

アシクロビル (acyclovir, ACV) やガンシクロビル (ganciclovir, GCV) は、 $\alpha$  ヘルペスウイルスが発現するウイルス性チミジンリン酸化酵素 (viral thymidine kinase, vTK) によりリン酸化され一リン酸体 (ACV-MP) となり、さらに細胞性リン酸化酵素でリン酸化され、三リン酸体 (ACV-TP) となる。ACV-TP はウイルスの DNA に取り込まれてチェインターミネーターとして機能したり、DNA ポリメラーゼ活性を阻害したりすることでウイルスの増殖を抑制する。ACV は単純ヘルペスウイルス 1 型 (herpes simplex virus type 1, HSV-1)、同 2 型 (HSV-2) や水痘帯状疱疹ウイルス (varicella-zoster virus, VZV) などだけでなく、BV の増殖を抑制することが知られている。

ヒトの BV 感染症の治療には、ACV や GCV による治療を要し、長期にわたる投与を必要とする場合がある。そのため、感染ウイルスのこれら薬剤に対する感受性を調べるのが重要となる。しかし、BV は国際的に BSL-4 病原体に分類されているため (国立感染症研究所では少量培養に限り BSL-3)、その試験は容易ではない。そこで BV の薬剤感受性を、感染性 BV を用いることなく測定するシステムを開発した。ただし、今年度は HSV-2 をモデルとして、同システムを開発した。

## B. 研究方法

### 1. ウイルス.

HSV-2 UW268 株、および、その vTK 欠損 HSV-2 UWTK<sup>-</sup> 株を、それぞれ ACV 感受性株、ACV 耐性株として用いた。また、vTK 蛋白に一アミノ酸変異で耐性を獲得した HSV-2 CL06 を用いた。さらに vTK 欠損 HSV-1 TAR 株も用いた。尚、HSV-2 CL06 の vTK 遺伝子

には、塩基配列に変異が生じ、376 個のアミノ酸配からなる vTK に R217H の一アミノ酸変異が認められる。また、UWTK<sup>-</sup> 株の vTK 遺伝子には、1 塩基欠損が認められ vTK 活性が認められない。尚、HSV-2 UW268 および UWTK<sup>-</sup> の vTK 遺伝子の塩基配列は、GenBank accession 番号 AB009256.1 および AB009257.1 として登録されている。

2. 細胞. HSV-2 UW268 および HSV-2 UWTK<sup>-</sup> の薬剤感受性や増殖した HSV-1 TAR の感染価は、Vero 細胞を用いたプラーク減少法で測定した。また、組換え vTK の発現には、293T 細胞を用いた。

### 3. 抗ウイルス薬

TK 関連抗  $\alpha$  ヘルペスウイルス薬として ACV を用いた。

### 4. 新規薬剤感受性試験システム

本研究で開発された新規薬剤感受性試験システムは、以下の戦略で開発された (図 1)。各 HSV-2 株の vTK 遺伝子全長を適切なプライマーセットを用いて、PCR 法により増幅した。その遺伝子を pcDNA3.1(-) 哺乳細胞発現ベクター (Invitrogen 社) のクローニングサイトに、プロモーターに順方向になるよう工夫して挿入した。この哺乳細胞組換え蛋白発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクションして一過性に発現させた。その細胞に vTK 欠損高度 ACV 耐性 HSV-1 TAR を MOI が約 1/細胞になるように感染させ、PBS で 1 回洗浄後各濃度の ACV 含有 MEM 培地で 12 時間培養した。その細胞および培養液に含まれる TAR 株の感染価を、Vero 細胞を用いたプラーク法で測定し、各薬剤の組換え

HSV-2 vTK 発現 293T 細胞における TAR 株増殖に対する抑制効果を評価した。ACV の TAR 株に対する増殖抑制効果は、増殖抑制率（ACV が含まれない培地で HSV-1 TAR を増殖させた場合に得られるそのウイルスの感染価に比べて、各濃度の ACV が含まれる培地増殖させた場合に得られる感染価の比）で評価した。例えば、例えば、ACV が含まれない培地で HSV-1 TAR を増殖させた場合に得られるそのウイルスの感染価が 100,000 PFU/ml で、40µg/ml の ACV が含まれる培地で増殖させた場合の感染価が 1,00 PFU/ml とすると、増殖抑制率は 1,00/100,000 (0.001) となる。

(倫理面からの配慮について)  
該当しない。

### C. 研究結果

#### 1. HSV-2 と BV の vTK のアミノ酸配列。

BV の vTK は 370 個のアミノ酸からなる蛋白で、一方、HSV-2 UW268 の vTK は 376 個のアミノ酸からなる。両 vTK のアミノ酸配列を図 2 に示した。

#### 2. HSV-2 の vTK 発現ベクターの作製と HSV-2 vTK の発現。

HSV-2 UW268, UWTK<sup>-</sup>, および、CL06 の vTK 遺伝子が挿入された pcDNA3.1(-)ベクターをそれぞれ作製し、pcDNA3.1(-)-UW268-vTK, pcDNA3.1(-)-UWTK<sup>-</sup>-vTK, pcDNA3.1(-)-CL06-vTK と命名した。これらのベクターを 293T 細胞にトランスフェクションすることにより、目的のサイズの vTK

蛋白発現がウエスタンブロット法により確認された（未表示）。

#### 3. ACV の HSV-2 vTK 発現 293T 細胞における HSV-1 TAR 株増殖抑制効果。

40 µg/ml 濃度の ACV が含まれる培地で、pcDNA3.1(-)-UW268-vTK, pcDNA3.1(-)-UWTK<sup>-</sup>-vTK, および pcDNA3.1(-)-CL06-vTK ベクターをトランスフェクションした細胞において TAR 株を増殖させ、ACV の TAR に対する増殖抑制率を検討した（図 3）。陰性対照として、pcDNA3.1(-)を用いた。感受性株 HSV-2 UW268 の vTK を発現する 293T 細胞では TAR 株は効率よく ACV によりその増殖が抑制されたのに対し、2つの耐性株の組換え vTK が発現されている細胞では、TAR 株の増殖は ACV によって抑制されなかった。陰性コントロール細胞においても同様であった。

### D. 考察

マカク属霊長類が保有する BV は、霊長類の輸入によって我が国においても患者が発生する可能性がある。また、日本ザルも BV を保有していると報告されている。これら BV 感染サルは、無症候性にウイルスを唾液等に排出していることがあり、サルを扱う技術者や研究者が感染する危険性がある。また、霊長類に咬まれると、その危険性を心配されることが多い。それは、ヒトが感染すると脳炎等の中枢神経感染症を引き起こし、さらには、潜伏感染して長期潜伏期間後に脳炎を発症させる場合も報告されているからである。

BV は ACV や GCV により増殖が抑えられるこ

とから、BV 感染症には ACV や GCV が投与される。しかし、BV は BSL-4 病原体（感染研では少量培養に限り BSL-3 病原体）に指定されている。そのため治療や治療法開発に欠かせない薬剤感受性試験が、BSL-4 研究施設が稼働していない我が国では実施することが困難な状況にある。そこで、本研究では、感染性 BV の ACV 等の vTK 関連薬剤に対する感受性を、感染性 BV を用いることなく解析するためのシステムを開発した。被検 BV の vTK 遺伝子を増幅して、その組換え vTK を 293T 細胞に発現させ、その細胞における ACV の TAR 株の増殖抑制効果を評価することで、感受性を評価できる可能性がある。現在、BV の vTK を用いて、さらに詳細に検討している。

このシステムを用いることにより、BV の薬剤感受性を調べるだけでなく、BV の vTK の ACV 等の薬剤のリン酸化能を、耐性化の誘導という観点から検討することも可能となる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Taniguchi, S., Watanabe, S., Masangkay, J. S., Omatsu, T., Ikegami, T., Alviola, P., Ueda, N., Iha, K., Fujii, H., Ishii, Y., Mizutani, T., Fukushi, S., Saijo, M., Kurane, I., Kyuwa, S., Akashi, H., Yoshikawa, Y., Morikawa, S.: Reston ebolavirus antibodies in Bats, the Philippines. *Emerging Infectious*

*Diseases* 17:1559-1560, 2011

2) 西條政幸: バイオテロリズムに用いられる可能性のある病原体と国立感染症研究所における対応: 出血熱ウイルスと痘瘡ワクチン. *日本犯罪学会雑誌* 77:63-66, 2011

##### 2. 学会発表

1) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Yoshikawa-(Iwata), N., Hasegawa, H., Fukushi, S., Mizutani, T., Sata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Immune responses against EEV and IMV in non-human primates infected with monkeypox virus or vaccinated with a highly attenuated smallpox vaccine LC16m8 and protection from lethal monkeypox. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)

2) Sayama, Y, Fukushi, S, Saito, M, Taniguchi, S., Iizuka, I., Mizutani, T., Kurane, I., Saijo, M.: A serological survey of *reston ebolavirus* infection in swine during epizootic in 2008 in the Philippines. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)

3) Taniguchi, S., Watanabe, S., Iha, K., Fukushi, S., Mizutani, T., Saijo, M., Kurane, I., Kyuwa, S., Akashi, H., Yoshikawa, Y., Morikawa, S.: The detection of reston ebolavirus antibodies in wild bats in the Philippines. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)

- 4) 西條政幸. ヘルペスウイルスによる 中枢神経感染症. 第16回日本神経感染症学会学術集会, 東京, (2011. 11)
2. 実用新案登録
3. その他
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得

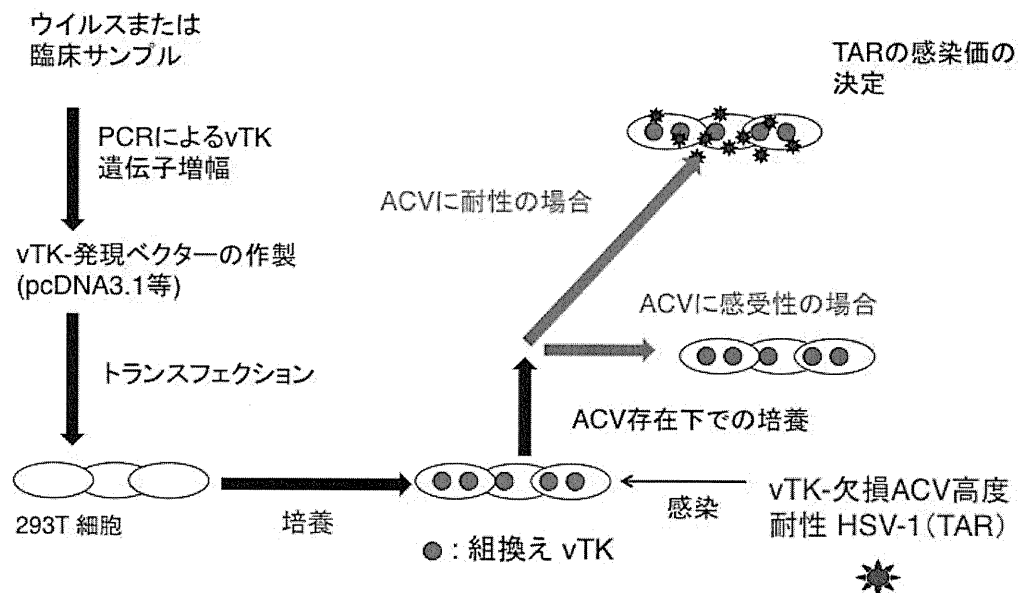


図1. 組換え vTK を発現させた 293T 細胞における ACV の HSV-1 TAR 株の増殖抑制効果を解析することで, 薬剤感受性を判断するためのシステムの概要.

## HSV-2 UW268 vTK (AB009256.1)

MASHAGQQHAPAFGQAARASGPTDGRAASRPSHROGASEARGDPELPTLLRV  
YIDGPHGVGKTTTSAQLMEALGPRDNIVYVPEPMTYWQVLGASETLTNIYNT  
QHRLDRGEISAGEAAVVM TSAQITMSTPYAATDAVLAPHIGGEAVGPQAPPP  
ALTLVFD RHP IASLLCYPAARYLMGSMTPOAVLAFVLMPPPTAPGTNLVLGV  
LPEAEHADRLARRQRPGERLDLAML SAIRRVYDLLANTVRYLQRGGRWREDW  
GRLTGVA AATRPDPEDGAGSLPRIEDTLFALFRVPELLAPNGDLYHIFAWVL  
DVLADRLLEPMHLFVLDYDQSPVGC RDALLRLTAGMIPTRVTTAGSIAEIRDL  
ARTFAREVGGV

## B virus vTK (GenBank accession number EF426677.1)

MASHAGHQDAPALDRVAGPAGHDNRPSALLRIYVDGPHGLGKTTTAAALAAA  
LGRRDEIEYVPEPMAYWQTLGGPQTITRIFDAQHRLDRGEISAGEAAVAMAS  
AQVTMSTPYAVTESAVAPHIGAELPPGHGPHPNIDLTLVFD RHPVAPLLCYP  
AARYLMGSLSLPTVLSFAALLPQTPGTNLVLGALPEAVHAERLAQRQRPGE  
RLDLAMLSAIRRVYDMLGNAIVYLOQGGSWRADWRRLSPARPAAASGRPARI  
LPRPEIEDTIFALFCAPELLDGTGEPYRVFAWTLDLLAERLRPMHLLVLDYN  
QAPHHCWMDLMEPIPEMTPTLPATPGSMLTLQLLAREFAREMTSARGGDAGG  
EGSETQ

図 2. BV の HSV-2 の vTK のアミノ酸配列.

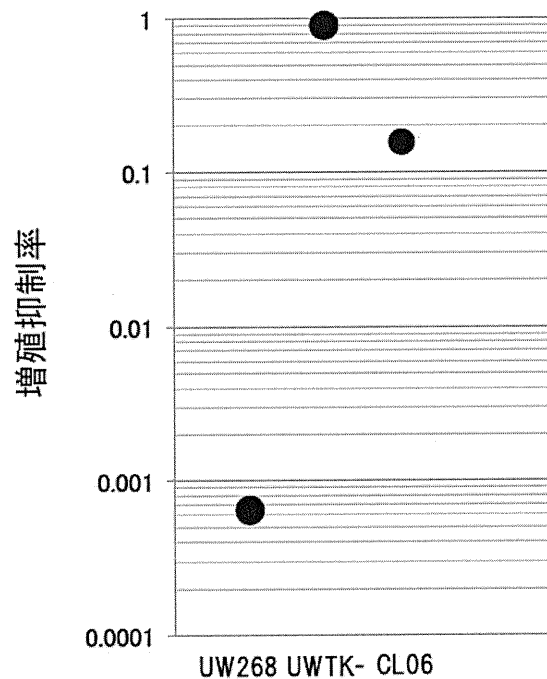


図 3. 高度耐性 HSV-2 および感受性 HSV-2 の vTK を発現させた 293T 細胞における ACV による HSV-1 TAR 株に対する増殖抑制効果.

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)

分担研究報告書

海外からの侵入が危惧される野生鳥獣媒介性感染症の疫学、診断・予防法等に関する研究  
狂犬病の疫学に関する研究

研究分担者	井上 智	国立感染症研究所・獣医科学部
研究協力者	野口 章	国立感染症研究所・獣医科学部
	Bazartseren Boldbaatar	日本大学、国立感染症研究所
	Nguyen Thi Kieu Anh	ベトナム・国立衛生疫学研究所
	Nguyen Tuyet Thu	ベトナム・国立衛生疫学研究所
	Nguyen Vinh Dong	ベトナム・国立衛生疫学研究所
	Ngo Chau Giang	ベトナム・国立衛生疫学研究所

研究要旨:わが国では、1970年と2006年に経験したヒトの輸入狂犬病3症例を除いて50年以上に渡って狂犬病は国内で発生していないが、アジア諸国ではヒトの感染源となるイヌ等の動物で流行が継続しており、ヒトの公衆衛生において大きな脅威となっている。近隣諸国での狂犬病流行拡大は日本への狂犬病侵入リスク増大につながるため、その疫学的背景を調査・分析して最新の情報をわが国の公衆衛生行政に還元することが期待される。本研究では、海外の研究協力者と共同してユーラシア大陸を中心とした野生獣の狂犬病(リッサウイルス感染症を含む)について流行状況に関する情報の収集、疫学調査、流行様式の解明、新規診断法開発等を行ってわが国への侵入可能性や発生予測・被害推計などを可能にすることを目的としている。昨年度、ユーロアジア(Euro-Asia)における狂犬病の流行様式を明らかにするために、モンゴルとベトナムの狂犬病専門家の研究協力を得て両国と近隣国で流行しているウイルス株について分子疫学的な系統解析を行ったところ、犬等家畜や野生動物を介して隣国のロシアや中国とウイルスが行き来していることが明らかとなった。近年、新種のリッサウイルスがシベリアで発見されていることから、今年度はコウモリ類を宿主とするリッサウイルスの血清疫学を明らかにするために必要な検査法の開発を行った。また、ユーロアジアで流行している野生動物の狂犬病を明らかにするために、シベリア地域での患者と野生動物の流行状況等について現地の狂犬病専門家から最新かつ正確な疫学情報等を入手した。

## A. 研究目的

狂犬病はニュージーランド、オーストラリア、ハワイ、英国、日本などを除く世界のほぼ全域で流行している。アジア、アフリカを中心に年間で少なくとも5万～7万人を超える死亡例があると推計されており、ヒトを含むほぼすべての哺乳類に致死的な脳炎を起こす狂犬病ウイルス(ラブドウイルス科リッサウイルス属)を原因とするウイルス性疾患である。わが国では、1970年と2006年に経験したヒトの輸入狂犬病3症例を除いて50年以上に渡って狂犬病は国内で発生していないが、アジア諸国ではヒトの感染源となるイヌ等の動物で流行が継続しており、ヒトの公衆衛生において大きな脅威となっている。

本研究では海外の研究協力者と共同してユーラシア大陸を中心とした野生獣の狂犬病(リッサウイルス感染症を含む)について流行状況に関する情報の収集、疫学調査、流行様式の解明、新規診断法開発等を行ってわが国への侵入可能性や発生予測・被害推計などを可能にすることを目的としている(図1)。

昨年度、ユーロアジアにおける狂犬病の流行様式を明らかにするために、モンゴルとベトナムの狂犬病専門家の研究協力を得て両国と近隣国で流行しているウイルス株について分子疫学的な系統解析を行ったところ、犬等家畜や野生動物を介して隣国のロシアや中国とウイルスが行き来していることが明らかとなった(図2)。

今年度は、ユーロアジアに生息するコウモリ類を宿主とするリッサウイルスの血清疫学を明らかにするために、ベトナムで捕獲されたコウモリから採取した血清を利用してリッサウイルスに対する中和抗体の検出法を開発した。また、ユーロアジ

アで流行している野生動物の狂犬病を明らかにするために、シベリア地域での患者と野生動物の流行状況等について現地の狂犬病専門家から最新かつ正確な疫学情報等を入手した。

## B. 研究方法

### コウモリ血清

ベトナム(Bac Giang 地区)で捕獲された108匹のコウモリから採取した血清を利用して中和抗体価の測定法を開発した。採取した血清は56℃、30分で非動化を行い、中和抗体の検出試験には培養液で10倍希釈したものを使用した。

### リッサウイルス株

リッサウイルスに対する中和抗体の検出法を、Rabies virus(CVS-11株)、Lagos Bat virus(USCDC/NIID株)、Mokola virus(USCDEC/NIID株)、Duvenhage virus(USCDC/NIID株)、EBLV1(USCDC/NIID株)を用いて検討した(表1)。いずれの株も、米国CDC・狂犬病ユニット長である、Dr.Rupprechtからの分与株である。なお、CVS-11株はMNA細胞に順化させた株であるが、他のリッサウイルス株はマウス脳で継代されたウイルス株をMNA細胞で4-6代の継代を行った株を使用した。

### ウイルス感染阻止を指標とした中和抗体の検出

材料:

培養細胞にはMNA細胞を用いた。また、細胞培養とウイルス・血清等の希釈には、MEME M4655(非動化 FBS 10%, ストレプトマイシン

100ug/ml, ペニシリン 100U/ml, アムホテリシン 0.25ug/ml を含む)を使用した。

培養細胞に感染したウイルスの検出は、FITC-標識抗狂犬病ウイルス抗体 (Fujirebio) を用いて、DFA 法によって行った(使用抗体: FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin, 0.002% Evan's Blue を含む PBS(-)で 50-100 倍希釈)。

ウイルスに対する中和抗体の検出系確立には、イワキ 96 穴マイクロプレート(平底) 3860-096 を使用した。

方法:

#### ◇中和試験(表2)

1. 血清希釈(x10)
2. 中和用ウイルス液の追加
3. 中和反応
4. 細胞の添加
5. 培養
6. 培養液の除去
7. PBS(-) で一回リンス
8. PBS(-)の除去
9. 80% 冷アセトンによる固定
10. アセトンの除去
11. 乾燥
12. DFA(Fujirebio)
13. PBS(-) による洗浄(200ul/well)
14. 蛍光顕微鏡による観察

#### ◇ウイルスの感染阻止を指標とした中和抗体の検出 (表2)

1. ウェル(well)中の全細胞に対するリッサウイルスの感染率は、顕微鏡下で目視観察により判断した。
2. 被検血清を入れたウェル(well)のリッサウイルス感染率を被検血清を入れていない陰性対照としたウェル(well)のリッサウイルス感染率で割って、各サンプルごとの感染阻止率を算出した。

#### C. 研究結果

リッサウイルス属に対する中和抗体検出系は、5つの遺伝子型(GT1、GT2、GT3、GT4、GT5)について確立を試みた(表1)。

ウイルスの感染と増殖には CVS-11 株(GT1)の中和抗体価測定(RFFIT 法)を行うために WHO や米国 CDC 等で一般的に使用されている MNA 細胞を使用した。獣医科学部・第二室で使用している MNA 細胞は米国 CDC から分与を受けた細胞であり、これに対する各リッサウイルス株の増殖効率率は株によって異なることが示された(表1)。

MNA 細胞に感染した、いずれのリッサウイルス株も市販の診断用抗体((Fujirebio 社製)によって検出可能であった。また、使用したウイルス株によって、感染後のウイルス増殖速度やウイルス感染・増殖が細胞に及ぼす影響も異なることが示された(図3)。

狂犬病ワクチンを接種して得られたハイパーイミュン血清を被検血清として、各リッサウイルス株に対する MNA 細胞への感染阻止を蛍光顕微鏡下で観察した。図4には、被検血清によって MNA 細胞に対する Rabies virus の感染が100% 感染阻止された像を示した。また、前記した被検血清(国際単位 0.5IU/ml の中和活性を持つ)を段階希釈して各リッサウイルス株に対する MNA 細胞への感染阻止率を調べたところ、使用したリッサウイルス株間で違いが示された。この違いは、系統樹における各リッサウイルス株の遺伝学的な距離を反映しているものと考えられた(図5)。

ベトナム(Bac Giang 地区)で捕獲された 108 匹のコウモリ血清(10 倍希釈)について、各リッサウイルス株の感染阻止像を蛍光顕微鏡下で観察を

したところ、CVS-11 株と EBLV-1 株に対して 31.6%および Mokola virus 株に対して 3.7%の被検血清が 90%以上の感染阻止を示した。また、いずれのリッサウイルス株でも 100%の感染阻止を示す被検血清はなかった。

#### D. 考察

自然界におけるリッサウイルスの分布については不明な点が多く、感染したコウモリにおける潜伏期間も明らかでない。狂犬病を除くリッサウイルスは、主にヨーロッパ、オーストラリア、アフリカに分布しており、これまでに報告されている事例から、そのほとんどがコウモリを自然宿主にしていると考えられている。

現在、リッサウイルスは遺伝学的に大きく2系統に分類され、狂犬病を含めて7種類の遺伝子型(genotype)が報告されている。近年、中央アジア(Kyrgyzstan、Tajikistan、Krasnodar region)、シベリア(Irkutsk)のコウモリからもリッサウイルスが分類されているがまだ未分類である(図1)。本研究で使用したリッサウイルス株の遺伝学的な違いを図7に示した。

東南アジアではリッサウイルスの分離報告はまだないが、リッサウイルスに対する中和抗体がフィリピン、タイ、カンボジアに生息するコウモリの血清にみられるといった報告がある(表3)。本研究では、これら既報の論文で行われた検査法をもとに、Rabies virus(CVS-11 株)、Lagos Bat virus(USCDC/NIID 株)、Mokola virus(USCDEC/NIID 株)、Duvenhage virus(USCDC/NIID 株)、EBLV1(USCDC/NIID 株)を用いて、ウイルスの感染阻止率を指標とした抗-

リッサウイルス中和抗体検出法を確立して、ベトナムに生息するコウモリについて中和抗体の保有率を調べた。

確立した検査系の課題として、使用した狂犬病ウイルス(CVS-11 株)以外のリッサウイルス株は、MNA 細胞でのウイルス増殖性が悪く、安定した検査系の確立には MNA 細胞への順化が必要であると考えられた(図4)。また、狂犬病ウイルスの中和抗体が、他のリッサウイルスに対してもある程度交差することを明らかにした(図5)が、リッサウイルス間での交差性の意義や、検出された中和活性を示す抗体の特性と感染阻止の機序等について解析が必要であると考えられた。

ユーロアジアに生息するコウモリ類を宿主とするリッサウイルスの血清疫学を行うためには、中央アジア(Kyrgyzstan、Tajikistan、Krasnodar region)、シベリア(Irkutsk)のコウモリから分離された、新種のリッサウイルスに対する中和抗体の検出系について検討が必要であり、今回確立した検査系の検証とともに、場合によってはウイルス株の入手や人工的に当該ウイルスの抗原性を持たせたVSVシュードウイルス等を利用した中和抗体の検出系を確立する必要もあると考えられた。

今回、シベリア地域の狂犬病流行状況(患者と野生動物)に詳しいElana Poleshchuk 博士(Omsk、Institute for Natural Foci Infection)から、「ロシア連邦における狂犬病の情報分析誌(2009 年度版)」を入手して、極東地区における狂犬病の発生状況等について情報共有および意見交換を行った。

ロシア連邦では、タヌキ、オオカミ、ホッキョクグツネ、ジャッカル、アカギツネ、コサックグツネの

野生動物で狂犬病の発生が報告されているが、野生動物等を介したシベリア地区とモンゴル・中国間での流行移動が課題となっている(図8、9)。特に、北海道に近いバロフスク地区について狂犬病の感染リスクが高くなっていることは、わが国への野生鳥獣等を介した狂犬病の侵入リスクについて調査・研究を進めていく必要性があると考えられた(図9)。

#### E. 結論

コウモリ類を宿主とするリッサウイルスの血清疫学を明らかにするために必要な検査法として、ウイルスの感染阻止を指標にした中和抗体の検出系を確立した。

確立した検査系の課題として、使用した狂犬病ウイルス(CVS-11 株)以外のリッサウイルス株は、MNA 細胞でのウイルス増殖が悪く、安定した検査系の確立には MNA 細胞への順化が必要と考えられた。また、狂犬病ウイルスの中和抗体が、他のリッサウイルスに対してもある程度交差する点について交差性の意義や、検出された中和活性と感染阻止の機序等について検証が必要であると考えられた。

新種のリッサウイルスが、シベリア南部、モンゴル西部、中国北東部のコウモリから新たに分離されていることから、シベリアから極東ないしアジア地域、さらにはわが国を含めた包括的なコウモリ類に関する生態学的調査をリンクさせたリッサウイルスの疫学的サーベイランスを進めることは公衆衛生上大変有意義であり、また、シベリア地域でヒトの狂犬病発生リスクが高く、野生動物での流行拡大が見られるという現地専門家からの情報を勘案すると、ロシア極東地区と北海道の間の

野生鳥獣等を介した狂犬病の侵入リスクを調査することはわが国の公衆衛生行政に対しても大変意義あるものと考えられた。

今後、隣国のロシアや中国等の研究者を加えて、ユーラシア大陸を中心とした野生獣の狂犬病(リッサウイルス感染症を含む)流行形態を患者発生状況、感染源動物における流行様式、分離 RABV 株の疫学的調査とその解析によって明らかにしていくことが重要であると考える。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Kojima D., Park C.-H., Tsujikawa S., Kohara K., Hatai H., Oyamada T., Noguchi A., and Inoue S. Lesions of the Central Nervous System Induced by Intracerebral Inoculation of BALB/c Mice with Rabies Virus (CVS-11). J.Vet.Med.Sci. 2010. 72: 1011-1016.
- 3) Boldbaatar B., Inoue S., Tuya N., Dulam P., Batchuluun D, Sugiura N, Okutani A., Kaku Y., Noguchi A., Kotaki A., and Yamada A. Molecular Epidemiology of Rabies Virus in Mongolia, 2005-2008. Jpn.J.Infect.Dis. 2010. 63: 358-363.
- 4) Nguyen T.K.A., Nguyen vinh D., Ngo C.G.,

- Nguyen van D., Nguyen T.T.H., Pham Q.B., Inoue S., Yamada A., Dinh K.X., Nguyen T.H.H., Nguyen T.H. Characterization nucleoprotein of isolated rabies virus in Vietnam 2006–2009”, *Journal of Preventive Medicine, Vietnam*. 2010. Volume XX, 6:164 – 170. p2542–2543, 2010
- 5) Kaku Y., Noguchi A., Hotta K., Yamada A., Inoue S. Inhibition of rabies virus propagation in mouse neuroblastoma cells by an intrabody against the viral phosphoprotein. *Antiviral Res.* 2011. 91:64–71.
- 6) 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. Molecular epidemiology of rabies virus in Vietnam (2006–2009). *Jpn.J.Infect.Dis.* 2011. 64:391–396.
- 7) Sugiura N., Uda A., Inoue S., Kojima D., Hamamoto N., Kaku Y., Okutani A., Noguchi A., Park C.-H. and Yamada A. Gene Expression Analysis of Host Innate Immune Responses in the Central Nervous System following Lethal CVS-11 Infection in mice. *Jpn.J.Infect.Dis.* 2011. 64:463–472.
- 8) 井上 智。リッサウイルス感染症。感染症法改正(2003)で追加された感染症。〈新4類〉。25 感染症。健康生活の基礎知識。六訂版家庭医学大全科。総合監修:高久史磨、猿田享男、北村惣一郎、福井次矢。法研、p2542–2543、2010
- 9) 井上 智、二宮 清。5 狂犬病、第3章 中枢神経症候群。第I部 臨床編。2 ウイルス感染症の検査・診断 スタンダード。編集:田代真人、牛島廣治。羊土社、p80–86、2011
- 10) 井上 智。狂犬病の現状とその課題。特集 ズーノーシス - 各論編 -。獣医畜産新報 (JVM)、64:551–555、2011
- 11) 井上 智。18. ラブドウイルスと感染症。第3章 II. ウイルス学各論。獣医微生物学(第3版)。監修:見上 彪。編集:関崎 勉、高井伸二、堀本泰介、望月雅美。文永堂出版、p231–238、2011
- 12) 井上 智。狂犬病(シリーズ8)。日本の警戒すべき感染症(感染症から身を守るために)。月刊「クリネンス」、11月号、p8–9、2011
- 13) 井上 智。狂犬病の対策を考える(学術)。宮城県獣医師会会報(Miyagi Veterinarian)。第64巻、第4号、10月号、p162–166、2011
- 14) 井上 智。事例3:狂犬病の発生様式、5:感染症の疫学事例、16章:感染症の疫学。獣医疫学・第2版(Veterinary Epidemiology 2nd edition)。獣医疫学会編。近代出版。p131、2011
- 2.学会発表

- 1) Nishizono A., Yamada K., Ito N., Inoue S., and Park C.-H. Pathogenesis and immune evasion of rabies virus in the mouse. 45<sup>th</sup> Joint Working Conference on Immunology and Viral Diseases. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 20-22 June, 2011. Stanford University, California, USA.
- 2) Park C.-H. and Inoue S. Neuropathological studies of the mouse experimentally inoculated three bat rabies viruses isolated in Brazil. 45<sup>th</sup> Joint Working Conference on Immunology and Viral Diseases. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 20-22 June, 2011. Stanford University, California, USA.
- 3) Park C.-H., Ishida M., Kojima D., Sato G., Ito F.H. and Inoue S. Neuropathological studies of the mouse experimentally inoculated three bat rabies viruses isolated in Brazil. Global Conference on Rabies Control. 7-9 Sep, 2011. Incheon, Republic of Korea.
- 4) Inoue S., Bazartseren B., Tuya N., Dulam P., Batchuluun D, Sugiura N, Okutani A., Kaku Y., Noguchi A., Kotaki A. Molecular Epidemiology of Rabies Virus in Mongolia, 2005-2008. Current Issues on Zoonotic Diseases. International Scientific Congerence, 80th anniversary of establishment of the national center for infectious diseases with natural foci in Mongolia. 15 Sep, 2011. Ulaanbaatar, Mongolia.
- 5) Marissen W.E., Ellison J., Niezgoda M., Kuzmin I., Kuzmina N., Franka R., Weverling G., Meijer J., Rasuli A., Sodoyer R., Laffly L., Quiambo B., Kamigaki T., Oshitani H., Saito M., Inoue S., Tang Q., Rahman S.A., Rupprecht C.E., Goudsmit J.. Global evaluation of neutralizing activity of CL184, a monoclonal antibody combination against rabies. 22nd International Conference on Rabies in the America. 16-21 Oct, 2011. Puerto Rico.
- 6) Orbina J.R., Saito M., Inoue S., de Guzman A., Kamigaki T., Demetria C., Sugiura N., Noguchi A., Sekizuka T., Kuroda M., Bajaro J.D., Manalo D., Quiambao B.P., Segubre-Mercado E., Olveda R., Oshitani H. Molecular epidemiology of rabies in the Philoppines. Rabies in Asia Conference (RIACon). 28-29 Nov, 2011. Sri Lanka.
- 7) 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
- 8) 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宿主遺伝子のマイクロアレイ解析。第 10 回 狂犬病研究会、2011、3 月、ホテル湯布院倶楽部、大分県

9) 小嶋大亮、朴 天鎬、石田 誠、佐藤 豪、野口 章、小宮尚之、久保達也、畑井 仁、小山田敏文、井上 智。狂犬病野外株接種マウスの中樞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。第 10 回 狂犬病研究会、2011、3 月、ホテル湯布院倶楽部、大分県

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

3. その他

なし

表1. Lyssavirus Neutralisation Test, Material

Serum: Vietnam Bat : 108 samples

Lyssaviruses

Genotype	Species	Titer (TCID <sub>50</sub> /50ul)	Dilution
1	Rabies:CVS11	10 <sup>6.6</sup>	1/40,000
2	Lagos bat	10 <sup>5.5</sup>	1/5,000
3	Mokola	10 <sup>4.6</sup>	1/500
4	Duvenhage	10 <sup>5.1</sup>	1/1,000
5	EBLV-1	10 <sup>5.4</sup>	1/2,000

Cell: MNA (8 x 10<sup>5</sup>/ml in MEME-10, S 100ug/ml, P 100U/ml, Ampho 0.25ug/ml)

FITC-Conjugate: FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin (Fujirebio).  
50-100 fold dilution by PBS(-) with 0.002% Evan's Blue.

表2. Lyssavirus Neutralisation Test, Method

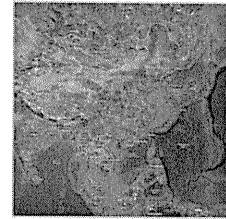
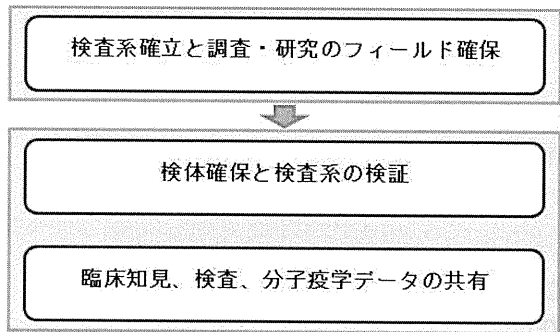
Step		
1. Serum dilution (x10)		50ul
2. Add challenge virus(100TCID <sub>50</sub> /50ul)		50ul
3. Incubation		37 C 1hr
4. Add MNA cells (8 x 10 <sup>5</sup> /ml)		50ul
5. Incubation		37 C 46hrs
6. Remove medium(by micropipette tip)		
7. Add PBS(-) (Rinse)		150ul
8. Remove PBS(-)(by micropipette tip)		
9. Fixation by 80% cold acetone (full of well)		4 C 30min
10. Remove acetone(decantation)		
11. Dry up		1 - 2h
12. DFA(Fujirebio)	80ul/well	30min at RT
13. Wash by PBS(-)	200ul	3times
14. Observation by microscope (UV)( x40 – 100)		

※ Judgement: % reduction or foci /well (Yes or No)

**表3.** Surveillance for lyssavirus in bat in Southeast Asia

1. Philippines (2002) (involvement : CDC)  
Serologic evidence of Lyssavirus infections among bats, the Philippines.  
Arguin *et al.*, *Emerg. Infect. Dis.* 8 p258
2. Thailand (2005) (involvement : CDC)  
Survey for bat lyssaviruses, Thailand.  
Lumlertdacha *et al.*, *Emerg. Infect. Dis.* 11 p232
3. Cambodia (2004) (involvement : Pasteur)  
Serologic evidence of lyssavirus infection in bats, Cambodia.  
Reynes *et al.*, *Emerg. Infect. Dis.* 10 p2231

図1



狂犬病は世界中で見られるが、アジアではイヌを中心に狂犬病が流行している。これ以外に、韓国でタヌキ、中国でイタチアナグマ、シベリアでキツネに狂犬病の流行が報告がされてはいるが、知見は極めて少ない。近年、中央アジアとシベリアでコウモリを宿主とする新しいリッサウイルスが分離されており、アジア地域での流行・分布様式について公衆衛生上でも高い関心がもたれている。

本報告では、ユーロアジアの野生動物等における狂犬病の流行と感染様式を明らかにするために、研究居力者に海外（モンゴル、ベトナム）の専門家を加えて、ウイルスの分離・検出法の確立を行いながら、分子疫学的解析を行っている。

狂犬病ウイルス以外のリッサウイルスの分布

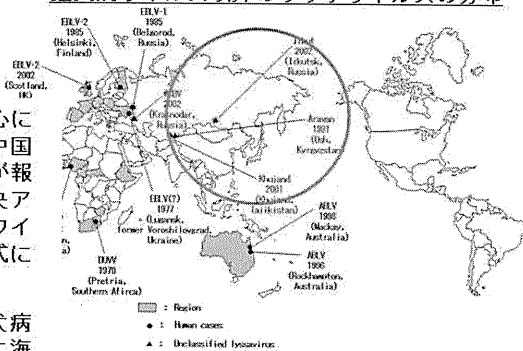
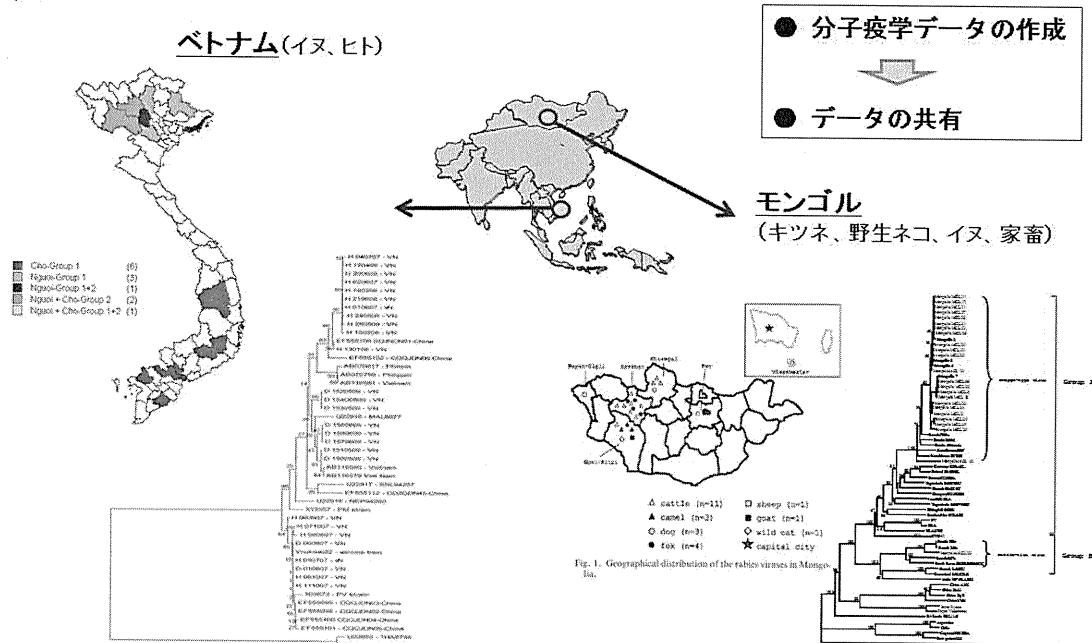


図2



Jpn. J. Infect. Dis., 64, 391-396, 2011  
Molecular Epidemiology of Rabies Virus in Vietnam (2006-2009)

Jpn. J. Infect. Dis., 64, 358-363, 2011  
Molecular Epidemiology of Rabies Virus in Mongolia, 2005-2008



図3. リッサウイルス株のMNA細胞に対する感染像の違い  
 (DFA染色(FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin、Fujirebio))

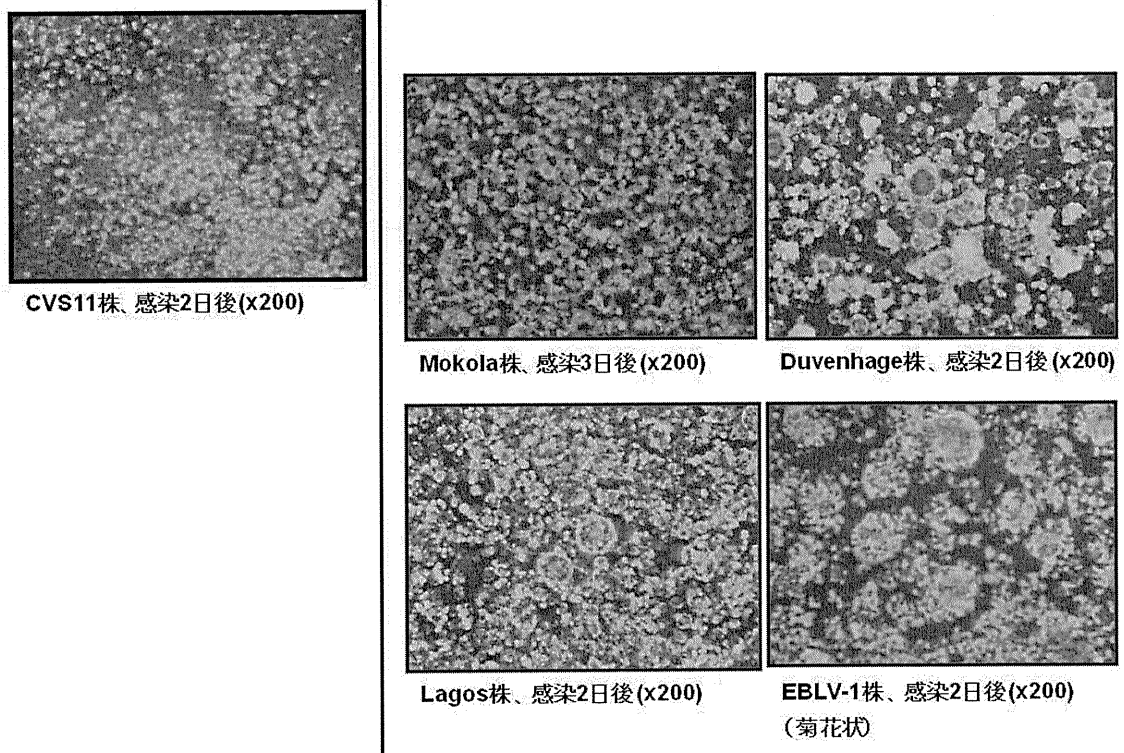
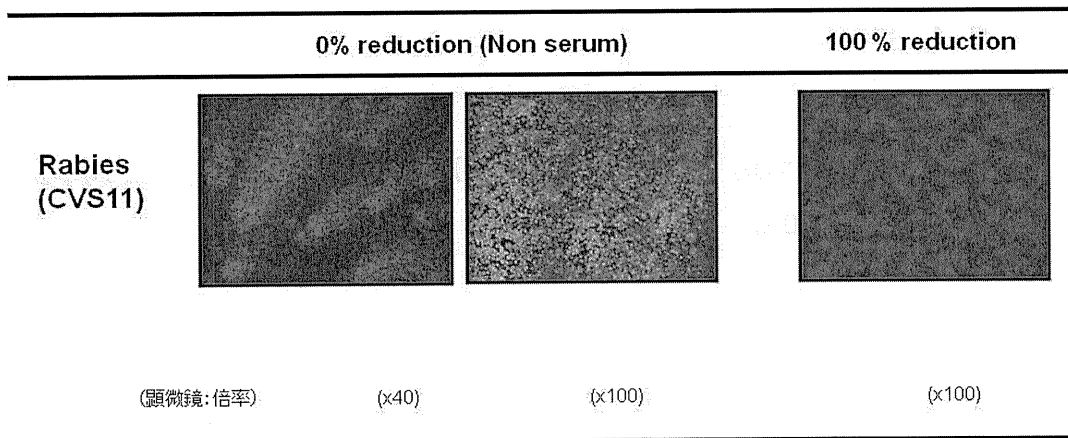
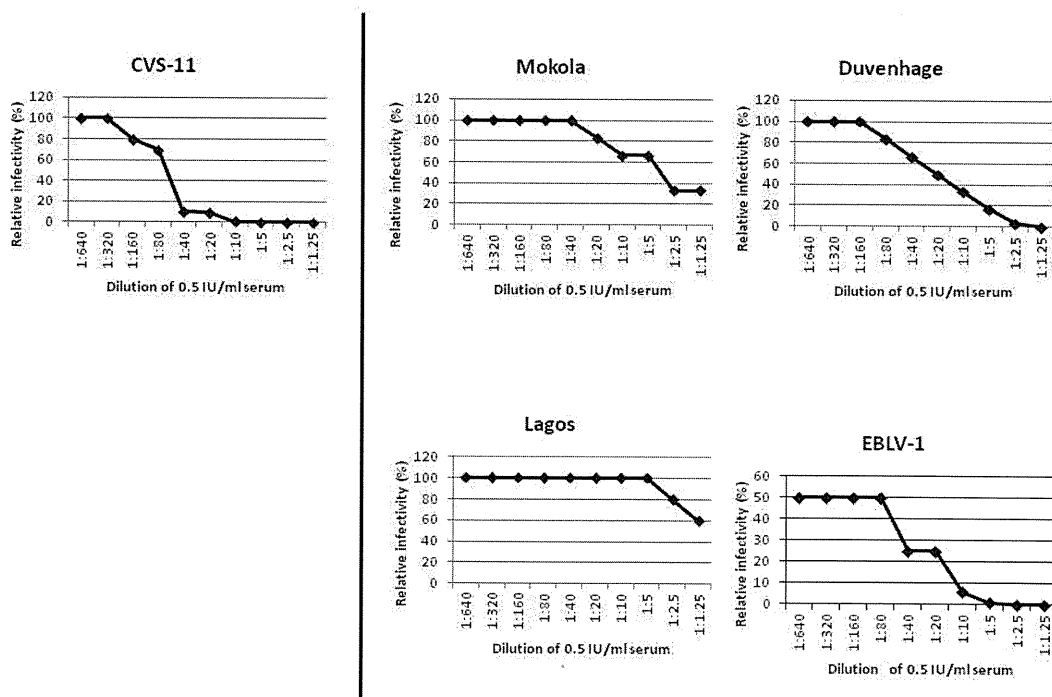


図4. Lyssavirus Neutralisation Test、蛍光顕微鏡下でのウイルス感染像



☒5. Lyssavirus Neutralisation Test,  
Infectivity of the lyssavirus using the 0.5IU/ml serum to rabies



☒6. Lyssavirus Neutralisation Test

%-reduction	CVS-11 (GT-1)	EBLV-1 (GT-5)	Duvenhage (GT-4)	Mokola (GT-3)	Lagos (GT-2)
100%	0/108 0%	0/108 0%	0/108 0%	0/108 0%	0/108 0%
>90%	39/108 36.1%	39/108 36.1%	0/108 0%	0/108 0%	4/108 3.7%

cf. 90%-reduction of bat sera against lyssaviruses  
(CVS-11, EBLV-1, Duvenhage virus, Mokola virus, Lagos bat virus) by using of  
1:10 bat serum dilution

图 7. Phylogenetic tree of Isolated Lyssavirus (N-gene 567bp)

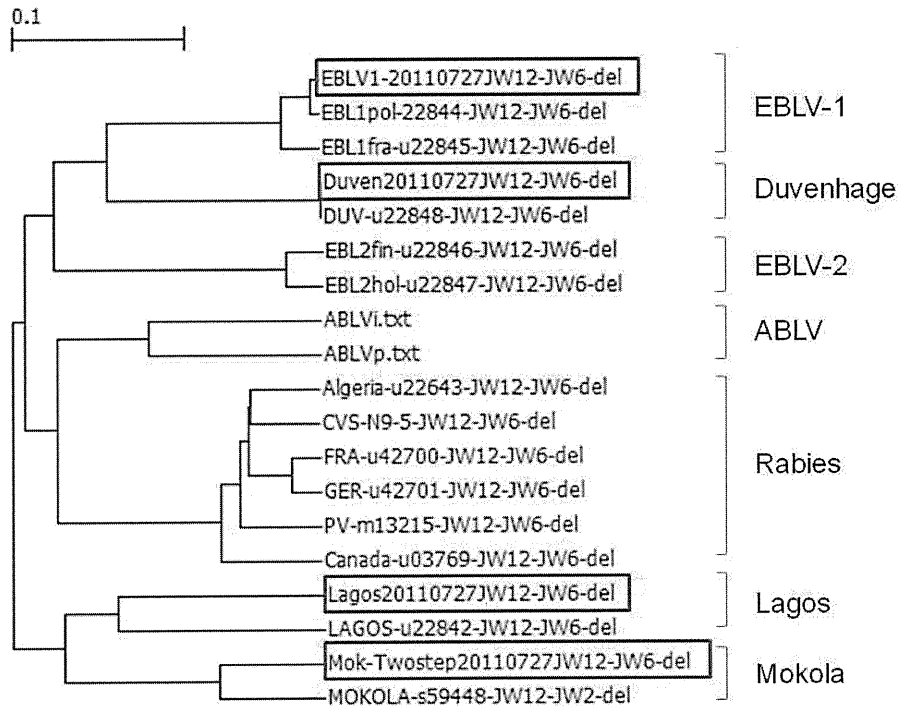


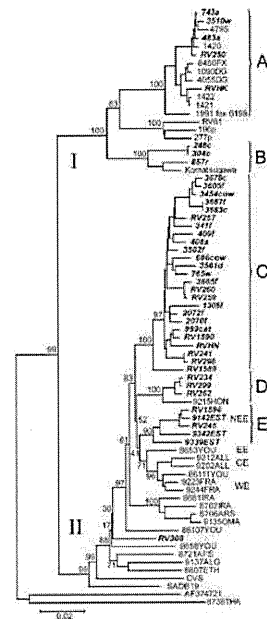
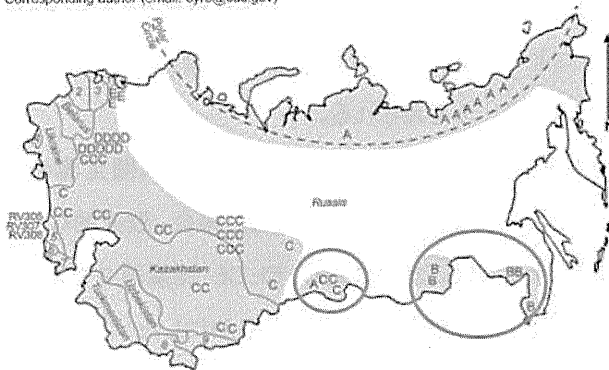
图 8.

*Journal of Wildlife Diseases*, 40(4), 2004, pp. 617-631  
© Wildlife Disease Association 2004

**MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF TERRESTRIAL RABIES IN THE FORMER SOVIET UNION**

Ivan V. Kuzmin,<sup>1,2</sup> Alexandr D. Botvinkin,<sup>3</sup> Lorraine M. McElhinney,<sup>4</sup> Jean S. Smith,<sup>2</sup> Lillian A. Orciari,<sup>2</sup> Gareth J. Hughes,<sup>2</sup> Anthony R. Fooks,<sup>4</sup> and Charles E. Rupprecht<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Rabies Group, Institute for Natural Foci Infections, Prospekt Mira, 7, Omsk, 644080 Russia  
<sup>2</sup> Rabies Section, Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Rd., Atlanta, Georgia 30333, USA  
<sup>3</sup> Epidemiology Chair, State Medical University, Krasnogo Vosstania, 1, Irkutsk 664003, Russia  
<sup>4</sup> Rabies Research and Diagnostic Group, Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, Addlestone, Surrey KT15 3NB, UK  
<sup>5</sup> Corresponding author (email: cyr5@cdc.gov)



- Since the western Mongolia is mountainous area, it seems likely that the Altai Mountains form a natural barrier which prevents spread of RABV from neighboring areas across the mountains. The major wildlife reservoirs of RABV in both Mongolia and Russia are considered to be Mongolian type steppe animals such as red foxes and steppe foxes.



海外からの侵入が危惧される野生鳥獣媒介性感染症の疫学、診断・予防法等に関する研究

狂犬病の発症機序の解析と診断法開発

マウスへの皮下投与による狂犬病ウイルスの末梢感染性の解析

研究分担者:伊藤直人 岐阜大学応用生物科学部・准教授

研究要旨:自然感染に近いと考えられる皮下投与法を用いて、狂犬病ウイルス西ヶ原株の末梢感染性の有無を検討した。その結果、高用量の西ヶ原株を皮下投与したマウスでは、すべての個体が発症し死亡した。対照的に、本株の鶏胚馴化株である Ni-CE 株を同様に接種した場合、マウスは全く症状を示さなかった。西ヶ原株-Ni-CE 株間の各種キメラウイルスの末梢感染性を検討した結果、皮下投与における西ヶ原株と Ni-CE 株の末梢感染性の違いに、P、M および L 遺伝子が関連することが明らかとなった。これらの成績は、筋肉内投与法を用いた場合と多くの点で異なっており、投与法の違いにより末梢感染の機序が異なることが示唆された。

A. 研究目的

狂犬病ウイルスは、重篤な神経症状と高い致死率(約 100%)を特徴とする狂犬病の原因として知られている。本ウイルスは、感染動物の唾液中のウイルスが咬傷を介して創傷感染することにより伝播する。末梢組織中のウイルスは、末梢神経に侵入後、中枢神経系に感染を拡大し、その結果として致死的な脳脊髄炎を引き起こす。このように、末梢組織から神経系へのウイルスの移行は、狂犬病ウイルスの病原性発現に必須な過程であるにもかかわらず、本ウイルスの末梢感染の機序に関しては極めて情報が少ない。

狂犬病ウイルスの末梢感染性に関する以前の研究では、ほとんどの場合、ウイルスを実験動物の筋肉内へ投与する方法が用いられている。し

かし、筋肉は何層もの結合組織に覆われており、咬傷から侵入したウイルスが筋肉細胞に感染するためには多数の物理的障壁を超えなければならない。したがって、自然感染では、筋肉が狂犬病ウイルスの主要な感染ルートではない可能性も考えられる。

昨年度は、狂犬病ウイルス固定毒の西ヶ原株が、筋肉内に接種した場合、致死的な感染を引き起こすのに対し、Ni-CE 株接種マウスは全く症状を示さないことを明らかにした。さらに、両株のキメラウイルスを用いた解析により、西ヶ原株と Ni-CE 株の末梢感染性の違いに P 遺伝子が主要に関連することを示した。そこで本年度は、より自然感染に近いと考えられる皮下投与を用いて同様の実験を行い、筋肉内接種で得られた結果と