

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08957

研究課題名(和文) カテゴリーIII曝露に対する効果的な狂犬病曝露後治療法の開発

研究課題名(英文) Improvement of rabies post-exposure prophylaxis for category III exposure

研究代表者

西園 晃 (Nishizono, Akira)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：70218155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：不治の病である狂犬病では、カテゴリーIIIに分類される重度咬傷の場合、免疫グロブリン製剤(RIG)と狂犬病ワクチンの連続接種による曝露後治療法(PEP)でも救命しえない場合がある。重度の曝露に対してアクセスしやすく、より効果的なPEPレジメの提案に向け、抗ウイルス薬ファビピラビルの効果的な投与方法についての検討を行った。薬剤の脳血液関門の透過性を更新させるため、シクロデキストリンによる修飾を行い、その効果を検討したが十分な結果は得られなかったが、重症曝露後直ぐにファビピラビルを経口連続投与し、引き続きワクチンの連続投与をすることで十分な発症予防効果が得られ、新たなPEPとして提唱し得ると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初の研究目的で挙げた、狂犬病発症後の脳血液関門の透過性を上昇させる結果は最終的に得られなかったが、これまでに狂犬病ウイルスに対する抗ウイルス効果を確認できている薬剤ファビピラビルをウイルス曝露直後に経口投与し、その後に狂犬病ワクチンの連続接種を行うことで、抗狂犬病免疫グロブリンの効果と遜色無い、100%での発症予防効果を確認できた。このことは、カテゴリーIIIの重度曝露に対する新たな発症後治療のレジメを提示できたものと考えられ、本研究の最終目的の達成に適うと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In rabies, which is an incurable disease, severe bites classified as Category III may be fatal even after exposure (PEP) with immunoglobulin preparations (RIG) and continuous rabies vaccines. Effective administration of the antiviral drug Favipiravir was examined for the proposal of PEP regimen which is accessible and more effective for severe bite exposure. In order to update the permeability of the brain blood barrier (BBB) of the drug, modification by cyclodextrin was performed, and the effect was examined, but sufficient results were not obtained. However, it was considered that sufficient prevention effect was obtained by administering favipiravir orally continuously immediately after severe exposure and continuing continuous administration of the vaccine, and it was possible to advocate it as a new PEP regimen.

研究分野：ウイルス学

キーワード：狂犬病 曝露後発症予防治療 抗ウイルス薬 脳血液関門

1. 研究開始当初の背景

狂犬病は、今もなお全世界で流行している人獣共通感染症である。原因は狂犬病ウイルスであり、イヌ等の発症した動物の咬傷を介して感染する。末梢組織に感染したウイルスは、いずれ中枢神経系に侵入し、ほぼ 100%死亡する脳炎を引き起こす。毎年、少なくとも約 6 万人が狂犬病で死亡し、未だ世界における公衆衛生上の重要な課題である。発症後の治療法は未だ確立されていない。しかし、狂犬病は長い潜伏期間（通常は 30 日から 90 日程度）を有するという特徴があり、そのため感染が疑われた場合には曝露後治療法（Post-Exposure Prophylaxis, PEP）、すなわち、潜伏期間の間にワクチンおよび免疫グロブリンを投与することで免疫を獲得させることにより「発症阻止」が可能であり、世界では毎年 1000~2000 万人がこの PEP を受けていると見積もられている。

狂犬病ウイルスへの曝露度は WHO によりカテゴリー I~III に分類されている。特に、最も重篤であるカテゴリー III 曝露、すなわち、経皮的な噛みつきやひっかき傷、粘膜への唾液汚染、コウモリへの曝露があった場合、WHO は速やかにワクチン（曝露後 0、3、7 および 14~28 日目の計 4 回）に加えて狂犬病免疫グロブリン（Rabies ImmunoGlobulin, RIG）も投与することを強く推奨している。しかし、この方法で適切に対処しても死亡してしまうカテゴリー III の患者があり、「PEP の失敗」として報告されている（Wilde, *Vaccine*, 2007）。この多くのケースは、手腕や頭頸部、顔面といった部位を負傷しており、脳に近いために治療が間に合わなかったと考えられる。また、狂犬病による死者の 30~50%が 15 歳以下の子供であるが、成人に比べて身長が低いために、発症犬に頭頸部を咬まれやすいことによる（Knobel *et al*, *Bull World Health Organ*, 2005）。

最近、ワクチンにより十分に免疫を獲得させたマウスに対して、ウイルスを頭蓋内接種した場合には耐過するが、脳神経と直接の連絡がある咬筋にウイルスを接種した場合には防御できずに死亡するという報告があった（Samantha *et al*, *J Neurovirol*, 2018）。このことから、カテゴリー III の特に頭頸部に咬傷を受けるような重度のケースに対して、現行の PEP はどこまで有効なのかと疑いが生じた。実際、イヌを用いた PEP の試験（Cho and Lawson, *Can J Vet Res*, 1989）では、大腿筋に狂犬病ウイルスを接種した後でワクチンのみの PEP を施した場合には生存したイヌはなかったが（0%）、RIG とワクチンによる PEP の場合では 100%生存した。一方で、ウイルスを咬筋に接種した場合には、RIG とワクチンによる PEP により 50%が生残した。しかし、50%は死亡しており、しかもこの実験ではウイルス接種の直後に RIG をウイルス接種部位に投与した結果である。現実では、発症動物からの咬傷を受けてその直後に PEP を受療することはまずなく、しばらくしてから受けるのが通常であり、良くて当日中で、数日遅れも稀ではない。したがって、このようなカテゴリー III 曝露のなかでも危険度の高いケース（カテゴリー IV としての提唱も必要？）に対する効果的な PEP を確立すべきである。

RIG については、高い生産コストや供給量不足、短い保存期間といった問題のために、必要とされる患者の数%しか RIG を用いた正しい PEP が届いていない（Bourhy *et al*, *Euro Surveill*, 2009）。日本では RIG の入手はほぼ不可能であり、カテゴリー III 曝露の場合は現地で PEP を受けることが強く推奨されている。したがって、よりアクセスしやすい、かつ効果のある PEP レジメが必要な状況になっている。これに関して、我々は抗ウイルス薬ファビピラビルが、ウイルス接種直後からの「経口投与」により、RIG の投与に比べて効率よく発症阻止ができることを示し、PEP における RIG の代替になり得ることを提案した（Yamada, 他 3 名, *Nishizono*, *J Infect Dis*, 2016）。RIG のような生物製剤に比べ、ファビピラビルのような抗ウイルス薬は、工業レベルでの大量生産が可能であり、冷蔵・冷凍が不要であるため輸送・保存が容易であるという利点がある。

また、前述の免疫マウスへの接種実験において、頭蓋内接種では予防効果が得られる理由については、血液脳関門（Blood-brain Barrier, BBB）の透過性が考えられており、針によって開けられた BBB の穴によってウイルスが排除されるに至ったとの報告もある（Samantha *et al*, *J Neurovirol*, 2018）。狂犬病では BBB の破綻が起こらないため、抗体や抗体産生 B 細胞が脳内に浸潤せず、ウイルスが排除されない故に高い致死率を有する（Hooper *et al*, *PLoS Negl Trop Dis*, 2009）。このことから、BBB の透過性を亢進させることが、カテゴリー III 曝露の重度のケースにおける PEP のもう一つの鍵となると考えられる。

現行の PEP レジメは、60 年以上前（1954 年）のワクチンと免疫グロブリンを受けた患者では生存率が高かった観察に基づくもので、それから大きく変更していない現在の知見と状況に即して、「失敗しない PEP」に向け、特にカテゴリー III 曝露に対するレジメンについて見直すべき時期に来ている。

2. 研究の目的

本研究では、カテゴリーIII 曝露に対する有効なレジメの提案を目指す、そのため(1) BBBの透過性を亢進させる効果のある薬剤を併用することで、抗ウイルス薬との併用で、頭部へのカテゴリーIII 曝露における BBB 透過性亢進処置の有効性の検証を行う。(2) RIGの代替としての抗ウイルス薬を用いた効果的な PEP レジメの立案と実証を行う。

3. 研究の方法

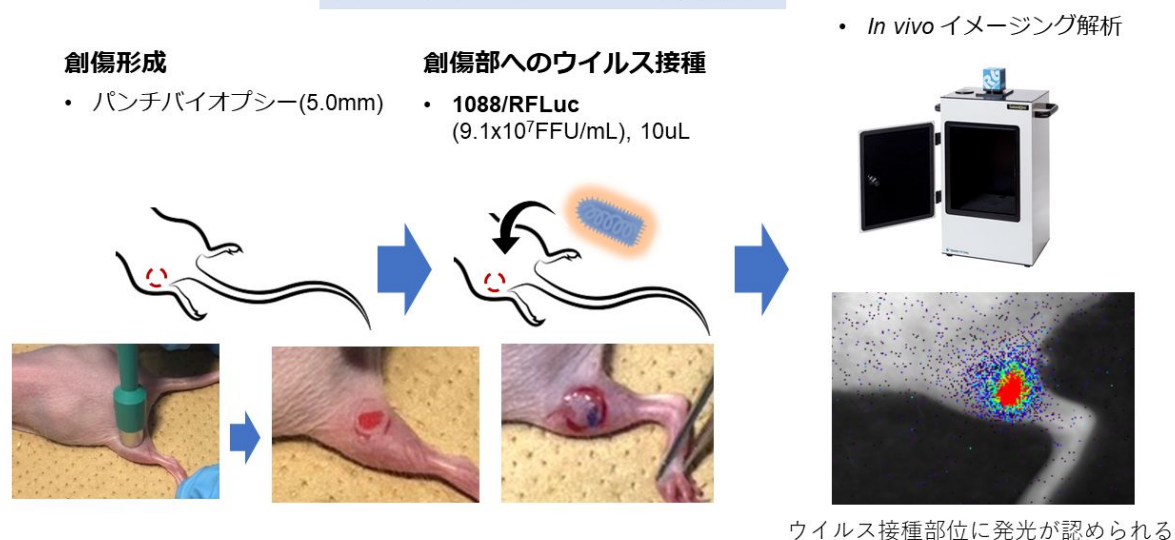
(1) BBB 透過性亢進薬剤の併用による、抗ウイルス薬の頭部へのカテゴリーIII 曝露に対する有効性の検証

抗ウイルス化合物の BBB 透過性を亢進させる修飾剤の効果について検討を行う。これまでに狂犬病ウイルスに対する抗ウイルス効果を既に確認、報告してきたファビピラビル(アビガン)をラクトース修飾ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンにより修飾することで、BBB 透過効率を増加させるかの検討を行う。*In vitro*でのレポーターアッセイによりマウス神経系 Neuro-2a 細胞において発光型組換え狂犬病ウイルスに対する増殖抑制効果の増強が確認できていたため、狂犬病ウイルス感染マウスモデルにおける効果を *in vivo* イメージングにより追跡する。また、血液脳関門の透過性を亢進させる処置法として、マイクロバブル・経頭蓋的集束超音波併用法については、まずはマイクロバブル投与後の超音波照射についての至適条件検討を、非感染マウスにおける蛍光色素(インドシアニンググリーン等)の脳への漏出を指標に行う。続いて、同併用法による抗ウイルス薬送達の頭部ウイルス感染に対する有効性の検証を行う。すなわち、感染マウスに抗ウイルス薬もしくは抗狂犬病免疫グロブリンを投与し、さらに同併用法を施して、抗ウイルス効果の改善が認められるか、*in vivo* イメージングにより定量的評価を行う。

(2) RIGの代替としての抗ウイルス薬を用いた効果的な PEP レジメの立案と実証

野外で通常観察される動物咬傷部位でのウイルスの増殖抑制効果をみるために、マウス背部皮膚に生検用トレパンで円形の創部を作成し、そこに発光型組換え狂犬病ウイルスを浸透接種し、その後白色ワセリンを基材とした10%ファビピラビル塗布剤を作成し、創部に塗布後ウイルスの増殖を *in vivo* イメージングで観察し、感染局所でウイルスの増殖(図1)が抑制されるかのモデルを作成する。

図1 カテゴリー IIIの病態解析



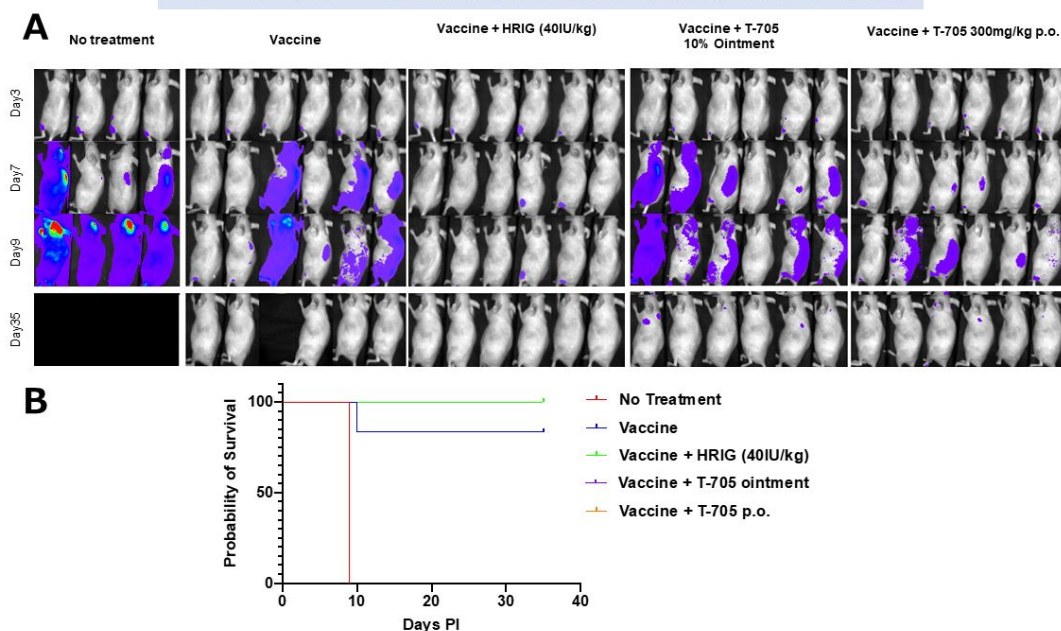
4. 研究成果

これまでにファビピラビルは *in vitro*, *in vivo* で狂犬病ウイルスの増殖を抑制することを明らかにしてきたが、実験感染モデルでの生残率は約 70% と完全なものではなかった。そこで、ファビピラビルの投与後にワクチンの連続接種を行い、通常の PEP と同様の治療レジメに沿って、その有効性を評価した。

カテゴリー III を模した創傷感染モデルマウスを用いて、*in vivo* イメージングにてウイルス感染動態の評価と、ワクチン接種との併用におけるファビピラビルの有効性の評価を目的とした実験を行ったところ、カテゴリー III を模した創傷感染モデルマウスに PEP としてワクチン接種（接種 0, 3, 7 日後）のみ、あるいはワクチン接種に加えて接種 0 日目に HRIG（40IU/kg）、接種 0 から 6 日目にファビピラビルを胃ゾンデを用いて経口投与（300mg/kg）した。PEP なし群、あるいはワクチン接種のみ群ではそれぞれ 4/4 匹、1/6 匹が発症・瀕死であったが（data not shown）、RIG あるいはファビピラビルを投与した処置群ではすべてが生残した（図 2A, 2B）。興味深いことに、ファビピラビル投与群においては、感染初期に脊髄でのウイルス増殖が見られたものの、接種 35 日目にはそれらが消失しており、ワクチンによる抗体誘導と相まって、ウイルスの脳内での増殖に至らないことが明らかとなった（図 2A）。以上の結果から、ファビピラビルは RIG 同様に PEP における初期ウイルス増殖抑制のための薬剤として代替できる可能性が示唆された。

当初の研究目的で挙げた、狂犬病発症後の脳血液関門の通過性を促進させる、修飾剤の効果についての追試の結果は得られなかったが、既に狂犬病ウイルスに対する抗ウイルス効果を確認できている、ファビピラビルをウイルス曝露直後に経口投与または局所塗布し、その後に曝露後接種として狂犬病ワクチンの連続接種を行うことで、抗狂犬病免疫グロブリンの効果と遜色無い、100%での発症予防効果を確認できた。このことは、カテゴリー III の重度曝露に対する新たな発症後治療のレジメを提示できたものと考えられ、本研究の最終目的の達成に適うと考えられた。

図 2 カテゴリー III に対するファビピラビルを用いた PEP の効果



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 1. Mananggit MR, Manalo DL, Saito N, Kimitsuki K, Garcia AMG, Lacanilao PMT, Ongtangco JT, Velasco CR, Del Rosario MVA, Lagayan MGO, Yamada K, Park CH, Inoue S, Suzuki M, Saito-Obata M, Kamiya Y, Demetria CS, Quiambao BP, Nishizono A*.	4. 巻 15(12)
2. 論文標題 Lateral flow devices for samples collected by straw sampling method for postmortem canine rabies diagnosis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS Negl Trop Dis.	6. 最初と最後の頁 e0009891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pntd.0009891.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 2. Mananggit MR, Kimitsuki K, Saito N, Garcia AMG, Lacanilao PMT1, Joely T. Ongtangco1, Velasco OCR, Rosario MRD, Lagayan MGO, Yamada K, Park C-H, Inoue S, Suzuki M, Saito-Obata M, Kamiya Y, Manalo DL, Demetria CS, Quiambao BP, Nishizono A*.	4. 巻 49(1)
2. 論文標題 Background and descriptive features of rabies-suspected animals in Central Luzon, Philippines.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Trop Med Health.	6. 最初と最後の頁 49-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41182-021-00351-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 3. Yamada K, Kuribayashi K, Inomata N, Noguchi K, Kimitsuki K, Demetria CS, Saito N, Inoue S, Park CH, Kaimori R, Suzuki M, Saito-Obata M, Kamiya Y, Manalo DL, Quiambao BP, Nishizono A*.	4. 巻 65(10)
2. 論文標題 Validation of serum apolipoprotein A1 in rabies virus-infected mice as a biomarker for the preclinical diagnosis of rabies.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol.	6. 最初と最後の頁 438-448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12929.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 4. Nguyen AKT, Vu AH, Nguyen TT, Nguyen DV, Ngo GC, Pham TQ, Inoue S, Nishizono A.	4. 巻 105(3)
2. 論文標題 Risk factors and protective immunity against rabies in unvaccinated butchers working at dog slaughterhouses in Northern Vietnam.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Trop Med Hyg.	6. 最初と最後の頁 788-793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4269/ajtmh.20-1172.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 5.Vu AH, Nguyen TT, Nguyen DV, Ngo GC, Inoue S, Nishizono A, Nguyen TD, Anh Kieu Thi Nguyen AKT.	4. 巻 68(6)
2. 論文標題 Rabies infected dog at slaughterhouses: A potential risk of rabies transmission via dog trading and butchering activities in Vietnam.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Zoonoses Public Health.	6. 最初と最後の頁 630-637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/zph.12851.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kimitsuki K, Saito N, Yamada K, Park CH, Inoue S, Suzuki M, Obata MS, Kamiya Y, Manalo DL, Demetria CS, Mananggit MR, Quiambao BP, Nishizono A.	4. 巻 14
2. 論文標題 Evaluation of the diagnostic accuracy of lateral flow devices as a tool to diagnose rabies in post-mortem animals.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS Negl Trop Dis.	6. 最初と最後の頁 e0008844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pntd.000884	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 11.Takahashi T, Inukai M, Sasaki M, Potratz M, Jarusombuti S, Fujii Y, Nishiyama S, Finke S, Yamada K, Sakai H, Sawa H, Nishizono A, Sugiyama M, Ito N.	4. 巻 12
2. 論文標題 Genetic and Phenotypic Characterization of a Rabies Virus Strain Isolated from a Dog in Tokyo, Japan in the 1940s.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 914
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v12090914.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamada K, Noguchi K, Kimitsuki K, Kaimori R, Saito N, Komeno T, Nakajima N, Furuta Y, Nishizono A.	4. 巻 172
2. 論文標題 Reevaluation of the efficacy of favipiravir against rabies virus using in vivo imaging analysis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antiviral Res.	6. 最初と最後の頁 104641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.antiviral.2019.104641.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto T, Sato M, Nishizono A, Ahmed K.	4. 巻 164(8)
2. 論文標題 A novel bat-associated circovirus identified in northern Hokkaido, Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arch Virol.	6. 最初と最後の頁 2179-2182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00705-019-04286-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西園晃
2. 発表標題 1. One Healthの視点からの狂犬病 Rabies, from the viewpoint of "One Health"
3. 学会等名 第25回日本渡航医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Demetria CS, Kawano M, Kimitsuki K, Yahiro T, Saito N, Manalo DL, Chu MYJV, Mauhay J, Quiambao BP and Nishizono A
2. 発表標題 2. Evaluation of a real-time mobile PCR device (PCR1100) in the detection of Rabies Nucleoprotein RNA in Experimentally Infected Samples
3. 学会等名 第25回日本渡航医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kimitsuki K, Saito N, Garcia AMG, Lacanilao PMT, Ongtangco JT, Velasco CR, Rosario MVD, Lagayan MGO, Manalo DL, Demetria CS, Quiambao BP, Nishizono A
2. 発表標題 3. Characteristics of management and clinical signs of rabies suspected animals in the endemic areas of the Philippines: Data from 2019 to 2021
3. 学会等名 第25回日本渡航医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Saito N, Kimitsuki K, Yamada K, Ferdinand GD, Rontgene SM, Kamiya Y, Quiambao BP, and Nishizono A
2. 発表標題 4.Characteristics of human rabies in Metro Manila. the Philippines. 2-year prospective study.
3. 学会等名 第25回日本渡航医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Saito N, Mauhay JM, Kimitsuki K, Yamada K, Quiambao, BP, and Nishizono A
2. 発表標題 5.Evaluation of screening RT-PCR assay using RNA extracted from lateral flow device after the use of rabies post-mortem diagnosis for the genome sequencing
3. 学会等名 第25回日本渡航医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西園晃, 君付和範, 齊藤信夫, Mananggit MR, Garcia AMG, Lacanilao PMT, Ongtangco JT, Velasco CR, Rosario MVD, Lagayan MGO, Manalo DL, Demetria CS, Quiambao BP.
2. 発表標題 6.狂犬病流行国フィリピンにおける狂犬病疑い動物の臨床的特徴
3. 学会等名 第25回日本渡航医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西園晃
2. 発表標題 7.狂犬病 ~この忘れられた死の病と最新の知見~
3. 学会等名 One Health国際フォーラム2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西園晃
2. 発表標題 8. One Healthの視点からの狂犬病
3. 学会等名 第95回日本感染症学会総会 教育講演（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nobuo Saito, Kazunori Kimitsuki, Kentaro Yamada, Beatriz Quiambao, Ferdinand Guzman, Solante Rontgene, Motoi Suzuki, Yasuhiko Kamiya, Akira Nishizono,
2. 発表標題 Prospective observational study of human rabies in the Philippines (Interim analysis)
3. 学会等名 グローバルヘルス合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 君付和範, 齊藤信夫, Manalo Daria, Lagayan MariaGlovezita, Manangitt Milagros, Quiambao Beatriz, 西園晃
2. 発表標題 フィリピン中部ルソン地域におけるイヌ狂犬病診断の現状と迅速診断キットの現場応用の評価
3. 学会等名 グローバルヘルス合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamada K, Kobayashi K, Inomato N, Kaimori R, Kimitsuki K., Saito N, Nishizono A.
2. 発表標題 Screening and validation of a biomarker candidate applicable to preclinical diagnosis of rabies
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会（東京）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamada K, Nishizono A
2. 発表標題 Illuminating the stealth rabies virus infection with bioluminescence
3. 学会等名 51st US-Japan Cooperative Medical Science Program, Viral Panel Meeting (Bangkok, Thailand) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 中野貴司編	4. 発行年 2020年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 465
3. 書名 まるわかりワクチンQ&A 第3版	

1. 著者名 西園晃	4. 発行年 2019年
2. 出版社 協和企画	5. 総ページ数 178 (100-105)
3. 書名 海外渡航者のためのワクチンガイドライン/ガイダンス2019	

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立大学法人大分大学医学部微生物学講座（西園研究室） http://www.med.oita-u.ac.jp/biseibut/ 国立大学法人グローバル感染症研究センター https://www.oita-glocal.jp/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
フィリピン	熱帯医学研究所	国立サンラザロ病院	農業省動物局