

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

Development of vaccines against bacterial pathogens difficult to prevent

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-09-16 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 加藤, 豪司 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1962

1 魚類細胞内寄生性細菌に対するワクチンの開発^a

2 加藤豪司

3 東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科

4

5 Development of vaccines against bacterial pathogens difficult to prevent

6 GOSHI KATO

7 *The Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine*

8 *Science and Technology, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan*

9

10 Tel : 81-3-5463-0462.

11 E-mail : gkato00@kaiyodai.ac.jp

12 ^a 受賞題目：防除が難しい魚類細菌性感染症に対するワクチンの開発

13

14

15

16

17

18

19 1. はじめに

20 2000年にブリのビブリオ病およびレンサ球菌症不活化混合ワクチンが市販化
21 されたことにより、わが国の養殖生産における魚病被害額はそれまでの半分以
22 下に抑えられるようになった。¹⁾ これまでに9種類の病原体に対する17種類の
23 水産用ワクチンが承認されており、魚病被害の軽減に貢献している。²⁾ しかしな
24 がら、これらの水産用ワクチンはすべてが病原体をホルマリン等で不活化した
25 不活化ワクチンであり、近年では不活化ワクチンでは予防が難しい細胞内寄生
26 性細菌による感染症の被害率が大きくなっている。一般的に、不活化ワクチンは
27 宿主の液性免疫応答を誘導し、抗原特異的な抗体の産生を促進する。抗体は病原
28 体表面の抗原物質を認識して結合し、病原体の感染力を奪う(中和抗体)か、食
29 食細胞による病原体の貪食を促進する(オプソニン化)。しかし、細胞内寄生性
30 細菌は宿主の細胞内に寄生するため、抗体は病原体までアクセスすることがで
31 きない。このため、細胞内寄生性病原体に対しては、感染細胞を除去する細胞障
32 害性T細胞(CTL)など、抗原特異的な細胞性免疫の誘導が必要である。筆者ら
33 は、これまでに、魚類に病原性を有する細胞内寄生性細菌 *Mycobacterium* sp.、
34 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Pdp*) および *Nocardia seriolae* に対して、
35 細胞性免疫応答を効果的に惹起できるワクチンの開発を行ってきた。

37 2. *Mycobacterium* sp.に対するワクチンの開発

38 細胞内寄生性細菌の *Mycobacterium* sp.を原因とするミコバクテリウム症は
39 1985年に発生³⁾して以降、ブリ属魚類養殖に対して経済的な被害を与え続けて
40 いる。本菌は試験管内においてリファンピシンに対して感受性を示すが、⁴⁾ 感
41 染魚にこれを投与しても治療効果は得にくい。⁵⁾ *Mycobacterium* sp.は、人畜共
42 通病原体 *M. marinum*、ウシ型結核菌 *M. bovis* およびヒト結核菌 *M. tuberculosis*
43 などと近縁であり、主要抗原である Ag85 複合体はそれぞれの種間で高いアミ
44 ノ酸同一率を示す。⁶⁾ このように *Mycobacterium* 属細菌は種間で高い抗原交差
45 性を示し、ヒトの肺結核に対する弱毒生ワクチン *M. bovis* Bacillus Calmette and
46 Guèrin (BCG) は、結核菌以外にも *M. leprae*、⁷⁾ *M. ulcerans*⁸⁾に対しても感染防
47 御効果を示すことが報告されている。そこで筆者らは、カンパチの
48 *Mycobacterium* sp.感染症に対する BCG ワクチンの感染防御効果について研究を
49 行った。弱毒化菌株である BCG をカンパチに接種すると、その体内菌数は時
50 間経過に伴い減少していくことから、BCG ワクチンはカンパチに対して病原性
51 を示さないことがわかった。また、BCG 接種後 4 週間目に *Mycobacterium* sp.に
52 よる感染実験を行ったところ、BCG ワクチン接種魚は対照試験区 (PBS 接種
53 区) よりも生存時間が長くなり、最終的な死亡率も低く抑えられた。攻撃菌で
54 ある *Mycobacterium* sp.の増殖も BCG 接種魚では抑えられていることがわか

55 り、BCG ワクチンはカンパチの *Mycobacterium sp.* に対して感染防御効果を有す
56 ることが示された。⁶⁾

57 哺乳類では、BCG 接種や結核菌への感染履歴をツベルクリン検査により調べ
58 ることができる。ツベルクリン反応は、抗原特異的な細胞性免疫応答により誘
59 導される遅延型アレルギー反応 (Delayed-type hypersensitivity: DTH) の一つで
60 あり、メモリーTh1 細胞により分泌されるサイトカイン IFN- γ が重要な働きを
61 担っている⁹⁾。そこで、BCG 接種により誘導される魚類の免疫応答を解析する
62 ために、魚類の DTH 応答について研究を行った。*Mycobacterium sp.* の培養上清
63 から精製したタンパク質 (Purified protein derivative: PPD) を抗原液として BCG
64 接種したヒラメに投与し、PPD 投与後の免疫応答をマイクロアレイ法により解
65 析した。*Mycobacterium sp.* の不活化菌体を接種した対照試験区では、PPD 接種
66 後に発現上昇する免疫関連遺伝子はほとんど観察されなかった。一方で、BCG
67 接種した魚では PPD 接種してから 24 時間後に、IFN- γ 、IL-1 β 、TNF α 、MHC
68 class II および MIP3 α などの哺乳類の DTH において重要な役割を果たす遺伝子
69 の発現上昇が観察された。¹⁰⁾ これらのことから、魚類でも BCG 接種により抗
70 原特異的な細胞性免疫が誘導され、*Mycobacterium sp.* に対する感染防御効果が
71 得られることがわかった。さらに、IFN- γ などの遺伝子発現レベルを指標とす
72 れば、魚類でも DTH を利用した細胞性免疫応答の評価が可能であることが示

73 された。¹¹⁻¹²⁾

74

75 3. *Pdp* に対する DNA ワクチンの開発とコドン使用頻度の最適化

76 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* による類結節症はブリ、¹³⁻¹⁴⁾ ヒラメ¹⁵⁾

77 をはじめ様々な魚種で発生しており、世界中の魚類養殖で問題となっている。

78 *Pdp* は宿主のマクロファージ内で生存・増殖することができる細胞内寄生性の

79 病原細菌である。¹⁶⁾ 本症に対しては、油性アジュバント添加ホルマリン不活化

80 ワクチンの有効性が示されており、現在日本でも水産用医薬品として使用され

81 ている。¹⁷⁾

82 DNA ワクチンは病原体の抗原遺伝子を発現ベクターに組み込んだプラスミド

83 DNA であり、接種すると宿主の体内で抗原遺伝子が転写・翻訳され、免疫系に

84 認識される。まず、翻訳された抗原は、それを発現した細胞の MHC class I 分

85 子により抗原提示され、抗原特異的な CTL を誘導する。¹⁸⁾ さらに、発現細胞

86 から分泌された抗原は B 細胞により認識され、抗原特異的な抗体の産生を誘導

87 する。¹⁸⁾ このように、DNA ワクチンは細胞性免疫応答および液性免疫応答の

88 両者を効率よく誘導できる優れたワクチン技術である。しかし、DNA ワクチン

89 の有効性を制限する要因として抗原遺伝子と宿主動物のコドン使用頻度の差異

90 が挙げられる。例えば、真核生物であるブリではアルギニンを指定するコドン

91 として AGA (31%) および AGG (29%) を主に使用するが、原核生物である
92 *Pdp* では CGU (24%) および CGC (26%) を主に使用する (Codon Usage
93 Database : <http://www.kazusa.or.jp/codon/>)。これらのコドン使用頻度の違いか
94 ら、抗原遺伝子を効率よく発現できず、ワクチン有効性が制限されてしまうと
95 考えられている。実際に、哺乳類では抗原遺伝子のコドン使用頻度を宿主のコ
96 ドン使用頻度に最適化することで、DNA ワクチンの感染防御効果を改善できる
97 ことが報告されている。¹⁹⁻²¹⁾

98 このような背景から、*Pdp* の抗原遺伝子 PPA1²²⁾をコードした DNA ワクチン
99 pPPA1^{wt} および PPA1 のコドン使用頻度を魚類に最適化した DNA ワクチン
100 pPPA1^{opt} を作製し、各ワクチンの *Pdp* に対する感染防御効果を検討した。ま
101 ず、pPPA1^{wt} または pPPA1^{opt} をヒラメの筋肉内に注射投与し、投与後 3 日目お
102 よび 7 日目の投与部位における各遺伝子の転写レベルおよび発現レベルを解析
103 した。その結果、各 DNA ワクチン間で抗原遺伝子の転写レベルに差異は認め
104 られなかったものの、抗原タンパク質の発現レベルは pPPA1^{opt} 接種区で有意に
105 高くなることがわかった。続いて、これら DNA ワクチンによる細胞性免疫応
106 答の誘導を確認するために、DNA ワクチン接種魚の *Pdp* 抗原に対する DTH 応
107 答の有無を解析した。その結果、pPPA1^{wt} 接種区の IFN- γ および IL-1 β の遺伝子
108 発現レベルは、pPPA1^{opt} 接種区よりも有意に高くなっており、コドン最適化に

109 より細胞性免疫応答が強く惹起されることが示唆された。また、*Pdp* に対する
110 凝集抗体価も pPPA1^{opt} 接種区では pPPA1^{wt} 接種区よりも高くなっており、コード
111 ン使用頻度の最適化により液性免疫の誘導能も強化されることがわかった。
112 *Pdp* による感染実験では対照試験区のベクターDNA 投与区の最終的な生残率が
113 8%であったことに対し、pPPA1^{opt} 接種区では 91%、および pPPA1^{wt} 接種区では
114 69%となり両 DNA ワクチンの感染防御効果が示された。²³⁾ これらの研究成果
115 から、PPA1 遺伝子を用いた DNA ワクチンが *Pdp* による類結節症に対して有効
116 であること、およびコドン最適化により魚類でも DNA ワクチンの有効性が向
117 上することがわかった。

118

119 4. *Nocardia seriolae* に対する DNA ワクチンの開発

120 *Nocardia seriolae* はグラム陽性、弱抗酸性の放線菌であり、ブリ、カンパチ
121 ²⁴⁾ およびヒラメ ²⁵⁾ に対して病原性を示す。本菌によるノカルジア症は、わが
122 国で最も生産量の多いブリ属魚類の養殖で多発しており、近年ではもっとも被
123 害額の大きな感染症の一つになっている。スルファモノメトキシシンおよびスル
124 フィゾゾールナトリウムによる治療が可能である ²⁶⁻²⁷⁾ が、抗生物質および合成
125 抗菌剤を多用することは薬剤耐性菌の出現につながるため、ワクチンの開発が
126 強く求められている。ホルマリンおよび加熱処理により不活化した菌体を接種

127 しても感染防御効果が得られないことが報告されており^{24,28)}、未だ効果の高い
128 ワクチンは開発されていない。*N. seriolae* に一度感染し耐過した個体（感染耐
129 過魚）は、再攻撃に対して強い抵抗性を示す。²⁹⁾ また、*N. seriolae* の培養上清
130 から PPD を精製して感染耐過魚に投与すると DTH 応答が誘導されることか
131 ら、本菌の排除には抗原特異的な細胞性免疫応答が重要な役割を果たすことが
132 示唆されている。¹²⁾

133 *Nocardia* 属細菌は、*Mycobacterium* 属細菌とともに *Corynebacterium* 亜目に分
134 類される。これらの細菌はワックス状の分厚い細胞壁を有しており、この細胞
135 壁を合成する酵素として *mycoryl transferase* を盛んに分泌している。³⁰⁾
136 *Mycoryl transferase* は別名 Ag85 複合体と呼ばれており、宿主動物の免疫応答を
137 強く誘導する主要抗原である。*Mycobacterium* 属細菌による感染症に対して
138 は、Ag85 複合体を抗原として用いた DNA ワクチンが哺乳類および魚類で開発
139 されている。³¹⁻³²⁾ そこで、まず、縮重プライマーを用いて *N. seriolae* の Ag85
140 複合体遺伝子のクローニングを行ったところ、362 アミノ酸をコードする 1,086
141 bp の *N. seriolae* の Ag85 様遺伝子 (Ag85L) を得ることができた。次いで、本
142 遺伝子を連結した発現プラスミド pAg85L^{wt} およびそのコドン使用頻度を魚類に
143 最適化した pAg85L^{opt} を作製した。これらをカンパチに投与して *N. seriolae* に
144 よる感染実験を行ったところ、対照試験区とした PBS 接種区の最終的な生残率

145 が 51%であったのに対し、pAg85L^{wt}接種区では 88%および pAg85L^{opt}接種区で
146 は 98%の魚が生残した。また、これら DNA ワクチンを接種したカンパチで
147 は、攻撃後で *N. seriolae* の体内増殖が抑えられており、ワクチン接種魚ではノ
148 カルジア症の症状である脾臓の肥大や結節の形成がまったく観察されなかつ
149 た。これらのことから、DNA ワクチン pAg85L^{opt} および pAg85L^{wt} は *N. seriolae*
150 に対して非常に高い感染防御効果を示すことがわかった。

151

152 5. おわりに

153 生ワクチンの水産動物への使用に対しては、病原性復帰の可能性、生ワクチ
154 ン株の伝播・増殖が水中では起こりやすいこと、および接種動物の隔離が難し
155 いことなど多くのリスクが挙げられる。生ワクチンの代替として、細胞性免疫
156 を効果的に惹起できる DNA ワクチンは非常に魅力的な技術である。この記事
157 でも紹介してきたように、DNA ワクチンは様々な魚類の感染症に対して有効性
158 が示されており、実際に 2005 年にはカナダでサケ科魚類の伝染性造血器壊死
159 症 (Infectious hematopoietic necrosis: IHN) に対する DNA ワクチンが承認され
160 た。³³⁾ DNA ワクチンとして接種された抗原遺伝子の DNA は宿主の染色体には
161 組み込まれないため、DNA ワクチン接種動物は遺伝子組換え動物にはあたらない。
162 い。³⁴⁾ わが国でも産業動物への DNA ワクチン使用に関する法整備が始まって

163 おり（農林水産省ホームページ：

164 <http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/tetuduki/>）、今後、DNA ワクチンが水産

165 用医薬品として承認されることが大いに期待される。

166

167 6. 謝辞

168 平成 27 年度日本水産学会 水産学奨励賞を受賞するにあたり、まず、大学院

169 在学中に主指導教員としてご指導賜りました東京海洋大学教授 廣野育生先生

170 に心より感謝いたします。また、東京海洋大学准教授 近藤秀裕先生ならびに

171 東京海洋大学特任教授 青木 宙先生には副指導教員としてご指導賜り、深く

172 感謝の意を表します。東京海洋大学大学院ゲノム科学研究室の先輩諸氏、卒業

173 生、修了生の皆様方にもこの場をお借りして感謝の意を表します。学術振興会

174 特別研究員として快く私を受け入れてくださった水産総合研究センター増養殖

175 研究所病害防除部の中易千早先生、松山知正先生、坂井貴光先生、高野倫一先

176 生、佐野菜採先生、ならびに川上 穰先生に深く感謝いたします。また、研究

177 所での活動をサポートしてくださいました乙竹 充先生、前野幸男先生、森 広

178 一郎先生、栗田 潤先生はじめ、増養殖研究所病害防除部および魚病診断研修

179 センターの皆様に深く感謝の意を表します。同特別研究員として 1 年間という

180 短い間でしたが、私を快く受け入れてくださり公私に渡り海外生活を支えてく

181 ださったドイツ Friedrich-Loeffler-Institut の Uwe Fischer 博士、山口卓哉博士、
182 Susann Schares 氏、Veronica Soto Lampe 氏、ならびに Gabriel Czerwinski 氏に深
183 く感謝いたします。最後に、水産学奨励賞に私を推薦してくださった東京海洋
184 大学教授 佐野元彦先生、増養殖研究所 乙竹 充先生、ならびに本選考に関わ
185 ってくださった先生方に深く感謝の意を表します。

186

187 7. 参考文献

- 188 1) 中西照幸, 乙竹 充. 「水産用ワクチンハンドブック」恒星社厚生閣, 東
189 京, 2009.
- 190 2) 水産用医薬品の使用について 第 29 報. 消費・安全局 畜水産安全管理課,
191 東京, 2016.
- 192 3) Kusuda R, Kawakami K, Kawai K. A fish-pathogenic *Mycobacterium* sp. Isolated
193 from an epizootic of cultured yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1987; **53**:
194 1797-1804.
- 195 4) Kawakami K, Kusuda R. In vitro effect of some chemotherapeutics on the causative
196 of mycobacterium infection in yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1989; **55**: 2111-
197 2114.
- 198 5) Kawakami K, Kusuda R. Efficacy of rifampicin, streptomycin and erythromycin

- 199 against experimental mycobacterium infection in cultured yellowtail. *Nippon*
200 *Suisan Gakkaishi* 1990; **56**: 51-53.
- 201 6) Kato G, Kato K, Saito K, Pe Y, Kondo H, Aoki T, et al. Vaccine efficacy of
202 *Mycobacterium bovis* BCG against *Mycobacterium* sp. infection in amberjack
203 *Seriola dumerili*. *Fish Shellfish. Immunol.* 2011; **30**: 467-472.
- 204 7) Ponninghaus JM, Fine PE, Sterne JA, Wilson RJ, Msosa E, Gruer PJ, Jenkins PA,
205 Lucas SB, Liomba NG, Bliss L. Efficacy of BCG vaccine against leprosy and
206 tuberculosis in northern Malawi. *Lancet* 1992; **339**: 636-639.
- 207 8) Portaels F, Aguiar J, Debacker M, Steunou C, Zinsou C, Guedenon A, Meyers WM.
208 Prophylactic effect of *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against osteomyelitis
209 in children with *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer). *Clin. Diagn. Lab.*
210 *Immunol.* 2002; **9**: 1389-1391.
- 211 9) Black CA. Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic
212 perspective. *Dermatol Online J* 1999; **5**: 7. (Accessed on April 10, 2016)
213 <http://dermatology-s10.cdlib.org/DOJvol5num1/reviews/black.html>.
- 214 10) Kato G, Kondo H, Aoki T, Hirono I. BCG vaccine confers adaptive immunity
215 against *Mycobacterium* sp. infection in fish. *Dev Comp Immunol* 2010; **34**: 133-
216 140.

- 217 11) Kato G, Kondo H, Aoki T, Hirono I. A novel immune-related gene, microtubule
218 aggregate protein homologue, is up-regulated during IFN- γ -related immune
219 responses in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Dev Comp Immunol* 2012;
220 **36**: 349-358.
- 221 12) Kato G, Kondo H, Aoki T, Hirono I. *Mycobacterium bovis* BCG vaccine induces
222 non-specific immune responses in Japanese flounder against *Nocardia seriolae*.
223 *Fish Shellfish Immunol.* 2012; **33**: 243-250.
- 224 13) Kubota S, Kimura T, Egusa S. Studies of a bacterial tuberculosis of yellowtail:
225 1. Symptomatology and histopathology. *Fish Pathol.* 1970; **4**: 111-118.
- 226 14) Kusuda R, Yamaoka M. Etiological studies on bacterial pseudotuberculosis in
227 cultured yellowtail with *Pasteurella piscicida* as the causative agent: I. On the
228 morphological and biochemical properties. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1978; **38**:
229 1325-1332.
- 230 15) Fukuda Y, Matsuoka S, Mizuno Y, Narita K. *Pasteurella piscicida* infection in
231 cultured juvenile Japanese flounder. *Fish Pathol.* 1996; **31**: 33-38.
- 232 16) Elkamel AA, Hawke JP, Henk WG, Thune RL. *Photobacterium damsela* subsp.
233 *piscicida* is capable of replicating in hybrid striped bass macrophages. *J. Aquat.*
234 *Anim. Health* 2003; **15**: 175-183.

- 235 17) Gravningen K, Sakai M, Mishiba T, Fujimoto T. The efficacy and safety of an oil-
236 based vaccine against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in yellowtail
237 (*Seriola quinqueradiata*): a field study. *Fish Shellfish Immunol.* 2008; **24**: 523-529.
- 238 18) Whitton JL, Rodriguez J, Zhang J, Daniel E, Hasset E. DNA immunization:
239 mechanistic studies: a review. *Vaccine* 1999; **17**: 1612-1619.
- 240 19) Narum DL, Kumar S, Rogers WO, Fuhrmann SR, Liang H, Oakley M, Taye A, Sim
241 BK, Hoffman SL. Codon optimization of gene fragments encoding *Plasmodium*
242 *falciparum* merozoite proteins enhances DNA vaccine protein expression and
243 immunogenicity in mice. *Infect. Immun.* 2001; **69**: 7250-7253.
- 244 20) Stratford R, Douce G, Zhang-Barber L, Fairweather N, Eskola J, Dougan G.
245 Influence of codon usage on the immunogenicity of a DNA vaccine against tetanus.
246 *Vaccine* 2000; **19**: 810-815.
- 247 21) Ko HJ, Ko SY, Kim YJ, Lee EG, Cho SN, Kang CY. Optimization of codon usage
248 enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding mycobacterial antigen
249 Ag85B. *Infect. Immun.* 2005; **73**: 5666-5674.
- 250 22) Hirono I, Kato M, Aoki T. Identification of major antigenic proteins of *Pasteurella*
251 *piscicida*. *Microb. Pathog.* 1997; **23**: 371-280.
- 252 23) Kato G, Yamashita K, Kondo H, Hirono I. Protective efficacy and immune

- 253 responses induced by a DNA vaccine encoding codon-optimized PPA1 against
254 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in Japanese flounder. *Vaccine* 2015; **33**:
255 1040-1045.
- 256 24) Kusuda R, Nakagawa A. Nocardial infection of cultured yellowtail. *Fish Pathol.*
257 1978; **13**: 25-31.
- 258 25) Kudo T, Hatai K, Seino A. *Nocardia seriolae* sp. nov. causing nocardiosis of
259 cultured fish. *Int. Syst. Bacteriol.* 1988; **38**: 173-178.
- 260 26) Itano T, Kawakami H. Drug susceptibility of recent isolates of *Nocardia seriolae*
261 from cultured fish. *Fish Pathol.* 2002; **37**: 152-153.
- 262 27) Ismail TF, Nakamura A, Nakanishi K, Minami T, Murase S, Yanagi T, Itami T,
263 Yoshida T. Modified resazurin microtiter assay for *in vitro* and *in vivo* assessment
264 of sulfamonomethoxine activity against the fish pathogen *Nocardia seriolae*. *Fish*
265 *Sci.* 2012; **78**: 351-357.
- 266 28) Shimahara Y, Yasuda H, Nakamura A, Itami T, Yoshida T. Detection of antibody
267 responses against *Nocardia seriolae* by enzyme-linked immunosorbent assay
268 (ELISA) and a preliminary vaccine trial in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *B.*
269 *Eur. Assoc. Fish Pathol.* 2005; **25**: 270-275.
- 270 29) Itano T, Kawakami H, Kono T, Sakai M. Live vaccine trials against nocardiosis in

271 yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture* 2006; **261**: 1175-1180.

272 30) Tang X, Deng W, Xie J. Novel insights into Mycobacterium antigen Ag85 biology
273 and implications in countermeasures for *M. tuberculosis*: a review. *Crit. Rev.*
274 *Eukaryot. Gene Expr.* 2012; **22**; 179-187.

275 31) Denis O, Tanghe A, Palfliet K, Jurion F, van den Berg TP, Vanonckelen A, Ooms J,
276 Saman E, Ulmer BJ, Content J, Huygen K. Vaccination with plasmid DNA
277 encoding mycobacterial antigen 85A stimulates CD4+ and CD8+ T-cell epitopic
278 repertoire broader than that stimulated by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv
279 infection. *Infect. Immun.* 1998; **66**: 1527-1533.

280 32) Pasnik DJ, Smith SA. Immunogenic and protective effects of a DNA vaccine for
281 *Mycobacterium marinum* in fish. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2005; **103**: 195-206.

282 33) Salenius K. The road to licensure of a DNA vaccine. *Curr. Top. Invest. Drugs* 2007;
283 **8**: 635-641.

284 34) Report of the OIE/FAO/WHO meeting on the assessment of food safety related to
285 the use of recombinant vaccines in food-producing animals, 2010, Paris, 18 -19
286 January
287