

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

「改良型狂犬病ワクチンの開発」

研究分担者 前田 健 (国立感染症研究所・獣医学部)  
研究協力者 原田 優子 (国立感染症研究所・獣医学部)

研究要旨 :

Vero 細胞継代により作製した Vero 細胞馴化 HEP 株を基にリバースジェネティクス法にて組換えウイルスを作製し、性状解析を行った。Vero 細胞の 10 継代過程で認められた P、G、L 遺伝子の変異を挿入した組換えウイルスではオリジナル株と比較して、G 変異株で軽度 Vero 細胞における増殖性が上昇し、P 変異株では更に上昇した。また、P 及び G 変異を組合せることで更なる上昇が認められた、そして、30 継代株では 10 継代株に更に G 遺伝子に 3ヶ所の変異を挿入した株で増殖性の向上が認められた。水疱性口内炎ウイルスを用いた非増殖型 シュードタイプウイルスに 10 継代株及び 30 継代株の G 蛋白を外套させ、

Vero 細胞における侵入性を比較した結果、30 継代株の G 蛋白外套ウイルスは有意に侵入効率が上昇した。HEP-Flury 株の Vero 細胞馴化には P 遺伝子と G 遺伝子の変異が関与していることが明らかとなった。また、30 継代で認められた G 遺伝子の変異が Vero 細胞への侵入に関与していた。以上のことより、Vero 細胞への馴化には P 遺伝子 1ヶ所、G 遺伝子 4ヶ所のアミノ酸が関与していることが明らかとなった。Vero 細胞馴化にかかる 5ヶ所の変異を有する HEP-Flury 株の作製により安定したワクチン親株の製造が可能になった。

A. 研究目的

従来の国産人用狂犬病ワクチンは鶏初代培養細胞で増殖された HEP-Flury 株である。以前の研究にて、Vero 細胞で HEP-Flury 株を 10、30 継代した結果、10 継代株では 3ヶ所のアミノ酸変異が認められ、30 継代株ではさらに 4ヶ所のアミノ酸変異が加わった。各ウイルスは Vero 細胞での増殖性が向上していたが、病原性や抗原性は親株とほぼ同等であった。本研究は、リバースジェネティクス法にて作製した組換え HEP-Flury 株を用いて Vero 細胞への馴化に伴うアミノ酸変異の効果を解析した。

B. 研究方法

HEP-Flury 株全長ゲノムを pcDNA3.1Zeo(+) に挿入した plasmid 及び、N, P, G, L 遺伝子をそれぞれ pcDNA3.1Zeo(+) に挿入した

helper plasmid を作製した。BHK 細胞にトランسفエクションし、5 日間培養、組換えウイルスを回収した。変異株として、Vero 細胞で 10 代継代後に認められた変異、P 遺伝子 1ヶ所、G 遺伝子 1ヶ所、L 遺伝子 1ヶ所そして 30 継代株でさらに加わった G 遺伝子 3ヶ所、L 遺伝子 1ヶ所の変異を単独及び組合せた組換えウイルスを作製した。それらの株を用いて、増殖性やマウスでの病原性、抗原性等を評価した。

(倫理面への配慮)  
特になし

C. 研究結果

10 継代株で認められた変異の内、P・G 変異が増殖性の向上に関与しており、30 継代で認められた変異の内 3 つの G 変異が関与して

いた。病原性及び抗体誘導性をマウスにて確認した結果、Vero 細胞の馴化に関与している変異を挿入した株 rHEP-PG4 株では病原性は親株と同等であり、抗体誘導性も親株と従来のワクチンである Rabipur と同等の誘導性が認められた。

#### D. 考察

HEP-Flury 株の Vero 細胞馴化には P 遺伝子と G 遺伝子の変異が関与していることが明らかとなつた。また、30 繼代で認められた G 遺伝子の変異が Vero 細胞への侵入に関与していた。以上のことより、Vero 細胞への馴化には P 遺伝子 1 ヶ所、G 遺伝子 4 ヶ所のアミノ酸が関与していることが明らかとなつた。Vero 細胞馴化にかかる 5 ヶ所の変異を有する rHEP-PG4 株は十分な抗体価の誘導性が認められたことより、新たなワクチン株として十分期待される。

#### E. 結論

Vero 細胞への馴化には P 遺伝子 1 ヶ所、G 遺伝子 4 ヶ所のアミノ酸が関与していることが明らかとなつた。Vero 細胞馴化にかかる 5 ヶ所の変異を有する HEP-Flury 株の作製により安定したワクチン親株の製造が可能になった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Harada M, Matsuu A, Park ES, Inoue Y, Uda A, Kaku Y, Okutani A, Posadas-Herrera G, Ishijima K, Inoue S, Maeda K\*. Construction of Vero cell-adapted rabies vaccine strain by five amino acid substitutions in HEP-Flury strain. *Sci Rep.* 2024 May 31;14(1):12559.
2. 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 Apr 28;16(5):699.

#### 2. 学会発表

1. 「マウス神経芽腫細胞への馴化による狂犬病ウイルスのマウス神経病原性の増強」、原田倫子、松鶴 彩、朴ウンシル、加来義浩、井上雄介、宇田晶彦、奥谷晶子、Guillermo Posadas-Herrera、井上智、前田 健、第 167 回日本獣医学会、2024/9/10-13、国内、口頭
2. 「狂犬病ウイルス HEP-Flury 株の細胞馴化の関連因子の検討」、原田倫子、松鶴 彩、朴ウンシル、加来義浩、井上雄介、宇田晶彦、奥谷晶子、Guillermo Posadas-Herrera、井上 智、前田 健、第 20 回狂犬病研究会、2025/1/24、国内、口頭
3. 「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」、原田倫子、松鶴 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、第 70 回日本ウイルス学会、2023/9/26-28、国内、口頭
4. 「リバースジェネティクス法による狂犬病ウイルスの細胞馴化機序の解明」、原田倫子、松鶴 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、井上 智、前田 健、第 6 回獣医微生物学フォーラム、2023/03/04、国内、口頭
5. 「狂犬病ワクチンの改良に向けた試み」、原田倫子、松鶴 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、井上 智、前田 健、第 165 回日本獣医学会、2022/9/6-8、国内、口頭

#### G. 知的財産権の取得状況

##### 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