

## 論文の内容の要旨

氏名：江 崎 素 之

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名：新規組換え七面鳥ヘルペスウイルスの構築と鶏用ワクチンへの応用に関する研究

### 1. 緒言

養鶏産業においては、生産の大規模集約化に起因する感染症発生リスクの増大が大きな問題となっている。その対策としては、農場外部からの病原体侵入防止を目的としたバイオセキュリティの強化と、疾病の発症防止および症状軽減を企図したワクチン接種の効果的な併用が重要とされている。鶏の代表的な疾病には、マレック病、ニューカッスル病（ND）、伝染性喉頭気管炎（LT）、伝染性ファブリキウス嚢病、トリインフルエンザ（AI）などが挙げられるが、これらの疾病には人獣共通感染症も含まれており、公衆衛生の観点からも疾病制御は極めて重要である。疾病制御の手段の一つとして、性状や投与経路、投与時期の異なる様々なワクチンが用いられるが、これらには副作用や病原性復帰など安全面に問題があるものも多く、また、複数のワクチン投与による干渉の問題も指摘されている。さらに、頻回接種に起因する鶏のストレス増大やワクチン接種に伴う生産者の負担も無視できない。そのため、より安全性が高く、接種回数を低減できる多価ワクチンの開発が急務である。

近年、分子生物学の手法を用い、病原体の防御抗原遺伝子を組み込んだ動物用あるいはヒト用組換えベクターワクチンの研究開発が進められている。適切なベクターの選択により、ワクチンの安全性向上や多価化、免疫効果の向上および長期持続といったメリットが期待できる。中でも、七面鳥ヘルペスウイルス（HVT）は、マレック病に対する有効かつ安全な生ワクチンとして広く用いられており、優れた鶏用ベクターとしての可能性が期待できる。そこで、本研究では、伝染性喉頭気管炎ウイルス（LTV）、ニューカッスル病ウイルス（NDV）、トリインフルエンザウイルス（AIV）の防御抗原遺伝子をそれぞれ組み込んだ3種の組換えHVT（rHVT）を作製し、これらrHVTによる抗原発現、遺伝的安定性、安全性等の解析を行うとともに、鶏に接種した際の防御抗原に対する免疫惹起能を明らかにすることを目的とした。

### 2. 試験方法

#### 2.1. rHVTによる抗原遺伝子の発現検討

rHVTによる抗原遺伝子の発現検討はウェスタンブロット法、免疫蛍光染色（IFA）法等により行った。ウェスタンブロット法では、まずrHVTを感染させた初代鶏胚線維芽細胞（CEF）のライセートを作製し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により蛋白質を分離した後、PVDF膜に転写した。このPVDF膜を抗原蛋白質に対する抗体で処理した後、アルカリフォスファターゼ（AP）標識二次抗体でさらに処理し、最後にAPの基質溶液を添加して発色させた。IFA法では、メタノール：アセトン混合液で固定したrHVT感染CEFを抗原蛋白質に対する抗体で処理し、さらに蛍光色素で標識した二次抗体で処理した後、蛍光顕微鏡で特異的な蛍光を観察した。

#### 2.2. rHVTの安全性評価

通常用いられる10倍量のrHVTを、50羽以上の特定病原体不在（SPF）採卵鶏の卵内（18日齢鶏胚）または頸部皮下（初日齢）に接種し、その後120日間に渡って副作用の有無を観察した。また120日後に体重を測定してワクチン非接種群と比較するとともに、全ての鶏を解剖し、主な臓器の肉眼病変を観察した。

#### 2.3. rHVTが付与する防御免疫の評価

一群10羽から30羽のSPF鶏、市販採卵鶏あるいは市販ブロイラー鶏の卵内（18日齢鶏胚）または頸部皮下（初日齢）に各種rHVTを接種し、3-19週間後に対応するウイルス強毒株で攻撃した後、呼吸器症状、神経症状等の臨床症状を観察した。また、ワクチン接種後血清を取得し、ELISAまたは赤血球凝集抑制試験（HI試験）により、防御抗原に対する抗体価を測定した。

### 3. 結果および考察

#### 3.1. rHVT の構築

HVT ゲノムの挿入部位領域 (UL45 遺伝子と UL46 遺伝子の間の非翻訳領域) に、プロモーターなどの転写調節配列とともに防御抗原遺伝子である LTV glycoprotein B (gB)、NDV fusion (F)、もしくは AIV H5 亜型の hemagglutinin (HA) 遺伝子を挿入した組換え用プラスミドを作製した。これらのプラスミドと感染性 HVT ゲノム DNA を CEF に導入して相同組換えを起こさせることにより、LTV、NDV、あるいは AIV の防御抗原遺伝子を組み込んだ 3 種の rHVT を構築した。これらをそれぞれ HVT/LT、HVT/ND、HVT/AI とし、正しいゲノム構造を持つことをサザンブロット法により明らかにした。HVT/AI については、HA 遺伝子発現を制御するプロモーターを評価するため、3 種の異なるプロモーター (①サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、②鶏ベータアクチン (Bac) プロモーター、③CMV/Bac 融合 (Pec) プロモーター) を用いた組換え体を構築した。それぞれ HVT/AI-cmv、HVT/AI-bac、HVT/AI-pec とする。

#### 3.2. rHVT の解析と安全性評価

構築した rHVT がそれぞれ抗原蛋白を発現していることを、ウェスタンブロット法、IFA 法等により明らかにした。また、これらの rHVT を細胞内で 20 代、または鶏体内で 5 代継代した後、組換えウイルスが遺伝的、表現型的に安定であることを見出した。さらに、これらの rHVT を、通常ワクチンとして使われる 10 倍量のウイルス量にて鶏に接種して 120 日間以上観察し、何ら副作用が見られないこと、また接種鶏の体重増が非接種鶏と差異が無いことを明らかにした。これらのことから、これら rHVT は、非常に安全かつ安定な鶏用ワクチンとして利用できることが分かった。

#### 3.3. rHVT が付与する防御免疫の評価

##### 3.3.1. 伝染性喉頭気管炎に対する HVT/LT の防御効果

HVT/LT を SPF 採卵鶏あるいは市販ブロイラー鶏に接種し、その防御効果について検討した。まず、1 羽あたり 3000 plaque forming units (pfu) または 1270 pfu の HVT/LT を初日齢 SPF 採卵鶏の頸部皮下に接種し、7 週後、LTV 強毒株 (USDA 株) にて攻撃した。その結果、非接種対照群では 14 羽すべてが呼吸器症状を伴う LT を発症したが、3000 pfu を接種したワクチン接種群では 14 羽すべてが、1270 pfu を接種したワクチン接種群では 92% の鶏 (14 羽中 13 羽) が防御し、HVT/LT の優れた防御効果が明らかになった。

さらに、HVT/LT の市販ブロイラー鶏での効果を調べるため、HVT/LT を卵内 (18 日齢鶏胚) に接種し、3 週齢あるいは 5 週齢にて LTV 強毒株 (USDA 株) で攻撃した。3 週齢では、非接種対照群において 15 羽すべての鶏が LT を発症したのに対し、ワクチン接種群では 15 羽中 10 羽 (67%) が防御した。一方、5 週齢では、非接種対照群において 15 羽中 11 羽 (73%) の鶏が LT を発症したのに対し、ワクチン接種群では 15 羽中 13 羽 (87%) が防御した。このことから、HVT/LT は 3 週齢という非常に早い段階から防御効果を発揮することが明らかになった。

##### 3.3.2. ニューカッスル病に対する HVT/ND の防御効果

次に、HVT/ND の ND に対する防御効果とその免疫持続を調べた。まず、HVT/ND を一群 30 羽の SPF 鶏の卵内 (18 日齢鶏胚) または頸部皮下 (初日齢) に接種した。市販 NDV ELISA kit (Idexx Laboratories) にて NDV に対する抗体上昇を検討したところ、24 日齢で卵内接種群の 93%、皮下接種群の 87% が陽性となった。28 日齢にて NDV 強毒株 (Texas GB 株) により攻撃したところ、非接種対照群では 10 羽すべてが神経症状を特徴とする ND を発症し、一週間以内に死亡したが、ワクチン接種群では、卵内接種群の 1 羽を除いてすべての鶏が防御した。

さらに、HVT/ND の免疫持続効果を検討した。HVT/ND を市販採卵鶏の頸部皮下に接種した後、19 週齢にて NDV 強毒株 (Texas GB 株) により攻撃したところ、非接種対照群では 10 羽すべてが ND を発症したが、ワクチン接種群では、30 羽すべての鶏が防御した。これにより、HVT/ND が NDV 攻撃に対して優れた防御効果を示すこと、またその防御効果が長期に渡って持続することが明らかになった。

##### 3.3.3. トリインフルエンザに対する HVT/AI の免疫惹起能の評価

最後に、HVT/AI の免疫惹起能を調べた。プロモーターの異なる 3 種の HVT/AI、それぞれ約 3000 pfu を、一群 17 羽の初日齢 SPF 鶏の頸部皮下に接種したのち、3-7 週齢にて血清を採取した。これらの血清を用いて AIV HI 試験を行ったところ、ワクチン接種群ではいずれも HI 抗体価が上昇していた。3 種のプロモーターの比較では、HVT/AI-cmv が、5 週齢及び 6 週齢において他の 2 つの組換え体よりも有意に高い HI 価を惹

起した。さらに、約 1500 pfu の HVT/AI を、一群 20–30 羽の初日齢 SPF 鶏の頸部皮下に接種し、4–6 週齢にて数種の異なる高病原性 AIV 株（H5 亜型）で攻撃したところ、いずれの AIV 株に対しても優秀な防御効果を示した。

#### 4. 結論

本研究では、HVT に 3 種の異なる防御抗原遺伝子を組み込んだ rHVT を作製し、これらの rHVT が防御抗原を発現すること、挿入した防御抗原遺伝子は安定に維持されること、さらにこれらの rHVT が安全であることを明らかにした。また、鶏に接種した際、防御抗原に対する優秀な免疫を惹起できること、さらに防御抗原に対する免疫が長期に渡って維持されることを見出した。従って、HVT は次世代ワクチンベクターとして非常に有用であると言える。