

論文の内容の要旨

論文題目 Establishments of Marek's disease virus vector
vaccine and its application

(マレック病ウイルスベクターワクチンの開発と
その応用)

氏名 石原ゆかり

遺伝子組換え生ワクチンは、外来遺伝子を生ワクチンに挿入することにより複数の病原体への免疫誘導を可能とするワクチンである。鶏では、七面鳥ヘルペスウイルス(HVT)、鶏痘ウイルス、ニューカッスル病ウイルス(NDV)などでワクチンベクターの研究が盛んに行われている。中でも、HVT は持続感染すること、ゲノムサイズが大きく外来遺伝子を保持しやすいこと、またその鶏への病原性の低さから最も研究が進んでおり、遺伝子組換え HVT は市販され成功を収めている。このように HVT はワクチンベクターとしての利用が進んでいるが、その本来の用途であったマレック病ウイルス(MDV)に対するワクチンとしては、最も優れた防御効果を示すワクチンではない。

MDV は鶏に脚弱、斜頸、発育不良、リンパ腫などを引き起こす接触感染性ウイルスであり、主に MDV 血清型 1 型の Rispens 株、2 型の SB-1 株、3 型の HVT がワクチンとして用いられている。これらワクチンは接種鶏において発症を防御することはできるが、感染防御はできない。そのため、これらワクチンが広く普及しているにも関わらず、MDV は至るところに存在し、現在でも発生は散発的に見られている。これら MDV ワクチンのうち HVT は最も早くから普及したワクチンであるが、超強毒 MDV に対する防御効果は低い。また、HVT はワクチンベクターとして有用であるものの、異なるウイルスの抗原遺伝子を挿入された二種の遺伝子組換え HVT を同時に接種すると挿入抗原ウイルスに対する防御効果が減少したという報告があり、複数の遺伝子組換え HVT を同時に用いるワクチンプログラムは存在しない。そこで、本報告では HVT に代わる、または HVT と共接種可能な新たなワクチンベクターとして、HVT よりも超強毒 MDV に対する発症防御効果の優れた Rispens 株について研究を行った。

Rispens 株は CVI988 株とも呼ばれ、MDV 感染鶏より分離され培養細胞での継代により弱毒化されたワクチン株である。Rispens 株は単独で、または HVT と共接種して用いられ、超強毒 MDV に対して最も効果的なワクチンとして知られている。さらにベクター化についても 1990 年代より報告がなされており、NDV、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス(IBDV)、伝染性気管支炎ウイルスなどの抗原が挿入され、挿入病原体に対する優れた防御効果が示されている。しかし、今日まで Rispens ベクターワクチンは市販には至っていない。本研究では、市販可能な Rispens ベクターワクチンの作出を目的とし、Rispens 株に IBDV の抗原遺伝子を挿入した遺伝子組換え Rispens/IBDV ウイルスを作製した。まず Rispens 株の US2 領域に異なる四種のプロモーター(鶏ベータアクチン(Bac)プロモーター、マウスサイトメガロウイルス前初期遺伝子(MCMV ie1)プロモーター、RS ウイルス(RSV)プロモーター、シミアンウイルス 40(SV40)プロモーター)で制御された IBDV 遺伝子をそれぞれ挿入し、四つの遺伝子組換え Rispens ウイルスを作製した(Rispens/Bac-IBDV、Rispens/MCMV ie1 -IBDV、Rispens/RSV-IBDV、Rispens/SV40-IBDV)。次に、各遺伝子組換え Rispens ウイルスにつき 2 クローンずつを鶏胚線維芽細胞で 20 回継代し、挿入遺伝子の安定性を調べた。結果、Rispens/Bac-IBDV のうちの 1 クローン、Rispens/RSV-IBDV、Rispens/SV40-IBDV でのみ挿入遺伝子の安定性が確認された。次に、これら安定性が確認された遺伝子組換え Rispens ウイルスを 1 日齢の SPF 鶏に皮下接種し、7 週齢時に IBDV で攻撃を行った。その結果、Rispens/Bac-IBDV では 87%、Rispens/RSV-IBDV では 53%、Rispens/SV40-IBDV では 33%の接種鶏で発症防御された。最も防御成績の良かった Rispens/Bac-IBDV では、鶏胚線維芽細胞で試験を行った 2 クローンのうち 1 クローンにおいて不安定性が示されていたため、IBDV 防御効果が高くより安定な遺伝子組換え Rispens ウイルスを作るべく、Bac プロモーターの中核部分のみを利用し、プロモーター配列長を短くした Coa5 プロモーターを用いた遺伝子組換え Rispens ウイルスを作製した(Rispens/Coa5-IBDV)。Rispens/Coa5-IBDV についても同様に鶏胚線維芽細胞での継代安定性を調べたところ、20 回の継代を通して安定であった。さらに、Rispens/Coa5-IBDV を 1 日齢市販鶏に接種し、5 週齢、7 週齢時に IBDV で攻撃を行ったところ、95%(5 週齢)または 91%(7 週齢)の鶏において発症防御された。これらにより、Rispens/Coa5-IBDV は安定で、かつ IBDV 防御効果の高いワクチンであることが分かった。

次に、有用なワクチンプログラムを作るべく、Rispens/Coa5-IBDV と遺伝子組換え HVT の同時接種について検討を行った。遺伝子組換え HVT としては、NDV の抗原遺伝子を保持する HVT/ND を用いた。Rispens/Coa5-IBDV、HVT/ND、またはその両方をそれぞれ 1 日齢市販鶏に接種し、7 週齢時に IBDV または NDV で攻撃を行った。IBDV 攻撃試験では、Rispens/Coa5-IBDV 単独接種群、HVT/ND と Rispens/Coa5-IBDV 共接種群両方において、全ての鶏が防御された。NDV 攻撃試験では、HVT/ND 接種群、HVT/ND と Rispens/Coa5-IBDV 共接種群両方において、ともに 94%の鶏が防御された。さらに、MDV 防御効果を調べるため、1 日齢 SPF 鶏に HVT/ND と Rispens/Coa5-IBDV を共接種し、4 日後に高病原性 MDV で攻撃を行った。結果、94%の鶏において発症防御され、この共接種プログラムは挿入抗原である

IBDV、NDV、さらにベクターである MDV に対しても優れた防御効果を持つことが分かった。

以上の研究結果より、Rispens/Coa5-IBD は有効なワクチンであり、HVT/ND との共接種プログラムも有効であることが分かった。しかし、この Rispens/Coa5-IBD は細菌人工染色体 (BAC) 技術を用いて作られており、それに関連した、ワクチンには不必要な配列を一部含んでいる。市販するためのステップとしては、このような配列を除くことが必要となる。そのため、Rispens 株より研究が進んでいる HVT を用いて、この望ましくない配列を除去する方法について検討を行った。

BAC は約 300kbp もの大きなゲノムを保持することが可能であり、プラスミドと同様に大腸菌内で保持、遺伝子改変される。この BAC 技術の普及により、大きなゲノムサイズのウイルスであってもウイルスの状態ではなく DNA として扱うことが可能となり、その遺伝子改変は飛躍的に容易となった。しかし、大腸菌内での遺伝子改変の後に真核細胞内で遺伝子改変ウイルスを再構成した後は BAC 配列は不要となり、ウイルス性状の研究やワクチンには望ましくない配列となる。そのため、一般的に BAC 由来の配列はウイルスを再構成する段階で除去されている。BAC を除去する方法としてはいくつかの方法が考案され用いられているが、除去後も一部好ましくない配列を残してしまう、除去法が簡便でない、大腸菌内での BAC の不安定性、いったんウイルス BAC を作製した後では BAC 除去方法を変更することが困難であるといった欠点を持つ。本報告では、これらに代わる新しい BAC 除去方法として、Removal of Inserted BAC after linearization (RIBON) 法を考案した。

まず、HVT のチミジンキナーゼ (TK) 領域に制限酵素 I-SceI 認識配列、eGFP 遺伝子、BAC 配列を相同組換えにより挿入し、遺伝子組換え HVT ウイルスを作製した。次に、大腸菌に遺伝子組み換え HVT DNA を導入し、HVT-BAC を作製した。さらに、HVT-BAC を保持する大腸菌から HVT-BAC DNA を回収し、制限酵素 I-SceI により HVT-BAC DNA を切断した。I-SceI は認識配列が長いいため HVT 本来の配列には I-SceI 認識配列が存在せず、HVT-BAC 中では TK 領域に挿入されたただ一つの認識配列のみが I-SceI により切断される。この認識配列は HVT-BAC において eGFP、BAC 配列に隣接しており、切断後は eGFP、BAC 配列を 5' 末端に持つ一本の線状 DNA となる。この線状化 HVT-BAC DNA と、HVT 本来の TK 領域配列とを同時に真核細胞に導入したところ、ウイルスが再構成された。再構成されたウイルスの形成した plaque のうち、44% は緑色蛍光を発現しておらず、さらに PCR 法により BAC 配列を保持しないことが確認された。以上から、線状化 HVT-BAC と BAC 挿入領域近傍配列とを真核細胞に導入することで、BAC 由来の配列を完全に除去することが可能であることが確かめられた。この方法を用いれば Rispens ベクターウイルスでも BAC に関連した望ましくない配列を完全に除去することが可能であると考えられる。

以上により、有効な Rispens ベクターウイルス、それを用いた新たなワクチンプログラム、Rispens ベクターウイルスを市販するにあたり不要な配列を除去する方法が確認された。これら研究は、鶏のワクチン産業に新たな可能性を提案するものである。