

2. 学会発表等

- (1) わが国の猫における *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae* および *Chlamydophila felis* DNA の検出状況 有本千波, 根岸あかね, 佐藤真伍, 壁谷英則, 辻本元, 遠藤泰之坂田義美, 市川康明, 丸山総一 第155回日本獣医学会学術集会(2012:9/20-22 岐阜大学)
- (2) 犬, 猫とその外部寄生虫からの

Rickettsia および *Bartonella* の検出状況について 藤永洋平, 國吉奏慧, 壁谷英則, 佐藤真伍, 市川康明, 丸山総一 第155回日本獣医学会学術集会(2012:9/20-22 岐阜大学)

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表 1 わが国の猫における菌種別 *Bartonella* 属菌 DNA 検出状況

項目		検体数	DNA 陽性検体数 (%)	
			<i>Bartonella</i>	<i>C. felis</i>
性	雄	931	43 (4.6)	29 (2.8)
	雌	815	36 (4.4)	20 (2.5)
	不明	8	1 (0.5)	0
年齢	1歳未満	218	14 (6.4)	7 (3.2)
	1歳以上	1,523	65 (4.3)	39 (2.6)
	不明	13	1 (7.7)	0
飼育地域*1	西日本	1,103	65 (5.9)**	32 (2.9)
	東日本	651	15 (2.3)	14 (2.2)
外出状況	0日	6	0	0
	1日	198	7 (3.5)	4 (2.0)
	2～6日	224	9 (4.0)	4 (1.8)
	7日(毎日)	1,278	62 (4.9)	36 (2.8)
	不明	48	2 (4.2)	2 (4.2)
FIV 感染	有	407	26 (6.4)*2	8 (2.0)
	無	1,347	54 (4.0)	38 (2.8)
FeLV 感染	有	209	16 (7.7)*	5 (2.4)
	無	1,545	64 (4.1)	42 (2.7)
<i>C. felis</i> ワクチン 接種歴	有	186	検討せず	3 (1.6)
	無	1,568		43 (2.7)
計		1,754	39 (2.2)	46 (2.6)

*1 : 静岡・長野・新潟県から以東を東日本, 愛知・岐阜・富山県から以西を西日本とした。

*2 : $p < 0.05$

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

一般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（一般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、加藤 美代子
（一般社団法人予防衛生協会）

高野 淳一郎（独立行政法人医薬基盤研究所）

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一般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 (BV) 感染症が挙げられる。BV はサルにおいて何ら致死的な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 BV 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。国内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。

H24 年度、我々は国内 3 か所の動物園、動物公園などサル飼育・展示施設を対象に、BV 感染状況調査を行った (H24 年度研究報告参照)。そのうち 2 か所では BV 陰性という状況であったが、1 か所ではアルファメールを含めて BV 陽性個体が存在しているという状況が判明した。陽性個体は、

動物倫理上の判断から安楽殺を避けるため、譲渡を受け BV 再活性化に関する研究に供与し、有効活用した。

B. 研究方法

1) 検査動物

H24 年度、関東地方の H 小動物園疫学調査で BV 抗体検査陽性と判定され、譲渡されたニホンザル (オス 1 頭、メス 3 頭) を実験に供与した。

2) 検査方法

(i) 採血および血清、口腔内および膣内スワブの回収

動物を麻酔下で大腿静脈またはサフェナ静脈から定期的に適当量採血を行った。また、口腔内および膣内 (メス個体) から専用スワブキットを用いて口腔、膣内ぬぐい液を回収した。採血管はプレーンまたは血液凝固剤入りのものを用い、2,500rpm、15 分、4°C で遠心し血清を回収した。回収した材料は、使用するまで冷凍または冷蔵で保管した。

(ii) ウイルス抗体検査

全血から回収した血清を用いて、Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)を用いた BV 抗体の検出を試みた。

(iii) ウイルス DNA 検出系

PCR は既に報告のある BV 定量 PCR (J Virol Methods 2003) の他に、アルファヘルペスウイルス属で変異の少ない UL31 領域にユニバーサルな定量 PCR の設計を試みた。各プライマーおよびプローブは、BV (GenBank Accession Number NC_004812)、SA8 (NC_006560)、HVP2 (NC_007653)、HSV-1 (NC_001806)、HSV-2 (NC_001798) を基に設計した (表 2)。

(*) 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

(i) ウイルス抗体検査

ELISA により血清中の抗 BV サル IgG 抗体価を計測した。4 頭中、メス 3 頭で陽性の結果を得た。オス 1 頭は陰性であった。過去の記録を遡ると、オス 1 頭、メス 2 頭は状態を継続・維持していたが、メス 1 頭は 2013 年 12 月後半に抗体価の上昇が見られた (表 1)。

(ii) ウイルス DNA 検出系

アルファヘルペスウイルス属の BV, SA8, HVP2, HSV1, HSV2 を対象に、相同性の高い遺伝子領域 UL31 (Nuclear phosphoprotein) を選定した。Taqman PCR による絶対定量による定量 PCR 系を確立するために、それぞれのウイルスのスタンダードプラスミドを構築した。

マルチプレックス PCR にて、感度、特異性を確認したところ、良好な結果が得られた。一方で今回設計した PCR の系と同じ条件で gG 遺伝子の PCR を行うと感度が著しく低下することも確認された (図 1)。

D. 考察

隔離されているニホンザルの抗体検査の結果から、各個体でほぼ過去の状態を維持していることが判明した。BV も含まれるヘルペスウイルスは、ストレスにより個体の免疫力 (体力) が低下

した頃に神経系細胞からウイルスが再活性化し、排出されると考えられている。今回、すべてのサルで抗体価が維持されていたことは、サル体内で常時 BV が活性化していたと考えられ、ウイルス活性化と個体の状態との関連が注目された。常時 BV が排出されているとなると、サルに接触する機会があればヒトが感染する可能性があり、リスク管理上憂慮される。また、メス個体 1 頭で、抗体価の上昇が確認され、BV 再活性化と繁殖時期や性周期との関連について、今後さらに検討の余地があると思われた。

BV 定量 PCR はすでに Gold standard と言える系が報告されているが、変異の大きい gG 遺伝子領域に設計されているため、BV 株によって検出率に差がでることが危惧されている。このことから検出感度を改善するために、同じアルファウイルス属の異なるウイルス種間でも相同性の高い UL31 領域にプライマーとプローブを設計し、プライマーの感度と特異性を検討した結果、良好な結果であることが明らかとなった。現在、Taqman PCR での検討を始めているところであるが、gG 遺伝子の PCR 系と併用することで変異の大きい BV 株についても対応が可能であると期待される。

抗体検査、遺伝子検査を組み合わせることで、BV のモニターが可能となり、定期的なモニタリングが BV 感染症に対するリスク管理を行う上で重要な意義を持つと思われた。今後、BV の再活性化について研究をすすめる、繁殖期や性周期 (メス個体) との関連性、ウイルスの体内動態などについて基礎的データを得たいと考えている。

E. 結論

サルにおける BV 感染状況を調査することおよび遺伝子検査系を確立することは、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非常に有効である。特にヒトとの接触が危惧されるサル飼育・展示施設では、定期的なサルのモニタリングが推奨されると思われる。

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

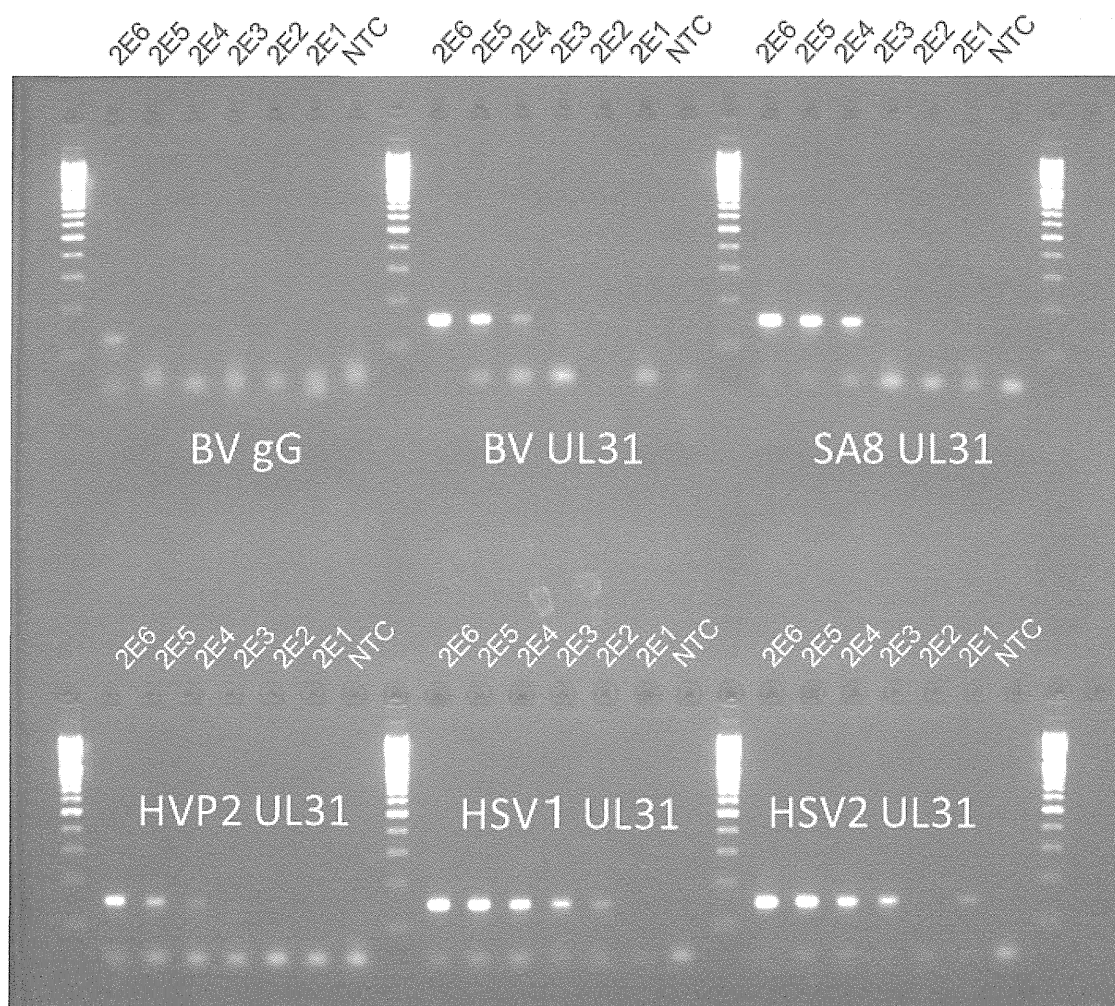
表1 Bウイルス抗体検査の結果

	♂A		♀B	♀C	♀D
採血日	BV	採血日	BV	BV	BV
20091217	—	20091217	⊕	+	⊕
20101217	+	20101217	+	+	⊕
20121025	—	20121025	NT	NT	NT
20130401	—	20130401	⊕	+	⊕
20130903	—	20130903	⊕	+	⊕
20131110	—	20131110	⊕	—	⊕
20131210	—	20131114	⊕	+	⊕
		20131117	⊕	—	⊕
		20131121	⊕	+	⊕
		20131124	⊕	+	⊕
		20131128	⊕	+	⊕
		20131201	⊕	+	⊕
		20131205	⊕	+	⊕
		20131208	⊕	+	⊕
		20131212	⊕	+	⊕
		20131215	⊕	+	⊕
		20131219	⊕	+	⊕
		20131222	⊕	⊕	⊕
		20131226	⊕	⊕	⊕
		20131229	⊕	⊕	⊕

表 2 使用したプライマーとプローブ

Name	Direction	Primer sequence	Target virus
UL31Sa	Sense	GTGTGGCAGAGCACGTTC	BV, HVP2
UL31Sb	Sense	GTGTGGCAGAGCACGTTTG	SA8, HSV-1, HSV-2
UL31AS	Anti-sense	AGCCTTTGATACTCTAGCATGAG	All
UL31Pa	Probe	CGTCCGYGTCCGTCGTCGTTCT	BV, SA8, HVP2
UL31Pb	Probe	CGCAACGCAGAGAAACCMRCGGACG	HSV-1, HSV-2

図1 PCRの結果



gG 領域以外の UL31 の 5 種類で使ったスタンダードは、BV, SA8, HVP2, HSV-1, -2 のプラスミドを混合した後に使った。

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

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)、野中成晃、関口 敏(宮崎大学農学部)、奥 祐三郎、党 志勝(鳥取大学農学部)、梅田 滋(コミュニティ研究所)、加地祥文(厚生労働省)、岡崎克則(倶知安町)、黄 鴻堅(麻布大学)、高橋 徹(北海道獣医師会)、高橋俊幸、浦口宏二、山野公明、孝口裕一、入江隆夫(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、北海道、札幌市

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。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立、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立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、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、疫学調査における糞便内抗原検出法と虫卵検出法についての有用性の検討を行ったので報告する。小清水町については、継続調査の結果と、キツネ剖検結果と比較検討を行った。また、ベイト散布活動に対する地域住民の意識調査を実施するため、ベイト散布参加/非参加の市町村で行う説明会や意見交換会等で調査内容に関する予備情報の収集および分析を行ったので、それについても言及する。人への感染リスクの軽減のため、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、実際に動物園で発生した、霊長類の感染死亡事例、および自然治癒が推定された症例について報告する。

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

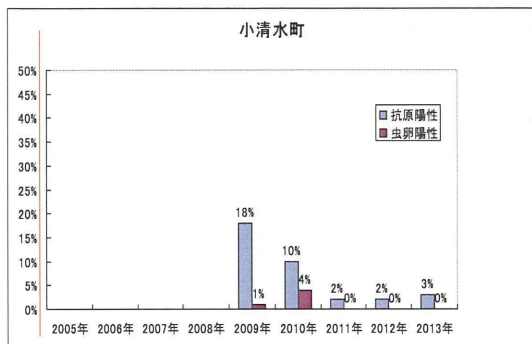
小清水町、羊蹄山山麓5町及び鹿追町の小規模農場に加えて、2013年度は留寿都村、真狩村においてプラジカンテル入りのベイト散布によるエキノコックス感染源対策を実施した。

また厚真町においてエキノコックス感染状況の予備調査を行った。

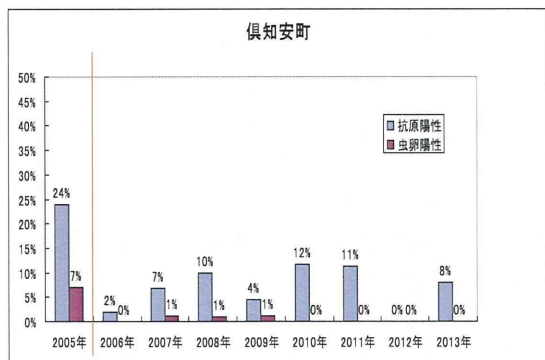
小清水町

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った。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が、2013年度は3件が抗原陽性だった。虫卵は出ていない。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。

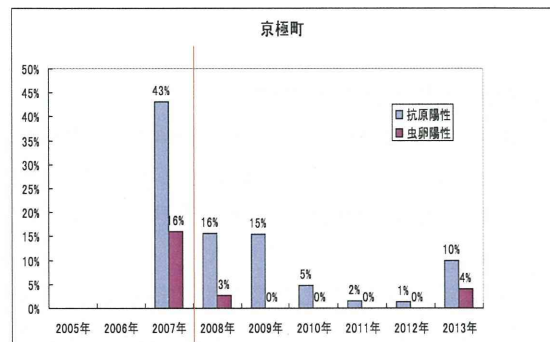
倶知安町

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が(32検体)、2013年度は5検体が抗原陽性だった。虫卵は出ていない(64検体)。

京極町

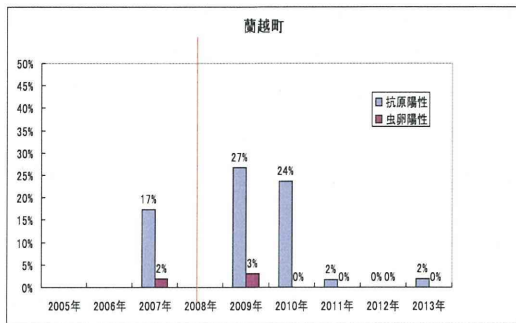
京極町では2007年にベイト散布前の調査



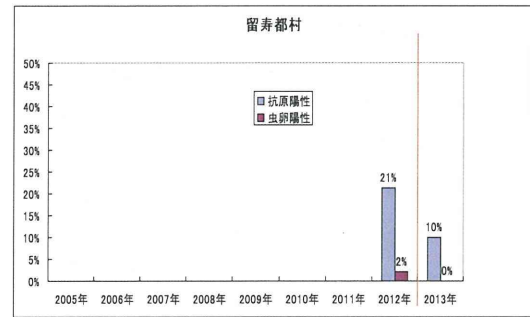
を行い、2008年から5-11月まで毎月、約1,200個のベイト散布をほぼ全町に実施しているが、2011年まで顕著にキツネの感染状況抑えられ、2012年度もさらに抑えられていたが、2013年度は虫卵抗原陽性が3検体、虫卵陰性抗原陽性が5検体の結果だった。この結果を受けて京極町とも相談し今後の戦術を考えている。

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が、2013年度は抗原陽性が2検体あった。



月にかけて毎月約 1000 個のベイトを散布し



喜茂別町およびニセコ町

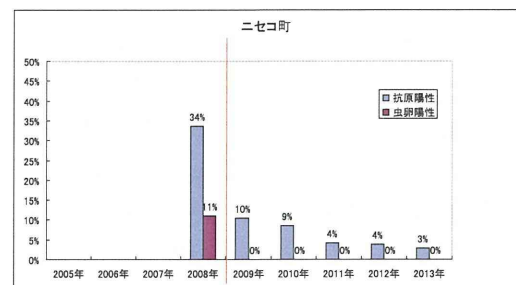
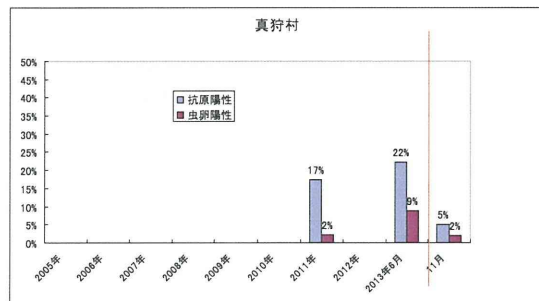
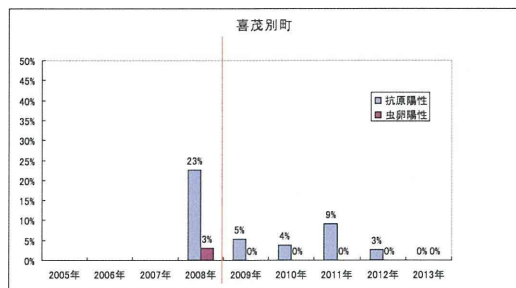
両町とも 2008 年にベイト散布前の調査を行い、2009 年から 5-11 月まで毎月、約 1,200 個もしくは 1,100 個のベイト散布をほぼ全町に実施している。

た。ベイト散布後は虫卵陽性はゼロ、抗原陽性は 6 検体 (62 検体中) に下がった。他地域と同じくベイト散布の効果が認められた。

2012 年の検査では喜茂別町では虫卵、抗原共に陰性であった。ニセコ町では感染率がさらに抑えられていた。

真狩村

真狩村では 2013 年 7 月にベイト散布前のエキノコックス感染状況の予備調査を行った。45 検体中虫卵抗原陽性は 4 検体、抗原陽性は 8 検体であった。その後 8 月から 11 月まで約



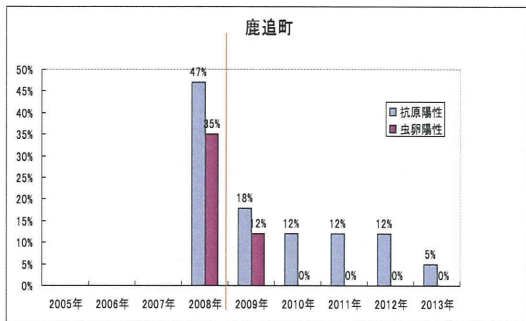
2000 個のベイト散布を計 4 回行った。11 月に感染状況の調査を行った結果、虫卵抗原陽性は 1、抗原陽性は 2 に下がった。

留寿都村

大草原の小さな家 (鹿追町)

2012 年度よりキツネのエキノコックス感染状況の予備調査を行い、2013 年 5 月から 10

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 2km²) に行った。抗原陽性率は徐々に減少し 2010 年より虫卵が検出されず、2013 年は抗原陽性率も 5% にまで下がった。



厚真町

厚真町では2013年12月にキノコックス感染状況の予備調査を行った。結果は35検体中虫卵抗原陽性3検体、抗原陽性5検体であった。

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250km²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。

2. 疫学調査における糞便内抗原検出法と虫卵検出法について

疫学調査には虫卵の陽性率より、抗原の陽性率が感染率の指標に適することが、以下のことから結論された。

I. 剖検結果(成虫の寄生率)との比較による証拠

1. 抗原検査は高い特異度 97%と感度 92%を示した。

2. 一方、虫卵の検出感度は明らかに低かった。

I I. 疫学的なデータからの示唆

1. 小清水における短期のベイト散布では

虫卵の陽性率はすぐに激減するが、すぐ再感染が起こると予想され、抗原陽性率は高い(20%)。長年のベイト散布により、顕著に抗原陽性率が減少する。この間虫卵陽性率はほぼ0のままであった。

2. 羊蹄山麓(4町)の調査において、7-11月の月別の推移を比較したところ、虫卵陽性率はバラバラで、顕著に増減するが、抗原の陽性率は一定の傾向を示した。

3. 小清水における継続調査の結果とキツネ剖検結果について

2012年に続いて5月から11月まで隔月ベイト散布を行い、8月に102個の糞便採取を行い、虫卵及び抗原検査を実施した。虫卵は全く検出されず、1個が抗原陽性、2個が抗原擬陽性となり、2012年と同様の結果であった。

町役場に行って、冬に実施されているキツネの剖検結果とそれらに供したキツネの捕獲場所のデータを提供してもらった。この結果と我々の糞便内抗原の結果を比較すると、下記のような結果となった。

西暦	夏の抗原陽性率%	ベイト散布	冬のキツネ剖検
1997	50	無し	6/10
1998	20-50	毎月	
1999	20	毎月	4/10
2000	20	2回	
2001	30	3回	
2002	10	毎月	0/10
2003	14	無し	4/10
2004	20	無し	1/5
2005	4	毎月	1/10
2006	0	毎月	1/10
2007	25	隔月	1/10
2008	6	毎月	3/10
2009	14	毎月	3/10
2010	8	毎月隔月	1/11?
2011	0	隔月	3/10
2012	1	隔月	
2013	1	隔月	

夏のキツネ糞便の抗原陽性率では顕著に減少したが、冬のキツネの剖検結果ではまだ高い陽性率を示す年があった。この差について考察した。

予想される原因

1 夏でも感染率が高かったが、糞便抗原で低く見積もられた可能性。

しかしながら、糞便抗原検出法の感度は低いので、この可能性は低い。

2 サンプルングしている場所が異なる可能性。

少なくとも中央部の地域ではサンプルング地域が重複する。

異なる個体群を調べている可能性（道路嗜好ギツネと道路回避ギツネ）

キツネ糞便検査は道路嗜好性のキツネを対象にしているが、剖検ギツネは罠による捕獲個体と射殺個体で、道路回避ギツネも含む可能性あり。しかし、剖検ギツネの捕獲場所はベイト散布が十分に行われている平らな畑作地帯である。（ただ、冬にキツネが移動してきたかも知れない。）

3 夏の感染率は減少しているが、冬は高くなっている可能性。

この可能性が最も高く、さらに2つの可能性が予想された。

3-1 地域内に生息するキツネが秋・冬に感染した可能性。

3-2 感染ギツネが侵入してきた可能性。

今後の解析法

- ・夏、秋、冬に糞便サンプルングを実施し、キツネ DNA 個体識別を試みる
- ・定着・侵入個体推定と定着・侵入個体感染率の比較
- ・文献的な考察 移動・定着の割合。雄は移動・雌は定着？ 30%は移動？
- ・移動・侵入キツネの駆虫は11月・12月の駆虫では足りない？
- ・陽性豚からの感染時期の推定

4. リスク分析について

エキノコックス症対策では、研究者、行政、地域住民に至るすべての関係者が情報を共有し、相互が理解し合ったうえで対策に取り組む必要がある。この過程がリスクコミュニケーションであり、リスク分析に必須の構成要素である。そこで我々は、ベイト散布活動に対する地域住民の意識調査を実施するため、ベイト散布参加/非参加の市町村で行う説明会や意見交換会等で調査内容に関する予備情報の収集および分析を行った。エキノコックスに対する危機意識は程度の差はあるものの、説明会に参加したほぼ全ての住民がエキノコックスの危険性と清浄化の意義について理解していた。これはマスコミなどの報道等でエキノコックスが度々取り上げられていることに加え、本研究班の取り組みや環境動物フォーラムそして各自治体のボランティアによる



写真1. 小清水町での住民説明会

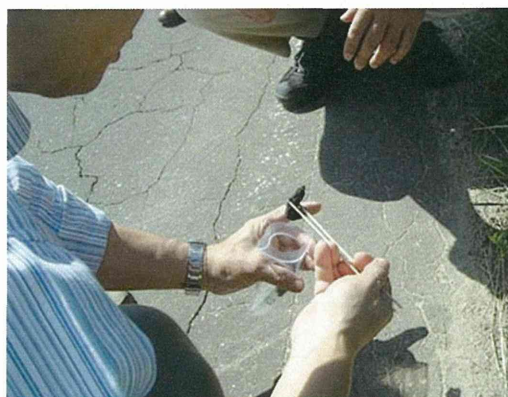


写真2. 小清水町でのベイト散布調査

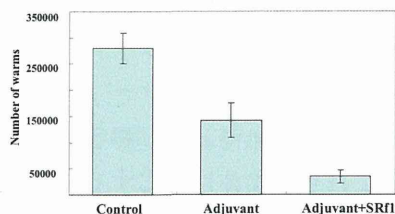
啓発活動の影響が考えられた。しかしながら、説明会の参加者の多くはエキノコックスの危険性に対する意識レベルが高い集団であることが予想され、標本調査としては大きな対象者バイアスが生じていると思われる。北海道全域あるいは各自治体における住民の意識調査を正確に把握する場合は、これらのバイアスの混入を極力避けるように研究デザインを設計する必要がある。またペイトの駆虫効果については一定の理解が得られた一方、散布方法や今後の活動計画に関してはいくつかの課題が明らかとなった。ペイト散布活動は自治体とボランティアの協力が不可欠であるが、限られた予算と人的資源のことを考慮すると、今後の散布活動を不安視する意見が目立つようになった。エキノコックスを完全にコントロールまたは清浄化するためには、長期間に渡り継続的に駆虫活動を実施していく必要がある。しかし、ボランティア参加者の多くは短期的に解決できるものと認識しているため、散布活動の疲労感と明確なロードマップが提示されていないことなどから、散布活動に対する理解とモチベーションが低下していることが考えられた。一方で散布活動に対する不安や不満がほとんどみられない地域もあった。これら地域間における意識の違いとその要因を明らかにすることは、駆虫活動を北海道全域で進めていく上で非常に重要である。今後は散布活動に対する危機意識や理解度について、エキノコックスの有病率や散布活動による駆虫効果、説明会によるコミュニケーション等の関連性をこれまで蓄積されたデータと合わせて解析する予定である。さらに、駆虫活動の取り組みを円滑に行うためには、意識調査を通してボランティア参加者が必要としている情報を明らかにし、情報共有や情報発信を図ることが重要である。また、現行の散布方法についてもボランティア参加者から意見を取り入れ、より経済的かつ効果的な方法を確立する必要がある。これらの課題を解決することで、継続的で実行可能なエキノコックス対策が可能となる。

5. 多包条虫感染イヌの血清および腸管粘液を利用した終宿主粘膜ワクチン抗原候補の探索

エキノコックス終宿主ワクチンの開発は将来的に飼いイヌからヒトへ、あるいは終宿主動物の感染率を長期的に下げる有力な手段になり得る可能性がある。ワクチンとして有力な候補を見出すため、エキノコックスに感染させたイヌから、血清および腸管拭い液を採取した。これらの検体に反応する抗原を二次元ウェスタンブロット (2D-WB) 法によりスクリーニングした。特に強く反応した成分を、幼虫の細胞破碎液からゲルろ過カラムによって精製した。この抗原の性質は、免疫染色および糖鎖染色によって調べた。さらにこの抗原を粘膜アジュバントと共に 4 回経鼻および 3 回経口免疫を行い、実験感染後、腸管内に寄生する成虫の数を測定することで、感染防御効果を調べた。エキノコックス感染イヌから採取した腸管拭い液を用いて 2D-WB を行った結果、タンパクスポットには全く反応を示さず、膜の上端にスミアーバンドとして分離される巨大糖タンパク質成分に強い反応を示した。この成分は感染イヌ血清が強く反応する成分と同一であると考えられ、本成分が感染イヌの免疫に強く認識されていることが明らかになった。この抗原に対する抗血清を用いて幼虫シストおよび成虫の免疫染色を行うと、幼虫および成虫のどちらにおいても虫体表面に局在していることが明らかになった。この抗原を用いて免疫したイヌに 50 万原頭節を含むシストを投与し、実験感染を行うと、何も投与しないグループに比べて 86.7%の寄生成虫数の減少が認められた。一方、アジュバントのみを投与したグループに 49.1%の寄生数の減少が確認され、アジュバントによる感作がイヌのエキノコックス感染に対する防御機構に何らかの関係を持つことが示唆された (下図参照)。今後、どのようなメカニズム

によってイヌの感染防御効果が誘導されているのか検討する必要がある。

免疫による感染防御効果の誘導

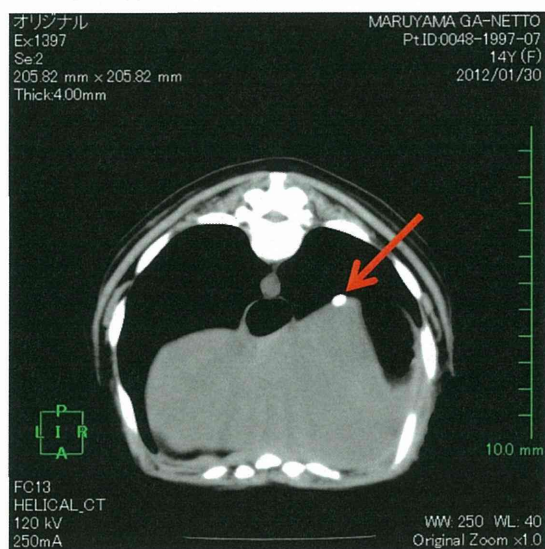


Control: 298,675; 349,785; 169,785; 289,000; 291,000
 Adjuvant: 201,450; 215,850; 175,800; 41,800; 73,800; 145,125
 Vaccine: 210; 7,700; 37,675; 20,670; 64,550; 77,000

6. 動物園で飼育されているサルに発生したエキノコックス症

2011年8月、円山動物園から繁殖のために貸し出されていたダイアナモンキー（メス、当時6歳）が浜松市動物園で死亡した。解剖の結果、肝臓等に寄生虫感染を疑う病変が見つかった。病理組織標本を観察したところ、層状構造を有するクチクラで構成された不形成のシストが多数確認され、内部には鉤を有する原頭節も認められたことから、形態学的にエキノコックス幼虫の感染病巣であると同定された。また、病巣組織からDNAを抽出し、ミトコンドリア 12S rRNA 遺伝子の PCR 増幅及び制限酵素による切断を行ったところ、多包条虫特有の増幅と切断パターンを示した。さらに、多包条虫特異的であることが知られている U1snRNA 遺伝子の増幅も認められたことから、摘出病変は多包条虫感染によるものと断定された。このダイアナモンキーは輸入個体ではなく、円山動物園で出生した個体なので、国内感染は疑う余地がない。また、死亡した浜松市動物園がある静岡県はエキノコックス症流行地域ではないため、滞在期間（約3か月）・病巣の進行具合からみて、円山動物園での飼育時に感染したと考えられた。この事例を機に、円山動物園内にはエキノコックス感染リスクがあった（あるいは今もある）

という前提でフィールド調査と他のサルたちの血清診断を順次実施した。フィールド調査からは、施設を取り囲むフェンスはキツネが侵入しうる状態であったことが判明した。また、冬期間の雪面に多数の足跡を確認するとともに仕掛けた自動撮影装置によってキツネの姿を実際に捉えることができた。一方、のべ45頭のサル各種に実施した血清検査からは1頭のクロザルの異常を検出したが、典型的な陽性ではなく、ヒト患者の術後に抗体応答が弱まっていく過程に似た反応であった。CT画像には小さな石灰化病変が認められたのみであったことから（下図参照）、このクロザルは感染が成立したものの、自然治癒したものと推測された。



研究発表

論文発表.

1) Hirokazu Kouguchi , Jun Matsumoto , Ryo Nakao , Kimiaki Yamano , Yuzaburo Oku, Kinpei Yagi. Characterization of a Surface Glycoprotein from *Echinococcus*

multilocularis and Its Mucosal Vaccine Potential in Dogs: PLoS One

8(7):e69821. (2013)

2) Kimiaki Yamano, Hirokazu Kouguchi, Kohji Uraguchi, Takeshi Mukai, Chikako Shibata, Hideaki Yamamoto, Noboru Takaesu, Masaki Ito, Yoshinori Makino, Mitsuyoshi Takiguchi Kinpei Yagi. First detection of *Echinococcus multilocularis* infection in two species of nonhuman primates raised in a zoo: a fatal case in *Cercopithecus diana* and a case of spontaneous recovery in *Macaca nigra* (投稿中)

3) Wei LI, Zhihong GUO, Hong DUO, Yong FU, Mao PENG, Xiuying SHEN, Hideharu Tsukada, Takao IRIE, Tetsuo NASU, Yoichiro HORII, Nariaki NONAKA. Survey on Helminths in the Small Intestine of Wild Foxes in Qinghai, China: J. Vet. Med. Sci. 75(10), 1329-1333 (2013)

4) Zhihong GUO, Wei LI, Mao PENG, Hong DUO, Xiuying SHEN, Yong FU, Takao IRIE, Tiantian GAN, Yumi KIRINO, Tetsuo NASU, Yoichiro HORII, Nariaki NONAKA. Epidemiological Study and Control Trial of Taeniid Cestode Infection in Farm Dogs in Qinghai Province, China: J. Vet. Med. Sci. 76(3), 395-400 (2014)

口頭発表

1) 奥 祐三郎, 水上 智秋, 土井 純子, 松本 淳, 孝口 裕一, 八木 欣平. 多包虫感染マウス(感受性 DBA/2 と抵抗性 C57BL/6)の肝臓病変部の宿主遺伝子発現: 第 82 回日本寄生虫学会 東京, 2013 年 3 月 30 日

2) Hirokazu Kouguchi , Jun Matsumoto , Ryo

Nakao , Kimiaki Yamano , Yuzaburo Oku, Takao Irie, Kinpei Yagi. Characterization of a Surface Glycoprotein from *Echinococcus multilocularis* and Its Mucosal Vaccine Potential in Dogs 第 86

日本生化学会大会、横浜市、2013 年 9 月

3) 浦口宏二. 糞のカウントによるキツネの密度推定のために(予備調査) 第 29 回日本霊長類学会・日本哺乳類学会 2013 年度合同大会、岡山市、2013 年 9 月

4) 孝口裕一、松本淳、中尾亮、山野公明、入江隆夫、奥祐三郎、八木欣平. 多包条虫感染イヌの血清および腸管粘液を利用した終宿主粘膜ワクチン抗原候補の探索: 第 59 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 北日本支部合同大会、江別市、2013 年 10 月 5 日

5) 山野公明、孝口裕一、向井猛、柴田千賀子、山本秀明、高江洲 昇、伊藤真輝、牧野良則、滝口満喜、八木欣平. 動物園で飼育されているサルに発生したエキノコックス症: 第 59 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 北日本支部合同大会、江別市、2013 年 10 月 5 日 Oct. 29-30, 2012

6) 神谷正男. キツネも一緒にキレイな環境: エキノコックス汚染環境の修復: 土地改良事業団胆振支部役員研修会、2013 年 2 月 18 日 洞爺

7) 神谷正男. エキノコックス 基礎知識と対策: 汚染環境の修復へ向けて: 札幌市公園緑化協会研修会、2013 年 3 月 11 日 札幌市

8) 奥祐三郎. エキノコックス症: 小清水町の感染源対策の成果: 小清水町 生涯学習推進支援事業報告会、2013 年 8 月 3 日 小清水町

9) 小林文夫. エキノコックス症: 羊蹄山麓の感染源対策の成果: 小清水町 生涯学習推進支援事業報告会、2013 年 8 月 3 日 小清水町

「野生動物におけるインフルエンザウイルス汚染の調査」

「重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分離と同定」

「フィリピン蝙蝠からの新規レオウイルスの分離」

山口大学 前田 健

野生動物におけるインフルエンザウイルス汚染の調査

分担研究者 前田 健（山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室）
研究協力者 堀本 泰介（東京大学大学院農学生命科学研究科）
谷口 怜（東京大学大学院農学生命科学研究科）
鈴木 和男（和歌山県田辺市ふるさと自然公園センター）
下田 宙（山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室）
米満 研三（山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室）

研究要旨

イノシシを中心とした野生動物およびイヌにおける A 型インフルエンザウイルスの疫学調査を実施した。その結果、1) 中国、関東、九州地方のイノシシにそれぞれ 2.1% (192 頭中 4 頭)、7.4% (153 頭中 9 頭)、0% (40 頭中 0 頭) の A 型インフルエンザウイルスの感染歴があった。関東のイノシシは豚の H1N1、中国地方のイノシシはヒトの H1N1pdm に近縁はインフルエンザウイルスに感染していることが判明した。2) イノシシの鼻腔ぬぐい液からの抗原検出は 106 頭すべて陰性であった。3) フィリピンのオオコウモリ 278 頭中 15 頭 (5.4%)、中国地方のユビナガコウモリ 135 頭中 0 頭 (0%) に A 型インフルエンザウイルスの感染歴があった。フィリピンのオオコウモリは 2009H1N1pdm や H5N1 ではないウイルスに感染している可能性が示された。4) インフルエンザウイルス抗原検出用キットを用いてフィリピンのオオコウモリからのインフルエンザウイルス抗原の検出を試みた結果、7 頭に疑わしい個体が存在した。しかし、インフルエンザの分離や遺伝子検出はすべて陰性であった。5) 2011 年にベトナムの飼育犬の 92 頭から回収した血清中 8 頭 (8.7%) から A 型インフルエンザウイルスの感染歴が確認された。6) インフルエンザウイルス陽性フィリピンのコウモリ 1 個体の口腔スワブからレオウイルスと予測されるウイルスが分離された。

A. 研究目的

本研究は野生動物におけるインフルエンザウイルス感染状況を調査することにより高病原性鳥インフルエンザの発生のリスクを評価することを目的とする。本年度は、国内のイノシシ、ユビナガコウモリ、国外のイヌ、オオコウモリにおける A 型インフルエンザウイルスの感染状況を調査した。

B. 研究方法

1) 被検血清

2009 年から 2011 年の狩猟期および 2012-13 年は有害鳥獣として中国地方で捕獲された 192 頭のイノシシから血清を回収した。

2012 年有害鳥獣として九州地方と関東地方で捕獲された 40 頭あるいは 153 頭のイノシシから血清を回収した。

2008-2013 年にかけてルソン島とミンダナオ島でフィリピン大学ロスバニオス校獣医学部マサンガイ教授の協力を得て捕獲したコウモリ 278 頭から血清を回収した。

2012-2013 年にかけて近畿地方で捕獲された 135 頭のユビナガコウモリから血清を回収した。

2) 高病原性インフルエンザウイルスの抗体価測定

各種血清型の A 型インフルエンザウイルスを用いてマイクロプレート法で中和抗体価を測定した。

3) ブロッキング ELISA による A 型インフルエンザに対する抗体検査

IDEXX 社の Influenza A Multi Species Kit を輸入許可を得て輸入した。キットに書かれている使用方法通りに検査を実施し、S/N 比 0.6 未満を陽性とした。

4) ウイルス抗原検出

2012-2013 年に捕獲された野生のイノシシ 106 頭の鼻腔ぬぐい液を現場で採材し、タウンズ社のイムノエース Flu を用いて検査した。

5) コウモリからインフルエンザウイルスの検出の試み

インフルエンザウイルス抗原検出用キットで陽性となった 7 頭のコウモリの口腔スワブと直腸ス

ワブからウイルス分離（発育鶏卵接種法、培養細胞接種法）および遺伝子検出（PCR）を試みた。

（倫理面への配慮）

イノシシに関しては、有害鳥獣としてあるいは狩猟期に捕獲されたものを調べた。コウモリはフィリピン大学ロスバニオ校との共同研究により捕獲したものを調査した。ベトナムのサンプルに関しては輸入許可を得て、血清を輸入した。

C. 研究結果

1) イノシシにおける A 型インフルエンザ感染状況

関東、中国、九州地方で捕獲されたイノシシそれぞれ 153 頭、192 頭、40 頭の A 型インフルエンザウイルスに対する抗体保有状況を調べた。その結果、関東地方では 9 頭 (5.9%)、中国地方では 4 頭 (2.1%) の陽性反応が認められた (表 1)。陽性が認められた個体の詳細は表 2 に示している。感染ウイルスを推定するために、可能性の高い 6 種類のウイルス（季節性 H1N1, 新型インフルエンザ H1N1pdm, 豚 H1N1, 豚 H1N2, 豚 H3N2, 鳥 H5N1）を用いた中和試験を実施した。その結果、中国地方および関東地方の豚すべてが H1 亜型に対して高い中和抗体価を有していた (表 3)。そのうち、関東地方のイノシシ 4 頭すべてが豚 H1N1 ウイルスに、中国地方のイノシシ 2 頭すべてがヒトの新型インフルエンザに最も高い中和活性を有していた。中国地方においては 2012-13 年にかけて捕獲された 106 頭の鼻腔および口腔ぬぐい液からウイルス抗原の検出を試みたが、全頭陰性となった (表 4)。

2) コウモリにおける A 型インフルエンザ感染状況

フィリピンのオオコウモリにおける A 型インフルエンザウイルスの感染状況を調査した結果、2008-2013 年に捕獲されたオオコウモリ 278 頭中の 15 頭 (5.4%) に A 型インフルエンザに対する抗体が認められた (表 5)。陽性個体の詳細は表 6 に示しているが、その多くがジョフロアルーセットオオコウモリであった。中和試験による、感染ウイルスの推定を試みたが、新型インフルエンザ H1N1 や鳥インフルエンザ H5N1 などではなかった (表 7)。本年度は、更にウイルスの特定を試みるために、口腔スワブをとり、インフルエンザウイルス抗原の検出を試みた。そのうち、7 頭から陽性反応が認められた (図 1)。この 7 頭の発育鶏卵、培養細胞を用いたウイルス分離、既存のコンセンサスプライマーを用いた遺伝子検出を試みたが、現在のところ、インフルエンザ陽性は認められていない。

3) イヌにおける A 型インフルエンザ感染状況

近年、アメリカを中心に馬のインフルエンザがイヌに馴化した H3N8、東南アジアを中心に鳥のインフルエンザがイヌに馴化した H3N2 が北米および東南アジアでそれぞれ蔓延している。ヒトと生活を共にするイヌはヒトのインフルエンザウイルスに暴露されており、イヌのインフルエンザとヒトのインフルエンザが出会う、疫学上重要な宿主である。我々は、イヌインフルエンザウイルス、高病原性鳥インフルエンザウイルス、ヒトインフルエンザウイルスなどに感染するリスクの高い、ベトナムのイヌに注目して、インフルエンザウイルスの感染状況を調べた。その結果、92 頭中 8 頭 (8.7%) がインフルエンザウイルスに感染していた。

4) フィリピンのルーセットコウモリの口腔から新規ウイルスの分離

インフルエンザウイルスの分離を試みた結果、#24 の個体から MDCK 細胞に巨細胞を形成した (図 2)。インフルエンザでないことを確認した後、次世代シーケンサーによる解析を行った。その結果は、コウモリ由来の人獣共通感染症であるオルトレオウイルスに非常に近いウイルスであった。詳細は、別の項目として報告する。

D. 考察

1) 関東地方のイノシシは豚 H1N1 に近いウイルスに感染していた。本ウイルスは豚で流行している。イノシシから豚、あるいは豚からイノシシへ感染が広がった可能性もある。感染経路の特定が必要である。

2) 中国地方のイノシシはヒトの新型 H1N1pdm に近いウイルスに感染していた。野生のイノシシであるため人との接触はあまりないと考えられるが、何らかの形でヒトと接触していたのか、あるいは国内のイノシシが既に新型の H1N1pdm に近いウイルスを保持していた可能性がある。ウイルスの分離が必要である。

3) フィリピンのある地域に生息するルーセットオオコウモリは非常に高いインフルエンザ感染歴を有していた。最近、コウモリから幾つかの新型インフルエンザウイルスが報告されており、そのような新しいインフルエンザに感染している可能性もある。ウイルスの特定が必要である。

4) ベトナムのイヌに高いインフルエンザウイルス感染歴が見出された。イヌはヒトのインフルエンザウイルスが感染していることを見出している。