

## A. 研究目的

Rabies is still a major public health problem in the third world countries. Approximately 55,000 people die from rabies annually and majority of these deaths occur in Asia and Africa (WHO, 2007). Estimate of disability-adjusted life year (DALY) score places rabies just behind trypanosomiasis, slightly above Onchocerciasis and well above dengue (Coleman, 2004). One of the major factors in the failure of rabies control is the lack of political commitment in areas that do not have reliable epidemiological data and facilities for accurate laboratory diagnosis (WHO, 2004). In the Philippines, 6-8 rabies deaths per million populations occur each year and the main reservoir of infection is domestic dogs.

Rabies is a fatal, but preventable zoonotic disease which infects mammals. It is caused by the single strand RNA rabies virus (RABV) that belongs to the genus of Lyssavirus of the family Rhabdoviridae. It is bullet shaped under electron microscope and consists of a surface lipid-bilayer enveloped glycoprotein, inner matrix M protein and ribonucleoprotein (RNP). The RNP contains the genomic RNA associated with three internal proteins:

transcriptase (L) (M = 190,000 daltons), nucleoprotein (N) (M= 55,000 daltons), and phosphoprotein (NS) (M = 38,000 daltons) (WHO, 1992).

Among the five proteins, the G and N proteins are the most extensively characterized. The G protein is the only viral antigen that induces virus-neutralizing antibodies; it is also a target for virus-immune T helper cells and cytotoxic T cells. Rabies virus-neutralizing antibodies directed against the G protein appear to be an important component in the immune response to rabies. The N protein represents the major internal protein in the virus. The N protein gene of several rabies virus strains is the most conserved gene. This is the major antigen that is capable of inducing T helper cells that cross react between different rabies and rabies related viruses. Monoclonal antibodies directed against the N protein have been used to differentiate and classify rabies wild isolates of lyssaviruses (Meslin, 1996). The antibody primarily responsible for staining in the immunofluorescence (IF) test is that directed against the nucleocapsid antigen of the virus. Rabies virus grows in the cytoplasm of the cell, causing large inclusions which appear to

be collections of nucleocapsid antigens and stain well in the IF test (Velleca, 1981).

WHO has already approved the use of direct fluorescence antibody test (FAT) as the gold standard for routine rabies diagnosis (WHO, 2004). It is rapid and sensitive method for rabies diagnosis in animals and humans (WHO Expert Committee on Rabies, 1992). However, accuracy of the test depends on the expertise of the examiner and the quality of the anti-rabies conjugate and the fluorescence microscope (WHO, 2004). Accessibility and availability of good anti-rabies conjugate is a problem in the Philippines which constraint the provision for rabies diagnosis in most of the remote areas in the Philippines. Field samples are therefore not diagnosed or it is being referred to Manila for diagnosis. This leads to underreporting of cases or delayed results which defeat the purpose of rabies diagnosis that is to save lives and laboratory results may save a patient from unnecessary physical and psychological trauma, and financial burdens, if the animal is not rabid (WHO, 2002).

This study aims to produce and evaluate reagents for FAT to be able to address the problem on the availability of the rabies

conjugate in the Philippines.

## B. 研究方法

### 1. Immunization of BALB/c mice and blood extraction

Challenge Virus Strain 11 (CVS 11) of rabies with a concentration of  $10^{-3.48}$  FFD50 was emulsified with complete Freund's adjuvant for primary immunization and incomplete Freund's adjuvant for subsequent booster immunization. Live virus was inactivated with formalin prior to emulsification. Five 16-18 grams female BALB/c mice were immunized intraperitoneally with emulsified antigen. Each mouse was inoculated with 200 ul of antigen twice at 4 to 8 week intervals. Behavioral changes were not observed because the dose used for immunization was not the lethal dose. After 45 days from initial immunization, mice were bled and given final booster without adjuvant. Three days later mouse were euthanized by cervical dislocation for fusion. Antibody titers were determined using Enzyme Linked Immunoassay (ELISA) Test and Rapid Focus Fluorescent Inhibition Test (RFFIT). For the RFFIT Meslin's procedure was followed (1996).

## 2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Briefly flat bottom 96-well ELISA plate was coated with 50 ul/well rabies CVS 11 strain. Unbound antigens were washed and plate was blocked with 5% milk-PBST (phosphate buffered saline-tween) for 1 hour at 37°C. Serum samples were added at 50 ul/well and incubated for 2 hours at 37°C. Anti-mouse IgG at 1:100 dilution were added. P-nitrophenyl phosphate (pNPP) in diethyl-amino (DEAE) solution were used as substrate. The absorbance values were read at 405 nm. Absorbance reading for the ELISA was used instead of ELISA titers since there were no available standard sera. For every ELISA test, the cut off absorbance is derived from the average of the negative sera plus three standard deviations from the average. After 45 days from the initial immunization, ELISA, RFFIT and FAT were used to screen hybridoma clones.

## 3. Fusion with myeloma cells and production of hybridoma

Spleen cells were fused with NS1 myeloma cells using polyethylene glycol (PEG). The hybrids were plated into

96-well tissue culture plates, selected and observed for cell growth. The hybridoma cultures were expanded. Supernatants were screened using ELISA. Limiting dilution was done for positive hybridoma to produce single clone. The final screening was done by FAT.

## 4. Fluorescent Antibody Test

Briefly, brain impression smears were fixed in cold acetone. After fixation, slides were air dried. Each smear was covered with the supernatant of the hybridoma, incubated in a humid chamber at 37° C for 30 minutes. Rinse with Phosphate buffered saline (PBS). After washing, smears were stained with sheep anti-rabbit Immunoglobulin G (IgG) (whole molecule) conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma). Again slides were incubated in a humid chamber at 37 C for 30 minutes and rinse with PBS. Slides were air dried and mounted in buffered glycerol mounting medium and read under fluorescence microscope.

## 5. Production of ascites

One hundred milliliters of hybridoma cells was inoculated to BALB/c mice intraperitoneally. To increase the production of ascites, each mouse was

injected intraperitoneally with 500 ul of pristane (2,6,10,14 tetramethylpentadecane) 1-4 weeks prior to inoculation. Inoculated mice were observed clinically every other day. However, once ascitic fluid accumulates and peritoneal distention was noted, the aspiration was done. Advanced peritoneal distention was an indicator that aspiration of ascites was needed. Euthanasia was recommended if severe clinical signs or the mice become moribund, euthanasia was recommended.

Mice were anesthetized using CO<sub>2</sub> during the aspiration of ascites. Eighteen gauge needle was used in the aspiration of ascitic fluid through paracentesis. Ascitic fluid was collected for as long as the mouse was not experiencing pain or distress, in good body condition, or did not show signs of debilitation or complication from the procedure. Mice were euthanized by cervical dislocation after paracentesis.

#### 6. Antibody isotyping and purification

Antibody isotyping was performed using the Mouse-Typer<sup>R</sup> (Bio-Rad Lab) Isotyping Panel, an ELISA based test.

Ascites were purified using the automated liquid chromatography system using

AKTA Explorer 100 (Amersham Pharmacia). Dialysis was carried out by means of Amicon ultrafiltration and dialysis (Millipore).

#### Future activities

After dialysis protein concentration of the ascites will be determined by Bicinchoninic Acid (BCA). Further screening of the purified antibody will be done using FAT and RFFIT. Monoclonal antibody will be labeled or conjugated with fluorescein to make FITC labeled monoclonal antibody. FITC rabies monoclonal antibodies will be purified and will be evaluated using brain impression smear from sample of human and animal rabies suspect. For confirmation of the test, mouse inoculation technique will be used.

#### (Ethical Consideration)

The study was approved by both the Research Institute for Tropical Medicine (RITM) Institutional/ Ethical Review Board and Institutional Animal Care and Use Committee.

#### C. 研究結果

There were 5 96-well ELISA plates hybridoma produced after fusion of spleen

cells and NSI myeloma cells. Hybrids which showed yellowish color were screened using ELISA. The hybrid 5G7 showed positive result in FAT. Then it was subjected to limiting dilution and screened again twice using ELISA. And it resulted to 9 hybridoma positives for ELISA. These 9 hybridoma were screened by FAT, which is the routine test being used in rabies diagnosis. There were three consistently positive hybridoma tested 3 times by FAT, 5G7F3, 5G7D4, 5G7D5. Table 1 describes the appearance of the under the IF microscope of the 3 clones.

The three clones 5G7F3, 5G7D4, 5G7D5 were injected into the pristane primed BALB/c mice for ascites production. After 11 days, ascites was collected. Antibody isotyping was done to each of the ascites, and it turned out that each clone was IgG<sub>1</sub>.

Table 2. Ascites production using BALB/c mice and antibody isotyping

The ascites were purified and dialyzed. There are still 33 hybridoma clones left for screening and subjecting to limiting dilution.

#### D. 考察

Rabies virus grows in the cytoplasm of the cell, causing large inclusions which appear to be collections of nucleocapsid antigens and stain well in the IF test. The monoclonal antibody primarily responsible for staining in the IF test is directed against the nucleocapsid antigen of the virus (Velleca, 1981).

Production of monoclonal antibodies directed to nucleocapsid antigen is the main objective of this study. There are already 3 monoclonals, 5G7F3, 5G7D4, 5G7D5, that give positive results in FAT. However, the intensity and quantity of the monoclonals are lower than the preferred. This can be achieved by using a cocktail of monoclonals.

Each monoclonal will be conjugated with FITC and purified. A cocktail of these monoclonals will be evaluated using the samples submitted for routine rabies diagnosis.

Each monoclonal and a cocktail will still be ran in ELISA and RFFIT to assess if it can meet the criteria of FAT reagents.

#### E. 結論

本研究では、フィリピンで流行しているウイルス

株に特異的な診断用モノクローナル抗体を作出して、これを利用した独自の安価な抗原検出系の確立とともに、フィリピン国内における正確な診断システムの確立とモノクローナル抗体を利用した疫学サーベイランスを可能にすることが目的である。今回、フィリピンで流行している狂犬病ウイルスを感染させたマウスを利用して3種類のモノクローナル抗体を確立することに成功した。

現在、この3クローンを利用した直接蛍光ラベルカクテル抗体を作出して、フィールドにおける野外狂犬病ウイルスに対する特異抗原の検出感度とその精度について有効性を評価している。

本研究の成果は、フィリピン全土における正確な狂犬病の発生状況や疫学的背景について研究を進めることにより、科学的知見に基づいた効果的な狂犬病対策の推進を容易ことが可能なることが期待された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

- 1) Inoue S. 2007. The rabies prevention and the risk management in Japan. J.Disas.Res. 2:90-93.

##### 2.学会発表

- 1) 井上 智、ポルドバータ・バザーツレン、堀田 こそえ、野口 章、加来義浩、奥谷晶子、山田章雄。DNA 免疫を利用した簡便で特異性の高い抗狂犬病グロブリン産生モデル実験系の検討。第 11 回日本ワクチン学会、2007、12 月 10 日、横浜

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

Table 1. Appearance of three clones using FAT

CLONES	Quantity*	Intensity*
5G7F3	+1	+2
5G7D4	+2	+1
5G7D5	+2	+1

\*Evaluation of the FAT slides (Velleca 1981):

Fluorescence intensity:

- +4 = a glaring apple-green fluorescence
- +3 = a bright apple-green fluorescence, slight loss of glare
- +2 = a dull apple-green fluorescence
- +1 = a very dim but detectable apple-green fluorescence
- 0 = no fluorescence

Quantity or antigen distribution

- +4 = a massive infiltration of large and small inclusions of varying shape in almost every area of the impressions
- +3 = inclusions in varying size and shape are found in almost every microscopic field, the number of inclusions per field varies, but inclusions are numerous in most fields
- +2 = inclusions of varying size and shape are present in 10% to 50% of the microscopic fields and most fields contain only a few inclusions.
- +1 = inclusions of varying size and shape are present in <10% of the microscope fields and only a few inclusions are found per field (usually only one or two inclusions per field)

Table 2. Ascites production using BALB/c mice and antibody isotyping

Clones	Pristine priming	Cell injection	Ascites collection	Ascites	Antibody Isotype
5G7F3	Day 0	Day 9	Day 20	13 ml	IgG <sub>1</sub>
5G7D4	Day 0	Day 9	Day 20	40 ml	IgG <sub>1</sub>
5G7D5	Day 0	Day 9	Day 20	8 ml	IgG <sub>1</sub>



狂犬病ウイルスイヌ街上毒株の BHK 細胞への馴化過程における病原性の変化

分担研究者： 森本 金次郎 （国立感染症研究所ウイルス第一部）  
（安田女子大学薬学部）

協力研究者： Pakamat Khawplod （タイ赤十字 Queen Saovabha Memorial Institute）

研究要旨：狂犬病ウイルスにおいて野生型である街上毒株とワクチン製造株として用いられている固定毒株では感染指向、増殖、伝播等において様々な性状の違いがみられる。本研究において狂犬病ウイルス街上毒株の継代による性状の変化を観察した。タイ・バンコクにおいて狂犬病に罹患したイヌの脳より採取したウイルス株を元に、培養細胞（BHK-21 細胞）と乳のみマウスでウイルスを継代し、その過程で引き起こされる性状の変化を調べた。その結果、BHK-21 細胞継代株（BHK P-7 株）は乳のみマウス継代株（SMB P-2 株）より末梢感染力が 10 倍以上強いものとして得られた。また、感染細胞においてウイルス抗原の分布や産生量に違いがみられることが分かった。

A. 研究目的

ヒト狂犬病のほとんどはイヌからヒトへの伝播により引き起こされる。長い潜伏期においていかなる状態で存在しているのかなど、野生型である街上毒株の病態に関しては、依然不明な点が多い。街上毒株の生化学的な研究が困難な理由は実験を行うにあたって、その増殖力が弱いことが挙げられる。増殖が良いものを獲得しようとする、その性状が元来の株とは変化してしまうという問題点がある。そこで、我々はまず狂犬病ウイルスの継代による性状の変化を調べることにした。タイ・バンコクにおいて狂犬病に罹患したイヌの脳より採取したウイルス株を元に、培養細胞

（BHK-21 細胞）あるいは乳のみマウスでウイルスを継代し、その過程で引き起こされる性状の変化を観察した。街上毒株から

固定毒株（弱毒株）への移行の機序、異種動物への感染（spill-over）の機序、ウイルスが侵入して感染が成立するまでのメカニズムの解明の手掛りとなると考える。

街上毒株から固定毒株への移行の過程で潜伏期の一定化、すなわち固定化（fixed）は雑多な形質の混ざり（quasispecies）である街上毒株から均一の性状をもつウイルス株への選択の結果であると考えられる。また、街上毒株から固定毒株への移行の過程はこのような選択とともに特定宿主への適応の過程でもある。このような過程を解析することは狂犬病ウイルスの発症機序、免疫応答の制御、潜伏期の状態等を理解するための一助となると考える。

イヌ街上毒株をイヌ以外の宿主動物に感染させても、常に感染が成立し発症するとは限らない。恒常的な感染成立にはその宿

主への適応が不可欠である。しかしながら、自然界においては異種宿主への感染

(spill-over) が少なからず起こっており、通常ヒト狂犬病の発症もイヌからヒトへのスピルオーバー感染である。異種動物への伝播、さらに固定毒株への変化の推移を観察し、その過程での感染性、病原性の変化を調べることとした。

本研究はタイ国赤十字 Queen Saovabha Memorial Institute の Pakamatz Khawplod 博士との共同研究としてなされた。

## B. 研究方法

### 1) イヌ街上毒株の乳のみマウスおよび BHK-21 細胞での継代

タイ・バンコクで捕獲された狂犬病罹患イヌより採取した脳の 20% 乳剤をオリジナルストック株 (QS-05 株) として用いた。

#### 乳のみマウスでの継代

QS-05 株ウイルス懸濁液を乳のみマウスに脳内接種、4 日後に脳を取り出し、PBS で 20% 乳剤とした (SMB P-1 株)。さらに、SMB-1 株ウイルス懸濁液を乳のみマウスに脳内接種、4 日後に脳を取り出し、PBS で 20% 乳剤とした (SMB P-2 株)。

#### BHK-21 細胞での継代

QS-05 株ウイルス懸濁液を BHK-21 細胞に接種し、3 日後に抗狂犬病ウイルス IgG を用いた蛍光抗体法により、その感染の程度を観察した。蛍光フォーカスは非常に小さなもので、抗原陽性細胞は非常にわずかであった (passage 1)。そのため、感染細胞を新たな BHK-21 細胞と混ぜ、新鮮な培地において、さらに 3 日培養し

た (passage 2)。このような継代を続け、継代ごとに感染様式を蛍光抗体法により観察した。継代が進むにつれ、蛍光フォーカスの数が増加するとともに、個々の蛍光フォーカスが大きなものとなってきた。第 7 代継代において (passage 7)、感染細胞の割合が 50% 以上となった。その培養上清を BHK P-7 株として保管した。その後は BHK-21 細胞に感染させた培養上清を次の感染に用いることにより、ウイルスを継代し、3 回繰り返すことにより BHK P-10 株を得た。

### 2) 免疫蛍光染色

感染細胞におけるウイルス抗原の分布、細胞の形態を蛍光抗体法により観察した。狂犬病ウイルス感染細胞は FITC-抗狂犬病 N 蛋白質抗体を用い、蛍光顕微鏡下で観察した。

### 3) マウスでの病原性の測定

各ウイルス株 (QS-05 株、SMB P-2 株、BHK P-7 株) のマウスでの病原性を比較するため、脳内接種と抹消感染として後肢筋肉接種を行い、マウスの致死数より LD<sub>50</sub> 値を算出した。QS-05 株、SMB P-2 株、BHK P-7 株の段階希釈したウイルス懸濁液を 1 グループ 6 匹のマウスに脳内 (30 $\mu$ l) あるいは筋肉内接種 (100 $\mu$ l) し、その後のマウスの病態を脳内接種のものは 14 日まで、筋肉接種のものは 25 日まで観察した。

## C. 研究結果

### 1) イヌ街上毒株 QS-05 株のマウスでの病原性と BHK-21 細胞での感染性

イヌ街上毒株である QS-05 株をマウスに

接種した場合、抹消感染である筋肉接種では低い病原性しか示さなかった。20%脳乳剤原液を接種した場合でも30%の致死率しか示さなかった。脳内接種においては致死率100%の感染を成立させることができたが、QS-05株は異種宿主動物であるマウスへの抹消感染力は弱いものであった。

また、BHK-21細胞へ感染させた場合も最初は蛍光抗体法で感染陽性となる細胞はわずかで、その抗原の発現強度も非常に微々たるものであった。そこで、乳のみマウスとBHK-21細胞へ感染馴化させることを試み、その過程でどのような変化が起こるかを調べた。

## 2) 感染 BHK-21 細胞での感染様式の変化

オリジナルの QS-05 株と乳のみマウス継代株 SMB P-1 株、SMB P-2 株、および BHK-21 細胞継代株 BHK P-7 株、BHK P-10 株をそれぞれ BHK-21 細胞に感染させ、3 日後の感染細胞を蛍光抗体法により観察した (図 1)。QS-05 株の感染細胞内でのウイルス抗原は非常にわずかで、感染フォーカスは微小な点として確認された。SMB P-1 株、SMB P-2 株感染細胞においてもウイルス抗原は細胞内で微小な状態でみられた。感染フォーカスの数は継代するとともに増加していった。一方、BHK P-7 株、BHK P-10 株感染細胞の方では細胞内でのウイルス抗原の分布に著しい変化が見られ、一つ一つの細胞内で多量にウイルス抗原が産生していることが示された。感染 BHK-21 細胞において、ウイルス抗原の著しい増加が窺えた。

## 3) 病原性の変化

そこで次に、マウスでの病原性を調べてみた。図 2 でマウスへの脳内接種と筋肉内接種後の生存数の変化を示した。脳内接種で 100%致死率を示す感染において、QS-05 株は 10 日から死に始め、すべてのマウスが死亡するのに 13 日要した。SMB P-2 株、BHK P-7 株感染マウスでは 6 日から死に始め、8 日ですべて死亡した (図 2 上)。末梢感染においては QS-05 株、SMB P-2 株感染マウスにおいて各々の 20%脳乳剤原液を感染させても 100%致死率を得ることはできなかった。BHK P-7 株感染マウスは 100%致死率の感染が起こり、8 日までにすべてのマウスが死亡した。その死亡に到る時間経過は脳内接種の場合と変わらなかった (図 2 下)。

BHK P-7 株はマウスでの末梢感染力を獲得していることが示された。SMB P-2 株、BHK P-7 株において脳内接種の  $LD_{50}$  ( $ICLD_{50}$ ) と筋肉接種の  $LD_{50}$  ( $IMLD_{50}$ ) を比較してみると、SMB P-2 株は  $ICLD_{50}=10^{-2.4}$ 、 $IMLD_{50}=10^{-0.2}$  となり、BHK P-7 株では  $ICLD_{50}=10^{-2.5}$ 、 $IMLD_{50}=10^{-1.4}$  となった。脳内接種における  $LD_{50}$  はほぼ同じであるが、末梢感染による  $LD_{50}$  には違いがみられた。その違いはどれほどかを理解するため、IC と IM の  $LD_{50}$  比で末梢感染力の程度 (Peripheral susceptibility index) として表すと SMB P-2 株は  $10^{-2.2}=0.006$  に対し、BHK P-7 株  $10^{-1.1}=0.079$  と 13 倍の末梢感染力の増加が見られた (図 3)。

## D. 考察

イヌ街上毒株である QS-05 株は継代することなくマウスに感染させると末梢感染においてはその病原性は弱いものであった。

異種動物への感染成立は低い程度で起こると考えられていることからこの現象は予測されるものである。そこで、どのような株でもよく増殖する乳のみマウス脳と培養細胞である BHK-21 細胞でウイルスを継代して、その後の性状の変化を観察し、以下のことが明らかとなった。1) 乳のみマウス継代、BHK-21 細胞継代とも継代することにより、容易に増殖可能となり高いウイルス価のものが得られるようになった。しかしながら、得られたウイルス株の性状にはいくつかの違いが見られた。末梢感染力において、BHK-21 細胞継代株 (BHK P-7) は乳のみマウス継代株 (SMB P-2) より 10 倍以上強いものであった。2) BHK-21 細胞への感染において、そのウイルス抗原の発現が BHK-21 細胞継代株 (BHK P-7) のものでは著しく増加していることが分かった。街上毒株は末梢感染力を保持しているが、異種動物への感染成立 (spill-over) は高頻度で起こるものではないことが分かる。継代することによるウイルスの性状の変化は雑多な性質をもつ街上毒株のポピュレーション (quasispecies) の中から、ある一つの形質のウイルス株が選択されてきたと考える。あるいは異なる環境下 (宿主内) で引き起こされる変異によることも考えられる。なぜ BHK-21 細胞での継代がマウスでの末梢感染力を増加させたのかのメカニズムは今後の検討を進めることにより解明したい。

#### E. 結論

狂犬病ウイルス・イヌ街上毒株である QS-05 株を乳のみマウスと BHK-21 細胞で継代して、性状の異なる株を獲得した。

BHK-21 細胞継代株 (BHK P-7) は乳のみマウス継代株 (SMB P-2) より末梢感染力が 10 倍以上強いものとして得られた。また、BHK-21 細胞感染においてウイルス抗原の分布や産生量に違いがみられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

森本金次郎：解説「狂犬病」 感染症 37 巻 第 4 号 15 - 18 (2007)

森本金次郎：日本における狂犬病の予防と対策 日中医学 第 22 巻 第 2 号 11 - 15 (2007)

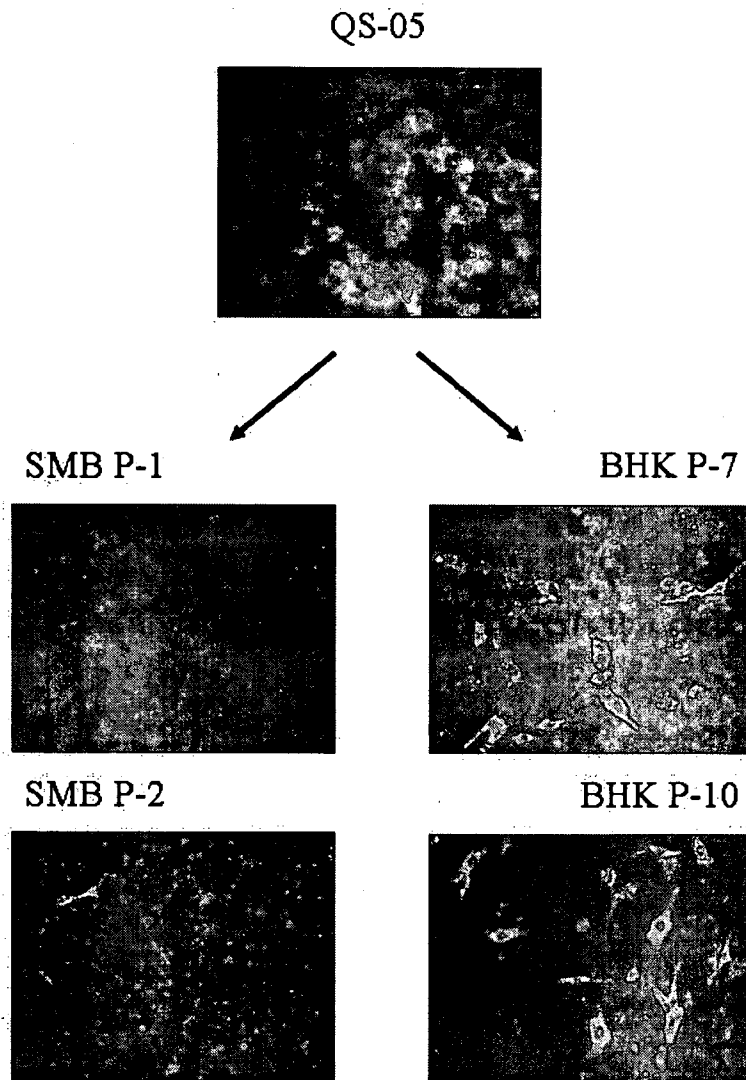
##### 2. 学会発表

なし

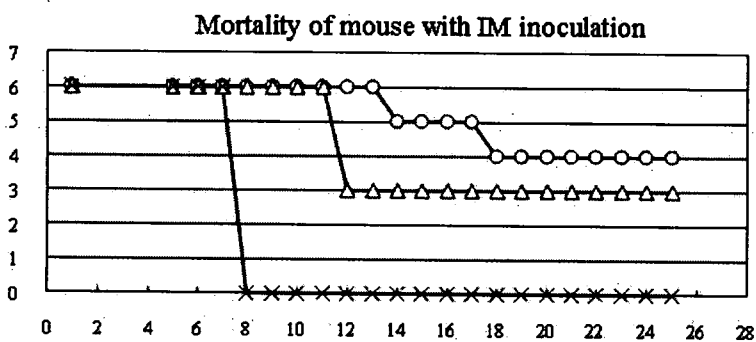
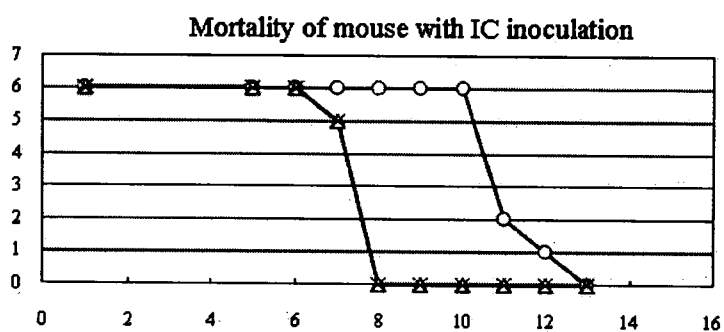
#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

☒ 1 . Immunofluorescence of BHK cells infected with QS-05 and SMB-, BHK- passaged viruses

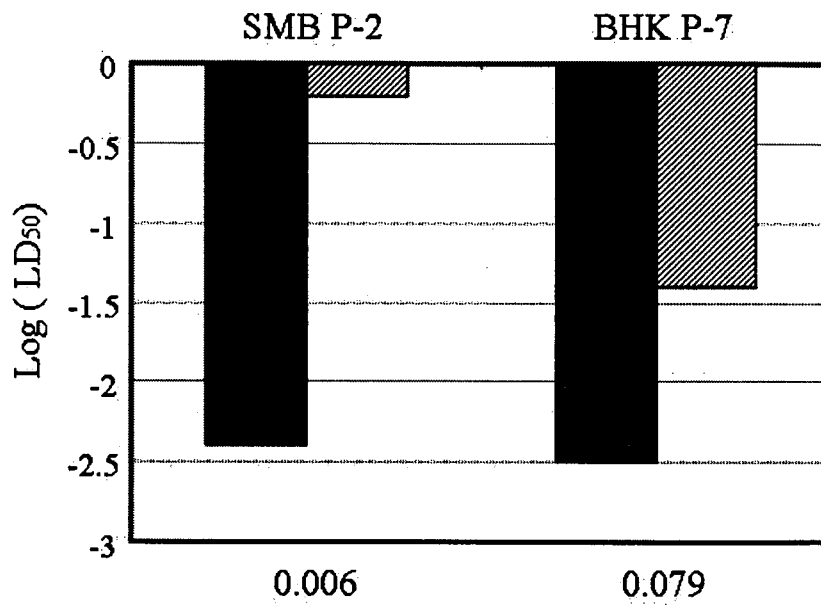


☒ 2. Mortality of mouse infected with QS-05, SMB P-2, and BHK P-7



- QS-05
- △ SMB P-2
- ✕ BHK P-7

図3. SMB P-2株とBHK P-7株の末梢感染力の比較



Peripheral susceptibility index = IC LD<sub>50</sub>/IM LD<sub>50</sub>

 IC LD<sub>50</sub>  
 IM LD<sub>50</sub>

狂犬病ウイルスの病原性発現機序に関する研究

分担研究者: 伊藤直人 岐阜大学応用生物科学部・准教授

研究要旨: 強毒の狂犬病ウイルス西ヶ原株、弱毒の Ni-CE 株、ならびに Ni-CE 株のゲノムに西ヶ原株由来の N 遺伝子を持つ強毒のキメラウイルス CE(NiN)株の感染が神経系培養細胞の遺伝子発現にもたらす影響を網羅的に検索・比較した。これにより、病原性に関連する西ヶ原株 N 遺伝子機能の解明を試みた。その結果、西ヶ原株及び CE(NiN)株感染細胞のインターフェロン及びケモカイン類の遺伝子発現は、Ni-CE 株感染細胞よりも有意に低いことが明らかとなった。以上より、西ヶ原株 N 遺伝子が宿主の自然免疫及び炎症反応の抑制に関連することが示唆された。

A. 研究目的

狂犬病ウイルス西ヶ原株は、脳内接種により成熟マウスに致死的な感染を引きこす強毒の固定毒株である。一方、その鶏胚線維芽細胞馴化株の Ni-CE 株は非致死的な感染を起こし、弱毒である。これまで、両株の病原性の違いにウイルスの N、P 及び M 遺伝子に関連することを明らかにしてきた(Shimizu et al., *Virus Res.*, 2007)。しかし、これらのウイルス遺伝子がどのような機序で病原性に影響するかは明らかになっていない。今回、これらの遺伝子のうち N 遺伝子に注目し、その病原性に関連する機能の解明を試みた。

B. 研究方法

西ヶ原株、Ni-CE 株ならびに Ni-CE 株のゲノムに西ヶ原株の N 遺伝子を持つ、強毒のキメラウイルス CE(NiN)株(Shimizu et al., *Virus Res.*, 2007)をヒト神経芽腫細胞由来 SYM-I 細胞に moi=2 で接種した。接種 24 時間後に細胞より RNA を抽出

し、DNA マイクロアレイ(アジレント、ヒト全ゲノム)を実施した。各株感染細胞の遺伝子発現パターンを比較・検討した。また、特徴的な変化が認められた宿主遺伝子の発現レベルをリアルタイム PCR によっても確認した。

C. 研究結果

各株感染 SYM-I 細胞から抽出した RNA を DNA マイクロアレイによって解析した結果、約 41,000 種の遺伝子の発現レベルを調べることができた。キメラウイルス CE(NiN)株感染細胞の遺伝子発現パターンは、Ni-CE 株感染細胞と非常に類似していた。一方、CE(NiN)株感染細胞における IFN- $\beta$ 、IFN- $\lambda$  などのインターフェロン類、IL-8、CCL5 などのケモカイン類などの一部の遺伝子の発現は、Ni-CE 感染細胞より低いことが明らかとなった。これらの結果は、リアルタイム PCR によっても確認された。



#### D. 考察

以上の結果より、西ヶ原株N遺伝子は宿主神経細胞のインターフェロン類及びケモカイン類の発現抑制に関連していることが示された。これらの遺伝子の発現抑制により、宿主の自然免疫応答や炎症反応が抑制されると考えられた。今後、in vivo において、実際にこのような現象が認められるのかについて検証する必要がある。また、in vitro の実験も引き続き行い、インターフェロン類及びケモカイン類遺伝子の発現抑制に関与する分子機序を明らかにする予定である。

#### E. 結論

狂犬病ウイルス西ヶ原株のN遺伝子は、宿主神経細胞のインターフェロン及びケモカイン遺伝子の発現抑制に関連していることが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

1) Sugiyama M, Ito N.: Control of rabies: Epidemiology of rabies in Asia and development of new-generation vaccines for rabies. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 30: 273-286, 2007.

2) 伊藤直人、杉山誠:狂犬病ウイルスの病原性

に関する研究の進展, ウイルス, 57: 191-198, 2007.

##### 2.学会発表

- 1) Masatani, T., Shimizu, K., Ito, N., Sugiyama, M.: Effect of rabies virus infection on gene expression in neuroblastoma cells. 41th Annual Meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program, Baltimore, MD, U. S. A. (2007. 7).
- 2) 正谷達膳、清水健太、伊藤直人、杉山誠:狂犬病ウイルスのI型インターフェロン誘導能はN遺伝子により決定される:第144回日本獣医学会、江別(2007, 9)
- 3) 正谷達膳、清水健太、伊藤直人、杉山誠:狂犬病ウイルスN遺伝子が神経細胞の遺伝子発現に及ぼす影響:第55回日本ウイルス学会、札幌(2007, 10)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

### III 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Wang, H.Y., Takasaki, T., Fu, S.H., Sun, X.L., Zhang, H.L., Wang, Z.X., Hao, Z.Y., Zhang, J.K., Tang, Q., Kotaki, A., Tajima, S., Liang X.F., Yang, W.Z., Kurane, I. and Liang G.D	Molecular epidemiological analysis of Japanese encephalitis virus in China.	Journal of General Virology	88(Pt 3)		2007
Oya, A. and Kurane, I.	Japanese encephalitis for a reference to international travelers.	Journal of Travel Medicine	14(4)	259-268	2007
Kurane, I.	Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis.	Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases	30(5-6)	329-340	2007
Anantapreecha, S., A-Nuegoonpipat, A., Prakong, S., Chanama, S., Sa-Ngasang, A., Sawanpanyalert, P. and Kurane, I.	Dengue virus cross-reactive hemagglutination inhibition antibody responses in patients with primary dengue virus infection.	Japanese Journal of Infectious Diseases	60(5)	267-270,	2007
Takasaki, T., Kotaki, A., Nishimura, K., Sato, Y., Tokuda, A., Lim, C.K., Ito, M., Tajima, S., Nerome, R. and Kurane, I.	Dengue virus type 2 isolated from an imported dengue patient in Japan: first isolation of dengue virus from Nepal.	Journal of Travel Medicine	15(1)	46-49	2008
Ishikawa, T., Takasaki, T., Kurane, I., Nukuzuma, S., Kondo, T. and Konishi, E.	Co-immunization with West Nile DNA and inactivated vaccines provides synergistic increases in their immunogenicities in mice.	Microbes and Infection	9	1089-1095	2007
Kitai, Y., Shoda, M., Kondo T. and Konishi, E.	Epitope-Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Differentiate West Nile Virus from Japanese Encephalitis Virus Infections in Equine Sera.	Clinical and Vaccine Immunology	14	1024-1031	2007
Yamanaka, A., Kosugi, S. and Konishi, E.	Infection-enhancing and neutralizing activities of mouse monoclonal antibodies against dengue type 2 and 4 viruses are controlled by complement levels.	Journal of Virology	82	927-937	2008
Konishi, E., Kitai, Y. and Kondo, T.	Utilization of Complement-Dependent Cytotoxicity to Measure Low Levels of Antibodies: Evaluation in a Model of Japanese Encephalitis Nonstructural Protein 1.	Clinical and Vaccine Immunology	15	88-94	2008
Ota T, Maeda M, Murakami M, Takegami I, Suto S, Tatsuka M.	Activation of Rac1 by Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor- $\beta$ with defective isoprenyl-binding pocket.	Cell Biology Internationa	31	92-96	2007
Dong L, Masaki Y, Takegami I, Kawanami T, Itoh K, Jin Z, Sakai T, Huang C, Fukushima T, Tong X, Sawaki T, Sugai S, Hirose Y, Umehara H	Cloning and expression of two human recombinant monoclonal Fab fragments specific for EBV viral capsid antigen.	Int Immunol	19	331-336	2007
Dong L, Masaki Y, Takegami I, Jin Z, Huang C, Fukushima T, Sawaki T, Kawanami T, Saeki T, Kitagawa K, Sugai S, Okazaki T, Hirose Y, Umehara H	Clonality analysis of lymphoproliferative disorders in patients with Sjogren's syndrome	Clin. Exp. Immunol	150	279-284	2007
Sun W, Dong L, Kaneyama K, Takegami I.	Bacterial diversity in synovial fluids of patients with RMD determined by cloning and sequencing analysis of the 16S ribosomal RNA gene.		(in press)		2007
Maeda M, Murakami M, Takegami I, Ota T	Promotion or suppression of experimental metastasis of B16 melanoma cells after oral administration of lapachol	Toxicology and Applied Pharmacolog	(in press)		2008
Kariwa, H., Lokugamage, K., Lokugamage, N., Miyamoto, H., Yoshii, K., Nakauchi, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Ivanov, L.I., Iwasaki, T. and Takashima, I	A comparative epidemiological study of hantavirus infection in Japan and Far East Russia	Jpn J Vet Res	54(4)	145-161	2007
Matsuura, Y., Suzuki, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I., Yokoyama, M., Igota, H., Yamauchi, K., Ishida, S., Fukui, D., Bando, G., Kosuge, M., Tsunemitsu, H., Koshimoto, C., Sakae, K., Chikahira, M., Ogawa, S., Miyamura, T., Takeda, N. and Li, T. C.:	Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, Cervus Nippon, in Japan.	Arch Virol	152	1375-1381	2007

Taruishi, M., Yoshimatsu, K., Araki, K., Okumura, M., Nakamura, I., Kajino, K., <u>Arikawa, J.</u>	Analysis of the immune response of Hantaan virus nucleocapsid protein-specific CD8+ T cells in mice.	Virology	365(2)	292-301	2007
<u>Arikawa, J.</u> , Yoshimatsu, K., Truong U.T., Truong, U.N	Hantavirus infection—typical rodent-borne viral zoonosis.	Tropical Medicine and health	35(2)	55-59	2007
Kariwa, H., Yoshimatsu, K., <u>Arikawa, J.</u>	Hantavirus infection in East Asia.	Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases	30	341-356	2007
Bin Abu Daud, N.H., Kariwa, H., Tanikawa Y., Nakamura, I., Seto, T., Miyashita, D., Yoshii, K., Nakauchi, M., Yoshimatsu, K., <u>Arikawa, J.</u> and Takashima, I	Mode of Infection of Hokkaido Virus (Genus Hantavirus) among Grey Red-Backed Voles, <i>Myodes rufocanus</i> , in Hokkaido, Japan.	Microbiol Immunol	51(11)	1081-1090	2007
Chandy, S., Yoshimatsu, K., Ulrich, R.G., Mertens, M., Okumura, M., George, R.P., John, T., Balraj, V., Muliylil, J., Mammen, J., Abraham, P., <u>Arikawa, J.</u> , Sridharan, G	Seroepidemiological study on hantavirus infections in India.	Trans R Soc Trop Med Hyg	102(1)	70-74	2008
有川二郎	ハンタウイルス肺症候群	日本臨床	65巻, 増刊号3	126-130	2007
有川二郎	腎症候性出血熱	日本臨床	65巻, 増刊号3	112-116	2007
Bin Abu Daud, N.H., <u>Kariwa, H.</u> , Tanikawa, Y., Nakamura, I., Seto, T., Miyashita, D., Yoshii, K., Nakauchi, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I	Mode of Infection of Hokkaido Virus (Genus Hantavirus) among Grey Red-Backed Voles, <i>Myodes rufocanus</i> , in Hokkaido, Japan.	Microbiol. Immunol.	51(11)	1081-1090	2007
<u>Kariwa, H.</u> , Yoshimatsu, K., Arikawa, J.	Hantavirus infection in East Asia.	Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.	30(5-6)	341-356	2007
<u>Kariwa, H.</u> , Lokugamage, K., Lokugamage, N., Miyamoto, H., Yoshii, K., Nakauchi, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Ivanov, L.I., Iwasaki, T., Takashima, I.	A comparative epidemiological study of hantavirus infection in Japan and Far East Russia.	Jpn. J. Vet. Res.	54(4)	145-161	2007
Shirato K, Nishimura, H., <u>Saijo, M.</u> , Okamoto, M., Noda, M., Tashiro, M., Taguchi, F.	Diagnosis of human respiratory syncytial virus infections using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP).	J. Virol. Methods	139	78-84	2007
Ike, F., Bourgade, B., Sato, H., <u>Saijo, M.</u> , Kurane, I., Morikawa, S., Yamada, Y., Jaubert, J., Berard, M., Nakata, H., Hiraiwa, N., Mekada, K., Takakura, A., Itoh, T., Obata, Y., Yoshiki, A., Montagutelli, X.	LCMV infection in a wild-derived mouse inbred strain undetected by dirty bedding sentinel health monitoring and revealed after embryo transfer	Comp. Med.	53	272-281	2007
Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Fukushi, S., Yokoyama, M., Harashima, A., Sato, Y., <u>Saijo, M.</u> , Morikawa, S., Sata, T.	Participation of both host and virus factors in induction of severe acute respiratory syndrome in F344 rats infected with SARS coronavirus	J. Virol.	81	1848-1857	2007
Sakai, K., Mizutani, T., Fukushi, S., <u>Saijo, M.</u> , Endoh, D., Kurane, I., Takehara, K., Morikawa, S.	An improved procedure for rapid determination of viral RNA sequences of avian RNA viruses	Arch. Virol.	152	1763-1765	2007
Morikawa S, <u>Saijo, M.</u> , Kurane I.	Current knowledge on lower virulence of Reston Ebola virus	Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.	30	391-398	2007
<u>Saijo, M.</u> , Georges-Courbot, M.C., Marianneau, P., Romanowski, V., Fukushi, S., Mizutani, T., Georges, A.J., Kurata, K., Kurane, I., Morikawa, S.	Recombinant nucleoprotein-based diagnostic systems for Lassa fever: development of diagnostic assays, which do not require infectious virus for antibody and antigen detection	Clin. Vac. Immunol.	14	1182-1189	2007
Fukushi, S., Mizutani, T., Sakai, K., <u>Saijo, M.</u> , Taguchi, F., Yokoyama, M., Kurane, I., Morikawa, S.	Amino acid substitutions in S2 region enhance SARS-CoV infectivity in rat ACE2-expressing cells	J. Virol.	81	10831-10834	2007
Morikawa, S., <u>Saijo, M.</u> , Kurane, I.	Recent progress in molecular biology of Crimean-Congo hemorrhagic fever	Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.	30	375-389	2007
Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Sato, Y., Morikawa, S., <u>Saijo, M.</u> , Itamura, S., Saito, T., Ami, Y., Odagiri, T., Tashiro, M., Sata, T.	Pathology and virus dispersion in cynomolgus monkeys experimentally infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus via different inoculation routes.	International J. Exp. Pathol.	88	403-414	2007