

表2 抗体調査に供試した検体

捕獲地	動物種			計	地域別 計
	ウサギ	ラット	クマ		
北海道	0	97	0	97	97
青森	10	0	0	10	
秋田	21	0	0	21	
岩手	11	0	62	73	159
山形	12	0	0	12	
福島	8	0	0	8	
新潟	35	0	0	35	
高知	12	0	0	12	
宮崎	3	0	0	3	26
鹿児島	11	0	0	11	
計	123	97	62	282	282

ウサギ : *Lepus brachyurus*

ラット : *Rattus norvegicus* および *Rattus rattus*

クマ : *Ursus thibetanus japonicus*

表3 各種動物における抗体調査結果

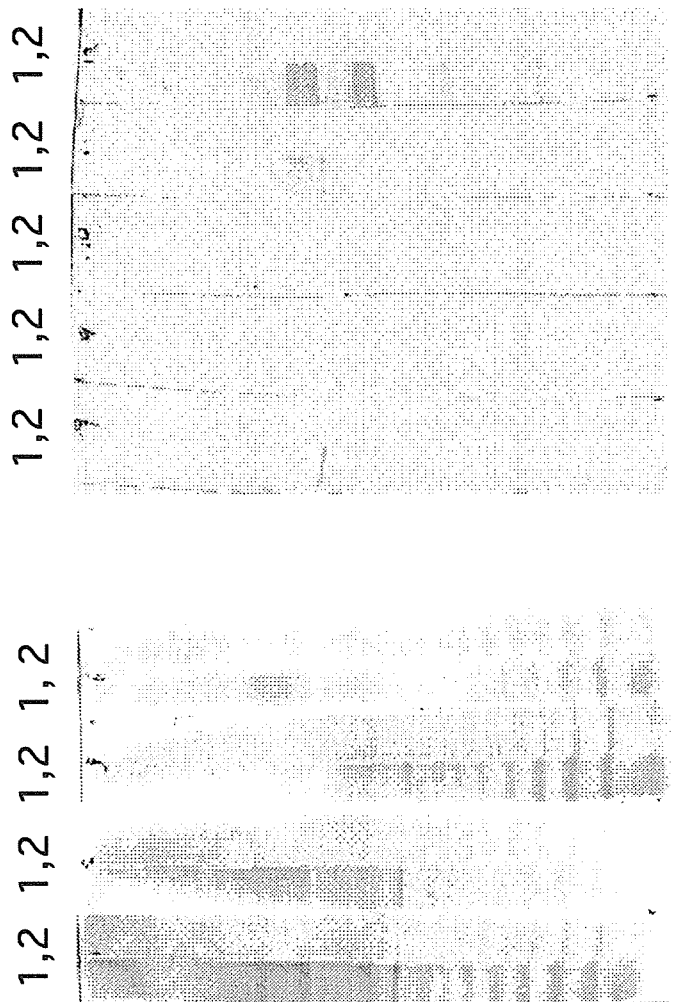
動物種	由来 地域	スクリーニング (陽性数/検体数)				WB	判定		
		ELISA		MA					
ウサギ	青森	0	10	NT	0	10	0	0	
	秋田	0	21	NT	0	21	0	0	
	岩手	0	11	NT	0	11	0	0	
	山形	0	12	NT	0	12	0	0	
	福島	2	8	NT	2	8	0	0	
	新潟	3	35	NT	3	35	0	0	
	高知	1	12	NT	1	12	0	0	
	宮崎	0	3	NT	0	3	0	0	
	鹿児島	0	11	NT	0	11	0	0	
	小計		6	123	NT	6	123	0	0
ラット	北海道	3	97	NT	3	97	0	0	
クマ	岩手	7	62	2	48	7	62	4	4

ELISA : 平均+2SD以上のOD値を示した検体を陽性とした。

MA : 凝集力価40倍以上を陽性とした。

WB: 精製LPSを抗原とした

NT: not tested



判定

+ + + + +

クマ血清
(1000倍希釈)

ウサギ血液
(100倍希釈)

レーン1 : *F. tularensis* 全菌体
レーン2 : *F. tularensis* 精製LPS

野生動物検体のウエスタンブロット像の一例

使用検体は全てスクリーニングにて陽性と判定された検体
クマ検体は一樣にLPS様梯子状バンドを呈したが、ウサギ検体の反応は多様であった。

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

野兎病菌の亜種および株鑑別に有用な遺伝子マーカーの検討(続報)

分担研究者 藤田 修 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官

協力研究者 棚林 清 国立感染症研究所 獣医科学部 室長

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

山本美江 国立感染症研究所 獣医科学部 研究員

研究要旨:野兎病の起因菌である *Francisella tularensis* の亜種や菌株の鑑別に有用な遺伝子マーカーの検討を行った。*F. tularensis* subsp. *holarctica* のゲノム DNA に存在する縦列反復配列構造を含む8領域について国内外由来の菌株を解析した結果、Ft-V2 と Ft-V4 の両領域で国内外由来株間に繰返し回数(アリアル数)や塩基配列に特徴があり、さらに Ft-M2 と Ft-M20 の2領域を併せて解析することで、国内株間での鑑別が可能となり、これらの領域は株の鑑別に有用な遺伝子マーカーになりうることを示唆された。

A. 研究目的

野兎病の起因菌として、野兎病菌(*F. tularensis*)のうち、主に北米に分布する強病原性の *F. tularensis* subsp. *tularensis* とユーラシア大陸から北米にかけて広く分布する病原性がやや弱い subsp. *holarctica* が主に分離されている。近年、国内の野兎病の発生は極めて稀だが、今後国内で野兎病菌が検出された場合、その感染源や感染経路を明らかにするために分離菌の亜種の鑑別や株の鑑別は、感染症対策のための疫学情報として重要である。我々は、国

内で分離された野兎病菌(subsp. *holarctica*)のゲノム DNA に存在する縦列反復配列(tandem repeat)領域の解析を行い、このうち2領域(Ft-V2 と Ft-V4)が国内外由来株間の鑑別に有用な遺伝子マーカーである事を報告した。

本研究では、さらに多くの *F. tularensis* subsp. *holarctica* の国内外分離株を解析し、国内株の遺伝子配列構造の特徴を調べ、また国内の分離株間の鑑別に有用な遺伝子マーカーの検討を行った。

B. 研究方法

Farlow ら(2001)が報告した縦列反復配列を含む 6 領域に加え、Johansson ら(2004)が報告した野兎病菌ゲノム DNA に存在する縦列反復配列の新たな 2 領域(Ft-M2 と Ft-M20)の計 8 領域を検討した。

国内外由来の *subsp. holarctica* 44 株(33 国内分離株と 11 海外株)について PCR 増幅とその塩基配列の解析を行い、各領域での国内株の配列の特徴を調べ、さらにこれらを外国株での結果と比較し、国内外株間および国内株間の区別に有用な領域を選択した。

C. 結果

解析した 8 箇所の縦列反復配列領域のうち 4 領域では、国内株と海外株のいずれにおいてもほぼ同じ繰返し配列数を有しており明瞭な差は認められなかった。一方、Ft-V2、Ft-V4、Ft-M2 と Ft-M20 の 4 領域において国内株と海外株間にそれぞれ特徴的な縦列反復配列構造が認められた(表 1)。

即ち、Ft-V2、Ft-M2 と Ft-M20 領域において海外株では各々 2 回、2 回および 3-4 回とほぼ均一の構造であったが、国内株間では 2-22(アリアル数; 15) 回、2-24(14) 回および 3-18(9) 回と変化に富んだ縦列反復配列構造を示した。

一方、Ft-V4 領域では、国内株の 2 株

(Kokuchi 株と Aichi 株)を除く全てが 3 回の縦列反復配列とほぼ均一構造だったのに対し、海外株で 10-21 回(アリアル数; 8)の縦列反復配列と変化に富み、国内株とは明瞭な差が認められた。Ft-V4 の縦列反復配列は 3 アミノ酸残基(Asn-Lys-Asp)をコードしており、その塩基配列には異なるモチーフがある。塩基配列の解析の結果、ほとんどの国内分離株はモチーフ A (AACAAAGAC) が 1、モチーフ C (AATAAGGAT) が 2 の計 3 回の縦列反復配列だったのに対し、反復配列数が異なった Kokuchi 株ではモチーフ A が 4、モチーフ C が 13 の計 17 回、Aichi 株ではモチーフ A が 5、モチーフ C が 21 の合計 26 回の縦列反復配列だった。但し、同じ縦列反復配列数を有する海外株からこれらのモチーフの組合せ配列構造は認められなかった。

解析した 8 領域での全縦列反復配列数を基に平均距離法(UPGMA)を用いて系統樹を作成した(図 1)。その結果、国内株と Kokuchi 株と Aichi 株を含む海外株が各々異なるクラスターを形成していた。

D. 考察

野兎病菌の種・亜種・株の分類は、これまで地理的、生物学的あるいは生化学的特性により行われてきた。野兎病菌に特徴的な遺伝子配列が明らかになるに従い、16S リボゾーム RNA 遺伝子、

外膜蛋白質(*fopA*)または主要膜蛋白質(*tu14*)遺伝子を対象としたPCR法により属や種の同定が可能となった。しかし、これらの方法は、分離菌の亜種や菌株の鑑別には不十分である。本研究では、野兔病菌の亜種さらには菌株鑑別のための遺伝子マーカーの検討を行った。

F. tularensis subsp. *holarctica*の国内外分離菌株が有する縦列反復配列構造の特徴を調べた結果、Ft-V4と国内株内で最もアリアル数の多い(=変化に富む配列構造を示す)Ft-V2の両領域における縦列反復配列の回数と塩基配列を併せて解析することで国内分離株と海外株との区別や菌株の鑑別が可能であり、さらにFt-M2およびFt-M20の両領域の縦列反復配列構造を解析する事で国内で分離された株の鑑別に有用な遺伝子マーカーとなりうる事が示唆された。またクラスター解析の結果、国内株において、1954年に福島県内のダニ2種から分離されたTI株とTH株の両株の区別がつかず由来が同一か否かの判定は不能であったが、それ以外の31株はの由来は全て異なると推察された。

国内株の中にも、海外株と類似した縦列反復配列構造を示した株(Kokuchi株やAichi株)が存在する事が明らかとなった。Kokuchi株はロシア由来の2株と近縁関係にあり、またAichi株については今回検討した全株内にこの株と近縁の株はないと推察された。今後分離菌の

同定等に関してはより慎重に行う必要がある。

E. 結論

野兔病菌の亜種鑑別や株鑑別に有用な遺伝子マーカーの検討を行った結果、*F. tularensis* subsp. *holarctica*における8領域の縦列反復配列構造について国内外由来の株を解析した結果、Ft-V2とFt-V4の2領域で反復配列の回数や塩基配列に特徴があり、国内外由来株の鑑別に有用な遺伝子マーカーになりうる事が示唆された。さらにFt-M2とFt-M20の2領域を解析する事で国内分離株間の鑑別が可能である事が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) Fujita O., Tatsumi M., Tanabayashi K., Yamada A. Development of a real-time PCR for detection and quantification of *Francisella tularensis*. Jpn J Infect Dis, 59: 46-51(2006)
- 2) Hotta A., Uda A., Fujita O., Tanabayashi K., and Yamada A. Preparation of Monoclonal Antibodies for Detection and Identification of *Francisella tularensis*. Clin Vaccine Immunol, 14: 81-84 (2007)
- 3) 棚林 清 野兔病 獣医感染症カラ

ーアトラス第2版 (見上 彪 監修) 文永堂出版(2006)

4) 藤田 修、堀田明豊、棚林 清 野兎病 感染症週報第 22 週:15-18(2006)

5) 堀田明豊、棚林 清 特集:家畜と野生動物における人と動物の共通感染症 野兎病 獣医畜産新報 56:644-648 (2006)

学会発表

1) Fujita O., Uda A., Hotta A., Okutani A., Inoue S., Tanabayashi K., Yamada A. Genotypic diversity of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* strains isolated in Japan. 5th International Conference on Tularemia, Wood Hole, MA, USA. Nov. 2006

2) Hotta A., Uda A., Fujita O., Tanabayashi K., Yamada A. Preparation of monoclonal antibodies for detection and identification of *Francisella tularensis*. 5th International Conference on Tularemia, Wood Hole, MA, USA. Nov. 2006

3) Tanabayashi K., Fujita O., Hotta A., Uda A., Yamada A. PCR based typing on the *Francisella tularensis* isolated in Japan. 5th International Conference on Tularemia, Wood Hole, MA, USA. Nov. 2006

4) 藤田 修、バイオセーフティの観点か

ら見た病原細菌—野兎病、第6回日本バイオセーフティ学会学術集会、11 月、2006

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Table 2 Results of VNTR allelic attribute

No. of strains		Ft-V1	Ft-V2	Ft-V3	Ft-V4	Ft-V5	Ft-V6	Ft-M2	Ft-M20		
Repeat size (nt) ^a		21	16	6	9	2	2	6	12		
Japanese stains											
Present	33	4, 5	2-22	2	3-26	4, 5	5	2-24	3-18		
		No. of alleles		2	15	1	3	2	1	14	9
Ref. ^b	7	Array size		3-5	4-8	2	3	5	NR ^c	6-26	11-18
Non-Japanese strains											
Present	11	Array size		4-7	2	2	10-21	4	5	2	3-4
		No. of alleles		4	1	1	8	1	1	1	2
Ref. ^b	132	Array size		4-7	2	2-4	8-28	4	NR ^c	2	3-4

^a nt; nucleotides

^b; Johansson *et al.* (2004) *J. Bacteriol.*, 17, pp. 5808-5818.

^cNR; not reported in ref^b

	Repeat	Repeat	Array	No. of
	motif	size	size	alleles
Ft-V1		4, 5	2	
Ft-V2		2-22		
Ft-V3		2		
Ft-V4		3-26		
Ft-V5		4, 5		
Ft-V6		5		
Ft-M2		2-24		
Ft-M20		3-18		

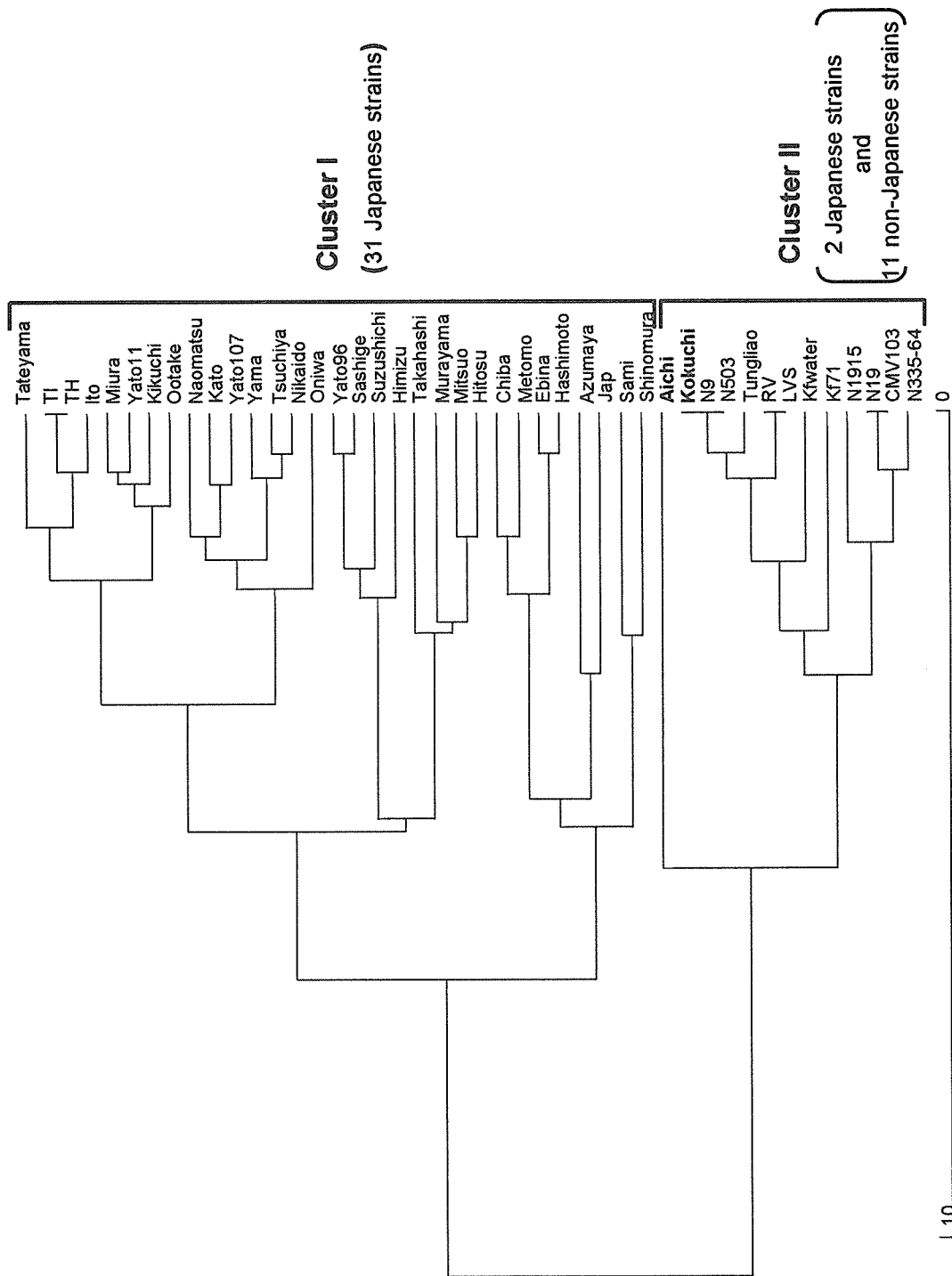


Fig. 1 Dendrogram of Japanese and non-Japanese strains of *F. tularensis* subsp. *holarctica* obtained from the cluster analysis based on the eight MLVA

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

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。大日本猟友会に依頼し、カモ血液サンプルを、血液をろ紙に採取する方法により収集した。ろ紙よりサンプルを回収し、WNVおよびJEVに対する中和抗体をPRNTで測定した。2005年度に回収した122サンプルについては、WNVに対して6サンプルが抑制を示したが、この6サンプルを含め12サンプルがJEVについても抑制した。PRNTの結果は、抗体の交差反応の可能性やサンプル中の非特異的物質によるのか、についてさらに検討する必要がある。抗体価の測定およびその特異性の検討方法として、Blocking-ELISAを確立し2004年度および2005年度サンプルの測定を実施したところ、2004年度はすべて陰性、2005年度は1羽がJEVに対して陽性を示した。Blocking-ELISAとPRNTの結果との違いについてさらに検討する必要があると考えられた。しかしながら現在までの結果では、WNVに対してのみ陽性を示すカモサンプルは、PRNTおよびBlocking-ELISAどちらからも得られていない。なお、CDCより入手したWNV感染鳥血清では、PRNTおよびBlocking-ELISAどちらもWNVに対してのみ陽性を示した。2006年度サンプルについては2/13現在、84サンプルを回収しているが、測定はすべてがそろってから実施する予定である。

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する。アフリカ、東ヨーロッパ、西アジアなどで流行が報告され、近年、ロシアでも野鳥の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。また、米国におけるWNVの流行拡大にも野鳥の関与が考えられている。日本への

WNVの侵入を考えると、特に日本に近い極東地域からの渡り鳥が重要ではないかと考えられる。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思われる。そこで、本研究では、カモ類の生息地域での流行状況を類推することを目的として、カモ類における抗体保有状況を検討した。

今回、昨年度（2005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）で検討した。また、新たに Blocking-ELISA を開発し、これを用いて 2004年度および 2005年度のサンプルを検討した。また、2006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. サンプル収集（2005年度および2006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。2005年度は1人あたり4サンプル、2006年度は3サンプル依頼した。

サンプルの採取と回収の方法については、ほぼ2004年度報告と同様であるが、ろ紙1枚だと得られるサンプル量が少ないので、2005年度からは、カモ1羽につき、ろ紙2枚ずつ依頼した。

2. サンプル処理： 送付されてきたろ紙2枚を2mlチューブ中に入れ、血液が十分に吸着したろ紙2枚に対して1.8mlの割合で0.5%BSA-PBSを加え、4℃で一晩、ローテーターで攪拌し抽出した。ろ紙への吸着血液量が少ないものについては、その血液量に応じて0.5%BSA-PBSの量を減らした。抽出後、非動化し、0.22 μ mのフィルターで濾過滅菌し、測定まで-80℃で保存した。この場合の血清希釈は1:25と換算される。

3. 中和抗体の測定（PRNT）： WNVはNY99-6922株、JEVはJaGAR01株を用いた。25倍希釈サンプルとウイルス液（200PFU/100 μ l）を等量混和し、37℃、1時間反応させた。その後、6wellプレート上のVero細胞に100 μ l/wellずつ

加え、37℃、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。25倍希釈サンプルで抑制を示したものは、50倍希釈サンプルでも検討した。

4. 特異抗体の測定（Blocking-ELISA）： 抗原として不活化WNVまたはJEVを、96well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、抗WNVモノクローナル抗体（3.67G）または抗JEVモノクローナル抗体（clone503）を反応させ、二次抗体としてHRPO標識抗マウスIgG抗体を反応させ、OPD+H₂O₂を用いて発色を見た。サンプル中にWNVもしくはJEVに対する抗体が存在したときには、モノクローナル抗体の抗原への結合が阻害される。結果はその阻害の程度で判定した。

C. 研究結果

1. サンプル収集状況： 2004年度および2005年度サンプルの最終的なプロファイルを表1に示す。2005年度は122サンプルが収集され、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：11、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、北海道のうち5サンプルが2005年10月1、2日、秋田県のうち2サンプルが2005年11月1日であったが、その他は2005年11月29日から2006年2月13日までであった。

2006年度サンプルの収集状況（2007年2月13日現在）を表2に示す。84サンプルがすでに収集され、カモの種類は、マガモ：54羽、コガモ：16、ヒドリガモ：8、オナガガモ：3、ハシビロガモ：1、ヨシガモ：2である。採取期間

は、北海道の4サンプルが2006年10月1,2日、秋田県のうち2サンプルが2006年11月2,9日であったが、その他は2006年11月24日から2007年2月9日までである。

2. 2005年度サンプルのPRNT: 中和抗体活性をPRNTにより測定したところ、WNVに対して6サンプルが抑制を示したが、この6サンプルを含め12サンプルがJEVについても抑制した(表3, 4)。No14-14のみ50倍希釈でも抑制を示したが、このサンプルに関しては細胞に対するダメージが強く、非特異的反応だと考えられた。

対象として用いた、CDCより入手したWNV感染トリ血清では、WNVに対してのみ抑制を示した。一方、不活化WNVで免疫したニワトリ血清は、WNVだけでなくJEVにも程度は低いが抑制を示した(表4)。

3. 2004年度および2005年度サンプルのBlocking-ELISA: 抗体をBlocking-ELISAにより測定したところ、国内留鳥および2004年度はすべて陰性、2005年度は1羽(No12-11)がJEVに対してのみ陽性を示した(表4)。No14-14は陰性であった。また、対象として用いたWNV感染トリ血清では、WNVに対してのみ抑制を示した。一方、不活化WNVで免疫したニワトリ血清は、WNVだけでなくJEVにも程度は低いが抑制を示した(表4)。

D. 考察

渡り鳥(カモ類)の抗体保有状況を検討したところ、PRNTでは2004年度サンプルの1/29、2005年度サンプルの6/122が、WNVに対して希釈25倍で90%以上の抑制を示した。しかしこのサンプルはすべてJEVに対しても同様に抑制を示した。

通常のELISA(Indirect-ELISA)では、二次抗体として抗Duck-IgG抗体を使用するが、ほか

の種類トリサンプル、たとえばニワトリの場合は抗Chicken-IgGを使用することとなる。抗Bird-IgGも使用可能であるが、その結果に鳥種による影響が否めない。そこで、その影響を避けるためにBlocking-ELISAを開発した。2005年度の1羽(No12-11)がJEVに対して陽性を示したが、WNVに対しては陰性であった。残りの2005年度サンプルおよび2004年度サンプルは、WNV、JEVともにすべて陰性であった。

JEVなど他のフラビウイルスに対する抗体はWNVと交差反応を示すことが知られている。今回のNo12-11は、PRNTでもWNVおよびJEVに対して抑制を示していることから、本サンプルはJEVに対して抗体を持ちその交差反応によりPRNTでWNVに抑制を示したと考えられた。

現在までの結果では、WNVに対してのみ陽性を示すカモサンプルは、PRNTおよびBlocking-ELISAどちらからも得られていない。なお、CDCより入手したWNV感染トリ血清では、PRNTおよびBlocking-ELISAどちらもWNVに対してのみ陽性を示した。このことから、交差反応性やBlocking-ELISAとPRNTの結果との違いについてさらに検討する必要があると考えられた。

なお、2006年度(回収継続中)のサンプルについては、すべての回収が終了した後、測定を実施する予定である。

E. 結論

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。WNVおよびJEVに対する中和抗体をPRNTで、また、抗体をBlocking-ELISAで測定した。PRNTでは2005年度サンプルのうち、WNVに対して6サンプルが抑制を示したが、この6サンプルを含め12サンプルがJEVについても抑制した。Blocking-ELISAでは、2004年度はすべて陰性、

2005年度は1羽がJEVに対してのみ陽性を示した。現在までの結果では、WNVに対してのみ陽性を示すカモサンプルは、PRNT および Blocking-ELISA どちらからも得られていない。

F. 健康危害情報

なし。

G. 研究発表等

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1) 2004年度および2005年度カモサンプルのプロファイル

a) 2004年度

都道府県	検体数
秋田県	5
新潟県	10
石川県	7
福井県	7
合計	29

種類	検体数
マガモ	18
コガモ	3
オナガガモ	4
ヒドリガモ	3
ホシハジロ	1
合計	29

b) 2005年度

都道府県	検体数
北海道	7
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

都道府県	検体数
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
合計	122

種類	検体数
マガモ	57
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	1
合計	122

表2) 2006年度カモサンプルのプロファイル (2007.2.8 現在)

都道府県	検体数
北海道	4
青森県	1
秋田県	5
新潟県	4
石川県	5
福井県	4
兵庫県	2
島根県	3

都道府県	検体数
山口県	6
福岡県	9
佐賀県	7
長崎県	7
熊本県	6
大分県	5
宮崎県	8
鹿児島県	8
合計	84

種類	検体数
マガモ	54
コガモ	16
ヒドリガモ	8
オナガガモ	3
ハシビロガモ	1
ヨシガモ	2
合計	84

表3) 2005年度カモサンプルの JEV および WNV に対する中和抗体 (PRNT₉₀)

都道府県	122 No.	サンプル No.	JEV-PRNT (%)		WNV-PRNT (%)	
			x 25	x 50	x 25	x 50
北海道	1	北-1	81.4	77.4	85.5	
	2	北-2	80.3	57.0	69.4	
	3	北-3	67.7		32.3	
	4	北-4	98.6	35.5	18.4	19.4
5	北-5	99.9	50.5	33.3	9.7	
秋田	6	秋-1	33.3		6.5	
	7	秋-2	31.2		9.7	
北海道	8	1-21	15.9		25.0	
	9	1-22	88.4		61.1	
青森	10	2-21	4.3		50.0	
	11	3-11	38.2		44.4	
秋田	12	3-12	18.8		25.0	
	13	3-13	24.6		19.4	
北海道	14	3-14	15.9		2.8	
	15	4-11	13.0		55.6	
北海道	16	4-12	59.7		55.6	
	17	4-13	-1.4		38.1	
北海道	18	4-14	-4.3		44.4	
	19	4-21	-7.2		30.6	
石川	20	4-22	-7.2		27.8	
	21	5-11	-15.9		2.8	
石川	22	5-12	4.3		16.7	
	23	5-21	30.4		38.9	
石川	24	5-22	53.6		55.6	
	25	5-31	44.9		33.3	
福井	26	6-11	-18.8		2.8	
	27	6-12	100.0	70.5	89.5	15.3
福井	28	6-21	-7.2		33.3	
	29	6-22	15.9		25.0	
福井	30	6-23	44.9		52.8	
	31	6-24	42.0		66.7	
兵庫	32	7-11	39.1		36.1	
	33	7-12	15.9		61.1	
兵庫	34	7-13	-15.9		13.9	
	35	7-14	13.0		55.6	
鳥取	36	8-11	98.6	88.3	98.2	
	37	8-31	81.2		77.8	
山口	38	9-11	7.2		30.6	
	39	9-21	13.0		38.9	
山口	40	9-22	71.0		36.1	
	41	9-23	38.2		27.8	
山口	42	9-24	30.4		41.7	
	43	9-31	4.3		-2.8	
山口	44	9-32	4.3		2.8	
	45	9-41	13.0		41.7	
山口	46	9-42	7.2		0.0	

都道府県	122 No.	サンプル No.	JEV-PRNT (%)		WNV-PRNT (%)	
			x 25	x 50	x 25	x 50
徳島	47	10-11	4.3		33.3	
	48	10-12	-7.2		27.8	
徳島	49	10-13	7.2		47.2	
	50	10-14	-13.0		36.1	
徳島	51	10-21	42.0		47.2	
	52	10-22	30.4		5.6	
徳島	53	10-23	24.6		44.4	
	54	10-24	21.7		38.1	
徳島	55	10-31	10.1		61.1	
	56	10-32	50.7		52.8	
徳島	57	10-33	-15.9		2.8	
	58	10-34	15.9		41.7	
佐賀	59	11-11	1.4		22.2	
	60	11-12	59.4		81.1	
佐賀	61	11-13	47.8		38.9	
	62	11-14	69.1		61.1	
佐賀	63	11-21	27.5		41.7	
	64	11-22	50.7		33.3	
佐賀	65	11-23	47.8		66.7	
	66	11-24	66.0		60.0	
佐賀	67	11-31	42.3		36.0	
	68	11-32	60.8		40.0	
佐賀	69	11-33	52.6		16.0	
	70	11-34	40.2		36.0	
長崎	71	12-11	25.0	62.1	36.2	59.3
	72	12-12	60.8		50.0	
長崎	73	12-13	69.1		8.0	
	74	12-14	85.6		38.0	
長崎	75	12-21	92.2	68.4	56.0	
	76	12-22	56.7		20.0	
長崎	77	12-23	60.8		48.0	
	78	12-24	56.7		16.0	
長崎	79	12-31	60.8		84.0	
	80	12-32	58.8		52.0	
熊本	81	13-33	58.8		48.0	
	82	13-34	54.6		60.0	
熊本	83	13-11	69.1		32.0	
	84	13-21	38.1		16.0	
熊本	85	13-22	60.8		48.0	
	86	13-23	34.3	84.7	30.8	84.7
熊本	87	13-24	84.5		24.0	
	88	13-31	48.5		48.0	
熊本	89	13-32	63.9		48.0	
	90	13-33	62.9		64.0	

都道府県	122 No.	サンプル No.	JEV-PRNT (%)		WNV-PRNT (%)	
			x 25	x 50	x 25	x 50
大分	91	14-11	54.6		56.0	
	92	14-12	87.0		84.0	
大分	93	14-13	67.0		44.0	
	94	14-14	38.3	38.3	58.3	38.3
大分	95	14-21	81.7	87.4	78.0	
	96	14-22	89.7		48.0	
大分	97	14-23	56.7		12.0	
	98	14-24	91.7	83.2	64.0	
宮崎	99	14-31	60.8		48.0	
	100	14-32	23.7		-20.0	
宮崎	101	15-11	29.8		48.0	
	102	15-12	56.7		84.0	
宮崎	103	15-13	38.1		-8.0	
	104	15-14	82.5		68.0	
宮崎	105	15-21	56.7		64.0	
	106	15-22	42.3		64.0	
宮崎	107	15-23	36.1		20.0	
	108	15-41	11.3		4.0	
宮崎	109	15-42	42.3		20.0	
	110	15-43	40.2		16.0	
鹿児島	111	15-44	11.3		52.0	
	112	16-11	79.4		52.0	
鹿児島	113	16-12	77.3		20.0	
	114	16-13	84.9		52.0	
鹿児島	115	16-14	23.8		40.0	
	116	16-21	73.2		40.0	
鹿児島	117	16-22	84.5		76.0	
	118	16-23	85.6		60.0	
鹿児島	119	16-31	83.5		56.0	
	120	16-32	64.9		48.0	
鹿児島	121	16-33	52.6		64.0	
	122	16-34	54.6		36.0	

表4) 2004年度および2005年度カモサンプル、感染トリ血清、免疫ニワトリ血清の JEV および WNV に対する中和抗体 (PRNT₉₀) と抗体 (Blocking-ELISA)

		PRNT90		Blocking-ELISA	
		JEV	WNV	JEV	WNV
Uninfected/ Infected Birds (CDC)	House Sparrow (-)	<25	<25	-	-
	House Sparrow (+)	<25	300	-	+
	Rock Dove (-)	<25	<25	-	+
	Rock Dove (+)	<25	75	-	+
Immunized Chicken	JEV-1	400	<25	++	+
	JEV-2	400	<25	++	+
	WNV-1	100	400	+	++
	WNV-2	200	400	+	++
国内かも(留鳥)	4	<25	<25	-	-
かも'04(猟友会)	29	1/29	1/29	-	-
かも'05(猟友会)	122	12/122	6/122	1/122	-

注: <25, 75, 100, 200, 300, 400 は抗体価 (PRNT90 を示す血清希釈倍率)

: 1/29 などは 25 倍希釈サンプルにおける陽性サンプル数/総サンプル数

: -, + はそれぞれ陰性、陽性

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

リケッチア・クラミジアに関する研究

分担研究者	倉根一郎	国立感染症研究所 ウイルス第一部	部長
協力研究者	岸本壽男	国立感染症研究所 ウイルス第一部 第五室	室長
	安藤秀二	同	主任研究官
	坂田明子	同	研究員
	小川基彦	同	主任研究官
	佐藤 梢	同	協力研究員
	福士秀人	岐阜大学農学部獣医学科獣医微生物学講座	教授
	大屋賢司	同	助手
	蔡 燕	オリエンタル酵母工業(株)長浜生物科学研究所	研究員
	飯島義雄	神戸市環境保健研究所	副部長
	秋吉京子	同	研究員
	大石英明	同	副部長
	田中 忍	同	研究員
	貫名正文	同	部長
	伊藤正寛	同	所長
	春田恒和	神戸市立中央市民病院小児科	部長

研究要旨: 動物由来感染症であるリケッチアならびにクラミジア関連疾患を対象に、動物、ヒト、環境、ベクター等の感染状況の把握、サーベイランスを行うことを目的として、それらの特異的な診断法の開発とそれを応用した疫学調査を行ってきた。本年度は、クラミジアに関しては、我々が昨年度開発した *C. psittaci* のみを特異的に検出する TaqMan MGB probe を用いた real-time PCR 法の臨床応用の機会を得た。本法を神戸のトリ展示施設にて発生したオウム病の集団発生事例で調査解析に用いて有用性を確認した。また患者およびトリから検出された *C. psittaci* 株の遺伝子を解析し、感染源の推測がほぼ可能であった。リケッチアに関しては、つつが虫病の血清診断について、商業検査機関の陽性との成績が、複数の研究施設での判定と異なる事例を経験し、血清診断における非特異反応の課題が浮き彫りとなった。Q熱コクシエラに関しては、*C. burnetii* の遺伝子検出法について、J民間検査施設の検出法(J 検出法)を再現し、特異性について検証を行った。J 検出法では各種細菌(39株)に対して、様々な細菌 DNA 等を増幅し、特異性が極めて低く、実際の使用には問題があることが明らかになった。

A.研究目的

本研究では動物由来感染症であるクラミジア

ならびにリケッチア関連疾患を対象として、動物、ヒト、環境、ベクター等の感染状況のサー

バランスを行うことを目的に、特異的で多検体を処理できる診断法の開発と、さらに実際の検体を用いて実用性の確認を行い、疫学調査や臨床例に応用することを目指してきた。

本年度はクラミジアに関しては、トリ展示施設におけるオウム病集団発生例を経験し、調査解析を行った。その中で我々が開発したオウム病クラミジア *Chlamydoiphila psittaci* (*C. psittaci*) を特異的に検出する real-time PCR を用いて、トリやヒトの調査を行った。また micro-IF 法による血清抗体価測定にて患者の特定を行った。

またリケッチアに関しては、現在つつが虫病の血清診断について、商業検査機関で 3 血清型に関しては対応がなされているが、流行地によっては 5 血清型の必要性が指摘され、その成績についても、一部で研究施設での成績と異なることが指摘されており、検証や標準化の必要性が出てきている。今回、商業検査機関の陽性との成績が、複数の研究施設での判定と異なる事例を経験し、その課題を検討した。

Q 熱コキシエラに関しては、*Coxiella burnetii* の遺伝子検出法について、J 民間検査施設の検出法 (J 検出法) を再現し、特異性について検証を行った。J 検出法では各種細菌 (39 株) に対して、様々な細菌 DNA 等を増幅し、特異性が極めて低く、実際の使用には問題があることが明らかになった。

B. 研究方法ならびに結果

I. クラミジアに関する研究

1. 神戸市のトリ展示施設におけるオウム病集団発生例の調査

1. オウム病発生の概要及び経緯

2005 年 12 月 6 日、神戸市内の医療機関より神戸市保健所あてに、12 月 8 日に開園予定の A トリ展示施設の飼育担当者でオウム病を強く

疑う患者が受診し、さらに同施設の従業員複数と同様の症状を呈している模様との通報があった。これを受けて、中央区保健福祉部及び東部衛生監視事務所が合同で調査を開始し、患者の症状・行動調査、施設の管理運営状況の調査及び検査用検体の確保等を図った。

12 月 6 日の調査時点で、A 施設の鳥飼育担当者 4 名が高熱、咳、筋肉痛、肺炎症状を呈して 3 ヶ所の医療機関を受診 (うち 3 名は入院) しており、さらに複数の従業員が風邪様の症状を呈していることが判明した。また、A 施設では飼育している鳥が連日数羽ずつ死亡しており、これら有症者は、鳥の死体の処理や、給餌、清掃等の作業の際に、マスク、手袋の着用が徹底されていなかったことも判明した。従業員の発症状況等から施設内の集団感染が疑われたため、営業者は 2 日後に予定していた開園を延期し、同日自らその旨を公表した。なお、開園前であったため、通報のあった時点では一般客の入園は始まっていなかったが、それまでに内覧会として近隣住民、マスコミ関係者や周辺の企業関係者等、約 1,100 名が招待され、入園していた。12 月 7 日に入院患者 1 名の気管支洗浄液から PCR 法によりオウム病クラミジア遺伝子が検出されたことから、医師より四類感染症患者としての提出がなされた。これを受けて、同日、神戸市は A 施設に対して、法に基づき、施設内の清掃・消毒及び鳥類の移動禁止等を命じた。また、患者発生について公表し、市内全医療機関に情報提供を行い、内覧会参加者が発症した場合の診療への協力及び保健所への連絡を依頼した。さらに、内覧会参加者に対しては、A 施設がリーフレットを作成し、対象地域住民への全戸配布または参加企業等へのダイレクトメール送付により、発症時の受診案内を行った。

12 月 6 日から 8 日にかけて施設内で採取し

た死亡鳥、落下糞便等 90 検体を検査したところ、死亡鳥 1 件及び落下糞便 4 件から PCR 法でオウム病クラミジア遺伝子が検出された。また、全従業員のうち同意の得られた者を対象に実施した血清抗体検査の結果、入院患者 1 名（上記 PCR 陽性者とは別人）がペア血清で 1gG の有意な上昇を示し、オウム病と診断された。さらに、神戸市外の医療機関を外来受診した患者 1 名が、同医療機関で実施した CF 法での血清抗体検査の結果に基づきオウム病と診断され、最終的に合計 3 名が四類感染症患者として届け出られた。なお、内覧会参加者のうち、発熱等の症状を訴えて医療機関を受診した者は 5 名いたが、いずれもオウム病とは診断されなかった。

神戸市は、オウム病や動物管理、疫学調査の専門家を加えた、「神戸市健康危機管理専門家会議 食中毒・細菌感染症部会」（以下、「専門家会議」という。）を 3 回にわたり開催し、原因の究明及び再発防止策を検討した。その結果、今回の患者発生は、検疫室や病鳥隔離室等の施設設備の不備、個体識別を含めた飼育鳥の健康管理体制の不備、従業員の感染防御策の不備等、「動物展示施設における人と動物の共通感染症対策ガイドライン 2003」（以下、「ガイドライン 2003」という。）に基づく管理運営がなされていないことが原因であり、必要な施設設備を設け、適正な管理運営体制を確立することが再発を防止するための要件であるとの提言をまとめた。

専門家会議の意見を踏まえて改善指導を行った結果、A 施設は、検疫室・病鳥隔離室等の施設設備や全飼育鳥の個体識別をはじめとする健康管理体制、管理経営のためのマニュアルの整備などガイドライン 2003 に基づく適正管理を実施する体制を整えた。また、A 施設は、2005 年 12 月 7 日より園内の全飼育鳥に対して

45 日間の抗菌薬投与を行った。その効果の確認のため、神戸市では飼育鳥 879 羽について、クラミジア検査を実施し、陽性のものについては、改めて隔離治療を指示した。これらのことから、「患者発生に至った特別な状況は解消された」との専門家会議の意見を受けて、A 施設は 2006 年 3 月 15 日に開園した。

2. 施設の概要

飼養羽数：2005 年 12 月 8 日までの施設搬入羽数 1,052 羽（施設内で死亡した鳥を含む）水禽類 332、インコ類 302、シギ類 150、家禽類 78、猛禽類 37、オオハシ類 25、その他 128

従事者数：計 67 人（当時）

A 施設がこの場所で開園することが明らかになった 2004 年 8 月以降、東部衛生監視事務所は営業者に対して 10 回にわたり動物の愛護及び管理に関する法律に基づく基準並びにガイドライン 2003 に基づき事前指導を行っており、営業届出書に添付されていた書類には、鳥の検疫室、病鳥隔離室、診療室、バードスタッフ室等の施設設備が記載されていた。しかしながら、2005 年 12 月 6 日の調査時点でこれらは設置されていなかった。したがって 1,000 羽を越す鳥類は検疫を実施せずに導入され、個体識別や健康状態の確認、病鳥の隔離措置等も行われることはなく、また従業員も作業後シャワー等の利用ができない状況であった。

3. 有症者の状況

発熱等の症状を呈する従業員の医療機関受診を指示するとともに、全従業員に対して健康調査及び行動調査を実施した。その結果、A 施設に本格的に鳥の導入が始まった 2005 年 11 月 12 日以降、12 月 15 日までに何らかの症状を訴えたものは 23 名おり、このうち 11 名が飼育担当者であった。

全ての患者検体について PCR 検査を実施し

た。その結果、入院患者1名の気管支洗浄液からPCR法でオウム病クラミジア遺伝子が検出され、12月7日に四類感染症患者としての届出がなされた。

その後、全従業員のうち、本人の同意が得られた者に対して採血を行い、国立感染症研究所ウイルス第一部にてmicro-IF法によるオウム病クラミジアの血清抗体価の測定を施行した(一回目採血:12月14日、15日、二回目採血:12月26日、27日。ペア血清が採取された者38名、シングル血清のみの者14名。)その結果、市外の医療機関に入院した患者1名がペア血清でIgGの有意な上昇(16倍→256倍)を示し、オウム病と診断された。

また、神戸市外の医療機関を外来受診した患者1名が、当該医療機関で実施したCF法でのペア血清抗体検査の結果(4倍未満→16倍)に基づき、オウム病と診断され、最終的には合計3名が法に基づく四類感染症患者としての届出がなされた。

飼育担当者については、鳥の死体の処理や、給餌清掃等の作業時に、マスク、手袋の着用が徹底されていなかった。また、個人ごとの担当場所は決められておらず、全員が施設全域にわたって作業を行っており、患者特有の行動もしくは作業内容は特定されなかった。

内覧会参加者については、A施設がリーフレットを作成し、対象地域住民への全戸配布または参加企業等へのダイレクトメール送付により発症時の受診案内を行った。また、神戸市は患者発生について公表し、市内全医療機関に情報提供を行い、内覧会参加者が発症した場合の診療への協力及び保健所への連絡を依頼した。その結果5名が発熱等の症状を訴えて医療機関を受診したが、オウム病と診断された者はいなかった。

なお、国立感染症研究所においてmicro-IF法の抗体測定に用いた菌株(*C. psittaci* Budgerigar-No.1株)では抗体価の上昇がみられたのは1名のみであったが、使用抗原によって抗体価の反応が異なる可能性もあるため、今後A施設の鳥由来の菌株を用いたmicro-IF法により再度測定を行う予定である。

4. 飼育鳥の状況

A施設が導入していた鳥の仕入れ元リストを入手し、該当施設を所管する自治体(4自治体)に対して、仕入れ状況の確認、従事者及び鳥の健康調査等について調査を依頼したが、いずれの施設も従業員及び飼育鳥の健康状態に異常はみられなかった。

12月6日、オウム病とは確定していないものの、その疑いが濃厚であったため、原因究明の一環として死亡鳥1件、落下糞便9件を採取して神戸市環境保健研究所に搬入した。12月7日に、A施設が全飼育鳥に対して抗菌薬投与を開始したとの情報を探知したため、あらためて死亡鳥4件、落下糞便70件、土壌4件、中庭池の水2件を採取した。その結果、死亡鳥1件(オキナインコ)、落下糞便4件(ヒメネオオハシの糞1件、中庭池で採取した糞3件)からPCR法でオウム病クラミジア遺伝子が検出された。

A施設は、全飼育鳥に対して12月7日から45日間の抗菌薬投与(ドキシサイクリン、飲み水または餌に混ぜて投与)しており、その効果の確認のため東部衛生監視事務所が投薬終了一週間後の1月27日に、113件の検体(落下糞便または総排泄ロスワブ)を採取した。その結果、「中庭池」で採取したホオジロカンムリヅル一羽が陽性となった(他の112件は陰性)。このため、再度、中庭池で放し飼い飼育されている全ての鳥(検査済みの鳥を除く503羽)を捕獲し、個体識別のうえ総排泄ロスワブの検体採取を