

200829006A

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 酒井 健夫

平成21（2009）年 3月

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 酒井 健夫

平成21 (2009) 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 _____ 7

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ 21

IV. 研究成果の刊行物・別刷 _____ 22

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

研究代表者 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。一方、2006年11月には36年ぶりに国内で本病患者が発生し、本病が再興感染症となる危険性が極めて高いことが認識された。そこで公衆衛生上、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、狂犬病が常在している地域、または流行している地域における本病の疫学状況を把握し、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。しかし、コウモリなどの野生動物間で感染が維持されてい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点が多い。したがって、本病が多発している常在国で、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分子疫学調査を行った。

- (1) ブラジルの広範囲の地域から分離された野外狂犬病ウイルス（RABV）、すなわちウシ分離株666検体および吸血コウモリ分離株18検体を用いて吸血コウモリ由来RABVの分子系統学および地理学的解析を行った。ウシ分離株の99.2%は吸血コウモリ由来であり、イヌ由来株は極めて少ないことが系統樹から示唆された。系統樹の分岐パターンから、吸血コウモリ由来ウシ分離株は、さらに分離地域を反映した多様な遺伝子系統に区分された。これらの系統の地域分布は山脈によって区分される傾向があり、系統樹上で同一系統に属するウシおよび吸血コウモリ分離株の地域分布は一致した。吸血コウモリは定住性で、長距離を移動しないので、ウシの飼養地域に近隣して生息する吸血コウモリがウシにウイルスを伝播していることが遺伝子学的に再確認された。さらに、殆どのウシ分離株は河川周辺に分布した。吸血コウモリは河川を移動経路として利用する生態学的特徴があるため、河川は吸血コウモリ由来狂犬病が拡大する地理的要因である可能性が示唆された。以上、吸血コウモリ由来RABVは、分離地域を反映した多様な遺伝子系統を形成しており、ウシ狂犬病の疫学的特徴は、吸血コウモリの生態および地理的要因が深く関与することが示唆された。
- (2) RABVの糖タンパク質に存在する333位のアミノ酸残基RまたはKは、マウスに対する病原性を発揮するために必要であると考えられている。幾つかの例外が存在するが、この部位のアミノ酸残基の置換は、ウイルスの弱毒化または非病原性への表現型の変化を引き起こす。このような変異は、これまでRABVの固定株においてのみ発見されている。本研究では、ブラジルの非吸血性コウモリから分離されたRABVにおいて、333位のアミノ酸残基が333H、333Nおよび333Qに置換している分離株を発見した。これらの野外分離株は、マウスへ脳内接種すると病原性および致死性が認められ、マウス脳では蛍光抗体法によってRABV抗原陽性が確認された。したがって、これまでに知られていないアミノ酸置換を有する病原性のRABV株が野外に存在し、それらが感染環の形成に関与している可能性が示唆された。

以上、本調査によって、野生動物に維持されている野外RABVの動態、およびこれまで知られていなかった野外株の存在が明らかになった。本成果は、野生動物狂犬病の防疫や拡大防止対策を図る上で重要なワクチネーションプログラムの実施にあたり、重要な情報を提供できると考えられた。

研究分担者 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、近年では高病原性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3,200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、我が国で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ている森林型狂犬病は、発生の増加傾向にあるにもかかわらず、その感染環や自然宿主については不明な点が多い。したがって、本病が多発している常在地域において、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

・南米における吸血コウモリ由来狂犬病ウイルスの分子疫学的解析：

1) 供試検体

供試検体は、ブラジルの広範囲の地域のウシから採取された666検体の脳サンプルであった。すなわち、1987年から2006年にかけて、ブラジル連邦自治体のブラジリアの3検体、ゴイアス州の352検体、マラニョン州の19検体、ミナス・ジェライス州の7検体、マツ・グロッソ・ド・スール州の64検体、マツ・グロッソ州の98検体、パラ州の2検体、パライバ州の19検体、

リオ・デ・ジャネイロ州の46検体、サン・パウロ州の31検体、トカンチンス州の24検体およびロンドニア州の1検体のウシから採取した (Fig. 1)。吸血コウモリ分離株はこれまでに報告したBR-DR1~BR-DR5、BR-DR6~BR-DR14、BR-DR16~BR-DR21株を解析に用いた。

ウイルスRNAは、FATおよびMITによって狂犬病陽性と診断されたウシの脳サンプルから直接抽出した。脳乳剤は、脳サンプルの一部をマイクロチューブに移した後に、ペッスルを用いて破砕した。その後、滅菌PBSで脳乳剤を希釈し、遠心した後に、上清より全RNAを抽出した。RNA抽出は、QIAmp Viral RNA Mini Kitを用いてマニュアルに従って行った。

2) 狂犬病ウイルス遺伝子の検出および塩基配列の決定

RT-PCRは、SuperScript One-Step RT-PCR Systemを用いて行った。核蛋白質遺伝子の増幅にはP1およびP2プライマーセット、P1およびBRAB P-C1プライマーセット、またはP1およびN8プライマーセットを用いた。RT-PCRサイクルは、RT反応を50℃、30分間、熱変性を94℃、2分間行った後に、PCR反応として、熱変性を94℃、15秒間、アニーリングを50℃、30秒間、伸張反応を68℃、2分間の工程を1サイクルとして、40サイクル行った。ワンステップRT-PCRで増幅が確認されなかった検体は、Nested PCRを行った。増幅産物の確認およびPCR産物の精製は、定法に従って行った。

3) ダイレクトシーケンス

シーケンス反応および反応物の精製は定法に従って行った。解析した遺伝子領域は、N蛋白質遺伝子の203塩基配列 (塩基位置: 109-301) であった。本研究で決定したウシ分離株のアクセッション番号は、以下の通りである (Accession Nos.: AB307066-307631、AB377125-377128、AB083799、AB083803、AB083805、AB083809、AB083813、AB083814、AB083818、AB206423-20643

6、AB246194-246210、AB246213-246248、AB246250-246267、AB246268-246270、AB307065)。

4) 分子系統解析および相同性の算出

マルチプルアライメントおよび近隣結合法による系統樹の作成はClustalXを用いて行った。アウトグループにはMokolaを用いた(Accession No.: Y09762)。ブラジルのイヌ由来RVは、BRdg10株およびBRdg603株を用いた。アミノ酸配列はGENETYX-WIN (Ver. 6.2)によって推定した。塩基およびアミノ酸配列はClustalWでマルチプルアライメントを行った後に、BioEditを用いて相同性を算出した。

5) 分離株のマッピング

検体の地図上へのマッピングは、MapInfo Professional GIS software (ver. 8.0)を用いて行った。本研究で用いた地図は、Brasil em Relevo - Embrapa Monitoramento por Satélite (<http://www.relevobr.cnpm.embrapa.br/>)およびIBGE Mapas Interativos (<http://mapas.ibge.gov.br/>)から得た。

C. 研究結果

1) ブラジルの吸血コウモリ由来狂犬病ウイルスの分子系統解析

N蛋白質遺伝子に基づく分子系統解析によって、ブラジル野外RVはイヌおよび吸血コウモリ由来RVに区分された。本章で解析したウシ分離株の99.2%にあたる661検体が吸血コウモリ由来RVであり、さらに多様な遺伝子系統に区分された(Fig. 2)。

ブートストラップ値は、70%以上であれば系統樹の分岐パターンが支持されることがシミュレーション解析によって明らかにされている(Hillis DM, 1993)。そこで、吸血コウモリ由来RVの地理的分布パターンを観察するために、ブートストラップ値が70%以上を示す内部枝によって支持される遺伝子系統、もしくは、100%の塩基相同性を示す検体が5検体以上存在する遺伝子系統の解析を行った。

その結果、593検体のウシ分離株が属する24

の遺伝子系統(C-1~C-24)が明らかになり、これら遺伝子系統間の塩基相同性は93.1%以上であった。C-1~C-3、C-9、C-11、C-15、C-22およびC-23は70%以上のブートストラップ値によって支持される複数のサブ系統によって構成された。

2) 吸血コウモリ由来RVの地理的分布様式

C-1~C-24に属するウシ分離株をブラジルの地図上にマッピングしたところ、遺伝子系統の分布様式には地域性が観察された(Fig. 3)。すなわち、ブラジル北部にはC-2、C-8およびC-9が、ブラジル中央部にはC-1、C-3、C-5~C-7、C-10~C-14、C-20~C-22およびC-24が、ブラジル南部にはC-4、C-15~C-19およびC-23が分布した。さらに、本章で解析した吸血コウモリ由来ウシ分離株の殆どは、河川流域に沿って分布した(Fig. 4)。

また、ウシから分離されたRVと分布地域の関係には、採取地域を隔てる山脈が関与する傾向が観察された(Fig. 3)。例えば、ゴイアス州、マット・グロッソ州およびマット・グロッソ・ド・スール州に連なる山脈を中心に、山脈の北部から北西部にかけてC-24が、南東部にC-10~C-12およびC-14が、北東部にC-5およびC-20~C-22が、南西部にC-13、C-16およびC-19が分布した。また、C-1、C-3、C-5およびC-22はゴイアス州の中心部に存在する山岳地帯を囲むように分布し、C-21はゴイアス州の溪谷に分布した。C-4およびC-17は、ミナス・ジェライス州およびサン・パウロ州にある山脈に囲まれたリオ・デ・ジャネイロ州の平野部に分布した。

また、吸血コウモリ由来ウシ分離株は、様々な標高地域に分布していることが明らかになった(Fig. 4)。例えば、C-5、C-7、C-11、C-12、C-14、C-19およびC-23に属するウシ分離株は、100mから1000mまでの標高地域に分布した。一方、一定の標高地域に分布する遺伝子系統も観察され、C-2、C-4、C-9およびC-22は標高が300m以下の平野部に、C-6は標高が700mの山岳地帯に分布した。本章ではさらに、気候要因が分離株の遺伝子系統の分布に及ぼす影響についても検

討したが、これらの要因による明確な分布パターンの変化は観察されなかった (Fig. 5)。

吸血コウモリ分離株は解析した18検体のうち10検体がC-4、C-5、C-7、C-15およびC-23に属し、C-5、C-7、C-15およびC-23に属する吸血コウモリ分離株の分布地域は、同一の遺伝子系統に属するウシ分離株とほぼ一致した (Fig. 4)。一方、C-4に属する吸血コウモリ分離株は、同一の遺伝子系統に属するウシ分離株の採取地域から数10km離れていたが、同一の河川流域に分布した。なお、C-2、C-6、C-17およびC-20に属するウシ分離株において少数の検体が、これら遺伝子系統の主要な分布地域から離れた地域に分布することが観察された。C-6およびC-20は主にゴイアス州に分布したが、C-6に属する1検体のウシ分離株はマット・グロッソ州の中央地域に、C-20に属する1検体のウシ分離株はパラ州の南部地域に分布した。C-17の主要な分布地域はリオ・デ・ジャネイロ州であったが、ウシ分離株1検体がサン・パウロ州の南部で観察された。また、C-2の主要な分布地域はトカンチンス州だが、1検体のウシ分離株がマット・グロッソ州に分布した。

D. 考察

平成19年度までの調査成果より、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。ブラジルの各種食虫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長距離移動性コウモリにおけるウイルス運搬の可能性が明らかになった。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。

そこで、本研究では、ブラジルにおいて現在最も課題となっている吸血コウモリ由来狂犬病に焦点を当て、それらが最も分離されるウシ狂犬病から得られる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。分子系統解析によって、ブラジルの野外で採取されるRVは、主にイヌおよび吸血コウモリ由来のRVに区分されることがItoらによって報告されている (Itoら, 2001a)。本研究で解析したウシ分離株の99.2%は吸血コウモリ由来RVであったことから、ブラジルで問題となっているウシ狂犬病の主要な媒介動物は吸血コウモリであることが分子疫学的に証明された。

さらに吸血コウモリ由来ウシ分離株は、採取地域を反映した少なくとも24の遺伝子系統に区分された。吸血コウモリは20~100頭前後のコロニーを形成して活動しており、長距離の移動を行わない定住性である。ねぐらは餌場周辺の洞窟、樹洞および井戸などを利用しており、吸血コウモリがねぐらから餌場まで移動する距離は、2~3km程度である (Arellano-Sota, 1988a)。また、吸血コウモリは複数のねぐらを同時に利用しており、近隣地域に生息する吸血コウモリ集団は互いに接触する機会を有している (Arellano-Sota, 1988a; Lordら, 1975)。従って、吸血コウモリの生態学的特徴より、近隣地域に生息する吸血コウモリ集団の間でRVの感染サイクルが維持される結果、ウイルスの採取地域を反映した吸血コウモリ由来RVの遺伝的多様性が形成された可能性が示唆された。また、本章では同一の遺伝子系統に属するウシ分離株と吸血コウモリ分離株の分布地域はほぼ一致していた。このことから、ウシが飼養されている地域に生息する吸血コウモリがウシにRVを伝播していることが分子疫学的に明らかになった。

吸血コウモリは河川流域を移動経路として利用しており、吸血コウモリ由来RVのアウトブレイクは、河川に沿って発生し拡大する傾向が観察されている (Lord, 1980)。本章で解析した多くの吸血コウモリ由来ウシ分離株は、河川流域に沿って分布した。従って、吸血コウモリが媒介するウシ狂犬病の発生パターンは、吸血コウモリの行動様式と密接に関連しており、河川は、吸血コウモリ由来RVがその流域に沿って拡大する地理的要因の1つであることが示唆された。

また、吸血コウモリの狂犬病の発生には季節変動があり、雨季になると吸血コウモリが媒介する狂犬病の発生件数が増加することが報告されている (Lord, 1992)。これは、吸血コウモリが雨季に子育てをするため、雨季になると吸血コウモリの集団内にRVに対する感受性の高い若齢個体が増加することに起因している。このような疫学的特徴から、吸血コウモリ由来RVは、RVに対する感受性の高い吸血コウモリ集団と、狂犬病に罹患した個体が含まれる吸血コウモリ集団が接触することによって拡大していくと考えられている (McCollら, 2000)。また、吸血コウモリが媒介するウシの狂犬病アウトブレイクは、年間40kmの速度で拡大していくことが観察されており、この疫学的特徴は「migrating epizootic」と呼ばれている (Lord, 1980; Lordら, 1975)。

本研究では、RVの遺伝子系統の分布は山脈によって区分される傾向が観察された。同様の疫学的特徴は、メキシコの吸血コウモリ由来RVにおいても観察されている (Velasco-Villaら, 2006)。ブラジルの標高の高い地域では、ウシの飼養頭数密度が低く、また吸血コウモリは、標高が2000m以下の地域に生息することが観察されている (Arellano-Sota, 1988a; Romijn, ら, 2003)。従って、標高の高い山岳地帯では吸血コウモリの生息分布密度が低いことが予測され、山脈は、吸血コウモリ由来RVの拡大を抑制する地理的要因の1つである可能性が示唆された。

以上、ウシから分離されたRVの疫学的特徴は、吸血コウモリの生態学的特徴およびウシの飼養地域の地理的要因が関与していることが示唆された。

E. 結論

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。

吸血コウモリは、南米で発生しているウシの狂犬病の主要な媒介動物である。本研究は、吸血コウモリ由来RVの疫学的特徴を明らかにするために、1987年から2006年にかけてブラジルの広範囲の地

域で採取されたウシ分離株666検体および吸血コウモリ分離株18検体の分子系統学および疾病地理学的解析を行った。その結果、本研究で解析したウシ分離株の99.2%が吸血コウモリ由来であり、さらに多様な遺伝子系統に区分された。そこで、これらの遺伝子系統に属するウシ分離株の地理的分布パターンを明らかにするために、ブートストラップ値が70%以上を示す内部枝によって支持される遺伝子系統、もしくは100%の塩基相同性を示すウシ分離株が5検体以上存在する遺伝子系統の解析を行った。その結果、遺伝子系統の区分にはRVの採取地域が関与しており、さらに遺伝子系統の分布は山脈によって区分される傾向が観察された。吸血コウモリは長距離の移動を行わないことから、吸血コウモリ由来RVは、近隣地域に生息する吸血コウモリ集団の間で感染サイクルが維持され、ウイルスの採取地域を反映した遺伝的な多様性が形成される可能性が示唆された。また、本章では同一の遺伝子系統に属するウシ分離株と吸血コウモリ分離株の分布地域は一致したことから、ウシの飼養地域に生息する吸血コウモリがウシにRVを伝播していることが分子疫学的に明らかにされた。

さらに、本研究で解析したウシ分離株は、河川流域に沿って分布する傾向が明らかになった。吸血コウモリは河川を移動経路として利用しており、さらにウシの狂犬病アウトブレイクは河川に沿って発生する傾向が観察されている。従って、河川流域は、吸血コウモリ由来RVが拡大する地理的要因の1つである可能性が示唆された。

以上、吸血コウモリ由来RVは、採取地域を反映した多様な遺伝子系統を形成し、これらの疫学的特徴は、吸血コウモリの生態学的特徴およびウシの飼養地域の地理的要因が関与している可能性が示唆された。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) Kobayashi Y, Sato G, Mochizuki N, Hirano S, Itou T, Carvalho AA, Albas A, Santos HP, Ito FH, Sakai T. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in Central Brazil. BMC Vet. Res. 2008, 4, 44
- 2) Sato G, Kobayashi Y, Motizuki N, Hirano S, Itou T, Cunha EM, Ito FH, Sakai T. A unique substitution at position 333 on the glycoprotein of rabies virus street strains isolated from non-hematophagous bats in Brazil. Virus Genes 2009, 38, 74-79

・学会発表

- 1) Kobayashi Y, Itou T, AA, Albas, Cunha EMS, Carvalho A, Ito FH, Sakai T. Genetic diversity of bat rabies depends on the host species and its ecology: molecular epidemiological evidence in Brazil. The XIX International Conference "Rabies in the Americas" (RITA XIX) September 28th-October 3rd, 2008, Atlanta, Georgia
 - 2) 萩原絃子、佐藤豪、平野慎二、小林由紀、伊藤琢也、Ting Rong Luo、Fumio H. Ito、酒井健夫. Multiplex RT-PCRを用いた狂犬病ウイルスの系統鑑別診断法の確立. 第146回日本獣医学会学術集会 2008年9月24-26日, 宮崎
- 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－

研究分担者 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的分類および病原性状の解析に多用される糖蛋白質遺伝子を主な標的として、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。吸血コウモリ以外コウモリ（食虫コウモリあるいは食果コウモリ）から分離された狂犬病ウイルス（RABV）のうち、これまで知られていないアミノ酸置換を有するウイルスが見いだされ、これらは病原性を有していることが確認された。

- (1) RABVの糖蛋白質に存在する333位のアミノ酸残基RまたはKは、マウスに対する病原性を発揮するために必要であると考えられている。幾つかの例外が存在するが、この部位のアミノ酸残基の置換は、ウイルスの弱毒化または非病原性への表現型の変化を引き起こす。このような変異は、これまでRABVの固定株においてのみ発見されている。本研究では、ブラジルの非吸血性コウモリから分離されたRABVにおいて、333位のアミノ酸残基が333H、333Nおよび333Qに置換している分離株を発見した。これらの野外分離株は、マウスへ脳内接種すると病原性および致死性が認められ、マウス脳では蛍光抗体法によってRABV抗原陽性が確認された。したがって、これまで知られていないアミノ酸置換を有する病原性のRABV株が野外に存在していて、それらが感染環の形成に関与している可能性が示唆された。

以上、本調査によって、野生動物に維持されている野外RABVの動態、およびこれまで知られていなかった野外株の存在が明らかになった。本研究成果は、野生動物狂犬病の防疫並びに拡大防止対策を図るワクチネーションプログラムの実施にあたり、重要な情報を提供できると考えられた。

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。本研究では、狂犬病ウイルスの遺伝子学的分類および病原性状の解析に用いられる糖蛋白質遺伝子を中心に各構造蛋白遺伝子を標的にして、狂犬病常在地でコウモリから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病原性状を明らかにするためにマウスへ脳内接種を行った。

B. 研究方法

・ブラジルのコウモリから分離された野外狂犬病ウイルスの遺伝子および病原性状の解析

1) 供試検体

供試検体として用いた全てのRABV分離株は、ブラジルの非吸血性のコウモリから分離された。以前に行われた核蛋白質 (N) 遺伝子に基づいた系統分析より、コウモリ由来RABV (Kobayashi et al. 2007) は、8つの系統 (I~VIII) に分類されている。本研究において使用されたサンプルは、そのうち系統VI、VおよびVIIであった。BR-EA1株のみは、NとG遺伝子に基づく系統分類によって系統VIIに属することが確認された。すべての分離株はマウス脳内接種法によって、成マウスに対して致死的で、かつ直接蛍光抗体法狂犬病ウイルス抗原陽性であることが確認された。

ウイルスRNAは、FATおよびMITによって狂犬病陽性と診断されたウシの脳サンプルから直接抽出した。脳乳剤は、脳サンプルの一部をマイクロチューブに移した後に、ペッセルを用いて破碎した。その後、滅菌PBSで脳乳剤を希釈し、遠心した後に、上清より全RNAを抽出した。RNA抽出は、QIAmp Viral RNA Mini Kitを用いてマニュアルに従って行った。

2) 狂犬病ウイルス遺伝子の検出および塩基配列の決定

RT-PCRは、SuperScript One-Step RT-PCR Systemを用いて行った。核蛋白質遺伝子の増幅には糖蛋白コード領域全長 (3,318-4,892; 1,575 bp) を増幅可能なプライマーセットを用いた。RT-PCR、増幅産物の確認およびPCR産物の精製は、定法に従って行った。

3) ダイレクトシーケンス

シーケンス反応および反応物の精製は定法に従って行った。解析した遺伝子領域は、N蛋白質遺伝子の203塩基配列 (塩基位置: 109-301) であった。

4) 分子系統解析および相同性の算出

マルチプルアラインメントおよび近隣結合法による系統樹の作成はClustalXを用いて行った。アミノ酸配列はGENETYX-WIN (Ver. 6.2) によって推定した。塩基およびアミノ酸配列はClustalWでマルチプルアラインメントを行った後に、BioEditを用いて相同性を算出した。比較のために用いた他の分離株および固定株は以下の通りである。ブラジルコウモリ分離株 (Artibeus sp. n = 8, Eumops sp. n = 1, Molossus sp. n = 13, Nictinomops sp. n = 3, Tadalida sp. n = 2, 吸血コウモリ n = 16, 種不明コウモリ n = 8); 固定株 (Nishigahara, RC-HL, CVS, Flury-HEP)、その他哺乳動物から分離された分離株の配列データはGenbankおよび公表データから引用した。

C. 研究結果

ブラジルの非吸血コウモリ分離株の病原性および糖 (G) 蛋白質のアミノ酸配列

解析したすべてのブラジルRABV分離株のG蛋白遺伝子のオープン・リーディング・フレームは1,575個のヌクレオチドから構成されており、他のRV分離株 (Fig. 6) 上で

以前より知られていたように、524個のアミノ酸をコードしていた。ブラジルのRABV分離株のオープン・リーディング・フレームの間のアミノ酸配列は、他の固定株と83.5%~88.1%の相同性を有し、ブラジルRABV分離株間では88.7%~100%であった。Fig. 6は代表株(西ヶ原、RC-HL、CVS、Flury-HEP、およびSHBRV-18)と本研究で解析された9つのRABV分離株のG蛋白質のアラインメントを示す。本研究で使われたRABV分離株のうち、BR-BAT29とBR-BAT3はG蛋白質のアミノ酸配列上にそれぞれ333Qと333Hの変異残基を有していた。BR-BAT29は332位においてVからIへの変異が認められ、一方、BR-BAT28、BR-EA1、BR-EF1-4およびBR-NL2は333Nの変異を有していた。333位の変異を持つこれらの9つのRABV分離株は、サイト「a」(342位)を除いて、すべての抗原サイト上に変異を有していた。すなわち、以前に報告されている抗原サイト上の変異として、I (231位)、II (34-42位と198-200位)、III (330-338位)、およびVI (264位)があった。例外として、BR-BAT29は抗原サイトII (198-200位)において変異を有していなかった。成体マウスに対する病原性の減弱に関与していることが報告されている抗原サイトII上の34、42および198位のアミノ酸残基は保存されていた。ニコチン酸のアセチルコリン受容体(nAChR)へのG蛋白質の結合に重要であることが提唱されている189-214位の領域は保存されていたが、196位のRからKへの変異が生じていた。また、p75ニューロトロフィン受容体に結合するために重要であると報告されている318Fと352Hは保存されていた。Asn37、Asn247およびAsn319の間で、RABVのG遺伝子のN結合型グリコシレーションサイトとして知られている3つのsequonsが、Asn37とAsn247に存在したが、Asn319は保存されていた。例外として、Asn37はBR-BAT3において保存されていた。西ヶ原株の病原性発揮に重要であると明らかにされている3つのアミノ酸残基のうち、255Nと268Iは全ての分離株で保存されていたが、A242Sの変異がBR-BAT3

とBR-BAT29で発見された。さらに、333Nを保有している他の7つのRABV分離株においてA242Tの変異が発見された。抗原サイト上、すなわちnAChRへのRABV G蛋白質結合サイト、N結合型グリコシレーションサイト、および242位における上記の変異は、333位の変異を持ったRABV分離株のみならず、他のRABV分離株、特にコウモリ関連RABV分離株においても見いだされた。しかし、西ヶ原株の病原性に関与することが示唆されているアミノ酸残基164位から210位の領域における168Fの変異は、333Nを有する7つのRABV分離株においてのみ発見された。さらに、194位(この部位は333Q変異を持つ組換えRABVのマウスに対する病原性増大にKからNへの変異が関与することが報告されている)におけるKからTへの変異が333Nを有するこれらの7つのRABV分離株においても発見された。

D. 考察

明らかとなったこれらのアミノ酸変異のパターンは、N遺伝子に基づく近隣結合法で分類された系統と一致していたため、本研究で発見された333位での変異は、ウイルス分離のためにマウス脳内接種の過程で偶然生じたとは考えにくい。これらの分離株およびアミノ酸変異パターンの発見は、以上の変異を有するRABV分離株が野外で存在していて、感染環を結果として生じる可能性を示す。333H、333Qおよび333N変異を有するRABV野外分離株はこれまで報告されていない。各RABVのウイルスの力価は計算されなかったが、333位の変異を持つこれらのRABV分離株は脳内接種でマウスに病原性と致死性を示し、蛍光抗体法でも狂犬病ウイルス抗原が陽性であった。これは、これらの分離株が少なくともマウスに病原性を維持していることを示している。興味深いことに、333Qは攻撃株であるCVS株の非病原性への変異を引き起こす報告があるにもかかわらず、同様な変異を有するRABV分離株BR-BAT29は、本研究においてマウ

スへの致死性を示した。このRABV分離株で見いだされた近隣の332I変異が病原性の復帰に関係している可能性も推測された。本研究では、成マウスに対する病原性が333Q、333Hと333Nの変異のみに関連しているかどうかを決定することはできなかったが、以上の結果は、G遺伝子の333位のアミノ酸RとKは、RABVが病原性を発揮するための絶対的な必要条件ではなく、またG遺伝子に加えて他の遺伝子領域がRABVの病原性に関与することが示唆された。さらに、コウモリの中で維持されているRABV分離株は、食肉目で維持されている分離株や組換えワクチン株とは異なる配列をいくつか持っていることは知られていたが、コウモリ分離株が有するこれらの違いがRABVの機能的役割にどのように関与するかについては明確にされていない。333位でのこれらのアミノ酸変異がブラジルの非吸血性コウモリから分離されたRABVの病原性と関連しているか否かを明らかにするために、より一層の研究が必要である。そのためには、力価測定を伴う接種実験とともに、完全長ゲノム配列の決定や組換えRABVを用いた攻撃試験が必要である。

E. 結論

狂犬病ウイルスの遺伝子学的分類および病原性状の解析に多用される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。

RABVの糖蛋白質に存在する333位のアミノ酸残基RまたはKは、マウスに対する病原性を発揮するために必要であると考えられている。この部位のアミノ酸残基の置換は、ウイルスの弱毒化または非病原性への表現型の変化を引き起こす。このような変異は、これまでRABVの固定株においてのみ発見されている。本研究では、ブラジルの非吸血性コウモリから分離されたRABVにおいて、333位のアミノ酸残基が333H、333Nおよび333Qに置換している分離株を発見した。これらの野外分離株は、マウスへ脳内接種すると病原性および致死性が認められ、マウス脳では蛍光抗体法によっ

てRABV抗原陽性が確認された。したがって、これまでに知られていないアミノ酸置換を有する病原性のRABV株が野外に存在している、それらが感染源の形成に関与しているか可能性が示唆された。

今後は、本研究成果をもとに、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を行う予定である。

F. 研究発表

・論文発表

- 1) Kobayashi Y, Sato G, Mochizuki N, Hirano S, Ito T, Carvalho AA, Albas A, Santos HP, Ito FH, Sakai T. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in Central Brazil. BMC Vet. Res. 2008, 4, 44
- 2) Sato G, Kobayashi Y, Motizuki N, Hirano S, Ito T, Cunha EM, Ito FH, Sakai T. A unique substitution at position 333 on the glycoprotein of rabies virus street strains isolated from non-hematophagous bats in Brazil. Virus Genes 2009, 38, 74-79

・学会発表

- 1) Kobayashi Y, Ito T, AA, Albas, Cunha EMS, Carvalho A, Ito FH, Sakai T. Genetic diversity of bat rabies depends on the host species and its ecology: molecular epidemiological evidence in Brazil. The XIX International Conference "Rabies in the Americas" (RITA XIX) September 28th-October 3rd, 2008, Atlanta, Georgia
- 2) 萩原絏子、佐藤豪、平野慎二、小林由紀、伊藤琢也、Ting Rong Luo、Fumio H. Ito、酒井健夫。Multiplex RT-PCRを用いた狂犬病ウイルスの系統鑑別診断法の確立。第146回日本獣医学会学術集会 2008年9月24-26日、宮崎

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む） 特記事項なし。

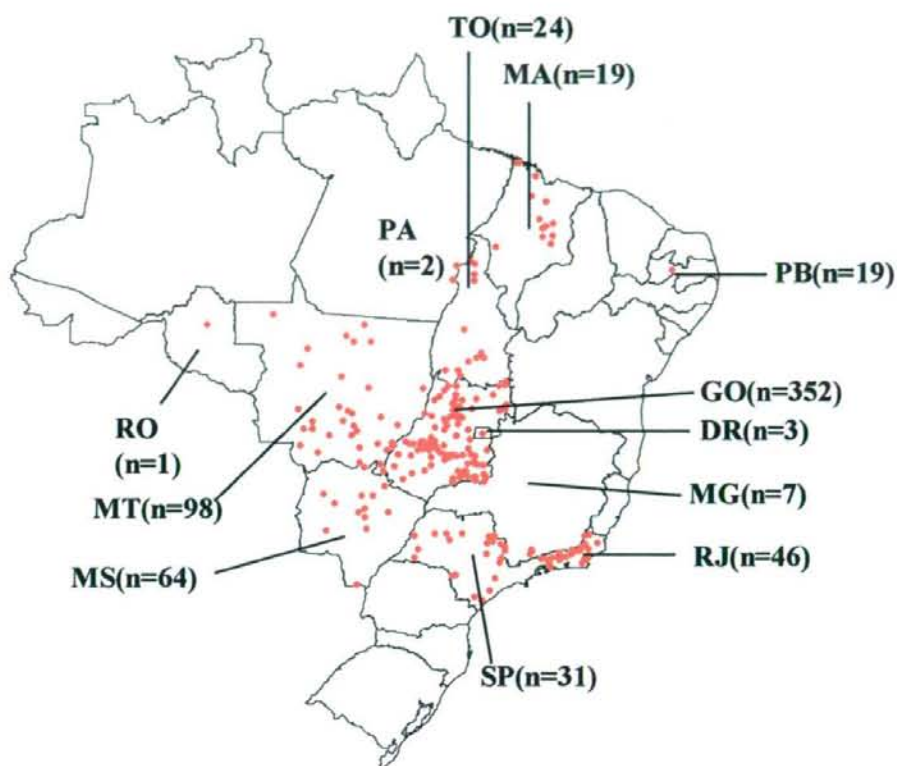


Fig.1 ウシ分離株の採集地域

採集地域の略名は以下のとおり。DR:連邦自治区ブラジリア、GO:ゴイアス州、MA:マラニョン州、MG:ミナス・ジェライス州、MT:マツト・グロッソ州、MS:マツト・グロッソ・ド・スール州、RJ:リオ・デ・ジャネイロ州、RO:ロンドニア州、PA:パラ州、PB:パライバ州、SP:サン・パウロ州、TO:トカンチンス州。括弧内の数字はウシ分離株の検体数を示す。

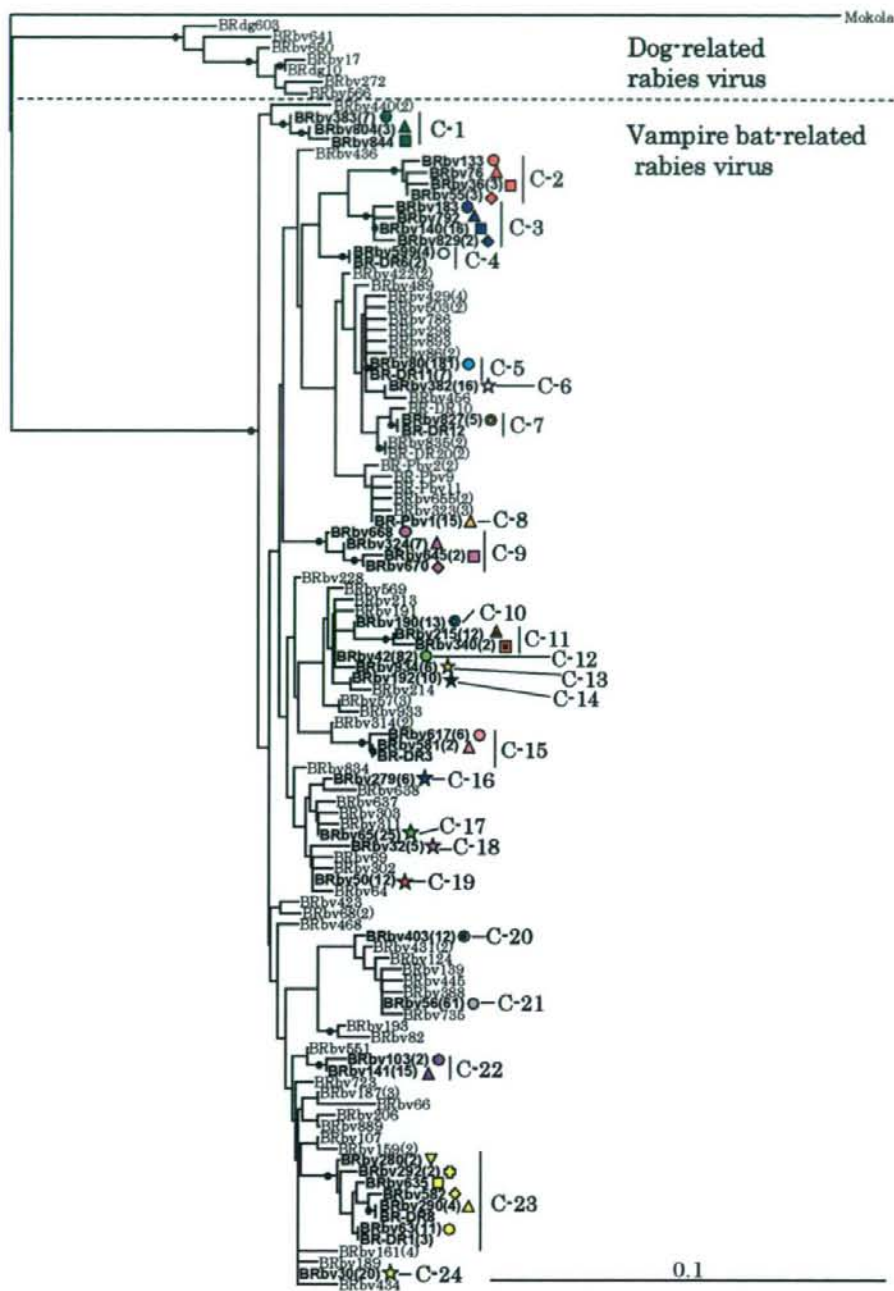


Fig. 2 N蛋白質203塩基配列（塩基位置：109-301）に基づく系統樹
 C-1～C-24は、ブートストラップ値が70以上の値を示す内部枝によって支持される遺伝子系統
 または相同性が100%のウシ分離株が5検体以上属する遺伝子系統を示した。24の遺伝子系統に
 属する検体は太文字で、記号はそれぞれの遺伝子系統に対応した。括弧内の数字は、遺伝子系
 統に属し、100%の塩基相同性を示すウシ分離株の件対数を記載した。70%以上のブートストラ
 ップ値によって支持される内部枝には黒丸を記した。

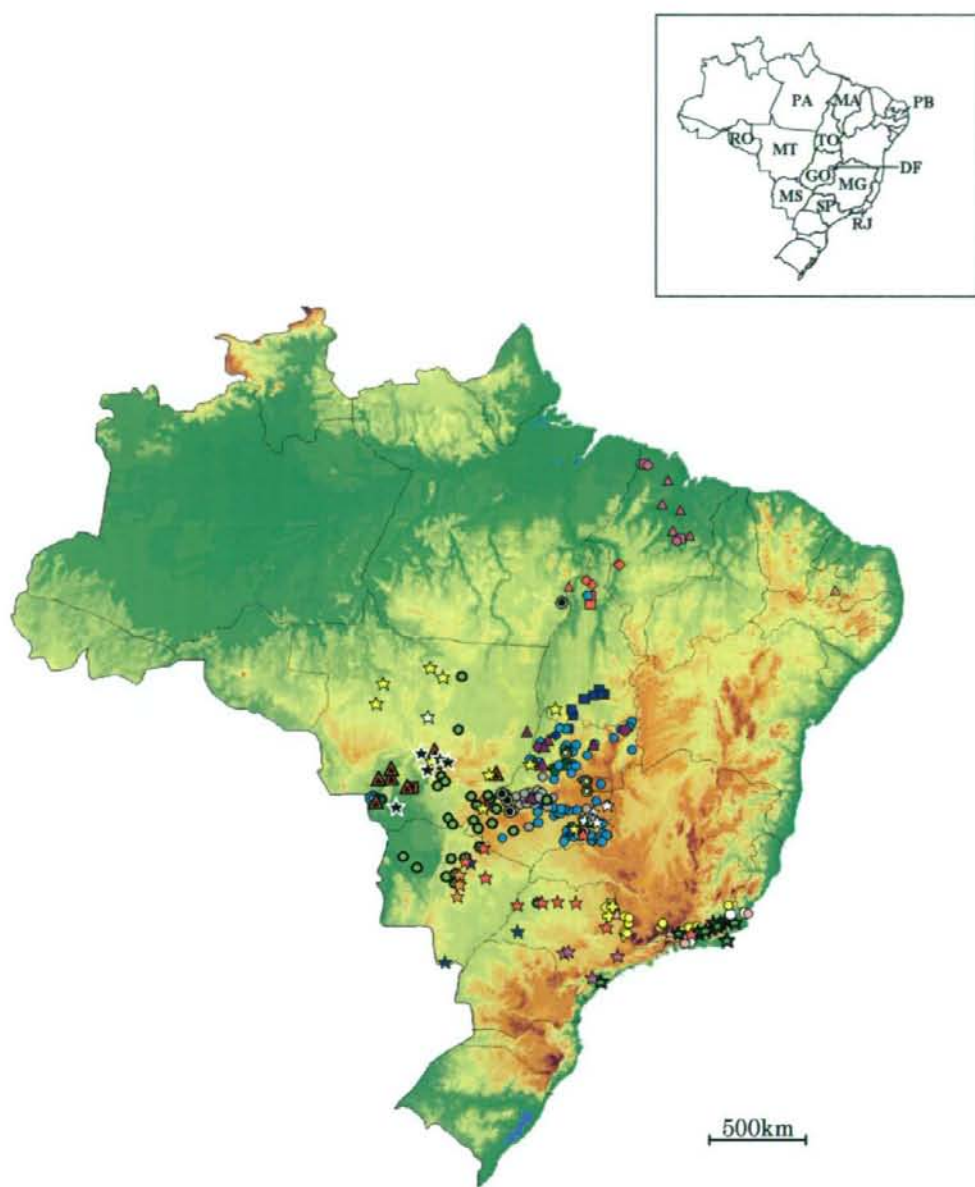


Fig. 3 24の遺伝子系統に属したウシ分離株の地理的分布
 記号はFig. 2の24の遺伝子系統に対応し、同一の遺伝子系統に属し、かつ採集地域が同一の検体は、同じ記号で記した。

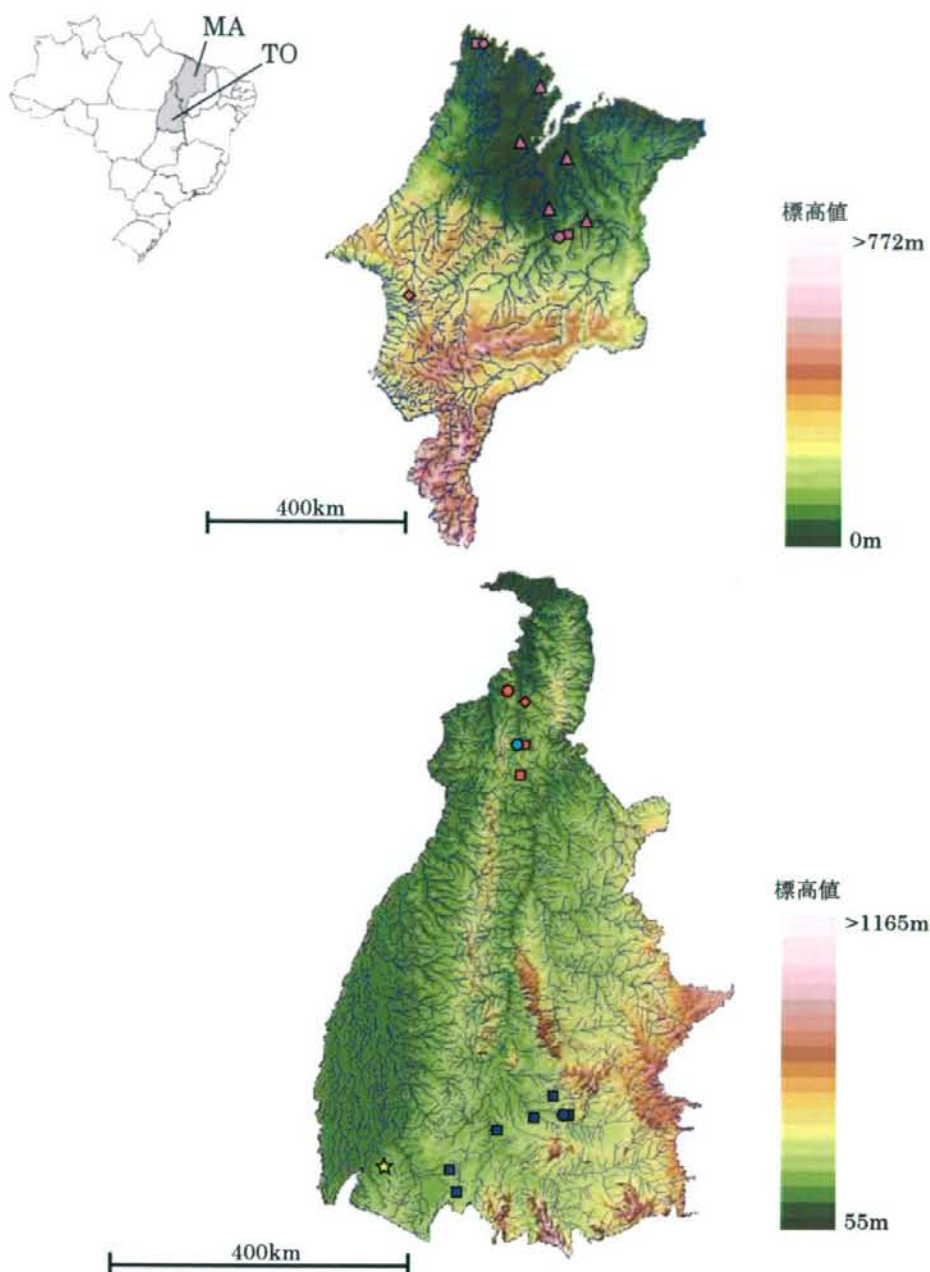


Fig. 4a マラニョン州 (MA) およびトカンチンス州 (TO) におけるウシ分離株の地理的分布
記号はFig. 3に対応し、青いラインは川を示す。

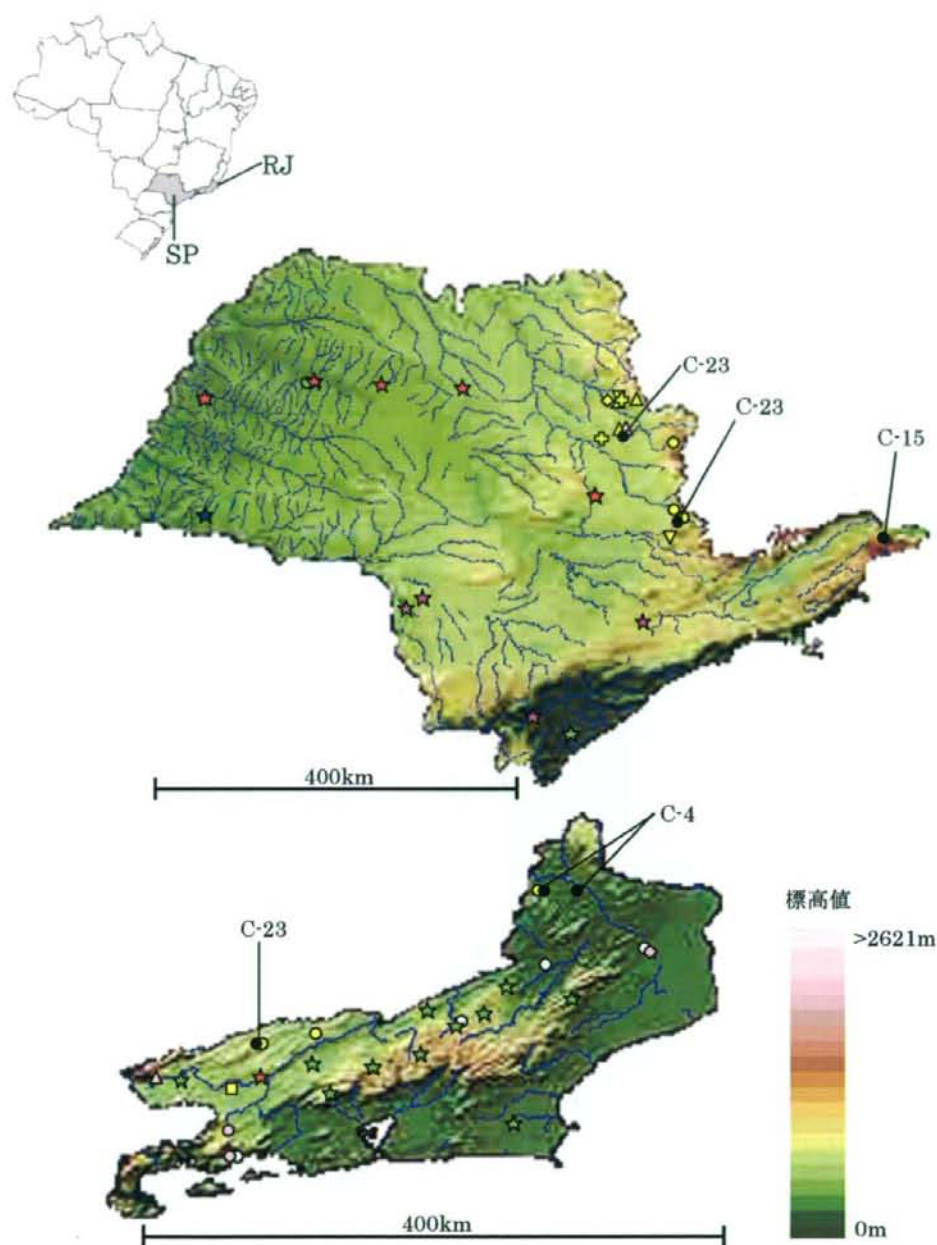


Fig. 4b サン・パウロ州 (SP) およびリオ・デ・ジャネイロ州 (RJ) におけるウシおよび吸血コウモリ分離株の地理的分布
 記号はFig. 3に対応し、黒丸は吸血コウモリ分離株の分離地域を示し、青いラインは川を示す。

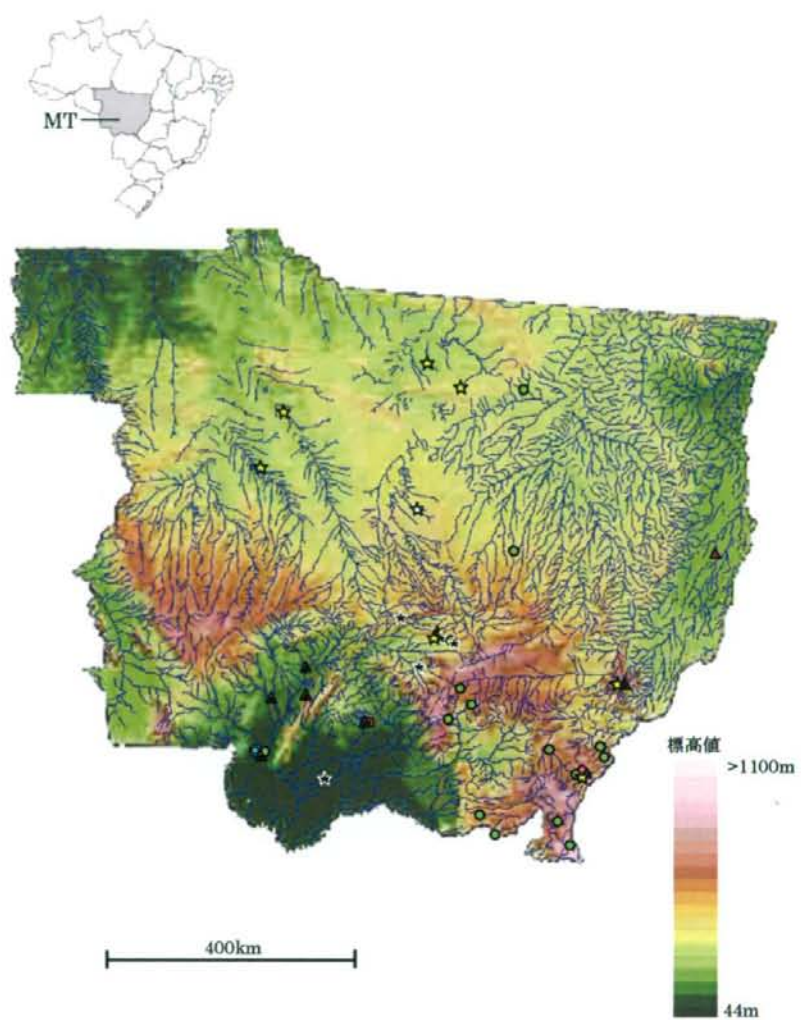


Fig. 4c マット・グロソ州 (MT) におけるウシ分離株の地理的分布
記号はFig. 3に対応し、青いラインは川を示す。

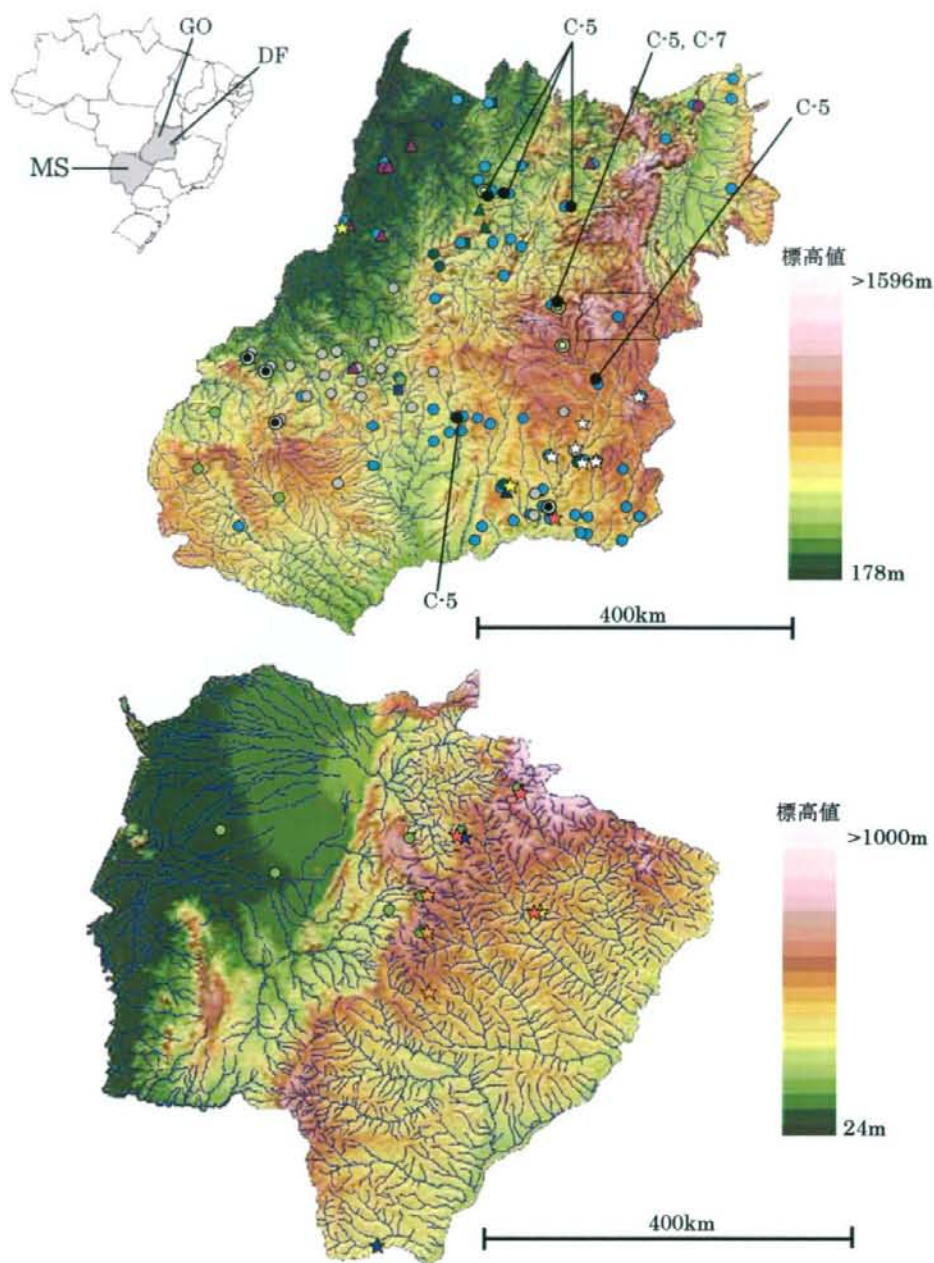


Fig. 4d 連邦自治区ブラジリア (DR)、ゴイアス州 (GO) およびマト・グロッソ・ド・スール州 (MS) におけるウシおよび吸血コウモリ分離株の地理的分布
 記号はFig. 3に対応し、黒丸は吸血コウモリ分離株の分離地域を、青いラインは川を示す。