

平成16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：** 2003年から2004年にかけて、東アジア各国において高病原性鳥インフルエンザが発生した。原因ウイルスはH5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスであり、タイ、ベトナムにおいては本ウイルスのヒトへの感染・死亡例も報告された。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。高病原性鳥インフルエンザなどの重要疾病が発生した際には、ニワトリの淘汰や移動制限などの防疫措置がとられる。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。

#### A. 研究目的

2003年から2004年にかけて、東アジア各国において高病原性鳥インフルエンザが発生した。原因ウイルスはH5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスであり、タイ、ベトナムにおいては本ウイルスのヒトへの感染・死亡例も報告された。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。

#### B. 研究方法

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、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。抗体識別用ELISA確立のために、まずNS遺伝子をクローニングした。大腸菌発現系を用いてNS1蛋白を発現し、アフィニテ

ィーカラムを用いて組換え蛋白を精製した。このNS1蛋白を抗原とする抗体検出ELISAの条件設定を行った。ニワトリにA/chicken/Yokohama/Y-55 (H9N2)株を実験感染させ、経過血清を採取した。これらの血清をELISAの検体として用いた。

また、野生動物のインフルエンザの血清疫学調査として、ロシア海洋のアザラシのインフルエンザ抗体保有調査を行った。ELISAによりスクリーニング後、陽性血清はHI試験により抗体のHA亜型を決定した。

#### C. 研究結果

A/equine/Miami/63 (H3N8)株のNS遺伝子分節のうち、NS1蛋白をコードしている遺伝子領域をRT-PCR法を用いて増幅した。これを大腸菌発現ベクターpET-30c(+) (Novagen)に制限酵素サイトEcoRIを用いてクローニングした。この発現用プラスミドを大腸菌BL21 (DE3) (Novagen)に導入後、IPTG存在下で組換えNS1蛋白の発現を誘導した。本組換え蛋白はヒスチジンタグとの融合蛋白として発現するよう設計した。この大腸菌を可溶化後、ニッケルカラム (Amersham)を用いてアフィニテ

イー精製した。SDS-PAGE において精製された NS1 蛋白は 31kda の単一バンドとして検出された。

本 NS1 蛋白をプレートに固層化後、BSA でブロッキングした。ニワトリに A/chicken/Yokohama/Y-55 (H9N2) 株を実験感染させて得られた経過血清を段階希釈し、プレートに分注した。洗浄後、抗ニワトリ IgG ペルオキシダーゼ抗体を二次抗体として反応させ、テトラメチルベンチジン (TMB) を基質として発色させた。測定した吸光度から、非検血清中の抗 NS1 抗体の有無を評価したところ、ウイルス感染 2 週間より NS1 蛋白に対する抗体が特異的に検出された。

ロシア海洋のアザラシから血清を採取した。採取された血清中のインフルエンザウイルスに対する抗体を精製ウイルスを抗原とした ELISA で検出した。その結果、7 頭のアザラシの血清が ELISA 陽性となった。この 7 つの血清中のインフルエンザウイルスに対する抗体の血清型を HI 試験で同定した。その結果、これらの ELISA 陽性血清は H3 と H7 亜型に対する抗体であることが判明した。

#### D. 考察

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。今回確立した NS1 蛋白に対する抗体を検出する ELISA は、これを可能とする技術であると考えられる。今後、感染実験から得られる検体と同時に、ワクチン接種した動物の検体を用いて本 ELISA を評価し、抗体識別技術を確立する。さらに野外材料を用いて本血清学的サーベイランス手法の評価を行っていく予定である。

#### E. 結論

人獣共通感染症であるインフルエンザの感染抗体とワクチン抗体を識別する技術を確立するために、NS1 蛋白を抗原とした 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血清中の感染抗体を特異的に検出できた。また、野生動物の抗体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。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Kishida N, Sakoda Y, Eto M, Sunaga Y, Kida H (2004) Co-infection of *Staphylococcus aureus* or *Haemophilus paragallinarum* exacerbates H9N2 influenza A virus infection in chickens, *Arch Virol* 149: 2095-2104.

(2) 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.

##### 2. 学会発表

(1) 「Novel immunodiagnosis using recombinant NS1 protein of influenza A virus」Aaron Mweene、迫田義博、磯田典和、岸田典子、難波靖治、喜田宏 第138回日本獣医学会学術集会 (2004年、札幌)

(2) 「Evaluation of influenza A virus recombinant NS1 in diagnosis」Aaron Mweene、迫田義博、磯田典和、岸田典子、喜田宏 第52回日本ウイルス学会学術集会 (2004年、横浜)

#### 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

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の進捗状況

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の国内への侵入に備えるため、渡り鳥（主にカモ類）の抗体保有状況を検討することにした。サンプルとしてカモ類の血液の採取を大日本猟友会を介して6道県、各2名ずつ、それぞれ5検体、依頼した。現在、29検体のみ回収されているが、サンプル依頼開始の遅れによる狩猟期間の短縮、血液のろ紙へ付着量のばらつき、その鮮度の問題など、次年度以降に改善すべき点がいくつか見つかった。抗体は、Blocking ELISA で測定することになっているが、他のサンプルがそろった後、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し急性熱性疾患や脳炎を引き起こす。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が、1999年に初めて西半球のニューヨークで発生して以来、わずかに数年で全米にその流行が拡大し、その拡大には野鳥の関与が考えられている。また、近年、ロシアで、野鳥での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傾向が見られ、患者も発生している。これらの地域からの渡り鳥等によるWNVの国内への持ち込みに備えるためには、何よりもそれら渡り鳥の国外生息地におけるWNV流行状況の把握が必要となる。そこで、本研究では、渡り鳥として、留鳥（たとえばカルガモ）を除く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た。

B. 研究方法

サンプル収集： 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、福井県の6道県、各2名ずつにそれぞれ5検体を依頼した。サンプルの採取と回収（感染研への送付）の方法については、図1に示した説明書を同封した。血液採取用のろ紙に血液を染みこませ、軽く振ってこれを乾かし、容器に入れる。図2に示した記録用ラベルに必要事項（カモの種類、採取日、採取場所（メッシュ番号を含む）、採取者など）を記入した上、容器とともに返信用封筒に入れ感染研に送ってもらうこととした。もし、トリにダニがついていた場合、これも別容器に入れて一緒に送付してもらうこととした。また、極力、新鮮なサンプルを採取し、迅速に送付し

てくれるように依頼した。

サンプル処理： 送付されてきたサンプルは、1 mlの 0.5% BSA-PBS の入った 2 mlチューブ中に血液のついたろ紙を入れ、4℃で一晩、ローテーターで攪拌し抽出した。その後、0.22µm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。

抗WNV抗体の測定： 抗体の測定は、Blocking ELISAを実施することとした。まず、WNV抗原をマイクロプレートにコーティングする。次いでスキムミルクを用いて非特異的吸着をブロッキングした後、サンプル血清を反応させる。さらにモノクローナル抗WNVマウス抗体を反応させる。最後に、HRPO標識抗マウスIgG抗体を反応させ、基質を入れて発色を見る。サンプル中の特異抗体の有無は、モノクローナル抗WNV抗体の反応をどの程度ブロックするかで判定する。

### C. 進捗状況

1) サンプル収集状況： 2005年3月14日現在、回収された血液サンプルは、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、ヒドリカモ：3、オナガカモ：4、ホシハジロ：1であった。北海道および青森県で回収が悪いのは、おそらく今冬、雪が多く狩猟しづらい状況にあったことよ

と考えられる。また、サンプル収集依頼の開始が遅かったため、狩猟期間自体が短かったことにもよると考えられる。次年度は、サンプル収集の依頼をもっと早い時期から開始する必要があると思われた。

2) サンプルの状態： 回収されたサンプルについても、本年度は改善すべき点が多かったように思われる。ろ紙に血液をしみこませてもらったのだが、その量にばらつきが多く、全体に血液が採取されていない例が多く見られた。また、サンプルの鮮度に関しても狩猟後すぐに血液採取ができなかったようなサンプルも多く、今後、これらの点について、よりわかりやすく依頼する必要があると思われた。記録ラベルに関しては、こちらが依頼した十分な情報が得られた(図3)。

3) 抗体の測定： 抗体の測定は、すべてのサンプルがそろそろまで待つて開始する予定である。Blocking ELISA で実施する予定である。

### D. 健康危害情報

なし。

### E. 研究発表等

なし。

### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

図1) 渡り鳥 (カモ) サンプルの採取と回収方法に関する説明書

カモ類血液サンプルの採取と送付のお願い

カモ類 (留鳥・カルガモ以外) の血液を濾紙 (スティック) にしみこませて、封筒に入れ、投函してください。

1. 容器の中に濾紙 (スティック) が入っています。
2. 濾紙を取り出し、細い方に血液を十分しみこませます。
3. 濾紙を振って、乾燥させます。
4. 濾紙を容器に戻し、ふたをしっかりと閉めます。
5. 記録ラベルに採取日・場所などを記入します。
6. ラベルを容器に巻きつけます。
7. 返信用封筒に入れ、封をして投函してください。

1つの封筒に2本の容器 (血液用とダニ用) が入っています。

採取した物は、可能な限り、その日に投函をお願いします。

封筒の外側に血液が付着しないようにご注意ください。

封筒にはろ紙入り容器1本、空き容器1本(ダニ用)、記録ラベル、返信用封筒が入っています。まず、容器の中のろ紙を取り出します。

5. 返信用封筒に容器および記入用紙を入れるべくその日のうちにポストに投函してください。

4. 記録ラベルに採取日・場所・採取者などを記入し、裏の両面テープで容器に止め、容器に巻きつけます。

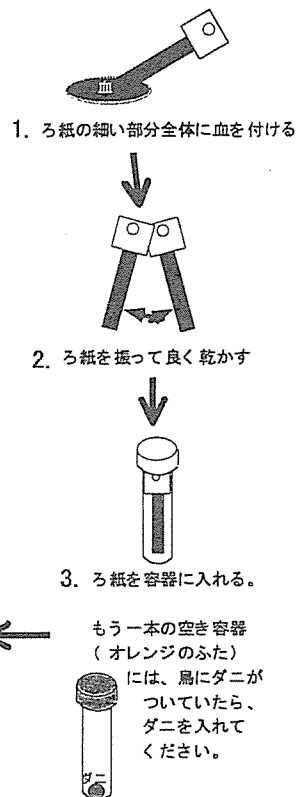


図2) 渡り鳥 (カモ) サンプルに添付する検体記録ラベル

記録ラベル (記入後、チューブに巻きつけてください)				
採取日	月	日		
採取場所	市町村		採取者	責任者 氏名
	地区			同 住所
	メッシュ 番号			協力者 氏名

図3) 実際に送付されてきたサンプルに添付されていた記録ラベルの一例  
 (責任者氏名、住所の一部、協力者氏名は伏せてある。)

記録ラベル (記入後、チューブに巻きつけてください)					
採取日	2月12日	カモの種類 (カルガモを除く)	ヒドリガモ		
採取場所	市町村	七尾市	採取者	責任者氏名	
	地区	七尾湾西湾		同住所	石川県七尾市
	メッシュ番号	32		協力者氏名	
記録ラベル (記入後、チューブに巻きつけてください)					
採取日	2月12日	カモの種類 (カルガモを除く)	オナガガモ		
採取場所	市町村	七尾市	採取者	責任者氏名	
	地区	七尾湾西湾		同住所	石川県七尾市
	メッシュ番号	23		協力者氏名	
記録ラベル (記入後、チューブに巻きつけてください)					
採取日	2月13日	カモの種類 (カルガモを除く)	マガモ		
採取場所	市町村	七尾市	採取者	責任者氏名	
	地区	七尾湾西湾		同住所	石川県七尾市
	メッシュ番号	00		協力者氏名	

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohishi K, Kishida N, Ninomiya A, Kida H, Takada Y, Miyazaki N, Boltunov AN, Maruyama T	Antibodies to human-related H3 influenza A virus in Baikal seals ( <i>Phoca sibirica</i> ) and ringed seals ( <i>Phoca hispida</i> ) in Russia.	Microbiol Immunol	48	905-909	2004
Inoue S, Noguchi A, Tanabayashi K, Yamada A	Preparation of a positive control DNA for molecular diagnosis of <i>Bacillus anthracis</i>	Jpn J Infect Dis.	57	29-32	2004
蔡 燕, 小川基 彦, アグス・ス テイヨノ, 福土秀 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	79	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

# Antibodies to Human-Related H3 Influenza A Virus in Baikal Seals (*Phoca sibirica*) and Ringed Seals (*Phoca hispida*) in Russia

Kazue Ohishi<sup>\*1</sup>, Noriko Kishida<sup>2</sup>, Ai Ninomiya<sup>3</sup>, Hiroshi Kida<sup>2</sup>, Yoshitake Takada<sup>4</sup>, Nobuyuki Miyazaki<sup>4</sup>, Andrei N. Boltunov<sup>5</sup>, and Tadashi Maruyama<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Program for Marine Biology and Ecology, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC), Yokosuka, Kanagawa 237–0061, Japan, <sup>2</sup>Department of Disease Control, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060–0818, Japan, <sup>3</sup>Laboratory of Influenza Viruses, Department of Virology 3, National Institute of Infectious Diseases, Musashimurayama, Tokyo 208–0011, Japan, <sup>4</sup>The University of Tokyo, Ocean Research Institute, Nakano-ku, Tokyo 164–8639, Japan, and <sup>5</sup>All-Russian Research Institute for Nature, Moscow, Russia

Received June 21, 2004; in revised form, July 30, 2004. Accepted August 10, 2004

**Abstract:** Antibodies to influenza A virus were detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the sera from two of seven Baikal seals (*Phoca sibirica*) and from five of six ringed seals (*Phoca hispida*) in Russia. In a hemagglutination-inhibition test using H1–H15 reference influenza A viruses, ELISA-positive sera from one Baikal seal and four ringed seals reacted to A/Aichi/2/68 (H3N2) and A/Bangkok/1/79 (H3N2) strains. One ringed seal serum sample reacted to A/seal/Massachusetts/1/80 (H7N7). The present results suggested that human-related H3 viruses were prevalent in Baikal seals and ringed seals inhabiting the central Russian Arctic.

**Key words:** Influenza virus, Seal, Marine mammal

Influenza A virus infects a variety of avian and mammalian species including humans and marine mammals such as seals and cetaceans (13, 19). Waterfowl are the primary host for all influenza A virus strains that have been introduced into mammals, including humans, as pandemic strains. It has been experimentally demonstrated that pigs serve as intermediate hosts to generate human pandemic strains (11). As interspecies transmission plays a crucial role in pandemic disease in new hosts, monitoring of the viral infections in animals, including wild animals, is important not only for the control of animal diseases but also for the prevention of human pandemics. Mass mortality associated with pneumonia occurred in harbor seals (*Phoca vitulina*) on the northeast coast of the U.S.A. in 1979–1980. A/seal/Massachusetts/1/80 (H7N7) influenza virus was isolated from dead animals during that outbreak (4, 12, 18). H4N5, H4N6, and H3N3 viruses were also isolated from dead seals in subsequent epizootics of pneumonia in the same location in 1982–1983 and 1991–1992 (1,

5). All of these seal viruses were of avian origin (1, 5, 8, 18). Serological investigations of the viral infection in marine mammals in the Barents Sea, Alaska, and Arctic Canada revealed that sporadic infections occurred in the animals (2, 3, 14, 17).

On the other hand, influenza B virus was isolated from a harbor seal, although influenza B virus had been believed to be a pathogen only for humans (16).

In a recent serological study of influenza virus infection in Caspian seals (*Phoca caspica*) that inhabit only the Caspian Sea, antibodies to human-related H3N2 virus were detected in 36% of the seals examined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (15). Antibodies to influenza B virus were observed in 6% of the seals using ELISA (15). The purpose of this study is to examine the distribution of the viral infection and the viral subtypes in other seal species in Russia. Serological study was conducted in Baikal seals (*Phoca sibirica*) and ringed seals (*Phoca hispida*), which like Caspian seals belong to the genus *Phoca*.

Serum samples were collected under the Russian-Japanese Joint Research Program for Biological and

\*Address correspondence to Dr. Kazue Ohishi, Research Program for Marine Biology and Ecology, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC), 2–15 Natsushima, Yokosuka, Kanagawa 237–0061, Japan. Fax: +81–46–867–9525. E-mail: oishik@jamstec.go.jp

Abbreviations: ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HI, hemagglutination-inhibition.



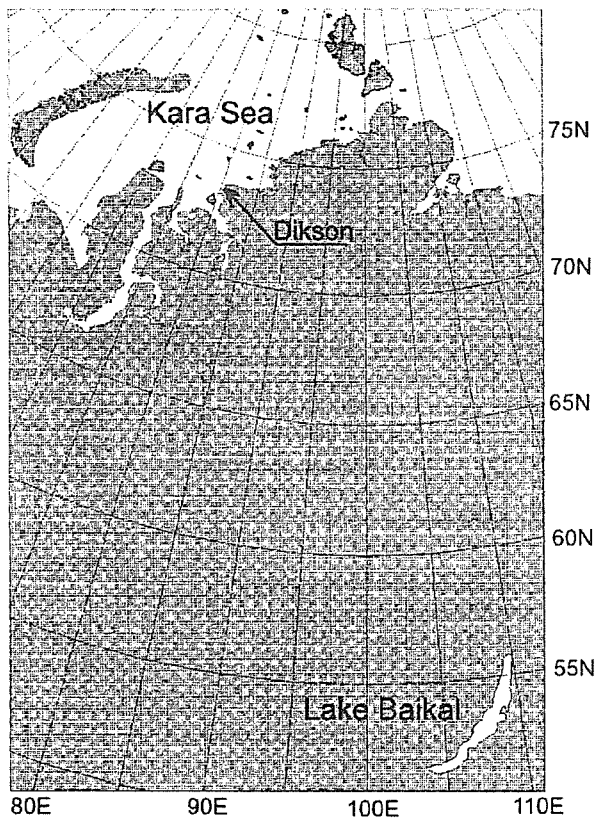


Fig. 1. Map of the sampling areas. Serum samples from Baikal seals and ringed seals were collected in Lake Baikal in 1998, and in the southern part of the Kara Sea near Dikson settlement in 2002, respectively.

Environmental Studies with special permission from the local government. Sera were collected from seven (one female, six males) Baikal seals in Lake Baikal (53° 46–52' N, 108° 23–31' E), on May 21 and 22, 1998 (Fig. 1). All the Baikal seals were judged to be less than 1 year of age based on their body length (85–103 cm). Serum samples were collected from six (three females, three males) ringed seals in the southern part of the Kara Sea near Dikson settlement from May 2 to 22, 2002 (Fig. 1). The ringed seals were estimated to be 5.5–27.5 years of age based on an analysis of dental layers following Kasuya's method (7).

The following influenza viruses were from the repository of the Department of Disease Control, Hokkaido University, Graduate School of Veterinary Medicine: A/swine/Iowa/15/30 (H1N1), A/Singapore/1/57 (H2N2), A/Aichi/2/68 (H3N2), A/Bangkok/1/79 (H3N2), A/Philippines/2/82 (H3N2), A/Memphis/1/96 (H3N2), A/swine/Hong Kong/126/82 (H3N2), A/duck/Hokkaido/8/80 (H3N8), A/duck/Czechoslovakia/56 (H4N6), A/duck/Pennsylvania/10128/84 (H5N2), A/shearwater/Australia/1/72 (H6N5), A/seal/Massachusetts/1/80

Table 1. Antibodies to influenza A virus detected using ELISA in Baikal seals and ringed seals

Species	Positive rate <sup>a)</sup>			Range of titer <sup>b)</sup>
	Female	Male	Total	
Baikal seals	0/1	2/6	2/7	1,600–6,400
Ringed seals	3/3	2/3	5/6	800–12,800

<sup>a)</sup> Percent positive (number positive/number tested). An absorbance value higher than 0.25 was regarded as positive according to the previous report (15).

<sup>b)</sup> Titer was determined using the twofold serial dilution method.

(H7N7), A/turkey/Ontario/6118/67 (H8N4), A/chicken/Hong Kong/G24/98 (H9N2), A/chicken/Germany/N/49 (H10N7), A/duck/England/56 (H11N6), A/duck/Alberta/60/76 (H12N5), A/gull/Maryland/704/77 (H13N6), A/mallard/Astrakhan/263/82 (H14N5), A/duck/Australia/341/83 (H15N8), and B/Lee/40. Propagation and purification of the viruses were conducted according to previously described procedures (15). For analysis of the antibodies in seal sera, ELISA and the hemagglutination-inhibition (HI) test were conducted according to methods described previously (15).

Antibodies to influenza A virus were first screened with ELISA using seal sera diluted to 1:50. Purified A/Aichi/2/68 (H3N2) viruses were used as antigens. Antibodies were detected in two of the seven serum samples from Baikal seals and in five of six serum samples from ringed seals (Table 1). Serum samples judged as positive were further titrated using the twofold serial dilution method (Table 1). Antibodies to influenza B virus in the serum samples were examined with ELISA using purified B/Lee/40 as antigens, and no antibody was observed in any serum sample examined.

To determine the subtype of the hemagglutinin (HA) protein recognized by the serum antibodies, the HI test using the reference influenza A virus strains of each of the known HA subtypes (H1–H15) was carried out. ELISA-positive serum from one Baikal seal and sera from four ringed seals inhibited hemagglutination of the H3 virus strain (A/Aichi/2/68 (H3N2)) (Table 2a). One ringed seal serum responded weakly to the H7 virus strain (A/seal/Massachusetts/1/80) (H7N7) (Table 2a). To investigate the strain specificity of the antibodies detected in the above tests, the sera were further examined using the HI test for their reactivity to naturally occurring human H3N2 antigenic variants. The serum from one Baikal seal (B-35) reacted equally to both the A/Aichi/2/68 (H3N2) and A/Bangkok/1/79 (H3N2) strains (Table 2b). Serum samples from three ringed seals (R-2, R-5, and R-6) reacted only to the A/Aichi/2/68 (H3N2) strain, while one sample from a

Table 2. Hemagglutination-inhibition (HI) test of seal serum samples with influenza A viruses

a)

Influenza A virus strain (subtype)	Baikal seal	Ringed seal
A/swine/Iowa/15/30 (H1N1)	—	—
A/Singapore/1/57 (H2N2)	—	—
A/Aichi/2/68 (H3N2)	256	160, 320, 640, 1,280
A/duck/Czechoslovakia/56 (H4N6)	—	—
A/duck/Pennsylvania/10128/84 (H5N2)	—	—
A/shearwater/Australia/1/72 (H6N5)	—	—
A/seal/Massachusetts/1/80 (H7N7)	—	80
A/turkey/Ontario/6118/67 (H8N4)	—	—
A/chicken/Hong Kong/G24/98 (H9N2)	—	—
A/chicken/Germany/N/49 (H10N7)	—	—
A/duck/England/56 (H11N6)	—	—
A/duck/Alberta/60/76 (H12N5)	—	—
A/gull/Maryland/704/77 (H13N6)	—	—
A/mallard/Astrakhan/263/82 (H14N5)	—	—
A/duck/Australia/341/83 (H15N8)	—	—

b)

Virus strain bearing H3 HA	HI titer of seal serum samples				
	B-35	R-2	R-4	R-5	R-6
A/Aichi/2/68 (H3N2)	256	640	160	320	1,280
A/Victoria/3/75 (H3N2)	—	—	—	—	—
A/Bangkok/1/79 (H3N2)	256	—	80	—	—
A/Philippines/2/82 (H3N2)	—	—	—	—	—
A/Memphis/1/96 (H3N2)	—	—	—	—	—

c)

H3 influenza virus	HI titer of seal serum samples					
	R-1	R-2	R-3	R-4	R-5	R-6
A/Aichi/2/68 (H3N2)	—/160 <sup>a</sup>	640/640	—/—	160/160	320/320	640/640
A/sw/Hong Kong/126/82 (H3N2)	—/160	—/320	—/—	—/80	—/160	—/320
A/duck/Hokkaido/8/80 (H3N8)	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—

The HI titer is expressed as the highest serum dilution that inhibited 4 units or 2 units of hemagglutination in Baikal or ringed seals, respectively. A titer higher than 80 was regarded as positive. — indicates a titer of less than 80. b, c) B-35, Baikal seal; R-1, -2, -3, -4, -5, -6, ringed seal. c) <sup>a</sup> Titer in the conventional HI test/titer in the HI test with rosette antigens.

ringed seal (R-4) responded to the A/Aichi/2/68 (H3N2) and A/Bangkok/1/79 (H3N2) strains (Table 2b). These data suggested that infections with A/Aichi/2/68 (H3N2)- and A/Bangkok/1/79 (H3N2)-related H3 influenza A viruses were prevalent in Baikal seals and ringed seals in the central Russian Arctic, and that sporadic infection with H7 virus occurred in ringed seals.

A/swine/Hong Kong/126/82 (H3N2) and A/duck/Hokkaido/8/80 (H3N8) share similar antigenicity with A/Aichi/2/68 (H3N2) based on the analysis with H3 HA-specific monoclonal antibodies (10, 20). However, there are discrepancies between the antigenicity results in the HI test and ELISA with soluble antigens to these viruses (10). To examine the reactivity of the seal sera to the two viruses, the conventional HI test and the test

with rosette antigens were conducted using all ringed seal samples. The sera did not inhibit the hemagglutination of the two viruses in the conventional HI test. However, four samples (R-2, -4, -5 and -6) inhibited the hemagglutination of A/swine/Hong Kong/126/82 (H3N2) rosette antigens at a lower titer than they inhibited that of A/Aichi/2/68 (H3N2) (Table 2c). One sample (R-1) which had been negative in conventional test using A/Aichi/2/68 (H3N2), showed positive in HI test with A/Aichi/2/68 (H3N2) and A/swine/Hong Kong/126/82 (H3N2) rosette antigens. These results showed that the seal sera specifically reacted to H3 virus related to A/Aichi/2/68 (H3N2).

In a previous report, we suggested that A/Bangkok/1/79 (H3N2)-related virus infected Caspian seals (15). That previous finding and the present results

together indicate that human-related H3N2 virus might be widely prevalent in seal populations inhabiting Lake Baikal, the Caspian Sea and the Arctic Sea in Russia. They might also indicate that H3N2 viruses are well-adapted to seal cells. Seals are terrestrial and aquatic inhabitants. They breed, reproduce, and nurse children on the land or ice, whereas they feed in waters. Seals have a chance to contact humans. They are often caught by hunters as valuable materials for fur production and as food for farmed minks in Lake Baikal and the Arctic Ocean. Recent expansion of human economic activity in Russia to the habitat of the seals might increase the possibility of transmission of the viruses from humans to seals. Specific receptors on target organs is a major factor in the host range restriction of influenza A viruses. A previous study showed the presence of *N*-acetylneuraminic acid- $\alpha$ 2,3-galactose (NeuAc $\alpha$ 2,3Gal) in seal lung tissues, which has high affinity with avian and equine viruses, but low affinity with human influenza A viruses (6). This discrepancy may indicate that seal cells may have another influenza virus receptor.

Estimation of age in the three species of seals indicated that the viruses were prevalent in Caspian seals, ringed seals, and Baikal seals at least until 1993, 1995, and 1997, respectively. The counterpart viruses had disappeared in humans because of rapid change in the virus in humans. This indicates that the viruses may have been maintained in seals in a similar manner as in ducks and pigs (9, 10). Because previous reports demonstrated that avian viruses can infect seals (1, 5, 8, 18), seals may play a role as "mixing vessel," similar to the role played by pigs (11). After the recent outbreaks of avian influenza in many Asian countries, monitoring of the virus in wild animals has been the focus of attention. Study of influenza virus infection including viral isolation in marine mammals, is important for understanding of ecology of the virus, as well as for the control of the pandemics in humans.

## References

- 1) Callan, R.J., Early, G., Kida, H., and Hinshaw, V.S. 1995. The appearance of H3 influenza viruses in seals. *J. Gen. Virol.* **76**: 199–203.
- 2) Danner, G.R., McGregor, M.W., Zarnke, R.L., and Olsen, C.W. 1998. Serologic evidence of influenza virus infection in a ringed seal (*Phoca hispida*) from Alaska. *Mar. Mammal Sci.* **14**: 380–384.
- 3) De Boer, G.F., Back, W., and Osterhaus, A.D.M. 1990. An ELISA for the detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species. *Arch. Virol.* **115**: 47–61.
- 4) Geraci, J.R., Aubin, D.J.St., Barker, I.K., Webster, R.G., Hinshaw, V.S., Bean, W.J., Ruhnke, H.L., Prescott, J.H., Early, G., Baker, A.S., Madoff, S., and Schooley, R.T. 1982. Mass mortality of harbor seals: pneumonia associated with influenza A virus. *Science* **215**: 1129–1131.
- 5) Hinshaw, V.S., Bean, W.J., Webster, R.G., Rehg, J.E., Fiorelli, P., Early, G., Geraci, J.R., and Aubin, D.J.St. 1984. Are seals frequently infected with avian influenza viruses? *J. Virol.* **51**: 863–865.
- 6) Ito, T., Kawaoka, Y., Nomura, A., and Otsuki, K. 1999. Receptor specificity of influenza A viruses from sea mammals correlates with lung sialyloligosaccharides in these animals. *J. Vet. Med. Sci.* **61**: 955–958.
- 7) Kasuya, T. 1976. Reconsideration of life history parameters of the spotted and striped dolphins based on cemental layers. *Sci. Rep. Whal. Res. Inst.* **28**: 73–106.
- 8) Kida, H., Brown, L., and Webster, R.G. 1982. Biological activity of monoclonal antibodies to operationally defined antigenic regions on the hemagglutinin molecule of A/seal/Massachusetts/1/80 (H7N7) influenza virus. *Virology* **122**: 38–47.
- 9) Kida, H., Kawaoka, Y., Naeve, C.W., and Webster, R.G. 1987. Antigenic and genetic conservation of H3 influenza virus in wild ducks. *Virology* **159**: 109–119.
- 10) Kida, H., Shortridge, K.F., and Webster, R.G. 1988. Origin of the hemagglutinin gene of H3N2 influenza viruses from pigs in China. *Virology* **162**: 160–166.
- 11) Kida, H., Ito, T., Yasuda, J., Shimizu, Y., Itakura, C., Shortridge, K.F., Kawaoka, Y., and Webster, R.G. 1994. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *J. Gen. Virol.* **75**: 2183–2188.
- 12) Lang, G., Gagnon, A., and Geraci, J.R. 1981. Isolation of an influenza A virus from seals. *Arch. Virol.* **68**: 189–195.
- 13) Murphy, B.R., and Webster, R.G. 1996. Orthomyxoviruses, p. 1397–1445. *In* Fields, B.N., Knipe, D.M., and Howley, P.M. (eds), *Fields virology*, 3rd ed, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- 14) Niesen, O., Clavijo, A., and Boughen, J.A. 2001. Serologic evidence of influenza A infection in marine mammals of Arctic Canada. *J. Wildl. Dis.* **37**: 820–825.
- 15) Ohishi, K., Ninomiya, A., Kida, H., Park, C.-H., Maruyama, T., Arai, T., Katsumata, E., Tobayama, T., Boltunov, A.N., Khursakin, L.S., and Miyazaki, N. 2002. Serological evidence of transmission of human influenza A and B viruses to Caspian seals (*Phoca caspica*). *Microbiol. Immunol.* **46**: 639–644.
- 16) Osterhaus, A.D.M.E., Rimmelzwaan, G.F., Martina, B.E.E., Bestebroer, T.M., and Fouchier, R.A.M. 2000. Influenza B virus in seals. *Science* **288**: 1051–1053.
- 17) Steuen, S., Have, P., Osterhaus, D.M.E., Arnemo, J.M., and Moustgaard, A. 1994. Serological investigation of virus infections in harp seals (*Phoca groenlandica*) and hooded seals (*Cystophora cristata*). *Vet. Rec.* **134**: 502–503.
- 18) Webster, R.G., Hinshaw, V.S., Bean, W.J., Van Wyke, K.L., Geraci, J.R., Aubin, D.J.St., and Petrusson, G. 1981. Characterization of an influenza A virus from seals. *Virology* **113**: 712–724.
- 19) Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., and Kawaoka, Y. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* **56**: 152–179.

Short Communication

Preparation of a Positive Control DNA for Molecular Diagnosis of *Bacillus anthracis*

Satoshi Inoue\*, Akira Noguchi, Kiyoshi Tanabayashi and Akio Yamada

Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan

(Received October 16, 2003. Accepted December 25, 2003)

**SUMMARY:** *Bacillus anthracis* is considered to be one of the most potent biological weapons because of its highly pathogenic nature and efficiency of transmission. Routinely, a presumptive diagnosis of anthrax is achieved if the bands with predicted sizes are detected after the PCR targeted to the *pag* and *cap* genes residing on pXO1 and pXO2 plasmids, respectively. A positive control DNA prepared from the standard strains of *B. anthracis* (PAI and PAII) is usually included in the PCR tests. The handling of living *B. anthracis*, however, requires physical containment. The inclusion of DNA from *B. anthracis* as a positive control in the PCR test also has a potential risk of cross contamination that may confuse the results. In order to circumvent such problems, we attempted to construct a recombinant plasmid harboring the fragments of the *pag* and *cap* genes that could be distinguished from authentic sequences by the presence the restriction-enzyme site, the *EcoRV* site for the *pag* gene and the *Bam*HI site for the *cap* gene, respectively, which were newly introduced. The strategy reported here provides a safe and reproducible positive-control DNA template. It also allows the detection of possible cross contamination, indicating that this strategy would be useful and convenient for the molecular identification of not only *B. anthracis* but also other highly pathogenic microbes.

*Bacillus anthracis* is considered to be one of the most potent biological weapons because of its highly pathogenic nature and efficiency of transmission (1). After the anthrax attack by bioterrorists in the United States (U.S.) in September 2001, thousands of envelopes containing so-called "white powder" were disseminated to many places not only in the U.S. but also in Japan. Public health institutions are responsible for testing these envelopes for the presence of *B. anthracis* even though the majority of them are hoaxes, demonstrating that rapid and precise diagnostic methods to detect anthrax are urgently needed.

In Japan, the PCR method recommended by the World Health Organization (WHO) is accepted as the standard diagnostic approach for identifying *B. anthracis* (2). Routinely, a presumptive diagnosis of anthrax is achieved if the bands with predicted sizes are detected after the PCR is targeted to *pag* and *cap* genes residing on pXO1 and pXO2 plasmids, respectively (3). A positive control DNA prepared from the standard strains of *B. anthracis* (PAI and PAII) is usually included in the PCR tests. The handling of living *B. anthracis*, however, requires physical containment. The inclusion of DNA from *B. anthracis* as a positive control in the PCR test also has a potential risk of cross contamination that may confuse the results. In order to circumvent such problems, we attempted to construct a recombinant plasmid DNA harboring the fragments of the *pag* and *cap* genes that could be distinguished from authentic sequences by the presence of the restriction-enzyme site, the *EcoRV* site for the *pag* gene, and the *Bam*HI site for the *cap* gene, respectively, which were newly introduced.

For introduction of each restriction-enzyme site into the

DNA fragments of the *pag* or *cap* genes, overlap extension PCR (Table 1 and Fig. 1) was applied (4). DNA extracted from *B. anthracis* (PAI strain) was used as a template DNA for the PCR reaction. In short, the first PCR was performed using the forward primer A and the reverse primer B in order to obtain the left half of the *pag* gene fragment. The primer B was designed to contain a restriction site recognized by *EcoRV*. The right half of the target was amplified with the primer C containing the same restriction-enzyme site and the primer D. The resulting amplicons were used as a template to generate the DNA fragment containing the *EcoRV* site in the

Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequence (5'-3')
<i>pag</i> gene (based on accession no. AF065404)	
PA5	tcttaacactaacgaagctg
PA8	gaggtagaaggatatacgg
primer A	caagtatgtgacttaattgg
primer B	gtacatgtag <u>gat</u> Cgagaatattatc
primer C	ttctc <u>Gat</u> atctacatgtacaatcg
primer D	aagcgaagtacaagtgtctgg
<i>cap</i> gene (based on accession no. AF188935)	
CAP1301	tcccacttacgtaactctgag
CAP1234	ctgagccattaatcgatg
primer A'	aggatgttcgaattcccac
primer B'	ggtgtttca <u>Ggat</u> Ccatgatttatatg
primer C'	atcatg <u>Gat</u> cCtgaaacaccatcag
primer D'	attatgtctcgtatgcgtcc

Primer pairs of (PA5 and PA8) and (CAP1301 and CAP1234) were diagnostic primers recommended by the WHO. Primer sets of A, B, C and D & A', B', C' and D' were used for the overlap extension PCR of the *pag* and *cap* genes, respectively. The generated restriction enzyme sites are indicated by underline. Primers B and C have a *EcoRV* site (gatc) and primers B' and C' have a *Bam*HI site (ggatcc).

\*Corresponding author: Mailing address: Laboratory of Transmission Control, Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan. Tel: +81-3-5285-1111 ext. 2620, Fax: +81-3-5285-1179, E-mail: sinoue@nih.go.jp

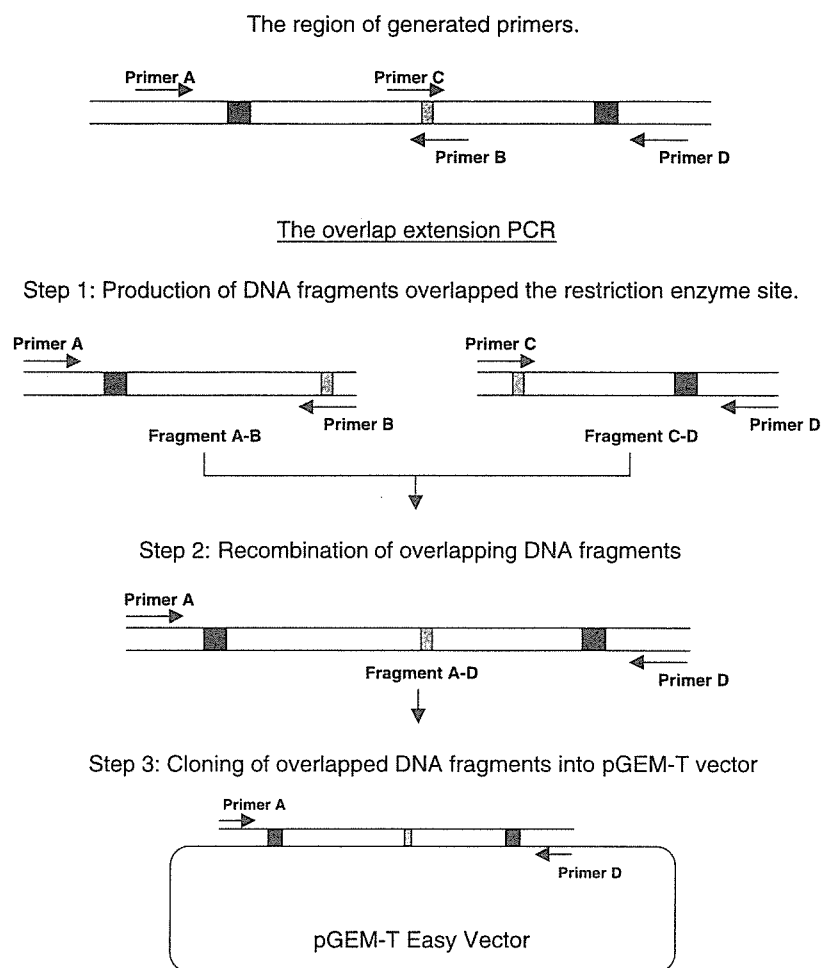


Fig. 1. Construction of recombinant plasmid DNAs harboring the mutated DNA fragments of the *pag* gene that were flanked by primer pairs recommended by the WHO. Step 1 was carried out using the primers. PCR reaction of Step 2 was started using a mixture of fragments of A-B and C-D (each 20 ng) purified by means of QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). The first 5 cycles of PCR were performed without using primers of A and D, and then next 35 cycles were performed using these primers.

middle of the sequence by PCR using the primers A and D. Introduction of the *Bam*HI site into the *cap* gene fragment was similarly conducted. These PCR fragments were purified using a QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and ligated into a cloning vector, pGEM-T (Promega, Madison, Wis., USA), by means of a TA-ligation method. The resulting recombinant plasmid DNAs designated pGEM-Pac1 for the *pag* gene and pGEM-CAPc3 for the *cap* gene, respectively, were subjected to nucleotide sequencing to ensure that each restriction site was properly introduced into them (Fig. 2). These replacements of the nucleotide did not affect the results of the PCR assays for the detection of both the *pag* and *cap* genes. A nucleotide at position 130 was changed from T to C in the insert of the *pag* gene, and three nucleotides at positions 8, 52, and 591 were changed from T, A, and A to C, G, and a deletion in the insert of *cap* gene, respectively. The nucleotide sequences were determined using a Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator kit according to the manufacturer's instructions and with a Long-Read Tower DNA sequencer (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, N.J., USA). The sequence data of the inserted DNA fragment of pGEM-Pac1 and pGEM-CAPc3 will appear in the DDBJ, EMBL, and GenBank nucleotide sequence databases under the accession numbers AB125961

and AB125962, respectively. Although it was found that a nucleotide at position 591 was deleted from the target region of pGEM-CAPc3. This deletion did not affect the recognition by the enzyme.

The pGEM-Pac1 and pGEM-CAPc3 plasmids were subjected to PCR amplification by the diagnostic primer pairs (PA5 and PA8 for the *pag* gene and CAP1301 and CAP1234 for the *cap* gene) (Table 1) recommended by the WHO, respectively. PCR reaction was performed using *Ex Taq* polymerase (TAKARA BIO Inc., Shiga) according their protocol employing an automated thermal cycler (ASTEC PC808, ASTEC Inc., Fukuoka) for 35 cycles (each consisting of 15 sec at 95°C, 30 sec at 55°C, and 30 sec at 72°C) after denaturation for 5 min at 95°C. PCR mixtures contained 2.5 U of *Ex Taq* polymerase, 10 pmol of each primer, and 10 ng of template DNA in a 50  $\mu$ l total reaction volume. The PCR products obtained by the amplification of pGEM-Pac1 and pGEM-CAPc3 as the template, respectively, were incubated with either *Eco*RV or *Bam*HI. These digests yielded two distinct bands 366 bp and 237 bp for the *pag* gene, and 570 bp and 282 bp for the *cap* gene, while PCR products amplified from the DNA extracted from PAI strain of *B. anthracis* showed only the one band even after these products were digested by *Eco*RV or *Bam*HI (Fig. 3).

**A**

1' CAAGTATTTGACTTAATTGGTTTTCTTAGCTTAATTGTGCGGAGTGTTGATTTTTCTAACACTAACGAAGTCGTTGGTAACACGTTGTAGATTG  
 \*\*\*\*\*  
 CAAGTATTTGACTTAATTGGTTTTCTTAGCTTAATTGTGCGGAGTGTTGATTTTTCTAACACTAACGAAGTCGTTGGTAACACGTTGTAGATTG

100' GAGCCGTCGCCAGTATTTACATATCTAATATTGGCATTAACTTCTGCTATCAGCGGATTTAAACCCATTGTTTCAGCCCAAGTCTTTCCCTGCTAG  
 \*\*\*\*\*  
 GAGCCGTCGCCAGTATTTACATATCTAATATTGGCATTAACTTCTGCTATCAGCGGATTTAAACCCATTGTTTCAGCCCAAGTCTTTCCCTGCTAG

200' AGATAGTGAATGATCAATTGCGACCGTACTTGAATTCGAATTAATACTCCTGCAGATACACTCCCACCAATATCAAAGAACGACGCGATGCACCTTGCA  
 \*\*\*\*\*  
 AGATAGTGAATGATCAATTGCGACCGTACTTGAATTCGAATTAATACTCCTGCAGATACACTCCCACCAATATCAAAGAACGACGCGATGCACCTTGCA

300' TTTCCATGACTTCACTAGTATGTGCTACTTGTAGAAGTATTTTACTTATTGTTCTCGTTTGAATATCAGTATTCTGTGGATTGATCCTCATTTT  
 \*\*\*\*\*  
 TTTCCATGACTTCACTAGTATGTGCTACTTGTAGAAGTATTTTACTTATTGTTCTCGTTTGAATATCAGTATTCTGTGGATTGATCCTCATTTT

400' TTGAGAGAATAATATTCTCCATATCTACATGTACAATCGGATAAGCTGCCACAAGGGGGTCTTGCCTCTGGTGATACATTCTTATCAATCCGTCCTGT  
 \*\*\*\*\*  
 TTGAGAGAATAATATTCTCCATATCTACATGTACAATCGGATAAGCTGCCACAAGGGGGTCTTGCCTCTGGTGATACATTCTTATCAATCCGTCCTGT

500' AACCTTTTCAAATCACTGTACGGATCAGAAGCCGTCTCCATTTTTCAGGAGATGATTTATATTGGTTAATCCTTCTTTTTCATGAATATTAGAATC  
 \*\*\*\*\*  
 AACCTTTTCAAATCACTGTACGGATCAGAAGCCGTCTCCATTTTTCAGGAGATGATTTATATTGGTTAATCCTTCTTTTTCATGAATATTAGAATC

600' CATGGTGAAGAAAAGTTCTTTTATTTTGTACATCAACCGTATATCCTTCTACCTCTAATGAATCAGGATTCCATCATTGTCACGGTCTGGAACCGTAG  
 \*\*\*\*\*  
 CATGGTGAAGAAAAGTTCTTTTATTTTGTACATCAACCGTATATCCTTCTACCTCTAATGAATCAGGATTCCATCATTGTCACGGTCTGGAACCGTAG

700' GTCACGACTTGTACTTCGCTT  
 \*\*\*\*\*  
 GTCACGACTTGTACTTCGCTT

**B**

1' AGGATGTCGAAATCCCACTTACGTAATCTGAGTTTTTAAATATGGCGAAACATGACGAAAACATAATCTGTACCGTAACGATTAACAATCTCTTT  
 \*\*\*\*\*  
 AGGATGTCGAAATCCCACTTACGTAATCTGAGTTTTTAAATATGGCGAGACATGACGAAAACATAATCTGTACCGTAACGATTAACAATCTCTTT

100' TACGTGACGTCCCAGTATAATGTACCAACCATCGTCATCGTCAATTTTTCTGTTCTCAGCATGTTTACTGGTGTACTGCTTCTGTACGTTGTACCCAT  
 \*\*\*\*\*  
 TACGTGACGTCCCAGTATAATGTACCAACCATCGTCATCGTCAATTTTTCTGTTCTCAGCATGTTTACTGGTGTACTGCTTCTGTACGTTGTACCCAT

200' GTGCGAGCTATTAAATAAAGTGGGATAAGAGGTAATACGATTGCTACATAACGAGGATTTTTTCTTGGTTTTCTTAATAAAGATCAGTAAGTTTCTT  
 \*\*\*\*\*  
 GTGCGAGCTATTAAATAAAGTGGGATAAGAGGTAATACGATTGCTACATAACGAGGATTTTTTCTTGGTTTTCTTAATAAAGATCAGTAAGTTTCTT

300' GAAATGTCAATTTTCTGCTCATTCTACCTCACCTTAAAAAAGTAATAAATATTGATGTCGAAATGTTGCACCCTTAACAAAATTGTAGTTCCAATT  
 \*\*\*\*\*  
 GAAATGTCAATTTTCTGCTCATTCTACCTCACCTTAAAAAAGTAATAAATATTGATGTCGAAATGTTGCACCCTTAACAAAATTGTAGTTCCAATT

400' GTTAATGGTAACCCCTGTCTTTGAATTGATTTGCAATTAATCCTGGAACAATAACTCCAATACCACGGAATTCAAAATCTCAAATGGCATAACAGGAT  
 \*\*\*\*\*  
 GTTAATGGTAACCCCTGTCTTTGAATTGATTTGCAATTAATCCTGGAACAATAACTCCAATACCACGGAATTCAAAATCTCAAATGGCATAACAGGAT

500' AACAAATAACAAAAGTTTAAACAAAATACCTGTAATAGCGTTGCCGCAAAATTTCTACGGCCATATAAAAATCATGAATCTTGAACACCATACCT  
 \*\*\*\*\*  
 AACAAATAACAAAAGTTTAAACAAAATACCTGTAATAGCGTTGCCGCAAAATTTCTACGGCCATATAAAAATCATGAATCTTGAACACCATACCT

600' AACGATTACATATGTTAAAATACTGATAAAATAAACACCAACATAAATACGGGCTGATTAACGAGTGTAAATAACCGAGTACAACCTAACCTGCA  
 \*\*\*\*\*  
 AACGATTACATATGTTAAAATACTGATAAAATAAACACCAACATAAATACGGGCTGATTAACGAGTGTAAATAACCGAGTACAACCTAACCTGCA

700' GGTAAAATACCTGTTCTTTCTGTAATAAAGGCTCAGTGAATCCTAATACTAATGCAATATAAATCTGATCAAACATTCTGTCCCTCCACTTA  
 \*\*\*\*\*  
 GGTAAAATACCTGTTCTTTCTGTAATAAAGGCTCAGTGAATCCTAATACTAATGCAATATAAATCTGATCAAACATTCTGTCCCTCCACTTA

800' AATCACTTTTGTCTGCTTTTGGCAATTTGTTCTTCCATTAATCATATCGATTAATGGCTCAGCTGCACCATGAATATTACCCACTCCATATACAATCCGA  
 \*\*\*\*\*  
 AATCACTTTTGTCTGCTTTTGGCAATTTGTTCTTCCATTAATCATATCGATTAATGGCTCAGCTGCACCATGAATATTACCCACTCCATATACAATCCGA

900' TTTTTAAATATGGACGCATACGAGACATAAT  
 \*\*\*\*\*  
 TTTTTAAATATGGACGCATACGAGACATAAT

Fig. 2. The nucleotide sequences of the inserted region of pGEM-Pac1 (A) and pGEM-CAPc3 (B). The sequences of A-D and A'-D' fragments obtained in this study (lower) were aligned with those of the *pag* and *cap* genes (upper) assigned in GenBank as accession numbers AF065404 and AF188935, respectively. The generated restriction sites are encircled by solid lines. The sequences of primers reported by the WHO are underlined (PA5, PA8, CAP1301, and CAP1234).

Inclusion of the positive control when diagnosing anthrax by means of PCR is a sort of prerequisite to ensure that the primers and other aspects of the process are working. The preparation of the DNA from the bacteria, however, requires a Biosafety Level 3 laboratory, and handling of highly pathogenic *B. anthracis* may impose a potential risk of infection. In addition, cross contamination of the control DNA could compromise the results.

The strategy described here provides a safe and reproducible positive-control DNA template. It also allows the detection of possible cross contamination, indicating that the strategy would be useful and convenient for the molecular diagnosis of not only *B. anthracis* but also other highly pathogenic microbes.

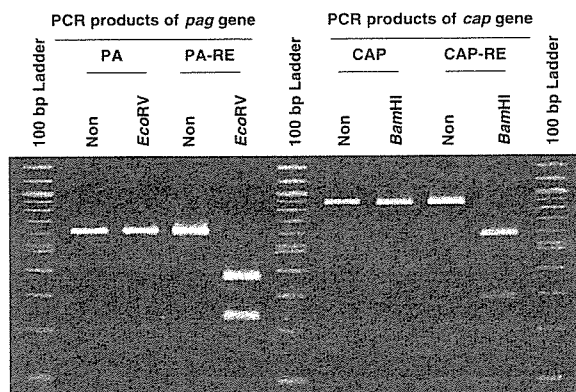


Fig. 3. The target sequences of *pag* and *cap* genes were amplified by means of the primer pairs of PA5 & PA8 and CAP1301 & CAP1234, respectively. PA and CAP indicate the PCR products amplified from the DNA-extracts of the *B. anthracis* PAI strain, whereas PA-RE and CAP-RE indicate the PCR products amplified from pGEM-PAc1 and pGEM-CAPc3, respectively. The PCR products of the *pag* and *cap* genes were digested by the restriction enzymes, *EcoRV* and *Bam*HI, respectively. The molecular marker was a 100 bp Ladder. The sample was loaded on 4% agarose gel.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by the Health Science Research Grants of the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

## REFERENCES

1. Henderson, D. A. (1998): Bioterrorism as a public health threat. *Emerg. Infect. Dis.*, 4, 488-492.
2. World Health Organization (1998): Guidelines for the surveillance and control of anthrax in human and animals. 3rd ed. World Health Organization, Geneva.
3. Fujita, O., Inoue, S., Tatsumi, M., Kamiyama, T., Akaishi, S., Ootani, T., Kawai, T., Hirochi, T., Sakamoto, Y., Tamura, K., Watanabe, H. and Yamada, A. (2002): Amplification of irrelevant sequence from *Bacillus subtilis* using a primer set designed for detection of the *pag* gene of *Bacillus anthracis*. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 55, 99-100.
4. Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. and Pease, L. R. (1989): Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 77, 61-68.

20) Yasuda, J., Shortridge, K.F., Shimizu, Y., and Kida, H. 1991. Molecular evidence for a role of domestic ducks in the introduction of avian H3 influenza viruses to pigs in

Southern China, where the A/Hong Kong/68 (H3N2) strain emerged. *J. Gen. Virol.* **72**: 2007–2010.



## 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

<sup>1)</sup>国立感染症研究所ウイルス第一部, <sup>2)</sup>岐阜大学農学部獣医学科,<sup>3)</sup>鳥根県保健環境科学研究所感染症疫学科

蔡 燕<sup>1)</sup> 小川 基彦<sup>1)</sup> スティヨノ・アグス<sup>1)</sup> 福士 秀人<sup>2)</sup>  
 田原 研司<sup>3)</sup> 安藤 秀二<sup>1)</sup> 岸本 寿男<sup>1)</sup>

(平成 16 年 6 月 21 日受付)

(平成 16 年 12 月 16 日受理)

---

 Key words : *Chlamydophila psittaci*, PCR, DNA extraction
 

---

〔感染症誌 79 : 153~154, 2005〕

## 序 文

オウム病は *Chlamydophila psittaci* (オウム病クラミジア) を起因菌とする人獣共通感染症であり, オウムおよびインコ類をはじめとする鳥類が感染源となる<sup>1)</sup>. ヒトは, 主に, 菌を含む排泄物などを吸入して感染する. ヒトの症状は軽症の上気道炎から重症例まで多様で, 治療が遅れると死の転帰をとることもある<sup>2)</sup>.

近年, 鳥が放し飼いにされているケージに人が入る展示形態や鳥とのふれあいを魅力とする鳥展示施設が増加し, 鳥とヒトの距離が近くなり, 感染源となりうる鳥のオウム病クラミジア検査の必要性が生じてきた. また実際, 国内のトリ展示施設において, オウム病の集団発生が起こった<sup>3)</sup>. そこで, 本研究では, 鳥類からのオウム病クラミジアの検出法を確立するため, 鳥の総排泄口擦過材料 (総排泄口スワブ) および糞便からの *C. psittaci* の遺伝子検出法について検討を行った.

## 材料と方法

S 動物展示施設の協力を得て, オウムおよびインコ類のトリの総排泄口スワブ 98 検体, 同トリの

ケージ内糞便 25 検体を用いた. また, 陽性コントロールとして, オウム病のアウトブレイクのおきた施設鳥由来の陽性総排泄口スワブ 10 検体を用いた. トリ由来検体からの DNA 抽出には, Puregene (フナコシ), セパジーン (三光純薬) および QIAamp DNA Stool Mini Kit (以下 QIAamp, キアゲン) DNA 抽出キットを用いた. 総排泄口スワブは PBS に浸しよく混和し, 糞便は PBS でおよそ 20% の乳剤を作成し, 低速で遠心後, その上清を各 DNA 抽出キットに用いた. 最終的に, 50 $\mu$ l の蒸留水に浮遊させ, そのうちの 5 $\mu$ l を外膜タンパク質を標的とした PCR 法<sup>4)</sup>に用いた.

## 結 果

S 施設鳥由来総排泄口スワブ 98 検体では, Puregene では 13 検体 (13%) が陽性, セパジーンでは 2 検体 (2.0%) が陽性であった (Table 1). また, 糞便 25 検体では, Puregene では 2 検体 (8.0%) が陽性, セパジーンでは 1 検体 (4.0%) が陽性であった. また, 陽性総排泄口スワブ 10 検体では, Puregene では 10 検体全て (100%) が陽性, セパジーンでは 8 検体 (80%) が陽性, QIAamp では 5 検体 (50%) のみが陽性であった.

## 考 察

我らは初めて現在日本で汎用している 3 つの

---

別刷請求先 : (〒189-0024) 東京都新宿区戸山 1-23-1  
 国立感染症研究所ウイルス第一部第五室  
 岸本 寿男

Table 1 Comparison of DNA extraction from birds' specimens

	PureGene DNA extraction kit		Sepagene		QIAamp DNA Stool Mini Kit	
	Cloacal swabs	Feces	Cloacal swabs	Feces	Cloacal swabs	Feces
Birds' specimens (unknown) <sup>a)</sup>	13/98 (13) <sup>c)</sup>	2/25 (8.0)	2/98 (2.0)	1/25 (4.0)	NT	NT
Birds' specimens (positive) <sup>b)</sup>	10/10 (100)	NT	8/10 (80)	NT	5/10 (50)	NT

<sup>a)</sup> Bird's specimens were collected in S bird park. <sup>b)</sup> Positive birds' specimens were originated from an outbreak of Psittacosis in V bird park. <sup>c)</sup> Positive specimens/Total specimens (%)

DNA 抽出キットの効率を比較した。これまで、一部のキットでヒトや動物検体での検討および報告がされているが、鳥由来検体については報告がなかった<sup>5)~7)</sup>。

今回の結果から、鳥由来検体からのオウム病クラミジアの検出には、Puregene が、他の2キットより検出率が高く有用であることが示された。一般に糞便やスワブ検体中には夾雑物が多く、実際検体中の蛋白質もまちまちである。Puregene が優れていた理由として、強力な酵素 ProteinaseK により（濃度を上げることも可能）蛋白質消化が効率よく行え、その後の蛋白質沈殿ステップにより、夾雑物などを沈殿物として効率よく排除できることが考えられた。一方で、セパジーンでは蛋白や夾雑物が多いと蛋白除去剤による除去が十分でなく、DNA 抽出液に不純物が混入するようである。また、QIAamp では、検体量および抽出DNA量が200 $\mu$ lと、Puregene がそれぞれ50 $\mu$ lであるのと比べるとスケールが大きく、陽性排泄口スワブを用いた結果では検出効率も悪かった。

また、Puregene では、1検体あたりの価格も比較的安くて経済的であり、操作が簡便で大量の検体の処理にも適している。今後もさらに検討を進め、本法を鳥類におけるオウム病クラミジアの検査に応用していく予定である。

謝辞：本研究にご協力いただいた鳥展示施設の関係各位に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) Panigrahy B, Grimes JE, Rideout MI, Simpson RB, Grumbles LC : Zoonotic diseases in psittacine birds : apparent increased occurrence of chlamydiosis (psittacosis), salmonellosis, and giardiasis. J Am Vet Med Assoc 1979 ; 175 : 359—61.
- 2) Brron AL : Micobiology of Chlamydia. In : Schachter J, ed. Overview of human diseases. Boca Raton, Fla : CRC Press, 1988 ; p. 153—65.
- 3) 田原研司, 板垣朝夫, 新田則之, 村下 伯, 足立行, 道越小雪, 他 : 鳥展示施設に関連したオウム病集団発生事例—鳥根県松江市. IASR 2002 ; 23 ; 247—8.
- 4) Yoshida H, Kishi Y, Shiga S, Hagiwara T : Differentiation of Chlamydia species by combined use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. Microbiol Immunol 1998 ; 42 : 411—4.
- 5) Vandenberg N, Van Oorschot RA : Extraction of human nuclear DNA from feces samples using the QIAamp DNA Stool Mini Kit. J Forensic Sci 2002 ; 47 : 993—5.
- 6) Li M, Gong J, Cottrill M, Yu H, de Lange C, Burton J, et al. : Evaluation of QIAamp DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota. J Microbiol Methods 2003 ; 54 : 13—20.
- 7) Gary AF, Steven HF : Comparison of six commercial DNA extraction kits for recovery of cytomegalovirus DNA from spiked human specimens. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 3860—3.

#### DNA Extraction of *Chlamydophila psittaci* from Cloacal Swabs and Feces of Birds

Yan CAI<sup>1)</sup>, Motohiko OGAWA<sup>1)</sup>, Agus SETIYONO<sup>1)</sup>, Hideto FUKUSHI<sup>2)</sup>,  
Kenji TABARA<sup>3)</sup>, Shuji ANDO<sup>1)</sup> & Toshio KISHIMOTO<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of virology I, Laboratory of Rickettsia & Chlamydia,  
National Institute of Infectious Disease, Tokyo, Japan,

<sup>2)</sup>Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, Gifu University, Gifu, Japan,

<sup>3)</sup>Shimane Prefectural Institute of Public Health Environmental Science, Matsue, Japan

# 動物由来感染症の サーベイランス



国立感染症研究所獣医科学部長 山田 章雄 先生

## 近年、注目されるようになった 動物由来感染症

動物からヒトに病気が移ることがあることは古くから知られており、旧約聖書『申命記』に「死んだブタの肉を食べたり、その死体に触れたりすべきではない」との記載がある。これは当時の人々が旋毛虫症、炭疽、ブルセラ症あるいは日本脳炎などがブタから感染することを認識していた可能性を示していると思われる。また、メソポタミアのエシェンナ法典にも狂犬病らしき記載がある。このように、目新しいものでもない動物由来感染症が近年、注目されるようになってきた背景には様々な要因によりヒトと動物との距離が縮まったことがあると考えられる。

## サーベイランスとは

「サーベイランス」とは「ある事象に関連するデータを連続的に収集し、それを解析した後、得られた情報を必要とする人々に還元し疾病対策に反映すること」をいう。一方、「モニタリング」という言葉は「ある集団における疾病を検出すること」で、それ自体は対策を講じることを前提としているわけではないが、しばしばサーベイランスと同義的に用いられている。

サーベイランスは感染症のみならず、癌、生活習慣病などの対策においても重要な手法であり、畜産分野においても家畜の疾病制御のうえで重要な手法となっている。

## 動物由来感染症対策に重要な サーベイランス

動物由来感染症はヒトと動物の間で共通の感染症であるというだけで、他の感染症と著しい違いがあるわけではない。したがって、動物由来感染症対策も具体的には他の一般的感染症と同様であり、大規模流行を阻止するためにはサーベイランスの実施が極めて重要であるといえる。しかし、多くの動物由来感染症では、その流行要因が生態系と深く関わっており、サーベイランスを実施することが難しい場合もある。

動物由来感染症のサーベイランスを考えるうえで重要なことは「どのような動物の、どのような疾患を、どういう目的で対象とするか」であると考えられる。本稿では動物をイヌ、ネコなどのペット、すなわち「伴侶動物」、動物園などで飼育される「展示動物」、家畜すなわち「産業動物」、そして「野生動物」に大別して述べる。

## 重要な課題となる関係者による 情報の共有化

ヒトを中心に考えれば動物は環境要因の一部であるが、他の要因と大きく異なるのは動物間で感染症の流行が拡大し得ることである。すなわち、動物における発生動向を知ることがヒトへの流行を阻止するうえで非常に有効な情報となるのである。

動物由来感染症は世界に200種余り、国内には60種以上あるといわれており、そのうち公

衆衛生上問題となる多くの感染症は「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）」で報告が義務づけられており、ヒトでの発生動向は把握できていると考えられる。

また、産業動物における発生に関しては「家畜伝染病予防法」における対象疾患はやはり報告されることになっているが、産業動物における発生動向はヒトの公衆衛生関係者に即時的に伝達されるシステムにはなっていない。関係者による情報の共有化をいかに進めていくかが今後の重要な課題であるといえる。

## わが国における動物側での疾病のサーベイランス、モニタリング

### ①産業動物

現在、わが国において、ヒトへの感染拡大を阻止するために動物側でサーベイランスが行われている疾病は産業動物における日本脳炎とウシ海綿状脳症(BSE)である。日本脳炎はブタにおける抗体保有状況、BSEは周知の如くウシの全頭検査が行われている。

### ②伴侶動物・展示動物

伴侶動物、展示動物では体系的なモニタリングは行われていないが、都道府県の衛生当局などによるスポット的なモニタリングのデータが存在する場合もあり、それらを有効に活用することができると考えられる。

### ③野生動物

野生動物においては全く情報がないのが実情である。

## サーベイランスの対象とすべき疾患

サーベイランスの主たる目的は、解析されたデータに基づいて公衆衛生上、脅威となる疾患の大規模流行を未然に防ぐことにあるといえる。したがって、公衆衛生に及ぼす影響の少ない疾患をサーベイランスの対象とすべきであると考えられる。

### ①伴侶動物

#### 1) イヌ・ネコ

イヌ、ネコのようなヒトとの共存の歴史の長い小動物では公衆衛生上の視点からサーベイランスの対象とすべき疾患は少ないと考えられる。しかし、近年の医療の目覚ましい進歩あるいは社会の高齢化に伴い、免疫機能の低い人々が増加する傾向を鑑みると、これらのペット動物から感染する日和見的な感染症のモニタリングが重要となる。そういった疾患はサーベイランスによるよりは、むしろ啓発、教育による対策のほうが費用対効果の視点からも、より有効であるように思われる。

#### 2) エキゾチックアニマル

イヌ、ネコ以外の動物、いわゆるエキゾチックアニマルがペットとして飼育されるケースが増加している。特にプレーリードッグその他の齧歯類等が多量に輸入されているが、これらの動物が野生由来である場合、様々な病原体を有する可能性があり、厳重な対策が望まれる。

ちなみに、日本に輸入される予定のプレーリードッグでペストや野兔病が発生したため、プレーリードッグの輸入は本年3月1日より禁止となった。

### ②展示動物

展示動物は基本的には野生あるいは限りなく野生に近い動物である。しかし、長期間にわたり動物園で飼育されていること、一応閉鎖空間で飼養されていることを考え合わせると、これらの動物が公衆衛生上、問題となるケースは少ないと考えられる。

しかし、不特定多数の人々がこれらの施設を訪れていることを考えれば、必要な対策を講じておくことは重要であると考えられる。実際、昨年度、2カ所の動物展示施設においてオウム病の集団感染が発生しており、そういった事例の発生を未然に防ぐには、施設の衛生管理、従業員教育、来園者に対する注意喚起などが有効な対策であると考えられる。

同時に、オウム病、Q熱、結核など特定の疾患を念頭に置いた園内サーベイランスを実施することも重要であると考えられる。