

精製したらい菌膜タンパク抗原 Major membrane protein-I (MMP-I)と MMP-II のハンセン病患者血清との反応性を ELISA 法で確認後、精製を行った。その精製抗原を用い、台湾のハンセン病患者血清 98 検体について ELISA 試験を行った。本血清は台湾市郊外にある元ハンセン病療養所を持つ病院、楽生療養院が保存している患者血清である。特異性や感度あるいは病型、臨床症状との相関性について解析した。

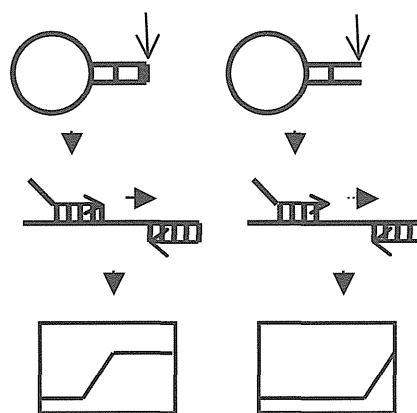
抗らい菌薬のダプソン、リファンピシシ及びオフロキサシシに対する薬剤耐性を惹起する遺伝子変異は、*folP1*, *rpoB* そして *gyrA* 遺伝子で、その耐性とかかわる遺伝子変異が集中する領域を Drug Resistance Determining Region (DRDR) と呼ぶ。台湾で得た 13 検体を用いて DRDR における変異を検出を試みた。ハンセン病患者由来の生検材料は台湾 CDC が収集し DNA 抽出を行い、その一部を分与された。DNA から各遺伝子を個別に PCR 増幅し、DRDR における変異の有無を直接シーケンスすることにより検出した。

変異と耐性の相関を明らかとする実験では、台湾サンプルで検出された *folP1* 遺伝子の変異を試験した。まず、らい菌 *folP1* 遺伝子を発現ベクターにクローニングし、*M. smegmatis* に導入した。次に *M. smegmatis* の *folP1* 遺伝子を破壊するための温度感受性ファージを作製し、らい菌 *folP1* 遺伝子導入 *M. smegmatis* にこれを作用させて、染色体上に存在する *M. smegmatis folP1* の破壊を試みた。また、らい菌 *folP1* に変異を加えたものと加えないものを使用して同様の実験を行い、得られた菌株を用いてダプソン感受性を 7H10 培地を用いて試験した。

耐性変異の迅速検出のために今回用いた方法は結核菌の薬剤耐性変異検出のために以前報告された方法で、リアルタイム PCR 法を一部改変した方法を用いている。PCR 産物である 2本鎖 DNA がサイバググリーンで蛍光標識される反応系を用い、ABI の Step One Plus を用いて測定を行った。Forward Primer はそれ自身が構造的にヘアピンを形成するような配列にするのが特徴である。Reverse Primer は通常の PCR に使用するような配列にする。Forward Primer の 3'末端の塩基が変異の有無

を調べる標的部にくるように設計する。その標的部位の塩基が 4種の塩基 G, A, T, C のいずれかを知るために、その 3'末端が異なる 4つの塩基となる 4つの Forward Primer を作成する。ここでは本法を Hp-rPCR (Hairpin primer real time PCR) 法と呼ぶ (図 1)。それぞれを Reverse Primer と PCR を行い、いずれとの PCR がもっとも効率良く PCR 産物を産生するかを見ることでサンプルの持つその標的部位の塩基を決定し変異の有無を判定するものである。

図 1 Hp-rPCR(Hairpin-primer realtime PCR)法



(倫理面への配慮)

本研究は動物実験を含まない。分担研究、共同研究者の所属する両施設の倫理委員会の承認を得て行った。検体の採取は通常の菌検査において実施される方法であり、その方法は特段の侵襲性を有するものではなく、菌の解析は患者のプライバシーには抵触しない。患者に対しては目的を説明し、同意が得られた場合にのみ検体の採取を実施した。

C. 研究結果

台湾のハンセン病患者由来血清サンプル 98 検体の ELISA を 3種の抗原を用いて行った。

カットオフ値は我々が保存している陽性血清コントロールの値の 10%とし、それ以上の値を示すものを陽性とした。その結果、表 1 のように従来法で用いられる抗原 PGL-I で 62%陽性であるのに対し、MMP-II で 87%と高

い陽性率を示した。また、新しく調整した抗原 MMP-I では 91%と最も高い陽性率を示した。

表 1

Antigen	No. of positive	No of sera	Positive rate
PGL-I	61	98	62%
MMP-II	85	98	87%
MMP-I	89	98	91%

台湾で採取及び DNA 抽出された 13 検体について薬剤耐性変異を調べた。これまでに、ダブソン耐性をもたらすことが知られている *folP1* 遺伝子のコドン 53 位と 55 位、リファンピシン耐性の *rpoB* 遺伝子 4 カ所 (441 位、451 位、456 位、458 位) 及びキノロン耐性の *gyrA* 遺伝子 2 カ所 (89 位、91 位) の変異の有無を検出した。

表 2

Sample	Type	<i>folP1</i>	<i>rpoB</i>	<i>gyrA</i>
NTU001	MB	wt	wt	wt
NTU002	MB	wt	wt	wt
NTU003	MB	wt	wt	wt
NTU004	MB	T53R★	wt	wt
NTU006	MB	NA	NA	NR
NTU007	MB	wt	NA	NA
NTU011	MB	wt	NA	NA
NTU012	PB	T53I	wt	NA
NTU013	PB	wt	wt	NR

★T53R: *folP1* 遺伝子の 53 位トレオニンがアルギニンに変異

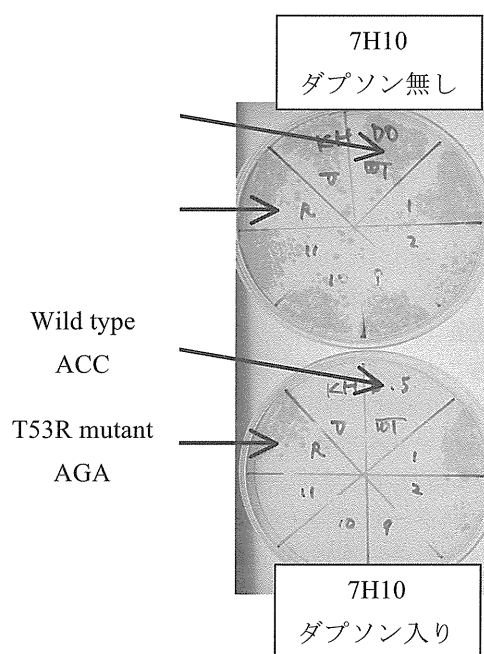
NA: not amplify, NR: could not read

13 検体を用い、9 検体の結果を得た (表 2)。NTU004 は *folP1* 遺伝子の 53 位のアミノ酸トレオニンに変異がありアルギニンとなり、そのコドンは ACC から AGA に 2 塩基に変異が生じた。この変異によってダブソン耐性をもたらすことが推察された。他は変異が認められず、各薬剤に対して感受性であることがわかった。NTU012 の変異は再現性がなく、次の実験では対象外とした。

folP1 遺伝子の 53 位が ACC の wild タイプと AGA の NTU004 タイプの遺伝子を作成し、*M. smegmatis* の染色体に挿入し、*M. smegmatis* が自然に持っている *folP* 遺伝子を破壊した。得られた *M. smegmatis* で、53 位が wild タイプのらい菌 *folP1* 遺伝子持つ菌 (Wild type ACC)

と NTU004 タイプを持つ菌 (T53R mutant AGA) の増殖をダブソン入り培地及び薬剤無しの培地での増殖の違いを検討した結果、図 2 で見られるように、薬剤の入った 7H10 培地でも T53R mutant AGA は増殖できることを確認した。すなわち NTU004 で見られた変異が明らかにダブソン耐性をもたらすことが示された。

図 2. 組換え *M. smegmatis* を用いた薬剤感受性試験



薬剤耐性変異の多数迅速同時検出において図 3 は Zensho-2 の *folP1* 遺伝子 55 位コドンの 2 番目の塩基を標的とした Hp-rPCR 法を示した。Forward プライマーの 3'末端が T のプライマーの Ct 値が最も小さいことから Zensho-2 の *folP1* 遺伝子 55 位のコドンは CTC であり、ダブソン耐性変異であることが確認できた。同様に Thai-53 を用いて行った *folP1* 遺伝子 3 カ所の結果は 53 位の 1 番目の塩基は A、2 番目は C、そして 55 位の 2 番目が C であり、確かに感受性菌での配列であることが確認できた。*rpoB* 及び *gyrA* の結果は示していないが、いずれも本法により標的部位の塩基の判定ができた。

次に前述の表 2 にあるように耐性変異を示した NTU004 を用い、本法を試みた。最初は

[53I-T

A

28

[53I-G

G

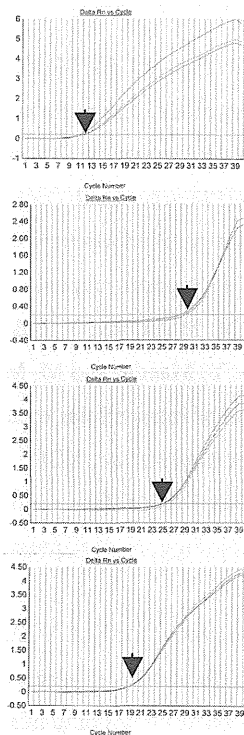
25

C

19

臨床検体から得た DNA であることから非常に DNA が少なくクリアな結果が得られなかったため、マルチプレックス PCR 法を行い、その後 Hp-rPCR 法を行うこととした。その結果、クリアな結果を得ることができた。NTU004 は *folP1* 遺伝子の 53 位のアミノ酸トレオニンに変異がありアルギニンとなり、そのコドンは ACC から AGA に 2 塩基に変異が生じていたことはこれまでに確認されている。この変異によってダプソン耐性をもたらすことが推察された。

図 3. *folP1* 遺伝子 55 位のコドン 2 番目の塩基 C の変異を持つらい菌 Zensho-2



数字は Ct 値

D. 考察

血清診断試験では、従来法に使用する PGL-I での値に比べ MMP-II はより高い陽性率であり、他の東南アジア諸国で得られた結果とほぼ同様であった。血清の少菌型、多菌型の区別がわからないので従来法より少菌型が高い値を示したかどうかはまだ判定できないが、いい結果が期待できるだろう。MMP-II よりいい結果を MMP-I が示したことは大変興味深く、また期待もできそうであるが、結核患者や健常人のデータを揃え特異度を検討し、今

後正確な評価をする必要がある。

13 検体中、明らかなダプソン耐性変異が NTU004 で検出された。このトレオニンからアルギニンへの変異はコドンの ACC が AGA に変わる変異であった。同じコドンにおいても耐性変異が 1 塩基変異で生じている例と今回のように 2 つの塩基が変化している例があることからそれらの違いが耐性の度合いに影響する可能性も示唆され、大変興味深い結果であった。また、患者データからも NTU004 は多菌型患者であり、臨床的にも薬剤耐性が疑われた例であることが台湾 CDC からの情報でわかり、この変異検出の有用性をお互いに再認識することができた。

Hp-rPCR 法が標的である 9 カ所の変異の有無を確実に判定できることを、コントロールの菌においても臨床由来の菌においても可能であることが明らかとなった。DNA 回収が非常に悪いことが多い臨床検体においてもマルチプレックス PCR 法との併用により非常に高感度に判定することができた。マルチプレックス PCR 法と Hp-rPCR 法を併用した場合に要した時間は DNA 抽出から判定までで、約 5 時間であり、迅速性についても良好な結果だったと考えられる。NTU004 の持つ ACC から AGA の変異はトレオニンからアルギニンの変異であるが、Hp-rPCR 法で判定されるのは 2 番目の C が G であっただけであることから、ACC から AGC への変異の可能性もあり、その場合アミノ酸の変異はトレオニンからセリンへの変異になる。この場合の変異と耐性の関係は証明されていないので、厳密には判定に間違いを冒す可能性があることになる。これは今後の課題である。

E. 結論

台湾ハンセン病患者血清を用い、血清診断法の評価を行った結果、従来法で用いている PGL-I 抗原での結果よりも MMP-II 及び MMP-I でより好成績を得た。今後、健常人及びらい菌と同じ抗酸菌である結核菌による感染で生じる結核患者の血清を用いて、本法のハンセン病血清診断法としての特異度・感度を測定する予定である。

薬剤耐性変異の検出では 13 例中 9 例の結果を得ることができ、得られた変異が確かに

耐性と相関していることが証明できた。

H_p-rPCR 法をらい菌の耐性変異検出のために利用することが可能であることが証明出来た。マルチプレックス PCR 法との併用で迅速・簡便に多数標的箇所の同時判定ができた。

上記、結果を台湾のパートナーと共有し、使用した様々な技術に関しても共有することができた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Khin S. A., Matsuoka M, Kai M., Kyaw K., Win A. A., Shwe M. M., Thein M., Htoo M. M., & Htoon M. T. FTA Card Utility for PCR Detection of *Mycobacterium leprae*. Jpn J Infect Dis. Vol. 64: 246-248, 2011.
- 2) Nakata N., Kai M., Makino M. Amino acid substitutions at position 95 in GyrA can add fluoroquinolone resistance to *Mycobacterium leprae*. Antimicrobial Agent Chemother. Doi:10.1128/AAC. 05831-11, 2012
- 3) Li W., Matsuoka M., Kai M., Thapa P., Khadge S., Hagge D. A., Brennan P. J., Vissa V. Real-time PCR and high resolution melt analysis for rapid detection of *Mycobacterium leprae* drug resistance mutations and strain types. J Clin Microbiol. Vol. 50: 742-753, 2011
- 4) Kai M., Nakata N, Matsuoka M, Sekizuka T, Kuroda M, Makino M. Characteristic mutations found in the ML0411 gene of *Mycobacterium leprae* isolated in Northeast Asian countries. Infection, Genetics and Evolution Vol. 19, 200-204, 2013.
- 5) 甲斐雅規. H_p-rPCR 法を用いたらい菌薬剤耐性変異の検出. 日本ハンセン病学会雑誌. 2014 年 (in press)

2. 学会発表

- 1) 甲斐雅規, 松岡正典, 宮本友司, 中田登, 牧野正彦: 増殖能の異なるらい菌株間のゲノム比較解析. 第 83 回日本ハンセン病学会総会, 岡山市, 2011 年 5 月
- 2) Amako, K., K. Iida, M. Kai, M. Matsuoka, and S. Yoshida. *In vitro* cultivation of *Mycobacterium leprae* in microaerophilic or

anaerobic conditions. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.

- 3) Kai, M., H. Yamada, N. Fujiwara, S. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, N. Nakata, and M. Makino. Establishment and characterization of knockout mutants of *Mycobacterium bovis* BCG gene involved in mycolic acid synthesis pathway. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 4) Nakata, N., M. Matsuoka, M. Makino, and M. Kai. Whole genome comparison of *Mycobacterium leprae* strains differing in growth rate. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 5) Miyamoto, Y., M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Characterization of intracellular metabolites from *Mycobacterium leprae*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 6) Maeda, Y., T. Tamura, M. Kai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Induction of intracellular killing of *Mycobacterium leprae* in human dendritic cells by a lipopeptide-mediated activation of T cells. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 7) Tsukamoto, Y., E. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai, and M. Makino. Activation of human naïve T cells of both CD4 and CD8 subsets by *Mycobacterium tuberculosis* major membrane protein II. XIII International Congress of Bacteriology

- and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 8) Nakata, N., M. Kai, and M. Makino. Mutation analysis of the *Mycobacterium leprae* *rpoB* gene and rifampicin resistance. 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 17-20 September, 2011, Chicago, USA.
 - 9) Miyamoto, Y., M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Metabolome analysis of mycobacteria. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
 - 10) Kai, M., H. Yamada, N. Fujiwara, S. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, I. Yano, and M. Makino. Functional analysis of *mmaA2* and *mmaA4* in *Mycobacterium bovis* BCG Connaught. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
 - 11) 甲斐雅規、中田登、松岡正典、関塚剛史、黒田 誠、牧野正彦：らい菌 Kyoto-2 株の全ゲノムシーケンスにより同定された SNPs の解析。第 85 回日本ハンセン病学会総会、札幌市、2012 年 6 月
 - 12) M. Kai, Y. Maeda, M. Makino. Molecular Studies on *M. leprae* and Ser-diagnosis of Leprosy. The 9th Taiwan-Japan Symposium on Preparedness, Surveillance and Response to New Emerging, Re-emerging Infectious Diseases and Infectious Diseases Associated with Disaster. Taipei, Sep. 20-21. 2012.
 - 13) P. S. Rosa, S. M. Diório, A. F. F. Belone, I. M.F.D. Baptista, P. N. Suffys, L. R V Fachin, L. M. Trino, B. G. C. Sartori, L. R. De Lamano, M. I. de Araujo, W. F. B. Delanina, F. B. Marques, S. Ura, C. T. Soares, M. B. Xavier, M. T. Mira, M. O. Moraes, M. Matsuoka, M. Kai, M. C. L. Virmond. Evidence of active transmission of drug resistant *Mycobacterium leprae* strain in Brazil. 18th International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
 - 14) Y. Miyamoto, M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Metabolome analysis of *Mycobacterium leprae*. 18th International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
 - 15) N. Nakata, M. Kai, and M. Makino. Mutation analysis of *Mycobacterium leprae* genes and drug resistance using cultivable mycobacteria. 18th International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
 - 16) Kai M, N. Nakata^a, G. T. Chae^b, P. Saunderson^c, A. A. Maghanoy^c, M. F. Balagon^c, M. Matsuoka^a, T. Sekizuka^d, M. Kuroda^d, and M. Makino. Characteristic SNPs in *Mycobacterium leprae* isolated in Japan. 18th International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
 - 17) 天児和暢、飯田健一郎、斉藤光正、甲斐雅規、松岡正典、吉田真一：ライ菌の培養、マウス組織抽出物・ヒト血漿の効果。第 86 回日本ハンセン病学会総会、大宮市、2013 年 5 月
 - 18) 宮本友司、松岡正典、福富康夫、向井 徹、甲斐雅規、前田百美、牧野正彦：*Mycobacterium leprae* のメタボローム解析。第 86 回日本ハンセン病学会総会、大宮市、2013 年 5 月
 - 19) 中田登、甲斐雅規：培養可能抗酸菌を用いたらい菌薬剤耐性変異解析法のフルオロキノロン耐性変異解析への応用。第 86 回日本ハンセン病学会総会、大宮市、2013 年 5 月
 - 20) 甲斐雅規、中田登、松岡正典、関塚剛史、黒田 誠、牧野正彦：SNPs の解析により

示されたらい菌日本株ゲノムの特徴。第 86
回日本ハンセン病学会総会、大宮市、2013
年 5 月

- 21) M. Kai, Y. Maeda, M. Makino. Molecular
detection of drug resistant *M. leprae* and
genotyping of *M. leprae*. The 10th Japan-
Taiwan Symposium on Vaccine Preventable
Diseases and Vector-Borne Diseases &
Cooperative Project Reports. Tokyo, Sep.
12-13. 2013

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 著書

- 1) 著者名 Kai M. 編集・分担執筆

Edited by Makino, M., M. Matsuoka,
M. Gotoh, and K. Hatano.

書名 Leprosy chapter 9 Serology.

Tokai University Press, Kanagawa,

Japan Total page 274 (partial page

108-115) 2011

厚生労働科学研究費 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と

共同研究体制の強化に関する研究 (H23-新興-指定-020)

下痢症ウイルスの高感度検出法の確立と分子疫学に関する共同研究

分担研究者 片山 和彦 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究協力者 朴 英斌 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究協力者 戸高 玲子 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨： ノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) は、非細菌性胃腸炎の原因ウイルスである。NoV, SaV には、それぞれ抗原性の異なる 30 種類以上の genotype が存在しており、宿主免疫機構から逃れた genotype が、新たな流行を起こすと考えられている。Genotype の変遷を経時的、地域別に追跡し、分子疫学的解析を行うことは、流行メカニズムを解明する上で重要である。本研究では、台湾 CDC (TCDC) と、両国における 2010 年以降 2012 年度末までの 3 年間で得られた NoV 陽性を呈した臨床検体を用いて、初年度：簡便かつ高精度なウイルス genome 検出法の検討、評価、次年度：実検体の解析、最終年度：Universal RT-PCR system によるノロウイルスサイエンティフィックコミッティー推奨法に適合した genotyping と、NoV の固体内進化の解析を行った。

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) は、非細菌性胃腸炎の原因ウイルスである。NoV, SaV には、それぞれ抗原性の異なる 30 種類以上の genotype が存在しており、宿主免疫機構から逃れた genotype が、毎年新たな流行を繰り返すと考えられている。Genotype の全世界的変遷を経時的、地域別に追跡し、分子疫学的解析を行うことは、両ウイルスの流行メカニズムを解明する上で重要である。本研究では、台湾 CDC と、両

国における 2010 年以降 2012 年度末まで、3 年間、両ウイルスの流行状況、流行株の変遷を経時的に解析し、ウイルス流行のメカニズムを研究することに取り組んだ。また、簡便かつ高精度なウイルス genome 検出法と、分子疫学解析手法の開発も開始した。本研究のカウンターパートは、TCDC: Director, Research & Diagnostic Center Director, National Influenza Center Centers for Disease Control, DOH, Taiwan, Ho-Sheng Wu, Ph. D. (吳 和生), Head, Viral Enteric

& Emerging Disease Lab Research & Diagnostic Center, Fang-Tzy Wu, Ms. (吳芳姿) の2名である。

具体的には、新規迅速診断システムとして、Super rapid real-time RT-PCR, multiplex RT-PCR, long distance RT-PCRの構築、ELISA, イムノクロマトグラフィー (IC) を用いた抗原検出システムの評価、応用、NoV, SaVのキメラに対応した新規genotyping system構築と評価を行う。疫学調査として、台湾における流行の把握、genotype, 流行の経時的变化を日本と比較検討する。これらの検討を、TCDC職員を長期研修として感染研に受け入れ、技術の共同開発、共同研究を行う。

B. 研究方法

1. 材料と方法

<NoV 陽性検体>

TCDCによって2010年から2011年にかけて収集された、ウイルス性下痢症患者検体をNoV, SaVのコンベンショナルなRT-PCR (Kojima et al. JVM, 2002. NoV: G1SKF & R, G2SKF & R, SaV Okada et al primer sets) によって検査し、NoV 陽性を呈した糞便検体169検体を用いた。

また、埼玉県衛生研究所によって検査された、1990年から2000年にかけて埼玉県近傍で発生した集団食中毒事例の糞便検体132検体を新手法の評価用レファレンスNoV 陽性糞便パネルとして用いた。これらの検体は、埼玉県衛生研究所より国立感染症研究所ウイルス第二部第一室が分与を受け、すべてのgenotypeの約90%をカバー

する糞便レファレンスパネルとして管理運用している。

NoVの固体内進化を調べるため、NoV感染患者A-Pの15名から経時的にサンプリングされた便検体を、次世代シーケンスシステム: NGS (イルミナMiSeq) による解析に用いた。

<コンベンショナル RT-PCR>

NoVの検出には、Kojima et al. JVM, 2002. によって報告されたG1SKF & R, G2SKF & Rプライマーセットを用いたRT-PCRを行った。

<Real-time RT-PCR>

NoVのRNAゲノム定量には、Kageyama et al. JCM, 2004 によって報告され、現在も世界のゴールドスタンダードとして位置づけられているCOG primer setとRING probeを用いたreal-time RT-PCRを用いた。本方法で得られたRNA定量値を基準として、Super rapid RT-PCR, BLEIAを評価した。

<Universal primer RT-PCR>

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を行うため、本タイピングに必要とする領域を増幅可能な全てのNoVに適合した第3世代Universal primer setをデザインした。HuNoV全長塩基配列のアライメントを用いて、高度に保存された領域を検索し、ORF1にコードされたプロテアーゼ切断モチーフ付近に、新規Universal primer set (Uni3KY primers) を設計した。設計した新規 primer set と、Takara PrimeStar GXL を用いて約4.5 kbのlong

distance RT-PCR を実施し、PCR amplicons が得られなかった場合、UnikY primers を用いた nested PCR を実施した。1st step RT-PCR amplicon, 2nd step amplicon 共に、完全長の polymerase region (RdRp) から Capsid N/S region をカバーし、ORF2 (VP1) 全長をカバーする。

<塩基配列解析>

NoV の塩基配列解析は、RT-PCR で得られた PCR アンプリコンを鋳型としたダイレクトシーケンスとプライマーウォーキングによって行った。ゲノム量末端の塩基配列解析は、5' RACE および 3' RACE を用いて決定した。

<NGS による塩基配列解析>

便検体から抽出した RNA より、NEB 社の NEBnext Ultra キットを用いて、cDNA ライブラリーを調整し、MiSeq に用いた。得られた塩基配列は、CLC 社 Genomics work bench によって De Novo assemble および standard sequence に対する Mapping を行い NoV genome 上の核酸変異、アミノ酸変異を検出した。

<分子系統解析>

得られた NoV ゲノムシーケンスは、Clustal W version 1.8 でアライメントし、kimura の 2 パラメーターによって genetic distance を算出した。その後、NJ 法によって分子系統樹を作成し、解析した。

C. 研究結果

1. Super rapid RT-PCR は、10%糞便乳剤からの RNA 抽出が、試薬添加と 1min

の加熱だけで修了する。これに加え、逆転写反応、PCR まで、試薬を加えることで実施可能であった。従来法では、RNA の抽出操作に約 1 時間半の操作が必要であったが、本法では、試薬準備時間も含め、約 10 分で実施可能であった。

2. レファレンス 132 検体は、すべてコンベンショナルな RT-PCR を施行し、得られた PCR 産物を用いて、塩基配列を決定後、genotyping が明らかにされた NoV 陽性検体である。その内訳は、GI 単独感染 16 検体、GII 単独感染 78 検体、GI, GII の混合感染 37 検体であった。これらの値を基準に、Super rapid RT-PCR の陽性率を検討したところ、GI 単独感染検体に対する陽性率は、14/16 (87.5%)、GII 単独感染検体に対する陽性率は、67/79 (85.9%)、混合感染検体の陽性率は、32/37 (86.5%) であった。検出不能であった検体の genotype に特筆すべき特徴はなかった。
3. TCDC の検体 169 検体の内訳は、GI 単独感染 39 検体、GII 単独感染 123 検体、GI, GII 混合感染 7 検体であった。これを基準に Super rapid RT-PCR の陽性率を検討したところ、GI 単独感染検体に対する陽性率は、7/39 (18%) と極めて低かった。陰性を示した検体は、そのほとんどが 10⁴ copies /uL を示した。GII 単独感染検体に対する陽性率は、93/123 (75.6%) であったが、

結果 2 に示したレファレンスパネル試験で示した 85.9% に比較して、約 10% 程度低い値を示した。混合感染検体の陽性率は、0/7 (0%) であった。

4. レファレンス 132 検体は、すべてコンベンショナルな RT-PCR を施行し、得られた PCR 産物を用いて、塩基配列を決定後、genotyping が明らかにされた NoV 陽性検体である。その内訳は、GI 単独感染 18 検体、GII 単独感染 76 検体、GI, GII の混合感染 38 検体であった。これらの値を基準に、Super rapid RT-PCR の陽性率を検討したところ、GI 単独感染検体に対する陽性率は、17/18 (94.4%)、GII 単独感染検体に対する陽性率は、72/76 (94.7%)、混合感染検体の陽性率は、GI 18/38 (47.4%)、GII 37/38 (97.4%) であった。
5. TCDC の GI 陽性サンプルを除き、他の全てのサンプルにおいて、Super rapid RT-PCR と BLEIA は良い相関関係を示した。BLEIA の定量値である COI は、ELISA における OD value に相当する。Standard real-time RT-PCR と BLEIA の COI の相関関係は 1 に近く、非常に強い相関関係が認められた。
6. NoV 陽性糞便レファレンスパネル検体を用いた比較検討において、全ての genotype を検出可能で有り、全ての genotype において、その COI は RNA titer と強い相関関係を保っていた。
7. TCDC より持ち込まれた GII.4 の 2011/12 シーズンの流行株 4 株の全塩基配列を決定したところ、TCDC#5, 6 は 2012 年に日本で大規模な流行を示した GII.4 2012 変異株と同じクラスターに属することが明らかになった。しかし、TCDC#8, 9 は互いに 100% 同じ配列を有しており、さらに GII.4 2008 クラスタに属していた。2012/13 シーズンにおいて台湾では GII.4 2012 年変異株と従来の変異株の混合流行が認められた。この傾向は、2012 年変異株が流行の 9 割を占める日本、ヨーロッパ、USA と異なる傾向であり、GII.4 のバリエーションの流行は、日本よりも遅れる傾向にあることが明らかになった。
8. Super rapid RT-PCR で検出可能であった検体は、Universal primer RT-PCR 検出系で 100% 検出可能であった。つまり、Super rapid RT-PCR にて陽性を示した検体は、Universal primer RT-PCR で増幅し、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 が可能であることが明らかとなった。
9. NoV 陽性糞便レファレンスパネル検体を用いた比較検討において、Universal 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。
10. 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 に向け、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	Amino acid	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 sequence 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

従来のコンベンショナルな RT-PCR 法に変わる Super rapid RT-PCR を確立し、簡便かつ高感度に NoV, SaV の分子疫学に用いることのできる検出法を開発、構築した。本検出法の感度は、1990 年代にサンプリングされた GI, GII レファレンス検体を用いた場合、両者ともに 85%以上を示し、十分な感度を有していた。テストあたりに含まれる 10%糞便懸濁液量は、コンベンショナル RT-PCR が 1.7 μ L であるのに対し、Super rapid 法は、1 μ L と、約 40%持ち込む NoV RNA 量が異なると思われる。この条件下で、15%の感度低下にとどまっていたのは、評価に値する。

2010 年から 2011 年に台湾でサンプリングされた検体で比較検討した場合、GI の検出率が極めて低い値を示した。レファレンスには、多種多様な GI genotype が認められるとともに、多様な GI genotype の混合感染も認められた。しかし、2010 年から 2011 年にサンプリングされた台湾 CDC の検体では、GI.1, GI.4, GI.8 などの単一 genotype の感染事例であった。

Super rapid RT-PCR は、抽出操作が簡便で、操作性が高く大規模なスクリーニングには、適していると思われる。しかし、増幅領域がコンベンショナルな RT-PCR とは異なる、COG primer set のターゲット領域 (ORF1-2 ジャンクション領域) であり、genotyping を行うには、陽性検体について、改めてコンベンショナルな RT-PCR を施行し、PCR 増幅産物を得て、塩基配列を決定

する必要がある。また、検出感度においても、改良が必要である。

RNA titer が 10^4 copies/uL と低値を示したことから、Super rapid RT-PCR は、 10^5 copies/uL 以下の検体は検出が困難であると考えられた。しかし、Super rapid RT-PCR は、抽出操作が簡便で、操作性が高く、大規模なスクリーニングを施行し、素早く結果を得るなど、迅速な NoV 流行解析に適していると思われる。

TCDC の GII.4 変異株解析の結果、日本や Europe, USA で観察された GII.4 2012 年変異株の流行は、まだ始まったばかりで有り、従来型 2008 年変異株と勢力を分かち状態である事が明らかになった。台湾での NoV 流行は、日本、Europe, USA, Australia よりも遅れて始まる事が示唆された。

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

研究分担者 今岡 浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 第1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 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 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。世界では日本や台湾など一部の国を除いて、多くの国々で家畜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。

1) 日本では、現在、家畜における家畜ブルセラ菌感染は清浄化しており、同菌に感染する患者も輸入患者に限られている。台湾においても感染家畜の報告はなく、また、患者も過去33年間報告されていなかったが、2011年初めに輸入患者2例が報告された。

そこで、2011年度は、日台における共同研究の端緒として、台湾CDCにおけるブルセラ症検査体制構築のために、抗体検出法として日本で標準的に用いられている試験管内凝集反応 (TAT) と我々の作成したマイクロプレート凝集反応 (MAT) を、遺伝子検出法として同じく我々の作成した Combinatorial PCR 法を移転し、診断技術の共有を行った。また、本方法を用いて、技術移転時にすでに報告されていた3例の輸入患者の同定を行った。さらに、その後、本方法により新たに2名の患者が台湾CDCにおいて同定された。

2) 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、2012年度からは、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し、比較を行った。*B. canis* に対する抗体は、国内のイヌでは、2,318頭中115頭 (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った。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、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経路となっている可能性を検討するため、膀胱尿、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。尿が感染源となる可能性が示唆された。

本研究を通じて、台湾 CDC への技術移転が良好に行われ、台湾 CDC でブルセラ症の検査が可能となったこと、また台湾 CDC においてブルセラ病診断用菌液等を日本より入手するルートが構築できたことにより、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。台湾 CDC におけるブルセラ症の検査診断体制の構築、患者診断および感染症対策構築に寄与した。

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り、日本では感染症法によって4類感染症（全数把握）に指定されている。人に感染するものは病原性の強い順に *Brucella melitensis*、*B. suis*、*B. abortus*、*B. canis* があるが、このうち前3つはすべて家畜が自然宿主となっている。

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、国内の家畜から感染するリスクはない。そのため、ブルセラ症が4類感染症に指定された1999年4月1日以降の感染者7例はすべて輸入感染例である（表1）。その内訳は、*B. melitensis* 感染が5例、*B. abortus* 感染が2例で、最初の2例を除き残りの5例はすべて外国人であり、それぞれの母国で感染し日本国内で発症・診断されている。一方、*B. canis* はイヌを自然宿主とし、現在も国内の、3~5%のイヌが感染歴を持つと考えられている。ごくまれに人にも感染することもあり、国内では、*B. canis* 感染患者13例が届け出られている（表2）。

一方、台湾では、1987年に最後の感染例（実験室感染）が報告されて以降、患者の報告はなかった。台湾国内の家畜でもブルセラ菌感染報告はなく、状況としては日本と非常に似通っている。ところが、台湾CDCにおいて、ブルセラ症の診断方法を確立すべく、我々と共同研究を行うこととなっていた矢先の、2011年5月に、2例の輸入患者（北アフリカ、マ

レーシア）が報告され、7月にさらに1例、マレーシアからの輸入患者が報告された。そこで、2011年度は、日本において実施している検査診断法について、必要な抗原、陽性抗体、遺伝子検査用プライマー他を持参して台湾CDCに赴き、台湾で見つかった患者検体を用いた検証や、同技術の台湾CDCへの移転を行った。

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、さらに、報告されていない物も多々あると考えられている。台湾でも、2001年に、イヌの *B. canis* 感染に関する論文報告がある。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、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. 供試検体： 台湾において確認された3名の患者 (No.1~3) および、感染疑いの者1名 (No.4) の血清。合計4検体。

2. 試験管凝集反応 (TAT) による抗ブルセラ抗体の検出： 家畜ブルセラ菌に対する抗体を測定するための TAT は、*B. abortus* 凝集反应用菌液 (農業・食品産業技術総合研究機構) を用い、添付のプロトコールに従い実施した。すなわち血清サンプルを5倍から2倍段階希釈し、凝集反应用菌液を等量加え、37°C、18~24時間感作後、サンプルの最終希釈倍数1:40以上で50%以上の凝集を示すものを陽性と判定した。イヌブルセラ菌に対する抗体は、*B. canis* 凝集反应用菌液 (北里研究所) を用いた。すなわち血清サンプルを10倍から2倍段階希釈し、凝集反应用菌液を等量加え、50°C、24時間感作後、サンプルの最終希釈倍数1:160以上で50%以上の凝集を示すものを陽性と判定した。

3. マイクロプレート凝集反応 (MAT)： 家畜ブルセラ菌に対する抗体を測定するための MAT は、*B. abortus* 凝集反应用菌液と0.25%サフラニン染色液を50:1の比率で混合し、抗原とした。96穴U底プレートを用い、サンプルをフェノール加生理食塩水で5倍から2倍段階希釈し、同量の凝集反应用抗原を混合・攪拌し、37°C、18~24時間感作後、凝集反応を判定した。抗イヌブルセラ菌抗体については、*B. canis* 凝集反应用菌液を同様に用いたが、サンプルはリン酸緩衝生理食塩水で10倍から2倍段階希釈し、同量の凝集反应用抗原を混合・攪拌し、50°C、24時間感作後、凝集反応を判定した。肉眼で凝集像が確認されたものを陽性と判定した。

4. Combinatorial PCRによるブルセラ遺伝子の検出： このPCRでは、4セットのプライマーによる増幅パターンの違いにより、ヒトに感染しうる主要4菌種を鑑別することが可能である。ただ、台湾 CDC の

保有する患者血清の量が少なく、DNAを抽出し検査するのは困難なため、各種ブルセラ菌抽出陽性対照コントロールDNA等を用いて、台湾CDCに遺伝子検査法を実際に実施・検証してもらうこととした。

5. イヌ血液サンプル： 2007年から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については2012年度の65頭ほか2002~2005年度の検体を含めて603頭の実績を検討に用いた。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頭の実績を検討に用いた。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。

6. 膀胱尿及びスワブの採取： 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。

7. 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 (ロシュ) 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. 試験管凝集反応 (TAT) による抗ブルセラ抗体の検出: *B. abortus* を抗原として用いた場合、No.1~3の検体はそれぞれ、1:160 以上を示し、陽性であった。No.4は 1:10 未満で陰性となった。図1)には、抗原 *B. abortus*、血清希釈 1:40 の結果を示している。一方、*B. canis* を抗原に用いた場合は、いずれの検体も 1:160 未満の陰性であった。No.1~3 はいずれも確かに家畜ブルセラ菌に感染していることが確認された。また、No.4 は現時点では感染していないことがわかった。

2. マイクロプレート凝集反応 (MAT): 当初、総反応液量 50ul の系で実施したが、視認性がやや悪かったため、100ul にして追試験を実施した。*B. abortus* を抗原として用いた場合、No.1~3 の検体はそれぞれ、1:160、1:320、1:160 を示し、陽性であった。No.4 は 1:10 未満で陰性となった (図2)。一方、*B. canis* を抗原に用いた場合は、1:80、1:40、1:80、1:20 未満と、いずれの検体も 1:160 未満の陰性であった。以上の結果より、No.1~3 はいずれも確かに家畜ブルセラ菌に感染していることが確認された。また、No.4 では感染は確認されなかった。*B. melitensis* 感染の場合は、*B. canis* に対しても (陽性までとはいかないまでも) 反応性を示すことがある。このことから、本 No.1~3 の患者は、*B. melitensis* 感染と思われた。

3. Combinatorial PCR によるブルセラ遺伝子の検出: 予定される通りの結果が得られたので、問題なく我々の方法は、台湾でも実施可能で、PCR によるブルセラ特異的遺伝子検出法の共有は完了した。

4. 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った。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、4)。

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)。

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%) が抗体陽性であった (表4)。

5. 台湾のイヌにおける抗体保有状況: MAT 法で愛護センターのイヌのうち 63 検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。

6. 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3)。それ以外にも、*bcsp31* のみ陽性の検体も散見された。

D&E. 考察・結論

今回、日本で用いられている抗体検査法及び遺伝子検出法について、それぞれ日本から抗原、陽性対照血清等を持参し、台湾 CDC と検査法の共有を行った。その検査法の検証は、まず我々がデモンストレーションを行い、その後、台湾 CDC 担当者がこれを再試する形式で、実際に台湾で確認された患者サンプルを用いて行った。日本国内と同様に台湾でも有効な検査法であることが明らかとなった。日本では、感染症法における届出基準による検査法として TAT が記されていることと、民間の臨床検査機関でも TAT が保険適用下で実施されていることから、TAT が、患者診断に主として用いられている。しかしながら、TAT は使用する抗原や抗体の量が多く、また溶血の影響を受けやすいことが知られている。一方、台湾ではブルセラ症に対する検査法が規定されておらず、今回の結果も良好であったことから、

100ul 系の MAT を使用するよう、台湾 CDC に対して提案した。移転後 (9、10 月)、本検査法を用いて、4 例目の患者 (3 例目と同一地域・マレーシアへの渡航歴あり) および 5 例目の患者 (中国への渡航歴あり) が、確定診断された (表 5)。このことから、本検査法の有用性と台湾 CDC への技術移転が良好に行われたことがわかった。また、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 (表 6)。

ブルセラ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の情報が、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、徐々に実施さ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へ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、検査頭数は少ないものの、陽性率 1.6%と、日本よりも低くなっていた。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、その抗体保有率が本当に低下しているのかどうか、興味深い点である。台湾では、日本と同じく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る。そのため、今後も家畜ブルセラ菌感染患者は輸入感染者であると思われる。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る。

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、東京都動物愛護相談センター城南島出張所の皆様、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深謝いたします。

F. 健康危険情報

なし。

G. 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.niid.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

(7) 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

(8) 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. Brucellosis in Japan. 8th Japan-Taiwan Symposium on Antibiotics resistance and Foodborne Disease, Tokyo, Oct. 12-14, 2011

(2) Koichi Imaoka. Bacterial infection from dogs and cats – Brucellosis and *Capnocytophaga canimorsus* infection-. Workshop I: Zoonoses transmitted from pet animals in daily life. The 2nd International Conference on Animal Care in KOBE 2012, Kobe, Feb. 18-19, 2012

(3) 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

(4) 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

(5) 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

(6) 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

Ⅱ. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1) 国内の家畜ブルセラ属菌感染事例 (感染症法指定後、1999.4.1～2014.1.31)

Date of diagnosis	age group	Reporting prefecture	Suspected place of infection	Suspected route of infection	Symptoms	Ab test (SAT)			Identification by PCR
						abortus	canis	Isolation	
2005.6	30-39 yrs	Tokyo M.	Syria (Travel to)	Foodborne (Sheep meat)	Fever, exanthema, splenomegaly, swelling of abdominal lymph nodes, arthralgia	(+)	(+)	(+)	<i>B. melitensis</i>
2006.2	50-59 yrs	Tokyo M.	Egypt (Travel to)	Unknown (Inhalation?)	Fever, headache, hepatomegaly, splenomegaly	(+)	(-)	(+)	<i>B. melitensis</i>
2006.7	20-29 yrs	Hokkaido P.	Egypt (Visit from)	Foodborne (Milk)	Fever, headache	(+)	(-)	(-)	Negative (Blood)
2008.7	60-69 yrs	Shizuoka P.	Peru (Visit from)	Foodborne	Fever, back pain, lack of energy	(+)	(-)	(-)	<i>B. abortus</i> (Blood)
2009.10	10-19 yrs	Tokyo M.	India (Visit from)	Foodborne (cheese)	Fever, splenomegaly, lymphadenopathy, arthritis, hepatomegaly	(+)	(+)	(+)	<i>B. melitensis</i>
2010.4	40-49 yrs	Aichi P.	Peru (Visit from)	Foodborne (cheese)	Fever, gastroenteritis, abdominal pain (iliopsoas abscess)	(+)	(+)	(+)	<i>B. melitensis</i>
2011.11	40-49 yrs	Niigata P.	China (Homecoming to)	Unknown (Inhalation?)	Fever, headache, occipital ache	(+)	(-)	(+)	<i>B. melitensis</i>

表 2) 国内のイヌブルセラ菌感染事例 (感染症法指定後、1999.4.1～2014.1.31)

Date of diagnosis	age group	Reporting prefecture	Suspected place of infection	Suspected route of infection	Symptoms	Ab test (SAT)			Identification by PCR
						abortus	canis	Isolation	
2002.1	40-49 yrs	Tokyo M.	Tokyo M.?	Pet dog	Fever, loss of appetite	(-)	(+)	(-)	Not tested
2005.12	10-19 yrs	Nagano P.	Nagano P.?	Unknown	Fever, muscle pain, abdominal pain	(-)	(+)	(-)	Negative (Serum)
2006.6	20-29 yrs	Nagano P.	(Italy)	Unknown	Fever, muscle pain	(-)	(+)	(-)	Negative (Blood)
2006.9	60-69 yrs	Nagano P.	Nagano P.	Unknown	Fever, splenomegaly	(-)	(+)	(-)	Not tested
2006.10	70-79 yrs	Miyagi P.	Miyagi P.	Unknown	Fever, central nervous system abnormalities	(-)	(+)	(-)	Not tested
2007.4	40-49 yrs	Osaka P.	Osaka P.	Pet dog	Lymphadenopathy, lack of energy	(-)	(+)	(-)	Not tested
2008.6	10-19 yrs	Saitama P.	Saitama P.	Pet dog	Fever, arthritis, myositis	(-)	(+)	(-)	Negative (Serum)
2008.8	70-79 yrs	Aichi P.	Aichi P.	Breeding dog	Fever, splenomegaly, hepatomegaly	(-)	(+)	(+)	<i>B. canis</i>
2008.8	40-49 yrs	Aichi P.	Aichi P.	Breeding dog	Fever	(-)	(+)	(+)	<i>B. canis</i>
2009.4	30-39 yrs	Saitama P.	Saitama P.	Breeding dog	(reported as an asymptomatic case)	(-)	(+)	(-)	Not tested
2010.6	60-69 yrs	Tochigi P.	Tochigi P.	Unknown	Fever	(-)	(+)	(-)	Not tested
2011.11	60-69 yrs	Shimane P.	Shimane P.	Unknown	Fever, central nervous system abnormalities (encephalomyelitis)	(-)	(+)	(-)	Negative (Serum·Spinal fluid)
2013.7	40-49 yrs	Kanagawa P.	Kanagawa P.	Pet dog	Fever, joint pain, muscle pain, lymphadenopathy	(-)	(+)	(-)	<i>B. canis</i> (Blood)