

Medicine)、82:6-10、2005

井上 智。特集：ヒトと動物に共通の感染症- 狂犬病。「ペットを加害者にしないために」。北海道新聞社：北海道百科 vol.4、99-100、2005

井上 智。世界における狂犬病の発生状況および狂犬病侵入のリスク。〈特集〉動物由来感染症。病原体微生物検出情報 vol.26、12-14、2005

井上 智。狂犬病／動物に由来する感染症- ウイルス性疾患を中心に。企画：倉田 毅。生物の科学 遺伝：59、51-58、2005

井上 智。狂犬病：狂犬病発生時の行政機関対応マニュアル／特集 動物由来ウイルス感染症（- 現状・課題・対策 -）、臨床研究と展望。日本臨床：63、2180-2186、2005

学会発表等

朴 天鎬、井上 智、近藤真理子、野口 章、小山田敏文、吉川博康、山田章雄。狂犬病ウイルス (CVS-11) を感染させた C57BL/6J マウスの発症病理。第9回日本神経ウイルス研究会 2005、6月、浜松

Park, C. H., Inoue, S., Kondo, M., Noguchi, A., Oyamada, T., Yoshikawa, H., and Yamada, A. 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. The 2nd Asian Society of Veterinary Pathology Symposium & 2005 Annual Meeting of the Korean Society of Veterinary Pathology. 3-4 November, 2005. National Veterinary Research & Quarantine Service, Anyang city, Korea.

大日康史、井上 智。我が国の飼育犬に狂犬病が侵入した場合の伝播と流行拡大の数理モデルによる解析。第5回人と動物の共通感

染症研究会学術集会 2005、11月、東京

井上 智。人と動物の共通感染症。平成16年度臨床獣医師講習会。日本獣医師会 栃木県獣医師会。2005年、1月14日、栃木県

井上 智。狂犬病の現状と日本における危機管理。平成16年度適正飼養講習会。東京都福祉保健局 健康安全室 環境衛生課。2005年、2月25日、東京都

井上 智。世界の狂犬病発生の実況／／公開シンポジウム「狂犬病の防止に向けて」。日本学術会議獣医学研究連絡委員会 日本獣医師会 合同公開シンポジウム。2005年3月15日、東京都

井上 智。動物由来感染症（狂犬病）の概要について。平成17年度動物の輸入届出業務及びベクター調査担当者研修会。2005年、6月8日、東京都

井上 智。狂犬病の侵入リスク／／シンポジウム VII 「動物由来感染症」。衛生微生物技術協議会第26回研究会。2005年7月8日、福井県

井上 智。狂犬病と気になる動物由来感染症(覚えておきたい狂犬病予防のポイント)。狂犬病予防に関する市町村担当者研修会。岐阜県獣医師会。2005年7月15日、岐阜県

Inoue, S. Rabies in Asia: Zoonotic threat, problem, control and prevention. Session II: Viral Zoonoses. Pathogenesis and Etiology of Zoonoses causing Encephalitis and/or Encephalopathy. The 9th International Symposium for Zoonosis Control, 21 COE Hokkaido University, Hokkaido, 29 August, 2005.

Inoue, S. Laboratory diagnosis and

surveillance of rabies in Japan. Session II: Zoonoses. Japan-Taiwan Symposium on Zoonotic Diseases. National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan, 7-8 September, 2005.

井上 智。我が国における狂犬病予防対策の有効性評価について。平成 17 年度動物由来感染症対策（狂犬病予防を含む）技術研修会。厚生労働省健康局結核感染症課。2005 年、11 月 4 日、東京（JA ホール）

井上 智。狂犬病：世界における最近の話題と日本をとりまく状況。平成 17 年度狂犬病予防研修会。三重県健康福祉部。2005 年、11 月 18 日、三重県

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

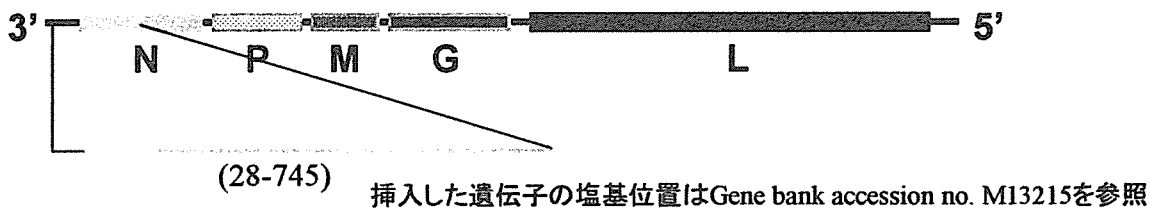
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図 1. 陽性対照鋳型RNA合成のための鋳型DNAの改変



Cloning into pGEM-T Easy

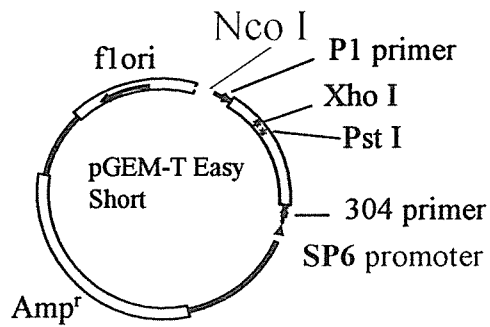
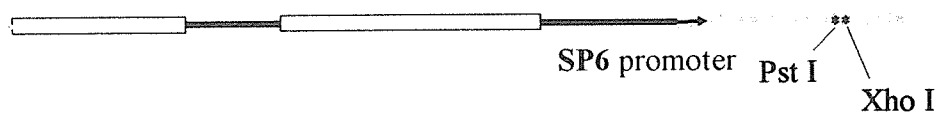
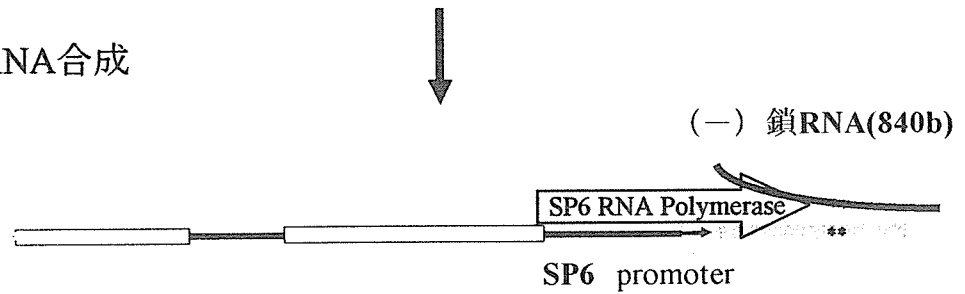


図2. 鋳型とする(-)鎖RNAの合成からRT-PCRまでのフロー

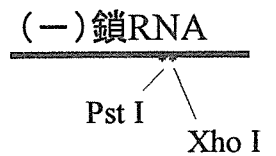
Linearization by Nco I



RNA合成



DNase処理・RNA精製



RT-PCR

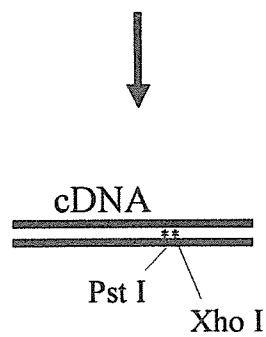


図3. Nco I処理によるプラスミドの直鎖化

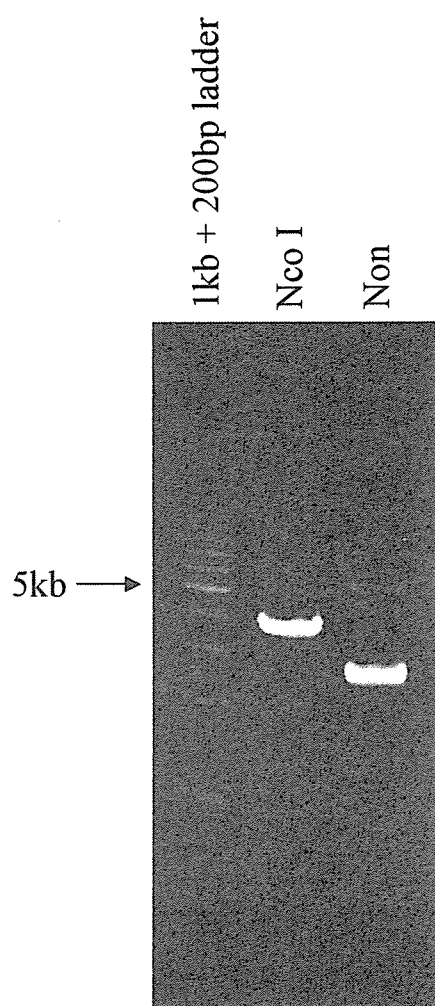


図4. SP6 RNA polymerase promoter 活性を利用して合成した (-)鎖 RNA

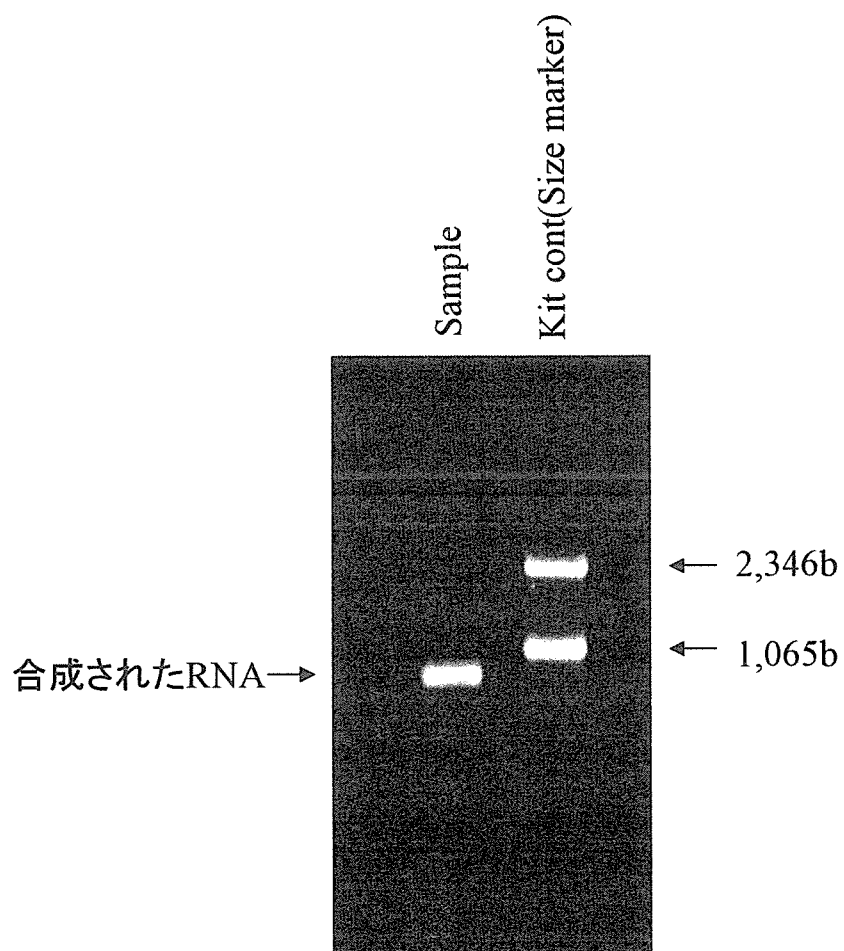
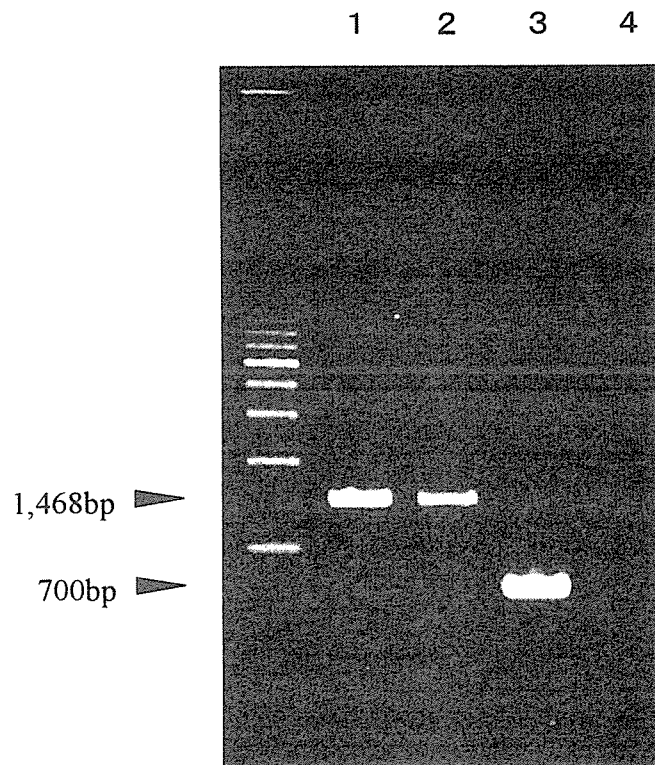


表 1. RT-PCRの反応条件

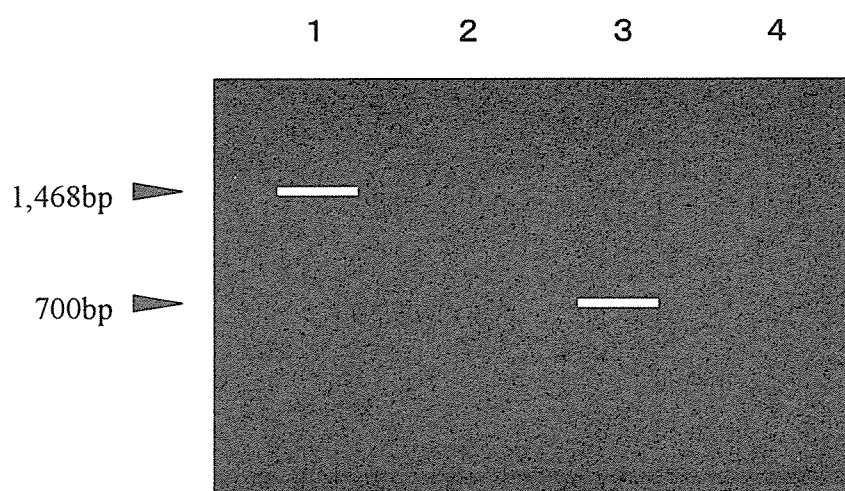
RT反応 (AMV reverse transcriptase, Promega Cat.No. M9004)			
Step①	10 μ l RNA in DW 1 μ l Sense primer: JW12 (10pmol/ μ l)		
Step②	95°C、1分 → onice → 室温		
Step③	(Step②のTubelに順次以下の試薬を加える) 4 μ l 5x buffer 4 μ l dNTP (2.5mM each) 1 μ l rRNasin(40u/ μ l) (Promega Cat.No. N2511) 1 μ l AMV RTase(20u/ μ l)		
Step④	42°C 45min、95°C 5min、4°C		
PCR反応 (TaKaRa EX-Taq) (TaKaRa Cat.No. RR001B)			
(1 cycle)	(30 cycles)	(1 cycle)	(1 cycle)
95°C 5min	95°C 30sec	95°C 30sec	4°C
	50°C 20sec	50°C 20sec	
	72°C 60sec	72°C 10min	
Reagents			
38 μ l	DW		
5 μ l	X10 buffer		
4 μ l	dNTP (2.5mM each)		
1 μ l	Primer-F: (10pmol/ μ l)	10g	
1 μ l	Primer-R: (10pmol/ μ l)	304	
1 μ l	Template (10倍希釈したRT反応液)		
0.25 μ l	EX-Taq		

図5. 合成した陽性対照鑄型RNAのRT-PCR成績

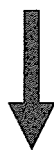


1. サイズマーカー(PSM:RV-1468bp)
2. 検体(狂犬病 CVS11株)
3. 陽性対照
4. 陰性対象

図6. 検体レーンにバンドがない場合

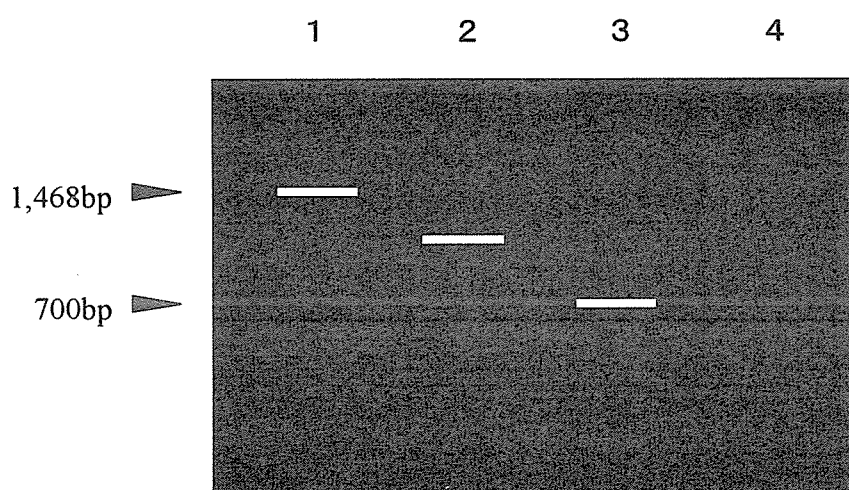


1. サイズマーカー(PSM:RV-1468bp)
2. 検体
3. 陽性対照
4. 陰性対象



検体は陰性。
RT-PCRは正しく反応している。

図7. 検体レーンに非特異的なサイズのバンドが出た場合

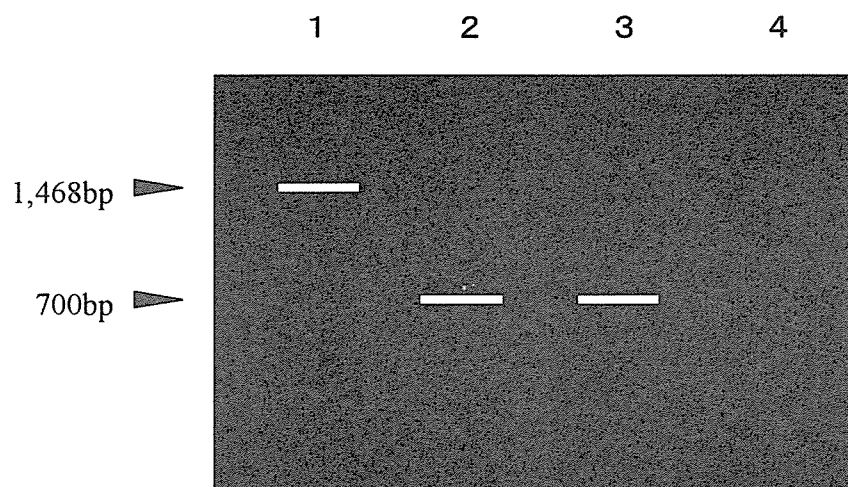


1. サイズマーカー(PSM:RV-1468bp)
2. 検体
3. 陽性対照
4. 陰性対象



検体は陰性。
RT-PCRは正しく反応している。

図8. 検体レーンに陽性対照と同じサイズのバンドが出た場合

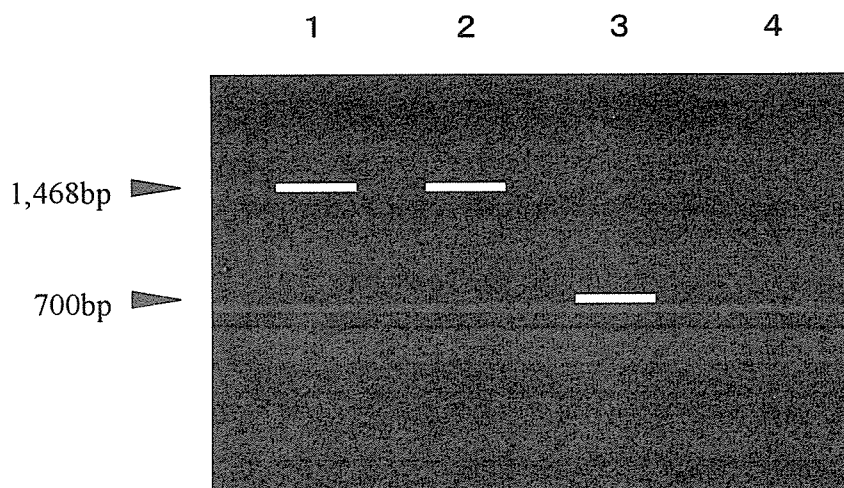


1. サイズマーカー(PSM:RV-1468bp)
2. 検体
3. 陽性対照
4. 陰性対象



検体に陽性対照鑄型RNAの
クロスコンタミネーション
が疑われる。

図9. 検体レーンにサイズマーカーと同じサイズのバンドが出た場合



1. サイズマーカー(PSM:RV-1468bp)
2. 検体
3. 陽性対照
4. 陰性対象



検体は陽性と考えられる。

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

熱帯地域由来の人獣共通感染症の診断

分担研究者 岩崎琢也（長崎大・熱帯医学研 国立感染研・感染病理部）

協力研究者 安部優子、佐藤浩（長崎大・先端生命研究支援センター）

Wong Kum Thong（マレーシア・クアラルンプール市・マラヤ大・医学部）、Somchai Jongwutiwes,
Chaturong Putaporntip（タイ・バンコック市・チュラロンコン大学・医学部）

研究要旨 熱帯地域で過去に流行した、あるいは現時点でも流行している病原体のうち、人獣共通感染症を引き起こす可能性のあるウイルス、寄生虫について検討している。これまでにニパウイルス、サルマラリア、*Trypanosoma evansi* について研究を行ってきた。今年度はニパウイルスに関しては RT-PCR による解析のための鋳型作製を行ってきた。サルマラリアに関しては同定を行うための PCR 診断系の確立と、人体に感染した時のサルマラリア原虫が感染した赤血球の形態を明らかにした。*T. evansi* については、これまでこの病原体は家畜を中心に感染し人体は感受性を有していないとされていたが、WHO によりアジアにおいて人体感染例が存在していることが報告され、私たちもタイにおける1例の存在を確認した。

A. 研究目的

熱帯地域で流行した既往あるいは現在進行形の流行の病原体のうち、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迅速診断法を開発する。

今年度対象とした病原体は 1998-9 年にマレー半島において、2004 年にはバングラディッシュにおいても流行し、コウモリ由来と推定され、中間宿主としてブタが介在することもあるニパウイルス、マレー半島において野生のカニクイザルに自然感染して、ときに人体にも伝播するサルマラリア原虫、アフリカにおいて睡眠病を引き起こす *Trypanosoma brucei* に近縁するも、媒介する吸血性の節足動物がいらず、旧世界に広く分布し、ウシ等の家畜を自然宿主とするも、2004 年インドで初の人体感染例が確認された *Trypanosoma evansi* である。

B & C. 方法と結果

1. ニパウイルスの迅速診断用鋳型 cDNA の作製

マレーシアで 1998 年のアウトブレイク時に分離されたニパウイルス分離株を使用した。このウイルス株はマレーシア国内においてバイオセーフティ管理下に分離されている。昨年度、加熱により感染性を不活化させたウイルス粒子より抽出したウイルスゲノムを鋳型とし、RT-PCR 反応により nucleoprotein をコードする遺伝子領

域を増幅し、pGEM-T ベクターに TA クローニングをしたことを報告した。さらに、この遺伝子断片を切り取り、発現ベクター pGEX-3X に組換え、この遺伝子産物を大腸菌に発現させ、この蛋白を認識する抗体を樹立している。

今年度はこの遺伝子領域を標的とした RT-PCR を用いた迅速診断のための鋳型を作製することにした。この背景として、このウイルスは以前本邦ではクラス 3 に分類されていたが、カルタヘナル条約の調印により、米国と同じクラス 4 とする研究者もおり、容易にウイルス粒子を提供することが困難となったことが挙げられる。一方、ウイルスゲノムの一部を RT-PCR の鋳型として提供する場合、その遺伝子領域が全長のままでは検査室汚染による偽陽性の結果が頻繁に生じ、現時点では本邦の自然界に確認されていないウイルスの存在を間違って報告する可能性が生じる。そこで、偽陽性が問題とらない鋳型を提供するために、ウイルスゲノムの一部を欠損させた鋳型を作製した。

ニパウイルス NC_002728 の nucleoprotein 遺伝子領域の塩基配列の制限酵素切断様式について DNASIS (Hitachi) を用いて検討した。その結果、以下の酵素がこの領域を 1 度切断する酵素である (表 1)。なお、この遺伝子領域は開始コドンと停止コドンよりそれぞれ 30 塩基 5' あるいは 3' よりを含んだ配列を対象とし解析して

いる。

Enzyme	Sequence	Count	1- 1656 Position	
<i>Ava</i> I	C!YCGRG	2	280	434
<i>Bam</i> HI	G!GATCC	1	8	
<i>Bgl</i> II	A!GATCT	2	208	542
<i>Clal</i> II	AT!CGAT	1	1315	
<i>Eco</i> RI	G!AATTC	1	886	
<i>Eco</i> RV	GAT!ATC	2	37	1312
<i>Hinc</i> II	GTY!RAC	2	352	466
<i>Hind</i> III	A!AGCTT	1	915	
<i>Msp</i> I	C!CGG	2	281	1430
<i>Rsa</i> I	GT!AC	1	145	
<i>Sac</i> I	GAGCT!C	1	166	
<i>Sma</i> I	CCC!GGG	1	280	
<i>Xho</i> I	C!TCGAG	1	434	
<i>Xma</i> I	C!CCGGG	1	280	

このデータより、*Ava*I を用いて増幅断片より 280-434 の間の塩基配列を取り除き、再度 ligation することにより 154 塩基短い増幅産物を作製することにした。

昨年度、ウイルスよりウイルスゲノム RNA を通常の方法にて抽出した。この抽出ウイルスゲノムを random hexamer を用いて、first strand cDNA を合成した。これを鋳型として、以下のプライマー

Nipah virus np (NC_002728)

F TGG ATC CTC ATG AGT GAT ATC TTT G
R GGG GAT CCA CGT CAC ACA TCA GCT CT

により np 遺伝子の塩基配列を増幅し、目的のサイズの増幅産物を得た。この増幅産物を TA クローニング法によりプラスミドベクター pGEM-T にクローニングした。この組み換えプラスミドを *Ava*I で切断し、残念ながら、この段端は相補性が無いため、一度 Taq ポリメラーゼにより blunt 化し、再度 ligation をした。この ligation したプラスミド DNA を上記のプライマーで再度 PCR をかけることにより、これまでより 150 塩基短くなった鋳型が完成した。なお、dideoxy sequencing により塩基配列の解析により、この脱落部分を挟む配列は確認した。なお、この過程においては大腸菌等の細胞は用いずに行なった。

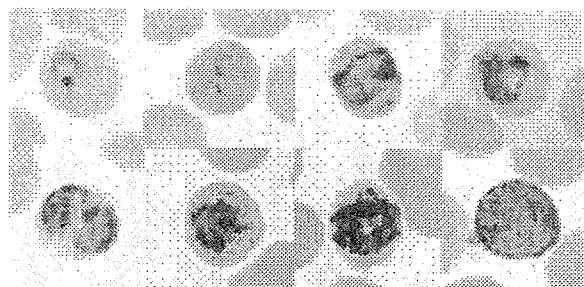
この鋳型は上記のプライマーを用いて容易に増幅することが可能であり、今後のニパウイルスの RT-PCR を用いた検査の鋳型として使用できる。

2. サルマリアの PCR による診断系:

霊長類は 26 種以上のマラリア原虫を保有し、霊長類間で伝播している。この中にはヒトマラリア原虫に類似した種があり、*Plasmodium simium*, *P. brasilianum*, *P. cynomogci*, *P. inui*, *P. knowlesi* が挙げられる。実験的にはこれらのいくつかは人体に感染しうることが証明されてきたが、一般的にヒトのマラリア症例の鑑別診断として、これらの霊長類由来のマラリアを考慮することは稀である。

2000 年 3 月から 2002 年 11 月の 32 ヶ月間をかけて、Singh らによりマレーシア ボルネオ島サラワク州 Kapit 地区(人口 90 967 人、面積 38 934 km²)を対象として 208 人のマラリア症例が解析された。*P. knowlesi* 特異的 PCR が開発され、これらの症例を解析したところ 120 例(57.7%)に *P. knowlesi* のゲノムが検出され、うち 106 例は単独感染で残りの 14 例は混合感染であった (Singh et al. Lancet 363: 1017-24, 2004)。

共同研究者のタイ・バンコック市チュラロンコン大学医学部の Jongwutiwes 博士も、2000 年にタイ南部のミャンマー国境近くの Prachuap Khiri Khan 地域で罹患し、発熱を主訴としたマラリア症例について解析した。末梢血の塗抹像は *P. malariae* に類字していた。Kawamura ら (2002) が開発した 4 種類のヒトマラリア原虫の small subunit (SSU) rRNA 遺伝子を増幅する PCR 解析を行ったところ陽性コントロールは陽性であったが、この検体は陰性であった。末梢血の感染赤血球の原虫の形態は *P. malariae* に類似するものの、成熟 schizont が辺縁に嚢を有していた。



P. knowlesi 感染塗抹像: Giemsa 染色

Singh ら(2004)らが開発した SSU rRNA を標的とする Pmk8 (5'GTT AGC GAG AGC CA CAA AAA AGC GAA T3')と Pmk8 (5' ACT CAA

AGT AAC AAA ATC TTC CGT A3')ならびにミトコンドリアチトクローム b 遺伝子配列を標的とする mTPk-F (5'AGG TAT TAT ATT CTT TAT ACA AAT ATT AAC-3')と mPk-R (5'TCT TTT ATA ATG AAC AAG TGT AAA TAA TC3')を用いて PCR を行い、増幅産物が得られた場合は増幅産物の塩基配列の解析を行った。その結果、本例が保有するマラリア原虫のこれらの塩基配列は *P. knowlesi* H 株 (AF069621)と 100% 完全一致した。

P. knowlesi はマレー半島とフィリピン諸島に生息するカニクイザル *Macaca fascicularis* を自然宿主とし、これ以外にもブタオザル *M. nemestrina*、リーフモンキー *Presbytis melalophos* も宿主とされている。1932 年に Knowles らにより分離・同定され、マレーシアの森林での人体の自然感染が 1965 年に報告されている。本例でも明らかかなように末梢血の赤血球内の原虫の形態は *P. malariae* に類似しており、また、Singh らの例では *P. falciparum* とも鑑別が困難であった例もあり、この点に留意しながら塗抹像を観察し、必要とあれば特異的 PCR により確定診断をする必要がある。

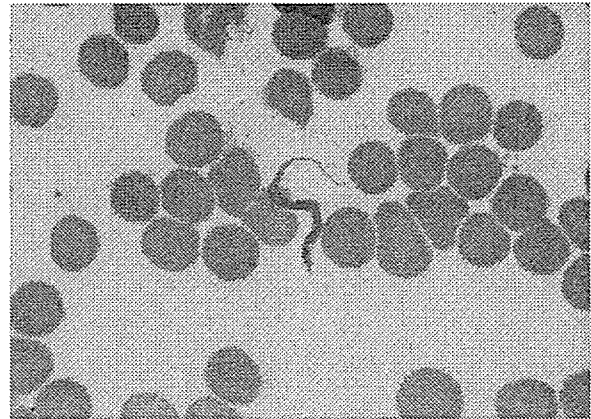
3. *Trypanosoma evansi* の人体感染例

2005 年 2 月 WHO の Weekly Epidemiological Record Vol 80 No 7 61-64 にインドで発生した人体の trypanosomiasis が報告された。これまで人体に感染する *Trypanosoma* にはアフリカにおいて伝播する *T. brucei* と南アメリカの *T. cruzi* が認識されていたが、これ以外の地域でその地域で感染したと推定されるヒト trypanosomiasis は初めてであった。このインドの例は 2004 年 10 月に発症し、海外旅行歴はなく、症状は発熱と知覚障害であった。家畜と接触する職業についていた。末梢血検査で trypanosomes が検出された。7-10 日間隔の発熱を繰り返し、2005 年 2 月まで高原虫血症が持続した。最終的に安全試験後、suramin 1 g による点滴治療が 5 週間行われ、末梢血の原虫は消失し、以後 3ヶ月間検出されていない。ほぼ同時期にインドの他の地域でも 1 例の死亡例の存在が推定されている。

T. evansi は本来は家畜の原虫であり、サシバエ、アブ等の多種類の吸血昆虫により媒介あるいは物理的に伝播すると推定されている。しかし、インドのこの人体例での伝播様式は確定していない。患者が家畜の皮膚と接触した既往があり、手指の微小外傷により伝播した可能性

も否定しきれないとされている。

私たちはタイ北部のチェンマイ近郊において *T. evansi* の乳児例が存在したことを確認した。発症時の末梢血には多数の原虫が存在し、かつこの地域の家畜間には *T. evansi* が伝播していることも確認した。現地で提供を受けた乳児の塗抹標本を提示する。



このように、細胞外に存在する原虫を認め、形態学的には trypanosoma の形状であった。残念ながら、本例を詳細に検討する機会を得ることはできず、経過が良好であったことのみ確認している。

D. 考察

熱帯地域からは種々の新興病原体が報告され、これらの大部分は人獣共通感染症である。本研究では分担研究者が熱帯地域の共同研究者の遭遇したこれらの病原体の検査法について検討を行い、これらの病原体の迅速診断法の開発ならびに確認を行っている。今年度は 3 種類の病原体、ウイルス 1 種類と原虫 2 種類を取り上げた。ウイルス感染症の形態学的把握は困難なことが多く、ウイルスゲノムあるいは蛋白の検出か分離が原則で、抗体に関する血清学的診断は急性期の IgM 抗体を除くと迅速診断には適さず、また診断が確定しないことが多い。分離は時間を要し、また今回対象としたニパウイルスは BSL-3 あるいは BSL-4 施設を必要とし、容易ではなく、ウイルスゲノム・蛋白の検出が第一となる。PCR を用いた方法は迅速かつ容易であり、最も多く使用されている方法であるが、検査室汚染による偽陽性が頻繁に生じていることが否定できず、本邦に存在しない病原体を PCR のみで診断することには危惧を覚える。今回、ニパウイルスの nucleoprotein 遺伝子の一部を欠失させた鋳型を作製した。この鋳型を用いることにより検査室汚染との区別が容易となる。この鋳型は 1500 塩基と長く、種々のプライマー

による増幅が可能であるが、欠失部を挟まない PCR は不適であることに留意しなければならない。

マラリアは熱帯地域では猛威をふるっている感染症であり、発熱患者が検査なくマラリアと診断されていることもある。血液塗抹が診断の基礎とされているが、今回提示した例のように、感染したマラリア原虫の形態学的同定が困難な例も存在する。最終的には PCR を用いた診断に依存しなければならない。幸い、サルマラリアは熱帯熱マラリアのような重症化は来さないが、治療のための薬剤選択・耐性等において確実に鑑別することが要求される。未だに十分な情報が得られていないサルマラリア人体感染について今後の臨床研究が必要とされている。

Trypanosoma evansi のヒト症例の存在をタイにおいて認識し、その後、文献学的に検索したところ、2004 年に初めてその疾患概念が確認されたことを認識した。現在、アジア、とくにフィリピンにおいては家畜の感染が問題となっているが、今後はこれら家畜産業における従事者さらにはヒトからヒトへの伝播も問題となることが予想される。血液塗抹を顕微鏡下で確認すれば原虫の検出は容易であるが、検査室の機械化にともない本邦では末梢血を確認しないことが予想される。現在、タイの流行地より固定した原虫を入手し、PCR ならびに鋳型作製の検討を開始した。

E. 結論

熱帯地域では次々と新興病原体が発見されているが、これらの多くは人獣共通感染症である。この背景には診断の機会が増加したこと、開発に伴い野生動物とヒトとの接点が増したことがある。これらの病原体、それぞれに、適した迅速診断法が必要とされている。

F. 健康危機情報

家畜を自然宿主とする *Trypanosoma evansi* の人体感染成人例が WHO により 2004 年インドにて発生していることが報告されている。また、タイ北部においても同様の感染が推定された乳児

例が発生しており、この病原体も人獣共通感染症としてのリスクを有している。

G. 知的所有権の取得状況

なし

H. 研究発表

1. Nishimura N, Yoshikawa T, Ozaki T, Sun H, Goshima F, Nishiyama Y, Asano Y, Kurata T, Iwasaki T. in vitro and in vivo analysis of human herpesvirus-6 U90 protein expression. *J Med Virol* 2005 Jan; 75:86-92
2. Miyachi S, Lu X, Inoue S, Iwasaki T, Koike S, Nambu A, Takada M. Organization of multisynaptic inputs from prefrontal cortex to primary motor cortex as revealed by retrograde transneuronal transport of rabies virus. *J Neuroscience* 2005 Mar 9; 25(10): 2547-56.
3. Suzuki R, Sakamoto S, Tsutsumi T, Rikimaru A, Tanaka K, Shimoike T, Moriishi K, Iwasaki T, Mizumoto K, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 2005 Jan; 79 (2): 1271-1281
4. Ida-Hosonuma M, Iwasaki T, Yoshikawa T, Nagata N, Sato Y, Sata T, Yoneyama M, Fujita T, Taya C, Yonekawa H, Koike S. The alpha/beta interferon response controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus. *J Virol* 2005; April 79 (7): 4460-9
5. Arita M, Shimizu H, Nagata N, Ami Y, Suzaki Y, Sata T, Iwasaki T, Miyamura T. Temperature sensitive mutants of enterovirus 71 show attenuation in cynomolgus monkeys: Implication of temperature sensitivity as a determinant of attenuation. *J Gen Virol*. 2005 May; 86(Pt 5): 1391-401.
6. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, Ferreira MU, Kanbara H, Hughes AL. Mitochondrial genome sequences support ancient population expansion in *Plasmodium vivax*. *Mol Biol Evol*. 2005 Aug; 22(8):1733-9. Epub 2005 May 18.□

平成17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。したがって本研究の目的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。高病原性鳥インフルエンザが発生した際には、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を開発している。本年はニワトリおよびミニブタを用いたウイルス感染試験を実施し、本ELISAの有用性を評価した。その結果、ニワトリおよびミニブタの感染14日目以降の血清中にはNS1に対する抗体が特異的に検出され、ワクチン接種動物のそれらには検出されなかった。したがって、本法によって動物インフルエンザウイルスの感染によって誘導される抗体とワクチン抗体を識別できることがわかった。

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した。本年はニワトリおよびミニブタを用いた感染実験を実施し、本ELISAの有用性を評価した。

B. 研究方法

ニワトリに低病原性鳥インフルエンザウイルスA/chicken/Ibaraki/1/05 (H5N2) を実験感染させた。ニワトリから経時採血し、血清中のNS1に対する抗体をELISAにより検出した。また、本ウイルスを不活化して作製したワクチンをニワトリに免疫し、同様に経過血清を採取した。ワクチンを接種したニワトリの血清中に抗NS1抗体が検出されるかについても本ELISA系で検査した。

また高病原性鳥インフルエンザウイルスA/turkey/England/63 (H7N3) をニワトリに接種した。14日間飼育し、死亡および生残したニワトリの血清を採取し、同様に抗NS1抗体の検出を試みた。

ミニブタに豚インフルエンザウイルスA/swine/Hokkaido/2/81 (H1N1) を実験的に感染させた。経過血清中の抗NS1抗体をELISAで検出した。また、市販の豚インフルエンザワクチンをミニブタに接種し、同様に経過血清を採取した。ワクチン接種豚の血清に抗NS1抗体が検出されるか否かについても本ELISAで検査した。

C. 研究結果

ニワトリに A/chicken/Ibaraki/1/05 (H5N2) を接種したところ、ニワトリはすべて生存した。感染後 14 日目から NS1 に対する抗体が検出され、以後実験終了した 48 日目まで抗体が検出された。また A/turkey/England/63 (H7N3) を接種したところ、その大半が感染 14 日以内に死亡した。これらのニワトリからは抗 NS1 抗体は検出されなかった。しかし、感染に耐化した 2 羽からは抗 NS1 抗体が検出された。よって、低病原性株および高病原性株いずれに感染したニワトリからも抗 NS1 抗体が検出できることがわかった。また不活化ワクチンを接種したニワトリからは抗 NS1 抗体は全く検出されなかった。

ミニブタにおける感染実験においても感染 14 日目には抗 NS1 抗体が検出され、ワクチン接種豚には抗 NS1 抗体は検出されなかった。

D. 考察

ワクチンが接種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、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ことがわかった。今回の感染実験の成績から本 ELISA の有用性が確認されたので、野外に応用してサーベイランスを進める計画である。

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を確立するために、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) Kishida N, Sakoda Y, Isoda N, Matsuda K, Eto M, Sunaga Y, Umemura T, Kida H (2005) Pathogenicity of H5 influenza viruses for ducks. *Arch Virol*, 150: 1383-1392
- (2) Matsuda K, Shibata T, Sakoda Y, Kida

H, Kimura T, Ochiai K, Umemura T (2005) In vitro demonstration of neural transmission of avian influenza A virus. *J Gen Virol* 86: 1131-1139

(3) Takeda S, Sbagyo A, Sakoda Y, Ishii A, Sawamura M, Sueoka K, Kida H, Mukasa K, Matsumoto K (2005) Application of carbon nanotubes for detecting anti-hemagglutinins based on antigen-antibody interaction. *Biosensors and Bioelectronics* 21: 201-205

(4) Bai G, Sakoda Y, Mweene AS, Yamada T, Minakawa H, Kida H (2005) Evaluation of the ESPLINE INFLUENZA A&B-N kit for the diagnosis of avian and swine influenza. *Microbiol Immunol*, 49, 1063-1067

(5) Bai G, Sakoda Y., Mweene AS, Fujii N, Minakawa H and 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

(6) Muramoto Y, Ozaki H, Takada A, Park C-H, Sunden Y, Umemura T, Kawaoka Y, Matsuda H, Kida H (2006) Highly pathogenic H5N1 influenza virus causes coagulopathy in chickens. *Microbiol Immunol*, 50: 73-81.

(7) 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*, in press

2. 学会発表

(1) 「野生水禽から分離された H7 亜型鳥インフルエンザウイルスの遺伝子および抗原性解析」坂部沙織、Aaron Mweene、曾田公輔、磯田典和、岸田典子、迫田義博、喜田宏 第 140 回日本獣医学会学術集会 (2005 年、鹿児島)

(2) 「野生水禽から分離された H7 亜型鳥インフルエンザウイルスの遺伝子および抗原性解析」坂部沙織、Aaron Mweene、曾田公輔、磯田典和、岸田典子、迫田義博、喜田宏 第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (2005 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

国内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

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
	鈴木 道雄	国立感染症研究所	獣医科学部	第1室研究員
	谷川 力	イカリ消毒株式会社	技術研究所	所長
	小泉 信夫	国立感染症研究所	細菌第一部	主任研究官
	林 栄治	東京医科歯科大学大学院		助手
	宇根 有美	麻布大学獣医学部	病理学研究室	助教授
	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つである *Streptobacillus moniliformis* は、ラットの口腔内から検出されるが、ラットによる咬傷や掻き傷および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。昨年度に引き続き、国内野生ラット（ドブネズミおよびクマネズミ）の *S. moniliformis* 保有状況の調査を行い、さらに、実験用ラットおよびペット用に輸入された外国産齧歯目および食虫目についても調査をおこなった。その結果、実験用ラットおよびペット用輸入齧歯目および食虫目からは今回は検出されなかったが、屋内外の野生ラットでは、高率に保菌が確認された。また、*S. moniliformis* 検出のために、16S rRNA を標的とした PCR 法の開発を行っているが、今回、近縁の細菌に対しても増幅が起こるという不十分な点を改善し、より有効な検出方法を確立した。

A. 研究目的

鼠咬症の原因菌は、*Streptobacillus moniliformis*（グラム陰性、多形性桿菌、好気性もしくは通性嫌気性）と *Spirillum minus*（グラム陰性、螺旋状）がある。本研究の検討対象である *S. moniliformis* は主にラットの口腔内細菌の1つであり、他の齧歯類にも保菌する物がある。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。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、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った。さらに、過去に保菌動物として報告例のある実験用ラットと、ペット用に輸入された外国産齧歯目および食

虫目についても *S. moniliformis* 保菌状況の調査を行った。

B. 研究方法

1. サンプル (口腔内スワブ) : ラットより口腔・咽喉頭スワブを、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、豊島区千早町 (4 匹)、静岡県沼津市 (1 匹)、横浜市中区石川町 (10 匹)、横浜市中区黄金町 (11 匹)、横浜市浮島 (1 匹)、諏訪市諏訪湖畔 (1 匹)、ひたちなか市 (11 匹)、銚子市 (10 匹) の計 49 匹で、いずれもドブネズミ (*Rattus norvegicus*) であった。屋内捕獲ラットは、計 25 匹で、内訳は、ドブネズミ (*R. norvegicus*) が、豊島区池袋 (1 匹)、八王子市 (1 匹)、クマネズミ (*Rattus rattus*) が、新宿区の商業ビル (15 匹)、新宿区の商店街 (1 匹)、豊島区のデパート (6 匹)、小笠原 (1 匹)、であった。

実験用ラットは、Fisher344 (28 匹)、Wistar (25 匹) の 2 系統を検討し、これらは同じ国内ブリーダーの SPF であった。

外国産齧歯目 (19 種、189 匹)、外国産食虫目 (1 種、10 匹) は、いずれもペット用を目的として輸入されたものであった (Table 1)。

2. サンプル処理 : 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 % CO₂ 存在下および微好気下で培養し、残りは 488 broth 8 ml を用いて 37°C、5 % CO₂ 存在下で培養した。

3. 陽性対照菌株 : 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。

4. DNA の検出 : 一晚培養後の 488 broth 1

ml の遠心沈査、ならびに適宜培養後の 488 agar 上のコロニーを少量 (50~100ul) の TE に溶解し熱変成後、16S rRNA 特異的プライマーを用いて PCR を行った。昨年度の検討では、Boot ら (Lab. Anim., 36:200-8, 2002) の報告による S および AS プライマー (Table 2) のシーケンスが、*Leptotrichia amnioni* との相同性が高く、S および AS のみでは十分な特異性は得られず、そのため *Leptotrichia* のシーケンスと塩基配列の異なる部分を中心にして、S3 および S4 を作製した。今年度は、さらに特異性の高い S5 および AS2 を新たに作製し検出に用いた (Table 2)。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。

C. 研究結果

1. PCR 用プライマーの特異性 : 昨年度の検討では S-AS、S4-AS のどちらの組み合わせでも、近縁な *Leptotrichia* では、特異的産物とほぼ等しい位置にバンドが確認され、区別できなかった。また、S3-AS の組み合わせでは *S. moniliformis* と *Leptotrichia* が区別できるもののサイズの異なる非特異的バンドが認められた。新たに作製した S5、AS プライマーを用いて、その特異性を検討したところ、S5-AS2 の組み合わせは、近縁の *Leptotrichia* においても、その他の細菌においても非特異的バンドは認められず、前述のプライマーよりも高い特異性を示した (Fig. 1)。

2. ラットサンプルにおける 16S rRNA の検出 (Table 3) とシーケンス : S-AS プライマーでは、ドブネズミは全て (51/51)、クマネズミでは 11/23 が陽性を示した。今回作製した S5-AS2 を用いて特異性の確認をしたところドブネズミは 44/51、クマネズミは 11/23 が陽性を示し