

令和 5 年度厚生労働科学研究費補助金
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
「我が国の狂犬病清浄性の検証及び関係機関の連携強化のための研究」
分担研究報告書

各種リッサウイルスの診断とワクチンに関する研究

研究代表者	前田 健	(国立感染症研究所・獣医科学部)
研究協力者	井上 雄介	(国立感染症研究所・獣医科学部)
研究協力者	松鶴 彩	(国立感染症研究所・獣医科学部)
研究協力者	原田 倫子	(国立感染症研究所・獣医科学部)

研究要旨：

N 蛋白質の発現プラスミドを作製し、現在狂犬病診断に使用されているモノクローナル抗体 (mAb) が狂犬病ウイルス以外のリッサウイルスを検出できるかを検証した。また狂犬病ウイルスを含むリッサウイルスの交差反応性を検証するために、18 種全てのシュードタイプウイルスを作製した。結果、狂犬病診断に使用されている mAb は多くのリッサウイルスを検出することができた。しかし既存の狂犬病ワクチンでは、狂犬病ウイルスと異なるフィログループに属するリッサウイルスに対する防御能が低いという結果が得られた。

A. 研究目的

狂犬病ウイルス (RABV) は世界中で蔓延しているが日本では 1957 年以降自然発生がない。しかし厚労省が狂犬病清浄国と定めているオーストラリアにはコウモリが保有するオーストラリアコウモリリッサウイルス (ABLV) が存在し、人、馬への感染例がある。さらに日本に近い台湾では台湾コウモリリッサウイルス (TWBLV) が存在している。このようにリッサウイルスが日本に侵入してくる可能性や、RABV 以外のリッサウイルスが日本に存在する可能性を考慮する必要がある。そこで現行の狂犬病検出方法でその他のリッサウイルスが検出できるか、また狂犬病ワクチンでその他のリッサウイルスが防御できるかを検証していく。

B. 研究方法

現在確認されている全リッサウイルス 18 種の N 蛋白質発現プラスミドを作製した。3' 末端に His-tag の配列を付加した N 蛋白質発現プラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、フジレビオの RABV-N-mAb を用いた IFA 試験で全てのリッサウイルスが

検出できるかどうかを確認した。また水疱性口炎ウイルス (VSV) を用いたシュードタイプウイルス (VSVp) を作製した。更にウサギを用いて人用・動物用狂犬病ワクチンを用いた免疫血清を作製し、既存のワクチンが全リッサウイルスを防御できるかどうか検討した。

(倫理面への配慮)

動物を使用した実験は全て国立感染症研究所の実験動物委員会の承認のもと行われた。

C. 研究結果

N 蛋白質検出の IFA 試験では、今回検証した 18 種の内、16 種のリッサウイルスで RABV-N-mAb による検出を確認することができた (図 1)。狂犬病ワクチン抗血清を、新規リッサウイルス (KBLV) を加えた 18 種のリッサウイルス VSVp で中和したところ、RABV と同じフィログループ I に属する 12 種の VSVp は交差反応を示したが、フィログループ II に属する VSVp はほとんど交差反応を示さなかった。また未分類に属する VSVp は全ての抗

血清において交差反応を示さなかった (図 2)。

D. 考察

現在リッサウイルスはフィログループ I, II, 未分類種の 3 グループに分けられている。現在診断で使用されているフジレビオの RABV-N-mAb は非常に感度が良く、検証したリッサウイルスのほとんどを検出することに成功した。フィログループ II, 未分類種を検出できたことから、RABV 以外のリッサウイルスが日本に侵入してきた場合、更に新たなリッサウイルスが見つかった場合においても対応が可能であると考えられる。100 倍の希釈濃度で RABV-N-mAb を使用した場合、KBLV と TWBLV を検出できなかったため、より濃い濃度で抗体を使用して再試をする必要がある。また狂犬病ワクチンの免疫血清を用いた VSVp の中和試験では、RABV と違うフィログループ II の VSVp とはほとんど交差反応を示さず、未分類種の VSVp とは全く交差反応を示さなかった。このことから既存の狂犬病ワクチンでは全てのリッサウイルスを防御できるわけではないということが判明した。

E. 結論

現行の RABV-N-mAb を使用した診断ではほぼ全てのリッサウイルスを検出できるが、RABV 以外のリッサウイルスに対する防御に関しては現行の狂犬病ワクチンのみでは不十分であり、新たな対策が必要である。

F. 健康危機情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Inoue Y, Kaku Y, Harada M, Ishijima K, Kuroda Y, Tatemoto K, Virhuez-Mendoza M, Nishino A, Yamamoto T,

Park ES, Inoue S, Matsuu A, Maeda K. Establishment of serological neutralizing tests using pseudotyped viruses for comprehensive detection of antibodies against all 18 lyssaviruses. *J Vet Med Sci.* 2024 Jan 26;86(1):128-134.

2. Inoue Y, Kaku Y, Harada M, Ishijima K, Kuroda Y, Tatemoto K, Virhuez-Mendoza M, Nishino A, Yamamoto T, Inoue S, Matsuu A, Maeda K. Cross-neutralization activities of antibodies against 18 lyssavirus glycoproteins. *Jpn J Infect Dis.* 2023 Dec 28.

2. 学会発表

1. 井上 雄介, 加来 義浩, 松鶴 彩, 原田 倫子, 石嶋 慧多, 黒田 雄大, 立本 完吾, Milagros Virhuez Mendoza, 西野 綾乃, 山本 つかさ, 井上 智, 前田 健 「18 種類のリッサウイルスの交差反応性」, 第 70 回日本ウイルス学会, 宮城県仙台市, 仙台国際センター, 2023 年 9 月 26 日~28 日

3. 講演会

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

(図1) リッサウイルス N 蛋白質の発現確認及び anti-RABV-mAb を使用した時の反応性

抗体希釈倍率	RABV		EBLV1		EBLV2		ABLV		DUVV		BBLV	
	anti-His	anti-RABV	anti-His	anti-RABV	anti-His	anti-RABV	anti-His	anti-RABV	anti-His	anti-RABV	anti-His	anti-RABV
100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
400	+	+	+	-	±	-	+	±	±	±	+	-
800	±	±	±	-	±	-	±	-	-	-	+	-
1,600	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	±	-
3,200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
抗体希釈倍率	ARAV		IRKV		KHUV		GBLV		TWBLV		KBLV	
	anti-His	anti-RABV	anti-His	anti-RABV	anti-His	anti-RABV	anti-His	anti-RABV	anti-His	anti-RABV	anti-His	anti-RABV
100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
200	+	+	+	±	+	+	+	+	+	-	+	-
400	+	±	+	-	+	±	+	±	+	-	+	-
800	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	±	-
1,600	±	-	±	-	±	-	±	-	±	-	-	-
3,200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
抗体希釈倍率	LBV		MOKV		SHIBV		IKOV		WCBV		LLEBV	
	anti-His	anti-RABV	anti-His	anti-RABV	anti-His	anti-RABV	anti-His	anti-RABV	anti-His	anti-RABV	anti-His	anti-RABV
100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
400	±	+	+	±	+	±	+	+	+	+	+	±
800	-	±	±	-	±	-	±	+	+	+	+	-
1,600	-	-	-	-	-	-	-	±	+	±	±	-
3,200	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-
6,400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(図2) 狂犬病ワクチン抗血清とシュードタイプウイルスを用いた交差中和試験

