

表 1 1 名古屋港および名古屋市街地で捕獲されたネズミ族のハンタウイルス抗体保有状況

	*1992	*1993	*1994	1997	1998	1999
港湾地域 (%)	29.5	28.3	46.8	37.7	15.2	8.3
市街地 (%)	3.3 (すべてドブネズミ)	3.0	2.4	NT (すべてクマネズミ)	15.8	NT

*Sugiyama, K et al. J. Vet. Med. Sci. 1995

図4

名古屋市街地でのハンタウイルス抗体陽性ネズミの分布

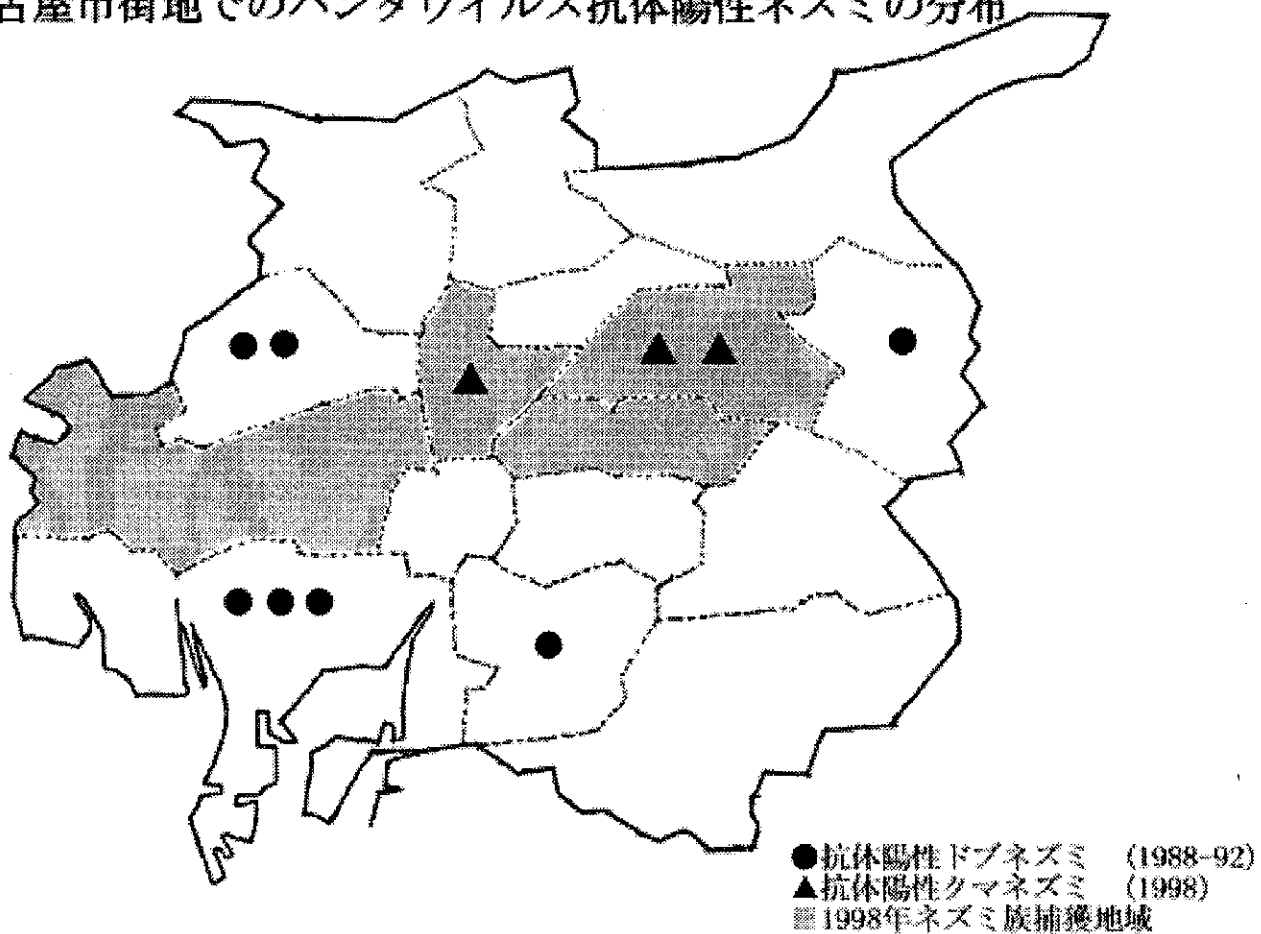


表12 名古屋市でハンタウイルス抗体陽性ネズミ族が確認された地区
 ◎1986～93年（杉山ら）

地域名	抗体陽性数	抗体価	ネズミの種類	報告年
名東区	1/12	1024	ドブネズミ	1988
港区	1/42	2048	ドブネズミ	1990
	1/12	2048	ドブネズミ	1991
	1/28	1024	ドブネズミ	1992
中村区	2/22	128	ドブネズミ	1991
		2048	ドブネズミ	
	1/9	128	ドブネズミ	1992
南区	1/42	32	ドブネズミ	1992

◎1998年（神戸検疫所）

中区	1/6	64	クマネズミ	1998
千種区	2/5	64	クマネズミ	1998
		128	クマネズミ	1998

分担研究報告書

輸入動物由来人獣共通感染症の防疫対策としての狂犬病検査に関する研究

分担研究者：神山恒夫 国立感染症研究所、獣医科学部長
井上 智 同上、主任研究官

研究要旨：

日本の狂犬病対策は検疫による狂犬病ウイルスの侵入防止とイヌのワクチン接種による狂犬病発症阻止が骨格である。日本では 1957 年に報告されたイヌの狂犬病を最後に動物における狂犬病の発生報告はない [11]。しかし、欧米ではイヌの狂犬病を制御した後に野生動物による狂犬病の流行が大きな問題となりこれまでに膨大な予算が野生動物の狂犬病対策に投入されている [12, 13]。一方、アジアの多くの国々ではイヌを中心とした狂犬病が現在も流行しており毎年 4-5 万人ものヒトが命を落としている [14, 15, 16]。日本では、狂犬病の制圧に成功して 40 年近く狂犬病の経験がない。しかしながら、いまだに多くの国々が狂犬病流行国である現状や毎年多くのヒトや物が容易に狂犬病流行国と行き交う日本の流通事情を考えると決して狂犬病の脅威から遠く離れているとは言い難い。このような状況下で、国内では感染症予防法の改正に伴う狂犬病予防法の改正が行われるところとなり 2000 年度から検疫の対象動物として新たにネコ、アライグマ、キツネ、スカンクが加えられるなど狂犬病の対策が強化されることとなった。狂犬病の国内への侵入と発生を阻止する方法として検疫やイヌに対する適切なワクチン接種の継続が大変重要なことは言うまでもない。一方で、狂犬病の感染が疑われた動物に対して適切な対応を行うためには正しい検査方法を確立しておくことが重要である。今回は、米国 CDC の協力を得て導入した野生動物を含めた狂犬病の検査方法について報告する。

A.B. 研究目的と方法

人獣共通感染症対策の一つとして、野生動物を含めた狂犬病の検査方法を米国 CDC の協力により日本へ導入して確立することを試みた。

【導入した検査方法と材料】

- (1) 直接蛍光抗体法。
- (2) ウイルスの遺伝子増幅方法 (RT-PCR 法)。
- (3) 感染組織からのウイルス分離法。
- (4) 血清ウイルス中和抗体の検出法。
- (5) 検査には CDC から分与をうけ

たウイルス株 (CVS 株) を使用した。

- (6) 感染材料には、BALB/c マウスと CDC から分与をうけたマウス神経芽腫細胞 (MNA 細胞) を使用した。
- (7) 野生動物に対する狂犬病検査方法の検討を北海道で野生化したアライグマ (*Procyon lotor*) の脳組織と血清を使用して行った。

C. 研究結果

米国 CDC で行われている狂犬病の検査方法の導入と確立を試みた。以下にこれまでに導入を行った検査方法の実験室内での試験成績を示す。また、国内で対応が迫られている輸入動物の狂犬病検査について野生化したアライグマ (*Procyon lotor*) を利用して検討を行った。

導入した検査方法は (1) 直接蛍光抗体法、(2) RT-PCR 法、(3) 培養細胞によるウイルスの分離・増殖方法、(4) 血清中のウイルス中和抗体価測定方法 (RFFIT) である。野生化アライグマについては、直接蛍光抗体法、RT-PCR 法、RFFIT と間接蛍光抗体法による血中ウイルス抗体価の測定を行った。

検査の概要と注意点：

狂犬病の検査は主として感染が疑われた動物の脳組織について行う。

狂犬病が疑われた動物は、安楽殺後速やかに頭部を切り離し検査可能な施設へ郵送する (郵送は万国郵便条約に準じた包装とする)。安楽殺後に外部寄生体を消毒剤等で除去しておく。検体の郵送はできるだけ冷蔵が望ましい。検査施設における脳の摘出は Laboratory techniques in rabies. Fourth edition. [1] の記載に準拠して行う。脳の摘出は周囲と区画された専用の部屋で行う。検査担当者は狂犬病ワクチンの接種が求められる。狂犬病に対する抗体価は 6 カ月ごとに測定を行い、値が最小許容抗体価 (0.5U/ml 国際単位もしくは 1:5 中和抗体価 (RIFFT)) を下回った場合に速やかに追加免疫を行う。脳の摘出に際しては感染組織の飛沫に十分注意を払う。脳の摘出後は全ての操作を安全キャビネット内で行うことが望ましい。脳摘出後の頭部は 2 重に重ねた専用の袋に密閉してウイルスの不活化処置を行い廃棄する。使用器具と部屋はオートクレーブ、1/4 アンモニウム不活化剤、45-70% アルコール、1% 消毒剤、5-7% ヨウド剤等で十分にウイルスの不活化を行う。ウイルスの取り扱いに関する注意点は文献・資料 [2、3、4、5] を参照。検査担当者に求められる必要事項

- ・狂犬病ワクチンの接種
- ・病原微生物取り扱いに関する十分

な経験と理解

- ・安全器具の正しい使用方法

検査時のウイルス暴露を防ぐ環境

- ・外部と十分に隔離された部屋
- ・バイオセーフティーキャビネットの使用
- ・オートクレーブ（汚染器具のウイルス不活化）の設置
- ・病原体の不活化剤（1/4アンモニウム不活化剤、45-70%アルコール、1%消毒剤、5-7%ヨウド剤等）を常備
- ・専用の着衣（手袋（2重に使用）、着衣、マスク、ゴーグル、履き物等）を使用。国立感染症研究所病原体等安全管理規定（平成11年）では Rabies virus（街上毒、street strain）をバイオセーフティレベル 3 に分類している [5]。

<1> 直接蛍光抗体法：

直接蛍光抗体法による検査は、アンモン角、延髄、小脳、大脳の4箇所について同時に行う。直接蛍光抗体法は、簡便で感度のよい現在もっとも信頼度の高い狂犬病検査方法である。検査には米国 CDC で使用されているモノクローナル抗体（Rabies FITC KIT/ CENTOCOR FITC anti-rabies monoclonal globulin、Fujirebio diagnostics,inc.）とポリクローナル抗体（BBL anti-rabies globulin/ Fluorescein labeled、Becton Dickinson Microbiology

Systems）の2種類を使用した。

検査手技の概要（操作は安全キャビネット内で行う）：

- 1) 摘出した脳から海馬、延髄、小脳、大脳の組織をそれぞれ1 cm 角大に切り出す。
- 2) 各組織をスライドガラス（8穴、テフロンコーティング：HTC Super cured autoclavable）に2穴ずつ圧片を行う。組織に付着している血液は非特異反応の原因となりやすいためできるだけ除く。厚い圧片標本では脳組織の自家蛍光や非特異反応などにより蛍光顕微鏡での観察が困難となりやすい。
- 3) キャビネット内で十分風乾する。
- 4) 冷アセトンで固定（-20C、2時間以上）後に風乾（標本は-20Cで保存可能。長期間保存は抗原性に影響するため注意）を行う。
- 6) FITC 標識-抗狂犬病ウイルス抗体（ポリクローナル抗体（BBL 社）及びモノクローナル抗体（Centocor 社））を 20-30 分間（37C）反応させる（使用抗体の希釈倍率は適時確認）。
- 7) PBS (-) にて 10 分間洗浄（2回）。
- 8) スライドを蒸留水に 2-3 秒浸したのち風乾する。
- 7) グリセリン封入を行い蛍光顕微鏡下で狂犬病ウイルスの抗原を確認する。

陽性コントロール：固定毒（CVS 株）を感染させたマウスの脳組織を圧片して作成する。

陰性コントロール：正常マウスの脳組織を圧片して作成する。

顕微鏡観察：通常 200 倍で観察。抗原量の少ない検体や蛍光の弱い検体では 400 倍で詳細な観察を行う。

参考：固定毒（CVS 株）感染マウス脳で作成した圧片標本をモノクローナル抗体（CENTOCOR FITC anti-rabies monoclonal globulin）とポリクローナル抗体（BBL anti-rabies globulin/Fluorescein labeled）で染色した場合の蛍光顕微鏡像を図 1 に示した。8 穴スライドガラスは図 3 に示した。

<2> RT-PCR 法：

RT-PCR 法はウイルス抗原の検出が困難な事例に対して行われている。RT-PCR 法による遺伝子検出は高感度である。目的遺伝子の重複汚染を防ぐためには実験環境と実験手技の十分な確立が求められる。ウイルス検出に使用するプライマーは核蛋白（N）とリン酸化蛋白（P）の翻訳開始領域を含む遺伝子配列から合成されたものである[6]。

RT-PCR 法（ウイルス RNA の抽出は安全キャビネット内で行う）：

- 1) ウイルス RNA の抽出には TRI-ZOL reagent (GibcoBTL 社、No.15596) を使用した。RNA 抽出の方法は

添付された資料に記載されているので参照されたい。

- 2) 抽出 RNA は 50ul の蒸留水 (RNase 不活化処理) に溶解し使用直前まで -80C に保存しておく。
- 3) RT プライマー (10g、10pmol) により逆転写反応を行う (Promega 社、AMV reverse transcriptase、No.M5101)。試薬調整の詳細は添付された資料を参照されたい。
- 3) プライマー 10g (10pmol) と 304 (10pmol) で PCR 増幅を行う (TAKARA 社、TaKaRa Ex Taq、No.RR001A)。試薬調整の詳細は添付された資料を参照されたい。
- 4) サーマルサイクラーにより遺伝子増幅を行う。
- 6) 増幅産物をアガロース電気泳動後、EtBr 染色を行い UV 照射によって目的遺伝子を確認する。

材料と反応条件：

逆転写用プライマー (PCR にも使用)：10g [CTA CAA TGG ATG CCG AC]

PCR 用リバースプライマー：304 [TT GAC GAA GAT CTT GCT CAT]

RT：42C、45分 -> 95C、5分

反応液 (20ul)：10ul RNA、10pmol Primer、5xRB (Promega AMV-RT)、2.5mM dNTP、rRNasin (Promega

AMV-RT)、 DW

PCR：反応液（50ul）：各 10pmol プライマー、TAKARA Ex Taq、10x Buffer、2.5mM dNTP、DW。94C、1分；94C、30秒、37C、30秒、72C、90秒（このステップ40回）；72C、7分
参考：固定毒（CVS 株）からウイルス RNA を抽出して行った RT-PCR の成績を図2に示した。

<3> ウイルスの分離方法：

狂犬病ウイルスの分離にはマウス神経芽種細胞（MNA 細胞）を使用する方法を導入した。これまでウイルスの分離や病原性の確認には乳のみマウスが利用されてきたが、マウスの検査系では判定に長い日数（一般に21日間の観察が必要）のかかることが欠点であった[1]。現在では培養細胞を利用した簡便な狂犬病ウイルス分離方法が幾つか開発されている。なかでも MNA 細胞（NA-C1300）はヒトの神経細胞の特徴を多く持つことや神経細胞特有の膜蛋白、細胞内微細構造、酵素などを保持していることから大変有用と考えられている[1]。CDC では、マウスの試験系と MNA 細胞を使用した試験系を比較して両者間に差のないことを確認している。

ウイルスの分離方法の概要（ウイルスの分離操作は安全キャビネット内で行う）：

- 1) Oリング付き 1.5ml 遠心チューブに 800ul の 10%ウシ胎児血清と抗生物質・抗カビ剤の入った培養用培地（EMEM-10）を準備する。
- 2) およそ 50mg の検体を遠心チューブに加えて 20%のホモゲナイズ液とする。
- 3) 遠心（4C、1600回転、10分）を行い破碎した組織を沈殿させる。
- 4) 遠心上清を 1.5ml の培養細胞浮遊液（およそ 2×10^6 個の MNA 細胞を 15ml コニカルチューブに浮遊したもの）に加える。
- 5) ウイルスと培養細胞の混和液を 37C で1時間培養を行う（15分ごとに攪拌。1時間以上の培養も可能）。
- 6) EMEM-10 をウイルス-培養細胞液に加えて 5ml に調整する。
- 7) ウイルス-培養細胞液を 8 穴のスライドに 1-2 滴滴下（5ml ピペット使用）してスライド上で培養を行う（図3）。残りのウイルス-培養細胞液（およそ半量）は培養フラスコ（25ml フラスコ）で培養を行う。
- 8) 48 時間後に 8 穴スライドを PBS(-)で軽く洗いアセトン固定を行う。
- 9) 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ウイルス感染が強く疑われている場合 -

1 0) 7) でウイルス-培養細胞液を播種した培養フラスコの培地を新鮮な培地と交換してさらに3日から4日間培養を継続する。

1 1) 培養の継続が終了したら、トリプシン処理を行って培養細胞を培養フラスコからはがす。

1 2) EMEM-10 を培養細胞液に加えて5ml に調整する。

1 3) 8 穴のスライドに培養細胞液を滴下して細胞をスライドに固着させる (3 ないし 4 時間、もしくは翌日まで培養)。

1 4) アセトン固定後に 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。

1 3) 判定、もしくはウイルスの回収。

< 4 > 血清中の中和抗体価 (RFFIT) の測定方法:

狂犬病ウイルスに対する中和抗体価の測定方法としてマウス神経芽種細胞 (MNA 細胞) を利用する RFFIT (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test) を導入した。マウスを用いたウ

イルスの中和試験方法が 1935 年に確立されて以来、世界中で広く行われている一般的な試験方法である [1]。1958 年に実験標準株である CVS (Challenge Virus Standard) 株が培養細胞で増殖可能なことが報告されると、培養細胞を利用した廉価で時間のかからないウイルスの実験方法が開発されるようになった [1]。現在、狂犬病ウイルスの感染を証明する方法として最も広く行われているのは蛍光標識された特異抗体を使用して感染細胞内のウイルス抗原を確認する方法である。CDC ではこの技術を使用して狂犬病ウイルスの中和抗体価測定方法 (RFFIT) をルーチンで行っている。彼らは、マウスの試験で得られた中和抗体価と RFFIT (MNA 細胞を使用) で得られた中和抗体価の成績比較を行い、RFFIT が信頼のおける方法であることを確認している。

RFFIT 法の概要 (ウイルスの操作は安全キャビネット内で行う):

- 検査血清の準備 -

1) 被験血清を、56C で 30 分間加熱して非動化する。

2) 75ul の EMEM-10 に 50ul の被験血清を加えて十分に混和する。

3) 2) の混和液 25ul を 100ul の EMEM-10 に加えて血清を希釈

- する。
- 4) 3) の希釈液 25ul を 100ul の EMEM-10 に加えて順次段階希釈を行う。
 - 5) 血清の希釈は 4 段階行う (希釈は直接チャンバースライド (図 3) で行うことも可能)。
- 被験血清によるウイルスの中和 -
- 6) 段階希釈の終了した被験血清に 100ul のウイルス (感染価: 32-100FFD50) を加える。
 - 7) ウイルスを加えた血清を 0.5%-CO₂ 条件下、35C で 90 分間培養を行う。
- 培養細胞への感染 -
- 8) 培養 3-5 日目の MNA 細胞を培養フラスコから回収する (使用細胞は Wistar Institute、Philadelphia から CDC に分与されたもの; 類似の培養細胞は ATCC から購入可能 (CCL131))。
 - 9) MNA 細胞を EMEM-10 (10% ウシ胎児血清、100U/ml ペニシリン、100ug/ml ストレプトマイシン、0.25ug/ml アンフォテリシン B、E-MEM 培地) に再浮遊して細胞数を $1-2 \times 10^6$ /ml に調整する。
 - 10) 操作 7) で調整した 200ul の MNA 細胞液をチャンバースライドの各ウェルに加える。
- 11) ウイルスを吸着させた培養細胞は 0.5%-CO₂ 条件下、35C で 20 時間の培養を行う。
- 固定・染色と蛍光顕微鏡による被験血清の中和抗体価測定 -
- 12) 培養液をウイルス不活化液と混ぜて廃棄する。
 - 13) チャンバーを外したスライドを PBS(-) で軽く洗い冷アセトン (-20C) で 10 分間以上の固定を行う。
 - 14) スライドをキャビネット内で風乾する。
 - 15) FITC 標識-抗狂犬病ウイルス抗体 (Centocor 社) を 20-30 分間 (37C) 反応させる。
 - 16) PBS (-) で 10 分間、2 回の洗浄を行う。
 - 17) スライドを蒸留水に 2-3 秒浸したのち風乾する。
 - 18) グリセリン封入を行い蛍光顕微鏡下で狂犬病ウイルス抗原の分布を観察する。
- 中和抗体価の算出 -
- 19) 血清の中和抗体価 (FFD50: the focus-forming dose) は、蛍光顕微鏡で観察した 20 視野 (倍率 200 倍で観察) の半数 (50%) で視野内にウイルス抗原陽性の感染細胞が 1 個以上見られた時の血清希釈倍率とする。

RFFIT の確認：狂犬病ワクチン接種ヒト血清と非接種ヒト血清をそれぞれ陽性コントロールと陰性コントロールとして、RFFIT による中和抗体価の測定を試みた。

参考：検査にもちいた MNA 細胞の培養方法、感染に利用した固定毒（CVS 株）の増殖方法、感染価の算出方法、50%中和抗体価の算出方法は参考文献（1）に詳しく記載されている。

<5> 北海道で野生化したアライグマを用いた検査成績：

狂犬病予防法の改正によって検疫の対象動物としてネコ、アライグマ、キツネ、スカンクが加えられることになった。そこで、野生動物を含めた狂犬病の検査方法を確立するために野生化したアライグマの脳組織と血液を検査材料として導入した方法を試みた。

検査の概要：

検査材料：1999 年度に北海道野幌地域で捕獲された野生化アライグマ（*Procyon lotor*）22 頭の脳組織と血液を利用した。

検査：

直接蛍光抗体法（1）、RT-PCR 法（2）、血清中のウイルス中和抗体価の測定（3）を<1>から<4>で示した方法にしたがって行った。

成績：

（1）直接蛍光抗体法は脳の摘出が可能であった 15 頭について行った。検査したアライグマの脳組織はいずれも狂犬病ウイルス陰性であった（図 4）。陽性コントロールとして使用した固定毒感染マウスの脳組織はいずれも陽性であった。

（2）直接蛍光抗体法を行った脳組織について RT-PCR 法を行った。標的の遺伝子はいずれの脳組織からも増幅されなかった。陽性コントロールとして使用した固定毒感染マウスの脳組織ではいずれも標的遺伝子が増幅された（図 5）。

（3）採血の行われた 20 頭の血清についてウイルス中和抗体価の測定を行った。被験血清はいずれも溶血が著しかった。血清希釈 5 倍では MNA 細胞がチャンバースライドから脱落するなどの障害がみられていずれの血清も検査はできなかった。被験血清 20 例中 11 例は血清希釈 25 倍で中和抗体価陰性となった。残りの 9 例は血清希釈 25 ないし 50 倍で細胞障害が示されたため中和抗体価を求めることができなかった。同 9 例について血清のカオリン処置をして検査を再度行ったが、同様の理由により中和抗体価を求めることはできなかった。なお、被験血清はプロテイン A（蛍光色素標識）を利用した間接蛍光抗体法によりいずれも血清希釈 25

倍の値で抗狂犬病ウイルス抗体陰性であった(図4)。

課題：直接蛍光抗体法、RT-PCR法、いずれの方法も狂犬病ウイルス(固定毒、実験株)の検出に成功した。今後は、野生ウイルス株に対する検討が必要と考えられた。野生化アライグマの血清を用いたRFFITでは場合によって中和抗体価の測定ができないことが示された。野生動物の血清を用いた抗体検出系については検査方法について検討する必要があると考えられた。【CDCからのコメント：野生動物の血清は培養細胞に対する細胞毒性が強くしばしば成績が得られないことがある。可能であれば検査には新鮮かつ溶血の見られない血清を使用する。】

D. 考察

米国CDCで行われている狂犬病検査法を導入した。今後、国内で狂犬病検査を正しく行っていくためには以下に示した事柄についての検討が必要と考えられた。(1)導入した検査方法の質をいかに維持するか。(2)実験株ではなく、野外株についても導入した検査方法を同様に行えるか。

(3)導入した検査方法をどのように普及するのか。(4)CDCで検査される機会の少ないアジアなどの狂犬病ウイルスについて各検査の検出感度は十分であるか。(5)野生動物の

検査は該当動物ごとに検査系を検討する必要があると考えられる。

E. 研究発表

Inoue,S., Moriishi,K., Koura,M.and Kamiyama,T. The research on rabies and rabies-related virus in Japan to keep the rabies free situation. The Xth Annual Rabies in the Americas Meeting. November 14-19, 1999. San Diego California, USA.

参考文献：

- ・検査方法と狂犬病ウイルス
取り扱いに関する資料
- (1) Laboratory techniques in rabies. Fourth edition. Edited by F.-X. Meslin, M.M.Kaplan, H.Koprowski WHO Geneva, 1996.
- (2) WHO / 8th Report of the WHO Expert Committee on Rabies. Technical Report Series, No.824, Geneva, 1992.
- (3) Rabies: Guidelines for Medical Professionals, Veterinary Learning systems, a division of MediMedia, 1999.
- (4) 4th Edition. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. CDC/NIH
- (5) 国立感染症研究所病原体安

全管理規程

- (6) Epidemiologic and historical relationships among 87 rabies virus isolates as determined by limited sequence analysis. J.S.Smith, L.A.Orciari, P.A.Yager, H.D.Seidel, and C.K.Warner. J.Infect.Dis. 166:296-307. 1992.

・狂犬病の発生状況に関する

資料

- (7) World Survey of Rabies No 33 for the year 1997. WHO/DCDSR
- (8) Viral Infections of Human. Epidemiology and Control. Rabies, 14th ed. P665-690. 1997.
- (9) Reprort of the 3rd International Symposium on Rabies in Asia, Wuhan, China, 11-15 Sep. 1996
- (10) WHO Rabnet Map [http://oms.b3c.jussieu.fr/rabnet S/]
- ・狂犬病の概要に関して記載された資料
- (11) 特集・エマージングウイルス感染症-人類の新たな脅威となるウイルス病／狂犬病と狂犬病ウイルス井上 智。企画：倉田 毅。生物の科学 遺伝：53、14-19. 1999

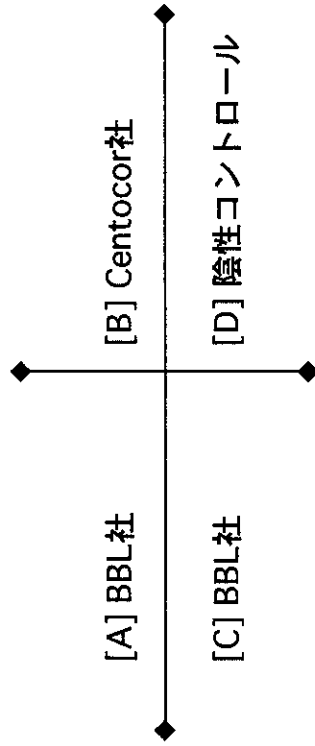
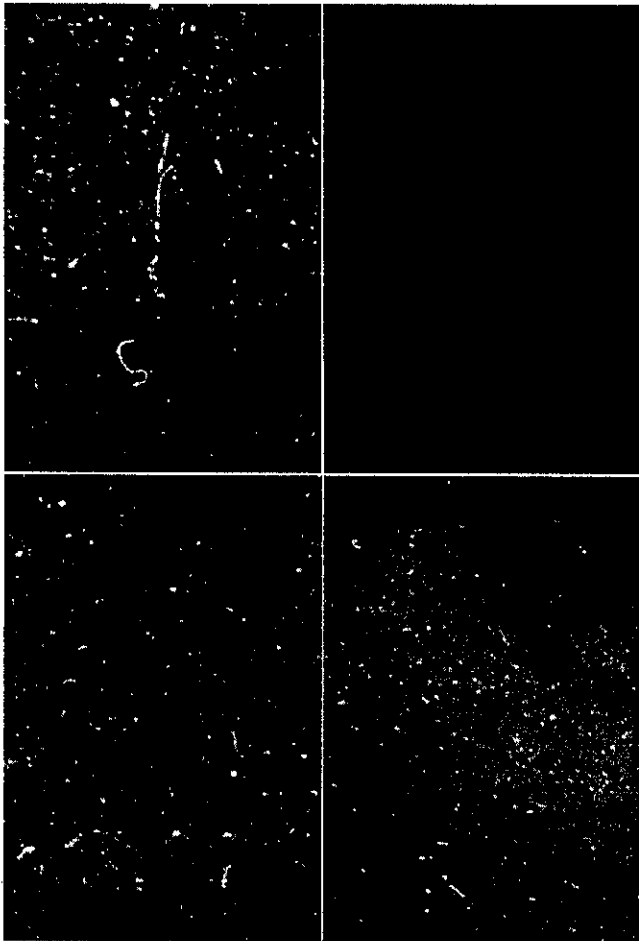
年.

- (12) A review of the economics of the prevention and control of rabies. Part 1: Global impact and rabies in humans. M.I.Meltzer and C.E.Rupprecht. Pharmacoeconomics. 14:365-383. 1998.
- (13) A review of the economics of the prevention and control of rabies. Part 2: Rabies in dogs, livestock and wildlife. M.I.Meltzer and C.E.Rupprecht. Pharmacoeconomics. 14:481-498. 1998.
- (14) Rabies control in the republic of the Philippines: benefits and costs of elimination. D.B.Fishbein, N.J.Miranda, P.Merrill, R.A.Camba, M.Meltzer, E.T.Carlos, C.F.Bautista, P.V.Sopungco, L.C.Mangahas, L.M.Hernandez, M.M.Leoncio, D.Mercado, S.Gregorio, E.Salva, J.G.Dobbins and W.G.Winkler. Vaccine 9:581-587. 1991.
- (15) Rabies. T. Hemachudha. in Central Nervous System Infectious Diseases and Therapy. Ed by Karen L.Roos. Marcel Dekker, Inc., New York

(1 6) Human Rabies Prevention -
United States, 1999.
Recommendations of the

Advisory Committee on
Immunization Practices (ACIP).
MMWR 48:RR1. 1997.

図1 直接蛍光抗体法



cf. ポリクローナル[C]ではモノクローナル[B]よりも背景が強く染色されることが多い

- 1) 脳組織 (海馬、脳髄、小脳、大脳) の圧片標本を作製
- 2) 十分に風乾後、冷アセトンにて固定 (-20C、2 時間以上)
- 3) 風乾 (標本は-20Cにて保存可能)
- 4) FITC標識抗-狂犬病ウイルス抗体を20分間反応 (ポリクローナル抗体 (BBL社) 及びモノクローナル抗体 (Centocor社))
- 5) PBS (-) にて10分間洗浄 (2回)
- 6) 蒸留水に2-3秒浸したのち風乾
- 7) スライドをグリセリンで封入後、蛍光顕微鏡にて抗原の有無を確認 (x200 & x400)
- ・ 陽性コントロールには固定毒 (CVS株) を感染させたマウスの脳組織を使用

図2 RT-PCR法による狂犬病ウイルスの検出

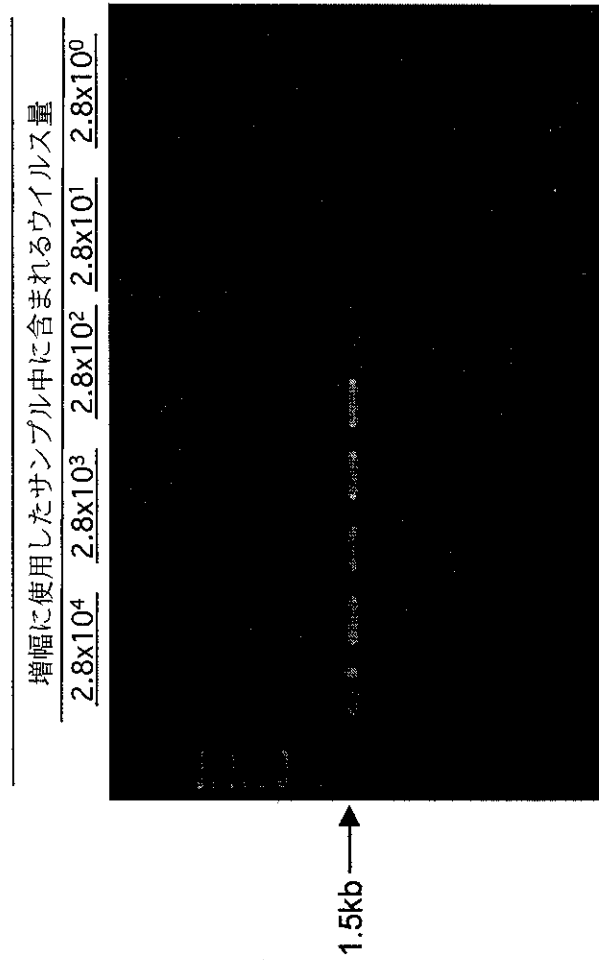


図3 ウイルス分離に使用された8穴スライドとウイルスの中和抗体価測定に使用された8穴の組織培養用チャンバースライド

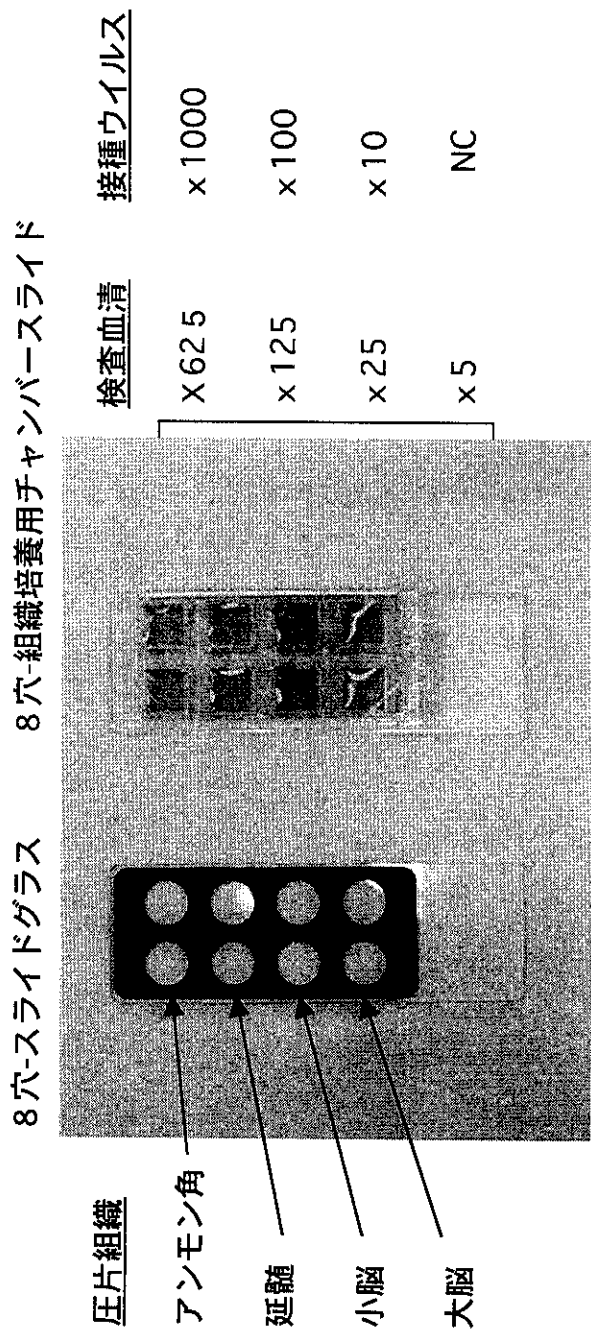
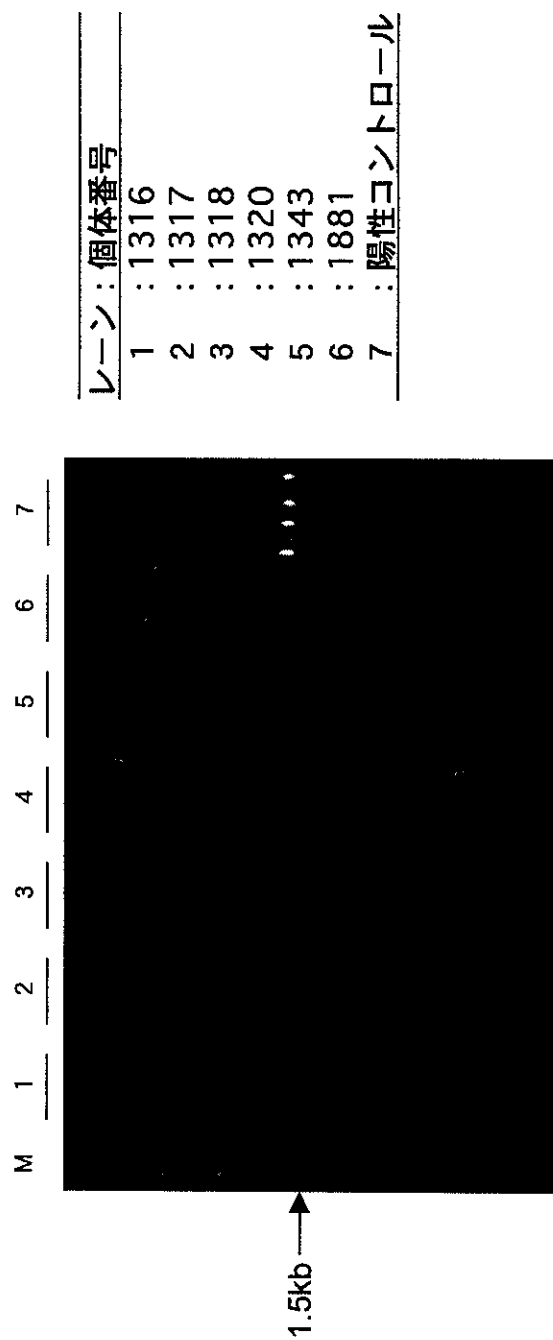


図4 野生化アライグマに対する狂犬病検査

個体番号	性別	アンモン角		延髄		小脳		大脳		血中ウイルス 抗体価
		BBL	CCor	BBL	CCor	BBL	CCor	BBL	CCor	
1301	F	-	-	-	-	-	-	-	-	<25
1302	F	-	-	-	-	-	-	-	-	<25
1303	M	-	-	-	-	-	-	-	-	<25
1304	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1308	M	-	-	-	-	-	-	-	-	<25
1310	F	-	-	-	-	-	-	-	-	<25
1316	F	N	N	N	N	N	N	N	N	<25
1317	F	N	N	N	N	N	N	N	N	<25
1318	F	N	N	N	N	N	N	N	N	<25
1319	F	N	N	N	N	N	N	N	N	-
1320	F	N	N	N	N	N	N	N	N	<25
1343	F	N	N	N	N	N	N	N	N	<25
1449	F	N	N	N	N	N	N	N	N	<25
1465	M	N	N	N	N	N	N	N	N	<25
1467	M	N	N	N	N	N	N	N	N	<25
1881	F	N	N	N	N	N	N	N	N	<25
1882	M	N	N	N	N	N	N	N	N	<25
1883	F	N	N	N	N	N	N	N	N	<25
1884	F	N	N	N	N	N	N	N	N	<25
1885	F	N	N	N	N	N	N	N	N	<25
1886	F	-	-	-	-	-	-	-	-	<25
1887	M	N	N	N	N	N	N	N	N	<25

Cf. (F) : 雌、(M) : 雄。(N) : 陰性、(-) : 検体なし。(<25) : 血清希釈倍率。血中ウイルス抗体価：プロテインA-FITCを利用した間接蛍光抗体法によって測定。

図5 野生化アライグマの脳乳剤を用いたRT-PCR



分担研究報告書

神戸市および福岡市医師会会員への 動物由来感染症（人獣共通感染症）に関するアンケート調査

分担研究者 : 内田 幸憲 (神戸検疫所長)
研究協力者 : 藤尾 昭信 (神戸検疫所)

研究要旨：

医師の人獣共通感染症へのかかわりの現状を知る目的で神戸市および福岡市医師会に所属の医師にアンケート調査を行った。神戸市医師会会員からは1,165通(回収率45.1%)福岡市医師会会員からは774通(回収率42.7%)のアンケートが回収された。診療の中で感染症患者診察率が10%以下の医師は7～8割であるが感染症を疑う時に動物飼育の有無や海外旅行について問診を行う医師は70%に及んでいた。

感染症新法に定められた15種類の人獣共通感染症を5年くらいの中に疑うか確定診断をした医師は738名(38.1%)1,355件に及んでいた。ペット動物が感染源と思われる患者の診察経験のある医師は365名(18.9%)であった。原因動物は犬、ネコとインコなど鳥類が主であるがサル、チンチラ、カメも少数の報告があった。今後、感染症や人獣共通感染症が増えると感じている医師は半数であった。動物由来感染症（人獣共通感染症）対策に対する意見の自由記載では712名(36.7%)から1,066件の提案がなされた。その概要は、「行政」に対するもの466件、「教育」に対するもの240件、「医療」に対するもの209件であった。また、二次調査には80%の医師が協力すると回答した。

動物由来感染症対策への期待は大きく行政-医師-獣医師-ペット業者-ペット飼育者の間でのネットワーク構築が望まれる。

A. 研究目的

近年、新興再興感染症が、世界的に発生・増加する傾向にあり、WHOは「もはやどの国も安全ではありえない」との声明を発するに至っている。そしてこれら感染症の半数以上は人獣共通感染症であることも周知の事実である。しかしながら、我が国においては人獣共通感染症

対策は立ち遅れているといっても過言ではなく、系統的組織的データ蓄積と対応策の構築はなされていない。これまでの2年間の本研究班活動の中で、家畜以外の動物輸入実態は無検疫の状態でも年間約400万頭が輸入されていることが判明した。また、全国開業獣医師へのアンケート調査でイヌ、ネコ以外のエキゾチ