

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16年度～平成18年度 総合研究報告書

主任研究者 山 田 章 雄

平成19（2007）年3月

目 次

I.	総合研究報告書 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.	平成16年度 総括・分担研究報告書-----	7
III.	平成17年度 総括・分担研究報告書-----	129
IV.	平成18年度 総括・分担研究報告書-----	227

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総合研究報告書

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 部長

研究要旨 各種の病原体に対する検査法の確立を試み(1) 野兎病菌について、そのゲノム検出系を開発するとともに、過去の分離菌株が強毒型ではない B 型菌であることを簡易な PCR 型別法で明らかにした。また、ゲノム内の繰り返し配列構造の解析により国内菌株の特徴ならびに国外株との鑑別方法を確立した。(2) 免疫組織化学法を利用してホルマリンで固定不活化された検体から狂犬病ウイルスの抗原検出を可能とした。(3) リアルタイムで塩基配列を特定できる Pyrosequencing 法を利用して分離菌の迅速な遺伝子同定を可能とした。(4) 狂犬病ウイルスおよび炭疽菌を使用しない PCR 用陽性対照鋳型 RNA 産生システムを遺伝子組換えの方法を利用して確立した。(5) レプトスピラの迅速検出のためのリアルタイム PCR 法を確立した。(6) オウム病クラミジア、Q 熱リケッチア及び動物クラミジアの病原体検出法として各種 real-time PCR を確立した。(7) ウエストナイルウイルスに対する抗体を特異的検出する方法として Blocking-ELISA を確立した。(8) ニワトリにおける鳥インフルエンザウイルス感染と不活化ワクチン接種とを血清学的に区別するために非構造蛋白に対する抗体検出法を確立した。(9) 鼠咬症の病原体 *S. moniliformis* の検出法を確立した。

これらの方法あるいは既存方法を用いて、野生動物における病原体保有状況を検討し以下の成績を得た。

(10) 野生ノウサギおよび野生クマにおける野兎病菌に対する抗体測定を実施したところ野生ノウサギ血液 123 検体中 4 例が ELISA 法で陽性を示した。クマ検体では 62 例中 4 例が陽性だった。これらの結果ウエスタンブロットでも確認され、現在も国内野生動物には野兎病菌が維持されていると考えられた。(11) 東京都内のドブネズミのレプトスピラ保有状況を明らかにし、またネズミが原因と考えられるヒトのレプトスピラ症の発生を確認した。イノシシ、シカの腎臓からレプトスピラの遺伝子を検出した。(12) 151 羽のカモ血清において WNV および JEV に対する中和抗体を PRNT で測定したところ、WNV に対して 7 検体が中和活性を示した。しかしこれらの血清は日本脳炎ウイルスとも反応することから、その特異性を検討している。(13) 国内の野生ラット、実験用ラット、ペット用の輸入外国産齧歯目および食虫目における *S. moniliformis* の保菌状況の調査を行った結果、実験用ラット（近交系 2 系統、53 匹）、および外国産輸入齧歯目（19 種、189 匹）・食虫目（1 種、10 匹）からは検出されなかったが、野生ラットでは高率に保菌していることが確認された。(14) 野生動物との接触が多く動物由来感染症への曝露リスクが高いと考えられる集団としてハンターを選び、その感染症に関する意識調査を行った。その結果動物由来感染症という言葉はかなり知られているものの、マスコミ等に出てくる感染症以外で特にハンターにおいて曝露リスクが高いと思われる感染症についてあまり知られていないことが明らかになった。今後の啓発が望まれる。

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室長

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室長

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 東京都神経科学総合研究所

藤田 修 国立感染症研究所獣医科学部主任研究官

堀田明豊 国立感染症研究所獣医科学部研究員

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、サーベイランスのモデルを構築することも目的とする。

B. 研究方法

病原体あるいは抗体の検出は個々の報告書に記載した方法による。意識調査等も各報告書に記載した。

C. 研究結果

平成16年度

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実施した。具体的には狂犬病及び炭疽において、安全かつコンタミネーシ

ョンの起きない形で遺伝子検出を実施するために必要不可欠な陽性対照品を供給できる体制整備を試みた。また、パラミクソウイルスに新興動物由来感染症の病原体が多いことに着目し、ヘニパウイルス等について主に免疫組織学的診断系を確立することを試みた。狂犬病についてもより安全性の高い免疫組織学的検出法の開発を試みた。野兔病は平成15年の法改正で、4類感染症に加えられたが、病原体検出法の標準化は遅れていた。そこで標準化を図るとともに、亜種レベルあるいは株レベルで鑑別する方法を開発することを試みた。動物およびダニ由来リケッチアのうちマダニ媒介性のリケッチアに限定した TaqMan

Real-time PCR 検出系を開発した。感度、特異性の検討を行った結果、実用可能と判断したので、一部野外ダニ類からのダニ媒介性リケッチアの遺伝子検出と同定を試みた。動物由来クラミジア感染症の病原体検出法についても、TaqMan Real-time PCR の開発および実用化を検討した。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、国内に棲息する野生ラットでの病原体保有状況を調査した。レプトスピラは平成15年の感染症法改正により全数把握対象の4類感染症となったが、国内の野生動物における保有状況は未だ十分には調査されていない。前回の研究に引き続き病原体保有調査を行った。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、本年度も引き続き調査を行った。これまでのところ、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。ロシア沿海州でウエストナイルウイルスが鳥類に拡がっているとする報道がなされた。アメリカよりはロシアルートの方が日本へ侵入する可能性としては高いと考えられる。これを検出する手段として渡り鳥における抗体保有調査の実施を計画している。この調査とともに動物での病原体保有状況調査のシス

テムを構築するため、数種の感染症について大日本猟友会に協力を仰ぎ調査システムのモデル立ちあげを検討した。一方、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。そこで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非構造蛋白 NS1 を抗原とした ELISA を開発した。

平成 17 年度

平成 16 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。

平成 18 年度

平成 18 年度も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を継続するとともに、数種の感染症についてはパイロットモニタリングあるいはサーベイランスを継続した。方法論としては野兔病菌の A 型と B 型の簡易鑑別法、ならびに更に詳細な株鑑別法を開発した。また、昨年度までに実用化が図られた方法を用いて、各種動物における病原体保有状況調査を継続した。たとえば昨年度確立したクラミジア real-time PCR を野外発生事例で検討し、その有用性を確認した。また、リケッチアの血清学的診断法の問題点の抽出およびその改良を行った。鳥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に確立した、ウイルス非構造蛋白である NS1 に対する抗体の測定系を国内で発生した H5N2 亜型の流行解析に応用したところ、過去の流行による抗体産生の検出が可能であることが明らかになった。レプトスピラについては昨年度、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を明らかにしたが、更に新たな地域でも本菌が野生動物に保有されていることを明らかにした。また、動物愛護センターに引き取られたイヌにおける調査では、これまでのところ陽性個体は見つかっていない。野兔病に関してはツキノワグマで明らかな抗体保有が認められた。鼠咬症については、国内の野生ラットから菌分離に成功し、その 16SRNA 遺伝子配列を決定したところ、異なる遺伝子型が存在する可能性が示唆された。ウエストナイルウイルスに関して、死亡カラスの調査は厚生労働省の事業として継続されることとなった。また、渡り鳥における抗体保有調査に必須な鳥における抗体測定法の更なる改良を試みた。その他、(社)大日本猟友会の協力により、狩猟者における動物由来感染症に対する意識調査を実施した。また、狂犬病対策に関わる地方自治体職員の狂犬病あるいはその対策に関する意識調査を行った。

D. 考察

新興感染症の 75%が動物由来感染症であること、規制は強化されつつあるものの海外からの動物やその生産物が大量に輸入されている現状を踏まえれば国内において新たな動物に由来する感染症が発生する可能性はゼロではないと考えられる。国内の野生動物にどのような感染症がどの程度維持されているかを知っておくことは、新興感染症の発生時にそれが真に新しいものであるのかを判断する上で極めて重要である。特にヒトの感染機会の多い感染症あるいはヒト社会に侵入すればヒトからヒトへ感染が拡大する感染症は公衆衛生上重要であるといえる。動物由来感染症の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。このような観点から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。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、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てきた。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。しかし、まだ手を付けられていない感染症も実際には存在するため、更なる研究が必要であると思われる。

E. 結論

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、数種類の重要な感染症の動物における検出法を確立し、それらの方法に基づいて国内野生動物における病原体保有状況を明らかにした。また、野生動物と関わりの深い団体との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

- (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) Takayama-Ito M., Inoue KI., Shoji Y., Inoue S., Iijima T., Sakai T., Kurane I. and Morimoto K. 2006. A highly attenuated rabies virus HEP-Flury strain reverts to virulent by single amino acid substitution to arginine at position 333 in glycoprotein. Virus Res. 119:208-215.
- (4) Park C.-H., Kondo M., Inoue S., Noguchi A.,

Oyamada T, Yoshikawa H. and Yamada A.
2006. 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.
J.Vet.Med.Sci. 68:589-595.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

II. 平成16年研究報告書

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 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実施した。具体的には狂犬病及び炭疽において、安全かつコンタミネーションの起きない形で遺伝子検出を実施するために必要不可欠な陽性対照品を供給できる体制整備を試みた。また、パラミクソウイルスに新興動物由来感染症の病原体が多いことに着目し、ヘニパウイルス等について主に免疫組織学的診断系を確立することを試みた。狂犬病についてもより安全性の高い免疫組織学的検出法を開発を試みた。野兔病は平成 15 年の法改正で、4 類感染症に加えられたが、病原体検出法の標準化は遅れていた。そこで標準化を図るとともに、亜種レベルあるいは株レベルで鑑別する方法を開発することを試みた。動物およびダニ由来リケッチアのうちマダニ媒介性のリケッチアに限定した TaqMan Real-time PCR 検出系を開発した。感度、特異性の検討を行った結果、実用可能と判断したので、一部野外ダニ類からのダニ媒介性リケッチアの遺伝子検出と同定を試みた。動物由来クラミジア感染症の病原体検出法についても、TaqMan Real-time PCR の開発および実用化を検討した。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、国内に棲息する野生ラットでの病原体保有状況を調査した。レプトスピラは平成 15 年の感染症法改正により全数把握対象の 4 類感染症となったが、国内の野生動物における保有状況は未だ十分には調査されていない。前回の研究に引き続き病原体保有調査を行った。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、本年度も引き続き調査を行った。これまでのところ、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。ロシア沿海州でウエストナイルウイルスが鳥類に拡がっているとする報道が最近なされた。アメリカよりはロシアルートの方が日本へ侵入する可能性としては高いと考えられる。これを検出する手段として渡り鳥における抗体保有調査の実施を計画している。この調査とともに動物での病原体保有状況調査のシステムを構築するため、数種の感染症について大日本獣友会に協力を仰ぎ調査システムのモデル立ちあげを検討した。一方、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。そこで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非構造蛋白 NS1 を抗原とした ELISA を開発した。

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室長

今岡浩一 国立感染症研究所獣医科学部主任研

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

岸本壽男 国立感染症研究所ウイルス 1 部室長

安藤秀二 国立感染症研究所ウイルス 1 部主任研究官

小川基彦 国立感染症研究所ウイルス 1 部主任研究官

荒川香南子 国立感染症研究所ウイルス 1 部

柳 陳堅 国立感染症研究所ウイルス 1 部

佐藤 梢 国立感染症研究所ウイルス 1 部

川端寛樹 国立感染症研究所 細菌第一部室長

藤田博巳 大原総合病院付属大原研究所主任研究員

福士秀人 岐阜大学農学部獣医学科教授

野口 章 国立感染症研究所獣医科学部

加来義浩 国立感染症研究所獣医科学部

奥谷晶子 国立感染症研究所獣医科学部

小泉信夫 国立感染症研究所細菌第 1 部

谷川 力 イカリ消毒技術研究所所長

堀田明豊 国立感染症研究所獣医科学部

藤田 修 国立感染症研究所獣医科学部

宇田晶彦 国立感染症研究所獣医科学部

木村昌伸 国立感染症研究所獣医科学部

鈴木道雄 国立感染症研究所獣医科学部

林 栄治 東京医科歯科大学助手

水谷浩志 東京都動物愛護相談センター

長谷川徹 東京都動物愛護相談センター

新田芳樹 沖縄県家畜衛生試験場

廣瀬和彦 明治製菓生物産業研究所

朴 天鎬 北里大学獣医畜産学部

安部優子 長崎大学熱帯医学研究所

早坂大輔 長崎大学熱帯医学研究所

森田公一 長崎大学熱帯医学研究所教授

佐藤由子 国立感染症研究所感染病理部

永田典代 国立感染症研究所感染病理部

佐多徹太郎 国立感染症研究所感染病理部部長

渡辺洋二 長崎大学先導生命研究支援センター

佐藤 浩 長崎大学先導生命研究支援センター

西村秀一 国立病院仙台医療センター

Wong Kum Thong マラヤ大学医学部

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にはなっていない。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、サーベイラ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。野兔病菌の鑑別法も標準的な方法によった。ウエストナイルウイルスに対する抗体検出は競合 ELISA を用いることとした。他の血清学的手法についても標準的方法を用いた。

C. 研究結果

(1) 狂犬病の報告がない日本では可能なかぎり生ウイルスを使用しない安全性の高い簡便な診断・検査法が望まれる。そこで、生ウイルスを使用しない安全性の高い簡便な狂犬病ウイルスの抗原診断系を 1. 大腸菌による組換えタン

バクの発現、2. 免疫鶏卵法による IgY 抗体の産生、3. 免疫組織抗体法によるホルマリン固定された狂犬病ウイルス抗原の検出法を組み合わせることで可能とした。

(2) 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の普及が期待されるが、狂犬病清浄国である国内で検査の陽性対照をウイルスとして保持することは容易でない。そこで、狂犬病の遺伝子診断用に、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 産生システムの作出を行なった。同時に、陽性対照遺伝子のクロスコンタミネーションが疑われた場合には制限酵素処理もしくは Pyrosequencing 法によって迅速に検証できるようにした。炭疽についても同様に炭疽菌遺伝子由来の PCR 産物とサイズが異なるが同じプライマーで増幅できる陽性対照鋳型 DNA を作出して PCR 反応系の検証を可能とした。また、炭疽菌遺伝子由来の PCR 産物に対するサイズ・マーカーを大腸菌の 16S rRNA 遺伝子由来の PCR 産物から作成して PCR サンプル調整時の検体間のクロス・コンタミネーションを危惧することなく簡便かつ容易に擬陽性および陰性時の PCR 反応系の検証を可能とした。

(3) ニパウイルスに関しては人体組織材料において感染細胞を検出できる免疫組織学的解析法を確立した。ルブラウイルスの PIV3 は人獣共通感染を引き起こしている可能性が高く、この診断に必要な抗体も作製し、また、齧歯類の感染実験により、モルモット、ラット、マウスが感受性を有していること、また、T 細胞・B 細胞の免疫能が欠如している齧歯類でも感染は一過性であり、獲得免疫以外の機序でウイルスが排除されている可能性を明らかにした。

(4) 野兔病の起原菌である *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結果、*F. tularensis* subsp. *tularensis* (Type A) と *F. tularensis* subsp. *holarctica* (Type B) との鑑別には、ISFtu2 や PPI-RNA helicase 遺伝子領域の PCR 増幅 DNA

断片のサイズの差を利用できることがわかった。また、Type B 野兔病菌ゲノム DNA に存在する繰返し配列構造を含む 6 領域について国内外由来の菌株を解析した結果、SSTR16 と SSTR9 領域で繰返し回数や塩基配列に特徴があり有用な疫学調査のための遺伝子マーカーになりうることを示唆された。

(5) 国内で捕獲した野生ラットにおける *S. moniliformis* の保菌状況の調査を行った結果、高率に保菌していることが明らかとなった。今回用いた 16S rRNA を標的とした PCR は、非特異バンドの出現が認められるが、バンドのサイズが異なっているので、実用に耐えらる。と考えられる。

(6) 動物およびダニ由来リケッチア感染症の病原体の遺伝子データベースから、マダニ媒介性のリケッチア病原体の検出に限定した TaqMan Real-time PCR による検出系のプライマーおよびプローブを設計した。感度、特異性の検討を行った結果、実用可能と判断したので、一部野外ダニ類からのダニ媒介性リケッチアの遺伝子検出と同定を試みた。調査を実施した動物寄生ダニ 230 検体からは 29 件が SFG リケッチア陽性となった。また *Ehrlichia chaffeensis*、*E. canis* を標的とした系では 3 件が陽性、1 件が疑陽性となった。次に動物由来クラミジア感染症の病原体検出法についても、TaqMan Real-time PCR の開発および実用化を検討した。*C. psittaci* とともに動物由来の *C. caviae* および *C. pecorum* が検出可能であり、主にヒトを宿主とする *C. pneumoniae*、*C. trachomatis* には反応しなかった。

(7) 国内の野生動物等におけるレプトスピラの保有状況を調査した。その結果、関東 3 県および静岡県計 12 ヶ所で捕獲したドブネズミ 78 頭中 4 頭(2 ヶ所)からレプトスピラが分離された、また 4 頭(2 ヶ所)より、遺伝子断片が PCR で検出された。神奈川県および長崎県のアライグマから分離されたレプトスピラ 2 株について

性状解析を行った結果、2株とも *Leptospira interrogans* serovar Hebdomadis と同定され、血清型 Hebdomadis の遺伝的多様性が明らかになった。また神奈川県および愛知県で捕獲されたアライグマの血清診断を行ったところ、それぞれ124頭中17頭と7頭中1頭が抗体価陽性であることが明らかになった。一方、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からレプトスピラの分離および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。また、沖縄県の養豚場のブタの尿からレプトスピラの分離と遺伝子の検出および養豚場内で捕獲したネズミ類からレプトスピラの分離を試みたがすべて陰性であった。

(8) ワクチンが使用されている動物においてインフルエンザの血清学的サーベイランスを実施する場合には、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。そこで大腸菌で発現させた非構造蛋白NS1を抗原としたELISAを開発した。本ELISAを用いて、鳥インフルエンザウイルスを実験的に感染させたニワトリの血清から特異抗体を検出を試みたところウイルス感染2週間後よりNS1蛋白に対する抗体が検出できた。また、野生動物の血清学的サーベイランスを行い、アザラシの血清からH3とH7亜型のインフルエンザウイルスに対する抗体を検出した。

(9) 国内野生動物がどのような病原体を保有しているかについて、大日本猟友会の協力により、調査を開始した。別添の方々の協力により、カモ、シカ、イノシシ、ウサギから、血液、臓器、ダニの提供を受け、ウエストナイルウイルス、E型肝炎ウイルス、レプトスピラ、野兔病菌の保有状況を調べるようになった。

(10) ウエストナイル熱に関してはこれまでの死亡カラス調査を継続して行っているが、これまでのところ異常は見いだされていないとともに、平時におけるカラスの死亡状況がある程度把握できるようになった(表参照)。

D. 考察

動物由来感染症の病原体は800種を上回るのので、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、検査手法等の確立を試みた。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。今後野鳥関連でのネットワークも構築してゆく予定である。

E. 結論

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

Ohishi K, Kishida N, Ninomiya A, Kida H, Takada Y, Miyazaki N, Boltunov AN, Maruyama T (2004) Antibodies to human-related H3 influenza A virus in

Baikal seals (*Phoca sibirica*) and ringed seals (*Phoca hispida*) in Russia. *Microbiol Immunol* 48(11): 905-909

Inoue S, Noguchi A, Tanabayashi K, Yamada A Preparation of a positive control DNA for molecular diagnosis of *Bacillus anthracis*. *Jpn J Infect Dis.* 2004 Feb;57(1):29-32.

.蔡 燕,小川基彦, アグス・ステイヨノ,福士秀人,田原健司,安藤秀二,岸本寿男:鳥由来検体からのオウム病クラミジアの遺伝子抽出法の検討.*感染症誌*.2:153-154,2005.

山田章雄:動物由来感染症のサーベイランス、*感染症と化学療法*、6, 22-24, 2003

山田章雄:狂犬病ワクチンとサーベイランス、*SA Medicine*, 6, 14-18, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
なし

別添

研究にご協力頂いた大日本猟友会の方々（敬称略）

専務理事 小熊 實

松田美博、小松久平、渋谷鉄治、池田 均、真坂照和、水落邦一、根津 誠、藤木 満、新田 亨、
渡辺仙市、太田寛平、小宮山一夫、南雲勝安、山田由夫、山口正夫、村山隆敏、根本知司、
鈴木 茂、上野敬清、鈴木謙治、白濱 佑、宮口富義、吉川良長をはじめ、フロッキハンターズメ
ンバー18名、初津昭一、花田 實 花田姜子、祐本征武、丹下 修、石本 進、石本 剛、
高橋忠一、太田良一、菊地栄一、天羽 実、中條平治、板倉 真、高山喜代之、永野昭一、
長谷川権輔、前田 司、荒井輝光、佐藤 翼、末沢 勉、野島秀美、小池勝美、中村建造、
鈴木俊平、土田哲也、小熊 忠、岡川純一郎 笹谷彦一郎、近藤則男、中村 隆、末山興良、
川端進美、錦織和夫、佐藤一栄、坂田勝治、根本知司、宮口富義、吉川良長、前田 司、荒井輝光
吉田 浩、竹内郁端、富樫春吉、向井勝義、速水英利

2003 カラス

12/30- 1/6-

1/27- 2/3-

2/24- 3/3-

3/1

	第1週	第2週	第3週	第4週	第5週	第6週	第7週	第8週	第9週	第10週	第11週	第12週
北海道	死	病	死	病	死	病	死	病	死	病	死	病
北山公園	2004・27週より調査再開											
北海道	中島公園											
青森県	合浦公園(未入力)											
青森県	弘前公園(未入力)											
岩手県	岩手県営運動公園											
秋田県	県立小泉潟公園											
秋田県	千秋公園											
宮城県仙台市	八木山動物公園											
宮城県仙台市	台原森林公園											
山形県	霞城公園											
山形県	鶴岡公園											
茨城県	借楽園(未入力)											
栃木県	那須野が原公園(未入力)											
栃木県	日光田母沢御用邸記念公園(未入力)											
栃木県	日光だいや川公園(未入力)											
栃木県	鬼怒グリーンパーク(未入力)											
栃木県	中央公園(未入力)											
栃木県	栃木県総合運動公園(未入力)											
栃木県	井頭公園(未入力)											
栃木県	とちぎわんぱく公園(未入力)											
栃木県	みかも山公園(未入力)											
宇都宮市	栃木県宇都宮市総合運動公園(仮称)											
宇都宮市	栃木県北山霊園											
宇都宮市	栃木県東の杜公園											
宇都宮市	栃木県総合運動公園											
群馬県	敷島公園											
群馬県	群馬の森(2004より)											
群馬県	つづじが岡公園(2004より)											
群馬県	金山総合公園											
群馬県	観音山ファミリーパーク(2004より)											

Start →
Start →

2003 カラス

	7-	3/31-	4/7-	4/14-	4/28-	5/5-	5/19-	5/26-	6/2-	6/9-
円山公園	2004・27週より調査再開									
中島公園										
合浦公園(未入力)										
弘前公園(未入力)										
岩手県営運動公園										
県立小泉潟公園										
千秋公園					1					
八木山動物公園										
台原森林公園										
霞城公園										
鶴岡公園										
借楽園(未入力)										
那須野が原公園(未入力)										
日光田母沢御用邸記念公園(未入)										
日光だいや川公園(未入力)										
鬼怒グリーンパーク(未入力)										
中央公園(未入力)										
栃木県総合運動公園(未入力)										
井頭公園(未入力)										
とちぎわんぱく公園(未入力)										
みかも山公園(未入力)										
宇都宮市総合運動公園(仮称)										
北山霊園										
東の杜公園										
栃木県総合運動公園										
敷島公園										
群馬の森(2004より)										
つつじが岡公園(2004より)										
金山総合公園										
観音山ファミリーパーク(2004より)										

2週 第13週 第14週 第15週 第16週 第17週 第18週 第19週 第20週 第21週 第22週 第23週 第24週
病 死 病 死 病 死 病 死 病 死 病 死 病 死 病 死 病 死 病 死 病 死 病 死 病 死 病 死 病 死

Start →

Start →

Start →

Start → 1

Start → 1

Start → 1

Start → (以後、02)
Start → (以後、02)
Start → (以後、02)
Start → (以後、02)

2003 カラス

6/23- 6/30- 7/7- 7/14- 7/21- 7/28- 8/4-

	第25週	第26週	第27週	第28週	第29週	第30週	第31週	第32週	第33週	第34週	第35週	第36週
円山公園 2004・27週より調査再開	死	病	死	病	死	病	死	病	死	病	死	病
中島公園				Start →	1	1	2004・27週より調査再開					
合浦公園(未入力)					Start →	1				1		1
弘前公園(未入力)												
岩手県営運動公園												
県立小泉潟公園							1					
千秋公園												
八木山動物公園												
台原森林公園												
霞城公園				1								
鶴岡公園												2
借楽園(未入力)												
那須野が原公園(未入力)												
日光田母沢御用邸記念公園(未入)												
日光だいや川公園(未入力)												
鬼怒グリーンプール(未入力)												
中央公園(未入力)												
栃木県総合運動公園(未入力)												
井頭公園(未入力)												
とちぎわんぱく公園(未入力)												
みかも山公園(未入力)												
宇都宮市総合運動公園(仮称)												
北山霊園												
東の杜公園												
栃木県総合運動公園												
敷島公園												1
群馬の森(2004より)												
つづしが岡公園(2004より)												
金山総合公園												
観音山ファミリーパーク(2004より)												

2003 カラス

9/8-

9/29-

10/27-

11/17-

11/24-

	第37週	第38週	第39週	第40週	第41週	第42週	第43週	第44週	第45週	第46週	第47週	第48週
円山公園 2004・27週より調査再開	死	病	死	病	死	病	死	病	死	病	死	病
中島公園			1					1				
合浦公園(未入力)												
弘前公園(未入力)												
岩手県営運動公園												
県立小泉湯公園												
千秋公園												
八木山動物公園												
台原森林公園												
鶴岡公園	1			1				2			1	3
借楽園(未入力)												
那須野が原公園(未入力)												
日光田母沢御用邸記念公園(未入力)												
日光だいや川公園(未入力)												
鬼怒グリーンパーク(未入力)												
中央公園(未入力)												
栃木県総合運動公園(未入力)												
井頭公園(未入力)												
とちぎわんぱく公園(未入力)												
みかも山公園(未入力)												
宇都宮市総合運動公園(仮称)												
北山霊園												
東の杜公園												
栃木県総合運動公園												
敷島公園				1								
群馬の森(2004より)												
つじが岡公園(2004より)												
金山総合公園												
観音山ファミリーパーク(2004より)												

Start →
Start →

2003 カラス

12/15-

12/22-

	第49週	第50週	第51週	第52週
円山公園 2004・27週より調査再開	死	病	死	病
中島公園				
合浦公園(未入力)				
弘前公園(未入力)				
岩手県営運動公園				
県立小泉緑公園				
千秋公園				
八木山動物公園				
台原森林公園				
霞城公園				
鶴岡公園		2		
借楽園(未入力)				
那須野が原公園(未入力)				
日光田母沢御用邸記念公園(未入)				
日光だいや川公園(未入力)				
鬼怒グリーンパーク(未入力)				
中央公園(未入力)				
栃木県総合運動公園(未入力)				
井頭公園(未入力)				
とちぎわんぱく公園(未入力)				
みかも山公園(未入力)				
宇都宮市総合運動公園(仮称)				
北山霊園				
東の杜公園				
栃木県総合運動公園				
敷島公園				
群馬の森(2004より)				
つつじが岡公園(2004より)				
金山総合公園				
観音山ファミリーパーク(2004より)				