バイオテクノロジーの進展と今後の家畜防疫対応

山 内 一 也

日本生物科学研究所・東京大学名誉教授

Development of Biotechnology and Disease Control Measures
of Domestic Animals in the Future

Kazuya YAMANOUCHI

Nippon Institute for Biological Science, Ome-shi, Tokyo 198, Japan

わが国に家畜伝染病予防法が制定されてすでに40年が過ぎた。これに支えられて家畜伝染病対策が進み、多くの急性家畜伝染病はいまや過去のものとなってきた。しかし、国際貿易の進展に伴い、口蹄疫など海外悪性伝染病について国際獣疫事務局(OIE)では汚染国であっても正常な地域(牧場)と認定されたところからの畜産物等の輸入は認めるような方向を検討しはじめている³⁾。厳しい輸入制限により口蹄疫などの侵入を防いできたこれまでのわが国の検疫体制は、今後、水際での検査体制の確立をせまられることが予想される。また、家畜の衛生管理に多く用いられてきた抗生物質が畜産食品での残留の面で問題となり、ワクチンの必要性はますます増えてきている。最近10数年間に著しい進展をみせているバイオテクノロジーはこのような新しい問題の解決につながるものと期待される。また、いっぽうバイオテクノロジーが開発途上国における家畜防疫の面で非常に期待されている技術である点にも注目しなければならない。バイオテクノロジーは生体のさまざまな機能を人為的に有効利用する技術である。生命科学におけるバイオテクノロジーは図1に示したように、遺伝子工学、細胞工学、発生工学の3種の技術を基盤としている。その応用領域は多岐にわたるが、そのうち家畜防疫に特に関係の深いものとして、ワクチン、モノクローナル抗体、遺伝的抵抗性の賦与、遺伝子診断について述べることにする。

バイオテクノロジーによるウイルス・ワクチン開発

ウイルス・ワクチンの製造法の変遷を表1に示した。

図1 生命科学におけるバイオテクノロジー

18世紀末、JENNERによる種痘ワクチンに始まったワクチンは最初は動物、次いで孵化鶏卵、培養細胞と、その基質の面での変遷はあったが、いずれもワクチンウイルスを増殖させるもので基本的にはすべて同じ方式である。バイオテクノロジーはワクチンの製法にまったく新しい手法を導入した。このバイオワクチンのなかで、もっとも進展してきているサブユニットワクチンとベクターワクチンの2つについて以下に解説する。

サブユニットワクチン

ワクチンとして防御に働く蛋白の遺伝子を大腸菌、酵母、哺乳動物細胞、昆虫細胞などで発現させて防御蛋白を産生させ、それをワクチンとするものである。多くのウイルスについてサブユニットワクチンの開発が行われており、すでに人体用としてB型肝炎ワクチンが実用化されている。いっぽう、動物用として特に口蹄疫ワクチンのサブユニットワクチンがバイオテクノロジー応用がもっとも期待されるものとして非常に多くの研究が行われたが、これはいまだに実用化のめどがたっていない。この2種類のサブユニットワクチンを例にサブユニットワクチンの利点、欠点について整理してみる。

表1 ウイルスワクチンの製造法の変遷

ワクチンの種類	基 質	年 代
第一世代ワクチン		
種 痘	牛, 羊	1798—1980
狂 犬 病	兎	1880
	山 羊	1940年代
	培養細胞	1980年代
日 本 脳 炎	マ ウ ス	1950年代
鶏 痘	孵化鶏卵	1950年代
ポ リ オ	培養細胞	1960年代
麻 疹	培養細胞	1960年代
第二世代ワクチン (遺伝子組換えワクチン)		
B 型 肝 炎	大 腸 菌	1980年代後半
	酵 母	1980年代後半
口 蹄 疫	大 腸 菌	開 発 中
	化学合成	開 発 中
狂 犬 病	ワクチニアウイルスベクター	実用化
牛 疫	ワクチニアウイルスベクター	開発中

B型肝炎ウイルスには増殖のための適当な細胞がない。動物でも感受性のあるのは人とチンパンジーだけである。そこで、これまではキャリアの血液を精製してB型肝炎ウイルスの表面抗原であるHBs蛋白を分離してワクチンが製造されていた。このワクチンの製造過程で生きたウイルスを取り扱うために作業者が感染を受けるおそれがないとはいえない。また、できあがったワクチンの不活化がもしも不十分で生きたウイルスが残っているとワクチンによる感染事故の危険性もでてくる。しかし、このウイルスではチンパンジーを用いない限り、不活化を確認することはできない。ワクチンの品質管理の面で大きな問題を抱えていたわけである。さらに、ワクチンが普及してくるとワクチンの原材料となるキャリアの血液が入手できなくなるという大きな問題があった。

現在用いられている肝炎ワクチンはHBs蛋白遺伝子を組み込んだ酵母が産生するHBs蛋白からできている。HBs蛋白には感染性はないし、ワクチンの製造は組換え酵母の増殖で行うことになる。したがって、上述した感染の危険性、原材料の確保といった基本的問題はすべてバイオテクノロジーにより解決されたことになる。

口蹄疫ワクチンの場合には肝炎ワクチンと異なりウイルスを増殖させる細胞はあるため原材料の確保の問題はない。しかし、ワクチン製造過程で生きたウイルスが外部にもれないようにすることと、ウイルスの不活化を確実にすることが非常に大きな問題となっている。事実、不活化が不十分のためにワクチンを介して感染事故が起きたと考えられる例があり、そのためにヨーロッパではワクチンの接種を中止した。口蹄疫ウイルスではウイルス粒子の表面に存在するVP1蛋白が防御抗原として重要である。VP1蛋白には感染性はないのでB型肝炎ワクチンの場合と同様に安全に取り扱える。米国では口蹄疫ウイルスからの遺伝子の分離の実験はPlum Islandにある農務省の高度隔離施設で行われたのち、VP1蛋白遺伝子を用いた実験は民間企業のP1実験室で行われている⁵⁾。家畜伝染病のなかでもっとも重要なものとして、遺伝子工学による口蹄疫ワクチンの開発が10数年にわたって極めて精力的に各国で試みられてきた。VP1蛋白の産生は十分に行えるようになったにもかかわらず、実際に動物での実験では免疫力が不十分であるため、いまだに実用に値するワクチンはできていない。その結果、現在では大部分の研究所は開発研究を中止しはじめている。

サブユニットワクチンの大きな欠点として単独では免疫力が不十分な点がある。そのために適当な免疫増強の対策が必要である。口蹄疫ウイルスのVP1蛋白ではこの点が特に重要と推測される。サブユニットワクチンの免疫力を増強させるために種々の方法が検討されているが、そのなかで特に注目されるものとして、ISCOMワ

クチンとリポソームワクチンがある。ISCOM (Immunostimulating complex) ワクチンは南米産の Quillaja saponaria の幹から分離した配糖体 Quil A という物質が強い免疫増強作用を示すことを利用して開発されたものである。図2にはインフルエンザや麻疹ウイルスのようなエンベロープウイルスでの防御蛋白であるエンベロープを用いた ISCOM ワクチンを示してある。できあがったワクチンには蜂の巣のような形にエンベロープ蛋白と Quil A が組み込まれている。この構造が免疫細胞に対する抗原提示の効率を高めている。リポソームワクチンは図3に示したように脂質二重膜で作ったリポソームの中に防御蛋白を組み込むものである。サブユニットワクチン単独ではB細胞に対しわずかの抗原刺激を与えるに過ぎないが、リポソームに組み込むことにより、マクロファージに取り込まれてT、B細胞への抗原提示が効率良く行われるようになる。

ベクターワクチン

もっとも代表的なものは種痘に用いられたワクチニアウイルスをベクターとしたものである。ワクチニアウイルスは大型のDNAウイルスであって、その185kbのDNAの中にはウイルスの増殖に必須でない領域がある。その中にワクチンの防御遺伝子(ワクチン遺伝子)を組み込む。ここに複数の遺伝子を入れて多価ワクチンを作ることできる。図4では著者らが開発した組換え牛疫ワクチンを例としてベクターワクチンの作成法を示した。ワクチニアウイルスDNA断片にプロモーターとワクチン遺伝子を組み込んだプラスミドを作り、これを組換えベクターとしてワクチニアウイルス感染細胞にトランス

図2 ISOM (Immunostimulatory Complex)

図3 リポソームワクチン

図4 ワクチニアベクターによる組換え牛痘ワクチンの作製法

フェクトさせる。その結果、ワクチン遺伝子を含むウイルスDNAとワクチニアウイルスの間で相対的組換えが起こり、ワクチン遺伝子を含む感染性ワクチニアウイルスが産生される。これがベクターワクチンである。

種痘ワクチンはJENNERの時代から200年にわたって全世界で使用され、1970年代の終りについに天然痘(痘瘡)の根絶という微生物学における最大の偉業をもたらした。これだけの長期間にわたっての人体での使用経験のあるワクチンはほかになく、種痘ワクチンではその安全性、危険性のいずれについても豊富な知識の積み重ねがある。そのため、ワクチニアウイルスをベクターとした組換えワクチンはもっとも期待されているバイオテクノロジーワクチンといえる。ワクチニアベクター・ワクチンの中で、実用化に向けての研究がもっとも進んでいるものとして、フランスのグループが開発した狂犬病ワクチンと筆者のグループが開発した牛痘ワクチンがある。

狂犬病は日本では根絶しているがヨーロッパ大陸、アメリカ大陸をはじめ世界各地でいまだ重要な伝染病である。主な感染源は狐などの野生動物であるため、通常のワクチン接種方法は不可能である。フランスのグループは狂犬病ウイルスの防御蛋白であるG蛋白の遺伝子をワクチニアウイルスに組み込んだワクチンを開発した。これを鶏の頭のような餌の中に入れて野外に散布し、狐などに食べさせて経口的にワクチン接種を行おうというものである。すでにベルギー、フランスでは大規模な野外接種実験が終了し¹⁾、米国でもひとつの島で野外実験

が終了した。ベルギー、フランスの両政府はこのワクチンを買って、狂犬病汚染地域でヘリコプターによるワクチン散布を1990年から実施している。いっぽう、牛痘は口蹄疫とならぶ牛の最重要伝染病である。現在、使用されている弱毒牛痘ワクチンは非常に強い免疫力があり、先進国では牛痘は過去の病気となった。しかし、アフリカ、中近東、インドなどの国々ではいまだ、牛痘の流行が繰り返され、時には国家経済に影響を与えるような大きな被害をもたらしている。そしてFAOやEECでは大規模な根絶計画をすすめている。ここでもっとも大きな問題になっているのはこれらの国ではワクチンの冷蔵輸送、冷蔵保存といったいわゆるコールドチェーンシステムが充分でないことである。痘瘡根絶が成功した理由のひとつに高い耐熱性の乾燥種痘ワクチンの開発がある。そして耐熱性種痘ワクチンが威力を発揮した地域はまさに今、牛痘の流行している地域である。そこで筆者らはワクチニアウイルスをベクターとした牛痘ワクチンにより痘瘡根絶と同じ戦略が可能と考えたわけである。われわれの開発した組換え牛痘ワクチンは45Cで1カ月保存しても力価が保たれている⁴⁾。英国国家畜衛生研究所⁷⁾およびインド獣医学研究所⁸⁾との共同研究で、このワクチンは中近東由来およびインド由来の強毒牛痘ウイルスに対する免疫効果を牛に与えることが確認されている。いっぽう、このような組換え牛痘ワクチンの実用化にあたって、牛のような接種対象動物をはじめ、対象外動物であるほかの動物および人での安全性、環境への安全性評価を中心に検討する国際会議が1989年にOIE, FAO, WHO 合同で開かれ、われわれのワクチンは実用化の可能性のあるものと認められた²⁾。

ワクチニアウイルスに感受性を持つのは人、牛、羊、豚などである。鶏ではワクチニアウイルスと同じポックスウイルス・グループに属する鶏痘ウイルスの弱毒ワクチンをベクターに用いる組換えワクチン、また大型DNAウイルスであるマレック病ウイルスの弱毒ワクチンをベクターに用いるものなどの開発が進んでいる。鶏では過密なワクチンプログラムがあるため、いくつものワクチン遺伝子を組み込んだ多価ワクチンによる省力化に大きな期待が寄せられている。

バイオテクノロジーによる診断法の開発

遺伝子工学による診断抗原の作成

遺伝子工学は特定のウイルス蛋白を産生させる手段をもたらした。これは前述のサブユニットワクチンへの応用に加えて、診断抗原としても非常に役立つ。1例として著者らの行っている牛痘の血清診断法について述べる。

牛痘ウイルスは図5に示したように6種類の蛋白よりなる。そのうち、NP蛋白はもっとも免疫原性が強く、感染した動物ではNP蛋白に対する抗体産生が起こる。

牛疫診断の標準法のひとつである補体結合反応で検出される抗体は主として抗 NP 抗体と推測されている。しかし、これまでの血清診断法では 6 種類の蛋白が混在している抗原しか使用できないため、NP 蛋白に対する抗体を検出することは不可能であった。われわれは NP 蛋白遺伝子を分離し、それをバキュロウイルスベクター系に入れて昆虫細胞の中で大量に NP 蛋白を産生させるシステムを開発した。この組換え NP 蛋白を抗原として酵素抗体法 (ELISA) により牛疫感染の診断に役立つことが兎の実験系で確かめられた。また、前述のワクチニアウイルスをベクターとした組換え牛疫ワクチン接種と自然感染の鑑別にも役立つ。すなわち、組換えワクチンでは 6 種類のウイルス蛋白のうちの H 蛋白に対する抗体だけが産生されるが、自然感染では H 蛋白以外に NP 蛋白をはじめとする各ウイルス蛋白に対する抗体が産生される。したがって、抗 NP 抗体の有無からワクチン接種と自然感染が区別できる。

モノクローナル抗体による診断

免疫学における最大の進歩のひとつとして細胞工学技術を応用したモノクローナル抗体の開発がある。これにより抗原エピトープの検出が可能となり、感染症の領域では鑑別診断の道が開けた。これまで血清診断に用いられていた抗体はポリクローナル抗体であるため、共通抗原性を有する微生物の間の区別はできなかったが、モノクローナル抗体は単一の蛋白を認識するので、個々の微生物に固有の抗原部分を検出するわけである。

モノクローナル抗体による鑑別診断のひとつの例として、われわれの研究室で犬ジステンパーウイルスによるニホンザルの脳炎の診断を紹介する。ある獣医学で飼育していたニホンザルで脳炎が起り、サルが麻疹ウイルスに高い感受性を持つことから麻疹脳炎が疑われた。しかし、種々の所見から犬ジステンパーウイルスの感染の可能性が考えられたため、犬ジステンパーウイルスとのみ反応し、麻疹ウイルスとは反応しないモノクローナ

ル抗体を用いた結果、ニホンザルの脳内に犬ジステンパーウイルス抗原を証明することができた。これはサルでのジステンパー感染の初めての報告である⁹⁾。これまでも人を含めた霊長類で犬ジステンパーウイルスに感染する可能性が疑われたことがあったが、麻疹ウイルスと区別できないため明確な証明はできていなかった。モノクローナル抗体ではじめて鑑別可能になったわけである。

同一ウイルス内での血清型の鑑別の例としては、口蹄疫の OIE レファレンスセンターになっている英国 Pirbright Laboratory での仕事がある。ここでは 7 種類の口蹄疫ウイルスのうち 4 種類に対し約 100 種のモノクローナル抗体を作成して鑑別診断のシステムを作ってきている。また、極めて近縁のウイルスである牛疫ウイルスと羊疫 (PPR) ウイルスの鑑別にモノクローナル抗体を利用することも Pirbright Laboratory で試みられている。

DNA 診断

病原微生物の遺伝子を検出することにより診断を行うまったく新しい方法である。最近、開発された Polymerase chain reaction (PCR) を利用するもので今後、非常に強力な武器になることが期待されている。PCR は図 6 に示したように微量の DNA を数時間の間に 10 万倍以上に増幅する技術である。実際にこの方法で麻疹、風疹、ムンプスの 3 混ワクチン接種後に髄膜炎になった例から分離されたムンプスウイルスがワクチン株であることが証明された⁶⁾。浦和の幼稚園で起きた溶血性大腸

図5 6種類の蛋白よりなる牛疫ウイルス

図6 PCR (Polymerase Chain Reaction) 法によるDNA増幅システム

菌の検査では菌を培養し血清型を決定する旧来の方式により、検査結果がでるまでかなりの日数が必要であった。いっぽう、米国疾病管理センター (CDC) では溶血性大腸菌の感染の診断に PCR による DNA 診断の検査体制を採用しており、5 時間位で診断結果が得られるようになっている。そこで、わが国でも最近、DNA 診断体制が作られることになった。

DNA 診断は獣医領域、特に海外悪性伝染病の診断に極めて役立つことが期待される。最大の利点は生きたウイルスを使用しないで極めて短時間に検査できる点である。すなわち、検査のプロセスはまず検体から DNA を抽出し、PCR で増幅し DNA プローブによるハイブリダイゼーションでウイルス遺伝子の存在を確認するものである。この検査プロセスで必要なものは合成プライマーと検査用プローブであり、いずれも感染の危険性はまったくない。口蹄疫に例をとると、検査用プローブとしての口蹄疫ウイルスの遺伝子断片が必要であるがこれには感染性はない。実際に米国ではサブユニットワクチンの項で述べたように P1 実験室でとりあつかうことができる。また、プライマーを選ぶことで血清型の区別も容易にできる。そのほかの利点として検体は必ずしも生の材料である必要はなく、たとえばホルマリン固定組織のような不活化材料も利用できる点があげられる。家畜の輸入規制について今後、口蹄疫汚染国であっても正常と判定された地域からの輸入を国際的に認めるような方向での検討が進んでいる状況を考えると、DNA 診断による安全かつ急速な検査体制の確立が必要であろう。

遺伝子導入による抗病性家畜の開発

日本産のある系統のマウスや野生マウスでのマウス白血病ウイルスに対する遺伝的抵抗性にかかわるものとして Fv-4 遺伝子が見い出され、この遺伝子産物が実はマウス白血病ウイルスのエンベロープ糖蛋白であることが明らかにされている。いっぽう、鶏では古くから鶏白血病抵抗性の鶏が知られていたが、この抵抗性が鶏の内在性白血病ウイルスのエンベロープ蛋白によることが明らかになっている。このようにウイルスに対する遺伝的抵抗性がそのウイルスの遺伝子産物によってもたらされている例が自然界に存在している。そこで、人為的に抵抗性にかかわるウイルス・エンベロープ遺伝子を導入することにより感染抵抗性の動物を作りだすことが可能と考えられる。

モデル実験としわれわれは代表的マウスウイルスであるセンダイウイルス抵抗性のマウスの作出を試みた。センダイウイルスはパラミクソウイルスに属し、そのエンベロープには HN 蛋白が存在する。そこで、マウスの受精卵に HN 遺伝子をマイクロインジェクトしてトラ

ンスジェニックマウスを作出した。このマウスはセンダイウイルスの攻撃に対して大部分が生残するという明確な抵抗性を示した。この方法は、たとえばマウス白血病ウイルスと同じレトロウイルス科に属する牛白血病ウイルス抵抗性の牛の作出などに利用することが期待される。いっぽう、ウイルス遺伝子からメッセンジャー RNA が転写される時に逆の配列を持つ RNA (アンチセンス RNA) が存在すると、2 重鎖の RNA が形成されて蛋白への翻訳は行われず、したがってウイルス増殖が中止してしまう。この考えにしたがって鶏で伝染性気管支炎ウイルスのアンチセンス RNA を作るようなトランスジェニック鶏の作出が英国で試みられている。まだ、期待できる成績は得られていないが、この方法も遺伝的抵抗性の動物作出の有効な手段になるであろう。

お わ り に

バイオテクノロジーが今後の家畜衛生の向上に役立つ側面を中心に述べてきた。その成果は先進国だけではなく、むしろ開発途上国に大いに役立つことが期待されている。実際に FAO では人口増加による食糧不足の解決策としてバイオテクノロジーを重要視しており、アジア地域に Asian network on biotechnology in animal production and health を組織し、開発途上国でのバイオテクノロジーの推進をはかっている。国際的視野に立ってバイオテクノロジーについての認識を深めることが求められているといえよう。

引 用 文 献

- 1) BROCHIER P, KIENY MP, COSTY F et al: Nature, 354, 520-522 (1991)
- 2) OIE: Report of the expert consultation of requirements for vaccinia-rinderpest recombinant (VRR) vaccines, Paris, 21-24 March (1989)
- 3) OIE: Meeting of the Bureau of the OIE International Animal Health Code Commission, Paris 2-3 March (1992)
- 4) TSUKIYAMA K, YOSHIKAWA Y, KAMATA, H et al: Arch Virol, 107, 225-235 (1989)
- 5) US Department of Health and Human Service: Federal Register Vol 51, No 88, Appendix D-II, D-VIII (1986)
- 6) YAMADA A, TAKEUCHI K, TANABAYASHI K et al: Vaccine, 8, 553-557 (1990)
- 7) YAMANOUCHI K, INUI, K, SUGIMOTO M et al: Vet Rec (In press)
- 8) YAMANOUCHI K, YOSHIKAWA Y, BHAT PN et al: Proc VIIIth Int Cong Virol, 355 (1990)
- 9) YOSHIKAWA Y, OCHIKUBO F, MATSUBARA Y et al: Vet Microbiol, 20, 193-205 (1989)