

ID:77

label	5' pos	3' pos	len	Tm	5' dg	3' dg	GCrate	Sequence
F3	782	799	18	56.10	-4.76	-5.57	0.50	TGATCCTCTCGTTGTTGC
B3	994	1017	24	57.27	-4.08	-4.67	0.33	AAGGTAGTTTTTTACTCAGCTCTA
FIP	45	GGCCCTCTTTTCAAACCGTATTTA						-TTGCACCTTGATATTGTGGATT
BIP	42	AGGAGTGCCTGAGTCTATGAGG						-GTTGACAAAAATGACCATCGT
F2	819	839	21	55.45	-5.57	-4.41	0.33	TTGCACCTTGATATTGTGGATT
F1c	878	901	24	61.27	-7.03	-1.98	0.42	GGCCCTCTTTTCAAACCGTATTTA
B2	973	992	20	55.96	-4.67	-5.23	0.40	GTTGACAAAAATGACCATCGT
B1c	911	932	22	62.61	-5.08	-4.74	0.55	AGGAGTGCCTGAGTCTATGAGG

ID:94

label	5' pos	3' pos	len	Tm	5' dg	3' dg	GCrate	Sequence
F3	782	799	18	56.10	-4.76	-5.57	0.50	TGATCCTCTCGTTGTTGC
B3	994	1017	24	57.27	-4.08	-4.67	0.33	AAGGTAGTTTTTTACTCAGCTCTA
FIP	44	GGCCCTCTTTTCAAACCGTATTT						-TTGCACCTTGATATTGTGGATT
BIP	40	AGTGCCTGAGTCTATGAGG						-GTTGACAAAAATGACCATCGT
F2	819	839	21	55.45	-5.57	-4.41	0.33	TTGCACCTTGATATTGTGGATT
F1c	879	901	23	61.48	-7.03	-2.89	0.43	GGCCCTCTTTTCAAACCGTATTT
B2	973	992	20	55.96	-4.67	-5.23	0.40	GTTGACAAAAATGACCATCGT
B1c	914	933	20	60.08	-6.24	-5.70	0.55	AGTGCCTGAGTCTATGAGG

図3-3 鳥インフルエンザウイルスM遺伝子LAMP法のプライマー候補(3)

ID:95

label	5' pos	3' pos	len	Tm	5' dg	3' dg	GCrate	Sequence
F3	782	799	18	56.10	-4.76	-5.57	0.50	TGATCCICICGTTGTTGC
B3	994	1017	24	57.27	-4.08	-4.67	0.33	AAGGTAGTTTTTACICAGCICIA
FIP	44	GGCCCTCTTTTCAAACCGTATTTT						-TTGCAC TTGATATTGGGATT
BIP	41	AGTGCCTGAGTCTATGAGGGA						-GTTGACAAAAATGACCATCGT
F2	819	839	21	55.45	-5.57	-4.41	0.33	TTGCAC TTGATATTGGGATT
F1c	879	901	23	61.48	-7.03	-2.89	0.43	GGCCCTCTTTTCAAACCGTATTTT
B2	973	992	20	55.96	-4.67	-5.23	0.40	GTTGACAAAAATGACCATCGT
B1c	914	934	21	61.75	-6.24	-5.55	0.52	AGTGCCTGAGTCTATGAGGGA

ID:109

label	5' pos	3' pos	len	Tm	5' dg	3' dg	GCrate	Sequence
F3	782	799	18	56.10	-4.76	-5.57	0.50	TGATCCICICGTTGTTGC
B3	997	1018	22	55.91	-5.00	-5.49	0.36	CAAGGTAGTTTTTACTCAGCT
FIP	46	GGCCCTCTTTTCAAACCGTATTTAA						-TTGCAC TTGATATTGGGATT
BIP	42	AGGAGTGCCTGAGTCTATGAGG						-GTTGACAAAAATGACCATCGT
F2	819	839	21	55.45	-5.57	-4.41	0.33	TTGCAC TTGATATTGGGATT
F1c	877	901	25	61.78	-7.03	-2.40	0.40	GGCCCTCTTTTCAAACCGTATTTAA
B2	973	992	20	55.96	-4.67	-5.23	0.40	GTTGACAAAAATGACCATCGT
B1c	911	932	22	62.61	-5.08	-4.74	0.55	AGGAGTGCCTGAGTCTATGAGG

図3-4 鳥インフルエンザウイルスM遺伝子LAMP法のプライマー候補(4)

ID:125

label	5' pos	3' pos	len	Tm	5' dG	3' dG	GGrate	Sequence
F3	782	799	18	56.10	-4.76	-5.57	0.50	TGATCCCTCGTTGTTGC
B3	997	1018	22	55.91	-5.00	-5.49	0.36	CAAGGTAGTTTTTACTCAGCT
FIP	45	GGCCCTCTTTTCAAACCGTATTTA						-TTGCACITGATATTGGGATT
BIP	42	AGGAGTGCCTGAGTCTATGAGG						-GTTGACAAAAATGACCAATCGT
F2	819	839	21	55.45	-5.57	-4.41	0.33	TTGCACITGATATTGGGATT
F1c	878	901	24	61.27	-7.03	-1.98	0.42	GGCCCTCTTTTCAAACCGTATTTA
B2	973	992	20	55.96	-4.67	-5.23	0.40	GTTGACAAAAATGACCAATCGT
B1c	911	932	22	62.61	-5.08	-4.74	0.55	AGGAGTGCCTGAGTCTATGAGG

ID:141

label	5' pos	3' pos	len	Tm	5' dG	3' dG	GGrate	Sequence
F3	782	799	18	56.10	-4.76	-5.57	0.50	TGATCCCTCGTTGTTGC
B3	997	1018	22	55.91	-5.00	-5.49	0.36	CAAGGTAGTTTTTACTCAGCT
FIP	44	GGCCCTCTTTTCAAACCGTATTT						-TTGCACITGATATTGGGATT
BIP	42	AGGAGTGCCTGAGTCTATGAGG						-GTTGACAAAAATGACCAATCGT
F2	819	839	21	55.45	-5.57	-4.41	0.33	TTGCACITGATATTGGGATT
F1c	879	901	23	61.48	-7.03	-2.89	0.43	GGCCCTCTTTTCAAACCGTATTT
B2	973	992	20	55.96	-4.67	-5.23	0.40	GTTGACAAAAATGACCAATCGT
B1c	911	932	22	62.61	-5.08	-4.74	0.55	AGGAGTGCCTGAGTCTATGAGG

図3-5 鳥インフルエンザウイルスM遺伝子LAMP法のプライマー候補(5)

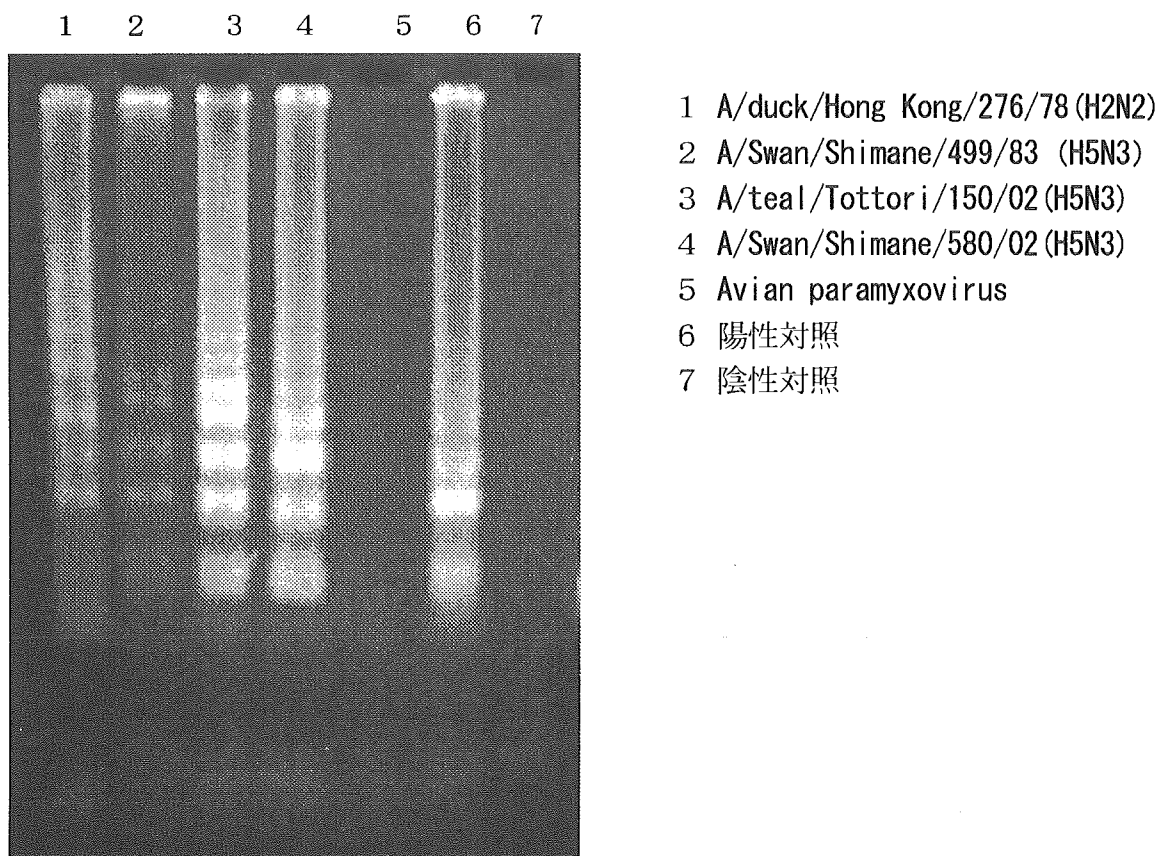


図4-1 LAMP法で増幅された鳥インフルエンザウイルスM遺伝子の電気泳動像(1)

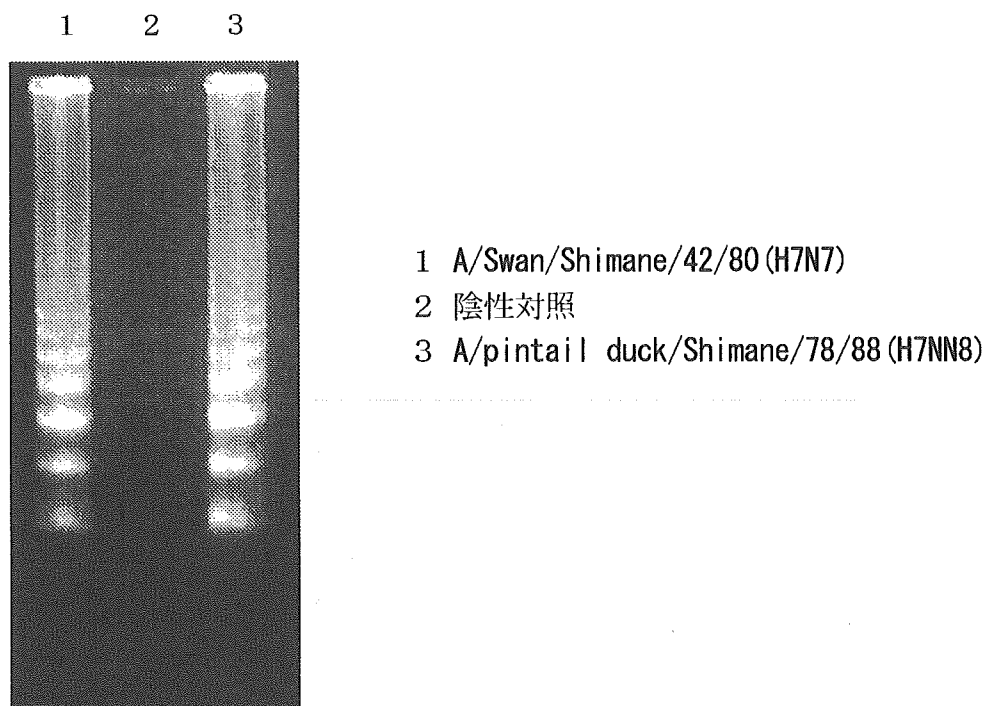
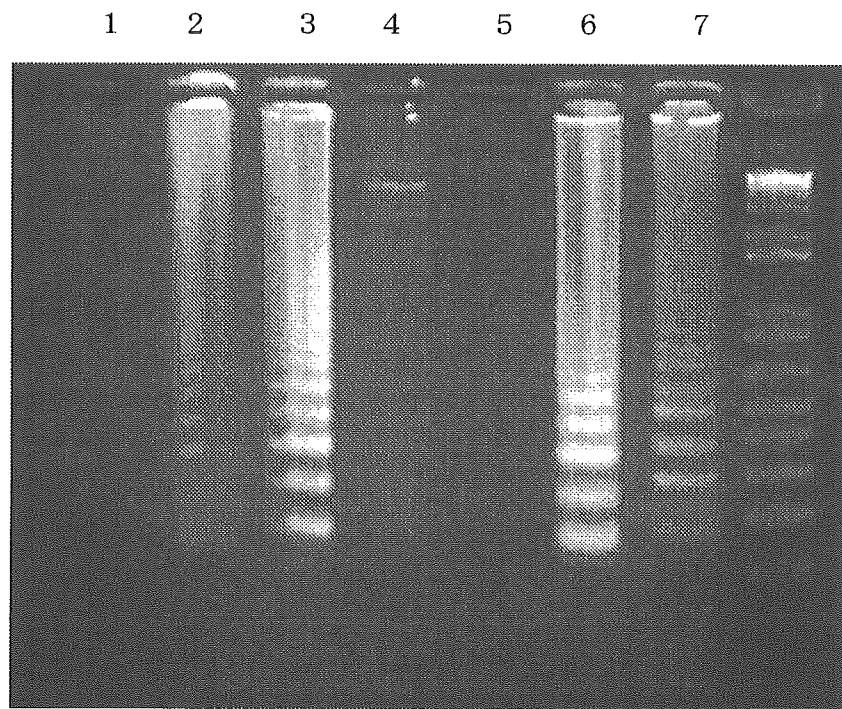


図4-2 LAMP法で増幅された鳥インフルエンザウイルスM遺伝子の電気泳動像(2)



- 1 A/turkey/Ontario/6118/68 (H8N4)
- 2 A/duck/Hokkaido/26/99 (H9N2)
- 3 分子量マーカー
- 4 陰性対照
- 5 A/turkey/Wiscon/1/66 (H9N2)
- 6 A/Swan/Shimane/499/83 (H5N3)
- 7 分子量マーカー

図4-3 LAMP法で増幅された鳥インフルエンザウイルスM遺伝子の電気泳動像(3)

市販の人用インフルエンザ検査キットの
鳥インフルエンザウイルスでの評価

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 山本美江 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

研究要旨：各種市販の人用インフルエンザ検査キットを用いて鳥類由来 H5N1 亜型インフルエンザウイルスの検出を試みたところキットにより感度に差があることや人由来ウイルス株での検出感度に比較して低いことが分かった。また、検体処理液を添加するだけで反応できるキットの方が操作が容易であった。クロアカスワブを検査材料とした場合を想定して検体に糞を混入させ反応性を調べたところ、多くのキットで非特異的反応は無く、検出感度も保たれていた。今後、他の高病原性のウイルス株を含め複数の鳥類由来ウイルスでの検討やより高感度で簡易な検査法の開発が必要であると考えられた。

A. 研究目的

2004 年本邦においても高病原性鳥インフルエンザが発生し、京都の事例では感染鶏が食鳥処理場に搬入された事例があった。また、その後も海外では本病が家禽でも発生が続いており国民の関心も高い。食鳥検査において通常の検査では感知できないようなウイルス疾病ではウイルス学的検査が必要となる。一般にウイルス学的検査は煩雑で時間を要することから、迅速高感度かつ簡便な診断法の開発が必要である。本研究では食鳥検査所で鳥インフルエンザを簡易に検査する方法として既に人用に開発市販されている各種インフルエンザ検査キットの鳥インフルエンザウイルスでの検出感度や操作性について検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. 供試ウイルス：野生カモ由来の低病原性鳥インフルエンザウイルス株 A/duck/Hyogo/35/01 (H5N1) (神戸市環境保健研究所より分与) を 10 日令発育鶏卵に接種して増殖させ調製し、使用まで -80°C に分注保存した。50%感染価は MDCK 細胞を用いて Reed & Munch の方法で求めた。

2. インフルエンザ検査キットでの反応：購入供試した 12 キットを表 1 に示した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈したウイルス液 100 μl を各キットに同梱されている各規定量の検体処理液に加え攪

拌後、テストプレートにろ過フィルターを通し各キットの指示に従い滴下した。また、ストリップタイプのは攪拌後ろ過フィルターを通さずに抽出液に投入した。各ウイルス希釈液あたり 3 キットを用いた。標準の判定時間まで静置し、目視判定した。明らかな発色ができたものを++、やや薄いものを+、また、シグナルはあるが判定しにくい場合を±、シグナルが見えないものを-とした。確認のため複数人で判定した。

4. 阻害物の混合試験：検査材料の 1 つとして使用されるニワトリのクロアカスワブを想定して、混入するニワトリ糞の各キットの反応に及ぼす影響を調べるために、希釈したウイルス液にニワトリの糞を混合して各キットによる反応性を調べた。

C. 研究結果

1. 各種インフルエンザウイルス抗原検出キットでの検出

ウイルス液を PBS にて 10 倍段階希釈し、その 0.1ml を各キットの規定量の検体処理液に添加後各キットに滴下もしくはストリップを浸漬させ判定した。結果の一覧を表 2 に示した。

$10^{6.5}$ TCID₅₀ のウイルスを各キット同梱の検体処理液に添加後反応させた場合は供試した 12 種すべてのキットで検出可能であった。しかし $10^{5.5}$ ではシグナルが観察されないものや弱くなる場合があった。また $10^{4.5}$ では弱く反応するものもあったがほとんどのキットで検出できなかった。

キットにより添加する抽出液中の元のウイルス液の割合は 10% から 31% であったが、その割合が多いもので反応が良

好ということではなかった。

操作性については判定までに試料を 1 回滴下するものが簡易であった。また、スティックタイプのはより簡便であった。

2. 阻害物の混合試験：阻害物として正常ニワトリの糞を 1% または 5% の割合で混和し、7 種類のキットでの反応性を調べた結果を表 3 に示す。いずれのキットでも非特異的反応が現れることはなかった。また、6 種のキットでは糞が混入しても反応は阻害されなかったが、1 キット(ディレクテジェン FluA+B)では反応が阻害され、混入無しでは陽性を示したウイルス量 ($10^{6.5}$ TCID₅₀) においても陽性を示さなかった。

D. 考察

人用のインフルエンザ診断のために開発された簡易インフルエンザウイルス抗原検出キットを鳥インフルエンザウイルス株で検出感度や食鳥検査所での一時スクリーニング検査として用いる場合の操作性について検討した。今回は 1 株の H5N1 亜型ウイルス株についてのみ検討したが $10^{4.5}$ から $10^{6.5}$ TCID₅₀ のウイルス量が必要であった。これは報告されている人由来ウイルスでの必要量より多く、他の高病原性ウイルス株や異なる亜型ウイルスでの比較検討が必要であると考えられた。また、操作性においては検体処理後の反応操作が 1 回で済むキットの方が適していると考えられた。

インフルエンザウイルス感染疑いで検査する場合の採取材料としては咽頭ぬぐい液やクロアカスワブが用いられる。本研究ではクロアカスワブを用いた場合に予想されるニワトリ糞の混入を想定して

キットの反応性を調べたところ、ほとんどで非特異反応はなく検出感度が低下することも無かったが、一部キットでは感度の低下が見られたことからクロアカスワブを検体とする場合はキットの選択が必要であると考えられる。

インフルエンザウイルスの簡易検出キットとして人用は開発販売されているもの鳥類のインフルエンザ診断キットの市販はされておらず今後の製品化が期待される。

E. 結論

各種市販の人用インフルエンザ診断キットを用いて鳥類由来インフルエンザウイルスの検出を試みたところキットにより感度に差があることや人由来ウイルス株の検出感度に比較して低いことが分かった。また、検体処理液を添加するだけで反応できるキットの方が操作性に容易であった。クロアカスワブを検査材料とした場合は多くのキットで非特異的反応は無く、検出感度も保たれていた。今後、他の高病原性のウイルス株を含め複数の鳥類由来ウイルスでの検討や高感度の検査系の開発やより高感度で簡易な検査法の開発が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 澤邊京子, 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 林利彦, 津田良夫, 倉橋 弘, 棚林清, 堀田昭豊, 山田章雄, 西藤岳彦, 小淵正次, 田代眞人, 小林睦生: 2004年高病原性鳥インフルエンザ国内流行地で採集されたクロバエ類からの H5N1 亜型インフルエンザウイルスの検出と分離。病原微生物検出情報 26, 119-121, 2005.

2) Sawabe K., Isawa H., Hoshino K., Sasaki T., Tanabayashi K., Hotta A., Yamada A., Hayashi T., Tsuda Y., Kurahashi H., Saito T., and Kobayashi M. Detection and isolation of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses from blow flies collected in the vicinity of an infected poultry farm in Kyoto, Japan, 2004. Am J Trop Med Hyg, In press.

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

表1-1 試験に供したインフルエンザウイルス簡易検出キット


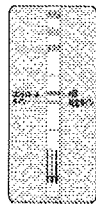


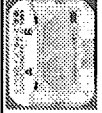
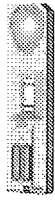
商品名 (メーカー)	形状	試料添加法 操作ステップ	判定までの 所要時間	有効期間
BD Fluエグザマン (日本ベクトン・ディッ キンソン)		滴下 1ステップ	15分	9ヶ月
QuickVeuラピッドSP influ (住友製薬バイオ メデカル)		ステイック	10分	24ヶ月
エスプラインインフルエ ンザA&B-N (富士レビオ)		滴下 1ステップ	15分	15ヶ月
ダイレクテイジェン FluA+B (日本ベクトン・ ディキンソン)		滴下 7ステップ	15分	6ヶ月
クイックーインフルA・B 「生研」 (デンカ生研)		滴下 1ステップ	15分	16ヶ月
ポクテムインフルエンザ A/B(シスメックス=大塚)		滴下 1ステップ	15分	12ヶ月

表1-2 試験に供したインフルエンザウイルス簡易検出キット


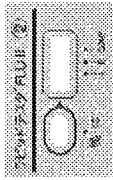




商品名 (メーカー)	形状	試料添加法 操作ステップ	判定までの 所要時間	有効期間
スタットマークインフル エンザA/B (カイノス)		滴下 1 ステップ	15分	12ヶ月
ラピッドテスタFLUⅡ (第一化学薬品)		滴下 1 ステップ	15分	14ヶ月
ラピッドテスタFLUS ティック (第一化学薬品)		スティック	15分	10ヶ月
キャピリアFluA+B (日本ベクトン・ディキ ンソン)		滴下 1 ステップ	15分	21ヶ月
チェックFluA・B (アルフレックスファーマ)		滴下 1 ステップ	15分	21ヶ月
クイックチェイサー FluA, B (ミズホメデイ)		滴下 1 ステップ	15分	21ヶ月

表 2 各種インフルエンザ検査キットでの検出

添加ウイルス量*	BD Flu エグザマン			QuickVeU ラピッド SPinfl			エスプラインインフルエンザ A&B-N		
	6.5	++	++	++	++	++	++	++	++
5.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4.5	±	±	±	±	+	-	+	+	+

添加ウイルス量*	ディレクティージェン FluA+B			クイックインフル A・B「生研」			ポクテムインフルエンザ A/B		
	6.5	++	++	++	++	++	++	++	++
5.5	+	+	±	+	+	+	+	+	+
4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-

添加ウイルス量*	スタットマークインフルエンザ A/B			ラピッドテスト FLU II			ラピッドテスト FLU スティック		
	6.5	+	+	+	+	+	+	+	+
5.5	+	+	+	±	±	±	±	±	±
4.5	-	-	-	-	nt	nt	-	nt	nt

添加ウイルス量*	キャピリア FluA+B			チェック FluA・B			クイックチェイサー FluA, B		
	6.5	+	+	+	±	±	±	±	±
5.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.5	-	nt	nt	-	-	-	-	-	-

* : 添加ウイルス量(10ⁿTCID₅₀)

表 3 ニワトリ糞混入時の反応

混入量 (%)	添加ウイルス量*	ディレクティ ジェン FluA+B	エスプラインインフル エンザ A&B-N			クイックーインフル A・B「生研」		
1	6.5	± + uc	+	+	+	+	+	+
5	6.5	uc uc uc	+	+	+	+	+	+
5	5.5	uc uc uc	+	+	+	+	+	+

混入量 (%)	添加ウイルス量*	QuickVeu ラ ピッド SPinflu	ポクテムインフルエン ザ A/B			スタットマークインフ ルエンザ A/B		
1	6.5	+ + +	++	++	++	++	++	++
5	6.5	+ + +	+	+	+	±	±	±
5	5.5	+ + +	-	-	-	-	-	-

混入量 (%)	添加ウイルス量*	BD Flu エグザ マン
1	6.5	++ ++ ++
5	6.5	+ + +
5	5.5	+ + +

* : 添加ウイルス量(10ⁿTCID₅₀)

uc: unclear

食肉に供される動物における A 群ロタウイルス及び日本脳炎ウイルスの
汚染状況調査に関する研究

分担研究者 杉山 誠 岐阜大学大学院連合獣医学研究科 教授
協力研究者 山吉誠也、高木愛香、源 宣之、伊藤直人、浅野 玄、
坪田敏男、石黒直隆（岐阜大学応用生物科学部）
泉對 博（日本大学生物資源科学部）
伊藤 雅、山下照夫、榮 賢司（愛知県衛生研究所）

研究要旨：食肉に供される家畜及び野生動物における A 群ロタウイルス及び日本脳炎ウイルスの汚染状況を把握することを目的に血清疫学調査を実施した。その結果、全国のウシ 343 例のうち、52.2%が P[17] 遺伝子型のトリロタウイルスの、46.6%が P[4] あるいは P[8] 遺伝子型のヒトロタウイルスの、そして 60.9%が P[2] あるいは P[3] 遺伝子型のロタウイルスの感染を受けたと考えられた。ウシではヒト以外の動物由来ロタウイルスが感染環の中心となっており、これにトリロタウイルスやヒトロタウイルスの感染が高頻度で加わる非常に複雑な感染環を形成していると推測された。一方、イノシシ 234 例の 25.2%が日本脳炎ウイルスに対する中和抗体を保有していた。これに対し、同様な環境に生息するニホンジカおよびニホンザルにおける中和抗体保有率は、それぞれ 1.6%および 4.2%と低率であり、タヌキには抗体保有個体は認められなかった。この結果から、食肉に供されるイノシシが日本脳炎ウイルスに高い感受性を有し、同ウイルスの感染環に増幅動物として係わっている可能性が示唆された。

A. 研究目的

A 群ロタウイルスは、人を含めた幼若動物の下痢症の主な病因の一つである。特に本ウイルスは、人の冬期乳幼児下痢症を引き起こすウイルスとして知られている。人では食品が原因と考えられる集団発生例も報告されている。これまでに、A 群ロタウイルスとして、哺乳類から鳥類まで 15 の G 血清型と 25 の P 遺伝子型のウイルスが分離されている。また、インフルエンザウイルスと同様に分節タイプのウイルスで

あるため、遺伝子交雑が起こりやすいとされている。このように、さまざまなタイプのロタウイルスが各種動物から分離されているものの、その感染の実態や異種動物間での感染・流行については、ほとんど明らかにされていない。そこで今回、食肉に供されるウシを対象に、P 遺伝子型特異的な抗体を検出することができるラテックス凝集 (LA) 試験を用いて、血清疫学的調査を行った。

一方、日本脳炎ウイルスによって引き起こされる日本脳炎は、古くから知られる節足動

物媒介性の人獣共通感染症の一つである。毎年、アジアを中心に約 3.5-5 万件の発生報告があり、1 万人以上が本疾病により死亡していると言われている。2005 年夏には、インド北部からネパールにかけて大規模な日本脳炎の流行があり、7 千人以上の患者と約 1,500 人の死亡が確認されている。近年、日本における日本脳炎患者の発生は減少しているものの、ブタで続く高率な日本脳炎ウイルス感染、これまでとは異なる患者の年齢構成、流行ウイルスの遺伝子型の変化等、本ウイルス感染の継続や動向変化が報告されている。これまで日本では、日本脳炎の流行予測のため、本ウイルスの増幅動物であるブタを対象とした疫学調査を中心に研究が進められてきた。一方で、ブタ以外の動物、特に野生動物における日本脳炎ウイルス感染に関する情報はほとんど不明のままである。そこで今回、食肉に供され、ブタに近縁であるイノシシを対象に、中和試験による日本脳炎ウイルスに対する血清疫学調査を実施した。イノシシと同様に食肉として利用されるニホンジカ及び対照として同じ環境に生息する野生動物であるニホンザルとタヌキについても調査を行い、結果を比較した。

B. 研究方法

1. A 群ロタウイルスに対する血清疫学的調査:

1997-1998 年にかけて、全国で採取されたウシの血清 343 例が LA 試験に供試された(表 1)。大腸菌で発現させ、精製したトリロタウイルス PO-13 株、ヒトロタウイルス Wa 株及びサルロタウイルス SA-11 株の GST 融合 VP8 蛋白質を抗原とした LA (各 PO-, Wa-及び SA-LA) 試験を用いて各抗体価を測定した。血清はカオリンで 1 回処理された。処理血清を 8 倍から 2 倍段階希釈し、V 字型 96 穴マイクロプレート上で各感作ラテックスを加え、1 晩放置した後、凝集像を判定した。凝集を起こす一番高い希釈倍数を各 LA 抗体価とした。8 倍以上の抗体価を有する個体

を陽性とした。

2. 日本脳炎ウイルスに対する血清疫学調査:

1991-2004 年にかけて、岐阜県で採取されたニホンザル 96 例及びタヌキ 40 例、兵庫、岩手、岐阜県を中心に採取されたニホンジカ 64 例、ならびに岐阜、滋賀、愛知、及び四国 4 県を中心に採取されたイノシシ 234 例の血清が、日本脳炎ウイルス JaGAr01 株を攻撃ウイルスとした中和試験に供試された(表 2)。中和試験は、培養用 96 穴マイクロプレートが用いられ、pH 7.8 の培養条件下で BHK-21 細胞への同時接種法を応用した TCID50 法により実施された。10 倍以上の抗体価を有する個体を陽性とした。

C. 研究結果

1. A 群ロタウイルスに対する血清疫学的調査

各 LA 試験の結果を表 1 に示す。ウシ血清 343 例のうち、PO-, Wa-および SA-LA 試験において、それぞれ 179 例 (52.2%)、160 例 (46.6%) および 209 例 (60.9%) が抗体陽性であり、すべての LA 試験において陰性を示した血清は 98 例 (28.6%) であった(表 1)。SA-LA 試験の抗体陽性率は Wa-LA 試験の抗体陽性率に比べ有意に高かった ($P < 0.01$)。

各地方別では、PO-, Wa-および SA-LA 試験の抗体陽性率は、それぞれ 43.2%から 68.8%、25.0%から 70.7%および 25.0%から 81.3%であった。北海道の Wa-LA 試験における抗体陽性率 70.7%および SA-LA 試験における抗体陽性率 81.3%は、全体の Wa-LA 試験における抗体陽性率 46.6%および全体の SA-LA 試験における抗体陽性率 60.9%よりも高い傾向がみられた。

2. 日本脳炎ウイルスに対する血清疫学調査

査

今回の調査において、タヌキに中和抗体保有個体は認められなかった(表2)。ニホンザルおよびニホンジカにおける中和抗体陽性率はそれぞれ4.2%および1.6%であり、両者において稀に日本脳炎ウイルス感染が成立していることが示された。これに対し、イノシシにおける中和抗体保有個体は全体の25.2%を占めることが明らかとなった。四国で採材されたイノシシにおける抗体陽性率32.7%(33/101)は、東海・近畿地方の陽性率19.5%(26/133)より高い値を示し($P < 0.05$)、地方間での感染状況の違いが認められた。

D. 考察

1. A群ロタウイルスに対する血清疫学的調査:

各種A群ロタウイルスに対する抗血清を用いた交差LA試験の結果から、PO-LA試験はP[17]遺伝子型のトリロタウイルスの感染抗体を、Wa-LA試験はP[4]およびP[8]遺伝子型のヒトロタウイルスの感染抗体を、SA-LA試験はP[2]およびP[3]遺伝子型のサル、イヌおよびネコのロタウイルス感染抗体を検出可能であることが示されている。また、今回用いたLA試験は中和試験と同等の感度を有することが分かっている。

A群ロタウイルスは宿主の壁を越えて異種間感染を起こすことが次第に明らかにされつつあり、さらに人獣共通感染症の病原体としての可能性も考えられている。しかし、これまでにヒトにおいて異種間感染を確証させるウイルス株は分離されていない。また、動物のなかでA群ロタウイルスがどのような感染環を形成しているかについての研究はほとんど行われていない。そこで今回、食肉として供給されるウシについて、上述のLA試験を用いた血清疫学調査を実施した。

日本国内のウシで検出されるA群ロタウイルスの血清型は、G6P[5]およびG10P[11]を中心と

して、G血清型6、8および10とP遺伝子型1、5および11のさまざまな組み合わせで構成されると報告されている。P遺伝子型1、5および11のロタウイルスとP[2]遺伝子型のSA-11株のVP8のアミノ酸ホモロジーは80%未満であることから、今回のSA-LA試験ではウシで広く流行しているウイルスに対する抗体が十分に検出されていないと考えられた。これを前提としてウシにおける解析を行った。

ウシ血清343例のうち、PO-LA試験における抗体陽性率は52.2%(179/343)であった(表1)。陽性例の85.5%(153/179)は他のLA試験においても陽性を示した血清であり、抗体価の分布も他のLA試験の結果と差が認められなかった。このようにウシにおいてP[17]遺伝子型のトリロタウイルスの高頻度な感染が疑われたが、他のロタウイルスの感染も複雑に起こっていると考えられた。

ウシにおいてP[17]遺伝子型のトリロタウイルスが常に感染環を形成していると考えられた。牛舎は通常開放型であり、ハト等の野鳥が比較的自由に出入りできる環境にある。従ってウシの餌を目的に進入した野鳥の糞便からトリロタウイルスがウシに感染する機会は、非常に多いと考えられる。このことが、ウシにおいてPO-13株に近いP[17]遺伝子型のトリロタウイルスに対する抗体保有率が高い理由かもしれない。鳥類からのロタウイルスの分離および検出の報告は少なく、野鳥に至ってはほとんど情報が存在しない。ウシにおけるトリロタウイルスの感染環を明らかにするためには、まず野鳥におけるロタウイルスの感染実態の解明が必要なのかもしれない。

Wa-およびSA-LA試験において抗体陽性を示したウシ血清は、それぞれ160例(46.6%)および209例(60.9%)であった(表1)。SA-LA試験における抗体陽性率は、Wa-LA試験における抗体陽性率に比べ有意に高い値であっ

た。このことは、1997年および1998年のウシにおいてはSA-11株に近いP[2]あるいはP[3]遺伝子型のロタウイルス感染が頻繁に起きていたことを示唆している。通常、牛舎はネコやイヌが自由に出入り出来る環境にあるところが多い。また、放牧中にはサルなどの野生動物との間接的接触が起きる可能性も高く、ウシはペットあるいは野生動物由来ロタウイルスに感染する機会が比較的多いことが考えられる。今後、ペットおよび野生動物を含めたさまざまな哺乳動物におけるロタウイルスの感染実態を明らかにすることにより、今回の結果に対する明確な結論が導かれると考える。また、家畜としてのウシは、ヒトからの給餌等、生まれてから常にヒトとの接触がある。そのような状況のなかで、Wa株に近いP[4]あるいはP[8]遺伝子型のヒトロタウイルスの感染が高頻度で起こっているのかもしれない。

ウシではSA-11株に近いP[2]あるいはP[3]遺伝子型のロタウイルスが高頻度で感染を起こしており、同時にP[17]遺伝子型のトリロタウイルスおよびP[4]あるいはP[8]遺伝子型のヒトロタウイルスの感染も頻繁に起こるといふ非常に複雑な感染環の存在が示唆された。また、このようにヒトおよびウシにおいて多様なロタウイルスによる複雑な重感染が起きている状況から、リアソートメントによる新型ロタウイルス出現の可能性も否定できない。

以上、今回の研究から、食肉の供給源であるウシにおいて様々なロタウイルスの汚染の可能性が示唆された。消費者側では、糞便に存在するウイルスの食肉への汚染による健康被害が問題となるが、現在のと畜場における衛生管理を考えると問題は少ないかも知れない。一方、と畜場に係わる人間への被害については、警戒していく必要があると考えられる。今後、実際に健康なウシの糞便中における同ウイルスの汚染に関する調査が必要である。

2. 日本脳炎ウイルスに対する血清疫学調査：

日本で養豚が本格的に始まったのは戦後であるにもかかわらず、国内における日本脳炎の流行は戦前から確認されている。これは、古来の日本脳炎の流行にブタ以外の動物が増幅動物として関係していたことを示唆している。これまでにサギなどの野鳥類が日本脳炎ウイルスの感染環に関わっていることが示されているが、他の野生動物に関する報告はみられない。今回、食肉として利用される野生動物の間での日本脳炎ウイルスの汚染状況を調査するために、イノシシおよびニホンジカを対象に中和試験による血清疫学調査を実施した。これら野生動物と同じ環境に生息するニホンザルおよびタヌキについても、同様な調査を実施した。

今回の調査の結果、イノシシが他の野生動物に比べ高率に日本脳炎ウイルスに感染していることが明らかとなった。その陽性率も南部に位置する四国の方が高いことが示された。同じような環境に生息する、すなわち蚊に吸血される機会が同じと考えられる野生動物の間で示された陽性率の差は、各動物の日本脳炎ウイルスに対する感受性の違いによることが推察される。イノシシは他の野生動物より高頻度で日本脳炎ウイルスに感染していることが明らかとなり、ブタと遺伝的に近縁なイノシシが日本脳炎ウイルスに対して高感受性であることが示唆された。このことから、日本で養豚が盛んになる以前は、イノシシが日本脳炎ウイルスの増幅動物となっていた可能性が考えられ、現在の日本脳炎ウイルスの感染環においてもイノシシは重要な位置付けにあることが推察された。

今回の結果からイノシシにおいて日本脳炎ウイルスによるウイルス血症が起きている可能性が示唆された。イノシシの猟期は蚊が活動しない冬期に設定されているため、イノシシを介した直接の日本脳炎ウイルスによる健康被害はほとんどないと考えられる。一方で、温暖化の影響のため、蚊の活動の変

化が報告されていることから、今後もイノシシと日本脳炎ウイルスの関係について注意していく必要がある。

E. 結論

1. 1997～1998年において、全国のウシ343例のうち、52.2%がP[17]遺伝子型のトリロタウイルスの、46.6%がP[4]あるいはP[8]遺伝子型のヒトロタウイルスの、そして60.9%がP[2]あるいはP[3]遺伝子型のロタウイルスの感染を受けたと考えられた。ウシではヒト以外の動物由来ロタウイルスが感染環の中心となっており、これにトリロタウイルスやヒトロタウイルスの感染が高頻度で加わる非常に複雑な感染環を形成していると推測された。

2. 1991～2004年に採血されたイノシシ234例の25.2%が日本脳炎ウイルスに対する中和抗体を保有していた。これに対し、同様な環境に生息するニホンジカおよびニホンザルにおける中和抗体保有率は、それぞれ1.6%および4.2%と低率であり、タヌキには抗体保有個体は認められなかった。この結果から、食肉に供されるイノシシが日本脳炎ウイルスに高い感受性を有し、同ウイルスの感染環に増幅動物として関わっている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 杉山 誠, 高木愛香, 源 宣之, 伊藤直人, 浅野 玄, 坪田敏男, 石黒直隆, 伊藤雅, 山下照夫, 榮 賢司: 国内の野生動物における日本脳炎ウイルスに対する血清疫学調査-イノシシが日本脳炎ウイルスの増幅動物である可能性-, 獣医畜産新報 4, 2006 (印刷中) .

2. 学会発表

1) 高木愛香, 杉山 誠, 伊藤直人, 浅野玄, 坪田敏男, 源 宣之: 国内の野生動物における日本脳炎ウイルスに対する血清疫学調査、第139回日本獣医学会学術集会、2005年4月 (和光)

2) 杉山 誠, 高木愛香, 源 宣之, 伊藤直人, 浅野 玄, 坪田敏男, 石黒直隆, 伊藤雅, 山下照夫, 榮 賢司: 国内の野生動物における日本脳炎ウイルスに対する血清疫学調査-イノシシが日本脳炎ウイルスの増幅動物である可能性-, 第5回人と動物の共通感染症研究会学術集会、2005年11月 (東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表1 ロタウイルスに対する各 LA 試験におけるウシ血清の地方別の抗体陽性率

地方	血清数	LA 試験 (%)			陰性 (%)
		PO-	Wa-	SA-	
北海道	75	58.7	70.7	81.3	16.0
東北	49	44.9	34.7	71.4	26.5
関東	38	60.5	57.9	73.7	21.1
中部	49	46.9	32.7	46.9	36.7
近畿	36	47.2	44.4	55.6	27.8
中国	20	45.0	25.0	25.0	45.0
四国	44	43.2	31.0	47.7	40.9
九州	32	68.8	53.1	50.0	31.2
全体	343	52.2	46.6	60.9	28.6

表2 各種野生動物における日本脳炎ウイルスに対する中和抗体陽性率

動物種	捕獲地	捕獲年	例数	陽性数	(陽性率)
イノシシ	岐阜県	1991-1992	11	4	
		2003	12	2	
		計	23	6	(26.1%)
	滋賀県	1991-1992	21	3	(14.3%)
	兵庫県	1992	1	0	(0%)
	愛知県	2003-2004	88	17	(19.3%)
	徳島県	2003-2004	25	6	(24.0%)
	高知県	2003-2004	7	0	(0%)
	香川県	2003	29	11	(37.9%)
	愛媛県	2003-2004	40	16	(40.0%)
		合計	234	59	(25.2%)
ニホンシカ	岐阜県	1991-1992	16	1	
		滋賀県	1991	2	0
	兵庫県	1992	25	0	
	岩手県	1992	20	0	
	三重県	1992	1	0	
			計	64	1
ニホンザル	岐阜県	1991	96	4	(4.2%)
タヌキ	岐阜県	1991-1992	36	0	
		2003-2004	4	0	
		計	40	0	(0%)