

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

**ブルセラ症の診断法の開発に関する研究**

（含、日本・台湾のイヌにおけるイヌブルセラ菌感染状況調査）

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
研究協力者	水谷 浩志	東京都動物愛護相談センター	城南島出張所	獣医師
研究協力者	山本 智美	東京都動物愛護相談センター	城南島出張所	獣医師
研究協力者	久保田 菜美	東京都動物愛護相談センター	城南島出張所	獣医師
研究協力者	岡本 その子	栃木県保健環境センター	微生物部	主任研究員
研究協力者	山本 明彦	国立感染症研究所	細菌第二部	主任研究官
研究協力者	柳井 徳磨	岐阜大学	応用生物科学部	獣医病理学教室 教授

**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。世界では、多くの国々で家畜、ヒトにおける感染が知られ、家畜衛生ひいては人の公衆衛生上も大きな問題となっている。

ただ、現在は日本・台湾ともに家畜ブルセラ菌は国内の家畜からは清浄化していると考えられ、家畜ブルセラ菌感染患者は輸入症例に限られている。一方、イヌブルセラ菌 (*Brucella canis*) については、日本と同様に、台湾国内のイヌでも *B. canis* 感染報告が過去にあることから、ヒトへの感染も起きていることが懸念される。そこで、今年度は、日本・台湾のイヌにおける *B. canis* 感染状況調査として、同一の手技により、その抗体保有状況を検討、比較することとした。

*B. canis* に対する抗体は、マイクロプレート凝集反応 (MAT) を用いて測定した。東京都、栃木県、東北 6 県より新たに検体を得た。これまでに検討していた結果と併せて、国内のイヌは、4.9% が抗体陽性、すなわち感染歴を持つことがわかった。また、500 検体前後調査した中では、神奈川県は 2.5% に比較して、栃木県は 6.5%、東京都は 7.9% と陽性率が高くなっていた。ただ、栃木県、東京都とも近年は、陽性率の低下傾向が認められるようであった。その理由については、イヌのプロファイルを元に検討中であるが、結論は得られていない。台湾については、現在、調査継続中である。

**A . 研究目的**

ブルセラ症 (Brucellosis) は世界では、毎年新規患者が50万人以上発生していると言われる重要な人獣共通感染症であるが、家畜が自然宿主である *Brucella*

*melitensis*、*B. suis*、*B. abortus* については、国内の家畜はこれら家畜ブルセラ菌に対して清浄であり、国内の家畜からヒトが感染するリスクはない。一方、*B. canis* (イヌブルセラ菌) はイヌを自然宿主とし、ごくまれに人にも感染することがあり、国内では、

*B. canis* 感染患者12例が届け出られている(表1)。国内のイヌのブルセラ病については、1970年代の実験用イヌ繁殖施設での集団発生を始めとして、近年でもペット用イヌの繁殖施設における集団発生がしばしば報告されており(表2)、さらに、報告されていない物も多々あると考えられることから、国内のイヌの数%が感染歴を持つと考えられている。台湾でも、現在は家畜ではブルセラ菌の感染報告はなく清浄化していると考えられるが、イヌでは2001年に、*B. canis* 感染に関する論文報告があり、状況としては日本と非常に似通っている。

一般に、日本では、ブルセラ属菌に対する抗体を測定する際には、不活化ブルセラ属菌を用いた試験管内凝集反応(TAT)が実施されている。しかし、TATは試験管を用いるため検査に必要な抗原量・血清量が多く、また一度に多くのサンプルを検査することも困難である。そこで、より少量の抗原・血清ですみ、また多くのサンプルを一度に検査することを可能にする、マイクロプレートを用いた凝集反応(MAT)を用いて、イヌのスクリーニングを実施することも有用な方法であると考えられる。また、MATによる検査結果がTATによる結果と相関を持つことはすでに我々により報告済みである。

そこで、今年度は、日本および台湾のイヌにおける*B. canis*感染状況調査として、双方同一の手技により、その抗体保有状況を調査・検討することとした。検査方法については、MATもTATとともに、昨年度、本研究班で台湾CDCにその検査手技について技術移転を実施済み(技術移転が良好に行われたことにより、台湾では、2012年2月7日より、ブルセラ症が新たに届出疾患となった)であることから、MATを用いることとした。

## B. 研究方法

1. イヌ血液サンプル： 2011 および 2012 年度に東京都動物愛護相談センターに収容されたイヌ 125 および 79 頭、栃木県動物愛護指導センターに収容されたイヌについては 2012 年度の 44 頭ほか 2002~2005 年度の 536 頭の血清を検討に用いた。福

島~青森県については、猟犬の血清を検討に用いた(表3)。検査結果については、すでに実施済みの結果と併せて、解析を行った。総検査数は、25 都府県、2,176 頭である。

2. マイクロプレート凝集反応(MAT)：*B. canis* 凝集反应用菌液(北里研究所)と 0.25%サフラニン染色液を 50:1 の比率で混合し、MAT 用の抗原とした。抗原がプレートへの吸着することによる非特異的反応を避けるために、96 穴 U 底プレートを、あらかじめ Blocking One(ナカライテスク)で、室温、1 時間、ブロッキングした。ブロッキング溶液を捨てた後、サンプルをリン酸緩衝生理食塩水で 5 倍から 2 倍段階希釈して調整した(各ウェルの液量は 25ul)、これに等量(25ul)のサフラニン処理した凝集反作用抗原を加え、プレートを攪拌した後、湿潤箱に入れて、50、24 時間、反応させた。血清希釈 1:160 以上で、凝集像が確認されたものを陽性と判定した。陽性対照にはホルマリン不活化 *B. canis* 全菌体を免疫したウサギ血清を用いた。

## C. 研究結果

1. マイクロプレート凝集反応(MAT)： 2011 および 2012 年度の東京都の結果は、それぞれ 7/125 (5.6%)、3/79 (3.8%) が陽性であった。これに 2007~2010 年度の結果をあわせると、全 519 頭に対して 41 頭(7.9%)が陽性を示した。年度ごとの比較では、検体数のばらつきはあるが、2007~2010 年度は 7.6~13.5%の陽性率と、隣接県の神奈川県 2.5% や全数 2,176 頭における陽性率 4.9% (107 頭) に比べて高値を示した。ただ、2011, 2012 年度と陽性率は低下傾向が認められ、全数陽性率 4.9% とほぼ同程度であった(表3)。

栃木県の結果は、2002~2004 年度が 7% 強、2005 年度が 5.4% の陽性率だったのに対し、2012 年度は 2.3% と、東京都と同様やはり低下傾向が伺われ、神奈川県と同等であった(表3)。ただ、2012 年度に関しては検体数が少ないことから、追加の検体を集めているところである。

福島～青森県の猟犬については、各県のそれぞれの検体数は少ないため、県ごとに結果を判断することはできないが、まとめると東北地方の陽性は4/112(3.6%)であり、全体平均よりもやや少ない結果であった。対象が猟犬でない東京、神奈川、栃木を除いて、猟犬のみで検討すると、陽性は16/596(2.7%)となった(表3)。

*B. canis* はその自然宿主はイヌ科の動物に限られ、宿主特異性が高いが、参考として東京都のネコを調査した結果では2/280(0.7%)が陽性であった。

## D. 考察・結論

ブルセラ属菌は細胞内寄生菌であるため、抗体は菌の排除には余り役に立たない。つまり抗体が存在すると言うことは、「菌がどこか(リンパ節など)に潜んでいて、時折、抗原刺激を与えている=感染が継続している」と考えることもできる。そのため、抗体保有状況はそのときの感染状況を直接反映すると考えられている。今回、国内のイヌにおける抗体保有状況を調査し、すでに我々のところで得られていた結果と併せて比較検討したところ、4.9%が「抗体陽性=感染」であった。この結果は、他のグループによる、国内の動物病院を受診しているイヌにおける抗体保有状況調査結果3.0%よりも、若干高くなっていた。

本調査では東京、栃木、神奈川についてはそれぞれの動物愛護センターに収容されたイヌ、それ以外の県については猟犬となっている。猟犬は特殊な用途のイヌグループではあるが、その陽性率は2.7%と全体平均よりも低く、神奈川県と同程度であった。このことは、飼育犬の用途(愛玩用か猟犬か)に陽性率はあまり関わらないと言うことを表している。また、本調査における全体平均は、先に示した動物病院調査よりも高値を示したが、これは、神奈川県や猟犬では2.5、2.7%であるのに対し、栃木県と東京都の結果が、全体平均を押し上げていることによる。神奈川県の調査も2003~2006年度であり、ほぼ栃木県、東京都の調査時期と重なるにもかかわらず、なぜ栃木県や東京都で高い抗体保有率を示したのか、

理由は定かではない。ただ、近年は、両地域ともに抗体保有率に低下傾向が見えている。その理由が、何によるのかは推測の域を出ないが、2006年頃から一時期、イヌのブルセラ病そのものについてや、繁殖施設における集団発生情報が、マスコミ等にも取り上げられたことで、本疾患がより認知され、予防措置(個人ブリーダーも含めて、繁殖施設内への保菌動物の侵入阻止や繁殖に供する動物の事前検査の実施など)が、徐々に取られるようになってきているのかもしれない。

*B. canis* は、その自然宿主はイヌ科の動物に限られ、宿主特異性が高い。また、ヒトに感染しても発症しない、または発症しても軽微なカゼ様で自然治癒すると言われる。ただ、2008年の繁殖犬による施設従業員の感染例のように比較的強い症状を示したものや、その他の報告例のような長期にわたる不明熱を示し、診断まで時間がかかったものなどがあり、患者数が少ないとはいえ公衆衛生学的に無視して良い物ではない。またイヌにおける繁殖障害による経済的被害は業者にとっては甚大である。本疾患は明らかに国内のイヌで感染が維持されており、2~5%が感染・保菌している。一般飼育者を含めたイヌを取り扱う者に対して、本疾患及びその予防・対処法に関する情報を提供し、より一層、認知・実践してもらう必要があると考えられる。

ブルセラ症に関して、日本と同様の状況にある台湾については、現在、調査継続中であるが、2001年の調査では5/38(13.2%)の抗体陽性(感染)イヌが報告されている。現在、その抗体保有率が低下しているのかどうか、興味深い点である。また、これまで知られていなかった患者についても、徐々に明らかになってくるものと思われる。

**謝辞:** イヌ血清サンプルの採取・提供、データ解析のご協力について、藤澤美和子城南島出張所長ほか東京都動物愛護センターの皆様、栃木県保健環境センターの皆様、岐阜大学応用生物科学部獣医病理学教室の皆様へ深謝いたします。

## E. 健康危険情報

なし。

## F . 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, 慕蓉蓉. 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 -. 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, 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. *Brucella abortus* 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, 2013年3月

## G . 知的財産権の出願・登録状況

なし

**表1) 国内の *B. canis* 感染患者事例 (感染症法指定後、1999.4.1 ~ 2012.12.31)**

診断年月	年齢	報告都道府県	推定感染地	推定感染経路	症状	血清抗体検査		菌分離	PCRによる同定
						abortus	canis		
2002.1	40代	東京都	東京都?	ペットの犬	発熱、食欲不振	-	陽性	(-)	実施せず
2005.12	10代	長野県	長野県?	不明	発熱、筋肉痛、腹痛	-	陽性	(-)	陰性(血清)
2006.6	20代	長野県	(イタリア)	不明	発熱、筋肉痛	-	陽性	(-)	陰性(血液)
2006.9	60代	長野県	長野県	不明	発熱、脾腫	-	陽性	(-)	実施せず
2006.10	70代	宮城県	宮城県	不明	発熱、中枢神経症状	-	陽性	(-)	実施せず
2007.4	40代	大阪府	大阪府	イヌ	リンパ節腫脹、倦怠感	-	陽性	(-)	実施せず
2008.6	10代	埼玉県	埼玉県	飼い犬	発熱、関節炎、筋炎	-	陽性	(-)	陰性(血清)
2008.8	70代	愛知県	愛知県	繁殖犬	発熱、脾腫、肝腫大	-	陽性	(+)	<i>B. canis</i>
2008.8	40代	愛知県	愛知県	繁殖犬	発熱	-	陽性	(+)	<i>B. canis</i>
2009.4	30代	埼玉県	埼玉県	繁殖犬	(無症状病原体保有者として届出)	-	陽性	(-)	実施せず
2010.6	60代	栃木県	栃木県	不明	発熱	-	陽性	(-)	実施せず
2011.11	60代	島根県	島根県	不明	発熱、中枢神経症状(脳脊髄炎)	-	陽性	(-)	陰性(血清・髄液)

**表2) 国内のイヌにおける *B. canis* 集団感染事例**

1971: 実験動物用ビーグル犬繁殖場で発生

70年代: 実験動物用、訓練学校、ペット用繁殖場などで発生報告

70年代後半の抗体保有状況 -- 調査報告の平均8.8%

(近年の集団発生)					
発生年	地区	飼育場・用途	感染イヌ	陽性犬の処置	感染者の届出
2003	静岡	繁殖施設	51 / 114	不明	なし
2005 ~ 2006	沖縄	繁殖施設 (2カ所)	16 / 83	安楽殺処分 または投薬治療	なし
2006 ~ 2007	大阪	繁殖施設	139 / 263	安楽殺処分	なし
2008	愛知	ペットショップ・繁殖施設	15 / 37	安楽殺処分	飼育者 2名
2008	東京・千葉	ドッグレンタル・ドッグカフェ等	18 / 59	去勢	なし

表3) 国内のイヌにおける *B. canis* に対する抗体保有状況

都道府県	検査頭数	陽性数	陽性率(%)
青森	23	0	0.0
岩手	16	0	0.0
宮城	28	0	0.0
秋田	9	0	0.0
山形	20	3	15.0
福島	16	1	6.3
栃木	582	38	6.5
東京	519	41	7.9
神奈川	479	12	2.5
新潟	24	2	8.3
富山	9	0	0.0
長野	23	1	4.3
岐阜	36	3	8.3
静岡	46	1	2.2
愛知	15	0	0.0
三重	56	0	0.0
滋賀	5	0	0.0
広島	47	0	0.0
香川	8	0	0.0
高知	10	0	0.0
長崎	20	0	0.0
熊本	20	0	0.0
宮崎	20	1	5.0
鹿児島	110	2	1.8
沖縄	35	2	5.7
合計	2176	107	4.9

東京都一犬

年度	検査頭数	陽性数	(%)
2007	50	5	10.00
2008	89	12	13.48
2009	106	8	7.55
2010	70	6	8.57
2011	125	7	5.60
2012	79	3	3.80
合計	519	41	7.90

栃木県一犬

年度	検査頭数	陽性数	(%)
2002	245	18	7.35
2003	64	5	7.81
2004	99	7	7.07
2005	130	7	5.38
2012	44	1	2.27
合計	582	38	6.53

(参考)

東京都一猫

年度	検査頭数	陽性数	(%)
2008	98	1	1.02
2009	102	0	0.00
2010	80	1	1.25
合計	280	2	0.71

東京：東京都動物愛護相談センター調査(2007-2012)

栃木：栃木県動物愛護指導センター調査(2003, 2012)

神奈川：神奈川県A市動物愛護センター調査(2003-2006)

その他：猟犬調査(2009-2012)

\* 本表は、2012年度に入手した東京都(一部)、栃木県、東北地方の結果と、それまでの検査結果をまとめたものである