

令和元年6月4日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04593

研究課題名(和文) 狂犬病の発症後治療法開発のための実験的研究

研究課題名(英文) Experimental study to control rabies after the onset of the neurological sign

研究代表者

寸田 祐嗣 (Sunden, Yuji)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：20451403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：致死的なウイルス性人獣共通感染症である狂犬病の制圧を目指して、実験病理学的研究を行った。特に、ウイルス感染動物の脳病変と脳脊髄液(CSF)の変化を詳細に解析した。その結果、血液とCSF中に多量のウイルス中和抗体が誘導されると、狂犬病ウイルスが脳に侵入したとしても非致死経過をたどることが判明した。またラットを使用した成績と合わせると、CSFへの抗原特異抗体の産生は深頸部リンパ節で生じることが明らかになり、さらに脳内免疫反応の足場のひとつとして脳硬膜の関与が示唆された。また狂犬病ウイルス感染によってCSFに生じる微小変化としてapolipoprotein A-1の増加が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

狂犬病の治療法は未だ確立されておらず、ひとたび発症すると悲惨な神経症状を示して、死を待つという恐ろしい病気であるが、本病に関する研究は進展がないまま頓挫している状況にあった。本研究成果は狂犬病の原因ウイルスを体内で駆逐するための具体的な戦略を示した点において学術的意義が高く、また、その他の中枢神経系感染症や炎症性疾患への応用も期待できる成果であるため、学術的意義が高い基礎研究である。また、本病は年間5万人以上が犠牲となっている状況であり、本邦においても輸入感染症、越境感染症、バイオテロなどにより発生リスクが無視できないため、その制圧に貢献する知見を提供した点において社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：To control rabies, lethal viral zoonotic disease, experimental and pathological studies were performed, especially brain histopathology and CSF analysis were examined. It is showed that rabies viruses were eliminated from the brain and not induce lethal infection when viral neutralizing antibodies were produced in blood and CSF in high level. Further, the antigen-specific antibodies in CSF were produced in deep cervical lymph nodes, and brain dura matter might be involved in cerebral immune responses. Apolipoprotein A-1 in CSF was detected after rabies virus infection, as one of the small compositional changes in CSF.

研究分野：獣医病理学

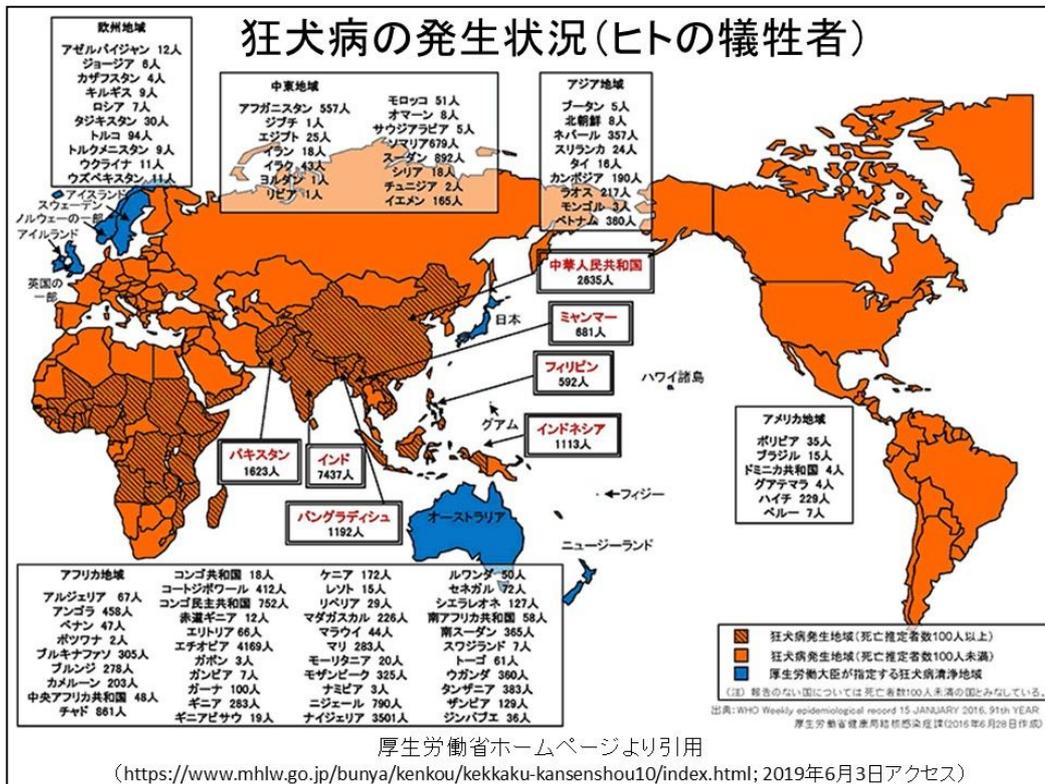
キーワード：狂犬病 人獣共通感染症 獣医病理学 脳脊髄液 中和抗体 ウイルス 神経細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

狂犬病は古来より存在する人獣共通感染症であり、犬だけでなくヒトも含めた多くの哺乳動物に生じる病気である。本病は狂犬病ウイルスの感染によって起こるが、このウイルスは動物の神経細胞内で増殖する性質を有しており、その細胞を傷害したり機能障害を起こしたりする。その結果、ウイルスに感染した動物は麻痺や狂騒などの悲惨な神経症状を示して、最終的に死に至る。本病の恐ろしい点はひとたび神経症状を発症すると、有効な治療法がなく、ほとんどの症例・患者が死亡してしまう点である。しかしながら、狂犬病は“Neglect disease (顧みられない疾病)”として風化し、その予防や治療に関して進展がみられない状況にあった。

一般に感染症の制圧にはワクチン(予防接種)が有効であり、狂犬病も例外ではない。ところが、アジア・アフリカ等の本病の流行地域においては、良質なワクチンの安定供給が難しいこと、ウイルスを保有する動物が多岐にわたること、から本病の制圧は困難であった。実際、現在もなお世界中で年間5万人以上が狂犬病で死亡していると推測されている(下図参照)。日本は狂犬病予防法に基づき、ワクチン徹底ならびに野犬の制御を行った結果、狂犬病清浄国となった。しかしながら、海外でウイルスに感染して帰国後に発症・死亡した例や、日本と同じ島国であり長年狂犬病が発生していなかった台湾において近年本病が突発している状況などを鑑みると、本邦においても重要な感染症であると認識される。よって、狂犬病ウイルスが病気を起こす機序を解明して、有効な治療法を開発することは喫緊の課題であった。



2. 研究の目的

実験的に誘発した狂犬病の動物の脳病変ならびに脳脊髄液の変化を詳細に解析することによって、本病の予防・治療法開発のための有益な情報を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

狂犬病ウイルス固定毒(CVS株)ならびに野外株(1088株)をウサギに実験接種した材料を用いた。主な方法は病理組織学的解析、免疫組織化学的解析、免疫蛍光染色、中和抗体価の測定である。またラットを用いて、エバンスブルーを皮下または脳脊髄内に投与して、その分布を解析した。また狂犬病不活化ウイルス粒子を抗原として、同様に投与したラットの各種臓器を観察した。脳組織は頭蓋骨・硬膜を含めて脱灰標本を作製した。またラット由来ミエローム細胞との融合により深頸部リンパ節に由来する細胞から抗体産生細胞株の作出を行った。

4. 研究成果

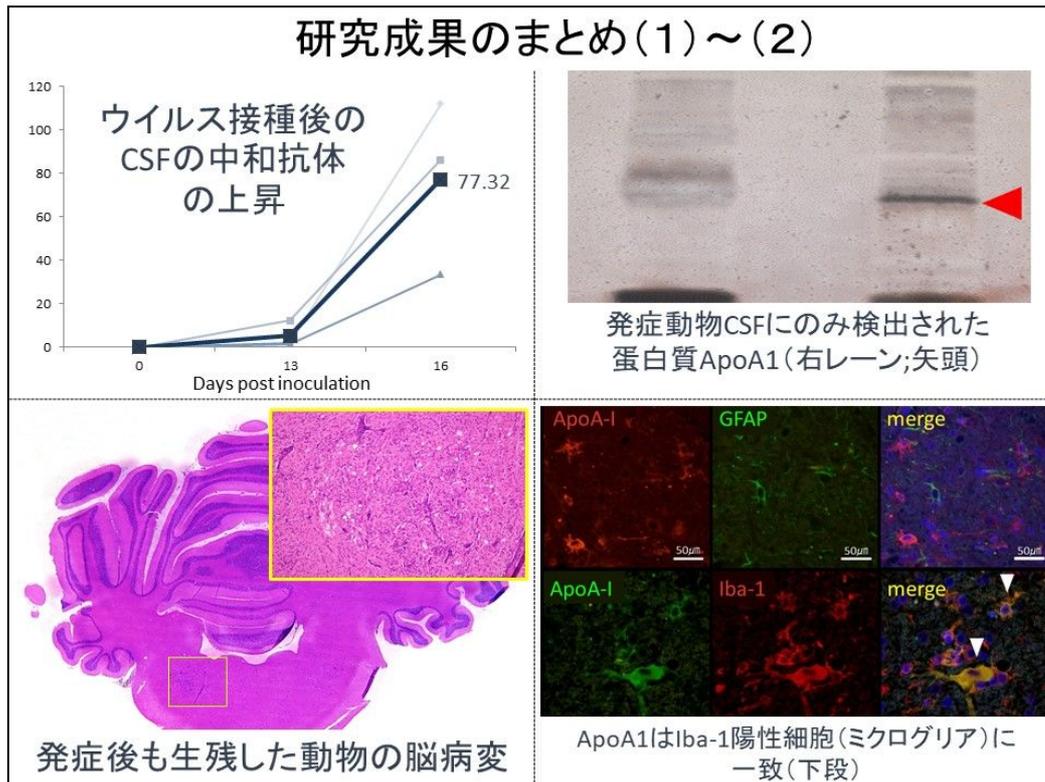
(1) 狂犬病ウイルスの病原性の多様性

マウスに致死感染を起こす狂犬病ウイルス野外株(1088株)を実験的に接種したウサギを詳細に解析した結果、ウサギ体内でウイルスが増殖した痕跡、すなわち空胞化を伴う脳病変が形成されていた。しかし、脳内にウイルス抗原は検出されなかった。また、血液中と脳脊髄液(CSF)中のウイルス中和抗体が急増しており、ウイルスはウサギを致死に至らしめることなく、体内から排除された可能性が高いと推察された。これは固定毒(CVS株)を接種されたウサギ(致死感染を起こし、多量のウイルスが検出)とは異なる所見であり、両ウイルスの増殖速度の違いと神経細胞への傷害性の違いによると推察された。野外株感染ウサギのCSF中の抗体

値上昇と脳病変形成を明らかにした点は、ユニークで貴重な成績であると思われた。

(2) 狂犬病発症動物のCSFの微小変化

狂犬病ウイルスに感染した動物のCSF中にapolipoprotein A-1 (ApoA1)が上昇することを見出した。組織標本上で解析すると、ApoA1は脳内の様々な細胞に一致して存在していたが、特にIba-1陽性を示すミクログリア細胞との共有が特徴的であった。ApoA1は脳炎に続発して血管内からCSF中へ漏出した可能性が疑われたが、狂犬病以外の脳炎で斃死した動物の脳内にはApoA1の沈着が観察されなかったことから、狂犬病の病態進行において、ApoA1が特異的に作用している可能性が疑われた。また本成績は、狂犬病の早期診断ならびに予後評価にCSF組成についての微小変化が応用できる可能性を示した点において、ユニークであると思われた。



(3) CSF内への抗体供給と深頸部リンパ節の関連ならびにその応用

色素投与によって、CSFと深頸部リンパ節(dCLN)の解剖学的連絡を確認し、さらに同リンパ節がウイルス特異抗体を産生しうることを示した。すなわち、少量の抗原をCSF内に投与することによって、dCLNが腫大し重量を増し、その中には抗原特異抗体産生細胞の存在が示唆された。さらに、新たな抗体作出法としての応用性を検証した結果、dCLN細胞に由来する抗体産生細胞株クローンを得ることができた。また、脳外へCSFの排出経路・dCLNにつながる経路として、複数のルート、特に嗅球部・大脳横裂を介した存在が示唆された。

(4) 硬膜内リンパ管の関与

CSFとdCLN、脳内免疫制御に関わる新たな因子として、マウスの脳硬膜内リンパ管の存在が相次いで報告されたため(J Exp Med. 2015 Jun 29;212(7):991-9; Nature. 2016 May 12;533(7602):278)、本研究で使用している実験系のラットにおいて検索したところ、リンパ管内皮細胞マーカーであるpodoplanin, LYVE1陽性の微小な脈管構造の存在が確認された。また、脳内抗原投与時、すなわち脳内免疫反応誘導時には、脳硬膜内に様々な炎症性細胞(マクロファージ、Tリンパ球、Bリンパ球)が増数することを見出し、脳内免疫制御における硬膜の重要性を示唆する貴重な成果と思われた。

(5) まとめと展望

本研究によって、狂犬病の予防と治療について以下の結論を得た。

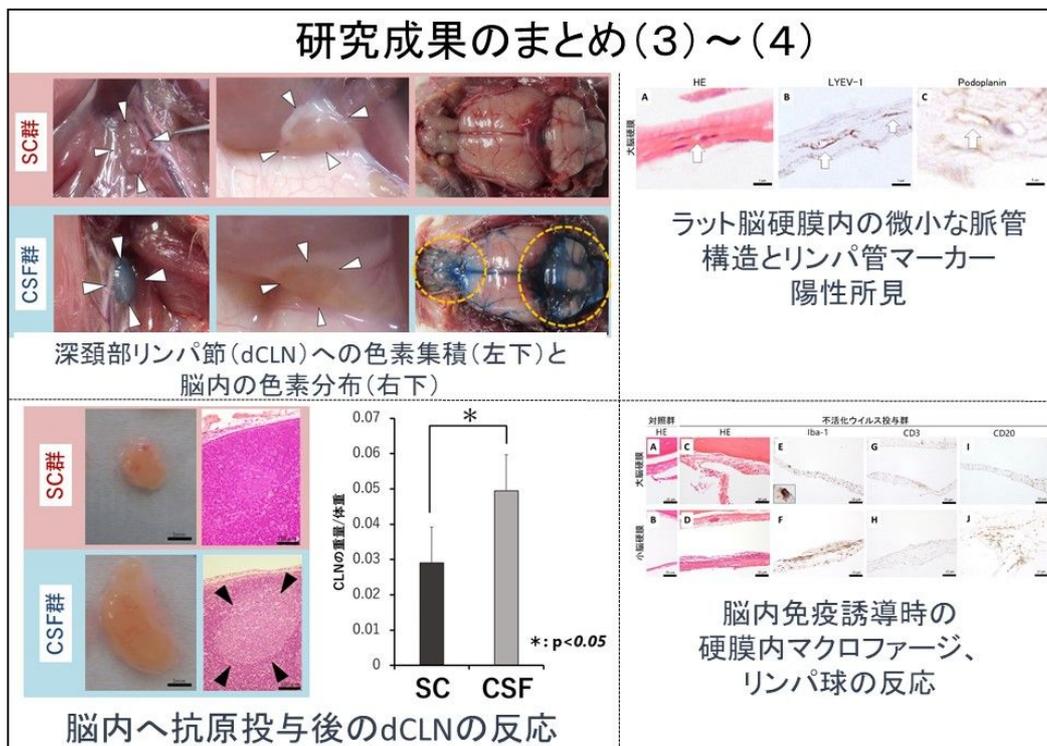
体内で抗ウイルス抗体を誘導することの重要性が再認識され、特に脳脊髄液中の抗体価を高める工夫が、顕著な病態進展阻止効果を示す可能性が高い。

狂犬病ウイルスの感染感受性には動物種差があることが判明した(マウスとウサギでは異なる)。特に、「狂犬病ウイルス野外株=強毒株ではない」ことが実験的に再確認され、自然界におけるウイルス持続様式の多様性(どこにウイルスが長期間潜伏するのか?)、動物やヒトにおけるウイルス暴露後経過の多様性(ウイルスに暴露・発症しても耐過・回復する可能性)が示唆された。

生残した動物の脳組織・神経細胞は傷害を受けており、様々な程度の後遺症が残存する可能性が高い。これはわずかに報告されているヒト生存例の特徴に一致する(J Neurol Sci. 2014 Apr 15;339(1-2):8-14)。

CSFの解析は狂犬病の早期診断・予後評価・発症リスク評価に応用できる可能性がある。これは、盲目的な暴露後ワクチン接種の改善等に応用されると考えられた。

脳内免疫制御機構を理解することによって、狂犬病の治療だけにとどまらず、様々な炎症性神経系疾患の制圧への応用が期待できる。特に、脳硬膜は検査対象としてこれまで注目されてこなかった部位であり、今後の研究発展が期待される。



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

Osaki T, Yokoe I, Sunden Y, Ota U, Ichikawa T, Imazato H, Ishii T, Takahashi K, Ishizuka M, Tanaka T, Li L, Yamashita M, Murahata Y, Tsuka T, Azuma K, Ito N, Imagawa T, Okamoto Y. Efficacy of 5-Aminolevulinic Acid in Photodynamic Detection and Photodynamic Therapy in Veterinary Medicine. *Cancers (Basel)*. 2019 Apr 7;11(4). pii: E495. doi: 10.3390/cancers11040495. 査読有 .

Nakamura T, Ichii O, Irie T, Kouguchi H, Sotozaki K, Chihara M, Sunden Y, Nagasaki KI, Tatsumi O, Elewa YHA, Kon Y. Cotton rat (*Sigmodon hispidus*) develops metabolic disorders associated with visceral adipose inflammation and fatty pancreas without obesity. *Cell Tissue Res*. 2019 Feb;375(2):483-492. doi:10.1007/s00441-018-2908-9. 査読有 .

Yamashita M, Osaki T, Sunden Y, Takahashi K, Ishizuka M, Tanaka T, Li L, Okamoto Y. Photodynamic detection of a canine glioblastoma using 5-aminolevulinic acid. *J Small Anim Pract*. 2018 Oct 23. doi: 10.1111/jsap.12947. 査読有 .

Ichii O, Nakamura T, Irie T, Kouguchi H, Sotozaki K, Horino T, Sunden Y, Elewa YHA, Kon Y. Close pathological correlations between chronic kidney disease and reproductive organ-associated abnormalities in female cotton rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018 Mar;243(5):418-427. doi: 10.1177/1535370218758250. 査読有 .

Sakurai M, Suzuki H, Tomita N, Sunden Y, Shimada A, Miyata H, Morita T. Enhanced neurogenesis and possible synaptic reorganization in the piriform cortex of adult rat following kainic acid-induced status epilepticus. *Neuropathology*. 2018 Apr;38(2):135-143. doi: 10.1111/neup.12445. 査読有 .

El-Bahrawy A, Zaid A, Sunden Y, Sakurai M, Ito H, Ito T, Morita T. Pathogenesis of renal lesions in chickens after experimental infection with 9a5b Newcastle disease virus mutant isolate. Vet Pathol. 2017 Jan;54(1):94-98.

doi:10.1177/0300985816655852. 査読有 .

Ichii O, Nakamura T, Irie T, Kouguchi H, Nakamura D, Nakamura S, Sato S, Yokoyama K, Horino T, Sunden Y, Elewa YH, Kon Y. Female cotton rats (*Sigmodon hispidus*) develop chronic anemia with renal inflammation and cystic changes. Histochem Cell Biol. 2016 Sep;146(3):351-62. doi: 10.1007/s00418-016-1438-3. 査読有 .

El-Bahrawy A, Zaid A, Sunden Y, Sakurai M, Ito H, Ito T, Morita T. Pathogenesis of pancreatitis in chickens after experimental infection with 9a5b Newcastle disease virus mutant isolate. J Comp Pathol. 2015 Nov;153(4):315-23. doi:

10.1016/j.jcpa.2015.08.002. 査読有 .

Kesdangsakonwut S, Sunden Y, Yamada K, Nishizono A, Sawa H, Umemura T. Neurogenic cardiomyopathy in rabbits with experimentally induced rabies. Vet Pathol. 2015 May;52(3):573-5. doi: 10.1177/0300985814543197. 査読有 .

〔学会発表〕(計 7 件)

石川寛、岡田亜季子、寸田祐嗣、森田剛仁；ラットの脳脊髄液、脳硬膜、深頸部リンパ節の免疫学的関連性についての基礎的研究、第6回日本獣医病理学専門家協会学術集会、2019年

Yuji SUNDEN, Midori KIHARA, Naoki TSUNEKAWA, Takehito MORITA; APOLIPOPROTEIN A-I DETECTION IN CSF OF RABBIT EXPERIMENTALLY INOCULATED WITH RABIES VIRUS AND ITS EXPRESSION IN THE BRAIN, 2018 ACVP/ASVCP Concurrent Annual Meeting, 2018

木原翠、寸田祐嗣、森田剛仁；狂犬病発症ウサギ脳脊髄液中のApoA-Iの発現量増加と病理組織学的変化との関連性についての実験病理学的研究、第161回日本獣医学会学術集会、2018年

黒川葵、寸田祐嗣、Sawang Kesdangsakonwut、西園晃、山田健太郎、森田剛仁；狂犬病ウイルス野外株接種ウサギの中樞神経系病変に関する実験病理学的研究、第160回日本獣医学会学術集会、2017年

Yuji SUNDEN; Experimental and pathological studies to control rabies by using mice and rabbits, The 8th joint symposium of veterinary research among universities of veterinary medicine in East Asia, 2017

寸田祐嗣、Sawang Kesdangsakonwut、西園 晃、山田健太郎、森田剛仁；狂犬病ウイルス野外株(1088)接種ウサギの病理組織学的変化ならびに血清・脳脊髄液中の中和抗体誘導、第15回狂犬病ウイルス研究会、2016年

寸田祐嗣；狂犬病の病理学的特徴と発症後治療に向けた実験病理学的研究、狂犬病予防業務地方ブロック技術研修会、2015年

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：森田 剛仁

ローマ字氏名：(MORITA, takehito)

研究協力者氏名：澤 洋文

ローマ字氏名：(SAWA, hirofumi)

研究協力者氏名：曾田 公輔
ローマ字氏名：(SODA, kousuke)

研究協力者氏名：山田 健太郎
ローマ字氏名：(YAMADA, kentarou)

研究協力者氏名：西園 晃
ローマ字氏名：(NISHIZONO, akira)

研究協力者氏名：黒川 葵
ローマ字氏名：(KUROKAWA, aoi)

研究協力者氏名：木原 翠
ローマ字氏名：(KIHARA, midori)

研究協力者氏名：岡田 亜季子
ローマ字氏名：(OKADA, akiko)

研究協力者氏名：石川 寛
ローマ字氏名：(ISHIKAWA, hiroshi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。