

学位論文要旨

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

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

北里大学大学院獣医学系研究科

獣医学専攻 博士課程

志和 希

Nozomi Shiwa

指導教授 小山田 敏文

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、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レット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。ヒトでは、頸部（うなじ）の皮膚組織が狂犬病の補助的な生前・死後診断材料として用いられているが、動物では皮膚組織を用いた診断的有用性についてはこれまでほとんど検証されていない。

本研究室では、狂犬病発症犬の脳、唾液腺および皮膚組織を用いて病理学的研究を展開しており、狂犬病ウイルス抗原が脳や唾液腺のみならず鼻口部洞毛組織（洞毛）のメルケル細胞においても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い。本研究は上述の4つの研究課題について病理学的解析を実施し、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ものである。

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

我々は、狂犬病発症犬の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陽性例 60 頭のみと少なく、その客観的評価が不十分であった。さらに、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。そこで第 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、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。また、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 mRNA が局在することが判明した。以上の結果から、洞毛のメルケル細胞がウイルス感染の標的であることが示された。本研究により、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 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

第 I 章では、洞毛が脳に代わる新規の診断材料として有用であ

ることが示された。しかし、どの位置から何本の洞毛を採材すれば、確定診断が可能かについては明らかにされなかった。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、下から第2列目の5本の洞毛をそれぞれ採材し、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、洞毛5本の感度は97.3%、特異度は100%、 κ 係数は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 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

第Ⅰ・Ⅱ章では、狂犬病自然発症犬において洞毛が脳に代わる死後診断材料として有用であることを報告した。そこで、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 mRNA 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 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

狂犬病発症動物の病理検索により、洞毛が診断材料として有用であることが示された。しかし、末梢組織で感染したウイルスがどの経路を辿って、いつ洞毛に侵入するのかについては、不明な点が多い。そこで、発光酵素（Red firefly luciferase）発現組換え狂犬病街上毒ウイルス（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。