

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450410

研究課題名(和文) 狂犬病発病犬の皮膚組織を用いた安価で迅速な確定診断法の開発

研究課題名(英文) Development of cheap and quick diagnostic methods using muzzle skin of rabid dogs

研究代表者

朴 天鎬 (PARK, ChunHo)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：50383550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：狂犬病の確定診断には脳組織を用いた直接蛍光抗体法が用いられる。この方法は頭蓋を開ける必要があり、開頭時にウイルスの飛散による実験者への感染リスクを伴う。哺乳動物には洞毛と呼ばれる感覚受容体があり、特に鼻口部皮膚に豊富に存在する。各洞毛には2,000個以上の神経終末が存在するため、洞毛が脳組織に代わる診断材料として期待されている。本研究では、狂犬病発病犬の洞毛を用いてウイルスのターゲット細胞と抗原分布について精査した。その結果、ウイルス抗原が洞毛の環状洞の高さに存在するメルケル細胞において高率に検出されることが判明した。本研究によって、洞毛が狂犬病の診断材料として極めて有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The direct fluorescent antibody test on fresh brain tissues is the gold standard for rabies virus antigen detection in dogs. However, this method is laborious and holds a high risk of virus exposure for the experimenter. In mammals, the tactile hair is a specialized touch organ that is abundant in the muzzle skin. Each tactile hair is equipped with more than 2,000 sensory nerve endings. Therefore, this organ is expected to serve as an alternative postmortem diagnostic material. In the present study, muzzle skins were obtained from rabid dogs and the target cells and localization of rabies virus antigen was defined. Virus antigen was clearly detected in a part of the outer root sheath at the level of the ring sinus of the tactile hairs, and the majority of cells were Merkel cell. Our results suggest that Merkel cells in the tactile hairs of the muzzle skin are a target for virus replication and could serve as a useful specimen source for diagnosis of rabies.

研究分野：獣医病理学

キーワード：狂犬病 フィリピン 犬 脳 洞毛(触毛) 病理診断法 メルケル細胞 人獣共通感染症

1. 研究開始当初の背景

狂犬病は全ての哺乳動物に感染する人獣共通感染症である。アジアやアフリカの発展途上国を中心に毎年約 55,000 人と約 500 万頭の動物が本疾患によって死亡する。発病後の有効な治療法は存在せず、ほぼ 100%の患者が発病から数日以内に死を迎える。主な感染源は放浪犬である。ヒトへの伝播は罹患犬の咬傷によって成立する。罹患犬は発病後数日以内に死亡するが、その大半が野外に放置された状態で発見される。そのため、発見時には生体の腐敗(自己融解)が進行し、確定診断に提供されることなく多くの検体が廃棄となる。特に、確定診断の対象となる脳組織は頭蓋骨に包まれているため、死後すぐに自己融解が進む。狂犬病流行国の多くは高温・多湿な地域であり、財政難のため死体を保管するための冷蔵設備や輸送手段も十分に整っていない。

2. 研究の目的

本研究は、フィリピンの熱帯医学研究所(RITM)の協力を得て、狂犬病発病犬の材料を用いて脳に代わる安価で迅速な確定診断法の開発を研究目的とした。皮膚組織は脳や唾液腺に比較し、材料採取が容易であり、ヒトへの感染リスクが低く、死後の自己融解も遅い。そのため、高温・多湿な気候が多いアジア諸国において皮膚組織を用いた狂犬病の確定診断法は極めて有用であると判断した。

3. 研究の方法

(1) 狂犬病発病犬の捕獲と回収はフィリピン熱帯医学研究所(RITM)保健部の Manalo 主任研究官と現地の研究協力者が行った。回収された犬の脳と唾液腺の一部は簡易蛍光抗体法で確定診断し、陽性個体の皮膚組織を 10%緩衝ホルマリンに固定した後病理検索に供した。皮膚組織の切り出しは RITM の病理解剖室で朴と研究協力者が行った。採集し

た研究材料は日本へ運搬し、北里大学の病理学研究室で病理学的検索を実施した。

(2) 街上毒 1088 株(1088-N0, 1088-N30)の病理発生機序の解明のため、マウスの感染実験を行った。感染実験は大分大学医学部の BSL3 施設で実施した。街上毒 1088 株をマウス neuroblastoma cells で培養し、その上清を 6 週齢、雌、ddY マウスの骨格筋筋肉内(右腓腹筋、IM)に接種(10^6 plaque-forming units, $50 \mu l$)した。ウイルス接種後、毎日臨床徴候をノート記録・ビデオ撮影し、接種 2 日、3 日、5 日、7 日、9 日後および死亡時に病理解剖を実施した。各感染マウスはイソフルランで深麻酔をかけた後、心採血により安楽死させた。その後、脳脊髄、接種部位の骨格筋および全身臓器は中性緩衝 10%ホルマリン液を用いて固定・浸漬し、その後、病理標本を作製して病理学的検索を行った。

4. 研究成果

(1) 狂犬病発病犬のホルマリン固定後の脳組織と洞毛を用いて抗原検出の感度と特異度を比較検討したところ、いずれも 100%となり、洞毛の診断的有用性が確認された。さらに、洞毛の中でどの細胞が一番高い染色感度を示すかについて詳細に検討してみたところ、洞毛の環状洞の高さに配列するメルケル細胞において強陽性像が観察されることが判明した。

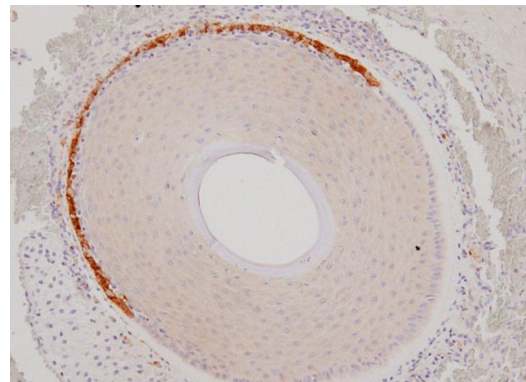


図 1. 狂犬病発症犬の洞毛の環状洞の高さに配列するメルケル細胞に明瞭な抗原陽性像が観察される。

この知見は世界で初めてであり、ウイルス診断学の国際雑誌(J. Virol. Methods. 2016)に投稿し、革新的な診断法として高く評価された。

犬の鼻口部洞毛には、約2,000以上の感覚神経が存在するが、特に、環状洞の高さに局在するメルケル細胞には無数の神経終末が形成されている。狂犬病発病犬には、知覚過敏(噛みつき、恐水症、恐風症など)や運動障害(四肢麻痺)などの臨床症状が観察されるが、これらの症状を規定する要因については不明である。我々は、狂犬病発病犬にみられる諸症状が中枢神経系だけに起因するのではなく、末梢の感覚神経の機能障害によって起こる可能性を報告しており、今後さらに検体数を増やし、狂犬病発病犬のみならず人の患者にみられる臨床症状の発現機構の解明を行っていく所存である。

(2) 街上毒1088株(N0, N30)を接種された感染マウスは、接種5日から右後肢麻痺を示した。8日では全ての感染マウスにおいて踏み外しや後肢麻痺が観察された。両群において、ウイルス抗原陽性像は接種5日後の右脊髄運動神経、背根神経節、脊髄背角、赤核、大脳皮質運動野、延髄において観察された。接種8日以降、1088-N0群ではCNS全域に、N30群では大脳皮質と視床に限局しウイルス抗原陽性像が観察された。脊髄では両群ともに背角および背根神経節に抗原陽性像が顕著であった。炎症細胞は両群ともに、CD3, Iba-1, GFAP陽性細胞が主体であったが、1088-N30群において感染初期に高値を示した。中和抗体も急上昇していた。以上より、1088株では病原性が変化しても感染初期に下行性神経路を利用して大脳皮質に到達することが判明した。また、弱毒株では強毒株に比較し感染初期に炎症細胞と中和抗体が上昇しており、このことがその後の感染拡大を阻止している可能性が示唆された。また、

感染後期には狂犬病発症犬でみられた洞毛のメルケル細胞においてウイルス抗原陽性像が観察された。このことから、今後マウスの実験モデルを用いた洞毛組織の診断的有用性の検証が可能と考えられた。

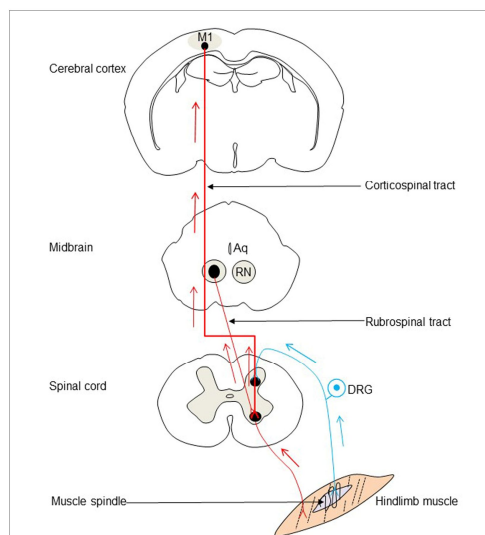


図2. 狂犬病ウイルス街上毒(1088株)の筋肉から大脳皮質への感染経路

フィリピンでは狂犬病に関する専門家の不足、検査設備および高額な検査費用のため、脳および唾液腺の一部の組織以外は検査対象とならず、ほとんどの臓器が廃棄処分されている。本研究では、実験室で作り上げてきた優れた病理解析法並びに診断技術を先方に提供することができた他方で、フィリピンから入手する狂犬病発症犬の材料を用いて狂犬病の病理発生機序の解明が可能となった。本研究は相互補完性が極めて高く、今後の人獣共通感染症の共同研究の推進と拡大にも直結すると思われる。本研究によって得た成果は多いが、特に、以下の3点が重要である。日本国内では1961年以降狂犬病の自然発症例が存在しないが、海外からの野生動物やペットの輸入が急増している昨今、いつ侵入してきてもおかしくない。しかしながら、狂犬病の実態を知るものは殆どいない。進歩している病理解析法を用いて、もう一度病理発生機序を詳細に解明することによっ

て、感染予防と発病後の治療法の開発が可能と思われる。フィリピンでは狂犬病の確定診断法が十分に確立していない。本研究を通じて、狂犬病診断の統括機関である RITM に安価で正確な免疫組織化学的診断法を提供することができた。これにより、より多くのヒトと動物の命を救うことができると判断される。今の獣医学教育現場にいる殆どの教員は人獣共通感染症の実体を知らない。しかし、あたかも全てを知っているかのように講義と実習に挑まざるを得ない現実があり、矛盾を感じることが多い。本研究では、狂犬病を始め、フィリピンで問題となっている重要な人獣共通感染症を経験することができた。これらの経験を教育現場に組み入れ、現場感溢れる講義に挑むとともに、国際性豊かな獣医師の育成に全力投球したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Kimitsuki K, Yamada K, Shiwa N, Inoue S, Nishizono A, Park CH. Pathological lesions in the central nervous system and peripheral tissues of ddY mice with street rabies virus (1088 strain). J. Vet. Med. Sci. 79(6):970-978. 2017. 査読有。

Shimatsu T, Shinozaki H, Kimitsuki K, Shiwa N, Manalo DL, Perez RC, Dilig JE, Yamada K, Boonsriroj H, Inoue S, Park CH. Localization of the rabies virus antigen in Merkel cells in the follicle-sinus complexes of muzzle skins of rabid dogs. J. Virol. Methods 237(40): 40-46. 2016. 査読有。

Boonsriroj H, Manalo DL, Kimitsuki K, Shimatsu T, Shiwa N, Shinozaki H, Takahashi Y, Tanaka N, Inoue S, Park CH.

A pathological study of the salivary glands of rabid dogs in the Philippines. J. Vet. Med. Sci. 78 (1): 35-42. 2016. 査読有。

Hamamoto N, Uda A, Tobiume M, Park CH, Noguchi A, Kaku Y, Okutani A, Morikawa S, Inoue S. Association between RABV G proteins transported from the perinuclear space to the cell surface membrane and N-glycosylation of the sequon Asn²⁰⁴. Jpn. J. Infect. Dis. 65(5): 387-393. 2015. 査読有。

[学会発表](計8件)

志和希, 川本尚未, 君付和範, Daria Llenaresas Manalo, 井上智, 朴天鎬. フィリピンの熱帯医学研究所で狂犬病陽性と診断された発症犬の神経病理学的研究. 第4回日本獣医病理学専門家協会学術集会. 2017.3.30-3.31. タワーホール船堀(東京都江戸川区)

中島千景, Daria Llenaresas Manalo, 君付和範, 川本尚未, 須見康代, 山岸光葉, 篠崎春美, 島津太一, 志和希, 山田健太郎, 井上智, 朴天鎬. 狂犬病発症犬の鼻口部洞毛組織の死後診断的有用性の再確認と洞毛組織における病理学的所見. 第159回日本獣医学会学術集会. 2016.9.6. 日本大学(神奈川県藤沢市)

Shimatsu T, Kawamoto N, Shiwa N, Kimitsuki K, Boonsriroj H, Manalo DL, Shinozaki H, Takahashi Y, Tanaka N, Inoue S, Park C. The utility of muzzle skin of rabid dogs as antemortem and postmortem diagnosis. 7th Asian Society of Veterinary Pathology (ASVP), 8-11 November 2015, Institute of Biology Auditorium, University of the Philippines Diliman, Quezon City (Philippines)

Kimitsuki K, Boonsriroj H, Manalo DL, Shimatsu T, Shiwa N, Takahashi Y, Tanaka N, Inoue S, Park CH. A pathological study of the salivary glands of rabid dogs in the Philippines. 7th Asian Society of Veterinary Pathology (ASVP), 8-11 November 2015, Institute of Biology Auditorium, University of the Philippines Diliman, Quezon City (Philippines)

Shiwa N, Sumi Y, Shimatsu T, Kimitsuki K, Boonsriroj H, Manalo DL, Inoue S, Park CH. Pathological study on the taste buds and von Ebner 's glands of rabid dogs in the Philippines. 7th Asian Society of Veterinary Pathology (ASVP), 8-11 November 2015, Institute of Biology Auditorium, University of the Philippines Diliman, Quezon City (Philippines)

Manalo L. Daria, Bazartseren Boldbaatar, 朴 天鎬, 井上 智. 直接迅速免疫組織化学 (DRIT) 法を利用したフィリピンにおける狂犬病検査法の検討。第 158 回日本獣医学会学術集会。

2015.9.7-9.9.北里大学十和田キャンパス (青森県十和田市)

島津太一, 志和希, 君付和範, Hassadin Boonsriroj, Daria Llenaresas Manalo, 井上智, 朴 天鎬. 狂犬病発病犬の鼻口部洞毛は死後組織診断材料として極めて有用である。第 158 回日本獣医学会学術集会。2015.9.7-9.9.北里大学十和田キャンパス (青森県十和田市)

志和希, 島津太一, 君付和範, Hassadin Boonsriroj, Daria Llenaresas Manalo, 井上智, 朴天鎬. 狂犬病発病犬の味蕾乳頭 (有郭乳頭) と舌小唾液腺 (エブネル腺) に関する病理学的研究。第 158 回日本獣医学会学術集会。2015.9.7-9.9.

北里大学十和田キャンパス (青森県十和田市)

〔図書〕(計 1 件)

Inoue S, Park CH, Hatta H. Production of polyclonal antibodies in bird, in "Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention" ELSEVIER, Inoue S, Park C, Hatta H, 305-315. 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朴 天鎬 (Park ChunHo)
北里大学・獣医学部・准教授
研究者番号: 50383550

(3) 連携研究者

井上 智 (Inoue Satoshi)
国立感染症研究所・獣医科学部・室長
研究者番号: 90213157

山田 健太郎 (Yamada Kentaro)
大分大学・医学部・准教授
研究者番号: 70458280