

コンポーネントワクチンの展開

(株)微生物化学研究所 研究第5部
岡部 達二

近年、畜産業界では、安価で良質かつ安全な食肉、食卵等を求める社会のニーズと、厳しい経済環境のなかでの生産コストの削減に対する期待から、生産の合理化が急速に進んでいる。この様な傾向を受けて動物用ワクチンの分野でも徐々にではあるが従来の技術レベルから新しい技術レベルへと変化しつつある。具体的な例として、省力的なワクチネーションプログラムを可能にし、しかもより有効かつ安全なワクチンをいかに実用化していくか、が大きな課題となってきた。省力的ワクチネーションという点を考える時、畜産労働力の確保が難しい、又人件費の生産コストに対する割合が高い等の問題を、解消するために、ワクチンの頻回注射をできるだけ少なくすることが重要である。このためには免疫の持続期間を高いレベルで長期にする必要があることから、免疫補助剤の開発、ワクチン原料の高力価化、多価ワクチンの開発等が要求される。ここに、新技術としてのコンポーネントワクチンの開発がクローズアップされてくるのである。

細菌やウイルスの構成成分(コンポーネント)の中から感染防御抗体を産生する抗原を分画精製してワクチン原料としたものをコンポーネントワクチンという。

このようなワクチンは例えば菌体毒素(endotoxin)が除かれていることから、安全性が高く、大量の抗原を注射して、ワクチンの効果を高めることも可能である。

コンポーネントワクチンを実用化するための第一歩は感染防御抗体を産生する抗原の確認である。最近ではこの種の研究に細胞融合技術によって作出されたモノクローナル抗体等が利用されている。次に、これらの抗原を大量に、より純度高く生産するための方法の確立である。未だ広く実用化されるには到っていないが、遺伝子操作によって作出した組換え体で大量に抗原蛋白を生産しようという試みが多くの研究所でなされている。最後の段階では、この抗原蛋白の精製工程を確立することである。

このシンポジウムでは、私共の所で進められているこの種の研究課題の内、すでに実用化されている豚萎縮性鼻炎に対する*Bordetella bronchiseptica*のコンポーネントワクチンについて紹介し、コンポーネントワクチン開発の今後の展開を考察する。

豚萎縮性鼻炎 (Swine atrophic rhinitis;AR) コンポーネントワクチン (A R C V)

A Rの病原はブタ由来のI相*Bordetella bronchiseptica* (B. bronch)及びD型(A型)*Pasteurella multocida* (P. multo)の壊死毒素産生株である。一般にはB. bronch単独感染でもB. bronch、P. multoの混合感染でもA Rは発現するが、P. multo単独感染では発現しにくい。

感染はB. bronchの鼻腔粘膜への定着及び増殖に始まり、この菌が産生する壊死毒素により骨芽細胞の編成壊死、鼻甲介の減形成を伴うARが発病する。一方P. multo は単独では鼻腔粘膜には定着しないが、B. bronchの感染に付随して、二次感染菌として定着し、破骨細胞の増生と骨吸収の亢進を伴う、重度のARが発病する。さらに重要なことはARが発症すると豚にとっては大きなストレスとなり、飼育効果を著しく低下させることである。

菌が細胞組織に吸着するための条件としてある種のレセプターが介在するといわれている。菌の持つ赤血球凝集性は、当該菌が赤血球膜表面のレセプターに結合することを示している。このレセプターは細胞膜表面にも存在し、菌の定着を支配する要員の一つであることが知られている。また、B. bronchにはI相菌とⅢ相菌があり、前者はARを発現し、赤血球凝集性を示すのに対し、後者はARを発現せず、赤血球凝集性を示さない。

私共はこの点に注目し、I相菌の赤血球凝集性(HA)を検索した。

I相菌のGCK株、MCU株、A-19株(標準株)、Ⅲ相菌のMCU-2株をSDS-PAGEで検討すると殆どの株で多数の共通成分が検出される中で、150kDaの蛋白だけに違いがあり、Ⅲ相菌にこの蛋白のバンドは見られなかった。

一方、GCK株をペプトン培地で培養すると、菌の増殖に伴ってHAが培養上清に遊離してくることが確認された。培養開始後48時間でGCK株は 3.0×10^{10} 個/mlに増殖し、培養上清のHAは256倍/0.5 μ lを示した。HA価を128倍に調整して、オイルアジュバントを加え、マウス及び子豚に接種し、GCK株生菌で攻撃したところ、双方共に高いHI抗体が産生され、感染防御活性が認められた。

この培養上清液を牛赤血球で感作すると、150kDaの蛋白は牛赤血球に吸着され、上清液のHA及び感染防御活性は消失した。また150kDa蛋白吸着赤血球を固定化してオイルアジュバントとともにマウスに接種すると有意な感染防御活性が認められた。

そこで、培養上清液からのHAの精製を試みた。

培養上清を限外濾過膜で20~50倍に濃縮し、蔗糖密度勾配法で分画すると、蔗糖密度30~60%の境界にHA活性が認められた。この分画を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にかけ、さらに精製を進めた。カラムはゲル濾過カラムを使用し、i) トーヨーパールHW-60, HW-75コンビネーションカラム、ii) TSKゲルG5000pw、iii) TSKゲルG3000swで精製度と比活性をあげた。i)の工程のHA分画は150kDa、40kDa、32kDa、23kDaの主要成分がSDS-PAGEの結果から検出された(この分画をCrude cell free antigen:CFAとする)。このCFAと牛赤血球とを感作させるとHA性は消失し、150kDa蛋白も検出されなくなった。ここでHAは150kDaの蛋白によって発現される性状であることを確認した。iii)の工程により得られたHA分画は、比活性が595倍に上昇し、SDS-PAGEでは

150 kDa のバンドのみが検出され、ほぼHA成分が単離されたものと思われる。この単離された分画をTSKゲルフェニル5pwカラムを用いたHPLCにかけ疎水性を調べたところ、HA成分は硫酸濃度が0になってから溶出し、void volume peakには見られなかったことから、疎水性の高い成分であることが確認された。さらに電子顕微鏡下でみると長さ約150nm、幅2~3nmの細い繊維状の構造物が観察された。

B. bronch HA 抗原の精製工程と比活性

Sample	specific activity ^{a)}	purification rate	recovery (%)
Culture supernatant	86	1	100
Zone-60	1,280	15	78.2
Cell-free Antigen(CFA)	2,800	34	60.1
Crude HA ; HA fraction by G-5000 PW column	8,400	98	5.23
Final products; HA fraction by G-3000 SW column	51,200	595	0.68

a) HA 活性は、0.4%新鮮牛赤血球を用い常法に従って測定したHA価をHA units/mg蛋白質量で表現した。

コンポーネントワクチン開発の第1のテーマについてみると、B. bronchの感染防御抗体(HI抗体)を産生する抗原は、菌体から容易に遊離する15kDa蛋白質で繊維状の疎水性の高いHA成分であることがまず確認された。

マウス、モルモット、豚等でのこの抗原の有効性をさらに検討したところ、CFAのHA抗原(HA価256~512倍)とオイルアジュバントで調整した試作ワクチンでは、有意な感染防御能とHI抗体価の上昇が認められた。

以上のような過程を経て、ARCVの形状がほぼ確立された。ARCVは91年1月より製造販売されている。主として母豚にワクチン注射して高いHI抗体を初乳に含有させ、子豚に受身免疫を賦与する用法で野外では広く応用されている。野外で使われてから未だ日が浅いが徐々にコンポーネントワクチンの利点、弱点が明らかになってきた。

○省力化：このワクチンの母豚への注射量は1 mlで、従来のワクチン（B. bronchの不活化菌体のアルミニウムゲルワクチン）の10 mlまたは、5 mlと比較すると注射作業が容易であること。ワクチネーションプログラムは初めての豚に対しては、交配時、分娩前30～40日の2回、次回妊娠からは分娩前の1回のみ、従来のワクチンでは、150日齢、交配、分娩前の3回、次回分娩でも交配、分娩の2回である。一般に母豚候補豚は5～7産するといわれているので、仮に5産と計算すると、コンポーネントワクチンでは注射が6回、従来のワクチンでは11回となる。しかも従来ワクチンの場合、濃厚汚染ファームでは、子豚に対し離乳期まで数回カナマイシンの噴霧接種を実施していると聞く。この点を考慮するとかなりの省力化になっていると判断される。

このような省力化はワクチン中に含有される有効抗原量と、オイルアジュバントのアジュバント効果により可能になった。

仮にHAで256～512倍の抗原量とすると、不活化菌体ワクチンでは 10^{12} 個/mlが必要である。これだけ多くの菌体をワクチンに調整することは困難で、特に菌体の持つ毒素（グラム陰性菌ではlipopolysaccharide;LPS）の影響があり、実際にはワクチン化は不可能である。オイルアジュバントワクチンへの応用も、LPSの影響により注射部位の反応が極めて強く出るため難しい。ここにコンポーネントワクチンの有用性が認められている。

○経済性：ARCVの製造には、培養上清液を濃縮し、蔗糖密度勾配遠心、ゲル濾過カラムクロマトによる精製工程が加味されることから、1ドースのユーザー価格が高くなることは避けられない。この点がARCVの弱点である。しかし、培養技術の改良によって、上清液のHA濃度を上昇させれば原価は下がることになる。現在この努力が技術的になされている。

○安全性：コンポーネントは、菌体を含む培養液と比較すると、菌体毒素や菌体外毒素が除かれているため、モルモットやマウスの致死性、局所の硬結及び腫脹、発熱等の副反応は数段改善されている。しかし、それ自身免疫原性が極めて弱いため一般的にはアジュバントが必要なる。オイルアジュバントは有効であるが、一面注射局所の反応があり、特に炎症反応として特有の壊死、オイルシストの形成、膿瘍、オイル肉芽腫の形成等が問題となる。コンポーネントワクチンの開発にはオイルアジュバントの応用技術が必要不可欠である。

ARCVはわが国で初めての本格的なコンポーネントワクチンであるが、有効性はともかく、未だ技術的に検討していく点が多々ある。実用化され野外で使われるにつれて、経済的な面と、食肉衛生の面で、又このワクチンのより省力的な用法、用量を期待して、私共の所に多くの情報がもたらされている。これらを受け止め多くの課題を解決していく道がよりよいコンポーネントワクチン開発の道と考えている。