

狂犬病検査マニュアル

(第2版)

平成24年度3月

狂犬病(rabies)

目次

- I 狂犬病と狂犬病検査の概説
 - II 狂犬病ウイルス検査に関する一般的な注意事項
 - III 検査材料の採取・輸送および保管
 - 1 検査材料の採取において注意すべき点
 - (1)ヒトの材料
 - (2)動物の材料
 - 2 検査材料の輸送において注意すべき点
 - IV 狂犬病ウイルスの検査の実際
 - 1 直接蛍光抗体法
 - 2 RT-PCR
 - a) Two step RT-PCR
 - b) One step RT-PCR
 - 3 ウイルス分離法
 - a) マウス脳内接種法
 - b) 培養細胞接種法
 - 4 免疫組織化学
 - V 引用文献等
 - VI 検査依頼先
 - VII 執筆者一覧
- 添付図1. 病理組織学的検査

I. 狂犬病と狂犬病検査の概説

狂犬病ウイルス

狂犬病ウイルス(Rabies virus)は、ラブドウイルス科リッサウイルス属に分類されるマイナス鎖の1本鎖RNA ウイルスである。ウイルス粒子は「弾丸」様の特徴的な形態を示す。従来、狂犬病ウイルスは血清学的に単一のウイルスと考えられていたが、免疫学的・分子生物学的解析により、流行地域や流行宿主に固有の変異株(variants)が多数存在することが明らかにされてきている。一方、1960年代後半にアフリカとヨーロッパおよび1996年にオーストラリアで臨床的には狂犬病と診断されたヒトおよび動物から狂犬病ウイルスとは異なるリッサウイルス(Lagos bat virus、Mokola virus、Duvenhage virus、European bat lyssavirus 1 & 2、Australian bat lyssavirus)が分離されている。現在、血清疫学および遺伝子解析によって、狂犬病ウイルスを1型、狂犬病類似(関連)ウイルスを2型から7型に分類している。なお、これらのウイルスは全ての温血動物に感染可能と考えられている。

狂犬病ウイルス(street strain、街上毒、野生株)はバイオセーフティーレベル3(BSL3)に分類されており、狂犬病と診断されて狂犬病ウイルスが分離されて以降は、ウイルスの取り扱いをP3施設で行うことになる。

疫学的背景

狂犬病は代表的な人獣共通感染症(動物由来感染症)であり、いったん発症するとヒトも動物も致命的転帰を示す脳脊髄炎である。本症は、世界中の多くの国に常在する狂犬病ウイルスによって引き起こされる。日本は、1956年のイヌ6頭と1957年のネコ1頭を最後にヒトおよび動物での国内に由来する狂犬病の発生報告はない。しかし、輸入感染症としては海外でイヌの咬傷を受けて帰国後に狂犬病を発症して死亡したヒトの症例が1970年に1例、2006年に2例が報告されている。現在、狂犬病ウイルスの存在しない国はイギリス・オーストラリア・ニュージーランド等わずか数カ国であり、毎年7万人が狂犬病で死亡し、年間で1200万人以上が治療的予防接種(post-exposure prophylaxis (PEP))を受けている。

世界における地域別の狂犬病に感染する危険のある動物種は、アジアのイヌ、ネコ; アフリカのイヌ、マンガース、ジャッカル、ネコ; ヨーロッパのキツネ; 北米のコウモリ、アライグマ、スカンク、キツネ、コヨーテ; 中南米のイヌ、コウモリ、マンガース、コヨーテ、ネコ等である。なお、暴露前のワクチン接種を受けた者でも狂犬病の動物から咬傷をうけた場合には追加のPEPを速やかに受ける必要がある。また、コウモリの狂犬病が流

行している地域でコウモリとの接触を持ったヒトは医師の指示に従って狂犬病ワクチンの接種を速やかに受ける必要がある。流行地への渡航に際しては、渡航先の狂犬病に関する疫学情報を十分に理解した上でワクチン接種を事前に受けておくとよいが、渡航先で狂犬病の疑われる動物に咬傷を受けた場合には速やかにワクチン接種を受けるべきである。

臨床

狂犬病はワクチン接種により予防が可能なウイルス感染症であり、また、感染後の適切なPEPにより発症を予防できる。しかしながら、発症後の治療法は確立していない。ヒトの狂犬病は主に狂犬病に罹患した動物の咬傷が原因であり、狂犬病を発症したヒトは間欠的な不安感による精神的動揺を示して半数は咽頭喉頭筋群の痙攣による嚥下障害がおこる(麻痺症状が主体の例もある)。ヒトでは恐水症や恐風症などの症状を示すのが特徴であるが、動物の狂犬病では恐水症は見られない。イヌの狂犬病では性格の変化、視覚的もしくは聴覚的な刺激に対する過敏反応、恐怖心による興奮、飼い主に対する反抗、咬傷部の搔痒、嚥下筋の麻痺による流涎、瞳孔の散大および麻痺症状等が見られる。

狂犬病の疑われる動物から咬傷をうけた場合は、WHO(狂犬病治療的予防接種指針、1992年)の指示に従う。(1)咬傷後直ちに傷口を流水と石鹼で十分に洗浄する。(2)70%エタノールもしくはポピドンヨード液で消毒する。(3)「組織培養不活化狂犬病ワクチン」を初回接種日を0日として、0、3、7、14、30日の5回接種する(場合により90日に6回目の注射をする)。(4)必要に応じてヒト狂犬病免疫グロブリンを咬傷部位周囲に注射する(狂犬病ワクチン接種歴がある場合には免疫グロブリンの注射は行わない)。

検査

狂犬病を臨床症状から診断することは困難であり、他の神経症状を有する疾患との鑑別は容易でない。また、感染から発症までの潜伏期間が数日から数年(平均3週から8週)におよび、この期間内はウイルスを検出することは困難であり血中の抗ウイルス抗体も検出されない。したがって、狂犬病の検査は発症したヒトおよび動物の神経系の組織を生検・剖検した材料を用いて行うことになる。ヒトが狂犬病の疑いのある動物に咬傷を受けた場合は速やかにPEPの開始を行い、検査によって加害動物が狂犬病陰性と診断された場合にのみPEPの継続が中止される。

<ヒトの狂犬病検査>

「可能な検査方法」

(1) 直接蛍光抗体法または病理組織学的検査法のうち免疫組織化学によるウイルス抗原検索：生前診断として項部皮膚生検を対象に行われるが、気管吸引材料、唾液腺などの生検組織、角膜塗抹標本などからもウイルス抗原が検出される場合がある。剖検では脳などの神経組織が対象となる。

(2) RT-PCR 法によるウイルス遺伝子の検出：唾液、脳脊髄液、項部皮膚生検など。剖検時の臓器でも可能である。

(3) ウイルス分離(乳のみマウスおよびマウス神経芽腫細胞への接種)：唾液、脳脊髄液、項部皮膚生検、気管吸引材料および唾液腺などの生検組織。剖検時の臓器でも可能である。

(4) 抗体測定：血液、脳脊髄液。

<動物の狂犬病検査>

動物に狂犬病が疑われた場合には、必ず10日間の観察を行ない、観察期間内に狂犬病の症状が見られた場合や死亡した場合には速やかに致死処分を行って中枢神経組織(ウイルスの検出率が最も高い脳の脳幹、小脳、海馬)について検査を行う。動物の狂犬病検査は、咬傷やウイルス暴露を受けたヒトへのPEPの判断や他のリスク動物に対する初期対応(対策)を迅速かつ適切に行なうために重要である。

「可能な検査方法」

(1) 直接蛍光抗体法によるウイルス抗原検索：中枢神経組織(延髄、橋、視床、小脳、海馬、(唾液腺))。

(2) RT-PCR 法によるウイルス遺伝子の検出：中枢神経組織。

(3) ウイルス分離(乳のみマウスおよびマウス神経芽腫細胞への接種)：中枢神経組織。

II. 狂犬病ウイルス検査に関する一般的な注意事項

「検査担当者」および「材料に直接接する機会を有している者」は狂犬病ワクチン接種を行い狂犬病ウイルス感染に対する予防を行う。検査作業中の事故等により狂犬病ウイルスの暴露を受けたと考えられる場合には、医師の指示に従いすみやかにPEPを行う。

動物に狂犬病が疑われる神経症状を呈した場合には速やかに致死処分を行い、中枢神経組織に対する検査を行う。脳の摘出は周囲と区画された専用の部屋で行う（BSL2 相当の環境）。

検体の取り扱いに際しては、組織等の飛散に十分注意を払い感染組織（中枢神経系組織、体液、特に唾液）と皮膚及び粘膜との直接的な接触を避ける。

感染が疑われた動物の脳は、延髄、橋、視床、小脳、海馬の各部位について検査を行なう。脳摘出後の操作は安全キャビネット（クラスII）内で行う。

作業中は防護手袋、マスク等の保護器具を必ず使用する。脳摘出後の頭部等の廃棄物は専用の袋に2重に密閉してウイルスの不活化処置をおこなう。解剖等に使用した道具、部屋等は作業終了後に十分にウイルスの不活化処理を行う。基本的に、狂犬病ウイルスに汚染された可能性のある衣服や用具の表面の清浄化には、一般的な消毒剤が使用可能である。狂犬病動物の居た部屋の床等の表面の清浄化には、1%の温湯石けん水や洗剤液、もしくは第4級アンモニア塩が有効である。大切なことは、清浄化のための溶液を噴霧する前に、洗剤で表面の有機物を取り除いておくこと。衣類はオートクレーブで清浄化可能であるが、所有者がいとわなければ焼却する。

検査の最終判定結果は「検査結果の報告」に基づいて速やかに関係者等に報告する。狂犬病が強く疑われていたが、検査結果が陰性の場合や検査成績が不明瞭で疑問のある場合には必ず追検査や異なる検査を行って判定を行う。

注) 動物の狂犬病検査は感染が疑われた個体の脳組織について行う。狂犬病の生前診断は現在不可能であり検査は剖検後の新鮮な脳組織で行う。

「検査担当者に必要な事項」

- ・狂犬病ワクチンの暴露前予防接種。
- ・病原微生物取り扱いに関する十分な経験と理解。
- ・検査器具等の正しい使用法。

「検査に必要な施設等」

- ・外部と十分に隔離された部屋(BSL-2)。
- ・バイオセーフティーキャビネット(クラスII) (バイオセーフティーキャビネット内にはベンチコートを敷いて感染性溶液の飛散等を防ぐ。
- ・オートクレーブの設置(汚染器具のウイルス不活化)。
- ・ウイルスは石けん液、エーテル、クロロホルム、アセトン、70%エチルアルコール、5-7%ヨード剤、第4級アンモニウム化合物で不活化される。
- ・専用着衣(手袋(2重に使用)、着衣、マスク、帽子、ゴーグル、履き物等)の使用。

「検査施設に必要な準備事項」

- ・緊急時の狂犬病暴露後ワクチン接種(PEP)を可能にしておく。
 - (1)連絡網。
 - (2)ワクチン接種を行う医療機関の確保。

III. 検査材料の採取・輸送および保管

狂犬病が疑われたヒトの生検、剖検および狂犬病が疑われた動物の剖検では「II. 狂犬病ウイルス検査に関する一般的な注意事項」を参照して十分な感染防護処置を行ない、作業中における検体組織等の飛散や感染組織(中枢神経系組織、体液、特に唾液)と皮膚及び粘膜との直接的な接触を避ける。

(1) ヒトの材料

ヒトの狂犬病診断では、狂犬病常在地での滞在歴や動物による咬傷歴が重要な手がかりとなるため、狂犬病の疑われる患者を診た場合には、海外渡航歴や海外での動物咬傷歴(イヌ、ネコ、コウモリ等の野生動物等)をまず確認する。これらが不明である場合は、臨床症状から狂犬病を診断することは一般には困難である。狂犬病が疑われた患者では、皮膚生検や角膜塗沫標本からのウイルス抗原検出、唾液や髄液からのウイルス遺伝子の検出やウイルス分離が行なわれる。血中や髄液中の抗狂犬病ウイルス抗体の検査は、発病以降でない限り抗体が上昇しないため役に立たない。また、ワクチン接種者では、血清の抗体検査による狂犬病ウイルス感染の証明は不可能である。

狂犬病患者の診察、看護、諸検査を行なう医療職員は狂犬病ワクチンを事前に受けていることが望ましい。また、患者が狂犬病と診断された時点で速やかに医療職員等に対するPEPを開始する。同時に、患者と接触した家族や友人へのPEPも行なう。ヒトの狂犬病症状や狂犬病が疑われる患者への対応は引用文献(1)「狂犬病対応ガイドライン2001」の「付属書6、7、8」を参照。

生前検査

生検組織:免疫組織学化学、直接蛍光抗体法による狂犬病ウイルス抗原の検出及びRT-PCR法による狂犬病ウイルス遺伝子の検出が可能である。後頸部皮膚(皮下組織を含む)を20x10x5(深さ)mm大の組織を採取する。検体を2分割し、ホルマリン固定サンプル(病理、免疫組織化学用)及び凍結サンプル(直接蛍光抗体法及びRT-PCR法用)を作製する。ホルマリン固定サンプルは常温で、凍結サンプルは-80℃で保存する。検査材料には必ず患者名、組織名、日時を鉛筆で記載する。

唾液・髄液・血清: RT-PCR法を用いた狂犬病ウイルス遺伝子の検出及びウイルス分離に用いる。採取された検体をアウターキャップのクライオチューブ4本にそれぞれ

500 µl 注入して蓋をし、-80°Cで冷凍保管する。

死後検査

狂犬病ウイルスは神経指向性のため、開頭を含めた病理解剖の施行と中枢神経系組織の採取が必要である。脳では通常ホルマリン固定サンプルに加え、視床、小脳、海馬(アンモン角)につき、大豆大のサンプルを生のまま採取し、冷凍保存(-80°C)しておくことが望ましい。可能であれば髄液・血液も採取する。

(2) 動物の材料

動物に狂犬病が疑われた場合には、必ず10日間の観察を行なう(註記を参照)。死亡した個体や観察期間中に狂犬病の症状が見られて、致死処分を行った個体は速やかに解剖を行ない検査に必要な脳組織を取り出す(解剖は死後24時間以内に行なう。死亡個体の場合は解剖を行なうまで冷蔵状態で保管する。狂犬病検査は、死後の自壊が速い脳の組織で行なうので適切かつ迅速な対応が必要である)。解剖および検査が可能な施設への輸送は冷蔵状態(4°Cもしくは氷冷)で行なう。搬送方法についてもその安全性を確認する。

解剖施設における脳の摘出は「狂犬病対応ガイドライン2001」、「Laboratory techniques in rabies.、WHO、第4版」に方法が記載されている(引用文献等(1)と(3)を参照/具体的な方法と写真、図が示されている)。また、各自治体には狂犬病の疑われたイヌの解剖と検査の実際を記載した資料が配付されている(平成14年度狂犬病予防等技術研修会で配付された冊子と「CD-ROM-タイで麻痺型狂犬病と診断されたイヌの臨床経過(1例)/脳の取り出し方」および平成14年度希少感染症診断技術研修会で配付された資料「狂犬病の危機管理対応- 地方自治体における対応および検査の実際」/狂犬病検査に必要な解剖の方法(安全で簡便な脳の取り出し方の1例)(平成18年度厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業・動物由来感染症のサーベイランス手法の開発に関する研究・狂犬病のサーベイランス及び診断に関するワーキンググループ)/狂犬病検査に必要な解剖方法(安全で簡便な脳の取り出し方の1例)(平成21年度厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業・動物由来感染症のサーベイランス手法の開発に関する研究・狂犬病のサーベイランス及び診断に関するワーキンググループ))。同様に結核感染症課からは狂犬病に関する通知が出ており上記資料とあわせて参照して頂きたい(引用文献等(14)～(17))。

解剖施設において取り出された脳は冷蔵状態(4°Cもしくは氷冷)で速やかに輸送して検査を行なう。検査は、頭部より取り出した脳の「視床」、「橋」、「延髄」、「小脳」、「海

馬」の各部位について行う。検査部位を切り出した場合には、検体を2分して残りを凍結材料とする(保管は-80°Cで行う)。

(註)狂犬病ウイルスは感染してから発症するまでに平均1ヶ月の潜伏期間があり、感染した動物は症状を全く示さず、潜伏期間中にウイルスを検出することは現在不可能である。また、発症する以前にウイルスに対する抗体の産生も見られない。したがって、感染した疑いのある動物の観察は大変重要である。特に、狂犬病ウイルスに感染したイヌでは発症の10日前から唾液中にウイルスの排出が見られると報告されているため、イヌの症状観察はヒトが咬まれた場合のワクチン接種継続(PEP)の重要な判断材料となる。

検査材料の輸送において注意すべき点

(1) 検体採取後、4時間以内に検査が可能な施設では、検体は冷蔵状態(氷上もしくは4°C)で温度管理を十分に行い直ちに検査室へ輸送する。外部施設での検査など、輸送に時間がかかる場合には、検体を直ちに凍結し、融解することなく、凍結したまま検査機関に輸送する。

(2) 搬送に際しては、下記の必要事項を記載した書類(データシート)を検査材料に添付する。

必要事項(ヒトサンプルの場合): ①患者IDなど、②年齢、③性別、④採取部位とサンプル数、⑤咬んだ動物の情報、⑥剖検、生検の別、⑦患者のワクチン接種状況、⑧簡単な臨床経過、⑨検査結果の情報提供を受ける「担当官」および「医務担当者」の「名前」、「連絡先」、「住所」、「電話」、「FAX」と「e-mailアドレス」。

必要事項(動物サンプルの場合): ①提供者名、②採取年月日、③採取地、④動物種と品種、⑤咬まれたヒトや動物、⑥検体動物は死亡か安楽殺かの別、⑦検体動物のワクチン接種状況、⑧検体動物は死亡前に捕獲、隔離、観察されたかの別、⑨検体動物の生前の挙動、⑩噛みつき等の暴露事故発生状況、⑪検査結果の情報提供を受ける「担当官」および「医務担当者」の「名前」、「連絡先」、「住所」、「電話」、「FAX」と「e-mailアドレス」。

IV. 狂犬病ウイルスの検査法の実際

検査材料を受理した検査室は、「受理した検査材料」と「添付されているデータシート」の内容が同一であることを確認し、直ちに検査を実施する。

狂犬病ウイルス感染の実験室診内検査は、状況により直接蛍光抗体法または免疫組織化学、RT-PCR 法(シーケンス含む)、ウイルス分離のいずれかもしくは複数の検査を行う。最終的には、実験室内検査の結果、臨床診断、疫学データ等から総合的に診断する。

一般的には、最も簡便で確実な検査方法として直接蛍光抗体法が行なわれている。臨床診断、疫学的情報等で狂犬病の疑いが強く示唆された症例で陰性を示した場合には、追検査やウイルス分離の成績を待って最終的な確定を行う。

検査結果については速やかに関係者等に報告を行う。

1 直接蛍光抗体法

ヒトでは主に項部皮膚生検、気管吸引材料等を使用して生前診断が行われる。動物の検査では、「脳幹部(視床、橋、延髄)」、「小脳」、「海馬」それぞれについて直接蛍光抗体法を行う。唾液腺の検査は咬傷時のウイルス排泄を知る1つの手掛かりとしてのみ行なわれている。特にウシ、ウマなどの大型の動物ではウイルスの抗原分布に偏りが見られるため検査部位を増やす必要がある。

現在、狂犬病検査に使用するFITC標識抗体「**FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin**」は、国内で入手可能である(製造元:FDI(フジレピオアメリカ)、販売:(株)テイエフビー/テイエフビーカスタマーズセンター(電話:03-5922-2821))。

<必要な試薬、器具、機材(指定品目または同等品を使用)>

* 検査用抗体

FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin, Fujirebio Diagnostics, Inc. 201 Great Valley Parkway Malvern, PA 19355 U.S.A.

*リン酸緩衝液(PBS(-))

*蒸留水

*封入材(10%グリセリン-PBS(pH8.4))

*ハサミ

*ピンセット

*舌圧子(木製)

*無蛍光スライドガラス(3穴: HTC Super cured autoclavable)

*塗抹標本固定用染色バット

*冷アセトン(-20℃)

*ベンチコート(検査材料等の飛沫吸収用に作業領域全域に敷く)

*湿潤箱(蛍光抗体反応用)

*落射型蛍光顕微鏡(FITC 検出用のフィルターを使用)

<検査手順(操作は安全キャビネット(クラスI I)内で行う)>

1. 摘出した脳をシャーレ等に移し、延髄、橋、視床、小脳、海馬(左右)の組織*¹を1cm角大以下に切り出す。陰性対照は、正常イヌ脳を-80℃保存に保存をしておき、検査時に融解する。検体と同様にスタンプを作成し陰性対照とする。(検体と陰性対照とでコンタミがおこらないように解剖器具等は同じもので取り扱わない)
2. 切り出した組織を舌圧子に置く。血液が多量についている場合はキムワイプで取り除いてから、無蛍光スライドガラス(3穴スライドガラス*²が扱いやすい。スライドガラスの汚れを落とすために、70%アルコールを吹きかけキムワイプできれいにふき取る)に組織をスタンプする(血液は非特異反応の原因になりやすいのでなるべく取り除く)。
スタンプは、各部位について、最低3組を作成し、再検査に備える。(参照: 図1)
3. 作成した塗抹スライドは安全キャビネット内で十分に風乾する(10-30分くらい)。
4. 冷アセトン(-20℃)を染色ビン等に満たし、塗末スライドを完全に浸し固定する(-20℃で30分~オーバーナイト)。
5. アセトンから取り出し、十分に風乾する(乾燥後、染色まで-20℃以下で1ヶ月は保存可能、-80℃保存推奨)。
6. 指定濃度に希釈した標識抗体*³を重層(約150ul/well)。室温で30分反応させる。

7. 反応液は捨て、スタンプ面を洗ビンの PBS で吹きかけて洗い流し、十分量の PBS が入った染色ビンに 10 分間浸ける。10 分後に取り出したら、洗ビンに入れた PBS をスタンプ部位に吹きかけ余分なゴミ等を洗い流す。
8. 再度、PBS に 10 分間浸け、同様に洗ビンで洗い流す。
9. 蒸留水に 2-3 秒浸して塩を除去し、風乾する。
10. 10%グリセリン-PBS(pH8.4)*⁴で封入しカバーガラスをかけ蛍光顕微鏡で観察する。

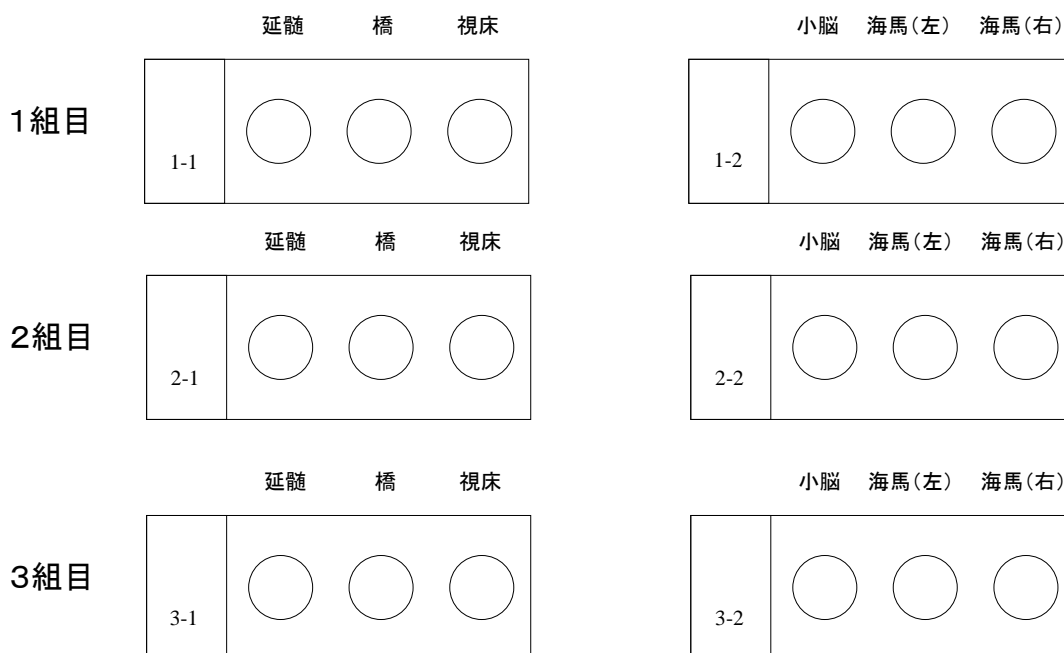


図. 1 RV-FA スライドスタンプ

* 1 脳組織 (検査部位)

Reference: (9)

* 2 3穴無蛍光スライドグラス

3 well 11MM

HTC SUPER CURED(R) AUTOCLAVABLE BLUE

CEL-LINE/ERIE SCIENTIFIC. CO.

* 3 標識抗体

FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin, Fujirebio Diagnostics, Inc. 201 Great Valley Parkway Malvern, PA 19355 U.S.A.の凍結乾燥品を所定量(5ml)の DW で溶解する。必要量を PBS で 25 倍*³⁻¹に希釈し、1%エバンスブルー溶液を 2ul/ml (500 倍希釈) の割合に加える。

なお、希釈した標識抗体を濾過する場合は、タンパク低吸着性 0.45um 濾過フィルター

(Millipore 製品であれば PVDF 製 Millex-HV など)を通して使用する。

* 4 10%グリセリン-PBS(pH8.4)

Reference: (10)

2 RT-PCR 法

狂犬病ウイルスの遺伝子検出で行われるRT-PCR は、一般的に実験室で行われているRT-PCR 法と同じである。狂犬病ウイルスのRT-PCR は主として脳組織を検査材料として行なわれるが、ヒトの生前診断においては唾液や髄液、頸部の毛根部皮膚生検材料等を利用して行われている。複数の検体を取り扱う場合には、目的遺伝子の重複汚染に注意を払う。狂犬病ウイルスは、ウイルスRNA の抽出操作を行った時点で感染性を失う。従って、RNA 抽出以降は一般的な実験室内での操作が可能である。

<必要な試薬、器具、機材(指定品目または同等品を使用)>

* O リング付き2.0ml 遠心チューブ(IWAKI、スクリューキャップマイクロチューブ、No:2758-020)

* RNA 抽出液:TRI-ZOL reagent(GibcoBTL 社、No:15596-026)

* クロロホルム

* イソプロパノール

* 逆転写酵素:RTase(Promega 社、AMV reverse transcriptase、No:M9004)

* Taq DNA ポリメラーゼ(TaKaRa 社、TaKaRa Ex Taq、No:RR001A)

* RNase 阻害剤(Promega 社、Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor、No:N2511)

* QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (210210 or 210212)

* エタノール

* RNase free 蒸留水

* エチジウムブロマイド(EtBr)

* アガロース(SIGMA、Agarose A0169など)

* DNA サイズマーカー(New England BioLabs, Inc.、1kb DNA Ladder、No:323-2Lなど)

* マイクロチューブ用遠心機

* サーマルサイクラー

* 電気泳動槽 (コスモバイオ社、ミューピッドなど)

* UVゲル撮影装置 (FAS IIIなど)

* グローブ

* 逆転写用プライマー:

JW12(mix) [5'- ATG TAA CAC C(C/T)C TAC AAT G -3']

JW12は ()で示したC とTがそれぞれ10pmol/ulとなるように調整

* Two step RT-PCR プライマーセット (2種類):

(1) 1468bp のフラグメントが増幅

フォワードプライマー 10g [5'- CTA CAA TGG ATG CCG AC -3']

リバースプライマー 304 [5 - TTG ACG AAG ATC TTG CTC AT -3]

(2) 606bpのフラグメントが増幅

フォワードプライマー JW12(mix) [5'- ATG TAA CAC C(C/T)C TAC AAT G -3']

JW12は ()で示したCとTの塩基がそれぞれ10pmol/ulとなるように調整

リバースプライマー JW6(mix)

JW6(DPL) [5'- CAA TTC GCA CAC ATT TTG TG - 3']

JW6(E) [5'- CAG TTG GCA CAC ATC TTG TG - 3']

JW6(M) [5'- CAG TTA GCG CAC ATC TTA TG - 3']

JW6(DPL), JW6(E), JW6(M)がそれぞれ10pmol/ulとなるように調整

* OneStep RT-PCR用プライマーセット

N7(mix): [5' - ATG TAA CAC C(T/C)C TAC AAT GG - 3']

N7(mix) は ()で示したTとCの塩基がそれぞれ10pmol/ulとなるように調整

JW6(mix):

JW6(DPL) [5'- CAA TTC GCA CAC ATT TTG TG - 3']

JW6(E) [5'- CAG TTG GCA CAC ATC TTG TG - 3']

JW6(M) [5'- CAG TTA GCG CAC ATC TTA TG - 3']

JW6(DPL), JW6(E), JW6(M)がそれぞれ10pmol/ulとなるように調整

<検査手順>

ウイルスRNA の抽出:

検査検体が犬脳組織の場合

1. 1ml の TRIZOL に 50-100mg の脳組織を加え、ホモゲナイズする。(細胞破碎機としてミニビード・ビーター、Ceramics YTZ ボール入り Asist 2ml tube を使用し 20 秒ホモゲナイズする。脳材料は、延髄、橋、視床の各 20-30mg ほどを pool した 50-100mg の検体-1 と、小脳、海馬 (左右) を同様に pool した検体-2 の 2 つを別々に TRIZOL でホモゲナイズする。以下、検体は検体-1、検体-2 で RNA 抽出を行う)
2. 室温 5 分放置し、0.2ml のクロロホルムを加えボルテックス(15sec)。
3. 室温 2-3 分放置し、12,000xg (13,000 rpm)、4℃、10 分遠心。
4. 上層 (水層) を別のチューブに移し、0.5ml のイソプロパノールを加え混和。
5. 室温 10 分放置し、12,000xg (13,000 rpm)、4℃、10 分遠心。
6. 上清をチップでほぼ取り去り、壁に残った上清部分を再度 12,000xg (13,000 rpm)、4℃、1 分スピンドウンし、沈殿の反対側の壁面から上清を完全に取り去る。
7. 75%エタノール 1ml を入れ、軽く転倒混和し 7,500xg (11,000 rpm)、4℃、5 分遠心。
8. 上清をチップでほぼ取り去り、壁に残った上清部分を再度 7,500xg (11,000 rpm)、4℃、1 分スピンドウンし、沈殿の反対側の壁面から上清を完全に取り去る。
9. フタを開けたまま、安全キャビネット内の室温で 5-10 分乾燥。
10. 50ul の DW をチューブに入れ、55-60℃、10 分加熱。氷上で冷却。スピンドウン。
11. すぐに RT の操作に移る。残りは-80℃に保存。

検査検体がヒトの唾液・脊髄液の場合

1. 50ml の遠心管に、唾液あるいは脊髄液の 0.5ml と 5ml の TRIZOL を入れ、ボルテックス (約 15sec) 後、5 本の 2ml のチューブに 5 等分(1.1ml/tube)する。
2. 室温 5 分放置し、0.2ml のクロロホルムを加えボルテックス(15sec)。
3. 室温 2-3 分放置し、12,000xg (13,000 rpm)、4℃、10 分遠心。
4. 上層 (水層) を別のチューブに移し、0.5ml のイソプロパノールを加え混和。
5. 室温 10 分放置し、12,000xg (13,000 rpm)、4℃、10 分遠心。
6. 上清をチップでほぼ取り去り、壁に残った上清部分を再度 12,000xg (13,000 rpm)、4℃、1 分スピンドウンし、沈殿の反対側の壁面から上清を完全に取り去る。

7. 75%エタノール 1ml を入れ、軽く転倒混和し 7,500xg (11,000 rpm)、4℃、5 分遠心。
8. 上清をチップでほぼ取り去り、壁に残った上清部分を再度 7,500xg (11,000 rpm)、4℃、1 分スピンドウンし、沈殿の反対側の壁面から上清を完全に取り去る。
9. フタを開けたまま、安全キャビネット内の室温で 5-10 分乾燥。
10. 10ul の DW を各チューブに入れ、55-60℃、10 分加熱。氷上で冷却。スピンドウン。
11. 1 本のチューブにプールして、すぐに RT の操作に移る。残りは-80℃に保存。

TRIZOL 溶液でホモゲナイズ(フェノール処理)を行うことでウイルスは不活化される。従って、これ以降の操作は安全キャビネット内で行う必要はないが、使用した器具等は十分に滅菌・消毒等の処置を行う。

a).Two step RT-PCR

逆転写反応(RT 反応):

- (1) 1ulの逆転写用プライマーJW12 (10pmol/ul-each) に、10ulの抽出したRNA 溶液を加えて95 °C、1分間の加熱、氷中で急速冷却後、室温とする。
- (2) 4ul の5xバッファー、4ul のdNTP (2.5mM-each)、1ul のRNasin (Ribonuclease inhibitor)、1ul のAMV RTase を加えて反応液の総量を21ul とする。
- (3) サーマルサイクラーで、42 °Cで45 分間、95 °Cで5 分間のRT 反応を行う。
- (4) 反応液の3ulを27ulのDWで10倍希釈する。

PCR 反応:

- (1) 10g/304プライマーセット
38ulのDW、5ul の10x ExTaq Buffer、4ul のdNTP Mixture (2.5mM-each)、1ul の10g (10pmol/ul)プライマー、1ulの304 (10pmol/ul)プライマー、0.25ulのTaKaRa Ex Taq (5U/ul)、1ul のRT 反応終了溶液をテンプレートとして加え総量50ul でPCR 反応を行う。ただし、テンプレートはRT 反応終了溶液の原液と10倍希釈液とする。
- (2) JW12/JW6プライマーセット
38ulのDW、5ul の10x ExTaq Buffer、4ul のdNTP Mixture (2.5mM-each)、1ul のJW12プライマー、1ul のJW6プライマー、0.25ul のTaKaRa Ex Taq (5U/ul)、1ul のRT 反応終了溶液をテンプレートとして加え総量50ul でPCR 反応を行う。ただし、テンプレートはRT 反応終了溶液の原液と10倍希釈液とする。

注意: RT反応、PCR反応ともに陽性コントロールは、コンタミが起こらないように各工程の最後に操作する。

10g/304, JW12(mix)/JW6(mix)共に、サーマルサイクラー条件は以下の通り。

95°C 5min
↓
95°C 30sec
50°C 20sec } x30
72°C 60sec }
↓
95°C 30sec
50°C 20sec } x1
72°C 10min }
↓
4°C

10g/304 は 1 % agarose(TAE)、 JW12/JW6 は 1.5 % agarose(TAE), にて確認する。

b). One step RT-PCR

20ulのDW、10ulの 5x Buffer、2ulのdNTP Mixture、3ulのJW6プライマー、3ulの N7(mix)プライマー、2ulのEnzyme mixture、10ulのRNA抽出液を加え総量50 μ l として RT-PCR 反応を行う。

サーマルサイクラーは以下の条件で行う。

50 °C 30 min (チューブは、ヒートブロックが 50°Cになってから入れる)

95 °C 15 min

↓

94 °C 60 sec
56 °C 60 sec } x40
72 °C 90 sec }

↓

72°C 10min

4 °C

↓

1.5% agarose gel にて泳動

増幅遺伝子の確認:

増幅産物をアガロース電気泳動後、EtBr 染色、またはSYBR染色を行いUV 照射によって目的遺伝子の存在を確認する。

a) Two step RT-PCT

- ・ 10g/304 プライマーセットでは、1,468bp の増幅産物を確認する。
- ・ JW12/JW6 プライマーセットでは、606bp の増幅産物を確認する。

b) One step RT-PCR

N7(mix)とJW6では606bpの増幅産物を確認する。

c) 増幅された遺伝子のシーケンシング

目的サイズの遺伝子が増幅された場合は、シーケンスを行い既存の狂犬病遺伝子と一致するかBLAST、系統樹解析等で確認する。

3 ウイルスの分離方法

狂犬病ウイルスの分離は乳のみマウスを利用したマウス脳内接種法とマウス神経芽腫細胞(MNA 細胞)を利用したウイルス分離法で行うことが可能である。マウス接種法は簡便で検出感度の優れた方法ではあるが検査に長い日数(一般に21-28 日間の観察が必要)を必要とする。一方、培養細胞を利用したウイルス分離法は簡便、短時間でウイルス分離が出来る。

a) マウス脳内接種法

マウス接種法による狂犬病ウイルスの分離は脳組織や唾液線の乳剤をマウスの脳内に直接接種して行う。なお、ウイルス分離の最終確認は前述の「直接蛍光抗体法」によりウイルス抗原の検出で行う。生後3日以内のマウスが最も感受性が高いが、性成熟したマウスの使用も可能である。狂犬病ウイルスに対する感受性は雌雄間で差がない。

<必要な器具等(指定品目または同等品を使用)>

- * マウス: 1から3日令の乳のみマウスを使用 (Swiss albino、BALB/c、ICR 等の白色マウスを使用する)
- * マウスケージ
- * 給餌及び給水器
- * 麻酔瓶
- * ハサミ
- * ピンセット
- * 舌圧子
- * 針と注射器(ツベルクリン用、25 μ l 容量、2段針もしくは1.0ml ディスポ注射器、27-26 ゲージ針)
- * ホモゲナイザー(破砕する組織の大きさに応じたものを使用)
- * 10-50%の非動化済み動物血清(ウマ、ウサギもしくはハムスター)を含む生理食塩水もしくはPBS(-)等の緩衝液(組織をホモゲナイズするのに使用)
- * FITC標識抗体 (FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin, Fujirebio)
- * 麻酔薬(イソフルラン)
- * ピペット
- * オートピペッター
- * 試験管もしくはコンカルチューブ(乳剤の希釈及び分注)

<検査手順(操作は隔離された専用の感染実験動物区で行う)>

感染乳剤の作製:

感染乳剤は無菌的に作製する。接種乳剤中には重量あたり10%の検査組織が含まれるようにホモゲナイザー等を使用し調製する。乳剤は遠心(4℃、12,000rpm、5分)を行いその上清を接種する。細菌汚染を防ぐために乳剤作製に使用する緩衝液にストレプトマイシン(500mg/ml)とペニシリン(500IU/ml)を加える。

マウスへの接種方法:

マウスへの乳剤接種はイソフルラン等で麻酔してから行う。親指でマウスの下顎、人さし指で反対側の頭部を抑えてマウスの頭部を固定する。一方の手で注射器をもちながら針をマウスの右目と右耳の中間点の頭頂部から脳内に0.1-0.2cm 刺して30 μ l を注入する。接種の終わったマウスは速やかにマウスケージに移して次の接種を始める。接種事故によりマウスが死亡しないことを確認して狂犬病発症の観察に移る。もし、接種後短時間(2日以内)にマウスが死亡した場合は廃棄して別の接種マウスを加えて数をそろえる。

マウスの観察:

狂犬病ウイルスを脳内に接種されたマウスが接種後5日以内に病的症状を示すことはまれではあるが、接種1日目から毎日観察を行うことが望まれる。

接種マウスは、その数、病状、死亡について21 日間継続して観察と記録を行う。

<記録すべきマウスの症状>

- * 体毛の逆立
- * 振戦(尾をピンセットでつまみ上げて空中で観察)
- * 後肢の協調運動の欠落(テーブルに置いて歩かせて観察)
- * 麻痺
- * 衰弱(瀕死状態)

ウイルスを接種して24-48 時間で死亡したマウスは狂犬病ウイルスではなく、ウイルス接種時の外傷による場合や細菌感染もしくは狂犬病ウイルス以外のウイルス感染によるものである。

ウイルス接種5日目以降から、診断目的のために1ないし2匹のマウスを毎日解剖して脳をスライドグラスに塗末、アセトン固定後、直接蛍光抗体法によるウイルス検出を行う。

b) 培養細胞を利用したウイルス分離法

狂犬病ウイルスの分離はマウス神経芽腫細胞(MNA 細胞)によって行う。本培養法は、マウスによる検査系の欠点である長い検査日数(一般に21-28 日間の観察が必要)を必要としない点がすぐれているが、野外株によっては抗原の検出が難しい場合がある。

< 必要な試薬と機材(指定品目または同等品を使用) >

- * 組織培養フラスコ(IWAKI、25cm² フラスコ、No: 4100-010)
- * 培養液(E-MEM10:MEM 培地(SIGMA 社、MEM、No:M-4655)に10%ウシ胎児血清に抗生物質(100U/ml-Penicillin、100µg/ml-Streptomycin)・抗カビ剤(0.25µg/ml、アンホテリシンなどを加える)
- * ウシ胎児血清
- * 抗生物質Invitrogen社、Penicillin-Streptomycin、No: 15140-063 あるいはInvitrogen社、Antibiotic Antimycotic 15240-096)
- * 抗カビ剤(WAKO 社、Amphotericin B、No:015-13361 あるいはInvitrogen社、Antibiotic Antimycotic 15240-096)
- * トリプシン(Invitrogen社、0.05% Trypsin/EDTA、No:25300-054)
- * FITC標識抗体(FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin, Fujirebio)
- * O リング付き2ml マイクロチューブ(IWAKI、No:2757-020)
- * O リング付き1.5mlマイクロチューブ(IWAKI、No:2752-015)
- * ディスポーザブルピペット(1ml、5ml、10ml)
- * ピペットエード
- * CO₂ インキュベーター(5%-CO₂、35-37°C)
- * スライドグラス(8穴、テフロンコーティング:HTC Super cured autoclavable)使用前に、70%エタノールで表面のゴミなどをふき取り、UV照射をしておく。

< 検査手順(操作は安全キャビネット(クラスI I)内で行う) >

(1) ホモゲナイザー等を使い10%の検査組織が含まれるようにE-MEM10で乳剤調製する。

- (2) 2mlマイクロチューブに移し替える。
- (3) 遠心(4°C、12,000rpm、5分)を行い破碎した組織を沈殿させる。
- (4) 遠心上清を1.5ml の培養細胞浮遊液(およそ $2\text{-}3\times 10^6$ 個のMNA 細胞を50ml コニカルチューブに浮遊したもの)に加える。
- (5) ウイルスと培養細胞の混和液を37°Cで1時間培養を行う(15 分ごとに攪拌)。
- (6) E-MEM10 をウイルス-培養細胞液に加えて5ml に調整する。
- (7) ウイルス-培養細胞液を3枚の8 穴スライドグラスに2 滴滴下(5ml ピペット使用で約100ul)してスライド上で培養を行う。残りのウイルス-培養細胞液(およそ半量)はE-MEM10で総量5mlとして培養フラスコ(25cm²フラスコ)で培養を行う。
- (8) 24時間後、48 時間後、72時間後に8 穴スライドをPBS(-)で軽く洗いアセトン固定を行う。
- (9) FITC 標識-抗狂犬病ウイルス抗体を用いて培養細胞内のウイルス抗原を確認する。

／／前述(9)でウイルス抗原の確認が困難な場合や、検査成績が陰性でも臨床所見や疫学的情報から狂犬病ウイルスの感染が強く疑われている場合には以下に進む／／

- (10) 3日後のウイルス-培養細胞液を播種した培養フラスコの培地1mlを新たに用意したMNA細胞($2\text{-}3\times 10^6/1.5\text{ml}$)に(4) – (7)と同様な操作で継続する。
- (11) (8) – (9)と同様にウイルス抗原を確認する。
- (12) もう一度、同様に継代し、陰性の場合、継代を中止する。陽性の場合、ウイルスを回収する。

cf. スライドグラスによる感染細胞の培養はシャーレ等の容器内で行いウイルス液の外部への飛散を防ぐ。シャーレ等の容器内には湿らせたペーパータオル等を敷いてスライド上の培養液の蒸発・乾燥を防ぐ。

4 免疫組織化学

採取された組織材料は採材直後に中性緩衝ホルマリンで固定を行い、速やかに検査室に輸送する。生検・剖検組織は中性緩衝ホルマリンで固定することにより感染性が喪失する。固定の後に通常の方法でパラフィン包埋、薄切を行い、パラフィン切片を作成する。免疫組織化学に加え、HE染色も同時に行い、組織学的所見を加え、結果を判定する。

<必要な試薬、器具、機材(指定品目または同等品を使用)>

- * 抗狂犬病ウイルス核タンパクウサギ抗血清(感染研作成、Pathol Int、53:525-533、2003.)
- * ダコ社製 Envision ポリマー試薬 抗ウサギ抗体用
- * 0.01M クエン酸バッファー(pH6.0)
- * PBS(-)
- * 蒸留水
- * 封入材
- * 染色バット
- * 染色籠
- * 特級エタノール
- * 特級メタノール
- * 特級キシロール
- * 30%過酸化水素水
- * ピンセット
- * スライドガラス
- * カバーガラス
- * 湿潤箱(免疫組織化学反応用)
- * 恒温槽(37 °C)
- * 光学顕微鏡

[リリーの緩衝ホルマリンの組成]

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 44 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 163.8 g

特級ホルマリン1L

蒸留水全量10 L となるように蒸留水を加える

<検査手順>

- (1) パラフィン切片を、スライドが完全に浸漬する量の特級キシロールを入れた染色バットに浸漬する。5分間、時折、上下に動かす。バットを換えて、計3回繰り返し、脱パラフィンを行う。
- (2) 100%エタノールを入れた染色バット中に5分間、3回繰り返す。次に70%エタノールを入れたバット中に5分間浸漬、最後に蒸留水に浸漬して親水化する。
- (3) 0.3%過酸化水素メタノール溶液中に30分間、室温で浸漬する。
- (4) 蒸留水中にスライドを浸漬する。
- (5) クエン酸バッファーにスライドを浸漬しオートクレーブ121°C10分かける。
- (6) 5%-正常ヤギ血清/PBS(-)で切片をカバーし、室温で20分間静置する。
- (7) 過剰の正常ヤギ血清を拭き取り、抗狂犬病ウイルス核タンパク抗体と4°Cにて1晩反応させる(検査のために調整した抗体は1週間以内に使用する。使用抗体は4°Cに保存する)。
- (8) PBS(-)で抗体を洗い流し、十分量のPBS(-)を入れたバットに浸漬する。5分間3回繰り返す。
- (9) Envision ポリマー試薬ウサギー一次抗体用を室温で30分反応させる。
- (10) PBS(-)で抗体を洗い流し、充分量のPBS(-)を入れたバットに浸漬する。5分間3回繰り返す。
- (14) 切片をDAB発色キットを用いて発色させ必要に応じて核染を行う。
- (11) 脱水、透徹、封入する。

<結果の判定>

HE染色では、狂犬病で死亡した患者組織には炎症反応は乏しいが、神経細胞中にNegri小体とよばれる特徴的な好酸性細胞質内封入体がみられることがある(添付図2、左)。免疫組織化学では、狂犬病発症者の中枢神経系組織に狂犬病ウイルス抗原を豊富に認め、ウイルス抗原はほぼ全身の神経系組織に分布する(添付図1、右)。生前診断として、発症時の皮膚生検組織に含まれる末梢神経組織にウイルス抗原を確認することもある。

V. 引用文献等

狂犬病に関する対応マニュアルおよびウイルスの取扱について

- (1) 狂犬病対応ガイドライン2001、厚生労働省健康局結核感染症課、2001 年10月18 日、第1版第1刷。
- (2) 国立感染症研究所病原体安全管理規程、平成11 年4月、国立感染症研究所。

検査方法に関する資料

- (3) Meslin, F.-X., Kaplan, M.M. and Koprowski, H., eds.: Laboratory techniques in rabies. 4th ed., WHO Geneva, 1996.
- (4) WHO: 8th Report of the WHO Expert Committee on Rabies, Technical Report Series, No.824, Geneva, 1992.
- (5) Smith, J.S., Rabies Virus, In: Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C. and Tenover, F.C. and Tenover, R.H., eds., 7th ed., Manual of clinical microbiology, AMS press, Washington, D.C., 1099-1106, 2003.
- (6) Trimarchi, C.V. and Briggs, D.J., The diagnosis of rabies, In: Rabies., Guidelines for Medical Professionals, Veterinary Learning systems, a division of MediMedia, USA, 55-66, 1999.
- (7) Black, E.M., Lowings, J.P., Smith, J., Heaton, P.R. and McElhinney, L.M., A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan™ technology. J.Virol.Methods., 105:25-35, 2002.
- (8) Inoue, S., Sato, Y., Hasegawa, H., Noguchi, A., Yamada, A., Kurata, T. and Iwasaki, T. , Cross-reactive antigenicity of nucleoproteins of lyssaviruses recognized by a monospecific anti-rabies virus nucleoprotein antiserum on paraffin sections of formalin-fixed tissues. Pathol.Int., 53:525-533, 2003.
- (9) John Bingham , Maria van der Merwe Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. Journal of Virological Methods 101 (2002) 85–94
- (10) Robert J. Rudd, Jean S. Smith , Pamela A. Yager , Lillian A. Orciari , Charles V. Trimarchi A need for standardized rabies-virus diagnostic

procedures: Effect of cover-glass mountant on the reliability of antigen detection by the fluorescent antibody test. *Virus Research* 111 (2005) 83–88

(11) Inoue, S., Sato, Y., Hasegawa, H., Noguchi, A., Yamada, A., Kurata, T. and Iwasaki, T. 2003. Cross-reactive antigenicity of nucleoproteins of lyssaviruses recognized by a monospecific anti-rabies virus nucleoprotein antiserum on paraffin sections of formalin-fixed tissues. *Pathology International*. 53:525-533.

(12) Nishizono A., Khawplod P., Ahmed K., Goto K., Shiota S., Mifune K., Yasui T., Takayama K., Kobayashi Y., Mannen K., Tepsumethanon V., Mitmoonpitak C., Inoue S. and Morimoto K. 2008. A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis. *Microbiol.Immunol.* 52:243-249.

(13) 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.* 59:555-66.

(14) Inoue S., Boldbaatar B., Sugiura N., Noguchi A., and Park C.-H. (2010) 10 Rabies. In: *Animal Viruses* (Maeda A., ed.). Transworld Research Network. p143-153.

(15) 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.

(16) Nguyen T.K.A., Nguyen vinh D., Ngo C.G., Nguyen van D., Nguyen T.T.H., Pham Q.B., Inoue S., Yamada A., Dinh K.X., Nguyen T.H.H., and Nguyen T.H. (2010) Characterization nucleoprotein of isolated rabies virus in Vietnam 2006-2009”, *Journal of Preventive Medicine, Vietnam*. Volume XX, 6:164 - 170.

(17) Nguyen A.K.T., Nguyen vinh D., Ngo G.C., Nguyen T.T., Inoue S., Yamada A., K.X.D., Nguyen van D., Phan T.X., Pham B.Q., Nguyen H.T., and Nguyen H.T.H. (2011) Molecular epidemiology of rabies virus in Vietnam (2006-2009). *Jpn.J.Infect.Dis.* 64:391-396.

(18) Hatakeyama K., Sadamatsu K., and Kai A. (2011) Phylogenetic analysis of rabies viruses isolated from animals in Tokyo in the 1950s. *The J. Jpn.*

Assoc.Infec.Dis. 85:238-243.

狂犬病の概要に関する資料

- (1) 狂犬病、編集：山崎修道、井上栄、大久保一郎、神谷斎、倉田毅、小池麒一郎、竹内勤、千葉俊三、箕輪眞澄、感染症予防必携、日本公衆衛生協会、88-91、1999.
- (2) Dietzschold, B, Rupprecht, C.E., Fu, Z.F. and Koprowski, H., Chapter 38, Rhabdoviruses, In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., eds., Fields Virology. 3rd ed., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1137-1159, 1996.
- (3) Dodet, B., Meslin, F.-X. and Heseltine, E., eds.: Rabies control in Asia, Proceedings of the Fourth International Symposium organized by the Merieux Foundation, with the co-sponsorship of the World Health Organization, Hanoi, Viet Nam, 5-9 March 2001, John Libbey and Company Ltd., 2001.
- (4) 井上 智. 特集・エマージングウイルス感染症-人類の新たな脅威となるウイルス病／狂犬病と狂犬病ウイルス。企画：倉田 毅。生物の科学 遺伝:53、14-19、1999
- (5) 井上 智. 狂犬病:狂犬病発生時の行政機関対応マニュアル／特集 動物由来ウイルス感染症(- 現状・課題・対策 -)、臨床研究と展望。日本臨床:63、2180-2186、2005
- (6) 高橋華子、相楽裕子、藤田せつ子、林 宏行、吉田幸子、井上 智、佐多徹太郎。36年ぶりに国内で発生した狂犬病の臨床経過と感染予防策－横浜の事例。＜特集＞ 狂犬病 2006年現在。病原体微生物検出情報 vol.28、64-65、2007
- (7) 森本金次朗、井上 智。アジアの狂犬病と疫学。＜特集＞ 狂犬病 2006年現在。病原体微生物検出情報 vol.28、61-68、2007
- (8) 神垣太郎、鈴木 陽、押谷 仁、Miranda ME、井上 智。フィリピンにおける狂犬病の流行状況およびその対策。＜特集＞ 狂犬病 2006年現在。病原体微生物検出情報 vol.28、69-70、2007
- (9) 井上 智、山田章雄、森本金次朗、倉根一郎、飛梅 実、佐多徹太郎。ヒト狂犬病の検査 - 生前診断から剖検診断まで(その意義)。＜特集＞ 狂犬病 2006年現在。病原体微生物検出情報 vol.28、70-73、2007
- (10) 井上 智、佐藤 克、梅田浩史、衛藤真理子。狂犬病(Rabies)。JRA特別振興事業(ウエストナイルウイルス感染症等特別対策事業)。社団法人 全国家畜畜産物衛生指導協会。2008
- (11) 井上 智。狂犬病の診断技術向上のためのイヌの頭部解剖手技の習得モデルと教材開発の紹介。ラボテック(技術紹介)。LABIO 21。34:33-35、2008

- (12)井上 智、野口 章。トピック:リッサウイルス感染症。検査と技術。36:1465-1467、2008
- (13)井上 智。人獣共通感染症が侵入・発生した場合の動物側の対応。特集:海外からの人獣共通感染症の侵入危機とその対策。獣医畜産新法 (Journal of Veterinary Medicine)。61 :901-907、2008
- (14)井上 智。(7)狂犬病ウイルス、8-4 ウイルス、第8章病原微生物の特性と対策。バイオセーフティの辞典:病原微生物とハザード対策の実際。編集:バイオメディカルサイエンス研究会。医学評論社。p258-259、2008
- (15)提 言:狂犬病対策システムの構築に向けて。日本学術会議、生産農学委員会獣医学分科会、平成20年(2008年年)8月28日
- (16)井上 智。ウイルス 狂犬病。ZOONOSIS HANDBOOK(ズーノーシスハンドブック:医療関係者・獣医療関係者のための診断・治療ガイド)。監修:岸本寿男、山田章雄。Medical Science(メディカルサイエンス社)、41-43、2009
- (17)井上 智。ウイルス リッサウイルス感染症。ZOONOSIS HANDBOOK(ズーノーシスハンドブック:医療関係者・獣医療関係者のための診断・治療ガイド)。監修:岸本寿男、山田章雄。Medical Science(メディカルサイエンス社)、75-76、2009
- (18)井上 智、二宮 清。5 狂犬病、第3章 中枢神経症候群。第I部 臨床編。2ウイルス感染症の検査・診断 スタンダード。編集:田代真人、牛島廣治。羊土社、p80-86、2011

狂犬病に関する通知(結核感染症課)

- (14)平成13年10月25日(結核感染症課事務連絡)「狂犬病対応ガイドライン2001の配布について」
- (15)平成14年9月27日(厚生労働省健康局結核感染症課長通知、健感発第0927001号)「我が国に不法に持ち込まれる犬の対策等の徹底について」
- (16)平成14年11月8日付(結核感染症課事務連絡)「CD ROM(タイで麻痺型狂犬病と診断された犬の臨床経過)の配布について」
- (17)平成15年1月21日付(結核感染症課事務連絡)「狂犬病に感染する動物の概要」

VI. 連絡先

国立感染症研究所 獣医科学部 第二室

井上 智

野口 章

〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1

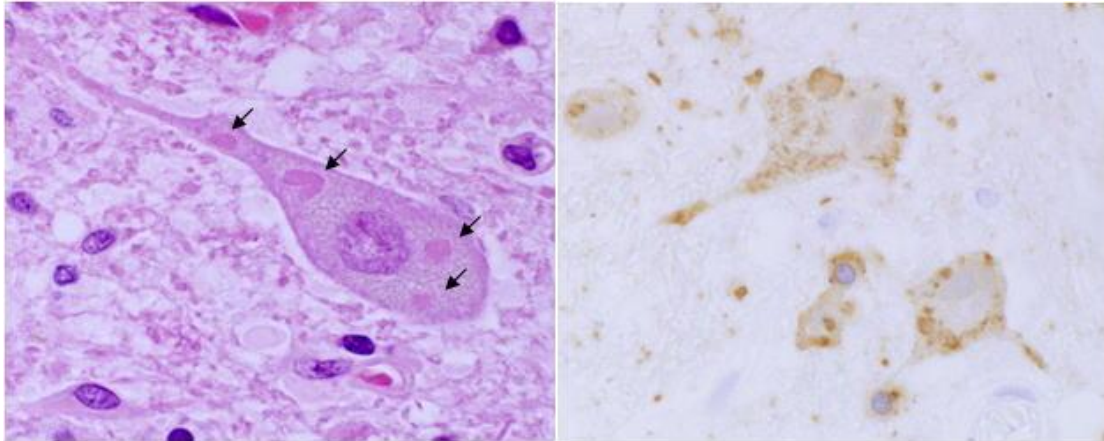
電話 03-5285-1111 (代表)

FAX 03-5285-1179 (直通)

VII 執筆者一覧

井上 智:	国立感染症研究所獣医科学部
野口 章:	国立感染症研究所獣医科学部
飛梅 実:	国立感染症研究所感染病理部
片野晴隆	国立感染症研究所感染病理部
長谷川秀樹:	国立感染症研究所感染病理部
林 昌宏:	国立感染症研究所感ウイルス第一部
伊藤睦代:	国立感染症研究所感ウイルス第一部
畠山 薫:	東京都健康安全研究センター

添付図1病理組織学的検査



- 左： ヒト脳幹部の神経細胞にみられるNegri小体(矢印、好酸性細胞質内封入体)
右： 抗狂犬病N蛋白抗体を用いた免疫組織化学。ヒト神経細胞中に狂犬病ウイルス抗原を認める。(国立感染症研究所感染病理部ホームページより転載)