

Table 1. 主要野外病原体の陽性率

2011年	抗トキソプラズマ 抗体	抗レプトスピラ 抗体	フィリア 抗原	ジフテリア 抗毒素抗体	ボレリア ELISA/Western
佐渡(17)	17.6	5.9	29.4	5.9	5.8
渥美(14)	21.4	—	—	—	14.2
対馬(20)	40.0	20.0	47.4	—	5.0
大隅(25)	32.0	8.0	40.0	20.0	44.0
種子(20)	30.0	20.0	30.0	—	20.0
屋久(28)	60.7	7.1	55.6	—	17.8
奄美(37)	32.4	2.7	38.9	8.1	2.7
沖縄(6)	50.0	16.7	100	16.7	0
石垣(29)	37.9	17.2	35.7	10.3	20.6
2010(142)	19.7	ND	26.0	7.7	44.3
2009(155)	ND	7.8	ND	8.4	19.4

(検出率:%)

競合 ELISA 法による多様な動物種に適用可能な野兔病菌抗体測定法の開発

研究分担者 棚林 清 国立感染症研究所獣医科学部第三室 室長
研究協力者 シャルマ ニークン*、堀田明豊、宇田晶彦、藤田修、山本美江
(国立感染症研究所獣医科学部、*岐阜大学大学院連合獣医研究科)
溝口俊夫(福島県鳥獣保護センター)、進藤順治、朴天鎬、小山田敏文、畑井仁、
工藤上(北里大学獣医学部)

研究要旨 野兔病の起因病原体である野兔病菌 (*Francisella tularensis*) は、非常に多くの動物種に感染することができ、野生動物等の血清疫学調査では、多様な動物種に適用可能な抗体測定法が必要となる。本研究では野兔病菌 LPS および抗 LPS モノクローナル抗体を抗原と標準抗体として各種動物由来血液検体に含まれる野兔病菌抗体による競合反応として測定する競合 ELISA (Ft-cELISA) を開発した。本方法で、既知の野兔病菌免疫ウサギ血清抗体や患者血清抗体等を効率よく測定することができた。また、国内の野生動物の血液検体について野兔病菌抗体の検出を試み、ツキノワグマ、ニホンザル、ホンダタヌキ、野鼠類で陽性反応を認めた。これらはいずれも微量凝集反応 (MA) 法でも陽性であった。Ft-cELISA は動物種特異的標識二次抗体等を用いることなく野兔病菌抗体を測定でき有用な方法と考えられるが、さらに多くの検体を測定し、MA やウェスタンブロット法等の他の手法との相関性を検証する必要がある。

A. 研究目的

野兔病菌は、代表的な動物由来感染症である野兔病の起因病原体である。本菌は、感染ノウサギやげっ歯類との直接接触、ダニや蚊等の吸血性節足動物の媒介、汚染食物や水、汚染塵芥の吸入等によりヒトに感染するとされている。日本での患者発生は近年まれであるが、これまでのヒトへの感染のほとんどがノウサギとの接触が原因となっている。しかしながら、本菌は非常に多数の動物種に感染が可能である事が知られており、各種動物での分布状況を調査解析し、本菌の生態系での維持様式やヒトへの感染リスクを評価するための基礎的情報を収集することは重要である。

各種動物、特に野生動物における感染状況の調査では血清中の野兔病菌に対する抗体を検出する血清疫学調査は有効な手法と考えられる。このための抗体測定法としては、微量凝集

反応 (MA) 法や ELISA 法などが用いられる。しかしながら、特に、野生動物から採取される検体においては、溶血していたり、少量しか採取できないなどの困難さがある。また、通常の ELISA 法では酵素標識された動物種特異的イムノグロブリン抗体などが利用されるが、市販されている動物種は限られている。

本研究では、多様な種の動物における野兔病菌抗体を測定するための方法として競合 ELISA (Ft-cELISA) 法の開発を行い、この方法で国内各種動物の血液検体での野兔病菌抗体検出に応用することを目的とした。

B. 研究方法

1. 野兔病菌抗体測定用 Ft-cELISA

(1) 抗原および標準抗体 : ELISA 用 96 穴プレートに固相化する野兔病菌の抗原は、リポポリサッカライド(LPS)を用いることとし、LPS

の抽出は国内斃死ノウサギより分離した NVF1 株を chocolate agar II 培地 (Becton Dickinson 社) で培養後、LPS extraction kit (iNtRON Biotechnology 社) を用いて行った。

標準抗野兎病菌抗体は、LPS を認識するマウスモノクローナル抗体 (クローン M14B11) をビオチン標識 (T.K. Craft 社) して用いた。

(2) cELISA 反応: 抽出精製 LPS 抗原 (2.5µg/50µl/well) を 96 穴 ELISA プレートに加え 37°C で 16~18 時間保温し固相化した。PBST (0.1% Tween20 加 PBS) での洗浄後、3% スキムミルク加 PBST でブロッキングした。PBS で希釈した検体 50µl を加え 37°C、90 分間反応させ、PBST で洗浄後、ビオチン標識抗 LPS 抗体 (3.4mg/ml) 50µl を 37°C、60 分間反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンおよび SureBlue reserve TMB MicroWell Peroxidase Substrate (KPL 社) を反応させ、固相抗原と反応した標準 LPS 抗体を発色させた。1N 塩酸で反応停止後 450nm の吸光度を計測した。

(3) 反応阻止率の算出: 検体中の野兎病菌 LPS 抗体による標準抗 LPS 抗体の反応の阻止率(% inhibition)は、検体希釈液だけを事前に反応させた時の標準抗 LPS 抗体の吸光度を 100% とし、検体を反応させた場合の吸光度の割合を、以下の計算式により算出した。

$$1 - \left(\frac{\text{OD sample} - \text{OD Background}}{\text{OD standard} - \text{OD Background}} \right) \times 100$$

2. cELISA での既知血清の反応

不活化野兎病菌を免疫したウサギ血清 (2 検体) を 125 倍から 16,000 倍に希釈し、各希釈における反応阻止率を Ft-ELISA で測定した。陰性対照には非免疫ウサギ血清を用いた。同様に、不活化菌を免疫したマウス血清 (2 検体) および感染耐過したマウスの血清を測定した。さらに、不活化した野兎病菌の類似菌である *F. novicida* の免疫マウス血清についても測定した。また、野兎病と診断されたヒト血清および野兎病と確認されなかった血清各 3 検体も段階

希釈して測定した。ヒト血清の使用については国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会で承認されたものである。

3. 非特異反応の確認

Ft-cELISA の特異性を確認するために、不活化ブルセラ属菌 (*Brucella abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. suis*) や *Yersinia pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* を免疫したウサギ血清を段階希釈し各希釈での反応阻止率を測定した。これらの血清は国立感染症研究所獣医科学部今岡浩一博士より分与された。

4. 各種野生動物由来血液検体の測定

収集または分与された国内野生動物由来血液のうち、主に、過去に野兎病の発生が多く報告されていた東北地方で捕獲された各種動物の検体 (表 1、ノウサギについては血清あるいは全血吸収ろ紙からの抽出液) 合計 510 検体の 100 倍希釈液について Ft-cELISA を行い、阻止率を算出し、30% 以上を陽性とした。なお、血清については MA 法でも抗体価を測定した。

C. 研究結果

1. 野兎病菌免疫ウサギおよびマウス血清および既知の患者血清の Ft-cELISA での反応

不活化した野兎病菌を免疫したウサギ血清および非免疫血清を段階希釈して、標準抗 LPS 抗体の反応阻止率を算出した (図 1A)。2 検体の免疫ウサギ血清はそれぞれ 4,000 倍または 8,000 倍希釈まで 30% 以上の阻止率を示した。非免疫血清はほとんど反応を阻止しなかった。

野兎病菌感染後耐過したマウス血清および不活化菌免疫マウス血清はそれぞれ、1,000 倍以上、500 倍、250 倍で 30% 阻止を示し、非免疫マウス血清での阻止は見られなかった。野兎病菌の類似菌である *F. novicida* の免疫血清は低希釈で 20% 程度の阻止が見られた (図 1B)。

MA で野兎病菌抗体が確認されたヒト血清 3 検体はいずれも希釈に応じた反応阻止を示し、いずれも 2,000 倍希釈で 30% 以上の阻止率を示した。なお、これらの MA 抗体価は 40 または 160 であった。MA で 10 倍未満の非野兎病ヒト血清 3 検体では、いずれも反応阻止は認め

られなかった。(図2)

3. 非特異反応の確認

Ft-cELISAの特異反応性を確認するために、野兎病菌以外の細菌が免疫されたウサギ血清の反応を調べた。野兎病検査で非特異反応の可能性が指摘されているブルセラ属菌免疫血清のうち *B. abortus* と *B. canis* 血清や *Y. enterocolitica* 免疫血清は低希釈で20%程度の反応阻止を示した。*B. melitensis*、*B. suis* や *Y. pestis* では弱い阻止が見られたが、*Y. pseudotuberculosis* を免疫したウサギ血清は阻止しなかった。(図3)

4. 各種野生動物由来血液検体の測定

国内の各種野生動物血液510検体について、その100倍希釈液をFt-cELISAで測定し30%以上を阻止した検体数およびMAで10倍以上の抗体価を示した検体数を陽性として表1に検体数を示した。ツキノワグマで4/28(陽性数/供試検体数)、ニホンザル1/26、ホンダタヌキ3/21、野鼠類2/120がFt-cELISAで陽性だった。また、MAでは7検体が陽性であり、これら7検体は全てFt-cELISAでも陽性の検体であった。

D. 考察

動物由来感染症のサーベイランスやモニタリングの結果は感染症対策立案のための重要な情報を提供できる。そのためには、的確な検査法での調査が必要である。特に、人獣共通感染症においては感染源動物における調査も重要となる。本研究では動物由来感染のうち野兎病の動物での調査に有用な抗体検査法の確立とその応用を試みた。

野兎病の抗体検査は通常MA法により実施され、簡易な方法である一方、非特異反応の可能性があること、検出感度が低いこと、溶血が著しい検体では利用しにくい等の問題がある。また、ELISA法は、多検体処理が可能で感度もよい方法であるが、利用できる標識二次抗体に制限がある。これらの問題を解決する抗体検出法として競合ELISAを野兎病抗体測定に応用することとした。事前に、使用する菌

株の選定や全菌体抗原あるいはLPS抗原を使用したcELISAを検討し、菌株は斃死野兎から分離され人工培地での継代が進んでいないNVF1株を、標準抗体としては、当研究室で樹立した抗野兎病菌LPSマウスモノクローナル抗体を用いることとし、ビオチン標識して用いた。

抗原や標準抗体の使用濃度や反応時間等の基礎条件を検討し、初めに不活化野兎病菌免疫ウサギ血清抗体を測定したところ検体の希釈倍率依存的に標準抗体の反応を阻害し、高希釈倍率まで有意な阻害反応を示し感度良くできることが示された。同様に免疫または感染耐過マウス血清でも測定できた。次に、既知のヒト血清においても血清濃度依存的な阻害率を示し、非特異な阻害は認められず本Ft-ELISAが有用であることが示された。また、MA法では40倍もしくは160倍の抗体価を示した血清はFt-ELISAでは2,000倍でも30%阻害を示し、MAに比較して50倍以上感度がよい方法であることが示された。さらに、他の病原体免疫血清での阻害はなかった。これらの結果から、本Ft-cELISA法での抗体陽性判定は30%阻害以上とすることとした。

ノウサギ、ツキノワグマ、野鼠等の野生動物の血液検体での野兎病菌抗体測定に応用できるかを検証するために、510検体をFt-ELISAで測定したところ、ツキノワグマ、ホンダタヌキ、ニホンザルで合計10検体が30%以上の阻害を示した。MA法で10倍以上の抗体価を示した全検体がFt-cELISAでも陽性と判定できたことから高感度に検出できる方法であることがわかり、本法が多種類の動物血清の抗体測定に有用であると示唆された。しかしながら、野兎病菌抗体陽性の野生動物の検体数は少なく他の手法との相関性等を正確に検証するためにもさらに多数の検体の測定とMAをはじめウェスタンブロット法や蛍光抗体法等の他の測定方法との比較検証をする必要があると考えられる。

本研究に使用した動物検体の分与および収集に協力いただいた、岩手大学青木美樹子先生、

北海道大学荏和宏明先生、大日本獺友会および
獺友会会員の皆様に感謝いたします。

E. 結論

多様な動物種に適用可能な野兎病菌抗体測定法として競合 ELISA(Ft-cELISA)を開発した。実験用ウサギやマウス免疫または感染血清、および野兎病患者血清で明らかな抗野兎病菌 LPS モノクローナル抗体の反応阻害がみられ、野兎病菌以外の抗体は反応を阻害しなかった。Ft-cELISA で 510 検体の各種野生動物の血液検体を測定し 10 検体が陽性と判定され、微量凝集反応法での陽性検体は全て陽性だった。本 Ft-cELISA は多種類の野生動物の野兎病の血清疫学調査に有用と考えられる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Seroprevalence of tularemia in wild bears and hares in Japan. Zoonoses and Public Health (印刷中) A. Hotta, K. Tanabayashi, Y. Yamamoto, O. Fujita, A. Uda, T. Mizoguchi and A. Yamada

2. 学会発表

Development of competitive ELISA for serosurvey of tularemia among various animal species. N Sharma, A Hotta, K. Tanabayashi, Y Yamamoto, O Fujita, A Uda, T Mizoguchi, J Shindo, C-H Park, N Kudo, H Hatai, T Oyamada, A Yamada. 5th Asian Workshop on Zoo and Wildlife Medicine/Conservation in Nepal 2011 (2011年10月 カトマンズ、ネパール)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

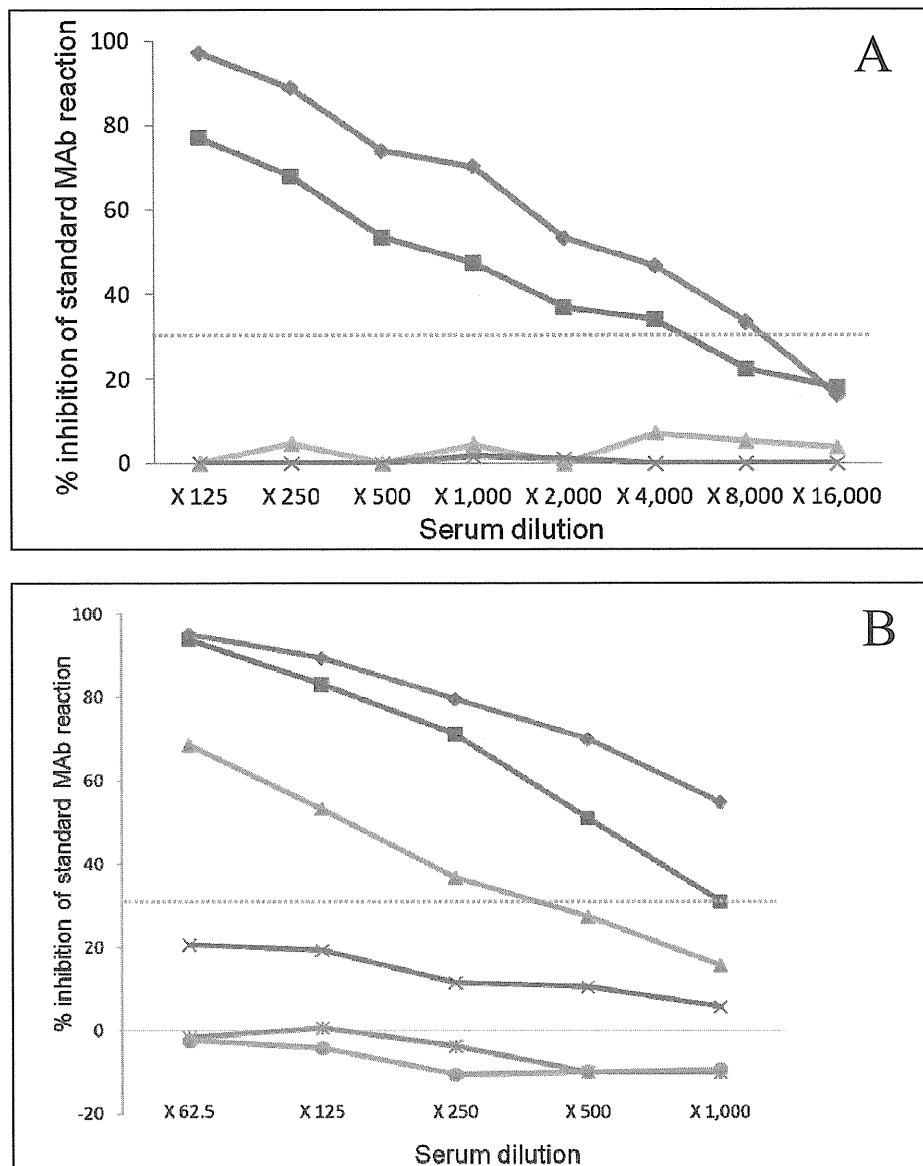


図1. 野兎病菌免疫ウサギおよびマウス血清の Ft-cELISA での反応

(A) 不活化野兎病菌免疫ウサギ血清 (◆、■) および非免疫ウサギ血清 (▲、×) を 125 倍から 16,000 倍まで 2 倍段階希釈して Ft-cELISA で反応させ、各希釈での反応阻止率を算出した。(B) 不活化野兎病菌免疫マウス血清 (■、▲)、感染耐過マウス血清 (◆)、不活化 *F. novicida* 免疫マウス血清 (×) および非免疫マウス血清 (●、※) を 62.5 倍から 1,000 倍まで 2 倍段階希釈して Ft-cELISA で反応させ、各希釈での反応阻止率を算出した。

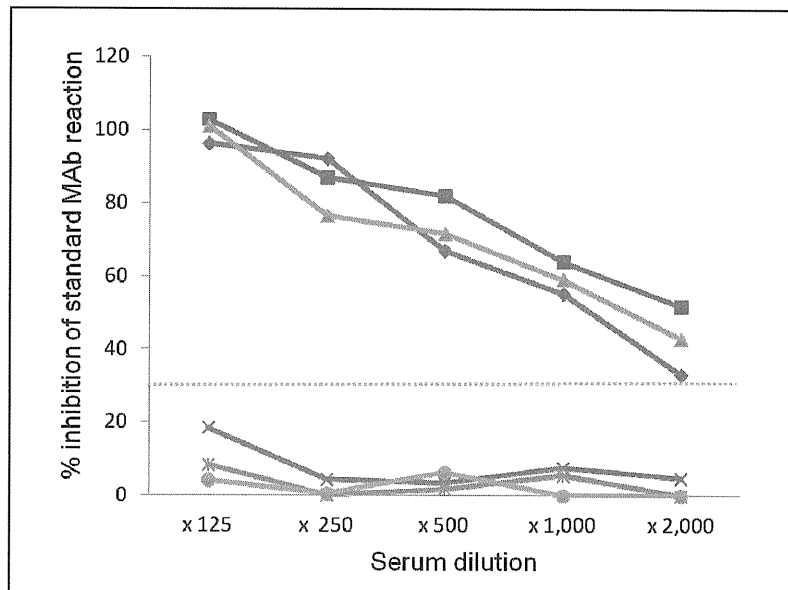


図 2. 野兔病菌抗体陽性および陰性ヒト血清の Ft-cELISA での反応
陽性ヒト血清 (◆、■、▲ : MA 抗体価はそれぞれ 40 倍、160 倍、160 倍)
および陰性ヒト血清 (×、※、● : MA 抗体価はいずれも 10 倍未満) を 125
倍から 2,000 倍まで 2 倍段階希釈して Ft-cELISA で反応させ、各希釈での
反応阻止率を算出した。

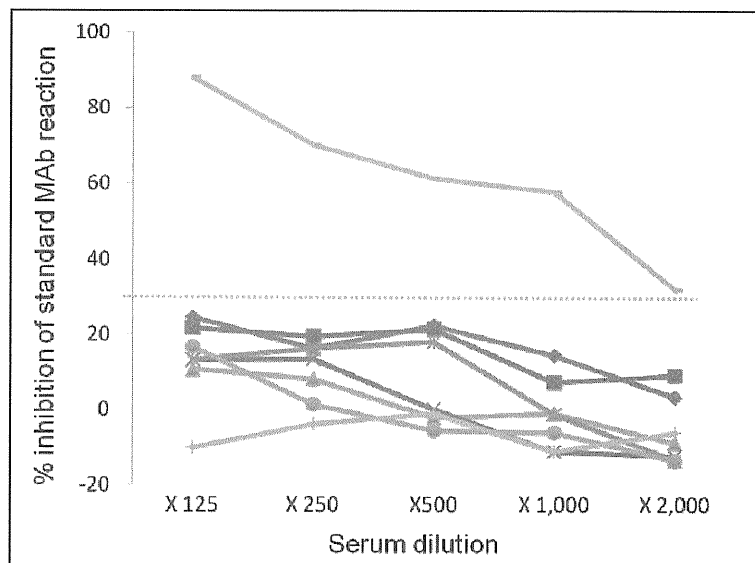


図 3. 各種細菌免疫ウサギ血清の Ft-cELISA での反応
不活化 *Brucella abortus*(◆), *B. canis*(■), *B. melitensis*(▲), *B. suis*(×),
Y. enterocolitica (※), *Yersinia pestis* (●), *Y. pseudotuberculosis* (+)
F. tularensis(-)免疫ウサギ血清を 125 倍から 2,000 倍まで 2 倍段階希釈して
Ft-cELISA で反応させ、各希釈での反応阻止率を算出した。

表 1. 各種野生動物由来血液検体の Ft-cELISA による陽性率

野生動物種等	No. of samples	No. of positive	
		cELISA	MA
ノウサギ	142	0	0
ツキノワグマ	28	4	4
ニホンザル	26	1	0
ホンドタヌキ	21	3	2
ハクビシン	20	0	0
ホンドキツネ	3	0	0
野ネズミ類 (アカネズミ、ハタネズミ、ヒメネズミ、トガリネズミ、ヒミズ)	120	2	1
ラット類 (クマネズミ、ドブネズミ)	97	0	0
猛禽類 (オジロワシ、ハヤブサ、トビ、ノスリ、サシバ、フクロウ、オオタカ)	53	0	0
Total	510	10	7

(検体は PBS にて 100 倍希釈)

エキノコックスに関する研究

研究分担者 森嶋康之（国立感染症研究所 寄生動物部 主任研究官）

研究協力者 杉山 広（国立感染症研究所 寄生動物部 主任研究官）

山崎 浩（国立感染症研究所 寄生動物部 第二室長）

要旨 ヒトの感染時における早期診断システムの確立ならびに感染源となる動物での寄生虫の発育を阻害する分子標的治療薬の開発を目的とし、エキノコックスの各発育ステージに特異的に発現する遺伝子群を網羅的に同定するため、マイクロアレイでの解析に至適化した *in vitro* の人工培養系を開発した。

A. 研究目的

エキノコックス症は、エキノコックス属条虫の幼虫寄生によって引き起こされる人獣共通寄生虫症で、ヒトをはじめとする中間宿主動物に致死的な転帰をもたらす。このような強い病原性は一般的な条虫幼虫感染症と異なるものであるが、その差異は本属条虫のみに特異的な幼虫形態である原頭節の無性生殖能にあると考えられている。すなわち、中間宿主体内において原頭節は無性的に増殖していく。ところが、原頭節はイヌをはじめとする終宿主動物に経口摂取された場合、同発育ステージである原頭節へと再分化するのではなく、次の発育ステージである成虫へと変化し、有性生殖を行って虫卵を産生する。本研究は、このエキノコックスの原頭節が持つ二方向性の分化能に焦点をあて、はじめにその方向決定に関わる遺伝子の発現および制御の機構の分子レベルでの解明を試みている。

エキノコックス原頭節の分化を網羅的に解析するにあたって、各発育期を経時的に取得

しなければならない。しかし、本来の宿主動物を用いる方法では、感染動物の維持・飼育を行う施設面からも、また動物倫理上からも多数のサンプリングポイントを設定することができない。そのため、人工培養を用いたサンプリング方法が必要となる。

エキノコックス原頭節の人工培養は古くから試みられてきた。他の寄生蠕虫同様、いまだ生活環の完結までは至っていないが、種々の化学処理によってある程度の段階まで発育を促すことが可能とされている。ところが、予備的にこれらのプロトコルに従って得られたサンプルのRNA品質を調べてみると、たしかに発育を誘導することはできるものの、遺伝子発現プロファイリングにおいて要求される品質を満たすことができず、再現性の高い結果が得られないことが予想された。そこで本研究ではトランスクリプトーム解析に適用することが可能な損傷の少ないRNAを得ることを目的として、特に分化初期における人工培養法の至適化をはかった。

B. 研究方法

エキノコックス属原頭節の人工培養の基本的な考えは、終宿主に経口摂取されたあと、消化の過程で発生する事象をいかに再現するかであり、先行研究もこのことを常に意識している。本研究では、Smyth (1979) および Thompson et al. (1990) の方法を出発点として、より高品質の RNA を得られる条件について検討を進めた。

エキノコックスの原頭節は、二次包虫症によって感染させた実験動物（スナネズミ）から得た。原頭節は、定法にしたがって宿主組織から分離・精製後、以下の処理 I~III およびそれに付随する培養を行い、処理方法および時間の最適な組み合わせを探索した。

処理 I は胃環境を仮定したもので、1%ペプシン溶液あるいは 0.9%塩化ナトリウム溶液（pH 2.0）に浸漬し、37°C で 15 分/30 分/1 時間処理、処理 II は腸環境を仮定したもので、1%パンクレアチンおよび 10%胆汁（タウロコール酸ナトリウムまたは再構成イヌ胆汁のいずれか）溶液（pH 8.0）に浸漬し、37°C で 30 分/1 時間/2 時間処理、処理 III も腸環境の仮定で、0.3%トリプシン加・FBS 非添加培養液（Thompson et al. 1990）溶液に浸漬し、3 時間/12 時間/24 時間処理を行った。処理 III 終了後、FBS 加培養液に移し、38°C-5% CO₂ 条件下で本培養を行い、12 日後まで毎日サンプリングを行い、その際実体顕微鏡下で原頭節の翻転ならびに石灰小体の消失程度を主とした形態学的な変化を観察した。

得られたサンプルの評価は、形態学的な変化のほか、市販キット（PureLink RNA Mini Kit, インビトロジェン）を用いてトータル RNA を精製後、バイオアナライザ（Agilent 2100、アジレント）を用いて RIN 値を測定し、そ

れぞれの培養系で得られたサンプルの RNA の品質を比較した。

C. 結果

処理 I では処理溶液間で形態学的な差異は確認できなかったが、RIN 値を比べると、0.9%塩化ナトリウム溶液処理群でより高い値が示された。3 種の処理時間には有意な差は認められなかった。処理 II ではタウロコール酸ナトリウムと再構成イヌ胆汁とのあいだに有意な差は認められなかった。処理時間は 30 分~2 時間まで本培養時における形態学的な違いは認められなかったが、処理時間が延長するにつれ RIN 値が徐々に低下する傾向があった。処理 III は継続時間が長いほどその後の本培養時における翻転原頭節の出現率が高くなった。しかし一方で 24 時間処理では RIN 値が極端に低下し、本培養期間中の回復も遅かった。

以上、RIN 値ならびに形態学的変化にもとづいて分化初期における遺伝子発現を観察するのに最も優れた培養系として選別されたのは、処理 I : 0.9%塩化ナトリウム（pH 2.0）15 分→処理 II : 1%パンクレアチン+タウロコール酸ナトリウム（pH 8.0）30 分→処理 III : 実施しないで、処理から培養の全期間を通じた平均 RIN 値は 7.6 であった。

D. 考察

これまで検討がなされてきたエキノコックス原頭節の人工培養法は、生活環を完結させることに目標が置かれてきた。すなわち、成虫型への分化であれば性成熟（中間宿主への感染能を持つ虫卵の有無）である。しかしながら、これらの方法では、従来の分化と発育の促進を強く誘導することに主眼が置かれ、そのような処理によって一時的にはあれ

生じている虫体そのものの損傷が顧みられることはなかった。

実際、今回予備的に検討したところ、先行研究のプロトコルは、分化・発育自体は促進されたものの、生体へのダメージが大きく、マイクロアレイで要求される品質を満たすことが困難であった。マイクロアレイに適用する場合、アジレントは RIN 値 7.0 以上を推奨しているが、従来のプロトコルによって得られたサンプルでは RIN 値はしばしばこれを下回っていた。今回確立した方法では、虫体の損傷をできるだけ避けつつ、従来報告されてきた分化・発育程度とほぼ同等の効率を達成することができた。すでに本方法にもとづいて得たサンプルを用いてマイクロアレイデータを取得しており、現在解析を進めている。

また、今回検討を重ねた *in vitro* の人工培養法は、分化関連遺伝子の発現解析に有用であるのみならず、新規薬剤候補をスクリーニングする際の評価にも応用可能なものであり、作用機序の理解など、トランスクリプトーム解析と組み合わせての活用も期待される。

E. 結論

エキノコックスの発育ステージに特異的に発現する遺伝子群を網羅的に同定し、その制御機構を解析することを目的として、マイクロアレイを用いた解析に適用可能な品質の RNA サンプルを得るための人工培養法を開発した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

土壌中の *Bacillus* 属菌の分離・同定法の確立

分担研究者：井上 智 国立感染症研究所獣医科学部、室長
協力研究者：奥谷晶子 国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官

研究要旨：土壌中における炭疽菌の生活史を明らかにすることは国内における炭疽発生リスクを考える上でも非常に重要である。国内各地から土壌を採取・収集して、MYP 選択培地と羊血液寒天培地を用いて土壌中の炭疽菌近縁菌種で構成される *Bacillus cereus* group 菌種群を効率良く分離培養を行う方法を確立した。また、*B. cereus* group 菌種群の菌株ライブラリーを構築することで、臨床分離株と環境由来株との鑑別や、感染経路の特定にも有益となる遺伝型別に必要なゲノム情報等を得られることが期待される。

A. 研究目的

炭疽の発生がヒトや動物で疑われた場合には、患者や患畜から採取可能な検体を用いて炭疽菌の分離や同定が必要になるが、感染経路の特定には、周囲の環境検体に対する調査等が必要になる場合がある。これは、*Bacillus* 属菌が土壌中に生息して、芽胞の形態で土壌中に長く生存が可能であることによる。

現在、炭疽は国内で発生の見られない疾患であるが、芽胞として数十年間は土壌中に生存出来ると考えられていることから、土壌中における炭疽菌の生活史を明らかにすることは国内における炭疽発生リスクを考える上でも非常に重要である。

土壌中には、炭疽菌や、炭疽菌と遺伝的に非常に近縁である *B. cereus* を含む、いわゆる *B. cereus* group を構成する菌種群の芽胞が多数存在していると考えられているが、これまでにどの程度これらの菌種群が土壌中に存在しているか、どのように分布しているかについての知見は得られていない。また、菌の培養を阻害する物質が多く含まれる土壌から効率良く *B. cereus* group 構成菌種群を分離同定する方法についても選択培地の選択、培養法の検討などが必要である。

本研究では、国内各地から採取・収集した土壌中の *B. cereus* group 菌種群の網羅的検索および分離同定と炭疽菌芽胞および炭疽菌との鑑別

法の確立を行うことを目的としている。

B. 研究方法

日本国内各地域からこれまでに 14 地域 70 箇所
の土壌を収集し、うち 3 地域 12 箇所分を解析した。

培養法による *B. cereus* group を構成する菌種群の分離を以下の流れで行った。

土壌は 4°C に保存。

↓

土壌約 250m g 分を生理食塩水に 500 μL に懸濁した。なお、一部を 100°C 5 分で煮沸し、炭疽菌特異的プライマーを用いた PCR の鋳型とした。

↓

上記の懸濁液 100 μL を *B. cereus* 選択培地および羊血液寒天培地に塗沫。

↓

卵黄反応を確認したコロニーを羊血液寒天培地に純培養して溶血性の有無を確認した。卵黄反応陽性コロニーは *Bacillus* 属特異的プライマーおよび *B. cereus* group 特異的プライマーを用いたコロニー-PCR を行った。

↓

PCR で *B. cereus* group と判定されたコロニーを *B. cereus* group 菌種群として分離箇所毎に 6 株選択して更なる分離・同定を行うため

の菌株ライブラリーを作成した。

Bacillus cereus 選択培地には、MYP (mannitol, yeast extract, polymixinB) 含有寒天培地を使用した。

C. 研究結果

国内では以前炭疽が発生した地域あるいは炭疽の患畜を埋却した箇所には炭疽菌の芽胞が存在している可能性はあるものの、今回解析した土壌検体を鋳型とした PCR からは炭疽菌特異的遺伝子は検出されなかった。

選択圧の高い MYP 培地で一次培養を行い、純培養に羊血液寒天培地を用いたところ、MYP および羊血液寒天培地から純培養したコロニーの 60% 以上が *B. cereus* group 菌種群特異的遺伝子を保有していたことから、効率よく *B. cereus* group 菌種群のコロニーを分離培養することが出来た。

炭疽菌に近縁な *B. cereus* を各地点から 6 株ずつをグリセロールストックで -80°C で保存し、今後の遺伝子解析用のライブラリーを作成した。

D. 結論

土壌から効率よく *B. cereus* group 菌種群を分離培養する方法を確立することができた。これにより、近縁菌の菌株ライブラリーを充実させて、国内各地域の土壌中の *B. cereus* group 菌種群の分布を解析することが可能になった。また、これらの方法は土壌からの炭疽菌芽胞の分離に応用可能であると考えられる。

次年度は、構築した菌株ライブラリーから遺伝子を抽出して、*B. cereus* の 7 house keeping genes を用いた MLVA (タンデムリピート) 解析による系統解析を行い、土壌分離地域との相関の有無や食中毒由来の *B. cereus* との比較解析を行って遺伝子型別の方法を確立を試みる。

土壌中における炭疽菌の生活史を明らかにすることは国内における炭疽発生リスクを考える上でも非常に重要である。また、本研究の推進によって *B. cereus* group 菌種群の菌株ライブラリーを構築することで、臨床分離株と環

境由来株との鑑別および、感染経路の特定にも有益となる遺伝子型別に必要なゲノム情報等を得られることが期待される。

E. 研究発表

A. Okutani, H Tungalag, B Boldbaatar, A Yamada, D Tserennorov, I Otgonchimeg, A Erdenebat, D Otgonbaatar, and S. Inoue. Molecular Epidemiological Study of *Bacillus anthracis* Isolated in Mongolia by Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for 8 Loci (MLVA-8) Japanese Journal of Infectious Diseases 2011;4:345-348.

F. 知的所有権の取得状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

single chain variable fragment (scFv)と
Direct, rapid immunohistochemical test (DRIT) 法による
狂犬病ウイルス抗原検出法の開発

分担研究者：井上 智 国立感染症研究所獣医科学部、室長
協力研究者：加来義浩 国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官
野口 章 国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官
朴 天鎬 北里大学獣医病理学研究室、准教授

研究要旨：現在、世界の狂犬病患者の99%はイヌからの感染が原因とされている。アジア等の狂犬病流行地域で狂犬病の疑われるイヌから咬傷をうけたヒトは、暴露後のワクチン接種（PEP）の是非を医師に相談するとともに、狂犬病ウイルス（RABV）の感染リスクを判断するために、専門家による加害犬の観察（臨床診断）および安楽殺した当該犬の脳について実験室内ウイルス検査を速やかに行わなければならない。近年注目されているRABVの抗原検出法として、検査が簡便、かつ、高価な蛍光顕微鏡を必要としないDirect, rapid immunohistochemical test (DRIT) 法がある。本研究の目的は、獣医科学部・第二室で作出したRABV蛋白質を特異的に認識するsingle chain variable fragment (scFv)を使用したDRIT法の確立と有効性の検証である。現在、検出感度の向上を図るために抗RABV-PおよびN蛋白質scFvにビオチンを融合させた蛋白の発現を検討している。今年度、4クローンの抗RABV-P scFv、1クローンの抗RABV-N scFvの当該遺伝子をビオチン融合蛋白質発現プラスミドにクローニングした。今後、scFv-ビオチン融合蛋白質の発現確認を行って、DRIT法の確立を行う予定である。

A. 研究目的

世界では毎年55,000人が狂犬病で死亡している。発生例の大半は発展途上国に集中しており、毎年800～1,000万人が曝露後予防（PEP:post-exposure prophylaxis）を受けている。狂犬病患者の99%以上がイヌの咬傷で感染していることから、発症を疑うイヌの迅速で確実な診断法の確立と発生地域における流行拡大等の状況把握は公衆衛生上の重要課題である。また、加害犬の迅速診断は咬傷被害者への速やかなPEP判断を適切に行うためにも大切である。

現在、発症を疑うイヌの実験室内診断は、加害犬の脳組織からスタンプ標本作製して、直接蛍光抗体法による狂犬病ウイルス（RABV）の抗原検出が行われている。しかし、本法は蛍

光顕微鏡が必要であり、アジア等の流行地域ではより安価な検出法が望まれている。

今回、光学顕微鏡で簡易に観察が可能となる迅速抗原検出法「DRIT法（a direct, rapid immunohistochemical test）」に使用する検出抗体を安価に大量生産する方法をsingle chain variable fragment (scFv)で検討した。scFvは、免疫グロブリンのVH領域とVL領域をリンカーでつないだ構造を持っており、scFv遺伝子発現プラスミドを大腸菌に導入することで、容易かつ大量の検出抗体を発現・精製可能となる。

昨年度、精製した4クローンの抗RABV-P scFv、1クローンの抗RABV-N scFvをビオチン標識してDRITをRABV感染マウス脳の塗抹標本で行い、狂犬病ウイルス特異的な蛋白質

の検出に成功したが、各 scFv クローンで感度が異なり、ビオチン標識の効率が一定でないことが考えられた。そこで、今年度、確実にビオチン標識 scFv を得るために、scFv とビオチンの融合蛋白質を発現することを試みた。

B. 研究方法

- (1) 抗 RABV-P 蛋白質、抗 RABV-N 蛋白質 scFv 遺伝子のクローニング：4 クローンの抗 RABV-P scFv (P19, P38, P80, P115)、1 クローンの抗 RABV-N scFv (N1) 発現プラスミド (pCAGGS) より、以下のプライマーを用いて、scFv 遺伝子 (精製用 myc/His タグを含む) を増幅した。

```
-----  
# HindIII-PinPoint Xa-F:  
GCGAAGCTTATGGCCGAGGTG  
# BglII-pHEN seq:  
AGTAGATCTCTATGCGGCCCCATTCA  
-----
```

scFv 遺伝子は、大腸菌内でビオチン融合蛋白質を産生できる発現プラスミド (PinPoint Xa-3 ベクター ; Promega) にクローニングした (図 1)。

- (2) シーケンスの確認：得られた各 scFv-PinPoint Xa-3 ベクターについて、以下のプライマーセットを用いて、シーケンスを解析した。

```
-----  
# link seq new  
CGACCCGCCACCGCCGCTG  
# DPK9 FR1 seq  
CATCTGTAGGAGACAGAGTC  
# SP6  
CATACGATTTAGGTGACACTATAG  
-----
```

C. 研究結果

抗 RABV-P scFv (P19, P38, P80, P115) 、

抗 RABV-N scFv (N1) について、全て PinPoint Xa-3 ベクターへのクローニングを終えた。またシーケンス解析の結果、全ての scFv 遺伝子が正しくクローニングされていることが確認できた。

D. 考察

本研究の目的は、獣医科学部・第二室で作出した RABV 蛋白質を特異的に認識する single chain variable fragment (scFv) を使用した DRIT 法の確立と有効性の検証である。現在、検出感度の向上を図るために抗 RABV-P および N 蛋白質 scFv にビオチンを融合させた蛋白質の発現を検討している。今年度、4 クローンの抗 RABV-P scFv、1 クローンの抗 RABV-N scFv の当該遺伝子をビオチン融合蛋白質発現プラスミドにクローニングした。今後、scFv-ビオチン融合蛋白質の発現確認を行って、DRIT 法の確立を行う予定である。

E. 結論

ビオチン融合 scFv を大腸菌内に発現させるため、4 クローンの抗 RABV-P scFv (P19, P38, P80, P115) 、1 クローンの抗 RABV-N scFv (N1) を PinPoint Xa-3 ベクターにクローニングを行った。現在、scFv-ビオチン融合蛋白質の発現確認を行っている。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

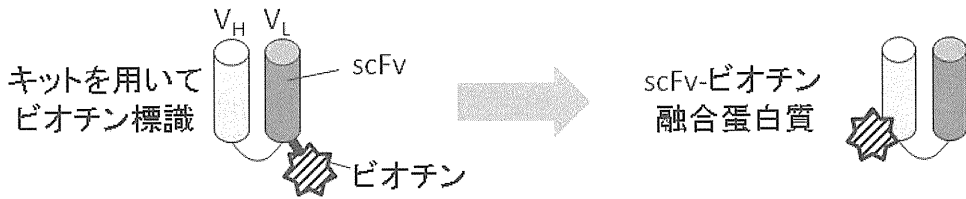
1 論文発表
なし

2 口頭発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 scFv-ビオチン 融合蛋白質の作製

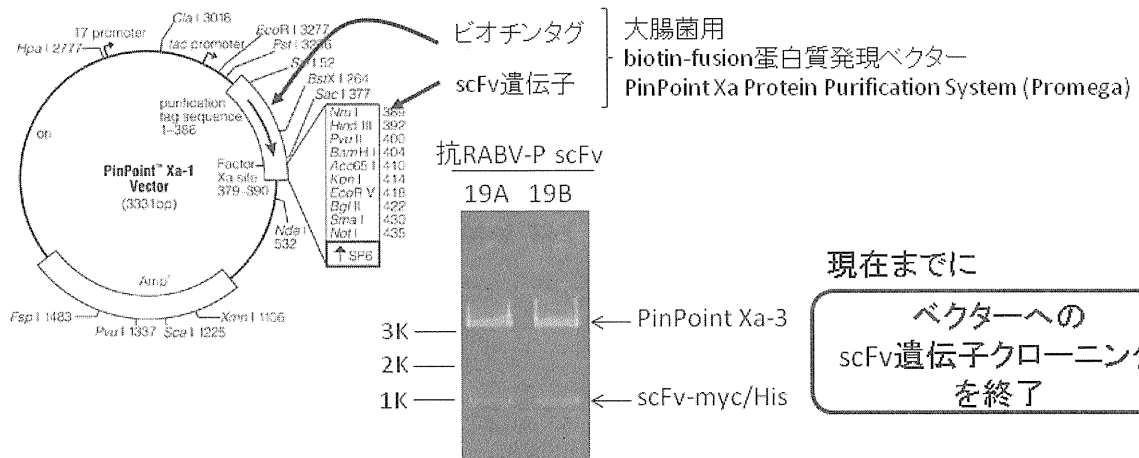


△

- ・標識効率がまちまち
- 中には標識されていないscFvも。
- ・標識に手間がかかる。

○

- ・全てのscFvが確実に標識される。
- ・標識の手間が不要。



厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
「ワンヘルス理念に基づく動物由来感染症制御に関する研究」 分担研究報告書

輸入狂犬病発生前後における当院ワクチン外来での曝露後発病予防被実施者の分析

研究分担者 菅沼明彦 (がん・感染症センター都立駒込病院感染症科)
協力研究者 高山直秀 (がん・感染症センター都立駒込病院小児科)
協力研究者 柳澤如樹 (がん・感染症センター都立駒込病院感染症科)
協力研究者 中山栄一 (がん・感染症センター都立駒込病院小児科)

要旨 海外で狂犬病危険動物による咬傷などの傷を受け、当院ワクチン外来を受診した曝露後発病予防被実施者数は、2004-5年は70名台であった。しかし、2006年11月に輸入狂犬病が2例発生した後は、狂犬病曝露後発病予防のため当院ワクチン外来を受診する海外動物咬傷被害者の数が急増した。このため、2006～2008年における受診者の動向を比較検討した。2007年の受診者は、従来より男性が、年齢層では20代後半の者が多く、フィリピンでの受傷者の増加が目立ち、また脱落者の割合が大きかったが、現地医療機関を受診した者の割合、被害を受けた地域、受傷部位などの点では、2006～2008年の間に著しい差はみられなかった。

A. 序

狂犬病は代表的な人獣共通感染症であり、独特の臨床像とほぼ100%の死亡率のために紀元前から恐れられてきた疾患である。狂犬病は、発生状況に大きな相違があるとはいえ、世界の多くの地域で発生し続けている。日本では1957～2005年の間、1970年にネパールでイヌに咬まれて帰国後発病した輸入狂犬病症例1例を除いて、動物の狂犬病もヒトの狂犬病も発生の報告がなかった。このため日本人の多くは狂犬病に対する警戒心が薄く、海外の狂犬病常在地でイヌやネコなどの狂犬病危険動物に傷つけられて帰国する渡航者も少なくない。

海外の狂犬病常在地でイヌやネコなどの狂犬病危険動物に咬まれて帰国した咬傷被害者が、狂犬病曝露後発病予防を受けるため、1990年から当院ワクチン外来を受診し

始めた。当院における狂犬病曝露後発病予防被実施者数は1998年から増加が目立ち、2000-02年には年間80名を超えた。2003年にはSARSが発生した影響で48名に減少したものの、2004-5年は70名台であった。しかし、2006年11月に輸入狂犬病が2例発生した後は、狂犬病曝露後発病予防のため当院ワクチン外来を受診する海外動物咬傷被害者の数が急増し、2007年の曝露後発病予防被実施者は138名に達した。しかし、その後2008年には98名、2009年には70名と減少した。輸入狂犬病発生の影響が残ると思われる2007年の被実施者の動向を、輸入狂犬病が発生した2006年及び発生後1年以上経過した2008年の受診者と、一部は2005年以前のデータをも含めて、比較検討した。

B. 対象と方法

2006年1月から2008年12月までに、海外で狂犬病危険動物に咬まれたのち、狂犬病ワクチン接種による狂犬病曝露後発病予防を求めて当院を受診した、海外動物咬傷被害者を調査対象とし、性別、年齢、咬傷を受けた地域、加害動物、現地での医療機関受診の有無、接種を受けたワクチンの種類、転機などを診療録に基づいて調査した。咬傷被害者が海外で接種を受けた狂犬病ワクチンの種類は、現地での診療記録、接種証明書または接種ワクチンの空き箱で確認した。診療記録、接種証明書、空き箱などがない場合は不明とした。なお、狂犬病曝露後発病予防の継続は、原則として化学及血清療法研究所（化血研）製精製ニワトリ胚細胞狂犬病ワクチン〔purified chick embryo cell vaccine (PCEC-K)〕を使用して実施した。

C. 結果

1) 年別受診者数および男女比

当院ワクチン外来には、1990年から海外の狂犬病常在地でイヌなどの狂犬病危険動物による咬傷などを受けた被害者が狂犬病曝露後発病予防を受けるために受診し始めた。その後2000年までは年々受診者数が上昇し、SARS流行の影響によりアジアへの旅行者が減少した2003年を除いて71～84名程度であった。しかし、2006年11月に狂犬病患者が2例発生した後は狂犬病曝露後発病予防希望者が急増し、2007年には年間138名に達した（図1）。

2006年には108名（男性：58名、女性：50名）、2007年には138名（男性：95名、女性：43名）、2008年には98名（男性：51名、女性：47名）の海外動物咬傷被害者が当院ワクチン外来を受診して、狂犬病曝露後発病予防を受けた。2006年を輸入狂犬病症例発生の報道があった11月17日の前後で区分すると、1月から11月16日まで

は72名、11-12月は36名であった（図2）。受診者の男女比は2006年が1.16、2007年が2.21、2008年が1.09であり、2006年、2008年は男性数が女性数をやや上回る程度であったが、2007年には男性数が女性数の2倍以上となった。

2) 受診者の年齢分布

2006年の受診者108名のうち、25-29歳が28名、20-24歳が21名で、20歳代が全体の45.4% (49/108) を占め、30歳代が16.7% (18/108) でこれに次ぎ、40歳代が13.0% (14/108) であった。2007年は25-29歳が28名、20-24歳が26名で、20歳代が全体の39.1% (54/138) を占め、30歳代が21.7% (30/138)、40歳代が11.6% (16/138) であり、2008年は20-24歳が21名、25-29歳が15名で、20歳代が36.7% (36/98)、30歳代が22.4% (22/98)、40歳代が17.3% (17/98) であった。いずれの年も20歳代の受診者が最も多く、30歳代が2番目、40歳代が3番目に多い点では差がなかったが、2006-07は25-29歳が20-24歳よりも多く、2008年には20歳代前半の受診者が20歳代後半の者よりも多かった。

3) 加害動物

いずれの年も、それぞれの件数に差があるとはいえ、イヌによる咬傷が最も多く、ネコ、サルが続いていた。イヌ咬傷件数は、2006年が66.7% (72/108)、2007年が71.7% (99/138)、2008年が72.4% (71/98) と大多数を占めており、ネコ、サルによる被害者はいずれの年も20%未満であった。2006年と2007年にはコウモリに咬まれて狂犬病曝露後発病予防を実施した例が各2例あった。ウマに咬まれた被害者が2006年と2008年に各1例、飼育されている幼獣のトラに咬まれた被害者が2007年と2008年に各1例あった。2007年にはロバに咬ま

れた例，2008年にはウマに咬まれた例が各1例あった。

4) 受傷部位と受傷契機

各例における受傷部位を，素肌を傷つけられた例（素肌群）と衣服の上から咬まれた例（衣服群）に分け，さらに，現地医療機関受診の有無で分けてみると，現地医療機関受診例と未受診例の間の受傷部位には大差が見られないが，素肌群と衣服群の間には明らかな差がみられた。衣服群では下半身に受傷した例が多かったが，素肌群では，手指が最も多く，次いで下腿・足が多く，上肢，顔面に受傷した例もみられた。下肢に傷を受けた被害者の多くは，歩行中または何かに気を取られているときに，突然背後から来たイヌなどに咬まれていた。素肌群で下腿・足に傷を受けた例は，半ズボン，サンダル履きなどで歩いていた。また背後から飛びつかれて臀部や背部に受傷した者もいた。一方，手指や顔面を咬まれた被害者の中には，不用意に動物をなでようとしたり，手に餌をのせて与えようとした者が少なくなかった。

加害動物を捕獲し，脳組織検査の結果狂犬病と診断された例は2例のみであり，他の例では加害動物の検査は行われていなかった。

5) 受傷地域

当院受診者が受傷した地域をみると，いずれの年もアジア地域が80～87%を占めており，特にタイ，中国，インド，フィリピン，インドネシアが多かった。

6) 海外での狂犬病ワクチン接種

海外咬傷受傷者のうち，受傷した地域で狂犬病曝露後発病予防のため狂犬病ワクチン接種を受けたから帰国し，曝露後発病予防継続のため当院を受診した被害者の割合

は，2006年には51.9% (56/108)，2007年には55.1% (76/138)，2008年には55.1% (54/98)であり，いずれの年も半数を多少上回る程度であった。しかし，2006年の受診者について，輸入狂犬病報道日11月17日前後で区分すると，報道前の1月から11月16日までの受診者72名中48名が現地医療機関を受診して狂犬病ワクチン接種を受けており，現地での受診率は66.7% (48/72)であったが，11月17日から12月末までの受診者36名中現地医療機関の受診者は8名で，受診しなかった者が28名で現地での受診率は28.6% (8/28)と低かった（図2）。なお，2007年1月から6月までの受診者では，49.4% (44/89)が現地の医療機関を受診していた。

なお，受傷地で狂犬病ワクチン接種を受けた187例中，WHOの勧告どおりに狂犬病ワクチンとヒトないしウマ抗狂犬病免疫グロブリンの接種を受けた被害者は，2006年が21.4% (12/56)，2007年が15.6% (12/77)，2008年が13.0% (7/54)，3年間の平均は16.6% (31/187)であった。

7) 海外で接種された狂犬病ワクチンの種類

海外咬傷被害者が帰国以前に接種された狂犬病ワクチンの種類をみると，いずれの年も，組織培養由来凍結乾燥ワクチンの，ベロ細胞ワクチン[purified vero cell rabies vaccine (PVRV)，商品名：Verorab]が最も多く，次いでニワトリ胚細胞ワクチン[purified chick embryo cell vaccine (PCEC)，商品名：Rabipur, PCECなど]が多かった。中国製組織培養由来濃縮狂犬病ワクチンがこれに次いでいた。ヒト2倍体細胞ワクチン(human diploid cell vaccine：HDCV)はいずれの年も1例に過ぎなかった。また，旧式の動物脳由来ワクチンの接種を受けて帰国した咬傷被害者もあり，乳のみマウスワ

クチン接種を受けた例が 2008 年に 1 例、センプル型ワクチンの接種を受けて帰国した者も 2006 年と 2007 年に各 1 例いた。また狂犬病ワクチン接種を受けたが、種類を特定できない被接種者が、2006 年に 5 例、2007 年に 15 例、2008 年に 8 例みられた。

8) 狂犬病ワクチンの副反応

当院で使用している PCEC-K の接種後に、発熱や蕁麻疹など全身性の副反応や神経系の副反応はみられなかった。ワクチン接種部位の局所的発赤はしばしばみられたが、大多数では軽度であり、発赤・腫脹が強いため投薬を必要とした例も、副反応が強いためワクチン接種を中断した例もなかった。

9) 転機

海外での接種も含めて狂犬病ワクチン接種を 6 回受けた被害者は、2006 年が 28 例 (25.9%)、2007 年が 16 例 (11.6%)、2008 年が 0 例、5 回接種した例は、それぞれ 56 例 (51.9%)、91 例 (65.9%)、88 例 (89.8%) であり、他の医療機関に転院して狂犬病曝露後発病予防を継続した例は、それぞれ 7 例 (6.5%)、10 例 (7.2%)、5 例 (5.1%) であり、加害動物に 10 日間以上異常がみられないことが判明して狂犬病曝露後発病予防を中止した例が、それぞれ 13 例 (12.0%)、11 例 (8.0%)、4 例 (4.1%) であった。一方、当院に連絡なく受診しなくなった脱落例は、2006 年には 4 例 (3.7%)、2008 年には 1 例 (1.0%) であったが、2007 年には 10 例 (7.2%) いた。比較のために 1990～99 年と 2000～2005 年における狂犬病曝露後発病予防被実施者の集計結果は、1990～99 年では 6 回接種した例が 51.5% (119/231) で最も多かったが、2000～2005 年では 5 回接種した例が 69.2% (303/438) で最多であった。なお、脱落例はそれぞれ、6 例 (2.6%)、12 例

(2.7%) であった。

当院にて狂犬病曝露後発病予防のための狂犬病ワクチン接種を 6 回完了ないし 5 回終了した海外咬傷被害者の中から狂犬病発症者は出ていない。また、サルに咬まれた被害者では、狂犬病以外に B ウイルス感染症が心配されたが、サル咬傷被害者 38 名の中から発病者はみられていない。

D. 考察

海外において動物による咬傷、搔傷を受けたため、狂犬病曝露後発病予防を希望して当院を受診する被害者の数は、2000 年以降、SARS が発生した 2003 年を除いて、70～80 例台で推移していた。しかし、2006 年 11 月に、2 例の輸入狂犬病が発生したのは、曝露後発病予防希望者の受診が急増し、2007 年における曝露後発病予防被実施者は 138 例に達した。輸入狂犬病発症後の被実施者急増は、以前であれば治療を考えなかった海外咬傷被害者が新聞やテレビなどの報道から狂犬病の致命率の高さに気づいたためと考えられる。2007 年には 20 代後半男性の受診が 2006 年、2008 年より多かったことは、20 代後半男性の中には、それまで海外の狂犬病常在地で動物咬傷を受けても狂犬病の危険を無視していた者が多かったことを反映していると考えられる。

また、2007 年の受診者では、フィリピンで受傷した者の増加が目立ち、また脱落者の割合が大きかった。しかし、現地医療機関を受診した者の割合、被害を受けた地域、加害動物種、受傷部位などの点では、2006～2008 年の受診者間に著しい差はみられなかった。

動物咬傷被害を受けた国や地域、加害動物の種類に大差が見られなかったことは、輸入狂犬病の発生が人々の旅行先の選択や旅行形態に大きな影響を与えなかったこと