

リスクについて、幅広く啓発していく必要があると考えられる。

## G. 研究発表等

### 1. 論文発表等

(1) 斎藤洋子, 丹野大樹, 吉田詠子, 渡辺洋子, 伊藤真弘, 菅野喜久子, 田中京子, 大花昇, 三浦里織, 阿部良伸, 山本夏男, 今福裕司, 鈴木道雄, 今岡浩一, 金光敬二. 血液像所見が早期診断に有効であった *Capnocytophaga canimorsus* 敗血症の一症例. 福島県臨床衛生検査技師会誌, 50:135-140, 2012

(2) 内藤亮, 瀧口恭男, 秋葉容子, 駿河洋介, 鈴木道雄, 今岡浩一. *Capnocytophaga sputigena* による肺化膿症の1例. 日本呼吸器学会雑誌, 2(2), 2013 (*in press*)

(3) 今岡浩一, 鈴木道雄. カプノサイトファーガ・カニモルサス感染症—特集・ペットからの感染症. *in*: 小児科, 金原出版, 54(1): 49-56, 2013

### 2. 学会発表等

(1) 鈴木道雄, 木村昌伸, 今岡浩一, 山田章雄. 犬・猫咬・搔傷感染から重症敗血症やDICに至ることもある *Capnocytophaga canimorsus* 感染症の現状. 第86回日本感染症学会総会, 長崎, 2012年4月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表1) *C. canimorsus* 国内臨床分離株の 16S rRNA および *gyrB* 遺伝子シーケンスの基準株との一致率

		ATCC35979株との一致率(%)		
		16S rRNA	<i>gyrB</i>	
<i>C. canimorsus</i>	ATCC35979	100.00	100.00	
	患者分離株			
		1	98.94	99.33
		2	98.94	99.16
		3	98.89	100.00
		4	98.89	99.58
		5	98.89	98.24
		6	98.87	99.66
		7	98.82	99.59
		8	98.82	99.33
		9	98.79	99.50
		10	98.75	99.42
		11	98.72	99.64
		12	98.68	99.64
		13	98.68	99.13
		14	98.16	99.50
		15	98.02	99.25
		16	97.85	99.37
		17	97.11	99.50
		18	97.01	99.67
	19	97.01	74.76	
<i>C. cynodegmi</i>	ATCC49044	98.58	73.41	

表2-1) 新鮮ヒト血漿中補体に対する *C. canimorsus* ATCC35979 株 (基準株) の感受性  
-1

*C. canimorsus* ATCC35979  $2.0 \times 10^3$  cells

	血漿A	血漿B	血漿C
Index	0.00	0.01	0.00

Index=[新鮮血清 (血漿) 反応後CFU]/[非働化血清 (血漿) 反応後CFU]

表2-2) 新鮮ヒト血清(血漿)中補体に対する *C. canimorsus* ATCC35979 株(基準株)の感受性-2

被検菌数	血清D	血漿E	CH50 (U/ml)
	49	37	
Index			
1.0 x 10 <sup>8</sup>	1.47	4.96	
1.0 x 10 <sup>7</sup>	0.03	1.50	
1.0 x 10 <sup>6</sup>	0.00	0.12	
1.0 x 10 <sup>5</sup>	0.03	0.11	
1.0 x 10 <sup>4</sup>	0.01	0.11	
1.0 x 10 <sup>3</sup>	0.02	N.D.	

N.D. : Not Done

表2-3) 新鮮ヒト血清中補体に対する *E. coli* Top10 株および ATCC25922 株の感受性

被検菌数	被検菌株	
	Top10	ATCC25922
Index		
1.0 x 10 <sup>8</sup>	0.94	N.D.
1.0 x 10 <sup>7</sup>	0.00	N.D.
1.0 x 10 <sup>6</sup>	0.00	N.D.
1.0 x 10 <sup>5</sup>	0.00	N.D.
1.0 x 10 <sup>4</sup>	0.00	N.D.
1.0 x 10 <sup>3</sup>	N.D.	3.00

使用血清D : CH50=49U/ml

N.D. : Not Done

表2-4) 新鮮ヒト血清中補体に対する *C. canimorsus* 国内臨床分離株の感受性

被検菌数	被検菌株					
	HP1	HP2	HP3	HP4	HP5	HP6
1.0 x 10 <sup>8</sup>	0.74	0.33	N.D.	0.86	N.D.	0.23
1.0 x 10 <sup>7</sup>	0.47	0.02	1.67	0.09	0.99	0.00
1.0 x 10 <sup>6</sup>	0.02	0.01	0.13	0.05	0.07	0.00
1.0 x 10 <sup>5</sup>	0.04	0.00	0.07	0.04	0.05	0.00
1.0 x 10 <sup>4</sup>	0.04	0.01	0.17	0.02	0.01	0.00
1.0 x 10 <sup>3</sup>	N.D.	N.D.	0.07	N.D.	N.D.	N.D.

使用血清D : CH50=49U/ml

N.D. : Not Done

表 3-1) 患者発生状況

発生年	人数 (死亡数)
1993	1
2002	1 (1)
2004	3 (1)
2006	2 (1)
2007	3 (1)
2008	7 (2)
2009	2
2010	5 (1)
2011	7 (1)
2012	4 (1)

表 3-2) 患者年齢構成

年齢 (代)	男	女	全体	%
0	0	0	0	0.0
10	0	0	0	0.0
20	1	0	1	2.9
30	0	1	1	2.9
40	5	0	5	14.3
50	5	3	8	22.9
60	10	2	12	34.3
70	3	3	6	17.1
80	1	0	1	2.9
90	0	1	1	2.9
計	25	10	35	

表 3-3) 患者主症状

主症状	人数 (死亡数)
敗血症	29 (8)
髄膜炎	1 (1)
意識障害	1
頭痛・発熱	1
創部膿瘍・腫脹	3

表 3-4) 患者感染経路

感染経路	人数 (死亡数)
イヌ咬傷	17 (3)
ネコ咬傷	4
ネコ搔傷	7 (4)
動物との接触	5 (1)
不明	2 (1)

表 3-5) 患者の基礎疾患の有無

基礎疾患	人数 (死亡数)
あり	19 (5)
なし	15 (4)

# イヌのレプトスピラ症に関する研究

研究協力者 小泉信夫 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

## 研究要旨

- 1) 10 都県 39 頭のレプトスピラ症疑いイヌの実験室診断を行い, 7 県 13 頭のレプトスピラ症が確定した. 6 頭からレプトスピラが分離され, すべて *L. interrogans* serogroup Hebdomadis と同定された.
- 2) LAMP 法によるイヌ尿からのレプトスピラ DNA 検出を行った. 精製 DNA を用いた場合は 18 検体中 4 検体が陽性となった. 一方 DNA 精製を行わない簡便な DNA 調整法では 3 検体が陽性となった.

## A. 研究目的

レプトスピラ症は, 病原性レプトスピラ (*Leptospira* spp.) の感染によっておこる人獣共通感染症である. イヌは, レプトスピラ感染後に保有体となりヒトへの感染源となる可能性がある. 本研究はイヌのレプトスピラ症の発生実態の解明およびレプトスピラ感染のリスク評価を目的に, レプトスピラ症疑いイヌの実験室診断および簡便な診断法の開発・評価を行った.

## B. 研究方法

1. レプトスピラの分離培養: レプトスピラ症疑いイヌの血液, 東京都引き取り・収容イヌの腎臓および尿から, コルトフ培地あるいは EMJH 培地を用いてレプトスピラの分離培養を行った. 培養は 30°C で 3 ヶ月間行い, 1~2 週間ごとに暗視野顕微鏡下でレプトスピラの増殖の有無を観察した.

2. レプトスピラ DNA の検出: レプトスピラ症疑いイヌの血液・尿, 東京都イヌ腎臓・尿から DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて DNA 抽出を行った. DNA 検出は *flaB*-nested PCR により行った (参考文献 1).

3. レプトスピラ抗体検出: レプトスピラ症疑いイヌのレプトスピラ抗体検出は顕微鏡下凝集試験 (MAT) により行った (参考文献 2).

4. レプトスピラ分離株の解析: レプトスピラ分離株の種同定は *flaB* 遺伝子の部分塩基配列の決定により行った. また血清群の同定は, レプトスピラ標準抗血清を用いた MAT により行った.

5. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法による尿からのレプトスピラ DNA 検出: 尿から簡便にレプトスピラ DNA 検出を行う *Lepto-rrs* LAMP 法を, イヌ尿を用いて評価した (参考文献 3).

## 参考文献

1. Koizumi N et al., Jpn J Infect Dis. 61:465, 2008.
2. Faine S et al. Leptospira and leptospirosis, 2nd edn. MediSci. 1999.
3. Koizumi N et al., J Clin Microbiol. 50:2072, 2012.

## C. 研究結果と考察

1. レプトスピラ疑いイヌの実験室診断：イヌは、ヒトと同様にレプトスピラ感染により急性発症する一方で、感染後にレプトスピラ保有動物となり、ヒトへの感染源となる可能性がある。またイヌのレプトスピラ症は、ヒトに比べて容易に診断されることから、当該地域のヒトのレプトスピラ感染リスクを評価するための歩哨動物となることも期待できる。そこで本研究では、レプトスピラ感染が疑われたイヌの実験室診断を行った。

本年度は表 1 にある 10 都県 39 頭の実験室診断を行い、7 県 13 頭のレプトスピラ症が確定した。レプトスピラは、千葉、静岡、福岡、熊本、宮崎および鹿児島 の 6 県 6 頭から分離された。静岡県でのレプトスピラの分離は初めてであった。分離株は *flaB* 部分塩基配列からすべて *L. interrogans* であると推定された。また分離株の血清群は、すべて *Hebdomadis* と同定された(未解析 1 頭)。一方、抗体が検出された血清群は、*Australis*, *Autumnalis*, *Canicola*, *Hebdomadis* であった(表 1)。

本調査のイヌのレプトスピラ急性感染が発生した複数の県で、イヌが感染した血清群に対する抗体がヒト患者でも検出されている。感染症法施行後これまでに、イヌが感染原因と同定されたヒトのレプトスピラ症は報告されていないものの、レプトスピラ保有イヌがヒトへの感染源となっている可能性も考えられる。したがって、イヌがヒトへの感染源となっているかを明らかにするために、急性感染だけでなく健常イヌのレプトスピラ保有状況を調査し、ヒトで検出されたレプトスピラとの比較解析を行う必要がある。

イヌのレプトスピラ感染予防として、レプトスピラワクチンが存在する。しかしながら、現行のワクチンは血清型に特異的な効果しかないとされている。本研究でレプ

トスピラ症が確定したイヌの 42% はワクチンの接種歴があった。また血清群 *Hebdomadis* 全国的な流行が明らかとなったが、この血清群は大部分のワクチンに含まれていない。これらの結果は、現行ワクチンの血清型特異的効果を支持するものである。したがって、血清型に依存しない広範囲のレプトスピラ感染に有効で、長期に効果が持続する新たなワクチンの開発が急務である。

2. LAMP 法による尿からの簡便なレプトスピラ DNA 検出：現行のレプトスピラ DNA 検出は、キットを用いて精製した DNA を用いて *nested PCR* を行っているため、高価で時間がかかり、臨床現場で容易に行うことはできない。最近我々は、DNA 精製を行わなくても尿から高感度で DNA 検出ができる LAMP 法 (*Lepto-rrs* LAMP) を開発した。そこで本研究では、レプトスピラ疑いのイヌ尿を用いて *Lepto-rrs* LAMP の評価を行った。

レプトスピラ疑いのイヌ尿 18 検体で *Lepto-rrs* LAMP を行った結果、DNA 精製を行った検体では 4 検体から、DNA 精製を行わない簡便法では 3 検体が陽性となった(簡便法陽性 3 検体は DNA 精製陽性であった)。簡便法で陰性となった 1 検体は、用いた検体量が精製法に比べて少なかったことが原因と考えられた。一方で、DNA 精製を行った検体で陰性となった 1 検体が、簡便法で陽性となった。DNA が検出された。本検体を採取したイヌは抗体検出によりレプトスピラ感染が確定したことから、簡便法の感度が精製法よりも高い可能性が示唆された。今後、さらに多検体を用いての簡便法の有用性を評価する予定である。

尿からのレプトスピラ DNA 検出により診断ができる一方で、表 1 にあるように陽性イヌの約 3 分の 1 は血液からのみ DNA

が検出された。血液（血漿）を尿と同じ簡便法で調整した場合、その検出感度は 10～100 倍低下し DNA 精製が必須となっている。血液でも簡便に *Lepto-rrs* LAMP を行えるような DNA 抽出法を検討する必要がある。

#### D. 謝辞

本研究にご協力をいただいた武藤麻紀氏（国立感染症研究所）に深謝いたします。

#### E. 研究発表等

##### 1. 論文発表等

(1) Koizumi N, Mizutani Muto M, Akachi S, Okano S, Yamamoto S, Horikawa K, Harada S, Funatsumaru S, Ohnishi M. Molecular and serological investigation of *Leptospira* and leptospirosis in dogs in Japan. *J Med Microbiol* (in press).

(2) Koizumi N, Nakajima C, Harunari T,

Tanikawa T, Tokiwa T, Uchimura E, Furuya T, Mingala CN, Villanueva MA, Ohnishi M, Suzuki Y. A new loop-mediated isothermal amplification method for rapid, simple, and sensitive detection of *Leptospira* spp. in urine. *J Clin Microbiol* 50: 2072-2074, 2012.

(3) Koizumi N, Yasutomi I. Prevalence of leptospirosis in farm animals. *Jpn J Vet Res* 60: S55-S58, 2012

(4) 小泉信夫, 大西真. 人獣共通感染症としてのレプトスピラ症. *養豚界* 47 (5): 43-45, 2012

##### 2. 学会発表等

(1) 小泉信夫. レプトスピラ症の現状. 第12回人と動物の共通感染症研究会学術集会. 2012年11月.

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表1. イヌのレプトスピラ症実験室診断結果

依頼先	検査頭数	陽性頭数	陽性犬種別		陽性犬ワクチン接種率(%)	死亡率(%)	血清診断陽性頭数	血清診断陽性血清群(陽性数)	分離頭数	分離株のレプトスピラ種およびレプトスピラ血清群(陽性数)	PCR陽性頭数	陽性臨床検体(陽性数)
			ペット	狩猟犬								
茨城県	4	0	—	—	—	—	0		0		0	
千葉県	5	2	2	0	100	50	1	Hebdomadis	1	<i>L. interrogans</i> 血清群 Hebdomadis	2	血液および尿
東京都	1	0	—	—	—	—	0		0		0	
静岡県	1	1	0	1	不明	不明	0		1	<i>L. interrogans</i> 血清群 Hebdomadis	1	血液
愛知県	3	0	—	—	—	—	0		0		0	
奈良県	1	1	1	0	0	100	1	Hebdomadis	0		0	
福岡県	9	3	2	1	0	67	2	Australis Hebdomadis	1	<i>L. interrogans</i> 血清群 Hebdomadis	1	血液
熊本県	1	1	0	1	100	不明	1	Hebdomadis	1	未解析		
宮崎県	3	2	2	0	0	100	2	Canicola Hebdomadis	1	<i>L. interrogans</i> 血清群 Hebdomadis	2	血液 尿
鹿児島県	11	3	1	2	67	50 (不明 1)	3	Australis Autumnalis Hebdomadis	1	<i>L. interrogans</i> 血清群 Hebdomadis	2	血液および尿 尿
合計	39	13	8	5	42	70	10	Australis (2) Autumnalis (1) Canicola (1) Hebdomadis (6)	6	<i>L. interrogans</i> 血清群 Hebdomadis (5) 未解析 (1)	8	血液(3) 尿(2) 血液および尿(3)



## 組換え蛋白抗原を用いた猫ひっかき病血清診断法の開発

研究協力者 丸山 総一 日本大学 生物資源科学部  
獣医公衆衛生学研究室 教授

### A. 研究目的

猫ひっかき病 (Cat-Scratch Disease : CSD) は、グラム陰性、細胞内寄生細菌の *Bartonella henselae* が原因の人獣共通感染症である。現在、本症の血清診断には間接蛍光抗体法 (indirect fluorescent antibody assay, IFA) が用いられているが、本法は一度に多くの検体を検査できない、抗原の作製が煩雑で判定に経験が必要とする等の問題がある。また、*Chlamydophila* 属等との交差反応も報告されていることから、より簡便で特異性の高い血清診断法の開発が望まれている。これまでの研究で、CSD 患者血清と反応する *B. henselae* の特異抗原として、Omp43 epi2, 17-kDa antigen, RplL を明らかにしてきた。そこで本研究では、これら 3 種類の *B. henselae* 組換え蛋白を混合して抗原として用いた ELISA 法の有用性について検討した。

### B. 研究方法

*B. henselae* Houston-1 株の *omp43epi2*, *17-kDa antigen*, *rplL* の各遺伝子を、それぞれ pET-32a ベクター及び大腸菌 (BL21 株) を用いて Trx 蛋白との融合蛋白として発現させた後、アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、それぞれの組換えタンパク抗原, rOmp43 epi2/Trx, r17kDa /Trx, および rRplL/Trx を得た。また、*E. coli* 由来成分との交差反応を防ぐために、大腸菌で Trx 蛋白のみを発現させ、超音波破碎し遠心分離した後の上清を *E. coli* buffer として用いた。人血清は 1999 年~2011 年の間に CSD 様の臨床症状を有し、IFA 法により抗 *B. henselae* 抗体が陽

性 (IFA 抗体価 1 : 128 以上) と診断された 29 検体 (IFA 陽性群), CSD 様の症状を有したものの IFA 法では陰性 (IFA 抗体価 1 : 64 以下) を示した 80 検体 (IFA 陰性群) および健常者から採取された 40 検体 (IFA 抗体価 1 : 32 以下, 健常者群) を用いた。ELISA 法は、抗原濃度を各々 30nM に調整した 2 種の組換え抗原 rOmp43 epi2/Trx と rRplL/Trx, あるいはこれらに r17-kDa/Trx 抗原を加えて 3 種を混合したものを、96 穴 ELISA プレートに 4°C で一晚固相化した (以後各々 2 種および 3 種 ELISA 法と示す)。3% スキムミルク加 PBS-T を用いて室温で 1 時間ブロッキングした後、1% スキムミルク加 PBS-T または *E. coli* buffer (PBS-T で蛋白の終濃度が 8µg/ml となるように調整) を加えた混合液で 100 倍希釈した被検血清を各穴に 100µl ずつ添加して室温で 1 時間反応させた。次いで、1% スキムミルク加 PBS-T で 1,000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗人 IgG-山羊 IgG (Cappel 社) を各穴に 100µl ずつ添加し、室温で 1 時間反応させた後、発色剤 TMB を加え、波長 450nm における吸光度を測定した。なお、カットオフ値は [健常者群の平均値 + 標準偏差 × 3] とし、各組換え抗原を用いた ELISA 法の成績から、IFA 法の成績に対する感度および特異度を検討した。

### C. 研究結果

*E. coli* buffer を用いない 2 種 ELISA 法と 3 種 ELISA 法の感度は、それぞれ 61.1%, 0% で、特異度はいずれも 100% であった (図 1)。一方、*E. coli* buffer を用いた 2 種 ELISA 法と 3

種 ELISA 法の感度・特異度は、それぞれ 89.7%・85%と 96.6%・90%であった(図 2)。また、IFA 陰性群の血清の 47.5% (38/80), 46.3% (37/80) がそれぞれ 2 種および 3 種 ELISA 法で陽性を示した(表 1)。

#### D. 考察

*E.coli* buffer を用いない 3 種 ELISA 法では、健常者血清群の OD 値の平均が 0.60 と高い値を示したが、*E.coli* buffer を用いると、0.129 まで低下したことから、人血清中には大腸菌由来抗原と交差反応を起こす抗体が存在すると考えられた。従って、組換え大腸菌により作製した抗原を用いて ELISA 法を行う際には被検血清を *E.coli* buffer により前処理(吸収)する必要があると考えられた。2 種 ELISA 法に比べ 3 種 ELISA 法は、感度、特異度ともに高値を示し、また、従来 of *B. henselae* 菌体可溶化抗原を用いた ELISA 法に比べても高い感度を示したことから、3 種 ELISA 法は CSD の特異診断に有用であると考えられた。さらに、IFA 陰性群の血清の中にも本 ELISA 法で陽性と判定された血清が多く存在したことから、従来血清診断に使用していた IFA 法は感度が低く、陰性と判定された検体が多く存在していた可能性が示唆された。今後、さらに多くの血清を検討することで、本 ELISA 法による猫ひっかき病の簡便で特異的な血清診断法を確立していく必要があると思われた。

#### E. 研究発表等

##### 1. 論文発表等

(1) Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Ohtsuka M, Hongo I, Fukata T, Kabeya H, Maruyama S, Hiramatsu K. Population genetic structures of *Staphylococcus aureus* isolates from cats and dogs in Japan. *J Clin Microbiol.* 2012 Jun;50(6):2152-5.

(2) Sato S, Kabeya H, Fujinaga Y, Inoue K, Une Y, Yoshikawa Y, Maruyama S. *Bartonella jaculi* sp. nov., *Bartonella callosciuri* sp. nov., *Bartonella pachyuromydis* sp. nov., and *Bartonella acomydis* sp. nov. isolated from wild Rodentia. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012 Aug 31. (in press)

##### 2. 学会発表等

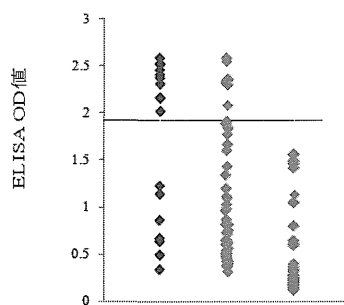
(1) Immune responses in *Bartonella elizabethae* infected BALB/c and C57BL/6 mice. Hidenori Kabeya, Kenji Araki, Tadashi Okamura, Ying Bai, Michael Kosoy, and Soichi Maruyama 7th International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens (April 25 - 28, 2012 Raleigh, North Carolina, USA)

(2) *Bartonella elizabethae* 感染マウスにおける菌血症動態と免疫応答の性差 有馬奈公子, 壁谷英則, 丸山総一 第 154 回日本獣医学会学術集会 (2012: 9/14-16 岩手大学)

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

A



B

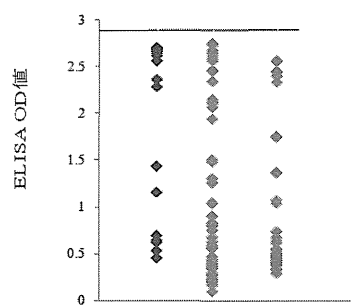
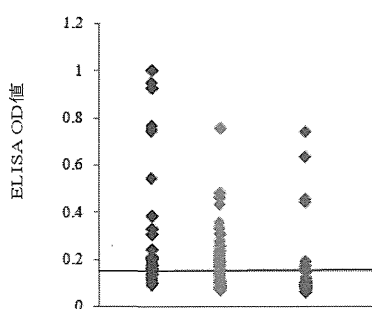


図 1. *E.coli* buffer による前処置なしで行った 2 種および 3 種 ELISA 法の成績

2 種 ELISA 法 (A), 3 種 ELISA 法 (B) と IFA 陽性血清 18 検体 (◆ : 左), IFA 陰性血清 58 検体 (◆ : 中) および健常者血清 40 検体 (◆ : 右) を用いて行った。縦軸は ELISA OD 値を示す。また、直線 (—) はカットオフ値[健常者血清の平均値+標準偏差×3]を示す。

A



B

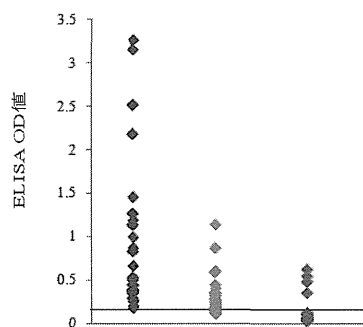


図 2. *E.coli* buffer による前処置を施した 2 種および 3 種 ELISA 法の成績

2 種 ELISA 法 (A), および 3 種 ELISA 法 (B) と IFA 陽性血清 29 検体 (◆ : 左), IFA 陰性血清 80 検体 (◆ : 中) および健常者血清 40 検体 (◆ : 右) を用いて行った。縦軸は ELISA の OD 値を示す。また、直線 (—) はカットオフ値[健常者血清の平均値+標準偏差×3]を示す。

表 1 IFA 陰性群の血清を用いた ELISA 法の成績

組換え抗原蛋白の組み合わせ		
ELISA	rOmp43 epi2/Trx rRpIL/Trx	rOmp43 epi2/Trx r17kDa/Trx rRpIL/Trx
+ ※1	38	37
- ※1	42	43

※1 +は陽性を, -は陰性をそれぞれ示す。

日本国内のニホンザルにおける B ウイルス感染症に  
対するリスク管理

社団法人予防衛生協会：濱野 正敬

## 動物由来感染症に対するリスク管理手法に関する研究 「日本国内のニホンザルにおける Bウイルス感染症に対するリスク管理」

分担研究者 濱野 正敬（社団法人予防衛生協会）

研究協力者 藤本 浩二、小野 文子、岡林 佐知、高野 淳一朗、加藤 美代子、  
大藤 圭子、成田 勇人、羽成 光二（社団法人予防衛生協会）

西 英篤（NAS 研究所）

宇根 有美（麻布大学獣医学部）

門平 睦代（帯広畜産大学獣医学部）

### 研究要旨

本研究班の研究では、主要な動物由来感染症として専門家がリストアップした90種を超す感染症のうち、重要度の序列化で上位20位に入った感染症を対象とした。このうち早急にリスク管理対策の必要な感染症病原体（リッサウイルス、カプノサイトファーガ、エキノコックス、Bウイルス、高病原性鳥インフルエンザウイルス）等を対象に研究を進め、動物由来感染症に対する適正なリスク管理手法を確立することを目的とした。分担研究者の所属する社団法人予防衛生協会では、霊長類実験動物の繁殖・育成を主な業としているため、我々は霊長類動物の調査研究対象としてサルとヒトの間で重要な感染症と考えられるBウイルスについて、日本国内で飼育されているニホンザルにおける感染状況調査および感染ニホンザルを用いたBウイルスの再活性化とヒトへの感染リスクについて基礎的研究を行った。

### A. 研究目的

霊長類動物とヒトの間で重要な人獣共通感染症と考えられるものにBウイルス感染症が挙げられる。Bウイルスはサルにおいて何ら症状を引き起こすことはないが、咬傷などでサルからヒトに感染するとヒトは重篤な神経症状を引き起こし、死に至ることがある。米国内であるが、実験従事者が死亡したという報告例があり、サルに身近で接するヒトにとってBウイルス感染サルは脅威となり得る。これまでに日本国内での感染事故例は報告されていない。飼育されているサルでBウイルスの感染状況は調査されておらず、一般に公開されたデータはない。Bウイルス感染症のリスク管理について考える上で、Bウイルスの感染状況を調査することは、第一のステップと考えられる。また、万一陽性個体が見つかった場合、その個体を単に群から排除する（安楽殺する）ことは動物倫理上問題があると思われるため、隔離した上で陽性個体を有効に利用することは重要であり、感染リスク管理上避けて通れない。そこで我々は、サルがヒトに接する機会の多いと思われる日本

国内の動物園、野猿公苑、動物公園に焦点を当て、展示・飼育されているニホンザルのBウイルス感染状況調査を行った。

### B. 研究方法

#### 1) 検査動物

北海道地区および関東地区の動物園、動物公園で飼育・展示されているニホンザルについて調査した。

#### 2) 検査方法

##### (i) 採血および血清、唾液の回収

動物を捕獲後、麻酔下で大腿静脈またはサフェナ静脈から適当量採血を行った。また、口腔内から専用スワブキットを用いて唾液を回収した。採血管はプレーンまたは血液凝固剤入りのものを用い、冷蔵保管後安全に輸送し、2,500rpm、15分、4℃で遠心し血清を回収した。回収した血清は、使用するまで冷凍または冷蔵で保管した。回収したスワブは、使用するまで冷蔵で保管した。

##### (ii) ウイルス抗体検査

全血から回収した血清および凍結保存した血

清を用いて、ELISA 法を用いた B ウイルス抗体の検出を試みた。

(\*) 倫理面への配慮について

動物を扱う上でヒトと動物の安全を第一に考え、麻酔下での作業を推奨しており、協力機関にはその旨説明した。また、適切なリスク管理手法が確立されるまでは情報の取扱いに留意し、協力機関において風評被害等の影響が出ないように配慮した。

C. 研究結果

B ウイルス (BV) 抗体検査の結果を表に示す。

O 動物園および T 動物公園では、BV 抗体陽性個体は存在せず、陽性率はともに 0%であった。一方、H 小動物公園では、アルファメール (ボスザル) を含めて BV 抗体陽性個体が存在した。過去に採取された保存血清を用いた追跡調査の結果、時を追うごとにその陽性率は低下しており、最新の結果では 2.5%に減少していた。

D. 考察

日本国内に存在する動物園で飼育されているニホンザルについて B ウイルス感染状況を調査した。その結果、ほとんどのサルが未感染あるいは潜伏感染の状態にあることが判明した。ヘルペスウイルスは、神経細胞にウイルス DNA の状態で潜伏感染しており、強いストレスなどにより宿主動物の免疫システムが弱ってくるとウイルス再活性化が起こり、粒子となったウイルスが宿主体内で増殖し、結果として宿主動物に病気を引き起こす。O 動物園、T 動物公園では、B ウイルス抗体陽性ザルは存在しなかった。飼育されているサルの履歴を見ると、過去に陽性であったという記録はなく、B ウイルスへの感染履歴はないものと考えられ、今後清浄な場にサルを導入する場合には、B ウイルスに対する検査を導入前に実施することが推奨される。一方、H 小動物公園では、過去に破傷風のアウトブレイクが発生したという履歴があり、当時の血清が保管されていたため追跡調査を行うことができた。その結果、群のアル

ファメールが抗体陽性を示していた。時系列で抗体検査の結果を追っていくと、最近の結果では陽性率は 2.5%にまで減少していた。このことは、B ウイルスがアルファメール体内で再活性化し、主に生殖行為から群内に汚染が拡大したものと考えられた。さらに破傷風が蔓延したことで群内のサルにストレスが生じ、ウイルス活性化の状態が持続していたと考えられた。破傷風が収束することで群は安定していき、サルはストレスから解放され、次第に B ウイルスの活性化状態も解消され潜伏感染の状態に落ち着いたのではないかと推察された。

B ウイルスの感染リスク管理を行う上で、ヒトと接する機会が多いと考えられる動物園などでは、展示・飼育されているサルのウイルス検査を定期的実施し、感染状況を把握しておくことは非常に重要である。今後調査対象を増やし、日本国内における B ウイルス感染状況を調査しリスク管理に役立てたい。また、陽性個体は群から引き取り、B ウイルスの再活性化に関する研究に供する計画である。

E. 結論

サルにおける B ウイルス感染状況を調査することは、霊長類サル類とヒトの間の感染症リスクを管理する上で基礎的なデータとなり非常に有効である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

学会発表  
特になし

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

表 各場所での BV 抗体陽性率

場所	BV 抗体陽性 個体数 (頭)	総数 (頭)	陽性率 (%)
O 動物園	0	22	0
T 動物公園	0	12	0
H 小動物公園	9*	65	13.8
(2009.10)	8*	61	13.1
(2009.12)	7*	65	10.8
(2010.12)	2*	80	2.5
(2012.10)			

\*アルファメイルを含む

エキノコックス等寄生虫感染撲滅のための方策の  
研究と効率の良い有効評価方法の開発

北海道立衛生研究所：八木欣平



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

エキノコックス等寄生虫感染撲滅のための方策の研究と効率の良い有効性評価  
方法の開発

分担研究者： 八木欣平(北海道立衛生研究所)

協力研究者： 神谷正男\*、スミヤ・ガンゾリグ\*、小林文夫、斎藤通彦(環境動物フォーラム、\*酪農学園大学)、野中成晃、関谷 敏(宮崎大学農学部)、奥 祐三郎(鳥取大学農学部)、梅田 滋(コミュニティ研究所)、加地祥文(小樽検疫所)、岡崎克則(倶知安町)、高橋 徹(北海道獣医師会)、浦口宏二、山野公明、孝口裕一(北海道立衛生研究所)、小清水町、倶知安町、ニセコ町、京極町、喜茂別町、蘭越町

**研究要旨** エキノコックス症は、本邦に常在する有効な治療法のない致死的な寄生虫性疾患である。本症は、わが国で感染の可能性のある動物由来感染症に対するリスクプロファイグの結果、高リスク感染症として上位にランクされており(吉川ら、2009)、対策法の確立が求められている。実際に、北海道では、野生のキツネの40%が感染していることが明らかにされており、年間15-20名の新規のヒト患者が報告される状態が続いている。本虫が感染したキツネやイヌ等の終宿主動物から排泄される虫卵は、住民の日常の感染の脅威となっており、このエキノコックスの感染リスクを軽減するための、野外のキツネへの駆虫薬を含んだベイト剤の散布は、有効な手段の一つとして、高く評価されている。本研究は、エキノコックス感染予防のための実用可能な対策方法を確認、提言することを目的に構築された。研究グループは本目的達成のために、フィールドグループと実験グループに分けて遂行することとした。フィールドグループは、ベイト剤の効果的散布により、環境中のエキノコックスの清浄化方法を確認することを目的とし、実験グループは、清浄化が達成できるまでのエキノコックス感染予防対策に有効な手段を検討することを目的とした。本報告書では、本年度までに行ったフィールドグループによるベイト剤散布の成果について報告し、本年度開催したグループ内での検討会で議論された問題点と方向性について概説する。また、同時に、人への感染リスクの軽減のための実験的な検討として行った中間宿主ならびに終宿主に対するワクチンの開発について報告するとともに、疫学調査に必須である動物の診断方法について、実際に動物園で発生した、霊長類の感染事例を中心に報告する

1. プラジカンテル入りのベイト散布によるエキノコックス感染源対策

有効性を評価した。

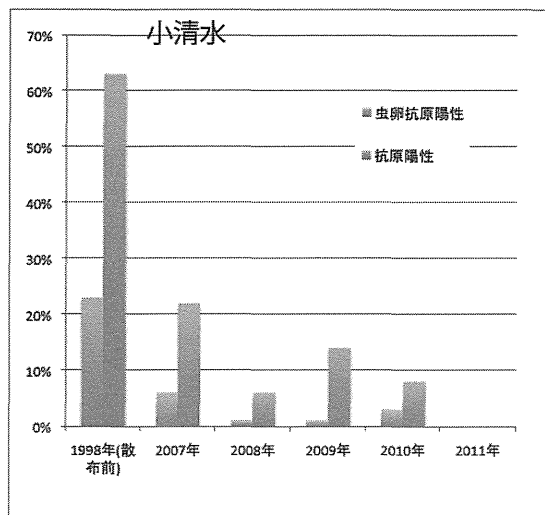
1) 市町村単位での対策

小清水町、羊蹄山山麓(ニセコ周辺)5町においてプラジカンテル入りのベイト散布によるエキノコックス感染源対策を実施した。散布地域では、年1回、キツネ糞便を採取し、糞便虫卵検査および糞便内抗原検査を実施して、その推移を観察することにより、対策の

小清水町

小清水町では1997年からベイト散布を開始し、2005年からは住民によるベイト散布がほぼ全町(200ポイント)で行われた。2007年は2ヶ月に一度のベイト散布で、2008年および2009年は1ヶ月に一度であった。2010年は夏までは毎月散布で、その後は2ヶ月に一度散布とし、再度二倍量散布し省力化を図つ

た。2012年度はエキノкокスの抗原の陽性率も、虫卵陽性率もゼロに抑えられた。今後も、省力化に向けて、2ヶ月に一度の散布とし、1回のベイト散布数は倍量として継続したい。

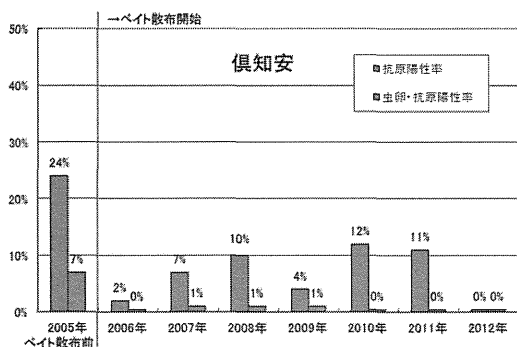


### ニセコ周辺におけるベイト散布効果

ニセコ周辺ではまず、倶知安町がベイト散布を開始しその後、京極、蘭越、喜茂別、ニセコにおいてベイト散布を行った。

#### (倶知安町)

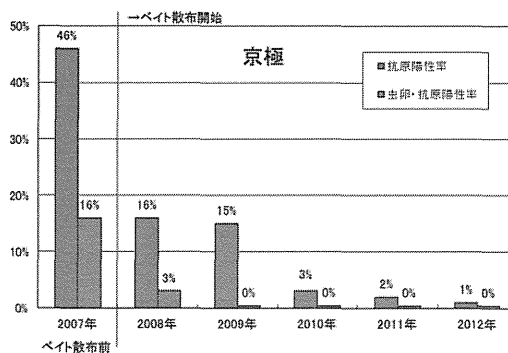
倶知安町では2006年から5-11月まで毎月、約1,400個のベイト散布を町周辺に行った。ベイト散布後は、2006年から顕著に減少し、2010年まで虫卵陽性率は減少しているが、2009年から2010年にかけて抗原陽性率が上昇している。2012年度は虫卵・抗原ともに検



出されなかった (32検体)。

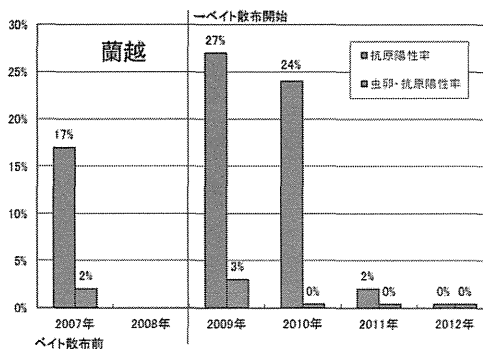
#### (京極町)

京極町では2007年にベイト散布前の調査を行い、2008年から5-11月まで毎月、約1,200個のベイト散布をほぼ全町に実施しているが、2011年まで顕著にキツネの感染状況抑えられ、2012年度もさらに抑えられている。



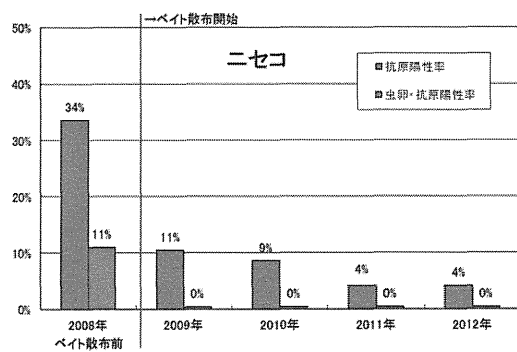
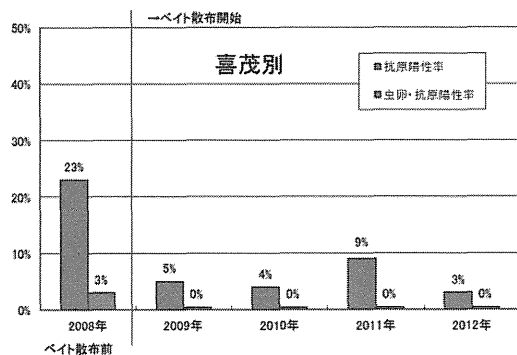
#### (蘭越町)

2007年にベイト散布前調査をおこない、2009年にはベイト散布されたがこれは非常に少数であったため、2010年には5-11月まで毎月、約1,500個のベイト散布をほぼ全町に実施しているが、2009年度より減少傾向があるが、蘭越町は他の町の2倍ほどの広さがあり、面積当たりのベイト数が少ないためか、顕著な効果とは言えなかった。2011年度からはベイトの散布数を増やしたところ、顕著な効果が見られ2012年度は虫卵・抗原ともに検出されなかった。



(喜茂別町およびニセコ町)

両町とも 2008 年にベイト散布前の調査を行い、2009 年から 5-11 月まで毎月、約 1,200 個もしくは 1,100 個のベイト散布をほぼ全町に実施している。2012 年の検査では喜茂別町及びニセコ町では感染率がさらに抑えられていた。



なお、来年度から 2 市町村が新たにベイト散布に参加する予定である。

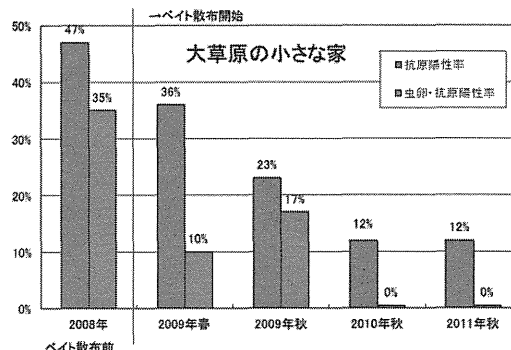
2) 小規模個別対策モデル

小規模な個別対策モデルとして、鹿追町の小規模農場においてエキノコックス感染源対策を実施した。

「大草原の小さな家」(鹿追町)

鹿追町のレストラン「大草原の小さな家」では、2009 年から 5-11 月まで毎月、約 100 個のベイト散布を自社農場周辺 (約 2km<sup>2</sup>) に行った。抗原陽性率は徐々に減少し 2010 年・2011 年は虫卵が検出されなかった。2012 年は積雪が早く調査を実施できなかった。現在、

冬期間においても駆虫薬入り餌の撒布を実施しており、春に調査を行う予定である。



以上のように、個々の地域で試行錯誤が必要であるが、駆虫薬入りベイトの散布によるキツネの駆虫は可能と思われる。今後、この方法の普及に向けた活動が重要と考えられる。なお、町の大きさにより、ベイト散布数や検査するキツネ糞便数に差はあるものの、例えば約 250km<sup>2</sup> の地域では、年間 100 万円ほどの予算があり、ベイト散布要員が確保されればこの事業は可能である。しかし、各町村だけの負担では全道展開へ拡大普及が困難と考えられる。今後は、北海道の積極的な支援が必要である。

3) 今年度の検討事項と来年度以降の課題

a) 感染源対策評価のための検査方法について

現在、感染源対策の評価は、採取したキツネ糞便の糞便虫卵陽性率と糞便内抗原陽性率の推移を観察して行っている。対策経費削減の観点から、両検査の必要性について討議した。1) ベイト散布参加者は結果を楽しみにしており、ヒトへの感染源となる虫卵排出の推移をベイト散布参加者に周知するために虫卵検査は必要である。2) 2 種の検査は必要なく、当面は虫卵検査のみで十分ではないか。しかしながら、虫卵排出が 0 になった地域でもベイト散布は継続実施が必要であり、潜在的なキツネへの感染圧の指標、すなわち虫卵

排泄予備軍となるキツネの存在の指標となる抗原検査は、ベイト散布参加者のモチベーションを維持するために有効な手段となっている。また、同様の意味で、抗原検査結果はベイト散布を継続するかどうかの審議資料として重要である。

したがって、ベイト散布地域でどの検査をどの程度実施するかは、地域の状況とコスト／パフォーマンスにより、優先順位をつけて柔軟に対応・決定することが望ましい。

#### b) 感染源対策評価のための調査実施時期について

現在、感染源対策の評価は、年1回、ベイト散布終了時の11月頃に実施している。終了時に評価する方がベイト散布参加者に一年の活動成果として効果的に提示することができるためである。

しかしながら、キツネの生態を考慮すると、11月は、キツネの分散時期であり、ベイト散布地域に分散のため侵入してきた飛び込み個体の糞便を収集する可能性が大きくなる時期である。ベイト散布地域内に生息するキツネの感染を評価するためには、春から夏のテリトリアルな時期に評価する方がよい。分散期は9月後期からなので、調査時期は8月か、9月上旬が最適である。実際、調査（糞便収集）は枯れ草で見えにくくなる11月よりも夏の方が容易である。

#### c) 子ギツネをターゲットとしたベイト散布について

子ギツネはエキノコックスに対する感受性が高く、排泄虫卵数も多くなるため、感染源として重要であることが示唆されている。そこで、子ギツネをターゲットにしたベイト散布について協議した。

冬のベイト散布：冬は餌が少なくなり、キツネは人為的な餌によりやすくなるため、親ギツネを効率的に駆虫できる可能性がある。また、冬の餌付けにより親ギツネが子ギツネへベイトを餌として運搬することも期待でき

る。しかしながら、北海道では積雪の問題があり、散布後雪の中に入ってしまうベイトの臭いに反応し、ベイトを見つけて食べるかどうかは不明である。したがって、冬のベイト散布はその効果や散布方法についてさらなる協議が必要である。

春先のベイト散布と調査：子ギツネは5月くらいから固形物を食べ始めるので、雪解け時期の春先からベイト散布を実施すれば効果的である。春の調査は、農産物への虫卵の付着などの観点から地元でも関心があるので、是非実施するべきである。ただし、従来どおりの親ギツネを対象とした調査では子ギツネへの駆虫効果が評価できないので、巣穴を探索するなどして子ギツネも含めた調査の方法論を詰めていく必要がある。

#### d) ベイト散布地周辺の波及効果の検証

ベイト散布による周辺地域への波及効果を検証する必要性について討議した。

現在、ベイト散布は市街地で行っているが、ベイト散布地域の周辺部や、山を隔てた周辺町村のキツネの感染率に影響を与えているかどうかを検証することは、今後のベイト散布継続や散布地域拡大に有用な情報を与える。今後、方法論を詰めなければならないが、まず、ベイト散布に興味を示している周辺町村において、ベイト散布参加前の予備情報収集を兼ねた調査計画を立てる。

#### e) 個別対策モデルの拡充

個別対策モデルの拡充について協議した。今年度は鹿追町の「大草原の小さな家」で実施したが、今後モデル数を増やして検証する必要がある。具体的には、人の多く集まる農家や施設、あるいは継続的に感染豚を出している養豚農家を対象としたベイト散布を検討する。

#### f) ネズミ対策について

ネズミ対策の是非について協議した。ネズミ対策を行うには、しっかりとしたアセスメ