

32. Wash the QIAGEN tip with 30 ml buffer QC. First put 5ml to each tube to start washing and add the remaining 25 ml. Empty the capture tube and repeat washing.
33. Change the capture tube with sterile tube. Elute DNA by adding 15 ml of QF buffer.

C. Precipitate, wash and redissolved plasmid DNA

34. Precipitate DNA by adding 10.5 ml (0.7 volumes) room-temperature absolute isopropanol to the eluted DNA and mix. Centrifuge at 15,000 x g for 30 mins to 1 hour at 4 °C.
35. Examine the DNA (white part). Carefully decant without disturbing the pellet (once decanted keep the tube upside down, do not invert the tube) and blot excess isopropanol.
36. Add carefully 5 ml 70% ethanol by not disturbing the pellet. Centrifuge (angular type) for 10 minutes at 4 °C with speed of 15,000 x g. Centrifuge again in less than a minute in swing type to let the pellet drop to the bottom.
37. Carefully aspirate the ethanol without disturbing the pellet with transfer pipette. If there is still ethanol, centrifuge again and aspirate with pipette carefully not to disturb the pellet. Repeat centrifugation if there is still ethanol. Make sure that completely no ethanol left. Turn the tube upside down and let it dry for 10-15 minutes.
38. If completely dry, redissolve the pellet in 200 µl suitable medium (distilled water). Completely dissolve the DNA by pipetting in and out. Check if DNA is already dissolved by aspirating all the content and no bubble is seen at the tip of the pipette tip. If there are left on the wall centrifuge for few seconds to bring totally down. Pool all dissolved DNA in one tube.
39. Check for nucleic acid content.

Result:

Nucleic acid content = 3394.5 ng/ul
260/280 ratio = 1.88

資料 2

ワーキングプラン

Nucleoprotein production by recombinant method

- Design the experiments (Select cloning sites, Select vector, design primer)

Tool: GST-fusion protein expression vector : pGEX-4T-2

Schema of mission

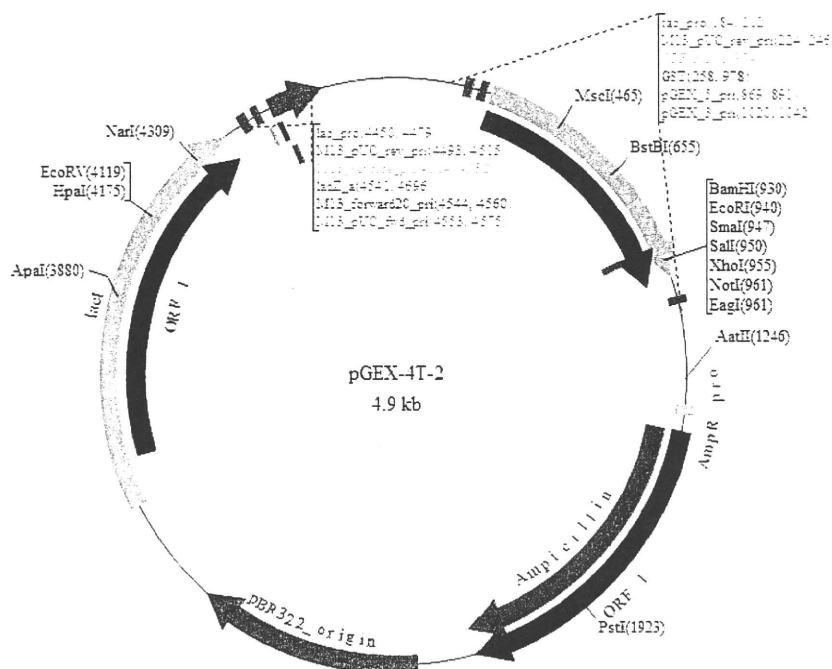
Step 1: Make GST fused Rabies NP expression vector

- Amplification of DNA by PCR
- Cloning targeted genes into the vector to express protein (transform, detect the positive colonies, purification of plasmid, express protein and

Step2: Purification of GST-Rabies NP protein

- Purification of targeted protein)

Tool: GST-fusion protein expression vector : pGEX-4T-2



pGEX-4T-2 (27-4581-01)

Thrombin

Leu	Val	Pro	Arg	Gly	Ser	Pro	Gly	Ile	Pro	Gly	Ser	Thr	Arg	Ala	Ala	Ala	Ser
CTG	GTT	CCG	CGT	GGA	TCC	CCA	GGA	ATT	CCC	GGG	TCG	ACT	CGA	GCG	GCC	GCA	TCG TGA
				BamHI			EcoRI	SmaI	SalI	XhoI	NotI						Stop codon

Primer:

N terminal: tataCCCGGGatggatgccgacaagatt

C terminal: tataGCGGCCGcttatgagtcactcgaa

PCR-enzyme:

Takara PrimeSTAR® Max DNA Polymerase

*PCR products will have blunt end.

Sub-Cloning Vector:

Invitrogen PCR Blunt-TOPO

*Sub-Cloning vector for blunt end PCR product.

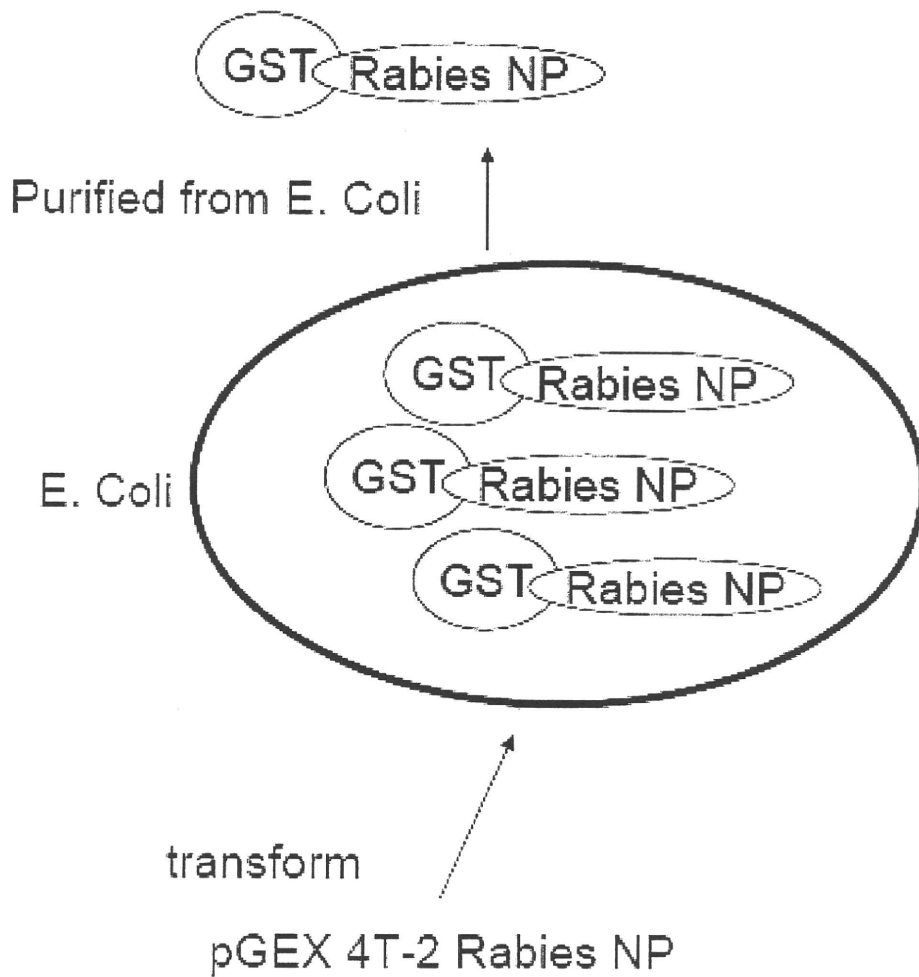
Purification:

Glutathione Sepharose 4B

*High affinity to GST

Schema of mission

Goal: purified GST fused Rabies NP protein



Step 1: Make GST fused Rabies NP expression vector.

- 1: PCR Amplification of Rabies N gene using specific primers (contain SmaI and NotI site)
- 2: Sub-cloning to PCR blunt TOPO vector
- 3: Cloning to pGEX4T-2(SmaI/NotI site)

1: PCR

In this examination, we use Rabies N gene expression vector as a template. Normally, amplification of Rabies N gene must use RT-PCR. If, you will amplify the N gene from Rabies infected tissues, you must add following steps:

- 1) RNA extraction
- 2) cDNA synthesis (Reverse transcriptase reaction)

PCR mixture:

12.5ul	2 x PrimeSTAR® Max DNA Polymerase mix
0.4ul	primer 1
0.4ul	primer 2
2.0ul	template
2.5ul	BSA
7.2ul	DDW

98°C 0sec

55°C 5sec

72°C 16sec

35 cycle

72°C 5min

Products will be checked by electrophoresis, and then go to next step: sub-cloning

2: Sub-cloning to PCR Blunt TOPO

2ul PCR product
0.5ul Salt solution
0.5ul PCR-Blunt TOPO

- 1: Mix gently and keep at RT for 5min.
- 2: At once, add 25ul of competent cell (E.Coli). Keep on ice for 15min
- 3: add 25ul of SOC medium, keep at 37°C for 60min
- 4: harvest to LB Plate (pre-contained 50ug/ml Kanamycine) .
- 5: keep at 37°C for over night

Next Day

Sub-cloning check

- 6: Pick up colonies (>12)
- 7: small culture (in 2ml 2xYT medium, 37°C for 7hr)
- 8: plasmid extraction
- 9: enzyme cut
- 10: electrophoresis

Cloning to pGEX 4T-2

- 1: Cutout Rabies NP gene from PCR-Blunt TOPO by SmaI and NotI
- 2: Cut pGEX 4T-2 by SmaI and NotI (make cloning site)
- 3: Ligation (Rabies NP gene will ligate to pGEX 4T-2)

Step2: Purification of GST-Rabies NP protein

pGEX-Rabies NP transformed E.Coli

↓ 1ml from small culture(10hr culture from single colony in 2 ml 2xYT medium)

100ml 2xYT medium

↓ 6~7 hr culture at 30°C (will be OD:0.4)

Add IPTG (final conc:0.2mM)

↓ culture at 30°C for ~4hr (depend on the target protein)

Collect the E.Coli by centrifuge (6000 r.p.m 5min)

↓ PBS wash

Re-suspend to 20ml of PBS

↓

Breakup (high pressure)

↓ (add Triton X-100:final conc 1%; depend on the target protein)

Collect supernatant after centrifuge (8000r.p.m 5min)

↓

Apply to the Column

↓ wash by 100ml of PBS

Elute by 50 mM Tris-HCl, 10 mM Glutathion、 pH 8.0 (threefold the column volume)

↓

Dialysis, concentrate

IPTG: 500mM stock (DDW)

Glutathion Column: Before use, wash by DDW 2times wash, 2times wash
PBS

資料3

ワーキングプラン

中国 CDC と国立感染症研究所 (NIID) で行われている狂犬病ウイルス (CVS-11 株) に対する中和抗体測定 (RFFIT) 法の実験室間での検証と関連技術情報の共有および交換に関わる研究を行う。

予定

1 週目

- 1 日目 : BSL2施設でのウイルス取り扱いのためのバイオセーフティ講習会受講
- 2 日目 : RFFIT (NIID法) の実技研修 (測定に用いる培養細胞の調整)
- 3 日目 : RFFIT (NIID法) の実技研修 (被検血清のCVS-11株吸着と培養細胞感染)
- 4 日目 : RFFIT (NIID法) の実技研修 (被検血清のRFFIT値測定と国際単位算出)
- 5 日目 : RFFIT (NIID法) の実技研修 (NIID法と中国CDC法の比較)

2 週目

- 1 日目 : RFFIT法の比較検証 (測定に用いる培養細胞の調整)
- 2 日目 : RFFIT法の比較検証 (被検血清のCVS-11株吸着と培養細胞感染)
- 3 日目 : RFFIT法の比較検証 (被検血清のRFFIT値測定と国際単位の算出)
- 4 日目 : RFFIT法の比較検証 (課題点等の抽出、考察とまとめ)
- 5 日目 : RFFIT法の比較検証 (成績に基づく帰国後に行う共同研究案の計画)

2010.12.6 - 12.17

NIID-RFFIT 法と China-RFFIT 法の比較実験

RFFIT に使用したサンプル

中国からの持参したサンプル

WHO 標準血清凍結乾燥品 (30IU/ ampoule) (EMEM の 1ml にて溶解)

China 標準血清凍結乾燥品 (21.4IU/vial) (EMEM の 1ml にて溶解)

感染研標準血清

SI 2 IU/ml

SI 0.5IU/ml

陰性血清 (イヌ血清)

テスト血清

Ar-1 inactivated (以前のデータ 10.10 IU/ml)

Ar-2 inactivated (以前のデータ 6.13IU/ml)

Sa-1 inactivated (以前のデータ 5.21 IU/ml)

Sa-2 inactivated (以前のデータ 2.09 IU/ml)

NIID-RFFIT (2010. 12. 06 - 12. 09)

1. 前日の MNA 細胞の播き込み (テストプレート)
平底プレートに 4×10^5 /ml を 100ul/well → 37°C 約 24h
2. 血清非動化
56°C 30 分
3. 血清希釈 (希釈プレート) (丸底)
血清 60ul + 2%-MEM 90ul (x2.5) → 30ul + 120ul (x12.5) → 30ul + 120ul (x62.5) ……
4. ウイルス混和
血清希釈系列 120ul + virus 120ul (50FFD50/0.1ul)
5. Back titration
チャレンジウイルスを 10 倍希釈する
6. Incubation
35°C 90min
7. 接種
前日に播き込んだテストプレートの MNA のメディウムを取り去り、血清-ウイルス混和液を 100ul/well を 2 つの well に接種 → 35°C 21-23h
8. アセトン固定
培地捨て → PBS で 1 回洗い → 80% アセトン 室温 30min → アセトン捨て → 完全に乾かす (1.5 - 2h) すぐ染色しない場合は、-20°C 以下に保存
9. FA 染色
抗狂犬病モノクローナル FITC 標識抗体を PBS- で 100 倍希釈し、1% エバンスブルーを 500 倍に希釈し、80ul を各ウエルに加え、室温 30 分反応。200ul の PBS- で 3 回洗い、100ul の PBS- を加える。
10. 観察
一希釈 2 ウエルについて、x200 でウエル当たり 10 視野観察し、合計 20 視野中の陽性細胞がある視野数を記録
11. 計算
50% end-point を所定の計算式より算出し、2IU/ml の標準血清との相対比からサンプルの IU/ml を計算する

80% infection dose titration (2010.12.07 – 12.09)

1. 希釈液等の分注

希釈プレートに 70ul、テストプレートに 100ul の MEME-10 を分注

2. ウイルスの希釈

希釈プレートの 70ul にウイルスストックの 70ul(x2 希釈)を加えピペッティング。

この 2 倍階段希釈を 12 管行う

希釈プレートから 50ul をとり、テストプレートの 100ul に加える

3. MEME-10 で 1×10^6 /ml に調整した MNA を 50ul 加える

4. インキュベーション

35°C 24 時間 5%CO₂ 下でインキュベート

5. アセトン固定

メディアムをチップで吸い取り、PBS を 100ul ゆっくり加えたあと、チップで吸い取る。80%冷アセトンをフタに付くくらいの量 (約 400ul) 入れ、フタをして、4°C 30 分固定する。アセトンを捨て、キャビネット内で約 10 分アセトンを乾燥させ-20°C、あるいはすぐに FA 染色を行う。

6. FA 染色

抗狂犬病モノクローナル FITC 標識抗体を PBS で 100 倍希釈し、1%エバンスブルーを 500 倍に希釈し、80ul を各ウエルに加え、室温 30 分反応。200ul の PBS で 3 回洗い、100ul の PBS を加える。

7. 観察

40 倍で観察し各ウエルの感染率を記録する。

China-RFFIT (2010.12.10 - 12.13, 2010.12.15 - 12.16)

1. 原血清非動化

56°C 30分

2. 血清希釈

希釈プレートとテストプレートに、100ulのMEME-10(10%FBS含む)を分注しておく。

希釈プレートの100ulにテスト血清を50ul加えピペッティング(x3 dilution)

x3希釈した血清の50ulを、テストプレートのこの100ulのMEME-10に加えピペッティング。(同様にx3希釈を行う)

3. チャレンジウイルスの追加

80% infection doseに希釈したウイルス(CVS11)の50ulを加える。

他に、ウイルス量確認のため、希釈プレートに70ulを分注し、ウイルス原液を70ul加え、ピペッティング2倍階段希釈を行い、このうち50ulをテストプレートの100ulに加える。

4. 35°C 1時間 5%CO₂下で反応

5. 細胞の追加

1時間の反応時間中に、MNAを 1×10^6 /mlに調整しておき、全ウエルに50ulずつ細胞を加える。

6. インキュベーション

35°C 24時間 5%CO₂下でインキュベート

7. アセトン固定

メディアムをチップで吸い取り、PBS-を100ulゆっくり加えたあと、チップで吸い取る。80%冷アセトンをフタに付くくらいの量(約400ul)入れ、フタをして、4°C 30分固定する。アセトンを捨て、キャビネット内で約10分アセトンを乾燥させ、20°C、あるいはすぐにFA染色を行う。

8. FA染色

抗狂犬病モノクローナルFITC標識抗体をPBS-で100倍希釈し、1%エバンスブルーを500倍に希釈し、80ulを各ウエルに加え、室温30分反応。200ulのPBS-で3回洗い、100ulのPBS-を加える。

9. 観察

40倍で観察し50%感染率の前後のウエルの感染率を記録する。

10. 計算

50%前後の感染率から、50% end-pointを所定の計算式から算出(エクセルプログラムあり)し、標準血清のIU/mlより、テスト血清のIU/mlを算出する。

資料 4

資料 4-1

- ・ウイルス: 固定毒 (CVS-11 株)
- ・マウス (C57BL/6J)
 - ウイルス感染: 9匹 (マイクロアレイ: 6匹、病理: 3匹)
 - 陰性対照: 6匹

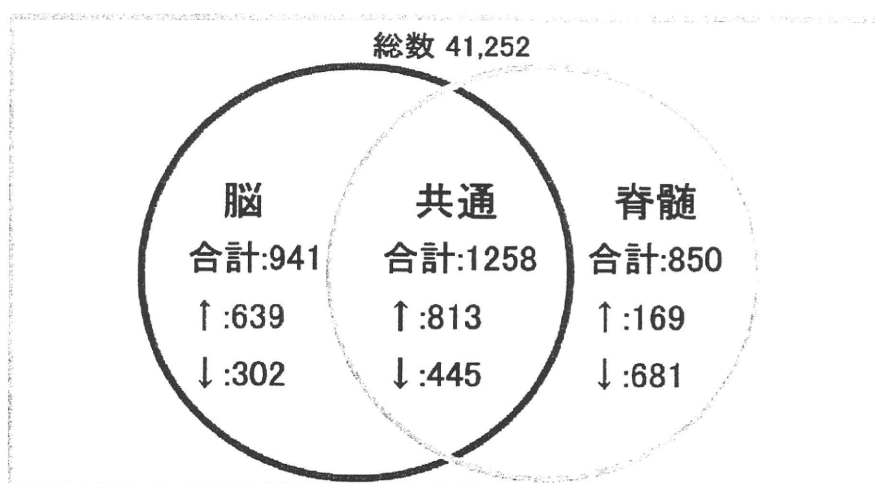


- ・接種 左腓腹筋肉内 (i.m.) (10^7 FFU/ 100μ l)
- ・採材 接種7日後 → 「脳」と「脊髄」
- ・解析 マイクロアレイ解析 → IPA (インジェヌイティパスウェイアナリシス)
病理組織学的解析

LYCZDW/SNIID NIID

資料 4-2

ウイルス接種後に有意に発現が変動していた遺伝子



LYCZDW/SNIID NIID

資料 4-3

脊髄特異的に発現が減少した遺伝子

GeneSymbol	関連事項	Fold change
Mfap4	細胞間相互作用	6.9075627
Ttyh1	イオンチャネル	6.795322
Myoc	細胞骨格	6.735036
Igsf1	免疫	4.77105
Gjt6	細胞結合	4.114564
Gjt6	細胞	3.8794105
Doc2a	神経、イオン	3.631662
Reln	神経	3.604256
Gamt	神経	
Fkbp1b	免疫	
Snap25	神経	
Lama2	細胞	
Ntng1	神経	
Gabra5	GABA関連	
Mapt	神経	2.292787
Kcnaab3	イオンチャネル	2.2665944
Ntng1	神経	2.244677
Ank3	神経、細胞	2.2352304
Gabrg2	GABA関連遺伝子	2.185783
Gabra5	GABA関連遺伝子	2.1851609
Gabrg2	GABA関連遺伝子	2.149914
Gabra3	GABA関連遺伝子	2.1382432
Sncb	神経	2.1292624
Gabrg1	GABA関連遺伝子	2.1209127
Hpca	神経、イオン	2.0772607
Syng1	神経	2.0608115
Gstm5	細胞	2.0086986

神経疾患関連遺伝子
GABA関連遺伝子
イオンチャネル関連遺伝子

厚生労働科学研究費補助金（インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワークの強化に関する研究
狂犬病の免疫組織診断系の検証と確立

分担研究者	朴 天鎬	北里大学・獣医病理学研究室
研究協力者	小嶋大亮	北里大学・獣医病理学研究室
	杉浦尚子	国立感染症研究所・獣医科学部
	井上謙一	京都大学霊長類研究所・統合脳システム分野
	高田昌彦	京都大学霊長類研究所・統合脳システム分野
	佐藤 豪	国立感染症研究所・獣医科学部
	野口 章	国立感染症研究所・獣医科学部
	井上 智	国立感染症研究所・獣医科学部

研究要旨 昨年、狂犬病の免疫組織診断系の検証と確立を目的に、ウサギとニワトリ卵黄で作製した抗狂犬病ウイルス蛋白抗体の特性等についてホルマリン固定材料を用いて比較検討した。その結果、最も染色感度が高いのはウサギおよびニワトリ卵黄由来の抗 P 蛋白抗体であり、抗 N 抗体も十分な染色性を示した。動物種間の染色態度の比較では、ヒツジ由来の野外毒に感染したマウスの脳脊髄において大型な封入体が観察されるのに対し、固定毒 CVS-11 やコウモリ由来株では比較的的小型であり、HE 標本では観察困難であることが判明した。しかしながら、昨年の病理検索に供した例数は少なく、免疫染色の感度の十分な比較検討が出来なかった。そこで本年度は免疫染色感度が比較的良好であったウサギおよびニワトリ卵黄由来の抗 P、N 蛋白抗体を用いて、例数および検索部位を増やして免疫染色の感度を比較検証した。その結果、P-18 株と MP 株を接種したマウスでは、特に脊髄神経節、脊髄、延髄、中脳、海馬および大脳皮質に小型から大型なネグリ小体が多数観察された。ニワトリ卵黄由来の N および P 抗体を用いた免疫染色では、接種経路や動物種に関わらずウサギ由来の N および P 抗体と同程度の染色感度が確認された。以上の結果より、野外毒狂犬病ウイルスの抗原分布が明らかとなり、ニワトリ卵黄由来の抗体が自然発症例においても十分応用できることが判明した。

A. 研究目的

近年、狂犬病ウイルスのリコンビナント核蛋白を大腸菌で発現させ、その蛋白を産卵ニワトリに免疫させ、ニワトリ卵黄から特異抗体を作製する方法が開発されている。ニワトリ卵黄抗体はこれまでの抗血清に比べ、安価でかつ大量生産が可能であり、狂犬病の確定診断に対する有用性が注目されている。

本研究では、まず①3種の野外株に感染したマウスの CNS に関する病理組織学的変化を株間で比較検討した。次に、②ニワトリ卵黄抗体を用いた免疫組織化学的診断系の確立を目指して、野外株および固定株に感染した実験動物（マウス、サル）の脳脊髄を用いて染色感度を比較検討した。

B. 研究材料および方法

1. ウイルス、動物、ウイルス接種

ウイルスは固定株 CVS-34、ブラジルで分離された吸血コウモリ由来ヒツジ分離野外株 (P-18)、吸血コウモリ由来ウシ分離野外株 (P-17)、食虫コウモリ由来食虫コウモリ分離株 (MP) を用いた。感染動物ないし実験感染マウスの脳組織を 10 倍量の PBS に懸濁し、遠心後上清を採り、10 倍希釈ウイルス液を作製した。それぞれのウイルス液を 3 週齢のマウス (CH3 Rockfeller lineage) の左側後肢大腿部筋肉 (以下 IM) に 100 μ l ずつ、および大脳右前頭葉 (以下 IC) に 30 μ l ずつ接種し

た。その内訳は、CVS-34 株を IM 14 匹、IC 16 匹、P-18 株を IM 23 匹、IC 17 匹、P-17 株を IM 3 匹、IC 4 匹、MP 株を IM 24 匹、IC 24 匹である。マウスは計 125 匹使用した。また、免疫組織化学的診断系の確立に関して動物種の違いを検討するため、CVS-11 を脳内接種したカニクイザルおよびアカゲザルの脳組織を用いた。

2. 解剖および組織学的検索

接種後一定期間 (表 1) を置いて、エーテルを用いた深麻酔によりマウスを安楽死させた。直後に中性緩衝 10%ホルマリン液を用いて灌流固定を行い、さらに 2 週間以上ホルマリンに浸漬させた。途中で死亡したマウスについては開腹し、同様に灌流固定、ホルマリン浸漬により処理した。脊髄を含む脊椎は脱灰液 K-CX (Fujisawa, Pharmaceutical Co,Ltd, Osaka, Japan) を水道水で 4 倍希釈して室温約 12 時間脱灰した。脳は嗅球、大脳、中脳、脳幹で前額断し、脊髄は頸髄 (以下 C) 3~4、胸髄 (以下 T) 1~3、腰髄 (以下 L) 1~2 レベルで切り出した。組織片は、上昇アルコール系列で脱水、クリアプラス透徹後、パラフィン包埋した。包埋ブロックより 3 μ m 厚さの連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を施した。

表1. 検索検体一覧

検体番号	ウイルス株	接種経路	継代数	希釈	観察日数	臨床症状	感染率 (%) [*]	
1	CVS-34	IM	original	10 ⁻¹	7	麻痺	2/14 (14)	
2	CVS-34	IM	original	10 ⁻¹	12	麻痺		
3	CVS-34	IC	original	5MIC LD50	5	発症	8/18 (44)	
4	CVS-34	IC	original	5MIC LD50	5	発症		
5	CVS-34	IC	original	10 ⁻¹	5	なし		
6	CVS-34	IC	original	10 ⁻¹	6	震戦		
7	CVS-34	IC	original	10 ⁻¹	6	震戦		
8	CVS-34	IC	original	10 ⁻¹	6	震戦		
9	CVS-34	IC	original	10 ⁻¹	6	震戦		
10	CVS-34	IC	original	10 ⁻¹	7	昏睡		
11	P-18	IM	original	10 ⁻¹	7	なし		6/23 (26)
12	P-18	IM	original	10 ⁻¹	11	麻痺		
13	P-18	IM	1	10 ⁻¹	14	死亡		
14	P-18	IM	5	10 ⁻¹	19	死亡		
15	P-18	IM	2	10 ⁻¹	22	死亡		
16	P-18	IM	1	10 ⁻¹	32	死亡		
17	P-18	IC	original	10 ⁻¹	5	なし	9/17 (52)	
18	P-18	IC	original	10 ⁻¹	8	発症		
19	P-18	IC	original	10 ⁻¹	8	発症		
20	P-18	IC	original	10 ⁻¹	8	死亡		
21	P-18	IC	original	10 ⁻¹	8	死亡		
22	P-18	IC	original	10 ⁻¹	13	死亡		
23	P-18	IC	1	10 ⁻²	15	死亡		
24	P-18	IC	1	10 ⁻²	15	発症		
25	P-18	IC	5	5MIC LD50	27	発症		
26	P-17	IM	10	10 ⁻¹	12	死亡		2/3 (66)
27	P-17	IM	10	10 ⁻¹	12	死亡		
28	P-17	IC	1	10 ⁻¹	40	なし	1/4 (25)	
29	MP	IM	1	10 ⁻¹	7	死亡	8/24 (33)	
30	MP	IM	1	10 ⁻¹	7	死亡		
31	MP	IM	1	10 ⁻¹	7	なし		
32	MP	IM	2	10 ⁻¹	11	痙攣		
33	MP	IM	2	10 ⁻¹	12	痙攣		
34	MP	IM	1	10 ⁻¹	14	麻痺		
35	MP	IM	1	10 ⁻¹	53	なし		
36	MP	IM	10	10 ⁻¹	54	なし		
37	MP	IC	1	10 ⁻¹	5	なし		
38	MP	IC	1	10 ⁻¹	6	背弯姿勢		
39	MP	IC	1	10 ⁻¹	6	背弯姿勢		
40	MP	IC	10	10 ⁻¹	7	死亡	8/24 (33)	
41	MP	IC	1	10 ⁻¹	8	死亡		
42	MP	IC	1	10 ⁻¹	8	死亡		
43	MP	IC	10	5MIC LD50	8	死亡		
44	MP	IC	10	5MIC LD50	8	発症		

CVS-34: 固定株、P-18: 吸血コウモリ由来ヒツジ分離野外株、
P-17: 吸血コウモリ由来ウシ分離野外株、MP: 食虫コウモリ由来食虫コウモリ野外株
IM: 筋肉内接種、IC: 脳内接種

5MIC LD50: ウイルスを脳内接種した際の半数致死量の5倍濃度

*ウサギPおよびR抗体で陽性を示した検体を%で表した。

表2. ニワトリ卵黄抗体の局在と検出検体数

ウイルス株	接種経路	部位	抗体名	
			ニワトリP	ニワトリN
CVS-34	IM	胸髄	2/2 [*]	2/2
		胸髄神経節	2/2	2/2
		脳幹	1/1	1/1
		小脳	1/1	1/1
		海馬	0/1	0/1
	大脳	1/1	1/1	
	IC	胸髄	8/8	7/8
		胸髄神経節	8/8	6/8
		脳幹	8/8	6/8
		小脳	8/8	4/8
海馬		8/8	6/8	
P-18	IM	胸髄	4/6	6/6
		胸髄神経節	4/6	6/6
		脳幹	3/3	3/3
		小脳	2/3	3/3
		海馬	2/3	1/3
	大脳	2/3	3/3	
	IC	胸髄	9/9	8/9
		胸髄神経節	8/8	8/9
		脳幹	9/9	8/9
		小脳	5/5	5/5
海馬		8/9	6/9	
P-17	IM	胸髄	2/2	2/2
		胸髄神経節	2/2	2/2
		脳幹	2/2	2/2
		小脳	2/2	2/2
		海馬	2/2	2/2
	大脳	2/2	2/2	
	IC	胸髄	1/1	1/1
		胸髄神経節	0/1	1/1
		脳幹	1/1	1/1
		小脳	0/0	1/1
海馬		0/0	0/1	
MP	IM	胸髄	6/8	7/7
		胸髄神経節	7/7	7/7
		脳幹	4/5	5/5
		小脳	3/3	3/3
		海馬	3/3	2/3
	大脳	4/4	4/4	
	IC	胸髄	6/6	7/7
		胸髄神経節	5/7	5/7
		脳幹	8/8	7/8
		小脳	7/8	5/7
海馬		7/8	6/8	
大脳	8/8	7/8		

^{*}分子；ニワトリ卵黄由来抗体陽性検体数、分母；ウサギ血清由来抗体陽性検体数

3. 免疫組織化学的検索

ウイルス抗体を用いた免疫組織化学的検索

ウサギ血清とニワトリ卵黄で作製した抗狂犬病ウイルス蛋白 (Nucleoprotein および Phosphoprotein、以下 N および P) 抗体を用い、Labeled streptavidin-biotinperoxidase complex 法 (LSAB 法) を行った。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、0.25% トリプシンで抗原を賦活化し、0.3% 過酸化水素加メタノール (室温、60 分) で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、非特異反応を抑制するためウサギ抗体は 10% 正常ヤギ血清、ニワトリ抗体は 10% 正常ウサギ血清でブロッキングを行った。一次抗体としてウサギ N、P 抗体を 1200 倍、ニワトリ N 抗体を 150 倍、ニワトリ P 抗体を 1000 倍に希釈し、4°C で一晩反応させた。PBS 洗浄後、ウサギ抗体はビオチン標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (NICHIREI BIOSCIENCES INC., TOKYO, JAPAN) を、ニワトリ抗体は HRP 標識抗ニワトリ IgY 抗体を二次抗体として室温で 30 分反応させた。続いてペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (NICHIREI BIOSCIENCES) を室温で 30 分反応させた後、3-3'-Diaminobenzidine (以下、DAB) 基質 (NICHIREI BIOSCIENCES) で可視

化した。その後、ヘマトキシリンで核染色を施した。

4. 超微形態学的検索

10% 緩衝ホルマリンで固定した後に脊髄を取り出し、さらに 0.5% グルタルアルデヒドで再固定した。固定材料を 1mm 角に細切し、1% オスミウム酸で後固定した。定法に従い脱水、透徹、エポキシ樹脂包埋し、厚さ 70nm の超薄切片を作製した。超薄切片を酢酸ウラニル・佐藤の鉛で重染色した後、透過型電子顕微鏡 (H-7650, Hitachi, Tokyo, Japan) で観察した。

C. 研究結果

1. 感染率

感染を確認するため、検体の脳脊髄を用い、ウサギ P および N 抗体を用いて、ウイルス抗原の検出を行ったところ全 125 検体中、44 検体にウイルス抗原が検出された。その感染率は CVS-34 株の IM 14% (2/14 例)、IC 44% (8/18 例)、P-18 株の IM 26% (6/23 例)、IC 52% (9/17 例)、P-17 株の IM 66% (2/3 例)、IC 25% (1/4 例)、MP 株の IM 33% (8/24 例)、IC 33% (8/24 例) であった。本研究では脳脊髄内にウイルス抗原が検出された 44 検体を対象に病理学的検索を行った。それらの接種ウイルス株、接種経路、ウイルス液の継代数、希釈倍率、観察日数、臨床症状を表 2 に示した。一部のマウス

は実験期間中に死亡した。

2. 病理組織学的所見

P-18 株を接種したマウス全 15 匹中 IM 2 匹 (Nos. 12, 13)、IC 7 匹 (Nos. 17, 19-22, 24, 25) および MP 株を接種したマウス全 16 匹中 IM 2 匹 (Nos. 33, 34)、IC 2 匹 (Nos. 40, 41) の脊髄神経節細胞、脊髄神経細胞、延髄・中脳・海馬・大脳皮質・海馬神経細胞の細胞質内に大小の類円形好酸性封入体 (ネグリ小体) が散見された。特に IC 群マウスの大脳皮質神経細胞には多数認められた。

P-17 株および CVS 株を接種したマウスの神経細胞にはこれらのネグリ小体は観察されなかった。

IM 群において CVS 株あるいは MP 株を接種したマウスの一部 (No. 2 あるいは No. 33) には濃縮核および好酸性を増した細胞質を有する小脳プルキンエ細胞および大脳皮質錐体細胞がまれに観察されたが、その他の脊髄神経細胞や脳神経細胞に明らかな変化は認められなかった。いっぽう IC 群では CVS 株を接種したマウス (Nos. 4, 6, 8-10) で濃縮核および好酸性細胞質を有する小脳プルキンエ細胞、海馬錐体細胞、大脳基底核神経細胞および大脳皮質錐体細胞が多数認められた。MP 株接種マウス (Nos. 40, 41, 43, 44) の海馬錐体細胞と大脳皮質錐体細胞にも同様の変性像が観察された。

脊髄神経節においては、ウイルス株および接種経路にかかわらず共通して濃縮核と好酸性の増した空胞状細胞質を有する脊髄神経節細胞が多数認められた。

また CNS の全域にグリア細胞の瀰漫性増数とリンパ球主体の炎症細胞浸潤が認められた。一部のリンパ球様単核細胞には核濃縮が認められた。特に IM 群では P-18 株 (Nos. 12, 14, 15) および MP 株 (Nos. 33, 40) を接種したマウスで脊髄神経節を含む脊髄、脳幹に主座して囲管性細胞浸潤やグリア結節が散見されたが、その他の検体では軽微であった。いっぽう IC 群では、上述の細胞反応は P-18 株を接種した一部のマウス (Nos. 18, 23, 25) で重度であり、CVS 株 (Nos. 3-7, 10)、一部の MP 株接種マウス (Nos. 40, 41, 43, 44) では中等度、P-17 およびその他 P-18 株、MP 株接種マウスでは軽度であった。特に CVS 株および一部の P-18 株を接種したマウスでは大脳基底核、中脳、延髄に主座してグリア結節や囲管性細胞浸潤が多数認められた。上述の通り P-18 株と MP 株接種マウスにおいては、検体により変性した神経細胞の出現頻度および細胞反応の程度が一定しなかった。

3. 免疫組織化学的所見

a) 4 種の抗ウイルス抗体を用いた免疫組織化学的検索

本研究室の過去の結果より、最も染色