

令和 4 年度～令和 6 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)
(分担) 研究報告書

「狂犬病に対する新規ワクチン開発」

研究分担者	前田 健	(国立感染症研究所・獣医科学部)
研究協力者	松鶴 彩	(日本大学・生物資源科学部)

研究要旨：

本研究では、狂犬病ウイルス G タンパク質をコードする mRNA ワクチンの有効性をマウスモデルで検証した。その結果、単回投与で感染防御レベルの中和抗体が長期間維持され、曝露前および曝露後ワクチンとして高い防御効果を示した。また、既存の不活化ワクチンよりも一部のリッサウイルスに対して高い中和活性を示した。さらに、G タンパク質の糖鎖付加部位に変異を導入した 6 種の mRNA ワクチンを作成し、中和抗体誘導能を比較したが、顕著な効果は認められなかった。ただし、特定の変異 (R215S) を含むワクチンは一部の個体で高力価の中和抗体を誘導する可能性が示唆された。本 mRNA ワクチンは狂犬病およびリッサウイルス感染症に対する新たなワクチン候補として期待される。

A. 研究目的

狂犬病の予防および治療（曝露後ワクチン）には、狂犬病ウイルス不活化ワクチンが広く使用されているが、高コストであることから、十分な供給が困難な国や地域も存在する。さらに、現在国内での生産は限定的である。リッサウイルス属の他のウイルスに対しても同ワクチンが使用されているが、遺伝的に異なる系統群に対しては十分な効果が得られない可能性がある。

mRNA ワクチン技術は、安価かつ大規模な迅速製造が可能な新しいワクチンプラットフォームとして期待されている。本研究では、国立感染症研究所において開発された狂犬病ウイルス G タンパク質をコードする mRNA ワクチンのマウスにおける有効性を検証した。また、接種後のマウス血清を用いて、狂犬病ウイルス以外のリッサウイルスに対する中和活性も評価した。さらに、中和抗体の誘導効果向上を目的に、G タンパク質の糖鎖付加部位に変異を導入した 6 種類の mRNA ワクチンを新たに作製し、それらの中和抗体誘導能を比較した。

B. 研究方法

狂犬病 G タンパク質 mRNA ワクチンは、街上株である Toyohashi 株の G タンパク質をコードし、脂質ナノ粒子に封入したものである。比較対象として、市販の不活化ワクチン (Rabipur、GlaxoSmithKline 社製) を使用した。すべての実験には、6 週齢の雌 C57BL/6 マウスを用いた。①mRNA ワクチンを 0.05、0.5、5 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ の用量で、1 回または 2 回 (d0 および d21) 筋肉内接種し、各接種後 21 日目 (d21、d42) の中和抗体価を測定した。さらに、5 μg 単回接種後、d3、d7、d10、d14、d21 の中和抗体価の推移を解析し、以後 4 週間間隔で最大 54 週間まで抗体価を追跡した。②mRNA ワクチン (0.05、0.5、5 μg) 接種 21 日後に狂犬病ウイルス CVS 株を脳内接種し、生存率を評価した (曝露前ワクチン)。また、街上株 (Toyohashi 株) を筋肉内接種後、6 時間以内に mRNA ワクチンを接種し、生存率を評価した (曝露後ワクチン)。③①で得たマウス血清を用い、狂犬病ウイルス (CVS-11 株)、Duvenhage virus (DUVV)、European bat lyssavirus 1 (EBLV-1)、Australian bat lyssavirus

(ABLV)、Mokola virus (MOKV) の G タンパク質を発現する VSV シュードタイプウイルスを用いた中和試験を行った。

6 種類の糖鎖付加部位変異体 mRNA (D266N、K177N、R215S、K177N/R548S、K177N/D266N、R215S/D266N) を内包するワクチンを作成し、各 $0.5 \mu\text{g}$ を筋肉内に 1 回または 21 日間隔で 2 回接種し、最終接種 21 日後 (d21) の中和抗体価を比較した。特に、R215S 変異を含む 4 種類のワクチン (R215S、K177S/R215S、R215S/D266N、K177M/R266N) について、d3、d7、d10、d14、d21 の中和抗体価を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

mRNA ワクチン接種により、用量依存的に狂犬病に対する中和抗体が誘導され、2 回接種によりさらに高力価が得られた (図 1)。 $5 \mu\text{g}$ 群では、接種 7 日後に不活化ワクチン群を上回る抗体価が確認された (図 2)。さらに、 $5 \mu\text{g}$ 単回接種で少なくとも 54 週間にわたり感染防御レベル ($>0.5 \text{ IU/mL}$) の抗体価が維持され、2 回接種によりさらに高い値が維持された (図 3)。

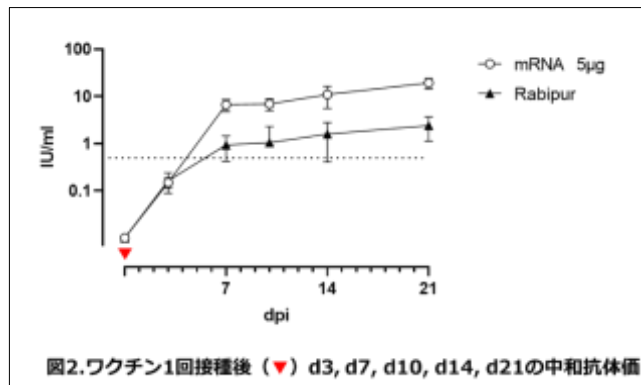
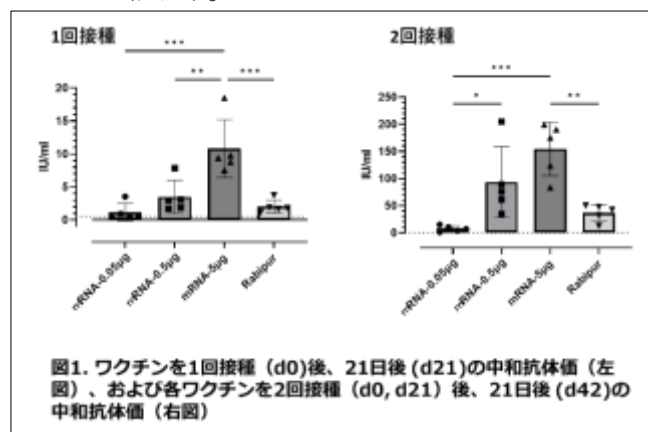


図2. ワクチン1回接種後 (▼) d3, d7, d10, d14, d21の中和抗体価

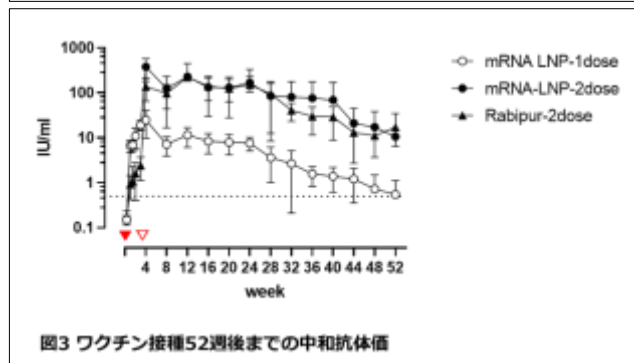


図3 ワクチン接種52週後までの中和抗体価

$5 \mu\text{g}$ 接種群では、CVS 株脳内接種後に全個体が生存し、 $0.5 \mu\text{g}$ 群では 80% の生存率で不活化ワクチンと同等の効果が確認された。 $0.05 \mu\text{g}$ 群では全例死亡した (図 4)。

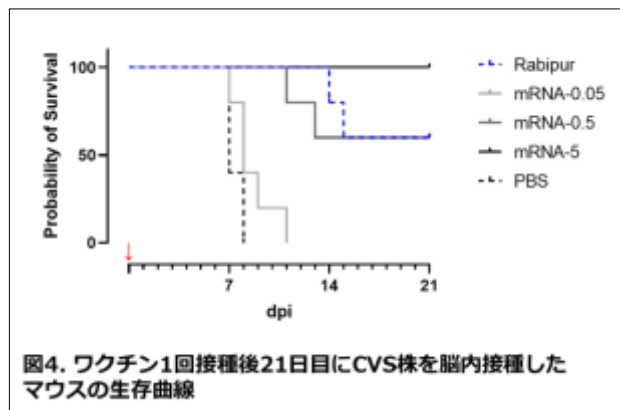


図4. ワクチン1回接種後21日目にCVS株を脳内接種したマウスの生存曲線

曝露後ワクチンとしては、Toyohashi 株接種 6 時間後に $5 \mu\text{g}$ を投与した群で 80% の生存率が得られ、不活化ワクチンよりも有意に高い効果を示した (図 5)。

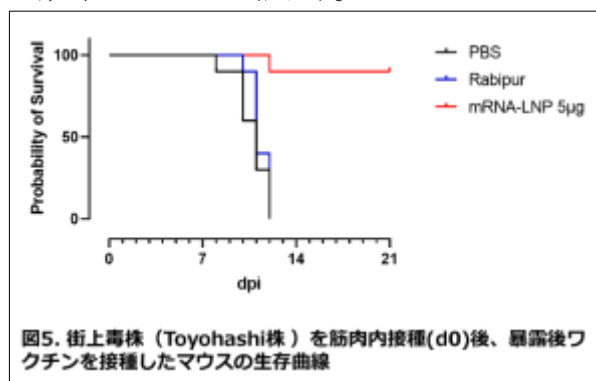


図5. 街上毒株 (Toyohashi株) を筋肉内接種(d0)後、曝露後ワクチンを接種したマウスの生存曲線

mRNA ワクチン接種後の血清は、DUVV、EBLV-1、ABLV に対して不活化ワクチン群を上回る中和抗体価を示した (図 6)。一方、MOKV に対しては中和活性が認められなかった。

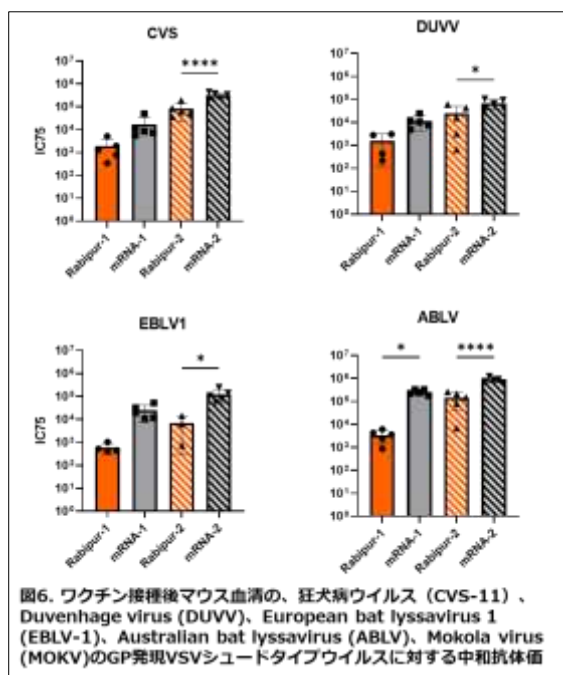


図6. ワクチン接種後マウス血清の、狂犬病ウイルス (CVS-11)、Duvnaha virus (DUVV)、European bat lyssavirus 1 (EBLV-1)、Australian bat lyssavirus (ABLV)、Mokola virus (MOKV)のGP発現VSVシュートタイプウイルスに対する中和抗体価

糖鎖付加変異体 mRNA ワクチンと野生型ワクチン接種群の間で、d21 における群間差は統計的に有意ではなかった。R215S 変異を含むワクチン接種群の中には、高力価抗体を誘導する個体が一部存在した (図 6)。この傾向を詳細に検証するため、追加実験を実施したが、群間における有意差は認められなかった (図 7)。

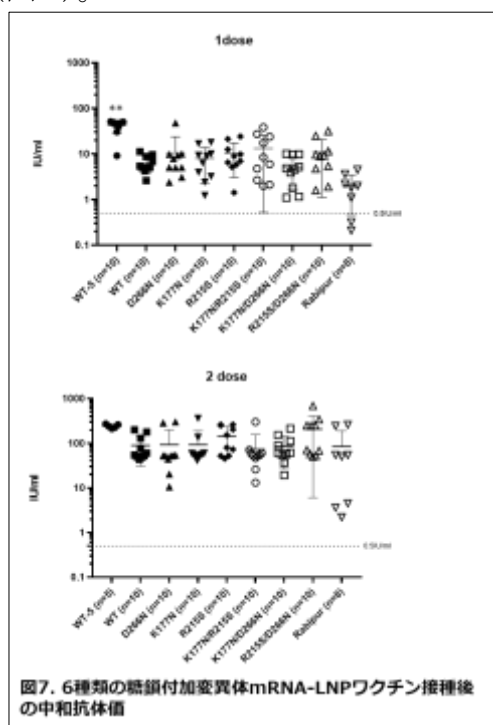


図7. 6種類の糖鎖付加変異体mRNA-LNPワクチン接種後の中和抗体価

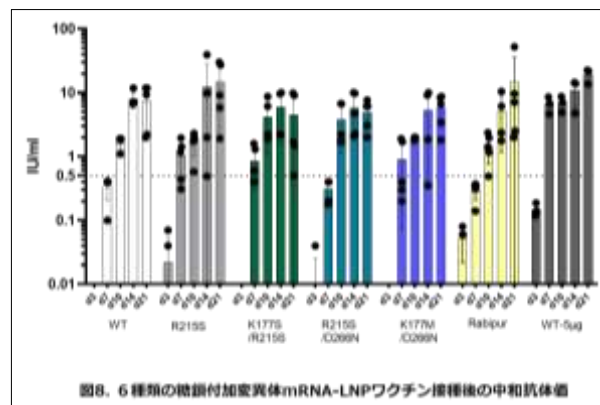


図8. 6種類の糖鎖付加変異体mRNA-LNPワクチン接種後の中和抗体価

D. 考察

本研究で開発された mRNA ワクチンは、マウスにおいて高力価の中和抗体を誘導し、曝露前・曝露後ワクチンとして共に高い有効性を示した。新たなワクチン候補として有望である。本ワクチンは、狂犬病ウイルスと同じ系統群 1 に分類されるリッサウイルスに対しても、不活化ワクチンより高い中和抗体価を誘導した。一方、異なる系統群に属する MOKV に対する交差中和活性は認められなかった。今後、mRNA 配列や抗原設計を改良することで、より広範囲なリッサウイルスに対応可能なワクチンへの発展が期待される。

in vitro での予備実験においては、糖鎖付加変異体 mRNA を導入した細胞膜上で GP の高発現を示し、特に 2 箇所の変異導入でさらに発現が増強されたことを確認している。しかし、mRNA ワクチンとして接種した場合中和抗体価の有意な上昇は得られなかった。R215S 変異体は一部のマウスで高い抗体価を誘導しており、今後の性能向上に向けた詳細な解析が必要である。

E. 結論

本研究で開発した狂犬病 G タンパク質 mRNA ワクチンは、マウスにおいて感染防御レベルの中和抗体を誘導した。本技術は、広範囲のリッサウイルスに対応可能なワクチン開発や、他のウイルス感染症に対する新規 mRNA ワクチン開発の有力な基盤となることが期待される。

F. 研究発表

該当なし

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

第 167 回日本獣医学会学術集会 2024 年 9 月
10 日～13 日 講演要旨集 p 224

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし