

研 究 主 論 文 抄 録

論文題目 伝染性コリーザワクチンに関する研究
(Research on Infectious Coryza Vaccine)

熊本大学大学院自然科学研究科 理学 専攻 生命科学 講座
(主任指導 高宗 和史 教授)

論文提出者 坂元 隆一
(Ryuichi Sakamoto)

主論文要旨

《本文》

伝染性コリーザは *Avibacterium paragallinarum* (以下、*A.pg*) というグラム陰性菌によって引き起こされる鶏の疾病で、鼻汁の漏出、顔面の腫脹、産卵の低下を特徴とする。*A.pg* には A、B 及び C の 3 つの型があり、日本では A 型及び C 型が流行している。*A.pg* の細胞表面には HA (haemagglutinin) タンパクがあり、これに対する抗体 (HI : haemagglutinin inhibition) は防御との相関が高いため、感染の確認やワクチンの有効性に HI 試験が利用されている。

伝染性コリーザに対する現行ワクチンは全菌体を不活化して調製されるが、野外農場において現行ワクチンを投与した鶏は期待されるほどには抗体が上昇しない。また脚部筋肉内に投与した場合、副作用が確認されることから、有効性及び安全性が高いワクチンを目的とした。また抗体価の上昇を精度よく検出できるシステムの構築についても検討した。

1. HMTp210 遺伝子の短縮化の検討

これまでの研究で、HI モノクローナル抗体を用いたプラークリフトアッセイによって同定された HMTp210 遺伝子 (HI Monoclonal antibody Targeting Protein 210kDa) (6.1kb) から発現する産物が伝染性コリーザに対して有効であることを確認している。この遺伝子は全長を大腸菌で発現させた場合、発現量が低かった。そこで、「発現量の改善」及び「本遺伝子内において防御に重要な領域の同定」を目的として、この遺伝子を短縮化したところ、いずれの型 (A 及び C) においても 1.6kb 断片がコードするタンパク (△5-1) で高い有効性が確認された。また発現量も改善した。

2. AC 融合組換えワクチンの有効性及び安全性

C 型菌由来の △5-1 タンパクは、大腸菌で発現させた場合、可溶性画分に発現したり封入体画分に発現したりと発現画分が不安定であり、品質管理や安定製造の面から問題であっ

た。そこで安定して封入体画分に発現する A 型菌由来の $\Delta 5-1$ タンパクと融合して大腸菌で発現させたところ、AC 融合抗原 (AC $\Delta 5-1$ タンパク) は封入体画分に安定して発現することが確認された。この AC $\Delta 5-1$ タンパクが A 型及び C 型の双方に対して有効性を保持しているか確認するために、鶏において免疫・攻撃試験を行ったところ、100%の防御成績が得られた。

また、安全性についても評価した。現在市販されている全菌体ワクチンの用法は頸部皮下接種である。これは脚部筋肉内に投与した場合、投与部位の腫脹などの副作用が確認されるためである。しかしながら、作業性の面から、脚部筋肉内投与のワクチンが望まれている。そこで、組換えワクチンを鶏の脚部筋肉内に投与した。その結果、歩行困難を引き起こすような重度の腫脹は認められなかった。

3. 伝染性コリーザに対する新規抗体検出法 (ELISA)

伝染性コリーザに対する抗体測定は通常、HI 試験が使用される。しかしながら、AC 融合抗原 (AC $\Delta 5-1$ タンパク) は成分ワクチンであるため、HI 抗体を惹起しない。そこで新たな抗体測定系として ELISA 系を構築した。この系では組換えワクチンに対する抗体を A 型、C 型それぞれ測定することが可能であった。また防御と抗体価 (ELISA 値) の関係を確認するために、A 型菌または C 型菌を用いて攻撃試験を行ったところ、防御との相関が確認された。

4. 現行の市販ワクチンに対する新規抗体測定法 (ELISA) の応用

上記の新規抗体測定系が現行の全菌体ワクチンについても応用できるか確認したところ、現行ワクチンについても A 型及び C 型に対する抗体をそれぞれ検出することが可能であった。現行ワクチンでは HI 試験においても抗体測定が可能であるが、防御した個体の中に HI 陰性の個体が数多く認められた。しかしながら、これらの個体を ELISA で評価したところ、抗体陽性であり、HI 試験よりも伝染性コリーザに対する抗体を高感度に検出できることが確認された。更にワクチン投与鶏が感染防御レベルの抗体を保有しているかどうかを正確に診断できるようになった。

5. アビバクテリウムパラガリナルムの血清型診断

A.pg の型識別に使用される HI 試験は 2 日間かかる上に、感染後に HI 抗体が惹起されにくいため、検出されない場合もある。そこで型識別のために multiplex PCR を開発した。型特異的なプライマーを用いた multiplex PCR により、それぞれ目的のサイズの PCR 産物が増幅された。更に PCR-RFLP により型ごとに異なる RFLP パターンが示された。これらのことより、multiplex PCR 及び PCR-RFLP 法はアビバクテリウムパラガリナルムの血清型診断に有用なツールとなると考えられた。