

F. 公衆衛生学分科会

シンポジウム

3月31日(月) 9:00~12:00 第6会場

リスクアナリシスにおける獣医学の役割

F-S-1-5

3月31日 9:00-12:00

熊谷進 (東大) 源宣之 (岐阜大)

F-S-1 リスクアナリシスにおける獣医学の役割 - 司会の言葉

熊谷進¹、源宣之²

(¹東大・院農生、²岐阜大・農学部)

F-S-2 感染症新法の制定とその後の経緯

吉川泰弘¹

(¹東大・農)

F-S-3 狂犬病予防におけるリスク管理 / 海外からの侵入に備えた危機管理マニュアル策定等の経緯

井上智¹、中嶋健介²

(¹感染研・獣医科学、²厚労省・結核感染症課)

F-S-4 食品添加物のリスクアナリシス

津田修治¹

(¹岩手大学)

F-S-5 動物用医薬品・残留農薬のリスクアナリシス

三森国敏¹

(¹農工大・獣医病理)

一般口演

3月30日(日) 10:00~12:00 第6会場

F-1-12

3月30日 10:00-10:20

丸山総一 (日大)

F-1 カラス腸内細菌の分離・同定

有路優子¹、杉田昭栄²、足立吉数¹、小川恭喜¹

(¹茨城大学農学部動物保健衛生学研究室、²宇都宮大学農学部動物機能形態学研究室)

F-2 食肉における黄色ブドウ球菌汚染~最近の動向

北井智¹、清水晃¹、河野潤一¹、山下賢司¹、安田亮¹、飯島想¹、塚本梓¹、福原大典¹

(¹神戸大・農)

3月30日 10:20-10:40

加藤行男 (麻布大)

F-3 豚の肺病変からのサルモネラの分離

並松孝憲¹、大角貴幸¹、浅井鉄夫¹、新沼伸吾¹、佐藤静夫¹

(¹全農家畜衛研)

F-4 The presence of common antigen among 54 serotypes of Salmonella

Begum Ferdousi¹、小川恭喜¹、足立吉数¹

(¹茨城大学農学部)

3月30日 10:40-11:10

三澤尚明 (宮崎大)

F-5 *Bartonella henselae* *sucB* 遺伝子のクローニング

平野晃司¹、壁谷英則¹、丸山総一¹、見上彪¹

(¹日大・獣医公衆衛生)

F-6 生乳の黄色ブドウ球菌汚染と毒素遺伝子型の経時的变化
本多みのり¹、重茂克彦¹、品川邦汎¹ (¹岩手大・微生物)

F-7 *Listeria monocytogenes* 汚染の分子疫学に関する基礎的研究
4. 食肉とヒト由来血清型 1/2a 株における *iap* 遺伝子の構造解析
勇上恭子¹、小笠原邦敏²、山田文也³、庄司紘史⁴、落合由嗣¹、植田富貴子¹、本藤良¹
(¹日獣大・獣医公衆衛生、²横浜検疫検査センター、³埼玉衛研、⁴久留米大・医)

3月30日 11:10-11:30

菊地直哉 (酪農大)

F-8 松本で分離された人の腸管スピロヘータの形態の差による遺伝学的相違に関する研究
中村修一¹、吉澤明彦²、平根亜希子¹、足立吉数¹ (¹茨城大動物保健、²信大医)

F-9 胃腸障害を持つヒト腸内からの腸管スピロヘータ菌の分離と 16 S rDNA 塩基配列解析による同定
平根亜希子¹、吉澤明彦²、足立吉数¹
(¹茨城大学農学部動物保健衛生学研究室、²信州大学医学部中央検査部病理)

3月30日 11:30-12:00

片岡康 (日獣大)

F-10 沖縄県で分離された豚赤痢スピロヘータの薬剤感受性
上里華代¹、金城英企²、足立吉数¹
(¹茨城大学農学部動物保健衛生学研究室、²沖縄県、³茨城大学農学部動物保健衛生学研究室)

F-11 各種食肉や魚介類などから分離された *Erysipelothrix* 属菌の薬剤感受性
Okatani Alexandre T¹、本山さやか¹、堀坂知子¹、堀北哲也¹、林谷秀樹¹ (¹農工大・家畜衛生)

F-12 家畜由来フルオロキノロン耐性サルモネラの耐性機構
江寄英剛¹、小島明美¹、石原加奈子¹、白木早苗¹、田村豊¹、高橋敏雄¹ (¹農水省・動薬検)

3月31日(月) 15:00~16:40 第6会場
F-13 - 22

3月31日 15:00-15:30

植田富貴子 (日獣大)

F-13 ブチルスズ及びフェニルスズ化合物の代謝と毒性
上野俊治¹、柏本孝茂¹、宮下竜一¹、田中こずえ¹、諏佐信行¹、鈴木隆²
(¹北里大・獣医公衆衛生、²京都府大)

F-14 ディーゼル排気中の血管・心筋に作用する化学物質について
鈴木明¹、戸田典子¹、机直美²、局博一²
(¹国環研・PM2.5・DEP 研究プロジェクト、²東大院・農学生命・比較病態)

F-15 ディーゼル排気粒子 (DEP) から分離した化学物質のエストロゲン様作用
古田千恵¹、鈴木明²、李春梅¹、渡辺元¹、田谷一善¹
(¹東京農工大・農・家畜生理、²国環研・PM2.5・DEP プロジェクト)

3月31日 15:30-15:50

松本芳嗣 (東大)

F-16 わが国で分離された *B. microti* 様原虫のヒメネズミへの感染試験
座本綾¹、坪井千絵子¹、辻正義¹、石原智明¹ (¹酪農大・獣医)

- F-17 わが国で検出された *Babesia divergens* 様原虫の α -tubulin 遺伝子に基づく系統解析
辻正義¹、座本綾¹、石原智明¹、J. S. Gray²、P. J. Holman³
(¹酪農大・獣医、²Univ. Dublin、³Texas A&M Univ)

3月31日 15:50-16:10

杉山誠 (岐阜大)

- F-18 ダニ媒介性脳炎ウイルスのエンペロープ糖蛋白の糖鎖欠損がウイルス粒子形成に与える影響
後藤明子¹、好井健太郎¹、小原真弓¹、植木智隆¹、水谷哲也¹、苅和宏明¹、高島郁夫¹
(¹北大・院・獣医・公衆衛生)

- F-19 ウェストナイルウイルス(WNV)NY株および Eg101株のマウスにおける病原性の比較
白戸憲也¹、木村享史²、水谷哲也¹、苅和宏明¹、高島郁夫¹
(¹北大・院・獣医・公衆衛生、²北大・院・獣医・比較病理)

3月31日 16:10-16:40

苅和宏明 (北大)

- F-20 A群動物口タウイルスの感染抗体を検出する発現 VP8 蛋白質を用いたラテックス凝集試験の開発
杉山誠¹、鈴岡宣孝¹、山吉誠也¹、伊藤直人¹、源宣之¹ (¹岐阜大・獣医公衆衛生)

- F-21 インドネシアにおける狂犬病ウイルスの分子疫学
ヘルスセティア¹、杉山誠²、伊藤直人²、源宣之²
(¹岐阜大・連合獣医学研究科、²岐阜大・獣医公衆衛生)

- F-22 免疫鶏卵法で作製した抗狂犬病ウイルスリコンビナント蛋白 IgY の反応性と有用性
本井ゆり恵¹、井上智⁴、井上さやか²、八田一²、佐藤こずえ¹、森本金次郎³、山田章雄⁴
(¹岐阜連大、感染研・獣医、²京都女子大、³感染研・ウ1部、⁴感染研・獣医)

F-S-1 リスクアナリシスにおける獣医学の役割 —司会の言葉

熊谷進¹、源宣之²
(¹東大・院農生、²岐阜大・農学部)

コーデックス（FAO/WHO 合同食品規格計画）において、国際的な食品の規格やガイドラインの調和と透明性を推進するためにその導入が図られてきたリスクアナリシスの枠組みは今や各国に浸透し、食品に伴うリスクの回避に徐々にではあるが着実に適用されてきている。国際的に了解されているリスクアナリシスは、リスクを科学的に推定する過程であるリスクアセスメント、リスク軽減化の実行または管理方策構築の過程であるリスクマネジメント、消費者や食品製造者などとリスクアセッサーやリスクマネージャーとの相互的な情報伝達の過程であるリスクコミュニケーションから構成される。1995年に、食品規格へのリスクアナリシスの適用に向けて開催されたFAO/WHO 専門家会議の報告書「Application of risk analysis to food standards issues」が公表され、以来、微生物学的リスクアセスメントやリスクマネジメントに関する専門家会議等による国際的な導入に向けての助言あるいはガイダンスの文書がいくつか公表されてきた。しかし、リスクコミュニケーションのあり方や方法、様々な危害因子に対応したリスクアセスメントの方法、リスクアナリシスの枠組みを実現する体制のあり方など、今後詰めていくべき問題が国際的にも山積している。こうした中、ヒトの健康リスクの軽減に向けた研究を推進し、リスクアナリシスを発展させるにあたって、ズーノーシスと食品衛生の担い手である獣医学が果たすべき役割は極めて大であると考えられる。本シンポジウムでは、ズーノーシスと化学物質のリスクとの関わり方の観点から4名の演者に話題を提供していただき、それを踏まえて獣医学の役割についての認識と考え方を深めた。

F-S-3 狂犬病予防におけるリスク管理/海外からの侵入に備えた危機管理マニュアル策定等の経緯

井上智¹、中嶋健介²
(¹感染研・獣医科学、²厚労省・結核感染症課)

我が国は半世紀近く狂犬病が発生していない稀少な国の一つですが、海外では年間45万人のヒトが狂犬病で死亡しており多くの国々がいまだに狂犬病流行国です。隣国であるアジア諸国ではイヌの狂犬病を制圧しておらず、欧米、南米、アフリカではイヌ以外にキツネ、アライグマ、スカンク、コヨーテ、コウモリ、マンガースといった野生動物で狂犬病が流行しています。これまで、国内の狂犬病予防対策は狂犬病予防法に基づく輸入検査、犬の登録と狂犬病予防注射、未登録・未注射犬の捕獲抑留などの強い推進によって行われて来ました。2000年には狂犬病予防法が改正されて輸入検査の対象動物にイヌに加えてネコ、アライグマ、キツネ、スカンクが加えられて野生動物の輸入による狂犬病の国内侵入阻止が強化されました。しかしながら、狂犬病が発生した際には感染経路の疫学調査や狂犬病感染動物との接触者調査など、国と地方自治体、厚生労働省と農林水産省といった組織間の密接な連携が必要となります。狂犬病が長期間発生していない我が国では、国民はもとより国及び自治体職員、獣医師、医師等において本感染症に対する知識と情報が十分に行き渡っていないことが指摘されるようになり、狂犬病発生時において迅速・適切に組織的な対応を取るためのガイドライン案を国内の狂犬病研究者、国及び地方自治体職員等からなる研究班がまとめて、後に関係機関からの意見を踏まえて厚生労働省から危機管理マニュアル（狂犬病対応ガイドライン2001）として作成されました。今回、ガイドライン策定参加者として、現在の国内外における狂犬病に関する状況を紹介しながら、ガイドラインの紹介とともに狂犬病予防におけるリスク管理について考察します。

F-S-2 感染症新法の制定とその後の経緯

吉川泰弘¹
(¹東大・農)

動物由来感染症、zoonosis はギリシャ語の zoon(動物)と nosos(病気)を連結した英語で人畜共通伝染病、人畜共通感染症、人獣共通感染症などと訳されているが、厚生省はヒトの立場から動物由来感染症と定義している。動物由来感染症は1)現在日本では発生はみられないが重要であり、輸入時に検査等の対応により侵入防止対策を取る必要のあるものと、2)既に国内に侵入しており輸入時の検査及び国内の対策が必要であるものがある。この点に関し平成9年、伝染病予防部会・基本問題検討小委員会、zoonosis ワーキンググループ(WG)専門家による検討が進められた。これらを含めた感染症新法すなわち「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」と「狂犬病法及び狂犬病予防法の一部を改正する法律」は平成10年10月2日の官報に掲載された。また12月28日に政令で指定動物と対象感染症(サル類のエボラ、マールブルグ)、狂犬病予防法の改訂に関連する対象動物(ネコ、キツネ、スカンク、アライグマ)が明示された。しかし、これらはいずれも上述の1)のうち限られた感染症を対象にしたものであり、ワーキンググループが問題とした2)の人獣共通感染症については据え置かれた。新感染症法の5年見直しをうけて、平成14年7月、感染症分科会にWGが設置され、前回の法制定後に出現した感染症、前回輸入規制対象にならなかった翼手目、齧歯類、鳥類などについて、リスク分析を導入し、新たな法整備を検討している。この点について、経緯と進捗状況を説明する。

F-S-4 食品添加物のリスクアナリシス

津田修治¹
(¹岩手大)

食品添加物の国際的な規制として、安全性に関しては、食糧農業機関(FAO)と世界保健機関(WHO)が、FAO/WHO 合同添加物専門家委員会(JECFA)を設け、安全性の評価を行っている。JECFAは、毎年、各国の専門家が集まり、各国で実施された試験データを用いて、添加物に関する安全性の試験結果を評価し、安全性に問題がないと認められた場合に、ADIを設定する。また、添加物の安全性評価に関して、5段階にランク付けがされている。安全評価が終了し、ADIを正式に設定されたものはA1にランクされ、国際的に広くその使用が認められる。わが国で新たに添加物を指定する場合は、原則としてFAO/WHOで安全性の評価が終了し、A1のランクに分類されており、国際的に広く使用が認められているものを対象としている。手順としては厚生労働大臣は、添加物を新たに指定する場合は、諮問機関である薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会にはかる。薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会は、安全性、有用性、必要性などについて科学的に検討し、審議結果を厚生労働大臣に答申する。厚生労働大臣はこの意見をきいて指定する。なお、添加物の指定や削除などの変更を行うときは、事前に世界貿易機関(WTO)の加盟各国に通告(WTO通報)して、了解を得る。既に指定されている添加物についても、年々、科学技術が進歩するので、最新の科学水準により、必要に応じて再評価が行われている。これらについて概説するとともに、各国での使用が異なり、発癌等その安全性に関して学問的にさらに精査する必要があると思われるものがあるなどの問題についても例を挙げて言及する。

F-S-5 動物用医薬品・残留農薬のリスクアナリシス

三森国敏¹
(¹農工大・獣医病理)

食品中には、微量ではあるが、農薬や動物用医薬品(動物薬)が残留基準値以下の濃度で含まれている。これらの化学物質は、残留基準値以下であれば食品中に含まれていてもヒトへの安全性は担保できるとの国際連合の食品規格委員会(CAC)の考えに基づき、微量の残留が許容されている。これらの基準値を設定するためには、以下のような安全性評価が JECFA および JMPR でなされている。まず、許容一日摂取量(ADI)が求められる。ADI は、変異原性・発癌性が陰性の場合、各種の毒性試験成績を総合的に評価して実験動物に対する無毒性量(NOAEL)を求め、それに安全係数で除して、ADI が算出される。次のステップとしては、最大残留基準値(MRL)の設定が実施される。農薬についての MRL は、適正農業規範に基づいて散布された場合に作物に残留する濃度を越えない量として設定されている。動物薬については、残留物がすべて抽出可能な場合と抽出が不可能な結合型残留物が多く含まれる場合で異なるが、その食品内残留値や分析限界値を考慮した上で MRL が設定される。さらに、設定された MRL が公衆衛生上受け入れられるか否かを決定するために、理論的 maximum 一日摂取量(TMDI)を用いた暴露評価が行われる。農薬の場合、ある食品中の残留農薬の摂取量は、その食品中の残留値にその食品の消費量を乗じ、その残留物を含有する全ての食品由来の摂取量を合計して残留農薬の食品に由来する全摂取量が算定される。この TMDI と ADI を比較し、TMDI が ADI より少ない場合、これらの農薬や動物薬の食品中における MRL の設定は適切とみなされ、これらの化学物質が食品中に含まれていても安全であるとの決定がなされる。

F-1 カラス腸内細菌の分離・同定

有路優子¹、杉田昭栄²、足立吉数¹、小川恭喜¹

(¹茨城大学農学部動物保健衛生学研究室、²宇都宮大学農学部動物機能形態学研究室)

現在カラスは人間と非常に密接な関係のある野鳥であり、東京都内のカラス生息数は3万7千羽と考えられている。本研究ではカラスの総排泄肛より採取した糞便と盲腸内容物から腸内細菌を分離・同定し、カラス保有菌による人獣共通感染症の伝播の危険性について検討した。【材料および方法】ハシブトガラス33羽の総排泄肛より採取した糞便(スワブ)と、12羽の盲腸内容物を $10^1 \sim 10^6$ 倍希釈した液をそれぞれトリプチケース・ソイ寒天培地、DHL寒天培地およびMLCB寒天培地に塗布し好氣的に培養し、羊血液寒天培地、スペクチノマイシン添加羊血液寒天培地に塗布し嫌氣的に培養し、糞便と盲腸内容物 10^1 希釈液1mlをハーナ・テトラチオン塩基基礎培地に接種し24時間ならびに48時間培養後DHL寒天培地に塗布し好氣的に培養した。そこから分離されたコロニーをグラム染色すると同時にTSI寒天培地を用いてブドウ糖、乳糖および白糖分解性、ならびにブドウ糖からのガス産生、硫化水素産生、オキシダーゼテスト、カタラーゼテストを行なった後API20Eによって菌の同定を行った。【結果および考察】48のサンプルから *Escherichia coli*、*Proteus mirabilis*、*Klebsiella(K) pneumoniae*、*K. oxytoca*、*Enterobacter(E) aerogenes*、*E. cloacae*、*E. agglomerans* がそれぞれ14/48、13/48、10/48、1/48、5/48、4/48、1/48の割合で検出された。以上の結果から病原性の可能性のある菌が分離されており、カラスが人獣共通感染症伝播の役割を担っている可能性が示唆された。

F-3 豚の肺病変からのサルモネラの分離

並松孝憲¹、大角貴幸¹、浅井鉄夫¹、新沼伸吾¹、佐藤静夫¹

(¹全農家畜衛研)

【目的】わが国ではサルモネラによる豚の肺炎について、あまり調査されていない。今回、養豚場で飼育中の豚と、と畜場へ出荷された豚の肺病変からサルモネラの分離を行ったので報告する。

【材料と方法】2002年4月から12月までの間に60農場で飼育されていた豚の肺病変部133検体、と畜された豚の肺病変部446検体(100農場)を供試した。サルモネラの分離は肺病変部をDHL寒天培地にスタンプし実施した。分離菌は血清型特異的な病原性プラスミドの保有を第132、133回本学会で報告したPCR法により調べた。また、平板希釈法により抗生物質に対するMICを求めた。

【結果と考察】農場由来の検体では60農場133検体のうち、5農場(8.3%)7検体(5.3%)からサルモネラが分離されたが、と畜場由来の全ての検体からは分離されなかった。分離株の血清型は、4株(2農場)が *Salmonella* Typhimurium (ST) 3株(3農場)が *S. Choleraesuis* (SC)であった。全株とも病原性プラスミドを保有していた。薬剤感受性を調べたところ、全ての株が8薬剤中3薬剤以上に耐性を示したが、エンロフロキサシンに対する耐性株は認められなかった。

飼育中の豚においてのみ病原性プラスミドを保有するSTおよびSCが、低率ではあるが肺病変部から分離されたことから、肺炎へのサルモネラの関与も考えられた。しかし、これまで我々が検査したSTによる敗血症で死亡した豚においても、肺から高率に分離されることから、サルモネラが肺病変部に存在するのは、敗血症との関連も考えられるので、今後の検討が必要である。

F-2 食肉における黄色ブドウ球菌汚染～最近の動向

北井智¹、清水晃¹、河野潤一¹、山下賢司¹、安田亮¹、飯島想¹、塚本梓¹、福原大¹

(¹神戸大・農)

【目的】乳肉などの動物性食品における黄色ブドウ球菌の汚染はときに社会的に重大な影響を与える。今回、我々は市販食肉の本菌汚染状況について広範囲な国内調査を行ったのでその成績について報告する。【材料と方法】調査期間は2002年5月～10月で、鶏肉(精肉、手羽、内臓)は12道府県の53店舗で市販されていた178検体、豚肉と牛肉はそれぞれ2府県各20店舗の40検体を供試した。なお、1トレイパックを1検体とした。菌分離は肉表面全体を滅菌綿棒でこすり、3%卵黄加マンニト食塩培地に塗抹し(直接法) また上記綿棒を7.5%食塩加HIブイヨンに入れ、増菌後、その1白金耳量を上記の卵黄加培地に塗抹した(増菌法)。菌同定は常法に従った。【結果と考察】菌検出率は直接法で鶏肉39.3%、豚肉2.5%、牛肉2.5%で、増菌法では検出率は著しく上昇し、それぞれ70.2%、27.5%、32.5%であった。鶏肉273株中158株(57.9%)がDevrieseの生物型のPoultry型に属し、次いでK+ - CV: A型55株、K- + CV: C型21株、Human型18株、K- - CV: C型12株、K- + CV: A型8株、Ovine型1株であった。豚肉(13株)ではK- + CV: A型4株、Human型3株、PoultryとK+ - CV: A型各2株、K+ + CV: A型とOvine型各1株で、牛肉(17株)はK+ - CV: A型10株、Human型3株、K- + CV: A型2株、PoultryとK- - CV: C型各1株であった。菌検出率は、鶏肉では極めて高率で、豚肉、牛肉では比較的低率であり、従来の成績と同じ傾向にあった。最近、薬剤耐性菌の食肉汚染が注目されているが、分離株の薬剤感受性やエンテロトキシン産生性などについては現在検討中である。

F-4 The presence of common antigen among 54 serotypes of Salmonella

BegumFerdousi¹、小川恭喜¹、足立吉数¹

(¹茨城大学農学部)

Salmonella causes a wide variety of disease and the syndrome in different animals, birds including humans beings and it remains as a big problem with public health significance throughout the world. A suitable vaccines or suitable diagnostic techniques system are not still available. A common protein from 54 serotypes were detected by SDS PAGE and Western blotting technique. The protein band of 36.5kDa was heavy and in common among the 54 serotypes and were confirmed by Western blotting using chicken antiserum. We are analysing the protein sequencing, whether the protein with the molecular size of 36.5kDa is same among the serotypes.

F-5 *Bartonella henselae* *sucB* 遺伝子のクローニング

平野晃司¹、壁谷英則¹、丸山総一¹、見上彪¹
(¹日大・獣医公衆衛生)

【目的】*Bartonella henselae* は猫を病原巣とする人獣共通感染症である猫ひっかき病の原因菌である。本症の血清診断には現在、間接蛍光抗体法(IFA)が用いられているが、*Chlamidia* 種や *Coxiella burnetti* との交叉反応が問題となる。本研究では *B. henselae* 感染症の血清診断に用いる特異性の高い抗原の確立を目的として、*B. henselae* 特異抗原遺伝子の単離を試みた。【方法】実験には *B. henselae* 標準株である Houston-1 株を用いた。またゲノムライブラリーの作製には ZAP Express Predigested Gigapack Cloning Kits を用いた。作製したライブラリーを、*B. henselae* 免疫マウス血清を用いてイムノスクリーニングを行うとともに、強い反応を示したクローンの塩基配列を決定した。【結果】イムノスクリーニングにより 2 つの陽性クローン (B.H.HousC1、C3) を単離することができた。FASTA による検索の結果、1 つのクローン (B.H.HousC1) はすでに報告されている 17 k Da の蛋白をコードしていた。もう 1 つのクローン (B.H.HousC3) の領域遺伝子は、*Brucella melitensis* 及び *C. burnetti* の dihydrodipolipamide succinyltransferase (*sucB*) とそれぞれ 64.2% 及び 54.5% の相同性を示す遺伝子をコードしていた。*B. henselae* *sucB* の ORF は 1,164 b.p. であり、388 アミノ酸残基をコードすると推定された。次に、*B. henselae* *sucB* ORF を発現する組換え大腸菌と、IFA で陽性を示した *B. henselae* 自然感染猫血清を用いて、ウエスタンブロットティングを行ったところ、約 113.4 k Da (融合蛋白質の Tag 領域は 63.4 k Da) のバンドが検出された。これより、*B. henselae* *Suc B* は、*B. henselae* 感染猫に対して抗原性を有する分子の 1 つであることが明らかとなった。

F-7 *Listeria monocytogenes* 汚染の分子疫学に関する基礎的研究 4. 食肉とヒト由来血清型 1/2a 株における *iap* 遺伝子の構造解析

勇上恭子¹、小笠原邦敏²、山田文也³、庄司紘史⁴、落合由嗣¹、植田富貴子¹、本藤良¹
(¹日大・獣医公衆衛生、²横浜検疫検査センター、³埼玉衛研、⁴久留米大・医)

【目的】ヒト・リステリア症および食肉汚染由来 *Listeria monocytogenes* (L.m)・血清型 1/2a 株について *iap* 遺伝子内・多型領域のゲノム構造の特性を解明し、その分子疫学的解析を試みた。【材料と方法】1) 検体：血清型 1/2a、ヒト・リステリア症由来 3 株 (敗血症患者の動脈血由来 HM1 株と糞便由来 HM2 株、髄膜炎患者の髄液由来 12H 株) および食肉由来 17 株 (8 店舗；牛、豚、鶏由来) の合計 20 株から抽出した DNA。2) 分子疫学的解析：各菌株・抽出 DNA の制限酵素切断解析による株間の識別、および *iap* 領域内 407bp の塩基配列の構造特性から解析した。【成績と考察】1) 制限酵素切断解析では、同一症例由来 HM1 と HM2 株が同一で、症例の異なる 12H 株とは異なるパターンを示した。敗血症由来の HM1 と HM2 株は、同一店舗で検体採取年度の異なる豚肉由来株 (11P1) および鶏肉由来株 (80C1) と同一パターンを示した。髄膜炎症例由来 12H 株は、異なる店舗で分離された鶏肉由来の 2 株 (186C1、188C3) と同一のパターンを示した。また、食肉由来株間では同一店舗、異なる店舗由来株 (A 店：76P2、78P5、89C5 株、B 店：183P1 株、G 店：312B1 株、および A、B、C、E 店：104P5、213C1、221C1、268C1 株) 間でも同一の泳動パターンが得られた。2) 塩基配列の構造特性では、0~9 点の変異、6 塩基の挿入 (AATACA) および 6 塩基を単位とする反復数 1~5 回の反復配列構造の局で 9 群に分類された。以上の成績から、地域常在株のゲノム構造の特性を明らかにした。また、ヒト・リステリア症の感染様式に地域常在汚染と汚染食肉の関与が示唆された。

F-6 生乳の黄色ブドウ球菌汚染と毒素遺伝子型の経時的変化

本多みのり¹、重茂克彦¹、品川邦汎¹
(¹岩手大・微生物)

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は食中毒の原因菌であると共に、乳房炎起因菌としても重要である。本研究では、生乳中の *S. aureus* 汚染状況を把握するために、各生産農家から集乳したローリー車別乳、各農家 (バルククーラ) から採取した生乳中を経時的に調べた。さらに、これらから分離された菌株について SE 遺伝子 (*se*) 保有状況を Multiplex PCR 法を用いて調べた。2001 年 8 月から 2002 年 9 月まで 4 回、集乳ローリー車および各農家バルククーラからの生乳を調べた結果、ローリー乳の *S. aureus* 汚染は、4 回のいずれの調査でも高率 (84.6~91.9%) であり、その菌数も 10^2 ~ 10^6 cfu/ml のものが多く認められた。各農家バルク乳の *S. aureus* 汚染率は 29.7~35.5% であり、その菌数も 10^2 ~ 10^4 cfu/ml のものが多く認められた。各搾乳牛から採取した生乳中の本菌の汚染は 13.9~28.6% であり、菌数は 10^2 cfu/ml 以上のものが多く、中には 10^6 cfu/ml 以上を示した。これらの結果から生乳全体の汚染は一部の農家および一部の牛が原因となっていると考えられる。また、*se* 遺伝子保有株はローリー乳分離株では 253 株中 117 株 (46.2%)、バルク乳分離株では 165 株中 83 株 (50.3%) であった。もっとも多い遺伝子型は *seg+sei* であった。*sea~see* 保有株はローリー乳分離株で 35 株 (13.8%)、バルク乳分離株で 23 株 (13.9%) みられた。今後、これら *se* 保有菌株のヒト食中毒およびウシ乳房炎との関連について検討が必要がある。

F-8 松本で分離された人の腸管スピロヘータの形態の差による遺伝学的相違に関する研究

中村修一¹、吉澤明彦²、平根亜希子¹、足立吉數¹
(¹茨城大動物保健、²信大医)

目的：人の腸管スピロヘータはその分離が非常に困難とされている。1982 年に初めてデンマークで分離されその後最近、私どもが分離したのが 2 回めであり、それと同じくしてスカンジナビアでもきんが分離されている。しかし、分類学的には不明の点が多くさらなる遺伝的解析が必要である。また様々なころに作られることも知られているがこのコロニーの差と遺伝的解析は行われていない。さらにそれらコロニーの内形態学的に異なるスピロヘータが見つかったがこの異なる形態を持つスピロヘータの間の遺伝学的解析は興味深い。そこでこれら形態の異なるスピロヘータの遺伝的、及び菌体蛋白質の解析を目的に研究を行った。材料及び方法：供試菌株としては *Brachyspira* (B.) 属の NCTC11492、ATCC27164、ATCC29796、C2 及び松本で分離された 6 菌株ならびに岩手で人から分離された 1 株を用いた。SDS-PAGE は Ochiai ら (1997) の方法に従った。16S rribosomal DNA の解析は Ochiai ら (1999) に従った。結果及び考察：SDS-PAGE の結果から松本で分離された大型のスピロヘータと小型のスピロヘータの間でその泳動パターンに違いが認められた。また、岩手で分離された人の腸管スピロヘータとも大きく異なっていた。さらに抗 *B.aalborghi* 抗体を用いたウエスタンブロットティングでも大型と小型の間に違いが認められ、岩手で分離された腸管スピロヘータとも異なっていた。遺伝的解析として *B.hyodysenteriae* から作られたプライマーを用いて、増幅された 16SrDNA の遺伝的解析を実施中である。これら人からの分離菌株は *B.aalborghi* 特異のプライマーで増幅され、*B.pilosicoli* 特異のプライマーでは増幅されないことから *B.aalborghi* に近い菌種と考えられた。

F-9 胃腸障害を持つヒト腸内からの腸管スピロヘータ菌の分離と16SrDNA塩基配列解析による同定

平根亜希子¹、吉澤明彦²、足立吉数¹

(¹茨城大学農学部動物保健衛生学研究室、²信州大学医学部中央検査部病理)

人の腸管スピロヘータ菌は、難治性疾患で頻繁に起きる下痢に関与すると考えられている。人からの分離は Hovind - Hougenら(1982)が最初で、以後報告がなかったが、2000年、Fellstromらによって分離され、日本では Adachi らが分離するのに成功している。日本で最初に分離された人の腸管スピロヘータ菌は、*Brachyspira aalborgi* に類似ではあったが、遺伝的分析の結果がそれとは異なることから、新しい種として *B.ibaraki* と提唱した。本実験では、人からのスピロヘータ菌の分離を試み、その同定を 16SrDNA 塩基配列の解析によって行った。【材料及び方法】ポリープ患者の腸管から採取した 8 サンプルからの分離培養を試みた。それらのサンプルをトリプチケースソイ液体培地に浮遊・攪拌後、0.1ml をスペクチノマイシン 400 µg/ml 加血液寒天培地に塗布し、37 °C でガスバックシステムを用いて 2 ~ 3 週間培養した。その後数代継代し、その中からコロニー形態に特徴的なもの 15 コロニーを選出し、16SrDNA 領域を PCR によって増幅した後、キャピラリー型シーケンサーを用いて塩基配列の解析を行なった。【結果及び考察】分離培養の結果、少なくとも 3 種類のコロニーが確認された。これらのコロニーを指標として選出した 15 コロニーのうち、8 コロニーの 16SrDNA シークエンスを行い、各基準株との相同性を調べた結果、*B.aalborgi*NCTC11492 とは 99.3 ~ 99.7 %、*B.hydysenteriae*ATCC27164 とは 96.2 ~ 96.7 %、*B.pilosicoli*P43 / 6 / 78T とは 95.4 ~ 95.8 % であった。以上の結果より、今回分離された菌は *B.aalborgi* かそれに類似した種であると推測される。なお、残り 7 サンプルも同様に解析し、さらに塩基配列の相異部分について検討して行く予定である。

F-11 各種食肉や魚介類などから分離された *Erysipelothrix* 属菌の薬剤感受性

Okatani Alexandre T¹、本山さやか¹、堀坂知子¹、堀北哲也¹、林谷秀樹¹

(¹農工大・家畜衛生)

我々は、我が国の豚肉、鶏肉、野生動物肉など市販食肉や魚介類などの食品が *Erysipelothrix* 属菌によって高率に汚染されていることを報告してきたが、これら食品から分離される菌株の薬剤感受性を調べた報告はみられない。本研究では、市販食肉や魚介類などから分離された *Erysipelothrix* 属菌について各種抗生物質に対する薬剤感受性を調べ、耐性菌の出現状況などについて検討した。【材料及び方法】供試菌株として *E.rhusiopathiae*153 株、*E. tonsillarum*20 株および血清型同定不能の *Erysipelothrix* 属菌 27 株の計 200 株を用いた。薬剤感受性試験は日本化学療法学会標準法に準拠し、寒天平板希釈法により実施した。供試した抗生物質はアンピシリン(ABPC)、エリスロマイシン(EM)、キタサマイシン(KT)、オキシテトラサイクリン(OTC)、オキシリン酸(OA)、クロラムフェニコール(CP)、チアンフェニコール(TP)、セファゾリン(CEZ)、カナマイシン(KM)、スルファキノキサリン(SQ)の計 10 薬剤である。【結果】1. 供試 200 菌株中 17 株(8.5%)が OTC に、6 株(3%)が EM に対して耐性であった。2. 由来別では鶏・鶏肉由来の 12 株(15%)が OTC に、6 株(7.5%)が EM に、猪・鹿肉由来の 4 株(6.7%)ならびに魚介類由来の 1 株(1.7%)が OTC に耐性を示した。3. 抗生物質に対する耐性菌の出現状況は菌株の由来によって異なり、特に鶏・鶏肉由来株では OTC と EM に対する耐性菌出現率が高かった。

F-10 沖縄県で分離された豚赤痢スピロヘータの薬剤感受性

上里華代¹、金城英企²、足立吉数¹

(¹茨城大学農学部動物保健衛生学研究室、²沖縄県、³茨城大学農学部動物保健衛生学研究室)

【目的】豚肉生産において、豚赤痢スピロヘータによる下痢症、削瘦、突然死の発生は肉量低下を引き起こし、養豚農家に経済的損失を与えている。そこで、沖縄県で飼育されている豚から豚赤痢スピロヘータの分離を試み、その分離菌株の各種抗菌剤に対する薬剤感受性試験を実施した。【材料及び方法】菌株は昨年に沖縄県で豚の腸内容物から分離したスピロヘータ 37 株を用いた。薬剤感受性試験は寒天平板希釈法で行ない、最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。薬剤としては、カルバドックス、チアムリン、リンコマイシン、ペニシリン G、アンピシリン、クロラムフェニコール、オキシテトラサイクリン、ロイコマイシン、タイロシン、エリスロマイシン、オレアンドマイシン、スピラマイシン、ストレプトマイシン、セデカマイシン、テルデカマイシン、アピラマイシンの 16 種類の抗菌剤を用いた。【結果及び考察】カルバドックスは最も活性があり、MIC 値は 0.003 µg/ml で耐性菌の存在は認められなかった。チアムリン、ペニシリン G、クロラムフェニコール、及びテルデカマイシンに対する感受性も高く 0.1 から 6.4 µg/ml の範囲にあった。マクロライド系及びアピラマイシンは 50 から 100 µg/ml と分離菌株の多くが耐性を示した。リンコマイシン、オキシテトラサイクリン、ストレプトマイシン、セデカマイシンは菌株間でその薬剤感受性に差があった。以上の結果から、カルバドックス、チアムリンが最も有効であると考えられる。

F-12 家畜由来フルオロキノロン耐性サルモネラの耐性機構

江崎英剛¹、小島明美¹、石原加奈子¹、白木早苗¹、田村豊¹、高橋敏雄¹

(¹農水省・動薬検)

【背景】国内におけるフルオロキノロンに耐性を獲得したサルモネラの報告は稀である。これまでシプロフロキサシンに耐性を獲得した *Salmonella Choleraesuis* では、DNA ジャイレース遺伝子 *gyrA* のキノロン耐性決定領域(QRDR)の 2 カ所に点変異があることが外国で報告されている。

当所では、平成 11 年度より畜産分野における薬剤耐性菌調査事業のひとつとして、サルモネラの薬剤耐性をモニタリングしているが、平成 13 年度において、病性鑑定豚よりキノロン耐性 *S. Choleraesuis* が分離された。当該菌株の各種薬剤に対する薬剤感受性試験及び遺伝学的解析を行ったので、その結果について報告する。

【方法】家畜由来サルモネラのフルオロキノロン耐性株 1 株、オールドキノロン耐性株 8 株を用いた。薬剤感受性試験は、供試薬剤はオールドキノロンとして、NA、OA を、またフルオロキノロン剤として動物用に認可されているものを中心に NFLX、ERFX、OFLX、BFLX、OBFX、DNFX、DFLX 及び CPFX の 10 薬剤について、NCCLS 寒天平板希釈法に準じて行った。また、*gyrA* 及び *parC* 遺伝子の QRDR について、その変異の有無を調べた。

【結果】フルオロキノロン耐性 *S. Choleraesuis* は、オールドキノロン剤に対しては高度耐性を、フルオロキノロン剤に対しては比較的低度の耐性を示した。また、QRDR 配列に関して、*gyrA* で 2 カ所に、*parC* に関しては 1 カ所に点変異が認められた。オールドキノロン剤耐性株は *gyrA* に 1 カ所の点変異が認められた。なお、本菌株はセフェム系薬剤に対しては感受性を示した。

F-13 ブチルスズ及びフェニルスズ化合物の代謝と毒性

上野俊治¹、柏本孝茂¹、宮下竜一¹、田中こずえ¹、諏佐信行¹、鈴木隆²
(¹北里大・獣医公衆衛生、²京都府大)

【目的】ブチルスズ及びフェニルスズ化合物の臓器毒性と代謝をマウスとハムスターで比較し、毒性の動物種差の原因を検討する。【材料と方法】トリブチルスズ(TBTC)、ジブチルスズ(DBTC)、トリフェニルスズ(TPTC)、ジフェニルスズ(DPTC)を180 µmol/kg経口投与で24時間後の肝臓、腎臓及び膵臓毒性を血清生化学的に評価し、臓器の有機スズ化合物をGC-MSで分析した。【結果及び考察】(1) TBTC及びDBTCは、マウスにのみ肝臓毒性を示した。代謝分析の結果、肝臓障害の原因であるDBTCの分布量は、マウスではハムスターに比較して高い傾向が観察された。TPTC及びDPTCは両動物で肝臓毒性を示さず、肝臓への分布量もブチルスズに比較して低かった。(2) TBTC、DBTC及びTPTCは、ハムスターでのみ腎臓機能を障害した。また、DPTCは両動物で腎臓毒性を示さなかった。代謝分析の結果からは、ブチルスズ化合物による腎臓毒性の原因物質は特定できなかったが、TPTCはハムスターにおける腎臓障害の原因物質であることが示唆された。また、腎臓毒性に動物種差が現れる原因は明らかにできなかった。(3) TBTC及びDBTCは、マウスにのみ膵臓毒性を示した。代謝分析から、マウスにおける膵臓障害は、TBTC及びDBTCのそれぞれによるものであることが示唆された。また、TPTCは、ハムスターのみに膵臓毒性を示すが、DPTCは両動物において膵臓毒性を示さなかった。代謝分析の結果から、TPTCはハムスターにおける膵臓毒性の原因となっていることが示唆されたが、膵臓毒性における動物種差の原因についても、今回の代謝分析からは明らかにしなかった。

F-15 ディーゼル排気粒子(DEP)から分離した化学物質のエストロゲン様作用

古田千恵¹、鈴木明²、李春梅¹、渡辺元¹、田谷一善¹
(¹東京農工大・農・家畜生理、²国環研・PM2.5・DEPプロジェクト)

【目的】ディーゼル排気粒子(DEP)は多くの化学物質を含有し、大気汚染による健康影響の原因の一つとして重要である。全DEP成分の生体影響について、種々の報告があるが、単離精製された化学物質の生体影響についての報告は乏しい。今回我々は、森らがDEPから単離した化学物質、3-メチル-4-ニトロフェノール(PNMC)と3-フェニル-4-ニトロフェノール(PNMPP)の*in vivo*におけるエストロゲン様作用について以下の方法を用いて検討した。【方法】1.卵巣摘出ラット子宮肥大試験：卵巣を摘出した9週齢の成熟雌ラット(F334系)にPNMC100mg/kg、PNMPP20mg/kgを2日間皮下投与した。2.幼若ラット子宮肥大試験：未処置あるいは卵巣を摘出した25日齢の幼若雌ラット(Wistar-Imamichi系)にPNMC100mg/kgを2日間皮下投与した。【結果および考察】1.では、PNMC群とPNMPP群の子宮重量に有意な増加は見られなかったが、PNMC群では膈スミア像に角化細胞が検出された。2.では卵巣摘出群、非卵巣摘出群共にPNMC群は対照群と比較して子宮重量が有意に増加した。また、非卵巣摘出群では卵巣重量も有意に増加した。酵母(hER-yeast)を用いたレポーター遺伝子発現試験で、PNMC、PNMPP共にエストロゲン受容体と結合することが確認されている(種田ら)ので、PNMCはエストロゲン受容体と結合し、*in vivo*においてエストロゲン様作用を有することが判明した。今回の*in vivo*実験では、PNMPPのエストロゲン様作用が確認されなかった。

F-14 ディーゼル排気中の血管・心筋に作用する化学物質について

鈴木明¹、戸田典子¹、机直美²、局博一²
(¹国環研・PM2.5・DEP研究プロジェクト、²東大院・農学生命・比較病態)

【目的】ディーゼル排気粒子(DEP)は多くの化学物質を含有し、大気汚染による健康影響の原因として重要である。演者らは、これまでに、DEPの血管・心臓作用を明らかにする目的で、摘出血管標本および心筋標本に対しDEP溶液を作用させ、DEP溶液中に動脈および心臓に作用する物質があることを報告してきた。今回、化学分析とバイオアッセイ法を繰り返し、作用物質の分離・単離する事に成功したので、その作用について報告する。【材料および方法】ラット(F344:JCL)雄25~35週齢BW170g~300gを使用した。国立環境研究所のディーゼル排気装置から採取したDEPを林らの方法で極性によって5分画に分け、さらに、酸塩基抽出法によって、酸性、中性、アルカリ性分画にわけた(林ら2000)。それらのDEP抽出液について、さらにバイオアッセイを指標にして細分画を繰り返し、4個のニトロフェノール類の単離に成功した(森ら)。この化学物質についてオルガンバス法によって、DEP全成分溶液と同様な血管作用と心臓作用があるか検討した。【結果と考察】DEP溶液から抽出単離された2-メチル-4-ニトロフェノール、3-メチル-4-ニトロフェノール、4-ニトロフェノール、3-フェニル-4-ニトロフェノールは、いずれも、胸部大動脈に対して弛緩反応を示した。また、心筋に対しては一時的な振幅の増加後、再び減少しはじめ、収縮が消失し、張力レベルが著しく上昇した("強縮"と表現)。これらの結果から、DEP中の血管・心臓作用はこれらのニトロフェノールの作用であると考えられた。

F-16 わが国で分離された*B. microti*様原虫のヒメネズミへの感染試験

座本綾¹、坪井千絵子¹、辻正義¹、石原智明¹
(¹酪農大・獣医)

我々がこれまでに国内で行った野外疫学調査の結果から、わが国には3つの型の*B. microti*様原虫(穂別型、神戸型、北米型)が存在し、アカネズミ*Apodemus speciosus*がそれらの主なレズルポアであることが判明した。しかし、アカネズミに近縁で日本の森林に広く生息するヒメネズミ*A. argentus*からは、これまで一度もパペシア原虫が分離されたことがなかった。そこで本研究では、ヒメネズミのパペシア原虫に対する感受性を明らかにする目的で、穂別型、神戸型および北米型原虫のヒメネズミへの感染実験を行った。穂別型および北米型の原虫を接種したヒメネズミでは接種後短期間のうちに原虫が排除され、抗体価の上昇もほとんど認められなかった。一方、神戸型の原虫を接種した場合には、ヒメネズミでもアカネズミと同様に活発な原虫増殖が認められた。寄生率は接種後8~10日めにピーク(約40%)に達し、その後減少したが、原虫が完全に排除されることはなく、低い寄生率で持続感染状態に移行した。抗体応答に関してはヒメネズミとアカネズミで若干の違いが認められた。すなわち、アカネズミでは速やかに抗体価が上昇し長期にわたって高い抗体価(~12,800倍)が持続したのに対し、ヒメネズミでは抗体応答は見られたものの、抗体価はアカネズミと比べ低かった。以上のことから、ヒメネズミは穂別型および北米型の原虫に感受性がなく、これらのレズルポアにはならないと推定された。また、ヒメネズミとアカネズミは共に神戸型原虫に感受性を示したが、原虫感染に対する両者の免疫応答の様式は若干異なる可能性が示唆された。

F-17 わが国で検出された *Babesia divergens* 様原虫の α -tubulin 遺伝子に基づく系統解析

辻正義¹、座本綾¹、石原智明¹、J. S. Gray²、P. J. Holman³
(¹酪農大・獣医、²Univ. Dublin、³Texas A&M Univ)

Babesia divergens は主に欧州のウシに寄生の報告がある赤血球寄生原虫で、時にヒトにも感染し重篤なバベシア症を起こす。我々は第 132 回本学会において北海道のマダニから *B. divergens* に近縁な 2 種類の原虫 (Kbs7-7 および Etb5) を検出したことを報告した。しかし、これらの原虫の 18SrRNA 塩基配列は、欧州の *B. divergens* の配列とだけでなく、米国のシカ類に寄生する *B. odocoilei* の配列とも高い類似度 (97.9~99.4%) を示したため、rRNA 遺伝子の情報だけから原虫種の同定を行うのは困難であった。そこで今回は、これらの原虫の近縁関係をより明確にする目的で、 α -tubulin 遺伝子の塩基配列を調べ系統解析を試みた。Kbs7-7、Etb5、*B. divergens* MRNK 株 および *B. odocoilei* Engeling 株の 4 つについて、 α -tubulin のアミノ酸 18 番~404 番に相当する領域を PCR で増幅した。得られた DNA のサイズは約 1.2kb で、5'末端付近に 1 つのイントロンを含んでいた。エクソン部分の塩基配列の類似度は、Kbs7-7 と *B. divergens* との間で 97.9%と最も高く、それ以外の組み合わせでも 89.9%~91.8%であった。一方、イントロン塩基配列の類似度は、Kbs7-7 と *B. divergens* との間でのみ非常に高かった(93%) が、それ以外の組み合わせでは 55~67%しかなかった。以上の結果から、わが国で検出された 2 種類の *B. divergens* 様原虫のうちの 1 つは、欧州の *B. divergens* と同種あるいは亜種である可能性が示唆された。

F-19 ウェストナイルウイルス(WNV)NY 株および Eg101 株のマウスにおける病原性の比較

白戸憲也¹、木村享史²、水谷哲也¹、苅和宏明¹、高島郁夫¹
(¹北大・院・獣医・公衆衛生、²北大・院・獣医・比較病理)

【背景】ウェストナイルウイルス(WNV)はフラビウイルス科日本脳炎血清グループに属するアルボウイルスで蚊によって媒介され、人や馬に致死性の脳炎を引き起こす。WNV はアフリカ、中東アジア、ヨーロッパで存在が知られていたが、1999 年に西半球で初めてニューヨーク(NY)で発生した。NY で分離された株(NY 株)は本来宿主であるはずの野生鳥類に致死性の疾患を引き起こす、という点で既存の株と病原性が異なるため、実験動物を用いて NY 株の病原性の解析を進めることは重要である。WNV はその遺伝子配列から lineage 1 と 2 の大きく二つに分けられ、NY 株は lineage1 に属することが判明している。同じ lineage1 の Eg101 株と NY 株は 99.6%のアミノ酸配列の相同性を示す。今回、我々は NY 株と Eg101 株を実験感染させたマウスにおける両者の病原性の比較を試みた。【方法】6 週齢の BALB/c マウスに 1×10^5 PFU の NY 株および Eg101 株を皮下接種にて感染させ、経過を観察するとともに、脳、脾臓におけるウイルス力価、血中抗体価の測定、病理組織学的検索等を行った。【結果】NY 株を感染させたマウスは 80%が死亡し、脳、脾臓からウイルスが検出されたが、Eg101 株を感染させたマウスはほとんど生存し、脳、脾臓からウイルスは検出されなかった。また血中抗体価は NY 株を感染させたマウスで有意に上昇していた。これより NY 株のマウスにおける病原性は Eg101 株より強いことが示唆された。本学会ではこれらの結果にあわせて病理組織学的検索等の解析結果を併せて報告する。

F-18 ダニ媒介性脳炎ウイルスのエンベロープ糖蛋白の糖鎖欠損がウイルス粒子形成に与える影響

後藤明子¹、好井健太郎¹、小原真弓¹、植木智隆¹、水谷哲也¹、苅和宏明¹、高島郁夫¹
(¹北大・院・獣医・公衆衛生)

【目的】ダニ媒介性脳炎 (TBE) ウイルスはフラビウイルス科に属し、人に重篤な脳炎を起こす人獣共通感染症の原因となる。TBE ウイルスはエンベロープ上に 2 種類の糖蛋白 (prM、E) を持ち、それぞれに 1 箇所ずつ N 型糖鎖結合配列を有する。ウイルスのエンベロープ上の糖蛋白の糖鎖変異は蛋白自身の成熟過程やウイルスの生物活性に大きな影響を与えると考えられている。今回、TBE ウイルスの粒子の形成機序を明らかにするため、哺乳類細胞で TBE ウイルスの prM-E 蛋白を発現するプラスミド (pCAGprME) を用いたウイルス様粒子 (VLPs) 分泌発現系 (第 131 回本学会) を使用して、TBE ウイルスの糖蛋白上の糖鎖欠損が VLPs の発現量や性状に与える影響を調べた。【方法】prM、E 蛋白それぞれの糖鎖欠損変異を導入した pCAGprME を作出し、293T 細胞に導入して prM-E 蛋白を発現させた。細胞内および培養上清中に分泌された E 蛋白を ELISA により検出し、発現量を野生株と比較した。また、ウエスタンブロットや赤血球凝集 (HA) 試験により、発現した E 蛋白の性状を解析し、野生株と比較した。【結果と考察】prM 蛋白糖鎖欠損株では細胞内および培養上清中の E 蛋白は野生株とほぼ同量発現しており、さらに野生株と同様の HA 活性を保持している。一方、E 蛋白糖鎖欠損株では細胞内の E 蛋白は野生株と同程度の量を発現していたものの、培養上清中の E 蛋白が野生株と比較して少なかった。今後、糖鎖を欠損した VLPs のさらなる性状解析や生体内での抗体誘導能をより詳細に調べるとともに、糖鎖欠損の病原性に与える影響について感染性 cDNA クローン技術を用いて解析を加える。

F-20 A 群動物ロタウイルスの感染抗体を検出する発現 VP8 蛋白質を用いたラテックス凝集試験の開発

杉山誠¹、鈴岡宣孝¹、山吉誠也¹、伊藤直人¹、源宣之¹
(¹岐阜大・獣医公衆衛生)

【背景と目的】これまで A 群トリロタウイルスが人獣共通病原体である可能性に注目し、研究を進めてきた。このトリロタウイルスを含め A 群ロタウイルスの自然界での生態の解明を目的に、ヒトロタウイルスによる感染抗体を検出するラテックス凝集 (LA) 試験 (WAVP8-LA 試験) およびトリロタウイルスによる抗体を検出する POV8-LA 試験の開発を行ってきた (第 133 回本学会)。今回、ヒト以外の哺乳類 (動物) ロタウイルスによる感染抗体を検出しうる LA 試験を確立したので、その概略を報告する。【材料と方法】前回と同様の方法により、サルから分離されたロタウイルス SA-11 株の発現精製 GST 融合 VP8 蛋白質を抗原として、LA 試験に応用した (SAVP8-LA 試験)。中和試験により、その多くが動物ロタウイルスに感染していることが確認された二ホンザル 94 例の血清を用いて SAVP8-LA 試験を行い、中和試験の結果と比較した。この血清は、岐阜県において 1991~92 年に有害鳥獣として捕獲された二ホンザルから採取された。LA 試験と中和試験の陽性限界をいずれも 8 倍とした。【結果と考察】二ホンザル血清 94 例の SAVP8-LA 試験と中和試験の結果の全体の一致率は 75.5% (71/94) であった。また、感度および特異性がそれぞれ 0.70 (51/73) および 0.95 (20/21) となった。両試験の抗体価の間には相関関係が認められた (相関係数 0.627)。以上、感度の面で若干問題があるものの特異性の高い簡便な動物ロタウイルス感染抗体検出法が開発された。前回開発した LA 試験と合わせて、これら 3 つの LA 試験により、既知のほぼ全ての動物、ヒトおよびトリロタウイルスによる感染抗体を区別して簡便に検出することが可能となった。

F-21 インドネシアにおける狂犬病ウイルスの分子疫学

ヘルスセティア¹、杉山誠²、伊藤直人²、源宣之²
(¹岐阜大・連合獣医学研究科、²岐阜大・獣医公衆衛生)

【背景と目的】狂犬病は一部の清浄国を除き全世界で発生しており、アジア諸国でも深刻な問題である。島国であるインドネシアでは、各島において風土病となっている。しかし、インドネシアの狂犬病の流行形態に関する情報はほとんどない。そこで今回、インドネシアで流行している狂犬病ウイルスの N 遺伝子を解析し、本ウイルスの感染環の解明を試みた。【材料と方法】インドネシアで狂犬病と診断された犬 16 例、猫 2 例および野生動物 5 例の脳から RNA を抽出し、狂犬病ウイルスの N 遺伝子に特異的なプライマーを用いて cDNA を合成した。Nested PCR 法により増幅した N 遺伝子の大部分(1312bp)の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定し、塩基配列をもとに系統的解析を行った。【結果と考察】インドネシアで流行している狂犬病ウイルスのいずれも、中国で分離されたウイルスと近縁であることが明らかとなった。この結果は、第 132 回本学会で報告したスマトラ島で分離された 1 例の G 遺伝子の解析と一致した。また、インドネシアで流行しているウイルスには、4 つの遺伝子タイプのあることが明らかとなった。すなわち各タイプはスマトラ中央部で(SM タイプ)、スマトラ島北部・南部とジャワ島北部で(SJ タイプ)、ジャワ島で(JA タイプ)、インドネシア東部にあたるカリマンタン、スラウェシおよびフロレス各島でそれぞれ流行がみられた。猫および野生動物由来ウイルスはいずれも SM タイプに属し、独自の系統群を形成しなかった。これらのことから、スマトラ島中央部では猫と野生動物も含め犬を中心とした感染環が形成されていると考えられた。(本研究は、インドネシア国立動物医薬品検査所との共同研究によるものである。)

F-22 免疫鶏卵法で作製した抗狂犬病ウイルスリコンビナント蛋白 IgY の反応性と有用性

本井ゆり恵¹、井上智¹、井上さやか²、八田一²、佐藤こずえ¹、森本金次郎³、山田章雄⁴
(¹岐阜連大、感染研・獣医、²京都女子大、³感染研・ウ1部、⁴感染研・獣医)

【目的】産卵鶏に抗原を免疫して卵黄抗体(IgY)を得る免疫鶏卵法は、従来のウサギ等を用いる方法よりも抗体回収量が多く精製が容易であり抗体を簡便に作製できる。今回、狂犬病ウイルス(CVS-11 株)N、P、および G 遺伝子をクローニングして作製したリコンビナント蛋白を産卵鶏に免疫して IgY を作り、その反応性と有用性について検討を行った。

【方法】狂犬病ウイルスの N、P および部分的 G(GF-2)リコンビナント蛋白は、pQE ベクターを使用して大腸菌(JM109)に発現させて QIAexpress System で精製した。産卵鶏の免疫は精製リコンビナント蛋白約 0.3mg/羽をアジュバントと共に産卵鶏の左脚大腿筋肉内に 2 週毎に 3 回接種した。IgY は免疫鶏卵から分離した卵黄を PBS で希釈して使用した。抗体の反応性は CVS-11 株を抗原としたウエスタンブロット(WB)法、間接蛍光抗体法(IFA)および RFFIT 法による中和活性測定で検討した。

【結果・考察】N および P に対する IgY は、初回免疫後 6 週目で IFA 抗体価が最高値(1:4,000~1:32,000)となり CVS-11 株に対して強い反応性を示し、いずれも抗体価は 14 週目まで 1:500 以上を維持した。中和活性は GF-2 蛋白に対する IgY でのみ見られ、6 週目で最高値(1:1893)を示した。また、WB 法では G、N、P 蛋白に特異的な大きさのバンドが各 IgY 抗体により検出できた。今回、リコンビナント蛋白を用いた免疫鶏卵法により狂犬病ウイルス検出用 IgY を作出した。現在、中和活性を誘導した GF-2 蛋白の中和エピトープの特定と防御抗体としての有効性について検討している。