

NIBS LETTER 2008 NOVEMBER
No. 553

日 生 研 報

2008年(平成20年)11月号 第54巻第6号(通巻553号)

挨拶・巻頭言

日本の畜産を支える獣医学：家畜感染症
の制御……………土井邦雄(2)

獣医病理学研修会

第47回 No. 944 イヌの眼球
……………鳥取大学(3)

第47回 No. 945 ウマの足根関節(飛節)
内腫瘍……………JRA 総研(4)

レビュー

トキソプラズマ原虫感染症に対する新規組
換えワクチンの開発……………玄 学南(5)

メタボリックシンドロームと実験モデル
の利用……………長谷川 也須子(8)

お知らせ

学会発表演題……………(12)



NIBS

財団法人 日本生物科学研究所

NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE

<http://nibs.lin.go.jp/>

日本の畜産を支える獣医学：家畜感染症の制御

土井邦雄

大学在職中は実験的脳心筋炎ウイルス感染症をはじめとする所謂“実験病理学”を生業とし、有能な同僚と優秀な学生に恵まれて自由気儘に過ごすことが出来た。その一方で、日本獣医学会等学会活動は兎も角、農林水産省獣医事審議会、畜産振興審議会（途中で食料・農業・農村政策審議会に改称）等に否応なく組み込まれ、畜産行政・家畜衛生行政の一端を垣間見ることもあった。

欧米、特に欧州の獣医学は家畜を対象にその長い歴史を刻んで来たが、日本では第二次大戦の終結を機に、それ以前の軍馬中心の獣医学から家畜を対象とする獣医学へと転換した、とは良く言われることである。それが今では家畜からさらに伴侶動物へと大きく傾斜している。その背景には、高齢化社会に“癒し”をもたらす存在としての伴侶動物の需要が急増した事実があると考えられる。獣医学教育の場でも、臨床学、感染病学、病理学等の各論の領域で伴侶動物の比重が増加し、その傾向は特に臨床学で顕著である。伴侶動物への傾斜は欧米でも認められるが、欧米では同時に、畜産を支える獣医学本来の姿勢に些かの揺るぎもないように見受けられる。最近、日本の獣医学は、上述したように伴侶動物医療を一方の極とし、その一方の極では比較生物学を基盤に生命科学としての色彩を一段と強め、種々の学際領域に進出している。それはそれで結構なことだが、日本の獣医学の将来を考えると、公衆衛生分野での獣医学の重要性をもっと強く社会にアピールし、また、“畜産を支える獣医学”の在り方を今一度真剣に考えてみるべきであろう。

ところで、畜産と言えば、JICA プロジェクトで訪れた晩秋のアルゼンチンのパンパの佇まいが、魅惑的なブエノスアイレスの夜の情景とともに、今も脳裏に焼き付いている。見渡す限り遮るものとて殆どないパンパの遠く近くに牛の群れが草を食み、よく見ると路傍には牛の白骨が無造作に転がっている。夕暮ともなると、彼方の朱色に染まる夕焼け空を名も知らぬ鳥のシルエットが風に流され、その下に点在している牛の群れが瞬間に夕闇に沈んで行く。畜産の原風景に接した思いで、こうした畜産形態下では感染病よりもむしろ放牧地での繁殖障害や植物中毒の方が問題なのだという現地の専門家の話にも素直に頷けた。

翻って、国土の狭い日本の畜産は、高度の集約飼育によって収益を挙げようとする所謂“集約型畜産”が主体で、そうした飼育形態に起因する生産病の発生に加え、一度感染病が侵入したらたちどころに甚大な被害を蒙る危険性を必然的に内包している。従って、日本の脆弱な畜産業を支え、畜産物自給率を一定水準で維持するには、畜産行政上の適切な施策に加え、生産病および特に家畜感染症の制御が家畜衛生行政の要であり、同時に獣医学の重要課題の一つであることを再確認すべきである。日本ではこの10年間に、それまで長い年月にわたって発生を見なかった牛の口蹄疫および高病原性鳥インフルエンザの発生に遭遇し、国民の大きな関心事となった。今回は幸い迅速な対応により、未解決の課題を残しながらも早期に收拾出来たが、同様な事態は今後も十分起こり得る。一方で、日本には未だ制御されていない家畜感染症（例えば、牛白血病、ヨーネ病、豚繁殖・呼吸障害症候群、鶏大腸菌病等々）が相当数常在しており、これらがボディーブローみたいに家畜の生産性に影響を及ぼしている。従って、家畜衛生行政担当者および獣医学関係者は、国民の関心を引く“華々しい”感染症に過度に引き摺られることなく、上述したような一見地味な感染症の制御にも日頃から堅実に取り組んで行く姿勢が大切であろう。

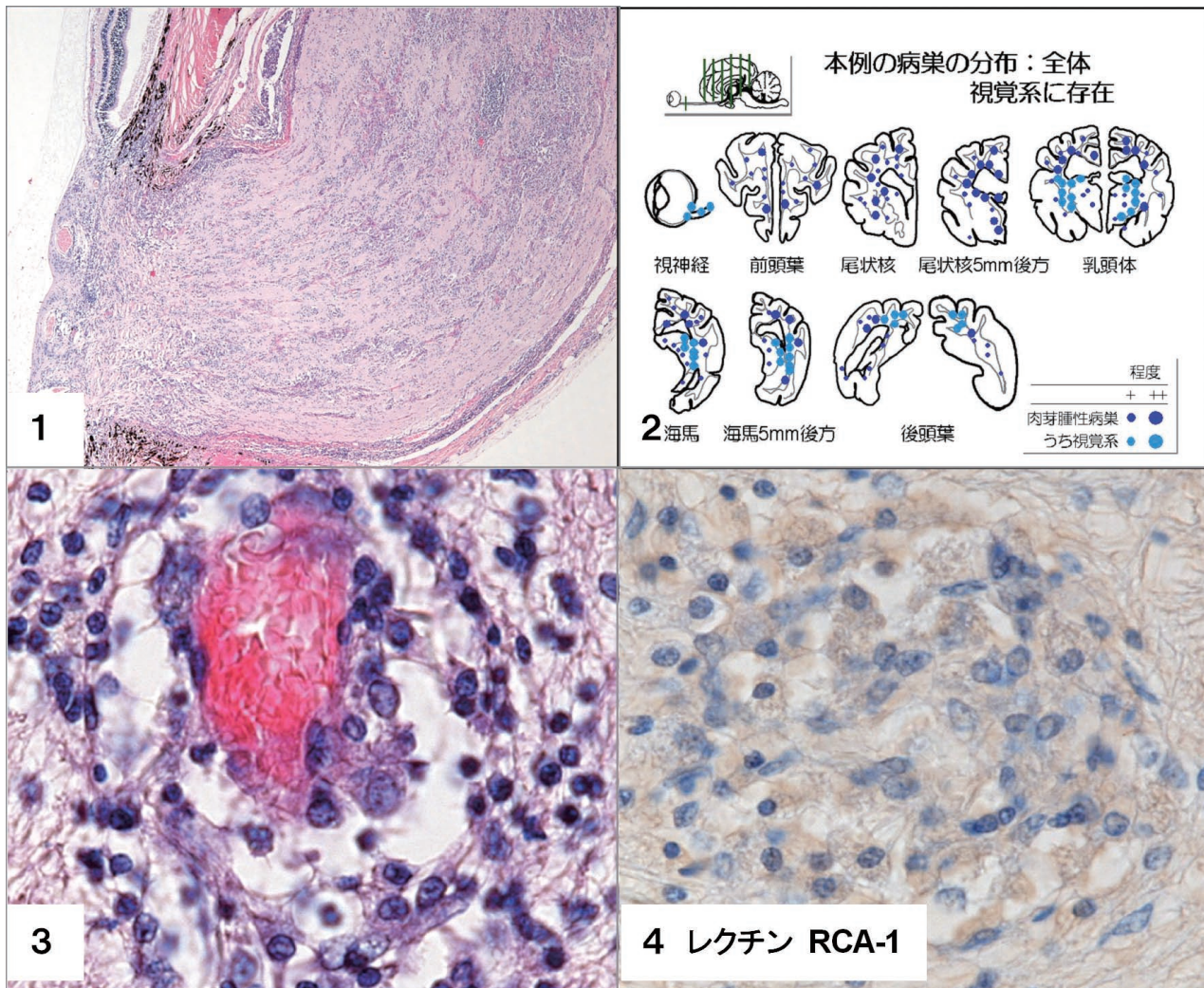
我々はまた最近、牛伝染性海綿状脳症（BSE）の発生をも経験した。BSEの発生は、家畜衛生・畜産物安全性が公衆衛生上の問題としてまさしく国家レベルで大きくクローズアップされた最初の出来事で、これを契機に食品安全委員会が設立された意義は大きい。同時に、家畜衛生行政の重要性が強く認識され、この職域の拡充が図られたことは、欧米に比べて遅きに失したとは言え、歓迎すべきことである。一方、BSEの発生は、国民の受け止め方という点で、本来科学的判断に基づく“安全”と理屈抜きの信頼に基づく“安心”との乖離を浮き彫りにし、適切なリスクコミュニケーションの重要さと困難さをともに示す格好となり、今後に貴重な教訓を遺した。

最後に、上述したような我が国における家畜感染症の現状を踏まえ、家畜感染症の制御を目的として設立され、これまで数々の実績をあげて来た日生研の将来展望や如何に？ 新参者の私の目にも幾つかの課題が透けて見える。それらの課題を克服し、明るい未来を紡ぎ出すのは、他でもない、若い所社員諸君である。ところで、私の役割は？ 言わずと知れた若い諸君との“コミュニケーション”と“尻叩き”。

（東京大学名誉教授 日本生物科学研究所常務理事）

イヌの眼球

鳥取大学家畜病理学教室 第47回獣医病理学研修会 No. 944



動物：イヌ，トイプードル，避妊済み雌，11歳6ヵ月齢。

臨床事項：11歳4ヵ月齢時，3日前からの突然の失明を主訴に来院。左右の眼球ともに対光反射，威嚇瞬き反射，追跡運動消失。網膜誘発活動電位記録において異常が認められなかった (b/a：1.58 (R)，1.88 (L)) ことから中枢の病変を疑う。その1ヶ月後から心雑音が聴取され (心雑音レベルⅡ / Ⅵ)，さらにその1ヵ月後，重度の僧帽弁閉鎖不全 (心雑音レベルⅤ / Ⅵ) を伴う腱索の断裂に起因すると思われる急性心不全により突然死した。

剖検所見：心臓に左心室壁の肥厚および僧帽弁の短縮およびねじれを伴う部分的な肥厚が見られた。中枢神経系および眼球には著変は認められなかった。

組織所見：眼球において，視神経の重度肉芽腫性炎症 (図1)，重度瀰漫性グリオシス，網膜神経細胞の著明な脱落が認められた。大脳 (次の各レベルの冠状断：前頭葉，乳頭体，尾状核および後頭葉)，中脳，橋，小脳，延髄，脊髄 (C3，L4) などの中枢神経系全域にわたり

(図2)，視神経に認められる病変と同質的肉芽腫性病巣 (図3)，重度瀰漫性グリオシス，まれに神経細胞体の壊死，グリア結節が認められた。肉芽腫性病巣は主にリンパ球，形質細胞，組織球様細胞 (図4，レクチン RCA-1 陽性)，マクロファージから構成され，白質好性，囲管性に認められた (図3，図4)。心臓，肺において心不全を示唆する所見が認められた。

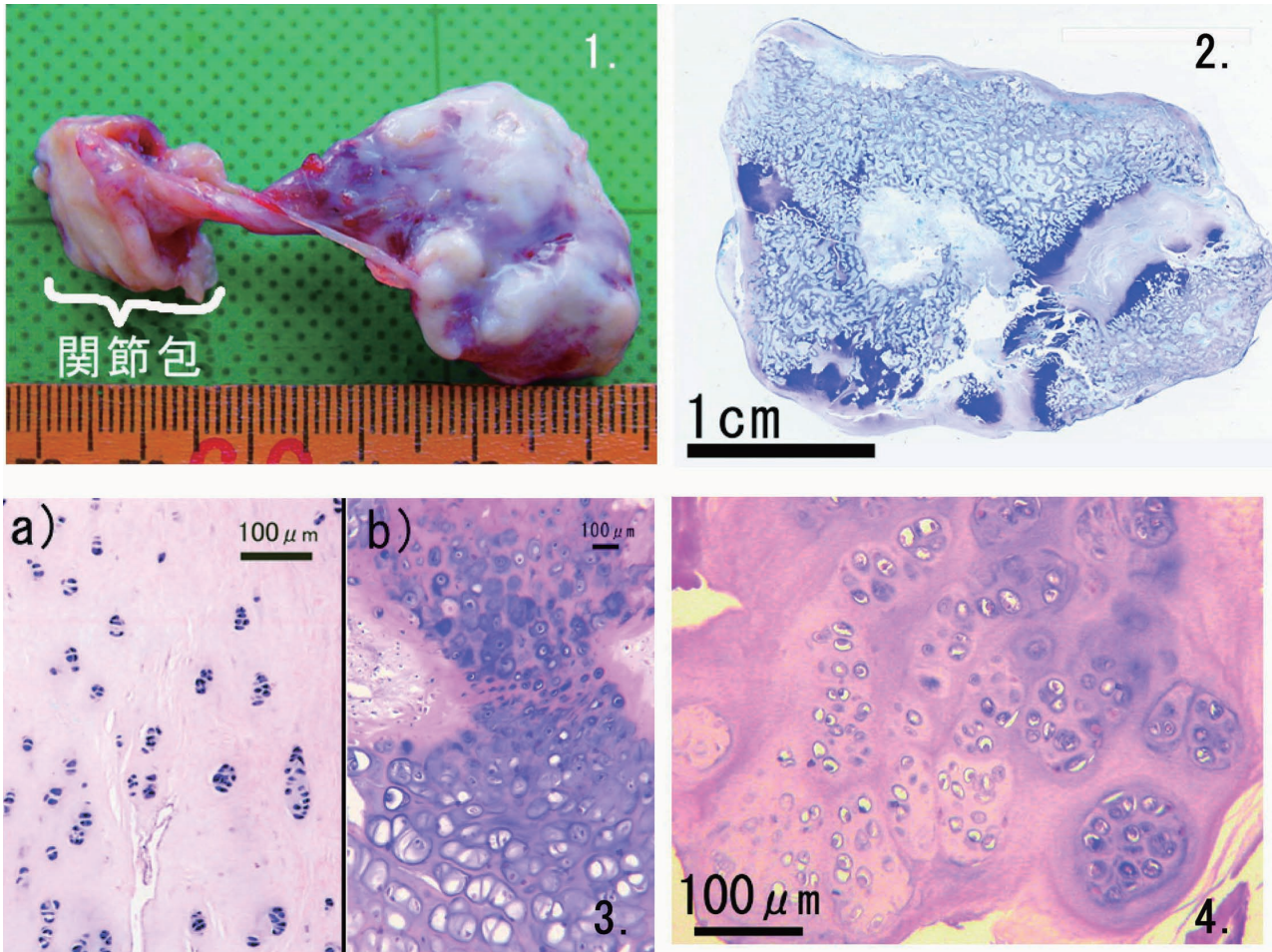
診断：肉芽腫性視神経炎および網膜神経細胞の脱落 (イヌの肉芽腫性髄膜脳脊髄炎「眼型」)

考察：イヌの肉芽腫性髄膜脳脊髄炎は，臨床症状および病変の広がりなどの特徴所見から，臨床的に「播種型」，「限局型」および「眼型」に分類されている。いずれの型も進行に伴い中枢全体に病変が広がる。本例は失明発症後，3ヶ月という短期間に急性心不全で死亡したため，視神経に初期病変が保持された「眼型」の症例として出題した。

(前原朋美・島田章則)

ウマの足根関節（飛節）内腫瘍

JRA 総研 第 47 回獣医病理学研修会 No. 945



動物：ウマ，サラブレッド，雄，6歳。放牧休養（7ヵ月）後，JRAトレーニングセンターに再入厩。

臨床事項：入厩時より，左寛跛行と関連する左足根関節（飛節）の腫脹を認めた。初診時のX線検査では，表面不整のX線不透過な増生物が飛節領域に，関節鏡検査では，足根下腿関節内を遊走する鳩卵大の関節鼠が目視で確認された。

肉眼所見：表面白色滑沢な硬結性腫瘍を足根下腿関節内の一つ，中心遠位関節内の一つ認めた。前者（図1）を提出標本としたが，これは下方で有茎性に関節包と連絡していた。その断面では，主たる構成組織は海綿骨様で，局所で血管を有する結合組織および軟骨様組織を内含し，これら腫瘍内部の軟組織は，表層数ミリを覆う結合組織および軟骨様組織と連続していた。なお，後者の腫瘍も基本的に前者と同様であった。

組織所見：肉眼的に海綿骨様に認められた硬組織は，硝子軟骨を混じる骨梁を主体とした海綿骨だった。硝子軟骨はトルイジン青染色（pH7.0）で一律に異染性を示したが（図2），ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色では弱から強好塩基性と変化に富んでいた（図3a, b）。硝子軟骨細胞は中程度の異形性を示し，軟骨円柱様構造（図3a），軟骨小嚢内に複数の軟骨細胞が密集した hypercellular cartilage lobules（図4）が認められ，chondroblasticな変化が見られた。一方，腫瘍表層は2

から3層の滑膜細胞層，その下方で増生する線維芽細胞様細胞および膠原線維，さらにその下方で発達する線維軟骨層により構成されていた。線維軟骨基質はメタクロマジーを示さなかった。また，軟骨組織では，破骨細胞による浸食，骨芽細胞による骨添加が観察された。
診断：馬の足根下腿関節に形成された孤立性滑膜性骨軟骨腫瘍

考察：形態学的特徴から，前記の病名で診断した。その形成機序は，関節包あるいはその隣接結合組織を構成する間葉系細胞の軟骨化生に始まり，何らかの刺激により軟骨細胞の増生に転機した後，軟骨内骨化による骨梁形成と盛んな骨リモデリングが骨軟骨性腫瘍をつくったと推察された。おそらく，腫瘍表層の線維軟骨および結合組織の発達には，関節炎の進行が関与している。滑膜性骨軟骨腫瘍は，関節包滑膜と連続性がある骨軟骨性腫瘍で，滑膜細胞の腫瘍ではない。一関節に多結節性に発生する傾向があるが，ヒトでは孤立性のものも認められている。ヒト2002年新WHO腫瘍分類では，新たに良性腫瘍の範疇に加えられたが，動物では分類が整理されていない。（桑野陸敏）

参考文献：

1. Hamir, A. N. *Vet. Rec.*, **137**, 293-294 (1995).
2. Mayhew, I. G. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **170**, 195-201 (1977).

トキソプラズマ原虫感染症に 対する新規組換えワクチンの開発

玄 学 南 (帯広畜産大学原虫病研究センター 遺伝生化学研究分野教授)

Development of novel recombinant vaccines against *Toxoplasma gondii* infection

Xuenan Xuan

National Research Center for Protozoan Diseases,

Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

はじめに

トキソプラズマ原虫 (*Toxoplasma gondii*) は、猫科動物を終宿主とし、人および殆どの動物を中間宿主とする細胞内寄生性原虫である。感染猫などの糞便とともに排泄されるオーシスト (虫卵) は通常の消毒薬に抵抗性が強く、食物や砂場など環境を汚染し、経口で人や他の動物に伝播していく。人では特に妊婦が感染した場合、流・死産、水頭症や脈絡網膜炎などの先天性トキソプラズマ原虫感染症を引き起こす。また、トキソプラズマ性脳炎はエイズ患者や免疫抑制剤の投与を受けている患者の主要な死因の一つでもある。豚、羊、山羊などへの感染は、直接的損耗から経済的損害になるだけでなく、シストを含む食肉が人への感染源になるために、公衆衛生・家畜衛生上の大きな問題になっている。しかしながら、いまだにトキソプラズマ原虫感染症に対する有効なワクチンは開発されていないのが現状である。トキソプラズマ原虫感染に対する宿主の防御免疫には IFN- γ を主役とする細胞性免疫が重要とされる。そこで、我々の研究室では細胞性免疫を誘導可能な組換え生ベクターワクチンの開発に取り組んでいるが、その概略について紹介する。

ヘルペスウイルスベクターを用いた 組換えワクチンの開発

1) ヘルペスウイルスベクターの特徴

ヘルペスウイルスベクターの特徴として、1) 弱毒化したウイルス株或いは市販の弱毒生ワクチン株より作製するために、ベクターウイルス自体の動物に対する安全性が十分確保されていること、2) 宿主域が非常にせまく、それぞれ固有の宿主のみに感染し、人と他の動物へ感染する危険性がないこと、3) ゲノムサイズが大きく、ベクターウイルスの増

殖に非必須な遺伝子を数多く有するために外来遺伝子の許容量が大きいこと、4) 感染防御に関わる抗原遺伝子とサイトカイン遺伝子を同時に発現させることにより、強力な細胞性免疫と液性免疫の効果が期待できること、5) 体内で持続感染するために、外来遺伝子を長期に亘って持続的に発現できること、6) 粘膜接種が可能であるために、多くの病原体の侵入門戸である消化管と呼吸器粘膜の免疫効果が期待できることなどが挙げられる。獣医学領域では、馬用としてウマヘルペスウイルス 1 型 (EHV-1) [6]; 牛用としてウシヘルペスウイルス 1 型 (BHV-1) [5]; 豚用としてオーエスキー病ウイルス (PRV) [10]; 犬用としてイヌヘルペスウイルス (CHV) [11, 12]; 猫用としてネコヘルペスウイルス 1 型 (FHV-1) [13, 14] などが開発されている。

2) トキソプラズマ原虫のワクチン抗原 TgSAG1 と TgROP2 を発現する組換えネコヘルペスウイルスの作製とワクチン効果の評価

トキソプラズマ原虫の終宿主が猫であることから、猫のトキソプラズマ原虫感染症を制御することは重要な意味をもつ。そこで、トキソプラズマ原虫の主要ワクチン候補抗原 TgSAG1 と TgROP2 を発現する組換えネコヘルペスウイルス (FHV/TgSAG1, FHV/TgROP2) を作製した。組換え FHV/TgSAG1 と FHV/TgROP2 により発現された TgSAG1 と TgROP2 の抗原性はそれぞれ特異抗体を用いて確認した。次に、FHV/TgSAG1 と FHV/TgROP2 を猫に 3 週間間隔で 2 回経鼻接種したところ、血中に高い抗 TgSAG1, TgROP2 抗体の誘導が認められた。さらに、組換え FHV/TgSAG1 と FHV/TgROP2 接種した猫にトキソプラズマ原虫にて攻撃したところ、有意な感染防御効果が得られた [1, 2]。

その他にも、我々の研究室ではネオスポラ原虫の

ワクチン候補抗原 NcSRS2 を発現する組換えイヌヘルペスウイルス (CHV/NcSRS2) やクリプトスポリジウム原虫のワクチン候補抗原 CpP23 を発現する組換えウシヘルペスウイルス (BHV/CpP23) を作製し、それぞれの抗原虫免疫効果を確認した [4, 9]。

ネオスポラ原虫ベクターを用いた組換えワクチンの開発

1) ネオスポラ原虫のベクター化

これまでに数多くのウイルスや細菌などが生ワクチン用ベクターとして開発されているが、いまだ有効な原虫ベクターは開発されていないのが現状である。ワクチン候補抗原の翻訳後の修飾を考慮すると、原虫ベクターを用いた方が、より天然型に類似した組換え抗原が作製できると考えられる。そこで、我々の研究室では試験管培養が容易で、トキソプラズマ原虫と近縁のネオスポラ原虫のベクター化を試みた。

ネオスポラ原虫をベクター化する第一歩として、薬剤耐性遺伝子と自然発光遺伝子を選択マーカーとした迅速で簡便な組換えネオスポラ原虫作製法を確立した。トキソプラズマ原虫由来のピリメタミン耐性ジヒドロ葉酸レダクターゼチミジル酸シンターゼ (DHFR-TS) 遺伝子と海洋生物由来の緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子発現ユニットの間にマルチクロニングサイト (MCS) を持つトランスファーベクター pDMG を構築した [3]。MCS に外来抗原遺伝子を挿入した pDMG プラスミドを Electroporation 法によりネオスポラ原虫に導入した後に、ピリメタミンによる薬剤選択と GFP によるカラー選択を行ったところ、目的の外来抗原遺伝子を発現する組換えネオスポラ原虫を効率よく作製することに成功した [16]。

2) トキソプラズマ原虫のワクチン抗原 TgSAG1 を発現する組換えネオスポラ原虫の作製とワクチン効果の評価

トキソプラズマ原虫の主要ワクチン候補抗原 TgSAG1 を発現する組換えネオスポラ原虫 (Nc/TgSAG1) を作製した。組換え Nc/TgSAG1 により発現された TgSAG1 の局在、分子量及び抗原性などはトキソプラズマ原虫由来の天然型 TgSAG1 に類似していることが示された。次に、Nc/TgSAG1 虫体のマウスにおける免疫原性を検討した。Nc/TgSAG1 虫体をマウスに 4 週間間隔で 2 回腹腔内接種した後に特異抗体反応を ELISA 法にて測定した

ところ、高い抗 TgSAG1 抗体の誘導が認められた。抗血清の IgG サブクラスの同定を行ったところ、IgG2a の方が IgG1 より高い値を示したことから、細胞内寄生原虫の感染防御反応に重要とされる Th1 反応が優勢であることが推察された。また、Nc/TgSAG1 虫体を接種したマウスでは、対照マウスと比べ有意に高い IFN- γ の産生が確認された。さらに、致死量のトキソプラズマ原虫にて攻撃したところ、対照群は 100% 死亡したのに対し、Nc/TgSAG1 虫体を接種した群は 80% が生存し、有意な感染防御効果が得られた [16]。

その他にも、我々の研究室ではクリプトスポリジウム原虫の CpP23 を発現する組換えトキソプラズマ原虫 (Tg/CpP23) を作製し、マウスにおける感染防御効果を確認した [8]。

プラスミドベクターを用いた組換えワクチンの開発

1) プラスミドベクター (DNA ワクチン) の特徴

DNA ワクチンの特徴として生体内で長期に渡り持続的に抗原を発現すること、MHC クラス I 拘束を受ける細胞性免疫を誘導し易いこと、比較的安いで副作用が少ないこと、及び生産工程が簡単でコストが低いことなどが挙げられる。一方では、まだ免疫効率と再現性があまり高くない課題も残されている。

2) トキソプラズマ原虫のワクチン抗原 TgGRA4 を発現する DNA ワクチンの作製とワクチン効果の評価

DNA ワクチン作製には pcDNA プラスミド [Invitrogen 社製] を用いた。TgGRA4 遺伝子を CMVIE プロモーターの制御下に挿入し、DNA ワクチン (pcDNA/TgGRA4) を構築した。最近、DNA ワクチンでプライミングした後にワクシニアウイルスでブースターをかける免疫スケジュールがマラリア原虫感染防御に効果的であることが報告されている [7]。そこで、我々も TgGRA4 を発現する組換えワクシニアウイルス (VV/TgGRA4) を作製し、マウスに pcDNA/TgGRA4 によるプライミングを行った後に VV/TgGRA4 にてブースティングを行った。具体的には DNA ワクチンを 2 週間間隔にて 3 回投与し、2 週間後に組換えワクシニアウイルスを接種し、さらに 2 週間後に致死量の *T. gondii* を接種し、マウスにおける組換えワクチンの感染防御効果を評価した。マウスにおける免疫応答の誘導を ELISA 法にて測定したところ、強力な抗体誘導が認められた。

また、有意な IFN- γ の誘導が認められた。さらに、致死量のトキソプラズマ原虫で攻撃したところ、対照群は 80% が死亡したのに対し、免疫群は 100% が生存し、有意な感染防御効果が認められた [15]。

おわりに

ある感染症に対する組換えワクチンを開発する際に、大腸菌から植物細胞に至るまで多種多様な発現系の中で如何に適切なベクター系を選択するかが成功の鍵を握ると考えられる。一般的に、天然型のワクチン候補タンパク質に類似した組換えタンパク質の発現が可能なベクター系の選択が望ましい。ところが、これまでに原虫ベクターの選択肢はなかった。今回紹介した我々の研究により、原虫感染症に対する組換えワクチン開発で求められていた原虫ベクターの選択肢提供の可能性が示唆された。今後の課題として、さらなるワクチン候補抗原の探索と各発育ステージの虫体（急性期のタキゾイト、慢性期のブラディゾイト、有性生殖期のスポロゾイト等）に対応できる、組換えワクチンの開発が残されている。また、ネオスポラ原虫ベクターについては、まだ弱毒株が開発されていない現状を踏まえ、病原性遺伝子の同定と破壊によるベクター原虫の弱毒化が今後の課題として残されている。

キーワード：トキソプラズマ原虫、組換えワクチン、ベクターワクチン、ウイルスベクター、原虫ベクター、DNA ワクチン

引用文献

- Mishima, M., Xuan, X., Yokoyama, N., Igarashi, I., Fujisaki, K., Nagasawa, H. and Mikami, T. 2002. Recombinant feline herpesvirus type 1 expressing *Toxoplasma gondii* ROP2 antigen inducible protective immunity in cats. *Parasitol. Res.* **88**:144-149.
- Mishima, M., Xuan, X., Nishikawa, Y., Makala, L., Yokoyama, N., Nagasawa, H. and Mikami, T. 2001. Construction of recombinant feline herpesvirus type 1 expressing *Toxoplasma gondii* surface antigen 1. *Mol. Biochem. Parasitol.* **117**:103-106.
- Nishikawa, Y., Xuan, X., Makala, L., Vielemeyer, O., Joiner, K. A. and Nagasawa, H. 2003. Characterization of *Toxoplasma gondii* engineered to express mouse interferon-gamma. *Int. J. Parasitol.* **33**:1525-1535.
- Nishikawa, Y., Ikeda, H., Fukumoto, S., Xuan, X., Nagasawa, H., Otsuka, H. and Mikami, T. 2000. Immunisation of dogs with a canine herpesvirus vector expressing *Neospora caninum* surface protein, NcSRS2. *Int. J. Parasitol.* **30**:1167-1171.
- Otsuka, H. and Xuan, X. 1996. Construction of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) recombinants which express pseudorabies virus (PRV) glycoproteins gB, gC, gD, and gE. *Arch. Virol.* **141**: 57-71.
- Rosas, C. T., König, P., Beer, M., Dubovi, E. J., Tischer, B. K. and Osterrieder, N. 2007. Evaluation of the vaccine potential of an equine herpesvirus type 1 vector expressing bovine viral diarrhoea virus structural proteins. *J. Gen. Virol.* **88**:748-757.
- Schneider, J., Gilbert, S. C., Blanchard, T. J., Hanke, T., Robson, K. J., Hannan, C. M., Becker, M., Sinden, R., Smith, G. L. and Hill, A. V. 1998. Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat. Med.* **4**:397-402.
- Shirafuji, H., Xuan, X., Kimata, I., Takashima, Y., Shinya, F., Otsuka, H., Nagasawa, H. and Suzuki, H. 2005. Expression of P23 of *Cryptosporidium parvum* in *Toxoplasma gondii* and evaluation of its protective effects. *J. Parasitol.* **91**:476-479.
- Takashima, Y., Xuan, X., Kimata, I., Iseki, M., Kodama, Y., Nagane, N., Nagasawa, H., Matsumoto, Y., Mikami, T. and Otsuka, H. 2003. Recombinant bovine herpesvirus-1 (BHV-1) expressing P23 protein of *Cryptosporidium parvum* induces neutralizing antibodies in rabbits. *J. Parasitol.* **89**:276-282.
- van Zijl, M., Wensvoort, G., de Kluyver, E., Hulst, M., van der Gulden, H., Gielkens, A., Berns, A. and Moormann, R. 1991. Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J. Virol.* **65**:2761-2765.
- Xuan, X., Nishikawa, Y., Takashima, Y., Tuchiya, K., Ueda, S., Yokoyama, N., Maeda, K., Mikami, T. and Otsuka, H. 1998. Construction of canine her-

- pesvirus vector expressing foreign genes using a lacZ-TK gene cassette as a double selectional marker. *Virus Genes* **17**:25-32.
12. Xuan, X., Tuchiya, K., Sato, I., Nishikawa, Y., Takashima, Y., Yamamoto, A., Ueda, S., Mikami, T. and Otsuka, H. 1998. Biological and immunogenic properties of rabies virus glycoprotein expressed by canine herpesvirus vector. *Vaccine* **16**:969-976.
13. Yokoyama, N., Maeda, K., Tohya, Y., Kawaguchi, Y., Fujita, K. and Mikami, T. 1996. Recombinant feline herpesvirus type 1 expressing immunogenic proteins inducible virus neutralizing antibody against feline calicivirus in cats. *Vaccine* **14**:1657-1663.
14. 横山直明, 玄学南, 見上彪. 2000. 遺伝子組換えヘルペスウイルスのワクチン応用. 日本臨床 **58**:188-194.
15. Zhang, G., Huong, V. T. T., Battur, B., Zhou, J., Zhang, H., Liao, M., Kawase, O., Lee, E., Dautu, G., Igarashi, M., Nishikawa, Y. and Xuan, X. 2007. A heterologous prime-boost vaccination regime using DNA and a vaccinia virus, both expressing GRA4, induced protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Parasitology* **134**:1339-1346.
16. Zhang, G., Huang, X., Boldbaatar, D., Battur, B., Liao, M., Zhang, H., Zhou, J., Nishikawa, Y., Suzuki, H., Igarashi, I., Fujisaki, F. and Xuan, X. Construction of recombinant *Neospora caninum* expressing TgSAG1 and evaluation of its protective effects against *Toxoplasma gondii* infection. *in preparation*.

レビュー

メタボリックシンドロームと実験モデルの利用

長谷川 也須子 (研究員)

はじめに

近年、飽食や運動不足といった背景から、糖尿病、高脂血症、高血圧、肥満症患者が増加している。これらの疾患が一個人に重複し、動脈硬化症のリスクが増加する病態がメタボリックシンドロームである。現在、メタボリックシンドロームに関連した疾患による死亡は全体の3分の1にもほると言われ、病態メカニズムの解明および予防対策が急務であると考えられている。平成16年の厚生労働省国民健康栄養調査によると、メタボリックシンドローム該当者は男女あわせて約940万人と推計され、平成20年4月からはメタボリックシンドロームを予防するため特定健康診査・特定保健指導が開始された。本稿では、身近な疾患になりつつあるメタボリックシンドロームの概念と脂肪細胞肥大の問題点について述べ、本疾患の実験モデルの利用について紹介する。

メタボリックシンドローム

糖尿病、高脂血症、高血圧、肥満症は主な生活習慣病であるが、以前よりこれらの疾患が一個人に合併することが知られていた。この疾患概念は1980

年代後半よりシンドローム X [5]、死の四重奏 [3]、インスリン抵抗性症候群 [1]、内臓脂肪症候群 [2] といった名称で提唱され、現在はメタボリックシンドロームという名称が用いられている (表1) [4]。シンドローム X やインスリン抵抗性症候群は疾患の起点にインスリン抵抗性を据えたものであるのに対し、内臓脂肪症候群は内臓脂肪蓄積を重要視した概念であったため、インスリン抵抗性と内臓脂肪蓄積のどちらを重視するのかについて2004年から国際糖尿病連合 (IDF) を中心に会合がなされ、最終的に2005年、内臓脂肪蓄積を必須項目とした診断基準が設定された。

このような背景から2004年より国内でも日本動脈硬化学会、日本糖尿病学会、日本高血圧学会、日本肥満学会、日本循環器学会、日本腎臓病学会、日本血栓止血学会および日本内科学会が合同でメタボリックシンドロームの診断基準の策定を進め、2005年に現在利用されている診断基準が発表された。表2に示すメタボリックシンドロームの各種診断基準を見ると、本疾患の診断基準は各々設定した組織により異なっていることが分かる。わが国の診断基準の必須項目である腹部肥満 (ウェスト径) は、元々腹腔内脂肪面積が100 cm² 以上でリスクが高まるこ

表1 メタボリックシンドロームの概念につながる過去の疾患概念と構成要因

名称	シンドローム X Reaven, G. M. (1988)	死の四重奏 Kaplan, N. M. (1989)	インスリン抵抗性症候群 DeFronzo, R. A. (1991)	内臓脂肪症候群 Matsuzawa, Y. (1987)
構成 要因	インスリン抵抗性 高インスリン血症 耐糖能異常 高 VLDL トリグリセリド血症 低 HDL コレステロール血症 高血圧	上半身肥満 耐糖能異常 高トリグリセリド血症 高血圧	肥満 インスリン非依存型糖尿病 高血圧 動脈硬化性疾患 脂質代謝異常 高インスリン血症	内臓脂肪蓄積 耐糖能異常 高脂血症 高血圧

表2 メタボリックシンドロームの診断基準

WHO consultation (1998)	NCEP-ATPIII* (2001)	わが国の診断基準 (2005)
①耐糖能異常 (2型糖尿病・耐糖能低下) ②インスリン抵抗性 ③腹部肥満 (ウエスト/ヒップ比) 男性 ≥ 0.90 女性 ≥ 0.85 かつ/または BMI ≥ 30 ④血清トリグリセリド値 ≥ 150 mg/dl かつ/または HDL コレステロール値 男性 < 35 mg/dl 女性 < 39 mg/dl ⑤血圧 収縮期血圧 ≥ 160 mmHg かつ/または 拡張期血圧 ≥ 90 mmHg ⑥微量アルブミン尿 尿中アルブミン排泄率 ≥ 20 μ g/min アルブミン/クレアチニン比 ≥ 20 mg/g	①腹部肥満 (ウエスト径) 男性 ≥ 102 cm 女性 ≥ 88 cm ②血清トリグリセリド値 ≥ 150 mg/dl ③ HDL コレステロール値 男性 < 40 mg/dl 女性 < 50 mg/dl ④血圧 収縮期血圧 ≥ 130 mmHg かつ/または 拡張期血圧 ≥ 85 mmHg ⑤空腹時血糖値 ≥ 110 mg/dl	①腹部肥満 (ウエスト径) 男性 ≥ 85 cm 女性 ≥ 90 cm ②血清トリグリセリド値 ≥ 150 mg/dl かつ/または HDL コレステロール値 < 40 mg/dl ④血圧 収縮期血圧 ≥ 130 mmHg かつ/または 拡張期血圧 ≥ 85 mmHg ⑤空腹時血糖値 ≥ 110 mg/dl
①および②のいずれか、あるいは両方 ③~⑥のうち2項目以上該当	①~⑤のうち3項目以上該当	①が必須項目 ②~④のうち2項目以上該当

*: national cholesterol education program (NCEP) -adult treatment panel III (ATPIII)

とより算出された値を用いているが、実際には個人差があるため腹部肥満の基準を満たしていなくとも、他の項目で該当するものが多い場合は注意が必要であると思われる。

メタボリックシンドロームの病態発症メカニズムは図1のように考えられている [4]。まず内臓脂肪が蓄積することによる肥満が発端となり、インスリン抵抗性が誘導され糖尿病、高脂血症、高血圧が生じ、疾患が重複することによって動脈硬化症を発症しやすくなる。近年、肥満はインスリン抵抗性を生じずとも糖尿病、高血圧、動脈硬化症を誘導することが明らかとなっており、メタボリックシンドロームの発症機序は更に複雑なものとなりつつある。

大し増殖する。軽度のやせを示す人の脂肪細胞の直径が $30 \mu\text{m}$ であるのに対し、普通体重者で $70\text{--}90 \mu\text{m}$ 、肥満者では $100\text{--}110 \mu\text{m}$ に達し、時には $130\text{--}140 \mu\text{m}$ になると報告されている。しかしながら脂肪細胞はこれ以上肥大することはなく、更に栄養を貯蔵しようとする小型の未熟脂肪細胞 (小型球形脂肪細胞・線維芽細胞様脂肪細胞) を増殖させるようになる。杉原らは体格指数 (BMI) と脂肪細胞の

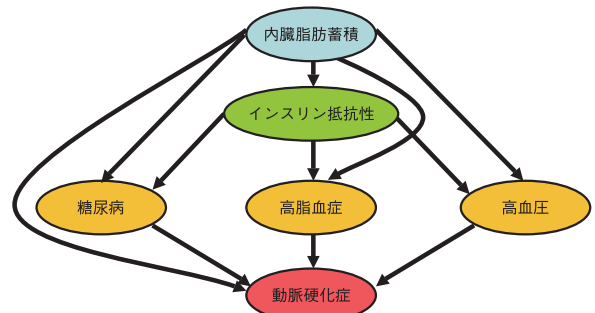


図1 メタボリックシンドロームの発症メカニズム

肥満と脂肪細胞肥大の問題点

形態学的に肥満状態の脂肪組織では脂肪細胞は肥

形態的特徴を相関させて、これらの形態学的変化を肥大優勢型、肥大・増殖型、増殖優勢型と提案した(図2)[7]。メタボリックシンドローム患者の脂肪組織では90%が肥大優勢型をとり、マクロファージや肥満細胞が出現すると報告されている[6]。健康者の脂肪組織でマクロファージや肥満細胞が見られることは殆どないため、これらの炎症細胞の出現は脂肪細胞の機能障害と密接な関連があると考えられている。

メタボリックシンドロームで重要視される内臓脂肪は皮下脂肪に比べ脂質代謝が活発で、遊離脂肪酸やグリセロールの血中への放出能が高いと言われている。そのため内臓脂肪の機能が肥満によって障害されると、様々な代謝機能異常が生じやすいと考えられる。脂肪細胞は余剰なエネルギーを蓄積するだけでなく、様々な生理活性物質(アディポサイトカイン)を分泌することが明らかとなってきた(図3)[8]。アディポサイトカインの機能は多様であり、代謝機構だけではなく摂食や血圧も調節している。

メタボリックシンドローム研究のための 実験モデル利用

メタボリックシンドロームの研究では培養細胞と実験動物を用いたモデルが汎用されている(表3)。

培養細胞では脂肪細胞をはじめとして臍臓細胞、骨格筋細胞、間葉系幹細胞が用いられている。特に脂肪前駆細胞や脂肪細胞は脂肪細胞大型化の抑制あ

るいはインスリン抵抗性の改善といった医薬品や機能性食品の研究で多く用いられている。

実験動物モデルは症状を誘発する飼料を給餌するもの、遺伝的な要因で発症するものおよび薬剤投与により誘発するものに分けられ、メタボリックシンドロームにより近いモデルを作出するために、これらを重複させるものもある。飼料給餌モデルでは高脂肪あるいは高グルコース飼料が用いられており、高脂肪飼料にはオイル、ラードあるいはコレステロールを添加している場合が多い。遺伝モデルは遺伝的背景が明らかなマウスやラットを利用することが多いが、高脂血症や肥満を家系的に持ち合わせているウサギやミニブタでの応用も近年報告されている。薬物誘発モデルとしてはアロキサンやストレプトゾトシン投与により膵島を傷害し糖尿病を生じるものが知られている。

現在までのメタボリックシンドローム研究は、飼育の簡便さや利用可能な系統の多さからマウスの利用が圧倒的に多いと思われる。しかしながらヒトと代謝機構や食性の異なるマウスでは実験成績を完全に外挿出来ない点是否めない。そのためイヌ、サル、ヤギ、ミニブタといった多様な実験動物の利用が試みられつつある。

おわりに

メタボリックシンドロームの病態解析には、脂肪

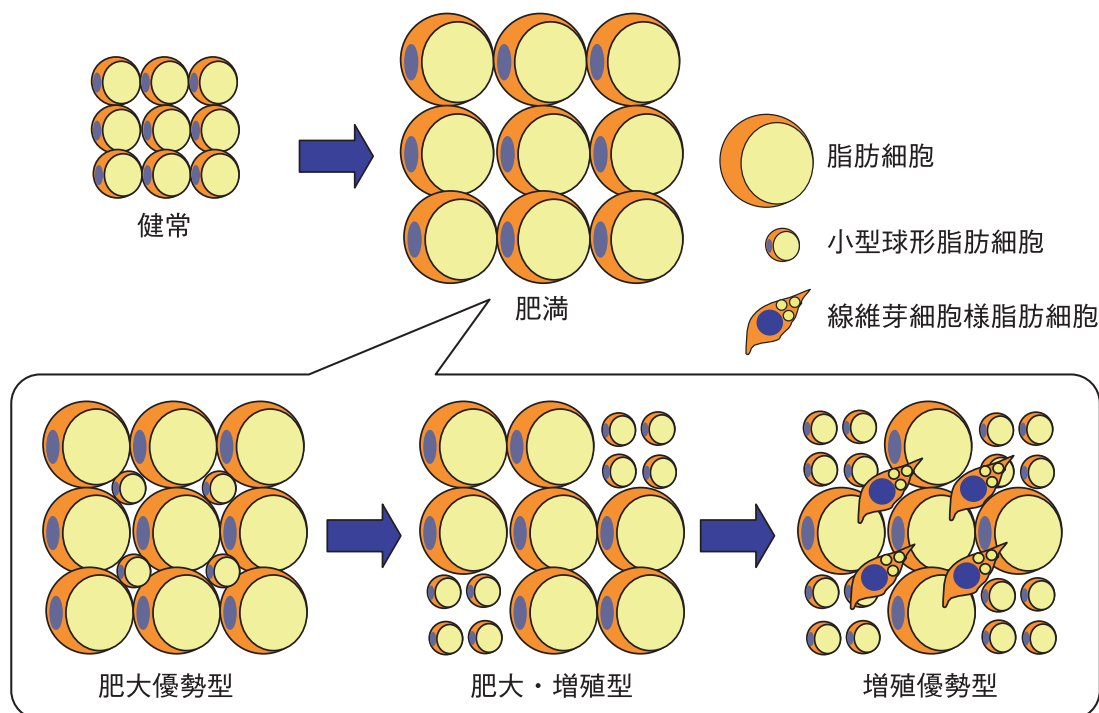


図2 肥満による脂肪細胞の形態学的変化

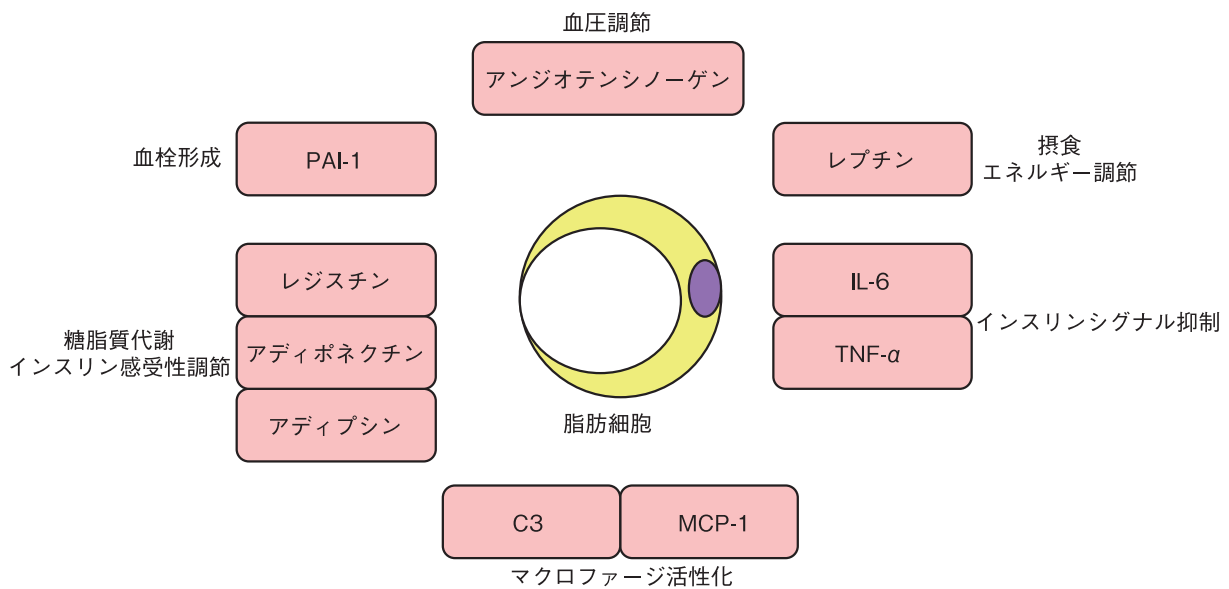


図3 脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカイン

表3 メタボリックシンドローム研究で利用されている主な実験モデル

培養細胞	実験動物		
	飼料給餌モデル	遺伝モデル	薬剤誘発モデル
皮下脂肪前駆細胞・脂肪細胞 内臓脂肪前駆細胞・脂肪細胞 脂肪由来株化細胞 膵臓由来株化細胞 骨格筋由来株化細胞 間葉系幹細胞	高脂肪飼料 高グルコース飼料	マウス (ob/ob, db/db, KK-Ay) ラット (ZDF, SHHF, SHROB, OLETF, TSOD, GK) ウサギ (WHHL)	アロキサン ストレプトゾトシン

組織機能の解明が非常に重要な役割を果たしている。しかしながら多くの臓器を跨いで発症する本疾患の本態を完全に明らかにするには今後多くの時間が必要であると考えられ、既存の実験モデルに加え、より多様な新規モデルの開発が行われると予想される。

飢餓状態に直面していた生物が獲得した組織とも言われる脂肪組織は、現在でも飢えている生物にとってはなくてはならない組織である一方、飽食によって必要以上のエネルギーを摂取する生物にとっては新たな疾患を提供する場となってしまった。地球規模で環境資源の枯渇が叫ばれる中、このような疾患が問題視されることは偶然ではなく己の消費活動を見直すための警鐘が鳴らされていると考えてよいのではないだろうか。

参考文献

1. DeFronzo, R. A. and Ferrannini, E. 1991. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* **14**:173-194.

2. Fujioka, S., Matsuzawa, Y., Tokunaga, K. and Tarui S. 1987. Construction of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism* **36**:54-59.

3. Kaplan, N. M. 1989. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch. Intern. Med.* **149**:1514-1520.

4. 春日雅人. 2007. メタボリックシンドロームとは何か? *実験医学* **25**:2250-2261.

5. Reaven, G. M. 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **37**:1595-1607.

6. Sugihara, H., Aoki, S. and Eguti, Y. 2006. Fat cells: structure and function. *Saishin Igaku* **61**:624-637.

7. 杉原甫. 2003. 肥満の脂肪細胞診断—肥満についての新しい分類の提唱. *内科 (臨床雑誌内科)* **92**:225-230.

8. Ueki, K. and Kadowaki, T. 2006. *Saishin Igaku* **61**:1237-1247.

学会発表演題

第146回日本獣医学会学術集会

期 日：2008年9月24日～9月26日

開催地：宮崎県宮崎市（ワールドコンベンションセンター・サミット）

発表演題：NS1-DIVAを用いた国内製造鳥インフルエンザワクチン注射鶏のモニタリング

○竹山夏実¹，三成健二²，坂元隆一³，佐々木崇⁴，瀧川義康⁵，真瀬昌司⁶，土屋耕太郎¹，岡松正敏²，塚本健司⁶，林志鋒¹，迫田義博²，喜田 宏²（¹日生研，²北大・院獣医・微生物，³化血研，⁴京都微研，⁵北里研，⁶動衛研）

発表演題：リアルタイムPCR法によるエリシペロトリックス属菌の検出・鑑別と定量

○トーホー，小山智洋，長井伸也，土屋耕太郎，布谷鉄夫（日生研）

発表演題：ケージ内飼育鶏におけるコクシジウム生ワクチン点眼投与試験

○川原史也（日生研）

発表演題：鶏大腸菌血清型O78菌株由来サイクリックAMPリセプタータンパク質（CRP）遺伝子欠損変異株の作出

○長井伸也，永野哲司，鳥海宏司，北原梨恵（日生研）

発表演題：鶏大腸菌血清型O78菌株由来サイクリックAMPリセプタータンパク質（CRP）遺伝子欠損変異株の免疫原性

○永野哲司，北原梨恵，長井伸也（日生研）

発表演題：組換えイヌ顆粒球コロニー刺激因子によるサイクロフォスファミドによって誘導した好中球減少症の改善

○山元 哲，岩田 晃（日生研）

動物サイトカイン研究会 第6回学術集会

期 日：2008年9月26日

開催地：宮崎県宮崎市（ワールドコンベンションセンター・サミット）

発表演題：組換えイヌ顆粒球コロニー刺激因子投与による好中球減少症の改善

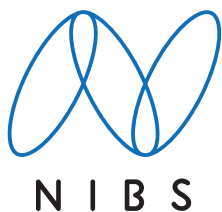
○岩田 晃，山元 哲（日生研）

5th International Workshop on Biological Effects of Electromagnetic Fields

期 日：2008年9月28日～10月2日

開催地：イタリア（Hotel Citta del Mare, Sicily）

発表演題：Effects of 50 Hz Circularly Polarized Magnetic Fields on 1-propyl-1-nitrosourea Induced Neoplasms in Female Donryu Rats: (2) Major Neoplasms Expect for Hematopoietic Neoplasms

○K. Shibuya¹，T. Negishi²，I. Nishimura²，and S. Imai^{1,2}（¹Nippon Institute for Biological Science，²Central Research Institute of Electric Power Industry）

—— テーマは「生命の連鎖」——
 生命の「共生・調和」を理念とし，生命体の豊かな明日と，研究の永続性を願う気持ちを心よいリズムに整え，視覚化したものです。カラーは生命の源，水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士の揮毫

日生研たより 昭和30年9月1日創刊(隔月1回発行)

(通巻553号) 平成20年10月25日印刷 平成20年11月1日発行(第54巻第6号)

発行所 財団法人 日本生物科学研究所

〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目2221番地の1

TEL: 0428(33)1056(企画学術部) FAX: 0428(33)1036

発行人 林志鋒

編集室 委員/大森崇司(委員長)，竹山夏実，小川寛人

事務/企画学術部

印刷所 株式会社 精興社

(無断転載を禁ず)