

200829006B

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～20年度 総合研究報告書

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18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者 酒井 健夫

平成21 (2009) 年 3月

目 次

I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ 32

III. 研究成果の刊行物・別刷 _____ 34

総合研究報告書

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。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、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する必要があるが、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66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、イヌ由来株はわずかである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。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。
- (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。

- (4) ブラジルの各種コウモリから分離されたRABV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。
- (5) 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、RABV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RABVであった。
- (6) 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RABV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局限する遺伝子グループに大別された。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。
- (7) RABVの糖タンパク質に存在する333位のアミノ酸残基または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と考えられている。このような変異は、これまでRABVの固定株においてのみ認められている。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、本調査研究によって、狂犬病常在地におい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、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策定および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

1) ブラジルおよび中華人民共和国での野生動物および家畜由来RABV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上記同様のサンプル収集を行った。

ブラジルおよび中国いずれの地域においても現地共同研究者の協力を得て、サンプリングを

実施した地域における疫学情報を収集した。

2) 脳組織からのウイルスRNA抽出

RABVの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。

3) RABV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BRABP-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。上記のワンステップ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。

4) 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蛋白質遺伝子全領域あるいは203塩基配列(塩基位置:109-301)であった。

5) 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。アウトグループにはMokolaを用いた(Accession No.: Y09762)。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。

6) 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。ブラジルにおけるRABVの地理的分布の解析に用いた地図は、Brasil em Relevô - 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

ブラジルの野生動物および家畜より分離した野外RABV80検体 (図1) 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 (図2)。

以上の成績を受けて、より大規模な分子疫学調査を実施した (図3)。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検体を用いたN蛋白質遺伝子に基づくブラジル吸血コウモリ由来RABVの分子系統解析を行った。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RABVであり、さらに多様な遺伝子系統に区分された (図4)。

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RABV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。

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 (図5)。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 (図6)。

ウシから分離されたRABV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 (図5)。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。

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となった (図5)。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 (図7)。

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(図6)。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10 km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。

(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、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8)。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RABV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。(図9、図10)。

そこで、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RABV47検体(図11)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(図12)。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。

(4) 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RABV 56検体(図13)の核蛋白質(N)遺伝子情報を基に分子系統樹を作製した(図14)。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(図15)。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。

(5) 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、RABV (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(図16)。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RABVであることが明らかとなった(図17)。

(6) 中華人民共和国南部での狂犬病疫学調査

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RABV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(図18)。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。

(7) 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RABV分離株(図19)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S HBRV-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-BAT 29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。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。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の上で見つかったけれども、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のために重要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を持っている他の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への変異が関わってい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

● ブラジルの吸血コウモリ由来狂犬病

平成18年度の調査におけるブラジルのウシから分離されたRABVの解析によって、コウモリ由来RABV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。そこで、平成20年度は、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RABV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RABVは、主にイヌおよび

吸血コウモリ由来のRABV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RABV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RABV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RABVの遺伝的な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近隣地域に生息する吸血コウモリがウシにRABV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RABV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RABV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RABV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RABVは、RABV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、RABV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RABV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RABV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RABV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。

● ブラジル森林地帯で発生したヒト狂犬病

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。

● ブラジルの食肉目狂犬病

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いる。当研究グループは、ブラジル北東部においてイヌとは異なる遺伝子系統のRABVをキツネから分離した。これらキツネから分離されたRABVはイヌ分離株と遺伝子学的に近縁であった。そこで、ブラジルの食肉目の間で維持されているRABV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RABV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RABV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。

● ブラジルのコウモリ狂犬病

平成18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RABV（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た。ブラジ

ルの各種食虫コウモリから分離されたRABVの分子疫学調査の結果、種に依存したRABV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示唆された。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。食虫コウモリが保有するRABV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。したがって、広範な地域から多検体のコウモリ由来RABV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。そこで、平成19年度は、ブラジルのコウモリ由来RABVに焦点を当て、各種コウモリから分離されたRABV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平成18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RABV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。

● ブラジルにおけるリッサウイルス浸潤調査

これまでアメリカ大陸においてはRABV (Genotype 1) 以外のリッサウイルス (狂犬病類似ウイルス ; Genotype 2-7および型未同定) 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RABV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RABV/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。

● 中国南部におけるイヌ狂犬病

中華人民共和国における予備的な疫学調査によって、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RABV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。

そこで、ヒトおよびイヌ狂犬病が多発している中国南部地域で実施した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ウイルスは、N遺伝子解析において全て遺伝子型1のRABV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。さらに考察を加えるために、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。さらに解析した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。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。このように、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RABV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。

● 新規のコウモリ分離RABV

ブラジルの非吸血コウモリから分離されたRABVにおいて明らかとなった333位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唆する。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測定されなかったが、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RABV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かも知れない。本研究では、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ができなかったが、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の病原性に参与することを示唆する。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なっていない。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どう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

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。

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RABV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検体の分子系統学的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。これらの遺伝子系統の区分にはRABV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RABV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RABV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、これらウシ分離株は、河川流域に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RABV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。このように、吸血コウモリ由来RABV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。ブラジルにおける吸血コウモリ由来RABV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。

一方、食虫コウモリが保有するRABV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。種に依存したRABV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。

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、これらの疫学的背景を明らかにするために、ブラジルの食肉目における狂犬病が調査された。ブラジルの野生キツネから分離されたRABV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RABV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、RABV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RABV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。また、家畜狂犬病は、イヌ由来であることが確認されたため、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RABVの分子疫学調査がより一層重要であると考えられた。

RABV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RABVの遺伝子解析および分子系統学的解析を行った。その結果、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、病原性に関与する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、今後はこれらの研究成果をもとに、さらなる野外RABV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) Shoji Y, Kobayashi Y, Sato G, Gomes AA, Ito 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, Ito 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, Ito T, Samara SI, Carvalho AA, Nociti DP, Ito T, 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, Ito 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

- 5) Kobayashi Y, Okuda H, Nakamura K, Sato G, Ito 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
- 6) Kobayashi Y, Sato G, Kato M, Ito 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
- 7) 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
- 8) 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) 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, Ito 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.
- 5) 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

- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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 2007年9月3日、江別
- 9) 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 X IX International Conference "Rabies in the Americas" (RITA X IX) September 28th-October 3rd, 2008, Atlanta, Georgia
- 10) 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。

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)

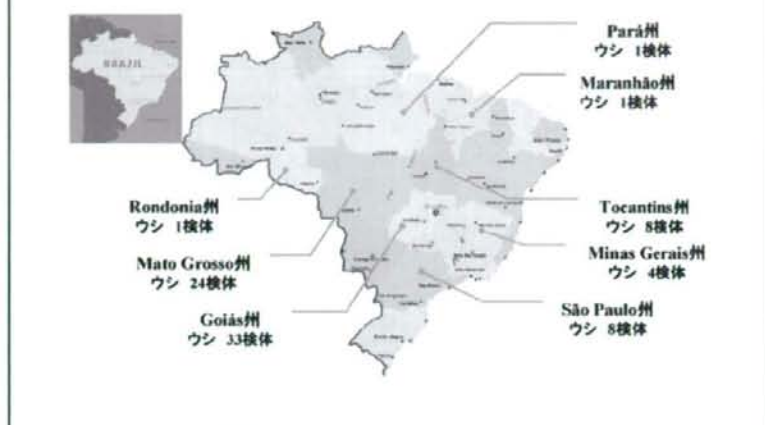
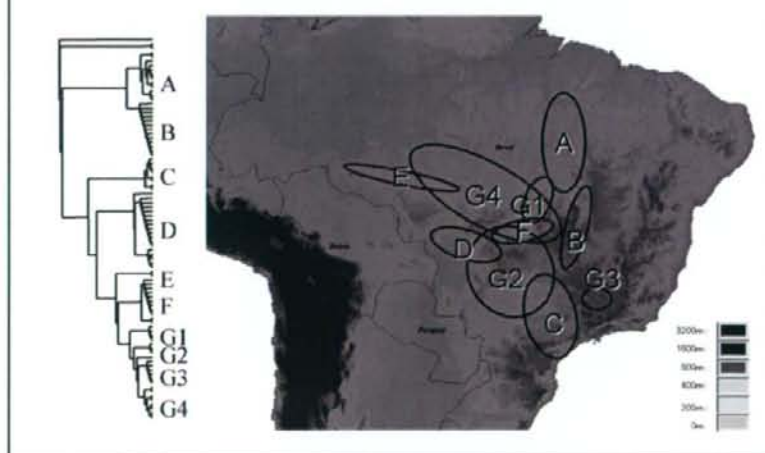


図2 ウシRV分離株(吸血コウモリ由来株)の系統樹および分布



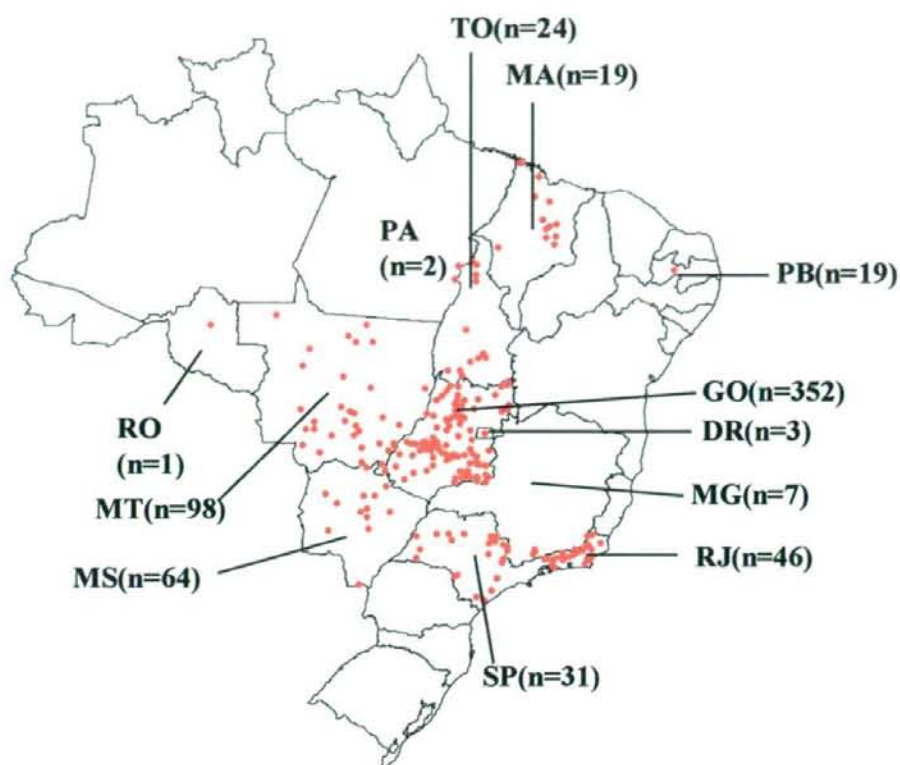


図3 ウシ分離株666検体の採集地域

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:マット・グロソ州、MS:マット・グロソ・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。

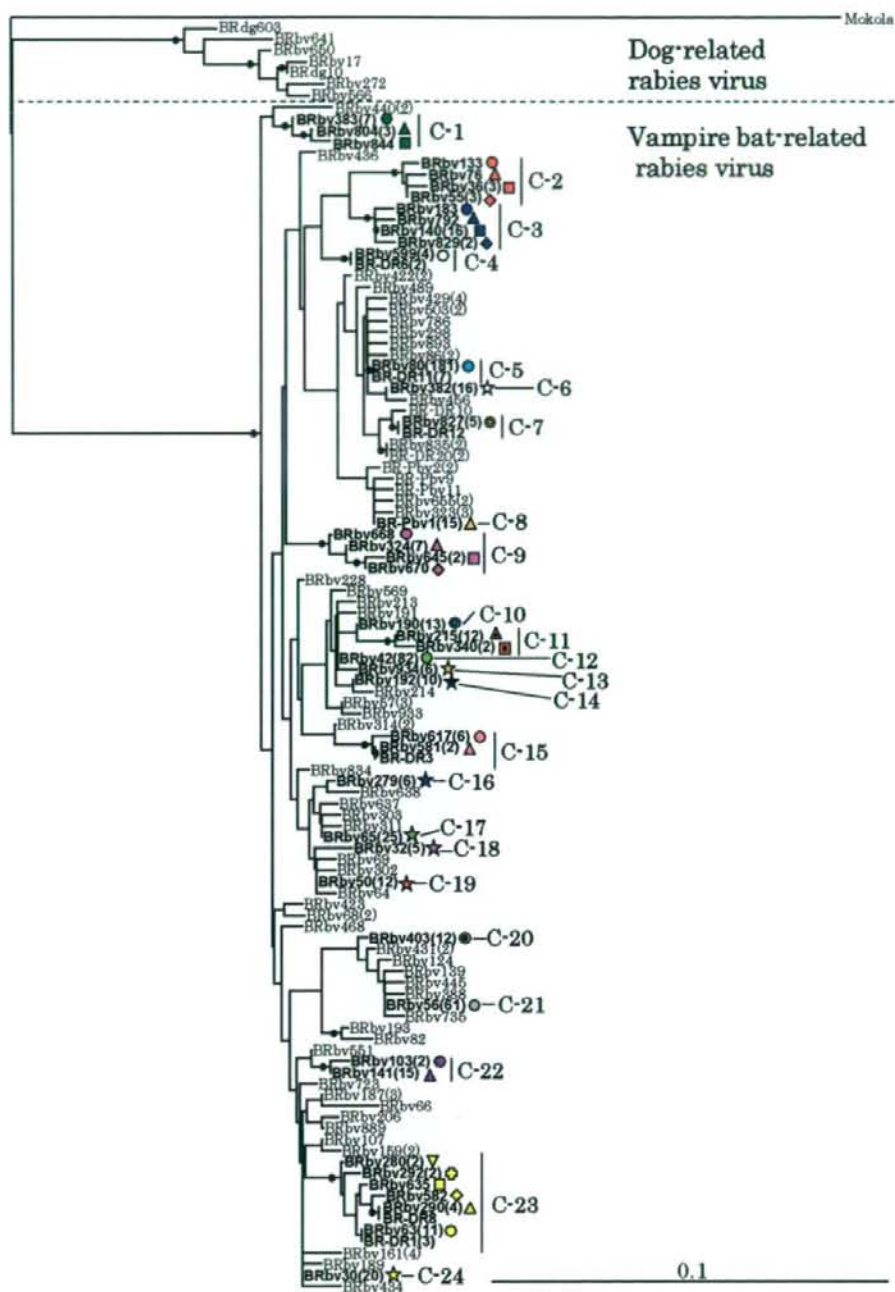


図4 N蛋白質203塩基配列(塩基位置:109-301)に基づく系統樹

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。

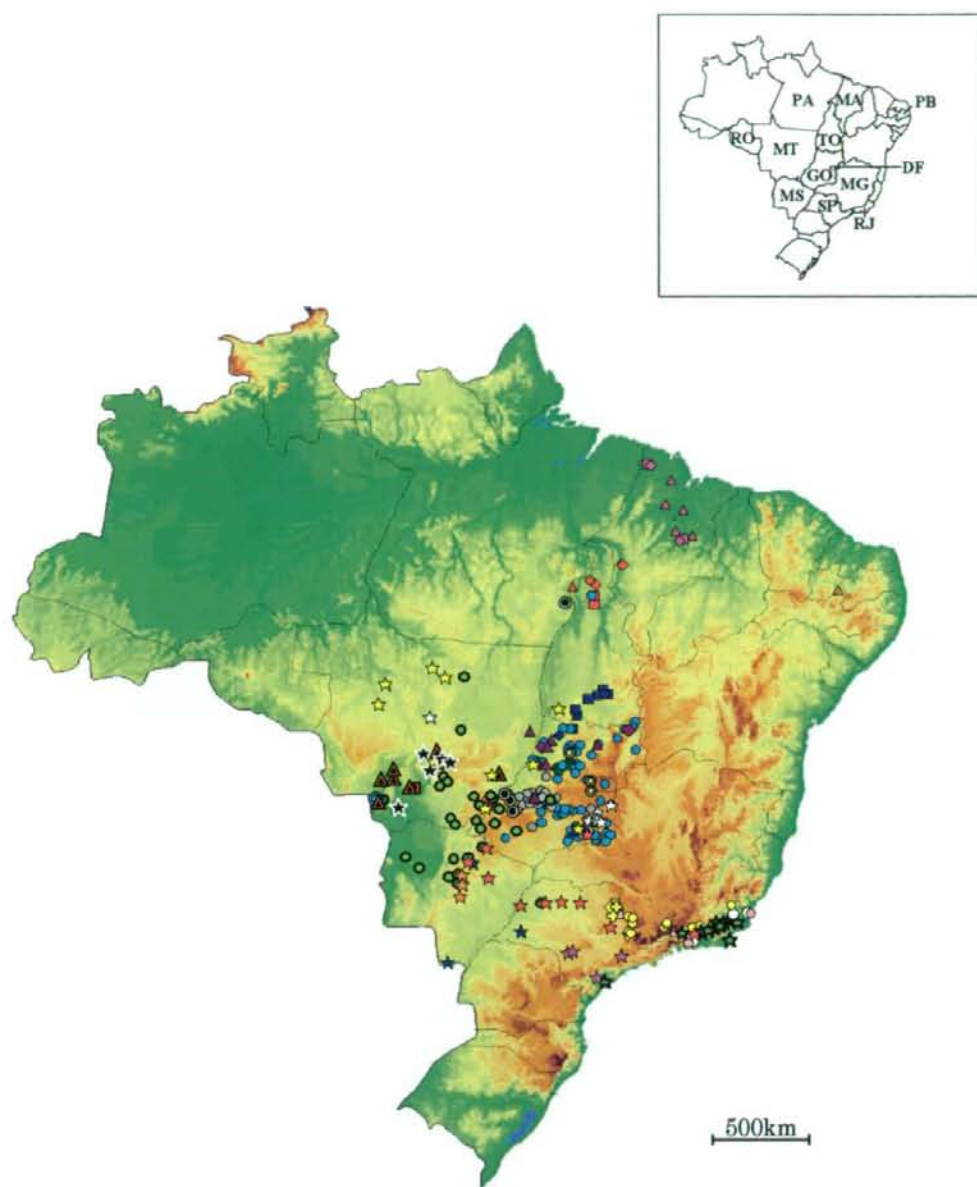


図5 24の遺伝子系統に属したウシ分離株の地理的分布
 記号はFig. 2の24の遺伝子系統に対応し、同一の遺伝子系統に属し、かつ採集地域が同一の検体は、同じ記号で記した。

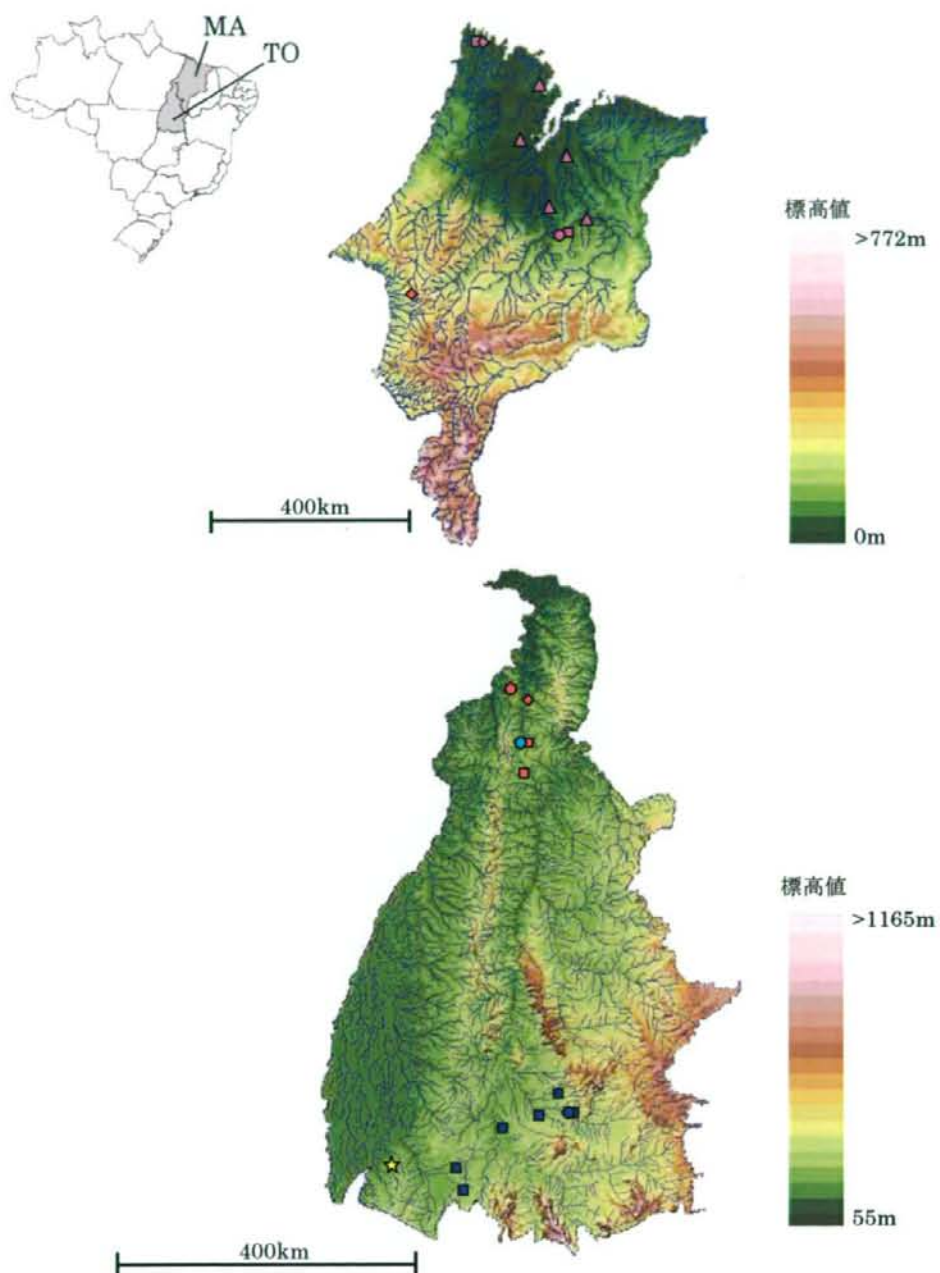


図 6 a マラニョン州 (MA) およびトカンチンス州 (TO) におけるウシ分離株の地理的分布
記号はFig.3に対応し、青いラインは川を示す。