

12. 獣医科学部

部長 山田章雄

概要

平成 21 年度はメキシコに端を発するインフルエンザが WHO によりパンデミック宣言され、感染研は大きな影響を受けた。その渦中において、獣医科学部も感染研の 24 時間体制による診断への協力、あるいは科学振興調整費による緊急研究への参画などで、新型インフルエンザ対応に少なからぬ影響を被ることになった。幸いなことに当初予想されたような健康被害にはつながらなかったが、動物に起因する新興感染症の出現が今後も続くであろうこと、その対応・対策が如何に重要であるかを再認識させるには十分であった。この年は歴史に残る政権交代の実現した年で、新興動物由来感染症に対する基礎研究、対策研究等への新たな取り組みをはじめられような淡い期待を抱いたのであるが、その期待がどのように実現されていくかについては、更に見守る必要がありそうである。研究においてはこれまでに引き続きブルセラ症、カプノサイトファーガ感染症、狂犬病、ニパウイルス感染症、炭疽、野兔病、高病原性鳥インフルエンザウイルスなどに関する研究が進められた。国内外の研究機関との連携も滞りなく進められ、ほぼ順調であると言える。

業績

調査・研究

1. 動物由来感染症に関する研究

1. *Brucella* 特異的抗体検出法の開発に関する研究

B. canis 感染および非感染イヌ血清を用いて、試験管内凝集反応 (TAT)、マイクロプレート凝集反応 (MAT)、市販の免疫クロマト法 (ICA) KIT および蛍光抗体法 (IFA) KIT を入手し検討した。その結果、TAT で感度が若干劣るものの、検査結果には有意な相関が認められた。ウエスタンブロッティング法 (WB) との比較も行ったが、TAT で陰性と判断された *B. canis* 感染流行施設内のイヌ血清で、陽性となるケースが認められた。このことは、WB が、他の検出方法よりも感度が良いことによると思われるが、通常の検査法では感染流行施設内の抗体価低値の感染イヌを見逃す可能性を示している。また、

特異性の高いタンパクの同定・解析、組換えタンパクの作成など、新たな in-house の ICA の開発を進めている。[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

国内の野生イノシシおよびシカの血液サンプルを入手し、ブルセラ属菌に対する抗体の保有状況を検討した。イノシシでは、家畜ブルセラ菌に対し 2/334 (0.6%)、*B. canis* に対し 32/334 (9.6%) が、ニホンジカについては、*B. canis* に対し 1/97 (1.0%) が、MAT により抗体陽性を示した。これら陽性サンプルは、*B. canis* を抗原として用いた WB でも陽性を示した。さらに、抗体陽性血液サンプルから DNA を抽出し、ブルセラ特異的 PCR を実施したところ、イノシシで 21/34、ニホンジカで 1/1 が陽性となった。増幅産物のシーケンスを確認したところ *B. canis* 遺伝子と 100% 配列が一致した。国内のイノシシとニホンジカのブルセラ属菌感染が示唆されるが、確定には、他菌との交差反応の確認も含め、さらに検証が必要である。[今岡浩一、木村昌伸、鈴木道雄、山田章雄]

3. カプノサイトファーガ属菌に関する疫学的調査・研究

(1) カプノサイトファーガ属菌はイヌやネコの口腔内に常在するグラム陰性桿菌であり、特に *Capnocytophaga canimorsus* が臨床的に重要で、ヒトがイヌやネコに咬傷、搔傷を受けた際に傷口から感染する。国内症例報告を医中誌、各種学会抄録集などを検索し調査したところ、2002 年以降、14 例が報告されており、うち 6 例が死亡症例(イヌ咬傷 1 例、ネコ搔傷 4 例、不明 1 例)であった。また、イヌ・ネコの同菌保有率について特異性の高いプライマーを新たに作製し PCR で解析を行ったところ、イヌの 74%、ネコの 57% が *C. canimorsus* 陽性であった。収集した臨床分離株、イヌ・ネコからの分離株、ATCC 株の生化学的性状解析を行った結果、生化学的性状には糖の分解能以外に大きな違いは見られなかった。また、16S rRNA 遺伝子のシーケンス比較を行った結果、大きく 2 つのグループに分けられる他、ところどころに変異

も認められた。情報の収集と、菌株の解析、カプノサイトファーガ属菌の感染・発症メカニズムについて解明していくことが重要である。[鈴木道雄、木村昌伸、山田章雄、今岡浩一]

(2) カプノサイトファーガ症のリスクプロファイリングを行った。イヌ・ネコの飼育頭数と飼育者数、動物病院獣医師・動物看護師数、動物取扱業者数、それぞれ対象人集団におけるイヌ・ネコ咬傷、ネコ掻傷の年間推定受傷回数、イヌ・ネコの保菌率、受傷した際の感染成立率および発症率の推定値、を用いて年間推定患者数を算出した。その結果、500~600人の感染発症者がいると推定された。オランダ、デンマークでは100万人対0.7、0.6人との報告があり、日本の人口を考えると、500~600人という推定は妥当であると思われる。すなわち、現在は重症例のみ数例が報告されているが、報告されていない軽症例がまだ多く存在すると推定された。今後も継続した調査が必要である。[今岡浩一、東レリサーチセンター]

4. 鳥類における WNV および JEV に対する抗体保有状況調査

Blocking-ELISA を用いて、2009 年度の渡り鳥(カモ類)における WNV および JEV に対する抗体保有状況を調査した。しかし、いずれも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]

5. 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

自治体・大学・獣医臨床などの専門家とともに開発した狂犬病の診断技術向上のために必要な解剖手技習得モデルについて、技術研修等を利用した手技等の試行と自治体の公衆衛生領域への普及・啓発、厚生労働行政における有効性について調査を行った。結果、開発したモデルと教材は自治体の現場での狂犬病啓発と技術研修等に対して波及効果があると期待され、本研究の目的である「狂犬病の診断技術向上のために必要となる解剖手技習得モデル・教材の開発」は自治体等における担当者への実技伝達のみならず発生時を想定した意識啓発と動物由来感染症である狂犬病の感染源対策に対する危機管理意識の向上にも大いに貢献することが示唆された。[井上智、野口章、加来義浩、奥谷晶子、山田章雄(獣医科学部)、志村薫、齊藤薫(モルフォバイオイメージング研究所)、佐藤克(狂犬病臨床研究会)、村山悠子(さいたま市動物愛護ふれあいセンター)、織間博光、

長谷川大輔(日本獣医生命科学大学)、川田睦、王寺隆(ネオ・ベッツ VR センター)、朴天鎬(北里大学獣医畜産学部)、安藤秀二(国立感染症研究所ウイルス一部)沼田一三、川島朗、久本千絵(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)、魚住佳世(徳島県動物愛護管理センター)、高橋朱実(岩手県北上保健所)、佐野哲也(滋賀県健康福祉部生活衛生課)、宗村佳子(東京都動物愛護相談センター)、川越辰也(宮崎県衛生管理課)、坊菌慶信(宮崎県都城保健所衛生環境課)、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(島根県保健環境科学研究所)、川瀬遵(島根県健康福祉部)

(2) 侵入・不許可動物等の公衆衛生リスク評価と管理に関する研究

海外における狂犬病罹患動物の不法侵入事例および我が国の関連情報等の分析、狂犬病の発生を想定した机上訓練の実際と課題の検討(我が国に必要な狂犬病サーベイランス)、外国犬不法上陸防止等に関わる課題分析(北海道根室・網走における不法上陸犬等の実態調査)を行った。今回特に、タイの赤十字研究所狂犬病診断部の研究協力によって、狂犬病が疑われた動物を臨床判断する方法を我が国に導入して狂犬病の臨床サーベイランスの検証を行った。[井上智、野口章、加来義浩、奥谷晶子(獣医科学部)、浦口宏二(北海道立衛生研究所)、深瀬徹(明治薬科大学)、佐藤克(狂犬病臨床研究会)、村山悠子(さいたま市動物愛護ふれあいセンター)、横山敦志(北海道保健福祉部保健医療局)、梅澤めぐみ(根室保健福祉事務所保健福祉部)、宗村佳子(東京都動物愛護相談センター)、沼田一三、久本千絵(兵庫県動物愛護センター)、西條和芳(徳島県保健福祉部生活衛生課)、魚住佳世(徳島県動物愛護管理センター)、川越辰也(宮崎県衛生管理課)、坊菌慶信(宮崎県都城保健所衛生環境課)、佐野哲也(滋賀県健康福祉部生活衛生課)、松本尚美(鳥取県衛生環境研究所)、Veera Tepsuethanon(タイ赤十字サオパー王女記念研究所)]

(3) 侵入・不許可動物等の生態的リスク評価と管理に関する研究

北海道では寄港したロシア船からの不法上陸犬が依然あり、野生動物であるキツネとの接触が否定できない。今回、北海道に生息するキツネに狂犬病が侵入した場合

の流行予測モデルを確立するために必要な基礎的データの収集と解析を行った。北海道は本州以南に較べてキツネの生息密度が高く(根室半島:キツネの生息密度は0.85頭/km²)、港湾区域(稚内港、紋別港、網走港、根室港)でキツネと不法上陸犬が接触するリスクを否定できなかった。現在、流行予測を行うために必要なキツネの個体数推定・個体数密度情報、港湾の地理情報・周辺環境情報を調査している。[浦口宏二(北海道立衛生研究所)、深瀬 徹(明治薬科大学)、井上 智、野口 章、加来義浩、奥谷晶子(獣医科学部)、佐藤 克(狂犬病臨床研究会)、村山悠子(さいたま市動物愛護ふれあいセンター)、横山敦志(北海道保健福祉部保健医療局)、関谷紀幸(宗谷保健福祉事務所)、竹下日出夫、児玉晋治(網走保健福祉事務所)、梅澤めぐみ(根室保健福祉事務所保健福祉部)]

(4) アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワークの強化に関する研究

本研究はアジアのCDC機能を持つ国立の研究機関等と狂犬病ラボラトリーネットワークを構築してその連携を強化することが目的である。[井上 智、杉浦尚子、宇田晶彦、Bordbaatar Bazartseren、佐藤 豪、野口 章、加来義浩、奥谷晶子、山田章雄(獣医科学部)、朴 天鎬(北里大学)、黒田 誠、関塚剛史(病原体ゲノム解析研究センター)、Jun R.C. Orbina、Catalino Demetria、Daraia L. Manalo、Plebian Medina、Beatriz Quiambao(RITM)、Nguyen Thi Kieu Anh、Dong V. Nguyen、Giang C. Ngo (NIHE)、Qing Tang (China CDC)]

(a) 狂犬病ウイルスの分子疫学に関する研究: フィリピンで流行している狂犬病ウイルスの地域性を分子疫学的系統解析によって識別可能とし、流行拡大しているウイルス株の特定と地域性や輸入経路推定方法について検討した。ラボラトリーネットワークが構築できればアジア地域における国境を越えた狂犬病の侵入・流行拡大について情報共有が可能となり公衆衛生領域での狂犬病対策に大きな波及効果があるものと考えられた。

(b) 狂犬病ウイルスの迅速抗原検出系に関する研究: 野外での検査を想定して、遺伝子診断系として野外検体を利用したRT-LAMP法の感度とその特異性について検証を行い、また抗原診断系として検査に使用する抗体作成の簡易化と標本固定の簡便化をdRIT法で可能にした。

(c) 狂犬病の新しい診断法の開発に関する研究: 狂犬病ウイルスに感染した宿主の生体側の遺伝子応答をマイクロアレイで解析をした。感染を特徴付ける宿主遺伝子応答について脳で941遺伝子、脊髄で850遺伝子、脳と脊髄に共通したものについて1258遺伝子を抽出するこ

とができた。現在、発現が有意に高かった遺伝子群についてその機能分類を行い、感染した宿主で見られる病態との関連性及び因果関係について解析を行っている。

(5) 狂犬病の免疫組織化学によるウイルス抗原検出に関する研究

免疫組織化学による狂犬病ウイルスの抗原検出系は簡便・安価である。今回、検出用の抗体をウサギとニワトリ卵黄で作製して、それぞれの抗狂犬病ウイルス蛋白抗体の特性等についてホルマリン固定材料を用いて比較検討した。最も染色感度が高いのはウサギおよびニワトリ卵黄由来の抗P蛋白抗体であり、ニワトリ卵黄由来のP抗体では非特異反応が殆どみられないことが示された。また、HE標本ではネグリ小体の観察が困難であるが、免疫組織化学では抗原検出によるウイルスの特定が可能であった。[朴 天鎬、小嶋大亮、石田 誠(北里大学)、井上謙一、高田昌彦(京都大学霊長類研究所)、杉浦尚子、佐藤 豪、野口 章、井上 智(感染研)]

(6) 狂犬病の病態解析のための感染モデル実験系

感染した宿主の潜伏期間中及び発病初期を解析する感染実験モデルを確立するために、狂犬病ウイルス(CVS11株)をC57BL/6Jマウスの右後肢下腿三頭筋に末梢感染させて後肢麻痺を伴う致死性の脳炎をマウスに発病させることに成功した。下腿の麻痺はウイルス接種側で顕著であり、麻痺症状の主因は脳に見られたアポトーシス病変よりも脊髄で顕著な壊死性病変に起因することが組織病理学的検索によって強く示唆された。[朴 天鎬、小嶋大亮、石田 誠(北里大学)、杉浦尚子、Bazartseren BOLDBAATAR、野口 章、井上 智(感染研)]

(7) 狂犬病の免疫グロブリン(RIG)に関する研究

現在、RIGはわが国では生産されていない。万が一、狂犬病を強く疑うイヌ等による咬傷被害が国内で報告された場合には緊急輸入もしくは過去に輸入されたRIGを使用しなければならないことが想定される。本研究では、「Aventis Behring社」から輸入したRIG(Berirab P、Lot.No. 03947131L)について冷蔵状態(4℃)保存で有効期限を4年経過した時点でも安定した力価を維持していることを実験的に明らかとした。また、狂犬病の概要、アジアにおける現状、患者の臨床症状、暴露後予防の方法、公衆衛生対策等についてまとめた啓発資料等を作成した。[野口 章、井上 智(獣医科学部)、倉根一郎(ウイルス一部)]

(8) 狂犬病野外ブラジル株を用いた In vivo 接種試験とゲノム配列の決定

狂犬病野外株の馴化メカニズムを解明するために、食虫コウモリおよび家畜（ウシ・ヒツジ）より分離された6株をマウス脳内で、また、食虫コウモリ・ヒツジ分離株各1株をマウスの筋肉接種で継代して、ウイルスのゲノム配列を継代毎に決定した。構造遺伝子上の変異は散発的であり、非コード領域上の変異は全てリン蛋白(P)および膜蛋白(M)遺伝子間に存在し、特に P-M 遺伝子間の転写終了シグナル(TTS)上に集中していた。また、P-M TTS 上の変異は継代1代後であり、RABV の新たな宿主への順化では短い継代期間でゲノムのへ変異が起きていることが示唆された。[佐藤 豪、Ito H. Fumio(州立サンパウロ大学)、井上 智、伊藤 琢也(日本大学)、酒井 健夫(日本大学)]

6. 炭疽に関する研究

(1) キノロン耐性炭疽菌のゲノム解析による耐性関連遺伝子の同定

炭疽菌が有するキノロン耐性メカニズムを網羅的に解明するために、キノロン剤感受性である炭疽菌（日本分離株 BA103, BA104）を親株とし、薬剤耐性株と感受性株との間に見られる遺伝子変異をゲノムワイドに同定したところ、キノロン耐性化には段階的なメカニズムがあり、QRDR のような必須遺伝子上の変異導入よりも先に、変異導入しやすい TetR タイプ・レギュレーター (GBAA0834) を機能欠損させ中等度耐性化していることが示唆された。また、中等度耐性株は、キノロン剤選択圧下においても菌集団を増加し、QRDR 変異を伴う高度耐性化の危険性を増大させることが明らかとなった。[奥谷晶子、井上 智(獣医科学部)、芹澤昌邦、関塚剛史、坂野聡美、黒田 誠(病原体ゲノム解析研究センター)]

(2) 病原体等の登録、保管、輸送、廃棄に関する一括管理システムを利用した炭疽菌の取り扱いについての研究

炭疽菌の取り扱い等については感染症法により二種病原体等に指定されており、バイオセキュリティ上の観点から、法に基づく厳重な保管管理が必要とされている。今回、バイオセーフティ管理室で研究開発中の「病原体等の登録、保管、輸送、廃棄に関する一括管理システム」を炭疽菌について導入可能かを検討したところ、危機管理の視点から感染症法に基づいた分離菌株の届け出、保管、輸送、廃棄が迅速かつ適切、確実に行われるために大変有用であることが示された。[奥谷晶子、井上 智(獣医科学部)、篠原克明(バイオセーフティ管理室)]

7. ヘニパウイルス感染症に関する研究

(1) ニパウイルス中和代替法の開発

現在、NiV、HeV 抗体の確定診断では感染性ウイルスを用いた中和試験が行われるが BSL4 施設が必要である。そこで、NiV-F, G 蛋白を発現した VSV シュードタイプを用いて BSL2 以下で行える中和代替法の開発を行った。すでに、GFP 発現シュードタイプを利用した系を開発しているが、測定に蛍光顕微鏡/蛍光プレートリーダーが必要であった。そこで、より簡便に測定できるよう、分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) 発現シュードタイプを利用した系の確立を試みたところ、本中和試験は(感染性ウイルスを用いた) 現行法よりも高感度に中和抗体を検出できることが明らかになった。SEAP 発現シュードタイプは、安価な ELISA プレートリーダーで、迅速に感染価を計測できるため、本法は、途上国でも普及しうる中和試験法として期待できる。[加来義浩、野口 章、奥谷晶子、山田章雄、井上 智]

(2) ニパウイルスの抗原 capture ELISA の開発

現在、ニパウイルス (NiV) 感染症、ヘンドラウイルス (HeV) 感染症の迅速診断法として、RT-PCR または realtime RT-PCR が広く利用されている。その一方で、近年、現行の診断用プライマーでは増幅できないヘニパウイルス株の出現が報告されている。そこで、ウイルス遺伝子のプライマー相当領域が変異した株でも検出できるよう、capture ELISA による抗原検出系の開発を行った。豪州家畜衛生研究所 BSL4 施設において、感染性ウイルス (NiV マレーシア株、NiV バングラデシュ株および HeV) を用いて、検出限界の測定を行ったところ、それぞれ 6.0×10^5 (TCID₅₀/100 μl/well)、NiV-B では 2.5×10^4 、HeV では 9.4×10^5 であった。現在、(脳脊髄液など) 臨床検体への反応性を検証するため、本症発生国とのネットワークを検討している。[加来義浩、野口 章、奥谷晶子、山田章雄、井上 智]

8. 季節性インフルエンザ (H1N1) に関する研究

(1) ファージディスプレイ scFv 法を利用した新型 H1N1 検出イムノクロマト法の開発

インフルエンザの簡易検査として広く利用されているイムノクロマト法は、季節性 H1N1 株と 2009 年に発生した新型 H1N1 株の両方に反応するため、これらの株を識別することはできない。そこで、single chain variable fragment (scFv) phage display library より、新型株に特異的な scFv を選択し、新型/季節性 H1N1 識別用イムノクロマトキットの構築を目指した。ELISA と IFA で 5 クローンが新型株と季節株に対して同等に反応した。また、1

クローンが ELISA、IFA、IP で新型株に強く反応したが、季節性株に対しても、若干の反応性を有したため両株識別用イムノクロマト法に使用することは難しいと思われた。低分子量の scFv は、抗原認識部位の立体構造に可塑性があることから、わずかな抗原性状の違いを識別するよりは、むしろ幅広い抗原性状に対応できるモノクローナル抗体として有用なフォーマットと考えられた。[加来義浩、野口 章、奥谷晶子、井上 智、山田章雄]

(2) 新型インフルエンザウイルスのタミフル耐性遺伝子迅速検出法の検討

パイロシークエンシング法を用いて、我が国で分離された季節性 H1N1 株のタミフル耐性遺伝子の迅速塩基配列解読を可能にした。耐性遺伝子の検出には、国内分離タミフル感受性株および耐性株から抽出した RNA、WHO 推奨のプライマーと耐性遺伝子増幅用に設計したプライマーを使用して、LightCycler による耐性遺伝子の迅速増幅を行った。本法では、抽出された検体 RNA から遺伝子増幅を開始して 1 時間後に耐性遺伝子の塩基配列を解読することができた。[奥谷晶子、井上 智、山田章雄(獣医科学部)、小田切孝人(インフルエンザウイルス研究センター)]

9. 野兔病に関する研究

(1) 野生動物における抗野兔病菌抗体調査
過去に野兔病患者発生が多数あった福島県内で捕獲された野生動物由来血液検体(ツキノワグマ 34 を含む全 126 検体)について野兔病菌に対する抗体調査を実施した。微量凝集反応によるスクリーニング陽性検体についてウエスタンブロット法および間接蛍光抗体法により確認試験をしたところ、ツキノワグマ由来 1 検体が陽性と判断された。過去のツキノワグマの調査で長野県以西の 310 検体からは陽性例はなく、岩手県内由来 62 検体からは陽性 8 例が認められたことや、過去の野兔病患者報告状況などから、今後、野生動物における野兔病菌に関する調査は福島県以北について進める必要があると考えられる。[堀田明豊、棚林 清、藤田 修、山本美江、宇田晶彦(感染研) 溝口俊夫(福島県鳥獣保護センター)]

(2) 野鼠における野兔病に関する調査

環境中の野兔病菌の存在様式の解明を目的に、野兔病罹患ノウサギの発見場所周辺で発見同時期の 6 月に 54 個体の野鼠を捕獲した。前年秋期と比較し、捕獲個体の生存率は高く、血液 46 検体を採取できた。微量凝集反応で 40 倍を呈した 1 例を含む 4 例が酵素抗体法にて陽性であった。しかし、いずれもウエスタンブロット法と間接

蛍光抗体法で陰性であった。脾臓や肝臓からの菌分離及びゲノム検出はいずれも陰性であったが、ダニやツツガムシなどの外部寄生動物については、弱いながらリアルタイム PCR で反応する検体が存在した。今後、野兔病菌の類似菌の存在も考慮し、血清学的反応やゲノム検出の特異性について詳細に検討し調査を継続する必要がある。[堀田明豊、棚林 清、藤田 修、山本美江、宇田晶彦(感染研)、朴天鎬、小山田敏文、進藤順治、畑井 仁、工藤上(北里大)]

(3) 日本国内で分離された野兔病菌のパルスフィールドゲル電気泳動法を用いた遺伝学的解析に関する基礎研究

日本国内に分布する野兔病菌 (*Francisella tularensis*) の遺伝的特性を明らかにする目的で、種々の制限酵素を用い日本国内分離株のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析を行った。まず、PFGE 解析に利用可能な 7 種の制限酵素を選択し、これらを用いて解析した結果、北米やヨーロッパなどに分布する同亜種菌株と比較して国内株は非常に高い遺伝的多型を有している事が明らかとなった。さらに、今回用いた制限酵素の全てで日本分離株は海外由来株と明確に異なるバンドパターンを示し、国内外由来株間の鑑別にも PFGE が有用な手法の一つであることが示唆された。

[藤田 修、宇田晶彦、堀田明豊、山本美江、棚林 清]

(4) *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* SCHU 株の強毒性に関わる因子の同定

F. tularensis は、ヒトや動物に野兔病を引き起こす細胞内寄生性のグラム陰性桿菌である。我々は、保管していた弱毒性の SCHU 株をマウスで 9 代継代し強毒性復帰株を得ることができた。これらは近似した遺伝的背景を有しながらマウスに異なる病原性を示すことから、各株の人工培地や培養細胞での増殖性および全ゲノム解析を行い、病原性関連遺伝子の同定を試みた。弱毒株と強毒株の人工培地やマクロファージでの増殖速度は同等だったが、骨髄由来樹状細胞では強毒株が高い増殖性を示した。また、全ゲノム塩基配列解析を行った結果、ゲノム上の 1 塩基に違いが見つかり、本菌株の病原性を支配している可能性が示唆された。

[宇田晶彦、関塚剛史*、藤田 修、黒田 誠*、堀田明豊、山本美江、棚林 清、山田章雄(*病原体ゲノム解析センター)]

10. インフルエンザウイルスの検出法に関する研究

(1) インフルエンザ A ウイルス RNA 増幅法について

の検討

インフルエンザ A ウイルス(InfAv) RNA を簡便・短時間・大量に増幅する方法の構築を目的とした。プライマーは既知の InfAv の HA 遺伝子の株間で比較的保存されていた領域内に設計し、定温で増幅可能な NASBA 法と TRC 法を用いて各種 InfAv から抽出したウイルス RNA の増幅を試みた。その結果、TRC 法は鋳型 RNA の添加量が少なく増幅効率が低下したが、NASBA 法では新型 H1、季節性 H1、H5 亜型のウイルス RNA を 1 万倍以上の安定した増幅が認められた。高額な機器を必要としない NASBA 法は HA 亜型の異なる少量の InfAv の HA 領域 RNA を短時間で効率良く増幅する方法として有用性の高い事が示唆された。

[藤田 修、宇田晶彦、棚林 清、堀田明豊、山本美江、山田章雄]

(2) 新型インフルエンザウイルス検出のためのハイブリクロマトグラフィー

これまでに病原体を網羅的に検査できるマイクロアレイを開発してきた。この研究成果を応用し、特異性(サンドイッチハイブリダイゼーション)と迅速性(イムノクロマトグラフィー)を組み合わせた新しい遺伝子検出システム『ハイブリクロマト』の構築を試みた。また、短時間かつ一定温度で RNA を増幅できる NASBA 法によりウイルス RNA を増幅してハイブリクロマトを検討した結果、非特異反応が確認されるものの新型インフルエンザウイルスを検出でき、ハイブリクロマトで新型インフルエンザを診断できる可能性が示唆された。

[宇田晶彦、棚林 清、藤田 修、堀田明豊、山本美江、山田章雄]

(3) 鳥インフルエンザウイルスの保存性に関する研究
家禽や野鳥で高病原性鳥インフルエンザが疑われた場合には、簡易キットによる検査に続いて確定検査のために検体を採取し、検査可能な施設へ輸送する必要がある。本研究ではウイルスが安定して保持されるための検体輸送用培地の検討を行った。組織培養用培地、生理食塩水および市販のトランスポート培地に H5N1 亜型ウイルスを添加しその生残性を調べたところ、7 日後の感染価の低下は 20℃ 保存ではやや低下したが 4℃ では安定であった。ウイルス核酸もよく保存されていることがわかった。家禽等の咽頭スワブやクロアカスワブなどの実際の検体に含まれる体液や糞便等の影響についてはさらに検討が必要である。

[山本美江、宇田晶彦、堀田明豊、藤田 修、棚林 清]

SARS-コロナウイルス(CoV)感染 hACE2Tg マウスの肺における初期宿主応答の解析

SARS-CoV 感染後の hACE2Tg マウスの免疫応答や遺伝子応答をを観察することを目的として、hACE2Tg マウスにおける感染前、感染後 2 日目、4 日目の肺から全 RNA 抽出を行った。これらの RNA についてマイクロアレイ解析を行い、SARS-CoV 感染後有意に変動している遺伝子を抽出し、遺伝子機能分類解析を行った。Tg マウスにおいて、感染後 2 日目には感染応答遺伝子群が強く誘導されていた。感染 4 日目ではアポトーシス、免疫抑制遺伝子や一部の炎症関連遺伝子発現量が上昇していた。一方で細胞間シグナルや細胞分化に関わる遺伝子応答関連遺伝子の発現量が減少していた。これらの現象は、SARS-CoV が増殖に伴い免疫抑制効果を発揮していた可能性が示唆された。

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

国際協力

(1) ベトナム国立衛生疫学研究所(NIHE)能力強化計画プロジェクト(JICA)への協力

ベトナム NIHE において、JICA 支援で建設された BSL3 実験室で使用する P3 病原体(結核菌、炭疽菌、狂犬病ウイルス、リケッチア、インフルエンザ)の取り扱いに関わるバイオセーフティ/基準微生物実験技術(SOP)について NIHE と国立感染症研究所(NIID)の各病原体専門家での情報・意見交換、NIHE バイオセーフティ部が作成中のバイオセーフティ教育・研修用 DVD への助言等(SOP の検証、課題抽出、SOP の修正とリスク評価、等)を行った。[篠原克明(バイオセーフティ管理室)、影山 勉(インフルエンザウイルス研究センター)、大野秀明(生物活性物質部)、安藤秀二(ウイルス一部)、井上 智、奥谷晶子(獣医科学部)]

(2) ベトナム国立衛生疫学研究所(NIHE)能力強化計画プロジェクト(JICA)本邦研修への協力

ベトナム NIHE において、JICA 支援で建設された BSL3 実験室で使用する P3 病原体(炭疽菌、狂犬病ウイルス)の取り扱いに関わるバイオセーフティ/基準微生物実験技術(SOP)の研修を NIHE 担当者(炭疽:Pham Thanh Hai、狂犬病:Nguyen Vinh Dong)とともに国立感染症研究所において行った。[奥谷晶子、野口 章、井上 智(獣医科学部)]

1 1. SARS コロナウイルスに関する研究

発表業績一覧

I. 誌 上 発 表

1. 欧文発表

- 1) Suzuki, M., Kimura, M., Imaoka, K. and Yamada, A. Prevalence of *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* in dogs and cats determined by using a newly established species-specific PCR. *Veterinary Microbiology*, doi:10.1016/j.vetmic.2010.01.001 (Available online 18 January 2010)
- 2) Boldbaatar B., Inoue S., Sugiura N., Noguchi A., Orbina J.R.C., Demetria C., Miranda M.E., and Yamada A. (2009) Rapid detection of rabies virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Jpn.J.Infect.Dis.* 62:187-191.
- 3) Kaku Y., Noguchi A., Marsh G.A., McEachern J.A., Okutani A., Hotta K., Boldbaatar B., Fukushi S., Broder C.C., Yamada A., Inoue S., and Wang L.-F. (2009) A neutralization test for specific detection of Nipah virus antibodies using pseudotyped vesicular stomatitis virus expressing green fluorescent protein. *J.Virol.Methods* 160:7-13.
- 4) Inoue S., Boldbaatar B., Sugiura N., Noguchi A., and Park C.-H. 2009. Rabies. In: *Animal Viruses* (Maeda A., ed.). RESEARCH SIGNPOST. (in press).
- 5) Tobiume M., Sato Y., Katano H., Nakajima N., Tanaka K., Noguchi A., Inoue S., Hasegawa H., Iwasa Y., Tanaka J., Hayashi H., Yoshida S., Kurane I., and Sata T. (2009) Rabies virus dissemination in neural tissues of autopsy cases due to rabies imported into Japan from the Philippines: immunohistochemistry. *Pathol.Int.* 59:555-66.
- 6) Russell-Lodrigue, K. E., Andoh, M., Poels, M. W., Shive, H. R., Weeks, B. R., Zhang G. Q., Tersteeg, C., Masegi, T., Hotta, A., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., McMurray, D. N., and Samuel, J. E. *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever. *Infect. Immun.* 77: 5640-5650, 2009
- 7) Park, C-H., Nakanishi, A., Hatai, H., Kojima, D., Oyamada, T., Sato, H., Kudo, N., Shindo, J., Fujita, O., Hotta, A., Inoue, S., and Tanabayashi, K. Pathological and microbiological studies of Japanese hare (*Lepus Brachyurus Angustidens*) naturally infected with *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. *J. Vet. Med. Sci.* 71: 1629-1635, 2009
- 8) Sawabe, K., Tanabayashi, K., Hotta, A., Hoshino, K., Isawa, H., Sasaki, T., Yamada, A., Kurahashi, H., Shudo, C., and Kobayashi, M. Survival of avian H5N1 influenza viruses in *Calliphora Nigrivarbis* (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol.* 46: 852-855, 2009

2. 和文発表

- 1) 山田章雄:動物由来感染症にどう対処するか 田村優 (監) 最新獣医公衆衛生 チクサン出版社 pp60-65 2009
- 2) 山田章雄:家畜からの反逆-BSE・ヒトと動物の共通感染症 林良博、森裕司、秋篠宮文仁、池谷和信、奥野卓司(編)ヒト動物の関係学 第2巻 家畜の文化 岩波書店 2009 pp197-217
- 3) 岸本寿男、山田章雄 監修・著 ズーノーシスハンドブック メディカルサイエンス 2009
- 4) 太田求磨, 加澤敏広, 津畑千佳子, 鈴木道雄, 今岡浩一. *Capnocytophaga canimorsus* による敗血症の1剖検例. *感染症学雑誌*, 83:661-664, 2009
- 5) 今岡浩一, 高橋英之. エルシニア症. in: ズーノーシスハンドブック (岸本寿男, 山田章雄 監修), メディカルサイエンス社, 東京, pp.118-120, 2009
- 6) 今岡浩一. 鼠咬症. in: ズーノーシスハンドブック (岸本寿男, 山田章雄 監修), メディカルサイエンス社, 東京, pp132-133, 2009
- 7) 今岡浩一. ブルセラ症. in: ズーノーシスハンドブック (岸本寿男, 山田章雄 監修), メディカルサイエンス社, 東京, pp.156-158, 2009
- 8) 高橋英之, 今岡浩一. ペスト. in: ズーノーシスハンドブック (岸本寿男, 山田章雄 監修), メディカルサイエンス社, 東京, pp.159-161, 2009
- 9) 今岡浩一. ブルセラ症 一人・家畜・犬一. in: 獣医畜産新報, 文永堂, 62(6): 457-461, 2009
- 10) 内田幸憲, 鎌倉和政, 後藤郁夫, 杉本昌生, 山本和正, 丸山総一, 福士秀人, 今岡浩一, 岸本壽男, 吉川泰弘. 動物病院勤務者の人獣共通感染症にかかわる健康調査. in: 獣医畜産新報, 文永堂, 62(6): pp.487, 2009
- 11) 今岡浩一. 犬, 猫由来細菌感染症. in: 獣医疫学雑誌, 獣医疫学会, 13(1): pp.65-70, 2009
- 12) 鈴木道雄, 木村昌伸, 今岡浩一, 山田章雄. *Capnocytophaga canimorsus* 感染症. in: 獣医畜産新報, 文永堂, 63(3): 217-218, 2010
- 13) 井上 智. (3) リッサウイルス感染症(四類感染症)。6 神経疾患。III 疾患別各論編。東京都 感染症マニュアル 2009. 監修・東京都新たな感染症対策委員会。東京都福祉保険局。262-263, 2009
- 14) 井上 智. 狂犬病 in: ズーノーシスハンドブック (岸本寿男, 山田章雄 監修), メディカルサイエンス社, 東京, pp.41-43, 2009
- 15) 井上 智. リッサウイルス感染症 in: ズーノーシスハンドブック (岸本寿男, 山田章雄 監修), メディカルサイエンス社, 東京, pp.75-76, 2009
- 16) 棚林 清: Bウイルス病(ヘルペス B 感染症) in:

ズーノーシスハンドブック (岸本寿男, 山田章雄 監修),
メディカルサイエンス社, 東京, pp 66-70, 2009

17) 棚林 清: 細菌性赤痢. in: ズーノーシスハンドブ
ック (岸本寿男, 山田章雄 監修), メディカルサイエン
ス社, 東京, pp.130-131, 2009

18) 棚林 清: 腸管出血性大腸菌感染. in: ズーノーシ
スハンドブック (岸本寿男, 山田章雄 監修), メディカ
ルサイエンス社, 東京, pp136-137, 2009

19) 棚林 清: 野兔病. in: ズーノーシスハンドブ
ック (岸本寿男, 山田章雄 監修), メディカルサイエン
ス社, 東京, pp.165-167, 2009

II. 学 会 発 表

1. 国際学会

1) Inoue, S., Kojima, D., Boldbaatar, B., Sugiura, N.,
Noguchi, A. and Park C.-H. Histopathogenesis of paralytic
rabies in mice following inoculation of the CVS-11 strain into
the triceps surae muscle. 43rd joint working conferece on viral
diseases of US-Japan Cooperative Medical Science Program.
20-22 July, 2009. Philadelphia, USA.

2) Orbina, J.R., Saito, M., Kamigaki, T., SDe Guzman, A.,
Inoue, S., Noguchi, A., Manalo, D., Demetria, C., Quiambao,
B., Segubre-Mercado, E., Miranda, M.E., Suzuki, A., Lupisan,
S., Olveda, R., and Oshitani H. Molecular Epidemiology of
Rabies in the Philippines. International Joint Forum on
Infectious Diseases. 16-17 September, 2009. Bangkok,
Thailand.

2. 国内学会

1) 今岡浩一, 野村篤史, 今西一, 木村昌伸, 鈴木道雄,
山田章雄, 志水英明. *Brucella canis* 感染症例とその背景,
事後対応. 第 83 回日本感染症学会総会, 2009 年 4 月、
東京

2) 鈴木道雄, 木村昌伸, 今岡浩一, 山田章雄. イヌ・ネ
コ咬傷感染症原因菌(*Capnocytophaga*, *Pasteurella*)の薬
剤感受性. 第 83 回日本感染症学会総会, 2009 年 4 月、
東京

3) 古谷明子, 吉田里美, 久保綾, 山下麻衣子, 伊藤達章,
鈴木道雄, 大楠清文. 血液培養で陽性シグナルを呈し
なかった *Capnocytophaga canimorsus* による敗血症の 1
例. 第 21 回日本臨床微生物学会, 2010 年 1 月、東京

4) 小嶋大亮, 朴 天鎬, 辻川真太郎, 小原慶子, 野口
章, 小山田敏文, 井上 智. 狂犬病ウイルス (CVS-11)
を脳内接種した BALB/c マウスの脳脊髄に関する病理学
的研究. 第 147 回日本獣医学会学術集会, 2009 年 4 月、

宇都宮

5) 野口 章, 青木憲雄, 佐藤 克, Boldbaatar Bazartseren,
杉浦尚子, 加来義浩, 奥谷晶子, 山田章雄, 井上 智.
飼育犬の狂犬病ワクチン接種による防御抗体産生能. 第
147 回日本獣医学会学術集会, 2009 年 4 月、宇都宮

6) Boldbaatar Bazartseren, Naoko Sugiura, Jun Ryan C.
Orbina, Catalino Demetria, Akira Noguchi, Mary Elizabeth
Miranda, Akio Yamada, Satoshi Inoue. Rapid detection of
street rabies virus by RT-LAMP. 第 147 回日本獣医学会学
術集会, 2009 年 4 月、宇都宮

7) 小嶋大亮, 朴 天鎬, 小原慶子, 杉浦尚子, Boldbaatar
Bazartseren, 佐藤 豪, 野口 章, 畑井 仁, 小山田敏
文, 井上 智. 狂犬病ウイルス (CVS-11) を後肢筋肉内
に接種した C57BL/6J およびヌードマウスの脊髄に関す
る比較病理学的研究. 第 148 回日本獣医学会学術集会,
2009 年 9 月、鳥取

8) 杉浦尚子, Demetria Catalino, Boldbaatar Bazartseren,
Manalo Daria, 小嶋大亮, 朴 天鎬, 野口 章, 加来義
浩, 奥谷晶子, 佐藤 豪, 山田章雄, Quiambao Beatriz,
井上 智. 迅速免疫組織化学とプラスミド免疫抗体を利用
した狂犬病ウイルス簡易検査系の確立. 第 148 回日本
獣医学会学術集会, 2009 年 9 月、鳥取

9) 齊藤麻理子, 井上 智, 神垣太郎, 杉浦尚子,
Boldbaatar Bazartseren, 関塚剛史, 黒田 誠, 鈴木 陽,
押谷 仁. フィリピンにおける狂犬病ウイルスの分子疫
学的検討. 第 50 回日本熱帯医学会大会, 2009 年 10 月、
宜野湾

10) 齊藤麻理子, 井上 智, 神垣太郎, 杉浦尚子,
Boldbaatar Bazartseren, 関塚剛史, 黒田 誠, 鈴木 陽,
押谷 仁. フィリピンにおける狂犬病ウイルスの分子疫
学的検討. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 2009 年
10 月、東京

11) 黒田誠, 芹澤昌邦, 関塚剛史, 奥谷晶子, 坂野聡美,
井上 智. 全ゲノム解読による炭疽菌・キノロン耐性領
域の探索. 第 92 回日本細菌学会・関東支部会, 2009 年
11 月、東京

12) 黒田誠, 芹澤昌邦, 関塚剛史, 奥谷晶子, 坂野聡美,
井上 智. 全ゲノム解読による炭疽菌・キノロン耐性領
域の探索. 第 83 回日本細菌学会総会, 2010 年 3 月、横
浜

13) 坂野聡美, 奥谷晶子, 井上 智, 黒田 誠. 炭疽菌
病原プラスミドにコードされる分泌タンパク質の培養細
胞への影響. 第 83 回日本細菌学会総会, 2010 年 3 月、
横浜

14) 朴 天鎬, 中西 中, 小山田敏文, 佐藤久聡, 進藤
順治, 藤田 修, 堀田明豊, 棚林 清: 野兔病菌(*Francisella*

tularensis)に感染後死亡したノウサギに関する病理学的研究。第147回日本獣医学会学術集会 2009年4月、宇都宮

15) 堀田明豊、棚林 清、山本美江、藤田 修、宇田晶彦、溝口俊夫、進藤順治、朴 天鎬、小山田敏文、畑井仁、工藤 上、山田章雄：国内野生動物からの野兔病菌検出。第149回日本獣医学会学術集会 2010年3月、東京

3. セミナー・講演等

1) 鈴木道雄，木村昌伸，今岡浩一，山田章雄。*Capnocytophaga canimorsus*感染症. 第9回人と動物の共通感染症研究会学術集会, 2009年11月、東京

2) 今岡浩一. 日本におけるブルセラ症の現状: 特別講演. 第47回レプトスピラ・シンポジウム, 2010年3月、東京

3) Inoue S. Research for rabies prevention in Japan. RITM-TOHOKU research collaboration workshop: working towards rabies control in the Philippines. RITM training center, Alabang, Muntinlupa city, the Philippines. April 29-30, 2009.

4) 井上 智。狂犬病の予防(発生を想定した取り組み)。狂犬病予防及び動物愛護関係協議会合同会議。九州地区獣医師会連合会。2009年8月6日、福岡

5) Inoue,S. Rabies. Core Curriculum for Zoonosis Control 2009. Global COE (Center of Excellence) Program “Establishment of International Collaboration Centers for Zoonosis Control”, Global COE program Hokkaido University, Hokkaido, 31 August,

6) 井上 智。狂犬病の発生を想定した取り組みについて。宮崎県獣医師会公衆衛生講習会。宮崎県獣医師会。宮崎県総合保健センター。2009年9月18日、宮崎

7) 井上 智。人獣共通感染症について知る：社会人として知っておいて欲しいズーノシス。早稲田大学、規範科学総合研究所、レギュラトリーサイエンス教育講座(WT221 シラバス (09 後期))。2009年10月29日、東京

8) 井上 智。平成19年に徳島県で開催された狂犬病の国内発生を想定した実地訓練から学ぶ(有事の際に必要な行政対応における課題点とマニュアル整備等の意義)。平成21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。2009年11月6日、東京

9) 井上 智。狂犬病への取り組み(発生を想定した対応策)。外国犬不法上陸防止対策連絡会議。北海道根室保健福祉事務所。2009年、11月11日、根室

10) 井上 智。狂犬病への取り組み(発生を想定した対応について)。平成21年度 獣医職研修(初級)。東京都福祉保健局健康安全部。2009年11月13日、東京

11) 井上 智。海外における狂犬病の現状と課題について(狂犬病への取り組み - 発生を想定した対応について)。狂犬病講演会。福井県獣医師会。2009年12月3日、福井

12) 井上 智。人獣共通感染症-社会人として知っておいて欲しいズーノシス；特別講義。公衆衛生学III。2009年12月17日、東京

13) 井上 智。準量産型解剖手技モデル(犬解剖手技・骨切断モデル)を用いた実技演習。準量産型解剖手技モデル(犬解剖手技・骨切断モデル)の使用に関する技術講習会。2010年2月25日、東京

14) 井上 智。他国における狂犬病の発生について。平成21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。2010年2月26日、東京

15) 井上 智。準量産型解剖手技モデル(犬解剖手技・骨切断モデル)の活用について。平成21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。2010年2月26日、東京

16) 井上 智。準量産型解剖手技モデル(犬解剖手技・骨切断モデル)を用いた実技演習。平成21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。2010年2月26日、東京

17) 棚林 清：野兔病について。衛生微生物技術協議会第30回研究会 平成21年7月10日、堺

18) 棚林 清：動物由来感染症。平成21年度獣医師高度技術研修事業。東京大学動物医療センター 平成21年12月4日、東京

19) 棚林 清：人獣共通感染症について－話題の感染症と今後の課題－。平成21年度岩手県獣医師会研修会 平成22年2月27日、盛岡

20) 棚林 清：鳥インフルエンザウイルスの病原性の違いについて：平成21年度動物の輸入届出業務に係る担当者会議 平成22年3月5日、東京