

弱毒および強毒マレック病ウイルス感染鶏における 免疫応答に関する研究

学位論文内容の要旨

マレック病 (MD) の病態には宿主免疫応答が関与していることが示唆されている。特にMDウイルス (MDV) の増殖抑制およびMDの発症防御には細胞性免疫応答が有効であるとされているが、MDワクチンの作用機序との関連については完全には解明されていない。そこで本研究では、鶏にMDV1強毒株 (RB1B) またはMDV1の弱毒ワクチン株 (CVI988)、あるいは両者を実験感染し、誘導される免疫応答の解析を行った。まず第1章ではマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析により、宿主免疫応答の全体像を捉えると共に重要な役割を担っていると考えられる候補遺伝子のスクリーニングを行った。続く第2章ではサイトカインおよびサイトカイン関連因子に注目した解析を、第3章では異なるT細胞受容体 (TCR) を発現する細胞集団に着目して解析を行った。各章で得られた知見を以下にまとめる。

1) MDV1強毒株攻撃鶏では、感染初期にあたる7日目には多くの宿主-病原体相互作用関連遺伝子の発現が上昇していたが、潜伏感染後期の21日目になるとMDV遺伝子量の増加にも関わらず、免疫応答が抑制されていることが示唆された。一方、ワクチン株接種対照鶏では、劇的な遺伝子発現量の変化は認められなかったが、ワクチン接種後強毒株攻撃鶏では21日目に多くの宿主-病原体相互作用関連遺伝子の発現上昇が認められ、潜伏感染期においても免疫応答が誘導されることで、MDVの再活性化を抑制していることが示唆された。

2) 強毒株攻撃後、各実験群におけるサイトカイン遺伝子およびその関連遺伝子の経時的な発現検索をリアルタイムPCR法によって行ったところ、MDV1強毒株攻撃群では感染初期に細胞性免疫応答に関連する遺伝子発現の上昇が認められたが、潜伏感染が完全に成立すると考えられる感染10-14日目には発現は減少していた。また同群では21日目にMDV遺伝子量の増加が確認され、MDVの再活性化が示唆されたが、これに対する各種サイトカイン遺伝子の発現誘導は観察されなかった。これらの結果は第1章で観察された免疫応答の全体像と一致した。一方、ワクチン接種鶏では、強毒株攻撃の有無に関わらず様々な遺伝子発現が変動を示し、免疫応答の誘導が示唆された。特にワクチン接種後攻撃鶏では、攻撃後10日目においてインターフェロン (IFN) γ の一過性発現増加が認められた。各群鶏のマイトージェン刺激下での脾臓細胞におけるIFN- γ 産生量をEnzyme linked Immune Sorbent Assay (ELISA) 法により測定したところ、強毒株攻撃群では発現が殆ど認められなかったのに対し、ワクチン接種後攻撃群では、活発なIFN- γ 産生が検出された。また同群ではIFN- γ 受容体2やIFN regulatory factor-3の発現上昇も認められ、

MDV遺伝子量も終始検出限界以下か検出されても非常に低い値であったため、ワクチン接種によるMD防御において、潜伏感染期のIFN- γ 発現重要な役割を担っている可能性が示唆された。

3) 第1章の結果から、TCR1細胞がワクチン接種によるMD発症防御機構に関与している可能性が示唆されたため、その詳細について検討した。その結果、ワクチン接種後攻撃群において、強毒株の潜伏感染後期にCD8 α 鎖を強発現しているTCR1⁺細胞 (CD8 α ^{high} TCR1⁺細胞) が特異的に誘導されている可能性が示唆された。またこの細胞集団におけるMDV潜伏感染率は低く、TCR2⁺細胞の産生したIFN- γ による何らかの作用を受けていることが示唆された。その機能の詳細については明らかにされなかったが、CD8 α ^{high} TCR1⁺細胞がMDワクチン接種によるMD発症防御の一端を担っている可能性が強く示唆された。

MDワクチン接種によるMD発症防御には様々な因子が関与し、その機構は非常に複雑である。本研究において、潜伏感染後期におけるMDV再活性化の抑制に関して、IFN- γ およびCD8 α ^{high} TCR1⁺細胞が重要な役割を担っている可能性が示唆された。これはMDワクチン作用機序に関する新しい知見であり、MDワクチン作用機序の免疫学的観点からの解明、および安全かつ効果的な新しいMDワクチンの作製に貢献し得る研究結果であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	大橋	和彦
副査	教授	堀内	基広
副査	准教授	今内	覚
副査	名誉教授	小沼	操

学位論文題名

弱毒および強毒マレック病ウイルス感染鶏における 免疫応答に関する研究

マレック病(MD)は、非病原性あるいは弱毒マレック病ウイルス(MDV)を用いた生ワクチンにより制御されている。MDの発症防御には細胞性免疫応答が有効であるとされているが、MDワクチンの作用機序との関連については解明されていない。本研究では、MDV強毒株や弱毒ワクチン株に感染した鶏で誘導される免疫応答の解析を行った。まずマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析により、重要な役割を担うと考えられる候補遺伝子の探索を行った。そしてその中でサイトカインおよびサイトカイン関連因子や異なるT細胞受容体(TCR)を発現する細胞集団に着目して解析を行った。

MDV強毒株攻撃鶏では、感染初期(7日目)に多くの宿主-病原体相互作用関連遺伝子の発現が上昇していたが、潜伏感染後期(21日目)には、MDVの再活性化にも関わらず、免疫応答が抑制されていた。一方、ワクチン株接種鶏では、劇的な遺伝子発現量の変化は認められず、ワクチン接種後強毒株攻撃鶏では、潜伏感染期においても多くの宿主-病原体相互作用関連遺伝子の発現が上昇し、MDV再活性化が抑制されていることが示された。

次にリアルタイムPCR法により、MDV強毒株攻撃後のサイトカインおよびその関連遺伝子の経時的な発現検索を行った。強毒株攻撃鶏では、感染初期に細胞性免疫応答に関連する遺伝子の発現が上昇していたが、潜伏感染期の10-14日目には減少し、MDVの再活性化(21日目)に対する各種サイトカイン遺伝子の発現誘導は観察されなかった。しかしワクチン接種鶏では、強毒株攻撃の有無に関わらず様々な遺伝子発現が変動を示し、免疫応答の誘導が示唆された。特にワクチン接種後攻撃鶏では、10日目でインターフェロン(IFN)- γ の一過性発現増加がみられた。さらにマイトージェン刺激下の脾臓細胞におけるIFN- γ 産生量を測定したところ、強毒株攻撃鶏では発現しなかったのに対し、ワクチン接種後攻撃鶏では、活発なIFN- γ 産生およびIFN- γ receptor 2やIFN regulatory factor-3の発現上昇が認められた。以上より、潜伏感染期におけるIFN- γ 発現が、ワクチンによる防御に重要な役割を担っている可能性が示唆された。さらにTCR1細胞($\gamma\delta$ 型TCR⁺T細胞)の役割を検討した結果、ワクチン接種後攻撃鶏において、強毒株の潜伏感染後期にCD8 α 鎖を強発現するTCR1細胞(CD8 α^{high} TCR1細胞)が特異的に誘導される可能性が示された。またこの細胞集団ではMDV感染率が低く、TCR2細胞($\alpha\beta$ 型TCR⁺T細胞)が産生したIFN- γ による作用を受けていることが示され、TCR1細胞もワクチンによるMD発症防御の一端を担っている可能性が強く示唆された。

以上より、ワクチンによるMD発症防御機構のひとつとして、IFN- γ およびTCR1細胞が潜伏感

染後期における MDV 再活性化の抑制に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

MD ワクチンによる防御機構の詳細は不明であるが、本研究により、IFN- γ および TCR1 細胞による MDV 再活性化の抑制という知見が得られ、MD ワクチン作用機序の免疫学的観点からの解明やより効果的な新規 MD ワクチンの作製に貢献し得ると考える。よって、審査委員一同は、加納里佳君の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。