

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 石原 ゆかり

外来遺伝子を生ワクチンに挿入した遺伝子組換え生ワクチンは、複数の病原体に対する免疫を誘導する。鶏では、ワクチンベクターとして七面鳥ヘルペス（HVT）、鶏痘、ニューカッスル病（NDV）ウイルスなどが用いられる。中でも、遺伝子組換え HVT は持続感染し、外来遺伝子を保持しやすく、鶏への病原性が低いことから一部は実用化されている。しかし、その本来の用途であるマレック病ウイルス（MDV）に対する防御効果は完全ではない。鶏に脚弱、斜頸、発育不良、リンパ腫などを起こすマレック病は、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るが、発症防御効果にとどまるため、ワクチンの普及にも関わらず現在でも散発的に見られている。特に、早くから普及した HVT ワクチンの超強毒 MDV に対する防御効果は低い。また、異なるウイルス抗原を搭載する二種の遺伝子組換え HVT を同時に接種すると防御効果が減少する。

第一章では、超強毒 MDV に対する発症防御に優れる Rispens 株のワクチンベクターとしての有用性を検討した。Rispens 株は細胞継代により弱毒化され単独あるいは HVT との共接種で超強毒 MDV を防御する。そのベクター化についても、これまでに複数のウイルス抗原が挿入され、優れた防御効果が示されているが実用化には至っていない。本研究では、Rispens 株に伝染性ファブリキウス囊病ウイルス（IBDV）抗原を搭載した遺伝子組換えウイルスを作製した。Rispens 株 US2 領域に様々なプロモーター（鶏 β アクチン Bac、MCMV 前初期 *ie1*、RSV、SV40）を介して IBDV 遺伝子を挿入した組換えウイルス（Rispens/Bac-IBD、Rispens/MCMV*ie1*-IBD、Rispens/RSV-IBD、Rispens/SV40-IBD）を細菌人工染色体（BAC）技術により作製し、遺伝子安定性が認められたクローンを用いて鶏を用いて免疫・攻撃試験を実施した。各遺伝子組換えウイルスを 1 日齢の SPF 鶏に皮下接種し、7 週齢時に IBDV で攻撃した結果、発症防御率は Rispens/Bac-IBD では 87%、Rispens/RSV-IBD では 53%、Rispens/SV40-IBD では 33%であった。次に、より安定な組換え体の構築を目指し、防御効果の高い Rispens/Bac-IBD のプロモーター領域を改変した Rispens/Coa5-IBD を作製した。Bac プロモーター中核領域（Coa5）のみをもつウイルスである。1 日齢市販鶏に接種し、5 週齢、7 週齢時に IBDV で攻撃したところ、それぞれ 95%、91%の鶏において発症防御されたことから、Rispens/Coa5-IBD は実用化レベルのワクチン候補株であることが分かった。

第二章では、有用なワクチンプログラムを考え、第一章で作製した Rispens/Coa5-IBD と遺伝子組換え HVT の同時接種法について検討した。Rispens/Coa5-IBD、NDV 抗原を搭載した 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 週齢時にウイルスで攻撃した。IBDV 攻撃試験では、Rispens/Coa5-IBD 単独接種群、Rispens/Coa5-IBD と HVT/ND 共接種群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、Rispens/Coa5 共接種群においてともに 94%の鶏が防御された。さらに、共接種群においては、4 日後に高病原性 MDV で攻撃したところ、94%の鶏において発症防御された。したがって、Rispens/Coa5-IBD と HVT/ND 共接種は IBDV、NDV、さらにベクターである MDV に対して高い防御効果を持つことが分かった。したがって、これら二種類の組換えウイルスを用いた共接種ワクチンプログラムは有効であると評価された。

第三章では、組換えウイルスの市販化を念頭に、組換え HVT ウイルスをモデルにそれに含まれる細菌人工染色体 (BAC) 由来配列の除去法について検討した。BAC 技術はヘルペスウイルス組換え体の構築に必須であり、BAC 由来配列はウイルスを再構成する段階でいくつかの方法により除去されるが、本来のウイルスゲノム配列には含まれない配列が一部残存する。本研究では、新しい BAC 配列除去方法として 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 配列を相同性組換えにより挿入した遺伝子組換え HVT DNA を大腸菌に導入し、HVT-BAC を作製した。さらに、大腸菌から HVT-BAC DNA を回収し、I-SceI により切断した。HVT ゲノム DNA には I-SceI 認識配列がないため一か所で切断される。認識配列は eGFP、BAC 配列に隣接しており、切断後はこれらの配列を 5' 末端に持つ一本の線状 DNA となる。この線状化 DNA と、HVT TK 領域配列とを同時に細胞に導入したところ、再構成されたウイルスの 44%から BAC 配列などウイルスゲノム配列には含まれない配列が完全に除去されていた。この方法は、Rispens ベクターウイルスなど他の組換えウイルスにも応用できると考えられる。

以上により、本論文ではワクチン効果に優れる Rispens 株をベースとする遺伝子組換え生ワクチン候補株を作出し、それを用いた新たなワクチンプログラムの有効性を検証し、さらに組換えウイルスの市販に障害となる不要な配列を除去する新しい方法を確立した。得られた成果は、鶏のワクチン産業に新たな可能性を提案するものであり、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。