

論文内容の要旨

題目 Study for the development of vaccines against cryptosporidiosis of bovine.

(ウシのクリプトスポリジウム症ワクチン開発に関する基礎研究)

氏名 高島康弘

Cryptosporidium parvum(*C.parvum*)は家畜、伴侶動物、ヒトに感染し下痢などの症状を引き起こす原虫で、下痢を起こす病原体としては一般的なものである。本研究の目的は、DNA ワクチンや組換えウイルスベクターの手法を用いてウシのクリプトスポリジウム症ワクチンを開発することにある。

第1章 (chapter 1) では、*C.parvum* sporozoites の免疫原性抗原である p23 を発現する組換えワクシニアウイルスを作製した。この組換えウイルスで BALB/c マウスを免疫したところ、p23 抗原を認識する抗体の産生が確認できた。C57BL マウスにおいては、抗体産生は見られなかったものの p23 抗原に対する遅延型過敏反応が検出された。免疫反応の違いはマウスの系統によると考えられる。

第2章 (chapter 2) では p23 抗原を発現するウシヘルペスウイルス1型 (BHV-1) を作製し、その性状を分析した。また、ヘルペスウイルスベクターの改良を目的とし、BHV-1 とオーエスキー病ウイルス (PRV) の基礎的な性状分析を行った。

Chapter2.1 において US3 遺伝子を欠損する BHV-1 組換え体を作製し、US3 遺伝子産物の性状を解析した。US3 遺伝子はヒト単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) の US3 protein kinase の相同タンパクであるとされている。HSV-1 においてこのタンパクは感染

細胞のアポトーシスを阻害することが知られているが、本研究で作製した US3 欠損 BHV-1 はアポトーシス抑制に関して HSV-1 で報告されているような効果を示さなかった。これらの結果は、BHV-1 組換え体作成時、US3 遺伝子が外来遺伝子挿入部位として使用可能であることを示唆している。US3 遺伝子産物によってその発現が影響を受ける他の遺伝子も同様である。

Chapter2.2 において、p23 抗原を発現するヘルペスウイルス組換え体を作製した。アルファヘルペスウイルス亜科に属するウイルスの中では組換えが容易であることから PRV を本研究でのベクターとして選択し、ヘルペスウイルスベクターを用いた p23 抗原の発現に成功した。このことから、ヘルペスウイルスベクターを用いて *C.parvum* 抗原を発現させ、ワクチンとして用いることの可能性が示唆された。

PRV はマウスなど実験動物を含む多くの種類の動物に感染する。いっぽう、BHV-1 の宿主域は狭くマウス体内では全く増殖しない。Chapter2.3 では PRV の糖タンパク (gB および gC) を発現する組換え BHV-1 を作製し、この組換え体が効率よくマウスの細胞に感染しうることを示した。これらの結果から本来 BHV-1 が感染しにくい小型実験動物をもちいた BHV-1 感染実験が可能であることが明らかになった。

Chapter2.4 では、ウシのクリプトスポリジウムワクチン候補として、p23 抗原を発現する BHV-1 組換え体を作製した。P23 遺伝子は BHV-1 ゲノム中の glycoproteinG(gG) 遺伝子領域に、緑色蛍光タンパクをコードするマーカー遺伝子とともに挿入した。BHV-1 の組換え頻度は極めて低いが、蛍光を発するプラークを単離することで、組換え体は容易にクローニングできた。近縁のウイルスである PRV では、gG 遺伝子領域への外来遺伝子挿入によって US3 遺伝子の発現が抑制されることが報告されているが、chapter2.1 で示したように BHV-1 では US3 遺伝子の欠損による悪影響は少ないと思われるため gG 遺伝子領域を挿入部位として選択した。この組換え体をウサギに接種したところ p23 を認識する抗体の産生が確認された。また、この抗体は *C.parvum* の細胞への感染を抑制した。これらの結果から、本組換えウイルスのワクチンとしての可能性が明らかになった。

ヘルペスウイルスは外来遺伝子のベクターとして可能性をもっているが、同時に宿主免疫を抑制することも知られている。Chapter2.5 ではマウスの系を用いて PRV による免疫抑制について検討した。マウスリンパ球を PRV とともに培養したところその増殖能が抑制され、この効果は紫外線照射によって不活化されたウイルスでも同様の効果をもつことが明らかになった。これらの結果は、PRV によるリンパ球増殖抑制はウイルス遺伝子の発現によるものではなくウイルス粒子を構成する成分によるものであると考えられた。

第 3 章 (Chapter 3) ではイムノグロブリン G1 (gG1) の Fc 領域をコードする遺伝子をクローニングし、この遺伝子産物によるアジュバント効果について検討した。Chapter3.1 では、Fc 領域を含む膜タンパクをコードする融合遺伝子を作成し、RK13 細胞を用いて、この遺伝子産物を細胞表面に発現する細胞株を樹立した。この細胞をマクロファージとともに培養したところ、通常細胞に比べて激しく傷害された。このことはマク

ロファージ上の Fc レセプターが細胞表面の融合遺伝子産物を認識することを示している。またこの細胞をマウスに接種したところ通常細胞を接種するより効率よく抗 RK13 細胞抗体を誘導できた。このことから Fc 領域を含む融合タンパクがアジュバント効果をもつことが明らかになった。

Chapter3.2 では p23 を発現するプラスミド(pCX-p23)と p23 と Fc 領域の融合タンパクを発現するプラスミド(pCX-p23fc)を作製し、DNA ワクチンとしてマウスに接種した。融合タンパクをコードする pCX-p23fc プラスミドを接種したマウスでは、pCX-p23 接種マウス群に比べて高いレベルの抗原特異的インターフェロン γ 産生がみられた。このことから、p23 を用いたクリプトスポリジウム症ワクチンにおいても Fc 領域がアジュバントとして有効であることが示唆された。

本研究では、いくつかのワクチン候補を作製しその性状を分析した。本稿に示したように組換えヘルペスウイルスや抗体分子 Fc 領域と *C.parvum* 抗原の融合タンパクによる免疫はクリプトスポリジウム症ワクチンとして効果が期待できる。