

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。

## 2. ジフテリア抗毒素価の測定：

各種動物より採取した血液より血清を分離し、一定量のジフテリア試験毒素と2倍階段希釈した血清を等量Vero細胞の培養液に加えて4日間培養し、Vero細胞へのジフテリア毒素の細胞障害性の抑制を観察することで血清中のジフテリア抗毒素価を算出した。既知の標準抗毒素とジフテリア試験毒素との毒素活性中和能と比較して抗毒素価を算出する。毎回の測定時に、ジフテリア試験毒素の細胞障害性と検体となる血清中の細胞障害活性も確認した。

## 3. 簡易迅速鑑別診断法の開発：

*C. ulcerans*、*C. diphtheriae*を類縁の*Corynebacterium*属菌から迅速かつ簡易に鑑別する実験室診断法の候補として、*Corynebacterium*属菌の遺伝子診断に用いられている*rpoB*遺伝子の遺伝子配列から

それぞれ候補配列を選択してprimerを設計し、それを組み合わせることでMultiplex PCR法を作成した。作成したMultiplex PCR法について、その特異性を*C. ulcerans*17株、*C. diphtheriae*10株、*C. pseudotuberculosis*1株について確認し、さらに、*Corynebacterium*属菌16種、*Corynebacterium*属菌以外の39種についても試験した。

## 4. 感染実験動物モデルの開発：

*C. ulcerans*感染モデルの作成のため、汎用実験動物であるマウスを用いた。供試菌株はジフテリア毒素陰性の*C. ulcerans* ATCC51799株と、またジフテリア毒素陽性の臨床分離0102株、*C. diphtheriae*および*C. glutamicum*を用いた。菌液は $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ CFU/50 $\mu$ lの濃度に調製し、それぞれ経鼻投与にて接種した。接種後、感染マウスの病態の観察、体重の測定、及び接種後一定期間で採材し、死亡個体については、病理学的検索を行った。肺、肝臓、腎臓、脾臓、血液、盲腸内容物、直腸内容物は、定量的に生菌数を測定した。鼻腔スワブ、口腔スワブ、気管スワブ、眼脂スワブについては、定性的な測定を行った。

（倫理面への配慮）

人を対象とする調査に関しては、国立感染症研究所医学研究倫理委員会へ「*C. ulcerans*によるジフテリア症の血清疫学と菌分離調査」として審査申請を行い、承認を得た（承認期間～H28年3月31日）。また、感染実

験動物モデルの作成には、国立感染症研究所・動物実験委員会に計画書を提出しその承認（承認番号 113002）を得て実験を行った。

### C. 研究成果：

#### 1. 新規発生患者周辺調査：

##### 1) 国内 12 章例目の患者調査：

患者は埼玉県在住で 71 歳の女性、夫と 2 人家族であった。2012（平成 24）年 11 月 12 日より鼻閉、咽頭痛、後鼻漏出現し 11 月 16 日近医受診し、急性副鼻腔炎や急性咽喉頭炎を疑われ朝霞中央病院へ紹介受診した。初診時、多量の水様から膿性鼻汁と後鼻漏があり、鼻咽頭を充満する非常に厚く強固に付着する偽膜形成を認めた。この偽膜の培養から *C.ulcerans* 検出。鼻閉など症状が強く同日に入院となった。抗生物質感受性試験の結果からセフトリアキソン点滴施行し鼻閉も軽快し、同月 19 日退院となった。退院後はレボフロキサシン内服を 11 月 31 日まで行い、自覚症状、局所所見の改善を認め終診となった。

患者宅は埼玉県朝霞市で寺の境内にある。付近に生息する野良猫に餌をやり、自宅でも猫を 4 匹（うち 1 匹に鼻汁など感冒様症状有り）が飼育していた。これら 4 匹のネコより、口腔、目、鼻および耳からスワブを採取し *C.ulcerans* 培養を試みた。その結果 1 匹のネコの口腔と鼻スワブよりジフテリア毒素産生性の *C.ulcerans* が分離された。一方、患者血清のジフテリア抗毒素

価は 8.16IU/mL を示した。

##### 2) 国内 13 章例目の患者調査：

患者は埼玉県在住の 20 歳の女性で、父と母の 3 人家族であった。2013 年 4 月 7 日よりのどの痛み、4 月 9 日嚙下痛と発熱のため診療所を受診した。その際、扁桃から咽頭にかけて広範囲に分厚い偽膜が覆っていた。この偽膜を細菌検査し *C.ulcerans* を分離した。同時に実施した抗生物質感受性試験からエリスロマイシン感受性を確認した。エリスロマイシン投与開始、著効で症状が改善された。この患者は DPT 免疫を行っておらず、来院時及び治療による症状軽快後に採決を実施しジフテリア抗毒素価を測定したが *C.ulcerans* 感染後もジフテリア抗毒素価上昇しなかった。ほぼ 1 年前にも同様の症状を発症して、同じ主治医のところを受信したが、その折は、原因菌検査の前に抗生物質による治療を始めたために原因菌を特定できなかった。

患者宅は埼玉県北本市である。周辺は近郊酪農地帯で家には室内外にネコ 18 匹が飼育されていた。18 匹のネコより、口腔、目、鼻および耳からスワブを採取し *C.ulcerans* 培養を試みた。その結果、*Corynebacterium* 属菌は検出されたが、*C.ulcerans* は分離できなかった。初診時及び治療による症状軽快後の血清について、ジフテリア抗毒素価を測定したところ、いずれも検出レベル以下であった。

## 2. 各地の動物調査結果

8 都道府県 9 地域について、動物からの菌分離及び血清ジフテリア抗毒素価の調査を行った。

### 1) K 県 :

K 県内 5 動物病院について、患畜所有者に調査協力の説明後血清採取をお願いし、ジフテリア抗毒素価の測定を行った。犬の調査総数 109 頭中、1 頭より 0.0407IU/mL の抗体価の検出がみられた。該当犬より *C.ulcerans* 培養を試みるため、主治医および、飼い主に依頼し、スワブ検体の採取を行った。採取部位は、口腔、鼻、背、耳、尾、腹部、尻、血液等 11 検体であった。結果はすべてウルセランス培養陰性であった。

また、同居のイヌに皮膚病巣があったため、その部位を含め、スワブ 11 検体、および血液、便を採取し培養を試みたが、いずれも *C.ulcerans* は陰性であった。このイヌの血清を再度、抗毒素価を測定したところ、前回同様 0.0407IU/mL であった。なお、同居のイヌは検出レベル以下であった。

### 2) K 市 :

市内の動物愛護センターの協力を得て、搬入されるネコより咽頭、口腔、鼻腔、肛門、眼漏、皮膚潰瘍部よりふき取りを行って、*C.ulcerans* 培養を試みた。さらにジフテリア毒素遺伝子を PCR 法にて検出した。その結果、57 頭のネコから、菌分離はできなかったが、ジフテリア毒素遺伝子陽性が 3 検体検出された。

### 3) S 県 :

動物保護管理センターおよび県内の動物病院に検体の採材を依頼して調査を実施した。動物保護管理センターに収容されたイヌおよびネコ合計 75 検体を検査した結果、ジフテリア毒素遺伝子は検出されず菌も分離されなかった。また、動物病院を受診したイヌおよびネコ合計 22 検体を検査した結果、1 検体からジフテリア毒素遺伝子が検出され、*C. ulcerans* が分離された。菌が分離された猫と同居するネコ 6 検体と飼い主 1 検体について検査したところ、ネコ 2 頭からジフテリア毒素遺伝子が検出された。これら 2 検体について、現在菌を分離中である。

### 4) M 県 :

M 県では、愛護センターの協力を得てイヌ、ネコの咽頭スワブより *C. ulcerans* の分離を目指した。イヌ 55 検体、ネコ 48 検体について調査したところ、ネコ 4 検体より *C. ulcerans* が分離された。

### 5) O 市 :

O 市内の動物管理センターの協力を得てイヌ 14 検体とネコ 25 検体の咽頭スワブより、*C.ulcerans* 培養を試みたが、イヌ、ネコどちらの検体からも菌分離はできなかった。同市内で、硬膜下血腫のため寝たきりとなり、胃ろうにて栄養摂取していた 55 歳女性が発熱、痰が認められたために喀痰の菌培養を行ったところ、ジフテリア毒素陰性の *C. diphtheriae* が分離された。

### 6) O 府 :

O 府内では、主に都市近郊に生息する肉

食鳥類とその捕食動物からの *C. ulcerans* の分離を目的として調査を行った。肉食鳥類としてはフクロウ、コゲラ、ヒヨドリを 20 羽、その捕食動物としてアカネズミ、コウベモグラ、アズマモグラを 8 検体より *C. ulcerans* の分離を目指したがいずれも陰性であった。

7) T 都 :

T 都内の動物病院の患畜所有者に調査協力の説明後鼻汁採取をお願いした。採取した鼻汁 22 検体のうち 1 検体より *C. ulcerans* が分離された。

8) H 地方 :

H 地方について、岐阜大学柳井教授と猟友会の協力を得て、クマ、シカ、鳥などを狩猟対象とする猟犬で年齢が 1 歳から 15 歳までに範囲の 36 頭より採血し、そのジフテリア抗毒素価を測定した。採取血液量が少ないために測定できなかった 3 頭分除く 33 頭の血清を測定したが、測定結果はすべて検出レベル以下であった。

9) O 県 :

O 県内では、と畜場の協力を得て牛の血清ジフテリア抗毒素価の調査を実施した。112 検体より採血し、そのジフテリア抗毒素価を測定した。112 頭の血清を測定したが、測定結果は 1 検体で 0.0576IU/mL を示す陽性であった。

また、O 県の川崎医科大学秋定教授、山根准教授との協力研究で川崎医科大学付属病院及び川崎病院の来院する患者より分離された菌株及び咽頭スワブからの菌分離を行

ったところ、分離菌では 50 株中 41 株が *Corynebacterium* 属菌であったが、*C. ulcerans* 菌は分離されなかった。呼吸器症状を示す来院患者 2 名の咽頭スワブのうち 1 検体からは、*Corynebacterium* 属菌であったが、*C. ulcerans* 菌は分離されなかった。

3. 簡易迅速鑑別診断法の開発 :

*C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis* および、DT (DLT) 遺伝子を同時に検出する Multiplex PCR 法を構築した。特異性の試験結果として表 2 に示し、その検出感度は表 3 に示した。*C. ulcerans* 17 株、*C. diphtheriae* 10 株、*C. pseudotuberculosis* 1 株について 100% の一致を確認した。さらに、*Corynebacterium* 属菌 16 種では 2 種で標的遺伝子異なるサイズの弱い増幅が見られた。また、*Corynebacterium* 属菌以外の 39 種では、1 種で標的遺伝子異なるサイズの弱い増幅が見られた。この研究成果は主に O 市の梅田先生中心に進められた。

4. 感染実験動物モデルの開発 :

*C. diphtheriae* および *C. glutamicum* 接種マウスは全く症状を示さないが、*C. ulcerans* 接種マウスは、立毛、削瘦、連続的な体重減少を呈し、多くの臓器に接種菌が分布して全身感染を確認した。また、投与菌数に依存して死亡した。*C. ulcerans* 接種マウスでは、ジフテリア毒素産生性の臨床分離株が  $10^6$ CFU 投与で半数致死量であり、非産生株に比べて約 2 倍高い死亡率であった。経鼻

接種した個体よりの採材では、肺、腎、脾臓などから菌が分離され、その分時期は、肺から脾臓、腎臓経日的な移行が観察された。ところが、盲腸内容物、直腸内容物では、まったく接種菌が回収されなかった。死亡個体の肺から脾臓、腎臓の各臓器には壊死性結節性病変が認められ、病変部の中心に接種菌の存在が確認された。スワブ採取による定性的な測定結果から、上気道から生菌が持続的に分離された。

#### D. 考察：

2例の新規 *C. ulcerans* 感染症罹患者の調査で、12例目の患者は呼吸器症状を示す今までの *C. ulcerans* 感染症の典型的な症状を示した（表1）。さらに、患者の飼育するネコから同菌が分離されたことは、この飼い猫も家の内外を自由に出入りすることで、野良猫との接触の機会もありキャリアーとして働いた可能性が示唆された。この点は、これまでに報告された症例 6,7,8 と同様の結果であった。これまでに報告された11症例の内、5症例までは *C. ulcerans* 感染症の医療関係者における認知度が低く、患者発生の第一報が大変遅れていた。6症例目から実質的な患者周辺調査が実施されるようになった。すなわち、患者が飼育する動物、患者の周辺にいて接触のあった動物を特定して調査が可能となった。これで、患者の周辺にいる動物のうち、ネコが50%の割合で *C. ulcerans* を保菌していたことになる。一方、13例目の患者は同じく呼吸器症状を

示したが、1年前にも同様の症状を示したことから、主治医が疑問を持ち *C. ulcerans* 感染症を疑ったために同菌の分離まで至った。患者調査でDPT免疫を行っていないことが判明し、*C. ulcerans* 感染の前後でジフテリア抗毒素価が全く検出されなかったことはこのことを裏付けた。さらに、同感染症の感染状況によっては、ジフテリア毒素に対する免疫が成立しないことが示唆された。これは、今までの症例では見られなかった事実であるので、さらに今後も調査に際し注意すべき点である。また、本邦ではDPTワクチンは高い接種率を有するが、本症例のようにワクチン未接種者にとっては、*C. ulcerans* 感染の再感染が起きることが証明されたことで、罹患患者についても今後の監視をする必要性が示唆された。

9 地域の動物の保菌状況を調査した結果、イヌからは検出されず、ネコの4.5%から *C. ulcerans* が分離されることから、地域を問わずネコは *C. ulcerans* のキャリアーの一つになっていることが示唆された。この点は、前段の新規患者の周辺調査結果とよく符合する。また、ウシも頻度は低いと同菌の汚染が存在し環境中の暴露を受けていることが示唆された。肉食鳥類やその糞菌動物の調査は、検体数が十分とは言えずキャリアーとしての可能性を言及すべき状況ではないので、今後対象動物数を増やして検索を行う必要がある。また、本年度の調査では、イヌから本菌が分離されない結果となったが、動物愛護センターのイヌから

5～10%の割合で *C. ulcerans* が検出されたという勝川氏の報告もあることから、イヌがキャリアの候補から外れると結論付けることはできない。また、O 県で行われている来院患者の調査で、多くの *Corynebacterium* 属菌が分離される事実は、同種菌が環境中と人との間を行き来する可能性を示した。今後 *C.ulserans* 菌感染との関連性をさらに追求してゆく必要性が示唆された。

*C. ulcerans*、*C. diphtheriae* および *C. pseudotuberculosis* を類縁の *Corynebacterium* 属菌から迅速簡易に鑑別診断できる方法として開発した Multiplex PCR 法は特異性、検出感度ともに高かった（表 2、3）。今のところ、この方法を用いることで、ジフテリアのような 2 類感染症と他の 2 菌の感染症のように感染症法の規定のないものと、地方自治体がコリネバクテリウムによる感染症への対応で大きく位置づけが異なる感染症に対して混乱を起こすことなく行政検査・臨床検査に応用できる可能性がある。そのためには、今後、臨床検体検査、動物検体検査、菌株同定（型別）検査等に使用し、従来法の結果との比較、使用における問題点について、複数の試験者、複数の実験室にて、同様の成績が出るようにするための条件を検討する必要があるが、現状では未知数である。来年度よりこの点を実施してゆく予定である。

マウスを用いた *C. ulcerans* 感染モデルを作成した。本実験系によりマウスが *C.*

*ulcerans* の宿主となりうることが示され、また *C. ulcerans* 菌株間での感染力の相違を本実験系により検出できる可能性が示された。*C.ulcerans* はマウスに対して病原性を持ち、一定以上の濃度の経鼻腔投与により宿主に対して致死的な病原性があることが明らかになった。また、菌株によってマウスに対する病原性が異なり、*C.ulcerans* はネズミコリネ菌 (*C.kutscheri*) のようには腸内に分布しないことが判明した。この世にして、マウスを用いて人と類似の増殖部位を持つ上気道感染モデルが完成した。この感染モデルを用いて、今後 *C. ulcerans* 感染症について、より詳細な解析を行ってゆく予定である。

## E. 結論

1. ヒトからジフテリア毒素産生性 *C.ulcerans* 感染による呼吸器症状を示した 12、13 例目の症例が埼玉県で報告され、同感染症の感染状況によっては、ジフテリア毒素に対する免疫が成立しないことが示唆された。
2. 9 地域の動物の保菌状況を調査した結果、イヌからは検出されず、ネコの 4,5% から *C. ulcerans* が分離されることから、地域を問わずネコは *C. ulcerans* のキャリアの一つになっていることが示唆された。
3. *C. ulcerans*、*C. diphtheriae* および *C. pseudotuberculosis* を類縁の *Corynebacterium* 属菌から迅速簡易に鑑別診断できる方法として、マルチプレックス PCR 法を開発した。

4. マウスを用いた *C. ulcerans* 感染モデルを作成した。本実験系によりマウスが *C. ulcerans* の宿主となりうることを示され、また *C. ulcerans* 菌株間での感染力の相違を本実験系により検出できる可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1 論文発表

- 1) Y. Yoshimura, N. Tachikawa, T. Komiya, A. Yamamoto : A case report and epidemiological investigation of axillary lymph node abscess caused by *Corynebacterium ulcerans* in an HIV-1-positive patient. *Epidemiology and Infection*, 2013, 20 September p1-4.
- 2) A. Hirai-Yuki, T. Komiya, Y. Suzaki, Y. Ami, C. Katsukawa, M. Takahashi, A. Yamamoto and Y. K. Yamada: Isolation and characterization of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* from two closed colonies of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) in Japan. *Comparative medicine* June 2013, Vol 63, p1-7.

##### 2 和文発表

- 1) 廣瀬知子、寺田裕美、河野智美、石川和彦、山本明彦、小宮貴子：滋賀県で初めて確認されたジフテリア症状が認

められたジフテリア毒素産生

*Corynebacterium ulcerans* 感染症例、*IASR* Vol. 34 p. 143、2013.

- 2) 堀 志郎、有塚真弓、池本龍一、山本明彦、小宮貴子：香川県で初めて確認されたコリネバクテリウム・ウルセランス感染による腋下膿瘍の1症例、*IASR* Vol. 34 p. 71-72: 2013。
- 3) 仲田拓人、嶋田直美、青木敦子、山本明彦、小宮貴子：本邦12例目となる *C. ulcerans* ヒト感染症例、*IASR* Vol. 34 p. 381-382: 2013。

##### 3 著書

- 1) 山本明彦：感染症症候群(第2版)上 病原体別感染症編 II 細菌感染症 グラム陽性桿菌感染症 ジフテリア菌感染症 (ジフテリア)、*日本臨床* p.75-79、2013.

##### 4 学会発表

- 1) T. Sekizuka, A. Yamamoto, T. Komiya, T. Kenri, F. Takeuchi, K. Shibayama, M. Takahashi, M. Kuroda and M. Iwaki : *Corynebacterium ulcerans* 0102 carries the gene encoding diphtheria toxin on a prophage different from the *C. diphtheriae* NCTC 13129 prophage. *European. Workshop on Bacterial Protein Toxins. (ETOX16)*, Freiburg im Breisgau, Germany, 2013.
- 2) 河野智美、佐野哲也、須藤正之、山本明彦、小宮貴子、梅原成子、青木佳代、

石川和彦、林賢一： 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・ウルセランスの保菌状況、獣医学術近畿地区学会、2013年10月、泉佐野市。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



表1. 日本国内で確認されたC. Ulcerans感染症例

番号	発生年	患者年齢、性別と発地域	症状	備考	分離菌でのジフテリア毒素活性の有無	周辺動物からのC. Ulcerans分離の有無
1	2001年2月	52歳、女性、千葉県旭市	呼吸困難、嘔声、咽頭痛、咳、発熱、上咽頭と喉頭前庭に白色偽膜等	猫を20匹飼育、1匹の猫が皮膚炎で死亡後に本人が発症	toxigenic	NT
2	2002年10月	54歳、男性、千葉県旭市	同上	1例目の患者と同地区に住居	toxigenic	NT
3	2005年9月	58歳、男性、岡山県	左耳下腺部腫脹、軽度の咳等	飼育犬は慢性の皮膚疾患で死亡後に患者が発症	toxigenic	NT
4	2005年10月	51歳、男性、大分県	肺に多発性空洞病変、咳、痰、発熱等	猫を12匹飼育	toxigenic	NT
5	2006年7月	57歳、女性、神奈川県	呼吸困難、嘔声、咽頭痛、咳、発熱、上咽頭と喉頭前庭に白色偽膜等(腸癌及び関節リウマチ)	インコを飼育していたが、今事例における直接の因果関係は不明	toxigenic	NT
6	2009年1月	57歳、女性、東京都葛飾区	咽頭痛、嘔声、咽頭痛、咳、発熱、上咽頭と喉頭前庭に白色偽膜等(関節リウマチ)	自宅に集まる野良猫5匹中2匹から菌分離陽性。家内外に飼育している犬2匹及び猫4匹は陰性	toxigenic	+
7	2010年7月	55歳、男性、神奈川県横浜市	ピンポン玉大の腋下膿瘍。その穿刺液より菌分離。(HIV感染症治療中)	猫10匹を屋内外で飼育。1匹から菌分離	toxigenic	+
8	2010年10月	51歳、女性、茨城県行方市	呼吸困難、嘔声、咽頭痛、咳、発熱、上咽頭と喉頭前庭に白色偽膜等	猫1匹飼育。この猫の眼やにから菌分離	toxigenic	+
9	2011年4月	57歳、女性、滋賀県大津市	同上	猫14匹、犬7匹、ヤギ2匹飼育。	toxigenic	-
10	2011年12月	38歳、女性、山形県鶴岡市	ピンポン玉大の右肘膿瘍。その穿刺液より菌分離。	猫6匹飼育。	toxigenic	-
11	2012年1月	33歳、男性、香川県高松市	ピンポン玉大の腋下リンパ節膿瘍。その穿刺液より菌分離。	妻の実家で犬3匹飼育。	toxigenic	-
12	2012年11月	71歳、女性、埼玉県朝霞市	呼吸困難、嘔声、咽頭痛、咳、発熱、上咽頭と喉頭前庭に白色偽膜等	自宅に飼育している猫4匹は中1匹から菌分離陽性。毒素産生性	toxigenic	+
13	2013年4月	20歳、女性、埼玉県桶川市	呼吸困難、嘔声、咽頭痛、咳、発熱、上咽頭と喉頭前庭に白色偽膜等	猫18匹飼育。9匹は室内飼育、9匹は屋外ベランダで飼育	toxigenic	-

NT: 試験せず

toxigenic: ジフテリア様毒素産生性

表 2. 開発した Multiplex PCR 法の感受性

Species, I. D.	4plex PCR amplification					DT (248 bp)
	C. U (110 bp)	C. P (204 bp)	C. D (434 bp)	DT (303 bp)	Nonspecific (bp)	
<i>C. diphtheriae</i>						
66	-	-	+	+	-	+
TO-15	-	-	+	+	-	+
RT-17	-	-	+	-	-	-
PW8	-	-	+	+	-	+
CD1994-1	-	-	+	+	-	+
2013-1	-	-	+	-	-	-
ATCC13812	-	-	+	+	-	+
ATCC11051	-	-	+	+	-	+
RIMD0343044	-	-	+	+	-	+
ATCC11049	-	-	+	+	-	+
<i>C. ulcerans</i>						
ATCC10387	+	-	-	-	-	-
11021A	+	-	-	+	-	+
11022A	+	-	-	+	-	+
11030A	+	-	-	+	-	+
11031A	+	-	-	+	-	+
12109A	+	-	-	+	-	+
2009-81	+	-	-	+	-	+
2008-64	+	-	-	+	-	+
2008-168	+	-	-	-	-	-
2008-169	+	-	-	-	-	-
2008-191	+	-	-	+	-	+
2010-018	+	-	-	+	-	+
2008-144	+	-	-	+	-	+
2009-047	+	-	-	+	-	+
2007-030	+	-	-	+	-	+
2010-020	+	-	-	+	-	+
2012-044	+	-	-	+	-	+
<i>C. pseudotuberculosis</i>						
ATCC9389	-	+	-	-	-	-

C.U.: *C. ulcerans*, C.P.: *C. pseudotuberculosis*, C.D.: *C. diphtheria*, DT: Diphtheria Toxin, DT(248 bp):  
ジフテリア毒素の単独 PCR による検出

表 3. Multiplex PCR の感度

Strain I. D.-DNA fragment	Amount of DNA/reaction					
	100pg	10pg	1pg	100fg	10fg	1fg
<i>C. diphtheriae</i> ATCC13812						
C. D (434 bp)	+	+	+	+	—	—
DT (303 bp)	+	+	+	+	—	—
<i>C. diphtheriae</i> 2013-1						
C. D (434 bp)	+	+	+	+	—	—
<i>C. ulcerans</i> 11021A						
C. U (110 bp)	+	+	+	—	—	—
DT (303 bp)	+	+	+	—	—	—
<i>C. ulcerans</i> 10387						
C. U (110 bp)	+	+	+	—	—	—
<i>C. pseudotuberculosis</i> 9389						
C. P (204 bp)	+	+	+	+	—	—

動物由来感染症の対応に関する研究

分担研究課題：ヒトの狂犬病の診断・治療法に関する調査研究

研究分担者：菅沼明彦（東京都立駒込病院感染症科医長）

研究要旨：狂犬病は、発症すると有効な治療法がなく、ほぼ全例が死亡することから、狂犬病曝露後発症予防が極めて重要である。曝露後発症予防については、複数の狂犬病ワクチン接種スケジュールが存在するが、今回ザグレブ方式による接種の効果を後方視的に検討した。対象は、海外産ワクチンを用いたザグレブ方式による曝露後発症予防が行われ、帰国後国産ワクチンにて接種を完遂した3例とした。ELISAキットにて、接種完遂後2週間にて抗体を測定したところ、いずれも防御抗体価（0.5IU/mL）を上回っていた。これより、海外にてザグレブ方式が導入された症例について、国産ワクチンによる接種スケジュールの継続が可能であることが示唆されるが、更に症例を蓄積して検討する必要がある。

A. 研究目的：

狂犬病は、中枢神経症状をきたす人獣共通感染症であり、一度発症すると有効な治療法が存在しない。このため狂犬病流行地域において、動物への曝露があった際は、適切な曝露後発症予防が必要となる。曝露後発症予防には、適切な創部の処置、狂犬病ワクチン、抗狂犬病免疫グロブリンが使用される。その接種スケジュールには、複数の方法が知られている。日本も含めて世界的には、WHO（エッセン）方式が広く用いられているが、接種回数及び接種本数を減じたザグレブ方式を実施される例も少なくない。（表1）海外にてザグレブ方式にて狂犬病曝露発症予防を行い、

接種スケジュールの途中で帰国した場合に、どのような対応を行うかを明確にした基準は存在していない。また、海外産ワクチン接種後に国産ワクチンによるザグレブ方式に沿ったスケジュールを完遂した場合の効果を検討した検討は皆無である。今回、海外にてザグレブ方式にて狂犬病曝露後発症予防が実施され、引き続き国産ワクチンにて同方法のスケジュールに沿って接種を完了した者への効果を評価した。

B. 研究方法：

狂犬病流行地にて動物曝露歴があり、現地にてザグレブ方式にて狂犬病曝露後発症予防を行い、国産ワクチンにて接種スケジ

ールを完遂し、狂犬病抗体測定を希望したものを対象とした。研究は、後方視的に行われ、対象者について、診療録及び接種台帳を基に情報を収集した。狂犬病抗体の測定は、3回目接種終了2週間後に採取した患者の血清検体を、化学及び血清療法研究所に送付し実施された。採取された検体を用いて、一般財団法人化学及血清療法研究所において狂犬病抗体価が測定された。狂犬病抗体価の測定には、Platelia Rabies II ELISA (Bio-Rad 社) を用い、防御抗体価は、0.5 EU/mL とした。

当院では、狂犬病曝露後発症予防完遂者に対して、希望者について抗体検査を実施している。今回の対象者については希望されるものについてのみ、採血の必要性、採血採取時の疼痛などを説明した上で、検査を実施している。検査結果を基に追加接種、抗体再検査の必要性を検討することから、患者にも有益と思われた。

#### C. 研究成果：

対象者は以下の3名であった。いずれも、曝露前に狂犬病ワクチン接種歴は有していなかった。抗狂犬病グロブリンの接種を併用されたものはいなかった。

症例1：19歳女性。X年6月14日-28日まで中国に滞在。6月24日、野犬に左肘を咬まれた。咬傷は、着衣の上からであり、出血は認めなかった。同日、現地の病院を受診し、狂犬病ワクチン（ベロ細胞由来）を2本接種された。7月1日当院を受診し、国

産狂犬病ワクチン（2回目）、破傷風トキソイドを接種した。7月16日に国産狂犬病ワクチンを接種。抗狂犬病抗体の希望あり、7月30日に血清を採取し、抗体価9.3 EU/mLであった。同日、併せて国産狂犬病ワクチンにて追加接種を行った。

症例2：21歳男性。X年8月17日-9月5日までトルコに滞在。8月24日に、野犬の子犬に左足首を咬まれた。咬傷は素肌であり、出血を認めた。8月28日に医療機関を受診し、狂犬病ワクチン（ベロ細胞由来）2本を接種（初回）。9月4日に引き続き現地にて、狂犬病ワクチン（2回目）を接種した。9月5日に、帰国。9月18日に当院を受診。同日国産狂犬病ワクチン（3回目）、破傷風トキソイドを接種。10月3日患者血清を採血。抗体価は、5.3 EU/mLであった。同日、併せて国産狂犬病ワクチンの追加接種を行った。

症例3：69歳女性。X年11月20日-11月27日までインドネシア（バリ島）に滞在し、同年11月20日に野生のサルに前額部を引っかかれた。素肌を直接引っかかれたが、出血は伴っていなかった。同日、医療機関を受診し、狂犬病ワクチン（ベロ細胞由来）2本（初回）、破傷風トキソイドを接種された。11月27日当院を受診し、国産狂犬病ワクチン（2回目）を接種した。12月12日、国産狂犬病ワクチン（3回目）、破傷風トキソイドを接種した。12月26日、狂犬病抗体検査を実施し、3.5 EU/mLであった。同日、併せて国産狂犬病ワクチンの追加接

種を行った。

上記 3 例について、いずれも接種後に重篤な有害事象を認めなかった。表 2 に、3 症例のまとめを示す。

#### D. 考察：

狂犬病曝露後発症予防として、様々な接種法が存在する。近年アジア地域からの帰国者において、ザグレブ方式により、曝露後発症予防を導入されるケースが少なくなっている。ザグレブ方式は、接種回数及び接種本数が WHO 方式よりも少なく、患者への負担が少ない利点がある。しかしながら、スケジュールの途中で帰国となり、その後の対応については合意されたものがなく、苦慮することが少なくない。ザグレブ方式は、近年中国において正式に認可されており、今後更に今回の症例のようなケースに遭遇する可能性が高いと思われる。中国で実施されたザグレブ方式及び WHO 方式による抗体価の推移を観察した研究では、ザグレブ方式でより早期に抗体上昇を認め、接種完了後の抗体価は、両者に差を認めなかったことが示されている<sup>1)</sup>。

国内における問題として、ザグレブ方式は海外で実施されていることから、必然的に海外産ワクチンと国産ワクチンとの互換性、国産ワクチンとのスケジュールの違いによる効果減弱の懸念が問題となる。WHO 方式による、海外産ワクチン及び海外産ワクチンの互換性については、2002 年に高山らが報告しており、国産ワクチン単独で接種し

た場合と海外産ワクチンで導入された場合のいずれもが、防御抗体価が得られることが示されている<sup>2)</sup>。

今回我々は、海外にてザグレブ方式が実施され、帰国に伴って国産狂犬病ワクチンが実施された 3 例の抗狂犬病抗体を ELISA キットで測定したところ、いずれも防御抗体価とされる 0.5IU/L を大きく上回る抗体価が得られた。元来、狂犬病抗体検査については、中和抗体法が標準であるが、柳澤らの研究によると、本 ELISA キットと、中和抗体には良好な相関関係が認められると報告されており<sup>3)</sup>、簡便に測定できる本法にて測定を行った。今回の 3 症例はいずれも、ザグレブ方式による曝露後免疫を完了した後、抗狂犬病抗体価の低値を懸念して採血と同時に追加接種を行ったが、結果的にはいずれの症例も、追加接種時に十分な抗体上昇を認めており、追加接種は不要であったことが示された。

海外産ワクチンを接種した際に、互換性及び接種スケジュールの相違より、改めて初回より国産ワクチンにて狂犬病曝露後免疫を実施することも可能ではあるが、患者への身体的、経済的負担、及び接種部位における局所反応の増大など懸念などがある。今後も、ザグレブ方式にて狂犬病発症予防を開始された症例について、更に検討されることが望まれる。

#### E. 結論

今回、海外にてザグレブ方式による狂犬

病曝露後免疫が導入され、スケジュール途中に帰国し、国産ワクチンにて完遂した 3 症例について、後方視的に検討を行った。全例が防御抗体価を上回る抗体価が得られた。少数例の検討であり、今後更に症例を増やして検討する必要がある。

#### F. 健康危険情報

特筆すべきことなし

#### G. 研究発表

##### 1 論文発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

(表 1) 曝露後発症予防 狂犬病ワクチン接種スケジュール

接種法	接種スケジュール
WHO方式 (エッセン方式)	day0-day3-day7-day14-day30 毎回狂犬病ワクチンを1本ずつ接種 (国産ワクチンは6回目 day90日目も指示)
ザグレブ方式	day0-day7-day21 day0狂犬病ワクチン2本接種 day7/day21 狂犬病ワクチン1本接種

(表 2) 症例

	渡航先	加害動物	ワクチン	抗体価 (IU/L)
1. 19歳女性	中国	イヌ	初回、2回目 海外産 3回目 国産	9.3
2. 21歳男性	トルコ	イヌ	初回、2回目海 外産 3回目 国産	5.3
3. 69歳女性	インドネシア	サル	初回、海外産 2回目、3回目 国産	3.5

文献

- 1) Huazhang Liu, Guihua Huang, Qing Tang, Jia Li, et al. The immunogenicity and safety of vaccination with purified vero cell rabies vaccine (PVRV) in China under a 2-1-1 regimen. Human Vaccines. 2011; 7: 220-224.
- 2) 高山直秀ら、外国製狂犬病ワクチンに引き続き国産狂犬病ワクチンで狂犬病曝露後発症予防を受けた人々における抗狂犬病抗体価. 感染症誌 2002年 pp.882-887
- 3) Yanagisawa N, Takayama N, Nakayama E, et al. Pre-exposure immunization against rabies using Japanese rabies vaccine following the WHO recommended schedule. J Infect Chemother. 2010; 16: 38-41.



### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. Uda A, Sekizuka T, Tanabayashi K, Fujita O, Kuroda M, Hotta A, Sugiura N, Sharma N, Morikawa S, Yamada A. Role of Pathogenicity Determinant Protein C (PdpC) in Determining the Virulence of the *Francisella tularensis* Subspecies *tularensis* SCHU. PLoS One. 2014 Feb 18;9(2):e89075.
2. Toru Takahashi, Ken Maeda, Tadaki Suzuki, Aki Ishido, et al. , Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. J Inf Dis., 2014 Mar;209(6):816-27.
3. Hotta A, Fujita O, Uda A, Sharma N, Tanabayashi K, Yamamoto Y, Yamada A. and Morikawa S. In vitro Antibiotic Susceptibility of *Francisella tularensis* isolates from Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 2013;66(6):534-6.
4. Fujita O, Hotta A, Uda A, Yamamoto Y, Fujita H, Shinya F, Asano S, Morikawa S, Tanabayashi K, Yamada A. Identification of the source of *Francisella tularensis* infection by a multi-locus variable-number tandem repeat analysis. Jpn. J. Infect. Dis. 2013;66(6):543-5.
5. Neekun Sharma, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Akihiko Uda, Osamu Fujita, Toshio Mizoguchi, Junji Shindo, Chun-Ho Park, Noboru Kudo, Hitoshi Hatai, Toshifumi Oyamada, Akio Yamada, Shigeru Morikawa, and Kiyoshi Tanabayashi. Serosurveillance for *Francisella tularensis* among wild animals in Japan using a newly developed competitive ELISA. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, in press
6. Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, Fukushi S, Tahara M, Nagata N, Ami Y, Mizutani T, Kurane I, Hasegawa H, Saijo M, Komase K, Morikawa S, and Takeda M. Canine Distemper Virus Associated with a Lethal Outbreak in Monkeys Readily Adapted to Use Human Receptors. J Virol. 2013, 2013 Jun;87(12):7170-5.
7. Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in Cynomolgus Monkeys in Japan in 2008. J Virol. 2013, 87(2): 1105-1114
8. Neekun Sharma, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Osamu Fujita, Akihiko Uda, Shigeru Morikawa, Akio Yamada, Kiyoshi Tanabayashi. Detection of *Francisella tularensis*-specific antibodies in patients with tularemia using a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay. Clinical and Vaccine Immunology, 2013 20(1): 9-16
9. Arai, S., Nguyen, S. T., Boldgiv, B., Fukui, D., Araki, K., Dang, C. N., Ohdachi, S. D.,

- Nguyen, N. X., Pham, T. D., Boldbaatar, B., Satoh, H., Yoshikawa, Y., Morikawa, S., Tanaka-Taya, K., Yanagihara, R., and Oishi, K. Novel Bat-borne Hantavirus, Vietnam. *Emerging Infectious Diseases*. 19(7):1159-1161. 2013.
10. Arai, S., Tabara, K., Yamamoto, N., Fujita, H., Itagaki, A., Kon, M., Satoh, H., Araki, K., Tanaka-Taya, K., Takada, N., Yoshikawa, Y., Ishihara, C., Okabe, N., Oishi, K. Molecular phylogenetic analysis of *Orientia tsutsugamushi* based on the *groES* and *groEL* genes. *Vector-borne and zoonotic diseases*. 13(11): 825-829. 2013.
  11. Terada Y, Minami S, Noguchi K, Mahmoud H.Y.A.H., Shimoda H, Mochizuki M, Une Y, Maeda K. Genetic characterization of coronaviruses from domestic ferrets in Japan. *Emerging Infectious Diseases (in press)*
  12. Noguchi K, Shimoda H, Terada Y, Shimojima M, Kohyama K, Inoshima Y, Maeda K. Isolation of a novel herpesvirus from a Pacific white-sided dolphin. *Archives of Virology* 2013 158(3): 695-699.
  13. Takano A, Fujita H, Kadosaka T, Takahashi M, Yamauchi T, Ishiguro F, Takada N, Yano Y, Oikawa Y, Honda T, Gokuden M, Tsunoda T, Tsurumi M, Ando S, Andoh M, Sato K, Kawabata H. Construction of a DNA database for ticks collected in Japan: application of molecular identification based on the mitochondrial 16S rDNA gene. *Med Entomol Zool. (in press)*.
  14. Y. Yoshimura, N. Tachikawa, T. Komiya, A. Yamamoto : A case report and epidemiological investigation of axillary lymph node abscess caused by *Corynebacterium ulcerans* in an HIV-1 -positive patient. *Epidemiology and Infection*, 2013, 20 September p1-4.
  15. A. Hirai-Yuki, T. Komiya, Y. Suzaki, Y. Ami, C. Katsukawa, M. Takahashi, A. Yamamoto and Y. K. Yamada: Isolation and characterization of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* from two closed colonies of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) in Japan. *Comparative medicine* June 2013, Vol 63, p1-7.

