

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 酒井 健夫

平成20（2008）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 ----- 6

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 16

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 17

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症 研究事業）

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、先進国を含む世界各地でその発生が認められている。さらに2006年11月に36年ぶりに本病の国内患者が発生し、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) ブラジルの各種コウモリから分離された狂犬病ウイルスの分子疫学調査の結果、主に吸血コウモリ分離株のグループとそれ以外の食虫コウモリ分離株のグループに区分され、さらに食虫コウモリ分離株は種を反映した複数のサブグループに分類できた。またブラジルのコウモリ分離株のうち、一部の非吸血性コウモリ分離株は、長距離を移動することが知られている北米のコウモリから分離されたウイルス株と遺伝子学的に非常に近縁であった。したがって、コウモリを介した狂犬病はコウモリの食性や生息地の分布等、その生態に依存したダイナミックなウイルス感染環によって形成されていることを明らかにした。
- (2) ブラジルの食肉目動物の間で維持されている狂犬病の疫学的特徴を明らかにする目的で、イヌ、ネコおよびキツネから分離された狂犬病野外株の系統解析を行った。食肉目分離株は大きく2つの遺伝子グループに分類され、第1のグループはイヌおよびネコ分離株によって構成され、南米に広範囲に分布する遺伝子系統と考えられた。また第2のグループはイヌ分離株で構成される1つのサブグループとキツネ分離株によって構成される2つのサブグループで構成されていた。したがって、過去にキツネとイヌの間でウイルス伝播が起きた可能性が示唆された。
- (3) 狂犬病が疑われたブラジルの野生動物およびイヌ、ネコから採材された脳組織47検体に対して、狂犬病ウイルスおよびリッサウイルスを検出できる共通プライマーを用いたRT-PCR法を適用し、増幅された遺伝子産物の塩基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った。
- (4) ヒトおよびイヌ狂犬病が多発している中国南部地域のイヌおよびウシ、ブタ等の家畜より分離された本病ウイルスゲノム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、家畜狂犬病はイヌ由来株であることが推測された。複数の構造遺伝子の解析結果より、分離株は中国全土に分布する遺伝子グループと中国南部に限局する遺伝子グループに大別された。

以上、本調査成果をもとに、今後はさらなる野外株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、本病常在地における野生動物あるいはイヌ由来ウイルスの動態を把握し、本病の宿主および伝播動物となる動物の危険度評価に有益な情報の集積とその提供を目指す計画である。

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

海外において発生している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、我が国周辺諸国では本病の発生が頻繁に認められており、中華人民共和国では2006年に3,000名以上の死亡者が確認されている。さらに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大きい。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地域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

・ブラジルで分離された野生動物由来狂犬病ウイルスの分子疫学的調査：

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、ブラジル各州を対象とした。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・保管された脳組織および分離ウイルスを利用した。

・中華人民共和国広西自治区における狂犬病疫学調査：

中国においては南部地域においてヒトおよび

イヌにおける狂犬病症例が報告されている。そこで、中国南部に位置する広西チワン族自治区においては、広西大学および広西自治区獣医検査所の協力を得て疫学調査および狂犬病ウイルスのサンプル採集を行った。

・野外狂犬病ウイルスの分離と遺伝子解析：

①狂犬病が疑われる動物の脳組織を用いてマウス脳内接種法および狂犬病ウイルス核蛋白質に対する特異抗体を用いた蛍光抗体法によって狂犬病の診断を行った。狂犬病陽性と診断された動物の脳乳剤から得られたウイルスサンプルを調整し、次いで②サンプルより市販のRNA抽出キットにより狂犬病ウイルスのゲノム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、既知の株が有する遺伝子配列との比較を行った。

C. 研究結果

(1) ブラジルのコウモリ由来狂犬病

ブラジルの各種コウモリから分離された狂犬病ウイルス56検体 (Fig. 1) の核蛋白質 (N) 遺伝子情報を基に分子系統樹を作製した (Fig. 2)。系統樹によって、主に吸血コウモリ分離株のグループとそれ以外の食虫コウモリ分離株のグループに分けられ、さらに食虫コウモリ分離株はコウモリ種を反映した複数のサブグループに分類できた。また既知のコウモリ由来株の遺伝子情報を追加して作製した分子系統樹によって、ブラジルのコウモリ分離株のうち、一部の非吸血性コウモリ分離株は、長距離を移動することが知られている北米のコウモリから分離されたウイルス株と遺伝子学的に非常に近縁であった (Fig. 3)。したがって、コウモリの狂犬病はコウモリの食性や生息地の分布等、その生態に依存したダイナミックなウイルス感染環によって形成されていることを明らかにした。

(2) ブラジルの食肉目由来狂犬病

ブラジルの食肉目動物の間で維持されている狂犬病の疫学的特徴を明らかにする目的でイヌ、

ネコおよび野生のキツネから分離された狂犬病ウイルス47検体 (Fig. 4) の系統解析を行った。食肉目分離株は大きく2つの遺伝子グループに分類され、第1のグループはイヌおよびネコ分離株によって構成され、南米に広範囲に分布する遺伝子系統と考えられた (Fig. 5)。また第2のグループはイヌ分離株で構成される1つのサブグループとキツネ分離株によって構成される2つのサブグループで構成されていたことから、過去にキツネとイヌの間でウイルス伝播が起きた可能性が示唆された。

(3) ブラジルでのリッサウイルス感染症の調査

狂犬病が疑われたブラジルの野生動物およびイヌ、ネコから採材された脳組織47検体に対して、狂犬病ウイルス (Genotype 1) およびリッサウイルス (Genotype 2-7) を検出できる共通プライマーを用いたRT-PCR法を適用したところ、全ての検体において目的の分子量において特異的な遺伝子増幅産物を得た (Fig. 6)。増幅された遺伝子産物のうち、417塩基配列を決定し既知のリッサウイルスの遺伝子配列とともに系統樹を作製したところ、調査した全ての検体は遺伝子型1の狂犬病ウイルスであることが明らかとなった (Fig. 7)。

(4) 中華人民共和国南部における狂犬病疫学調査

ヒトおよびイヌ狂犬病が多発している中国南部地域での分子疫学的調査を行った。狂犬病が疑われたイヌおよびウシ、ブタ等の家畜より分離された本病ウイルスゲノムのN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、家畜狂犬病はイヌ由来株であることが推測された (Fig. 8)。さらに複数の構造遺伝子 (G、MおよびP蛋白遺伝子) の解析結果より、分離株は中国全土に分布する遺伝子グループと中国南部に限局する遺伝子グループに大別された。

D. 考察

前年度の調査成果より、多種多様な狂犬病感受性 (宿主) 動物が生息するブラジルでは様々

な遺伝子系統の狂犬病ウイルス (Genotype 1) が存在しており、特にコウモリ分離株においては多様性が大きいことが明らかとなっていた。本研究では、ブラジルのコウモリ由来狂犬病ウイルスに焦点を当て、各種コウモリから分離された狂犬病ウイルスゲノムの遺伝子解析によって、野外狂犬病の感染環の一端を解明することを目指した。吸血コウモリ、食虫コウモリおよび食果コウモリおよび種不明のコウモリ分離株の遺伝子解析により、主に吸血コウモリ分離株のグループとそれ以外の食虫コウモリ分離株のグループに分類された。吸血コウモリ分離株は前年度の報告と同様にブラジルの畜産経済の脅威となっているウシ狂犬病および森林地帯で散発的に発生するヒト狂犬病において分離されるウイルス株と同一グループを形成するので、引き続き継続的な分子疫学的調査を行い、その分布域および拡散動態を注視する必要があると考えられた。食果コウモリ分離株は全てが吸血コウモリ分離株と同一のグループに包含されたので、これらは吸血コウモリと生息域が重なる個体が同一ウイルスグループを保有していることが推測される。また食虫コウモリ分離株については非常に多様性が大きく、数個のサブグループを形成した。これらのサブグループは興味深いことにコウモリ種毎に形成される傾向があったことから、食虫コウモリにおいてはその生息地および生態が種によって限定されており、それらの生態学的因子が食虫コウモリ分離株の遺伝子系統の形成に深く関わっていることが推察された。また、ブラジルのコウモリ分離株のうち、未同定種であるが非吸血性コウモリから分離された一部の株は、数千キロ以上離れた北米のコウモリから分離されたウイルス株と遺伝子学的に非常に近縁であった。この北米産コウモリは、長距離を移動することが知られていることから、移動性のコウモリによって狂犬病ウイルスの南北大陸間の長距離運搬が自然界において行われている危険性が示唆された。以上の知見をまとめると、コウモリの狂犬病は、その宿主であるコウモリ自身の多様性に反映される食性や生息地の分布等、その生態に依存したダイ

ナミックなウイルス感染環によって形成されていることが明らかにされた。したがって、野外において狂犬病の自然宿主と予想されるコウモリにおける分子疫学的調査は、狂犬病の予防・拡大防止の観点から重要なだけでなく、自然界における寄生体の動態を把握する上で非常に重要なモデルとなると考えられた。

ブラジルでは減少傾向ではあるが、イヌにおいても狂犬病が発生しており、近年、キツネから分離された狂犬病ウイルスはイヌ分離株と遺伝子学的に近縁であることが報告された。本研究はブラジルの食肉目の間で維持されている狂犬病ウイルスの疫学的特徴を明らかにするために、野生のキツネを含む食肉目から分離された狂犬病ウイルスの系統解析を行った。ブラジルで分離された食肉目分離株は、2つの系統に分類された。第1の系統は、家庭動物であるイヌおよびネコから分離されたウイルスによって構成されており、アルゼンチンおよびボリビアで分離された食肉目分離株はこの系統に属した。このことから、第1の系統はブラジルおよびその周囲の広範囲な地域に分布することが明らかとなった。第2の系統は、イヌ分離株によって構成される1つのサブ系統とキツネ分離株によって構成される2つのサブ系統によって構成されており、イヌ分離株は、キツネ分離株のサブ系統の分岐として位置していたことから、過去にイヌとキツネの間でウイルス伝播が起きた可能性が示唆された。以上、イヌと野生動物の接触は新たな狂犬病ウイルス変異株を出現させる可能性があり、狂犬病の流行を防止するためにはイヌと野生動物の両方の狂犬病をコントロールすることが重要であると考えられた。

これまでアメリカ大陸においては狂犬病ウイルス (Genotype 1) 以外のリッサウイルス (狂犬病類似ウイルス; Genotype 2-7および型未定) は発見されていない。この理由は定かではないが他のRNAウイルスと比べると比較的変異が少ない *Lyssa* ウイルス属に該当する狂犬病ウイルスがある程度地理的および宿主特異的に分布することから、大陸間の地理的隔離とそれに伴う自然宿主の分布域の違いが狂犬病類似ウイ

ルスであるリッサウイルスの限定的分布に関与していることが予想される。しかしながらリッサウイルスに罹患した場合、狂犬病と同様の症状を呈し致死的であること、またほとんどのリッサウイルスはコウモリから分離されていることを考慮すると、世界で最も多様性の大きいコウモリ種が生息する南米地域においてリッサウイルスの調査を実施することは疫学的価値があると思われた。予備的研究ではあるが、本研究において行った狂犬病ウイルス/リッサウイルス同時検出系では、狂犬病症状が疑われた野生動物を中心としたブラジルの動物からリッサウイルスは検出されなかった。本研究結果は非常に限定的であるため、アメリカ大陸においてリッサウイルスが存在しないことを裏付ける証左には全くならないが、今後、未調査地域を含めてリッサウイルスの分布域を解明するための分子疫学的調査を行う一助としたい。

ヒトおよびイヌ狂犬病が多発している中国南部地域での分子疫学的調査の結果、イヌおよびウシ、ブタ等の家畜より分離された本病ウイルスは、N遺伝子解析において全て遺伝子型1の狂犬病ウイルスであることが確認され、家畜狂犬病はイヌ由来株であることが予想された。そこでN遺伝子以外の複数の構造遺伝子の解析を加えることにより、これらの予測を確認できた。さらに分離株は中国全土に分布する遺伝子グループと中国南部に限局する遺伝子グループに大別されることを明らかにした。中国で発生報告がある狂犬病は、イヌ由来がほとんどであることから今後は、家畜および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。

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。

ブラジルの各種コウモリから分離された狂犬病ウイルスの分子疫学調査の結果、種に依存した狂犬病ウイルスの分子系統の存在および南北大陸間を移動するコウモリにおけるウイルス運搬の可能

性が明らかとなった。このようなダイナミックなウイルス感染環を形成するコウモリ狂犬病を防除するためには、コウモリの食性や生息地の分布等、その生態を把握することがより重要であると考えられた。

ブラジルの野生キツネから分離された狂犬病ウイルスとイヌおよびネコ分離株の分子系統解析によって食肉目動物の間で維持されている狂犬病の疫学的特徴が明らかとなり、過去にキツネとイヌの間でウイルス伝播が起きた可能性が示唆された。したがって、イヌと野生動物の接触は新たな狂犬病ウイルス変異株を出現させる可能性があり、狂犬病の流行を防止するためにはイヌと野生動物の両方の狂犬病をコントロールすることが重要であると考えられた。

南米の野生動物において行った限定的な調査では、狂犬病ウイルス以外のリッサウイルスは検出されなかった。今後未調査地域における継続拡大調査が必要と考えられた。

ヒトおよびイヌ狂犬病が多発している中国南部地域の分子疫学的調査の結果、イヌおよびウシ、ブタ等の家畜より分離された狂犬病ウイルスは、中国全土に分布する遺伝子グループと中国南部に限局する遺伝子グループに大別された。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、野生動物および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と提供を目指す計画である。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

・論文発表

- 1) Kobayashi Y, Okuda H, Nakamura K, Sato G, Itou T, Carvalho AA, Silva MV, Mota CS, Ito FH, Sakai T Genetic analysis of phosph

oprotein and matrix protein of rabies viruses isolated in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.* 2007; 69(11): 1145-1154

- 2) Kobayashi Y, Sato G, Kato M, Itou T, Cunha EM, Silva MV, Mota CS, Ito FH, Sakai T Genetic diversity of bat rabies viruses in Brazil. *Arch. Virol.* 2007; 152(11): 1995-2004
- 3) Kobayashi Y, Inoue N, Sato G, Itou T, Santos HP, Brito CJ, Gomes AA, Santos MF, Silva MV, Mota CS, Ito FH, Sakai T Phylogenetic characterization of rabies virus isolates from Carnivora in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.* 2007; 69(7): 691-696

・学会発表

- 1) 小林由紀、佐藤豪、伊藤琢也、Ito FH、酒井健夫. ブラジルにおけるコウモリ由来狂犬病ウイルスの遺伝子多様性. 第144回日本獣医学会学術集会 2007年9月3日, 江別
- 2) 小林慶生、小林由紀、佐藤豪、伊藤琢也、Ito FH、酒井健夫. ブラジルの吸血コウモリ由来狂犬病ウイルスの分子疫学的解析. 第144回日本獣医学会学術集会 2007年9月3日, 江別
- 3) 平野慎二、小林由紀、佐藤豪、萩原絃子、望月信之、Ting Rong Luo、Qi Liu、Ning-Yi Jin、伊藤琢也、酒井健夫. 中国広西自治区で分離された狂犬病ウイルスの分子疫学的解析. 第144回日本獣医学会学術集会 2007年9月3日, 江別

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分子系統学的解析を行った。さらに、明らかになった野外株の遺伝子情報を基にした迅速簡便遺伝子増幅法の確立を試みた。

- (1) ブラジルの各種コウモリから分離された狂犬病ウイルスの分子疫学調査の結果、主に吸血コウモリ分離株のグループとそれ以外の食虫コウモリ分離株のグループに区分され、さらに食虫コウモリ分離株は種を反映した複数のサブグループに分類できた。また本研究で解析したブラジルのコウモリ分離株のうち、一部の非吸血性コウモリ分離株は、長距離を移動することが知られている北米のコウモリから分離されたウイルス株と遺伝子学的に非常に近縁であった。したがって、コウモリの狂犬病はコウモリの食性や生息地の分布等、その生態に依存したダイナミックなウイルス感染環によって形成されていることを明らかにした。
- (2) ブラジルの食肉目動物であるイヌ、ネコおよびキツネから分離された狂犬病ウイルスの系統解析を行ったところ、食肉目分離株は大きく2つの遺伝子グループに分類され、第1のグループはイヌおよびネコ分離株によって構成され、南米に広範囲に分布する遺伝子系統と考えられた。また第2のグループはイヌ分離株で構成される1つのサブグループとキツネ分離株によって構成される2つのサブグループで構成されていたことから、過去にキツネとイヌの間でウイルス伝播が起きた可能性が示唆された。
- (3) 狂犬病症状が疑われたブラジルの野生動物およびイヌ、ネコから採材された脳組織47検体に対して、狂犬病ウイルスおよびリッサウイルスを検出できる共通プライマーを用いたRT-PCR法を適用し、増幅された遺伝子産物の塩基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った。
- (4) ヒトおよびイヌ狂犬病が多発している中国南部地域のイヌおよびウシ、ブタ等の家畜より分離された本病ウイルスゲノム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、家畜狂犬病はイヌ由来株であることが推測された。複数の構造遺伝子の解析結果より、分離株は中国全土に分布する遺伝子グループIと中国南部に限局する遺伝子グループIIに大別された。
- (5) 狂犬病のより迅速簡便な診断を目指し、野外サンプルを用いたRT-LAMP法の確立を試みた。イヌおよび吸血コウモリ由来株を対象とした場合、従来のRT-PCR法より迅速かつ高感度に検出できる条件を見い出した。

以上、狂犬病野外株の遺伝子解析によって、コウモリ狂犬病および食肉目狂犬病の感染環の特徴を明らかにした。また狂犬病の迅速簡便診断法としてRT-LAMP法が有用であることを確認した。

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用いられる核蛋白質遺伝子を中心に各構造蛋白遺伝子を標的にして、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と分子系統学的解析を行った。さらに得られた野外株の遺伝子情報に基づく狂犬病ウイルスの迅速簡便検出法の確立を試みた。

B. 研究方法

・ブラジルで分離された野生動物由来狂犬病ウイルスの分子疫学的調査：

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、ブラジル各州を対象とした。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・保管された脳組織および分離ウイルスを利用した。

・中華人民共和国広西自治区における狂犬病疫学調査：

中国においては南部地域においてヒトおよびイヌにおける狂犬病症例が報告されている。そこで、中国南部に位置する広西チワン族自治区においては、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および狂犬病ウイルスのサンプル採集を行った。

・野外狂犬病ウイルスの分離と遺伝子解析：

①狂犬病が疑われる動物の脳組織を用いてマウス脳内接種法および狂犬病ウイルス核蛋白質に対する特異抗体を用いた蛍光抗体法によって狂犬病の診断を行った。狂犬病陽性と診断された動物の脳乳剤から得られたウイルスサンプルを調整し、次いで②サンプルよ

り市販のRNA抽出キットにより狂犬病ウイルスのゲノム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、既知の株が有する遺伝子配列との比較を行った。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 (N) 遺伝子、抗原性状に関与する糖蛋白質 (G) 遺伝子、マトリックス蛋白質 (M) 遺伝子およびリン酸化蛋白質 (P) 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。

・迅速簡便遺伝子検出法の開発

狂犬病のより迅速簡便な診断を目指し、野外狂犬病ウイルスゲノムを標的としたRT-LAMP法の確立を試みた。これまでの研究によって明らかにした遺伝子配列のうち、特異的かつ高感度に検出が可能な領域に適合するプライマーを設計し、イヌおよび吸血コウモリ由来株より抽出したゲノムRNAを鋳型として増幅できる条件を検討した。確立された遺伝子増幅条件を用いて、従来のRT-PCR法と比較することによって感度および特異性を確認した。

C. 研究結果

(1) ブラジルのコウモリ由来狂犬病

ブラジルの各種コウモリから分離された狂犬病ウイルス56検体 (Fig. 1) の核蛋白質 (N) 遺伝子情報を基に分子系統樹を作製した (Fig. 2)。系統樹によって、主に吸血コウモリ分離株のグループとそれ以外の食虫コウモリ分離株のグループに分けられ、さらに食虫コウモリ分離株はコウモリ種を反映した複数のサブグループに分類できた。また既知のコウモリ由来株の遺伝子情報を追加して作製した分子系統樹によって、ブラジルのコウモリ分離株のうち、一部の非吸血性コウモリ分離株は、長距離を移動することが知られている北米のコウモ

リから分離されたウイルス株と遺伝子学的に非常に近縁であった (Fig. 3)。したがって、コウモリの狂犬病はコウモリの食性や生息地の分布等、その生態に依存したダイナミックなウイルス感染環によって形成されていることを明らかにした。食肉目分離株は大きく2つの遺伝子グループに分類され、第1のグループはイヌおよびネコ分離株によって構成され、南米に広範囲に分布する遺伝子系統と考えられた (Fig. 5)。また第2のグループはイヌ分離株で構成される1つのサブグループとキツネ分離株によって構成される2つのサブグループで構成されていたことから、過去にキツネとイヌの間でウイルス伝播が起きた可能性が示唆された。

(3) ブラジルでのリッサウイルス感染症の調査

狂犬病が疑われたブラジルの野生動物およびイヌ、ネコから採材された脳組織47検体に対して、狂犬病ウイルス (Genotype 1) およびリッサウイルス (Genotype 2-7) を検出できる共通プライマーを用いたRT-PCR法を適用したところ、全ての検体において目的の分子量において特異的な遺伝子増幅産物を得た (Fig. 6)。増幅された遺伝子産物のうち、417塩基配列を決定し既知のリッサウイルスの遺伝子配列とともに系統樹を作製したところ、調査した全ての検体は遺伝子型1の狂犬病ウイルスであることが明らかとなった (Fig. 7)。

(4) 中華人民共和国南部における狂犬病疫学調査

ヒトおよびイヌ狂犬病が多発している中国南部地域での分子疫学的調査を行った。狂犬病が疑われたイヌおよびウシ、ブタ等の家畜より分離された本病ウイルスゲノムのN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、家畜狂犬病はイヌ由来株であることが推測された (Fig. 8)。さらに複数の構造遺伝子 (G、M およびP蛋白遺伝子) の解析結果より、分離

株は中国全土に分布する遺伝子グループと中国南部に局限する遺伝子グループに大別された。

(5) 狂犬病ウイルス迅速簡便診断法開発の試み

野外ウイルスゲノムサンプルを用いたRT-LAMP法の確立を試みた。イヌおよび吸血コウモリ由来株を対象とした場合、従来のRT-PCR法より迅速かつ高感度に検出できる条件を見い出した。

D. 考察

吸血コウモリ、食虫コウモリおよび食果コウモリおよび種不明のコウモリ分離株の遺伝子解析により、主に吸血コウモリ分離株のグループとそれ以外の食虫コウモリ分離株のグループに分類された。食果コウモリ分離株は全てが吸血コウモリ分離株と同一のグループに包含されたので、これらは吸血コウモリと生息域が重なる個体が同一ウイルスグループを保有していることが推測される。また食虫コウモリ分離株については非常に多様性が大きく、数個のサブグループを形成した。これらのサブグループは興味深いことにコウモリ種毎に形成される傾向があったことから、食虫コウモリにおいてはその生息地および生態が種によって限定されており、それらの生態学的因子が食虫コウモリ分離株の遺伝子系統の形成に深く関わっていることが推察された。また、ブラジルのコウモリ分離株のうち、未同定種であるが非吸血性コウモリから分離された一部の株は、数千キロ以上離れた北米のコウモリから分離されたウイルス株と遺伝子学的に非常に近縁であった。この北米産コウモリは、長距離を移動することが知られていることから、移動性のコウモリによって狂犬病ウイルスの南北大陸間の長距離運搬が自然界において行われている危険性が示唆された。以上、コウモリの狂犬病は、その宿主であるコウモリ自身の多様性に反映される食性や生息地の分布等、そ

の生態に依存したダイナミックなウイルス感染環境によって形成されていることが明らかになった。

ブラジルの食肉目の間で維持されている狂犬病ウイルスの疫学的特徴を明らかにするために、野生のキツネを含む食肉目から分離された狂犬病ウイルスの系統解析を行った。ブラジルで分離された食肉目分離株は、2つの系統に分類された。第1の系統は、家庭動物であるイヌおよびネコから分離されたウイルスによって構成されており、アルゼンチンおよびボリビアで分離された食肉目分離株はこの系統に属した。このことから、第1の系統はブラジルおよびその周囲の広範囲な地域に分布することが明らかとなった。第2の系統は、イヌ分離株によって構成される1つのサブ系統とキツネ分離株によって構成される2つのサブ系統によって構成されており、イヌ分離株は、キツネ分離株のサブ系統の分岐として位置していたことから、過去にイヌとキツネの間でウイルス伝播が起きた可能性が示唆された。

本研究において行った狂犬病ウイルス/リッサウイルス同時検出系では、狂犬病症状が疑われた野生動物を中心としたブラジルの動物からリッサウイルスは検出されなかった。本研究結果は非常に限定的であるため、アメリカ大陸においてリッサウイルスが存在しないことを裏付ける証左には全くならないが、今後、未調査地域を含めてリッサウイルスの分布域を解明するための分子疫学的調査を行う一助としたい。

中国南部地域での分子疫学的調査の結果、イヌおよびウシ、ブタ等の家畜より分離された本病ウイルスは、N遺伝子解析において全て遺伝子型1の狂犬病ウイルスであることが確認され、家畜狂犬病はイヌ由来株であることが予想された。そこでN遺伝子以外の複数の構造遺伝子の解析を加えることにより、これらの予測を確認できた。さらに分離株は中国全土に分布する遺伝子グループと中国南部に限局する遺伝子グループに大別されること

を明らかにした。

今回新たな狂犬病ウイルス遺伝子検出法としてRT-LAMP法を適用し、一部の野外狂犬病ウイルスを迅速高感度に検出することが可能であることを確認した。今後はGenotype 1の野外狂犬病ウイルスを特異かつ高感度に検出できる迅速簡便診断法の最適条件を確立する予定である。

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。

ブラジルの各種コウモリから分離された狂犬病ウイルスの分子疫学調査の結果、種に依存した狂犬病ウイルスの分子系統の存在および南北大陸間を移動するコウモリにおけるウイルス運搬の可能性が明らかとなった。

ブラジルの野生キツネから分離された狂犬病ウイルスとイヌおよびネコ分離株の分子系統解析によって食肉目動物の間で維持されている狂犬病の疫学的特徴が明らかとなり、過去にキツネとイヌの間でウイルス伝播が起きた可能性が示唆された。

南米の野生動物において行った限定的な調査では、狂犬病ウイルス以外のリッサウイルスは検出されなかった。今後未調査地域における継続拡大調査が必要と考えられた。

ヒトおよびイヌ狂犬病が多発している中国南部地域の分子疫学的調査の結果、イヌおよびウシ、ブタ等の家畜より分離された狂犬病ウイルスは、中国全土に分布する遺伝子グループと中国南部に限局する遺伝子グループに大別された。

野外ウイルスゲノムサンプルからのRT-LAMP法を用いた新たな遺伝子検出法を試みた。イヌおよび吸血コウモリ由来株を対象とした場合、従来のRT-PCR法より迅速かつ高感度に検出できる条件を見出した。

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およびより精確な迅速簡便診断法の確立を行う予定である。

2007年9月3日, 江別

F. 研究発表

・論文発表

- 1) Kobayashi Y, Okuda H, Nakamura K, Sato G, Itou T, Carvalho AA, Silva MV, Mota CS, Ito FH, Sakai T Genetic analysis of phosphoprotein and matrix protein of rabies viruses isolated in Brazil. J. Vet. Med. Sci. 2007; 69(11): 1145-1154
- 2) Kobayashi Y, Sato G, Kato M, Itou T, Cunha EM, Silva MV, Mota CS, Ito FH, Sakai T Genetic diversity of bat rabies viruses in Brazil. Arch. Virol. 2007; 152(11): 1995-2004
- 3) Kobayashi Y, Inoue N, Sato G, Itou T, Santos HP, Brito CJ, Gomes AA, Santos MF, Silva MV, Mota CS, Ito FH, Sakai T Phylogenetic characterization of rabies virus isolates from Carnivora in Brazil. J. Vet. Med. Sci. 2007; 69(7): 691-696




・学会発表

- 1) 小林由紀、佐藤豪、伊藤琢也、Ito FH、酒井健夫。ブラジルにおけるコウモリ由来狂犬病ウイルスの遺伝子多様性。第144回日本獣医学会学術集会 2007年9月3日, 江別
- 2) 小林慶生、小林由紀、佐藤豪、伊藤琢也、Ito FH、酒井健夫。ブラジルの吸血コウモリ由来狂犬病ウイルスの分子疫学的解析。第144回日本獣医学会学術集会 2007年9月3日, 江別
- 3) 平野慎二、小林由紀、佐藤豪、萩原絃子、望月信之、Ting Rong Luo、Qi Liu、Ning-Yi Jin、伊藤琢也、酒井健夫。中国広西自治区で分離された狂犬病ウイルスの分子疫学的解析。第144回日本獣医学会学術集会 2007年9月3日, 江別
- 4) 工藤瞳、小林由紀、佐藤豪、伊藤琢也、Ito FH、酒井健夫。RT-LAMP (Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification) 法を用いた野外狂犬病ウイルスの検出。第144回日本獣医学会学術集会

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特記事項なし。

Samples (n=56)

bat species		No.
<i>Desmodus rotundus</i>		20
<i>Artibeus fimbriatus</i>		1
<i>A. lituratus</i>		6
<i>A. planirostris</i>		1
<i>Artibeus</i> spp.		2
<i>Eptesicus fulinaris</i>		4
<i>Molossus molossus</i>		6
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>		4
<i>Tadarida laticaudata</i>		2
Non-hematophagous bat		10

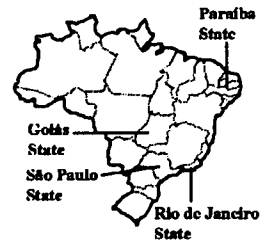


Fig. 1

Bat rabies in Brazil

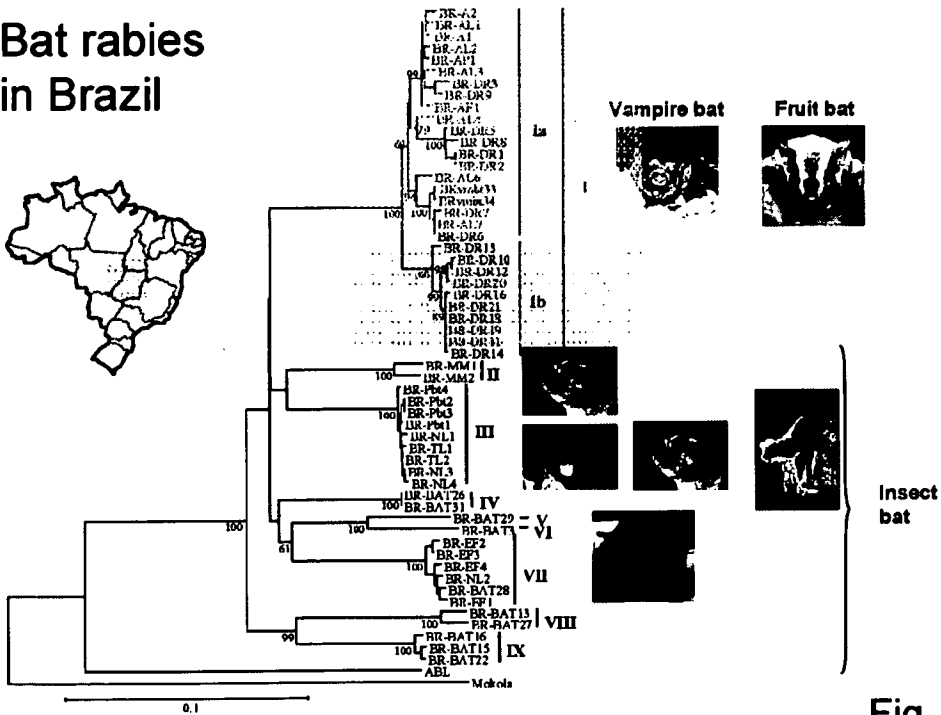


Fig. 2

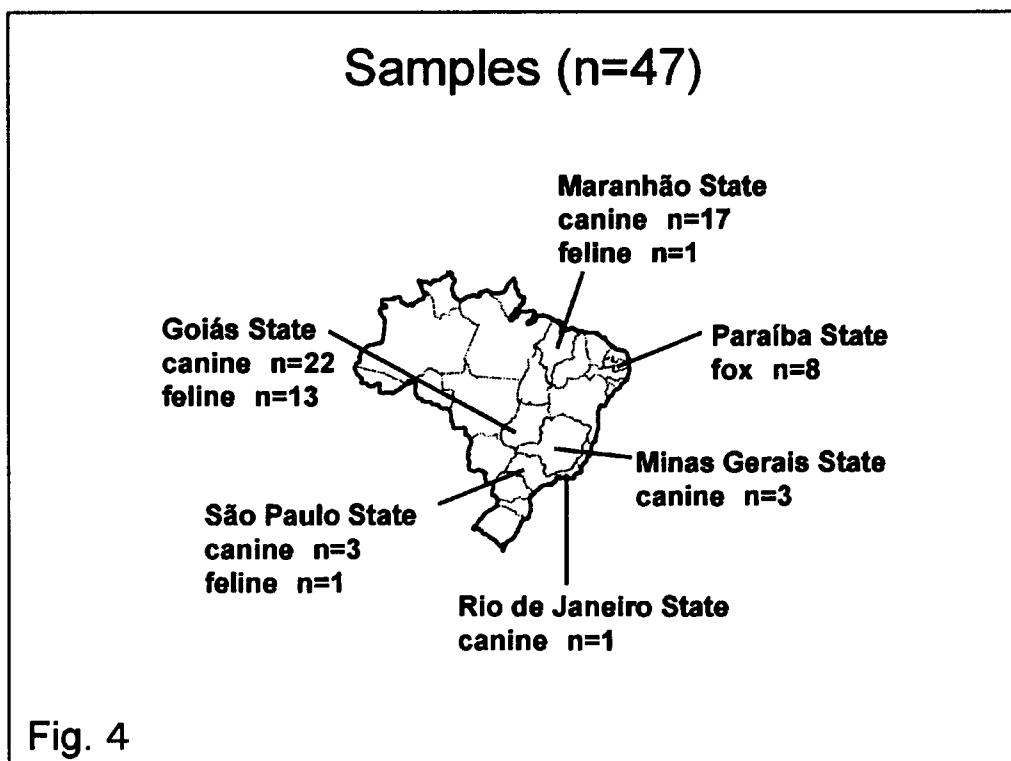
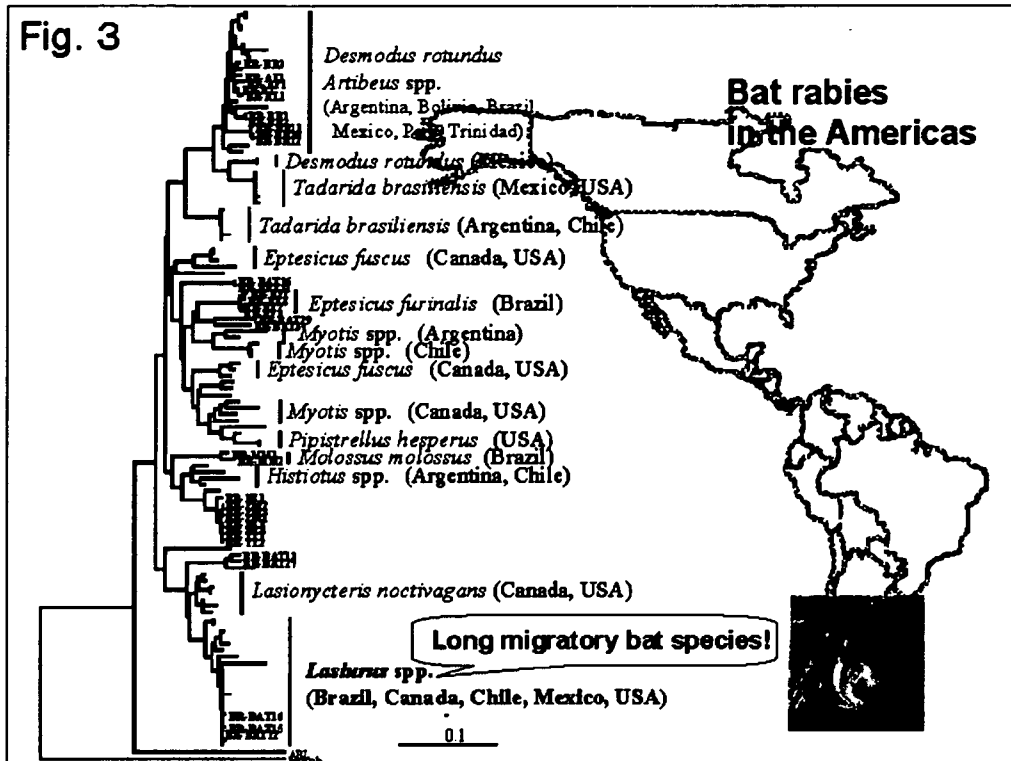
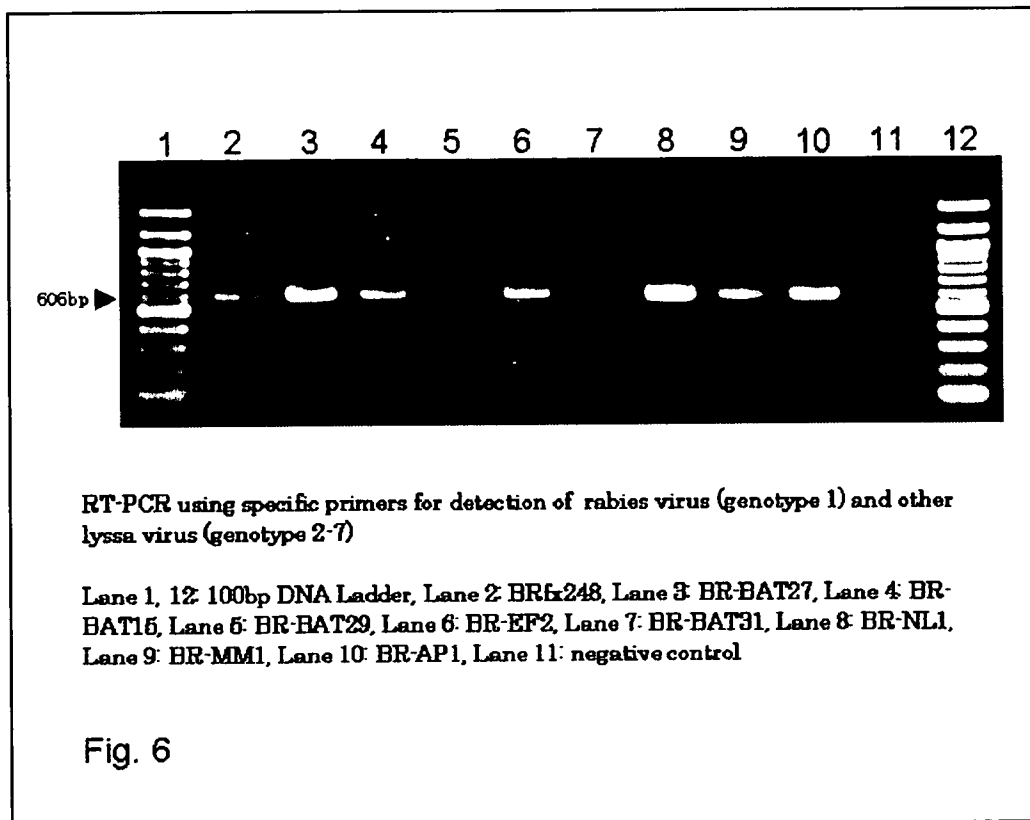
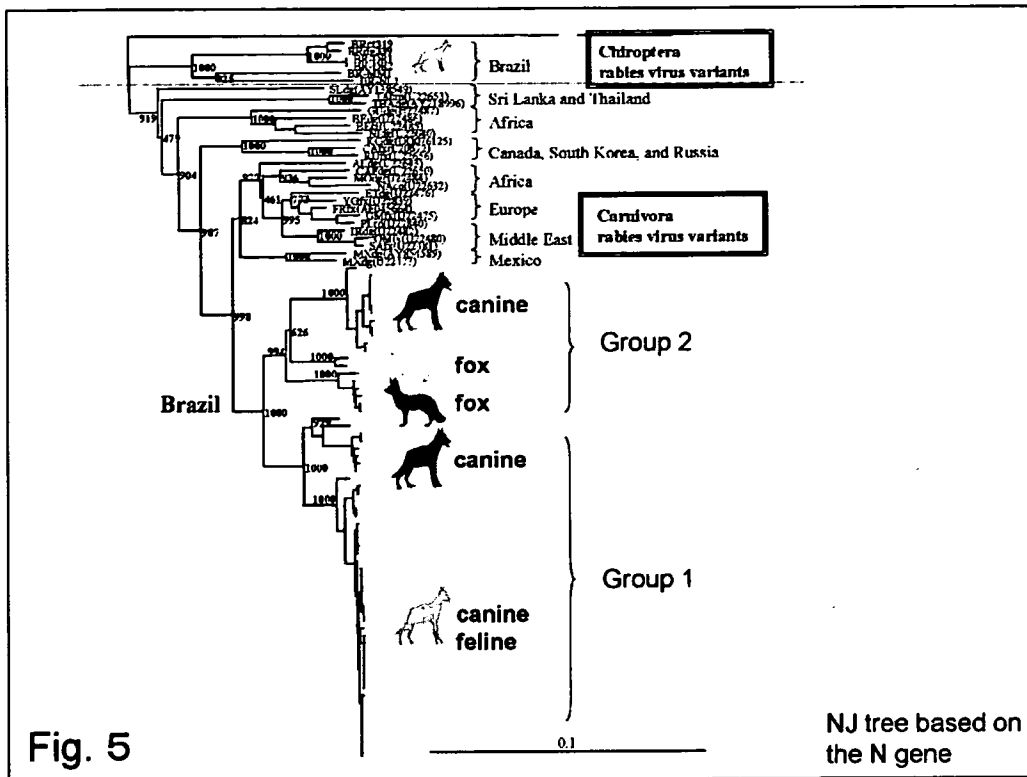


Fig. 4



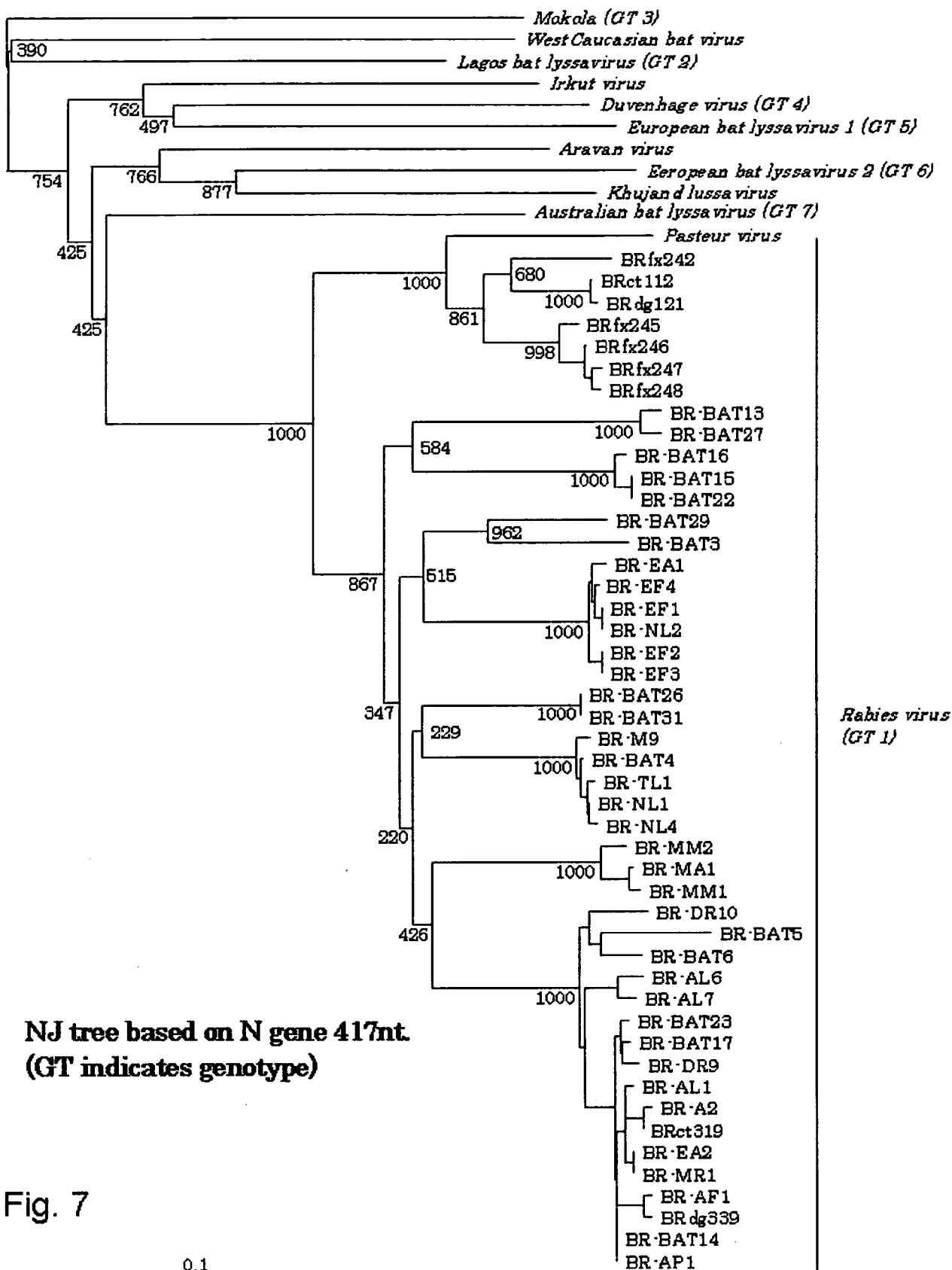


Fig. 7

NJ-tree based on N gene of rabies isolates from Southern China

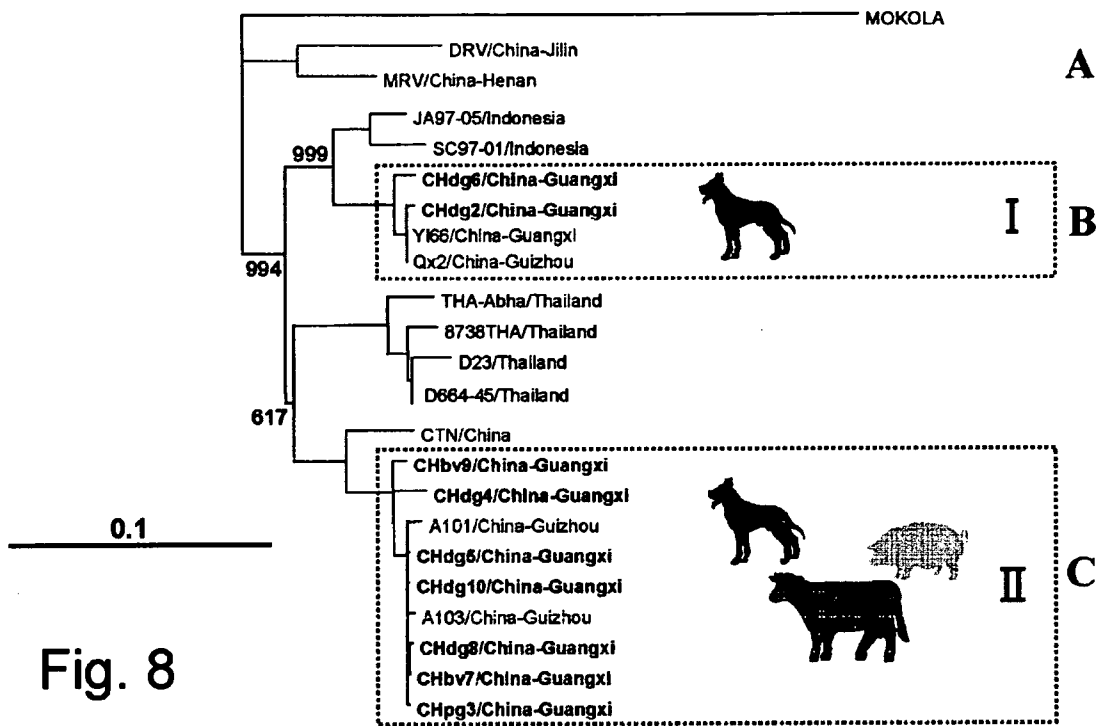


Fig. 8

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
Kobayashi Y, Inoue N, Sato G, <u>Itou T</u> , Santos HP, Brito CJ, Gomes AA, Santos MF, Silva MV, Mota CS, Ito FH, <u>Sakai T</u>	Phylogenetic characterization of rabies virus isolates from Carnivora in Brazil.	Journal of Veterinary Medical Sciences	69	691-696	2007
Kobayashi Y, Sato G, Kato M, <u>Itou T</u> , Cunha EM, Silva MV, Mota CS, Ito FH, <u>Sakai T</u>	Genetic diversity of bat rabies viruses in Brazil.	Archives of Virology	152	1995-2004	2007
Kobayashi Y, Okuda H, Nakamura K, Sato G, <u>Itou T</u> , Carvalho AA, Silva MV, Mota CS, Ito FH, <u>Sakai T</u>	Genetic analysis of phosphoprotein and matrix protein of rabies viruses isolated in Brazil.	Journal of Veterinary Medical Sciences	69	1145-1154	2007

Phylogenetic Characterization of Rabies Virus Isolates from Carnivora in Brazil

Yuki KOBAYASHI¹⁾, Nana INOUE¹⁾, Go SATO¹⁾, Takuya ITOU¹⁾, Hamilton P. SANTOS²⁾, Cristina J. C. BRITO⁶⁾, Albério A. B. GOMES³⁾, Marli F. C. SANTOS⁴⁾, Marlon V. SILVA⁵⁾, Carla S. MOTA⁶⁾, Fumio H. ITO⁶⁾ and Takeo SAKAI^{1)*}

¹⁾Nihon University Veterinary Research Center, 1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-8510, Japan, ²⁾School of Veterinary Medicine, Maranhão State University, Campus I, Cidade Universitária Paulo VI, Tirirical, Caixa Postal, 09 São Luis, Maranhão, ³⁾Department of Veterinary Medicine, Center of Health and Rural Technology, Federal University of Campina Grande, Patos, Paraíba, ⁴⁾Center for Diagnostic and Veterinary Research, Goianian Rural and Fundiary Development Agency, Secretary of Agriculture and Livestock of the State of Goiás, Av. Anhanguera, 1077, Setor Leste Universitária, Goiânia, ⁵⁾Jorge Vaitsmann Municipal Institute, Av. Bartolomeu de Gusmão, 1120, São Cristóvão, Rio de Janeiro and ⁶⁾Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny, University of São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo 05508-000, Brazil

(Received 18 August 2006/Accepted 13 March 2007)

ABSTRACT. The incidence of canine rabies has been widely reported in Brazil, and new rabies virus (RV) variants, genetically similar to canine RV, have recently been isolated from foxes. In order to derive the epidemiological characteristics of Brazilian Carnivora RV, Brazilian RVs isolated from dogs, cats, and foxes were genetically analyzed. Brazilian Carnivora RV isolates were divided into 2 main lineages. The predominant lineage was found in dogs and cats, which included the Argentinean and Bolivian Carnivora RV isolates, and was extensively distributed throughout Brazil and surrounding countries. The other lineage consisted of three sublineages containing Brazilian dog and fox RV isolates, with the dog sublineages located on an internal branch of 2 fox sublineages, suggesting that RV transmission events might have occurred between foxes and dogs in the past. These results suggest that contact between dogs and wildlife has the potential to generate new rabies variants and that it is important to control RV infection cycles in both dogs and wildlife to prevent spread of rabies infection.

KEY WORDS: Brazil, Carnivora rabies, phylogenetic analysis, rabies virus.

J. Vet. Med. Sci. 69(7): 691-696, 2007

Rabies virus (RV) belongs to genotype 1 of the *Lyssavirus* genus of the *Rhabdoviridae* family and is capable of infecting all warm-blooded animals to cause a lethal form of encephalitis [15]. The orders of Carnivora and Chiroptera are known to be the principal RV reservoirs of the virus. The epidemiological cycle is divided into two different forms: urban rabies, in which the primary transmitter to human is dogs, and sylvatic rabies, in which the transmitter or reservoir is one of several wildlife species.

Rabies is an endemic disease in Brazil, and dogs and vampire bats are known to transmit RV to both humans and livestock. Although the incidence of canine rabies has tended to decrease in response to effective vaccination programs undertaken in urban areas [1], during the period of 1993 to 2002, the highest numbers of canine and human rabies cases transmitted by dogs in the Pan-American region were recorded in Brazil [1]. Recently, new RV variants exhibiting genetic characteristics similar to canine rabies have been isolated from foxes in northeastern Brazil [2, 4, 23]. Additionally, RVs isolated from dogs in the state of Maranhão were found to consist of 2 distinct phylogenetic groups, with 1 group being genetically similar to the fox RV variant [22]. However, the phylogenetic relationship among RVs isolated from foxes and dogs is uncertain. Since dogs are primary transmitters of RV and therefore pose unique

problems within the context of public health, epidemiological study of dissemination of rabies among wildlife and dogs is important.

Phylogenetic analysis and surveillance data increase our understanding of the epidemiological characteristics of RVs and contribute to development of prophylaxes against viral infection. In this study, to derive the epidemiological characteristics of Brazilian Carnivora RVs, we analyzed RVs isolated from dogs, cats, and foxes from Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Viruses: Thirty-seven brain samples (32 dogs and 5 cats) were collected in the states of Goiás, Maranhão, Minas Gerais, São Paulo, and Rio de Janeiro between 1985 and 2005 (Table 1). These samples were diagnosed as rabies positive using the immunofluorescence antibody assay and mouse inoculation test [7, 18]. In addition, 12 isolates were collected from dogs, 8 from foxes, 11 from cats, 2 from insectivorous bats, and 2 from vampire bats as reported previously [12, 17, 23].

RT-PCR and sequencing: Extraction and purification of viral RNA, RT-PCR, and sequencing were performed as described previously [17]. The primers for RT-PCR and sequencing are shown in Table 2. The RHN1/RHNS3 primer set was used for amplification of the nucleoprotein (N) coding region of dog-related RV [14]. For the BRct319 and BRdg339 isolates, which did not yield detectable products, RT-PCR was performed using the P1/N8 primer set,

* CORRESPONDENCE TO: Prof. SAKAI T., Nihon University Veterinary Research Center, 1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-8510, Japan.
e-mail: sakai@brs.nihon-u.ac.jp

Table 1. Brazilian rabies isolates used in this study

Sample name	Lineage ^{b)}	Species ^{c)}	Isolated city	Isolated State	Isolated year	Accession no.
BRdg1	B-2	Dog	Unknown ^{d)}	Goiás	1998	AB263292
BRdg2	B-2	Dog	Goiânia	Goiás	1999	AB083792
BRct3	B-2	Cat	Goiânia	Goiás	1999	AB083793
BRct4	B-2	Cat	Goiânia	Goiás	1999	AB263293
BRct5	B-2	Cat	Goiânia	Goiás	1998	AB083794
BRdg7	B-2	Dog	Morrinhos	Goiás	1999	AB263294
BRdg8	B-2	Dog	Piracanjuba	Goiás	1999	AB263295
BRct9	B-2	Cat	Piracanjuba	Goiás	1998	AB263296
BRdg10	B-2	Dog	Poços de Caldas	Minas Gerais	1987	AB083796
BRdg11	B-2	Dog	Poços de Caldas	Minas Gerais	1987	AB263297
BRdg12	B-2	Dog	Mogi Guaçu	São Paulo	1989	AB083797
BRdg13	B-2	Dog	São João da Boa Vista	São Paulo	1989	AB263298
BRct14	B-2	Cat	São João da Boa Vista	São Paulo	1989	AB263299
BRdg15	B-2	Dog	Anápolis	Goiás	1999	AB083798
BRdg19	B-2	Dog	Caldas Novas	Goiás	1999	AB263300
BRct20	B-2	Cat	Caldas Novas	Goiás	1999	AB263301
BRct21	B-2	Cat	Cocalzinho de Goiás	Goiás	1999	AB263302
BRct22	B-2	Cat	Goiânia	Goiás	1998	AB263303
BRdg24	B-2	Dog	Goiás	Goiás	1999	AB263304
BRct25	B-2	Cat	Itaberaí	Goiás	1999	AB263305
BRct26	B-2	Cat	Leopoldo do Bulhões	Goiás	1999	AB263306
BRct27	B-2	Cat	Morrinhos	Goiás	1999	AB263307
BRdg29	B-2	Dog	Taquaral de Goiás	Goiás	1999	AB263308
BRdg77 ^{a)}	B-2	Dog	Andradina	São Paulo	1992	AB263309
BRdg96 ^{a)}	B-2	Dog	Itaguaçu	Goiás	2001	AB263310
BRdg97 ^{a)}	B-2	Dog	Itaguaçu	Goiás	2001	AB263311
BRdg98 ^{a)}	B-2	Dog	Itaguaçu	Goiás	2001	AB263312
BRdg101 ^{a)}	B-2	Dog	Santa Tereza de Goiás	Goiás	2001	AB263313
BRdg102 ^{a)}	B-2	Dog	Ceres	Goiás	2001	AB263314
BRct112 ^{a)}	B-2	Cat	Morrinhos	Goiás	1999	AB263315
BRct116 ^{a)}	B-2	Cat	Itaberaí	Goiás	1999	AB263316
BRdg117 ^{a)}	B-2	Dog	Unknown ^{d)}	Goiás	1998	AB263317
BRct120 ^{a)}	B-2	Cat	Unknown ^{d)}	Goiás	2000	AB263318
BRdg121 ^{a)}	B-2	Dog	Goiânia	Goiás	2000	AB263319
BRdg125 ^{a)}	B-2	Dog	Morrinhos	Goiás	2000	AB263320
BRdg126 ^{a)}	B-2	Dog	Goiânia	Goiás	2000	AB263321
BRdg127 ^{a)}	B-2	Dog	Goiânia	Goiás	2000	AB263322
BRdg128 ^{a)}	B-2	Dog	Unknown ^{d)}	Goiás	2000	AB263323
BRdg317 ^{a)}	B-1	Dog	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	1985	AB263324
BRct319 ^{a)}	BT	Cat	Cambuci	Rio de Janeiro	2001	AB263325
BRdg321 ^{a)}	B-1	Dog	Bacabal	Maranhão	Unknown ^{d)}	AB263326
BRdg322 ^{a)}	A-1	Dog	Miranda do Norte	Maranhão	2003	AB263327
BRdg325 ^{a)}	B-1	Dog	Santa Inês	Maranhão	2003	AB263328
BRdg331 ^{a)}	A-1	Dog	Coroatá	Maranhão	2003	AB263329
BRct333 ^{a)}	B-1	Cat	Gonçalves Dias	Maranhão	2003	AB263330
BRdg334 ^{a)}	A-1	Dog	Capinzal do Norte	Maranhão	Unknown ^{d)}	AB263331
BRdg335 ^{a)}	B-1	Dog	Barra do Corda	Maranhão	2003	AB263332
BRdg339 ^{a)}	BT	Dog	Niterói	Rio de Janeiro	2001	AB263333
BRdg603 ^{a)}	B-1	Dog	Turmalina	Minas Gerais	2002	AB263334
BRdg640 ^{a)}	A-1	Dog	Santa Rita	Maranhão	2004	AB263335
BRdg642 ^{a)}	A-1	Dog	São João Batista	Maranhão	2004	AB263336

which was designed previously for detection of the N gene of vampire bat-related RV [13]. Similarly, direct sequencing was performed using specific primers based on the nucleotide sequences of the dog- and vampire bat-related RVs [13].

Phylogenetic analysis: Phylogenetic trees were generated

using the neighbour-joining method of Saitou and Nei [21, 24]. Bootstrap values were calculated using 1,000 replicates, and homologies and multiple alignments between nucleotide sequences were identified using the BioEdit software [11].