

表2 砂場から回収された虫卵の感染力

	脳(隻)	肝臓	心臓・肺	筋肉(隻)	検出総数	好酸球(%)
	(隻)	(隻)	(隻)	(隻)	(隻)	
イヌ回虫卵感	12	3	0	23	38	12.0
染群	32	1	0	48	81	9.5
	22	0	1	33	56	14.5
砂場由来	2	0	0	72	74	4.0
虫卵感染群	0	0	0	76	76	9.0
	1	0	0	81	82	6.5
非感染群						2.5
						0.5
						2.0

表3 幼虫1隻からのDNA抽出を行うときのNaOH量の検討

PCR trial	Eppendorf Falcon tube					
	tube					
NaOH	1 ml	1 ml	5 ml	10 ml	25 ml	50 ml
1st trial	+	-	+	-	-	-
2nd trial	+	+	-	-	-	-
3rd trial	+	+	+	+	-	-

LAMP trial	Eppendorf Falcon tube					
	tube					
NaOH	1 ml	1 ml	5 ml	10 ml	25 ml	50 ml
1st trial	+	+	+	+	+	+
2nd trial	+	+	+	+	-	-
3rd trial	+	+	+	+	+	+

表4 ウシ肝臓5gからの幼虫DNA検出

添加幼虫数	5時間消化		人工胃液を途中で1回交換	
	LAMP	PCR	LAMP	PCR
0	-	-	-	-
1	+	-	+	-
2	+	-	+	-
3	+	-	+	-
4	+	-	+	-
5	+	-	+	-
30	+	-	+	-

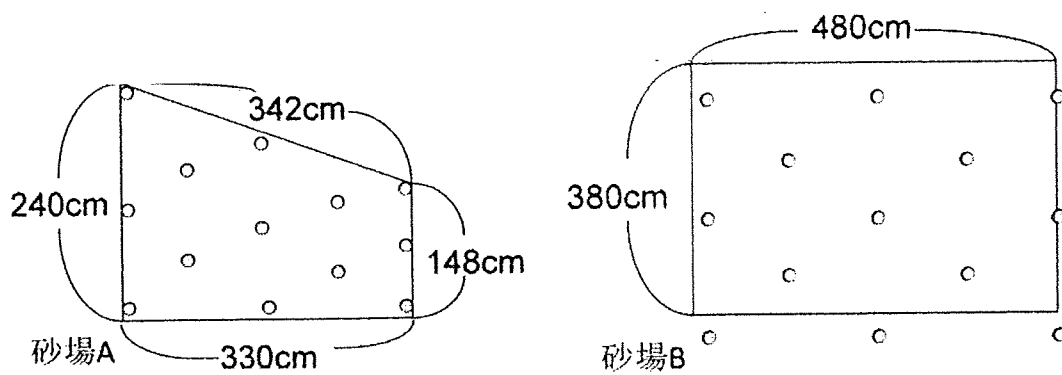


図 1.

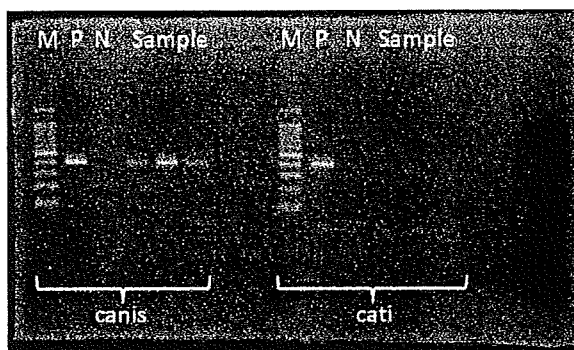


図3. 砂場から出た虫卵をマウスに感染させ脳内移行していた幼虫のPCR法による虫種同定 (M: マーカー, P: ポジティブコントロール, N: ネガティブコントロール)

(図 2 は次頁参照)

砂場 A

表層

129		555		363
	429		479	
244		2368		353
	328		404	
507		374		182

浅層

38		50		92
	880		144	
3		1192		163
	412		137	
983		317		338

中層

1		0		5
	24		27	
0		15		9
	1085		97	
1942		262		2

深層

1		0		0
	6		3	
1		0		3
	3019		63	
21		7		1

砂場 B

表層

306		276		3159
	185		85	
774		379		290
	269		47	
123		139		532

浅層

86		12		229
	252		419	
75		156		44
	152		47	
282		6		56

中層

5		2		365
	1		0	
5		7		1
	0		0	
0		1		2

深層

0		7		5
	1		1	
0		0		16
	0		0	
0		1		4

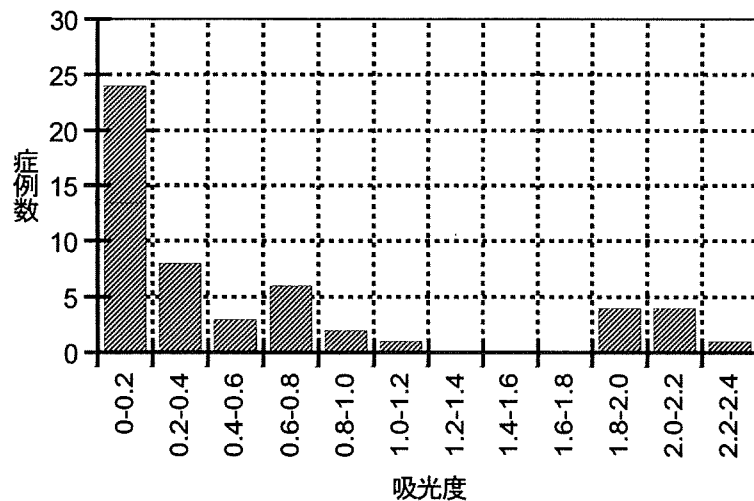


図4. 肝臓白斑症のウシ血清中のイヌ回虫特異抗体

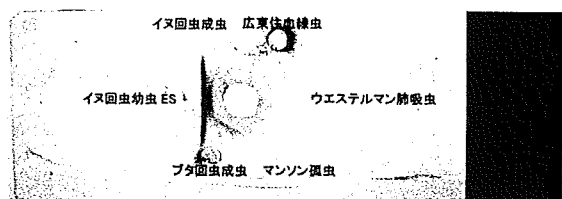


図5 脊髄トキソカラ症患者の寒天ゲル内二重拡散法

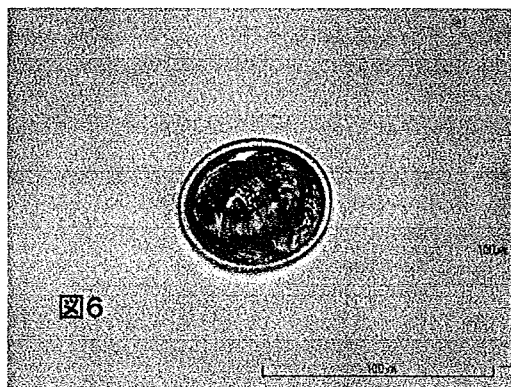


図6. 砂場から回収された幼虫包蔵卵

厚生科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
「我が国における動物由来感染症の感染実態把握に資する研究」  
分担研究報告書

動物由来ウイルス・クラミジア・リケッチア感染症の症例収集と分析

研究分担者 福士 秀人 岐阜大学応用生物科学部獣医学講座教授  
協力研究者 大屋 賢司 岐阜大学応用生物科学部獣医学講座准教授

研究要旨 ウイルス、クラミジアおよびリケッチアを病因とする動物由来感染症の実態把握を目的として調査研究を行った。濾紙採血法による抗体検査では、2007 から 2009 年度においてオウム病、Q 熱および E 型肝炎抗体をそれぞれ 22, 30, 35 検体について検索した。オウム病と診断された検体は 1 検体で IgG 抗体価 20 倍であった。Q 熱抗体測定では IgG 抗体価 20 倍以上 4 検体であったが、他の検体はいずれも IgG 抗体価 32 倍未満、IgM 抗体価 16 倍未満であった。E 型肝炎抗体はいずれも陰性であった。オウム病抗体検査用抗原のクローニングを行った。その結果、抗体検査用抗原の候補として PMP があげられた。ELISA 抗原としての有用性を検討するための準備を進めた。また、主として鳥の糞を対象とする病原体検出用リアルタイム PCR を確立できた。コクシエラ症（Q 熱）外膜タンパク質 com1 を抗原とする ELISA を開発した。濾紙採血法を用いた抗体検索が可能である事が示され、今後の診断および調査に活用できると結論した

#### A. 研究目的

偏性細胞内寄生体を病原体とする人獣共通感染症としてオウム病、Q 熱および E 型肝炎などが知られている。オウム病は古くから知られる人獣共通感染症である。近年、オウム病の届け出数は年間 30 例前後であるが、年により増減が見られる。Q 熱は我が国において、その実態は未だに不明である。特に抗体保有率については報告者により大きな差がある。またイノシシやブタ肉を感染源としたウイルス性肝炎として E 型肝炎が注目されている。

これまでに、臨床現場からの検体輸送を改良する目的で、濾紙採血法を確立した。

本研究では濾紙採血法により上記 3 疾患の抗体調査を実施した。さらに従来の微量蛍光抗体法と同等の抗体検査法を確立するため、新たなオウム病クラミジア抗原および Q 熱抗原の探索を行った。また、鳥類における定量的なクラミジア検出法を開発した。

#### B. 研究方法

##### 1. クラミジアおよび Q 熱抗体保有率（濾紙採血法）

クラミジア検出：血清ないし血液を濾紙に吸収させ、乾燥後、1ml の希釈液で溶出した。この溶出液を 1:10 溶液とした。（濾紙

はおよそ 100 $\mu$ l が吸収されるとされているため)。1:10 溶出液を段階希釈し、明らかな蛍光を示す最高希釈倍数の逆数を抗体価とした。2009 年度は 16 倍希釈から段階希釈し、抗体価を測定した。

精製基本小体を抗原として微量間接蛍光抗体法 (MIF) によりオウム病抗体測定およびコクシエラ感染細胞を抗原とした間接蛍光抗体法により Q 熱抗体価を測定した。

## 2. クラミジア診断用抗原の探索

オウム病クラミジアの血清診断用抗原を探索した。*C. psittaci* Mat116 株感染マウス血清を用いて、*C. psittaci* ライブラリースクリーニングを行った。陽性クローンについて、コードされる遺伝子の塩基配列解析を行った。得られた遺伝子 *pmp* については、定法に従い、大腸菌を用いて組換え蛋白質を作製し、ウエスタンブロット、ELISA により反応性を検討した。

## 3. リアルタイム PCR によるクラミジア検出法の確立

オウム病クラミジアを定量的に検出するためリアルタイム PCR 法の確立を行った。クラミジア外膜蛋白質 *omcB* 遺伝子において、*Chlamydophila* 属内で高い相同性を示す領域を標的とした。コピー数を定量するため、pGEM-T vector に *omcB* 遺伝子を挿入したプラスミドを精製し、鋳型として検量線を作成した。*C. psittaci* Mat116 株の基本小体 (EB) 106 感染単位を接種したトリ糞便から抽出した DNA を 10 倍段階希釈して検出感度の測定に用いた。検出系の特異性は一般細菌を用いて検討した。動物病院から提供されたトリ糞便を用いて、従来法と比較した。

## 4. コクシエラ外膜蛋白質 Com1 を抗原とした ELISA による抗体検出系の開発

*C. burnetii* ゲノム DNA から外膜タンパク質遺伝子 *com1* を PCR により増幅し、定法にしたがい、GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させ、抽出精製した (GST-Com1)。以前の研究で得られた *C. burnetii* Nine Mile I 相菌感染 A/J マウス血清、Priscilla 株感染 A/J マウス血清およびヒト血清を系の評価に用いた。

## C. 研究結果

### 1. クラミジアおよび Q 熱抗体保有率 (濾紙採血法)

2007 から 2009 年度におけるクラミジアおよび Q 熱抗体保有率 (濾紙採血法)

濾紙採血法で採取され郵送された検体についてオウム病抗体価を測定した (表 1)。のべ 22 検体について検査した結果、32 倍 1 検体、20 倍 3 検体、16 倍未満 18 検体であった。このうち、オウム病と診断された検体は 20 倍 (IgG) であった。IgG 32 倍検体は以前にオウム病に罹患した患者からの検体であった。この検体は IgM 16 倍未満であった。オウム病疑いとされた 2 検体はいずれも 10 倍であった。

Q 熱抗体および E 型肝炎抗体は検査した 30 検体および 25 検体いずれも陰性であった。

### 2. クラミジア診断用抗原の探索

オウム病クラミジア感染マウス血清を用いたライブラリースクリーニングの結果、多型膜蛋白質 (Pmp) をコードするクローンを得ることができた。大腸菌を用いて作製した組換え Pmp は、ELISA およびウエスタンブロット双方で、オウム病クラミジア感染マウス血清および不活化オウム病クラミジア免疫ウサギ血清と反応した。

### 3. リアルタイム PCR によるクラミジア検出法の確立

構築したリアルタイム PCR 法は定量的に 10 コピー以上がから検出できた。EB を接種したトリ糞便では反応系あたり 100 感染単位以上から検出できた。各種クラミジア DNA を鋳型とした場合、*C. psittaci*, *C. abortus* (反芻獣クラミジア), *C. felis* (ネコクラミジア) を検出したが、*C. pneumonia*, *C. trachomatis* を始めとした他種クラミジアならびに腸内細菌科を始めとした一般細菌の DNA を鋳型とした場合、反応は認められなかった。動物病院から提供されたトリ糞便において、従来法で陽性を示した 4 検体は全て陽性を示し、陰性を示した 14 検体中 5 検体が陽性を示した。これらのコピー数は 10 コピー未満であった。

#### 4. コクシエラ外膜蛋白質 Com1 を抗原とした ELISA による抗体検出系の開発

マウス感染血清を ELISA で測定したところ GST-com1 では接種菌数が多かったマウスにおいて接種菌株に関わらず抗体応答が認められた。しかし、接種菌数が少ない場合には IFA 抗体応答が認められたが、ELISA 抗体は検出されなかった。

#### D. 考察

##### 1. クラミジアおよび Q 熱抗体保有率 (濾紙採血法)

現行の判定基準は「間接蛍光抗体法による抗体の検出 (単一血清で IgM 抗体の検出もしくは IgG 抗体 256 倍以上、又はペア血清による抗体陽転もしくは抗体価の有意上昇)」となっている。現行の基準では今回の検体は、オウム病と診断された検体を含んだいずれの検体も陰性と判定される。以前にオウム病と確定診断された検体では IgG 抗体価が 32 倍であったが、IgM は 16 倍未満であった。このデータからオウム病抗体は低いながらも数年間にわたって保持される事が示唆された。さらに例数を重ね、

診断基準の妥当性も含め、検討が必要であると考えられた。

Q 熱に関しては抗体陽性例は見いだされなかった。今回の結果と近年の届け出数が数件であることとを考慮すると、我が国における Q 熱の発生数は非常に少ないと考えられる。また、動物との関連性も明確ではない。診断法も確定していないことも問題である。課題は多いが、人獣共通感染症としての重要度はそれほど高くないと考えられた。

##### 2. クラミジア診断用抗原の探索

本研究で得られた血清診断用抗原候補 Pmp は、クラミジア種間における相同性も 30% 程度と低く、また免疫原性も保持していることから、新規診断抗原として有用であると考えられる。今後は、患者血清等を用いた、有用性の更なる検討が必要である。

##### 3. リアルタイム PCR によるクラミジア検出法の確立

本年度に樹立したリアルタイム PCR 法による、*C. psittaci* *omcB* 遺伝子検出法は、従来の *ompA* 領域を標的とした nested PCR 法より約 10 倍高感度であった。*C. abortus*, *C. felis* DNA は増幅するものの、*C. pneumoniae* および *C. trachomatis* とは反応しなかったこと、さらに腸内細菌科を始めとした一般細菌は全て陰性であったことから本検出法の特異性が示された。以上より、本法を用いることにより、特に *C. pneumoniae* と *C. psittaci* の簡便な鑑別に有用であることが示唆された。また、本検出法では、クラミジア DNA を定量的に検出出来ることから、クラミジア罹患鳥の排菌量を定量的にとらえることが可能になった。ヒト検体の応用が今後の課題である。

##### 4. コクシエラ外膜蛋白質 Com1 を抗原とし

た ELISA による抗体検出系の開発

*C. burnetii* 感染 A/J マウス血清における抗体応答を Com1-ELISA にて検出することができた。しかしながら、今回検索した Com1-ELISA は感度の点で IF 法に劣っていた。また、感染個体により応答性は異なる可能性が示された。Com1 に対する抗体応答は感染動物や患者の感染経過により異なるとの報告もある。今後、検出系の検討が必要である。

#### E. 結論

濾紙採血法を用いた抗体検索が可能である事が示され、今後の診断および調査に活用できると結論した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Russell-Lodrigue, KE., Andoh, M., Poels, MW., Shive, HR., Weeks, BR., Zhang, GQ., Tersteeg, C., Masegi, T., Hotta, A., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., McMurray, DN., Samuel, JE.: *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever. *Infect. Immun.* 77 : 5640-5650, 2009
- 2) Fukushi, H., Inoue, K., Saito, L., Ohya, K., Sashihara, N., Yamaguchi, T., Hirai, K.: Survival rates of *Coxiella burnetii* in mayonnaise and constituents. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 62 : 481-484, 2009
- 3) Ohya, K., Takahara, Y., Kuroda, E., Koyasu, S., Hagiwara, S., Sakamoto, M., Hisaka, M., Morizane, K., Ishiguro, S., Yamaguchi, T., Fukushi H.: “*Chlamydomphila felis* CF0218 is a novel TMH-family protein with potential as a diagnostic antigen for diagnosis of *C. felis*

infection.” *Clin. Vaccine Immunol.* 15: 1606-1615, 2008.

4) Puolakkainen M., Lee A., Nosaka T., Fukushi H., Kuo C.-C., Campbell L.: “Retinoic acid inhibits the infectivity and growth of *Chlamydia pneumoniae* in epithelial and endothelial cells through different receptors.” *Microb. Pathog.* 44: 410-416, 2008.

5) Matsui T., Nakashima K., Ohyama T., Kobayashi J., Arima Y., Kishimoto T., Ogawa M., Cai Y., Shiga S., Ando S., Kurane I., Tabara K., Itagaki A., Nitta N., Fukushi H., Matsumoto A., Okabe N.: “An outbreak of psittacosis in a bird park in Japan.” *Epidemiol. Infect.* 136: 492-495, 2008.

#### 学会発表

- 1) 大屋賢司, 福士秀人: “ネコクラミジア CF0218 の性状解析と感染診断用抗原としての有用性.” 第 81 回日本細菌学会総会, 2008 (京都) .
- 2) 塩田幸弘, 大屋賢司, 福士秀人: “Real-time PCR 法によるオウム病クラミジア遺伝子検出法の開発.” 第 146 回日本獣医学会学術集会, 2008 (宮崎) .
- 3) 大屋賢司, 前田貞俊, 山口剛士, 福士秀人: “感染特異抗体検出による, ネコクラミジア *Chlamydomphila felis* の血清疫学調査.” 第 26 回日本クラミジア研究会, 2008 (岐阜) .
- 4) 奥田秀子, 大屋賢司, 安藤匡子, 小宮智義, 野村彩朱, 矢野竹男, 平井克哉, 福士秀人: *Coxiella burnetii* 外膜蛋白質 Com1 の診断用抗原としての有用性: 第 147 回日本獣医学会, 2009 宇都宮.



表1.

疾病	抗体価	2007	2008	2009	合計
オウム病	10未満	3	4		7
	10	2	4		6
	20		2		2
	40				
	80				
	IgG 10未満 / IgM 10未満			4	4
	IgG 10 / IgM 10未満			1	1
	IgG 20未満 / IgM 10未満				
	IgG 20 / IgM 10未満			1	1
	IgG 32未満 / IgM 16未満				
	IgG 32 / IgM 16未満			1	1
	合計		5	10	7
Q熱	10未満				
	10				
	40				
	80				
	IgG 20未満 / IgM 10未満	5	6	3	14
	IgG 32未満 / IgM 16未満	2	1	8	11
	IgG 32 / IgM 16未満			1	1
	IgG 20未満 / IgM 10未満 (封入体 (+))		4		4
	合計	7	11	12	30
E型肝炎	基準値以下	12	22	1	35

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
「我が国における動物由来感染症の感染実態把握に資する研究」  
分担研究報告書

動物由来細菌感染症の症例収集と分析及び諸検査

研究分担者 丸山 総一 （日本大学生物資源科学部・教授）

研究要旨 猫ひっかき病（Cat-Scratch Disease；CSD）の新たな血清診断法として、組換え蛋白を用いた ELISA について検討した。ウエスタンブロット（WB）解析により判明した、CSD 患者血清において有意に高率で反応する抗原蛋白について、二次元電気泳動法、質量分析法により解析したところ、熱ショック蛋白（GroEL）、セリンプロテアーゼ（SP）、および外膜蛋白 43（OMP43）であることが明らかとなった。本研究では、各蛋白を大腸菌を用いて発現し、*B. henselae* サルコシン可溶化抗原（Whole）を含め、それぞれ抗原として用いた ELISA を実施した。Whole 抗原を用いた ELISA の感度は IFA に対し 95.0 % で、特異度は 95.3 % であった。組換え GroEL、および SP を抗原とした ELISA 法の感度はそれぞれ 10 %、85 % となり、特異度は 100 %、97.7 % となった。また、組換え GroEL、SP の判定成績を組み合わせると、感度 90 %、特異度 97.7 % となった。今後、OMP43 を加え、より感度および特異度の高い ELISA 用診断抗原の組み合わせについて検討する必要がある。

A. 研究目的

従来、CSD の血清診断には間接蛍光抗体（IFA）法が用いられているが、手技や判定が煩雑であり、*Chlamydia* 属、*Coxiella* 属などの近縁の病原体との交差反応も報告されている。本研究では、より簡便で特異的な血清診断法の開発を目的として、*B. henselae* 特異抗原を解析し、組換え蛋白を抗原として用いた ELISA の開発を行った。

B. 研究方法

IFA で 128 倍以上を示した CSD 患者血清（CSD 群：21 検体）、ならびに健常者血清（健常群：44 検体）と *B. henselae* Houston-1 株（：H1）抗原を用いて WB 解析を行い、CSD 群において特異的に検出される抗原蛋白を推定し、二次元電気泳動法、質量分析法によ

り同定した。同定された蛋白と他の *B. henselae* H1 特異抗原である *groEL*、セリンプロテアーゼの各遺伝子をそれぞれ pET-32a ベクターに挿入し、大腸菌（BL21 株）を用いて発現させ、各 Trx 融合組換え蛋白を精製し、ELISA 抗原とした。さらに、H1 サルコシン可溶化抗原（Whole）も併せて検討した。カットオフ値は[健常者群の平均値 + 標準偏差 × 3]とした。さらに、CSD の臨床症状を有しているものの、IFA では陰性と診断された人の血清（偽 CSD 群：68 検体）について、ELISA により再評価した

C. 研究結果

二次元電気泳動法および質量分析法により、健常者群に比べ CSD 群で有意に高い割合で検出される抗原は、GroEL、SP、および

OMP43 であることが明らかとなった。

本研究において使用したヒト血清 133 検体中 12 検体 (CSD 群 1 検体, 健常群 1 検体, 疑 CSD 群 10 検体) が Trx と反応したため, 成績から除外した。

Whole 抗原を用いた ELISA の感度は IFA に対し 95.0 % で, 特異度は 95.3 % であった。同様に, 組換え GroEL, SP を抗原とした ELISA の感度はそれぞれ 10 %, 85 % 特異度は 100 %, 97.7 % であった。また, 組換え GroEL, SP の判定成績を組み合わせると, 感度 90 %, 特異度 97.7 % となった (表 1)。

偽 CSD 群において, ELISA OD 値がカットオフ値を上回る検体は, Whole 抗原では 58 検体中 24 検体, SP 抗原では 58 検体中 27 検体に認められたが, GroEL 抗原では認められなかった (表 2)。OMP43 については, 現在組換え蛋白の発現, ならびに精製を継続している。

#### D. 考察

Whole 抗原を用いた ELISA の感度は 95.0 % となり各組換え蛋白抗原を用いた ELISA の感度を上回ることが判明した。一方, 特異度は組換え抗原蛋白で 97.7 ~ 100 % と Whole 抗原の 95.3 % を上回っていた。これらの結果から, CSD 群の患者血清は, 個体間で認識する抗原蛋白が異なるため, それぞれ組換え抗原蛋白単独では, 十分な感度を得ることが困難であると考えられた。そこで, それぞれの組換え蛋白抗原による判定成績を組み合わせた結果, 特異度が 97.7% と高いまま, 90 % まで感度を上げることができた。このことから組換え蛋白抗原を組み合わせることで, 感度および特異度の高い ELISA 診断抗原として応用できる可能性が示唆された。

CSD の臨床症状を示すものの, IFA で陰性と判定された偽 CSD 群では, Whole 抗原では 58 検体中 24 検体, SP 抗原では 27 検体が, それぞれ陽性を示した。本研究で使用した

偽 CSD 群は, いずれも発熱や, リンパ節腫脹などの臨床症状を示した患者から採取されたものであり, また, ELISA の感度, ならびに特異度の高さから, Whole 抗原および SP 抗原で陽性となった検体は, いずれも各抗原を認識する抗体が含まれていると考えられる。以上の成績から, 従来の IFA は ELISA に比べて感度が低く, CSD を発症しているにも関わらず, 陰性と判定される可能性が示唆された。

今後, OMP43 や未同定の抗原蛋白を組換え蛋白として作製し, GroEL, や SP を含めた複数の蛋白を組み合わせた抗原を用いることにより, さらに感度, 特異度の高い ELISA の開発が期待できるものと思われる。今後, 臨床現場で応用可能なイムノクロマトグラフィーなどによる簡易診断法を確立することが望まれる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Jittapalpong, S., Sittisan, P., Sakpuaram, T., Kabeya, H., Maruyama, S. and Inpankaew, T. 2009. Coinfection of *Leptospira* spp and *Toxoplasma gondii* among stray dogs in Bangkok, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 40(2):247-52.

##### 2. 著書

1. 分担執筆, サウンダース小動物臨床マニュアル第 3 版 (長谷川篤彦監訳), 2. 感染症 第 19 章 全身性細菌感染症 P 191-203, 文永堂出版 (東京), 2009. 4. 25.
2. 丸山総一 猫ひっかき病 小児科臨床 2009 ; 62 : 703-708
3. 丸山総一 トキソプラズマ症 小児科臨床 2009 ; 62 : 717-720

4. 丸山総一 猫ひっかき病 岸本寿男, 山田章雄編 ズーノーシスハンドブック, Medical Science 社 (東京) 2009.

3. 学会発表

井上 快, 壁谷英則, Michael Y. Kosoy, Bai Ying, George Smirnov, Dorothy McColl, Harvey Artsob, 丸山総一: 野鼠由来 *Bartonella grahamii* の進化系統と地理的起源. 日仏獣医学会第40回研究例会, 恵比寿 (2009.3.13)

4. 講演・シンポジウム

1. 2009年12月7日(月), 麻布大学動物病院研修医講習会「「ペットと人獣共通感染症」
2. 2009年10月19日(月), 住友化学(株), 「ペットと人獣共通感染症ーペットと楽しく暮らすために」
3. 2009年9月16日(水), 韓国ソウル大学「Situation of *Bartonella* infections in Japan: from humans to rodents」
4. 2009年8月7日(金), 動物医薬品協同組合夏期研修会, 「ペットと人獣共通感染症

ーペットと楽しく暮らすために」, 五反田ゆうぼうと

5. 2009年5月16日(土), 千里ライフサイエンス市民公開講座 第54回「家庭で気をつけないといけない“うつる病気(感染症)” 「ペットから人にうつる病気ーペットと楽しく暮らすために」

6. 2009年2月10日(火), 県央四市学校飼育動物連絡協議会, 平成20年度教師と獣医師との合同学習会「注意すべき人と動物の共通感染症～学校飼育動物を中心として～」, 大和市勤労福祉会館

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

厚生科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
「我が国における動物由来感染症の感染実態把握に資する研究」  
分担研究報告書

ヒト狂犬病の治療に関する研究：2009年度改定版

研究分担者 菅沼 明彦 東京都立駒込病院感染症科 医長  
研究分担者 高山 直秀 東京都立駒込病院小児科  
協力研究者 柳澤 如樹 東京都立駒込病院感染症科

研究要旨 狂犬病は、致死的な脳炎をきたす人獣共通感染症であり、発病するとほぼ全例が死に至る。発病後の治療は未確立だが、近年、新たな治療法を模索する動きがみられる。輸入狂犬病発生の際に、日本国内には、狂犬病の治療、院内感染対策に関する資料が非常に乏しいことが明らかとなった。今年度は狂犬病治療を考える基礎資料として、海外から報告された文献に基づき、狂犬病救命例、治療法、院内感染対策について暫定的にまとめた。これまでに報告された狂犬病発症後の救命例は6例に過ぎない。このうち6例目の救命例は狂犬病ワクチンや抗狂犬病免疫グロブリン（RIG）の投与を受けず、人工呼吸管理及びケタミン、ミダゾラムなどの投与による強力な鎮静処置を受けた後に救命され、社会復帰できた。この症例での治療を基礎として、Milwaukee rabies protocol (MRP)が、ウイスコンシン大学より提唱され、その後、2008年に同様の治療を受けた2例の救命例が報告された。しかし、それらの詳細は依然として明らかではなく、かつ治療失敗例の報告も数多くあることから、MRBは確立された治療法として認められていない。WHOは、狂犬病が確定診断された症例に対し、苦痛の軽減を目的とした緩和治療を推奨しており、人工呼吸器の使用などの侵襲的処置は避けるべきであるとしている。

#### A. 背景

狂犬病は、古代より知られたウイルス性の人獣共通感染症である。神経親和性を有し、末梢神経より侵入し脊髄から脳に至り、脳炎をきたす。感染経路は、感染動物による咬傷が大多数だが、エアロゾル、臓器移植による感染も報告されている。狂犬病は、適切な咬傷部位の処置と、狂犬病ワクチンを用いた曝露後免疫により発症予防が可能である。しかし、ひとたび発症すると、ほぼ全例が死に至る。これまで、種々の治療法が試みられているが、発症後の救命例は

わずかにすぎない。

このような現状を踏まえ、治癒をめざす積極的治療が望ましいのか、患者の苦痛緩和・除去を主眼に置く緩和的治療が望ましいのか、現在まで議論が続けられている。

#### B. 狂犬病患者の治療方針

狂犬病患者に対する治療方針として、治癒を目指す積極的治療か、患者の苦痛の軽減・除去に主眼を置く緩和的治療か、現在統一された見解はない。

気管内挿管、人工呼吸器などの集中治療

により、狂犬病患者の生存期間延長は認められている。(平均5日から3週間へ延長) また、生存期間の延長により、経過中に様々な合併症の発現が確認されている 1) 3) 25)。

2003年米国ウイコンシン大学において、人工呼吸管理、抗痙攣薬に加え、特異的治療としてケタミン、リバビリン、アマンタジンを使用して狂犬病患者の救命に成功した。この治療を基に、Milwaukee Rabies Protocol (MRP) が作成され、これに準じた治療が各地で行われている。しかし、同様の治療を実施した他の症例は、生存期間の延長は認められたものの、全例が死の転帰をとり、有効性は確認されなかった 6)。2008年、ブラジル及びカンボジアからより、上記と同様の治療を受け救命された症例が報告された 37)。しかし、これらの臨床経過、治療内容などの詳細を含む新たな報告は依然として認められておらず、MRP の有効性を支持するものとは言い難い。

Alan らは 4、現時点では積極的治療を支持する根拠は乏しく、通常は緩和的治療が選択されるとしている。また、狂犬病の治療を目標とした積極的治療が考慮されるのは、特殊な状況下で、医療者及び本人または家族の希望があり、必要な条件を満たした場合である。積極的治療をすすめる上での条件として以下の点があげられている 4)。

- 1：狂犬病発症前に狂犬病ワクチンが接種されている。
- 2：発症早期の症状（咬傷部位の疼痛・知覚異常など）にとどまっている
- 3：元来健康で、基礎疾患を有さない
- 4：家族が、治療が不成功に終わる可能性が非常に高く、神経学的後遺症を残す可能性を受容できる
- 5：治療を実施する医療機関が、十分な医療スタッフと設備を有する

上記の提言は、ワクチン接種を行わずに救命された 2003 年米国の症例が報告される以前のものであり、「1：狂犬病発症前に狂犬病ワクチンを接種されている。」については、検討の余地はある。しかし、それ以前の救命例は、全例に狂犬病ワクチンを発症前（曝露前免疫 1 例、曝露後免疫 4 例）に接種しており、発症前のワクチン接種が、発症後の回復に有利となる可能性はある。

WHO の狂犬病専門家会議の検討では、現時点では、各種治療薬の有効性は確立されておらず、狂犬病が確定した時点で、侵襲的治療を回避すべきであるとしている。診断確定後は、緩和的にバルビツール、モルヒネなどで鎮静を図り、気管内挿管、人工呼吸器管理などは行わない方針を示している。新たな治療法を模索するため、本人及び家族の同意のもとに、専門的施設にて実験的治療が試みられる際には、患者への多大な経済的負担は避け、救命しえたとしても重篤な後遺症が残る可能性について家族の承諾が必要であるとしている 5)。

### 3：狂犬病救命例

これまで、狂犬病発症後に救命されたと報告された症例は 6 例である 5) 17)。(表 1) 感染地は、米国が 3 例と最も多く、性別は男性 3 例、女性 3 例、年齢は 6～45 歳である。感染経路は、動物咬傷 5 例（イヌ 3 例、コウモリ 2 例）、実験室内感染 1 例、5 例はワクチン接種歴を有し、うち 1 例は曝露前免疫を受けていた。後遺症は 5 例に認められ、うち 2 例は高度の障害を残し、救命後数年以内に後遺症を原因として死亡している。

狂犬病救命例には、狂犬病ワクチンの副反応の可能性を否定できない症例が含まれている点や、全症例が狂犬病ウイルス抗体

価（特に髄液中抗体価）による診断であり、ウイルスを直接同定した症例がない 5) などの問題点が指摘されている。そのため、すべての救命例が、狂犬病であったかを疑問視する意見もみられる。

上記 6 例以外に、発熱、咬傷部疼痛、感覚障害、不安感、狂水症などの臨床症状から狂犬病と診断され、救命に至った 2 症例が報告されている。しかし、いずれも抗体検査・抗原検査が未実施であるため、狂犬病救命例として公認されていない 18)。

また、2008 年に 2 例の狂犬病発症例で、MRB に準じた治療を受け救命された症例が報告されたが、その詳細は不明である 37)。

#### < 第 1 例目 > 17) 19)

米国での 6 歳の男子。左親指をコウモリにかまれる。そのコウモリが実験室内検査より狂犬病であることが判明。受傷 4 日後より、アヒル胚細胞由来狂犬病ワクチンの接種を開始。

受傷後 20 日目に発熱、髄膜刺激症状。異常行動も出現し、その後昏睡となる。巣症状、痙攣、循環器・呼吸器合併症も認められた。その後、神経所見は良好な回復を認めた。脳生検は、脳炎に一致した所見を呈した。3 か月後の血清中和抗体価は、63,000 倍を示し、髄液中の抗体価も高値であった。狂犬病ウイルスは、脳、髄液、髄液のいずれからも検出されなかった。

#### < 第 2 例目 > 17) 34)

アルゼンチンの 45 歳女性。イヌにより左腕を受傷した。そのイヌは、受傷させた後に神経症状が現われ、4 日後に死亡した。受傷 10 日後より、乳のみマウス脳由来ワクチンの接種を開始した。ワクチンを 14 日間連日接種した後に、さらに 2 回の追加接種を行った。受傷 21 日後（ワクチン接種 12 日目）、受傷部位に知覚異常が出現し、その範囲は拡大し、疼痛を伴うようになっ

た。受傷後 31 日目に四肢麻痺と反射亢進のため入院となる。四肢筋力低下、上肢の振戦、小脳症状（協調運動障害、失調など）全身性ミオクローヌス、下肢の反射亢進を認めた。髄液所見は、細胞数 5、タンパク 0.65g/l。3 か月後の血清狂犬病抗体価は 640,000 倍であり、髄液抗体価も高価を示した。唾液、髄液、角膜のいずれからも、狂犬病ウイルスは分離されなかった。2 回の追加接種の後に、急速に神経学的異常が出現し、神経症状の改善に 2-3 か月を要した。報告では、ほぼ完全な回復をみたとされているが、詳細な記載はない。本例は、典型的な狂犬病の臨床像と異なり、乳のみマウス脳由来ワクチンによる脳炎の可能性も指摘されている。

#### < 第 3 例目 > 17)

米国の 32 歳男性。狂犬病ウイルスを扱う研究員であり、1977 年にアヒル胚細胞由来狂犬病ワクチンにより曝露前免疫を受けた。発症 5 か月前の血清中和抗体は、32 倍であった。発症 2 週間前に、エアロゾルによる狂犬病ウイルス（ワクチン株）の曝露を受けた。

初期症状として、倦怠感、頭痛、発熱、悪寒、嘔気を認め、その後間欠的な幻覚を伴う傾眠が現れた。発症 6 日後に失語、腱反射亢進、原始反射が認められ入院となる。髄液検査は、白血球 230/ $\mu$  l (95 % 単核球)、タンパク 1.17g/l などを示した。入院後、症状が悪化し昏睡状態となる。血清中和抗体価は、64000 倍へ上昇し、経過中に 175,000 倍まで上昇した。髄液抗体価の上昇も認められた。皮膚生検、角膜塗抹標本から、狂犬病ウイルスは検出されなかった。発症 4 か月後、歩行可能となるが、失語、痙攣性麻痺が残存した。本例は、曝露前免疫を受けながらも、狂犬病を発症した最初の症例となった。また、詳細が報告された 4 例目のエアロゾル感染例である。

<第4例目> 17)35)

メキシコの9歳男性。顔面をイヌに咬まれた後、創部処置、ペロ細胞狂犬病ワクチン接種が行われた。しかし、抗狂犬病免疫グロブリンは投与されなかった。受傷19日後より発熱、嚥下障害が出現。その後、様々な異常な神経学的所見と、痙攣が出現したが、恐水症や、吸気時の痙攣は認めなかった。入院後、意識状態の悪化を認め、昏睡となり数日間人工呼吸管理を要した。髄液所見は、白血球 $184/\mu\text{l}$  (単核球65%)を呈した。唾液、皮膚、角膜から狂犬病ウイルスは検出されなかった。血清中和抗体価は受傷39日目に34,800倍と上昇し、髄液抗体も高値を示した。後遺症として、四肢麻痺、視覚障害などを認めた。約4年後に死亡した。

<第5例目> 17)36)

インドの6歳女性。顔面、手をイヌに咬まれた。咬んだイヌは4日後に死亡した。トリ胚細胞狂犬病ワクチンを0日、3日、7日に接種されるが、創部の処置、免疫グロブリン投与は行われなかった。受傷14日後より、発熱、嚥下障害、幻覚を認めた。ワクチンによる神経障害と考えられ、メチルプレドニゾロン投与、ヒト2倍体細胞ワクチン接種が行われた。その後、唾液分泌増加、痙攣が出現し、昏睡状態となった。頭部MRIは、大脳皮質、基底核、脳幹部にT2強調像にて高信号領域を認めた。髄液は、多核球優位の細胞数増多を認めた。血清抗体価は発症110日目に31,200倍(7,800IU/ml)まで上昇し、髄液抗体価は18,200倍(4,550IU/ml)であった。皮膚生検、角膜からウイルス抗原は検出されなかった。重篤な後遺症が残り、四肢の筋固縮、不随意運動、後弓反張が認められた。2年後に死亡した。

<第6例目> 17)31)

米国の15歳女性。左第2指をコウモリに

咬まれる。創部の処置は、オキシドールで行われた、その際に医療機関は受診しなかった。約1か月後左手の疼痛としびれを自覚し、それが3日間続いた後に両側第6神経障害による複視、落ち着きのなさ、嘔気、嘔吐が認められた。頭部MRIは正常であった。症状発現4日後に髄液検査を行い、白血球 $23/\mu\text{l}$  (リンパ球93%)とタンパク $50\text{mg/dl}$ を認めた。その後、発熱、眼振、左上腕振戦、唾液分泌過多が認められた。発症5日目に3次医療機関へ転送された。再度実施された頭部MRIでは異常を認めなかった。転院初日の血清および髄液の中和抗体はそれぞれ102倍、47倍であった。その後両者ともに上昇を認め、1,183倍、1,300倍となった。皮膚、項部、唾液のいずれからもウイルスは検出されなかった。人工呼吸管理となり、ケタミン、ミダゾラムを投与され、てんかん波抑制のためフェノバルビタールが加えられた。また、リバビリン、アマンタジンを経腸的に投与された。後遺症を残したが改善を認め退院した。退院後もさらに神経症状の改善を認められた。2007年には、歩行障害、構語障害などが残存するものの、高校生活を卒業し、大学進学試験にて平均以上の点数を得たことが報告された(21)。本例は、発症前にも発症後にも狂犬病ワクチン接種を受けずに救命された初めての症例であった。

#### 4: 狂犬病の合併症とその治療

これまでの症例の蓄積により、狂犬病の臨床経過が明らかになってきている。集中治療により生存期間の延長した症例が増加し、経過中に代謝系、循環器系、呼吸器系などの多彩な合併症が出現することが確認された(25)。

6例目の救命例の治療を行ったウイスコンシン大学により、狂犬病患者に対する治療指針が示され、Milwaukee rabies protocol (MRP)



として公開されている 28)31)38)。

MRP には、これまでの症例報告から、合併症とその発病日、推奨される治療が示されている。これらの治療は、特異的な治療により治癒を目指すことが前提であり、気管内挿管、人工呼吸管理、心臓ペースメーカーなどの侵襲的処置が含まれている。積極的治療を目指すのか、緩和的治療を目指すのか、統一された見解がない現状では、合併症治療をどこまで行うかについても議論が分かれると思われる。(表 2)

#### 5: 狂犬病に対する特異的治療

これまで、狂犬病に対する特異的治療が検討されているが、実験室レベルでの有効性を示した薬剤はあるが、ヒト狂犬病の治療において効果の再現性が示されたものはない。前述したウイスコンシン大学を中心としたグループが特異的治療を積極的に行っており、MRP に特異的治療が述べられている 30)。

以下にその概略を記す。

#### <ケタミン>

ケタミンは、非競合性 N-methyl-d-aspartate (NMDA) 受容体阻害剤であり、一般的に臨床では、解離性麻酔薬として、麻酔科領域で使用されている薬剤である。

感染ラット神経細胞において、ケタミンを作用させることにより、狂犬病ウイルスの核タンパクおよび糖タンパクの合成抑制が確認したとの報告がみられた 8)。

しかし、同様の感染神経細胞を用いた実験において、ケタミンに神経保護作用は認めなかったとの報告もあり、結果は一定していない。マウスの脳内に狂犬病ウイルスに接種した実験系では、感染した神経細胞数、発現した狂犬病ウイルス量、及び死亡率に有意差を認めなかった 9)。

#### <リバビリン>

リバビリンは、1970 年代に合成されたプリンヌクレオシドアナログであり、これまでに、C 型肝炎ウイルスをはじめとして、広範なウイルス活性を有することが知られている 27)。

狂犬病にも応用され、単独で投与された例がみられたが、効果は認めなかった 11)。

MRP では、免疫応答を抑制する可能性から、その使用が禁忌とされた 38)。

#### <インターフェロン・アルファ>

狂犬病患者の体液および脳組織のインターフェロンが低値であることから、高容量のインターフェロンが治療に有望との報告 12) や、感染したサルにおいて、インターフェロン投与群で生存率上昇を認めた報告がある 10)。

しかし、Warrell らは、ヒト狂犬病 3 例にインターフェロンを投与したが、いずれも 2 週間以内に死亡し、有効性を見出し得なかったことを報告している 11)。

#### <抗狂犬病免疫グロブリン>

狂犬病ウイルスの早期の排除を目的に、抗狂犬病免疫グロブリン (RIG) を試みられている。しかし、免疫グロブリンは通常血液脳関門を通過できないため、14) 狂犬病患者の中樞神経系にどの程度移行し、効果を発揮するのか不明である。また、髄腔内投与の安全性、有効性も分かっていない 13)。

ウマ抗狂犬病免疫グロブリン (ERIG) 髄腔内投与を実施した症例では、生存期間延長を認めたが、救命には至らなかった 1)。

曝露前・曝露後免疫を行わず脳炎型狂犬病を発症し、ヒト抗狂犬病免疫グロブリン (HRIG) が投与された症例では、急速に四肢麻痺出現し、発症 15 日目に死亡したことが報告された 14)。

このことは、発症後の Immunoglobulin 投

与が狂犬病をむしろ悪化させる可能性を示唆している。

#### <狂犬病ワクチン>

液性免疫および細胞性免疫の誘導を目的として、筋肉注射による狂犬病ワクチン接種が行われているが、明らかな効果は認められていない2)。

通常の接種では、抗体検出までに1週間あるいはそれ以上の期間を要するため、複数個所の皮下接種を考慮すべきとの意見がみられる。しかし、このような強化したワクチン接種の有効性について、一致した見解は得られていない4)。

#### <副腎皮質ステロイド>

狂犬病を感染させたマウスに対してステロイドを使用したところ、死亡率の上昇と潜伏期の短縮が認められている。このため、ヒト狂犬病への使用は、副腎不全を合併している例などを除いて原則禁忌と考えられている20)。

#### < Milwaukee rabies protocol (MRP) >

これまでに、人工呼吸管理を含めた全身管理に加え、上記の薬剤を含んだ様々な治療が試みられているが、多くは救命に至っていない26)。

2003年米国での救命例では、人工呼吸管理に加え、ケタミン、ミダゾラム、フェノバルビタールにより、神経保護、けいれん波抑制や、自律神経系の抑制を図り、抗ウイルス剤としてリバビリン、アマンタジンを経腸投与された。これを基に、MRPが作成された。MRPの概要は、支持療法、神経保護と治療的昏睡、特異的抗ウイルス療法、免疫調整、治療期間の項目よりなっており、各項目に関する治療についての見解及び実施の可否が示されている。

世界各地でMRPに準じた治療がおこなわれているが、その後の生存例は報告され

ていない。Hemachudhaの報告では、33歳の狂犬病発症者にMRPに準じた治療を行ったが、入院8日目に死亡した29)。

2006年米国で発生した2症例に対してもMRPによる治療を行ったが、死の転帰をとった24)。

2010年1月時点において、ウイスコンシン大学の治療チームに登録された20症例の中で、先に示した詳細不明である狂犬病救命例の2例が生存例とされており、治療の再現性には疑問が残る状況である38)39)40)。

これらの結果から、MRPの理論的根拠が明らかでなく、実験室レベルでの研究の蓄積が必要との批判的意見も少なくない29)。

MRPは現在も検討が加えられており、2007年9月に、version2.1示され、2009年6月にVersion3.1が公開された31)30)。

Version3.1の主な変更として、tetrahydrobiopterine (BH4)の適応の変更、昏睡療法に関する薬剤の推奨、脳血管痙縮に対するカルシウム拮抗薬の使用、の3点があげられる。Version2.1では、神経伝達物質に関連する酵素に必須とされるBH4の投与が推奨されていたが、Version3.1では、低血圧などが出現する例に適応が限定された。昏睡療法は、ケタミン、ベンゾジアゼピン系薬剤、アマンタジンが推奨されている。バルビツール酸は、リンパ球減少を惹起する可能性により、必要時のみの使用となった。また、リバビリンの使用は、患者の免疫応答を抑制し、臨床症状を悪化させる可能性から禁忌となった。脳血管痙縮を認める患者に予防的に、血管拡張薬であるカルシウム拮抗薬(Nimodipine 国内未承認薬)の投与が推奨されている。

前回の変更に加えて、治療はより細部にわたり指示されている。しかし、MRPの忠実な実施には、嚴重な全身管理及び合

併症治療・特異的治療に相当の医療資源を要することが明らかである。また、MRPが理論のみに基づく点も多いことから、有用性の評価には、症例の蓄積が必要である。

MRP version3.1の要点について、表3に示した。

#### 6：狂犬病の院内感染対策

狂犬病の院内感染対策について、これまでに示された文献は少なく、2004年のWHOにおける専門家の検討で示されたものを以下に示した(32)(33)。

要点については、表4に記した。

狂犬病患者の治療・看護にあたり、医療スタッフだけでなく、報道機関や一般住民の不安を惹起する可能性がある。他の多くの細菌やウイルスと比べて、感染リスクは高くないが、医療スタッフには、ガウン、ゴーグル、マスク、グローブ（Personal protective equipment PPE）の着用が求められる。特に、気管内挿管、吸引の実施時に、適切なPPE着用が重要である。ウイルスは、血液中には存在せず、唾液、髄液、尿とある組織内のみ間欠的に出現する。

感染のリスクがあると考えられる医療スタッフに対しては、十分に調査した上で、狂犬病曝露前免疫が考慮される。他の感染症と同様に、狂犬病患者をケアする際は、

適切な感染対策を徹底するように、医療スタッフの意識を高めることが重要である。狂犬病患者を診療する特別な医療機関では、狂犬病患者にかかわる医療スタッフは、狂犬病曝露前免疫を行うべきである。ある医療機関では、狂犬病曝露後免疫を、組織培養狂犬病ワクチンを用いて0,3,7,14日と短縮したスケジュールで行っている。

生検や剖検などにおける、脳、脊髄の不用意な取り扱い（電気のこぎり、ドリルなどを用いた生検）は感染の危険性がある。そのため、このような操作では、ゴーグルや呼吸器防護具を用いるべきである。組織や体液は、結核や肝炎などの他の感染症と同様に廃棄しなければならない。一般的に、狂犬病で死亡したヒトからの感染の危険性は低い。血液にはウイルスは含まれないが、中枢神経系、唾液線、筋肉になどの多くの組織にウイルスが存在する。また、唾液や尿にも存在する。遺体に防腐処置を施すことは勧められない。不注意な局所解剖（ネクロプシー）の実施は、粘膜への曝露や、エアロゾルの吸入を招く可能性があり、ガウン、フェイスマスク、ゴーグル、厚い手袋などのPPE着用により、感染を防御する。使用した器具は、オートクレーブまたは煮沸消毒が必要である。遺体は、早期に火葬または埋葬されることが勧められる。

#### <文献>

- 1) Richard W. Emmons, et al. A case of human rabies with prolonged survival. *Intervirology*. 1973; 1: 60-72
- 2) SL Cohen, et al. A case of rabies in man: some problem in diagnosis and management. *BMJ*. 1976; 1: 1041-42.
- 3) Gode GR, et al. Intensive care in rabies therapy. *Lancet* 1976; 2: 6-8
- 4) Alan C, et al. Management of rabies in

humans. *Clinical Infectious Diseases*.2003; 36:60-3.

- 5) WHO expert consultation on rabies first report 2004. Management of rabies patients before and after death.
- 6) MJ Warrell, et al. Failure of interferon alfa and tribavirin in rabies encephalitis. *BMJ* 1989; 299: 830-3.
- 7) Porter RH, et al. Regional variations in the pharmacology of NMDA receptor channel

- blockers: implications for therapeutic potential. *J Neurochem* 1995; 64: 614-623.
- 8) Brian Paul Lockhart, et al. Inhibition of rabies virus transcription in rat cortical neurons with the dissociative anesthetic ketamine. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 1992; 36:1750-1755.
  - 9) Simno C. Weli, et al. Rabies virus infection primary neuronal cultures and adult mice: failure to demonstrate evidence of excitotoxicity. *Journal of Virology*, 2006; 10270-10273
  - 10) J. Hilfenhaus, et al. Effect of administered human interferon on experimental rabies in monkeys. *Infection and immunity*, 1975; 1156-8
  - 11) MJ Warrell, et al. Failure of interferon alfa and ribavirin in rabies encephalitis. *BMJ* 1989; 299: 830-3.
  - 12) Merigan TC, et al. Human leukocyte interferon administration to patients with symptomatic and suspected rabies. *Ann neuro*. 1984; 16: 82-7.
  - 13) Alan C, et al. Management of rabies in humans. *Clinical Infectious Diseases*.2003; 36:60-3.
  - 14) Hemachudha T, et al. Paralytic complications following intravenous rabies immune globulin treatment in a patient with furious rabies. *Int J Infect Dis* 2003; 7: 76-77
  - 15) GR Gode, et al. Treatment of 54 clinically diagnosed rabies patients with two survivals *Indian J Med Res*. 1988; 88: 564-566
  - 16) Madhusudana SM, et al. In vitro inactivation of the rabies virus by ascorbic acid. *Int J Infect dis*. 2004; 8: 21-5
  - 17) Alan C. Jackson. *Human diseases*. Rabies 2<sup>nd</sup> edition. pp309-340
  - 18) GR Gode, et al. Treatment of 54 clinically diagnosed rabies patients with two survivals. *Indian J Med Res*. 1988; 88: 564-566
  - 19) Michael A. W. Hattwick, et al. Recovery from rabies. *Annals of Internal Medicine*. 1972; 76: 931-942.
  - 20) Enright JB, et al. The effects of corticosteroids on rabies in mice. *Can J Microbiol* 1970; 16: 667-75.
  - 21) William T, et al. Long-term follow-up after treatment of rabies by induction of coma. *N Engl J Med*. 2007; 357: 945-946.
  - 22) Manuel J, et al. Failure to thrive, wasting syndrome, and immunodeficiency in rabies: a hypothalamic/ hypothalamic/ thymic axis effect of rabies virus. *Reviews of infectious diseases*. 1988; 10:S710-725.
  - 23) S L Cohen, et al. A case of rabies in man: some problems in diagnosis and management. *British Medical Journal*.1976; 1: 1041-42.
  - 24) Human rabies—Indiana and California, 2006. *MMWR* 2006; 56: 361-365.
  - 25) Dilip R. et al. Human rabies. *Am J Dis Child*. 1974; 127: 862-869
  - 26) C.L. Dolman, et al. Massive necrosis of the brain in rabies. *Can J Neurol Sci*. 1987; 14: 162-16
  - 27) Johnson Y, et al. Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection.
  - 28) Milwaukee rabies protocol Version 1.1 The Medical College of Wisconsin.
  - 29) Hemachudha T, et al. Failure of therapeutic coma and ketamine for therapy of human rabies. *J Neurovirol*. 2006; 12: 407-9
  - 30) Milwaukee rabies protocol Version 2.1 The Medical College of Wisconsin.
  - 31) Willoughby RE, et al. Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N Engl J Med* 2005; 352: 2508-2514.
  - 32) WHO expert consultation on rabies first report 2004. Management of rabies patients before and after death. 4.3 Recommendations for safe clinical management of rabies patients
  - 33) WHO expert consultation on rabies first