

B. 研究方法

狂犬病ウイルス固定毒の西ヶ原株 (10^6 FFU) ddY マウス(雌、6 週齢)の大腿部に筋肉内接種し、狂犬病ウイルス感染マウスモデルを作出した。同条件で、1 群 8 匹の感染マウスを作出し、その症状の推移を観察した。このとき、マウスの症状を「正常」、「体重減少」、「神経症状」および「死亡」の 4 段階に分類した。なお、前日体重から 5% の減少が認められた場合を「体重減少」と判定した。

上記の条件で作製した感染マウス的大脑・小脳および非神経系諸臓器(心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、鼠径リンパ節、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、大腿筋[接種部位])を接種後 1、2、3、4、5 および 6 日目に採取した。これらの組織切片に対して HE 染色を行い、組織学的病変の有無を検証した。また、抗狂犬病ウイルス N 蛋白質単クローン抗体による免疫染色(ABC 法)も実施し、ウイルス抗原の有無および分布を検討した。

さらに、諸臓器におけるウイルス遺伝子の存在を検討するため、接種後 1、3 および 5 日目のマウス(3 匹/群)から諸臓器を採取し、総 RNA を抽出後、ウイルス N 遺伝子を標的とした RT-PCR 法を実施した。

なお、本研究で行った動物実験は、岐阜大学動物実験委員会において承認された(動物実験承認番号:10086)。

C. 研究結果

本研究で用いた狂犬病ウイルス感染マウスは、平均 4.3 日の潜伏期を経て「体重減少」および「神経症状」を発症し、平均で接種後 5.8 日目に死亡

することが確認された(図 1)。

潜伏期である接種後 3 および 4 日目の感染マウスにおいて、その脾臓の白脾髄における濾胞壊死が認められた(データ未掲載)。また、発症後の接種後 5 日目以降では、大脳皮質・小脳における神経細胞の壊死(図 2)、ならびに血管性細胞浸潤が軽度に認められた(データ未掲載)。その他の臓器に明瞭な病変は確認されなかった(表 1)。

潜伏期である接種後 3 日目に大脳および小脳において少数のウイルス抗原陽性細胞が確認された(図 3)。一方、発症後の接種後 5 日目において、これらのウイルス抗原陽性細胞の増加と分布拡大が認められた。その他の臓器においては、いずれもウイルス抗原は検出されなかった(表 2)。

潜伏期である接種後 1 日目のマウスでは、いずれの臓器においてもウイルス遺伝子は検出されなかった(表 3)。また、同じく潜伏期の接種後 3 日目のマウスでは、ウイルス接種部位の大腿筋の他、全個体ではないものの神経系を中心にウイルス遺伝子が検出された。発症後の接種後 5 日目においては、全個体の神経系、肺および腎臓にウイルス遺伝子が確認された。また、一部の個体ながら、心臓や副腎にもウイルス遺伝子が存在していた。

D. 考察

潜伏期である接種後 3 日目のマウスの脳において少数のウイルス抗原陽性細胞が確認されたのに対し、発症後の 5 日目のマウスの脳では、より多くの抗原陽性細胞が広範囲に確認された(図 3)。すなわち、発症の有無と脳におけるウイルス

感染細胞数の間に関連性が認められた。中枢神経系における感染の拡大が狂犬病の病態形成に重要であることは既に報告されているものの (Dietzschold et al., J. Virol., 1985)、本研究では改めてその重要性を確認することができた。

発症時の接種後 5 日目の中枢神経系において、軽度な神経細胞の壊死 (図2) および血管性細胞浸潤が認められた。このような病理組織学的変化は、街上毒 (野外株) に感染した脳においても観察されることから、これらの病変が何らかの機序で狂犬病の病態に関与する可能性がある。しかし一方で、これらの脳病変は非常に軽微なため、狂犬病の多様な症状およびその死因の全てに関連するとは考えにくい。

本研究では、RT-PCR 法を用いて、接種後 5 日目の狂犬病発症マウスにおいて、肺、腎臓、心臓などの様々な臓器にウイルス遺伝子が存在することを明らかにした (表3)。潜伏期の個体では、このようなウイルスの分布は確認されていないことから、諸臓器へのウイルス分布の拡大が病態形成に関与する可能性が考えられた。興味深いことに、集中治療を受けた狂犬病の患者は、最終的に多臓器不全によって死亡することが報告されている (Jackson. Rabies 2nd edition, 2007)。上記のような諸臓器へのウイルス分布と多臓器不全の関連性は、今後、検討されるべき重要な課題と考えられる。

E. 結論

狂犬病を発症したマウスでは、中枢神経系における感染拡大や軽微な病変だけでなく、肺や腎臓などの諸臓器へのウイルスの分布拡大が確認された。このような変化が狂犬病の病態形成に関

与する可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ito, N, Mita, T, Shimizu, K, Ito, Y, Masatani, T, Nakagawa, K, Yamaoka, S, Abe, M, Okadera, K, Minamoto, N, Sugiyama, M. Amino Acid substitution at position 95 in rabies virus matrix protein affects viral pathogenicity. J Vet Med Sci 2011;73(10):1363-6.

2. 学会発表

- 1) Nakagawa, K., Ito, N., Masatani, T., Abe, M., Yamaoka, S., Sugiyama, M. Generation of rabies virus strain attenuated by multiple mechanisms. XV International Congress of Virology, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (2011, 9).
- 2) Yamaoka, S., Ito, N., Masatani, T., Abe, M., Nakagawa, K., Okadera, K., Sugiyama, M. All viral genes contribute to different pathogenicities of rabies virus Nishigahara and Ni-CE strains. XV International Congress of Virology, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (2011, 9).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

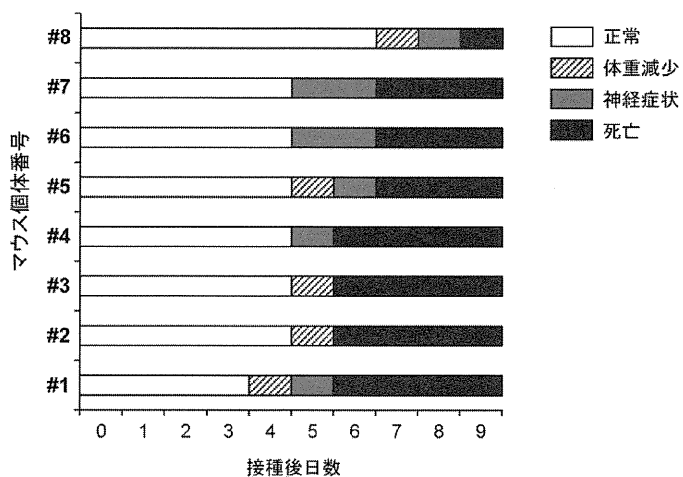


図1. 西ヶ原株感染マウスの症状の推移

非感染マウス

感染マウス

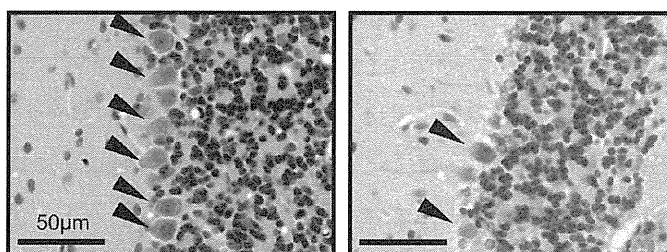


図2. 感染マウスの小脳における
プルキンエ細胞の壊死・脱落

矢頭は、プルキンエ細胞を示す。

感染マウス

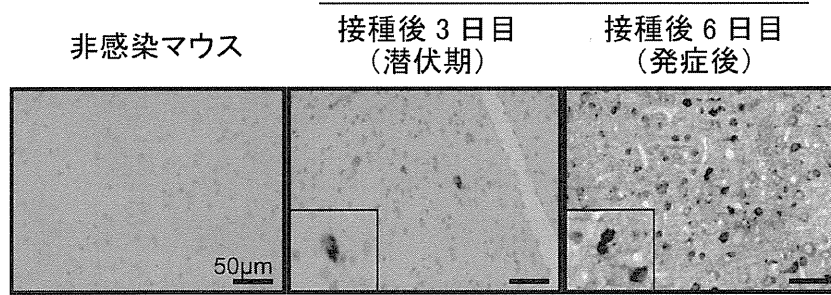


図 3. 感染マウス的大脑におけるウイルス抗原陽性細胞

表 1. 西ヶ原株接種マウスの全身臓器における病理組織学的検討結果

	接種後					
	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目
大脳	-	-	-	-	+	+
小脳	-	-	-	-	+	+
大腿筋	-	-	-	-	-	-
心臓	-	-	-	-	-	-
肺	-	-	-	-	-	-
脾臓	-	-	++	+	-	-
肝臓	-	-	-	-	-	-
腎臓	右	-	-	-	-	-
	左	-	-	-	-	-
副腎	右	-	-	-	-	-
	左	-	-	-	-	-
鼠径リンパ節	右	-	-	-	-	-
	左	-	-	-	-	-
胃	-	-	-	-	-	-
十二指腸	-	-	-	-	-	-
空腸	-	-	-	-	-	-
回腸	-	-	-	-	-	-
盲腸	-	-	-	-	-	-
結腸	-	-	-	-	-	-

接種後6日目まで1日1個体より全身臓器を採取し、それらの組織切片をHE染色した。
++: 高度の組織学的変化、+: 軽度の組織学的変化、-: 正常

表2. 西ヶ原株接種マウスの全身臓器におけるウイルス抗原の検出

		接種後					
		1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目
大脳		-	-	+	++	+++	+++
小脳		-	-	+	++	+++	+++
大腿筋		-	-	-	-	-	-
心臓		-	-	-	-	-	-
肺		-	-	-	-	-	-
脾臓		-	-	-	-	-	-
肝臓		-	-	-	-	-	-
腎臓	右	-	-	-	-	-	-
	左	-	-	-	-	-	-
副腎	右	-	-	-	-	-	-
	左	-	-	-	-	-	-
鼠径リンパ節	右	-	-	-	-	-	-
	左	-	-	-	-	-	-
胃		-	-	-	-	-	-
十二指腸		-	-	-	-	-	-
空腸		-	-	-	-	-	-
回腸		-	-	-	-	-	-
盲腸		-	-	-	-	-	-
結腸		-	-	-	-	-	-

接種後6日目まで1日1個体より全身臓器を採取し、それらの組織切片を免疫染色した。
 +++: 高度のウイルス抗原検出、++: 中程度のウイルス抗原検出
 +: 軽度のウイルス抗原検出、-: ウイルス抗原非検出

表3. 西ヶ原株接種マウスの全身臓器におけるウイルス遺伝子の検出

		接種後		
		1日目	3日目	5日目
		#1/#2/#3	#1/#2/#3	#1/#2/#3
発症		-/-/-	-/-/-	+/+/+
大脳		-/-/-	+/+/-	+/+/+
小脳		-/-/-	+/+/-	+/+/+
脊髄		-/-/-	+/+/+	+/+/+
坐骨神経		-/-/-	+/+/-	+/+/+
大腿筋		-/-/-	+/+/+	+/+/+
心臓		-/-/-	-/-/-	-/+/+
肺		-/-/-	-/-/-	+/+/+
肝臓		-/-/-	-/-/-	-/-/-
脾臓		-/-/-	-/-/-	-/-/-
腎臓	右	-/-/-	-/-/-	+/+/+
	左	-/-/-	-/-/-	+/+/+
副腎	右	-/-/-	-/-/-	+/-/-
	左	-/-/-	-/-/-	+/-/-
鼠径リンパ節	右	-/-/-	-/-/-	+/-/-
	左	-/-/-	-/-/-	+/-/-
胃		-/-/-	-/-/-	-/-/-
十二指腸		-/-/-	-/-/-	-/-/-
空腸		-/-/-	-/-/-	-/-/-
回腸		-/-/-	-/-/-	-/-/-
盲腸		-/-/-	-/-/-	-/-/-
結腸		-/-/-	-/-/-	-/-/-

接種後1、3および5日目に諸臓器を採取し(3匹/群)、RNA抽出およびRT-PCRを行い、ウイルス遺伝子を検出した。

#1、#2および#3は個体番号を示す。+:陽性、-:陰性

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業））
分担研究報告書

狂犬病の診断法確立に関する研究

狂犬病野外株接種マウスの中枢神経系に関する病理学的研究並びに
免疫組織化学的診断法の確立

研究分担者	井上 智	国立感染症研究所・獣医科学部・室長
研究協力者	朴 天鎬	北里大学・獣医病理学研究室
研究協力者	佐藤 豪	日本大学・獣医微生物学研究室

研究要旨 狂犬病発症例の CNS 病変は、主に神経細胞の細胞質内封入体（ネグリ小体）および軽度の非化膿性脳脊髄炎である。ネグリ小体の出現率は 40%～80%とされ、ウイルス株によっては形成されないことも知られている。狂犬病の確定診断には、蛍光抗体法が汎用されているが、狂犬病の多発地域は開発途上国であり、設備投資の必要ない確定診断法の開発が期待されている。

そこで本研究では、ブラジルの吸血コウモリ由来のヒツジ分離株（P-18 株）、ウシ分離株（P-17 株）および食虫コウモリ分離株（MP 株）をマウスの筋肉内および脳内に接種し、CNS および頭蓋末梢神経（PNS）における病理組織学的変化（ネグリ小体の出現有無）を株間で比較した。次に、ニワトリ卵黄抗体をこれらの野外株とサル組織に適用し、免疫組織化学的診断系の確立を試みた。

その結果、P-18 株を接種したマウスの CNS では、光学顕微鏡レベルにおいて脊髄神経節、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が、MP 株および P-17 では殆ど認められなかった。いっぽう、PNS ではいずれの株においても明瞭なネグリ小体は観察されなかった。免疫染色ではネグリ小体が存在しない頭蓋の PNS および分泌腺においても多数のウイルス抗原陽性像が観察された。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染色感度が高く、ウサギ P, N 抗体に比較して非特異性反応が少なかった。

以上の結果より、CNS および PNS におけるネグリ小体の有無、ウイルス抗原の分布は株間において大きく異なっていることが明らかとなった。また、頭蓋の唾液腺以外の分泌腺や末梢神経組織からウイルス抗原陽性像が多数観察されており、唾液腺以外の排泄門戸が存在する可能性が示唆された。さらに、ニワトリ卵黄抗体が高い染色感度を示し、非特異反応も少ないことから、今後自然発症例の病理診断に十分応用できると思われた。

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（表）

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。病理検索に供したマウスは、P-18 株 15 匹、P-17 株を IM 3 匹、MP 株を 16 匹である。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. Virus, inoculation routes, passage, incubation days and clinical signs

Nos.	virus	routes	passage	dilution	DPI	Signs	Infection (%)
1	P-18	IM	original	10 ⁻¹	7	-	
2	P-18	IM	original	10 ⁻¹	11	+	
3	P-18	IM	1	10 ⁻¹	14	dead	6/23 (26)
4	P-18	IM	5	10 ⁻¹	19	dead	
5	P-18	IM	2	10 ⁻¹	22	dead	
6	P-18	IM	1	10 ⁻¹	32	dead	
7	P-18	IC	original	10 ⁻¹	5	-	
8	P-18	IC	original	10 ⁻¹	8	+	
9	P-18	IC	original	10 ⁻¹	8	+	
10	P-18	IC	original	10 ⁻¹	8	dead	
11	P-18	IC	original	10 ⁻¹	8	dead	9/17 (52)
12	P-18	IC	original	10 ⁻¹	13	dead	
13	P-18	IC	1	10 ⁻²	15	dead	
14	P-18	IC	1	10 ⁻²	15	+	
15	P-18	IC	5	5MIC LD50	27	+	
16	P-17	IM	10	10 ⁻¹	12	dead	2/3 (66)
17	P-17	IM	10	10 ⁻¹	12	dead	
18	P-17	IC	1	10 ⁻¹	40	-	1/4 (25)

表1. Virus, inoculation routes, passage, incubation days and clinical signs

Nos.	virus	routes	passage	dilution	DPI	Signs	Infection (%)
19	MP	IM	1	10 ⁻¹	7	dead	
20	MP	IM	1	10 ⁻¹	7	dead	
21	MP	IM	1	10 ⁻¹	7	-	
22	MP	IM	2	10 ⁻¹	11	+	8/24 (33)
23	MP	IM	2	10 ⁻¹	12	+	
24	MP	IM	1	10 ⁻¹	14	+	
25	MP	IM	1	10 ⁻¹	53	-	
26	MP	IM	10	10 ⁻¹	54	-	
27	MP	IC	1	10 ⁻¹	5	-	
28	MP	IC	1	10 ⁻¹	6	+	
29	MP	IC	1	10 ⁻¹	6	+	
30	MP	IC	10	10 ⁻¹	7	dead	8/24 (33)
31	MP	IC	1	10 ⁻¹	8	dead	
32	MP	IC	1	10 ⁻¹	8	dead	
33	MP	IC	10	5MIC LD50	8	dead	
34	MP	IC	10	5MIC LD50	8	+	

3. 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-biotin peroxidase 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% トリプシンで抗原性の賦活化し、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髓を取り出し、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. 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、IC 7 匹および MP 株を接種したマウス全 16 匹中 IM 2 匹、IC 2 匹の脊髓神経節細胞、脊髓神経細胞、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 MP 株を接種したマウスの一部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、その他の脊髓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。

脊髓神経節においては、ウイルス株お

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 株および MP 株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で重度であった。

頭蓋の PNS では、P-18 株接種マウスにおいて最も検出頻度が高く、嗅神経、視神経、鼻粘膜上皮、鼻腺、小唾液腺、味蕾、三叉神経、下顎腺から抗原陽性像が検出された。なお、いずれの株においても涙腺からウイルス抗原は検出されなかった。

2. 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

接種経路に関わらず、4 種類の抗体全てに対してマウスおよびサル の CNS で十分な染色性が認められた。

その中でニワトリ P 抗体は非特異反応が少なかった。ウイルス抗原は脊髄神経節を含む脊髄、延髄、中脳、小脳、大脳

皮質、大脳基底核領域の神経細胞の細胞質内で瀰漫性に認められた。P-18 株および MP 株接種マウスの神経細胞では、概ねネグリ小体に一致して中型～大型のスポット状に染色されるのに対し、CVS 株および P-17 株接種マウスの神経細胞では細顆粒状～小型のスポット状の陽性像が観察された。

また各蛋白抗体の染色性は、P 抗体を用いた場合では、感染細胞の細胞質のみならず、軸索、樹状突起において大小のスポット状に高率に観察されたのに対し、N 抗体は主に神経細胞の細胞質にスポット状に検出され、軸索や樹状突起では P 抗体に比べわずかであった。

【付図および表の説明】

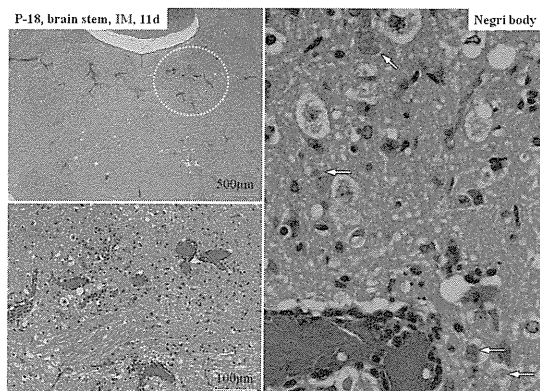


図1. P-18株感染マウスの脳幹。IM, 接種11日。HE染色。血管周囲にリンパ球浸潤が認められる。細胞質にはネグリ小体(矢印)が観察される。

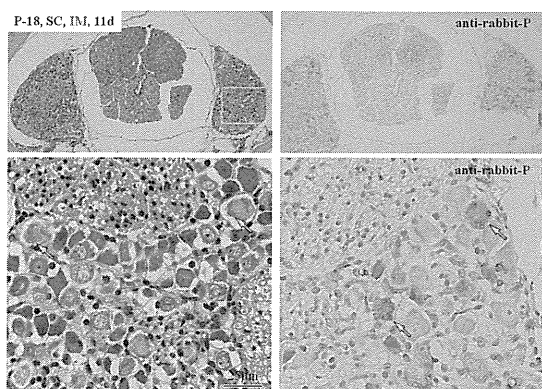


図2. P-18株感染マウスの腰髄。IM, 接種11日。HE染色(左)、IHC(右)。脊髄神経節神経細胞の細胞質にネグリ小体が多数観察される(矢印)。

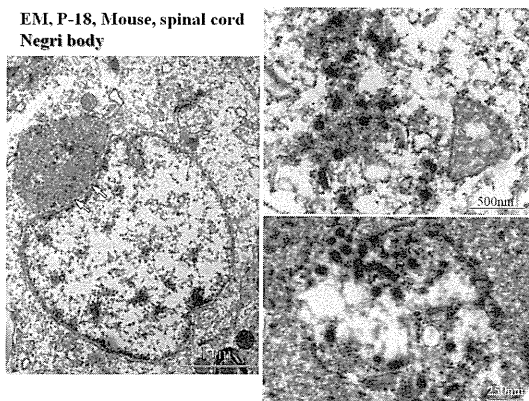


図3. P-18株感染マウスの脊髄。IM, 接種11日。電顕。脊髄神経細胞の細胞質にウイルス粒子およびネグリ小体(矢印)が観察される。

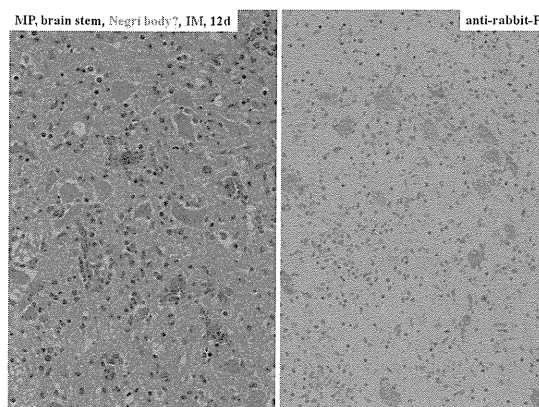


図4. MP株感染マウスの脳幹。IM, 接種12日。HE染色(左)、IHC(右)。軽度のリンパ球浸潤(左)とウイルス抗原陽性像(右)が認められる。

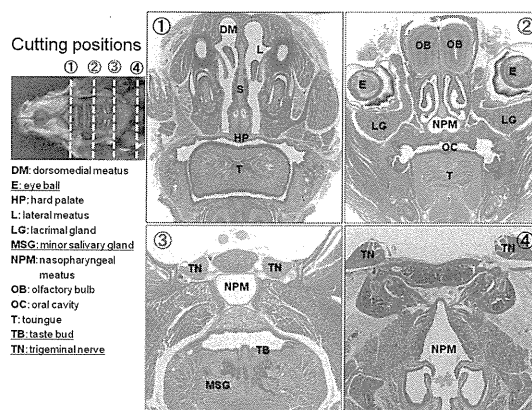


図5. マウス頭蓋の断面像と病理検索部位。

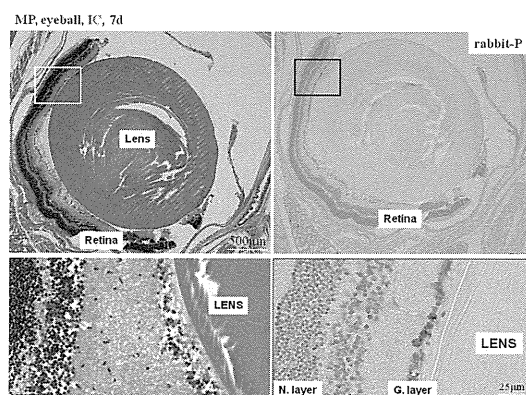


図6. MP株感染マウスの眼球。IC, 接種7日。HE染色(左)、IHC(右)。視神経細胞層にグリア細胞の増生がみられる。(左)視神経細胞の細胞質に多数のウイルス抗原陽性像(右)が認められる。

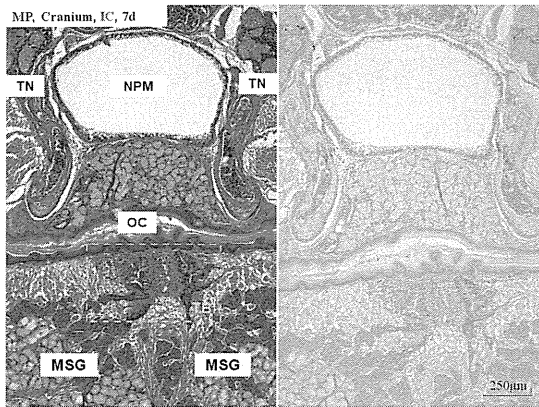


図 7. MP 株感染マウスの頭蓋および舌。IC, 接種 7 日。HE 染色 (左)、IHC (右)。舌味蕾 (点線) に多数のウイルス抗原陽性像 (右) が認められる。

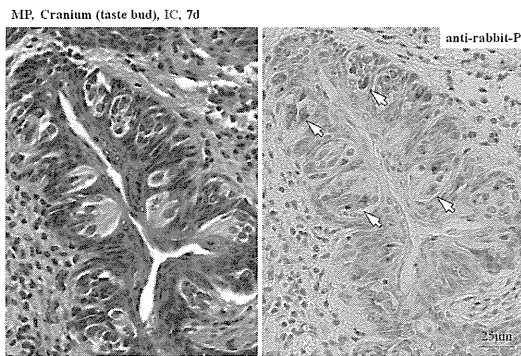


図 8. MP 株感染マウスの舌味蕾の拡大像。IC, 接種 7 日。HE 染色 (左)、IHC (右)。舌味蕾に多数のウイルス抗原陽性像 (右、矢印) が認められる。

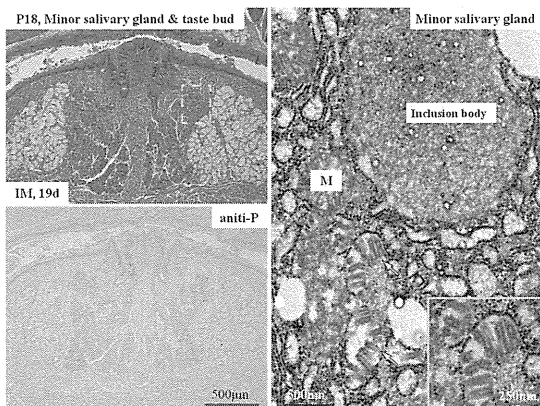


図 9. P-18 株感染マウスの舌唾液腺。IM, 接種 19 日。HE 染色 (左上)、IHC (左下)、電顕 (右)。舌味蕾及び舌唾液腺 (漿液腺) にウイルス抗原陽性像 (点線) が観察される。電顕では、漿液腺上皮の細胞質内に封入体とウイルス粒子 (矢印および挿入図) が観察される。

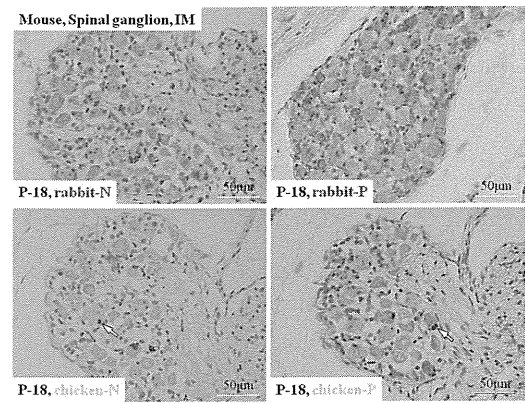


図 10. P-18 株感染マウスの脊髄神経節を用いたウサギ P, N 抗体 (上段) とニワトリ P, N 抗体 (下段) の免疫染色感度の比較。ニワトリ P, N 抗体では非特異反応がなく、より鮮明に染色されている。

表 2. Summary of pathological findings in the CNS of virus infected mice

Pathological findings	CVS	P-18	P-17	MP
Negri body	-	++	-	-
Peripheral tropism of virus	-	++	-	+
Apoptosis of neurons	++	-	-	+
Apoptosis of inflammatory cells	+	+	+	+
Glial and lymphocytes proliferation	++	++	+	++

表 2. 中枢神経系病変の株間比較。P-18 株感染マウスにおいてネグリ小体の検出頻度が高い。炎症反応は程度の差はあるものの、いずれの感染マウスにおいても認められる。トリ P, N 抗体では非特異反応がなく、より鮮明に染色されている。

表 3. Presence of virus antigens in neuron and non-neuron in the PNS (cranium) of infected mice

Virus	ON	OPN	TN	NG	SMG	TB	NM	MSG	LG
CVS-11	+	+	+	-	-	-	-	-	-
CVS-34	+	+	+	-	-	-	-	-	-
P17	+	+	+	+	+	-	-	-	-
MP	+	+	+	+	+	+	+	-	-
P18	+	+	+	+	+	+	+	+	-

LG: Lacrimal gland, ON: Olfactory nerve, OPN: Optic nerve, NM: Nasal mucosa, NG: Nasal gland, MSG: minor salivary gland, TB: Taste bud, TN: Trigeminal nerve, SMG: submandibular gland

表 3. 頭蓋末梢組織におけるウイルス抗原陽性細胞の株間比較。P-18>MP>P-17 株の順に検出頻度が高い。いっぽう、固定毒 (CVS) では末梢組織への親和性が低い。

D. 考察

本研究では、ブラジルの吸血コウモリ、食虫コウモリ由来の狂犬病野外株をマウスに接種し、組織病変の違いを比較検討した。また、マウスとサルの中樞神経系を用いて、ニワトリ卵黄抗体の染色性についてウサギ血清と比較検討した。その結果、吸血コウモリ由来ウシ分離株、ヒツジ分離株および食虫コウモリ由来野外株間では、マウスに形成される組織病変が異なることが明らかになった。さらに、ニワトリ卵黄抗体をホルマリン固定後のパラフィンブロックに適用した場合、ウサギ抗体同様の染色感度が得られており、本抗体を用いた免疫組織化学的診断法の有用性が再確認された。

CVS 株をマウスやサルに接種した場合、接種経路に関係なく CNS のほぼ全域から検出される。しかし本実験では、P-17 株接種マウスの IC 群で、海馬錐体細胞、大脳において陽性細胞数は少なく、P-18 株および P-17 株接種マウスの IC 群においては小脳および小脳脚に陽性細胞が少ない傾向を示した。自然発生例のイヌでは、大脳や脳幹に比較して小脳では抗原陽性細胞が少ない。本実験に用いた翼手目由来の狂犬病ウイルスの体内移行様式や病原性については不明な点が多いが、動物種によって CNS におけるウイルス抗原の局在が多様であることを考慮すると、従来の海馬、脳幹、小脳を中心とした CNS の検索部位を再評価する必要がある

あると思われる。

CVS 株をマウスやサルに接種した場合、自然発症例とは異なり光学顕微鏡レベルにおいてネグリ小体を見つけることは困難である。本研究では P-18 株および MP 株接種マウスにおいて、神経細胞の細胞質内にネグリ小体が観察された。自然発生例におけるネグリ小体の検出率は約 40～80%であり、株によっては観察されないこともある。本実験では、P-18 株を接種したマウスで 60% (9/15 例)、MP 株接種マウスでは 25% (4/16 例) の検出率であり、また P-17 株を接種したマウスの神経細胞では観察されなかった。P-18 株および P-17 株は同じく吸血コウモリ由来の分離株であるが、ネグリ小体の検出率に明らかな違いがみられることは興味深い所見である。その理由は不明であるが、吸血コウモリ由来のウイルスが次の宿主の体内で何回も継代される間にウイルスの増殖性や宿主に対する病原性が変化した可能性は否定できない。

頭蓋の PNS では、P-18 株接種マウスにおいて最も検出頻度が高く、嗅神経、視神経、鼻粘膜上皮、鼻腺、小唾液腺、味蕾、三叉神経、下顎腺から抗原陽性像が検出されたが、脳・脊髄と異なり明瞭なネグリ小体は観察されなかった（三叉神経節を除く）。また、いずれの株においても涙腺からウイルス抗原陽性像は検出されなかった。このことから、CNS と頭

蓋 PNS との間では狂犬病ウイルスの複製・増殖様式が異なる可能性が示唆された。

ニワトリ P および N 抗体を用いた免疫組織化学的検索では、ウサギ抗体とほぼ同様の染色感度を得られた。特に、ニワトリ P 抗体はその他の抗体に比較して非特異反応がほとんど見られず、今後の病理診断に有効と思われた。抗体陽性像は P-18 株および MP 株を接種した一部のマウスでは、ネグリ小体の中～大型のスポット状を呈したのに対し、P-17 株および CVS 株を接種したマウスでは比較的小型なスポット状の陽性像を示した。一般的にウイルス抗原の組織学的検出には、凍結生材料かホルマリン固定パラフィン材料を利用している。凍結生材料と比較してホルマリン固定パラフィン材料は感染性がなく、長期保存が可能であり、特別な装置を必要としないため安全かつ安価で確定診断が可能である。本実験に用いたウサギ抗体を 1.4g 作製するためには、成ウサギ 1 羽が必要なのに対し、ニワトリ抗体は卵 14 個で十分である。従って、ニワトリ抗体を用いた免疫組織化学的診断は安全で安価な確定診断が期待できる。今後は今回確立した免疫染色の手法を自然感染例に応用し、各種抗体の染色感度について更に比較検討すべきであると思われる。

E. 結論

本研究では、まず、吸血コウモリ由来のヒツジ分離株 (P-18 株)、ウシ分離株 (P-17 株) および食虫コウモリ分離株 (MP 株) をマウスの筋肉内および脳内に接種し、CNS および PNS における病理組織学的変化を株間で比較した。次に、ニワトリ卵黄抗体をこれらの野外株とサル組織に適用し、免疫組織化学的診断系の確立を試みた。

その結果、P-18 株と MP 株を接種したマウスの CNS では、光学顕微鏡レベルにおいて脊髄神経節、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が、P-17 ではいずれの部位においても認められなかった。いっぽう、頭蓋の PNS では、P-18 株接種マウスにおいて最も検出頻度が高く、嗅神経、視神経、鼻粘膜上皮、鼻腺、小唾液腺、味蕾、三叉神経、下顎腺から抗原陽性像が検出されたが、脳・脊髄と異なり明瞭なネグリ小体は観察されなかった(三叉神経節を除く)。このことから、CNS と PNS との間では狂犬病ウイルスの複製・増殖様式が異なる可能性が示唆された。また、唾液腺以外から感染性のウイルスが体外に排泄される可能性が考えられた。

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認められた。従って、今後自然発症例においても十分応用できると思われた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

Kaku Y., Noguchi A., Hotta K., Yamada A., Inoue S. (2011) Inhibition of rabies virus propagation in mouse neuroblastoma cells by an intrabody against the viral phosphoprotein. *Antiviral Res.* 91:64-71.

Nguyen A.K.T., Nguyen vinh D., Ngo G.C., Nguyen T.T., Inoue S., Yamada A., K.X.D., Nguyen van D., Phan T.X., Pham B.Q., Nguyen H.T. and Nguyen H.T.H. (2011) Molecular epidemiology of rabies virus in Vietnam (2006-2009). *Jpn.J.Infect.Dis.* 64:391-396.

Sugiura N., Uda A., Inoue S., Kojima D., Hamamoto N., Kaku Y., Okutani A., Noguchi A., Park C.-H. and Yamada A. (2011) Gene Expression Analysis of Host Innate Immune Responses in the Central Nervous System following Lethal CVS-11 Infection in mice. *Jpn.J.Infect.Dis.* 64:463-472.

Yamada K., Park C.-H., Noguchi K., Kojima D., Kubo T., Komiya N., Matsumoto T., Mitsui M.T., Ahmed K., Morimoto K., Inoue S., Nishizono A. (2012) Serial passage of a street rabies virus in mouse neuroblastoma cells resulted in attenuation: potential role of the additional N-glycosylation of a viral glycoprotein in the reduced pathogenicity of street rabies virus. *Virus Res.*(accepted)

2 口頭発表

Neuropathological studies of the mouse experimentally inoculated three bat rabies viruses isolated in Brazil Park CH, Ishida M, Kojima D, Sato G, Ito FH, Inoue S. OIE Global Conference on Rabies Control, p58, Incheon, Korea 2011.9.7-9.9

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

狂犬病の病原性と治療法開発に関する研究

狂犬病ウイルス街上毒の弱毒化機構に関する研究

研究分担者： 西園 晃 大分大学医学部微生物学講座 教授

研究要旨

狂犬病は狂犬病ウイルスの感染によって引き起こされる脳炎で、ヒトを含む全ての哺乳類が感受性を持つ人獣共通感染症であり、今なお多くの発展途上国において公衆衛生上重大な問題となっている。発症後の致死率はほぼ100%で、発症後の有効な治療法は未だ確立されていない。強毒株と弱毒株の性状比較をすることで、その弱毒化機構を解明することは治療法の確立のために有効であると考えられる。さらに本来の狂犬病を動物モデルで再現するためには、野外流行株である街上毒を使用する必要がある。昨年度、我々は街上毒1088株をマウス神経芽細胞腫由来NA細胞で連続継代することで、成熟マウスにおいて脳内接種での病原性は有しているが、末梢感染(右後肢筋肉内接種)では病原性が著しく減弱した1088-N30株を確立した。そこで本研究ではその弱毒化機構の一端を解明する目的で、1088株と1088-N30株の間で、末梢感染時の成熟マウスにおける中和抗体誘導能と脳内におけるウイルス抗原の拡がりを比較した。マウス脳内におけるウイルス抗原の拡がりは、1088-N30株感染では大脳皮質や視床の一部に限局していたが、1088株感染では感染後8日目以降には脳全体に分布していた。一方、血中中和抗体は1088株感染に比べて、1088-N30株では顕著に強く誘導された。以上のことから、1088-N30株の末梢感染時における病原性の減弱は、脳内に侵入する過程で宿主免疫反応を強く誘導し、その結果脳内でのウイルスの拡がりが抑制されるためであることが示唆された。

A. 研究目的

狂犬病はラブドウイルス科リッサウイルス属の狂犬病ウイルスによって引き起こされる致死性のウイルス脳炎である。全世界で推定年間約55,000人が狂犬病によって亡くなっている。臨床症状が現れると有効な治療法はなく致死率はほぼ100%で、現在のところ曝露後ワクチンを繰り返し接種することが狂犬病の疑われる動物に咬まれた場合の唯一の発症予防手段である。

昨年度、我々は米国で1970年代にウッドチャックから分離された街上毒(野外流行株)1088株をマウス神経芽細胞腫由来NA細胞で計30代継代し、NA細胞馴化株1088-N30を確立した。1088-N30株には7塩基の変異と3つのアミノ酸変異が認められた。2つのアミノ酸変異はGタンパク質に認められ(P144L および R196S)、このうちR196S変異はN型糖鎖付加の追加をもたらす。興味深いことに、Gタンパク質へのN型

糖鎖付加の追加は固定毒(実験室株)でも認められる。1088 株は成熟マウスに脳内接種、右後肢筋肉内接種(末梢感染)のいずれの接種法でも成熟マウスに致死感染を起こす。一方、1088-N30 株は脳内接種では致死感染を起こすが、末梢感染ではマウスは発症してもそのほとんどが耐過する。

そこで、本研究ではそこで本研究ではその弱毒化機構の一端を解明する目的で、1088 株と 1088-N30 株の間で、末梢感染時の成熟マウスにおける中和抗体誘導能と脳内におけるウイルス抗原の拡がりを比較した。

B. 研究方法

ウイルス株

1970 年代に北米でウッドチャックより分離され乳飲みマウス脳で 2 代継代された 1088 株とそれをマウス神経芽細胞腫来 NA 細胞で 30 代継代した 1088-N30 株を用いた。

マウスへのウイルス接種

6 週齢の雌 ddY マウスの右後肢筋肉内に各ウイルスを接種 (10^6 FFU/0.05 ml/mouse)し、毎日、体重の測定と症状の観察を行った。接種後 5、8 および 11 日後に各群 5 匹ずつ安楽殺し、臓器の採材、採血・血清分離を行った。マウス接種試験は大分大学の動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

迅速蛍光フォーカス阻止試験(RFFIT)による抗狂犬病ウイルス中和抗体価(VNA)の測定

96 ウェルプレートにて、2 倍階段希釈されたマウス血清と等量の狂犬病ウイルス CVS 株 (100 TCID₅₀)とを混合し、37°C で 90 分間反応させた。次に BHK-21 細胞 (1×10^5 cell/well) をそれぞれのウェルに加え 24 時間培養した。細胞を固定後、FITC-RABV N

MAb (FUJIREBIO) で染色し、蛍光顕微鏡下で一視野における感染細胞の有無を観察した。中和力価 (international unit: IU) の決定のため、WHO の国際標準品と比較し、Spearman-Kärber 法により算出した。

免疫組織化学的試験

採材した臓器はホルマリンで固定後、切片を作製し、抗狂犬病ウイルス P タンパク質抗体で染色した。この試験は朴天鎬博士(北里大学獣医病理学研究室)との共同研究により行われた。

C. 研究結果

感染マウスの症状の推移

図 1 に示すように、5 日目ではいずれのウイルス感染でもほとんどのマウスは症状を示さなかった。1088-N30 株感染マウスでは、1088 株感染と比べて体重減少や接種側の後肢の麻痺が早く認められたが、いずれのマウスも瀕死には至らなかった。一方、1088 株感染マウスでは重度に病態が進行し、11 日目では全てが瀕死状態となった。

脳内でのウイルス抗原の拡がり

感染 5 日目に、1088 株感染マウスおよび 1088-N30 株感染マウスの大脳皮質においてウイルス抗原が検出された(図 2)。感染 8・11 日目において、1088 株感染マウスではウイルス抗原が脳全体に拡がっていたが、1088-N30 株感染マウスでは大脳皮質(一部は視床まで)に限局していた。

血中中和抗体価の比較

図 3 に示すように、感染 5 日目において、1088 株感染マウスに比べて、1088-N30 株感染マウスでは中和抗体が有意に高く誘導された。この傾向は、感染 8 および 11 日目で

も認められた。

D. 考察

狂犬病の治療法確立のためには本来の狂犬病を再現させた動物モデルが必須である。昨年度、街上毒 1088 株をマウスに感染させて狂犬病モデルとしての評価を行ったところ、末梢感染において低用量でも致死感染が成立し、潜伏期間および発症から死亡までの期間も長く、神経症状の進行も緩徐で、さらに低用量の接種では潜伏期間の延長とバラツキが認められ、個体によっては攻撃行動も観察されたことから、1088 株感染マウスは本来の狂犬病を再現していると考えている。さらに、この 1088 株を NA 細胞で連続継代することで確立された 1088-N30 株は、末梢感染においてマウスを発症させることができるが、ほとんどのマウスは死亡することなく耐過する。したがって、このメカニズムを解明すれば狂犬病発症後の治療法確立のための糸口になると考えられた。

マウスに高病原性を示すコウモリ由来街上毒と固定毒弱毒株の比較より、弱毒株は感染マウスに防御免疫反応を強く誘導することが報告されている (Wang ら, J. Virol. 2005)。このことから 1088 株と 1088-N30 株の病原性の違いは、感染マウスにおける免疫誘導能違いによることが考えられた。そこで今回、1088 株と 1088-N30 株の間で、末梢感染時の成熟マウスにおける中和抗体誘導能と脳内におけるウイルス抗原の拡がりについて比較を行った。

結果に示したように、1088-N30 株感染マウスでは、1088 株感染の場合と比べて、脳内におけるウイルス抗原の拡がり著しく制限されており、一方で、感染早期から高い中和抗体の誘導が認められた。また、感染 5 日目の時点で、両接種群ともに大脳皮質でウ

イルス抗原が認められ、抗原の分布の程度は両接種群間で差は認められなかったことから、1088-N30 株は末梢部位から中枢神経系へ侵入する能力は 1088 株と遜色ないことが示唆された。1088-N30 株は脳内接種ではマウスに致死感染を起こせることから、神経病原性も損なわれていない。以上より、末梢より感染した 1088-N30 株がマウスに致死感染を起こせないのは、脳内に侵入する過程で宿主の防御免疫反応を強く誘導し、そのため脳内に侵入後その拡がり抑制されるためであると考えられた。Hooper ら (PLoS Neglect. Trop. Dis. 2009) は狂犬病ウイルスが脳内から排除されるためには、血液脳関門の透過性が亢進し抗体産生 B 細胞が脳内に侵入することが重要であることを報告している。今回の結果と併せて考えると、狂犬病を発症しても、非常に高い免疫を早く誘導し、かつ抗体産生細胞が脳内に侵入できるよう血液脳関門の透過性を亢進させるような処置ができれば、治癒させることが出来るかもしれない。

E. 結論

1088-N30 株の末梢感染時における病原性の減弱は、脳内に侵入する過程で宿主免疫反応を強く誘導し、その結果脳内でのウイルスの拡がり抑制されるためであることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Moazzem Hossain, Tania Bulbul, Kamruddin Ahmed, Ziauddin Ahmed, Mohammad Salimuzzaman,

Mohammad Shahidul Haque, Ajmat Ali, Shohrab Hossain, Kentaro Yamada, Kazuhiko Moji, Akira Nishizono. Five year (January 2004 – December 2008) surveillance on animal bite and rabies vaccine utilization in the Infectious Disease Hospital, Dhaka, Bangladesh. **Vaccine**. 2011 29: 1036-1040

2) Takashi Matsumoto, Kamruddin Ahmed, Omala Wimalaratne, Kentaro Yamada, Susilakanthi Nanayakkara, Devika Perera, Dushantha Karunanayake, Akira Nishizono. Whole genome analysis of a human rabies virus from Sri Lanka. **Arch Virol**. 2011 156: 659-669

3) T Takashi Matsumoto, Kamruddin Ahmed, Omala Wimalaratne, Susilakanthi Nanayakkara, Devika Perera, Dushantha Karunanayake, and Akira Nishizono: Novel sylvatic rabies virus variant in endangered golden palm civet, Sri Lanka. **Emerging Infect Dis**. 2011 17(12): 2346-2349

2. 総説

なし

3. 著書

西園 晃:「ラブドウイルス科」, シンブル微生物学 改訂第5版, 南江堂(編

集: 東 匡伸, 小熊惠二, 堀田博), 294-297, 2011/4/10

4. 学会発表

1) 2011. 8. 26 北九州市 第48回日本ウイルス学会九州支部総会 山田 健太郎, 野口 賀津子, 西園 晃「狂犬病ウイルス街上市毒 G タンパク質における N 型糖鎖の追加は細胞からのウイルス粒子の放出を促進する」

2) 2011. 8. 26 北九州市 第48回日本ウイルス学会九州支部総会 松本 昂, Kamruddin Ahmed, Moazzem Hossain, Khondoker Mahabuba Jamil, Mohammad Azmat Ali, Sohrab Hossain, Shakawet Hossain, Aminul Islam, Nasir Uddin, 西園 晃「バングラデシュにおける狂犬病の分子疫学的解析」

3) 2011. 9. 11-16 Sapporo XV International Congress of Virology International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011) Kentaro Yamada, Kazuko Noguchi, Takashi Matsumoto, Takahiro M Mitsui, Kamruddin Ahmed, Akira Nishizono 「A Candidate for a Viral Element Related to Street Rabies Virus Pathogenicity Following Peripheral Infection」

4) 2011. 9. 11-16 Sapporo XV International Congress of Virology International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011) Takashi Matsumoto, Kamruddin Ahmed, Moazzem Hossain, Khondoker Mahabuba Jamil, Mohammad Azmat