

NIBS LETTER 2010 JULY
No. 563

日生研おより

2010年(平成22年)7月号 第56巻第4号(通巻563号)

挨拶・巻頭言

鳥、ブタ、そしてパンデミックインフル
エンザ騒動を振り返る……喜田 宏(2)

獣医病理学研修会

第49回 No. 984 マウスの精巣腫瘍
……………残留農業研究所(3)

第49回 No. 973 スナメリの心嚢部腫瘍
……………鳥取大学獣医病理学教室(4)

レビュー

抗体医薬品の研究開発
……………鈴木雅実(5)

発表論文紹介

Detection of Five Avian *Eimeria*
Species by Species-Specific Real-Time
Polymerase Chain Reaction Assay
……………川原史也(12)

お知らせ

研修者・見学者受け入れ状況……………(16)
柏崎評議員“瑞宝中綬章”受賞……………(16)



NIBS

財団法人 日本生物科学研究所

NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE

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

鳥、ブタ、そしてパンデミックインフルエンザ騒動を振り返る

喜田 宏

H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスによる家禽と野生水禽の被害が、ユーラシアとアフリカの 62 カ国に広がった。内 15 カ国では、6 年間に、計 495 名のヒトがこのウイルスに感染し、6 割が死亡した (2010 年 4 月 21 日現在)。中国、ベトナム、インドネシアと、2006 年からはエジプトが、家禽に不活化ワクチンを接種して、摘発淘汰を怠ったために、H5N1 ウイルスが 10 年以上も感染を拡大し、抗原変異まで起こしたのである。さらに、これら 4 カ国が、ヒトの H5N1 ウイルス感染例数の 87% を占める。

斯かる背景の下で、H5N1 鳥インフルエンザウイルスがヒトにおける伝播能と病原性を獲得してパンデミックを起こすのは、秒読み段階との妄想の基に対策が執られた。日本では、プレパンデミックワクチンと称して、不活化 H5N1 ウイルス完全粒子に水酸化アルミニウムゲルをアジュバントとして加えたワクチンを成人のみならず、3 歳以下の幼児を含む 6,000 人余に接種する臨床試験が実施された。これに驚いた外国の識者から「日本は何故このように無駄な暴挙に走るのか」との抗議や質問が寄せられ、返答し辛くて困ったものである。

鳥インフルエンザとパンデミック対策の基本は、まず、「感染家禽の摘発、淘汰により、被害を最小限に食い止めるとともにヒトの健康と食の安全を守る。鳥インフルエンザウイルスを鳥に止める」ことである。次に、「過去のパンデミックウイルスの出現にブタが関与したことはない疑いがないので、ブタインフルエンザの疫学調査を、特に鳥インフルエンザの多発地である中国、東南アジア、北・中米で継続実施する」ことである。2004 年以來、これらを OIE (国際獣疫事務局、世界動物衛生機関と自称)、WHO と各国に提案してきた結果、本年になってようやく一部が OIE の鳥インフルエンザ対策の指針に記述されることとなった。残念ながら、WHO、わが国の厚生労働省と多くの所謂専門家は、未だに、「H5N1 鳥インフルエンザウイルスはヒトに対しても“高毒性”で、これがパンデミックウイルスの本命」と“警告”している。

昨年 4 月、メキシコで、ブタ由来 H1N1 インフルエンザウイルスがヒトに伝播して、米国にその感染が拡大していることがわかった。WHO は 6 月に、パンデミックの段階に至ったと宣言した。日本では、これを「新型インフルエンザ」と呼び、流行防止を図ろうとしたが、対策に一貫性は見られなかった。「毒性の高い H5N1 ではなく、季節性インフルエンザ並みの毒性の低い H1N1 なので、これまでの新型インフルエンザ対策を緩める」とした。インフルエンザウイルスは毒素ではないので、“毒性”は誤用であり、“新型インフルエンザ”も「インフルエンザとは異なる、怖い病気」との誤解を招いている。そもそもブタのウイルスがヒトに伝播してすぐには、ヒトに高い病原性を示すことはない。鳥インフルエンザウイルスも同じである。インフルエンザウイルスの病原性は、感染した宿主体内における増殖の速さと量によって決まるからである。これがヒトからヒトに感染伝播を繰り返すうちに、ヒトでよく増殖する子孫ウイルスが選択される結果、ヒトに対して高い病原性を示すのである。第二波の病原性が高いのは“謎”ではない。当たり前である。現に、このブタ由来 H1N1 パンデミックウイルスは、出現してから 1 年間に、214 カ国に感染が広がったが、確認された死亡者は 17,919 名 (4 月 25 日現在) に止まり、季節性インフルエンザによるそれよりはるかに少ない。おそらく、日本だけでも数千万人がこのウイルスに既に感染した、すなわち、不顕性感染が圧倒的に多かったものと推察する。

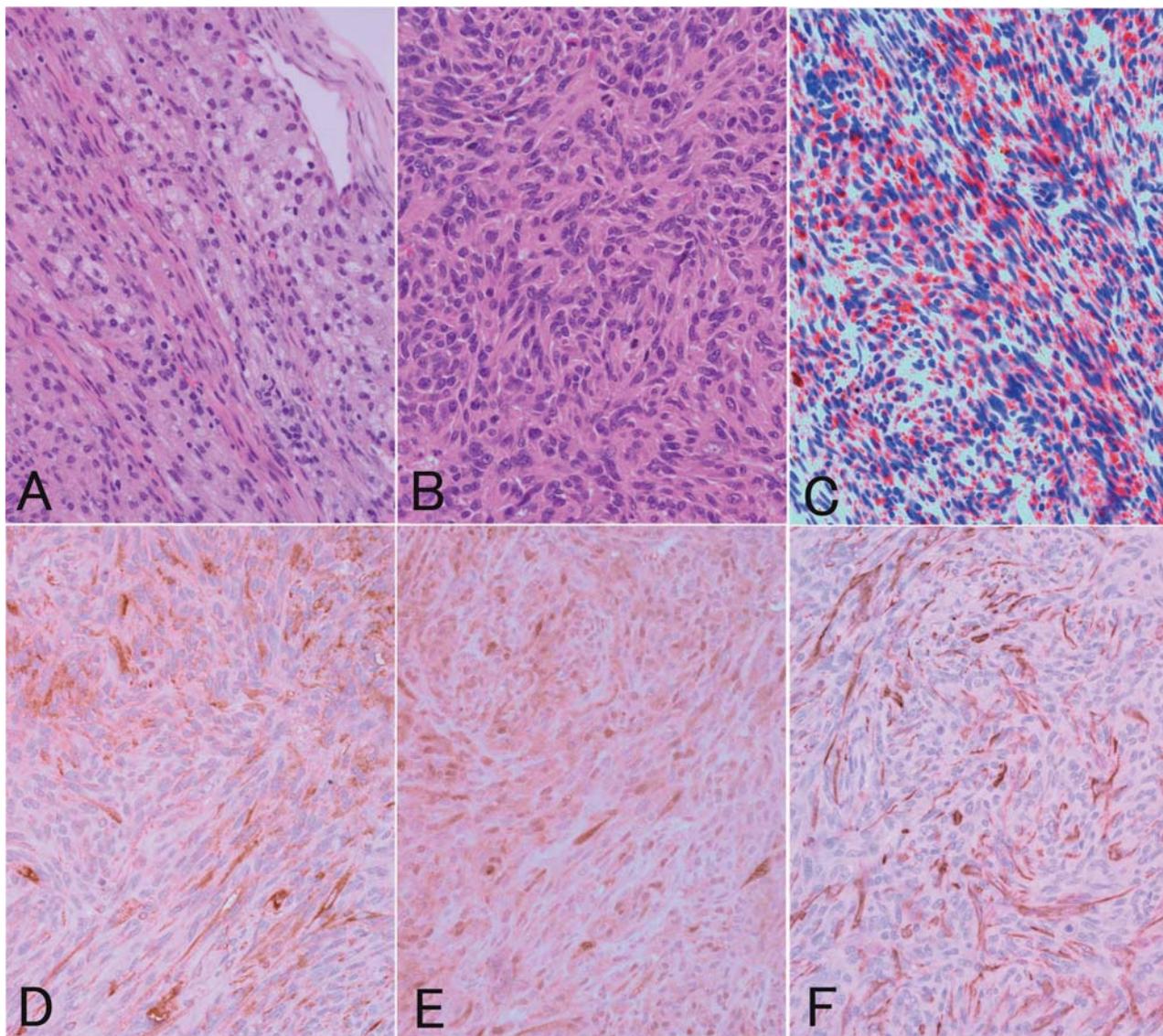
日本だけで毎年数千名以上を死亡させ、数百名以上に脳症、多臓器不全を起こしている、季節性インフルエンザウイルスこそ、恐るべき相手なのである。しかるに、季節性インフルエンザ対策を放置して、新型、新型と大騒ぎするのは見当違いである。日本政府は、一千億円超を投じてこのブタ由来 H1N1 ウイルスワクチンを一億ドースも国外企業から輸入するという途方もない契約を交わしてしまった。これまで日本の季節性ワクチンの年度毎の総接種量でさえ、三千万ドースを超えたことはない。輸入品のほとんどが使われずに廃棄されるであろう。

インフルエンザのような人獣共通感染症については、自然界から人間社会に至る病因微生物の生態、伝播経路、感染と宿主生体の応答としての発症、免疫と宿主集団の疫学をトータルで捉えて、対策に活かす視点が欠かせない。昨今のインフルエンザ騒動は、斯かる姿勢が定まらない、所謂専門家、行政 (WHO などの国際機関を含む)、メディアの人々の大合唱によって引き起こされたものである。感染症の本質を踏まえた、筋の通った情報発信を望むものである。特に行政には、「危機管理とは一般市民に安全・安心を齎すための方策であって、徒に危機感を煽ることではない」ことを強調したい。

(北海道大学大学院獣医学研究科教授・同大学人獣共通感染症リサーチセンター長)

マウスの精巣腫瘍

残留農薬研究所 第 49 回獣医病理学研修会 No. 984



動物：マウス, Crj:CD1 (ICR), 雄, 84 週齢。

臨床事項：発がん性試験に用いた投与群の動物で, 79 週間投与終了後に計画殺。剖検の 1 週間前より外陰部の腫脹。

剖検所見：右側精巣に直径約 20 mm の淡褐色腫瘍。

組織所見：腫瘍細胞は卵円形から紡錘形の核を持ち, 腫瘍の辺縁部 (図 A) では微細～中程度の空胞を有する細胞が充実に増殖し, 中央部 (図 B) では好酸性の細胞質を持つ細胞が時に花筵様に増殖していた。核の異型性や分裂像とともに, 出血, 壊死, 被膜への浸潤像が観察され, 一部の壊死周囲では pseudopalisading が認められた。腫瘍細胞は oil red O に陽性 (図 C), 免疫染色では inhibin (図 D), S-100 (図 E), α -smooth muscle actin (α -SMA, 図 F), vimentin に陽性, androgen receptor に陰性であった。腫瘍内部には, 萎縮精細管や eosinophilic globule cell が散見された。Bar = 20 μ m。

診断：Malignant Leydig cell tumor, spindle cell type

考察：紡錘形細胞の増殖より当初, 間葉系由来の腫瘍を

疑った。しかし, 脂肪の蓄積や卵円形細胞の集簇, 免疫染色の結果から, Leydig cell 由来が示唆された。一般に Leydig cell tumor は α -SMA 陰性であり, ヒトで α -SMA 陽性を示す腫瘍として Incompletely differentiated (unclassified) sex cord/gonadal stromal tumor が知られている。しかし, この未分化腫瘍ではほとんどの腫瘍細胞が α -SMA 陽性を示すため, 本症例の染色パターンとは異なっていた。Leydig cell の progenitor cell は α -SMA 陽性を示すことから, 腫瘍細胞の“脱分化”を反映している可能性も考えられた。

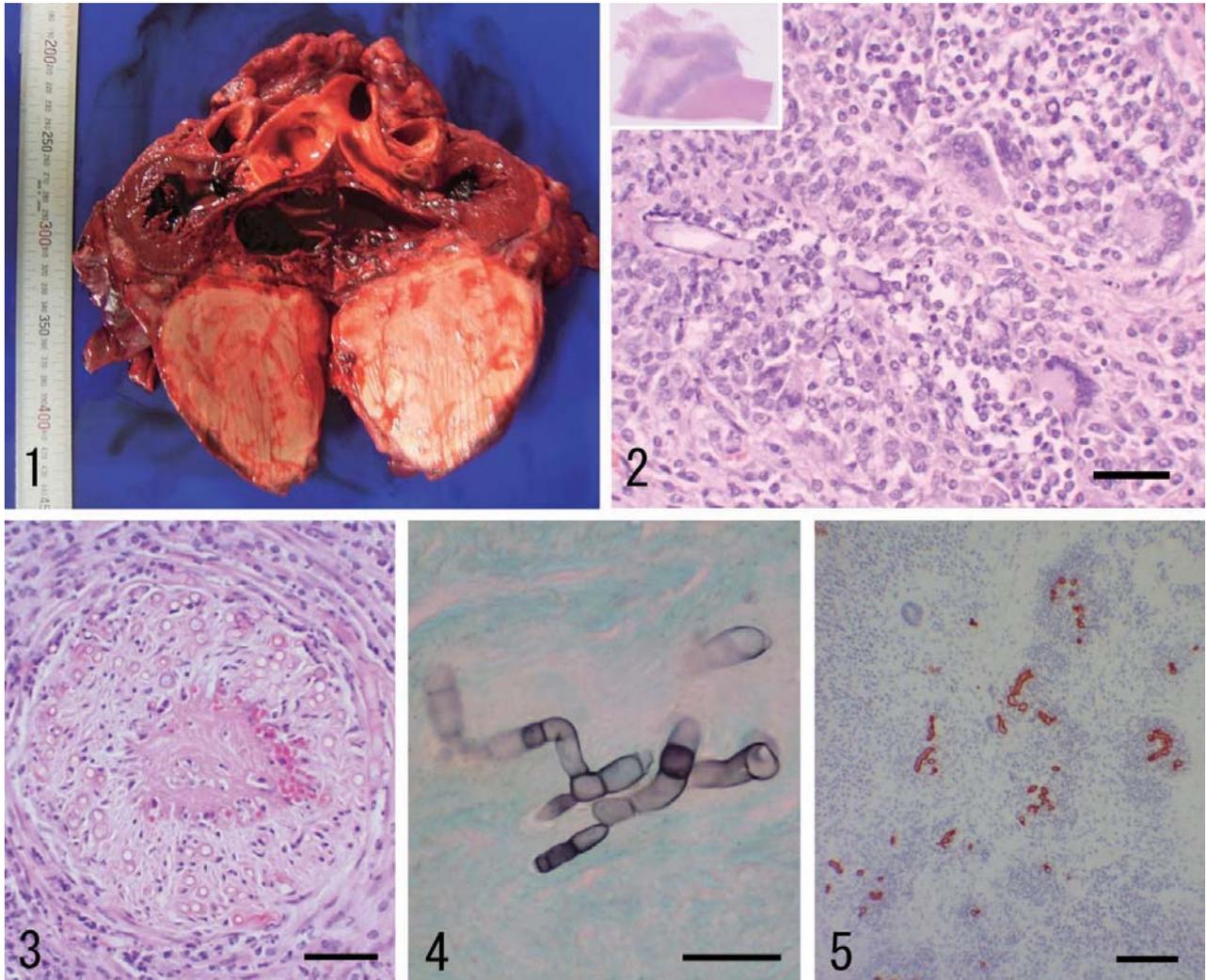
(吉田敏則, 大沼 彩)

参考文献：

Magro, G., Gurrera, A., Gangemi, P., Saita, A. and Greco, P. 2007. Incompletely differentiated (unclassified) sex cord/gonadal stromal tumor of the testis with a “pure” spindle cell component: report of a case with diagnostic and histogenetic considerations. *Pathol. Res. Pract.* **203**: 759-762.

スナメリの心嚢部腫瘍

鳥取大学獣医病理学教室 第49回獣医病理学研修会 No. 973



動物：イルカ、スナメリ (*Neophocaena phocaenoides*), 雄, 成体 (年齢不詳)。

臨床事項：約2年前に国内にて捕獲され水族館で飼育。数ヶ月前より食欲低下, 削瘦。1ヶ月前の血液生化学検査では, γ -GTP, ALT, カリウムおよび総蛋白質の上昇が認められた。総白血球数は正常範囲内だった。その後, 強肝剤, ビタミン剤投与などによる治療を行ったが著効なし。一般状態が徐々に悪化し死亡。

剖検所見：心室下部の位置の心嚢部に $22 \times 12 \times 13$ cm 大の白色結節の形成が認められた (図1)。また, その他の心嚢部位にも 2 cm 大に至る同様の白色結節 (図2 挿入図) が多数散在していた。同様の病変が肺, 縦隔リンパ節および臍十二指腸リンパ節に認められた。

組織所見：心嚢部結節は真菌性肉芽腫性炎で構成されており (図2, Bar = $50 \mu\text{m}$), 真菌が血管に集積している像が見られた (図3, Bar = $50 \mu\text{m}$)。結節周囲では線維化が顕著だった。菌糸は幅が広くさまざまな角度に分岐し, 隔壁を持つ菌糸 (図4, Bar = $30 \mu\text{m}$) が時折見られた。病巣内のほぼ全ての菌糸が抗 *Rhizomucor* 抗体に陽性を示した (図5, Bar = $100 \mu\text{m}$)。その他の真菌に

対する抗体には陰性を示した。肺, 縦隔リンパ節および臍十二指腸リンパ節に認められた病変においても同様の所見を示した。

診断：接合菌 (ムコール目真菌) による肉芽腫性心嚢炎
 考察：病原性, 菌糸の形態学的特徴および免疫染色の結果より上記の診断とした。一般に接合菌は菌糸の幅が比較的太く, 直角に分岐し, 隔壁は無いもしくは乏しいと理解されている。本例では, 多数の隔壁を持つ菌糸が見られたが, ムコール目真菌の中にもそのような多数の隔壁を有するものが報告されている。また, 接合菌による動物における代表的な病変形成部位は肺, 鼻腔, 脳, 消化管, 皮膚などである。本例のように心嚢炎を引き起こすことはまれであり, さらに海生哺乳類での本症の報告はこれまでになかったことから出題した。

(直田みさき・島田章則)

参考文献：

Frater, J. L., Hall, G. S. and Procop, G. W. 2001. Histologic features of zygomycosis: emphasis of perineural invasion and fungal morphology. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 125:375-378.

抗体医薬品の研究開発

鈴木雅実 (中外製薬・富士御殿場研究所)

抗体医薬品は、1) 標的分子 (抗原) に対する高い特異性と親和性に基づく高い効果と少ない副作用が期待できる、2) 標的分子の多様性ならびに抗体の有する作用メカニズムの多様性からさまざまな薬剤標的に作用できる、3) 遺伝子工学的手法の改変・改良、組み換え体製造技術の確立により工業生産が可能であるなどの特徴から、ゲノム研究で見出された標的分子に対していち早く治療法の提供を検討できる医薬品として注目されている (Table 1)。

Table 1 抗体医薬品の特徴

高い効果, 少ない副作用 標的分子 (抗原) に対する高い特異性と親和性 抗原以外には作用しない
多様な薬剤標的に作用できる 標的分子 (抗原) の多様性 作用メカニズムの多様性
工業生産が可能 遺伝子工学的な手法により改変, 改良が可能 組み換え体製造技術の確立

抗体医薬品の研究開発ブームは1980年代に到来し、最初の抗体医薬品は1986年に臓器移植の際の免疫抑制剤としてマウス抗体が上市された (Table 2)。しかし、マウス抗体がヒトにおいて抗原性を発現するなどの問題点より、その後約10年間抗体医薬品の上市はなかった。その間、抗体工学の技術開発が活発に行われ、マウス抗体からキメラ抗体、ヒト化抗体を作出する技術が確立された。また、ヒト抗体ファージライブラリーやヒト抗体産生マウスの活用などによるヒト抗体取得技術も確立された。このような技術革新を背景に、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体の研究開発が活発化し、1990年代半ばより抗体医薬品の上市が相次ぎ、現在までに30弱の抗体医薬品が臨床の場で活用されている。抗体医薬品の対象疾患領域は、研究開発初期には移植、循環器、癌領域で展開され、その後、感染症、炎症などの領域に拡大された (Table 3)。現在、癌、炎症、移植、循環器、感染症、呼吸器、眼科などの領域で医薬品として活用されている。

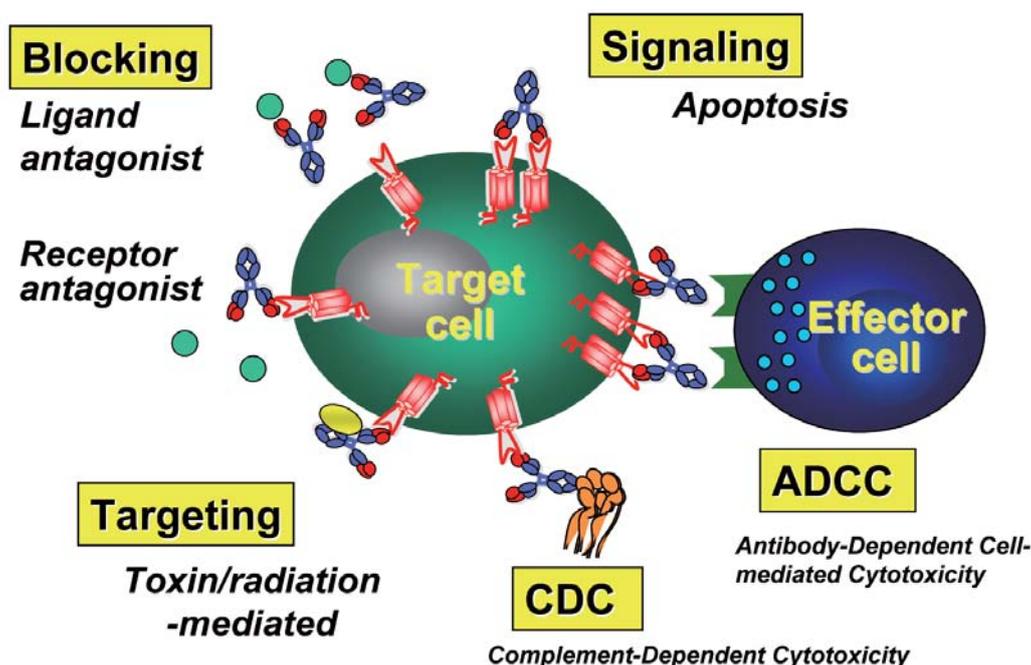


Fig. 1 抗体医薬品の主な作用機序 (模式図)

Table 2 抗体医薬品*の抗体型と上市時期

	1980				1990									2000											
	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
マウス抗体	1															1	1								
キメラ抗体									1			1	2						1						
ヒト化抗体													3		1	1		2	2	1	1	1	1	1	1
ヒト抗体																			1			1			3

*：いずれかの国・地域（日本，US，EU など）で医薬品として上市された抗体医薬品数。

Table 3 抗体医薬品*の適応疾患と上市時期

領域	製品数	1980		1990		2000	
		5-9	0-4	5-9	0-4	5-9	0-4
癌	10			2	6	2	
炎症	6			1	1	4	
移植	3	1		2			
循環器	1			1			
感染症	1			1			
呼吸器	1				1		
眼科	1					1	
その他	4				2	2	

*：いずれかの国・地域（日本，US，EU など）で医薬品として上市された抗体医薬品数。

Table 4 抗体医薬品の作用機序と適応疾患

領域	作用機序			
	Blocking	ADCC/CDC	Targeting	Signaling
癌	1(+3*)	6	3	—
炎症	6	—	—	—
移植	3	—	—	—
循環器	1	—	—	—
感染症	1	—	—	—
呼吸器	1	—	—	—
眼科	1	—	—	—
その他	4	—	—	—

*：ADCC/CDCを主な作用機序とする抗体のうち、3抗体は blocking 作用も合わせもつものと考えられている。

抗体医薬品は、抗体に種々の機能を付加することで医薬品としての薬理作用を発現する (Fig. 1)。現在上市されている抗体医薬品の多くは、標的分子の生理機能を阻害する中和作用により薬理作用を発揮している (Table 4)。

癌領域では、抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用 (ADCC)、補体依存性細胞傷害作用 (CDC)、あるいは、ドラッグデリバリー担体 (いわゆるミサイル療法) として、標的分子発現細胞を傷害することで薬理作用を発揮する抗体医薬品も上市されている。

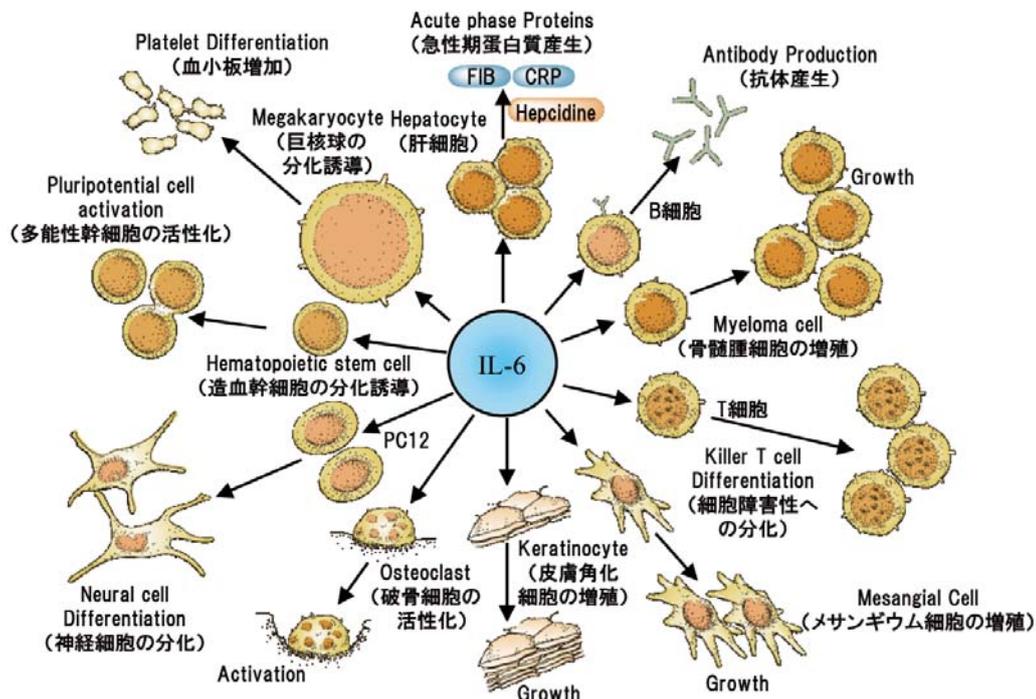


Fig. 2 IL-6の生理作用 (西本憲弘, 吉崎和幸. 医学の歩み. 1999^[1]を一部改変)

Table 5 抗体医薬品の抗体型, 標的分子, 作用機序, ならびに主な適応疾患

	Antibody	Approval	Type	Antigen	MoA	Indication
癌	Rituxan	1997	Chimera (IgG)	CD20	ADCC/CDC	血液癌 非ホジキンリンパ腫
	Herceptin	1998	Humanized (IgG)	Her2	ADCC/CDC	固形癌 乳癌など
	Mylotarg	2000	Humanized (IgG), conjugated	CD33	Targeting	血液癌 AML (急性骨髄性白血病)
	Campath	2001	Humanized (IgG)	CD52	ADCC/CDC	血液癌 CLL (B細胞性慢性リンパ腫)
	Zevalin	2002	Mouse (IgG), radiolabelled Ab	CD20	Targeting	血液癌 B細胞性非ホジキンリンパ腫
	Bexxar	2003	Mouse (IgG), radiolabelled Ab	CD20	Targeting	血液癌 CD20陽性非ホジキンリンパ腫
	Erbitux	2004	Chimera (IgG)	EGFR	ADCC/CDC	固形癌 結腸直腸癌, 頭頸部扁平上皮癌
	Avastin	2004	Humanized (IgG)	VEGF	Blocking	固形癌 結腸直腸癌, 非小細胞肺癌, 乳癌
	Vectibix	2006	Human (IgG)	EGFR	ADCC/CDC	固形癌 結腸直腸癌
Removab	2009	Humanized (bi-specific)	Ep-CAM, CD3	ADCC/CDC	固形癌 がん性腹水 (卵巣癌など)	
炎症	Remicade	1998	Chimera (IgG)	TNF	Blocking	関節リウマチ, 乾癬, クロウ病など
	Humira	2003	Humanized (IgG)	TNF	Blocking	関節リウマチ, 乾癬, クロウ病など
	Actemra	2005	Humanized (IgG)	IL-6R	Blocking	関節リウマチ, キャッスルマン病など
	Cimzia	2008	Humanized (Fab)	TNF	Blocking	クロウ病など
	Ilaris	2009	Human (IgG)	IL-1 β	Blocking	関節リウマチ, 乾癬
	Simponi	2009	Human (IgG)	TNF	Blocking	関節リウマチなど
移植	Orthoclone	1986	Mouse (IgG)	CD3	Blocking	急性拒絶反応
	Simulect	1998	Chimera (IgG)	CD25	Blocking	急性拒絶反応
	Zenapax	1998	Humanized (IgG)	CD25	Blocking	急性拒絶反応
循環器	ReoPro	1995	Chimera (Fab)	GPIIb/IIIa	Blocking	急性心虚血性合併症の抑制
感染症	Synagis	1998	Humanized (IgG)	RSV	Blocking	RSウイルスによる下気道疾患
呼吸器	Xolair	2003	Humanized (IgG)	IgE	Blocking	喘息
眼科	Lucentis	2006	Humanized (Fab)	VEGF	Blocking	加齢黄斑変性症
その他	Raptiva	2003	Humanized (IgG)	CD11a	Blocking	尋常性乾癬
	Tysabri	2004	Humanized (IgG)	VLA-4	Blocking	多発性硬化症
	Soliris	2007	Humanized (IgG)	C5	Blocking	発作性夜間ヘモグロビン尿症
	Stelara	2008	Human (IgG)	p40	Blocking	尋常性乾癬

また、癌領域の抗体医薬品には、その薬理作用に複数の機序 (ADCC/CDC と中和機能) が関与するものと想定されている製品もある。なお、シグナル誘導 (アゴニスト) として作用する抗体は、現時点で上市されていない。2009年11月までに上市された抗体医薬品について、疾患領域別に、抗体型、標的分子、作用機序、ならびに、主な適応疾患を Table 5 に示す。

現在上市されている抗体医薬品の中で、日本オリジンの抗体医薬品の第1号として、大阪大学と中外製薬との産学連携により“抗IL-6レセプター抗体”トシリズマブ (商品名: アクテムラ) が研究開発された。抗体医薬品を理解していただくための1例として、トシリズマブの特徴を概説する。

トシリズマブは、マウスで作成された抗ヒトIL-6レセプター抗体をもとに、ヒトに対する抗原性を減らす目的で、マウス抗体の抗原認識部位である相補性決定領域 (CDR) のみをヒトIgG1に移入し、全アミノ酸配列の90%以上をヒト由来としたヒト化抗体である。

IL-6はT細胞, B細胞, 単球, 線維芽細胞, 内皮細胞などさまざまな細胞から産生される炎症性サイトカインであり、肝細胞を介しての急性期タンパクであるCRPやフィブリノーゲンの産生, B細胞を介しての抗体産生, 破骨細胞の活性化など多様な生理作用を有することが知られている [1] (Fig. 2)。また、関節リウマチ, 全身型若年性特発性関節炎, キャッスルマン病の病態形成に深く関与していることも知られている。IL-6には、膜結合性と可溶性のレセプターが存在し、これらのレセプターとの複合体がIL-6ファミリーサイトカインの共通のシグナル伝達分子であるgp130 (糖タンパク分子) と結合することにより、細胞核内へシグナルが伝達される (Fig. 3)。トシリズマブは、膜結合性IL-6レセプターと可溶性IL-6レセプターの両方に結合することにより、IL-6とIL-6レセプターの結合を阻害し、gp130を介するIL-6の核内へのシグナル伝達を抑制する (Fig. 4)。

このような特徴を有する抗体を医薬品としていくために種々の臨床試験が行われた。関節リウマチを対象とした臨床試験成績の一部を紹介する。臨床試

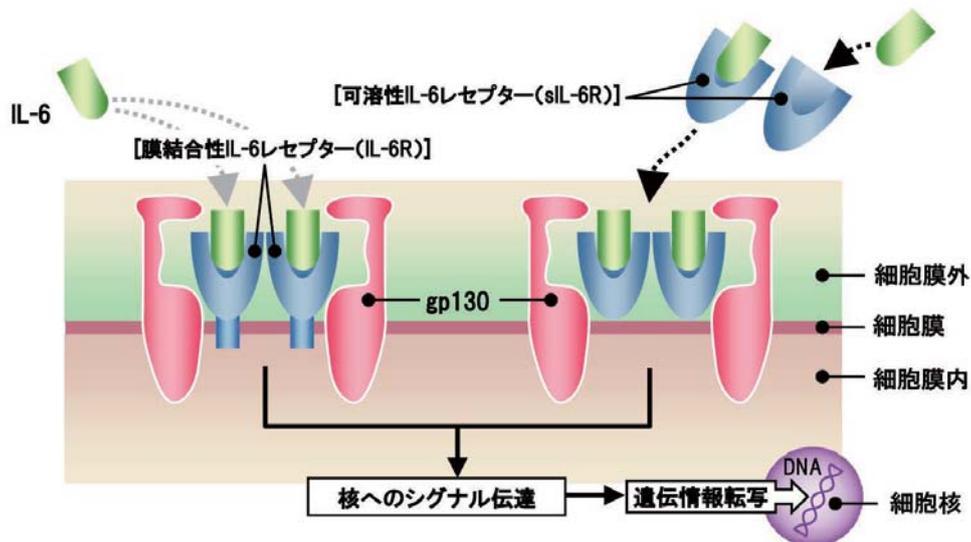


Fig. 3 IL-6 のシグナル伝達機構 (模式図)

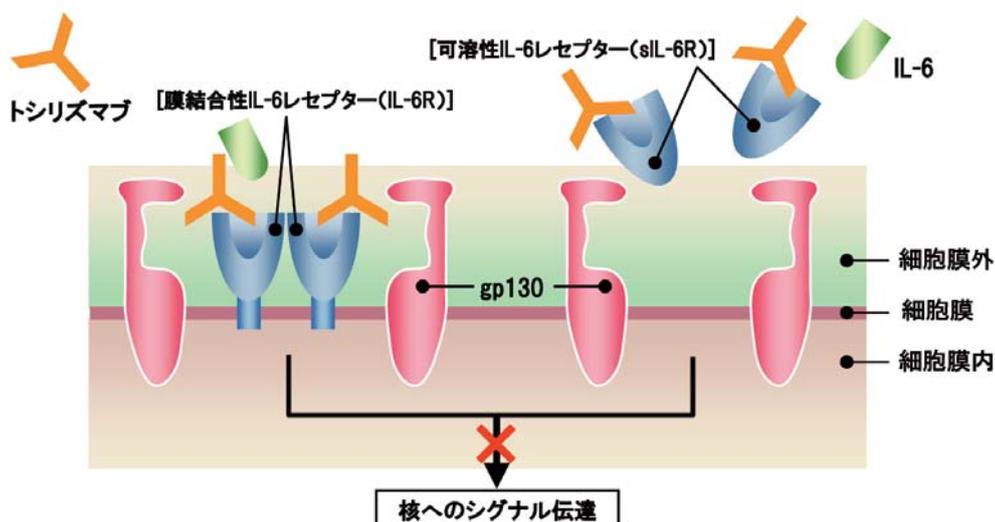


Fig. 4 トシリズマブの作用機序 (模式図)

験 (SATORI 試験) は、メトトレキサート使用中で一定の活動性を有する関節リウマチを対象に、トシリズマブ群は 8 mg/kg を 4 週間隔で計 6 回点滴静注投与し、メトトレキサート群は 8 mg/週ごとに計 24 週間経口投与した。その結果、トシリズマブ投与により関節リウマチ治療薬の評価である ACR スコア (米国リウマチ学会が策定した関節リウマチ診断の基準) は改善し、トシリズマブ群における最終観察時の ACR20, ACR50, ACR70 の改善率は、それぞれ 80.3%, 49.2%, 29.5% であり、いずれもメトトレキサート群に比べて有意に高い改善率を示した [2] (Fig. 5)。また、さまざまな視点から臨床試験を実施した結果、関節の炎症を改善するとともに、関節変形・破壊から生じる機能障害、疲労、貧

血、骨粗鬆症など関節リウマチに伴う種々の全身症状を緩和し、関節リウマチ治療薬としての有用性が示された。現在、日本をはじめ、ヨーロッパ、米国など世界各国で治療に用いられており、多くの方々の健康回復に貢献している。

新たな抗体医薬品の上市に向けた研究開発状況に目を移すと、世界規模で抗体医薬品プロジェクトが活発に推進されており、情報公開されている臨床開発段階 (実験動物での有効性・安全性が確認され、ヒトでの臨床試験が行われている段階) にあるプロジェクトだけでも 300 程度挙げられ、非臨床研究段階にあるものを加えると相当数になるものと推察される。特にここ 1-2 年、臨床開発段階に移行したプロジェクトが急増しており、2 年間で約 2 倍近い数

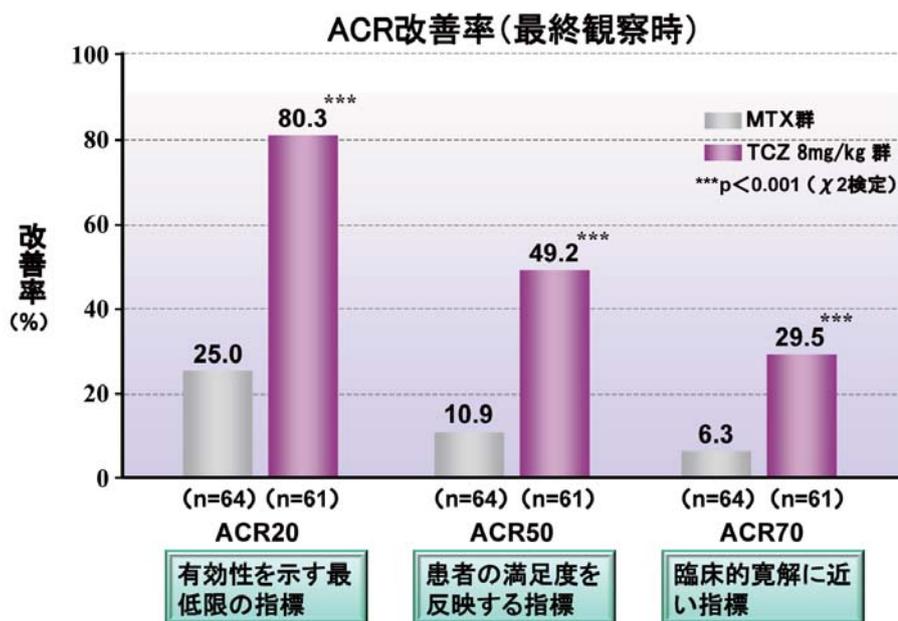


Fig. 5 トシリズマブ投与による ACR 改善率：第 III 相試験 SATORI 試験 (Nishimoto, N., et. al. 2009 : *Mod. Rheumatol.* [2])

に増加している。研究開発段階にある抗体医薬品の標的分子は生理機能や病態での役割が良く研究されているものに加え、新規標的分子も含まれている。新規標的分子は魅力的である反面、こうした分子の多くは病態での役割が良く判っていないことが多く、臨床応用のためには標的分子の生理学的ならびに病理学的な機能解析が必要不可欠となり、結果として開発が不成功に終わるリスクも高い。このような背景から、最近の標的分子は、臨床でバリデーションされたものや生理機能や病態での役割が良く分かっているものに集中する傾向がみられる。CD20, TNF, CD3, CD22, amyloid β , VEGF, Erb B, HER2, CD4, CD40などを標的分子とするプロジェクトには、5プロジェクト以上が集中し、開発が進められている。また、現在の抗体工学ではさまざまな機能(中和, 細胞傷害など)を有する抗体の創生が可能となり、標的分子の選択に加え、どのような機能を抗体に付加していくかも研究開発成功に向けた重要な要因となっている。

中外製薬でもトシリズマブに続く抗体医薬品の医療現場への提供に向け、複数の抗体医薬品プロジェクトに取り組んでいる。その標的分子には、生理学的ならびに病理学的な機能が明らかでない新規標的分子も含まれている。このような分子を標的とする抗体の臨床応用に向け、標的分子の生理学的・病理学的な機能を解析した経験を以下に概説する。

遺伝子発現解析より肝がんにおいて高発現する分子としてグリピカン3 (GPC3)が見出され、肝がんを適応疾患とする抗 GPC3 抗体プロジェクトに取り組んだ。GPC3は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンであるグリピカンファミリーの一員であり、細胞膜上に繫留されている。GPC3を含むヘパラン硫酸プロテオグリカンは、そのコアタンパクやヘパラン硫酸糖鎖への結合を介して、ケモカインや細胞増殖因子など様々なサイトカインの調節に関わっていることが知られているが、GPC3の機能は明らかにされていなかった。そこで、肝がんを高発現している GPC3 の機能を解析した。

抗ヒト GPC3 抗体を GPC3 発現肝がん移植モデルに投与し、同モデル腫瘍組織を病理組織学的に解析した。その結果、腫瘍細胞の変化に加え、マクロファージ (M ϕ) の浸潤状態に変化がみられ、GPC3 と M ϕ との間の生物学的な関係が示唆された [3]。

そこで、肝細胞がん患者由来の肝臓を用いて、GPC3 の機能と M ϕ 浸潤との関係を検討した。各肝細胞がんサンプルを GPC3 発現パターンに基づき 3 群 (GPC3 陰性: GPC3⁻, GPC3 陽性だが細胞膜発現は不明瞭: GPC3⁺/UC, GPC3 陽性で細胞膜発現明瞭: GPC3⁺/C) に分類した (Fig. 6)。次いで、汎 M ϕ (pM ϕ) マーカーを用いた免疫染色を行い、上記の GPC3 発現パターンによる群間で陽性細胞数を比較した。その結果、pM ϕ マーカー陽性細胞

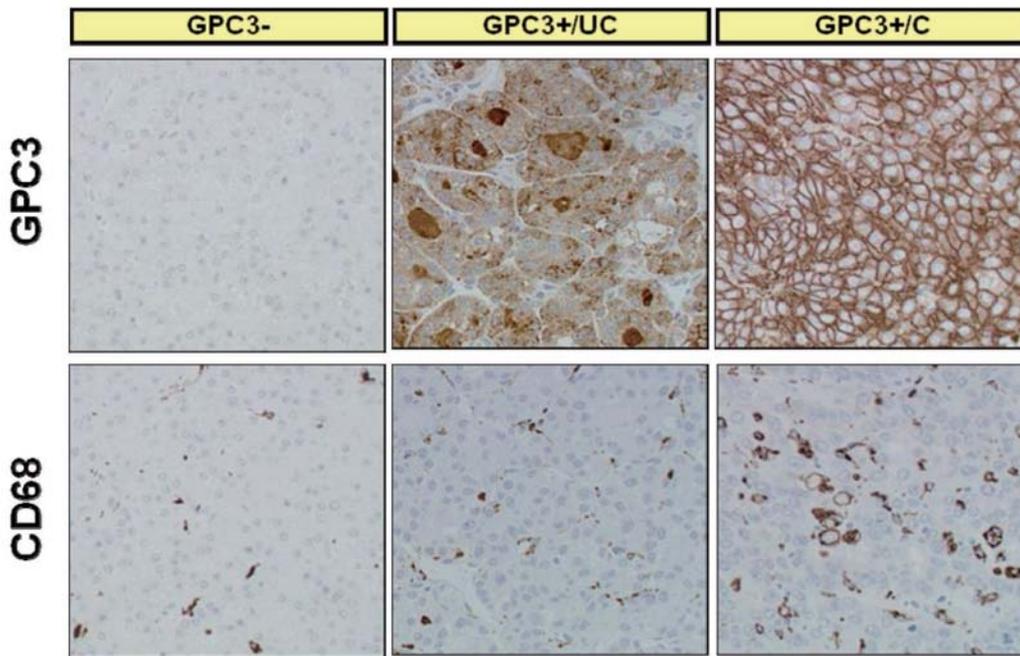


Fig. 6 ヒト肝がん組織における GPC3 発現と CD68 陽性細胞 (Takai, H., et. al. 2009: *Liver Int.* ^[4])

数は、GPC3+/C の肝細胞がん組織で GPC3- 及び GPC3+/UC と比較して有意に増加していた [4] (Fig. 7)。また、ヒト肝細胞がんマウス皮下移植モデルを用いた検討でも同様の現象が再現され、肝がん細胞における GPC3 の細胞膜発現と同組織への Mφ 動員との関連が示された。

上記 Mφ の phenotype (M1 or M2) をマイクロアレイ及び病理組織学的手法を用いて解析した。GPC3 非発現 (SK-Hep-1:GPC3-) 及び発現 (SK03:

GPC3+) 肝細胞がん移植モデル腫瘍組織を用いて、遺伝子発現プロファイルを比較したところ、SK03 移植組織で M2 Mφ 関連遺伝子の発現上昇がみられた [5] (Fig. 8)。さらに、SK-Hep-1 移植組織と比べて SK03 移植組織で浸潤が増加していた Mφ の大部分は M2 Mφ 特異的マーカーに対して陽性であった。これらの結果から、SK03 移植組織に動員された Mφ は M2 Mφ であることが強く示唆された。腫瘍組織中の M2 Mφ は、一般に tumor-associated

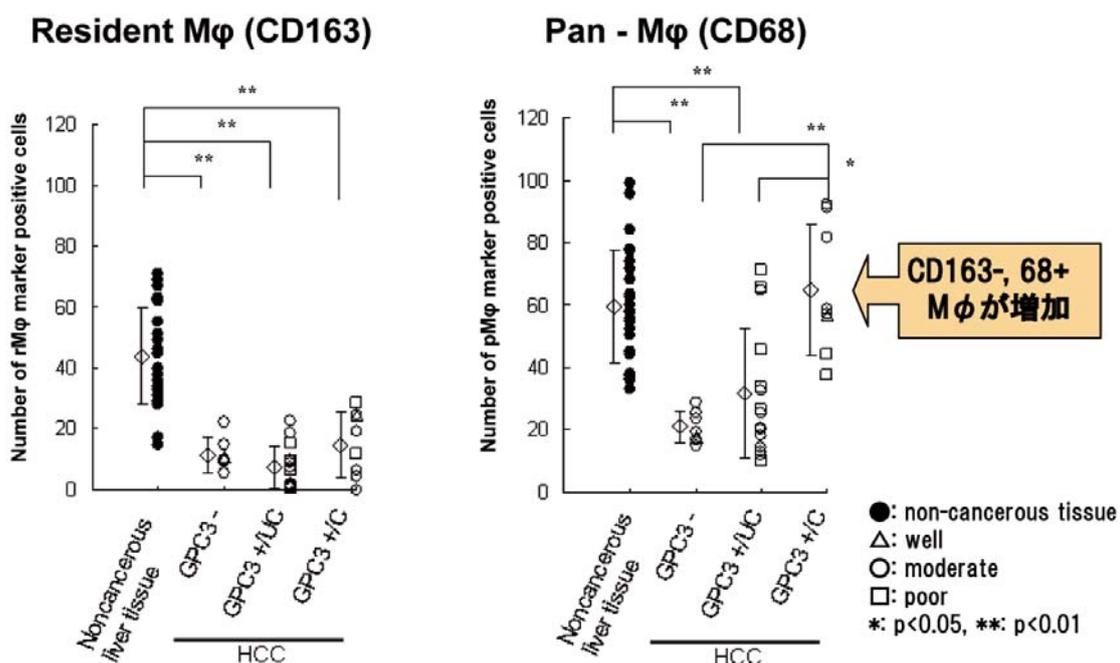


Fig. 7 ヒト肝がん組織における GPC3 発現とマクロファージ数 (Takai, H., et. al. 2009: *Liver Int.* ^[4] を一部改変)

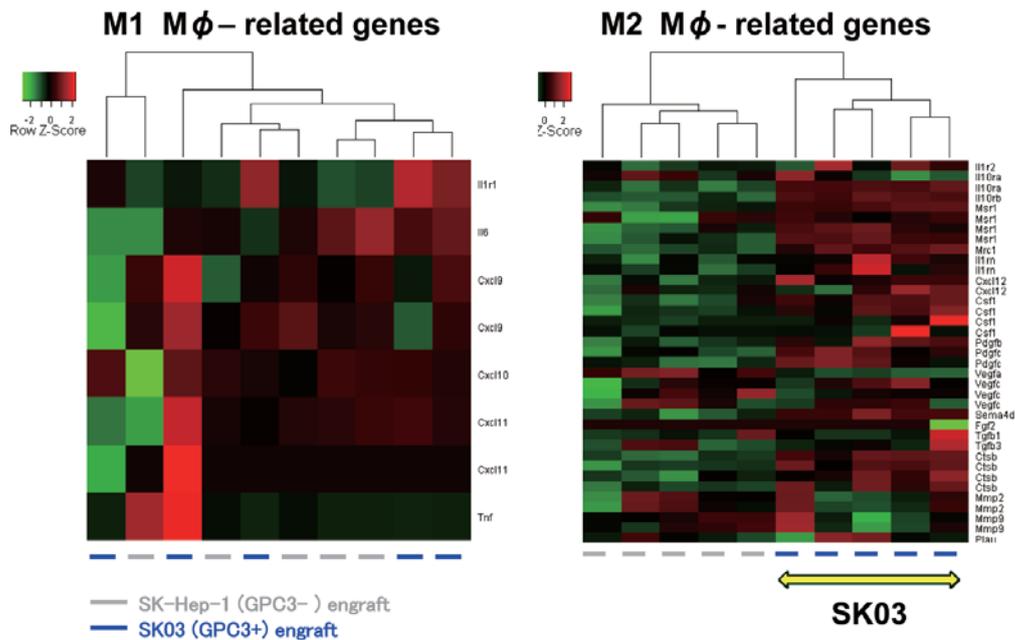


Fig. 8 GPC3 非発現 (SK-Hep-1:GPC3-) 及び発現 (SK03:GPC3+) 肝細胞がん移植モデル腫瘍組織を用いた M1, M2 関連遺伝子クラスター解析 (Takai, H., et. al. 2009: *Cancer Biol. Ther.* [5] を一部改変)

macrophage (TAM) に分類され、腫瘍の進展や転移を促すとされている。実際に、SK03 移植組織では、TAM の機能としての血管・リンパ管新生や基質リモデリングの充進が観察された。

これらの研究成績から、肝がん細胞における GPC3 の細胞膜発現により、肝がん組織への M2 タイプの TAM の動員が促されることが明らかになった。また、GPC3 は、これら TAM の機能を介して、血管・リンパ管や細胞外マトリックスなどの腫瘍微小環境を調節し、肝がんの進展や転移を促している可能性が示唆された。現在、抗 GPC3 抗体は肝がんを対象に臨床試験による有効性・安全性の評価を進めている。

今回、抗体医薬品の研究開発状況、上市抗体医薬品の標的分子と適応疾患に加え、抗体医薬開発過程から明らかとなる新規標的分子の機能などをごく簡単に紹介した。抗体医薬品は分子標的治療薬のひとつとして脚光を浴び、研究開発が盛んで、近年、レビューを含めおびただしい報告がなされている。詳細について興味のある読者の方はこれらの書籍、レビューならびに最新の報告を参照いただきたい。

参考文献

1. 西本憲弘, 吉崎和幸. 1999. Castleman 病と MCD -IL-6 シグナル阻害による治療. *医学のあゆみ*

188:942-948.

2. Nishimoto, N., Miyasaka, N., Yamamoto, K., Kawai, S., Takeuchi, T., Azuma, J. and Kishimoto, T. 2009. Study of active controlled tocilizumab monotherapy for rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate (SATORI) : significant reduction in disease activity and serum vascular endothelial growth factor by IL-6 receptor inhibition therapy. *Mod. Rheumatol.* **19**:12-19.
3. Takai, H., Kato, A., Kinoshita, Y., Ishiguro, T., Takai, Y., Ohtani, Y., Sugimoto, M. and Suzuki, M. 2009. Histopathological analyses of the antitumor activity of anti-glypican-3 antibody (GC33) in human liver cancer xenograft models: The contribution of macrophages. *Cancer Biol. Ther.* **8**:930-938.
4. Takai, H., Kato, A., Kato, C., Watanabe, T., Matsubara, K., Suzuki, M. and Kataoka, H. 2009. The expression profile of glypican-3 and its relation to macrophage population in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* **29**:1056-1064.
5. Takai, H., Ashihara, M., Ishiguro, T., Terashima, H., Watanabe, T., Kato, A. and Suzuki, M. 2009. Involvement of glypican-3 in the recruitment of M2-polarized tumor-associated macrophages in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol. Ther.* **8**:2329-2338.

発表論文紹介

Detection of Five Avian *Eimeria* Species by Species-Specific Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay

川原史也¹, 平 健介², 長井伸也¹, 大永博資¹, 小沼 操¹, 布谷鉄夫¹

1 財団法人日本生物科学研究所, 2 麻布大学

Avian Diseases 52:652-656, 2008

川原史也

背景

鶏コクシジウム症は *Eimeria* 属の原虫によって引き起こされる疾病であり, 養鶏産業において甚大な経済的被害をもたらしている。原虫の寄生により腸管が傷害されることから, 臨床症状は水様から血様に至る下痢を主体とし, 増体の抑制や死亡なども認められる。

鶏に寄生する *Eimeria* 原虫は 8 種が報告されているが, そのうち病原性が問題となるのは主に *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* および *E. tenella* の 5 種である。疾病の発生があった場合, 腸管に病変が形成される部位や糞便中に排泄されるオーシストの形態などにより原因種が同定されるが, これらの方法は熟練を要する上に常に客観的な成績が得られるとは限らない [7, 9]。また, 多くの野外感染事例では, 同時に複数種が感染しているため, その病態は複雑で正確な診断は極めて困難である。

臨床の現場や疫学的調査に利用するために, 鶏コクシジウム原虫種を鑑別できる客観的かつ簡便な方法の確立が望まれてきた。これまでに, 5S rRNA 遺伝子, スモールサブユニット rRNA 遺伝子, ITS-1 領域および ITS-2 領域を対象にした PCR 法をベースにした鑑別法が報告されている [3-6, 8, 10-12, 16-18, 20, 21]。近年, 様々な応用が試みられているリアルタイム PCR 法 (以下, qPCR 法) は, 反応時間が短い上にゲル電気泳動などの作業が不要であり, これまでの PCR 法と比べて大幅に省力化することが可能である。これまでに *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix* および *E. tenella* を対象としたプローブベースの qPCR 法が報告されていた [1, 2,

19]。今回, 我々は *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* および *E. tenella* の 5 種を対象とし, プローブベースと比較してより省コストかつ省力的な SYBR Green ベースの qPCR 法を開発した。

材料と方法

実験には, 野外から分離されて当研究所で維持されている *E. acervulina* Na 株, *E. brunetti* Nb 株, *E. maxima* Nm 株, *E. necatrix* Nn 株および *E. tenella* Nt 株を使用した。各種のオーシスト浮遊液は 10^7 個 /mL に調製した後, 10 倍に段階希釈して標準試料を準備した。それぞれの濃度の標準試料を 0.5 mL 分取して遠心した後, 上清を捨てて High Pure PCR Template Preparation Kit (ロシユ) の tissue lysis buffer 0.5 mL に浮遊した。浮遊液は直径 0.5 mm のガラスビーズとともに振盪してオーシスト壁を破碎し, その後はキットの手順に従って DNA 抽出を実施した。野外の糞便検体は, 糞便を PBS で 10 倍に希釈した後, 0.5 mL を分取して上述した方法で同様に DNA を抽出した。また, 野外の糞便検体は定法により, オーシスト含有量測定および形態による簡易的な種鑑別を実施した。*E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. necatrix* および *E. tenella* については今回, ITS-1 領域を対象にして独自に種特異的プライマーを設計したが, *E. maxima* については既報のプライマーに基づき改変した [8]。qPCR 反応には Light Cycler (ロシユ) を使用し, 反応液の組成は SYBR Premix Ex Taq (タカラバイオ) 10 μ L, 10 mM の種特異的プライマーセット各 1 μ L (最終濃度各 0.5 mM), DNA サンプル 5 μ L とした。増幅条件は, 初期変性が 95°C, 60 秒, そ

の後 95℃, 10 秒, 62℃, 10 秒, 72℃, 10 秒の増幅反応を 45 サイクル繰り返した。増幅完了後, 60℃ から 95℃ に温度を上昇させて融解曲線分析を実施した。

成績

今回, 構築した qPCR 法は交差反応を認めず, 対象とした 5 種の鶏コクシジウム原虫を種特異的に検出できた。各種の検出限界は, *E. brunetti*, *E. maxima* および *E. tenella* では 10^1 /mL, *E. acervulina* および *E. necatrix* では 10^2 /mL であった (Table 1)。増幅産物の融解曲線は各種で単一かつ固有のピークを示し, Tm 値は *E. acervulina* 88.8℃, *E. brunetti* 83.5℃, *E. maxima* 81.6℃, *E. necatrix* 80.2℃ および *E. tenella* 88.3℃ であった (Fig. 1)。野外の 32 ヶ所の養鶏場のうち, *E. brunetti* は 21 農場, *E. maxima* および *E. necatrix* は 16 農場, *E. tenella* は 12 農場ならびに *E.*

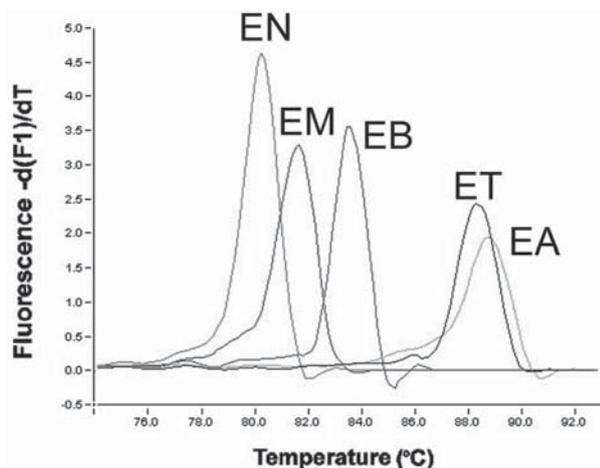


Fig. 1 増幅産物の融解曲線分析
EA, *E. acervulina*; EB, *E. brunetti*; EM, *E. maxima*;
EN, *E. necatrix*; ET, *E. tenella*.

acervulina は 8 農場でそれぞれ検出された (Table 2)。

総括

qPCR 法は反応中であつてもリアルタイムに成績を確認可能な上に, 反応後のゲル電気泳動などの作業が不要であるため, これまでの PCR 法と比較して迅速に結果を得ることができる。これまでに, 鶏コクシジウム原虫を対象とした SYBR Green ベースの qPCR 法はまだ報告されていなかった。SYBR Green ベースの反応ではプローブの設計および合成が不要であり, 種特異的なプライマーセットを変更するだけで系の構築が可能である。その一方で, 非特異的な DNA 断片の増幅産物も検出してしまうため, 特異的なプライマーセットの設計が極めて重要である。今回, 我々が設計した種特異的なプライマーセットは他種の DNA とは反応せず高い特異性を示し, プライマーダイマーなどの非特異的な反応産物が生じることもなかった。

一般的な糞便検査によるオーシストの検出限界は 100 個/g であるが, 本 qPCR 法は同等以上の検出限界を示した。本 qPCR 法の検出感度が優れているのは, PCR 増幅の対象とした ITS-1 領域がマルチコピーである上に, 一つのオーシストには 8 隻のスプロゾイト (虫体) が含まれているためと考えられる。

鶏コクシジウム原虫は, *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* および *E. tenella* の 5 種が主に疾病を引き起こすと言われる。そのうち, *E. brunetti* は過去の野外調査において確認されていなかったため, 日本には本種は浸潤していないと考えられてきた [14, 15]。ところが 1990 年に始めて国内で *E. brunetti* の分離が報告されて以来, 浸潤の拡

Table 1. 本 qPCR 法の標準試料を用いた定量および検出範囲の成績

種 ^A	標準試料のオーシスト数(個/mL)		
	検討範囲	定量範囲 (相関係数)	検出限界
EA		$10^7 - 10^2$ (0.9992)	10^2
EB		$10^7 - 10^1$ (0.9947)	10^1
EM	$10^7 - 10^1$	$10^7 - 10^2$ (0.9971)	10^1
EN		$10^7 - 10^3$ (0.9971)	10^2
ET		$10^7 - 10^1$ (0.9997)	10^1

^AEA, *E. acervulina*; EB, *E. brunetti*; EM, *E. maxima*; EN, *E. necatrix*; ET, *E. tenella*.

Table 2. 野外糞便検体の検査成績

農場 ^A	日齢	OPG (Log) ^B	形態による鑑別 ^C			qPCR 法による検出 ^D				
			AMi	NPT	BMa	EA	EB	EM	EN	ET
BB	25	2.9	-	+	+	-	-	+	+	+
BB	39	NT		NT		-	+	+	+	-
BB	39	NT		NT		+	-	-	+	-
BB	48	3.0	-	+	-	-	+	+	+	-
BB	49	3.0	-	+	-	-	+	-	+	-
BB	51	NT		NT		-	-	+	+	-
BB	60	4.0	-	+	+	+	+	+	-	+
BB	60	4.7	-	+	-	-	-	-	+	-
BB	70	4.0	-	+	-	-	-	-	+	+
BB	91	NT		NT		-	+	-	+	-
BB	111	NT		NT		-	+	+	-	+
BB	112	5.0	-	-	+	-	+	-	-	-
BB	175	2.0	-	+	+	-	+	+	+	-
BB	200	4.0	-	-	+	-	+	-	-	-
BB	203	5.0	-	+	+	-	+	-	-	-
BL	40	6.6	-	-	+	-	+	-	-	-
BL	71	NT		NT		+	+	-	+	-
BL	80	5.6	-	+	-	-	+	-	-	-
BL	149	6.4	-	+	+	-	+	-	-	-
L	71	6.1	-	+	+	-	+	+	-	+
L	86	5.0	-	+	+	-	+	-	+	+
L	110	5.0	-	-	+	-	+	+	-	-
L	140	4.0	+	+	+	+	+	+	-	-
L	140	NT		NT		-	-	-	+	-
L	157	NT		NT		+	+	+	+	+
L	210	5.5	-	+	+	-	+	-	+	+
B	29	NT		NT		+	-	+	-	+
B	37	5.4	-	+	-	-	-	-	-	+
B	42	3.0	-	+	-	-	-	+	+	-
B	45	3.7	+	+	+	+	-	+	-	+
B	46	3.8	+	-	+	+	+	+	-	+
B	50	NT		NT		-	-	+	-	-

^ABB, Breeders for broilers; BL, Breeders for layers; L, Layers; B, Broilers. ^{B,C} NT, Not tested. ^CAMi, small oocysts (<19.0 μ m; tentatively *E. acervulina* and/or *E. mitis*); NPT, medium-sized oocysts (19.0 to 24.0 μ m; tentatively *E. necatrix*, *E. praecox* and/or *E. tenella*); BMa, large oocysts (>24.0 μ m; tentatively *E. brunetti* and/or *E. maxima*).

^DEA, *E. acervulina*; EB, *E. brunetti*; EM, *E. maxima*; EN, *E. necatrix*; ET, *E. tenella*. ^{C,D}+, Detected; -, Not detected.

大と被害の発生が危惧されてきた [13]。その後、野外調査の報告は見当たらず、国内での広がり是不明のままであったが、今回、検査の対象とした 21ヶ所の種鶏場のうち、20農場で *E. brunetti* が検出されたことから、その浸潤が大幅に進行したものと示唆された。

(研究員)

引用文献

1. Blake, D. P., Hesketh, P., Archer, A., Shirley, M. W. and Smith, A. L. 2006. *Eimeria maxima*: the influence of host genotype on parasite reproduction as revealed by quantitative real-time PCR. *Int. J. Parasitol.* **36**:97-105.
2. Blake, D. P., Qin, Z., Cai, J. and Smith, A. L. 2008. Development and validation of real-time polymerase chain reaction assays specific to four species of *Eimeria*. *Avian Pathol.* **37**:89-94.
3. Cantacessi, C., Riddell, S., Morris, G. M., Doran, T., Woods, W. G., Otranto, D. and Gasser, R. B. 2008. Genetic characterization of three unique operational taxonomic units of *Eimeria* from chickens in Australia based on nuclear spacer ribosomal DNA. *Vet. Parasitol.* **152**:226-234.
4. Gasser, R. B., Woods, W. G., Wood, J. M., Ashdown,

- L., Richards, G. and Whithear, K. G. 2001. Automated, fluorescence-based approach for the specific diagnosis of chicken coccidiosis. *Electrophoresis* **22**:3546–3550.
5. Jenkins, M. C., Miska, K. and Klopp, S. 2006. Application of polymerase chain reaction based on ITS1 rDNA to speciate *Eimeria*. *Avian Dis.* **50**:110–114.
6. Jenkins, M. C., Miska, K. and Klopp, S. 2006. Improved polymerase chain reaction technique for determining the species composition of *Eimeria* in poultry litter. *Avian Dis.* **50**:632–635.
7. Joyner, L. P. and Long, P. L. 1974. The specific characters of *Eimeria*, with special reference to the coccidia of the fowl. *Avian Pathol.* **3**:145–157.
8. Lew, A. E., Anderson, G. R., Minchin, C. M., Jeston, P. J. and Jorgensen, W. K. 2003. Inter- and intra-strain variation and PCR detection of the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences of Australian isolates of *Eimeria* species from chickens. *Vet. Parasitol.* **112**:33–50.
9. Long, P. L. and Joyner, L. P. 1984. Problems in the identification of species of *Eimeria*. *J. Protozool.* **31**:535–541.
10. Morris, G. M. and Gasser, R. B. 2006. Biotechnological advances in the diagnosis of avian coccidiosis and the analysis of genetic variation in *Eimeria*. *Biotechnol. Adv.* **24**:590–603.
11. Morris, G. M., Woods, W. G., Richards, D. G. and Gasser, R. B. 2007. Investigating a persistent coccidiosis problem on a commercial broiler-breeder farm utilising PCR-coupled capillary electrophoresis. *Parasitol. Res.* **101**:583–589.
12. Morris, G. M., Woods, W. G., Richards, D. G. and Gasser, R. B. 2007. The application of a polymerase chain reaction (PCR)-based capillary electrophoretic technique provides detailed insights into *Eimeria* populations in intensive poultry establishments. *Mol. Cell. Probes* **21**:288–294.
13. Nakamura, T., Kawaguchi, H. and Imose, J. 1990. Identification of *Eimeria brunetti* using glucose phosphate isomerase and lactate dehydrogenase. *Nippon Juigaku Zasshi* **52**:859–860.
14. Oikawa, H., Kawaguchi, H., Katagiri, K. and Nakamoto, K. 1979. Incidence of chicken coccidia from broiler houses in Japan, 1973–1977. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A.* **244**:339–344.
15. Oikawa, H., Kawaguchi, H., Nakamoto, K. and Tsunoda, K. 1977. Field surveys on coccidial infection in broilers in Japan in 1974 and 1975. *Nippon Juigaku Zasshi* **39**:127–134.
16. Schnitzler, B. E., Thebo, P. L., Mattsson, J. G., Tomley, F. M. and Shirley, M. W. 1998. Development of a diagnostic PCR assay for the detection and discrimination of four pathogenic *Eimeria* species of the chicken. *Avian Pathol.* **27**:490–497.
17. Schnitzler, B. E., Thebo, P. L., Tomley, F. M., Uggla, A. and Shirley, M. W. 1999. PCR identification of chicken *Eimeria*: a simplified read-out. *Avian Pathol.* **28**:89–93.
18. Stucki, U., Braun, R. and Roditi, I. 1993. *Eimeria tenella*: characterization of a 5S ribosomal RNA repeat unit and its use as a species-specific probe. *Exp. Parasitol.* **76**:68–75.
19. Swinkels, W. J., Post, J., Cornelissen, J. B., Engel, B., Boersma, W. J. and Rebel, J. M. 2006. Immune responses in *Eimeria acervulina* infected one-day-old broilers compared to amount of *Eimeria* in the duodenum, measured by real-time PCR. *Vet. Parasitol.* **138**:223–233.
20. Tsuji, N., Kawazu, S., Ohta, M., Kamio, T., Isobe, T., Shimura, K. and Fujisaki, K. 1997. Discrimination of eight chicken *Eimeria* species using the two-step polymerase chain reaction. *J. Parasitol.* **83**:966–970.
21. Woods, W. G., Whithear, K. G., Richards, D. G., Anderson, G. R., Jorgensen, W. K. and Gasser, R. B. 2000. Single-strand restriction fragment length polymorphism analysis of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) for six species of *Eimeria* from chickens in Australia. *Int. J. Parasitol.* **30**:1019–1023.

研修者・見学者受け入れ状況（平成21年4月から平成22年3月）

来所日・期間	所属機関・人数	研修・見学内容
4月27日～ 4月28日	株式会社 ナルク 2名	実験動物取扱手技習得等
6月11日～ 6月12日	長崎県中央家畜保健衛生所 1名	豚病診断技術習得
7月13日～ 7月15日	静岡県畜産技術研究所 中小家畜研究センター 1名	組織培養等技術習得
8月 3日～ 8月 7日	北里大学獣医学部 1名	学外実習
8月17日～ 8月28日	麻布大学獣医学部 1名	専門学外実習
8月25日～ 8月27日	日本大学生物資源科学部 1名	学外実習
11月16日～11月20日	株式会社 食環境衛生研究所 1名	豚病診断技術習得
2月15日～ 2月19日	北海道大学獣医学部 1名	インターンシップ
3月19日	日本獣医生命科学大学獣医学部 4名	施設見学
3月23日～ 3月24日	グローバルビッグファーム 2名	豚病診断技術習得

— 柏崎評議員 “瑞宝中綬章” 受賞 —

当所の柏崎守評議員は、平成22年春の叙勲で瑞宝中綬章の栄に浴されました。お慶び申し上げます。



— 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

日生研たより 昭和30年9月1日創刊(隔月1回発行)
 (通巻563号) 平成22年6月25日印刷 平成22年7月1日発行(第56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/黒田丹(委員長), 竹山夏実, 鈴木敬之
 事務/企画学術部
 印刷所 株式会社 精興社
 (無断転載を禁ず)