

厚生労働科学研究費補助金 [新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 (新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)]

分担研究報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 (H25-新興-一般-008)

分担研究課題：動物由来細菌性腸管感染症の再興に向けた感染制御に関する研究

研究分担者 山田章雄 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授

研究協力者 平山和宏 東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授

吉村和敏 東京大学大学院農学生命科学研究科

研究要旨：腸管出血性大腸菌 (EHEC) による腸炎の治療における抗菌薬投与は EHEC からの志賀毒素 (Stx2) の産生を促進することから、勧められていない。われわれは乳児の糞便を無菌 (GF) マウスに経口投与して作出したノトバイオート (GB) マウスにおいて、EHEC 感染に抵抗性を示す GB マウスの存在を明らかにしてきた。本研究では GF マウスに EHEC 感染に対する抵抗性を付与できる機構の解析を試みた。その結果乳児の糞便に存在する *Bifidobacterium* の菌種や菌株の中に EHEC による感染死を抑制する効果を有するものがあることが明らかになった。特に同じ菌種・亜種であっても、*B. longum* subsp. *infantis* JCM1222T (*B. infantis*T) は抑制効果を持たないが、*B. longum* subsp. *infantis* 157F-4-1 (*B. infantis* 157F) には抑制効果があることを明らかにした。

A. 研究目的：

腸管出血性大腸菌症は年間 3000 から 5000 人の患者ならびに数例の死亡が報告されており、動物由来感染症としては極めて重要な疾患である。通常細菌性腸炎の治療には抗菌薬投与が行われるが、抗菌薬投与は EHEC からの Stx2 産生を促し、溶血性尿毒症 (HUS) などの重篤な合併症につながる可能性があり、慎重な使用が求められている。われわれは乳児の糞便を無菌 (GF) マウスに経口投与して作出したノトバイオ

ート (GB) マウスにおいて、EHEC 感染に抵抗性を示す GB マウスの存在を明らかにしてきた。本研究では GF マウスに EHEC 感染に対する抵抗性を付与できる機構の解明を目的とする。

B. 研究方法：

1) 動物

当教室で繁殖維持している無菌 Balb/c マウスを 8~13 週齢で実験に供与した。

2) 菌株

以下の 6 菌種 9 菌株を使用した。 *B. adolescentis* JCM1275T (*B. adolescentis* T)、*B. bifidum* JCM1255T (*B. bifidum* T)、*B. bifidum* M、*B. breve* JCM1192T (*B. breve* T)、*B. longum* subsp. *infantis* JCM1222T (*B. infantis* T)、*B. longum* subsp. *infantis* 157F-4-1 (*B. infantis* 157F)、*B. longum* subsp. *longum* JCM1217T (*B. longum* T)、*B. longum* subsp. *longum* NCC2705 (*B. longum* NS)、*B. pseudocatenulatum* JCM1200T (*B. pseudocatenulatum* T)。 EHEC は *E. coli* O157:H7 strain 44^{Rf} (Stx2) (*E. coli* 44^{Rf}) を使用した。

3) *Bifidobacterium* の経口投与 7 日後に *E. coli* 44^{Rf} を同様に経口投与した。 Stx2 は VTEC-RPLA キット (Denka, Japan) とノバパスベロ毒素 EIA キット (BIORAD, USA) を用いて測定した。

(倫理面からの配慮について)

マウスにおける全ての感染実験は東京大学農学生命科学研究科動物実験委員会による審査を経て承認されている。

C. 結果：

1. 上記 9 菌株を GF マウスに経口接種し作出した GB マウスに *E. coli* 44^{Rf} を感染させた後のマウスの生残を図 1 に示す。図から明らかなように *B. infantis* 157F と *B. longum* NS を投与した GB マウスは *E. coli* 44^{Rf} 感染を耐過したが、*Bifidobacterium* 未投与対象群並びにこ

れら以外の 7 菌株の接種で作出した GB マウスはすべて *E. coli* 44^{Rf} 感染により死亡した。

2. これら GB マウス糞便中の *E. coli* 44^{Rf} 菌数を経目的に測定し比較したところ、GF マウスに予め *Bifidobacterium* を投与しても *E. coli* 44^{Rf} の糞便中への排泄に差は認められず、腸管内への定着には影響がないと考えられた。
3. 表 1 に示すように *E. coli* 44^{Rf} 感染 6 日後における盲腸内容物中の Stx2 濃度は *B. infantis* 157F と *B. longum* NS 接種した GB マウスでは他の *Bifidobacterium* 投与群と比較して低いことが明らかになった。また、マウス血清中の Stx2 濃度を測定したところ、感染抵抗性を示した GB マウスでは血清中 Stx 濃度が優位に低いことが明らかになった。

D. 考察：

以上の成績は *B. longum* subsp. *longum/infantis* に属する特定の菌には、他の *Bifidobacterium* に比べて、*E. coli* O157:H7 感染に対する高い防御効果を示すものが存在することを示している。さらにその防御効果は *E. coli* O157:H7 の腸管粘膜への定着を阻害することによるものではなく、腸管内での Stx2 産生の抑制及びその体内への移行を阻害することによるものであることが示唆された。今後は防御効果の機構について詳細に解析したい。

E. 結論

Bifidobacterium 投与により作出した GB マウスを用いて、*Bifidobacterium* の *E. coli* O157:H7 感染に及ぼす影響を調べたところ特定の菌株には明らかな感染防御効果があることが判明した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

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

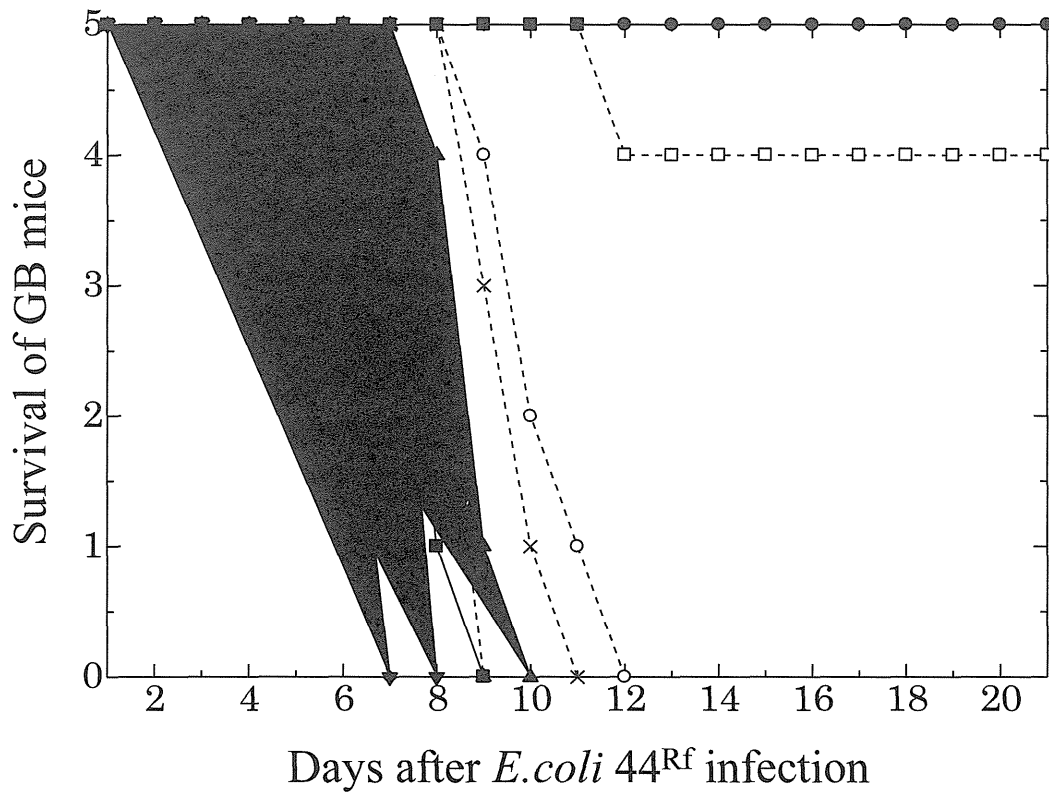
表 1. 盲腸内容物中の Stx2 濃度

| <i>Bifidobacterium</i> strains | days after <i>E. coli</i> 44Rf infection | | |
|--|--|------|-----|
| | 1 | 6 | 14 |
| <i>B. adolescentis</i> ^T | 8.6 | 9.5 | NT |
| <i>B. bifidum</i> ^T | 8.5 | 10.1 | NT |
| <i>B. breve</i> ^T | 8.9 | 9.4 | NT |
| <i>B. infantis</i> ^T | 8.9 | 9.6 | NT |
| <i>B. infantis</i> 157F | 8.9 | 9.3 | 9.1 |
| <i>B. longum</i> ^T | 8.9 | 9.6 | NT |
| <i>B. longum</i> NS | 8.8 | 9.5 | 9.5 |
| <i>B. pseudocatenulatum</i> ^T | 8.7 | 9.4 | NT |
| (<i>E. coli</i> 44 ^{Rf} only) | 9 | 10 | NT |

Bifidobacterium の経口投与 7 日後に *E. coli* 44^{Rf} を同様に経口投与した。

盲腸内容物中の Stx2 は VTEC-RPLA キット (Denka, Japan) と
ノバパスベロ毒素 EIA キット (BIORAD, USA) を用いて測定した。

図 1. *Bifidobacterium* の 9 菌種のノトバイオートマウスの *E. coli* 44^{Rf} 感受性



—▲— *B. adolescentis* T —▲— *B. bifidum* M —▽— *B. bifidum* T —◇— *B. breve* T
 —▽— *B. infantis* T —□— *B. infantis* 157F —●— *B. longum* NS —○— *B. longum* T
 —■— *B. pseudocatenulatum* T —◆— *E. coli* 44^{Rf} only

厚生労働科学研究費補助金〔新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）〕

分担研究報告書

動物由来感染症の対応に関する研究（H25-新興-一般-008）

分担研究課題：コリネバクテリウムに関する研究

研究分担者：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：畠山薫、久保田寛顕、奥野ルミ、貞升健志、井出 治、加藤敦子（東京都健康安全研究センター）、本間幸子、佐藤弘康（川崎市健康安全研究所）、古川一郎、石岡慎也、岡本浩介、水谷達二（神奈川県衛生研究所）、勝川千尋（大阪府立公衆衛生研究所）、梅田薫、阿部拓人、畠山理沙、木村吉秀（大阪市立環境科学研究所）、中嶋洋、狩屋英明、岸本壽男、橋本英典、近藤 真、東 正秋、藤原慎一（岡山県環境保健センター）、内田順子、有塚真弓、藤井康三 蔦田博也（香川県環境保健センター）、小山絵理子（徳島県保健環境センター）、畠山敬、後藤郁男、山口友美（宮城県環境衛生センター）、青木敦子、嶋田直美、近真理奈（埼玉県衛生研究所）、柳井徳磨（岐阜大学）、秋定健、兵行儀、與田茂利、黒川幸徳、山根一和（川崎医科大学）、本間康夫（信楽園病院）、天尾弘実、藤平篤志、佐伯穂波（日本獣医生命科学大学）、小宮貴子、岩城正昭、網 康至、須崎百合子、新倉綾、高橋元秀、今岡浩一（国立感染症研究所）

研究要旨：ジフテリア様の症状を示すジフテリア毒素産生性の *Corynebacterium ulcerans* (*C. ulcerans*) による感染症について、リンパ節膿瘍を示す 6 歳の女兒での新規 1 症例が報告された。この患者分離菌株は MLST 解析から、本邦初発例と類似の MLST タイプに属することが判明した。また、キャリアーとなる動物の 7 地域の検索ではイヌから 1%ネコからは 5.7%*C.ulcerans* が分離され、さらに血清ジフテリア抗毒素価の調査でウシの 6.7%、シカ血清から 12.2%が陽性である結果から、シカが自然界の保菌者でウシやネコなどに感染させ、ネコが人への感染の *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。*C. ulcerans*、*Corynebacterium diphtheria* (*C. diphtheriae*) および *C. pseudotuberculosis* を類縁の *Corynebacterium* 属菌から鑑別する迅速診断法として、マルチプレックス PCR 法を昨年開発したが、汎用するには改良が必要なことが判明した。さらに、昨年開発したマウス *C. ulcerans* 感染モデルで *C. ulcerans* 抗体の消長を追うべく ELISA 測定系を作成して感染と抗体応答の関連を調べたところ感染に伴う IgM 抗体が検出された。

A. 研究目的：

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として、昨年度に開発した鑑別診断法のを協力研究機関である地方衛生研究所に周知し試薬を配布して、その特異性と測定精度などを検討する。さらに、*Corynebacterium* 属菌全菌体を用いた ELISA 法を開発し、抗体による診断方法の開発を行う。

また、発生患者周辺や動物の疫学調査を行なうとともに、分離菌の分子疫学的解析ツールを検討する。

ジフテリアは、ジフテリア毒素を有する *C. diphtheriae* による細菌感染症である。高い死亡率と飛沫感染で広範囲に伝染することから、感染症法の 2 類感染症に分類される。日本ではこの 10 年間患者の発生はない。この感染症は古くから知られる疾患で、ジフテリア毒素を不活化して作成したワクチン接種による防疫が全世界的に実施されている。2001 年よりジフテリア様の症状を示すジフテリア毒素産生性の *C. ulcerans* による感染症が、本邦でも報告されるようになった（表 1）。ジフテリア毒素を主要な病原因子とする *C. ulcerans* 感染症はヒトを含む哺乳動物が広く罹患する。ECDC の定義では、ヒトに特異的な *C. diphtheriae* 感染症とあわせ「ジフテリア」とされるが、本邦では *C. ulcerans* 感染症は感染症法の対象疾患ではない。患者発生時の迅速な対応が要求される 2 類感染症と分類される *C.*

diphtheriae 感染症（ジフテリア）との鑑別診断が公衆衛生上の課題である。昨年開発した迅速診断法を実際の対応を行う地方衛生研究所評価した。

同感染症は、これまでの症例報告から動物由来感染症であるが、その実態が不明な点がある。そこで、国内の発生患者の症状や患者周辺の動物についての疫学調査を実施した。また、どの動物がその感染源となるのかについて協力研究者を中心に調査を実施した。さらに、昨年開発したマウス感染モデルでの *C. ulcerans* 全菌体に対する抗体の消長を調べた。感染源としての動物のリスク評価に役立てることを目的とした。

B. 研究方法

1. 新規発生患者周辺調査

今年度リンパ節膿瘍を呈した 1 名の患者が医療機関で確認された。医師と患者の同意を得たのち、患者からの病原体確認および患者の環境調査を行なった。さらに、患者および病院を所轄する自治体の衛生研究所との共同調査を実施した。

2. 各地の動物及びヒトからの菌分離、抗体調査

1) *C. ulcerans* の菌分離法

被検体となる動物の口腔、鼻、背、耳、尾、腹部、尻、血液等のスワブを採取し、培養は検体をヒツジ血液寒天培地および亜テルル酸カリウム添加活性炭末加ヒツジ血液寒天培地（以下、荒川変法血液寒天培地）

に塗抹、血液寒天培地は 18～24 時間後、荒川変法血液寒天培地は 24 または 48 時間後に疑われる集落について性状を検査した。同定は DSS 培地による糖分解性状のスクリーニング、カタラーゼ試験、ウレアーゼ試験を実施した後、Api coryne(bioMérieux)を用いて確定した。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. 分離菌株の分子疫学解析

これまでの *C. ulcerans* 分離菌株の解析は、*Sfi* I を用いた PFGE 法を用いてきたが、再現性、データのポータビリティ等において PFGE より優れているとされる MLST 法の解析を今回試みた。解析は König et al, (2014) J. Clin. Microbiol. 52(12):4318-4324 に従った。供試菌体を熱抽出して得たゲノム DNA を含む画分を鋳型として 7 つの遺伝子 (*atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA*, *rpoB*) の断片をそれぞれ増幅し、塩基配列を決定後 web サイト pubMLST (<http://pubmlst.org/cdiphtheriae/>) 上の解析アプリケーションにより MLST タイプを決定した。

4. 簡易迅速鑑別診断法の汎用化検討

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 法を昨年作成した。作成した Multiplex PCR 法について、汎用化の可能性を探るために地方衛生研究所の 6 実験室に 4 種類の primer pair と 6 種類の DNA を配布して、その特異性や感度などを調べた。

5. 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経鼻感染モデルを昨年作成した。本年は感染モデル抗体応答を調べるため Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay(ELISA)による抗 *C. ulcerans* 全菌体抗体価測定系を構築し、経鼻感染マウスにおける IgG および IgM 抗体価の測定を行った。

(倫理面からの配慮について)

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を得て実験を行った。

C. 研究結果

1. 新規発生患者周辺調査

1) 国内 14 症例目の患者調査

本邦 14 例目となる徳島県での *C. ulcerans* 症例は、6 歳の女兒であった。平成 26 年 4 月に友人と顔をぶつけて唇を切る事故を起こし、翌日に熱感をもって左耳下腺部が腫れ、発熱 (38.5℃) もあり疼痛を伴っていたため近医を受診したが、症状が治まらず、徳島県立中央病院小児科に紹介され入院となった。超音波検査にて左耳下腺部の腫れは、最大直径 9mm の膿瘍を形成し、その周囲が炎症あるリンパ節膿瘍と診断された。膿瘍の穿刺培養を行って *C. ulcerans* のみ培養

された。治療で発熱は収まり退院した。しかし、腫れが再燃したために外来受診しマクロライド系抗生物質を投与して 4 日後には腫れが消失した。患者の入院時のジフテリア抗毒素価は、0.756IU/mL で腫れの消失時の抗体価は 6.06IU/mL と高い値を示した。患者は、日本脳炎以外のワクチン投与は行っていた。今回の症例の調査にて、抗ジフテリア毒素抗体が十分にあっても *C. ulcerans* 感染が成立したことは初めての知見である。

感染経路に関しては、飼い猫からの可能性が高い。患者宅では、飼い猫を 1 匹飼育しているが、患者が発症するころひどい皮膚病にかかっている、獣医科病院の受診をしてエリスロマイシンを投与されている。治療により患者の症状が消失したところに、この猫の皮膚炎痕や口腔、耳スワブなど採材して菌培養の検査を行ったが、*Corynebacterium* 属菌は培養されたが、*C. ulcerans* は陰性であった。その原因として、*C. ulcerans* に感受性のあるエリスロマイシンの治療が皮膚炎への処置として行われていたためであると推測される。

2. 各地の動物及び人での調査結果

7 都道府県 7 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) O 県

O 県では、県内病院と提携して臨床で分離された *Corynebacterium* 属菌について同

定を行い動物との関連についても聞き取りを行った。その結果、平成 26 年に 16 検体ほど *Corynebacterium* 属菌が分離された。その由来は喀痰、血液が主で膿、尿、耳漏なども含まれていた。*C.ulcerans* は分離されなかったが、どの症例もネコを飼育する環境であった。

2) T 県

T 県においては、平成 22 年から 25 年のイヌ、ネコの調査で分離された *C.ulcerans* 7 株 (DLT (+) 5 株、DLT(-)2 株) について、型別方法を検討した。①DLT 毒素遺伝子配列による解析 DLT 毒素遺伝子を持つ 5 株から得られた DLT 毒素遺伝子 (約 1683bp)配列、ならびに O102 株を含めた 12 株の DLT 遺伝子配列を用いて、系統樹解析を行った。5 株中 4 株は、O102 株と同一クラスターを形成したが、1 株はイヌ由来株 (大阪)ならびに O510 株と同一のクラスターを形成した。また、JCM10387 は供試した株とは異なる型であった。②MLST 法による解析 : *C.diphtheriae* MLSTdata (<http://pubmlst.org/cdiphtheriae/>) に準じた、ハウスキーピング遺伝子 7 部位の遺伝子配列を比較し型別を行った。7 株中 6 株 (DLT(+)) 4 株、DLT(-)2 株) は O102 株と同一型となったが、1 株は異なる型となった。この株は、DLT 遺伝子解析でも他と異なる結果となった株であった。イヌ、ネコには、単一クローンの *C.ulcerans* が分布しているのではなく、少なくとも 2 種類以上のクローンが分布していることが示唆され

た。

3) Ok 県

Ok 県においては、食肉検査上に搬入される全国から搬入される牛の血液のジフテリア抗毒素価の調査を行った。平成 26 年度は 133 頭を調査し 9 頭 (6.7%) からジフテリア抗毒素価が検出された。

さらに、川崎医科大学との共同研究で、耳鼻咽喉科外来患者からの *C.ulcerans* 検索、内科受信患者及び入院患者から分離された *Corynebacterium* 属菌 70 株について同定を行った。同定された菌株は 40 株が *C.striatum* でおおよそ 6 割を占めていた。*C.ulcerans* は分離されなかった。

4) K 県

K 県内動物管理事務所に搬入されたネコ 102 匹、イヌ 13 匹の咽頭ぬぐい、また環境 6 か所のふきとり検体について、培養にて *C.ulcerans* の検出を試みた。結果は培養同定、毒素遺伝子共に全て陰性であった。

5) S 県

S 県では動物指導センターに搬入された犬及び猫で、安楽死処分直後にシードスワブ γ 3 号を使用し採取した咽頭ぬぐい液及び血液を検体とし、菌分離と抗毒素価その久亭を行った。

犬の調査総数 95 頭中、1 頭より *Corynebacterium* 属菌が分離され、猫 35 頭中 2 頭より *C.ulcerans* が分離された。

6) Ka 県

Ka 県では、2013 年度から 2014 年度にかけて県内の動物病院で採材されたイヌ 18 頭、

ネコ 56 頭の口腔内ぬぐい液あるいは目脂を検体とした。検体処理は前景の方法で行った。イヌ 18 検体およびネコ 56 検体について調査した結果、*C.ulcerans* はジフテリア毒素遺伝子を標的とした PCR 法では検出されず、培養法においても菌分離には至らず、陽性率は 0%であった。

7) To 県

To 県では、本邦 14 例目の比と発症例を経験した。*C.ulcerans* の汚染状況調査は今までに実施した結果、地域猫 241 検体より 4.2%で菌分離された。汚染地域は県内に偏りがなくほとんどの保菌猫が無症状であった。ヒト分離菌株と県内猫からの分離菌株を PFGE 法で比較した結果、同じパターンを示す猫分離株が存在した。

8) シカ血清調査

全国より収集した狩猟されたシカ 332 頭の血清に関してジフテリア抗毒素価の測定を行った。測定した 332 頭の血清の内測定可能であった 319 検体中 39 頭が陽性であった。(12.2%)

3. 分離菌株の分子疫学解析

C. ulcerans について MLST を実施するための予備的検討を行った。この方法はそれぞれの分離株の 7 種類の遺伝子のシーケンス成績をデータベースからタイプ分けするものであった。現在までに分離された人臨床分離株及び患者の感染経路と密接な関係のある動物からの分離株を合わせて *C. ulcerans* 19 株についての解析では 6 種類の

MLST タイプに分別された。この結果は PFGE での解析結果と類似するものであった。本邦 14 例目の徳島県の症例で患者から分離された菌株は、千葉県の場合と同じ MLST タイプに分類された。

4. 簡易診断法の汎用化予備実験

昨年開発した multiplex PCR 法に関して 6 か所の地方衛生研究所で検討を実施し、4 か所からのデータがまとまった。その結果、非特異バンドについては、毒素陰性株で毒素遺伝子と同様のサイズの PCR 増幅産物を認めた。また一部で *C.diphtheriae* の *rpo B* 遺伝子と同サイズのバンドが認められた。この日特異的増幅は、アニーリング温度の変更では解消することができなかった。

5. *C. ulcerans* 感染実験モデルでの解析

C. ulcerans 加熱死菌体を 96 穴プレートに固相化し、抗 *C. ulcerans* 全菌体に対する血中抗体価を測定するための ELISA 測定系を構築した(図 1)。ウサギおよびマウスの高度免疫血清を用いて測定可能域の確認を行なったのち、感染後 2、4、6、8、10 日の経鼻感染マウス血清中抗体価の測定を行なった。感染後 10 日目まで、抗 *C. ulcerans* 全菌体 IgG 抗体価は測定限界以下であった(図 2)。一方、同じ血清において、IgM 抗体価は経目的に緩やかな上昇傾向を示した(図 3)。IgM については今後詳細な検討が必要であるが、この測定結果は、感染初期の抗 *C. ulcerans* 全菌体 IgM 抗体レベルの上昇を反

映している可能性がある。なお、肺の生菌数は感染直後から 10 日間の間で著しく生菌数は減少することを昨年度の報告書で示したが、IgM 抗体が本菌の感染後の減少に直接関与している証拠は得られなかった。

D. 考察

本年度初頭に徳島県で発生した 1 例の新規 *C. ulcerans* 感染症罹患者の調査で、14 例目の患者はリンパ節炎膿瘍を示す 6 歳の女児であった（表 1）。さらに、患者の飼育するネコは患者の発症前に皮膚炎を患っており、ネコが *C. ulcerans* 感受性のエリスロマイシンを用いた治療がなされたために、ネコから同菌が分離されなかったが、この飼い猫からの感染が疑われる。患者の発生した徳島県内のネコの汚染調査はすでに行われていて、県内偏りがなく保菌率は 4.2% であることが判明している。（論文 1）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。一方、今回の患者は 6 歳と大変若く、昨年度発生した DPT ワクチンを接種していない 20 歳女性患者より患者年齢を大きく下回った。海外の報告では同世代の報告があるが日本で確認されたのは初めてである。また、この症例の 6 歳という年齢は DPT1 期が終了してジフテリア免疫が出来上がったばかりの年齢である。事実 DPT1 期を接種した 6 歳児の 87% はジフテリア抗毒素価がジフテリア発症予防の 0.1 IU/ml を越えていると報告されており、

予防接種完了後の小児では *C. ulcerans* の感染は起こりにくいと考えられた。この患者もジフテリア抗毒素価を測定したところ、0.76IU/mL と測定されて大変高く十分な発症防御抗体のレベルであった。（論文 1）患者の症状が呼吸器症状ではなくリンパ節膿瘍と会われたことに関連があるのかもしれない。今後、小児のリンパ節膿瘍についても *C. ulcerans* 感染の可能性を考慮する必要がある。

7 地域の動物の保菌状況を調査した結果、イヌの 1% からネコの 5.7% 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。血清ジフテリア抗毒素価の調査ではウシの 6.7% シカの 12.2%（表 2）が陽性を示した。ネコヤイヌでの調査と比較すると抗体陽性動物はシカが最も多いことから、自然界の保菌者としてこの菌を環境中に保持しているかの世が示唆された。今回の調査だけでは結論できないが、今後対象動物数を増やして検索を行う必要がある。また、Ok 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. ulcerans* 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。ただし、昨年から実施している人の臨床分離株の同定調査では、およそ 120 株の分離された *Corynebacterium* 属菌から *C. ulcerans* 菌が 1 株も同定されなかったこ

とから、この菌が分離されることは大変低い可能性が示唆された。

C. ulcerans について MLST を実施するための予備的検討を行った。が臨床分離株及び関係のある動物からの分離株 *C. ulcerans* 19 株についての解析では 6 種類の MLST タイプに分別された。この結果は PFGE での解析結果と類似するものであった。本邦 14 例目の徳島県の症例で患者から分離された菌株は、千葉県の場合と同じ MLST タイプに分類された。これらの結果から MLST 法は少なくとも PFGE 法の解析力よりも弱いものではないこととシーケンス解析によるために実験者による誤差が少なくそのデータを世界で使用しているデータベースで分類するので大変再現性の良いデータが得られることも実証できた。今後保有している他の分離菌株についての解析を進めてゆく予定である。

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法として昨年開発した Multiplex PCR 法の 4 実験室での評価結果から、各地の地方衛生研究所で汎用するには改善が必要なことが判明した。

昨年作成したマウス *C. ulcerans* 感染モデルを用いてその抗体価の消長を今年度に関与した *C. ulcerans* 菌全菌体を用いた ELISA 法で解析した。今年度開発した ELISA 法は、特異性が高くバックグラウンドが低い抗体検出系と評価でき(図 1)、*C. ulcerans* 感染に伴った全菌体に対する抗体の消長を測定す

ることができた。今年度に関鼻感染マウスの使用した血清は感染後 2、4、6、8、10 日のものであったため、IgG 抗体の上昇は見られなかった(図 2)。IgM 抗体は経日的に緩やかな上昇傾向を示した。(図 3)。今後この感染モデルを用いて、*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* 感染によるリンパ節炎膿瘍を示した 14 例目の症例が徳島県で報告された。同症例は DPT 基礎免疫を終えた 6 歳女児であったことから、若年性の感染が起きうることが実証されたとともにジフテリア抗毒素を持つ症例での *C. ulcerans* 発症例として特質すべきものである。

2. 7 地域の動物の保菌状況を調査した結果、ネコの 4.5% から *C. ulcerans* が分離され、さらに血清ジフテリア抗毒素価の調査でウシの 6.7%、シカ血清から 12.2% が陽性である結果から、シカが自然界の保菌者でウシやネコなどに感染させ、ネコが人への感染の *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。

3. *C. ulcerans*、*C. diphtheriae* 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、第一年度に関与したマルチプレックス PCR 法について、6 か所の地衛研で評価を行ったところ、非特異的バンドの増幅や実験室による反応性の違

いなど、問題点が見つかった。

4. 今年度発生した国内初の *C. ulcerans* 小児症例についての調査を行った。また、分離菌の分子疫学的解析ツールとして MLST 法を用いて解析を行い本邦初発の千葉の症例と同じ MLST に属することが判明した。
5. 昨年度に開発したマウスを用いた *C. ulcerans* 感染モデルを用いて感染に伴う抗体価の消長を解析するため、*Corynebacterium* 属菌全菌体に対する血中抗体価を測定するための ELISA 系を開発し、感染マウスの血中抗体価の測定を行なった。

G. 研究発表

- 1) 寺田知正、小山恵理子、山本明彦、本邦初となる *Corynebacterium ulcerans* 感染の小児例、IASR 35: 226-227、2014.
- 2) 石井照之、嶋田直美、青木敦子、小宮貴子、山本明彦、再感染を疑わせる *Corynebacterium ulcerans* 感染症の 1 例、IASR 35: 247-248、2014
- 3) KOUNO T, SANO T, MOMIYAMA A, SUDO M, YAMAMOTO A, KOMIYA T, UMEHARA S, AOKI K and ISHIKAWA K. Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* Isolated from Dogs and Cats in Shiga Prefecture. Republic of Shiga Prefecture Institute of Public Health 49: 5-8, 2014.

2. 学会発表

- 1) 上野太輔, 山根一和, 山本明彦, 中嶋 洋. *Corynebacterium striatum* によるカテー

テル関連血流感染症を来した 1 例. 第 88 回日本感染症学会総会. 福岡、(2014. 6)

- 2) 小山絵理子、石田弘子、矢野さやか、都築謙治、下野生世、嶋田啓司、山本 明彦. ジフテリア毒素原性陽性 *Corynebacterium ulcerans* の徳島県内におけるネコの浸潤状況と患者発生事例について第 26 回四国獣医学術大会、徳島、(2014、9)
- 3) 畠山理沙、梅田 薫、阿部拓人、小笠原準、小宮貴子、岩城正昭、山本明彦、長谷 篤、真田秀一、大阪市のイヌ・ネコにおけるジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* 保菌状況調査、平成 26 年度獣医学術近畿地区大会、大阪、(2014、9)
- 4) 寺田知正 松浦 里、小野朱美、井上美紀、須賀健一、川人雅美、森 一博、山本明彦、ジフテリア毒素産生型 *Corynebacterium ulcerans* 感染による頸部リンパ節炎：本邦最年少例、第 46 回日本小児感染症学会総会、東京、(2014、10)

H. 知的財産権の出願・登録状況

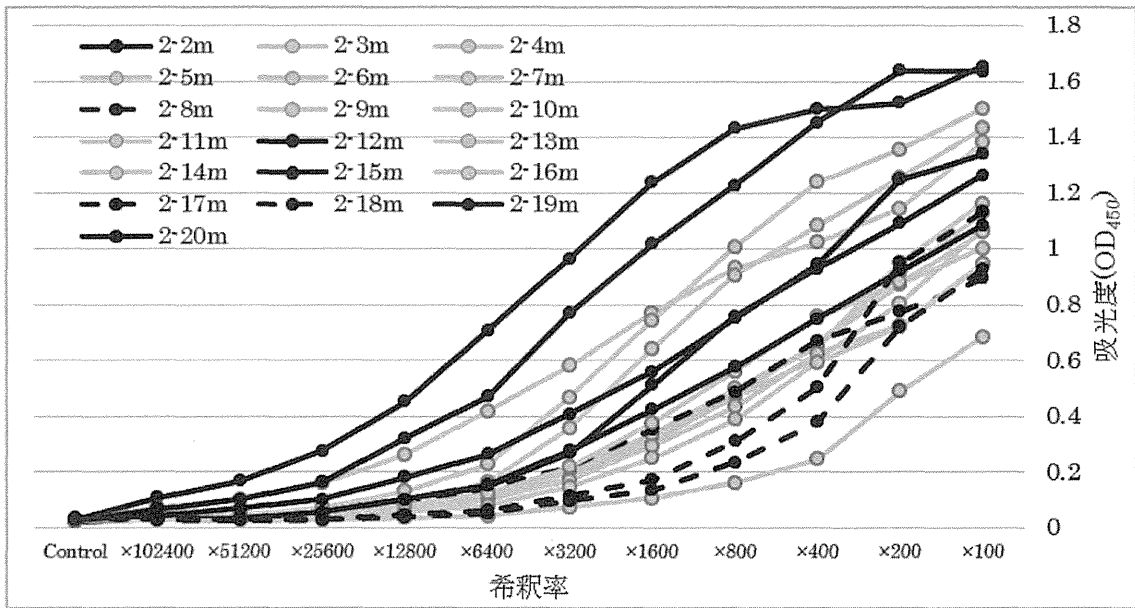
なし

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

表1. *C. ulcerans* 患者発生一覧

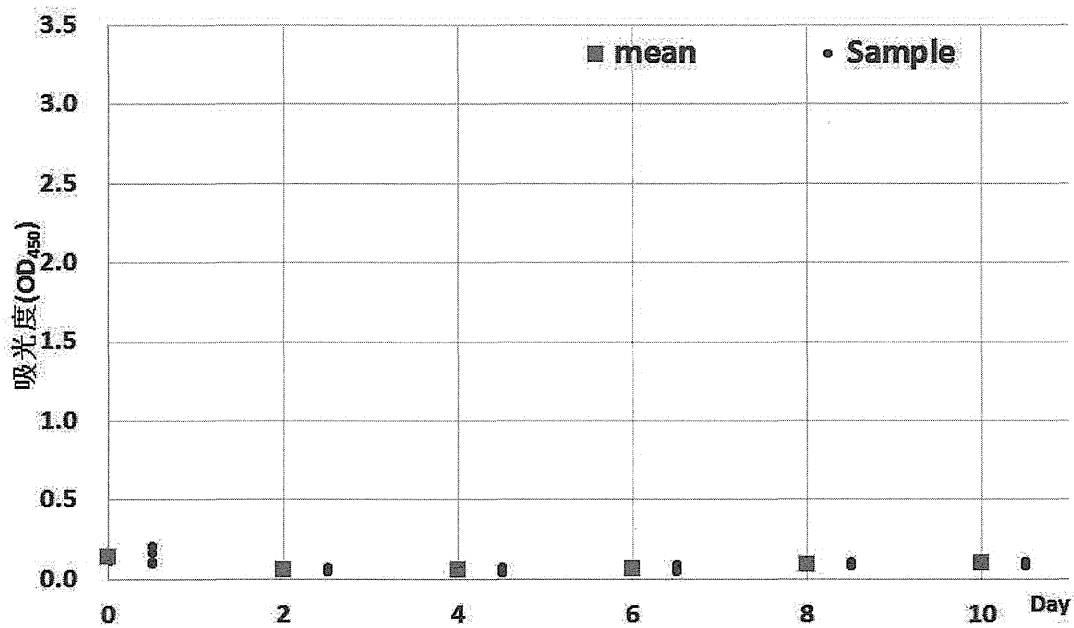
| No | 発症日 | 患者 | 症状等 | その他 | 毒素原性 |
|----|----------|----------------|--|---|------|
| 1 | 2001年2月 | 52歳、女性、千葉県旭市 | 呼吸困難、嘔声、咽頭痛、咳、発熱、上咽頭と喉頭前庭に白色偽膜等 | 猫を20匹飼育、1匹の猫が皮膚炎で死亡後に本人が発症 | + |
| 2 | 2002年10月 | 54歳、男性、千葉県旭市 | 同上 | 1例目の患者と同地区に住居 | + |
| 3 | 2005年9月 | 58歳、男性、岡山県 | 左耳下腺部腫脹、軽度の咳等 | 飼育犬は慢性の皮膚疾患で死亡後に患者が発症 | + |
| 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 | + |
| 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 | 詳細情報なし | + |
| 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 | + |
| 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) | 猫10匹を屋内外で飼育。1匹から菌分離 | + |
| 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 | + |
| 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。 | + |
| 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。 | + |
| 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。 | + |
| 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 | + |
| 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 | + |
| 14 | 2014年4月 | 6歳、女児、徳島県 | ピンポン玉大の頸部リンパ節膿瘍。その穿刺液より菌分離。 | 発病時皮膚病のひどい猫1匹飼育 | + |

図1. マウスの血清を用いた ELISA 測定系の検討



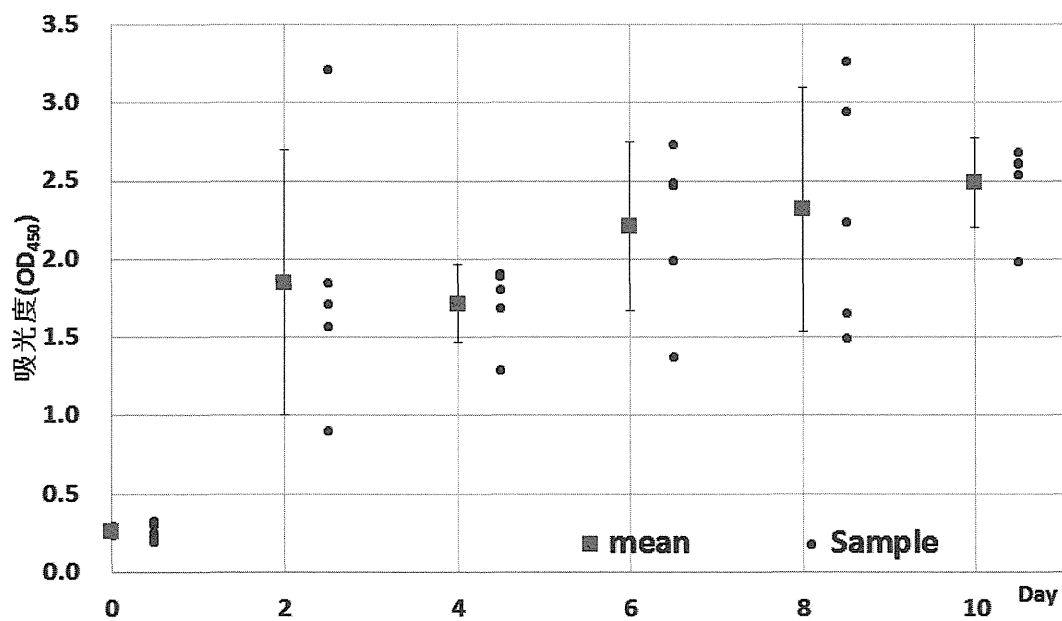
黒実線：強ポジティブコントロール 黒点線：弱ポジティブコントロール

図2. 経鼻感染マウスの IgG 抗体の測定 n=5、mean±SE



: $\rho < 0.01$ (vs day2)、* : $\rho < 0.01$ (vs day4)

図3. 経鼻感染マウスの IgM 抗体の測定 n=5、mean±SE



: $\rho < 0.01$ (vs day2)、* : $\rho < 0.01$ (vs day4)

厚生労働科学研究費補助金 [新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 (新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)]

分担研究報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 (H25-新興-一般-008)

分担研究課題：動物由来新興ヒトバベシア症原虫の国内感染実態の解明

研究分担者 新倉 綾 (国立感染症研究所 動物管理室 主任研究官)

研究協力者 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 平田 晴之 (酪農学園大学 獣医学群 准教授)

研究要旨：ヒトバベシア症はマダニ媒介性の人獣共通感染症である。世界的には、米国の *B. microti* 欧州の *B. divergens* が主要因であるが、流行地域以外での近縁種や新種が患者から相次いでみつかり、ヒトバベシア症は新興感染症として注目されている。本研究で我々は、これまで日本に存在しないとされていた *B. divergens* をはじめてシカから検出し、全国的に分布している事を明らかにした。また、分子疫学的解析から、本原虫は欧州、米国と同じクレードに属する原虫であり、今後、感染患者が発生する可能性が示唆された。さらに、米国の *B. microti* と同系統である *B. microti* US-type の分離を *Ixodes persulcatus* (シユルツマダニ)からはじめて成功し、4 株を樹立した。分離株は遺伝的、抗原的に野ネズミ由来の原虫と同一であり、シユルツマダニが自然界での媒介種であることが確定した。シユルツマダニはマダニ刺口症の主要種であることから、汚染地域におけるヒトへの感染を監視する必要がある。

A. 研究目的

Babesia divergens は欧州のウシバベシア症の主病因であるが、時にヒトに感染して重症化することが知られ、とくに脾臓摘出者では死亡率は約 40%に上る。レゼルボアは、欧州ではウシとされてきたが、シカが自然界における本来の宿主ではないかとの報告が相次いでいる。一方、最近、米国で *B. divergens*

の近縁種(*Babesia* sp.MO1)感染による死亡例が相次ぎ、新興感染症として注目されている。本研究では、日本シカ (*Cervus nippon*) の血液を調べる機会に恵まれたため、*B. divergens* 感染の有無を、赤血球を材料とした遺伝子検査にて検出を行い、遺伝子配列の解読と系統解析を行った。

一方 *Babesia microti* US-lineage によるヒト

バベシア症は米国北東部が主な流行地であり、野ネズミ (deer mouse) と *Ixodes scapularis* (black legged tick) が、レゼルボアおよびベクターである。近年、シカやマダニの増加と生息域の拡大に伴い、患者発生地域の拡大や輸血による感染事故の増加が問題となっている。我々はこれまで、北海道、道東地方の野鼠から US-lineage を分離し、これが米国分離株と遺伝的に近縁であること、同地方の *Ixodes. persulcatus* (シュルツマダニ) から野鼠由来株と同一の遺伝子が検出されること等を報告してきた。本研究では、シュルツマダニがベクターであることを確定するため、原虫分離を試み、抗原・遺伝子性状を野鼠由来株や米国株と比較した。

B. 研究方法

1) *B. divergens* の検出と解析

21 都道府県（北海道、岩手、宮城、栃木、群馬、山梨、長野、岐阜、静岡、千葉、三重、滋賀、京都、兵庫、鳥取、島根、広島、宮崎、徳島、熊本、鹿児島）で捕獲された、合計 449 匹のニホンシカの血餅をマイクロビーズで破碎し、定法により DNA を抽出した。次に *B. divergens* の *18SrRNA* をターゲットとしたプライマー-dv101F/dv1353R (1st) と dv159F/dv1296R (2nd) を用いて Nested PCR によりスクリーニングを行った。陽性検体の *18SrRNA* と β -tubulin、CCT7 遺伝子について、特異的プライマーにより増幅を試み、塩基配列を決定した。GenBank に登録されている類似の配列を用いて、ClustalW による

アライメントを行った。進化系統樹解析は neighbor-joining method 用い、系統樹の分枝位置の信頼性については 1,000 回のブーツストラップによって計算された値を用いた。

2) *B. microti* の分離

旗ざり法により未吸血のマダニを北海道各地で採集し、形態学的に種分類を行った。レゼルボアの生息密度を間接的に知るため、採集時間と採集数を記録し、各採集地域における採集効率を計算した。シュルツマダニのオスは冷凍、メスは 4°C で保存した。オスはプール (~5 匹) してホモジナイザーで破碎後、定法により DNA した。US-lineage の β -tubulin をターゲットとした PCR でスクリーニングを行い、採集地ごとの *B. microti* US-lineage 陽性率を算出した。シュルツマダニのメスはスナネズミに数日吸血させた後回収した。実体顕微鏡下で唾液腺を取り出し、そのホモジェネートをハムスターに腹腔内接種した。感染ハムスターを定期的に微量採血し、血液塗抹標本を作成した。赤血球内感染率がピークに達した時点で全採血し、感染赤血球の凍結保存、ウェスタンブロット並びに CCT7 遺伝子のシークエンス材料とした。また、感染後 8 週後の血液から血清を分離し。抗血清とした。

(倫理面からの配慮について)

本課題の動物実験は、国立感染症研究所動物実験委員会に承認され、指針に基づいて国