

厚生労働科学研究費補助金（インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

狂犬病ウイルス抗原を簡易に検出する single chain variable fragment (scFv)を利用した
Direct, rapid immunohistochemical test (DRIT) 法の確立に関する研究

分担研究者：井上 智 国立感染症研究所獣医科学部、室長
研究協力者：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
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：現在、世界の狂犬病患者の 98%はイヌの咬傷が原因とされており、流行地域の検査機関では、発症を疑うイヌ症例の診断を日常的に行っている。近年注目されている狂犬病ウイルス（RABV）抗原検出法のひとつに、測定が簡便で高価な蛍光顕微鏡を必要しない Direct, rapid immunohistochemical test (DRIT) がある。本研究では、RABV 蛋白質を特異的に認識するビオチン融合タンパク化した single chain variable fragment (scFv)を使用して、DRIT をより簡易化する方法を検討した。これまでに、大腸菌を利用してビオチン融合タンパク化した抗 RABV-P タンパク scFv を発現できるクローン (scFv-P19-biotin) を作出することに成功した。現在、大腸菌で発現させた scFv-P19-biotin タンパクを利用した DRIT 法の確立を進めている。

A. 研究目的

狂犬病患者の 95%以上がイヌの咬傷が原因であり、狂犬病が疑れるイヌに咬まれたヒトは暴露後の予防接種（PEP）を速やかに開始しなければならないが、加害犬の狂犬病診断を現場で迅速に行うことができれば PEP を中止することができる。

近年、迅速抗原検出法「DRIT 法 (a direct, rapid immunohistochemical test)」が開発されて、蛍光顕微鏡を使用しない安価で簡易な検査法として発展途上国の検査機関で普及が期待されている。そこで、本研究では上記 DRIT 法をより安価かつ簡易な検出系とするために、single chain variable fragment (scFv) を利用した改良型 DRIT 法の開発を検討している。

一昨年度、精製した 4 クローンの抗 RABV-P scFv と 1 クローンの抗 RABV-N scFv をビオチン標識した DRIT 法を構築して、狂犬病ウイルスの抗原を RABV 感染マウス脳の塗抹標本を使用して特異的に検出することに成功した。

今回、検出に使用する抗体にビオチンを簡易に標識する方法として、上記 5 クローンの scFv 遺伝子を PinPoint Xa-3 ベクター (Promega) にクローニングして、大腸菌内で scFv をビオチン化する系の確立を検討した。

B. 研究方法

1) 抗 RABV-P 蛋白質、抗 RABV-N 蛋白質 scFv の発現確認

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) 遺伝子をクローニングした PinPoint Xa-3 ベクターを、大腸菌 JM109 に導入した。

①小容量培養：上記の大腸菌を 50ml の LB 培地で培養後、IPTG (最終濃度 9mM) で 30°C で 4 時間誘導し、NB-scFv の発現を試みた。菌液を遠心し、回収したペレットを lysis buffer で処理した後、Talon-His isolation kit (Life Technologies) を用いて、His タグ標識蛋白質である NB-scFv を精製・回収した。蛋白質濃度を測定し、SDS-PAGE で発現を確認できたクローンについては、②の大容量培養を行った。

②大容量培養：上記の大腸菌を 2l の LB 培地で培養後、前述の条件で NB-scFv の発現を試みた。菌液を遠心し、回収したペレットを lysis buffer で処理した後、Ni-NTA (Qiagen) を用いて、scFv を精製・回収した。蛋白質濃度を測定し、SDS-PAGE で発現を確認した。その後、Western blotting を行い、Avidin-HRP を用いて免疫染色することにより、NB-scFv が実際にビオチン化されているかを確認した。

2) NB-scFv (scFv-P19-biotin) の RABV 蛋白質

への結合能の確認

精製した大腸菌発現 RABV-P を SDS-PAGE に供し、Western blotting を行った。メンブレンを scFv-P19 および scFv-P19-biotin により免疫染色を行い、各 scFv 分子の RABV-P への結合能を確認した。1 次抗体として各 scFv、2 次抗体として Protein-L-HRP を用いた。

3) NB-scFv (scFv-P19-biotin) の DRIT における反応性の確認

① RABV 感染細胞 96 穴プレートの作製

マウス神経芽腫由来 MNA 細胞を 96 穴プレートに播きこみ、confluent になった状態で RABV CVS11 株を接種した。48 時間後に培養上清を取り除いた後、細胞をアセトンで固定した。陰性対照として、非感染 MNA 細胞を播きこんだプレートも同様に処理した。

② DRIT

上記プレートに、scFv-P19-biotin を反応させ、Streptavidin-peroxidase complex (KPL), AEC (Sigma) を用いて検出した (プロトコールの詳細は図 1 を参照)。scFv-P19-biotin は 4 段階 (280, 56, 28, 14 μ g/ml) に希釈し、50 μ l/well で使用した。また陽性対照として、DRIT 従来法に用いている精製抗 RABV-N polyclonal IgG (同仁化学 Biotin Labeling Kit-NH2 で標識済み) を使用した。

C. 研究結果

1) 抗 RABV-P 蛋白質、抗 RABV-N 蛋白質 scFv の発現確認

上記 5 クローンのうち、小容量培養でビオチン融合 scFv の発現が確認できたのは、P19 のみであった (data not shown)。そこで、P19 について大容量培養を行い、発現の確認を行った。SDS-PAGE により、約 45kDa の NB-scFv が確認できた (図 2 左)。蛋白質濃度は 0.28mg/ml であった。また、Western blotting および Avidin-HRP を用いた免疫染色により、同じ分子量のバンドが検出できたことから、P19-biotin が実際にビオチン標識されていることが確認できた (図 2 右)。

2) NB-scFv (scFv-P19-biotin) の RABV-P 蛋白質への結合能の確認

Western blotting および scFv-P19 / scFv-P19-biotin を用いた免疫染色により、約 40kDa の RABV-P 蛋白質が確認できた (図 3)。このことから、NB-scFv (scFv-P19-biotin) でも、scFv-P19 同様、RABV-P 蛋白質に対する結合能を保持していることが確認された。

3) NB-scFv (scFv-P19-biotin) の DRIT における反応性の確認

scFv-P19-biotin で染色した RABV 感染細胞においては、いずれの抗体濃度においても RABV 抗原を検出することはできなかった。一方、ビオチン標識済み抗 RABV-N polyclonal IgG で染色した場合、RABV 感染細胞において、特異的に RABV 抗原を検出することができた (図 4)。

D. 考察

今年度、昨年度に作製した NB-scFv 発現用プラスミド (PinPoint Xa-3 ベクター) 5 クローンを利用して、scFv のビオチン標識を行った。

検討した 5 クローンのうち scFv-P19-biotin のみで NB-scFv の発現が確認されており、ビオチン標識についても Western blotting と免疫染色による RABV-P 検出によって確認できた (図 2 右)。しかしながら、同クローンを DRIT に利用したところ RABV 抗原を検出することができなかった。

非標識の scFv-P19 を大容量培養後に精製した際の蛋白質濃度は 4.84mg/ml であったが、scFv-P19-biotin を精製した際の濃度が 0.28mg/ml であったことから、DRIT で RABV 抗原を検出できなかった理由として scFv-P19-biotin の発現量が著しく低かったことが考えられる。また、これ以外にビオチン化タグが付加したことで scFv の affinity が低下している可能性も考えられた。

一般的に、大腸菌発現系における蛋白質の発現効率は、蛋白質自身の性質のほか、発現プラスミドと大腸菌種の組み合わせで決まることから、① scFv 遺伝子をコードした PinPoint Xa-3 ベクターを、異なる大腸菌を用いて発現させる、② PinPoint Xa-3 ベクターにクローニングした scFv 遺伝子およびビオチン化ペプチドタグ遺伝子を、phagemid pIT2 にリクローニングし、大腸菌 HB2151 により発現させることが今後の課題と考えられた。

E. 結論

本研究では、DRIT 法をより安価かつ簡易な検出系とするために、PinPoint Xa-3 ベクター (Promega) を利用してウイルス抗原の検出に使用する single chain variable fragment (scFv) のビオチン標識を大腸菌内で行う系の確立を試みた。今回、ビオチン標識された NB-scFv を発現するクローン

(scFv-P19-biotin) の作出に成功したが、DRIT に利用した際に RABV 抗原を検出することができなかった。

現在、DRIT で RABV 抗原を検出できなかった理由を明らかにするために、scFv-P19-biotin の発現量の改良とビオチン化タグによる scFv の affinity への影響を検証している。

PinPoint Xa-3 ベクター (Promega) を使用して大腸菌内で scFv をビオチン化する系は、ビオチン標識の簡易化とともに、大腸菌を利用することによってビオチン化 scFv を大量に発現・精製できる利点がある。

したがって、本研究によって、安価・大量にビオチン化 scFv を生産することが可能になれば、発展途上国の検査機関で DRIT の普及が容易となり、近隣アジア諸国における狂犬病対策が促進され、わが国への狂犬病の脅威が低減するといった波及効果をもたらし、わが国の公衆衛生行政に多大な貢献をするものと考えられた。

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: 本研究で用いたDRIT プロトコール

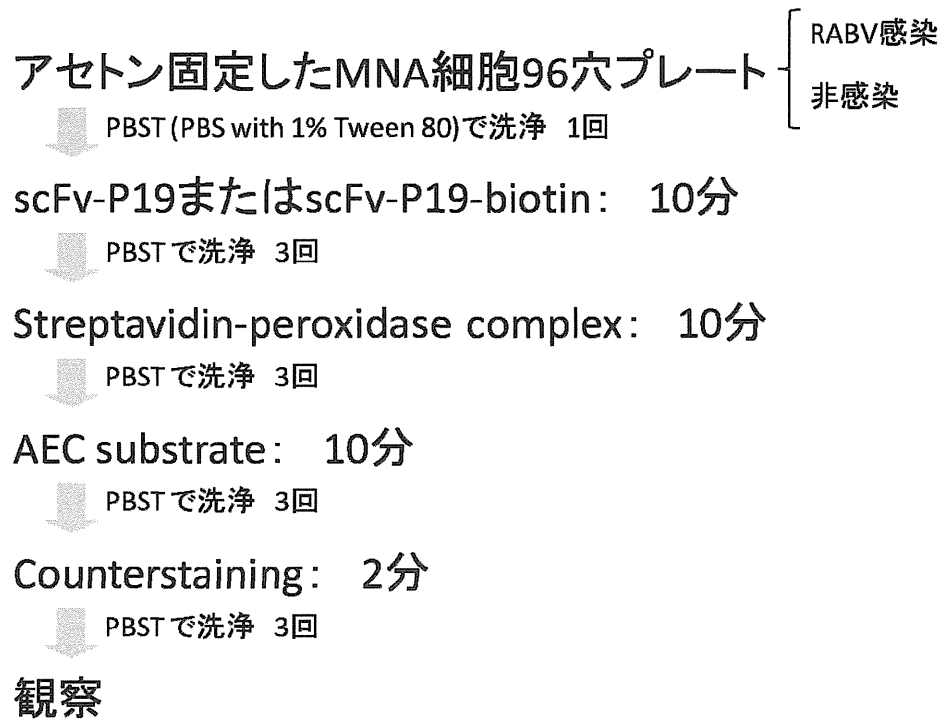


図2: NB scFv (scFv-P19-biotin) : 大腸菌発現 + 精製

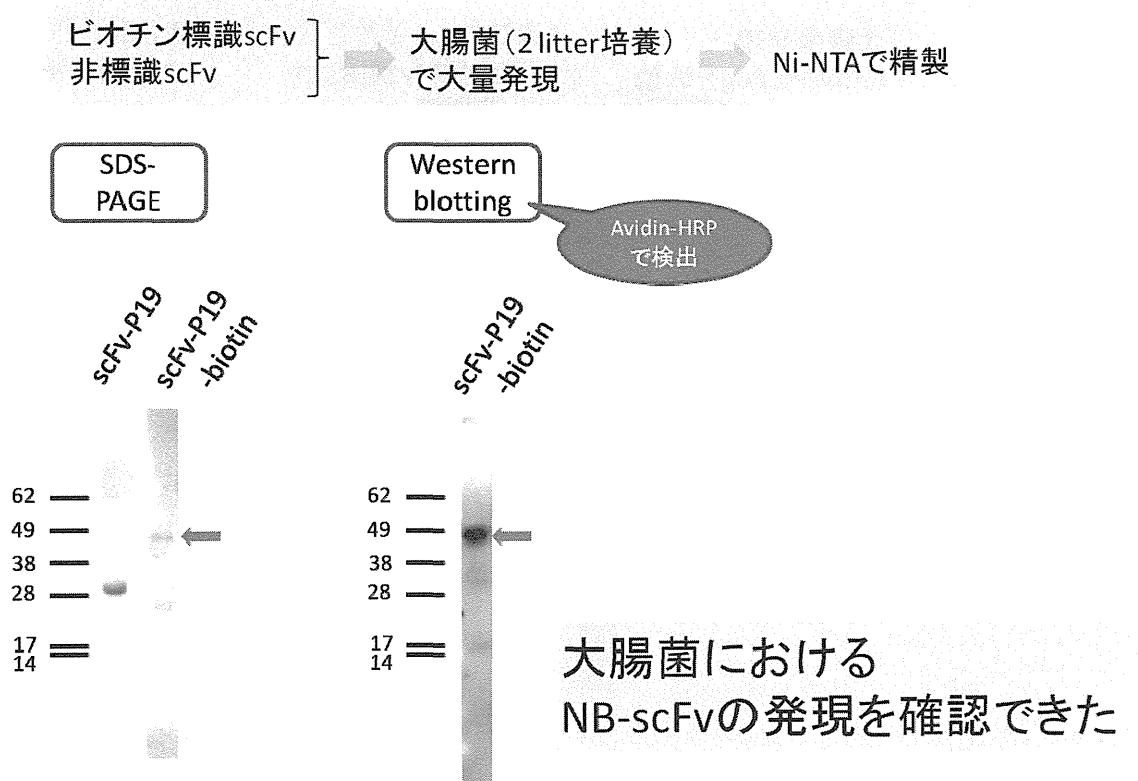
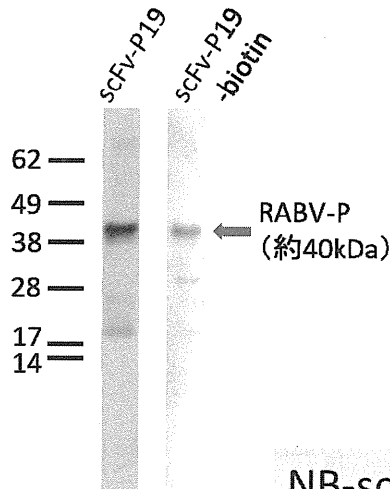
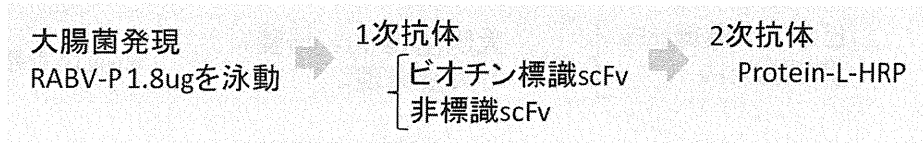
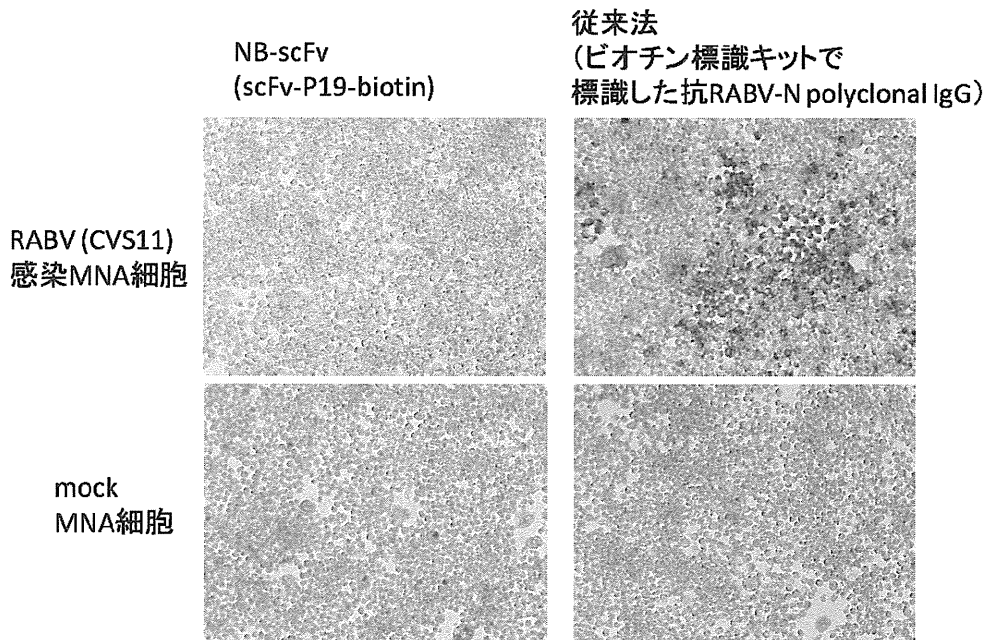


図3: NB scFv (scFv-P19-biotin) : RABV-Pへの結合能



NB-scFv (scFv-P19-biotin)は
RABV-P蛋白質に結合できる

図4: NB scFv (scFv-P19-biotin) : DRITでの反応性



NB-scFv (scFv-P19-biotin)は
RABV-P抗原を検出できなかった

狂犬病曝露後免疫 4 回接種法の検討

分担研究者	感染症科	菅沼明彦	がん・感染症センター都立駒込病院
協力研究者	小児科	高山直秀	がん・感染症センター都立駒込病院
協力研究者	感染症科	柳澤如樹	がん・感染症センター都立駒込病院

研究要旨：世界保健機関（WHO）は、狂犬病ワクチン接種歴を有しないものへの狂犬病曝露後免疫に狂犬病ワクチンの 5 回接種を推奨しているが、2009 年に米国では、曝露後免疫を原則 4 回接種への減量することが推奨された。本研究は、海外の狂犬病常在地にて動物咬傷を受傷したもので、狂犬病ワクチン接種歴がないものを対象とし、海外産及び国内産ワクチンを用いた 4 回接種による曝露後免疫について、4 回接種後 2 週間（5 回接種時）に抗体を測定し、その効果を検討した。対象は 18 例（男性 13 例、女性 5 例）、平均年齢 38.1 歳（20-68）であり、渡航地は全例アジア地域であった。国産ワクチンのみ実施されたもの 9 例、海外産ワクチン接種後に国産ワクチンが接種されたもの 9 例であった。全 18 例の狂犬病抗体幾何平均 1.36EU/mL、抗体陽転率（有意抗体価 0.5EU/mL 以上）16 例（89%）であった。狂犬病は発症すると致死性であり、曝露後免疫により限りなく 100%に近い抗体陽転率が求められることから、現時点において 4 回接種法は容認しがたいと思われた。

A.背景

狂犬病は、狂犬病ウイルスによる人獣共通感染症であり、致死的な中枢神経感染症を引き起こす。

昭和 31 年以降、ヒト及び動物の国内感染例は報告されていないが、世界的には途上国を中心に毎年 7 万人以上の感染者が発生していると推測されている。

発症前に狂犬病ウイルスの感染を診断することは不可能であり、狂犬病発症後の治療も確立されていない。このため、狂犬病常在地域で、狂犬病に感染した動物、または狂犬病に感染する可能性がある動物により受傷した場合は、適切な狂犬病曝露後免疫が必要である。

WHO は、曝露後免疫として、組織培養ワクチンを用いた 5 回接種（0、3、7、14、30 日）を推奨している。国産狂犬病ワクチンは、これに 90 日での接種を加えた、6 回接種が指示されている。

米国においても、1980 年代より 5 回接種による曝露後免疫が採用されていたが、2010 年 3 月に米国の ACIP(Advisory committee on immunization practices)は、狂犬病曝露後免疫における狂犬病ワクチンの接種回数を 4 回（0、3、7、14 日）へ減量することを勧告した（表 1）。¹⁾ 4 回接種法を推奨する根拠として、1) 動物実験で接種回数にかかわらず発症予防効果を認めた、2) ヒト臨床研究で接種後 14 日に十分な中

和抗体価が得られた²⁾、3)疫学的サーベイランスにて5回未満の狂犬病ワクチン接種とヒト由来抗狂犬病免疫グロブリンを投与したもので狂犬病発症者は確認されなかった³⁾、4)5回目接種の省略により、渡航費用の軽減、勤務時間減少の抑制、医療従事者の診療時間の確保、ワクチンによる副作用の減少が得られる⁴⁾、などを上げている。また、狂犬病暴露後免疫失敗例の多くは、顔面、頸部を受傷し、ほとんどが受傷後28日以内に発症していることから、5回目接種が発症予防に寄与しなかったことが示されている。⁶⁾

現時点において、WHOは4回接種法を追認していないが、世界的に狂犬病暴露後免疫を再検討する契機になりうると考えられる。今回、国内における狂犬病暴露後免疫希望者での4回接種法の効果を検討したので報告する。

方法

狂犬病流行地域において、狂犬病の可能性を有する哺乳動物に暴露され、狂犬病暴露後免疫を開始し、当院での接種継続を希望されたものを対象とした。暴露後免疫が、現地において海外産ワクチンにより開始されたものと、帰国後に国産ワクチンにより開始されたもののいずれも検討の対象とした。暴露前に狂犬病ワクチン接種歴を有するものは除外した。

4回接種の効果を判定するため、4回接種2週間後となる5回接種時に採血を行い、検体を採取した。採取された検体を用いて、一般財団法人化学及血清療法研究所において狂犬病抗体価が測定された。狂犬病抗体価の測定には、Platelia Rabies

II ELISA (Bio-Rad社)を用いた。狂犬病発症予防に必要とされる有意抗体価は、0.5EU/mLとした。

結果

対象は18例(男性13例、女性5例)、平均年齢38.1歳(20-68)であり、渡航地は全例アジア地域であった。国産ワクチンのみ実施されたものが9例、海外産ワクチン接種後に国産ワクチンが接種されたものが9例であった。現地にてヒト狂犬病免疫グロブリンが投与された例を1例認めた。全18例の狂犬病抗体幾何平均1.36(EU/mL)、抗体陽転例(0.5EU/mL以上)16例(89%)であった。

考察

本研究では、国内における狂犬病暴露後免疫の4回接種の効果をみるため、4回接種2週間後に実施される5回接種時に狂犬病抗体を測定した。米国では、標準法であるRFFIN法による中和抗体を採用し、ELISA法を推奨していないが、中和抗体法は迅速、かつ簡便に行いえない難点がある。今回、Platelia Rabies II ELISA (Bio-Rad社)にて抗体検査を実施したが、標準法との相関性が良好であることが複数の報告により示されている。⁷⁾⁸⁾

国内における狂犬病暴露後免疫は、基本的に海外での動物咬傷を理由として行われることから、海外産ワクチンに引き続いて、国産ワクチンの接種が行われるケースが少ない。このため、国産ワクチンのみでの暴露後免疫の効果を見ることだけでは現実に即しておらず、海外産ワクチンを接種した後に国産ワクチンを接種したのもも検

討する必要がある。これまで、暴露後免疫 5 回接種法の評価を、国産ワクチンのみの群と海外産ベロ細胞由来ワクチンまたはトリ胚細胞由来ワクチンを接種後に国産ワクチンにて継続接種した群において検討した高山らの報告では、両群とも 5 回接種後 2 週間での抗体陽転率は 100%を示しており、従来法の高い有効性が証明されている。⁹⁾

今回の結果から、4 回接種後 2 週間での狂犬病抗体価が狂犬病抗体幾何平均 1.36EU/mL、抗体陽転率（有意抗体 0.5EU/mL 以上）16 例（89%）との結果が得られた。狂犬病は発症すると救命が困難であるため、狂犬病ワクチンによる暴露後免疫の実施が、狂犬病発症予防に極めて重要である。このため、暴露後免疫により限りなく 100%に近い抗体陽転率が求められることから、上記の結果は容認しがたい。

有意抗体価に満たなかった 2 例は、いずれも海外産ワクチン接種後に国産ワクチンを継続したものであるが、症例数が少ない

ことから、国産ワクチンのみを接種した症例と比較することは困難である。

約 9 割に抗体の陽転化を認めたことから、中和抗体との相関性が良好で、迅速かつ簡便な抗体検査が実施可能ならば、これを基準として、多くの症例で 5 回目の狂犬病ワクチン接種を回避できる可能性があるが、この条件に合致した検査法はない。

今回は対象が少数例にとどまったため、患者背景及び接種ワクチンの差異などによる抗体産生への詳細な分析は行いえなかったが、国内における狂犬病暴露後免疫として、従来の 5-6 回接種を継続することが現実的な対応と考える。

<文献>

- 1) Rupprecht CE, et al. Use of a reduced (4-dose) vaccine schedule for postexposure prophylaxis to prevent human rabies: recommendations of the advisory committee on immunization Practices. *MMWR Recomm Rep.* 2010; 59: 1-9.
- 2) Charles E. Rupprecht, et al. Evidence for a vaccine schedule for human rabies post-exposure prophylaxis in previous non-vaccinated individuals. *Vaccine* 2009; 27: 7141-8.
- 3) Kis Robertson, et al. Seroconversion following incomplete human rabies postexposure prophylaxis. *Vaccine* 201; 28: 6523-6526
- 4) Krebs JW, et al. Causes, costs and estimates of rabies postexposure prophylaxis treatments in the United States. *J Public Health Manag Pract* 1998; 4: 56-62.
- 5) Dhankhar P, et al. Cost effectiveness of rabies post exposure prophylaxis in the United States. *Vaccine* 2008; 26:4251-5.
- 6) Wilde H. et al, Failure of post exposure rabies prophylaxis. *Vaccine*

2007; 25: 7605-9.

- 7) Yanagisawa, N., et al. Pre-exposure immunization against rabies using Japanese rabies vaccine following the WHO recommended schedule. *J Infect Chemother* 2010; 16: 38-41.
- 8) Ryan J. Welch, et al. An evaluation of two commercially available ELISAs

and one in-house reference laboratory ELISA for the determination of human anti-rabies virus antibodies. *J Medical Microbiol* 2009, 58, 806-810

- 9) 高山直秀ら、外国製狂犬病ワクチンに引き続き国産狂犬病ワクチンで狂犬病暴露後発症予防を受けた人々における抗狂犬病抗体価. *感染症学雑誌* 2002 年第 76 卷 P882-887

表 1 <変更された狂犬病曝露後免疫のスケジュール>

接種の既往	処置	対応
なし	創部の洗浄	直ちに流水と石鹼にて直ちに洗浄する。 可能ならば抗ウイルス作用のある消毒薬を使用する。
	HRIG	20IU/kg を可能ならば全量創部周辺に浸潤させる。 残量がある場合はワクチン接種部より離して筋注する。
	ワクチン	HDCV または、PCECV 1.0ml を 0、3、7、14 日に接種する。*
あり	創部の洗浄	直ちに流水と石鹼にて直ちに洗浄する。 可能ならば抗ウイルス作用のある消毒薬を使用する。
	HRIG	投与しない。
	ワクチン	HDCV または PCECV1.0ml を 0、3 日に接種する。

HRIG : ヒト由来抗狂犬病免疫グロブリン

HDCV : ヒト 2 倍体細胞ワクチン

PCECV : ニワトリ杯細胞ワクチン

* 免疫不全を有す場合は、0、3、7、14、28 日の 5 回接種を行う

分担研究報告書

狂犬病の治療 2012年改訂版

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、現在に至るまで、その改訂が行われている。2012年までに同様の治療を受けた4例の救命例が報告されたが、それらの詳細はすべてが明らかとはなっておらず、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、狂犬病確定例に対し、苦痛の軽減を目的とした緩和治療を推奨し、人工呼吸器の使用などの侵襲的処置は避けるべきとの立場をとっている。これまでに報告された救命例は、いずれも各種検体より狂犬病ウイルスが直接検出されておらず、抗体上昇によって診断に至っている。これは、発症早期における狂犬病ウイルスの排除が、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、ウイルスの変異、曝露量、宿主の免疫応答などが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。狂犬病患者に対する院内感染対策として、飛沫感染及び接触感染予防の順守が求められる。

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、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 4)。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

工呼吸器管理等を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。巢症状、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/ μ 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、痙攣性麻痺が残存した。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、ベ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つ

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/ μ 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 50 mg/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。発症 5 日目に 3 次医療機関へ転送された。再度実施された頭部 MRI では異常を認めなかった。転院初日の血清および髄液の中和抗体はそれぞれ 102 倍、47 倍であった。その後両者ともに上昇を認め、1,183 倍、1,300 倍となった。皮膚、項部、唾液のいずれからもウイルスは検出されなかった。人工呼吸管理となり、ケタミン、ミダゾラムを投与され、てんかん波抑制のためフェノバルビタールが加えられた。また、リバビリン、アマンタジンを経腸的に投与された。後遺症を残したが改善を認め退院した。退院後もさらに神経症状の改善を認められた。2007 年には、歩行障害、構語障害などが残存するものの、高校生活を卒業し、大学進学試験にて平均以上の点数を得たことが報告された (21)。本例は、発症前にも発症後にも狂犬病ワクチン接種を受けずに救命された初めての症例であった。

<7 例目> 41)

2009 年に米国より髄膜炎から集中治療を要せずに回復した症例で、後に狂犬病が判明した症例が報告された。41)

17 歳女性。2009 年 2 月 25 日に強い前頭部痛、羞明、嘔吐、頸部痛、めまい、および顔面と前腕の知覚異常を主訴に救急外来を受診した。頭痛は受診 2 週間前から出現していた。間欠的な失見当識を認め

(GCS=14)、項部硬直および 38.9 度の発熱も認められた。頭部 CT で異常を認めなかった。腰椎穿刺が施行され、白血球 $163/\text{mm}^3$ 、赤血球検出なし、リンパ球 97%、単球 3%、糖 61mg/dL であった。セフトリアキソンおよびデキサメサゾンの投与を行ったが、髄液培養陰性であり、両薬剤は中止された。3 日後に症状改善したため、退院した。

その後頭痛が再燃し、増悪した。3 月 6 日、羞明、嘔吐、頸部～背部を中心とした筋肉痛を訴えて別の病院を受診した。頭部 MRI では、年齢に比して側脳室拡大が著明であった。腰椎穿刺が再度施行され、蛋白 160mg/dL、白血球 $185/\text{mm}^3$ 、赤血球 $1/\text{mm}^3$ 、リンパ球 95%、マクロファージ 5% であった。同日、小児専門治療機関に搬送され、入院した。

入院時、発熱はなく意識は声明で、見当識も正常であった。眼底検査では両側乳頭の辺縁不鮮明化が認められた。また左視野の一時的な狭窄を伴う羞明を認めた。入院当初は左上下肢の筋力低下を認めたが、その後改善した。腕から背部にかけて、搔痒感を伴う丘疹も認められた。感染性脳炎が疑われ、アシクロビル、セフトリアキソン、エサンプトール、イソニアジド、ピラジナミド、リファンピシンの投与が開始された。3 月 10 日、患者は右上下肢の感覚と筋力消失を訴えるようになり、脱力感も認められた。嘔吐回数が増加し、興奮状態および攻撃的になったが、翌日には症状は改善した。再度腰椎穿

刺を施行したところ、髄液圧の上昇が認められた。

脳炎と無菌性髄膜炎の精査目的で様々な検査が施行されたが、確定診断には至らなかった。3月10日、コウモリへの曝露歴が確認されたため、狂犬病が鑑別診断として浮上した。患者は、頭痛が出現するおよそ2カ月前、テキサス州でキャンプに行っていた際に洞窟に入り、飛んでいるコウモリと接触したことを思い出した。数匹のコウモリとの接触があったが、咬傷やひっかけ傷などを受けた自覚はなかった。また、ペットとしてフェレットおよびイヌを飼っていたが、いずれも健康であり、定期健診を受けていた。

患者は狂犬病ワクチンの接種歴はなかった。3月11日、血清と髄液の狂犬病ウイルス抗体検査、唾液と項部皮膚生検による狂犬病ウイルスRNAのPCR法、項部皮膚生検による狂犬病ウイルス抗原の直接蛍光抗体法が疾病対策予防センター(CDC)で行われた。狂犬病ウイルス抗原およびRNAは検出されなかったが、IFAにより4本の血清および髄液検体で狂犬病ウイルス抗体が陽性となった。血清免疫グロブリンG(IgG)反応は上昇し、最大時の希釈率は8192倍であり、血清免疫グロブリンM(IgM)は32倍であった。髄液IgGも陽性となり、3月19日には希釈率が32倍であり、4月3日までに8倍まで低下した。髄液IgMは陰性であった。IFA陽性所見は、第三者による盲検法で行われたウエスタンブロット法により確認された。狂犬病ウイルスはリッサウイルス属の他のウイ

ルスと血清学的に交差反応を示す場合があるが、北米に生息するコウモリが媒介するラブドウイルスのうち、狂犬病ウイルスと血清交差反応を示す可能性があるものは、Kern Canyon virus(KCV)のみである。患者の皮膚、唾液、髄液を用いてPCR法を行ったが、KCVのRNAは検出されなかった。

3月14日、狂犬病陽性の結果を受け、狂犬病ワクチン接種およびHRIG 1500 IUの投与が行われた。免疫応答が高まることによる有害反応を懸念し、ワクチンの追加接種は施行されなかった。3月19日と3月29日に、迅速蛍光フォーカス抑制試験(RFFIT)により血清の狂犬病VNAが陽性となったが、髄液の狂犬病VNAは依然として陰性であった。

患者は保存的治療が継続され、集中治療は不要であった。3月22日、臨床症状が改善したため退院した。しかし頭痛が再燃したため3月29日に救急外来を受診した。この際、腰椎穿刺は施行されず帰宅した。しかし4月3日に頭痛と嘔吐を主訴に再度救急外来を受診し、今回は腰椎穿刺が施行された。髄液圧はいまだに上昇が認められた。腰椎穿刺後に頭痛は消失した。その後再入院することなく、フォローアップの外来も受診しなかった。

曝露後発病予防(PEP)の適応を評価するため、患者の親しい友人および親族、医療関係者に問診票を配布した。患者のボーイフレンドのみが基準を満たし、PEPを受けた。現在の患者およびボーイフレンドの状態は不明である。

<症例 8> 42)

2011 年に MRP に準じた治療により回復した 1 例が報告されている。42)

2011 年 4 月 25 日、8 歳女児が上室性頻脈のために以前から処方されていたソタロールを服用する際に咽頭痛と嘔吐を訴え、かかりつけの小児科医を受診した。その後数日間で、嚥下困難が出現したため、水分を少量しか飲み込むことができなかったが、日常生活は可能であった。最初の受診から 3 日後、経口摂取不良のため地域の ED を再診し、脱水治療のため補液が行われた。その 2 日後、患児は腹部全体、頸部、背部の疼痛を訴え、再度 ED を受診したが、ウイルス性疾患の診断にて帰宅となった。5 月 1 日、咽頭痛、全身脱力、虫垂炎を示唆する腹痛を訴え、3 回目の ED 受診となった。患児は混乱状態で、脈拍 108/分、血圧 112/87mmHg、体温 35.9°C であった。頭部と腹部の CT 検査では、有意な所見は認められなかった。胸部 CT では、左下肺葉の無気肺のみを認めた。患児は造影剤を飲みこむ際に、喉を詰まらせた。動脈血液ガス分析で呼吸窮迫とアシドーシスが判明し、人工呼吸管理となった。補液、セフトリアキソン、アジスロマイシンの投与開始後、専門治療施設に搬送された。

小児集中治療室に入院時、神経学検査では両側の下肢脱力が認められた。5 月 1 日の血液検査では、白血球数 19,200/ μ L (基準値: 3,700-9,400/ μ L) であった。この時点で、呼吸器検体の PCR 検査でライノウイルス

が検出されたこと以外、感染症関連の検査は陰性であった。電解質と腎機能は正常であった。CSF 検査では、白血球数 6/ μ L (基準値: 0~5/ μ L)、蛋白 62mg/dL (基準値: 10-45mg/dL)、糖 67mg/dL (基準値: 45-75mg/dL) であった。薬物スクリーニング検査は陰性であった。その後数日間で、上行性弛緩麻痺、意識レベルの低下、発熱が出現した。脳 MRI 検査では、大脳皮質と大脳皮質下領域、脳室周囲白質に T2 および FLAIR 画像で異常信号を複数認め、制限拡散領域も認められた。筋電図では、主に脱髄型の運動症状優位の重篤な多発ニューロパチーの所見に合致しており、手足の遠位の筋肉の運動神経の刺激に対しても電気信号が認められなかった。細菌性肺炎とマイコプラズマ脳炎の可能性を考慮し、セフトリアキソン、レボフロキサシン、アジスロマイシンの短期投与を開始した。また、発作予防のためレベチラセタムの投与も開始した。

2011 年 5 月 4 日、カリフォルニア州公衆衛生局ウイルス・リケッチア疾患研究所 (VRDL) のカリフォルニア脳炎プロジェクトチームに、エンテロウイルス (EV) およびウエストナイルウイルス (WNV) の検査を緊急で実施するよう依頼した。エンテロウイルスとライノウイルスの交差反応は良く知られていることから、EV の分子学的検査が依頼された。呼吸器検体の EV およびライノウイルスの PCR 検査では、EV の RNA は検出されず、ライノウイルスが検出された。WNV の血清学検査は陰性であった。VRDL は臨床症状が狂

犬病と一致していることから、狂犬病検査を提案し、その後血清の間接蛍光抗体 (IFA) 試験で、狂犬病ウイルス特異的 IgG と IgM 抗体が検出された。

狂犬病が推定されたため、鎮静薬としてケタミンとミダゾラムを、大脳動脈血管攣縮の予防としてアマンタジンとニモジピンを開始した。また、ナトリウムレベルを $>140\text{mmol/L}$ に維持するため、フルドロコルチゾンと高張生理食塩液の投与を開始した。ヒト狂犬病免疫グロブリンおよび狂犬病ワクチンは接種されなかった。

入院 1 週目、患児は交感神経系の機能不全に陥り、著明な高血圧が認められた。エスモロールとニカルジピンの点滴静注、さらにはヒドララジンの間欠投与とアムロジピンの定期投与を必要とした。また、アデノシンを要する上室性頻脈も高頻度で認められた。これらの症状は、中心静脈カテーテルの位置を変更することで改善した。経頭蓋ドップラー超音波検査および頭部 CT 血管造影では、大脳動脈攣縮は認められなかった。

5 月 8 日、患者は自発的に頭を動かすようになった。その後数日間で、頭を更に動かすようになり、次に上肢、下肢の順で動かすようになった。力が徐々に回復したため、5 月 16 日に抜管し、患児は 1 週間後に小児病棟に移動した。5 月 31 日、左の下垂足のため、患児はリハビリテーション科に移された。6 月 22 日の退院時、認知機能障害はなく、歩行や日常生活動作に問題はなかった。

診断検査

CSF と血清の抗狂犬病ウイルス抗体検査、狂犬病 RNA 検出のための唾液と項部生検検体の PCR 検査、および狂犬病ウイルスのための項部生検検体の直接蛍光抗体法が実施された。VRDL と疾病対策予防センター (CDC) で、5 月 3 日から 6 月 9 日までに採取された複数の血清検体から、IFA により狂犬病ウイルス特異抗体が検出された。血清 IFA の力価は 5 月 11 日にピークとなり、IgG は 1:64、IgM は 1:160 であった (VRDL の結果)。CDC で実施された IFA でも、3 つの CSF 検体で狂犬病ウイルス特異抗体が検出された。IFA の力価は 5 月 8 日にピークとなり、IgG は 1:4、IgM は 1:8 であった。血清と CSF において、狂犬病ウイルス中和抗体は検出されなかった。同様に、狂犬病ウイルス抗原および RNA も全ての検体で検出はされなかった。

その他の感染性および非感染性の原因を特定するため、詳細な検査が実施された。しかし、陽性となったのは、民間検査機関で検出された *M. pneumoniae* IgM のみであった。発症から 4 カ月経ても、*M. pneumoniae* IgG へのセロコンバージョンは報告されていないが、IgM は陽性のままであった。PCR の再検査で、呼吸器スワブ検体中に *M. pneumoniae* 核酸が検出されたが、CSF 中には検出されなかった。呼吸器検体からの核酸検出では感染と定着が区別できず、中枢神経系で *M. pneumoniae* が検出されていないため、*M. pneumoniae* 陽性の結果は、狂

犬病ウイルス診断結果ほど重要とは考えられなかった。さらに、IgG セロコンバージョンが起こっていない状態でも IgM が検出されたことから、偽陽性の可能性が示唆された。

<狂犬病救命例の考察>

上記 8 症例は、各種検体より狂犬病ウイルスは検出されず、狂犬病抗体の上昇が確認されたことにより、狂犬病と診断されている。この事実は、遅くとも診断時には狂犬病ウイルスが排除されていることが、良好な転帰に寄与した可能性が示唆される。特に、症例 7 においては、集中治療を要せずに症状が改善しており、治療以外の要因が予後に影響することを強く示唆すると思われる。狂犬病ウイルスの早期排除に、ウイルスの変異、曝露量、受傷の程度、宿主の免疫応答などの影響が考慮される。狂犬病ウイルスの早期排除に関する因子を今後検討する必要があると思われる。

また、近年の救命例が北米の症例に限られていることから、狂犬病ウイルスの地域性及び由来する動物種による病原性の変化が、予後に影響している可能性も考慮される。

4：狂犬病の合併症とその治療

これまでの症例の蓄積により、狂犬病の臨床経過が明らかになってきている。集中治療により生存期間の延長した症例が増加し、経過中に代謝系、循環器系、呼吸器系などの多彩な合併症が出現することが確認された 25)。

6 例目の救命例の治療を行ったウイスコンシン大学により、狂犬病患者に対する治療指針が示され、Milwaukee rabies protocol

(MRP) として公開されている 28)31)38)。MRP には、これまでの症例報告から、合併症とその発病日、推奨される治療が示されている。これらの治療は、特異的な治療により治癒を目指すことが前提であり、気管内挿管、人工呼吸管理、心臓ペースメーカーなどの侵襲的処置が含まれている。治療方針に統一された見解がない現状では、合併症への対応についても議論が分かれる。(表 2)

5：狂犬病に対する特異的治療

これまで、狂犬病に対する特異的治療が検討されているが、実験室レベルでの有効性を示した薬剤はあるが、ヒト狂犬病の治療において効果の再現性が示されたものはない。前述したウイスコンシン大学を中心としたグループが特異的治療を積極的に行っており、MRP に特異的治療が述べられている 30)。

<ケタミン>

ケタミンは、非競合性 N-methyl-d-aspartate(NMDA)受容体阻害剤であり、一般的に臨床では、解離性麻酔薬として、麻酔科領域で使用されている薬剤である。

感染ラット神経細胞において、ケタミンを作用させることにより、狂犬病ウイルスの核タンパクおよび糖タンパクの合成抑制が確認したとの報告がみられた 8)。

しかし、同様の感染神経細胞を用いた実験において、ケタミンに神経保護作用は認めなかったとの報告もあり、結果は一定していない。マウスの脳内に狂犬病ウイルスに接種した実験系では、感染した神経細胞