

2003 カラス

12/30- 1/6-

1/27- 2/3-

2/24- 3/3-

3/1

第1週	第2週	第3週	第4週	第5週	第6週	第7週	第8週	第9週	第10週	第11週	第12週
死	病	死	病	死	病	死	病	死	病	死	病

2003 カラス

7-

3/31-

4/7-

4/14-

4/28-

5/5-

5/19-

5/26-

6/2-

6/9-

2週 病 第13週 死 病 第14週 死 病 第15週 死 病 第16週 死 病 第17週 死 病 第18週 死 病 第19週 死 病 第20週 死 病 第21週 死 病 第22週 死 病 第23週 死 病 第24週 病

2003 カラス

6/23-

6/30-

7/7-

7/14-

7/21-

7/28-

8/4-

第25週	第26週	第27週	第28週	第29週	第30週	第31週	第32週	第33週	第34週	第35週	第36週
死	病	死	病	死	病	死	病	死	病	死	病

2003 カラス

9/8-

9/29-

10/27-

11/17-

11/24-

第37週	第38週	第39週	第40週	第41週	第42週	第43週	第44週	第45週	第46週	第47週	第48週
死	病	死	病	死	病	死	病	死	病	死	病

2003 カラス

12/15-

12/22-

第49週 第50週 第51週 第52週  
死 病 死 病 死 病 死 病

別添

研究にご協力頂いた大日本猟友会の方々（敬称略）

専務理事 小熊 實

松田美博、小松久平、渋谷鉄治、池田 均、真坂照和、水落邦一、根津 誠、藤木 満、新田 亨、  
渡辺仙市、太田寛平、小宮山一夫、南雲勝安、山田由夫、山口正夫、村山隆敏、根本知司、  
鈴木 茂、上野敬清、鈴木謙治、白濱 佑、宮口富義、吉川良長をはじめ、フロッキハンターズメ  
ンバー18名、初津昭一、花田 實 花田姜子、祐本征武、丹下 修、石本 進、石本 剛、  
高橋忠一、太田良一、菊地栄一、天羽 実、中條平治、板倉 真、高山喜代之、永野昭一、  
長谷川権輔、前田 司、荒井輝光、佐藤 翼、末沢 勉、野島秀美、小池勝美、中村建造、  
鈴木俊平、土田哲也、小熊 忠、岡川純一郎 笹谷彦一郎、近藤則男、中村 隆、末山興良、  
川端進美、錦織和夫、佐藤一栄、坂田勝治、根本知司、宮口富義、吉川良長、前田 司、荒井輝光  
吉田 浩、竹内郁端、富樫春吉、向井勝義、速水英利

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
（総括・分担）研究報告書

抗狂犬病ウイルス IgY 抗体によるホルマリン固定材料からの抗原検出法

分担研究者：井上 智 国立感染症研究所獣医科学部第二室長

研究協力者：朴 天鎬 北里大学獣医畜産学部獣医病理学教室

研究協力者：野口 章 国立感染症研究所獣医科学部第二室

研究要旨：狂犬病の報告がない日本では可能なかぎり生ウイルスを使用しない安全性の高い簡便な診断・検査法が望まれる。そこで、生ウイルスを使用しない安全性の高い簡便な狂犬病ウイルスの抗原診断系を（1）大腸菌による組換えタンパクの発現、（2）免疫鶏卵法による IgY 抗体の産生、（3）免疫組織抗体法によるホルマリン固定された狂犬病ウイルス抗原の検出法を組み合わせ可能とした。

A. 研究目的

狂犬病の報告がない日本では可能なかぎり生ウイルスを使用しない安全性の高い簡便な診断・検査法が望まれる。これまでに、大腸菌による組換えタンパク発現系と免疫鶏卵法を併用した安全で安価な狂犬病ウイルス検出用 IgY 抗体の作成に成功している。そこで、狂犬病のウイルス抗原検出を安全に行なうために狂犬病ウイルス感染マウスのホルマリン固定材料を利用して作出 IgY 抗体の免疫組織抗体法への有効性を検討した。

B. 研究方法

狂犬病ウイルスのリコンビナント核蛋白は CVS-11 株（CDC 分与株）から作製した。PCR 増幅した核蛋白遺伝子は pQE

ベクター（キアゲン）に組み込み 6xHis タグ標識蛋白（His-NP）として発現した。

発現 His-NP は Ni-NTA agarose を用いて native condition 下で精製を行い、産卵鶏の左脚大腿筋に 1mg を免疫して鶏卵中に蓄積した IgY 抗体を $\lambda$ カラギーナン法を用いて精製した。

抗原検査系の確立には CVS-11 株感染マウス（BALB/c および C57BL/6J）の神経組織のホルマリン固定後にパラフィン包埋されたマウスの脳材料を使用した。免疫組織法はビオチン化抗体と Streptoavidin-peroxidase を用いるダコ社の LSAB Kit で行った。

・産卵鶏への免疫

精製 His-NP を左脚大腿筋の筋肉内に接種。初回免疫には 0.36mg の His-NP を 1ml の FCA と共に接種を行なった。追加免疫は 0.18mg の His-NP と 0.5ml の FIA を 2 週目と 4 週目に行なった。鶏卵は毎日採卵し、卵黄を凍結保存した。

・ IgY 抗体の精製 (λカラギーナン法)

1. 卵黄 100g を 300ml の 0.5%NaCl とともに攪拌
2. λカラギーナン (0.4%) 200ml を加えて、室温で 1 時間静置
3. 遠心分離 (9000 rpm、30 分、4°C)
4. 塩析 (3 回)
  - ・ 上清の 15% (w/v) 量の Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えて 30 分間静置
  - ・ 遠心分離 (9000 rpm、30 分、4°C)
  - ・ 沈澱に 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を加えて溶解
5. 透析

・ 免疫染色

1. 脱パラフィン
2. 水洗 (10 分、DW、PBS)
3. 0.1%トリプシン (37°C、30 分)
4. PBS 洗浄 (3 回 : total 10 分)
5. 内因性ペルオキシダーゼ活性のブロッキング (0.3%過酸化水素加メタノール、室温、30 分)
6. PBS 洗浄 (3 回 : total 10 分)
7. 10%ウサギ血清 (室温、20 分)

8. Blotting off
9. 一次抗体 (anti N IgY、200 倍希釈、4°C、一晚)
10. PBS 洗浄 (3 回 : total 10 分)
11. 二次抗体 (HRP anti chicken、200 倍、37°C、30 分)
12. PBS 洗浄 (3 回 : total 10 分)
13. DAKO LSAB 社製 streptavidin-HRP (2 滴、37°C、20 分)
14. PBS 洗浄 (3 回 : total 10 分)
15. DAB で発色
16. 水洗
17. 核染、色出し 10 分
18. 分色
19. 封入

C. 研究結果

鶏卵法により作出した大腸菌発現リコンビナント核蛋白 (His-NP) に特異的な IgY 抗体を利用して、狂犬病ウイルスを感染させたマウスのホルマリン固定脳組織から作成したパラフィンブロックの狂犬病ウイルス抗原の検出を免疫組織抗体法により行なった。

作出した抗 His-NP -IgY 抗体は、マウスの中枢および末梢の神経組織中に感染している CVS-11 株の核蛋白を特異的に検出可能な事が示された (図 1)。

D. 考察



大腸菌による組換えタンパク発現系と免疫鶏卵法を併用して作成した狂犬病ウイルス検出用 IgY 抗体は、ホルマリン固定脳組織から作成したパラフィンブロックを利用した免疫組織抗体法において狂犬病ウイルス抗原の検出が可能である事が示された。

#### E. 結論

本研究により、生ウイルスを使用しない安全性の高い簡便な狂犬病ウイルスの抗原診断系を（1）大腸菌による組換えタンパクの発現、（2）免疫鶏卵法による IgY 抗体の産生、（3）免疫組織抗体法によるホルマリン固定された狂犬病ウイルス抗原の検出法を組み合わせる事によって可能とした。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Motoi Y., Sato K., Hatta H., Morimoto K., Inoue S. and Yamada A. 2005. Production of rabies neutralizing antibody in hen's eggs using a part of the G protein expressed in Escherichia coli. Vaccine in press.

Motoi Y., Inoue S., Hatta H., Sato K., Morimoto K. and Yamada A. 2005. Detection of Rabies-Specific Antigens

by Egg Yolk Antibody (IgY) to the Recombinant Rabies Virus Proteins Produced in Escherichia coli. JJID 58: in press.

##### 2. 学会発表

朴 天鎬、井上 智、野口 章、小山田敏文、吉川博康、山田章雄。狂犬病ウイルス (CVS-11) を感染させた C57BL/6J マウスの中樞神経系と骨格筋の感染病理。第 137 回日本獣医学会、2004 年、9 月、札幌

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

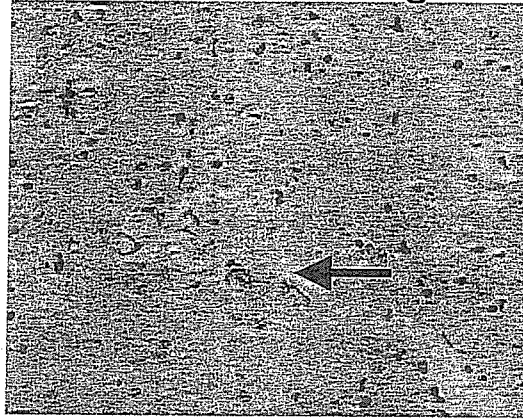
なし

##### 3. その他

なし

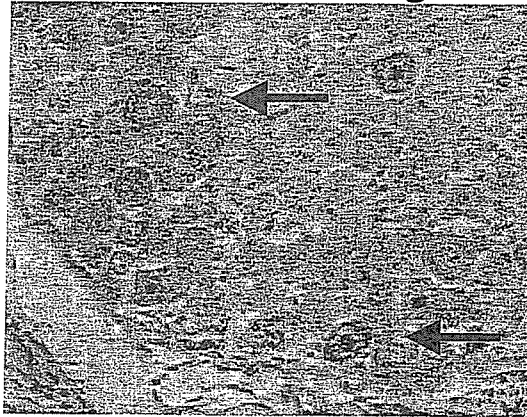
図 1

Anti-N chicken IgY



C57BL/6J、脊髓、× 400

Anti-N chicken IgY



BALB/c、三叉神経節、× 400

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
（総括・分担）研究報告書

狂犬病ウイルスの遺伝子診断に使用する安全で簡易な陽性対照鋳型 RNA の作出

分担研究者：井上 智 国立感染症研究所獣医科学部第二室長

研究協力者：野口 章 国立感染症研究所獣医科学部第二室  
加来義浩 国立感染症研究所獣医科学部第二室

研究要旨：日本では40年以上狂犬病の発生はないが、近年の国際的な流通拡大、無検疫動物の大量輸入、港湾の不法上陸犬などによって偶発的な狂犬病の発生が危惧されている。狂犬病の発生が疑われた場合の迅速な検査法として遺伝子診断の普及が期待されるが、狂犬病清浄国である国内で検査の陽性対照をウイルスとして保持することは容易でない。そこで、狂犬病の遺伝子診断用に、生ウイルスを使用しない安全で再生産可能な陽性対照鋳型 RNA 産生システムの作出を行なった。同時に、陽性対照遺伝子のクロスコンタミネーションが疑われた場合には制限酵素処理もしくは Pyrosequencing 法によって迅速に検証できるようにした。

## A. 研究目的

狂犬病の発生が疑われた場合の迅速な検査法として遺伝子診断法の普及が期待されるが、狂犬病清浄国である国内で検査に使用する陽性対照をウイルスとして保持することは容易でない。そこで、狂犬病の遺伝子診断用に、生ウイルスを使用しない安全で再生産可能な陽性対照鋳型 RNA 産生システムの作出を行なった。

## B. 研究方法

### 陽性対照鋳型 RNA 合成のための鋳型 DNA の作出

CVS-11 株の N 遺伝子全長を含む cDNA（1,506bp：Primer P1 & 304）を pGEM-T Easy vector にクローニング（pGEM-T E P1/304）した。作出した鋳型 DNA の遺伝子内には Overlap PCR 法を用いて4カ所に4種類の異なる制限酵素サイトを挿入

（pGEM-T E P1/304 mutant）して PCR により増幅される遺伝子を特定可能とした。

### 陽性対照とする鋳型 RNA の合成

陽性対照鋳型 RNA 合成用の鋳型 DNA には pGEM-T E P1/304 mutant を Apa I にて1本鎖化したものを使用した。陽性対照 (-)RNA 鎖は pGEM-T Easy Vector の SP6 RNA polymerase promoter 活性を利用して Riboprobe in vitro transcription (RIT) systems により合成した。陽性対照鋳型 RNA には Dnase によって RNA 合成に使用した鋳型 DNA を処理した後にフェノール・クロロホルム処理によって精製したものを使用した。

### 作出した陽性対照鋳型 RNA を利用した RT-PCR

正常脳組織を陽性対照鋳型 RNA とともに TRIZOL でホモジナイズした後、試薬のプロットコールに従い RNA の抽出を行った。抽出した RNA は、AMV RTase (Promega) によ

り JW12 プライマー (ATGTAACACC(c/t)CTACAATG) により RT を行った。RT 産物は EX-Taq (TaKaRa) を使用して PCR を 10g プライマー (CTACAATGGATGCCGAC) と 304 (TTgACgAAGATCTTGCTCAT) プライマーで行なった。PCR による特異的遺伝子の増幅は、1% agarose gel (TAE) による電気泳動の後に EtBr 染色を行い UV イルミネータで確認した。

#### 作出した陽性対照鋳型 RNA を用いて行なった RT-PCR 産物の同定

作出した陽性対照鋳型 RNA によって増幅された遺伝子産物の同定は、鋳型 DNA の遺伝子内に挿入した 4 種類の異なる制限酵素サイトの切断パターンと挿入した制限酵素サイトの塩基配列をパイロシーケンシング法により短時間で迅速シーケンスすることにより可能とした。

### C. 研究結果

#### 陽性対照とする鋳型 RNA の合成

作出した pGEM-T E P1/304 vector を 1 本鎖化して得た DNA を鋳型として SP6 RNA polymerase により合成される 1 本鎖 RNA の予想サイズは 1,628b であり、今回 RIT systems により合成された鋳型用のマイナス鎖 RNA は、アガロースゲル上で 1,628b 相当の位置に観察された。(図 3)

#### RT-PCR の成績

制限酵素サイトを挿入した合成マイナス鎖 RNA と制限酵素サイトが挿入されていないウイルス由来のマイナス鎖 RNA とともに RT 後に PCR のプライマーを 10g/304 の組合せで行った結果、目的サイズの cDNA が増幅された。また、RNA 合成に使用した鋳型 DNA による遺伝子増幅の否定は RTase を加えない RT-PCR の系も同時行い、増幅産物がないことで確認した。(図 4)

#### 制限酵素処理の成績

制限酵素サイトが挿入された(-)鎖 RNA を RT-PCR で増幅した cDNA は、挿入した全ての制限酵素により予想された 2 つのサイズに切断された。一方、制限酵素サイトが挿入されていないウイルス由来の(-)鎖 RNA を RT-PCR で増幅した cDNA は、今回使用した何れの制限酵素によっても切断されなかった。この結果により陽性対照として使用した RNA には新たに挿入した制限酵素サイトが確実に存在していることが確認できた。(図 5)

#### パイロシーケンスによる塩基配列の確認

作出した鋳型 DNA の混入による擬陽性の確認は、挿入した制限酵素サイトの塩基配列の決定によって行うことが可能であり、今回行った実験では陽性対照として使用した RNA から RT-PCR により増幅した産物の塩基配列を確認したところ間違いなく、陽性対照の塩基配列を確認できた。一方、ウイルス由来の RNA から RT-PCR を行った産物には制限酵素サイトはなく、ウイルス本来のシーケンスが確認できた。(図 6)

### D. 考察

今回、狂犬病の遺伝子診断に必要となる陽性対照用の鋳型 RNA を人工的に合成するシステムを確立した。これにより、生ウイルスを使用しないで安全かつ安価に陽性対照用の鋳型 RNA を産生することが可能となり、狂犬病の遺伝子診断において必要とされる陽性対照に狂犬病ウイルスを使用しないで RT-PCR を行なうことが可能になった。また、陽性対照遺伝子のクロスコンタミネーションが疑われた場合には、挿入した特異な制限酵素サイトの制限酵素処理もしくは Pyrosequencing 法による迅速な塩基配列の特定によって短時間で検証を可能にした。

## E. 結論

狂犬病の発生が疑われた場合の迅速な検査法として遺伝子診断法の普及が期待されるが、狂犬病清浄国である国内で検査に使用する陽性対照をウイルスとして保持することは容易でない。そこで、今回、狂犬病の遺伝子診断に必要となる陽性対照用の鋳型 RNA を人工的に合成するシステムを確立した。また、陽性対照遺伝子のクロスコンタミネーションが疑われた場合に制限酵素処理もしくは Pyrosequencing 法によって迅速に検証することを可能にした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表 誌上発表

Shoji, Y., Inoue, S., Nakamichi, K., Kurane, I., Sakai, T., Morimoto, K. 2004. Generation and characterization of P gene-deficient rabies virus. *Virology*. 318:295-305.

Inoue, S., Noguchi, A., Tanabayashi, K. and Yamada, A. 2004. Preparation of a Positive Control DNA for Molecular Diagnosis of *Bacillus anthracis*. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57:29-32.

Inoue, S., Asano, M., Motoi, Y., Makino, T. and Yamada, A. 2004. The Absence of Anti-Rabies Antibody in Sera of the Feral Raccoons (*Procyon lotor*) Captured in Hokkaido, Japan. *Jpn.J.Infect.Dis.* 57:110-112.

Iwasaki, T., Inoue, S., Tanaka, K., Sato, Y., Morikawa, S., Hayasaka, D., Moriyama, M., Ono, T., Kanai, S., Yamada, A., Kurata, T. 2004. Characterization of Oita virus 296/1972 of Rhabdoviridae isolated from a horseshoe bat bearing characteristics of both lyssavirus and vesiculovirus. *Arch Virol.* 149:1139-54.

Nakamichi K., Inoue S., Takasaki T., Morimoto K. and Kurane I. 2004. Rabies Virus Stimulates Nitric Oxide Production and CXC Chemokine Ligand 10 Expression in Macrophages through Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2. *J. Virol.* 78:9376-88.

井上 智。トピックス：日本の狂犬病予防と危機管理。感染症等情報 (World Focus) : No55、1-2、2004

森本金次郎、井上 智。感染症。42。リッサウイルス感染症。編集：竹田美文、木村 哲。朝倉書店：179-182、2004

井上 智。感染症の診断・治療ガイドライン 2004。リッサウイルス感染症。日本医師会雑誌、臨時増刊号 132 : 174-175、2004

最新版 家庭医学大全科 総合監修：高久史麿、北村惣一郎、猿田享男、福井次矢。法研：2004

井上 智。狂犬病～日本とアジアをとりまく状況～。特集 日本画直面する狂犬病の脅威。Journal of Modern Veterinary Medicine、82:6-10、2005

### 学会発表等

Inoue, S., Noguchi, A., and Akio, Y. Preparation of Safe and Reproducible Positive-control for Molecular Diagnosis of Rabies. Fortieth anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program (38th Joint Working Conference on Viral Diseases). 7-9 December, 2004. Kyoto, Japan.

井上 智。人と動物に共通の感染症の予防対策と危機管理：危機意識の継続。食染協総会後講演会。日本食品洗浄衛生協会。2004年、5月20日、東京

井上 智。狂犬病の現状と防疫の要点。愛護動物管理関係研修会。栃木県動物愛護指導センター。2004年、6月9日、栃木県

井上 智。人獣共通感染症（zoonosis）について。家畜衛生講習会（獣疫学特殊講習会）。独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構動物衛生研究所。2004年、9月28日、茨城県

井上 智。人獣共通感染症の最近の話題（人と動物に共通の感染症の予防対策と危機管理－危機意識の継続）。獣医師講習会。広島県獣医師会畜産部会。2004年、10月27日、広島県

井上 智。世界における狂犬病の発生状況について。平成16年度狂犬病予防等技術研修会。厚生労働省健康局結核感染症課。2004年、11月5日、東京（東京大学大講堂）

井上 智。動物由来感染症における獣医師の役割。平成16年度 四国地区公衆衛生講習会。社団法人徳島県獣医師会。2004年、11月20日、徳島県

井上 智。日本の狂犬病予防と危機管理。学術フロンティア 第1回公開シンポジウム「人獣共通感染症のサーベイランスと制御」。日本大学生物資源科学部 日本大学大学院獣医学研究科。2004年、11月27日、神奈川県

井上 智。国内外における狂犬病の現状について。群馬県甘楽富岡狂犬病連絡予防協議会研修。国立感染症研究所（共用第二会議室）。2004年、12月2日、東京

井上 智。人と動物の共通感染症。平成16年度臨床獣医師講習会。日本獣医師会 栃木県獣医師会。2005年、1月14日、栃木県

井上 智、野口 章、加来義浩、反町士朗、根本卓弥、平塚千書、更科 順、高橋まり、

山形 章、松澤留美子、林 裕一、出村尚子、高附敏幸、山田章雄。不法上陸犬が報告された港湾地域の放浪犬における狂犬病防御抗体の保有状況。第137回日本獣医学会、2004年、9月、札幌

朴 天鎬、井上 智、野口 章、小山田敏文、吉川博康、山田章雄。狂犬病ウイルス（CVS-11）を感染させた C57BL/6J マウスの中枢神経系と骨格筋の感染病理。第137回日本獣医学会、2004年、9月、札幌

野口 章、井上 智、棚林 清、山田章雄。狂犬病ウイルスの遺伝子診断に使用する安全で簡易な陽性対照鋳型 RNA 産生システムの確立。第52回日本ウイルス学会、2004年、11月、横浜

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

図 1

# 陽性対照鋳型RNAを合成するための鋳型DNAの作出

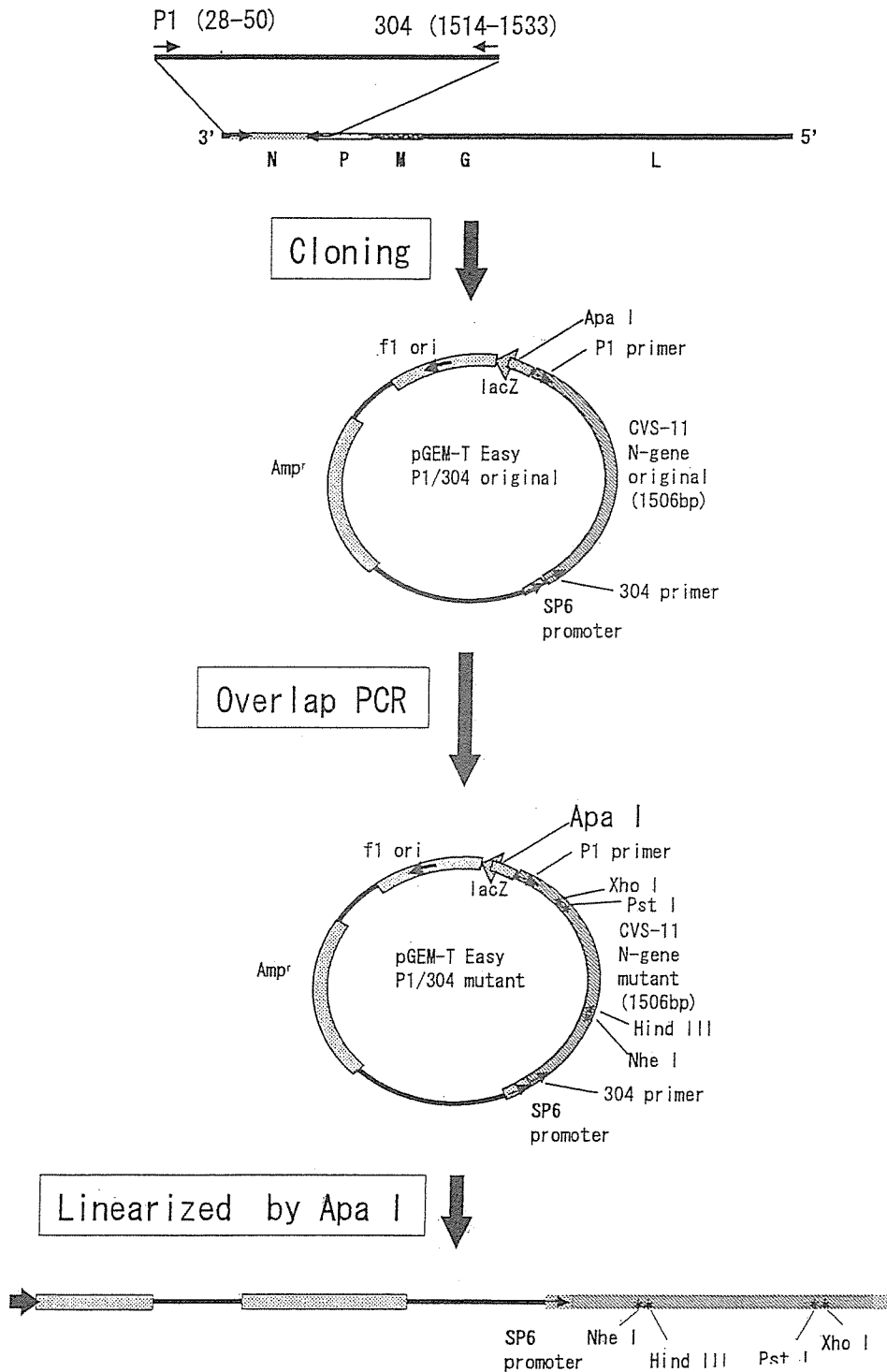


図 2

陽性対照とする鋳型マイナス鎖RNAの合成と  
合成した鋳型RNA鎖を使用した RT-PCR

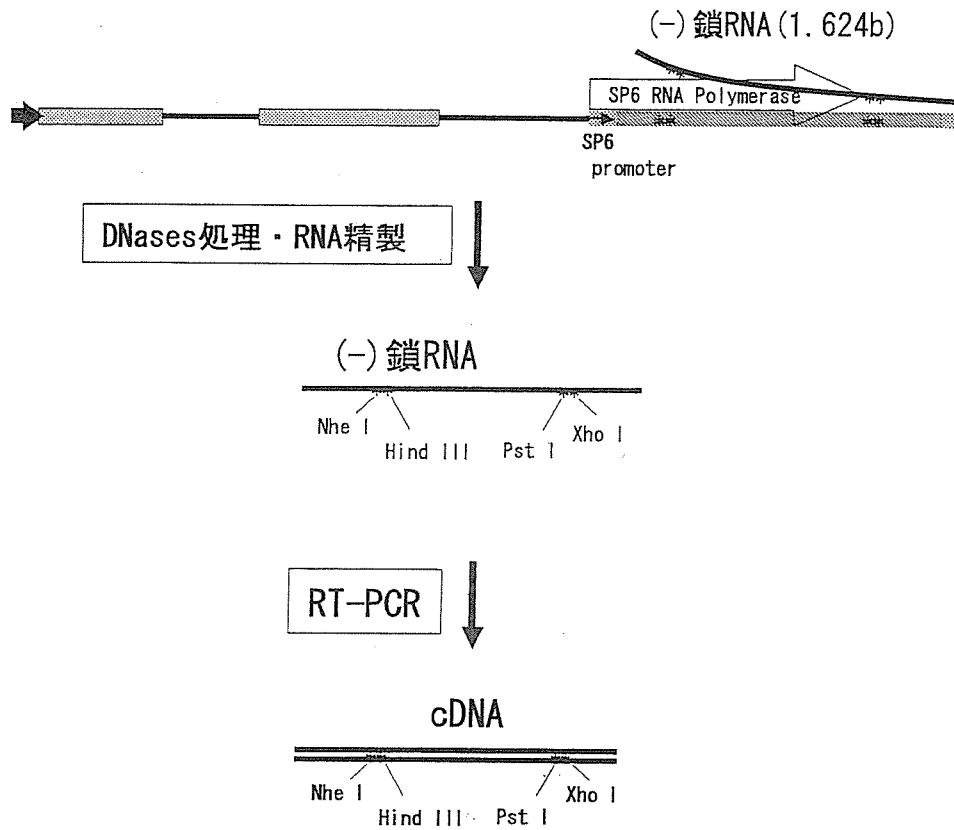
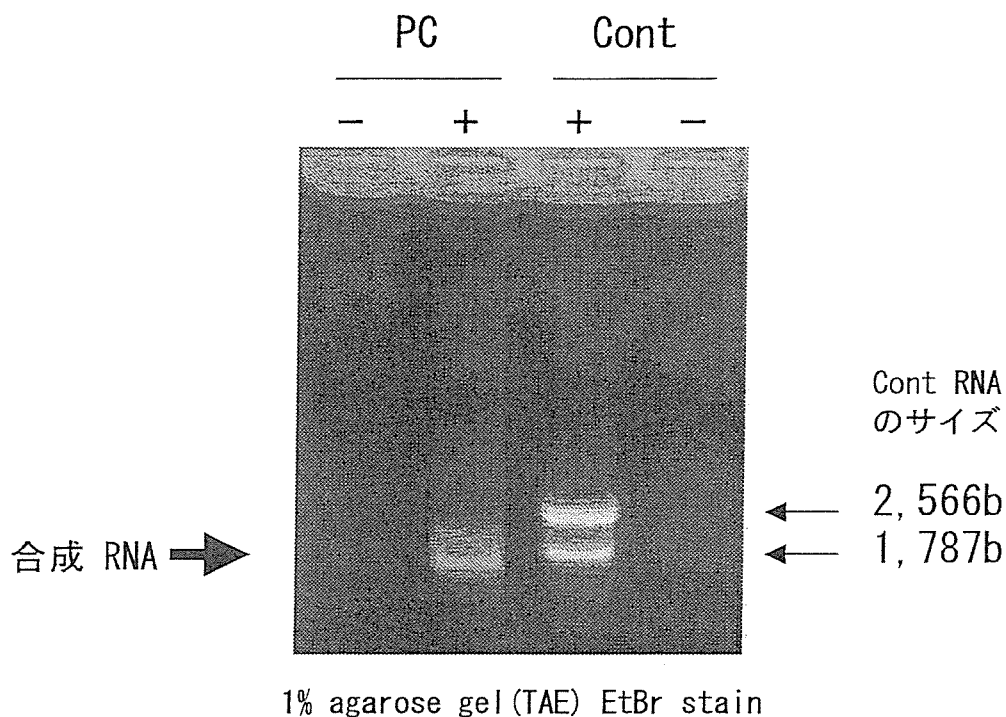




図 3

RNA polymeraseにより合成した1本鎖の  
マイナス鎖 RNA ( 陽性対照の鋳型RNA )

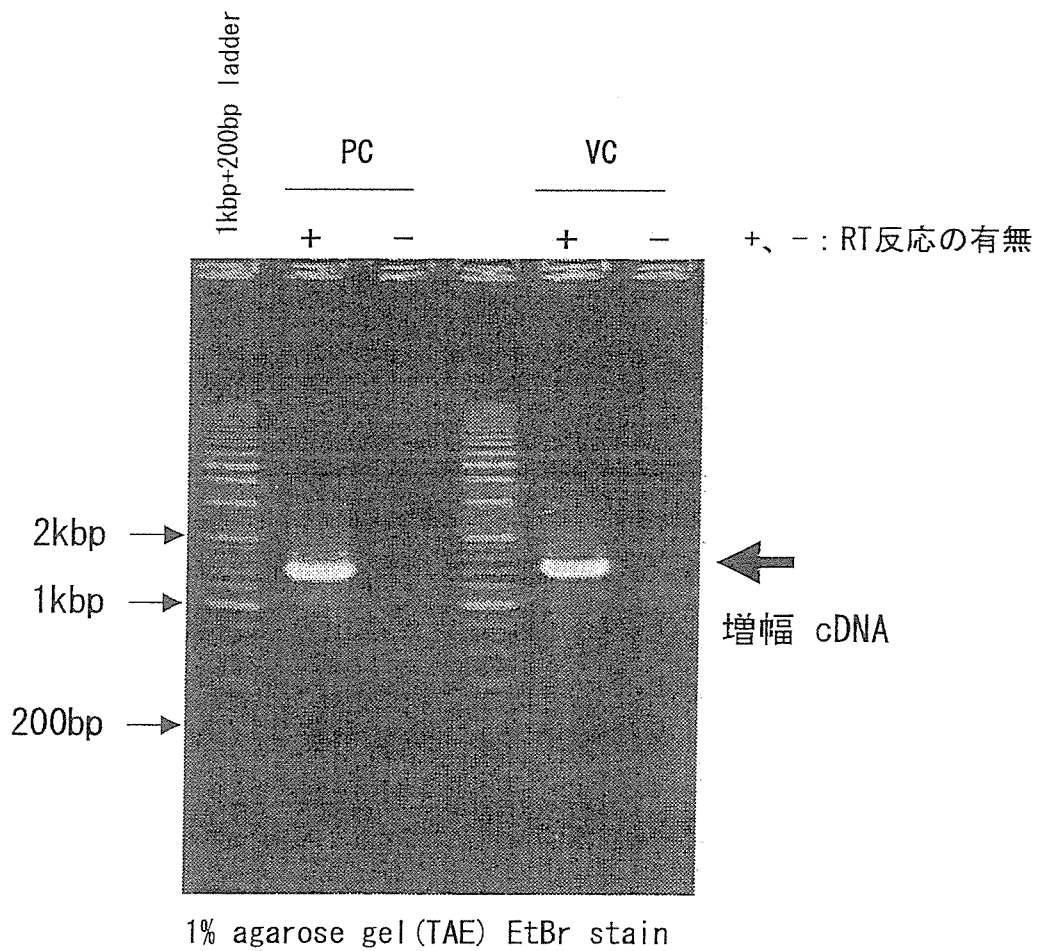


PC: RIT systems により pGEM-T E P1/304 mutant Vector から合成した鋳型用のマイナス鎖RNA

Cont: RIT systems 附属の 鋳型 DNA を利用して合成した2種類の Control RNA鎖

図 4

合成した鋳型用のマイナス鎖 RNA  
を利用した RT-PCR の成績

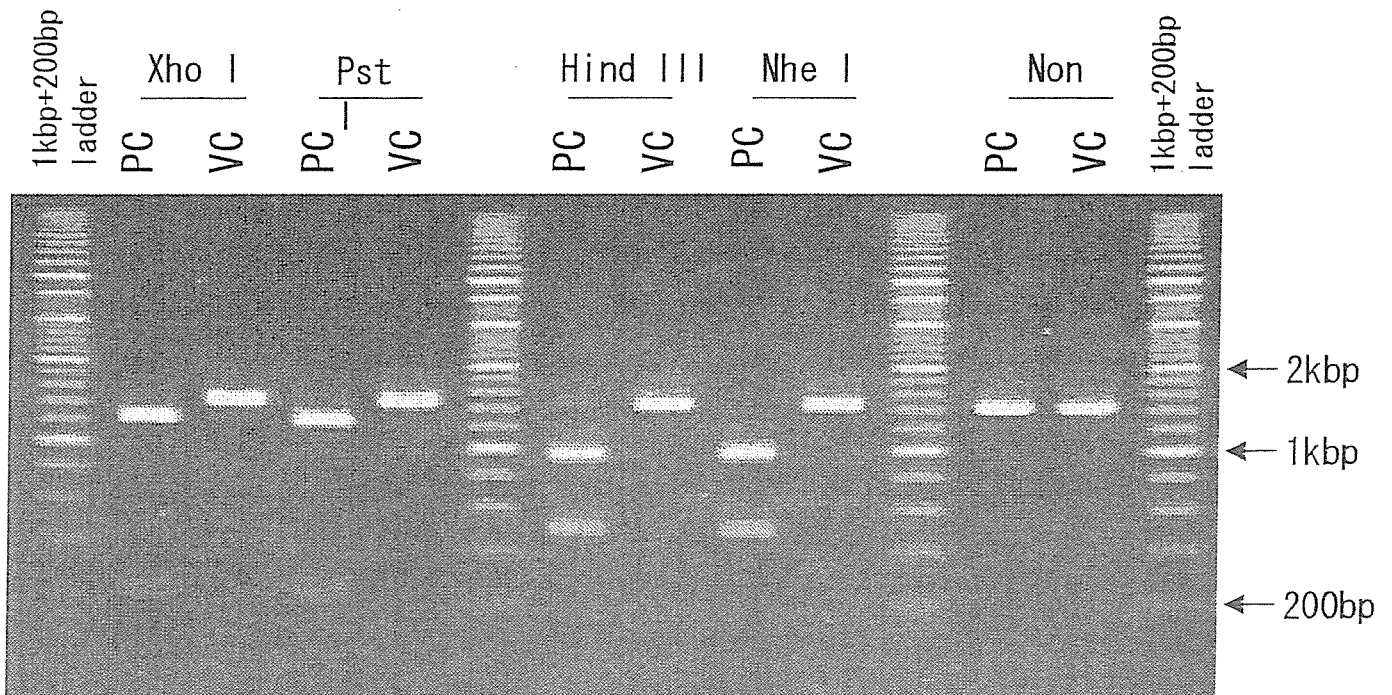


PC: 制限酵素サイトを挿入した pGEM-T E P1/304 Mutant vector から合成したマイナス鎖RNAの RT-PCR

VC: 制限酵素サイトが挿入されていないウイルス由来のマイナス鎖RNAのRT-PCR

図 5

合成した鋳型用のマイナス鎖 RNA を利用した RT-PCR 産物の制限酵素処理



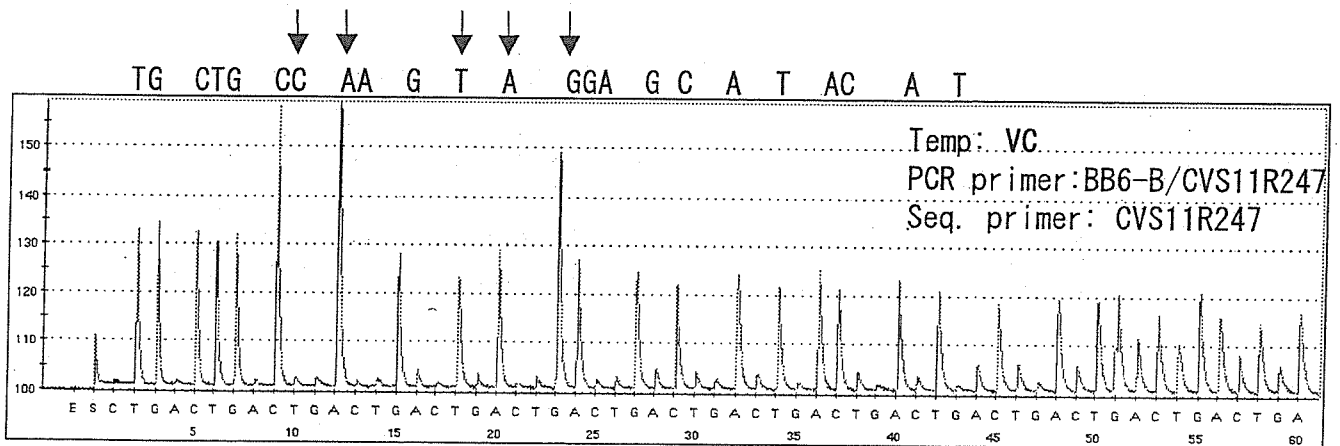
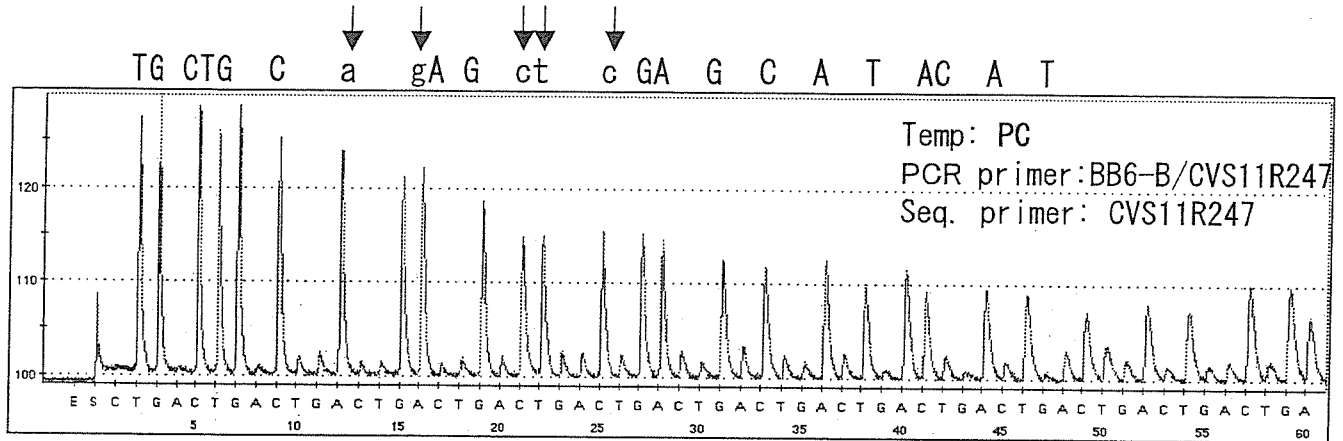
1% agarose gel (TAE) EtBr stain

合成した鋳型用マイナス鎖 RNA の RT-PCR 産物を制限酵素処理した場合の切断断片サイズ

{	Xho I:	218bp + 1,250bp (Total: 1,468bp)
	Pst I:	230bp + 1,238bp (Total: 1,468bp)
	Hind III:	463bp + 1,005bp (Total: 1,468bp)
	Nhe I:	458bp + 1,011bp (Total: 1,468bp)

図 6

Pyrosequencing法を用いた鋳型 DNA 混入による擬陽性の迅速な確認



CVS11 PC. . . . . Pst I Xho I  
 . . . . . ag . ctc . . . . .  
 CVS11 VC. TGCTGCCAAGTAGGAGCATACAT