

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 1日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究 B

研究期間：2008～2011

課題番号：20406026

研究課題名（和文）

狂犬病迅速診断法の開発と麻痺型狂犬病臨床診断への応用—アジアにおける多施設検討

研究課題名（英文）

Evaluation of a diagnostic kit for rabies and application of the kit for the diagnosis of paralytic rabies: A multi-center study in Asian countries.

研究代表者

アハメド カムルディン (Ahmed Kamruddin)

大分大学・全学研究推進機構・准教授

研究者番号：00398140

研究成果の概要（和文）：

本研究課題で、我々は狂犬病ウイルス抗原迅速イムノクロマト法(RITC)を応用し、その有用性を評価した。この RICT とその他の方法を用いて東南アジア諸国における狂犬病の疫学調査を行い、RICT の有用性および狂犬病ウイルスの新たな分子疫学的特徴を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In this study we developed and evaluated a rapid immunochromatography test for the diagnosis of rabies. Using this kit and other tests we did epidemiological surveillance of rabies. The study was a success and added new knowledge.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
平成21年度	3,300,000	990,000	4,290,000
平成22年度	3,300,000	990,000	4,290,000
平成23年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

研究分野：医歯薬学 A

科研費の分科・細目：感染症内科学

キーワード：狂犬病・診断学・分子疫学

1. 研究開始当初の背景

狂犬病により、全世界で年間5万5千が死亡していると推定されている。しかし、実際の死亡者数はこの100倍以上とも言われている。しかし、現行の狂犬病の実験室診断法は高価な実験施設や実験機器が必要であり、さらに高度な技術を必要とされるなどの問題点が挙げられる。また、麻痺型狂犬病は臨床診断が非常に困難であり、その有病率や発症機序は明らかではない。

狂犬病は主にアジア・アフリカ諸国で流行し、日本人旅行者の死亡例も近年報告されて

おり、日本における再興感染症が懸念されている。日本への侵入や流行の拡大を防ぐためにも、狂犬病ウイルスの流行形態を把握することが必要であるが、これら流行国における狂犬病ウイルスの分子疫学的調査は十分行われていない。

2. 研究の目的

(1) 狂犬病ウイルス抗原迅速イムノクロマト法 (Rapid immunochromatography test [RICT]) を実際の狂犬病診断に応用し、その有用性を検討する。

(2) RICT を用いた原因不明脳炎、急性弛緩性麻痺患者における麻痺型狂犬病の有病率を調査する。

(3) アジアにおける狂犬病の疫学及び分子疫学調査を行う。

3. 研究の方法

狂犬病のヒトおよび動物検体を用いて、既存の蛍光抗体法(FAT)と比較し RICT の有効性を検討する。原因不明脳炎、急性弛緩性麻痺患者から脳脊髄液(CSF)を採取し、RICT によって狂犬病ウイルス抗原を検出する。さらに、CSF から核酸を抽出し、RT-PCR 法によって狂犬病ウイルス N および G 遺伝子領域を増幅し、分子疫学解析を行う。

4. 研究成果

(1) タイ、ブータンおよびスリランカにおいて、狂犬病疑いのヒト脳検体、計 86 検体、及び動物脳検体、計 417 検体を用いて FAT と比較し RICT の有効性を評価した。ヒトにおける検出感度は 99%、イヌでは 95%、ネコ検体では 74%であった。イヌ 228 検体における特異度は 98%であった(Am J Trop Med Hyg, 2012, 表 1)。

表 1. 狂犬病ウイルス抗原検出における FAT 法と比較した RICT の感度・特異度・精度

Country	Thailand	Bhutan	Sri Lanka		
Species	Dog	Cow, Dog	Cat	Other animals	Human
No. samples	228	27	115	47	86
Sensitivity	95%	90%	74%	89%	99%
Specificity	98%	100%	100%	100%	8%
Accuracy	96%	93%	91%	98%	86%

(2) 原因不明脳炎および急性弛緩性麻痺患者 CSF から RICT を用いて麻痺型狂犬病を検索した結果、スリランカにおいては 202 検体中 1 検体、バングラデシュにおいては 69 検体中 0 検体が陽性であった(Clin Infect Dis, 2012)。

(3) RICT を改良することで抗狂犬病ウイルス中和抗体を迅速に検出可能な RAPINA キットを開発し、ヒト及びイヌ検体を用いて、その性能を評価した(Vaccine, in press)

(4) 2004 年から 2008 年までのバングラデシュにおける狂犬病の疫学調査を行った(Vaccine, 2011, Epidemiol Infect, 2011)。その結果、バングラデシュでは年間約 2000 人ものヒトが狂犬病によって死亡していることが明らかになった。現在、バングラデシュにおける狂犬病ウイルスの分子疫学的解析を進めている。

(5) スリランカにおいては、流行株の全ゲ

ノム配列を決定した(Arch Virol, 2011)。さらに、アジアで初めてとなる森林型狂犬病がジャコウネコで流行していることを発見した(Emerg Infect Dis, 2011, 図 1)。

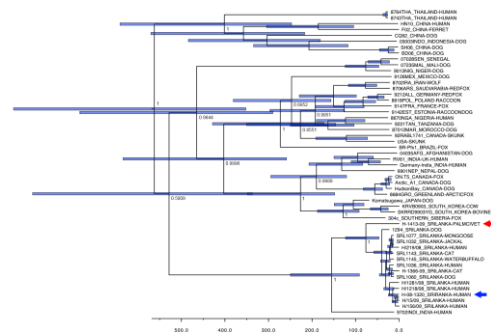


図 1. 狂犬病ウイルス N 遺伝子全長領域を用いた進化系統樹解析

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 11 件)

(1) Nishizono A, 7 Authors, Ahmed K. Evaluation of an improved rapid neutralizing antibody detection test (RAPINA) for qualitative and semi-quantitative detection of rabies neutralizing antibody in humans and dogs. Vaccine. In press. 査読有り。

(2) Ahmed K, 8 Authors, Nishizono A. Evaluation of a monoclonal antibody-based rapid immunochromatographic test for detection of rabies virus in the brain of humans and animals. Am J Trop Med Hyg. 2012. In press. 査読有り。

(3) Yamada K, 7 Authors, Ahmed K, Morimoto K, Inoue S, Nishizono A. Serial passage of a street rabies virus in mouse neuroblastoma cells resulted in attenuation: Potential role of the additional N-glycosylation of a viral glycoprotein in the reduced pathogenicity of street rabies virus. Virus Res. 2012, 165: 34-48. 査読有り。

(4) Mitui MT, 8 Authors, Nishizono A, Söderlund-Venermo M, Ahmed K. Detection of Human Bocavirus in the Cerebrospinal Fluid of Children With Encephalitis. Clin Infect Dis. 2012, 54: 964-7. 査読有り。

(5) Hossain M, Ahmed K, 4 Authors, Nishizono A. Human rabies in rural Bangladesh. Epidemiol Infect 2011 Dec

20:1-8. 査読有り

(6) Matsumoto T, Ahmed K, 4 Authors, Nishizono A. Novel sylvatic rabies virus variant in endangered golden palm civet, Sri Lanka. *Emerg Infect Dis*. 2011, 17:2346-9. 査読有り.

(7) Matsumoto T, Ahmed K, 5 Authors, Nishizono A. Whole-genome analysis of a human rabies virus from Sri Lanka. *Arch Virol*. 2011 156:659-69. 査読有り.

(8) Hossain M, Bulbul T, Ahmed K, 7 Authors, Nishizono A. Five-year (January 2004-December 2008) surveillance on animal bite and rabies vaccine utilization in the Infectious Disease Hospital, Dhaka, Bangladesh. *Vaccine*. 2011, 29:1036-40. 査読有り.

(9) Shiota S, Ahmed K, Mifune K, Nishizono A. Efficacy of intradermal regimen using Japanese rabies vaccine for pre-exposure prophylaxis. *Kansenshogaku Zasshi*. 2010, 84: 9-13. 査読有り.

(10) Shiota S, 8 Authors, Ahmed K, Iha H, Nishizono A. Development of evaluation of a rapid neutralizing anti body test for rabies. *J Virol Methods*. 2009, 161: 58-62. 査読有り.

(11) Nishizono A, Khawplod P, Ahmed K, 11 Authors. A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis. *Microbiol Immunol*. 2008, 52: 243-9. 査読有り.

〔学会発表〕(計19件)

【2012年】

① Wahida Khanam. Detection of Human Bocavirus in the Cerebrospinal Fluid of Children With Encephalitis. 17th Biennial International Congress of Bangladesh Pediatric Association (BPA) 2012年2月18日. バングラデシュ, ダッカ.

【2011年】

①松本 昂, Ahmed K, 4 Authors, 西園 晃. スリランカにおける森林型狂犬病. 第52回日本熱帯医学会・第26回日本国際医療保健医療学会学術集会. 2011年11月6日

②松本 昂, Ahmed K, 7 Authors, 西園 晃.

バングラデシュにおける狂犬病の分子疫学的解析. 第48回日本ウイルス学会九州支部総会. 2011年8月26-27日. 北九州.

③ Yamada K, 3 Authors, Ahmed K, Nishizono A. A candidate for a viral element related to street rabies virus pathogenicity following peripheral infection. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011), Oral presentation. 2011年9月15日. 札幌.

④ Matsumoto T, Ahmed K, 7 Authors, Nishizono A. Prevalence of Arctic-Like Rabies in Bangladesh. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011), Poster presentation. 2011年9月15日. 札幌.

⑤ Ahmed K, 5 Authors, Nishizono A. Development and Evaluation of a Rapid Immunochromatographic Test for the Direct Detection of Rabies Virus in Brain Samples from Humans and Animals. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011). Poster presentation. 2011年9月15日. 札幌.

【2010年】

①松本 昂. 1999年~2009年までのスリランカにおける狂犬病の調査. 第51回日本熱帯医学会大会, 2010年12月3日, 仙台, 日本.

②山田健太郎. 狂犬病ウイルス街上毒にMNA細胞での連続継代による末梢感染性減弱変異株の樹立. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010年11月8日, 徳島, 日本.

③松本 昂. スリランカにおける狂犬病ウイルスの全ゲノム配列の決定とそれに基づく分子疫学的解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010年11月9日, 徳島, 日本.

④Ahmed K. The Impact of Climate changes on the Burden of Rabies in Bangladesh. 2nd International conference on Climate

Change and Neglected Tropical Diseases, 2010年9月29日, Dhaka, Bangladesh.

⑤ 松本 昂. ブータンにおける狂犬病の分子疫学的解析. 第47回日本ウイルス学会九州支部総会, 2010年9月3日, 宮崎, 日本.

⑥ 松本 昂, 山田健太郎, Ahmed K, 西園 晃. 脳炎および急性弛緩性麻痺患者における非定型狂犬病. 第8回狂犬病研究会. 2010年3月5日. 東京.

⑦ 山田健太郎, 松本 昂, Khawplod P, Ahmed K, 西園 晃. 狂犬病ウイルス街上毒のNA細胞での連続継代による末梢感染性減弱株の樹立. 2010年3月5日. 東京.

【2009】

① 松本 昂, 山田健太郎, アハメド カムルディン, 西園 晃. スリランカにおける狂犬病ウイルス迅速抗原診断キットの有用性と分子系統学的解析. 第50回日本熱帯医学会. 2009年10月22日. 那覇.

② 松本 昂, 山田健太郎, アハメド カムルディン, 西園 晃. スリランカにおける狂犬病ウイルスの診断とその分子系統学的解析. 第57回日本ウイルス学会. 東京.

【2008】

① 塩田星児, Ahmed K, 万年和明, 三舟求真, 西園 晃. 狂犬病中和抗体価迅速測定キットの開発とその評価. 第12回日本ワクチン学会. 2008年11月8-9日. 熊本.

② 塩田星児, Ahmed K, 西園 晃 他. 狂犬病中和抗体価迅速測定キットの開発とその評価. 2008年10月26-28日. 岡山.

③ Ahmed K, Khawplod P, Nishizono A. A simple and rapid immunochromatographic test kit for the diagnosis of rabies. 14th International Congress of Virology (IUMS). 2008年8月10-15日. トルコ.

④ 塩田星児, Ahmed K, 三舟求真. 狂犬病ウイルス迅速診断キットの開発とその評価. 第82回日本感染症学会総会. 2008年4月18日

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

大分大学微生物学教室

<http://www.med.oita-u.ac.jp/biseibut/home.html/Ahmed.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

アハメド カムルディン (AHMED KAMRUDDIN)

大分大学・全学研究推進機構・准教授

研究者番号: 00398140

(2) 研究分担者

西園 晃 (NISHIZONO AKIRA)

大分大学医学部・微生物学講座・教授

研究者番号: 70218155

(3) 連携研究者

()

研究者番号: