

## 1940年代に分離された日本の狂犬病ウイルス (高免株と小松川株)の系統樹解析

国立感染症研究所ウイルス第一部

新 井 陽 子

(平成16年2月4日受付)

(平成16年6月17日受理)

Key words : rabies virus, nucleoprotein gene, phylogenetic analysis, Japanese isolates

### 要 旨

1940年代に分離された日本の狂犬病ウイルス株の中から高免株と、小松川株の核タンパク(N)遺伝子1,353全塩基の配列を決定した。従来より研究されてきた日本の諸ウイルス株と世界で分離、研究されてきたリッサウイルス140株(128株の遺伝子型1と12株の他の遺伝子型)の関係をj知る目的で系統樹解析を行った。その結果狂犬病ウイルスは少なくとも12のクラスターに分けられた。高免株および西ヶ原株は、ヨーロッパ、中近東、アフリカからなる最も広い地域の分離株で形成されるクラスターに属した。さらに、これら2株は中国でヒトから分離された北京株由来の3aG(中国のワクチン株)と同じクラスターを形成した。一方、小松川株は北極、カナダ、ロシアから分離されたウイルスのクラスターに属し、特にバイカル湖地域のsteppe fox、ハバロフスク地域のraccoon dogから分離されたウイルスと同じクラスターを形成した。これらの結果と史実から、1940年代に分離された日本の狂犬病ウイルスは中国およびロシア由来のウイルスが伝播してきたと推測された。

〔感染症誌 78 : 815 ~ 822 2004〕

### 序 文

狂犬病は狂犬病ウイルスによって起こる哺乳動物の脳炎である。狂犬病ウイルスはラブドウイルス科リッサウイルス属に属し、現在7つの遺伝子型に分類されている<sup>1)</sup>。リッサウイルスの中で遺伝子型1の狂犬病ウイルスは世界中に存在し、コウモリを含む哺乳類から分離されている。遺伝子型2のLagos bat virusはアフリカのコウモリから、遺伝子型3のMokola virusはアフリカのイヌ、ネコ、齧歯動物から、遺伝子型4のDuven-

hage virusはアフリカのコウモリから、遺伝子型5のEuropean bat lyssavirus 1(EBLV1)はヨーロッパのコウモリから、遺伝子型6のEuropean bat lyssavirus 2(EBLV2)はヨーロッパのコウモリから、遺伝子型7のAustralian bat lyssavirus(ABLV)はオーストラリアのフルーツコウモリと食虫コウモリから分離されている。しかしながら、近年新しい遺伝子型の可能性があるリッサウイルスが見つかっており、狂犬病ウイルス以外のリッサウイルスにも関心が持たれている<sup>2,3)</sup>。狂犬病の患者は、世界保健機関(WHO)の報告では全世界で毎年3万5千~5万人が死亡していると推定されている。アジア、アフリカ等では狂犬病の犬から感染した患者が現在も多く発生している。日本

別刷請求先 : (〒228 8555)神奈川県相模原市北里1

15 1

北里大学医療系研究科

新井 陽子

平成16年9月20日

での狂犬病は1954年イヌ98頭、ヒト1人、その他6頭、1955年イヌ23頭、1956年イヌ6頭を最後に姿を消した<sup>4)</sup>。ヒトの狂犬病は、1970年にネパールで野犬にかまれ発症死亡した例が、唯一報告されている。この国外感染例を別にすれば1957年以降日本国内では、ヒト以外の狂犬病発生例も報告されていない。

過去の日本の狂犬病ウイルスは、fixed rabies (固定毒)の研究用株である西ヶ原株、小松川株、および、高橋株由来の高免株が保存されてきた。小松川株は動物医薬品研究所の佐沢らが1940年代に分離したといわれている<sup>6)</sup>。この株は、N遺伝子の限られた領域の解析からカナダ、北極から分離された狂犬病ウイルスと同じクラスターを形成することが報告されている<sup>7)</sup>。西ヶ原株は近藤らが、農林省獣疫調査所でパスツール系毒(パスツール株)を家兎に継代してきた株と記載されている<sup>9)</sup>。三舟らは、西ヶ原株は分離歴が不明であるが、Pasteur株由来(PV)との伝聞があると記している<sup>10)</sup>。高橋株は1948年に牛場らによって患者から分離された<sup>11)</sup>。高免株はこの高橋株をマウス継代し固定毒の性状を示した株である<sup>12)</sup>。われわれは日本の狂犬病ウイルスとして分離歴が明確な株と、分離歴は明確でないが従来から研究等に使用されてきた狂犬病ウイルス株がどのような経路によって侵入し流行したかを知る目的で、系統樹解析を行った。

### 材料と方法

4週マウス脳に継代した小松川株を材料とした<sup>7)</sup>。高橋株由来の高免株については、成熟マウスに12代、乳のみマウスに12代継代し、当研究室で1968年に凍結乾燥し保存されていた株を用いた。タイのAY-163は、Ayudhayaのイヌから1963年に分離し、4週マウスに継代した後、1967年に凍結乾燥し保存した株を使用した。THA-Abha株は、1977年に分離されたウイルスであり、THA1013、THA1015、THA1017は、Bangkokのイヌから1985年に分離され、4週マウスに数代継代した株を用いた<sup>8)</sup>。

RNAの抽出は前報で報告した方法に従いIso-genキットを用いた。RT-PCRと塩基配列決定に

使用したプライマーは、RHN-1 5'-ACAGACAGCGTCAATTGCAAAGC-3 (28-50)、RHNS-3 5'-CTAGGATTGACAAAGATTTTGCTC-3 (1516-1539)と10g、5'-CTACAATGGATGCCGAC-3' (66-82)、304 5'-TTGACGAAGATCTTGCTCA-T-3 (1514-1533)の2種類のプライマーセット用いてInvitrogenのSuperScript One-Stepで行った<sup>3)</sup>。

塩基配列はABI社のオートシーケンサーによるBigDyeを用いたターミネーター法によって決定した<sup>2)</sup>。系統樹解析はClustal XとMegaプログラムによってNeighbor-Joining法で行った<sup>2)</sup>。本研究で決定した塩基配列はDDBJのデータベースにAB178890からAB178896まで登録した。

### 成 績

#### 1. 塩基配列の比較

N遺伝子1,350全塩基において、高免株(AB178891)は西ヶ原株(AB044824)と99.8%、わが国の動物ワクチン株であるRC-HL(AB009663)と99.4%の相同性があり、中国の3aG株(AF155039)との間では97.2%の相同性を示した。高免株と西ヶ原株、RC-HL株、3aG株の450アミノ酸(deduced amino acid)配列の比較では、それぞれ2, 3, 10カ所異なっていた。西ヶ原とRC-HL株はPV株(M13215)とChallenge Virus Standard(CVS, AF406696)株よりも中国の株に相同性が高く、高免株に最も近い株であった(Fig. 1)。一方、小松川株(AB178890)は、N遺伝子全1,350塩基の比較において、ハバロフスクのタヌキ(raccoon dog)から分離した狂犬病ウイルス、バイカル湖地域のキツネ(steppe fox)から分離したウイルスとそれぞれ98.4%と97.3%の相同性を示した。また450のアミノ酸(deduced amino acid)配列においては、それぞれ1カ所の変化しかなかった。小松川株はロシアのArctic foxから1988年に分離されたウイルス(U22656)とは5カ所のアミノ酸が違っていた。

#### 2. 系統樹解析

データベースからLagos batウイルス、MokolaウイルスDuvnhageウイルス、EBLV1、

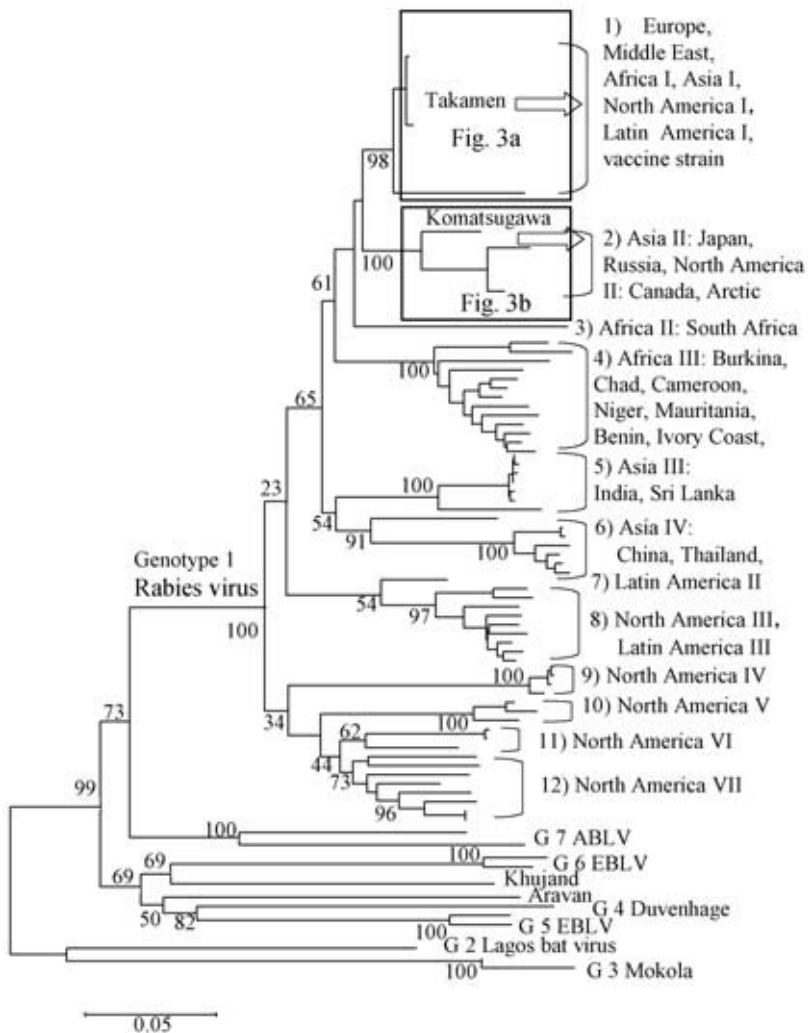
Fig. 1 Alignment of the amino acid sequences of the N protein, as deduced from the nucleotide sequences of 6 rabies virus strains : Takamen ( AB178891 ) Nishigahara ( AB044824 ) RC-HL( AB009663 ) 3aG( AF155039 ) Pasteur( PV, M13215 ) and Challenge Virus Standard ( CVS, AF406696 ) Sequence identical to the Takamen strain is indicated by a dash.

Takamen	1:MDADRIVFRANNQVSL&FEITADQY&EYKY&PAIKDLKKPCITLGH&APDLNK&YKSVLSG&MNA&AKLDFDDVCSYLAA&MQFFEGTC&FEDWT	90
AB044824	1:.....S.....	90
AB009663	1:.....	90
AF155039	1:...K.....	90
M13215	1:...K...KV.....K...V.....C.S.....	90
AF406696	1:...K...KV.....K...V...H.....S.....	90
	* * * * *	
Takamen	91:SYG&L&I&A&R&K&G&D&K&I&T&P&N&S&L&V&E&I&K&R&N&D&V&E&G&N&H&A&L&T&G&G&M&E&M&T&R&D&P&T&V&S&E&H&A&S&L&V&G&L&L&L&S&L&Y&R&L&S&K&I&S&G&Q&N&T&G&N&Y&K&T&N&I&A&R&I&E&Q&I&P&E&T&A&P&F&V&K	180
AB044824	91:.....	180
AB009663	91:.....L.....	180
AF155039	91:.....R.....R.....S.....	180
M13215	91:...V.....G.....T.....L.....P.....S.....	180
AF406696	91:...V.....G.....T.....L.....P.....	180
	* * * * *	
Takamen	181:IVEH&H&T&L&M&T&H&Q&M&C&A&N&W&S&T&I&P&N&F&R&F&L&A&G&T&Y&D&M&F&F&S&R&I&E&H&L&Y&S&A&I&R&V&G&T&V&V&T&A&Y&E&D&C&S&G&L&V&S&F&T&G&F&I&K&Q&I&N&L&T&A&R&E&A&I&L&Y&F&F&H&N&F&E&E&I&R	270
AB044824	181:.....	270
AB009663	181:.....T.....	270
AF155039	181:.....N.....L.....	270
M13215	181:.....	270
AF406696	181:.....	270
	* * * * *	
Takamen	271:R&M&F&E&P&G&Q&E&T&A&V&P&H&S&Y&F&I&H&F&R&S&L&G&L&S&G&K&S&P&Y&S&S&N&A&V&G&H&V&F&N&L&I&H&F&V&G&C&Y&M&Q&I&R&S&L&N&A&T&V&I&A&A&C&A&P&H&E&M&S&V&L&G&G&Y&L&G&E&E&F&F&R&G&T&F&E&R&R&F&F	360
AB044824	271:.....	360
AB009663	271:.....	360
AF155039	271:.....S.....	360
M13215	271:.....V.....K.....	360
AF406696	271:.....V.....K.....	360
	* * * * *	
Takamen	361:R&D&E&K&E&L&Q&E&Y&E&A&E&L&T&K&T&D&V&A&L&A&D&D&G&T&V&D&S&D&D&E&D&H&F&S&G&E&A&R&G&P&E&A&V&Y&A&R&I&M&M&N&G&R&L&K&R&S&H&I&R&R&Y&V&S&V&S&N&H&Q&A&R&P&N&S&F&A&E&F&L&N&K&T&Y&S&D&S	450
AB044824	361:.....Y.....	450
AB009663	361:.....P.....	450
AF155039	361:.....N...Y...T.....	450
M13215	361:.....N...Y...T.S...T..I.....	450
AF406696	361:.....N...Y...T.S...T.....	450
	* * * * *	

EBLV2, ABLV とリッサウイルスの新しく分離された Aravan, Khujand ウイルスと, さらに世界各地の狂犬病ウイルスを選定し, これら 140 株について解析した. その結果はそれぞれ 1~7 の遺伝子型に分けられ, さらに Aravan と Khujand ウイルスはどの遺伝子型にも属していなかった.

遺伝子型 1 の狂犬病ウイルスは, 下記のように地域と宿主によって少なくとも 12 のクラスターに分けられた(Fig. 2). 1; ヨーロッパ, 中近東, アフリカ I, アジア I, ワクチン株, ラテンアメリカ I, 北アメリカ I. 2; 北極, ロシア, 北アメリカ II, アジア II. 3; アフリカ II. 4; アフリカ III. 5; ア

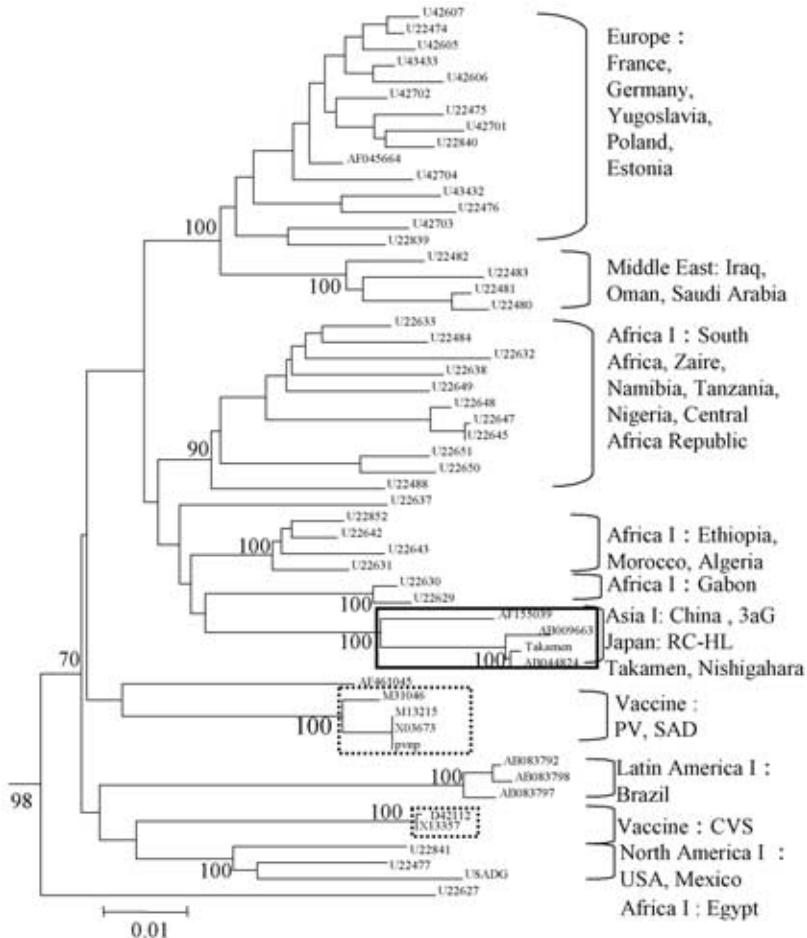
Fig. 2 Phylogenetic analysis of the 1,350-nucleotides of the N gene from 140 lyssaviruses ( 128 rabies viruses of genotype 1 and 12 lyssaviruses from other genotypes ) The 128 rabies viruses from various parts of the world were divided at least into 12 distinct clusters based on the sequences of 1,350 nucleotides, 1 : Worldwide strains ( Europe, Middle East, Africa I, Asia I, North America I, Latin America I, and vaccine strains ); 2 : Asia II, Japan, Russia, North America II, Canada, and Arctic ; 3 : Africa II, South Africa ; 4 : Africa III ; 5 : Asia III, India, Sri Lanka ; 6 : Asia IV, China, Thailand ; 7 : Latin America II ; 8 : North America III, Latin America III ; 9 : North America IV ; 10 : North America V ; 11 : Latin America IV, North America VI ; 12 : North America VII by the neighbor-joining method using the Clustal X and Mega programs. Previous Japanese rabies viruses are included in the two boxes.



ジア III .6 ; アジア IV .7 ; ラテンアメリカ II .8 ;  
北アメリカ III ( アメリカの食虫コウモリ ), ラテン

アメリカ III ( ブラジルの吸血コウモリ由来 ) .9 ;  
北アメリカ IV ( アメリカのアライグマ由来 ) .10 :

Fig. 3 Phylogenetic analysis of the 1,350-nucleotide sequence of the N gene from rabies viruses isolated in Europe, Middle East, Africa, Asia, North America, Latin America, and vaccine strains (cluster 1 in Fig. 2) (a) and those from Arctic regions (cluster 2 in Fig. 2) (b). The two Japanese rabies viruses, Takamen and Komatsugawa strains are surrounded by solid lines and the Pasteur and Challenge Virus Standard (CVS) strains are surrounded by dotted lines. The sequences reported here were deposited in DDBJ database as Komatsugawa (Accession number AB178890) and Takamen (AB178891) strains.

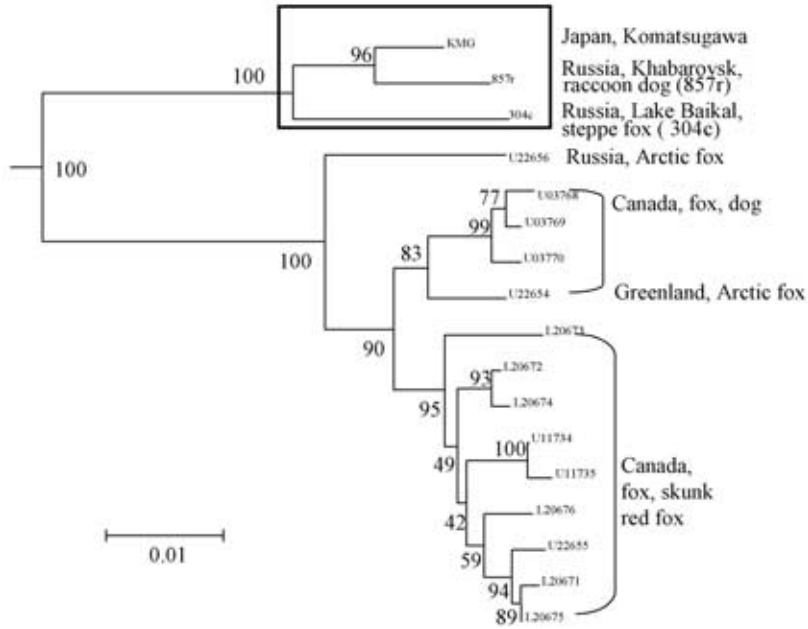


(a)

北アメリカ V (アメリカ, カナダの食虫コウモリ). 11; ラテンアメリカ IV (チリの食虫コウモリ), 北アメリカ V (カナダの食虫コウモリ). 12; 北アメリカ VII (アメリカの食虫コウモリ) である. Mega の解析では, ブートストラップ値は 95% 以上が信頼値である. したがってクラスター 6 のアジア IV は 91% の値から中国とタイは別々の

クラスターに分かれる可能性がある. クラスター 11, 12 はいずれも 95% 以下のブートストラップ値を示したので, これらコウモリ由来の株は, 今後新しい分離株の解析が進めば, より多くのクラスターに分けられる可能性がある. こうして狂犬病ウイルスの多様性があらためて示唆された.

日本の狂犬病ウイルス高免疫株および西ヶ原株



(b)

は、ヨーロッパ、中近東、アフリカにまたがる最も広い地域のクラスター1に属した。さらにこれらの株は、中国でヒト<sup>14)</sup>、イヌ<sup>15)</sup>から分離された北京株由来の3aG株(中国のワクチン株)と同じクラスターを形成した。しかし、このクラスターは、PV株のクラスターとはあきらかに異なっていた(Fig. 3a)。小松川株は、北極、カナダ、ロシアから分離されたウイルスのクラスター2に属し、特にバイカル湖地域のsteppe fox、ハバロフスク地域のraccoon dogから分離されたウイルスと同じクラスターを形成した(Fig. 3b)。

### 考 察

西ヶ原株は、東京の西ヶ原にあった当時の農林省獣疫調査所近藤正一博士らによって確立された狂犬病ウイルス株である。日本の動物用ワクチン株RC-HLは、固定毒の西ヶ原株をマウス脳に21代継代後、ニワトリ胚に296代継代馴化したH株をニワトリ胚細胞に8代、Vero細胞に5代、HmLu細胞に20代継代してクローニングしたウイルス株である(動物医薬品製造承認申請書、日生研狂犬病TC精製ワクチン)。しかし、これらの分離歴等の記録がないためPV株の由来株なの

か、日本のstreet株を馴化した株なのかははっきりしていなかった。高橋株は、昭和20年7月にイヌに右頬部をかまれ、潜伏期が2年以上と極めて長く昭和23年1月発病して死亡した患者から分離された株である。ウイルスは患者の海馬等の乳剤をマウスへ接種後、ネグリー小体陽性を示した感染マウス材料から分離された<sup>11)</sup>。高免株は、この高橋株をマウスへの継代によって潜伏期間が短縮され、固定毒の性状をもつようになった高橋株由来の変異株である<sup>12)</sup>。今回の結果から、西ヶ原株は牛場大蔵博士らによって分離された高橋株由来の高免株とほぼ同一の株であることが明らかとなった。このことから西ヶ原株は、PV株由来ではなく、日本で分離された株と考えるのが妥当と考えられた。

わが国におけるヒトの狂犬病は、1970年にネパールで野犬に右下腿を咬まれ帰国し、感染36日後に発症死亡した例が、海外での感染例として唯一報告されている。この患者の狂犬病確定診断は、1; 蛍光抗体による脊髄の狂犬病ウイルス抗原陽性、2; 患者の脊髄乳剤を幼若マウス脳内に接種、その後発症したマウス脳は蛍光抗体陽性、セ

ラズ染色でネグリー小体が検出され、さらに補体結合反応も陽性であった。近年 N 遺伝子等の系統樹解析の導入によって、世界中に分布している狂犬病ウイルスがウイルスの宿主および分離地域によってクラスターに分けられるようになり、本ウイルスの感染経路等の解析に威力を発揮している<sup>16)-18)</sup>。

すでに、幾つかの国、地域における狂犬病ウイルス分離株は、世界中に分布しているクラスターとその国、その地域に存在する autochthonous なクラスターに分けられている。世界中に分布しているクラスターに属しているウイルスは Smith らが報告したように、ヨーロッパの狂犬病のイヌ (European dog rabies) が経済活動、植民地政策等によってアフリカ、アジア、アメリカ大陸へ運ばれた結果、世界中に分布して行ったと考えられている<sup>16)-18)</sup>。また European dog rabies の N 遺伝子の配列と中国の 3aG 株の配列が近いことから、18 世紀時代の植民地政策等によるヒトの交流によって英国から香港、上海へ広がったと推測されている<sup>16)</sup>。そしてこれらの株が中国からさらに日本へ伝播したと推測された。一方、Fig. 3b で示したように小松川株は 1980 年ロシアの Botvinkin らがハバロフスク地域の raccoon dog<sup>19)</sup>とバイカル湖地域の steppe fox から分離したウイルスとアミノ酸で 1 カ所しか変わらないことから、これらのウイルスが日本へ伝播したと推測された。またこれらの株と小松川株は、北極、カナダ、ロシアの地域に分布している株に近く、共通の祖先から分岐したと考えられる。このように日本においても世界中に分布しているウイルスと autochthonous なウイルスが存在していたと考えられる。これら 2 株の日本の狂犬病ウイルスは、戦前の旧満州との人的および物資等の軍事的、経済的交流によって中国やロシアの極東から日本に入ったと推測される。

一方、日本の狂犬病の歴史をみると、717 年(養老元年)養老律令、984 年医心方、江戸時代の狂犬咬傷治方等と古くからその存在が知られていた<sup>20)</sup>。狂犬病の発生数の統計としては、第一次大戦頃に 1,374 頭のイヌ、135 人のヒトの狂犬病が報

告されている。関東大震災直後のイヌ 3,205 頭、ヒト 235 人の発生数は、第 2 次世界大戦後の混乱期における狂犬病のイヌ 867 頭、ヒト 54 人の報告数より明らかに多い。しかしこうした過去の日本の狂犬病ウイルスは、われわれが今回解析したウイルスと同一の起源を持っていたかどうかについては、これらのウイルスが保存されていないため不明のままである。

謝辞：本研究において使用したロシアの分離株の塩基配列データを提供して頂いた Research Institute of Siberia and the Far East, Irkutsk, Russia の Dr. Botvinkin AD と米国厚生省疾病管理・予防センターの Dr. Kuzmin IV に感謝致します。また種々の実験にご援助頂いた国立感染症研究所の亀岡洋祐博士と本稿のご掲載を頂きました倉根一郎ウイルス第一部長に感謝致します。

#### 文 献

- 1) Smith JS: Molecular epidemiology. In Rabies. AC Jackson, WH Wunner, eds. Academic Press, 2002; p. 79-111.
- 2) Arai YT, Kuzmin IV, Kameoka Y, Botvinkin AD: New lyssavirus genotype from the lesser mouse-eared bat (*Myotis blythi*) Kyrgyzstan. Emerg Infect Dis 2003; 9: 333-7.
- 3) Kuzmin IV, Orciari LA, Arai YT, Smith JS, Hanlon CA, Kameoka Y, et al.: Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. Virus Research 2003; 97: 65-79.
- 4) 岩淵秀夫: 狂犬病の流行と予防の変遷. 日獣医師会誌 1970; 23: 367-76.
- 5) 上木英人: 東京都立衛生研究所事業月報. 東京狂犬病流行誌 1942.
- 6) Miyamoto K: Electron Microscopic studies on the Negri body: Ann Report, Inst. Virus Res, Kyoto Univ 1965; 8: 10-34.
- 7) Ito N, Sugiyama M, Oraveerakul K, Piyaviriyakul P, Lumlerdacha B, Arai YT, et al.: Molecular epidemiology of rabies in Thailand. Microbiol Immunol 1999; 43: 551-9.
- 8) Arai YT, Yamada K, Kameoka Y, Horimoto T, Yamamoto K, Yabe S, et al.: Nucleoprotein gene analysis of fixed and street rabies virus variants using RT-PCR. Arch Virol 1997; 142: 1787-96.
- 9) 高松泰人, 大島康夫, 中村 義: 狂犬病死毒予防液に関する研究, 第一報石炭酸死毒(不活化)予防液の免疫効力(ヘエベル法による MLD 防備価). 日獣会誌 1952; 5: 216-9.

- 10) Mifune K, Mannen K, Minamoto N, Arai YT : Further studies on an improved haemagglutination inhibition test with higher sensitivity for rabies virus antibody. *Bulletin of the World Health Organization* 1986 ; 64 : 133 - 7.
- 11) 牛場大蔵, 田中重太郎, 堀江喜一, 阿部和男: 狂犬病ウイルスの研究第1報 新ウイルス株の人体からの分離. *医学と生物学* 1948 ; 13 : 239 - 41.
- 12) 阿部和男: 狂犬病ウイルスの研究, 第3報 街上毒生ウイルスによるマウスの免疫効果と血清中和抗体との関係. *日細菌誌* 1950 ; 5 : 267 - 70.
- 13) Arai YT, Takahashi H, Kameoka Y, Shiino T, Wimalaratne O, Lodmell DL : Characterization of Sri Lanka rabies virus isolates using nucleotide sequence analysis of nucleoprotein gene. *Acta Virologica* 2001 ; 45 : 327 - 33.
- 14) Xianhe B, Warner CK, Fekadu M : Comparisons of nucleotide and deduced amino acid sequences of the glycoprotein genes of a Chinese street (CGX89-1) and a Chinese vaccine strain (3aG) of rabies virus. *Virus Research* 1993 ; 27 : 101 - 12.
- 15) Fangtao L, Fanzhen Z, Longmu L, Xiaozhen L, Rongfang Z, Yongxin Y, *et al.* : The primary hamster kidney cell rabies vaccine : adaptation of viral strain, production of vaccine, and pre-and postexposure treatment. *J Infect Dis* 1983 ; 147 : 467 - 73.
- 16) Smith JS, Orciari LA, Yager PA, Seidel HD, Warner CK : Epidemiologic and historical relationships among 87 rabies virus isolates as determined by limited sequence analysis. *J Infect Dis* 1992 ; 166 : 296 - 307.
- 17) Badrane H, Tordo N : Host switching in lyssavirus history from the chiroptera to the carnivora orders. *J Virol* 2001 ; 75 : 8096 - 104.
- 18) Holmes EC, Woelk CH, Kassir R, Bourhy H : Genetic constraints and the adaptive evolution of rabies virus in nature. *Virology* 2002 ; 292 : 247 - 57.
- 19) Botvinkin AD, Savitsky VP, Sindorov GN, Yudin VG : Role of Raccoon dogs in the epidemiology and epizootology of rabies in the Far East. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology* 1981 ; 12 : 79 - 82 ( in Russian )
- 20) 唐仁原景昭: わが国における犬の狂犬病の流行と防疫の歴史 1. *日本獣医史学会* 2002 ; 39号 .

### Phylogenetic Analysis of Two Rabies Viruses, Takamen and Komatsugawa Strains Isolated in Japan in the 1940 s

Yohko T. ARAI

Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases

The entire coding region of the nucleoprotein ( N ) gene of Takamen and Komatsugawa strains of rabies virus isolated in Japan in 1940 s were determined. Phylogenetic analysis was performed on 140 lyssaviruses ( 128 viruses of genotype 1 and 12 lyssaviruses of other genotypes ) isolated in various parts of the world, including the two Japanese rabies strains, based on the sequences of 1,350 nucleotides of the N gene. The rabies viruses were divided into 12 distinct clusters at least, reflecting geographical areas and hosts as reservoirs. The Takamen, Nishigahara, and RC-HL strains derived from the Nishigahara strain were grouped into the same cluster as the Chinese strain ( 3aG ) in the worldwide distribution group. The Komatsugawa strain was grouped into the same cluster as the viruses from a raccoon dog from Khabarovsk, and from a steppe fox in area of Lake Baikal in Russia in a group consisting of Canada, Greenland, and the Arctic. These data along with the historical evidence suggest that Japanese rabies viruses, the Takamen and Komatsugawa strains, belong to two different clusters and moved into Japan from China and Russia, respectively.