

野兎病
検査マニュアル
(第3版)

(令和7年1月)

第3版における主な改訂箇所

- *Francisella novicida* を *Francisella tularensis* subspecies *novicida* へ記載変更
- リアルタイムPCRの実施方法の追記
- 野兔病菌以外の *Francisella* 属菌を含む性状比較表の修正、培養コロニーの写真添付
- 参考文献の追加

目次

(1) 野兔病の概説	3
(2) 検査に関する一般的注意	5
1. 検査材料の採取	5
2. 検査材料の輸送	5
3. 検査の進め方	5
4. 検査の判定	5
(3) 検査方法	7
1. 細菌学的検査	7
2. 血清学的検査	9
3. 遺伝子学的検査	11
(4) 参考文献	16
(5) 連絡先	18
(6) 執筆者一覧	18
(7) 参考図表	19
表1. 野兔病菌の性状	19
表2. 野兔病の臨床病型	19
図1. 野兔病の分布	20
図2. 野兔病菌の培地上のコロニーとグラム染色像	21
図3. 微量凝集反応像	21
図4. 野兔病菌遺伝子増幅産物の確認	22
図5. 寒天培地上の野兔病菌とその近縁菌の発育	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、感染した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。本菌による感染は極めて少ない菌数 (10-50 個) でも成立するとされている。本疾病は近年、国内では極めて稀だが、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。感染症法の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* および *holarctica* 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。また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, *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。動物の感染例は報告されているが、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、動物からの感染例でなく、野兎病の起原菌として認識されていない。*Francisella* 属には他に *F. hispaniensis* および *F. philomiragia* で人感染例が報告されているが、これらの菌の性状 (表 1) や病状は野兎病菌とは異なる。

【疫学】野兎病は北米や北欧で多数発生している (図 1)。また東欧や中欧などでは、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、菌分離もされている。その他の地域においては数症例が報告されているが、菌分離はされていない。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 年に東北地方生息のノウサギから菌分離がされている。

【感染経路】日本の野兎病患者の約 93% が剥皮や調理などのノウサギとの直接接触が原因とされている。稀にネコ、クマ、リスとの接触、ダニの刺咬などによる感染例もある。海外では、汚染水の摂取などの水系感染や塵芥の吸引による呼吸器感染、蚊やアブなどの吸血による感染が報告されている。これまでヒトからヒトへの感染報告はない。

【臨床症状】潜伏期間は3日を中心に7日以内が主で、稀に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、潰瘍または膿瘍化する。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例であり、そのうち60%がリンパ節型、20%が潰瘍リンパ節型で、米国では潰瘍リンパ節型が多い。他の型は稀である。Subsp. *tularensis* 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】治療にはアミノグリコシド系、ニューキノロン系、テトラサイクリン系抗菌剤が有効で、ペニシリンやセファロスポリン系抗菌剤は無効である。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、また、それらを扱う場合、マスクおよびゴム手袋を装着すること、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を使用することとなる。

【法律上の取り扱い】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經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)。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。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。病院や検査機関が、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により進められる。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合せされたい。野兔病が疑われる臨床検体の取り扱い(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おり、生菌の扱いは、BSL3 施設で実施することになっている。本菌が確認もしくは強く疑われる場合は BSL3 実験室で作業を実施する。

1. 検査材料の採取

細菌学的検査および遺伝子学的検査は、摘出リンパ節、リンパ節穿刺液、原発病巣部ぬぐい液などが対象となる。採材は抗菌薬投与前が望ましい。適切な抗菌薬投与後の菌分離は困難である。血清学的検査には、少なくとも1週以上の間隔で採血した急性期と回復期(発症2週目以降)のペア血清が望ましい。感染源として疑われる動物の材料が得られる場合、血液、肝臓、脾臓、病変部や動物体表に付着したダニなどを採取する。

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する。

3. 検査の進め方

医師の問診により得られる情報が重要となる。患者の症状、国内外の野兔病発生地における野外活動歴や、動物および吸血性節足動物との接触歴などから野兔病の可能性を考慮し、検査を実施する。確定診断は患者病変部からの野兔病菌分離であるが、バイオハザードや法律上の問題等から一般的ではない。ペア血清を用いた血清学的検査を実施することが多い。生物兵器の可能性のある物質や感染源の確認など、迅速性や高感度性を要する場合は遺伝子学的検査が有効である。

4. 検査の判定

- 1) 患者から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。対象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) 血清学的検査では急性期から回復期にかけて 4 倍以上の抗体価上昇を認めた場合を陽性とする。単一血清では抗体価 80 倍以上の場合、陽性を疑う。他の *Francisella* 属菌、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。
- 3) 遺伝子学的検査は、迅速な検出、分離菌同定の指標として有効である。コンタミネーションの可能性に注意する必要がある。
- 4) 鑑別診断を要する疾患には、ツツガムシ病、日本紅斑熱、猫ひっかき病、ブルセラ症、結核、ペストなどがある。

(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。市販の平板寒天培地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。

1) 検体の採取および培養までの保存

検体は野兔病菌に有効な抗菌薬の投与前に無菌的に採取し、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、雑菌の混入は本菌のコロニー形成を著しく阻害するため、採材後の即時の培養が困難な場合、検体を一時的に4℃に保存し、速やかに培養の準備をする。

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)
- ・ 緬羊脱繊血
- ・ 蒸留水
- ・ オートクレーブ
- ・ 恒温槽
- ・ 三角コルベン (500 ml)
- ・ 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、保温した緬羊脱繊血 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加温する。
- ・ 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。

* 検査材料に雑菌の混入が懸念される場合、培地の温度が冷め、シャーレに分注する直前にペニシリンを 500 U/ml 程添加する。

3) 検体の接種および培養

①接種

摘出リンパ節などの場合、断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。バイオハザードを考慮し、培地を密閉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 3 日以内で観察されるが 7 日目まで観察する事が望ましい。抗菌剤を使用した場合は増殖が遅延する事がある。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

培地や菌株で異なるが、多くは、白色から灰白色の 1 から 3mm 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

グラム染色により薄いピンク色に観察される (図 2B)。小桿菌だが、球菌状、長桿菌状など多形性を示す。蒸留水への懸濁により球形を呈す。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 分以内に混合液が凝集した場合、野兔病菌を疑う。培養菌が自家凝集することがあるため、供試前に菌を PBS や生理食塩水などで洗浄する。

⑤免疫学的試験

抗野兔病菌特異的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検出に有効である。

⑥遺伝子学的試験

コンベンショナル PCR またはリアルタイム PCR 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ンタミネーションに注意する。

2. 血清学的検査

人では野兔病菌に対する抗体価は発症後 1～2 週後から上昇し、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。他に ELISA 法やウェスタンブロット法による検査もある。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。

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、Nunclon™ 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 μ l とする。
- ・ 抗原液を 25 μ l 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。単一血清では凝集抗体価 80 倍以上の場合、陽性を疑う。
- * ブルセラ属菌との交差反応が知られているため、必要に応じて（特に犬との関連がある検体）ブルセラ属菌に対する抗体測定を行う（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*) を標的としたコンベンショナルPCR、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について記載する。リアルタイムPCRはコンベンショナルPCRと比較して、高感度で、短時間に結果が得られる。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。これら手法では野兔病菌と *F. tularensis* subsp. *novicida* の判別はできない。*F. tularensis* subsp. *novicida* や *F. hispaniensis*、*F. philomiragia* など臨床検体から分離されうる *Francisella* 属菌は培養1日目で明瞭なコロニーを形成する点が野兔病菌と異なる(図5)。遺伝子の増幅が検出された場合、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、野兔病菌以外の検査を検討する。単一菌が分離されていれば、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) コンベンショナルPCR

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'-CAgCTACTACACAAgCAgTgg-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 (スクリュウキャップ付) 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/μl)	0.25 μl
10x Buffer (BTQ-1B)	2.5 μl
2 mM dNTPs (NTP-201)	2.5 μl
Sense Primer (10 μM)	1 μl
Antisense Primer (10 μM)	1 μl
Sample DNA	2 μl
DEPC-H ₂ O	15.75 μl
総量	25 μl

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 サンプルを 1%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 : 87bp

- ・ LightCycler[®] 480 System II (Roche # 05015197001)
- ・ 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
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* の特異的遺伝子の増幅が検出される。

(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. 大原嘗一郎、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

(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)

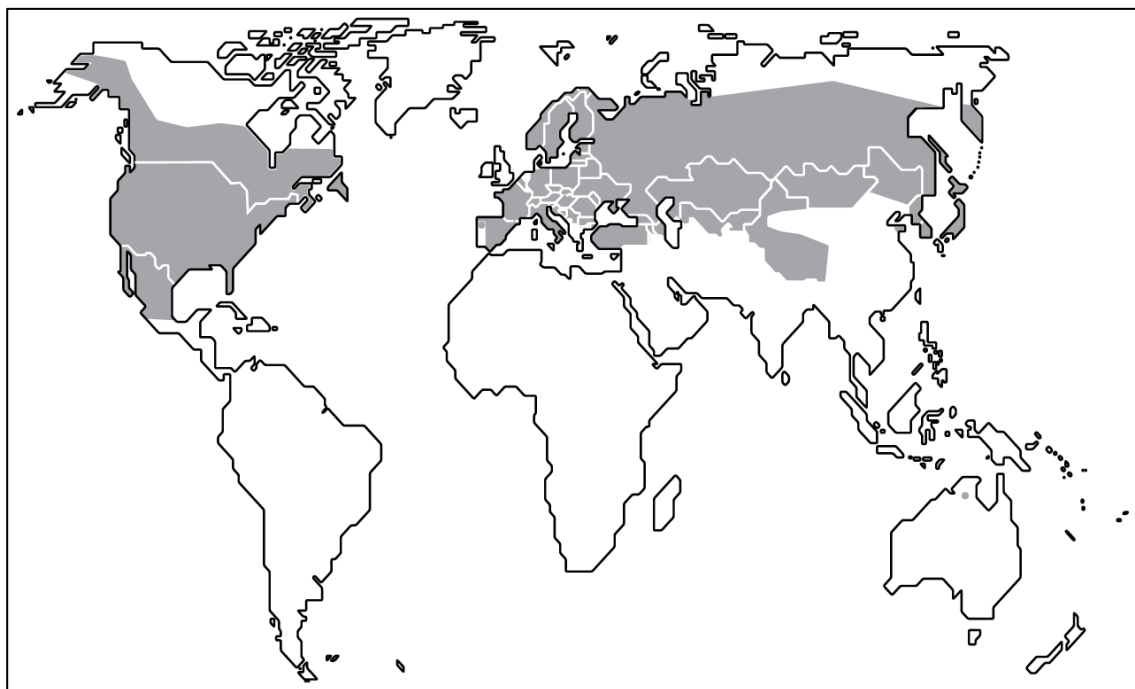


図 1b : 日本での発生状況 (参考文献 3 より改変)

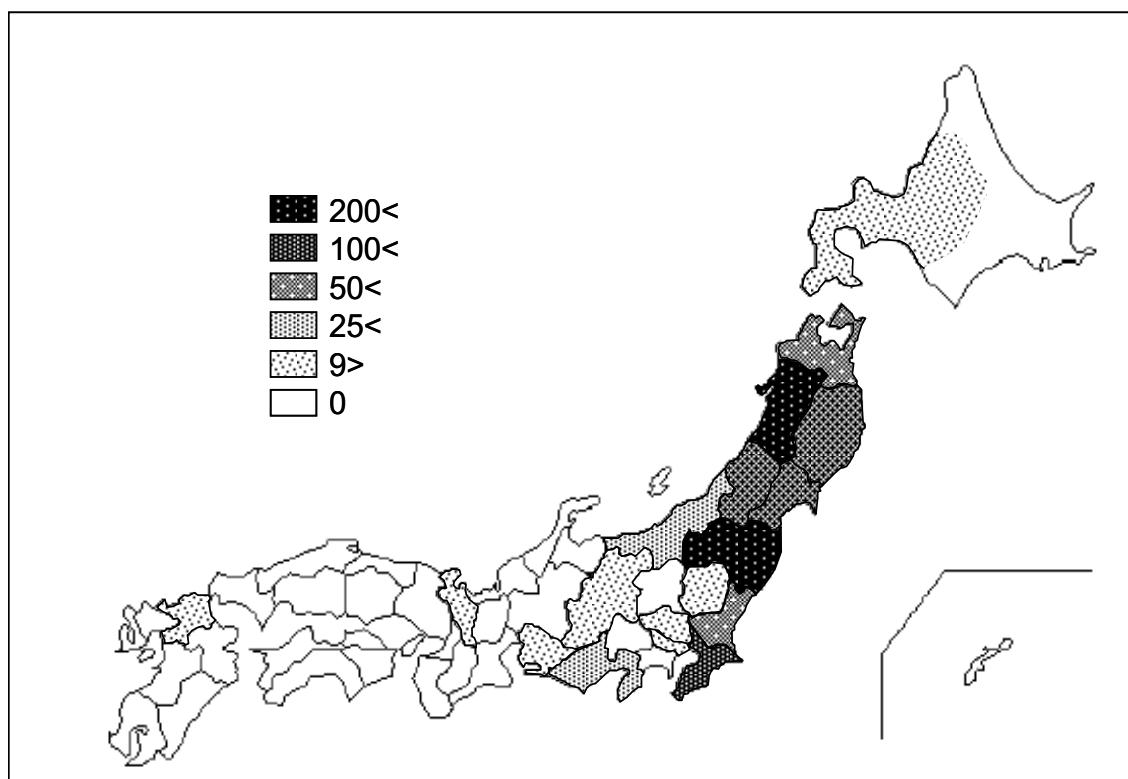


図2：培地上のコロニーとグラム染色像

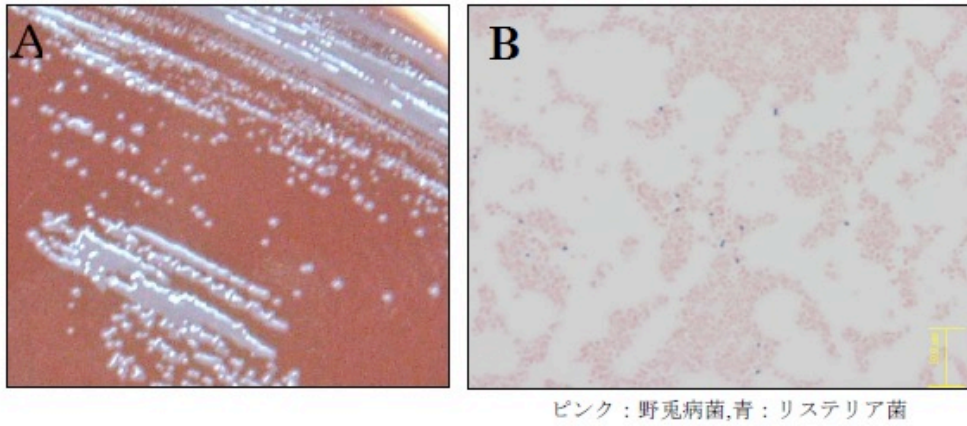


図3：微量凝集反応像

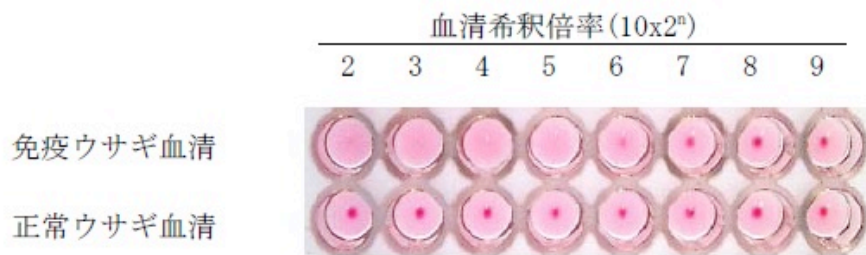
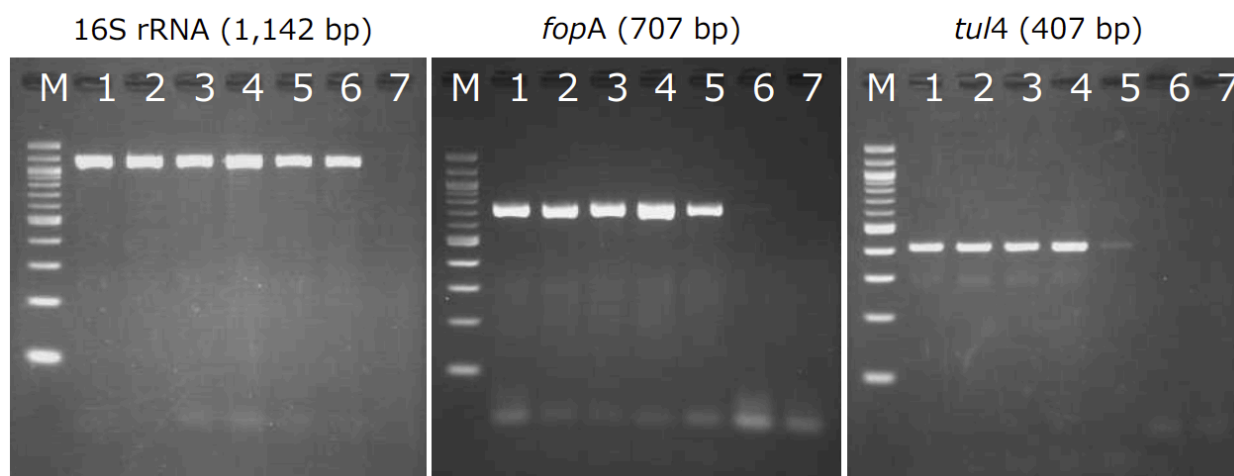


図4：PCR 増幅産物の泳動像

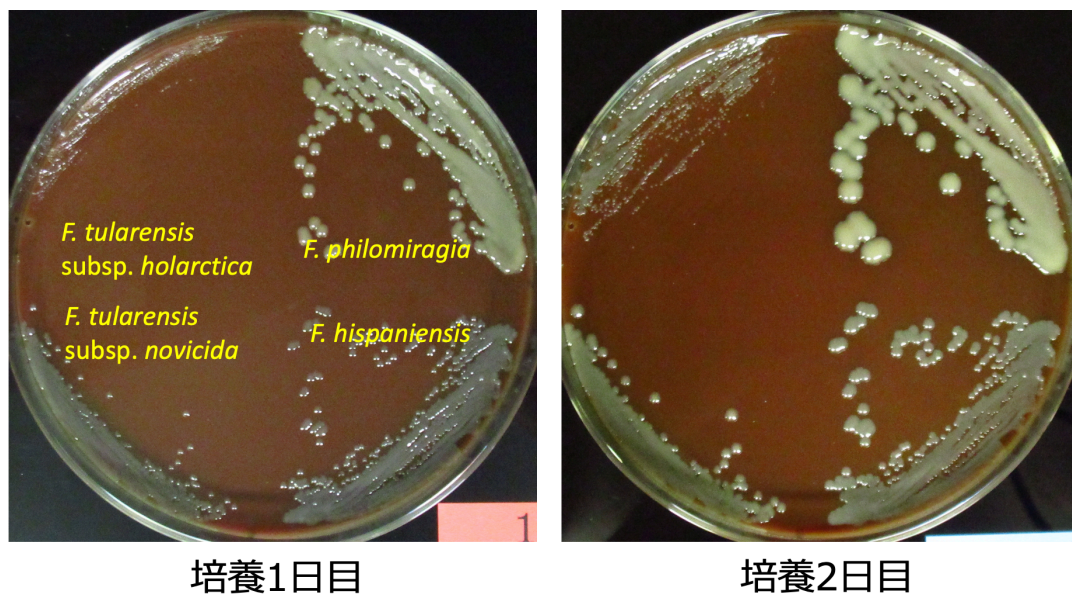


M: サイズマーカー

- 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. tularensis subsp. *novicida* および *F. hispaniensis* は上記3領域のPCR反応全てで野兔病菌と同様に増幅する為、鑑別が必要となる。

図5 寒天培地上の野兔病菌とその近縁菌の発育



野兔病菌 (*F. tularensis subsp. holarctica* プレート左上) は他と比較してコロニーが小さく、一般に2-3日ほどの培養を必要とする。