

表 2. 予防接種率の推定実施率

市町村名	人口(平成 17 年)	世帯数	犬登録数	推定犬飼育頭数	推定登録率	注射頭数	見かけの注射実施率	推定注射実施率
A	538	277	66	63	104.3%	49	74.2%	77.5%
B	1,170	500	103	114	90.2%	57	55.3%	49.9%
C	1,478	606	116	138	83.8%	64	55.2%	46.2%
D	1,808	735	149	168	89.0%	119	79.9%	70.0%
E	3,236	1,272	219	291	75.4%	113	51.6%	38.9%
F	3,297	1,274	270	291	92.6%	94	34.8%	32.3%
G	3,386	1,565	231	357	64.6%	119	51.5%	33.3%
H	3,727	1,524	269	346	77.3%	161	59.9%	46.3%
I	4,208	1,504	436	343	126.9%	289	66.3%	84.1%
J	4,374	1,835	346	419	82.6%	228	65.9%	54.4%
K	4,625	1,930	398	441	90.0%	272	68.3%	61.7%
L	4,632	1,860	509	425	119.3%	438	86.1%	103.1%
M	5,492	2,564	321	586	54.8%	271	84.4%	46.3%
N	5,895	2,157	505	493	102.5%	413	81.8%	83.0%
O	6,437	2,742	494	626	78.9%	382	77.3%	61.0%
P	6,862	2,463	558	563	99.2%	387	69.4%	68.0%
Q	6,952	2,793	481	638	75.4%	384	79.8%	60.2%
R	7,347	3,399	803	776	103.4%	482	60.0%	62.1%
S	8,320	3,226	604	737	82.0%	481	79.6%	65.3%
T	13,437	5,173	881	1181	74.6%	739	83.9%	62.6%
U	14,447	5,384	931	1230	75.7%	755	81.1%	61.4%
V	15,506	5,293	1440	1209	119.1%	772	53.6%	63.9%
W	17,281	7,707	986	1760	55.0%	811	82.3%	46.1%
X	17,490	7,613	726	1739	41.8%	371	51.1%	21.3%
Y	20,348	8,068	1330	1943	72.2%	879	66.1%	47.7%
Z	20,527	8,225	1714	1878	91.2%	1353	78.9%	72.0%
AA	24,397	9,371	1704	2140	79.6%	1083	63.6%	50.6%
AB	26,039	9,543	1400	2179	64.2%	890	63.6%	40.8%
AC	27,068	10,005	2147	2285	94.0%	1327	61.8%	58.1%
AD	30,011	10,611	1812	2423	74.8%	1074	59.3%	44.3%
AE	30,257	12,411	1836	2834	64.8%	1441	78.5%	50.8%
AF	33,541	12,544	2053	2865	71.7%	1401	68.2%	48.9%
AG	37,917	15,360	2305	3508	65.7%	1879	81.5%	53.6%
AH	50,758	19,296	3177	4407	72.1%	2123	66.8%	48.2%
AI	333,484	143,609	15570	32798	47.5%	9828	63.1%	30.0%

人口および世帯数は平成 18 年高知県統計書による。

市町村名は平成 18 年 4 月現在として合併市町村の数値については積算して表示した。

犬の登録数・注射数：高知県健康福祉部食品・衛生課 平成 18 年度 食品・衛生関係業務概要より。

推定犬飼育頭数＝世帯数×0.366（ペット飼育者率）×0.624（犬飼育率）。

定注射実施率＝注射頭数/推定犬飼育頭数。

## 添付資料 3

### 兵庫県における狂犬病対策の現状

表1 組織体制（行政機関）

地 域	所管事務所	予防員	技術員	整 備
阪神南	動物愛護センター本所	8	6	H10年4月開所
阪神北				
東播磨	明石健康福祉事務所	4	5	三木支所（H19年4月開所予定）
北播磨	社健康福祉事務所	4		
中播磨	動物愛護センター	5	5	H17年8月開所
西播磨	龍野支所			
但 馬	豊岡健康福祉事務所	3	3	〇〇支所（H20以降開所予定）
丹 波	柏原健康福祉事務所	3	3	△△支所（H20以降開所予定）
淡 路	洲本健康福祉事務所	3	3	淡路支所（H19年10月開所予定）
動物管理事務所（センター所内所）		3	7	S53年4月開所
合 計（7事務所+処分施設）		33	32	

表2 施設整備状況（行政機関）

機 能	愛 護 C 本 所	愛 護 C 龍野支所	動物管理 事 務 所	健康福祉事務所	
				現 在	支所整備後
捕獲・抑留犬保管室	○	○	△（*1）	○	○
引取り犬保管室	○	○		○	○
ねこ保管室	○	○		×	○
その他動物保管室	○	○	×	×	○
咬傷犬検診室	○	○	○	△（*2）	○
普及啓発犬・譲渡動物室	○	○	×	×	○
傷病動物保管・隔離室	○	○	×	×	○（*3）
処置治療・手術室（X線室）	○	○	×	×	○
微生物検査室	○	×	○	×	○
病理解剖・検査室	○	×	○	×	○
その他検査室	○	×	×	×	○
多目的室・研修室	○	○	○	×	○
処分施設	×	×	○	×	×

\*1 処分前の一時保管用      \*2 捕獲・抑留犬保管室を活用

\*3 三木支所は、BSL2対応

表3 組織体制（研究機関）

設 立	旧衛生研究所	旧公害研究所	備 考								
	昭和23年8月	昭和43年4月	平成14年4月統合								
現	名称	兵庫県立健康環境科学研究センター									
	組織	所長 — 次長 — 総務部(兵庫・須磨) 企画情報部(兵庫) 感染症部(兵庫) 健康科学部(兵庫) 安全科学部(須磨) 水質環境部(須磨) 大気環境部(須磨)					医師	事務	研究	行政	技労
在						1	9			4	
								5	1		
								8	1	1	
								9			
								12			
								13	1		
								11			
						1	9	58	3	5	
		合 計									

\* 兵庫庁舎（旧衛生研究所）、須磨庁舎（旧公害研究所）

表4 登録、予防注射、捕獲実績

年 度	登 録 数	予 防 注 射 数	実 施 率 (%)	捕 獲 数
元	162,251	162,159	99.9	8,495
7	177,739	177,518	99.9	5,894
8	204,490	187,038	91.5	5,163
9	220,559	193,708	87.8	4,448
10	235,234	198,149	84.2	4,168
11	248,389	200,307	80.6	3,997
12	257,356	202,935	78.9	3,414
13	266,903	205,093	76.8	3,223
14	276,382	204,522	74.0	2,589
15	285,453	207,152	72.6	2,351
16	295,670	213,052	72.1	1,972

## 添付資料 4

### 臨床獣医師における狂犬病臨床診断の現状

表1a. 犬の狂犬病臨床症状 鑑別比較

		感染症				
疾病名	ジステンパー症	ネオスポーラ症	破傷風	仮性狂犬病	クリプトコックス症	トキソプラズマ症
原因	<i>Distemper virus</i>	<i>Neospora caninum</i>	<i>Clostridium tetani</i>	豚ヘルペスウイルス ス1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
症状	咳・結膜炎 発熱 足趾の角化亢進 チツク てんかん	運行動調 麻痺 後肢の硬直	発熱・流涎 嚙下障害 開口障害 木馬様歩様 後弓反張	痲痺 痲痺 流涎 運動失調	斜頸 旋回運動 震顫 てんかん 脈絡網膜炎 皮膚潰瘍	発熱 食欲不振 ブドウ膜炎 てんかん
経過	慢性	慢性	急性	甚急性	慢性	慢性
診断	中和抗体 PCR 簡易検査キット	IFA 抗体価	臨床症状	FA ウイルス分離	墨汁染色 培養	虫体・オージストの証明 抗体価

表1b. 犬の狂犬病臨床症状 鑑別比較

		中毒	
疾病名	有機リン中毒	エチレングリコール中毒	ストリキニーネ中毒
原因	有機リン 呼吸困難 流涎 流涎 縮瞳 筋れん縮 てんかん	エチレングリコール 多飲多尿 嘔吐 鬱・痲痺 頻脈 呼吸数増加 乏尿性腎不全 抑うつ	ストリキニーネ 不穏 聴力・視力過敏 弱い刺激による痲痺 痲痺 呼吸筋緊張による窒息
経過	甚急性	←	←
診断	暴露歴 コリンエステラーゼ活性低下	← エチレングリコール証明	← 臨床症状

参考 動物の感染症, 清水悠紀臣ら編, 株式会社 近代出版 p.302-344  
器管系統別 イヌとネコの感染症マニュアル, 監訳 並河和彦, 株式会社インターズー p. 108-110, p. 246-258

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
 分担研究報告書  
 人獣共通感染症の組織診断における病原体の抗原性  
 （代表研究者:山田章雄）

分担研究者 岩崎琢也  
 （東京都神経科学総合研究所（前長崎大・熱帯医学研））

研究要旨 人獣共通感染症を病理学的側面より検査・解析する方法を開発し、未知の輸入感染症の診断に有用な手段を確立することを目的として研究を行ってきた。人獣共通感染症の代表的な病原体であるラブドウイルス科について検討した。この科に属するリッサウイルス属、ヴェシクロウイルス属、ラブドウイルス科の新しいウイルス属の特徴を有している Oita ウイルスの nucleoprotein (NP)の抗原共通性を検討し、リッサウイルス属には共通の抗原性が存在し、私たちが開発した抗狂犬病ウイルス nucleoprotein 抗体ではこの属(リッサウイルス属)に存在するウイルスは免疫組織学的には区別できないことを明らかにした。一方、パラミキソウイルス科の NP には抗原共通性が同じ属でも見られないことがあり、ウイルスの科によった共通抗原の検出系の開発が必要であることが明らかにされた。

#### A. 研究目的

人獣共通感染症を引き起こす可能性のあるウイルスならびに寄生虫の病理学的迅速診断法を開発することを目的として研究を行っている。人獣共通感染症の病原体は非常に多岐に及び、かつ引き起こされる病態も多様であり、個々の病態を病理組織学的に鑑別することも容易ではない。

米国においてネズミ由来のハンタウイルス肺症候群がアウトブレイクした際に、この未知の病原体が旧世界に浸淫している旧世界ハンタウイルスと抗原性が類似していることより、迅速に新しいハンタウイルスと突き止められている。このように病原体の共通抗原性は、組織学的鑑別においても病原体の候補を絞り込む上で有用である。

本分担研究では幾つかの病原体を対象として、各ウイルス科あるいはウイルス属に共通する抗原を認識する抗体を作製し、病理学的迅速診断法の開発ならびにその有効性ならびに限界を明らかにすることを目的とした。はじめにラブドウイルス科ウイルスの抗原共通性について報告する。

ウイルスによる人獣共通感染症の代表的病原体として狂犬病ウイルスがあるが、このウイルスには近縁のウイルスとして、同じ属(*lyssaviruses*)の *Lagos* コウモリウイルス、*Mokola* ウイルス、*Duvenhage* ウイルス、ヨーロッパコウモリウイルス

(*EBL*) 1, 2、オーストラリアコウモリウイルス等があり、同じ科に属し、異なる属のウイルスとしては、*Ephemeroviruses* と *Vesiculoviruses* がある。これらのいずれのウイルスも人獣共通感染症を引き起こしうるとみなされているが、臨床的に狂犬病の症状を哺乳動物に引き起こすのは *lyssavirus* に属するウイルスである。

私たちはこれまでに狂犬病ウイルスの nucleoprotein を認識する抗体を作製し、この抗体を用いることにより病理学的に狂犬病の診断が可能であることを発表してきた(Inoue S et al. *Cross-reactive antigenicity of nucleoproteins of lyssaviruses recognized by a monospecific anti-rabies virus nucleoprotein antiserum on paraffin sections of formalin-fixed tissues. Pathol Int.*

2003; 53(8):525-33)。この研究において、この抗体が他のリッサウイルスをホルマリン固定パラフィン切片上で検出できることを確認した。このことは臨床検体を免疫組織学的にこの抗体を使用して解析した場合、陽性となった場合、検体に感染していた病原体は必ずしも古典的狂犬病ウイルスのみと限らず、他のリッサウイルスである可能性があるということを意味している。近年の研究によりリッサウイルスには *Aragon* ウイルスのような新しい種の存在も明らかにされており、免疫組織学的に陽性となった場合、他の方法(ウイルス分離あるいは分子生物学的方法)により、組織内に感染しているウイルス種を鑑別する必要がある。

*lyssavirus* が属するラブドウイルス科の他の属

との抗原性について検討した。本邦で問題となるラブドウイルスとしては水疱性口内炎ウイルス (vesicular stomatitis virus (VSV))と本邦でコウモリから分離され、その性状を我々が明らかにした Oitavirus がある。これらのウイルスの抗原性について免疫組織学的に検討した。

次にパラミキソウイルス科ウイルスを認識する抗体パネルを樹立することにした。パラミキソウイルスはニパウイルスが含まれ、新興感染症として注目され、オオコウモリ、ブタ、ヒト等が感染することが明らかにされている。ニパウイルスが発見された際に、ヘンドラウイルスに対する抗体が用いられたようにパラミキソウイルス科には抗原共通性を有していることが明らかである。これまでに抗麻疹ウイルス NP 抗体、抗ニパウイルス NP 抗体、抗ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型 NP 抗体を樹立し、今年度は抗ヒトパラインフルエンザウイルス 1、2、4 型 NP 抗体、抗 RS ウイルス NP 抗体、抗ムンプスウイルス NP 抗体を作製することにした。パラミキソウイルスの系統樹から明らかかなようにこれらの抗体パネルを使用することにより、広範囲のパラミキソウイルスを検出することが可能である。

## I. ラブドウイルス科ウイルスの共通抗原性

### B 方法

感染実験 生後 1 週以内の乳のみマウスの脳内に狂犬病ウイルス、Mokola ウイルス、EBL-1、Dubenhage ウイルス、VSV、Oita ウイルスを脳内接種し、接種後 1、2 あるいは 3 日目に脳組織を採材した。

組織学的解析 採材した脳組織は 10%ホルマリンリン酸緩衝液にて固定し、定法によりパラフィン包埋し、厚さ 3  $\mu\text{m}$  の薄切切片を作製した。薄切切片を hematoxylin-eosin 染色により薄切切片を染色し、光学顕微鏡による観察を行った。

免疫組織学的解析 抗狂犬病ウイルス nucleoprotein (NP)抗体、抗 Oita ウイルスウサギ血清、抗 VSV ウサギ血清を用いて、免疫組織学的解析を行った。薄切切片を脱パラフィン後、0.3%過酸化水素・メタノール液中で内因性の peroxidase 活性を失活させ、必要に応じて抗原を賦活させ、正常ヤギ血清でブロック後、希釈段階を作製した一次抗体(ウサギ血清)と反応させ、linked streptavidin-peroxidase (LSAB)法により、結合した一次抗体を検出した。発色基質には diaminobenzidine を用い、核染色には methylgreen あるいは hematoxylin を使

用した。

### C & D. 結果と考案

抗狂犬病ウイルス NP 抗体は検索した狂犬病ウイルス、Mokola ウイルス、Dubenhage ウイルス、EBL-1 ウイルスを接種したマウスの脳組織の神経細胞が陽性となり、一方、非感染マウス脳、VSV 接種マウス脳、Oita ウイルス接種マウス脳は陰性であった。

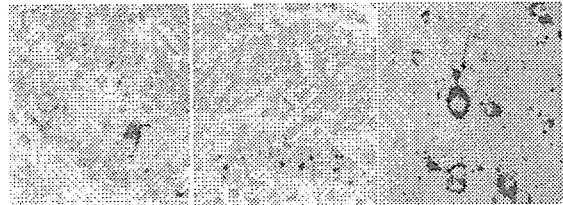


図 抗狂犬病ウイルス NP 抗体を用いて Mokola ウイルス接種脳(左)、Dubenhage ウイルス接種脳(中)、EBL-1 接種脳(右)を免疫組織学的に解析したところ、いずれの脳組織の神経細胞が陽性となった。

一方、VSV 抗体の解析では VSV マウス脳のみが陽性となり、リッサウイルス属ウイルス接種脳ならびに Oita ウイルス接種脳は陰性であった。Oita ウイルス接種脳組織は抗 Oita ウイルス抗体のみが陽性であった。以上の結果は明らかに異なる属のラブドウイルス科ウイルスには共通抗原性が殆ど無いことを示唆している。従って、抗狂犬病ウイルス NP 抗体を用いた免疫組織学的解析が陽性となった場合、組織内に存在するウイルスはリッサウイルス属で有る確率が非常に高く、この属に的を絞った分子生物学的解析により、感染した種を同定することが、最も高率の良い方法である。

## II. パラミキソウイルスの抗体パネル樹立

### B 方法

抗体作製:ヒトパラインフルエンザウイルス (HPIV)1、2、4 型、RS ウイルス、ムンプスウイルスより、定法により RNA を抽出し、random prime 法により cDNA を作製した。GenBank のデータベースに登録されている塩基配列に基づき、ウイルスゲノムのヌクレオプロテイン(np)遺伝子を増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、これを用いて np 遺伝子を増幅した。この設計の際には、GST 融合蛋白発現ベクター pGEX-3X のクローニング部位に reading frame がずれないように留意し、制限酵素切断箇所を挿入した。



それぞれのウイルスの np 遺伝子の塩基配列が挿入された組換え pGEX-3X は、dideoxy sequencing により塩基配列を解析した。定法により、レコンビナント GST 融合蛋白を発現させた。

一定量のレコンビナント蛋白を New Zealand ウサギにアジュバントと一緒に免疫し、抗体を作製した。

抗体の解析: 作製した抗体の特性に付いての解析は、最初にウサギを免疫するときを使用した抗原(レコンビナント蛋白)との western ブロット上で反応性を検討した。次に、それぞれのウイルスを接種した培養細胞あるいは動物組織での免疫学的反応性を検討した。

#### C & D. 結果と考案

目的としたそれぞれのウイルスの np 遺伝子を PCR により増幅し、発現ベクター pGEX-3X に組換えを行い、目的とする組換えプラスミドを作製した。挿入断片とその前後の塩基配列解析により frame shift が無く、問題となる変異が無い組換え体を用いて NP 蛋白を発現させた。それぞれの NP 蛋白約 100 µg を Freund アジュバントと一緒にウサギ皮下に接種し、4-5 回免疫し、血清を採取した。

採取した抗血清と免疫原に使用したレコンビナント NP 蛋白との western ブロット上の反応性はいずれも 2000 倍以上で陽性となり、免疫原により抗体が誘導されていた。

次に、HPIV1, 2, 4 のそれぞれについて、非感染細胞との反応が生じない至適希釈濃度で、接種した培養細胞とそれぞれの抗体の反応性を検討したところ、抗 HPIV1 抗体は HPIV1 のみと反応し、抗 HPIV2 は HPIV2 と、抗 HPIV4 抗体は HPIV4 と反応した。抗 RS ウイルス NP 抗体と抗ムンプスウイルス NP 抗体については現在検討中である。

以上のように、パラミキソウイルス科ウイルスの同じ属に分類されているウイルス種の NP に対して作製した抗体は必ずしも同属の他の種の NP を認識できないことが明らかとなった。

パラミキソウイルス科ウイルスのウイルスゲノムの np 遺伝子の塩基配列より予想される NP 蛋白にはある程度の相同性・類似性が見られるものの、検体の解析においては必ずしも検出できないことがあることが以上の様に判明した。この原因として、GST 融合蛋白として大腸菌に蛋白を発現させ、glutathione カラムで精製する場合、カルボキシル側のアミノ酸配列が大腸菌内の蛋

白分解酵素で切断され、アフィニティ精製では、落とされてしまうことが挙げられる。したがって、リッサウイルス属ウイルスの NP 蛋白は大腸菌内でも非常に安定で、容易に精製できたのに対し、パラミキソウイルス科ウイルスの NP 蛋白は大腸菌での発現量が少なく、発現蛋白も予想サイズを下回ることが多かったことも、この事実を指示する。今後さらに、確実に全長蛋白を発現させ、免疫することによりこのポイントが明らかになると予想する。しかしながら、ほぼ全長の NP 蛋白を発現することができた抗 HPIV3 NP 抗体を用いても HPIV1 との感染細胞との抗原交差性は非常に乏しく、リッサウイルスのような共通抗原性はあまり見られないのかもしれない。いずれにしても、現時点ではパラミキソウイルスの NP 蛋白に対する抗体は種特異的であることが多く、広範囲のウイルスを容易に免疫組織学的に検出するには、さらに検討する必要がある。

上記の研究以外に、熱帯地域に特に浸淫している病原体のゲノム DNA の収集を行ってきた。これまでにヒトならびにサルの *Plasmodium* 原虫、ウシを自然宿主とし、インドならびにタイにおいて人体感染が確認された *Trypanosoma evansi*、ヒトを自然宿主とする *Trypanosoma brucei*、広東住血線虫のゲノム DNA を収集し、これらの病原体の侵入した際の分子生物学的解析の陽性コントロールを準備した。

#### E. 結論

臨床検体の免疫組織学的解析において、抗狂犬病ウイルス NP 抗体で陽性となった場合はリッサウイルス属ウイルスが感染しているものと判断し、他の方法により感染したリッサウイルスの種を同定する必要がある。一方、パラミキソウイルス科のウイルスでは同じ属とされる種間でも抗 NP 抗体を用いた抗原解析では共通抗原性を検出できないことがあり、パラミキソウイルス科の同定には非常に多種類の抗体を用いた解析が必要である。

#### F. 健康危機情報 なし

#### G. 知的所有権の取得状況 なし

H. 研究発表

1. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Iwasaki T, Kanbara H, Hughes AL. Ancient common ancestry of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* as inferred from its homologue in *Plasmodium knowlesi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2006 Mar;146(1):105-8. Epub 2005 Nov 22.
2. Yoshikawa T, Iwasaki T, Ida-Hosonuma M, Yoneyama M, Fujita T, Horie H, Miyazawa M, Abe S, Simizu B, Koike S. Role of alpha/beta interferon response in the acquisition of poliovirus susceptibility of kidney cells in culture. *J. Virol*. 2006 May, 80 (9): 4313-4325

□

平成18年度 厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

動物インフルエンザの血清学的サーベイランス手法の開発に関する研究

分担研究者：北海道大学大学院獣医学研究科 動物疾病制御学講座 教授 喜田宏

**研究要旨：** 高病原性鳥インフルエンザはアジア地域だけでなく、ヨーロッパ、アフリカ諸国においても発生が報告され、被害が拡大している。現在流行しているH5N1亜型のウイルスによるヒトへの感染・死亡例も報告され、新型インフルエンザウイルスの出現が危惧されている。鳥インフルエンザウイルスを含む動物インフルエンザウイルスのヒトへの感染の危険を低減させるためには、動物インフルエンザのサーベイランスとそれらの成績に基づく動物の疾病コントロールが重要である。よって動物インフルエンザの血清学的診断法を開発し、サーベイランス体制を整備することが本研究の目的である。動物用のインフルエンザワクチンはヒトと同様に不活化ワクチンが用いられている。よって、血清学的サーベイランスを実施する場合、野外感染による抗体とワクチン接種による抗体を識別する必要がある。この抗体識別技術を確認するために、非構造蛋白NS1を抗原としたELISA法の確立を目指している。今年度は鳥インフルエンザ発生農場および製造許可を取得したワクチンを接種したニワトリの血清を用いて本抗体検出系の有用性を確認した。これらの成績より、NS1抗体を検出する抗体サーベイランス法が動物インフルエンザの血清疫学に有用であることが実証された。

#### A. 研究目的

高病原性鳥インフルエンザはアジア地域だけでなく、ヨーロッパ、アフリカ諸国においても発生が報告され、被害が拡大している。現在流行しているH5N1亜型のウイルスによるヒトへの感染・死亡例も報告され、新型インフルエンザウイルスの出現が危惧されている。鳥インフルエンザウイルスを含む動物インフルエンザウイルスのヒトへの感染の危険を低減させるためには、動物インフルエンザのサーベイランスとそれらの成績に基づく疾病のコントロールが重要である。本研究は動物インフルエンザの血清学的診断法を開発し、サーベイランス体制を整備することを目的としている。

ヒトと同様に動物用のインフルエンザワクチンは不活化ワクチンが用いられている。血清学的サーベイランスを実施する場合、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。そのためにウイルス非構造蛋白NS1を組換え蛋白として発現し、これを抗原としたELISA系によって感染抗体のみを検出する方法を開発することとした。本年は2005年に茨城県で発生したH5N2亜型のウイルスによる鳥インフルエンザ発生農場の血清を用いて本ELISA系の有用性を評価した。さらに当研究室と国内の

ワクチンメーカーとの共同開発により製造承認を取得した鳥インフルエンザ国産ワクチンを接種したニワトリも同様にNS1抗体の検出を試み、ワクチン抗体と感染抗体の識別が可能であることを実証することとした。

#### B. 研究方法

2005年茨城県でH5N2亜型のウイルスによる鳥インフルエンザの発生が報告された。これらの発生農場のニワトリ血清を動物衛生研究所より分与を受け、抗NS1抗体の検出を試みた。この抗NS1抗体検出の成績とウイルス分離、ゲル内沈降反応による抗体検出、赤血球凝集阻止試験（HI）試験による抗体検出の成績と比較した。

当研究室と国内のワクチンメーカーとの共同開発により鳥インフルエンザ国産ワクチンの製造が本年1月に承認された。本ワクチンを健康ニワトリに接種し、発症防御に十分な抗体上昇を確認した。さらに、これらのニワトリの血清中から抗NS1抗体が検出されないことをELISAで確認した。

#### C. 研究結果

H5N2亜型のウイルスが分離された農場では多くのニワトリから抗NS1抗体が検出さ

れた。これらの抗NS1抗体陽性サンプルは、ゲル内沈降反応やHI試験でも陽性となる個体が大半であった。また、ウイルスが分離できなかった農場からも抗NS1抗体が検出された。これらの抗体陽性サンプルはゲル内沈降反応やHI試験でも陽性となる個体が多く、両試験間には高い相関があることが確認された。昨年本研究で報告したように、A/chicken/Ibaraki/1/05 (H5N2)を接種したニワトリは高病原性鳥インフルエンザに特徴的な臨床症状を示すことなく全てのニワトリが感染に耐過し、抗体の上昇のみが確認された。以上より、ウイルス分離陰性の農場でも感染抗体である抗NS1抗体が検出されたことから、これらの農場でも過去に鳥インフルエンザウイルスの流行があったと考えられる。

国内での製造が認可されたH5亜型鳥インフルエンザに対するワクチンを4週齢のニワトリに接種し、抗体価の上昇を観察した。その結果、抗体はワクチン接種8日目以降より検出され、接種6週目頃にピークに達することがHI試験の結果から明らかになった。これらのワクチン接種ニワトリの血清からは抗NS1抗体の検出を試みたが、調べたサンプルは全てELISAで抗体陰性と判定された。

これらの結果と昨年度までの成績をまとめると、抗NS1抗体ELISAは鳥インフルエンザウイルスの感染抗体のみを特異的に検出し、製造認可されたワクチンによる抗体との識別が可能であることが確認された。

#### D. 考察

鳥インフルエンザウイルスの防疫はワクチン接種を行わず摘発淘汰を基本としている。しかし、発生が拡大した場合、他農場への拡大防止およびヒトへの感染の機会を減らすためにワクチン接種により環境中のウイルス濃度を軽減する必要がある。このようなワクチンを野外で使用した場合、鶏群が保有する抗体がワクチン接種によるのか野外感染によるのか識別する必要がある。本研究で確立した抗体サーベイランス系はこのような事態に大きな力を発揮するものと期待される。今後は、ニワトリの種類、加齢による影響などを十分考慮した上で抗NS1抗体検出系をキット化し、全国の野外抗体調査で応用可能にするための実証試験、野外評価試験を積み重ねていく必要がある。

#### E. 結論

人獣共通感染症であるインフルエンザのウイルス感染抗体とワクチン抗体を識別する技術確立するために、NS1蛋白を抗原としたELISAの開発を試みた。感染実験材料を用いた成績から、本ELISAは感染抗体とワクチン抗体を識別することができる技術であることがわかった。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Bai GR, Sakoda Y, Mweene AS, Fujii N, Minakawa H, Kida H (2006) Improvement of a rapid diagnosis kit to detect either influenza A or B virus infections. *J Vet Med Sci* 68: 35-40
- (2) Isoda N, Sakoda Y, Kishida N, Bai GR, Matsuda K, Umemura T, Kida H (2006) Pathogenicity of a highly pathogenic avian influenza virus, A/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1) in different species of birds and mammals. *Arch Virol* 151: 1267-79
- (3) Kida H, Sakoda Y (2006) Library of influenza virus strains for vaccine and diagnostic use against highly pathogenic avian influenza and human pandemics. *Dev Biol (Basel)* 124: 69-72

##### 2. 学会発表

- (1) 「鳥インフルエンザワクチンの開発 1. H5N1ウイルス不活化ワクチンの免疫効果」磯田典和、迫田義博、曾田公輔、坂部沙織、今村孝、扇谷年昭、喜田宏 第54回日本ウイルス学会学術集会 (2006年、名古屋)
- (2) 「A/chicken/Ibaraki/1/05 (H5N2)株のニワトリ、アイガモおよびミニブタに対する病原性」迫田義博、津田祥美、喜田宏 第54回日本ウイルス学会学術集会 (2006年、名古屋)

#### H. 知的財産の出願、登録状況

予定なし。

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

国内ラットにおける鼠咬症原因菌の保有状況調査

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	木村 昌伸	国立感染症研究所	獣医科学部	第1室研究員
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	谷川 力	イカリ消毒株式会社	技術研究所	所長
協力研究者	神山 恒夫	国立感染症研究所	獣医科学部	第1室長

研究要旨：鼠咬症原因菌の1つであり、ラットの口腔内から検出される *Streptobacillus moniliformis* は、咬傷や掻き傷、排泄物に汚染した水や食物の摂取によりヒトに感染することがある。国内野生ラット（ドブネズミおよびクマネズミ）の口腔内における *S. moniliformis* 保有状況の調査を行ったところ、ドブネズミで92%、クマネズミで58%が保菌していた。分離株の16S-rRNAの遺伝子配列を比較したところ、ドブネズミとクマネズミでは異なる株を保有し、さらに、クマネズミには2種類の株があることが明らかとなった。

#### A. 研究目的

鼠咬症の原因菌の1つである *Streptobacillus moniliformis*（グラム陰性、多形性桿菌、好気性もしくは通性嫌気性）は主にラットの口腔内に存在する。ヒトにおける感染は、アメリカ大陸ほか、世界中で報告されているが、日本でも死亡例が報告されている。ヒトへの感染経路は、感染ラットによる咬傷、接触、その他汚染したものによる経口感染である。発熱、悪寒、筋肉痛、関節痛、四肢の斑状丘疹状発疹、敗血症性関節炎などが主な症状であり、治療を行わない場合の致死率は10%とされる。診断は、血液、関節液、発疹滲出液の培養によりおこなうが、栄養要求の厳しい細菌であり、一般的な組成の培地による培養は困難である。感染時に有効とされる薬剤としては、ペニシリン、アンピシリン

ン、テトラサイクリンなどがある。

国内における鼠咬症の危険性を確認する目的から、前年度に引き続き *S. moniliformis* 検出法の確立、および屋外と屋内の野生ラットにおける保菌状況の調査を行い、また、各々より分離した株の16S-rRNAの遺伝子配列を比較・検討した。

#### B. 研究方法

1. サンプル（口腔内スワブ）：野生ラットを捕獲し、口腔・咽頭スワブを、BD BBL カルチャースワブ・プラス（#212553）を用いて採取した。屋外捕獲ラットは、いずれもドブネズミ（*Rattus norvegicus*）であった。屋内捕獲ラットは、2匹がドブネズミであったが、ほかはすべてクマネズミ（*Rattus rattus*）であった（Table 1）。

2. サンプル処理と培養：スワブを1 mlの *S. moniliformis* 用ウマ血清添加液体培地 (ATCC medium 488 broth) に希釈し、このうち10ulをウマ血清添加寒天培地 (ATCC medium 488 agar) で、37°C、5% CO<sub>2</sub>存在下および微好気下で培養し、残りはATCC488 broth 8 mlを用いて37°C、5% CO<sub>2</sub>存在下で培養した。その後の分離培養は、colisin-nalidixic acid と sulfamethoxazole-trimethoprim を含む ATCC488 agar を用いて、嫌気条件下で行った。

陽性対照菌株として、ATCCより *S. moniliformis* ATCC14647、ATCC49567、ATCC49940 株を入手し用いた。

3. DNAの検出：一晚培養後のATCC488 broth 1 mlの遠心沈査、ならびに適宜培養後のATCC488 agar上のコロニーを少量(50-100ul)のTEに溶解し熱変成後、特異性の高いS5およびAS2プライマー (Table 2) を用いてPCRを行った。PCR産物はアガロースゲル電気泳動し、目的サイズのバンドをゲルより切り出し、DNAを抽出した後、ABI3100を用いてプロトコールに従い遺伝子解析を実施しシーケンスの確認を行った。

分離株に関しては、16S-rRNAのユニバーサルプライマー (27f, 1492r) とS5、AS2を適宜組み合わせることでテンプレートを作成し、遺伝子解析を行った。

## C. 研究結果

1. PCR用プライマーの特異性：従来のS/ASプライマーでは近縁な *Fusobacterium* や *Leptotrichia* で非特異的な増幅反応を示した。しかし、我々の作成したS5/AS2プライマーは *Fusobacterium*、*Leptotrichia*、また、その他の細菌においても非特異的の反応を示さず、特異性が高かった (Table 3、Fig 1)。

2. *S. moniliformis* の分離： ドブネズミより 3

株、クマネズミより2株、菌株を得た。これら分離菌株はATCC488 brothで培養すると、典型的なパフボール様の形態を示した。また、顕微鏡下では、グラム陰性、多形性の桿菌で、中央部のふくらんだフィラメント状のbizarre formが混在した (Fig. 2)。

3. 遺伝子解析： 分離株の16S-rRNAの遺伝子配列を比較したところ、ドブネズミはATCC14647株 (Z35305) と高い相同性を示した (Fig. 3)。一方、クマネズミはドブネズミと異なる配列を示し、またクマネズミの中でも2種類の株があった (Fig. 3)。各々の配列の相違は50-300bp付近に多く認められた。S5/AS2陽性サンプルのうちドブネズミ32匹とクマネズミ10匹について、S/ASプライマー増幅領域 (39-317bp) の配列を比較した。その結果、ドブネズミはすべて分離株と同様の配列を示し、また、クマネズミではやはり2種類の配列が見られた。

## D. 考察

ヒトの *S. moniliformis* 感染は世界中で知られ、米国だけでも200例以上の報告がある。2001年の日本での死亡例は、野生ラットの駆除を行った際に感染したと考えられている。今回、国内の野生ラットが *S. moniliformis* を高率に保菌していることが確認された。近年では、これら野生ラットが都市の住宅地、飲食店街等へ侵入することによる衛生被害が問題になってきている。そのため、今後、野生ラットによる咬症、飲食物の汚染を原因とするヒトの *S. moniliformis* 感染が懸念される。

また、今回の検討によりドブネズミとクマネズミでは保菌している *S. moniliformis* 株が異なっていることが明らかとなった。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など、詳細の検討については今後の課題である。

## E. 結論

国内の野生ラット（ドブネズミおよびクマネズミ）の *S. morbiliformis* の保菌状況の調査を行い、高率に保菌していることを明らかにした。患者の報告は定かではないが、今後、感染例が出て不思議ではないと考えられた。また、ドブネズミとクマネズミでは、保菌している *S. morbiliformis* 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) Domestic wild rats used in this study  
and the results of PCR with S5/AS2 primers**

	n	PCR Positive	Positive (%)
<b>Norway rat (<i>Rattus norvegicus</i>)</b>			
Toshima-ku Tokyo	5	5	100
Numazu City	1	1	100
Yokohama City A	10	10	100
Yokohama City B	11	9	82
Yokohama City C	1	0	0
Suwa City	1	1	100
Hitachinaka City	11	11	100
Choushi City	10	9	90
Itabashi-ku Tokyo	15	15	100
Hachiouji City	1	0	0
<b>Total</b>	<b>66</b>	<b>61</b>	<b>92</b>
<b>Black rat (<i>Rattus rattus</i>)</b>			
Shinjuku-ku Tokyo A	15	8	53
Shinjuku-ku Tokyo B	1	0	0
Toshima-ku Tokyo	6	2	33
Ogasawara-mura Tokyo	1	1	100
Kawagoe City	29	19	66
<b>Total</b>	<b>52</b>	<b>30</b>	<b>58</b>

**Table 2) Primer design used in this study**

Primer name	Sequence	Target Length	Location
S5	5' - CATACTCGGAATAAGATGG	269bp	965-983
AS2	5' - GCTTAGCTCCTCTTTGTAC		1233-1215
S	5' - GCTTAACACATGCAAATCTAT	296bp	39-59
AS	5' - AGTAAGGGCCGTATCTCA		334-317

Genbank: Z35305

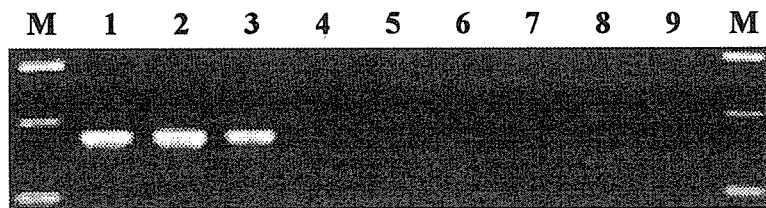


Table 3) Bacterial strains used in specificity confirmation of PCR primers and the results

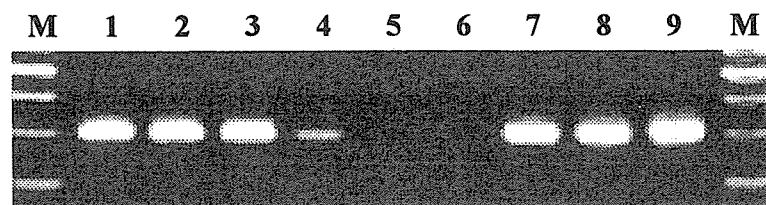
Bacterial species	PCR Results	
	S5/AS2	S/AS
<i>Streptobacillus moniliformis</i> ATCC14647	+	+
<i>Streptobacillus moniliformis</i> ATCC45567	+	+
<i>Streptobacillus moniliformis</i> ATCC49940	+	+
<i>Bacillus anthracis</i> PAII	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-
<i>Brucella abortus</i> 1 544	-	-
<i>Brucella canis</i> QE13	-	-
<i>Brucella melitensis</i> 1 16M	-	-
<i>Brucella suis</i> 1 1330	-	-
<i>Capnocytophaga canimorsus</i> ATCC35979	-	-
<i>Capnocytophaga cynodegmi</i> ATCC49044	-	-
<i>Capnocytophaga sputigena</i> ATCC33612	-	-
<i>Coxiella burnettii</i> Nine Mile	-	-
<i>Escherichia coli</i> DH5 alpha	-	-
<i>Francisella tularensis</i> LVS	-	-
<i>Fusobacterium</i> sp.	-	+
<i>Haemophilus influenzae</i> Type B	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp <i>pneumoniae</i>	-	-
<i>Leptotrichia</i> sp.	-	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-	-
<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC49187	-	-
<i>Pasteurella aerogenes</i>	-	-
<i>Pasteurella aerogenes</i> ATCC27883	-	-
<i>Pasteurella canis</i> ATCC43326	-	-
<i>Pasteurella dagmatis</i> ATCC43325	-	-
<i>Pasteurella gallinarum</i> ATCC13361	-	-
<i>Pasteurella multocida</i> ATCC12947	-	-
<i>Pasteurella multocida</i> ATCC51687	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> spp <i>aureus</i>	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> Pa177	-	-
<i>Yersinia pestis</i> Yreka	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> 319	-	-

**Fig. 1) Specificity of PCR primer**

**a) S5-AS2 (269bp)**



**b) S-AS (296bp)**



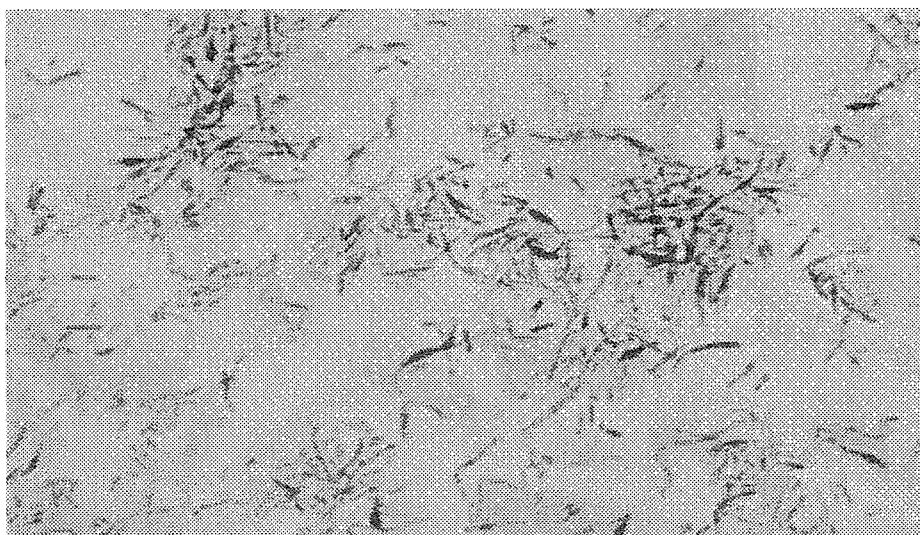
**M : Marker**

**Lane 1-3 : *S. moniliformis* (ATCC strains)**

**Lane 4-6 : *Fusobacterium sp.***

**Lane 7-9 : *Leptotrichia sp.***

**Fig. 2) *S. moniliformis* isolated from oral cavity of *Rattus norvegicus***



**(Gram-stained/ ATCC488 broth/ 24h/ 5% CO<sub>2</sub>/ 35°C)**

**Fig. 3) 16S-rRNA sequences of *S. moniliformis* isolates from domestic wild rats**

1	1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGACAGAATGCTTAACACATGCAAATCTATG	719	AACTGACGCTGAAGTGCGAAACGTAGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCT
2	1	.....	719	.....GC.....
3	1	.....	719	.....GC.....
4	1	.....A.....	719	.....GC.....
5	1	.....	719	.....GC.....
60		TATGAAATGTAAGCTTGCTFACATAGACTACATGGTGGACTGGTGAACGTGTAAGA	779	AGCTGTAACGATGATCACTGGGTGTGGGGTGTGAAGCCTCTGTGCCGAAGCAAAAGCG
60		.....	779	.....
60		.....	779	.....
60		.....IAATL.AC.....G.....AGAG.....	779	.....
60		.....TAATT.....G.....ACAG.....	779	.....
120		ACTTACCTCTTAGACTGGGATAACCAATTAGGAAATGATGGATAAATACTAGATAATTATTAG	839	ATAAGTGATCCGCCTGGGGAGTACGTACGCAAGTATGAACTCAAAGGAATTGACGGGGA
120		.....	839	.....
120		.....G.....C.....A.....	839	.....
120		.....	839	.....
180		TAGTAGGCATCTACTATTAATGAAAGGAGAGATTGCTAAGAGAGAGCTTTGCATCCTATT	899	CCCGCACAGTGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGACGCAACGCGAGGAACCTTACAGGT
179		.....	899	.....
179		.....TA.....A.....TA.TTT.....	899	.....
179		.....A.....G.....T.....	899	.....
240		AGCTAGTTGGTGGGTAAGGGCTACCAAGGCTATGATAGGTAGCCGCCCGAGAGG-TG	959	CTTGACATACTCGGAATAAGATGAAGCATCTTAGTGCCTTTGGGAACCGAGATACAGGT
239		.....G.....	959	.....
239		.....G.....	959	.....
239		.....G.....	959	.....C.....
239		.....G.....	959	.....C.....
299		AACGGCCACAAGGGGACTGAGATACGGCCCTACTCCTACGGGAGGACAGTGGGGAAT	1019	GGTGCATGGCTGTCGACAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACBAGCGA
299		.....	1019	.....
299		.....	1019	.....
299		.....	1019	.....
359		ATTGGACAATGGAGGAACTCTGATCCAGCAATCTGTGTGCACGAAGAAGTTTTCGGA	1079	AACCCCTATCATTAGTGCATCATTAAGTTGGGSACTCTAATGAACTGCCCGCAGCA
359		.....	1079	.....
359		.....C.....	1079	.....
359		.....	1079	.....
419		TTGTAAGTGCTTTCAGTAGGGGAAGAGAAGATGACGGTACCTACAGAAGAGCGCGGC	1139	GCAGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAITTC-TGCCCTTATGATCTGGGTACACA
419		.....	1139	.....A.....
419		.....	1139	.....G.....A.....
419		.....AG.....	1139	.....G.....A.....
479		TAAATACGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGTATGTCGAAGCGTTATCCGGAATTATTGG	1199	CGTGCACAATGGTAGTACAAGAGGAGCTAAGCAGTGTGTGGAGCAAACTTTCAA
479		.....	1199	.....
479		.....	1199	.....
479		.....	1199	.....A.....
539		GCTTAAAGGCATCTAGCGGTCTAACCAAGTTGAAGGTGAAAAGCTGTGGCTCAACCATA	1258	GCTACCTCAGTTCGGATTGAAGTCYCAACICGACTTCATGAAGTGGAAATCACIAGTA
539		.....	1258	.....
539		.....	1258	.....
539		.....	1258	.....
599		GTCTTGCCACAAAACGTGACACTAGACTGGAAGGTGGTGGAACTACACGAGTA	1318	ATCGCAAAATCAGCAATGTTGCGGTGAATACGTTCTCGGGTCTGTACACACCGCCGTC
599		.....	1319	.....
599		.....	1317	.....
599		.....	1319	.....
599		.....	1318	.....
659		GAGGTGAAATTCGTAGATAAGTGTAGCAAAGCCGATGATGAAGAIACTCACIGGACAGA	1378	CACCACGAGAGTTAGTGCACCTGAAGTTACTGGCTAACCCGTAAGGGAGGGAAGTACC
659		.....	1379	.....
659		.....	1377	.....
659		.....	1379	.....
659		.....	1378	.....
			1438	TAAGGTGTGATTAGTATTGGGGTGAAGTCGTAACAAAGGTAGCCGTA
			1439	.....
			1437	.....
			1439	.....
			1436	.....

Lane 1: Genbank (Z35305), Lane 2-3: Isolates from *Rattus norvegicus*, Lane 4-5: Isolates from *Rattus rattus*

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 新田芳樹 沖縄県家畜衛生試験場 研究員  
研究協力者 廣瀬和彦 明治製菓生物産業研究所 研究員

研究要旨

1. 大日本猟友会の協力により、1道8県のシカ腎臓32検体、また11県のイノシシ腎臓45検体からレプトスピラ遺伝子 *flaB* の検出を行ったところ、シカ腎臓2検体およびイノシシ腎臓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、*L. interrogans* (6検体) および *L. borgpetersenii* (3検体) と同定された。
2. 東京都の2ヶ所で捕獲したドブネズミそれぞれ4匹と1匹からレプトスピラが分離された。*flaB* 塩基配列からこれら分離株は *L. interrogans* と同定された。
3. ブタのレプトスピラ抗体の簡便な検出のため、レプトスピライムノグロブリン様タンパク質を抗原とした ELISA の評価を行った。レプトスピラ症血清診断標準法の顕微鏡下凝集試験 (MAT) 結果との比較から、ELISA の感度、特異度、陽性的中率および陰性的中率は、それぞれ 33.3%、82.1%、13%、94.7% となった。また本試験における沖縄県のブタの MAT によるレプトスピラ抗体保有率は 7.8% であった。
4. 東京都動物愛護相談センターに収容されたイヌの腎臓、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。

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)におけるレプトスピラ保有状況を調査した。またブタのレプトスピラ抗体の簡便な検出のため、レプトスピライムノグロブリン様タンパク質を抗原とした ELISA の評価を行った。

方法

1. レプトスピラの分離培養およびシ