

primer RT-PCR は、全ての genotype を検出可能で有り、全ての既報の genotype において、提唱された新規 genotyping が可能であった。

5. TCDC より提供を受けた NoV 感染患者の時系列サンプルは、全例が GII.4 感染者であった。これらのサンプルを NGS にかけて、全塩基配列を決定したところ、患者 A, D, F, G, H, I, J, K において 2 ポイントの全塩基配列比較データを得ることに成功した。ゲノム全長に渡る塩基およびアミノ酸残基の時系列変異を比較検討したところ、下表に示した結果が得られた。

Patient#	Sample ID	Interval	Nucleotide	Aminoacid	dS/dN ratio
A	120.121	5 days	16	8	0.5
D	126.127	13 days	2	1	0.5
F	131.132	8 days	2	1	0.5
G	135.136	8 days	4	2	0.5
H	137.138	8 days	8	4	0.5
I	140.141	3 days	2	1	0.5
J	143.144	8 days	4	2	0.5
K	146.147	6 days	4	2	0.5

患者 A は GII.4 2006b variant と GII.4 2009 variant の混合感染であった。他の患者は GII.4 2006b variant の単独感染であった。患者 A を除外し、遺伝子変位速度を算出したところ、0.48nt/0.24aa/day/genome の変異速度であった。この速度は、これまでに通常の PCR sequeunce で得られた報告の 1/4 程度の速度であった。同義置換/非同義置換 (dS/dN ratio) を計算すると、A を除く全ての患者で負の淘汰が起きていたことが明らかになった。つまり、患者体内で発生した塩基配

列変化が NoV の生存に不利であったため除外される負の淘汰が繰り返されることにより、NoV が進化していると考えられた。

D. 結論

Universal primer RT-PCR システムは、 10^4 copies /uL 以下の RNA titer を示す低濃度の検体に対しては、増幅成功率が低かったが、それ以上の RNA titer を示した検体は遺伝子型にかかわらず 100%増幅、塩基配列決定が可能であった。本システムは、ノロウイルスサイエンティフィックコミッティーによって提唱された新規 genotyping が実施できるため、今後の TCDC とのデータ共有のみならず、グローバルな配列データ共有に有用である。

TCDC の有する同一個体から時系列でサンプリングしたノロウイルス陽性検体を用い、ノロウイルスの個体内進化について NGS を用いて研究したところ、0.48nt/0.24aa/day/genome の進化速度 (負の淘汰) であり、これまでに報告された速度の約 1/4 の進化速度であることが示唆された。ノロウイルスの個体内進化は宿主による強い選択圧に依存することが明らかになった。

健康危険情報

なし

F. 論文発表

Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, Koopmans M. Proposal for a unified norovirus

nomenclature and genotyping. Arch
Virol. 2013 Oct;158(10):2059-68.
doi: 10.1007/s00705-013-1708-5.
Epub 2013 Apr 25.

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

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 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 斎藤 隆一 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 柳井 徳麿 岐阜大学 応用生物科学部 獣医病理学教室 教授
台湾側研究分担者 慕 蓉蓉

台湾行政院衛生署 疾病管制局研究檢驗中心 腸道及新感染症細菌実験室

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、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し、比較を行った。国内のイヌでは、2,318 頭中 115 頭 (5.0%) が抗体陽性であった。そのうち、500 検体前後調査した中では、神奈川県は 2.5% に比較して、東京都は 7.9% と陽性率が高くなっていたが、近年は、陽性率の低下傾向が認められた。台湾については、63 検体調査して抗体陽性 1 頭、陽性率 1.6% と、日本よりも低くなっていた。また、国内のイヌについて *B. canis* が尿中に排菌されイヌ間での感染原因となっている可能性を検討するため、膀胱尿および尿道 (雄)・膣 (雌) スワブを採取し、ブルセラ菌特異的遺伝子検出を行った。その結果、抗体陽性イヌ 2 頭の尿、抗体陰性イヌの膣スワブ、血清、各 1 頭ずつより、*B. canis* 特異的遺伝子が検出された。市中のイヌ間での感染伝播において、尿が感染源となっている可能性が示唆された。

A. 研究目的

ブルセラ症 (Brucellosis) は世界では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 13 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。

そこで、2012年度からは、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。ブルセラ菌特異的抗体検出方法については、MAT（マイクロプレート凝集反応）もTAT（試験管凝集反応）とともに、本共同研究初年度に台湾CDCにその検査手技について技術移転を実施済みであることから、TATよりも少量の抗原・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、MATを用いることとした。

また、イヌ間における感染伝播には、感染イヌの尿の関与が推測されている。そこで、その可能性を検証するため、今回、国内のイヌより、尿および尿道・膣スワブを採取し、*B. canis* 特異的遺伝子検出を試みた。

B. 研究方法

1. イヌ血液サンプル： 2007 から 2013 年度に東京都動物愛護相談センターに収容されたイヌ 605 頭、栃木県動物愛護指導センターに収容されたイヌ 603 頭の血清を検討に用いた。イヌの殺処分直後に心臓採血を行い、血清を分離し、使用まで -40°C にて冷凍保存した。その他、沖縄から北海道にかけて、猟犬 631 頭の血清を検討に用いた。検査結果については、すでに実施済みの神奈川の結果と併せて、解析を行った。総検査数は、26 都道府県、2,318 頭である。

2. マイクロプレート凝集反応（MAT）：*B. canis*

凝集反応用菌液（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応用抗原を加え、プレートを攪拌した後、湿潤箱に入れて、 50°C 、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。

3. 膀胱尿及びスワブの採取： 東京都動物愛護相談センターに収容されたイヌの殺処分直後に、膀胱尿は膀胱から直接、尿を採取した。スワブは、雄では膀胱と尿道の境目近辺に前立腺、射精口が開いているため、膀胱から尿道方向に綿棒を挿入して採取し、雌では外陰部から膣に綿棒を挿入して採取した。綿棒で採取した検体は、生理食塩水に溶解し、検査まで -40°C にて冷凍保存した。

4. DNA の抽出と遺伝子検出： 血清、膀胱尿、スワブ（溶解液）から、DNA 抽出剤（SepaGene、エーディア）を用いて、DNA を抽出した。*bcs31* および *omp2* を標的遺伝子として、ブルセラ特異的遺伝子検出を行った。*bcs31* は、ブルセラ属菌体表面タンパクの 31kDa 抗原（BCSP31）をコードする遺伝子で、全てのブルセラ属菌に保存されている。*omp2* はブルセラ属菌の外膜タンパク OMP2 の遺伝子であるが、その中でも *B. canis* に特徴的な配列を持つ領域を標的とした。それぞれの増幅領域内に特異的なハイブリダイゼーションプローブを作成し、これを使用したリアルタイム PCR を Light-cycler（ロシユ）を用いて実施し、特異的遺伝子を検出した。*bcs31* と *omp2* *canis-type* が両方検出された検体を陽性とした。

C. 研究結果

1. イヌ血液サンプルにおける抗体保有状況： 国内のイヌでは、2,318 頭中 115 頭が陽性、5.0%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 6.3%、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、東京都ではここ3年間については5%台となっていた（表3）。猟犬については、各都道府県それぞれの検体数が少ないため、県ごとに結果を判断することはできないが、まとめると、陽性は17/631（2.7%）と、神奈川県と同程度であった（表3）。

2. 台湾のイヌにおける抗体保有状況： 動物愛護センターのイヌのうち63検体について、MAT法で抗体を調査したところ、陽性1頭、陽性率1.6%と、日本よりも低くなっていた。

3. 膀胱尿およびスワブからのブルセラ菌特異的遺伝子検出： 抗体陽性イヌ2頭（1:320, 1:640）の尿、抗体陰性イヌの膣スワブ、血清、各1頭ずつより、*B. canis* 特異的遺伝子が検出された（図1）。それ以外にも、*bcspl31*のみ陽性の検体も散見された。

D. 考察・結論

国内のイヌにおける抗体保有状況を調査したところ、5.0%が抗体陽性であった。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、若干高い。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。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おり、東京では3年続けて5%台、以前よりも有意に低い陽性率を維持している。

ブルセラ症に関して、日本と同様の状況にある台湾では、63検体と検査頭数は少ないものの、今回の調査の陽性率は1.6%と、日本よりも低くなっていた。

2001年の調査報告では5/38（13.2%）の抗体陽性（感染）イヌが報告されていることから、現在、その抗体保有率が本当に低下しているのかどうか、興味深い点である。ただ、日本と同様に、台湾国内のイヌでもイヌブルセラ菌感染が認められることから、ヒトへの感染も起きていることが疑われ、今後、ヒトの患者についての調査が必要であろう。

日本では、イヌ繁殖施設で時折、*B. canis* 感染流行が起きており、実際にペットとして飼育されているイヌで見られる抗体陽性の原因の一つ（感染イヌの市中への流入）とも考えられている。ただ、それ以外にも、市中において感染イヌから、別のイヌへの感染伝播が起きている可能性が否定できない。また、実験的*B. canis* 感染イヌの尿中に菌が排出されることが知られている。そこで、今回、尿および尿道（雄）・膣（雌）スワブを採取し、その中の*B. canis* 特異的遺伝子の検出を実施したところ、抗体陽性イヌの尿、抗体陰性のイヌではあるが膣スワブから、特異的遺伝子が検出された。これは、実際に尿等を介して、市中で感染が拡大していることを示していると考えられる。これについては、今後も検討を続け、例数を増やしていく予定である。

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）今岡浩一．犬ブルセラ症—特集・診断シリーズ・感染症．in：SA Medicine, インターズー, pp.53-56, 2013

（2）水谷浩志, 久保田菜美, 宗村佳子, 松村藍, 山

本智美, 木村昌伸, 今岡浩一. 東京都における犬の抗 *Brucella canis* 抗体保有状況. 日本獣医師会雑誌, 67(3):, 2014 (in press)

2. 学会発表・講演等

(1) Koichi Imaoka. Development of diagnostic methods for brucellosis – Sero-epidemiology of *Brucella canis* infection in dogs in Japan. 10th Japan-Taiwan Symposium on Antibiotics resistance and Foodborne Disease, Tokyo, Sep. 12-13, 2013

(2) 今岡浩一. 犬猫から感染する動物由来感染症について～カプノサイトファーガ・カニモルサス感染症、ブルセラ感染症など～. 厚生労働省平成 25 年度動物由来感染症対策（狂犬病予防を含む）技術研修会 東京 2013 年 11 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)
2013.7	40代	神奈川県	神奈川県	イヌ	発熱、関節痛、筋肉痛、リンパ節腫脹	—	陽性	(-)	<i>B. canis</i> (血液)

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(%)
北海道	35	1	2.9
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	603	38	6.3
東京	605	48	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	2318	115	5.0

東京：東京都動物愛護相談センター調査(2007-2013)
 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(2009-2013)

年度	検査頭数	陽性数	(%)
2007	50	5	10.0
2008	89	12	13.5
2009	106	9	8.5
2010	70	6	8.6
2011	125	7	5.6
2012	113	6	5.3
2013	52	3	5.8
合計	605	48	7.9

年度	検査頭数	陽性数	(%)
2002	245	18	7.3
2003	64	5	7.8
2004	99	7	7.1
2005	130	7	5.4
2012	65	1	1.5
合計	603	38	6.3

(参考)

年度	検査頭数	陽性数	(%)
2008	98	1	1.0
2009	102	0	0.0
2010	80	1	1.3
合計	280	2	0.7

図1) 国内のイヌにおける *B. canis* 遺伝子の検出

No.	D	抗体価		Real-time PCR						
				尿		スワブ		血清		
				bcp31	omp2ca	bcp31	omp2ca	bcp31	omp2ca	
1	D1	<x10	(-)							
2	D2	x20	(-)			+		+	+	
3	D3	x320	(+)	+	+			+		
4	D4	x10	(-)							
5	D5	x10	(-)							
6	D6	x10	(-)							
7	D7	<x10	(-)							
8	D8	x10	(-)							
9	D9	<x10	(-)							
10	D10	x10	(-)							
11	D11	x640	(+)	+	+	+				
12	D12	x20	(-)							
13	D13	<x10	(-)							
14	D14	<x10	(-)							
15	D15	x10	(-)	+		+				
16	D16	x10	(-)							
17	D17	<x10	(-)							
18	D18	<x10	(-)							
19	D19	x10	(-)							
20	D20	x10	(-)							
21	D21	x10	(-)							
22	D22	<x10	(-)							
23	D23	x10	(-)			+				
24	D24	x10	(-)							
25	D25	x10	(-)							
26	D26	<x10	(-)							
27	D27	x10	(-)							
28	D28	x10	(-)							
29	D29	<x10	(-)							
30	D30	x40	(-)							

No.	D	抗体価		Real-time PCR						
				尿		スワブ		血清		
				bcp31	omp2ca	bcp31	omp2ca	bcp31	omp2ca	
31	D31	x10	(-)							
32	D32	x10	(-)	+						
33	D33	x10	(-)							
34	D34	x20	(-)							
35	D35	x10	(-)							
36	D36	x10	(-)							
37	D37	<x10	(-)							
38	D38	≥x1280	(+)	なし	なし				+	
39	D39	x10	(-)	なし	なし					
40	D40	x10	(-)							
41	D41	<x10	(-)							
42	D42	<x10	(-)							
43	D43	<x10	(-)							
44	D44	<x10	(-)							
45	D45	<x10	(-)							
46	D46	<x10	(-)			+	+			
47	D47	<x10	(-)			+			+	
48	D48	<x10	(-)							
49	D49	<x10	(-)							
50	D50	<x10	(-)							
51	D51	<x10	(-)	なし	なし					
52	D52	<x10	(-)	なし	なし					

台湾および日本の蚊相の違いと蚊によって媒介される病原体の遺伝的關係：

台湾における 2012 年 2013 年の調査結果

研究分担者	津田良夫	国立感染症研究所
研究協力者	金 京純	鳥取大学農学部
	鄧 華眞	台湾 CDC
	陳 典煌	台湾 CDC

渡り鳥飛来地に生息する疾病媒介蚊に着目して、台湾の水田地帯に接した渡り鳥飛来地で 2012 年と 2013 年に各 2 回の媒介蚊採集を行い、捕獲された成虫から野鳥由来の蚊媒介性病原体である鳥マラリア原虫の検出を行った。2012 年には、13 種類 1,228 個体の蚊成虫を 133 プールに分けて分析した。その結果 DNA シーケンスが異なる 5 つの鳥マラリア原虫の遺伝的系統が検出された。2013 年には、15 種類 5,362 個体 (242 プール) を分析した結果、これまでに 6 種類の遺伝的系統が検出された。鳥マラリア原虫が検出された蚊の種類は、以下の 8 種類であった：カラツイエカ、ハマダライエカ群、ツノフサカ的一种、ネッタイエカ、ムラサキヌマカ、ヨツホシイエカ、オオクロヤブカ、サキジロカクイカ。これらの蚊はすべて我が国にも生息する種類である。2012 年と 2013 年に検出された鳥マラリア原虫の遺伝的系統は合計 8 系統で、そのうち 3 系統は 2 年続けて検出されていることから、この調査地で毎年感染がくり返されている可能性が高い。これらの系統はアフリカ大陸北部からユーラシア大陸にかけて広域に分布する系統であることから、長距離移動する渡り鳥によって地理的分布を拡大していることが示唆された。

A. 研究目的

台湾と我が国の疾病媒介蚊や蚊によって媒介される病原体の間には、どのような遺伝的類縁関係があるかを明らかにし、蚊によって媒介される病原体の侵入監視や流行の予測に役立てることを目的として、台湾 CDC との共同研究を行っている。

本研究は渡り鳥飛来地に生息する疾病媒介蚊に着目して、台湾の水田地帯に接した渡り鳥飛来地で 2012 年と 2013 年に各 2 回の媒介蚊採集を行い、捕獲された成虫から野鳥由来

の蚊媒介性病原体である鳥マラリア原虫の検出を行った。鳥マラリア原虫が検出される蚊の種類、検出された鳥マラリア原虫の種類と地理的分布、検出される頻度を比較することによって、渡り鳥による蚊媒介性病原体の持ち込みや侵入・定着の実態について考察した。

B. 研究方法

現地調査：台湾北東部宜蘭県の渡り鳥飛来地（蘇澳，無尾港水鳥保護区）を調査地として疾病媒介蚊の現地調査を行った。調査は渡り鳥が飛来する季節を選び 2012 年ならびに

2013年の5月と10月に実施した。1kgのドライアイスに誘引された成虫を捕獲するためにトラップ10台を設置して、連続した2日間採集を行った。捕獲された成虫は毎日回収し、台湾CDCの実験室に持ち帰って種類同定を行った。サンプルはその後の分析のために冷凍で保存し、2012年のサンプルは国立感染症研究所昆虫医科学部で、また2013年のサンプルは台湾CDCで分析を行った。

蚊からの病原体の検出：捕獲されたコガタアカイエカ成虫サンプルは、台湾CDCで日本脳炎ウイルスの分離を試みた。それ以外の成虫サンプルを用いてDNAを抽出し、チトクロームb遺伝子を増幅して、鳥マラリア原虫の分子分類を行った。

C.研究結果

2012年に実施した2回の現地調査で採集し、鳥マラリア原虫の検出に用いたのは、13種1,228個体であった。これらの成虫サンプルを種類ごとに1~10個体を1プールとして合計133プールにまとめ分析したところ、11個のマラリア原虫陽性プールが得られた(表1)。陽性プールが得られた蚊の種類は、カラツイエカ(*Culex bitaeniorhynchus*)、ハマダライエカ的一种(*Culex mimetics* gr.)、クシヒゲカ的一种(*Culex sasai/kyotoensis*)、アシマダラヌマカ(*Mansonia uniformis*)、ネッタイエカ(*Culex quinquefasciatus*)であった。検出された原虫をDNAシーケンスに基づいて同定した結果、5種類の遺伝的系統が区別された；*P.tacy7*, *P.prouxi*, *P.elongatum*, *Yilan03*, *Yilan04*。このうち*Yilan03*と*Yilan04*は新規の系統であった。

2013年の2回の現地調査では、15種類5,362個体(242プール)を採集し、分析に用いた。その結果、17個の陽性プールが得られた(表

2, 3)。新たに鳥マラリア原虫陽性サンプルが得られた蚊の種類は、ヨツホシイエカ(*Culex sitiens*)、オオクロヤブカ(*Armigeres subalbatus*)、サキジロカクイカ(*Lutzia fuscans*)、ムラサキヌマカ(*Coquillettidia crassipes*)の4種類であった。また、検出された原虫の遺伝的系統は、6種類(*P.gallinaceum*, *P.tacy7*, *P.prouxi*, *P.elongatum*, *P.lutzi*, *P.juxtannucleare*)であった。

D.考察

本研究で鳥マラリア原虫が検出された以下の8種の蚊は、すべて我が国にも生息する種類である：カラツイエカ、ハマダライエカ群、ツノフサカ的一种、ネッタイエカ、ムラサキヌマカ、ヨツホシイエカ、オオクロヤブカ、サキジロカクイカ。したがって、これらの蚊が鳥マラリア原虫に感染した渡り鳥から吸血する機会さえあれば、本研究で検出された鳥マラリア原虫系統が我国で流行する可能性があると考えられる。さらに、鳥マラリア原虫以外の鳥類由来の蚊媒介性病原体をこれらの蚊が受け取る機会があることも示唆されるため、これらの蚊の医学的あるいは獣医学的重要度は比較的高いといえることができるだろう。

2012年と2013年に検出された鳥マラリア原虫の遺伝的系統は合計8系統で、そのうち3系統(*P.tacy7*, *P.prouxi*, *P.elongatum*)は2年続けて検出されていることから、この調査地で毎年感染がくり返されている可能性が高い。*P.elongatum*はオーストラリア区と極地方を除く地域に広範囲に分布する種類で、わが国でも蚊から検出されている。*P.prouxi*も全北区、東洋区、エチオピア区に分布する系統で、アフリカでの報告が多い系統である。これら2つの系統は、長距離を移動する渡り鳥によっ

て台湾に持ち込まれ、台湾産の潜在的な媒介蚊によって感染サイクルが確立されたと考えられる。これに対して *P.tacy7* は野外サンプルからの検出報告は限られており、*P.prouxi*, *P.elongatum* に比べて分布範囲は狭いと思われる。ただし、埼玉県のリビタキの血液サンプルから報告されているので、少なくとも台湾から日本列島にかけて分布している系統であると思われる。

台湾の蚊から検出された鳥マラリア原虫 8 系統の残りの 5 系統は、いずれも 1 回の調査で 1~3 個の陽性サンプルが得られただけで、それ以外の調査ではまったく検出されていない。したがって、これらの系統は感染した渡り鳥などによってこの調査地に持ち込まれ、そこに生息している蚊が吸血することによって受け取られる機会があるものの、定着するまでに至っていない系統であると思われる。このように、ある地域に持ち込まれているが侵入・定着に成功していないと考えられる系統が実際に蚊から検出されることは、渡り鳥が蚊媒介性病原体の拡散や分布拡大に重要な役割を果たしていることを示唆する結果であると考えられる。

E. 結論

台湾北東部宜蘭県の渡り鳥飛来地（蘇澳，無尾港水鳥保護区）では 15 種の蚊が採集されたが、そのうち以下の 8 種類が鳥マラリア原虫を媒介していると思われる：カラツイエカ，ハマダライエカ群，ツノフサカ的一种，ネッタイエカ，ムラサキヌマカ，ヨツホシイエカ，オオクロヤブカ，サキジロカクイカ。これらの蚊サンプルから検出された鳥マラリア原虫には、遺伝的に異なる 8 種類の系統が区別できた。そのうち 3 系統は 2 年続けて検出されていることから、この調査地で毎年感染がくり返されている可能性が高い。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1 台湾北東部の渡り鳥飛来地で 2012 年 5 月、10 月に採集された蚊からの鳥マラリア原虫の検出結果

採集月	種類	個体数	プール数	検出された原虫の遺伝的系統
5 月	<i>Aedes albopictus</i>	13	2	
	<i>Armigeres subalbatus</i>	162	17	
	<i>Tripteoides bambusa</i>	1	1	
	<i>Culex bitaeniorhynchus</i>	90	9	<i>P. tacy7</i> <i>Plasmodium rouxi</i> ×3
	<i>Coquillettidia crassipes</i>	2	1	
	<i>Mansonia uniformis</i>	11	2	
	<i>Culex murrelli</i>	318	32	Yilan03 <i>Plasmodium rouxi</i> ×2
	<i>Uranotaenia novobscura</i>	1	1	
	<i>Culex pseudovishnui</i>	4	1	
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	21	3	
	<i>Culex rubithoracis</i>	5	1	
	<i>Culex sasai/kyotoensis</i>	60	7	<i>Plasmodium elongatum</i> ×2
	<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	7	1	
5 月集計		695	78	
10 月	<i>Culex bitaeniorhynchus</i>	39	4	
	<i>Coquillettidia crassipes</i>	169	17	
	<i>Mansonia uniformis</i>	294	30	Yilan04
	<i>Culex orientalis</i>	22	3	
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	9	1	<i>P. tacy7</i>
	10 月集計		533	55
総計		1228	133	

表 2 台湾北東部の渡り鳥飛来地で 2013 年 5 月 20-22 日に採集された蚊からの鳥マラリア原虫の検出結果

種類	採集個体数		鳥マラリア原虫の検出			検出された原虫の遺伝的系統
	雌	雄	供試数	プール数	陽性数	
<i>Coquillettidia crassipes</i>	39	0	39	4	2	<i>Plasmodium gallinaceum</i>
<i>Culex sasai/kyotoensis</i>	34	0	34	4	2	<i>Plasmodium elongatum</i>
<i>Culex murrelli</i>	319	0	319	32	2	<i>Plasmodium rouxi</i> , <i>Plasmodium lutzi</i>
<i>Culex bitaeniorhynchus</i>	83	0	83	9	0	
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	191	0	191	20	0	
<i>Armigeres subalbatus</i>	149	0	149	15	0	
<i>Aedes albopictus</i>	26	0	26	3	0	
<i>Culex murrelli</i>	5	0	5	1	0	
<i>Culex malayi</i>	9	0	9	1	0	
<i>Mansonia uniformis</i>	12	0	12	2	0	
<i>Culex nigropunctatus</i>	1	0	1	1	0	
<i>Culex quinquefasciatus</i>	29	0	29	3	0	
<i>Culex annulus</i>	58	0	58	6	0	
<i>Culex sitiens</i>	8	0	8	1	0	

表3 台湾北東部の渡り鳥飛来地で2013年10月7-9日に採集された蚊からの鳥マラリア原虫の検出結果

種類	採集個体数		鳥マラリア原虫の検出			検出された原虫の遺伝的系統
	雌	雄	供試数	プール数	陽性数	
<i>Culex sitiens</i>	866	0	866	87	6	<i>P. tacy7</i> ×4 <i>Plasmodium juxtannucleare</i> ×2
<i>Culex sasai/kyotoensis</i>	15	0	15	2	1	<i>P. tacy7</i>
<i>Culex murrelli</i>	27	0	27	3	1	<i>P. tacy7</i>
<i>Culex bitaeniorhynchus</i>	12	0	10	1	1	<i>P. tacy7</i>
<i>Armigeres subalbatus</i>	22	0	22	3	1	<i>P. tacy7</i>
<i>Lutzia fuscans</i>	3	0	3	1	1	<i>Plasmodium juxtannucleare</i>
<i>Aedes albopictus</i>	243	0	243	25	0	
<i>Coquillettidia crassipes</i>	105	1	104	11	0	
<i>Culex rubithoracis</i>	6	0	5	1	0	
<i>Culex malayi</i>	14	0	14	2	0	
<i>Mansonia uniformis</i>	14	0	14	2	0	
<i>Culex nigropunctatus</i>	7	0	7	1	0	
<i>Culex quinquefasciatus</i>	2	0	2	1	0	
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	2,564	0				分析中
<i>Culex annulus</i>	499	0				

厚生科学研究費補助金（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

アジアにおける百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* の流行調査と病原性解析

研究分担者 蒲地一成 国立感染症研究所 細菌第二部 室長
研究協力者 大塚菜緒 国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官
渡邊峰雄 北里大学大学院 感染制御科学府 准教授

研究要旨 アジアにおける百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* の流行状況を把握するため、昨年度に引き続き百日咳の病原体サーベイランスを実施した。国内で発生した百日咳様患者 433 名を対象に *B. holmesii* と百日咳菌の遺伝子検査を行った結果、*B. holmesii* の検査陽性者は 0 名、百日咳菌の陽性者は 29 名（6.7%）であった。また、*B. holmesii* の呼吸器症例の増加原因を考察するため、呼吸器由来株に特異的に発現する高分子タンパク質について解析を行った。その結果、高分子タンパク質は定着因子 BipA (*Bordetella* intermediated phase protein A) と同定され、血液由来株では 1 塩基欠失または負の転写調節により発現が抑制されていることが判明した。調査を実施した 2013 年は百日咳の非流行期にあったことから、*B. holmesii* は百日咳菌と同様に周期的に流行する可能性が示唆された。

A. 研究目的

Bordetella holmesii は 1995 年に米国 CDC により命名された新しい百日咳類縁菌であり、免疫系に基礎疾患を持つ患者に感染し、敗血症・心内膜炎などの起原菌となる。近年では基礎疾患を持たない青年・成人に感染し、百日咳と同様な呼吸器症状を引き起こすことが報告されている。これまで *B. holmesii* の症例報告は主に米国に限られていたが、わが国でも 2009 年に初の成人感染例が確認された。2010~11 年には百日咳地域流行で 6 名の感染者が認められ (Kamiya et al., Emerg Infect Dis, 2012)、2011 年には気管支炎を発症した幼児の *B. holmesii* 感染症例も確認された (Katsukawa et al., J Infect Chemter, 2013)。これらの感染症例は *B. holmesii* がすでにアジア地域に広がっていることを示唆するが、本菌の病原体サーベイランスが実施されていないためその実態は不明である。

B. holmesii 感染者の呼吸器症状は百日咳菌と等しいことから、両菌を臨床症状から区別することは不可能である。そこで、本研究事業では *B. holmesii* に特異的な遺伝子検査法 (LAMP 法) を開発し、2011 年から台湾 CDC と共同して遺伝子検査を用いた病原体サーベ

イランスを開始した。平成 25 年度は *B. holmesii* の病原体サーベイランスを継続するとともに、呼吸器症例の増加原因を考察するため本菌の病原性について検討を加えた。

B. 研究方法

遺伝子検査：福岡県と高知県で発生した百日咳様患者を対象に遺伝子検査を行った。遺伝子検査は *B. holmesii* の LAMP 法 (Otsuka et al., Microbiol Immunol, 2012) またはリアルタイム PCR により実施し、TaqMan プローブは既報 (Guthrie et al., J Clin Microbiol, 2010) のものを一部改変して使用した。福岡県の患者検体 (鼻腔分泌物) は国立感染症研究所・細菌第二部、高知県の患者検体は高知県衛生研究所において検査を行った。百日咳菌の遺伝子検査は LAMP 法またはリアルタイム PCR 法により行った。なお、高知県衛生研究所では百日咳強化サーベイランス事業の一環として遺伝子検査が実施された。

解析菌株：*B. holmesii* 患者の呼吸器から分離された 2 株 (BH2, BH6) と呼吸器以外から分離された 2 株 (BH7, BH ATCC51541) を供試した。BH7 株は心外膜炎患者

の心嚢液 (Nei et al., J Clin Microbiol, 2012), BH ATCC51541 株は敗血症患者の血液から分離された菌株であり, 両株を血液由来株とした。菌株は BG 培地で培養し, 菌体の全タンパク質を 10-20% SDS-PAGE に供試した。

細菌学的解析: 血液由来株に特異的に認められた高分子タンパク質は質量分析により同定した。タンパク質の発現はイムブロット法により解析し, 一次抗体には BH2 株の全菌体に対するマウス抗血清 (抗 wBH2) およびマウス BipA 抗血清 (R1, R3) を用いた。bipA 遺伝子のシーケンス解析は非翻訳領域を含めた 4.8 kb について実施し, bipA mRNA は TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

臨床検体は百日咳診断を目的に国立感染症研究所・細菌第二部に搬入されたものを供試した。患者検体は医療機関において連結可能匿名化され, 患者個人が特定出来ないよう配慮した。

C. 結果

百日咳疑い患者 (計 433 名) について遺伝子検査を実施した結果, *B. holmesii* の陽性者は 0 名, 百日咳菌の陽性者は福岡県 12 名 (8.3%), 高知県 17 名 (5.9%) であった (表 1)。両県を合わせた百日咳菌陽性者は 29 名, その陽性率は 6.7% を示した。

B. holmesii の呼吸器由来株と血液由来株を比較したところ, 呼吸器由来株に特異的に発現する高分子タンパク質 (2本の蛋白バンド) を認めた (図 1)。この高分子タンパク質は抗 wBH2 抗体に強く交差するとともに, 抗 BipA 抗体にも強く交差した。この蛋白質を質量分析に供試したところ, 2本の蛋白バンドともに *Bordetella intermediated protein A* (BipA) と同定された。なお, 血液由来の BH7 株では低分子の位置に 2本のバンドが確認され, この低分子タンパク質を truncated BipA と命名した。

血液由来株において BipA 発現が認められなかった原因を考察するため, bipA 遺伝子のシーケンス解析を行った。その結果, truncated BipA が認められた BH7 株では bipA 遺伝子に 1塩基欠失 (c.1961delG) が確認された (図 2)。この遺伝子欠失は終止コドンを新たに

形成し, 不完全長の truncated BipA を産生することが示された。なお, 血液由来株 BH ATCC51541 に遺伝子変異が確認されなかったことから, bipA 転写量について検討を加えた (図 3)。その結果, BH ATCC51541 では bipA mRNA がほとんど検出されず, 負の転写調節を受けていることが判明した。

D. 考察

百日咳様患者 433 名を対象に *B. holmesii* の病原体サーベイランスを実施した。遺伝子検査において全例が陰性を示し, 2012 年の調査と同様に *B. holmesii* 感染者は確認されなかった。一方, 2012 年の百日咳菌の検査陽性率は 13.1% (64/487) であったが, 2013 年は 6.7% (29/433) と減少傾向を示した。わが国では 2008~10 年に大規模な百日咳流行が発生し, 調査開始の 2012 年以降は百日咳の非流行年であったと考えられる。米国では *B. holmesii* の菌血症患者は 2010~11 年の百日咳流行時に増加したことから (Tartof et al., Clin Infect Dis, 2014), *B. holmesii* は百日咳菌と同様に周期的に流行する可能性が示唆された。百日咳菌の流行周期は約 4 年であることから, *B. holmesii* については今後も継続的な病原体サーベイランスが必要である。

米国では百日咳流行時に *B. holmesii* による菌血症患者が増加したが, 本菌の血流感染と呼吸器感染の関係は不明である。本研究では呼吸器感染症例の増加原因を考察するため, 呼吸器由来株と血液由来株を比較し, 呼吸器由来株に特異的に発現する高分子タンパク質 BipA を同定した。菌体の表層タンパク質である BipA は高い抗原性を持つこと, さらに気管支敗血症菌の BipA は BcfA (*Bordetella colonization factor A*) と共同して菌の定着に働くことが知られている。そのため, BipA が呼吸器感染症例の増加に関与する可能性は高く, 今後 BipA に焦点を当てた研究が必要である。また, 百日咳流行時に *B. holmesii* が流行する可能性は否定出来ないため, BipA の高い抗原性を利用したワクチン開発も重要な検討課題となる。

E. 結論

百日咳類縁菌 *B. holmesii* の病原体サーベイランスを実施し, 本菌が百日咳菌と同様に周期的に流行する可

能性が示唆された。また、近年の呼吸器症例の増加に定着因子 BipA の関与が指摘された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Katsukawa C, Kushibiki C, Nishito A, Nishida R, Kuwabara N, Kawahara R, Otsuka N, Miyaji Y, Toyozumi-Ajisaka H, Kamachi K. Bronchitis caused by *Bordetella holmesii* in a child with asthma misdiagnosed as mycoplasmal infection. *J Infect Chemter*, 19:534-7, 2013.

2. 学会発表

1. *Bordetella holmesii* に対する無細胞ワクチンの開発. 山口哲矢, 鈴木英里, 大塚菜緒, 蒲地一成, 渡邊峰

雄. 第 87 回日本細菌学会総会, 平成 26 年 3 月, 東京.

2. Kamachi K. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. The 10th Japan-Taiwan Symposium on Vaccine Preventable Diseases and Vector Borne Diseases. September 12-13, 2013, Tokyo.

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得: 百日咳の血清診断法 (特願 2013-77138, 平成 25 年 4 月出願)
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

表 1. 百日咳様患者における *Bordetella holmesii* と百日咳菌の検出状況 (2013 年)

調査場所	患者数	<i>B. holmesii</i> 陽性数	百日咳菌陽性数 (%)
福岡県	145	0	12 (8.3%)
高知県	288	0	17 (5.9%)
総計	433	0	29 (6.7%)

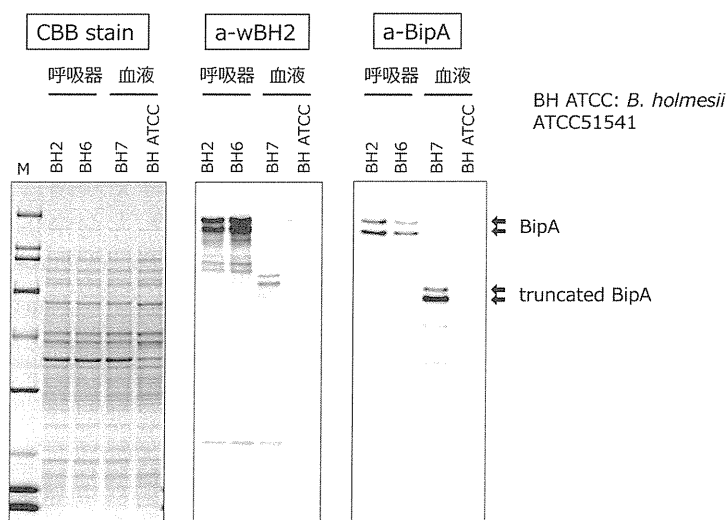


図 1. *Bordetella holmesii* の呼吸器由来株に発現する高分子タンパク質
呼吸器由来株 (BH2, BH6) と血液由来株 (BH7, BH ATCC51541) から全タンパク質を抽出し, SDS-PAGE (10-20% gradient) により分離した。呼吸器由来株に認められる 2 種類の高分子タンパク質は BipA, 血液由来の BH7 株に認められる低分子タンパク質は不完全長の truncated BipA を示した

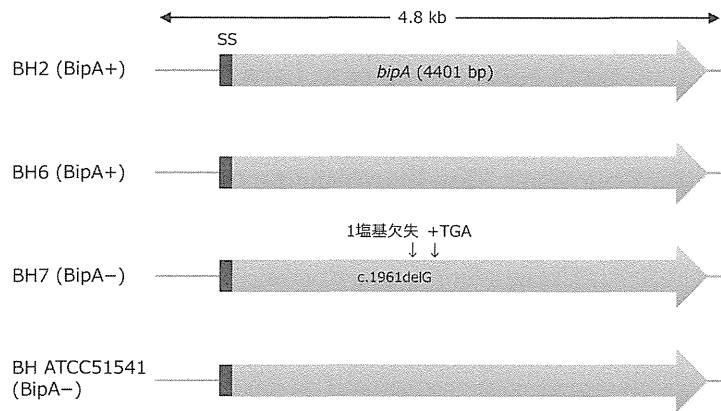


図2. *Bordetella holmesii* の血液由来株 BH7 に認められた遺伝子変異
 呼吸器由来株 (BH2, BH6) と血液由来株 (BH7, BH ATCC51541) の *bipA* 遺伝子 (4.8 kb) につ
 て, シークエンス解析を行った。その結果, BH7 株に 1 塩基欠失 (c.1961delG) による終止コドン
 の形成が認められた。一方, BH ATCC54541 株に遺伝子変異は確認されなかった

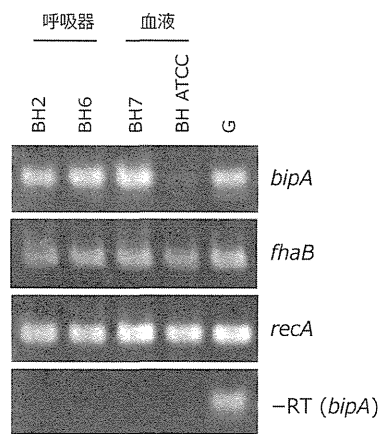


図3. *Bordetella holmesii* ATCC54541 株における *bipA* mRNA の検出
 呼吸器由来株 (BH2, BH6) と血液由来株 (BH7, BH ATCC51541) から mRNA を調製し, RT-PCR
 法により *bipA* mRNA を検出した。*fhaB* と *recA* は陽性コントロール, -RT は逆転写酵素を添加し
 ない陰性コントロール, G は BH ATCC51541 のゲノム DNA を増幅したサイズコントロールを示
 した

Genetic relationship of vector mosquitoes and the vector-borne pathogens between Taiwan and Japan

Tien-Huang Chen, Pei-Feng Wang, Cheo Lin, Chang-Lu Liang, Chien-Ling Su, Yu-Yu Chen,
Pei-Yun Shu, Hwa-Jen Teng
Centers for Disease Control, Taiwan

Summary:

The project of this year is to study the genetic relationship of vector mosquitoes and vector-borne pathogens between Taiwan and Japan to clarify the taxonomic status and gene flow of *Culex pipiens* complex by gene sequencing analysis. The results showed that *Culex pipiens* complex in Taiwan includes only 2 species, *Cx. quinquefasciatus* and *Cx. pipiens form molestus*. The former species is a predominant species in Taiwan, which were commonly found island wise. The latter species was limited distributed only in northern Taiwan, airports and harbors. It is highly likely that the *Culex pipiens* complex of other countries can invade Taiwan through the international airports or harbors. The avian *Plasmodium* lineages found in this study included two widely distributing lineages (*P. elongatum* and *P. juxtannucleare*) and lineages distributing neighboring countries; in Japan (*P. tacyi* and *P. gallinaceum*), in China (may be *P. rouxi*), and in Philippines (*P. gallinaceum*) and the species composition were different for May and October. These results supported our idea of the close genetic relationship of mosquito-borne pathogens between Taiwan and Japan, and the importance of migrating birds for introduction of novel pathogens from oversea regions. Additionally, in our study, phylogenetic analysis of E gene sequences of JEV supports the multiple introductions and maintenance of transmission cycles of GI of JEV strains in Taiwan. The lineages of the eastern coastal Asian endemic cycle and the central Asia endemic cycle suggest that GI of JEV strains were likely introduced constantly from China and Japan into Taiwan in the recent years.

Purpose:

To study the genetic relationship of vector mosquitoes and vector-borne pathogens between Taiwan and Japan can provide basic information on the risk of vector-borne infectious diseases. Understanding the epidemiological situations of the diseases and the phenotypic and genotypic characteristics of viruses and vectors contributes to the development of new strategies for control and prevention. This year was focus on the study of *Culex pipiens* complex and Japanese encephalitis viruses to understand the origin of invading of *Cx. pipiens form molestus* Forskal since 1966 and Type I of JEV of Taiwan since 2008. Additionally, avian *Plasmodium* infection on mosquitoes in Yilan was also continuing to conduct on May and October collection.

Methods:

1. Mosquito study on *Culex pipiens* complex