

度ジフテリア様症状を呈した2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。さらに、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1都道府県の小児科受診からランダムに抽出した50人について、気道材料を採取し、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、または開業獣医医院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、香川県、山形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。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、菌分離試験に用いる培地については、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は、2大学と実施した。岐阜大学・柳井研究室では2012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として、AFLP法の開発と検討を行った。

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、咽頭や体表などの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。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、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った。菌の毒素原性はジフテリア毒素遺伝子のAサブユニット相当部分の一部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日間培養した。部分中和により細胞の50%が死亡する各検体の希釈倍率を標準抗毒素のそれと比較し、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UPGMA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、日本で初めてヒトから分離された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2症例について実施した。今年度の症例は、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。

1例目は、香川県R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10例目)。担当医師から以下の情報を得た。香川県在住の33歳の男性。2011年12月ころより右上腕部に無痛性腫瘤を自覚したが、徐々に縮小し消失した。しかし、2012年1月初旬に同部に再度腫瘤が出現。増大傾向にあったため近医受診。加療目的にてR病院紹介となった。来院時、呼吸器症状、咽頭症状は認めず。右腋窩に直径25mm大の平滑なリンパ節を触知した。血液検査値はWBC12800、CRP5.51と炎症所見を示していた。悪性リンパ腫が否定できなかったため右腋窩リンパ節生検を行い、摘出標本を病理検査・細菌検査に提出した。リンパ節摘出時、リンパ節内部より壊死・膿汁様排出液を認めた。感染性のものが疑われたため、細菌学的検査を依頼し *C.ulcerans* が確認された。エリスロマイシン(EM)を投与した。以後、右腋窩のリンパ節膿瘍は退縮し、EM投与開始10日目にはほぼ改善した。この菌は、PFGE法による分子疫学的解析により、2005年に岡山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、妻と同居、ペットに関する問診を行ったところ、家の内外を行き来する犬3匹がよく行き来する妻の実家で飼育していることが判明した。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。患者妻及びその義母、義父、義兄の咽頭スワブも採取した。*C.ulcerans* は検出されなかったが、患者の家族から *Corynebacterium* 属菌が検出され、妻のジフテリア抗毒素価が高値を示した。

2症例目は、山形県衛生研究所より照会があった(国内ヒトの症例の11例目)。担当医師から以下の情報を得た。山形県在住の37

歳の女性。2011 年 12 月初旬、右肘内側の腫脹、搔痒感が出現、次第に熱感と腫脹が増強し、12 月中旬、近医を受診、軟部腫瘍の疑いで精査目的に S 病院を紹介された。初診時、右肘内側に発赤、局所熱感、疼痛を伴った約 4cm の弾性硬、可動性のない腫瘤を認めた。Tinel sign は認めなかった。血液検査では WBC 7,500/mm³、CRP 2.3 mg/dl と軽度の炎症所見を示した。MRIT1 強調画像で筋肉と等輝度、T2 強調画像で不均一に高輝度、造影 T1 強調画像で辺縁が造影される腫瘤を認めた。穿刺吸引を行ったが、培養で細菌は検出されず、悪性細胞も認めなかった。発症から 1 か月の経過で次第に右手指のしびれが見られるようになってきた。2012 年 1 月確定診断と疼痛緩和のため腫瘤切除術を行った。その際、腫瘤の周囲皮下組織に炎症を認め、剥離する際に腫瘤内から膿が出てきた。腫瘤の病理検査を行い、中心壊死を伴った膿瘍であった。手術時に採取した膿を培養したところ、グラム陽性短桿菌を認めた。起因菌はジフテリア毒素産生性の *C. ulcerans* であると確定された。この菌は、PFGE 法による分子疫学的解析により、2006 年に神奈川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、夫と娘 2 人と同居、ペットに関する問診を行ったところ、家の内外を行き来するネコ 6 匹を飼育していることが判明した。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。患者の娘 2 人の咽頭スワブと血液を採取した。*C. ulcerans* は検出されなかったが、ネコ 2 匹から *Corynebacterium* 属菌が検出され、DT 2 期の予防接種を受けていない娘のジフテリア抗毒素価が高値を示した。

(論文発表 (2))

(2)人での菌分離調査

OS 府の小児科受診者の気道材料のうち、50 人分について菌分離を試みたが、*C. ulcerans* は検出されなかった。

(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 1)

1) KG 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 68 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。動物病院のネコから採取した血清 1 検体がジフテリア抗毒素が検出された。

2) YG 県の調査

県内全域を網羅する形で選定した 20 ヶ所の動物病院の協力を得て、ネコ 187 匹のジフテリア抗毒素価を測定したところ、2 匹が陽性となった (0.651IU/ml、0.230 IU/ml)。抗毒素価陽性ネコ及び同居ネコ計 12 匹から採取した咽頭拭い液からウルセランス菌の分離を試みたが、いずれも菌分離陰性であった。今回、抗毒素陽性となったネコの自宅ではいずれも複数のネコが飼われていた (5 匹および 7 匹) ことから、多頭飼育が抗毒素価陽性に関連している可能性が推察された。

3) SO 県の調査

動管センターのイヌ 116 頭を調査した結果、PCR では 1 頭で陽性であったが菌分離はできなかった。動物病院のイヌ 5 頭、ネコ 33 頭を調査した結果、菌分離はされず PCR は全て陰性であった。

4) TS 県の調査

県内でネコが集団で生息している地域 7 カ所 (A から G 地域) について、保菌状況及び抗毒素抗体の保有状況を調査した。その結果、

それぞれの地域におけるネコの保菌状況は、E 地域 4.8%(3/26)、G 地域 22.2%(2/9)であり、残り 5 地域からは検出されなかった。しかし、抗毒素抗体の保有率は、E 地域 19.2%(5/26)、G 地域 22.2%(2/9)の他、A 地域 3.2%(1/31)、B 地域 6.3%(1/16)、F 地域 28.6%(4/14)と多くの地域で認められた。なお、これら陽性ネコはすべて、外見上健康であった。

5) SG 県の調査

動物保護管理センターに収容されたイヌおよびネコの保菌状況を調査した。イヌおよびネコ合計 67 検体を検査した結果、1 検体でジフテリア毒素遺伝子陽性を確認したが、菌は分離されなかった。また、県内の獣医科医院で受診したネコの保菌状況を調査した。合計 34 検体を検査した結果、2 検体でジフテリア毒素遺伝子陽性を確認した。このうち、1 検体からジフテリア毒素産生性ウルセランスが分離されたが、残り 1 検体から菌は分離されなかった。

6) MG 県の調査

動物愛護センターの協力で、各保健所から搬入された犬 55 匹、猫 48 匹を調査の対象とした。塗抹平板を PCR でスクリーニングした結果、県北西部の保健所管内から搬入された成猫（♀）1 匹から DT 遺伝子が検出された。単離した菌は生化学試験等で *C. ulcerans* と同定された。

7) OS 市の調査

動物管理センターに収容されたイヌ 41 頭、およびネコ 21 匹の保菌状況を調査した。イヌはすべて菌陰性であり、5 月に調査したネコ 1 匹(4.7%)から *C. ulcerans* を検出した。菌陽性ネコは、老年（10 歳以上）のメスで、栄養状態は普通だが衰弱していた。鼻水、くしゃみ等の呼吸器症状は認められなかった。所有者有（飼育されていた）のネコであるが、飼育形態は不明で外飼いの可能性もある。分

離菌は *C. ulcerans* に典型的な生化学性状（API Coryne: *C. ulcerans* 99.7% ID）を示し、DLT 遺伝子陽性、PLD 遺伝子陽性であった。さらに、ドブネズミの調査も実施した（ドブネズミの採取はもともと繁殖調査を目的としたものである）。採取場所はヒトの出入りの少ない埋め立て地である。9 匹調査して、すべて菌陰性であった。

8) TK 都の調査

リアルタイム PCR 法により、調査対象動物のスワブ 10 検体について検査を行って、*C. ulcerans* の p1D 遺伝子、DLT 遺伝子、および *C. pseudotuberculosis* の p1D 遺伝子は検出されず、また、*Coryne* 属菌も分離されなかった。

9) TG 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、咽頭スワブ及び血清を採取している。調査の結果、咽頭スワブからジフテリア毒素遺伝子は検出されなかった。*C. ulcerans* の分離はなく、他のコリネバクテリウム属菌 5 株（2 種）を検出した。血清については、動物病院の協力で採取したネコ血清 1 検体がジフテリア抗毒素価陽性を示した。さらに動物愛護センターにて保管してあった過去に採血したイヌ血清 568 検体について測定したところ 9 検体が抗毒素価陽性であった。

10) KS 市の調査

愛護センターのイヌ 2 検体、ネコ 29 検体について、咽頭スワブからの菌分離を目指したが陽性の検体はなく、また全 31 件中 18 件においては抗毒素検査を実施済みであり、全て検出レベル以下という結果であった。なお、昨年度の検体のうち抗毒素検査が未実施であった 30 検体についても同様に検査を実施し検出レベル以下という結果であった。

11) KN 県の調査

県内の動物病院の協力を得てイヌ 18 検体、

ネコ 8 検体より菌分離を目指したが、すべて陰性であった。

1 2) 獣医科大学との共同研究調査結果

①岐阜大学 柳井研究室

野生動物と接する機会の多い猟イヌについて、福島県、宮城県、山形県、秋田県、岩手県および青森県の地域獣医会の協力を得て合計 123 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、青森県の 1 頭がジフテリア抗毒素価 0.0144 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。この方法を用いて現在までに当研究班で分離された *C.ulcerans*130 株について、解析を行い図 2-1,2-2 に示した。

(4) *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 つのプロファージ領域を含み総塩基長 2,579,188 塩基であった。見出された特徴として、① *C.ulcerans*0102 株は *C. pseudotuberculosis* ときわめて似通っていた。その一方で *C. diphtheriae* ゲノムとの間には、そのようなゲノム全体にわたる類似性が見いだされなかった。②毒素遺伝子をコードする (Tox+) プ

ロファージ領域の構造は非常に特徴的であり、*C. diphtheriae* の (Tox+) プロファージ領域とはホモロジーがほとんど見いだされなかった。両菌種の (Tox+) プロファージが異なる期限を持つことが示唆された。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 of 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 (pld)* の遺伝子の存在が確認された。(論文発表 (1))

D. 考 察

国内 10、11 症例目のヒトでの *C.ulcerans*^{Tox+} 感染症が香川県および山形県で発見された。患者は 30 代で基礎疾患を持たない健常人あり、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。これら発生した症例は、菌が分離された部位についても、呼吸器ではなくリンパ節や皮下膿瘍であって今までの *C.ulcerans*^{Tox+} 感染が起きたヒトでの症例とは異なるものであった。この 2 人の感染者の感染前の抗体価は測定していないが、流行予測調査によると 30 歳台のジフテリア毒素抗体価平均は、ジフテリア発症阻止可能なレベルにあるので、この点からもこの世代に発症したことは特徴的であった。今後、分離された *C.ulcerans*^{Tox+} の解析でその感染特性が異なる菌であることが明らかになると予想される。飼育動物からの感染の可能性は、本年度調査した 2 症例でも推察された。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行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、一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。今回のヒト症例が発生した2つの地域についても調査を行うことができ、ジフテリア毒素抗体価を有するイヌやネコが同地域に生息することを確認した。

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て汚染源の元凶となっているのかは、現状では言及できない。昨年から行われている猟犬の血清調査で、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、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結果である可能性がある。この血清からのジフテリア抗毒素価検出による *C.ulcerans*^{Tox+} 汚染状況の把握に今後も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。本年度に発生した患者の特性から、健常

者であっても感染の機会があることが示唆された。

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ために、今までは PFGE 法によっていた。その結果、香川県及び山形県で分離された菌の遺伝子型は岡山県及び神奈川県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 法を実施した結果、高い解析能力と簡易で客観的な手法であることが確認された。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、一定の割合で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+} 分布調査に役立てる可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Sekizuka T, Yamamoto A, Komiya T, Kenri T, Takeuchi F, Shibayama K,

Takahashi M, Kuroda M and Iwaki M: *Corynebacterium ulcerans* 0102 carries the gene encoding diphtheria toxin on a prophage different from the *C. diphtheriae* NCTC 13129 prophage, BMC Microbiol. 2012 May 14; 12: 72.

- (2) Urakawa T, Seto J, Yamamoto A, Nakajima T, and Goto S, Subcutaneous abscess formation in the upper extremity caused by toxigenic *Corynebacterium ulcerans* J Med Microbiol [Epub ahead of print]
- (3) 鎌田知子、畑中章生、田崎彰久、本多圭司、角田篤信、喜多村健； 茨城県で発見されたコリネバクテリウム・ウルセランスの 1 症例、日本耳鼻咽喉科学会会報 115 巻 7 号 682-686・2012 年
- (4) 木全恵子、嶋 智子、金谷潤一、磯部順子、嶋 一世、廣田昌幸、保田信一、綿引正則、佐田徹太郎。ネコにおけるジフテリア毒素産生型 *Corynebacterium ulcerans* および *Corynebacterium* 属菌保有状況調査 (2010-2011) 第 2 報、富

山 県 衛 生 研 究 所 年 報 第 35 号
139-142・2012 年

2. 学会発表

- (1) 畠山理沙、梅田薫、阿部拓人、松村国彦、小笠原準、小宮貴子、岩城正昭、山本明彦、長谷篤、真田秀一。大阪市のイヌ・ネコにおけるジフテリア毒素産生性コリネバクテリウム・ウルセランス保菌状況調査。平成 24 年度獣医近畿地区学会、2012 年 10 月。
- (2) 河野智美、須藤正之、佐野哲也、山本明彦、梅原成子、青木佳代、石川和彦。滋賀県内のイヌ・ネコにおけるジフテリア毒素産生性コリネバクテリウム・ウルセランスの分布調査結果。第 43 回滋賀県公衆衛生学会、2013 年 2 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. 平成 24 年動物の菌分離調査結果

地 域	調査動物	機 関	採取検体	検体数	菌分離	抗体陽性	備 考
KG県	イヌ	動物病院、動物管理指導所他	咽頭、耳、体表スワブ	68匹	0		
	ネコ	動物病院	咽頭スワブ	1匹	0	1	
YG県	ネコ	動物病院(20ヶ所)	血清	187	0	2	多頭飼育(それぞれ5匹および7匹飼育)
SO県	イヌ	動物管理指導センター	咽頭スワブ	116	0		PCR:1陽性
	イヌ	動物病院(3ヶ所)	鼻腔、咽頭	5	0		
	ネコ	動物病院(4ヶ所)	鼻腔、咽頭、眼脂	33	0		
TS県	ネコ	動物愛護管理センター	咽頭スワブ	121	5	13	県内のネコ集団で生息地域7カ所の保菌状況及び抗毒素抗体保有状況を調査。外見上健康であったネコより菌は2地域から検出され、抗毒素抗体は5地域で認められた。
SG県	イヌ	動物保護管理センター	口腔	39	0		
	ネコ	動物保護管理センター	口腔	28	0		PCR:1陽性
	ネコ	獣医科大学	咽頭、口腔、鼻腔、肛門、	34	1		PCR:2陽性
MG県	イヌ	動物愛護センター	咽頭スワブ	55	0		
	ネコ	動物愛護センター	咽頭スワブ	48	1		<i>C. ulcerans</i> 検出 県北西部より搬入された
OS市	イヌ	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	咽頭スワブ・目やに	21	1		
	ドブネズミ	環境科学研究所	咽頭(口腔内)スワブ	9	0		
TK都	ネコ	動物病院	鼻汁、皮膚炎	2	0		
	ネコ	不明	鼻汁	8	0		
TG県	イヌ	動物愛護指導センター	咽頭スワブ	37	0	0	他のコリネ属:5株(2種) 検出
	イヌ	同上	膿、皮膚擦過	2	0	0	
	イヌ	同上	血清	28	0	0	
	ネコ	動物病院(10ヶ所)	皮膚炎	1	0	0	
	ネコ	動物病院	無症状・血清	3	0	1	採血後死亡のために菌検査はできなかった
	イヌ	動物愛護指導センター	血清(H14-17)	568		9	過去に採血した血清
KS市	イヌ	愛護センター	咽頭スワブ	2	0	0	
	ネコ	愛護センター	咽頭スワブ	29	0	0	
KN県	イヌ	動物病院	咽頭スワブ	18	0		
	ネコ	動物病院	咽頭スワブ	8	0		

図 1. 本年度人から（10、11 症例目）分離された *C.ulcerans* の PFGE 解析

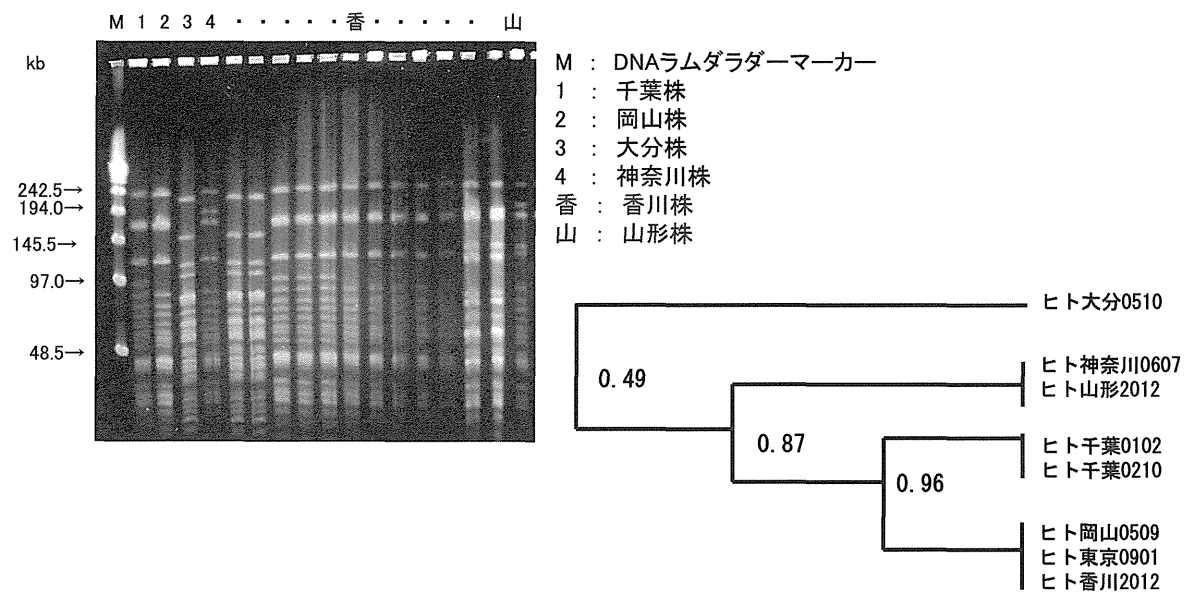
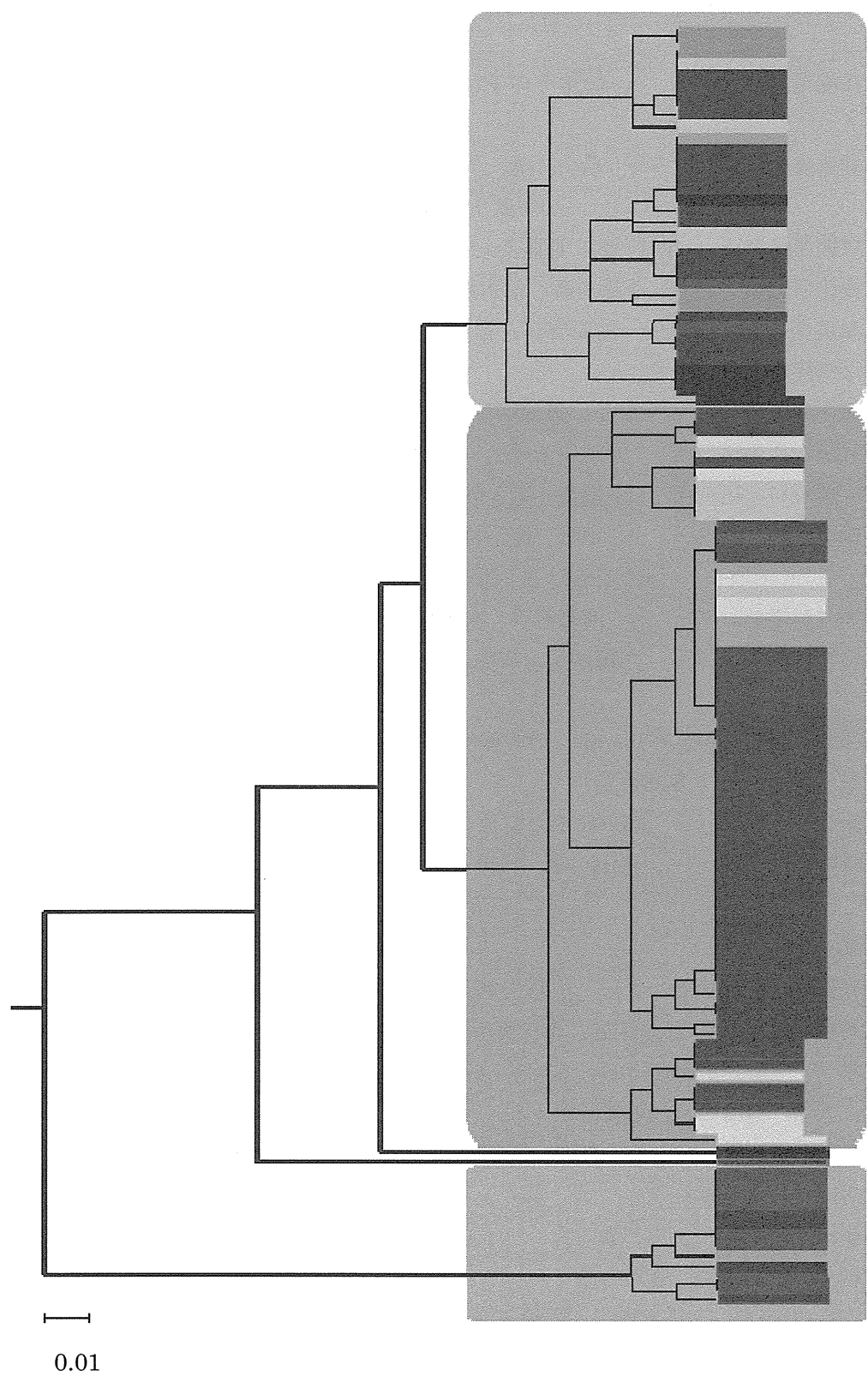


図 2-1. PFGE 法による *C.ulcerans* 解析



図 2-2. AFLP 法による *C.ulcerans* 解析



別紙

平成 24 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、舩渡川圭次、増山知由、関口明子、福田幸男、
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、遠藤亜紀、岡本浩介、内田 茂、水谷達二

川崎市衛生研究所 小嶋由香、清水亜希子、佐藤弘康、西村悠貴、鈴木香奈子

静岡県環境衛生科学研究所 佐原啓二、道越勇樹、森 大典、村松芳貴、小川 高、増田
敏行、深澤隆司、谷 浩之

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

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、青木佳代、須藤正之、佐野哲也

香川県環境保健センター 内田順子、有塚真弓、池本龍一、薦田博也、宮本孝子、関 和
美、

寺嶋由佳理、保田英彰、砂川一浩、麻野俊機、坪井利樹、千野和彦

長崎淳一、上田 勲、多田芽生

山形県衛生研究所 瀬戸順次、安孫子千恵子

宮城県保健環境センター 畠山 敬、後藤郁男、山口友美、木村葉子、齋藤香織、宮崎麻
由、

野地和高、建入茂樹

徳島県立保健製薬環境センター 下野生世、石田弘子、石川生代、矢野さやか

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

大阪府立大学 幸田知子、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

済生会新潟第二病院 小出 勝

日本歯科大学医科病院 菅原芳秋

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：東北地方を中心として

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

林 武志 岐阜大学連合大学院獣医学研究科 大学院生

濱野剛久 岐阜大学応用生物科学部獣医課程 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、東北地方（福島県、宮城県、岩手県、青森県、秋田県および山形県）の猟犬計 123 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、中部地方および島嶼部の調査に引き続き、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。

人獣共通感染症に関しては、ブルセラ症は福島で 1 例、山形県で 3 例の計 4 例の陽性例が認められた。トキソプラズマでは、先の報告と同様に各県とも高い陽性率で、検索例の 18% が陽性を示した。ジフテリア毒素では、青森で 1 例の陽性例が認められた。東北地方で問題となる野兎病は、今回検出されなかった。犬由来の感染で、宮城県で *Babesia (B) gibsoni* が 3 例にのみ検出された。また、ヘパトゾーン(*Hepatozoon canis*)について、全例とも陰性であった。犬フィラリア症では、検索した猟犬全体の約 30%で抗原が検出され、比較的高い陽性率であった。

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、東北地方の猟犬 123 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”，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”および 2011 年の“島嶼部を中心にした猟犬の保有病原体に関する研究”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、2012 年 6 月から 9 月にかけて東北 6 県の猟犬 123 頭（福島県 19 頭、宮城県 30 頭、岩手県 17 頭、青森県 26 頭、秋田県 11 頭、山形県 20 頭の猟犬から血液を採取した。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 58 頭、雌 64 頭、不明 1 頭であった。年齢は、1 歳～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°C 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°C 30 分非動化处理し、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℃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℃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。

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℃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、十分な色を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℃、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℃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. *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 穴プレート上でを行い、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)

野兎病菌 Yama 株の精製リボ多糖体を 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、リボ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 μ l, 各々プライマー 1 μ l, dNTP 5 μ l, Ex-Taq 0.25 μ l, $\times 10$ バッファー 5 μ l を入れ、全 50 μ l で実施された。PCR は、

94℃30 秒間変性, 55℃2 分間アニーリング, そして 72℃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 μ l 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 μ g/ μ 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 μ l, 各々プライマー1 μ l, dNTP 5 μ l, Ex-Taq 0.25 μ l, \times 10 バッファー5 μ l を入れ, 全 50 μ l で実施された。PCR は, 94℃30 秒間変性, 55℃2 分間アニーリング, そして 72℃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 μ l 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 μ g/ μ l に希釈したものを使用) 2.5 μ l, 各々プライマー1 μ l, dNTP 5 μ l, Ex-Taq 0.25 μ l, \times 10 バッファー5 μ l を入れ, 全 50 μ l で実施された。PCR は, 94℃30 秒間変性, 54℃1 分間アニーリング, そして 72℃で 1 分間伸展の 1 サイクルを 30 回繰り返し, 最後に 72℃で 5 分間伸展させた。PCR 生成物の内, 10 μ l 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。

④Universal 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 μ l, 各々プライマー1 μ l, dNTP 5 μ l, Ex-Taq 0.25 μ l, \times 10 バッファー5 μ l を入れ, 全 50 μ l で実施された。PCR は, 94℃30 秒間変性, 54℃1 分間アニーリング, そして 72℃で 1 分間伸展の 1 サイクルを 30 回繰り返し, 最後に 72℃で 5 分間伸展させた。PCR 生成物の内, 10 μ l 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 μ l) 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

検索した 120 頭中 1 頭 (0.8%) でジフテリア抗毒素陽性例が認められた。陽性例は青森県上北郡の鳥猟犬 (9 歳雌) であった。

2) レプトスピラ症

検索した 121 検体中 17 例 (14.0%) で

陽性が認められた。陽性例の検出された地域の内訳は、福島県：4/19 (21.1%)、宮城県：5/30 (16.7%)、岩手県：1/16 (6.3%)、青森県：3/25 (12%)、秋田県：0/11 (0%)、山形県：4/20 (20%) であった。ワクチンの摂取歴がなく、抗レプトスピラ抗体が陽性であったのは、福島県：4/19 (21.0%)、宮城県：4/30 (13.3%)、岩手県：0/16 (0%)、青森県：2/25 (8%)、秋田県：0/11 (0%)、山形県：1/20 (5%) であった。

3) ライム病ボレリア

検索した 121 頭中 59 頭 (48.8%) で陽性 (ELISA/Western Blotting の両方が陽性のものを陽性とした) が認められた。陽性例が検出された地域の内訳は、福島県：12/19 (63.2%)、宮城県：11/30 (36.7%)、岩手県：11/16 (68.8%)、青森：10/25 (40%)、秋田県：5/11 (45.5%)、山形県：10/20 (50%) であった (詳細な解析は川端寛樹博士の報告を参照)。

4) ブルセラ症

検索した 112 検体中に、*B. abortus* に陽性を示すものはなかった。また、*B. canis* に陽性を示すものは 4/112 (3.9%) であった。それぞれの地域における *B. canis* の検出率は、福島県：1/16 (6.3%)、宮城県：0/28 (0%)、岩手県：0/16 (0%)、青森県：0/23 (0%)、山形県：3/20 (15%) であった。陽性 4 例はいずれも鳥猟犬で福島県のセッター 1 例 (2 歳雌)、福島県のスパニエル 3 例 (10 歳雄、10 歳雌、5 歳雌) であった。

5) 野兔病

123 検体中に、野兔病菌 Yama 株に陽性を示すものはなかった。

6) 破傷風

採血した全 123 サンプルにおいて、血清中破傷風抗毒素価が測定レベル以下 (< 0.0025U/ml) であったため、検索した全例とも陰性と判断した。

7) トキソプラズマ

検索した 122 頭中 22 頭 (18%) で *Toxoplasma (T.) gondii* 陽性が認められた。陽性例が検出された地域の内訳は、福島県：3/19 (15.8%)、宮城県：6/30 (20%)、岩手県：3/17 (17.6%)、青森県：3/26 (11.5%)、秋田県：1/11 (9%)、山形県：6/20 (30%) であった。

8) 犬由来感染症

(1) バベシア症およびヘパトゾーン症
PCR による検出結果以下に示す。

1) PCR による *B. gibsoni* の同定

123 例中 3 例 (宮城県) で 2363bp 付近にバンドが認めらる陽性例がみられた。

2) PCR による Hepatozoon の同定

123 例中 660bp 付近にバンドが認められた例はなかった。

(2) 犬フィラリア症

ミクロフィラリアおよび *Dirofilaria immitis* (Di) 抗原陽性個体を示す。122 頭中 38 頭 (31.1%) で Di 抗原が検出された。その内訳は、福島県：5/19 (26.3%)、宮城県：12/30 (40%)、岩手県：5/17 (29.4%)、青森県：10/25 (40%)、秋田県：3/11 (27.3%)、

山形県：3/20（15％）であった。

D.考察

今回の東北地方における調査研究では、高い感染率を示したボレリア症（59/121：48.8％）、トキソプラズマ感染（22/122：18％）、レプトスピラ（17/121:14％）および犬フィラリア症（38/122：31.1％）以外に、*Corinebacterium (C.) ulcerans* 感染（1/120：0.8％）、ブルセラ感染（4/112：3.9％）が認められた。野兎病および破傷風は、検索した猟犬には認められなかった。

1) ジフテリア

動物において抗毒素価が高い場合には *C. ulcerans* への感染歴を最も疑うべきである。現在、*C. ulcerans* の感染には、家畜やペットとの接触や、未殺菌牛乳の摂取が関与していると考えられている。そのため、同一飼い主に飼育されており、生活環境が同一かつ、互いに接触の機会が多い犬でそれぞれ血清抗毒素価が高いということは、同居犬同士が互いの感染原となっている可能性がある。前回の島嶼部における *C. ulcerans* 血清抗毒素価の保有状況では、奄美大島群（8.1％）、佐渡島（5.9％）、鹿児島大隅半島（20％）、石垣島（10.3％）および沖縄本島（16.7％）で比較的高い陽性率が確認された。また、以前に実施した宮崎、熊本および三重の調査では 20－30％と高い陽性率が認められた。それらと比較すると、今回の東北地方の陽性率（0.8％）は極めて低い。寒冷地では野外犬では *C. ulcerans* 血清抗毒素価の保有率が低い可能性が考えられるが、東北地方にも患者の発生がみられること（秋田県）、また、以北の北海道の調査を

行っていないことから、現時点で結論を下すことができなかった。

2) レプトスピラ

今回調査を行った、秋田県を除く、いずれの地域においても、秋田県を除き、比較的高い抗レプトスピラ抗体の陽性率が認められ、ワクチン接種歴がなく、かつ抗体価が陽性を示す個体が散見された。これらは自然感染による抗体価の上昇である可能性が高いため、*Leptospira spp.* の分布の評価に使用可能と考えられる。レプトスピラは動物の尿中に排出され、それに汚染された土壌や水を介して感染するため、陽性個体が 1 例であっても、拡大する範囲は広いと考えられる。

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。今回の東北地方における陽性率（48.8％）は、比較的高く、山野で行動する猟犬と人は感染する可能性が非常に高いと考えられる。以前の調査でも、患者の発生がない熊本および宮崎、大隅半島、種子島、屋久島および石垣島で比較的高い陽性率（10-40％）が認められ、病原性の無いか、弱毒の菌株の存在が疑われていた（川端寛樹博士の報告を参照されたい）。

4) ブルセラ症

今回、*Burucella (B.) abortus* に陽性を示すサンプルは認められなかったが、*B. canis* に陽性を示すものが 4/112 例（3.9％）認め

られた。この陽性率は国内における陽性率の平均(2~5%)と概ね一致していたため、地域による差はあまりないと考えられる。また、山形県の陽性率(3/19:15.8%)は東日本における2006年度の調査結果(12.9%)と大きな差はない。

5) 野兔病

原因菌は *Francisella (F.) tularensis* (野兔病菌) であり、犬を始めとし、猫、羊、豚、牛、馬、兎、げっ歯類等多種の動物に認められる。人への感染は、汚染吸血性節足動物の刺咬、犬猫などの保菌動物による咬傷、またペットに寄生している汚染ダニなどをつぶした際に飛び散る汚染液体などにより起こる。野兔病菌は健常人の皮膚、粘膜をも通過し、容易に感染が成立することから注意が必要である。日本における人の野兔病はこれまで主に東北地方の各県と千葉県、茨城県で発生が認められ、多くの県で散発的発生が存在する。今回の調査では、東北地方での本感染症、特に秋田県および青森県の兎猟犬に予測されたが、陽性例はなかった。さらに例数と採材個所を増やして検討する必要がある。

6) 破傷風

破傷風菌 *Clostridium tetani* 産生外毒素が原因となって発症する。破傷風菌は広く自然界に分布し、土壌病の原因となり、犬の体表が土で汚れた際に傷口から侵入し、体内で毒素を産生する。今回、山野を駆け回り、土壌中の菌に汚染される可能性の高い猟犬において、菌保有調査を行うことで日本における破傷風菌の分布を知ることが出来ると考えたが、陽性個体は認められな

かった。これは感染が発生した場合、猟犬は容易に淘汰されるため、活動している猟犬には陽性例を欠く可能性がある。

7) トキソプラズマ

今回のトキソプラズマ症の調査では、採血を行った全ての地域において陽性例が検出された。近年ではあまりトキソプラズマ症の実態調査は大規模に行われていないが、往年の実態調査では、犬の抗体保有率は10~30%であった。また、以前の岐阜、静岡、三重、長野、新潟における調査の平均陽性率19.7%とほぼ同等であった。

いずれの調査地域においても抗トキソプラズマ抗体陽性犬が認められたことから、これらの地域はいずれも野生下に *T. gondii* が分布しているということが示唆されることから、狩猟肉の喫食には十分に注意しなければならない。また、妊婦は狩猟肉に対する取り扱いに注意するとともに、狩猟犬に対しても不用意な接触をしないように心がける必要がある。

8) 犬由来の感染症

(1) バベシアおよびヘパトゾーン症

Babesia (B.) gibsoni および *Hepatozoon (H.) canis* の両方について、PCRによる検出を試みた。全東北地方で *H. canis* は検出されず、宮城県でのみ *B. gibsoni* が検出された。

以前から近畿以西では *B. gibsoni* の感染が流行しているとされており、以前の中部地方近辺の調査時には三重県のみで *B. gibsoni* が確認されている。また、過去の報告でも、岐阜県、富山県などの中部地方では *H. canis* の発生は認められていない。