

FO-61

狂犬病ウイルスの増殖におけるL蛋白質NPYNE配列の重要性

牧野真知子¹、○伊藤直人^{1,2}、中川賢人²、佐々木道仁³、高橋龍樹²、岡田和真¹、西山祥子¹、澤洋文³、杉山誠^{1,2}(¹岐阜大 応用生物・人獣、²岐阜大 院・連合獣医、³北海道大 人獣センター)

【背景と目的】狂犬病ウイルスL蛋白質は、P蛋白質と結合することでRNAポリメラーゼとして機能する。最近、私達は、L蛋白質1929-1933位に存在するNPYNE配列がP蛋白質との結合に関与することを報告した(Nakagawa *et al.*, J.Virol., 2017)。しかし、ウイルス増殖において同配列が重要かどうかは未検討である。そこで今回、狂犬病ウイルスの増殖におけるL蛋白質NPYNE配列の重要性を検討した。【材料と方法】狂犬病ウイルス西ヶ原株の遺伝子操作により、NPYNE配列を、L蛋白質のP蛋白質結合能を減弱させるAPYAA(上記報告)に置換したNi-APYAA株を作成した。増殖性を比較する目的で、マウス神経芽腫由来NA細胞に各株を接種し(moi=0.01)、感染5日後の培養上清の感染価を測定した。次に、Ni-APYAA株をNA細胞で20回連続継代することで復帰変異株Ni-APYAA p20を得た。Ni-APYAA p20株に出現した変異を特定するため、次世代シーケンサーによるゲノム解析を行った。【結果と考察】Ni-APYAA株の感染価(5.9×10^4 FFU/ml)は、西ヶ原株(2.8×10^7 FFU/ml)よりも低かった($p < 0.05$)。すなわち、NPYNE配列は効率的なウイルス増殖に重要であることが判明した。一方、Ni-APYAA p20株の感染価(6.3×10^6 FFU/ml)はNi-APYAA株に比べて高く($p < 0.05$)、継代による増殖性の回復が確認された。Ni-APYAA p20株のゲノム解析では、アラニン置換の導入部位であるL蛋白質1929位にアミノ酸変異が認められた。さらに、P蛋白質81および138位、G蛋白質40位にも変異が確認された。以上より、G蛋白質上の変異の影響は否定できないものの、LおよびP蛋白質に認められた計3つの変異が、APYAA置換により阻害されたL-P蛋白質間の結合を補った可能性が考えられた。

FO-63

狂犬病対応ガイドラインを利用した自治体の狂犬病対策に係る研修とワールドカフェ形式を取り入れたアクティブラーニングによる演習の成果等に関する報告

○井上 智^{1,3}、好井健太郎²、兼子千穂³、桐野有美⁴、矢野さやか^{4,5}、堀田明豊¹、三澤尚明³(¹国立感染症研究所 獣医科学部、²北海道大 獣医・公衆衛生、³宮崎大 産業動物防疫リサーチセンター、⁴宮崎大 獣医・外科、⁵徳島県 動物愛護管理センター)

【目的】2013年に狂犬病清浄地域と考えられていた台湾で野生動物での狂犬病の流行が報告され、2014年に厚生労働省健康局結核感染症課(厚労省)から「国内動物を対象とした狂犬病検査実施について：平成26年8月4日健感発0804 第1号」が都道府県・保健所設置市・特別区衛生主管部(局)長宛通知された。国内で狂犬病に罹患した動物を確実に探知することが目的である。現在、自治体では狂犬病対応ガイドライン(2001・2013)と動物の狂犬病調査ガイドラインに基づいた対応マニュアルの作成と体制整備強化が行われている。本報告では厚労省が主催する狂犬病予防業務技術研修会(技術研修会)の現況、宮崎県と宮崎大学の官学連携研修、北海道大学の獣医公衆衛生学実習で行った狂犬病の体制整備に係る演習成果を紹介する。【方法】2015年度から厚労省が主催する技術研修会が東北・近畿・中国・四国・北陸地域・九州沖縄地域・中部・北関東ブロックで開催され、動物の狂犬病検査に必要な解剖とバイオセーフティ等の実技習得が行われた。研修では体制整備状況の把握と課題把握のために、ガイドラインを利用した演習で宮崎大学が行っているワールドカフェ形式の参加型グループディスカッションを実施して、その成果をアンケート調査等で分析した。【結果・考察】動物の狂犬病検査に必要な解剖は自治体で実施可能なことが示され、地域ブロックでの開催によって近隣自治体との連携が促進された。実技後の演習では現実的な体制整備の重要さと課題点が参加自治体間で共有された。宮崎県と宮崎大学の取り組みは官学連携による研修の推進モデルとして期待され、北海道大学の演習では卒前に公衆衛生獣医師の役割と意義が体感されて教育効果も高いことが示された。

FO-62

野生動物の狂犬病調査を想定した狂犬病ウイルスの簡易モニタリング法構築に関する研究

○野口 章¹、藤澤直輝²、矢野さやか³、Daira Llenaresas Manalo⁴、Tuyet Thu Nguyen⁵、朴天鎬⁷、井上 智^{1,7}(¹国立感染症研究所 獣医科学部、²鳥根県 保健環境科学研究所、³徳島県 動物愛護管理センター、⁴沖縄県 衛生環境研究所、⁵Research Institute for Tropical Medicine Veterinary Research Department、⁶National Institute of Hygiene and Epidemiology Department of Virology、⁷北里大 獣医・病理)

【目的】狂犬病清浄地域であった台湾で2013年に野生動物に狂犬病の流行が報告され、日本でも狂犬病に罹患した動物を確実に探知できる動物の狂犬病調査構築が課題とされており、台湾動物衛生研究所の協力を得て、野生動物の狂犬病サーベイランスで試行されている簡易モニタリング法について検討を行ったので報告する。【方法】台湾で検討されたイムノクロマトキット(ICT)について野生動物の狂犬病モニタリング法構築を検討した。ICTにはRabies Virus Antigen Rapid Test Card(RVARTC: Shenzhen Lvshiyuan Biotechnology 社)を使用し、陽性抗原に狂犬病TCワクチン「化血研」(RC・HL株)とHEP Flurry株、検体に有害鳥獣捕獲のライグマ個体等から採材した脳組織をキット添付溶剤もしくはPBS(-)で10-20%の乳剤作製後に静置した上清50 μ 相当を使用した。【結果】RVARTCはTCワクチン中に含まれる 5×10^3 TCID₅₀相当のRC・HL株抗原と、 5×10^4 FFUを示したマウス神経芽腫細胞で増殖させた培養上清中HEP Flurry株の抗原を検出可能であった。脳乳剤にウイルス添加した場合に非添加との間で検出感度に差はなかった。PBS(-)で脳乳剤を作製した場合はキットの溶剤を使用した場合と比較して目視での検出感度が若干低下した。死後の経過が長く脳組織が自壊した野外8検体と新鮮な脳組織にウイルスを添加した脳乳剤で検出感度に違いは見られなかった。【考察】野生動物の死亡個体を利用した簡易モニタリングがICTで可能と考えられた。現在、地方自治体の協力を得て検査方法と死後検体における非特異反応の検討、また、ベトナムとフィリピンで流行している動物の狂犬病を利用して感染脳組織の感度と特異度を検討している。

FO-64

近年の牛ロタウイルスAに対する疫学調査および遺伝子性状解析

○梅田浩二¹、鈴木 亨²、Shofiqur Rahman¹、小田切航希¹、Sa VanNguyen¹(¹株式会社イーダブルニュートリション・ジャパン 岐阜免疫研究所、²農研機構 動物衛生)

【背景】牛ロタウイルスA(RVA)感染症は以前から国内で流行・蔓延しており、特に、生後間もない子牛で激しい水様性の下痢を引き起こし、稀に死に至る。このため、生産現場ではワクチンならびに衛生管理で本病の対策に努めているが、発生は後を絶たない。従って、科学的根拠に基づいた新たな対策の開発が求められている。

【目的】弊社は以前から鶏卵抗体を活用した受動免疫法による防除技術の開発に取り組んでいる。近年の本ウイルスの流行動向に合わせた鶏卵抗体を開発するために、疫学調査を実施し、各種遺伝子型ウイルスの単離およびそれらの遺伝子性状解析を実施する。

【材料と方法】2017年2月から2018年4月にかけて、5道県の生産農場21カ所の下痢発症子牛より採取した牛RVA陽性糞便40検体を材料に供した。RT-PCRにてVP4およびVP7遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンシング法で塩基配列を解析し、G遺伝子型およびP遺伝子型の決定ならびに系統樹解析を実施した。

【結果および考察】疫学調査の結果、40検体における牛RVA各遺伝子型の出現頻度は、G6P [5] 17検体(42.5%)、G6P [11] 10検体(25%)、G10P [11] 6検体(15%)であり、以前の国内流行株に対する疫学調査とは出現株およびその頻度に大きな差があることを明らかにした。現在、各種遺伝子型ウイルスの単離を行い、VP4およびVP7の遺伝子性状解析を実施するとともに、過去の流行株との間で詳細な比較・解析を実施している。