

学 位 論 文 題 名

オーエスキー病ウイルス糖蛋白 gC を主成分とする
サブユニットワクチンの開発

学位論文内容の要旨

オーエスキー病ウイルス (ADV) の糖蛋白 gC を主成分とするサブユニットワクチンを開発した。株化細胞に ADV を感染させ、赤血球凝集反応 (HA) とイムノブロッティング法によって糖蛋白 gC 多量に産生する細胞を選択した。ブタ由来の株化細胞 (PK-15, CSK, EPK) の可溶化抗原が 1,280~2,560 HA 価を示し、他種の動物由来の株化細胞の可溶化抗原 (80~640HA 価) より高く、gC を多く産生すると考えられた。マウス抗 gC モノクローナル抗体を用いたイムノブロッティング法によってブタ由来株化細胞がより大量の gC 蛋白を産生することが確かめられた。以上の成績から、gC 抗原を収穫するために PK-15 細胞を用いることとした。

gC がヘパリンに結合すること (Mettenleiter ら, 1990) を利用して、ヘパリン・アフィニティーカラムクロマトグラフィーによる gC の精製を検討した。得られた成績から、可溶化には 1 % トリトン X-100 ・ 0.4 M NaCl 含有りん酸緩衝液 (pH 7.4) を、溶出液には 2M NaCl 含有りん酸緩衝液 (pH 7.4) を用いることとした。

試製ワクチンは PBS で透析した gC リッチ抗原を ISA70 オイルアジュバント (セピック社、フランス) と 3 : 7 の割合で混合・乳化して water in oil 型乳剤とした。マウスとモルモットに試製ワクチンを接種し、中和抗体の産生と致死量の ADV 攻撃に対する防御効果を調べた。マウスには 15,000HA 単位を、モルモットには 75,000HA 単位を筋肉内に注射し、10 あるいは 100LD₅₀ の強毒ウイルスを腹腔内あるいは皮下に攻撃した。マウスは攻撃時の中和抗体価が 2~16 倍であり、攻撃後に全頭が生残した。モルモットは攻撃時の中和抗体価が 8~64 倍

であり、攻撃後にマウスと同様、全頭が生残した。

マウスに試製ワクチンを接種し、細胞障害性 T リンパ球 (CTL) の誘導について調べた。Balb/c マウスに 15,000HA 単位を 2 週間隔 4 回筋肉内に注射した後、脾細胞を採取し、ADV を感染させた健康マウスの抗原提示細胞と混合培養してエフェクター細胞とした。標的細胞は gC 遺伝子を連結した発現プラスミドで Balb/3T3 clone A31 細胞をトランスフェクトして得た A31/gC 細胞を用いた。CTL 応答の検出は ^{51}Cr release assay によった。その結果、本試製ワクチンはマウスに CTL を誘導することが判った。

6 週齢ブタを用いて 128,000、12,800 あるいは 1,280HA 単位/ドーズに調製した試製ワクチンの ADV 感染防御効果を調べた。各群 2 頭のブタに 2 週間隔 2 回、筋肉内に試製ワクチンを注射した。対照の 2 頭は非感染細胞可溶化抗原と ISA70 の混合乳剤 1 ml を同様に注射した。最終注射の 1 週間後に全頭を 10^6 TCID₅₀ の強毒ウイルスで鼻腔内攻撃した。攻撃時、高用量群 (128,000HA) は 32 倍の中和抗体価を示し、攻撃後 13 日間ウイルスの排泄はなく、耐過・生残した。他の用量の試製ワクチンによる中和抗体価は 8 倍を示し、3 あるいは 4 日間ウイルスを排泄したが、耐過・生残した。一方、対照ブタは 6 日間ウイルスを排泄し、耐過した。従って攻撃後のウイルス排泄期間はワクチンの HA 単位量に依存し、攻撃時の中和抗体価と関連していた。

試製ワクチンの妊娠ブタにおける繁殖障害防止効果を検討した。3 頭の繁殖用雌ブタに 300,000HA 単位を含むワクチン 1 ml を交配 1 週間前までに 3 週間隔 2 回筋肉内に注射した。ワクチンを注射したブタとワクチンを注射しないブタを交配後 28 日 (A 群)、54 日 (B 群) および 85 日 (C 群) に 10^6 TCID₅₀ の強毒ウイルスで鼻腔内攻撃した。攻撃後 2 週間、ワクチンを注射したブタは発熱期間 (39℃以上) が短くなる傾向にあった。高レベルの中和抗体を持ったブタは、攻撃後の排泄ウイルス量が減少し、その期間が短縮された。ワクチンを注射したブタの攻撃時の中和抗体価は A 群で 5.6 倍、B 群で 45 倍、C 群で 13 倍であった。また、排泄ウイルス量の最高値は各群の対照ブタより A 群が 1/17.8、B 群が 1/1,000 および C 群が 1/178 で、排泄期間は対照ブタが 7~12 日間であったのに対し、ワクチン接種群は 1~5 日間であった。妊娠期間中、ワクチン

を注射したブタでは死流産が認められなかったが、対照ブタのうち妊娠後期に攻撃したブタで死流産が認められた。これらの結果から、試製ワクチンは ADV による繁殖障害の抑制に有効であると結論された。

本研究で得られた結果から gC を主成分とするサブユニットワクチンは幼齢ブタのウイルス排泄と損耗を抑制するだけでなく、妊娠ブタの繁殖障害を抑制することが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 喜 田 宏
副 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 高 島 郁 夫
副 査 助 教 授 岡 崎 克 則

学 位 論 文 題 名

オーエスキー病ウイルス糖蛋白 gC を主成分とする サブユニットワクチンの開発

オーエスキー病 (AD) の糖蛋白gCを主成分とするサブユニットワクチンを開発した。

異なる動物種に由来する株化細胞に AD ウイルス (ADV) を感染させ、赤血球凝集(HA) 反応とイムプロットティング法によって、gCの産生量を検討した結果、ブタ腎由来株化 PK-15 細胞が最も多くの gC を産生することが判明した。

ADV感染PK-15細胞を可溶化し、これをヘパリンアフィニティークロマトグラフィーで分画してgCリッチ画分を得た。これをオイルアジュバントISA70 (セピック社、フランス) と混合・乳化して、water-in-oil エマルジョンを調製し、これをワクチンとした。

150,000HA単位/mlのワクチンを試製し、マウスに0.1ml、モルモットに0.5mlを筋肉内に注射し、4または3週間後に強毒ウイルスで攻撃した。ワクチンを接種したマウスとモルモットは何れも中和抗体を産生し100%耐過・生残した。またワクチンを注射した Balb/cマウスの脾臓に細胞障害性T細胞が誘導されることを⁵¹Cr release assayで確認した。

6週齢のブタに128,000、12,800或いは1,280HA単位/ドースのワクチンを2週間隔で2回注射し、最終注射の1週後に強毒ウイルスで鼻腔内攻撃した。この結果、ワクチンの用量依存性に中和抗体が産生され、鼻汁中へのウイルス排泄が抑制された。

3群の繁殖用雌ブタに300,000HA単位/ドースのワクチンを交配1週間までに3週間隔2回注射し、各群交配後28日、54日、85日目に強毒ウイルスで鼻腔内攻撃した。攻撃時の中和抗体価は5.6~45倍で、鼻汁中へのウイルス排泄量は対照群より少なかった。対照

のブタ1頭に死流産を認めたが、ワクチン注射群では死流産はなかった。

以上の成績から、gCを主成分とするADサブユニットワクチンはADV感染幼齢ブタのウイルス排泄と損耗を抑制するだけでなく、妊娠ブタの繁殖障害を予防することが明らかになった。本研究によって開発されたサブユニットワクチンは、ADの予防に優れた効果を発揮するものと期待される。よって、審査員一同は片山茂二氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有するものと認めた。