラ菌抗体陽性サンプルからは、ブルセラ特異的遺伝子は全く検出されなかった。PCR で *B. canis* と同一の増幅パターンを示したサンプルについて各増幅産物のシーケンスを確認したところ、100%ブルセラ属菌の配列と一致し、すなわち、*B. canis* の保菌が強く疑われた。

4. WB 法による抗体検出： *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. canis* に対する免疫家兎抗血清で、11kDa 付近に見られる特異的なバンドの有無を指標に判定した(図1)。陽性標準である *B. canis* 免疫血清と *B. canis* 感染イヌ血清では、11kDa 付近に陽性バンドが出現しているが、ウサギ、イヌそれぞれの陰性標準血清とイノシシ血清では、このバンドを確認できない(図1)。WB 法では、MAT 陽性のイノシシ血清については、全てが陰性であった。

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

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

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

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

E. 結論

国内の野生イノシシ血液サンプルにおいて *B. canis* に対して MAT 法で、抗体陽性を示すものが確認された。特に、調査した四国地区では約 23% が陽性を示した。全国では、合計で 543 頭中、60 頭 (11.0%) が陽性となった。国内では *B. canis* の存在は、イヌ繁殖施設におけるブルセラ病の流行や愛護センター等でのイヌの抗体検査で確認されている。国内感染による患者も報告されている。さらに特異性の高い WB 法での検討では、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、*B. canis* 特異的 DNA が増幅されている。生物種としてイノシシと同種であるブタは、イヌブルセラ菌に対し、抵抗性とされるが、野生イノシシが、*B. canis* に軽度感染し、抗体を持つ可能性は否定できない。

また、イノシシ血清合計 543 サンプル中で、家畜ブルセラ菌に対し抗体陽性の 3 例については、ブルセラ特異的 DNA が増幅されておらず、WB 法でも陰性であったことから、現時点では、他のグラム陰性菌との交叉反応であると考えられる。しかし野生イノシシで家畜ブルセラ菌の保有が疑われることは、畜産業はもとより公衆衛生上も大きな懸念材料となる。確証を得るために、さらなる検討が必要と考える。

新たなブルセラ属菌特異的な抗体検出法のた

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

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

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表等

1. 論文・総説等

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

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

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

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

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

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

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

2. 学会発表・講演等

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1) ブルセラ症の国内事例 (感染症法指定後、1999.4.1～2012.12.31)

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

表 2) 検査対象イノシシー一覧

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

表 3) MAT による抗ブルセラ抗体検出

地域	n	MAT (number of positive)		
		<i>B. abortus</i>	<i>B. canis</i>	
千葉	26	0	2	
長野	3	0	1	
静岡	53	0	6	
滋賀	8	0	0	
岐阜	19	0	0	
愛知	21	0	0	
三重	6	0	0	
兵庫	9	0	0	
島根	16	0	0	
広島	22	0	1	
徳島	59	0	10	<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	-	-	-	-	
	07	4	千葉	-	-	+	-
8		鹿児島	-	-	-	-	
20		熊本	+	-	-	-	
49		愛媛	-	-	-	-	
60		愛媛	-	-	+	-	
62		愛媛	+	-	+	-	
63		愛媛	-	-	-	-	
68		愛媛	-	-	-	-	
08	3	高知	-	-	-	-	
	13	香川	+	-	-	-	
	21	長野	-	-	+	-	
	24	静岡	+	-	-	-	
	25	静岡	+	-	+	+	
	28	徳島	+	-	-	-	
	31	徳島	-	-	+	+	#
	33	愛媛	-	-	-	-	
	61	愛媛	+	-	+	+	#
	70	静岡	+	-	+	+	#
09	85	愛媛	+	-	-	+	
	87	鹿児島	-	-	-	-	
	18	香川	-	-	-	-	@
	19	愛媛	-	-	-	-	
	21	香川	+	-	-	-	
	22	香川	+	-	+	-	@
	34	高知	-	-	-	-	

年度	No.	捕獲地	標的遺伝子 ※)				
			1	2	3	4	
10	13	愛媛	-	-	-	-	
	14	香川	-	-	-	-	
	52	徳島	+	-	+	-	
	57	徳島	-	-	-	-	
	73	愛媛	-	-	-	-	
	77	高知	-	-	-	-	@
	78	高知	-	-	-	-	
	87	徳島	-	-	-	-	
	90	徳島	-	+	-	+	
	93	香川	+	-	-	-	
11	94	愛媛	-	-	-	-	
	100	香川	-	-	-	+	
	2	徳島	-	-	-	-	
	5	愛媛	-	-	-	-	
	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>	+	+	-	-

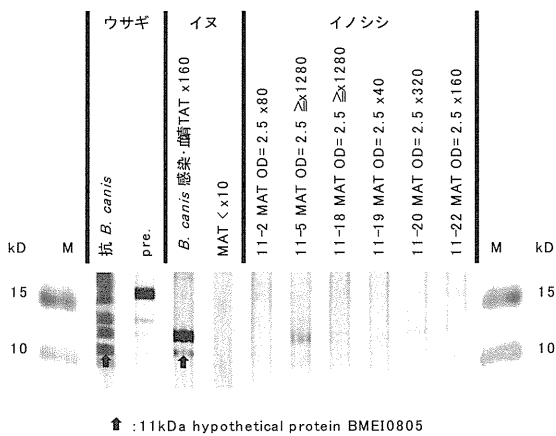
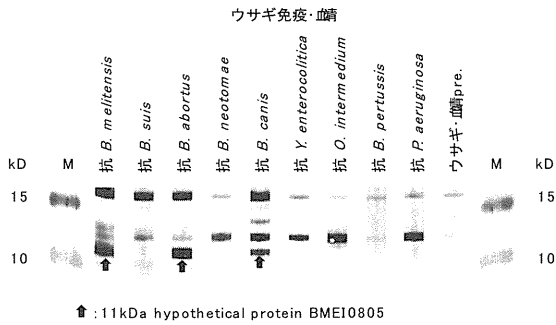
※)				
1	2	3	4	
<i>bcsp31</i>	<i>omp2</i> (<i>abortus</i> type)	<i>omp2</i> (<i>canis</i> type)	<i>omp31</i>	

PCR陽性

@ 抗*B. abortus*抗体陽性

*B. canis*と陽性パターンが一致

図1) SE 抗原を用いたウェスタンブロッティング法によるブルセラ特異的抗体の検出



(11kDa 付近にブルセラ特異的バンドが認められる
—その後の解析で Hypothetical protein BMEI0805 と同定)

図2) 組換えタンパクの作成

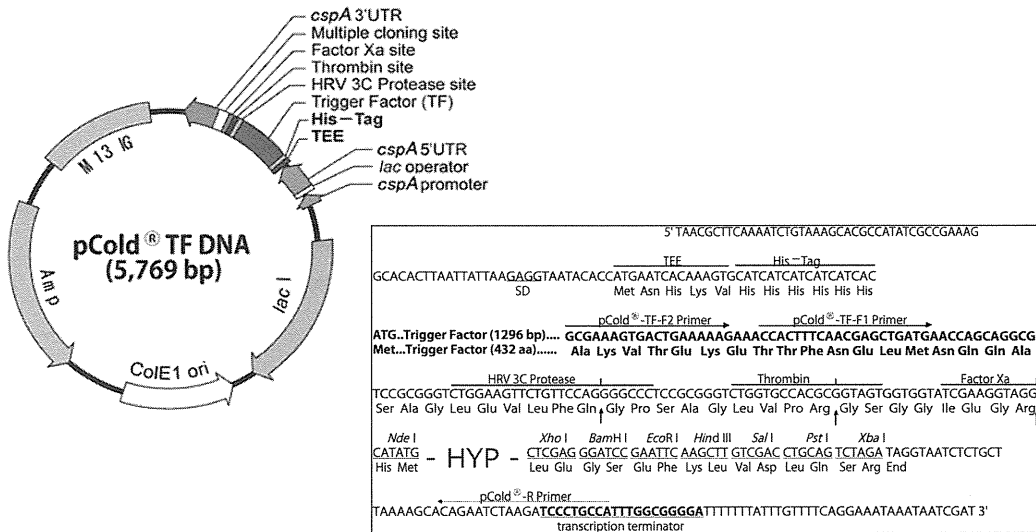


図3) TF を酵素切断後の Hypothetical Protein の反応

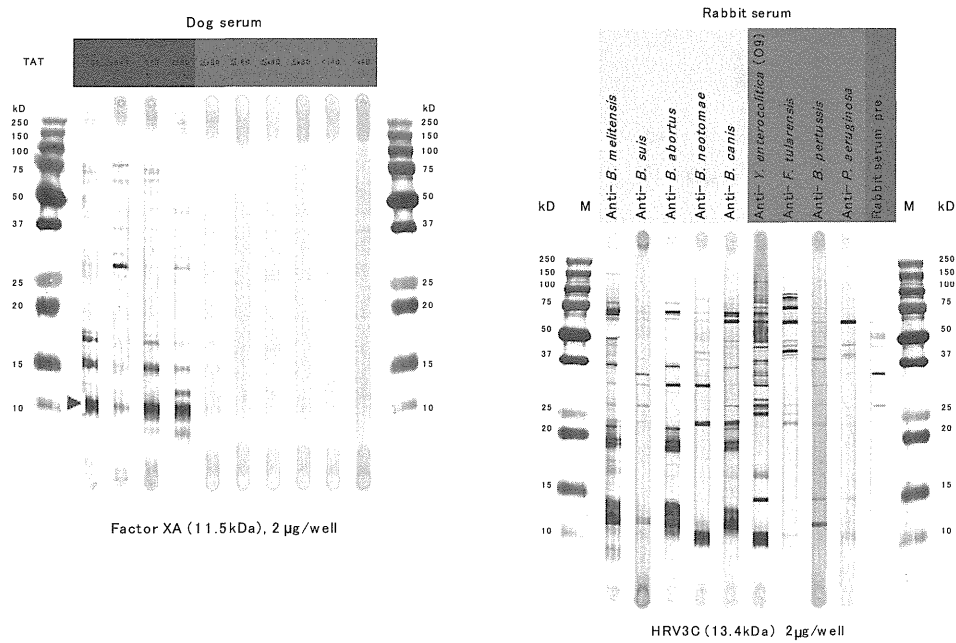


図4) 組換えベクターの改変(TFの除去)と改変後のベクターによる組換え Hypothetical protein (HYP3)

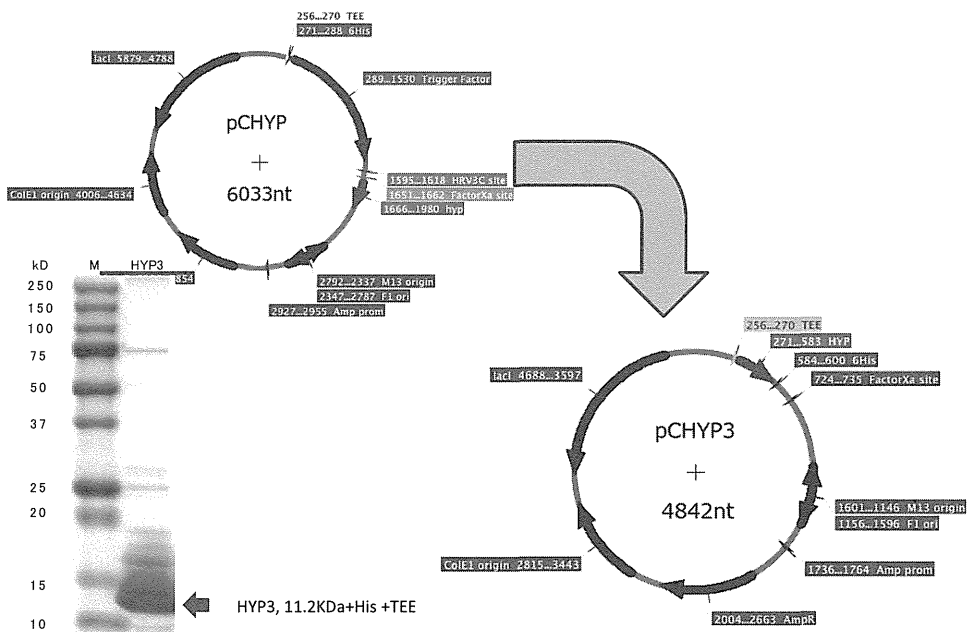


図5) HYP3 の反応性

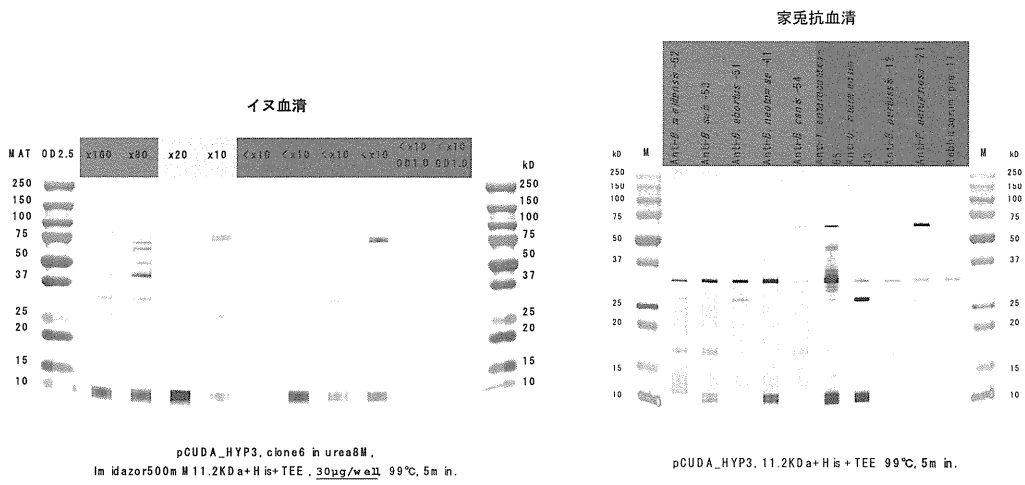
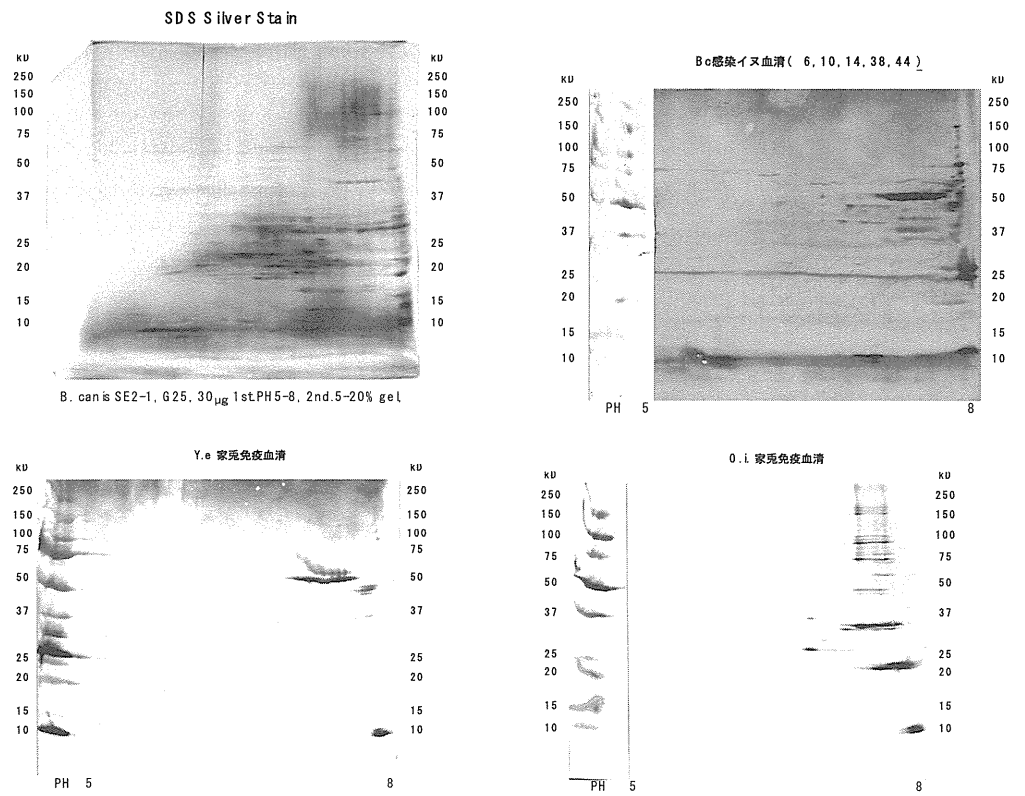


図6) 2D 電気泳動による SE 抗原の解析と WB



分担研究報告書

コリネバクテリウムに関する研究

分担研究者

山本 明彦（国立感染症研究所 細菌第二部）

研究協力者

別紙のリスト添付

研究要旨

今年度、新たにジフテリア様症状を呈する 2 名の患者からジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* (*C.ulcerans*^{Tox+}) が分離された。患者の環境調査において飼いネコ及びイヌから *Corynebacterium* 属菌が分離された。また、患者家族のジフテリア抗毒素抗体価が高かった。これらの症例は、今まで報告されたような呼吸器症状ではなくリンパ節膿瘍や皮下膿瘍の症例であった。

12 カ所の地方自治体の動物愛護センターや動物病院に搬入されたイヌまたはネコの咽頭スワブ等について菌分離調査及び血清ジフテリア抗毒素抗体価測定を実施した結果、4 カ所の愛護センターのネコとイヌより *C.ulcerans*^{Tox+} 8 株が分離され、また抗毒素は 5 箇所 28 検体が陽性を示した。

今年度までの調査結果では、野外活動時間の多いイヌやネコは本菌を保菌または本菌に感染している可能性が懸念される。しかも外見上健康な動物が保有していた。感染した動物からは動物への菌の伝播がおこり感染が成立する。感染動物では排菌量が多いために、人はイヌ、ネコからの感染リスクが高いことが考えられる。

A. 研究目的

ジフテリアは *C.diphtheriae* に起因する急性呼吸器疾患で、その感染力と重篤性から 2 類感染症に指定されている。我が国では千葉県で、ジフテリア様患者からジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* が初発症例として分離され、結核感染症課から本菌が分離された場合は報告する旨の通知が今回も発出された。しかし、初発症例を含めてその環境調査は不十分であった。

C.ulcerans^{Tox+} 感染はジフテリアに極めて類

似する病態を呈し、動物から感染する可能性が国内外の感染報告から指摘されているが、その実態は不明な点が多く、その実態を把握する必要がある。生態系でどのように維持されているか、菌の分布、疫学等の調査により明らかにし、人と動物へのリスク評価を実施する。

B. 研究方法

1. 調査対象

(1) 感染患者の病原体診断と環境調査： 今年