

令和元年6月10日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18809

研究課題名(和文) 寄生虫が切り拓く鶏ウイルス病ワクチン研究の新展開

研究課題名(英文) New insights on avian coccidia as a vaccine vector for viral diseases

研究代表者

井関 博 (ISEKI, HIROSHI)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・主任研究員

研究者番号：90548207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：培養細胞を用いて継代が可能な*Toxoplasma gondii*を用いて得られた遺伝子組換え条件を元に、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス(IBDV)のVP2遺伝子を導入した*Eimeria tenella*を得ることに成功した。遺伝子組換え*E. tenella*のスポロゾイトをMDBK細胞に接種し、間接蛍光抗体法によって細胞内で発現する外来遺伝子由来蛋白質を確認する手法の確立にも成功した。VP2遺伝子を発現する遺伝子組換え*T. gondii*を用いて、原虫の発現するウイルス蛋白質による鶏の免疫誘導能を確認したところ、IBDVの鶏体内での増殖に対して抑制的に働いている実験結果を得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、原虫が鶏に対してウイルスの感染を防御しうる免疫を賦与することができることを示した。現在、鶏ウイルス性疾病の予防を目的として、世界中で膨大な種類の生ワクチンが使用されているが、本研究成果はそれらの使用量を大きく減じることにつながるものである。原虫には導入するウイルス遺伝子のサイズにほとんど制限がないため、様々なウイルスの遺伝子を導入することにより、経口単回投与で免疫可能な多価ワクチンの開発も想定され、本研究の更なる発展は、食品衛生や環境衛生、生物多様性等において大きく貢献することができる。

研究成果の概要(英文)：The capsid protein encoded in VP2 region in genomic RNA of infectious bursal disease virus (IBDV) is a major immunodominant antigen. To establish the method of developing a transgenic *Eimeria tenella*, we produced transgenic *Toxoplasma gondii* which was engineered to express the green fluorescent protein (GFP) and IBDV VP2 in the cytoplasm as a pilot study. Subsequently, the transgenic *E. tenella* has been successfully developed using same plasmid vector. The recombinant proteins expressed in the transgenic parasites in MDBK cells were confirmed by indirect fluorescent antibody test. An intraperitoneal injection of the transgenic *T. gondii* GFP/VP2 in chickens afforded partial protection against the inoculation of IBDV. This result suggests the possibility of induction of cellular immunity by the inoculation of the transgenic parasites in chickens.

研究分野：ウイルス学

キーワード：Eimeria コクシジウム 伝染性ファブリキウス嚢病 ウイルス IBD ワクチン 鶏 原虫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

産業動物である鶏に対して国内での使用が承認されているワクチンの数は、17種類の疾病に対して実に203品目にも及ぶ(2010年1月1日時点。動物医薬品検査所報告)。近年、大規模集約化が著しい養鶏産業においては、ワクチン接種の省力化のために生ワクチンの頻用が常態化している。結果として、ワクチン株と野外株の遺伝子組換え体の出現や、ワクチン株が野外に拡散する等の問題が報告されている。そのような弊害に対し、これまで様々なウイルス性疾患に対して異種のウイルスや細菌をベクターにした遺伝子組換えワクチンが研究されてきたが、実用性のハードルは極めて高い。ハードルを上げている最大の理由は安全性への懸念であり、ウイルスや細菌は真核生物に比べると遺伝子変異や遺伝子そのものの交換などが容易に起こるというリスクを内包することにある。そこで申請者が着目したのが原虫のワクチンベクターとしての可能性である。原虫は、1)長大な外来遺伝子を導入する十分な遺伝子サイズがあり(遺伝子組換えワクチンとして唯一承認されているマレック病ウイルスの約164kbpに対し、鶏コクシジウム原虫は約365倍にあたる約60Mbp)、2)遺伝子変異や遺伝子の交換の頻度はウイルスや細菌よりも低く、3)大量培養が容易であることなど、ワクチンベクターとして様々な利点が挙げられる。

2. 研究の目的

本課題の研究目的は、ウイルス遺伝子を導入した寄生虫が、ウイルスに対する免疫を宿主に誘導するか、つまり寄生虫が鶏のウイルス性疾病のワクチンベクターと成り得るか検証することである。申請者がワクチンベクターとして使用を検討する鶏コクシジウム原虫は、不可逆的に弱毒化が可能であり、複数の外来遺伝子を導入することを可能とする十分な遺伝子サイズがある。本研究により作出された遺伝子組換え原虫の免疫により、ウイルス性疾患に対する予防効果が鶏に確認された場合、単回の飲水によるワクチン接種によって様々なウイルス性疾患に対する免疫を付加することができ、鶏ウイルス性疾患におけるワクチン研究のブレイクスルーが期待される。

3. 研究の方法

本研究における最も大きなハードルは、鶏コクシジウム原虫である *Eimeria tenella* は培養細胞を用いた *in vitro* 培養をすることができないため、遺伝子組み換えによる実験が難しい点にある。そこで、申請者は、*E. tenella* と近縁であり、*in vitro* 培養が可能な *Toxoplasma gondii* を用いて先行実験を行い、そこから得られた実験の条件を *E. tenella* に応用することで実験を進めた。

- (1) 伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) の VP2 遺伝子を発現する *T. gondii* の作製
T. gondii に GFP 及び薬剤耐性遺伝子を発現させるプラスミドに VP2 をコードする遺伝子の全長を挿入し、ヌクレオフェクションにより遺伝子を導入した。
薬剤添加した培養細胞を用いて外来遺伝子を安定発現する虫体を選抜し、ブランクアッセイによりクローンを得た。
IBDV 全粒子に対する免疫血清を用いた間接蛍光抗体法により、VP2 の発現を確認した。
得られた遺伝子組換え *T. gondii* を用いて GFP 発現虫体のセルソーティング条件を決定した。
- (2) 弱毒化 *E. tenella* スポロゾイトの鶏盲腸内接種によるオーシスト回収法の検討
鶏が糞と共に排出する *E. tenella* のオーシストは頑強な膜に覆われているため、オーシストが排出されてから一定の温度に保たれた後に形成されるスポロシスト内部に含まれるスポロゾイトに、外来遺伝子を導入する必要がある。しかし、オーシストから脱囊させたスポロゾイトは経口で感染しないため、遺伝子導入操作をした後に *E. tenella* の増殖部位である鶏の盲腸内に直接接種する必要がある。そこで、トキソプラズマを用いた実験で得られた遺伝子導入条件で処置した *E. tenella* を外科的に鶏の盲腸内に接種する手法を検討し、オーシストの排出量や排出期間を記録した。
- (3) *E. tenella* に対する外来遺伝子導入条件の検討
孢子形成させた *E. tenella* のオーシストを脱囊させてスポロゾイトを取り出し、“(1)”で用いたプラスミド及びその条件を使用して遺伝子をスポロゾイトに導入した。
幼雛の盲腸に” ”を投与した一週間後から糞中に排出されるオーシストを回収し、回収オーシスト数、スポロシスト形成率、外来遺伝子の保有率を確認した。
得られたオーシストから DNA を抽出し、*E. tenella* の ITS-1 遺伝子及び IBDV の VP2 遺伝子に対する PCR プライマーを用いてリアルタイム PCR を実施し、遺伝子組換え体の外来遺伝子導入効率を算出した。
- (4) MDBK 細胞を用いた遺伝子組換え体由来第一代シゾントの検出
MDBK 細胞を 41 で増殖するように馴化した。
“(3)”で得られた遺伝子組換え体を含む *E. tenella* スポロゾイトを MDBK 細胞に接種し、第一代シゾントを形成させ、間接蛍光抗体法によりメロゾイトを回収可能な時間と培養条件を検討した。
- (5) 遺伝子組換え *T. gondii* 免疫鶏における IBDV 増殖抑制効果の観察
3日齢の鶏4羽に 1×10^7 個の遺伝子組換え *T. gondii* を腹腔内投与し、14日後に1羽あた

り 10^4 TCID₅₀ の IBDV 弱毒株を経口投与した。対照群として、遺伝子組換え原虫を接種せずに IBDV のみ接種した群及び遺伝子組換え原虫のみを接種した群をそれぞれ 4 羽ずつ設定した。ウイルス接種 3 週間後に安楽殺するまで、2 から 3 日間隔で採血し、IBDV 全粒子を抗原とする ELISA キットを用い、IBDV に対する抗体産生量を比較した。

4. 研究成果

- (1) IBDV の VP2 遺伝子を安定発現する *T. gondii* を 16 クローン作製し、IBDV の全粒子免疫血清を用いた間接蛍光抗体法によって蛍光を確認した(図 1)。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、組換え蛋白質が原虫のどの部位に発現しているかを確認したところ、VP2 遺伝子とタンデムに挿入されている GFP の蛍光は原虫の細胞質内に局限している像が観察された。このことから、IBDV の VP2 遺伝子がコードするカプシド蛋白質も同様に原虫の細胞質内に存在することが示唆された。
- (2) *T. gondii* を用いて成功した条件を元に、*E. tenella* のスポロゾイトにヌクレオフェクションを行い、鶏の盲腸内に直接接種した原虫に由来するオーシストを鶏の糞から得ることに成功した。糞中に排泄されたオーシストを精製し、その一部から抽出した DNA をテンプレートとしたリアルタイム PCR 法により、遺伝子組換え体の存在を確認した。これらのオーシストからスポロゾイトを取り出し、41 で生育するように馴化した MDBK 細胞に接種して、第一代シゾントの形成を確認した。これらの間接蛍光抗体法で確認したところ、GFP を発現する虫体を確認することに成功した(図 2)。さらに、得られたオーシストを鶏に経口接種し、薬剤耐性遺伝子を利用した *in vivo* セレクションを実施してオーシストを得たが、これらから外来遺伝子由来の増幅断片は確認できず、薬剤による遺伝子組換え体の選抜に問題があることが示唆され、薬剤耐性遺伝子の発現に別のプロモーターが必要であることが明らかとなった。GFP 遺伝子の発現も微弱であり、最終的には抗 GFP 抗体を利用して検出感度を上げたことから、*E. tenella* 由来のプロモーターによる条件検討が必要であることが再確認された。
- (3) 原虫の発現する IBDV のカプシド蛋白質によって免疫された鶏の IBDV に対する防御効果を検討するため、同蛋白質を発現する *T. gondii* を用いて先行試験を実施した。遺伝子組換え *T. gondii* を接種した鶏では、遺伝子組換え原虫を接種しなかった群に比較して有意に IBDV に対する抗体産生量が低かった(図 3)。遺伝子組換え原虫を接種した鶏の体内では、ウイルスの増殖に対して免疫が抑制的に働いていることが示唆されたが、IBDV を接種せずに遺伝子組換え原虫のみ接種した群ではほとんど抗体の産生が確認されなかった。このことから、遺伝子組換え原虫の発現するカプシド蛋白質に対して細胞性免疫が優位に誘導されることが示唆された。

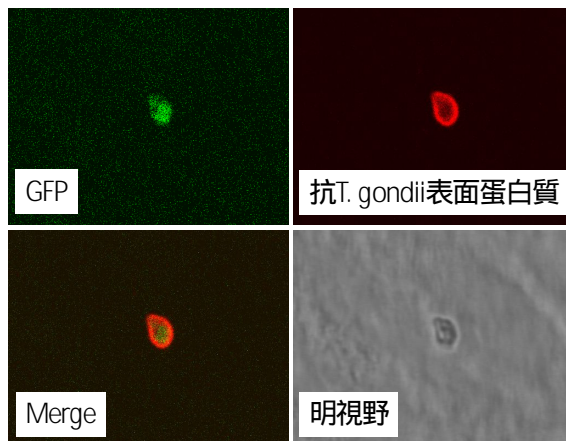


図 1 . IBDV の VP2 遺伝子とタンデムに挿入された GFP 遺伝子を発現する遺伝子組換え *T. gondii*。抗 *T. gondii* 抗体は、原虫の細胞表面抗原を認識する抗体を使用した。

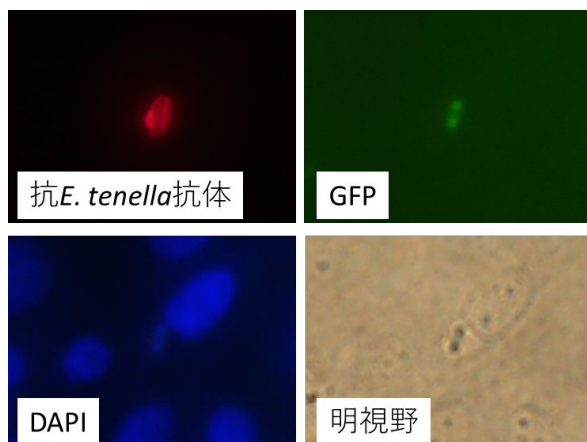


図2 . IBDV の VP2 遺伝子とタンデムに挿入された GFP 遺伝子を発現する遺伝子組換え *E. tenella*。抗 *E. tenella* 抗体は、原虫の粗抗原に対する免疫血清から得られた抗体を使用した。

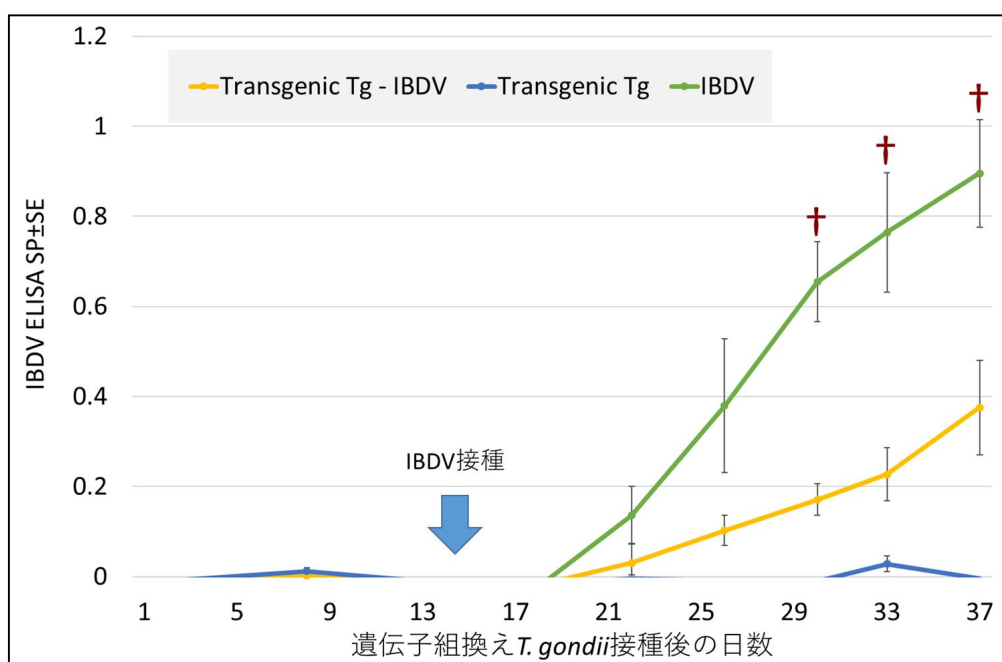


図3 . IBDV 全粒子に対する抗体産生量の比較。遺伝子組換え *T. gondii* 接種 2 週後に IBDV を経口投与し、経時的に採血を行った。† IBDV 及び遺伝子組換え *T. gondii* (Transgenic Tg - IBDV) 間で有意差あり ($p < 0.05$)。

5 . 主な発表論文等

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。