

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380179

研究課題名(和文) 増殖欠損ウイルスを応用した次世代・狂犬病ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of the novel rabies vaccine by using gene-deficient virus

研究代表者

杉山 誠 (Sugiyama, Makoto)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：80196774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,700,000円、(間接経費) 3,210,000円

研究成果の概要(和文)：狂犬病を制圧・撲滅するために、狂犬病ウイルスの遺伝子操作により、増殖欠損型(M遺伝子欠損)ウイルスを作出し、狂犬病ワクチンとしての有用性を検証した。M遺伝子欠損ウイルスの増殖性が不十分であることを示す結果が得られたため、PおよびM遺伝子欠損ウイルスの混合ウイルスを作出し、ワクチンとしての有用性を確認した。この混合ウイルスは、2種類の遺伝子欠損ウイルスが同一の細胞に感染した場合のみ、互いの遺伝子欠損を補完し、子孫ウイルスが産生される。実際、本混合ウイルスは、高い安全性と免疫原性を有することが確認された。以上、遺伝子欠損・混合ウイルスは、次世代の狂犬病ワクチンとして有望であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to generate a replication-defective (M gene-deficient) rabies virus strain by gene manipulation and to examine the potency of the strain as a rabies vaccine. Our preliminary data strongly suggested that the M gene-deficient virus could not sufficiently propagate in Vero cells stably expressing M protein. We generated a mixture of P- and M-gene deficient viruses by gene manipulation and examined the potency as a rabies vaccine. Theoretically, P- and M-gene deficient viruses will not produce progeny viruses unless the two different viruses infect an identical cell and complement the gene defect of each other. In fact, we found that the mixture of the P- and M-gene deficient viruses has high levels of safety and immunogenicity, indicating that the mixture is a promising candidate as the next-generation rabies vaccine.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：狂犬病ウイルス ワクチン 増殖欠損ウイルス Mタンパク質 Pタンパク質

1. 研究開始当初の背景

現在、安全性の観点から日本をはじめ世界的に不活化狂犬病ワクチンが普及している。しかし、不活化ワクチンには大量のウイルス精製抗原が必要なため高価となり、狂犬病の流行が深刻な開発途上国での利用・普及を困難にしている。一方、比較的安価に製造が可能な生ワクチンは、細胞性免疫を刺激し、経口投与により動物を免疫することができるが、病原性復帰により動物が狂犬病を発症する可能性を否定できない。したがって、次世代のワクチンの具備する要件として、安全かつ安価で経口投与が可能であり、さらに免疫原性が高いことが求められる。

2. 研究の目的

遺伝子操作により、増殖欠損 (M 遺伝子欠損) 狂犬病ウイルスを作出する。その上で、増殖欠損ウイルスを応用した次世代ワクチンの開発に関する基盤的研究を行う。具体的には、動物に対する安全性および免疫原性について検討する。

3. 研究の方法

(1) 複数の変異により弱毒化されたワクチン候補株の作出

M 遺伝子欠損ウイルスを作出する際、その元株となる安全性の高いワクチン候補株を作出する目的で、複数の変異により弱毒化されたウイルス株の作出を行った。具体的には、N、P および M 遺伝子上の変異によって弱毒化されている Ni-CE 株の遺伝子操作系 (Shimizu et al., *Virus Res.*, 2007) を用いて、その G 蛋白質 333 位 (G333) に既知の弱毒化変異 (Glu) を保有する変異株 Ni-CE (G333Glu) 株を作出した (Nakagawa et al., *Vaccine*, 2012)。また、生ワクチンとして使用された実績のある ERA 株の遺伝子操作系 (Nakagawa et al. 投稿中) により、G333 に Glu、N 蛋白質 273 および 394 位に Ni-CE 株由来弱毒化変異 (各々 Leu および His) を保有する ERA-N273/394-G333 株を樹立した。

(2) 培養細胞におけるワクチン候補株の増殖性の検討

ハムスター腎由来 BHK 細胞あるいはアフリカミドリザル腎由来 Vero 細胞における各ワクチン候補株の増殖性を検討した。すなわち、各ウイルスを感染多重度 0.01 で細胞に接種した後、経目的に培養上清を回収した。その上清中のウイルス力価をマウス神経芽細胞腫由来の NA 細胞を用いたフォーカス・アッセイにより測定した。

(3) ワクチン候補株の残存病原性の検討

各ワクチン候補株を 6 週齢マウス (ddY 系統・雌) に脳内接種することで、残存病

原性の程度を評価した。観察期間である 2 週間の間、毎日、接種マウスの生存率、症状および体重について観察・記録した。

(4) ワクチン候補株の免疫原性の検討

各ワクチン候補株を 6 週齢マウスに筋肉内接種し、6 週後、その血清を回収した。その後、血清中の中和抗体価を常法に従い測定した。また、免疫 6 週後のマウスに対して、50%致死量の 25 倍の用量で標準攻撃株 (CVS 株) を脳内接種し、各ワクチン株の感染防御能を評価した。

(5) M 遺伝子恒常発現 Vero 細胞の確立

ERA 株 M 遺伝子 cDNA を市販の哺乳類細胞発現プラスミド (pcDNA3.1) にクローニングした。本プラスミドを用いて、M 蛋白質を恒常的に発現する Vero 細胞を樹立した。

(6) M 遺伝子欠損ウイルスの作出

ERA 株の遺伝子操作系と M 蛋白質発現プラスミドを用いて、M 遺伝子のアミノ酸コード領域を完全に欠損したウイルス株を作出した。

(7) P および M 遺伝子欠損・混合ウイルスの作出

ERA-N273/394-G333 株の遺伝子操作により、P および M 遺伝子欠損ウイルスを同時に回収することで、これら 2 種類の遺伝子欠損ウイルスの混合液を得た。

4. 研究成果

(1) 複数の変異により弱毒化された Ni-CE (G333Glu) 株と ERA-N273/394-G333 株の作出

非常に可能性は低いと考えられるものの、モノネガウイルス目ウイルスでも相同組換えが確認されている (Spann et al., *J. Virol.*, 2003)。このことは、自然界において、M 遺伝子欠損ウイルスが相同組換えによって病原性を獲得する危険性を示している。そこで、仮に M 遺伝子を獲得した場合でも弱毒性状を保つようなウイルス株を選定し、M 遺伝子欠損ウイルスの作製に使用することが望ましいと考えた。本研究では、そのようなウイルス株として、Ni-CE (G333Glu) 株、ならびに ERA-N273/394-G333 株を遺伝子操作により作出した。

(2) 培養細胞における Ni-CE (G333Glu) 株と ERA-N273/394-G333 株の増殖性

Ni-CE (G333Glu) 株と ERA-N273/394-G333 株の培養細胞における増殖性を検討した (図 1)。BHK 細胞において、Ni-CE (G333Glu) 株は Ni-CE 株よりも若干遅い増殖性を示したものの、接種後 5 日目における培養上清中の力価は 1.0×10^7 FFU/ml と Ni-CE 株と同

等であった。

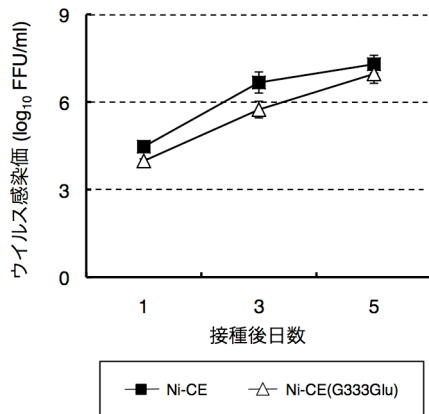


図1. BHK細胞におけるNi-CE(G333G)株の増殖性

Vero細胞におけるERA-N273/394-G333株の増殖性を検討した結果、ERA株よりも若干低い増殖性を示したものの、その接種後9日目の培養上清中のウイルス力価は、 3.8×10^8 FFU/mlに達した。

以上より、Ni-CE(G333Glu)株とERA-N273/394-G333株のいずれも組織培養でよく増殖することが明らかとなった。特に、ERA-N273/394-G333株の増殖性が顕著に高いことが判明した。

(3) Ni-CE(G333Glu)株ERA-N273/394-G333株の残存病原性の検討

10^5 FFUのNi-CE株を6週齢マウスに脳内接種した場合、マウスは一過性の体重減少を示した(図2)。一方、Ni-CE(G333Glu)株を接種したマウスは、明瞭な体重減少を示さなかった。

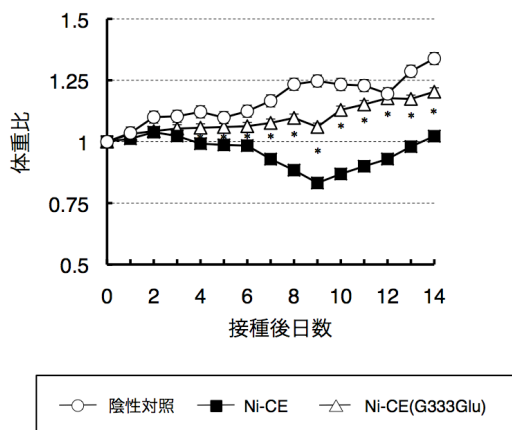


図2. Ni-CE(G333G)株感染マウスの体重曲線

*: Ni-CE株感染マウスの体重との間で有意差あり(P<0.05)。接種日の体重を1.0とした場合の相対値で表示した。

同様に、 10^5 FFUのERA-N273/394-G333株を6週齢マウスに脳内接種した場合でも、その致死性は確認されなかった。また、同株を接種したマウスは、体重減少を含む、いかなる症状も示さなかった(データ未掲載)。

以上の成績より、Ni-CE(G333Glu)株もERA-N273/394-G333株も、6週齢マウスにおいて、ほとんど残存病原性を示さないことが確認された。

(4) Ni-CE(G333Glu)株ERA-N273/394-G333株の免疫原性

一般的に、ワクチン接種後、血清中に0.5 IU/ml以上の中和抗体が誘導されれば、狂犬病ウイルスに対する十分な感染防御免疫が付与されたと見なされる。 10^6 FFUのNi-CE(G333Glu)株を筋肉内に単回接種したマウスでは、免疫6週間後に1.29 IU/mlの血清中和抗体が確認された。同条件でNi-CE株によって免疫されたマウスでは、血清中和抗体が1.78 IU/mlに達した。これらの免疫マウスに対して、CVS株の脳内接種による攻撃を行った結果、Ni-CE(G333Glu)株とNi-CE株の50%有効用量(ED₅₀)は、それぞれ 1.5×10^5 および 6.8×10^4 FFU/mlと算定された(図3)。

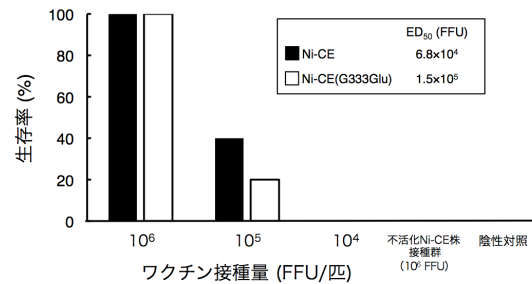


図3. 攻撃試験におけるNi-CE(G333G)株免疫マウスの生存率

10^5 FFUのERA-N273/394-G333株を筋肉内に単回接種されたマウスにおいて、免疫6週間後に1.23 IU/mlの血清中和抗体が確認された。上記と同様に、攻撃試験を実施した結果、ERA-N273/394-G333株のED₅₀は、 4.8×10^3 FFUと算定された(データ未掲載)。

以上、培養細胞における増殖性、残存病原性、ならびに免疫原性の成績の総合的な検討により、Ni-CE(G333Glu)株よりもERA-N273/394-G333株のほうがM遺伝子欠損ウイルス作製の元株として相応しいと判断した。

(5) M遺伝子欠損ウイルスの作出と増殖性

ERA-N273/394-G333株を用いてM遺伝子欠損ウイルスを作出する前に、予備試験としてERA株を用いて同欠損ウイルスを作出することとした。実際、ERA株のM遺伝子欠損ウイルスの作出に成功したものの、M蛋白質発現Vero細胞における同欠損ウイルスの増殖が極めて悪いことが判明した。その培養上清中のウイルス力価は、最大でも 2.1×10^2 FFU/mlであった。

Vero細胞におけるERA株の増殖性がERA-N273/394-G333株よりも若干高いとい

う事実を考慮すると、このM遺伝子欠損ウイルスのNおよびG遺伝子上に弱毒化変異を導入した場合、さらに増殖性が低下することが推測された。

(6) P および M 遺伝子欠損・混合ウイルスの作出

M 遺伝子欠損ウイルスの増殖性が極端に低かったことより、研究のアプローチを修正する必要が生じた。そこで、P および M 遺伝子欠損ウイルスの混合液を安全性の高いワクチンとして応用できるかどうか検討することにした。理論的に、この遺伝子欠損・混合ウイルスは、2 種類の遺伝子欠損ウイルスが同一の細胞に感染した場合のみ、互いの遺伝子欠損を補完し、子孫ウイルス（遺伝子欠損型）が産生される。この方法を用いれば、本研究で確立した M 蛋白質恒常発現 Vero 細胞のような特殊な細胞を用いることなく、遺伝子欠損ウイルスを増殖できると考えた。

実際に、ERA-N273/394-G333 株の遺伝子操作により、P および M 遺伝子欠損・混合ウイルスの作出に成功した。リアルタイム RT-PCR 法を用いた解析により、この P および M 遺伝子欠損・混合ウイルスは、2 種類の遺伝子欠損ウイルスをそれぞれ 1.0:0.8 とほぼ同等の割合で含むことが判明した。

(7) Vero 細胞における P および M 遺伝子欠損・混合ウイルスの増殖性

この遺伝子欠損・混合ウイルスを感染多重度 0.1 で Vero 細胞に接種した場合、接種 7 日目の培養上清において、 3.2×10^7 FFU/ml という高い力価のウイルスが産生されることが明らかとなった。

(8) P および M 遺伝子欠損・混合ウイルスの残存病原性

10^5 FFU の遺伝子欠損・混合ウイルスを 6 週齢マウスに脳内接種した結果、死亡するマウスは確認されなかった。また、明瞭な症状を示す個体についても観察されなかった（データ未掲載）。

(9) P および M 遺伝子欠損・混合ウイルスの免疫原性

10^6 FFU の遺伝子欠損・混合ウイルスを筋肉内接種したマウスでは、免疫 6 週間後に 1.48 IU/ml の血清中和抗体が確認された。また、CVS 株の脳内接種による攻撃試験により、その ED₅₀ は 4.0×10^4 FFU/ml と算出された。

以上の成績より、ERA-N273/394-G333 株をベースとした遺伝子欠損・混合ウイルスは、高い安全性と免疫効果を有するワクチンとして有望であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

① Wiltzer, L, Okada, K, Yamaoka, S, Larrous, F, Kuusisto, HV, Sugiyama, M, Blondel, D, Bourhy, H, Jans, DA, Ito, N, Moseley, GW. Interaction of Rabies Virus P-Protein With STAT Proteins is Critical to Lethal Rabies Disease. *J. Infect. Dis.* 2013 (in press)、査読有

② Yamaoka, S, Ito, N, Ohka, S, Kaneda, S, Nakamura, H, Agari, T, Masatani, T, Nakagawa, K, Okada, K, Okadera, K, Mitake, H, Fujii, T, Sugiyama, M. Involvement of the rabies virus phosphoprotein gene in neuroinvasiveness. *J. Virol.* 2013;87(22):12327-38. doi: 10.1128/JVI.02132-13、査読有

③ Nakagawa, K, Ito, N, Masatani, T, Abe, M, Yamaoka, S, Ito, Y, Okadera, K, Sugiyama, M. Generation of a live rabies vaccine strain attenuated by multiple mutations and evaluation of its safety and efficacy. *Vaccine.* 2012;30(24):3610-7. doi:10.1016/j.vaccine.2012.03.044、査読有

〔学会発表〕（計 6 件）

① Nakagawa, K., Ito, N., Mastani, T., Yamaoka, S., Okadera, K., Okada, K., Sugiyama, M. Generation of live rabies virus strain with high levels of safety and immunogenicity by mutations in nucleoprotein and glycoprotein. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji Yumebutai International Conference Center, Japan, 2014/9/11~2014/9/14

② Nakagawa, K., Ito, N., Mastani, T., Yamaoka, S., Okadera, K., Okada, K., Sugiyama, M. Combination of attenuating mutations in rabies virus nucleoprotein and glycoprotein enhances safety of a live vaccine strain. 4th Infection and Immunity conference Lorne Mantra, Australia, 2014/2/19~2014/2/22

③ 中川敬介、伊藤直人、山岡理子、岡寺康太、杉山誠：N および G 遺伝子に弱毒化変異を導入した狂犬病生ワクチン候補株の作出. 第 60 回日本ウイルス学会. 大阪国際

会議場. 2012/11/13~2012/11/15

- ④中川敬介、伊藤直人、山岡理子、岡寺康太、杉山誠：N および G 遺伝子に弱毒化変異を導入した狂犬病ウイルス株の弱毒性状の解析. 第 154 回日本獣医学会. 岩手大学. 2012/9/14~2012/9/16
- ⑤中川敬介、伊藤直人、正谷達膳、山岡理子、岡寺康太、杉山誠：N 遺伝子への変異導入による狂犬病ウイルス弱毒株の作出. 第 152 回日本獣医学会. 大阪府立大学. 2011/9/19~2011/9/21
- ⑥Nakagawa, K., Ito, N., Masatani, N., Abe, M. Yamaoka, S., Okadera, K., Sugiyama, M. Generation of rabies virus strain attenuated by multiple mechanisms. XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center
2011/9/11-2011/9/16

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称：変異狂犬病ウイルス及びワクチン
発明者：伊藤直人・杉山誠
権利者：国立大学法人岐阜大学・共立製薬株式会社
種類：特許
番号：特願 2011-234036
出願年月日：2011 年 10 月 25 日
国内外の別：国内

名称：変異狂犬病ウイルス合成・増殖方法、並びに狂犬病ワクチン製剤
発明者：伊藤直人・杉山誠
権利者：国立大学法人岐阜大学・共立製薬株式会社
種類：特許
番号：特願 2012-229854
出願年月日：2012 年 10 月 17 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 誠 (Sugiyama, Makoto)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：80196774

(2) 研究分担者

伊藤 直人 (Ito, Naoto)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号：20334922

(3) 連携研究者

井上 智 (Inoue, Satoshi)
国立感染症研究所・獣医科学部・室長
研究者番号：90213157