

氏 名	深野木 信一
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 2 6 3 号
学 位 授 与 の 日 付	平成 14 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規程第 3 条第 3 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科 機能科学専攻
学 位 论 文 題 目	バキュロウイルスベクターを用いた遺伝子組換え動物用ワクチンの製剤化に関する研究 (主査)
審 査 委 員	教 授 古澤 壽治 教 授 小田 耕平 教 授 遠藤 泰久 助教授 森 肇

論文内容の要旨

家禽業界では、重篤な感染症であるニューカッスル病からニワトリを守るためにワクチン投与が必要である。しかし、現行ワクチンは、免疫持続性を長期間有するが炎症反応の強いオイルアジュバントワクチンか、炎症反応は弱いが免疫効果の低い生ワクチンを使用せざるを得ない。そこで本研究では、炎症反応が低く、かつ免疫持続性を長期間有することのできるニワトリニューカッスル病ウイルス(NDV)に対するサブユニットワクチンの開発を目的とした研究を行った。

第 1 章では、これまでの NDV に対するワクチン開発に関する歴史的背景、及びその意義について概観し、本論文の目的を述べた。

第 2 章では、抗原タンパク質として、NDV の感染防御と関係のある Hemagglutinin-neuraminidase (HN) タンパク質に着目し、以下の通り、この HN タンパク質を遺伝子組み換え技術により生産した。Autographa californica の nuclear polyhedrosis virus(NPV) と Bombyx mori の NPV の両方の形質を持ったハイブリッドバキュロウイルスをベクターとして用い、HN 遺伝子を挿入した組換えウイルスを作製した。この組み換えウイルスをカイコ蛹に接種し HN タンパク質を得た。HN タンパク質の発現は抗 NDV 血清を用いたプロテイング解析によって確認し、また HN タンパク質の特徴である赤血球凝集反応によって抗原量を調節した。

第 3 章では、アジュバント作用を有するオイル組成の探索を行った。免疫効果の判定には血清 IgG、マクロファージ活性化能の測定、炎症反応についてはその指標となるクレアチニナーゼ活性およびシアル酸濃度の測定を行った。その結果、脂肪族飽和炭化水素の中でも $n\text{-C}_{16}\text{H}_{34}$ と $n\text{-C}_{18}\text{H}_{38}$ は炎症反応が低く、高い抗体産生能を長期間維持するのに対し、 $n\text{-C}_{12}\text{H}_{26}$ と $n\text{-C}_{14}\text{H}_{30}$ のような $n\text{-C}_{16}\text{H}_{34}$ より分子量の小さい炭化水素では非常に強い炎症反応と低い免疫持続性を示すことを明らかにした。

第 4 章では、 $n\text{-C}_{16}\text{H}_{34}$ と $n\text{-C}_{18}\text{H}_{38}$ を中心とする流動パラフィンが有効と考えられたため、このような組成が中心の実用的な流動パラフィン選抜を GC/MS を用いて行った。その結果、Crystol 52® が、 $n\text{-C}_{16}\text{H}_{34}$ と $n\text{-C}_{18}\text{H}_{38}$ を主成分とする流動パラフィンであり、抗体産生能が高くかつ炎症反応が弱いことを示した。

第 5 章では、さらにオイルアジュバントの形態について検討を加えた。より炎症反応が低くなるように、オイルの少ない水中油中水(W/O/W)型エマルションの調製を試みた。この W/O/W 型製剤からの抗原の放出性と免疫効果との関係を調べた結果、抗原の放出を抑制すればより高い免疫効果を持続できるこ

とを示した。

第6章では、抗原の放出抑制を示したW/O/W型製剤投与に伴う炎症反応と免疫持続効果について検討したところ、処方組成として、抗原/モノオレイン酸ジグリセリル/ポリソルベート80/Crystol52®/スクワレン/リン酸緩衝液(30:5:2:25:10:28)であるW/O/W型エマルションが実用的に最も有効であることを明らかにした。

第7章では、これまでの結果を基にNDVのサブユニットオイルアジュバントワクチンを調製し、免疫効果と接種反応を調べた。すなわち、カイコ蛹から調製したHNタンパク質を抗原に使用し、第6章で構築した処方組成のW/O/W型サブユニットオイルアジュバントワクチンの効果を調べた。その結果、本ワクチンを使用してあらかじめ免疫したニワトリはNDV強毒株を投与しても、全羽感染を免れることができた。また、接種部位での炎症反応は見られなかった。このことから、NDVワクチンのこれまでの問題を解決した画期的なワクチンを開発した。

第8章では、以上の研究成果をもとに、NDVに対するサブユニットワクチンの今後の展開と、産業上の有効性について総合的に考察した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、現在使用されているニワトリのニューカッスル病ウイルスに対するワクチンの問題点の解決を目的として研究を行ったものである。現行では、二つのタイプのニューカッスル病ウイルスのワクチンが使用されている。一つはオイルアジュバントワクチンで、免疫効果は高いが、炎症反応が非常に強く、採卵用のニワトリにしか使用できない。また、もう一つの弱毒ウイルスを用いた生ワクチンは炎症反応が低いためブロイラーに使用されているが、免疫効果が低いという問題があった。そこで、免疫効果が高く、かつ炎症反応の低いニューカッスル病ウイルスに対するワクチンの製剤開発を行った。ニューカッスル病ウイルスのエンベロープタンパク質はバキュロウイルスベクターを用いてカイコ蛹で発現した。このエンベロープタンパク質を抗原としたニューカッスル病ウイルスに対するW/O/W型サブユニットオイルアジュバントワクチンを作製した。このワクチンは高い免疫持続性と炎症反応が見られないという目的にかなう新規なサブユニットワクチンであった。このワクチンの完成により、法定伝染病であるニューカッスル病の防御という点から、家禽業界に対する貢献は極めて大である。

その内容は次の4報に報告されているが、その全報が申請者を筆頭著者としている。

- (1) Shin-ichi Fukanoki, Tadashi Iwakura, Shuji Iwaki, Kohei Matsumoto, Reiji Takeda, Keiko Ikeda, Zhe Shi, Hajime Mori (2001) Safety and efficacy of water-in-oil-in-water emulsion vaccines containing Newcastle disease virus haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein. Avian Pathology **30**, 509-516.
- (2) Shin-ichi Fukanoki, Kohei Matsumoto, Hajime Mori, Reiji Takeda (2000) Adjuvanticity and Inflammatory Response following Administration of Water-in-Oil Emulsions Prepared with Saturated Hydrocarbons in Chickens. The Journal of Veterinary Medical Science **62**, 917-919.
- (3) Shin-ichi Fukanoki, Kohei Matsumoto, Hajime Mori, Reiji Takeda (2000) Effect of Liquid Paraffin on Antibody Responses and Local Adverse Reactions of Bivalent Oil Adjuvanted Vaccines

Containing Newcastle Disease Virus and Infectious Bronchitis Virus. The Journal of Veterinary Medical Science **62**, 1317-1319.

- (4) Shin-ichi Fukanoki, Kohei Matsumoto, Hajime Mori, Reiji Takeda(2000)Relationship between Antigen Release and Antibody Response of Infectious Coryza Water-in-Oil-in-Water Emulsion Vaccines. Avian Diseases **44**, 869—873.