

# バチルス菌を用いた鳥インフルエンザ用芽胞ワクチンの開発

福山大学生命工学部・教授 菊田 安至

## ■ 目的

鳥インフルエンザウイルス、特に高病原性を示す H5 又は H7 亜型のウイルスは、世界各地で家畜に甚大な被害を与えており、さらに、人インフルエンザの大流行(パンデミック)の原因ともなることから、その防疫技術の開発は緊急の課題である。しかし、水鳥などの野鳥に常在し、急速な増殖と変異を繰り返すインフルエンザウイルスの感染をワクチンの使用により完全に制御することは難しいことから、効果の高い遺伝子組換えワクチンの開発が検討されている。

本研究課題では、セラサス社(米国、カリフォルニア州)の NanoBioPak 技術による動物用ワクチン開発のライセンスを得て、バチルス菌の芽胞を用いた新規鳥インフルエンザワクチンの開発を行った。

## ■ 方法

インフルエンザウイルスの表在抗原の中で変異の少ない M2 タンパク質のアミノ酸配列を基に、3 種類の抗原ペプチドを作製することにした。これらの組換え型抗原ペプチドを生産するため、バチルス菌の発現用プラスミドベクターにオリゴ DNA を組み込み、バチルス菌(*Bacillus thuringiensis*)に導入した。組換え菌体を培養して芽胞を回収した。抗原の生成の確認は、組換え抗原のリンカー部分にある HA 抗原に対する抗体を用いて行った。免疫測定に用いる抗原ペプチドは、pCold I を使った大腸菌発現系を用いて作製した。

PBS で  $1 \times 10^4 \sim 10^6$  個/ml に調製した芽胞液 0.1ml を 1 週齢のニワトリ(ジュリアライト、雄、1 週齢)に筋肉内投与した。投与後 2 週間目に翼下静脈より採血を行い、血清を回収して ELISA により抗体価を測定した。

## ■ 結果および考察

M2 タンパク質の N 末端に相当するペプチド抗原を持つ 4 種の芽胞ワクチン株(M2172, M2262, M2171, M2191)を作製した。また、コントロールとして組換えを行っていない発現プラスミドベクターにより形質転換した菌株(Bt634)を作出した。これらの中で 2 株(M2172 と Bt634)の芽胞を 1 週齢の雄のニワトリ(7 羽)に各 100 $\mu$ l 投与したところ、それぞれの  $1 \times 10^6$  個/ml の芽胞液を投与した群で各 1 羽が、投与後 24 時間以内に斃死した。しかし、その他の個体については外見上の変化は観察されず、体重の変動も非接種群とほとんど差が見られなかった。また、生残個体について接種 2 週間後に剖検を行い免疫箇所を肉眼で観察したが、壊死・出血等の所見は確認できなかった。特に、抗体価の上昇が確認されている濃度( $1 \times 10^3$  個/羽)の芽胞の投与は、これまでに 58 羽に対して行ったが、2 週間以内での斃死は見られなかったことから、芽胞濃度を調整する事でワクチン使用による損耗率を実用可能なレベルに低下させることは可能と考えられる。

$1 \times 10^4$  個/ml の芽胞ワクチンを 0.1ml 接種し、2 週間後に採取したニワトリ血清の抗体価を ELISA で測定した。その結果、M2171、M2172、M2262 の芽胞を投与したニワトリでは、M2 抗原を持たない Bt634 を投与した群と比べて 2 ~ 4 倍の有意な抗体価の上昇が確認できた。一方、M2 タンパク質のより C 末端側に近い抗原を持つ M2191 の芽胞を投与したニワトリでは抗体価の有意な上昇は確認できなかった。

## ■ 結語

インフルエンザ抗原を生成した芽胞をそのまま免疫することで、抗体価の上昇が確認できた。一方、今回の研究課題では、芽胞ワクチンの粘膜投与による効果を検討する予定であったが、これについてはまだ予備的な検討段階にある。そのため、今後は、①粘膜免疫を強化するワクチン接種方法を確立するとともに、ワクチンの効果を高めるために、②有効な抗体をニワトリの血液並びに消化管粘膜の双方で誘導可能なワクチン株の選抜、③芽胞ワクチンを無生物として扱うための技術開発を行う。