

別添 4

令和 4 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
「野生動物及び愛玩動物が保有する動物由来感染症の国内サーベイランスシステムの
構築に資する研究」
分担研究報告書

国内の野生動物及び愛玩動物サーベイランスのガイダンスの作成

分担研究者	鈴木 道雄 (国立感染症研究所獣医科学部)
研究協力者	李 天成 (国立感染症研究所ウイルス第二部)
	松鶴 彩 (国立感染症研究所獣医科学部)
	石嶋 慧多 (国立感染症研究所獣医科学部)
	立本 完吾 (国立感染症研究所獣医科学部)
	新井 智 (国立感染症研究所感染症疫学センター)
	安藤 秀二 (国立感染症研究所ウイルス第一部)
	岩城 正昭 (国立感染症研究所安全実験管理部)
	山本 明彦 (国立感染症研究所安全実験管理部)
	木村 美幸 (国立感染症研究所細菌第二部)
	妹尾 充敏 (国立感染症研究所細菌第二部)
	川瀬 遵 (島根県保健環境科学研究所)
	奥谷 晶子 (国立感染症研究所獣医科学部)
	今岡 浩一 (国立感染症研究所獣医科学部)
	堀田 明豊 (国立感染症研究所獣医科学部)
	藤田 修 (国立感染症研究所獣医科学部)
	小泉 信夫 (国立感染症研究所細菌第一部)
	宮崎 秀継 (国立感染症研究所真菌部)
	梅山 隆 (国立感染症研究所真菌部)
	上野 圭吾 (国立感染症研究所真菌部)
	村長 保憲 (国立感染症研究所真菌部)
	泉山 信司 (国立感染症研究所寄生動物部)
	森嶋 康之 (国立感染症研究所寄生動物部)
	西川 義文 (帯広畜産大学原虫病病研究センター)

研究要旨：動物由来感染症の検査法について、各種の動物から病原体を検出する際の検体採取法および検査・診断法等について適切な方法を検討し、国内の野生動物および愛玩動物等を対象とした動物由来感染症サーベイランスのガイダンスとしてまとめるため、各感染症の研究者の協力を得て作成を進めた。具体的にはガイダンスの作成対象として、ウイルス、細菌、真菌、原虫および条虫を病原体とする計 15 種の動物由来感染症を選定し、それぞれの感染症の病原体の検出方法を中心に、ガイダンスをまとめた。今回作成した動物由来感染症のガイダンスは、今後動物由来感染症のサーベイランスを実施していく上で非常に有用であり、ワンヘルスの推進、ひいては公衆衛生の向上・増進に寄与することが期待される。

A. 研究目的

これまで主に人医療の面からマニュアル化されることの多かった動物由来感染症の検査法について、各種の動物から病原体を検出する場合にそれ

ぞれ適切な検体採取法および検査法等に関する知見を集約し、各感染症の疫学情報等とともに動物を対象とした動物由来感染症サーベイランスのガイダンスとしてまとめる。

B. 研究方法

国内の野生動物、愛玩動物および産業動物から病原体を検出する際の検体採取法および検査・診断法等について、適切な方法を検討し、各感染症の疫学情報等とともに動物由来感染症サーベイランスを実施する際のガイドンスとしてまとめた。

ガイドンスの作成対象として、ウイルス感染症であるE型肝炎、狂犬病、重症熱性血小板減少症候群(SFTS)およびハンタウイルス感染症(腎症候性・肺症候群)の4種、細菌感染症であるオウム病、コリネバクテリウム・ウルセランス感染症、細菌性犬・猫咬傷感染症、炭疽、ブルセラ症、野兔病およびレプトスピラ症の7種、真菌感染症であるクリプトコックス症、原虫感染症であるクリプトスポリジウム症およびトキソプラズマ症の2種、条虫感染症であるエキノコックス症の計15種の感染症を選定し、各感染症を専門とする研究者に研究協力あるいは原稿執筆依頼の形でガイドンスの作成を依頼した。これらの15感染症については基本的に人(患者)由来検体の検査法が確立しており、その多くがマニュアル化されているが、それらの検査法のうち、動物由来検体の検査にも適用し得る手法を、各感染症のガイドンスを作成する専門家が検討し、選定した。その上で各種の動物からの検体採取法やその保存・輸送法についての項目を記載し、また各検査法を動物由来検体に適用するに当たり、変更を要する点を対象動物種毎に検討し記述した。さらに各感染症の病原体の性状や疫学情報などについてもまとめ、それぞれの感染症のガイドンスを作成し、その全体を研究分担者がとりまとめて編集した。

C. 研究結果

それぞれの動物由来感染症においてサーベイランスの対象として想定される各種の動物における病原体の検出方法を中心に、各感染症の疫学情報等とともに各ガイドンスをまとめた。ガイドンスに記載のある各感染症の検査法を表1にまとめた。適用される検査法として最も多いのは検体からの遺伝子検出であり、次いで病原体の分離を行ってその各種性状を確認する病原体検出や抗体価を測定する抗体検出が多く感染症で有用である。一部の感染症では抗原検出や毒素検出の手法も用いられる。

遺伝子検出は各動物種に広く応用可能であるが、人患者の検査室診断と動物の疫学調査では検査対象とするサンプルがそれぞれ異なる場合があり、また抗体検出においては判定基準を対象動物毎に決定する必要があるなど、対象動物が多岐に

亘るほど多くの検討、各論的記述が必要であった。

各感染症のガイドンスについては別添1を参照。

D. 考察

動物由来感染症は、その病原体も感染源となる動物も多種多様であり、優先的にガイドンスを作成していくべき感染症の選択が難しいが、本研究では国内における人・動物それぞれでの発生状況や感染症法上の扱いなどを考慮して優先度を決定し、15種の感染症を選定した。今後、これらのガイドンスがサーベイランスで活用される中で得られる知見がフィードバックされることにより、検体採取法や検査法についてさらなる最適化を進めることができると考えられる。重要でありながら各種の動物のサーベイランスに資するガイドンスが整備されていない動物由来感染症は未だ多く残っており、それらの整備をしつつ、作成したガイドンスを広く一般に利用できる形で公開すること、またその周知を図っていくことが今後の課題となる。

E. 結論

今回作成した動物由来感染症のガイドンスは、今後動物由来感染症のサーベイランスを実施していく上で非常に有用であり、ワンヘルスの推進、ひいては公衆衛生の向上・増進に寄与することが期待される。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) M. Suzuki, K. Imaoka, M. Kimura, S. Morikawa and K. Maeda. *Capnocytophaga catalasegens* sp. nov., isolated from feline oral cavities. *Int J Syst Evol Microbiol* 2023, 73: 005731. DOI 10.1099/ijsem.0.005731

2. 学会発表

(1) 鈴木道雄, 今岡浩一, 前田健. *Capnocytophaga canimorsus* 国内ヒト患者由来株の莢膜遺伝子型の解析. 第165回日本獣医学会学術集会, オンライン, 2022年9月

(2) 鈴木道雄, 今岡浩一, 前田健. *Capnocytophaga canimorsus* 国内ヒト患者由来株の莢膜遺伝子型の解析. 第165回日本獣医学会学術集会, オンライン, 2022年9月

3. 講演会
該当なし

2. 実用新案登録
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし

3. その他
該当なし

表1 ガイダンスを作成した動物由来感染症および記載のある検査法一覧

病原体	動物由来感染症	病原体検出	遺伝子検出	抗体検出	抗原検出	毒素検出
ウイルス	E型肝炎		○	○		
	狂犬病	○	○		○	
	重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)	○	○	○		
	ハンタウイルス感染症 (腎症候性・肺症候群)	○	○	○		
細菌	オウム病		○			
	コリネバクテリウム・ウルセランス感染症	○	○	○		○
	細菌性犬・猫咬傷感染症	○	○			
	炭疽	○	○			○
	ブルセラ症	○	○	○		
	野兔病	○	○	○	○	
	レプトスピラ症	○	○	○		
真菌	クリプトコックス症	○	○		○	
原虫	クリプトスポリジウム症	○	○			
	トキソプラズマ症	○	○	○		
条虫	エキノコックス症	○	○			

令和4年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
「野生動物及び愛玩動物が保有する動物由来感染症の国内サーベイランスシステムの
構築に資する研究」

分担研究報告書：国内の野生動物及び愛玩動物サーベイランスのガイダンスの作成
分担研究者 鈴木 道雄（国立感染症研究所獣医科学部）

[付録1] 動物由来感染症ガイダンス

1. E型肝炎	3
2. 狂犬病	16
3. 重症熱性血小板減少症候群（SFTS）	33
4. ハンタウイルス感染症（腎症候性・肺症候群）	49
5. オウム病	58
6. コリネバクテリウム・ウルセランス感染症	66
7. 細菌性犬・猫咬傷感染症	82
8. 炭疽	96
9. ブルセラ症	118
10. 野兎病	143
11. レプトスピラ症	166
12. クリプトコックス症	179
13. クリプトスポリジウム症	191
14. トキソプラズマ症	209
15. エキノコックス症	225

E型肝炎ガイドンス

目次

1. 感染症の概説
2. 検体の取り扱い
 - 2-i. 検体取扱い上の注意（バイオセーフティ）
 - 2-ii. 各種動物からの検体採取法
 - 2-iii. 検体の保存法
 - 2-iv. 検体の輸送法
3. 検査法各論
 - 3-i. 検査法（総論）
 - 3-ii. 検査法（各論）
 - 3-ii-1 RT-PCR 法
 - 3-ii-2 リアルタイム RT-PCR 法
 - 3-ii-3 ELISA 法による抗体検出法
 - 3-iii. 各種動物の検査法
 - 3-iii-1. ブタとイノシシ
 - 3-iii-2. シカ
 - 3-iii-3. ウサギ
 - 3-iii-4. ラクダ
 - 3-iii-5. マングース
 - 3-iii-6. サル
 - 3-iii-7. ラット
4. 参考文献
5. 連絡先
6. 謝辞

1. 感染症の概説

病原体の性状

E型肝炎ウイルス(Hepatitis E Virus, HEV)は小型球形のエンベロープを持たないRNAウイルスである。人においては遺伝子型が異なる四つのHEV (Genotype 1-4 HEV)がE型肝炎の主な原因ウイルスである、近年HEVはヒトだけではなく、多くのほ乳類や鳥類、さらに魚類からも分離され、分離株の増加に伴ってHEVの遺伝学的分類も日々更新されてきている。

現在、HEVはへぺウイルス科 (*Hepeviridae*) に分類され、へぺウイルス科には *Orthohepevirinae* と *Parahepevirinae* という2つの亜科がある

(ictv.global/taxonomy)。魚由来のCutthroat trout virusは*Parahepevirinae*に属するが、それ以外のHEV株は全て*Orthohepevirinae*に分類されている。

*Orthohepevirinae*は更に少なくとも*Paslahepevirus*, *Avihepevirus*, *Rocahepevirus*, 及び*Chirohepevirus*の四つの属に分けられる。各属にまたいくつかのspecies (種)が含まれる。このうち*Paslahepevirus*属には*balayani*と*alci*と2つの種がある。*balayani*には前述のGenotype 1 (G1)-4(G4)を含むG1からG8まで8つの遺伝子型があり、ヒトのみならずブタ、イノシシ、シカ、サル、マンゴース、ウサギ、及びラクダが自然宿主と思われる様々なHEVが含まれている。これまでにヒトに感染することが明らかになっているHEVは主に*balayani*に属するウイルスである。ヘラジカから検出されたMoose HEVは*alci*に分類されている。トリ由来Avian HEVは*Avihepevirus*属に、フェレット、ラットからは*Rocahepevirus*に属するHEVが、コウモリからは*Chirohepevirus*に属するBat HEVが見つっている。

HEVのゲノムはプラス一本鎖RNAで5'末端にはcap構造が、3'末端にはポリアデニル酸が付加されている。塩基数はポリアデニル酸を除き、約6.4~7.2Kbである。HEVの遺伝子上には3つのオープンリーディングフレーム(ORF1、ORF3およびORF2)が5'末端から一部重複しながら配列している。ORF1は非構造蛋白をコードする。ORF2は72 kDaの構造蛋白をコードする領域である。ORF3はウイルス複製において多様な機能を担っている。

ヒトがHEVに感染した場合、一部の不顕性感染例を除き、臨床所見は主に黄疸を伴う急性肝炎である。患者は平均6週間の潜伏期の後に発熱と悪心、腹痛等の消化器症状が急速に始まる。ときには倦怠感、食欲不振等の症状が先行することもある。

E型肝炎の典型的な症状である黄疸は、発症後の0～10病日目に顕著になり、この時期にAST値とALT値は著しく上昇する。この時期には抗HEV-IgGとIgMが共に検出される。発症前後の短期間に血液と糞便からHEV-RNAをRT-PCRで検出することができる。E型肝炎の特徴として高い死亡率があげられるが、それはA型肝炎の10倍ともいわれ、妊婦では実に20%に達するという報告もある。ヒトとは対照的にHEVが動物に感染した場合、ALT上昇以外の明確な臨床症状はあまり見られない。

これまでにG1～4 HEV, G7 HEV, rabbit HEV 及び rat HEV がヒトに感染することが確認されている。カニクイザルを用いた実験でG5、G6 及び G8 HEV が感染することからヒトへの伝播の可能性が示唆されている。E型肝炎が人獣共通感染症であり、ブタ、イノシシ、シカ、サル、マングース、ウサギ、ラクダ及びラットがHEVの主な宿主である。HEVはBS2Lに分類される病原体であり、E型肝炎と診断された場合は4類感染症として直ちに届出を行わなければならない

(<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/01-04-01.html>)。

2. 検体の取り扱い

2-i. 検体取扱い上の注意 (バイオセーフティ)

検査に用いる検体は、バイオセーフティーに十分留意した上で取り扱う必要がある。検体の処理はクラスIIの安全キャビネット内で行い、作業中は必ず個人用防護具(グローブ、マスク、ガウンなど)を着用する。

2-ii. 各種動物からの検体採取法

検査に用いる検体は主に血清と糞便である。殺処分された動物の場合は肝臓組織を採取し検査に供することが望ましい。検査を効率良くかつ正確に実施するためには、検体は発症後できるだけ早い時期に採取し速やかに検査に供する。すぐに検査に供しない場合は凍結保存する。

2-iii. 検体の保存法

検体は-20℃以下で保管する。材料の保管及び輸送中の凍結、融解の繰り返しは極力避けなければならない。

2-iv. 検体の輸送法

採取した検体を密閉容器（一時容器）に入れ、緩衝材および吸収剤とともに密閉性の二次容器に入れる。二次容器を非密閉性の三次容器に入れて冷凍で輸送する。検体番号、発病日、検体採取日等、必要事項を明記したうえ、輸送に関する安全管理規定等を遵守する。送付先にはあらかじめ検体数、搬入予定日などを連絡しておく。

3. 検査法

3-i. 検査法(総論)

HEV の検査は主に RT-PCR あるいはリアルタイム RT-PCR によるウイルス遺伝子検査と ELISA 法による抗体検査で行う。病原体検査は血清、糞便あるいは肝組織を用い HEV 遺伝子の検出により感染を確定する。抗体検査は血清中の抗体の検出により感染推定するが、IgM 抗体は急性期の感染の重要マーカーである。HEV はヒト肝癌細胞由来 PLC/PRF/5 などの細胞で増殖が可能なのでいくつかのウイルス株の分離が成功している。しかし、この細胞を用いた場合であっても HEV の増殖は遅い上分離効率も低いため、現在一般検査には使われていない。

3-ii. 検査法（各論）

3-ii-1 RT-PCR 法

本法では HEV 遺伝子の一部の領域を増幅し、さらにその塩基配列を系統樹解析してウイルスの遺伝子型を同定する。

(1) 器材および試薬等

- 1) 遠心分離器
- 2) ボルテックスミキサー
- 3) マイクロピペット
- 4) フィルター付きマイクロピペットチップ
- 5) マイクロチューブ(1.5ml)
- 6) RNA 抽出キット

7) 純エタノール

8) 低速遠心機

9) 遺伝子増幅装置

10) 逆転写酵素

11) Taq DNA ポリメラーゼ

12) アガロースゲル電気泳動装置

13) トランスイルミネータ

14) プライマー

*G1~G8 HEV をターゲットした場合に用いるプライマー¹

First PCR

Forward primer HE044 : 5' -CAAGGHTGGCGYTCKGTTGAGAC-3'

Reverse primer HE040 : 5' -CCCTTRTCCTGCTGAGCRTTCTC-3'

増幅する HEV 遺伝子の断片は 506bp である。

Nested PCR

Forward primer HE044 : 5' -CAAGGHTGGCGYTCKGTTGAGAC-3'

Reverse primer HE041 : 5' -TTMACWGTCRGCTCGCCATTGGC-3'

増幅する HEV 遺伝子の断片は 466bp である。

*Rat HEV と ferret HEV をターゲットした場合に用いるプライマー²

First PCR

HEV-cs 5' -TCGCGCATCACMTTYTTCCARAA-3'

HEV-cas 5' -GCCATGTTCCAGACDGTRTTCCA-3'

増幅する HEV 遺伝子の断片は 469-472bp である。

Nested PCR

HEV-csn 5' -TGTGCTCTGTTTGGCCNTGGTTYCDG-3'

HEV-casn 5' -CCAGGCTCACCRGARTGYTTCTTCCA-3'

増幅する HEV 遺伝子の断片は 331~334 bp である。

*D=A, G or T; H=A, T or C; K=G or T; M=A or C; N=A, C, G or T; R=A or G;
Y=C or T.

(2) RNA の抽出

市販されるウイルス RNA 抽出キットを使用し、説明書に従い、RNA を抽出する。

(3) cDNA 合成

市販される cDNA 合成キットを使用し、説明書に従い cDNA を合成する。

High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit ((ABI Applied Biosystems) を用いて行う場合 :

PCR チューブに以下の試薬を加える。反応液の総量は 20 μ L である。

1.0 μ l DW

1.0 μ l 10 \times RT-Buffer

0.8 μ l 25xsNTP Mix (100mM)

2.0 μ l 10xRT Random Primers

1.0 μ l MultScribeTM Reverse Transcriptase

1.0 μ l RNase Inhibitor

3.2 μ l Nuclease-free DW

10.0 μ l RNA

cDNA の合成はサーマルサイクラーを用い以下の条件で行う

25 $^{\circ}$ C 10 分

↓

37 $^{\circ}$ C 120 分

85 $^{\circ}$ C 5 分

↓

4 $^{\circ}$ C

(4) RT-PCR 反応

1) First PCR 反応

PCR チューブに以下の試薬を加える。反応液の総量は 50 μ l である。

32.75 μ l DW

5 μ l 10 \times ExTaq Buffer、

5 μ l dNTP Mixture (2.5mM-each)

1 μ l Forward primer HEV044 or HEV-cs (10pmol/ml)

1 μ l Reverse primer HEV040 or HEV-cas (10pmol/ml)

0.25 μ l TaKaRa Ex Taq (5U/ml)

5 μ l 上記 RT 反応液

サーマルサイクラーを用い、以下の条件で PCR 反応を行う

*G1~G8 HEV をターゲットした場合：

96 $^{\circ}$ C 2分

↓

94 $^{\circ}$ C 30秒

55 $^{\circ}$ C 30秒

72 $^{\circ}$ C 75秒

×35 サイクル

↓

72 $^{\circ}$ C 7分

↓

4 $^{\circ}$ C

*Rat HEV と ferret HEV をターゲットした場合：

95 $^{\circ}$ C 1分

↓

94 $^{\circ}$ C 30秒

52 $^{\circ}$ C 30秒

72 $^{\circ}$ C 60秒

×35 サイクル

↓

72 $^{\circ}$ C 7分

2) Nested PCR 反応

PCR チューブに、以下の試薬を加える。反応液の総量は 50 μ l である。

35.75ml DW

5 μ l 10 \times ExTaq Buffer、

5 μ l dNTP Mixture (2.5mM-each)

1 μ l Forward primer HEV044 or HEV-csn (10pmol/ml)

1 μ l Reverse primer HEV041 or HEV-casn (10pmol/ml)

0.25 μ l TaKaRa Ex Taq (5U/ml)

2 μ l 1st PCR 反応液

First PCR と同じ条件で PCR 反応を行う。

(5) RT-PCR 産物の確認

RT-PCR 産物 10 μ L を 2.0%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色により増幅された DNA 産物を確認する。

(6) 塩基配列解析

PCR 産物が電気泳動で確認できたら目的とするバンドを切り出して市販の PCR 産物精製キットを用いて精製する。

精製した RT-PCR 産物について BigDye Terminator ver. 3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI, 4336917) を用いてシーケンシング反応を行い、シーケンサーで塩基配列を解析する（詳細はキットの取り扱い説明書を参照すること）。得られた塩基配列を系統樹解析して遺伝子型を同定する。

3-ii-2 リアルタイム RT-PCR 法

G1~G8HEV の検査に適用する³

(1) プライマー配列

Forward primer JVHEVF 5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3'

Reverse primer JVHEVR 5'-AGGGGTTGGTTGGATGAA-3'

TaqMan probe JVHEVP 5'-FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-TAMRA-3'

(2) 反応液の調整

反応液の調製は以下の通りである。この方法は ABI 7500 リアルタイム PCR システムを用いるものである。機種が異なる時にはそれぞれの機種での最適な条件に合わせる。HEV RNA 陽性コントロール(10^7 から 10^0) および検体は各 2 ウェルを用いる。PCR チューブに、以下の試薬を加える。反応液の総量は 20 μ l である。

5.0 μ l 4 \times TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix

1.8 μ l 10 μ M JV-HEVF

1.8 μ l 10 μ M JV-HEVR

0.5 μ l 10 μ M JV-HEVP

5.9 μ l DW

5.0 μ l RNA

(3) PCR 反応

PCR 反応は以下に示した条件で行う。

50°C 5分

95°C 20秒

↓

95°C 3秒、

60°C 30秒

×40 サイクル。

(4) ABI 7500リアルタイムPCRシステムを用いた蛍光強度測定

蛍光強度測定しHEV RNAを 10^7 から 10^0 コピーに希釈した標準サンプルによる検量線を作成し、サンプルの初期濃度(コピー数)を算出する。

(5) 判定

サンプルのコピー数が2ウェル共に10コピー以上の時に陽性とする。また、1ウェルのみ行ったときには再度行い、2回共に10コピー以上の時に陽性とする。

判断に困難を来したときには再度行い判定する。

3-ii-3 ELISA 法による抗 HEV 抗体の検出

HEV の感染によって血中には HEV に対する特異的な抗体が誘導される。HEV の検査には抗 HEV IgG 抗体と同 IgM 抗体の検出が迅速かつ確実な方法である。抗体検出は N 末端から 100~111 アミノ酸を欠失した HEV ORF2 を組換えバキュロウイルスで発現することによって得られる中空粒子 (hepatitis E virus-like particle, HEV-LP) を固相化抗原とした ELISA 法を用いる⁴。G1-G8 HEV に関しては血清型が同じなので何れか一種類の抗原、例えば G1 HEV-LP が全ての抗原検出に使用できる。Rat HEV と ferret HEV の抗体検出はそれぞれ rat HEV-LP と ferret HEV-LP を抗原に使用する。

(1) 器具および試薬

- 1) 96 穴平底プレート : IMMULON 2, Dynatech Laboratories, Inc. USA. catalog# 011-010-3455、あるいは MaxiSorp, (Nalgen NUNC International, Denmark. Catalog#439454) を用いる。
- 2) コーティング用緩衝液 : [Sigma C-3041] を用いて carbonate-bicarbonate 緩衝液 (pH9.6) を調製する。
- 3) PBS-T : 0.05% Tween20 を含む PBS を調製する。
- 4) 1%SM/PBS-T : 1% skim milk (DIFCO catalog#0032-17-3) を含む PBS-T を調製する。
- 5) 5%SM/PBS : 5% skim milk を含む PBS を調製する。
- 6) OPD 用緩衝液 : [Sigma P-4809] を用いて 0.05M phosphate-citrate 緩衝液 (pH5.0) を調製する。
- 7) OPD 溶液 : [Sigma P-3804] を OPD 用緩衝液に 0.4mg/ml となるように溶解する。
- 8) ELISA plate reader
- 9) 37°C インキュベーター
- 10) 96 穴プレート用シール
- 11) 陽性対照血清 (E 型肝炎患者回復期血清)
- 12) 陰性対照血清 (正常ヒト血清)

(2) 方法

- 1) 中空粒子をコーティング用緩衝液で 1 µg/ml に希釈し、96 穴平底プレートの各ウェルに 100 µl 加え 4°C に一夜置く。

- 2)各ウェルの液を除き 150 μ l の 5%SM/PBS を加える。37°Cに 1 時間、あるいは4°Cに一夜置く。
- 3)各ウェルの液を除き PBS-T で 3 回洗浄する。
- 4)血清を 1%SM/PBS-T で 1:200 に希釈し 100 μ l 加える。37°C に 1 時間置く。
- 5)各ウェルの液を除き PBS-T で 3 回洗浄する。
- 6)各ウェルに HRP-conjugated goat anti-human IgG(Cappel catalog No. 55224) (1:10, 000,)あるいは IgM(Cappel catalog No. 55255) (1:1, 000)を 100 μ l 加える。37°C に 1 時間置く。
- 7)各ウェルの液を除き PBS-T で 4 回洗浄する。
- 8)OPD 溶液に 30%過酸化水素水を 0.04% (v/v) 加える (OPD 溶液 12.5 mL に対して 30%過酸化水素水を 5 μ l 加える)。各ウェルに 100 μ l 加え遮光して室温に 30 分置く。
- 9)4N 硫酸を各ウェルに 50 μ l 加え反応を停止する。
- 10)492nm の吸光度を測定する。

(3)判定

OD 値が 0.2 以上の検体を陽性とする。

3-iii. 各種動物の検査法

HEV を伝播する動物主にブタ、イノシシ、シカ、ウサギ、ラクダ、マングース、サルおよびラットがある。宿主が異なっても遺伝子検査法は共通である。ただし、抗体検査の場合、動物種によって用いる二次抗体が異なる。

3-iii-1. ブタとイノシシ

ブタとイノシシは HEV の主たる自然宿主である。ブタからは G3 と G4 HEV が、イノシシからは G3、G4、G5 及び G6 HEV 遺伝子が検出されている。HEV 遺伝子は 2-3 ヶ月齢のブタから高率に検出されるが、出荷豚から検出された報告もある。抗体検査には horseradish peroxidase (HRP)-labeledgoat anti-swine IgG (H + L) (KPL, Guildford, UK) (1:4000)を二次抗体として使用する。

3-iii-2. シカ

シカ肉が原因と考えられる E 型肝炎がわが国で報告されが、シカにおける抗体保有率は低く、シカから HEV 遺伝子が検出される例が稀なことからリザーバーとしての可能性は低いと考えられる。

抗体検査には HRP-conjugated rabbit anti-deer IgG ((H+L)) (1:1000) (KPL) を二次抗体として使用する。

3-iii-3. ウサギ

ウサギは Rabbit HEV の自然宿主である。感染実験では Rabbit HEV がウサギに急性肝炎のみならず不顕性感染と持続感染も引き起こすことが明らかになっている。ウサギ肉の喫食やペットの飼育も感染のリスクがある。

抗体検査には HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody (1:5000) (Cappel, Westchester, PA, USA) を二次抗体として使用する。

3-iii-4. ラクダ

ラクダは G7 と G8 HEV の自然宿主である。これらのウイルスはラクダのミルクからも検出されるので肉類や乳製品などの喫食にも十分に注意すべきある。抗体検査には HRP-conjugated goat anti-camel IgG (H+ L) (1:1000) (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX) を二次抗体として使用する。

3-iii-5. マングース

沖縄に棲息しているマングースから抗 HEV 抗体および G3 HEV 遺伝子が検出されたことから、HEV を伝播するリスクがある。抗体検査には HRP-conjugated goat anti-cat IgG (H+L) (1:4,000) (Kirkegaard and Perry Laboratories, KPL, Guildford, UK) を二次抗体として使用する。

3-iii-6. サル

これまでニホンザルから G3 HEV が、アカゲザルから G4 HEV が分離されている。実験動物として輸入したカニクイザルも高い抗体保有率を有する。抗体検査には HRP-conjugated goat anti-monkey IgG (H+L) (1:10 000) (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) を二次抗体として使用する。

3-iii-7. ラット

ラットは rat HEV の自然宿主である。rat HEV はヒトに感染することが報告されている。抗体検査には HRP-conjugated goat anti-rat IgG(H+L) (1:10,000 dilution; Zymed Laboratories) を二次抗体として使用する。

4. 参考文献

1. Mizuo H, Suzuki K, Takikawa Y, Sugai Y, Tokita H, Akahane Y, Itoh K, Gotanda Y, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H, 2002: Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3209-18.
2. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson, BH, Meng XJ, Hill VR. 2006; A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J. Virol. Methods* 131: 65-71.
3. Johne, R., Plenge-Boonig, A., Hess, M., Ulrich, R. G., Reetz, J. & Schielke, A. (2010a). Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J Gen Virol* 91, 750-758.
4. Li TC, Zhang J, Shinzawa H, Ishibashi M, Sata M, Mast EE, Kim K, Miyamura T, Takeda N, 2000: Empty virus-like particle-based enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to hepatitis E virus. *J Med Virol* 62: 327-33.

5. 連絡先

李 天成

国立感染症研究所ウイルス第二部

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

電話 : 042-561-0771 (3359)

6. 謝辞

本マニュアルは元職員武田直和のご協力により作成した。

狂犬病ガイドンス

目次

1. 感染症の概説（人と動物の症状）
 - 1- i 病原体の性状
 - 1- ii 疫学（人と動物）

2. 検体の取り扱い
 - 2- i 検体取り扱い上の注意（バイオセーフティ）
 - 2- ii 各種動物からの検体採取法
 - 2- iii 検体の輸送法
 - 2- iv 検体の保存法

3. 検査法
 - 3- i 検査法（総論）
 - 3- ii 検査法（各論）
 - 3- ii - (1) 直接蛍光抗体法による抗原検出
 - 3- ii - (2) 免疫組織化学による抗原検出
 - 3- ii - (3) RT-PCR 法
 - 3- ii - (4) 乳のみマウス脳内接種法によるウイルス分離法
 - 3- ii - (5) 培養細胞を用いたウイルス分離法
 - 3- iii 各種動物の検査法
 - 3- iii - (1) 犬および猫
 - 3- iii - (2) 野生動物および野生動物

4. 参考文献

5. 連絡先

6. 謝辞など

1 感染症の概説（人と動物の症状）

1- i 病原体の性状

狂犬病の原因はモノネガウイルス目ラブドウイルス科リッサウイルス属に分類される狂犬病ウイルスである。狂犬病ウイルスは直径約 75nm、長さ約 180nm の弾丸状の形状をとり、脂質二重膜からなるエンベロープを有している。ウイルスは 5 つの構造タンパク質（N: nucleoprotein、P: phosphoprotein、M: matrix protein、G: glycoprotein、L: RNA dependent RNA polymerase）から構成され、ゲノムは一本鎖マイナス鎖 RNA である。

リッサウイルス属には狂犬病ウイルスの他に、世界各地のコウモリや哺乳動物から分離されている複数のリッサウイルスが含まれる。リッサウイルス感染症の発生頻度は低いものの狂犬病に類似した疾患を引き起こす。狂犬病ウイルスを含むリッサウイルスは感染症法により三種病原体等に区分されており、一部の実験室株（固定毒株 CVS 株など）は BSL2 での取り扱いが、それ以外の野外株（街上毒株）等は BSL3 での取り扱いが必要である。ただしワクチン株ウイルス（HEP-Flury 株および RC・HL 株）については規制除外病原体等に指定されている。狂犬病疑似症例の臨床検体は、感染性の検体として確定診断されるまで BSL2 施設で取り扱う。

1- ii 疫学（人と動物）（感染症法、家伝法など国内における法律上の扱い含む）

狂犬病はすべての哺乳動物が感染し発症する代表的な動物由来感染症であり、人、犬の他にも野生動物や生産動物の感染および発症が認められている。狂犬病を発症した動物の唾液中にウイルスが排泄され、咬傷により人や動物に伝播する。体内に侵入した後、ウイルスは中枢神経系で増殖し、致死的なウイルス性脳炎を引き起こす。日本での発生は現在認められていないが、世界的には 150 以上の国と地域で認められ、年間 5 万人以上が犠牲となっている。国や地域によって人に対する危険性が高い動物は異なるが、人の狂犬病の 90%以上が犬からの咬傷によるものである¹⁻³。現在 WHO と国際獣疫事務局（WOAH）は、国連食糧農業機構（FAO）や狂犬病予防連盟（GARC）と共同で、2030 年までに犬に由来する人の狂犬病の死亡数をゼロにすることを目標に掲げ、世界的な取り組みが行われている⁴。

人の狂犬病は感染症法 4 類感染症全数把握疾患に分類されている。狂犬病予防法により犬、猫、その他の動物（牛、馬、めん羊、山羊、豚、鶏及びあひるを除く）の狂犬病を診断した獣医師またはその所有者には保健所への届出と隔離が義務づけられている。牛、馬、めん羊、山羊、豚、鶏及びあひるの狂犬病は家畜伝染病予防法にて監視伝染病（家畜伝染病）に指定されている。診断した獣医師はただちに家畜保健衛生所への届出が必要となる。

[人]日本では 1956 年以降、国内由来の人の狂犬病は認められていない。しかし 1970 年に 1 例、2006 年に 2 例、2020 年に 1 例と、海外で動物からの咬傷を受けたことによる輸入感染事例が確認されている¹。

動物から咬傷を受けた後、典型的には 30~90 日間の潜伏期の後、前駆期、急性神経症状期（興奮期）、麻痺期（昏睡期）の経過をたどる^{1-3,5}。前駆期には全身倦怠感、食欲不振、咬傷部位の灼熱感や疼痛などの知覚異常が認められる。興奮期には幻覚、幻視、興奮、躁動などを主症状とし、この時期に認められる恐水症状や恐風症状は狂犬病に特徴的な症状である。最終的に脳神経麻痺あるいは筋肉麻痺により死亡する。必ずしも典型的な経過を辿らないこともあることから、確定診断には実験室内診断が必要となる。生前診断として唾液、脳脊髄液、頂部皮膚や角膜などの生検材料を用いた検査（直接蛍光抗体法、組織免疫化学、RT-PCR 法）が行われるが、死後の脳組織を用いた検査に比べて感度が低いことがあるため、複数個所の材料を用いて、複数回の検査が必要となる⁶。抗狂犬病ウイルス抗体は死亡直前まで上昇しにくいことから、血清学的診断の有用性は低い。潜伏期における実験室診断法は現在も確立されていない。

狂犬病を発症後の有効な治療法はなく、ほぼ 100%死に至る。流行地で動物からの咬傷を受けた場合、速やかに咬傷部位を洗浄し、暴露後免疫を受けることで発症を阻止することが可能であり暴露後発症予防治療（Post-exposure prophylaxis; PEP）と呼ばれる。PEP には組織培養不活化ワクチンおよび免疫グロブリン製剤を用いた複数のプロトコルが提唱されている^{3,7-9}。

予防として組織培養不活化ワクチン接種（Pre-exposure prophylaxis; PrEP）を受けることが可能である^{3,7-9}。リスクの高い地域へ海外渡航を予定している場合や、狂犬病ウイルスを扱う研究者および診断担当者、動物検疫関係者などはあらかじめ基礎免疫をつけておくことが重要である。

[犬・猫] 犬は 1956 年、猫は 1957 年の発生を最後に国内での発症例は認められていない¹。日本では狂犬病予防法により飼育犬の届出および狂犬病ワクチンの接種が義務付けられている他、海外の指定地域以外から犬や猫を輸入する際にはマイクロチップの装着、狂犬病ワクチン接種、および抗体検査についての必要事項が記載された輸出国政府機関発行の証明書が必要となる。

犬の場合の潜伏期間は通常 2 週間~2 か月程度で、前駆期には性格の変化、行動異常を認め、興奮期には目の前のものに何でも咬みついで攻撃する、異嗜、刺激に対する過敏反応等が認められる。麻痺期には全身の麻痺症状による歩行不能、嚥下困難、昏睡状態となり最終的に死亡する。必ずしも狂騒期と麻痺期が明確ではないこともあるため、慎重な診断が必要である。猫の症状も犬とほぼ同様であるが、猫は犬よりも興奮型の症状を示すことが多く、攻撃性が認められる。犬および猫の生前検査は確立されていないが、犬では臨

床的な診断基準も提唱されている¹⁰⁻¹²。治療は行われず、問診や臨床症状から狂犬病が疑われる場合には脳組織を用いた実験室内診断が行われる。

[野生動物] 海外ではオオカミ、キツネ、タヌキ、アライグマ、スカンク、マンゲース、コウモリなどの野生動物の間での流行が認められている。野生動物の狂犬病では行動異常が重要な所見であり、不自然に人と接触を試みる、挑発を受けていないにも関わらず人を攻撃する、夜行性の動物が日中に活動しているなどの所見が認められた場合には狂犬病を疑う必要がある^{13,14}。

[生産動物] 海外の狂犬病流行地において、狂犬病に感染した野生動物や犬、猫と接触のあった生産動物の狂犬病が認められている。基本的には人や犬と同様の脳炎症状を呈するが、馬や豚は狂騒型の症状が顕著に認められるのに対して、牛の場合は麻痺性の神経症状を示すことが多い。治療は行われず、問診や疫学情報から狂犬病が疑われる場合には、他の動物と同様に、死後の材料を用いた実験室内診断が必要となる。

2 検体の取り扱い

2-i 検体取り扱い上の注意（バイオセーフティ）

動物の狂犬病の診断には脳組織を用いる。検体中に狂犬病ウイルスが含まれ、感染源となることを十分に理解し、慎重な取り扱いが必要である。脳組織の採材のための解剖、開頭作業は適切な解剖施設で実施する。解剖施設における脳の摘出法については複数の資料に詳細に記載されている^{6,15,16}。摘出後の脳組織は BSL2 施設および安全キャビネット内で取り扱い、作業中は個人用防護具（グローブ、マスク、ガウン、可能であればゴーグルなど）を着用する。

検査担当者は狂犬病ワクチンの暴露前予防接種を行っておくことが望ましい。万が一、採材や検査の際に暴露された場合には適切な暴露後免疫を行えるよう事前に体制を確認しておく必要がある。

2-ii 各種動物からの検体採取法

死後あるいは安楽殺後の疑似症例から脳組織を採取し、視床、橋、延髄、小脳、海馬の各部位について検査を行う。検査方法と必要な材料を以下の表に示した。

検査方法		材料
抗原検出	直接蛍光抗体法	脳組織（視床、橋、延髄、小脳、海馬）
	免疫組織化学	
遺伝子検出	RT-PCR 法	
病原体研修	ウイルス分離	

2-iii 検体の輸送法

脳組織を採材後、同一施設内で 4 時間以内に検査を行うことが可能な場合、脳組織は冷蔵（氷上もしくは冷蔵庫）で温度管理を行いつつに検査室へ輸送する。外部施設での検査など輸送が必要な場合は、脳組織をただちに凍結し検査機関に輸送する。脳組織は密封容器（一次容器）に入れ、緩衝材および吸収剤とともに密封性の二次容器に入れる。これを非密封性の三次容器に入れて輸送する。

2-iv 検体の保存法

切り出した脳の各部位は、二分して一つを -80°C で凍結保存する。

3 検査法

3-i 検査法（総論）

動物の狂犬病診断は、感染が疑われた個体の死後あるいは安楽殺後の脳組織を用いた実験室内検査が基本となる。生前診断法は確立されていない。状況により直接蛍光抗体法、免疫組織化学、RT-PCR 法（シーケンス解析を含む）、ウイルス分離のいずれか、もしくは複数の検査を組み合わせる。確定診断は実験室内検査の結果と、臨床診断および疫学データを合わせて総合的に行う。

3-ii 検査法（各論）

3-ii-(1)直接蛍光抗体法による抗原検出

簡便かつ迅速で、診断精度が高いことから、人および動物の狂犬病診断の世界的なゴールドスタンダードである。動物の検査では、「脳幹部（視床、橋、延髄）」、「小脳」、「海馬」それぞれについて直接蛍光抗体法を行う。

準備するもの：

検査用抗体*、D-PBS (-)、蒸留水、封入材(10%グリセリン-PBS、pH8.4)、シャーレ、キムワイプ、カバーガラス(Matsunami 24 x 60 mm NEO micro cover glass Thickness No.1)、ハサミ、ピンセット、舌圧子（木製）、無蛍光スライドガラス（Matsunami 高撥水性印字黒3穴14φ MICRO SLIDE GLASS SF17335等）、染色バット、アセトン、ベンチコート、湿潤箱、洗浄瓶、蛍光顕微鏡、陽性対照塗抹スライド、陰性対照用の正常犬の脳（-80℃保存）

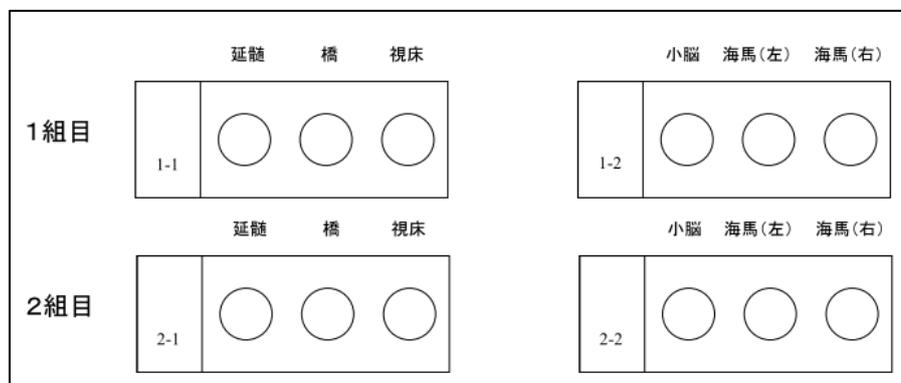
*検査用抗体：FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin（Fujirebio Diagnostics, Inc. 201 Great Valley Parkway Malvern, PA 19355 U.S.A.）の凍結乾燥品を説明書の通り5mlの蒸留水で溶解し原液とする。検査の直前に、検査数にあわせて原液を25倍量のD-PBS(-)で希釈し、1%エバンスブルー溶液を2μl/ml（500倍希釈）の割合で加える。

プロトコール：

- 検査材料等の飛沫吸収用にベンチコートを安全キャビネット内の作業領域全域に敷く。
- アセトンは染色バットに入れ、冷凍庫（-20℃）に入れておく。
- 検体の脳をシャーレに移し、延髄、橋、視床、小脳、海馬（左右）の組織を1cm角大以下に切り出す。陰性対照は、-80℃保存の正常犬の脳を検査時に融解する。
- 切り出した組織を舌圧子に置く。血液が多量についている場合はキムワイプで取り除いてから、無蛍光スライドガラスに組織をスタンプする。血液は非特異反応の原因になりやすいので可能な限り取り除く。スライドガラスに汚れがある場合は、70%アル

コールを吹きかけキムワイプでふき取る。

- スタンプスライドは、下図のように各部位について最低2組作成し、再検査に備える。



- スタンプスライドを安全キャビネット内で十分に風乾する(10~30分)。
- アセトン(-20°C)を入れた染色バットに、スタンプスライドを完全に浸して固定する(-20°Cで1時間~オーバーナイト)。
- アセトンから取り出し、十分に風乾する。
- 希釈した標識抗体を塗抹面に滴下する(約50µl/well)。広がりにくい場合はチップなどの側面で塗布面全体に広げる。
- 湿潤箱に入れ暗所に置き(あるいはアルムホイルで包む)、室温で30分間反応する。
- 反応液を捨て、洗浄瓶を用いてD-PBS(-)を吹きかけてスタンプ面を洗い流したのち、十分量のD-PBS(-)が入った染色バットに3-5分間浸ける。もう一度D-PBS(-)を塗抹面に吹きかけ余分なゴミ等を洗い流す。
- 再度、D-PBS(-)に3-5分間浸け、同様にD-PBS(-)を塗抹面に吹きかけ余分なゴミ等を洗い流す。
- 蒸留水の入った染色バットに2-3秒浸して塩を除去したのち風乾する。
- 余分な水滴は、塗布面をこすらないように気を付けてキムワイプで吸い取る。
- 封入材を滴下し、カバーグラスをかけて蛍光顕微鏡で観察する。

※注意事項：検体、陰性対照と陽性対照の間でコンタミがおこらないように注意する。

3-ii-(2)免疫組織化学による抗原検出

採取した脳組織は速やかに中性緩衝ホルマリンで固定を行い、検査室に輸送する。組織中のウイルスの感染性は中性緩衝ホルマリンで固定することにより喪失する。固定後に通常の方法でパラフィン包埋、薄切を行い、パラフィン切片を作成する。免疫組織化学に加え、HE染色も同時に行い、組織学的所見を加えて結果を判定する。

準備するもの：

抗狂犬病ウイルス N 抗原および P 抗原ウサギ抗血清、Envision ポリマー試薬（抗ウサギ抗体用、ダコ社）、0.01M クエン酸バッファー(pH6.0)、D-PBS (-)、蒸留水、封入材、染色バット、染色籠、特級エタノール、特級メタノール、特級キシロール、30%過酸化水素水、ピンセット、スライドガラス、カバーガラス、湿潤箱、光学顕微鏡

[リリーの緩衝ホルマリンの組成]

NaH₂PO₄ · 2H₂O 44 g

Na₂HPO₄ · 12H₂O 163.8 g

特級ホルマリン 1 L

全量 10L となるように蒸留水を加える

プロトコール：

- 特級キシロールを入れた染色バットにパラフィン切片スライドを入れ、時々上下に動かしながら 5 分間浸漬する。染色バットを交換し、計 3 回繰り返すことで脱パラフィンを行う。
- スライドを、100%エタノールを入れた染色バットに 5 分間浸漬し、これを 3 回繰り返す。次に 70%エタノールを入れたバットに 5 分間浸漬し、最後に蒸留水に浸漬して親水化する。
- スライドを、0.3%過酸化水素メタノール溶液を入れた染色バットに室温で 30 分間浸漬する。
- スライドを、蒸留水を入れた染色バットに浸漬する。
- スライドをクエン酸バッファーに浸漬しオートクレーブにかける（121°C10. 分間）
- 5%-正常ヤギ血清/PBS(-)でスライドをカバーし、室温で 20 分間静置する。
- 過剰の正常ヤギ血清を拭き取り、抗狂犬病ウイルス N 抗原および P 抗原抗体と 4°Cにて 1 晩反応させる（検査のために調整した抗体は 1 週間以内に使用する。使用抗体は 4°Cに保存する）。
- D-PBS(-)で抗体を洗い流し、十分量の D-PBS(-)を入れたバットに 5 分間浸漬する。これを 3 回繰り返す。
- Envision ポリマー試薬を室温で 30 分反応させる。
- D-PBS(-)で抗体を洗い流し、D-PBS(-)を入れた染色バットに 5 分間浸漬するこれを 3 回繰り返す。
- スライドを、DAB 発色キットを用いて発色させ必要に応じて核染を行う。
- 脱水、透徹、封入する。

※注意事項：

HE 染色の場合、狂犬病で死亡した患者組織では炎症反応は乏しいが、神経細胞中に

Negri 小体とよばれる特徴的な好酸性細胞質内封入体がみられることがある。免疫組織化学では、狂犬病発症者の中枢神経系組織に狂犬病ウイルス抗原を豊富に認め、ウイルス抗原はほぼ全身の神経系組織に分布する。

人の生前診断として、発症時の皮膚生検組織に含まれる末梢神経組織にウイルス抗原を確認することもある。

3-ii-(3) RT-PCR 法

動物では脳組織を用いて検査を実施するが、人の生前診断では唾液、脳脊髄液あるいは皮膚などの生検材料を用いて行われることがある。市販の RNA 抽出用キットを用いるよりも TRIZOL によるフェノールクロロホルム法による RNA 抽出の方が検出感度は高い。狂犬病ウイルスの感染性は、RNA の抽出操作を行った時点で消失する。

準備するもの (RNA 抽出) :

Ceramics YTZ ボール (φ2mm)、2ml スクリューキャップマイクロチューブ (ザルスタット 72.693.00003 相当品)、1.5ml スクリューキャップマイクロチューブ (IWAKI 2752-015 相当品)、TRIZOL (Invitrogen、No : 15596-026)、クロロホルム、イソプロパノール、細胞破碎機 (ミニビード・ビーター相当品)、75%エタノール、DNase/RNase free DW、ヒートブロック、マイクロチューブ用遠心機、50ml 遠心管、ボルテックスミキサー

プロトコール :

- 2ml スクリューキャップマイクロチューブに Ceramics YTZ ボールを入れておく。
- 脳材料は、延髄、橋、視床の各 20-30mg ほどをプールした計 50-100mg の検体 (検体-1) と、小脳、海馬 (左右) を同様にプールした検体 (検体-2) を用いる。それぞれの検体を上記の 2ml チューブに入れる。
- 検体-1 および-2 のチューブにそれぞれ TRIZOL を 1ml 加えて細胞破碎機を用いて 10 秒 2 回ホモゲナイズする。ホモゲナイズの前とインターバルには氷で十分に検体を冷やすように注意する。
- 室温で 5 分間放置し、0.2ml のクロロホルムを加えボルテックス (15 秒) する。
- 室温で 2-3 分間放置し、12,000×g (13,000rpm)、4°C、10 分間遠心する。
- 上層 (水層) を新しいチューブに移し、0.5ml のイソプロパノールを加え混和する。
- 室温で 10 分間放置し、12,000×g (13,000rpm)、4°C、10 分間遠心する。
- 沈殿したペレットを吸わないようにマイクロピペットを用いて上清を除去する。壁に残った上清部分は再度 12,000×g (13,000rpm)、4°C、1 分間スピンドアウンした後、沈殿の反対側の壁面から上清を完全に取り去る。
- 75%エタノールを 1ml 入れ、軽く転倒混和し 7,500×g (11,000rpm)、4°C、5 分間遠心する。

- 沈殿したペレットを吸わないように上清をチップで除去する。壁に残った上清部分は再度 7,500×g(11,000rpm)、4°C、1 分間スピンドウンし、沈殿の反対側の壁面から上清を完全に取り去る。
- チューブの蓋を開けたまま、安全キャビネット内の室温で 5-10 分間乾燥する。
- チューブに 50µl の DW を入れ、55-60°C、10 分間加熱したのち、氷上で冷却しスピンドウンする。
- すぐに RT-PCR の操作に移る。残りは-80°Cに保存する。

準備するもの (One-step RT-PCR) :

QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (210210 or 210212)、DNase/RNase free DW、プライマー (下記参照)、1×TAE、10mg/ml-エチジウムブロマイド (EtBr) 溶液、アガロース (SIGMA、Agarose A0169 など)、DNA サイズマーカー、マイクロチューブ用遠心機、サーマルサイクラー、アガロースゲル電気泳動装置、UV ゲル撮影装置、陽性コントロール

プライマーセット 1 (606bp のフラグメントが増幅) ^{17,18} :

Primer set		塩基配列 (5'- 3')	濃度
N7(mix)	N7(C)	ATGTAACACCCCTACAATGG	N7(C) と N7(T) がそれぞれ 10pmol/µl となるように混合
	N7(T)	ATGTAACACCTCTACAATGG	
JW6 (mix)	JW6(DPL)	CAATTCGCACACATTTTGTG	JW6(DPL) 、 JW6(E) 、 JW6(M) がそれぞれ 10pmol/µl となるように混合
	JW6(E)	CAGTTGGCACACATCTTGTG	
	JW6(M)	CAGTTAGCGCACATCTTATG	

プライマーセット 2 (1,468bp のフラグメントが増幅) ^{19,20} :

Primer set		塩基配列 (5'- 3')	濃度
10g		CTACAATGGATGCCGAC	10pmol/µl
304		TTGACGAAGATCTTGCTCAT	10pmol/µl

プロトコール :

- QIAGEN One step RT-PCR kit を用いる場合の 1 チューブあたりの反応液組成を以下に示した。

Master mixture 1

5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	10.0 µL
dNTP Mix	2.0 µL
N7(mix) primer	2.0 µL

JW6(mix) primer	3.0 μ L
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	2.0 μ L
RNAase free water	20.0 μ L
Total	40.0 μ L

Master mixture 2

5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	10.0 μ L
dNTP Mix	2.0 μ L
10g primer	1.0 μ L
304 primer	1.0 μ L
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	2.0 μ L
RNAase free water	24.0 μ L
Total	40.0 μ L

- 各チューブに検体 RNA、陰性コントロール (RNase free water)、陽性コントロール (プラスミド DNA) を 10 μ L ずつ加える。
- PCR チューブをサーマルサイクラーにセットし、以下の条件で RT-PCR を行う。

50°C	30min	
95°C	15min	
94°C	60sec	} × 40 サイクル
56°C	60sec	
72°C	90sec	
72°C	10min	
4°C		

- 反応終了後、Gel loading dye と PCR 反応液を混合し、N7(mix)/JW6(mix)は 1.5% agarose gel、10g/304 は 1.0%アガロースゲルで電気泳動を行う。染色後トランスイルミネーターを用いて PCR 反応物を確認する。
- 陽性の場合、N7(mix)/JW6(mix)は 606bp、10g/304 は 1,468bp のサイズが増幅される。陽性コントロールおよびサイズマーカーとの比較により、サイズを判定する。検体に予想付近のバンドが確認されたら、シークエンス反応を行い、遺伝子がリッサイウイルスであるかを確定する。

※注意事項：複数の検体を取り扱う場合には、実験室内における遺伝子の汚染に注意を払う。

3-ii-(4)乳のみマウス脳内接種法によるウイルス分離

乳のみマウス脳内接種法は簡便で検出感度に優れているが、観察期間が21～28日間と診断に時間を要する。

準備するもの：

マウス（1～3日齢、Swiss albino、BALB/c、ICR等の白色マウス）、マウスケージ、給餌および給水器、麻酔瓶、麻酔薬（イソフルラン）、ハサミ、ピンセット、2段針(27G)付ディスプレイ注射器、細胞破碎機

プロトコール：

- ホモゲナイザーを用いて、E-MEM10で検査材料の10%の乳剤を作成する
- 採取した脳組織に対して10倍量の緩衝液（ストレプトマイシン500 μ g/ml、ペニシリン500IU/ml加える）を加えて、細胞破碎機を用いて10%乳剤を作成する。
- 4 $^{\circ}$ C、12,000rpm5分間の遠心を行い、上清を回収する。
- 片手で乳のみマウス頭部を固定し、頭頂部から脳内に10%脳乳剤を10-20 μ lを注入する。
- 脳内接種から21日間の観察を行う。
- 体毛の逆立、振戦（尾をピンセットでつまみ上げたときの姿勢と振戦を観察）、後肢の協調運動の欠落（テーブルを歩かせて観察）、麻痺、衰弱（瀕死状態）などの症状の有無について観察と記録を行う。
- 接種後5日目以降から1～2匹ずつマウスを解剖し、脳を採材する。脳のスタンプ標本作製し、直接蛍光抗体法でウイルス抗原の検出を行う。
- 発症が認められた場合には安楽殺後、脳のスタンプ標本作製し、3-(ii)2の方法に従い直接蛍光抗体法によりウイルス抗原の検出を行う。

※注意事項：

接種後5日以内にマウスが神経症状を示すことはまれである。特に接種後24～48時間以内に死亡したマウスは接種時の外傷や細菌感染である可能性が高いと考えられる。

狂犬病ウイルス（街上毒株）は三種病原体に指定され、BSL3施設での取り扱いが必要である。ウイルス分離を行う際は、BSL3施設で行い、ウイルスが分離された場合には廃棄するか、保管する場合には7日以内に厚生労働大臣への届け出が必要となる。

3-ii-(5)培養細胞を用いたウイルス分離法

マウス神経芽腫（MNA）細胞を用いてウイルス分離を行う。本法は乳のみマウス脳内接種法に比べると簡便かつ短期間にウイルス分離が可能であるが、野外株は検出が難しい場合

がある。

準備するもの：

組織培養フラスコ（IWAKI、25cm² フラスコ、No：4100-010）、培養液（E-MEM10：MEM 培地（SIGMA 社 M-4655）にウシ胎児血清（最終濃度 10%）、抗生物質（100U/ml-Penicillin、100µg/ml-Streptomycin）、抗カビ剤（0.25 µg/ml、アンホテリシンなどを加える）、トリプシン 0.05% Trypsin/EDTA（サーモフィッシャー25300054 など）、FITC 標識抗体（FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin, Fujirebio）、CO₂ インキュベーター、スライドグラス（8 穴 Matsunami 高撥水性 TF0808 など）

プロトコール：

- ホモゲナイザーを用いて、E-MEM10 で検査材料の 10%の乳剤を作成する
- 遠心（4°C、12,000rpm、5分）後、上清を 1.5ml の培養細胞浮遊液（およそ 2~3×10⁶ 個の MNA 細胞）に加える。
- ウイルスと培養細胞の混和液を 15 分毎に攪拌しながら、37°C で 1 時間培養する。
- E-MEM10 をウイルス-培養細胞液に加えて 5ml に調整する。
- ウイルス-培養細胞液を 3 枚の 8 穴スライドグラスに 2 滴滴下（5ml ピペット使用で約 100µl）してスライド上で培養を行う。残りのウイルス-培養細胞液（およそ半量）は E-MEM10 で総量 5ml として 25cm² 培養フラスコで培養する。
- 24、48、72 時間後に 8 穴スライドを D-PBS(-)で軽く洗い冷アセトン固定する。
- FITC 標識-抗狂犬病ウイルス抗体を用いて培養細胞内のウイルス抗原を確認する。
- ウイルス抗原の確認が困難な場合や、検査成績が陰性でも臨床所見や疫学的情報から狂犬病の感染が強く疑われている場合には以下に進む
- 3 日後のウイルス-培養細胞液を播種した培養フラスコの培地 1ml を新たに用意した MNA 細胞(2~3×10⁶/1.5ml)に同様な操作で継続する。
- 同様にウイルス抗原を確認する。
- もう一度、同様に継代し、陰性の場合には、継代を中止する。陽性の場合には、ウイルスを回収する。

※注意事項：

スライドグラスを用いた感染細胞の培養はシャーレ等の容器内で行う。またシャーレ等の容器内には湿らせたペーパータオル等を入れスライド上の培養液の蒸発・乾燥を防ぐ。

3-iii 各種動物の検査法

3-iii-(1)犬および猫

国内で犬および猫の狂犬病疑い症例に遭遇した場合、動物のワクチン接種歴、海外（流行地）への渡航歴、臨床症状、発症からの経過など詳細な問診が必要となる。狂犬病が疑われた時点から、感染対策として非接触での経過観察（視診）を行う。狂犬病が強く疑われる場合には速やかに安楽殺を行い解剖による脳組織の採材および実験室検査を行う。経過観察中に犬が死亡した場合は、可能な限り新鮮な検査材料を得るために速やかに解剖を行う。

- 直接蛍光抗体法： 3-ii-(1) 直接蛍光抗体法を参照
- 免疫組織化学法： 3-ii-(2) 間接蛍光抗体法を参照
- RT-PCR法： 3-ii-(3) RT-PCR法を参照
- ウイルス分離法： 3-ii-(4) 乳のみマウス脳内接種法によるウイルス分離法
3-ii-(5) 培養細胞を用いたウイルス分離法を参照

3-iii-(2)野生動物および生産動物

野外において異常行動を示す野生動物を発見した場合や、臨床および疫学情報から生産動物の狂犬病が疑われた場合には、脳組織を採材し実験室検査を行う。

- 直接蛍光抗体法： 3-ii-(1) 直接蛍光抗体法を参照
- 免疫組織化学法： 3-ii-(2) 間接蛍光抗体法を参照
- RT-PCR法： 3-ii-(3) RT-PCR法を参照
- ウイルス分離法： 3-ii-(4) 乳のみマウス脳内接種法によるウイルス分離法、
3-ii-(5) 培養細胞を用いたウイルス分離法を参照

4 参考文献

1. 厚労省 HP <https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou10/>
2. 国立感染症研究所 HP <https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ka/rabies/392-encyclopedia/394-rabies-intro.html>
3. WHO: WHO expert consultation on rabies: third report,2018
<https://apps.who.int/iris/handle/10665/272364>
4. WHO: Zero by 30: the global strategic plan to end human deaths from dog-mediated rabies by 2030: United Against Rabies Collaboration: first annual progress report: global strategic plan to end human deaths from dog-mediated rabies by 2030
<https://apps.who.int/iris/handle/10665/328053>
5. ヒト狂犬病症例集 2008-2012 年 (厚生労働科学研究 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「ワンヘルス理念に基づく動物由来感染症制御に関する研究」
<https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou10/dl/sankou130712-01.pdf>
6. Laboratory techniques in rabies, volume 1, 5th ed.
<https://apps.who.int/iris/handle/10665/310836>
7. Rabies vaccines: WHO position paper, April 2018 – Recommendations. Vaccine. 2018 Sep 5;36(37):5500-5503.
8. 厚生労働省検疫所 FORTH HP
<https://www.forth.go.jp/useful/infectious/name/name47.html>
9. 国立研究開発法人国立国際医療研究センター病院 HP
<https://www.hosp.ncgm.go.jp/isc/vaccines/010/index.html>
10. 犬狂犬病の症状と臨床診断方法の一例 (第一版) DVD 狂犬病臨床研究会
11. 犬狂犬病の症状と臨床診断方法の一例 (第二版) DVD 狂犬病臨床研究会
12. タイで麻痺型狂犬病と診断された犬の臨床経過 (一例) DVD 厚生科学研究費補助金 振興・再興感染症研究事業「動物由来感染症対策としての新しいサーベイランスシステムの開発に関する研究」
13. 狂犬病対応ガイドライン 2001
<https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkakukansenshou18/pdf/05-01.pdf>
14. 狂犬病対応ガイドライン 2013
<https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkakukansenshou18/pdf/guideline2013.pdf>
15. 狂犬病検査に必要な解剖の方法 (安全で簡便な脳の取り出し方の 1 例) DVD 平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業「動物由来感染症のサーベイランス手法の開発に関する研究」
16. 狂犬病検査に必要な解剖方法 (安全で簡便な脳の取り出し方の 1 例) ver.2 DVD 平成

21 年度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
「動物由来感染症のサーベイランス手法の開発に関する研究」

17. Paul R. Heaton, Lorraine M. McElhinney, J. Paul Lowings Detection and identification of rabies and rabies-related viruses using rapid-cycle PCR. *J. Virol. Methods.*, 81, 63-69, 1999.
18. Anh K. Nguyen, Done V. Nguyen, Giang C. Ngo, Thu T. Nguyen, Satoshi Inoue, Akio Yamada, Xuyen K. Dinh, Dung V. Nguyen, Thao X. Phan, Bao Q. Pham, Hien T. Nguyen, and Hanh T. H. Nguyen Molecular Epidemiology of Rabies Virus in Vietnam (2006-2009) *Jpn. J. Infect. Dis.*, 64, 391-396, 2011.
19. J Smith, L Orciari, P Yager. Molecular epidemiology of rabies in the US. *Semin. Virol.*, 6, 387-400. 1995.
20. A De Mattos, C De Mattos, E Loza-Rubio, A Aguilar-Setién, L Orciari, J Smith. Molecular characterization of rabies virus isolates from Mexico: implications for transmission dynamics and human risk. *Am. J. Trop. Med.*, 61, 587-597. 1999.

5 連絡先（執筆者情報）

松鶴 彩（国立感染症研究所獣医科学部）

前田 健（国立感染症研究所獣医科学部）

問い合わせ先

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

国立感染症研究所獣医科学部

電話 03-2582-2750

E-mail: kmaeda@niid.go.jp

6 謝辞等

本マニュアルは AMED 研究費 No. JP21fk0108615, JP18fk0108069 で実施された研究成果の一部から作成された。また、多くの獣医師を含めた関係者のご協力により実施された。

重症熱性血小板減少症候群（SFTS）ガイドンス

目次

1. 感染症の概説（人と動物の症状）
 - 1- i 病原体の性状
 - 1- ii 疫学（人と動物）

2. 検体の取り扱い
 - 2- i 検体取り扱い上の注意（バイオセーフティ）
 - 2- ii 各種動物からの検体採取法
 - 2- iii 検体の輸送法
 - 2- iv 検体の保存法

3. 検査法
 - 3- i 検査法（総論）
 - 3- ii 検査法（各論）
 - 3- ii -(1) ウイルス分離法
 - 3- ii -(2) RT-PCR 法
 - 3- ii -(3) real-time RT-PCR 法
 - 3- ii -(4) 間接蛍光抗体法
 - 3- ii -(5) ELISA
 - 3- ii -(6) 中和試験
 - 3- iii 各種動物の検査法
 - 3- iii -(1) 犬および猫
 - 3- iii -(2) 野生動物および生産動物
 - 3- iii -(3) マダニ

4. 参考文献

5. 連絡先

6. 謝辞など

1 感染症の概説（人と動物の症状）

1-i 病原体の性状

重症熱性血小板減少症候群（SFTS）は新規ブニヤウイルス属ウイルスによるマダニ媒介性感染症である。原因の SFTS ウイルスは直径約 80-100nm の球形ビリオン構造を呈し、表面にスパイク状構造を有するエンベロープを持つ。ゲノムは一本鎖マイナス鎖 RNA で、S、M、L の三分節からなる。日本、中国、韓国で分離された SFTS ウイルス遺伝子の系統樹解析により、東アジアに分布する SFTS ウイルスは主に中国系統と日本系統の二つの系統に分類される¹⁹。

現在 SFTS ウイルスは感染症法において三種病原体に指定されている。ウイルスを所持・使用する場合には入手してから 7 日以内に厚生労働大臣への届け出が必要であり、BSL3 施設での取り扱いとなる。確定診断されるまでの SFTS 疑い症例の血液や体液などの検体等は、感染性のある臨床検体として BSL2 施設で取り扱う（https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/kekkaku-kansenshou17/03.html）。

1-ii 疫学（人と動物）（感染症法、家伝法など国内における法律上の扱い含む）

これまでの国内外の疫学調査から多くの哺乳動物が SFTS ウイルスに対する抗体を保有することが示されており、幅広い宿主域を有すると考えられている。人および伴侶動物（猫および一部の犬）は感染すると重症化する傾向にあり、SFTS 発症事例が報告されている。

[人] 日本では 2013 年に山口県で初めて人患者が確認され、これ以降年間数十名の患者の届け出がある。関西以西に多く発生がみられるが、2020 年以降、東海地方や千葉県での患者も確認されている。発症は春～秋に多い傾向があり、患者の多くが高齢者である。ウイルス感染後 6 日～2 週間の潜伏期を経て発熱、消化器症状（食欲低下、嘔吐、下痢、腹痛など）が多くの症例で認められ、頭痛、悪寒、全身倦怠感、筋肉痛、意識障害や失語などの神経症状、リンパ節腫脹、皮下出血や下血等の出血症状が起こる。血液検査では白血球減少、血小板減少、逸脱肝酵素（AST、ALT、LDH）の上昇が多くの症例で認められている。国内の致死率は 27%～35%と報告されている^{11,13,18}。人の SFTS は感染症法で四類感染症に位置付けられているため、SFTS と診断した場合は保健所への届け出が義務付けられている。

[犬・猫] 犬や猫の SFTS 発生は 2017 年以降、西日本を中心に認められている。特に猫の発生が多く、野外に出る動物にリスクがあると考えられる。初期の症状は急激な活動性の低下、食欲不振、発熱であり、約半数の症例が嘔吐を伴う。一部の症例では下痢が認められることもある。血液検査では白血球減少、血小板減少、総ビリルビン値の上昇（猫）、

炎症性タンパク質である SAA(猫)や CRP (犬) の上昇が認められる。CPK の上昇を伴うことが多い。ALT や AST などの逸脱酵素は一部の個体で著しく上昇することがあるが、基準値内であることも多い。症状は急激に進行し重症化する傾向にある。特に猫の致死率は 58.0~62.5%^{1,8}と、人に比べると高く、重症化例では発症からの生存日数は 7 日程度である。発症~回復期にかけて動物の体液(唾液、涙)や排泄物(糞、尿)中にウイルスが排泄されるため、これらが人や他の動物への感染源となる可能性がある。これまでに SFTS を発症した犬や猫から飼主や獣医療従事者が感染したことが疑われる事例が複数報告されている^{5,10,17}。そのため伴侶動物の SFTS を早期に診断し、速やかな感染防護策を開始することが重要である。現時点では動物の SFTS の届け出等について法律上の規定はない。

[野生動物] 国内では猪、日本鹿、アライグマ、マングース、犬および猫の SFTS ウイルス感染状況についての血清疫学調査が愛媛県、山口県、和歌山県、大分県、長崎県、鹿児島県、宮崎県、沖縄県で行われており^{2-4,6,7,9,15,16}、流行地における野生動物の抗体陽性率は高い傾向が示されている。特に人患者の SFTS 発生と日本鹿の抗体保有率には正の相関がみられる (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-sp/2342-related-articles/related-articles-433/6319-dj4339.html>) ことから、発生リスクのモニタリングとして野生動物の血清疫学調査が有用であると考えられる。これまでに野生動物における SFTS 発症事例は報告されていない。

[生産動物] 生産動物については島根県の食肉衛生検査所にて採材された牛の 2.2%が抗体陽性であったことが報告されているが¹⁴、国内の生産動物における詳細な感染状況については不明である。これまでに生産動物における SFTS 発症事例は報告されていない。また畜産物を介した人への感染事例も認められていない。

2 検体の取り扱い

2-i 検体取り扱い上の注意（バイオセーフティ）

SFTS 発症動物の臨床検体中に SFTS ウイルスが含まれ、人への感染源となることを十分に理解し、慎重な取り扱いが必要である。臨床検体は BSL2 施設および安全キャビネット内で取り扱い、作業中は個人用防護具（グローブ、マスク、ガウンなど）を着用する。

2-ii 各種動物からの検体採取法

動物の診断に用いる検査方法と必要な材料は以下の表に示した。スワブは口腔粘膜、肛門を滅菌綿棒で拭い、1.0ml の PBS あるいはウイルス輸送用培地（BD ユニバーサルトランスポート検体輸送用培地など）に浸漬する。

検査方法		材料
病原検査	ウイルス分離・同定	血清、必要に応じて口腔スワブ、肛門スワブ
	RT-PCR 法	
	real-time RT-PCR 法	
抗体検査	間接蛍光抗体法	血清（ペア血清による診断の場合は急性期血清と 1 週間～10 日後の血清を用いる）
	ELISA	
	中和試験	

2-iii 検体の輸送法

採材された血清やスワブ検体は密封容器（一次容器）に入れ、緩衝材および吸収剤とともに密封性の二次容器に入れる。これを非密封性の三次容器に入れて輸送する。

2-iv 検体の保存法

SFTS 発症が疑われる犬や猫の検体は、検査まで冷蔵保存とし、できるだけ早く検査を実施する。すぐに実験室診断を行わない場合（疫学調査など）には、血清あるいは血漿を分離後密閉チューブに分注して冷凍保存する。

3 検査法

3-i 検査法（総論）

SFTS の検査は病原学的検査（ウイルス分離法、RT-PCR 法および real-time RT-PCR 法）と血清学的検査（間接蛍光抗体法、ELISA、中和試験）に分けられる。

犬や猫における急性期 SFTS は、次のいずれかが満たされた場合に診断される。

- ウイルス分離による病原体検出
- RT-PCR 法および real-time RT-PCR 法による病原体遺伝子の検出
- 蛍光抗体法あるいは ELISA による抗体検出（IgM 抗体の検出、ペア血清による IgG 抗体陽転もしくは IgG 抗体価上昇、protein A/G を用いた場合の抗体上昇）
- 中和試験による抗体検出（ペア血清による抗体陽転あるいは抗体価の上昇）

各種動物の血清疫学調査等における陽性判定は、ELISA や間接蛍光抗体法による IgM 抗体および IgG 抗体の検出、または中和試験による抗体検出により行われる。動物種により ELISA による診断感度が異なることから、カットオフ値は動物種毎に設定する必要がある。また ELISA で SFTS ウイルス特異的 IgG 抗体が陽性と判定された場合であっても、中和試験による中和抗体の存在を確認することが望ましい。

3-ii 検査法（各論）

3-ii-(1) ウイルス分離法

準備するもの：

DMEM、非働化 FBS、Vero9013 細胞（JCRB9013）、細胞培養フラスコ、細胞培養マルチウェルプレート（24 または 48 ウェルなど）、PBS、ホルマリン、抗 SFTS ウイルス抗体（抗 SFTSV-NP ウサギ血清など）、蛍光標識二次抗体（Alexa488 Goat anti-Rabbit IgG など）、Triton X-100

プロトコール：

- 5%FBS-DMEM を用いて Vero9013 細胞を培養し単層を用意する。
- 培養液を 2%FBS-DMEM に交換し、披検血清を接種（200 μ L/5mL 培地）する。翌日培養液を新たな 2%FBS-DMEM に交換する。
- 5～10 日ごとに細胞を継代し、その際細胞の一部を細胞培養マルチプレートに撒き、蛍光抗体によるウイルスの確認を行う。3 回の継代でウイルスの存在が確認できない場合、ウイルス分離は陰性と判定する。
- 蛍光抗体法を用いる場合、1-3 日培養したマルチプレートを 10%ホルマリンで固定後、UV 照射によりウイルスを不活化する。
- PBS で洗浄後、0.1% Triton X-100 添加 PBS を加えて室温で 10 分間静置する。

- PBS で 3 回洗浄後、1,000 倍希釈した抗 SFTS ウイルス抗体を加えて室温で 1 時間インキュベートする。
- PBS で 3 回洗浄後、400 倍（ロットにより異なる）希釈した Alexa488 Goat anti-rabbit IgG を加えて室温で 1 時間インキュベートする。
- PBS で 3 回洗浄後、カバーグラスを載せて蛍光顕微鏡で観察する。

※注意事項：SFTS ウイルスは三種病原体に指定されているため、ウイルス分離を行う際は、BSL3 施設で行い、SFTS ウイルスが分離された場合には廃棄するか、保管する場合には 7 日以内に厚生労働大臣への届け出が必要となる。

3-ii-(2) RT-PCR 法

準備するもの：

市販の RNA 抽出キット、RT-PCR 試薬（QIAGEN One step RT-PCR kit など）、サーマルサイクラー、電気泳動装置、電気泳動用アガロース、電気泳動用バッファー、プライマー（下記参照）

プライマーの配列¹²：

Primer set	塩基配列	部位	サイズ
1	TGCTGCAGCACATGTCCAAGTGG	nt1347-1369	201bp
	GACACAAAGTTCATCATTGTCTTTGCC	nt1524-1496	
2	GCCATCTGTCTTCTTTTGCG	nt1028-1048	125bp
	AGTCACTTGCAAGGCTAAGAGG	nt1131-1152	

プロトコール：

- キットのマニュアルに従い臨床検体から RNA を抽出する。
- QIAGEN One step RT-PCR kit (QIAGEN, Cat No. 52904)を用いる場合の 1 チューブあたりの反応液組成を以下に示した。

Primer set 1

5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	5.0 μ L
dNTP Mix	1.0 μ L
Forward primer (10 μ M)	1.5 μ L
Reverse primer (10 μ M)	1.5 μ L
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1.0 μ L
RNAase free water	14.0 μ L
Total	24.0 μ L

Primer set 2

5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	5.0 μ L
dNTP Mix	1.0 μ L
Forward primer (10 μ M)	0.5 μ L
Reverse primer (10 μ M)	0.5 μ L
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1.0 μ L
RNAase free water	16.0 μ L
Total	24.0 μ L

- 各チューブに検体 RNA あるいは陰性コントロール (RNase free water) を 1 μ L ずつ加える。
- PCR チューブをサーマルサイクラーにセットし、以下の条件で RT-PCR を行う。

Primer set 1

50°C	30min	
95°C	15min	
94°C	30sec	} × 40 サイクル
60°C	30sec	
72°C	1min	
72°C	7min	
12°C		

Primer set 2

50°C	30min	
95°C	15min	
94°C	30sec	} × 40 サイクル
52°C	30sec	
72°C	30sec	
72°C	5min	
12°C		

- 反応終了後、Gel loading dye と PCR 反応液を混合し、2%アガロースゲルで電気泳動を行う。染色後トランスイルミネーターを用いて PCR 反応物を確認する。

※注意事項：SFTS ウイルス S 分節を標的とした 2 種類のプライマーセットを用いて RT-PCR を行い、1 つでも目的サイズの PCR 産物が得られた場合には陽性と判定する。

3-3-(3) real-time RT-PCR 法

準備するもの：市販の RNA 抽出キット、real-time RT-PCR 試薬 (QIAGEN QuantiTect probe RT-PCR kit など)、real-time PCR 装置、プライマーおよびプローブ (下記参照)

プライマーの配列²⁰：

Primer set	塩基配列
Primer-F	TGTCAGAGTGGTCCAGGATT
Primer-R	ACCTGTCTCCTTCAGCTTCT
Taqman Probe	[FAM]-TGGAGTTTGGTGAGCAGCAGC-[BHQ1]
Contamplicon Probe	[VIC]-CGAGATCCAATGCGCTAGCT-[MGB]

10× primer/ probe mix の調整：Forward primer 4 μ M, Reverse primer 4 μ M, Taqman Probe 2 μ M, Contamplicon Probe 2 μ M となるように混合しておく。

プロトコール：

- キットのマニュアルに従い臨床検体から RNA を抽出する。
- QIAGEN QuantiTect probe RT-PCR kit (QIAGEN, Cat No. 204443)を用いる場合の 1 チューブあたりの反応液組成を以下に示した。

2x Master Mix	5.0 μ L
10x primer/probe mix	1.0 μ L
Quantitect RT Mix	0.1 μ L
DEPC treated water	1.9 μ L
Total	8.0 μ L

- 各チューブに検体 RNA あるいは陰性コントロール (RNase free water) を 2 μ L ずつ加える。
- PCR チューブをサーマルサイクラーにセットし、以下の条件で反応を行う。

反応条件

50°C	30min	
95°C	15min	
95°C	15sec	} × 45 サイクル
60°C	60sec	

3- ii -(4) 間接蛍光抗体法

準備するもの：DMEM、非働化 FBS、アセトン固定容器、蛍光標識二次抗体 (各動物種 IgG あるいは IgM に対する抗体)、抗 SFTS ウイルス抗体 (抗 SFTSV-NP ウサギ血清な

ど)、Vero 細胞、細胞培養フラスコ、細胞培養マルチウェルプレート (24、48 または 96 ウェルなど)、免疫蛍光染色用スライドガラス

プロトコール：

- T75 フラスコで培養した Vero 細胞 (コンフルエント) に MOI=0.1 相当のウイルスを添加する。
- 感染 2 日後に細胞をトリプシン-EDTA で剥離、チューブに回収する。
- PBS で洗浄後、32mL の PBS に浮遊させ、浮遊細胞を免疫蛍光染色用スライドガラス上のウェルにスポットする (10 μ L/well)。
- 安全キャビネット内の UV 照射下で、2 時間完全に乾燥させる。
- アセトンを入れた容器にスライドを浸し、3 分間細胞を固定する。
- 免疫蛍光染色用スライドガラスを取り出して風乾後する。スライドは使用まで-80°Cで保管する
- 検査時に免疫蛍光染色用スライドガラスを取り出して室温に戻しておく。
- 披検血清は 60°Cで 30 分間処理し非働化したのち、10 倍から 2 倍ずつ 640 倍まで希釈列を作成する。各希釈血清を 20 μ L ずつウェルにアプライする。
- 陽性コントロールとして抗 SFTSV NP ウサギ血清の 10 倍希釈を作成し、20 μ L ウェルにアプライする。
- 湿潤箱に免疫蛍光染色用スライドガラスを入れて 37°Cで 1 時間反応後、PBS で洗浄する。
- 希釈した蛍光二次抗体をウェルにアプライする。陽性コントロールには蛍光標識抗ウサギ IgG を 200 倍 (ロットにより異なる) 希釈したものをアプライする。
- 湿潤箱に免疫蛍光染色用スライドガラスを入れて 37°Cで 1 時間反応後、PBS でスライドを洗浄する
- カバーガラスを載せて蛍光顕微鏡で蛍光を確認する

注意事項：蛍光が確認できる最大の希釈倍率を抗体価とする。

3-ii-(5) ELISA

準備するもの：ELISA 用プレート、SFTSV 抗原 (SFTSV 感染 Huh7 細胞溶解液)、mock 抗原 (Huh7 細胞溶解液)、コーティングバッファー(0.05M 炭酸緩衝液 pH9.6)、ブロッキングバッファー、希釈バッファー、HRP 標識抗体及び代替物 (各動物種 IgG あるいは IgM に対する抗体、Protein A/G)、ABTS 発色試薬

プロトコール：

- SFTSV 抗原および mock 抗原をコーティングバッファーで 5 μ g/mL になるよう希釈

(希釈倍率はロットによって異なる) し、ELISA 用プレートに 100 μ L/well ずつアプライする。プレートをシールして、37°Cで2時間インキュベートした後、4°Cで一晩インキュベートする。

- ELISA プレートはブロッキング剤を 200 μ L/well ずつ分注し、37°Cで 30 分インキュベートする。
- 被検血清は 60°C 30 分間インキュベートして非働化する。血清は希釈バッファーを用いて 100 倍に希釈する。
- ELISA プレートのブロッキング終了後、T-PBS で 3 回洗浄し、各希釈列の血清を抗原プレートに 100 μ L ずつ、SFTS 抗原と Mock 抗原をコーティングした well、それぞれ 2well にアプライする。
- 37°Cで 30 分反応する。T-PBS で 3 回洗浄したのち、希釈バッファーを用いて希釈した HRP 標識二次抗体を 100 μ L/well ずつアプライする。37°Cで 30 分反応する。
- 発色基質を 100 μ L/well 加えて室温で 30 分インキュベートしたのち、発色停止液 1%SDS 溶液を 100 μ L/well 加え、吸光度計を用いて OD₄₀₅ 値を測定する。
- (SFTS ウイルス抗原に対する OD₄₀₅ 値) - (mock 抗原に対する OD₄₀₅ 値) を算出する。

※注意事項：各動物種におけるカットオフ値は異なる。感染研で決定しているカットオフ値および試薬は以下の通り。記載以外の動物種は、ELISA による値は参考値となる。

動物種	カットオフ値	二次抗体と希釈倍率	発色試薬
犬	IgM >0.410	Anti-IgM(μ), Dog, Goat-Poly, HRP (Bethyl Laboratories, A40-116P)、5,000 倍希釈	KPL ABTS® Peroxidase Substrate System 2-Component, SeraCare Life Sciences, Inc. Cat. No. 5120-0032
	IgG >0.646	Anti-IgG(H + L), Dog, Goat-Poly, HRP (Bethyl Laboratories, A40-123P)、5,000 倍希釈	
猫	IgM >0.580	Goat anti-Feline IgM Secondary Antibody HRP (Novus biologicals, NB7260)、2,000 倍希釈	
	IgG >0.742	Goat anti-Feline IgG Fc Secondary Antibody HRP (Novus biologicals, NB7270)、2,000 倍希釈	
アライグマ	\geq 0.564	Pierce™ Recombinant Protein A/G, Peroxidase Conjugated (Thermo Fisher Scientific 32490)、20,000 倍希釈	

3- ii -(6)中和試験

準備するもの：SFTS ウイルス(2~3 \times 10³ FFU/mL)、Vero 細胞 (前日に 12 ウェルプレー

トに播種し 80%コンフルエントのものを準備)、血清およびウイルス希釈液 (2%FCS 添加 DMEM)、1%メチルセルロース液 (作成例を以下に示す)

1%メチルセルロース液作成例 (12 ウェルプレート 6 枚分) :

5× DMEM	15 mL
FCS	1.5 mL
ペニシリン・ストレプトマイシン	750 μ L (カナマイシンでも可)
7% NaHCO ₃	2.344 mL
<u>1%メチルセルロース</u>	<u>60 mL</u>

プロトコール :

- 非働化した血清 30 μ L と 2%FCS DMEM120 μ L を混和する
- 希釈した SFTS ウイルス 150 μ L を加えてピペッティングで混和、37°Cで 1 時間インキュベート
- 細胞プレートから培地を除去し、2%FCS 培地を 500 μ L 添加し、ここにウイルスと血清混合液を 100 μ L ずつ 2well に添加する。その際、mock のウェルを 2 つ作成する。
- 37°Cで 1 時間反応後、上清を除去し、2 %FCS DMEM で 1 回洗浄する。オーバーレイメディアウム (1%メチルセルロース液) 1mL/well ずつ添加し、7 日間培養する。
- 10% 中性ホルマリンを添加し、30 分以上室温で反応させる。
- 1 回洗浄後、0.1%tritonX-100 加 PBS を添加し、30 分室温で反応させる。
- 1 次抗体 (抗 SFTS ウイルス NP IgG) を添加し、1 時間室温で反応させる。
- 3 回洗浄後、2 次抗体 (protein A/G) を 1mL 添加し、1 時間室温で反応させる。
- 3 回洗浄後、DAB を添加し発色後、DW で洗浄後、実体顕微鏡下で計測する。

※注意事項：ウイルス接種は BSL3 施設内で行う。

3-iii 各種動物の検査法

3-iii-(1)犬および猫

SFTS 発症が疑われる動物の場合、迅速な診断が必要となるため、通常 RT-PCR 法による検査が行われる。稀に血清中から SFTS ウイルス遺伝子が検出されない個体も存在することから、RT-PCR 法による陰性結果は SFTS の完全な否定とはならないことに注意が必要である。また ELISA や間接蛍光抗体法によって SFTS ウイルス特異的 IgM 抗体の上昇が認められた場合には SFTS の診断につながるが、犬および猫では急性期であっても IgM 抗体上昇が認められない個体も存在する。そのため RT-PCR 法と血清学的検査を組み合わせることにより高い診断精度が得られる。ペア血清を用いた SFTS ウイルス特異的 IgM や

IgG、中和抗体価の推移を確認することも診断には有用である。

- RT-PCR 法： 3- ii -(2) RT-PCR 法を参照
- 間接蛍光抗体法： 3- ii -(3) 間接蛍光抗体法を参照
- ELISA： 3- ii -(4) ELISA を参照
- 中和試験： 3- ii -(5) 中和試験を参照

3- iii -(2)野生動物および生産動物

概要：血清疫学調査には、間接蛍光抗体法、ELISA および中和試験による SFTS ウイルス特異的抗体の検出および RT-PCR 法による SFTS ウイルス遺伝子の検出が行われる。

- RT-PCR 法： 3- ii -(2) RT-PCR 法を参照
- 間接蛍光抗体法： 3- ii -(3) 間接蛍光抗体法を参照
- ELISA： 3- ii -(4) ELISA を参照
- 中和試験： 3- ii -(5) 中和試験を参照

3- iii -(3)マダニ

概要：マダニを用いた調査には、RT-PCR 法による SFTS ウイルス遺伝子検出が行われる。マダニをエッペンチューブに入れてチューブサイズのディスポーザブルホモジナイザーにより破碎したのち、市販の RNA 抽出キットを用いて RNA を抽出し、検査に用いる。

- RT-PCR 法： 3- ii -(2) RT-PCR 法を参照

4 参考文献

1. Ando, T., Nabeshima, T., Inoue, S., Tun, M. M. N., Obata, M., Hu, W., Shimoda, H., Kurihara, S., Izumikawa, K., Morita, K. and Hayasaka, D. 2021. Severe fever with thrombocytopenia syndrome in cats and its prevalence among veterinarian staff members in Nagasaki, Japan. *Viruses* 13:1142.
2. Hashimoto, T., Yahiro, T., Yamada, K., Kimitsuki, K., Okuyama, M. W., Honda, A., Kato, M., Narimatsu, H., Hiramatsu, K. and Nishizono, A. 2022. Distribution of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus and antiviral antibodies in wild and domestic animals in Oita Prefecture, Japan. *Am J Trop Med Hyg.*106:1547-1551.
3. Hayasaka, D., Fuxun, Y., Yoshikawa, A., Posadas-Herrera, G., Shimada, S., Tun, M. M., Agoh, M. and Morita, K. 2016. Seroepidemiological evidence of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infections in wild boars in Nagasaki, Japan. *Trop Med Health* 44: 6.
4. Kimura, T., Fukuma, A., Shimojima, M., Yamashita, Y., Mizota, F., Yamashita, M., Otsuka, Y., Kan, M., Fukushi, S., Tani, H., Taniguchi, S., Ogata, M., Kurosu, T., Morikawa, S., Saijo, M. and Shinomiya, H. 2018. Seroprevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus antibodies in humans and animals in Ehime prefecture, Japan, an endemic region of SFTS. *J Infect Chemother* 24: 802-806.
5. Kirino, Y., Yamanaka, A., Ishijima, K., Tatemoto, K., Maeda, K. and Okabayashi, T. 2022. Retrospective study on the possibility of an SFTS outbreak associated with undiagnosed febrile illness in veterinary professionals and a family with sick dogs in 2003. *J Infect Chemother* 28: 753-756.
6. Kirino, Y., Yamamoto, S., Nomachi, T., Mai, T. N., Sato, Y., Sudaryatma, P. E., Norimine, J., Fujii, Y., Ando, S. and Okabayashi, T. 2022. Serological and molecular survey of tick-borne zoonotic pathogens including severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in wild boars in Miyazaki Prefecture, Japan. *Vet Med Sci* 8: 877-885.
7. Kuba, Y., Azama, Y., Kyan, H., Fukuchi, Y., Maeshiro, N., Kakita, T., Miyahira, M., Kudaken, T. and Nidaira, M. 2022. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus RNA in ticks from wild mongooses in Okinawa Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis* (in press).
8. Matsuu, A., Momoi, Y., Nishiguchi, A., Noguchi, K., Yabuki, M., Hamakubo, E., Take, M., and Maeda, K. 2019. Natural severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in domestic cats in Japan. *Vet Microbiol.* 236:108346.
9. Matsuu, A., Hamakubo, E. and Yabuki, M. 2021. Seroprevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in animals in Kagoshima Prefecture, Japan, and

development of Gaussia luciferase immunoprecipitation system to detect specific IgG antibodies. *Ticks Tick Borne Dis* 12: 101771.

10. Miyauchi, A., Sada, K. E., Yamamoto, H., Iriyoshi, H., Touyama, Y., Hashimoto, D., Nojima, S., Yamanaka, S., Ishijima, K., Maeda, K. and Kawamura, M. 2022. Suspected transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus from a cat to a veterinarian by a single contact: A case report. *Viruses* 14: 223.
11. Outani, H., Kobayashi, E., Wasa, J., Saito, M., Takenaka, S., Hayakawa, K., Endo, M., Takeuchi, A., Kobayashi, H., Kito, M., Morii, T., Imanishi, J. and Ueda, T. 2021. Clinical outcomes of patients with metastatic solitary fibrous tumors: A Japanese Musculoskeletal Oncology Group (JMOG) multiinstitutional study. *Ann Surg Oncol* 28: 3893-3901.
12. Park, E. S., Fujita, O., Kimura, M., Hotta, A., Imaoka, K., Shimojima, M., Saijo, M., Maeda, K. and Morikawa, S. 2021. Diagnostic system for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus RNA from suspected infected animals. *PLoS One* 16: e0238671.
13. Saijo, M. 2022. Severe fever with thrombocytopenia syndrome, a viral hemorrhagic fever, endemic to Japan: achievements in and directions for medical research. *Jpn J Infect Dis* 75: 217-227.
14. Tabara, K., Fujita, H., Hirata, A. and Hayasaka, D. 2016. Investigation of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus antibody among domestic bovines transported to slaughterhouse in Shimane Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis* 69: 445-447.
15. Tatemoto, K., Ishijima, K., Kuroda, T., Mendoza, M. V., Inoue Y., Park, E., Shimoda, H., Sato, Y., Suzuki, T., Suzuki, K., Morikawa, S., Maeda, K. 2022. Roles of raccoons in the transmission cycle of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *J Vet Med Sci* 84: 982-991.
16. Tatemoto, K., Mendoza, M. V., Ishijima, K., Kuroda, Y., Inoue, Y., Taira, M., Kuwata, R., Takano, A., Morikawa, S., Shimoda, H. Risk assessment of infection with severe fever with thrombocytopenia syndrome virus based on a 10-year serosurveillance in Yamaguchi Prefecture. (in press)
17. Yamanaka, A., Kirino, Y., Fujimoto, S., Ueda, N., Himeji, D., Miura, M., Sudaryatma, P. E., Sato, Y., Tanaka, H., Mekata, H. and Okabayashi, T. 2020. Direct Transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus from domestic cat to veterinary personnel. *Emerg Infect Dis* 26: 2994-2998.
18. Yokomizo, K., Tomozane, M., Sano, C. and Ohta, R. 2022. Clinical presentation and mortality of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan: A systematic review of case reports. *Int J Environ Res Public Health* 19: 2271.
19. Yoshikawa, T., Shimojima, M., Fukushi, S., Tani, H., Fukuma, A., Taniguchi, S., Singh,

- H., Suda, Y., Shirabe, K., Toda, S., Shimazu, Y., Nomachi, T., Gokuden, M., Morimitsu, T., Ando, K., Yoshikawa, A., Kan, M., Uramoto, M., Osako, H., Kida, K., Takimoto, H., Kitamoto, H., Terasoma, F., Honda, A., Maeda, K., Takahashi, T., Yamagishi, T., Oishi, K., Morikawa, S. and Saijo, M. 2015. Phylogenetic and geographic relationships of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in China, South Korea, and Japan. *J Infect Dis* 212: 889-898.
20. Yoshikawa, T. Fukushi, S., Tani, H., Fukuma, A., Taniguchi, S., Toda, S., Shimazu, Y., Yano, K., Morimitsu, T., Ando, K., Yoshikawa, A., Kan, M., Kato, N., Motoya, T., Kuzuguchi, T., Nishino, Y., Osako, H., Yumisashi, T., Kida, K., Suzuki, F., Takimoto, H., Kitamoto, H., Maeda, K., Takahashi, T., Yamagishi, T., Oishi, K., Morikawa, S., Saijo, M., Shimojima, M. 2014. Sensitive and specific PCR systems for detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains and prediction of patient survival based on viral load. *J Clin Microbiol* 52: 3325-3333.

5 連絡先（執筆者情報）

松鶴 彩（国立感染症研究所獣医科学部）
石嶋 慧多（国立感染症研究所獣医科学部）
立本 完吾（国立感染症研究所獣医科学部）
前田 健（国立感染症研究所獣医科学部）

問い合わせ先

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

国立感染症研究所獣医科学部

電話 03-2582-2750

E-mail: kmaeda@niid.go.jp

6 謝辞等

本マニュアルは AMED 研究費 No. JP21fk0108615, JP18fk0108069 で実施された研究成果の一部から作成された。また、多くの獣医師を含めた関係者のご協力により実施された。

ハンタウイルス感染症（腎症候性・肺症候群）ガイドンス

目次

1. 感染症の概説 人と動物での症状
2. 1- i 病原体の性状（BSL分類、特定病原体等法律上の扱い含む）
 - 1- ii 疫学（人と動物）
3. 検体の取り扱い
 - 2- i 検体取り扱い上の注意（バイオセーフティ）
 - 2- ii 各種動物からの検体採取法
 - 2- iii 検体の輸送法
 - 2- iv 検体の保存法
4. 検査法
 - 3- i 検査法（総論）
 - 3- ii 検査法（各論）
 - 3- ii -(1) ウイルス分離法
 - 3- ii -(2) RT-PCR 法
 - 3- ii -(3) real-time RT-PCR 法
 - 3- ii -(4) 間接蛍光抗体法
 - 3- ii -(5) ELISA
 - 3- ii -(6) 中和試験
 - 3- iii 各種動物の検査法
 - 3- iii -(1) 犬および猫
 - 3- iii -(2) 野生動物および生産動物
5. 参考文献
6. 連絡先
7. 謝辞など

1 感染症の概説（人と動物の症状）

1. - i 病原体の性状

ハンタウイルスは自然宿主との関わりが強く、自然宿主の種類によってその感染しているウイルスの種類が異なることが報告されている。特に近年では、げっ歯目だけでなく真無盲腸目(旧食虫目)や翼手目に特徴的なハンタウイルスが相次いで報告されている(1-9)。本ウイルスはブニヤウイルス目、ハンタウイルス科に属しブニヤウイルス目では唯一ベクターを介さず媒介されるウイルスである。本ウイルスの構造は、80~100 nmの球形ビリオン構造を呈していて、表面に糖たんぱく質のエンベロープを有し、一本鎖マイナス鎖RNAウイルスでS、M、Lの三分節からなるゲノム構造を有している。

2. - i 病原体の性状 (BSL分類、特定病原体等法律上の扱い含む)

ハンタウイルス属のうち、アンデスウイルス、シンノンブレウイルス、ニューヨークウイルス、バヨウウイルス、ブラッククリークカナルウイルス、ラグナネグラウイルス、ソウルウイルス、ドブラバーベルグレッドウイルス、ハンタンウイルス、プーマラウイルスは3種病原体指定され、BSL3病原体に分類されている。その為、取り扱う場合はBSL3で取り扱う。

特にげっ歯目に感染した場合、動物は全く症状を示さない場合も多く報告されているため感染が疑われるようなげっ歯目の取り扱いには十分注意する。

2 検体の取り扱い

1- i 検体取り扱い上の注意（バイオセーフティ）

基本的に感染動物は無症状である。その為、発症者の周辺で飼育されているげっ歯類等の動物は感染動物度として取り扱うことが求められる。通常、糞尿や体液を介して人へ感染することが疑われるため、野生動物の取り扱いには十分注意し、慎重な取り扱いが必要である。臨床検体は BSL2 施設および安全キャビネット内で取り扱い、作業中は個人用防護具（グローブ、マスク、ガウンなど）を着用する。

2- ii 各種動物からの検体採取法

動物の診断に用いる検査方法と必要な材料は以下の表に示した。スワブは口腔粘膜、肛門を滅菌綿棒で拭い、1.0ml の PBS あるいはウイルス輸送用培地（BD ユニバーサルトランスポート検体輸送用培地など）に浸漬する。

検査方法		材料
病原検査	ウイルス分離・同定	血清、必要に応じて口腔スワブ、肛門スワブ
	RT-PCR 法	
	real-time RT-PCR 法	
抗体検査	間接蛍光抗体法	血清（ペア血清による診断の場合は急性期血清と 1 週間～10 日後の血清を用いる）
	ELISA	
	中和試験	

2- iii 検体の輸送法

採材された血清やスワブ検体は密封容器（一次容器）に入れ、緩衝材および吸収剤とともに密封性の二次容器に入れる。これを非密封性の三次容器に入れて輸送する。吸収剤は容器が破損した場合も液漏れ等を防止するために入れているため、内容物を吸収できる十分な量を入れる必要がある。

2- iv 検体の保存法

ハンタウイルスの感染が疑われるげっ歯目の検体は、検査まで冷蔵保存とし、できるだけ早期に検査を実施する。検体採取後、何らかの理由ですぐに実験室診断を行わない場合には、血清あるいは血漿を分離後スクリーキャップチューブを用いて分注して冷凍保存する。押し込み式の蓋のチューブ（いわゆるエッペンチューブ）は、凍結時に蓋が開く可能性があるため利用しない。

3 検査法

3- i 検査法（総論）

ハンタウイルスの検査のうち、ウイルス分離は一般的に感度が低く陽性検体を用いても成功しないことも報告されている。その為、ウイルス分離よりも遺伝子検出(RT-PCR 法および real-time RT-PCR 法)や抗体検出（間接蛍光抗体法、ELISA、中和試験）による検査が優先される。

感染の疑われる動物の感染は次のいずれかが満たされた場合に感染の可能性が高い。

- RT-PCR 法および real-time RT-PCR 法による病原体遺伝子の検出
- 蛍光抗体法あるいは ELISA による抗体検出
- 中和試験による抗体検出
- ウイルス分離による病原体検出

持続感染が成立する感染症において、基本的に自然宿主におけるIgMの検出は現実的でない。各種動物の血清疫学調査等における陽性判定は、ELISA や間接蛍光抗体法による抗体の検出、または中和試験による抗体検出により行われる。動物種によりELISA による診断感度が異なることから、カットオフ値は動物種毎に設定する必要がある。またELISA でハンタウイルス特異的IgG 抗体が陽性と判定された場合であっても、中和試験による中和抗体の存在を確認することが望ましい。

3- ii 検査法（各論）

3- ii -(1) RT-PCR 法

準備するもの：

市販の RNA 抽出キット、RT-PCR 試薬（TakaraBIO RT-PCR kit など）、サーマルサイクラー、電気泳動装置、電気泳動用アガロース、電気泳動用バッファー、プライマー
（下記参照）

cDNA用プライマー：(6, 10, 11)

OSM55F TAG TAG TAG ACT CC

プライマーの配列：(7, 9, 10)

segment	種類	Primers	Sequence
L	1ST	HAN-L-F1(2938F)	ATG TAY GTB AGT GCW GAT GC
		HAN-L-R1(3390R)	AAC CAD TCW GTY CCR TCA TC
	NESTED	HAN-L-F2(2949F)	TGC WGA TGC HAC NAA RTG GTC
		HAN-L-R2(3344R)	GCR TCR TCW GAR TGR TGD GCA A
M	1ST	PHM-3ENDR	TAG TAG TAG ACT CCG CAA GAA

		TM-2957R	GAA CCC CAD GCC CCNTCY AT
	NESTED	T-M1199F(1199F)	TAA VTT CAM CAA CAT GTC T
		T-M1485R	CCA GCC AAA RCA RAA TGT
	NESTED	OSV697F(1150F)	GGA CCA GGT GCA DCT TGT GAA GC
		T-M1485R	CCA GCC AAA RCA RAA TGT
S	1ST	HS-5endF	TAGTAGTAKRCTCCYTA
		HTN-S6(1250R)	AGC TCN GGA TCC ATN TCA TC
	NESTED	S-437F	SWG GTC ARA CTG CHR AYT GG
		CRO2R(1126R)	ANG AYT GRT ARA ANG ANG AYT TYT T
	NESTED	CRO2F(685F)	AGY CCN GTN ATG RGW GTN RTY GG
		CRO2R(1126R)	ANG AYT GRT ARA ANG ANG AYT TYT T

プロトコール：

- キットのマニュアルに従い臨床検体から RNA を抽出する。げっ歯類等、小型哺乳類の場合、比較的ウイルス力価が高いと考えられている肺、腎臓、脾臓、肝臓などが検査対象臓器となる。ウイルス分離にもこれらの臓器が用いられるが、一般的に腎臓もしくは肺が用いられる場合が多い。
- クロスコンタミネーションの防止の観点から、One step RT-PCR kit が用いられる場合が多いが、多様なハンタウイルスを網羅するため、1種類のcDNAから3種類の1st PCRと5種類のnested PCRの実施が推奨されるため、2 step RT-PCRを推奨する。もし、実施の余力が無い場合は、LセグメントのPCRが最も広範なウイルス種に保存されているため、LセグメントPCRが推奨される。

cDNA(メーカーのインストラクションに則る、下記はPrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kitのプロトコール)

Recipe (PrimeScripts II)

RT		1X				1X	
Sol. A	dH2O	1.00	μ L	Sol. B	dH2O	2.75	μ L
	dNTP	0.50	μ L		5X buffer	2.00	μ L
	Primer	1.00	μ L		RNase inhibitor	0.25	μ L
	RNA	3.00	μ L		PrimeScript II	0.50	μ L
	Total	5.50	μ L		Total	5.50	μ L
	RNA	2.0	μ L				
	Total	7.5	μ L				

温度設定

Sol. Aを下記で反応させる

65°C/ 5min

直ぐにOn ice/3min

Sol. Bを加える

42°C/ 60min

70°C/15min

cDNAは-30°C保存

cDNAはnested PCRに利用する

3-3-(3) real-time RT-PCR 法

準備するもの：市販の RNA 抽出キット、real-time RT-PCR 試薬 (NEB Luna® Universal Probe qPCR Master Mix など)、real-time PCR 装置、プライマーおよびプローブ (下記参照)

プライマーの配列 (12) :

Primer/Probe	Sequence (5'-3')	Position
Hantaan-F	TGGTGGTCCTGCAACAAACA	804-823
Hantaan-R	GACTCCTTTGTCTCCATATTGCCTAA	878-853
Hantaan-probe	ACTACTTACGGCAGCGGCAAGTGGC	
Seoul-F	GATGAACTGAAGCGCCAACCTT	217-237
Seoul-R	CCGGTCTTGCCCGATGT	279-263
Seoul-probe	CCGACAGGATTGCAGCAGGGAAG	
SNV-F	GCAGACGGGCAGCTGTGT	179-196
SNV-R	GATCAGCCAGTTCCCGCTTA	244-225
SNV-probe	TGCATTGGAGACCAAACCTCGGAG	

10× primer/ probe mix の調整：Forward primer 4 μM, Reverse primer 4 μM, Taqman Probe 2 μM となるように混合しておく。

プロトコール：

- キットのマニュアルに従い臨床検体から RNA を抽出する。
- Luna® Universal Probe qPCR Master Mix (NEB, Cat No. M3004SVIAL) を用いる場合の 1 チューブあたりの反応液組成を以下に示した。

COMPONENT	20 μl REACTION	FINAL CONCENTRATION
Luna Universal Probe qPCR Master Mix	10 μl	1X
Forward primer (4 μM)	2 μl	0.4 μM
Reverse primer (4 μM)	2 μl	0.4 μM
Probe (2 μM)	2 μl	0.2 μM
Template cDNA	variable	< 100 ng
Nuclease-free Water	to 20 μl	

- 各チューブに検体 RNA あるいは陰性コントロール（非感染Vero cell RNA）を 2 μ L ずつ加える。
- PCR チューブをサーマルサイクラーにセットし、以下の条件で反応を行う。

反応条件

95°C	60sec	} × 45 サイクル
95°C	15sec	
60°C	60sec	

3- ii -(2) ウイルス分離法

準備するもの：

MEM、非働化 FBS、Vero E6 細胞、細胞培養フラスコ、細胞培養マルチウェルプレート（24 または 48 ウェルなど）、PBS

プロトコール：

- 10%FBS-MEM を用いてVero E6 細胞を培養し単層を用意する。
- 組織を播種する前日に継代し、新鮮な細胞を使用する。
- 通常感染動物は、中和抗体を有しているため組織をPBSで3回以上洗浄し、はさみで細かく裁断する。裁断後も2-3回PBSで洗浄し、組織濃度を薄くし接種する。重層する培地は2% F B S - M E Mを使用する。
- 接種後、3日間はプレートを動かさず静置する。
- 接種後、1週間程度したのちに培地を交換し更に1週間程度放置する。細胞の状態をよく観察しオーバーカルチャーにならないように培地を交換する。
- 接種後10日から2週間程度経過したのち、細胞を継代する。継代する時に少量の細胞を取りRT-PCRで感染の有無を確認する
- 細胞は更に10日から2週間程度培養する。細胞の濃度にもよるが2-4日に1回程度、培地のみを交換し長期継続培養を試みる。接種から4週後にRT-PCRで感染の有無を確認する。
-

ハンタウイルスの分離培養は、成功率が低く感染個体からも分離培養できない場合も報告されている。Vero E6にアダプトした場合に分離できるのではないかと考えられている。

※注意事項：ハンタウイルスは三種病原体に指定されているため、ウイルス分離を行う際は、BSL3施設で行い、ウイルスが分離された場合には廃棄するか、保管する場合には7日以内に厚生労働大臣への届け出が必要となる。

1. Arai S, Yanagihara R. Genetic Diversity and Geographic Distribution of Bat-borne Hantaviruses.

In: Corrales-Aguilar E, Schwemmler M, editors. Bats and Viruses: Caister Academic Press; 2020.

2. Arai S, Aoki K, Sơn NT, Tú VT, Kikuchi F, Kinoshita G, et al. Đakrông virus, a novel mobatvirus (Hantaviridae) harbored by the Stoliczka's Asian trident bat (*Aselliscus stoliczkanus*) in Vietnam. *Sci Rep*. 2019 2019/07/15;9(1):10239.
3. Arai S, Taniguchi S, Aoki K, Yoshikawa Y, Kyuwa S, Tanaka-Taya K, et al. Molecular phylogeny of a genetically divergent hantavirus harbored by the Geoffroy's rousette (*Rousettus amplexicaudatus*), a frugivorous bat species in the Philippines. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2016 Nov;45:26-32.
4. Guo WP, Lin XD, Wang W, Tian JH, Cong ML, Zhang HL, et al. Phylogeny and origins of hantaviruses harbored by bats, insectivores, and rodents. *PLoS pathogens*. 2013 Feb;9(2):e1003159.
5. Arai S, Nguyen ST, Boldgiv B, Fukui D, Araki K, Dang CN, et al. Novel bat-borne hantavirus, Vietnam. *Emerg Infect Dis*. 2013 Jul;19(7):1159-61.
6. Arai S, Ohdachi SD, Asakawa M, Kang HJ, Mocz G, Arikawa J, et al. Molecular phylogeny of a newfound hantavirus in the Japanese shrew mole (*Urotrichus talpoides*). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Oct 21;105(42):16296-301.
7. Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompte E, Auste B, Aniskin V, Meisel H, et al. Novel hantavirus sequences in shrew, Guinea. *Emerg Infect Dis*. 2007 Mar;13(3):520-2.
8. Arai S, Song J-W, Sumibcay L, Bennett SN, Nerurkar VR, Parmenter C, et al. Hantavirus in northern short-tailed shrew, United States. *Emerg Infect Dis*. 2007 Sep;13(9):1420-3.
9. Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompte E, Auste B, Aniskin V, Meisel H, et al. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg Infect Dis*. 2006 May;12(5):838-40.
10. Song J-W, Kang HJ, Song KJ, Truong TT, Bennett SN, Arai S, et al. Newfound hantavirus in Chinese mole shrew, Vietnam. *Emerg Infect Dis*. 2007 Nov;13(11):1784-7.
11. Song J-W, Baek LJ, Schmaljohn CS, Yanagihara R. Thottapalayam virus, a prototype shrewborne hantavirus. *Emerg Infect Dis*. 2007 Jul;13(7):980-5.
12. Katano H, Kano M, Nakamura T, Kanno T, Asanuma H, Sata T. A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses. *J Med Virol*. 2011 Feb;83(2):322-30.

1. オウム病の概説
 - i. 病原体の性状
 - ii. 疫学（人と動物）

2. 検体の取扱い
 - I 検体取扱い上の注意
 - ii. 各種動物からの検体採取法
 - iii. 検体の輸送法
 - iv. 検体の保存法

3. 検査法各論
病原体分離、遺伝子検査、
抗原・抗体検査

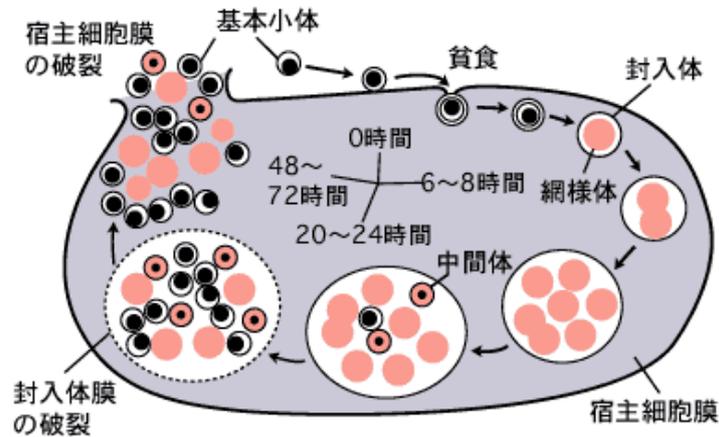
4. 参考文献

5. 連絡先等

1. オウム病の概説

i. 病原体の性状

クラミジアは DNA と RNA を有し、細菌に属するが、特異な性質を有する偏性細胞内寄生性微生物である。人口培地では増殖できず、細胞に感染して封入体を作り、その中で特異な形態変化をしながら増殖する。感染性を持つ基本小体と増殖型の網様体、その中間体などの極めて複雑な形態をとりながら、2 分裂を繰り返した後、おおよそ 48 時間後には一部の巨大化した封入体の膜は破壊され、次に細胞膜も破壊され、クラミジア粒子が排出される（図 2, 3）。基本小体は新しい細胞に再び感染し、増殖を繰り返す。



ii. 疫学（人と動物）

オウム病はオウム病クラミジア（*Chlamydia psittaci* 以下 *C. psittaci*）による人獣共通感染症である。

感染様式としては、病鳥の排泄物からの *C. psittaci* の吸入が主体であるが、口移しの給餌や噛まれて感染することもまれにある（図 1）。飼育しているトリから複数の家族が同時に感染し発症する家族内発生も、ときに認められる。オウム病の潜伏期間は 1~2 週間で、急激な高熱と咳嗽で発症する。軽症の気道感染から、肺炎や髄膜炎までの多様な病態を含む。市中肺炎における頻度はさほど高くはないが、中等症までの非定型肺炎と原因菌不明の重症肺炎では、必ず鑑別に入れる必要がある。

感染源としてトリとの接触歴は重要である。オウム病は本来トリの感染症で、保菌していても一見健常である。弱ったときやヒナを育てる期間に排菌しやすい。セキセイインコなど国内生産されるトリにおける汚染がみられ、また、自然界のトリにも侵淫している。



オウム病の感染様式と病態

ドバトの保菌率は20%程度と高く、ヒトへの感染源となりうる。本邦において、オウム病の感染源となった鳥類の追跡調査では、60%がオウム・インコ類であり、そのうち約3分の1はセキセイインコである。

1999年4月の感染症法施行以前には異型肺炎の中に含まれ、市中肺炎の2~3%程度と推測されていたが、実態を反映しているかどうかは不明であった。感染症法施行以後は4類感染症全数把握疾患となったが、年間報告数は1999年(ただし4~12月)が23例であり、時期的には5月に多い傾向が見られた。2000年の年間報告数は18例であり、時期的には特定の傾向は見られなかった。2007年から2016年の10年間の感染症発生動向調査による患者集計によると、111件の症例が報告され、年間症例数、届出率ともに以前より減少した。58%が男性で、年齢中央値は61歳であったが、年齢中央値は男女で異なり(男性:63歳、女性:53歳)、50歳未満では女性の症例が多かった。

2. 検体の取扱い

2-i 検体取り扱い上の注意

通常、トリにおける *C.psittaci* 感染の有無の確認は、トリを解剖しその臓器から、分離培養、抗原検出法、遺伝子検出法等の種々の検出法によって行なわれる。生きた状態での検査は排泄物（以下糞便）や分泌物、また総排泄腔のスワブから *C.psittaci* を検出する方法がある。

トリの総排泄腔スワブ・糞便の採取等：採取にはいずれもマスク、手袋を着用する等して感染に注意する。

2-ii. 各種動物からの検体採取・輸送・保存法

①総排泄腔スワブ： トリを保持固定し、滅菌綿棒を総排泄腔に挿入し、回転させて採取し、スクリュウキャップ付きの容器に移して 4℃で保存し輸送する。

②糞便： できるだけ新鮮な便をディスポーザブルのヘラ等で採取し、スクリュウキャップ付きのプラスチック容器に移して 4℃で保存し輸送する。

③トリ臓器： 死亡個体は冷蔵で速やかに輸送し、すぐに解剖できない場合は冷凍保存する。解剖では、肝臓、脾臓等の主張の有無など肉眼的観察後、臓器を摘出する。操作はすべて安全キャビネット内で行いバイオハザードに注意する。

長期保存する場合は-80℃に凍結保存する。

3. 検査法各論

検体の調整 操作については実験室内感染に注意する。

3-i. 検体の前処理

①総排泄腔スワブ：スワブが入っているチューブに滅菌した PBS 約 2ml を入れ、十分な Vortex をかけ、低速遠心し（1000～1500rpm、5 分程度）、上清を回収する。この回収した上清を DNA 抽出材料とする。

②トリ糞便：糞便検体は溶けやすい場合、滅菌 PBS を加えて Vortex をかけ、低速遠心し（1000～1500rpm 5 分程度）、上清を回収する。この回収した上清をさらに 15000 rpm 30 分程度遠心し、沈渣を DNA 抽出材料とする。乾燥糞便で Vortex のみで溶けにくい場合は、10～20%乳剤を作成した後、低速遠心後、同様に処理し、DNA 抽出材料とする。乳剤作成にはホモジナイザー（滅菌済み）を用いると良い。

③トリ臓器：特に肝臓、脾臓での陽性率が高いので、これらを小片にして滅菌 PBS を加えて 10～20%乳剤を作製した後、低速遠心、上記と同様に処理する。

3-ii. 遺伝子検査

①鋳型 DNA の抽出：DNA 抽出については、抽出キットが市販されているので利用すると良い。また、検体処理の乳剤作製における低速遠心後の上清をさらに高速遠心して最終沈渣を用いることにより、糞便に含まれる阻害物質の影響をおさえることにもなる。

遺伝子検出の方法として、多岐にわたる conventional PCR、real-time PCR が報告されているが、本マニュアルでは、現在、国内での使用実績が高いものを示す。国内で検証されていないものも少なくないが、海外で用いられている系については、参考文献を示すので参照されたい。

実施にあたっては、実施施設の PCR 機材の性能等にも影響を受けるため、反応条件を実施施設で事前に検証する必要がある。デフォルトの反応液調整ならびに反応条件は初出となる参考文献を参照されたい。

②real-time PCR (Okuda et al., 2011)

プライマー

Env-F: 5'-AACCTCGGATAGCAAATTAATCTGG-3'

Env-R: 5'-ATTTGGTATAAGAGCGAAGTTCTGG-3'

③conventional PCR for typing (Chahota et al., 2006)

プライマー

outer primer

CMGP-1F CCTTGTGATCCTTGCGCTACTTG

CMGP-1R GTGAGCAGCTCTTTCGTTGAT

inner primer

CMGP-2F GCCTTAAACATCTGGGATCG

CMGP-2R GCACAACCACATTCCATAAAG

*増幅確認後、シーケンス配列の解析、確認が必要。

3-iii. 病原体分離

感染性の有無を確定できる方法であるが、実施に特別な施設や経験を要すること、またバイオハザードの観点からも習熟した施設以外で行なうことは困難であり、迅速性に欠けるため、本マニュアルでは省略する。

将来の分離を想定した準備のため、分離に適した材料の輸送保存液を下記に示す。

輸送保存液：SPG (sucrose phosphate glutamate)

Sucrose	75.0 g
KH ₂ PO ₄	0.52 g
K ₂ HPO ₄	1.22 g
Glutamic acid	0.72 g

上記を蒸留水に溶解し、pHを7.4~7.6に調整、1000mLにメスアップ後、ろ過滅菌する。使用目的によって分注、4℃で保存、長期保存には-20℃以下とする。

分離には、SPGや滅菌PBSにゲンタマイシン (GM)、バンコマイシン (VCM)、アンフォテリシン (AMPH)をそれぞれ終濃度10µg/ml、100µg/ml、2µg/ml含むものを用意し、検体の乳剤を作成する際に使用、4℃で一晩、抗菌薬を反応させ、分離に供する。または処理後、-80℃で保存する。

3-iv. 抗原検査

ヒト検体への使用を目的にした標識抗体が販売されているが、トリ材料では、糞便等多様な常在菌等が含まれ、非特異反応が強いため、トリ材料の糞便や総排泄腔スワブからの抗原検出は現実的でない。

4. 参考文献

厚生労働省：オウム病について.

<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000154524.html>

岸本壽男：オウム病とは.

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/366-psittacosis-intro.html>

Kozuki E, Arima Y, Matsui T. et al., Human psittacosis in Japan: notification trends and differences in infection source and age distribution by gender, 2007 to 2016. *Ann Epidemiol.*, 2020, 44: 60-63.

国立感染症研究所・厚生労働省健康局結核感染症課：小鳥のオウム病の検査方法等ガイドライン、2003.

Okuda H, Ohya K, Shiota Y, et al.: Detection of *Chlamydophila psittaci* by using SYBR green real-time PCR. *J Vet Med Sci.* 2011,73: 249-54.

Chahota R, Ogawa H, Mitsuhashi Y, et al.: Genetic diversity and epizootiology of *Chlamydophila psittaci* prevalent among the captive and feral avian species based on VD2 region of ompA gene. *Microbiol Immunol.* 2006, 50:663-78.

Centers for Disease Control and Prevention: Psittacosis.

<https://www.cdc.gov/pneumonia/atypical/psittacosis/index.html>

Balsamo G, Maxted AM, Midla JW, et al.: Compendium of measures to control *Chlamydia psittaci* infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydosis), 2017. *J Avian Med Surg.* 2017, 31: 262–82.

McGovern OL, Kobayashi M, Shaw KA, et al.: Use of real-time PCR for *Chlamydia psittaci* detection in human specimens during an outbreak of psittacosis — Georgia and Virginia, 2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2021,70: 505–9.

5. 連絡先等

国立感染症研究所ウイルス第一部第五室

コリネバクテリウム・ウルセランス感染症ガイドンス

目次

1. 感染症の概説(人と動物の症状)
 - 1-i 病原体の性状
 - 1-ii 疫学(人と動物)
2. 検体の取り扱い
 - 2-i 検体取り扱い上の注意(バイオセーフティ)
 - 2-ii 各種動物からの検体採取法
 - 2-iii 検体の輸送法
 - 2-iv 検体の保存法
3. 検査法
 - 3-i 検査法(総論)
 - 3-ii 検査法(各論)
 - 3-ii-(1) 検体の採取
 - 3-ii-(2) 寒天平板培地への塗布
 - 3-ii-(3) コロニーの選択
 - 3-ii-(4) 同定
 - 3-ii-(5) 毒素原性試験
 - 3-ii-(6) 血中抗体検査
4. 参考文献
5. 連絡先
6. 謝辞

1. 感染症の概説(人と動物の症状)

1-i 病原体の性状

Corynebacterium ulcerans 感染症は、ジフテリア毒素を産生するジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheriae*) の近縁菌である *C. ulcerans* の感染によって起きる感染症である (https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou18/corynebacterium_02.html)。

C. ulcerans はグラム陽性の短桿菌であり、典型的なコリネ型細菌の形態を示す *C. diphtheriae* に比べると、より球菌に近い形態である。病原因子として最も重要なものが、*C. diphtheriae* のジフテリア毒素と極めて近い構造を持つ毒素である。この毒素は、「ジフテリア毒素」あるいは「ジフテリア様毒素」と呼ばれる。*C. diphtheriae* の産生する毒素と *C. ulcerans* の産生する毒素の相同性は、塩基配列およびアミノ酸配列において約 95% である。*C. diphtheriae* の毒素では、菌株間差はほとんどないのに対して、*C. ulcerans* の毒素は菌株間で数%程度の相違がみられる。毒素は動物細胞のリボソームの構成成分である elongation factor 2 (EF2) の特定のアミノ酸残基 (ヒスチジンが翻訳後修飾されたジフタミド残基) を ADP-リボシル化することによりリボソームを不活化して毒性を発揮する。*C. diphtheriae* の場合と同様、毒素の遺伝子は染色体上に溶原化したバクテリオファージ (プロファージ) 上にコードされていることが多いが[1]、プロファージの構造を伴わない毒素遺伝子も稀に見られる[2]。ジフテリア毒素の他には、ホスホリパーゼ D (PLD) などいくつかの推定病原因子が知られている[3]。動物細胞への付着、増殖などについては知見が限られていて、全容は明らかにされていない。

ヒトの *C. ulcerans* による感染症は、*C. diphtheriae* によるジフテリアと同様、上気道に感染し呼吸困難、嘔声、咽頭痛、咳、発熱、上咽頭と喉頭前庭に白色偽膜等の呼吸器症状を引き起こすことが知られている。また、皮膚潰瘍、皮下潰瘍、リンパ節の腫脹や膿瘍を含む非呼吸器症状を示すことも知られている。これらの臨床症状から *C. diphtheriae* によるジフテリアと区別することは極めて困難である。

一方、動物の *C. ulcerans* による感染症の定義は定められていない。感染動物はくしゃみ、鼻汁、目やになどの症状を示す。また、皮膚潰瘍から菌が分離されることもある。

1-ii 疫学(人と動物)

C. diphtheriae の感染はヒトからヒトに限られており、ヒト以外の動物の感染例は極めて限られている。これに対して *C. ulcerans* 感染症は動物由来感染症であり、特に伴侶動物からの感染が疑われる例が多い。菌は伴侶動物に限らず多様な哺乳類と鳥類を宿主としようと考えられる。これまで知られている感染例は、国内ではネコ、イヌ、ウシ、シャチ、ライオン、ヒミズ、フクロウ、実験用カニクイザルであり[4-10]、国外ではさらにイノシシ、ヘラジカ、リス[11-15]など多岐にわたっている。

国内でのヒト感染例は、2020年現在 36 例であり、死亡例 2 例を含む(山本ら、病原微生物

物検出情報 in press)。臨床症状としては呼吸器症状を示すものが多数を占めるが、リンパ節等の膿瘍から菌が分離された症例も複数みられる。国内ヒト感染例の多くでネコ、イヌの飼育が随伴しており、それらの動物からも菌が分離される割合が高い(山本ら、病原微生物検出情報 in press)。

感染症法上、*C. diphtheriae*によるジフテリアは二類感染症とされており、発生した場合には届出が必要で、患者やその環境に対して行政的な介入が可能となっている(2001年以降、国内では*C. diphtheriae*によるジフテリアの報告はない)。これに対して*C. ulcerans*感染症は、近年の症例数が*C. diphtheriae*によるジフテリアを上回っているが、感染症法上の位置付けがない。一方でWHOは、ジフテリア毒素(またはジフテリア様毒素)を産生する*C. diphtheriae*、*C. ulcerans*および*Corynebacterium pseudotuberculosis*による感染症を全て「ジフテリア」と位置付けている。

*C. diphtheriae*によるジフテリアが二類感染症であり届け出が必要で、*C. ulcerans*感染症が感染症法の対象ではなく届出が不要であることから、この2つの感染症の鑑別は極めて重要である。この2者は臨床的に区別することが困難であるため、病原体の分離同定による鑑別が必要になる。

2. 検体の取り扱い

2-i 検体取り扱い上の注意(バイオセーフティ)

*C. ulcerans*感染疑いの動物検体は人への感染源となりうることを十分に理解し、慎重な取り扱いが必要である。臨床検体はBSL2レベルの病原体を含むものと想定して、各施設のバイオセーフティ規定に従って取り扱う。

2-ii 各種動物からの検体採取法

(菌分離)それぞれの動物に適した保定を行い、咽頭、口腔、目脂、耳、皮膚表面や潰瘍等のみられる部位などからスワブを採取する。咽頭などの偽膜や病変部位の膿なども菌分離の材料となりうるので、これらが認められた場合は採取する。動物血液からの菌分離は一般的には行われない。

(血中抗体検査)ジフテリア毒素に対する血中抗体を検査することで、感染の既往を推測することができる。それぞれの動物に適した保定を行い、一般的な方法で血清を採取する。

2-iii 検体の輸送法

スワブ、偽膜、膿など菌分離用の検体は冷蔵で輸送することが望ましく、凍結は避けるべきである。血清については冷蔵あるいは凍結の状態に輸送する。

2-iv 検体の保存法

菌分離のための検体は、採取後可能な限り早く処理することが望ましいが、やむなく保存する場合は凍結を避けて冷蔵で保存する。血清は、すぐに抗体検査を行う場合は検査まで冷蔵で差し支えないが、長期保存の場合は凍結保存が望ましい。

3. 検査法

3-i 検査法(総論)

ヒト症例の場合、上述のように、二類感染症であり届出が必要なジフテリア (*C. diphtheriae* による) と、感染症法の対象外である *C. ulcerans* 感染症は臨床的に識別することが極めて困難であるため、実験室での検査による鑑別が必須である。一方、動物においては、*C. ulcerans* 感染症は家畜伝染病予防法などの法律の対象ではなく、類似の疾患と特に鑑別する必要もない。臨床的な定義および診断の基準も定められていない。*C. ulcerans* の検出を目的とする動物の検査としては、ヒト症例の感染源となった可能性が考えられる伴侶動物などの環境調査、動物の菌保有状況の調査などがある。また、呼吸器等の症状を呈する伴侶動物の診断の過程で分離された菌を同定したところ *C. ulcerans* であることが判明するケースもある。

3-ii 検査法(各論)

3-ii-(1)検体の採取

現在のところ、栄研化学(株) シードスワブγ 2号‘栄研’ [8]を滅菌生理食塩水で湿らせてスワブを採取することにより良好な成績が得られている。また、シードスワブγ 3号‘栄研’も用いられる[6]。実際はネコ、イヌ以上の大きさの動物からのスワブ採取が必要な場合が多いと思われるが、動物の種類に限らず、動物が暴れて採取者が負傷することを防ぐために、その保定には、動物の飼い主または熟練した採取者が担当することが望ましい。スワブの採取部位としては咽頭、口腔、目脂、耳、皮膚表面や潰瘍等のみられる部位など一頭の複数部位から採取することが望ましい。特に複数の動物からのスワブ採取が必要な場合は、検体の取違えを防ぐために採取者と採取した検体の記録を担う補助者との共同作業が有効である。また、家の内外を行き来するネコなどからのスワブ採取の場合往々にして対象動物が戸外にいて保定ができずその動物からの採取ができない場合がある。このような場合は、飼い主から対象動物の室内での生活状況を聴取して、その動物がいつも使用している場所や食器などからのスワブ採取で菌分離が可能ながある[16]。*Corynebacterium* 属菌は動物体内だけでなくその体液が付着し乾燥した物質からも分離されうる。採取したスワブは冷蔵(やむを得ない場合は室温)で運搬し、可能な限り早く菌分離の操作に用いるべきである。

3-ii-(2) 寒天平板培地への塗布

勝川変法荒川培地[5]が *C. ulcerans* 分離には好適である。この培地は市販されておらず、下記の組成に従って作成する。スワブを培地の一部に直接塗布し、さらに白金耳で画線することで、相互に分離したコロニーの形成を図る。勝川変法荒川培地上に形成された *C. ulcerans* のコロニーを写真に示す。

勝川変法荒川培地の他に、ホスホマイシン添加血液寒天培地で良好な成績を上げている例もある[4]。また、WHO マニュアルにはチンスダール培地、ホイル培地などが選択培地として収載されている[17]。

勝川変法荒川培地の組成

ハートインフュージョン寒天培地 40 g

活性炭末 0.5 g

蒸留水 1,000 mL

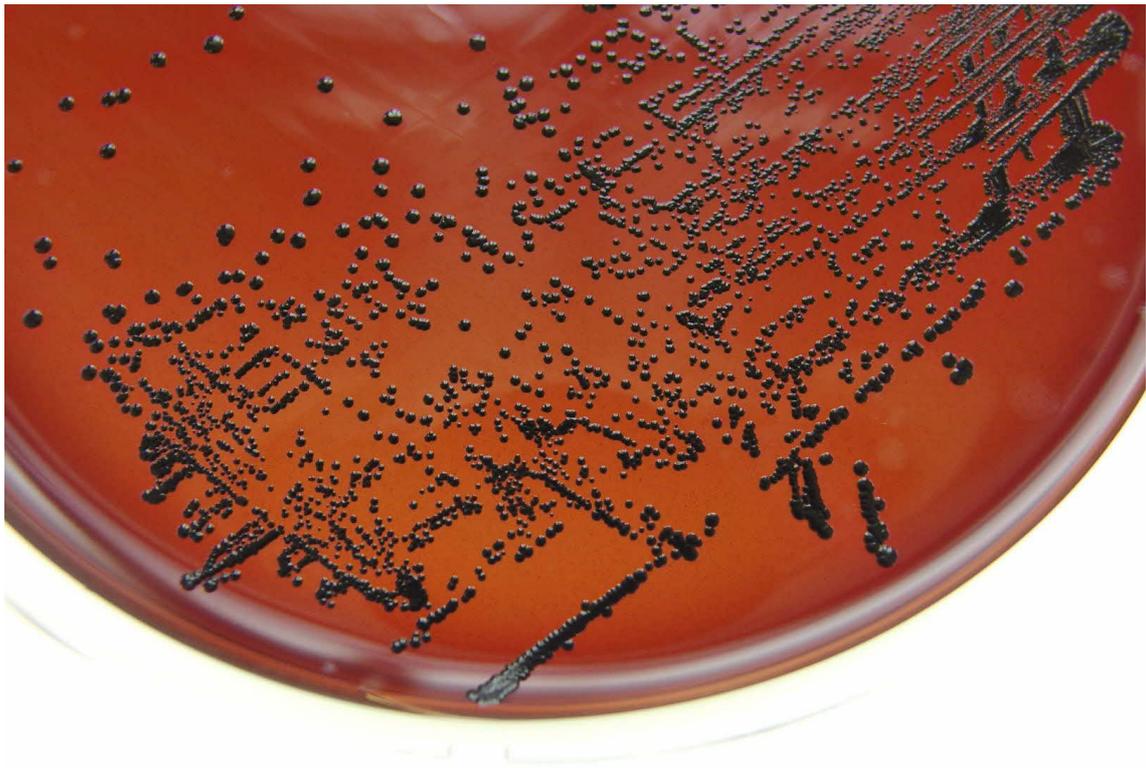
121°C、15分、高圧滅菌

滅菌後、50°Cに冷えた段階で下記を添加。

1%亜テルル酸カリウム液 30 mL

(溶解後30分以上放置後添加、溶解後長期保存も可能)

羊脱線維血液 100 mL

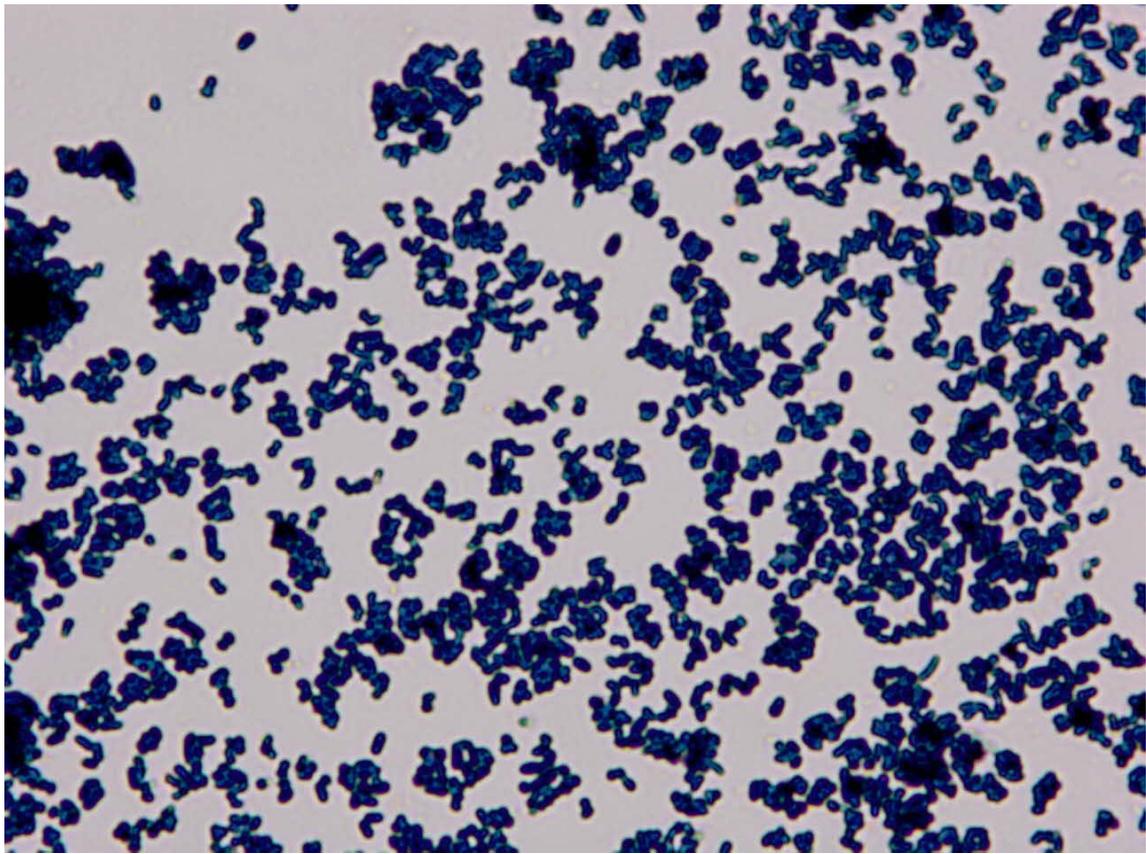


勝川変法荒川培地上に生育した *C. ulcerans* 0102 株

3-ii-(3) コロニーの選択

勝川変法荒川培地上に生じたコロニーのうち、黒から濃い灰色のものを1検体あたり複数選び、新しい勝川変法荒川培地で単コロニー分離を行い、分離したコロニーをグラム染色してスクリーニングを行う。ネコ、イヌ等の伴侶動物のスワブからの菌分離は、夾雑菌のコロニーが比較的少ないのでこの方法でスクリーニングを行うことが容易である。シカ、イノシシ等の野生動物では非常に多くの夾雑菌のコロニーが生じるため、菌分離は容易でないが、スクリーニングを繰り返し行うことで、菌が分離できることがある。

別法として、コロニー密集部分から菌体をかき取り、後述の方法でPCRによるホスホリパーゼD (PLD) 遺伝子の検出を試みることでスクリーニングとすることができる(コロニースイープPCR法)。この場合は陽性を示したコロニー密集部分を新しい勝川変法荒川培地に画線し、単コロニー分離したのち、グラム染色あるいは後述のPLD遺伝子PCRで候補を絞る。



C. ulcerans CUL_2018_046 株のグラム染色像

3-ii-(4) 同定

スクリーニングを経て候補として絞られた菌株について、*C. ulcerans*であるかの同定を行う。*rpoB* 遺伝子配列の解析、鑑別用リアルタイム PCR、簡易同定キット API-Coryne などによって行う。

rpoB 遺伝子配列の解析による同定：

- ・ 必要な器具・試薬：アルミブロックヒーター、サーマルサイクラー、アガロースゲル電気泳動とバンド確認のための試薬・器具一式、白金耳、PCR 試薬キット、プライマー除去キット、サイクルシークエンシング試薬、滅菌蒸留水、マイクロチューブ、PCR チューブ
- ・ 1 白金耳の菌体を平板培地上のコロニーからかき取り、あらかじめマイクロチューブに入れておいた 100 μ L の滅菌蒸留水に懸濁する。
- ・ 懸濁液の入ったマイクロチューブを、100°C のアルミブロックヒーターで 10 分間加熱する。
- ・ 加熱後、15,000 rpm、5 分間遠心し、上清 1 μ L (コロニーが微小でテンプレート DNA 濃度が低いと予想される場合には適宜テンプレート DNA 溶液の容量を調整する) を以下の PCR 反応のテンプレートとする。

- ・ 下記のプライマー[18] と PCR 試薬を用い、以下の条件で反応を行う。

C2700F 5'-CGWATGAACATYGGBCAGGT-3'

C3130R 5'-TCCATYTCRCCRAARCGCTG-3'

94°C	2 min	
94°C	30 sec	} 30 サイクル
54°C	30 sec	
72°C	2 min	
72°C	7 min	
4°C	⊗	

反応後、アガロースゲル電気泳動(2%)にて PCR 反応物 (400 bp 強) の生成を確認する。その後、PCR 反応物を精製し、塩基配列を決定する。DNA シークエンス用のプライマーとして C2700F と C3130R を用いて差し支えない。

適当なソフトウェアを用いて配列を結合し、NCBI 等の BLAST にてホモロジー検索を行う。

ホスホリパーゼ D (PLD) PCR

テンプレート DNA の調製は前項と同様に行う。

- ・ 下記のプライマー[19]と PCR 試薬を用い、以下の条件で反応を行う。

CorynePLD-F 5'-AAAGTTGTTTTATTCTTATCAATAATTAT-3'

CorynePLD-R1 5'-GTAGYGATTGTCCACCCAAAAG-3' (Y: C と T の混合)

94°C	2 min	
94°C	30 sec	} 30 サイクル
54°C	30 sec	
72°C	2 min	
72°C	7 min	
4°C	⊗	

反応後、アガロースゲル電気泳動(2%)にて PCR 反応物 (723 bp) の生成を確認する。

鑑別用リアルタイム PCR

2022 年に島根県保健環境科学研究所の川瀬らによって開発された方法である[20]。 *C. diphtheriae*、 *C. ulcerans*、 *C. pseudotuberculosis* の 3 菌種を一度のリアルタイム PCR で鑑別可能で、毒素遺伝子の有無を同時に判定することができる優れた方法である。

(1) 必要な試薬、器具

リアルタイム PCR 装置、リアルタイム PCR 用 96 穴プレート（又は 8 連リアルタイム PCR 用チューブ）、試薬類（下記表）、滅菌蒸留水、マイクロチューブ

(2) PCR プライマー

菌種	標的遺伝子	プライマー名	塩基配列 (5' to 3')	Accession 番号	増幅断片のサイズ
<i>C. ulcerans</i> / <i>C. pseudotuberculosis</i>	<i>rpoB</i>	rpoB_385F rpoB_458R	AACTATTCTGCGCCGCTTTATG ACAGTCTGGGACTTGATCTCCTG	AP012284/ CP021251	74 bp
<i>C. ulcerans</i> / <i>C. pseudotuberculosis</i> / <i>C. diphtheriae</i>	<i>tox</i>	DT_404F DT_553R	TCACTGAACCGCTGATGGAG TTAACGCTTTCGCCTGTTC	AB304280/ JN176077/ CP003216	150 bp

プライマープレックス溶液（各プライマーの終濃度 0.1 $\mu\text{mol/L}$ ）の事前作成も可能である（例：滅菌蒸留水 480 μL に対し、各 primer (10 $\mu\text{mol/L}$) を 20 μL ずつ加えて、560 μL のプレックス溶液を作成し、冷凍保存する）。

(3) インターナルコントロール (IAC) の調製

- ・ 下記配列を含む DNA を合成したうえで、10 倍段階希釈し、 10^4 コピー/ μL まで希釈する。
- ・ 10^4 コピー/ μL のものを小分け分注し、使用時まで凍結保存する（ストック溶液）
- ・ IAC の配列（下線部は *rpoB* のプライマー配列箇所）

AAC TAT TCT GCG CCG CTT TAT GTC AGC TGG GTG CGC GAT CAA TAC GCG ACC GCG GAG
TCC CTG CTC TCC TCC AAG ACG GCC ACC GTC TGG GGC CAG GAG ATC AAG TCC CAG ACT
GT

(4) テンプレートの作成

- ・ 1 白金耳の菌体を平板培地上のコロニーからかき取り、あらかじめマイクロチューブに入れておいた 100 μL の滅菌蒸留水に懸濁する。
- ・ 懸濁液の入ったマイクロチューブを、 100°C のアルミブロックヒーターで 10 分間加熱する。
- ・ 加熱後、15,000 rpm、5 分間遠心し、上清 2 μL （コロニーが微小でテンプレート DNA 濃度が低いと予想される場合などテンプレート DNA の濃度に応じて、テンプレート DNA 溶液の容量を調整する）を以下の PCR 反応のテンプレートとする。

(5) 試薬調製と反応条件

- ・ 下記試薬を準備する。
- ・ IAC ストック溶液 (10⁴ コピー/μL) に滅菌蒸留水を加え、充分に混和する。IAC の濃度は、2x10² コピー/μL となるように調製する。
- ・ 下記組成で試薬調製を行う。

PCR反応液の組成

試薬	1反応あたり(μL)	備考
Premix Ex Taq(Takara bio)	10	
Evagreen(20X) (コスモバイオ)	1	
Rox Reference dye II	0.4	Premix Ex Taq付属の試薬
Primer premix	5.6	最終濃度は0.1 μmol/L
IAC(2x10 ² copies/μL)	1	
DNA	2	
Total	20	

- ・ 反応液 18 μL を各 well に添加し、陰性コントロール (滅菌蒸留水)、サンプル、陽性コントロール 2 μL を加える。
- ・ ABI7500Fast を使用する場合は、下記条件で PCR と融解曲線分析を行う。
95°C 30 sec→40 cycle (95°C 5 sec, 63°C 25 sec) →Melting (95°C 5 sec, 63°C 25 sec)

(6) 結果判定

- ・ 陰性コントロールと陽性コントロールの結果を確認のうえ、融解曲線のピーク温度 (T_m 値) から検体の菌種や毒素遺伝子の有無を判定する。
- ・ 増幅曲線と融解曲線の例示を図 1 に示した。T_m 値の一例は次のとおりである。
rpoB: *C. ulcerans*: 78.6、*rpoB* *C. pseudotuberculosis*: 76.43、*tox*: 83.26、IAC: 87.27
- ・ 図 1 の CU の位置にピーク (T_m) を認めた場合、*C. ulcerans*、CP の位置にピークを認めた場合、*C. pseudotuberculosis* と判定する。*tox* の位置にピークを認めた場合、毒素遺伝子陽性、*tox* の位置にピークを認めなければ、毒素遺伝子陰性と判定する。
- ・ CP と CU の位置にピークを認めず、*tox* のみ陽性の場合には毒素遺伝子陽性 *C. diphtheriae* を疑い、他の試験成績を考慮のうえ、最終判定を行う。
- ・ IAC の位置のみにピークを認めた場合は陰性と判定する。

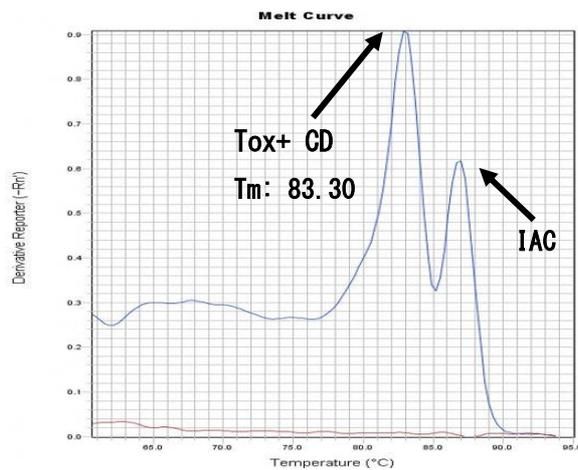
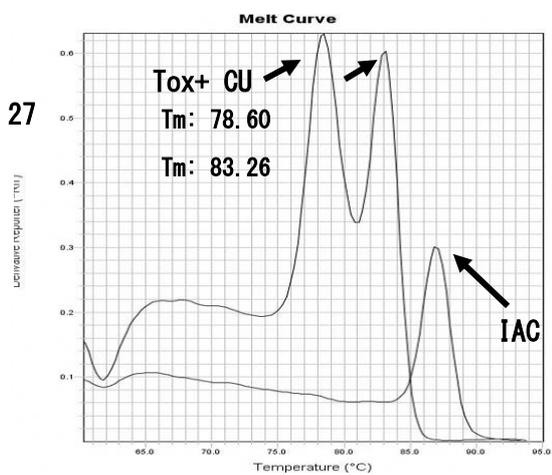
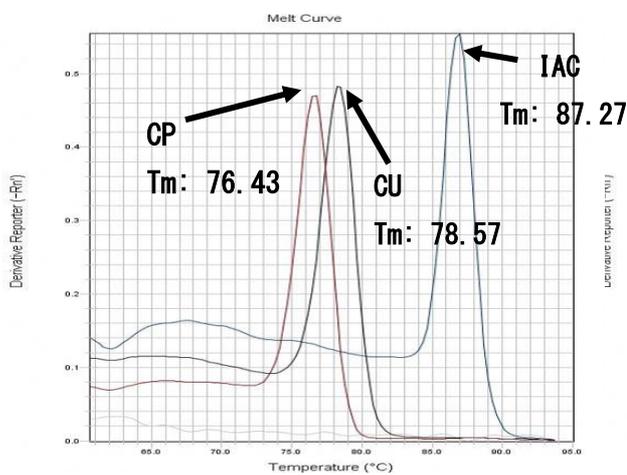
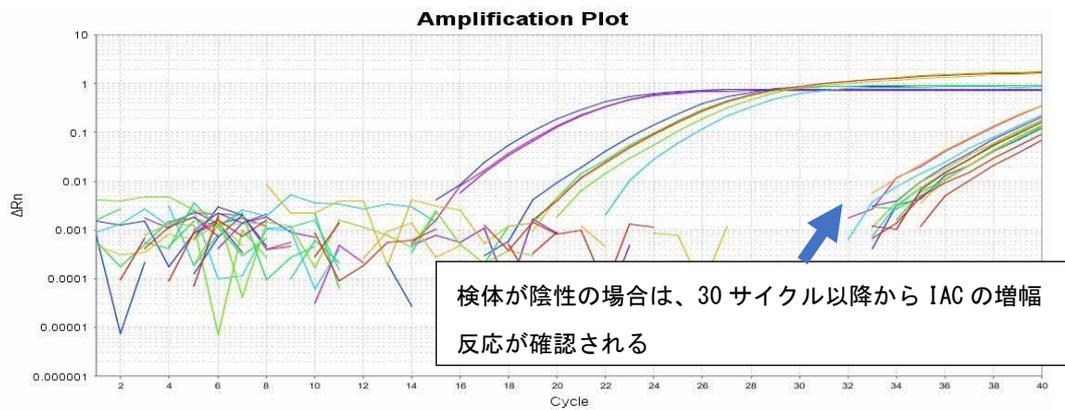


図1 リアルタイム PCR の増幅曲線と融解曲線の例示
 CP: *C. pseudotuberculosis*, CU: *C. ulcerans*, CD: *C. diphtheriae*

API Coryne による同定

- ・ 必要な器具・試薬：API Coryne 試薬一式（API Coryne 本体の他に付随する添加試薬あり。詳しくはビオメリュー社 web ページ <https://www.biomerieux-jp.net/clinical/c023.php> を参照）、APIWEB ライセンス（判定のために web サイトへのログインが必要）、コロンビア血液寒天培地
- ・ コロンビア血液寒天培地に分離菌を塗布し 37°C で 24-48 時間培養する。
- ・ その後の操作は API Coryne キットの使用説明書に従って行う。
(https://www.info.pmda.go.jp/downloadfiles/ivd/PDF/530633_20400AMY00060000_A_01_10.pdf)

3-ii-(5) 毒素原性試験

分離菌がジフテリア毒素を産生するかを判定する試験である。

まず、PCR で毒素遺伝子の検出を行う。毒素遺伝子陽性の場合には、毒素遺伝子が機能している（菌が活性のあるジフテリア毒素を産生している）かを、Vero 細胞に対する培養濾液の細胞毒性を指標に調べる。

PCR によるジフテリア毒素遺伝子の検出

- ・ 1 白金耳の菌体を平板培地上のコロニーからかき取り、あらかじめマイクロチューブに入れておいた 100 μ L の滅菌蒸留水に懸濁する。
- ・ 懸濁液の入ったマイクロチューブを、100°C のアルミブロックヒーターで 10 分間加熱する。
- ・ 加熱後、15,000 rpm、5 分間遠心し、上清 1 μ L（コロニーが微小でテンプレート DNA 濃度が低いと予想される場合には適宜テンプレート DNA 溶液の容量を調整する）を以下の PCR 反応のテンプレートとする。
- ・ 下記のプライマー[21] と PCR 試薬を用い、以下の条件で反応を行う。このプライマーはジフテリア毒素遺伝子のうち毒素の A サブユニットに相当する部分の遺伝子を検出するためのプライマーである。ごく稀に、欠失のある毒素遺伝子を有する菌が存在する可能性があり、PCR で A サブユニットが検出されても活性のある毒素が産生されていないことがありうる。そこで PCR 陽性の検体については Vero 細胞毒性試験を合わせて行うことが薦められる。

Tox 1 5'-ATCCACTTTT AGTGCGAGAACCTTCGTCA-3'

Tox 2 5'-GAAAACTTTTCTTCGTACCA CGGGACTAA-3'

94°C 2 min

94°C 30 sec

54°C 30 sec

} 30 サイクル

72°C 2 min

72°C 7 min

4°C ⊙

反応後、アガロースゲル電気泳動(2%)にて PCR 反応物 (248 bp) の生成を確認する。陽性対照として、ジフテリア毒素陽性であることがわかっている菌の DNA を用いることが望ましい。陰性対照 (テンプレートとして滅菌水を用いるなど) も必要である。

Vero 細胞による細胞毒性試験

- 必要な試薬、器具：CO₂ インキュベーター、低速遠心機、位相差倒立顕微鏡、マルチチャンネルピペット、ジフテリア抗毒素、陽性対照用ジフテリア毒素、MEM 培地、牛胎児あるいは新生仔牛血清、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (細胞培養用)、トリプシン-EDTA 溶液 (細胞培養用)、細胞培養用シャーレあるいはフラスコ、細胞培養用 96 穴プレート、Bacto Proteose Peptone No. 2 (Becton-Dickinson #212120)、マルトース、乳酸、水酸化ナトリウム溶液(40% w/v = 10 N)、塩化ナトリウム、メンブランフィルター (0.22 あるいは 0.45 μm)、デイスポーザブル注射筒 (2.5 あるいは 5 mL)
- Elek broth (毒素産生用液体培地) の作成 ([17]p77 A7.4 を液体培地用に改変)
 - 20 g の Bacto Proteose Peptone No. 2 を精製水 (最終的に 1 L にメスアップ可能な容量) に溶解する
 - 3.25 ml の水酸化ナトリウム溶液を加える
 - ホットプレートスターラーで混合しながら沸騰するまで加熱する
 - 冷却する
 - 可能であれば Whatman® グラスフィルター (Grade GF/F) または Whatman® no. 12 濾紙で沈殿を濾過除去する
 - 0.7 ml の乳酸を加える
 - 3.0 g のマルトースを加える
 - 5.0 g の塩化ナトリウムを加える
 - 5 N または 1 N HCl で pH を 7.8 に調製する
 - 容量を 1 L にメスアップし、濾過滅菌またはオートクレーブ滅菌する
- 分離菌を 2-3 mL の Elek broth に接種して 37°C 24-48 時間振盪培養したのち、3500 rpm、5 分間遠心して上清を注射筒に移し、メンブランフィルターで濾過滅菌したものを検体とする。使用するまで 4°C で保存する。
- 96 穴プレートの横列を使う。非中和、中和の列をそれぞれ準備する。
- 96 穴プレートの 2-12 well 目に 25 μL の MEM+3%血清をあらかじめ入れておく。
- 96 穴プレートの 1 well 目に、50 μL の検体を入れ、そこから 2 列目、3 列目と 25 μL を移してゆく。移す際には十分にピペッティング (5 回ぐらい) して混合したも

のを移す。

- ・ 非中和列には 25 μL の MEM+3%血清、中和列には 25 μL のジフテリア抗毒素を入れる。
- ・ 室温に 30 分置いたのち、全ての well に 50 μL の MEM+3%血清を加え、さらに 50 μL の Vero 細胞懸濁液 (3×10^5 cell/mL) を加える。
- ・ CO_2 インキュベーター (37°C、5% CO_2) で 4 日間培養し、検鏡して細胞障害性を確認する。非中和で細胞障害が認められ、中和で細胞障害が消失あるいは軽減している場合、毒素原性陽性と判定する。

3-ii-(6) 血中抗体検査

Vero 細胞に対する細胞毒性を血清中の抗体が中和できるかをみる試験である[22]。必要な器具、試薬は「Vero 細胞による細胞毒性試験」と共通である。手順は「Vero 細胞による細胞毒性試験」の“検体”を“ジフテリア毒素”、“ジフテリア抗毒素”を“血清”に置き換える。血清を加えない非中和列（毒素の希釈による細胞障害活性の消失と区別するために必須）に対し、細胞障害活性が中和で消失あるいは軽減している場合、抗体陽性と判定する。

4. 参考文献

- [1] Sekizuka T, Yamamoto A, Komiya T, Kenri T, Takeuchi F, Shibayama K, et al. *Corynebacterium ulcerans* 0102 carries the gene encoding diphtheria toxin on a prophage different from the *C. diphtheriae* NCTC 13129 prophage. BMC Microbiol. 2012;12:72.
- [2] Meinel DM, Margos G, Konrad R, Krebs S, Blum H, Sing A. Next generation sequencing analysis of nine *Corynebacterium ulcerans* isolates reveals zoonotic transmission and a novel putative diphtheria toxin-encoding pathogenicity island. Genome Med. 2014;6:113.
- [3] Trost E, Al-Dilaimi A, Papavasiliou P, Schneider J, Viehoveer P, Burkovski A, et al. Comparative analysis of two complete *Corynebacterium ulcerans* genomes and detection of candidate virulence factors. BMC Genomics. 2011;12:383.
- [4] Hirai-Yuki A, Komiya T, Suzaki Y, Ami Y, Katsukawa C, Takahashi M, et al. Isolation and characterization of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* from 2 closed colonies of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) in Japan. Comp Med. 2013;63:272-8.
- [5] Katsukawa C, Kawahara R, Inoue K, Ishii A, Yamagishi H, Kida K, et al. Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* Isolated from the domestic dog for the first time in Japan. Jpn J Infect Dis. 2009;62:171-2.
- [6] Katsukawa C, Komiya T, Umeda K, Goto M, Yanai T, Takahashi M, et al. Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* isolated from a hunting dog and its diphtheria toxin antibody titer. Microbiol Immunol. 2016;60:177-86.

- [7] Katsukawa C, Komiya T, Yamagishi H, Ishii A, Nishino S, Nagahama S, et al. Prevalence of *Corynebacterium ulcerans* in dogs in Osaka, Japan. *J Med Microbiol*. 2012;61:266-73.
- [8] Katsukawa C, Umeda K, Inamori I, Kosono Y, Tanigawa T, Komiya T, et al. Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* isolated from a wild bird (ural owl) and its feed (shrew-moles): comparison of molecular types with human isolates. *BMC Res Notes*. 2016;9:181.
- [9] Seto Y, Komiya T, Iwaki M, Kohda T, Mukamoto M, Takahashi M, et al. Properties of coryneophage attachment site and molecular epidemiology of *Corynebacterium ulcerans* isolated from humans and animals in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2008;61:116-22.
- [10] Murakami K, Hata E, Hatama S, Wada Y, Ito M, Ishikawa Y, et al. Eosinophilic granuloma with Splendore-Hoeppli material caused by toxigenic *Corynebacterium ulcerans* in a heifer. *J Vet Med Sci*. 2014;76:931-5.
- [11] Busch A, Möller J, Burkovski A, Hotzel H. Genome sequence of a pathogenic *Corynebacterium ulcerans* strain isolated from a wild boar with necrotizing lymphadenitis. *BMC Res Notes*. 2019;12:692.
- [12] Contzen M, Sting R, Blazey B, Rau J. *Corynebacterium ulcerans* from diseased wild boars. *Zoonoses Public Health*. 2011;58:479-88.
- [13] Dangel A, Berger A, Rau J, Eisenberg T, Kampf P, Margos G, et al. *Corynebacterium silvaticum* sp. nov., a unique group of NTTB corynebacteria in wild boar and roe deer. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020.
- [14] Olson ME, Goemans I, Bolingbroke D, Lundberg S. Gangrenous dermatitis caused by *Corynebacterium ulcerans* in Richardson ground squirrels. *J Am Vet Med Assoc*. 1988;193:367-8.
- [15] Rau J, Blazey B, Contzen M, Sting R. *Corynebacterium ulcerans* infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) (in German). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 2012;125:159-62.
- [16] Yasuda I, Matsuyama H, Ishifuji T, Yamashita Y, Takaki M, Morimoto K, et al. Severe Pneumonia Caused by Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* Infection, Japan. *Emerg Infect Dis*. 2018;24:588-91.
- [17] World Health Organization. WHO laboratory manual for the diagnosis of diphtheria and other related infections. 2021. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/352275>.
- [18] Khamis A, Raoult D, La Scola B. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J Clin Microbiol*. 2004;42:3925-31.
- [19] Komiya T, Seto Y, De Zoysa A, Iwaki M, Hatanaka A, Tsunoda A, et al. Two Japanese *Corynebacterium ulcerans* isolates from the same hospital: ribotype, toxigenicity and serum antitoxin titre. *J Med Microbiol*. 2010;59:1497 - 504.
- [20] Kawase J, Sakai T, Iwaki M, Umeda K, Fukuma A, Fujisawa N, et al. Rapid detection and discrimination of potentially toxigenic *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium*

pseudotuberculosis by multiplex real-time PCR and amplicon melting curve analysis. J Microbiol Methods. 2022;195:106454.

[21] Nakao H, Popovic T. Development of a direct PCR assay for detection of the diphtheria toxin gene. J Clin Microbiol. 1997;35:1651-5.

[22] Miyamura K, Nishio S, Ito A, Murata R, Kono R. Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres using VERO cells. I. Studies on factors affecting the toxin and antitoxin titration. J Biol Stand. 1974;2:189-201.

5. 連絡先

執筆者情報

岩城 正昭 (国立感染症研究所 安全実験管理部)

山本 明彦 (国立感染症研究所 安全実験管理部)

木村 美幸 (国立感染症研究所 細菌第二部)

妹尾 充敏 (国立感染症研究所 細菌第二部)

川瀬 遵 (島根県保健環境科学研究所 感染症疫学部)

問い合わせ先

(全般)

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

国立感染症研究所 細菌第二部第三室

Tel: 042-561-0771

E-mail: senoh@niid.go.jp

(鑑別用リアルタイム PCR)

〒690-0122 島根県松江市西浜佐陀町 582-1

島根県保健環境科学研究所 感染症疫学部

Tel: 0852-36-8181

E-mail: hokanken@pref.shimane.lg.jp

6. 謝辞

本マニュアルは AMED 研究費 JP21fk0108097、JP22fk0108653 で実施された研究成果の一部から作成された。

細菌性犬・猫咬搔傷感染症ガイドンス

- パストツレラ症
- 猫ひっかき病
- カプノサイトファーガ感染症

目次

1. 感染症の概説
 - 1-i 病原体
 - 1-ii 疫学
2. 検体の取扱い
 - 2-i 検体取扱い上の注意（バイオセーフティ）
 - 2-ii 犬・猫からの検体採取法および処理法
 - 2-iii. 検体の輸送法
3. 検査法
 - 3-i 検査法総論
 - 3-ii. 検査法各論
4. 参考文献
5. 連絡先

- パストツレラ症
- 猫ひっかき病
- カブノサイトファーガ感染症

1. 感染症の概説

犬・猫による咬搔傷に伴って感染する細菌には種々のものがあるが、本ガイドランスではこのうち、パストツレラ症、猫ひっかき病およびカブノサイトファーガ感染症について概説する。

1-i 病原体

a) パストツレラ症

パストツレラ症は、犬・猫の口腔内に常在する通性嫌気性、非運動性のグラム陰性短桿菌である *Pasteurella* 属菌が病原体である。保菌率は犬の口腔で 55～75%，猫の口腔で 60～97%，猫の爪で 20%であり、とくに猫で高い[1]。代表的な菌種は *Pasteurella multocida* であり、ほかに *Pasteurella canis*, *Pasteurella dagmatis* および *Pasteurella stomatis* の計 4 菌種が人に病原性を有する[2]。*Pasteurella* 属菌の形態は小球桿菌状または短桿菌状で莢膜を有し、両端染色性を示す。

P. multocida は莢膜血清型群 A、B、D、E、F および Non-typable に分類されるが、犬・猫の保有株には A 群が多い[3]。

b) 猫ひっかき病 (cat scratch disease: CSD)

猫ひっかき病は、グラム陰性小桿菌である *Bartonella* 属菌感染を原因とする。*Bartonella henselae* が主な病原体であり、ほかに *Bartonella clarridgeiae* 感染による CSD も報告されている[4]。これらの病原体は猫を自然宿主とし、ネコノミがベクターとなって猫間を伝播する。犬も保菌していることがある。

c) カプトサイトファーガ感染症

カプトサイトファーガ感染症は、犬・猫の口腔内に常在するグラム陰性桿菌である *Capnocytophaga* 属菌感染を原因とする。*Capnocytophaga canimorsus* が最も重要な病原体であり、ほかに *Capnocytophaga cynodegmi* および *Capnocytophaga canis* の感染例が報告されている。*Capnocytophaga* 属菌は生育に二酸化炭素を要求し、寒天培地上での滑走能を有することが特徴である[5]。

C. canimorsus は遺伝子検査によって莢膜型 A~E および Non-typable に分類することができるが、臨床分離株では莢膜型 A~C が 90%以上を占めることが報告されており、これらの莢膜型の菌株は高病原性株であることが示唆される[6]。

上記の3種の感染症の病原体は、いずれもバイオセーフティレベル (BSL2) の病原体に分類されることから、検体および分離菌株はバイオセーフティに十分留意して取り扱う必要がある。

1-ii 疫学

a) パスツレラ症

人に感染した場合、潜伏期は比較的短く、犬・猫による咬搔傷受傷後、数時間～2日程度で咬傷部位付近の発赤、腫脹、疼痛が認められる。発熱、蜂窩織炎、近位リンパ節の腫脹もしばしば認められる。重症例では関節炎、骨髄炎などを呈し、まれに敗血症を起こし死に至る例もある。患者は中高年に多い。

犬・猫では口腔内常在菌であり保有していても通常無症状であるが、まれに動物同士の咬傷などによって受傷部位から *Pasteurella* 属菌に感染することがあるほか、猫では肺炎を起こした例がある。犬・猫での感染は人と同様、日和見的と考えられる[1]。

b) 猫ひっかき病 (cat scratch disease: CSD)

主に猫から搔傷を受けることによって感染するが、犬から感染した事例も報告されている。人に感染した場合、リンパ節の腫脹などが特徴である。また中高年齢者に多いパスツレラ症、カプトサイトファーガ感染症に対し、患者は20歳未満が約半数を占めるなど比較的

若い人が多い[4]。患者数は米国で年に 12000 人という推計があり、我が国でも年に数千人の発生があるのではないかと推測される。

B. henselae に感染している猫は、通常臨床症状を示さない。*B. henselae* を実験的に猫に感染させた場合、約 1 週間で菌血症（菌量：3～10⁶ CFU/ml）に達し、2～3 カ月間持続する。自然感染した猫では 1～2 年もの間、菌血症が持続した例もある。実験感染した猫では、発熱、一過性の神経機能障害、傾眠、食欲不振などが見られている[4]。

c) カプトサイトファーガ感染症

1993 年の国内初報告以降、国内では約 130 例が把握されている。人において最も報告の多いのは *C. canimorsus* 感染であり、重症化して敗血症を呈した場合の致命率は約 26% である。傷口には特に病変が見られないまま急激に全身状態が悪化するケースが多いのが特徴である。患者は平均年齢が約 65 歳と中高年が多く、男女比は約 7:3 である[5]。

犬・猫においては口腔内常在菌であり、保菌動物は特に症状を示さない。人では *Capnocytophaga* 属菌は歯周病関連菌に分類されるが、犬・猫における歯周病への関与は不明である[5]。

2. 検体の取扱い

2-i 検体取扱い上の注意（バイオセーフティ）

Pasteurella 属菌、*Bartonella* 属菌および *Capnocytophaga* 属菌が含まれる可能性がある動物由来検体は人への感染性を有するリスクがあることに留意し、BSL2 レベルの病原体と同等の取扱いを行う。具体的には各施設におけるバイオセーフティに関する規定・指針に従う。

2-ii 犬・猫からの検体採取法および処理法

●口腔スワブ

スワブ採取用の滅菌綿棒を用いて、犬・猫の歯肉部（歯と歯肉の境目付近）を擦る。あるいは舌の表面を擦ってもよい。可能であれば綿棒を生理食塩水で湿らせてからサンプル採取を行う。サンプルを送付する場合は、輸送培地入りの輸送綿棒を用い、冷蔵便で発送するなど、検体処理まで低温状態を保つ。

●血液

採血後、DNA 抽出前の血液は冷蔵で保存する。長期保存の場合は冷凍保存する。

2-iii. 検体の輸送法

検体は基本冷蔵で、三重梱包した上で輸送する。検体を密閉性の一次容器に入れ、緩衝材及び吸収剤とともに密閉性の二次容器に入れる。これを非密閉性の三次容器に入れて輸送する。

3. 検査法

3-i 検査法総論

菌分離と遺伝子検出によって同定を行う。分離菌に対しては質量分析法も有用である。

3-ii. 検査法各論

遺伝子検出法（PCR 法）

●口腔スワブ

綿棒を生理食塩水や PBS（200～1000 μ l）に入れて攪拌し、懸濁液を作製する。懸濁液にハートインフュージョンブ罗斯を 1:9 となるように加え、5%CO₂、35～37℃で 24 時間培養する。培養液 1ml を 13000rpm で遠心し、沈渣を 200 μ l の蒸留水に再懸濁して、ヒートブロック、サーマルサイクラー等で 99℃、20～30 分加熱する。加熱後、13000rpm で遠心した上清を PCR 検出に用いる。各種の DNA 抽出・精製キットを用いてもよい。

●血液

Bartonella 属菌由来の DNA を猫の血液から検出する場合は、EDTA 添加血液 200 μ l から、QIAGEN の Blood & Tissue Kit を用いて DNA 抽出を行い、検査に供する。

a) パスツレラ症

P. multocida, *P. canis*, *P. dagmatis*, *P. stomatis* の 4 菌種をそれぞれ特異的に検出することができる。*P. multocida* については *kmt* 遺伝子領域を、他の 3 菌種については *sodA* 遺伝子領域を増幅して遺伝子検出を行う[2]。

病原体	増幅遺伝子領域	PCR産物長		プライマー塩基配列
<i>P. multocida</i>	<i>kmt</i>	168bp	Forward	TGCCACTTGAAATGGGAAATG
			Reverse	AATAACGTCCAATCAGTTGCG
<i>P. canis</i>	<i>sodA</i>	186bp	Forward	GTAAATAATGCAAATGCGG
			Reverse	GCCTTGCAAAGTAGTAC
<i>P. dagmatis</i>	<i>sodA</i>	184bp	Forward	TAACAACGCTAACGCAGCGT
			Reverse	CACCTTGTAATGTTGTACCT
<i>P. stomatis</i>	<i>sodA</i>	218bp	Forward	CTCAGCAAATTATCGCTCGTC
			Reverse	TGCCCAGCCTGAACCGAAACGA

反応条件

95°C, 5 min

↓

95°C, 30 sec → 57°C, 30 sec → 72°C, 30 sec

x35 cycles

↓

72°C, 7 min

↓

4°C (12°C)

b) 猫ひっかき病

B. henselae、*B. clarridgeiae* をそれぞれ特異的に検出することができる。

B. henselae および *B. clarridgeiae* の *its* 領域を増幅する[7,8]。

病原体	増幅領域	PCR産物長		プライマー塩基配列
<i>Bartonella</i> spp.	<i>its</i>	708-752bp	Forward	CTTCGTTTCTCTTTCTTCA
			Reverse	CTTCTCTTCACAATTTCAAT
<i>B. henselae</i>	<i>its</i>	254bp	Forward	TTGCTTCTAAAAAGCTTATCAA
			Reverse	CAAAAGAGGGATTACAAAATC
<i>B. clarridgeiae</i>	<i>its</i>	283-285bp	Forward	ATGCTAAAAGTTGCTATATTGG
			Reverse	CCTCACACTAAAATATAAAAAAC

反応条件 (1st PCR、2nd PCR ともに)

95°C, 3 min

↓

95°C, 30 sec → 50°C, 30 sec → 72°C, 1 min

x40 cycles

↓

72°C, 7 min

↓

4°C (12°C)

c) カプノサイトファーガ感染症

C. canimorsus, *C. cynodegmi*, *C. canis* の3菌種をそれぞれ特異的に検出することがで

きる。*C. canimorsus*, *C. canis* については *gyrB* 遺伝子領域を、*C. cynodegmi* について

は 16S rRNA 遺伝子領域を増幅して遺伝子検出を行う[9]。

病原体	増幅遺伝子領域	PCR産物長		プライマー塩基配列
<i>C. canimorsus</i>	<i>gyrB</i>	402bp	Forward	TGCCACTTGAAATGGGAAATG
			Reverse	AATAACGTCCAATCAGTTGCG
<i>C. cynodegmi</i>	16S rRNA	323bp	Forward	GTAAATAATGCAAATGCGG
			Reverse	GCCTTGCAAAGTAGTAC
<i>C. canis</i>	<i>gyrB</i>	248bp	Forward	TAACAACGCTAACGCAGCGT
			Reverse	CACCTTGTAATGTTGTACCT

反応条件

95°C, 5 min

↓

95°C, 30 sec → 58°C, 1 min → 72°C, 1 min

x35 cycles

↓

72°C, 7 min

↓

4°C (12°C)

上記の反応条件はそれぞれの参考文献によるもので、各 PCR の反応液調整法についても各参考文献に記載があるが、それぞれの施設で用いるサーマルサイクラーや PCR 試薬について検討し、また反応条件についても用いる Taq DNA Polymerase に対して至適な条件を検討の上、実施する。

菌分離法

- 口腔スワブ

菌分離は、懸濁液を段階希釈して、5%ウサギ血液加ハートインフュージョン寒天培地 (*Pasteurella* 属、*Bartonella* 属、*Capnocytophaga* 属)、またはヒツジ血液寒天培地 (*Pasteurella* 属、*Capnocytophaga* 属)、チョコレート寒天培地 (*Bartonella* 属) に接種して *Bartonella* 属および *Capnocytophaga* 属の分離は 5%CO₂、35~37℃、*Pasteurella* 属の分離は 37℃、好気条件で培養する (5%CO₂ 培養でもよい)。

●血液

検体を溶血させたのちに上記培地に接種する。

●コロニーの選択

Pasteurella 属：光沢がありムコイド状の乳白色円形のコロニー。

Bartonella 属：培養開始から 1~2 週間で認められる灰白色ないしクリーム色の微小なコロニー。

Capnocytophaga 属：淡灰白色~淡桃白色で、成長すると滑走能を示して周縁へ拡がりを出すコロニー。滑走能が明瞭な場合、薄く拡がるため、かなり透明なコロニーとなる (菌種や培養条件によって滑走の程度には差異がある。*C. canimorsus* はあまり明瞭な滑走性を認めないことが多い)。

釣菌し、増菌培養したコロニーから 95~99℃、20~30 分の熱処理や各種の DNA 抽出・精製キットを用いて DNA サンプルを調整し、上述した PCR 法によって同定する。下記の質量分析法も有用である。

〈参考〉 質量分析法

菌が分離された場合、微生物同定用の質量分析装置による同定も可能であるが、使用する機器で利用できるデータベースへの各菌種の収載状況に留意が必要である。基本的にデータベースに菌種のデータが収載されていないと、菌種レベル、あるいは属レベルでも同定はできない。

Bruker 社の MALDI BioTyper のデータベースには *C. canimorsus*、*C. cynodegmi*、*P. multocida*、*P. canis*、*P. dagmatis*、*P. stomatis* の各菌種が収載されているおり菌種同定が可能であるが、*C. canis*、*B. henselae*、*B. clarridgeiae* については収載がなく、菌種同定はできない。同様に bioMérieux 社の vitek MS のデータベースには *C. canimorsus*、*P. multocida*、*P. canis*、*P. dagmatis*、*P. stomatis* の各菌種が収載されているが、*C. cynodegmi*、*C. canis*、*B. henselae*、*B. clarridgeiae* は収載されていない。

各機器を使用する際の検体の処理法、機器の使用法については、それぞれの機器の説明書に従う。

4. 参考文献

- [1] 木村 唯, 嶋田 恵理子, 宮本 忠, 鳩谷 晋吾. 1 動物病院における伴侶動物のパスツレラ感染症発生状況と治療成績, 日本獣医師会雑誌 67 (10): 761-766, 2014

- [2] Król J, Bania J, Florek M, et. al. Polymerase chain reaction-based identification of clinically relevant *Pasteurellaceae* isolated from cats and dogs in Poland. J Vet Diagn Invest. 2011 May;23(3):532-7. doi: 10.1177/1040638711403434.
- [3] Ujvári B, Weiczner R, Deim Z, et al. Characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated from human infections. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2019;63:37-43. doi:10.1016/j.cimid.2018.12.008.
- [4] 丸山 総一. 猫ひっかき病, モダンメディア, 50: 203-211. 2004.
- [5] 鈴木道雄. 人と動物の共通感染症の最新情報(10) カプノサイトファーガ感染症. 日本獣医師会雑誌. 72(5):256-260, 2019.
- [6] Hess E, Renzi F, Koudad D, Dol M, Cornelis GR. Identification of Virulent *Capnocytophaga canimorsus* Isolates by Capsular Typing. J Clin Microbiol. 2017;55(6):1902-1914. doi:10.1128/JCM.00249-17.
- [7] Rolain JM, Franc M, Davoust B, Raoult D. Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. Emerg Infect Dis. 2003 Mar;9(3):338-42. doi: 10.3201/eid0903.020278.

[8] Sato S, Kabeya H, Negishi A, et al. Molecular survey of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in pet cats across Japan by species-specific nested-PCR. *Epidemiol Infect.* 2017;145(13):2694-2700. doi:10.1017/S0950268817001601

[9] Suzuki M, Kimura M, Imaoka K, Yamada A. Prevalence of *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* in dogs and cats determined by using a newly established species-specific PCR. *Vet Microbiol* 2010; 144: 172-6.

5. 連絡先

執筆者情報

鈴木 道雄（国立感染症研究所獣医科学部第一室）

問い合わせ

鈴木 道雄、前田 健

国立感染症研究所獣医科学部

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

電話: 03-5285-1111（代表）、FAX: 03-5285-1179

炭疽ガイドンス

(動物由来検体)

目次

I. 炭疽について

1. 疫学
2. 臨床症状

II. 細菌学的検査

1. 炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) の形態
2. 莢膜および芽胞の染色
 - 1 ポリクローム・メチレンブルー染色
(Polychrome methylene blue stain: M Fadyean s reaction)
 - 2 レフレルのメチレンブルー染色
 - 3 レビーゲル染色
 - 4 ギムザ染色
 - 5 芽胞染色
3. 分離培養法
 - 1 分離培養用培地
 - 1) 血液寒天 (BA) 培地
 - 2) Polymyxin-lysozyme-EDTA-thallos acetate (PLET) 培地
 - 3) 運動性試験用半流動培地
 - 4) 芽胞形成促進用培地(土壌浸出液)
 - 2 アスコリー反応
 - 3 パールテスト
 - 4 γ ファージテスト
 - 5 形態及び生化学的性状
 - 6 動物接種

III. 遺伝子診断

1. 遺伝子診断における注意点
2. 鋳型DNA の調整
 - 1 菌株
 - 2 組織及び臓器
3. PCR
 - 1 プライマーオリゴヌクレオチド
 - 2 PCR 反応液
 - 3 反応条件
 - 4 電気泳動、核酸染色、バンドの確認、塩基配列の確定

IV. 汚染の除去と消毒

1. 汚染の除去、消毒及び滅菌
2. 検査室における消毒

3. 人体の汚染
4. 建物等の汚染
5. 衣服、道具、器物等の汚染
6. 水の汚染

V. 文献

VI. 連絡先

I. 炭疽について

炭疽 (anthrax) は *Bacillus anthracis* (炭疽菌) の感染によっておこる急性敗血症性の疾病である。人獣共通感染症として重要であるが、ウシやウマなどの草食獣に比べてヒトは比較的抵抗性が強いといわれる。

1. 疫学

炭疽菌は地球上に広く存在し、世界の多くの地域で炭疽の発生がみられる。患者数および動物の炭疽の発生は発展途上国や獣医衛生の立ち後れている国に多く、それぞれ年間およそ2万人および100万頭に達すると推定されている。一方、先進国でみられる炭疽は動物の組織の処理過程での孤発的発生が多い。ヒトおよび動物の炭疽の自然感染は、偶発的に摂取（あるいは接触）した芽胞が原因であり、炭疽菌が個体から個体へ直接伝播されることはほとんどない。

炭疽菌は土壌などの環境中で芽胞として長期間生残り、動物に感染を繰り返す。芽胞が生体内に侵入すると発芽し、栄養型として体内で急速に増殖し炭疽を発病する。感染した動物の血液、体液、死体などで地表が汚染すると、その土壌は再び感染源となりうる。炭疽菌はこのような感染サイクルを繰り返して炭疽汚染地帯を作る。スペイン中部からギリシャ、トルコを経てパキスタンに及ぶ汚染地域は炭疽ベルトとも呼ばれる。近年わが国では家畜衛生等の対策が功を奏して動物の炭疽発生は極めて少なくなり、その結果ヒトの炭疽発生も経験されていない。

炭疽菌による暴露が明らかな場合、発症前であれば経口感染や吸入感染であっても抗生物質による暴露後治療が効果的とされる。発症者にはシプロフロキサシンやドキシサイクリンの投与が推奨される。ウシおよびウマの予防には莢膜プラスミドが脱落した無莢膜ワクチン株の生菌ワクチンが用いられている。ヒト用ワクチンが実用化されている国もあるが、わが国では使用されていない。

家畜からヒトへの伝播の防止は、病獣の同定診断と淘汰が第一である。非流行国における炭疽の発生は流行地域から輸入される羊毛や骨などの動物産品からおこる危険性が高いため、防疫には汚染された家畜成分のサーベイランス、および検疫が有効である。

2. 臨床症状

動物での病型は動物種によって症状が大きく異なる。

反芻動物： 突然の死、開口部からの出血、皮下出血、前兆のない、あるいは短期間の発熱と意識障害を伴う場合、炭疽を疑う必要がある。

ウマおよび一部の野生の草食動物： 発熱、落ち着きのなさ、呼吸困難、興奮などの一過性の症状が見られることがある。

ブタ、肉食動物、霊長類： 顔面、頸部、リンパ節（特に下顎、咽頭、腸間膜）の局所的な浮腫、腫脹がある。

II. 細菌学的検査

1. 炭疽菌(*Bacillus anthracis*)の形態

炭疽菌(*B.anthraxis*)は、1.5～3 μ m のグラム陽性大桿菌で鞭毛は保有していない。感染動物の体内では単在か短連鎖であるが、培地で人工培養すると並列または絡み合った状態の断節的な長連鎖を呈する。

2. 莢膜および芽胞の染色

莢膜は、炭疽菌の強毒株がウシ、マウス、モルモット等に感染するとその体内で形成される。このほか、ウマやウシなどの血清を10～20%添加した普通寒天培地に塗抹し10～30% CO₂ 存在下で一晩（18 時間程度）培養すると莢膜が形成される。本法で培養した強毒株の炭疽菌集落はS 型で、血清非添加で好気条件下で培養した時のR 型とは容易に区別できる。また、ブレイン・ハート・インフュージョン(BHI)寒天培地で24時間程度培養した菌を1炭疽菌白金耳分取り2～3mlのウマ脱線維素血液に接種し、37℃で5～8 時間培養後、厚めの塗抹標本を作製し染色を行う。

芽胞は、楕円形または卵円形で菌の中央に菌体の幅以内で形成される。一般的に感染動物体内では形成されないが、剖検や出血により菌が空気に触れると形成される。人工培地では、2% NaCl の添加または対数増殖期以降も培養を続けると芽胞の形成が促進されるが、Ca⁺⁺の存在で抑制される。

2. 1 ポリクローム・メチレンブルー染色(Polychrome methylene blue stain : M'Fadyean's reaction) : 莢膜染色

【染色液】

- 1) メチレンブルー0.3g を95%エタノール30ml に溶解する。
- 2) 0.01% KOH 溶液を100ml 作製し混合する。

新たに調製した2)の溶液は染色性が悪いので、古い染色液でも同時に染色して染色性を比較し、莢膜が染色されることを確認できるまで保存してから使用する。

【染色法】

- 1) スライドグラスに菌を培養した血液を1.5 μ l 滴下し、カバーグラスで塗抹する。
- 2) 風乾後、無水または95%エタノール（メタノールでもよい）に60 秒間浸漬、固定後、再度風乾させる。
- 3) 染色液を塗抹面に満遍なく滴下し、60 秒間放置する。
- 4) 水洗し、濾紙で水分を吸収し、乾燥させる。洗浄水は高圧滅菌または、10,000ppm の次亜塩素酸ナトリウム溶液中に捨てる。
- 5) まず、100 倍で観察し、次いで1,000 倍で莢膜を観察する。2～4個または長連鎖した無芽胞を観察すると莢膜はピンク色、菌体は青色に染色される。使用した濾紙及びスライドグラスは、高圧滅菌または10,000ppm の次亜塩素酸ナトリウム溶液中に浸漬後捨てる。

2. 2 レフレルのメチレンブルー染色 : 莢膜染色

【染色液】

- 1) メチレンブルー5g を純アルコール100ml に溶解したものをメチレンブルー原液とする。
- 2) メチレンブルー原液30ml に0.01%水酸化カリウム溶液100ml を加えて混和

する。これをレフレルのアルカリ性メチレンブルー染色液という。

【染色法】

- 1) スライドガラスに培養した菌、血液や感染動物の臓器を塗抹またはスタンプする。
- 2) 完全に風乾したら、火炎固定する。
- 3) 固定後速やかにレフレルのアルカリ性メチレンブルー染色液を載せ数秒間染色する。
- 4) 水洗し、乾燥後鏡検する。菌体は青色、莢膜は淡青色に染色される。本染色法は、染色時間が長くなると菌体と莢膜の区別がつかなくなる。
- 5) レフレルのメチレンブルーは古くなると酸化されて染色性が良くなる。37℃一晩静置あるいは1% K_2CO_3 添加において酸化が促進される。

2. 3 レビーゲル染色：莢膜染色

【染色液】

- 1) ゲンチアナバイオレット10g と局方ホルマリン100ml を混和する。
- 2) よく混和し、数時間後に濾過する。

【染色法】

- 1) スライドガラスに培養した菌、血液や感染動物の臓器を塗抹またはスタンプする。
- 2) 完全に風乾したら、固定せず染色液を載せて20～30 秒間染色する。
- 3) 水洗し、乾燥後鏡検する。菌体は鮮やかな紫色、莢膜は淡い紫色に染色される。

染色液には、ホルマリンが入っているので殺菌効果が強く安全であるが、洗浄液やスライドガラスは滅菌後捨てる。ヒトや動物が敗血症死後時間が経過すると染色性が悪くなる。

2. 4 ギムザ染色：莢膜染色

【染色液】

- 1) 水2ml にギムザ染色液を1～3滴加えた薄い染色液を作る。

【染色法】

- 1) スライドガラスに培養した菌、血液や感染動物の臓器を塗抹またはスタンプする。
- 2) 完全に風乾したら、ホルマリンガスで固定する。200 または300ml のビーカーにホルマリンを10ml 位入れ、そこに1)で作製したスライドガラスの塗抹面を下向きにして斜めに立て、発生したホルマリンガスが漏れないように上部はアルミ箔で覆って3～5分間固定する。
- 3) 固定後 1)の染色液で2～3分間染色する。
- 4) 水洗し、乾燥後鏡検する。菌体は濃紫色、莢膜は淡紫色に染色される。本染色法では、

白血球や赤血球も紫色に染色されるので血液塗抹標本では菌と血球との比較ができる。

2. 5 芽胞染色

【染色液】

- 1) 飽和マラカイトグリーン水溶液 6.9g /100ml (20℃)を作成する。マラカイト

グリーン粉末は非常に飛散しやすいので閉鎖容器内で秤量するとよい。

2) 0.25%サフラニン水溶液を作成する。

【染色法】

1) スライドガラスに培養した菌、血液や感染動物の臓器を塗末またはスタンプする。

2) 完全に風乾したら、ホルマリンガスで固定する。

3) 固定後上記飽和マラカイトグリーン水溶液を標本上に満載し、10分間染色する。

4) 水洗後、サフラニン水溶液で約30秒間、後染色する。

5) 乾燥後鏡検する。菌体は赤色、芽胞は緑色に染色される。

染色時、飽和マラカイトグリーン溶液で染色する場合は加温する必要はない。

3. 分離培養法

炭疽菌は、普通寒天培地や普通ブイヨンでよく発育する。発育至適温度は37℃であるが、12～44℃でも発育する。普通寒天培地で好氣的条件下において37℃、18 時間位の培養に

より、やや乾燥、隆起したRough 型の大きな集落を生じる。普通寒天培地では、束状の長連鎖発育をするため集落の周縁はカール(捲毛: Medusa-head)状、表面は粗造でスリガラス様構造である。

図1に示したように血液寒天培地での炭疽菌は、37℃、18 時間培養で非溶血性の周辺が鋸歯状の集落を作る。それに対して、枯草菌(*B.subtilis*) は、37℃、18 時間培養で集落の表面は乾燥した凸凹状で、溶血性が認められる。このほか、*B.mycoides* の初代分離では、根足状 (rhizoid)の集落を作るのですが、培地で継代を重ねると炭疽菌と区別し難くなる。また、普通寒天培地での炭疽菌と*B.cereus* の集落はよく似ているが、*B.cereus* は2～3日経過すると運動性のため拡散する性質が強い。

強毒株は、R 型であるが環境の変化によってS 型への移行、毒性の低下、莢膜形成能の喪失など種々の変異が認められることがある。炭疽菌分離培養法の手順の概略を図1 に示す。本菌の感染が疑われる敗血症を起こした動物由来新鮮材料は、血液寒天や普通寒天培地への直接塗抹で充分分離できる。しかし、動物由来材料でも死後時間が経過したものや土壌等環境材料では、他の菌が混入している可能性があるため、検体を希釈したり加熱して芽胞のみを選択的に培養する方法がとられる。

炭疽菌または本菌に汚染された可能性が強い検体の分離培養に当たっては、安全性の面からBSL3実験室内に設置されたクラスⅡB のバイオセーフティキャビネット内で操作する。術者は、ラテックス・ディスポーザブル手袋やガウン等を着用して危険性を軽減する。

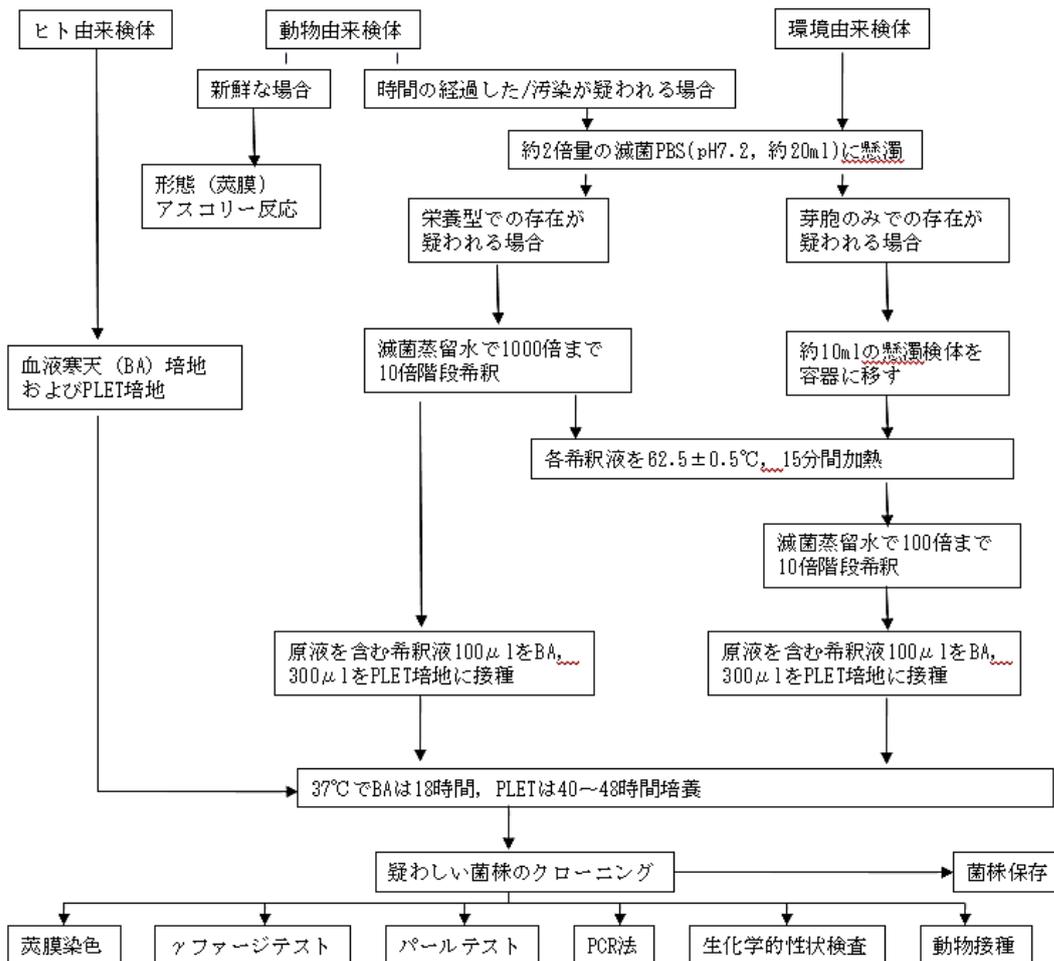


図1. 炭疽菌分離培養法の手順概略

3. 1 分離培養用培地

炭疽菌分離用培地は、普通寒天培地のほか下記に示したような培地を用いる。その培地の組成を以下に示す。

1) 血液寒天 (BA) 培地 市販の培地を用いても良い。

ハートインフュージョン寒天 40 g (ブロスを用いた場合はBact agarを1.5%の割合で添加する)

蒸留水 950ml

121℃, 15分間高压滅菌後、50℃まで冷却

馬または綿羊脱線維素血液 50 ml

十分攪拌し滅菌シャーレに分注し固める。

2) Polymyxin-lysozyme-EDTA-thallos acetate (PLET) agar [文献1]

炭疽菌の選択培地である。炭疽菌では、24時間以内に発育する。

BAP、PLET 培地は、雑菌混入の多いと考えられる検体からの炭疽菌の分離に適する。

ハート・インフュージョン寒天 40 g

蒸留水 1,000ml

pH7.4

121℃, 15分間高压滅菌後、50℃まで冷却後に下記を添加する。

ポリミキシンB 30,000 IU

EDTA,0.01%水溶液 3ml
酢酸タリウム 40mg
リゾチーム 40mg
十分に攪拌し、滅菌シャーレに分注し固める。

3) 運動性試験用半流動培地
ハート・インフュージョン・ブロス 2.5g
Bact agar 0.3g
蒸留水 100ml
2mlずつ分注後、121°C、15分間高压滅菌

B.anthraxis が疑われる集落の微量を高層に固めた運動性試験用半流動培地の上部から1cm 位の深さまで接種し、20~25°C及び37°C、48 時間培養し運動性の有無を観察する。

B.cereus は運動性が陽性で、*B.anthraxis* は陰性である。

4) 芽胞形成促進用培地(土壌浸出液)
土浸出液 1000ml
牛肉エキス(Beef Extract) 3g
ペプトン 5g
寒天 15g
pH7.0

下記のようにして作った土浸出液に各成分を加熱して溶かし、pHを調整して試験管に分注して、121°C15分間滅菌後、斜面に固める。

土浸出液の作り方[文献2]

畑その他の場所の有機物を多量に含む土を空气中で良く乾燥させ、ふるい(No.9 目の開き 2.00mm)で漉す。その500~1000gに水2400mlを加え、良く混和した後、121°Cで1時間加熱浸出する。液は濾紙で濾過する。もし透明な浸出液が得られないときは、その1000mlに対し、タルク30~40gを加えてよく振り、再び濾紙で濾過する。

3. 2 アスコリー反応 (血清学的検査)

- 1) 感染動物の臓器等を細切し、3~5倍量の生理食塩水を加える。培養した菌でも同様の方法で試験できる。
- 2) これを沸騰水中で20分間程度加熱する。
- 3) 2,000rpm、5分間遠心し、上清を0.45 μ mのミリポアフィルターで濾過。
- 4) 濾液を村田試験管または細試験管にとり、その上に炭疽沈殿素血清を静かに重層する。陽性であれば数分以内に境界面に白濁帯を生じる。本法での白濁は、炭疽菌の莢膜の成分であるグルタミン酸ポリペプチドと抗血清との反応による沈降帯である。3)で作製した抗原と生理食塩水、炭疽菌非感染健康血清とを重層させたものを対照として、いずれも陰性であることを確認しておく。

【注意点】

- 1) 菌量が少ない、あるいは古くなった材料では陰性となることがある。
- 2) 重層時に境界面が乱れないようにパスツール・ピペットで静かに入れる。なお、抗原と炭疽沈殿素血清は、どちらを先に入れてもよい。

3. 3 パールテスト

- 1) 最終濃度0.5 IU/ml、0.05 IU/ml になるようにペニシリンを添加した普通寒天培地を作製する。本培地は、高圧滅菌した9ml の普通寒天培地を2 組用意し、それぞれに濾過滅菌した5.0 IU/ml、0.5 IU/ml のペニシリンをそれぞれ1ml 添加し、静かによく攪拌し滅菌シャーレに分注し固めて作製する。この時、泡を立てないように注意する。なお、対照はペニシリン非添加の普通寒天培地とする。この時作製する各培地は、あまり厚すぎると観察し難いのみならず、鏡検の時フォーカスが合わなくなるので注意すること。
- 2) 各寒天培地をカバーグラス大に切り、図2のように滅菌スライドグラスに載せる。
- 3) 被検菌を各寒天培地表面に塗抹し、滅菌カバーグラスを無菌的にかける。
- 4) 菌を接種した寒天培地が乾燥しないように図に示したように脱脂綿に蒸留水等を浸したものをあらかじめ滅菌しておきシャーレの中央に入れる。これを37℃で2～4 時間培養する。脱脂綿は、スライドグラスへ触れないようにすること。
- 5) 培養後、400 倍程度で鏡検し、ペニシリンを含む培地で菌が真珠状の膨満した菌、含まない培地で桿菌になっているかを確認する。このテストは、ペニシリンによって菌の細胞壁が脆弱化し、プロトプラスト化と呼ばれる菌体が膨化する現象を応用したものである。

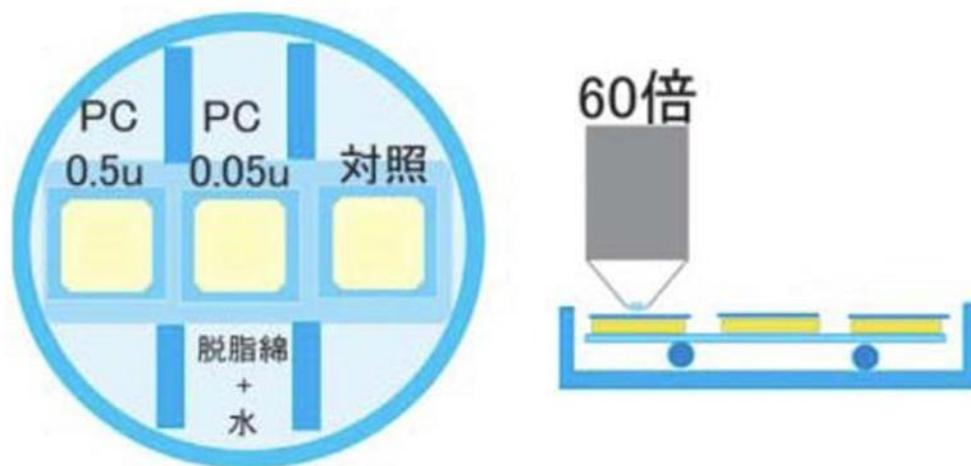


図2. パールテストの模式図

【注意点】

- 1) 菌がプロトプラスト化し、真珠の珠状になると浸透圧で極めて短時間に破裂する。したがって、30 分間隔で観察するのが望ましい。
- 2) 本試験を行う際には、必ず陽性対照として炭疽菌弱毒株、陰性対照として *B.subtilis* または *B.cereus* を必ずおく。まれにパールテスト陽性の *B.cereus* があるので、陰性対照とする *B.cereus* は、あらかじめ陰性であることを確かめておくこと。
- 3) ペニシリン耐性の炭疽菌はパールテスト陰性となる。このような株もまれに認められる。
- 4) 敗血症を起こした動物の血液を直接接種する場合は、赤血球を誤認する可能性があるため1～2 倍量の滅菌蒸留水を加えて溶血させる。

3. 4 γ ファージテスト

- 1) 培養菌、臓器乳剤、血液等を普通あるいは血液寒天培地に接種し、直径3～4cm に広げる。この時、陽性対照として炭疽菌弱毒株、陰性対照として枯草菌や*B.cereus* を必ずおく。
- 2) γ ファージ液を中央部に1 滴接種して37℃で培養する。
- 3) 3～4時間培養すると γ ファージ滴下部が溶菌して透明化してくる。

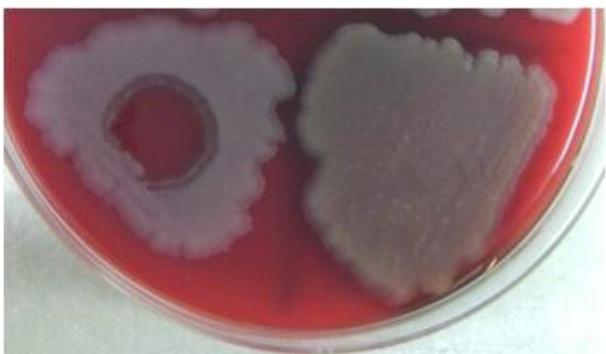


図3. ファージテスト 左：炭疽菌34F2株、右：*B.cereus*

【注意点】

本テストも新鮮検体でないとできない。

3. 5 形態及び生化学的性状

B.anthraxis、*B.cereus*、*B.subtilis* の主な形態ならびに生化学的性状を表1に示した。

B.anthraxis は、普通寒天や普通ブロスで好氣的条件下でよく発育し、37℃、18 時間位の培養により、やや乾燥、隆起した周縁部がカール状になったRough型の大きな集落を生じる。普通ブロスでは、上清が透明で長糸状の沈殿ができて試験管の内壁に厚いリング状の菌苔が付着してくる。

運動性用半流動培地では運動性は認められないが、ゼラチン培地に穿刺培養すると穿刺部から外側へ向けて樹枝状の発育をする。*B.anthraxis* の場合、形態及び生化学的性状のみで同定することはほとんどない。したがって、*B.cereus* と*B.anthraxis* との鑑別は運動性、ヒツジ血液寒天培地での溶血性、 γ ファージの溶菌性や莢膜の有無等の結果を総合して判定すればほとんど間違うことがない。

別項で記述されているPCR 法を併用すれば、さらに同定の精度が上がる。

表1 *Bacillus anthracis* および近縁*Bacillus*属の主な性状

性状	<i>B. anthracis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>
桿菌平均長さ (μm)	1.3	1.4	0.8
菌の連鎖	+	+	(-)
運動性	-	+	+
芽胞の位置	中央	中央、端	中央、端
β溶血性	-	+	-
嫌気での発育	+	+	-
50℃での発育	-	-	v
65℃での発育	-	-	-
卵黄反応	+	+	-
カゼイン加水分解	+	+	+
スターチ加水分解	+	+	+
アルギニン分解酵素	-	-	-
ゼラチン加水分解	(+)	+	+
硝酸還元	+	(+)	+
D-アラビノース	-	-	-
グリセロール	-	+	+
グリコーゲン	+	+	+
イヌリン	-	-	+
マンニトール	-	-	+
ザリシン	-	+	+
D-トレハロース	+	+	+

3. 6 動物接種

通常必要ではないが、動物接種により病原性の確認を行う場合がある。

炭疽菌は、*Bacillus* spp.の中で唯一ほとんどの哺乳動物に敗血症や菌血症を起こす菌である。本菌に対する感受性が最も高いのはマウスで、次いでモルモットである。これらに対するLD₅₀は、芽胞の場合皮下接種で5 CFU とされている。皮下接種した場合、芽胞はまもなく発芽し、約2時間で浮腫病巣が接種部位に形成される。この時すでに莢膜を形成した菌体が病巣部に認められる。菌は更に増殖すると毛細血管の変性、リンパ管の拡張も認められる。

浮腫は、最初に起こった部位から段々外に拡大していくが、菌が存在するのは最初の浮腫層のみで、拡大した浮腫層には存在しない。その後、時間が経過すると菌はリンパ流で局所リンパ節に運ばれ増殖し、血液中に放出され脾臓で捕らえられ暗赤色に腫大する。動物が死亡する直前は血液中にも大量の菌が存在する。また、この時期、血液中には浮腫因子と致死因子という外毒素が証明され、さらにこれらの毒素を宿主細胞に運ぶための防御抗原と呼ばれる蛋白も産生される。

臓器や汚染材料等の乳剤等については、15g以下のマウスでは0.1~0.2ml、モルモットでは0.5~1.0mlを皮下または腹腔内に接種する。分離菌の場合、マウ

スに対する致死量は2~4 logCFU である。

動物接種を行う場合は、次のことに留意する。

- 1) 接種動物が死んだ場合、炭疽菌によるものか否かを確認する。
- 2) 接種材料を加熱してから接種しても接種動物が死んだ場合は、*Clostridium* sp.を検査する。
- 3) 接種動物が死んだ場合、そのままにしておく共食いし、ケージ内面や床敷を汚染するので直ちに検査すると共に実験に用いたケージは完全に滅菌する。

Ⅲ. 遺伝子診断

炭疽の迅速診断法の一つとして、炭疽菌の毒素遺伝子及び莢膜遺伝子を標的としたPCR法が普及している。迅速に結果を得るために、検体から直接鋳型DNAを調製してPCRを行う方法が考案されているが、検出感度やPCR阻害物質の混在など種々の問題がある。

確実な結果を得るためには検体の増菌培養を同時に行い、増菌後の試料からも鋳型DNAを調製してPCRを行う必要がある。PCR法については迅速スクリーニングとして用い、確定は菌の生化学的性状の確認など培養試験によって行われる。

1. 遺伝子診断における注意点

PCRを実施するときは、試験の結果に与える影響や環境への汚染防止の観点から、特にクロスコンタミネーションが起らないように注意する。そのためには鋳型DNAの調製、PCR反応液の調製、増幅反応及び電気泳動などの各作業を異なった場所で行い、必ず滅菌済のフィルター付チップやねじロマイクロチューブなどを使用し、試験終了後は使用した器具等を必ずオートクレーブ処理する。

試験には必ず陰性対照（滅菌蒸留水及びセレウス菌由来DNA）ならびに陽性対照（炭疽菌由来DNA）を置き、偽陰性及び偽陽性のないことを確認する。また、検出感度やPCR阻害物質の影響などを考慮すると、増菌培養後の試料から鋳型DNAを調製する操作も併せて行うことが必要である。

PCR試験は、脳脊髄液や血清など元来は無菌である臨床検体の場合は陽性結果を確定診断の根拠としてよい。ただし環境検体の場合は迅速スクリーニングの手段であると考えべきである。

最終的な確定診断は、生化学的性状による培養試験などの結果と共に総合的に判定する。培養試験と同様、鋳型DNAの調製までの操作はレベル3の実験室で行われるべきである。炭疽菌の栄養細胞及び芽胞は、鋳型DNA調製時の加熱条件で死滅するので、以後の操作についてはレベル3の実験室で行う必要はない。

2. 鋳型DNAの調製

搬入される検体については菌株、白色粉状物（洗剤、デンプン、スキムミルクなど）、食品、組織及び臓器、土壌などが想定される。陽性対照DNAおよび陰性対照DNAは、各PCR反応毎に必ず用いること。

2.1 菌株

試験には新鮮培養の菌株を用いる。増菌培養については、トリプトソイブイオンに株を接種し、37℃で一夜振とう培養する。培養液を10倍希釈し、これをトリプトソイブイオンに接種してさらに3～4時間振とう培養する。二次増菌により、芽胞非形成の栄養型細胞を多数得ることができる。培養後、その100μlをTE緩衝液900μlに接種し、加熱処理（100℃、10～15分間、以下加熱処理）する。これを冷却し、その遠心上清1μlを鋳型DNAとして用いる。寒天培養については、菌株を選択培地（下記参照）に画線塗抹し、37℃で24時間培養する。炭疽菌を疑う集落を少量の滅菌蒸留水に懸濁し、増菌培養と同様に加熱処理して鋳型DNAを調製する。

セレウス菌選択培地を用いる場合は、NGKG培地、PBCW培地およびMYP培地等のうちいずれか一つを用いればよい。

2.2 組織及び臓器

検体を鉋などで細切し、これに5倍容の抽出液（注）を加えてよく混和し、55℃で1時間反応させる。この間、緩やかに混和操作を数回繰り返す。反応終了後、フェノール・クロロホルム溶液を等量加えて処理し、これを遠心（12,000rpm, 5分間）する。上清をマイクロチューブにとり、これに1/10量の酢酸ソーダ（3M, pH 4.0）を加え、次いでイソプロピルアルコールを加えて（抽出液と等量）よく混和した後、遠心する。上清を捨て、沈渣に500 μ lの70%エタノールを加えてよく混和し、再度遠心する。上清を捨て、沈渣を乾燥させ、これに50 μ lの滅菌蒸留水を加えて鋳型DNAとする。

また、検体を細切後、10倍容のTSBPに接種し、37℃で一夜振とう培養を行ってから鋳型DNAを調製する。

注) 抽出液の組成

TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.8)

NaCl(100mM)

Proteinase K(200mg/ml)

SDS(終末濃度1%)

土壌から炭疽菌を検出・分離することは、菌数が多い場合を除き極めて困難で、その検出法はまだ確立されていない。

3. PCR WHO推奨プライマーを用いる [文献3]。

3.1 プライマーオリゴヌクレオチド

炭疽菌遺伝子の増幅に用いられるWHO PCR プライマー

プライマー名	標的遺伝子	増幅塩基配列(5'-3')	サイズ
CAP1234	莢膜遺伝子	CTGAGCCATTAATCGATATG	846 bp
CAP1301		TCCCACCTTACGTAATCTGAG	
PA5	毒素遺伝子	TCCTAACACTAACGAAGTCG	596 bp
PA8		GAGGTAGAAGGATATACGGT	

3.2 PCR 反応液

PCR 反応液の組成 例

滅菌蒸留水	37 μ l
10x 緩衝液 (TaKaRa Ex Taqに付属)	5.0 μ l
dNTPs (2.5 mM each)	4.0 μ l
sense primer (10 pM)	1.0 μ l
anti-sense primer (10 pM)	1.0 μ l
TaKaRa ExTaq DNA Polymerase (2.5 unit / μ l)	1.0 μ l
template	1.0 μ l
	total 50.0 μ l

3.3 反応条件

(a) 熱変性: 95℃ 5分

(b) 熱変性: 95℃、30秒、アニーリング: 55℃、30秒、伸長72℃30秒。

以上を30サイクル。

(c) 伸長: 72℃ 5分

アニーリング温度は50℃および52℃でも反応を行い、増幅の有無を確認する方

が良い。

3. 4 電気泳動、核酸染色、バンドの確認、塩基配列の確認

増幅反応終了後、常法に従って反応液をアガロースゲルにアプライし、電気泳動を行う。次いでゲルをエチジウムブロマイド水溶液 ($0.5 \mu\text{g/ml}$) に浸して増幅産物を染色し、これをトランスイルミネーターで観察する。予想されたサイズの増幅断片が確認できたならば、これを撮影して保存する。

増幅産物の塩基配列を確定し、炭疽菌由来の遺伝子であることを確認する。

IV. 汚染の除去と消毒[文献3]

1. 汚染の除去、消毒および滅菌

炭疽菌芽胞により汚染した身体、器物および環境から芽胞の飛散を最小限に抑える一方、以下に掲げるいずれかの消毒薬または滅菌法を用いることが奨められる。どの方法を用いるかは、対象物の性質（生物材料、器物、建造物の一部、土壌、水など）や、処理後の用途（廃棄、再使用など）によって異なる。汚染物の取り扱いにはガウン等を着用する。

汚染した可能性のある衣服（靴、ソックス、ストッキング、および袖や襟が汚染した場合には上着）はできるだけ早く脱衣して缶かバッグに入れ、消毒やオートクレーブ処理を行う。使い捨てガウンは焼却しても良い。最終消毒終了後、室内あるいは動物舎のような閉鎖空間は十分に換気を行い、消毒剤が人体に悪影響を及ぼさないように注意してから再使用する。

- ・ 10%ホルムアルデヒド（30%ホルマリン） 1~1.5L/m²、2 時間、10℃以上
- ・ 4%グルタルアルデヒド（pH8.0-8.5） 1~1.5 L / m²、2 時間、10℃以上
- ・ 3%過酸化水素水 0.5 L / m²、2 時間
- ・ 1%過酢酸 0.5 L / m²、2 時間
- ・ 焼却
- ・ オートクレーブ処理 121℃ 20-30 分
- ・ エチレンオキサイドガス滅菌

なお、芽胞を効果的に消毒するのはきわめて困難であり、状況によってはこれを完全に実施するのは不可能な場合がある。また、消毒作業の効果を推定することはできないので、確認する場合はスワブを採取して培養によって確かめる。

2. 検査室における消毒

病院用の殺芽胞剤過酢酸製剤（アセサイド6% 消毒液(原液) : 0.3% w/v 実用液で使用）または0.5%次亜塩素酸溶液（家庭用漂白剤の10 倍希釈液、有効塩素濃度5,000 ppm）を用いて、消毒を行いながら作業を行う。ベンチコートなどの実験台カバーを用いる。

3. 人体の汚染

検体などが皮膚についた場合、汚染部位を0.01%次亜塩素酸溶液で拭き取り、水洗後に石鹸を使って十分に洗い落とす。皮膚に損傷がある場合は血液を絞り出してから傷口を十

分量の水を用いて洗浄する。目に飛散した場合には、目をこすらず、直ちに大量の水で十分に洗い出す。口腔内の汚染は直ちに口の中のものを吐き出し

0.01%次亜塩素酸溶液で口腔内を十分にすすぎ、次いで何回か水で口腔内をすすぐ。人体の汚染が考えられた場合には直ちに医師による診察を受け、最低1週間は観察下に置く。

4. 建物等の汚染

床等の上に滴下したり飛散したのものには直接、または汚染区域を吸湿性物質で覆ってから、1%次亜塩素酸溶液（有効塩素濃度10,000ppm）、10%ホルマリン、4%グルタルアルデヒドまたは1%過酢酸を十分にふりかける。2 時間以上経過してからペーパータオルでふき取り、ペーパータオルは袋に入れて焼却す

る。

5. 衣服、道具、器物等の汚染

可能な場合には汚染した器物は焼却またはオートクレーブ滅菌を行う。使い捨てにしない器物の場合は、付着している大きなゴミは焼却用袋またはオートクレーブ用袋にそそぎ落としたあと、器物それ自身は4%ホルムアルデヒド溶液または2%グルタルアルデヒド溶液に一晩（8時間以上）浸漬する。

6. 水の汚染

汚染水の滅菌・消毒にはオートクレーブ滅菌、ホルムアルデヒドによる滅菌、塩素剤による滅菌、濾過滅菌などが考えられるが、水の溜まり場所、芽胞の推定濃度、処理する水の量、その水が流れて行く先、および処理後の水の使用目的等の状況を判断して、最もよい解決方法を適用する。

また、消毒方法については、と畜検査実施要領（昭和47年5月27日作成 平成16年4月6日改正）の別表「消毒方法の基準」を最後に添付する。

V. 文献

1. Knisely, R. F. 1966. Selective medium for *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*. 92:784-6.
2. Gordon, R. E., and M. M. Smith. 1953. Rapidly growing, acid fast bacteria. *Journal of Bacteriology*. 66:41-8.
3. WHO. 2008. Anthrax in humans and animals, 4th ed.
https://apps.who.int/iris/handle/10665/97503?search-result=true&query=anthrax&scope=&rpp=10&sort_by=score&order=desc

VI.連絡先

国立感染症研究所 獣医科学部

前田 健

奥谷 晶子

〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1

電話 03-5285-1111 (代表)

FAX 03-5285-1179 (直通)

別表

消毒方法の基準

消毒目的物	処理室、運搬車	けい留所、生体検査所通路その他の場所	ふん尿溜、汚水溝と、場廃水、その他	器具器械その他	と、体、肉、骨、内臓、血液皮等	汚物および胃腸内容物	接触者
一般消毒法	次亜塩素酸ソーダ(100—200PPM)又は逆性石けん(2%)両性石けん(0.5%)を散布、浸潤させ若しくは洗浄し、1時間以上経過した後常水で十分に洗浄すること。	次亜塩素酸ソーダ(100～200PPM)逆性石けん(2%)両性石けん(0.5%)又はクレゾール石けん水(3%)石炭酸水(3%)クロール石灰水(5%)、土壌の場合はクロール石灰若しくは苛性ソーダ液(2～3%)を十分に撒布すること。	クロール石灰、消石灰を用いるときは汚水量の1/10以上、クレゾール水又は石炭酸水を用いるときは汚水量と同量以上になるよう投入し攪拌して5時間以上放置すること。	1時間以上煮沸又は流通蒸気による消毒をするか若しくは30分以上1cm/kg以上の加圧蒸気消毒をすること。ただしこの方法による消毒が困難な場合は逆性石けん(2%)両性石けん(0.5%)次亜塩素酸ソーダ(100～200PPM)クレゾール水(3%)に十分浸すこと。	適当な大きさに切断し、1時間以上煮沸又は、流通蒸気は、流通蒸気消毒するか焼却炉により焼却すること。薬物消毒による場合はクレゾール(3%)石炭酸水(3%)ホルマリン水(ホルマリン1：水34)に浸すこと。	焼却するか、クロール石灰又は消石灰を用いるときは汚物量のおよそ1/10以上クレゾール水又は石炭酸水を用いるときはおよそ汚物量の同量以上投入し攪拌して5時間以上経過した後他の場所に埋却すること。	手指は逆性石けん(2%)両性石けん(0.5%)クレゾール石けん水(3%)石炭酸水(1%)に十分浸した後、常水で洗浄すること。被服類は1時間以上煮沸するか又は、流通蒸気により、消毒するか、30分以上の加圧蒸気消毒をするか、若しくはクレゾール水(3%)ホルマリン水(ホルマリン1：水34)石炭酸水(3%)両性石けん(0.5%)に十分浸すこと。

炭疽等芽胞形成菌に対する消毒方法	次亜塩素酸ソーダ(5000PPM)又はホルマリン水(ホルマリン1：水34)を十分撒布、浸潤させ若しくは洗浄し数日にわたり3回以上反復実施し、最終回には常水で洗浄すること。	次亜塩素酸ソーダ(5000PPM)クロール石灰を十分撒布し、数日にわたり3回以上反復実施すること。土壌の場合は表面にクロール石灰又は消石灰を撒布してから深さ20～30cm掘起しこれを搬出した後、クロール石灰又は消石灰を撒布し、新しい土を入れること。搬出した土は焼却又は埋却すること。	次亜塩素酸ソーダ、クロール石灰を用い遊離塩素が十分残存するまで投入すること。	1時間以上煮沸又は流通蒸気による消毒をするか、若しくは30分以上1cm/kg以上の加圧蒸気消毒をすること。ただし、この方法による消毒が困難な場合は、次亜塩素酸ソーダ(500～1000PPM)の水溶液に十分浸漬するか同(5000PPM)の水溶液、ホルマリン水(ホルマリン1：水34)で撒布浸潤若しくは洗浄すること。	焼却すること。血液等煮沸困難なものについては煮沸消毒を準用する。	焼却すること。血液等煮沸困難なものについては煮沸消毒を準用する。	手、腕等接触部附近を流水と石けんブラシを用いて洗浄をくり返し、その後昇汞水(0.1%)に1分以上浸して流水で洗うこと。被服類は1時間以上煮沸するか又は30分以上の加圧蒸気による消毒をすること。安価な被服類は焼却すること。
------------------	---	---	--	--	----------------------------------	----------------------------------	--

注 前記消毒方法によらない時はこれと同等以上の効果がある場合に限り実施することができる。

ブルセラ症ガイドンス

目 次

I. ブルセラ症の概説

1. 法律上の取扱い
2. 病原体・疫学・感染源・症状・治療・予防

II. ブルセラ属菌検査に関する一般的な注意事項

1. 作業上の一般的注意

III. 検体の採取・輸送・保管および滅菌

1. 検査材料の採取・輸送
2. 検査材料および病原体の保存
3. 消毒・滅菌法

IV. 検査・診断

1. 抗体の測定（試験管凝集反応、マイクロプレート凝集反応）
2. 細菌学的検査
3. 遺伝子の検出

V. 参考文献

VI. 連絡先

I. ブルセラ症の概説

波状熱やマルタ熱として知られるブルセラ症（Brucellosis）は、ブルセラ属菌（*Brucella* spp.）により引き起こされる人獣共通感染症である。わが国では家畜ブルセラ症は清浄化したが、3%程度のイヌがイヌブルセラ症に感染している。患者は多くないが、犬ブルセラ属菌の国内感染例と家畜ブルセラ属菌感染の輸入症例が報告されている。世界では、食料や社会・経済面での動物への依存度が強く、家畜でブルセラ症が発生している国や地域において、いまだに多くの患者が発生しており、新規患者は年間 50 万人に上るといわれる。そのため、公衆衛生面のみならず経済的にも重要な感染症の一つである。また、米国 CDC によるバイオテロに用いられ得る病原体カテゴリー B であり、家畜への影響の大きさからバイオテロだけでなくアグリテロにも用いられ得る病原体として、Overlap Select Agents and Toxins の 1 つにあげられている。

1. 法律上の取扱い

国内では、ヒトブルセラ症については、1999 年 4 月 1 日より感染症法で、家畜ブルセラ症については家畜伝染病予防法で、それぞれ対策が取られている。

また、病原体については 2007 年 6 月 1 日より、感染症法でその所持・保管、輸送等に関して厳しく制限されている。

1) 感染症法（感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律）

* 感染症法及び施行令（法第六条第五項、政令第一条）によりブルセラ症は、感染症法に基づく感染症発生動向調査では 4 類感染症として、診断した医師に全数届出が義務付けられている（<https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/01-04-28.html>）。診断した医師は届出基準に基づいて、直ちに最寄りの保健所長を経由して都道府県知事に届け出なければならない（法第十二条）。

* 感染症法及び施行令（法第六条第二十二項、政令第二条）により、*Brucella melitensis*、*B. abortus*、*B. suis*、*B. canis* が特定三種病原体に指定されている。よって、これらの所持には厚生労働大臣への届出が必要であり、また、取扱施設が三種病原体等取扱施設基準を満たしている必要がある（法第五十六条の十六及び二十四、省令第三十一条の十七及び二十九）。

* 病院や病原体等の検査を行っている機関が、業務に伴い三種病原体を所持することになり、滅菌譲渡をするまで所持することになった場合は、届出は不要である（法第五十六条の十六）。ただし、定められた基準（省令第三十一条の十八：十日以内に滅菌する、もしくは遅滞なく譲

渡しをする、など) に従う必要がある。

2) 家畜伝染病予防法

*対象病原体を *B. abortus*、*B. melitensis*、*B. suis* および *B. ovis* として、家畜伝染病予防法（第二条：この法律において「家畜伝染病」とは、次の表の上欄に掲げる伝染性疾患であってそれぞれ相当下欄に掲げる家畜及び当該伝染性疾患ごとに政令で定めるその他の家畜についてのものをいう）により対象家畜「牛、めん羊、山羊、豚」、家畜伝染病予防法施行令（第一条：家畜伝染病予防法第二条第一項の政令で定めるその他の家畜は、次の表の上欄に掲げる伝染性疾患ごとにそれぞれ同表の下欄に掲げる家畜とする）により対象家畜「水牛、しか、いのしし」の、合計7種の家畜のブルセラ症が、家畜伝染病として指定されている。

すなわち、当該対象病原体であっても対象家畜以外の動物については、家畜伝染病予防法の対象には当たらない。*B. canis* および犬のブルセラ症も家畜伝染病予防法の対象外となる。

ただ、上記7家畜に当たらない家畜や野生動物等の疫学調査を行い、ブルセラ属菌に感染していることが示唆もしくは明らかになった場合、日本は家畜ブルセラ症清浄国であるので、調査結果の発表等には注意を要する。農林水産省の担当部局や当該地域の家畜衛生保健所と、事前に協議することが望ましい。

2. 病原体・疫学・感染源・症状・治療・予防

1) 病原体

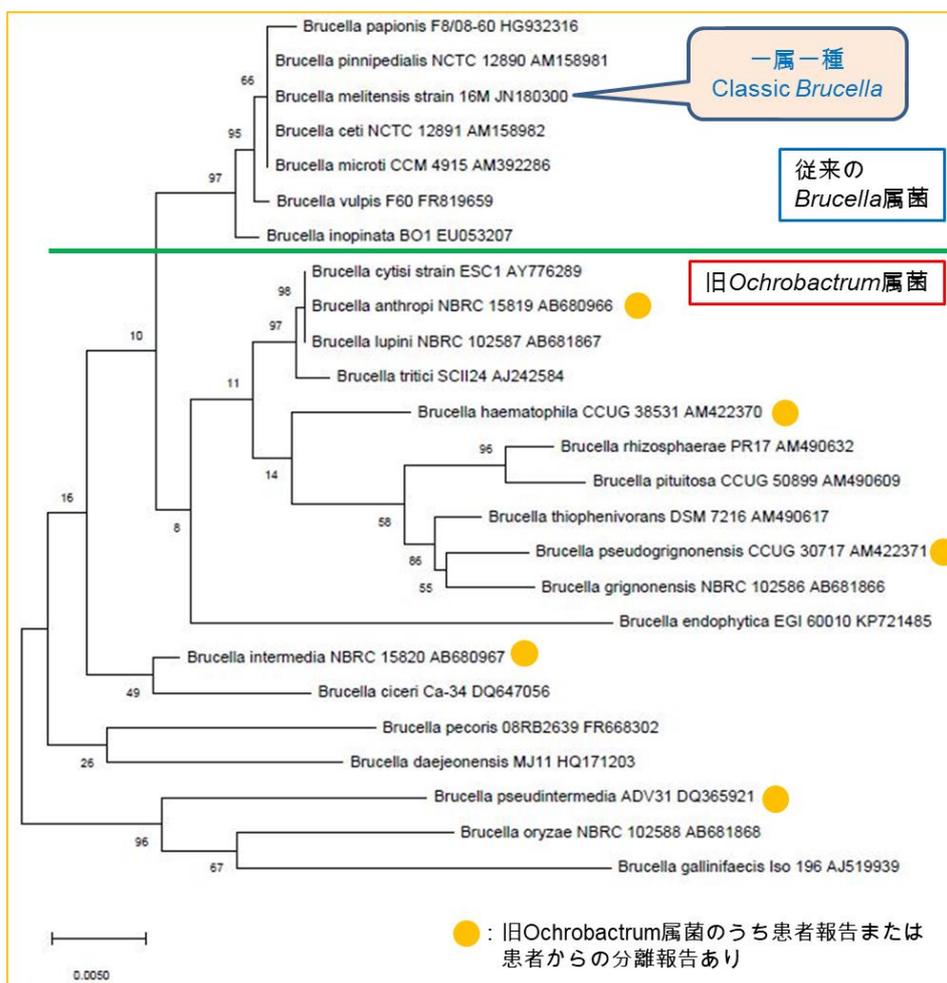
19 世紀中頃のクリミア戦争当時に英国軍兵士の間で流行したマルタ熱の原因菌として、1887 年、Sir David Bruce により *Brucella melitensis*（発見当初は *Micrococcus melitensis*）が分離されて以降、種々のブルセラ属菌が発見された。ブルセラ属菌はグラム陰性、偏性好気性短小桿菌で、芽胞や鞭毛を持たず、細胞内寄生性である。

20 世紀に見つかった6種のブルセラ属菌（いわゆる *Classic Brucella*）はその遺伝子的近縁もあり、1 属 1 種として *B. melitensis* の6つの生物型（*biovar melitensis*, *suis*, *abortus*, *canis*, *ovis*, *neotomae*）としてまとめられた。ただし、病原性の違いなどから、独立させた旧称（通称）の使用も便宜的に認められている。その後、21 世紀に入って種々のブルセラ属菌が発見されるが、これらについては *B. melitensis* の生物型ではなく独立した種としている。ヒトの感染が報告されている主要なものは、病原性の順に *B. melitensis biovar melitensis*（自然宿主：ヤギ、ヒツジ）、*biovar suis*（ブタ）、*biovar abortus*（ウシ）、*biovar canis*（イヌ）の4菌種がある。ほかには数例の患者報告だが、海産ほ乳類の *B. ceti*（クジラ、イルカ）、*B. inopinata*（不明）がある。患者報告のない *biovar ovis*（ヒツジ）は家畜伝染病である。*B. melitensis biovar melitensis*、*biovar*

abortus、biovar *suis* は smooth-type (LPS が o-side chain を持つ)、biovar *canis*、biovar *ovis* は rough-type (LPS が o-side chain を持たない、もしくは不完全) である。

ところで、近年の全ゲノム解析の結果等により、元々、*Brucella* 属菌に遺伝子的に近縁であると知られていた *Ochrobactrum* 属菌が *Brucella* 属菌に命名変更 (統合) された。そのため、*Brucella* 属菌は、旧 *Brucella* 属菌 7 菌種と旧 *Ochrobactrum* 属菌 18 菌種を併せて 25 菌種となった。旧 *Ochrobactrum* 属菌では、主に日和見感染として *B. anthropi*、*B. intermedia*、その他、*B. pseudintermedia*、*B. haematophilum*、*B. pseudogrignonense* が患者より分離されている。

表) *Brucella* 属菌の種類 (Evolutionary relationships of taxa (16S rRNA))



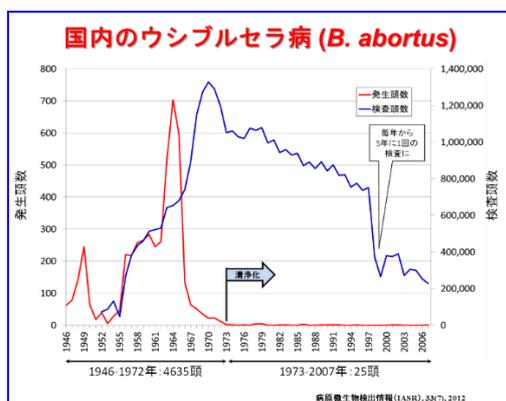
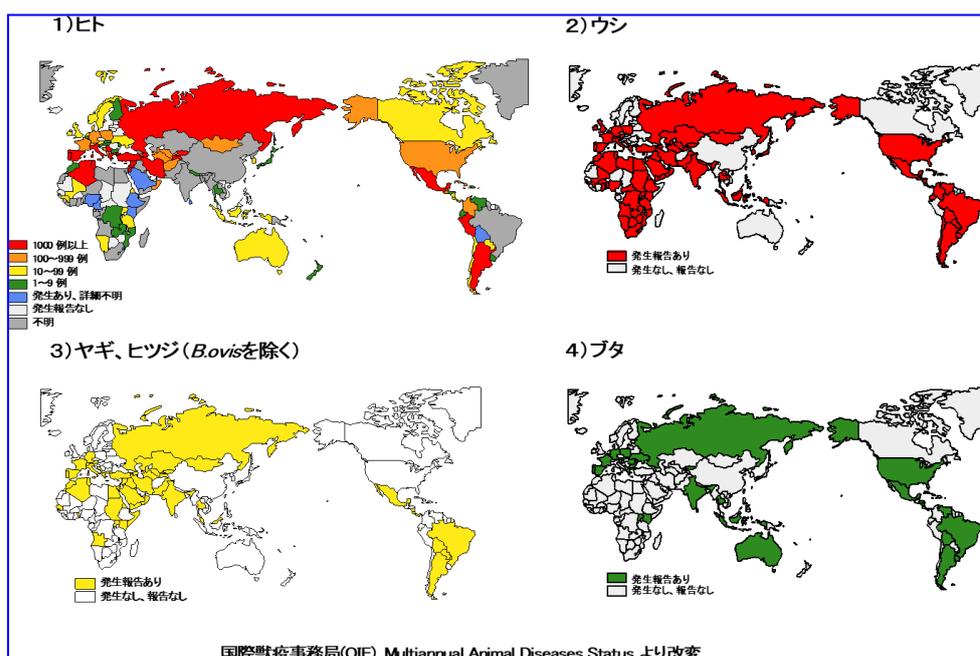
なお、本稿では以降の記載については、通称を用いる。

2) 疫学

ブルセラ症が世界的に注目されたのは、19 世紀中頃にマルタ熱が流行したことによるが、すでに、紀元前 400 年頃のヒポクラテス著「Of the Epidemics」にブルセラ症と思われる疾患が記載されており、ヤギなどの家畜化に伴い古くから流行していたと考えられる。近年では、中

国、西アジア、中東、地中海地域およびアフリカと中南米を中心として、世界中で毎年 50 万人を越える家畜ブルセラ菌感染患者が新規に発生している。これら流行地は、総じて動物に対するブルセラ症対策が不十分で、家畜で発生が多い地域である。中でも中国では東北部を中心として、近年、患者が急増し、年間 3.5 万人を越えている。主にヒツジ・ヤギを感染源とすることから、家畜の出産シーズンの 1~2 ヶ月後、すなわち毎年 4~8 月に *B. melitensis* 感染による新規患者が多くなっている。なお、多くの国では本症は届出感染症になっているが、「原因不明熱」として扱われることも多く、実際の感染者数は公式に発表される患者数の 10~25 倍存在するものと推定されている。

現在、国内の家畜は清浄化しており、家畜ブルセラ菌感染例はすべて輸入症例である。ブルセラ症流行地域からの訪日者や、日本在住の外国人が流行地域である母国に一時帰国した際に感染してくるケースなど、外国人の症例が大半を占める。一方、*B. canis* 感染については、国内のイヌは約 3% が感染歴を持つことから、患者はすべて国内感染である。



国内の家畜ブルセラ病

B. suis
 1936: 養豚場での流行 (神奈川)
 1938: " (千葉) --- 輸入種豚による
 1940: 最後の報告
 神奈川 --- 1種豚

B. melitensis, B. ovis
 報告は見あたらない。

国内では 1890 年代後半に *B. abortus* によると考えられる牛の流産の発生が報告されているが、1956 年頃から輸入ジャージー種牛が原因と考えられる国内発生が拡大して問題となった。特に 1960 年代前半には年間 500 頭を超える患畜の発生もあった。このため、摘発・淘汰による国内対策と輸入検疫など防疫対策の徹底により、1973 年以降はほとんど発生をみなくなり、令和 4 年、牛ブルセラ症の清浄化宣言を国際獣疫事務局 (OIE) に提出し、令和 3 年 4 月 1 日を清浄化宣言の開始日として WOA (OIE) の Web に公開された。*B. melitensis* の感染家畜は国内での発生報告はなく、*B. suis* 感染豚は 1940 年より後は報告がない。家畜ブルセラ属菌に対して、国内は清浄化しており、国内の家畜から人が感染することはないと考えてよい。

野生動物については、以下のような報告をはじめとして、世界で認められる。

野生動物のブルセラ病	
<i>B. abortus</i> :	
米国 – イエローストーン国立公園 バイソンの流産とエルクの感染 感染防御のために家畜にワクチン接種 年間450万頭	
<i>B. suis</i> 1, 3: イノシシ	
<i>B. suis</i> 4:	<i>B. melitensis</i>:
米国 – アラスカ カリブー、トナカイ 家畜への感染源	インパラなど

B. canis は 1962 年頃から米国の犬繁殖施設で多発した流産の原因菌として、1966 年に LE Carmichael により同定・報告された。世界で報告があるのは、アメリカ、中南米 (メキシコ、ペルー、アルゼンチン)、アジア (日本、中国、韓国、インドなど)、ヨーロッパの一部 (ドイツ、スペイン、イタリアなど) などだが、世界中で発生していると考えられている。日本 (2~5%) やアメリカ (南部で高く、8%) の感染率は比較的低い、メキシコやペルーでは 28% と高い。一般に、野犬を含めて犬の密度が高く、繁殖がコントロールされていない地域で、感染率が高くなる。日本では、1971 年に輸入犬に起因する、実験用ビーグル犬の繁殖施設で初めて集団感染が報告され、その後も実験用犬施設や訓練学校などでの発生が報告され、やがてペット用犬でも感染が広がった。現在、国内の 2~5% 程度のペット用犬が抗体陽性であり、主として犬の繁殖施設を中心として犬同士の間で病原体が維持されている。現在も、犬の繁殖施設や保護施設で集団発生が認められる。

3) 感染源

家畜ブルセラ菌は非常に感染しやすく 10~100 個の菌で感染しうる。感染動物の加熱 (殺菌) 不十分な乳・チーズなど乳製品や肉の喫食による経口感染が最も一般的である。家畜が流産した時の汚物・流産仔への直接接触、汚染エアロゾルの吸入によっても感染する。*B. canis* に

については、感染イヌの流産時の汚物や死流産胎仔中には非常に多く排菌され、主要な感染源となり、特にブリーダーなどペット用イヌの繁殖・流通に関与している者や獣医療関係者は注意が必要である。また、尿や精液中にも排菌され、一般飼育者における感染源にもなり得る。ヒト-ヒト感染は、授乳、性交、臓器移植による事例が報告されているが極めてまれである。

また、ブルセラ属菌は環境・食品中で長期間、生残し、感染源となることが知られている。さらに、検査室・実験室感染事故の起こりやすい菌である。近年、安全キャビネットの使用により、感染事故は減少したが、特に菌の分離培養（増菌培養）時に感染リスクは高くなる。安全キャビネットを使用しない、培養液をこぼす、培養プレートの臭いをかぐ、などにより、エアロゾルを介して感染することが知られている。

家畜・犬では、流産時の汚物、死流産仔中には非常に多く排菌されており、最も重要な感染源となる。その他、膣分泌液や乳汁、雄犬の尿や精液中にも排菌される。ゆえに、汚物等への直接接触や汚染された飼料・水を介した経口・経鼻・経粘膜感染、エアロゾルの吸入感染、交尾による生殖器粘膜を介した感染が重要な感染経路となる。

4) 症状

B. melitensis がもっとも重く、ついで *B. suis*、*B. abortus* となる。通常、潜伏期は1~3週間であるが、時に数ヶ月になることもある。症状そのものに特異的なものはなく、軽症では単にインフルエンザ様だが、筋肉・骨格系に及ぼす影響が強く、全身的な疼痛、倦怠感を示す。発熱は主に午後から夕方かけて、時に 40℃以上となることもあるが、発汗とともに朝には解熱する。このような間欠熱が数週間続いた後、1~2週間の症状の好転、そして再び間欠熱、という波状熱が特徴である。病気の期間は、数週間から数ヶ月、年余に及ぶこともあり、また、治療が不完全な場合、再発しやすい感染症としても知られる。

臨床症状により、急性型、慢性型に分けられ、その他合併症としてさまざまな局所症状を示すことがある。骨関節症状が最も多く、中でも仙腸骨炎が一般的である。その他、吸入感染による肺炎や経口感染に伴う胃腸症状、ブドウ膜炎、まれに中枢神経障害を示すこともある。男性では精巣炎や副精巣炎が認められる。心内膜炎が死亡原因の大半を占め、未治療時の致死率は5%程度である。

急性型：発熱、悪寒、倦怠感、関節痛など。脾腫、リンパ節腫脹、肝腫大を認めることもある。発熱は午後から夕方にかけて認められることが多い。

限局型：心内膜炎、肺炎、骨髄炎、睪炎、精巣炎。心内膜炎はブルセラ症による死亡原因の大半を占める。

慢性型：発症後、年余にわたって脱力感や疲労感が続く。

家畜では、外見上の異常は認められないことが多いが、主な症状としては、妊娠動物における死流産など繁殖障害が知られている。その他、雄では精巣炎や精巣上体炎が報告される。

家畜ブルセラ病の症状	
妊娠動物以外は、通常、外見上の異常は認められない。	
菌種	症状・特徴
<i>B. melitensis</i>	胎盤での菌の増殖と胎仔への感染による死流産。通常、流産は一度。分娩時に排菌。乳汁中への持続的排菌。雄では精巣炎、精巣上体炎(不妊をもたらす)。
<i>B. abortus</i>	胎盤で菌が増殖し、壊死性化膿性炎による、妊娠6~8ヶ月での死流産。子宮内膜炎。流産後の妊娠は、通常、正常。乳量の減少。
<i>B. suis</i>	雄では精巣炎、精巣上体炎。雌は子宮炎、胎盤炎と流産。
<i>B. ovis</i> (羊)	雄の精巣炎、精巣上体炎と性機能の低下。雄ヒツジは感受性が強く精液中に排菌を続ける。雌ではまれに胎盤炎と流産。



*B. melitensis*感染による流産胎仔(4ヶ月)



*B. melitensis*感染による精巣上体炎

Brucellosis in humans and animals, FAO/OIE/WHO, 2006.7より引用

イヌブルセラ症
1962~ 繁殖施設での流産の多発(US)
1966 LE Carmichael --- <i>B. canis</i>
世界中で発生している
米国: 特に南部地域(8%) 中南米: メキシコ、ペルー(28%)、アルゼンチン... アジア: 日本(2-5%)、韓国、中国、台湾、インド...
臨床症状 <ol style="list-style-type: none"> 1. 外見的にこれといった症状は示さない。 (流産により初めて気がつくことが多い。) 2. 妊娠後期に死流産。子宮内胎児死亡。 (主に45-55日、幅30-60日) 3. 雄は、精巣上体炎、精巣の萎縮。 精子数の減少、異常精子の割合の増加 精液や尿に菌の排出。 4. 脊椎炎、ブドウ膜炎、心内膜炎、髄膜脳炎の報告もある。





5) 治療

2剤併用が基本である。[Brucellosis in humans and animals. WHO/CDS/EPR/2006.7.] および抗菌薬治療の効果を比較した論文では、RFPは血中からのDOXYのクリアランスを早めることや、脊椎炎などの合併症に対してDOXY+ストレプトマイシン(SM)の方が効果的であったことから、DOXY+SMを推奨している。また、ゲンタマイシン(GM)の方が、SMよりも治療の中止に至る副作用が少ないとも言われる。可能ならば、DOXY+SM+RFPの3剤併用が最も

効果的という報告がある。小児にはコトリモキサゾール（ST 合剤）+SM/GM の併用、妊婦には ST 合剤または RFP の長期投与が推奨されている。

日本では家畜での発生はないが、感染が認められた場合は治療せず、原則、殺処分となる。犬の場合は、治療の選択は飼育者の判断に任せられるが、慢性化すると投薬治療の効果が減弱し、再発が見られる。

表) 犬の投薬治療スキーム

2 剤併用が原則：テトラサイクリン系+アミノグリコシド系/リファンピシン				
薬 剤	用量 (mg/kg)	方 法	間隔 (時間)	期間 (週間)
テトラサイクリン系				
ドキシサイクリン・ミノマイシン	25	経 口	24	4
	12.5	経 口	12	4
テトラサイクリン	30	経 口	12	4
アミノグリコシド系				
ストレプトマイシン	20	筋注・皮下	24	2 (1, 4週目)
ゲンタマイシン	2.5	筋注・皮下	12	2 (1, 4週目)
	5	筋注・皮下	24	2 (1, 4週目)
その他				
リファンピシン	5	経 口	24	4

Greene CE and Carmicheal LE, in: Infectious diseases of the dog and cat. 369-81, 2006より

6) 予防

ヒトのブルセラ症の予防は、家畜へのワクチン接種や検査陽性動物の殺処分（Test and Slaughter）などによる、感染動物の根絶対策を中心とした獣医学的な対策が有効である。これらの方法によってヒトのブルセラ症の発生が激減した国や地域が多い。また、根本的な解決には至らないが、乳と乳製品の適切な加熱処理も感染者予防には効果が高い。

かつて旧ソ連、中国、およびフランスにおいて、ヒト用の弱毒生菌ワクチンやペプチドグリカンワクチンが用いられたこともあるが、現在では用いられていない。

家畜については以下のようなワクチンが用いられる。

家畜ブルセラ病ワクチン
<i>B. abortus</i>
S19 (Strain 19の弱毒変異株) - Smooth型 - 病原性、自然感染と区別できない
RB51 (Rough型株) - 1996年より使用 (主に米国、ラテンアメリカ) - 自然感染と区別可能 (LPSのO鎖を欠く)
<i>B. melitensis</i>
Rev-1 (弱毒変異株) - Smooth型
各々、年間、2,000万頭前後に接種 (4-12ヶ月令)
いずれのワクチンも病原性がないわけではない ヒトに対する病原性もある

II. ブルセラ属菌検査に関する一般的な注意事項

1. 作業上の一般的注意

ブルセラ属菌のうち感染者の報告が多い *B. melitensis*、*B. suis*、*B. abortus*、*B. canis* は、国立感染症研究所バイオセーフティーレベル3 (BSL3) に分類されている。ブルセラ症が疑われる臨床材料の取り扱いは、まず、BSL2 内の安全キャビネットで行う。ブルセラ属菌が同定された場合、以降の検討はすべて BSL3 実験室内で行う。

ブルセラ属菌は、安全キャビネットが一般的になるまでは、検査室・実験室内感染が最も多い細菌であった。今日では、ブルセラ属菌であっても、安全キャビネットを使用して、基本的な取扱いを守っている限りにおいては、それほど検査室内感染のリスクは高くない。しかしながら、必ずしもすべての検体で安全キャビネットが使用されているわけでもないため、確定するまでに検査室内感染してしまうリスクは依然高い。通常、血液や関節液など患者検体中の菌量はあまり多くなく、したがって感染リスクも比較的低い。しかし、それら検体の増菌培養（とりわけ液体培地を用いて）を実施すると、感染リスクは格段に高くなる。ただ、報告されている感染経路については、試験管や血液培養ボトルの破損によるエアロゾルよりも、むしろ、大半は、培養プレートの臭いをかぐ、生菌を安全キャビネットの外で取扱う、個人用防護具 (PPE: personal protective equipment) を使用していない、口でピペット操作をする、など不適切で危険な取扱いをしたことに起因している。

*疑い検体は BSL2 内の安全キャビネット内で取り扱う。

*ブルセラ属菌が同定された場合、以降の作業はすべて BSL3 実験室で実施する。

*ガウン、マスク、手袋など PPE を使用する。

*使用した器具等は、70%エタノールで消毒する。

*オートクレーブ可能な器具等や汚物は、オートクレーブ (121°C、20 分) 処理をする。

III. 検体の採取・輸送・保管および滅菌

1. 検査材料の採取・輸送

血清抗体検査、遺伝子検出、血液培養が実施されるので、発熱時の、なるべく抗生物質投与前の血液を無菌的に採取する。通常は血清分離用滅菌真空採血管と DNA 分離のための EDTA-2K 滅菌真空採血管に採取する。血清分離用滅菌真空採血管は、常法通りに血清を分離する。分離した血清と EDTA-2K 血液含め、その他の材料とともに凍結を避けて氷冷して輸送する（血清のみの場合は凍結も可）。

また、リンパ節生検材料、骨髄穿刺材料、合併症として認められる腸腰筋膿瘍なども遺伝子検出や分離・培養に用いられる。動物では解剖により検体を採取できる場合は、脾臓や肝臓、リンパ節、骨髄を極力無菌的に採材し、分離・培養を行う。

ブルセラ属菌のうち *B. melitensis*、*B. abortus*、*B. suis*、*B. canis* は特定三種病原体に指定されているため、これら 4 種であると同定された病原体は運搬について感染症法の規定に従う必要がある。

2. 検査材料および病原体の保存

疑い検体は、BSL2 実験室内で保存する。

ブルセラ属菌は、BSL3 実験室内で保存する。

3. 消毒・滅菌法

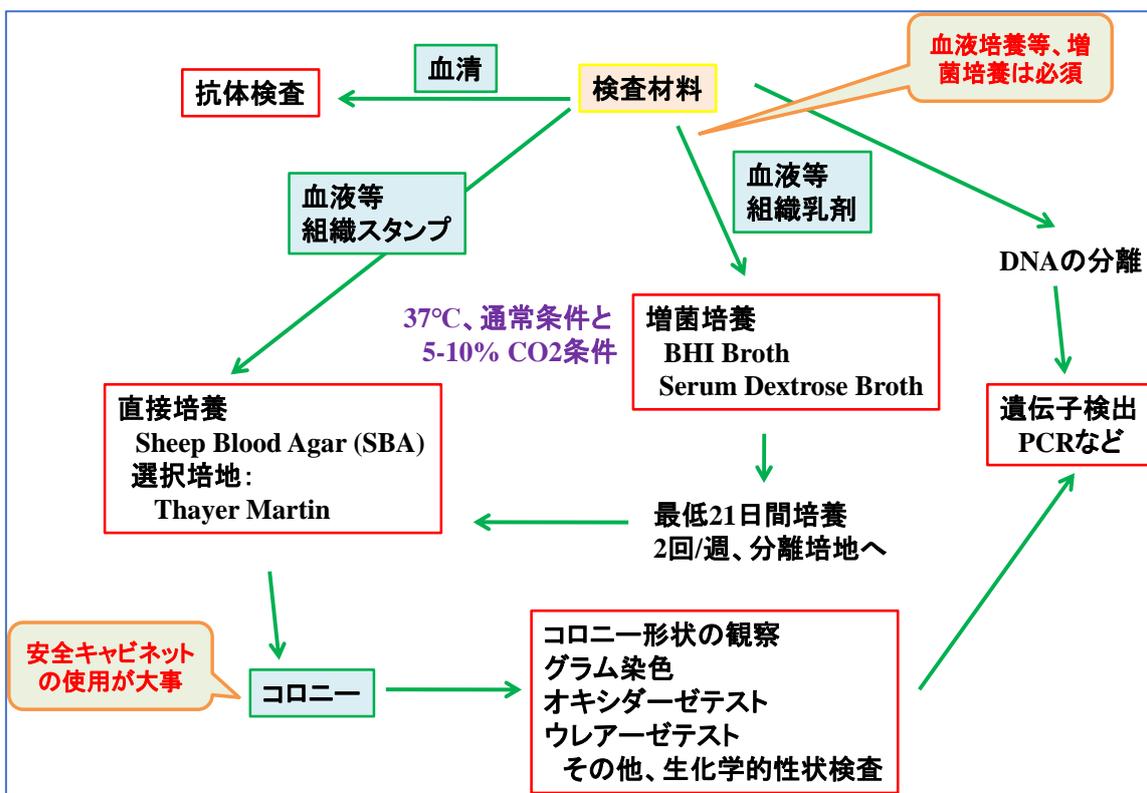
使用した器具等は、70%エタノールで消毒する。汚物やオートクレーブ可能な器具等は、オートクレーブ（121℃、20 分）処理をする。

IV. 検査・診断

図) ヒトのブルセラ症の検査・診断

臨床症状 感染機会の有無 など	+	細菌学的検査：分離・同定 血清学的検査：抗体の測定 遺伝子の検出：PCR など
ブルセラ症の感染症法における届出基準		
検査方法	検査材料	
分離・同定による病原体の検出	血液、骨髄	
試験管凝集反応による抗体の検出 (抗原がアボルタスの場合は40倍以上、 カニスの場合は160倍以上の抗体価)	血清	

図) ブルセラ症の検査フロー



1. 抗体の測定

ブルセラ症は、潜伏期間が長いことも多く、発症初期（風邪様症状など）でもすでに抗体を保有していることが多い。また、ブルセラ属菌は細胞内寄生菌であるため、抗体は菌の排除には余りに立たない。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）に潜伏していて、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、抗体検査の診断的意義は非常に大きい。

ヒトは試験管内凝集反応、イヌは試験管内凝集反応やマイクロプレート凝集反応が用いられる。

一方、家畜のブルセラ症は感染症法により家畜伝染病として厳しく措置されているので、家畜（家畜伝染病法および施行令による「牛、めん羊、山羊、豚、水牛、しか、いのしし」）の抗体検査については、農林水産省等より公開されている方法（下記）に準じる必要がある。仮に、他の方法（試験管凝集反応やマイクロプレート凝集反応など）で抗体陽性が示唆されたとしても、指定された方法で検証することが必要である。

＊牛のブルセラ症及び結核の清浄性維持サーベイランス実施要領

https://www.maff.go.jp/j/council/seisaku/eisei/usibuta_sippe/74/attach/pdf/index-4.pdf

＊牛以外の家畜を対象としたブルセラ症抗体検査マニュアル

https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/153929.html

1-1. 試験管内凝集反応

ヒトの血清診断では試験管内凝集反応（SAT）が行われる。S-LPSを持つ家畜ブルセラ属菌に対する抗体の測定には、*B. abortus* の死菌体を用いた試験管内凝集反応が広く用いられるが、これではR-LPSを持つ*B. canis* に対する抗体は検出できない。*B. canis* に対しては*B. canis* の凝集反应用抗原を用いる。基本的に臨床検体では、両方の検査をセットで行うことになる。家畜ブルセラ菌感染症例では*B. abortus* 抗原に陽性を示すが、*B. canis* 抗原にも陽性を示すこともある。野兎病菌、エルシニア菌、コレラ菌などとの交差反応に注意が必要であり、特に *Yersinia enterocolitica* O9 と家畜ブルセラ菌はほぼ100%交差反応する。

注意事項として、過度に溶血した検体は、ヘモグロビンの影響によるとされる偽陽性を示すことが知られており、その場合は採血をやり直す必要がある。なお、血清は非動化しないで検査に供する。

必要な器具等

*透明なガラス製小試験管(直径 12mm-長さ 75mm、Disposable culture tubes、#9831-1207、IWAKI)

*0.5w/v%フェノール加生理食塩水(生理食塩水に 0.5% (w/v) になるよう加温融解したフェノールを加える)(*B. abortus* 用)

*リン酸緩衝食塩液(pH7.2、46.7g リン酸二ナトリウム・12 水、6.55g リン酸一ナトリウム・2 水、9.0g 塩化ナトリウム、1.0g 窒化ナトリウム、以上を 1,000ml に調整)(*B. canis* 用)

*試験管内凝集反应用菌液(*B. abortus* : 農業・食品産業技術総合研究機構、*B. canis* : 国立感染症研究所)

なお、現在、ブルセラ病診断用菌液(*B. canis* 死菌液)は市販されておらず、国立感染症研究所より入手となる。入手に当たっては、いくつかの条件があるので、国立感染症研究所に問い合わせが必要である。

*陽性対照血清(ウサギに *B. abortus*、*B. canis* それぞれの死菌体を免疫して調整する)

*その他、一般的に血清反応に必要なとされる器具類

1) *B. abortus*、*B. melitensis*、*B. suis* に対する抗体の検出

抗原：ブルセラ病診断用菌液(*B. abortus* 99 もしくは 125 株 (*Brucella melitensis* biovar *abortus* strain 99 or 125) の加熱死菌液、製造・販売：農業・食品産業技術総合研究機構)

検査手順

- (1) 菌液をよく振り、フェノール加生理食塩水(B：希釈液)で 10 倍に希釈(A：10 倍希釈診断用菌液)。
- (2) 標準混濁管を調整。
- (3) 5 倍希釈血清から出発して 2 倍段階希釈で 8 段階の希釈系列を用意(0.5 ml / 試験管、希釈倍数 1 : 5 ~ 1 : 640)。
- (4) 同様に力価が 160 倍以上の陽性対照血清を希釈。
- (5) 抗原菌液 0.5 ml を各試験管に加えてよく攪拌し、37°C で 18 ~ 24 時間感作後、判定。(最終血清希釈倍数 1 : 10 ~ 1 : 1280)
- (6) 判定は、標準混濁管と対比して凝集の程度を調べ、50%凝集を示す最終血清希釈倍数を読む。
- (7) 血清の最終希釈倍数 40 倍以上で 50%以上の凝集を示すものを陽性と判定。

表) 判定の基準と標準混濁管

判定の基準			混濁管の作り方		
凝集度	記号	所見	A : B	A	B
100%	++++	凝集沈殿し、上清はまったく透明	0 : 8	0ml	1.0ml
75	+++	強い凝集沈殿があるが、上清はかすかに混濁	1 : 7	0.125ml	0.875ml
50	++	かなりの凝集沈殿があり、上清もかなり混濁	2 : 6	0.25ml	0.75ml
25	+	わずかな凝集塊の沈殿を認める	3 : 5	0.375ml	0.625ml
0	—	凝集を認めない	4 : 4	0.5ml	0.5ml

注 : *Yersinia enterocolitica* serotype O9、*Francisella tularensis*、*Vibrio cholera* との交差凝集があり偽陽性を呈することがあるため注意を要する。また、凝集抗体価が高値の検体では血清希釈の低いところで疑陰性を呈することがあるため、320 倍以上も希釈し検査する。

2) *B. canis* に対する抗体の検出

抗原 : ブルセラ病診断用菌液 (*B. canis* 死菌液、製造 : 国立感染症研究所)

検査手順

- (1) 標準混濁管を調整 (*B. abortus* に準じる)。
- (2) 20 倍希釈血清から、2 倍段階希釈で 8 段階の希釈系列を用意。(0.5 ml / 試験管、希釈倍数 1 : 20 ~ 1 : 1280)。
- (3) 同様に力価が 320 倍以上の陽性対照血清を希釈。
- (4) 抗原菌液 (OD₅₅₀=1) 0.5 ml を各試験管に加えてよく攪拌し、50°C で 24 時間感作後、判定。(最終血清希釈倍数 1 : 40 ~ 1 : 2560)
- (5) 判定は、標準混濁管と対比して凝集の程度を調べ、50%凝集を示す最終血清希釈倍数を読む。
- (6) 血清の最終希釈倍数 160 倍以上で 50%以上の凝集を示すものを陽性と判定。

1-2. マイクロプレート凝集反応

1) *B. canis* に対する抗体の検出

試験管凝集反応と原理は同じだが、96穴U底のマイクロプレートを用いる。そのため、12連マルチチャンネルピペットが使用でき、一度に多くの検体の検査が可能である。また、血清・抗原とも少量ですむ。さらに、色素で着色するので、判定も容易である。試験管凝集反応の結果と整合性を持つ。多数の検体のスクリーニングに適している。

抗原：ブルセラ病診断用菌液 (*B. canis* 死菌液、製造：国立感染症研究所)

検査手順

- (1) 使用枚数分のマイクロプレートを、125ul/well の 20% Blocking One in DW で、室温で1時間、プレブロッキングする (>12ml/plate)。
- (2) 菌液の入ったボトルをよく振り、必要量を 23G の注射針をつけたシリンジを使って 50ml ファルコンチューブに取り出す。
- (3) リン酸緩衝食塩液 (E：希釈液) の必要量を、50ml チューブにとる。
- (4) 菌液に 1/50 量の 0.25% サフラニンまたは 0.4% フクシン溶液を加える (染色液加菌液 F)。
- (5) 検体は 10 倍希釈血清から出発して 2 倍段階希釈で、各 8 段階の希釈系列を用意 (希釈倍数 1:10~1:1280)。

希釈液 (B)	90ul	50ul	50ul	~	50ul	50ul	捨てる 50ul
検体血清	10ul	50ul	50ul	~	50ul	50ul	
染色液加菌液 (F) 50ul を加える							
最終希釈倍率	X20	X40	X80	~	X1280	X2560	

*プレブロッキング済みのマイクロプレートの、第1列には 90ul、第2~8列には 50ul の希釈液 (B) を入れる。

*第1列に、10ul の検体血清を入れる。

*ピペットマンでよく混和する (こぼさないように注意する)。

*50ul をピペットマンでとって、第2列に移す。

*ピペットマンでよく混和する (こぼさないように注意する)。

*ピペットチップはその都度新しい物に交換して、同様に第8列まで移していき、最後に第8列から 50ul をとって、捨てる。

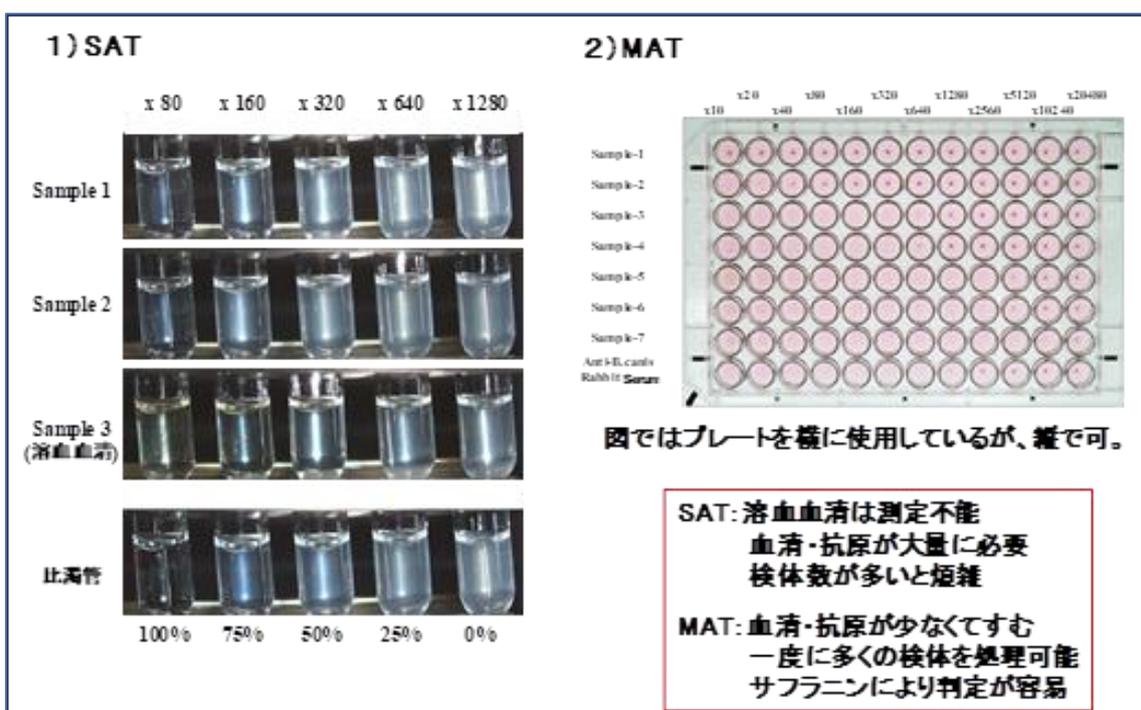
*これで、各ウェルに 50ul ずつの希釈系列ができあがる。

(血清希釈倍数は 1:10~1:1280 となる)

- (6) 同様に力価が 160 倍以上の陽性対照血清の希釈系列を作る。

- (7) 染色液加菌液 (F) 50ul を各ウェルに加える。
 これで各ウェル 100ul となる (最終血清希釈倍数は 1:20~1:2560 となる)。
 (8) プレートを 20 秒程度穏やかに振とうする (ELISA プレート振とう機で可)。
 (9) 溶液が乾燥しないように、プレートを湿潤箱に入れる。
 (10) 50°C の恒温器に入れて、24 時間反応させる。
 (11) プレートを揺らさないよう注意して恒温器から取り出す。
 (12) 判定は、血清の最終希釈倍数 160 倍以上で凝集を示すものを陽性と判定する。

図 試験管内凝集反応とマイクロプレート凝集反応による *B. canis* に対する抗体検出の例



2. 細菌学的検査

1) 検査材料

検査材料としては発熱時の、なるべく抗生物質投与前の血液 (同時に血清を分離し抗体測定に用いる)、リンパ節生検材料、骨髄穿刺材料、合併症として認められる腸腰筋膿瘍などの無菌的に採取した組織、体液を対象とする。本菌の増殖は遅いので、菌分離には無菌的に採取された材料が望ましい。血液には滅菌真空採血管 (培養だけならヘパリン加でよいが、DNA 分離を考える場合は EDTA-2K) を用いる。

2) 培養

直接平板寒天培養もしくは増菌培養を行うが、特に血液などでは菌数が少ないことが多く、増菌培養は必要である。

直接平板寒天培養は、血液などの検査材料を 5% Sheep Blood Agar (SBA)、Serum Dextrose Agar (5% v/v equine/bovine serum、1% w/v dextrose)、Trypticase Soy Agar (TS Agar) などに塗抹して培養する。組織・臓器の場合は、平板全体に断面をスタンプする。ブルセラ菌は淋菌の選択培地である Thayer Martin 培地や Martin Lewis 培地を選択培地としても成長するので、創傷部位や肺などからの菌の分離に利用できる。ただし、Thayer Martin 培地でのブルセラ属菌の成長は、SBA に比較してやや遅い。

増菌培養は Brain Heart Infusion (BHI) Broth、Serum Dextrose Broth、TS Broth などを用いる。通常血液培養ビンを用いて行うが、ない場合は 0.2 μ m フィルターキャップ付き細胞培養用小フラスコ (#MA-23050 : 住友ベークライト、#35-3108 : BD Falcon など) に液体培地 10ml を入れ、これに血液 0.05~0.2ml を加えて培養する。振盪培養が望ましいが、無理な場合は適宜、混和する。組織の場合は、無菌的に生理食塩水などで 10%乳剤にした後に液体培地に加える。培養は通常の好気培養と、原因菌が *B. abortus* である場合を考慮して炭酸ガス (5~10%) 培養で行う。37°Cで最低 21 日間培養し、各週 2 回程度分離培地 (SBA、ブルセラ寒天など) に移植する。また、汚染が危惧される場合には、ブルセラ選択サプリメント (Oxoid、#SR0083A、1 バイアル (500ml 培養液用) 中に以下の物を含む。ポリミキシン B: 2500IU、バシトラシン: 12500IU、シクロヘキシミド: 50mg、ナリジクス酸: 2.5mg、ナイスタチン: 50000IU、バンコマイシン: 10mg) をあらかじめ液体培地に加えて利用できる。血液培養時には、血球 (特に白血球) を破壊しておく方が菌の検出がよいと言われている。

3) 判定

smooth-type のブルセラ菌の場合、小さい正円形、半球状にやや隆起した表面平滑なコロニーで、rough-type の場合は、辺縁が均一ではない。初期は芥子粒をまいたような感じである。発育はやや遅く、3 日以上培養で直径 1.5~2mm になる。疑わしいコロニーについてはスライドグラスに塗抹後、微量のホルマリンを入れた 50ml プラスチックチューブなどに密閉燻蒸し、その後、火炎固定したのちグラム染色を行う。グラム陰性の小球菌~球桿菌で単在することが多く、長い連鎖は作らず両端濃染性を示さない。特に新鮮分離株では小球菌のように見えやすい。その他、一般的な生理学的 (運動性等)・生化学的性状 (オキシダーゼテスト、ウレアーゼテスト等) の検査を実施する。いわゆる生化学的性状検査キット用いられるが、あくまでも補足的な利用にとどめ、結果コードによる判定はしない。しばしばコードの誤判定があり、特にブルセラ属菌でないと誤判定されたときに、その後の取扱による検査室・実験室感染リス

クが増す。

図) 血液寒天培地上の *B. canis* コロニーとグラム染色像

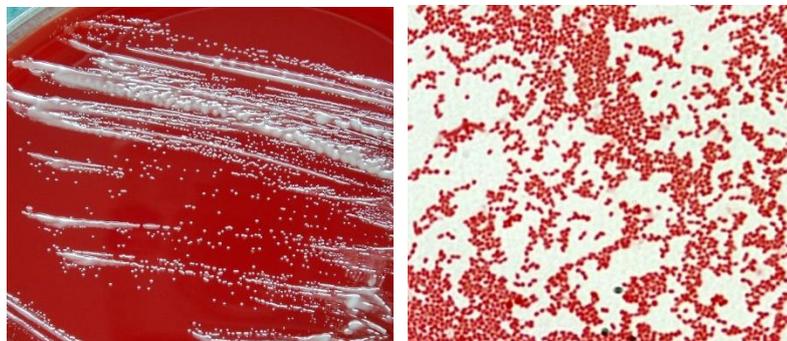


表) ブルセラ属菌と鑑別を要する細菌

試験	<i>Brucella</i> spp.	<i>Bordetella</i> <i>bronchiseptica</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Moraxella</i> <i>phenylpyruvica</i>	<i>Oligella</i> <i>ureolytica</i>	<i>Haemophilus</i> <i>influenzae</i>
抗ブルセラ抗血清 での凝集	+	-	-	-	-	-
オキシダーゼ #	+	+	-	+	+	+
運動性	-	+	-	-	+/-	-
ウレアーゼ #	+	+	+/-	+	+	+/-
硝酸塩還元	+	+	-/+	+	+	
血液寒天 での発育	+	+	+	+	+	-
グラム染色						
形態	極小の 球桿菌	短桿菌 小球桿菌	大球桿菌	球桿菌	極小の 球桿菌	小球桿菌
染色性	淡い	鮮明	鮮明	鮮明		

: *B. ovis* はオキシダーゼ、ウレアーゼ(-)

表) ブルセラ属菌の鑑別

鑑別試験等	<i>B. abortus</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. suis</i>	<i>B. ovis</i>	<i>B. canis</i>
宿主	ウシ	ヤギ・ヒツジ	ブタ	ヒツジ	イヌ
ヒトへの病原性	中等度	強い	強い	なし	弱い
色素に対する感受性					
塩基性フクシン	耐性	耐性	感受性	感受性	感受性
チオニン	感受性	耐性	耐性	耐性	耐性
ウレアーゼ	>90min	>90min	<90min	-	<90min
H ₂ S産生	2~5 days	-	1~6 days	-	-
CO ₂ 要求性*	+/-	-	-	+	-

3. 遺伝子の検出

周知のように、検体からの菌の分離・培養は困難で、時間を要し、さらに十分量の菌血症が起こっていないと分離されない場合があることから、「培養検査陰性＝非感染」とは言えない。同様に、血液など検体からの遺伝子検出も、陰性であっても感染は否定できない。したがって、特に遺伝子検出においては分離菌株の同定には効果的ではあるが、一次診断には用いられるべきではない。その点に留意した上で検査を実施する。

ブルセラ属菌遺伝子の検出には PCR 法を用いる。サンプルは、血清もしくは血液、骨髓穿刺材料から、市販の DNA 抽出キット (QIAamp DNA Mini Kit : #51304 : QIAGEN、SepaGene : #516221 : 積水メディカル) を用いて精製した DNA、もしくは、分離培養した細菌コロニーの煮沸菌液上清またはキットを用いて抽出した DNA を用いる。

B. abortus 細胞表面タンパクの 31kDa 抗原 BCSP31 をコードする遺伝子 (*bcs31*) 内の 224 bp の領域を標的とした PCR が最も広く用いられるが、この領域は全てのブルセラ属菌に保存されている。その他、16S ribosomal RNA 遺伝子や IS711 領域遺伝子を標的とした PCR も用いられる。

我々の実施している 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。

表) プライマーと標的遺伝子、増幅産物サイズ、陽性を示す菌種

Target gene	Primer pair	Product size	Positive
<i>bcs31</i>	B4/B5	224 bp	BM, BA, BS, BC
<i>omp2</i>	(<i>abortus</i> type) JPF/JPR-ab	186 bp	BM, BA, BS
	(<i>canis</i> type) JPF/JPR-ca	187 bp	BS, BC
<i>omp31</i>	1S/1AS	249 bp	BM, BS, BC

BM: *Brucella melitensis*, BA: *B. abortus*, BS: *B. suis*, BC: *B. canis*

bcs31 --- 224 bp (M20404)

B4(S) --- 5'-Tgg CTC ggT TgC CAA TAT CAA

B5(AS)--- 5'-CgC gCT TgC CTT TCA ggT CTg

omp2 --- (U26438, U26439)

JPF(S) --- 5'-gCg CTC Agg CTg CCg ACg CAA

JPR-ab(AS)--- 5'-CAT TgC ggT Cgg TAC Cgg Ag (186 bp)

JPR-ca(AS)--- 5'-CCT TTA CgA TCC gAg CCg gTA (187 bp)

omp31 --- 249 bp (AF366073)

1S(S) --- 5'-gTT CgC TCg ACg TAA CAg CTg

1AS(AS)--- 5'-gAC CgC Cgg TAC CAT AAA CCA

bbsp31-PCR のプライマーによって増幅される産物は、*B. abortus* 細胞表面タンパクの 31kDa 抗原 (BCSP31) をコードする遺伝子の 224bp の領域で、全てのブルセラ属菌に保存されている。*omp31*-PCR のプライマーによって増幅される 249bp の産物はブルセラ属菌の外膜タンパク (OMP31) をコードする遺伝子の一部で *B. abortus* 以外に含まれる (*B. abortus* はその領域を欠く)。同じくブルセラ属菌の外膜タンパク OMP2 には 2 種類のプライマーセットを用いる。*omp2-ab*-PCR のプライマーによって増幅される 186bp の産物は *B. ovis*、および *B. canis* には含まれていない。*omp2-ca*-PCR のプライマーによって増幅される 187bp の産物は *B. suis* および *B. canis* に含まれる。

陽性コントロール遺伝子には、全ての PCR で標的サイズの産物が得られる *B. suis* の DNA を使用するが、コンタミネーションによる疑陽性のリスクが伴うことから、サンプル調整時には、調整の順番など注意が必要である。それぞれの増副産物のサイズを変更した陽性コントロール DNA も使用することも可能であるが、PCR 反応のコントロールではあってもサイズのコントロールとはならない。陽性コントロール DNA は、感染研から分与可能である。

PCR は、puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (#27-9559-01 : GE Healthcare、2~2.5unit puReTaq DNA polymerase, 10mM Tris-HCl pH9.0, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 200uM dNTP, BSA) を用いて実施するのが簡便で良い。以下にその反応溶液の調整方法および反応条件 (4 セット共通) を記す。

表) 反応溶液の調整

	<i>bbsp31, omp2-JPR-ab, omp2-JPR-ca, omp31</i>	
RTG PCR Beads	1 tube	tubes
DEPC-H ₂ O	20.5 ul	ul
Primer (S & AS) (10uM)	1 ul × 2 (final: 0.4uM)	ul
	22.5 ul (/ tube)	ul
反応溶液をまとめて調整し、各チューブに 22.5ul ずつ入れる。 その後、サンプル DNA 溶液を 2.5ul 加える。		
Sample DNA	2.5 ul	ul
Total volume	25 ul	ul

bbsp31-PCR のプライマーによって増幅される産物は、*B. abortus* 細胞表面タンパクの 31kDa 抗原 (BCSP31) をコードする遺伝子の 224bp の領域で、全てのブルセラ属菌に保存されている。*omp31*-PCR のプライマーによって増幅される 249bp の産物はブルセラ属菌の外膜タンパク (OMP31) をコードする遺伝子の一部で *B. abortus* 以外に含まれる (*B. abortus* はその領域を欠く)。同じくブルセラ属菌の外膜タンパク OMP2 には 2 種類のプライマーセットを用いる。*omp2-ab*-PCR のプライマーによって増幅される 186bp の産物は *B. ovis*、および *B. canis* には含まれていない。*omp2-ca*-PCR のプライマーによって増幅される 187bp の産物は *B. suis* および *B. canis* に含まれる。

陽性コントロール遺伝子には、全ての PCR で標的サイズの産物が得られる *B. suis* の DNA を使用するが、コンタミネーションによる疑陽性のリスクが伴うことから、サンプル調整時には、調整の順番など注意が必要である。それぞれの増副産物のサイズを変更した陽性コントロール DNA も使用することも可能であるが、PCR 反応のコントロールではあってもサイズのコントロールとはならない。陽性コントロール DNA は、感染研から分与可能である。

PCR は、puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (#27-9559-01 : GE Healthcare、2~2.5unit puReTaq DNA polymerase, 10mM Tris-HCl pH9.0, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 200uM dNTP, BSA) を用いて実施するのが簡便で良い。以下にその反応溶液の調整方法および反応条件 (4 セット共通) を記す。

表) 反応溶液の調整

	<i>bbsp31, omp2-JPR-ab, omp2-JPR-ca, omp31</i>	
RTG PCR Beads	1 tube	tubes
DEPC-H ₂ O	20.5 ul	ul
Primer (S & AS) (10uM)	1 ul × 2 (final: 0.4uM)	ul
	22.5 ul (/ tube)	ul
反応溶液をまとめて調整し、各チューブに 22.5ul ずつ入れる。 その後、サンプル DNA 溶液を 2.5ul 加える。		
Sample DNA	2.5 ul	ul
Total volume	25 ul	ul

図) PCR 反応条件

95 °C、5 min

--- ×35 cycle (95 °C, 1 min - 65 °C, 1 min - 72 °C, 1 min)

--- 72 °C、7 min

--- 4 °C

次に、*B. abortus* biovar 1 125 株、*B. canis* QE13 株、*B. melitensis* biovar 1 16M 株、*B. suis* biovar 1 1330 株を用いて前述の PCR を行ったときの検出パターンを示す。図のように、*B. abortus* では *bcbp31*、*B. abortus* 型の *omp2* 遺伝子が検出される。*B. melitensis* では *bcbp31*、*omp31*、*B. abortus* 型の *omp2* 遺伝子が検出される。*B. canis* では *bcbp31*、*omp31*、*B. canis* 型の *omp2* 遺伝子が検出される。*B. suis* は *B. abortus* 型と *B. canis* 型、両方の *omp2* 遺伝子を持つため、すべての遺伝子が検出される。

図) 基本検出パターンと *B. melitensis* 検出例

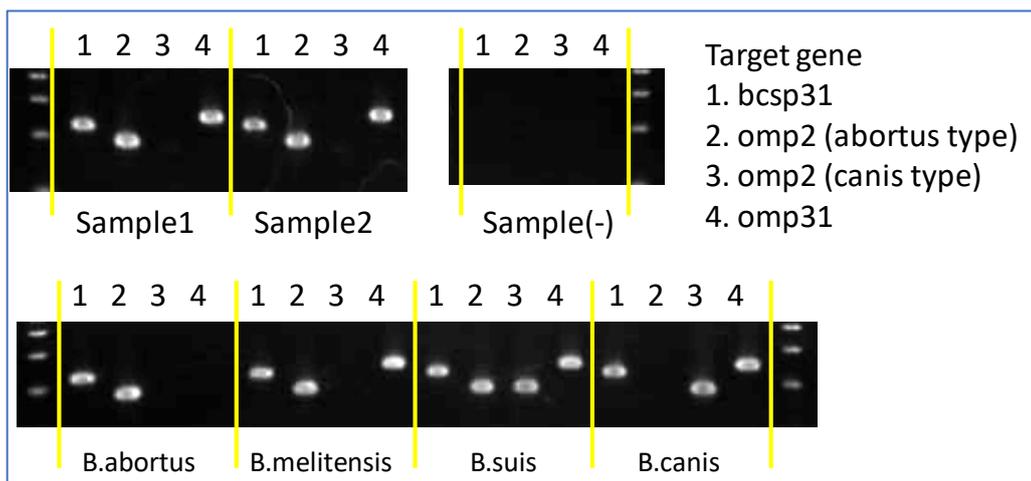
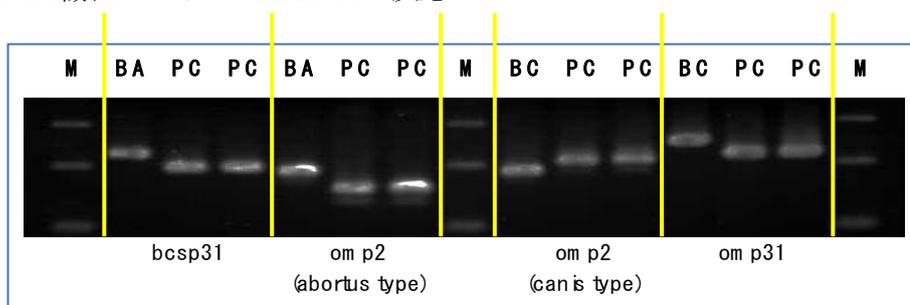


図) PCR 陽性コントロール DNA の反応パターン



BA: *B. abortus*, BC: *B. canis*,

PC: Positive control DNA

	ProductLength (bp)	
	Target	Posi Cont
<i>bcbp31</i>	224	194
<i>omp2</i> (ab)	186	156
<i>omp2</i> (ca)	187	207
<i>omp31</i>	249	219

V. 参考文献

1. Brucellosis in humans and animals. WHO/CDS/EPR/2006.7.
(<https://www.who.int/publications/i/item/9789241547130>) WHO. 2006. (総論)
2. Terrestrial Animal Health Code (2019). Chapter 8.4. Infection with *Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*. (https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/?id=169&L=1&htmfile=chapitre_bovine_brucellosis.htm) OIE. 2019. (総論)
3. Brucellosis. (<https://www.cdc.gov/brucellosis/>) CDC. 2021. (総論)
4. Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., Tsianos, E.V. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.*, 6: 91-99, 2006 (総論、疫学)
5. Memish, Z.A. and H.Balkhy, H.H. Brucellosis and international travel. *J. Travel. Med.*, 11: 49-55, 2004 (総論、疫学)
6. Greene, C.E. and Carmichael, L.E. Canine brucellosis. pp369-381. In: Greene CE. (ed), *Infectious diseases of the dog and cat*, 3rd ed. Elsevier, Inc., Canada, 2006 (総論、イヌブルセラ)
7. Genus *Brucella*. (<https://lpsn.dsmz.de/genus/brucella>)
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=2826938&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>) (分類)
8. 特集：ブルセラ症 1999年4月～2012年3月, 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), 2012. (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-sp/2342-related->) (疫学、国内ヒト)
9. 今岡浩一. ブルセラ肺炎. in : 別冊日本臨床 呼吸器症候群(第3版)IV 領域別症候群シリーズ 20, 日本臨床社, pp. 290-294, 2021 (総論、疫学)
10. 我が国の牛のブルセラ症及び結核の清浄化宣言について : 農林水産省 R4.8.30
(<https://www.maff.go.jp/j/press/syouan/douei/220830.html>) (疫学、国内ウシ)
11. Self-declaration by Japan of freedom from infection with *Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis* in bovids. (<https://www.woah.org/app/uploads/2022/08/2022-08-japan-bovbrucellosis-selfd.pdf>)
(疫学、国内ウシ)
12. Sewell, D.L. Laboratory-associated infections and biosafety. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8: 389-405, 1995
(実験室感染)
13. Skalsky, K., Yahav, D., Bishara, J., Pitlik, S., Leibovici, L. and Paul, M. Treatment of human brucellosis: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Br. Med. J.*, 336 :701-704, 2008 (治療、ヒト)
14. Baily, G.G., Krahn, J.B., Drasar, B.S. and Stoker, N.G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella*

- abortus by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.* 95:271-275. 1992. (PCR、BCSP31)
15. Imaoka, K., Kimura, M., Suzuki, M., Kamiyama, T. and Yamada, A. Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 60:137-139, 2007 (PCR、omp2&omp31)
16. MacMillan, A. Conventional serological tests. pp153-197. In: Nielsen, K and Duncan, J.R. (eds), *Animal brucellosis*. CRC Press, Inc. Florida. 1990. (試験管凝集反応)
17. Hart, C.A. and Bennett, M. Gram negative infections: Gram negative zoonoses. pp581-604. In: Cimolai, N. (ed), *Laboratory diagnosis of bacterial infections*. Marcel Dekker, Inc. New York. 2001. (試験管凝集反応)
18. Baum, M., Zamir, O., Bergman-Rios, R., Katz, E., Beider, Z., Cohen, A. and Banai, M. Comparative evaluation of microagglutination test and serum agglutination test as supplementary diagnostic methods for brucellosis. 1995. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2166-2170. (マイクロプレート凝集反応)
19. Kimura, M., Imaoka, K., Suzuki, M., Kamiyama, T. and Yamada, A. Evaluation of a microplate agglutination test (MAT) for serological diagnosis of canine brucellosis. *J. Vet. Med. Sci*, 70:707-709, 2008 (マイクロプレート凝集反応)
20. 牛のブルセラ症及び結核の清浄性維持サーベイランス実施要領
(https://www.maff.go.jp/j/council/seisaku/eisei/usibuta_sippe/74/attach/pdf/index-4.pdf) (ウシの検査)
21. 牛以外の家畜を対象としたブルセラ症抗体検査マニュアル
(https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/153929.html) (ウシ以外の家畜の検査)
22. 今岡浩一, 鈴木道雄, 前田健. ブルセラ症-ブルセラ症検査マニュアル第3版. 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) , pp.1-22, 2021

VI. 連絡先

国立感染症研究所 獣医科学部

今岡浩一、鈴木道雄、前田健

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

電話 03-5285-1111 (代表) FA X03-5285-1179 (直通)

野兎病ガイドス
(動物用)

(令和5年2月)

目次

(1) 野兔病の概説	3
(2) 検査に関する一般的注意	6
1. 検査材料の採取	6
2. 検査材料の輸送	6
3. 検査の進め方	6
4. 検査の判定	6
(3) 検査方法	8
1. 細菌学的検査	8
2. 血清学的検査	10
3. 遺伝子学的検査	13
(4) 参考文献	15
(5) 連絡先	17
(6) 執筆者一覧	19
(7) 参考図表	20
表1. 野兔病菌の性状	20
表2. 野兔病の臨床病型	20
図1. 野兔病の分布	21
図2. 野兔病菌の培地上のコロニーとグラム染色像	22
図3. 微量凝集反応像	22
図4. 野兔病菌遺伝子増幅産物の確認	23

(1) 野兎病の概説

野兎病は野兎病菌 (*Francisella tularensis* subspecies *tularensis*, *holarctica*, および *mediasiatica*) 感染による急性熱性疾患で、ノウサギやげっ歯類動物などとの接触や、ダニ・アブなどの節足動物の刺咬により感染する動物由来感染症である。本菌は極めて少ない菌数 (10-50 個) で感染が成立するとされている。近年、国内では極めて極めて稀だが、米国、欧州では毎年発生があり、時に多数の患者が報告されている。感染症法で四類感染症に分類されていて、全数届け出対象である。また、*F. tularensis* subsp. *tularensis* (Type A) および *holarctica* (Type B) は特定病原体 (二種) に指定されている。

【病原体】*F. tularensis* はグラム陰性の短桿菌 (0.2 x 0.3~0.7 μm) で、好氣的に増殖する多形性の細胞内寄生菌である。非運動性で芽胞は無い。血清型は 1 種で、生化学的性状、病原性、分布などの相異から 4 亜種 (subsp. *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* および *novicida*) に分類されている。野兎病の起原菌は前 3 亜種である。ヒトへの感染は主に subsp. *tularensis* (Type A) および subsp. *holarctica* (Type B) の 2 亜種による。Type A は北米にのみ分布し、強毒である。ゲノム性状より、さらに A1a、A1b、A2a、A2b などに区別され病原性や米国内の分布が異なることが明らかになってきた。Type B は北半球に広く分布する。2011 年にはオーストラリアでも分離された。病原性は比較的弱い。エリスロマイシン感受性や分離地などから生物型 (biovar) 1, 2, および *japonica* に分類される。日本分離株は biovar *japonica* に属す。Subsp. *mediasiatica* は中央アジアに分布する。動物の感染例が報告されているが、ヒトの感染例はない。Subsp. *novicida* は、免疫学的弱者などへの感染が報告されているが、動物の感染例はなく、野兎病の起原菌として認識されていない。これら *Francisella* 属菌の性状は表 1 を参照されたい。

【疫学】野兎病は北米や北欧で多数発生していて (図 1) ときおり大きな流行が確認されている。日本では戦後から 1960 年代まで多数の症例が報告されていた。特に東北地方各県および千葉県で多く、菌も分離されている。その他の地域においては数症例が報告されているが、菌の分離報告はない。2000 年以降では、血清学的陽性例が 2008 年に青森県、福島県、千葉県および和歌山県で計 5 例、2014 年に兵庫県で 1 例、2015 年に福島県および徳島県で計 2 例が報告されている。また 2008 年および 2009 年には東北地方の斃死ノウサギから菌が分離されている。

動物の野兎病は人臨床例とほぼ同じ地域およびオーストラリアで報告されている。野兎病菌に対する感受性は動物種によって異なる。小型げっ歯類やウサギ目動物は比較的感受性が高い。特に実験用マウスやノウサギは感染後、敗血症にて 3 週以内に斃死するとされている。ラットやアナウサギは比較的抵抗性で、斃死例は少ない。大動物では野兎病菌の Type A の感染による馬および羊の斃死例があるが、極めて稀である。また米国では猫の斃死例も報告されている。主要感染動物種は日本ではノウサギだが、海外ではノウサギ以

外にハタネズミ属やジリスなども多い。これら動物種の個体数増加とともに人の症例数が増加する傾向にある。

【感染経路】動物の野兔病の感染経路は不明である。ダニの刺咬、野兔病により斃死した動物への直接的、間接的接触の可能性が高い。日本の野兔病患者の9割以上が剥皮や調理など、ノウサギとの直接接触が原因とされている。ネコ、クマ、リスとの接触、ダニの刺咬などによる人感染例も報告されている。海外では水系感染や塵芥の吸引による呼吸器感染、蚊やアブなどの刺咬による感染が報告されている。ヒトからヒトへの感染例はない。

【臨床症状】高感受性動物のほとんどは感染後3週以内に敗血症死する。剖検により脾臓の腫大が認められる。それ以外の動物の症例報告数は少なく不明な点が多い。特徴的な症状はないため、野兔病と診断された人の感染源として疑われるか、同居動物が野兔病と診断されない限り、野兔病の検査をすることはない。人の場合、潜伏期間は3日を中心に7日以内が主で、まれに2週間におよぶことがある。インフルエンザ様の全身症状ではじまり、発熱、頭痛、悪寒戦慄、筋肉痛、関節痛が認められ、その後、弛緩熱として長期化する。多くの場合、所属リンパ節の腫脹、潰瘍または腫瘍化する。臨床的病型は菌の侵入経路により異なり、表2の様に分類される。日本では90%以上がリンパ節腫脹を伴うが、そのうち60%がリンパ節型、20%が潰瘍リンパ節型で、他の型は稀である。野兔病菌 Type A の呼吸器系感染は重篤例となることがあり、適切な処置がされなければ、死に至ることもある。不顕性感染は本邦で約2.5%に認められている。

【治療・予防】動物の治療法は確立されていない。人の治療にはゲンタマイシンやストレプトマイシン、テトラサイクリンが有効で、ペニシリンやセファロスポリン系抗生物質は無効である。旧ソ連や米国においては弱毒生ワクチンが限定的に使用されていたが、一般に使用されるワクチンはない。予防法としては、斃死または瀕死状態の野生動物と接触しない、やむをえず、それらを扱う場合は、マスクおよびゴム手袋を装着することとなる。また、野外活動時にはダニの刺咬を避けるため、長ズボンや長袖シャツなど肌を露出しない服装、防虫剤や忌避剤などの利用が望ましい。

【法律上の取り扱い】家畜の野兔病は家畜伝染病予防法で届出伝染病に指定されている。対象家畜は馬、めん羊、豚、いのししおよびうさぎである。ヒトの野兔病は感染症法(感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律)で、四類感染症に指定されている。診断した医師は届出基準に基づき、直ちに最寄りの保健所長を経由し都道府県知事に届け出なければならない(法第十二条)。また、野兔病菌は感染症法及び施行令(法第六条第二十一項政令第五条)により、特定二種病原体に指定されている。このため本菌の所持・保管は厚生労働大臣へ届出が必要である。業務に伴い二種病原体を滅菌譲渡するまで所持することとな

った場合、検出後 1 日以内に届出し、検出後 3 日以内に滅菌等を実施する。

(2) 検査に関する一般的注意

野兔病の主要な検査は、細菌学的検査、血清学的検査ならびに遺伝子学的検査である。現在、国内で入手可能な検査キットは研究用のみで、検査法や試薬などは普及していない。本マニュアルでは病原体の分離・同定法、抗野兔病菌抗体の検出および野兔病菌特異的遺伝子の検出法について記述する。検査に必要な試薬等については下記連絡先に問い合わせされたい。野兔病が疑われる検体の取り扱いは Biosafety Level (BSL) 2 内の安全キャビネット内で取り扱う。国立感染症研究所では、*F. tularensis* subsp. *tularensis* および *holarctica* は BSL3 病原体に分類されている。本菌が確認もしくは強く疑われる場合は BSL3 実験室で取り扱う。

1. 検査材料の採取

細菌学的検査および遺伝子学的検査には、脾臓や肝臓、リンパ節、原発病巣部などが対象となる。適切な抗菌薬投与後の生体や腐敗した試料からの菌分離は困難である。採材時は必ず手袋、マスク、ガウンを着用する。採材した検体は密閉容器に保存し、使用機材等は滅菌処理する。血清学的検査には急性期と回復期（発症 2 週目以降）のペア血清の採取が望ましい。単一血清の場合、2 種以上の検査法で抗体価を確認することが望ましい。

2. 検査材料の輸送

三重梱包し、社用車や公用車などの自動車、または臨床検体等の取扱いが可能な輸送業者を利用する。公共交通機関を利用する場合は、航空法や各公共交通機関の約款等ルールを遵守する。輸送業者を利用する場合は、検体の内容、梱包方法、運搬経路などをよく打ち合わせる。ゆうパックを利用の場合、包装責任者による確認などの追加要件が求められる。検体は可能であれば凍結を避け、速やかに冷蔵で搬送する。詳細は検査機関の担当者に確認されたい。

3. 検査の進め方

確定診断は野兔病菌分離であるが、バイオハザードや法律上の問題があるため注意が必要を要する。早急性や高感度性を要す場合は遺伝子学的検査が有効である。血清学的検査は、抗体価の上昇に時間を要するため、有症状動物の診断への適用価値は低い。疫学調査には有用である。

4. 検査の判定

1) 野兔病菌が分離同定された場合、確定診断となる。本菌は特定二種病原体であるため、その所持・保管は厚生労働省への届出が必要となる。分離菌の性状を精査したうえで菌種を判定することが望まれる。

- 2) 血清学的検査は標準法である微量凝集反応にて凝集像を認めた場合に陽性を疑う。確認試験として蛍光抗体法、野兔病菌の特異的抗原であるリポ多糖体を抗原とした ELISA 法やウエスタンブロット法を実施する。国立感染症研究所獣医科学部ではウエスタンブロット法においてプロテナーゼ K 処理した野兔病菌全菌体抗原に対して梯子状の反応像を呈した検体を抗野兔病菌抗体陽性と判定している。野兔病菌はブルセラ属菌やエルシニア属菌などとの交差反応が報告されているため、注意を要する。
- 3) 遺伝子学的検査は、迅速な検出、菌種判定の指標として有効であるが、他の *Francisella* 属菌、特に *F. tularensis* subsp. *novicida* でも増幅される。*Francisella* 属菌は多種の動物や環境中に存在するため、複数の PCR 系の遺伝子増幅の確認や、増幅された遺伝子のシーケンスの確認が必要となる。またコンタミネーションの可能性に注意する必要がある。

(3) 検査方法

1. 細菌学的検査

病変部からの野兔病菌分離を目的とする。分離にはグルコース、システインおよび鉄分を含む寒天培地が用いられる。Eugon 寒天培地は容易に調製できる有効な培地である。市販品としてはチョコレート II 寒天培地 (Becton, Dickinson and Company) などが有効である。雑菌の混入が懸念される場合、ペニシリンを添加し培養するが、野兔病菌の増殖も遅くなる。ペニシリンを 500 U/ml 程に調整し、シャーレに注ぐ。

1) 検体の採取および培養までの保存

検体は無菌的に採取し、直ちに培地に塗抹、培養が望ましい。野兔病菌は増殖が遅く、雑菌の混入により、増殖が著しく阻害する。採材後の即時の培養が困難な場合、検体を一時的に 4℃ に保存する。

2) Eugon(血液またはチョコレート) 寒天培地の作製

①試薬および器具

- ・ Eugon agar (Difco cat. No 258910)
- ・ 綿羊脱繊血
- ・ 蒸留水
- ・ オートクレーブ
- ・ 恒温槽
- ・ 三角コルベン
- ・ メスシリンダー
- ・ 計量天秤
- ・ ピペット
- ・ シャーレ

②作製方法 (シャーレ 10 枚分)

- ・ 三角フラスコ内にて蒸留水 200 ml に Eugon agar 9.08g を加温溶解させ、オートクレーブにて 121℃ 15 分間滅菌する。
- ・ 50℃程度まで冷却後、保温した綿羊脱繊血 16 ml を無菌的に混合し、緩やかに攪拌する。チョコレート寒天作製の場合、培地がチョコレート色を呈すまで 65℃程度に保温する。
- ・ ペニシリンを添加する場合、寒天を 50℃ほどに冷ましてから添加し、よく混合する。
- ・ シャーレに 20 ml ずつ入れ、固まるまで放置する。
- ・ 使用まで 4℃ に保存する。

3) 検体の接種および培養

①接種

臓器の場合、表面を消毒後、滅菌ハサミまたはメスで割を入れ、割面を直接培地に塗布、または生理食塩水にて 10%乳剤を作製し、静置後の乳剤上清を塗布する。穿刺液やぬぐい液、血液の場合は直接培地に塗布する。

②培養

33～37℃で好氣的に培養する。培地を容器に入れる場合はパッキンを緩めた状態で培養する。

* コロニーは通常培養 4 日以内で観察されるが、10 日目まで観察する事が望ましい。抗菌材を使用した場合は増殖が遅延する。CO₂濃度は本菌の増殖に関与しないとされている。

4) 判定

①コロニー性状

使用培地や菌株で異なる。多くの株は、白色から灰白色の 1 から 2mm 径 (図 2A) の露滴状、湿潤性、光沢があり、粘稠性を有すコロニーを形成する。疑わしいコロニーについては以下の検査を実施する。

②菌染色

グラム陰性であり、グラム染色にて薄いピンク色に観察される (図 2B) 。小桿菌だが場合により多形性を呈し、蒸留水への懸濁により球形となる。芽胞は形成せず、鞭毛は保有しない。

③生化学的試験

カタラーゼ弱陽性、オキシダーゼ陰性である。亜種間で糖分解能などが異なる (表 1) 。

④血清学的試験

スライド凝集反応が簡便である。スライドグラス上にて菌懸濁液と野兔病菌抗血清を混合し、凝集像を確認する。3 分以内に凝集した場合、野兔病菌を疑う。自家凝集する菌があるため、供試前に菌を PBS や生理食塩水などで洗浄する。また、対照として菌と生理食塩水との混合液の凝集性を確認する。

⑤免疫学的試験

抗野兔病菌抗体による蛍光抗体法が一般的である。蛍光標識抗体と蛍光顕微鏡を要すが、比較的短時間で結果が得られる。スタンプ標本からの菌体抗原の検出に有効である。

⑥遺伝子学的試験

PCR 法またはリアルタイム PCR 法にて野兔病菌特異遺伝子を検出する。日常的に野兔病菌扱う場所ではコソタミネーションに注意する。

2. 血清学的検査

血清診断は血清中の抗野兔病菌抗体価の有意な上昇を確認する。人では野兔病菌に対する抗体価は発症後 1～2 週間から上昇し、長期にわたり維持される。抗体価の測定は操作が簡便な凝集反応（試験管法または微量凝集反応法）が一般的であるが、溶血した血清や濁った検体を呈した場合、凝集が判定しにくい、非特異反応が出るなどの問題がある。他の検査法として、野兔病菌の特異的抗原であるリポ多糖体（LPS）を抗原とした ELISA 法やウェスタンブロット法がある。LPS の精製は操作が煩雑であり、一般的ではない。国立感染症研究所ではウェスタンブロット法の抗原として、通常の SDS-PAGE 用の全菌体可溶性抗原をプロテナーゼ K 処理し、LPS 抗原として代用している。本マニュアルでは凝集反応のうち感度が高く、少量の血清および抗原が試験可能な微量凝集反応について記載する。

1) 検体

急性期（発症直後）および回復期（発症 2 週目以降）のペア血清の同時測定が望ましい。ペア血清は少なくとも 1 週間以上間隔をあけて採血する。単一血清を用いる場合はスクリーニング目的で実施する。

2) 微量凝集反応法

①試薬および器具

- ・ホルマリン不活化菌液（②参照）
- ・生理食塩水
- ・0.5%ホルマリン加生理食塩水
- ・サフラニン溶液¹⁾
- ・U底 96 穴プレート²⁾
- ・インキュベーター
- ・プレート振盪機
- ・陽性（強および弱）³⁾ならびに陰性対照用血清
- ・マイクロチューブ、ピペット類

¹⁾ 国立感染症研究所では日水製薬株式会社「フェイバーG」を使用している。凝集像の目視確認を容易にするための菌の着色が目的であるため、1%Tetrazolium-blue や 0.1%クリスタルバイオレットも使用可である。

²⁾ 国立感染症研究所では IWAKI 3870-096、FALCON 351177、NuncloTM MPC treatment、WATSON 4846-96US の 4 種のプレートで適用性を確認している。

³⁾ 国立感染症研究所では、強陽性対照用血清を陰性対照用血清で 8 倍希釈して弱陽性対照用血清としている。

②ホルマリン不活化菌液の調整

- ・ 新鮮培養菌⁴⁾を0.5%ホルマリン加生理食塩水に懸濁し、37℃に一晩保温する。
 - ・ 菌の不活化を確認する。⁵⁾
 - ・ 低速遠心(1,500 rpm, 5分)後の上清中の菌体を遠心分離(3,500 rpm, 20分)し、生理食塩水にて2回洗浄する。
 - ・ 調製した菌が自家凝集しない事をアクリフラビン反応⁶⁾にて確認する。
 - ・ 0.5%ホルマリン加生理食塩水に再浮遊させ、4℃に保存する。
 - ・ 生理食塩水にてOD560値を1.0⁷⁾に調整する。
 - ・ 菌液にサフラニン溶液を加え、最終濃度0.005%にする。
- 4) 自家凝集しない菌株を使用する。国立感染症研究所では Eugon チョコレート寒天培地で3日培養した *F. tularensis* subsp. *holarctica* Yama 株を使用している。
- 5) 菌の不活化は菌液の一部を5,000 rpm, 10分遠心後、再浮遊した沈殿を10日培養し、コロニー形成が無いことを確認する。
- 6) 0.1%アクリフラビン水溶液と菌液を1滴ずつ混和し、3分後に凝集しないことを確認する。
- 7) 抗原液を薄くすると高倍希釈血清と凝集を呈すが、目視の判定が困難となる。また偽陽性が生じることがある。

③反応手順

- ・ 血清を56℃30分間にて非働化处理する。
- ・ U底96穴プレート上に、陽性(強および弱)ならびに陰性対照血清とともに被験血清を2列ずつ生理食塩水にて5から640倍まで2倍段階で希釈する。血清希釈液は1ウェルあたり25 µlとする。
- ・ 抗原液を25 µlずつ分注し、血清と混合する。
- ・ プレートを20秒程振盪し、反応液を混和する。
- ・ プレートをビニールフィルム等で包み、乾燥しないよう、37℃にて16時間以上感作させる。

④判定

- ・ 菌体が沈殿したものを陰性像、分散したものを陽性像とする。トレース台上で観察すると判定しやすい。(図3)
 - ・ 凝集力価は、陽性凝集像を示す血清の最高希釈倍数で表す。(血清と抗原液を等量混合するため、最終希釈は10倍から1,280倍となる)
 - ・ 陽性対照の強と弱の凝集力価に8倍の差があることを確認する。
 - ・ 回復期血清の凝集価が急性期血清の凝集価から4倍以上上昇した場合を陽性とする。単一血清では、凝集像の確認とともに、他の検査法における反応を確認する。
- * ブルセラ属菌などと交差反応するため、必要に応じてブルセラ属菌に対する抗体価測定を行う(検査マ

ニュアル「ブルセラ症」参照)

3. 遺伝子学的検査

野兔病菌遺伝子の検出は迅速な病原体検出法、分離菌の同定の指標として有用である。本マニュアルでは野兔病菌の16S リボソームRNA 遺伝子 (16S rRNA) および2種の外膜蛋白質遺伝子 (*fopA* および *tul4*) を標的としたPCR法、ならびに*fopA*を標的としたTaqMan プローブによるリアルタイムPCR法について記載する。リアルタイムPCR法はPCR法と比較して、高感度で、短時間に結果が得られる。機器や試薬の維持費が高額となるため、野兔病の発生例が極めて稀である日本国内の検査法としては現実的ではないが、野兔病菌によるバイオテロ対策には有効なツールとなる。しかしPCR法では野兔病菌と*F. tularensis* subsp. *novicida*の判別はできない。遺伝子の増幅が確認された場合、さらに菌の亜種や由来地域を推定するため、IS*Ftu2*領域やRD1領域などをPCRで増幅し、対照菌株と比較解析する。いずれの遺伝子の増幅も認められなかった場合、野兔病以外の検査を検討する。単一菌種として分離されていれば、細菌の16S rRNA universal primerによる塩基配列解読により、菌の属名が推定可能である(14)。詳細は国立感染症研究所獣医科学部に問い合わせされたい。

(1) PCR法

1) 必要な試薬・器具・機材

- DNA抽出キット; SepaGene (エーディア)、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)、illustra bacteria genomicPrep Mini Spin Kit (Cytiva)など
- DEPC-H₂O
- TE buffer (pH 8.0) (10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA)
- 増幅用プライマーセット

標的遺伝子 (バンドサイズ)	プライマー名 配列	参照
16S rRNA (1,142bp)	F5 5'-CCTTTTTgAgTTTCgCTCC-3'	15
	F11 5'-TACCAgTTggAAACgACTgT-3'	
<i>fopA</i> (707bp)	MS1 5'-CAgCTACTACACAAAgCAgTgg-3'	16
	MAI 5'-CACCATTTACTgTATAgCACgC-3'	
<i>tul4</i> (407bp)	TUL4-435 5'-gCTgTATCATCATTTAATAAACTgCTg-3'	17
	TUL4-863 5'-TTgggAAgCTTgTATCATggCACT-3'	

- PCRキット (TOYOBO Blend Taq #BTQ-101 など)
- サーマルサイクラー
- エチジウムブロマイド

- ・ アガロース
- ・ TAE buffer
- ・ 電気泳動装置
- ・ UV トランスイルミネーター
- ・ 撮影装置
- ・ その他ピペット、チップ、チューブ類

2) DNA の抽出

- ・ 血液や生検材料や、分離培養した菌コロニーから市販の DNA 抽出キット等を用いてプロトコールに従い抽出精製し、TE buffer (pH 8.0) に溶解する。
- ・ 菌コロニーの場合は、マイクロチューブ (スクリューキャップ付) に入れた 0.1 ml の TE buffer に菌を浮遊させ 95°C 10 分間加熱後の遠心上清が供試可能である。

3) PCR 反応

① 反応溶液組成

Blend Taq [®] (2.5 unit/ μ l)	0.25 μ l
10x Buffer (BTQ-1B)	2.5 μ l
2 mM dNTPs (NTP-201)	2.5 μ l
Sense Primer (10 μ M)	1 μ l
Antisense Primer (10 μ M)	1 μ l
Sample DNA	2 μ l
DEPC-H ₂ O	15.75 μ l
総量	25 μ l

② 反応条件

94°C 5 min

94°C 30 sec	} 35 cycles
58°C 30 sec	
72°C 30 sec	

72°C 7 min

4°C ∞

③ 操作手順

- ・ PCR 用反応マイクロチューブに①の組成の反応溶液を加える。
- ・ サーマルサイクラーにマイクロチューブをセットし、②の条件で反応させる。
- ・ PCR サンプルの 5 µl を 1.3%アガロースゲル (1x TAE buffer) で電気泳動する。
- ・ エチジウムブロマイドなどで染色する。
- ・ バンドを UV トランスイルミネーターにて観察する。

④ 増幅産物の確認 (図 4)

- ・ 16S rRNA : 全ての *Francisella* 属菌で 1,142 bp の遺伝子断片が増幅される。
- ・ *fopA* : *F. tularensis* で 707 bp の遺伝子断片が増幅され、*F. phiromiragia* では増幅されない。
- ・ *tul4* : *F. tularensis* で 407 bp の遺伝子断片が増幅され、*F. phiromiragia* では増幅されない。

(2) リアルタイム PCR 法

1) 必要な試薬・器具・機材

- ・ DNA 抽出キット ; SepaGene (エーディア)、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)、illustra bacteria genomicPrep Mini Spin Kit (Cytiva) など
- ・ DEPC-H₂O
- ・ TE buffer (pH 8.0) (10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA)
- ・ 増幅用プライマー・プローブセット

標的遺伝子	プライマー名 配列	参照
<i>fopA</i> *	FopA F 5'-ATCTAgCAggTCAAgCAACAggT-3'	18
	FopA R 5'-gTCAACACTTgCTTgAACATTTCTAgATA-3'	
	FopA P 5'-FAM-CAAACCTTAAgACCACCACCCACATCCCAA-TAMRA-3'	

* Amplicon size (bp): 87

- ・ LightCycler[®] 480 System II (Roche)
- ・ LightCycler[®] 480 用プローブマスター (Roche # 04 707 494 001)
- ・ LightCycler[®] 480 マルチウエルプレート 96 ホワイト (Roche # 04 729 692 001) または PCR-96-

LC480-W-NF (AXYGEN #363)

- LightCycler[®] 480 シーリングホイール (Roche # 04 729 757 001)
- その他ピペット、チップ、チューブ類

2) DNA の抽出

- 前述参照 (P. 12)

3) リアルタイム PCR 反応

① 反応溶液組成

Probes Master (2x conc.)	10 µl
Sense Primer (10 µM)	1 µl
Antisense Primer (10 µM)	1 µl
TaqMan Probe (2 µM)	2 µl
Sample DNA	2 µl
DEPC-H ₂ O	4 µl
<hr/>	
総量	20 µl

② 反応条件

95°C 10 min

95°C 10 sec } 45 cycles
62°C 20 sec }

40°C 30 sec

③ 操作手順

- リアルタイム PCR 用反応マルチウエルプレートに①の組成の反応溶液を加える。
- マルチウエルプレート上面にシーリングホイールを装着する。
- LightCycler[®] 480 System II にマルチウエルプレートをセットし、②の条件で反応させる。

④ 増幅反応の確認

- *F. tularensis* の遺伝子増幅が検出される。

(4) 参考文献

概説

1. Ellis J, Oyston PCF, Green M and Titball RW (2002) Tularemia. Clin. Microbiol. Rev. 15:631-646.
2. 藤田博己 (2002) 野兔病菌. 「細菌学」竹田美文、林英夫編 : 245-250 朝倉書店.
3. 大原義朗 (2003) 野兔病. 「動物由来感染症その診断と対策」神山恒夫、山田章雄編 : 209-213 真興交易.
4. Petersen JM and Molins CR (2010) Subpopulations of *Francisella tularensis* ssp. *tularensis* and *holarctica*: identification and associated epidemiology. Future Microbiol. 5:649-661.
5. WHO Guidelines on Tularemia (WHO 2007)
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43793/9789241547376_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
6. 棚林清 (2004) 野兔病. 「感染症の事典」国立感染症研究所 学友会編 : 249-250 朝倉書店.
7. Eden JS, Rose K, Ng J, Shi M, Wang, Q, Sintchenko V, Holmes EC, *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* in ringtail possums, Australia. Emerg. Infect. Dis. 2017, 23, 1198-1201.

細菌学的検査

8. 佐藤 侑、藤田博己、渡辺百合子、大原義朗、本間守男 (1992) 大原研究所における野兔病の検査法. 大原年報 35: 1-10.
9. Chu MC and Weyant RS (2003) *Francisella* and *Brucella*. "Manual of Clinical Microbiology" 8th ed, Murray PR Ed.: pp. 789-808. ASM Press, Washington D. C.
10. 大原誉一郎、桜井信夫 (1987) 野兔病菌. 「微生物検査必携、細菌・真菌検査第3版」I 各論 6. 人畜共通感染症 : pp. I 28-I 39 日本公衆衛生協会.
11. Sjöstedt AB. *Francisella*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (Eds), Springer-Verlag, New York 2005. Vol 2, p.200.

血清学的検査

12. Sato T, Fujita H, Ohara Y and Homma M (1990) Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of tularemia. J. Clin. Microbiol. 28:2372-2374.

13. Sharma N, Hotta A, Yamamoto Y, Fujita O, Uda A, Morikawa S, Yamada A and Tanabayashi K (2013) Detection of *Francisella tularensis*-specific antibodies in patients with tularemia by a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Vaccine Immunol.* 20:9-16.

遺伝子学的検査

14. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, and Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.
15. Forsman M, Sandström G and Sjöstedt A (1994) Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella tularensis* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:38-46.
16. Higgins JA, Hubalek Z, Halouzka J, Elkins KL, Sjöstedt A, Shipley M and Ibrahim S (2000) Detection of *Francisella tularensis* in infected mammals and vectors using a probe-based polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62:310-318.
17. Sjöstedt A, Eriksson U, Berglund L and Tärnvik A (1997) Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 35:1045-1048.
18. Versage JL, Severin DD, Chu MC and Petersen JM (2003) Development of a multitarget real-time PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. *J. Clin. Microbiol.* 41:5492-5499.

(5) 連絡先

国立感染症研究所 獣医科学部

前田 健

電話 : 03-5285-1111 (内線 2601)

ファックス : 03-5285-1179

(6) 執筆者一覧

堀田明豊 : 国立感染症研究所 獣医科学部

藤田 修 : 国立感染症研究所 獣医科学部

(7) 参考図表

表1 : *Francisella* 属菌の性状

	<i>tularensis</i>				<i>hispaniensis</i> *	<i>philomiragia</i>
	subsp. <i>tularensis</i>	subsp. <i>holarctica</i>	subsp. <i>mediasiatica</i>	subsp. <i>novicida</i>		
大きさ(μm)	<0.5	<0.5	<0.5	<1.5	NA	<1.5
システイン要求性	+	+	+	-	-	-
マッコンキー培地における増殖性	-	-	-	v	-	v
オキシダーゼ試験	-	-	-	-	+	+
カタラーゼ試験	W	W	W	W	W	W
糖分解能						
マルトース	+	+	-	V	-	+
サクロース	-	-	V	+	+	+
グルコース	+	+	-	+	+	V
グリセロール	+	-	+	V	+	V
家兎に対する病原性	強	弱	弱	弱	NA	NA
16S rRNA相同性 (%)	≥99.8	≥99.8	≥99.8	≥99.8	NA	≥99.3

*: 標準株 (Fhsp1) の性状を示す。

NA: Not available、W: 弱陽性、V: 株により異なる。

参考文献11より改変

表2 : 野兎病の臨床型

リンパ節腫脹を伴うもの

- ・潰瘍リンパ節型 : 感染部位の潰瘍壊死、所属リンパ節の腫脹化膿潰瘍
- ・リンパ節型 : 潰瘍を欠き、所属リンパ節の腫脹のみ
- ・扁桃リンパ節型 : 口腔及び扁桃の潰瘍、下顎頸部リンパ節の腫脹
- ・眼リンパ節型 : 羞明、流涙、眼瞼浮腫、小潰瘍を伴う結膜炎
- ・鼻リンパ節型 : 鼻ジフテリア様痂皮、下顎頸部リンパ節の腫脹

リンパ節腫脹を伴わないもの

- ・チフス型 : 悪寒、戦慄を伴う発熱、頭痛、髄膜刺激症状
- ・肺炎型 : 発熱、咳、胸痛、肺炎症状
- ・胃型 : 急性腹症

参考文献3より改変

図 1a : 海外の野兎病の発生状況 (参考文献 5 より)

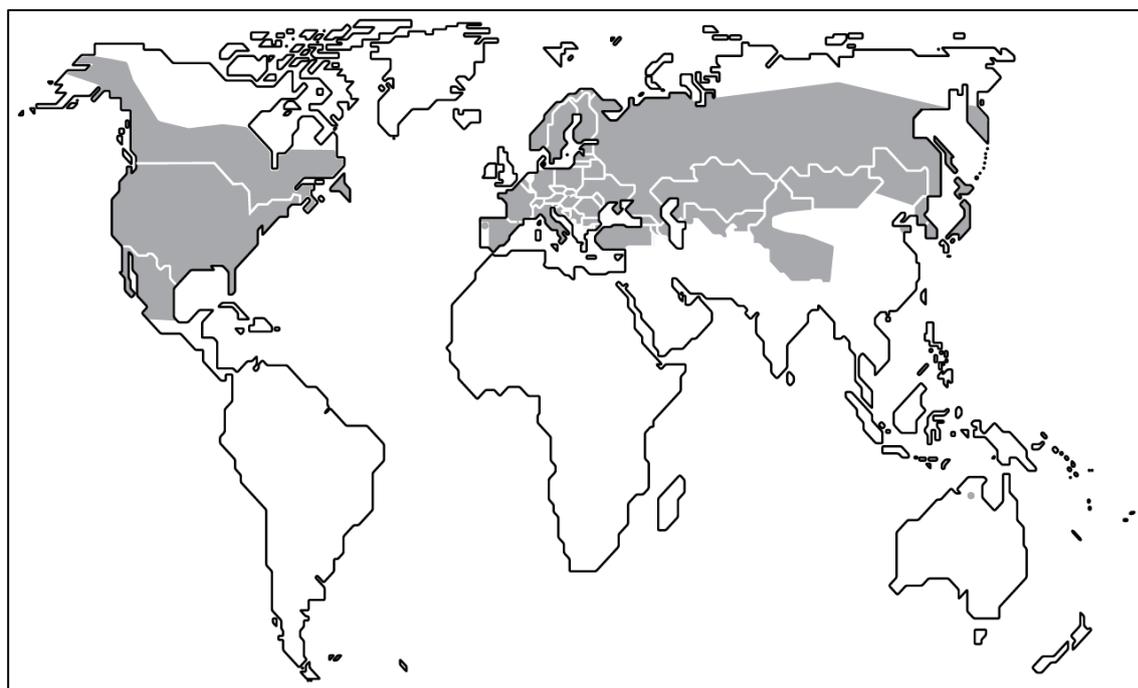


図 1b : 日本での発生状況 (参考文献 3 より改変)

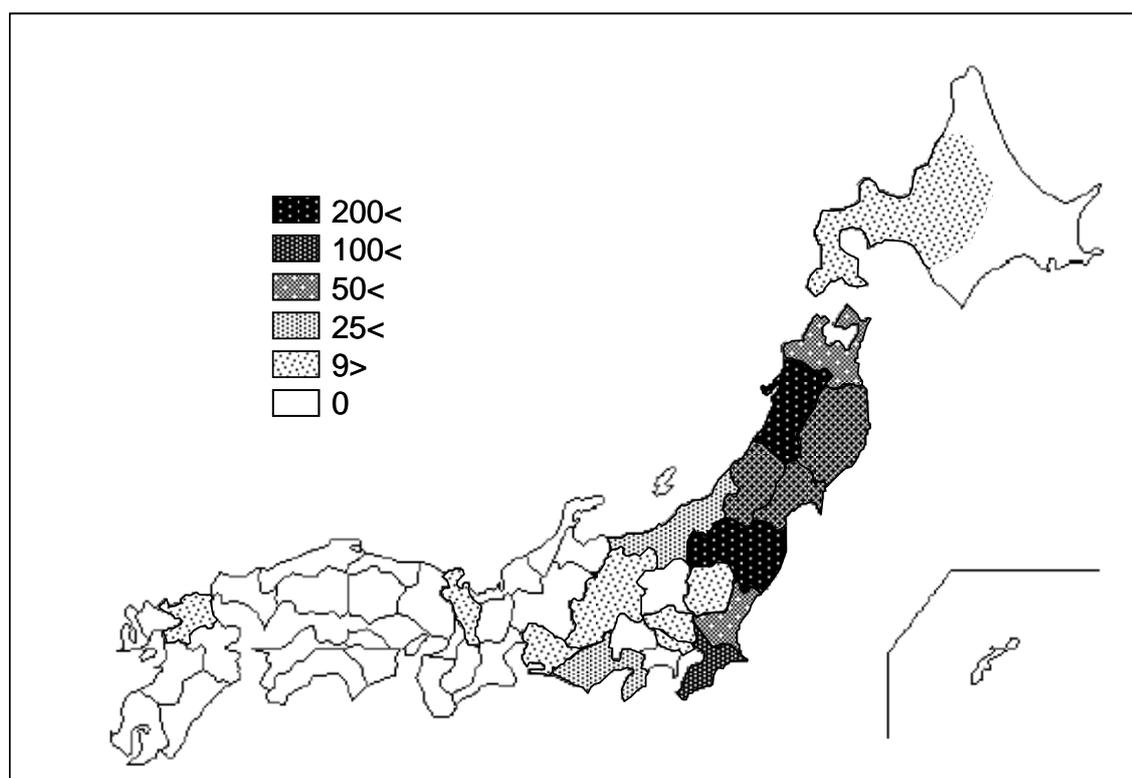


図2：培地上のコロニーとグラム染色像

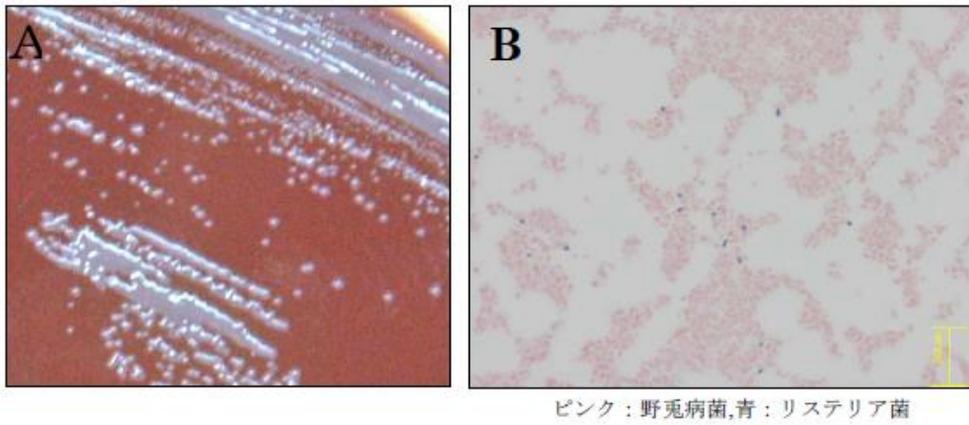


図3：微量凝集反応像

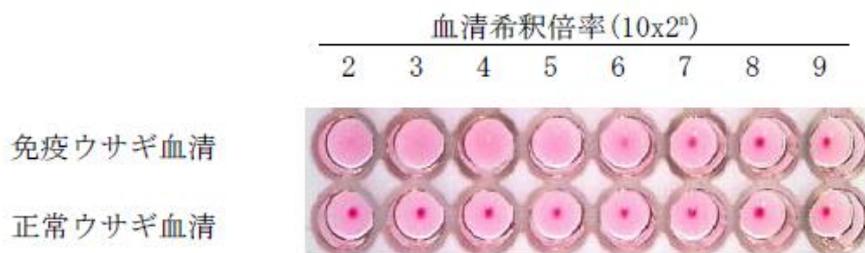
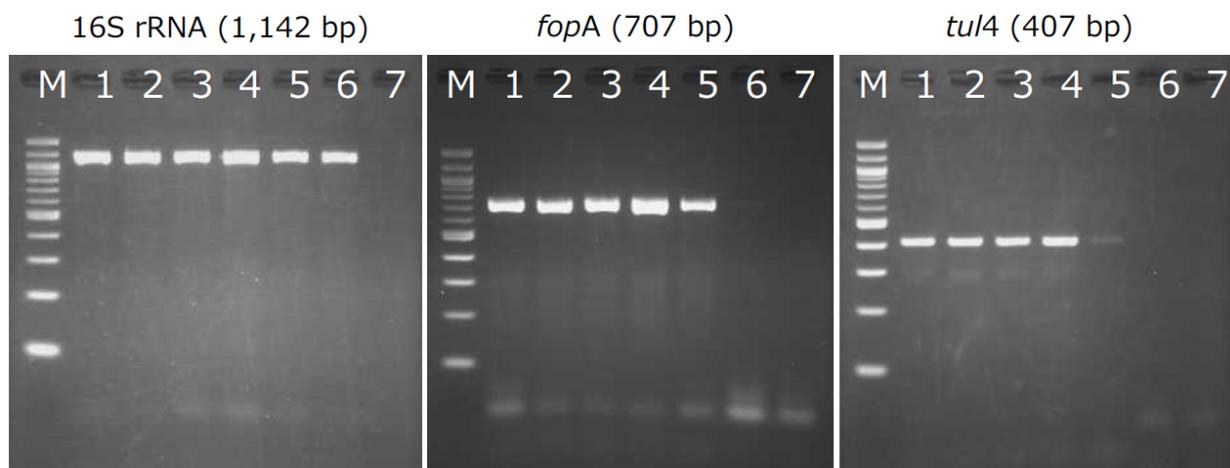


図4 : PCR 増幅産物の泳動像



M: サイズマーカー

- 1: *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* (Schu株)
- 2: *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* (LVS株)
- 3: *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* (NVF1株:日本分離)
- 4: *Francisella tularensis* subsp. *novicida* (U112株)
- 5: *Francisella hispaniensis* (KUMA-UJP1株)
- 6: *Francisella philomiragia* (ATCC 25015株)
- 7: DW

F. hispaniensis は上記3領域のPCR反応全てで増幅するため、鑑別が必要となる。

レプトスピラ症ガイドンス

目次

1. 感染症の概説 人と動物での症状
 - 1- i 病原体の性状
 - 1- ii 疫学（人と動物）

2. 検体の取り扱い
 - 2- i 検体取り扱い上の注意（バイオセーフティ）
 - 2- ii 各種動物からの検体採取法
 - 2- iii 検体の輸送法
 - 2- iv 検体の保存法

3. 検査法各論
 - 3- i 検査法
 - 3- ii 各種動物の検査法

4. 参考文献

5. 連絡先

1. 感染症の概説 人と動物での症状

1- i. 病原体の性状

レプトスピラ症の起因病原体は、細菌（スピロヘータ）のレプトスピラである。レプトスピラは 64 種からなり、環境から分離され、人や動物への感染性のない種からなる Saprophytes クレードと、人や動物から分離され病原性のある種（環境から分離され病原性が明らかになっていない種も含む）からなる Pathogens クレードの 2 つに大別され、各クレードはさらに 2 つのサブクレード S1, S2 および P1（以前の Pathogens グループ）、P2（以前の Intermediates グループ）からなる¹。またレプトスピラは、凝集素交差吸収試験に基づいた免疫学的性状により 300 以上の血清型（serovar）に分類され、抗原性の似た血清型は血清群（serogroup）としてグループ化され、少なくとも 29 の血清群が報告されている²。

レプトスピラは BSL2 の病原体であり、本菌を扱う場合には標準的微生物取扱安全対策が必要である。

1- ii. 疫学（人と動物）

レプトスピラは、維持宿主（maintenance host）の腎尿細管に定着し、尿とともに環境中に排出される。ネズミなどの野生動物が維持宿主であるが、特定の血清型のレプトスピラが特定の宿主に定着する宿主特異性が報告されている。

人や犬、牛、豚などの動物は、維持宿主の尿との接触あるいは尿で汚染された淡水や土壌との接触によって、経皮的あるいは経粘膜的にレプトスピラに感染して発症する。一方で犬や牛、豚は特定のレプトスピラ血清型の維持宿主にもなる。

人の疫学

2003 年 11 月の感染症法改正により、レプトスピラ症は全数把握の 4 類感染症となり、各年 16～76 例が報告されている。本症の発生は全国的に報告されているが、報告例の半数以上は沖縄県で感染した事例となっている。その他、東京都や宮崎県、鹿児島県での発生が多い。レプトスピラへの感染は維持宿主の尿で汚染された環境で起きることから、河川でのレジャーや労働、農作業、台風や季節的な大雨による洪水などの水害、ネズミ咬傷やネズミなどの動物尿で汚染された河川以外の環境での労働作業が、感染原因として報告されている。レプトスピラ症は急性熱性疾患であり、インフルエンザ様症状のみで軽快する軽症型から、黄疸、出血、腎不全を伴う重症型まで多彩な症状を示す。レプトスピラの潜伏期は 5～14 日で、その後 38～40℃の発熱を呈し、悪寒、頭痛、筋痛、腹痛、結膜充血などの初期症状をもって発病する。重症型の場合は第 2 病週に黄疸、出血、腎不全が出現、増強する。

動物の疫学

家畜伝染病予防法では、7 つの血清型（Australis, Autumnalis, Canicola, Grippotyphosa, Hardjo,

Icterohaemorrhagiae, Pomona) によるレプトスピラ症が、牛、水牛、鹿、豚、いのしし、犬で届出対象（届出伝染病）となっている。犬では各年 22～52 例，牛では平成 26 年と令和 2 年に各 1 例，豚では平成 29 年に 2 例，令和 4 年に 2 例の報告がある（最近 10 年間の発生事例）。しかしながら，届出対象となっていない血清型（血清群）による犬のレプトスピラ症が多く発生しており，また検査した牛の腎臓や豚の早死産胎子の 30%以上からレプトスピラ DNA が検出されるなど，実態は過小評価されていると考えられている³⁻⁵。犬のレプトスピラ症では，発熱，倦怠感，食欲不振，嘔吐，脱水などの初期症状の後に，腎不全や肝不全が発展する亜急性型が多いとされているが，臨床症状を示すことなく急速に死亡する例もある。牛の急性感染では，発熱，溶血性貧血，血色素尿，黄疸などの症状があらわれる。妊娠牛が感染した場合は流産，乳牛の場合は乳量の低下や無乳がみられることがある。牛は血清型 Hardjo（遺伝子型 Hardjobovis および Hardjoprajitno）の維持宿主であるが，Hardjobovis の持続感染は不妊や流産などの繁殖障害を引き起こすことがある。豚では，出血や黄疸，腎不全がみられ，妊娠中の感染では流産や死産が起こることがある。野生動物では，ドブネズミやアカネズミなどのネズミ類やイノシシやアライグマなどからレプトスピラが検出されている⁶。また沖縄県では，ノネコからもレプトスピラが検出されている⁷。

2. 検体の取り扱い

2-i. 検体取り扱い上の注意（バイオセーフティ）

レプトスピラ症急性期の動物および維持宿主（保菌動物）の臨床検体中にはレプトスピラが存在するため，経皮感染，特に傷口からの感染，あるいはスプラッシュによる眼からの感染の危険性があることを認識し，作業を行うことが重要である。

2-ii. 各種動物からの検体採取法

レプトスピラ症の実験室診断に用いる検査法と必要な検体は以下の表の通りである。抗菌薬投与前の発熱期の血液は培養および DNA 検出の検体となるが，保菌動物の検査の場合は尿や腎臓，またウシではこれらに加えて膣や子宮，卵管，卵巣などの生殖器が検体となる。抗体検出によるレプトスピラ症確定診断のためには，発症直後の血清と発症後 10 日から 2 週間程度の血清（ペア血清）を用いる必要がある。

検査法	検体
培養	血液，尿，組織
DNA 検出	血液，尿，組織
抗体検出	血清

2-iii. 検体の輸送法

検体は基本三重梱包で輸送する。検体を密閉性の一次容器に入れ、緩衝材および吸収剤とともに密閉性の二次容器に入れる。これを非密閉性の三次容器に入れて輸送する。

2-iv. 検体の保存法

培養は、検体を採取後速やかに培地に接種することが重要である。採材後ただちに培地に接種できない場合は、血液はヘパリン採血し常温で、組織は冷蔵で検査可能な機関に送付する。DNA 検出および抗体検出のための検体は採材後ただちに凍結する。

3. 検査法

3-i. 検査法

急性感染の動物の検査は、培養、DNA 検出、抗体検出によって行われる。レプトスピラの分離、レプトスピラ DNA の検出、ペア血清を用いた顕微鏡下凝集試験 (Microscopic Agglutination Test) で抗体陽転あるいは4倍以上の抗体価上昇の場合に確定診断となる。保菌動物の検査は培養およびDNA 検出により行われ、レプトスピラの分離あるいはレプトスピラ DNA の検出により確定診断となる。

3-ii. 各種動物の検査法

動物種により検査法が異なることはない。上述の通り、急性感染動物および保菌動物によって実施する検査法が異なる。

3-ii-(1). 急性感染動物の検査法

3-ii-(1)-a. 培養法

準備するもの

- 10×コルトフ基礎培地 (−CaCl₂) : 以下の試薬を蒸留水に溶解し、1L に調整する。pH7.2 ~7.4 に調整後、オートクレーブで 121°C、20 分間滅菌する。

ペプトン (Peptone 140)	8.0 g
NaCl	14.0 g
NaHCO ₃	0.2 g
KCl	0.4 g
CaCl ₂	0.4 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g
Na ₂ HPO ₄	8.8 g

2. 0.4 g/mL CaCl₂ 溶液：40 g の CaCl₂ を蒸留水 100 mL に溶解し、フィルター滅菌する。
3. 10×コルトフ基礎培地：滅菌済み 10×コルトフ基礎培地（-CaCl₂）1 L に 0.4 g/mL CaCl₂ 溶液 1 mL を無菌的に加える。
4. ウサギ血清：56°C で 30 分間非働化を行う。未滅菌の場合はフィルター滅菌する。
5. コルトフ培地^{注)}：以下の試薬を無菌的に混合する。

10×コルトフ基礎培地	100 mL
滅菌非働化ウサギ血清	100 mL
滅菌蒸留水	800 mL

6. EMJH 培地ストック溶液：以下の各試薬を蒸留水 100 mL に溶解する。FeSO₄ 溶液は用事調製する。

① NH ₄ Cl	25.0 g
② ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.4 g
③ MgCl ₂ · 6H ₂ O	1.5g
④ CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.5 g
⑤ FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g（用事調製）
⑥ ピルビン酸ナトリウム	10.0 g
⑦ グリセロール	10.0 g
⑧ Tween 80	10.0 g
⑨ チアミン塩酸塩	0.5 g
⑩ シアノコバラミン	0.02 g

7. EMJH 培地アルブミン溶液：ウシ血清アルブミン（Probumin）10 g を 60 mL の蒸留水に溶解し、以下のストック溶液を加える。pH 7.4 に調整後、100 mL に調整する。

ウシ血清アルブミン（Probumin）	10 g（蒸留水 60 mL に溶解）
ストック溶液②	1 mL
ストック溶液③	1 mL
ストック溶液④	1 mL
ストック溶液⑤	10 mL
ストック溶液⑧	12.5 mL
ストック溶液⑩	1 mL

8. EMJH 基礎培地：以下の試薬を混合，溶解し，pH 7.4 に調整する.

NaCl	1.0 g
Na ₂ HPO ₄ (無水)	1.0 g
KH ₂ PO ₄	0.3 g
ストック溶液①	1 mL
ストック溶液⑥	1 mL
ストック溶液⑦	1 mL
ストック溶液⑨	1 mL
蒸留水	896 mL

9. EMJH 培地^{注)}：アルブミン溶液 100 mL と基礎培地 900 mL を混合し，フィルター滅菌する.
10. フィルター滅菌装置
 11. 培養チューブ
 12. ピペット
 13. 検査用プレート・沈査用プレート
 14. 暗視野顕微鏡

注) コルトフ培地はデンカ生研，EMJH 培地はベクトン・ディッキンソンより市販されている. その他，EMJH 培地では培養が困難なレプトスピラのための T80/T40/LH 培地や HAN 培地がある^{9,10}.

プロトコール

1. 血液培養：抗菌薬投与前の発熱期の血液 1, 2 滴を 5 mL のコルトフ培地あるいは EMJH 培地に接種する.
2. 尿培養：発熱期に加え第 2 病週の尿 1 滴を 5 mL の培地に接種する. 尿培養の場合，他の細菌の混入を避けるために 100 µg/mL の 5-フルオロウラシルや抗菌薬カクテルを加える場合もある⁸.
3. 培養は 30°C で行い，1 週間ごとに暗視野顕微鏡で培養上清の観察を行う. 1 週間ごとに新鮮な培地に植え継ぐことで，分離率は上昇する場合がある. 培養は 3 ヶ月間行う. レプトスピラは暗視野顕微鏡下で，回転運動をするひも状・螺旋型の菌体として観察される. レプトスピラと考えられる菌体が観察された場合は，レプトスピラ特異的遺伝子の検出（および塩基配列決定）や血清学的方法により同定する.

3-ii -(1)-b. DNA 検出 (*flaB*-nested PCR)

準備するもの

1. DNA 抽出キット
2. PCR 試薬
3. PCR チューブ
4. プライマー：以下の nested PCR プライマーを合成する.

PCR	プライマー	配列 (5' - 3')	増幅サイズ
1st	L- <i>flaB</i> F1	CTC ACC GTT CTC TAA AGT TCA AC	791 bp
	L- <i>flaB</i> R1	TGA ATT CGG TTT CAT ATT TGC C	
2nd	L- <i>flaB</i> F2	TGT GGA CAA GAC GAT GAA AGC	732 bp
	L- <i>flaB</i> R2	AAC ATT GCC GTA CCA CTC TG	

5. サーマルサイクラー
6. アガロース電気泳動槽
7. 1%アガロースゲル
8. アガロース電気泳動バッファー
9. マイクロピペット
10. チップ
11. ローディングバッファー

プロトコール

1. キットに記載された方法により臨床検体から DNA を抽出する.
2. 1st PCR の反応液を調製する. 下記は *TaKaRa Ex Taq Hot Start Version* を用いた場合の反応液の組成である.

10×PCR バッファー (+MgCl ₂)	5.0 μL
dNTP 混合液 (各 2.5 mM)	4.0 μL
20 μM F1 プライマー	0.5 μL
20 μM R1 プライマー	0.5 μL
<i>TaKaRa Ex Taq Hot Start Version</i>	0.25 μL
滅菌蒸留水	34.75 μL

3. 抽出 DNA および陽性コントロール, 陰性コントロールを 5 μL 加え, 以下の反応を行う.

95°C	60 秒	} 25 サイクル
98°C	10 秒	
50°C	30 秒	
72°C	60 秒	
10°C		

4. 2nd PCR の反応液を調製する。下記は *TaKaRa Ex Taq* Hot Start Version を用いた場合の反応液の組成である。

10×PCR バッファー (+MgCl ₂)	2.0 μL
dNTP 混合液 (各 2.5 mM)	1.6 μL
20 μM F2 プライマー	0.2 μL
20 μM R2 プライマー	0.2 μL
<i>TaKaRa Ex Taq</i> Hot Start Version	0.1 μL
滅菌蒸留水	14.9 μL

5. 1st PCR 産物を 1 μL 加え、以下の反応を行う。

95°C	60 秒	} 30 サイクル
98°C	10 秒	
55°C	30 秒	
72°C	50 秒	
72°C	7 分	
10°C		

6. PCR サンプルを 5 μL 分取し、アガロース電気泳動にて DNA の増幅を確認する。

3- ii -(1)-c. 抗体検出（顕微鏡下凝集試験：MAT）

準備するもの

1. EMJH 培地
2. レプトスピラ供試菌：継代培養しているものを新しい培地に 1/10～1/20 植え継ぎ、30°C で 4～7 日間培養したもの（1～2×10⁸ 細胞/ml）を用いる。これまで国内では以下の血清型・血清群が報告されている。MAT は血清群特異的な抗体を検出する方法であるため、これらに記載されている血清群を使うことが望ましい。

血清群	血清型	分布
Australis	Australis	本州, 四国, 九州, 沖縄
Autumnalis	Autumnalis	全国
	Rachmati	沖縄
Ballum	未同定*	沖縄
Bataviae	Bataviae	本州
Canicola	Canicola	全国
Cynopteri	未同定*	北海道
Grippotyphosa	Grippotyphosa	沖縄
Hebdomadis	Hebdomadis	全国
	Kremastos	本州
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	本州, 四国, 九州
	Icterohaemorrhagiae	全国
Javanica	Javanica	沖縄
	未同定	北海道
Pomona	未同定*	本州
Pyrogenes	Pyrogenes	沖縄
Sejroe	未同定*	北海道

*MAT には血清型 Castellonis, Cynopteri, Pomona, Sejroe の株を用いる

3. U底 96 ウエルマイクロプレート
4. PBS
5. マイクロチューブ
6. マイクロピペット
7. チップ
8. 検査用プレート・沈査用プレート
9. プレートミキサー
10. 暗視野顕微鏡

プロトコール

1. 被検血清を非働化 (56°C, 30 分間) する.
2. 被検血清を PBS で 25 倍に希釈する. 対照には PBS を用いる.
3. 96 穴 U 底マイクロプレートの各穴に PBS あるいは希釈血清を 25 μ L ずつ入れる.
4. レプトスピラ培養液 25 μ L を PBS あるいは希釈血清を含む各穴に加える.
5. プレートミキサーで混合する.
6. 30°C で 2.5 時間反応後, 各穴の上清 5 μ L を検査用プレートに分取し, 暗視野顕微鏡 (倍

率 100 倍) で観察する。対照と比較して、凝集していないフリーの菌数が 50%以下になっている場合を陽性とする。

7. 陽性となったレプトスピラについては、血清を 25 倍から 2 階段希釈し、上記方法でエンドポイントを決定する。
8. ペア血清を用いて 4 倍以上の抗体価の上昇が認められた場合を陽性とする。単一血清の場合、イヌではワクチン未接種あるいはワクチンに含まれていない血清群に対して 800 倍以上の抗体価を陽性とするが、感染初期では抗体価が十分に上昇していない場合があることがあるため、ペア血清を用いて行うことが重要である。

3- ii -(2). 保菌動物の検査法

3- ii -(2)-a. 培養法

準備するもの

1. コルトフ培地
2. EMJH 培地
3. 培養チューブ
4. ピペット
5. メス
6. ピンセット
7. 乳棒
8. 乳鉢
9. 2.5 mL ディスポーザブルシリンジ
10. スライドグラス
11. カバーグラス
12. 暗視野顕微鏡

プロトコール

1. 尿培養：発熱期に加え第 2 病週の尿 1 滴を 5 mL の培地に接種する。尿培養の場合、他の細菌の混入を避けるために 100 µg/mL の 5-フルオロウラシルや抗菌薬カクテルを加える場合もある⁸。
2. 組織培養：腎臓、ウシでは腎臓および生殖器
 - 2-1. 摘出した組織から 5 ミリ角程度を切り出す。
 - 2-2. 乳鉢に切り出した組織と少量の培地を加えて乳棒を用いて磨砕する。磨砕液を 5 mL の培地に接種する。あるいは 5 ミリ角程度の組織を 2.5 mL シリンジ（注射針なし）の内筒を抜いた外筒の中に投入し、内筒を装着して培地へ押し出す。
 - 2-3. 組織を接種した培地は 30°C で一晩静置し、翌日培養上清 0.5 mL を新しい培地 5 mL

に植え継ぎ，30°Cで培養を続ける。

- 2-4. 1週間ごとに暗視野顕微鏡で培養上清の観察を行う。1週間ごとに新鮮な培地に植え継ぐことで，分離率は上昇する場合がある。培養は3ヶ月間行う。レプトスピラは暗視野顕微鏡下で，回転運動をするひも状・螺旋型の菌体として観察される。レプトスピラと考えられる菌体が観察された場合は，レプトスピラ特異的遺伝子の検出（および塩基配列決定）や血清学的方法により同定する。

3- ii -(2)-b. DNA 検出

準備するもの

3- ii -(1)-b の通り

プロトコール

3- ii -(1)-b の通り

4. 参考文献

1. Vincent, A.T., Schiettekatte, O., Goarant, C., Neela, V.K., Bernet, E., Thibeaux, R., Ismail, N., Mohd Khalid, M.K.N., Amran, F., Masuzawa, T., Nakao, R., Amara Korba, A., Bourhy, P., Veyrier, F. J., Picardeau, M. 2019. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. PLoS Negl Trop Dis 13: e0007270. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>.
2. Cerqueira, G.M., Picardeau, M., 2009. A century of *Leptospira* strain typing. Infect Genet Evol 9: 760–768, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.009>.
3. Koizumi, N., Mizutani Muto, M., Akachi, S., Okano, S., Yamamoto, S., Horikawa, K., Harada, S., Funatsumaru, S., Ohnishi, M. 2013. Molecular and serological investigation of *Leptospira* and leptospirosis in dogs in Japan. J Med Microbiol 62: 630–636. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.050039-0>.
4. Zoetis Japan. 牛のレプトスピラ症. <https://www.zoetis.jp/%E7%95%9C%E7%94%A3-%E7%89%9B/%E7%89%9B%E3%81%AE%E7%97%85%E6%B0%97/%E7%89%9B%E3%81%AE%E3%83%AC%E3%83%97%E3%83%88%E3%82%B9%E3%83%94%E3%83%A9%E7%97%87.aspx>（最終アクセス 2023 年 1 月 8 日）
5. 古谷徳次郎，藤井武，森研一，長井新，菊池直哉. 2006. 豚の早死産胎子における PCR および抗体検査によるレプトスピラ浸潤調査. 日本獣医師会雑誌 59: 459–463. <https://doi.org/10.12935/jvma1951.59.459>.
6. 小泉信夫，岡野祥，大西真. 2013. レプトスピラ症. 化学療法の領域 29: 672–678.

<https://doi.org/10.20837/2201304118>.

7. Kakita, T., Kuba, Y., Kyan, H., Okano, S., Morita, M., Koizumi, N. 2021. Molecular and serological epidemiology of *Leptospira* infection in cats in Okinawa Island, Japan. *Sci Rep* 11: 10365. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89872-3>.
8. Chakraborty, A., Miyahara, S., Villanueva, S.Y.A.M., Saito, M., Gloriani, N.G., Yoshida, S. 2011. A novel combination of selective agents for isolation of *Leptospira* species. *Microbiol Immunol* 55: 494–501. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00347.x>.
9. Hornsby, R.L., Alt, D.P., Nally, J.E. 2020. Isolation and propagation of leptospires at 37°C directly from the mammalian host. *Sci Rep* 10: 9620. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66526-4>.
10. Ellis, W., Montgomery, J., Cassells, J. 1985. Dihydrostreptomycin treatment of bovine carriers of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *Res Vet Sci* 39: 292–295.

5. 連絡先

小泉信夫

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

国立感染症研究所細菌第一部

電話 03-2582-1111

動物 クリプトコックス症ガイドンス
(cryptococcosis in animals)

2023年2月
Version 1

目次

1. 感染症の概説（人と動物の症状）
 - 1- i 病原体の性状（BSL 分類、特定病原体等法律上の扱い含む）
 - 1- ii 疫学（人と動物）（感染症法、家伝法など国内における法律上の扱い含む）

2. 検体の取り扱い
 - 2- i 検体取り扱い上の注意（バイオセーフティ）
 - 2- ii 各種動物からの検体採取法
 - 2- iii 検体の輸送法
 - 2- iv 検体の保存法

3. 検査法
 - 3- i 検査法（総論）
 - 3- ii 検査法（各論）
 1. 分離培養法
 2. 生化学的検査と形態観察
 3. 抗原検出法
 4. 遺伝子検査

4. 参考文献

5. 連絡先（執筆者情報）

1. 感染症の概説

1-i 病原体の性状

クリプトコックス症はクリプトコックス属真菌による感染症である。この真菌は担子菌門に属する酵母様真菌であり、菌体の最外層には多糖体の莢膜があり、他の病原性酵母と区別される。クリプトコックス症の主な原因菌は *Cryptococcus neoformans* と *Cryptococcus gattii* であり哺乳類から鳥類、爬虫類まで、幅広い宿主に感染する¹。*C. neoformans* は世界的に広く生息しており、樹木などから環境中に飛散し鳥類の糞や土壌で増殖する。*C. gattii* は熱帯や亜熱帯地域、特にオーストラリアやパプアニューギニアなどに限定的に認められていた。しかし近年、北米において *C. gattii* による集団感染事例が報告され、発生地域の世界的拡大が懸念されている²。

国立感染症研究所病原体等安全管理規程では *C. neoformans* と *C. gattii* の取り扱いがBSL 2に規定されている。上記2菌種は感染症法の定める特定病原体等には該当しない。

1-ii 疫学（人と動物）

[人] わが国において人のクリプトコックス症のほとんどが *C. neoformans* によるものである^{3,4}。人への感染源として鳩などの鳥の糞との関与が示唆されており、環境中に浮遊する本菌を吸入して感染する場合や、創傷のある皮膚などを介して感染する（鳥類に本菌は定着しておらず、環境浮遊菌が糞中で増殖すると考えられている）。これまでに人一人間での感染は報告されていない。*C. gattii* によるクリプトコックス症は、国内においては限定的であるものの症例がある⁵。人のクリプトコックス症は、健常者における侵襲性真菌感染症として国内で最も頻度が高い。病型として肺クリプトコックス症が多いものの、肺クリプトコックス症患者のうち1割は免疫異常が無い場合でも播種性感染に至ることがある⁶。特に中枢神経系に播種し、脳髄膜炎を起こすことが多い。腎疾患、膠原病、悪性腫瘍、糖尿病やステロイド投与などがクリプトコックス症のリスク因子であり、ヒト免疫不全症候群ウイルス（HIV）感染し細胞性免疫が低下した場合にクリプトコックス脳髄膜炎を発症する危険性がある⁷。平成26年9月に感染症法が改定され、人の播種性クリプトコックス症は感染症法で定める五類感染症として全数把握疾患となった。その発生件数は年間約120–180程度で推移している⁸。

[犬猫] 猫で多くみられ、犬の症例は稀である。猫では猫エイズや猫白血病にクリプトコックス症が續発するケースが多く、免疫機能の低下に伴ってクリプトコックス症が発症する点はヒトと同様である。侵入門戸もヒトの場合と同様であり、呼吸器または皮膚である。本菌は健康な犬猫の鼻腔からも検出されることがある。上部呼吸器感染と皮膚感染が多いが、播種性の病態も稀にみられる。上部呼吸器感染では、くしゃみ、いびき、鼻汁、呼吸困難、鼻腔の変形、鼻腔内の肉芽腫性病変が認められる。顔面、特に鼻梁に結節がみられることがあり、病変の一部は潰瘍化することもある。全身へ播種すると、肝臓、脾臓、腎臓、脳などに

病巣を形成する^{9,10}。本邦における犬や猫のクリプトコックス症の主な病原真菌は *C. neoformans* であるが、海外では *C. gattii* による症例も報告されている⁹。

【家畜】 家畜におけるクリプトコックス症は、主に牛の乳房炎に関連して報告されることが多い。牛のほかには馬、羊、ヤギ、ラクダでクリプトコックス症の報告がある⁹。家畜のクリプトコックス症は家畜伝染病予防法の定める家畜伝染病には該当しない。

【野生動物】 野生動物の中では、コアラがクリプトコックス症に罹患し易い動物として知られている。これは、コアラの餌となるユーカリの葉に *C. gattii* が生息していることと関連している可能性がある。上述の動物と同様、吸入した本菌が呼吸器等の粘膜に定着し、免疫機能の低下を契機に感染が成立すると考えられている。また、症状の無いコアラからも *C. neoformans* および *C. gattii* が分離されており、無症候性キャリアも多いと考えられている^{9,11}。本邦でも動物園飼育下のコアラに *C. gattii* が感染しクリプトコックス症を発症した症例も報告されている¹²。

【鳥類】 鳥類は体温が高いため、クリプトコックス属真菌は鳥類の体内で増殖できず、発症に至ることは稀である。一方、鳥類の糞はクリプトコックス属真菌の汚染源として重要である。本邦における鳩糞調査では、*C. neoformans* の検出率は50–80%であった¹³。

2 検体の取り扱い

2-i. 検体取扱い上の注意（バイオセーフティ）

国立感染症研究所病原体等安全管理規程では *C. neoformans* と *C. gattii* の取り扱いは BSL 2 に規定されている。クリプトコックス症の発症が疑われる臨床検体には病原真菌が含まれ、人への感染源となる可能性があることを十分理解し、慎重な取り扱いが必要である。培養菌および臨床検体は BSL2 施設および安全キャビネット内で取り扱い、作業中は個人用防護具（グローブ、マスク、ガウンなど）を着用する。

2-ii. 各種動物からの検体採取法

組織検体：採取部位をヨード剤で消毒し局所麻酔後、滅菌メスまたは注射器を用いて採取する。

脳脊髄液：腰椎穿刺または脳室穿刺により採取する。採取部位の皮膚消毒は、アルコールとヨード剤で厳重に行う。穿刺後に自然流出する髄液を採取する。

2-iii. 検体の輸送法

1. 臨床検体を入れた容器をビニールテープ等で 2-3 重に巻いて内容物が漏れないようにする。ガラス容器の場合は、破損しないように緩衝材で厚めに保護する。
2. 1 の容器を、キムタオルなどの水分を吸収する素材と一緒に、密閉可能な袋（ジップロックなど）に入れる。
3. さらに緩衝材で、中の容器が壊れないように包む。
4. 箱に入れる。空間は緩衝材や新聞紙で埋める。
5. 冷蔵検体は「冷蔵」、凍結検体は「凍結」を指定しそれぞれ発送する。

2-iv. 検体の保存法

分離培養を行う臨床検体は、検査まで冷蔵保存とし、できるだけ早く検査を実施する。抗原検出あるいは遺伝子検査を行う臨床検体は、検査まで冷凍保存する。疫学調査などすぐに実験室診断を行わない場合は、血清や血漿あるいは脳脊髄液を密閉チューブに分注して冷凍保存する。

3. 検査法

3-i. 検査法（総論）

クリプトコックス症の検査は培養検査、抗原検査、遺伝子検査に分けられる。培養検査は、検体を寒天培地に塗布、または液体培地に添加し培養する。真菌の発育が確認された場合、墨汁法による直接鏡検で莢膜を有する酵母様真菌を確認する。抗原検査は、市販のラテックス凝集反応キットを用いてクリプトコックス属の莢膜多糖抗原を検出する。遺伝子検査は、真菌の rRNA 遺伝子を PCR で増幅し、増幅産物の塩基配列を比較することで菌種を同定する。

3-ii. 検査法（各論）

1. 分離培養法

真菌の分離、遺伝子学的検査、血清検査のうちどの検査を実施するかを考慮し、臨床検体を分割する。全検体や分割検体を寒天培地に塗布するか、あるいは液体培地に液性検体を添加し、25-37°Cで培養する。4週間培養して真菌の生育を認めない場合は、培養陰性と判定する（培養期間は、検体毎に考慮する）。

a. 組織検体

検体が環境中の菌や核酸で汚染されないよう、無菌的に取り扱う。必要に応じて、検体を細断、または破碎処理等を行う。細断に際しては、滅菌したピンセット、ハサミあるいは使い捨てのメス等を用いる。細断検体、または破碎検体の全量または一部を寒天培地に塗布し、培養する。

b. 血液検体

全血を寒天培地に塗布するか、または液体培地に直接添加し培養する。血清や血漿は、検体採取の過程で遠心操作に伴い、血球成分とともに病原体も沈降している可能性がある。そのため培養試験には原則として血清や血漿を用いないが、必要に応じて考慮する。

c. 液性検体（血液以外の無菌検体）

検体中の菌数が少ないと予測される場合は、必要に応じて遠心分離し、菌体や白血球など不溶成分を濃縮する。沈渣画分を生理食塩水などで再懸濁し、その全量または一部を寒天培地に塗布するか、または液体培地に添加し培養する。

d. その他の検体

上記以外の検体については、用途に応じその都度考慮する。

2. 生化学的検査と形態観察

・ウレアーゼ試験

担子菌系酵母と子囊菌系酵母の鑑別に用いることができる。クリプトコックス属菌などの担子菌系酵母はウレアーゼを産生し、カンジダ属菌などの子囊菌系酵母はウレアーゼを産生しない。クリステンセン尿素斜面培地に培養菌を接種し、25°Cで5日間培養する。供試菌が尿素を分解し、ウレアーゼが産生されると、培地の色が濃いピンク色になる。

・フェノールオキシダーゼ試験

カフェイン酸培地又はバードシード寒天培地に画線植菌し、25—30°Cで5—7日間培養する。*C. neoformans* 及び *C. gattii* の場合は、フェノールオキシダーゼ陽性となり褐色集落を形成する。

・CGB 培地を用いた *C. neoformans* と *C. gattii* の鑑別

カナバニン-グリシン-ブロモチモールブルー (CGB) 寒天培地に画線塗抹し、25°Cで2—5日間培養する。*C. gattii* はアミノ酸アナログのL-カナバニンに耐性であり、グリシンを資化して増殖するため CGB 寒天培地で生育する。また増殖に伴い培地が塩基性になることからブロモチモールブルーの呈色反応により培地が青変する。一方、*C. neoformans* はL-カナバニンに感性であり、CGB 培地で増殖せず培地は変色しない。ただし、他のクリプトコックス属菌でも CGB 寒天培地で青色を示すことがあるのでフェノールオキシダーゼ試験で *C. neoformans* 又は *C. gattii* の確認が必要である¹⁴。

・墨汁法による直接鏡検

脳脊髄液などの臨床検体や培養菌液を用いて、墨汁法による直接鏡検で莢膜を有する酵母を確認する (図1)。

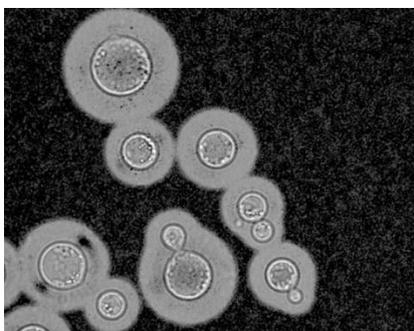


図1 墨汁法による莢膜の観察

3. 抗原検出法

クリプトコックス属の莢膜は、多糖体のグルクロノキシロマンナンで構成されており、クリプトコックス抗原として診断に利用される。一般に臨床診断はこの抗原の検出により行われている。国内ではセロダイレクト®栄研クリプトコックス（栄研化学、東京）とパストレックス®クリプトプラス（バイオ・ラッド ラボラトリーズ、東京）が市販されており、どちらのキットもラテックス凝集法により莢膜多糖抗原を半定量的に検出する。どちらのキットも血清や脳脊髄液中の抗原を検出することが可能である。しかし、トリコスポロン属菌との交差反応が知られているため、注意が必要である。

4. 遺伝子検査

真核生物である真菌の rRNA 遺伝子は 18S、5.8S、26S、5S の 4 つのサブユニットから構成され、これらのサブユニットの長さは菌種によらずほぼ同じである。一方、各サブユニット間にあるスペーサー領域（18S と 26S の間にある internal transcribed spacer : ITS、および 26S と 18S の間にある intergenic spacer : IGS）は、菌種により長さが著しく異なることが知られている。また、26S サブユニットの部分塩基配列（Domain1/Domain2: D1/D2）は、同種間で 99%以上の類似度を示すことが分かっている（図 2）。

杉田らの検討によると、同一種内の ITS 領域の類似度は 99%以上であり、変種以上の関係では 99%未満であることが示されている¹⁵。これらの理由から、現時点では 26S および ITS 領域の塩基配列類似度に基づく同定基準は、おおむね妥当であると考えられている。また、*C. neoformans* および *C. gattii* の鑑別には、IGS 領域の塩基配列を比較する必要がある。

【実際の手順】

■**核酸抽出**：検体の種類に応じて適切な DNA 抽出キットを用いる。培養菌株、組織、病理切片には、それぞれ Qiagen 社の DNeasy Plant Mini kit、DNeasy Blood and Tissue kit、QIAamp DNA FFPE Tissue kit などが利用できる。抽出方法は、キット付属の添付文書に従う。

■**PCR**：抽出した DNA を鋳型として、rRNA 遺伝子間に存在する ITS 領域、IGS 領域、rRNA 遺伝子中の D1/D2 領域を増幅する（図 2）。使用するプライマーは表 1 に示した。標的領域の増幅には、原則 ITS5 と NL4、IGS1F と IGS1R を使用し、塩基配列の決定には表中のプライマーを適宜使用する。

<PCR 反応手順>

- ・環境中から異物混入を避けるため、クリーンベンチ内で酵素反応液を混合する。
- ・上記と異なるクリーンベンチで陰性対照の鋳型を添加する。組織や病理切片由来の DNA を鋳型に用いる際は、このクリーンベンチ内で添加する。
- ・菌株由来の DNA を鋳型に用いる際は、所定の実験台で添加する。最後に陽性対照の鋳型を添加する。

- ・サーマルサイクラーを用いて DNA を増幅する。この時の反応温度や反応時間の設定は DNA ポリメラーゼの添付文書に従い、アニール温度は 55–60°C とし、伸長時間は 1 分とする。

<増幅産物の確認と異物混入の予防>

- ・ 1.5% アガロースゲルで泳動し、増幅産物の有無と分子量を確認する。
- ・ 陽性対照の持ち越しで偽陽性となる技術過誤を防ぐため、陽性対照の増幅産物は、検体で増幅が見込まれる大きさと一致しないよう設計する必要がある。操作手順の完全性を担保するため、陽性対照は毎回使用する。
- ・ 増幅した DNA 断片が飛散し環境を汚染する可能性を考慮して、試薬調製、検体処理、泳動などは物理的に隔絶された場所で行う。
- ・ 試薬調製等に用いるチップおよび各種サンプルチューブは、毎回新しい包装を開封して使用し再利用しない。検体の相互汚染を防ぐため、マイクロピペットやチューブブラックなどは他の検査と共用せず専用とする。
- ・ 検体で増幅産物を認めない場合、遺伝子検査陰性と判定する。このとき、陽性対照で増幅を認め、陰性対照で増幅がないことを確認する。陰性対照には、DNA 抽出の方法に応じて、PCR グレードの水、DNA 抽出に用いた生理食塩水、抽出バッファーなどを用いる。臨床検体から DNA を抽出し検査をする場合、抽出工程における汚染の有無を検定する目的で、別の陰性対照が必要となる。この場合は、検体を入れずに同様の操作を行って得られた抽出液を PCR の陰性対照とする。

■**塩基配列解析**：PCR の増幅産物について塩基配列を決定する。国際的に公表されたデータベース GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) および MycoBank (<https://www.mycobank.org>) の配列データと検体由来の塩基配列を照合し、99%以上の塩基一致率を基準として菌種を同定する。このとき、Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) culture collection や American Type Culture Collection (ATCC) の基準株に注視し、その参照配列と検体由来の塩基配列を照合する。基準株との一致率が 99%未満の場合は、一致率の高い上位菌種を列挙し参考結果とする。

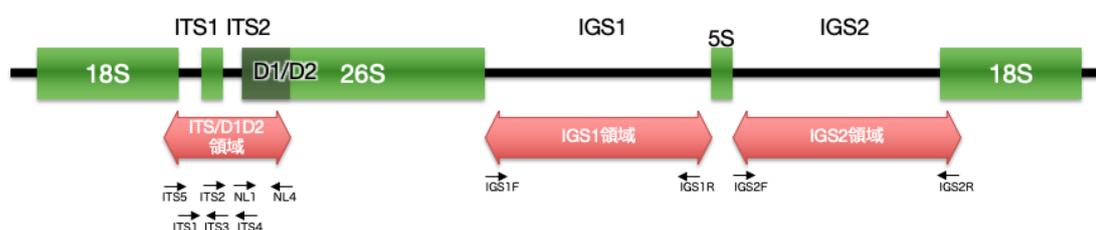


図2 遺伝子検査で標的とする真菌 rRNA 遺伝子の遺伝子座とプライマー結合部位

表1 遺伝子増幅や塩基配列の決定に用いるプライマーとその配列

プライマー名	塩基配列 (5'-3')
<u>ITS-D1/D2 領域を増幅するプライマー</u>	
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG
<u>ITS-D1/D2 領域の塩基配列解析用プライマー (上記以外)</u>	
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAA
<u>クリプトコックス特異的 IGS 領域を増幅するプライマーと塩基配列解析用プライマー</u>	
IGS1F	ATCCTTTGCAGACGACTTGA
IGS1R	GTGATCAGTGCATTGCATGA
IGS2F	CAGGAAGTTAAGCTGAAGAG
IGS2R	AGTGTTTGAGCCTACCACGTA

4. 参考文献

1. Malik R, Krockenberger MB, O'Brien CR, Carter DA, Meyer W, Canfield PJ. Veterinary Insights into Cryptococcosis Caused by *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. In: *Cryptococcus*; 2010. p. 489-504.
2. Byrnes EJ, 3rd, Bildfell RJ, Frank SA, Mitchell TG, Marr KA, Heitman J. Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of *Cryptococcus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. *J Infect Dis* 2009; 199:1081-6.
3. Umeyama T, Ohno H, Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, et al. Determination of epidemiology of clinically isolated *Cryptococcus neoformans* strains in Japan by multilocus sequence typing. *Jpn J Infect Dis* 2013; 66:51-5.
4. Mihara T, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrungraj P, Umeyama T, Takazono T, et al. Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. *Med Mycol* 2013; 51:252-60.
5. Okamoto K, Hatakeyama S, Itoyama S, Nukui Y, Yoshino Y, Kitazawa T, et al. *Cryptococcus gattii* genotype VGIIa infection in man, Japan, 2007. *Emerg Infect Dis* 2010; 16:1155-7.
6. Kohno S et al. Clinical features of pulmonary cryptococcosis in non-HIV patients in Japan. *J Infect Chemother* 2015 Jan;21(1):23-30.
7. 深在性真菌症のガイドライン編集委員会, 深在性真菌症の診断・治療ガイドライン 2014, 共和企画, 東京, 2014.
8. 播種性クリプトコックス症の発生動向 2014年第39週~2015年第37週、IASR 36:183-4, 2015.
9. Refai M, El-Hariri M, Alarousy R. Cryptococcosis in animals and birds: a review. *Eur J Acad Essays* 2017; 4:202-23.
10. Kano R. Small Animal Aspergillosis and Cryptococcosis in Japan. *Med Mycol J* 2017; 58:J121-J6.
11. Danesi P, Falcaro C, Schmettmann LJ, de Miranda LHM, Krockenberger M, Malik R. *Cryptococcus* in Wildlife and Free-Living Mammals. *J Fungi (Basel)* 2021; 7.
12. Hanaki K, Shimokawa E, Nakasuji K, Fujii Y, Miyazawa T, Makimura K. A Case of Cryptococcosis Caused by *Cryptococcus gattii* in a Captive Queensland Koala (*Phascolarctos cinereus adustus*). *Japanese Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 2018; 23:39-44.
13. Yamamoto Y, Kohno S, Noda T, Kakeya H, Yanagihara K, Ohno H, et al. Isolation of

- Cryptococcus neoformans* from Environments (Pigeon Excreta) in Nagasaki. Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases 1995; 69:642-5.
14. Oguri T, Abe M, Ikeda R, Uno J, Shibuya K, Nishiyama Y, et al. Manual of laboratory procedures for medically important fungi (2013). Med Mycol J 2013; 54:345-60.
 15. Sugita T, Nishikawa A. Molecular taxonomy and identification of pathogenic fungi based on DNA sequence analysis. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi 2004; 45:55-8.

5. 連絡先（執筆者情報）

村長 保憲 （国立感染症研究所 真菌部）
梅山 隆 （国立感染症研究所 真菌部）
上野 圭吾 （国立感染症研究所 真菌部）
宮崎 義継 （国立感染症研究所 真菌部）

問い合わせ先

〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1

国立感染症研究所 真菌部

クリプトスポリジウム症ガイドンス

目次

- 1 感染症の概説（人と動物の症状）
 - 1-i 病原体の性状
 - 1-ii 疫学（人と動物）（感染症法、家伝法など国内における法律上の扱い含む）
- 2 検体の取り扱い
 - 2-i 検体の取り扱い上の注意（バイオセーフティー）
 - 2-ii 各種動物からの検体採取法
 - 2-iii 検体の輸送法
 - 2-iv 検体の保存法
- 3 検査法
 - 3-i 検査法（総論）
 - 3-ii 検査法（各論）
 - 3-ii-(1) 顕微鏡観察法
 - 3-ii-(2) PCR 法（rRNA を標的にした逆転写 RT-PCR 法）
 - 3-ii-(3) PCR 法（CPB-DIAGF/R プライマーの例）
 - 3-ii-(4) PCR 法（semi nested-PCR の例）
 - 3-ii-(5) PCR 法（より高解像度な種別の nested-PCR の例）
 - 3-ii-(6) クリプトスポリジウム分離法
 - 3-iii 各種動物の検査法
 - 3-iii-(1) 犬および猫
 - 3-iii-(2) 野生動物および生産動物
- 4 参考文献
- 5 連絡先（執筆者情報）
- 6 謝辞等

1 感染症の概説（人と動物の症状）

1-i 病原体の性状

クリプトスポリジウム症は、クリプトスポリジウム属原虫の消化管感染に起因して、ヒトを含む一部の動物で下痢症となる¹⁾。単細胞の真核生物、いわゆる原虫に分類される。哺乳類、鳥類、爬虫類あるいは魚類まで広い範囲の脊椎動物に寄生がみられる。消化管に寄生し、糞便とともにオーシスト（嚢子）の形態として排出され、その経口摂取により糞口感染する。排出された時点で感染力を持つが、環境中で増殖することなく、寄生部位の上皮細胞に虫嚢を形成して増殖する。無性生殖期、有性生殖期を経て、オーシストが形成されて便とともに外界に排出される。オーシストには、バナナ状の形態をした4個体のスポロゾイト（虫体）が入っている。

オーシストは環境や消毒に抵抗性があるので、塩素消毒だけでは不足し、ろ過等による除去や紫外線等による不活化を必要とする。適切なる過処理がされていない水道水、浅井戸、水泳プール等の非加熱の水（なまみず）による水系集団感染が問題になる²⁾。1996年に埼玉県越生町の水道水を介したクリプトスポリジウム症の水系集団感染では、住民6割強の8,800人が発症したとされる³⁾。細菌の芽胞と異なり、乾燥に弱く、加熱により不活化される。消毒薬は、不活化を期待せず、除染に使用し、糞便の取り扱い後は手洗いが励行される。

1-ii 疫学（人と動物）（感染症法、家伝法など国内における法律上の扱い含む）

オーシストの直径が5 μm の小型な種類は多くが腸管に感染し、7 μm のより大きな種類は胃などに感染し、前者がよく問題になる。それぞれのグループに属する種は形態が似ており、鑑別不能である。もっぱら遺伝子の塩基配列による種別や遺伝子型別が行われる。

〔ヒト〕

ヒトの感染報告が多い種は、ヒトに特異的な *Cryptosporidium hominis*（ヒト型、あるいは *C. parvum* Genotype I）、人獣共通の *C. parvum*（ウシ型、あるいは *C. parvum* Genotype II）、*C. meleagridis*（トリ）が知られている⁴⁾。宿主特異性があり、他の種によるヒト感染事例は少ないが、*C. canis*（イヌ）、*C. felis*（ネコ）等の報告がある。これらはいずれも小型種である。小型種の寄生部位は腸管、とくに小腸であるが、AIDS等の免疫不全者では膵臓、胆道、胆嚢、呼吸器への感染も報告されている。免疫不全では大型種の *C. baileyi*（トリ、ファブリキウス嚢）や *C. muris*（マウス、胃）の感染も考えられる。

ヒト感染の症状としては、非血性水様下痢を主症状とする消化器症状を呈する。その他の症状として、腹痛、倦怠感、食欲低下、悪心などで、軽い発熱を伴う例もある。下痢は一日数回程度から20回以上の激しいものまであり、数日から2~3週間持続する。抗生物質等の特効薬が未だになく、自然治癒を待つ必要がある⁵⁾。

免疫不全者には重症・難治性・再発性・致死性の下痢症となりえる。本症はエイズ診断の指標疾患の1つで、HIV陽性者で本原虫感染による下痢が1カ月以上持続した場合はエイ

ズと診断される。近年のエイズは多剤併用療法（HAART）による免疫機能の回復が行われることで、クリプトスポリジウム症の問題は軽減している⁶⁾。下痢の程度は、軟便・泥状便から水様便まで、免疫不全の進行とともに重症化し、重症例ではコレラに見られるような大量の水様便や失禁を伴って死因となることもありえる。

クリプトスポリジウム症は、感染症法における5類の全数把握疾患で、医師には診断後7日以内の届け出が義務付けられている。国内の年間の報告数は、10件前後にとどまっている。特効薬がないこと、自然治癒すること、保険点数の関係などから、クリプトスポリジウムを対象とした検査がなされることは少ないかもしれない。比較参考として、米国のクリプトスポリジウム症の届け出数は、年間1万件程度である⁷⁾。感染症としては広く世界中に分布し、工業先進国で集団感染が生じて注目される。

病原体のクリプトスポリジウム（*C. hominis*、並びに *C. parvum*）は、特定病原体の四種病原体としての管理を要する。病原体を所持・使用する場合には、施設の届け出が求められる。BSL2施設での取り扱いとされる。

糞口感染することから性的接触や食品を介した感染経路もあり、食中毒事件票における病因物質の分類『その他の寄生虫』にはクリプトスポリジウム等と例示されている⁸⁾。

〔ヒト以外〕

ヒト以外でも多くの哺乳類、特にその幼獣に感染が認められる。家伝法では、監視伝染病（家畜伝染病、届出伝染病）としての指定はないが、病原体の輸入に関する届出（法第36条の2、規則第44条の2）に *C. parvum*、*C. meleagridis*、*C. baileyi*、*C. muris* の4種が指定されている（<https://www.maff.go.jp/aqs/tetuzuki/attach/pdf/88-18.pdf>、2023年1月23日時点）。

C. hominis（ヒト型）ではヒトとサル類が宿主であり、一部ヒツジやジュゴンから報告されている。また、実験レベルでは幼齢のブタやウシおよびヒツジへの感染が可能とされている。

〔ウシ〕

子牛の *C. parvum* 感染による下痢症が問題で、一例としてクリプトスポリジウム感染の25%（7/28頭）の子牛の死亡が報告されている⁹⁾。牧場実習や、畜産業従事者の *C. parvum* 感染が報告される¹⁰⁾。成牛では、胃に寄生する *C. andersoni* の感染が認められることがある。

〔トリ〕

小型種の *C. meleagridis*、大型種の *C. baileyi* と *C. galli* 等が知られている。*C. meleagridis* は七面鳥など、*C. baileyi* はニワトリや七面鳥を主な宿主とし、両種は小腸やファブリキウス嚢、総排泄腔の上皮細胞に寄生する。前者は国内でもヒト集団感染例が報告されている¹¹⁾。*C. galli* はニワトリやフィンチ類などを宿主とし、胃の上皮細胞に寄生する。

〔爬虫類〕

C. serpentis、*C. varanii* (syn. *C. saurophilum*) 等が知られている。ヒョウモントカゲモドキやヘビが、クリプトスポリジウム症により著しく消耗したり死亡する¹²⁾。

2 検体の取り扱い

2-i 検体の取り扱い上の注意 (バイオセーフティー)

ヒトと動物のいずれの検体であっても、クリプトスポリジウム以外にも様々な病原体を含む恐れがあることを理解した上で、慎重な取り扱いが必要である。BSL2 施設および安全キャビネット内で取り扱い、作業中は個人用防護具 (グローブ、マスク、ガウン、ゴーグル等) を着用する。遺伝子検査を想定せず、顕微鏡検査に限定すれば、ホルマリン固定により、危険性が格段に緩和される。ただし寄生虫に対する短いホルマリン固定は十分とはならず、なお注意して取り扱う。

2-ii 各種動物からの検体採取法

もっぱら糞便を検査材料とし、1g など、なるべく十分量を確保したい。細菌・ウイルスを想定した微量の検査材料からは、検査が困難になる。

2-iii 検体の輸送法

病原体が検出される前のヒトあるいは動物検体は、UN3373 の方法に従う。

2-iv 検体の保存法

検体の保存容器は、密栓できるプラスチックチューブ等を使用し、乾燥や臭気を防ぐ。顕微鏡検査と遺伝子検査の両方を想定する場合は冷蔵保存し、1 週間程度の期間内に検査する。すぐに検査を行わない場合は、遺伝子検査用に冷凍保存、顕微鏡検査用にホルマリン固定後に冷蔵保存し、必要によりその両方を用意する。十分量のホルマリンで固定した後であれば、短期的に室温で保存や輸送することもある。

3 検査法

3-i 検査法 (総論)

ヒトのクリプトスポリジウム症は、以下の表にある感染症法の基準で診断されており、本解説では他の動物もこれに準じて便からの検出を紹介する¹³⁾。すなわちクリプトスポリジウム検査は、もっぱら病原体の検出が行われており、本解説でも顕微鏡と PCR による検出を紹介する。ELISA 等の酵素抗体法やイムノクロマト法は、海外製品があっても国内では一般的にはなっておらず、特に動物を対象とした場合の真偽の確認や性能の評価が容易ではなく、文献の紹介に留める^{14, 15)}。ヒト由来ではないクリプトスポリジウムを検査するには、少なくとも 2 種類の原理の異なる方法で確認しないと真偽に不安が残る。

検査方法	検査材料
顕鏡による原虫(オーシスト)の証明による病原体の検出	便、生検組織、十二指腸液、胆汁、腭液
酵素抗体法又はイムノクロマト法による病原体抗原の検出	
PCR法による病原体の遺伝子の検出	

ヒトの原虫性下痢症には、感染症法の施行当初より、顕微鏡検査が行われてきた。顕微鏡はクリプトスポリジウム以外の寄生虫卵も同時に検出できる可能性があること、他方 PCR は標的外の病原体が考慮されず、数の多い原虫には良くても少ない蠕虫には使いづらい可能性、糞便試料の PCR は簡単ではなく偽陰性の恐れがあり避けられてきたこと、などが背景にあったと思われる。

ヒト由来のクリプトスポリジウムの検出には、蛍光抗体を用いた顕微鏡観察が最も簡便で感度も期待できる。水道の検査を目的に、10L 中の 1 個を検出する、蛍光抗体を用いた高感度な検査方法が整備されている¹⁶⁾。その蛍光抗体試薬を利用して糞便試料と混合して蛍光顕微鏡観察するだけなら、環境が整っていれば分単位の時間で行える。市販の蛍光抗体には、抗ジアルジア抗体も含まれており、同時に検査できる。自家蛍光を発する他の虫卵の検出や、微分干涉顕微鏡下では運動性を有する栄養型虫体の検査に対象を拡大することもできる¹⁷⁾。ただし ELISA 法で言及の通り、抗体の反応特異性には注意を要する。特に珍しいクリプトスポリジウムの場合、反応特異性の低い IgM 抗体の蛍光抗体試薬で顕微鏡下に検出できるかもしれないが、試してみないことには何とも言えないのが実際である。反応特異性の高い試薬では、ヒト型とウシ型の他に、少なくともブタやトリに由来するクリプトスポリジウムまでは検出可能と思われる。検出感度を高めるには濃縮精製の操作も必要になる。

PCR であれば、クリプトスポリジウム属を標的としたプライマー・プローブの設計により、感度や特異性の問題が少ないかもしれない。標的遺伝子として、SSU rRNA 遺伝子を同定や種別に、GP60 遺伝子 (60-kDa glycoprotein、cpgp40/15 と呼ばれる) を詳細なサブタイピングに使われることが多い¹⁸⁻²⁰⁾。他にクリプトスポリジウムウイルス (Cryspovirus)、COWP 遺伝子 (*Cryptosporidium* oocyst wall protein)、HSP 遺伝子 (heat shock protein) 等々が報告されている²¹⁻²³⁾。本稿では SSU rRNA 遺伝子の方法を紹介する^{18, 19)}。

前述の水道の検査用に、クリプトスポリジウム属を標的としたリアルタイム PCR 試薬と LAMP 試薬も販売されている。これらは SSU rRNA 分子の逆転写により、1 個未満に相当するクリプトスポリジウムから、高感度な検出が可能となっている。糞便試料へは適用の経験に乏しいが、キットに付属の陽性対照が使用可能であること、性能が製造元により管理されていること、PCR 産物の配列決定はフルサポートシーケンスの外注で検査環境の汚染を防止できる等の利点がある。

3-ii 検査法（各論）

3-ii-(1) 顕微鏡観察法

プロトコールの選択について：

基本は、後述のホルマリン固定+脱脂操作+蛍光抗体染色+顕微鏡観察が推奨になる。

試料量やクリプトスポリジウムの多寡に従い、濃縮精製の有り無しといった方法を選択する。自由に組み合わせて行えるよう、後述の顕微鏡観察以降にオプションのプロトコールを列挙しておく。試料が極端に少なければ、スライドガラス上で直接的に蛍光抗体と混合、観察するくらいの分量しか無いかもしれない。濃度が高い方で 10^7 個/g の場合は、直接塗抹に蛍光抗体染色が簡便で、20 倍対物レンズの 1 視野中に数十のクリプトスポリジウムが見つかる²⁴⁾。感度は落ちるが、この直接塗抹が検査としては最短の方法になる。濃度が低ければ、濃縮精製を要し、全視野を見て回って 1 つ 2 つしか見つからないかもしれない。感度向上には、シヨ糖浮遊法、塩化セシウム浮遊法や磁気ビーズ法によりクリプトスポリジウムを濃縮精製する^{25, 26)}。多数の検体をスクリーニングする場合に、簡易シヨ糖浮遊法がある。

ホルマリン固定を行うことで、細菌やウイルスを防ぐ意味で、操作の安全性が増す。なお、20 分間程度の固定では、クリプトスポリジウム内部は固定されず、クリプトスポリジウムの数が多ければ遺伝子検査に使うことも可能かもしれない。繰り返しになるが、寄生虫卵は全般的に、ホルマリン固定では完全には死滅しないことに注意して取り扱う必要がある。加熱処理で死滅する。

ヒト、ウシ、ブタなど、糞便に脂肪分が多い場合、脱脂操作により、顕微鏡下に紛らわしい丸い油滴が観察されるのを防ぐ。

蛍光抗体染色を行うことで、クリプトスポリジウムを特異的に染色できる。抗酸染色などの古典的な染色方法も教科書にあるかもしれないが、特異的な染色法ではなく、高濃度でなければ見つけるのは困難で、観察と判断が非常に難しいので、ここでは推奨しない。蛍光標識-抗クリプトスポリジウム抗体の製品には、抗ジアルジア抗体を同時に含むものがあり、ジアルジアを同時に検査できる。一方、慣れない動物試料からクリプトスポリジウムを探す場合、ジアルジア抗体でクリプトスポリジウムに近い大きさの鞭毛虫類が染色されたりする恐れがあり、クリプトスポリジウム単独の抗体試薬を使うほうが迷わずに済むかもしれない。

DAPI 染色を行うことで、クリプトスポリジウムは 4 つの核を観察できる。鞭毛虫類に 4 核のものもあり、DAPI 染色は参考にはなっても、それだけで断定の根拠にはしていない。

準備するもの（オプション含む）：

蛍光標識-抗クリプトスポリジウム抗体、例えば Waterborne 社の IgM 抗体製品である Crypt-a-Glo、あるいは抗ジアルジア抗体も含まれる Aqua-Glo G/C Direct があり、いずれも抗クリプトスポリジウム抗体としては genus-specific が想定されている。特異性が高い

と考えられる IgG 抗体の製品に、BTF 社の EasyStain、アークリソース社の ArcFluor、Meridian Bioscience 社の Merifluor 等がある。FITC 標識が多い。

蛍光（微分干渉）顕微鏡、スライドガラス、カバーガラス、蛍光退色防止剤、ネイルエナメルかパラフィン。

各種チューブ、ピペッターチップ類、小型遠心機、攪拌装置等。

核染色用の DAPI (メタノール 1mL に DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) の 2mg を溶解し、密栓、遮光して冷蔵保存する。使用時にこの保存液 10 μ L を PBS 50mL に加えて混合希釈してから使用する)、加熱用のドライブロック。

シヨ糖浮遊法用の 50%シヨ糖液 (シヨ糖 500g と水 650mL を混合して 121 $^{\circ}$ C 15 分間オートクレーブで約 1L の比重がおよそ 1.2 になる)。

塩化セシウム浮遊法用の 20% (w/v) 塩化セシウム水溶液 (塩化セシウム 20g と水を混合して 100mL にする (オートクレーブは省略)、比重がおよそ 1.15 になる)。

精製用の免疫磁気ビーズ、Dynabeads anti-Cryptosporidium kit、あるいは抗ジアルジア磁気ビーズも含まれる GC-Combo、ただしいずれも抗クリプトスポリジウム抗体としての特異性は不明。磁石と回転装置。

10%ホルマリン水 (市販 30%ホルムアルデヒド溶液を 10 倍希釈した 3%ホルムアルデヒド水溶液)。病理検査で用いられる 10%中性緩衝ホルマリンである必要はないが、その方が入手や利用しやすいかもしれない。

酢酸エチル、スポイト、廃液入れ。

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS、Phosphate buffered saline)、PBST (Tween 80 を 0.01% 程度含む PBS)。

夾雑物を除くガーゼと漏斗、綿棒。

各種遠心管、スイングローター遠心機、小型遠心機。

ホルマリン固定：

少量の糞便 (1g 弱) を試験管 (10 ないし 15mL) に取り、10%ホルマリン水の 10mL を加えてよく懸濁する。

室温で 20 分間程度、固定する。

二つ折りで 4 枚重ねにしたガーゼを漏斗に敷いて、試料をろ過する。

少量のホルマリン水でチューブを洗い、再びろ過してガーゼ上の残渣も洗浄し、ガーゼを綿棒で絞り、全量で 8mL 程のろ液を試験管に得る。

脱脂：

上述 8mL のろ液に酢酸エチル 2mL を加えて、密栓して激しく上下に混和する。

スイングローター遠心機で 1,000 \times G、室温、5 分間、遠心分離する。

上から酢酸エチル層、脂肪層、ホルマリン液層、沈さの 4 層に分離するので、綿棒で脂肪

層をチューブから離す操作をしてから、スポイトあるいはデカントで上部の3層を捨てて、沈さを得る。沈さに脂肪が入らないように、綿棒で試験管内壁の脂肪等の付着物を良く拭き取る。(廃液は焼却処分などする)

PBS を数 mL 加えて、遠心分離 5 分間、上清を除いて、100 μ L 程度の沈さを得る。

蛍光抗体染色：

試料 10 μ L 程度を、スライドガラス上で等量の蛍光抗体試薬と混合し、カバーガラスをかける。(液量はカバーガラスの大きさに加減する)

時間をかける場合は、ネイルエナメルやパラフィンでカバーガラスをシールして乾燥を防ぐ。

5 分間ないし 30 分間程度、室温ないし 37 $^{\circ}$ C で染色する。特異性が問題なりそうな場合は長めの反応にする。試薬とクリプトスポリジウムの種類によるが、数分で染色できることもあれば、30 分間染色したほうが良い場合がある。

(乾燥を防ぎながらチューブ内で染色して過剰な染色液を遠心洗浄で除いたり、退色防止封入剤も使って封入するほうが、操作としては丁寧になる。)

顕微鏡観察：

蛍光抗体染色した標本から、20 倍対物レンズに蛍光フィルター (B 励起) を用いて、FITC の特異蛍光 (緑色) に染色された 5 μ m 程度の球状のクリプトスポリジウムを探す。

微分干渉観察が可能であれば、40 倍ないし 100 倍の対物レンズで、内部構造 (4 つのスポロゾイトの有無等) を確認する。

下記の DAPI 染色をしている場合、蛍光フィルター (U 励起) を用いて、内部に 4 核の有無を確認する。

DAPI 染色 (以降はオプション)：

脱脂後の試料等を、95 $^{\circ}$ C で 5 分間、加熱する (DAPI は新鮮な状態のオーシスト壁を通過できない) (凝集しないように、精製水を加えて分散状態で行い、その後に再濃縮するなど液量を調整する)。

核染色用の DAPI 液を 1 割ないし 5 割程度を加えて、蛍光抗体染色と同時に DAPI 染色する。染色時間は 5 分間あれば十分で、量を加減して 4 核が見やすい状態にする。多すぎると内部が全体的に光ってしまい、少ないと暗く、観察し辛い。

対比染色に Evans Blue 等を使う場合、色素と蛍光観察フィルタの組み合わせによっては内部が染まって見えるので、対比染色あるいは加熱をしない。

シヨ糖浮遊法：

含まれる脂肪分の多少により、ホルマリン固定直後、あるいは脱脂後の試料を用いる。

ショ糖液 4mL を 10 ないし 15mL 試験管に取り、4mL 程度の試料を上部に重層する（混合しない）（ショ糖を後から試料の下層に入れる方法も可能）。

遠心分離し、2つの液層の界面に集まるクリプトスポリジウムを新しい試験管に回収する。

精製水でショ糖の分量の 5 ないし 10 倍量に希釈し、遠心分離して沈さを得る。沈さは微量なので、100 μ L 程度の液を残して回収する。沈さを蛍光抗体染色と顕微鏡観察に使用する。

塩化セシウム浮遊法：

2mL チューブに、0.7mL の塩化セシウム水溶液を用意する。

先を切ったチップ等を用いて、塩化セシウム水溶液の上に、20%以下濃度の糞便懸濁液 0.5mL を重層する。

小型遠心機で 12,000rpm、3 分間、室温で遠心分離する。2つの液層の界面に集まるクリプトスポリジウムを新しい試験管に回収する。具体的には、上から夾雑物を含む 0.4mL を捨てて、次のクリプトスポリジウムを含む 0.6mL を新しいチューブに回収する。

回収したクリプトスポリジウムに滅菌水 0.8mL を加えて、遠心分離して、（沈さは微量なので 50 ないし 100 μ L を残して）上清を捨てて、沈さを得る。

沈さに PBS 1mL を加えて、遠心分離して、上清を捨てて、沈さを得る。沈さを蛍光抗体染色と顕微鏡観察に使用する。

簡易ショ糖浮遊法：

スライドガラス上に少量の糞便を置き、ショ糖液を加えて混合し、カバーガラスをかけて数分間静置して、カバーガラス付近に浮いた粒子を顕微鏡観察する。

あるいは 1g 弱の糞便を直接にショ糖液に溶いて、試験管の口から表面張力で液面が盛り上がるまで、試験管立てに立てた新しい試験管を満たす。20 分間室温で静置した後、カバーガラスを液面に触れさせて、浮遊したオーシストをカバーガラスに取る。カバーガラスをスライドガラスに移して、浮いた粒子を顕微鏡観察する。

いずれも蛍光抗体染色がなくても、多数の排出がある場合に、スクリーニング検査としての利用が考えられる。後者の試験管からは、浮いたものを繰り返し金属ループで回収して新しい精製水のチューブに集めたり、蛍光抗体染色しての観察も考えられる。

免疫磁気ビーズ法：

0.5g 未満の糞便を 12mL の PBST に良く懸濁して遠心洗浄した後、キットの A buffer、B buffer の各 1mL と精製水で 12mL 程度にする。よく再懸濁した後、磁気ビーズを添加して、専用装置で回転させながら室温で 1 時間結合させる。磁石で磁気ビーズとクリプトスポリジウムの複合体を集めて、上清の糞便を捨てる。A buffer の 10 倍希釈液、あるいは PBST でチューブ内を洗浄する。複合体を 1mL の A buffer10 倍希釈液で 1.5mL チューブ

に移したら、磁石で磁気ビーズとクリプトスポリジウムの複合体を集めて上清を捨てる。0.1mLの0.1M塩酸を加えて激しく攪拌して10分間待ち、磁気ビーズからクリプトスポリジウムを乖離させる。磁石で磁気ビーズを沈めたら、クリプトスポリジウムを含む塩酸を新しい試験管に回収する。水酸化ナトリウムとPBSTの遠心洗浄で塩酸を中和したら、精製物を蛍光抗体染色と顕微鏡観察に使用する。この精製操作には、専用ガラスチューブではなく、15mLのポリプロピレンチューブを使ったり、スケールダウンして2mLチューブを使ったりもする。

直接観察：

糞便をPBSに懸濁し、スライドガラス上で蛍光抗体染色液と1:1で混合し、カバーガラスをかける。あるいは糞便をスライドガラスに薄く塗抹し、蛍光抗体染色液の十分量を加えて、カバーガラスをかける（ちなみに、Meridianの蛍光抗体キットには、染色後の洗浄など、もう少し丁寧な操作方法が説明されている）。

室温で数分間染色し、顕微鏡観察する。

3-ii-(2) PCR法（rRNAを標的にした逆転写RT-PCR法）

準備するもの：

市販の核酸抽出キット（DNAまたはRNA）。

市販の逆転写リアルタイムPCRキット（Takarabio Cycleave RT-PCR Cryptosporidium (18S rRNA) Detection Kit など）、あるいはカスタム合成プライマーやプローブ等、TE (Tris-EDTA) 緩衝液。

リアルタイムPCR装置、サーマルサイクラー、アガロースゲル電気泳動一式、DNase/RNaseフリーのチューブやピペットチップ類（できれば低吸着のもの）。

核酸抽出：

糞便が十分量ある場合は、糞便用の市販の核酸抽出キットを使用して、DNAを精製する。

糞便に十分量がなければ、微量の糞便から、標準的試料用の市販の核酸抽出キットを利用して、DNAあるいはRNAを精製する。プロトコールに若干の手を加えて、核酸の抽出効率を高めることと、糞便阻害を避けることに気をつける。まずマッチ棒の先より小さい僅かな糞便を出発材料にして、添付Bufferに懸濁する。ここで凍結融解（1～5回）を追加してオーシストを壊し、その後に添付の溶解酵素（Proteinase K等）を使用する。溶解後に軽く遠心分離を行い、溶け残った糞便の残渣を避けつつ、上清の核酸抽出液をカラムにアプライする。最終の抽出サンプルの着色を避けるよう、核酸の溶出直前にある、カラム洗浄の操作を繰り返す（1～5回）。

逆転写反応：

rRNA の一部領域を標的とする場合、増幅サイズが小さければ、増幅効率が高く、検出感度の上昇が見込めるので、逆転写反応を行うことがある。DNA 抽出キットであっても RNA の混入が有り、SSU rRNA からの RT-PCR により感度上昇することがあるので、PCR の前に RT 逆転写の有無を試してみる。逆転写反応試薬には、Poly-T/ランダムプライマー混合を所定の方法で使うのが簡便である（市販の逆転写リアルタイム PCR キットに付属等）。

反応液の組成の例

抽出核酸サンプル	2 μ L
滅菌水	6 μ L
5 倍濃度逆転写試薬	2 μ L
計	10 μ L

サーマルサイクラーを用いて、37°C15 分間反応、85°C5 秒間で酵素失活、冷蔵待機する。ここから 2 μ L を次の PCR に用いる。

PCR：

クリプトスポリジウム属に共通のプライマーが使われている、市販のリアルタイム PCR 試薬を所定の方法で使うのが簡便である。その場合はキット反応液に、インターナルコントロールの鋳型とプライマー・プローブの一式が含まれているので、クリプトスポリジウムの陽性対照を取り扱うこと無く、増幅反応の有無と、阻害の有無を確認できて便利である。陽性対照を省略しても、陰性対照は用意する。

文献をもとにカスタム合成プライマー等を使う場合は、その反応条件に従う。

いずれのプライマー・プローブを使うにしても、あらゆるクリプトスポリジウムの種に対応していると確認が取れているわけではないので、必要により塩基配列決定を行ってクリプトスポリジウムであることの確認や種別を行う。

反応液組成の例

サンプル	2 μ L
プライマー・プローブ	5 μ L
2 倍濃度反応液	12.5 μ L
滅菌水	5.5 μ L
計	25 μ L

リアルタイム PCR 装置等を用いて、所定のプログラムで反応、測定する。

塩基配列決定：

標的の大きさが 300bp 程度と小さいが、十分な量の産物が得られた場合、直接に塩基配列決定が可能であり、シーケンスプライマーを市販キット販売元から入手する。増幅が弱い場合は、後述の semi-nested-PCR を行って鋳型量を十分に作る。

3-ii-(3)PCR 法 (CPB-DIAGF/R プライマーの例)

準備するもの：

先と同様のものに加えて、陽性対照

プライマーの配列¹⁹⁾：

CPB-DIAGF 5' - AAG CTC GTA GTT GGA TTT CTG -3'

CPB-DIAGR 5' - TAA GGT GCT GAA GGA GTA AGG -3'

プロトコール：

先と同様に DNA/RNA を抽出する。

逆転写反応は、標的の大きさが 400bp 強なので、感度向上の効果が先に比べて低下するが、試して良いと思われる。

PCR：

精製水	74.5μL
10×buffer	10μL
dNTP	8μL
20μM CPB-DIAGF	1μL
20μM CPB-DIAGR	1μL
ExTaq hot start version	0.5μL
サンプル	5μL 最大
計	100μL

阻害の軽減等を目的に反応液量を多くしており、目的により加減する。陽性対照、陰性対照を用意する。

反応条件：

94°C 5min 初期変性

94°C 30sec┐

55°C 30sec | ×40 サイクル

72°C 60sec┘

72°C 7min

4~12°C 待機

アガロースゲル電気泳動等により 400bp 強の増幅産物を確認する。必要により塩基配列を確認する。

3-ii-(4)PCR 法 (semi nested-PCR の例)

準備するもの :

先と同様のものに加えて、以下 2nd PCR プライマー、Nested-PCR 用の試験環境。

プライマーの配列 :

Forward プライマーは 1st PCR と同じ

Reverse プライマー 5'-AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-3'

プロトコール :

3-ii-(2) PCR 法 (rRNA を標的にした逆転写 RT-PCR 法) 又は 3-ii-(3)PCR 法 (CPB-DIAGF/R プライマーの例) の増幅産物を、TE 緩衝液を用いるなどして、1/100 ないし 1/10000 倍に希釈し、2nd PCR の鋳型とする。試験環境の汚染に注意して、専用の道具類を用意して行い、1st PCR とは決して共有しない。

PCR :

精製水	38.75µL
10×buffer	5µL
dNTP	4µL
20µM Forward プライマー	0.5µL
20µM Reverse プライマー	0.5µL
ExTaq hot start version	0.25µL
サンプル	1µL
計	50µL

電気泳動と配列決定の操作を目的に反応液量を多くしており、目的により加減する。

反応条件 :

94°C 5min 初期変性

94°C 30sec┐

55°C 30sec | ×35 サイクル

72°C 30sec┘

72°C 7min

4~12°C 待機

アガロースゲル電気泳動等により 300 ないし 400bp の増幅産物を確認する。必要により塩基配列決定を行う。

3-ii-(5)PCR 法 (より高解像度な種別の nested-PCR の例)

準備するもの :

先と同様のものに加えて、以下 Nested-PCR プライマー。

プライマーの配列¹⁸⁾ :

First PCR (forward) 5'-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3'

First PCR (reverse) 5'-CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3'

Second PCR (forward) 5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3'

Second PCR (reverse) 5'-AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-3'

プロトコール :

抽出 DNA を鋳型とする。産物が 800bp 強と長く、逆転写反応による感度の向上は期待していない。

1st PCR :

精製水	28.75 μ L
10 \times buffer	5 μ L
dNTP	4 μ L
5 μ M Forward primer	5 μ L
5 μ M Reverse primer	5 μ L
ExTaq hot start version	0.25 μ L
サンプル	2 μ L
計	50 μ L

2nd PCR :

精製水	29.75 μ L
10 \times buffer	5 μ L
dNTP	4 μ L
5 μ M Forward primer	5 μ L
5 μ M Reverse primer	5 μ L

ExTaq hot start version 0.25 μ L
サンプル 1 μ L
計 50 μ L

反応条件、1st と 2nd PCR に共通：

94 $^{\circ}$ C 5min 初期変性
94 $^{\circ}$ C 30sec \neg
55 $^{\circ}$ C 30sec | \times 30 サイクル
72 $^{\circ}$ C 60sec \perp
72 $^{\circ}$ C 7min
4 \sim 12 $^{\circ}$ C 待機

アガロースゲル電気泳動等により 800bp の増幅産物を確認する。塩基配列決定によりクリプトスポリジウムの確認と種別を行う。多検体のスクリーニング目的には、制限酵素切断パターンによる種別の方法 (RFLP) もある¹⁸⁾。マイナーな種類は塩基配列を読む。

3-ii-(6)クリプトスポリジウム分離法

準備するもの：

免疫不全マウス (BALB/c nu/nu、CB-17/ICR/SCID 等)、動物実験施設 (ABSL2)、事前の動物実験申請

プロトコール：

糞便から、ショ糖浮遊法、塩化セシウム浮遊法、あるいは免疫磁気ビーズ法により、クリプトスポリジウムを精製する。

精製オーシストを免疫不全マウスに経口接種する。

1 \sim 2 週間後に、糞便中に排出されるクリプトスポリジウムのオーシストを検査する。

※注意事項：クリプトスポリジウムは、試験管培養が大変困難である。この方法で分離できるクリプトスポリジウムの種類は、マウスに感染できるものに限られる。マウスは、感染後 1 \sim 2 ヶ月で衰弱死するので、適切な時期に継代と安楽殺を行う。精製により他の病原体との重複感染を低減している。重複感染を徹底して避けるには、消毒してから接種する。

3-iii 各種動物の検査法

3-iii-(1) 犬および猫

十分量の糞便から検査を開始する。

顕微鏡検査法は、ホルマリン固定+脱脂操作+蛍光抗体染色+顕微鏡観察を参照する。

遺伝子検査法は、糞使用の DNA 抽出試薬を使って十分量の核酸を抽出する。PCR はいずれの方法でも可能と期待する。

3-iii-(2) 野生動物および生産動物

十分量の糞便が得られる場合、上述の犬および猫と同様に行う。動物が小さいなど、微量の糞便しか得られない場合は、顕微鏡検査法は、直接塗抹＋蛍光抗体染色＋顕微鏡観察、あるいは塩化セシウム浮遊法＋蛍光抗体染色＋顕微鏡観察を参照する。

遺伝子検査法は、微量の試料から、DNA あるいは RNA 抽出試薬を使って、抽出の効率や糞便阻害に気をつけながら核酸を抽出する。PCR は、標的が短く逆転写を含む、RT-PCR の高感度な方法から順に試す。

4 参考文献

1. Fayer R: General Biology. In: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2nd ed. (Fayer R, Xiao L, ed.), CRC press, Boca Raton, FL, pp1-42, 2008
2. 泉山信司、八木田健司、永宗喜三郎：生水と原虫症（生水のリスク）、公衆衛生、76, 50-53, 2012
3. 埼玉県衛生部、クリプトスポリジウムによる集団下痢症－越生町集団下痢症発生事件－報告書（平成9年3月）、1997
4. Yagita K, Izumiyama S, Tachibana H, Masuda G, Iseki M, Furuya K, Kameoka Y, Kuroki T, Itagaki T, Endo T. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. *Parasitol Res.* 2001 Nov;87(11):950-5.
5. 所正治、クリプトスポリジウム症、寄生虫薬物治療の手引 2020（改訂第 10.2 版）より、熱帯病治療薬研究班、2020、17-19.
6. 渡辺恒二、日本の HAART 時代における HIV 感染合併ジアルジア症・クリプトスポリジウム症、病原微生物検出情報 IASR. 2014; 35: 192-194.
7. Nationally Notifiable Infectious Diseases and Conditions, United States (https://wonder.cdc.gov/nndss/nndss_annual_tables_menu.aspより 2019 年、2023 年 1 月時点)
8. 厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課長、食中毒統計作成要領の改正について（薬生食監発 0329 第 2 号、平成 31 年 3 月 29 日）
9. 水戸康明、西山 篤、大賀まりえ、梅田浩二、岡山県内飼養牛におけるクリプトスポリジウムの浸潤状況および 抗体保有状況、家畜診療 66 (10), 621-625, 2019
10. 武沼浩子、福田 理、大野譲治、工藤真哉、蛭名勇登、瀬川香代子、宮川隆美、クリプトスポリジウム農場実習感染事例、2010 年－青森県、病原微生物検出情報 IASR, 2014;

35: 188-189

11. 浅野由紀子、烏谷竜哉、奥山正明、高見俊才、大瀬戸光明、井上博雄、山本浩二、青陰純子、佐伯紀之、内田和彦、佐伯裕子、鈴木美紀子、山本 公、宇高雅稔、菅 恭三、松浦榮美、木村真理、高校の寮生における集団下痢症事例からのクリプトスポリジウム (*Cryptosporidium meleagridis*) の検出－愛媛県、病原微生物検出情報 IASR、29, 22-23 : 2008
12. Deming C, Greiner E, Uhl EW. Prevalence of *Cryptosporidium* infection and characteristics of oocyst shedding in a breeding colony of leopard geckos (*Eublepharis macularius*). J Zoo Wildl Med. 2008 Dec;39(4):600-7.
13. 阿部仁一郎、吉田永祥、鈴木 淳、黒木俊郎、八木田健司、泉山信司、病原体検出マニュアル「クリプトスポリジウム症・ジアルジア症等の原虫性下痢症」、https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/CryptoGiardia_201709.pdf (2023年1月17日時点)
14. 小林正規、鈴木淳、竹内勤、化学療法の領域、腸管感染症の全て、III 寄生虫・ウイルスを原因とする腸管感染症 3.腸管原虫症の迅速診断、2007、Vol.23, S-1, 141-147
15. 伊藤直之、村岡 登、金井一享、中尾るり子、堀 泰智、星 史雄、樋口誠一、家庭飼育犬および猫におけるクリプトスポリジウム抗原の検出、動物臨床医学、2008、17 巻、1 号、p. 19-23
16. 厚生労働省健康局水道課長。水道水中のクリプトスポリジウム等対策の実施について (通知) , 健水発第 0330005 号 (平成 19 年 3 月 30 日)
17. Dauschies A, Bialek R, Joachim A, Mundt HC. Autofluorescence microscopy for the detection of nematode eggs and protozoa, in particular *Isospora suis*, in swine faeces. Parasitol Res. 2001 May;87(5):409-12.
18. Xiao L, Morgan UM, Limor J, Escalante A, Arrowood M, Shulaw W, Thompson RC, Fayer R, Lal AA. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. Appl Environ Microbiol. 1999 Aug;65(8):3386-91.
19. Johnson, D. W., N. J. Pieniazek, D. W. Griffin, L. Misenerand, and J. B. Rose. 1995. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. Appl. Environ. Microbiol. 61:3849-3855.
20. Peng MM, Matos O, Gatei W, Das P, Stantic-Pavlinic M, Bern C, Sulaiman IM, Glaberman S, Lal AA, Xiao L. A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions. J Eukaryot Microbiol. 2001;Suppl:28S-31S.
21. Spano F, Putignani L, McLauchlin J, Casemore DP, Crisanti A. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. FEMS Microbiol Lett. 1997 May 15;150(2):209-17.

22. Murakoshi F, Ichikawa-Seki M, Aita J, Yaita S, Kinami A, Fujimoto K, Nishikawa Y, Murakami S, Horimoto T, Kato K. Molecular epidemiological analyses of *Cryptosporidium parvum* virus 1 (CSpV1), a symbiotic virus of *Cryptosporidium parvum*, in Japan. *Virus Res.* 2016 Jan 4;211:69-72.
23. Sulaiman IM, Morgan UM, Thompson RC, Lal AA, Xiao L. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Jun;66(6):2385-91.
24. 山本徳栄, 砂押克彦, 山口正則, 森田久男, 森永安司, 川名孝雄, 高木正明, 鳥海 宏, 所 正治, 井関基弘. クリプトスポリジウム症患者におけるオーシスト排出数の推移と排出期間. *Clin Parasitol* 16: 53-57, 2005.
25. 古屋宏二, 木村浩男, 中岡祐司, 村上晋一, 山本徳栄, 遠藤卓郎, *Cryptosporidium parvum* オーシストの簡易分離法、臨床と微生物 1998, 25 (6), 869-871
26. 井関基弘. 新しい腸管寄生原虫の検査. *検査と技術* 25: 335-341, 1997.

5 連絡先 (執筆者情報)

泉山 信司 (国立感染症研究所寄生動物部)

問い合わせ先

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

国立感染症研究所寄生動物部

電話 03-5285-1111

E-mail: izmym@niid.go.jp

6 謝辞等

本マニュアルは、病原体検出マニュアル「クリプトスポリジウム症・ジアルジア症等の原虫性下痢症」を参考にして作成された。

トキソプラズマ症ガイドンス

目次

1. 感染症の概説(人と動物の症状)
 - 1-i 病原体の性状
 - 1-ii 疫学(人と動物)
2. 検体の取り扱い
 - 2-i 検体取り扱い上の注意(バイオセーフティ)
 - 2-ii 各種動物からの検体採取法
 - 2-iii 検体の輸送法
 - 2-iv 検体の保存法
3. 検査法
 - 3-i 検査法(総論)
 - 3-ii 検査法(各論)
 - 3-ii-(1)原虫分離法
 - 3-ii-(2) PCR 法
 - 3-ii-(3) 糞便検査法
 - 3-ii-(4) 間接蛍光抗体法
 - 3-ii-(5) ELISA
 - 3-iii 各種動物の検査法
 - 3-iii-(1)猫
 - 3-iii-(2)野生動物および生産動物
4. 参考文献
5. 連絡先
6. 謝辞など

1 感染症の概説(人と動物の症状)

1-i 病原体の性状

トキソプラズマ症は、アピコンプレクサに属する一属一種の寄生性原生生物（原虫）であるトキソプラズマ（*Toxoplasma gondii*）の感染により起こされる感染症である。トキソプラズマの終宿主はネコ科（イエネコおよびその近縁種）動物のみであり、感染ネコの糞便中にオーシストが排出される。土壌、水、植物性物質、またはネコのトイレがオーシストで汚染されると感染源となり、経口的に摂取することで自然界の中間宿主（例、鳥類、齧歯類、野生猟獣、ヒトの食用に飼育される家畜）に感染する。摂取後すぐにオーシストがタキゾイトに発育し、体中に広がり、神経、眼、および筋組織でブラディゾイトからなる組織シストを形成する。組織シストを保有した中間宿主を摂取してネコが感染することで、トキソプラズマの生活環が成立する。ヒトは組織シストを含む加熱調理が不十分な食肉、環境由来のオーシストを摂取して感染する可能性があり、妊娠期の初感染による母親から胎児への経胎盤感染や、慢性感染者が免疫不全状態になり組織シストが再活性化することによるトキソプラズマ脳炎に注意する必要がある。

1-ii 疫学(人と動物)(家伝法など国内における法律上の扱い含む)

これまでの国内外の疫学調査から多くの哺乳動物、鳥類がトキソプラズマに感染することが示されており、幅広い宿主域を有すると考えられている。

ヒトのトキソプラズマ症は、感染症法に規定された感染症とは異なり届出義務がないため、国内における年間発生件数や、症状ごとの発生動向の把握が難しい。一方で、ヒツジ、ヤギ、ブタ、イノシシにおけるトキソプラズマ症は家畜伝染病予防法の監視伝染病（届出伝染病）となり、届出が義務付けられている（家畜伝染病発生情報データベース https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html）。また、と畜場法および食鳥検査法により感染動物は全廃棄処分となる。

[ヒト] ヒトにおけるトキソプラズマ症には、先天性トキソプラズマ症と後天性トキソプラズマ症がある。前者では、妊娠中に初めてトキソプラズマに感染すると、流産、死産、水頭症や発達障害などを引き起こす恐れがある。後天性トキソプラズマ症では、免疫機能の正常な成人がトキソプラズマに感染してもほとんどの場合には重篤な症状を示さず慢性感染へ移行するが、子供や AIDS、臓器移植などで免疫抑制状態にある患者が感染あるいは原虫が再活性化した場合には重篤な脳炎、心筋炎などで死に至ることもある。また、眼トキソプラズマ症は、視力障害、眼痛などを引き起こす。国内におけるトキソプラズマ症の年間発生件数や、症状ごとの発生動向の把握は難しいのが現状であるが、医療機関が健康保険組合等に提出する診療報酬明細書のレセプトデータ（2010～2018年）を用いた国内におけるトキソプラズマ症の病状別の割合を算定した調査報告では、眼トキソプラズマ症が 84.2%、先天

性トキソプラズマ症が 11.2%、トキソプラズマ脳症が 4.6%となっている¹。妊婦における抗体陽性率は数報の報告があり、調査年代は異なるが妊婦におけるトキソプラズマ IgG の陽性率は概ね 2-10%程度である。先天性トキソプラズマ症児は、10 万出生当たり 0.13~1.1 例であり、熱帯病治療薬研究班での登録症例では 10 年弱の間に 17 例となる²。

[ネコ] ネコ科動物はトキソプラズマの終宿主であり、原虫がネコの腸管で有性生殖をおこなうことでオーシストを形成し、糞便中に排出される。実験感染により、ネコは 1 週間で 10⁷ 個~10⁸ 個のオーシストを排出することが報告されている。しかし、自然界のネコ科動物がどれくらいの頻度と量でオーシストを排出しているかは不明である。その陽性率は家ネコで 30~40%、調査対象国の 80%以上に感染ネコの存在が示されている³。日本での感染率は 9~13%であるが、沖縄では 27%との報告がある⁴。ネコにおける臨床症状は、発熱 (40°C 以上)、呼吸器疾患、腸間膜リンパ節の腫脹、虹彩炎、網膜炎がある。

[生産動物] ブタのトキソプラズマ症は実際に日本で問題となり、家畜衛生、公衆衛生の両面から注目を浴びてきた。全国の届出数のほぼ 100%を沖縄県が占めている⁵。ブタのトキソプラズマ症に特有な症状はないが、発熱 (40~42°C)、呼吸器症状、食欲不振、耳翼・下腹部・四肢の内側に鬱血性の紅斑や紫斑、体表リンパ節の腫脹、仔豚 (2~3 ヶ月齢) の神経症状が報告されている。特徴的な内臓の肉眼所見は、肝臓の白色結節および点状出血、腸間膜リンパ節の腫大および出血である。ヒツジとヤギはトキソプラズマ感染に対し感受性が高いとされている。沖縄県では食用のためのヤギの飼養が盛んであるが、2008-2009 年にと畜場に搬入されたヤギの抗体陽性率は 50%を越えており、本症による流産や原虫の分離が報告されている⁵。ヒツジのトキソプラズマ症に特徴的な症状は流産であり、感染による発熱とホルモン調節の破綻が影響している。北日本での調査では、29%の感染が報告されている⁶。室内飼いのニワトリではトキソプラズマの感染は確認されないが、放し飼いのニワトリでの感染が報告されている⁷。

[野生動物] トキソプラズマは幅広い宿主域を有しており、日本でもさまざまな種類の野生動物への感染が報告されている。エゾシカで 47.5%⁸、ニホンジカで 1.9%⁹のトキソプラズマ抗体の陽性が確認されている。また、イノシシでも 6.3%のトキソプラズマ抗体の陽性が確認されており⁹、ジビエとしての利用が推進されてきている野生鳥獣については食品衛生的に注意する必要がある。さらに、トキソプラズマの海棲哺乳類への感染も報告されている¹⁰。実際、日本でもクジラ肉の生食によるトキソプラズマ等の寄生虫が原因と推定される有症事例が発生している¹¹。二枚貝類はトキソプラズマの宿主ではないが、濾過摂食性であるため水中のオーシストを濃縮する危険性があり、海外で感染例が複数報告されている¹²。一方、日本での二枚貝のトキソプラズマ汚染状況は知られておらず、今後の調査が必要とされる。

2 検体の取り扱い

2-i 検体取り扱い上の注意(バイオセーフティ)

動物の臨床検体中にトキソプラズマが含まれ、ヒトへの感染源となることを十分に理解し、慎重な取り扱いが必要である。臨床検体は BSL2 施設および安全キャビネット内で取り扱い、作業中は個人用防護具(グローブ、マスク、ガウンなど)を着用する。

2-ii 各種動物からの検体採取法

動物の診断に用いる検査方法と必要な材料は以下の表に示した。

検査方法		材料
病原検査	原虫分離・同定	組織（筋肉、脳、胎盤など）
	PCR 法	
	糞便検査法	ネコの糞便
抗体検査	間接蛍光抗体法	血清
	ELISA	

2-iii 検体の輸送法

採材された組織や血清は密封容器(一次容器)に入れ、緩衝材および吸収剤とともに密封性の二次容器に入れる。これを非密封性の三次容器に入れて輸送する。

2-iv 検体の保存法

検体は、検査まで冷蔵保存とし、できるだけ早く検査を実施する。すぐに実験室診断を行わない場合(疫学調査など)には冷凍保存する。

3 検査法

3-i 検査法(総論)

トキソプラズマ感染の検査は病原学的検査(原虫分離法、PCR 法)と血清学的検査(間接蛍光抗体法、ELISA)に分けられる。ネコの糞便にはオーシストが存在する可能性があるため、糞便検査が実施できる。各種動物の血清疫学調査等における陽性判定は、ELISA や間接蛍光抗体法による IgM 抗体および IgG 抗体の検出により行われる。動物種により ELISA による診断感度が異なることから、カットオフ値は動物種毎に設定する必要がある。

3-ii 検査法(各論)

3-ii-(1)原虫分離法¹³

感染源としては、心臓や横隔膜の筋肉、流産個体の胎盤や胎児、あるいは生きたまま捕獲したネズミの骨格筋や脳などが有効である。冷凍保存あるいは長期の冷蔵保存をした検体からの原虫分離は難しい。どの検体からバイオアッセイを行うかを定める前に、抗体検査を行って陽性動物を確定することが望ましい。

3-ii-(1)-a ホモジネートの作製方法

脳サンプルの場合

準備するもの：

PBS、組織ホモジナイザー、酸性ペプシン溶液(0.52% ブタ胃粘膜由来ペプシン(Sigma Cat# P-7000)、170 mM NaCl、pH 1.1-1.2 in H₂O)、中和液(1.2% Sodium Bicarbonate、pH 8.3 in PBS)、DMSO

プロトコール：

- 脳組織 1~2 g に対し 1~2 ml の PBS を入れ、組織ホモジナイザーを用いてホモジナイズする。
- 同量の酸性ペプシン溶液を加え、37°Cで 45 分間保温する。
- 500×gで 10 分間遠心する。
- 沈殿物を中和液に懸濁し、500×gで 10 分間遠心する。これを 2 回繰り返す。
- 沈殿物を PBS に再懸濁する。
- DMSO を 10%添加し、凍結保存するか、マウスあるいは動物細胞に接種する(下記プロトコール参照)。

その他の組織サンプルの場合

準備するもの：

解剖用ハサミまたはメス、ホモジナイザーまたはブレンダー、PBS、氷、酸性ペプシン溶液

(0.52% ブタ胃粘膜由来ペプシン (Sigma Cat# P-7000)、170 mM NaCl、pH 1.1-1.2 in H₂O)、ガーゼ、50 ml チューブ、中和液 (1.2% Sodium Bicarbonate、pH 8.3 in PBS)、DMSO

プロトコール：

- 筋肉サンプル (～20 g) を解剖用ハサミまたは使い捨てメスで細かく刻む。
- ホモジナイザーまたはブレンダーを使用して、十分な量の PBS を用いて十分に粉砕する。
- サンプルを氷上に置き、25 ml になるように PBS を加える。
- 全サンプルがホモジナイズされたら、25 ml の酸性ペプシン溶液を加え、転倒混和し、37°C、45 分間、振とうする。
- 各サンプルを清潔な二重ガーゼで濾過し、新しい 50 ml チューブに入れる。
- 濾液を 500×g で 10 分間遠心する。
- 沈殿物を 10 ml の中和液に懸濁し、500×g で 10 分間遠心する。これを 2 回繰り返す。
- 沈殿物を 1-2 ml の PBS に懸濁する。
- DMSO を 10% 加え、凍結保存するか、マウスあるいは動物細胞に接種する (下記プロトコール参照)。

3-ii-(1)-b マウスからの原虫の回収方法

トキソプラズマ分離のためのマウス接種法

準備するもの：

感染動物組織のホモジネート (髄液、末梢血単核細胞などの臨床液も可)、近交系マウス (8-10 週齢、20g 程度)、25G の注射針、PBS、DMEM 培地、解剖用ハサミまたはメス、ホモジナイザーまたはブレンダー

プロトコール (高病原性株の分離)：

- 感染動物組織のホモジネート 0.25～0.5 ml を 25G の注射針を使用して、マウスへ腹腔内投与する。
- マウスの臨床症状を毎日観察する。高病原性株は、接種後最初の 6～8 日でマウスが致死する可能性がある。
- 接種後 6～10 日の間に臨床症状及び腹水の貯留が確認されたら、滅菌した冷 PBS を 10 mL 腹腔に注入することにより腹水を回収する。
- 回収した腹水中に原虫が存在するか顕微鏡下で確認する。
- 回収した腹水を氷上のチューブに入れ、400×g、4°C で 10 分間遠心する。
- 沈殿物を 1 ml の DMEM に再懸濁する。
- 適量をマウスへ再接種、あるいは動物細胞への接種 (下記プロトコール参照) により原虫株を維持する。

プロトコール（低病原性株の分離）：

- ホモジネート接種後にマウスの臨床症状が認められなかった場合、スルファジアジン（0.2～0.6 mg/ml を飲料水中に 1~2 週間）を投与する。
- マウスの臨床症状を毎日観察し、腹水の貯留が確認されたら、上述の方法により原虫の分離を試みる。
- 腹水の貯留が確認されなかった場合、ホモジネート接種後 1~2 ヶ月でマウスを安楽殺し、脳を採材する。
- 1 ml の PBS でホモジナイズする（脳サンプルの場合のプロトコール参照）。
- 適量をマウスへ再接種する、あるいは動物細胞への接種（下記プロトコール参照）により原虫株を維持する。

3-ii-(1)-c トキソプラズマ分離のための培養法

トキソプラズマの株は、組織ホモジネートや臨床検体から直接動物細胞へ接種して培養することで分離することができる。線維芽細胞を 1~2 週間前に準備する。

準備するもの：

ヒト線維芽細胞（MRC5：ATCC#CCI-171、NB1RGB：RCB0222、など）、培養プレート、FBS、DMEM 培地、組織培養フラスコ

プロトコール：

- 24、12、または 6 ウェル培養プレートに 10% FBS を含む DMEM でヒト線維芽細胞がコンフルエントになるまで培養する。
- 1 ウェルあたり 0.1~0.2 ml のサンプル（1~2 ml の 10% FBS を含む DMEM）をヒト線維芽細胞に接種する。
- 接種後 1 日目に細胞を滅菌 PBS で 3 回洗浄し、新しい 10% FBS を含む DMEM で培養を再開し、5~7 日間培養する。
- この期間の終わりには、原虫が細胞内でロゼットとして成長しているのが確認できるはずである。
- 原虫をヒト線維芽細胞を含む 25 cm² 組織培養フラスコ、次に 75 cm² 組織培養フラスコで培養し、増殖が確認されたものを 96 ウェル培養プレートを用いた限界希釈法によりクローニングする。

3-ii-(1)-d トキソプラズマ分離株の冷凍保存方法

準備するもの：

ヒト線維芽細胞（MRC5：ATCC#CCI-171、NB1RGB：RCB0222、など）、組織培養フラスコ、FBS、DMEM 培地、セルスクレーパー、DMSO、クライオチューブ、フリージングチ

チャンバー

プロトコール：

- コンフルエントなヒト線維芽細胞を含む 25 cm²組織培養フラスコに、原虫を接種する。
- 感染が進み、ロゼットが形成されたら（接種後 1~2 日）、凍結保存の準備をする。
- 新しい 10% FBS を含む DMEM で 2 回洗浄し、セルスクレーパーで感染細胞を剥離する。
- 回収した感染細胞をチューブに入れ、400 × g、4°C で 10 分間遠心分離する。
- 沈殿物を 1 ml の細胞保存液（10% DMSO, 90% FBS）に懸濁し、クライオチューブに入れる。
- クライオチューブをフリージングチャンバーに浸漬させ、-80°C に一晩置く。
- 長期保存のために、-150°C または液体窒素中にて保管する。
- この方法で調製したサンプルは、ドライアイスで輸送することができる。DMSO で適切に保存されたサンプルは数年間生存可能であり、マウスへの再注入や組織培養モノレイヤーへの接種により蘇生させることができる。

3-ii-(2)PCR 法^{10,14}

準備するもの：

検査用組織サンプルあるいは血液サンプル、細胞溶解緩衝液（0.1M Tris-HCl pH 9.0, 1% SDS, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA）、100 μg/ml Protinase K、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25:24:1, v/v）、エタノール、ボルテックスミキサー、TE 緩衝液（10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA）、dNTP、プライマー（下記参照）、Taq Gold、サーマルサイクラー、電気泳動装置、電気泳動用アガロース、電気泳動用バッファー

プロトコール：

- 検査用サンプルから 0.5~1.0 g 採材し、10 倍容量の細胞溶解緩衝液と 100 μg/ml Protinase K を加え、50°C で 1~4 日ほど転倒させながら反応させサンプルを溶解する。
- 500 μl の組織溶解液を回収し、等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25:24:1, v/v）を加え、室温で 5 分間転倒させながらよく混ぜる。
- 2,000 × g、5 分間、室温で遠心する。
- 2 層に分離するので、上層（DNA 層）から 400 μL 回収し、チューブに移す。
- 2 倍量の 100%エタノールを加え、転倒させながらよく混ぜる。
- 10,000 × g、10 分間、4°C で遠心する。
- 沈殿物に 200 μL の 70%エタノールを加え、ボルテックスミキサーで攪拌する。
- 10,000 × g、5 分間、4°C で遠心する。
- 液体をできるだけ取り除き、沈殿物を風乾させる。
- 沈殿物に 100 μL の TE 緩衝液を加え、ボルテックスミキサーで穏やかに攪拌する。

- DNA 量を測定し、以下の組成で反応液を調整する。

標的遺伝子： *B1* 遺伝子 (AF179871)

1st PCR

DNA (100 ng/μl)	1 μl
10× Buffer	2 μl
2 mM dNTP	2 μl
TgB1 NT-1st-1F (50 μM)	0.4 μl
TgB1 NT-2R (50 μM)	0.4 μl
Taq Gold	0.2 μl
DW	14 μl
total	20 μl

1st PCR (464 bp の DNA 増幅)

F primer 5' (TgB1 NT-1st-1F)- 5'-GGG GAA GAA TAG TTG TCG CA-3'

R primer 5' (TgB1 NT-2R)- 5'-GAT CCT TTT GCA CGG TTG TT-3'

- PCR チューブをサーマルサイクラーにセットし、以下の条件で反応を行う。

95°C

5min

95°C 15 sec

57°C 15 sec

72°C 1 min

72°C 7 min

40 cycles

- 反応終了後、Gel loading dye と PCR 反応液を混合し、1.5%アガロースゲルで電気泳動を行う。

- 染色後トランスイルミネーターを用いて PCR 反応物(464 bp)が確認された場合には陽性と判定する。

- PCR 反応物が確認されない場合は、PCR 反応液の 1 μl を用いて 2nd PCR (ネステッド PCR) を実施する。

2nd PCR

DNA from 1 st PCR	1 μl
reaction	

10× Buffer	2 μl
2 mM dNTP	2 μl
TgB1 NT-2nd-1F (50 μM)	0.4 μl
TgB1 NT-2R (50 μM)	0.4 μl
Taq Gold	0.2 μl
DW	14 μl
total	20 μl

2nd PCR (306 bp の DNA 増幅)

F primer 5' (TgB1 NT-2nd-1F)- 5'-GCT CTA GCG TGT TCG TCT CC-3'

R primer is TgB1 NT-2R.

- PCR チューブをサーマルサイクラーにセットし、以下の条件で反応を行う。

95°C

5min

95°C 15 sec

57°C 15 sec

72°C 1 min

72°C 7 min

40 cycles

- 反応終了後、Gel loading dye と PCR 反応液を混合し、1.5%アガロースゲルで電気泳動を行う。

- 染色後トランスイルミネーターを用いて PCR 反応物(306 bp)が確認された場合には陽性と判定する。

3-ii-(3) 糞便検査法¹⁴

準備するもの：

プラスチック製、紙製、ガラス製容器 (250 ml)、舌圧子、ガーゼまたはチーズクロス、パスツールピペット、ゴム球、剃刀、はさみ、遠沈管、遠心分離機 (浮上式)、顕微鏡、カバーガラス、スライドガラス、廃棄ピペットを入れる容器、比重 1.15 のショ糖液 (砂糖 53g、水 100ml)、液体フェノール、硫酸

プロトコール：

- 糞便検体を使い捨ての防水容器に採取する。

- 糞が濡れる程度の水を加え、蓋をして糞が軟らかくなるまで 1~2 時間以上放置する (胞

子形成防止のため 4°C が望ましい)。

- ショ糖浮遊液を添加する前に、糞を十分に乳化させる。舌圧子で糞を乳化させながら、5~10 容量程度のショ糖液をゆっくりと加える。
- 1~2 枚のチーズクロスまたはガーゼを輪ゴムで容器に固定し、乳化させた糞を濾す。
- 濾した糞を 50 ml のチューブに入れ、上端から 1~2 cm の所まで満たす。
- 400×g、10 分間、室温で遠心分離する。
- バルブ付きディスポーザブルピペットでチューブの最上部から 1~3 滴をサンプリングする。
- この液滴をスライドグラスにのせ、カバースリップで覆う。
- スライドを平らな面に 1~5 分間置いて、糞便の粒子を固定化する。100 倍で検鏡し、コクシジウムのオーシストを確認した後、さらに 400 倍で検鏡する。
- トキソプラズマのオーシストは 10~12 μm で、イソスポーラ (*Isospora felis*, *Cystoisospora felis*) の約 1/4、猫回虫 (*Toxocara cati*) の卵の 1/6~1/8、赤血球の約 2 倍の大きさである。顕微鏡による検出の閾値は、糞便 1 g あたり約 1,000 個のオーシストと推定される。
- 確定診断のためには、糞便をマウスに接種して、ハモンドディア (*Hammondia hammondi*) のオーシストと鑑別する必要がある。
- 上記遠心後の糞便懸濁液の一番上の上澄み液 0.5 ml と 2% 硫酸 4.5 ml を混和する。
- キャップをした後、室温で 3~7 日間放置する。瓶を振ると、オーシストの通気性がよくなる。
- マウスに接種する場合、保存したオーシストを水で希釈し遠心分離して硫酸を除去するか、指示薬として 2% フェノールレッドを含む 3.3% 水酸化ナトリウムで中和することが可能である。
- 原虫分離法に記載の方法により、トキソプラズマの分離が可能である。

3-ii-(4) 間接蛍光抗体法

準備するもの：

組織培養フラスコ、Vero 細胞、トキソプラズマ標準株、PBS、セルスクレーパー、27G の針、シリンジ、5 μm フィルター、血球計算盤、アセトン固定容器、血清希釈液 (Na₂HPO₄ 1.19 g, NaH₂PO₄ 0.22 g, NaCl 8.55 g, BSA 10 g, total 1L in H₂O)、洗浄液 (Na₂CO₃ 11.4 g, NaHCO₃ 33.6 g, NaCl 8.5 g, total 1L in H₂O)、封入剤 (50%グリセロール、50% 洗浄液)、蛍光標識二次抗体(各動物種 IgG あるいは IgM に対する抗体)、免疫蛍光染色用スライドガラス

プロトコール：

- 75 cm² 組織培養フラスコで培養した Vero 細胞(コンフルエント)に MOI=2.5 相当のトキソプラズマ標準株を添加する。

- 感染 2~3 日後に感染細胞を PBS で 2 回洗浄し、5 mL PBS を添加してセルスクレーパーで感染細胞を剥離する。
- 27G の針を装着したシリンジで感染細胞液を複数回懸濁し、5 μ m フィルターで濾過し、チューブへ回収する。
- 400 \times g、室温で 10 分間遠心分離する。
- 沈殿物を 1 ml PBS で懸濁し、血球計算盤で原虫数を測定する。
- 10⁵原虫を免疫蛍光染色用スライドガラス上のウェルにスポットする(10 μ l/ウェル)。
- 安全キャビネット内の UV 照射下で、2 時間完全に乾燥させる。
- アセトンを入れた容器にスライドを浸し、3 分間細胞を固定する。
- 免疫蛍光染色用スライドガラスを取り出して風乾後する。スライドは使用まで-30°Cで保管する
- 検査時に免疫蛍光染色用スライドガラスを取り出して室温に戻しておく。
- 披検血清は 60°Cで 30 分間処理して非働化したのち、血清希釈液で 10 倍から 640 倍まで 2 倍段階希釈列を作製する。
- 血清希釈液を 20 μ L ずつウェルにアプライして、30 分間室温でブロッキングする。
- 洗浄液で洗浄後、各希釈血清を 20 μ L ずつウェルにアプライする。
- 湿潤箱に免疫蛍光染色用スライドガラスを入れて 37°Cで 1 時間反応後、洗浄液で 2 回洗浄する。
- 血清希釈液で希釈した蛍光二次抗体をウェルにアプライする。
- 湿潤箱に免疫蛍光染色用スライドガラスを入れて 37°Cで 1 時間反応後、スライドを洗浄液で 2 回洗浄する。
- 封入剤をスライドガラス上に添加し、カバーガラスを載せて蛍光顕微鏡で蛍光を確認する

注意事項：蛍光が確認できる最大の希釈倍率を抗体価とし、50 倍以上を陽性とする。

3-ii-(5) ELISA ¹⁵⁻²⁰

準備するもの：

炭酸-重炭酸緩衝液 (pH 9.6)、組換え抗原 TgGRA7、トキソプラズマ虫体ライセート、ELISA プレート (Nunc 社製)、PBS-T (0.05% Tween20 を含む PBS)、PBS-SM (3%スキムミルクを含む PBS)、披検血清、ペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗体、基質溶液 (0.1 M クエン酸、0.2 M リン酸ナトリウム、0.003% H₂O₂、0.3 mg/ml 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid))、プレートリーダー

プロトコール：

-炭酸-重炭酸緩衝液を用いて 0.1 μ M の最終濃度で精製した組換え抗原 TgGRA7、あるいは 5 μ g/mL で調整したトキソプラズマ虫体ライセートを ELISA プレートに 50 μ l/ウェルで分

注する。

- 4℃で一晩静置後（コーティング）、ELISA プレートに PBS-T で 1 回洗浄する。
- PBS-SM を ELISA プレートに 100 μl/ウェルで添加し、37℃、1 時間静置する。
- ELISA プレートを PBS-T で 1 回洗浄し、PBS-SM で 200 倍に希釈した披検血清を 50 μl/ウェルで添加し、37℃、1 時間静置する。
- ELISA プレートを PBS-T で 6 回洗浄し、至適濃度に希釈した HRP 標識抗体を 50 μl/ウェルで添加し、37℃、1 時間静置する。
- ELISA プレートを PBS-T で 6 回洗浄し、基質溶液を 50 μl/ウェルで添加し、室温で 1 時間静置する。プレートリーダーを用いて、415 nm の吸光度を測定する。

注意事項：標準陰性血清を複数用意し、それら吸光度の平均値に 3～5 標準偏差を加えた値をカットオフ値として設定する。

3-iii 各種動物の検査法

3-iii-(1)ネコ

トキソプラズマ感染が疑われるネコの場合、通常は間接蛍光抗体法による IgG 抗体の検査が行われる。感染ネコは 1 週間で 10^7 個～ 10^8 個のオーシストを排出するとされるため、糞便からのオーシストの同定が確定診断となる。疫学調査目的では、分子疫学調査で PCR 法、血清疫学調査で ELISA が有効である。

- 診断用抗体検査 3-ii-(4) 間接蛍光抗体法を参照
- 診断用原虫同定 3-ii-(3) 糞便検査法、3-ii-(1)原虫分離法、を参照
- 疫学用遺伝子検査 3-ii-(2) PCR 法を参照
- 疫学用抗体検査 3-ii-(5) ELISA を参照

3-iii-(2)野生動物および生産動物

血清疫学調査には、間接蛍光抗体法あるいは ELISA によるトキソプラズマ特異抗体の検出および PCR 法による原虫遺伝子の検出が行われる。原虫の同定には、組織サンプルからの原虫分離法が行われる。

- 疫学用抗体検査 3-ii-(4) 間接蛍光抗体法、3-ii-(5) ELISA、を参照
- 疫学用遺伝子検査 3-ii-(2) PCR 法を参照
- 疫学用原虫分離 3-ii-(1)原虫分離法を参照

4 参考文献

1. 永宗喜三郎, 森島康之. 2022. レセプトデータを用いた日本国内におけるトキソプラズマ症発生動向の推定. 病原微生物検出情報 43:3-4.
2. 山元桂. 2022. 日本における先天性トキソプラズマ症の実状. 病原微生物検出情報 43:9-11.
3. Jones, J. L., Dubey, J. P. 2010. Waterborne toxoplasmosis--recent developments. Exp. Parasitol. 124:10-25.
4. Kyan, H., Takara, T., Taira, K., Obi, T. 2021. *Toxoplasma gondii* antibody prevalence and isolation in free-ranging cats in Okinawa, Japan. J Vet Med Sci. 83: 1303-1305.
5. 喜屋武向子, 柿田徹也, 眞榮城徳之, 仁平稔, 高良武俊, 久場由真仁, 久手堅剛. 2022. 沖縄県におけるトキソプラズマ症の現状. 病原微生物検出情報 43:4-5.
6. Giangaspero, M., Bonfini, B., Orusa, R., Savini, G., Osawa, T., Harasawa, R. 2013. Epidemiological survey for *Toxoplasma gondii*, *Chlamydia psittaci* var. *ovis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Coxiella burnetii*, *Brucella* spp., leptospirosis and Orf virus among sheep from northern districts of Japan. J Vet Med Sci. 75:679-684.
7. Duong, H. D., Appiah-Kwarteng, C., Takashima, Y., Aye, K. M., Nagayasu, E., Yoshida, A. 2020. A novel luciferase-linked antibody capture assay (LACA) for the diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in chickens. Parasitol Int. 77:102125.
8. Hoshina, T., Fukumoto, S., Aonuma, H., Saiki, E., Hori, S., Kanuka, H. 2019. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild sika deer in Japan. Parasitol Int. 71:76-79.
9. Matsumoto, J., Kako, Y., Morita, Y., Kabeya, H., Sakano, C., Nagai, A., Maruyama, S., Nogami, S. 2011. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild boars (*Sus scrofa leucomystax*) and wild sika deer (*Cervus nippon*) in Gunma Prefecture, Japan. Parasitol Int. 60:331-332.
10. Nakagun, S., Amano, M., El-Alfy, E. N., Nishikawa, Y., Shiozaki, A., Tajima, Y., Yamada, T. K., Kobayashi, Y. 2021. Disseminated toxoplasmosis in a narrow-ridged finless porpoise (*Neophocaena asiaeorientalis*) with transplacental embryonal transmission. J Wildl Dis. 57:205-210.
11. 村田理恵, 神門幸大, 前野愛, 鈴木淳, 横山敬子, 新開敬行, 貞升健志, 館山優乃, 西野孝洋, 永宗喜三郎. 2022. トキソプラズマ等の寄生原虫が検出された鯨肉の喫食による都内有症事例. 病原微生物検出情報 43:6-8.
12. 松原立真. 2022. 海外で新しく見出されてきた貝類のトキソプラズマ汚染の現状と感染源としての可能性. 病原微生物検出情報 43:8-9.
13. Nishimura, M., Goyama, T., Tomikawa, S., Fereig, R. M., El-Alfy, E. N., Nagamune, K., Kobayashi, Y., Nishikawa, Y. 2019. Outbreak of toxoplasmosis in four squirrel monkeys

- (*Saimiri sciureus*) in Japan. Parasitol Int. 68:79-86.
14. El-Alfy, E. S., Abu-Elwafa, S., Abbas, I., Al-Araby, M., Al-Kappany, Y., Umeda, K., Nishikawa, Y. 2019. Molecular screening approach to identify protozoan and trichostrongylid parasites infecting one-humped camels (*Camelus dromedarius*). Acta Trop. 197:105060.
 15. Terkawi, M. A., Kameyama, K., Rasul, N. H., Xuan, X., Nishikawa, Y. 2013. Development of an immunochromatographic assay based on dense granule protein 7 for serological detection of *Toxoplasma gondii* infection. Clin Vaccine Immunol. 20:596-601.
 16. Ybañez, R. H. D., Kyan, H., Nishikawa, Y. 2020. Detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in cats using an immunochromatographic test based on GRA7 antigen. J Vet Med Sci. 82:441-445.
 17. Pagmadulam, B., Myagmarsuren, P., Yokoyama, N., Battsetseg, B., Nishikawa, Y. 2020. Seroepidemiological study of *Toxoplasma gondii* in small ruminants (sheep and goat) in different provinces of Mongolia. Parasitol Int. 74:101996.
 18. Pagmadulam, B., Myagmarsuren, P., Fereig, R. M., Igarashi, M., Yokoyama, N., Battsetseg, B., Nishikawa, Y. 2018. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in cattle in Mongolia. Vet Parasitol Reg Stud Reports. 14:11-17.
 19. Fereig, R. M., Mahmoud, H. Y. A. H., Mohamed, S. G. A., AbouLaila, M. R., Abdel-Wahab, A., Osman, S. A., Zidan, S. A., El-Khodary, S. A., Mohamed, A. E. A., Nishikawa, Y. 2016. Seroprevalence and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in farm animals in different regions of Egypt. Vet Parasitol Reg Stud Reports. 3-4:1-6.
 20. Ichikawa-Seki, M., Guswanto, A., Allamanda, P., Mariamah, E. S., Wibowo, P. E., Igarashi, I., Nishikawa, Y. 2015. Seroprevalence of antibody to TgGRA7 antigen of *Toxoplasma gondii* in livestock animals from Western Java, Indonesia. Parasitol Int. 64:484-486.

5 連絡先(執筆者情報)

西川 義文 (帯広畜産大学原虫病研究センター)

問い合わせ先

〒080-8555 北海道帯広市稲田町西2線13番地 帯広畜産大学原虫病研究センター

電話 0155-49-5886

E-mail: nisikawa@obihiro.ac.jp

6 謝辞等

本マニュアルの作成にあたり、研究室員及び多くの関係者のご協力に感謝いたします。

エキノコックス症ガイドンス

目次

1	感染症の概説（人と動物の症状）	
1-i	病原体の性状	1
1-ii	疫学（人と動物）	1
2	検体の取り扱い	
2-i	検体取り扱い上の注意	3
2-ii	各種動物からの検体採取法	3
2-iii	検体の輸送法	3
2-iv	検体の保存法	3
3	検査法	
3-i	検査法（総論）	4
3-ii	検査法（各論）	4
3-iii	各種動物の検査法	8
4	参考文献	9
5	連絡先	10
6	謝辞	10

1 感染症の概説（人と動物の症状）

1-i 病原体の性状

エキノコックス症を引き起こすエキノコックス *Echinococcus* 属は、扁形動物門条虫綱円葉目テニア科に属し、単包条虫 *E. granulosus**、多包条虫 *E. multilocularis*、ヤマネコ包条虫 *E. oligarthrus*、フォーゲル包条虫 *E. vogeli*、*E. shiquicus*（和名未定）の5種からなる。公衆衛生上の重要種は単包条虫と多包条虫で、わが国の感染症法においても両種を四類感染症「エキノコックス症」の病原体に指定している。現在、日本国内には単包条虫の常在は認められず、主に多包条虫が問題となっている。

多包条虫は生活環を完結させるために2種の宿主を必要とする。キツネをはじめとするイヌ科動物が成虫（有性生殖により虫卵を産生）の寄生する終宿主に、ハタネズミ（ミズハタネズミ）亜科齧歯類が幼虫（無性生殖により原頭節を形成）の寄生する中間宿主となる。

1-ii 疫学（人と動物）

【人】日本国内で最初に発見された人の多包虫症は1926年に宮城県から報告された症例とされるが¹、多嚢型単包虫であった可能性を否定できない。確実な症例は1937年、北海道小樽市在住の礼文島出身者に見つかった症例である。1999年4月の感染症法施行以降、同法に基づき届け出られる「エキノコックス症」は年間10～30例程度であるが、その大部分は野生動物間で高度な流行が維持されている北海道の多包虫症感染例の報告である²。

人は幼虫が寄生する中間宿主に相当する宿主である。やや抵抗性で、虫体の発育は遅い。病態は悪性腫瘍と同様で、感染後5～10数年で肝腫大に伴う上腹部の膨満・不快感、肝障害を呈し、適切な治療が行われなければ死に至る²。

【犬】犬は終宿主として人への感染源となる虫卵を排泄する動物である。北海道庁が実施している媒介動物疫学調査（以下、道疫学調査）では、1966～2020年度の累計で陽性率1.0%であった。実験感染によりキツネ同様の感受性を持つことが証明されているにもかかわらず、犬の陽性率が低いことは、中間宿主となる野鼠類の捕食頻度の低さを反映した結果と考えられてきた。しかし、最近の報告では、北海道東部の飼育犬で7.1%と、従来の認識を覆す高い陽性率が確認されている⁴。

* 単包条虫は従来、宿主特異性や地理的分布などから11の遺伝子型に分けられてきたが、最近の分子系統学的検討により *E. granulosus sensu stricto*（狭義の単包条虫）とその他の4種に再分類された。しかし、感染症法では区別しておらず、本マニュアルでも区別しない（*E. granulosus sensu lato* = 広義の単包条虫）。

通常、犬など終宿主のエキノコックス感染は無症状に経過するが、粘血便や下痢などの異常便の排泄が観察されることもある。終宿主における寄生期間は2～5ヶ月程度で、寿命を迎えた虫体は脱落・排除されていく。

【猫】終宿主として好適な動物ではない。経口摂取後、原頭節は早期に脱落し、腸管内に残存した虫体も性成熟しない。これまでに国内で報告された猫の虫卵排泄は1例のみである⁵。

【野生動物】多包条虫の自然感染が確認されている国内の野生動物は、終宿主としてキタキツネ、エゾタヌキ、中間宿主として齧歯目のエゾヤチネズミ、ミカドネズミ、ムクゲネズミ、ヒメネズミ、ハツカネズミ、ドブネズミ、トガリネズミ目のトガリネズミ、オオアシトガリネズミである。この他に展示動物の感染例も報告されている。

道疫学調査における陽性率は、キツネ 23.1%、タヌキ 2.9%、ネズミ 1.3%であった（1966～2020年度累計）。

【産業動物】北海道では食肉検査時に豚や馬の多包虫感染が発見される。これらの動物が他府県へ出荷され、該地の食肉検査で感染が見つかった事例も報告されている。道疫学調査における豚と馬の陽性率はそれぞれ0.2%と0.3%であった（1983～2020年度累計）。なお、これらの動物の多包虫感染では嚢胞内に原頭節が形成されず（無頭包虫）、本症の伝播には関与しない。

既述のとおり、感染症法では人と犬のエキノコックス症を四類感染症に指定しており、それぞれを診断した医師と獣医師に対し、直ちに所管保健所へ報告することを義務づけている（全数把握）。犬以外の動物の感染例は届出の対象ではない。また、特定病原体等には該当しない。

2 検体の取り扱い

2-i 検体取り扱い上の注意（バイオセーフティ）

終宿主糞便内に含まれる虫卵は人への直接の感染源となる。また、中間宿主から分離した嚢胞内の原頭節は、針刺し事故や眼部への飛散などにより曝露部位に二次包虫症を引き起こす恐れがある。

したがって、エキノコックス属は虫卵・原頭節の両発育期が国立感染症研究所バイオセーフティレベル2（BSL2）に分類されている。何らかの不活化処理を実施していない臨床検体はBSL2施設および安全キャビネット内で取り扱うとともに、個人防護具を着用する必要がある。

2-ii 各種動物からの検体採取法

動物から採取する検査材料は、終宿主は糞便、中間宿主は病巣の含まれる実質臓器（主に肝臓）である。

糞便検体はできるだけ新鮮なものを採取する。直腸便を採取する場合、終宿主体表（被毛）が虫卵に汚染されている可能性を考慮し、個人防護具を着用する。糞便は母指頭大を一次容器（50 mL チューブでよい）に入れ、密栓後、粘着テープ（パラフィルム）でシールする。

糞便検体の採取に用いた器具類はオートクレーブ処理（121°C、20分）をする。オートクレーブが利用できない場合は、素材に応じて加熱処理（100°C、1分または60～80°C、5分間以上）や冷凍処理（-80°C、48時間以上）、もしくは次亜塩素酸ナトリウム（原液）への浸漬を行う。70%エタノールには虫卵を不活化する効果がない。

臓器検体は採取後速やかに十分量の固定液に浸漬する。周囲組織とともに病巣を切り出したら、病理学的検査に供する場合は10%中性緩衝ホルマリンを、遺伝子検査に用いる場合は70～80%エタノールを用いてそれぞれ固定する。これら固定液は原頭節の不活化に有効で、固定が進めば、以降は検体の安全な取り扱いが可能である。

2-iii 検体の輸送法

糞便検体は基本三重梱包を行い、冷蔵（4°C）または冷凍（-20°C）にて輸送する（冷凍が望ましい）。固定済み臓器検体は常温でよい。

2-iv 検体の保存法

糞便検体は、冷蔵保存品は可及的速やかに、冷凍保存品も検査のため解凍したら速やかに検査を実施する。検査後の余剰検体は適宜冷凍保存する。

3 検査法

3-i 検査法総論

動物のエキノコックス症の検査は、寄生虫学的検査（虫体または虫卵の検出）と病理学的検査（組織中の特異的形態の確認）単独、または両者を組み合わせて行う。検体から直接検出できない場合、あるいは顕微鏡観察での確定が困難な場合、遺伝子検査（病原体 DNA の検出）を行うこととなる。人のエキノコックス症で広く用いられる血清学的検査（血清からの特異抗体の検出）は、動物では一般に行われず。

なお、感染症法に基づく獣医師の届出基準では、犬の検査方法として「ELISA 法による病原体の抗原の検出」があるが、本法を原理とする市販検査キットは現在製造されておらず、一部の研究機関でのみ実施可能な方法なので、ここでは採り上げない。

3-ii 検査法各論

3-ii-(1) 虫卵検査（ホルマリンエーテル法）

準備

酢酸エチル（原法のジエチルエーテルは引火性が高く、取り扱いに注意を要するので、酢酸エチルで代替する）、15 mL 遠沈管（ガラス製またはポリプロピレン製）、ゴム栓（遠沈管にスクリーキャップがない場合）、試験管立て、竹串、小漏斗（ガラス製またはオートクレーブ可能な材質のもの）、ガーゼ、パストゥールピペットとニップル、スライドグラス、18×18 mm カバーグラス、卓上遠心機、光学顕微鏡

プロトコール

- ① 小試験管に糞便検体約 1 g を秤量し、適当量の水を加えて溶解する。
- ② 遠沈管にガーゼ 1 枚を敷いた小漏斗をのせ、①の糞便溶解液を濾過する。
- ③ 2,500 rpm で 2 分間遠心する。
- ④ 沈渣を残して上清を捨てる。
- ⑤ 水 7 mL を加え、沈渣とよく攪拌混和する。
※原法では原虫シスト固定のため 10%ホルマリンを用いるが、ここでは遺伝子検査を前提に水を用いる。
- ⑥ 酢酸エチル 2 mL を加え、管口を密栓して 30 秒間激しく振盪する。
- ⑦ 2,500 rpm で 2 分間遠心する。
- ⑧ 遠心後試料は上から順番に酢酸エチル層、浮上糞便層、水層、沈渣の 4 層に分離された状態になるので、竹串を使って浮上糞便層を管壁から剥がし、沈渣と少量の水層を残して上部 3 層を捨てる。
- ⑨ パストゥールピペットを用い、沈渣と水層を混和する。適当量をスライドグラス上に滴下し、カバーグラスをかけて鏡検する。

注意点

- ① エキノコックス（多包条虫）の産卵は感染後約 1~4 ヶ月に限られ、かつ虫卵を含む老熟片節の離脱には周期性がある。陰性結果の信頼性は高くない。
- ② エキノコックス属の虫卵が示す形態学的特徴はテニア科の条虫類に共通する。両者を区別するには分子同定を行う必要がある。
- ③ 虫卵の回収は次のように行う。中シャーレ上に目開き 20 μm と目開き 40 μm のステンレス製篩を重ねて置き、残沈渣全量を注ぐ。目開き 40 μm 篩を外したら、少量の水を加え、目開き 20 μm 篩のメッシュ上から水とともに虫卵を 1.5 mL チューブに回収する。15,000 rpm で 30 分間遠心後、注意深く上清を捨て、熱アルカリ処理後を行い、その上清を 3-ii-(2) または 3-ii-(3) の DNA 鋳型として用いる。

3-ii-(2) PCR 法 (1)

準備

市販 DNA 抽出キット（一般用：QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit、糞使用：QIAGEN QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit など）、PCR 試薬（TOYOBO KOD FX Neo）、サーマルサイクラー、電気泳動装置、電気泳動用アガロース、電気泳動用バッファー、プライマーセット（下記参照）

プライマー配列⁶

標的部位	塩基配列	産物長
12S rRNA	1st round: P60.for. 5'-TTAAGATATATGTGGTACAGGATTAGATACCC-3' P375.rev. 5'-AACCGAGGGTGACGGGCGGTGTGTACC-3'	373 bp
	2nd round: Pnest.for. 5'-ACAATACCATATTACAACAATATTCCTATC-3' Pnest.rev. 5'-ATATTTTGTAAGGTTGTTCTA-3'	250 bp

プロトコール

- ① キットのマニュアルに従って検体から DNA を抽出する。
- ② PCR チューブ 1 本あたり以下の反応液を用意する。

KOD FX Neo	1 μL
2x PCR Buffer	25 μL
2 mM dNTPs	10 μL
Primer Forward (1st rnd, 10 μM)	1 μL
Primer Reverse (1st rnd, 10 μM)	1 μL
Sample DNA	1~2 μL

Sterilized water	up to 50 μ L
Total	50 μ L

- ③ サーマルサイクラーに PCR チューブをセットし、以下の条件で反応を行う。

94°C	2 min	
98°C	10 sec	} × 30 サイクル
58°C	30 sec	
68°C	30 sec	
68°C	5 min	
4°C		

- ④ 反応終了後、PCR 産物を滅菌水で 100 倍に希釈する。

- ⑤ PCR チューブ 1 本あたり以下の反応液を用意する。

KOD FX Neo	1 μ L
2x PCR Buffer	25 μ L
2 mM dNTPs	10 μ L
Primer Forward (2nd rnd, 10 μ M)	1.5 μ L
Primer Reverse (2nd rnd, 10 μ M)	1.5 μ L
1st rnd PCR product, diluted	1~2 μ L
Sterilized water	up to 50 μ L
Total	50 μ L

- ⑥ サーマルサイクラーに PCR チューブをセットし、以下の条件で反応を行う。

94°C	2 min	
98°C	10 sec	} × 35 サイクル
60°C	30 sec	
68°C	30 sec	
68°C	5 min	
4°C		

- ⑦ 反応終了後、電気泳動を行い、染色後、紫外線下で PCR 産物を確認する。

3-ii-(3) PCR 法 (2)

糞便検体由来の DNA 鋳型に対して 3-ii-(3)の 12S rRNA プライマーセットを適用した場合、非特異的増幅が見られることがある。また、ホルマリン固定検体では DNA が断片

化し、産物長を 200～250 bp 程度に短く設定する必要がある。そのような場合に用いるプライマーセットを以下に示す。

準備

市販 DNA 抽出キット（一般用：QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit、糞使用：QIAGEN QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit、FFPE 用：TaKaRa DEXPAT など）、PCR 試薬（TOYOBO KOD FX Neo）、サーマルサイクラー、電気泳動装置、電気泳動用アガロース、電気泳動用バッファー、プライマーセット（下記参照）

プライマー配列

標的部位	塩基配列	産物長
cox1	Em cox1/F1201 5'-ATTACTGGTTTGGAGGTTGAATAAGT-3'	250 bp
	Em cox1/R1400 5'-CACCCACTAAACGCAGATATAAAAAG-3'	

プロトコール

- ① キットのマニュアルに従って検体から DNA を抽出する。
- ② PCR チューブ 1 本あたり以下の反応液を用意する。

KOD FX Neo	1 μL
2x Buffer	25 μL
2 mM dNTPs	10 μL
Primer Forward (10 μM)	1 μL
Primer Reverse (10 μM)	1 μL
Sample DNA	1~2 μL*
Sterilized water	up to 50 μL
Total	50 μL

* DEXPAT 抽出試料は 5 μL まで増量可能

- ③ サーマルサイクラーに PCR チューブをセットし、以下の条件で反応を行う。

通常の検体

98°C	2 min	} ×30 サイクル
98°C	10 sec	
58°C	30 sec	
68°C	30 sec	
68°C	5 min	
4°C		

ホルマリン固定検体	
94°C	15 min
98°C	10 sec
58°C	30 sec
68°C	30 sec
68°C	5 min
4°C	

} ×30 サイクル

④ 反応終了後、電気泳動を行い、染色後、紫外線下で PCR 産物を確認する。

3-ii-(4) 病理組織学的検査

捕獲後の剖検（野鼠類）や食肉検査の解体後検査（産業動物）の際に採取された検体は、10%中性緩衝ホルマリンで固定後、常法に従ってパラフィン包埋切片を作り、HE 染色および PAS 反応を行って鏡検する。ネズミ類では成熟嚢胞内に原頭節を、豚や馬では好酸性・PAS 強陽性を示す角皮層を確認する。

3-iii 各種動物の検査法

3-iii-(1) 終宿主（犬・猫など）

成虫は非常に小型（多包条虫で 1.5～4.5 mm）で、片節が脆弱なので、水様便や粘液便中に排泄された場合を除き、虫体またはその一部（片節）を直接確認できる場合は少ない。虫卵検査は特別な装置を必要としないが、感度・特異度とも低い。通常は PCR 法による糞便内 DNA の検出を試みることになる。

3-iii-(2) 中間宿主（ネズミ・産業動物など）

好適宿主である野鼠類の感染で、発育の進んだ病巣であれば、特徴的な形態からきわめて容易に確定できる。一方、未熟な微小結節の場合、肝寄生する他種寄生虫との鑑別が難しいことがある。豚・馬の肝臓に見られる白色結節も同様である。そのような寄生虫学的検査や病理学的検査では確定が困難な場合に PCR 法に基づく遺伝子検査を併用する。

4 参考文献

1. 土井陸雄ら. 2000. 北海道外における多包虫症発生の実態と今後の対策への提言. 日本公衛誌 **47**, 111-126.
2. 国立感染症研究所. 2019. エキノコックス症 1999～2018 年. IASR **40**, 33-34. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/echinococcus-m/echinococcus-iasrtpc/8682-469t.html>
3. 神山俊哉. 2019. 多包性肝エキノコックス症の臨床. IASR **40**, 35-36. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/allarticles/surveillance/2440-iasr/related-articles/related-articles-469/8683-469r01.html>
4. Irie T et al. 2019. High probability of pet dogs encountering the sylvatic cycle of *Echinococcus multilocularis* in a rural area in Hokkaido, Japan. J Vet Med Sci **81**, 1606-1608.
5. Nonaka N et al. 2008. The first instance of a cat excreting *Echinococcus multilocularis* eggs in Japan. Parasitol Int **57**, 519-520.
6. Dinkel A et al. 1998. Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. J Clin Microbiol **36**, 1871-1876.
7. 病原体検出マニュアル『エキノコックス症及び消化管寄生蠕虫症検査の基本』 <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Echinococcus2014Nov.pdf>