

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

野生動物由来狂犬病およびリッサウイルス感染症の汚染把握を目的とした国際疫学調査
(H18－新興－一般－007)

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 酒井 健夫

平成19（2007）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

野生動物由来狂犬病およびリッサウイルス感染症の汚染把握を目的とした国際疫学調査

酒井 健夫 ----- 1

II. 分担研究報告

野外狂犬病ウイルスの遺伝子および分子疫学的解析

伊藤 琢也 ----- 5

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 12

IV. 研究成果の刊行物・別刷

----- 13

総括研究報告書

野生動物由来狂犬病およびリッサウイルス感染症の汚染把握を目的とした国際疫学調査

主任研究者 酒井 健夫 日本大学生物資源科学部教授

研究要旨 我が国は、現在、致死性感染症である狂犬病の清浄国であるが、2006年11月に36年ぶりに国内で患者が発生し、本病が再興感染症となる危険性がある。海外の狂犬病発生地域から本病の侵入を阻止するためには、海外での狂犬病流行状態を把握し、科学的根拠に基づく侵入防止対策を確立しなければならないが、コウモリなどの野生動物間での感染が維持される森林型狂犬病の感染環および自然宿主については不明な点が多い。したがって、我が国周辺諸国ならびに常在国で多発している本病に対して、特に疫学情報が乏しい地域を選定し、野生動物由来狂犬病および類似疾患であるリッサウイルス感染症の疫学調査を行った。

- (1) ブラジルの野生動物および家畜より分離した野外狂犬病ウイルス80検体の遺伝子サンプルを収集した。南米で最も被害の大きいウシ狂犬病の分子疫学的解析の結果、ウシ分離株の遺伝子系統は、地域に依存した複数のウイルスグループによって構成され、各グループの分布は吸血コウモリの分布地域を反映することを明らかにした。したがって家畜狂犬病に代表される吸血コウモリ由来狂犬病の流行を阻止するには、地域ごとの吸血コウモリ集団の制御が有効であることが示唆された。また、食虫コウモリが保有する狂犬病ウイルスは遺伝子多様性が大きく、複雑に構成されている。今後、さらに広範な地域から多くのコウモリ由来狂犬病ウイルスの遺伝子サンプルを収集し、その遺伝子解析データの蓄積とそれを活用した分子疫学的解析によってコウモリ由来狂犬病の疫学の解明が期待できる。
- (2) ブラジル北部の森林地帯で流行したヒト狂犬病の分子疫学的調査の結果、その発生の多くが吸血コウモリを由来としたが、同時に同地域ではイヌ由来の狂犬病が発生していることも明らかにした。イヌ由来のいわゆる都市型狂犬病の発生は、大都市においては制圧傾向にあるが、イヌのワクチネーションおよび繋留などのコントロールが不十分な地域においては、野生動物のみならず、イヌにおける対策が本病の制御を図る上で不可欠であることが再認識された。
- (3) ブラジル北東部においてキツネから分離された狂犬病ウイルスの遺伝子を解析した結果、キツネは、既知のイヌ型狂犬病株と異なる遺伝子系統のウイルスを保有することを明らかにした。
- (4) 中華人民共和国の東北部、北西部および南部における疫学調査を行い、中国全土にわたって狂犬病が浸潤していることを確認した。これまで狂犬病の疫学報告が乏しい中国においては、野生動物由来を含む野外狂犬病ウイルスの分子疫学調査がより一層重要であると考えられた。
- (5) ヒトおよびイヌ狂犬病が多発している中国南部において、イヌおよびウシ、ブタ等の家畜から分離された狂犬病ウイルスを遺伝子学的に同定し、家畜から分離された狂犬病ウイルスはイヌ株を由来とすることが明らかとなった。したがって、本調査地域においてはイヌを宿主および伝播動物とする都市型狂犬病対策がその予防に重要である。

以上、本調査成果をもとに、今後はさらなる野外狂犬病ウイルスの遺伝子データの蓄積とそれに基づく分子疫学的解析によって、野生動物あるいはイヌ由来狂犬病の動態を精確に把握し、本病の宿主および伝播動物となりうる動物における危険度評価に有益な情報の集積を目指す。

分担研究者 伊藤 琢也
日本大学生物資源科学部講師

A. 研究目的

海外の人獣共通感染症が国内へ侵入する危険性が増大し、近年では鳥インフルエンザや牛海綿状脳症等の新興感染症が国内に侵入している。我が国は、現在、致死性感染症である狂犬病の清浄国であるが、2006年11月に36年ぶりに国内で患者が発生し、本病が再興感染症となる危険性が高い。海外の狂犬病発生地域から本病の侵入を阻止するためには、海外での狂犬病流行状態を把握し、科学的根拠に基づく侵入防止対策を確立しなければならないが、コウモリなどの野生動物間での感染環が維持される森林型狂犬病は増加傾向にあるにもかかわらず、その感染環および自然宿主については不明な点が多い。したがって、我が国周辺諸国ならびに常在国で多発している本病に対して、特に疫学情報が乏しい地域を選定し、野生動物由来狂犬病および類似疾患のリッサウイルス感染症の疫学調査を行った。

B. 研究方法

・ブラジルでの野生動物由来狂犬病ウイルスの採集：

これまでの調査実績があるブラジルにおいて、大規模な野生動物および家畜由来のウイルス採集を実施した。調査はサンパウロ大学獣医学部の協力を得て、サンプル収集にはコウモリの直接捕獲、害獣駆除および各地診断センターやサンパウロ大学に持ち込まれ、分離・保管されたウイルスを積極的に利用した。

・中華人民共和国黒龍江省・吉林省、新疆ウイグル自治区、および広西自治区における狂犬病疫学調査：

中国北東部では、中国黒竜江省ハルピン獣医研究所の協力を得て、また中国北西部の新疆ウイグル自治区では、新疆ウイグル大学と連携し、さらに広西自治区においては、広西大学および

広西自治区獣医検疫所の協力を得て疫学調査を行った。

・野外狂犬病ウイルスの分離と遺伝子解析：

①狂犬病陽性と診断された動物の脳組織から得られたウイルスサンプルを採集し、次いで②サンプルより市販のキットによりゲノムRNAを抽出し、③抽出したウイルスRNAの遺伝子解析、由来宿主の鑑別、既知の株との比較を行った（③は日本で実施した）。

C. 研究結果

(1) ブラジルのコウモリ由来狂犬病

ブラジルの野生動物および家畜より分離した野外狂犬病ウイルス80検体の遺伝子サンプルを収集した。南米で最も被害の大きいウシ狂犬病の分子疫学的解析の結果、ウシ分離株の遺伝子系統は、地域に依存した複数のウイルスグループによって構成され、各グループの分布は吸血コウモリの分布地域を反映することを明らかにした。

(2) ブラジル北部におけるヒト狂犬病の流行

2004年から2005年にかけてブラジル北部の森林地帯で流行したヒト狂犬病の分子疫学的調査の結果、その発生の多くが吸血コウモリを由来としたが、同時に同地域ではイヌ由来の狂犬病が発生していることを明らかにした。

(3) ブラジルのキツネ由来狂犬病

ブラジル北東部においてキツネから分離された狂犬病ウイルスの遺伝子を解析した結果、キツネは、既知のイヌ型狂犬病株と異なる遺伝子系統のウイルスを保有することを明らかにした。

(4) 中華人民共和国における狂犬病疫学調査

中華人民共和国の東北部（黒龍江省および吉林省）、北西部（新疆ウイグル自治区）および南部（広西自治区）における狂犬病の疫学調査を行い、中国全土にわたって狂犬病が広く浸潤していることが確認された。

(5) 中華人民共和国における家畜狂犬病

ヒトおよびイヌ狂犬病が多発している中国南部地域において、イヌおよびウシ、ブタ等の家

畜から分離された狂犬病ウイルスを遺伝子学的に同定した。詳細な遺伝子解析の結果、家畜から分離された狂犬病ウイルスはイヌ株を由来とすることが明らかとなった。

D. 考察

ブラジルのウシから分離された狂犬病ウイルスの解析によって、コウモリ由来狂犬病ウイルス家畜狂犬病に代表される吸血コウモリ由来狂犬病の流行阻止には地域ごとの吸血コウモリ集団の制御が有効であることが示唆された。食虫コウモリが保有する狂犬病ウイルスは吸血コウモリ由来ウイルスと異なる系統であり、しかもその遺伝子多様性が大きく、複雑である。今後、さらに広範な地域から多検体のコウモリ由来狂犬病ウイルスの遺伝子サンプルを収集し、その遺伝子解析データの蓄積とそれを活用した分子疫学的解析によってコウモリ由来狂犬病の疫学、すなわち流行動態および自然保有宿主におけるウイルスの維持機序等の解明が期待できる。

ブラジル北部の森林地帯で流行したヒト狂犬病の分子疫学的調査の結果、吸血コウモリ由来（森林型）およびイヌ由来（都市型）狂犬病の2つの型の流行が混在していたことが明らかとなった。イヌ由来のいわゆる都市型狂犬病の発生は、大都市においては制圧傾向にあるが、イヌのワクチネーションおよび繋留などのコントロールが不十分な地域においては、野生動物のみならず、イヌにおける対策が狂犬病の制御にとって不可欠であることが再認識された。

ブラジル北東部においてイヌとは異なる遺伝子系統のウイルスがキツネから分離された。このキツネ由来ウイルス系統とイヌ由来ウイルス系統の進化学的関連性については、今後の詳細なゲノム解析による解明が期待される。

中華人民共和国における疫学調査によって、中国全土にわたって広く狂犬病が浸潤していることを確認した。中国においては、これまで狂犬病の疫学報告が乏しいため、野生動物由来を含む野外狂犬病ウイルスの遺伝子解析による分子疫学調査がより一層重要であると考えられた。

ヒトおよびイヌ狂犬病が多発している中国南部地域において、イヌ株を由来とする家畜狂犬病の

存在が明らかとなった。したがって本調査地域においてはイヌを宿主および伝播動物とする都市型狂犬病の対策がその予防に重要であると言える。

E. 結論

我が国周辺諸国ならびに常在国で多発している本病に対して、特に疫学情報が乏しい地域を選定し、野生動物由来狂犬病および類似疾患のリッサウイルス感染症の疫学調査を行った。

ブラジルにおける吸血コウモリ由来狂犬病ウイルスの分布パターンより、家畜狂犬病に代表される吸血コウモリ由来狂犬病の流行阻止には、地域ごとの吸血コウモリ集団の制御が有効であることが示唆された。食虫コウモリが保有する狂犬病ウイルスの遺伝子系統は、吸血コウモリ由来ウイルスと異なり、遺伝子多様性が大きく、複雑であった。また、ブラジル北東部においてキツネから既知のイヌ型狂犬病株と異なる遺伝子系統のウイルスが分離された。これらの疫学的背景を明らかにするためにも、今後、さらに広範な調査が必要であると判断された。

ブラジル北部の森林地帯で発生している狂犬病の多くが吸血コウモリ由来であったが、同時にイヌ由来狂犬病の発生も認められた。したがって、狂犬病の制御においてイヌでの対策が不可欠であることが再認識された。

ヒトおよびイヌ狂犬病が多発している中国南部での疫学調査によって、イヌ由来の家畜狂犬病の存在を明らかにした。したがって本調査地域においてはイヌを宿主および伝播動物とする都市型狂犬病対策がその予防に重要であった。これまで狂犬病の疫学報告が乏しいが、全国的に浸潤が認められる中国においては、野生動物由来を含む野外狂犬病ウイルスの分子疫学調査がより一層重要であると考えられた。

今後は、これらの研究成果をもとに、さらなる野外狂犬病ウイルスの遺伝子データの蓄積とそれに基づく分子疫学的解析によって、野生動物あるいはイヌ由来狂犬病の動態を精確に把握し、本病の危険度評価に有益な情報の集積を目指したい。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

・論文発表

- 1) Shoji Y, Kobayashi Y, Sato G, Gomes AA, Itou T, Ito FH, Sakai T. Genetic and phylogenetic characterization of rabies virus isolates from wildlife and livestock in Paraiba, Brazil. *Acta Virol.* 2006; 50(1): 33-37
- 2) Sato G, Kobayashi Y, Shoji Y, Sato T, Itou T, Ito FH, Santos HP, Brito CJ, Sakai T. Molecular epidemiology of rabies from Maranhao and surrounding states in the northeastern region of Brazil. *Arch. Virol.* 2006; 151(11): 2243-2251
- 3) Kobayashi Y, Ogawa A, Sato G, Sato T, Itou T, Samara SI, Carvalho AA, Nociti DP, Ito FH, Sakai T. Geographical distribution of vampire bat-related cattle rabies in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.* 2006; 68(10): 1097-1100
- 4) Kobayashi Y, Inoue N, Sato G, Itou T, Santos HP, Brito CJ, Gomes AB, Santos MFC, Silva MV, Mota CS, Ito FH, Sakai T. Phylogenetic characterization of rabies virus isolates from Carnivora in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.* (in press)

・学会発表

- 1) 小林由紀、古郡幸子、佐藤豪、佐藤哲朗、伊藤琢也、Ito FH、酒井健夫. ブラジルのリオ・デ・ジャネイロ州における狂犬病ウイルス野外株の分子疫学. 第142回日本獣医学会学術集会 2006年9月22日, 山口
- 2) 早川利里、小林由紀、佐藤豪、佐藤哲朗、伊藤琢也、Ito FH、酒井健夫. ブラジルの狂犬病ウイルス牛分離株のG-L遺伝子間領域を用いた分子疫学的解析. 第142回日本獣医学会学術集会 2006年9月22日, 山口
- 3) 望月信之、小林由紀、佐藤豪、佐藤哲朗、伊藤琢也、Ito FH、酒井健夫. ブラジルのキツネから分離された狂犬病ウイルスの完全長ゲノム解析. 第142回日本獣医学会学術集会 2006年9月22日, 山口
- 4) Cunha EMS, Nassar AFC, Lara CSH, Villalobos ECM, Itou T, Sakai T, Shoji Y, Ito FH. Genetic characterization of Brazilian bat rabies virus. Evaluation of the pathogenicity and cross protection in mice. The XVII International Conference "Rabies in the Americas" (RITA XVII) October 19th, 2006. Brasília,

Brazil.

- ## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
- 特記事項なし。

分担研究報告書

野生動物由来狂犬病およびリッサウイルス感染症の汚染把握を目的とした国際疫学調査

－野外狂犬病ウイルスの遺伝子解析－

分担研究者 伊藤 琢也 日本大学生物資源科学部講師

研究要旨 狂犬病ウイルスの遺伝子学的分類に多用される核蛋白質および糖蛋白質遺伝子を主な標的にして、狂犬病常在地で分離された野外狂犬病ウイルスの遺伝子解析およびそれを基にした分子系統学的解析を行った。

- (1) ブラジルの野生動物および家畜より分離された野外狂犬病ウイルス80検体の遺伝子サンプルを解析した結果、ほとんどのウシ分離株は、吸血コウモリ分離株と非常に高い相同性を示した。核蛋白質遺伝子の分子系統樹を作製したところ、ウシ分離株は吸血コウモリ分離株とともに大きなグループを形成し、その分岐の内部にさらに幾つかのサブグループを形成した。食虫コウモリが保有する狂犬病ウイルスは吸血コウモリ由来ウイルスと異なる系統であり、しかもその遺伝子多様性は大きく、複雑であった。
- (2) ブラジル北部の森林地帯でヒトおよび家畜から分離された狂犬病ウイルスの糖蛋白質遺伝子を解析した結果、イヌ型および吸血コウモリ型の2つに大別され、ヒト分離株はいずれの型からも見出された。したがって、同地域ではイヌ由来および吸血コウモリ由来の狂犬病が同時に発生していることが示唆された。
- (3) ブラジル北東部のキツネから分離された狂犬病ウイルスの遺伝子は、既知のイヌ型狂犬病株と異なる遺伝子系統であった。
- (4) 中華人民共和国の東北部および北西部における疫学調査を行い、中国全土にわたって狂犬病が浸潤していることを確認した。
- (5) 中国南部でイヌ、ウシおよびブタから分離された狂犬病ウイルスは、全て遺伝子型1の狂犬病ウイルスであり、家畜から分離された狂犬病ウイルスは全てイヌ株由来であった。

以上、野外から得られたウイルスの遺伝子解析結果より、狂犬病ウイルスは宿主あるいは地域に依存した遺伝子系統として自然界に存在することが明らかとなった。

A. 研究目的

狂犬病の防除・侵入防止対策を確立する上で、野外における狂犬病ウイルスの感染環、保有宿主および伝播様式の解明は不可欠である。特にコウモリなどの野生動物間で維持される森林型狂犬病の感染環および自然宿主は不明な点が多い。本研究は、狂犬病ウイルスの遺伝子学的分類に多用される核蛋白質遺伝子を主な標的にして、狂犬病常在地で分離された野外狂犬病ウイルスの遺伝子解析およびそれに基づいて分子系統学的解析を行った。

B. 研究方法

・中華人民共和国黒龍江省・吉林省、新疆ウイグル自治区における狂犬病疫学調査：

中国北東部では、中国黒龍江省ハルビン獣医研究所の協力を得て、また中国北西部の新疆ウイグル自治区では、新疆ウイグル大学と連携して疫学調査を行った。

・野外狂犬病ウイルスの分離と遺伝子解析：

①狂犬病陽性と診断された動物の脳組織から得たウイルスサンプルを採集した後、②サンプルより市販のキットによりゲノムRNAを抽出し、③抽出したウイルスRNAの遺伝子解析、由来宿主の鑑別、既知の株との比較を行った（③は日本で実施）。遺伝子解析の標的は、狂犬病の分類に多用される核蛋白質遺伝子および抗原性状に関与する糖蛋白質遺伝子を用いた。野外分離株の遺伝子および推定アミノ酸配列と既知の分離株を用いて近隣結合法によって分子系統樹を作製し、それぞれの株のウイルス系統を明らかにした。

C. 研究結果

(1) ブラジルのコウモリ由来狂犬病

ブラジルの野生動物および家畜より分離した

野外狂犬病ウイルス80検体（図1）の分子疫学的解析の結果、ウシ分離株の遺伝子系統は、地域に依存した複数のウイルスグループによって構成された（図2）。

(2) ブラジル北部におけるヒト狂犬病の流行

ブラジル北部の森林地帯でヒトおよび家畜から分離された狂犬病ウイルスの糖蛋白質遺伝子を解析した結果、イヌ型および吸血コウモリ型の2つに大別され、ヒト分離株はいずれの型からも見出された（図3）。したがって、同地域ではイヌ由来および吸血コウモリ由来の狂犬病が同時に発生していることが示唆された。

(3) ブラジルのキツネ由来狂犬病

ブラジル北東部においてキツネから分離された狂犬病ウイルスの遺伝子を解析した結果、キツネは、既知のイヌ型狂犬病株と異なる遺伝子系統のウイルスを保有することが明らかになった（図4、図5）。

(4) 中華人民共和国における疫学調査

中華人民共和国の北東部（黒龍江省および吉林省）および北西部（新疆ウイグル自治区）における疫学調査を行い、中国全土にわたって広く狂犬病が浸潤していることを確認した。

(5) 中華人民共和国における家畜狂犬病

中国南部地域において、イヌおよびウシ、ブタ等の家畜から分離された狂犬病ウイルスの遺伝子配列を決定したところ、全て遺伝子型1の狂犬病ウイルスであることが確認された。詳細な遺伝子解析の結果、家畜から分離された狂犬病ウイルスはイヌ株を由来とすることが明らかとなった（図6）。

D. 考察

ブラジルのウシから分離された狂犬病ウイルスの解析によって、コウモリ由来狂犬病ウイルス家畜狂犬病に代表される吸血コウ

モリ由来狂犬病の流行阻止には地域ごとの吸血コウモリ集団の制御が有効であることが示唆された。食虫コウモリが保有する狂犬病ウイルスは吸血コウモリ由来ウイルスと異なる系統であり、しかもその遺伝子多様性が大きく、複雑であった。今後、さらに広範な地域から多検体のコウモリ由来狂犬病ウイルスの遺伝子サンプルを収集と遺伝子解析データの蓄積が望まれた。

ブラジル北部の森林地帯で流行したヒト狂犬病の分子疫学的調査の結果、吸血コウモリ由来（森林型）およびイヌ由来（都市型）狂犬病の2つの型の流行が混在していたことが明らかとなった。

ブラジル北東部においてイヌとは異なる遺伝子系統のウイルスがキツネから分離された。このキツネ由来ウイルス系統とイヌ由来ウイルス系統の進化学的関連性については、今後の詳細なゲノム解析による解明が期待された。

中華人民共和国における疫学調査によって、中国全土にわたって広く狂犬病が浸潤していることが確認された。

ヒトおよびイヌ狂犬病が多発している中国南部地域において、イヌ株を由来とする家畜狂犬病の存在が明らかとなった。したがって本調査地域においてはイヌを宿主および伝播動物とする都市型狂犬病の対策がその予防に重要であると判断された。

E. 結論

ブラジルにおける吸血コウモリ由来狂犬病ウイルスの分布パターンより、家畜狂犬病に代表される吸血コウモリ由来狂犬病の流行阻止には地域ごとの吸血コウモリ集団の制御が有効であることが示唆された。食虫コウモリが保有する狂犬病ウイルスの遺伝子系統は、吸血コウモリ由来ウイルスと異なり、遺伝子多様性が大きく、複雑であった。また、ブラジル北東部においてキツネから既知のイヌ型狂犬病株と異なる遺伝

子系統のウイルスが分離された。

ブラジル北部の森林地帯で発生している狂犬病の多くが吸血コウモリ由来であったが、同時にイヌ由来狂犬病の発生も認められた。

ヒトおよびイヌ狂犬病が多発している中国南部での疫学調査によって、イヌ由来の家畜狂犬病の存在が明らかになった。

今後は、以上の研究成果に基づいて、さらなる野外狂犬病ウイルスの遺伝子データの蓄積とそれに基づくより詳細な分子疫学的解析を行う予定である。

F. 研究発表

・論文発表

- 1) Shoji Y, Kobayashi Y, Sato G, Gomes A A, Itou T, Ito FH, Sakai T. Genetic and phylogenetic characterization of rabies virus isolates from wildlife and livestock in Paraiba, Brazil. *Acta Virol.* 2006; 50 (1): 33-37
- 2) Sato G, Kobayashi Y, Shoji Y, Sato T, Itou T, Ito FH, Santos HP, Brito CJ, Sakai T. Molecular epidemiology of rabies from Maranhao and surrounding states in the northeastern region of Brazil. *Arch. Virol.* 2006; 151(11): 2243-2251
- 3) Kobayashi Y, Ogawa A, Sato G, Sato T, Itou T, Samara SI, Carvalho AA, Nociti DP, Ito FH, Sakai T. Geographical distribution of vampire bat-related cattle rabies in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.* 2006; 68(10): 1097-1100
- 4) Kobayashi Y, Inoue N, Sato G, Itou T, Santos HP, Brito CJ, Gomes AB, Santos MFC, Silva MV, Mota CS, Ito FH, Sakai T.

i T. Phylogenetic characterization of rabies virus isolates from Carnivora in Brazil. J. Vet. Med. Sci. (in press)

・学会発表

- 1) 小林由紀、古郡幸子、佐藤豪、佐藤哲朗、伊藤琢也、Ito FH、酒井健夫. ブラジルのリオ・デ・ジャネイロ州における狂犬病ウイルス野外株の分子疫学. 第142回日本獣医学会学術集会 2006年9月22日, 山口
- 2) 早川利里、小林由紀、佐藤豪、佐藤哲朗、伊藤琢也、Ito FH、酒井健夫. ブラジルの狂犬病ウイルス牛分離株のG-L遺伝子間領域を用いた分子疫学的解析. 第142回日本獣医学会学術集会 2006年9月22日, 山口
- 3) 望月信之、小林由紀、佐藤豪、佐藤哲朗、伊藤琢也、Ito FH、酒井健夫. ブラジルのキツネから分離された狂犬病ウイルスの完全長ゲノム解析. 第142回日本獣医学会学術集会 2006年9月22日, 山口
- 4) Cunha EMS, Nassar AFC, Lara CSH, Villalobos ECM, Itou T, Sakai T, Shoji Y, Ito FH. Genetic characterization of Brazilian bat rabies virus. Evaluation of the pathogenicity and cross protection in mice. The XVII International Conference "Rabies in the Americas" (RITA XVII) October 19th, 2006. Brasilia, Brazil.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特記事項なし。

図1 ブラジルのウシ狂犬病から得られたRV分離株(80検体)

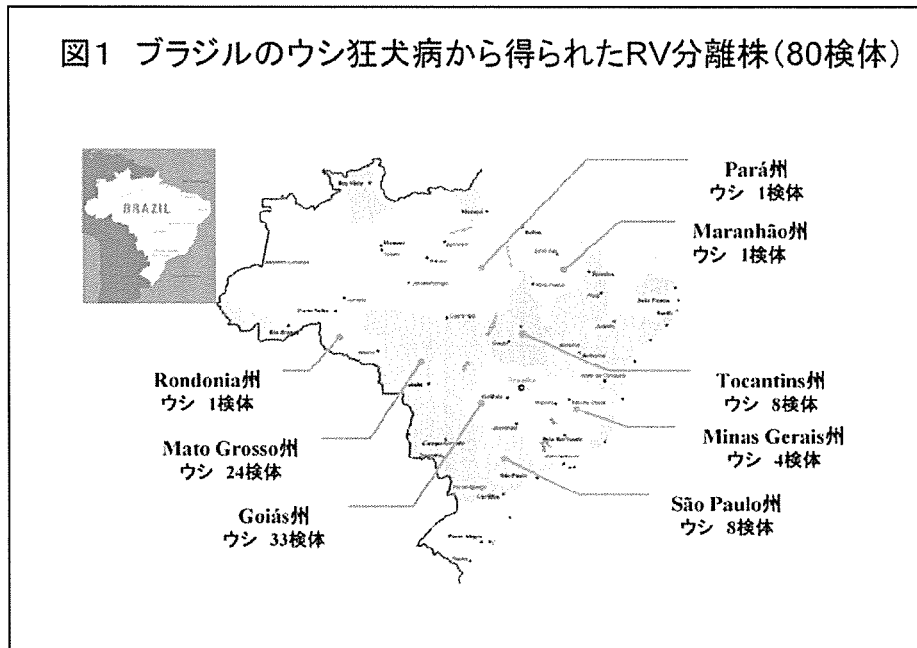


図2 ウシRV分離株(吸血コウモリ由来株)の系統樹および分布

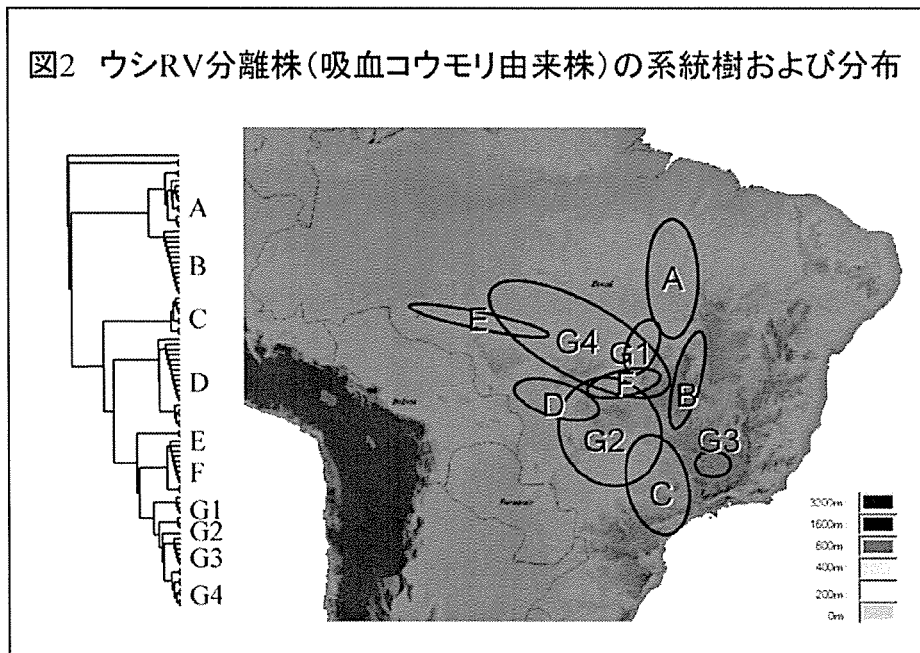


図3 ブラジル北東部における分離株の系統樹と分離地域

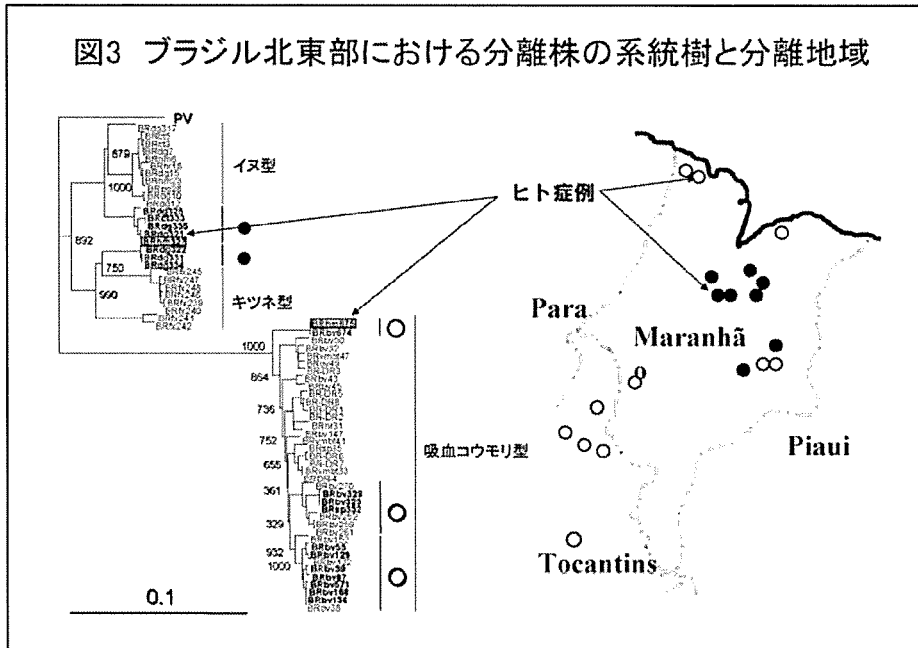


図4 ブラジル食肉目RVのN遺伝子領域に基づく系統樹

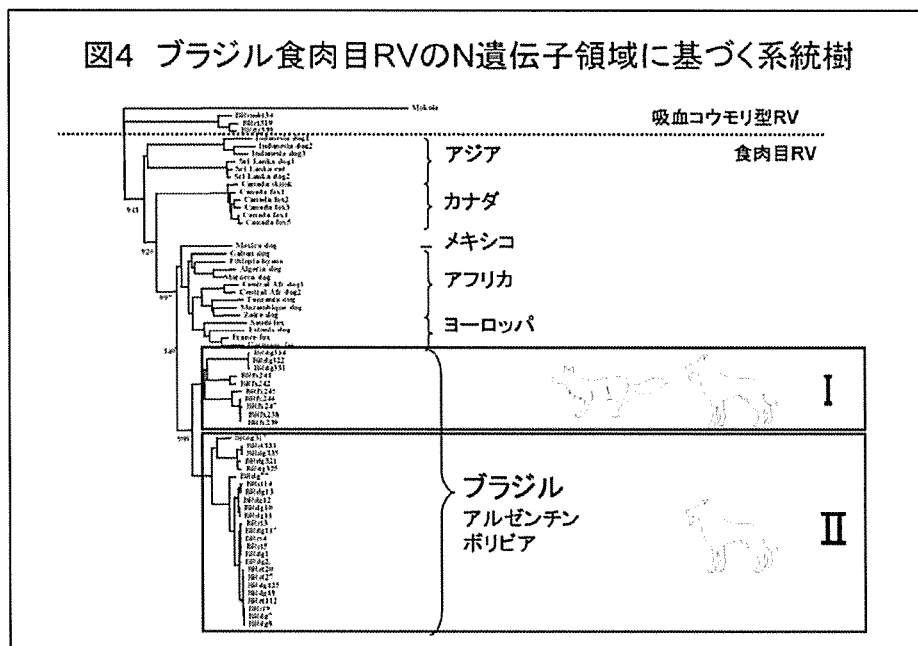


図5 ブラジル食肉目RVの第 I 系統の系統樹

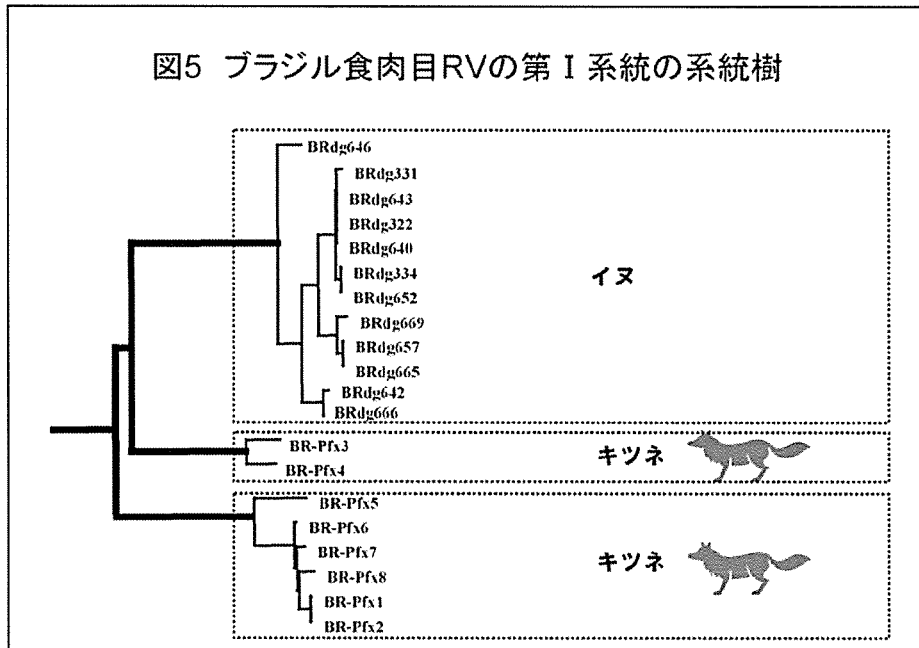
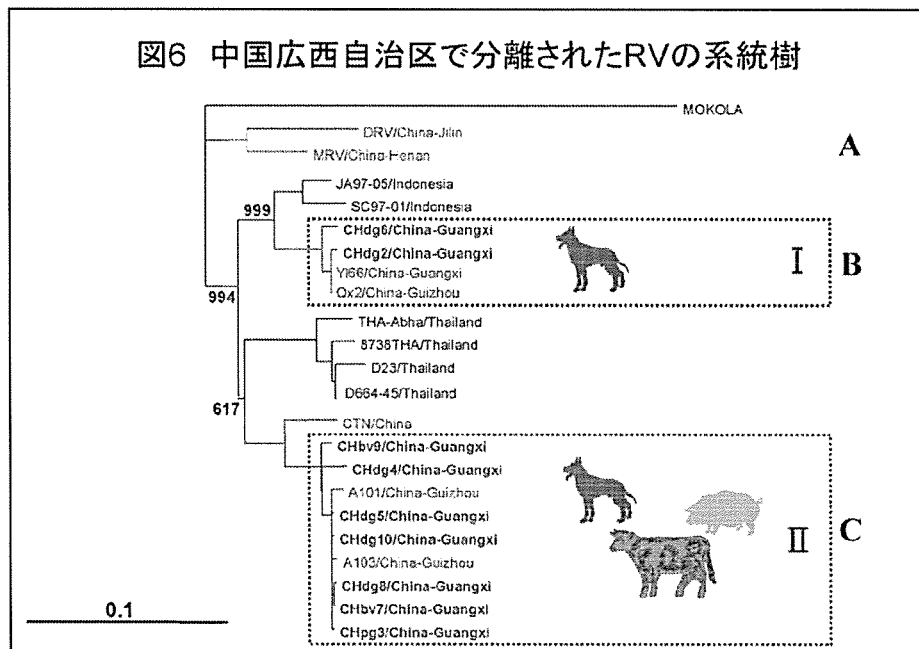


図6 中国広西自治区で分離されたRVの系統樹



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shoji Y, Kobayashi Y, Sato G, Gomes AA, <u>Itou T</u> , Ito FH, <u>Sakai T</u> .	Genetic and phylogenetic characterization of rabies virus isolates from wildlife and livestock in Paraiba, Brazil.	Acta Virol.	50(1)	33-37	2006
Sato G, Kobayashi Y, Shoji Y, Sato T, <u>Itou T</u> , Ito FH, Santos HP, Brito CJ, <u>Sakai T</u> .	Molecular epidemiology of rabies from Maranhao and surrounding states in the northeastern region of Brazil.	Arch. Virol.	151(11)	2243-2251	2006
Kobayashi Y, Ogasawa A, Sato G, Sato T, <u>Itou T</u> , Samara SI, Carvalho AA, Nociti DP, Ito FH, <u>Sakai T</u> .	Geographical distribution of vampire bat-related cattle rabies in Brazil.	J. Vet. Med. Sci.	68(10)	1097-1100	2006
Kobayashi Y, Inoue N, Sato G, <u>Itou T</u> , Santos HP, Brito CJ, Gomes AB, Santos MFC, Silva MV, Mota CS, Ito FH, <u>Sakai T</u> .	Phylogenetic characterization of rabies virus isolates from Carnivora in Brazil.	J. Vet. Med. Sci.	(in press)		

GENETIC AND PHYLOGENETIC CHARACTERIZATION OF RABIES VIRUS ISOLATES FROM WILDLIFE AND LIVESTOCK IN PARAIBA, BRAZIL

Y. SHOJI¹, Y. KOBAYASHI¹, G. SATO¹, A.A.B. GOMES², T. ITOU^{1*}, F.H. ITO³, T. SAKAI¹

¹Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, School of Veterinary Medicine, Nihon University, 1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-8510, Japan; ²Department of Veterinary Medicine, Center of Health and Rural Technology, Federal University of Campina Grande, Patos, Paraiba, Brazil; ³Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Received April 25, 2005; accepted December 20, 2005

Summary. – Thirty-four rabies virus (RV) isolates from foxes (8), insectivore bats (9), cattle (14), sheep (1), a goat (1) and a donkey (1) from Paraiba state, northeastern Brazil, were genetically characterized. Sequences of 890 nts of nucleoprotein (N) genes of these isolates were analyzed and compared with those of other Brazilian isolates characterized earlier. Phylogenetic analysis revealed three genetical lineages of RV co-existing in this region. Each lineage was found to be associated with particular host species and to circulate independently of each other. The first lineage was found in foxes (*Dusicyon* sp.) and could be discriminated from domestic carnivore isolates from Sao Paulo, Goias and Minas Gerais in the southern and central Brazil. The second lineage was associated with insectivorous bats (*Molossus* spp.) and differed from vampire bat-associated RV isolates. The third lineage was found in livestock and clustered with vampire bat-associated RV isolates from Sao Paulo, Tocantins, Goias and Matto Grosso. These results indicate that RV of these genetic lineages are co-circulating in the Paraiba state and that livestock in this region are infected with vampire bat-associated RV, suggesting that the vampire bat is the main reservoir of livestock rabies in this region.

Key words: Brazil; domestic animals; epidemiology; phylogenetic analysis; Rabies virus; wild animals

Introduction

Rabies is an enzootic disease caused by RV, a neurotropic virus of the genus *Lyssavirus*. Lyssaviruses (members of the *Lyssavirus* genus) are divided in 7 genotypes (GTs), among them GT1 (RV), GT3 (Mokola virus, MOKV) and GT7 (Australian bat lyssavirus, ABLV) (Fauquet *et al.*, 2005).

RV infects almost all kinds of mammalian species. RV infects the central nervous system, causing acute encephalitis, which is almost incurable after the clinical symptoms appear. However, there is a possibility of

prevention of this disease by effective vaccine even when administered after exposure to the virus.

In Brazil, like most other South American countries, rabies occurs in two different epidemiological forms, sylvatic and urban. The main reservoir of urban rabies is the dogs, while that of sylvatic rabies is the vampire bat (Ito *et al.*, 2001a). In large cities of southern Brazil like Rio de Janeiro and Sao Paulo, dog rabies has been controlled by effective dog vaccination campaigns (Romijn *et al.*, 2003; Heinemann *et al.*, 2002). However, in rural areas, the dog remains the main reservoir of human rabies, and the rabies cases of humans and livestock contracted from wild animals, such as vampire bats (*Desmodus rotundus*) (Schneider *et al.*, 1996; Romijn *et al.*, 2003), marmosets (Favoretto *et al.*, 2001), non-human primates (Ramos *et al.*, 2002) and foxes have been reported as increasing (Almeida *et al.*, 2001), especially in the northern Brazil. In the Ceara state, the northeastern

*E-mail: takuya@brs.nihon-u.ac.jp; fax: +81466-843380.

Abbreviations: ABLV = Australian bat lyssavirus; GT = genotype; MOKV = Mokola virus; N = nucleoprotein; RV = Rabies virus

Brazil, 13 human rabies cases originated from wild animals, such as bats, crab-eating raccoons (*Procyon cancrivorus*) and white-tufted-ear marmosets (*Calithrix jacchus jacchus*) during the past 7 years (1991–1998) (Favoretto *et al.*, 2001). The latter study revealed that these viruses represent a unique and independent rabies endemic cycle. In some other states surrounding Paraíba state, outbreaks of rabies in humans transmitted by vampire bats (Bahia, Amazonas and Para states) (Goncalves *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2001; Pan American Health Organization, 2004) also occurred.

Although rabies cases in humans and livestock in the Paraíba state have occurred, there is so far no report on molecular analysis of the respective RV isolates. The aim of this study was to characterize genetically RV circulating in this area and to obtain epidemiological information for prediction and prevention of rabies outbreaks in both humans and livestock in this region.

Materials and Methods

Viruses. Thirty-four RV isolates obtained from brain specimens from foxes (8), cattle (14), insectivorous bats (9), sheep (1), a goat (1) and a donkey (1), collected in the Paraíba state, the northeastern Brazil, were examined.

RT-PCR. Total RNA was extracted from brain specimens using a QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. To detect RV RNA in general, a RT-PCR specific for RV N gene (a sequence of 964 nts) was performed using the primer pair P1/P2. To detect carnivore-associated RV RNA in particular, the primer pair RHN1/RHNS3 yielding a product of 1,512 nts was used (Ito *et al.*, 1999, 2003).

Sequencing. The RT-PCR products of 964 nts were purified using a QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN) and subjected to direct sequencing using the primers P1, P2, BRABN-S1, BRABN-S3 and BRABN-C3 (Shoji *et al.*, 2004), a Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit version 3.1 (Applied Biosystems) and an automated sequencer (Applied Biosystems).

Phylogenetic analysis of RV isolates was based on the alignment of 890 nts-long sequences of N gene (nt 89–978) (Tordo *et al.*, 1986) using the CLUSTAL X program (Thompson *et al.*, 1994). A neighbor-joining tree was constructed using a method of Saitou and Nei (1987) and the bootstrap probabilities of each node were calculated using 1,000 replicates. A graphic output was obtained using the TREEVIEW program (Page *et al.*, 1996).

Results

Detection of RV RNA by RT-PCR

All the 34 RV isolates were positive by the RT-PCR with the primer pair P1/P2, while only 8 of them, originating exclusively from fox brains, were positive by the RT-PCR

with the primer pair RHN1/RHNS3 (Fig. 1); the latter isolates thus represented carnivore-associated RV.

Sequencing and phylogenetic analysis of RV isolates

The sequences of 890 nt-long RT-PCR products (nt 89–978) corresponding to RV N gene were determined for all the 34 RV isolates and were deposited in the Gen Bank database (Acc. Nos. AB206407-AB206439 and AB207884).

The nucleotide sequence identities of all the isolates with RV (GT1), MOKV (GT3) and ABLV (GT7) were 81.7–99.4%, 72.2–72.7% and 75.9–78.9%, respectively, showing that these isolates belong to GT 1 of lyssaviruses. The nucleotide and deduced amino acid sequences exhibited different levels of identity with each other, 82.5–100% and 92.3–100%, respectively. Among all the fox isolates, the nucleotide sequences showed a 94.6–100% identity. The latter also showed the highest identity (93.2–94.6%) with those of domestic carnivore isolates from Sao Paulo, Minas Gerais and Goias in the southern and central Brazil. However, these levels of identity were lower than those (98.9–99.1%) within domestic carnivore isolates except for fox isolates.

The nucleotide sequence identity within the insectivorous bat isolates from Paraíba was 97.8–99.7%, while the nucleotide and deduced amino acid sequences identities of these isolates with other isolates described in this study were relatively low, 82.1–89.5% and 92.9–97.3%, respectively. The nucleotide sequence identity within the livestock isolates showed 98.2–100%. The nucleotide and amino acid identities of the livestock isolates from Paraíba with the isolates from vampire bats and livestock from other regions in Brazil (Goias, Mato Grosso, Sao Paulo and Tocantins) were the highest, 96.1–98.2% and 97.6–100%, respectively.

Multiple alignment of deduced amino acid sequences (298 aa) of representative RV isolates revealed 19 amino acid substitutions. Several of them appeared to be lineage-specific. Five substitutions were found in carnivore or bat isolates. Another seven substitutions resulted in an amino acid with changed chemical properties. Seven substitutions were found in insectivorous bat isolates (data not shown).

The phylogenetic analysis based on the sequences of 890 nts of N gene revealed that 55 isolates analyzed in this study clustered into four major genetic lineages: (A) the lineage of domestic carnivore isolates from southern and central Brazil; (B) the lineage of fox isolates from Paraíba; (C) the lineage of insectivorous bat isolates from Paraíba and Sao Paulo; (D) the lineage of livestock isolates from Paraíba and vampire bat and livestock isolates from southern and central Brazil (Fig. 2a). Insectivorous bat isolates from Paraíba together with BRNL-1 constituted a lineage that differed from other insectivorous bat isolates from Sao Paulo (BREF-4 and BRMA-1). Fox isolates from Paraíba formed two discrete sub-lineages (B-1 and B-2) and each sub-lineage

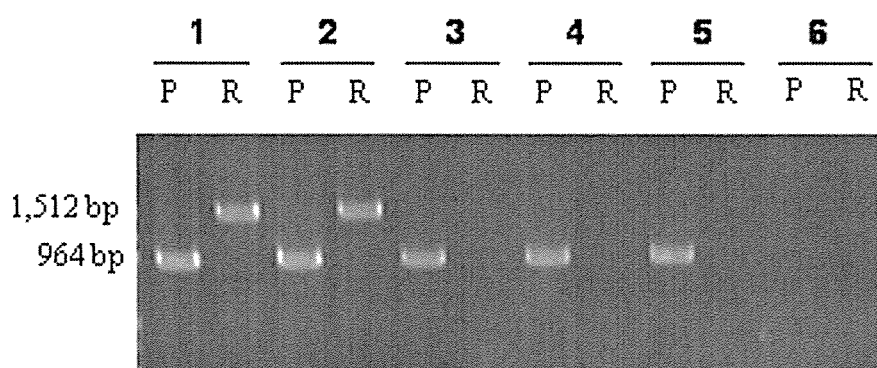


Fig. 1

Discrimination of carnivore-associated and non-carnivore-associated RV isolates by RT-PCR

Positive controls: BRdg 2 (Brazilian carnivore-associated RV, lanes 1) and BRvmbt 33 (Brazilian non-carnivore RV, lanes 3). Brazilian RV isolates BR-Pfx1 (lanes 2), BR-Pbt 1 (lanes 4) and BR-Pbv 1 (lanes 5). Negative control: RT-PCR without RNA template (lanes 6). P and R indicate P1/P2 and RHNI/RHNS3 primer pairs, respectively.

was distinguishable from domestic carnivore isolates from southern and central Brazil. Although the lineages A and B were categorized in carnivore rabies, they did not contain carnivore isolates from other countries (Fig. 2b). However, the lineages C and D were assigned to Chiropteran rabies together with other bat isolates. The insectivorous bat lineage C has closer relationship with North American and other Brazilian insectivorous bat isolates than the vampire bat lineage.

Discussion

In this study, viral RNA was detected by RT-PCR in 34 brain specimens from wild animals (foxes and insectivorous bats), livestock (cattle, sheep, a goat and a donkey) from Paraiba, northeastern Brazil. N gene sequences of these isolates and their phylogenetic analysis revealed that three genetic lineages of RV associated with specific host species occur in this area, indicating the presence of multiple endemic cycles of rabies. The fox RV lineage from Paraiba was found to belong to the group of Brazilian carnivore RV isolates but it apparently differed from carnivore RV lineage from southern and central Brazil. The insectivorous bat (*Molossus* sp.)-RV lineage of Paraiba clustered with an isolate from another species of insectivorous bat (*Nictinomops laticaudatus*; BRNL-1) and could be differentiated from other Brazilian RV isolates. Furthermore, the livestock RV lineage from Paraiba was found to belong to Brazilian vampire bat-associated RV lineages, suggesting that the main reservoir of livestock rabies in Paraiba is vampire bats though we could not isolate RV from vampire bats captured in Paraiba. The high bootstrap values of the node of each

lineage in the phylogenetic tree indicate that these three RV lineages have been circulating independently of each other in this region.

Considering the population of the fox *Dusysion* sp. in Paraiba and the fact that some residents keep foxes as pets, this species has a potential for transmission of RV to humans.

Vampire bats are responsible for most cases of livestock rabies and some outbreaks of human rabies. Fortunately, the human rabies cases transmitted by insectivorous bats have not been reported recently in Brazil, but the growing incidence of humans bitten by bats including insectivorous bats in Brazil (Mayen *et al.*, 2003) and the growing incidence of human rabies transmitted by insectivorous bats in North America (Messenger *et al.*, 2002; Pape *et al.*, 1999) suggest the importance of insectivorous bats in the epidemiology of rabies in Brazil.

In accord with problem of grouping of RV isolates worldwide, Brazilian RV isolates have been divided in two major phylogenetical groups, the carnivore RV group and the Chiropteran RV group (Tordo *et al.*, 1986). The Brazilian RV isolates from foxes, a dog and a cat belong to the carnivore RV group, while the bat and livestock isolates belong to the Chiropteran RV group. In our phylogenetic analysis, the fox, dog and cat, and insect bat RV lineages formed separate clusters without any isolates from other countries, suggesting that each lineage is circulating in Brazil only. On the other hand, the vampire bat RV lineage clustered with vampire bat isolates from other South American countries.

Brazil is so much diverse in geomorphology and in mammalian fauna including bats (Findley, 1993; Walker, 2001) that it is difficult to completely comprehend or elucidate the



Fig. 2

Phylogenetic analyses of RV isolates based on 890 nt-long sequences of N gene

(a) Phylogenetic tree of Brazilian RV isolates. (b) Phylogenetic tree of representative RV isolates from Brazil and other countries. MOKV (Mokola) and ABLV (ABL) (Acc. Nos. Y09762 and AF418014, respectively) were used as outgroups. Isolates from Paraíba are in bold. A, B (B-1 and B-2), C and D represent individual lineages (sublineages). Percentage bootstrap values out of 1,000 replicates are indicated at each respective node.

ecology of RV in Brazil. The findings of this study in agreement with those of other studies (Favoretto *et al.*, 2001, 2002; Ito *et al.*, 2001b; Romijn *et al.*, 2003) indicate that the RV lineages in Paraiba exhibit a geographic area-dependent divergence in addition to host species-specific divergence, and that endemic cycles of the carnivore-associated RV lineage and the bat-associated RV lineage co-exist in one area. Further investigation in each area and exchanging of epidemiological information is necessary for better understanding and more effective prevention of rabies outbreaks.

Acknowledgement. This work was supported in part by the Academic Frontier Project for Private Universities from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) of Japan.

References

- Almeida MF, Massad E, Aguiar EAC, Martorelli LFA, Joppert AMS (2001): Neutralizing antirabies antibodies in urban terrestrial wildlife. *J. Wildl. Dis.* **37**, 394–398.
- Arai YT, Kuzmin IV, Kameoka Y, Botvinkin AD (2003): New lyssavirus genotype from the lesser mouse-eared bat (*Myotis blythii*), Kyrgyzstan. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 333–336.
- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (Eds) (2005): *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier-Academic Press, Amsterdam.
- Favoretto SR, Carrieri ML, Cunha EMS, Aguiar EAC, Silva LHQ, Sodew MM, Souza M, Kotaito I (2002): Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989–2000. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **44**, 91–95.
- Favoretto SR, de Mattos CC, Morais NB, Alves Araujo FA, de Mattos CA (2001): Rabies in marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceara, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 1062–1065.
- Findley JS (1993): *Bats: a community perspective*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Goncalves MAS, Sa-Neto RJ, Brazil TK (2002): Out break of aggressions and transmission of rabies in human beings by vampire bats in northeastern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **35**, 462–464.
- Heinemann MB, Fernandes-Matioli FMC, Cortez A, Soares RM, Sakamoto SM, Bernardi F, Ito FH, Madeira AMBN, Richtzenhain LJ (2002): Genealogical analyses of rabies virus strains from Brazil based on N gene alleles. *Epidemiol. Infect.* **128**, 503–511.
- Ito M, Arai YT, Ito T, Sakai T, Ito FH, Takasaki T, Kurane I (2001a): Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. *Virology* **284**, 214–222.
- Ito M, Ito T, Sakai T, Santos FCM, Arai YT, Takasaki T, Kurane I, Ito FH (2001b): Detection of rabies virus RNA isolated from several species of animals in Brazil by RT-PCR. *J. Vet. Med. Sci.* **63**, 1309–1313.
- Ito M, Ito T, Shoji Y, Sakai T, Ito FH, Arai YT, Takasaki T, Kurane I (2003): Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Virol.* **26**, 317–330.
- Ito N, Sugiyama M, Oraveerakul K, Piyaviriyakul P, Lumlertdacha B, Arai YT, Tamura Y, Mori Y, Minamoto N (1999): Molecular epidemiology of rabies in Thailand. *Microbiol. Immunol.* **43**, 551–559.
- Messenger SL, Smith JS, Rupprecht C (2002): Emerging epidemiology of bat-associated cryptic cases of rabies in humans in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **35**, 738–747.
- Page RD (1996): TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **12**, 357–358.
- Pan American Health Organization (2004): Human rabies transmitted by bats in Para state, Brazil. Emerging and Reemerging Infectious diseases, Region of the Americas. *EID weekly updates* **2**(13)-2 April.
- Pape WJ, Fitzsimmons TD, Hoffman RE (1999): Risk for rabies transmission from encounters with bats, Colorado, 1977–1996. *Emerg. Infect. Dis.* **5**, 433–437.
- Ramos PM, Ramos PS (2002): Human accidents with monkeys relation to prophylactic treatment for rabies, in the municipal district of Sao Paulo, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **35**, 575–577.
- Romijn PC, Van Der Heide R, Cattaneo CA, Silva RD, Van Der Poel WH (2003): Study of lyssaviruses of bat origin as a source of rabies for other animal species in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **69**, 81–86.
- Saitou N, Nei M (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.
- Schneider MC, Aron J, Santos-Burgoa C, Uieda W, Ruiz-Velazco S (2001): Common vampire bat attacks on humans in Village of the Amazon region of Brazil. *Cad. Saude Publica* **17**, 1531–1536.
- Schneider MC, Santos-Burgoa C, Aron J, Munoz B, Ruiz-Velazco S, Uieda W (1996): Potential force of infection of human rabies transmitted by vampire bats in the Amazonian region of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **55**, 680–684.
- Shoji Y, Kobayashi Y, Sato G, Ito T, Miura Y, Mikami T, Cunha E, Samara S, Carvalho A, Nocitti D, Ito FH, Kurane I, Sakai T (2004): Genetic characterization of rabies viruses isolated from frugivorous bat (*Artibeus* spp.) in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.* **66**, 1271–1273.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997): The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876–4882.
- Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G, Rougeon F (1986): Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3914–3918.

Molecular epidemiology of rabies from Maranhão and surrounding states in the northeastern region of Brazil

**G. Sato¹, Y. Kobayashi¹, Y. Shoji¹, T. Sato¹, T. Itou¹, F. H. Ito²,
H. P. Santos³, C. J. C. Brito², and T. Sakai¹**

¹Nihon University Veterinary Research Center, Nihon University,
Fujisawa, Kanagawa, Japan

²Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health,
Faculty of the Veterinary Medicine and Zootechny, University of São Paulo,
São Paulo, Brazil

³School of Veterinary Medicine, Maranhão State University,
São Luís, Maranhão, Brazil

Received February 5, 2006; accepted March 27, 2006
Published online June 16, 2006 © Springer-Verlag 2006

Summary. Although many outbreaks of rabies have been reported in northern Brazil, few epidemiological studies of these outbreaks have been undertaken. In this study, molecular epidemiological analyses were performed using 41 rabies virus samples isolated in the Maranhão (MA), Pará (PA), and Tocantins (TO) states of northeastern Brazil. A 599-bp region of the glycoprotein (G) gene was first amplified from each sample by RT-PCR, then sequenced and subjected to phylogenetic analysis. A phylogenetic tree divided the 41 isolates into two clades: Clade I was associated with terrestrial carnivores and Clade II was associated with vampire bats. The Clade I isolates were further sub-divided into two groups. The first group was closer to carnivore isolates that predominate in central Brazil, whereas the second group more closely resembled wild fox isolates from the northeastern coastal state of Paraíba (PB). MA isolates of Clade II formed an entirely separate group. These results demonstrate that bat- and dog-transmitted rabies occur in northwestern Brazil.

Introduction

Rabies virus (RV) is a member of the genus *Lyssavirus*, and it belongs to the family *Rhabdoviridae*. RV is maintained by a diverse range of hosts, including both wild and domesticated animals. Carnivore rabies is most prevalent in Asia and Africa, where it kills tens of thousands of humans per year. On the other hand, vampire bats (*Desmodus rotundus*) negatively impact the livestock industry in Latin