

## 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 徳磨 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 疾病管制局研究検験中心 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 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 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应用抗原を加え、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。

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 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)。猫犬については、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、*bcspl1* 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、神奈川県や猫犬では 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に感謝いたします。

## 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～カプトサイトファーガ・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：獵犬調査(2009-2013)

東京都一犬			
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

栃木県一犬			
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)

東京都一猫			
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	
				bcsp31	omp2ca	bcsp31	omp2ca	bcsp31	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	
				bcsp31	omp2ca	bcsp31	omp2ca	bcsp31	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				