

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

狂犬病の神経病原性に関する研究

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	原田 倫子	(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)

研究要旨：

狂犬病は狂犬病ウイルス(RABV)によって致死性脳炎を引き起こされる感染症である。RABV は、神経親和性が高く、脳内や神経細胞で高率に増殖する。そのため、RABV の増殖や保存するためにマウス神経芽腫細胞(MNA 細胞)が良く用いられる。RABV の 1 つである HEP-Flury 株は固定毒株の中でも病原性の低い弱毒株であり、日本におけるヒト用狂犬病ワクチン株として使用されている。この株は、ニワトリ初代培養細胞にて継代・作製されており、神経細胞での継代は限られている。今回、この株を用いて組換え株を作製し、MNA 細胞で増殖性を比較したところ、増殖性に差が認められた。調べたところ、MNA 細胞に接種時の株の配列は親株と組換え株で同じであったが、培養二日目の上清から親株で 1 ヶ所の変異が認められた。この変異を解析したところ、MNA 細胞の増殖性のみならず、マウスの脳内においても増殖性が高いことが分かった。本研究は、この変異がマウスにおける神経病原性に関与することを明らかにした。

A. 研究目的

狂犬病ウイルス(RABV)は神経親和性が高いため、*in vitro*においてウイルスの増殖にはマウス神経芽腫細胞(MNA 細胞)が使われる。しかし、RABV は様々な細胞などでの継代に伴い、変異が入ることが知られているが、神経細胞における変異等に関しては報告が少ない。本研究は MNA 細胞で継代して認められた変異が *in vitro*, *in vivo* で増殖性に影響するかどうか解析した。

B. 研究方法

M 遺伝子に変異を有する組換え HEP-Flury 株をリバーシジェネティクスにより作製し、MNA 細胞、DF-1 細胞での増殖性を親株のウイルスと比較した。

また、マウスにおける病原性並びに脳中のウイルス量・IFN 産生量を確認した。

(倫理面への配慮)

動物実験は所内動物実験委員会の承諾を得て実施した。最小限の苦痛を考慮し、発症したマウスにおいては安楽殺処置を実施した。

C. 研究結果

M タンパクに認められた M(D80N) 変異により、MNA 細胞では親株と比較して、有意に増殖性が向上した(図 1)。一方で、ニワトリ胚細胞である DF-1 細胞においては増殖性に差がなかった(図 1 f)。マウスにおいては、M(D80N) 変異株接種群において、有意に脳中の力価も増加していた(図 2 d)。病原性においては、乳飲みマウスでは親株と同様に全頭発症・死亡し、成マウスでは全頭生存した(図 2 a)。しかし、M(D80N) 変異株接種成マウス群において有意に体重減少に差が認められた(図 2 b)。IFN 量を測定したところ、IFN- α ・ β では差は認められなかったが、IFN- γ においては増加していた(図 3)。

D. 考察

M(D80N)変異はMNA細胞並びにマウスの脳内での増殖性の向上に関与していた。一方で、DF-1細胞では変異による差がなかったことより、MNA細胞で高率に増殖するための変異であった。マウスにおいて、同様に脳内での増殖性の向上は認められたが、病原性には差はなかったことより、病原性に影響はしないがマウス脳内での増殖性もM(D80N)が関与していることが明らかとなった。IFN- α ・ β の減少が認められなかったことより、この変異がJack STAT系による関与ではなく、他の経路により関与していることが示唆された。このメカニズムの解明においては、今後も追及する必要がある。

E. 結論

MNA細胞で数回継代したことにより、Mタンパク80番アミノ酸残基にM(D80N)の変異が認められた。この変異は、MNA細胞のみならず、マウスの脳においても増殖性に関与していることが明らかとなった。この変異はin vivo・in vitroともにマウス神経親和性に関与している変異であることが明らかとなった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Harada M, Matsuu A, Kaku Y, Okutani A, Inoue Y, Posadas-Herrera G, Inoue S, Maeda K. Single Amino Acid Substitution in the Matrix Protein of Rabies Virus Is Associated with Neurovirulence in Mice. *Viruses*. 2024; 16(5):699.

2. 学会発表

1. 原田倫子、松鷲彩、朴ウンシル、加来義浩、井上雄介、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「狂犬病ウイルスのVero細胞での増殖に重要な5つのアミノ酸の同定」第70回日本ウイルス学会学術集会、2023年9月28日

3. 講演会

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

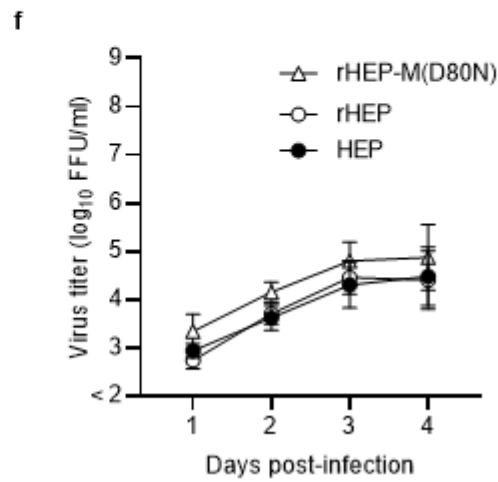
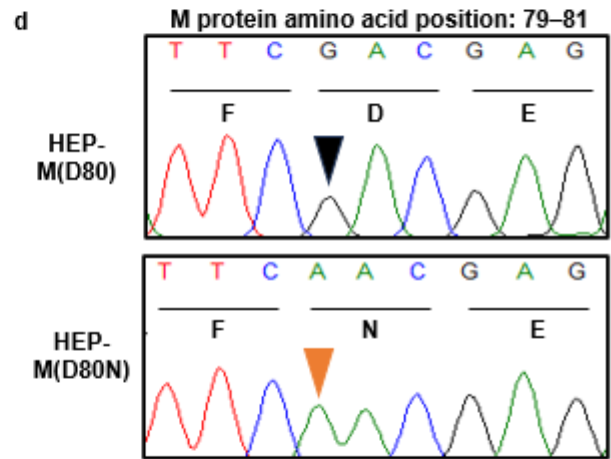
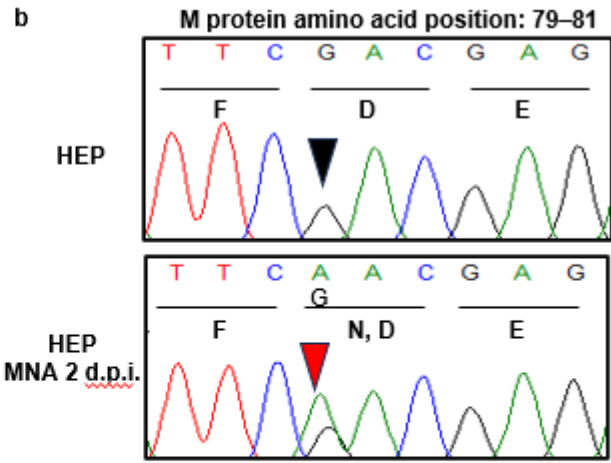
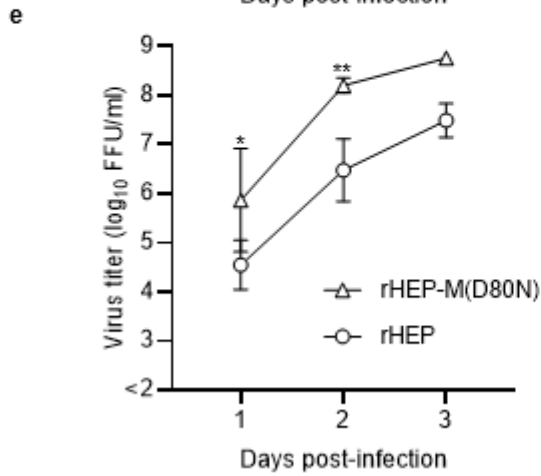
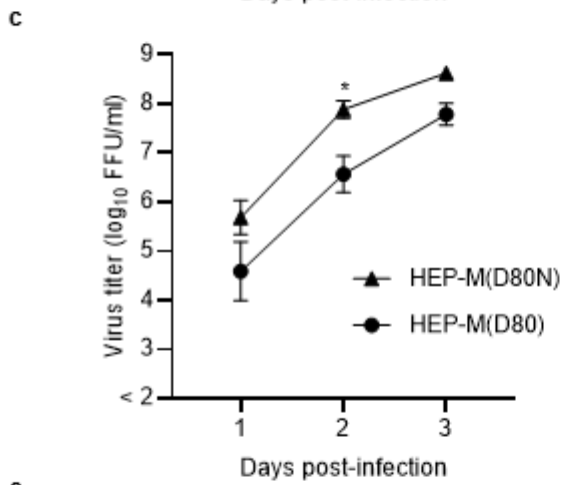
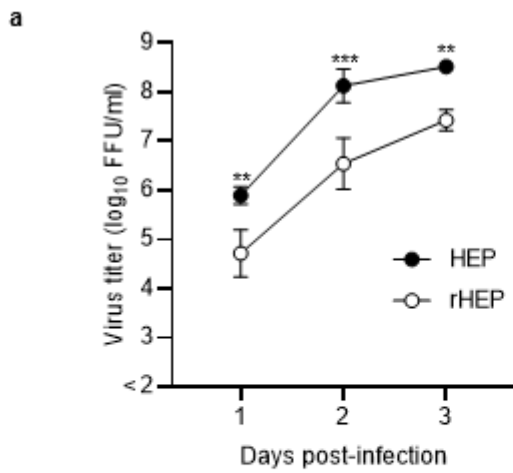
2. 実用新案登録

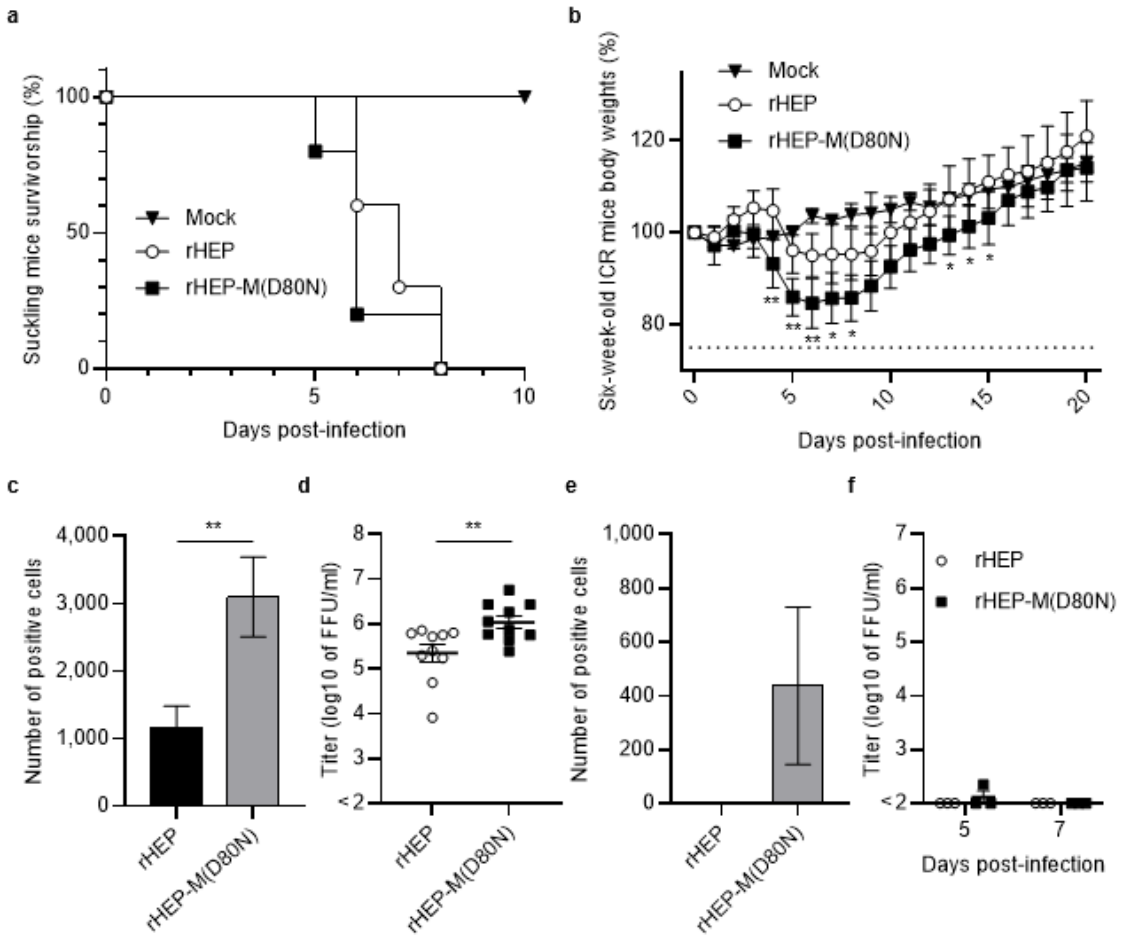
特になし

3. その他

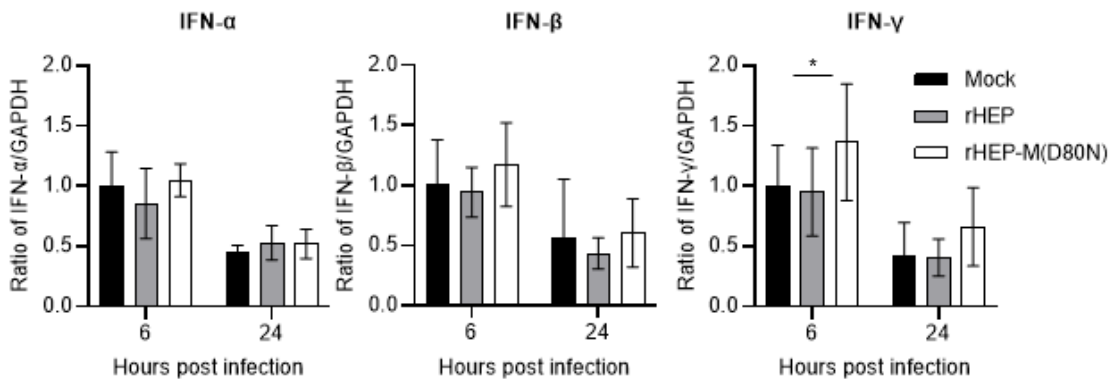
特になし

☒ 1





a



b

