

長崎県における狂犬病の検査方法の検討

山下 綾香、吉川 亮、三浦 佳奈、松本 文昭、田栗 利紹

Laboratory Diagnosis of Rabies virus in Nagasaki Prefecture

Ayaka YAMASHITA, Akira YOSHIKAWA, Kana MIURA, Fumiaki MATSUMOTO and Toshitsugu TAGURI

Key words : Rabies, Rabies virus, Zoonosis, RT-PCR, Direct Immunofluorescence Assay

キーワード : 狂犬病、狂犬病ウイルス、人獣共通感染症、RT-PCR、直接蛍光抗体法(DFA法)

はじめに

狂犬病は、発症後の死亡率が極めて高い人獣共通感染症(動物由来感染症)である。ヒトへの感染源の99%がペットの犬といわれるが、ネコや野生動物(コウモリなど)からの感染も報告されており、感染動物に咬まれたり、引っ掻かれたりしてできた傷口からの侵入によって発症する¹⁾。

日本での狂犬病は1957年以降発生していないが²⁾、近年、中国、インド、インドネシア、フィリピン、ベトナム等で狂犬病の発生が拡大していること³⁾から、狂犬病の脅威はなくなることはなく、依然として公衆衛生において重要な感染症の一つである。以上のことから、国内で狂犬病の発生がない状況下であっても、狂犬病検査体制を整備することは必須であり、今回、狂犬病の検査(遺伝子検査と抗体検査)を検討したので、その概要を報告する。

調査方法

1. 遺伝子検査

①材料

国立感染症研究所から衛生微生物技術協議会リファレンスセンターを通じて配布された Positive control RNA を使用して RT-PCR を行った。また、Positive control RNA の10倍段階希釈により、 $10 \sim 10^7$ copies/mL を作製し、検出感度を調査した。

②方法

国立感染症研究所 HP 病原体検出マニュアル・狂犬病⁴⁾に準拠し、N 遺伝子上のプライマー

セット N7(mix)/JW6(mix)を用いて増幅反応を行った。遺伝子増幅反応(PCR)条件およびプライマーを図1に示した。その後アガロースゲル電気泳動を行って 606 bp の増幅産物を確認した。増幅産物は、シークエンスを行い、塩基配列決定後、BLAST 検索により狂犬病ウイルス遺伝子であることを確認した。また、当所で他の四類感染症のウイルス検査で常用している SuperScript III RT/Platinum Taq Mix (Invitrogen)を用いた方法でも増幅反応を行い、2種類の方法の比較をした。

2. 抗体検査

①材料

2016年リファレンスセンターを通じて配布された抗体及び陽性スライドを被検材料とした。また、2014年に配布された抗体も共に検査を行い、比較をすることで保管精度を検証した。配布された抗体は5 mLのDWに溶解し(原液とする)、遮光チューブに小分けして入れ、 -30°C で2年間保管した。凍結融解後は 4°C で保管した。配布された陽性スライドは、塗抹抗原にHEP株感染マウス脳を使用したものであった。

②方法

国立感染症研究所 HP 病原体検出マニュアル・狂犬病⁴⁾に準拠した。当センターの検査手順を図2に示した。

③判定

蛍光顕微鏡下でB励起波長(励起波長450~490 nm)を使用して、200~400倍で観察した。被検組織内にFITCの黄緑色蛍光粒子を確認し、

陽性とした。

調査結果および考察

1. 遺伝子検査結果

Positive control RNA で 606 bp の増幅産物が確認でき、動作確認が出来た。泳動結果を図 3 に示した。次に QIAGEN では 10^{-6} copies/mL まで 606 bp の増幅産物が確認でき、Invitrogen では 10^{-4} copies/mL まで 606 bp の増幅産物が確認できた。泳動結果を図 4 に示した。また、増幅産物は狂犬病ウイルス遺伝子であることが確認できた。QIAGEN の検出感度がよかったため、今回の結果をふまえ、QIAGEN での検査を実施することとした。また、検査に使用する Positive control RNA は 10^{-4} copies/mL に調製後小分けし -80°C で保存をすることが最適であると考えられた。今後は、イヌの脳幹部(視床、橋、延髄)、小脳、海馬)を使用し、前処理の手順を確認したい。

2. 抗体検査結果

直接蛍光抗体法を行った結果を図 5 に示した。マウス脳に感染させた HEP 株が FITC 染色により発色して陽性であることを確認できた。また、2014 年に調製した抗体と、今回調製した抗体では蛍光発色に大きな差はなかったことから、原液を調製してから 2 年間は抗体の使用が可能であることがわかった。今後は、犬の解剖をする際の手順を確認するとともに、抗体の長期保存についても検討を継続していく。

謝辞

研修でご指導いただいた国立感染症研究所獣医科学部第二室の井上智室長、堀田明豊先生、大分大学山田健太郎先生および宮崎大学の皆様に深謝する。

参考文献

- 1) World Health Organization, Rabies Fact Sheet, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/>, 2017
- 2) 国立感染症研究所 狂犬病 2006 年現在 IASR28(3)1-23,2007.<http://idsc.nih.gov.jp/iasr/28/325/inx325-j.html>
- 3) 井上 智, 島山 薫, 水越 文徳, 野口 章.: 国境を超える感染症 狂犬病 Dokkyo Journal of Medical Sciences42 (3) 215-223.(2015)
- 4) 国立感染症研究所 狂犬病マニュアル(平成 24 年)

Rabies 遺伝子の増幅反応

< primer set > 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 10 pmol/μL となるように調製

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 10 pmol/μL となるように調製

< 組成 >

	volume	final conc.
5×QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	5.0 μL	(1×)
dNTP Mix (10 mM)	1.0 μL	(0.4 mM)
forward primer (N7 (mix) ; 10 μM)	1.5 μL	(0.6 μM)
reverse primer (JW6 (mix) ; 10 μM)	1.5 μL	(0.6 μM)
RNase free H ₂ O	10.0 μL	
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix (5 U / μL)	1.0 μL	(0.2 U / μL)
extract RNA	5.0 μL	
total	25.0 μL	

< 反応条件 >

temperature(°C)	time	cycles
50	30 min	1
95	15 min	1
94	60 sec	
56	60 sec	40
72	90 sec	
72	10 min	1
4	∞	1
4	∞	1

	volume	final conc.	temperature(°C)	time	cycles
2×Reaction Mix	12.5 μL	(1×)	50	30 min	1
forward primer (N7 (mix) ; 10 μM)	0.5 μL	(0.2 μM)	94	2 min	1
reverse primer (JW6 (mix) ; 10 μM)	0.5 μL	(0.2 μM)	94	60 sec	
RNase free H ₂ O	6.0 μL		56	60 sec	40
SuperScript III RT/Platinum Taq Mix (1 U / μL)	0.5 μL		68	90 sec	
extract RNA	5.0 μL		68	10 min	1
total	25.0 μL		4	∞	1

図 1 Rabies virus 遺伝子の検索(上:QIAGEN 下:Invitrogen)

< DFA (直接蛍光抗体)法 >

- 1) FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin, Fujirebio Diagnostics, Inc. 201 Great Valley Parkway Malvern, PA 19355 USA の凍結乾燥品を所定量(5 mL)の DW で溶解する(原液とする)。必要量を PBS (-)で 25 倍に希釈し、1%エバンスブルー溶液を 2 μL / mL (500 倍希釈)の割合に加える。
- 2) 塗沫標本を冷凍庫(-30°C)から必要分取り出し、安全キャビネット内で十分に風乾する。
- 3) 標識抗体(約 50 μL / well)を塗沫面に滴下して、室温・暗所で 30 分反応させる。
※抗体が塗沫面全域に行き渡らない場合はチップなどを利用して広げる。
- 4) 反応後、捨て缶にスライドガラス上の抗体液を廃棄して、塗沫面を洗浄ビン(PBS (-))で吹きかけて洗い流し、十分量の PBS (-)に 10 分間浸漬する。
- 5) 浸漬後、スライドを取り出して、塗沫面を洗浄ビン(PBS(-))で吹きかけて洗い流し、再度、十分量の PBS (-)に 10 分間浸漬する。
- 6) 浸漬後、スライドを取り出して、蒸留水に 2-3 秒浸して塩の除去を行って、風乾する。
※スライドガラスの塗沫面をこすり取らないように余分な水滴をキムワイブ等で除く。
- 7) カバーガラスと 10%グリセリン-PBS (pH8.4)で塗沫面を封入する。
- 8) 暗室にて蛍光顕微鏡でスライドを鏡検する。

図 2 DFA 法による狂犬病の検査手順

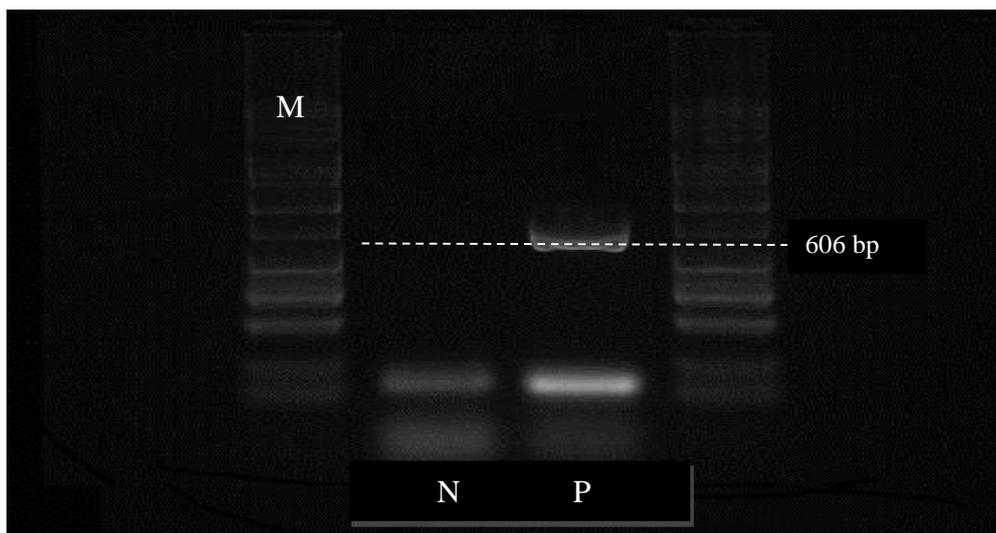


図3 陽性コントロールの遺伝子検査結果
P: Positive control (606 bp)、M: Size marker、N: Negative control

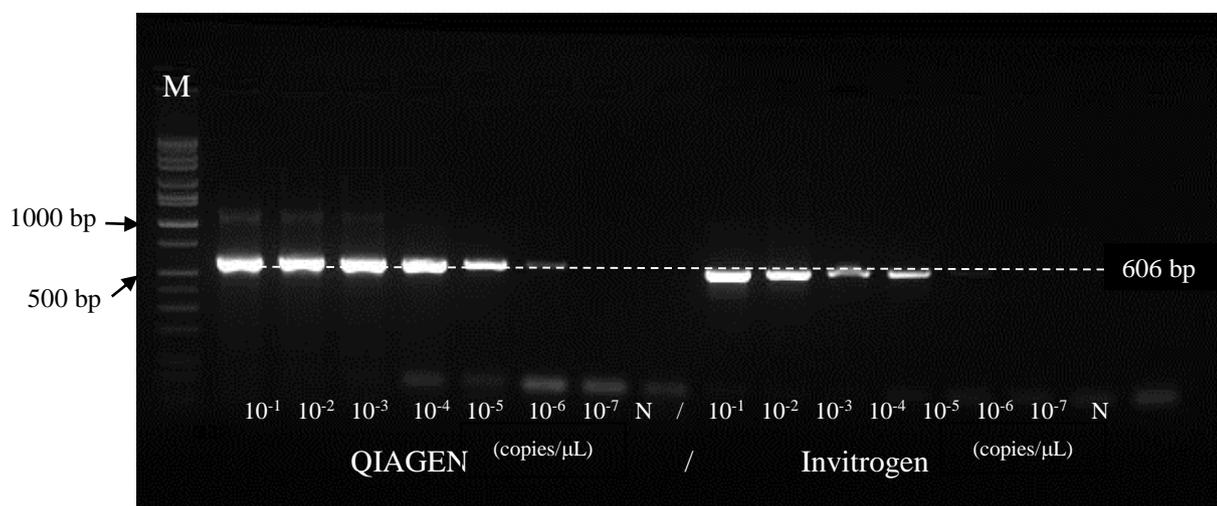


図4 異なる DNA ポリメラーゼキットによる遺伝子検査結果の比較
Break line: Target DNA (606 bp)、M: Size marker、N: Negative control

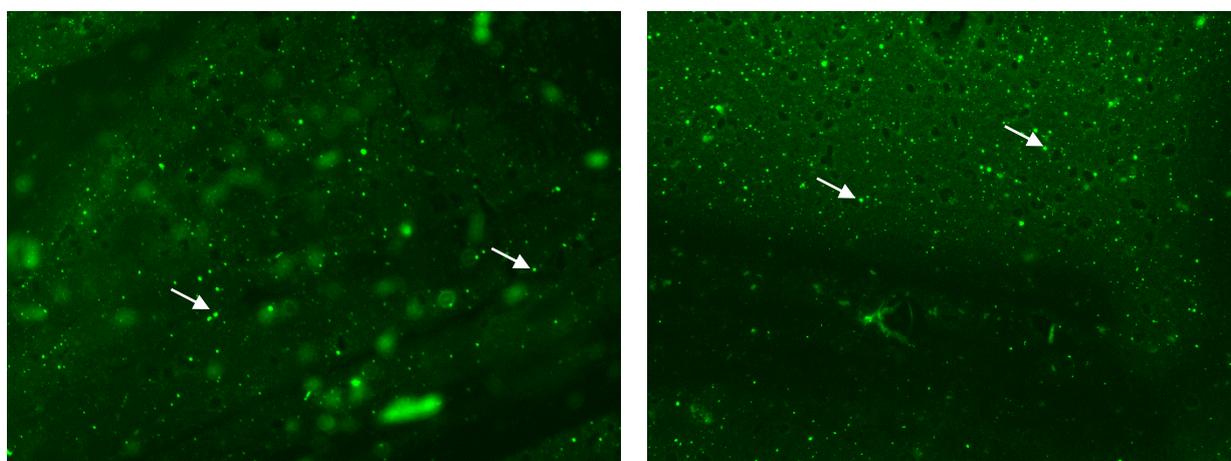


図5 マウス脳に感染させた Rabies virus HEP 株の直接蛍光抗体法による染色画像の比較
左は 2014 年調製抗体、右は今回調製抗体により処理した組織切片の FITC 染色像、矢印: Rabies virus