

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

なし。

G. 研究発表等

1. 学会発表

(1) 木村昌伸、鈴木道雄、今岡浩一、谷川力、神山恒夫、山田章雄。屋内外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。第141回日本獣医学会学術集会、つくば、2006年3月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

Table 1) 検討に用いた輸入齧歯目および食虫目

齧歯目

動物種	学名	分布域	個体数
アメリカモモンガ	<i>Graucomys Volans</i>	北米	10
パナナリス	<i>Callosciurus notatus</i>	マレー半島周辺	10
コロビアジリス	<i>Spermophilus columbianus</i>	北米	10
デゲー	<i>Octodon degus</i>	南米	9
ダウリアハタリス	<i>Spermophilus dauricus</i>	中国北部、モンゴル、ロシア	10
デブスナネズミ	<i>Psammomys obesus</i>	アフリカ、中東	10
エゾリス	<i>Sciurus vulgaris</i>	日本、ユーラシア	10
フサオジャービル	<i>Sekeetamys calurus</i>	アフリカ、中東	11
アレチネズミ		アフリカ、中東?	8
フトアレチネズミ	<i>Pachyuromys duprasi</i>	アフリカ	10
キンイロスパイニーマウス	<i>Acomys russatus</i>	中東	11
カイロトゲマウス(亜種:灰色)	<i>Acomys cahirinus</i>	アフリカ	8
ハウスマウス(分類不明)		アフリカ?	3
オオエジプトアレチネズミ	<i>Gerbillus pyramidium</i>	アフリカ、中東?	10
ビグミージェルボア	<i>Salpingotulus michaelis</i>	パキスタン	18
リチャードソンジリス	<i>Spermophilus richardsonii</i>	北米	10
シマリス	<i>Siberian chipmunk</i>	日本、ユーラシア	10
タイリクモモンガ	<i>Pteromys volans</i>	日本、ユーラシア	10
ゼブラマウス	<i>Lemiscomys barbarus</i>	アフリカ	11
計			189

食虫目

ミミナガハリネズミ	<i>Hemiechinus auritu</i>	アフリカ、インド、モンゴル	10
計			10

Table 2) 16S rRNA に対するプライマー

Primer name	Primer sequence	GenBank #Z35305
S (Sense)	5' - gcttaacacatgcaaacttat	39-49
S3 (Sense)	5' - gaaaggagagattgctaag	202-220
S4 (Sense)	5' - aggagagattgctaagag	205-222
S5 (Sense)	5'-cataactcggaataagatgg	965-983
AS (AntiSense)	5' - tgagatacggcccttact	334-317
AS2 (AntiSense)	5'-gcttagctcctctttgtac	1233-1215

Fig 1) S5 および AS2 プライマーの特異性



上段		下段	
21	<i>Streptococcus moniliformis</i> ATCC14647	21	<i>Streptococcus moniliformis</i> ATCC14647
1	<i>Brucella abortus</i> 1 544	22	<i>Streptococcus moniliformis</i> ATCC45567
2	<i>Brucella canis</i> QE13	23	<i>Streptococcus moniliformis</i> ATCC49940
3	<i>Brucella melitensis</i> 1 16M	24	<i>Leptotrichia</i> sp (DG5)
4	<i>Brucella suis</i> 1 1330	25	<i>Leptotrichia</i> sp (DG8)
5	<i>Yersinia pestis</i> Yreka (Vaccine)	26	<i>Leptotrichia</i> sp (DG17)
6	<i>Yersinia enterocolitica</i> Pa177	27	<i>Leptotrichia</i> sp (SR43)
7	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> 319	28	<i>Pasteurella multocida</i> ATCC12947
8	<i>Bacillus anthracis</i> PAJ	29	<i>Pasteurella multocida</i> ATCC51687
9	<i>Bacillus cereus</i>	30	<i>Pasteurella gallinarum</i> ATCC13361
10	<i>Bacillus subtilis</i>	31	<i>Pasteurella aerogenes</i> ATCC27863
11	<i>Francisella tularensis</i> LVS	32	<i>Pasteurella dagmatis</i> ATCC43325
12	<i>Coxiella burnetii</i> DH5 alpha	33	<i>Pasteurella canis</i> ATCC43326
13	<i>Escherichia coli</i> DH5 alpha	34	<i>Capnocytophaga sputigena</i> ATCC33612
14	<i>Haemophilus influenzae</i> Type B	35	<i>Capnocytophaga cynodegmi</i> ATCC49044
15	<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp pneumoniae	36	<i>Capnocytophaga canimorsus</i> ATCC35979
16	<i>Listeria monocytogenes</i>		
17	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		
18	<i>Pasteurella aerogenes</i>		
19	<i>Staphylococcus aureus</i> spp aureus		
20	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC49187		

Table 3) *S. moniliformis* の検出結果

		陽性率	
国内ラット	ドブネズミ(屋外)	88%	43/49
	ドブネズミ(屋内)	50%	1/2
	クマネズミ(屋内)	48%	11/23
実験用ラット (SPF)	Fisher	0	0/28
	Wister	0	0/25
輸入動物	齧歯目(19種)	0	0/189
	食虫目(1種)	0	0/10

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 川本久之 犬山動物病院 獣医師

研究要旨

1. 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。
2. 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。
3. 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 LflaB-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。
4. 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。
5. 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。

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となりえる野生動物(シカ、イノシシ、ネズミ)、愛玩動物(イヌ、ネコ)におけるレプトスピラ保有状況を調査した。またレプトスピラの迅速検出のため、リアルタイム定量 PCR の確立を行った。

方法

1. レプトスピラの分離, 培養およびシカおよびイノシシ腎臓, 尿からの DNA 抽出

ネズミおよびイヌの腎臓, イヌの尿から, 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°C 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。

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(表 1), DNeasy Tissue Kit (Qiagen)を用いて DNA 抽出を行った。

2. レプトスピラ *flaB* 遺伝子配列解析

分離レプトスピラより抽出した染色体 DNA および上記 1 のシカ, イノシシ検体抽出 DNA を鋳型として, 特異的プライマーを用いて *flaB* 遺伝子の増幅を行い(*flaB*-PCR; シカ, イノシシ検体については nested PCR), その塩基配列の決定を行った。また培養開始 24 時間後のイヌ腎臓培養上清 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. リアルタイム PCR

レプトスピラ遺伝子の迅速検出を行うため, *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。プライマーには LflaB-QF2(5'-CTTACGAR(A/G)GATCATGAGCAGAG-3') および LflaB-QR2 (5'-TGTTTTGTGGTCAGCGAGACA-3')を用いた。リアルタイム定量 PCR は, プライマー 900 nM, DNA 1 μ l を含む 25 μ l の反応系で, SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems)を用いて ABI PRISM 7000 sequence detection system で行った。PCR に使用したレプトスピラ菌株は表 2 の通りである。また実際の検体からのレプトスピラ遺伝子の検出として, 培養開始 24 時間後のネズ

ミの腎臓培養上清 1 ml を遠心分離にかけて沈殿を回収し, DNA 抽出を行い, 上記システムで *flaB* の検出を行った。

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 で希釈したブタ, ネコおよびイヌ血清と, 被検レプトスピラ培養液(表 2 の 13 血清型*および Bataviae, Copenhageni, Rachmati)をそれぞれ 25 μ l ずつ加え, 37°C, 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。

結果および考察

1. シカおよびイノシシ腎臓からのレプトスピラ遺伝子の検出

大日本猟友会の協力により採取したシカおよびイノシシ検体からレプトスピラ遺伝子 *flaB* の検出を行った。腎臓検体からは, およそ 30 mg の切片 2 ヶ所から切り出し, DNA 抽出, *flaB*-PCR を行い, どちらか一方からでも増幅産物が得られた場合を陽性個体と判定した。その結果, シカ腎臓 23 検体のすべて, またイノシシ 8 検体中 7 検体から *flaB* が検出された(表 1)。一方, 尿検体からは検出されなかった。増幅された *flaB* の塩基配列を決定したところ, 塩基配列は 3 種類に分類されたが, すべて *L. interrogans* であることが明らかになった。本調査により国内の広範囲のシカ, 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。このことは, これら野生動物の狩猟を行う人々およびそれらを調理する人々は, レプトスピラ感染のハイリスクグループとなることを示唆しており, これらの人々への注意喚起および感染防止策などの教育を行うことが重要である。今後はさらに多くの都道府県で検体を採取し, 遺伝子検出を行って, 全国のシカ, イノシシのレプトスピラ保有状況を明らかにしていくとともに, レプトスピラの分離も試みる。

2. ネズミのレプトスピラ保有状況

研究協力者のもとに集められた、以下の地域で捕獲されたネズミの腎臓からレプトスピラの分離を試みた。

ドブネズミ

- a) 茨城県ひたちなか市 10頭
 - b) 東京都豊島区 1頭
 - c) 千葉県銚子市 10頭
 - d) 長野県諏訪市 1頭
 - e) 東京都八王子市 1頭
 - f) 静岡県焼津市 5頭
- #### クマネズミ
- g) 東京都豊島区ビル内 6頭
 - h) 新潟県(屋外) 1頭

これらのうち、a)の1頭およびc)の2頭の腎臓からレプトスピラが分離された。分離レプトスピラ3株は、*flaB* 遺伝子部分塩基配列がすべて同一で、*L. interrogans* と同定された。前研究班からの調査により、東京都内でのドブネズミから高頻度にレプトスピラが分離されたが、その他の地域のドブネズミもレプトスピラを保有していることが明らかとなった。国内でのレプトスピラ症患者は、ネズミにより環境が汚染されやすい場所での労働、すなわち農作業や下水道内での作業、飲食業などに発生している。可能な限りのネズミの駆除あるいは侵入防止策をとることやワクチン接種が感染防止に重要である。

3. リアルタイム定量 PCR

flaB をターゲットとした SYBR green を用い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 LflaB-QF2/QR2 をもちいた PCR により、病原性レプトスピラ 7 遺伝種 23 株で *flaB* の検出ができた。一方、非病原性レプトスピラ 3 株および病原性未確定のレプトスピラ 2 株からは *flaB* は増幅されなかった。また *L. kirshneri* Moskva V ゲノムを基準として定量 PCR を行った場合、反応系あたりレプトスピラゲノム 2~3 ゲノム相当量の検

出ができることが明らかになった(図 1)。この検出感度はこれまでに報告されている他の遺伝子をターゲットとした定量 PCR と比較して同程度である。またこの系を用いてネズミの腎臓培養液中の *flaB* 検出を行ったところ、上記 2 のレプトスピラが分離された 3 検体以外に f) の 1 検体からレプトスピラ遺伝子が検出された。この検体から通常の *flaB*-PCR により増幅を行ったが、1st PCR ではスメア一状になってしまい、nested PCR を行わなければ検出することはできなかった。このことは、本リアルタイム定量 PCR 法は特異性においてもこれまでの *flaB*-PCR よりも優れていることを示している。今後は、血液などヒト臨床検体からの遺伝子検出への応用を行う。またリアルタイム定量 PCR 後の解離曲線よりもとめられる増幅産物の T_m 値により、レプトスピラ遺伝種の区別が可能かを調べたが、一般化することは困難であることも明らかになった。遺伝種の PCR による同定には、TaqMan プローブを利用することが必要となるかもしれない。

また焼津ドブネズミの腎臓培養液から増幅された *flaB* の塩基配列は、平塚や横浜で見つかっている、これまで国内では未同定の配列であった。本タイプのレプトスピラが広く存在することが明らかとなり、今後レプトスピラ症の血清診断のパネルに本菌を加え、ヒトの感染状況を明らかにしていく必要がある。

4. 東京都引き取りおよび捕獲・収容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あるいは捕獲・収容されたイヌ 68 頭の腎臓および 61 頭の尿からレプトスピラの分離を試みたが結果は陰性であった。また 58 頭の腎臓培養上清および 55 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。

5. ネコのレプトスピラ抗体調査

国内のネコのレプトスピラ保有状況については、沖縄県でネコからのレプトスピラ分離例が報告されてはいるが、その他の地域についてはほとんど報告がない。沖縄県でネコからレプトスピラが分離されていることから、他の地域でもネコがレプトスピラの保有体となる可能性はあり、イヌ同様ヒトとの距離を考えた場合にネコも重要な保有体となってくる。そこで本研究では、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。その結果 12 検体でレプトスピラに対する抗体価が 40 倍以上であり、そのうち 9 検体が血清型 Castellonis に対するものであった。この結果は、例えばイヌと血清型 Canicola のような、特定の動物とレプトスピラ血清型の特異的な保菌関係を示唆するかもしれない。しかしながら、この血清型はこれまで沖縄県以外での分離の報告はなく、また沖縄県でネコから分離されたレプトスピラの血清型は Castellonis とは異なっていた。C10 のように抗体価が 640 倍と高値の個体もあることから、ネコ血清の非特異反応をみているとは考えにくい。今後は SPF ネコ血清を用いてこの血清型に対する反応性を調べるとともに、40 倍というカットオフ値の設定の妥当性についても検討していく必要がある。また抗体が存在す

ることが、現在のネコのレプトスピラ保有を意味することにはならないが、沖縄県以外にもネコはレプトスピラに感染すること、またその後保有体となり尿中に排菌する可能性は否定できない。今後はレプトスピラの遺伝子検出あるいは分離により、ネコのレプトスピラの保有状況を明らかにしていくとともに、血清型 Castellonis の本州での分布状況を明らかにしていく。またレプトスピラ抗体保有 12 頭のうち 5 頭が慢性腎不全を呈していた。ネコの慢性腎不全へのレプトスピラ感染の関与についても今後さらに検体数を増やして検討していきたい。

著書

1. 小泉信夫, 渡辺治雄. レプトスピラ症(犬). SA Medicine 7(2): 42-46 2005.

学会発表

1. Koizumi N, Uchida M, Obe H, Hoshino M, Tanikawa T, Makino T, Watanabe H. Isolation and Characterization of *Leptospira* spp. from feral animals in the Tokyo metropolitan area, Japan. Thailand, Nov 2005.
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. 捕獲シカ, イノシシの *flaB*-PCR の結果

都道府県	市町村	動物	検体	検体数	<i>flaB</i> -PCR	
					陽性	陰性
北海道	網走市	シカ	腎臓	2	2	0
	釧路市	シカ	腎臓	2	2	0
岩手県	釜石市	シカ	腎臓	12	12	0
	釜石市	シカ	尿	2	0	2
千葉県	君津市	イノシシ	腎臓	1	1	0
	君津市	イノシシ	尿	2	0	2
三重県	熊野市	シカ	腎臓	2	2	0
	熊野市	イノシシ	腎臓	2	2	0
広島県	広島市	シカ	腎臓	1	1	0
	広島市	イノシシ	腎臓	1	1	0
	竹原市	イノシシ	腎臓	2	2	0
鹿児島県	阿久根市	シカ	腎臓	2	2	0
	阿久根市	イノシシ	腎臓	2	1	1
	薩摩川内市	シカ	腎臓	2	2	0

表 2. 使用レプトスピラ株一覧

レプトスピラ遺伝種	血清型	株名
病原性レプトスピラ		
<i>L. alexanderi</i>	Yunnan	A 10
<i>L. borgpetersenii</i>	*Castellonis	Castellon 3
	*Javanica	Veldrat Batavia 46
	*Poi	Poi
<i>L. interrogans</i>	*Australis	Akiyami C
	*Autumnalis	Akiyami A
	*Hebdomadis	Akiyami B
	*Icterohaemorrhagiae	Ictero No.1
	*Kremastos	Kremastos
	*Pyrogenes	Salinem
	*Canicola	Hond Utrecht IV
	*Pomona	Pomona
	Hardjo	Hardjoprajitno
	Bratislava	Jez Bratislava
<i>L. kirshneri</i>	Manilae	UP-MMC
	Cynopteri	3522 C
	*Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. noguchi</i>	Panama	CZ 214 K
	Lousiana	LSU 1945
<i>L. santarosai</i>	Shermani	1342 K
	Beye	1537 U
<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni
	Sarmin	Sarmin
非病原性レプトスピラ		
<i>L. biflexa</i>	Patoc	Patoc I
	Andaman	CH 11
<i>L. meyeri</i>	Semaranga	Veldrat Semarang 173
病原性未確定レプトスピラ		
<i>L. inadai</i>	Lyme	10
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	BUT 6

*MAT に使用した株(血清型)

表3. MATによりレプトスピラ抗体が検出されたネコの一覧

検体番号	性別	年齢	飼育形態	MAT結果	既往症
C10	オス	10	外にも行く	Casetllonis (640)	慢性腎不全
C23	オス	7	外にも行く	Castellonis (40)	なし
C25	メス	8	外にも行く	Pomona (40)	慢性腎不全
C57	オス	8	外にも行く	Castellonis (40)	なし
C76	オス	7	外にも行く	Castellonis (40)	なし
C86	メス	12	外にも行く	Autumnalis (40)	肝障害
C87	オス	16	外にも行く	Castellonis (40) Icterohaemorrhagiae (40)	慢性腎不全
C93	メス	6	外にも行く	Castellonis (40)	なし
C96	メス	12	外にも行く	Hebdomadis (1,280) Kremastos (1,280)	なし
C98	オス	9	外にも行く	Castellonis (80)	慢性腎不全
C108	メス	4	外にも行く	Castellonis (40)	なし
C113	オス	13	外にも行く	Castellonis (80)	慢性腎不全

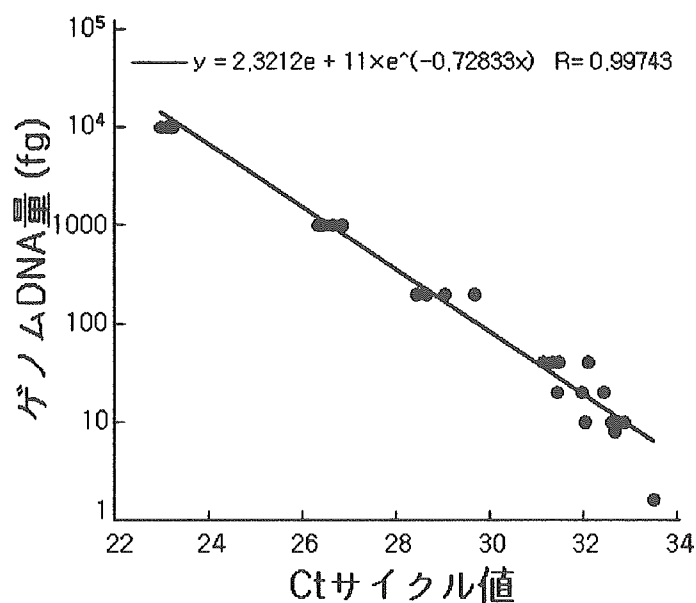


図1. リアルタイム定量PCRの検出感度

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

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

分担研究者	棚林 清	国立感染症研究所	獣医科学部	室長
協力研究者	藤田 修	国立感染症研究所	獣医科学部	研究員
	堀田明豊	国立感染症研究所	獣医科学部	研究員
	宇田晶彦	国立感染症研究所	獣医科学部	研究員

研究要旨：動物由来感染症である野兎病の起因菌、*Francisella tularensis* のヒトへの主な感染源は野生ノウサギであるが国内の野生ノウサギの感染状況は明らかでない。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。

A. 研究目的

Francisella tularensis は動物由来感染症、野兎病の起因菌である。野兎病は北半球を中心とした地域で多数発生している。日本では近年発生報告は無いが、過去には東北地方を中心に発生していた。主な感染源はノウサギやダニとされている。現在国内に生息するノウサギの *F. tularensis* 感染状況は明らかでない。感染源となる動物の血清疫学調査は野兎病の動態や *F. tularensis* の感染環の解明に重要である。

本研究では国内野生ノウサギの感染

状況を明らかにする目的で（社）大日本猟友会の協力により、狩猟または有害鳥獣駆除の目的で捕獲された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。

B. 研究方法

(1) ノウサギ検体の収集

検体は大日本猟友会の協力者より送付されたノウサギの血液を吸収させた採血用濾紙（東洋濾紙）31 片（秋田県 12 および新潟県 19 片）である。これら濾紙は 2005 年 2 月から 4 月の間に郵送された。協力者より提供された情報

により、捕獲全ノウサギは外見に著変は無かったとされている。また採血用濾紙の血液吸収後の室温放置期間は5日以内と考えられた。陽性および陰性対照として *F. tularensis* 免疫ウサギ血清、または正常ウサギ血清を2:8でウサギ保存血（バイオテスト）と混合し、吸収した採血用濾紙を用いた。

(2) 血液抽出液の回収

採血用濾紙の血液吸収部を1.5 ml チューブに入れ、800 μ l の0.1% Tween 20 加リン酸緩衝液（PBS）（PBST）に4℃一晩浸漬して、血液成分を抽出した。濾紙片を除去後、12,000 rpm にて5分遠心し、その上清を20倍希釈血液抽出液として-80℃に保存した。

(3) 濾紙法の有効性確認試験

F. tularensis 免疫ウサギ血清をウサギ保存血で5倍希釈し濾紙に吸収させ、-30℃、4℃または室温に4日保存した。吸収血液を濾紙から20倍希釈血液抽出液を調製し、*F. tularensis* 抗原に対する反応性をELISAにて比較した。

(4) 血液抽出液中のIgG量の確認

各血液抽出液中のIgG量はEasy-Titer IgG Assay Kit（Pierce）にて測定した。

(5) 酵素抗体法（ELISA）

F. tularensis LVS をユーゴンチョコレート寒天培地に3日培養後、1%フォルマリンにて不活化した。不活化菌懸濁液（OD_{600nm} = 2.5）をPBSで20倍

希釈し、ELISA用96穴マイクロプレート各穴に100 μ l ずつ分注し、37℃にて16時間、吸着させた。PBSTにて洗浄後、3%スキムミルク（雪印）含有PBSTにて1時間ブロッキングした。20倍希釈血液抽出液を最終希釈50、100および200倍にし、37℃にて1時間反応させた。洗浄後、8,000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体（Bethyl）を37℃にて1時間反応させた。30分間2,2'-アジノ-ジ（3-エチルベンゾチアゾリン-6-サルファネート）にて発色後、Plate reader（Bio-Rad）にて吸光度（OD_{405nm}）を測定した。

(6) ウエスタンブロット法

F. tularensis LVS をLaemmli サンプルバッファー（Bio-Rad）で処理し、12.5%のポリアクリルアミドゲル（ATTO）で電気泳動後、PVDFメンブランに転写し、ブロッキング後、400倍希釈した血液抽出液200 μ l と反応させた。抗体の反応はペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体（Bethyl）を反応させた後、DABによって発色した。

C. 結果

(1) ノウサギ血液抽出液の回収

31検体から20倍希釈血液抽出液（約200-700 μ l）が得られた。これらのうち無作為に抽出した6検体の含有IgG量は50、63、111、148、160および180

$\mu\text{g/ml}$ であった。

(2) 有効性確認

各血液吸収濾紙より処理した抽出液と血清の反応を比較した(図1)。血清のみと比較して回収血液抽出液ではやや高いOD値を呈したが、血液吸収後4日では濾紙の保存温度の相異による抽出液の *F. tularensis* 抗原に対する反応性への大きな影響は認められなかった。

(3) 酵素抗体法 (ELISA)

最終希釈50倍の血液抽出液のLVSに対する反応を確認したところ、2検体(No. 12および19)が陰性対照のOD値(0.121)の2倍以上のOD値を示した(図2)。これより、これら2検体を陽性と判断した。検体No. 12は100および200倍希釈においても陽性と判断された。他の検体が示したOD値は全て陰性対照のOD値の2倍未満であった。

(3) ウエスタンブロッティング

ELISAにて陽性であった2検体はウエスタンブロッティングにおいてLVS全菌体抗原に強く反応した。検体No. 12はプロテナーゼK処理LVS抗原にも反応した。No. 19は、No. 12と異なるバンドパターンでプロテナーゼ処理抗原とは反応しなかった。他の検体の反応は弱く、プロテナーゼK処理LVS抗原には反応しなかった(図3)。

D. 考察

山間部に生息する野生動物の検体収集は非常に困難である。本研究ではノウサギ捕獲経験のある協力者が簡便に血液を採取し輸送できる事から、採血用濾紙を用いた。本法により血清を得ることはできないが、短期間にノウサギ31羽分の血液検体を得られた。

ELISA法にて全31検体中2検体の陽性と判定されるものがあった(図2)。他検体は強く反応しなかったが、含有IgG量が著しく少ない検体が存在する可能性があるため、全検体について特異抗体の有無の判定はできず、抗*F. tularensis*抗体陽性率は示すことはできなかった。これらELISA陽性の2検体はウエスタンブロッティングにおいても強く反応したが、その反応像は異なった(図3)。1検体はプロテナーゼK処理*F. tularensis*抗原と反応したがリポ多糖体特有の梯子状バンドは認められなかった。ヒトの血清診断においてウエスタンブロッティング時のリポ多糖体様梯子状バンドの反応が目安となる事が報告されている。今回認められた反応像はそれと異なったが、ヒト以外の動物種における血清診断基準は設定されていない。今後ウサギを中心とした各種動物への感染実験を実施し、抗*F. tularensis*抗体の標的抗原や、抗体産生の動態を解析する必要がある。

本研究で使用した採血用濾紙はこれまで多くの血清疫学調査に使用されている。我々が行った予備実験においても、規定

の操作条件下では4日間では抽出液の反応性に大きな変化は無いと考えられた(図1)。しかし本法は血液の吸収、濾紙の乾燥、直射日光の照射などの条件により抽出液中の抗体量が変化する可能性が報告されている。一部の血液抽出液の含有IgG量は予想されたIgG量と比較して少量であり、検体間でも大きく異なった。これは現場における検体の採取法または輸送法が起因する可能性があり、さらに検討が必要である。

野兎病の血清検査はこれまで主に菌凝集反応が用いられているが、感度が低い、非特異的反応が多い、などの欠点がある。また凝集像の判定が困難なため不純物を多く含む血液抽出液は検体に不適である。高感度のELISAを用いた野生アナウサギの血清抗体調査で、100倍希釈以上で反応した検体を陽性としている報告がある。本研究では50倍希釈血液抽出液をELISAに用いたが、これは得られた血液抽出液の含有IgG量が血清(通常20倍希釈の血清の含有IgG量は275~1,100 μ g/ml)と比較して少なかったためである。ウエスタンブロッティングは簡便なELISAと比較して少ない検体量で試験できたが、その反応像の解釈に不明な点が多く残った。今後、*F. tularensis* 感染ウサギの血清などを用いて、特異抗体検出方法を改良する必要がある。

血液抽出液の反応から2検体のノウサギが過去に*F. tularensis* 感染した可能性

が考えられた。今後詳細を解析するため、陽性検体が得られた地域を重点的に、非健康ノウサギ等の存在の有無等について調べる必要である。また、ノウサギの臓器や付着ダニ、生息地域の土や水などの環境サンプルを採取し、*F. tularensis* の菌分離や遺伝子検出など、生物学的・分子生物学的な研究も必要である。今後も継続的な研究を行なことはヒトおよび野生動物における*F. tularensis* の感染状況の把握、感染環などの解明に役立つと思われる。

E. 結論

野兎病の主な感染源であるノウサギの血液を収集し、抗*F. tularensis* 抗体の検出を試みた結果、31検体中2検体がELISAおよびウエスタンブロッティングにおいて*F. tularensis* 抗原に対し強い反応を示した。更に広範囲の地域や他の動物種の血清調査を行い、*F. tularensis* の感染状況や感染環などを解析したい。これらのデータは国内の野兎病対策に有用であると考えられる。

E. 健康危険情報

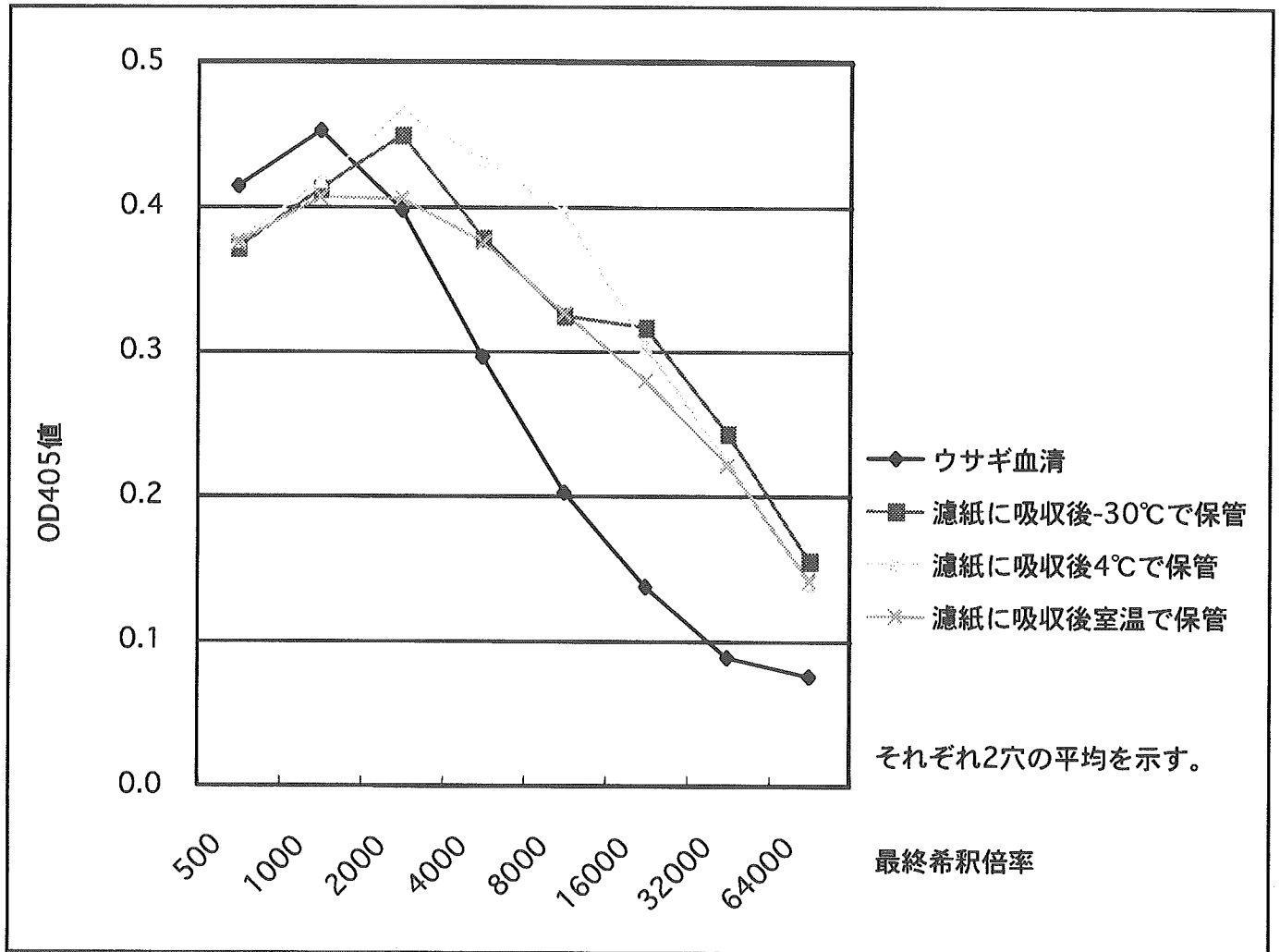
なし

F. 研究発表

Osamu Fujita, Masashi Tatsumi, Kiyoshi Tanabayashi and Akio Yamada,

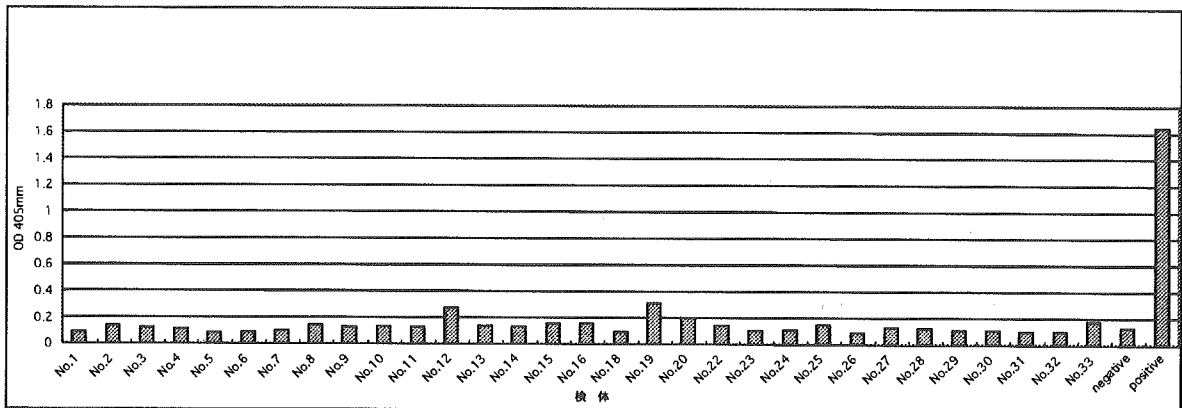
Development of a Real-Time PCR Assay
for Detection and Quantification of
Francisella tularensis, Jpn. J.
Infect. Dis., 59, 46-51, 2006.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし



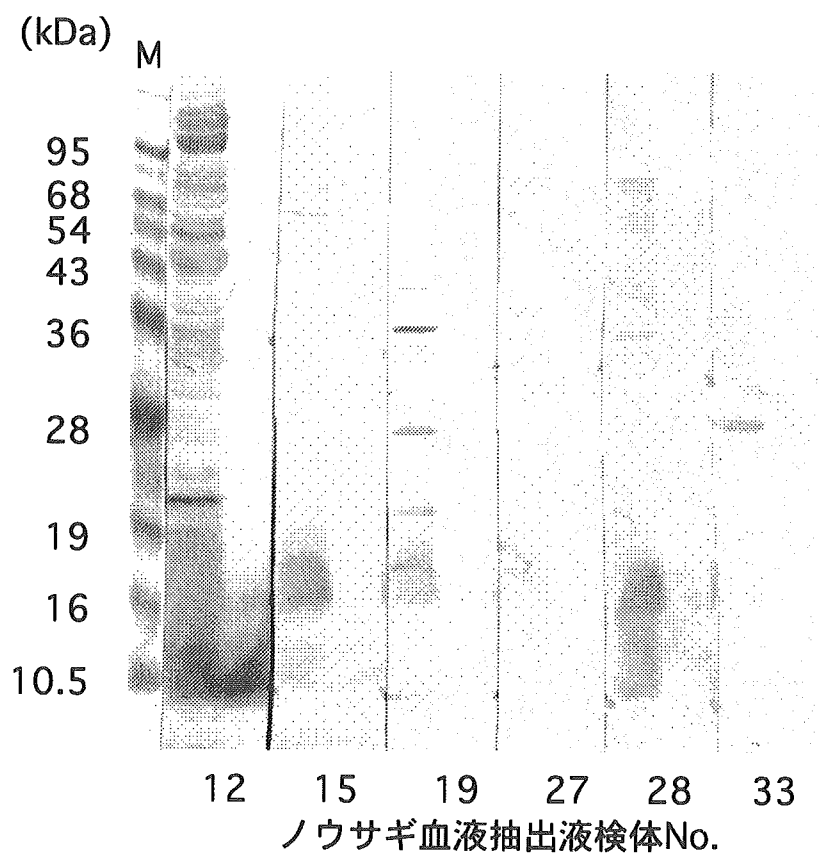
二次抗体：ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIg(A+G+M)使用

図1 採血用濾紙の有効性試験



検体No.17および21は欠番

図2 ノウサギ血液抽出液の*F. tularensis* 抗原に対する反応 (50倍希釈)



使用抗原：左レーン、LVS全菌体
 右レーン、プロテナーゼK処理LVS
 M：分子量マーカー

図3 ウエスタンブロッティングにおけるノウサギ血液抽出液の反応

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

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（WNV）の国内への侵入に備えるため、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。

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し、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。1999年にはニューヨークで発生し、わずか数年で全米にその流行が拡大したが、その拡大には野鳥の関与が考えられている。近年、ロシアで、野鳥の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様相を示し、さらに患者も報告されている。日本への渡り鳥による侵入を考えると、米国本土からよりも、むしろアラスカやシベリア地域からの渡り鳥が重要だと

考えられる。これら地域からの渡り鳥として代表的な物にはカモがあるが、国内へのWNV侵入に備えるためには、何よりもまず、それら渡り鳥（カモ類）の国外生息地におけるWNV流行状況の把握が必要と考えられる。そこで、本研究では、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ている。

今回、昨年度（2004年度）に収集を依頼したサンプルがそろったので、これらにおける抗体保有状況をPlaque Reduction Neutralization Test（PRNT）およびELISAにより検討した。また、新たに、渡り鳥の飛来地と考えられる県を加えて、2005年度サンプルの収集を依頼したので、その回収状況等を報告する。

B. 研究方法

1. サンプル・プロファイル (2004年度) : 昨年度報告した要領で収集されたカモ類サンプルは、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、ヒドリガモ : 3、オナガガモ : 4、ホシハジロ : 1 であった (表 1)。採取期間は、2005 年 1 月 26 日から 2 月 17 日までである。

2. サンプル収集 (2005年度) : 渡り鳥 (カモ類) のサンプル採取は、大日本猟友会の協力の下、北海道、青森県、秋田県、新潟県、石川県、福井県、兵庫県、島根県、山口県、福岡県、佐賀県、長崎県、熊本県、大分県、宮崎県、鹿児島県の 16 道県の方々に依頼した。

サンプルの採取と回収の方法については、ほぼ昨年度と同様であるが、ろ紙 1 枚だと得られるサンプル量が少ないので、今年度はろ紙 2 枚ずつ依頼した。また、昨年度はろ紙に血液を染みこませるのが不十分な物も見受けられたので、今年度は、その点に特に注意して採取してくれるよう依頼した。図 1 に同封した説明書を示す。昨年度と同様、記録用ラベルの記入も依頼した。

3. サンプル処理 (2005年度) : 1.8ml の 0.5% BSA-PBS の入った 2 ml チューブ中に送付されてきた血液のついたろ紙 2 枚を入れ、4°C で一晩、ローテーターで攪拌し抽出した。非動化した後、0.22µm のフィルターで濾過滅菌し、測定まで -80°C 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。

4. 対照サンプル : CDC の Dr. Komar より、WNV 感染後のハト (Rock Dove) 血清の分与をうけ、

WNV 陽性対照として用いた。留鳥として、ナキアヒル (合鴨 : 国内繁殖。4羽) の血清を入手し用いた。

5. 中和抗体の測定 (PRNT) : WNV は NY99-6922 株、JEV は JaGAr01 株を用いた。25 および 100 倍希釈サンプルとウイルス液 (200PFU/100µl) を等量混和し、37°C、1 時間反応させた。その後、6 well プレート上の Vero 細胞に 100µl/well ずつ加え、37°C、1 時間培養後、セルロース添加培養液を重層し、4 日間培養した。ホルマリン固定後、メチレンブルーで染色し、プラークを計数し、サンプル非添加対照のプラーク数に対するプラーク減少率を求めた。結果は、90% 減少 (PRNT₉₀) を示すサンプル希釈濃度で示した。

6. 特異抗体の測定 (ELISA) : 抗原として不活化 WNV または JEV を、96 well マイクロプレートにコーティングし、ブロッキング後サンプルを反応させた。次に、二次抗体を反応させ、OPD+H₂O₂ を用いて発色を見た。二次抗体には HRPO 標識抗トリ IgG-ヒツジ IgG (ハト、アヒル、スズメ、ニワトリ IgG で免疫。Bethyl) を用いた。

C. 研究結果

1. 2005 年度のサンプル収集状況 : 2006 年 2 月 27 日現在、回収された血液サンプルのプロファイルを表 2 に示す。その内訳は、北海道 : 7 検体、青森県 : 1、秋田県 : 6、新潟県 : 6、石川県 : 5、福井県 : 6、兵庫県 : 4、島根県 : 2、山口県 : 9、福岡県 : 12、佐賀県 : 12、長崎県 : 12、熊本県 : 8、大分県 : 10、宮崎県 : 11、鹿児島県 : 11 の合計 122 検体である。カモの種類は、マガモ : 57 羽、コガモ : 41、ヒドリガモ : 11、オナガガモ : 6、ハシビロガモ : 2、ホシハジロ : 1、オカヨシガモ : 1、スズガモ : 1、ヘラガモ : 1、不明 : 2 であった。採取期間は、昨年度の採取容器を用いて、北海道の 5