

Figure 2. Split decomposition phylogenetic network trees based on sequences of NSP- and SP-ORF of rubella genome. (a). Trees were constructed using the NSP- and SP-ORF sequences of nineteen strains of Clade 1 and 2. (b). Trees were constructed using the NSP- and SP-ORF sequences of thirteen strains of Clade 1. (c). Trees were constructed using the NSP-ORF sequences at first and second codon positions and third codon position of thirteen strains of Clade 1. All trees were constructed using split decomposition method as implemented in SplitTree 4.0 software package (built 2006Mar08, version 4.3). The genetic distances (substations in 100 nt) for all trees were calculated using the TN93 + Γ substitution model in program TREE-PUZZLE (version 5.2) with 50,000 puzzle steps. The value is indicated by the bar below each tree. The fit index (%) and the number of taxa are denoted on the below of each tree as wel

プロジェクト5：ウイルス

狂犬病ウイルス

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）

平成 20～22 年度 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
 狂犬病ウイルスに関する研究（海外の研究機関との連携）

研究分担者	井上 智	国立感染症研究所・獣医科学部
	朴 天鎬	北里大学・獣医病理学研究室
研究協力者	山田章雄	国立感染症研究所・獣医科学部
	黒田 誠	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター
	関塚剛史	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター
	Bordbaatar	国立感染症研究所・獣医科学部
	Bazartseren	
	野口 章	国立感染症研究所・獣医科学部
	宇田晶彦	国立感染症研究所・獣医科学部
	加来義浩	国立感染症研究所・獣医科学部
	飛梅 実	国立感染症研究所・感染病理部
	阿戸 学	国立感染症研究所・免疫部
	佐藤 豪	国立感染症研究所・獣医科学部
奥谷晶子	国立感染症研究所・獣医科学部	
海外研究 協力者	Beatriz Quiambao	Research Institute for Tropical Medicine (RITM)
	Daria Manalo	RITM
	Catalino Demetria	RITM
	Nguyen Thi Kieu Anh	The National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi (NIHE)
	Qing Tang	Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention (China CDC)
	Myung Guk Han	Department of Immunology and Pathology, National Institute of Health, Korea Centers for Disease Control and Prevention

研究要旨 本研究では、CDC 機能を持つアジアの国立研究機関等と連携した狂犬病ウイルスのラボラトリーネットワークの構築を強化するために分子疫学情報および診断技術等の共有化を行った。平成 20 年度に、フィリピンの熱帯医学研究所 (RITM)、ベトナムの国立衛生疫学研究所 (NIHE)、中国の疾病制御センター (China CDC) と共同研究および委託研究を開始した。平成 21 年度に、アジアの狂犬病国際会議等に参加し、RITM、NIHE、China CDC の共同研究者と共に他のアジア諸国の狂犬病専門家と連携強化を進める技法について意見交換と連携研究の打ち合わせを行った（（1）各国で流行している狂犬病ウイルス株の分子系統樹構築によるゲノムネットワークの基盤の構築、（2）LAMP 法（遺伝子検出）と dRIT 法（抗原検出）を連携機関で確立して共有、（3）実験感染マウスを利用して感染初期の免疫応答遺伝子の発現プロファイルをマイクロアレイで作

成（早期診断マーカーの検索）。平成 22 年度には RITM、NIHE、China CDC に NIH/KCDC の専門家を加えて連携ネットワークの拡大強化を行い、特に前年度までに確立した検査系等の成果・技術の評価と見直し、課題点の補強、連携研究の方向性等について国立感染症研究所（NIID）で実技を交えた議論と研修を行った。また、前年に作成したプロファイルを解析して感染マウスの脊髓で特異的に遺伝子の発現低下を示す遺伝子群（神経疾患関連遺伝、GABA 関連遺伝子、イオンチャンネル関連遺伝子）を見いだした。本研究（平成 20 年度～平成 22 年度）によりアジアにおける狂犬病ネットワークの基盤構築ができたと考える。今後、他のアジア諸国との相当機関によるネットワーク化の拡大と連携強化を進めるために RITM、NIHE、China CDC、NIH/KCDC と NIID の連携を強化してゲノム情報の共有化とデータベースの拡大やアジア関係諸国で標準化がなされていない中和抗体測定法等の試験法評価や共有化等をネットワークを活用して継続・推進していくことが望まれる。

A. 研究目的

世界では毎年 55,000 人が狂犬病で死亡しておりその 56%がアジア諸国の地方都市や辺境地での報告であり、狂犬病患者の 95%以上はイヌの咬傷が原因とされその 30～50%が 15 歳以下の子供である。また、毎年世界中で 2 億 5,000 万人が狂犬病の感染リスクに遭遇しておりその 800～1,000 万人が曝露後予防（PEP:post-exposure prophylaxis）を受けている。

平成 18 年（2006）の WHO 報告によると、インドで 19,000 人、中国で 3,209 人、パキスタンで 2,490 人、バングラディッシュで 2,000 人、ミャンマーで 1,100 人、フィリピンで 248 人、スリランカで 73 人、ネパールで 44 人、インドネシアで 40 人、ベトナムで 30 人、タイで 24 人が狂犬病を発症して死亡している。特に中国では減少傾向にあった患者数が 1998 年から急激に増加してここ数年の感染症による死亡者の 1 位、2 位を争う数となっている。

アジアにおける狂犬病対策の課題の一つに各国で流行している狂犬病ウイルスの実験室内診断システムが十分に確立しておらず、流行原因の分析に有効とされるウイルス株のゲノム情報を活用した分子疫学が十分に行えないことがあげられる。そこで、本研究では狂犬病ウイルスのラボラトリーネットワーク構築とその連携強化を目的と

して CDC 機能を持つアジアの国立研究機関等と共同研究及び委託研究を推進することを目的とした（図 1、2）。

B. 研究方法

アジアにおける狂犬病対策の課題の一つは、狂犬病の発生地域で迅速な実験室内診断が困難であることと流行ウイルス株と発生様式を分子疫学的に解析するためのゲノム情報の集積・共有ができていないことである。そこで、この課題を効果的に解決するために、委託研究を活用したラボラトリーネットワークによる連携研究を推進した（図 3）。

●平成 20 年度：アジアの CDC 機能を持つ国立の研究機関等と連携して、各地域で流行している狂犬病ウイルスの分離、分離ウイルスの遺伝子配列決定、これを利用した最新のゲノムデータベース構築を行った。

1) 狂犬病の疫学情報、ウイルス分離、ゲノム情報、診断システム等について連携協同研究を効果的に行うために、委託研究先であるフィリピンの熱帯医学研究所（RITM）、ベトナムの国立衛生疫学研究所（NIHE）、中国の疾病制御センター（China CDC）の狂犬病の狂病専門家とラボラトリーネットワーク

構築に関する研究打ち合わせを行った。

2) アジアで流行している狂犬病ウイルスの分子疫学をフルゲノムで解析可能とするプライマーを設計するために実験株と野外株についてフルゲノムシーケンスを試みた。

3) RITM と連携してフィリピンで分離されたウイルスの N 遺伝子について全長の塩基配列決定を行い、GenBank の登録データを利用して狂犬病ウイルス N 遺伝子の系統樹解析を試みた。

4) 狂犬病の疫学情報、ウイルス分離、ゲノム情報、診断システム等について連携協同研究を効果的に行うために、委託研究先であるフィリピンの熱帯医学研究所 (RITM)、ベトナムの国立衛生疫学研究所 (NIHE)、中国の疾病制御センター (China CDC) の分子疫学データベースの作成と共有を検討した。

●平成 21 年度：アジアの CDC 機能を持つ国立の研究機関等と連携して、流行地域に特異的なウイルス株とその発生様式を分子疫学的に解析するためのゲノム情報集積・共有に必要な迅速な実験室内診断を連携の研究課題とした。

1) 狂犬病の分子疫学ネットワーク構築の基盤となるゲノム情報共有に関する調査・研究：アジアの狂犬病専門家が集まる国際会議等に出席して連携強化に必要な調査と研究方法に関する意見交換、情報共有、共同研究の打ち合わせを行った。

2) ラボラトリーネットワーク構築に必要な実験室内診断系の開発・共有：狂犬病の分子疫学ネットワーク構築の基盤となるゲノム情報の収集と分析、実験室内で開発した診断法を狂犬病発生国の野外調査や実験

室内診断で試験的に使用して課題点の検討等を行った。

3) 新しい診断方法の開発に関する研究：狂犬病では発症するまで狂犬病ウイルスを検出できないため、発症後の生前診断は病原体の特定であり患者の救命には役立たない。そこで、発症前（感染後早期）に狂犬病診断を可能にする方法を確立するためにマイクロアレイを利用して狂犬病ウイルスに感染した宿主の遺伝子応答を調べた。

●平成 22 年度：ラボラトリーネットワークの確立と強化を推進するために、委託連携機関に韓国衛生研究所/疾病センター

(NIH/KCDC) を加えてネットワークの拡大強化を行った。特に、共同研究の推進と連携強化を図るために NIID と各連携機関

(RITM、NIHE、China CDC) とで確立した診断系等の研究成果や技術の評価、検証、課題点の補強、連携研究の方向性等について担当者間で実技を交えた検証および議論、研修を行った。また、新しいコンセプトの診断・治療法を開発する目的で、マウス感染モデルを利用した狂犬病の麻痺症状についてマイクロアレイによる解析マーカー遺伝子の検索を行った。

C. 研究結果

●平成 20 年度：委託研究を進めている RITM、NIHE、China CDC の狂犬病専門家とラボラトリーネットワーク構築に関する研究打ち合わせを行い、各国で流行している狂犬病の疫学情報および分離ウイルスのゲノム情報等の解析を可能とした。

平成 20 年 4 月 8 日 - 12 日：ベトナム、ハノイで NIHE の狂犬病専門家チームと情報

交換：近年のベトナムにおける狂犬病の流行拡大の現状と課題について情報交換を行った。

平成 20 年 4 月 22 日-27 日：ベトナム、ハロンベイで開催された「ASEAN plus Three ワークショップ」に参加：NIHE および中国 CDC の狂犬病専門家と本研究に関わる委託研究および研究協力について打ち合わせを行った。同時にアジア諸国参加国における狂犬病流行の現状把握と情報共有を行った。

平成 20 年 9 月 14 日-19 日：ベトナム、ハノイ NIHE の狂犬病担当リーダーである Dr. Kieu Anh 博士の研究室に短期滞在：流行拡大している狂犬病の診断系の確立とウイルス株の分子疫学的解析について協同研究の展開・方向性について打ち合わせを行った。

平成 20 年 11 月 30 日-12 月 6 日：フィリピン、マニラ RITM の狂犬病研究グループを訪問：狂犬病部門長 Dr. Quiambao と実験室内診断系の開発および流行ウイルス株の分子疫学解析法の確立に関する研究打ち合わせを行った。

補) フィリピン、ベトナム、中国における狂犬病の最近の疫学情報等については委託研究を行っているフィリピンの熱帯医学研究所 (RITM)、ベトナムの国立衛生疫学研究所 (NIHE)、中国の疾病制御センター (China CDC) の狂犬病研究部による委託研究報告を参照されたい。

●平成 21 年度：委託研究を進めている RITM、NIHE、China CDC の狂犬病専門家とラボラトリーネットワーク構築に関する研究打ち合わせを行い、各国で流行している狂犬病の疫学情報および分離ウイルスのゲノム情

報等の解析を可能とした (図 4)。

◇狂犬病の分子疫学ネットワーク構築の基盤となるゲノム情報共有に関する調査

平成 21 年(2009)4 月 29 日-30:RITM-TOHOKU research collaboration workshop, working towards rabies control in the Philippinesに参加：RITM・東北大学・NIID の狂犬病ラボが連携して、フィリピンの主たる地域狂犬病診断ラボと RITM 狂犬病診断ラボの連携ネットワーク構築を主題とした実験室内診断法の普及・啓発および流行狂犬病ウイルス株の収集・解析システムの確立を行った。

平成 21 年(2009)9 月 7 日-11 日:ASEAN Plus Three Workshop on Strengthening National Rabies Programmes and The Second Rabies in Asia Conferenceon に参加：会議の前半で、「ASEAN+3」の各国代表および WHO 専門家と狂犬病の現状報告、課題提起、参加国の連携による狂犬病対策の推進とこれに必要な研究開発について発表・議論を行ない報告案がまとめられた。最新の診断法・研究課題、アジアにおけるラボラトリーネットワーク強化の重要性・方法等とラボラトリーネットワーク構築に向けての研究協力等について意見交換が行われた。後半では、我が国の狂犬病対策の概要と現状(厚生労働省結核感染症課の資料・情報)について情報提供をすると共にアジア各国の狂犬病専門家と最新の研究情報等について意見交換を行った。本会議を利用して現在研究班で共同研究および委託研究を行っているフィリピン RITM、ベトナム NIHE、中国 CDC の各狂犬病専門家と現在の研究課題の進捗状況等について情報共有と意見交換も行った。

平成22年(2010)3月12日-21日:ベトナムの狂犬病流行地域(HaGiang省)におけるヒトと動物の発生実態調査と地域の診断ラボの現状調査を行った。

◇ラボラトリーネットワークを活用した実験室内診断系の開発・共有

狂犬病の分子疫学ネットワーク構築の基盤となるゲノム情報の収集と分析:連携機関であるRITMの狂犬病グループとRITMに研究拠点を置く東北大学の新興・再興感染症共同研究センターとの連携協力によってフィリピンで流行している狂犬病のG遺伝子について分子疫学データベースをRITMで構築した。本系統解析を利用してフィリピンで流行している狂犬病の地域性を分子疫学情報で識別可能であること、流行拡大しているウイルス株の推定とその地域性、散発的発生事例の輸入経路推定に活用できることが示唆された。また、同様にNIHE、China CDCの専門家とそれぞれの分子疫学データベースによる系統樹作成を行った(図4)。アジア諸国のCDC相当機関によるラボラトリーネットワークができればアジア地域における国境を越えた狂犬病の侵入・流行拡大について情報共有が可能となり公衆衛生領域での狂犬病対策に大変有益であると考えられた。

ラボラトリーネットワーク構築に必要な実験室内診断系の開発・共有

1) RT-LAMP法(図5):平成21年(2009)は、RITMとの連携によって平成20年(2008)に確立したRT-LAMP法を利用してフィリピンで流行しているウイルス株に対する検査系の感度と特異性について検証をおこなった。同様に、NIHEとの連携によりベトナムで流

行しているウイルス株を特異的に検出可能なRT-LAMP法も確立した。

2) dRIT法(図6):平成21年(2009)は、RITMとの連携によって平成20年(2008)に確立した「組換えN蛋白免疫によるmonospecific-polyclonal抗体(ms抗体)を利用したdRIT法」に代わり、簡便に標的抗原のエピトープのみに対する抗体産生が容易な「プラスミド免疫法」で作成した「ms抗体」を利用したdRIT法を確立した。プラスミド免疫で作成した「ms抗体」は組換え蛋白で得られた「ms抗体」と同様な染色性を示すことが示された。また、検査検体の固定を容易にするために冷アセトン(冷凍庫が必要)に代わり中性緩衝ホルマリン(室温で固定可能)の使用を可能にして野外検査をより簡易にした。

◇新しい診断方法の開発に関する研究

狂犬病を発症した宿主の組織特異的遺伝子応答の検索:狂犬病は発症するまで狂犬病ウイルスを検出できない。そこで、狂犬病ウイルスに感染した宿主の生体側の遺伝子応答をマイクロアレイによって解析を行い狂犬病ウイルスの感染を特徴付ける宿主遺伝子応答の検索を試みた。

狂犬病ウイルスCVS-11株を6週齢、雌、C57BL/6Jマウスの大腿三頭筋に接種して下腿麻痺が見られる7日後の脳と脊髄について組織病理学的検索、サイトカインアッセイ、マイクロアレイを行った(図7)。感染マウスではいずれも脊髄・脳の神経細胞中にウイルスの増殖が見られ、特定のサイトカインとケモカインの強い誘導が確認された。また、非感染マウスと比較して感染マ

ウスで有意 ($P < 0.001$) に変動していた遺伝子を検索したところ脳で 941 遺伝子、脊髄で 850 遺伝子、脳と脊髄に共通したものが 1258 遺伝子あった。各遺伝子群の生物学的な特徴を検討するため GO 解析 (機能分類) を進めており、今回の実験から狂犬病ウイルスが感染した脳ではサイトカインとケモカインに関連する免疫系の遺伝子群が有意に発現していることが示された。

●平成 22 年度: NIID と各連携機関 (RITM, NIHE, China CDC) とで確立した診断系等の研究成果や技術の評価、検証、課題点の補強、連携研究の方向性等について担当者間で実技を交えた検証および議論、研修を行い、新しいコンセプトの診断・治療法を開発する目的で、マウス感染モデルを利用した狂犬病の麻痺症状についてマイクロアレイによる解析マーカー遺伝子の検索を行った。

◇実技を交えた議論と研修

RITM (平成 22 年 (2010) 3 月 18 日-28 日): 狂犬病の迅速抗原検出系の確立に必要な手技および検出用抗体作成に必要な免疫用 plasmid の回収・増殖方法を習得。ウイルス感染マウス脳のスタンプスメアを利用して免疫組織化学を利用した迅速抗原検出系でウイルス抗原の検出を確認。

検討事項: 多くのアジア地域では診断用抗体の作成に必要な試薬・器具等は高価であり入手にも時間がかかる。コールドチェーンが未整備であり高温に安定な診断システムが望まれる。未調査地区があり野外診断ではできるだけ抗原性変異をカバーできる診断抗体の作成が望まれる。技術伝達をできるだけ容易にできる抗体産生手技が望まれる。以上の課題点を考慮して、タンパク

よりも精製と産生が容易で高温での保存性に課題の少ないプラスミドを免疫源にした診断用抗原作成法 (プラスミド免疫法) による免疫誘導法と得られたプラスミドで発現されたタンパクに特異的な抗体を用いた dRIT 法について技術共有を行った。

NIHE (平成 22 年 (2010) 8 月 22 日-9 月 11 日): 狂犬病の抗体検出系に使用する抗原の調整にウイルスを使用しないで安全 (非感染性) かつ安定して産生するために組み換え技術によるタンパク発現系を構築することにした。ベトナムでの流行株を使用した組み換え体作成はゲノム遺伝子の国外持ち出し規制が強いため実験株 (CVS-11 株) を利用してタンパク発現系の確立を行った。

検討事項: 発現系の確立を野外の流行株で行うことが希望である。帰国後、野外株で系を確立する必要がある。安定したタンパク発現が可能となれば ELISA の開発、さらには流行株に特異性の高い診断用抗体の作出が容易になると期待された。

China CDC (平成 22 年 (2010) 12 月 5 日-19 日): 狂犬病の中和抗体検出法には RFFIT 法がよく知られているが、現在の所アジア諸国では欧米のように検査系の検証や標準化等について定期的に評価し合う仕組みはない。したがって、実験室間での誤差を特定することが困難である。また、標準血清についても同様の課題がある。そこで、China CDC と NIID で行っている RFFIT 法の実験室間での比較検討と国際標準として用いている由来の異なる血清について評価を行った。

NIID の RFFIT 法

○利点: 細胞を前日に調整し、mono-layer で感染に使用することで、細胞のコンディションを一定条件で行える。観察部位 (視

野)をあらかじめ決めておくことで、観察者間でのカウント誤差を小さくできる。

○改善点：各ウエルについて、10視野観察し、陽性視野数をカウントする必要があるため、観察時間が長くなる。観察領域として、全面積に対し約30%しかカバーしないため、カウントの誤差が起こりうる。

ChinaCDCのRFFIT法

○利点：ウエルを低倍率(40倍)で観察することで、全体の感染状況を一瞬で把握できるので、観察時間が短い。細胞の播き込みが中和を行う当日なので、実際の中和試験を2日で完了できる。

改善点：感染率の判定は、感覚的なものなので観察者によりブレがある。判定基準が表現しにくいいため、一定の基準を把握するまでに熟練を要する

その他：NIIDの標準血清の値とWHO, Chinaの値に差がありそうである。今後、OIEの標準血清も考慮しNIIDの標準血清の値を再検討する必要がある。

◇新しい診断方法の開発に関する研究

マウス感染モデルのマイクロアレイによる解析：狂犬病の特徴である麻痺についてはその発症機序が十分に明らかとなっていない。狂犬病で見られる麻痺症状を特定できれば臨床診断における鑑別に有益となる。そこで、狂犬病ウイルスに感染して下肢に麻痺を示したマウスの脳と脊髄における遺伝子発現をマイクロアレイで解析した(図7)。狂犬病ウイルスCVS-11株を6週齢、雌、C57BL/6Jマウスの大腿三頭筋に接種して下腿麻痺が見られる7日後の脳と脊髄について検索を行ったところウイルス接種後に有

意に発現が変動していた遺伝子を調べたところ、「脳のみ」および「脳と脊髄共通」で変動していた遺伝子の多くは発現が上昇していたが、「脊髄のみ」で有意に変動していた遺伝子の多くは発現が低下していた(図8)。脊髄で発現が減少した遺伝子を検索したところ神経病的疾患・GABA関連遺伝子・イオンチャネル関連遺伝子が特定されたことからこれら神経疾患関連遺伝子の発現変動は麻痺症状と関連性があるのではないかと考えられた(図9)。現在、個々の遺伝子について感染した宿主で見られる麻痺との関連性及び因果関係について解析を進めている。

D. 考察

●平成20年度：GenBankに登録されている狂犬病ウイルスのゲノムデータは各研究者が設計したプライマーによって増幅された一部の塩基配列であることが多いため、登録データを共有しても統一的なゲノムの比較解析が十分に行えなかった。特に、アジア地域の狂犬病ウイルスについてのゲノム情報が少ないため、流行原因となっているウイルス株の分子疫学的な解析が十分に行えない課題が明らかとなった。

今後、狂犬病のラボラトリーネットワークの構築を行い狂犬病ラボ間でのゲノム情報と分子遺伝学的解析技術の共有が進むと、アジア各国で流行している狂犬病ウイルス変異株の遺伝子診断と分離株に対する分子疫学的比較解析が可能になる。また、我が国で懸念される輸入狂犬病の発生時には由来が不定のウイルスを正しく特定する必要があり、ラボラトリーネットワークで得たウイルスゲノムデータを利用した診断用プライマーの作成と変異ウイルス株の分子疫学的比較解析は発生事例における迅速診断

や輸入経路・感染源動物の特定に大変有効であると考えられた。

●平成 21 年度：アジアの狂犬病専門家が集まる国際会議等に参加して連携強化に必要な調査・研究法に関する意見交換と共同研究の打ち合わせを行いながら（1）狂犬病の分子疫学ネットワーク構築の基盤となるゲノム情報の収集と分析、（2）ラボラトリーネットワークの構築に必要な実験室内診断系の開発・共有、（3）新しい診断方法の開発に関する研究を行った。

国際会議等への参加によって、アジアにおける地域の狂犬病診断ラボと国の狂犬病診断ラボとの連携ネットワーク構築に関する現状把握と課題を明確にできた。このことは、今後アジアの研究機関と実験室内診断法の普及・啓発、流行ウイルス株の収集・解析システムの確立を連携して行う際に大変有益な知見になると考えられた。また、「ASEAN+3」会議ではアジア各国の狂犬病の現状把握、課題点の共有、必要な研究開発について議論を行うことができたが、今回はいずれの国もラボラトリーネットワーク強化を重要と考えておりネットワーク構築のための研究協力等について意見交換ができたことは大きな成果であった。さらに、本会議を利用して現在研究班で共同研究および委託研究を行っているフィリピン RITM、ベトナム NIHE、中国 CDC の各狂犬病専門家と現在の研究課題について進捗状況等の情報・意見交換が行えたことも大変有益であった。

アジアで流行している狂犬病の公開ゲノム情報は極めて限られておりアジア地域内の詳細な系統解析が十分に行えない状況ではあるが、本研究において系統解析を利用してフィリピンで流行している狂犬病の地域性を分子疫学情報で識別可能にしたこと、流行拡大しているウイルス株の特定と地域

性や輸入経路推定の可能性を示せたことは、アジア諸国の CDC 相当機関によるラボラトリーネットワークが構築できればアジア地域における国境を越えた狂犬病の侵入・流行拡大について情報共有が可能となり公衆衛生領域での狂犬病対策に大きな波及効果があるものと考えられた。

実験室内診断系の開発ではフィリピン RITM、ベトナム NIHE、中国 CDC との共同研究および委託研究によって野外での検査を想定した改良を遺伝子診断（RT-LAMP 法）と抗原診断（dRIT 法）について行った。RT-LAMP 法では野外検体を利用した感度と特異性の検証を行い、dRIT 法では検査に使用する抗体作成の簡易化と標本固定の簡便化を可能にした。また、新しい診断法の開発については、狂犬病ウイルスに感染した宿主の生体側の遺伝子応答をマイクロアレイによって解析を行うことで感染を特徴付ける宿主遺伝子応答について脳で 941 遺伝子、脊髄で 850 遺伝子、脳と脊髄に共通したもののついて 1258 遺伝子を抽出することができた。現在、発現が有意に高かった遺伝子群についてその機能部類を行い、感染した宿主で見られる病態との関連性及び因果関係について解析を行っている。

●平成 22 年度：ラボラトリーネットワークの確立と強化を推進するために、RITM、NIHE、China CDC の担当者と実技を交えた議論と研修を行う事により、共同研究の推進と連携強化に必要な研究成果・技術の評価と見直し、課題点の補強、連携研究の方向性等について明確にすることができた。また、新しいコンセプトの診断・治療法を開発する目的で、マウス感染モデルを利用した狂犬病の麻痺症状についてマイクロアレイによる解析マーカー遺伝子の検索を行い、感染マウスの脊髄で特異的に遺伝子の発現低下を示す遺伝子群（神経疾患関連遺伝、GABA

関連遺伝子、イオンチャネル関連遺伝子)を見いだすことができた。今後、構築されたラボラトリーネットワークを活用して実験室内で得られた知見を自然感染事例に応用、若しくは検証していきたい。

E. 結論

本研究では CDC 機能を持つアジアの国立研究機関等と狂犬病ウイルスのラボラトリーネットワークを構築してその連携強化を行った。

◆平成 20 年度：ラボラトリーネットワークの強化を目的にフィリピンの熱帯医学研究所 (RITM)、ベトナムの国立衛生疫学研究所 (NIHE)、中国の疾病制御センター (China CDC) と共同研究および委託研究を開始した。

◆平成 21 年度：アジアの狂犬病国際会議等に出席して RITM、NIHE、China CDC の共同研究者と共に他のアジア各国の狂犬病専門家と連携強化に必要な調査・研究法に関する意見交換と共同研究の打ち合わせを行い (1) フィリピン、ベトナム、中国で流行している狂犬病ウイルス株の分子疫学によるネットワークの基盤を構築、(2) ネットワーク構築に必要な実験室内診断系として LAMP 法 (遺伝子検出) と dRIT 法 (抗原検出) を確立して連携機関で共有、(3) 早期診断を可能とする感染初期の特徴的な免疫応答遺伝子の発現プロファイルをマウス感染モデルによりマイクロアレイで作成した。

◆平成 22 年度：RITM、NIHE、China CDC に NIH/KCDC を加えてネットワークの拡大強化を行い、特に前年度までに確立した成果・技術の評価と見直し、課題点の補強、連携研究の方向性等について国立感染症研究所 (NIID) において実技を交えた議論と研修を行った。また、感染マウスの脊髄で

特異的に遺伝子の発現低下を示す遺伝子群 (神経疾患関連遺伝、GABA 関連遺伝子、イオンチャネル関連遺伝子) を見いだした。

本研究 (平成 20 年度～平成 22 年度) により、アジアにおける狂犬病ネットワークの基盤が構築できた。今後、他のアジア諸国との相当機関によるネットワーク化の拡大と連携強化を進めるためには、NIID、RITM、NIHE、China CDC、NIH/KCDC を中心にゲノム情報の共有化やアジア関係諸国で標準化がなされていない中和抗体測定法等の試験法評価や共有化等を継続して推進していくことが望まれる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Kojima, D., Chun-Ho, P., Yusuke, S., Inoue, S., Noguchi, A. and Toshifumi, O. 2008. Pathology of the Spinal Cord of C57BL/6J Mice Infected with Rabies Virus (CVS-11 Strain). *J. Vet. Med. Sci.* 71:319-324.
- (2) Boldbaatar B., Inoue S., Sugiura N., Noguchi A., Orbina J. R. C., Demetria C., Miranda M. E., and Yamada A. (2009) Rapid detection of rabies virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Jpn. J. Infect. Dis.* 62:187-191.

- (3) Tobiume M., Sato Y., Katano H., Nakajima N., Tanaka K., Noguchi A., Inoue S., Hasegawa H., Iwasa Y., Tanaka J., Hayashi H., Yoshida S., Kurane I., and Sata T. (2009) Rabies virus dissemination in neural tissues of autopsy cases due to rabies imported into Japan from the Philippines: immunohistochemistry. *Pathol. Int.* 59:555-66.
- (4) Inoue S., Boldbaatar B., Sugiura N., Noguchi A., and Park C.-H. (2010) 10 Rabies. In: *Animal Viruses* (Maeda A., ed.). Transworld Research Network. p143-153.
- (5) Kojima D., Park C.-H., Tsujikawa S., Kohara K., Hatai H., Oyamada T., Noguchi A., and Inoue S. (2010) Lesions of the Central Nervous System Induced by Intracerebral Inoculation of BALB/c Mice with Rabies Virus (CVS-11). *J. Vet. Med. Sci.* 72: 1011-1016.
- (6) Bazartseren B., Inoue S., Tuya N., Dulam P., Batchuluun D., Sugiura N., Okutani A., Kaku Y., Noguchi A., Kotaki A., and Yamada A. (2010) Molecular Epidemiology of Rabies Virus in Mongolia, 2005-2008. *Jpn. J. Infect. Dis.* 63: 358-363.
- 4: Country reports on rabies surveillance, prevention and control, legislation and policies developed, IEC, multi-sectoral collaborations and community-based model in human and animals. Workshop on strengthening cooperation and sharing information on rabies among ASEAN plus three countries. The ASEAN plus three Emerging Infectious Diseases Programme. 23-25 April 2008, Ha Long, Vietnam.
- (2) Inoue, S. and Bazartseren, B. Rabies in Japan. Meeting Salon of The State Central Veterinary Laboratory (SCVL). 22 September 2008, Ulaanbaatar, Mongol.
- (3) Inoue, S. Rabies in Japan. Diagnostic skill and advanced methods (2nd technical conference). 26 September 2008, Ulaanbaatar, Mongol.
- (4) Orbina, J. R. C., Bajaro, J. D. P., Kamigaki, T., Noguchi, A., Inoue, S., Manalo, D. L., Demetria, C. S., De Guzman, A. S., Quiambao, B. P., Segubre-Mercado, E. M., Saito, M., Suzuki, A., Lupisan, S. P., Olveda, R. M., and Oshitani, H. Molecular epidemiology of rabies in the Philippines. Establishment of methods and preliminary results. The launching of the Tohoku University-RITM collaborating research center for emerging and

2 口頭発表

- (1) Inoue, S. Rabies in Japan. Session

- reemerging infectious diseases. RITM Auditorium. 20 October 2008, Manila, Philippines.
- (5) Kaku, Y., Noguchi, A., Okutani, A., Hotta, K., Bazartseren, B., Yamada, A. and Inoue, S.
Inhibition of rabies virus growth by intrabody against phosphoprotein in mouse neuroblastoma cells. 42nd joint working conferece on viral diseases and satellite meeting. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 26-28 May, 2008. Nagasaki, Japan.
- (6) Medina, P. B., Acosta, L. P., Jarilla, B., Demetria, C. S., Malbas, F., Inoue, S. and Manalo, D. L. Development of local rabies fluorescent isothiocyanate conjugate (FITC) for direct antigen detection by fluorescent microscopy (FAT) (Preliminary results). Asian DFederation of Laboratory Animal Science. 27-29 September, 2008. China.
- (7) Inoue S. Research for rabies prevention in Japan. RITM-TOHOKU research collaboration workshop: working towards rabies control in the Philippines. RITM training center, Alabang, Muntinlupa city, the Philippines. April 29-30, 2009.
- (1) Inoue, S. Rabies. Core Curriculum for Zoonosis Control 2009. Global COE (Center of Excellence) Program "Establishment of International Collaboration Centers for Zoonosis Control", Global COE program Hokkaido University, Hokkaido, 31 August, 2009.
- (2) Inoue, S. Rabies in Japan. Country report. ASEAN plus three workshop on strengthening national rabies programmes. 7-8 September 2009, Hanoi, Vietnam.
- (3) Inoue, S. Rabies in Japan. Rabies in North-Eastern Asia countries. The second rabies in Asia conference (RIACON 2009). 9-11 September 2009, Hanoi, Vietnam.
- (4) Inoue, S., Kojima, D., Boldbaatar, B., Sugiura, N., Noguchi, A. and Park C. -H. Histopathogenesis of paralytic rabies in mice following inoculation of the CVS-11 strain into the triceps surae muscle. 43rd joint working conferece on viral diseases of US-Japan Cooperative Medical Science Program. 20-22 July, 2009. Philadelphia, USA.
- (5) Orbina, J. R., Saito, M., Kamigaki, T., SDe Guzman, A., Inoue, S., Noguchi, A., Manalo, D., Demetria, C., Quiambao, B., Segubre-Mercado, E., Miranda, M. E., Suzuki, A., Lupisan, S., Olveda, R., and Oshitani H. Molecular Epidemiology of Rabies in the

- Philippines. International Joint Forum on Infectious Diseases. 16-17 September, 2009. Bangkok, Thailand.
- (6) 小嶋大亮、朴 天鎬、辻川真太郎、小原慶子、野口 章、小山田敏文、井上 智。狂犬病ウイルス (CVS-11) を脳内接種した BALB/c マウスの脳脊髄に関する病理学的研究。第 147 回日本獣医学会学術集会、2009、4 月、宇都宮市、茨城県
- (7) 野口 章、青木憲雄、佐藤 克、Boldbaatar Bazartseren、杉浦尚子、加来義浩、奥谷晶子、山田章雄、井上 智。飼育犬の狂犬病ワクチン接種による防御抗体産生能。第 147 回日本獣医学会学術集会、2009、4 月、宇都宮市、茨城県
- (8) Boldbaatar Bazartseren、Naoko Sugiura、Jun Ryan C. Orbina、Catalino Demetria、Akira Noguchi、Mary Elizabeth Miranda、Akio Yamada、Satoshi Inoue。Rapid detection of street rabies virus by RT-LAMP。第 147 回日本獣医学会学術集会、2009、4 月、宇都宮市、茨城県
- (9) 小嶋大亮、朴 天鎬、小原慶子、杉浦尚子、Boldbaatar Bazartseren、佐藤 豪、野口 章、畑井 仁、小山田敏文、井上 智。狂犬病ウイルス (CVS-11) を後肢筋肉内に接種した C57BL/6J およびヌードマウスの脊髄に関する比較病理学的研究。第 148 回日本獣医学会学術集会、2009、9 月、鳥取市、鳥取県
- (10) 杉浦尚子、Demetria Catalino、Boldbaatar Bazartseren、Manalo Daria、小嶋大亮、朴 天鎬、野口 章、加来義浩、奥谷晶子、佐藤 豪、山田章雄、Quiambao Beatriz、井上 智。迅速免疫組織化学とプラスミド免疫抗体を利用した狂犬病ウイルス簡易検査系の確立。第 148 回日本獣医学会学術集会、2009、9 月、鳥取市、鳥取県
- (11) 齊藤麻理子、井上 智、神垣太郎、杉浦直子、Boldbaatar Bazartseren、関塚剛史、黒田 誠、鈴木 陽、押谷 仁。フィリピンにおける狂犬病ウイルスの分子疫学的検討。第 50 回日本熱帯医学会大会、2009、10 月、宜野湾市、沖縄県
- (12) 齊藤麻理子、井上 智、神垣太郎、杉浦直子、Boldbaatar Bazartseren、関塚剛史、黒田 誠、鈴木 陽、押谷 仁。フィリピンにおける狂犬病ウイルスの分子疫学的検討。第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009、10 月、東京都
- (13) Sato G.、Inoue S.、Yamada A.、Ito F. -H.、Silva M. L. -C. -R、Itou T.、Sakai T.。The rabies viral RNA genomes selectively shifted in quasispecies population after serial passages of street virus in mouse. 44th joint working conferece on viral diseases. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 28-30 June, 2010. Sapporo, Japan.

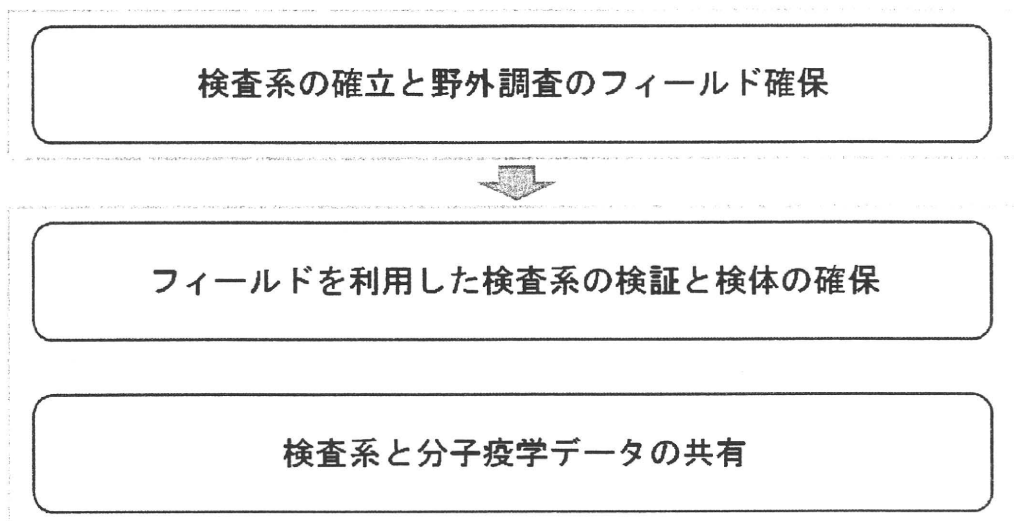
- (14) 杉浦尚子、宇田晶彦、小嶋大亮、野口章、奥谷晶子、加来義浩、朴天鎬、山田章雄、井上智。狂犬病ウイルス (CVS-11) の末梢感染により麻痺症状を示した C57BL/6J マウスの中枢神経組織における宿主遺伝子のマイクロアレイ解析。第 150 回日本獣医学会学術集会、2010、9 月、帯広畜産大学、北海道
- (15) 小嶋大亮、朴天鎬、石田誠、小原慶子、井上謙一、畑井仁、小山田敏文、野口章、井上智。Macaque 属サル¹の脳に関する病理学的研究。第 150 回日本獣医学会学術集会、2010、9 月、帯広畜産大学、北海道
- (16) 佐藤豪、井上智、Ito Fumio、Silva Maria、伊藤琢也、酒井健夫、山田章雄。マウスを用いた継代で見られたブラジル狂犬病ウイルスゲノムの選択。第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010、11 月、徳島県郷土文化会館、徳島県
- (17) 杉浦尚子、宇田晶彦、小嶋大亮、野口章、奥谷晶子、加来義浩、朴天鎬、山田章雄、井上智。狂犬病ウイルス (CVS-11 株) を末梢感染させた C57BL/6J マウスの脳脊髄における免疫関連遺伝子のマイクロアレイ解析。第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010、11 月、徳島県郷土文化会館、徳島県


H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. その他 なし

(図1)



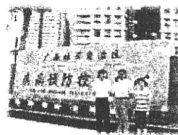

アジアの狂犬病ラボラトリーネットワークの連携強化




LPC/DV/S&ID 

(図2)

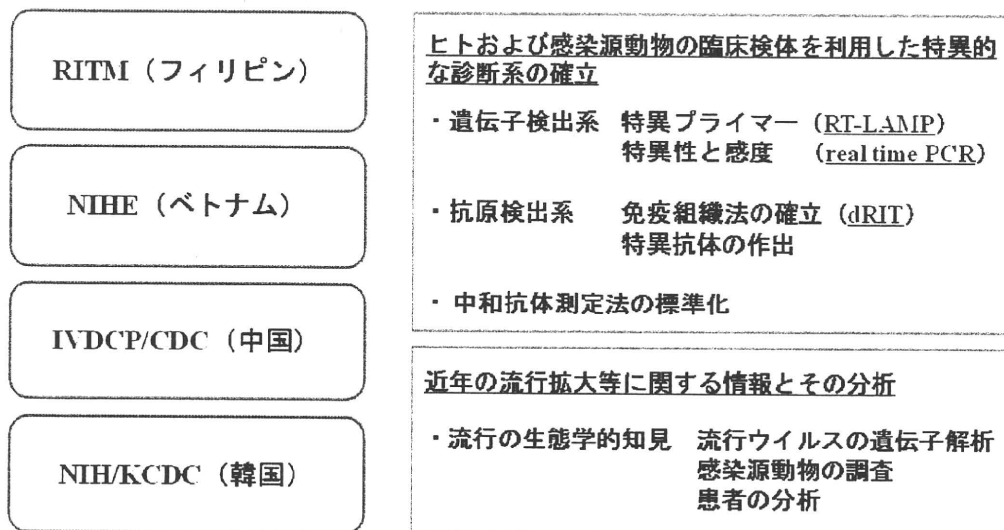
— 委託共同研究機関と主任研究者 —

・フィリピン:	RITM Dr. Beatriz P. Quiambao (Project Chief, Rabies group)	
・ベトナム:	NIHE Dr. Kieu Anh (Head of Rabies Laboratory, Dept. Virol.)	
・中国:	China CDC, IVDCP Dr. Qing Tang (Professor of Department of Encephalitis)	
・韓国:	NIH/KCDC Dr. Myung Guk Han (Deputy Scientific Director)	

LPC/DV/S&ID 

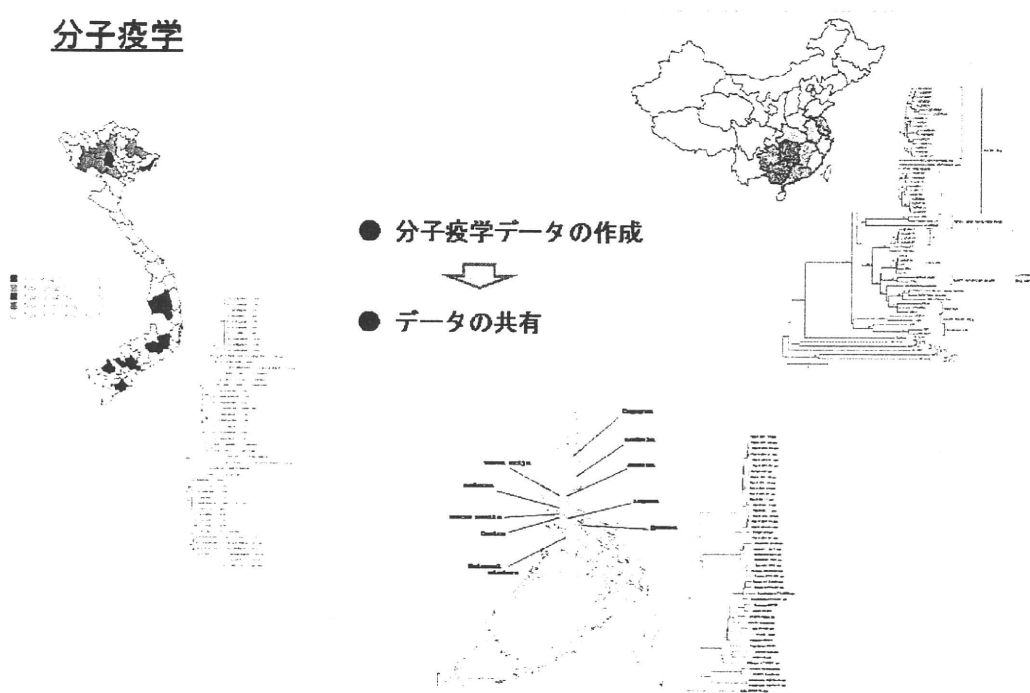
(図3)

ラボラトリーネットワークの強化における課題



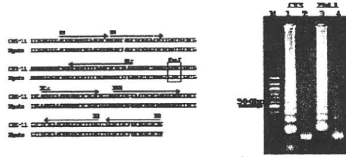
(図4)

分子疫学

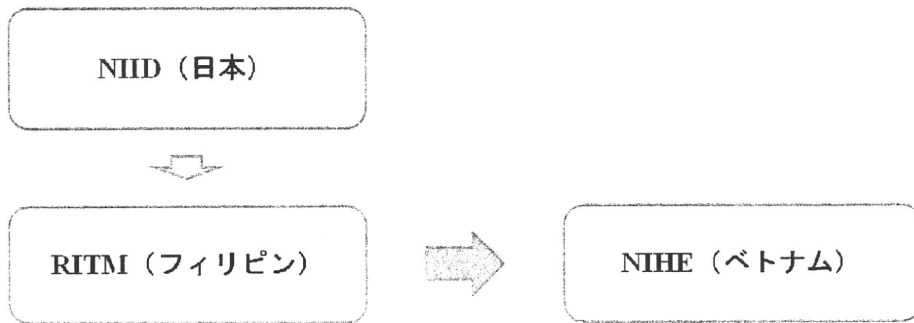


(図5)

RT-LAMP 法



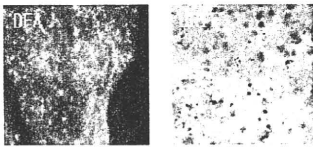
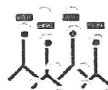
- 実験株を利用して系を検討
- ↓
- 野外株を利用して系を確立
- ↓
- 異なる野外株で系の検証



(図6)

dRIT 法

直接免疫組織検査法



固定方法: アセトン (-20°C 30分)



- 実験株を利用して系を確立
 - ・ 固定法: ホルマリン取り扱いと保存性の向上
 - ・ 抗体: プラスミド免疫抗体の使用



- 野外株を利用して系を検証

(図7)

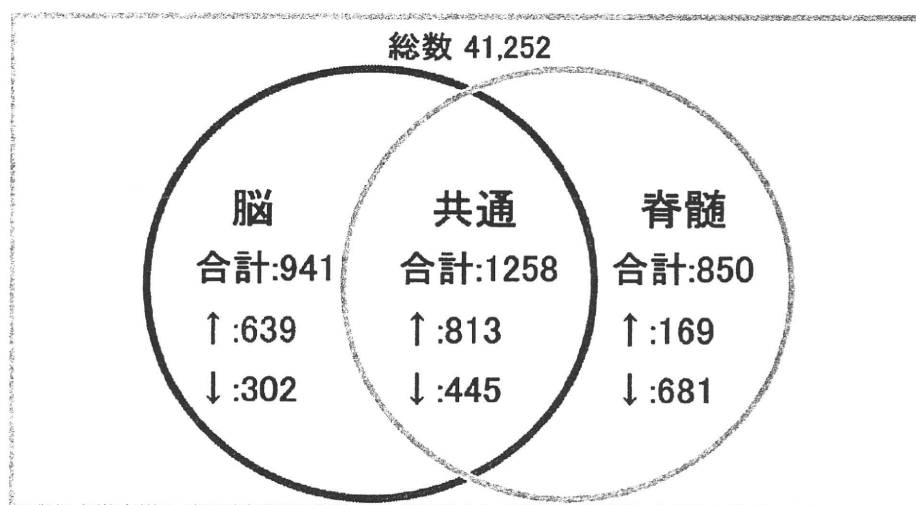
- ・ウイルス: 固定毒 (CVS-11 株)
- ・マウス (C57BL/6J)
 - ウイルス感染: 9匹 (マイクロアレイ: 6匹、病理: 3匹)
 - 陰性対照: 6匹



- ・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

(図8)

ウイルス接種後に有意に発現が変動していた遺伝子



(図9)

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
Gjb6	細胞結合	4.114564
Gjb6	細胞	3.8794105
Doc2a	神経、イオン	3.631662
Reln	神経	3.604266
Gamt	神経	
Fkbp1b	免疫	
Snap25	神経	
Lama2	細胞	
Ntng1	神経	
Gabra5	GABA関連	
Mapt	神経	2.292767
Kcra3	イオンチャネル	2.2665944
Ntng1	神経	2.244877
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	2.1208127
Hpca	神経、イオン	2.0772607
Syng1	神経	2.0608115
Gstm5	細胞	2.0096986

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