

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 7 月 7 日現在

機関番号：72633

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25850193

研究課題名(和文)組換え感染性クロンウイルスによる新規IBVワクチンの研究開発

研究課題名(英文)Study for development of attenuated IBV vaccine using recombinant viral vector

研究代表者

稲吉 勇仁(Inayoshi, Yujin)

一般財団法人日本生物科学研究所・その他部局等・研究員(移行)

研究者番号：70597963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：リバーシジェネティクス技術によって構築された伝染性気管支炎ウイルス(IBV)クロン作製技術を用いてIBVワクチン株のウイルスベクターを作出した。このIBVクロンをプラットフォームとして、近年流行している野外株由来のSタンパク質遺伝子と置換した組換えIBVを作製した。さらに、組換えウイルスの性状解析を行ったところ、これら組換えウイルスはIBVクロンの弱毒性を維持しつつ、組換えに用いられた野外株に対する感染防御免疫を誘導した。この新規ワクチン株作製技術は、従来の弱毒ワクチン株の作製に代わる、より迅速かつ有効なIBVワクチンの開発法に進展する事が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, a molecularly cloned Infectious Bronchitis Virus (IBV) of an attenuated live vaccine strain was constructed by using reverse genetic system. The cloned IBV was used as a recombinant vector platform to replace its spike protein gene with that of pathogenic IBV strains recently isolated in field. The resultant spike-recombinant clones exhibited an attenuated phenotype, as does the IBV vaccine clone, and induced a protective immunity against the pathogenic field strain used for the spike-recombination. The spike-recombination strategy using reverse genetics system holds promise for the development of live-attenuated vaccines against pathogenic IBV strains newly emerged in field.

研究分野：分子生物学 ウイルス学

キーワード：伝染性気管支炎ウイルス ワクチン リバーシジェネティクス コロナウイルス

1. 研究開始当初の背景

ニワトリ伝染性気管支炎ウイルス (Infectious Bronchitis Virus: IBV) はコロナウイルス科に属する一本差+鎖RNAウイルスであり、ニワトリに呼吸器障害、産卵低下、発育不良等を引き起こし養鶏業界に大きな損害を与える。IBVの高頻度の遺伝子変異により、その主要中和抗原であるSタンパク質は血清型多様性を示し、単一のワクチンによる防御は困難である。さらに、抗原変異により新規野外株が進化・流行すると大きな被害をもたらす。現在の養鶏業界では、一羽のニワトリに対して複数の血清型の異なるIBVワクチン接種に加え、様々な感染症に対するワクチン接種が行なわれているが、ワクチンのコスト、接種労力削減の為にワクチンの多価化が強く望まれている。これら、IBVの血清型多様性、新規野外株の流行並びにニワトリワクチンの多価化に対応する次世代IBVワクチンの研究開発が必要である。一方、新規野外IBVの生ワクチン株を作製するには、野外株を発育鶏卵で100代以上の長期継代を繰り返し弱毒化しなければならない。さらに、この長期継代弱毒化過程における抗原性変異により免疫原性の低下が認められる。このことから、野外株の免疫原性を維持し、感染防御免疫誘導能の優れた弱毒IBV生ワクチンを迅速に開発する方法の確立が望まれている。

2. 研究の目的

当研究は、IBVの血清型多様性、新規野外株の流行並びにニワトリワクチンの多価化に対応するため、IBVクローン作製技術を基盤として遺伝子組換えIBVを作製することで、新たな血清型を付与したIBVワクチンを迅速に作製するシステムの開発を目的としている。また、当研究所で分離した野外強毒株と、その株を長期継代によって弱毒化した株(弱毒株)の全ゲノム塩基配列を解読し、それらの遺伝子変位部位を比較することで、病原性関連遺伝子を同定し、その作用機序を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

リバースジェネティクス技術を利用して構築されたIBVクローン作製技術を基盤としてIBVワクチン株のウイルスベクター (IBV-CL) を作製し、さらに、野外株のSタンパク質遺伝子と置換することで、ワクチン株の弱毒性を維持しつつ、野外の免疫原性及び抗原性を維持した新規ワクチン株の作出が可能か検討した。

(1) 新規ワクチン候補株のスクリーニング

グ: 野外から分離されたIBV株をRT-PCRで検出し、S遺伝子型別(S1及びS2遺伝子型別)によって、野外分離株の遺伝子型を決定した(図1)。次に、そのS遺伝子型別によって選別された野外分離株と、複数の血清型の

ワクチン株に対する抗血清を用いて、中和交差性の検討を行い、新規ワクチン候補株をさらに絞り込んだ。

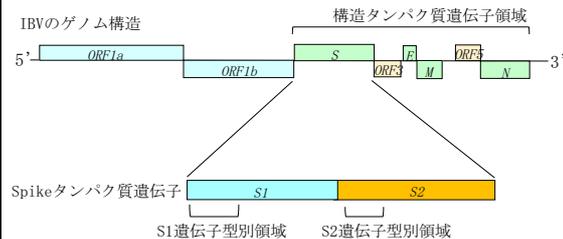


図1 IBVのゲノム構造とS遺伝子型別領域

(2) 遺伝子組換えIBVの作出: IBVの弱毒化に関する分子機構は明らかにされていないが、構造タンパク質遺伝子がIBVの病原性を決める因子であることを示した報告はない。従って、弱毒化されたワクチン株のSタンパク質遺伝子を、上記(1)で選別した野外株由来のSタンパク質遺伝子に入れ換えた組換えIBVの作製を試みた。

(3) 組換えウイルスの性状解析: 上記(2)で作出された組換えウイルスの性状解析を行った。まず、作製された組換えウイルスを発育鶏卵に接種し、鶏卵での増殖性を検討した(図2)。

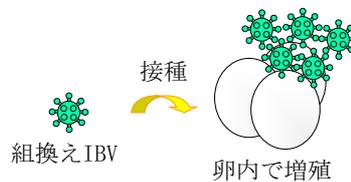


図2 発育鶏卵接種によるウイルス増殖

次に、組換えウイルスを点眼によってニワトリに接種し、ウイルスのニワトリに対する病原性、免疫原性、組織親和性及び抗原性を検討した。病原性については、組換えウイルス接種後経時的にニワトリを観察し、臨床症状の有無、並びに病理組織学的検査によって得られた組織所見によって判定した。免疫原性については、ウイルス接種後4週で、採血によって得られた抗血清を用いて、組換えウイルスに対する中和抗体価の測定を行った。組織親和性については、経時的に各臓器に対してRT-PCRを行い、ウイルスの有無によって体内分布の検討を行った。抗原性については、組換えウイルス接種後得られた抗血清を用いて、野外株に対する中和抗体価を測定することで、中和交差性の検討を行った。さらに、組換えウイルス接種後4週のニワトリを用いて、野外分離株を攻撃株とした攻撃試験を行い、この野外株に対する感染防御効果について検討した。この有効性は攻撃後の臨床症状の観察、主要臓器における攻撃株検

出の有無並びに病理組織学的所見によるスコアリングによって評価した。

IBV の病原性関連遺伝子は明らかとなっていない。そこで、当研究所で野外検体から分離した強毒株、さらに、それらを長期継代によって弱毒化した弱毒株について全ゲノムの塩基配列を決定し、両株の変異部位を同定した。

**(4) IBV 病原性関連遺伝子の同定：** C-78 強毒株と、発育鶏卵による長期継代培養によって弱毒化された C-78 弱毒株に対して、ゲノム全長 27.6kb の塩基配列を決定・比較し、長期継代培養によって変異した部位を同定した。弱毒化に関わる変異部位をさらに絞り込むため、当研究所で継代培養によって弱毒化した他の株 (S95、宮崎) においても、強毒株及び弱毒株についてゲノム全長の塩基配列を決定・比較し、病原性関連遺伝子の候補を探索した。当解析で得られた病原性関連遺伝子の候補については、組換え IBV を作製し、それらウイルスの病原性の変化を検討することで、病原性関連遺伝子の同定を試みた。

#### 4. 研究成果

以下、4. 研究成果の ( ) 内の番号は、上記 3. 研究方法の ( ) 内の番号と対応している。

**(1) 新規ワクチン候補株のスクリーニング：** 当ワクチン候補株のスクリーニングで用いた S2 遺伝子型別法は、一部検出されにくい遺伝子型があったため、IBV の検出 (RT-PCR 法) に用いられるプライマーの改良を行った。これら改良されたプライマーを用いた RT-PCR によって、野外検体中の IBV の検出を行い、得られた S2 遺伝子の増幅断片を用いて S2 の遺伝子解析を行った。その結果、これまでの S2 遺伝子型とは異なる新規 S2 遺伝子型の野外株が 4 株同定された。これら新規 S2 遺伝子型である野外分離株を用いて、S1 遺伝子型別並びに既知遺伝子型のワクチン株との中和交差性を検討した。その結果、S1 遺伝子型は JPI 型が 1 株、マサチューセッツ型が 1 株、JP III 型が 2 株であった。その中で、中和交差性が比較的広く、近年野外で流行している JP III 型 (C 株) と、既に当研究所で分離していた JPI 型の IBV (E 株) を組換えウイルス作製に用いるワクチン候補株とした (表 1)。

表1 選別された野外分離株の遺伝子型と中和交差性

野外分離株	S1 遺伝子型	S2 遺伝子型	中和交差性
A 株	Mass	既知株と異なる	ND
B 株	JPI	既知株と異なる	ND
C 株	JP III	既知株と異なる	比較的広い
D 株	JP III	既知株と異なる	C 株より狭い
E 株 (既知株)	JPI	Y-4	比較的広い

※ND：未実施

**(2) 遺伝子組換え IBV の作出：** 上記 4 の (1) で選別された IBV ワクチン候補株 (C 株及び E 株) の S タンパク質遺伝子を IBV-CL の S タンパク質遺伝子と置換したキメラ IBV を作製した (それぞれ recIBV-C、recIBV-E)。作製した組換え IBV を発育鶏卵に接種し回収したウイルス液を用いて、ウイルス力価測定を行った。その結果、recIBV-C は  $10^{8.7}$  EID<sub>50</sub>/ml、recIBV-E は  $10^{8.5}$  EID<sub>50</sub>/ml のウイルス力価を得ることに成功した。

**(3) 組換えウイルスの性状解析：** RecIBV-E 並びに IBV-CL について発育鶏卵接種しウイルスの増殖性を比較検討したところ、recIBV-E 及び IBV-CL は発育鶏卵において同等の増殖性を示した (図 3)。このことから、組換え IBV は安定した増殖性を保持していることが示された。

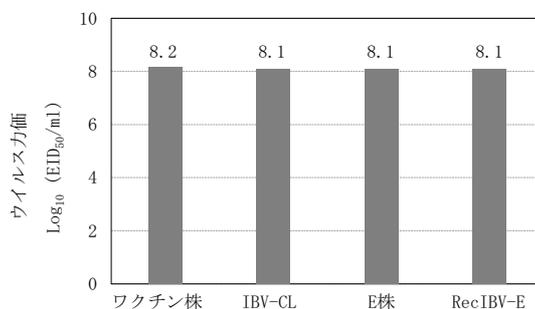


図3 発育鶏卵接種後24時間における漿尿液中のウイルス力価

次に、各組換えウイルス (recIBV-C 及び recIBV-E) を点眼によってニワトリに接種し、これら組換えウイルスのニワトリに対する病原性、免疫原性、組織親和性並びに抗原性を検討した。病原性に関しては、いずれの組換え IBV についても、感染初期に軽度な呼吸器症状が認められたが、いずれのニワトリも 2 週間程度で症状は治まり、それ以外の明らかな臨床症状は認められなかった。組織親和性については、いずれの組換え IBV においても、主に喉頭及び気管に局限した増殖を示し、2 週間程度で体内から検出されなくなった。これらのことから組換え IBV はワクチン株由来の弱毒性を保持しており、体内での組織親和性もワクチン株と類似していることが示唆された。さらに、ウイルス接種後 4 週の採血によって得られた抗血清を用いて、組換えウイルスに対する中和抗体価の測定を行ったところ、いずれの組換え IBV についても、十分な中和抗体価の上昇が認められた。攻撃試験については、攻撃に用いた野外株に対する感染防御効果を検討したところ、組換え IBV で免疫したニワトリは、非免疫のニワトリと比較して、呼吸器症状の軽減、並びに気管及び腎臓でのウイルス増殖を有意に抑制することが示された。以上の結果から、異なる遺伝子型由来の S タンパク質遺伝子をワクチン株のクローンウイルスである IBV-CL のそれと置換することで、新たな IBV 弱毒株を

作出可能であることが証明された。さらに、この組換え IBV は、組換えに用いられた野外株に対する感染防御免疫を誘導することが示唆された。当研究において、当組換え IBV 作製法によって作出された組換え IBV ワクチンの有効性が証明されたことから、今後は実用化へ向けた検証が必要である。国内外において、当研究と同様なキメラ IBV を用いた IBV ワクチン開発に関する研究は行われているが、実用化には至っていない。少なくとも、当研究において組換え IBV ワクチンの免疫原性、弱毒性、有効性は確認できたことから、今後、この新規ワクチン株作製技術は、従来の野外株長期継代による弱毒ワクチン株の作製に代わる、より迅速かつ有効な IBV ワクチンの開発法に進展することが期待される。さらに、当技術はニワトリのコロナウイルスのみならず、他の動物種に感染するコロナウイルス (PEDV、FCoV、SARS-CoV 等) に対しても応用が期待される。

(4) **IBV 病原性関連遺伝子の同定**：C-78 強毒株と、発育鶏卵による長期継代培養によって弱毒化された C-78 ワクチン株に対して、ゲノム全長 27.6kb の塩基配列を決定・比較し、長期継代培養によって遺伝子変異した部位を同定した (図 4)。さらに、弱毒化に関わる変異因子の絞り込みのために、当研究所で継代培養によって弱毒化した他の株 (S95、宮崎) においても、ゲノム全長の塩基配列を決定し、弱毒株と強毒株との遺伝子・アミノ酸変異部位の同定を行った。その結果、各株において、いくつかのアミノ酸変異部位は同定されたが、3 株に共通してアミノ酸変異が認められた遺伝子は存在しなかった。そこで、3 株中 2 株について共通に変異が認められた遺伝子について機能解析を行ったところ、これらの候補遺伝子が病原性に関与する明確な結果は得られなかった。このことから、IBV の病原性の発現には複数の因子が関与している可能性が示唆された。或いは、遺伝子変異部位は 3 株で異なっているが、全体のウイルスの変化としてとらえると共通した機能変化を生じている可能性も推察された。

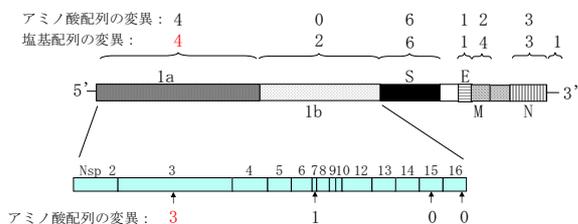


図4 C-78の強毒株とワクチン株の塩基配列の解析

以上のことから、当研究の病原性関連遺伝子の同定とその機能解析については、更なる検討が必要である。長期継代による IBV の弱毒化機構については明らかになっておらず、本研究が、病原性関連遺伝子の同定並びに IBV の長期継代による弱毒化の機構解明に繋

がり、今後のワクチン開発に重要な知見となることが期待される。

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲吉 勇仁 (INAYOSHI, Yujin)  
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：70597963

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )