

平成 2 6 年 5 月 2 8 日現在

機関番号 : 7 2 6 3 3

研究種目 : 研究活動スタート支援

研究期間 : 2012 ~ 2013

課題番号 : 2 4 8 8 0 0 3 1

研究課題名 ( 和文 ) 細菌の宿主免疫回避機構の解明と新規ワクチン開発への応用

研究課題名 ( 英文 ) Elucidation of bacterial evasion of host immune system and application for development of novel vaccine

研究代表者

今井 孝彦 ( Imai, Takahiko )

一般財団法人日本生物科学研究所・その他部局等・研究員

研究者番号 : 3 0 6 3 3 9 5 3

交付決定額 ( 研究期間全体 ) : ( 直接経費 ) 2,300,000 円、( 間接経費 ) 690,000 円

研究成果の概要 ( 和文 ) : 過去に全国で伝染性コリ－ザが発生した際に分離された *Avibacterium paragallinarum* (A. *paragallinarum*) の野外株など計11株を収集した。これらを鶏に感染させHI抗体を測定することにより、その血清型を同定した。さらにその抗体価や鶏の病態などから、遺伝子欠損の親株となる株を選定した。親株からゲノムDNAを抽出し、目的の遺伝子をPCRで取得した。遺伝子の一部を欠失させたコンストラクトを作製し、プラスミドに挿入し、A. *paragallinarum* の形質転換を試みたが形質転換体は得ならず、現在検討を重ねている。

研究成果の概要 ( 英文 ) : We collected total 11 field strains of *Avibacterium paragallinarum* (A. *paragallinarum*) that had ever been isolated in Japan. To evaluate the pathogenicity of these strains, chickens were challenged by these strains and clinical signs were observed. Furthermore, serotypes of these strains were determined by measuring HI antibody. Among them, strain 221 (serotype A) and G-1 (Serotype C) induced highest HI antibody titers. We selected these strains as parental strains of deletion mutant. Target genes (*crp*, *galE*, *aroA*) were amplified by PCR from genome DNA of A. *paragallinarum* parental strains. A part of the genes were deleted by restriction enzymes and these constructs were inserted into pCACTUS plasmid. Although we tried to transform A. *paragallinarum* in several conditions, we could not acquire the transformant of A. *paragallinarum*. We are now examining the way to transform A. *paragallinarum*.

研究分野 : 農学

科研費の分科・細目 : 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード : 伝染性コリ－ザ

### 1. 研究開始当初の背景

伝染性コリーザは *Avibacterium paragallinarum* (*A. paragallinarum*) が鶏に感染することによって引き起こされる急性の呼吸器病である。*A. paragallinarum* の A 型菌と C 型菌が鶏伝染性コリーザの主要な原因菌とされている。本病は、臨床症状として主に鼻汁の漏出、顔面の腫脹あるいは流涙を呈し、これに伴い鶏の育成率の低下、産卵開始の遅延、産卵率の低下あるいは産卵停止をもたらすため、一度発生するとその経済的損失は非常に大きい。

伝染性コリーザは高温多湿の地域で発生しやすく、日本を始め、中国、ブラジル、メキシコ、インドなど多くの地域で確認されている。予防ワクチンの使用は極めて有効であり、多くの国において 2 価(A 型および C 型)のワクチンが使用されている。このワクチンは多価不活化ワクチンのコンポーネントとして含まれており、その高い普及率から我が国で伝染性コリーザの発生が抑えられているのが現状である。不活化ワクチンを投与した鶏では、*A. paragallinarum* の菌体表面に存在する haemagglutination inhibition (HI) 抗体が誘導され、5 倍以上の HI 抗体価を保有している鶏は伝染性コリーザから防御されることが知られている。それゆえに、ワクチン効果を *in vitro* で評価する場合には HI 試験が行われているが、この haemagglutinin のエピトープとなる領域は hypervariable region であることが報告されており、*A. paragallinarum* はこの領域に多数の変異を導入することにより、宿主が産生する抗体から逃れている可能性が示唆されている。さらに多価不活化ワクチンを接種した際、その菌体成分自体が副反応の原因物質として働いてしまう上に、他のコンポーネントに対しても免疫抑制的に働くことが知られている。その上、多価ワクチンの抗原としてのバランスが考慮された結果、持続性に問題が生じて産卵期間の後半まで

有効な免疫が持続できずに伝染性コリーザを発症するといった事例も見受けられる。このような背景から、高い免疫原性と持続性を有した、生菌ワクチンの開発が強く望まれている。

### 2. 研究の目的

多くの病原細菌が宿主の免疫系を巧みに回避し、効率的に生存・増殖感染を拡大していることはよく知られているが、その詳しい機序については不明な点が多い。

本研究では養鶏産業において甚大な被害をもたらす感染症の 1 つである伝染性コリーザの病原体 *A. paragallinarum* による宿主免疫回避機構を解明することを目的とする。

宿主免疫回避機構に重要な細菌の病原因子を複数同定し、それらの遺伝子を欠損した組換え変異体を作製することにより、そのメカニズムを解明する。一方、この欠損株は宿主免疫を惹起する能力を保持したまま弱毒化していることが考えられるため、理想的なワクチン候補株となり得ることが考えられる。このワクチン効果についても、実際に鶏の病態モデルを用いて検証する。

### 3. 研究の方法

はじめに全国で伝染性コリーザが発生した際に分離された野外株を収集する。これら野外株を鶏に感染させ、病原性・抗原性などを指標に、親株として使用する株を選定する。この株に対し、大腸菌やサルモネラ菌で確立済みの組換え細菌作製系を用いて、組換え *A. paragallinarum* を作製する。標的とする遺伝子は、過去に大腸菌等、他の細菌で宿主免疫回避因子として報告のある遺伝子とする。これらの遺伝子を欠損することで、*A. paragallinarum* で宿主免疫回避機構に重要な病原因子を複数同定できることが期待され、そのメカニズムの解明を目指す。具体的には、この欠損株の *in vitro* および *in vivo* での表現系を調べる。*in vitro* の解析では、親株と欠損株

それぞれを感染させた培養細胞の培養上清中に含まれるサイトカイン量の測定や、免疫系シグナルの解析などを行う。in vivoの解析では、実際に鶏に親株と遺伝子欠損株を感染させ、抗体価やサイトカイン産生量といった各種免疫応答を調べる。また、感染鶏の病体を調べることで遺伝子欠損株の病原性を評価する。このとき、免疫応答が親株と同等で弱毒化していると認められた遺伝子欠損株は、理想的な弱毒生ワクチンの候補と考えられるため、そのワクチン効果についても鶏を用いて検証する。

4．研究成果

(1) 過去に全国で伝染性コリーザが発生した際に分離された野外株を収集した。具体的には、過去に当研究所で分離され保存されていた株や愛知県で伝染性コリーザが発生した際に分離され愛知県家畜衛生保健所で保存されていた株、また世界的に多くの研究者が使用している参照株など計11株を収集した。これらの菌株を鶏に感染させることで病原性を調べたところ、強弱はあるものの、全ての株で発症が認められ、全ての株が病原性を有していることがわかった。感染鶏の病原性は鼻汁の漏出、顔面の腫脹、流涙、増体率を指標にした(図1)。



図1. 感染鶏の病態

写真左は鼻汁の漏出が、写真右では顔面の腫脹が認められる。

さらに感染鶏から血清を採取し、HI抗体を調べることによりその血清型を同定した (図2)。

株名	血清型	発症率	臨床症状	抗体価
B	A	100% (5/5)	3	46
O222Rm	B	40% (2/5)	1	—
Modest	C	100% (5/5)	5	9
G-A	B	100% (5/5)	5	—
C	C	80% (4/5)	3	9
FY3-2	C	100% (5/5)	4	6
H-I	C	100% (5/5)	3	4
SS-1	C	87.5% (7/8)	2	31
SS-1 21	C	100% (8/8)	1	6
221	A	100% (5/5)	4	46
G-1	C	100% (5/5)	3	20

図2. 鶏感染試験の結果

また、過去に報告のあるPCR法やRFLP解析を用いた血清型別法を導入し、HI抗体から同定した血清型がPCRやRFLPを用いた血清型別法と一致することを確認した。

各株を感染させた鶏は、それぞれ様々な抗体価を示すことが分かった。これらの株から、血清型A型およびC型に属する菌株それぞれに対し、最も抗体価の上昇が認められた株を遺伝子欠損株の親株として使用することとした。

(2) (1)で選定した菌株からゲノム DNA を採取し、目的の遺伝子を PCR にて取得した。これらの遺伝子をプラスミド pCACTUS に挿入し、シーケンス解析を行うことで配列が正しいことを確かめた。続いて、遺伝子の一部制限酵素と PCR を用いて欠損させた。

標的遺伝子とした遺伝子は、環境のグルコースに応答する原核生物の転写因子 cAMP receptor protein (crp 遺伝子)や、リボ多糖合成に寄与する UDP-galactose epimerase(galE 遺伝子)、芳香属環の生合成に必須な 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (aroA 遺伝子)とした。

(3) 遺伝子欠損株を作製するためには、(2)で作製したプラスミドで菌体を形質転換することが必須である。現在までに*A. paragallinarum*を形質転換したという報告はない。

まず、(2)で作製したプラスミドを用いて*A. paragallinarum*の形質転換を試みた。エレクトロポレーションを用いた方法では、様々な条件(電圧・抵抗値・静電容量など)を検討したが、いずれの条件でも形質転換体を得ることができなかった。そこで、真菌や一部の細菌の形質転換に用いられている遺伝子銃 (gene gun) と呼ばれる方法を用いた。遺伝子銃を用いた形質転換では銃口から菌体までの距離や真空度などを検討した。しかしながら、いずれの条件においても形質転換体を得ることができなかった。続いて、接合によるプラスミドの導入を検討した。伝達性プラスミドR388を保持した大腸菌株に(2)で作製したプラスミドを保持させ、この大腸菌とfilter matingを行うことで接合によりプラスミドが伝達できるか検討したが、この方法でも形質転換体は得られていない。その他、大腸菌でよく用いられている方法である塩化カルシウム法や濃度の高いプラスミドを加えた培地で菌を培養する、さらにHaemophilus influenzaeの形質転換で使われている方法などを検討したが、いずれの方法でも形質転換体を得ることができていない。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

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

[http://nibs.lin.gr.jp/index\\_jp.html](http://nibs.lin.gr.jp/index_jp.html)

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

今井 孝彦 (IMAI, Takahiko)

一般財団法人 日本生物科学研究所 研究員

研究者番号：3 0 6 3 3 9 5 3

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：