

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

土壌中の *Bacillus* 属菌の分離・同定法の確立

分担研究者：井上 智 国立感染症研究所獣医科学部、室長
協力研究者：奥谷晶子 国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官

研究要旨：土壌中における炭疽菌の生活史を明らかにすることは国内における炭疽発生リスクを考える上でも非常に重要である。国内各地から土壌を採取・収集して、MYP 選択培地と羊血液寒天培地を用いて土壌中の炭疽菌近縁菌種で構成される *Bacillus cereus* group 菌種群を効率良く分離培養を行う方法を確立した。また、*B. cereus* group 菌種群の菌株ライブラリーを構築することで、臨床分離株と環境由来株との鑑別や、感染経路の特定にも有益となる遺伝型別に必要なゲノム情報等を得られることが期待される。

A. 研究目的

炭疽の発生がヒトや動物で疑われた場合には、患者や患畜から採取可能な検体を用いて炭疽菌の分離や同定が必要になるが、感染経路の特定には、周囲の環境検体に対する調査等が必要になる場合がある。これは、*Bacillus* 属菌が土壌中に生息して、芽胞の形態で土壌中に長く生存が可能であることによる。

現在、炭疽は国内で発生の見られない疾患であるが、芽胞として数十年間は土壌中に生存出来ると考えられていることから、土壌中における炭疽菌の生活史を明らかにすることは国内における炭疽発生リスクを考える上でも非常に重要である。

土壌中には、炭疽菌や、炭疽菌と遺伝的に非常に近縁である *B. cereus* を含む、いわゆる *B. cereus* group を構成する菌種群の芽胞が多数存在していると考えられているが、これまでどの程度これらの菌種群が土壌中に存在しているか、どのように分布しているかについての知見は得られていない。また、菌の培養を阻害する物質が多く含まれる土壌から効率良く *B. cereus* group 構成菌種群を分離同定する方法についても選択培地の選択、培養法の検討などが必要である。

本研究では、国内各地から採取・収集した土壌中の *B. cereus* group 菌種群の網羅的検索および分離同定と炭疽菌芽胞および炭疽菌との鑑別

法の確立を行うことを目的としている。

B. 研究方法

日本国内各地域からこれまでに 14 地域 70 箇所の土壌を収集し、うち 3 地域 12 箇所分を解析した。

培養法による *B. cereus* group を構成する菌種群の分離を以下の流れで行った。

土壌は 4℃ に保存。

↓

土壌約 250mg 分を生理食塩水に 500 μL に懸濁した。なお、一部を 100℃5 分で煮沸し、炭疽菌特異的プライマーを用いた PCR の鋳型とした。

↓

上記の懸濁液 100 μL を *B. cereus* 選択培地および羊血液寒天培地に塗抹。

↓

卵黄反応を確認したコロニーを羊血液寒天培地に純培養して溶血性の有無を確認した。卵黄反応陽性コロニーは *Bacillus* 属特異的プライマーおよび *B. cereus* group 特異的プライマーを用いたコロニーPCRを行った。

↓

PCR で *B. cereus* group と判定されたコロニーを *B. cereus* group 菌種群として分離箇所毎に 6 株選択して更なる分離・同定を行うため

の菌株ライブラリーを作成した。

Bacillus cereus 選択培地には、MYP(mannitol, yeast extract, polymixinB)含有寒天培地を使用した。

C. 研究結果

国内では以前炭疽が発生した地域あるいは炭疽の患畜を埋却した箇所には炭疽菌の芽胞が存在している可能性はあるものの、今回解析した土壌検体を鋳型とした PCR からは炭疽菌特異的遺伝子は検出されなかった。

選択圧の高い MYP 培地で一次培養を行い、純培養に羊血液寒天培地を用いたところ、MYP および羊血液寒天培地から純培養したコロニーの 60%以上が *B. cereus* group 菌種群特異的遺伝子を保有していたことから、効率よく *B. cereus* group 菌種群のコロニーを分離培養することが出来た。

炭疽菌に近縁な *B. cereus* を各地点から 6 株ずつをグリセロールストックで -80℃で保存し、今後の遺伝子解析用のライブラリーを作成した。

D. 結論

土壌から効率よく *B. cereus* group 菌種群を分離培養する方法を確立することができた。これにより、近縁菌の菌株ライブラリーを充実させて、国内各地域の土壌中の *B. cereus* group 菌種群の分布を解析することが可能になった。また、これらの方法は土壌からの炭疽菌芽胞の分離に応用可能であると考えられる。

次年度は、構築した菌株ライブラリーから遺伝子を抽出して、*B. cereus* の 7 house keeping genes を用いた MLVA (タンデムリピート) 解析による系統解析を行い、土壌分離地域との相関の有無や食中毒由来の *B. cereus* との比較解析を行って遺伝子型別の方法を確立を試みる。

土壌中における炭疽菌の生活史を明らかにすることは国内における炭疽発生リスクを考える上でも非常に重要である。また、本研究の推進によって *B. cereus* group 菌種群の菌株ライブラリーを構築することで、臨床分離株と環

境由来株との鑑別および、感染経路の特定にも有益となる遺伝型別に必要なゲノム情報等を得られることが期待される。

E. 研究発表

A Okutani, H Tungalag, B Boldbaatar, A Yamada, D Tserennorov, I Otgonchimeg, A Erdenebat, D Otgonbaatar, and S.....Inoue. Molecular Epidemiological Study of *Bacillus anthracis* Isolated in Mongolia by Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for 8 Loci (MLVA-8) Japanese Journal of Infectious Diseases 2011;4:345-348.

F. 知的所有権の取得状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

single chain variable fragment (scFv)と
Direct, rapid immunohistochemical test (DRIT) 法による
狂犬病ウイルス抗原検出法の開発

分担研究者：井上 智 国立感染症研究所獣医科学部、室長
協力研究者：加来義浩 国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官
野口 章 国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官
朴 天鎬 北里大学獣医病理学研究室、准教授

研究要旨：現在、世界の狂犬病患者の99%はイヌからの感染が原因とされている。アジア等の狂犬病流行地域で狂犬病の疑われるイヌから咬傷を受けたヒトは、暴露後のワクチン接種（PEP）の是非を医師に相談するとともに、狂犬病ウイルス（RABV）の感染リスクを判断するために、専門家による加害犬の観察（臨床診断）および安楽殺した当該犬の脳について実験室内ウイルス検査を速やかに行わなければならない。近年注目されているRABVの抗原検出法として、検査が簡便、かつ、高価な蛍光顕微鏡を必要としないDirect, rapid immunohistochemical test (DRIT) 法がある。本研究の目的は、獣医科学部・第二室で作出したRABV蛋白質を特異的に認識するsingle chain variable fragment (scFv)を使用したDRIT法の確立と有効性の検証である。現在、検出感度の向上を図るために抗RABV-PおよびN蛋白質scFvにビオチンを融合させた蛋白の発現を検討している。今年度、4クローンの抗RABV-P scFv、1クローンの抗RABV-N scFvの当該遺伝子をビオチン融合蛋白質発現プラスミドにクローニングした。今後、scFv-ビオチン融合蛋白質の発現確認を行って、DRIT法の確立を行う予定である。

A. 研究目的

世界では毎年55,000人が狂犬病で死亡している。発生例の大半は発展途上国に集中しており、毎年800～1,000万人が暴露後予防（PEP: post-exposure prophylaxis）を受けている。狂犬病患者の99%以上がイヌの咬傷で感染していることから、発症を疑うイヌの迅速で確実な診断法の確立と発生地域における流行拡大等の状況把握は公衆衛生上の重要課題である。また、加害犬の迅速診断は咬傷被害者への速やかなPEP判断を適切に行うためにも大切である。

現在、発症を疑うイヌの実験室内診断は、加害犬の脳組織からスタンプ標本作製して、直接蛍光抗体法による狂犬病ウイルス（RABV）の抗原検出が行われている。しかし、本法は蛍

光顕微鏡が必要であり、アジア等の流行地域ではより安価な検出法が望まれている。

今回、光学顕微鏡で簡易に観察が可能となる迅速抗原検出法「DRIT法（a direct, rapid immunohistochemical test）」に使用する検出抗体を安価に大量生産する方法をsingle chain variable fragment (scFv) で検討した。scFvは、免疫グロブリンのVH領域とVL領域をリンカーでつないだ構造を持っており、scFv遺伝子発現プラスミドを大腸菌に導入することで、容易かつ大量の検出抗体を発現・精製可能となる。

昨年度、精製した4クローンの抗RABV-P scFv、1クローンの抗RABV-N scFvをビオチン標識してDRITをRABV感染マウス脳の塗抹標本で行い、狂犬病ウイルス特異的な蛋白質

の検出に成功したが、各 scFv クローンで感度が異なり、ビオチン標識の効率が一定でないことが考えられた。そこで、今年度、確実にビオチン標識 scFv を得るために、scFv とビオチンの融合蛋白質を発現することを試みた。

B. 研究方法

- (1) 抗 RABV-P 蛋白質、抗 RABV-N 蛋白質 scFv 遺伝子のクローニング：4 クローンの抗 RABV-P scFv (P19, P38, P80, P115)、1 クローンの抗 RABV-N scFv (N1) 発現プラスミド (pCAGGS) より、以下のプライマーを用いて、scFv 遺伝子 (精製用 myc/His タグを含む) を増幅した。

```
-----  
# HindIII-PinPoint Xa-F:  
GCGAAGCTTATGGCCGAGGTG  
# BglII-pHEN seq:  
AGTAGATCTCTATGCGGCCCATTC  
-----
```

scFv 遺伝子は、大腸菌内でビオチン融合蛋白質を産生できる発現プラスミド (PinPoint Xa-3 ベクター; Promega) にクローニングした (図 1)。

- (2) シーケンスの確認：得られた各 scFv-PinPoint Xa-3 ベクターについて、以下のプライマーセットを用いて、シーケンスを解析した。

```
-----  
# link seq new  
CGACCCGCCACCGCCGCTG  
# DPK9 FR1 seq  
CATCTGTAGGAGACAGAGTC  
# SP6  
CATACGATTTAGGTGACACTATAG  
-----
```

C. 研究結果

抗 RABV-P scFv (P19, P38, P80, P115)、

抗 RABV-N scFv (N1) について、全て PinPoint Xa-3 ベクターへのクローニングを終えた。またシーケンス解析の結果、全ての scFv 遺伝子が正しくクローニングされていることが確認できた。

D. 考察

本研究の目的は、獣医科学部・第二室で作出した RABV 蛋白質を特異的に認識する single chain variable fragment (scFv) を使用した DRIT 法の確立と有効性の検証である。現在、検出感度の向上を図るために抗 RABV-P および N 蛋白質 scFv にビオチンを融合させた蛋白質の発現を検討している。今年度、4 クローンの抗 RABV-P scFv、1 クローンの抗 RABV-N scFv の当該遺伝子をビオチン融合蛋白質発現プラスミドにクローニングした。今後、scFv-ビオチン融合蛋白質の発現確認を行って、DRIT 法の確立を行う予定である。

E. 結論

ビオチン融合 scFv を大腸菌内に発現させるため、4 クローンの抗 RABV-P scFv (P19, P38, P80, P115)、1 クローンの抗 RABV-N scFv (N1) を PinPoint Xa-3 ベクターにクローニングを行った。現在、scFv-ビオチン融合蛋白質の発現確認を行っている。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

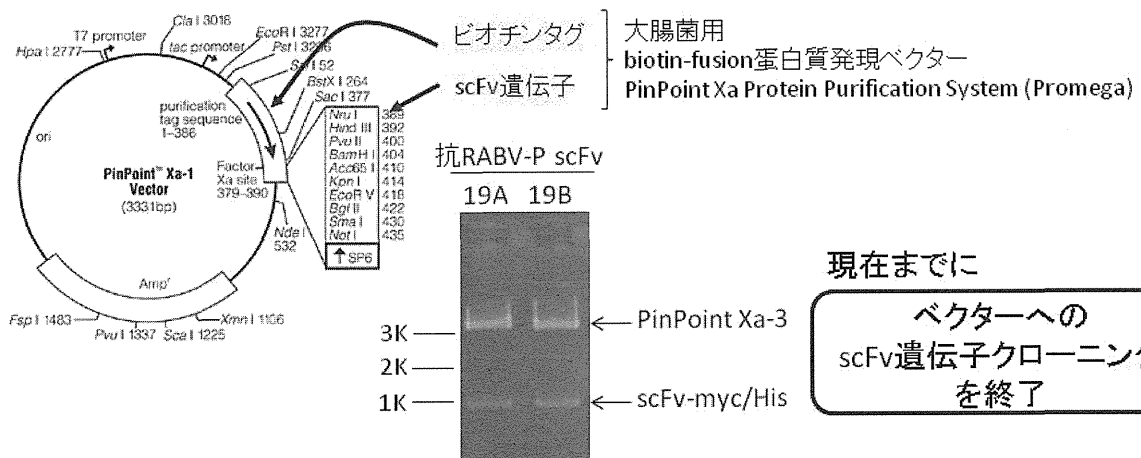
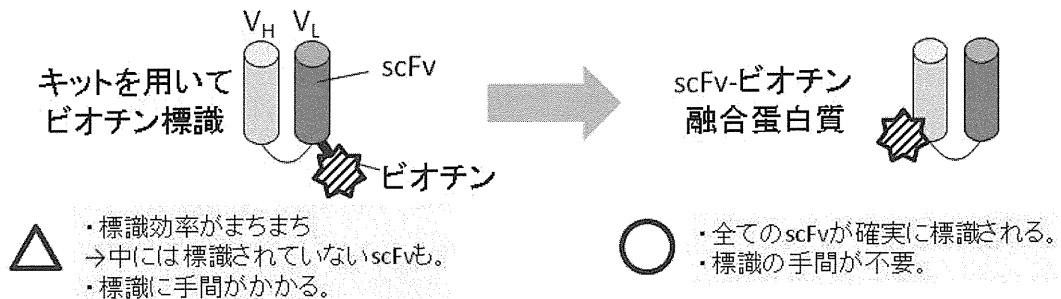
1 論文発表
なし

2 口頭発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 scFv-ビオチン 融合蛋白質の作製



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
「ワンヘルス理念に基づく動物由来感染症制御に関する研究」 分担研究報告書

輸入狂犬病発生前後における当院ワクチン外来での曝露後発病予防被実施者の分析

研究分担者 菅沼明彦 (がん・感染症センター都立駒込病院感染症科)
協力研究者 高山直秀 (がん・感染症センター都立駒込病院小児科)
協力研究者 柳澤如樹 (がん・感染症センター都立駒込病院感染症科)
協力研究者 中山栄一 (がん・感染症センター都立駒込病院小児科)

要旨 海外で狂犬病危険動物による咬傷などの傷を受け、当院ワクチン外来を受診した曝露後発病予防被実施者数は、2004-5年は70名台であった。しかし、2006年11月に輸入狂犬病が2例発生した後は、狂犬病曝露後発病予防のため当院ワクチン外来を受診する海外動物咬傷被害者の数が急増した。このため、2006～2008年における受診者の動向を比較検討した。2007年の受診者は、従来より男性が、年齢層では20代後半の者が多く、フィリピンでの受傷者の増加が目立ち、また脱落者の割合が大きかったが、現地医療機関を受診した者の割合、被害を受けた地域、受傷部位などの点では、2006～2008年の間に著しい差はみられなかった。

A. 序

狂犬病は代表的な人獣共通感染症であり、独特の臨床像とほぼ100%の死亡率のために紀元前から恐れられてきた疾患である。狂犬病は、発生状況に大きな相違があるとはいえ、世界の多くの地域で発生し続けている。日本では1957～2005年の間、1970年にネパールでイヌに咬まれて帰国後発病した輸入狂犬病症例1例を除いて、動物の狂犬病もヒトの狂犬病も発生の報告がなかった。このため日本人の多くは狂犬病に対する警戒心が薄く、海外の狂犬病常在地でイヌやネコなどの狂犬病危険動物に傷つけられて帰国する渡航者も少なくな

い。海外の狂犬病常在地でイヌやネコなどの狂犬病危険動物に咬まれて帰国した咬傷被害者が、狂犬病曝露後発病予防を受けるため、1990年から当院ワクチン外来を受診し

始めた。当院における狂犬病曝露後発病予防被実施者数は1998年から増加が目立ち、2000-02年には年間80名を超えた。2003年にはSARSが発生した影響で48名に減少したものの、2004-5年は70名台であった。しかし、2006年11月に輸入狂犬病が2例発生した後は、狂犬病曝露後発病予防のため当院ワクチン外来を受診する海外動物咬傷被害者の数が急増し、2007年の曝露後発病予防被実施者は138名に達した。しかし、その後2008年には98名、2009年には70名と減少した。輸入狂犬病発生の影響が残ると思われる2007年の被実施者の動向を、輸入狂犬病が発生した2006年及び発生後1年以上経過した2008年の受診者と、一部は2005年以前のデータをも含めて、比較検討した。

B. 対象と方法

2006年1月から2008年12月までに、海外で狂犬病危険動物に咬まれたのち、狂犬病ワクチン接種による狂犬病曝露後発病予防を求めて当院を受診した、海外動物咬傷被害者を調査対象とし、性別、年齢、咬傷を受けた地域、加害動物、現地での医療機関受診の有無、接種を受けたワクチンの種類、転機などを診療録に基づいて調査した。咬傷被害者が海外で接種を受けた狂犬病ワクチンの種類は、現地での診療記録、接種証明書または接種ワクチンの空き箱で確認した。診療記録、接種証明書、空き箱がない場合は不明とした。なお、狂犬病曝露後発病予防の継続は、原則として化学及血清療法研究所（化血研）製精製ニワトリ胚細胞狂犬病ワクチン〔purified chick embryo cell vaccine (PCEC-K)〕を使用して実施した。

C. 結果

1) 年別受診者数および男女比

当院ワクチン外来には、1990年から海外の狂犬病常在地でイヌなどの狂犬病危険動物による咬傷などを受けた被害者が狂犬病曝露後発病予防を受けるために受診し始めた。その後2000年までは年々受診者数が上昇し、SARS流行の影響によりアジアへの旅行者が減少した2003年を除いて71～84名程度であった。しかし、2006年11月に狂犬病患者が2例発生した後は狂犬病曝露後発病予防希望者が急増し、2007年には年間138名に達した（図1）。

2006年には108名（男性：58名、女性：50名）、2007年には138名（男性：95名、女性：43名）、2008年には98名（男性：51名、女性：47名）の海外動物咬傷被害者が当院ワクチン外来を受診して、狂犬病曝露後発病予防を受けた。2006年を輸入狂犬病症例発生の報道があった11月17日の前後で区分すると、1月から11月16日まで

は72名、11-12月は36名であった（図2）。受診者の男女比は2006年が1.16、2007年が2.21、2008年が1.09であり、2006年、2008年は男性数が女性数をやや上回る程度であったが、2007年には男性数が女性数の2倍以上となった。

2) 受診者の年齢分布

2006年の受診者108名のうち、25-29歳が28名、20-24歳が21名で、20歳代が全体の45.4% (49/108) を占め、30歳代が16.7% (18/108) でこれに次ぎ、40歳代が13.0% (14/108) であった。2007年は25-29歳が28名、20-24歳が26名で、20歳代が全体の39.1% (54/138) を占め、30歳代が21.7% (30/138)、40歳代が11.6% (16/138) であり、2008年は20-24歳が21名、25-29歳が15名で、20歳代が36.7% (36/98)、30歳代が22.4% (22/98)、40歳代が17.3% (17/98) であった。いずれの年も20歳代の受診者が最も多く、30歳代が2番目、40歳代が3番目に多い点では差がなかったが、2006-07は25-29歳が20-24歳よりも多く、2008年には20歳代前半の受診者が20歳代後半の者よりも多かった。

3) 加害動物

いずれの年も、それぞれの件数に差があるとはいえ、イヌによる咬傷が最も多く、ネコ、サルの順で続いていた。イヌ咬傷件数は、2006年が66.7% (72/108)、2007年が71.7% (99/138)、2008年が72.4% (71/98) と大多数を占めており、ネコ、サルによる被害者はいずれの年も20%未満であった。2006年と2007年にはコウモリに咬まれて狂犬病曝露後発病予防を実施した例が各2例あった。ウマに咬まれた被害者が2006年と2008年に各1例、飼育されている幼獣のトラに咬まれた被害者が2007年と2008年に各1例あった。2007年にはロバに咬ま

れた例，2008年にはウマに咬まれた例が各1例あった。

4) 受傷部位と受傷契機

各例における受傷部位を，素肌を傷つけられた例（素肌群）と衣服の上から咬まれた例（衣服群）に分け，さらに，現地医療機関受診の有無で分けてみると，現地医療機関受診例と未受診例の間の受傷部位には大差が見られないが，素肌群と衣服群の間には明らかな差がみられた。衣服群では下半身に受傷した例が多かったが，素肌群では，手指が最も多く，次いで下腿・足が多く，上肢，顔面に受傷した例もみられた。下肢に傷を受けた被害者の多くは，歩行中または何かに気を取られているときに，突然背後から来たイヌなどに咬まれていた。素肌群で下腿・足に傷を受けた例は，半ズボン，サンダル履きなどで歩いていた。また背後から飛びつかれて臀部や背部に受傷した者もいた。一方，手指や顔面を咬まれた被害者の中には，不用意に動物をなでようとしたり，手に餌をのせて与えようとした者が少なくなかった。

加害動物を捕獲し，脳組織検査の結果狂犬病と診断された例は2例のみであり，他の例では加害動物の検査は行われていなかった。

5) 受傷地域

当院受診者が受傷した地域をみると，いずれの年もアジア地域が80～87%を占めており，特にタイ，中国，インド，フィリピン，インドネシアが多かった。

6) 海外での狂犬病ワクチン接種

海外咬傷受傷者のうち，受傷した地域で狂犬病曝露後発病予防のため狂犬病ワクチン接種を受けたから帰国し，曝露後発病予防継続のため当院を受診した被害者の割合

は，2006年には51.9% (56/108)，2007年には55.1% (76/138)，2008年には55.1% (54/98)であり，いずれの年も半数を多少上回る程度であった。しかし，2006年の受診者について，輸入狂犬病報道日11月17日前後で区分すると，報道前の1月から11月16日までの受診者72名中48名が現地医療機関を受診して狂犬病ワクチン接種を受けており，現地での受診率は66.7% (48/72)であったが，11月17日から12月末までの受診者36名中現地医療機関の受診者は8名で，受診しなかった者が28名で現地での受診率は28.6% (8/28)と低かった（図2）。なお，2007年1月から6月までの受診者では，49.4% (44/89)が現地の医療機関を受診していた。

なお，受傷地で狂犬病ワクチン接種を受けた187例中，WHOの勧告どおりに狂犬病ワクチンとヒトないしウマ抗狂犬病免疫グロブリンの接種を受けた被害者は，2006年が21.4% (12/56)，2007年が15.6% (12/77)，2008年が13.0% (7/54)，3年間の平均は16.6% (31/187)であった。

7) 海外で接種された狂犬病ワクチンの種類

海外咬傷被害者が帰国以前に接種された狂犬病ワクチンの種類をみると，いずれの年も，組織培養由来凍結乾燥ワクチンの，ベロ細胞ワクチン[purified vero cell rabies vaccine (PVRV)，商品名：Verorab]が最も多く，次いでニワトリ胚細胞ワクチン[purified chick embryo cell vaccine (PCEC)，商品名：Rabipur, PCECなど]が多かった。中国製組織培養由来濃縮狂犬病ワクチンがこれに次いでいた。ヒト2倍体細胞ワクチン(human diploid cell vaccine：HDCV)はいずれの年も1例に過ぎなかった。また，旧式の動物脳由来ワクチンの接種を受けて帰国した咬傷被害者もあり，乳のみマウスワ

クチン接種を受けた例が 2008 年に 1 例, センプル型ワクチンの接種を受けて帰国した者も 2006 年と 2007 年に各 1 例いた。また狂犬病ワクチン接種を受けたが, 種類を特定できない被接種者が, 2006 年に 5 例, 2007 年に 15 例, 2008 年に 8 例みられた。

8) 狂犬病ワクチンの副反応

当院で使用している PCEC-K の接種後に, 発熱や蕁麻疹など全身性の副反応や神経系の副反応はみられなかった。ワクチン接種部位の局所的発赤はしばしばみられたが, 大多数では軽度であり, 発赤・腫脹が強いため投薬を必要とした例も, 副反応が強いためワクチン接種を中断した例もなかった。

9) 転機

海外での接種も含めて狂犬病ワクチン接種を 6 回受けた被害者は, 2006 年が 28 例 (25.9%), 2007 年が 16 例 (11.6%), 2008 年が 0 例, 5 回接種した例は, それぞれ 56 例 (51.9%), 91 例 (65.9%), 88 例 (89.8%) であり, 他の医療機関に転院して狂犬病曝露後発病予防を継続した例は, それぞれ 7 例 (6.5%), 10 例 (7.2%), 5 例 (5.1%) であり, 加害動物に 10 日間以上異常がみられないことが判明して狂犬病曝露後発病予防を中止した例が, それぞれ 13 例 (12.0%), 11 例 (8.0%), 4 例 (4.1%) であった。一方, 当院に連絡なく受診しなくなった脱落例は, 2006 年には 4 例 (3.7%), 2008 年には 1 例 (1.0%) であったが, 2007 年には 10 例 (7.2%) いた。比較のために 1990~99 年と 2000~2005 年における狂犬病曝露後発病予防被実施者の集計結果は, 1990~99 年では 6 回接種した例が 51.5% (119/231) で最も多かったが, 2000~2005 年では 5 回接種した例が 69.2% (303/438) で最多であった。なお, 脱落例はそれぞれ, 6 例 (2.6%), 12 例

(2.7%) であった。

当院にて狂犬病曝露後発病予防のための狂犬病ワクチン接種を 6 回完了ないし 5 回終了した海外咬傷被害者の中から狂犬病発症者は出ていない。また, サルに咬まれた被害者では, 狂犬病以外に B ウイルス感染症が心配されたが, サル咬傷被害者 38 名の中から発病者はみられていない。

D. 考察

海外において動物による咬傷, 搔傷を受けたため, 狂犬病曝露後発病予防を希望して当院を受診する被害者の数は, 2000 年以降, SARS が発生した 2003 年を除いて, 70~80 例台で推移していた。しかし, 2006 年 11 月に, 2 例の輸入狂犬病が発生したのは, 曝露後発病予防希望者の受診が急増し, 2007 年における曝露後発病予防被実施者は 138 例に達した。輸入狂犬病症例発生後の被実施者急増は, 以前であれば治療を考えなかった海外咬傷被害者が新聞やテレビなどの報道から狂犬病の致命率の高さに気づいたためと考えられる。2007 年には 20 代後半男性の受診が 2006 年, 2008 年より多かったことは, 20 代後半男性の中には, それまで海外の狂犬病常在地で動物咬傷を受けても狂犬病の危険を無視していた者が多かったことを反映していると考えられる。

また, 2007 年の受診者では, フィリピンで受傷した者の増加が目立ち, また脱落者の割合が大きかった。しかし, 現地医療機関を受診した者の割合, 被害を受けた地域, 加害動物種, 受傷部位などの点では, 2006~2008 年の受診者間に著しい差はみられなかった。

動物咬傷被害を受けた国や地域, 加害動物の種類に大差が見られなかったことは, 輸入狂犬病の発生が人々の旅行先の選択や旅行形態に大きな影響を与えなかったこと

を反映しているものと思われる。

狂犬病曝露後発病予防のため当院を受診した海外咬傷被害者数は、輸入狂犬病発生が報道された翌年の 2007 年を境に減少に転じ、2009 年には輸入狂犬病が発生した 2006 年以前の水準に戻った。この間海外で動物咬傷を受ける渡航者数が減少したとは考えにくく、海外で動物に傷つけられても狂犬病の可能性を考えない渡航者が以前の水準まで増えたと推測すべきであろう。

輸入狂犬病対策としては、海外で狂犬病危険動物に咬まれた被害者に対して、曝露後発病予防を迅速に実施できる体制を整えることも重要であるが、それにも増して海外旅行者などに狂犬病に関する知識を広める努力をするべきである。また、狂犬病常在地に赴任する人々や医療機関から遠い地域を旅行する人々は、組織培養狂犬病ワクチンによる曝露前免疫を受けてから出発するように指導するべきである。

表1. 狂犬病曝露後発病予防を受けた例の年齢分布,
男女比, 現地医療機関受診の有無比

年齢	2006年	2007年	2008年
0-9y	5	9	6
10-19y	0	4	8
20-24y	21	26	21
25-29y	28	28	15
30-34y	9	15	12
35-39y	9	15	10
40-49y	14	16	17
50-59y	10	11	5
60-69y	8	13	4
70y-	4	1	5
合計	108	138	103
男女比	58 : 50	95 : 43	51 : 47
有無比	56 : 52	77 : 61	54 : 44

表2. 受傷から現地医療機関受診までの日数
(現地医療機関受診例)

受診まで	2006年	2007年	2008年
0日	38	51	31
1日	13	15	13
2日	2	3	4
3日	1	3	1
4-6日	1	3	1
7-9日	0	1	1
10-29日	1	1	1
30-89日	0	0	1
90日~	0	0	1
合計	56	77	54

表3. 受傷から当院受診までの日数
(現地医療機関未受診例)

受診まで	2006年	2007年	2008年
0日	0	0	0
1日	2	7	3
2日	3	9	3
3日	7	11	6
4-6日	9	19	8
7-9日	10	2	4
10-29日	13	10	18
30-89日	6	2	2
90日～	2	1	0
合計	52	61	44

表4. 受傷から当院受診までの日数
(現地医療機関受診例)

受診まで	2006年	2007年	2008年
0日	0	0	0
1日	0	0	0
2日	0	0	0
3日	13	18	12
4-6日	11	12	10
7-9日	14	21	13
10-29日	15	22	13
30-89日	3	4	5
90日～	0	0	1
合計	56	77	54

表 5. 現地医療機関受診例の受傷部位および現地医療機関未受診例の受傷部位

2006年

受傷部位	素肌群	衣服群
顔面	3	0
頸部	0	0
上肢・肩	3	0
手・指	16	0
臀部	0	1
大腿部	0	2
下腿・足	11	20
合計	33	23

2006年

受傷部位	素肌群	衣服群
顔面	1	0
頸部	0	1
上肢・肩	5	2
手・指	23	0
臀部	0	2
大腿部	0	3
下腿・足	5	10
合計	34	18

2007年

受傷部位	素肌群	衣服群
顔面	5	0
頸部	0	0
上肢・肩	2	2
手・指	19	0
臀部・腰	0	3
大腿部	0	8
下腿・足	11	27
合計	37	40

2007年

受傷部位	素肌群	衣服群
顔面	2	0
頸部	0	0
上肢・肩	5	4
手・指	23	0
臀部・腰	0	0
大腿部	0	4
下腿・足	7	15
合計	37	23

2008年

受傷部位	素肌群	衣服群
顔面	0	0
頸部	0	0
上肢・肩	4	1
手・指	9	0
臀部・腰	0	5
大腿部	1	8
下腿・足	11	15
合計	25	29

2008年

受傷部位	素肌群	衣服群
顔面	1	0
頸部	0	0
上肢・肩	4	1
手・指	12	0
臀部・腰	0	0
大腿部	0	5
下腿・足	9	12
合計	26	18

表 6. 受診者が受傷した国または地域

受傷国名	2006年	2007年	2008年
タイ	40	38	20
中国	14	25	16
インド	6	10	16
フィリピン	7	16	8
インドネシア	11	10	5
他のアジア	9	21	17
中南米	4	8	7
北米	1	2	1
欧州	7	3	3
アフリカ	1	1	4
中近東	4	2	1
オセアニア	4	2	0
合計	108	138	98

表 7. 海外咬傷被害者における加害動物種

加害動物	2006年	2007年	2008年
イヌ	72	99	71
ネコ	20	17	13
サル	12	16	10
コウモリ	2	2	0
その他	2	4	4
合計	108	138	98

表 8. 当院における狂犬病曝露後発病予防被実施者の転帰

転帰	1990～99	2000～05	2006	2007	2008
6回完了	119	61	28	16	0
5回終了	72	303	56	91	88
転院	21	38	7	10	5
中止	13	24	13	11	4
脱落	6	12	4	10	1
合計	231	438	108	138	98

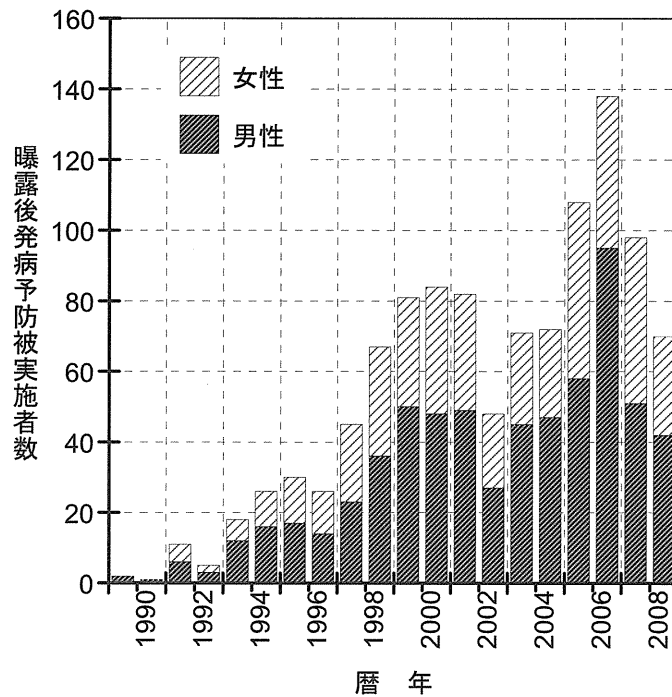


図1. 当院における年別狂犬病曝露後発病予防被実施者数

1990年から海外の狂犬病常在地でイヌなどの狂犬病危険動物による咬傷などを受けた被害者が狂犬病曝露後発病予防を受けるために当院を受診し始めた。その後2000年までは年々受診者数が上昇し、SARS流行の影響によりアジアへの旅行者が減少した2003年を除いて71～84名程度であった。しかし、2006年11月に狂犬病患者が2例発生した後は狂犬病曝露後発病予防希望者が急増し、2007年には年間138名に達したが、2008年には98名、2009年には70名と減少した。

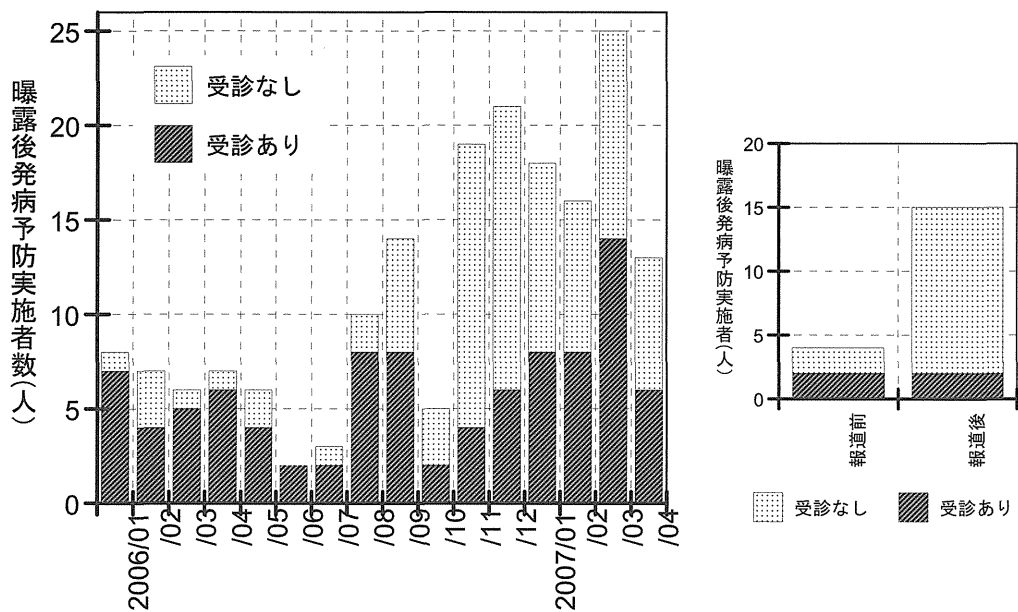


図2. 2006年1月から2007年4月までに当院ワクチン外来で狂犬病曝露後発病予防を受けた海外動物咬傷被害者数の月別推移。

輸入狂犬病発生が新聞などで報道された11月以降に曝露後発病予防実施者の数が急増した。特に2006年11月、12月には現地の医療機関などで狂犬病ワクチン接種を受けずに帰国し(受診なし)、帰国後に狂犬病の情報を得て当院を受診した者が、現地医療機関で狂犬病ワクチン接種を受けて帰国した者(受診あり)に比較して多くなった。

狂犬病の治療 改訂版

研究分担者 菅沼 明彦 東京都立駒込病院感染症科 医長
協力研究者 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少数に過ぎない。6例目の救命例は狂犬病ワクチン及び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、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、それらの詳細は明らかでなく、かつ治療失敗例の報告も数多いことから、MRBは確立された治療法としての合意は得られていない。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。これまでに報告された救命例は、いずれも狂犬病ウイルスが各種検体より直接検出されておらず、抗体上昇により診断されている。これは、狂犬病ウイルスが発症早期に排除されていることが、発症後の転帰に影響することを示唆していると思われる。狂犬病ウイルスの早期排除には、曝露量、宿主の免疫応答などが予後に影響する可能性があり、今後これらの因子について更なる検討が必要であると思われる。

1：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、議論が続けられている。

2：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年米国ウイス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

2004 年までに、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)。

<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、ほぼ完全に回復したとされているが、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 $230/\mu\text{l}$ (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 50mg/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。