

図3) 実際に送付されてきたサンプルに添付されていた記録ラベルの一例  
 (責任者氏名、住所の一部、協力者氏名は伏せてある。)

|                            |        |       |                    |       |        |
|----------------------------|--------|-------|--------------------|-------|--------|
| 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                        |        | 2月12日 | カモの種類<br>(カルガモを除く) |       | ヒドリガモ  |
| 採取場所                       | 市町村    | 七尾市   | 採取者                | 責任者氏名 |        |
|                            | 地区     | 七尾湾西湾 |                    | 同住所   | 石川県七尾市 |
|                            | メッシュ番号 | 32    |                    | 協力者氏名 |        |

|                            |        |       |                    |       |        |
|----------------------------|--------|-------|--------------------|-------|--------|
| 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                        |        | 2月12日 | カモの種類<br>(カルガモを除く) |       | オナガガモ  |
| 採取場所                       | 市町村    | 七尾市   | 採取者                | 責任者氏名 |        |
|                            | 地区     | 七尾湾西湾 |                    | 同住所   | 石川県七尾市 |
|                            | メッシュ番号 | 23    |                    | 協力者氏名 |        |

|                            |        |       |                    |       |        |
|----------------------------|--------|-------|--------------------|-------|--------|
| 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                        |        | 2月13日 | カモの種類<br>(カルガモを除く) |       | マガモ    |
| 採取場所                       | 市町村    | 七尾市   | 採取者                | 責任者氏名 |        |
|                            | 地区     | 七尾湾西湾 |                    | 同住所   | 石川県七尾市 |
|                            | メッシュ番号 | 00    |                    | 協力者氏名 |        |

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------|-----------|-----|------|-----|-----|-----|
|      |         |           |     |      |     |     |     |
|      |         |           |     |      |     |     |     |
|      |         |           |     |      |     |     |     |

## 雑誌

| 発表者氏名                                                                                                    | 論文タイトル名                                                                                                                                                            | 発表誌名                 | 巻号 | ページ     | 出版年  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----|---------|------|
| Ohishi K,<br>Kishida N,<br>Ninomiya A,<br>Kida H, Takada<br>Y, Miyazaki N,<br>Boltunov AN,<br>Maruyama T | Antibodies to<br>human-related H3<br>influenza A virus in<br>Baikal seals ( <i>Phoca<br/>sibirica</i> ) and ringed<br>seals ( <i>Phoca hispida</i> )<br>in Russia. | Microbiol<br>Immunol | 48 | 905-909 | 2004 |
| Inoue S,<br>Noguchi A,<br>Tanabayashi K,<br>Yamada A                                                     | Preparation of a positive<br>control DNA for<br>molecular diagnosis of<br><i>Bacillus anthracis</i>                                                                | Jpn J Infect<br>Dis. | 57 | 29-32   | 2004 |
| 蔡 燕, 小川基<br>彦, アグス・ス<br>ティヨノ, 福士秀<br>人, 田原健司, 安<br>藤秀二, 岸本寿男                                             | 鳥由来検体からのオウ<br>ム病クラミジアの遺伝<br>子抽出法の検討                                                                                                                                | 感染症誌                 | 79 | 153-154 | 2005 |
| 山田章雄                                                                                                     | 動物由来感染症のサー<br>ベイランス                                                                                                                                                | 感染症と化<br>学療法         | 6  | 22-24   | 2003 |
| 山田章雄                                                                                                     | 狂犬病ワクチンとサー<br>ベイランス                                                                                                                                                | SA Medicine,         | 6  | 14-18   | 2004 |

# Antibodies to Human-Related H3 Influenza A Virus in Baikal Seals (*Phoca sibirica*) and Ringed Seals (*Phoca hispida*) in Russia

Kazue Ohishi\*<sup>1</sup>, Noriko Kishida<sup>2</sup>, Ai Ninomiya<sup>3</sup>, Hiroshi Kida<sup>2</sup>, Yoshitake Takada<sup>4</sup>, Nobuyuki Miyazaki<sup>4</sup>, Andrei N. Boltunov<sup>5</sup>, and Tadashi Maruyama<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Program for Marine Biology and Ecology, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC), Yokosuka, Kanagawa 237-0061, Japan, <sup>2</sup>Department of Disease Control, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060-0818, Japan, <sup>3</sup>Laboratory of Influenza Viruses, Department of Virology 3, National Institute of Infectious Diseases, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan, <sup>4</sup>The University of Tokyo, Ocean Research Institute, Nakano-ku, Tokyo 164-8639, Japan, and <sup>5</sup>All-Russian Research Institute for Nature, Moscow, Russia

Received June 21, 2004; in revised form, July 30, 2004. Accepted August 10, 2004

**Abstract:** Antibodies to influenza A virus were detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the sera from two of seven Baikal seals (*Phoca sibirica*) and from five of six ringed seals (*Phoca hispida*) in Russia. In a hemagglutination-inhibition test using H1–H15 reference influenza A viruses, ELISA-positive sera from one Baikal seal and four ringed seals reacted to A/Aichi/2/68 (H3N2) and A/Bangkok/1/79 (H3N2) strains. One ringed seal serum sample reacted to A/seal/Massachusetts/1/80 (H7N7). The present results suggested that human-related H3 viruses were prevalent in Baikal seals and ringed seals inhabiting the central Russian Arctic.

**Key words:** Influenza virus, Seal, Marine mammal

Influenza A virus infects a variety of avian and mammalian species including humans and marine mammals such as seals and cetaceans (13, 19). Waterfowl are the primary host for all influenza A virus strains that have been introduced into mammals, including humans, as pandemic strains. It has been experimentally demonstrated that pigs serve as intermediate hosts to generate human pandemic strains (11). As interspecies transmission plays a crucial role in pandemic disease in new hosts, monitoring of the viral infections in animals, including wild animals, is important not only for the control of animal diseases but also for the prevention of human pandemics. Mass mortality associated with pneumonia occurred in harbor seals (*Phoca vitulina*) on the northeast coast of the U.S.A. in 1979–1980. A/seal/Massachusetts/1/80 (H7N7) influenza virus was isolated from dead animals during that outbreak (4, 12, 18). H4N5, H4N6, and H3N3 viruses were also isolated from dead seals in subsequent epizootics of pneumonia in the same location in 1982–1983 and 1991–1992 (1,

5). All of these seal viruses were of avian origin (1, 5, 8, 18). Serological investigations of the viral infection in marine mammals in the Barents Sea, Alaska, and Arctic Canada revealed that sporadic infections occurred in the animals (2, 3, 14, 17).

On the other hand, influenza B virus was isolated from a harbor seal, although influenza B virus had been believed to be a pathogen only for humans (16).

In a recent serological study of influenza virus infection in Caspian seals (*Phoca caspica*) that inhabit only the Caspian Sea, antibodies to human-related H3N2 virus were detected in 36% of the seals examined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (15). Antibodies to influenza B virus were observed in 6% of the seals using ELISA (15). The purpose of this study is to examine the distribution of the viral infection and the viral subtypes in other seal species in Russia. Serological study was conducted in Baikal seals (*Phoca sibirica*) and ringed seals (*Phoca hispida*), which like Caspian seals belong to the genus *Phoca*.

Serum samples were collected under the Russian-Japanese Joint Research Program for Biological and

\*Address correspondence to Dr. Kazue Ohishi, Research Program for Marine Biology and Ecology, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC), 2-15 Natsushima, Yokosuka, Kanagawa 237-0061, Japan. Fax: +81-46-867-9525. E-mail: oishik@jamstec.go.jp

Abbreviations: ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HI, hemagglutination-inhibition.

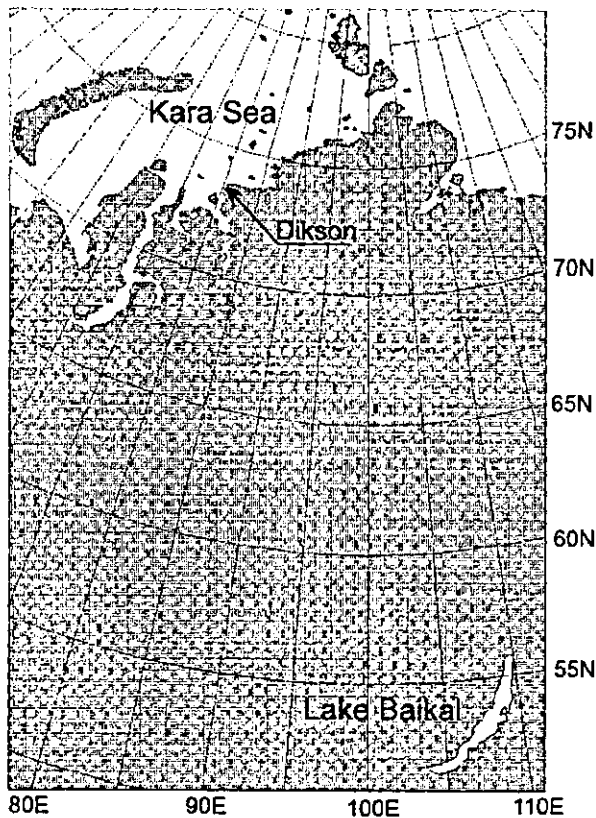


Fig. 1. Map of the sampling areas. Serum samples from Baikal seals and ringed seals were collected in Lake Baikal in 1998, and in the southern part of the Kara Sea near Dikson settlement in 2002, respectively.

Environmental Studies with special permission from the local government. Sera were collected from seven (one female, six males) Baikal seals in Lake Baikal (53° 46–52' N, 108° 23–31' E), on May 21 and 22, 1998 (Fig. 1). All the Baikal seals were judged to be less than 1 year of age based on their body length (85–103 cm). Serum samples were collected from six (three females, three males) ringed seals in the southern part of the Kara Sea near Dikson settlement from May 2 to 22, 2002 (Fig. 1). The ringed seals were estimated to be 5.5–27.5 years of age based on an analysis of dental layers following Kasuya's method (7).

The following influenza viruses were from the repository of the Department of Disease Control, Hokkaido University, Graduate School of Veterinary Medicine: A/swine/Iowa/15/30 (H1N1), A/Singapore/1/57 (H2N2), A/Aichi/2/68 (H3N2), A/Bangkok/1/79 (H3N2), A/Philippines/2/82 (H3N2), A/Memphis/1/96 (H3N2), A/swine/Hong Kong/126/82 (H3N2), A/duck/Hokkaido/8/80 (H3N8), A/duck/Czechoslovakia/56 (H4N6), A/duck/Pennsylvania/10128/84 (H5N2), A/shearwater/Australia/1/72 (H6N5), A/seal/Massachusetts/1/80

Table 1. Antibodies to influenza A virus detected using ELISA in Baikal seals and ringed seals

| Species      | Positive rate <sup>a)</sup> |      |       | Range of titer <sup>b)</sup> |
|--------------|-----------------------------|------|-------|------------------------------|
|              | Female                      | Male | Total |                              |
| Baikal seals | 0/1                         | 2/6  | 2/7   | 1,600–6,400                  |
| Ringed seals | 3/3                         | 2/3  | 5/6   | 800–12,800                   |

<sup>a)</sup> Percent positive (number positive/number tested). An absorbance value higher than 0.25 was regarded as positive according to the previous report (15).

<sup>b)</sup> Titer was determined using the twofold serial dilution method.

(H7N7), A/turkey/Ontario/6118/67 (H8N4), A/chicken/Hong Kong/G24/98 (H9N2), A/chicken/Germany/N/49 (H10N7), A/duck/England/56 (H11N6), A/duck/Alberta/60/76 (H12N5), A/gull/Maryland/704/77 (H13N6), A/mallard/Astrakhan/263/82 (H14N5), A/duck/Australia/341/83 (H15N8), and B/Lee/40. Propagation and purification of the viruses were conducted according to previously described procedures (15). For analysis of the antibodies in seal sera, ELISA and the hemagglutination-inhibition (HI) test were conducted according to methods described previously (15).

Antibodies to influenza A virus were first screened with ELISA using seal sera diluted to 1:50. Purified A/Aichi/2/68 (H3N2) viruses were used as antigens. Antibodies were detected in two of the seven serum samples from Baikal seals and in five of six serum samples from ringed seals (Table 1). Serum samples judged as positive were further titrated using the twofold serial dilution method (Table 1). Antibodies to influenza B virus in the serum samples were examined with ELISA using purified B/Lee/40 as antigens, and no antibody was observed in any serum sample examined.

To determine the subtype of the hemagglutinin (HA) protein recognized by the serum antibodies, the HI test using the reference influenza A virus strains of each of the known HA subtypes (H1–H15) was carried out. ELISA-positive serum from one Baikal seal and sera from four ringed seals inhibited hemagglutination of the H3 virus strain (A/Aichi/2/68 (H3N2)) (Table 2a). One ringed seal serum responded weakly to the H7 virus strain (A/seal/Massachusetts/1/80) (H7N7) (Table 2a). To investigate the strain specificity of the antibodies detected in the above tests, the sera were further examined using the HI test for their reactivity to naturally occurring human H3N2 antigenic variants. The serum from one Baikal seal (B-35) reacted equally to both the A/Aichi/2/68 (H3N2) and A/Bangkok/1/79 (H3N2) strains (Table 2b). Serum samples from three ringed seals (R-2, R-5, and R-6) reacted only to the A/Aichi/2/68 (H3N2) strain, while one sample from a

Table 2. Hemagglutination-inhibition (HI) test of seal serum samples with influenza A viruses

a)

| Influenza A virus strain (subtype)  | Baikal seal | Ringed seal          |
|-------------------------------------|-------------|----------------------|
| A/swine/Iowa/15/30 (H1N1)           | —           | —                    |
| A/Singapore/1/57 (H2N2)             | —           | —                    |
| A/Aichi/2/68 (H3N2)                 | 256         | 160, 320, 640, 1,280 |
| A/duck/Czechoslovakia/56 (H4N6)     | —           | —                    |
| A/duck/Pennsylvania/10128/84 (H5N2) | —           | —                    |
| A/shearwater/Australia/1/72 (H6N5)  | —           | —                    |
| A/seal/Massachusetts/1/80 (H7N7)    | —           | 80                   |
| A/turkey/Ontario/6118/67 (H8N4)     | —           | —                    |
| A/chicken/Hong Kong/G24/98 (H9N2)   | —           | —                    |
| A/chicken/Germany/N/49 (H10N7)      | —           | —                    |
| A/duck/England/56 (H11N6)           | —           | —                    |
| A/duck/Alberta/60/76 (H12N5)        | —           | —                    |
| A/gull/Maryland/704/77 (H13N6)      | —           | —                    |
| A/mallard/Astrakhan/263/82 (H14N5)  | —           | —                    |
| A/duck/Australia/341/83 (H15N8)     | —           | —                    |

b)

| Virus strain bearing H3 HA | HI titer of seal serum samples |     |     |     |       |
|----------------------------|--------------------------------|-----|-----|-----|-------|
|                            | B-35                           | R-2 | R-4 | R-5 | R-6   |
| A/Aichi/2/68 (H3N2)        | 256                            | 640 | 160 | 320 | 1,280 |
| A/Victoria/3/75 (H3N2)     | —                              | —   | —   | —   | —     |
| A/Bangkok/1/79 (H3N2)      | 256                            | —   | 80  | —   | —     |
| A/Philippines/2/82 (H3N2)  | —                              | —   | —   | —   | —     |
| A/Memphis/1/96 (H3N2)      | —                              | —   | —   | —   | —     |

c)

| H3 influenza virus           | HI titer of seal serum samples |         |     |         |         |         |
|------------------------------|--------------------------------|---------|-----|---------|---------|---------|
|                              | R-1                            | R-2     | R-3 | R-4     | R-5     | R-6     |
| A/Aichi/2/68 (H3N2)          | —/160 <sup>a)</sup>            | 640/640 | —/— | 160/160 | 320/320 | 640/640 |
| A/sw/Hong Kong/126/82 (H3N2) | —/160                          | —/320   | —/— | —/80    | —/160   | —/320   |
| A/duck/Hokkaido/8/80 (H3N8)  | —/—                            | —/—     | —/— | —/—     | —/—     | —/—     |

The HI titer is expressed as the highest serum dilution that inhibited 4 units or 2 units of hemagglutination in Baikal or ringed seals, respectively. A titer higher than 80 was regarded as positive. — indicates a titer of less than 80. b, c) B-35, Baikal seal; R-1, -2, -3, -4, -5, -6, ringed seal. c) <sup>a)</sup> Titer in the conventional HI test/titer in the HI test with rosette antigens.

ringed seal (R-4) responded to the A/Aichi/2/68 (H3N2) and A/Bangkok/1/79 (H3N2) strains (Table 2b). These data suggested that infections with A/Aichi/2/68 (H3N2)- and A/Bangkok/1/79 (H3N2)-related H3 influenza A viruses were prevalent in Baikal seals and ringed seals in the central Russian Arctic, and that sporadic infection with H7 virus occurred in ringed seals.

A/swine/Hong Kong/126/82 (H3N2) and A/duck/Hokkaido/8/80 (H3N8) share similar antigenicity with A/Aichi/2/68 (H3N2) based on the analysis with H3 HA-specific monoclonal antibodies (10, 20). However, there are discrepancies between the antigenicity results in the HI test and ELISA with soluble antigens to these viruses (10). To examine the reactivity of the seal sera to the two viruses, the conventional HI test and the test

with rosette antigens were conducted using all ringed seal samples. The sera did not inhibit the hemagglutination of the two viruses in the conventional HI test. However, four samples (R-2, -4, -5 and -6) inhibited the hemagglutination of A/swine/Hong Kong/126/82 (H3N2) rosette antigens at a lower titer than they inhibited that of A/Aichi/2/68 (H3N2) (Table 2c). One sample (R-1) which had been negative in conventional test using A/Aichi/2/68 (H3N2), showed positive in HI test with A/Aichi/2/68 (H3N2) and A/swine/Hong Kong/126/82 (H3N2) rosette antigens. These results showed that the seal sera specifically reacted to H3 virus related to A/Aichi/2/68 (H3N2).

In a previous report, we suggested that A/Bangkok/1/79 (H3N2)-related virus infected Caspian seals (15). That previous finding and the present results

together indicate that human-related H3N2 virus might be widely prevalent in seal populations inhabiting Lake Baikal, the Caspian Sea and the Arctic Sea in Russia. They might also indicate that H3N2 viruses are well-adapted to seal cells. Seals are terrestrial and aquatic inhabitants. They breed, reproduce, and nurse children on the land or ice, whereas they feed in waters. Seals have a chance to contact humans. They are often caught by hunters as valuable materials for fur production and as food for farmed minks in Lake Baikal and the Arctic Ocean. Recent expansion of human economic activity in Russia to the habitat of the seals might increase the possibility of transmission of the viruses from humans to seals. Specific receptors on target organs is a major factor in the host range restriction of influenza A viruses. A previous study showed the presence of *N*-acetylneuraminic acid- $\alpha$ 2,3-galactose (NeuAc $\alpha$ 2,3Gal) in seal lung tissues, which has high affinity with avian and equine viruses, but low affinity with human influenza A viruses (6). This discrepancy may indicate that seal cells may have another influenza virus receptor.

Estimation of age in the three species of seals indicated that the viruses were prevalent in Caspian seals, ringed seals, and Baikal seals at least until 1993, 1995, and 1997, respectively. The counterpart viruses had disappeared in humans because of rapid change in the virus in humans. This indicates that the viruses may have been maintained in seals in a similar manner as in ducks and pigs (9, 10). Because previous reports demonstrated that avian viruses can infect seals (1, 5, 8, 18), seals may play a role as "mixing vessel," similar to the role played by pigs (11). After the recent outbreaks of avian influenza in many Asian countries, monitoring of the virus in wild animals has been the focus of attention. Study of influenza virus infection including viral isolation in marine mammals, is important for understanding of ecology of the virus, as well as for the control of the pandemics in humans.

## References

- 1) Callan, R.J., Early, G., Kida, H., and Hinshaw, V.S. 1995. The appearance of H3 influenza viruses in seals. *J. Gen. Virol.* 76: 199–203.
- 2) Danner, G.R., McGregor, M.W., Zarnke, R.L., and Olsen, C.W. 1998. Serologic evidence of influenza virus infection in a ringed seal (*Phoca hispida*) from Alaska. *Mar. Mammal Sci.* 14: 380–384.
- 3) De Boer, G.F., Back, W., and Osterhaus, A.D.M. 1990. An ELISA for the detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animals species. *Arch. Virol.* 115: 47–61.
- 4) Geraci, J.R., Aubin, D.J.St., Barker, I.K., Webster, R.G., Hinshaw, V.S., Bean, W.J., Ruhnke, H.L., Prescott, J.H., Early, G., Baker, A.S., Madoff, S., and Schooley, R.T. 1982. Mass mortality of harbor seals: pneumonia associated with influenza A virus. *Science* 215: 1129–1131.
- 5) Hinshaw, V.S., Bean, W.J., Webster, R.G., Rehg, J.E., Fiorelli, P., Early, G., Geraci, J.R., and Aubin, D.J.St. 1984. Are seals frequently infected with avian influenza viruses? *J. Virol.* 51: 863–865.
- 6) Ito, T., Kawaoka, Y., Nomura, A., and Otsuki, K. 1999. Receptor specificity of influenza A viruses from sea mammals correlates with lung sialyloligosaccharides in these animals. *J. Vet. Med. Sci.* 61: 955–958.
- 7) Kasuya, T. 1976. Reconsideration of life history parameters of the spotted and striped dolphins based on cemental layers. *Sci. Rep. Whal. Res. Inst.* 28: 73–106.
- 8) Kida, H., Brown, L., and Webster, R.G. 1982. Biological activity of monoclonal antibodies to operationally defined antigenic regions on the hemagglutinin molecule of A/seal/Massachusetts/1/80 (H7N7) influenza virus. *Virology* 122: 38–47.
- 9) Kida, H., Kawaoka, Y., Naeve, C.W., and Webster, R.G. 1987. Antigenic and genetic conservation of H3 influenza virus in wild ducks. *Virology* 159: 109–119.
- 10) Kida, H., Shortridge, K.F., and Webster, R.G. 1988. Origin of the hemagglutinin gene of H3N2 influenza viruses from pigs in China. *Virology* 162: 160–166.
- 11) Kida, H., Ito, T., Yasuda, J., Shimizu, Y., Itakura, C., Shortridge, K.F., Kawaoka, Y., and Webster, R.G. 1994. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *J. Gen. Virol.* 75: 2183–2188.
- 12) Lang, G., Gagnon, A., and Geraci, J.R. 1981. Isolation of an influenza A virus from seals. *Arch. Virol.* 68: 189–195.
- 13) Murphy, B.R., and Webster, R.G. 1996. Orthomyxoviruses, p. 1397–1445. *In* Fields, B.N., Knipe, D.M., and Howley, P.M. (eds), *Fields virology*, 3rd ed, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- 14) Nieleesen, O., Clavijo, A., and Boughen, J.A. 2001. Serologic evidence of influenza A infection in marine mammals of Arctic Canada. *J. Wildl. Dis.* 37: 820–825.
- 15) Ohishi, K., Ninomiya, A., Kida, H., Park, C.-H., Maruyama, T., Arai, T., Katsumata, E., Tobayama, T., Boltunov, A.N., Khursakin, L.S., and Miyazaki, N. 2002. Serological evidence of transmission of human influenza A and B viruses to Caspian seals (*Phoca caspica*). *Microbiol. Immunol.* 46: 639–644.
- 16) Osterhaus, A.D.M.E., Rimmelzwaan, G.F., Martina, B.E.E., Bestebroer, T.M., and Fouchier, R.A.M. 2000. Influenza B virus in seals. *Science* 288: 1051–1053.
- 17) Steuen, S., Have, P., Osterhaus, D.M.E., Arnemo, J.M., and Moustgaard, A. 1994. Serological investigation of virus infections in harp seals (*Phoca groenlandica*) and hooded seals (*Cystophora cristata*). *Vet. Rec.* 134: 502–503.
- 18) Webster, R.G., Hinshaw, V.S., Bean, W.J., Van Wyke, K.L., Geraci, J.R., Aubin, D.J.St., and Petrusson, G. 1981. Characterization of an influenza A virus from seals. *Virology* 113: 712–724.
- 19) Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., and Kawaoka, Y. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 56: 152–179.

Short Communication

Preparation of a Positive Control DNA for Molecular Diagnosis of *Bacillus anthracis*

Satoshi Inoue\*, Akira Noguchi, Kiyoshi Tanabayashi and Akio Yamada

Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan

(Received October 16, 2003. Accepted December 25, 2003)

**SUMMARY:** *Bacillus anthracis* is considered to be one of the most potent biological weapons because of its highly pathogenic nature and efficiency of transmission. Routinely, a presumptive diagnosis of anthrax is achieved if the bands with predicted sizes are detected after the PCR targeted to the *pag* and *cap* genes residing on pXO1 and pXO2 plasmids, respectively. A positive control DNA prepared from the standard strains of *B. anthracis* (PAI and PAII) is usually included in the PCR tests. The handling of living *B. anthracis*, however, requires physical containment. The inclusion of DNA from *B. anthracis* as a positive control in the PCR test also has a potential risk of cross contamination that may confuse the results. In order to circumvent such problems, we attempted to construct a recombinant plasmid harboring the fragments of the *pag* and *cap* genes that could be distinguished from authentic sequences by the presence the restriction-enzyme site, the *EcoRV* site for the *pag* gene and the *BamHI* site for the *cap* gene, respectively, which were newly introduced. The strategy reported here provides a safe and reproducible positive-control DNA template. It also allows the detection of possible cross contamination, indicating that this strategy would be useful and convenient for the molecular identification of not only *B. anthracis* but also other highly pathogenic microbes.

*Bacillus anthracis* is considered to be one of the most potent biological weapons because of its highly pathogenic nature and efficiency of transmission (1). After the anthrax attack by bioterrorists in the United States (U.S.) in September 2001, thousands of envelopes containing so-called "white powder" were disseminated to many places not only in the U.S. but also in Japan. Public health institutions are responsible for testing these envelopes for the presence of *B. anthracis* even though the majority of them are hoaxes, demonstrating that rapid and precise diagnostic methods to detect anthrax are urgently needed.

In Japan, the PCR method recommended by the World Health Organization (WHO) is accepted as the standard diagnostic approach for identifying *B. anthracis* (2). Routinely, a presumptive diagnosis of anthrax is achieved if the bands with predicted sizes are detected after the PCR is targeted to *pag* and *cap* genes residing on pXO1 and pXO2 plasmids, respectively (3). A positive control DNA prepared from the standard strains of *B. anthracis* (PAI and PAII) is usually included in the PCR tests. The handling of living *B. anthracis*, however, requires physical containment. The inclusion of DNA from *B. anthracis* as a positive control in the PCR test also has a potential risk of cross contamination that may confuse the results. In order to circumvent such problems, we attempted to construct a recombinant plasmid DNA harboring the fragments of the *pag* and *cap* genes that could be distinguished from authentic sequences by the presence of the restriction-enzyme site, the *EcoRV* site for the *pag* gene, and the *BamHI* site for the *cap* gene, respectively, which were newly introduced.

For introduction of each restriction-enzyme site into the

DNA fragments of the *pag* or *cap* genes, overlap extension PCR (Table 1 and Fig. 1) was applied (4). DNA extracted from *B. anthracis* (PAI strain) was used as a template DNA for the PCR reaction. In short, the first PCR was performed using the forward primer A and the reverse primer B in order to obtain the left half of the *pag* gene fragment. The primer B was designed to contain a restriction site recognized by *EcoRV*. The right half of the target was amplified with the primer C containing the same restriction-enzyme site and the primer D. The resulting amplicons were used as a template to generate the DNA fragment containing the *EcoRV* site in the

Table 1. Primers used in this study

| Primers                                           | Sequence (5'-3')                              |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <i>pag</i> gene (based on accession no. AF065404) |                                               |
| PA5                                               | tcctaactaacgaagtcg                            |
| PA8                                               | gaggtagaaggatatacgg                           |
| primer A                                          | caagtatttgacttaattgg                          |
| primer B                                          | gtacatgtagat <u>C</u> gagaatattatc            |
| primer C                                          | ttctc <u>G</u> atattctacatgtacaatcg           |
| primer D                                          | aagcgaagtacaagtgcctgg                         |
| <i>cap</i> gene (based on accession no. AF188935) |                                               |
| CAP1301                                           | tcccacttacgtaactctgag                         |
| CAP1234                                           | ctgagccattaatcgatatg                          |
| primer A'                                         | aggatgttcgaaattcccac                          |
| primer B'                                         | ggtgtttca <u>G</u> gat <u>C</u> catgatttatatg |
| primer C'                                         | atcatg <u>G</u> atc <u>C</u> tgaacaccatacag   |
| primer D'                                         | attatgtctcgtatgcgtcc                          |

Primer pairs of (PA5 and PA8) and (CAP1301 and CAP1234) were diagnostic primers recommended by the WHO. Primer sets of A, B, C and D & A', B', C' and D' were used for the overlap extension PCR of the *pag* and *cap* genes, respectively. The generated restriction enzyme sites are indicated by underline. Primers B and C have a *EcoRV* site (gatatc) and primers B' and C' have a *BamHI* site (ggatcc).

\*Corresponding author: Mailing address: Laboratory of Transmission Control, Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan. Tel: +81-3-5285-1111 ext. 2620, Fax: +81-3-5285-1179, E-mail: sinoue@nih.go.jp

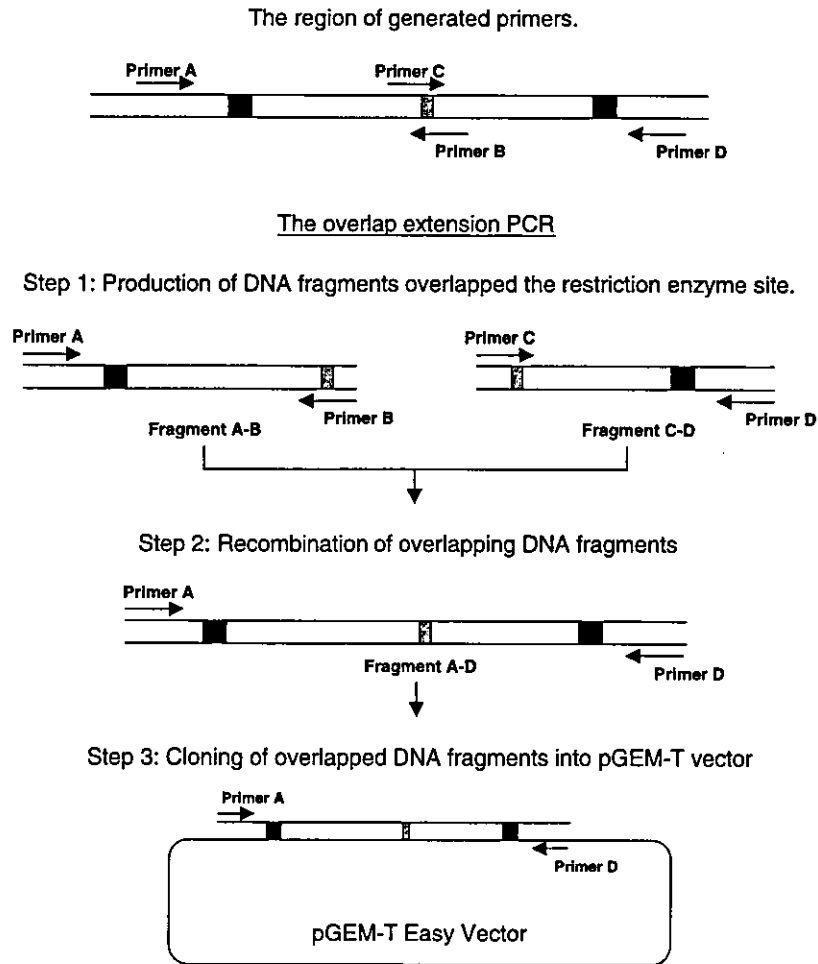


Fig. 1. Construction of recombinant plasmid DNAs harboring the mutated DNA fragments of the *pag* gene that were flanked by primer pairs recommended by the WHO. Step 1 was carried out using the primers. PCR reaction of Step 2 was started using a mixture of fragments of A-B and C-D (each 20 ng) purified by means of QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). The first 5 cycles of PCR were performed without using primers of A and D, and then next 35 cycles were performed using these primers.

middle of the sequence by PCR using the primers A and D. Introduction of the *Bam*HI site into the *cap* gene fragment was similarly conducted. These PCR fragments were purified using a QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and ligated into a cloning vector, pGEM-T (Promega, Madison, Wis., USA), by means of a TA-ligation method. The resulting recombinant plasmid DNAs designated pGEM-PAc1 for the *pag* gene and pGEM-CAPc3 for the *cap* gene, respectively, were subjected to nucleotide sequencing to ensure that each restriction site was properly introduced into them (Fig. 2). These replacements of the nucleotide did not affect the results of the PCR assays for the detection of both the *pag* and *cap* genes. A nucleotide at position 130 was changed from T to C in the insert of the *pag* gene, and three nucleotides at positions 8, 52, and 591 were changed from T, A, and A to C, G, and a deletion in the insert of *cap* gene, respectively. The nucleotide sequences were determined using a Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator kit according to the manufacturer's instructions and with a Long-Read Tower DNA sequencer (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, N.J., USA). The sequence data of the inserted DNA fragment of pGEM-PAc1 and pGEM-CAPc3 will appear in the DDBJ, EMBL, and GenBank nucleotide sequence databases under the accession numbers AB125961

and AB125962, respectively. Although it was found that a nucleotide at position 591 was deleted from the target region of pGEM-CAPc3. This deletion did not affect the recognition by the enzyme.

The pGEM-PAc1 and pGEM-CAPc3 plasmids were subjected to PCR amplification by the diagnostic primer pairs (PA5 and PA8 for the *pag* gene and CAP1301 and CAP1234 for the *cap* gene) (Table 1) recommended by the WHO, respectively. PCR reaction was performed using *Ex Taq* polymerase (TAKARA BIO Inc., Shiga) according their protocol employing an automated thermal cycler (ASTEPC808, ASTEC Inc., Fukuoka) for 35 cycles (each consisting of 15 sec at 95°C, 30 sec at 55°C, and 30 sec at 72°C) after denaturation for 5 min at 95°C. PCR mixtures contained 2.5 U of *Ex Taq* polymerase, 10 pmol of each primer, and 10 ng of template DNA in a 50  $\mu$ l total reaction volume. The PCR products obtained by the amplification of pGEM-PAc1 and pGEM-CAPc3 as the template, respectively, were incubated with either *Eco*RV or *Bam*HI. These digests yielded two distinct bands 366 bp and 237 bp for the *pag* gene, and 570 bp and 282 bp for the *cap* gene, while PCR products amplified from the DNA extracted from PAI strain of *B. anthracis* showed only the one band even after these products were digested by *Eco*RV or *Bam*HI (Fig. 3).



**A**

1' CAAGTATTTGACTTAATTGGTTTTCTTAGCTTTAATTTGTCCGAGTGTGGTTTTTCTAACACTAACGAAGTCGTTGGTAACACGTTGTAGATTG  
 \*\*\*\*\*  
 CAAGTATTTGACTTAATTGGTTTTCTTAGCTTTAATTTGTCCGAGTGTGGTTTTTCTAACACTAACGAAGTCGTTGGTAACACGTTGTAGATTG

100' GAGCCGTCGCCAGTATTACATATCTAATATTGGCATTAACTTCTGTATCAGCGGATTTAAACCCATTGTTTCAGCCCAAGTTCTTCCCGTGCTAG  
 \*\*\*\*\*  
 GAGCCGTCGCCAGTATTACATATCTAATATTGGCATTAACTTCTGTATCAGCGGATTTAAACCCATTGTTTCAGCCCAAGTTCTTCCCGTGCTAG

200' AGATAGTGAATGATCAATTGCGACCGTACTTGAATTGCAATTACTAAATCCTGCAGATACACTCCCACCAATATCAAAGAACGACGCATGCACCTTGCA  
 \*\*\*\*\*  
 AGATAGTGAATGATCAATTGCGACCGTACTTGAATTGCAATTACTAAATCCTGCAGATACACTCCCACCAATATCAAAGAACGACGCATGCACCTTGCA

300' TTTCCATGTACTTCACTAGTATGTGCTACTTGTAGAAGTATTTTACTTATTGTTCTCGTTGACTATCAGTATTCTGTGGATTGATCCTCATTTT  
 \*\*\*\*\*  
 TTTCCATGTACTTCACTAGTATGTGCTACTTGTAGAAGTATTTTACTTATTGTTCTCGTTGACTATCAGTATTCTGTGGATTGATCCTCATTTT

400' TTGAGAGAATAATTTCTCCATATCTACATGTACAATCGGATAAGCTGCCACAAGGGGGTGTCTTGCCTCTGGTGATACATTCTTATCAATCCGTCCTGT  
 \*\*\*\*\*  
 TTGAGAGAATAATTTCTCCATATCTACATGTACAATCGGATAAGCTGCCACAAGGGGGTGTCTTGCCTCTGGTGATACATTCTTATCAATCCGTCCTGT

500' AACCTTTTCGAAATCAGTACGGATCAGAAGCCGTGCTCCATTTTCAGGAGATGATTTATATTTGGTAATCCCTTCTTTTCATGAATATTAGAAATC  
 \*\*\*\*\*  
 AACCTTTTCGAAATCAGTACGGATCAGAAGCCGTGCTCCATTTTCAGGAGATGATTTATATTTGGTAATCCCTTCTTTTCATGAATATTAGAAATC

600' CATGGTGAAGAAAAGTCTTTTATTTTGGATCAACCGTATATCCTTCTACCTCTAATGAATCAGGGATCCATCATTGTACGGTCTGGAACCGTAG  
 \*\*\*\*\*  
 CATGGTGAAGAAAAGTCTTTTATTTTGGATCAACCGTATATCCTTCTACCTCTAATGAATCAGGGATCCATCATTGTACGGTCTGGAACCGTAG

700' GTCCAGCACTTGTACTTCGCTT  
 \*\*\*\*\*  
 GTCCAGCACTTGTACTTCGCTT

**B**

1' AGGATGTTCCGAAATCCCACTACGTAATCTGAGTTTTTAAATATGGCGAAACATGACGAAAAACATAATCTGTACCGTAACGATTAAACATCTCTTT  
 \*\*\*\*\*  
 AGGATGTTCCGAAATCCCACTACGTAATCTGAGTTTTTAAATATGGCGAGACATGACGAAAAACATAATCTGTACCGTAACGATTAAACATCTCTTT

100' TACGTGACGTCGCCATCATAATGTACCAACCATCGTCATCGTCAATTTTTCGTTCTCAGGATGTTTTACTGGTGTACTGCTTCTGTACGTTGTACCCAT  
 \*\*\*\*\*  
 TACGTGACGTCGCCATCATAATGTACCAACCATCGTCATCGTCAATTTTTCGTTCTCAGGATGTTTTACTGGTGTACTGCTTCTGTACGTTGTACCCAT

200' GTCCGAGCTAATAATAAAGTGGGTAAGAGGTAATACGATTGCTACATAACGAGGATTTTTTTCTTGGTTTTCTTAATAAAGATCAGTAACTTTCTT  
 \*\*\*\*\*  
 GTCCGAGCTAATAATAAAGTGGGTAAGAGGTAATACGATTGCTACATAACGAGGATTTTTTTCTTGGTTTTCTTAATAAAGATCAGTAACTTTCTT

300' GAAATGTCAATTTTCGTCATTCTACCTCACCTTAAATAAGTAATAAATATTATGATTGCAAATGTTGCACCCTTAACAAAATGTAGTTCCAATT  
 \*\*\*\*\*  
 GAAATGTCAATTTTCGTCATTCTACCTCACCTTAAATAAGTAATAAATATTATGATTGCAAATGTTGCACCCTTAACAAAATGTAGTTCCAATT

400' GTTAATGGTAACCCCTTGTCTTGAATTGATTTGCAATTAATCCTGGAACAATACTCCAATACCACGGAATCAAAAATCTCAAATGGCATAACAGGAT  
 \*\*\*\*\*  
 GTTAATGGTAACCCCTTGTCTTGAATTGATTTGCAATTAATCCTGGAACAATACTCCAATACCACGGAATCAAAAATCTCAAATGGCATAACAGGAT

500' AACAAATCAAAATAAAGTTTTAAACAAATACCTGTAATTAGCGTTGCCGCAAAATTTCTACGGCCATATAAAATCATGAATCTTGAACACCATACGT  
 \*\*\*\*\*  
 AACAAATCAAAATAAAGTTTTAAACAAATACCTGTAATTAGCGTTGCCGCAAAATTTCTACGGCCATATAAAATCATGAATCTTGAACACCATACGT

600' AACGATTACATATGTTAAAATCTGATAAATAAACCAACGATAAATACGGGCTGATTAACAAACGAGTCTAAATAACCGAGTACAACCTAACCTGCA  
 \*\*\*\*\*  
 AACGATTACATATGTTAAAATCTGATAAATAAACCAACGATAAATACGGGCTGATTAACAAACGAGTCTAAATAACCGAGTACAACCTAACCTGCA

700' GGTAATAATACCTGTTCTTCTGTAATAAAGGCTCAGTGAATCCTAATACTAATGCAATATATAAATCTGATCAAACATTCCTGTCCCTCCACTTA  
 \*\*\*\*\*  
 GGTAATAATACCTGTTCTTCTGTAATAAAGGCTCAGTGAATCCTAATACTAATGCAATATATAAATCTGATCAAACATTCCTGTCCCTCCACTTA

800' AATCAGTTTGTCTGCTTTTGGCAATTTGTTCTTCCATAATCATATCGATTAAATGGCTCAGCTGCACCATGAATATTACCCACTCCATATACAATCCGA  
 \*\*\*\*\*  
 AATCAGTTTGTCTGCTTTTGGCAATTTGTTCTTCCATAATCATATCGATTAAATGGCTCAGCTGCACCATGAATATTACCCACTCCATATACAATCCGA

900' TTTTTAAATATGGACGCATACGAGACATAAT  
 \*\*\*\*\*  
 TTTTTAAATATGGACGCATACGAGACATAAT

Fig. 2. The nucleotide sequences of the inserted region of pGEM-Pac1 (A) and pGEM-CAPc3 (B). The sequences of A-D and A'-D' fragments obtained in this study (lower) were aligned with those of the *pag* and *cap* genes (upper) assigned in GenBank as accession numbers AF065404 and AF188935, respectively. The generated restriction sites are encircled by solid lines. The sequences of primers reported by the WHO are underlined (PA5, PA8, CAP1301, and CAP1234).

Inclusion of the positive control when diagnosing anthrax by means of PCR is a sort of prerequisite to ensure that the primers and other aspects of the process are working. The preparation of the DNA from the bacteria, however, requires a Biosafety Level 3 laboratory, and handling of highly pathogenic *B. anthracis* may impose a potential risk of infection. In addition, cross contamination of the control DNA could compromise the results.

The strategy described here provides a safe and reproducible positive-control DNA template. It also allows the detection of possible cross contamination, indicating that the strategy would be useful and convenient for the molecular diagnosis of not only *B. anthracis* but also other highly pathogenic microbes.

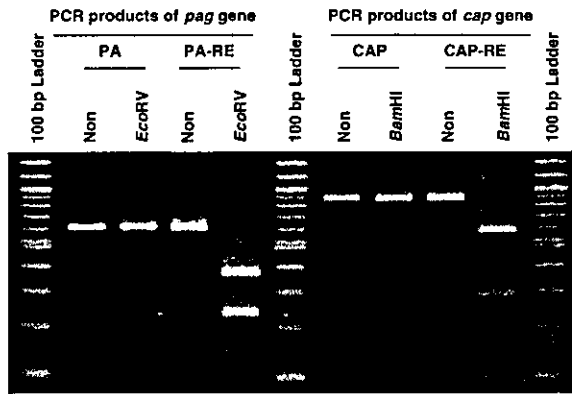


Fig. 3. The target sequences of *pag* and *cap* genes were amplified by means of the primer pairs of PA5 & PA8 and CAP1301 & CAP1234, respectively. PA and CAP indicate the PCR products amplified from the DNA-extracts of the *B. anthracis* PA1 strain, whereas PA-RE and CAP-RE indicate the PCR products amplified from pGEM-PAc1 and pGEM-CAPc3, respectively. The PCR products of the *pag* and *cap* genes were digested by the restriction enzymes, *EcoRV* and *BamHI*, respectively. The molecular marker was a 100 bp Ladder. The sample was loaded on 4% agarose gel.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by the Health Science Research Grants of the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

## REFERENCES

1. Henderson, D. A. (1998): Bioterrorism as a public health threat. *Emerg. Infect. Dis.*, 4, 488-492.
2. World Health Organization (1998): Guidelines for the surveillance and control of anthrax in human and animals. 3rd ed. World Health Organization, Geneva.
3. Fujita, O., Inoue, S., Tatsumi, M., Kamiyama, T., Akaishi, S., Ootani, T., Kawai, T., Hirochi, T., Sakamoto, Y., Tamura, K., Watanabe, H. and Yamada, A. (2002): Amplification of irrelevant sequence from *Bacillus subtilis* using a primer set designed for detection of the *pag* gene of *Bacillus anthracis*. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 55, 99-100.
4. Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. and Pease, L. R. (1989): Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 77, 61-68.

20) Yasuda, J., Shortridge, K.F., Shimizu, Y., and Kida, H. 1991. Molecular evidence for a role of domestic ducks in the introduction of avian H3 influenza viruses to pigs in

Southern China, where the A/Hong Kong/68 (H3N2) strain emerged. *J. Gen. Virol.* 72: 2007–2010.

## 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

<sup>1)</sup>国立感染症研究所ウイルス第一部, <sup>2)</sup>岐阜大学農学部獣医学科,<sup>3)</sup>鳥根県保健環境科学研究所感染症疫学科

蔡 燕<sup>1)</sup> 小川 基彦<sup>1)</sup> スティヨノ・アグス<sup>1)</sup> 福士 秀人<sup>2)</sup>  
 田原 研司<sup>3)</sup> 安藤 秀二<sup>1)</sup> 岸本 寿男<sup>1)</sup>

(平成 16 年 6 月 21 日受付)

(平成 16 年 12 月 16 日受理)

---

 Key words : *Chlamydomphila psittaci*, PCR, DNA extraction
 

---

〔感染症誌 79 : 153~154, 2005〕

## 序 文

オウム病は *Chlamydomphila psittaci* (オウム病クラミジア) を起因菌とする人獣共通感染症であり, オウムおよびインコ類をはじめとする鳥類が感染源となる<sup>1)</sup>. ヒトは, 主に, 菌を含む排泄物などを吸入して感染する. ヒトの症状は軽症の上気道炎から重症例まで多様で, 治療が遅れると死の転帰をとることもある<sup>2)</sup>.

近年, 鳥が放し飼いにされているケージに人が入る展示形態や鳥とのふれあいを魅力とする鳥展示施設が増加し, 鳥とヒトの距離が近くなり, 感染源となりうる鳥のオウム病クラミジア検査の必要性が生じてきた. また実際, 国内のトリ展示施設において, オウム病の集団発生が起こった<sup>3)</sup>. そこで, 本研究では, 鳥類からのオウム病クラミジアの検出法を確立するため, 鳥の総排泄口擦過材料 (総排泄口スワブ) および糞便からの *C. psittaci* の遺伝子検出法について検討を行った.

## 材料と方法

S 動物展示施設の協力を得て, オウムおよびインコ類のトリの総排泄口スワブ 98 検体, 同トリの

ケージ内糞便 25 検体を用いた. また, 陽性コントロールとして, オウム病のアウトブレイクのおきた施設鳥由来の陽性総排泄口スワブ 10 検体を用いた. トリ由来検体からの DNA 抽出には, Puregene (フナコシ), セバジーン (三光純薬) および QIAamp DNA Stool Mini Kit (以下 QIAamp, キアゲン) DNA 抽出キットを用いた. 総排泄口スワブは PBS に浸しよく混和し, 糞便は PBS でおよそ 20% の乳剤を作成し, 低速で遠心後, その上清を各 DNA 抽出キットに用いた. 最終的に, 50 $\mu$ l の蒸留水に浮遊させ, そのうちの 5 $\mu$ l を外膜タンパク質を標的とした PCR 法<sup>4)</sup>に用いた.

## 結 果

S 施設鳥由来総排泄口スワブ 98 検体では, Puregene では 13 検体 (13%) が陽性, セバジーンでは 2 検体 (2.0%) が陽性であった (Table 1). また, 糞便 25 検体では, Puregene では 2 検体 (8.0%) が陽性, セバジーンでは 1 検体 (4.0%) が陽性であった. また, 陽性総排泄口スワブ 10 検体では, Puregene では 10 検体全て (100%) が陽性, セバジーンでは 8 検体 (80%) が陽性, QIAamp では 5 検体 (50%) のみが陽性であった.

## 考 察

我らは初めて現在日本で汎用している 3 つの

---

 別刷請求先 : (〒189-0024) 東京都新宿区戸山 1-23-1  
 国立感染症研究所ウイルス第一部第五室  
 岸本 寿男

Table 1 Comparison of DNA extraction from birds' specimens

|                                           | PureGene DNA extraction kit |            | Sepagene      |            | QIAamp DNA Stool Mini Kit |       |
|-------------------------------------------|-----------------------------|------------|---------------|------------|---------------------------|-------|
|                                           | Cloacal swabs               | Feces      | Cloacal swabs | Feces      | Cloacal swabs             | Feces |
| Birds' specimens (unknown) <sup>a)</sup>  | 13/98 (13) <sup>c)</sup>    | 2/25 (8.0) | 2/98 (2.0)    | 1/25 (4.0) | NT                        | NT    |
| Birds' specimens (positive) <sup>b)</sup> | 10/10 (100)                 | NT         | 8/10 (80)     | NT         | 5/10 (50)                 | NT    |

<sup>a)</sup> Bird's specimens were collected in S bird park. <sup>b)</sup> Positive birds' specimens were originated from an outbreak of Psittacosis in V bird park. <sup>c)</sup> Positive specimens/Total specimens (%)

DNA 抽出キットの効率を比較した。これまで、一部のキットでヒトや動物検体での検討および報告がされているが、鳥由来検体については報告がなかった<sup>5)~7)</sup>。

今回の結果から、鳥由来検体からのオウム病クラミジアの検出には、Puregene が、他の2キットより検出率が高く有用であることが示された。一般に糞便やスワブ検体中には夾雑物が多く、実際検体中の蛋白質もまちまちである。Puregene が優れていた理由として、強力な酵素 ProteinaseK により (濃度を上げることも可能) 蛋白質消化が効率よく行え、その後の蛋白質沈殿ステップにより、夾雑物などを沈殿物として効率よく排除できることが考えられた。一方で、セバジーンでは蛋白や夾雑物が多いと蛋白除去剤による除去が十分でなく、DNA 抽出液に不純物が混入するようである。また、QIAamp では、検体量および抽出 DNA 量が 200 $\mu$ l と、Puregene がそれぞれ 50 $\mu$ l であるのと比べるとスケールが大きく、陽性排泄口スワブを用いた結果では検出効率も悪かった。

また、Puregene では、1 検体あたりの価格も比較的安くて経済的であり、操作が簡便で大量の検体の処理にも適している。今後もさらに検討を進め、本法を鳥類におけるオウム病クラミジアの検査に応用していく予定である。

謝辞：本研究にご協力いただいた鳥展示施設の関係各位に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) Panigrahy B, Grimes JE, Rideout ML, Simpson RB, Grumbles LC : Zoonotic diseases in psittacine birds : apparent increased occurrence of chlamydiosis (psittacosis), salmonellosis, and giardiasis. J Am Vet Med Assoc 1979 ; 175 : 359—61.
- 2) Erron AL : Microbiology of Chlamydia. In : Schachter J, ed. Overview of human diseases. Boca Raton, Fla : CRC Press, 1988 ; p. 153—65.
- 3) 田原研司, 板垣朝夫, 新田則之, 村下 伯, 足立行, 道越小雪, 他 : 鳥展示施設に関連したオウム病集団発生事例—鳥根県松江市. IASR 2002 ; 23 ; 247—8.
- 4) Yoshida H, Kishi Y, Shiga S, Hagiwara T : Differentiation of Chlamydia species by combined use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. Microbiol Immunol 1998 ; 42 : 411—4.
- 5) Vandenberg N, Van Oorschot RA : Extraction of human nuclear DNA from feces samples using the QIAamp DNA Stool Mini Kit. J Forensic Sci 2002 ; 47 : 993—5.
- 6) Li M, Gong J, Cottrill M, Yu H, de Lange C, Burton J, et al. : Evaluation of QIAamp DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota. J Microbiol Methods 2003 ; 54 : 13—20.
- 7) Gary AF, Steven HF : Comparison of six commercial DNA extraction kits for recovery of cytomegalovirus DNA from spiked human specimens. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 3860—3.

#### DNA Extraction of *Chlamydophila psittaci* from Cloacal Swabs and Feces of Birds

Yan CAI<sup>1)</sup>, Motohiko OGAWA<sup>1)</sup>, Agus SETYONO<sup>1)</sup>, Hideto FUKUSHI<sup>2)</sup>,  
Kenji TABARA<sup>3)</sup>, Shuji ANDO<sup>1)</sup> & Toshio KISHIMOTO<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of virology I, Laboratory of Rickettsia & Chlamydia,  
National Institute of Infectious Disease, Tokyo, Japan,

<sup>2)</sup>Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, Gifu University, Gifu, Japan,

<sup>3)</sup>Shimane Prefectural Institute of Public Health Environmental Science, Matsue, Japan

# 動物由来感染症の サーベイランス



国立感染症研究所獣医科学部長 山田 章雄 先生

## 近年、注目されるようになった 動物由来感染症

動物からヒトに病気が移ることがあることは古くから知られており、旧約聖書『申命記』に「死んだブタの肉を食べたり、その死体に触れたりすべきではない」との記載がある。これは当時の人々が旋毛虫症、炭疽、ブルセラ症あるいは日本脳炎などがブタから感染することを認識していた可能性を示していると思われる。また、メソポタミアのエシェンナ法典にも狂犬病らしき記載がある。このように、目新しいものでもない動物由来感染症が近年、注目されるようになってきた背景には様々な要因によりヒトと動物との距離が縮まったことがあると考えられる。

## サーベイランスとは

「サーベイランス」とは「ある事象に関連するデータを連続的に収集し、それを解析した後、得られた情報を必要とする人々に還元し疾病対策に反映すること」をいう。一方、「モニタリング」という言葉は「ある集団における疾病を検出すること」で、それ自体は対策を講じることを前提としているわけではないが、しばしばサーベイランスと同義的に用いられている。

サーベイランスは感染症のみならず、癌、生活習慣病などの対策においても重要な手法であり、畜産分野においても家畜の疾病制御のうえで重要な手法となっている。

## 動物由来感染症対策に重要な サーベイランス

動物由来感染症はヒトと動物の間で共通の感染症であるというだけで、他の感染症と著しい違いがあるわけではない。したがって、動物由来感染症対策も具体的には他の一般的感染症と同様であり、大規模流行を阻止するためにはサーベイランスの実施が極めて重要であるといえる。しかし、多くの動物由来感染症では、その流行要因が生態系と深く関わっており、サーベイランスを実施することが難しい場合もある。

動物由来感染症のサーベイランスを考えるうえで重要なことは「どのような動物の、どのような疾患を、どういう目的で対象とするか」であると考えられる。本稿では動物をイヌ、ネコなどのペット、すなわち「伴侶動物」、動物園などで飼育される「展示動物」、家畜すなわち「産業動物」、そして「野生動物」に大別して述べる。

## 重要な課題となる関係者による 情報の共有化

ヒトを中心に考えれば動物は環境要因の一部であるが、他の要因と大きく異なるのは動物間で感染症の流行が拡大し得ることである。すなわち、動物における発生動向を知ることがヒトへの流行を阻止するうえで非常に有効な情報となるのである。

動物由来感染症は世界に200種余り、国内には60種以上あるといわれており、そのうち公

衆衛生上問題となる多くの感染症は「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）」で報告が義務づけられており、ヒトでの発生動向は把握できていると考えられる。

また、産業動物における発生に関しては「家畜伝染病予防法」における対象疾患はやはり報告されることになっているが、産業動物における発生動向はヒトの公衆衛生関係者に即時的に伝達されるシステムにはなっていない。関係者による情報の共有化をいかに進めていくかが今後の重要な課題であるといえる。

## わが国における動物側での疾病のサーベイランス、モニタリング

### ①産業動物

現在、わが国において、ヒトへの感染拡大を阻止するために動物側でサーベイランスが行われている疾病は産業動物における日本脳炎とウシ海綿状脳症(BSE)である。日本脳炎はブタにおける抗体保有状況、BSEは周知の如くウシの全頭検査が行われている。

### ②伴侶動物・展示動物

伴侶動物、展示動物では体系的なモニタリングは行われていないが、都道府県の衛生当局などによるスポット的なモニタリングのデータが存在する場合もあり、それらを有効に活用することができると考えられる。

### ③野生動物

野生動物においては全く情報が無いのが実情である。

## サーベイランスの対象とすべき疾患

サーベイランスの主たる目的は、解析されたデータに基づいて公衆衛生上、脅威となる疾患の大規模流行を未然に防ぐことにあるといえる。したがって、公衆衛生に及ぼす影響の少ない疾患をサーベイランスの対象とすべきであると考えられる。

### ①伴侶動物

#### 1) イヌ・ネコ

イヌ、ネコのようなヒトとの共存の歴史の長い小動物では公衆衛生上の視点からサーベイランスの対象とすべき疾患は少ないと考えられる。しかし、近年の医療の目覚ましい進歩あるいは社会の高齢化に伴い、免疫機能の低い人々が増加する傾向を鑑みると、これらのペット動物から感染する日和見的な感染症のモニタリングが重要となる。そういった疾患はサーベイランスによるよりは、むしろ啓発、教育による対策のほうが費用対効果の視点からも、より有効であるように思われる。

#### 2) エキゾチックアニマル

イヌ、ネコ以外の動物、いわゆるエキゾチックアニマルがペットとして飼育されるケースが増加している。特にプレーリードッグその他の齧歯類等が多量に輸入されているが、それらの動物が野生由来である場合、様々な病原体を有する可能性があり、厳重な対策が望まれる。

ちなみに、日本に輸入される予定のプレーリードッグでペストや野兎病が発生したため、プレーリードッグの輸入は本年3月1日より禁止となった。

### ②展示動物

展示動物は基本的には野生あるいは限りなく野生に近い動物である。しかし、長期間にわたり動物園で飼育されていること、一応閉鎖空間で飼養されていることを考え合わせると、それらの動物が公衆衛生上、問題となるケースは少ないと考えられる。

しかし、不特定多数の人々がそれらの施設を訪れていることを考えれば、必要な対策を講じておくことは重要であると考えられる。実際、昨年度、2カ所の動物展示施設においてオウム病の集団感染が発生しており、そういった事例の発生を未然に防ぐには、施設の衛生管理、従業員教育、来園者に対する注意喚起などが有効な対策であると考えられる。

同時に、オウム病、Q熱、結核など特定の疾患を念頭に置いた園内サーベイランスを実施することも重要であると考えられる。

また、動物園には様々な動物が飼養されていることから、特定の疾患に対しては歩哨動物として動物由来感染症のサーベイランスを行うことが可能な場合もある。アメリカ合衆国では動物園のネットワークを利用したウエストナイルウイルスのサーベイランスを開始している。

### ③野生動物・産業動物

野生動物の感染症は産業動物に対しても脅威となり経済上の問題となるばかりか、疾患によってはヒトへの健康被害も考えられる。もし野生動物がヒトや産業動物と同様の感受性を示すのであれば、野生動物における流行の徴候をとらえることにより引き続くヒトや産業動物におけるアウトブレイクを未然に防いだり、その規模の拡大を防止したりできるものと考えられる。すなわち、野生動物における感染症のサーベイランスの目的は「新興・再興感染症の流行の兆しをとらえること」であると考えるのが妥当であると思われる。すなわち、野生動物を歩哨動物としてとらえるのである。

その際、実際にどのような疾患を対象にするべきかということについては費用対効果の面などから検討する必要がある。その検討のためには個々の動物の危険性解析(risk analysis)を行う必要があるが、そのための根拠が必要となる。

したがって、野生動物における感染症の幾つかについてはスポット的なモニタリングによる実態把握が必要となるのである。

こういったことに加えて、野生動物における衰弱も含む死亡情報収集システムを構築することも重要なことである。常に野生動物の状態を監視下に置くことで、異常な、あるいは大量の動物の疾病、死亡を検出することができ、その情報を解析することで新興・再興感染症の発生にいち早く気づくことが可能になると考えられる。

## まとめ

以上をまとめると、動物由来感染症は環境要因、すなわち生態系と非常に深く関わっており、サーベイランスを実施するにあたっては、それらの要因の存在を十分理解することが極めて重要となる。

一方で省庁間を含む関係諸機関でのデータの共有を初めとした従来の枠組みを超えた協力関係を構築することが、サーベイランスのみならず動物由来感染症対策にとって重要であると考えられる。

### [参考文献]

- 1) Hugh-Jones, ME., Hubbert, WT., Hagastad, HV. Zoonoses, Recognition, Control, and Prevention, Iowa State University Press, Ames Iowa, 1995.
- 2) Teutsch, SM, Churchill RE, Principles and Practice of Public Health Surveillance 2nd Ed. Oxford University Press, Oxford, 2000.



# 狂犬病ワクチンと サーベイランス

● Vaccination and surveillance of rabies ●

山田 章雄

## はじめに

日本における狂犬病は1957年以降発生していない。これは1950年に施行された狂犬病予防法によるところが大きい。すなわち畜犬の登録、並びにワクチン接種を義務付けることと野犬の掃討を徹底することにより国内から狂犬病を駆逐することができた<sup>2)</sup>。しかし、日本を取り巻くアジア諸国では依然として狂犬病は蔓延していること、海外から極めて大量の動物が輸入される現状を鑑みれば、再び日本に狂犬病が侵入する可能性を否定することはできない。流行阻止のための対策が極めて重要である。

## 狂犬病ウイルス

狂犬病はラブドウイルス科リッサウイルス属の狂犬病ウイルスによる致死的神経疾患である。リッサウイルスは1型から7型の血清型に分けられ、古典的狂犬病は1型である。リ

ッサウイルスは1本鎖ネガティブセンスのRNAをゲノムとする砲弾型の特徴ある形態をしたウイルスで、G蛋白と呼ばれる糖蛋白のスパイクを有するエンベロープを持つ(図1)。G蛋白上には中和抗体が認識する抗原決定基が存在する。ウイルス粒子にはG蛋白以外にN蛋白、M蛋白、P蛋白およびL蛋白が構造蛋白として存在している。

## 狂犬病の疫学

狂犬病は世界各地で流行しており、現在狂犬病の発生がないとされている国は日本、英国、オーストラリアなどごく少数である。図2は2000年における世界での狂犬病の発生をまとめたWHOの報告である。年間40,000～60,000人が狂犬病で死亡していると推定されている。また年間一千万人が暴露後発病予防(Post exposure prophylaxis; PEP, 後述)を受けているとされる。狂犬病ウイルスはほとんど全ての温血動物

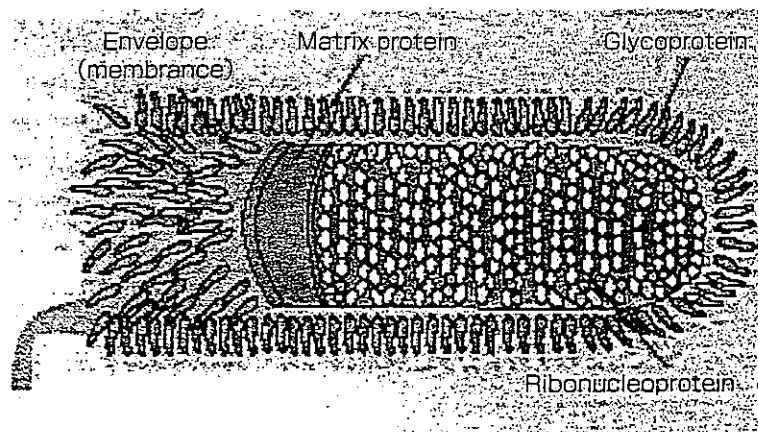


図1 狂犬病ウイルスの模式図

(Rupprecht, C. E., et al. The Lancet Infectious Diseases 2, 327, 2002 より引用)

\* 国立感染症研究所獣医学部 (東京都新宿区戸山1-23-1 〒162-8640)

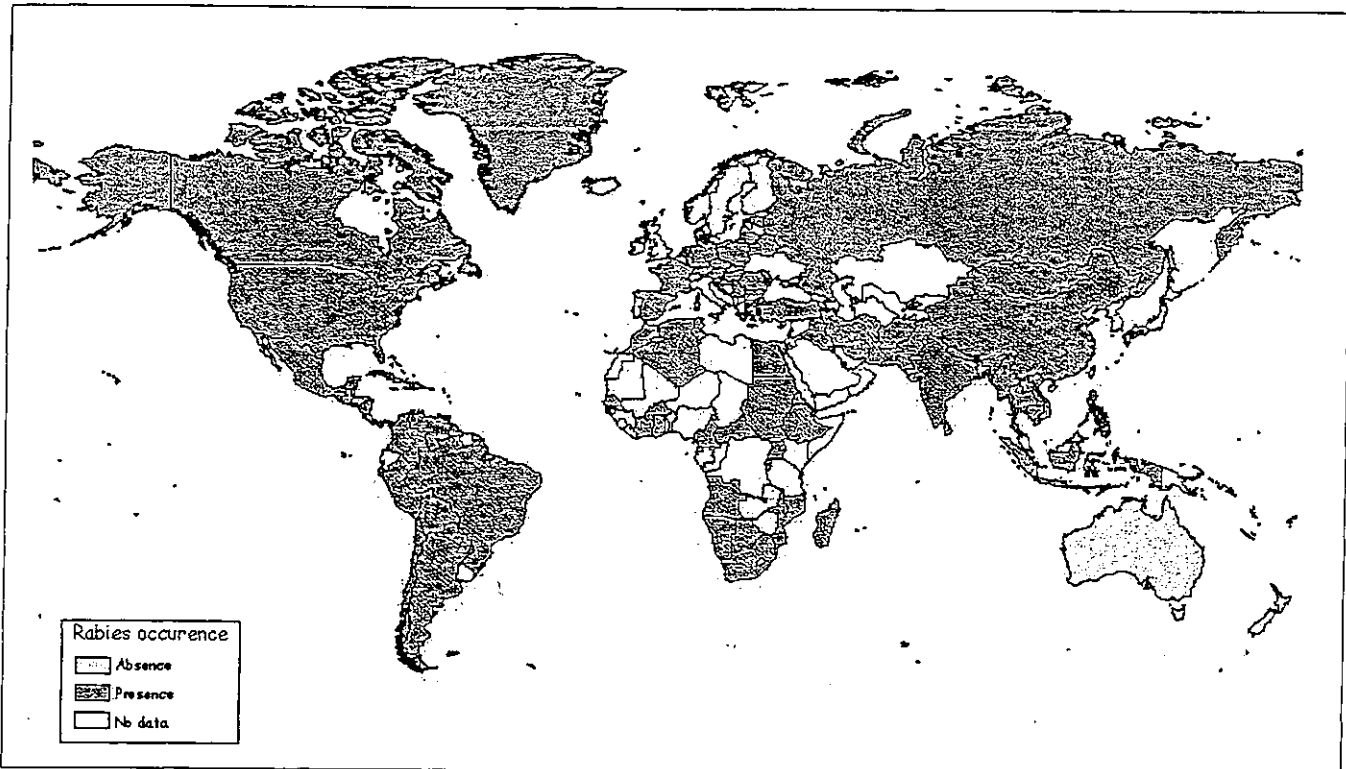


図2 世界の狂犬病 (World Health Organization より)

に感染するとされているが、その自然界での存続に必要な宿主いわゆるリザーバーは限られており、流行地域によって異なる。タイをはじめとする東南アジア諸国では犬が重要なリザーバーであるが、北米ではスカンク、キツネ、コヨーテ、アライグマやコウモリ、ヨーロッパではキツネやコウモリが重要なリザーバーである<sup>4)</sup>。

## 狂犬病の臨床

潜伏期は通常20～60日とされるが、6カ月以上の潜伏期を示したケースが1～3%といわれている。また劇症の場合は5～6日で発症することもある。発熱、不安、倦怠感などを予兆とし2～10日経つと明らかな神経症状を呈するようになる。神経症状は狂躁型と麻痺型に大別される。前者では興奮、混乱、恐水症、空気恐怖症、過呼吸、過流涎、持続勃起、痙攣などが認められ、後者では麻痺を主徴とするため特に Guillain-Barré 症候群<sup>5)</sup>との鑑別が必要である。発症後の生存期間は平均4日、最長20日とされている。犬の臨床症状も狂躁型と麻痺型に分けられるが、多く犬では短期間の興奮期の後、沈鬱と麻痺を呈する(図3)。



図3 麻痺型狂犬病に罹患したイヌ

注1) Guillain-Barré 症候群：急性突発性多発(性)神経炎。神経学的症候群でおそらく免疫介在性、しばしばある種のウイルス感染の続発症と思われる。四肢の感覚異常および筋脱力または弛緩麻痺を特徴とし、特徴的な検査所見としては細胞数の上昇をともなわない脳脊髄液の蛋白の上昇がある。

表1 ヒト用ワクチン

| ワクチンの種類  | 名称                                                                    | ワクチンのタイプ                                                                     | ワクチン原料                                                          | 摘要                                                       |
|----------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| 神経組織ワクチン | パスツール<br>フェルミ<br>センプル<br>フエンザリダ                                       | 乾燥による不活化<br>石炭酸処理ウイルス<br>石炭酸不活化<br>不活化                                       | ウサギ脊髄<br>羊, 山羊, ウサギ脳<br>羊, 山羊, ウサギ脳<br>乳のみマウス脳                  | 生ウイルスの残存<br>神経組織の混入, 生ウイルスの残存<br>神経組織の混入<br>ミエリン含量の減少    |
| 家禽胚ワクチン  | 精製アヒル胚ワクチン<br>アヒル胚ワクチン                                                | b-プロピオラクトン不活化<br>不活化                                                         | アヒル胚<br>アヒル胚                                                    | 超遠心での精製<br>ニワトリ抗原に対するアレルギー                               |
| 細胞培養由来   | ヒト二倍体細胞<br>吸着狂犬病ワクチン<br>ハムスター初代腎細胞<br>精製ニワトリ胚細胞ワクチン<br>精製 Vero 細胞ワクチン | b-プロピオラクトン不活化<br>b-プロピオラクトン不活化<br>ホルマリン不活化<br>b-プロピオラクトン不活化<br>b-プロピオラクトン不活化 | ヒト培養線維芽細胞<br>アカゲザル胎児肺細胞<br>シリアンハムスター初代腎細胞<br>ニワトリ肺細胞<br>Vero 細胞 | 高価, 世界標準<br>アレルギーの減少<br>中国, 旧ソ連で使用<br>超遠心での精製<br>超遠心での精製 |

Plotkin, S. A. Rabies Clin. Infect. Dis. 30, 4-12, 2000を改変

## ワクチン<sup>3, 5)</sup>

狂犬病にワクチンが有効であることはパスツールによるウサギ脊髄ワクチンにより証明された。これはウサギで継代し弱毒化したウイルスを接種したウサギの脊髄を乾燥させた今でいう乾燥弱毒生ワクチンである。犬の予防に有効であるだけでなくヒトにおける暴露後発症予防にも有効であることが示された(表1)。その後感染動物の神経組織由来の生ワクチンおよび不活化ワクチンが開発され、さらに、アヒル胚で作成した不活化ワクチン、次いで、不活化細胞培養ワクチンが実用化された。羊あるいは山羊の脳に由来するセンプル型ワクチンや、フエンザリダ型ワクチンと呼ばれるマウス脳由来の不活化ワクチンは、価格が安いと開発途上国ではいまだに使用されている。これらのワクチンは神経組織由来の成分が除去されていないために副反応も強い。センプル型ワクチンでは200人に1人から1,600人に1人の割合で神経系の障害が発生し、その14%が死亡している。フエンザリダ型ワクチンでは8,000~27,000人に1人の割合で神経系の副反応が生じている。有効性に関してもこれらのワクチンは他のワクチンに比べて劣っており、PEPが効果を示すためには23回も接種をしなければならないとされている。これに対し細胞培養由来のワクチンは安全性においても有効性においても優れており、PEPにも暴露前予防にも使用される。これらのワクチンでPEPが適切に行われれば100%の患者の救命ができるとされ

ているが、実際には100万件に1件ほどの失敗例がある。これは、頭部への激しい受傷の場合や、処置が適切でなかったなどの場合である。

狂犬病は発症した動物から感染するわけであるから、感染動物を減らせばヒトの感染は減らすことができるはずである。そのためには動物へのワクチン接種が必要である。ワクチン接種の対象動物は家畜から野生動物まで多岐にわたる。狂犬病常在国であっても、先進諸国の場合は犬での流行はほぼ終息しているが、その状態を保つためには犬へのワクチン接種が必要である。日本では狂犬病予防法により91日齢以上の犬にワクチン接種が義務づけられている。日本で承認されている5種類の製品について表2に示した。また、米国では猫やフェレットなどのペットへのワクチン接種も義務化されている。これらの先進諸国ではすでに述べたようにキツネやスカンクなどの野生動物で狂犬病ウイルスが維持されているので、牛や馬などの家畜の発症も多い。したがって野生動物における狂犬病流行地域では家畜へのワクチン接種が欠かせなくなっている。これらの動物には不活化ワクチン、リコンビナントワクチンが単味あるいは他の成分との混合ワクチンとして、皮下あるいは筋肉内に接種される。野生動物にはこれらのワクチンは適さない<sup>1)</sup>。欧州では20年間にわたって、キツネの狂犬病を撲滅することを目的として、ワクシニアウイルスベクターにG蛋白遺伝子を挿入したリコンビナントワクチンを餌(ベイト)に混入し、経口的に投与する試みを続けてきた。その結