

今回、日本における屋外および屋内の野生ラット（ドブネズミおよびクマネズミ）における *S. moniliformis* の保菌状況の調査を行った。その結果、高率に保菌していることが明らかとなり、患者の報告は定かではないが、今後、感染・発症例が出て不思議ではないことが示された。MMWR に報告されたように発症後、死亡までの経過が非常に短い例もあるので、その診断・同定法の開発が必要であると考えられた。今回、培養液から PCR で検出する方法の開発を行ったが、近縁の細菌に対しても増幅が起こるといふ不十分な点もあるが、これら非特異的なバンドは明らかにサイズが異なっているので、ある程度、有効な検出法であると考えられた。また、ドブネズミとクマネズミでは保菌している *S. moniliformis* 株が異なっていたが、それぞれの株の病原性の違い、保菌株が異なっている理由については不明である。

F. 健康危害情報

G. 研究発表等

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

Table 1) *S. moniliformis* 16S rRNA 特異的PCR用Primers

Primer name	Primer sequence	GenBank #35305
S (Sense)	5'- gcttaacacatgcaaattctat	39-49
S3 (Sense)	5'- gaaaggagagattgctaag	202-220
S4 (Sense)	5'- aggagagattgctaagag	205-222
AS (AntiSense)	5'- tgagatacggccttact	334-317

Fig 1) PCR用Primersの特異性 (1)

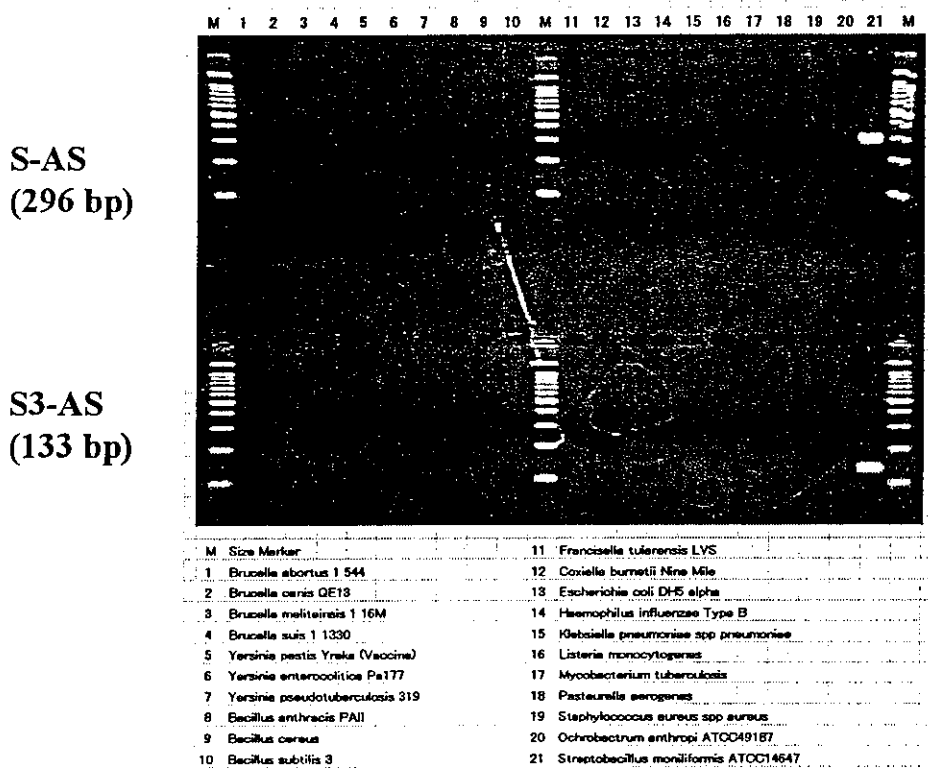


Fig 2) PCR用Primersの特異性(2)

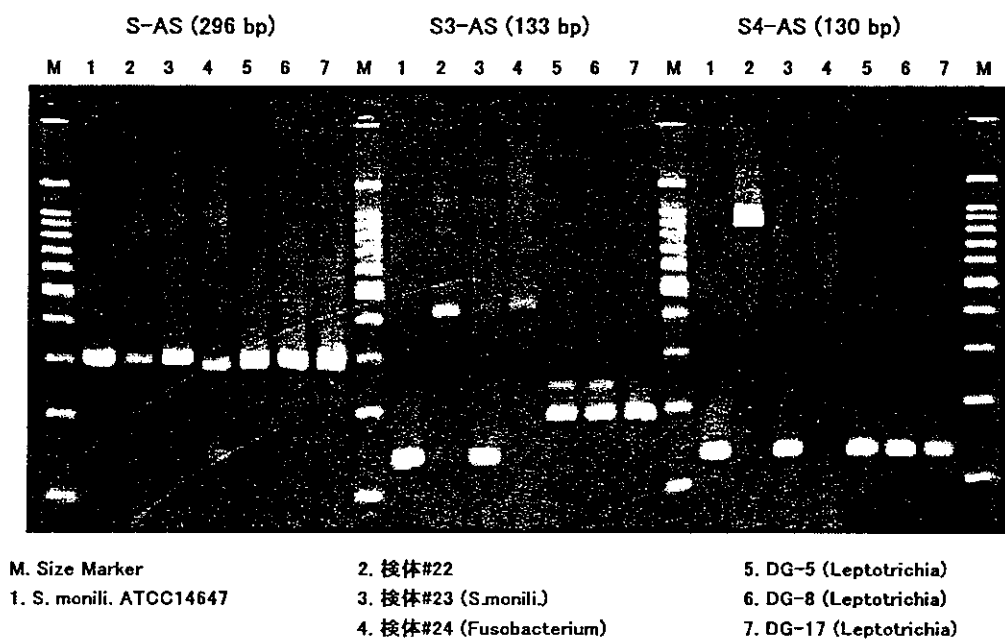
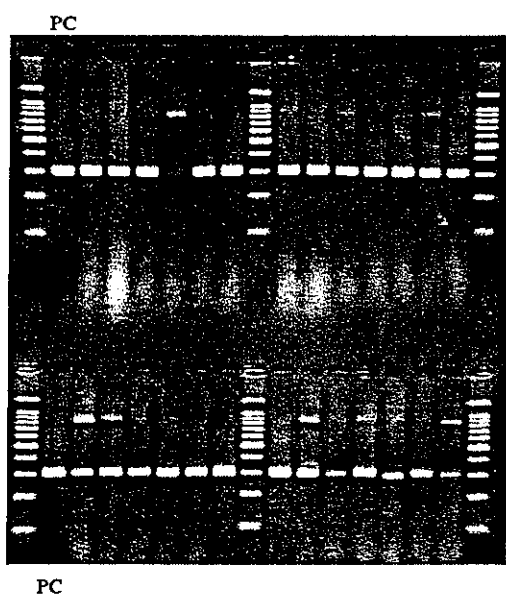
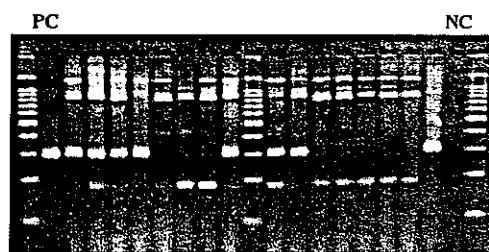


Fig 3) 16S rRNAの検出 (S-AS)

A) 屋外ラット (24/26)*



B) 屋内ラット (9/17)*



PC: *S.monili.* ATCC14647

NC: Sample (-)

*: シーケンス確認後の陽性率

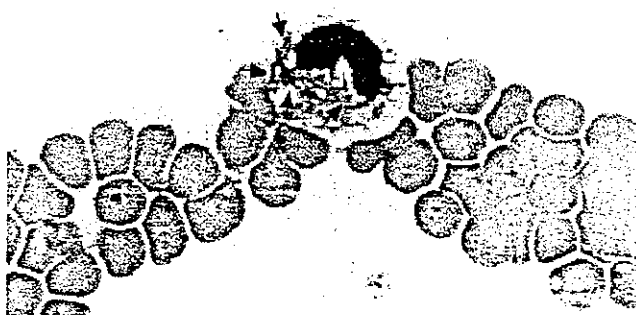
Fig 4) 16S rRNA の部分シーケンス (location: 38-297)

14647 01 .Seq 05 .Seq 06 .Seq 08 .Seq 15 .Seq AHL370-1	1	10	20	30	40	50	14647 1 (Kuma) .Seq 2 (Kuma) .Seq 4 (Kuma) .Seq 8 (Kuma) .Seq 9 (Kuma) .Seq 18 (Kuma) .Seq AHL370-1	16	20	30	40	50	14647 1 (Kuma) .Seq 2 (Kuma) .Seq 4 (Kuma) .Seq 8 (Kuma) .Seq 9 (Kuma) .Seq 18 (Kuma) .Seq AHL370-1
14647 01 .Seq 05 .Seq 06 .Seq 08 .Seq 15 .Seq AHL370-1	51	60	70	80	90	100	14647 1 (Kuma) .Seq 2 (Kuma) .Seq 4 (Kuma) .Seq 8 (Kuma) .Seq 9 (Kuma) .Seq 18 (Kuma) .Seq AHL370-1	60	70	80	90	100	14647 1 (Kuma) .Seq 2 (Kuma) .Seq 4 (Kuma) .Seq 8 (Kuma) .Seq 9 (Kuma) .Seq 18 (Kuma) .Seq AHL370-1
14647 01 .Seq 05 .Seq 06 .Seq 08 .Seq 15 .Seq AHL370-1	101	110	120	130	140	150	14647 1 (Kuma) .Seq 2 (Kuma) .Seq 4 (Kuma) .Seq 8 (Kuma) .Seq 9 (Kuma) .Seq 18 (Kuma) .Seq AHL370-1	110	120	130	140	150	14647 1 (Kuma) .Seq 2 (Kuma) .Seq 4 (Kuma) .Seq 8 (Kuma) .Seq 9 (Kuma) .Seq 18 (Kuma) .Seq AHL370-1
14647 01 .Seq 05 .Seq 06 .Seq 08 .Seq 15 .Seq AHL370-1	151	160	170	180	190	200	14647 1 (Kuma) .Seq 2 (Kuma) .Seq 4 (Kuma) .Seq 8 (Kuma) .Seq 9 (Kuma) .Seq 18 (Kuma) .Seq AHL370-1	160	170	180	190	200	14647 1 (Kuma) .Seq 2 (Kuma) .Seq 4 (Kuma) .Seq 8 (Kuma) .Seq 9 (Kuma) .Seq 18 (Kuma) .Seq AHL370-1
14647 01 .Seq 05 .Seq 06 .Seq 08 .Seq 15 .Seq AHL370-1	201	210	220	230	240	250	14647 1 (Kuma) .Seq 2 (Kuma) .Seq 4 (Kuma) .Seq 8 (Kuma) .Seq 9 (Kuma) .Seq 18 (Kuma) .Seq AHL370-1	210	220	230	240	250	14647 1 (Kuma) .Seq 2 (Kuma) .Seq 4 (Kuma) .Seq 8 (Kuma) .Seq 9 (Kuma) .Seq 18 (Kuma) .Seq AHL370-1
14647 01 .Seq 05 .Seq 06 .Seq 08 .Seq 15 .Seq AHL370-1	251	260	270	280	290	300	14647 1 (Kuma) .Seq 2 (Kuma) .Seq 4 (Kuma) .Seq 8 (Kuma) .Seq 9 (Kuma) .Seq 18 (Kuma) .Seq AHL370-1	260	270	280	290	300	14647 1 (Kuma) .Seq 2 (Kuma) .Seq 4 (Kuma) .Seq 8 (Kuma) .Seq 9 (Kuma) .Seq 18 (Kuma) .Seq AHL370-1

参考-図) 好中球内の *S. moniliformis* の菌体 (末梢血の塗抹、100倍)

(MMWR: 53 (51&52); 1198-1202, Jan. 2005 より)

FIGURE. *Streptobacillus moniliformis* bacilli in a neutrophil (peripheral blood smear, Wright stain, original magnification: 100X)



Photo/CDC

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)分担研究報告書

リケッチア・クラミジアに関する研究

分担研究者	倉根一郎	国立感染症研究所	ウイルス第一部	部長
協力研究者	岸本壽男	国立感染症研究所	ウイルス第一部	第五室 室長
	安藤秀二	同		主任研究官
	小川基彦	同		主任研究官
	荒川香南子	同		流動研究員
	柳 陳堅	同		流動研究員
	佐藤 梢	同		協力研究員
	川端寛樹	国立感染症研究所	細菌第一部	第四室 室長
	藤田博巳	大原総合病院附属大原研究所		主任研究員
	福士秀人	岐阜大学農学部獣医学科獣医微生物学講座		教授

研究要旨:動物由来感染症であるリケッチアならびにクラミジア関連疾患を対象に、動物、ヒト、環境、ベクター等の感染状況の把握を行うことを目的として、それらの特異的な診断法の開発を試みた。まず今回は動物およびダニ由来リケッチア感染症の病原体の遺伝子データベースから、マダニ媒介性のリケッチア病原体の検出に限定した TaqMan Real-Time PCR による検出系のプライマーおよびプローブを設計した。感度、特異性の検討を行った結果、実用可能と判断したので、一部野外ダニ類からのダニ媒介性リケッチアの遺伝子検出と同定を試みた。調査を実施した動物寄生ダニ 230 検体からは 29 件が SFG リケッチア陽性となった。また *Ehrlichia chaffeensis*、*E. canis* を標的とした系では 3 件が陽性、1 件が疑陽性となった。次に動物由来クラミジア感染症の病原体検出法についても、TaqMan Real-Time PCR の開発および実用化を検討した。*C. psittaci* とともに動物由来の *C. caviae* および *C. pecorum* が検出可能であり、主にヒトを宿主とする *C. pneumoniae*、*C. trachomatis* には反応しなかった。今後さらに他の動物由来クラミジアやその他の病原体についても特異性、感度の検討を行い、鳥、哺乳類等におけるクラミジア感染状況のサーベイランスに実用的な検出法の確立を目指す。

A. 研究目的

本研究では動物由来感染症であるリケッチアならびにクラミジア関連疾患を対象として、動物、ヒト、環境、ベクター等の感染状況のサーベイランスを行うことを目的に、特異的で多検体を処理できる診断法の開発と実

用化を目指し、さらに実際の検体を用いて実用性の確認を行うこととした。リケッチアは、ほとんどが自然界ではダニと動物の間のサイクルがあり、分類学的にはレジオネラ目に配置換えされた Q 熱コクシエラ (*C. burnetti*) や、つつが虫病の *Orientia tsutsugamushi* な

どのほか、現在マダニ媒介性リケッチアとして国内においては紅斑熱群リケッチア (Spotted Fever Group Rickettsia, SFG Rickettsia) に属する *Rickettsia japonica* (日本紅斑熱) が知られている。また、国内には患者が報告されていないものの、ヒトへの病原性を持つ、ヒト単球エーリキア症 (HME) を起こす *Ehrlichia chaffeensis* やヒト顆粒球エーリキア症 (HGE) を起こす *Anaplasma phagocytophila* が知られている。本年はこれらのなかで比較的診断、鑑別が困難で不明な点が多いマダニ媒介疾患を網羅的に検出する TaqMan probe 法 Real-Time PCR の構築を試み、一部野外ダニ類からのダニ媒介性リケッチアの遺伝子検出を試みる。

クラミジアについては、動物由来クラミジア感染症として *C.psittaci* とともに動物由来の *C.abortus*, *C.caviae*, *C.felis* ヒトへの感染が報告されており、これらとヒト由来の *C.pneumoniae*, *C.trachomatis* との鑑別が可能な病原体検出法の開発は意義がある。TaqMan probe 法を用いた Real-Time PCR により、迅速、感度、特異性に優れた動物由来クラミジア感染症の病原体検出法の開発を検討し、確立されれば、従来の PCR との比較や臨床検体での実用化を検討する。

B. 研究方法

1. 動物ならびにダニ由来リケッチア感染症の病原体検出法の開発

マダニ媒介疾患を網羅的に検出する TaqMan probe 法 Real-Time PCR の構築を試みた。まずマダニ由来リケッチア感染症の病原体の遺伝子データベースから、Real-Time PCR によるプライマーおよびプローブを設計し、感度、特異性の検討を行っ

た。

方法と材料

①プライマーおよびプローブの設計

データベースに登録されている情報にもとづき SFG *Rickettsia*, *Ehrlichia chaffeensis* / *canis*, *Anaplasma spp.* に特異的な Real-Time PCR のプライマーおよびプローブを設計した。

②特異性試験

以下の46菌種を用いて特異性試験を行った。

Alcaligenes faecalis, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Chryseobacterium indologenes*, *Flavobacterium breve*, *Staphylococcus spidermidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Acinetobacter lwoffii*, *Flavobacterium odoratum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus penneri*, *Legionella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella Choleraesuis*, *Salmonella Arizonae*, *Yersinia enterocolitica*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia conori*, *Rickettsia typhi*, *Rickettsia prowazekii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia canis*, *HGE*, *Ehrlichia sennetsu*, *Orientia tsutsugamishi* Gilliam 株, *Orientia*

tsutsugamishi Karp 株 , *Orientia*
tsutsugamishi Kato 株 , *Orientia*
tsutsugamishi Kawasaki 株 , *Orientia*
tsutsugamishi Kuroki 株

2. 野外ダニ類からのダニ媒介性リケッチアの遺伝子検出と同定

全国で捕獲されたマダニ類 230 件から QIAGEN DNA tissue kit を用いて鋳型 DNA を精製し、Real-Time PCR に供した。

3. 動物由来クラミジア感染症の病原体検出法の開発

データベースから *C.psittaci* の 16s rRNA の領域においてプライマーおよびプローブを設計した。*C.psittaci*、*C.abortus*、*C.caviae*、*C.felis* など動物由来クラミジアに特異的で、ヒト由来の *C.pneumoniae*、*C.trachomatis* との鑑別が可能か、実際にそれぞれの株を用いて検出感度や特異性を検討した。

C. 研究結果

1. 動物ならびにダニ由来リケッチア感染症の病原体検出法の開発

① 特異性試験

リケッチア、エーリキアを含む 46 菌種を用いて特異性を検討したところ、SFG *Rickettsia* を標的とした反応では *Neorickettsia sennetsu* と *E. chaffeensis* に、*Ehrlichia chaffeensis* と *canis* を標的とした反応では HGE にも増殖が認められた。これらの反応を除き、他の菌種に対しては特異的であった。

2. マダニ材料への応用

今回構築した Real-Time PCR の各反応系

は若干の交差が認められるものの、それぞれの組み合わせによって消去法によりそれぞれを特定できることから、マダニ材料への応用を試みたところ、230 件のマダニ材料から 29 件が SFG リケッチアが陽性となった。また *Ehrlichia chaffeensis* と *canis* を標的とした系では 3 件が陽性、1 件が 35 サイクル以降にシグナルの増幅が見られる疑陽性となった(表)。

3. 動物由来クラミジア感染症の病原体検出法の開発

新たに設計した Real-Time PCR 系では、*C.psittaci* とともに動物由来の *C.caviae* および *C.pecorum* が検出可能であったのに対し、*C.trachomatis* および *C.pneumoniae* は検出されなかった。他のクラミジア、およびその他の各種病原体についての特異性試験は今後実施予定である。

D. 考察

今回構築した Real-Time PCR 系によってダニ媒介性リケッチア症、エーリキア症を網羅的にスクリーニングできた。若干の交差は認められるものの、ダニ媒介性疾患の病原体の存在の有無には有効と考える。今後、より特異的な系の構築を試みるとともに、今回陽性となった検体を用いて、陽性マダニに含まれていた病原体についてシーケンス解析をおこなう予定である。マダニの病原体保有状況を網羅的に把握することにより、患者発生時のリスク評価へ有用と考えられる。

クラミジアについては新たに設計した Real-Time PCR 系では、*C.psittaci* はじめ動物由来のクラミジアが検出可能であったのに対し、*C.trachomatis* および *C.pneumoniae* は

検出されなかったことから、動物由来のクラミジアに特化した検出法としての有用性が示唆された。

E. 結論

今回開発した動物由来リケッチアならびにクラミジアの検出系は、動物由来感染症のサーベイランスに用いる場合、ある程度有用性が示唆されたが、さらに感度・特異性の確認や実用化のための検討を行い、今後の実用化を目指したい。

F. 健康危機情報 特になし。

G. 研究発表

論文発表

1. 蔡 燕, 小川基彦, アグス・スティヨノ, 福士秀人, 田原健司, 安藤秀二, 岸本寿男: 鳥由来検体からのオウム病クラミジアの遺伝子抽出法の検討. 感染症誌. 2:153-154, 2005.

学会発表

1) 蔡 燕, 小川基彦, 佐藤 梢, 志賀定祠, アグス・スティヨノ, 岸本寿男 オウム病の病原診断における新しい PCR 法の検討. 第78回日本感染症学会総会, 東京, 2004.

2) 小川基彦, 岸本寿男, 佐藤 梢, 蔡 燕, 志賀定祠, アグス・スティヨノ, 多田有希: オウム病集団発生の原因となったヘラジカ由来 *C. psittaci* の遺伝子学的解析とその感染源に関する調査. 第78回日本感染症学会総会, 東京, 2004.

3) Chahota, R., H. Ogawa, T. Yamaguchi, H. Fukushi. Genetic Diversity of *Chlamydophila* species prevalent among the captive and feral avian species based on VD2

region of ompA gene. 第22回日本クラミジア研究会・第11回リケッチア研究会合同学術集会, 倉敷, 2004.

4) 高原 悠, 黒田悦子, 子安沙織, 蔡 燕, 宮下修行, 山口剛士, 福士秀人. ネコクラミジア抗原発現遺伝子の同定および性状解析. 第22回日本クラミジア研究会・第11回リケッチア研究会合同学術集会, 倉敷, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし。

I. 特許取得 なし。

J. 実用新案登録 なし。

K. その他 なし。

表 Real Time PCR によるマダニからの特異遺伝子の検出

捕獲情報			マダニ形態分類		Real Time PCR 結果		
ID	捕獲地	捕獲日	属・種	ステージ	SFG	Ehrlichia	HGE
F-001	北海道 F	2004/6/6	<i>Haemaphysalis douglasi</i>	♀	+	-	-
F-002	北海道 F	2004/6/6	<i>H.douglasi</i>	♀	+	-	-
Y-016	山梨 U	2004/6/5	<i>Ixodes persulcatus</i>	♀	-	±	-
Y-017	山梨 U	2004/6/5	<i>I.ovatus</i>	♀	-	+	-
Y-019	山梨 U	2004/6/5	<i>I.ovatus</i>	♂	-	+	-
Y-021	山梨 U	2004/6/5	<i>I.ovatus</i>	♂	-	+	-
Fu-001	福島 F	2004/6/5	<i>H.japonica</i>	nymph	+	-	-
Yk-001	鹿児島 Y-1	2004/6/26	<i>H.megaspinosa</i>	♀	+	-	-
Yk-003	鹿児島 Y-1	2004/6/26	<i>H.megaspinosa</i>	nymph	+	-	-
Yk-007	鹿児島 Y-2	2004/6/26	<i>H.yeni</i>	nymph	+	-	-
Yk-008	鹿児島 Y-2	2004/6/26	<i>H.yeni</i>	nymph	+	-	-
Awj-002	兵庫 Awj-1	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-003	兵庫 Awj-1	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-004	兵庫 Awj-1	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-005	兵庫 Awj-1	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-006	兵庫 Awj-1	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-007	兵庫 Awj-1	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-008	兵庫 Awj-1	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-009	兵庫 Awj-1	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-010	兵庫 Awj-1	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-011	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	♂	+	-	-
Awj-012	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	♀	+	-	-
Awj-013	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	♀	+	-	-
Awj-014	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	♀	+	-	-
Awj-015	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	♀	+	-	-
Awj-016	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	♀	+	-	-
Awj-018	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	♀	+	-	-
Awj-019	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-020	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-021	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-022	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-023	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-024	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
陽性					29	3	
疑陽性*						1	

* 疑陽性 35サイクル以降に増幅が認められたもの

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

各種動物におけるレプトスピラ保有状況調査

分担研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所 副所長
協力研究者 小泉信夫 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官
研究協力者 谷川力 イカリ消毒技術研究所 所長
研究協力者 林栄治 東京医科歯科大学大学院 助手
研究協力者 今岡浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官
研究協力者 水谷浩志 東京都動物愛護相談センター・城南島出張所 係長
研究協力者 長谷川徹 東京都動物愛護相談センター・城南島出張所 主任
研究協力者 新田芳樹 沖縄県家畜衛生試験場 研究員
研究協力者 廣瀬和彦 明治製菓生物産業研究所 研究員

研究要旨

1. 関東3県および静岡県計12ヶ所で捕獲したドブネズミ78頭中4頭(2ヶ所)からレプトスピラが分離された。また分離はできなかったものの、4頭(2ヶ所)の腎臓培養液のPCRにより、レプトスピラの遺伝子断片が検出された。
2. 神奈川県および長崎県のアライグマから分離されたレプトスピラ2株について性状解析を行った結果、2株とも *Leptospira interrogans* serovar Hebdomadis と同定され、血清型 Hebdomadis の遺伝的多様性が明らかになった。また神奈川県および愛知県で捕獲されたアライグマの血清診断を行い、それぞれ124頭中17頭と7頭中1頭が抗体価陽性であった。
3. 東京都動物愛護相談センターに引き取られたイヌの腎臓からレプトスピラの分離および尿からレプトスピラ遺伝子の検出を試みたがすべて陰性であった。
4. 沖縄県の養豚場のブタの尿からレプトスピラの分離と遺伝子の検出および養豚場内で捕獲したネズミ類からレプトスピラの分離を試みたがすべて陰性であった。

研究目的

レプトスピラ症は、スピロヘータの一種である病原性レプトスピラ(*Leptospira*)の感染により起こる人獣共通感染症である。自然

界では、げっ歯類を中心として多くの野生動物や家畜、愛玩動物が、レプトスピラの保菌動物となっている。レプトスピラは保菌動物の腎臓に定着し、尿中に排出される。ヒトは、

この尿との直接的な接触，あるいは尿により汚染された水や土壌との接触により感染する。このため，レプトスピラ症のサーベイランスには，レプトスピラの保菌動物を明らかにすることが非常に重要である。本年度の調査では，レプトスピラの保菌動物である野生動物（ドブネズミおよびアライグマ），愛玩動物（イヌ），また家畜（ブタ）におけるレプトスピラ保有状況を調査した。

方法

1. レプトスピラの分離，培養法

ドブネズミなどのネズミ類，イヌの腎臓およびブタ尿から，コルトフ培地を用いてレプトスピラの分離培養を行った。培養は，30℃で3ヶ月間行い，一週間ごとに暗視野顕微鏡下でレプトスピラの増殖の有無を観察した。

2. レプトスピラ *flaB* 遺伝子配列解析

分離したレプトスピラより染色体 DNA を抽出し，これを鋳型として *flaB* 特異的プライマーを用いて遺伝子の増幅を行い，その塩基配列の決定を行った。また培養開始 24 時間後の培養上清 1 ml および尿サンプルを遠心分離にかけて沈殿を回収し，同様に DNA 抽出，*flaB*-PCR を行った。

3. パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)による制限酵素長鎖断片のパターン解析

対数増殖期のレプトスピラ菌体を低融点アガロースに封入し，ゲルブロックとした。ゲルブロックをリゾチーム，Proteinase K，制限酵素 *Not I* で処理し，このブロックを

6V/cm，パルスタイム 10-60 秒，5℃で 20 時間泳動を行った。

4. 顕微鏡下凝集試験(MAT)

96 穴マイクロタイタープレートに，PBS で希釈したアライグマ血清あるいはレプトスピラ標準抗血清と，被検レプトスピラ培養液をそれぞれ 25 μ l ずつ加え，37℃，3 時間インキュベートした後，暗視野顕微鏡下で観察を行った。

5. 凝集素交差吸収試験

アライグマから分離されたレプトスピラ Rc29, Rc57 に対する抗血清を作製し，血清型 *Hebdomadis* 標準株およびその標準抗血清を用いて凝集素交差吸収試験を行い，分離株の血清型を決定した。

結果および考察

1. ドブネズミのレプトスピラ保有状況

本年度は以下の 12 ヶ所で捕獲したドブネズミからレプトスピラの分離を行った(太字は本研究班で捕獲を行った場所。それ以外は研究協力者の元に集められたドブネズミ)。

- a) 東京都墨田区隅田川周辺 1 頭
- b) 東京都墨田区北部住宅街 4 頭
- c) 千葉県市川市 15 頭
- d) 神奈川県平塚市 1 頭
- e) 東京都八王子市 1 頭
- f) 神奈川県川崎市浮島公園 24 頭
- g) 東京都江東区 4 頭
- h) 千葉県銚子市 2 頭
- i) 静岡県沼津市 1 頭

- j) 東京都豊島区 4頭
- k) 横浜市中区大岡川周辺 11頭
- l) 横浜市中区中村川周辺 10頭

これらのうち、a)の1頭およびb)の3頭からレプトスピラが分離された。分離レプトスピラ4株は、*flaB* 遺伝子部分塩基配列、標準抗血清との反応性および *NotI* - PFGE の切断パターンから、すべて *L. interrogans* serovar Copenhageni あるいは *Icterohaemorrhagiae* と同定された(図1)。

また分離はできなかったものの、k)の3頭およびl)の1頭の培養液上清沈渣から *L. interrogans* の *flaB* 遺伝子の一部が検出された。

前研究班での調査により、東京都内では重症型レプトスピラ症であるワイル病の起原菌である血清型 Copenhageni/*Icterohaemorrhagiae* が分離されたが、本研究でもこの血清型が広くドブネズミの間で蔓延していることが明らかとなった。ワイル病の患者数は近年減少しているものの、感染機会は現在も以前と変わらず都心部でも存在し、実際に東京都や神奈川県など都心部で患者が発生していることから、レプトスピラ症は決して過去の病気ではないと言うことを認識する必要がある。

2. アライグマ分離レプトスピラの性状解析 およびアライグマ血清診断結果

前研究班での調査によりアライグマから分離されたレプトスピラ Rc29, Rc57 は、*flaB* 配列から遺伝種 *interrogans* であることが、

また抗血清との反応性および *NotI* - PFGE の切断パターンから血清型 *Hebdomadis* と共通な抗原を保有するが、これまで本邦で存在している血清型 *Hebdomadis* とは異なる血清型であることが示唆された。そこで本研究では、これら分離株の血清型を決定するためにそれぞれの抗血清を作製し、凝集素交差吸収試験を行ったところ、両株とも血清型 *Hebdomadis* であることが明らかとなった(表1および図2)。これまでの研究から、*NotI* による PFGE 切断パターンは、同じ遺伝種に属する血清型間では保存されており、時間、地域間による違いはないと考えられていた。しかしながら本研究により、すくなくとも血清型 *Hebdomadis* では遺伝的多様性が存在することが明らかとなった。一方、前、本研究班の結果から、血清型 Copenhageni/*Icterohaemorrhagiae* では、ゲノム構造が非常に保存されていることも明らかになっている。レプトスピラの血清型による遺伝的保存性、多様性について、さらに多くの血清型で調査を行い、明らかにしていく必要がある。

神奈川県で捕獲されたアライグマおよび愛知県で捕獲されたアライグマのレプトスピラ抗体測定を行ったところ、それぞれ124頭中17頭、7頭中1頭が抗体価陽性であった(表2)。これまでの我々の調査により、神奈川県および長崎県のアライグマからレプトスピラが分離されており、また他の研究者の調査から北海道のアライグマでもレプトスピラが広く蔓延していることも明らかとなっている。今回の結果は、アライグマのレプトスピラ汚染をさらに裏付けるものである。アライグマ

はペットとして輸入されたものが野生化したのであるが、これまで国内には存在しなかった動物が、新たなレプトスピラの保菌動物となってしまったということから、輸入動物の一層の規制、管理の徹底が望まれる。

3. 東京都引き取り犬のレプトスピラ保有状況

イヌは古くからレプトスピラの保菌動物として知られており、また人間との距離を考えた場合に、非常に重要な保有体である。本研究では、東京都動物愛護相談センターに引き取られたイヌ 28 頭の腎臓からレプトスピラの分離および 16 頭の尿からレプトスピラ遺伝子の検出を試みたが、すべて陰性であった。今後さらに調査頭数を増やし、正確な保有状況を明らかにしていきたい。

4. 沖縄県の飼養ブタのレプトスピラ保有状況調査

病原性レプトスピラはブタに対してもレプトスピラ症を引き起こすが、国内でのブタのレプトスピラ症の発生報告は少ない。しかしながら、沖縄県ではブタの死産、流産が散見されており、その原因としてレプトスピラ感染が考えられている。その理由として、流産胎子の乳剤上清中にスピロヘータ様菌体が観察されること、またブタ尿の *flaB*-PCR により期待される大きさの DNA 断片が増幅されたことなどがあげられている。そこで本研究では、過去に流産の発生があった沖縄県南部の養豚場のブタの尿 30 検体からのレプトスピラの分離および遺伝子検出を試みたが、す

べて陰性であった。また養豚場内でネズミ類の捕獲を行い(ドブネズミ 42 頭, クマネズミ 2 頭, ジャコウネズミ 1 頭), 腎臓からレプトスピラの分離を試みたが、これらもすべて陰性であった。今後、過去に流産が発生した他の養豚場でも同様の調査を行うとともに、MAT による抗体価測定なども行い、ブタの流産へのレプトスピラの関与を証明していきたい。

学会発表

1. 内田正紀, 小泉信夫, Okatani Alexandre Tomomitsu, 加藤行男, 渡辺治雄 アライグマにおけるレプトスピラの保有状況と分離株の性状解析. 第 138 回日本獣医学会学術集会. 北海道, 2004 年 9 月.
2. 小泉信夫, 大部宏子, 谷川力, 牧野敬, 林栄治, 渡辺治雄 ドブネズミおよびアライグマ分離レプトスピラの性状解析. 第 41 回レプトスピラシンポジウム. 大阪, 2004 年 4 月.

表 1. アライグマ由来分離株に対する抗血清と血清型 Hebdomadis 株との凝集素交差吸収試験

抗血清	吸収株	吸収前抗体価		吸収後抗体価		非吸収率
		抗血清同一株	吸収株	抗血清同一株	吸収株	
Hebdomadis	Rc29	4000	4000	< 100	< 100	< 2.5%
Rc29	Hebdomadis	4000	4000	< 100	< 100	< 2.5%
Hebdomadis	Rc57	4000	4000	< 100	< 100	< 2.5%
Rc57	Hebdomadis	4000	4000	< 100	< 100	< 2.5%
Rc29	Rc57	4000	4000	< 100	< 100	< 2.5%
Rc57	Rc29	4000	4000	< 100	< 100	< 2.5%

表 2. アライグマ血清中のレプトスピラ抗体価

捕獲場所	検体数	MAT 陽性数	血清型	陽性数
神奈川県	124	17 (13.7%)	Autumnalis	2
			Canicola	1
			Copenhageni	3
			Copenhageni/ Icterohaemorrhagiae	12
			Hebdomadis	1
愛知県	7	1 (14.3%)	Hebdomadis	1

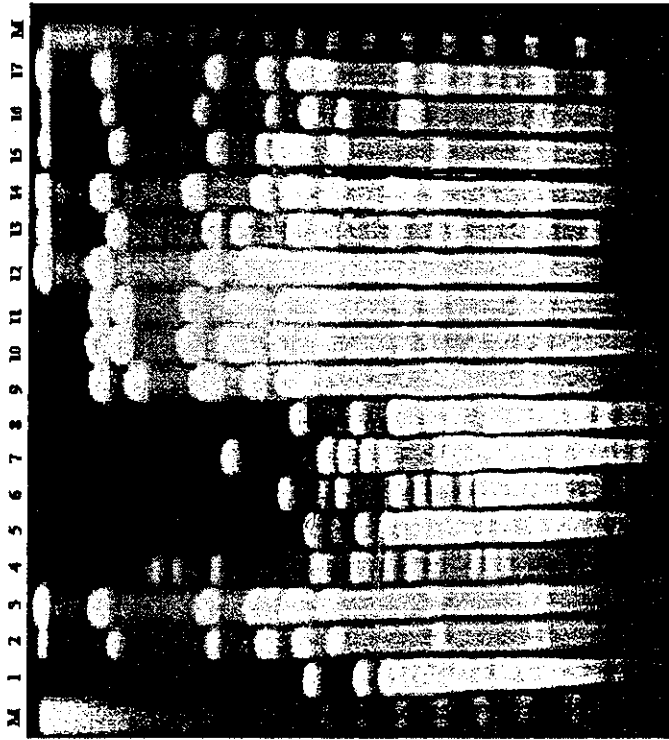


図2. 血清群 *Hebdomadis* 標準株とアライグマ由来分離株、
レプトスピラ症患者由来分離株の *Not I-PPGE*

Lanes 1 to 2: *L. braziliensis* strain Borinquena, Guiana. Lane 3: *L. heterogony* strain Heblomafis. Lane 4: *L. boggypherensis* strain scruva Juba. Lane 5: *L. guianensis* strain 2 scruva Mambung. Lanes 6 to 7: *L. sandraensis* strain Maru, Samaritani. Lane 8: *L. boggypherensis* strain Wursfaki. (標準株) Lane 9: Rc57 (野生アライグマ). Lanes 10 to 11: OPE2, OP79 (沖縄県レプトスピラ症患者). Lane 12: Akiyami B (標準株). Lane 13: Rc29 (展示アライグマ). Lanes 14 to 17: OP81, OP58, OP83, OP98 (沖縄県レプトスピラ症患者). Lane: M: lambda ladder.

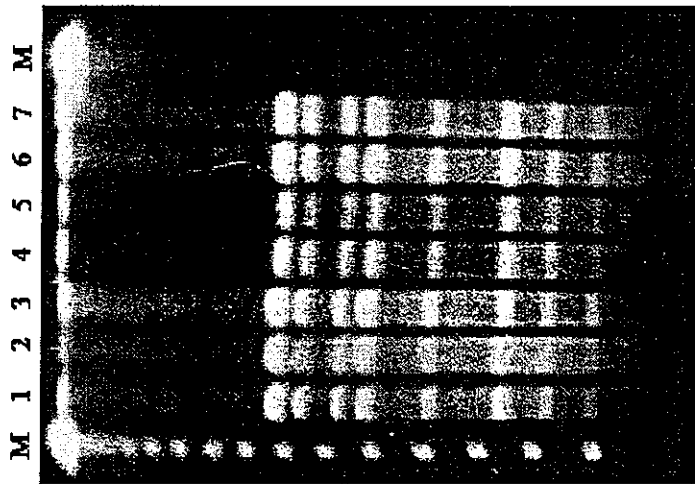


図1. 血清型 *Copenbagami* / *Ictrohacanthagiae* 標準株と
ドブネズミ由来分離株の *Not I-PPGE* 切断パターン

Lanes 1 to 3: *L. heterogony* strain Ictrohacanthagiae Ictro No.1, Ictrohacanthagiae RGA, Copenbagami M 20 (標準株). Lanes 4 to 7: Sum-1, Sum-2, Sum-3, Sum-4 (ドブネズミ). Lane: M: lambda ladder.

動物インフルエンザの血清学的サーベイランス手法の開発に関する研究

分担研究者：北海道大学大学院獣医学研究科 動物疾病制御学講座 教授 喜田宏

研究要旨： 2003年から2004年にかけて、東アジア各国において高病原性鳥インフルエンザが発生した。原因ウイルスはH5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスであり、タイ、ベトナムにおいては本ウイルスのヒトへの感染・死亡例も報告された。鳥インフルエンザウイルスを含む動物インフルエンザウイルスのヒトへの感染の危険を低減させるためには、動物インフルエンザのサーベイランスとそれらの成績に基づく疾病のコントロールが重要である。本研究は、動物インフルエンザの血清学的診断法を開発し、サーベイランス体制を整備することを目的としている。ヒトと同様に動物用のインフルエンザワクチンは不活化ワクチンが用いられている。高病原性鳥インフルエンザなどの重要疾病が発生した際には、ニワトリの淘汰や移動制限などの防疫措置がとられる。よって、血清学的サーベイランスを実施する場合、野外感染による抗体とワクチン接種による抗体を識別する必要がある。この抗体識別技術を確認するために、非構造蛋白NS1を抗原としたELISAを開発した。本ELISAを用いて、鳥インフルエンザウイルスを実験的に感染させたニワトリの血清から特異抗体を検出できた。また、野生動物の血清学的サーベイランスを行い、アザラシの血清からH3とH7亜型のインフルエンザウイルスに対する抗体を検出した。

A. 研究目的

2003年から2004年にかけて、東アジア各国において高病原性鳥インフルエンザが発生した。原因ウイルスはH5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスであり、タイ、ベトナムにおいては本ウイルスのヒトへの感染・死亡例も報告された。鳥インフルエンザウイルスを含む動物インフルエンザウイルスのヒトへの感染の危険を低減させるためには、動物インフルエンザのサーベイランスとそれらの成績に基づく疾病のコントロールが重要である。本研究は、動物インフルエンザの血清学的診断法を開発し、サーベイランス体制を整備することを目的としている。

B. 研究方法

ヒトと同様に動物用のインフルエンザワクチンは不活化ワクチンが用いられている。血清学的サーベイランスを実施する場合、野外感染による抗体とワクチン接種による抗体を識別する必要がある。抗体識別用ELISA確立のために、まずNS遺伝子をクローニングした。大腸菌発現系を用いてNS1蛋白を発現し、アフィニテ

ーカラムを用いて組換え蛋白を精製した。このNS1蛋白を抗原とする抗体検出ELISAの条件設定を行った。ニワトリにA/chicken/Yokohama/Y-55 (H9N2)株を実験感染させ、経過血清を採取した。これらの血清をELISAの検体として用いた。

また、野生動物のインフルエンザの血清疫学調査として、ロシア海洋のアザラシのインフルエンザ抗体保有調査を行った。ELISAによりスクリーニング後、陽性血清はHI試験により抗体のHA亜型を決定した。

C. 研究結果

A/equine/Miami/63 (H3N8)株のNS遺伝子分節のうち、NS1蛋白をコードしている遺伝子領域をRT-PCR法を用いて増幅した。これを大腸菌発現ベクターpET-30c(+) (Novagen)に制限酵素サイトEcoRIを用いてクローニングした。この発現用プラスミドを大腸菌BL21 (DE3) (Novagen)に導入後、IPTG存在下で組換えNS1蛋白の発現を誘導した。本組換え蛋白はヒスチジンタグとの融合蛋白として発現するよう設計した。この大腸菌を可溶化後、ニッケルカラム (Amersham)を用いてアフィニテ

イー精製した。SDS-PAGE において精製された NS1 蛋白は 31kda の単一バンドとして検出された。

本 NS1 蛋白をプレートに固層化後、BSA でブロッキングした。ニワトリに A/chicken/Yokohama/Y-55 (H9N2) 株を実験感染させて得られた経過血清を階段希釈し、プレートに分注した。洗浄後、抗ニワトリ IgG ペルオキシダーゼ抗体を二次抗体として反応させ、テトラメチルベンチジン (TMB) を基質として発色させた。測定した吸光度から、非検血清中の抗 NS1 抗体の有無を評価したところ、ウイルス感染 2 週間後より NS1 蛋白に対する抗体が特異的に検出された。

ロシア海洋のアザラシから血清を採取した。採取された血清中のインフルエンザウイルスに対する抗体を精製ウイルスを抗原とした ELISA で検出した。その結果、7 頭のアザラシの血清が ELISA 陽性となった。この 7 つの血清中のインフルエンザウイルスに対する抗体の血清型を HI 試験で同定した。その結果、これらの ELISA 陽性血清は H3 と H7 亜型に対する抗体であることが判明した。

D. 考察

ワクチンが使用されている動物においてインフルエンザの血清学的サーベイランスを実施する場合には、野外感染による抗体とワクチン接種による抗体を識別する必要がある。今回確立した NS1 蛋白に対する抗体を検出する ELISA は、これを可能とする技術であると考えられる。今後、感染実験から得られる検体と同時に、ワクチン接種した動物の検体を用いて本 ELISA を評価し、抗体識別技術を確認する。さらに野外材料を用いて本血清学的サーベイランス手法の評価を行っていく予定である。

E. 結論

人獣共通感染症であるインフルエンザの感染抗体とワクチン抗体を識別する技術を確認するために、NS1 蛋白を抗原とした ELISA を開発した。本 ELISA を用いて、鳥インフルエンザウイルスを実験的に感染させたニワトリ血清中の感染抗体を特異的に検出できた。また、野生動物の抗体サーベイランスを行い、アザラシの血清から H3 と H7 亜型のインフルエンザウイルスに対する抗体を検出した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kishida N, Sakoda Y, Eto M, Sunaga Y, Kida H (2004) Co-infection of *Staphylococcus aureus* or *Haemophilus paragallinarum* exacerbates H9N2 influenza A virus infection in chickens, *Arch Virol* 149: 2095-2104.

(2) Ohishi K, Kishida N, Ninomiya A, Kida H, Takada Y, Miyazaki N, Boltunov AN, Maruyama T (2004) Antibodies to human-related H3 influenza A virus in Baikal seals (*Phoca sibirica*) and ringed seals (*Phoca hispida*) in Russia. *Microbiol Immunol* 48(11): 905-909.

2. 学会発表

(1) 「Novel immunodiagnosis using recombinant NS1 protein of influenza A virus」 Aaron Mweene、迫田義博、磯田典和、岸田典子、難波靖治、喜田宏 第138回日本獣医学会学術集会 (2004年、札幌)

(2) 「Evaluation of influenza A virus recombinant NS1 in diagnosis」 Aaron Mweene、迫田義博、磯田典和、岸田典子、喜田宏 第52回日本ウイルス学会学術集会 (2004年、横浜)

H. 知的財産の出願、登録状況

予定なし。

渡り鳥におけるウエストナイルウイルスに対する抗体保有状況調査の進捗状況

分担研究者	今岡 浩一	国立感染症研究所	獣医科学部	主任研究官
協力研究者	鈴木 道雄	国立感染症研究所	獣医科学部	第1室研究員
協力研究者	木村 昌伸	国立感染症研究所	獣医科学部	第1室研究員

研究要旨： ウエストナイルウイルスの国内への侵入に備えるため、渡り鳥（主にカモ類）の抗体保有状況を検討することにした。サンプルとしてカモ類の血液の採取を大日本獺友会を介して6道県、各2名ずつ、それぞれ5検体、依頼した。現在、29検体のみ回収されているが、サンプル依頼開始の遅れによる狩猟期間の短縮、血液のろ紙へ付着量のばらつき、その鮮度の問題など、次年度以降に改善すべき点がいくつか見つかった。抗体は、Blocking ELISA で測定することになっているが、他のサンプルがそろった後、実施する予定である。

A. 研究目的

ウエストナイルウイルス（WNV）は、蚊と鳥の間で感染環が維持され、主に蚊を介してヒトに感染し急性熱性疾患や脳炎を引き起こす。アフリカ、東ヨーロッパ、西アジアなどで流行が報告されているが、1999年に初めて西半球のニューヨークで発生して以来、わずかに数年で全米にその流行が拡大し、その拡大には野鳥の関与が考えられている。また、近年、ロシアで、野鳥でのWNV感染が確認され、その感染が西アジア方面からシベリア方面にまで広がってきている傾向が見られ、患者も発生している。これらの地域からの渡り鳥等によるWNVの国内への持ち込みに備えるためには、何よりもそれら渡り鳥の国外生息地におけるWNV流行状況の把握が必要となる。そこで、本研究では、渡り鳥として、留鳥（たとえばカルガモ）を除くカモ類における抗体保有状況を検討し、その地域での

流行状況を類推することを目的とした。

B. 研究方法

サンプル収集： 渡り鳥（カモ類）のサンプル採取は、大日本獺友会の協力の下、北海道、青森県、秋田県、新潟県、石川県、福井県の6道県、各2名ずつにそれぞれ5検体を依頼した。サンプルの採取と回収（感染研への送付）の方法については、図1に示した説明書を同封した。血液採取用のろ紙に血液を染みこませ、軽く振ってこれを乾かし、容器に入れる。図2に示した記録用ラベルに必要な事項（カモの種類、採取日、採取場所（メッシュ番号を含む）、採取者など）を記入した上、容器とともに返信用封筒に入れ感染研に送ってもらうこととした。もし、トリにダニがついていた場合、これも別容器に入れて一緒に送付してもらうこととした。また、極力、新鮮なサンプルを採取し、迅速に送付し

てくれるように依頼した。

サンプル処理： 送付されてきたサンプルは、1mlの0.5% BSA-PBSの入った2mlチューブ中に血液のついたろ紙を入れ、4℃で一晩、ローテーターで攪拌し抽出した。その後、0.22µmのフィルターで濾過滅菌し、測定まで-80℃で保存した。この場合の血清希釈はろ紙に十分血液が採取されていた場合、1:25と換算される。

抗WNV抗体の測定： 抗体の測定は、Blocking ELISAを実施することとした。まず、WNV抗原をマイクロプレートにコーティングする。次いでスキムミルクを用いて非特異的吸着をブロックした後、サンプル血清を反応させる。さらにモノクローナル抗WNVマウス抗体を反応させる。最後に、HRPO標識抗マウスIgG抗体を反応させ、基質を入れて発色を見る。サンプル中の特異抗体の有無は、モノクローナル抗WNV抗体の反応をどの程度ブロックするかで判定する。

C. 進捗状況

1) サンプル収集状況： 2005年3月14日現在、回収された血液サンプルは、秋田県：5検体、新潟県：10検体、石川県：7検体、福井県：7検体、北海道および青森県：0検体の合計29検体が回収された。カモの種類としては、マガモ：18、コガモ：3、ヒドリカモ：3、オナガカモ：4、ホシハジロ：1であった。北海道および青森県で回収が悪いのは、おそらく今冬、雪が多く狩猟しづらい状況にあったことによる

と考えられる。また、サンプル収集依頼の開始が遅かったため、狩猟期間自体が短かったことにもよると考えられる。次年度は、サンプル収集の依頼をもっと早い時期から開始する必要があると思われた。

2) サンプルの状態： 回収されたサンプルについても、本年度は改善すべき点が多かったように思われる。ろ紙に血液をしみこませてもらったのだが、その量にばらつきが多く、全体に血液が採取されていない例が多く見られた。また、サンプルの鮮度に関しても狩猟後すぐに血液採取ができなかったようなサンプルも多く、今後、これらの点について、よりわかりやすく依頼する必要があると思われた。記録ラベルに関しては、こちらが依頼した十分な情報が得られた(図3)。

3) 抗体の測定： 抗体の測定は、すべてのサンプルがそろそろまで待って開始する予定である。Blocking ELISAで実施する予定である。

D. 健康危害情報

なし。

E. 研究発表等

なし。

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

図1) 渡り鳥 (カモ) サンプルの採取と回収方法に関する説明書

カモ類血液サンプルの採取と送付のお願い

カモ類 (留鳥・カルガモ以外) の血液を濾紙 (スティック) にしみこませて、封筒に入れ、投函してください。

1. 容器の中に濾紙 (スティック) が入っています。
2. 濾紙を取り出し、細い方に血液を十分しみこませます。
3. 濾紙を振って、乾燥させます。
4. 濾紙を容器に戻し、ふたをしっかりと閉めます。
5. 記録ラベルに採取日・場所などを記入します。
6. ラベルを容器に巻きつけます。
7. 返信用封筒に入れ、封をして投函してください。

1つの封筒に2本の容器 (血液用とダニ用) が入っています。

採取した物は、可能な限り、その日に投函をお願いします。

封筒の外側に血液が付着しないようにご注意ください。

封筒にはろ紙入り容器1本、空き容器1本(ダニ用)、記録ラベル、返信用封筒が入っています。まず、容器の中のろ紙を取り出します。

5. 返信用封筒に容器および記入用紙を入れなるべくその日のうちにポストに投函してください。

4. 記録ラベルに採取日・場所・採取者などを記入し、裏の両面テープで容器に止め、容器に巻きつけます。

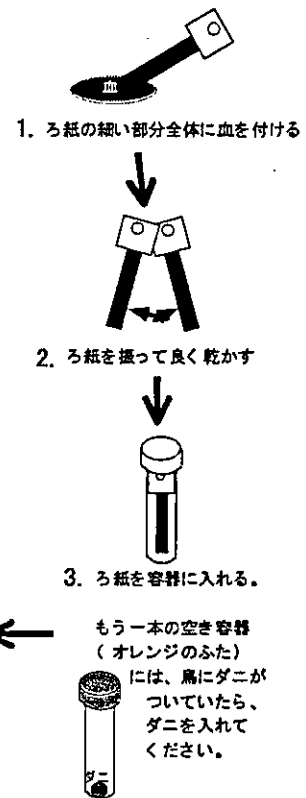


図2) 渡り鳥 (カモ) サンプルに添付する検体記録ラベル

記録ラベル (記入後、チューブに巻きつけてください)				
採取日	月	日		
採取場所	市町村		採取者	責任者 氏名
	地区			同住所
	メッシュ 番号			協力者 氏名