

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年4月21日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18405039  
 研究課題名（和文） ブラジルにおけるコウモリ由来狂犬病の分子疫学的調査研究  
 研究課題名（英文） Molecular epidemiological survey of bat-related rabies in Brazil

研究代表者  
 酒井 健夫（SAKAI TAKEO）  
 日本大学・生物資源科学部・教授  
 研究者番号：50147667

## 研究成果の概要：

我が国は、現在、致死性感染症である狂犬病の清浄国であるが、先進国を含む世界各地でその発生が認められている。一方、2006年11月に36年ぶりに国内で本病患者が発生し、本病が再興感染症となる危険性が極めて高いことが認識された。公衆衛生上、海外の狂犬病発生地域から本病の侵入を阻止するためには、海外での狂犬病流行状態を把握し、科学的根拠に基づく侵入防止対策を確立する必要があるが、コウモリなどの野生動物間での感染が維持される森林型狂犬病の感染環および自然宿主については不明な点が多い。したがって、野生動物狂犬病の媒介動物として最も重要な動物種の1つであるコウモリに着目し、それらを由来とする狂犬病の疫学調査を行った。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
総計	8,200,000	2,460,000	10,660,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：狂犬病ウイルス、コウモリ、分子疫学、遺伝子解析、ブラジル、野生動物

## 1. 研究開始当初の背景

海外において発生している人獣共通感染症が国内へ侵入する危険性が増大し、近年では鳥インフルエンザや牛海綿状脳症等の新興感染症が国内に侵入している。我が国は、現在、致死性感染症である狂犬病の清浄国であるが、我が国周辺諸国では本病の発生が頻繁に認められており、さらに2006年11月に36年ぶりに国内で患者が発生し、本病が再興感染症となる危険性が大きい。海外の狂犬病発生地域から本病の侵入を阻止するためには、海外での狂犬病流行状態を把握し、科学的根拠に基づく侵入防止対策を確立しなければならない。しかし、コウモリなどの野生動物間での感染環が維持される森林型狂犬病は増加傾向にあるにもかかわらず、その感染環および自然宿主については不明な点が多く、それらの解明が望まれている。

## 2. 研究の目的

- (1) 様々なコウモリによって媒介されるコウモリ由来狂犬病の感染環を疫学的に解明する。
- (2) 吸血コウモリ由来狂犬病であるウシおよびヒト狂犬病の疫学的特徴を解明する。
- (3) コウモリ分離狂犬病ウイルス (RABV) の性状を分子生物学的に解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) ブラジルでのコウモリ由来RABVの採集

これまでの調査実績があるブラジルにおいて、大規模なコウモリ由来のRABV採集を実施した。調査はサンパウロ大学獣医学部の協力を得て、サンプル収集にはコウモリの直接捕獲、害獣駆除および各地診断センターやサンパウロ大学に持ち込まれ、分離・保管されたRABVを積極的に利用した。

### (2) 脳組織からのウイルスRNA抽出

RABVのRNAは、FATおよびMITによって狂犬病陽性と診断されたウシの脳サンプルから直接抽出した。脳乳剤は、脳サンプルの一部をマイクロチューブに移した後に、ペッスルを用いて破碎した。その後、滅菌PBSで脳乳剤を希釈し、遠心した後に、上清より全RNAを抽出した。RNA抽出は、QIAmp Viral RNA Mini Kitを用いて行った。

### (3) RABV遺伝子の検出および塩基配列決定

RT-PCRは、SuperScript One-Step RT-PCR Systemを用いて行った。核蛋白質遺伝子の増幅にはP1およびP2プライマーセット、P1およびBRABP-C1プライマーセット、またはP1およびN8プライマーセットを用いた。RT-PCRサイクルは、RT反応を50°C、30分間、熱変性を94°C、2分間行った後に、PCR反応として、熱変性を94°C、15秒間、アニーリングを50°C、30秒間、伸張反応を68°C、2分間の工程を1サイクルとして、40サイクル行った。上記のワンステップRT-PCRで増幅が確認されなかった検体は、Nested PCRを行った。増幅産物の確認およびPCR産物の精製は、定法に従って行った。塩基配列は、ダイレクトシーケンスによって決定した。シーケンス反応および反応物の精製は定法に従って行った。解析した遺伝子領域は、NおよびG蛋白質遺伝子全領域あるいは部分塩基配列であった。

### (4) 分子系統解析および相同性の算出

マルチプルアラインメントおよび近隣結合法による系統樹の作成はClustalXを用いて行った。アウトグループにはMokolaを用いた (Accession No.: Y09762)。アミノ酸配列はGENETYX-WIN (Ver. 6.2) によって推定した。塩基およびアミノ酸配列はClustalWでマルチプルアラインメントを行った後に、BioEditを用いて相同性を算出した。

### (5) 分離株のマッピング

検体の地図上へのマッピングは、MapInfo Professional GIS software (ver. 8.0)を用いて行った。ブラジルにおけるRABVの地理的分布の解析に用いた地図は、Brasil em Relevô - Embrapa Monitoramento por Satélite (<http://www.relevobr.cnpm.embrapa.br/>)およびIBGE Mapas Interativos (<http://mapas.ibge.gov.br/>)から得た。

## 4. 研究成果

### (1) ブラジルの吸血コウモリ由来狂犬病

ブラジルの広範囲の地域から分離された野外狂犬病ウイルス (RABV)、すなわちウシ分離株666検体および吸血コウモリ分離株18検体を用いて吸血

コウモリ由来RABVの分子系統学および地理学的解析を行った。ウシ分離株の99.2%は吸血コウモリ由来であり、イヌ由来株はわずかであることが系統樹から示唆された。系統樹の分岐パターンから、吸血コウモリ由来ウシ分離株は、さらに分離地域を反映した多様な遺伝子系統に区分された。これらの系統の地域分布は山脈によって区分される傾向があり、系統樹上で同一系統に属するウシおよび吸血コウモリ分離株の地域分布は一致した。吸血コウモリは定住性で、長距離を移動しないので、ウシの飼養地域に近隣して生息する吸血コウモリがウシにウイルスを伝播していることが遺伝子学的に再確認された。さらに、殆どのウシ分離株は河川周辺に分布した。吸血コウモリは河川を移動経路として利用する生態学的特徴があるため、河川は吸血コウモリ由来狂犬病が拡大する地理的要因である可能性が示唆された。以上、吸血コウモリ由来RABVは、分離地域を反映した多様な遺伝子系統を形成しており、ウシ狂犬病の疫学的特徴は、吸血コウモリの生態および地理的要因が深く関与することが示唆された。したがって家畜狂犬病に代表される吸血コウモリ由来狂犬病の流行を阻止するには、地域ごとの吸血コウモリ集団の制御が有効であることが示唆された。

## (2) ブラジル北部でのヒト狂犬病の流行

ブラジル北部の森林地帯で流行したヒト狂犬病の分子疫学的調査の結果、その発生の多くが吸血コウモリを由来としたが、同時に同地域ではイヌ由来の狂犬病が発生していることも明らかにした。イヌ由来のいわゆる都市型狂犬病の発生は、大都市においては制圧傾向にあるが、イヌのワクチネーションおよび繫留などのコントロールが不十分な地域においては、野生動物のみならず、イヌにおける対策が本病の制御を図る上で不可欠であることが再認識された。

## (3) ブラジルのコウモリ由来狂犬病

ブラジルの各種コウモリから分離されたRABVの分子疫学調査の結果、主に吸血コウモリ分離株のグループとそれ以外の食虫コウモリ分離株のグループに区分され、さらに食虫コウモリ分離株は種を反

映した複数のサブグループに分類できた。またブラジルのコウモリ分離株のうち、一部の非吸血性コウモリ分離株は、長距離を移動することが知られている北米のコウモリから分離されたウイルス株と遺伝子学的に非常に近縁であった。したがって、コウモリを介した狂犬病はコウモリの食性や生息地の分布等、その生態に依存したダイナミックなウイルス感染環によって形成されていることを明らかにした。

## (4) ブラジルの非吸血コウモリ分離株の病原性および糖 (G) 蛋白質のアミノ酸配列

RABVの糖タンパク質に存在する333位のアミノ酸残基RまたはKは、マウスに対する病原性を発揮するために必要であると考えられている。幾つかの例外が存在するが、この部位のアミノ酸残基の置換は、ウイルスの弱毒化または非病原性への表現型の変化を引き起こすと考えられている。このような変異は、これまでRABVの固定株においてのみ認められている。本研究では、ブラジルの非吸血性コウモリから分離されたRABVにおいて、333位のアミノ酸残基が333H、333Nおよび333Qに置換している分離株を発見した。これらの野外分離株は、マウスへ脳内接種すると病原性および致死性が認められ、マウス脳では蛍光抗体法によってRABV抗原陽性が確認された。したがって、これまでに知られていないアミノ酸置換を有する病原性のRABV株が野外に存在していて、それらが感染環の形成に関与している可能性が示唆された。

以上、本調査研究によって、狂犬病常在地において野生動物に維持されている野外RABVの動態、およびこれまで知られていなかった野外株の存在が明らかになった。本成果は、野生動物狂犬病の防疫、拡大防止対策を図る上で重要なワクチネーションプログラムの策定および本病の宿主および伝播動物となりうる動物における危険度評価にあたり、重要な情報を提供できると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

【雑誌論文】 (計8件)

- (1) Sato G, Kobayashi Y, Motizuki N, Hirano S, Itou T, Cunha EM, Ito FH, Sakai T. A unique

substitution at position 333 on the glycoprotein of rabies virus street strains isolated from non-hematophagous bats in Brazil. *Virus Genes* 38, 74-79, 2009, 査読有

- (2) Kobayashi Y, Sato G, Mochizuki N, Hirano S, Itou T, Carvalho AA, Albas A, Santos HP, Ito FH, Sakai T. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in Central Brazil. *BMC Vet. Res.* 4, 44, 2008, 査読有
- (3) Kobayashi Y, Sato G, Kato M, Itou T, Cunha EM, Silva MV, Mota CS, Ito FH, Sakai T. Genetic diversity of bat rabies viruses in Brazil. *Arch. Virol.* 152: 1995-2004, 2007, 査読有
- (4) Kobayashi Y, Okuda H, Nakamura K, Sato G, Itou T, Carvalho AA, Silva MV, Mota CS, Ito FH, Sakai T. Genetic analysis of phosphoprotein and matrix protein of rabies viruses isolated in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.* 69: 1145-1154, 2007, 査読有
- (5) Kobayashi Y, Inoue N, Sato G, Itou T, Santos HP, Brito CJ, Gomes AA, Santos MF, Silva MV, Mota CS, Ito FH, Sakai T. Phylogenetic characterization of rabies virus isolates from Carnivora in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.* 69: 691-696, 2007, 査読有
- (6) Kobayashi Y, Ogawa A, Sato G, Sato T, Itou T, Samara SI, Carvalho AA, Nociti DP, Ito FH, Sakai T. Geographical distribution of vampire bat-related cattle rabies in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.* 68: 1097-1100, 2006, 査読有
- (7) Sato G, Kobayashi Y, Shoji Y, Sato T, Itou T, Ito FH, Santos HP, Brito CJ, Sakai T. Molecular epidemiology of rabies from Maranhao and surrounding states in the northeastern region of Brazil. *Arch. Virol.* 151: 2243-2251, 2006, 査読有
- (8) Shoji Y, Kobayashi Y, Sato G, Gomes AA, Itou T, Ito FH, Sakai T. Genetic and phylogenetic characterization of rabies virus isolates from wildlife and livestock in Paraiba, Brazil. *Acta Virol.* 50: 33-37, 2006, 査読有

【学会発表】 (計10件)

- (1) Kobayashi Y, Itou T, AA, Albas, Cunha EMS,

Carvalho A, Ito FH, Sakai T. Genetic diversity of bat rabies depends on the host species and its ecology: molecular epidemiological evidence in Brazil. The XIX International Conference "Rabies in the Americas" (RITA XIX) September 28<sup>th</sup>-October 3<sup>rd</sup>, 2008, Atlanta, Georgia

- (2) 萩原紘子、佐藤豪、平野慎二、小林由紀、伊藤琢也、Ting Rong Luo、Fumio H. Ito、酒井健夫. Multiplex RT-PCRを用いた狂犬病ウイルスの系統鑑別診断法の確立. 第146回日本獣医学会学術集会 2008年9月24-26日, 宮崎
- (3) 工藤瞳、小林由紀、佐藤豪、伊藤琢也、Ito FH、酒井健夫. RT-LAMP (Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification) 法を用いた野外狂犬病ウイルスの検出. 第144回日本獣医学会学術集会 2007年9月3日, 江別
- (4) 平野慎二、小林由紀、佐藤豪、萩原紘子、望月信之、Ting Rong Luo、Qi Liu、Ning-Yi Jin、伊藤琢也、酒井健夫. 中国広西自治区で分離された狂犬病ウイルスの分子疫学的解析. 第144回日本獣医学会学術集会 2007年9月3日, 江別
- (5) 小林慶生、小林由紀、佐藤豪、伊藤琢也、Ito FH、酒井健夫. ブラジルの吸血コウモリ由来狂犬病ウイルスの分子疫学的解析. 第144回日本獣医学会学術集会 2007年9月3日, 江別
- (6) 小林由紀、佐藤豪、伊藤琢也、Ito FH、酒井健夫. ブラジルにおけるコウモリ由来狂犬病ウイルスの遺伝子多様性. 第144回日本獣医学会学術集会 2007年9月3日, 江別
- (7) 望月信之、小林由紀、佐藤豪、佐藤哲朗、伊藤琢也、Ito FH、酒井健夫. ブラジルのキツネから分離された狂犬病ウイルスの完全長ゲノム解析. 第142回日本獣医学会学術集会 2006年9月22日, 山口
- (8) 早川利里、小林由紀、佐藤豪、佐藤哲朗、伊藤琢也、Ito FH、酒井健夫. ブラジルの狂犬病ウイルス牛分離株のG-L遺伝子間領域を用いた分子疫学的解析. 第142回日本獣医学会学術集会 2006年9月22日, 山口
- (9) 小林由紀、古郡幸子、佐藤豪、佐藤哲朗、伊藤琢也、Ito FH、酒井健夫. ブラジルのリオ・デ・ジ

ャネイロ州における狂犬病ウイルス野外株の分子疫学. 第142回日本獣医学会学術集会 2006年9月22日, 山口

- (10) Cunha EMS, Nassar AFC, Lara CSH, Villalobos ECM, Itou T, Sakai T, Shoji Y, Ito FH. Genetic characterization of Brazilian bat rabies virus. Evaluation of the pathogenicity and cross protection in mice. The XVII International Conference "Rabies in the Americas" (RITA XVII) October 19th, 2006. Brasilia, Brazil.

【図書】 (0件)

【産業財産権】

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

【その他】

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井健夫 (SAKAI TAKEO)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：50147667

(2) 研究分担者

伊藤琢也 (ITOU TAKUYA)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：20307820