

12. 獣医科学部

部長 山田 章雄

概要

平成19年度は感染症法の改正に伴い病原体の規制が始まった年である。獣医科学部が取り扱っている病原体のうち、炭疽菌、野兔病菌、ペスト菌、SARS コロナウイルスは二種病原体、狂犬病ウイルス、ブルセラ菌が三種病原体とされ、厳しい法規制の元に置かれることとなった。これまでもBSL3施設でパイオセーフティ管理室の監視下で厳密な対応がされてきており、大きな混乱はなかったが、SARS コロナウイルスについては村山での感染実験を余儀なくされており、感染動物の臓器の搬送に大きな制約が生じた。また狂犬病ウイルスのある種の弱毒株ではBSLレベルが下げられたものの、三種であることに変わりないことから、管理区域の設定で若干の混乱があった。しかし、これらの状況にも拘わらず、研究は順調に進んでいると思われる。3年間科学振興調整費の補助により行ってきた「野鳥由来ウイルスの生態解明とゲノム解析」が今年度終了したが、野生動物を指標とする動物由来感染症の監視体制の国内外における構築は、新興感染症が殆ど動物に由来することを考えれば、今後も規模を拡大し、継続する努力が国に求められていると考えられる。このほかにも厚生科学研究費補助金の援助により、動物由来感染症の診断技術の開発、サーベイランス、モニタリング等に係る研究が行われた。国内外の研究機関との連携も進められ、岐阜大学連合獣医学研究科、東京大学農学生命科学研究科の連携大学院の教官を兼務し、大学院生の指導に当たるほか、ベトナム国立衛生疫学研究所と国立感染症研究所が感染症にかかる研究協力に関する覚え書きを交わしたことを受け、同研究所と動物由来感染症での協力体制を構築する方針を固めた。その他厚生労働省、農林水産省、環境省あるいは地方自治体の審議会等の委員や学会理事等を務めることにより、社会貢献も図っている。人事面では長期に亘り勤務された神山恒夫第1室長が平成19年3月31日をもって定年退職された。後任には今岡浩一主任研究官が昇任し、同4月1日付けで就任した。

業績

調査・研究

I. 動物由来感染症に関する研究

1. *Brucella canis* 特異的抗体検出法の開発に関する研究
不活化 *B. canis* 菌体を抗原とした試験管内凝集反応 (TAT) が診断に用いられているが、これに代わる抗体検出法として、マイクロプレート凝集反応 (MAT) を開発し、その有用性を示した。さらに、不活化菌体または熱水抽出物 (HSE) を抗原とした ELISA および、市販の研究用迅速判定 KIT (Anigen Rapid C *Brucella* Ab Test Kit) を入手し検討した。その結果、MAT と TAT では、結果に良好な相関が見られ、感度は MAT の方が良かった。Test Kit は MAT と同等の感度と特異性を示した。ELISA は相関がやや劣っていたが、スクリーニングには使用可能であった。[木村昌伸、鈴木道雄、今岡浩一]

2. 国内野生イノシシ・シカにおける抗 *Brucella* 抗体の保有状況に関する研究

ブルセラ症 (brucellosis) はブルセラ属菌 (Genus *Brucella*) による人獣共通感染症である。国内では感染家畜の摘発・淘汰により、家畜については清浄化していると考えられる。今回、野生動物での保菌状況を調べるため、国内の野生イノシシおよび日本シカの血液サンプルを入手し、家畜ブルセラ菌に対する抗体の保有状況を MAT により検討した。検討したいずれの動物種・検体ともに抗体は検出されなかった。[今岡浩一、木村昌伸、鈴木道雄、山田章雄]

3. カブノサイトファーガ属菌およびパストレラ属菌に関する疫学的調査・研究

Capnocytophaga spp. を国内の犬が高率に保菌していることを報告してきた。今回、ネコの保有状況について調査した。約 90% が PCR 陽性であり、国内のネコも同属菌を高率に保有していることを明らかにした。また、同様にネコ咬傷・搔傷による感染の原因となる *Pasteurella multocida* の遺伝子検査も実施した結果、これも約 91% が陽性であった。

さらに、イヌ咬傷に伴って敗血症、多臓器不全を呈し

た患者から分離されたグラム陰性桿菌の検査を行い、同分離株が *C. canimorsus* であることを同定するとともに、咬んだ飼育犬の口腔内スワブでも同菌を確認した。*C. canimorsus* による敗血症例であることを明らかにした。[鈴木道雄、木村昌伸、山田章雄、今岡浩一]

4. *Streptobacillus moniliformis* 検出法の確立と国内野生ラットの保菌状況の検討およびクマネズミ咬傷により鼠咬症が疑われた症例からの同定に関する研究

鼠咬症原因菌の1つである *S. moniliformis* 検出のための特異的 PCR 法を確立し、国内野生ラットの調査を行ったところ、ドブネズミで 92%、クマネズミで 58%が口腔内に保菌していた。また、得られた野生分離株と ATCC 株は、生化学性状は全ての株間において良く一致していたが、16S-rRNA 遺伝子配列は、ドブネズミ株は ATCC 株とよく一致していたものの、クマネズミ株では変異が認められた。

クマネズミに咬まれた後、発熱、発疹等の症状を呈し、鼠咬症が疑われる患者を検査する機会を得た。血液培養および患部からの菌の分離は出来なかったが、我々の開発した PCR 法により咬傷部痂皮から *S. moniliformis* 特異的遺伝子を検出し、同定した。また、患者サンプルおよび患者宅捕獲クマネズミの口腔スワブから増幅された *S. moniliformis* 特異的 16S-rRNA 遺伝子配列も一致していた。クマネズミ保有株による鼠咬症が確認された初めての報告である。[木村昌伸、鈴木道雄、今岡浩一（感染研・獣医科学部）、中込大樹、出口順啓、矢ヶ崎晶子、原田和俊、柴垣直孝、島田眞路（山梨大学医学部付属病院皮膚科）、谷川力（イカリ消毒株式会社）]

5. 鳥類におけるウエストナイルウイルス検出および抗 WNV 抗体検出法の確立に関する研究

(1) マイクロアレイによる遺伝子検出法の開発：マイクロアレイは、1 検体から同時に多数の標的遺伝子の検出ができる利点がある。WNV をはじめとする各種のフラビウイルス属ウイルスならびに鳥類のウイルス性疾患の原因ウイルス遺伝子をプローブとしたカスタムマイクロアレイを作製し、反応特異性および検出感度を検討した。その結果、WNV および JEV 遺伝子の特異的な検出が可能であったが、一部の WNV 株では特異的反応が認められなかった。今後、WNV の各ウイルス株に対応するよう検出特異性および検出感度の向上を図る必要がある。[鈴木道雄、宇田晶彦、木村昌伸、今岡浩一、山田章雄]

(2) 鳥類における WNV および JEV に対する抗体検出

法の開発と抗体保有状況調査：確立した Blocking-ELISA と PRNT を用いて、鳥類における WNV および JEV に対する抗体保有状況を調査した結果、PRNT により陽性を示す物が、ろ紙による採取法を用いた一部のサンプルからのみ認められた。しかし、いずれも Blocking-ELISA や Western-Blotting により特異性の検証を行った結果、サンプルの非特異的反応の可能性が否定できなかった。さらに採取法や検出の特異性の検証が必要であると思われる。血清をサンプルとして検討した、渡り鳥(ミヤマガラス、シギ・チドリ、ヨシゴイ、カモ類)および、留鳥(ハシボソガラス、ハト、スズメ、ナキアヒル、イソシギ、ニワトリ)からは、どちらの抗原に対しても特異的抗体は検出されなかった。[今岡浩一、鈴木道雄、木村昌伸、山田章雄]

6. 動物由来感染症の検査・診断に関する調査研究

本調査研究では、動物由来感染症の検査・診断に対する要望や体制の現状把握を行い、具体的に対応していくために必要な問題点を提起し、診断体制の確立や情報提供といった動物由来感染症診断システムの構築に資することを目的として、実際に試験検査を行っている地方衛生研究所における検査対応に関してアンケート調査を行った。毎年患者が届け出られている疾患や患者発生が強く危惧される一部の疾患に関しては、多くの機関で検査対応可能もしくは、依頼先が確立されているようであった。しかしながら、その他の疾患に関しては、対応不可のものが多く、ほとんどすべてが依頼先として感染研を指定していた。検査方法の習得などに関する技術研修等の開催に関する要望があった。[今岡浩一]

7. 狂犬病に関する研究

(1) 狂犬病の診断技術向上のための解剖手技習得モデル・教材の開発に関する研究

国内に侵入した狂犬病に感染した動物を早期に察知するための診断技術向上には有効な実習用モデル・教育訓練教材等が必要不可欠であり、本研究では解剖手技習得モデル・教材の開発を自治体関係機関の現場担当者や解剖学の専門家等と行った。本年度は、医療用 MRI/CT 機器を利用して検査対象となる犬の頭部スキャン画像を取り込んで 3 次元データファイルを作成して、モデル作成の鋳型となる頭部 3D 画像を作成した。また、自治体等の狂犬病対策関係者の啓発用教材として昭和 25 年に記録された男児の狂犬病患者学術映像を DVD 化して各都道府県、政令市、特別区等の関係部局に配布を行った。[井上 智、佐藤 克(狂犬病臨床研究会)、千葉 操(ア

ペックスバイオサイエンス研究所)、織間博光(日本獣医生命科学大学)、長谷川大輔(日本獣医生命科学大学)、沼田一三(兵庫県動物愛護センター)、頓名昌宏(兵庫県健康生活部生活衛生課)、西條和芳(徳島県保健福祉部生活衛生課)、矢野さやか(徳島県徳島保健所)、高橋朱実(岩手県環境保健研究センター)、堀元栄詞(富山県衛生研究所ウイルス部)、小川知子(千葉県衛生研究所)、明石 誠(千葉県動物愛護センター)、松本尚美(鳥取県衛生環境研究所)、木山真大(鳥取県生活環境部公園自然課)、大下幸子(鳥取県西部総合事務所生活環境局)、田原研司(鳥根県保健環境科学研究所)、川瀬 遵(鳥根県健康福祉部)、安藤秀二(国立感染症研究所ウイルス一部)、野口 章、加来義浩、奥谷晶子、山田章雄]

(2) 自治体における狂犬病の発生を想定したシミュレーションと病原体診断システムの検証に関する調査研究
徳島保健所動物由来感染症対策協議会(32機関)が平成19年12月13-14日に開催した狂犬病発生時の対応マニュアルに基づくシミュレーション(机上訓練及び一部実地訓練を含む)に研究班として自治体等研究協力者とともに参加して現行の狂犬病対応マニュアルおよび検査システム等の課題について分析をおこなった。発生時対応マニュアルに記載されている自治体等関係部局間(生活衛生課、健康増進課、畜産課、報道等の参加)での連携、市民・報道への情報提供、病原体診断システムの課題が現場担当者レベルで明らかにできた。[徳島県保健所動物由来感染症対策協議会、西條和芳(徳島県保健福祉部生活衛生課)、頓名昌宏(兵庫県健康生活部生活衛生課)、矢野さやか(徳島県徳島保健所)、高橋朱実(岩手県環境保健研究センター)、堀元栄詞(富山県衛生研究所ウイルス部)、小川知子(千葉県衛生研究所)、明石 誠(千葉県動物愛護センター)、松本尚美(鳥取県衛生環境研究所)、木山真大(鳥取県生活環境部公園自然課)、大下幸子(鳥取県西部総合事務所生活環境局)、田原研司(鳥根県保健環境科学研究所)、川瀬 遵(鳥根県健康福祉部)、梅田浩史(厚生労働省結核感染症課)、野口 章、山田章雄、井上 智]

(3) 狂犬病の臨床診断に必要な教材開発に関する研究
希少感染症である狂犬病の課題は、医師・獣医師が経験のない狂犬病症例をいかに鑑別診断できるかである。平成18年度に国立感染症研究所で病原体診断を行った2例の輸入狂犬病症例は、担当医による臨床鑑別での狂犬病疑いが症例の摘発につながった。本研究では、獣医師

が狂犬病の疑われるイヌの臨床判断を適切におこなうために、狂犬病を発症したイヌの症例映像を解析して臨床鑑別を科学的に行えるようにすることが目的である。現在、タイの赤十字研究所狂犬病診断部(QSMI)の協力を得て狂犬病を発症したイヌの症例映像の記録と臨床家による臨床症状の分析をおこなっている。[佐藤 克(狂犬病臨床研究会)、Veera Tepsumethanon(QSMI)、Visith Sitprijia(QSMI)、井上 智]

(4) 狂犬病の診断技術向上に必要な検査系の開発に関する研究

狂犬病は希少感染症であり確立した診断系による検査が頻繁に行われるわけではない。したがって、狂犬病の検査系を普及するためには頻回にしか行われぬ検査の技術伝達や成績判定を安全に正しくかつ容易にできることが望まれる。そこで、今回は狂犬病の抗原診断に使用される抗体の力価・感度および反応性を簡単に検証できる方法として、組換え技術により抗原診断(DFA法、直接蛍光抗体法)の標的である狂犬病ウイルスN蛋白を培養細胞(BHK細胞)に発現させて、生ウイルスを使用しないで安全かつ安価に再生産できる検査抗体の反応性を検証できる抗原スライドを作成した。[加来義浩、野口章、奥谷晶子、井上 智]

(5) アジアにおける狂犬病等の動物由来感染症に関する疫学およびサーベイランスに関わる調査研究の推進

現在、フィリピンでは狂犬病の診断や疫学調査に必要な特異抗体の供給が十分でなく、発生した狂犬病の多くは臨床診断のみが行われている。このため、疫学等の科学的知見に基づいた効果的な狂犬病対策が行えない状況にある。本研究では、フィリピン国内における正確な診断システムの確立と疫学サーベイランスを可能にするためにフィリピンで流行している狂犬病ウイルスを感染させたマウスを利用して3種類のモノクローナル抗体を確立した。それぞれのモノクローナル抗体はELISAとRFFIT法(中和抗体アッセイ法)における抗原検出用抗体として優れた反応性が示された。[Daraia L. Manalo(RITM)、Blanca R. Jarilla(RITM)、Plebiana Medina(RITM)、Catalino Demetria(RITM)、Luz P. Acosta(RITM)、野口 章、井上 智]

(6) 中国の狂犬病の基盤的研究の確立と狂犬病流行の疫学的解析に関する研究

中国では広大な領土と多様な民族構成、都市部と辺境部の環境経済状況の違い等が原因となり、全国的に一律

な方策を行うことができていない。中国 CDC が構築を進めている各省での情報収集の均一化、基礎的診断技術の確立、狂犬病データの効率的集約化システムによる全土の狂犬病制御法について分析をおこなうために中国における狂犬病流行地における現状視察と我が国における病原体診断および感染源動物のモニタリングシステムの情報共有を行った。アジア諸国のなかでも政治経済的に関係の深い中国の狂犬病の撲滅は、今後、我が国への狂犬病の侵入防御の重要な課題と考えられた。[井上 智、森本金次朗（ウイルス一部）、Qing Tang（中国 CDC）]

（ 7 ）狂犬病ウイルス（街上毒株）の培養細胞とマウスに対する病原性

平成 18 年度に我が国で発生した輸入狂犬病 2 症例の感染材料を用いて培養細胞と乳のみマウスに対する感染試験を行った。両症例とも、培養細胞では神経系からウイルスの分離ができたが、唾液からの分離ができなかった。マウスの脳内接種試験では神経系および唾液腺乳剤の接種後 4 日ないし 5 日に直接蛍光抗体法で脳組織のほぼ全面にウイルス抗原が認められた。街上毒株は固定毒（実験）株よりも発症までの経過が長く、さらに今回分離された街上毒株 2 株間で病態の進行速度に違いがみられた。現在、両街上毒株のマウスに対する病理発生について調べている。[野口 章、加来義浩、奥谷晶子、井上 智]

（ 8 ）狂犬病ウイルスのゲノム配列を用いた分子疫学

平成 18 年度に我が国で発生した輸入狂犬病京都分離株についてプライマー・ウォーキング法を用いて、5'末端側の 90 bp および 3'末端側の約 340 bp を除く 11,490 bp を決定したところ、ゲノム配列は固定毒 CVS 株と 84% の相同性を示した。現在、フィリピンで流行している野外株（街上毒）と実験株（固定毒）間で病原性にかかわるゲノムの比較解析を行い野外株の病原性を特徴づけている遺伝子領域の特定を行っている。[関塚剛史（ゲノム解析センター）、黒田 誠（ゲノム解析センター）、野口章、井上 智]

（ 9 ）狂犬病の免疫グロブリンに関する研究

ヒトが狂犬病の疑われるイヌ等から咬傷をうけた場合には速やかに「暴露後のワクチン接種」を 5 回（ときに 6 回）行って発症予防を行うが、WHO カテゴリー分類で第 III 類以上の咬傷被害等を受けた場合には初回のワクチン接種と同時に免疫グロブリン（RIG: rabies immunoglobulin）の接種が必要となる（過去に狂犬病の

ワクチンを接種していないヒトの場合に限る）。我が国では、RIG の生産は行われていないためその力価等については十分な知見が蓄積されていない。そこで、RIG の冷蔵保存（4℃）での力価推移を知る目的で Aventis Behring 社から RIG を輸入して有効期限から 2 年経過した RIG について中和抗体価（RFFIT 法）を測定したところ、製品表示の基準値と遜色のない価が維持されていた。[野口章、井上 智、倉根一郎（ウイルス一部）]

（ 10 ）DNA 免疫を利用した簡便で特異性の高い抗狂犬病免疫グロブリン産生モデル実験系の検討

狂犬病の発症予防で行われる暴露後ワクチン接種では、カテゴリー III の咬傷時に抗狂犬病免疫グロブリン（RIG）の同時接種が必要であるが、ヒト由来、ウマ由来 RIG 共に高価かつ製造が容易でないことが課題とされている。本研究では、DNA 免疫を利用した RIG の産生法についてウサギを利用した実験系で検討を行った。結果、2 週間隔で 9 回の G-plasmid 接種により 200 IU/ml の中和活性をもつ免疫血清を誘導することが示された。[井上 智、ポルドバタ・バザーツレン、堀田こずえ、野口 章、加来義浩、奥谷晶子、山田章雄]

（ 11 ）狂犬病ウイルス（RV）P 蛋白に対する細胞内発現抗体（intrabody）の作製

神経細胞内の RV に対する増殖抑制効果を期待して、RV-P 蛋白に対する抗体様分子 scFv（single chain variable fragment）を、intrabody として neuroblastoma（MNA）細胞に発現させた。Intrabody は細胞内で感染させた RV と特異的に P 蛋白と結合しており、ウイルスの増殖も非発現細胞に比べて大幅に抑制されていることが確認された。今後は、この intrabody の作用機序について解析を行う。[加来義浩、野口 章、堀田こずえ、山田章雄、井上 智]

（ 12 ）細胞膜コレステロール枯渇剤 MBCD による狂犬病ウイルスの感染能に対する影響

細胞膜の Lipid raft やカベオラなどのマイクロドメインが狂犬病ウイルスの感染に関与するかを調べるため、コレステロール枯渇剤である Methyl- β -cyclodextrin（MBCD）を処置した細胞に狂犬病ウイルスを感染させた。MBCD 処置細胞は、非処置細胞に比べて狂犬病ウイルスの細胞への吸着と感染が増加することが確認された。現在、この現象の機序について解析中である。[堀田こずえ、加来 義浩、野口 章、井上 智、山田 章雄]

8. 炭疽に関する研究

(1) 炭疽菌の MLVA、ペスト菌のバイオタイプ、ブルセラ菌の菌種鑑別のための迅速遺伝子検査法の開発

炭疽菌の MLVA 中 4 loci、ペスト菌の 4 種類のバイオタイプおよびブルセラ菌強毒型菌種の迅速鑑別を目的とした real time sequencing (pyrosequencing)法の検討を行った。炭疽菌の MLVA の 4 loci についてはリピート数の算出に必要な範囲の塩基配列を得ることができた。ペスト菌のバイオタイプは 2 種の遺伝子の 1 塩基多型を検出することで 4 種類のバイオタイプの分類が可能となった。ブルセラ菌は 1 塩基多型により強毒型菌種 3 菌種の鑑別が可能となった。塩基配列の解析に必要な時間は炭疽菌 MLVA の解析では約 70 分、ペスト菌およびブルセラ菌の 1 塩基多型の解析は約 10 分であった。[奥谷晶子、今岡浩一、山田章雄、井上 智]

(2) 炭疽菌国内分離株および獣医科学部保有株のパイロシーケンシングによる遺伝子プロファイルの作成

平成 18 年度に収集した国内分離株および獣医科学部で保有していた株 合計 48 株について遺伝子プロファイルを作成するため、炭疽菌染色体上 2 loci および病原性プラスミド上の 2 loci 合わせて 4 loci の Multiple-locus VNTR analysis (MLVA)の解析をパイロシーケンスによる塩基配列解読により解析した。その結果、日本国内分離株の染色体上のプロファイルは均一性を保つ一方、プラスミド遺伝子では株によりバリエーションが見られた。[奥谷晶子、井上 智]

(3) 国内分離株の 8 loci MLVA 解析

国内分離株を含む所内保有炭疽菌 48 株について染色体およびプラスミド DNA 上の 8loci の MLVA のフラグメント解析を行った。国内分離炭疽菌株はほぼ同一のアレルにタイピングされた。今後、さらに 17 loci、合計 25 loci の MLVA 解析を行い、日本国内分離株の詳細な遺伝型の解析について検討したい。[関塚剛史(ゲノム解析センター)、奥谷晶子、黒田 誠(ゲノム解析センター)、井上 智]

(4) 炭疽菌分離 2 株の病原性プラスミド全塩基配列の解読

由来の異なる *B. anthracis* BA103 株および BA104 株計 2 株の病原性プラスミド pXO1(181 kb) pXO2(95 kb) の全塩基配列の解読を行った。その結果、Ames Ancestor 株および BA103 株間の一塩基多型は、pXO1 で 7 カ所、pXO2 で 2 カ所存在し、塩基の欠失および挿入箇所は pXO1 で 6 カ所、pXO2 で 3 カ所存在した。Ames Ancestor

株および BA104 株間の一塩基多型は、pXO1 で 18 カ所、pXO2 で 11 カ所存在し、塩基の欠失および挿入箇所は、pXO1 で 5 カ所、pXO2 で 8 カ所存在した。国内分離株間におけるプラスミドの塩基配列の多様性が示唆された。[関塚剛史(ゲノム解析センター)、奥谷晶子、黒田 誠(ゲノム解析センター)、井上 智]

9. ヘニパウイルス感染症に関する研究

(1) ニパウイルス F, G 蛋白に対する抗血清の作製

本年度は、抗原検出用 ELISA の開発に必要な固相化用 / 検出用抗体 (抗 NiV-F, G ウサギ抗血清) を F, G 蛋白遺伝子をコードするプラスミドを免疫原に用いて作製した。作成した血清は、不活化 NiV 抗原を用いた ELISA と開発中の中和代替法で特異性の高い抗血清であることが検証された。今後、これらの血清を用いた抗原検出 ELISA の開発を行う。

[加来義浩、野口 章、奥谷晶子、山田章雄、井上 智]

(2) ニパウイルス中和代替法の開発

ニパウイルス感染症の血清診断では、感染性ウイルスを用いた中和試験が望ましいが BSL4 施設が必要となる。今回、BSL2 で血清診断ができるように NiV-F, G 蛋白を発現した VSV pseudovirus を利用した中和代替法の開発を行った。抗原検出 ELISA 用に作製した NiV-F, G ウサギ抗血清により作出した VSV pseudovirus の感染が血清濃度依存的に阻害され中和試験が可能であることが示された。現在、代替中和試験法と感染性ニパウイルス中和試験法の比較検証を豪州家畜衛生研究所 BSL4 施設で行うことを予定している。[加来義浩、野口 章、奥谷晶子、山田章雄、井上 智]

10. 野生動物の血清疫学調査に関する研究

獣医系大学との連携による野外疫学調査を利用した動物由来感染症のモニタリングシステムを開発する目的で、帯広畜産大学臨床獣医学研究部門予防獣医療学分野の猪熊教授研究チームと日本大学生物資源科学部獣医学科獣医公衆衛生学研究室の丸山教授研究チームと連携して疫学調査を行い、エゾジカ末梢血からの *Rickettsia helvetica*、*Anaplasma bovis* および *Ehrlichia muris* DNA の検出、野生化アライグマ末梢血における Ehrlichia と Anaplasma 感染の状況を明らかにして共同調査と論文発表を行った。[猪熊 壽(帯広畜産大学)、丸山総一(日大生物資源科学部)、牧野 敬(神奈川県)、壁谷英則(日大生物資源科学部)、藤田博巳(大原研究所)、浅野玄、野上貞雄(日大生物資源科学部)、玉本智枝(帯広畜産大学)、

清野伸隆(帯広畜産大学)、田邊茂之(帯広畜産大学)、早川大輔(帯広畜産大学)、鈴木正嗣(帯広畜産大学)、梶 光一(帯広畜産大学)、高橋裕史(帯広畜産大学)、伊吾田宏正(帯広畜産大学)、井上 智]

1 1 . 野兔病に関する研究

(1) 国内生息ダニにおける野兔病菌保菌調査

国内のダニ類における野兔病菌 (*F. tularensis*) の保菌状況を知るために捕獲ノウサギに付着していたダニ 85 ブール (317 匹) およびノウサギ捕獲地域の植生上から採集したダニ 67 匹について本菌のゲノム DNA の検出を試みた。*fopA* 及び *tu14* 遺伝子領域のリアルタイム PCR ではノウサギ付着ダニの約 70% に、また植生ダニの約 60% に少量の DNA が検出された。しかし、菌分離はできなかったこと、過去に野兔病の発生がなかった地域のダニにも検出されること、また、検出率が非常に高いことなどから、今回検出された DNA 断片は *F. tularensis* あるいはダニに共生する本菌に非常に類似した菌由来の可能性が考えられ、今後、このような類似菌を確実に区別する方法を検討し精査する必要がある。

[藤田 修、堀田明豊、宇田晶彦、山本美江、棚林 清、川端寛樹 (細菌一部)]

(2) 各種溶液中の野兔病菌の生残性の検討

野兔病菌を各種溶液で 10^7 cfu/ml に調整後、4 に保管し、経時的に生残菌数を測定した。蒸留水中では 5 日後 10^2 cfu/ml、1 ヶ月後で検出限界以下 (5 cfu/ml 未満) に、水道水中では 3 ヶ月後で検出限界以下となった。生理食塩水およびミュラーヒントン培地中では 1 ヶ月後 10^6 、3 ヶ月後 10^2 cfu/ml に減少した。ウシ胎児血清中では、1 ヶ月後 10^7 、3 ヶ月後に 10^5 cfu/ml に減少した。検出限界以下となった溶液について菌の Live/Dead 解析 (Molecular probes 社) を行ったところ VBNC 菌と考えられる菌体は認められなかった。今後、自然環境に相当する条件での生残性についての検討が必要である。

[堀田明豊、宇田昌彦、山本美江、藤田修、棚林清]

(3) *Francisella tularensis* 感染マウスの回復例

野兔病菌日本野外株をマウス (Balb/c) へ経鼻 (i.n.) または腹腔内 (i.p.) に 10^0 cfu 接種し、20 日観察した。斃死への経過は i.n. 群が i.p. 群と比較して長かった。i.n. 群生残個体は臨床、剖検所見に異常はなく、抗体反応もないことから感染しなかったと考えられた。i.p. 群生残個体では 12% の体重減少後に回復し、脾臓の腫脹や特異抗体の上昇が認められ、感染耐過したものと判定した。高感受性のマ

ウスへの野外株接種で初めて回復個体例が観察でき、マウスも感染により抗 LPS 抗体を産生することが確認された。本実験感染条件は野兔病菌のマウス感染における生体反応の解析を可能にするものである。

[堀田明豊、山本美江、藤田修、宇田昌彦、棚林清]

(4) *Francisella* 属菌株のマウスに対する病原性

Francisella 属菌は実験用マウスに対して致死感染を起こすとされているが、当研究部保有株の病原性は不明である。そこで Schu、38、LVS および U112 菌株を 10^2 、 10^4 または 10^6 cfu 腹腔内接種し、20 日間観察しマウスへの病原性を確認した。 10^6 cfu の Schu 株接種群は、体重減少、立毛が認められた後に回復したが、他菌株接種群は全期間を通じ著変がなかった。また、 10^4 および 10^6 cfu Schu 株接種マウスの血清は LPS に強く反応したが、他の株接種マウス血清は反応がなかった。これらより現有の 4 株は既報の菌株と比較してマウスに対する感染性が著しく低下していると考えられ、ゲノムの比較解析を実施し、本菌の病原性因子の解明を進めたい。

[堀田明豊、山本美江、藤田修、宇田昌彦、棚林清]

1 2 . 鳥インフルエンザに関する研究

(1) 鳥用インフルエンザ迅速診断キットの H5N1 亜型ウイルスとの反応性

鳥インフルエンザ迅速診断キット (Anigen Rapid AIV Ag/NDV Ag Test Kit および Anigen Rapid AIV Ag/H5 Ag Test Kit、Animal Genetics 社、韓国) を用いて強毒または弱毒株 H5N1 亜型ウイルスの検出を試みた。Rapid AIV Ag では $10^{5.8}$ または $10^{4.8}$ TCID₅₀ を検出できたが検出感度の良い人用キットより 10 倍以上検出感度が低かった。H5 亜型検出部分ではさらに低感度であったが特異的に検出可能であり、十分なウイルスが含まれる検体では迅速に同定可能であると考えられた。

[山本美江、堀田明豊、宇田晶彦、藤田修、山田章雄、棚林清]

(2) 鳥類由来インフルエンザ A ウイルスの各種哺乳類細胞での増殖

哺乳類での鳥類由来インフルエンザ A ウイルスの感染機構を明らかにすることを目的に、各種動物由来培養細胞での弱毒型および強毒型 H5N1 ウイルスの増殖性を調べた。弱毒、強毒型ウイルスともにネコ由来培養細胞 (Fcowf-4, CRFK, Fc3Tg, AK-D) やミンク由来 Mv1-lu において、インフルエンザの分離によく用いられるイヌ由来 MDCK 細胞と同等またはそれ以上に増殖できることが

わかった。一方、ウサギ由来の RK-13, R9ab やマウス由来 LA-4, Mlg 細胞での増殖は低く、これらのウイルス増殖の程度の差を規定する要因と考えられる各細胞のウイルス受容体やウイルス複製に關与する因子等の解析が必要と考えられた。

[山本美江、堀田明豊、宇田晶彦、藤田修、山田章雄、棚林清]

1 3 . SARS コロナウイルスに関する研究

(1) 各種経路 SARS コロナウイルス接種におけるヒト ACE2 発現マウスの感受性

ヒト ACE2 を発現するトランスジェニックマウス (hACE2Tg、ライン#5)に段階希釈した SARS コロナウイルス(SARS-CoV、Frankfurt 株)を経鼻、腹腔内、皮下に接種し、21 日間観察した。いずれの接種経路でもウイルス接種後 3-4 日目に体重減少、立毛、運動失調や低下が認められ 4-6 日で死亡した。その半数致死量は経鼻接種では $10^{-0.5}$ TCID₅₀ (VeroE6)、腹腔内接種で $10^{0.4}$ TCID₅₀、皮下接種で $10^{1.3}$ TCID₅₀ と算出され、本 Tg マウスは SARS-CoV 感染に対して非常に高感受性で致死であることが明らかになった。今後、ウイルスの増殖臓器や組織の検索や致死に至る病理学的検索、生体反応等の検索が必要である。

[棚林 清、宇田晶彦、堀田明豊、藤田 修、山本美江、山田章雄、永田典代・長谷川秀樹 (感染病理部)]

1 4 . その他の研究

(1) 病原体を網羅的に検査するためのマイクロアレイ開発

本研究は、1 回の試験で多種類の病原体を同時特異的に検出する手法を確立するために、マイクロアレイへの応用を試みている。ゲノムプロジェクトが終了している又は途中の原虫、アルベオラータ、真菌、古細菌、細菌、ウイルスの合計 1192 株の全長ゲノム配列とタンパク毒素等 74 遺伝子配列から、各病原体に対して特異的検出に有効であると推測された 38,986 種類のプローブを設計した。これらのプローブが特異的に各病原体を検出できる事を明らかにする為に、インフルエンザウイルス、Q 熱の原因菌、大腸菌、エルシニア、および野兔病菌のゲノム核酸を用いて検討した。その結果、これらの病原体は特異的に検出可能であることが示された。

[宇田晶彦、棚林 清、堀田明豊、藤田 修、山本美江、山田章雄]

発表業績一覧

. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Imaoka,K., Kimura,M., Suzuki,M., Kamiyama,T. and Yamada,A. Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. Jpn. J. Inf. Dis., 60:137-139, 2007
- 2) Kimura,M., Tanikawa,T., Suzuki,M., Koizumi,N., Kamiyama,T., Imaoka,K. and Yamada,A. Detection of *Streptobacillus* spp. in feral rats by specific polymerase chain reaction. Microbiol. Immunol., 52:9-15, 2008
- 3) Hotta K., Motoi Y., Okutani A., Kaku Y., Noguchi A., Inoue S. and Yamada A. 2007. Role of GPI-anchored NCAM-120 in rabies virus infection. Microbes Infect. 9:167-174.
- 4) Inokuma H., Makino T., Kabeya H., Nogami S., Fujita H., Asano M., Inoue S. and Maruyama S. 2007. Serological survey of Ehrlichia and Anaplasma infection of feral raccoons (*Procyon lotor*) in Kanagawa Prefecture, Japan. Vet.Parasitol. 145:186-189.
- 5) Inoue S. 2007. The rabies prevention and the risk management in Japan. J.Disas.Res. 2:90-93.
- 6) Kato S, Inoue KI, Kobayashi K, Yasoshima Y, Miyachi S, Inoue S, Hanawa H, Shimada T, Takada M, Kobayashi K. 2007. Efficient Gene Transfer via Retrograde Transport in Rodent and Primate Brains Using a Human Immunodeficiency Virus Type 1-Based Vector Pseudotyped with Rabies Virus Glycoprotein. Hum.Gene.Ther. 18: 1141-51.
- 7) Fujita, O., Uda, A., Hotta, A., Okutani, A., Inoue, S., Tanabayashi, K., and Yamada, A. 2008. Genetic diversity of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* strains isolated in Japan. Microbiol. Immunol. 52: (in press)
- 8) Fujima, A., Ochiai, Y., Sioto, A., Omori, Y., Noda, A., Kazuyama,Y., Shoji, H., Tanabayashi, K., Ueda, F., Yoshikawa, Y., and Hondo, R. 2008. Discrimination of antibody to herpes B virus from antibody to herpes simplex virus type 1 and 2 in human and macaque sera. J. Clin. Microbiol. 46: 56-61.

2. 和文発表

- 1) 山田章雄:その他の人獣共通感染症 食中毒予防必携 196-211 2007
- 2) 山田章雄:狂犬病-36年ぶりに発生 ビオフィリア 3, 58-62, 2007
- 3) 中込大樹, 出口順啓, 矢ヶ崎晶子, 原田和俊, 柴垣直

- 孝, 島田眞路, 木村昌伸, 今岡浩一: 痂皮の PCR により *Streptobacillus moniliformis* を検出した鼠咬症の一例. in: 病原微生物検出情報, 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 28(8):226-227, 2007
- 4) 今岡浩一他: ブルセラ症 (1999 年 4 月 ~ 2007 年 3 月 31 日現在). in: 病原微生物検出情報, 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 28(8):227-228, 2007
- 5) 高橋春樹, 中川隆雄, 鈴木葉子, 鈴木道雄, 今岡浩一, 多田有希: *Capnocytophaga canimorsus* が分離された, 敗血症・多臓器不全で搬送され救命し得たイヌ咬傷の一例. in: 病原微生物検出情報, 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 28(10):299-300, 2007
- 6) 今岡浩一: 犬にかまれた! どうしよう... ~ パスツレラ症, カプノサイトファーガ症, 狂犬病 ~. in: チャイルドヘルス, 診断と治療社, 10(11):768-771, 2007
- 7) 新井 智, 田中政弘, 岡部信彦, 井上 智: ワクチン接種による狂犬病の流行阻止効果. 日本獣医師会雑誌. 60:377-382, 2007.
- 8) 井上 智, 野口 章: リッサウイルス感染症 新感染症学(下) - 新時代の基礎・臨床研究 - 日本臨床 65 巻 増刊号 3, 157-162, 2007.
- 9) 井上 智 アジアの狂犬病の現状を知る. 特集: ヒトと動物の共通感染症最前線 5. 獣医畜産新法 61:184-187, 2008.
- 10) 棚林 清: サルの感染症について - ズーノーシス (人獣共通感染症) - 2007. LABIO 21 No.28: 26-29.

. 学 会 発 表

1. 国際学会

- 1) Akio Yamada. Outbreaks of avian influenza in Japan. The Second Asian Conservation Medicine/Wildlife Pathology Workshop 2007, Aug. 30-Sep. 1, 2007, Taipei
- 2) Okutani A., Inoue, S., Yamada A. Application of high-throughput sequencing system for identification of *Bacillus anthracis*. International Conference on *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* (Bacillus-ACT 2007). 17-21 June, 2007. Oslo, Norway
- 3) Inoue, S., Yamada, A., Tobiume, M., Sata, T., Morimoto, K., and Kurane, I. Ante- and post-mortem diagnosis, and characters of virus isolated from two human cases of rabies imported into Japan from the Philippines in November 2006. 41st joint working conferece on viral diseases. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 24-25 July, 2007.

Baltimore, MD, USA.

2. 国内学会

- 1) 鈴木道雄, 今岡浩一, 木村昌伸, 神山恒夫, 山田章雄. *Capnocytophaga* 属菌のイヌにおける保有状況. 第 143 回日本獣医学会学術集会, つくば, 2007 年 4 月
- 2) 猪熊 壽, 玉本智枝, 清野伸隆, 田邊茂之, 早川大輔, 鈴木正嗣, 梶 光一, 高橋裕史, 伊吾田宏正, 井上智. エゾジカ末消血からの *Rickettsia helvetica*, *Anaplasma bovis* および *Ehrlichia muris* DNA の検出. 第 143 回日本獣医学会学術集会, 2007 年 4 月, つくば
- 3) 高橋華子, 相楽裕子, 井上 智, 佐多徹太郎. 36 年ぶりに国内で相次いで発生した狂犬病—横浜市—. 第 81 回日本感染症学会. 2007 年 4 月, 京都
- 4) 堀田こずえ, 井上 智, 山田章雄. 狂犬病ウイルス感染における NCAM-120 の役割について. 第 11 回日本神経ウイルス研究会学術集会, 2007 年 7 月, 草津・群馬県
- 5) 藤田 修, 宇田晶彦, 堀田明豊, 山本美江, 奥谷晶子, 井上 智, 棚林 清, 山田章雄. 野兎病菌 (*Francisella tularensis* subsp. *holarctica*) の株鑑別に有用な遺伝子マーカーの解析. 第 144 回日本獣医学会学術集会 2007 年 9 月 (北海道江別市)
- 6) 中込大樹, 出口順啓, 矢ヶ崎晶子, 原田和俊, 柴垣直孝, 島田眞路, 今岡浩一, 木村昌伸. 鼠咬熱の 1 例. 第 59 回日本皮膚科学会山梨地方会, 甲府, 2007 年 9 月
- 7) 加来義浩, 野口 章, 堀田こずえ, 山田章雄, 井上智. 狂犬病ウイルス P 蛋白に対する intrabody の作製と反応性の解析. 第 55 回日本ウイルス学会, 2007 年 10 月, 札幌・北海道
- 8) 井上 智, ボルドバータ・バザーツレン, 堀田こずえ, 野口 章, 加来義浩, 奥谷晶子, 山田章雄. DNA 免疫を利用した簡便で特異性の高い抗狂犬病グロブリン産生モデル実験系の検討. 第 11 回日本ワクチン学会, 2007 年 12 月 10 日, 横浜
- 9) 山本美江, 堀田明豊, 藤田 修, 宇田晶彦, 山田章雄, 棚林 清. インフルエンザ迅速診断キットの鳥類由来 H5N1 亜型ウイルスでの反応性の比較. 第 145 回日本獣医学会学術集会 2008 年 3 月 (神奈川県相模原市)

3. セミナー・講演等

- 1) 井上 智. トピック: 狂犬病. 衛生微生物技術協議会, 第 28 回研究会. 岡山県環境保健センター. 2007 年 7 月 5-6 日, 岡山市, 岡山県
- 2) 井上 智. 狂犬病の脅威と予防について. 第 144 回

獣医科学部

日本獣医学会学術集会 市民公開講座。酪農学園大学。
2007年9月2日、札幌市、北海道

3) 井上 智。狂犬病への対応事例等について。平成19年度 地方衛生研究所全国協議会:近畿支部ウイルス部会研究会。大阪市立環境科学研究所。2007年9月7日、大阪市、大阪府

4) 今岡浩一。ペスト(・野兔病):「感染症とバイオテロリズム」。2007年第2回日本細菌学会東日本支部会シンポジウム, 東京, 2007年10月

5) 井上 智。狂犬病の発生事例及び狂犬病を疑う動物の検査手法について。平成19年度 動物由来感染症対策(狂犬病を含む)技術研修会。厚生労働省健康局結核感染症課。2007年11月2日、東京都

6) 井上 智。アジアの狂犬病の現状を知る。第7回 人と動物の共通感染症研究会学術集会。2007年11月3日、北里大学薬学部コンベンションホール、東京都

7) 井上 智、奥谷晶子。希少感染症となった日本の炭疽とその課題。平成19年度特別課程細菌コース。国立保健医療科学院。2007年11月15日、埼玉県

8) 井上 智。狂犬病に関わる最近の話題とバイオセーフティ。第7回 日本バイオセーフティ学会総会・学術集会。日本バイオセーフティ学会(The Japanese Biological Safety Association: JBSA)。2007年11月17日、東京都

9) 井上 智。狂犬病の発生状況並びに対策の現状。狂犬病予防にかかる知識向上を図るための技術研修会。徳島県保健福祉部生活衛生課。2007年12月14日、徳島県

10) 井上 智。狂犬病の話題(海外と国内の課題について)。平成19年度埼玉県狂犬病予防協会研修会。徳島県保健福祉部生活衛生課。2008年1月17日、埼玉県

11) 棚林 清:食肉衛生検査におけるウイルス学的検査について。平成19年度食肉衛生技術研修会 2008年1月24日、東京

12) 今岡浩一。ブルセラ症 —特徴・疫学・対応—: 特別講演。第46回愛知県獣医師会学術研究発表会, 名古屋, 2008年3月

13) 井上 智。狂犬病の脅威と予防方法。府民公開講座。京都府獣医師会・京都市獣医師会共催。2008年3月23日、京都府

14) 井上 智。人獣共通感染症が侵入した場合の動物側の対応(狂犬病とそのリスク)。第145回 日本獣医学会学術集会。微生物分科会・公衆衛生分科会共催シンポジウム、「海外からの人獣共通感染症の侵入危機とその対策」。麻布大学。2008年3月29日、神奈川県

研修実績

今岡浩一。講義:人獣共通感染症。平成19年度特別課程細菌コース(主催:保健医療科学院)2007年11月15日

平成19年11月15日(木)

国立保健医療科学院が行っている「保健医療、生活衛生及びこれらに関連する社会福祉に係る職員の教育訓練」

平成19年度特別課程細菌コースの講師として講義を行った。

講師:井上 智、奥谷晶子

演題:希少感染症となった日本の炭疽とその課題

外国人研修

平成19年3月12日(月)

JICAベトナム研修員研修を行った

研修生:ベトナム NIHE、Dr. Doan Hai Yen

担当教官:井上 智、奥谷晶子

研修内容:炭疽菌の取扱一般と遺伝子診断法について

平成19年12月10-11日(月 火)

JICAベトナム研修員研修を行った

研修生:ベトナム NIHE、Dr. Hoang Thi Thu Ha

担当教官:井上 智、奥谷晶子

研修内容:炭疽菌の取扱一般と遺伝子診断法について

平成19年12月12日(水)

JICAベトナム研修員研修を行った

研修生:ベトナム NIHE、Dr. Hoang Thi Thu Ha

担当教官:今岡浩一

研修内容:ペスト菌の取扱と検出法について

平成19年12月13日(木)

JICAベトナム研修員研修を行った

研修生:ベトナム NIHE、Dr. Hoang Thi Thu Ha

担当教官:堀田明豊、藤田 修、棚林 清

研修内容:野兔病菌の検出法について