

令和4年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「我が国の狂犬病清浄性の検証及び関係機関の連携強化のための研究」
分担研究報告書

狂犬病およびリッサウイルス感染症の遺伝子診断についての研究

研究分担者 前田 健（国立感染症研究所獣医科学部）
研究協力者 松鶴 彩（国立感染症研究所獣医科学部）
井上雄介（国立感染症研究所獣医科学部）

研究要旨：

狂犬病診断の新たなツールとして既報の LN34 pan-lyssavirus real-time RT-PCR 法の感度を検証するとともに、リッサウイルスをより感度良く検出するために改良を試みた。従来法では狂犬病を除くリッサウイルス遺伝子の検出感度が低いことが明らかとなり、新たに作成した3種類のプライマーを用いた反応系でこれらを高い感度で検出できることを確認した。より簡便な診断系の確立を目指して引き続き検討を継続する予定である。

A. 研究目的

狂犬病はラブドウイルス科リッサウイルス属狂犬病ウイルスによる人獣共通感染症で、致死的な脳炎が引き起こされる。人や動物において狂犬病の確定診断は角膜塗抹標本、頸部の皮膚、唾液腺などの生検材料、あるいは死後の脳組織からの蛍光抗体法によるウイルス抗原の検出がゴールドスタンダードとして実施されている。さらに RT-PCR 法による遺伝子診断も併用されているが、近年 real-time RT-PCR 法による、より迅速かつ高感度な検出法についても報告されている。

リッサウイルス感染症は狂犬病を除くリッサウイルス属ウイルスが原因の感染症で、狂犬病に類似した病型を示す。これまでに世界各地の動物および人から 17 種類のウイルスが確認されている。診断は狂犬病診断法に準じて行われているが、その精度はすべてのリッサウイルスについて検証されているわけではない。

LN34 pan-lyssavirus real-time RT-PCR 法は、リッサウイルス属ウイルス遺伝子を広く検出できる方法として 2017 年に初めて報告されたマルチプレックス解析法である (Wadhawa A. et al., PLoS Negl Trop Dis. 12 e00054258. 2017)。世界各地の多施設間研究によって、狂犬病ウイルスを高い感度で検出できることが報告されている (Gigante CM. et al., PLoS One 13 e0197074. 2018) が、狂犬病ウイルスを除くリッサウイルスの検出についての情報は少ない。本課題では 17 種類のリッサウイルスの塩基配列をもとに合成した RNA を用いて LN34 pan-lyssavirus real-time RT-PCR 法の感度を解析した。さらにリッサウイルスの検出感度を上昇させるための改良を試みた。

B. 研究方法

狂犬病 (RABV) および 17 種類のリッサウイルス Aravan virus (ARAV)、Khujand virus (KHUV)、Kotakahti bat lyssavirus (KBLV)、Gannoruwa bat lyssavirus (GBLV)、Bokeloh bat lyssavirus (BBLV)、Duvenhage virus (DUVV)、European bat lyssavirus 1 (EBLV-1)、European bat lyssavirus 2 (EBLV-2)、Australian bat lyssavirus (ABLV)、Taiwan bat lyssavirus (TWBLV)、Irkut virus (IRKV)、Mokola virus (MOKV)、Shimoni bat virus (SHIBV)、Lagos bat virus (LBV)、Ikoma lyssavirus (IKOV)、West Caucasian bat virus (WCBV) および Lleida bat virus (LLBV) の NP 遺伝子配列をもとに RNA を合成し、LN34 pan-lyssavirus real-time RT-PCR 法による各ウイルス遺伝子の検出感度を比較した。さらに各ウイルスに対するより相動性の高いプライマーを作成し、改良法の作成を試みた。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

LN34 pan-lyssavirus real-time RT-PCR 法により、17 種類すべてのリッサウイルスが検出できることを確認した。特に DUVV、ABLV、MOKV、LBV は狂犬病ウイルスと同様に感度が高く、 1×10^2 copy のウイルス遺伝子を検出可能であった。しかし BBLV、KBLV、KHUV、GBLV、TWBLV、EBLV-1、EBLV-2、ARV、IRKV、SHIBV、WCBV、IKOV、

LLEBV については検出限界が $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ copy と、感度が低い傾向が認められた (表 1)。

各リッサウイルスにおける LN34 pan-lyssavirus real-time PCR 法のプライマー結合部位の塩基配列を比較したところ、特にフォワードプライマー結合部位に多くのミスマッチが存在したことから (表 2)、リッサウイルス特異的な配列となるように新たに 4 種類のプライマーを作成した (表 3)。これらを用いて 3 種類の反応系 (primer set #1~3) により各ウイルスの検出を試みたところ、LN34 pan-lyssavirus real-time PCR 法に比べて検出感度が上昇した (表 4)。

D. 考察

狂犬病およびリッサウイルス感染症は、現在国内での発生は認められていないものの、世界的に広く蔓延している重要な感染症である。人および動物の疑似症例について、狂犬病を速やかに診断するだけでなく、リッサウイルス感染症についても広く検出する必要がある。本課題では real-time PCR 法による狂犬病およびリッサウイルス診断法について検討を行った。

LN34 pan-lyssavirus real-time RT-PCR 法は狂犬病ウイルス遺伝子を高い感度で検出できるものの、狂犬病ウイルスを除くリッサウイルス遺伝子の検出感度は低い傾向にあることが明らかとなった。本法に改良を加えたところ、リッサウイルス検出の感度を高めることに成功した。今回作成したプライマーを混合し、1 つの反応系でウイルス遺伝子を検出することができれば、より簡便かつ確実なリッサウイルス遺伝子の検出が可能となることが期待されることから、現在さらなる改良を進めている。

E. 結論

LN34 pan-lyssavirus real-time RT-PCR 法を改良し、より感度の高いリッサウイルス検出系を作成した。狂犬病および汎リッサウイルス検出系として診断への応用が期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

該当なし

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

3. 講演会

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

表1. LN34 pan-lyssavirus real-time PCR法におけるリッサウイルス合成RNA (1×10²~1×10⁹コピー) のCt値

copy number	Phylogroup I											
	RABV	DUVV	BBLV	KBLV	KUHV	GBLV	TWBLV	ABLV	EBLV1	EBLV2	ARV	IRKV
9	11.2	12.2	16.5	19.8	20.6	21.4	21.3	11.6	19.8	28.2	20.3	18.3
8	14.6	16.7	20.1	23.7	23.1	24.7	24.7	14.9	22.9	30.8	23.3	22.1
7	18.3	20.2	24.1	28.1	26.5	28.7	28.2	18.2	26.2	32.0	26.9	25.8
6	21.8	23.5	25.9	31.6	29.7	32.4	32.6	22.6	30.1	35.7	31.0	25.0
5	25.3	27.2	31.6	32.8	34.3	39.6	32.0	26.6	33.5	-	33.8	34.5
4	28.9	30.6	33.6	35.5	-	-	-	30.1	37.3	-	38.2	-
3	31.8	33.7	36.1	-	-	-	-	32.1	-	-	-	-
2	36.2	40.7	-	-	-	-	-	36.6	-	-	-	-

copy number	Phylogroup II				Phylogroup III		
	MOKV	LBL (A) SEN	LBL (B) NGA	SHIBV	WCBV	IKOV	LLEBV
9	11.7	12.7	13.7	21.2	19.3	32.1	33.3
8	15.4	16.5	17.5	25.4	22.1	35.1	36.0
7	19.1	20.6	19.1	28.7	25.6	33.8	36.5
6	23.0	24.8	23.0	32.0	29.7	-	-
5	26.6	27.3	26.6	36.2	32.7	-	-
4	29.9	30.7	32.6	40.2	36.6	-	-
3	33.7	34.2	36.1	-	-	-	-
2	36.7	38.7	38.5	-	-	-	-

表2. 本研究で合成したリッサウイルスのRNA配列とプライマーおよびプローブ結合部位

Phylogroup	virus	accession no.	sequence (5'-3')*
I	RABV	GU565704	<u>ACGCTTAACACACAAAACCAAGAG</u> AGCAGACAGCGTCAGTTGCCAAAGCAAAATGTAACACCCCTACAAATGGAATGCCAGCAAGATTGGTCTCAAAGTCAATAACCCGGTGGTCTCTTTGAAGCCGAGATTATCGTGATCAATATGAGTACAAGTACCCG
I	DUVV	EU293119	<u>ACGCTTAACACACAAAATCATAAAG</u> GGCAGACATGTTCAATTTGTATAACACAAAATGTAACACCCCTACAAATGGAATGCCAGCAAGATTGGTCTCAAAGTCAATAACCCGGTGGTCTCTTTGAAGCCGAGATTATCGTGATCAATATGAGTACAAGTACCCG
I	BBLV	LT839643	<u>ACGCTTAACACACAAAATCAGAAAG</u> AGTAGACATAATCATCTACATAGCAAAAAGGGCAACCCCTACAAATGGAATGCCAGCAAGATTGGTCTCAAAGTCAATAACCCGGTGGTCTCTTTGAAGCCGAGATTATCGTGATCAATATGAGTACAAGTACCCG
I	KBLV	LR994545	<u>ACGCTTAACACACAAAACAGAGAA</u> GATTAGACATAATCGCCTACAGAACAGAAATGTAACACCCCTACAAATGGAATGCCAGCAAGATTGGTCTCAAAGTCAATAACCCGGTGGTCTCTTTGAAGCCGAGATTATCGTGATCAATATGAGTACAAGTACCCG
I	KHUV	EF614261	<u>ACGCTTAACACACAAAACAGAAAG</u> SAATAGACATCATCGCTGTAGAAATAGAAATGTAACACCCCTACAAATGGAATGCCAGCAAGATTGGTCTCAAAGTCAATAACCCGGTGGTCTCTTTGAAGCCGAGATTATCGTGATCAATATGAGTACAAGTACCCG
I	GBLV	KU244268	<u>ACGCTTAACACACAAAATCAGAAAG</u> AGTAGACAGGATCGTCTGCCAAAACAAAATGTAACACCCCTACAAATGGAATGCCAGCAAGATTGGTCTCAAAGTCAATAACCCGGTGGTCTCTTTGAAGCCGAGATTATCGTGATCAATATGAGTACAAGTACCCG
I	TWBLV	NC055474	<u>ACGCTTAACACACAAAATCATAAAG</u> GTAGACACAGTCGCTACAGAAAATGAATGTAACACCCCTACAAATGGAATGCCAGCAAGATTGGTCTCAAAGTCAATAACCCGGTGGTCTCTTTGAAGCCGAGATTATCGTGATCAATATGAGTACAAGTACCCG
I	ABLV	AF418014	<u>ACGCTTAACACACAAAACAGAGAA</u> AGTAGACATGATCATTGGCAAGCAAAAATGTAACACCCCTACAAATGGAATGCCAGCAAGATTGGTCTCAAAGTCAATAACCCGGTGGTCTCTTTGAAGCCGAGATTATCGTGATCAATATGAGTACAAGTACCCG
I	EBLV-1	EU293109	<u>ACGCTTAACACACAAAACAAAAG</u> GGTAGACAGTTCATCGATAGAACAGAAATGTAACACCCCTACAAATGGAATGCCAGCAAGATTGGTCTCAAAGTCAATAACCCGGTGGTCTCTTTGAAGCCGAGATTATCGTGATCAATATGAGTACAAGTACCCG
I	EBLV-2	EU293114	<u>ACGCTTAACACACAAAACAGAAAG</u> SAATAGACATAATCGCTGTAGACAGAAATGTAACACCCCTACAAATGGAATGCCAGCAAGATTGGTCTCAAAGTCAATAACCCGGTGGTCTCTTTGAAGCCGAGATTATCGTGATCAATATGAGTACAAGTACCCG
I	ARAV	EF614259	<u>ACGCTTAACACACAAAACAGAAAG</u> SAATAGACATAATCGCTGTAGACAGAAATGTAACACCCCTACAAATGGAATGCCAGCAAGATTGGTCTCAAAGTCAATAACCCGGTGGTCTCTTTGAAGCCGAGATTATCGTGATCAATATGAGTACAAGTACCCG
I	IRKV	EF614260	<u>ACGCTTAACACACAAAATCATAAAG</u> GGTAGACATGTTCAATCTGTAGACAGAAATGTAACACCCCTACAAATGGAATGCCAGCAAGATTGGTCTCAAAGTCAATAACCCGGTGGTCTCTTTGAAGCCGAGATTATCGTGATCAATATGAGTACAAGTACCCG
II	MOKV	EU293117	<u>ACGCTTAACACACAAAATCAGAAAG</u> AGTAGACAGTATCAGCGACCTAACCAAAAATGTAACACCCCTACAAATGGAATGCCAGCAAGATTGGTCTCAAAGTCAATAACCCGGTGGTCTCTTTGAAGCCGAGATTATCGTGATCAATATGAGTACAAGTACCCG
II	LBL (B)_NGA	EU293110	<u>ACGCTTAACACACAAAATCAGAGAA</u> AGTAGACACCTACAAATGAGGTAAATCAAAAATGTAACACCCCTACAAATGGAATGCCAGCAAGATTGGTCTCAAAGTCAATAACCCGGTGGTCTCTTTGAAGCCGAGATTATCGTGATCAATATGAGTACAAGTACCCG
II	LBL (A)_SEN	EU293108	<u>ACGCTTAACACACAAAATCAGAGAA</u> AGTAGACACCGCAATCGCCGTGACAAAATGTAACACCCCTACAAATGGAATGCCAGCAAGATTGGTCTCAAAGTCAATAACCCGGTGGTCTCTTTGAAGCCGAGATTATCGTGATCAATATGAGTACAAGTACCCG
II	SHIBV	GU170201	<u>ACGCTTAACACACAAAATCAGAGAA</u> AGTAGAGAGGATCATGAGGGCAAAAAGAAAATGTAACACCCCTACAAATGGAATGCCAGCAAGATTGGTCTCAAAGTCAATAACCCGGTGGTCTCTTTGAAGCCGAGATTATCGTGATCAATATGAGTACAAGTACCCG
III	WCBV	EF614258	<u>ACGCTTAACACACAAAATCTATAAG</u> SACGAGAAAACCTCAGAGGGCAAAAACCAATGTAACACCCCTACAAATGGAATGCCAGCAAGATTGGTCTCAAAGTCAATAACCCGGTGGTCTCTTTGAAGCCGAGATTATCGTGATCAATATGAGTACAAGTACCCG
III	IKOV	NC018629	<u>ACGCTTAACACCTAAAACAGAAAG</u> ACAGAGAAAGAAATCGAAGGGAAAAGAAAATGTAACACCCCTACAAATGGAATGCCAGCAAGATTGGTCTCAAAGTCAATAACCCGGTGGTCTCTTTGAAGCCGAGATTATCGTGATCAATATGAGTACAAGTACCCG
III	LLEBV	MG983927	<u>ACGCTTAACACCTAAAACAGAAAG</u> ATAGAAAAGAAAACGGAAGGGAAAAGAAAATGTAACACCCCTACAAATGGAATGCCAGCAAGATTGGTCTCAAAGTCAATAACCCGGTGGTCTCTTTGAAGCCGAGATTATCGTGATCAATATGAGTACAAGTACCCG

*LN34 pan-lyssavirus real-time PCR法で使用されているプライマーおよびプローブ結合部位を下線、ミスマッチのある塩基を赤で示した。

表3. 本課題で新たに作成したプライマーおよびプライマーセット

	primer/probe	Name	Sequences (5'-3')	Position
LN34 pan-lyssavirus real-time PCR法	Forward primer	primer forwad 1	ACGCTTAACAACCAGATCAAAGAA-	1-24
		primer forwad 2	ACGCTTAACAACAAAATCADAGAAG	1-25
	Reverse primer	Primer revers	CMGGGTAYTTRTAYTCATAYTGRTC	140-164
	probe	LN34	(FAM) AA+C+ACCY+C+T+ACA+A+TGGA (BHQ1)	59-75
		LN34lago	(FAM) AA+C+ACTA+C+T+ACA+A+TGGA (BHQ1)	59-75
primer set #1	Forward primer	F2-m1-mix2	ACGCTTAACRACAAAACADARAAG	1-25
	Reverse primer	Primer revers	CMGGGTAYTTRTAYTCATAYTGRTC	140-164
	probe	LN34	(FAM) AA+C+ACCY+C+T+ACA+A+TGGA (BHQ1)	59-75
		LN34lago	(FAM) AA+C+ACTA+C+T+ACA+A+TGGA (BHQ1)	59-75
Primer set #2	Forward primer	F2-m3-WCBV	ACGCTTAACAACAAAATCTTATAAG	1-25
		F2-m4-SHIBV	ACGCTTAACAGCAAAAGTCAGAGAAG	1-25
	Reverse primer	Primer revers	CMGGGTAYTTRTAYTCATAYTGRTC	140-164
	probe	LN34	(FAM) AA+C+ACCY+C+T+ACA+A+TGGA (BHQ1)	59-75
Primer set #3	Forward primer	F2-m5-IKO/LLE	ACGCTTAACAGCTAAAACCYAGAAG	1-25
	Reverse primer	Primer revers	CMGGGTAYTTRTAYTCATAYTGRTC	140-164
	probe	LN34	(FAM) AA+C+ACCY+C+T+ACA+A+TGGA (BHQ1)	59-75

新たに作成した4つのプライマーを赤字で示した。

表 4. 新たに作成したプライマーによるリッサウイルス合成 RNA ($1 \times 10^{2^{\sim}} 1 \times 10^9$ コピー) の Ct 値

copy number	Phylogroup I											
	RABV		DUVV		BBLV		KBLV		KUVH		GBLV	
	LN34	#1	LN34	#1	LN34	#1	LN34	#1	LN34	#1	LN34	#1
9	11.2	15.0	12.2	10.5	16.5	11.6	19.8	12.7	20.6	10.5	21.4	9.5
8	14.6	18.3	16.7	14.2	20.1	15.2	23.7	15.8	23.1	14.3	24.7	13.3
7	18.3	21.7	20.2	18.0	24.1	18.9	28.1	19.5	26.5	18.3	28.7	16.7
6	21.8	25.5	23.5	22.0	25.9	22.5	31.6	26.4	29.7	21.7	32.4	20.5
5	25.3	28.6	27.2	24.0	31.6	26.8	32.8	28.8	34.3	25.8	39.6	24.0
4	28.9	32.5	30.6	29.1	33.6	30.3	35.5	30.3	-	29.6	-	28.0
3	31.8	36.0	33.7	32.5	36.1	34.1	-	33.3	-	32.1	-	31.7
2	36.2	-	40.7	35.8	-	37.2	-	37.8	-	35.9	-	34.9
1	-	-	-	-	NT	38.6	NT	38.7	NT	37.9	NT	38.8

copy number	Phylogroup I											
	TWBLV		ABLV		EBLV1		EBLV2		ARV		IRKV	
	LN34	#1	LN34	#1	LN34	#1	LN34	#1	LN34	#1	LN34	#1
9	21.3	14.4	11.6	10.0	19.8	12.7	28.2	10.4	20.3	10.8	18.3	13.4
8	24.7	17.8	14.9	13.6	22.9	16.6	30.8	14.6	23.3	14.3	22.1	16.6
7	28.2	21.7	18.2	17.4	26.2	20.7	32.0	18.2	26.9	18.2	25.8	20.3
6	32.6	24.6	22.6	21.4	30.1	24.1	35.7	22.0	31.0	22.1	25.0	23.9
5	32.0	28.0	26.6	25.5	33.5	28.7	-	25.4	33.8	25.8	34.5	26.4
4	-	32.2	30.1	28.3	37.3	31.7	-	29.5	38.2	29.8	-	31.1
3	-	35.1	32.1	31.8	-	35.4	-	33.4	-	32.9	-	34.6
2	-	37.4	36.6	35.0	-	34.6	-	37.0	-	37.0	-	37.4
1	NT	40.6	NT	38.8	NT	37.5	NT	37.1	NT	39.3	NT	38.0

copy number	Phylogroup II								Phylogroup III							
	MOKV		LBL(B)_NGA		LBL(A)_SEN		SHIBV		WCBV		IKOV		LLEBV			
	LN34	#1	LN34	#1	LN34	#1	LN34	#2	LN34	#2	LN34	#3	LN34	#3		
9	11.7	15.9	12.7	12.4	13.7	16.3	21.2	10.0	19.3	10.2	32.1	14.3	33.3	10.7		
8	15.4	19.6	16.5	16.5	17.5	19.6	25.4	13.7	22.1	13.7	35.1	17.6	36.0	14.7		
7	19.1	22.8	20.6	19.9	19.1	23.4	28.7	17.1	25.6	17.4	33.8	21.4	36.5	18.3		
6	23.0	26.6	24.8	23.0	23.0	26.7	32.0	20.7	29.7	21.1	-	24.6	-	22.3		
5	26.6	30.0	27.3	26.9	26.6	30.2	36.2	24.4	32.7	24.5	-	28.2	-	25.7		
4	29.9	33.6	30.7	31.0	32.6	34.5	40.2	27.7	36.6	28.3	-	31.9	-	29.4		
3	33.7	38.2	34.2	34.7	36.1	36.9	-	31.5	-	31.4	-	34.6	-	33.4		
2	36.7	-	38.7	37.9	38.5	38.7	-	35.1	-	34.5	-	38.1	-	37.4		
1	-	-	-	-	-	-	NT	36.8	NT	38.7	NT	-	NT	39.6		