

図 1

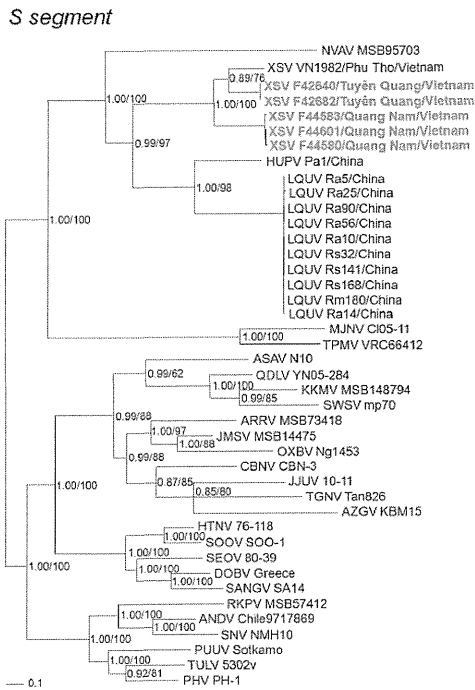


図 1：本研究班で明らかにした Xuan Son virus (XSV) とハワイ大学のグループが検出した博物館で保管されたサンプルの XSV の系統解析。2012 年の調査でベトナムの翼種目に検出した XSV VN1982 は、ハワイ大学のグループが新たに検出した XSV と一つのクラスターを形成し、翼手目もハンタウイルスの自然宿主である可能性が強く示唆された。

D 考察

本研究班の調査により、ベトナムの翼種目に Xuan Son virus (XSV) を確認し、これまで考えられてきた以上に多様な宿主がハンタウイルスに感染している事実が明らかになってきた。しかも今年度の解析により、ウイルスの陽性率は既知の齧歯目などの陽性率よりも低いことが明らかになった。今後、どのようなメカニズムで媒介、維持されているか明らかにすることで効率よく対策を講じることが可能となるだろう。日本では、ヒトのハンタウイルス感染は、1960

年代の症例以降報告がなく、現在もウイルスが常在しているか不明である。しかしながら、海外から紛れ込んでくる野生げっ歯類や翼種目などの想定していない宿主からの感染の可能性も否定できない。今後、ヒト感染が引き起こされた場合を想定し、翼手目由来ハンタウイルスについても病原性の有無を明らかにしていく必要がある。また、迅速な診断系の確立は、アウトブレイク対策の基本であり、効率よく感染者と非感染者を区別する手段の基礎となる技術である。ウイルス遺伝子の検出方法だけでなく、抗体検査法など過去の感染についても評価可能な検査法の確立を目指す必要がある。

E 結論

- ① 2013 年にベトナムおよびミャンマーで捕獲した翼種目について、未知のウイルス感染の検索を行った。
- ② 2012 年に我々が明らかにした翼手目由来ハンタウイルスについて検索した結果、2013 年にベトナムで捕獲した翼種目およびミャンマーで捕獲した翼手目から、ハンタウイルス感染は確認できなかった。
- ③ 268 頭の翼手目にハンタウイルス感染が 1 頭も検出できなかったことから、齧歯目およびトガリネズミ形目のハンタウイルスとは異なり、ウイルス陽性率は極めて低い可能性が示唆された。

F 健康危機管理情報

なし

G 研究発表

① 論文発表

1. Novel Bat-borne Hantavirus, Vietnam. Arai, S., Nguyen, S. T., Boldgiv, B., Fukui, D., Araki, K., Dang, C. N., Ohdachi, S. D., Nguyen, N. X., Pham, T. D., Boldbaatar, B., Satoh, H., Yoshikawa, Y., Morikawa, S., Tanaka-Taya, K., Yanagihara, R., and Oishi, K. *Emerging Infectious Diseases*. 19(7):1159-1161. 2013.
2. Molecular phylogenetic analysis of *Orientia tsutsugamushi* based on the *groES* and *groEL* genes. Arai, S., Tabara, K., Yamamoto, N., Fujita, H., Itagaki, A., Kon, M., Satoh, H., Araki, K., Tanaka-Taya, K., Takada, N., Yoshikawa, Y., Ishihara, C., Okabe, N., Oishi, K. *Vector-borne and zoonotic diseases*. 13(11): 825-829. 2013.

② 学会発表：なし

H 知的所有権の出願・登録状況

なし

「リッサウイルスの診断法確率に関する研究」

「わが国で狂犬病を発症したイヌが認められた場合の
危機管理に対応に関する研究」

国立感染症研究所 井上 智

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

動物由来感染症に対するリスク管理手法に関する研究

わが国で狂犬病を発症した動物が認められた場合の危機管理対応に関する研究

研究分担者： 井上 智 国立感染症研究所・獣医科学部
研究協力者： 浦口宏二 北海道立衛生研究所
喜屋武尚子 沖縄県衛生環境研究所
栗原八千代 東京都福祉保健局健康安全部環境保健衛生課
矢野さやか 徳島県保健福祉部生活衛生課
佐藤 克 狂犬病臨床研究会
山田健太郎 大分大学医学部全学研究推進機構重点研究推進分野
三澤尚明 宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター
費昌勇 台湾大学獣医大学院

研究要旨：平成13年（2001）にまとめられた『狂犬病対応ガイドライン2001』の補遺的な位置づけとなる『狂犬病対応ガイドライン2013』が取りまとめられたが、各々の都道府県等にはガイドラインに基づいた独自マニュアルをあらかじめ策定することが期待されている。現場での対応が迅速・正確に行われるためには動物の狂犬病検査を可能にしておかなければならない。そこで、宮崎県が宮崎大学と連携協力して行っている動物の狂犬病検査研修に参画した。狂犬病を想定した動物の解剖・検査に関する基盤を整備中の自治体にとって動物由来感染症を想定したBSL2対応の研修施設を持つ大学の連携協力による研修は朗報である。宮崎大学の施設を利用した解剖・検査実習では近隣他府県からも担当者が参加しており自治体施設間の現状比較が可能となり手技等の標準化も容易と考えられた。台湾でイタチアナグマに狂犬病が見つかり平成25年7月17日にOIEへ公式報告がなされた。これを受けて、台湾で政府担当者から詳細な情報を入手し、これ以降、継続した情報共有とともに状況分析を一緒に行った。イタチアナグマ（野生動物）の狂犬病は種特異的に流行が拡大しており他の動物種には容易に感染が広がっていない。また、イタチアナグマによるヒトの咬傷被害はあるが、ヒトの咬傷被害はイヌによる事例が最多であり野生動物の狂犬病が発生した場合でもイヌ対策をまず確実に行うことがヒトの健康危害防止に重要なことが示された。次年度以降も狂犬病発生後の対応について台湾の専門家と情報共有を継続してガイドラインの対応事項について引き続き検証を行う必要がある。

A. 研究目的

日本国内において狂犬病発生の疑いがある場合の対応を取りまとめている『狂犬病対応ガイドライン2001』の補遺的な位置づけとして、『狂犬病対応ガイドライン2013 - 日本国内に

おいて狂犬病を発症した犬が認められた場合の危機管理対応-』がとりまとめられた。

狂犬病の疑いがある動物が認められた場合の確定診断の進め方ならびにその際の行政の対応等は『狂犬病対応ガイドライン2001』に詳述されており、とりまとめからすでに10年

を経てはいるが、その内容は現在でも十分に適用できるものと考えられるが、『狂犬病対応ガイドライン 2013』では日本国内において狂犬病発生の疑いが生じ、精査の結果、狂犬病と診断された犬が認められて以降の対応を示して、狂犬病発生の拡大を防止し、事態を終息させるまでの措置を中心にとりまとめられている。

各々の都道府県等にあってはガイドラインに基づいた独自マニュアルをあらかじめ策定することが期待されているが、現場で対応が迅速・正確に行われるためには動物の狂犬病検査を可能にしておかなければならない。そこで、本研究では、ガイドラインが実際に機能するために必要となる自治体の基盤整備に関する調査・研究を行うこととした。

今年度は、自治体で懸案となっている疑い動物の解剖と検査を可能にするための取り組みを検討（分析）するために、宮崎県が宮崎大学と連携協力して平成 25 年 2 月から行っている動物の狂犬病検査研修に参画した。

また、台湾でイタチアナグマに狂犬病が見つかり平成 25 年 7 月 17 日に OIE へ公式報告がなされたことを受けて、台湾で政府担当者と専門家から詳細な情報を入手して、野生動物に対する『狂犬病対応ガイドライン 2013 - 日本国内において狂犬病を発症した犬が認められた場合の危機管理対応-』の対応事項について検証を行った。

B. 研究方法

◇宮崎大学で行われた狂犬病実習への参画

平成 25 年 6 月 27-28 日：第一回狂犬病防疫に関する打ち合わせ、官学連携の共同演習（狂犬病診断実習）

主催：宮崎大学農学部、宮崎県衛生管理課
講師：国立感染症研究所（1 名）、大分大学（1 名）

参加者：宮崎大学獣医学科学生（29 名）、宮崎県関係者（6 名）、長崎県関係者（1 名）

・ 1 日目：講義と解剖モデルによる実習

・ 2 日目：解剖および検査の実習

平成 26 年 2 月 17-19 日：九州地区狂犬病防疫講習講義

主催：宮崎大学農学部

講師：国立感染症研究所（1 名）、大分大学（1 名）

参加者：九州地区狂犬病防疫従事者・獣医師（23 名、福岡県・佐賀県・長崎県・熊本県・大分県・鹿児島県・沖縄県・宮崎県）

1 日目：講義と解剖モデルによる実習

2 日目：解剖および検査実習（資料 1・2）

3 日目：研修のまとめと意見交換

◇台湾の狂犬病事例に関する政府機関の情報収集

台湾でイタチアナグマに狂犬病が見つかり平成 25 年 7 月 17 日に OIE へ公式報告がなされたことを受けて、台湾政府機関等から狂犬病の発生状況について情報共有及び意見交換を行った。

参加会議等：

International Expert Meeting – Challenges and Opportunities in the Prevention and Control of Rabies. August 30, 2013. VNTUH International Convention Center Room 301. Taiwan.

International Expert Meeting – Rabies Command Center Internal Meeting with International Experts. August 31, 2013. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine. Taiwan.

2013 年狂犬病臨床防疫検討会議. October 22, 2013. 台南市政府（台南市動物貿易保護所、国立台湾大学獣医専業学院、台南市獣医師公会）、国立生活美学館国際会議場、台南市、Taiwan.

◇台湾の狂犬病関係者及び専門家と発生前後

の対応について検討。

東京で開催される国の狂犬病予防担当者会議に参加された台湾大学・獣医科学院の費昌勇教授（動物の狂犬病対策検討委員会議長）と最新の発生情報等について情報および意見交換を行って、ガイドラインの対応事項について検証を行った。

平成 25 年度狂犬病予防業務担当者会議

日時：平成 26 年 2 月 5 日（水）

場所：タワーホール船橋

参加者：自治体狂犬病予防業務担当者、関係省庁（300 人程度）

C. 研究結果

◇宮崎大学で行われた狂犬病実習

宮崎大学との協力によって、宮崎県では BSL2 対応施設を利用した狂犬病を想定する動物の解剖・検査が可能になった。

第一回狂犬病防疫に関する打ち合わせ（平成 25 年 6 月 27-28 日）の議事抜粋を資料 3 に示した。

実習に参加した学生の感想を以下に抜粋する。

- ・公務員獣医師として実際に狂犬病予防員としての仕事を経験できた。
- ・犬の登録頭数と予防接種頭数にはずいぶん差があると思います。今回の研修で宮崎県の発表があり、70%程度は接種されているといわれ、それは数値的には高いとおっしゃられました。しかし 70%程度で満足してはいけないと思います。より 100%に近い数値にするにはどのような働きかけが必要なのでしょうか。おそらく今のままでは数値をあげるは無理ではないかと考えます。もしあれば、新しい取り組みなどにつ

いても教えていただけますでしょうか。

- ・解剖を行った際に、亡くなって数日たった犬を用いたためか、脳を取り出して採材する際、各部位の境界が不明瞭でなかなか分けることができなかった。自分の解剖学の知識が浅かったことも原因だと思うので、しっかり復習しようと思う。
- ・正直分かりにくいものはありませんでした。教科書的な事柄は理解している気でしたが、今のままではいざ狂犬病が国内に入ってきたときは全く対処できないなということを感じました。
- ・分かりにくかったのは、脳内における橋の位置だった。重要な採材部位の一つだっただけに、もう少し説明があれば、と思った。
- ・海馬の位置が把握しづらかった。教科書で確認していたが立体的な位置関係が理解できず、解剖時には脳組織が新鮮でないと解剖学的位置を判断するのが難しかった。
- ・DVD を見たときは分かったつもりになっていたのですが、実物は融解が進んでいたこともあり、どこが採材部位なのか見分けが付きませんでした。生材料でもデモンストレーションをしていただけたらよかったです。
- ・手袋は二重にして、いつでも新しい手袋に代えられるようにしておくべきだと感じました。

平成 26 年 2 月 17-19 日に開催された九州地区狂犬病防疫講習講義では、大学の施設を利用した解剖・検査実習では近隣他府県から担当者が参加して、各自治体の現状等を直接に情報共有することで検査手技等を標準化することもが可能になった（資料 4）。

◇台湾の狂犬病事例に関する政府機関の情報収集

台湾でイタチアナグマに狂犬病が見つかり平成 25 年 7 月 17 日に OIE へ公式報告がなされたことを受けて、台湾政府機関から狂犬病の発生状況について情報共有及び意見交換を行った。

平成 25 年度狂犬病予防業務担当者会議（平成 26 年 2 月 5 日）（資料 5）で講演を頂いた台湾大学・獣医科学院の費昌勇教授（動物の狂犬病対策検討委員会議長）の発表スライドを資料 5 に示した。

D. 考察

本研究では、ガイドラインが実際的に機能するために必要となる自治体の基盤整備に関する調査・研究を行っている。

今年度は、自治体で懸案となっている疑い動物の解剖と検査を可能にするための取り組みを検討（分析）するために、宮崎県が宮崎大学と連携協力して平成 25 年 2 月から行っている動物の狂犬病検査研修に参画し、また、台湾でイタチアナグマに狂犬病が見つかり平成 25 年 7 月 17 日に OIE へ公式報告がなされたことを受けて、台湾で政府担当者と専門家から詳細な情報を入手して、野生動物に対する『狂犬病対応ガイドライン 2013 - 日本国内において狂犬病を発症した犬が認められた場合の危機管理対応 -』の対応事項について検証を行った（図 1）。

平成 13 年（2001）にまとめられた『狂犬病対応ガイドライン 2001』の補遺的な位置づけとなる『狂犬病対応ガイドライン 2013』が取りまとめられたが、各々の都道府県等にあるガイドラインに基づいた独自マニュアルをあらかじめ策定することが期待されている。

宮崎県が宮崎大学と連携協力して行っている動物の狂犬病検査研修に参画した。狂犬病を想定した動物の解剖・検査に関する基盤を整備中の自治体にとって動物由来感染症を想定した BSL2 対応の研修施設を持つ大学の連携協力による研修は朗報である。宮崎大学の施設を利用した解剖・検査実習では近隣他府県からも担当者が参加しており自治体施設間の現状比較が可能となり手技等の標準化も容易と考えられた。

台湾でイタチアナグマに狂犬病が見つかり平成 25 年 7 月 17 日に OIE へ公式報告がなされ

た。イタチアナグマ（野生動物）の狂犬病は種特異的に流行が拡大しており他の動物種には容易に感染が広がっていない。また、イタチアナグマによるヒトの咬傷被害はあるが、ヒトの咬傷被害はイヌによる事例が最多であり野生動物の狂犬病が発生した場合でもイヌ対策をまず確実にを行うことがヒトの健康危害防止に重要なことが示された。

次年度以降も狂犬病発生後の対応について台湾の専門家と情報共有を継続してガイドラインの対応事項について引き続き検証を行う必要がある。

E. 研究発表

1. 井上 智。狂犬病対応ガイドライン 2013 について。兵庫県立健康生活科学研究所。2013 年 2 月 13 日、健康科学研究センター、兵庫県
2. 井上 智。動物由来感染症。平成 24 年度 JICA 集団研修「獣医技術研究 (Research on Veterinary Technology)」。2013 年 4 月 11 日、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所、つくば、茨城県。
3. 井上 智。世界における狂犬病の実際と我が国に必要な予防対策について。動物愛護管理関係研修会。2013 年 6 月 14 日、栃木県動物愛護指導センター、宇都宮市、栃木県。
4. 井上 智。世界における狂犬病の実際と我が国に必要な予防対策について。人獣共通感染症学講義。2013 年 7 月 2 日、岩手大学農学部、盛岡市、岩手県。
5. 井上 智。台湾での狂犬病発生事例について。平成 25 年度第 1 回徳島県動物由来感染症対策検討会。2013 年 8 月 5 日、徳島県危機管理部県民くらし安全局、徳島市、徳島県。

6. 井上 智。狂犬病の概説と狂犬病臨床診断の重要性。緊急狂犬病セミナー。2013年8月21日、狂犬病臨床研究会・アニコム予防委員会、アリミノビル地下ホール、東京都。
7. 井上 智。世界に広がる狂犬病/今年発生した隣国台湾の現状～。2013年8月28日、第6回世界狂犬病デー 2013 in Tokyo、渋谷 TKP カンファレンスセンター、東京都。
8. 井上 智。公衆衛生における人獣共通感染症の疫学。家畜衛生講習会（獣医疫学特殊講習会）。2013年10月1日、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所、つくば市、茨城県。
9. 井上 智。日本への狂犬病侵入について（狂犬病ガイドライン 2013）。平成 25年度県民公開講座。2013年10月19日、静岡県獣医師会・公衆衛生部会、静岡市、静岡県。
10. 井上 智。台湾における動物の狂犬病について。平成25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。2013年11月1日、赤坂区民センター区民ホール、港区、東京都。
11. 井上 智。狂犬病ガイドライン2013。第13回 人と動物の共通感染症研究会学術講演会。人と動物の共通感染症研究会。2013年11月2日、国立感染症研究所・戸山研究庁舎、新宿区、東京都
12. 井上 智。アジアにおける狂犬病。シンポジウム・神経ウイルス。第61回日本ウイルス学会学術集会。2013年11月10日-12日、神戸国際会議場、神戸市、兵庫県
13. 井上 智。台湾のイタチアナグマで発生した狂犬病。狂犬病予防体制整備特別委員会（第1回）、日本獣医師会。2013年11月22日、日本獣医師会会議室、青山、東京都
14. 井上 智。台湾での発生を受けて：(I) 狂犬病ガイドライン 2013(獣医師の役割)。平成25年度大阪府獣医師会三部会合同・狂犬病予防対策研修会、大阪府獣医師会。2013年11月30日、大阪コミュニケーションアート専門学校、大阪市、大阪府
15. 井上 智。狂犬病清浄国であった台湾での再興について（世界に広がる狂犬病を知って、備えあれば憂いなし）。平成25年度狂犬病予防注射指定獣医師等研修会、岩手県獣医師会。2013年12月4日、ホテル東日本、盛岡市、岩手県
16. 井上 智。狂犬病の現状と今後の課題。狂犬病予防対策に関する講習会、埼玉県獣医師会。2013年12月12日、大宮法科大学院大学、さいたま市、埼玉県
17. 井上 智。狂犬病は今？—現状と今後の課題。生物医学・白金支部学術講習会、東京都獣医師会。2013年12月12日、国立医薬品食品衛生研究所（28号棟F）、東京都
18. 井上 智。台湾における動物の狂犬病発生事例の概要について。平成25年度狂犬病予防業務担当者会議。厚生労働省健康局結核感染症課。2014年2月5日、タワーホール船橋、東京、東京都
19. 井上 智。台湾での狂犬病発生を踏まえた日本での対応の検討について（緊急研究班）：本研究の概要概要について。平成25年度狂犬病予防業務担当者会議。厚生労働省健康局結核感染症課。2014年2月

- 5日、タワーホール船橋、東京都
20. 井上 智。狂犬病について。平成 25 年度適正飼養講習会（ペットをめぐる最新状況～ペットは飼い主を映す鏡です）。東京都福祉保健局健康安全部。2014 年 2 月 11 日、都議会議事堂 1 階「都民ホール」、東京都
21. 井上 智。狂犬病。平成 25 年度希少感染症診断技術研修会（その他重要なトピック）。厚生労働省健康局結果う感染症課・国立感染症研究所。2014 年 2 月 20 - 21 日、国立感染症研究所・共用第一会議室、東京都
22. 井上 智。危機管理(海外の狂犬病対策)。九州地区狂犬病防疫講習講義・実習。宮崎大学農学部・宮崎県福祉保健部。2014 年 2 月 17 - 19 日、宮崎大学農学部獣医棟、宮崎県
23. 井上 智。危機管理(ガイドライン2013)。九州地区狂犬病防疫講習講義・実習。宮崎大学農学部・宮崎県福祉保健部。2014 年 2 月 17 - 19 日、宮崎大学農学部獣医棟、宮崎県
24. 井上 智。台湾国内におけるイタチアナグマ等で発生した狂犬病に対する取り組みの現状と今後の課題。狂犬病シンポジウム：台湾で発生した狂犬病からわが国の対策を考える。市民公開シンポジウム（日本獣医師会・日本産業動物獣医学会・日本小動物獣医学会・日本獣医公衆衛生学会）。平成 25 年度日本獣医師会・獣医学術学会年次大会（千葉）。2014 年 2 月 21 日、幕張メッセ・アパホテル&リゾート（東京ベイ幕張）、千葉県
25. 仁和岳史、野口 章、井上 智、小川知子、田中俊光。千葉県のイヌにおける狂犬病ウイルスに対する中和抗体保有状況。

日本獣医公衆衛生学会（一般講演・研究発表）。平成 25 年度日本獣医師会・獣医学術学会年次大会（千葉）。2014 年 2 月 22 日、幕張メッセ・アパホテル&リゾート（東京ベイ幕張）、千葉県

26. 井上 智。世界の狂犬病の発生状況。人獣共通感染症～レプトスピラと狂犬病。日本小動物獣医学会・教育講演。平成 25 年度日本獣医師会・獣医学術学会年次大会（千葉）。2014 年 2 月 23 日、幕張メッセ・アパホテル&リゾート（東京ベイ幕張）、千葉県

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

狂犬病対応ガイドライン 2013

※厚生労働省ウェブサイトからダウンロード可能：

(<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou18/pdf/guideline2013.pdf>)。

図 1

狂犬病のリスク管理に関する指針の改訂と検証

わが国の狂犬病危機管理の強化

1. 狂犬病ガイドライン2013の普及：自治体と大学の連携モデル
2. 清浄国・台湾で再興した野生動物狂犬病のリスク管理に係る調査

わが国で狂犬病を発症したイヌが認められた場合の危機管理対応：狂犬病ガイドライン2013



自治体と大学の連携による狂犬病研修：宮崎県と宮崎大学産業動物防疫リサーチセンターの連携を支援・分析

大学のカリキュラムに狂犬病発生を想定したシミュレーションと疑い犬の解剖・検査を組み込んで、自治体担当者と学生で実地研修が行われた。

↓

自治体で困難であった技術研修(施設・機材)が可能となった。

+

波及効果：行政担当者と学生が研修を行うことで公衆衛生行政の実際とその意義について次世代が効果的に理解(啓発)できた。

台湾CDC主催の国際会議に参加して、台湾で発生した野生動物の狂犬病に関するリスク管理に関する情報共有と分析をおこなった

台湾の事例から学ぶべきこと(1)

- 台湾：狂犬病を一掃して50年後に再興!
- 日本：台湾とほぼ同じ様な狂犬病の事情である。
- ✓アジアの隣国で流行している狂犬病の宿主動物 イヌ、タヌキ、イタチアナグマ、(。。。?)
- ✗日本にイタチアナグマは生息していないが、渡鳥類、野犬、アラビグマ、タヌキ、キツネ、マンダリン等

現行の狂犬病対策 ⇒ 台湾事例は想定内?

台湾の事例から学ぶべきこと(2)

- ✗台湾が狂犬病の流行を摘発できたのは、適切な狂犬病のモニタリング ⇒ 動物の解剖と検査が可能

対照：イヌ・ネコ・食肉目の野生動物 管理されていない犬等ペット 密輸 疑い症状や不審死の野生動物等

- 資料 1 -

狂犬病発生時の対応 ～解剖編～

狂犬病発生時の対応 ～解剖編～

狂犬病は、発症以前にウイルスを検出することが困難である。このため、狂犬病の疑われるイヌによって咬傷を受けた場合には、被害者に狂犬病暴露後ワクチン接種を行い、加害犬を必ず抑留して症状等の経過観察を行う（14 日間）。

- 加害動物が観察期間中に狂犬病を発症しなければ・・・

被害者は咬傷によるウイルス暴露がなかったとして狂犬病ワクチンの連続接種を止めることができる。

- 加害動物が抑留期間中に死亡した場合や発症して殺処分を行った場合には・・・

狂犬病を疑い、死後速やかに検査に必要な脳組織を摘出し、狂犬病の検査を行う。



死亡後の神経組織は自己融解が著しいため、脳の取り出しと検査材料の採取は迅速に行う。その場で解剖できない場合は、解剖可能な施設に速やかに移送する。移動に時間がかかる場合には、氷冷もしくは冷蔵（4-10℃）状態で温度管理し、48 時間以内に検査材料（脳組織）を採取する。

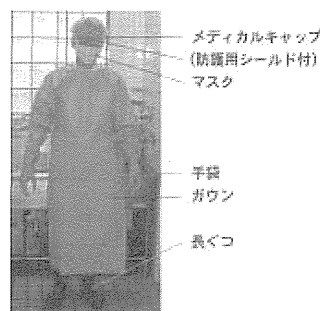
1. 作業者の準備

個人用防護具 personal protective equipment

厚い手袋（2重）、ゴーグルあるいはフェイスガードタイプのシールド、マスク、ガウンあるいは白衣

（注）脳の取り出し作業では、組織等の飛散に十分注意を払って感染組織（中枢神経系組織、体液、特に唾液）と作業者の皮膚及び粘膜との直接的な接触を避けるようにする。

（注）作業従事者は必ず事前に狂犬病ワクチンの接種を行い、狂犬病に対する免疫を獲得しておく。また、緊急時の狂犬病暴露後ワクチン接種を可能とするために連絡網を準備し、ワクチン接種を行う医療機関を確保する。



2. 必要な器具・機材

- PPE：ゴム手袋、厚手ゴム手袋、シールド、マスク、ディスプレイなぎ（ガウン）（班数×2）
- 消毒液（解剖部位清拭用）
- オートクレーブバッグ
- 長靴消毒槽
- 解剖台（ステンレス鋼製の剖検テーブル）
- ベンチコート
- キムタオル
- 動物の遺体と汚染タオル類を入れるビニール袋（体液等の漏れを防ぐために2重にして使用）

- ポリバケツかコンテナ（各班に1つ）
- 犬の保定器
- 結紮バンド
- 解剖器具：のこぎり、解剖刀、骨タガネ、カナヅチ、有鉤ピンセット、鋏、薬サジ、メス柄・刃
（複数の動物から脳を取り出す場合は器具一式を動物の数だけ用意する）
- 摘出した脳を置くシャーレおよび移送用二次容器
- 保冷容器、氷（検体輸送用）
- 汚染器具を入れる消毒液の入った薬槽
- 滅菌済み器具および手を洗うための洗剤と温水（水道）
- 床、壁、作業面を洗浄するための洗剤と温水（水道）

3. 作業開始直前の準備

- 解剖台を消毒し、ベンチコートをしきその上に紙タオル（もしくは新聞紙）を広げて滅菌済みの器具を配置する。
- 取り出した脳を入れるシャーレ等にラベリングする。

4. 脳の取り出し

- 1) 動物の頸部皮膚を正中に切開した後に、頸椎周囲の皮膚を切り開く。第2頸椎と第3頸椎もしくは第3頸椎と第4頸椎の境界域周囲の筋肉をできるだけ剥ぎ取った後に「のこ」を使用して頭部を体躯から切り離す（図1）。※頭部を切り離さないで行うことも可能。
- 2) 検体を解剖台にのせる。ドライバー等を利用して上顎と下顎に隙間を開け、保定器を装着する（図2）。（顎の筋肉が硬直して口蓋が十分に開かない場合には、ガーゼもしくはタオルを上顎と下顎に引っ掛けて引くと安全に開口できる）。
- 3) 消毒液を十分にしみ込ませたタオルもしくはガーゼで検体の頭部をよく消毒する。口腔周囲は唾液が付着しているので特に念入りに拭き取る。解剖中に出てくる体液（血液、唾液等）はペーパータオル等で適時拭き取って体液の飛散を防ぐ。
- 4) 頭部の皮膚を切開する（図3）。



図1 頭部の切り離し



図2 保定器



図3 皮膚の切開、剥離

5) ピンセットと解剖刀を使って側頭部と後頭部の筋肉を可能な限り切り取る。

6) 頭部にのこぎりを入れる。眼球の真上で水平に刃をあてて頭骨に切り込みを入れる。のこぎりの刃の高さを変えないで、頭部を一周するように切り込みを入れていく（図4）。



図4 頭部にのこぎりを入れる

7) のこぎりの切り込みが、頭部を一周したら頭蓋骨をはずす。頭蓋が頭骨に付着している場合は骨タガネを切り込みに打ち込んでテコの原理で付着部位を切り離す。

8) 脳を摘出する。頭部を切り離さずに解剖した場合は、ここで第一頸椎をノコギリで切断する。頭蓋に脳の硬膜が付着している場合には脳を傷つけないようにハサミとピンセットで硬膜を切り取る。次に、薬サジなどで脳を持ち上げながら脳底部に繋がる脳神経を1つずつ切り離す（図5）。鉗やスパーテル等で脳を持ち上げて、検体のラベルを貼ったシャーレ等に乗せる。取り出した脳は、輸送用の二次容器に入れて検査室に運ぶ。

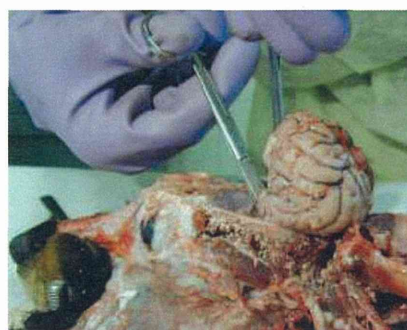


図5 脳を持ち上げて脳神経を切り離す

5. 作業終了時の消毒等

- 解剖後の動物の遺体や組織片と汚染タオル類は、焼却処分用のビニール袋等に入れて密閉する。袋の口をしぼるときは汚染していない手で行う。
- 使用した器具は消毒液にいれる。
- 作業面は消毒液で拭いてから、洗剤と温水で洗浄する。
- 汚染された可能性のある衣服や器具は、家庭用の石鹼や洗剤を使用した洗濯、またはオートクレーブ滅菌により狂犬病ウイルスを不活化することが可能である。
- 狂犬病の動物を飼育および解剖を行った部屋の床等は、「1%の温湯石鹼水」や「洗浄液」もしくは「第4級アンモニア塩」によって狂犬病ウイルスを不活化することが可能である。

- 資料 2 -

狂犬病研修・診断

狂犬病研修・診断

1. 安全キャビネット内で検査に必要な部位を切り出す。大脳の後ろから1/3の部位を切開し（図6）、海馬（図7）を摘出する（両側）。次に大脳と小脳を切り離し、続いて小脳と脳幹を切り分ける（図8）。最後に大脳から視床を切り取る（図9）。続いて、延髄、橋、視床、小脳、海馬（左右）の組織を1cm角大以下に切り出す。（*蛍光抗体法に使用）
脳幹部（延髄、橋、視床）および小脳と海馬をそれぞれ100mgほどに切り出し、ビーズ入りのチューブにうつす。1mlのTRIzol液をチューブに加え、細胞破砕機でホモゲナイズする。（*RT-PCR法に使用）

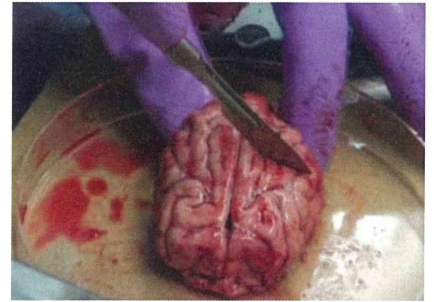


図 6

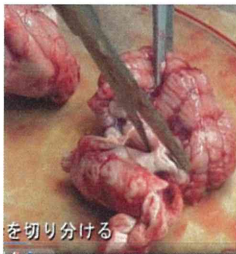


図 8 小脳と脳幹を切り分ける



図 9 大脳から視床を切り取る

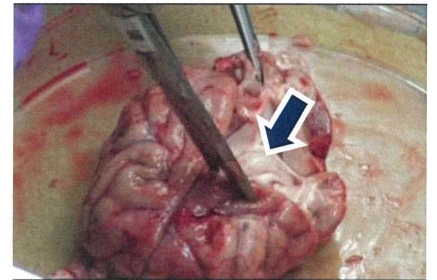


図 7 海馬（矢印）

*検査組織（脳幹部、小脳および海馬）の残りは追検査や確定診断が必要となった場合のために凍結保存（-80℃）しておく。

直接蛍光抗体法による狂犬病ウイルス抗原の検出

2. 1cm角以下に切り出した組織をペーパータオル上に置く。血液が多量についている場合は*丁寧に除去してから、スライドグラスに組織をそれぞれスタンプする。
*血液は非特異反応の原因となりやすい。
3. 作成したスライドは安全キャビネット内で十分に風乾する。約15分間
4. -20℃冷凍庫にある冷アセトン液に塗抹スライドを完全に浸し固定する。30分間
5. 冷アセトン液から取り出し、十分に風乾する。
6. 標識抗体(PBSで25倍に希釈済)1.5mlに1%エバンスブルー液を3ul(終濃度2ul/ml)加える。
*ここで、陽性対照スライドを渡します。
7. 作成したスライドと陽性対照スライドに標識抗体を重層する（約200ul/スタンプ）。室温で30分反応させる。
8. 重層した反応液は捨て、スタンプ面を洗瓶ボトルのPBS(-)で吹きかけて洗い流し、十分量のPBS(-)が入った染色ビンに10分間浸ける。10分後に取り出したら、洗瓶ボトルのPBS(-)をスタンプ部位に吹きかけ余分なゴミ等を洗い流す。
8. 再度、PBS(-)に10分間浸け、同様に洗瓶ボトルのPBS(-)で洗い流す。
9. 蒸留水に2-3秒浸して塩を除去し、風乾する。
10. 10%グリセリン-PBS(pH8.4)で封入し、カバーグラスをかけ蛍光顕微鏡で観察する。

RT-PCR 法による狂犬病ウイルス遺伝子の検出（直接蛍光抗体法と並行して行う。）

1. RNA の抽出

2. 室温に TRIzol を加えたチューブを 5 分放置し、0.2ml のクロロホルムを加えボルテックス（15 秒間）をする。
3. 室温で 2-3 分放置し、13,000 rpm, 4°C, 10 分遠心する。
4. 上層（水層）を新しい 1.5ml チューブに移し、0.5ml のイソプロパノールを加え転倒混和する。
5. 室温に 10 分放置し、13,000 rpm, 4°C, 10 分遠心する。
6. 上清をチップでほぼ取り去り、壁に残った上清部分を再度 13,000 rpm, 4°C, 1 分スピンドウンし、沈殿の反対側の壁面から上清を完全に取り去る。
7. 75%エタノール 1ml を入れ、軽く転倒混和し 11,000 rpm, 4°C, 5 分遠心する。
8. 上清をチップでほぼ取り去り、壁に残った上清部分を再度 11,000 rpm, 4°C, 1 分遠心して、沈殿の反対側の壁面から上清を完全に取り去る。
9. フタを開けたまま、安全キャビネット内の室温で 5-10 分乾燥。
10. 50ul の DDW をチューブに入れ、55-60°C, 10 分加熱。氷上で冷却。スピンドウン。
*ここで、陽性コントロール、陰性コントロールを渡します。

2. RT 反応

1. 新しい PCR チューブに 1ul の逆転写用プライマー JW12 (10pmol/ul) と 10ul の抽出した RNA を加える。
サーマルサイクラーで 95°C1 分 → 4°C1 分に設定、その後、室温におく。
2. 4ul の 5x バッファー、4ul の dNTP (2.5mM)、1ul の Ribonuclease inhibitor、1ul の AMV RTase をさきほどの PCR チューブに加えて反応液の総量を 21ul とする。
3. サーマルサイクラーで 42°C45 分 → 95°C5 分 → 4°C の RT 反応を行う。
4. 反応液の 3ul を 27ul の DW で 10 倍に希釈する。

3. PCR 反応

1. 1 本あたり、38ul の DW、5ul の 10x ExTaq Buffer、4ul の dNTP(2.5mM)、1ul の 10g プライマー (10pmol/ul)、1ul の 304 プライマー(10pmol/ul)、0.25ul の TaKaRa Ex Taq が入ったミクスチャーを必要な分(5 本分+1 本)作成する。このミクスチャーを 49ul ずつ新しい PCR チューブに分注する。1ul の希釈した RT 反応液を加えて、総量 50ul で PCR 反応を行う。
2. 95°C1min→95°C 30sec, 50°C20sec, 72°C1min を 30 サイクル→72°C7min→4°C
3. 1%アガロースゲルにて泳動、バンドを確認する。
(*作業の進捗状況によって、泳動は大学スタッフが先行し、翌日の会議の際に、泳動写真をお渡しします。)

- 資料 3 -

第 1 回 狂犬病防疫に関する打ち合わせ

- 議事録抜粋 -

日時 2013 年 6 月 27 日(木) 10:30-12:00

場所 宮崎大学農学部獣医学科 1 階会議室

議長 三澤 尚明

書記 桐野 有美

出席者(敬称略)

井上 智 (国立感染症研究所)

山田 健太郎 (大分大学医学部)

〈宮崎県〉

坊菌 慶信 (宮崎県衛生管理課)

石川 幸治 (宮崎県衛生管理課)

有川 玄樹 (高千穂保健所)

西村 幸江 (中央保健所)

中尾 敏章 (日南保健所)

鶴田 一郎 (都城保健所)

久保 明子 (小林保健所)

岡野 宏和 (高鍋保健所)

関谷 亜由美 (日向保健所)

松浦 真翔 (延岡保健所)

大山 貴史 (宮崎市保健所)

〈長崎県〉

吉川 亮 (長崎県環境保健研究センター)

〈宮崎大学〉

三澤 尚明 (宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター)

乗峰 潤三 (宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター)

野中 成晃 (獣医寄生虫病学)

渡邊 真治 (獣医微生物学)

山崎 渉 (獣医公衆衛生学)

関口 敏 (産業動物伝染病防疫学)

上村 涼子 (産業動物衛生学)

桐野 有美 (人獣共通感染症教育・研究プロジェクト)

目堅 博久 (人獣共通感染症教育・研究プロジェクト)

議題

官学連携での狂犬病診断体制強化に向けた取り組みについて

議事録

1. 開会

あいさつおよび経緯の説明

【三澤教員(宮崎大学)】

今回の取り組みは、平成 24 年度に行われた獣医師会主催の狂犬病講習会において、各自治体における診断体制について問題提起されたことに端を発する。感染研の井上先生、大分大学の山田先生、そして本県衛生管理課の賛同のもと実現することができた。

狂犬病対策は県の業務であるが、実際に疑わしい犬が発生した場合、その犬を解剖して診断する際には少なくとも施設・設備を大学が提供する必要がある、また診断技術の教育訓練においても大学がコミットできると考えている。まずは官学連携のもと、宮崎県において診断体制を構築し、本学を拠点とした取り組みを九州ブロックに拡大することを目指したい。

2. 協議事項

1) 今回の実習の流れについて

目堅教員(宮崎大学)より説明および確認が行われた。

2) 宮崎県における狂犬病の検査体制について(意見交換) 抜粋

2-1) 官学連携での診断体制構築について

- 狂犬病疑いの犬が発生した際の対応について大学と県との間で協定を結ぶことを前提に、問題点を整理し、前向きに検討していきたい。締結の具体的な方法として、すでに締結されている防疫協定の内容に狂犬病に係る項目を追加し改定する方向で検討する必要がある。
- 官学連携においては、宮崎県と宮崎大学との防疫協定に準じた形での連絡体制の構築が必要である。

2-2) 狂犬病が疑われる動物の剖検・診断の実際

Q. 観察期間に発症しなかった咬傷犬を飼い主に返却することに危険はないのか？

A. 咬傷事故後 10～14 日間で犬が発症しなかった場合に担保されるのは、「当該咬傷事故による狂犬病ウイルスの伝播はなかった」ということになる。

Q. 日本国内でのサーベイランス状況は？

A. わが国ではフランスのようなサーベイランスは実施されていない。日本でも狂犬病の疑われる咬傷犬の狂犬病検査は行うべきである。

2-3) 検査従事者のワクチン接種体制

- 化血研のヒト用狂犬病ワクチンは製造量が少なく、入手困難な状態である。宮崎県内では 1 か

所(源藤町の三原内科)で接種ができるが、病院ではワクチンを備蓄しておらず、接種の度に発注していることから、緊急ワクチン接種体制について十分とは言えない。

- ワクチン接種は、接種希望者に対し病院側が接種の要不要を判断している。今回の研修に先立ち、参加者のワクチン接種を予定していたが、不要と判断され見送られた。今後、国に対して狂犬病予防員へのワクチン接種の要望を挙げていきたい。

Q. 捕獲をする人(技術員、狂犬病予防員)に対してワクチンは打たないのか？

A. 狂犬病疑いの犬に接触する予定のある人は、予防ワクチンを打っておいた方がよい。

3) 今後の官学連携の共同演習について

今回の実習を踏まえて、次回以降協議することとする。

3. 閉会