

氏 名	お 小 川 良 平
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 乙 第 36 号
学位授与の日付	平成 7 年 7 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	鶏痘ウイルスベクターの開発と鶏ワクチンへの応用に関する研究
審 査 委 員	(主査) 教 授 牧 野 圭 祐 教 授 村 上 章 教 授 渡 邊 隆 夫

論 文 内 容 の 要 旨

鶏痘ウイルス (FPV) は、ボックスウイルス科のアビボックスウイルス群に属し、同科オルソボックスウイルス群のプロトタイプであるワクシニアウイルス (VV) の 1.5 倍に相当するおよそ 300kbp の DNA ゲノムを持つ巨大ウイルスである。本ウイルスは鶏痘に対するワクチンとして長い間使用されており、宿主域が限られていることや染色体へのインテグレーションが起こらないことから、安全性の高いベクター系と考え、FPV を利用した組み換え鶏用生ワクチンの開発を試みた。研究の内容は、以下に示すように、博士学位論文の本論第一章から第四章に分類されて記載されている。

第一章 鶏痘ウイルスゲノム非必須部位の同定

FPV の分子生物学的研究は VV と比べて大きく立ち遅れていたため、組み換えウイルス構築に必要な、異種遺伝子挿入可能でありかつウイルスの増殖に非必須なゲノム中の領域を同定することから研究を開始した。VV の 7.5kD ポリペプチドプロモーター (P7.5k) 下にレポーターとして β -ガラクトシダーゼをコードする lac Z 遺伝子を結合し、これをランダムに FPV ゲノムに挿入した。 β -ガラクトシダーゼを安定に発現するものを単離することにより 9 箇所に及ぶ非必須領域を同定した。またこれと同時に、ワクチニアウイルスのプロモーターが鶏痘ウイルス中で働くことをつきとめ、鶏痘ウイルスのゲノム中に外来遺伝子を導入するための基礎を築くことに成功した。

第二章 外来遺伝子導入部位の解析

ウイルスゲノムの部位によっては、外来遺伝子を挿入することによりそのウイルスの複製、伝播、毒性などが影響を受ける。第一章で作製した 9 種類の組み換え鶏痘ウイルスのうち、同定した非必須領域のうち 3 つについて配列分析を行ったところ、これらが 28kD、20kD、74kD のポリペプチドをコードすることのできるオープンリーディングフレーム (ORF) 上に位置していることを明らかにした。アミノ酸レベルで VV の F12L 遺伝子に相同性のある 74kD ORF と、VV の p37 遺伝子に相同性のあるこの ORF に隣接する ORF を lac Z 遺伝子で分断すると、ウイルスの細胞からの放出が阻害されることを見出し、これらの ORF が細胞からの FPV 放出機構に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

第三章 鶏痘ウイルスベクターによる組み換えニューカッスル病ワクチン作製の検討

作製した鶏痘ウイルスベクターを用いた組み換え生ワクチンの第一のターゲットとして、ニューカッスル病を選んだ。本病は伝染性の強い呼吸器系の病気で、パラミクソウイルス科に属するニューカッスル病ウイルス (NDV) によって引き起こされる。このウイルスは全長 15kbp の RNA ゲノムを持つウイルスである。このウイルスの主要な感染防御抗原と考えられている 2 種の膜糖タンパク、ヘマグルチニン=ノイラミニダーゼ (HN) と融合タンパク (F) 遺伝子をそれぞれ P7.5k プロモーター下に組み込んだ組み換え FPV を構築した。

SPF (Specific Pathogen Free) 鶏での接種試験では、NDV 抗原を発現する組み換えウイルスを接種した鶏のほとんどが強毒 NVD、強毒鶏痘ウイルスの攻撃に対して感染防御を示し、高率の感染防御が 17 週目まで観察された。一方、移行抗体を保持した鶏での感染防御試験では、強毒 NVD 攻撃で多くの接種鶏が死亡し、NVD に対する移行抗体が、組み換え鶏痘ウイルスによる NVD に対する免疫の成立を阻害することがわかった。組み換え鶏痘ウイルスが発現する NVD の抗原タンパクに移行抗体が結合し、これらを覆い隠すことにより NVD に対する新たな免疫誘導を阻害していると推測し、強い転写活性を持った合成プロモーター (Ps) を利用し、HN と F の両方の抗原を発現する組み換え体を作製した。移行抗体を保持する市販鶏での感染防御試験を行ったところ、この組み換えウイルスの接種鶏で高い防御率が観察され、この改良型組み換えウイルスが移行抗体を保持する雛に対しても高い免疫原性を持つことが示された。

第四章 鶏痘ウイルスベクターによるマレック病ウイルス抗原遺伝子の発現解析とマレック病ワクチン作製の検討

第二のターゲットとしてはマレック病を選んだ。本病は、ヘルペスウイルス科に属するマレック病ウイルス (MDV) に起因する鶏白血病の一種である。MDV は全長約 180kbp の DNA ゲノムを持つ大型ウイルスである。本ウイルスは、3つの血清型に分類されており、血清型 I のみが病原性である。そこで、血清型 I のみでその発現が見られるリン酸化タンパクである pp38 について発現を検討した。P7.5k あるいは Ps 下に FPV に組み込み発現させ、*in vitro* での解析を行った。Ps が P7.5k の数倍強力なことで、また、組み換え FPV によって発現される pp38 は、MDV のものと同様にリン酸化されていること等を確認した。次に、他のヘルペスウイルスの主要抗原タンパクに相同性のある糖タンパク (gBh) について検討した。Ps 下にこの遺伝子を結合し FPV 中に導入した。この組み換え体は MDV と同様、100kD、60kD、49kD の 3つの糖タンパクを発現しており、gBh 遺伝子が従来知られている B 抗原と同一であることを初めて明らかにした。

組み換え鶏痘ウイルスの MDV に対する免疫原性を調べるために、pp38 及び gBh を発現する組み換え鶏痘ウイルスを鶏に接種した。SPF 鶏を用いた感染防御試験を行ったところ、gBh を発現する組み換え鶏痘ウイルスを接種した鶏は、超強毒株 MDV による攻撃をも耐過し、この組み換えウイルスのワクチンとしての効果が示された。

以上示したように、FPV の組み換えウイルスワクチンのベクターとしての有効性を明らかにすることができた。ここで得られた知見は、1つの FPV ゲノムに複数の抗原遺伝子を導入した多価生ワクチン開発の可能性をも示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

小川良平氏の博士学位論文について詳細な審査を行った。論文は詳細かつ論理的にまとめられており、高い評価を与える。また以下に示すように、本論文には重要な結果が多く含まれている。(1)鶏痘ウイルスを組み換えウイルスワクチンのベクターとして初めて用い、鶏の二大ウイルス病であるニューカッスル病ならびにマレック病に対して長期にわたりしかも有効に感染防御を得ることに成功している。(2)1つの鶏痘ウイルスゲノムに複数の抗原遺伝子を導入した多価生ワクチン開発の可能性を示した。(3)鶏痘ウイルスゲノムの非必須部位の同定を行い、しかも作製した組み換え鶏痘ウイルス中の導入遺伝子の位置についても同定し、さらにウイルスの放出を妨げる導入部位についても詳細な解析を行い、鶏痘ウイルスワクチン実用化に必須の研究を成功させた。

以上、本論文では、鶏痘ウイルスワクチンの実用化に向けた詳細な研究の結果が詳細かつ論理的に記述されており、高い学術的水準にあるものと評価する。また、記載内容は 7 編の国際的学術雑誌に報告されたものであり、国際的にも高い評価を受けたものである。よって本審査委員会は、小川良平氏の提出された学位申請論文が本学の博士号 (学術) を授与するのに値すると結論する。