

200500634A

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

動物由来感染症のサーベイランス手法の 開発に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山 田 章 雄

平成18（2006）年3月

目 次

I. 総括研究報告書

動物由来感染症のサーベイランス手法の開発に関する研究

山田章雄-----1

II. 分担研究報告書

1. Pyrosequencing法を利用した簡便かつ迅速な炭疽菌同定法の開発

井上 智-----7

2. 陽性対照鋳型RNA産生システムを利用した安全でかつ簡易な狂犬病の実験室内診断法

井上 智-----13

3. 熱帯地域由来の人獣共通感染症の診断

岩崎琢也-----29

4. 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-

喜田 宏-----33

5. 国内ラットおよび輸入齧歯目における鼠咬症原因菌の保有状況調査

今岡浩-----35

6. 各種動物におけるレプトスピラ保有状況調査-

渡辺治雄-----41

7. 国内生息ノウサギにおける野兎病の血清疫学調査の試み

棚林 清-----49

8. 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

今岡浩-----57

9. リケッチア・クラミジアに関する研究

倉根一郎-----65

10. 研究成果の刊行に関する一覧-----79

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(新興再興感染症研究事業)
総括研究報告書

動物由来感染症のサーベイランス手法の開発に関する研究

主任研究者 山田章雄 国立感染症研究所獣医科学部長

研究要旨 今年度の本研究では動物における病原体保有状況のモニタリングあるいはサーベイランスに必要な診断技術の開発と、数種の感染症については実際にモニタリングあるいはサーベイランスを継続した。具体的には昨年度作出した狂犬病の診断に不可欠な陽性対照品を更に改良し現場での利用を容易にすることを試み、PCR産物が本来よりサイズが小さくなるように加工した鋳型RNAを作出した。ニパウイルスについても同様に遺伝子診断時に不可欠な鋳型RNAを作出した。炭疽菌に関しては16s rRNAのV1, V3領域の塩基配列をパイロシーケンシングを用いた方法により迅速に同定することを可能にした。その他、動物インフルエンザウイルス感染とワクチン接種によって獲得される抗体を判別するため、ウイルス非構造蛋白であるNS1に対する抗体の測定系を確立し、両者を判別できることを示した。鼠咬症は稀な動物由来感染症ではあるが本邦における実態が必ずしも明らかではないことから、国内のラット及び輸入げっ歯類における病原体保有状況を引き続き調査した。その結果、国内の野生ラットでは高率に菌が検出されたが、実験用ラット並びに輸入げっ歯類からは検出されなかった。レプトスピラについては国内の野生動物における病原体保有状況を引き続き調査した。その結果、国内の広範囲に棲息するシカ、イノシシがレプトスピラを保有していることが明らかになった。一方、野兔病に関してはノウサギに抗体が認められたものがあったことから、今後も調査を継続する必要性が示された。ウエストナイルウイルスは未だ本邦に侵入していないと思われるが、その可能性をできるだけ速やかに検出できる方法を模索している。その大きな部分を占めるのがこれまでに構築してきた死亡カラスの調査であるが、本年度はそのシステムの改良を図った。ウエストナイルウイルスが原因で死亡した可能性を伺わせる事例は認められていない。昨年度企図した渡り鳥における抗体保有調査を開始し、カモの一検体で、中和抗体が陽性と考えられる個体があったが、日本脳炎ウイルスに対しても同様の抗体価を示したため、鳥における抗体測定法の更なる改良の必要性が明らかになった。昨年度開発したオウム病クラミジアを主に検出するPCRの有用性を確認するとともに、動物由来クラミジアを網羅的に検出するリアルタイムPCRの開発を行った。更に斃死輸入愛玩鳥のクラミジア保有率を調査したところ、18%が陽性であることが明らかになった。

分担研究者

倉根一郎 国立感染症研究所ウイルス1部部長
井上 智 国立感染症研究所獣医科学部長
喜田 宏 北海道大学獣医学部教授
渡辺治雄 国立感染症研究所細菌部部長
棚林 清 国立感染症研究所獣医科学部長
今岡浩一 国立感染症研究所獣医科学部主任研究官
岩崎琢也 長崎大学熱帯医学研究所教授

研究協力者

各分担研究報告書に記載

A. 研究目的

感染症対策は感染源、感染経路、感受性者に対して行われる。その対策を立案実行するために感染症のサーベイランスは不可欠である。動物

由来感染症では感染源である動物においてもこれらの要素が成立するために対策の面からは複雑なものになるため、動物由来感染症対策としてのサーベイランスはこれらの複雑な事情を考慮して立案する必要がある。ヒトにおける動物由来感染症の発生動向は把握されているものの動物における発生動向は体系的には調査されていないかあるいはヒトでの発生防止に利用できるようなっていない。本研究ではいかなる動物におけるいかなる動物由来感染症をサーベイランスの対象とするかを科学的に明らかにすることを第1の目的とする。また、サーベイランスを実施するために不可欠な血清診断法、病原診断法の整備状況の把握ならびに開発及びサーベイランスの手法そのものの開発を第2の目的とする。更に小規模であっても野外において実際にサーベイランスを実施し、サーベイヤ

ンスのモデルを構築することも目的とする。

B. 研究方法

狂犬病、炭疽、ニパウイルスの遺伝子検出における陽性参照品の作製は標準的な分子生物学的手法によった。炭疽菌の遺伝子配列は Pyrosequencing 社製の PSQ96 により、リアルタイムで決定した。ウエストナイルウイルスに対する抗体検出は中和試験および ELISA を用いた。他の血清学的手法については標準的方法を用いた。

C. 研究結果

(1) 昨年度作出した狂犬病ウイルス陽性対照鋳型 RNA 産生プラスミド (pGEM-T E short) の検出用標的遺伝子内には 2 種類の制限酵素サイト (XhoI、PstI) が挿入されており、PCR 増幅遺伝子の特定が可能である。しかしながら、現場で陽性対照鋳型 RNA のクロスコンタミネーションを検証するためには増幅遺伝子の精製と制限酵素処理が必要となり手間と時間がかかる。そこで今回、陽性対照鋳型 RNA によって増幅される遺伝子産物のサイズを小さくすることにより、陽性対照鋳型 RNA のクロスコンタミネーションによる偽陽性の判定を簡便なものとした。

(2) 炭疽菌の診断を確実に行うために、PCR 法に Pyrosequencing 法を併用した迅速な塩基配列決定による炭疽菌の遺伝子同定法について検討を行った。菌種の同定には、16s rRNA の V1 領域と V3 領域の塩基配列が応用できることを示した。

(3) ニパウイルスの検出には PCR を用いた方法が迅速かつ容易であり、最も多く使用されている方法であるが、検査室汚染による偽陽性が頻繁に生じていることが否定できず、狂犬病や炭疽と同様クロスコンタミネーションの検証が可能な陽性対照が必要である。今年度はニパウイルスの nucleoprotein 遺伝子の一部を欠失させた鋳型を作製し、この鋳型を用いることにより検査室汚染との区別が容易となることを示した。

(4) ウエストナイルウイルス (WNV) の国内への侵入に備えるため、これまでの死亡鳥報告システムの改良を行った。また、渡り鳥 (カモ類) の抗体保有状況を検討した。2004 年度末までに回収したサンプル中の WNV および日本脳炎ウイルス (JEV) に対する中和抗体活性を Plaque Reduction Neutralization Test

(PRNT) により測定したところ、全 29 サンプルのうち 1 サンプルで、WNV に対して希釈 25 倍で 90 %以上の抑制を示したが、JEV に対しても同様に抑制を示した。また、ELISA で検討したところ、PRNT で陽性を示したサンプルとは異なる 1 サンプルが WNV に対して希釈 100 倍で 1.239 (OD490) を示した。JEV など他のフラビウイルスに対する抗体も WNV と交差反応を示すこと、またサンプル中の非特異的な抑制物質による可能性もあることなどから、結果が本当に WNV に対する中和抗体や抗体の存在を示しているのか、それとも JEV に対する抗体の交差反応なのか、について PRNT と ELISA の結果の整合性の問題も含めて、さらに結果の検証が必要と考えられた。

(5) 昨年度に引き続き、国内野生ラット (ドブネズミおよびクマネズミ) の *S. moniliformis* 保有状況の調査を行い、さらに、実験用ラットおよびペット用に輸入された外国産齧歯目および食虫目についても調査をおこなった。その結果、実験用ラットおよびペット用輸入齧歯目および食虫目からは今回は検出されなかったが、屋内外の野生ラットでは、高率に保菌が確認された。また、*S. moniliformis* 検出のために、16S rRNA を標的とした PCR 法の開発を行っているが、今回、近縁の細菌に対しても増幅が起こるといふ不十分な点を改善し、より有効な検出方法を確立した。

(6) 大日本猟友会の協力により、北海道 2 市および 5 県 7 市からシカ腎臓 23 検体、シカ尿 2 検体、イノシシ腎臓 8 検体、イノシシ尿 2 検体を採取してレプトスピラ遺伝子 *flaB* の検出を行ったところ、シカ腎臓検体のすべてとイノシシ腎臓 7 検体から *flaB* が検出された。またそれらの塩基配列を決定したところ、すべて *L. interrogans* と同定された。茨城県ひたちなか市および千葉県銚子市で捕獲されたドブネズミそれぞれ 1 頭と 2 頭からレプトスピラが分離された。これら分離株の *flaB* 塩基配列はすべて同一で *L. interrogans* と同定された。レプトスピラの迅速検出のために、*flaB* をターゲットとしたリアルタイム定量 PCR の確立を行った。プライマーセット L*flaB*-QF2/QR2 は、病原性レプトスピラからのみ *flaB* の増幅ができ、また検出感度は反応系あたり 2~3 ゲノム相当量であった。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、尿からレプトスピラの分離および腎臓培養液、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。愛知県の動物病

院に来院したネコから採取した血清 107 検体中のレプトスピラ抗体価を MAT により測定した結果、12 検体でレプトスピラに対する抗体が検出され、そのうち 9 検体がこれまで本州では報告のない血清型 Castellonis に対するものであった。

(7) 高病原性鳥インフルエンザが発生した際には、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立するために、非構造蛋白 NS1 を抗原とした ELISA を開発している。本年はニワトリおよびミニブタを用いたウイルス感染試験を実施し、本 ELISA の有用性を評価した。その結果、ニワトリおよびミニブタの感染 14 日目以降の血清中には NS1 に対する抗体が特異的に検出され、ワクチン接種動物のそれらには検出されなかった。したがって、本法によって動物インフルエンザウイルスの感染によって誘導される抗体とワクチン抗体を識別できることがわかった。

(8) 本研究では採血用濾紙を用いて、国内生息野生ノウサギの血液検体を収集し、抗 *F. tularensis* 抗体の検出を試みた。酵素抗体法にて 31 検体中 2 検体が有意な反応を示した。これら 2 検体はウエスタンブロット法においても *F. tularensis* 抗原に強く反応した。このことから検体ノウサギが過去に *F. tularensis* に感染した可能性が示唆されたが、さらに血液採取法や検出系を改良し、検体数や検査動物種を増やして調査する必要があると考えられた。

(9) クラミジアに関しては、本年度は蔡らが開発した *C. psittaci* を主に検出する one-step PCR 法について、特異性と感度の追加検討を行い有用性を確認した。次に動物由来クラミジア種を網羅的に検出することを目的に、TaqMan probe 法を用いた multiplex real-time PCR による病原体検出法の開発を行った。特異性の検討や従来の PCR との感度の比較や臨床検体での実用化を検討し、有用性が示された。さらに *C. psittaci* のみを特異的に検出する TaqMan MGB probe を用いた real-time PCR 法の開発を行い、特異性と感度の検討を行った。他に輸入鳥のオウム病クラミジアの保有率について調査を行い、斃死輸入愛玩鳥類におけるクラミジア科の保有率は約 18%であることを明らかにした。またヒトおよび鳥類より分離された *C. psittaci* 株の MOMP の特性を解析し、鳥類に高

度に蔓延している血清型/遺伝子型 A はオウム病の原因となることが示唆された。事例として家族 4 名全員が肺炎を呈したオウム病感染例を経験し、臨床的検討を行った。コクシエラに関しては、非常に高い抗体価を呈し国内感染が示唆された急性 Q 熱症例を経験し、臨床的検討を行った。感染源は特定できなかったが、国内にも典型的な急性 Q 熱症例が存在することが確認できた。

D. 考察

動物由来感染症の病原体は 800 種を上回ることで、全ての病原体をサーベイランスの対象にすることは不可能であるばかりでなく費用対効果の点からも無意味である。動物由来感染症のサーベイランスは目的に応じて対象動物と対象疾患を選定することが重要である。動物由来感染症多くはヒトが罹患しても重症化することなくまた、ヒトからヒトへの感染拡大も稀である。しかし、中にはヒトが感染すると致命的であったり、ヒトからヒトへの感染拡大が起きるものも存在する。また、国内に存在しないために、国内への侵入が必要以上の混乱を招く可能性のある疾患もある。本研究ではこうした多様な動物由来感染症からヒトへの危害を軽減するために、如何なる疾患と動物をサーベイランスの対象とすべきかを科学的に検討することを目的としている。このために必要なモニタリング及びモニタリングに必要な試薬、検査法等の確立を試みを継続中である。また、実際のサーベイランスには関連機関の連携が不可欠であるため、いくつかの感染症をモデルとして、ネットワークの構築を試みた。猟友会の協力により、全国的なネットワークが期待できる。現在野鳥関連でのネットワークの構築および野性動物医学の専門家とのネットワーク作りを模索中である。

E. 結論

昨年度に引き続き動物由来感染症対策としてのサーベイランス体制整備をすべき疾患並びに対象動物を選定する手段を検討した。また、実際のモデルを運用するために必要なネットワーク構築を試みた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

Motoi Y., Sato K., Hatta H., Morimoto K.,

Inoue S. and Yamada A. 2005. Production of rabies neutralizing antibody in hen's eggs using a part of the G peotein expressed in Escherichia coli. Vaccine 23:3026-3032.

Motoi Y., Inoue S., Hatta H., Sato K., Morimoto K. and Yamada A. 2005. Detection of Rabies-Specific Antigens by Egg Yolk Antibody (IgY) to the Recombinant Rabies Virus Proteins Produced in Escherichia coli. JJID 58:115-118.

山田章雄:人獣共通感染症、ウイルス、54, 17-22, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

別添

本研究を遂行するにあたり、下記の大日本猟友会の方々（敬称略）ご協力いただきました。またここには掲載されていない多くの地方猟友会所属の方のご協力も戴きました。この場をお借りしてお礼申し上げます。

専務理事 小熊 實

田子一雄、吉田 浩、竹内郁端、鈴木俊平、富樫春吉、土田哲也、小熊忠嗣、岡川純一郎、笹谷彦一郎、多田征志、近藤則男、錦織和夫、藤本秀通、井上 清、近藤忠行、市川正士、小林一成、義宮克美、津森文也、田中 守、福田 新、古賀英生、江頭久人、下村照英、小林茂治、東 正憲、城 武敏、山中靖男、嶋村 勝博、原 正文、森 哲郎、是末 準、秦 重二、上園敏則、中嶋國雄、齊藤 洋、藤井清治、米良安昭、上平清美、廣原裕生、林 洋一

秋沢光成、大川文雄、森岡三男、井上俊助、池田 均、小宮山一夫、水落邦一、藤木 満、山田由夫、今 義光、前田光裕、梅津梅男、竹田三郎、長谷部信美、大内千里、吉田正章、小原正弘、佐藤 弘、雫石 寛、川越 正、工藤正昭、小松久平、真坂照和、村上芳一、斎藤弘夫、佐藤武雄、斎藤 弘、斎藤 洋、楠元清春、下斗米孝善、小平沢由男、佐々木喜代志、松田美博、筒井博太郎、林 信夫、中平清文、平内和男、山田孫太郎、福士義行、松原 一、宮脇秋麿、光同寺辰夫、吉ヶ崎光好、新田 亨、黒丸信昭、奈須満造、浅沼喜治郎、渋谷鉄治

花田 実、荒井輝光、根本知司、鈴木 茂、菅沼 清、鈴木義光、阿久津寅三郎、竹入正一、西森徳重、窪田千古、向井勝義、速水英利、正国和孝、岡田房喜、渡辺昴一、新玉卓教、松岡今朝男、吉川良長、前田 司

高橋忠一、初津昭一、勝又訓男、金沢俊二郎、相馬与士夫、伊藤政夫、森井 慧、笹柄正道、下谷巧、宮口富義、祐本征武、松元忠重、秋山弘安、安岡和博、宮地且助、三宅省三、入船安行

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
（総括・分担）研究報告書

Pyrosequencing 法を利用した簡便かつ迅速な炭疽菌同定法の開発

分担研究者：井上 智 国立感染症研究所獣医科学部第二室長
研究協力者：奥谷 晶子 国立感染症研究所獣医科学部第二室
研究協力者：野口 章 国立感染症研究所獣医科学部第二室
研究協力者：加来 義浩 国立感染症研究所獣医科学部第二室
研究協力者：藤田 治 国立感染症研究所獣医科学部第三室

研究要旨：我が国の炭疽菌診断では、偶発的事例での安全で迅速な診断系の確立が求められる。前年度、安全で簡便な偽陽性判定を可能とするために、組換え体を利用した炭疽菌を使用しないでかつクロス・コンタミネーションの検証が容易な陽性対照鋳型 DNA の産生システムを作出した。今年度は、炭疽菌の診断を確実にを行うために、PCR 法に Pyrosequencing 法を併用した迅速な塩基配列決定による炭疽菌の遺伝子同定法について検討を行った。炭疽菌の遺伝子同定には、細菌の同定に使用されている 16s rRNA 遺伝子を利用した。

A. 研究目的

国内の公衆衛生領域における炭疽の偶発的事例では、迅速で確実な実験室内診断が重要である。

急性で重篤な感染症の迅速な臨床対応には PCR 法による遺伝子診断が大変有効な病原体検出法であるが、分離した菌の同定には他の細菌学的検査の結果を待たなければならない。

今回、炭疽の疑われた事例から分離された細菌の炭疽菌診断と分離菌の菌種同定を同時に行うために、PCR 法による迅速な遺伝子診断と Pyrosequencing 法による迅速な塩基配列決定を利用した分離菌の遺伝子同定を併用した検査系を検討した。

B. 研究方法

菌種の同定には、16s rRNA の V1 領域と V3

領域を使用した（表 1、図 1）。

Pyrosequencing 法による遺伝子同定は、8 菌種、25 菌株について行った（表 2）。

菌種同定に使用した標的遺伝子の Pyrosequencing 反応における条件は図 2 に示した。

C. 研究結果

Pyrosequencing 法によって得られた 16s rRNA の V1 領域と V3 領域の菌種間における塩基配列の違いを表 3 と表 4 に示した。

Pyrosequencing で確認された塩基配列は、Dye Terminator 法による塩基配列決定と既存のデータベース上に登録されている塩基

配列の成績と一致していた。

分離菌株の遺伝子増幅 (PCR) から菌種の特
定 (Pyrosequencing) までは約 5 時間であつ
た。

D. 考察

PCR 法と 16s rRNA の V1 領域と V3 領域を
標的とした Pyrosequencing 法により、炭疽
の疑われた事例から分離された細菌の迅速
な炭疽菌診断と分離菌の菌種同定が可能に
なった。

Pyrosequencing 法の併用により分離菌株
の遺伝子増幅から菌種の特特定までを約 5 時間
で行え、本法が未同定の分離菌を迅速・簡便
に同定する方法としても有用であることが
示された。

本報告では、炭疽と同時に近年注目されて
いる生物テロに使用される可能性のある危
険度の高い菌種として野兔病、ペストの原因
菌を遺伝子同定の対象に加えたが、現在、同
定可能な菌種を増やすための諸条件を検討
している。

E. 結論

急性で重篤な感染症の迅速な臨床対応に
は PCR 法による遺伝子診断が大変有効な病
原体検出法であるが、分離した菌の同定には
他の細菌学的検査の結果を待たなければな
らなかった。

今回、菌種の同定が可能な 16s rRNA の遺
伝子配列を標的にした Pyrosequencing を利
用して、炭疽菌の迅速な遺伝子診断に並行し
て迅速な分離細菌の菌種同定を可能にした。

本方法は、臨床等で分離された未同定菌の
迅速・簡便な遺伝子同定への応用も期待され
る。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Inoue, S. and Okutani, A. Global Health
Security Action Group (GHSAG)
Laboratory Network Anthrax Wetlab
Workshop. HPA Porton Down, Salisbury,
UK, 19th-21st April 2004.

Okutani A., Inoue, S., Noguchi, A., Kaku,
Y., and Yamada, A. Preparation of
positive-control DNA template for an
accurate genetic diagnosis of anthrax.
Bacillus anthracis, B. cereus and B.
thuringiensis International Conference
(Bacillus - ACT 2005). 25-29 September,
2005. Santa Fe, NM, USA.

奥谷 晶子、井上 智、山田 章雄。
Pyrosequencing 法を利用した簡便かつ迅
速な細菌同定法の開発。第 78 回日本細菌
学会 2005、4 月、東京

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1. 菌種同定の標的遺伝子

	PCR size for <i>B. anthracis</i> (bp)
16S rRNA V1 region	61
16S rRNA V3 region	99



表2. Bacterial strains used in this study

Bacterial strains		Reference
<i>Bacillus anthracis</i>	PA1	DVS
	PA2	DVS
	#52	DVS
	Morioka	DVS
	Shikan	DVS
	Davis	DVS
<i>Bacillus cereus</i>	NBRC15305	NBRC
<i>Bacillus subtilis</i>	80	NIID
<i>Bacillus thuringensis</i>	NBRC13866	NBRC
<i>Brucella abortus</i>	125	DVS
<i>Brucella canis</i>	QE13	DVS
<i>Brucella melitensis</i>	16M	DVS
<i>Brucella suis</i>	1330	DVS
<i>Escherichia coli</i>	DH5a	DVS
<i>Francisella philomiragia</i>	029	Ohara Hospital
<i>Francisella tularensis</i>	Schu	Ohara Hospital
	LVS	Ohara Hospital
	GIEM	Ohara Hospital
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC10211	REMEL
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC15315	DVS
<i>Pasteurella aerogenes</i>	ATCC27883	REMEL
<i>Yersinia enterocolitica</i>	177	DVS
<i>Yersinia pestis</i>	Yreka	DVS
	A1122	DVS
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	319	DVS



表3. Sequence of 16S rRNA V1 regions by Pyrosequencing

Bacteria strains		sequence
<i>B. anthracis</i>	PA1	GCGAATGGATTAA
<i>B. cereus</i>	NBRC15305	GCGAATGGATTAA
<i>B. subtilis</i>	80	GCGGACAGATGGG
<i>B. thuringensis</i>	NBRC13866	GCGAATGGATTAA
<i>Br. abortus</i>	125	GCGCCCGCAAGGGAGC
<i>Br. canis</i>	QE13	GCGCCCGCAAGGGAGC
<i>Br. melitensis</i>	16M	GCGCCCGCAAGGGAGC
<i>Br. suis</i>	1330	GCGCCCGCAAGGGAGC
<i>E. coli</i>	DH5a	ACGGTAACAGGA
<i>F. philomiragia</i>	029	ACGGTAACAGGT
<i>F. tularensis</i>	Schu	ACGGTAACAGGT
<i>H. influenzae</i>	ATCC10211	ACGGTAGCAGGT
<i>P. aerogenes</i>	ATCC27883	ACGGTAACAGGG
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC15315	ACGAACGGAGGAAG
<i>Y. enterocolitica</i>	177	GCGGCAGCGGG
<i>Y. pestis</i>	Yreka	GCGGCAGCGGG
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	319	GCGGCAGCGGG

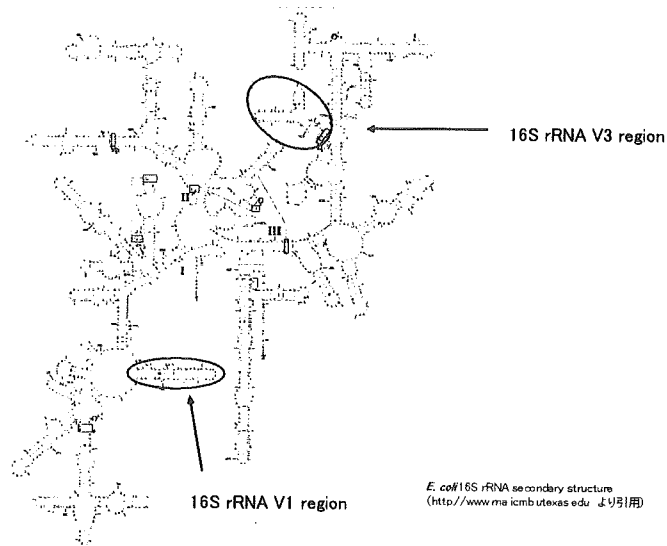


表4. Sequence of 16S rRNA V3 regions by Pyrosequencing

Bacterial strains		sequence
<i>B. anthracis</i>	PA1	AGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAG
<i>B. cereus</i>	NBRC15305	AGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAG
<i>B. subtilis</i>	80	AGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAG
<i>B. thuringensis</i>	NBRC13866	AGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAG
<i>Br. abortus</i>	125	AGCCCTTGACATCCCGGTCGCGGTTAGT
<i>Br. canis</i>	QE13	AGCCCTTGACATCCCGGTCGCGGTTAGT
<i>Br. melitensis</i>	16M	AGCCCTTGACATCCCGGTCGCGGTTAGT
<i>Br. suis</i>	1330	AGCCCTTGACATCCCGGTCGCGGTTAGT
<i>E. coli</i>	DH5a	TGGTCTTGACATCCACAGAA
<i>F. philomiragia</i>	029	TGGTCTTGACATCCTGCGAAC
<i>F. tularensis</i>	Schu	TGGTCTTGACATCCTGCGAAC
<i>H. influenzae</i>	ATCC10211	TACTCTTGACATCCTAAGAA
<i>P. aerogenes</i>	ATCC27883	TACTCTTGACATCCAGAGAA
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC15315	AGGTCTTGACATCCTTTGACCAC
<i>Y. enterocolitica</i>	177	TACTCTTGACATCCACGGAA
<i>Y. pestis</i>	Yreka	TACTCTTGACATCCACAGAA
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	319	TACTCTTGACATCCACAGAA



図1.



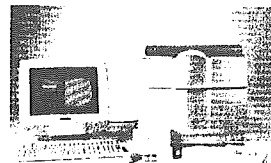
Primers of 16S rRNA genes include these regions.

Primers of house keeping genes were designed from the sequence of *B. anthracis* Ames strain.



図2. Procedure for PCR and pyrosequencing analysis

- ① Extract and purify chromosomal DNA from pure cultured bacteria
(純培養した細菌DNAの抽出・精製)
- ② Perform PCR program (total: ~2 hours) (TaKaRa Z-taqを使用)
—全プライマー共通PCRプログラム—
98° C 1min
98° C 10 sec } 35 cycles
36° C 10 sec }
72° C 15 sec }
72° C 1 min
- ③ Apply for pyrosequencing analysis (total: ~1.5 hours)
(平均およそ30bpの標的遺伝子の塩基配列解読)



厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
（総括（分担））研究報告書

陽性対照鋳型 RNA 産生システムを利用した安全で簡易な狂犬病の実験室内診断法

分担研究者：井上 智 国立感染症研究所 獣医科学部 室長
協力研究者：野口 章 国立感染症研究所 獣医科学部 研究員
近平雅嗣 兵庫県立健康環境科学研究所 センター 主幹
高橋朱実 岩手県環境保健研究センター 研究員
堀元栄詞 富山県衛生研究所 ウイルス部 研究員
頓名昌宏 兵庫県動物愛護センター 動物管理事務所 技術吏員
加来義浩 国立感染症研究所 獣医科学部 研究員
奥谷晶子 国立感染症研究所 獣医科学部 研究員

研究要旨：日本の狂犬病対策では、海外で感染して帰国したヒトとともに海外から侵入した疑い動物に対する対策が大変重要である。特に海外から国内に持ち込まれるすべての哺乳類を把握することは現時点では極めて困難であり、世界における狂犬病の発生状況を考えると、狂犬病が日本に侵入するリスクは決してなくなることはない。したがって、国内で狂犬病が疑われた、もしくは発生した場合に備えた検査系の確立が重要となる。昨年度、安全で簡易な狂犬病の実験室内診断システムを確立する目的で再生産可能な陽性対照鋳型 RNA 産生システムを作出した。今年度は、作出した陽性対照鋳型 RNA 産生システムに改良を加えて、実験室内遺伝子診断の重要課題である陽性対照遺伝子のクロスコンタミネーションによる偽陽性の検証を容易にする PCR 反応系を確立した。

A. 研究目的

狂犬病の発生が見られないが、海外からの侵入リスクが危惧される我が国の狂犬病対策では、偶発的な疑い事例に対する安全で簡便な狂犬病の否定試験や、海外から狂犬病が侵入するリスクの高い地域におけるリスク動物に対する狂犬病のモニタリング・サーベイランスが重要な課題である。しかしながら、国内に発生が見られない狂犬病の実験室内検査では、（１）偶発的事例の頻回検査に対する信頼性（経験不足）、（２）検査に必要となる陽性対照を狂犬病ウイルスとして容易に使用できない、（３）致死率 100% の狂犬病ウイルス（バイオセーフティーレベル 3）の取り扱いなどが大きな課題として指摘されている。

本研究の目的は、狂犬病ウイルスを使用しないで遺伝子検出を安全かつ簡便に行える

系を組換え技術を利用して確立することである。

B. 研究方法

狂犬病の発生が疑われた場合の迅速な検査法として遺伝子診断法の普及が期待されるが、狂犬病清浄国である国内で検査に使用する陽性対照をウイルスとして保持することは容易でない。また、偶発的な疑い事例では検査系の検証システムが重要な課題となる。

今回、狂犬病の遺伝子診断用に開発した生ウイルスを使用しない安全で再生産可能な陽性対照鋳型 RNA 産生システムを利用して「検査の現場」で偽陽性事例の検証が容易となる PCR 反応系の確立を行った。同時に、作出した改変陽性対照鋳型 RNA 産生プ

ラスミド (pGEM-T E short) を利用した遺伝子診断系について、自治体の現場担当者と普及、使用方法、配布製品の管理方法等について検討を行った。

C. 研究結果

陽性対照鋳型 RNA 合成のための鋳型 DNA (プラスミド (pGEM-T E P1/304)) の改変

昨年度報告した陽性対照鋳型 RNA 産生プラスミド (pGEM-T E P1/304) に組み込まれている狂犬病ウイルスの遺伝子検出用標的遺伝子 (CVS-11 株の N 遺伝子全長を含む cDNA (1,506bp : 塩基配列 28-1533)) を全長 738bp (標的遺伝子の塩基配列 28-745 の 745 端に検査用プライマー 304 の塩基配列 (20bp) を付加) に改変した (図 1) 。

検出用標的遺伝子内には 2 種類の制限酵素サイト (*XhoI*、*PstI*) が挿入されており PCR 増幅遺伝子の特定が制限酵素処理によって可能である。

プライマー (10g と 304) による増幅遺伝子サイズ	
1 : 狂犬病ウイルス	1,468bp
2 : 改変した陽性対照鋳型 RNA	700bp

図 2 に改変した陽性対照鋳型 RNA 産生プラスミド (pGEM-T E short) を利用した鋳型 RNA 合成から RT-PCR 反応までの流れを示した。

陽性対照鋳型 RNA の合成

改変した陽性対照鋳型 RNA 産生プラスミド (pGEM-T E short) は、制限酵素 *NcoI* で直鎖化し RNA 鎖の合成に使用した (図 3) 。

陽性対照鋳型 RNA は Riboprobe in vitro transcription (RIT) systems (Promega、Madison、WI、USA) により SP6 RNA polymerase promoter 活性を利用して合成を行い、DNase 処理の後にフェノール・クロロホルム処理で精製を行った。

図 4 に合成された RNA の電気泳動像を示した。

検査用 PCR プライマーで増幅される標的遺伝子産物に対するサイズマーカーの作成

検査材料から増幅される遺伝子サイズ (1,468bp) を確認するためのサイズマーカーを、大腸菌の 16S rRNA の特定領域 (1,468bp) を PCR 増幅して作成した。

以下に、PCR に使用した遺伝子とプライマーについて記載する。

サイズマーカー / 1468bp (PSM:RV-1468bp)

使用したプライマー

16Sf1L	5' -GAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3'
	* 9-27
16S1476r	5' -TCACAAAGTGGTAAGCGC- 3'
	* 1476-1459

* は、大腸菌の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列位置を示す。引用論文：篠田吉史、加藤暢夫、森田直樹 16S rRNA 遺伝子による細菌の系統分類法、島津評論、Vol. 57 No. 1. 2 (200. 8) 121-13。

合成鋳型 RNA を使用した RT-PCR の成績

合成した鋳型 RNA は、狂犬病が疑われたイヌの脳組織から遺伝子検出を行う方法に準じて、非感染のイヌの脳組織と TRIZOL (Invitrogen、Carlsbad、CA、USA) とともに混和してホモジナイズ後に RNA の抽出をおこなった (方法は TRIZOL 試薬のプロトコールに従った) 。

検査における陽性検体としては培養細胞に感染させた狂犬病ウイルス (CVS-11 株) を利用した。

RT-PCR の反応条件を表 1 に示した。

RT-PCR に使用したプライマーの塩基配列
1) RT (AMV RTase (Promega)) :
JW12 プライマー (ATGTAACACC (C/T) CTACAATG)
2) PCR (EX-Taq (TaKaRa)) :
10g プライマー (CTACAATGGATGCCGAC)
304 プライマー (TTGACGAAGATCTTGCTCAT)

PCR 増幅された遺伝子は電気泳動 (1% agarose gel (TAE)) 後に EtBr 染色を行い UV イ

ルミネータで確認した（図5）。

改変した陽性対照鋳型 RNA を利用した RT-PCR 成績の判定方法

改変した陽性対照鋳型 RNA 産生プラスミド（pGEM-T E short）を利用した RT-PCR 成績の判定方法について4つの事例を示した（図6-9）。

RT-PCR は、「検体」、「陽性対照」、「陰性対照」についてそれぞれ行い、PCR によって増幅された遺伝子は「サイズマーカー（1,468bp）」とともに電気泳動（1% agarose gel (TAE)）を行い EtBr 染色後に UV イルミネータで確認した（レーン1= サイズマーカー；レーン2= 検体；レーン3= 陽性対照；レーン4= 陰性対照）。

RT-PCR 反応成績の判定方法

- ・レーン2に PCR 産物が見られず、レーン3に合成鋳型 RNA の PCR 産物（700bp）が確認された場合：検体は陰性。RT-PCR は正しく反応。（図6）
- ・レーン2にサイズマーカー（1,468bp）と異なる PCR 産物、レーン3に合成鋳型 RNA の PCR 産物（700bp）が確認された場合：検体は陰性。RT-PCR は正しく反応。（図7）
- ・レーン2にレーン3の陽性対照鋳型 RNA の PCR 産物と同じサイズの PCR 産物（700bp）が確認された場合：検体に陽性対照鋳型 RNA のクロスコンタミネーションが疑われる。RT-PCR は正しく反応。（図8）
- ・レーン3に目的サイズの PCR 産物、レーン2に目的サイズの PCR 産物を確認された場合：検体は陽性と考えられる。（図9）

cf. レーン1にはサイズマーカー（1,468bp）

陰性対照のイヌの脳乳剤を利用した陽性対照鋳型 RNA の RT-PCR 成績

改変した陽性対照鋳型 RNA 産生プラスミド（pGEM-T E short）から産生した陽性対照鋳型 RNA をイヌの脳乳剤（40検体：狂犬病ウイルス陰性）と混和して狂犬病ウイルス検出用プライマーで RT-PCR を行ったところ、いずれの検体からも陽性対照鋳型 RNA に特異的な 738bp 相当の遺伝子産物が増幅された。

D. 考察

世界における狂犬病の発生状況を考えると、狂犬病が日本に侵入するリスクは決してなくなることはない。したがって、国内で狂犬病が疑われた、もしくは発生した場合に備えた検査系の確立が重要となる。

今年度は、昨年度作出した再生産可能な陽性対照鋳型 RNA 産生システムに改良を加えて、実験室内遺伝子診断の重要課題である陽性対照遺伝子のクロスコンタミネーションによる偽陽性の検証を現場で簡便に行える RT-PCR 反応系の確立を行った。

改変した陽性対照鋳型 RNA 産生プラスミド（pGEM-T E short）の検出用標的遺伝子内には2種類の制限酵素サイト（*Xho*I、*Pst*I）が挿入されており、PCR 増幅遺伝子の特定が可能である。しかしながら、現場で陽性対照鋳型 RNA のクロスコンタミネーションを検証するためには増幅遺伝子の精製と制限酵素処理が必要となり手間と時間がかかる。

そこで今回、陽性対照鋳型 RNA によって増幅される遺伝子産物のサイズを小さくすることにより、陽性対照鋳型 RNA のクロスコンタミネーションによる偽陽性の判定を簡便なものとした。RT-PCR 反応成績の判定方法について事例を挙げて図6から図9に示した。

改変した陽性対照鋳型 RNA 産生プラスミド（pGEM-T E short）を利用した RT-PCR 反応系は狂犬病ウイルスを使用することなく遺伝子検出系の確立（テスト）が可能であり、担当者の移り変わりが頻繁な検査室や検査経験の無い検査担当者が事前に検査系を確立・検証する場合にも大変有効であると考えられた。また、リスク調査におけるモニタリングやサーベイランスへの活用も期待された。

作出した改変陽性対照鋳型 RNA 産生プラスミド（pGEM-T E short）による遺伝子

診断系の普及と使用方法、配布製品の管理方法等については、現場担当者との検討が今後も必要であると考えられた。

狂犬病の実験室内検査では、発生頻度の低い疑い事例への対応と侵入リスクへの対応が求められる（否定試験、リスク調査、安心情報）。これは、狂犬病対策では検査系の整備と同時に疑い事例等を想定した迅速で適切かつ組織的な危機管理的対応への事前準備が関係機関等で行われる必要性を示している。

狂犬病の発生はないが侵入リスクを抱える我が国では、風評被害を含めた社会的混乱の拡大を最小限に止めることのできる狂犬病対策が必要と考えられるが、偶発的な狂犬病疑い事例に対して予防的もしくは適切な早期対応を行うためにも、緊急時への対応が誰でも容易な狂犬病の検査システムの開発、確立とその維持が重要であると考えられた。

E. 結論

狂犬病の遺伝子診断用に開発した生ウイルスを使用しない安全で再生産可能な陽性対照鋳型 RNA 産生システムを利用して「検査の現場」で偽陽性事例の検証が容易となる PCR 反応系を確立した。

改変した陽性対照鋳型 RNA 産生プラスミド（pGEM-T E short）を利用した RT-PCR 反応系は狂犬病ウイルスを使用することなく遺伝子検出系の確立（テスト）が可能であり、担当者の移り変わりが頻繁な検査室や検査経験の無い検査担当者が事前に検査系を確立・検証する場合にも大変有効であると考えられた。

確立した検査系は、地域における狂犬病のリスク調査に必要となるモニタリングやサーベイランスへの活用が期待されたが、作出した遺伝子診断系の普及と使用方法、配布製品の管理方法等については、現場担

当者との情報交換に基づく課題検討が必要であると考えられた。

F. 研究発表

誌上発表

Miyachi S, Lu X, Inoue S, Iwasaki T, Koike S, Nambu A, Takada M. 2005. Related Articles, Links Abstract Organization of multisynaptic inputs from prefrontal cortex to primary motor cortex as revealed by retrograde transneuronal transport of rabies virus. *J Neurosci.* 25:2547-56.

Motoi Y., Sato K., Hatta H., Morimoto K., Inoue S. and Yamada A. 2005. Production of rabies neutralizing antibody in hen's eggs using a part of the G protein expressed in *Escherichia coli*. *Vaccine* 23:3026-3032.

Motoi Y., Inoue S., Hatta H., Sato K., Morimoto K. and Yamada A. 2005. Detection of Rabies-Specific Antigens by Egg Yolk Antibody (IgY) to the Recombinant Rabies Virus Proteins Produced in *Escherichia coli*. *JJID* 58:115-118.

Morimoto K., Shoji Y., Inoue S. 2005. Related Articles, Links Abstract Characterization of P gene-deficient rabies virus: Propagation, pathogenicity and antigenicity. *Virus Res.* 111:61-7.

井上 智。狂犬病（犬） Rabies。特集 ズーノーシス -届出の概要と診断のガイドライン-。小動物内科専門誌（*J. Small Animal Med.*）7:47-52、2005

井上 智。狂犬病ー日本とアジアをとりまく状況ー。特集 日本画直面する狂犬病の脅威。MVM（*Journal of Modern Veterinary*

Medicine)、82:6-10、2005

井上 智。特集：ヒトと動物に共通の感染症- 狂犬病。「ペットを加害者にしないために」。北海道新聞社：北海道百科 vol. 4、99-100、2005

井上 智。世界における狂犬病の発生状況および狂犬病侵入のリスク。〈特集〉動物由来感染症。病原体微生物検出情報 vol. 26、12-14、2005

井上 智。狂犬病／動物に由来する感染症- ウイルス性疾患を中心に。企画：倉田 毅。生物の科学 遺伝：59、51-58、2005

井上 智。狂犬病：狂犬病発生時の行政機関対応マニュアル／特集 動物由来ウイルス感染症（- 現状・課題・対策 -）、臨床研究と展望。日本臨床：63、2180-2186、2005

学会発表等

朴 天鎬、井上 智、近藤真理子、野口 章、小山田敏文、吉川博康、山田章雄。狂犬病ウイルス (CVS-11) を感染させた C57BL/6J マウスの発症病理。第9回日本神経ウイルス研究会 2005、6月、浜松

Park, C. H., Inoue, S., Kondo, M., Noguchi, A., Oyamada, T., Yoshikawa, H., and Yamada, A. The histopathogenesis of paralytic rabies in six-week-old C57BL/6J mice following inoculation of the CVS-11 strain into the right triceps surae muscle. The 2nd Asian Society of Veterinary Pathology Symposium & 2005 Annual Meeting of the Korean Society of Veterinary Pathology. 3-4 November, 2005. National Veterinary Research & Quarantine Service, Anyang city, Korea.

大日康史、井上 智。我が国の飼育犬に狂犬病が侵入した場合の伝播と流行拡大の数理モデルによる解析。第5回人と動物の共通感

染症研究会学術集会 2005、11月、東京

井上 智。人と動物の共通感染症。平成16年度臨床獣医師講習会。日本獣医師会 栃木県獣医師会。2005年、1月14日、栃木県

井上 智。狂犬病の現状と日本における危機管理。平成16年度適正飼養講習会。東京都福祉保健局 健康安全室 環境衛生課。2005年、2月25日、東京都

井上 智。世界の狂犬病発生の実況／／公開シンポジウム「狂犬病の防止に向けて」。日本学術会議獣医学研究連絡委員会 日本獣医師会 合同公開シンポジウム。2005年3月15日、東京都

井上 智。動物由来感染症（狂犬病）の概要について。平成17年度動物の輸入届出業務及びベクター調査担当者研修会。2005年、6月8日、東京都

井上 智。狂犬病の侵入リスク／／シンポジウム VII 「動物由来感染症」。衛生微生物技術協議会第26回研究会。2005年7月8日、福井県

井上 智。狂犬病と気になる動物由来感染症（覚えておきたい狂犬病予防のポイント）。狂犬病予防に関する市町村担当者研修会。岐阜県獣医師会。2005年7月15日、岐阜県

Inoue, S. Rabies in Asia: Zoonotic threat, problem, control and prevention. Session II: Viral Zoonoses. Pathogenesis and Etiology of Zoonoses causing Encephalitis and/or Encephalopathy. The 9th International Symposium for Zoonosis Control, 21 COE Hokkaido University, Hokkaido, 29 August, 2005.

Inoue, S. Laboratory diagnosis and