

NIBS LETTER 2009 JULY
No. 557

日 生 研 報

2009年(平成21年)7月号 第55巻第4号(通巻557号)

挨拶・巻頭言

今、養鶏場から見えてくるもの
……………井土俊郎(2)

獣医病理学研修会

第48回 No.960 ネコの眼瞼結膜下腫瘍
……………帯広畜産大学家畜病理学教室(3)

第48回 No.963 イヌの空腸
……………山口大学獣医病理学教室(4)

レビュー

豚繁殖・呼吸障害症候群ワクチン
の現状と課題……………佐藤哲朗(5)

犬脂肪組織間質細胞の神経細胞への分化誘導
……………佐合健(9)

FIMF (Function of Intestinal Microbiota
and Food) 合同フォーラム 2008
「腸内共生菌と食の機能」に参加して
……………竹山夏実(10)

お知らせ

研修者・見学者受け入れ状況……………(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/>

今、養鶏場から見えてくるもの

井土俊郎

日本で獣医学分野に家禽疾病学の基盤が築かれつつあった頃、家畜伝染病学を専攻し、当時、講座の主要課題であった家禽疾病学の分野に進んで43年余が過ぎた。研究テーマは野外に在ると説く三浦四郎教授のもと、当時としては国内では最大規模のプロイラー農場に鶏病専門家の卵として毎週末に通い、日曜日の1日をかけて鶏舎を巡回した日々が思い出される。1 km 四方の広大な土地に米国式の飼育管理方式を採用した農場で生産されるプロイラーに眼を見はった。種鶏、孵卵、肥育及び食鳥処理の4部門からなる経営形態は今のインテグレーターの先駆けであった。今の農場と比較しても劣らない程、鶏舎、設備は充実しており、また衛生管理技術も非常に進んでいた。臨床的な鶏病診断法の知識を叩き込んで農場に出かけたが、当初は的確な診断は疎か、遭遇するのは簡明に説明することができない症例ばかりだった。その都度、異常鶏を研究室に持ち帰り病性鑑定を行ったが、その時の経験はその後の自分の歩んだ道の基礎となった。そして今、農場の裏もかなり見えてきたと感じる。

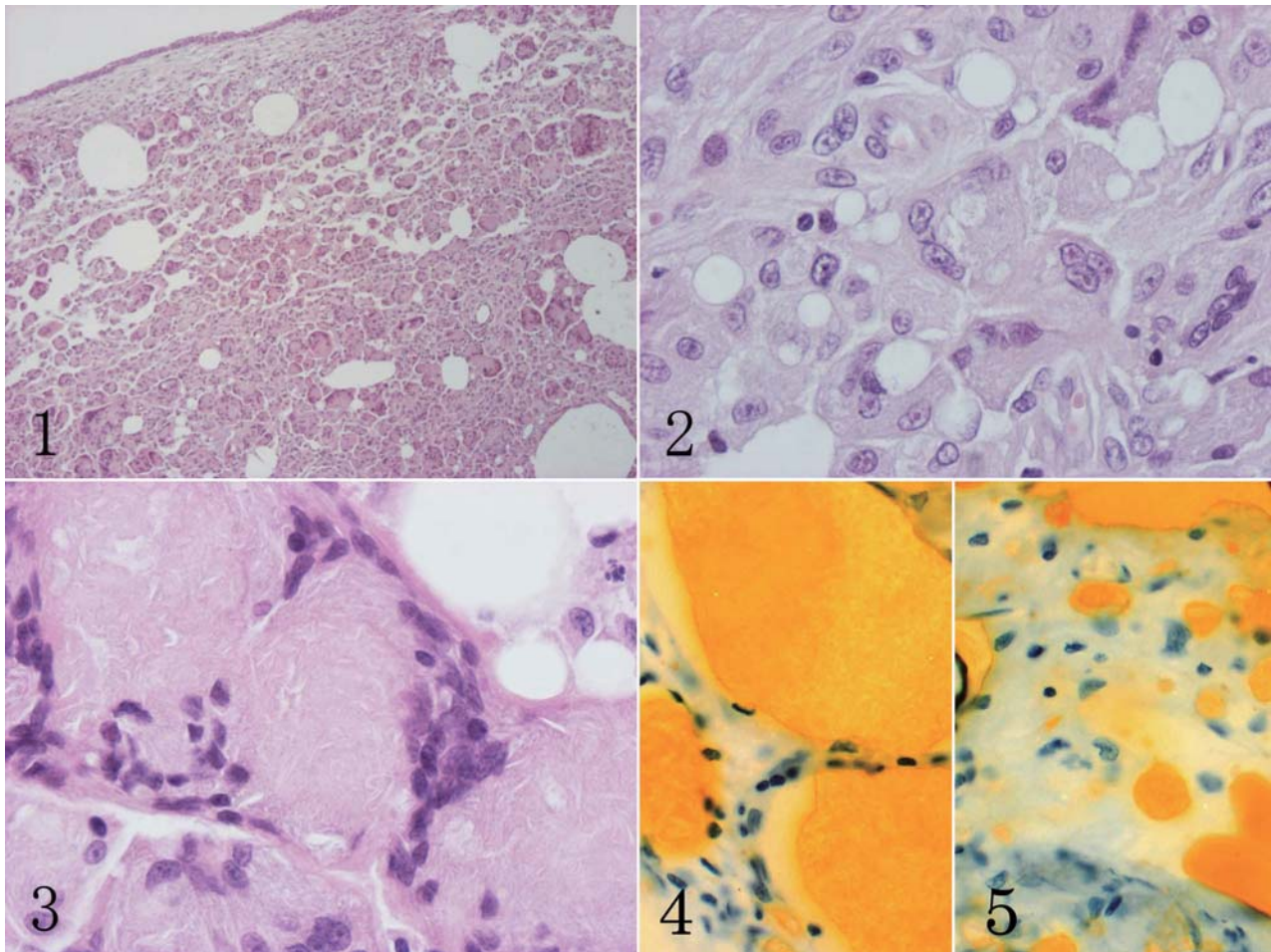
当時のプロイラーは品種改良の進んだ今のプロイラーとは性能的に大きな違いがあった。40年余前にはプロイラーは約50日間で、約3.2 kgの飼料を食べ、約1.2 kgの生体重になった。現在では50日齢までに5.9 kgの飼料を摂取し、生体重が3.0 kgになる。2.0 kgの飼料を食べて1.0 kgの生体重になるというエネルギー変換効率の高さは驚異的である。そんなことを回顧しながら今の農場を見てみると、40年間の養鶏技術の発展を反映させ効率的に経営している農場と、昔のままの低い生産性の農場と2極化しているのがわかる。プロイラーの生産性を評価する指標として生産性指数(PS)という数値がある。これは4つの要素を用いて、(体重kg x 出荷率% / 飼料効率 x 出荷日齢) x 100で算出される。この指数は農場における生産効率を評価する上で有益な指標となる。全国にある2,400余の農場のなかで、年間を通じて生産性指数が300を上回る優秀な成績を出している農場がある一方で、200前後しか出せない農場がある。採卵鶏農場においても同様に、90%以上の産卵率を35週間以上持続する鶏群がある一方で20週間も続かない鶏群もある。これほど大きな差が出る理由はどこにあるのだろうか。

肉用鶏も採卵鶏も同じであるが、現在の非常に優れた遺伝的能力をもつ鶏の性能を十分に発揮させるためには、鶏種毎に定められた飼養管理基準に合わせた管理が要求される。その基準は以前のそれに比較してより厳密さが要求され、許容範囲がかなり狭くなっているのが実態である。餌付けから出荷までの各段階で定められた範囲内に収まるような飼養管理ができる能力を持つか否かが明暗を分けていると考えられる。生産性に影響する種々な要素を全て記録し、その分析を通じて管理基準からの逸脱を把握し、対策を執るという姿勢は最低限必要なものである。過去の成功体験に頼った飼養管理は往々にして今の鶏種の飼養管理法には適合しない。特に温度、湿度の制御に関係する換気については立地条件、鶏舎構造、天候などを考慮した、厳密な対応が要求される。記憶に頼った管理は一見合理的に見えても、科学的な根拠の欠如した理論に過ぎないことが多い。最近では飼料についても生産効率を左右するかなり大きな要因になっている。(独法)農畜産業振興機構が発行している畜産2008に掲載されている配合飼料生産量と鶏肉、鶏卵生産量から生産効率を算出すると、2007年には成鶏用飼料が約582万t生産され、鶏卵が約259万t生産された(飼料効率:2.25)。プロイラーについては約380万tの飼料で約175万tの肉用鶏(生体)が生産された(飼料効率:2.17)。この数値は総体として算出されたものであるため、農場における実際の飼料効率とは乖離しているであろうが、実際には今の鶏は卵肉用種ともに飼料効率2.0を達成する能力を持っている。それが達成できないとすれば、飼料か、環境管理かあるいは健康管理に関して要求される条件を充たしていないものがあると考えて間違いはない。これらの何れが主要な生産性阻害要因となっているかは農場によって異なるであろう。平成19年度における鶏卵と鶏肉の自給率はそれぞれ96%と69%となっている。しかし、配合飼料の主原料となる飼料穀物はそのほとんどを輸入に依存している現状からして、生産から消費まで全ての段階で無駄を省きエネルギー効率の向上を計ることは至上命令である。全体的に見た場合、生産性の低い農場における効率を改善することでまだ養鶏産業は発展するものと考えられる。

(評議員)

ネコの眼瞼結膜下腫瘍

帯広畜産大学家畜病理学教室 第48回獣医病理学研修会 No. 960



動物：ネコ，雑種，去勢雄，3歳9ヵ月齢。

臨床事項：2007年2月に，上眼瞼の腫脹を主訴に某動物病院を受診した。初診時，両側の上眼瞼結膜の強い浮腫を認めた。内科的治療を行ったが改善せず，4月には両側上眼瞼結膜下にやや隆起する腫瘍が出現した。その後も改善は認められず，7月に両側の腫瘍を外科的に摘出した（右側腫瘍は小豆大，左側腫瘍は米粒大）。なお，2008年5月現在，再発は認められていない。

肉眼所見：両側の腫瘍は乳白色で表面滑沢であった。

組織所見：右側腫瘍は，眼瞼結膜下の結合組織層における多核巨細胞およびマクロファージを主体とする炎症性細胞の集簇から成っていた。また，集簇内にはこれら細胞によって取り囲まれた大小様々な細胞外空隙を認めた（図1）。多核巨細胞およびマクロファージの中には，細胞質内に大小様々な空胞を有するもの（図2），細胞質内に多数の微小裂隙を有するもの（図3）も認められた。これら細胞外空隙（図4），細胞質内空胞（図5），および細胞質内裂隙はいずれもズダンⅢ染色により赤橙色に染色され，脂質であることが確認された。

参考所見：左側腫瘍の組織像は，右側腫瘍の組織像と基本的に同質であった。

診断：結節性脂肪肉芽腫性結膜炎（Nodular Lipogranu-

lomatous Conjunctivitis）。

考察：マイボーム腺の腫瘍や炎症の際に，漏出した脂質に対し形成される脂肪肉芽腫は霰粒腫とされ，犬で多く報告されている。しかし猫では，マイボーム腺の腫瘍や炎症が認められない場合にも眼瞼結膜下に脂肪肉芽腫が発生するとされており，結節性脂肪肉芽腫性結膜炎とされている。本病変は両側性に多く発生し，内科的治療において難治性であるとされている。本病変を引き起こす脂質がどのように漏出するかは不明であるが，マイボーム腺との関連が示唆され，霰粒腫の一亜型という考え方もある。今回の症例においても，原因の特定には至らなかった。

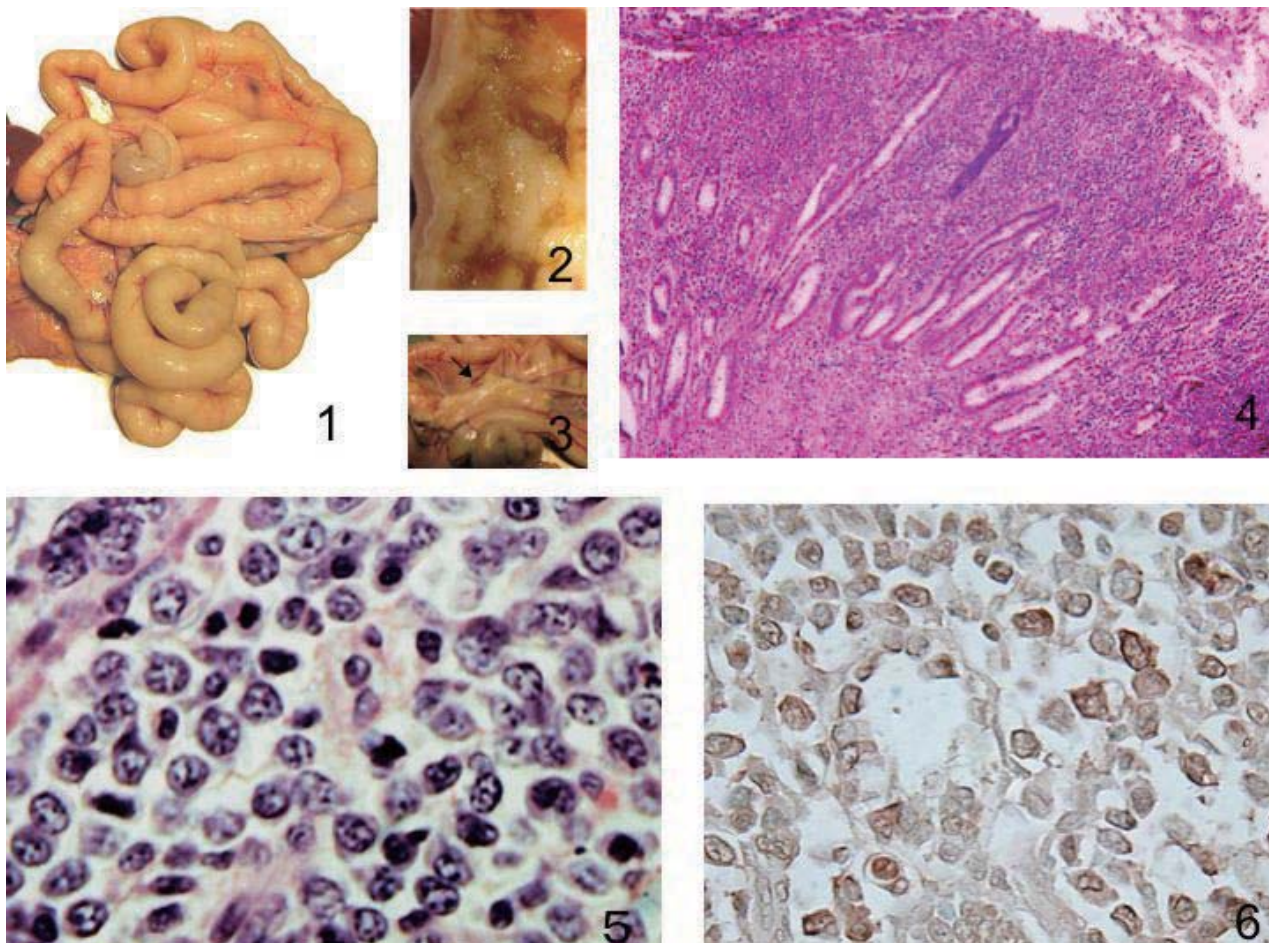
参考文献：

1. Wilcock, B., Dubielzig, R. R., and Render, J. A. 2002. Histological classification of ocular and otic tumors of domestic animals. 2nd series. Vol. IX. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, DC.
2. Read, R. A., and Lucas, J. 2001. Lipogranulomatous conjunctivitis: Clinical findings from 21 eyes in 13 cats. *Veterinary Ophthalmology* 4:93-98.

（舟戸慎悟・古林与志安）

イヌの空腸

山口大学獣医病理学教室 第48回獣医病理学研修会 No. 963



動物：イヌ，四国犬，雄，7歳7ヶ月齢。

臨床事項：2006年2月頃より食後の嘔吐が認められ、水様性下痢や血便および吐血もみられるようになったため、近医を受診するも改善せず、著しい体重減少が認められた。他院にて内視鏡・生検検査を行った結果、リンパ球性-プラズマ細胞性結腸炎（2007年4月4日）と診断され、プレドニゾロンによる治療を行ったが反応が悪く、2007年4月27日に本学動物医療センターに来院。超音波検査で、小・大腸壁の肥厚（4mm）が認められた。対症療法により、状態はやや改善したが、5月22日に死亡。同日病理解剖を行った。

剖検所見：主病変は小腸・大腸および腸間膜・臍十二指腸リンパ節にみられた。腸管（十二指腸から直腸）は全域が部厚いゴムホース状で（図1）、腸粘膜面は皺壁状、び慢性に重度に肥厚し、管腔は狭小で内容物はほとんどみられなかった（図2）。漿膜面、粘膜面共に乳白色で、粘膜面には少数・散在性点状出血を認めた。腸間膜リンパ節および臍十二指腸リンパ節は数倍に腫大していた（図3；矢印）。

組織所見：病巣は粘膜固有層に主座し、細胞および核ともに異型の強い中型から大型のリンパ芽球様類円形細胞がび慢性に浸潤していた（図4）。一部の腫瘍細胞は、粘膜筋板に浸潤していたが、粘膜下組織・筋層および漿膜への浸潤は認められなかった。腫瘍細胞の核は水泡状で、類円型から卵円型あるいは凹凸があり、複数の核小体をもっていた。細胞質は乏しいものからやや豊富なもの

のまであり、弱好酸性から弱好塩基性を示した。また、多くの核分裂像が認められた。腫瘍細胞増殖巣には、多数の成熟した形質細胞と中等度の好酸球浸潤が認められ、小型の成熟リンパ球がわずかに認められた（図5）。粘膜上皮の多くは変性・壊死、消失していた。腫瘍性的変化は、胃を除き、小腸に強く、大腸に弱いという程度の差はあるが、同質の変化が、十二指腸から直腸までの粘膜全域とリンパ節に認められた。免疫組織化学的染色では、腫瘍細胞は抗CD3抗体（図6）に陽性を、抗CD79a抗体に陰性を示した。PCR解析では、T細胞のモノクローナリティが認められた。

診断：犬の空腸粘膜における形質細胞と好酸球の浸潤を伴うT細胞リンパ腫。

考察：本症例の組織学的特徴は、粘膜部に限局した著明な形質細胞と中等度の好酸球浸潤を伴った異型のリンパ芽球様細胞の結節を形成しない、び慢性の浸潤であった。形態的には均質な腫瘍細胞集団ではなかったが、免疫組織化学的染色とPCRの所見から、本腫瘍細胞は、T細胞由来である事が示唆された。なお、生前リンパ球性-プラズマ細胞性結腸炎と診断されている事から、同病変が小腸にも存在し、それらが本病の前駆病変となった可能性、あるいは腫瘍細胞間にみられた形質細胞と好酸球の浸潤は本T細胞リンパ腫に随伴（関連）する可能性などが考えられるが、いずれも確定する事はできなかった。また、提出標本と類似の報告はみられない。

（村瀬亜由美・林俊春）

豚繁殖・呼吸障害症候群ワクチンの現状と課題

佐藤 哲朗

はじめに

豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) は、世界中の養豚農場で蔓延している豚のウイルス性感染症で、近年の豚の感染症研究において、最も多くの研究報告がなされている疾病の一つである。現在、本病の予防対策として、弱毒生ワクチンおよび不活化ワクチンが使用されている。しかし、これらワクチンは一定の有効性が認められるものの、PRRSの制圧には至っていない。この原因の一つとして、PRRSウイルス (PRRSV) の抗原性に関連する ORF5 遺伝子の高度な多様性があげられる。ORF5 遺伝子の遺伝的多様性は、各 PRRSV 株間における抗原交差性を低下させ、PRRSV を宿主の免疫機構から回避させると考えられている。PRRS に対する効果的なワクチン開発にあたり、この PRRSV が備える遺伝的多様性が、宿主の防御免疫に与える影響を解明することは重要な課題となっている。そこで、本レビューでは、現行のウイルス粒子を用いたワクチンによる免疫付与効果、PRRSV に対する宿主側の免疫応答の特徴および新規 PRRS ワクチン開発に関して、近年の学術論文から検証する。

PRRS ワクチンの現状

PRRSV に対するワクチンは、弱毒生ワクチンと不活化ワクチンが開発されており、我が国ではアメリカ型 PRRSV を使用した弱毒生ワクチンが 1997 年に承認され、利用されている。近年、これら両ワクチンの免疫原性に関する研究成果が、多くの研究

者から報告されている。PRRS 弱毒生ワクチンは、ホモウイルスの感染による病原性を減弱することはできるが、ヘテロウイルスの感染に対する効果は、限定的であるとの報告がある [13]。また、生ワクチンはワクチネーションされた豚からウイルスが排泄され、他の豚へ水平伝播する現象が繰り返し行われるため、野外において PRRSV ゲノムの変異が起りやすい状況を助長し、Quasispecies (遺伝子変異により異なる性質をもつウイルス集団) の発生の問題が指摘されている [4, 18]。一方、不活化ワクチンは、十分な中和抗体の産生を誘導できないこと、ウイルス血症を抑制できないことなどの問題がある [26]。

ORF5 遺伝子の相同性とワクチン効果

PRRSV ゲノムには、2つのポリメラーゼ蛋白質および7つの構造蛋白質をコードする遺伝子が存在する。このうちの ORF5 遺伝子は、エンベロープ蛋白質 GP5 をコードし、最も多くの変異が認められていることから、分子系統解析に利用されてきた。

ORF5 遺伝子を用いた系統解析では、PRRSV はアメリカ型およびヨーロッパ型の2つの遺伝子型に大別される。さらに、アメリカ型 PRRSV は5つの遺伝学的系統に、ヨーロッパ型 PRRSV は3つの遺伝学的系統に分類される。現在実用化されている両遺伝子型のワクチンは、異なる遺伝子型の PRRSV に対して、十分な防御免疫を付与できないと理解されており [22]、アメリカ型 PRRSV の流行地域ではアメリカ型株を用いたワクチンが、また、ヨー

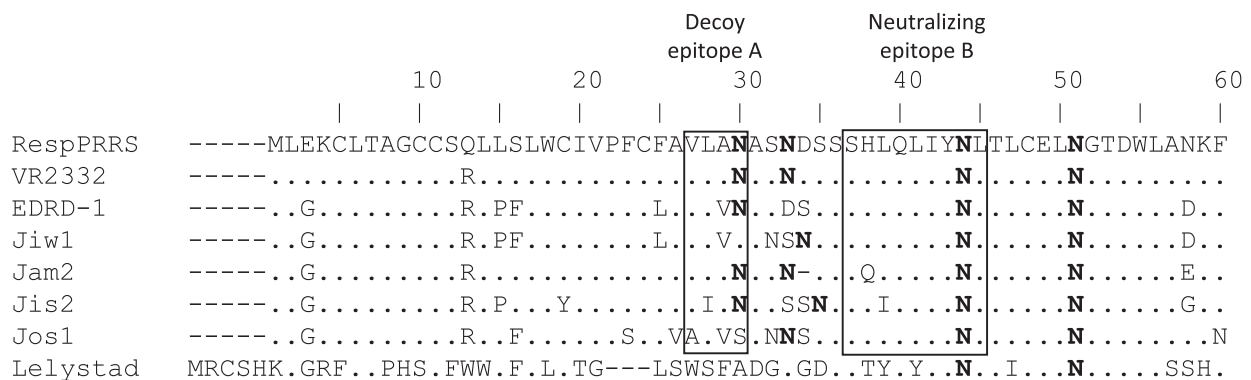


図1 PRRSV GP5 のN末端側アミノ酸配列

糖鎖結合部位のアスパラギン (N) を太字で示している。2箇所のエピトープ部位は四角で示している。

RespPRRS= ベーリンガーインゲルハイム社生ワクチン株 (GenBank accession No. AF159149) ; VR2332 = 1992年アメリカ分離株 (EF536003) ; EDRD-1 = 1992年千葉県分離株 (D45852) ; Jiw1 = 2000年岩手県分離株 (AB175696) ; Jam2 = 2000年青森県分離株 (AB175690) ; Jis2=2000年石川県分離株 (AB175695) ; Jos1 = 2000年大阪府分離株 (AB175699) ; Lelystad = 1991年オランダ分離株 (AY588319)

ロッパ型 PRRSV の流行地域ではヨーロッパ型株を用いたワクチンが使用されている。両遺伝子型の PRRSV の抗原交差性が認められない原因は、最も重要な中和エピトープである GP5 の細胞外ドメインにおけるアミノ酸配列が、まったく異なることにある [15, 16] (図 1)。さらに近年、同一遺伝子型でも抗原交差性は、限定的であるとの見解もある。

Labarque ら [8] は、ヨーロッパ型レリスタッド株系統に属する生ワクチンを接種した子豚にレリスタッド株系統の PRRSV または同じヨーロッパ型ではあるが、異なる遺伝学的系統であるイタリア株系統の PRRSV を攻撃した場合、分離されるウイルスの力価は、有意にイタリア株系統の方が高かったと報告した。また、Scotti ら [19] は、2 種類のヨーロッパ型レリスタッド株系統のワクチンをそれぞれ接種した妊娠豚にイタリア株系統の PRRSV を攻撃し、ウイルスの分離率が異なることを明らかにし、同じ遺伝学的系統に属するワクチンでも他の遺伝学的系統に属する株に対する免疫原性が異なることを証明した。一方、Prieto ら [17] は、ワクチン株に対してヘテロウイルスで攻撃した個体とホモウイルスで攻撃した個体で、中和抗体価の上昇は同程度であることから、同一遺伝子型でかつ同一系統の遺伝的に近縁な PRRSV 株に対しても、生ワクチンの免疫原性は十分でないことを提唱している。さらに、Diaz ら [3] による 2 つの異なるヨーロッパ型生ワクチンを用いた攻撃試験では、攻撃株 VP21 と同じ遺伝学的系統に属するワクチン v1 (ORF5 遺伝子相同性 99.6%) よりも異なる遺伝学的系統に属するワクチン v3 (同遺伝子相同性 94.0%) の方が、高い細胞性免疫を誘導した。これらの報告は、ORF5 遺伝子の相同性による遺伝子系統の分類とワクチン効果に相関が認められないということを示しており、ワクチン株に対する野外株の ORF5 遺伝子相同性が高ければ、必ずしもワクチンによる十分な防御効果を得られるとは限らない。

PRRSV とウイルス中和反応

十分な中和抗体の存在は、PRRS の発症を予防することが報告されている。Osorio ら [14] の報告では、16 倍の中和抗体を妊娠豚に静脈内投与すると、繁殖障害および胎盤感染を抑制した。また、Lopez ら [11] によると 8 倍の中和抗体価の存在下では、ウイルス血症を抑制することができたが、肺および扁桃などの末梢臓器中のウイルス増殖は阻止できなかった。しかし、32 倍の中和抗体を付与すると、末梢臓器中におけるウイルス増殖も抑制されたことから、十分な中和抗体価の上昇は PRRS の発症を予防すると評価できる。

PRRSV の中和エピトープは GP5、GP4 およびマトリックス蛋白質 (M) に存在し、GP5 に最も中心的な役割を果たす中和エピトープが位置している [15, 16]。GP5 の中和エピトープは、N 末端側細胞外ドメインのアミノ酸残基 37 ~ 45 番目付近 (エピトープ B) に存在し、その近傍には 4 箇所の糖鎖結合部位が存在する。この GP5 細胞外ドメインは遺伝的多様性が豊富で、ウイルス株間における変異が集中している。また、27 ~ 30 番目のアミノ酸残基は、デコイ (おとり) エピトープ (エピトープ A) としての働きを持ち、中和抗体産生を遅延させる働きをされるといわれている [15]。

GP5 細胞外ドメインの糖鎖結合部位は、PRRSV 株ごとにその数と位置が異なり、一般にアメリカ型ウイルスでは 30, 33, 44 および 51 番目のアスパラギンが糖鎖結合部位である (図 1)。エンベロープを持つ多くのウイルスは、宿主体内においてエンベロープ蛋白質に糖鎖の付加という修飾を受ける。糖鎖の付加は宿主細胞のレセプターとの結合、細胞質膜との融合、細胞内への侵入および細胞からの出芽といったウイルスの感染現象に影響を与える。また、蛋白質の折りたたみ構造や宿主細胞内での輸送も糖鎖に影響され、ウイルス蛋白質の生物活性およびその抗原性が変化する。Jiang ら [6] は、GP5 細胞外ドメインの糖鎖結合部位であるアスパラギン残基を置換した変異型 PRRSV GP5 発現アデノウイルスベクターを BALB/c マウスに免疫すると、PRRSV に対する中和抗体価が、野生型に比べ変化することを報告し、GP5 細胞外ドメインにおける糖鎖結合部位の存在は、中和抗体の誘導に影響することを証明した。また、同様にヒト免疫不全ウイルス 1 型 [24]、B 型肝炎ウイルス [9]、インフルエンザウイルス [21] だけでなく、PRRSV と同じアルテリウイルス科に属する乳酸脱水素酵素ウイルス [2] においても、表面抗原蛋白質の糖鎖結合部位の有無は、ウイルス中和反応を回避する機構として働いていることが示唆されている。

PRRSV と細胞性免疫

細胞性免疫は液性免疫と同じく PRRSV の免疫応答に重要であり、以前から、PRRSV は強いリンパ球分化誘導能をもつことで知られている [1, 10]。PRRSV 感染によって分化した CD4+/CD8+ T 細胞からは、インターフェロン (IFN) - γ が分泌される。

PRRS 生ワクチン接種後、早い個体では 3 週間から PRRSV 特異的 IFN- γ 分泌 T 細胞が末梢血中に出現し、最終的に末梢血単核球 100 万個中に 500 個程度の頻度で存在するようになる [12]。一方、不活化ワクチンを接種した場合には、IFN- γ 分泌 T

細胞は増えるものの、PRRSV 特異的 IFN- γ 分泌 T 細胞の割合が少ない [26]。PRRSV に対する免疫応答は、中和抗体の上昇が十分でないことから、細胞性免疫の果たす役割は大きいと考えられる。不活化ワクチンが、PRRSV 特異的 IFN- γ 分泌 T 細胞の産生を誘導できないことは、ウイルス血症を抑制できない一因として考えられる。

新たな PRRS ワクチンの開発研究

PRRS に対する理想的なワクチンは、多くの PRRSV 株に対して交差免疫原性を有するワクチンである。それは様々な野外株に対する中和抗体および IFN- γ の産生を誘導するだけでなく、生ワクチンのような野外へのウイルス排泄による病原性復帰株出現の危険性がないといった要件を満たす必要がある。

近年、ウイルスベクターを用いた新たな PRRS ワクチンの開発が、数多く報告されている。これらのベクターワクチンでは、アデノウイルス [5]、オーエスキー病ウイルス [7]、鶏痘ウイルス [20]、バキュロウイルス [23] およびワクシニアウイルス [25] などのウイルスベクターに PRRSV の GP5, GP3 または M 蛋白質などのウイルス中和にかかわる遺伝子を挿入し、宿主動物に免疫する。これらのベクターワクチンでは、ウイルス血症の抑制やヘテロウイルスに対する防御効果など、実際に豚で確認すべき多くの検討事項が残っている。しかし、中和抗体の標的とする分子を発現するウイルスベクターを宿主動物に免疫するため、従来型のウイルス粒子を用いたワクチンに比べ特異性は高まると考えられ、広範な交差性をもつ中和抗体の産生を促すことができると期待されている。

以上のように、PRRSV は高度な遺伝的多様性を有するウイルスであることから、単純なワクチンでは、宿主動物に完全な感染防御免疫を付与することは困難である。PRRSV の抗原性に関して、一定の研究成果は報告されているものの、ワクチン開発に応用可能な段階には至っていない。今後、PRRS の撲滅を目指すにあたり、ベクターワクチン、サブユニットワクチンおよび DNA ワクチンなどの技術に加え、新規アジュバントの検討ならびに粘膜ワクチンなどの次世代型ワクチンの開発も必要となるであろう。(研究員)

参考文献

1. Bautista, E. M. and Molitor, T. W. 1997. Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. *Viral Immunol.* **10**:83-94.
2. Chen, Z., Li, K. and Plagemann, P. G. 2000. Neuro-pathogenicity and sensitivity to antibody neutralization of lactate dehydrogenase-elevating virus are determined by polylactosaminoglycan chains on the primary envelope glycoprotein. *Virology* **266**:88-98.
3. Diaz, I., Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J. and Mateu, E. 2006. Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs. *Virology* **351**:249-259.
4. Goldberg, T. L., Lowe, J. F., Milburn, S. M. and Firkins, L. D. 2003. Quasispecies variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during natural infection. *Virology* **317**:197-207.
5. Jiang, W., Jiang, P., Wang, X., Li, Y., Du, Y. and Wang, X. 2008. Enhanced immune responses of mice inoculated recombinant adenoviruses expressing GP5 by fusion with GP3 and/or GP4 of PRRS virus. *Virus Res.* **136**:50-57.
6. Jiang, W., Jiang, P., Wang, X., Li, Y., Wang, X. and Du, Y. 2007. Influence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 glycoprotein N-linked glycans on immune responses in mice. *Virus Genes* **35**:663-671.
7. Jiang, Y., Fang, L., Xiao, S., Zhang, H., Pan, Y., Luo, R., Li, B. and Chen, H. 2007. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant pseudorabies virus expressing the two major membrane-associated proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* **25**:547-560.
8. Labarque, G., Reeth, K. V., Nauwynck, H., Drexler, C., Van Gucht, S. and Pensaert, M. 2004. Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy. *Vaccine* **22**:4183-4190.
9. Lee, J., Park, J. S., Moon, J. Y., Kim, K. Y. and Moon, H. M. 2003. The influence of glycosylation on secretion, stability, and immunogenicity of recombinant HBV pre-S antigen synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**:427-432.
10. Lopez Fuertes, L., Domenech, N., Alvarez, B., Ezquerro, A., Dominguez, J., Castro, J. M. and Alonso, F. 1999. Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection. *Virus Res.* **64**:33-42.

11. Lopez, O. J., Oliveira, M. F., Garcia, E. A., Kwon, B. J., Doster, A. and Osorio, F. A. 2007. Protection against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection through passive transfer of PRRSV-neutralizing antibodies is dose dependent. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**:269–275.
12. Meier, W. A., Galeota, J., Osorio, F. A., Husmann, R. J., Schnitzlein, W. M. and Zuckermann, F. A. 2003. Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology* **309**:18–31.
13. Mengeling, W. L., Lager, K. M., Vorwald, A. C. and Koehler, K. J. 2003. Strain specificity of the immune response of pigs following vaccination with various strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* **93**:13–24.
14. Osorio, F. A., Galeota, J. A., Nelson, E., Brodersen, B., Doster, A., Wills, R., Zuckermann, F. and Laegreid, W. W. 2002. Passive transfer of virus-specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity. *Virology* **302**:9–20.
15. Ostrowski, M., Galeota, J. A., Jar, A. M., Platt, K. B., Osorio, F. A. and Lopez, O. J. 2002. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J. Virol.* **76**:4241–4250.
16. Plagemann, P. G., Rowland, R. R. and Faaberg, K. S. 2002. The primary neutralization epitope of porcine respiratory and reproductive syndrome virus strain VR-2332 is located in the middle of the GP5 ectodomain. *Arch. Virol.* **147**:2327–2347.
17. Prieto, C., Alvarez, E., Martinez-Lobo, F. J., Simarro, I. and Castro, J. M. 2008. Similarity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains to vaccine strain is not necessarily predictive of the degree of protective immunity conferred. *Vet. J.* **175**:356–363.
18. Rowland, R. R., Steffen, M., Ackerman, T. and Benfield, D. A. 1999. The evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: quasispecies and emergence of a virus subpopulation during infection of pigs with VR-2332. *Virology* **259**:262–266.
19. Scortti, M., Prieto, C., Martinez-Lobo, F. J., Simarro, I. and Castro, J. M. 2006. Effects of two commercial European modified-live vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in pregnant gilts. *Vet. J.* **172**:506–514.
20. Shen, G., Jin, N., Ma, M., Jin, K., Zheng, M., Zhuang, T., Lu, H., Zhu, G., Jin, H., Jin, M., Huo, X., Qin, X., Yin, R., Li, C., Li, H., Li, Y., Han, Z., Chen, Y. and Jin, M. 2007. Immune responses of pigs inoculated with a recombinant fowlpox virus coexpressing GP5/GP3 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine IL-18. *Vaccine* **25**:4193–4202.
21. Skehel, J. J., Stevens, D. J., Daniels, R. S., Douglas, A. R., Knossow, M., Wilson, I. A. and Wiley, D. C. 1984. A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**:1779–1783.
22. van Woensel, P. A., Liefkens, K. and Demaret, S. 1998. Effect on viraemia of an American and a European serotype PRRSV vaccine after challenge with European wild-type strains of the virus. *Vet. Rec.* **142**:510–512.
23. Wang, S., Fang, L., Fan, H., Jiang, Y., Pan, Y., Luo, R., Zhao, Q., Chen, H. and Xiao, S. 2007. Construction and immunogenicity of pseudotype baculovirus expressing GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* **25**:8220–8227.
24. Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J. F., Salazar, M. G., Kilby, J. M., Saag, M. S., Komarova, N. L., Nowak, M. A., Hahn, B. H., Kwong, P. D. and Shaw, G. M. 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**:307–312.
25. Zheng, Q., Chen, D., Li, P., Bi, Z., Cao, R., Zhou, B. and Chen, P. 2007. Co-expressing GP5 and M proteins under different promoters in recombinant modified vaccinia virus ankara (rMVA)-based vaccine vector enhanced the humoral and cellular immune responses of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Genes* **35**:585–595.
26. Zuckermann, F. A., Garcia, E. A., Luque, I. D., Christopher-Hennings, J., Doster, A., Brito, M. and Osorio, F. 2007. Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory

syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological pa-

rameters of protection upon challenge. *Vet. Microbiol.* **123**:69–85.

犬脂肪組織間質細胞の神経細胞への分化誘導

佐合 健

はじめに

傷害を受けた組織に対する未分化細胞の移植療法は、様々な組織に対して行われている。とりわけ神経組織は、その自己再生能の低さから移植療法が重要である。これまでに神経再生に用いる細胞としての候補として、胚性幹細胞や、神経幹細胞があるが、共に細胞を得るために少なくない代償を必要とする上、倫理的、法的な障害もある。

この問題を回避するアプローチに *ex vivo* で処理した体性幹細胞の利用が挙げられる。今回、我々は数ある体性幹細胞の中で、脂肪組織血管間質細胞 (ATSCs; Adipose Tissue-derived Stromal Cells) に着目した。ATSCs は生体から非侵襲的に大量に得られる脂肪組織から簡単に分離可能で、自己再生を可能に示す。また、本実験にはイヌ ATSCs を用いた。In vivo での試験や、小動物臨床において、今後の需要の高まる可能性が高いことを考慮してである。今回我々はイヌ ATSCs を用いた神経再生への利用の可能性を *in vitro* において検討したので、これを報告する。

実験の流れ

・ ATSCs の分離

ビーグル成犬から、腹腔脂肪組織を無菌的に摘出し、酵素処理により細胞を分散させた後、FBS 含有 DMEM 培地で 1-2 週間程度培養することで、基質付着・増殖能により ATSCs を分離した。

・ ATSCs の *in vitro* での分化誘導

過去に未分化神経細胞や、骨髄間質細胞に対して行われていた分化誘導法に鑑み、dbcAMP および IBMX を通常増殖培地に添加する形で分化誘導を行った。

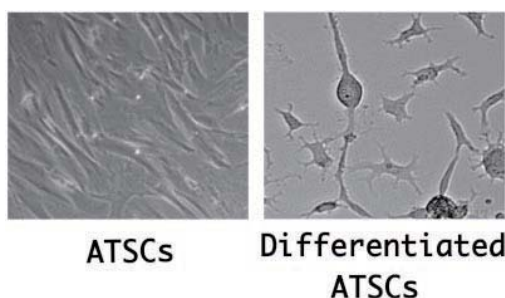


図1 化学薬剤による分化誘導での ATSCs の形態変化

・ ATSCs の神経細胞への分化評価

ATSCs の神経細胞への分化は、細胞形態、神経マーカー蛋白の発現、神経特異的トランスポーターの mRNA 発現を調べることにより評価した。

結果および考察

得られたイヌ ATSCs はマウス ATSCs で報告されているのと同様に紡錘形をしており、20 代ほどは安定して継代できる増殖能を示していた。dbcAMP, IBMX を用いた分化誘導により、誘導後 3 日目には ATSCs は複数の突起を伸張した、神経細胞様の形態を示していた (図 1)。こういった形態を示した細胞が全体の約 60% であったことから、今回の手法で得た ATSCs が複数の細胞集団で構成されているものと思われる。ATSCs は株化細胞ほどの増殖能は示さないため、単一の細胞集団を得ることが必要になったときには、神経細胞への分化能を有する ATSCs のみを増殖させる特殊培地で選択するか、ATSCs 特異的表面マーカーによる cell sorting が必要になってくるだろう。

分化誘導した ATSCs の神経マーカー蛋白の発現を調べたところ、Neuron specific enolase (NSE) の発現増加、Neurofilament 68 kDa (NF-68) の発現が見られるようになった (図 2)。さらに、NSE については分化誘導後の日数に比例して発現増加が見られた (図 3)。

また、神経特異的グルコーストランスポーターである GLUT-3、グルタミン酸トランスポーターである GLT-1, EAAC1, EAAT4 の mRNA 発現増加が半定量 RT-PCR で確認できた (図 4) ため、ATSCs は今回の

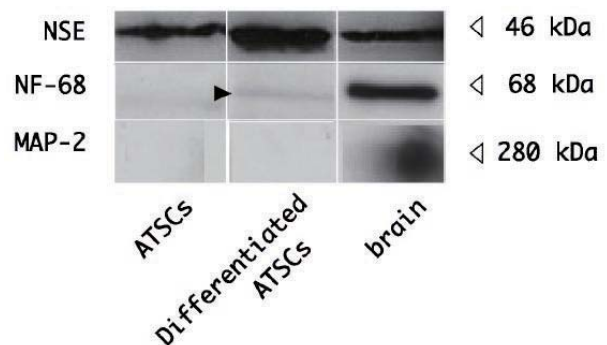


図2 分化誘導による神経マーカー蛋白発現の変化

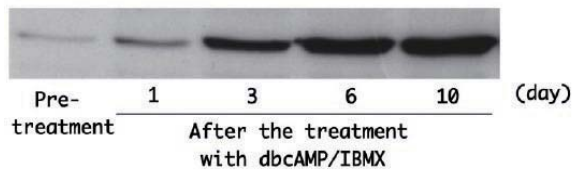


図3 分化誘導による ATSCs の NSE 蛋白の経時的変化

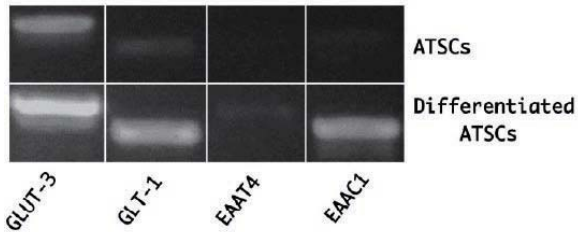


図4 分化誘導による神経特異的トランスポーター蛋白 mRNA 発現の変化

分化誘導法によって、少なくとも神経前駆細胞へ分化可能であると考えられた。

しかしながら、成熟神経マーカーである MAP-2 の発現は確認されなかった (図2) ことから、今回の手法では *in vitro* において成熟神経細胞へは分化していないことが示唆された。

生体への移植を考えた場合に、*in vitro* において成熟神経細胞へ分化させるよりも、ある程度未分化な状態の細胞を移植した方が、移植後の定着、増殖を考えた場合に有利である。よって、この ATSC は細胞移植による神経再生に有用であると考えられる。

おわりに

近年、成体組織から得られた主に線維芽細胞に、レトロウイルスベクターによって安定的に遺伝子導入

することで、胚性幹細胞様の幹細胞が得られることが京都大学およびウイスコンシン大のグループにより報告された。これは、細胞のリプログラミング、発生に必須の因子を考察するといった基礎的な意味でも、組織再生という臨床的な観点からも、世界的な *break through* であることは間違いない。

しかしながら、遺伝子操作した細胞をヒトに移植するというのは、実用的な面でまだまだ敷居が高い。そのため、化学薬剤などを用いた外部からの細胞への刺激で、遺伝子組み換えしていない細胞による組織再生を目指した研究も、今後重要になってくると思われる。
(研究員)

謝辞

本研究は東京大学農学生命科学研究科 獣医学専攻 獣医臨床病理学研究室在籍時 (指導教官: 小野憲一郎教授) に行ないました。また、本研究内容は *Journal of Veterinary Medical Science* 誌 2008 年 70 巻 4 号に誌上発表されております。

参考文献

- Jiang, Y., Henderson, D., Blackstad, M., Chen, A., Miller, R. and Verfaillie, C. M. 2003. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**:11854-11860.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., DeUgarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Benhaim, P. and Hedrick, M. H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stemcells. *Mol. Biol. Cell* **13**:4279-4295.

FIMF (Function of Intestinal Microbiota and Food) 合同フォーラム 2008 「腸内共生菌と食の機能」に参加して 会期: 2008 年 11 月 20 日 ~ 11 月 21 日, 場所: 東京大学安田講堂

竹山夏実

フォーラム開催の背景

本フォーラムは平成 20 年 11 月 20 日および 21 日の両日に、東京大学安田講堂にて開催された。(財)日本ビフィズス菌センター、日本乳酸菌学会、日本食品免疫学会、日本動物細胞工学会、(社)日本生

物工学会・乳酸菌工学研究部会による初の合同開催フォーラムという点からも着目された。近年、人体に有益な生菌 (プロバイオティクス) やその生菌の腸内生存の手助けとなる物質 (プレバイオティクス) の研究が加速的に進められてきており、「健康増進」

を特徴とする機能性食品に消費者の意識も高まっている。畜産分野においてもヒトと同様、飼料添加物による感染症の軽減効果が論文で発表されており、治療薬、予防薬と併せて今後研究が発展してゆくと考えられる。フォーラムはこのような現状を背景に、腸内微生物に対する日本の関連学会の研究姿勢を再確認し、活性化するための場を提供した。フォーラムは5つのセッション（下記参照）で構成され、各セッションでは国内外の指導的研究リーダーらが当該分野の研究概要について講演を行った。また、最新報告（平成20年7月発行 *Nature Immunology* 誌等）を交えて発表された大阪大学、審良教授の特別講演「Toll-Like Receptor と粘膜免疫」も興味深く拝聴した。

セッション1：腸内共生菌の機能、食品機能に関する研究動向

セッション2：セルシグナリング

セッション3：腸内共生菌のメタゲノム

セッション4：粘膜免疫

セッション5：腸内共生菌の代謝と宿主

腸内細菌に対する研究の現状

「腸内細菌叢（=集団）」が宿主に与える影響を解明するには、叢を構成する細菌の性状を明らかにする必要がある。20世紀後半までは *in vitro* の培養技術に支えられ、集団に含まれる菌種の分離同定が進められてきた。しかしながら大部分の菌種に対して *in vitro* 培養法が確立しておらず、このアプローチ方法には限界があった。21世紀に突入し難培養菌のゲノム解析は、分離や培養過程を経ずにヘテロな微生物集団からゲノムDNAを調製し、集団のままゲノムシーケンシングするメタゲノム解析技術によって躍進した。メタゲノム技術により腸内細菌叢を構成する細菌種が1,000を超えることも明らかになった。

今回のフォーラムでもハイスループットシーケンサー技術に支えられた、16S rRNA等の遺伝子解析に基づく新種同定分類から多くの講演があった。メタゲノム解析技術を最大限に活用し、腸内細菌叢の解明に挑む巨大プロジェクトが既に世界各国で立ち上がっていることも紹介された。平成20年1月に発足したEUを中心とする大学、企業、研究所等の研究機関が参画するMetaHITもそのプロジェクトの一つである。4カ年計画で、1) 一個人が有する腸内細菌の全遺伝子の解析、2) 100種類の腸内細菌の全ゲノム解析結果から得た遺伝子プロファイリングによる各細菌の構成比の算出、3) 構成比とヒトの疾病（特に肥満や炎症性腸疾患を対象とする）を関連づけ、腸内細菌叢がヒトの健康に及ぼす

影響を明らかにすることを目的に掲げている。日本においても Human Metagenome Consortium, Japan (HMGJ) と称する同様の研究プロジェクトが立ち上げられているが、MetaHITと比較すると小規模である点は否めない。

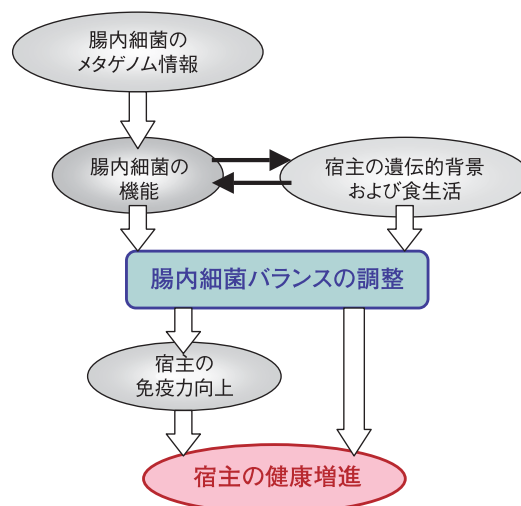
一方で、臨床面からのアプローチでも腸内細菌叢とヒトの疾病との関連を裏付ける研究成果が発表された。腸内細菌の構成比やその決定要因（出生時や育成時の環境による影響）とヒトのアレルギー発症との関連を示したデータにより、腸内細菌と宿主の恒常性維持に大きな相関性があることを我々に示唆した。

日本の腸内細菌研究に対する今後の姿勢

フォーラムの最後を締めくくるパネルディスカッションでは、副題に「これからどうする日本？」とあったように、パネリストから本研究で日本が取り組むべき姿勢について意見交換がなされた。先に示したように、海外のプロジェクトはチームワーク形成が良く、研究目的を絞り込み、様々な視点から課題にアプローチすることに長けている。反面、日本は欧米型の大型研究/大型ユニオンの形成を苦手とする傾向がある。しかしながら、日本では光岡知足博士に始まる腸内細菌研究で細菌との「共生」という概念を持つことで、食品等への共生菌の作用機序を掌握する力を養ってきた。近年の日本は欧米諸国と比べてゲノム解析の分野で若干遅れをとっているが、機能解析分野で強みがある。今後はゲノム情報による構造解析と機能解析を結びつけた研究が必須であると考えられるため、日本はこれまで培ってきた特性を維持しつつ、国家プロジェクトレベルで組織化を図れば研究展望が開けると期待される。

現在は断片的に捉えている腸内細菌研究を下図のように再編成することで、将来的にヒトや動物の健康促進につながる成果が導かれるであろう。

(研究員)



研修者・見学者受け入れ状況（平成20年1月から平成21年3月）

来所日・期間		所属機関・人数		研修・見学内容
平成20年	1月11日	山梨県東部家畜保健衛生所	1名	馬ウイルス感染症診断
	1月23日～1月24日	北海道大学大学院獣医学研究科	1名	鶏ウイルス感染症に関する血清学的診断技術
	2月13日～2月14日	グローバルビッグファーム株式会社	1名	豚ウイルス感染症 PCR 技術習得
	2月19日	大分県大分家畜保健衛生所 他	6名	鶏ウイルス感染症診断
	3月12日～3月13日	株式会社 ジャパンファーム	1名	鶏寄生虫病血清学的診断技術習得
	3月17日～3月21日	北里大学獣医畜産学部	1名	学外実習（細菌学）
	3月17日～7月31日	東京大学大学院農学生命科学研究科	1名	病原体感染マウスの酵素測定
	3月26日	国際協力機構	6名	鶏ウイルス感染症診断・施設見学
	4月17日	タイ・カセサート大学	1名	鶏ウイルス感染症診断・施設見学
	6月11日	東京都支援異業種交流会	1名	施設見学
	7月1日～7月3日	武蔵村山市立第一中学校	1名	職場体験学習
	9月26日～10月6日	国際協力機構	1名	鶏ウイルス感染症に関する血清学的診断技術
平成21年	2月3日	武蔵村山市立第一中学校	3名	職場訪問
	2月6日	東京大学大学院農学生命科学研究科	1名	施設見学

お 知 ら せ

当研究所の第67回評議員会ならびに第151回および第152回理事会が、去る平成21年5月27日に開催され、平成20年度の事業報告及び収支決算報告が承認・可決されると共に、任期満了に伴う理事、監事及び評議員の選任が行なわれました。その結果、下記の通り承認・決定されましたのでお知らせいたします。

1. 評議員

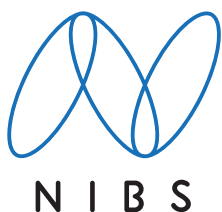
橋本 勉	高橋 英司	波岡 茂郎	上之蘭 博	柏崎 守	信國 卓史
林 研	菅野 茂	小野憲一郎	岩倉洋一郎	三田村圭二	明石 博臣
小川 博之	笹川 千尋	小沼 操	梅村 孝司	井土 俊郎	佐々木伸雄
吉川 泰弘（新任）	今原 照之（新任）	矢澤 肇（新任）			

2. 理事・監事

氏 名	役 職	担 当	氏 名	役 職
上田 進	理事長		板倉 智敏	理事
布谷 鉄夫	常務理事	所長（研究）、実験動物	永村 武美	理事
土井 邦雄	常務理事	研究	喜田 宏	理事
吉村 巖雄	常務理事	管理	長谷川篤彦	監事
小林 恒夫（新任）	常務理事	企画学術	真板 敬三（新任）	監事

日生研たより 昭和30年9月1日創刊(隔月1回発行)
 (通巻557号) 平成21年6月25日印刷 平成21年7月1日発行(第55巻第4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/竹山夏実(委員長), 入江拓也, 佐藤寛子
 事 務/企画学術部
 印刷所 株式会社 精興社
 (無断転載を禁ず)



—— 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、研究の持続性を願う気持ちを快いリズムに整え、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