

### 3. 狂犬病ウイルスの病原性に関する研究の進展

伊藤 直人, 杉山 誠

岐阜大学 応用生物科学部 獣医学講座 人獣共通感染症学研究室

狂犬病ウイルスは、人および動物に致死的な神経症状を主徴とする狂犬病を引き起こす。ワクチンによって効果的に予防できるにもかかわらず、本病の世界的な流行状況は好転していない。安価で安全な弱毒生ワクチンの開発ならびに治療法の確立が本病の制圧の鍵である。この目標を達成するためには、狂犬病ウイルスの病原性発現機序を解明することが重要となる。本稿では、狂犬病ウイルスの病原性に関する現在までの研究について紹介し、これをどのように狂犬病の制御に応用するのかについて考察する。

#### はじめに

狂犬病は、致死的な神経症状を特徴とするウイルス性人獣共通感染症である。治療法は未だに確立されておらず、発症した人および動物はほぼ100%死亡する。長く不定な潜伏期(6~150日, 平均1ヶ月)が本病の特徴であり、極めて稀ながら6年の潜伏期の後に狂犬病を発症した患者の例も報告されている<sup>29)</sup>。本病の病原体である狂犬病ウイルスは非常に広い宿主域を持ち、すべての哺乳類に感染すると考えられている。その中でも犬は、発展途上国における主要な病原巣となっている。一方、先進国ではキツネ、アライグマ、スカンク、コウモリなどの野生動物がウイルスの感染環の形成に重要な役割を果たしている。本病を発症した動物の多くは狂躁状態となり、他の動物個体に咬傷を加える。通常、発症動物の唾液には多量のウイルスが存在し、その咬傷口からウイルスが侵入することにより感染が成立する。様々な動物が人への媒介動物になりうるが、最も重要な動物は犬である。実際に、世界における人の症例の99%以上が犬の咬傷事故に起因するとされている<sup>39)</sup>。

我が国では、犬の予防接種、放浪犬の捕獲、動物の輸入

検査などの継続的な努力の結果、1957年における猫の1例を最後に狂犬病の撲滅に成功した。しかし、アジア諸国を含む世界中のほとんどの国においては、狂犬病は未だに大きな社会問題である。WHOの報告によると、発展途上国を中心に毎年55,000人以上が狂犬病によって死亡していると推定されている<sup>38)</sup>。このような状況と近年の急速なグローバル化から、日本への本病の侵入もしくは輸入症例が発生する可能性が指摘されていた。2006年11月、不幸にもその懸念が現実となった。フィリピンから帰国した日本人が狂犬病を発症し、死亡するという事例が、2件立て続けに起こった<sup>30, 42)</sup>。これらの事例は、1970年にネパールから帰国した旅行者が死亡した事例に続く、36年ぶりの狂犬病の輸入症例となった。このような輸入症例の発生は、狂犬病の撲滅に成功した日本であっても、本病の流行発生が身近な出来事であることを我々に強く印象づけた。これからは、「世界的な狂犬病の撲滅が、最も効果的な防疫手段である」という観点から、我が国の狂犬病に対する防疫を、さらに本病の対策に先進国が果たすべき国際貢献について考えて行く必要があるのではないだろうか。

狂犬病は、ワクチン接種により予防できる感染症である。また、咬傷によるウイルス暴露を受けた直後から集中的なワクチン接種(暴露後免疫)を行えば、ほとんどの場合、発症を予防できる。にもかかわらず、なぜ、世界中で狂犬病の流行に歯止めがかからないのだろうか? その一因として、現行の不活化狂犬病ワクチンには多量の抗原が必要のため、ワクチンがコスト高になってしまうことが挙げられる。経済的理由により、このコスト高が本病の発生が集中している発展途上国でのワクチンの普及を困難なものにしている。一方、一般的に不活化ワクチンよりも安価な弱

#### 連絡先

〒501-1193 岐阜市柳戸1-1  
岐阜大学 応用生物科学部 獣医学講座  
人獣共通感染症学研究室  
TEL : 058-293-2949  
FAX : 058-293-2949  
E-mail : naotoito@gifu-u.ac.jp

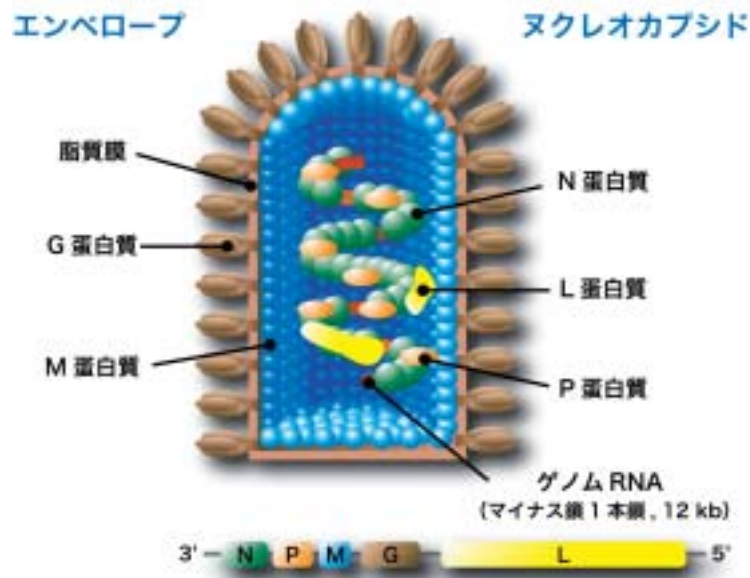


図1 狂犬病ウイルス粒子の構造

毒生ワクチンには安全面の懸念があるため、犬での使用は難しく、人への応用も不可能である。狂犬病を撲滅するためには、安全性の高い弱毒生ワクチンの開発が必要不可欠であると考えられる。

同時に、狂犬病に対する治療法が確立されていないことも本病の犠牲者が減少しない理由である。狂犬病ウイルス感染によって引き起こされる脳炎は、通常、顕著な神経細胞の変性・壊死を伴わないことが知られている。したがって、狂犬病発症時の激しい神経症状は、脳の器質の変化によるものではなく、むしろ機能障害によるものと考えられている<sup>14)</sup>。再生能の極めて低い中枢神経系が破壊されないという事実は、神経細胞の機能障害さえ除去できれば、狂犬病の治療が可能であることを暗示している。しかし、ウイルスがどのように神経細胞機能を障害しているのか、ウイルスがどのように宿主の免疫を回避しているのか等、本病の治療法を確立する上で必要な狂犬病ウイルスの病原性発現機序に関する情報は未だに十分とは言えない。

狂犬病ウイルスの病原性発現機序を解明することは、安全、効果的かつ安価な弱毒生ワクチンの開発、ならびに狂犬病の治療法の確立の両面において極めて重要である。本稿では、これまでの狂犬病ウイルスの病原性に関する研究がどのように展開してきたかについて概説する。さらに、これまでに得られた研究成果をどのように狂犬病の制御に応用していくのか、その具体的な方向性についても考えてみたい。

### 狂犬病ウイルスの構造と分類

狂犬病ウイルスは、モノネガウイルス目ラブドウイルス

科リッサウイルス属に分類される。ウイルス粒子は、幅60-110 nm、長さ130-250 nmの特徴的な弾丸状の形態をとり、その構造はエンベロープとヌクレオカプシドに区別される(図1)<sup>40)</sup>。エンベロープは、宿主細胞由来の脂質膜とその表面にスパイク状に突出する糖(G)蛋白質ならびに膜の内側に局在するマトリックス(M)蛋白質によって構成される。G蛋白質は、受容体結合蛋白質であると同時に、pH依存的な膜融合活性を持ち、ウイルスの細胞内侵入時にエンベロープとエンドソームの脂質膜を融合させる。また、本ウイルスの感染防御に中心的な役割を担うウイルス中和抗体の誘導に関与することが知られている。M蛋白質は、子孫ウイルスの出芽および粒子形成に重要な役割を担っている。一方、ヌクレオカプシドは、ゲノムRNAとそれを包み込む核(N)蛋白質、リン酸(P)蛋白質およびL蛋白質から構成される。N蛋白質はヌクレオカプシドの形成に関与し、L蛋白質は、その共因子であるP蛋白質と共に、RNA依存性RNAポリメラーゼとしてウイルスRNAの転写・複製を担当する。ウイルスゲノムは、全長約12,000塩基、マイナス鎖1本鎖のRNAで、3'末端よりN、P、M、GおよびL遺伝子の順に上記の5種類の構造蛋白質をコードしている。

狂犬病ウイルスは、いわゆる野外流行ウイルスである街上毒と、ワクチン株や実験室株などの固定毒に大別される。固定毒はパスツールによって初めて確立され、街上毒をウサギやその他の動物の脳内に長期継代することにより作出される。最初の狂犬病ワクチンの開発の礎となった歴史的経緯を持ち、現在もワクチン製造や基礎的研究に広く用いられている。固定毒という名前は、街上毒の感染時に認め



図 2 狂犬病ウイルスの体内動態

られる不定な潜伏期が固定毒の感染では一定となることに由来している。また、街上毒に比べて著しく末梢感染性が減弱していることが固定毒の大きな特徴である。そのため、安全性の観点から街上毒はBSL3実験室で扱われるのに対し、固定毒はBSL2実験室での取り扱いが可能である。

末梢感染性を減弱した固定毒でも、成熟マウスへの脳内接種によって街上毒と同様に致死的神経症状を引き起こす性状を保持するウイルスが存在する。一方、このような固定毒を鶏胚や各種培養細胞で長期継代することにより、脳内接種によって致死感染を起こさないウイルスも確立されている。本稿では、前者を強毒の固定毒、後者を弱毒の固定毒と定義する。

### 謎ばかりの狂犬病ウイルスの病原性

図2に狂犬病ウイルス(街上毒)の感染動物体内における動態を示した。まず、感染動物の唾液中に含まれるウイルスが創傷感染する。次に、創傷部位のウイルスは末梢神経に侵入し、神経線維を求心性に移動する。やがてウイルスは中枢神経系に到達し脳炎を誘起すると同時に、感染動物に神経症状を引き起こす。その後、ウイルスは神経線維を介して唾液腺を含む全身局所に遠心性に移動し、最終的に唾液中にウイルスが排出されるようになる。

上記の創傷感染の成立から脳炎の発症までのすべてのステップ(図2, ①~⑥)が狂犬病ウイルスの病原性に密接に関わると考えられる。しかし、これらの機序は、ほとんど謎のままである。例えば、長く不定な潜伏期の間、ウイルスが感染動物の体内のどの部位にどのような構造をとって潜んでいるかは未だ不明のままである。また、この潜伏期の間、血中の狂犬病ウイルスに対する抗体はほとんど上昇しない。この間、ウイルスがどのように宿主の免疫を回避しているのかについても明らかになっていない。また、

狂犬病ウイルスはニコチン性アセチルコリン受容体を介して筋細胞に感染することが知られているが<sup>17)</sup>、筋細胞におけるウイルスの増殖が末梢感染の成立に必須か否かについても不明のままである。ウイルスの末梢感染経路として、主に運動神経が関与することが示唆されているが<sup>15, 34)</sup>、感覚神経が関与する可能性も残されている。

狂犬病ウイルスの体内動態、特に末梢感染に関する機序が未だに解明されていない理由として、これまでの狂犬病ウイルスの研究が安全性の高い固定毒を利用して行われてきたことが挙げられる。大量の固定毒を末梢組織に接種(筋肉内投与、皮下投与など)すると、固定毒であっても末梢感染が成立することが知られている。この場合、接種後24時間には既に脳幹にウイルスRNAが検出されることから<sup>26)</sup>、固定毒は末梢組織の非神経系細胞で増殖することなく直接末梢神経に侵入すると考えられている<sup>14)</sup>。しかし、末梢感染性が減弱した固定毒による実験系が街上毒の末梢感染性を完全に再現しているとは考えがたい。

街上毒を一般的な実験動物に接種しても長く不定な潜伏期を再現することが難しいことも研究の障害となっている<sup>4)</sup>。BaerとCleary<sup>3)</sup>は、ボブキャット由来の街上毒をマウスの後肢足蹠に接種し、17~120日の潜伏期を再現することに成功している。このモデル系により、長い潜伏期の間、ウイルスは神経細胞に侵入することなく、末梢の感染部位の近くに留まっていることが示唆されている。同様に、野生動物を用いた実験において、スカンク由来の街上毒をスカンクの筋肉内に接種することにより、潜伏期の間、ウイルスが筋細胞に感染していることを示唆する成績が報告されている<sup>6)</sup>。このように、若干の知見はあるものの、街上毒の末梢感染機序の全容は未だに明らかにされていない。街上毒の特性である長く不定な潜伏期を再現できる実験動物モデルの確立が、機序解明の鍵となるであろう。



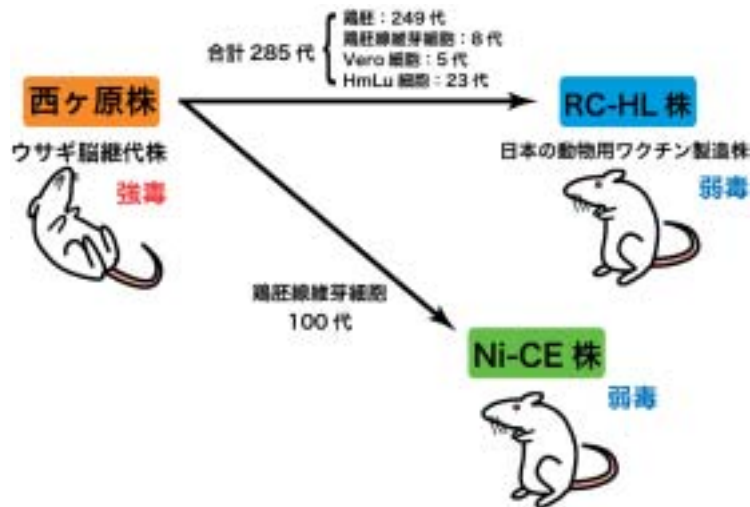


図3 西ヶ原株, RC-HL 株および Ni-CE 株の関係と病原性

### 狂犬病ウイルスの病原性決定因子

街上毒が引き起こす致死的な神経症状については、強毒の固定毒を成熟マウスに脳内接種することにより、再現することが可能である。この実験モデル系は、狂犬病ウイルスが脳内に到達した後に神経症状を引き起こすステップ(図2, ⑥)の解明のために利用されてきた。これまでに、本モデル系を用いて、ウイルスの病原性決定因子の同定に関する研究が行われている。1983年、Dietzscholdら<sup>8)</sup>は、抗G蛋白質モノクローナル抗体を用いて作出した強毒の固定毒株(CVS株およびERA株)の中和耐性変異株の中に、成熟マウスに致死的な感染を起こさない弱毒化したウイルスが含まれていることを見いだした。この弱毒変異株では、親株のG蛋白質333位のアルギニンがイソロイシンまたはグルタミンに変異していることが示された。他の研究者による追試もあり、G蛋白質の333位にアルギニンまたはリジンを持つウイルスは強毒に、それ以外のアミノ酸を持つウイルスは弱毒となることが明らかにされた<sup>25, 35)</sup>。ひとつのアミノ酸置換がウイルスの病原性を劇的に変化させる事実は、狂犬病ウイルス以外のウイルス研究分野にも大きな反響を与えた。その後の研究により、G蛋白質の333位に弱毒型のアミノ酸を持つ変異株は、神経系培養細胞への吸着および侵入、ならびに同細胞におけるCell-to-Cell感染の効率の点で強毒の親株よりも劣ることが示された<sup>7)</sup>。また、感染マウス脳内における弱毒変異株の感染の広がり、親株と比較して限局していることも明らかとなった。その後、狂犬病ウイルスの感染性cDNAが確立されると<sup>23)</sup>、上記のような中和耐性変異株を用いなくても直接的に遺伝子を改変したウイルスの病原性解析が可能になった。感染性cDNAを用いた研究により、他のウイルス株でもG蛋白質333位のアミノ酸がウイルス病原性の決定に重要であるこ

とが確認され<sup>19, 31, 41)</sup>、普遍的な病原性決定因子であることが示されている。

しかし、G蛋白質333位のアミノ酸が唯一の病原性決定因子でないことも予想されていた。日本の動物用狂犬病ワクチンの製造株であるRC-HL株は強毒の固定毒である西ヶ原株を親株とし、鶏胚および各種培養細胞で合計285代継代した後に確立された弱毒のウイルスである(図3)<sup>10)</sup>。その弱毒性状にも関わらず、RC-HL株のG蛋白質333位のアミノ酸は強毒型のアルギニンであることが報告されていた<sup>11, 12)</sup>。各遺伝子の推定アミノ酸配列を西ヶ原およびRC-HL株間で比較すると、G蛋白質において最も高率にアミノ酸置換が確認された<sup>12)</sup>。RC-HL株の感染性cDNAを用いて、RC-HL株のゲノムに西ヶ原株由来のG遺伝子を組み込んだキメラウイルスR(G)株が作出され、同株が西ヶ原株と同様に成熟マウスに致死的な感染を起こすことが明らかとなった<sup>13)</sup>。この結果は、狂犬病ウイルスのG蛋白質が、さらにはその333位以外の領域が病原性に関与していることを示すものとなった。その後、西ヶ原株とRC-HL株のG蛋白質間で認められる14のアミノ酸置換のうち、242位、255位および268位の置換が両株の病原性の違いに関与することが明らかとなった<sup>32, 33)</sup>。

G蛋白質がどのような機序で病原性に関与するかについての情報が少ない中、一部の研究によってアポトーシスの関与が報告されている。Morimotoら<sup>18)</sup>は、成熟マウスへの皮内接種により病原性の差異が認められる2つのCVS株変異株を比較した結果、低病原性の変異株は、高病原性のそれよりも強く初代培養神経細胞にアポトーシスを誘導することを明らかにしている。低病原性変異株の感染細胞におけるG蛋白質の発現量は、高病原性のそれよりも高く、この発現量の違いが両株のアポトーシス誘導能の差異に関

株名	ゲノム構成	ウイルス接種量 (FFU/マウス)		
		1000	100	10
西ヶ原	N P M G L	100%	100	100
Ni-CE		0	0	0
CE(NiN)		100	60	40
CE(NiP)		100	100	80
CE(NiM)		100	100	60
CE(NiG)		20	0	20
CE(NiL)		0	0	0

図4 各種キメラウイルスを脳内接種された成熟マウスの致死率

各種ウイルス(10-1000 FFU)を脳内接種された ddY マウス(1群5匹)を14日間観察し、各々の致死率を算出した。(文献27)

連していると考えられている。Préhaud ら<sup>21)</sup>も同様に、2株の固定毒G蛋白質のアポトーシス誘導能を比較・検討し、ウイルスの弱毒性状とアポトーシス誘導能との間の関連性を報告している。

以上、多くの研究により、狂犬病ウイルスのG蛋白質が主要な病原性決定因子であることが明らかになっている。

#### G蛋白質以外の狂犬病ウイルスの病原性決定因子

それでは、狂犬病ウイルスはG蛋白質以外のウイルス因子は病原性に関与しないのだろうか？

前述の西ヶ原株を鶏胚線維芽細胞で100代継代することにより、RC-HL株とは別の弱毒固定毒、Ni-CE株が確立されている(図3)。西ヶ原株とNi-CE株の間のアミノ酸置換の総数はわずかに15箇所であり、Ni-CE株のG蛋白質333位のアミノ酸は西ヶ原株と同じく強毒型のアルギニンであった<sup>27)</sup>。Ni-CE株の感染性cDNAを用いて、同株のゲノムに西ヶ原株由来の遺伝子をひとつずつ導入した各種キメラウイルスを作成し、これらの病原性について解析した(図4)<sup>27)</sup>。Ni-CE株のゲノムに西ヶ原株由来のN、PあるいはM遺伝子を保有するキメラウイルス(それぞれCE(NiN)株、CE(NiP)株、CE(NiM)株)は、脳内接種により成熟マウスに致死的な神経症状を引き起こした。一方、西ヶ原株由来のG遺伝子を持つキメラウイルスも成熟マウスに致死的な感染を引き起こしたが、その致死率は低く、ウイルス接種量に依存的ではなかった。この結果より、西ヶ原株とNi-CE株の病原性の違いには、主にN、PおよびM遺伝子が関連することが明らかとなった。すなわち、本研究によってG遺伝子以外のウイルス遺伝子が狂犬病ウイルスの主要な病原性決定因子となりうる事が初めて示された。また、由来が同じ狂犬病ウイルス株が、その継代

法の違いにより多様な機序で弱毒化されることも明らかとなった。

それでは、N、PおよびM遺伝子はどのような機序で病原性に関連するのだろうか？感染初期(脳内接種後2~3日)の成熟マウス脳内におけるNi-CE株の増殖性は、西ヶ原株のそれに比べて顕著に低いことが分かっている(未発表)。このことから、両株の病原性の違いに宿主の自然免疫に対する抵抗性の差が関与することが示唆された。最近、狂犬病ウイルスのP蛋白質が宿主細胞の転写因子であるSTAT1の核内移行を阻害することにより、I型およびII型インターフェロン(IFN)シグナル経路をブロックすることが報告されている<sup>36)</sup>。そこで、西ヶ原株、Ni-CE株およびキメラウイルスCE(NiP)株のI型IFN抵抗性に差異があるか否かについて検討を行ったところ、強毒の西ヶ原株およびCE(NiP)株のI型IFNに対する抵抗性は、弱毒のNi-CE株のそれよりも強いことが明らかにされた(図5)<sup>28)</sup>。その後の解析により、西ヶ原株P蛋白質のIFNシグナル阻害能がNi-CE株P蛋白質のそれよりも強いことも分かってきた(未発表)。一方、NおよびM遺伝子がどのような機序で病原性に関連するのについては未だ明らかにされておらず、今後の解明が待たれる。

#### 安全な弱毒生ワクチンの開発に向けて

上記のように、狂犬病ウイルスG蛋白質以外のウイルス因子が病原性に関与することが明らかとなった。この知見は安全な弱毒生ワクチンを開発する上でも重要である。これまで、野生動物の経口免疫を目的に、G蛋白質333位のアミノ酸を弱毒型に置換したウイルスが弱毒生ワクチンとして用いられてきた<sup>1, 2, 9, 16, 24)</sup>。ヨーロッパを中心とした各国では、この弱毒生ワクチンを混入させた餌を野外に散

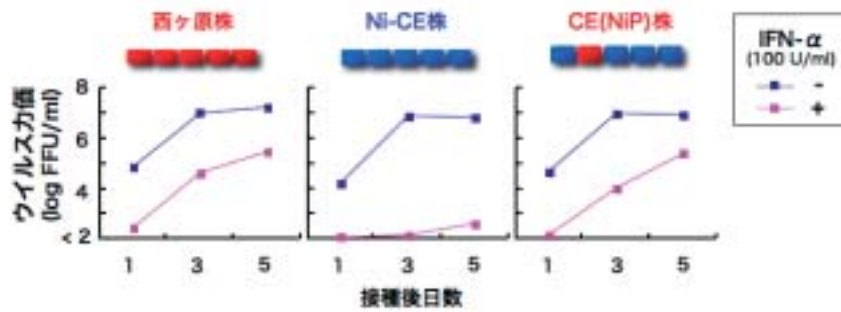


図5 IFN- $\alpha$ 存在下における各ウイルスの増殖曲線

各ウイルスをマウス神経芽腫由来 NA 細胞に  $\text{moi}=0.01$  で接種後、100 U/ml の IFN- $\alpha$  の存在下あるいは非存在下でウイルスを培養した。接種 1, 3 および 5 日後に回収した培養上清中のウイルスの力価 (FFU/ml) を測定した。なお、予備試験によって、NA 細胞の IFN 産生系は機能的に欠落していることが確認されている。(文献 28 の図を改変)

布することにより、キツネなどの野生動物における狂犬病の発生数を顕著に減少させている。しかし、この弱毒変異ウイルスの G 蛋白質 333 位のアミノ酸が強毒型のアルギニンあるいはリジンに置換した場合、ウイルスの病原性は強毒化することが報告されている<sup>16)</sup>。

既に述べたように、Ni-CE 株の弱毒化には主に N, P および M 遺伝子が関連している。そこで、G 蛋白質 333 位のアルギニンを弱毒型のアミノ酸に置換した同株の変異株を作製すれば、複数の機序で弱毒化したウイルス株を得ることができる。このようなウイルス株は、理論的に、上に述べた現行の弱毒生ワクチン株よりも病原性が復帰しにくいと考えることができる。今後、感染性 cDNA を用いて複数の機序により弱毒化したワクチン株を作出することにより、より安全性の高い弱毒生狂犬病ワクチンの開発を期待することができる。

### 狂犬病ウイルスの病原性に関する最近の知見

最近、脳内における狂犬病ウイルスが排除されるか否かを決定する要因として、血液-脳関門の透過性が重要であることが報告されている<sup>22)</sup>。すなわち、弱毒の固定毒に感染したマウスの血液-脳関門の透過性が、街上毒感染マウスのそれよりも顕著に高いことが明らかとなった。その結果、弱毒固定毒感染マウスでは、脳組織への免疫エフェクター細胞の浸潤が可能になり、ウイルスが脳から排除されることが考えられている。また、固定毒感染マウスにおける血液-脳関門の透過性上昇の機序に、脳血管周囲に浸潤した CD4<sup>+</sup> T 細胞が関与することも報告されている<sup>20)</sup>。これらの CD4<sup>+</sup> T 細胞に由来する IFN- $\gamma$  が血管内皮細胞に作用してペルオキシニトロライト・ラジカル (ONOO<sup>-</sup>) を産生させ、結果的に血液-脳関門の透過性を上昇させることが示された。

以上の報告は、これまでの狂犬病ウイルスの病原性に関

する研究の流れに、新たな方向性を示すものと考えられる。それと同時に、血液-脳関門が狂犬病の治療法の標的となる可能性を示した。すなわち、狂犬病患者の血液-脳関門の透過性を上昇させることができる薬剤が開発されれば、有力な本病の治療薬となるかもしれない。実際、暴露後免疫を受けずに狂犬病を発症した患者が回復するという稀なケースが最近報告されたが、この患者の血液-脳関門の透過性が上昇していたことを示唆するデータが得られている<sup>5, 37)</sup>。以上のように、狂犬病ウイルスの病原性の違いが生じる機序を解明し、その情報を蓄積することは、狂犬病の治療法を確立する上で極めて重要と言える。

### 最後に

上に述べたように、これまでの狂犬病ウイルスの病原性に関する研究は、ウイルスの病原性決定因子の同定を中心に行われてきた。今後の研究は、決定された病原性決定因子がウイルス-宿主相互作用にどのような影響を与えるのかという命題を中心に展開されていくことが予想される。このような情報の蓄積が、安全性の高い新規弱毒生ワクチンの開発や治療法の確立につながっていくことを期待したい。

### 謝辞

本稿で紹介した当研究室の成績の多くは、2006 年 3 月に岐阜大学を退職された源宣之先生 (岐阜大学名誉教授) のご指導のもと得られたものであり、ここに深く感謝いたします。また、一部のイラストをご提供いただいた山田健太郎博士 (当研究室修了生、現・自治医科大学・医学部) に感謝いたします。最後に、ここで紹介した我々の実験成績は、岐阜大学応用生物科学部人獣共通感染症学研究室の学生諸氏の努力によって得られたことを記し、御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) Artois M, Guittre C, Thomas I, Leblois H, Brochier B, Barrat J.: Potential pathogenicity for rodents of vaccines intended for oral vaccination against rabies: a comparison. *Vaccine*10: 524-528, 1992.
- 2) Artois M, Masson E, Barrat J, Aubert MF.: Efficacy of three oral rabies vaccine-baits in the red fox: a comparison. *Vet Microbiol.* 38:167-172, 1993.
- 3) Baer GM, Cleary WF.: A model in mice for the pathogenesis and treatment of rabies. *J. Infect. Dis.* 125: 520-527, 1972.
- 4) Baer GM, Lentz TL.: Rabies pathogenesis to the central nervous system. 1991. The natural history of rabies, 2nd edition. Baer GM ed. CRC press, Boca Raton, Florida, USA.
- 5) Centers for Disease Control and Prevention.: Recovery of a patient from clinical rabies — Wisconsin, 2004. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 53: 1171-1173, 2004
- 6) Charlton KM, Nadin-Davis S, Casey GA, Wandeler AI.: The long incubation period in rabies: delayed progression of infection in muscle at the site of exposure. *Acta Neuropathol* 94: 73-77, 1997.
- 7) Dietzschold B, Wiktor TJ, Trojanowski JQ, Macfarlan RI, Wunner WH, Torres-Anjel MJ, Koprowski H.: Differences in cell-to-cell spread of pathogenic and apathogenic rabies virus in vivo and in vitro. *J. Virol.* 56: 12-18, 1985.
- 8) Dietzschold B, Wunner WH, Wiktor TJ, Lopes AD, Lafon M, Smith CL, Koprowski H.: Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 70-74, 1983.
- 9) Follmann EH, Ritter DG, Baer GM.: Evaluation of the safety of two attenuated oral rabies vaccines, SAG1 and SAG2, in six Arctic mammals. *Vaccine*14: 270-273, 1996.
- 10) 石川義久, 鮫島都郷, 布谷鉄夫, 本橋常正, 野村吉利.: 細胞培養順化狂犬病ウイルス RC・HL 株の不活化ワクチン候補株としての生物性状. *日獣会誌* 42: 637-643, 1989.
- 11) Ito H, Minamoto N, Watanabe T, Goto H, Rong LT, Sugiyama M, Kinjo T, Mannen K, Mifune K, Konobe T, Yoshida I, Takamizawa A.: A unique mutation of glycoprotein gene of the attenuated RC-HL strain of rabies virus, a seed virus used for production of animal vaccine in Japan. *Microbiol Immunol.* 38: 479-482, 1994.
- 12) Ito N, Kakemizu M, Ito KA, Yamamoto A, Yoshida Y, Sugiyama M, Minamoto N.: A comparison of complete genome sequences of the attenuated RC-HL strain of rabies virus used for production of animal vaccine in Japan, and the parental Nishigahara strain. *Microbiol Immunol.* 45: 51-58, 2001.
- 13) Ito N, Takayama M, Yamada K, Sugiyama M, Minamoto N.: Rescue of rabies virus from cloned cDNA and identification of the pathogenicity-related gene: glycoprotein gene is associated with virulence for adult mice. *J. Virol.* 75: 9121-9128, 2001.
- 14) Jackson AC.: Pathogenesis. 2007, Rabies, 2nd edition. Jackson AC, Wunner WH eds., Elsevier Inc., London, UK.
- 15) Kelly RM, Strick PL.: Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central nervous system. *J. Neurosci. Methods.* 103: 63-71, 2000.
- 16) Lafay F, Benejean J, Tuffereau C, Flamand A, Coulon P.: Vaccination against rabies: construction and characterization of SAG2, a double avirulent derivative of SADBern. *Vaccine* 12: 317-320, 1994.
- 17) Lentz TL, Burrage TG, Smith AL, Crick J, Tignor GH.: Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science* 215:182-184, 1982.
- 18) Morimoto K, Hooper DC, Spitsin S, Koprowski H, Dietzschold B.: Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. *J. Virol.* 73: 510-518, 1999.
- 19) Morimoto K, McGettigan JP, Foley HD, Hooper DC, Dietzschold B, Schnell MJ.: Genetic engineering of live rabies vaccines. *Vaccine*19: 3543-3551, 2001.
- 20) Phares TW, Fabis MJ, Brimer CM, Kean RB, Hooper DC.: A peroxynitrite-dependent pathway is responsible for blood-brain barrier permeability changes during a central nervous system inflammatory response: TNF-alpha is neither necessary nor sufficient. *J. Immunol.* 178: 7334-7343, 2007.
- 21) Pr\_haud C, Lay S, Dietzschold B, Lafon M.: Glycoprotein of nonpathogenic rabies viruses is a key determinant of human cell apoptosis. *J. Virol.* 77: 10537-10547, 2003.
- 22) Roy A, Phares TW, Koprowski H, Hooper DC.: Failure to open the blood-brain barrier and deliver immune effectors to central nervous system tissues leads to the lethal outcome of silver-haired bat rabies virus infection. *J. Virol.* 81: 1110-1118, 2007.
- 23) Schnell MJ, Mebatsion T, Conzelmann KK.: Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J.* 13: 4195-4203, 1994.
- 24) Schumacher CL, Coulon P, Lafay F, Benejean J, Aubert MF, Barrat J, Aubert A, Flamand A.: SAG-2 oral rabies vaccine. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 60: 459-462, 1993.
- 25) Seif I, Coulon P, Rollin PE, Flamand A.: Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *J. Virol.* 53: 926-934, 1985.
- 26) Shankar V, Dietzschold B, Koprowski H.: Direct entry of rabies virus into the central nervous system without prior local replication. *J. Virol.* 65: 2736-2738, 1991.
- 27) Shimizu K, Ito N, Mita T, Yamada K, Hosokawa-Muto J, Sugiyama M, Minamoto N.: Involvement of nucleoprotein, phosphoprotein, and matrix protein genes of rabies virus in virulence for adult mice. *Virus Res.* 123: 154-160, 2007.
- 28) Shimizu K, Ito N, Sugiyama M, Minamoto N.: Sensitivity of rabies virus to type I interferon is determined



- by the phosphoprotein gene. *Microbiol. Immunol.* 50: 975-978, 2006.
- 29) Smith JS, Fishbein DB, Rupprecht CE, Clark K. Unexplained rabies in three immigrants in the United States. A virologic investigation. *N. Engl. J. Med.* 324: 205-211, 1991.
  - 30) 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. *病原微生物検出情報* 28巻: 64-65, 2007.
  - 31) Takayama-Ito M, Inoue K, Shoji Y, Inoue S, Iijima T, Sakai T, Kurane I, Morimoto K.: A highly attenuated rabies virus HEP-Flury strain reverts to virulent by single amino acid substitution to arginine at position 333 in glycoprotein. *Virus Res.* 119: 208-215, 2006.
  - 32) Takayama-Ito M, Ito N, Yamada K, Minamoto N, Sugiyama M.: Region at amino acids 164 to 303 of the rabies virus glycoprotein plays an important role in pathogenicity for adult mice. *J. Neurovirol.* 10: 131-135, 2004.
  - 33) Takayama-Ito M, Ito N, Yamada K, Sugiyama M, Minamoto N.: Multiple amino acids in the glycoprotein of rabies virus are responsible for pathogenicity in adult mice. *Virus Res.* 115: 169-175, 2006.
  - 34) Tang Y, Rampin O, Giuliano F, Ugolini G.: Spinal and brain circuits to motoneurons of the bulbospongiosus muscle: retrograde transneuronal tracing with rabies virus. *J. Comp. Neurol.* 414: 167-192, 1999.
  - 35) Tuffereau C, Leblois H, Benejean J, Coulon P, Lafay F, Flamand A.: Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice. *Virology* 172: 206-212, 1989.
  - 36) Vidy A, Chelbi-Alix M, Blondel D.: Rabies virus P protein interacts with STAT1 and inhibits interferon signal transduction pathways. *J. Virol.* 79: 14411-14420, 2005.
  - 37) Willoughby RE Jr, Tieves KS, Hoffman GM, Ghanayem NS, Amlie-Lefond CM, Schwabe MJ, Chusid MJ, Rupprecht CE.: Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N. Engl. J. Med.* 352: 2508-2514, 2005.
  - 38) World Health Organization.: Introduction. 2004, WHO expert consultation on rabies: first report. WHO technical report series; 931. , World Health Organization, Geneva, Switzerland.
  - 39) World Health Organization.: National programmes for the control of rabies in dogs. 2004, WHO expert consultation on rabies: first report. WHO technical report series; 931., World Health Organization, Geneva, Switzerland.
  - 40) Wunner WH.: Rabies virus. 2007, Rabies, 2nd edition. Jackson AC, Wunner WH eds., Elsevier Inc., London, UK.
  - 41) Yamada K, Ito N, Takayama-Ito M, Sugiyama M, Minamoto N.: Multigenic relation to the attenuation of rabies virus. *Microbiol. Immunol.* 50: 25-32, 2006.
  - 42) 山本舜悟, 岩崎千尋, 大野博司, 二宮清.: 本邦36年ぶりの狂犬病輸入症例の報告—京都の事例. *病原微生物検出情報* 28巻: 63-64, 2007.

## Progression in studies on pathogenesis of rabies virus

**Naoto ITO, and Makoto SUGIYAMA**

Laboratory of Zoonotic Diseases, Department of Veterinary Medicine,  
Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University  
1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan  
E-mail: naotoito@gifu-u.ac.jp

Rabies virus causes lethal neurological symptoms in humans and animals. Rabies epidemics have continued to occur throughout the world, despite the fact that rabies can be effectively prevented by vaccination. The development of inexpensive and safe attenuated live vaccines and the establishment of cures are the keys to control rabies. To achieve these objectives, it is important to elucidate mechanism by which rabies virus causes disease. Here, previous studies on the pathogenesis of rabies virus are reviewed and ways to apply previous findings to rabies control are also discussed.