

- 資料 4 -

2 4 5 -

平成 2 5 年 1 2 月 日

九州各県狂犬病予防担当部長 殿

宮崎県福祉保健部長
(公 印 省 略)

宮崎大学での狂犬病検査研修について (通知)

厳冬の候、貴職におかれましては、ますます御清祥のことと存じます。

さて、「宮崎県と国立大学法人宮崎大学との包括的連携協定」に基づき、「宮崎県福祉保健部と宮崎大学産業動物防疫リサーチセンターとの連携協力に関する覚書」を平成 2 5 年 1 2 月 1 8 日に締結し、標記研修を下記のとおり開催することとなりました。

つきましては、業務御多忙のこととは存じますが、貴県関係職員の出席について御配慮いただきますようお願いいたします。

なお、出席者等については別紙 1 により電子メールにて平成 2 6 年 1 月 1 6 日 (木) までに下記担当あて提出いただきますようお願いいたします。

記

- 1 日時
平成 2 6 年 2 月 1 7 日 (月) 午後 1 時から
平成 2 6 年 2 月 1 9 日 (水) 午後 0 時まで
- 2 場所
宮崎大学農学部獣医学科会議室等
- 3 講師
国立感染症研究所 井上 智 氏
大分大学医学部 山田 健太郎 氏
宮崎大学獣医学科 三澤 尚明 氏
- 4 内容
別紙のとおり

(文書取扱 衛生管理課)

乳肉衛生担当：坊菌 TEL：0985-26-7077 FAX：0985-26-7347 E.mail：bohsono-yoshinobu@pref.miyazaki.lg.jp

宮崎大学での狂犬病検査研修日程

【1日目】

平成 2 6 年 2 月 1 7 日 (月)
1 3 時～1 7 時 (受付：1 2 時 3 0 分～)

○研修内容（場所）

- ①講義（獣医棟1階獣医視聴覚室）
- ②防護服等の着脱実習（獣医棟1階獣医視聴覚室）
- ③犬の模型を使用した解剖実習（獣医棟3階微生物学実習室）

【2日目】

平成26年2月18日（火）9時～18時

○研修内容（場所）

- ①病理解剖実習：脳材料の摘出（獣医棟1階病理解剖実習室）
- ②ウイルス検出：直接蛍光抗体法及びRT-PCR法による狂犬病ウイルスの検出（獣医棟3階微生物学実習室）

【3日目】

平成26年2月19日（水）10時～12時

○研修内容（場所）

- ①総合ディスカッション（獣医棟1階獣医視聴覚室）

- 資料 5 -

平成 24 年度狂犬病予防業務担当者会議

日 時：平成 25 年 2 月 7 日（木） 10:00～17:00

場 所：三田共用会議所 講堂（東京都港区三田 2-1-8、別紙地図参照）

10:00～10:05	開会挨拶 厚生労働省健康局結核感染症課長 正林 督章
10:05～10:10	事務局説明
10:10～12:00	「狂犬病に関する最新の知見について～フランスにおける狂犬病犬輸入事例の紹介等～（仮題）」 Institut Pasteur Department Infection and Epidemiology Lyssavirus dynamics and host adaptation unit director Dr. Herve Bourhy （パスツール研究所動態・宿主適応ユニット長 エルヴェ・ブルリ博士） ※講義は実質 50 分間 発表後は 20 分間の質疑応答時間 同時通訳有り
12:00～13:10	（昼 休 憩）
13:10～14:20	第 1 部 狂犬病対応ガイドライン 2013 について (1) 狂犬病対応ガイドライン 2013 について 国立感染症研究所獣医科学部第二室長 井上 智 (2) 狂犬病対応ガイドライン 2013 に対するアンケート結果について 健康局結核感染症課 (3) 総合討論
14:20～15:30	第 2 部 狂犬病予防に関する取り組み紹介 (1) 神奈川県における狂犬病検査体制について（15 分間） 神奈川県動物保護センター (2) 岐阜県内で発生した狂犬病疑い犬事例の紹介等について（15 分間） 岐阜県健康福祉部生活衛生課 (3) 狂犬病検査体制に関するアンケート結果について（10 分間） 健康局結核感染症課 (4) 総合討論 ※(1)(2)の発表後、5 分間の質疑応答
15:30～15:40	（休 憩）
15:40～16:40	「海外文献によるヒト狂犬病症例の概観と狂犬病曝露後発病予防の実際」 がん・感染症センター都立駒込病院小児科非常勤医師 高山 直秀 ※講義後、10 分間の質疑応答
16:40～17:00	(1) 都道府県及び市町村を対象とした狂犬病予防注射時期に関するアンケート結果の紹介 (2) 業務連絡 健康局結核感染症課
17:00	閉会

Rabies in Taiwan
before and after 17th July, 2013

Andrew Chang-Young Fei, Professor, DVM, PhD.

School of Veterinary Medicine, National

Taiwan University

Rabies in Taiwan before and after 17th July, 2013

Andrew Chang-Young Fei, Professor, DVM, PhD.

School of Veterinary Medicine, National
Taiwan University

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan,
before and after 17th July, 2013

1

17th July 2013: Rabies outbreak!

- Experts meeting was held on 16th July 2013, with expert from CDC/US, at National Animal Health Research Institute (家畜衛生試驗所).
- Rabies was confirmed at this meeting.



5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan,
before and after 17th July, 2013

2

Retrospective study

- Retrospective studies were done immediately after rabies was confirmed, using the materials preserved in refrigerators as well as pathological wax blocks,
- Confirms: rabies epidemics started ever since 23rd May, 2012 in ferret badgers in central Taiwan mountains (Nantou, Yunlin)



5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan,
before and after 17th July, 2013

3

Why it could be found

- In January 2013, National Taiwan University received cases from Nantou. Encephalitis were diagnosed; Canine distemper (CD) was suspected but tested negative.
- RT-PCR for Rabies shown positive result.
- Samples were sent to Animal Health Research Institute (AHRI) for diagnosis, using the standard process of OIE.
- Four scientists were sent to CDC/US trained.

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan,
before and after 17th July, 2013

4

History of rabies prevention

Time	Contents
Before 1999:	Persuading pets owners to shot rabies vaccines for their pets, low vaccination rate
After 1999:	Starting dog population control programs, no rabies surveillance
From 2007:	Starting rabies/lyssavirus surveillance for dogs wildlife, and bats, working with US/CDC

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan,
before and after 17th July, 2013

5

Epidemiology

- Since autumn in 2012, many sick badgers were seen along the roads, or at the base of mountains in Nantou, Yunlin areas.
- The ratio of badgers to carnivores died along roads is 1:1.6 (61.5% among dead carnivores).
- The epidemics is similar to those happened in Zhejiang province (浙江省), China, during 2002~2004 (ref: Rabies in Ferret Badgers, Southeastern China. Emerging Inf. Dis. 15(6): June 2009, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2727325/>)

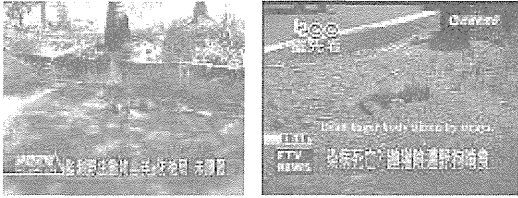
5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan,
before and after 17th July, 2013

6

Many dead badgers found on roads

Many sick ferret badgers were seen along the roads, or near the house in mountains. The right slide said stray dogs ate the body of ferret badgers---high risky



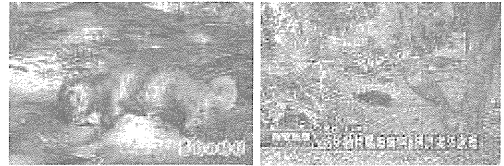
5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

7

Many dead badgers found on roads

Dead ferret badgers were seen in the base of mountains. The altitude (elevation above sea level) of the distribution of ferret badgers is lower than 1,800 meters, so rabid ferret badgers are very easily to enter human houses and attack humans.



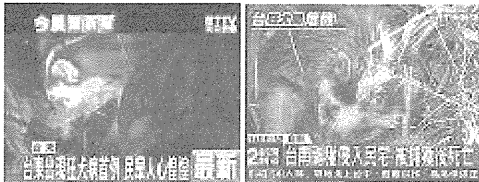
5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

8

Many dead badgers found on roads

Epidemics spreads to Tainan (台南市), Taitung (台東縣) areas quickly. People are very fearful.



5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

9

Many dead badgers found on roads

Epidemics continually spreads to Kaohsiung (高雄市).



5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

10

Many dead badgers found on roads

Dead ferret badgers were seen along the roads in Nantou, Yunlin, Taitung, Kaohsiung areas.

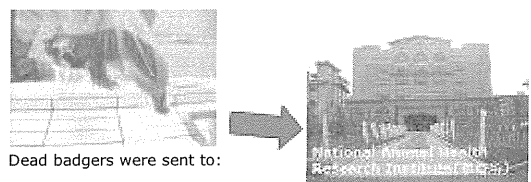


5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

11

Sent to National Animal Health Research Institute (家畜衛生試驗所)



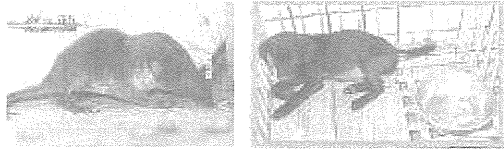
Dead badgers were sent to:

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

12

Cross species transmission --- two cases of spillover from badgers



Badger (Susmevaxca, mustelid) alive

One-and-a-half-months-old pupps, bitten by rabid ferret badger, infected rabies. Taipei Times, 18th September, 2013.



5th February, 2014

Professor Fai: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

13

Mr. Huang at Taitung (台東縣) was bitten by rabid ferret badger



A 31 years old farmer was bitten by a rabid ferret badger at home on 24th July, 2013 at Taitung, Taiwan.

5th February, 2014

Professor Fai: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

14

Responses of society: horror !!!

5th February, 2014

Professor Fai: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

15

Abandoning dogs

縣別	收容	第一季(1-3月)		第二季(4-6月)		第三季(7-9月)	
		收容	安樂死	收容	安樂死	收容	安樂死
1 臺南市	102%	68	15%	9	49%	84	
2 屏東縣	48%	4,206	85%	1,598	1,113	1,181	
3 高雄縣	77%	1,443	69%	887	625	696	
4 宜蘭縣	67%	586	71%	773	14%	474	
5 花蓮縣	41%	267	57%	379	11%	107	

5th February, 2014

Professor Fai: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

16

Euthanasia increases

縣市	收容	第一季(1-3月)		第二季(4-6月)		第三季(7-9月)	
		收容	安樂死	收容	安樂死	收容	安樂死
1 台中市	67%	1,838	94%	1,212	94%	1,234	
2 高雄市	76%	1,126	47%	3,695	77%	1,423	
3 新北市	75%	885	77%	138	76%	694	
4 台北市	6%	101	8%	87	1%	74	
5 基隆市	7%	13	0%	11	1%	1	

5th February, 2014

Professor Fai: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

17

Suspect/fear any sick wildlife!



5th February, 2014

Professor Fai: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

18

成立中央疫情指揮中心 衛福部(=厚生省)+農委會(=農林省)



5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

19

Contingency plan of rabies control: blocking virus in mountains

- Stray animals control
- Vaccination of pets
- Strengthening border control
- Intensified surveillance on: dogs/bats/wildlife
- Safeguard of human: PEP treatment
- Public communication and awareness
- www.rabies.tw for social education

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

20

Increase capturing stray dogs/cats



5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

21

Shelter capacity increase 10%

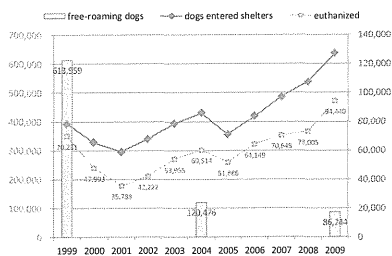
No.	City/county	城市	No. shelters	Critera (m ²)	Capacity (dog/cats)	pet/1000 people	pet/1000 people (2009)	ratio (%)
1	New Taipei City	新北市	12	1,000	372,300	185,308	49.8%	
2	Tainan City	臺南市	1	250	127,750	81,852	64.1%	
3	Taichung City	臺中市	2	600	219,000	101,556	46.4%	
4	Tainan City	臺南市	2	690	251,850	153,672	61.0%	
5	Kaohsiung City	高雄市	2	600	219,000	109,128	49.8%	
6	Yilan County	宜蘭縣	1	240	87,600	51,588	58.9%	
7	Taoyuan County	桃園縣	1	400	146,000	118,272	81.0%	
8	Hsinchu County	新竹縣	1	70	25,500	20,952	113.7%	
9	Miaoli County	苗栗縣	1	200	72,000	38,796	53.1%	
10	Changhua County	彰化縣	1	240	87,600	65,880	75.2%	
11	Nantou County	南投縣	1	250	91,250	74,652	81.6%	
12	Yulin County	雲林縣	1	150	54,750	32,220	58.8%	
13	Chiayi County	嘉義縣	1	150	54,750	53,352	97.4%	
14	Pingtung County	屏東縣	1	200	73,000	73,260	100.4%	
15	Taitung County	臺東縣	1	150	54,750	41,112	75.1%	
16	Hualien County	花蓮縣	1	120	43,800	39,360	89.9%	
17	Penghu County	澎湖縣	1	130	47,450	20,112	42.4%	
18	Keelung County	基隆市	1	120	43,800	26,064	59.5%	
19	Hsinchu City	新竹市	1	85	31,025	15,732	50.7%	
20	Cheyi City	嘉義市	1	55	20,075	11,880	59.2%	
21	Kinmen County	金門縣	1	120	43,800	21,744	49.6%	
22	Lienchiang County	連江縣	1	40	14,600	—	—	
23	Total	計	36	5,980	2,184,700	1,344,612	61.6%	

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

22

Populations of free-roaming dogs as well as dogs entering/ euthanized in shelters, 1999~2009



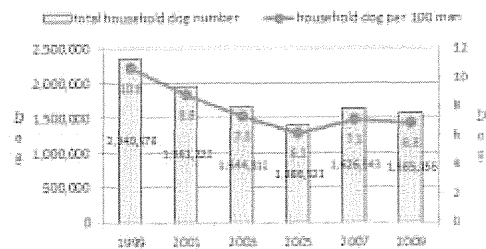
From: Tung and Fei. 2010. Surveys of dog populations in Taiwan from 1999 to 2009. J. Chin. Soc. Anim. Sci. 39(3) : 175~188, 2010

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

23

National surveys of the number of household dogs of Taiwan



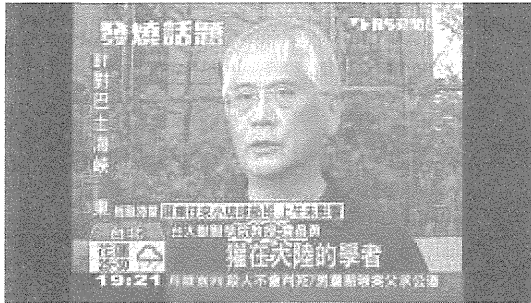
From: Tung and Fei. 2010. Surveys of dog populations in Taiwan from 1999 to 2009. J. Chin. Soc. Anim. Sci. 39(3) : 175~188, 2010

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

24

Answer questions of rabies



5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

31

Posters in subways, etc.



5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

32

Poster in rural and towns

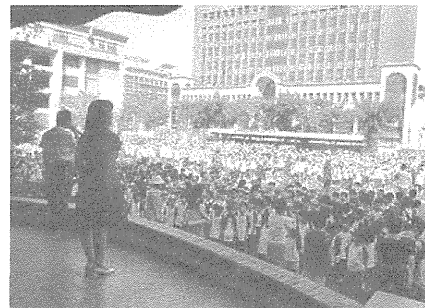


5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

33

Education at elementary schools



5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

34

Drawing competition for rabies prevention

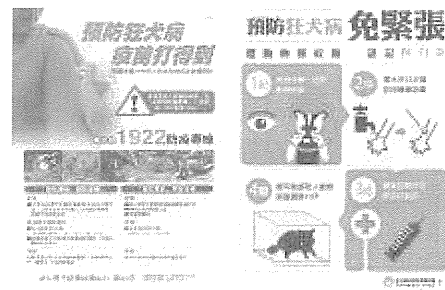


5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

35

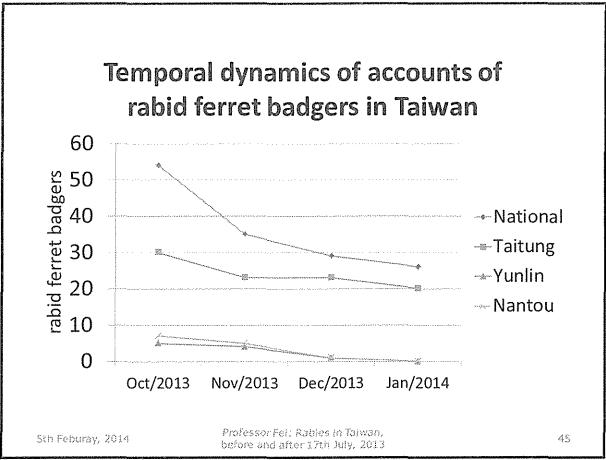
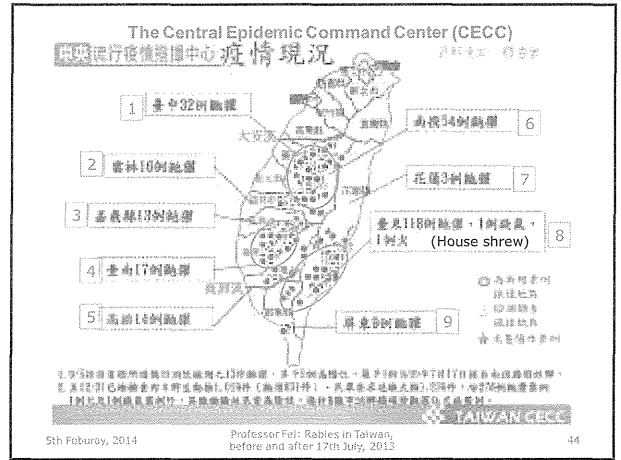
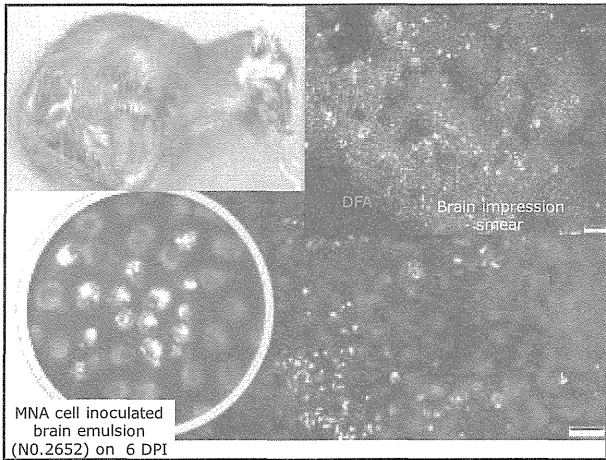
CDC: rabies hot line phone No.= 1922



5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

36



中央流行疫情指揮中心 1999~2013年底

88年至102年動物狂犬病視察監測統計

動物別	88年至101年 檢測件數	陽性件數	102年 檢測件數	陽性件數
犬	6,541	0	1,553(+1)	1*
貓	5	0	112	0
蝙蝠	522	0	64	11
食肉目 野生動物 (next slide)	—	—	1,039(+1)	236*
其他 野生動物 (rodents)	—	—	344(+1)	1*
總計	7,168	0	3,002(+4)	278*

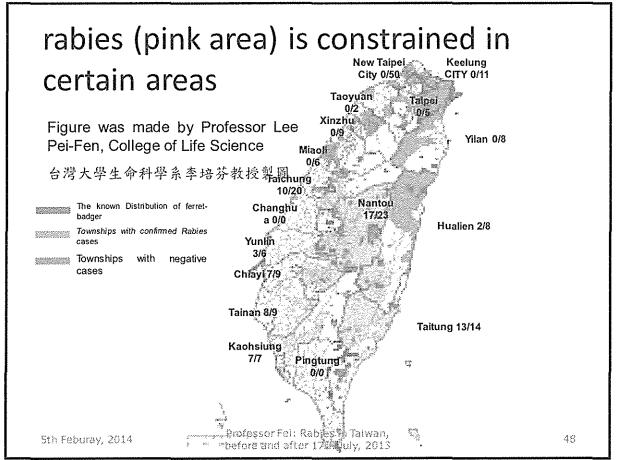
5th February, 2014 Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013 46

中央流行疫情指揮中心 Until the end of 2013

食肉目野生動物狂犬病監測情形一覽表

動物別	檢測件數	陽性	動物別	檢測件數	陽性
鼬獾 Ferret-badger	831(+1)	276	白鼻心 Formosan gemfaced civet	161	0
麝香貓 Small Chinese civet	3	0	黃鼬獾 Weasel	4	0
食蟹獾 Crab-eating mongoose	17	0	野兔 Ferret	3	0

5th February, 2014 Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013 47



Obstacles of rabies epidemics

- Large rivers, lakes and high mountain chains functioned as obstacles to the spread. Rivers were usually crossed where bridges were available. From: P. 37 WHO 931 report
- Natural obstacles at Taiwan rabies epidemics: 大安溪 Da'an river (north), and 高屏溪 Gau-Ping river (south);
- However, rabies will distribute all over the island gradually!

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

49

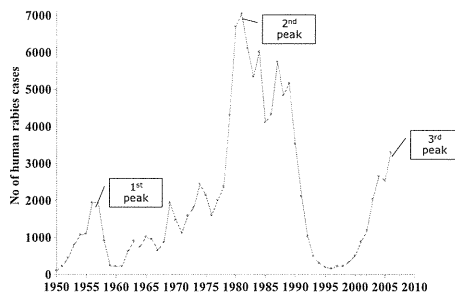
The strategic study for the prevention of animal rabies in Taiwan has started from 2007

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

50

Human rabies in China



From: Zhang YZ et. al. (張永振等編). Human rabies in China. Emerg. Infect Dis, 2005, 11: 1983-2002.

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

51



5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

52

“台灣地區動物狂犬病防疫策略研究”計畫 since 2007~ annually

臺灣本府衛生局委託財團法人農委會畜產試驗所畜醫所

103年度農委會科技計畫書草案(非農委會所屬機關專用)

專案項目：(一) 畜醫所畜產科畜醫所防疫策略研究(畜醫所)
 計畫名稱：防疫策略

計畫編號：103-2311-B-001-A-001-001
 管理單位：財團法人農委會畜產試驗所畜醫所
 計畫主持人簽名：張永振

一、計畫名稱

(一) 計畫名稱：台灣地區動物狂犬病防疫策略研究
 (二) 英文名稱：Epidemiology study on animal rabies prevention in Taiwan

二、計畫編號

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

53

Project of strategic study 2007~

- Holding >4 expert meetings annually to discuss any possible ideas.
- Updated <http://www.rabies.tw>, educating people >87,000 visitors visited.
- Initiating facebook of rabies, to answer the questions of fans.
- Introducing new knowledge of rabies, such as: 17 behaviors of rabid dogs.
- Propagandizing rabies knowledge at any conferences or symposiums.
- Submitting prevention strategy to BAPHIQ when needed: (1) constraining rabies epidemics of Taiwan ferret badger in the mountain; (2) Discussing with CDC_US on the possibility of rabid badger strain shifting to dogs. The possibility is low, but still possible, if the vaccination rate is <70%.
- Dangerous response of pet owners: (1) abandonment of household dogs is the highest risk of rabies. (2) TNVR cannot solve the risk of rabies.
- Sampling bats bodies and serum for lyssavirus surveillance.
- Working with local governments when needed.
- Collecting any informations of rabies in Asia.

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

54

Current risks in Taiwan

- Stray dogs and cats---collectors;
- Feral dogs in mountains;
- Los Angeles City 2010 municipal report said, those who do not vaccinate their pets are: (1)low income owners; (2)low educated families. They need governmental help.

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

55

Host shift event [保毒動物移轉]

Host shift event: ferret badger strain evolves to dogs strain

How to prevent:

1. >70% canine vaccination rate;
2. Monitoring suspected cases (dogs);
3. Blocking ferret badgers virus strain to infect dogs---vaccinating dogs.
4. Controlling stray dogs.

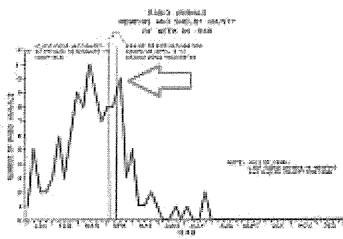
From: Dr. Wallace 2013, personal communication. US CDC.

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

56

80% vaccination rate can block the spread of rabies of dog strain



Memphis, Tennessee State, Tierkel 1950. Am J. Pub. Health. 40:1084-88

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

57

Table 1
Natural resistance of some candidate reservoirs with virus obtained from different species

Species of candidate reservoir	Origin of challenge virus (a)	Resistance of candidate reservoir	Ref.
Human	C. Canis lupus	+++	174
Human	F. Canis lupus	+	175
Human	C. Canis lupus	+++	176
Human	C. Canis lupus	+++	177
Human	F. Canis lupus	+	178
Human	C. Canis lupus	+++	179
Human	F. Canis lupus	+	180
Human	C. Canis lupus	+++	181
Human	F. Canis lupus	+	182
Human	C. Canis lupus	+++	183
Human	F. Canis lupus	+	184
Human	C. Canis lupus	+++	185
Human	F. Canis lupus	+	186

174. J. Infect. Dis. 1978; 137: 100-101.
175. J. Infect. Dis. 1978; 137: 102-103.
176. J. Infect. Dis. 1978; 137: 104-105.
177. J. Infect. Dis. 1978; 137: 106-107.
178. J. Infect. Dis. 1978; 137: 108-109.
179. J. Infect. Dis. 1978; 137: 110-111.
180. J. Infect. Dis. 1978; 137: 112-113.
181. J. Infect. Dis. 1978; 137: 114-115.
182. J. Infect. Dis. 1978; 137: 116-117.
183. J. Infect. Dis. 1978; 137: 118-119.
184. J. Infect. Dis. 1978; 137: 120-121.
185. J. Infect. Dis. 1978; 137: 122-123.
186. J. Infect. Dis. 1978; 137: 124-125.

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

58

Resistant capability to reservoirs

Animals (A)	Rabies strains (B)	Resistance of (A) columns to (B) columns	Resistant capability
Dog	Dog	±	Low
Dog	Fire fox	+++	Very strong
Yellow mongoose	Yellow mongoose	+	Low
Yellow mongoose	Dog	+++	Very strong
Raccoon dog	Raccoon dog	+	Low
Raccoon dog	Dog	+++	Very strong
Skunk	Skunk	±	Low
Skunk	Dog	+	Low
Firefox	Firefox	±	Low
Firefox	Dog	+++	Very strong
Ferret badger	Ferret badger	±	Low ?
Dog	Ferret badger	+++	Very strong?

From: OIE, Jean Blancou The Evolution of Rabies Epidemiology in wildlife.

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

59

Reservoir, vector, transmitter

- Middle carnivores(中型肉食獸) are candidates of the reservoir as well as vectors, such as: dog, skunk, mongoose, fox, raccoon dog, raccoon, wolf, coyote, bat.
- Rodents: are not able to be the vector as well as reservoir---why? (die when bitten by reservoirs)
- Cats: are good vector, but not able to be the reservoir, why? (cats are not flock animals---being alone, virus can not sub-pass in the same species).
- Humans, omnivores, herbivores: dead end hosts;

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

60

No dog strain at Taiwan, like in US

- There is only one rabid strain found in Taiwan, which is: ferret badger strain.
- It explains that only one 1.5 months old puppy infected, although many dogs were bitten by rabid ferret badgers.
- It takes long time if ferret badger strain evolve to the dog strain.
- In US, there are only around 6 strains.

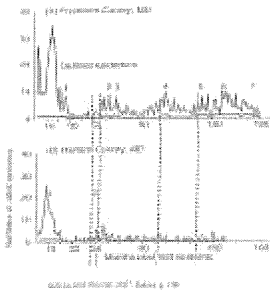
5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

61

Epidemiology

- Temporal dynamics of actual counts of rabid raccoons in initial epidemic of rabies in a new region. The prevalence is 3%~7% (Anderson et al. 1981 Nature 289:765).
- It will take 30 months to finish the epidemics.
- Around 40%~50% population will be cut in the first outbreak.
- Then a series of successively smaller epidemics may occur.



5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

62

Temporal dynamics at Taiwan

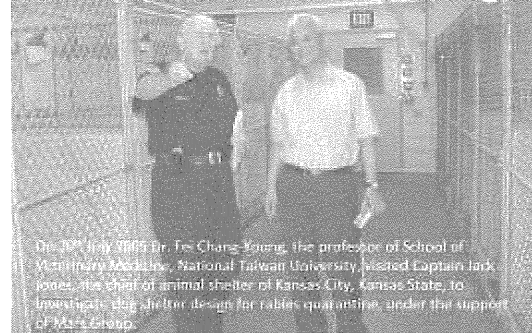
areas	August, 2013	December, 2013
Tainan (infected area)	easy to capture ferret badgers	difficult to capture ferret badgers (population decreased)
Sinchu (rabies free area)	easy to capture ferret badgers	easy to capture ferret badgers

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

63

Rabies quarantine shelter design



The JFMA invited Dr. Fei Chang-Jong, the professor of School of Veterinary Medicine, National Taiwan University, visited Captain Jack Jones, the chief of animal shelter of Kansas City, Kansas State, to investigate the shelter design for rabies quarantine, under the support of JFMA's funding.

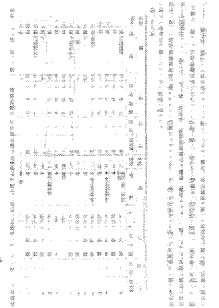
5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

64

日治以前 Before colonial period

- Colonial period: 1895~1945
- 佐藤新一(Sato)與洪蘭(Hung) 1923: They found that aboriginal Taiwanese would use the bile and poultice of mesentery of rabid dogs to treat the wound bitten by rabid dogs.
- They tested the neutralizing capability of bile of healthy pigs, buffalos, and rabid dogs, using rabbits inoculation as indicator. Results showed that those tested bile were able to neutralize the rabid virus.
- Conclusion: They predicted that rabies had been existing at Taiwan for a long time accordingly.
- 結論：佐藤新一、洪蘭(1923)認為狂犬病在台灣已經有非常長久之歷史(p. 23-24)。

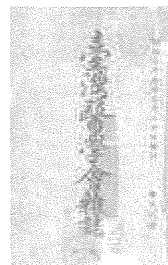


5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

65

J. Formosa Med. Assoc. (JFMA)



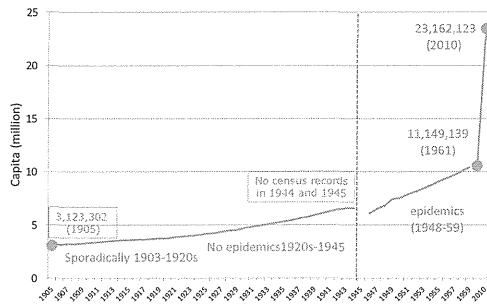
All the information of rabies is recorded in JFMA, which was founded in 1902 (明治35年) at Taiwan.

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

66

Overview of rabies epidemiology and census in Taiwan, 1905~2010



5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

67

Conclusions

- The epidemics decreases after the outbreak. It is believed that it is resulted from the population of ferret badger decreased.
- There is only one strain at Taiwan: ferret badger strain.
- Spillover infection: very difficult, only two cases: one puppy and one money shrew.
- Surveillance programs are continually conducted, especially for bats and dogs.
- Strengthening the control measures, according to the principles of WHO.
- Campaign canine and feline vaccination in the whole country, especially the mountain areas with rabies infection.
- Continuously conducting public education of prevention.

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

68

Thank you for your attention

5th February, 2014

Professor Fei: Rabies in Taiwan, before and after 17th July, 2013

69

動物由来感染症に対するリスク管理手法に関する研究

Intrabody／細胞内シグナル分子のキメラ受容体システムを用いた
病原体検査法の開発

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：河原正浩 東京大学大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 講師
加来義浩 国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官

研究要旨：細胞内発現抗体 (intrabody) は、細胞内で標的分子に特異的に結合できることから、種々のタンパク質の機能解析や、治療法への応用に向けた研究が進められている。本課題では、intrabody が細胞内シグナル分子と結合した「キメラ受容体」を用いて病原体検査法の開発を行うことを目指す。具体的には、「キメラ受容体」が標的分子である病原体由来蛋白質と結合することで、細胞の増殖に影響するシグナルが作動することを利用し、細胞の増殖を指標として病原体蛋白質の検出を行うものである。今年度は、狂犬病ウイルス (RABV) P 蛋白質を標的とする intrabody を利用して、intrabody を細胞内で効率よく発現させるための条件について検討を行った。

A. 研究目的

細胞内発現抗体 (intrabody) は、人為的に導入された細胞内で標的分子に結合し、その機能や分布に影響をもたらすことができることから、蛋白質の機能解析ツールや、次世代の治療薬の候補として注目されている。Intrabody の選択については、従来、ファージディスプレイ法など細胞外で選択する手法が一般的であったが、細胞外で選択された抗体は、還元的環境にある細胞内ではジスルフィド結合が形成されず、立体構造が正しく保たれないため、抗体としての機能が失われることが多かった。そこで我々の共同研究者である東京大学大学院工学系研究科 化学生命工学専攻の河原正浩博士は、intrabody を細胞内で直接かつ簡便に選択する方法として、抗体分子と種々のシグナル分子が結合した「キメラ受容体」を用いた手法を開発した。本法の分子的基盤は、具体的には以下のようなものである。1) サイトカイン受容体のサイトカイン結合部位を、intrabody の抗原部位に置換したキメラ受容体を作製し、オ

リゴマー抗原が発現されている細胞に導入して発現させる。2) キメラ受容体が抗原に結合する場合のみ、キメラ受容体がオリゴマーを形成して活性化し、増殖シグナルを伝達する。3) これにより、「細胞増殖の有無」を指標として、「正しく抗原結合能をもった抗体」を発現する細胞を選択できる。我々はこれまでに、本法を狂犬病ウイルス (Rabies virus; RABV) P 蛋白質に対して応用し、複数の抗 RABV-P intrabody 候補分子を獲得した。これらの intrabody は RABV 増殖阻害効果をもたらすことが期待されることから、狂犬病治療用分子としての応用に向けて研究が進められている。その一方で、我々は intrabody の標的分子に対する高い親和性／特異性を、感染症診断技術の向上に活用することを目指している。本研究では、細胞質内／細胞膜上に発現したキメラ受容体が標的分子 (病原体由来蛋白質) を認識することで、細胞増殖に正方向 (増殖亢進) あるいは負方向 (細胞死) のシグナルが作動する系を構築し、結果として生じる「細胞増殖の変化」

を指標として病原体由来蛋白質の検出を行うことを目的としている。

今年度は、キメラ受容体を高効率に細胞質内に導入し、かつ高い発現量をつねに維持できる方法を模索するため、抗 RABV-P scFv 分子 (P19) を用いて、効率的な細胞質内導入/発現系の検討を行った。

B. 研究方法

1) 抗 RABV-P intrabody の選択

IL-3 依存性マウス pro-B 細胞株 Ba/F3 に、抗原として狂犬病ウイルス P 蛋白質 (RABV-P) を発現させた後、一本鎖抗体 (scFv) ライブラリと幹細胞因子受容体 c-kit の細胞内ドメインを連結した細胞内発現型のキメラ受容体 (scFv-c-kit キメラ) ライブラリを発現させた。その後、IL-3 非存在下で培養することで、RABV-P に親和性を持つ scFv-c-kit キメラを発現した細胞を、増殖を指標として選択した。

2) 抗 RABV-P intrabody の細胞内発現導入法の検討

上述の方法で得られた scFv-c-kit キメラクローンから、scFv 遺伝子を哺乳細胞発現ベクター pCAGGS にリクローニングした。得られた scFv 発現プラスミドのうち 1 クローン (P19/pCAGGS) を選び、マウス神経芽腫由来 MNA 細胞内への発現導入をはかり、導入効率/細胞の生存効率を比較した。遺伝子導入には、遺伝子を直接核へ導入 ("nucleofection" 法) できる Lonza 社の Amaxa Nucleofector I を利用した。本法は、利用する細胞ごとにキット/プロトコルが最適化されていることから、Lonza 社の推奨する条件として、まずは以下の組み合わせを採用した。

キット : Amaxa nucleofector kit V

プログラム : T-24

細胞濃度 : 1×10^6 個/100 μ l 専用 buffer

DNA 量 : 2 μ g

しかし、後述 (「結果」の項を参照) するように、上記の条件では細胞障害性が強く、死滅細胞が多く認められたことから、キット/プログ

ラムを固定したまま、細胞濃度を $1 \times, 2 \times, 3 \times, 4 \times, 5 \times 10^6$ 個 (/100 μ l 専用 buffer) の範囲で、DNA 量を 2, 4, 6, 8, 10, 12 μ g の範囲で変動させ、最適条件を模索した。

遺伝子導入の 1 日、2 日、3 日後に細胞をホルマリン (0.4% TritonX を添加) で固定したうえで、マウス抗 myc 抗体および FITC-conjugate 抗マウス IgG 抗体を用いて染色し、蛍光顕微鏡で intrabody の発現を確認した。

C. 研究結果

1) 抗 RABV-P intrabody の選択

まず RABV-P 発現 Ba/F3 細胞に、細胞内発現型キメラ受容体 (scFv-c-kit キメラ) ライブラリを発現させた。IL-3 非存在下で培養し、増殖を指標として選択したところ、RABV-P に親和性を持つ scFv-c-kit キメラを発現した細胞を 4 クローン得られた。これらの scFv 遺伝子の配列をシーケンシングしたところ、1 クローンは、以前我々がファージディスプレイライブラリーを用いて細胞外で選択したクローン (P19) と同一であった。異なる手法のもとで同一のクローンが選択されたことから、この P19 クローンを有力な intrabody 候補と位置付けた。

2) 抗 RABV-P intrabody の細胞内発現導入法の検討

上述の方法で得られた 4 クローンの scFv-c-kit キメラから、scFv 遺伝子を pCAGGS ベクターにリクローニングした (#P6, #P23, #P24, P19/pCAGGS-Hismyc)。このうち P19/pCAGGS-Hismyc を用いて、MNA 細胞への発現導入法を検討した。

まず、Lonza 社の推奨する MNA 細胞用プロトコルに基づいて、細胞濃度 (1×10^6 個/100 μ l 専用 buffer)、DNA 量 (2 μ g) を設定して nucleofection を実施した。その 1, 2, 3 日後に intrabody の発現を確認したところ、陽性細胞は 40-50% 程度、細胞生存率は 10-20% 程度であった (data not shown)。

このため、細胞濃度を 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 個 (/100 μ l 専用 buffer) の範囲で、DNA 量を 2, 4, 6, 8, 10, 12 μ g の範囲で変動させ、最適条件を模索した。その結果、細胞濃度 2×10^6 個/100 μ l、DNA 量 10 μ g において、導入の 1 日後の時点で細胞生存率 50-60%程度、陽性細胞率 80%程度ともっとも良好な結果を得た。導入後 2, 3 日目では、細胞増殖により細胞数は増えた一方、陽性細胞率は漸減した (図 1)。

D. 考察

細胞内抗体 (intrabody) は、人為的に細胞質内で発現させることにより、標的分子に結合し、その機能/分布を制御できることから、タンパク質の機能解析や治療薬への応用が可能と考えられている。近年、東京大学大学院 工学系研究科 化学生命工学専攻の河原正浩博士により開発された AMEGA (Antigen-mediated genetically modified cell amplification) を応用することで、細胞内の還元的环境下でも機能を発揮しうる intrabody を効率的に選択できると報告された。AMEGA 法は元来、サイトカイン受容体のリガンド結合部位を抗体の抗原結合部位に置換したキメラ受容体を細胞膜上で発現させ、抗原の量によって人為的に細胞の増殖を制御する手法である。この手法を intrabody 選択に応用するために、河原博士はキメラ受容体を細胞内で発現させ、細胞内で標的分子と結合した場合にのみ増殖シグナルが入る系を構築した。具体的には、二量体またはポリマーを形成する標的分子がキメラ受容体に結合した際に、2つの受容体が会合することにより増殖シグナルが作動する。この系を用いることで、「細胞増殖の有無」を指標として、実際に細胞内で機能しうる intrabody を効率よく選択できる可能性が広がった。本課題は、この原理を病原体診断法の開発に応用することを目指すものである。

今回、標的分子として選んだのは、RABV-P 蛋白質である。この蛋白質は、RABV 蛋白質の中でも、とくに多機能蛋白質として知られ、かつウイルスの増殖に不可欠であることから、我々はかねてより治療用 intrabody の標的候補分

子として位置づけてきた。しかし、RABV-P は感染細胞内で 1) RABV 核蛋白質 (RABV-N) に次いで、比較的大量に発現される、2) 二量体またはポリマーとして存在する、3) RABV-N と結合して細胞質内封入体を形成する、などの特徴を持つことから、キメラ受容体を用いた病原体検査法の標的分子としても有望と考えた。

このシステムを診断系に応用するためには、キメラ受容体を高効率に細胞質内に導入し、かつ高い発現量をつねに維持する必要がある。このため本年度は、抗 RABV-P scFv 分子 (P19) を用いて、効率的な細胞質内導入/発現系の検討を行った。多数の候補分子の発現性/標的分子への反応性を比較し、実際に診断法に利用できる分子を短期間で選択するためには、構築に時間がかかる permanent 発現系よりは、むしろ transient な発現系を利用する方が効率がよいと考えた。今回、導入に用いた Nucleofection 法は、electroporation 法の一種であり、transient に遺伝子を導入するが、細胞分裂に依存せずに遺伝子を直接核内に導入するため、他の遺伝子導入法と比較してきわめて高い導入効率を得られることで知られている。今回はまず、発売元である Lonza 社が MNA 細胞に対して最適な組み合わせとして推奨しているキットおよびプロトコールを利用して導入を行った (「材料および方法」を参照)。しかし結果の項で示したように、Lonza 社推奨プロトコールでは、導入に成功した細胞では高度の発現が認められたものの、導入効率が低いというに著しい細胞障害が見られ、大半の細胞が死滅してしまった。このため、細胞数および導入 DNA 量を段階的に変動させることにより、最適な条件を模索した。この結果、導入効率と細胞生存性 (とくに後者) に著しい改善が認められ、とくに細胞濃度 2×10^6 個/100 μ l、DNA 量 10 μ g のときに、もっともよい導入効率/細胞生存性が得られた (図 1)。今後、この条件を利用して診断法構築に向けた諸実験を行うこととするが、現時点でも死滅する細胞が認められ、細胞生存性には改善の余地が認められることから、nucleofection 法のみならず、transfection 試薬を利用した lipofection 法についても検討

することとする。

E. 結論

intrabody と細胞内シグナル分子のキメラ受容体を、病原体検出法に活用するため、まず intrabody を効率よく細胞内に発現させる系を検討した。抗 RABV-P intrabody P19 を用いて LONZA 社 Nucleofector I による nucleofection 法を行った結果、細胞濃度 2×10^6 個/100 μ l、DNA 量 10 μ g のときに、もっともよい導入効率／細胞生存性が得られた。今後は、より高い導入効率／細胞生存性を目指して、

nucleofection 法のみならず、transfection 試薬を利用した lipofection 法についても検討する。

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