

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16001

研究課題名（和文）高感度生体イメージング法を用いた狂犬病ウイルス潜伏感染部位の同定と診断応用

研究課題名（英文）Identification and diagnostic application of rabies virus latent infection site using high sensitivity bioimaging method

研究代表者

君付 和範 (Kimitsuki, Kazunori)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：10829724

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、狂犬病ウイルス末梢感染マウスモデルを用いて感染初期におけるウイルス局在部位の特定、さらに同部位における遺伝子変動を解析することを目的とした。in vivo 発光イメージングにより生体内の狂犬病ウイルスの感染動態を観察したところ、接種3日目にシグナルが右後肢の膝窩付近に局限していた。さらに、膝窩リンパ節（PLN）および脊髄（SC）のみでウイルス遺伝子が検出され、特にPLNからは免疫反応に関連した遺伝子発現が上昇していたことから、感染初期の末梢組織におけるウイルス局在部位はリンパ節である可能性が示唆された。今後はより長い潜伏期間を再現したモデルでも検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

狂犬病は全ての哺乳動物に感染する人獣共通感染症で、アジアやアフリカの発展途上国を中心に毎年約55,000人が本疾患によって死亡している。狂犬病では感染から発症するまでの間、数週間から数年の不定期な潜伏期間が認められるが、その間、狂犬病ウイルスがどこでどのようにして存続しているのか未だ不明である。本研究では、潜伏部位の一部としてリンパ節が考えられた。狂犬病ウイルスが潜伏感染している細胞を同定し、そこでウイルス感染により分泌が亢進している分子を同定できれば、それをバイオマーカーとした狂犬病の発症前診断法の確立が可能であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to identify the localization of the virus during the incubation period and to analyze the gene variation at the site using a mouse model of peripheral infection of a street strain of the rabies virus. In 3 days post-inoculation, in vivo luminescence imaging that can detect the infectious dynamics of rabies virus with high sensitivity revealed that signals were localized near the knee of the right hind limb (inoculated side). Furthermore, we detected the viral genes only in the popliteal lymph node (PLN) and spinal cord (SC), and especially from PLN, gene expression related to immune response was increased. This study suggested that the lymph node is the candidate for initial localized tissue of rabies virus in peripheral tissue. In the future, it will be necessary to study using a model that mimicked natural infection.

研究分野：感染症学、ウイルス学、獣医学

キーワード：狂犬病 in vivo imaging リンパ節 初期感染

## 1. 研究開始当初の背景

狂犬病患者には咬傷を受けてから発症するまでの間、数週間の不定期な潜伏期間が認められる。稀ではあるが、7年と長期に及ぶ潜伏期間も報告されている(Smith et al, N Engl J Med, 1991)。このように潜伏期間は長く不定期であるため、どのタイミングで発症するかは不明である。そのため、狂犬病を確定するためには長期の観察期間が必要であり、狂犬病予防法では、犬や猫の輸入において最大 180 日間の係留期間が設けられている。しかし、その長い潜伏期間中、ウイルスはどこに潜伏しているのか、潜伏部位ではどのようにして存続(免疫回避)を可能にしているのかほとんど分かっていない。これまで多くの狂犬病ウイルスの潜伏感染に関する報告では末梢組織感染性の弱い実験室株(固定毒)を高用量で接種しているため、短い潜伏期間しか再現することができず(Scott et al, viruses, 2016)、自然感染例を再現しているとは言い難いものである。そのため、潜伏期間の解明には末梢感染性の高い野外流行株(街上毒)を用いた実験系が必要不可欠である。申請者は、これまでに街上毒 1088 株を用いたマウス末梢感染実験を行ってきており、感染初期ではウイルス抗原が接種部位の骨格筋に認められること等を報告してきた(Kimitsuki et al. J Vet Med Sci, 2017)。しかし、この解析では高用量のウイルスを末梢感染させており、高用量接種はウイルスの中樞神経系への侵入時期や発症時期(接種後 1 週間程度)が安定しているために再現性の点では優れているが、狂犬病の特徴である長く不定な潜伏期を再現できない欠点があった。一方、1088 株の低用量接種では、長く不定な潜伏期をマウスで再現することができる。しかし、実際にこの系で解析する際に、経日的にマウスを安楽死させてサンプリングを行う場合、そのマウスの感染ステージ(例えば、あと 5 日で発症するのか、それとも 2 週間後なのか)が分からないため、同じマウスを生かしたままウイルスの動態を観察できるシステムが、潜伏期間中にウイルスがどこに潜伏しているのか突き止めるために必要である。

## 2. 研究の目的

本研究は、in vivo 発光イメージング法を用いて感染初期に狂犬病ウイルスが潜伏している部位を特定し、さらに、同部位における宿主遺伝子の発現変動を解析することを目的とした。これに加え、感染するウイルス量は潜伏期間に影響を与えるが、実際の感染例ではどの程度のウイルス量に曝露しているのか全く分かっていない。そこで、フィリピンにおける発症犬の唾液中に含まれるウイルス量の調査を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1)狂犬病発症犬の唾液中における狂犬病ウイルス量の調査

フィリピン中部ルソン地域における狂犬病の疫学調査を行う中で、地域動物診断検査室に検査目的で搬入された狂犬病発症犬より唾液をサンプリングし、Real Time RT-PCR により唾液中に含まれる狂犬病ウイルス量の定量を試みた。

### (2)in vivo イメージングシステムによる潜伏期間中のウイルス感染動態の観察

AkaLuc 発現組み替え狂犬病ウイルス 1088 株(1088/AkaLuc)もしくは、RFLuc 発現組み換え狂犬病ウイルス 1088 株(1088/RFLuc)をヘアレスマウス(Hos:HR-1)の右後肢筋肉内に高用量接種(5x10<sup>6</sup>FFU/mouse)した後、1088/RFLuc 感染マウスには D-ルシフェリンを、1088/AkaLuc 感染マウスにはアカルミネをそれぞれ腹腔内投与し、in vivo イメージング装置(Lumazone imaging system, 日本ローパー)にて、発光シグナルを検出しその強度を比較した。さらに、接種部位による狂犬病ウイルスの局在の違いを検討するため、1088/RFLuc 株(10<sup>5</sup>FFU)をマウスの右後肢筋肉内(IM)あるいは右足蹠(FP)に接種し in vivo イメージングにより経日的なウイルス広がりを比較した。加えて確認のために ICG(インドシアニンググリーン)をマウスの IM あるいは FP に接種し色素の拡散の違いを比較した。

### (3)感染初期における狂犬病ウイルス潜伏感染部位の同定

狂犬病ウイルス 1088 株/wt を Balb/c マウスの FP に接種し、接種 3 日後に接種側の膝窩リンパ節(PLN)、鼠径リンパ節(InLN)、骨格筋(Mus)および脊髄(SC)と脳(Br)を採取し、RNA を抽出後、Real Time RT-PCR にて部位ごとのウイルス遺伝子量を比較した。さらに、ウイルス遺伝子が検出された部位においては in situ hybridization 法及び免疫組織化学を実施し、狂犬病ウイルス遺伝子あるいは蛋白質が局在する細胞の同定を試みた。

### (4)感染部位における遺伝子変動の解析

狂犬病ウイルス 1088 株/wt を Balb/c マウスの右 FP に接種し、接種 3 日後に狂犬病ウイルス遺伝子が検出された組織から RNA を抽出し、Real Time RT-PCR 及び網羅的遺伝子発現解析(RNA-Seq)により宿主遺伝子の相対的な発現定量を行った。

## 4. 研究成果

### (1)狂犬病発症犬の唾液中におけるウイルス量の調査

フィリピンの地域動物診断検査室に検査目的で搬入された狂犬病発症犬より唾液をサンプリングする予定であったが、現地での採取が不可能になったため、搬入された狂犬病疑い動物の唾液

腺を用いて狂犬病ウイルス遺伝子の検出を検討したが、陽性検体 16 頭中 2 頭しか検出ができなかった。唾液腺は自己融解などの影響を受けやすいため腐敗が進んでいたことが影響していた可能性がある。また、フィリピンで使用した Real Time RT-PCR 装置は我々が通常使用していたものと異なっていたため詳細な条件検討が必要であった。この点については、今後条件検討から再検討する必要がある。

## (2) in vivo イメージングシステムによる潜伏期間中のウイルス感染動態の観察

AkaLuc システムでは、接種 1 日目に肝臓で非特異反応が認められたが、接種 3 日目以降は脳と脊髄内へのウイルスの感染を確認できた。シグナル検出の強さは AkaLuc システムの方が、RFLuc システムよりも若干強いことが判明した。また、D-ルシフェリン、アカルミネをそれぞれ 1088/RFLuc 接種マウスと 1088/AkaLuc 接種マウスに接種したところ、1088/AkaLuc では D-ルシフェリンを使えないが、1088/RFLuc はアカルミネ、D-ルシフェリンの両方の基質を使えることが確認された。接種部位の違いによる狂犬病ウイルスの局在の検討については、1088/RFLuc 株 ( $10^5$ FFU) をマウスの右後肢筋肉内 (IM) あるいは右足蹠 (FP) に感染させたところ、両群ともに接種 3 日目より右後肢において、発光シグナルが検出されたが、FP 群の方が膝窩に限局してみられた (図 1A)。発光シグナルは接種 5 日目から脊髄で検出され、両群ともに接種 8 日目には神経症状を呈した。さらに ICG (インドシアニンググリーン) をマウスの IM あるいは FP に接種し色素の拡散の違いを比較したところ、IM 群では接種部位 (右骨格筋) と肝臓で蛍光が見られたが、FP 群では接種部位 (右足蹠)、リンパ管、膝窩リンパ節 (PLN)、坐骨リンパ節 (IsLN) に限局していた (図 1B)。以上の検討から今回の接種部位では発症まで病態の違いは認められないものの、FP の方が初期の潜伏部位が限局的である可能性が示唆された。

## (3) 狂犬病ウイルス遺伝子の検出

狂犬病ウイルスが局在する組織を詳細に確認するため、1088/wt 株 ( $10^5$ FFU) を右足蹠に接種し末梢組織および中枢神経系の各組織における狂犬病ウイルス遺伝子を検出した。その結果、接種 3 日目に PLN および脊髄 (SC) のみで狂犬病ウイルス遺伝子が検出された (図 2)。一方で、PLN での狂犬病ウイルス遺伝子及び蛋白質の局在を明らかにするため組織学的な検索を試みたが、ともに局在部位を明らかにすることができなかった。

## (4) 感染部位における遺伝子変動の解析

感染初期 (接種 3 日目) の SC と PLN における宿主遺伝子の発現量を比較するため、Real Time RT-PCR によって、免疫反応に関連した遺伝子を定量解析したところ、PLN でのみ Ccl4、Cxcl10、Fcgr1、Ifit2、IFNg、IL-6、Irf7、Mx1 及び Oasl1 が有意に発現していた (図 3)。さらに PLN において、mRNAseq でも Ifit3、Ifit1 などのインターフェロン発現に関連した遺伝子発現が上昇していた。SC に先行して PLN で宿主の免疫反応が顕著であったことから、狂犬病ウイルスは脊髄に到達する前にリンパ節に局在し、免疫反応が生じている可能性が示唆された。

本研究によって、狂犬病ウイルスは本来の増殖の場である中枢神経系に到達する前に所属リンパ節に局在していることが示唆された。本研究では高用量 ( $10^5$ FFU) の狂犬病ウイルスを接種したことにより免疫反応が誘導された可能性がある。一方で、狂犬病ウイルスは免疫回避および抑制機序 (Scott et al. *Viruses*, 2016) によって宿主の局所免疫応答から免れていると考えられていることから、この部位における何らかの機序が免疫回避に関与している可能性がある。今後は、低用量 ( $10^3$ FFU) で感染させ潜伏期間を再現した狂犬病感染モデルマウスでも同様の遺伝子発現が認められるかを確認する必要がある。また、ウイルス感染により分泌が亢進している分子を同定できれば、それをバイオマーカーとした狂犬病の発症前診断法の確立が可能になると考えられる。

図 1

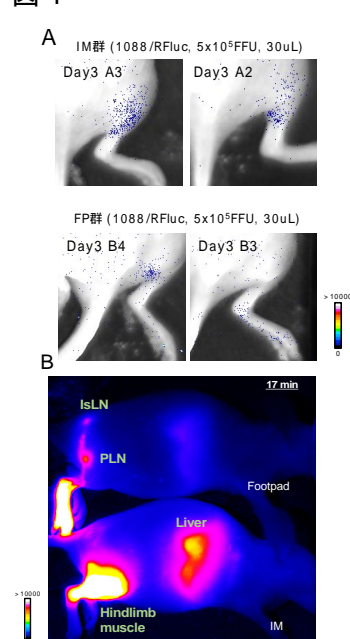
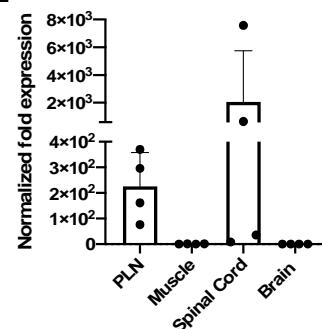
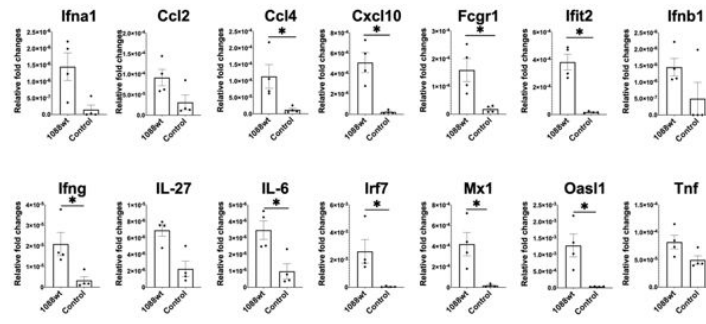
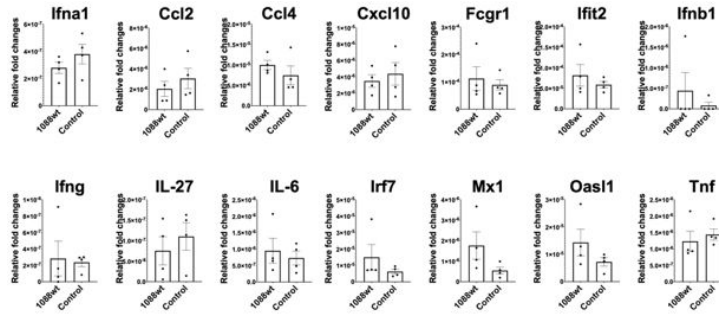


図 2





SC



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kimitsuki Kazunori, Saito Nobuo, Yamada Kentaro, Park Chun-Ho, Inoue Satoshi, Suzuki Motoi, Saito-Obata Mariko, Kamiya Yasuhiko, Manalo Daria L., Demetria Catalino S., Mananggit Milagros R., Quiambao Beatriz P., Nishizono Akira	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 Neglected Tropical Diseases	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.0008844	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 Yamada Kentaro, Noguchi Kazuko, Kimitsuki Kazunori, Kaimori Ryo, Saito Nobuo, Komeno Takashi, Nakajima Nozomi, Furuta Yousuke, Nishizono Akira	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 Research	6. 最初と最後の頁 104641 ~ 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 該当する

1. 著者名 Mananggit Milagros R., Kimitsuki Kazunori, Saito Nobuo, Garcia Alyssa Marie G., Lacanilao Patricia Mae T., Lagayan Maria Glofezita O., Yamada Kentaro, Park Chun-Ho, Inoue Satoshi, Suzuki Motoi, Saito-Obata Mariko, Kamiya Yasuhiko, Manalo Daria L., Demetria Catalino S., Quiambao Beatriz P., Nishizono Akira	4. 巻 49
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 Tropical Medicine and Health	6. 最初と最後の頁 -
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

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 君付 和範、齊藤 信夫、山田 健太郎、Daria L. Manalo3, Milagros R. Manangitt、朴 天鎬、井上 智、Beatriz P. Quiambao、西園 晃
2. 発表標題 フィリピン中部ルソン島における犬狂犬病の発症状況と迅速診断キットを用いた評価
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kimitsuki Kazunori, Saito Nobuo, Yamada Kentaro, Manalo Daria, Manangitt Milagros, Park Chun-ho, Inoue Satoshi, Kobayashi Yukiharu, Beatriz Quiambao, Nishizono Akira
2. 発表標題 Evaluation of Rabies Ag Test for laboratory diagnosis. An interim report
3. 学会等名 第60回熱帯医学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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