

## 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、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、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、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、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 から 2013 年度に東京都動物愛護相談センターに收容されたイヌ 605 頭、栃木県動物愛護指導センターに收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 頭の実験用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 頭の実験用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。

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 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 . 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、*bccsp31* 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力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ご厚意を感謝いたします。

## 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.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

(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 serve 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 (PrP<sup>c</sup>) 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

#### H. 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)		Isolation	Identification by PCR
						abortus	canis		
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)		Isolation	Identification by PCR
						abortus	canis		
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)



表3) 国内のイヌにおける *B. canis* に対する抗体保有状況

Prefecture	Samples (Tested)	Positive		Prefecture	Samples (Tested)	Positive				
		No.	(%)			No.	(%)			
Hokkaido	35	1	2.9	Gifu	36	3	8.3			
Aomori	23	0	0.0	Shizuoka	46	1	2.2			
Iwate	16	0	0.0	Aichi	15	0	0.0			
Miyagi	28	0	0.0	Mie	56	0	0.0			
Akita	9	0	0.0	Shiga	5	0	0.0			
Yamagata	20	3	15.0	Hiroshima	47	0	0.0			
Fukushima	16	1	6.3	Kagawa	8	0	0.0			
Tochigi	603	38	6.3	Kochi	10	0	0.0			
Tokyo	605	48	7.9	Nagasaki	20	0	0.0			
Kanagawa	479	12	2.5	Kumamoto	20	0	0.0			
Niigata	24	2	8.3	Miyazaki	20	1	5.0			
Toyama	9	0	0.0	Kagoshima	110	2	1.8			
Nagano	23	1	4.3	Okinawa	35	2	5.7			
Tochigi: 2003-2005, 2012 (in animal care center)				Total				2318	115	5.0
Tokyo: 2007-2013 (in animal care center)				Kanagawa: 2003-2006 (in animal care center)						
				Others: 2009-2013 (hunting dogs)						

表4) 国内のイヌにおける *B. canis* に対する抗体保有状況の経年変化

Tokyo: Dog				Cat		
Year	Samples (Tested)	Positive		Samples (Tested)	Positive	
		No.	(%)		No.	(%)
2007	50	5	10.0	-	-	-
2008	89	12	13.5	98	1	1.0
2009	106	9	8.5	102	0	0.0
2010	70	6	8.6	80	1	1.3
2011	125	7	5.6	-	-	-
2012	113	6	5.3	-	-	-
2013	52	3	5.8	-	-	-
Total	605	48	7.9	280	2	0.7

Tochigi: Dog			
Year	Samples (Tested)	Positive	
		No.	(%)
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
Total	603	38	6.3

表 5 ) Imported brucellosis cases in Taiwan after unseen for 33 years

Year	Age	sex	Disease onset	Symptoms	Confirmed date	Affected region	Infection route
2011	54	F	24-Apr	fever, abnormal liver function	17-May	Morocco, Algeria	raw meat, dairy products
2011	72	F	April (2010)	fever, spinal pain	24-May	Malaysia	goat's milk
2011	59	F	28-Apr	fatigue	5-Jul	Malaysia	goat's milk
2011	28	M	30-Aug	fever	14-Sep	Malaysia	goat's milk
2011	58	M	19-Jul	fever sweating	21-Oct	China	unknown

by Taiwan CDC

表 6 ) Notifiable Infectious Diseases in Taiwan

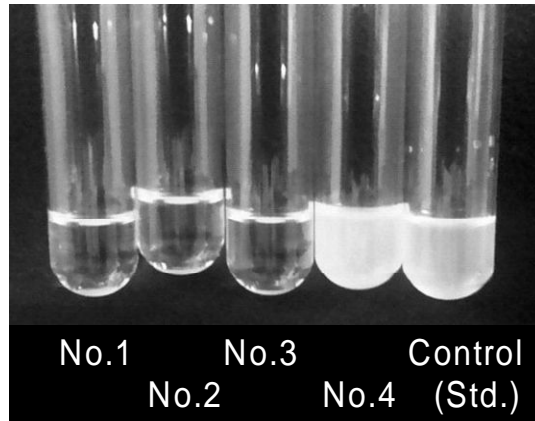
Classification	Infectious Diseases
Category I	Anthrax
	Plague
	SARS
Category II	Acute Flaccid Paralysis and Poliomyelitis
	Amoebiasis
	Cholera
	Dengue Hemorrhagic Fever/Dengue Shock Syndrome
	Enterohemorrhagic E. coli Infection
	Hantavirus Pulmonary Syndrome
	Malaria
	Meningococcal Meningitis
	Paratyphoid Fever
	Rubella
Typhoid fever	
Category III	Acute Viral Hepatitis type B
	Acute Viral Hepatitis type D
	Acute Viral Hepatitis untype
	Congenital Rubella Syndrome
	Gonorrhea
	Hansen's Disease
	Japanese Encephalitis
	Mumps
	Pertussis
	Tetanus
Category IV	Botulism
	Cat-scratch Fever
	Creutzfeldt-Jakob Disease
	Herpesvirus B Infection
	Leptospirosis
	Melioidosis
	Q Fever
	Toxoplasmosis
	Varicella
	Category V
Marburg Hemorrhagic Fever	
Yellow Fever	
	H5N1 Influenza
	Rabies
	Smallpox
	Acute Viral Hepatitis type A
	Chikungunya Fever
	Dengue Fever
	Diphtheria
	Epidemic Typhus Fever
	Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome
	Measles
	Multi-drug Resistant Tuberculosis
	Poliomyelitis
	Shigellosis
	West Nile Fever
	Acute Viral Hepatitis type C
	Acute Viral Hepatitis type E
	AIDS
	Enteroviruses Infection with Severe Complications
	Invasive Haemophilus Influenzae Type B Infection
	HIV Infection
	Legionellosis
	Neonatal Tetanus
	Syphilis
	Tuberculosis
	Brucellosis
	Complicated Influenza
	Endemic Typhus Fever
	Invasive Pneumococcal Disease
	Lyme Disease
	New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase -1 Enterobacteriaceae
	Scrub Typhus
	Tularremia
	Lassa Fever
	Rift Valley Fever

Conduct based on the "Communicable Disease Control Act" amended and promulgated on July 18, 2007, and the "Category 4 and Category 5 Communicable Diseases Preventive and Control Measures" announced on October 9, 2007.

図1) 台湾 CDC での試験管凝集反応 (TAT) による家畜ブルセラ菌特異的抗体の検出

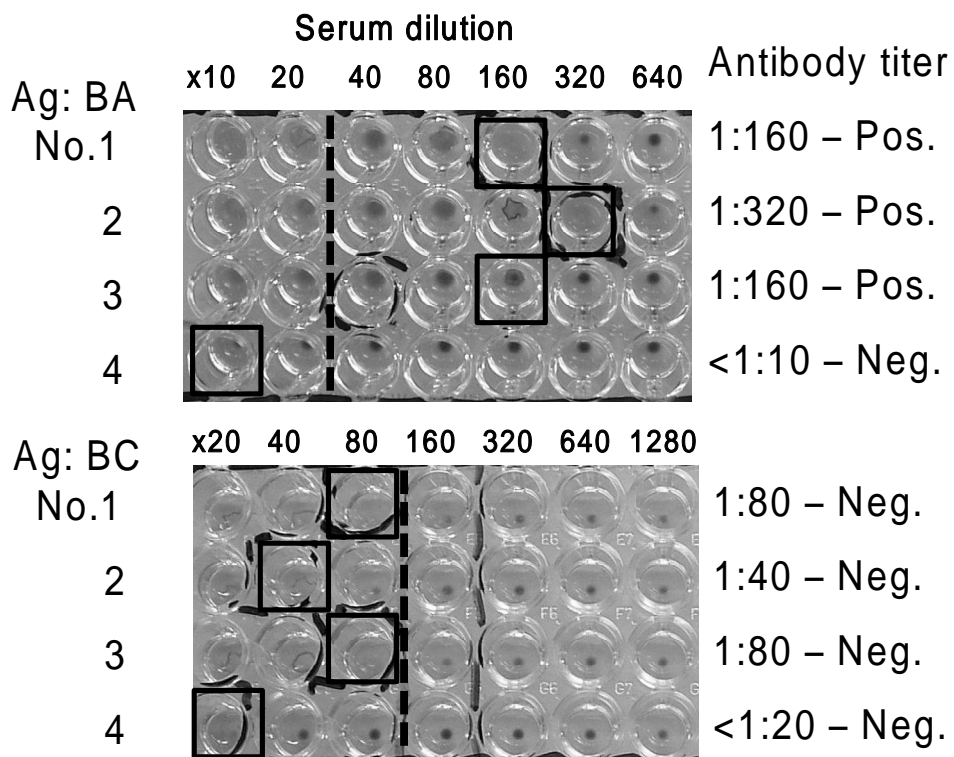
Samples : Brucellosis patients 3 ( No.1-3 )  
 Suspected 1 ( No.4 )  
 Ag : *B. abortus*

Serum dilution = 1:40



Results :  
 No.1 Pos.  
 No.2 Pos.  
 No.3 Pos.  
 No.4 Neg.

図2) 台湾 CDC でのマイクロプレート凝集反応 (MAT) による抗ブルセラ属菌抗体の検出



BA : 使用抗原 *B. abortus*、1:40 以上が陽性

BC : *B. canis*、1:160 以上が陽性

図3) 国内のイヌにおける *B. canis* 遺伝子の検出

No.	Anti-BC Ab	Real-time PCR					
		Urine		Urethra swab		Serum	
		bcbp31	omp2ca	bcbp31	omp2ca	bcbp31	omp2ca
D1	<x 10	(-)					
D2	x 20	(-)		+		+	+
D3	x 320	(+)	+	+		+	
D4	x 10	(-)					
D5	x 10	(-)					
D6	x 10	(-)					
D7	<x 10	(-)					
D8	x 10	(-)					
D9	<x 10	(-)					
D10	x 10	(-)					
D11	x 640	(+)	+	+	+		
D12	x 20	(-)					
D13	<x 10	(-)					
D14	<x 10	(-)					
D15	x 10	(-)	+		+		
D16	x 10	(-)					
D17	<x 10	(-)					
D18	<x 10	(-)					
D19	x 10	(-)					
D20	x 10	(-)					

No.	Anti-BC Ab	Real-time PCR					
		Urine		Urethra swab		Serum	
		bcbp31	omp2ca	bcbp31	omp2ca	bcbp31	omp2ca
D21	x 10	(-)					
D22	<x 10	(-)					
D23	x 10	(-)		+			
D24	x 10	(-)					
D25	x 10	(-)					
D26	<x 10	(-)					
D27	x 10	(-)					
D28	x 10	(-)					
D29	<x 10	(-)					
D30	x 40	(-)					
D31	x 10	(-)					
D32	x 10	(-)	+				
D33	x 10	(-)					
D34	x 20	(-)					
D35	x 10	(-)					
D36	x 10	(-)					
D37	<x 10	(-)					
D38	x 1280	(+)				+	
D39	x 10	(-)					
D40	x 10	(-)					

No.	Anti-BC Ab	Real-time PCR					
		Urine		Urethra swab		Serum	
		bcbp31	omp2ca	bcbp31	omp2ca	bcbp31	omp2ca
D41	<x 10	(-)					
D42	<x 10	(-)					
D43	<x 10	(-)					
D44	<x 10	(-)					
D45	<x 10	(-)					
D46	<x 10	(-)		+	+		
D47	<x 10	(-)		+		+	
D48	<x 10	(-)					
D49	<x 10	(-)					
D50	<x 10	(-)					
D51	<x 10	(-)					
D52	<x 10	(-)					
D53	nt						
D54	nt						
D55	nt						
D56	nt						
D57	nt						
D58	nt						