

琉球大学学術リポジトリ

沖縄島産マングースを用いたペスト抗体産生実験およびペスト抗体保有調査

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2009-04-22 キーワード (Ja): マングース, ペスト, 抗体応答, 沖縄島 キーワード (En): IgG-ELISA, small Asian mongoose, plague, antibody response, IgG-ELISA, Okinawajima island 作成者: 石橋, 治, 西島, 拓, 角田, かおり, 須藤, 健二, 山下, 勝弘, 小倉, 剛, 砂川, 勝徳, 仲田, 正 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/9907

沖縄島産マングースを用いたペスト抗体産生実験 およびペスト抗体保有調査

石橋治^{1*}, 西島拓¹, 角田かおり¹, 須藤健二^{1,2}, 山下勝弘^{1,3}, 小倉剛¹, 砂川勝徳¹, 仲田正⁴

1 琉球大学農学部生産環境学科, 2 株式会社南西環境研究所, 3 八千代エンジニアリング株式会社, 4 琉球大学農学部生物生産学科

Experiment of the antibody response and serological survey of plague with small Asian mongoose captured on Okinawajima island.

Osamu ISHIBASHI^{1,2*}, Taku NISHIJIMA¹, Kaori SUMIDA¹, Kenji SUDO²,
Katsuhiko YAMASHITA³, Go OGURA¹, Katsunori SUNAGAWA¹ and Tadashi NAKADA⁴

¹Department of Environmental Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus,

²Nansei Environmental Laboratory Co., Ltd., ³Yachiyo Engineering Co., Ltd.,

⁴Department of Bioproduction, Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus,

Abstract

We tried to the immunological experiment of antibody response with small Asian mongoose (*Herpestes javanicus*) captured on Okinawajima island, which inoculated plague (*Yersinia pestis*) vaccine, and then carried out the serological test measuring anti-plague antibody titer by IgG-ELISA. Three groups (each of four individuals) of mongoose inoculated by the different ways which in subcutaneous on their back, intradermal on their back, or in the crural muscle, respectively, and another three groups of mongoose inoculated with undiluted plague vaccine, diluted one at 1:10, or 1:10 with freund's adjuvant, respectively were compared. As the result, the group of mongoose inoculated in intradermal was found to increase of anti-plague antibody titer; and inoculated in diluted at 1:10 with adjuvant was found to highly increase of anti-plague antibody titer. The cutoff value (the average OD value + 3×standard deviation) calculated from negative control sera was 0.46, and the ratio of individual over the cutoff value was 5.6% (13 out of 231) by IgG-ELISA.

キーワード：マングース, ペスト, 抗体応答, IgG-ELISA, 沖縄島

Key word : small Asian mongoose, plague, antibody response, IgG-ELISA, Okinawajima island

緒言

ペスト菌 (*Yersinia pestis*) はエルシニア属に位置するグラム陰性桿菌で、主にげっ歯類とノミの間の循環の確立により、ヒトや家畜および野生動物に人獣共通感染症を引き起こすことが知られている。ペストの流行は西ヨーロッパ、中国、アメリカなど世界各地で確認されている。¹⁾ わが国では1899年に神戸においてインドから来航した船舶より保菌ネズミが侵入し、ヒトのペスト感染が確認されている。¹⁾ その後、横浜、大阪、長崎でヒトのペスト感染が報告されている^{2,3)} が、沖縄島では感染事例はない。

1910年にネズミとハブ (*Protobothrops flavoviridis*) の駆除を目的として英領インドで捕獲されたジャワマングース (*Herpestes javanicus*) (以下、マングースという) が沖縄島に人為的に持ち込まれた。^{4,5)} 当時のインドではペストの流行があったことが報告されている。¹⁾ マングースは主に昆虫類、は虫類、ネズミ類を捕食していることが明らかにされていることから^{6,7)}、マングースがインドにお

いてペスト保菌ネズミの捕食によるペスト感染を起こしている可能性があると考えられる。¹⁾ また、マングースはペスト菌の媒介能を持つノミの寄生例もあること⁸⁾ から、仮に沖縄島へペストが侵入した場合、マングースがその定着と伝播を担い、公衆衛生上大きな脅威となる可能性があると考えられる。

現在、ペスト菌の検査には菌の分離、同定などの抗原学的検査法⁹⁾ と血清学的検査法として、血球凝集反応^{9,12)}、補体結合反応¹¹⁾、ラテックス凝集反応¹⁰⁾ がある。野生動物における感染症の検査は、短時間で結果を得ることが防疫上重要である。現在のところ、ペスト菌の特異タンパク質である Fraction 1 (以下、F1 という) タンパク^{9,11)} を抗原として用いる IgG-ELISA 法は、迅速かつ簡単で感度の良い検査法として知られている。¹³⁾

本研究では、ペストワクチンを用いてマングースへペスト抗原を負荷する免疫実験を行い、ペスト抗体産生の推移について IgG-ELISA 法を用いた血清学的数値から陽性および陰性の判定基準を求めた。これをもとに沖縄島産マングースのペスト抗体保有調査

* Corresponding author (Email:ishibashi-osamu@keneki.go.jp)

を行った。

実験材料および方法

1. 材料

1) 供試マングース

2004年3月から9月の間に沖縄島の西原町、恩納村および中城村にて捕獲したマングース31頭(雄28頭, 雌3頭)を用いた。

2) 供試マングース血清

2002年7月から2004年10月の間に沖縄島で捕獲されたマングース231頭(雄123頭, 雌108頭)から採取した血清を用いた。

2. 実験方法

1) マングースの不動化

マングースは自作の捕定箱を用いて捕定し、塩酸メドミジン(ドミツール®, 明治製菓, 0.1mg/kg)と塩酸ケタミン(ノモペイン®, 第一製薬, 1.2mg/kg)の混合液を下腿部筋肉内投与にすることにより不動化を行った。覚醒は塩酸アチパメゾール(アンチセダン®, 明治製菓, 0.04mg/kg)を下腿部筋肉内投与により行った。

2) マングースの飼育

実験に供したマングースは、実験室内で個別に飼育箱(200mm×250mm×600mm)を用いて飼育した。給水は給水器を用いて不断給水とし、餌料は豚肉を1日30g与えた。採血日の前日は絶食とし、給水のみを行った。^{14,15)} 実験開始前に馴化期間として最低3日を設けた。

3) 抗原接種部位の検討

2004年3月から4月の間に捕獲した15頭のマングース(雄13頭, 雌2頭)を抗原接種部位の検討に使用した。マングースは、皮下接種群、皮内接種群、筋内接種群の各5頭ずつに分け、各群の合計体重が等しくなるよう配慮した。接種する抗原として、ペストワクチン(国立感染症研究所, 2×10^8 CFU/ml)を用い、接種量をヒト(体重約60kg)とマングース(体重約600g)の体重換算によって決定し、接種するのに必要な総量を得るために抗原液を生理食塩水で100倍に希釈し、全量を0.6mlとした。また、対照個体(各群1頭)は生理食塩水0.6mlのみを用いた。皮下接種群は頸背部に0.6mlを、皮内接種群は毛刈りした背部(3cm×3cm)の皮内に0.1mlずつ6ヶ所に計0.6mlを、筋内接種群は下腿部に0.6mlをそれぞれ接種した。初回抗原接種は0週目に行い、追加抗原接種は、2週目以降5週目まで週1回行った。採血は0週目以降7週目まで計7回、不動化したマングースの頸静脈から行った。¹⁶⁻¹⁸⁾ 採取した血液2.0mlは、遠心分離を行い(3,000rpm, 15min)、血清を分離し分析まで-20°Cで冷凍保存した。

4) 抗原接種量の検討

2004年4月から9月の間に捕獲した16頭のマングース(雄15頭, 雌1頭)を抗原接種量の検討に使用した。マングースは、抗原液原液群、抗原液10倍希釈群、Freund's不完全アジュバント(SIGMA-ALDRICH社)を用いた抗原液10倍希釈群および対照群の4群に各4頭ずつに分け、各群の合計体重が等しくなるよう配慮した。抗原液原液群はペストワクチン原液を使用し、抗原液10倍希

釈群は生理食塩水でペストワクチンを10倍希釈したものを使用した。アジュバント群は初回のみアジュバントを使用し、アジュバントは抗原液5倍希釈液と1:1で混合して抗原液10倍希釈液とした。また、対照群は生理食塩水を用いた。抗原接種方法は皮内接種とし、接種量は0.6mlとした。初回抗原接種は0週目に行い、追加抗原接種は、2週目以降5週目まで週1回行った。アジュバント群の追加抗原接種は、抗原液10倍希釈液のみを使用した。採血は抗原接種部位の検討と同様に行った。

5) マングースの抗ペスト抗体測定

マングースの抗ペストIgG抗体を酵素免疫測定法IgG-ELISA法を行った。¹⁹⁾ すなはち、抗原液は、精製ペストF1抗原粉末を化学天秤にて1mg秤量し、これを1mlのリン酸緩衝液(以下、PBS(-)という)に一晩4°Cで溶解して調製し、ストック抗原液とした。ストック抗原液は炭酸緩衝液(精製水1,000mlあたり炭酸ナトリウム1.6gおよび重炭酸ナトリウム2.92gにて調製)で100倍希釈し、マイクロプレート(Nunc Maxysorp flat plate)の各wellに100μlずつ分注し、4°Cで一晩静置して抗原を固相化した。また、抗原と二次抗体以外の非特異的な反応を見るため、被検血清を固相化しないブランクを設けた。翌日、Tween20を0.05%添加したPBS(-)(以下、PBSTという)で2回洗浄後、スキムミルク(Difco社)を5%添加したPBST(以下、Milk-PBSTという)を各wellに200μlずつ分注し、1時間室温にて静置してブロッキングした。再びPBSTで1回洗浄した後、Milk-PBSTで被検血清を100倍希釈したものを100μlずつ各wellに分注し、1時間静置した。次にPBSTで3回洗浄した後、Horse Radish Peroxydase(以下、HRPという)で標識した抗フェレットIgG(H+L)ヤギ抗体(BETHYL社)をMilk-PBSTで1,000倍希釈したものを全てのwellに100μlずつ分注し、室温にて1時間静置した。PBSTで4回洗浄の後、発色基質液として、クエン酸緩衝液(精製水1,000mlあたりにクエン酸4.68gおよびリン酸二ナトリウム・二水和物9.12gを溶解し、全量を1,000mlとして調製)25mlにオルトフェニレンジアミン10mg錠(和光純薬)を溶解し、使用前に過酸化水素液10μlを加えたものを100μlずつ分注し、10分間発色させた後、1M硫酸50μlを追加し発色反応を停止させた。OD492nmにて測定し、抗原を固相化したwellの値からブランクの値を差し引いた値をOD値とした。

実験結果

1. 抗原接種部位の検討

抗原接種部位の試験に使用したマングース15頭の0週目のOD値の平均は0.20であった。皮下接種群では6週間の実験期間のOD値は0.03から0.34であり、目立った抗体価の上昇は観られなかった。6週目の平均OD値は0.21で対象個体も0.21であり差はなかった。皮内接種群ではOD値は0.13から0.75であり、被験2個体に顕著なOD値の上昇が観られ、残りの2個体では対象個体との差はなかった。6週目の平均OD値は0.43であり、対象個体は0.20であり差があった。筋内接種群ではOD値は0.09から0.55であり、被験1個体に顕著なOD値の上昇が観られたが、残りの3個体は対象個体との差はなかった。6週目の平均OD値は0.22であり、対象個体も0.22

であり差はなかった (Fig.1).

2. 抗原接種量の検討

試験に使用したマンガース 16 頭の 0 週目の OD 値の平均は 0.29 であった。原液接種群の 6 週間の実験期間では OD 値は 0.18 から 1.11 であったが、被験 1 個体に顕著な OD 値の上昇、2 個体に明らかな増加が観られたが、残りの 1 個体は対象個体群との違いはなかった。6 週目の平均 OD 値は 0.57、対象個体は 0.17 であり差があった。10 倍希釈接種群では OD 値は 0.13 から 0.37 であったが、被験 1 個体に

OD 値の上昇が観られ、残りの 3 個体は対象個体群との差はなかった。6 週目の平均 OD 値は 0.22 であり、対象個体群との差はなかった。アジュバント接種群では OD 値は 0.22 から 1.57 であったが、全ての被験個体に顕著な OD 値の上昇が観られ、6 週目の平均 OD 値は 1.46 であり、対象個体群は 0.17 であった (Fig.2).

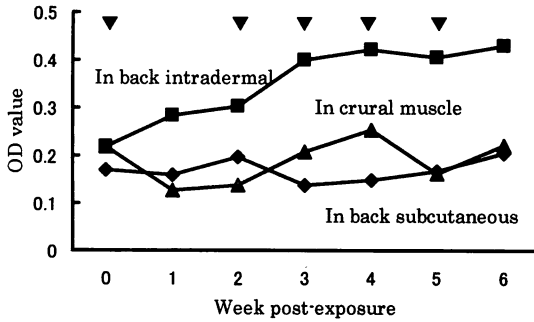


Fig. 1 Anti-plague antibody response compared with the injection method in small Asian mongoose.

▼ are shown in inoculation, ■ are shown in back intradermal inoculation, ▲ are shown in crural muscle inoculation, ◆ are shown in back subcutaneous inoculation. Inoculation dose are 1:100 diluted.

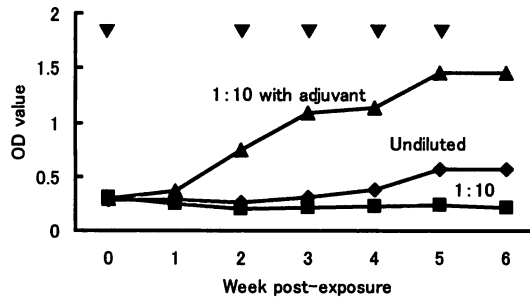


Fig. 2 Comparison of injection dose and effectiveness with adjuvant in small Asian mongoose.

▼ are shown in inoculation, ▲ are shown in 1:10 diluted with adjuvant, ◆ are shown in undiluted, ■ are shown in 1:10 diluted. Each inoculation position are back intradermal.

3. マンガースの抗ペスト抗体価の測定

実験に用いた 31 頭のマンガースの実験開始時の OD 値を測定し、平均値+標準偏差×3 からカットオフ値を 0.46 とした。雄マンガースの平均 OD 値は 0.27、雌マンガースでは 0.28 であり、OD 値にマンガースの性差は認められなかった (Table1)。捕獲年別の OD 値は

2002 年 (n=82) で 0.24、2003 年 (n=87) で 0.28、2004 年 (n=62) で 0.31 であり、2002 年とその他の間で OD 値に有意差があった ($p < 0.05$) (Table2)。また、カットオフ値を超える血清は 13 頭分 (5.6%) であり、最大値は 0.67 であった。

Table 1 Comparison of sexual difference in small Asian mongoose to anti-plague antibody by IgG-ELISA test.

Gender	n	OD492 average	± S.D.	Number of positive	Positive ratio (%)
Female	108	0.28	± 0.11	7	6.5
Male	123	0.27	± 0.11	6	4.9
Total	231	0.27	± 0.11	13	5.6

Table 2 Survey of anti-plague antibody in serum of small Asian mongoose captured on Okinawajima island, 2002-2004.

Year	n	OD492 average	± S.D.	Number of positive	Positive ratio (%)
2002	82	0.24	± 0.10	2	2.4
2003	87	0.28	± 0.09	4	4.6
2004	62	0.31	± 0.13	7	11.3

*, ** : $p < 0.05$

考 察

1. ペスト抗体産生実験

皮下接種群および筋内接種群は対照個体との差が見られず抗ペスト IgG の産生はなかったが、皮内接種群では抗ペスト IgG の産生が見られた。ヒトにおいては、狂犬病ワクチンは筋内接種、ジフテリ

ア、百日せき、破傷風、日本脳炎、インフルエンザなどのワクチンは皮下接種、また、ポリオワクチンは経口接種である。¹⁹⁾ 予防接種の方法として皮内接種は特殊であるが、皮内接種では抗原が貯留してマクロファージやリンパ球との接触および相互作用の機会が他の接種方法より多いと考えられる。

抗原液 10 倍希釈群では抗体産生が認められなかったが、アジュバントを用いた抗原液 10 倍希釈群では明らかな抗体産生を認めた。また、アジュバント群は原液群より早く抗体産生の推移を得ることができた。これらのことから、マングースの免疫応答においてアジュバントが高い抗体産生効果を持つと考えられる。アジュバントには抗原を体内に長時間留める作用があり、それによって接種部位に局所の炎症を起し、マクロファージの活性化や抗体産生細胞およびリンパ球の働きを促進する役割がある²⁰⁾ ためと考えられる。各試験群で抗体産生に差が生じているが、これは各個体の年齢や捕獲から実験までの馴化期間の差に起因すると考えられる。今後、マングースの免疫産生実験を行う場合には、この点について十分な配慮が必要と考える。

2. ペスト抗体保有調査

231 頭のマングース血清について、F1 タンパクを抗原としてマングースの抗ペスト IgG 抗体を測定し、その OD 値にマングースの性差が見られなかったことから、本実験の手法は両性で安定な手法であったといえる。次に保存血清のうち、保存期間が長い方に OD 値が低い傾向があり、2002 年分とその他の年との間に OD 値の有意な差があった原因については、F1 タンパクに反応する感染症がマングースに徐々に浸透している可能性と血清の保存中の劣化の可能性が考えられる。これについて、血清の保存条件を -20℃ から -80℃ へ変更し、抗ペスト IgG の保有調査を継続的に実施し、原因を明らかにする必要があると考える。ハワイのマングースにおける IHA 法による調査¹⁰⁾ では 12.5% にペスト抗体の保有を確認しているが、今回、カットオフ値を超えた血清は 5.2% (13 頭) であった。わが国においては、ペストは根絶されており¹⁾、沖縄島のマングースが沖縄島への導入後に新たにペストの感染を受ける機会がなかったことや F1 タンパクは仮性結核菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) にも存在している可能性があることが確認されており¹⁾、今回の結果がペストの浸淫を示唆しているとは断定できない。そのため、カットオフ値を超えた個体については、ウエスタンプロット法などのより正確な他の血清学的検査を実施し再確認することや、さらに多くの個体について調査した上でカットオフ値を補正する必要があるだろう。

3. まとめ

マングースにペストワクチンを接種し、抗体値の上昇を認めたことにより、マングースはペストへの感受性があることがわかった。沖縄島のネズミよりペストの媒介能を持つノミの寄生が確認されている²¹⁻²³⁾ ので、沖縄島へペストが侵入した場合、ネズミを介してマングースに感染拡大し、さらにマングースがその定着と伝播を担い、公衆衛生上大きな脅威となる可能性があると考えられる。外来動物であるマングースの駆除は公衆衛生の面からも考慮されなければならない。

要約

ジャワマングースに対しペスト F1 抗原を負荷する免疫実験を行い、ペスト抗体産生の推移を IgG-ELISA 法により、陽性および陰性の判断基準を求めた。その結果、免疫負荷は皮内接種により明確な抗体価の上昇を確認し、また、カットオフ値を 0.46 とした。次に抗-フェレット IgG を用いて、ペスト特異タンパク質 F1 を抗原として沖縄島のジャワマングースについて、2002 年 11 月から 2004 年 10 月に捕獲された 231 頭における抗体保有調査を行った。カットオフ値を超える個体は 5.2% であった。

謝辞

本研究を行うにあたり、琉球大学農学部の平良東紀准教授に大変お世話になりました。また、マングースの餌を無料で提供していただいた株式会社サンエーPCセンターの高橋範充センター長ならびにサンエーV21 我如古店のスタッフの方々を中心に御礼申し上げます。さらに本研究にご協力いただきました琉球大学農学部亜熱帯動物学講座の学生の皆さまに感謝申し上げます。

文献

- 1) 中瀬安清. 1995. 北里柴三郎によるペスト菌発見とその周辺. 日本細菌学雑誌 50 : 637-650.
- 2) 福田常太郎. 1927. 神奈川県におけるペスト発生概要. 日本伝染病学会誌 2 : 18-27.
- 3) 飯村保三. 1927. 日本におけるペストの発生および流行. 日本伝染病学会誌 2 : 1-18.
- 4) 岸田久吉. 1931. 渡瀬先生とマングース輸入. 動物学雑誌 43 : 70-78.
- 5) 梁井貴史. 2002. 渡瀬庄三郎によるマングース放獣の謎. 川口短大紀要 第 16 号.
- 6) 小倉剛, 川島由次, 織田銃一. 2003. 外来動物ジャワマングースの捕獲個体分析および対策の現状と課題. 獣医畜産新報 56 : 295-301.
- 7) 小倉剛, 佐々木健志, 当山昌直, 嵩原建二, 仲地学, 石橋治, 川島由次, 砂川勝徳, 織田銃一. 2002. 沖縄島北部に生息するジャワマングース (*Herpestes javanicus*) の食性と在来種への影響. 哺乳類科学 42 : 53-62.
- 8) Eskey CR. 1934. Epidemiological study of plague in the Hawaiian Islands. *United states government printing office* (WA). 213. 70pp.
- 9) 鈴木荘介. 1980. ペストの血清疫学的研究. 神戸大学医学部紀要 42 : 533-558.
- 10) Meyer KF, McNeill D, Wheeler CM. 1965. Results of a preliminary serological survey of small mammal populations for plague on the island of Hawaii. *Bull Wld Hlth Org.* 33 : 809-815.
- 11) Chen TH, Meyer KF. 1966. An evaluation of *Pasteurella pestis*

- fraction-1-specific antibody for the confirmation of plague infections. *Bull Wld Hlth Org.* 34 : 911-918.
- 12) McNeill D, Jenkin H, Armstrong D, Chang YS, Lien JC, Meyer KF. 1968. A serological survey of rodent plague in Taiwan and offshore island. *Bull Wld Hlth Org.* 38 : 793-798.
 - 13) May CC. 2000. Laboratory manual of plague diagnostic tests. CDC. 61-66.
 - 14) 緒方規矩雄監修. 1981. 図説動物実験の手技手法. 共立出版. 東京. 145-152.
 - 15) 南心司, 渡辺仁, 大丸秀土. 2001. 塩酸メデトミジン-塩酸ケタミンの混合液によるマレーバク (*Tapirus indicus*) の不動化例. 広島県獣医学会雑誌 16 : 35-38.
 - 16) 新村末雄, 前田宜俊, 加藤明子, 藤沢信義, 佐藤徳光, 浜田忠弥. 1987. Hantaan ウイルスを接種したラットおよびマウスの血清抗体価. 新潟医学会 101 : 126-131.
 - 17) Tsujimura K, Mizutani T, Kariwa H, Yoshimatsu K, Ogino M, Morii Y, Inagaki H, Arikawa J and Takashima I. 1999. A serosurvey of Borna disease virus infection in wild rats by a capture ELISA. *J Vet Med Sci* 61 : 113-117.
 - 18) Kevin TC, Dean B, Leon GC, May C, Kim I, Jeffery W. 2001. Siberian polecat to subcutaneous and oral *Yersinia pestis* exposure. *J Wildl dis* 37 : 746-754.
 - 19) 重松逸造. 1995. 予防接種要領. 伝染病予防必携. 日本公衆衛生協会. 446pp.
 - 20) 大海忍, 辻村邦夫, 稲垣昌樹. 2004. 新版抗ペプチド抗体実験プロトコール. 秀潤社. 東京. 172pp.
 - 21) 厚生労働省医薬食品局食品安全部企画情報課検疫所業務管理室. 2008. 平成18年検疫所業務年報 175pp.
 - 22) 岸本高男, 比嘉ヨシ子. 1978. 沖縄産の住家性ネズミの種類構成と繁殖. *Biol Mag Okinawa* 16 : 1-9.
 - 23) 比嘉ヨシ子, 下謝名和子. 1975. 南部の一圃場における鼠類調査. *Biol Mag Okinawa* 13 : 7-11.