

[別紙2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高島 康弘

Cryptosporidium parvum(*C.parvum*)は家畜、伴侶動物、ヒトに下痢などの症状を引き起こす原虫の一つである。本論文は DNA ワクチンや組換えウイルスベクターを用いたウシのクリプトスポリジウム症に対するワクチン開発の可能性を検討したもので以下の3章から構成されている。

第1章ではウイルスベクターを用いたワクチンの可能性について、組換え技術やウイルスの性状に関する知見が既に多数得られているワクシニアウイルスをベクターとして検討した。まず *C.parvum* sporozoites の表面抗原で免疫原性のある p23 を発現する組換え体を作製した。この組換え体で BALB/c マウスを免疫したところ抗 p23 抗体の産生が確認され、ウイルスベクターを用いたワクチンの可能性が示唆された。

第2章ではウシヘルペスウイルス1型(BHV-1)をベクターとして p23 抗原を発現させるための基礎研究を行った。本ウイルスを用いる利点は、BHV-1 感染によって起こる牛伝染性鼻気管炎のワクチンとして弱毒生ウイルスが既に使用されておりこの株がベクター候補となりうること、BHV-1 ゲノムには複数の外来遺伝子挿入可能部位があること、BHV-1 はヒトに感染しないことである。しかしながら BHV-1 をベクターとして用いるには、適切な外来遺伝子挿入部位の検討が必要な点、BHV-1 はウシ以外の動物にほとんど感染せず実験動物を用いた感染実験が困難な点など解決すべき問題が残っている。すなわち p23 遺伝子の挿入部位と想定した US4 遺伝子領域の改変は近傍の US3 遺伝子の発現を抑制する可能性があり、BHV-1 と近縁のヒト単純ヘルペス1型(HSV-1)では US3 遺伝子欠損株の感染細胞はアポトーシスを起こすことが知られている。そこで、まず US3 欠損 BHV-1 を作成し、BHV-1 US3 遺伝子産物の性状を解析した。

作製した US3 欠損株感染細胞はアポトーシスを発現しなかった。したがって BHV-1 の US3 遺伝子領域は感染細胞のアポトーシスに関連せず、BHV-1 組換え体作成時、US3 あるいは US4 遺伝子が外来遺伝子挿入部位として使用可能であると考えられた。また実験動物を用いた感染実験を可能にするため、宿主域の広いヘルペスウイルスである PRV の糖タンパク(gB および gC)を発現する組換え BHV-1 を作製した。この組換え体は効率よくマウスの細胞に感染し、本来 BHV-1 が感染しにくい小型実験動物を用いた感染実験が可能となった。これらの結果から、親株には PRV の糖タンパク質を発現している BHV-1 株を用い、p23 遺伝子挿入部位を US4 遺伝子

領域とした BHV-1 組換え体を作製した。すなわち、P23 遺伝子を BHV-1 ゲノム中の US4 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。その組換え頻度は極めて低かった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可能であった。さらに、この組換え体をウサギに接種したところ抗 p23 抗体の産生が確認され、またこの抗体で C.parvum のオーシストを処理すると C.parvum の HCT-8 細胞への感染が抑制された。これらのことから、クリプトスポリジウム症ワクチン開発において有用なヘルペスウイルスベクターを作成できることが明らかとなった。

第3章では p23 抗体産生に及ぼすイムノグロブリン G1 の Fc 領域のアジュバント効果を検討した。まず、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。得られた細胞をマウスマクロファージと共培養したところ、インタクトな RK13 細胞に比べて著しく高い細胞障害活性が認められ、マクロファージ上の Fc レセプターが融合遺伝子産物を認識していると考えられた。またこの細胞をマウスに接種したところインタクトな RK13 細胞を接種した場合と比較して優位に高い抗 RK13 細胞抗体が誘導され、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。つぎに 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。pCX-p23fc プラスミドを接種したマウスでは、pCX-p23 を接種したマウスに比べてインターフェロン γ の産生が有意に高く、p23 を用いたワクチンにおいても Fc 領域が何らかのアジュバント効果を示す可能性が示唆された。

このように本論文は、いくつかのワクチン候補を作製しその性状を明らかにしたもので、獣医学の学術上貢献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。