

狂犬病発症動物の鼻口部洞毛組織を用いた新規診断法の確立と
実装に向けた病理組織学的研究

志和 希

Histopathological study for the establishment and
implementation of a novel diagnostic method using the follicle
sinus complexes (FSCs) in muzzle skins of rabid animals

Nozomi SHIWA

目次

序論	- 1 -
第 I 章 狂犬病発症犬の鼻口部洞毛組織の死後診断材料と しての有用性に関する病理組織学的研究	- 4 -
緒言	- 4 -
材料方法	- 6 -
1. 供試動物(表 1)	- 6 -
2. 病理組織化学的検索(Figs.1-3)	- 6 -
3. 免疫組織化学的検索	- 6 -
4. 間接蛍光抗体法	- 7 -
5. <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション法を用いたウイルス ゲノムの検出	- 9 -
6. 超微形態学的検索	- 9 -
結果	- 10 -
1. 免疫組織化学的所見(Figs.4-9)	- 10 -
2. 蛍光抗体法によるウイルス抗原およびメルケル細胞 の検出(Figs.10-15)	- 10 -
3. ウイルス抗原検出による全 226 頭の検査結果(表 1-2)	- 11 -
4. ISH 法を用いたウイルスゲノムの検出(Figs.16-17)-	- 11 -
5. 超微形態学的所見(Figs.18-21)	- 11 -
考察	- 13 -
小括	- 16 -
表、付図および付図説明	- 17 -

第Ⅱ章 狂犬病発症犬の鼻口部洞毛組織を用いた狂犬病診断のための採材位置と採材本数の検討	- 30 -
緒言	- 30 -
材料方法	- 31 -
1. 供試動物(表 1)	- 31 -
2. 病理組織化学的検索(表 2,Figs.1-5)	- 31 -
3. 免疫組織化学的検索	- 32 -
4. 統計学的検討	- 33 -
結果	- 34 -
1. 洞毛組織の構造と病理組織学的所見(Figs.6-7,10-15)	- 34 -
2. 免疫組織化学的所見(Figs.8-9)	- 35 -
3. ウイルス抗原検出による全 123 頭の検査結果 (表 1,3-5,図 1)	- 35 -
考察	- 37 -
小括	- 40 -
表、付図および付図説明	- 41 -
第Ⅲ章 イヌ以外の狂犬病発症動物における鼻口部洞毛組織の死後診断材料としての有用性	- 50 -
緒言	- 50 -
材料方法	- 52 -
1. 供試動物(表 1)	- 52 -
2. 病理組織化学的検索	- 52 -
3. 免疫組織化学的検索	- 53 -

4. 間接蛍光抗体法	53 -
5. <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション法を用いたウイルスゲノムの検出	54 -
6. 超微形態学的検索	55 -
結果(表 2)	56 -
1. 病理組織化学的所見(Figs.1,3,5,7)	56 -
2. 免疫組織化学的所見(Figs.2,4,6,8)	56 -
3. 蛍光抗体法によるウイルス抗原およびメルケル細胞の検出(Figs.9-11)	56 -
4. ISH 法を用いたウイルスゲノムの検出(Figs.12-16)	57 -
5. 超微形態学的所見(Figs.17-21)	57 -
考察	58 -
小括	60 -
表、付図および付図説明	61 -

第IV章 街上毒感染実験マウスを用いた狂犬病ウイルスの鼻口部洞毛組織への感染経路・感染時期の特定	63 -
緒言	63 -
材料方法(表 1)	64 -
1. ウイルス、動物、接種経路(図 1)	64 -
2. <i>in vivo</i> 生物発光イメージング検索	64 -
3. 解剖および病理組織化学的検索	65 -
4. FFPE 切片を用いた免疫組織化学的検索	66 -
5. 凍結浮遊切片を用いた免疫組織化学的検索	66 -
結果	68 -

1. 臨床症状と体重変化(図 2-3)	- 68 -
2. <i>in vivo</i> 生物発光イメージング所見(Figs.1-2) (表 2)	- 68 -
3. 病理組織学的所見(Figs.3-6)	- 69 -
4. FFPE 切片および凍結浮遊切片を用いた免疫組織化学 的所見(Figs.7-18) (表 3)	- 69 -
考察	- 70 -
小括	- 73 -
表、付図および付図説明	- 74 -

参考文献

総括

謝辞

序論

狂犬病は狂犬病ウイルスに起因する人獣共通感染症である [29,52]。原因となる病原体は、ラブドウイルス科リッサウイルス属に属する狂犬病ウイルスで、ゲノム RNA はマイナス 1 本鎖からなる非分節 RNA である [68,82]。感染は主に発症動物の咬傷により成立し、ウイルスが感染部位の末梢神経を上行し中枢神経系 (Central Nervous System、以下 CNS) に到達し、感染動物に致死的な脳脊髄炎を引き起こす [37]。狂犬病に対する根本的な治療法は未だになく、ひとたび発症すると全ての哺乳類が麻痺型あるいは狂躁型の神経症状を示し、ほぼ 100% の確率で死亡する [29]。World Health Organization (WHO) によると、年間 59,000 人が狂犬病により死亡し、このうち 56% がアジア諸国で発生している [81]。アジアにおいてヒトへの主な感染源はイヌであり、イヌのコントロールが狂犬病の制圧に極めて重要である [3,81]。

現在、狂犬病の確定診断には新鮮な脳のスタンプ標本を用いた直接蛍光抗体法 (標準法) が推奨されており、その高い感度と特異度に加え、2 時間以内の迅速診断が可能であることが標準法の主な利点となっている [26,57,81]。しかし、狂犬病流行国の多くは温暖多湿な気候であり、野外で死亡したイヌの脳は腐敗が進行し、しばしば標準法で確定診断ができない [1,15]。また、高価な蛍光顕微鏡を必要とするため、途上国においては設備の整った限定された検査室でしか確定診断を行うことができない。実際フィリピンでは、マニラのレファレンスラボを除けば、18 カ所ある地方ラボでは狂犬病の確定診断が実施されていない。加えて、野外で死亡したイヌについて狂犬病検査を行うためには、頭部を切断

し、それを検査可能な特定の施設に冷蔵状態で送る必要があるが、これには日数と経費がかかる。さらに、脳を採材するためには頭蓋を開ける必要がある。検査者は、感染したイヌの脳に多量に含まれるウイルスによる粘膜からの感染リスクや、開頭作業時の刺傷事故による傷口からの感染リスクを常に伴う[81]。より簡便かつ危険性が低い脳の採材方法が検討されているが、正確な確定診断のためには、少なくとも海馬、脳幹、小脳の3つの部位を採材しなくてはならない[81]。なぜなら、脳における狂犬病ウイルス抗原の分布は個体によって一様ではなく、1度目の検査で陰性であった検体でも、他の脳の部位を用いた再検索では陽性と判断される例が報告されているからである[61,62]。ゆえに、適切な検査施設と訓練された検査者の技術が必要となる[81]。以上の問題点がイヌにおける狂犬病診断の普及・実施を妨げる要因となっている。

脳を用いた標準法のこれらの問題を解決するため、脳以外の末梢組織を用いた死後診断法の開発が求められており、これまで皮膚、毛包、角膜、唾液などの補助的な診断材料の利用が試みられてきた[81]。これら末梢組織の中で、頸部のうなじ領域に位置する末梢神経と毛包を含む皮膚は、ヒトの補助的な生前・死後診断材料として用いられている[6,26]。しかし、毛包を含む皮膚が採材できなかった場合は、70-90%と言われるその感度は低下する[6,11,14,79,81]。動物においても、洞毛組織(洞毛)と呼ばれる、ヒト以外の動物に存在する発達した毛包組織を含む鼻口部周囲の皮膚が診断材料として有用であることが報告されている[2,5]。しかし、洞毛におけるウイルス抗原が検出される細胞の特定には

至っていない。

当研究室では、フィリピンの熱帯医学研究所（**Research Institute for Tropical Medicine**、以下 **RITM**）に搬入される狂犬病発症犬の脳、唾液腺および皮膚などの頭部組織を用いて病理学的研究を展開している。これまで発症犬 60 頭の免疫組織化学的解析から、狂犬病ウイルス抗原が脳や唾液腺のみならず洞毛のメルケル細胞において高率に検出されることを報告している [71]。しかし、①メルケル細胞にウイルスゲノムとウイルス粒子が存在するかどうか、②どの部位から何本の洞毛を採取すれば狂犬病の診断が可能であるか、③イヌ以外の狂犬病発症動物の洞毛からウイルス抗原が検出されるかどうか、④狂犬病ウイルスがいつ、どのような神経経路を利用して洞毛に到達するかについて検討していない。そこで、本研究では上述した 4 つの研究課題に取り組み、洞毛が狂犬病の新規診断材料として有用か否かについて自然例および実験例を用いて詳しく検証した。

本論文は 4 章で構成されている。第 I 章では、洞毛の診断材料としての有用性並びにウイルス感染細胞について明らかにした。第 II 章では、狂犬病診断に適した洞毛の採材位置と採材本数について検討した。第 III 章では、イヌ以外の動物種の洞毛におけるウイルス抗原および遺伝子の局在について検討した。第 IV 章では、実験モデルを用いて狂犬病ウイルスの鼻口部洞毛への感染経路および感染時期について明らかにした。以下に各章の研究成績について記述する。

第 I 章 狂犬病発症犬の鼻口部洞毛組織の死後診断材料としての有用性に関する病理組織学的研究

緒言

狂犬病において皮膚生検は、ヒトおよび動物の生前・死後診断に有用である[5,6,74]。ウイルス抗原は、毛包を取り巻く末梢神経で検出され、感染経過が進むにつれてその陽性率が増加する[6]。動物には、洞毛と呼ばれる、ヒト以外の動物に存在する発達した触毛が鼻口部周囲の皮膚に存在する。Blendenらは、複数の動物種から得られた計104検体の脳と皮膚組織（洞毛を含む）を用いて両者の抗原陽性率を比較した結果、皮膚の陽性率が98%を示したと報告している[5]。Balachandranらは、スカンクの鼻口部皮膚の表皮および毛包の外根鞘においてウイルス抗原が検出されることを報告している[2]。しかし、これらの研究においてウイルスのターゲット細胞の特定には至らず、また、ウイルスがどのような感染経路を利用して毛包組織に到達するかについては解明されていない。

当研究室ではこれまでに、フィリピンのRITMに搬入された狂犬病発症犬60頭の鼻口部皮膚を用いた病理組織学的解析により、洞毛に分布するメルケル細胞においてウイルス抗原が高率に検出されることを世界で初めて報告している[8,71]。しかし、検索頭数が少数であったことから、その客観的評価が不十分であった。加えて、洞毛のメルケル細胞におけるウイルスゲノムとウイルス粒子の存在有無については明らかにしていなかった。そこで、本章では検体数を大幅に増やし、メルケル細胞におけるウイルス抗原のみならず、ウイルスゲノムとウイルス粒子の存在有無につい

て精査し、洞毛の診断材料としての有用性について明らかにした。

材料方法

1. 供試動物(表 1)

供試動物は 2013 年から 2016 年までの間、フィリピン国内において狂犬病発症疑いで捕獲または死後回収され、RITM に搬入されたイヌ計 226 頭である。捕獲または回収された 226 頭の犬種は不明であり、年齢は約 1 ヶ月齢から 15 歳である。捕獲前後に確認された臨床症状は、攻撃行動、噛みつき、食欲不振、異嗜、流涎、下痢、嘔吐などであった。フィリピンで実施された脳を用いた標準法では、211 頭が狂犬病陽性、15 頭が狂犬病陰性であった。

供試動物の臨床情報は表 1 に示した。

2. 病理組織化学的検索(Figs.1-3)

10%緩衝ホルマリン固定の脳と鼻口部皮膚(片側)を検索材料として病理組織学的検索を実施した。鼻口部皮膚に分布する洞毛に対して、環状洞の高さで水平断面を作製した(Figs.1-3)[71]。その後、組織片を上昇アルコール系列で脱水、クリアプラス透徹後パラフィン包埋した。全 226 頭のイヌに対して、包埋ブロックより 3 μ m の厚さで切片を作製し、免疫組織化学的検索に供した。

3. 免疫組織化学的検索 (Immunohistochemistry、以下 IHC)

a) 抗狂犬病ウイルス P タンパク質抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原の検出

ウイルス抗原陽性細胞を同定するため、ウサギ抗狂犬病ウイルス P タンパク質 (Rabies Phosphoprotein、以下 P) 抗体[73]を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、0.25%

トリプシンで抗原を賦活化し、0.3%過酸化水素加メタノール（室温、60分）で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、非特異反応を抑制するため10%正常ヤギ血清(Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan)でブロッキングを行った。一次抗体として1,200倍に希釈した抗P抗体を4℃で一晩反応させた。PBS洗浄後、Histofine® Simple Stain MAX-PO(R)(Nichirei Biosciences)を室温で30分反応させた後、Simple Stain DAB溶液(Nichirei Biosciences)で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。

4. 間接蛍光抗体法

間接蛍光抗体法により作製した蛍光二重染色標本を蛍光顕微鏡(Nikon, Intensilight, C-HGFI)で観察した。

a) 抗P抗体と抗CAM 5.2抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原とメルケル細胞の検出

洞毛でウイルス抗原陽性細胞を同定するために抗P抗体、メルケル細胞を同時に同定するため抗Cytokeratin CAM 5.2抗体(CAM5.2, Becton-Dickinson, CA, USA)を組み合わせた蛍光二重染色を行った。抗P抗体の二次抗体としてFITC conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H+L) (Southern Biotechnology Associates, Inc., AL, USA)を使用し、抗CAM 5.2抗体の二次抗体としてAlexa Fluor® 546 Goat Anti-Mouse IgG (H+L)(Thermo Fisher, MA, USA)を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、Proteinase K, pH7.5 (Dako, Kyoto, Japan)を用いて抗

原を賦活化し(室温、15分)、一次抗体として抗 P 抗体(1,000 倍希釈)と抗 CAM 5.2 抗体を 4℃で一晩反応させた。PBS 洗浄後、二次抗体として FITC conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(200 倍希釈)と Alexa Fluor® 546 Goat Anti-Mouse IgG (200 倍希釈)を室温で 30 分反応させた。ProLong® Gold 褪色防止用封入剤(DAPI 含有)(Molecular Probes, OR, USA)で封入し観察した。

b) 抗 N 抗体と抗 CAM 5.2 抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原とメルケル細胞の検出

洞毛でウイルス抗原陽性細胞を同定するためにニワトリ卵黄から作製した抗狂犬病ウイルス N タンパク質(Rabies Nucleoprotein、以下 N)抗体[54,63]、メルケル細胞を同時に同定するため抗 CAM5.2 抗体を組み合わせた蛍光二重染色を行った。抗 N 抗体の二次抗体として Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Chicken IgY (H+L)(Invitrogen, CA, USA)を使用し、抗 CAM5.2 抗体の二次抗体として Alexa Fluor® 546 Goat Anti-Mouse IgG (H+L)(Molecular Probes)を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、Proteinase K, pH7.5 (Dako)を用いて抗原を賦活化し(室温、15分)、一次抗体として抗 N 抗体(100 倍希釈)と抗 CAM5.2 抗体を 4℃で一晩反応させた。PBS 洗浄後、二次抗体として Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Chicken IgY (H+L) (200 倍希釈)と Alexa Fluor® 546 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (200 倍希釈)を室温で 30 分反応させた。ProLong® Gold 褪色防止用封入剤(DAPI 含有)(Molecular Probes)で封入し観察した。

5. *in situ* ハイブリダイゼーション (*in situ* hybridization、以下 ISH) 法を用いたウイルスゲノムの検出

狂犬病ウイルス N タンパク質 (Rabies Nucleoprotein) の mRNA(以下、狂犬病ウイルス NmRNA)の局在を観察するため、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた ISH 法を実施した。

ISH 法は、脱パラフィン後、RNAscope® 2.5 HD reagent kit-RED (Advanced Cell Diagnostics, CA, USA)を用いてキットメーカーの指示に従い実施した [78]。プローブは RNAscope® probe-V-RABV-gp1 (NC 001542.1, region 59-1482) (ACD#456781) を使用した。最後に、ヘマトキシリンで対比染色を施し、EcoMount (Biocare Medical, CA, USA)を用いて封入し観察を行った。

6. 超微形態学的検索

洞毛のメルケル細胞領域を確実に観察するため、パラフィン包埋材料から実体顕微鏡で ring-wulst が確認できる洞毛をメスで切り取り、以下の電子顕微鏡用試料の作製を行った。

インキュベート (60°C、30 分間) とキシレン浸漬 (室温、90 分間) による脱パラフィンの後、下降アルコール系列で再水和し、0.2M リン酸緩衝液 (室温、12 時間) によりエタノールを除去した。1% オスミウム酸で固定後、これらの試料を定法に従い脱水、透徹、エポン樹脂包埋した電子顕微鏡用試料から、厚さ 70nm の超薄切切片を作製した。超薄切切片を酢酸ウラニル・佐藤の鉛で重染色した後、透過型電子顕微鏡 (H-7650, Hitachi, Tokyo, Japan) で観察した。

結果

1. 免疫組織化学的所見

a) 抗 P 抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原の検出(Figs.4-9)

ウイルス抗原はこれまでの報告[71]と同様に、洞毛の毛軸最外層のメルケル細胞および毛軸周囲の末梢神経から検出された(Figs.4-5)。一部の検体では、最外層のメルケル細胞のみならず、外根鞘を構成する重層扁平上皮および口腔粘膜上皮、表皮直下の神経節からもウイルス抗原が検出された(Figs.6-7)。また、鼻口部皮膚に分布する一次毛においても毛包周囲の末梢神経においてウイルス抗原が検出された(Figs.8-9)。

2. 蛍光抗体法によるウイルス抗原およびメルケル細胞の検出

a) 抗 P 抗体と抗 CAM 5.2 抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原とメルケル細胞の検出(Figs.10-13)

洞毛の毛軸最外層において一層から数層に分布する抗 CAM5.2 抗体に陽性のメルケル細胞の数に対して、抗 P 抗体陽性細胞の数は少なかったが、ウイルス抗原の局在はメルケル細胞と概ね一致していた(Figs.10-13)。一部の洞毛では、毛軸内側に存在する抗 CAM5.2 抗体陰性の外根鞘を構成する重層扁平上皮にも抗 P 抗体陽性像が観察された(Figs.12-13)。

b) 抗 N 抗体と抗 CAM 5.2 抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原とメルケル細胞の検出(Figs.14-15)

抗 P 抗体と同様に、抗 N 抗体陽性細胞の局在は抗 CAM5.2 抗体陽性のメルケル細胞と概ね一致していた(Figs.14-15)。メルケル

細胞の細胞質における抗 N 抗体陽性像は顆粒状であった(Fig.15)。

3. ウイルス抗原検出による全 226 頭の検査結果(表 1-2)

全 226 頭中、脳が抗 P 抗体に対して陽性を示したのは 211 頭であり、残り 15 頭は陰性であった(表 1-2)。洞毛の検索結果も脳に一致していた。すなわち、洞毛を用いた診断方法は感度 100%、特異度 100%であった。

4. ISH 法を用いたウイルスゲノムの検出(Figs.16-17)

ISH 法による狂犬病ウイルス NmRNA の発現は、免疫染色による抗ウイルス抗体(抗 P 抗体、抗 N 抗体)の陽性像と同様に、洞毛のメルケル細胞の細胞質に認められた(Figs.16-17)。ISH シグナルの発現強度は、免疫染色による抗ウイルス抗体の染色強度と比較すると同程度か、わずかに低い傾向を示した。

5. 超微形態学的所見(Figs.18-21)

洞毛のメルケル細胞は環状洞の ring wulst の深さに位置し、薄い硝子膜によって包まれていた。メルケル細胞の細胞質には、大小様々な神経内分泌顆粒、微細なフィラメント、ミトコンドリア、粗面小胞体および遊離リボソームが存在し、時折神経終末像が観察された(Fig.18)。

ウイルス粒子(長さ約 150-200 nm、幅 70 nm)は、メルケル細胞の粗面小胞体、神経終末およびマトリクス領域において観察された。また、一部のメルケル細胞にはウイルス関連構造物が確認された。これらの構造物は、長さが 500-1,000 nm、幅が 100-200

nm と大小様々であり、楕円形、糸状および筒状と多形性を示した。筒状の構造物の表面は電子密度が高く、内部は電子密度の低い空洞状を呈した(Figs.19-21)。

考察

本章では、検体頭数を大幅に増やし、ウイルス抗原、ウイルスゲノムおよびウイルス粒子の存在有無について精査し、洞毛におけるウイルス感染細胞を特定するとともに、洞毛の診断材料としての有用性について検討した。

洞毛は、ヒト以外の哺乳動物において主に鼻口部、眼窩上部、頬部に存在する。それぞれの洞毛は 2,000 以上の感覚神経の支配を有し、外部からの感覚刺激の受容と応答に関与する [18,25,65,66]。メルケル細胞は、ヒトを含む脊椎動物に存在し、触覚に敏感な無毛および有毛の皮膚や粘膜に分布する [10]。洞毛のメルケル細胞は環状洞の高さに位置する毛軸最外層において分布密度が高い。さらに、メルケル神経終末を構成する [18]。メルケル神経終末は、洞毛の硝子膜を貫いて毛軸最外層に侵入する感覚神経とメルケル細胞により構成される [18,65,66]。今回の検索部位となった環状洞の高さには、メルケル神経終末以外に少なくとも、3 種類の神経終末（槍型神経終末、棍棒状神経終末、自由神経終末）が報告されているが、この中でメルケル神経終末が最も多い神経終末を有する [18,25]。本章では、洞毛のメルケル細胞からウイルス P および N タンパク質、ウイルス NmRNA、ウイルス粒子およびウイルス関連構造の局在が確認された。ゆえに、鼻口部洞毛のメルケル細胞が狂犬病ウイルスの感染と複製の標的の 1 つであることが考えられる。また、蛍光二重染色の結果、メルケル細胞より内側に存在する重層扁平上皮へとウイルス抗原陽性像が連続性に観察された (Figs.12-13)。このことから、洞毛におけるウイルスの主な標的細胞はメルケル細胞であり、メル

メルセル細胞から外根鞘上皮へのウイルス伝播が拡大していく可能性が示唆される。このほか、抗 CAM5.2 抗体陽性細胞と一致しない抗 P 抗体陽性細胞が毛軸最外層に数個観察(Figs.10-15)されたが、これらの細胞は上述したメルセル神経終末以外の槍型神経終末などにより神経支配を受ける細胞である可能性が考えられる。

狂犬病ウイルスが神経細胞に感染すると、ネグリ小体と呼ばれる細胞質内封入体が形成される[41]。ネグリ小体は、通常感染動物の海馬および大脳皮質の錐体細胞と小脳のプルキンエ細胞に観察される[61]。神経細胞とは対照的に、唾液腺上皮や表皮細胞では観察されない[2,9,72]。近年、Lahayeらは、培養細胞を用いた感染実験でネグリ小体がウイルスの転写と複製の場であり、ネグリ小体の構成成分が主にウイルス RNA、P、N タンパク質およびユビキチン化タンパク質であることを報告[42]している。メルセル細胞は神経細胞の特徴[19,58,59]と、上皮としての性質[55]を共有している。本章の光学顕微鏡学的検索において、メルセル細胞の細胞質に明瞭なネグリ小体は観察されなかったが、超微形態学的検索ではウイルス粒子やマトリクス様構造物が観察された。メルセル細胞においてネグリ小体が形成されない理由については不明であるが、メルセル細胞の細胞起源や細胞骨格の違いがネグリ小体の形成機構に関与していた可能性、または、メルセル細胞に可視可能な大きさの封入体が形成される前に罹患犬が安楽殺または死亡していた可能性が推察される。この点については、狂犬病ウイルス罹患犬や感染実験例の神経組織と非神経組織を用いて今後更なる検証を行う必要があると思われる。

皮膚生検は、ヒト[6]および動物[5,74]の生前および死後の狂犬

病診断に有用である。ヒトでは、毛包を取り巻く末梢神経において主にウイルス抗原が検出される。ウイルス抗原陽性率は臨床経過の進行とともに増加する[8,76]。本章では、安楽死例および死亡例にかかわらず、すべての検体において抗原陽性像が観察され、感度および特異度はそれぞれ 100%であった。このことから、少なくとも感染後期には洞毛にウイルスが到達している可能性が示唆される。したがって、イヌの洞毛は狂犬病ウイルスの感染後期または死後診断材料として最も適していると考えられる。

以上、本章の研究成果により、鼻口部皮膚に分布する洞毛のメルケル細胞が狂犬病ウイルスの標的細胞であり、洞毛が狂犬病の新たな診断材料として極めて有用であることが判明した。

小括

これまでに我々は、狂犬病発症犬の鼻口部洞毛に存在するメルケル細胞からウイルス抗原が高率に検出されることを報告している。しかし、洞毛が脳に代わる新規の診断材料として有用かどうかを判断するためには、検索頭数が十分でなく、メルケル細胞の細胞質にウイルス粒子やウイルスゲノムが存在するかどうかについても解明されていなかった。

今回著者は、狂犬病疑いのイヌ 226 頭の脳と鼻口部洞毛について免疫組織化学的解析を実施した。その結果、安楽死例、死亡例にかかわらず、すべてのイヌでウイルス抗原陽性像が観察され、感度および特異度は 100%となった。また、脳と洞毛におけるウイルス抗原陽性・陰性の一致率が 100%であった。加えて、死亡例・安楽死例ともにメルケル細胞の細胞質にウイルス粒子およびウイルス NmRNA が局在していることが初めて判明した。

以上の結果から、洞毛のメルケル細胞が狂犬病ウイルス感染と複製の標的であることが示された。狂犬病ウイルスは脳において著しく増殖してから遠心性に末梢組織に下降すると考えられている。そのため、豊富な神経終末を有する洞毛は脳に代わる死後診断材料として有用であると考えられる。洞毛の採材は開頭作業を必要としない点で脳より採材が簡便である。したがって、洞毛は狂犬病流行国や地域における狂犬病ウイルス媒介動物のサーベイランスなどにも利用できる可能性が高いと思われる。

表、付図および付図説明

表 1. 供試動物の臨床情報、蛍光抗体法および免疫組織化学的検索結果

No.	Sex	Age	dFAT	Manner of death	Rabies vaccination	Primary clinical symptoms	IHC of brain	IHC of FSCs
Z-14-193	Male	1	Positive	Euthanasia	No	Diarrhea, lack of appetite, vomiting	Positive	Positive
RADDL3-632	Female	1	Positive	Euthanasia	Unknown	Unknown	Positive	Positive
Z-14-215	Male	3	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	Positive
Z-14217	Male	4	Negative	Found Dead	Unknown	Diarrhea, lack of appetite, vomiting, weakness	Negative	Negative
RADDL3-383	Female	1	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive
Z-14-142	Female	Unknown	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	Positive
Z-14-162	Unknown	2	Positive	Found Dead	Unknown	Lack of appetite	Positive	Positive
Z-14-136	Male	1.5	Positive	Found Dead	No	Lack of appetite	Positive	Positive
Z-14-163	Female	1	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	Positive
Z-14-192	Unknown	8	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive
Z-13-216	Unknown	Unknown	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive
Z-14-194	Unknown	Unknown	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	Positive
RADDL2-5	Unknown	Unknown	Positive	Euthanasia	No	Unknown	Positive	Positive
RADDL1 7/8/14	Male	4	Positive	Euthanasia	Unknown	Unknown	Positive	Positive
Z-14-175	Female	2.5	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	Positive
Z-14-224	Male	2	Negative	Found Dead	No	Lack of appetite, weakness	Negative	Negative
Z-14-235	Male	1	Positive	Euthanasia	Unknown	Unknown	Positive	Positive
Z-14-232	Female	4	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive
Z-13-211	Male	9	Positive	Found Dead	No	Lack of appetite	Positive	Positive
RADDL3-688	Male	3	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive
Z-14-205	Male	3	Negative	Found Dead	No	Unknown	Negative	Negative
RADDL3-751	Male	3	Positive	Found Dead	Unknown	Lack of appetite	Positive	Positive
Z-14-154	Male	3	Negative	Found Dead	No	Unknown	Negative	Negative
RADDL3-720	Unknown	3	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive
Z-14-241-11/13/14	Female	5	Positive	Euthanasia	Unknown	Unknown	Positive	Positive
Z-14-247-11/25/14	Unknown	Unknown	Negative	Found Dead	No	Unknown	Negative	Negative
Z-14-243-11/14-14	Male	6	Positive	Euthanasia	No	Unknown	Positive	Positive
RADDL3-759	Unknown	Unknown	Positive	Euthanasia	Unknown	Unknown	Positive	Positive
RADDL3-643	Female	6	Positive	Euthanasia	Unknown	Unknown	Positive	Positive
RADDL-712	Unknown	Unknown	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	Positive
Z-13-243	Unknown	Unknown	Positive	Euthanasia	Unknown	Unknown	Positive	Positive
Z-13-259	Male	6	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	Positive
Z-14-269	Male	5	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	Positive
Z-14-254	Male	5	Positive	Euthanasia	No	Unknown	Positive	Positive

dFAT: direct fluorescent antibody test, FSC: follicle-sinus complex, IHC: immunohistochemistry

No.	Sex	Age	dFAT	Manner of death	Rabies vaccination	Primary clinical symptoms	IHC of brain	IHC of FSCs
Z-14-221	Male	Unknown	Positive	Found Dead	No	Vomiting	Positive	Positive
Z-13-171	Male	2	Positive	Euthanasia	No	Unknown	Positive	Positive
RADDL3-691	Male	3	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive
Z-14-202	Female	5	Negative	Found Dead	Unknown	Unknown	Negative	Negative
Z-14-201	Male	6	Negative	Found Dead	Yes	Unknown	Negative	Negative
Z-14-211	Female	3	Positive	Found Dead	No	Lack of appetite	Positive	Positive
Z-14-22	Unknown	1	Positive	Euthanasia	No	Unknown	Positive	Positive
Z-19-170	Male	2	Positive	Found Dead	No	Lack of appetite	Positive	Positive
Z-14-270	Male	3	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	Positive
Z-14-220	Male	1	Positive	Euthanasia	Unknown	Unknown	Positive	Positive
Z-14-116	Male	11	Negative	Euthanasia	No	Lack of appetite	Negative	Negative
Z-14-254	Male	5	Positive	Euthanasia	No	Unknown	Positive	Positive
Z-14-230	Male	2	Positive	Euthanasia	No	Unknown	Positive	Positive
Z-13-184	Female	2	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	Positive
Z-14-169	Male	5	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	Positive
Z-14-245	Male	1	Positive	Euthanasia	No	Unknown	Positive	Positive
Z-14-212	Male	1	Negative	Found Dead	No	Weakness	Negative	Negative
RADDL3-708	Unknown	7	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive
RADDL3-705	Unknown	Unknown	Positive	Euthanasia	No	Unknown	Positive	Positive
Z-14-111	Male	3	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive
Z-13-250	Female	3	Positive	Found Dead	No	Lack of appetite	Positive	Positive
Z-14-253	Female	3	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	Positive
RADDL3-450	Male	10	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive
1035	Male	0.17	Positive	Found Dead	No	Inappetence, lethargy, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
939(+)	Female	0.25	Positive	Found Dead	No	Drooling of saliva, inappetence, lethargy	Positive	Positive
942(+)	Female	15	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive
1032(+)	Unknown	0.42	Positive	Found Dead	No	Aimless running, eating inanimate objects, drooling of saliva, restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
Z-15-181	Female	0.25	Positive	Found Dead	No	Restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL3-15-422	Male	3	Positive	Found Dead	Unknown	Apprehensive, inappetence, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive

No.	Sex	Age	dFAT	Manner of death	Rabies vaccination	Primary clinical symptoms	IHC of brain	IHC of FSCs
RADDL3-15-560	Female	1	Positive	Euthanasia	Unknown	Restlessness, vomiting, weakness	Positive	Positive
RADDL3-15-449	Male	0.5	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive
Z-15-120	Male	0.67	Negative	Found Dead	No	Unprovoked aggressiveness	Negative	Negative
RADDL3-15-407	Male	0.67	Positive	Euthanasia	Unknown	Unknown	Positive	Positive
RADDL3-15-388	Male	3	Positive	Found Dead	Unknown	Diarrhea, restlessness, vomiting	Positive	Positive
1045	Female	2	Positive	Found Dead	No	Aimless running, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
Z-1586	Female	5	Positive	Euthanasia	Unknown	Unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL3-15-445	Male	4	Positive	Euthanasia	Unknown	Unknown	Positive	Positive
Z-15-126	Female	0.25	Positive	Found Dead	No	Apprehensive, mad biting of inanimate objects, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive
Z-15-196	Female	0.33	Positive	Found Dead	No	Aimless running, apprehensive, inappetence, mad biting of inanimate objects, paralysis, restlessness, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive
Z-15-91	Male	4	Positive	Found Dead	Unknown	Hind leg, jaw and tongue, paralysis, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
Z-15-130	Male	3	Positive	Found Dead	No	Mad biting of inanimate objects, paralysis, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
Z-15-116	Male	0.25	Positive	Found Dead	No	Mad biting of inanimate objects	Positive	Positive
RADDL3-15-446	Male	5	Positive	Found Dead	Unknown	Restlessness	Positive	Positive
Z-15-118	Unknown	0.25	Positive	Found Dead	No	Restlessness	Positive	Positive
Z-15-112	Female	3	Positive	Found Dead	No	Unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
Z-15-107	Female	2	Positive	Found Dead	Yes	Apprehensive, lack of appetite, mad biting of inanimate objects, restlessness, unprovoked aggressiveness, watchful look, weakness	Positive	Positive
Z-15-131	Unknown	Unknown	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, mad biting of inanimate objects	Positive	Positive
RADDL3-15-442	Male	1	Positive	Found Dead	Unknown	Mad biting of inanimate objects, paralysis, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive

No.	Sex	Age	dFAT	Manner of death	Rabies vaccination	Primary clinical symptoms	IHC of brain	IHC of FSCs
232	Female	1.5	Positive	Euthanasia	Unknown	Unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
Z-1539	Male	0.33	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	Positive
Z-15-119	Female	3	Positive	Found Dead	No	Unprovoked aggressiveness, drooling of saliva	Positive	Positive
343	Female	0.33	Positive	Found Dead	Unknown	Restlessness	Positive	Positive
RADDL3-15-554	Unknown	0.58	Positive	Found Dead	Unknown	Apprehensive, mad biting of inanimate objects, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive
Z-15-167	Male	0.25	Positive	Found Dead	No	Inappetence, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL3-15-437	Male	0.167	Positive	Found Dead	Unknown	Aimless running, apprehensive, nasal / ocular discharges, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive
Z-15-80	Male	5	Positive	Found Dead	Unknown	Aimless running, apprehensive, lack of appetite, unprovoked aggressiveness, watchful look, weakness	Positive	Positive
Z-15-53	Male	5	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, uprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive
RADDL3-298	Male	4	Positive	Found Dead	Unknown	Inappetence, restlessness	Positive	Positive
LP-165	Male	Unknown	Positive	Found Dead	Unknown	Eating inanimate objects, restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL5-1	Female	2	Positive	Euthanasia	No	Aimless running, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
Z-15-19	Female	3	Positive	Found Dead	Unknown	Aimless running, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
Z-15-62	Male	0.33	Positive	Found Dead	No	Apprehensive, lack of appetite, mad biting inanimate objects, watchful look	Positive	Positive
Z-15-75	Female	9	Positive	Found Dead	No	Unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL3-205	Female	4	Positive	Euthanasia	Unknown	Unprovoked aggressiveness, drooling of saliva	Positive	Positive
Z-15-96	Male	7	Positive	Found Dead	Unknown	Mad biting of inanimate objects	Positive	Positive
RADDL3-210	Unknown	0.25	Positive	Euthanasia	Unknown	Inappetence	Positive	Positive

No.	Sex	Age	dFAT	Manner of death	Rabies vaccination	Primary clinical symptoms	IHC of brain	IHC of FSCs
Z-15-61	Female	3	Positive	Found Dead	No	Mad biting of inanimate objects	Positive	Positive
Z-15-34	Female	3	Negative	Found Dead	No	Convulsion, nasal/ocular discharge, seizure	Negative	Negative
RADDL2-15-1	Unknown	Unknown	Positive	Euthanasia	Unknown	Unknown	Positive	Positive
Z-15-164	Male	1.5	Positive	Found Dead	No	Unprovoked aggressiveness, weakness	Positive	Positive
Z-15-99	Female	0.167	Negative	Found Dead	No	Weakness	Negative	Negative
249	Female	4.8	Positive	Euthanasia	Unknown	Restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
270	Unknown	Unknown	Positive	Euthanasia	Unknown	Unknown	Positive	Positive
350	Male	0.5	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, apprehensive, biting inanimate objects, restlessness, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive
Z-15-14	Female	6	Negative	Found Dead	No	Diarhea with blood, salivation	Negative	Negative
Z-15-16	Female	1	Positive	Euthanasia	Unknown	Unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL3-219	Female	Unknown	Positive	Euthanasia	Unknown	Unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL3-212	Male	10	Positive	Euthanasia	No	Unknown	Positive	Positive
Z-15-18	Unknown	0.25	Positive	Found Dead	Unknown	Apprehensive, watchful look	Positive	Positive
802	Male	3	Positive	Found Dead	No	Eating inanimate objects, inappetence, lethargy, restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL3-214	Male	4	Positive	Found Dead	Yes	Apprehensive, drooling of saliva, nasal/ocular discharge, restlessness, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive
RADDL3-221	Female	0.42	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive
LP-23	Female	2	Positive	Found Dead	Unknown	Inappetence	Positive	Positive
754	Male	0.25	Positive	Found Dead	No	Barking	Positive	Positive
Z-15-146	Male	1	Positive	Found Dead	No	Apprehensive, mad biting inanimate objects, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive
779	Female	0.25	Positive	Found Dead	No	Unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
866	Male	0.83	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	Positive
RADDL3-203	Male	0.167	Positive	Euthanasia	No	Drooling of saliva, inappetence, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive

No.	Sex	Age	dFAT	Manner of death	Rabies vaccination	Primary clinical symptoms	IHC of brain	IHC of FSCs
LP-77-15	Female	3	Positive	Found Dead	No	Mad biting of inanimate objects, restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
988	Female	0.58	Positive	Found Dead	Unknown	Convulsion, drooling of saliva, inappetence, lethargy, nasal/ocular discharge, restlessness, paralysis jaw and tongue, vomiting,	Positive	Positive
RADDL4-15-707	Female	1.83	Positive	Found Dead	Unknown	Diarrhea, inappetence	Positive	Positive
884	Male	3	Positive	Found Dead	Yes	Apprehensive, eating inanimate objects, inappetence, watchful look	Positive	Positive
961	Unknown	0.42	Positive	Euthanasia	Yes	Aimless running	Positive	Positive
RADDL4-15-524	Male	2	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive
880	Male	0.83	Positive	Euthanasia	No	Aimless running, restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
Z-15-154	Female	2.5	Negative	Euthanasia	Unknown	Unknown	Negative	Negative
842	Unknown	0.92	Positive	Found Dead	No	Unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
844	Male	1.167	Positive	Found Dead	Yes	Lethargy, restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
Z-15-172	Female	0.33	Positive	Found Dead	Unknown	Apprehensive, lack of appetite, mad biting inanimate objects, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive
RADDL4-15-704	Male	0.33	Positive	Found Dead	Unknown	Eating inanimate objects	Positive	Positive
959	Male	3	Positive	Euthanasia	Unknown	Inappetence, restlessness	Positive	Positive
804	Male	0.33	Positive	Found Dead	No	Drooling of saliva, restlessness	Positive	Positive
Z-15-155	Male	4	Positive	Euthanasia	No	Mad biting of inanimate objects, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
Z-15-194	Male	4	Negative	Euthanasia	Yes	Aimless running, apprehensive watchful look, diarrhea	Negative	Negative
Z-15-190	Female	1	Positive	Found Dead	No	Unprovoked aggressiveness, weakness	Positive	Positive
780	Unknown	0.5	Positive	Found Dead	No	Inappetence, lethargy	Positive	Positive

No.	Sex	Age	dFAT	Manner of death	Rabies vaccination	Primary clinical symptoms	IHC of brain	IHC of FSCs
701	Male	Unknown	Positive	Found Dead	Yes	Aimless running, apprehensive watchful look, drooling of saliva, eating inanimate objects, restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
433	Male	3	Positive	Found Dead	Unknown	Drooling of saliva, mad biting of inanimate objects, restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
Z-15-141	Unknown	1	Positive	Euthanasia	unknown	Weakness	Positive	Positive
Z-15-148	Female	0.167	Positive	Found Dead	No	Mad biting inanimate objects	Positive	Positive
Z-15-161	Male	Unknown	Positive	Found Dead	Unknown	Inappetence, vomiting	Positive	Positive
Z-15-192	Female	4	Positive	Found Dead	Yes	Inappetence, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
728	Female	1	Positive	Found Dead	No	Inappetence	Positive	Positive
Z-15-05	male	Unknown	Positive	Found Dead	No	Apprehensive, jaw and tongue paralysis, mad biting inanimate objects, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive
938	Male	2	Positive	Found Dead	No	Aimless running, apprehensive watchful look, eating inanimate objects, drooling of saliva, inappetence, restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL3-211	Female	7.5	positive	Euthanasia	Yes	Unknown	Positive	Positive
Z-15-71	Unknown	Unknown	Positive	Euthanasia	Unknown	Unknown	Positive	Positive
Z-15-17	Unknown	Unknown	Positive	Found Dead	Unknown	Apprehensive, watchful look	Positive	Positive
845	Male	0.17	Positive	Found Dead	Unknown	Diarrhea, inappetence, restlessness, vomiting	Positive	Positive
864	Female	0.17	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive
1061	Male	2	Positive	Found Dead	No	Diarrhea	Positive	Positive
RADDL3-16-413	Male	Unknown	Positive	Found Dead	Unknown	Drooling of saliva, mad biting of inanimate objects, unprovoked aggressiveness, vomiting, weakness	Positive	Positive
RADDL3-16-469	Unknown	Unknown	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive
Z-16-093	Male	1.33	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive

No.	Sex	Age	dFAT	Manner of death	Rabies vaccination	Primary clinical symptoms	IHC of brain	IHC of FSCs
Z-16-072	Unknown	Unknown	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive
RADDL3-16-549	Female	0.583	Positive	Found Dead	Unknown	Lack of appetite, nasal / ocular discharges, vomiting	Positive	Positive
RADDL3-16-454	Female	0.5	Positive	Found Dead	Unknown	Lack of appetite, weakness	Positive	Positive
RADDL3-16-439	Unknown	Unknown	Positive	Found Dead	Unknown	Diarrhea, weakness	Positive	Positive
Z-16-092	Unknown	Unknown	Positive	Euthanasia	Unknown	Unknown	Positive	Positive
RADDL3-16-441	Unknown	0.417	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive
RADDL1-16-169	Unknown	12.083	Positive	Found Dead	Unknown	Lack of appetite, mad biting of inanimate objects, restlessness, weakness	Positive	Positive
RADDL3-16-468	Male	0.917	Positive	Found Dead	Unknown	Apprehensive, lack of appetite, watchful look	Positive	Positive
RADDL3-16-656	Female	Unknown	Positive	Found Dead	Unknown	Aimless running, drooling of saliva, mad biting of inanimate objects, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL4-16-001	Female	0.417	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, drooling of saliva, paralysis	Positive	Positive
RADDL3-16-784	Unknown	1	Positive	Found Dead	Unknown	Aimless running, apprehensive, restlessness, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive
RADDL3-16-627	Male	5	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive
RADDL3-16-475	Male	0.917	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, lack of appetite, mad biting of inanimate objects, restlessness, vomiting, weakness	Positive	Positive
RADDL1-16-153	Female	3	Positive	Found Dead	Unknown	Diarrhea, nasal/ocular discharges, vomiting	Positive	Positive
RADDL3-16-527	Male	1	Positive	Found Dead	Unknown	Aimless running, convulsions, drooling of saliva, mad biting of inanimate objects, restlessness, seizures, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL3-16-452	Female	3	Positive	Euthanasia	Unknown	Restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL3-16-571	Male	3	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive

No.	Sex	Age	dFAT	Manner of death	Rabies vaccination	Primary clinical symptoms	IHC of brain	IHC of FSCs
RADDL1-16-111	Male	0.333	Positive	Found Dead	Unknown	Convulsions, lack of appetite, seizures, weakness	Positive	Positive
RADDL3-16-421	Female	1	Positive	Found Dead	Unknown	Aimless running, drooling of saliva, mad biting of inanimate objects, lack of appetite, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL3-16-422	Male	0.5	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, restlessness	Positive	Positive
RADDL3-16-731	Male	4	Positive	Found Dead	Unknown	Apprehensive, lack of appetite, skin lesions, watchful look, weakness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL3-16-579	Male	1	Positive	Found Dead	Unknown	Lack of appetite, vomiting, weakness	Positive	Positive
RADDL3-16-826	Female	3	Positive	Found Dead	Unknown	Convulsions, drooling of saliva, seizures	Positive	Positive
RADDL3-16-698	Female	12.333	Positive	Euthanasia	Unknown	Restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
Z-16-150	Male	Unknown	Positive	Euthanasia	Unknown	Unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL3-16-789	Unknown	1	Positive	Euthanasia	Unknown	Mad biting of inanimate objects, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
Z-16-151	Female	2	Positive	Found Dead	Unknown	Continuous barking, lack of appetite, weakness	Positive	Positive
Z-16-154	Female	0.833	Positive	Found Dead	Unknown	Vomiting, weakness	Positive	Positive
Z-16-135	Female	0.25	Positive	Found Dead	Unknown	Tail wound, unable to drink water	Positive	Positive
Z-16-149	Female	0.75	Positive	Found Dead	Unknown	Vaginal prolapse	Positive	Positive
Z-16-099	Male	2	Positive	Found Dead	Unknown	Lack of appetite, weakness	Positive	Positive
Z-16-173	Unknown	Unknown	Positive	Euthanasia	Unknown	Unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL1-16-144	Female	3	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, apprehensive, drooling of saliva, lack of appetite, watchful look	Positive	Positive
RADDL1-16-182	Female	2.75	Positive	Found Dead	Unknown	Lack of appetite, paralysis, restlessness, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive
Z-16-138	Male	0.33	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive
Z-16-146	Female	Unknown	Positive	Found Dead	Unknown	Unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL1-16-154	Male	1	Positive	Found Dead	Unknown	Lack of appetite	Positive	Positive

No.	Sex	Age	dFAT	Manner of death	Rabies vaccination	Primary clinical symptoms	IHC of brain	IHC of FSCs
RADDL1-16-166	Male	2.5	Positive	Found Dead	Unknown	Lack of appetite, mad biting of inanimate objects, restlessness, vomiting	Positive	Positive
Z-16-142	Female	0.5	Positive	Found Dead	Unknown	Restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
Z-16-148	Female	0.25	Positive	Found Dead	Unknown	Apprehensive, drooling of saliva, mad biting of inanimate objects, restlessness, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive
RADDL3-16-647	Female	2	Positive	Found Dead	Unknown	Lack of appetite	Positive	Positive
Z-16-129	Male	0.33	Positive	Found Dead	Unknown	Lack of appetite, weakness	Positive	Positive
Z-16-166	Male	Unknown	Positive	Euthanasia	Unknown	Unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
Z-16-143	Female	3	Positive	Euthanasia	Unknown	Unknown	Positive	Positive
RADDL1-16-175	Male	3	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, lack of appetite, mad biting of inanimate objects, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL3-16-701	Unknown	2	Positive	Found Dead	Unknown	Aimless running, restlessness	Positive	Positive
RADDL3-16-424	Male	0.5	Positive	Found Dead	Unknown	Lack of appetite, vomiting, weakness	Positive	Positive
Z-16-178	Male	7	Positive	Found Dead	Unknown	Unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
Z-16-100	Male	2	Positive	Euthanasia	Unknown	Apprehensive, drooling of saliva, mad biting of inanimate objects, watchful look	Positive	Positive
RADDL3-16-866	Female	5	Positive	Found Dead	Unknown	Drooling of saliva, lack of appetite	Positive	Positive
RADDL3-16-1018	Male	2	Positive	Found Dead	Unknown	Lack of appetite, mad biting of inanimate objects, restlessness, weakness	Positive	Positive
RADDL1-16-211	Female	8	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, lack of appetite, restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL1-16-224	Male	1	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, apprehensive, drooling of saliva, mad biting of inanimate objects, restlessness, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive
RADDL1-16-209	Male	0.33	Positive	Found Dead	Unknown	Diarrhea	Positive	Positive

No.	Sex	Age	dFAT	Manner of death	Rabies vaccination	Primary clinical symptoms	IHC of brain	IHC of FSCs
RADDL1-16-198	Male	3	Positive	Euthanasia	Unknown	Lack of appetite, mad biting of inanimate objects, paralysis, weakness	Positive	Positive
RADDL3-16-942	Female	0.333	Positive	Found Dead	Unknown	Aimless running, apprehensive, drooling of saliva, mad biting of inanimate objects, restlessness, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive
RADDL1-16-214	Female	0.33	Positive	Euthanasia	Unknown	Drooling of saliva	Positive	Positive
RADDL3-16-987	Male	0.33	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive
RADDL1-16-201	Male	0.5	Positive	Found Dead	Unknown	Aimless running, drooling of saliva, lack of appetite, restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL3-16-959	Female	0.5	Positive	Euthanasia	Unknown	Unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL3-16-966	Male	1	Positive	Found Dead	Unknown	Restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL1-16-215	Female	2	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, apprehensive, restlessness, unprovoked aggressiveness, watchful look, weakness	Positive	Positive
RADDL3-16-854	Male	0.833	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, drooling of saliva, restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL3-16-828	Male	1	Positive	Found Dead	Unknown	Aimless running, apprehensive, drooling of saliva, restlessness, watchful look	Positive	Positive
RADDL3-16-1012	Male	2	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive
RADDL3-16-1008	Male	3	Positive	Found Dead	Unknown	Drooling of saliva, lack of appetite, weakness	Positive	Positive
RADDL1-16-208	Male	10	Positive	Euthanasia	Unknown	Lack of appetite, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive
RADDL1-16-197	Female	1	Positive	Found Dead	Unknown	Drooling of saliva, lack of appetite, mad biting of inanimate objects, restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive

表 2. IHC による全 226 頭の脳と洞毛のウイルス抗原検出の結果

n = 226	脳 陽性検体	脳 陰性検体
洞毛 陽性検体	211	0
洞毛 陰性検体	0	15

第Ⅱ章 狂犬病発症犬の鼻口部洞毛組織を用いた狂犬病診断の ための採材位置と採材本数の検討

緒言

動物における狂犬病検査は、咬傷によってウイルスに暴露されたヒトへの暴露後予防対策や加害動物に対する適切な対応に極めて重要である[81]。第Ⅰ章で述べた通り、現行の狂犬病の確定診断には新鮮な脳を用いた直接蛍光抗体法が標準法として推奨されている。しかし、脳サンプルの採材のためには開頭が必要であり、これに伴う実験者への感染リスクが高く、実験設備や実験施設にも高額な費用がかかる。また、腐敗・自己融解が進んだ脳では信頼できる結果が得られないため、脳に代わる新たな診断材料が求められている。

第Ⅰ章では、フィリピンの狂犬病発症犬の鼻口部洞毛を用いて病理組織化学的解析を行った結果、洞毛が脳に代わる新規の狂犬病診断材料として極めて有用であることが判明した。しかし、どの位置に分布する洞毛から、何本の洞毛を採取すれば、狂犬病の確定診断が可能であるかについては明らかにされなかった。そこで、第Ⅱ章では狂犬病発症犬1頭当たり、何本の洞毛をどの位置から採材すれば狂犬病陽性と診断できるのか、また、採材本数の違いとウイルス抗原陽性率との相関関係について統計学的分析を行った。

材料方法

1. 供試動物(表 1)

供試動物は 2013 年から 2016 年までの間にフィリピン国内において狂犬病発病疑いで捕獲又は死後回収されたイヌ 123 頭（安楽殺 33 頭、死亡例 90 頭）である。123 頭の犬種は不明であり、年齢は 1 ヶ月齢から 15 歳齢であった。捕獲前後に確認された臨床症状は情動不安、食欲不振、攻撃性、噛みつき、嘔吐、下痢、皮膚病変、流涎、流涙、痙攣などであった。フィリピンで実施した脳を用いた標準法により、110 頭が狂犬病陽性、13 頭が狂犬病陰性となった。

供試動物の臨床情報は表 1 に示した。

2. 病理組織化学的検索

以下の検索には、10%緩衝ホルマリンで固定したイヌの脳と鼻口部皮膚に分布する洞毛を検索材料として使用した。

a) 採材する洞毛の列の検討(Figs.1-2)

まず、採材する洞毛の列を決定するため、鼻口部皮膚を水平方向に切出した。鼻口部皮膚に概ね 4 列の洞毛が確認された(Figs.1-2)。下から 2 列目（下 2 列目）は最長で、最大数の洞毛（6-7 本）を含み、洞毛の大きさは吻側から尾側に向けて大型化する傾向にあった(Fig.2)。

b) 採材する洞毛の本数の検討(表 2)

採材する洞毛の本数を決定するために、3 本、4 本、5 本の洞毛

を 10 頭の狂犬病発症犬の鼻口部皮膚に分布する洞毛から無作為に抽出し、それぞれについて免疫組織化学的解析（抗 P 抗体）によりウイルス抗原の分布を検討した。その結果、洞毛のメルケル細胞のウイルス抗原の局在に規則性は認められなかった。対照的に、ウイルス抗原陽性率は洞毛の数に比例して増加した。3 本、4 本、5 本の洞毛を採材し、1 本以上の洞毛にウイルス抗原が認められた検索頭数はそれぞれ 8 頭、9 頭、10 頭であった（表 2）。したがって、本章では、イヌ 1 頭につき下 2 列目の洞毛を 5 本採材し、以下の免疫組織化学的検索と統計学的検討に使用した。

c) 5 本の洞毛の病理組織学的検索 (Figs.3-5)

本章は、狂犬病発症疑いのイヌ 123 頭の洞毛を使用した。外科剪刀、鑷子、およびトリミングナイフを使用して下 2 列目の洞毛を吻側から 5 本採材し、毛軸の位置で縦断した (Figs.3-5)。

その後、組織片を上昇アルコール系列で脱水、クリアプラス透徹後、パラフィン包埋した。123 頭全てのイヌに対して、包埋ブロックより 3 μ m の厚さで切片を作製し、定法によるヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) および免疫組織化学的検索に供した。

3. 免疫組織化学的検索

a) 抗狂犬病ウイルス P タンパク質抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原の検出

ウイルス抗原陽性細胞を同定するため、ウサギ抗狂犬病ウイルス P タンパク質 (Rabies Phosphoprotein、以下 P) 抗体 [73] を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、0.25%

トリプシンで抗原を賦活化し、0.3%過酸化水素加メタノール（室温、60分）で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、非特異反応を抑制するため10%正常ヤギ血清(Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan)でブロッキングを行った。一次抗体として1,200倍に希釈した抗P抗体を、4°Cで一晩反応させた。PBS洗浄後、Histofine® Simple Stain MAX-PO(R)(Nichirei Biosciences)を室温で30分反応させた後、Simple Stain DAB溶液(Nichirei Biosciences)で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。

4. 統計学的検討

脳と洞毛5本の抗P抗体を用いた免疫染色を実施し、この2種類の材料を用いた検査法の一致度を評価するために、95%信頼区間(Confidence interval、以下CI)における感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率、および κ 係数を算出した。

また、死亡例と安楽殺例の洞毛5本の抗P抗体を用いた免疫染色のそれぞれの感度を比較するため、母比率の差に関する仮説検定($P < 0.05$ 、両側 z 検定)を用いて解析を実施した。

さらに、洞毛の死後変化の程度を静脈洞の褪色の程度と判断し、褪色程度の異なる3群間でのウイルス抗原検出率について比較検討した。比較検討には、3群以上の比率の差の多重検定法(Tukey法)を用いた。

結果

1. 洞毛組織の構造と病理組織学的所見

a) 洞毛の組織構造(Figs.6-7)

洞毛の縦断面において、外根鞘の外周に硝子膜が位置しており、硝子膜の厚さは深部から表皮に向けて薄くなり、環状洞のあたりで消失しているのが観察された。さらに環状洞の高さに位置する外根鞘の基底層に、細胞質が空胞を呈する単層性のメルケル細胞が第 I 章と同様に観察された(Figs.6-7)。

b) 静脈洞の褪色と病理組織学的所見(Figs.10-15)

洞毛の正常構造として、実体顕微鏡と組織学的所見より洞毛に特徴的な 2 種類の静脈洞(環状洞と海綿洞)と、環状洞内に Ring wulst と呼ばれるこぶ状の構造物が認められた。これらの静脈洞の色調は検体によって異なり、黒色、黄土色、白色を呈していた(Figs.10,12,14)。静脈洞の色が黒色の検体は HE 染色で組織構造が明瞭に観察できたが、黄土色の検体は細胞が酸欠状態により好酸性が増し、さらに核濃縮も見られた。そして静脈洞の白色の検体に関してはさらに重層扁平上皮細胞の空胞変性、メルケル細胞の変性壊死、細胞融解による裂隙が認められた(Figs.11,13,15)。これらの組織学的な変化から、静脈洞が黒色を呈する洞毛は死後変化なし、黄土色を呈する洞毛を軽度の死後変化、白色を呈するものを重度の死後変化と判断し、後述する洞毛の死後変化の程度とウイルス抗原陽性率との関係を調べた。

2. 免疫組織化学的所見

a) 抗 P 抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原分布と陽性率(Figs.8-9)

抗 P 抗体陽性細胞はこれまでの報告と同様に、洞毛の環状洞の高さの外根鞘の基底層および毛軸周囲の末梢神経から検出された(Figs.8-9)。このウイルス抗原陽性細胞は HE 染色において環状洞の高さに位置する空胞を含む淡明なメルケル細胞領域と一致した。

3. ウイルス抗原検出による全 123 頭の検査結果(表 1,3-5,図 1)

直接蛍光抗体法は狂犬病診断の標準法であるため、脳の直接蛍光抗体法による陽性および陰性結果は、真の狂犬病陽性(真陽性)および陰性(真陰性)と判断した[57,81]。脳における標準法と洞毛 5 本の抗 P 抗体を用いた免疫染色の陽性および陰性結果は 3 頭を除く 120 頭において一致した(表 1)。また、脳が標準法および免疫染色による抗 P 抗体陽性であるにも関わらず、洞毛の免疫染色結果が陰性を示した場合には偽の狂犬病陰性(偽陰性)と判断した。

全 123 頭中、洞毛の免疫染色結果は 107 頭が真陽性、13 頭が真陰性、3 頭が偽陰性であった(表 3)。偽陰性を示した 3 頭のイヌは、2 頭が死亡例、残りの 1 頭が安楽殺例であった。全頭の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率、および κ 係数は、それぞれ 97.3% (95% CI 91.8-99.5)、100% (95% CI 96.4-100.0)、100% (95% CI 96.4-100.0)、81.3% (95% CI 72.6-88.1)、0.88 であった(表 4)。

死亡例 90 頭において、洞毛の免疫染色結果は 78 頭が真陽性、

10頭が真陰性、2頭が偽陰性であった。死亡例90頭の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率、および κ 係数は、それぞれ97.5% (95% CI 92.3-99.6)、100% (95% CI 96.4-100.0)、100% (95% CI 96.4-100.0)、83.3% (95% CI 75.1-90.3)、0.9であった(表5)。一方、安楽殺例33頭において、洞毛の免疫染色結果は29頭が真陽性、3頭が真陰性、1頭が偽陰性であった。安楽殺例33頭の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率、および κ 係数は、それぞれ96.7% (95% CI 91.2-99.2)、100% (95% CI 96.4-100.0)、100% (95% CI 96.4-100.0)、75.0% (95% CI 65.6-82.9)、0.84であった(表5)。また、死亡例90頭と安楽殺例33頭の感度に統計学的に有意差は認められなかった。

真陽性110頭のうち、静脈洞の褪色によって分類した結果は、静脈洞の色が黒色の検体が49頭(48頭が真陽性、1頭が偽陰性)、黄土色の検体は50頭(49頭が真陽性、1頭が偽陰性)、白色の検体は11頭(10頭が真陽性、1頭が偽陰性)であった(表1)。この静脈洞の褪色の程度とウイルス抗原検出率には統計学的に有意差は認められなかった(図1)。

考察

本章では、1頭当たり何本の洞毛を検査することで狂犬病陽性と診断できるのかを明らかにするため、フィリピンの狂犬病発症犬の洞毛を用いて洞毛の採材位置、採材本数とウイルス抗原の陽性率の関係性について精査した。

狂犬病診断において、皮膚生検は一般にヒトの狂犬病の生前・死後診断に使用されている[6]。ウイルス抗原は毛包を取り巻く末梢神経で検出され、その数は感染の臨床経過の進行とともに増加する[5,6]。ヒトの皮膚生検を用いた蛍光抗体法による組織診断には、毛包を観察するために最低20枚の切片が必要であると報告[14]されている。さらに、皮膚生検材料には少なくとも10個の毛包が含まれている必要がある[36]。本章では、洞毛5本を使用して実施された検査の感度と特異度はともに97%以上を示し、高い真陽性率と低い偽陰性率が得られた。加えて、 κ 係数值0.88は脳と洞毛5本の検査結果がほぼ完全に一致することを示している[64]。また、死亡例と安楽殺例のイヌの両方で、感度は96%以上、特異度は100%であり、それぞれの κ 係数は0.9と0.84を示した。この結果は、洞毛検査がイヌの狂犬病死後診断に非常に有用であることを再確認できる結果である。

感度と特異度がともに100%を示す理想的な診断法を標準法（ゴールドスタンダード法）と呼ぶ[12]。本章では、110頭の真陽性のイヌの中で3頭が偽陰性を示したため、100%の感度を得ることはできなかった。Blendenらは、マウスに狂犬病街上毒ウイルスを接種すると、発症前に鼻口部皮膚でウイルス抗原が検出され始め、その後ウイルス抗原陽性率が感染の経過とともに増加し

たと報告[5]している。本章では、3頭の偽陰性の結果について、その原因を明確にすることはできなかったが、Blendenらの報告のように、個々のイヌの感染の経過段階が一因となっている可能性が示唆される。加えて、本章で使用した5本という洞毛の数が100%の感度を得るのに十分ではなかったことや、洞毛を1本ずつ分離し縦断面を作製した今回の採材手技による人為的な要因、死後の野外での温暖多湿な条件による洞毛の死後変化の進行が偽陰性の結果に影響した可能性も考えられる。

脳の死後変化の進行による直接蛍光抗体法および免疫染色法の感度の低下については、これまで幾つか報告[1,28,38,49]されている。しかし、皮膚の死後変化の進行によるウイルス抗原検出の影響を調査した報告はない。本章では、洞毛を縦断したことで洞毛全体の変化が良く観察でき、静脈洞の褪色度合が検体によって異なることが判明した。また、HE染色標本の観察により、これらの変化が死後の自己融解によるものであることがわかった(Figs.10-15)。発症犬の静脈洞の褪色の程度とウイルス抗原の検出率について統計学的に比較検討を試みたところ、静脈洞の褪色の程度の違いによるウイルス抗原の検出率には有意な差が認められなかった(図1)。この結果から、洞毛に死後変化が起っていても診断材料として用いることが可能であると考えられる。しかし、3頭においては偽陰性の結果が得られているため、洞毛の死後変化が陽性率に与える影響については今後実験モデルなどを用いて精査する必要があると思われる。

以上、本章の研究成果により、鼻口部皮膚に存在する洞毛を下2列目から5本を採取すれば97%以上の感度・特異度が得られる

ことが判明した。さらに、安楽殺例と死亡例との間に抗原陽性率の違いは認められず、死後変化による影響も受けないことが判明したので、鼻口部皮膚の洞毛が狂犬病の新規診断材料として極めて有用であることが再確認された。

小括

第 I 章では、狂犬病発症犬において、鼻口部洞毛が脳に代わる新規の診断材料として極めて有用であることが示された。しかし、どの位置から何本の洞毛を採取すれば、狂犬病の診断が可能かについては、これまで明らかにしていない。

第 II 章では、狂犬病疑いのイヌ 123 頭を用いて、1 頭当たり何本の洞毛を検査することで狂犬病陽性と診断できるのかについて検討した。鼻口部皮膚に分布する洞毛の下 2 列目から洞毛 5 本を採材した。さらに、免疫組織化学的解析を実施し、脳と洞毛 5 本の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率、および κ 係数を精査した。その結果、全頭の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率、および κ 係数は、それぞれ 97.3%、100%、100%、81.3%、0.88 であった。

以上の結果より、5 本の検査で 97%以上の感度・特異度を誇る洞毛を用いた診断方法は、安楽殺・死亡例による違いや死後変化にも大きな影響を受けないことが判明した。しかし、今回 3 頭が偽陰性を示した。これは狂犬病ウイルスの感染ステージも 1 つの要因として考えられるが、今回の採材手技による人為的な要因や死後の野外での温暖多湿な条件による洞毛の自己融解の進行が偽陰性の結果に影響した可能性も考えられる。今後の課題は、より簡易的な洞毛採材の手技を開発、洞毛の死後変化がウイルス抗原検出に及ぼす影響について検討する必要がある。

表、付図および付図説明

表1. 供試動物の臨床情報、免疫組織化学的検索、および静脈洞の褪色の結果

No.	Sex	Age	dFAT	Manner of death	Rabies vaccination	Primary clinical symptoms	IHC of brain	IHC of 5FSCs	Color of blood sinus
RADDL3-632	Female	1	Positive	Euthanasia	Unknown	Unknown	Positive	Positive	Black
Z-14-215	Male	3	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	Positive	Black
RADDL3-383	Female	1	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive	White
Z-14-142	Female	Unknown	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	Positive	Ocher
Z-14-136	Male	1.5	Positive	Found Dead	No	Lack of appetite	Positive	Positive	Black
Z-14-194	Unknown	Unknown	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	Positive	Ocher
RADDL2-5	Unknown	Unknown	Positive	Euthanasia	No	Unknown	Positive	Positive	Black
Z-14-224	Male	2	Negative	Found Dead	No	Lack of appetite, weakness	Negative	Negative	Black
Z-14-235	Male	1	Positive	Euthanasia	Unknown	Unknown	Positive	Positive	Black
Z-14-232	Female	4	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive	Black
Z-13-211	Male	9	Positive	Found Dead	No	Lack of appetite	Positive	Positive	Black
RADDL3-688	Male	3	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive	Black
Z-14-205	Male	3	Negative	Found Dead	No	Unknown	Negative	Negative	Ocher
RADDL3-751	Male	3	Positive	Found Dead	Unknown	Lack of appetite	Positive	Positive	Ocher
Z-14-154	Male	3	Negative	Found Dead	No	Unknown	Negative	Negative	Ocher
Z-14-241-11/13/14	Female	5	Positive	Euthanasia	Unknown	Unknown	Positive	Positive	Black
Z-13-243	Unknown	Unknown	Positive	Euthanasia	Unknown	Unknown	Positive	Positive	Black
Z-13-259	Male	6	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	Positive	Black
Z-13-171	Male	2	Positive	Euthanasia	No	Unknown	Positive	Positive	Black
RADDL3-691	Male	3	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive	Ocher
Z-14-202	Female	5	Negative	Found Dead	Unknown	Unknown	Negative	Negative	Black
Z-14-201	Male	6	Negative	Found Dead	Yes	Unknown	Negative	Negative	Ocher
Z-19-170	Male	2	Positive	Found Dead	No	Lack of appetite	Positive	Positive	White
Z-14-116	Male	11	Negative	Euthanasia	No	Lack of appetite	Negative	Negative	Ocher
Z-13-184	Female	2	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	Positive	Ocher
Z-14-169	Male	5	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	Positive	Ocher
Z-14-245	Male	1	Positive	Euthanasia	No	Unknown	Positive	Positive	Black
Z-14-212	Male	1	Negative	Found Dead	No	Weakness	Negative	Negative	Black
Z-14-111	Male	3	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive	Ocher
Z-14-253	Female	3	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	False negative	White
RADDL3-450	Male	10	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive	Ocher
942(+)	Female	15	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive	White
1032(+)	Unknown	0.42	Positive	Found Dead	No	Aimless running, eating inanimate objects, drooling of saliva, restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Black

dFAT: direct fluorescent antibody test, FSC: follicle-sinus complex, IHC: immunohistochemistry, Color of blood sinus: 静脈洞の褪色, Black: 黒色, Ocher: 黄土色, White: 白色

No.	Sex	Age	dFAT	Manner of death	Rabies vaccination	Primary clinical symptoms	IHC of brain	IHC of 5FSCs	Color of blood sinus
Z-15-181	Female	0.25	Positive	Found Dead	No	Restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Ocher
RADDL3-15-422	Male	3	Positive	Found Dead	Unknown	Apprehensive, inappetence, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive	Black
RADDL3-15-560	Female	1	Positive	Euthanasia	Unknown	Restlessness, vomiting, weakness	Positive	Positive	Ocher
RADDL3-15-449	Male	0.5	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive	Ocher
Z-15-120	Male	0.67	Negative	Found Dead	No	Unprovoked aggressiveness	Negative	Negative	Black
RADDL3-15-388	Male	3	Positive	Found Dead	Unknown	Diarrhea, restlessness, vomiting	Positive	Positive	White
Z-15-126	Female	0.25	Positive	Found Dead	No	Apprehensive, mad biting of inanimate objects, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive	Ocher
Z-15-196	Female	0.33	Positive	Found Dead	No	Aimless running, apprehensive, inappetence, mad biting of inanimate objects, paralysis, restlessness, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive	Ocher
Z-15-91	Male	4	Positive	Found Dead	Unknown	Hind leg, jaw and tongue, paralysis, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Black
Z-15-130	Male	3	Positive	Found Dead	No	Mad biting of inanimate objects, paralysis, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Black
Z-15-116	Male	0.25	Positive	Found Dead	No	Mad biting of inanimate objects	Positive	Positive	Black
RADDL3-15-446	Male	5	Positive	Found Dead	Unknown	Restlessness	Positive	Positive	Ocher
Z-15-118	Unknown	0.25	Positive	Found Dead	No	Restlessness	Positive	Positive	Ocher
Z-15-112	Female	3	Positive	Found Dead	No	Unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Black
Z-15-107	Female	2	Positive	Found Dead	Yes	Apprehensive, lack of appetite, mad biting of inanimate objects, restlessness, unprovoked aggressiveness, watchful look, weakness	Positive	Positive	Black
Z-15-131	Unknown	Unknown	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, mad biting of inanimate objects	Positive	Positive	Black
232	Female	1.5	Positive	Euthanasia	Unknown	Unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Ocher
Z-1539	Male	0.33	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	Positive	Ocher
Z-15-119	Female	3	Positive	Found Dead	No	Unprovoked aggressiveness, drooling of saliva	Positive	Positive	Black

No.	Sex	Age	dFAT	Manner of death	Rabies vaccination	Primary clinical symptoms	IHC of brain	IHC of 5FSCs	Color of blood sinus
343	Female	0.33	Positive	Found Dead	Unknown	Restlessness	Positive	Positive	Black
RADDL3-15-554	Unknown	0.58	Positive	Found Dead	Unknown	Apprehensive, mad biting of inanimate objects, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive	Ocher
Z-15-167	Male	0.25	Positive	Found Dead	No	Inappetence, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Black
Z-15-80	Male	5	Positive	Found Dead	Unknown	Aimless running, apprehensive, lack of appetite, unprovoked aggressiveness, watchful look, weakness	Positive	Positive	Black
Z-15-53	Male	5	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive	Ocher
RADDL3-298	Male	4	Positive	Found Dead	Unknown	Inappetence, restlessness	Positive	Positive	Black
RADDL5-1	Female	2	Positive	Euthanasia	No	Aimless running, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Ocher
Z-15-19	Female	3	Positive	Found Dead	Unknown	Aimless running, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Black
Z-15-75	Female	9	Positive	Found Dead	No	Unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Black
RADDL3-205	Female	4	Positive	Euthanasia	Unknown	Unprovoked aggressiveness, drooling of saliva	Positive	Positive	Black
RADDL3-210	Unknown	0.25	Positive	Euthanasia	Unknown	Inappetence	Positive	Positive	Black
Z-15-61	Female	3	Positive	Found Dead	No	Mad biting of inanimate objects	Positive	Positive	Black
Z-15-34	Female	3	Negative	Found Dead	No	Convulsion, nasal/ocular discharge, seizure	Negative	Negative	Ocher
RADDL2-15-1	Unknown	Unknown	Positive	Euthanasia	Unknown	Unknown	Positive	Positive	Ocher
Z-15-164	Male	1.5	Positive	Found Dead	No	Unprovoked aggressiveness, weakness	Positive	Positive	Ocher
Z-15-99	Female	0.167	Negative	Found Dead	No	Weakness	Negative	Negative	Ocher
249	Female	4.8	Positive	Euthanasia	Unknown	Restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	White
350	Male	0.5	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, apprehensive, biting inanimate objects, restlessness, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive	Ocher
Z-15-14	Female	6	Negative	Found Dead	No	Diarrhea with blood, salivation	Negative	Negative	Ocher
RADDL3-219	Female	Unknown	Positive	Euthanasia	Unknown	Unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Black
RADDL3-212	Male	10	Positive	Euthanasia	No	Unknown	Positive	Positive	Ocher
Z-15-18	Unknown	0.25	Positive	Found Dead	Unknown	Apprehensive, watchful look	Positive	Positive	Ocher

No.	Sex	Age	dFAT	Manner of death	Rabies vaccination	Primary clinical symptoms	IHC of brain	IHC of 5FSCs	Color of blood sinus
802	Male	3	Positive	Found Dead	No	Eating inanimate objects, inappetence, lethargy, restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Black
LP-23	Female	2	Positive	Found Dead	Unknown	Inappetence	Positive	Positive	Black
754	Male	0.25	Positive	Found Dead	No	Barking	Positive	Positive	Ocher
Z-15-146	Male	1	Positive	Found Dead	No	Apprehensive, mad biting inanimate objects, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive	Black
866	Male	0.83	Positive	Found Dead	No	Unknown	Positive	Positive	Black
LP-77-15	Female	3	Positive	Found Dead	No	Mad biting of inanimate objects, restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	White
988	Female	0.58	Positive	Found Dead	Unknown	Convulsion, drooling of saliva, inappetence, lethargy, nasal/ocular discharge, restlessness, paralysis jaw and tongue, vomiting,	Positive	Positive	Black
RADDL4-15-707	Female	1.83	Positive	Found Dead	Unknown	Diarrhea, inappetence	Positive	Positive	Ocher
RADDL4-15-524	Male	2	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive	Ocher
880	Male	0.83	Positive	Euthanasia	No	Aimless running, restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Ocher
Z-15-154	Female	2.5	Negative	Euthanasia	Unknown	Unknown	Negative	Negative	Black
842	Unknown	0.92	Positive	Found Dead	No	Unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Ocher
844	Male	1.167	Positive	Found Dead	Yes	Lethargy, restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Black
Z-15-172	Female	0.33	Positive	Found Dead	Unknown	Apprehensive, lack of appetite, mad biting inanimate objects, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive	Black
RADDL4-15-704	Male	0.33	Positive	Found Dead	Unknown	Eating inanimate objects	Positive	Positive	Ocher
Z-15-194	Male	4	Negative	Euthanasia	Yes	Aimless running, apprehensive watchful look, diarrhea	Negative	Negative	Black
Z-15-190	Female	1	Positive	Found Dead	No	Unprovoked aggressiveness, weakness	Positive	Positive	Black
780	Unknown	0.5	Positive	Found Dead	No	Inappetence, lethargy	Positive	Positive	Black

No.	Sex	Age	dFAT	Manner of death	Rabies vaccination	Primary clinical symptoms	IHC of brain	IHC of 5FSCs	Color of blood sinus
701	Male	Unknown	Positive	Found Dead	Yes	Aimless running, apprehensive watchful look, drooling of saliva, eating inanimate objects, restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Black
728	Female	1	Positive	Found Dead	No	Inappetence	Positive	Positive	Ocher
Z-15-05	male	Unknown	Positive	Found Dead	No	Apprehensive, jaw and tongue paralysis, mad biting inanimate objects, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive	Ocher
938	Male	2	Positive	Found Dead	No	Aimless running, apprehensive watchful look, eating inanimate objects, drooling of saliva, inappetence, restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Black
Z-15-71	Unknown	Unknown	Positive	Euthanasia	Unknown	Unknown	Positive	Positive	Ocher
845	Male	0.17	Positive	Found Dead	Unknown	Diarrhea, inappetence, restlessness, vomiting	Positive	Positive	Ocher
1061	Male	2	Positive	Found Dead	No	Diarrhea	Positive	Positive	Black
RADDL3-16-413	Male	Unknown	Positive	Found Dead	Unknown	Drooling of saliva, mad biting of inanimate objects, unprovoked aggressiveness, vomiting, weakness	Positive	Positive	Ocher
Z-16-093	Male	1.33	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Ocher
RADDL3-16-454	Female	0.5	Positive	Found Dead	Unknown	Lack of appetite, weakness	Positive	Positive	Ocher
Z-16-092	Unknown	Unknown	Positive	Euthanasia	Unknown	Unknown	Positive	Positive	Ocher
RADDL3-16-441	Unknown	0.417	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive	Ocher
RADDL4-16-001	Female	0.417	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, drooling of saliva, paralysis	Positive	False negative	Black
RADDL3-16-627	Male	5	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive	Ocher
RADDL3-16-422	Male	0.5	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, restlessness	Positive	Positive	Black
RADDL3-16-789	Unknown	1	Positive	Euthanasia	Unknown	Mad biting of inanimate objects, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	White
Z-16-154	Female	0.833	Positive	Found Dead	Unknown	Vomiting, weakness	Positive	Positive	Ocher
Z-16-099	Male	2	Positive	Found Dead	Unknown	Lack of appetite, weakness	Positive	Positive	Ocher
Z-16-173	Unknown	Unknown	Positive	Euthanasia	Unknown	Unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Ocher

No.	Sex	Age	dFAT	Manner of death	Rabies vaccination	Primary clinical symptoms	IHC of brain	IHC of 5FSCs	Color of blood sinus
RADDL1-16-154	Male	1	Positive	Found Dead	Unknown	Lack of appetite	Positive	Positive	Ocher
RADDL1-16-166	Male	2.5	Positive	Found Dead	Unknown	Lack of appetite, mad biting of inanimate objects, restlessness, vomiting	Positive	Positive	Black
Z-16-129	Male	0.33	Positive	Found Dead	Unknown	Lack of appetite, weakness	Positive	Positive	White
RADDL1-16-175	Male	3	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, lack of appetite, mad biting of inanimate objects, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Ocher
RADDL3-16-866	Female	5	Positive	Found Dead	Unknown	Drooling of saliva, lack of appetite	Positive	Positive	White
RADDL1-16-211	Female	8	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, lack of appetite, restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Black
RADDL3-16-942	Female	0.333	Positive	Found Dead	Unknown	Aimless running, apprehensive, drooling of saliva, mad biting of inanimate objects, restlessness, unprovoked aggressiveness, watchful look	Positive	Positive	Ocher
RADDL3-16-987	Male	0.33	Positive	Found Dead	Unknown	Unknown	Positive	Positive	White
RADDL1-16-215	Female	2	Positive	Euthanasia	Unknown	Aimless running, apprehensive, restlessness, unprovoked aggressiveness, watchful look, weakness	Positive	Positive	Ocher
RADDL3-16-828	Male	1	Positive	Found Dead	Unknown	Aimless running, apprehensive, drooling of saliva, restlessness, watchful look	Positive	False negative	Ocher
RADDL1-16-208	Male	10	Positive	Euthanasia	Unknown	Lack of appetite, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Ocher
RADDL1-16-197	Female	1	Positive	Found Dead	Unknown	Drooling of saliva, lack of appetite, mad biting of inanimate objects, restlessness, unprovoked aggressiveness	Positive	Positive	Black

表2. 全10頭の洞毛3本、4本、5本におけるウイルス抗原陽性率

洞毛の本数	ウイルス抗原陽性頭数/検索頭数	ウイルス抗原陽性率 (%)
3本	8/10	80
4本	9/10	90
5本	10/10	100

表3. 全123頭の脳と洞毛5本におけるウイルス抗原検出の結果

n = 123	脳 陽性検体	脳 陰性検体
洞毛5本 陽性検体	107	0
洞毛5本 陰性検体	3	13

表4. 全123頭の洞毛5本におけるウイルス抗原検出の結果（括弧内は95%信頼区間）

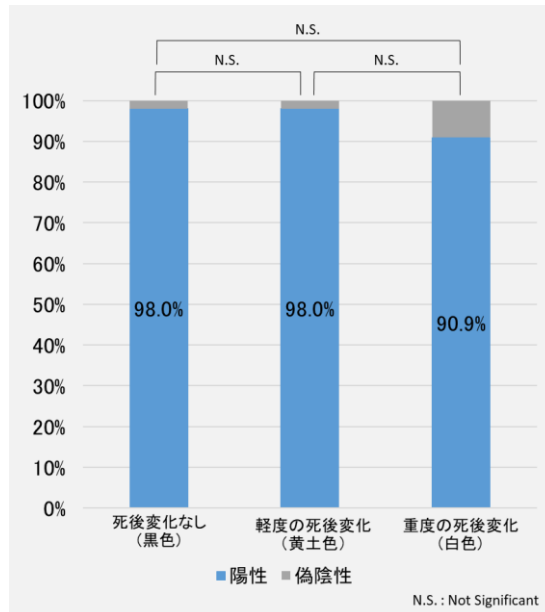
標本	感度	特異度	陽性的中率	陰性的中率	κ 係数
洞毛5本	97.3% (91.8–99.5)	100% (96.4–100.0)	100% (96.4–100.0)	81.3% (72.6–88.1)	0.88

死因	感度 ^{a)}	特異度	陽性的中率	陰性的中率	κ 係数
死亡例	97.5% ^x (92.3–99.6)	100% (96.4–100.0)	100% (96.4–100.0)	83.3% (75.1–90.3)	0.9
安楽殺例	96.7% ^x (91.2–99.2)	100% (96.4–100.0)	100% (96.4–100.0)	75.0% (65.6–82.9)	0.84

表 5. 死亡例・安楽殺例別の洞毛 5 本におけるウイルス抗原検出の結果（括弧内は 95 % 信頼区間）

a) 異なる文字 (xy) の場合、統計学的に有意差あり（両側 z 検定）（ $P < 0.05$ ）

図 1. 洞毛の死後変化の程度とウイルス抗原陽性率の関係



第Ⅲ章 イヌ以外の狂犬病発症動物における鼻口部洞毛組織の 死後診断材料としての有用性

緒言

狂犬病は南極を除くすべての大陸で発生する。また、コウモリを含むイヌ以外の哺乳動物においても多数報告されている[80]。

近年中国と韓国のタヌキ[69]、台湾と中国のイタチアナグマ[32,81]、モンゴルのオオカミ[7,56]など野生動物における狂犬病ウイルスの流行がヒトの狂犬病の新たな懸念材料になっている。また、フィリピンなどイヌの狂犬病流行国では、ネコによるヒトへの暴露も多数報告されている[17,60,81]。

さらに、欧州諸国ではキツネとタヌキ、米州ではアライグマ、スカンク、キツネおよびコウモリにおいて狂犬病の流行が維持されている[60,81]。これら野生動物とヒトとの接触頻度は高くないが、種の中で狂犬病の流行が常に維持されているため、ヒトへの感染リスクが危惧されている[60,81]。アメリカ大陸では、特にコウモリがヒトや家畜への感染源として問題となっている[81]。北米では、狂犬病ウイルスに感染したコウモリの咬傷による犠牲者が増加傾向にある[36]。ラテンアメリカには300種以上のコウモリが生息しており、このうち約20%の種が狂犬病ウイルスに暴露されていることが明らかになっている[20]。コウモリは、イヌなどの食肉目で流行している狂犬病ウイルス（*Rabies lyssavirus*、以下 RABV）以外の様々なリッサウイルスも保有している[81]。ヒトへの感染事例は RABV に比べ極めて少ないが、コウモリ由来のリッサウイルスによる感染、発症事例も報告されている[81]。このことから、野生動物における狂犬病ウイルスの感染状況と発

生状況をサーベイランスすることはヒトへの狂犬病ウイルスの暴露を未然に防ぐために重要である。

洞毛はヒト以外の多くの哺乳動物が持つ特殊な感覚受容器である[2,5]。第I章では、狂犬病発症犬において、洞毛のメルケル細胞にウイルス抗原、ウイルスゲノム、ウイルス粒子が存在することが判明し、脳に代わる死後診断材料として極めて有用であることを報告した。しかし、イヌ以外の動物の洞毛にウイルス抗原、ウイルスゲノムおよびウイルス粒子が存在するかどうかについてはわかっていない。そこで、本章ではイヌ以外の哺乳動物の洞毛がイヌと同様に狂犬病の死後診断材料として有用であるかどうかについて精査した。

材料方法

1. 供試動物(表 1)

供試動物はオオカミ(*Canis lupus*)1頭、アカギツネ(*Vulpes vulpes*)1頭、ネコ(*Felis catus*)2頭、オヒキコウモリ(*Tadarida brasiliensis*)2頭の計4種類、計6頭である。2016年から2019年までの間に、オオカミとアカギツネはモンゴル、ネコはフィリピン、オヒキコウモリはアルゼンチンにて狂犬病発症疑いで捕獲または死後回収された。脳あるいは唾液腺を用いた狂犬病検査法により、全頭で狂犬病陽性と診断された。本研究室には鼻口部皮膚の10%緩衝ホルマリン固定材料が送付された。

オオカミは、モンゴル国立公園内に生息する野生動物である。供試オオカミは観光客に攻撃行動を示したため、レンジャーにより安楽殺された。アカギツネもモンゴルの野生動物あり、死亡した状態で発見された。

ネコ2頭は、飼育動物である。このうち1頭は、情動不安や攻撃行動などの臨床症状を示したため、安楽殺処置後フィリピンのRITMに搬入された。残りの1頭については詳細な臨床情報が入手できなかった。

オヒキコウモリ2頭は、アルゼンチンの野生動物であり、見当識障害などの臨床症状を示したため、安楽殺処置後研究機関に搬入された。

それぞれの供試動物の概要は表1に示した。

2. 病理組織化学的検索

10%緩衝ホルマリン固定の鼻口部皮膚を検索材料として病理

検索を実施した。鼻口部皮膚に分布する洞毛に対して、環状洞の高さで水平断面を作製した[71]。その後、組織片を上昇アルコール系列で脱水、クリアプラス透徹後、パラフィン包埋した。6頭全ての供試動物に対して、包埋ブロックより 3 μ m の厚さで切片を作製し、定法によるヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)および免疫組織化学的検索に供した。

3. 免疫組織化学的検索 (Immunohistochemistry、以下 IHC)

a) 抗狂犬病ウイルス P タンパク質抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原の検出

ウイルス抗原陽性細胞を同定するため、ウサギ抗狂犬病ウイルス P タンパク質 (Rabies Phosphoprotein、以下 P) 抗体を用いた[73]。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、0.25%トリプシンで抗原を賦活化し、0.3%過酸化水素加メタノール(室温、60分)で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、非特異反応を抑制するため10%正常ヤギ血清でブロッキングを行った。一次抗体として1,200倍に希釈した抗P抗体を、4℃で一晩反応させた。PBS洗浄後、Histofine® Simple Stain MAX-PO(R)(Nichirei Bioscience)を室温で30分反応させた後、Simple Stain DAB溶液(Nichirei Bioscience)で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。

4. 間接蛍光抗体法

間接蛍光抗体法により作製した蛍光二重染色標本を蛍光顕微鏡(Nikon, Intensilight, C-HGFI)で観察した。

a) 抗 P 抗体と抗 CAM 5.2 抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原とメルケル細胞の検出

蛍光二重染色はアカギツネ、オオカミおよびネコの洞毛で実施した。洞毛でウイルス抗原陽性細胞を同定するために抗 P 抗体、メルケル細胞を同時に同定するため抗 Cytokeratin CAM 5.2 抗体 (CAM5.2, Becton-Dickinson, CA, USA) を組み合わせた蛍光二重染色を行った。抗 P 抗体の二次抗体として FITC conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(Southern Biotechnology Associates, Inc., AL, USA) を使用し、抗 CAM 5.2 抗体の二次抗体として Alexa Fluor® 546 Goat Anti-Mouse IgG (H+L)(Thermo Fisher, MA, USA) を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、Proteinase K, pH7.5 (Dako, Kyoto, Japan) を用いて抗原を賦活化し(室温、15 分)、一次抗体として抗 P 抗体(1,000 倍希釈)と抗 CAM 5.2 抗体を 4℃で一晩反応させた。PBS 洗浄後、二次抗体として FITC conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(200 倍希釈) と Alexa Fluor® 546 Goat Anti-Mouse IgG (200 倍希釈) を室温で 30 分反応させた。ProLong® Gold 褪色防止用封入剤(DAPI 含有)(Molecular Probes, OR, USA) で封入し観察した。

5. *in situ* ハイブリダイゼーション (*in situ* hybridization、以下 ISH) 法を用いたウイルスゲノムの検出

狂犬病ウイルス N タンパク質 (Rabies Nucleoprotein) の mRNA(以下、狂犬病ウイルス NmRNA) の局在を観察するため、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた ISH 法を実行した。

ISH 法は、脱パラフィン後、RNAscope® 2.5 HD reagent

kit-RED (Advanced Cell Diagnostics, CA, USA)を用いてキットメーカーの指示に従い実施した [78]。プローブは RNAscope® probe-V-RABV-gp1 (NC 001542.1, region 59-1482) (ACD#456781) を使用した。最後に、ヘマトキシリンで対比染色を施し、EcoMount (Biocare Medical, CA, USA)を用いて封入し観察を行った。

6. 超微形態学的検索

超微形態学的検索はオオカミとネコの洞毛で実施した。洞毛のメルケル細胞領域を確実に観察するため、パラフィン包埋材料から実体顕微鏡で ring-wulst が確認できる洞毛をメスで切り取り、以下の電子顕微鏡用試料の作製を行った。

インキュベート (60°C、30 分間) とキシレン浸漬 (室温、90 分間) による脱パラフィンの後、下降アルコール系列で再水和し、0.2M リン酸緩衝液 (室温、12 時間) によりエタノールを除去した。1% オスミウム酸で固定後、これらの試料を定法に従い脱水、透徹、エポキシ樹脂包埋した電子顕微鏡用試料から、厚さ 70nm の超薄切切片を作製した。超薄切切片を酢酸ウラニル・佐藤の鉛で重染色した後、透過型電子顕微鏡 (H-7650, Hitachi, Tokyo, Japan) で観察した。

結果(表 2)

本章の結果の概要は表 2 に示す。

1. 病理組織化学的所見(Figs.1,3,5,7)

全ての動物種において、イヌと同様の鼻口部皮膚における洞毛の存在が確認された。洞毛の毛軸の最外層に細胞質が淡明で空胞を持つメルケル細胞領域が観察された(Figs.1,3,5,7)。アカギツネの洞毛は、組織間に裂隙や細胞の核濃縮など死後の変化が観察された。全ての動物種の洞毛に組織学的変化は認められなかった。また、全 6 頭の洞毛にネグリ小体は観察されなかった。

2. 免疫組織化学的所見

a) 抗 P 抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原の検出(Figs.2,4,6,8)

全 6 頭において、ウイルス抗原はこれまでの報告と同様に[8,71]、洞毛の毛軸最外層のメルケル細胞および毛軸周囲の末梢神経から検出された(Figs.2,4,6,8)。

3. 蛍光抗体法によるウイルス抗原およびメルケル細胞の検出

a) 抗 P 抗体と抗 CAM 5.2 抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原とメルケル細胞の検出(Figs.9-11)

蛍光二重染色はアカギツネ、オオカミ、およびネコで実施した。洞毛の毛軸最外層において分布する抗 CAM5.2 抗体陽性のメルケル細胞が観察された。また、同領域に抗 P 抗体陽性細胞も散在性に認められ、ウイルス抗原の局在はメルケル細胞と概ね一致していた(Figs.9-11)。メルケル細胞の細胞質内における抗 P 抗体陽性像は、細胞質全域に均一な蛍光を示した。ネコにおいて、抗

CAM5.2 抗体陽性を示すメルケル細胞の細胞質内に顆粒状の抗 P 抗体陽性像が観察された(Fig.11)。

4. ISH 法を用いたウイルスゲノムの検出(Figs.12-16)

全 6 頭の ISH 法による狂犬病ウイルス NmRNA の発現は、洞毛のメルケル細胞の細胞質内に認められた(Figs.12-16)。その他、洞毛の毛軸周囲の末梢神経軸索からもウイルス NmRNA の発現が認められた(Fig.13)。

5. 超微形態学的所見(Figs.17-21)

メルケル細胞は外根鞘の深さに位置する基底層に観察され、薄い硝子膜に包まれていた。メルケル細胞は陥入核を有し、細胞質に大小様々な空胞や、微細なフィラメント、ミトコンドリア、粗面小胞体および遊離リボソームが観察された(Figs.17,20)。

また、メルケル細胞の粗面小胞体、神経終末、およびマトリクスにおいてウイルス粒子（長さ約 200 nm、幅 70 nm）が観察された(Figs.18,21)。一部のメルケル細胞の細胞質マトリクス内には、多様な形態を示すウイルス関連構造も確認された(Fig.19)。これらの構造は、長さ 500-1,000 nm、幅 100-200 nm と大小様々であり、電子密度は高く、楕円形から糸状ないし筒状の形状を示し、核周囲に分布する傾向にあった。これらの所見はオオカミとネコにおいて共通していた。

考察

狂犬病は、特定の動物種に順化したリッサウイルスによってそれぞれの動物種と生息地域で流行が維持されている[80]。今回著者は、イヌ以外の哺乳動物の洞毛が狂犬病死後診断材料として有用かどうかを明らかにするために、狂犬病を発症したオオカミ・アカギツネ・ネコ・オヒキコウモリの洞毛におけるウイルス抗原、ウイルスゲノムおよびウイルス粒子の局在を精査した。

抗 P 抗体を用いて実施した IHC 法では、全ての動物種において洞毛の環状洞の深さに位置する外根鞘の基底層に限局した明瞭なウイルス抗原陽性像が観察された。また、蛍光二重染色により抗 P 抗体陽性細胞はメルケル細胞マーカーである抗 CAM5.2 抗体に共陽性を示した。さらに、ISH 法によりメルケル細胞領域に狂犬病ウイルス NmRNA の発現が観察された。加えて、超微形態学的検索によりメルケル細胞の細胞質にウイルス粒子とウイルス関連構造が確認された。これらの結果から、イヌ以外の哺乳動物においても洞毛のメルケル細胞が狂犬病ウイルス感染と複製の標的になっていることが考えられた。この結果は、以前の当研究室での報告[8,71]と第 I 章で報告したイヌの結果とも共通する。ゆえに、イヌだけでなく、狂犬病ウイルスの媒介動物となりえる世界各地の様々な哺乳動物においても洞毛を用いた死後診断法は有用であると考えられる。しかし、今回は、動物種および検索頭数が少なかったため、今後も様々な哺乳動物の洞毛を用いた研究成績の蓄積が必要であると思われる。

狂犬病ウイルスは罹患動物の CNS や唾液腺において多数確認されている[16,22,23,46,48,53]。しかし、罹患動物の皮膚（表皮）

における病理変化やウイルスの存在有無についてはほとんど分かっていない。本章では、オオカミとネコについて超微形態学的検索を実施し、第 I 章で検索したイヌと同様にメルケル細胞の細胞質に多数のウイルス粒子やウイルス関連構造が存在することが初めて判明した。ウイルス関連構造は、狂犬病ウイルスの実験感染例 [34,47,70] やサルのポックスウイルス感染例 [27] において報告されているが、これら構造物の形成機序と存在意義については未だ不明であるため、さらなる精査が必要であると考えられる。

日本国内でのイヌやヒトの狂犬病感染は、1956 年以降報告されていない。しかし、1970 年にネパール [85]、2006 年にフィリピン [76] で感染し、帰国後に発症し死亡したヒトの輸入事例が報告されている。また、近年アジアにおいて、イヌの狂犬病だけでなく野生動物に狂犬病ウイルスの流行が報告されている。台湾では 2013 年のイタチアナグマ [32]、2016 年に在来のコウモリから新種のリッサウイルス (Taiwan bat lyssavirus) が分離され [31]、東アジアのコウモリにリッサウイルスが潜んでいることが判明している。清浄国である日本において、野生動物の狂犬病の再流行やリッサウイルス感染の侵淫は脅威であり、狂犬病の予防対策と発生時を想定した対応策の強化が重要である。狂犬病の効果的な制御および排除は、効果的なサーベイランスを必要とする [81]。

本研究の結果、イヌ以外の哺乳動物においても洞毛に分布するメルケル細胞が狂犬病ウイルスの標的細胞になっていることが判明し、同細胞からウイルス抗原が高率に検出されることから、洞毛組織が伴侶動物以外の野生動物のサーベイランスや死後診断材料として有用であることが示唆された。

小括

ヒトを含むすべての哺乳動物が狂犬病を発症する。洞毛はヒト以外の哺乳動物が持つ特殊な感覚受容器である。今回著者は、イヌ以外の哺乳動物の洞毛が狂犬病の死後診断材料として有用であるのかを明らかにするため、様々な狂犬病発症動物の洞毛におけるウイルス抗原、ウイルスゲノム、ウイルス粒子の局在について精査した。

狂犬病ウイルス陽性のオオカミ、アカギツネ、ネコ、オヒキコウモリにおいて、イヌ同様に鼻口部に洞毛の存在が確認された。また、死亡例、安楽殺例を含め全ての動物種でメルケル細胞の細胞質に狂犬病ウイルス抗原、ウイルス NmRNA、ウイルス粒子およびウイルス関連構造が局在していることが判明した。

以上の結果から、イヌと同様にオオカミ、アカギツネ、ネコ、オヒキコウモリの洞毛のメルケル細胞が狂犬病ウイルスの感染と複製の標的になっていることが考えられた。洞毛は脳と比較して材料採取が容易であるため、野外で死亡した様々な狂犬病発症動物の新規診断材料として期待される。しかし、今回は4種6頭に過ぎなかったため、今後も継続した検体数と様々な動物種の蓄積が必要であると考えられる。

狂犬病の制御および排除のためには、効果的なサーベイランスが必要である。今後、洞毛を利用した狂犬病の新規診断法の開発が野生動物のサーベイランスに大いに貢献できると期待される。

表、付図および付図説明

表 1. 供試動物の概要

Animal species	Scientific name	Numbers	Animal status	Manner of death	Countries	Clinical symptoms
Wolf	<i>Canis lupus</i>	1	Wild animal	Euthanasia	Mongolia	Attacking to tourists when they try to observe wild horse (takhi) in Mongolian National park.
Red fox	<i>Vulpes vulpes</i>	1	Wild animal	Found dead	Mongolia	Unknown because of found dead
Cat	<i>Felis catus</i>	2	Companion animals	Euthanasia/unknown	Philippines	Restlessness, unprovoked aggressiveness
Bat	<i>Tadarida brasiliensis</i>	2	Wild animals	Euthanasia/euthanasia	Argentina	Disorientation disorder

表 2. 結果の概要

検索方法	各種抗体	観察項目	Wolf	Red Fox	Cat	Bat
IHC	anti-P	ウイルス抗原	+	+	+	+
蛍光二重染色	anti-P & CAM5.2	メルケル細胞におけるウイルス抗原陽性像	+	+	+	検索できず
ISH法		ウイルスNmRNA	+	+	+	+
超微形態学的検索		ウイルス粒子	+	検索できず	+	検索できず
		ウイルス関連構造	+	検索できず	+	検索できず

第IV章 街上毒感染実験マウスを用いた狂犬病ウイルスの鼻口 部洞毛組織への感染経路・感染時期の特定

緒言

狂犬病ウイルスは咬傷部位の末梢神経に侵入した後、軸索を求心性に上行し、中枢神経系 (Central Nervous System、以下 CNS) で増殖した後、再び遠心性に末梢神経を介して全身諸臓器に移動する [26,61]。皮膚においても狂犬病ウイルス抗原が検出されることが報告されている [4,5,24,74]。第I章および第III章の研究成績から、狂犬病自然発症動物の洞毛に分布するメルケル細胞において明瞭なウイルス抗原、ウイルスゲノムおよびウイルス粒子が観察された。しかし、末梢組織に感染したウイルスがどの経路を辿り、いつ洞毛のメルケル細胞に到達するのかについては明らかになっていない。そこで、今回著者は、狂犬病ウイルスの洞毛メルケル細胞への感染経路・感染時期について明らかにするため、発光酵素 (Red firefly luciferase) 発現組換え狂犬病街上毒ウイルス 1088 株 (1088/RFLuc 株) をマウスの後肢筋肉内に接種し、CNS から洞毛に至るまでの感染経路について精査した。

材料方法(表 1)

本章の実験概要を表 1 に示す。

1. ウイルス、動物、接種経路(図 1)

狂犬病街上毒ウイルス 1088 株は、1970 年代に北米ウッドチャックから分離されたウイルスである [51,84]。この 1088 株から Red firefly luciferase(RFLuc)を発現する組換え街上毒ウイルス (1088/RFLuc 株)を作製した(図 1)[35,83]。RFLuc の発現カセットは、組換えウイルスゲノムの領域である G と L 遺伝子間の偽遺伝子に挿入した。なお、この外来遺伝子の挿入によるウイルス複製や病原性に対する影響はないと報告されている [13,50]。

このウイルス液を 6 週齢、雌のヌードマウス (BALB/c SIC-*nu/nu*, Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan)の右大腿部に 5×10⁵ の 5 乗 FFU ずつ筋肉内接種した。全ての実験は大分大学の実験動物ガイドラインに従って P3 施設で行われた。

2. *in vivo* 生物発光イメージング検索

1088/RFLuc 株接種群および非接種群 (陰性コントロール群)をそれぞれ接種 3、5、7、8、9、11 日後 (接種群の 8、9 日は同一群) に、陰性コントロール群は接種 3 日と 11 日後にイメージング撮影を行った。

in vivo イメージングシステムには、照明システム、電子増倍式電荷結合素子カメラおよび蛍光用バンドパスフィルターを装備した Lumazone イメージングシステム (Nippon Roper, Tokyo, Japan)を使用した [83]。生物発光イメージングは、ヌードマウスに D-ルシフェリンカリウム塩 (Wako Pure Chemical Industries,

Osaka, Japan)を腹腔内投与し、基質を投与した 15 分後に吸入麻酔下(2% イソフルラン)で撮影した。イメージング画像は、ImageJ software を用いて、画像のシグナルの強度に合わせて疑似カラー表示を行った[67]。

3. 解剖および病理組織化学的検索

1088/RFLuc 株接種群および陰性コントロール群をそれぞれ接種 3、5、7、9、11 日後(1088/RFLuc 株接種群は接種 3、5、7、9 日目に 8 匹ずつ、接種 11 日後に 7 匹、非接種群は実験最終日である 11 日目に 8 匹)に病理解剖した。また、接種後の臨床症状と体重変化について毎日記録した。

病理解剖は 3%イソフルランを用いて深麻酔後、心採血を行った後に実施した。脳および全身諸臓器を 10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬固定し、脳と頭蓋を中心に切り出した。脳は前頭葉、頭頂葉、小脳を含む脳幹で切り出した。頭蓋は、鼻口部洞毛と三叉神経節を含む各面で前頭断した。

1088/RFLuc 株接種群のうち、接種 3、5、7 日後の各 4 匹、計 12 匹の脳は「5. 凍結浮遊切片を用いた免疫組織化学的検索」に用いた。そのほかの組織片は、上昇アルコール系列で脱水、クリアプラスで透徹後、ホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin fixed paraffin embedded、以下 FFPE) 切片を作製した。包埋ブロックより 3µm の厚さで切片を作製し、定法によるヘマトキシリン・エオジン染色 (以下 HE 染色) および免疫組織化学的検索に供した。

4. FFPE 切片を用いた免疫組織化学的検索

a) 抗狂犬病ウイルス P タンパク質抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原の検出

ウイルス抗原陽性細胞を同定するため、ウサギ抗狂犬病ウイルス P タンパク質 (Rabies Phosphoprotein、以下 P) 抗体を用いた [73]。FFPE 切片を脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、0.25%トリプシンで抗原を賦活化し、0.3%過酸化水素加メタノール (室温、60 分) で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、非特異反応を抑制するため 10%正常ヤギ血清 (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) でブロッキングを行った。一次抗体として 1,200 倍に希釈した抗 P 抗体を、4°C で一晚反応させた。PBS 洗浄後、Histofine® Simple Stain MAX-PO(R) (Nichirei Biosciences) を室温で 30 分反応させた後、Simple Stain DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。

5. 凍結浮遊切片を用いた免疫組織化学的検索

脳におけるウイルス抗原の局在を詳細に調べるため、1088/RFLuc 株接種群のうち、接種 3、5、7 日後の各 4 匹、計 12 匹の脳は凍結標本を作製後、抗 P 抗体を用いて狂犬病ウイルス抗原の検出を行った。

a) 凍結浮遊切片の作製

0.02%アジ化ナトリウム添加 30%スクロースで置換した脳は、ミクロトームを用いて冠状面で 40 μ m の厚さで連続凍結浮遊切片

を作製した。全層にわたり薄切した脳の連続浮遊切片は、10区画に分け回収した。つまり、400 μ m ほどの脳断面を全層にわたり観察した。このうち1区画を、ゼラチンコーティングしたスライドガラスに貼付け、定法によるニッスル染色を実施した[75]。また、別の1区画は以下の抗P抗体を用いた免疫染色に使用した。

b) 抗P抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原の検出

浮遊切片を用いてウイルス抗原陽性細胞を同定するため、抗P抗体を使用した Avidin-biotinylated peroxidase complex(ABC)法を実施した。脳の連続浮遊切片のうち1区画が以下の免疫染色に使用された。

0.3%過酸化水素加メタノール(室温、30分)で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、非特異反応を抑制するため1%スキムミルク(Wako, Osaka, Japan)(室温、60分)でブロッキングを行った。その後、2%正常ロバ血清および0.1% Triton X-100を含む0.1M PBSの抗P抗体(10,000倍希釈)を、2 $^{\circ}$ Cで2日間反応させた。PBS洗浄後、ビオチン化ロバ抗ウサギIgG抗体(1,000倍希釈)(Jackson Laboratories, ME, USA)を室温で120分反応させた後、ABC Elite kit(200倍希釈)(Vector laboratories, CA, USA)を室温で90分反応させた。その後、0.04% DAB(Wako)、0.04% NiCl₂、0.002% H₂O₂を含む0.05M Tris-HClバッファー(pH7.6)で切片を反応させ、抗原を可視化した。この切片をスライドガラスに貼付け、0.5%ニュートラルレッドで対比染色を施した[75]。

結果

1. 臨床症状と体重変化(図 2-3)

接種 11 日後に神経症状を呈するマウスが 2 匹認められた。主な症状は両後肢の引きずりであった。

体重は、陰性コントロール群に比べて 1088/RFLuc 株接種群において経日的に低下した(図 2)。体重は陰性コントロール群に比べて、接種 11 日後の群において有意に低下した($P<0.05$)(図 3)。

2. *in vivo* 生物発光イメージング所見(Figs.1-2) (表 2)

接種 3 日後のマウスにおいて、接種部位である右後肢から微弱な生物発光シグナル(シグナル)が観察され始めた。接種 5 日後、マウスの右後肢から低度シグナルが認められ、同一マウスの腰髄領域でも低度から中等度のシグナルが観察された。接種 7 日後では、脳からスポット状、あるいは全域に低度のシグナルが観察された。また、1 匹の鼻口部から低度のシグナルが認められた。接種 8 日後では、全匹の脊髄に低度から高度のシグナルが認められた。脳では、8 匹中 6 匹においてシグナルが検出された。接種 9 日後では、全匹の脳と鼻口部で中等度から高度のシグナルが観察された。接種 9 日後から 11 日後には、脳を含めた頭蓋組織と脊髄のシグナルが時間経過とともに強くなり、同時に右後肢や足蹠などの末梢組織にもシグナルの分布が広がっていた。なお、陰性コントロールにおいてシグナルは観察されなかった。

シグナルが認められた検体の割合は表 2 に示した。

3. 病理組織学的所見(Figs.3-6)

HE染色による組織病変の観察は、脳と頭蓋を中心に実施した。接種3、5、7日後では特記すべき病理所見は認められなかった。接種9、11日後では、小脳脚、大脳皮質および頭蓋の三叉神経節において好酸性均一な細胞質や空胞化を呈する神経細胞と神経節細胞が時折観察された(Figs.3-5)。全接種群において、洞毛に特記すべき病理所見は認められなかった(Fig.6)。

4. FFPE切片および凍結浮遊切片を用いた免疫組織化学的所見

a) 抗P抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原の検出(Figs.7-18)

(表3)

脳、三叉神経節、洞毛に明瞭なウイルス抗原陽性像が観察された。接種5日後では、脳幹網様体核、小脳のプルキンエ細胞、中脳赤核および左側の大脳皮質の錐体細胞にウイルス抗原陽性像が観察された(Figs.7-12)。接種7日後では、橋の三叉神経核、左側あるいは両側視床の後内側腹側核、両側大脳皮質錐体細胞および三叉神経節にウイルス抗原陽性像が観察された(Figs.13-15)。接種9日後から11日後では、両側の脳全域にウイルス抗原陽性細胞が顕著に増加した(Fig.16)。接種9日後では、洞毛のメルケル細胞領域にウイルス抗原陽性像が散見され、接種11日後ではその数が顕著に増加した(Figs.17-18)。

ウイルス抗原のみられた検体の割合は表3に示した。

考察

街上毒 1088 株は、1970 年代にアメリカの疾病予防管理センターで分離されたウイルス株であり、進化系統樹の解析では北米スカンクに由来することが分かっている [51,84]。1088 株はマウスへの神経親和性が強く [30,84]、感染後期には末梢組織においてもウイルス抗原陽性像が認められる [40]。したがって、1088 株は狂犬病の病理発生機序や洞毛組織への移動経路や感染時期を解明するために有用な実験モデルと言える。今回著者は、狂犬病ウイルスの洞毛への感染経路および感染時期を明らかにするため、発光酵素発現組換え街上毒ウイルス 1088 株を作製し、ヌードマウスの筋肉内に接種した。また、感染マウスの個体を用いて発光酵素の発現時期と、脳、三叉神経節および洞毛組織におけるウイルス抗原の局在について精査した。一般的に洞毛の知覚神経終末で受容される刺激は、三叉神経節を経て、三叉神経核、視床の後内側腹側核および大脳皮質体性感覚野へ投射される [18,21,43,44]。洞毛に分布する知覚神経は、三叉神経の最大の分枝である上顎神経の延長部にある眼窩下神経である [18,21]。さらに、眼窩下神経は毛根底部から結合織性の被膜を貫いて、毛包内に入り、分岐を繰り返しながら毛軸に沿って上向き、メルケル神経終末を形成する [33,45]。本章の *in vivo* 生物発光イメージングでは、接種 3 日後から 7 日後にかけて右後肢から脊髄、脳にシグナルが観察された。免疫染色では接種 5 日後に視床を除く脳内にウイルス抗原が認められた。接種 8 日後から 11 日後では、脳および頭部末梢組織の広範囲に *in vivo* 生物発光シグナルが観察された。免疫染色では、接種 7 日後に視床、三叉神経節、接種 9、11 日後には洞毛にウイ

ルス抗原が観察された。これらの結果は、洞毛の知覚神経路および知覚神経終末の分布と一致する。また、過去に 1088 株を用いたマウスの筋肉内接種では、感染初期に接種部位の右後肢の筋肉で増殖したウイルスが運動神経路を利用して大脳皮質に到達するが、その後知覚神経を利用した大脳皮質への感染経路が存在することが報告 [39] されている。このことから、今回の実験では狂犬病ウイルスが右後肢から体内に侵入し、運動神経を逆行性あるいは知覚神経を順行性に上行し、CNS に到達・増殖した後、三叉神経核から三叉神経節に下降し、上顎神経および眼窩下神経を利用して洞毛メルケル細胞に到達した可能性が強く示唆された。

Blenden らは、街上毒狂犬病ウイルスをマウスに接種し、毛包組織におけるウイルス抗原の検出時期について調べている。その結果、感染初期（臨床徴候が現れる 4 日前）に毛包から狂犬病ウイルス抗原が検出されることを報告している。また、臨床症状の出現後死に至った検体の洞毛組織におけるウイルス抗原陽性率が 100% であったと報告している [5]。第 1 章において、狂犬病発症犬の安楽殺例・死亡例に関わらず洞毛のメルケル細胞にウイルス抗原陽性像が観察された。本章では、ウイルス接種 9 日後から洞毛メルケル細胞にウイルス抗原陽性像が観察され始め、臨床症状の観察された接種 11 日後では全匹が抗原陽性を示した。これらは、マウスにおいては少なくとも感染後期には洞毛組織にウイルスが到達していることを示唆する。しかし、イヌを用いた街上毒ウイルスの接種実験は少ない [24] ため、ウイルスの体内動態および洞毛組織への侵入時期などについては不明なままである。

本章において、脳と洞毛メルケル細胞におけるウイルス抗原陽

性細胞の検出時期が異なっていた。すなわち、脳ではウイルス接種 5 日後にウイルス抗原陽性像が観察されたのに対し、洞毛メルケル細胞では接種 9 日後に検出された。この 4 日間の違いが何故生じたかについては不明であるが、実験的研究によれば狂犬病ウイルスは 1 日およそ 1 cm ずつ軸索移動することが分かっている [77]。したがって、脳に到達したウイルスが洞毛組織へ侵入するまでの移動距離と、その後のウイルスタンパク合成に日数がかかったため、洞毛におけるウイルス抗原の発現時期が遅れたと解釈された。

以上、本章のマウスの感染実験により、狂犬病ウイルスが運動神経を逆行性あるいは知覚神経を順行性に上行し、大脳皮質、三叉神経核、三叉神経節および三叉神経を介し、感染後期に洞毛のメルケル細胞に到達することが初めて判明した。しかし、自然発症犬における洞毛メルケル細胞へのウイルスの感染時期については検討しておらず、今後、フィリピンなど狂犬病流行国におけるイヌの感染実験モデルを用いた研究成果が待たれる。

小括

狂犬病ウイルスは咬傷部位の末梢神経に侵入した後、軸索を求心性に上行し CNS に到達する。CNS で急速に増殖後、再び遠心性に末梢神経を利用して全身諸臓器に移動する。

今回著者は、発光酵素発現組換え狂犬病街上毒ウイルス 1088 株を接種したヌードマウスを用いて、ウイルスの洞毛への感染経路・感染時期について精査した。

その結果、ウイルスは末梢組織（右後肢）から侵入し、運動神経を逆行性あるいは知覚神経を順行性に上行し、接種 5 日後に脳に到達・増殖した後、三叉神経核、三叉神経節、三叉神経、上顎神経、眼窩下神経を介して、感染後期の接種 9 日後から 11 日後に洞毛のメルケル細胞に達することが判明した。

以上の結果より、ヌードマウスにおける街上毒ウイルス感染経路と洞毛へのウイルス感染時期が明らかになった。洞毛におけるウイルス抗原の発現時期は脳に比べて遅れるものの、感染後期には 100% の個体でウイルス抗原が観察された。今後は、イヌを用いた街上毒ウイルスの接種実験により、洞毛へのウイルスの感染経路・感染時期をより正確に把握する必要があると考える。

表、付図および付図説明

表 1. 本章の実験概要

接種後の日数	3DPI	5DPI	7DPI	8DPI	9DPI	11DPI
	in vivo イメージング 諸臓器サンプリング	in vivo イメージング 諸臓器サンプリング	in vivo イメージング 諸臓器サンプリング	8DPI: in vivo イメージング 9DPI: in vivo イメージング 諸臓器サンプリング		in vivo イメージング 諸臓器サンプリング
マウスの総数	8	8	8	8		7
FFPE (脳) 切片のIHCを 実施したマウスの数	4	4	4	8		7
凍結切片 (脳) のIHCを 実施したマウスの数	4	4	4	0		0
FFPE (頭蓋) のIHCを 実施したマウスの数	8	8	8	8		7

DPI: days post-inoculation

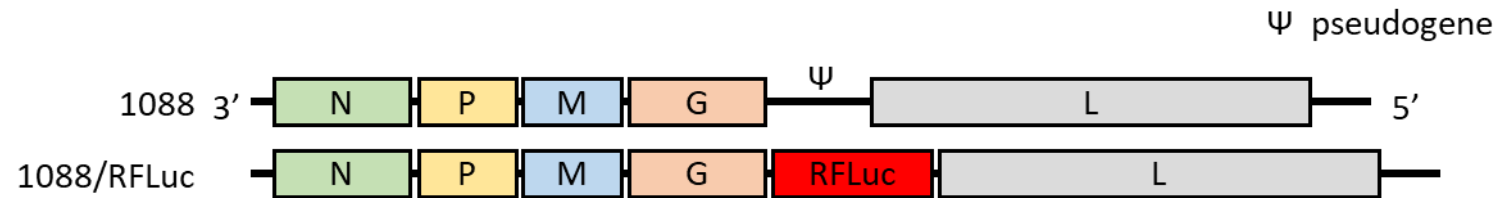
表 2. シグナルが認められた検体の割合

Days	右後肢	脊髄	脳	鼻口部
3DPI (n=8)	75%	0%	0%	0%
5DPI (n=8)	75%	75%	0%	0%
7DPI (n=8)	63%	88%	38%	13%
8DPI (n=8)	75%	100%	75%	13%
9DPI (n=8)	100%	100%	100%	100%
11DPI (n=7)	100%	100%	100%	100%

表 3. ウイルス抗原がみられた検体の割合

Days	延髄・橋	小脳	中脳	視床	大脳皮質	三叉神経節	洞毛
3DPI (n=8)	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
5DPI (n=8)	50%	12.5%	37.5%	0%	50%	0%	0%
7DPI (n=8)	100%	50%	87.5%	100%	87.5%	62.5%	0%
9DPI (n=8)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	38%
11DPI (n=7)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

図 1. 本実験に使用した組換え狂犬病ウイルス（1088/RFLuc 株）のゲノム構造の模式図



1088: 狂犬病街上毒ウイルス 1088 株

1088/RFLuc: Red firefly luciferase(RFLuc)を発現する組換え狂犬病街上毒ウイルス 1088 株

N: nucleoprotein gene, P: phosphoprotein gene, M: matrix protein gene,
G: glycoprotein gene, L: large protein gene

図 2. 体重変化

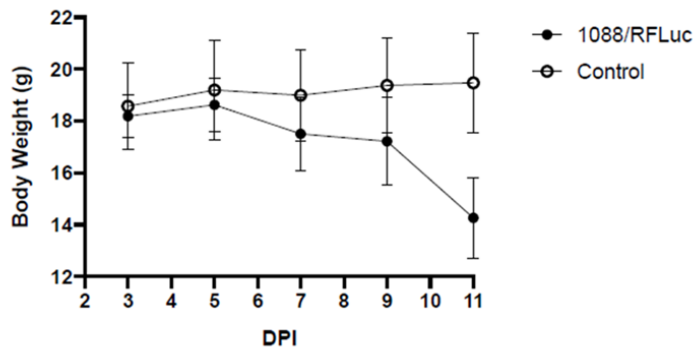
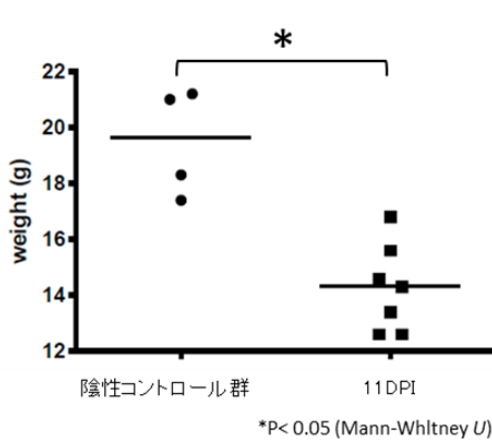


図 3. 陰性コントロール群と接種 11 日後の群の体重比較



参考文献

1. Arslan, A., Saglam, Y. S. and Temur, A. 2004. Detection of rabies viral antigens in non-autolysed and autolysed tissues by using an immunoperoxidase technique. *Vet. Rec.* **155**: 550–552.
2. Balachandran, A. and Charlton, K. 1994. Experimental rabies infection of non-nervous tissues in skunks (*Mephitis mephitis*) and foxes (*Vulpes vulpes*). *Vet. Pathol.* **31**: 93–102.
3. Banyard, A. C., Horton, D. L., Freuling, C., Müller, T. and Fooks, A. R. 2013. Control and prevention of canine rabies: the need for building laboratory-based surveillance capacity. *Antiviral Res.* **98**: 357–364.
4. Blenden, D. C. 1981. Rabies in a litter of skunks predicted and diagnosed by skin biopsy. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **179**: 789–791.
5. Blenden, D. C., Bell, J. F., Tsao, A. T. and Umoh, J. U. 1983. Immunofluorescent examination of the skin of rabies-infected animals as a means of early detection of rabies virus antigen. *J. Clin. Microbiol.* **18**: 631–636.
6. Blenden, D. C., Creech, W. and Torres-Anjel, M. J. 1986. Use of immunofluorescence examination to detect rabies virus antigen in the skin of humans with clinical encephalitis. *J. Infect. Dis.* **154**: 698–701.
7. Boldbaatar, B., Inoue, S., Tuya, N., Dulam, P.,

- Batchuluun, D., Sugiura, N., Okutani, A., Kaku, Y., Noguchi, A., Kotaki, A. and Yamada, A. 2010. Molecular epidemiology of rabies virus in Mongolia, 2005-2008. *Jpn. J. Infect. Dis.* **63**: 358–363.
8. Boonsriroj, H. 2015. Pathological studies on the rabid dogs and mice experimentally infected with rabies virus. 北里大学大学院獣医学系研究科博士論文.
9. Boonsriroj, H., Manalo, D. L., Kimitsuki, K., Shimatsu, T., Shiwa, N., Shinozaki, H., Takahashi, Y., Tanaka, N., Inoue, S. and Park, C. H. 2016. A pathological study of the salivary glands of rabid dogs in the Philippines. *J. Vet. Med. Sci.* **78**: 35–42.
10. Boulais, N. and Misery, L. 2007. Merkel cells. *J. Am. Acad. Dermatol.* **57**: 147–165.
11. Bryceson, A. D., Greenwood, B. M., Warrell, D. A., Davidson, N. M., Pope, H. M., Lawrie, J. H., Barnes, H. J., Bailie, W. E. and Wilcox, G. E. 1975. Demonstration during life of rabies antigen in humans. *J. Infect. Dis.* **131**: 71–74.
12. Cardoso, J. R., Pereira, L. M., Iversen, M. D. and Ramos, A. L. 2014. What is gold standard and what is ground truth? *Dental Press. J. Orthod.* **19**: 27–30.
13. Ceccaldi, P. E., Fayet, J., Conzelmann, K. K. and Tsiang, H. 1998. Infection characteristics of rabies virus variants with deletion or insertion in the pseudogene sequence. *J.*

- Neurovirol.* **4**: 115–119.
14. Crepin, P., Audry, L., Rotivel, Y., Gacoin, A., Caroff, C. and Bourhy, H. 1998. Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 1117–1121.
 15. David, D., Yakobson, B., Rotenberg, D., Dveres, N., Davidson, I. and Stram, Y. 2002. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. *Vet. Microbiol.* **87**: 111–118.
 16. Dierks, R. E., Murphy, F. A. and Harrison, A. K. 1969. Extraneural rabies virus infection. Virus development in fox salivary gland. *Am. J. Pathol.* **54**: 251–273.
 17. Dimaano, E. M., Scholand, S. J., Alera, M. T. P. and Belandres, D. B. 2011. Clinical and epidemiological features of human rabies cases in the Philippines: A review from 1987 to 2006. *Int. J. Infect. Dis.* **15**: 495–499.
 18. Ebara, S., Kumamoto, K., Matsuura, T., Mazurkiewicz, J. E. and Rice, F. L. 2002. Similarities and differences in the innervation of mystacial vibrissal follicle-sinus complexes in the rat and cat: a confocal microscopic study. *J. Comp. Neurol.* **449**: 103–119.
 19. Eispert, A. C., Fuchs, F., Brandner, J. M., Houdek, P., Wladykowski, E. and Moll, I. 2009. Evidence for distinct populations of human merkel cells. *Histochem. Cell Biol.* **132**: 83–93.

20. Escobar, L. E., Peterson, A. T., Favi, M., Yung, V. and Medina-Vogel, G. 2015. Bat-borne rabies in Latin America. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo.* **57**: 63–72.
21. Esteves, A., Ribeiro, C. F., Dâmaso, C. S., Moreira, F. L., Fernandes, G. J. M., Carvalho, F. J., and Rossi Jr, W. C. 2009. Anatomical description of the trigeminal nerve [v] and its branching in mongrel dogs. *Braz. J. Morphol. Sci.* **26**: 187–192.
22. Fekadu, M. 1988. Pathogenesis of rabies virus infection in dogs. *Rev. Infect. Dis.* **10**: 678-683.
23. Fekadu, M., Chandler, F. W. and Harrison, A. K. 1982. Pathogenesis of rabies in dogs inoculated with an Ethiopian rabies virus strain. Immunofluorescence, histologic and ultrastructural studies of the central nervous system. *Arch. Virol.* **71**: 109–126.
24. Fekadu, M. and Shaddock, J. H. 1984. Peripheral distribution of virus in dogs inoculated with two strains of rabies virus. *Am. J. Vet. Res.* **45**: 724–729.
25. Halata, Z. 1993. Sensory innervation of the hairy skin (light- and electronmicroscopic study. *J. Invest. Dermatol.* **101**: 75-81.
26. Hanlon, C. A. and Nadin-Davis, S. A. 2013. Laboratory diagnosis of rabies. pp. 409–459. *In*: Rabies. 3rd ed. (Jackson, A. C. ed.), Academic Press, Oxford.
27. Harven, E. D. and Yohn, D. S. 1966. The fine structure of

- the Yaba monkey tumor poxvirus. *Cancer Res.* **26**: 995–1008.
28. Heaton, P. R., Johnstone, P., McElhinney, L. M., Cowley, R., O’Sullivan, E. and Whitby, J. E. 1997. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2762–2766.
 29. Hemachudha, T., Ugolini, G., Wacharapluesadee, S., Sungkarat, W., Shuangshoti, S. and Laothamatas, J. 2013. Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis, and management. *Lancet Neurol.* **12**: 498–513.
 30. Hirai, K., Kawano, H., Mifune, K., Fujii, H., Nishizono, A., Shichijo, A. and Mannen, K. 1992. Suppression of cell-mediated immunity by street rabies virus infection. *Microbiol. Immunol.* **36**: 1277–1290.
 31. Hu, S. C., Hsu, C. L., Lee, M. S., Tu, Y. C., Chang, J. C., Wu, C. H., Lee, S. H., Ting, L. J., Tsai, K. R., Cheng, M. C., Tu, W. J. and Hsu, W. C. 2018. Lyssavirus in Japanese pipistrelle, Taiwan. *Emerg. Infect. Dis.* **24**: 782–785.
 32. Huang, A. S., Chen, W. C., Huang, W. T., Huang, S. T., Lo, Y. C., Wei, S. H., Kuo, H. W., Chan, P. C., Hung, M. N., Liu, Y. L., Mu, J. J., Yang, J. Y., Liu, D. P., Chou, J. H., Chuang, J. H. and Chang, F. Y. 2015. Public health responses to reemergence of animal rabies, Taiwan, July 16–December 28, 2013. *PLoS. One.* **10**: e0132160.
 33. Ikeda, M. and Okada, S. 1990. Fine structure of the sinus

- hair (pillus labialis maxillaris) and its microvascular architecture in the cat. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* **67**: 365–379.
34. Iseni, F., Barge, A., Baudin, F., Blondel, D. and Ruigrok, R. W. 1998. Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures. *J. Gen. Virol.* **79**: 2909–2919.
35. Isomura, M., Yamada, K., Noguchi, K. and Nishizono, A. 2017. Near-infrared fluorescent protein iRFP720 is optimal for in vivo fluorescence imaging of rabies virus infection. *J. Gen. Virol.* **98**: 2689–2698.
36. Jackson, A. C. 2011. Update on rabies. *Res. Rep. Trop. Med.* **2**: 31–43.
37. Jackson, A. C. and Fu, Z. F. 2013. Pathogenesis. pp. 299–349. *In*: Rabies. 3rd ed. (Jackson, A. C. ed.), Academic Press, Oxford.
38. Kamolvarin, N., Tirawatnpong, T., Rattanasiwamoke, R., Tirawatnpong, S., Panpanich, T. and Hemachudha, T. 1993. Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction with nested primers. *J. Infect. Dis.* **167**: 207–210.
39. Kimitsuki, K., Yamada, K., Shiwa, N., Inoue, S., Nishizono, A. and Park, C. H. 2017. Pathological lesions in the central nervous system and peripheral tissues of ddY mice with street rabies virus (1088 strain). *J. Vet. Med. Sci.* **79**: 970–978.

40. 君付和範. 2017. 街上毒狂犬病ウイルス(1088株)に感染したマウスの中樞神経系に関する病理組織学的研究. 北里大学大学院獣医学系研究科博士論文.
41. Kristensson, K., Dastur, D. K., Manghani, D. K., Tsiang, H. and Bentivoglio, M. 1996. Rabies: interactions between neurons and viruses. A review of the history of Negri inclusion bodies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **22**: 179–187.
42. Lahaye, X., Vidy, A., Pomier, C., Obiang, L., Harper, F., Gaudin, Y. and Blondel, D. 2009. Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: Evidence that NBs are sites of viral transcription and replication. *J. Virol.* **83**: 7948–7958.
43. Lichtenstein, S. H., Carvell, G. E. and Simons, D. J. 1990. Responses of rat trigeminal ganglion neurons to movements of vibrissae in different directions. *Somatosens. Mot. Res.* **7**: 47–65.
44. Lu, S. M. and Lin, R. C. S. 1993. Thalamic afferents of the rat barrel cortex: A light-and electron-microscopic study using phaseolus vulgaris leucoagglutinin as an anterograde tracer. *Somatosens. Mot. Res.* **10**: 1–16.
45. Marshall, C. D., Rozas, K., Kot, B. and Gill, V. A. 2014. Innervation patterns of sea otter (*Enhydra lutris*) mystacial follicle-sinus complexes. *Front. Neuroanat.* **8**: 121.

46. Matsumoto, S. 1962. Electron microscopy of nerve cells infected with street rabies virus. *Virology* **17**: 198–202.
47. Matsumoto, S. 1964. Electron microscopic studies of mouse brain infected with street rabies virus. *Acta Pathol. Jpn.* **14**: 195–198.
48. Matsumoto, S., Schneider, L. G., Kawai, A. and Yonezawa, T. 1974. Further studies on the replication of rabies and rabies-like viruses in organized cultures of mammalian neural tissues. *J. Virol.* **14**: 981–996.
49. McElhinney, L. M., Marston, D. A., Brookes, S. M. and Fooks, A. R. 2014. Effects of carcass decomposition on rabies virus infectivity and detection. *J. Virol. Methods* **207**: 110–113.
50. Mebatsion, T., Schnell, M. J., Cox, J. H., Finke, S. and Conzelmann, K. K. 1996. Highly stable expression of a foreign gene from rabies virus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 7310–7314.
51. Mifune, K., Makino, Y. and Mannen, K. 1979. Susceptibility of various cell lines to rabies virus. *Japan. J. Trop. Med. Hyg.* **7**: 201–208.
52. Mitrabhakdi, E., Shuangshoti, S., Wannakrairot, P., Lewis, R. A., Susuki, K., Laothamatas, J. and Hemachudha, T. 2005. Difference in neuropathogenetic mechanisms in human furious and paralytic rabies. *J. Neurol. Sci.* **238**: 3–10.

53. Miyamoto, K. and Matsumoto, S. 1967. Comparative studies between pathogenesis of street and fixed rabies infection. *J. Exp. Med.* **125**: 447–456.
54. Motoi, Y., Inoue, S., Hatta, H., Sato, K., Morimoto, K. and Yamada, A. 2005. Detection of rabies-specific antigens by egg yolk antibody (IgY) to the recombinant rabies virus proteins produced in *Escherichia coli*. *Jpn. J. Infect. Dis.* **58**: 115–118.
55. Ochiai, T. and Suzuki, H. 1981. Fine structural and morphometric studies of the Merkel cell during fetal and postnatal development. *J. Invest. Dermatol.* **77**: 437–443.
56. Odontsetseg, N., Uuganbayar, D., Tserendorj, S. and Adiyasuren, Z. 2009. Animal and human rabies in Mongolia. *Rev. Sci. Tech.* **28**: 995–1003.
57. OIE. 2017. Rabies. Chapter 2. 1. 17. pp. 1–28. *In*: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2017, World Organization for Animal Health.
58. Ramírez, G.A., Rodríguez, F., Herráez, P., Suárez-Bonnet, A., Andrada, M. and Espinosa-de-los-Monteros, A. 2014. Morphologic and immunohistochemical features of Merkel cells in the dog. *Res. Vet. Sci.* **97**: 475–480.
59. Ramírez, G.A., Rodríguez, F., Quesada, Ó., Herráez, P., Fernández, A. and Espinosa-de-los-Monteros, A. 2016. Anatomical mapping and density of Merkel cells in skin and mucosae of the dog. *Anat. Rec.* **299**: 1157–1164.

60. Rosatte, R. C. 2013. Rabies control in wild carnivores. pp. 617–670. *In: Rabies*. 3rd ed. (Jackson, A. C. ed.), Academic Press, Oxford.
61. Rossiter, J. P. and Jackson, A. C. 2013. Pathology. pp. 351–386. *In: Rabies*. 3rd ed. (Jackson, A. C. ed.), Academic Press, Oxford.
62. Rupprecht, C. E., Fooks, A. R. and Abela-ridder, B. 2018. Demonstration of antigens. pp. 107–194. *In: Laboratory techniques in rabies*. 5th ed. Vol. 1. World Health Organization.
63. Rupprecht, C. E., Fooks, A. R. and Abela-ridder, B. 2018. Production of biologicals. pp. 93–178. *In: Laboratory techniques in rabies*. 5th ed. Vol. 2. World Health Organization.
64. Sackett, D. L. 1992. A primer on the precision and accuracy of the clinical examination. *JAMA*. **267**: 2638–2644.
65. Sarko, D. K., Reep, R. L., Mazurkiewicz, J. E. and Rice, F. L. 2007. Adaptations in the structure and innervation of follicle-sinus complexes to an aquatic environment as seen in the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*). *J. Comp. Neurol.* **504**: 217–237.
66. Sarko, D. K., Rice, F. L. and Reep, R. L. 2011. Mammalian tactile hair: divergence from a limited distribution. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1225**: 90–100.

67. Schneider, C. A., Rasband, W. S. and Eliceiri, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**: 671–675.
68. Schnell, M. J., McGettigan, J. P., Wirblich, C. and Papaneri, A. 2009. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 51–61.
69. Shao, X. Q., Yan, X. J., Luo, G. L., Zhang, H. L., Chai, X. L., Wang, F. X., Wang, J. K., Zhao, J. J., Wu, W., Cheng, S. P., Yang, F. H., Qin, X. C. and Zhang, Y. Z. 2011. Genetic evidence for domestic raccoon dog rabies caused by Arctic-like rabies virus in Inner Mongolia, China. *Epidemiol. Infect.* **139**: 629–635.
70. Sheikh, K. A., Ramos-Alvarez, M., Jackson, A. C., Li, C. Y., Asbury, A. K. and Griffin, J. W. 2005. Overlap of pathology in paralytic rabies and axonal Guillain-Barré syndrome. *Ann. Neurol.* **57**: 768–772.
71. Shimatsu, T., Shinozaki, H., Kimitsuki, K., Shiwa, N., Manalo, D. L., Perez, R. C., Dilig, J. E., Yamada, K., Boonsriroj, H., Inoue, S. and Park, C. H. 2016. Localization of the rabies virus antigen in Merkel cells in the follicle-sinus complexes of muzzle skins of rabid dogs. *J. Virol. Methods* **237**: 40–46.
72. Shiwa, N., Kimitsuki, K., Manalo, D. L., Inoue, S. and Park, C. H. A pathological study of the tongues of rabid dogs in the Philippines. *Arch. Virol.* **163**: 1615-1621.

73. Shoji, Y., Inoue, S., Nakamichi, K., Kurane, I., Sakai, T. and Morimoto, K. 2004. Generation and characterization of P gene-deficient rabies virus. *Virology* **318**: 295–305.
74. Smith, W. B., Blendon, D. C., Fuh, T. H. and Hiler, L. 1972. Diagnosis of rabies by immunofluorescent staining of frozen sections of skin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **161**: 1495–1501.
75. Tanabe, S., Inoue, K. I., Tsuge, H., Uezono, S., Nagaya, K., Fujiwara, M., Kato, S., Kobayashi, K. and Takada, M. 2017. The use of an optimized chimeric envelope glycoprotein enhances the efficiency of retrograde gene transfer of a pseudotyped lentiviral vector in the primate brain. *Neurosci. Res.* **120**: 45–52.
76. Tobiume, M., Sato, Y., Katano, H., Nakajima, N., Tanaka, K., Noguchi, A., Inoue, S., Hasegawa, H., Iwasa, Y., Tanaka, J., Hayashi, H., Yoshida, S., Kurane, I. and Sata, T. 2009. Rabies virus dissemination in neural tissues of autopsy cases due to rabies imported into Japan from the Philippines: immunohistochemistry. *Pathol. Int.* **59**: 555–566.
77. Tsiang, H., Ceccaldi, P. E., Ermine, A., Lockhart, B. and Guillemer, S. 1991. Inhibition of rabies virus infection in cultured rat cortical neurons by an N-methyl-D-aspartate noncompetitive antagonist, MK-801. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 572–574.

78. Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L. C., Bui, S., Nielson, A., Wu, X., Vo, H. T., Ma, X. J. and Luo, Y. 2012. RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Mol. Diagnostics* **14**: 22–29.
79. Warrell, M. J., Looareesuwan, S., Manatsathit, S., White, N. J., Phuapradit, P., Vejajiva, A., Hoke, C. H., Burke, D. S. and Warrell, D. A. 1988. Rapid diagnosis of rabies and post-vaccinal encephalitides. *Clin. Exp. Immunol.* **71**: 229–234.
80. World Health Organization. 2016. 10 facts on rabies. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **91**: 515–516.
81. World Health Organization. 2018. WHO expert consultation on rabies. 3rd report. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* **982**: 1–183.
82. Wunner, W. H. and Conzelmann, K. K. 2013. Rabies virus. pp. 17–60. *In*: Rabies. 3rd ed. (Jackson, A. C. ed.), Academic Press, Oxford.
83. Yamada, K., Noguchi, K., Kimitsuki, K., Kaimori, R., Saito, N., Komeno, T., Nakajima, N., Furuta, Y. and Nishizono, A. 2019. Reevaluation of the efficacy of favipiravir against rabies virus using in vivo imaging analysis. *Antiviral Res.* **172**: 104641.
84. Yamada, K., Park, C. H., Noguchi, K., Kojima, D., Kubo, T., Komiya, N., Matsumoto, T., Mitui, M. T., Ahmed, K.,

- Morimoto, K., Inoue, S. and Nishizono, A. 2012. 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.* **165**: 34–45.
85. Yamamoto, S., Iwasaki, C., Oono, H., Ninomiya, K. and Matsumura, T. 2008. The first imported case of rabies into Japan in 36 years: A forgotten life-threatening disease. *J. Travel Med.* **15**: 372–374.

総括

狂犬病は全ての哺乳動物が感染・発症する致死的なウイルス性人獣共通感染症である。WHOによると年間 59,000 人が狂犬病により死亡している。アジア諸国においてヒトへの主な感染源はイヌであり、狂犬病を発症したイヌのコントロールが狂犬病の制圧に極めて重要である。

現在、狂犬病の確定診断には新鮮な脳のスタンプ標本を用いた直接蛍光抗体法（標準法）が推奨されている。しかし、狂犬病流行国の多くは温暖・多湿な気候であり、野外で死亡した状態で診断ラボに搬入される過程で大半の脳は腐敗が進行し、標準法で確定診断ができない場合が多い。また、診断ラボでの開頭作業は煩雑で労力を要し、開頭時の刺傷事故や飛沫による検査者への感染リスクが伴う。これらの問題を解決するため、脳に代わる死後診断法の開発が求められている。

本研究室では、これまでに狂犬病発症犬の鼻口部洞毛組織（洞毛）のメルケル細胞に狂犬病ウイルス抗原が高率に検出されることを報告している。しかし、①メルケル細胞にウイルス粒子とウイルスゲノムが存在するかどうか、②どの部位から何本の洞毛を採材すれば確定診断が可能であるか、③イヌ以外の狂犬病発症動物の洞毛からウイルス抗原が検出されるかどうか、④狂犬病ウイルスがいつ、どのような神経経路で洞毛に到達するかについて検討していなかった。そこで今回著者は、上述の4つの研究課題について病理組織学的解析を実施し、罹患動物の洞毛が新規の狂犬病診断材料として有用かどうかについて精査した。

第 I 章では、検体数を大幅に増やし、洞毛の診断材料としての有用性の検討並びにウイルス感染細胞の特定を試みた。狂犬病疑いのイヌ 226 頭の脳と洞毛について免疫組織化学的解析を実施した。その結果、安楽殺例、死亡例にかかわらず、すべてのイヌで抗原陽性像が観察され、感度および特異度は 100% となった。また、脳と洞毛におけるウイルス抗原陽性・陰性一致率が 100% であった。加えて、死亡例・安楽殺例ともにメルケル細胞の細胞質にウイルス粒子およびウイルス NmRNA が局在することが判明した。以上の結果より、洞毛のメルケル細胞がウイルス感染と複製の標的であることが示されたことに加え、イヌの洞毛が脳に代わる新規診断材料として有用であることが立証された。

第 II 章では、1 頭当たり何本の洞毛を検査することで狂犬病陽性と診断できるのかについて検討した。狂犬病疑いのイヌ 123 頭を用いて、下 2 列目の洞毛 5 本を採材し、免疫組織化学的解析を実施し、脳と洞毛 5 本の抗原陽性・陰性結果を比較検討した。その結果、全頭の洞毛 5 本の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率、および κ 係数は、それぞれ 97.3%、100%、100%、81.3%、0.88 を示した。以上の結果より、狂犬病疑いのイヌから 5 本程度の洞毛が採材されれば、概ね死後の確定診断が可能であると判断された。

第 III 章では、イヌ以外の狂犬病自然発症動物における洞毛の死後診断材料としての有用性について病理組織学的手法を用い

て検討した。供試動物は、狂犬病陽性例のオオカミ 1 頭、アカギツネ 1 頭、ネコ 2 頭、コウモリ 2 頭である。その結果、全ての動物種において鼻口部にイヌ同様の洞毛の存在が認められ、洞毛のメルケル細胞の細胞質にウイルス抗原、成熟ウイルス粒子およびウイルス NmRNA の局在が観察された。以上の結果から、イヌ以外の哺乳動物に関しても洞毛に分布するメルケル細胞がウイルス感染の標的であることが考えられ、洞毛が様々な哺乳動物の狂犬病死後診断材料として有用である可能性が示された。

第 IV 章では、発光酵素 (Red firefly luciferase) 発現組換え狂犬病街上市毒ウイルス 1088 株 (1088/RFLuc 株) をヌードマウスの右後肢筋肉内に接種し、ウイルスの洞毛への感染経路・感染時期について精査した。*in vivo* イメージングによるウイルス動態の可視化と免疫組織化学的解析によるウイルス抗原の経日的な観察から、ウイルスは運動神経を逆行性あるいは知覚神経を順行性に上行し、大脳皮質、三叉神経核、三叉神経節、三叉神経を介し、感染後期に洞毛のメルケル細胞に到達することが判明した。

以上の研究成果から、①洞毛のメルケル細胞にウイルス粒子とウイルスゲノムが存在すること、②下から第 2 列目の 5 本程度の洞毛が採材されれば、概ね死後の確定診断が可能であること、③イヌ以外の哺乳動物に関しても洞毛のメルケル細胞からウイルス抗原が検出されること、④ウイルスは運動神経を逆行

性あるいは知覚神経を順行性に上行し、大脳皮質、三叉神経を介し、感染後期に洞毛のメルケル細胞に達することが示唆された。

本研究の成果から、鼻口部洞毛組織（洞毛）を用いた狂犬病診断法が科学的根拠に基づく信頼性の高い診断方法の1つであることが示された。洞毛は脳に比べて材料採取が容易で検査者への感染リスクも低い。洞毛を用いた新規の狂犬病診断法が標準法として狂犬病流行地域の診断ラボに普及すれば、狂犬病の発生状況がより正確に把握できるようになる。これにより、適切なワクチンプログラムの実施が可能となり、費用対効果の高い狂犬病コントロールが実施可能になると期待される。

謝 辞

本論文は著者が北里大学大学院獣医学系研究科獣医学専攻博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。博士学位論文を提出するにあたり多くの方々のご指導とご協力を頂いた。同専攻獣医病理学研究室教授小山田敏文先生、准教授朴天鎬先生、専任講師安藤亮先生、畑井仁先生（現鹿児島大学共同獣医学部組織病理学研究室准教授）にはご指導、ご鞭撻、ご厚情を頂いた。特に、朴天鎬先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えていただき、研究の初歩から博士課程を修了するまでの間、終始ご指導いただいた。また、狂犬病の研究のみならず獣医病理学の考え方、研究方法についてもご指導頂いた。ここに深謝の意を表す。

フィリピン熱帯医学研究所 (Research Institute for Tropical Medicine) Daria Llenaresas Manalo 先生には、本研究の狂犬病発症したイヌとネコを、モンゴル獣医学研究所 (Institute of Veterinary Medicine) の Bazartseren Boldbaatar 先生には狂犬病発症したオオカミとキツネを、アルゼンチンの The Luis Pasteur Zoonosis Institute 研究所の渡辺オリビア先生にはコウモリを提供して頂いた。特に Daria Llenaresas Manalo 先生には、フィリピン渡航時にご助力を頂くとともに研究計画についてご指導いただいた。ここに深謝の意を表す。

大分大学医学部微生物学講座教授西園晃先生、並びに、准教授山田健太郎先生には、本研究のウイルス感染マウスの提供と感染実験の機会を頂いた。特に山田健太郎先生には、ご助言を頂くとともに研究計画についてご指導いただいた。ここに深謝

の意を表する。

国立感染症研究所獣医科学部井上智先生、野口章先生には貴重な抗体を提供していただくとともに、有益なご助言を頂いた。ここに深謝の意を表する。

小嶋大亮博士、Hassadin Boonsriroj 博士、君付和範博士には、同専攻の大学院生として公私ともに多大なご助力を頂いた。獣医病理学研究室第 44 期～51 期専攻生各位、特に小宮拓巳氏、篠崎春美氏、高橋友里花氏、矢野川祥子氏、島津太一氏、川本尚未氏、須見康代氏、中島千景氏、山岸光葉氏、井端康博氏、清水大智氏、中田浩美氏、山下緩子氏、久保庭清華氏、佐倉由美氏、富岡晃輝氏、岡本万智子氏、村上凌氏、和田康伸氏、栗津原優美氏、石原美奈氏、伊藤紗希氏、河合せりな氏、椎名亮太氏には本論文の遂行に多くの御助力を頂いた。ここに感謝の意を表する。

両親、妹には多大な苦勞をかけたにもかかわらず、在学中の研究生活を支えてもらった。ここに感謝の意を表する。

本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金（特別研究員 DC2 No. 19J10040）によった。ここに感謝の意を表する。

最後に、本研究のために尊い命を捧げてくださった動物たちの冥福をお祈りするとともに、狂犬病研究と北里大学獣医学部獣医病理学研究室の更なる発展を願う。

2020 年 1 月 8 日

志和 希