

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15661

研究課題名（和文）生ワクチン開発を目指した牛コロナウイルス感染マウスモデルの樹立

研究課題名（英文）Establishment of mouse model for bovine coronavirus infection to accelerate development of live vaccines

研究代表者

中川 敬介（Nakagawa, Keisuke）

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：90853250

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）：部分的ではあるもののBCoV経口投与乳飲みマウス（ICR系統）が下痢を起こすことが確認された。一方で、BCoV投与乳飲みマウスの下痢便より感染性ウイルスとウイルス遺伝子は検出されず、また血清中和抗体の上昇も認められなかった。また、3週齢のマウスにBCoVを経鼻接種することで、呼吸器症状を示すか否かを検討したものの、症状を示す個体は確認されなかった。これらの結果は、ICR系統のマウスはBCoVの病態を再現しないことを示している。一方、HRT-18細胞にて20代継代したBCoV株を得ることができた。現在、本継代株の培養細胞での増殖性とゲノム配列を決定中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

牛コロナウイルス（BCoV）は牛に呼吸器症と下痢症を引き起こす。牛以外に本感染症の病態を再現する動物モデルが存在しないため、病態解析や弱毒生ワクチン株の樹立が進んでいない。また、マウスのゲノム編集技術を用いて病態再現マウスを樹立するのではなく、日本で販売されているコンベンショナルマウスを用いてBCoV病態再現マウスを確立できたのなら、汎用性と経済性の面で大きな利点が期待される。残念ながら本研究では、BCoV病態再現マウスの樹立は叶わなかったものの、培養細胞にて長期継代したBCoVを得ることができた。今後、継代株の増殖性を解析することで、将来的なBCoVワクチン開発に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Bovine coronavirus (BCoV) causes respiratory and diarrheal symptoms in cattle. Since there is no small animal models that reproduces the pathogenesis, it is difficult to understand the mechanism of the pathogenicity and establish candidates of attenuated live vaccine. In this study, we aimed to 1) establish a mouse model of the BCoV infection and 2) develop and evaluate attenuated vaccine candidate strain. By using the isolate of BCoV strain, we orally administered BCoV to two-day-old suckling mice. As a result, we found that two out of 10 mice showed diarrhea. We then attempted to detect infectious virus and viral genes from the diarrhea of the infected suckling mice. However, no infectious virus or viral genes were detected from the diarrhea. Furthermore, we could not find neutralizing antibodies in the suckling mice. We obtained a 20th passage of BCoV in HRT-18 cells, and are currently determining the growth property and complete genome sequence of the passage strain.

研究分野：獣医学

キーワード：牛コロナウイルス マウスモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

牛コロナウイルスは、コロナウイルス科(コロナウイルス亜科)、ベータコロナウイルス属に分類される、エンベロープをもつプラス鎖1本鎖RNAウイルスである。牛コロナウイルスは成牛および幼牛に下痢症を引き起こす。また、本ウイルスは成牛および幼牛に呼吸器疾患を引き起こす病原体としても知られ、牛呼吸器病症候群(Bovine Respiratory Disease Complex: BRDC)の原因ウイルスの一つである。BRDCを原因とする発育不良および搾乳量減少による経済被害は、全世界で3600億円以上(Chirase *et al.*, J. Anim. Sci., 2001)、日本においても約200億円に上るといわれており(平 修, 産業動物臨床医学雑誌, 2016)、その制御は畜産における世界的な課題である。

コロナウイルス科に属する多くのウイルスの宿主域は、各コロナウイルスが利用する宿主由来受牛コロナウイルス病は特に冬期にその流行が顕著になるため、秋期における牛への不活化ワクチン接種による本病の予防が行われるものの、本ウイルスの流行は依然として続いている。また、畜産農家の経済的負担を考慮すると、不活化ワクチンより安価で免疫効果に優れる牛コロナウイルス弱毒生ワクチンの開発が重要であるものの、その開発は進んでいない。その原因として、経済的・技術的観点ならびに実験設備の制限より、多くの牛を用いた感染実験が困難である点が挙げられる。すなわち牛コロナウイルスの病態を再現する小動物モデルと弱毒生ワクチン株の樹立が求められている。

2. 研究の目的

コロナウイルス科に属する多くのウイルスの宿主域は、各コロナウイルスが利用する宿主由来受容体蛋白質により決定されると考えられてきた(例: 中東呼吸器症候群コロナウイルス [MERS-CoV]の受容体: ヒトDPP4蛋白質 [Lu *et al.*, Nature, 2013]、マウス肝炎ウイルス[MHV]の受容体: マウスCEACAM1蛋白質 [Dveksler *et al.*, J. Virol., 1991])。一方、多くのコロナウイルスと異なり、牛コロナウイルスは宿主由来受容体蛋白質ではなく、哺乳動物と鳥類に共通して存在するシアル酸を受容体として利用することが分かっている(Matrosovich *et al.*, Top. Curr. Chem., 2015)。一方、興味深いことに、牛コロナウイルスの遺伝子が牛以外の哺乳動物(犬および幼児)の呼吸器より検出された報告がある(Erles *et al.*, Virology, 2003; Zhang *et al.*, J. Med. Virol., 1994)。また、牛コロナウイルスを経口接種した七面鳥は下痢症を引き起こすことが知られる(Ismail *et al.*, Avian Dis., 2001)。これらの報告は、牛コロナウイルスが哺乳動物と鳥類に共通して存在するシアル酸を受容体として利用するため、本来病態を示す動物(牛)以外にも感染可能であることを示唆している。そこで、「様々な動物に共通して存在するシアル酸を受容体とする牛コロナウイルスは、牛と同様にマウスの呼吸器と消化器にも感染し、その病態を再現するのではないか?」という仮説のもと、本研究では、将来的な生ワクチン開発を見据え、未だ確立されていない牛コロナウイルス病態再現マウスモデルを確立し、本ウイルスに対する生ワクチン候補株の有効性を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 感染実験に使用する牛コロナウイルスの分離

岐阜県家畜保健衛生所と協力し、冬季下痢症により死亡した成牛の気道スワブおよび下痢便より感染性牛コロナウイルス分離を試みた。なお、分離に用いた培養細胞はヒト腸管由来培養細胞HRT-18細胞を用いた。分離されたウイルスについては、次世代シーケンズにより全ウイルスゲノム配列を決定した。

(2) コンベンショナルマウスを用いたマウスへの感染実験

様々な系統のマウス (ddY、ICR、BALB/c、C57B6系統) の乳飲みマウス (2日齢) にウイルスを経口投与することで感染実験を行なった。なお、非感染乳飲みマウスには培養細胞の上清を経口投与した。これら乳飲みマウスは、接種後に毎日観察し、下痢症を呈するか否かを検証した。また、下痢症を呈したマウスからは、下痢便を採取し、ウイルス遺伝子および感染性ウイルスの存在をRT-PCRおよびウイルス分離実験により検討した。

(3) 培養細胞への牛コロナウイルスの長期継代

生ワクチン開発に汎用され、かつ牛コロナウイルスが増殖すると報告があるVero細胞あるいは牛コロナウイルス分離に用いられるHRT-18細胞をウイルス長期継代に用いる細胞として選択した。分離したウイルスを低ウイルス力価条件で感染させ、細胞毒性が認められたタイミングで上清を回収した。回収した上清は再び培養細胞に接種することで継代を20回繰り返した。

4. 研究成果

牛コロナウイルスの分離、ゲノム配列の決定、および抗牛コロナウイルスN蛋白質抗体の作成と有用性の検討

2020年に岐阜県内の畜産農家にて下痢症を呈し死亡した成牛の下痢便および気管スワブより、牛コロナウイルスの遺伝子の検出に成功した。また、ヒト肺上皮由来細胞であるHRT-18細胞を用いて、本死亡牛の気管スワブから牛コロナウイルスの分離に成功した。さらに、次世代シーケンシングを用いることで、下痢便および気管スワブ中ならびに分離した牛コロナウイルスの全ゲノム配列を決定した。本成果はMicrobiology Resource Announcementsに報告した。

また、分離された牛コロナウイルスのN遺伝子情報を基に、牛コロナウイルス感染の検出への応用を目指したペプチド抗体を作成した。また、本ペプチド抗体の有効性を、ウェスタンブロッティングおよび間接蛍光抗体法により確認することができた。

コンベンショナルマウスへの感染実験

分離した牛コロナウイルス (1.8×10^4 PFU/匹) を2日齢の乳飲みマウス (ICR系統、10匹) に経口投与し、乳飲みマウスが下痢症を引き起こすか否かを検証した。その結果、培養上清を接種した非感染マウス3匹はいずれも症状を示すことはなかった一方、ウイルス接種マウス10匹中3匹が軟便を示し、また10匹中2匹が下痢症を呈した。これらウイルス接種マウスに見られた症状は一過性であった。また、それ以外のウイルス接種マウス5匹は軟便あるいは下痢症といった症状を呈することはなかった。一方で、牛コロナウイルス投与乳飲みマウスの下痢便より感染性ウイルスとウイルス遺伝子は検出されず、また血清中和抗体の上昇も認められなかった。また、3週齢のマウスに牛コロナウイルスを経鼻接種することで、呼吸器症状を示すか否かを検討したものの、症状を示す個体は確認されなかった。これらの結果は、ICR系統のマウスは牛コロナウイルス感染により、下痢症を再現しないことを示している。

長期継代によるワクチン候補株の樹立

生ワクチン開発に汎用され、かつ牛コロナウイルスが増殖すると報告があるVero細胞を用いて、分離された牛コロナウイルスを連続継代する予定であったが、報告と異なりVero細胞における分離牛コロナウイルスの増殖性が著しく低いことが分かった。そこで、分離に用いたHRT-18細胞を代替する細胞とし、本細胞において20継代した牛コロナウイルスを得た。現在、継代株の増殖性と全塩基配列を決定中である。

残念ながら本研究では、牛コロナウイルス病態再現マウスの樹立は叶わなかった。一方で、今後の牛コロナウイルス研究に供することができる分離ウイルスと抗牛コロナウイルスN蛋白質ペプチド

抗体の作製に成功した。また、HRT-18細胞にて長期継代した牛コロナウイルスを得ることができた。今後、継代株の増殖性およびゲノム配列を解析することで、将来的な牛コロナウイルスワクチン開発に貢献できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakagawa Keisuke, Kumano Hitomi, Kitamura Yuko, Kuwata Keisuke, Tanaka Eiji, Fukushi Hideto	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Bovine Coronavirus in Blood Diarrhea from Adult Cattle That Died from Winter Dysentery in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00807-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00807-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中川 敬介
2. 発表標題 冬季に死亡した牛の気道および腸管から検出された牛コロナウイルスのS遺伝子解析
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------