

NIBS LETTER 2011 NOVEMBER
No. 571

日生研たより

2011年(平成23年)11月号 第57巻第6号(通巻571号)

挨拶・巻頭言

温故知新

.....岩田 晃(2)

獣医病理学研修会

第50回 No. 1011 イヌの卵巣部腫瘍

.....摂南大学(3)

レビュー

消滅する器官としての胸腺：胸腺微小環境
の形成・恒常性維持の転写制御機構

.....後飯塚 僚(4)

文献紹介

牛マイコプラズマ病：無症状かつ致命的な
疾病.....田積 晃浩(11)



NIBS

財団法人 日本生物科学研究所

NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE

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

温故知新

岩田 晃

昨年从我々の研究室では李さんが研修生として活躍している。彼女は現代なお嬢さんで、日本語が堪能。誰からも好かれる性格である。しかし、研究テーマからは嫌われているようで、格闘の日々である。李さんのテーマは *Actinobacillus pleuropneumoniae* (以下, App) の抗体検査。日生研では、抗体検査として、血清型を判定するゲル内沈降反応検査、毒素 ApxI, III に対するウエスタン・ブロッティングによる検査、1, 2, 5 型の ELISA 検査を行っている。なかでも、微妙なバランスが要求される血清型 ELISA を合理的に改良しようと始めた課題であった。

先哲が経験的に確立した免疫法で作製した血清や抗原を利用した ELISA であったが、分析するにつれ、特異性がどうして確保できているのか理解不能な血清であり、抗原であった。

App の血清型を決めている抗原は莢膜を構成する多糖であってタンパク質ではない。タンパク質を抗原とする免疫応答は、免疫学が分子生物学的方法を取り入れて、1980 年代から急速に解明された分野である。簡単にまとめると、タンパク質抗原が樹状細胞などの抗原提示細胞に取り込まれ、細胞内でプロテアーゼによる限定分解を受けて MHC タンパク質のポケットに配置され、細胞表面上に提示される。提示された抗原を認識できるヘルパー T 細胞が樹状細胞によって活性化されると、同じく抗原を認識できる B 細胞を活性化して抗体生産細胞に分化させる。ところが、このルートには多糖を抗原提示する仕組みはない。

私が大学院で免疫学を学んだ 80 年代前半は抗原が T 細胞依存性抗原 (TD) と非依存性抗原 (TI) に分類されていた。T 細胞 mitogen (分裂促進物質) に対する B 細胞 mitogen の探索の結果、見つかったのが TI 抗原である。TI 抗原は、LPS など、すべての B 細胞に反応するもの (TI-1) の他に、特定の B 細胞集団が反応するもの (TI-2) があり、細菌由来の多糖は代表的な TI-2 である。

要するに、李さんが研究対象としている莢膜多糖は TI-2 抗原であり、その免疫応答は現代で主流になっているタンパク質抗原に対する免疫学の常識はあまり役に立たない。それ故に解析に混乱が生じていた。

TI-2 抗原に対する免疫応答の解析は、日陰者であったためか遅れている。血清を得るには通常使われるアジュバントを使って免疫してはいけない。TD 抗原に対する免疫応答が支配的になるためである。菌体のみを頻回投与し、早めに免疫を切り上げる。この方法は先哲が経験的に確立した方法である。抗体応答は B1-B もしくは marginal zone B 細胞と呼ばれる特殊集団が担い、主に IgM が生産される (1)。かくして、李さんの研究方針はこの特殊集団を標的することになった。このことは、タンパク質抗原を中心とした免疫学、すなわち組換え技術を駆使して解析ができる免疫学、を離れて大海へと漕ぎ出すことを意味する。

B1-B もしくは marginal zone B 細胞は自然免疫的な IgM (natural IgM) を生産すると考えられている。natural IgM が抗原刺激とは無関係に誘導されることは無菌マウスで証明された。また、抗原特異性が低く、おそらく親和性成熟が起こらない。KO マウスの解析から、natural IgM は感染防御に役に立っているほか、アポトーシス細胞の処理、がんの発生の防御、自己免疫反応の抑制に関与することが知られている (2)。

Streptococcus pneumoniae では、特定の血清型の CPS で免疫すると、他の 11 血清型の CPS に対しても、抗体価が多かれ少なかれ上昇する。natural IgM の抗原特異性が低いためと考えられる (3)。SPF の実験動物でも、加齢に伴い細菌に対する非特異的な凝集抗体が少しずつ上昇する。環境細菌により繰り返し刺激を受けて上昇した natural IgM のためではないだろうか。

また、natural IgM のレパートリーは進化的に保存されているようである (4)。魚の抗体は IgM のみであり、抗原特異性の低さや応答性の速さを見ると natural IgM に似ている。魚類は抗体遺伝子の再構成の仕組みが整った進化的に最初の生物であり (5)、natural IgM の原型は魚にあるように思えてくる。

流行の影で後回しにされた不可解な現象が新たな地平を生み出すことは科学の世界では珍しいことではない。だから、科学の将来を見通すことは困難で、だから、科学は面白い。

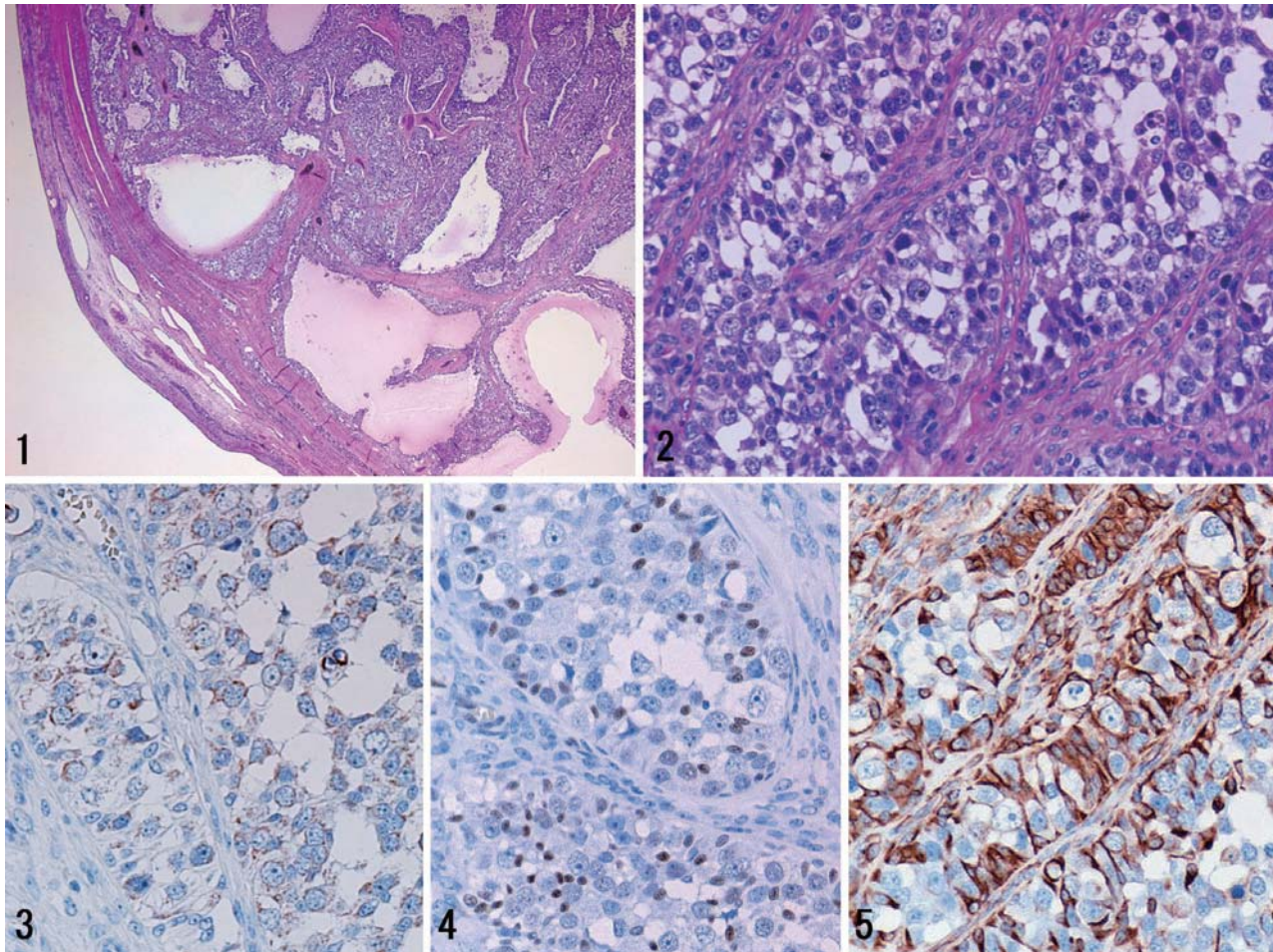
(理事)

文献

1. Swanson, CL et al., J. Exp. Med. 207, pp 1485-1500 (2010)
2. Ehrenstein MR & Notley CA. Nature Rev. Immunol., 10, pp 778-786 (2010)
3. Jones HE et al., Vaccine 27, pp 5806-5815 (2009)
4. Rapaka RR et al., J. Exp. Med. 207, pp 2907-2919 (2010)
5. Litman GW et al., Nature Rev. Immunol., 5, pp 866-879 (2005)

イヌの卵巢部腫瘍

摂南大学 第 50 回獣医病理学研修会標本 NO. 1011



動物：イヌ，雑種，雌，11 歳。

臨床事項：子宮蓄膿症が疑われ，避妊手術が実施された。左卵巢部に腫瘍が確認され，左卵巢部腫瘍と左子宮の一部がホルマリン固定後送付された。

肉眼所見：固定後の左卵巢部腫瘍は径約 4 cm 大，平滑乳白色，軟弾性，断面は白～淡黄色充実性であった。

組織所見：腫瘍は卵巢組織に隣接し，結合組織で区画された胞巣構造を示していた。ときに，胞巣構造内に嚢胞が形成されていた（図 1）。各胞巣では，顆粒膜～莖膜細胞に類似した小型～中型で紡錘形～不整形の細胞が密～疎に増殖し，胚細胞に類似の大型類円形細胞が様々な程度に混在していた。小型～中型の紡錘形～不整形細胞は均一なクロマチンの類円形核と好酸性で少量～中等量の細胞質を持ち，大型類円形細胞は散在したクロマチンと 1～複数の明瞭な核小体を入れた核と好酸性～淡明の広い細胞質を有していた（図 2）。Call-Exner like body と石灰沈着を欠いていた。免疫染色では，大型類円形細胞が胚細胞マーカーの PLAP 陽性，顆粒膜細胞マーカー

の WT-1，ビメンチン陰性であった。小型紡錘形細胞は WT-1，ビメンチン陽性，PLAP 陰性であり，中型不整形細胞は 2 者の中間の染色態度を示した。（図 3, 4, 5）
診断：イヌの卵巢の混合性胚細胞－性索間質腫瘍（Ovarian mixed germ cell sex cord-stromal tumor, canine）

考察：胚細胞と性索間質細胞の混合腫瘍は gonadoblastoma と mixed germ cell sex cord stromal tumor に分類される。gonadoblastoma は Call-Exner like body 形成や石灰沈着が特徴であるのに対し，mixed germ cell - sex cords stromal tumor はそれらを欠く。本例では gonadoblastoma の特徴所見を欠き，上記と診断した。（阿野直子）

参考文献：

1. Patnaik, A. K. and Mostofi, F. K. 1993. *Vet. Pathol.* **30** : 287-295.
2. Talerman, A. and Roth, L. M. 2007. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **26** : 313-321.

消滅する器官としての胸腺：胸腺微小環境の形成・恒常性維持の転写制御機構

後飯塚 僚 (東京理科大学生命科学研究所発生及び老化研究部門)

1. はじめに

成体の上皮組織における細胞のターンオーバーはそれぞれの組織で異なっており、小腸上皮では約5日で全ての細胞が入れ替わり、皮膚表皮では約4週間、肺胞上皮は全ての細胞が入れ替わるのに6ヶ月近くかかることが知られているが、このような持続的な細胞の交換は上皮組織の恒常性維持のために必須のプロセスである。皮膚、角膜、小腸、肺、乳腺などの上皮性組織の恒常性は、組織幹細胞によって維持されていると考えられており、実際、自己複製能を持ち、かつその組織に特有な細胞に分化可能な能力をもつ幹細胞の実体や幹細胞の維持に関わるそれぞれの組織に特徴的な微小環境(ニッチ)が明らかにされてきている。さらに、それら成体組織幹細胞の維持に、胎仔期の器官形成に関わる転写因子が密接に関係していることも明らかになってきており、最近では、それら転写因子の幾つかを組み合わせ、いわゆる脱分化・分化転換を介して組織を再生できることが報告されている。

胸腺は免疫器官の中で唯一の上皮性組織であり、約2週間で上皮細胞はターンオーバーし、また他の上皮組織と同様再生能力を有していることが知られている。近年、髄質上皮細胞の成熟や機能に関わる転写因子の機能についての研究が進展している反面、成体胸腺微小環境の恒常性の維持や再生、上皮幹細胞の存在や組織特有のニッチの構成、それに関わる転写因子ネットワークについては置き去りにされたままである。本稿では、まず胸腺の器官形成に関与する転写制御因子についての知見を概説し、それに基づいて、筆者等の胸腺上皮細胞における転写制御に関する知見を交えながら、成体胸腺の恒常性維持と転写因子の関係について考察することで、加齢に伴い退縮する胸腺という免疫器官の再生への道筋を探る。

2. 胸腺の構造

胸腺は分化途上のT細胞である胸腺細胞とその

分化を支持する微小環境である胸腺ストローマ細胞からなり、組織構造としては外側が胸腺細胞が密集し、ヘマトキシリン・エオジンで濃染する皮質、内側が細胞質の大きな上皮細胞が相対的に多く存在するために淡染する髄質から構成される。胸腺の微小環境を構成するストローマ細胞には、主にケラチン5(keratin 5: K5)ならびにK14陽性の髄質上皮細胞、K8陽性の皮質上皮細胞、繊維芽細胞、樹状細胞、マクロファージ、血管内皮細胞などがあり、それらが三次元的に配置されたネットワークを形成している(図1)。皮質では最も未熟なCD4⁻CD8⁻(double negative: DN)胸腺細胞がT細胞レセプターβ鎖の再構成とその後の増殖を経て、CD4⁺CD8⁺(double positive: DP)細胞へと分化し、胸腺上皮細胞の発現する主要組織適合性抗原(major histocompatibility complex: MHC)と自己抗原によって正の選択を受け、CD4⁺CD8⁻(CD4 single positive: CD4-SP)あるいはCD4⁻CD8⁺(CD8 single positive: CD8-SP)細胞に分化し、髄質へと移行する。髄質では自己抗原に強く反応するSP細胞が負の選択によって除去される。これらの胸腺細胞の自己抗原に対する正・負の選択を行うために、皮質胸腺上皮細胞にはb5tという胸腺特異的プロテアソームサブユニットが発現しており[1]、また、髄質上皮細胞の一部にはインスリンのような末梢組

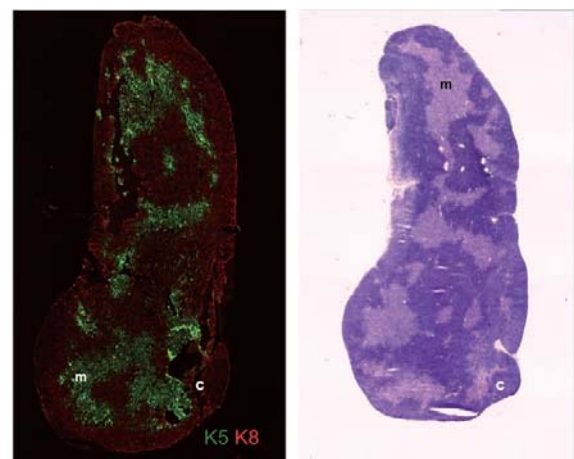


図1 胸腺の構造 右: H&E 染色, 左: K5/K8 の免疫染色 m: 髄質, c: 皮質

織特異的に発現する抗原を異所性に発現させるのに必須の転写因子である Aire が発現していることが近年明らかにされ [2], T 細胞の分化ならびに選択を支持する微小環境を構成する上皮細胞の機能が注目されてきている。

3. 胸腺の退縮と再生

胸腺の退縮はヒトでは生後 1 年で始まり, マウスでは約 6~8 週令の性成熟後に始まるが (図 2), この胸腺の加齢に伴う退縮が免疫老化 (immune senescence) の主要な要因と考えられている [3]。前述したように, 胸腺は多様な抗原特異性を持った T 細胞レパートアを持続的に末梢リンパ器官に供給することにより, 外来抗原刺激による活性化や老化によって失われる末梢 T 細胞レパートアを補っているが, 胸腺の退縮に伴い, 胸腺から末梢に供給される T 細胞の数が激減することにより, 易感染症や発癌などの危険性が高齢者では高まると考えられる。しかしながら, この胸腺の退縮の機構は, 胸腺という組織が胸腺細胞と胸腺上皮細胞の相互作用によって機能的にも環境的にも維持されていることもあり, 骨髄由来の胸腺細胞, 微小環境を構成する上皮細胞あるいはこの両方に, その主要な要因があるのか, 現在までのところ, 明確にはなっていない。

一方, 加齢による退縮以外にも, 化学療法, 放射線照射, 敗血症性ショックや急性のストレスなどで, 一過性の胸腺萎縮が起こるが, これら一過性の胸腺退縮は加齢によるものと異なり, 時間経過とともに回復することから, 胸腺自体には再生能力が存在す

るものと考えられる。

4. 胸腺の器官形成

胸腺の器官形成は, マウスにおいては胎齢 10 日頃に咽頭領域で始まる [4]。咽頭弓・鰓弓は鰓嚢と鰓裂から構成されており, 鰓嚢は両側性の咽頭由来の内胚葉のポケットで, 頭側から後方へ形成されていき, 一層の単層上皮からなる。一方, 鰓裂は外胚葉の陥入であり, これも単層上皮から構成されている (図 3)。

胎齢 10 日に第三鰓嚢の内胚葉細胞が増殖を開始し, 副甲状腺との共通の原基として胸腺原基が形成される。この胸腺・副甲状腺原基は, 神経堤由来の間葉系細胞に囲まれ, 最終的にこれら間葉系細胞は被膜を形成する。胎齢 12.5 日まで原基は増殖し, その結果, 咽頭から分離し, その後, 胸腺と副甲状腺原基への分離, 最終的な解剖学的な位置への移動が起こる。胸腺と副甲状腺形成領域の分離に関しては, 鰓嚢の腹側領域が胸腺原基になり, 背側領域が副甲状腺原基になるが, これは副甲状腺の器官形成に必須の転写因子である *Glial cell missing (Gcm2)* が胎齢 9.5 日に原基の背側に発現することによって決定されるものと考えられている (詳細については後述)。

リンパ系細胞は胎齢 11.5 日に最初に胸腺原基に認められるが, この段階の胸腺には血管形成が起こっていないので, これらの細胞は血管を介さず, 胸腺周囲の間葉を移動して, 原基に侵入するものと考えられている。胎齢 12.5 日までには胸腺上皮細

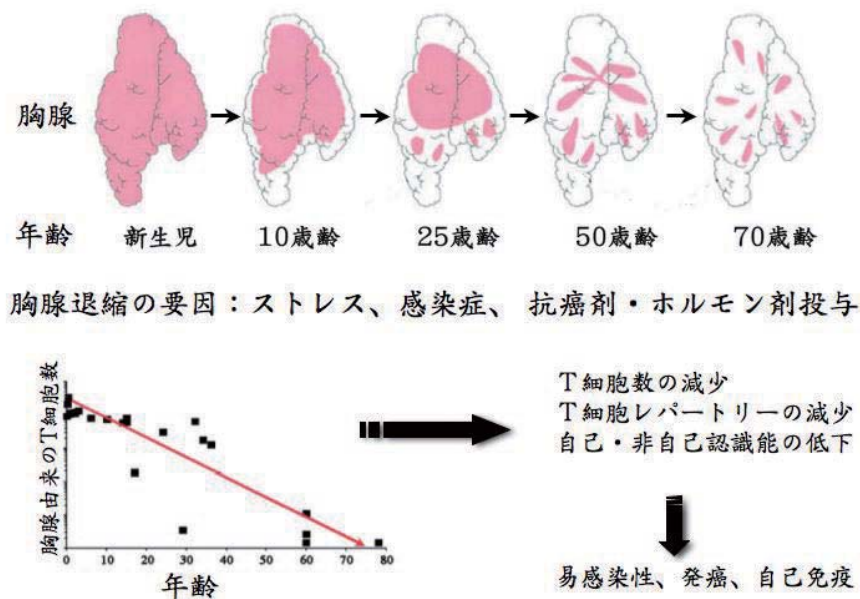


図 2 加齢に伴う胸腺の退縮と免疫老化

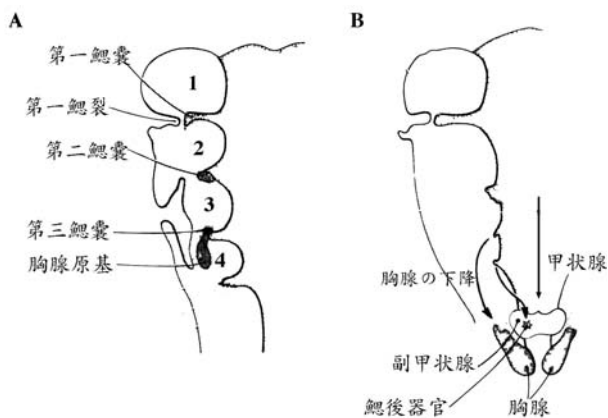


図3 胸腺の発生。(A) 発生初期における胸腺原基と鰓嚢との位置関係。(B) 胸腺原基ならびに関連する器官原基が移動する経路

胞の皮質、髄質上皮細胞への分化がおこり、髄質と皮質の発生は胎齢 15.5 日までリンパ球非依存的に進行する。胸腺上皮細胞における MHC class II の発現は胎齢 13.5 日、MHC class I の発現は胎齢 16 日あたりで認められ、これに引き続き、CD4、CD8 陽性胸腺細胞が、それぞれ、胎齢 15.5、胎齢 17.5 日に出現する。これ以降の皮質・髄質の形成はリンパ球との相互作用に依存して進行していくが、成熟器官としての特徴を有した微小環境の形成は、生後 2-3 週にならないと認められない。

5. 胸腺の器官形成に関与する転写制御因子

胸腺の器官形成の初期、すなわち、第三鰓嚢からの胸腺・副甲状腺原基の形成に関与する転写因子として、Hoxa3、Pax1、Pax9、Six1、そして、Six1 の活性を調節する脱リン酸化酵素である Eya1 が知られている。胸腺の器官形成の後期、すなわち、胸腺と副甲状腺原基の分離ならびにその後の胸腺上皮細胞の分化に関与する転写因子としては、Foxn1、Gcm2 がある。まず、胸腺の発生過程におけるこれら転写因子の機能について概説する (図 4)。

Hoxa3 と Pbx1

Hoxa3 は胎齢 9.5 日から第三、第四鰓嚢の内胚葉ならびに神経堤由来間葉組織に発現しており、Hoxa3 欠損マウスにおいては胸腺欠損、副甲状腺欠損、甲状腺低形成など、多数の咽頭に由来する異常を呈する [5]。すなわち、Hoxa3 欠損では第三鰓嚢からの胸腺原基の形成開始に異常がある。神経堤由来細胞特異的に Hoxa3 を欠損させた場合は胸腺原基の咽頭領域からの分離ならびに移動に異常がある

が、初期の原基の形成は起こることから、胸腺の器官形成において Hoxa3 は内胚葉内在性に機能しているものと考えられている [6]。また、胸腺の器官形成に異常の認められない Hoxb3、d3 欠損マウスの遺伝背景を Hoxa3 ヘテロ欠損にした場合、胸腺原基は形成されるが、胸腺原基の縦隔への移動が起こらないことから、Hoxa3 は胸腺原基の移動にも関与していることが示されている [5]。Pbx1 は Hox と協調して機能する TALE ファミリーに属するホメオドメイン転写因子である。Pbx1 欠損マウスでは第三、第四鰓嚢の形成が遅延し、その形成異常が認められる [7]。その結果、片側・両側性の胸腺の低形成或いは無形成が認められるが、これには、第三鰓嚢における Tbx1 の発現低下ならびに胸腺上皮細胞の著しい増殖の低下が関係しているものと考えられる。

Pax1 と Pax9

Pax1 および Pax9 は paired box ファミリーに属する転写因子であり、第三鰓嚢内胚葉に胎齢 9.5 日から発現している。ただし、Pax9 は神経堤由来の

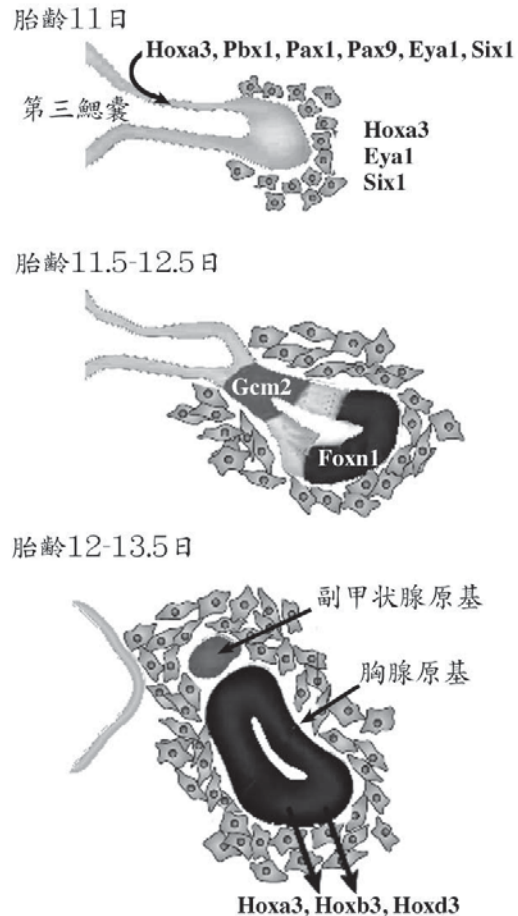


図4 胸腺原基の形成と移動に関わる転写制御因子

間葉系細胞にも発現している。胸腺の初期発生に伴い、当初、大部分の上皮細胞が Pax1 を発現しているが、その割合は次第に低下し、成体では、皮質上皮細胞の一部でしか高い Pax1 の発現は認められないことが報告されている。Pax1 欠損マウスでは、軽度から中程度の胸腺の低形成があり、その胸腺は皮質・髄質構造を保ったいくつかのシストからなる [8]。また、Pax1 および Pax9 の第三鰓嚢における発現が Hoxa3 欠損で低下するなど、Pax1 と Hoxa3 の間には遺伝学的関連が認められている。Hoxa3 ヘテロ欠損 Pax1 欠損マウスでは、Pax1 単独欠損マウスよりの重度の胸腺器官形成異常が認められ、MHC class II 陽性の胸腺上皮細胞の増殖低下による細胞数の減少や胸腺細胞のアポトーシスの増加が観察されている [9, 10]。胸腺細胞のアポトーシス増加については、Pax1 欠損に伴う胸腺上皮細胞による IL-7 と stem cell factor の発現低下に起因するものと考えられている [11]。Pax9 欠損では前腸からの胸腺原基の分離がおこらず、そのために腹側後方への胸腺原基の移動が障害されることにより、胸腺は喉頭領域に位置したままで、ポリープ様の外観を呈する [12]。このような異常があるにも関わらず、Pax9 欠損マウスの胸腺上皮細胞は Foxn1 を発現し、リンパ前駆細胞の侵入も起こる。しかしながら、その後の T 細胞分化には異常が認められ、発生経過に伴い、多くのアポトーシス細胞が認められ、胸腺の萎縮が認められる [13]。胸腺上皮細胞の機能における Pax9 の役割については明らかになっていない。

Eya1 と Six1

Eya1 はショウジョウバエの Eyes Absent のマウスホモログであり、第二から第四鰓嚢の内胚葉、間葉系細胞、第三および第四鰓裂の外胚葉に、胎齢 9.5 から 10.5 日に発現している。Eya1 欠損では、胎齢 12.5 日において胸腺・副甲状腺共通原基の形成が認められない。胸腺原基形成の開始となる第三鰓嚢の陥入が始まる以前の胎齢 10 日の鰓嚢内胚葉における Hoxa3, Pax1, Pax9 の発現には変化は認められないが、原基の形成が開始されないために、胎齢 12.5 日では、Foxn1, Pax1, Pax9 いずれの発現も検出されない [14]。したがって、Eya1 は Hoxa3, Pax1, Pax9 の下流で、第三鰓嚢内胚葉から胸腺原基形成の初期過程に関与していると考えられる。また、Eya1 欠損マウスでは第三および第四鰓嚢内胚葉、第二から第四鰓裂外胚葉において、Six1 の発現低

下が認められる。Six1 は、Eya1 と共発現する転写制御因子で、腎臓などの発生において前駆細胞の増殖や生存を制御していることが知られており、Eya1 はその脱リン酸化酵素活性により、Six1 を転写抑制から転写活性化へ変換することが報告されている。Six1 欠損マウスにおいても Eya1 欠損と類似した表現型が認められ、胸腺ならびに副甲状腺が形成されないことから、胸腺の器官形成においても Eya1 と Six1 は協調して機能しているものと考えられる [15]。ただ、Six1 欠損においては、胸腺原基の形成は開始されるが、Foxn1 と Gcm2 の発現が維持されないために、胎齢 12.5 日までにアポトーシスによって原基は消滅する。また、ショウジョウバエにおける眼の器官形成が、Pax-Eya-Six カスケードによって制御されているという知見に基づき、Pax1/Pax9 欠損、Eya1/Six1 欠損、Six1/Six4 欠損マウスを用いて、胸腺の初期器官形成に関与する転写因子の遺伝子発現への影響について解析されており [16]、その結果、Eya1/Six1 は Pax1, Foxn1, Gcm2 の上流で機能し、Hoxa3 および Pax9 は Eya1/Six1 の上流もしくはそれとは独立した様式で、胸腺の器官形成を制御していることが示されている。

Foxn1 と Gcm2

上述したように、胸腺は、副甲状腺と共通の原基として形成され、その後、胎齢 11.5 日から独立した胸腺、副甲状腺原基に分離して発生するが、この過程に関与するのが、Foxn1 と副甲状腺特異的な転写因子である Gcm2 である。Foxn1 と Gcm2 は胎齢 11.25 日の胸腺・副甲状腺共通原基において、胸腺、副甲状腺が発生する領域特異的に発現している。Gcm2 は胎齢 9.5 日から第三鰓嚢内胚葉の腹側領域に発現するが、Foxn1 の発現に先行することから、Gcm2 の発現が胸腺・副甲状腺予定領域の境界を決定している可能性がある。つまり、Gcm2 欠損では副甲状腺は形成されないが [17]、胸腺の器官形成は正常に起こるので、第三鰓嚢内胚葉の胸腺への分化は default 経路であり、Gcm2 の発現によって副甲状腺への分化運命が決定されるのではないかと考えられている。また、Gcm2 の内胚葉における発現は Hox3 ならびに Eya1 欠損では検出されず、Hox3 ヘテロ欠損 Pax1 欠損マウスでも減少することから、Hox-Pax-Eya-Six カスケードで制御されているものと考えられる。

Foxn1 は Forkhead ファミリーの転写因子で、胎齢 11.25 日から第三鰓嚢内胚葉の腹側後方に発現す

る。Foxn1 欠損においては、胸腺の器官形成は胎齢 11.5 ~ 12 日まで正常に進行するが、リンパ前駆細胞の胸腺原基への移入がおこらない。ヌードマウス胸腺上皮細胞では CCL25 と CXCL12 発現が欠如していることが原因と考えられている [18]。さらに、胸腺原基における胎齢 12.5 日以降の上皮細胞の増殖が起こらず、原基への血管形成も起こらない。ヌードマウスの胸腺上皮細胞は、上皮細胞の分化マーカーである MHC class I, MHC class II ともに発現せず、未分化な上皮細胞マーカーは発現していることから、上皮細胞の分化に異常があるものと考えられる [19]。このようなリンパ球系細胞の認められない小さな胸腺原基は成体まで維持されるが、T 細胞の分化を支持する機能的な胸腺微小環境は形成されない。したがって、胸腺の初期器官形成、すなわち胸腺上皮細胞の発生には Foxn1 は必要ではないが、その後の胸腺微小環境を構成する上皮細胞の分化や機能発現に重要な役割を果たしているものと考えられる。また、Foxn1 は成体の胸腺上皮細胞にも発現しており、胸腺微小環境の維持にも関与していることが明らかになっている [20, 21]。

6. 成体胸腺微小環境の恒常性維持と転写因子

筆者等は、Pbx1 と同じ TALE ファミリーに属するホメオドメイン転写因子であり、造血幹細胞の維持に関与することが報告されている Meis1 の解析を進める過程で、Meis1 が胎齢 18.5 日胸腺の K5 および K8 陽性上皮細胞に高発現し、また成体胸腺髓

質の一部の上皮細胞に発現していることを見いだした。Meis1 は Pbx1 を介して Hox と結合し、これら転写因子と協調して機能することや Pbx1 および Hoxa3 が胸腺の器官形成に関与することから、Meis1 の胸腺上皮細胞における機能に興味を持ち、研究を進めてきた (論文投稿中)。筆者等の知見を以下に簡単にまとめる (図 5)。

- 1) タモキシフェン誘導性に上皮細胞特異的 (K14-CreERT2, Meis1flox) に成体胸腺で Meis1 を欠損させると、髄質の縮小ならびに皮質領域での K5+ K8+ 細胞の出現を伴う胸腺構造の異常が認められ、最終的に胸腺は完全に消失することから、Meis1 は成体胸腺上皮細胞の維持に必要な転写因子と考えられる。
- 2) 胸腺上皮細胞における Meis1 の発現について EGFP レポーターマウスを用いて解析したところ、Meis1 の発現レベルの異なる 3 つの上皮細胞集団が存在し、Meis1 を高発現する細胞は CD40, CD205, MHC class II 陰性の未熟な胸腺上皮細胞を含み、BrdU を取り込まない細胞分裂していない細胞集団である。一方、Meis1 を低発現または発現していない細胞は CD40, CD205, MHC class II ならびに成熟マーカーである CD80 や CD86 を発現した成熟胸腺上皮細胞であり、Meis1 非発現細胞集団は多くの増殖している細胞を含み、Meis1 低発現細胞にはわずかに増殖細胞が認められる。また、Meis1 欠損誘導初期に CD40 および CD80 陰性の未熟上皮細胞が選択的に減少し、これら細胞の細胞分

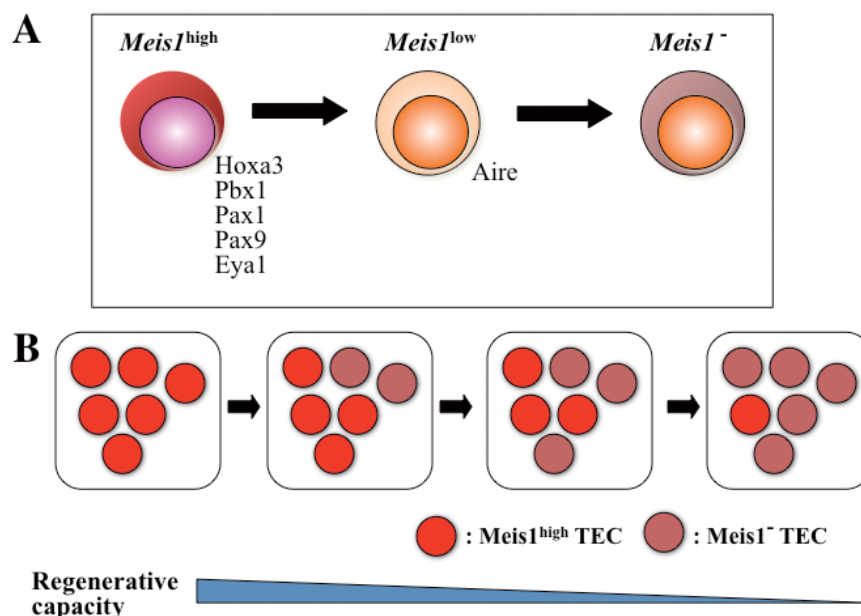


図 5 成体胸腺上皮細胞における Meis1 の発現と恒常性維持の関連 (A) Meis1 の発現と胸腺器官形成に関する転写制御因子の発現様式。(B) 加齢に伴う胸腺上皮細胞における Meis1 の発現変化と再生能との関連

裂が亢進することから、Meis1は、未熟なMeis1高発現上皮細胞の静止期の維持に関与しているものと考えられる。

- 3) Meis1高発現上皮細胞には、Hoxa3, Pbx1, Pax1, Pax9, Eya1などの胸腺器官形成に関与する転写因子ならびにそのファミリー分子(Hoxa2, Meis2, Eya4)が選択的に高発現しており、Meis1高発現細胞は胎仔期胸腺上皮細胞と類似した細胞集団と考えられる。また、Aireの発現はMeis1低発現細胞に選択的に認められ、Foxn1の発現は特定の細胞集団で高いということはない。
- 4) 移植実験により、Meis1高発現細胞はMeis1高発現細胞として増殖し、Meis1低発現および非発現細胞に分化する能力がある。一方、Meis1低発現および非発現細胞はMeis1高発現細胞に分化しない。
- 5) 加齢に伴い、胸腺上皮細胞におけるMeis1高発現細胞の割合は減少する傾向にある。
- 6) 機能的Foxn1を欠損するヌードマウスの胸腺において、K14陽性の上皮細胞シストにMeis1は高発現している。

以上のように、Meis1の発現と機能という観点から成体胸腺上皮細胞を眺めた場合、成体胸腺には、器官形成に関与する転写因子を高発現する一群の未熟上皮細胞が髄質領域に存在しており、Meis1はそれらの細胞の静止期状態の維持に関与しているようである。そして、Meis1が存在しない場合、それらの細胞の枯渇に起因する髄質・皮質を含む全ての胸腺上皮構造の恒常性維持の破綻が起こる。成体胸腺での上皮前駆細胞の存在に関する報告としては、ヌードマウス胸腺シストに認められるMeis1が高発現するK14陽性細胞に生後4週令以降に人為的にFoxn1を再発現させると、そこから小さいながらも髄質・皮質構造を有した胸腺が形成されるという報告があり[22]、成体においても髄質・皮質上皮細胞の両方に分化能力を有する共通前駆細胞がFoxn1非依存的に維持されている可能性が指摘されている。ヌードマウスのK14陽性Meis1高発現細胞が正常マウス胸腺に認められるMeis1高発現細胞集団と完全に同一かどうかは明らかではないが、Meis1高発現細胞集団には、胎仔期胸腺上皮細胞のような前駆細胞としての能力を残した細胞が含まれており、成体胸腺上皮細胞の恒常性維持に関与している可能性もある。一方、T前駆細胞が胸腺に存在しないために、最も未熟な段階で分化が停止してい

ると考えられているヒトCD3eトランスジェニックマウスの胸腺上皮細胞を正常にT細胞が分化する環境に戻してやった場合、新生仔期の胸腺上皮細胞には髄質・皮質細胞両方への分化する能力があるが、それ以降の成体胸腺上皮細胞ではその能力が維持されていないという報告もあるが[23]、このトランスジェニックマウスのT細胞が常に供給されないという特殊な環境が成体における上皮前駆細胞の枯渇をもたらした可能性もある。この点については、ヒトCD3・トランスジェニックマウス胸腺にMeis1高発現細胞集団が存在するか検討してみる必要があるかもしれない。

ごく最近、培養系で、胸腺構造を再構築する能力のあるK14陽性の胸腺上皮細胞クローンが成体胸腺からも培養可能なこと、それらの培養胸腺上皮細胞には、Meis1高発現胸腺上皮細胞と同様、胸腺の器官形成に関与するHoxa3, Pax1, Pax9, Eya1, Six1が高発現していることが報告された[24]。したがって、成体胸腺では、Meis1高発現細胞集団の中に、このような共通前駆細胞が含まれている可能性も残されている。

7. おわりに

胸腺の発生および成体胸腺の恒常性維持における胸腺上皮細胞の役割について転写制御因子の観点から、組織の恒常性維持の起点となる幹細胞・前駆細胞に結びつけて捉え直してみた。胸腺という組織の恒常性維持に、髄質・皮質上皮共通前駆細胞が関わっているのか、それとも、髄質と皮質には別々の上皮前駆細胞が存在して恒常性の維持に関わっているのか、加齢に伴う胸腺退縮における上皮前駆細胞の量的・質的变化など、この領域には未解明の問題が山積している。器官の再生(恒常性維持)と発生機構には類似性があるものと考えられるが、今後、胸腺の器官形成に関与する転写因子の発現や機能の面から包括的に、上記の問題にアプローチすることで、胸腺をはじめとする免疫器官の再生を基盤とした新たな免疫療法の開発に繋がるものと考えられる。

参考文献

1. Murata, S., Sasaki, K., Kishimoto, T., Niwa, S., Hayashi, H., Takahama, Y. and Tanaka, K. 2007. Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* **316**: 1349-1353.
2. Liston, A., Lesage, S., Wilson, J., Peltonen, L. and

- Goodnow, C. C. 2003. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nature immunology* **4** : 350–354.
3. Gruver, A. L., Hudson, L. L. and Sempowski, G. D. 2007. Immunosenescence of ageing. *J. Pathol.* **211** : 144–156.
 4. Nowell, C. S., Farley, A. M. and Blackburn, C. C. 2007. Thymus organogenesis and development of the thymic stroma. *Methods Mol. Biol.* **380** : 125–162.
 5. Manley, N. R. and Capecchi, M. R. 1998. Hox group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid, and parathyroid glands. *Developmental Biology* **195** : 1–15.
 6. Manley, N. R. and Condie, B. G. 2010. Transcriptional regulation of thymus organogenesis and thymic epithelial cell differentiation. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* **92** : 103–120.
 7. Manley, N. R., Selleri, L., Brendolan, A., Gordon, J. and Cleary, M. L. 2004. Abnormalities of caudal pharyngeal pouch development in Pbx1 knockout mice mimic loss of Hox3 paralogs. *Developmental Biology* **276** : 301–312.
 8. Wallin, J., Eibel, H., Neubuser, A., Wilting, J., Koseki, H. and Balling, R. 1996. Pax1 is expressed during development of the thymus epithelium and is required for normal T-cell maturation. *Development* **122** : 23–30.
 9. Su, D. M., Ellis, S., Napier, A., Lee, K. and Manley, N. R. 2001. Hoxa3 and Pax1 regulate epithelial cell death and proliferation during thymus and parathyroid organogenesis. *Developmental Biology* **236** : 316–329.
 10. Su, D. M. and Manley, N. R. 2000. Hoxa3 and Pax1 transcription factors regulate the ability of fetal thymic epithelial cells to promote thymocyte development. *Journal of Immunology* **164** : 5753–5760.
 11. Su, D. M. and Manley, N. R. 2002. Stage-specific changes in fetal thymocyte proliferation during the CD4⁻⁸-to CD4⁺⁸ transition in wild type, Rag1^{-/-}, and Hoxa3, Pax1 mutant mice. *BMC Immunology* **3** : 12.
 12. Peters, H., Neubuser, A., Kratochwil, K. and Balling, R. 1998. Pax9- deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes & Development* **12** : 2735–2747.
 13. Hetzer-Egger, C., Schorpp, M., Haas-Assenbaum, A., Balling, R., Peters, H. and Boehm, T. 2002. Thymopoiesis requires Pax9 function in thymic epithelial cells. *Eur. J. Immunol.* **32** : 1175–1181.
 14. Xu, P. X., Zheng, W., Laclef, C., Maire, P., Maas, R. L., Peters, H. and Xu, X. 2002. Eya1 is required for the morphogenesis of mammalian thymus, parathyroid and thyroid. *Development* **129** : 3033–3044.
 15. Laclef, C., Souil, E., Demignon, J. and Maire, P. 2003. Thymus, kidney and craniofacial abnormalities in Six 1 deficient mice. *Mechanisms of Development* **120** : 669–679.
 16. Zou, D., Silvius, D., Davenport, J., Grifone, R., Maire, P. and Xu, P. X. 2006. Patterning of the third pharyngeal pouch into thymus/parathyroid by Six and Eya1. *Developmental Biology* **293** : 499–512.
 17. Gunther, T., Chen, Z. F., Kim, J., Priemel, M., Rueger, J. M., Amling, M., Moseley, J. M., Martin, T. J., Anderson, D. J. and Karsenty, G. 2000. Genetic ablation of parathyroid glands reveals another source of parathyroid hormone. *Nature* **406** : 199–203.
 18. Bleul, C. C. and Boehm, T. 2000. Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus. *Eur. J. Immunol.* **30** : 3371–3379.
 19. Jenkinson, E. J., Van Ewijk, W. and Owen, J. J. 1981. Major histocompatibility complex antigen expression on the epithelium of the developing thymus in normal and nude mice. *The Journal of Experimental Medicine* **153** : 280–292.
 20. Chen, L., Xiao, S. and Manley, N. R. 2009. Foxn1 is required to maintain the postnatal thymic microenvironment in a dosage-sensitive manner. *Blood* **113** : 567–574.
 21. Cheng, L., Guo, J., Sun, L., Fu, J., Barnes, P. F., Metzger, D., Chambon, P., Oshima, R. G., Amagai, T. and Su, D. M., Postnatal tissue-specific disruption of transcription factor FoxN1 triggers acute thymic atrophy. *J. Biol. Chem.* **285** : 5836–5847.
 22. Bleul, C. C., Corbeaux, T., Reuter, A., Fisch, P.,

- Monting, J. S. and Boehm, T. 2006. Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature* **441** : 992–996.
23. Hollander, G. A., Wang, B., Nichogiannopoulou, A., Platenburg, P. P., van Ewijk, W., Burakoff, S. J., Gutierrez-Ramos, J. C. and Terhorst, C. 1995. Developmental control point in induction of

- thymic cortex regulated by a subpopulation of prothymocytes. *Nature*. **373** : 350–353.
24. Bonfanti, P., Claudinot, S., Amici, A. W., Farley, A., Blackburn, C. C. and Barrandon, Y. 2010. Microenvironmental reprogramming of thymic epithelial cells to skin multipotent stem cells. *Nature* **466** : 978–982.

文献紹介

牛マイコプラズマ病：無症状かつ致命的な疾病

田積 晃浩

Bovine mycoplasmosis: silent and deadly

R. A. J. Nicholas 著

Animal Health and Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB

Veterinary Record (2011) 168, 459–462

2009年カナダのサスカトゥーンで初めての牛マイコプラズマ病の国際会議が開催され、牛呼吸器病、乳房炎、関節炎やその他の疾患に関わるマイコプラズマの重要性が公に認識された。更に、本疾病はイギリス、ドイツ、イタリア及びイスラエルを含む牛マイコプラズマ病の診断法の改良と制御法の確立に関する3年間の研究助成金であるEMIDA ERA-NETのEuropean Community 7th Framework Programmeによって重要な新興感染症の1つとして認定された。これらの進展と歩調を合わせるかのように、*Mycoplasma bovis* (*M. bovis*)のゲノムの完全塩基配列が公表され、この小さな細胞壁を欠く細菌の特性について新たな知見が提供された。この事を念頭において、マイコプラズマにより引き起こされる牛疾患のこれまでの知識をレビューするのは良い機会である。

最も重要なマイコプラズマ病は、*Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* small colonyによって引き起こされる伝染性牛胸膜肺炎 (contagious bovine pleuropneumonia; CBPP) であるが、本疾病は20世紀の終わりにヨーロッパから根絶され、今日ではアフリカのサハラ砂漠の南部地域に限られる [19]。牛からは30種以上のマイコプラズマが分離されているが、この総説では、最も病原性が強く広く分布しているマイコプラズマで、様々な臨床症状を引き起こす *M. bovis* に焦点を当てて述べる。

牛呼吸器病は世界的に家畜牛に最も深刻な影響を

及ぼす疾患であり、罹患率、死亡率の増加及び発育不良の結果、生産性を阻害し、莫大な経済的損失へと繋がる。過去10年間で、マイコプラズマ (専ら *M. bovis*) 感染症は世界的に牛呼吸器病の第1位の要因であるという事が明らかとされてきた [16, 19] が、その真相は、この領域における詳細な研究が乏しいため不明である。マイコプラズマはウイルスや細菌の病原体とは性質が似ていないといった事が、この様な事態を招き今日においてマイコプラズマ病のための効果的な制御手段が存在しないという事につながる。マイコプラズマは細胞壁が存在しないため、ペニシリンやセファロスポリンのような抗生物質は効果がない事が知られており、今日ではヨーロッパや中東に広がる *M. bovis* においても多数の株を用いた *in vitro* の研究によって、マルボフロキサシンと同様にフルオロキノロンを含む抗生物質に耐性であるといった事実が証明されている。更に、他の牛病原体とは異なり、現在ヨーロッパでワクチンは存在しない。驚いたことに、いくつかの実験的なワクチンの効果試験では無接種の対照牛よりも重篤な症状を示した。

歴史

M. bovis は1961年にアメリカで初めて複数の牛の乳房炎の事例から分離され、小型反芻動物の病原体である *Mycoplasma agalactiae* と血清学的及び生化学的に類似していたため、*M. agalactiae* var *bovis*

と命名された。本菌はその後、イスラエル (1964)、スペイン (1967)、オーストラリア (1970)、フランス (1974)、イギリス (1974)、チェコスロバキア (1975)、ドイツ (1977)、デンマーク (1981)、スイス (1983)、モロッコ (1988)、韓国 (1989)、ブラジル (1989)、北アイルランド (1993)、アイルランド共和国 (1994)、チリ (2000)、南アフリカ (2005)、チェコ共和国 (2007) そして近年では中国 (2008) を含む世界各国で動物の移動を介してゆっくりと広がっていった [19]。今日、*M. bovis* の清浄国はノルウェーとニュージーランドを除きほとんどない。

1994年、イギリスの国会において *M. bovis* によって引き起こされる牛の肺炎について論議された事があるが、残念なことに届出伝染病に指定する等の対策は講じられなかった。*M. bovis* はEUの1つの市場に持ち込まれた後に、イギリスに導入されたと信じられてきたが、実際にはおそらくアメリカから20数年早くにイギリスに侵入していた。現在、イギリスではこの病気は牛肉や牛乳を介して蔓延しているが、それは閉鎖的であるため、至る所に存在しているというわけではない。実際に、少数の牛を用いた群単位でのELISAのような血清学的検査のスクリーニングは、アイルランド共和国では感染していない群が存在している事を示した [21]。

M. bovis に加えて、*Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma canis* 及び *Mycoplasma bovigenitalium* を含めた他のマイコプラズマが牛マイコプラズマ病に直接関わり合っている [19]。近年、*Mycoplasma alkalescens*, *Mycoplasma canadense* 及び *Mycoplasma californicum* 等は、病気との関係は疑わしいと考えられている。分子診断法の発達により、以前はリケッチアの *Eperythrozoon wenyonii* とされていた培養の出来ない *Mycoplasma wenyonii* が、イギリスの乳牛における流行性の貧血症や後肢浮腫例から大量に検出された [26]。

牛呼吸器病における *M. bovis* の役割

論文等での大きな論争は本疾病における *M. bovis* の重要性に関する事であり、特にマイコプラズマは他の細菌やウイルスとの混合感染の一因子として存在しているか否かという事である。マイコプラズマ病を診断する獣医師としては、もっとより簡便な検出法や迅速な培養法があれば良いといった考えを持つものが多い。その理由として、近年までマイコプラズマの診断には早くとも1週間ほどかかっていたため、マイコプラズマはよく見逃されがちであった。今日では、PCRのような分子検査の出現により、検出は数日、時には数時間で済むようになってきた。*Mannheimia haemolytica* や *Histophilus somni* 等のよ

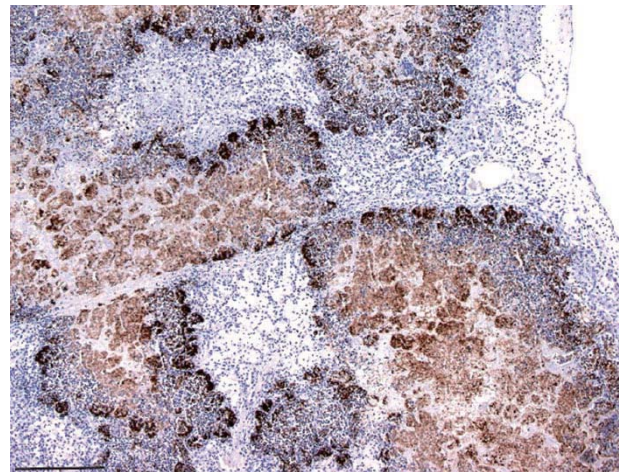


図1 肺炎病変部と関連する *Mycoplasma bovis* 抗原 (褐色部) を示す免疫細胞染色。Bar=100 μ m

うな細菌感染では顕著な臨床症状や病理学的変化を示すが、一方で *M. bovis* の感染は図1に示す様に慢性病変部における多量な抗原を検出することでしか判明せず、更に複合的な *M. bovis* の感染は致命的となり、時には高い死亡率を招くことになる。また、*M. bovis* はその乏しい免疫応答性のため、他の細菌 (特に *M. haemolytica*) を気管内へ侵入させやすくする [11]。*M. bovis* とウイルスとの関連性は殆ど明らかにされていないが、牛ウイルス性下痢 (BVD) ウイルスによって生じる免疫不全は、*M. bovis* が基礎疾患として関わっていると推察されている [8]。イギリスにおける過去数年間、ウシ伝染性鼻気管炎ウイルスは牛のマイコプラズマ症と関連したウイルスとして最も検出される一方で、*Pasteurella multocida* が *M. bovis* と共に病原性細菌として分離されるようになってきた。

Animal Health and Veterinary Laboratory Agency (AHVLA) で受付けた診断材料からの我々の経験として、化学療法に対して乏しい応答を示すことが特徴的な牛呼吸器病には様々な事例が存在するが、その様な場合には組織学的検査によって *M. bovis* だけが病原体として検出されることが多い。この様な事例の場合は、抗生物質の治療の結果他の病原細菌が死滅したといった疑いも持たなければならないであろう。イギリスにおける *M. bovis* を用いた感染実験では、全ての野外株ではないが、臨床症状や肺病変を牛で再現させることが出来た。その結果、*M. bovis* の多様な病原性は過酸化水素産生の違いに関連しているという事が示唆された [12]。蔓延した農場へ新たに導入された牛は、マイコプラズマに対して血清陽転しゆっくりと成長し、陰性の牛に比べて2倍量の抗生物質を必要とするといった事が研究によって証明されている [10, 27]。

多くの研究によってヨーロッパ内での食用牛や乳牛の農場での *M. bovis* の高い検出率が示されてい

る。2000年から2009年にかけてのイングランドとウェールズにおける *M. bovis* 感染症のスクリーニング調査では平均して30%以上の群が抗体陽性であり、2006年と2008年には39%であることが判明した。*M. bovis* はイングランドとウェールズにおいて家畜の肺炎から最も有意に検出され、過去10年間においては検体の40%であった。イスラエルでは2004年から2008年に検査された肺炎牛で26~60%の確率で *M. bovis* が分離され、2008年が最も高い発生率であった [9]。肉牛の農場が集中しているイタリアのベネト地方では、*M. bovis* は輸入された牛と共に持ち込まれる牛呼吸器病の最も危険な因子とみなされている。このような現象は、牛呼吸器病により死亡した肉牛の82%の肺で確認され、その内の42%は *M. bovis* のみに起因していた。一方で、それらの事例からBVDとRSウイルスの検出率はそれぞれ18%と8%であった。他のイタリアの研究によれば、ミラノ近郊の家畜が盛んな地方では、と畜場に送られてきた肉牛の80%以上が *M. bovis* に関連した肺炎を有していたと報告している [23]。2007年から2008年に行われたある研究では、肺炎を伴った牛135事例の内の30%で *M. bovis* が分離され、その内14%は *M. bovis* の単独感染であった。最も共通する細菌との組み合わせは、*M. bovis* と *P. multocida* が6%、*H. somni* が4%である。2003年から主に牛の肺からの *M. alkalescens* の検出が増加しており、2009年にイギリスでは、検出された220のマイコプラズマの内の約26%であった [2]。この *M. alkalescens* の検出率の増加の理由は分かっていないが、同様の傾向がフランスやイスラエルにおいても見られる [22]。

AFSSA Lyon はフランスの40カ所の検査所で実施される反芻動物のマイコプラズマの診断法を統一させた。2003年から2008年の期間に分離されたマイコプラズマ1,000株の95%近くは関節炎、耳炎及び乳房炎を伴った牛の気管支肺炎の事例から得られた。その内の半数以上が *M. bovis* と同定され、残りは *Mycoplasma bovirhinis* や *Mycoplasma arginini* のような日和見性のマイコプラズマであり、その他には *M. alkalescens*, *M. canadense* 及び *M. bovis genitalium* と同定された [22]。*M. bovis* はフランス西部の飼養場の肺炎から最もよく分離され、更にBVDと密接に関連していた [1]。ドイツでは2,000以上の検体の内、12%が *M. bovis* の抗体陽性であった。

EU内の輸入緩和に伴い、1993年に北アイルランドで *M. bovis* が確認されるようになった [4]。過去10年間でサンドイッチELISAにより検出される牛の肺からのマイコプラズマは、平均して20%前後であり、2004年には27%に達した。2005年までは

H. somni が肺での共病原体として最も検出されていたが、近年では *Arcanobacterium pyogenes* と *M. haemolytica* が圧倒してきた。更に2009年においては、*M. bovis* は40%の事例でみつかった顕著な病原体であった。

飼養場で少数の牛が感染した場合、多くの牛舎内は換気が悪く高密度のため2週間以内に殆どの牛が血清陽転したという事例が報告されている [1, 23]。フランスの飼養場の子牛を対象にした研究では、2%の牛だけが *M. bovis* に対して抗体陽性であったが、1, 2カ月後にはその割合が増加したという事を報告している [1]。

牛マイコプラズマ病への関心は、大半の飼養場で慢性肺炎がみられるアメリカやカナダで高まっている [6, 16]。牛呼吸器病におけるマイコプラズマの役割は複雑であるが、*M. bovis* は北アメリカの大規模農場で、深刻な経済的損失をもたらす乳房炎の単純な病原体としてよく知られている。マイコプラズマによる乳房炎の主要な危険因子は、群の大きさに依存するため、群を小さくするといった策がヨーロッパでは実施されているが、実際に牛乳房炎におけるマイコプラズマの役割を調べた研究は僅かである。それら公表された研究の1つでは、南ドイツの乳房炎の症状を示さない1,800頭の乳牛のミルクから *M. bovis* が平均20%検出され、その1年後には臨床症状は現れないが16%の牛からまだ *M. bovis* が排出されていた [25]。

若い牛への伝染経路の殆どは、感染した牛または貯蔵タンクからの授乳である。後者の場合、マイコプラズマを排出する1頭の牛が長い期間かけて複数の牛に感染させる事が出来る。その牛は気道分泌物を介して、密接な繰返し接触で他の牛へとマイコプラズマを排出する。

病理

一般的に、マイコプラズマに関連した共通の病変は、肺の前葉腹側面の硬化、組織学的に特徴的な細気管支周囲のリンパ濾胞過形成またはリンパ球浸潤である。しばしば化膿性細気管支炎や、CBPPに類似した小葉間壁の肥厚といった病変がみられる。アメリカでは近年、ヨーロッパで増加している、慢性的な乾酪性壊死性気管肺膜炎は *M. bovis* の特徴的の症状であると認識され始めている。この病変の珍しい特徴は、牛の結核症に似ているため間違われることも時々あるが、組織を切断した際にその肺の内部で著しいチーズ様壊死がみられるのである (図2)。免疫細胞化学染色はこの病変部とマイコプラズマを明瞭に関連付ける (図1)。このような病変部の激しさにも関わらず、無併発性の *M. bovis* 肺炎の臨床症状

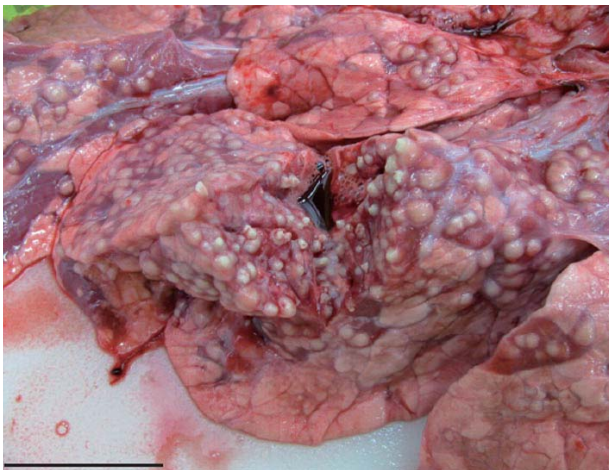


図2 *Mycoplasma bovis* によって引き起こされたチーズ様壊死病変部を示した牛の肺。Bar=5 cm

は穏やかで見逃されがちであり、治療するには進行しすぎている状態になるまで気付かれない。このような事態に警戒し、特にアメリカでは、牛における耳垂れや頭部加振が見られる中耳炎は、肺炎や時折、髄膜炎を後発する *M. bovis* による感染の初期症状であるとしている [3, 16]。マイコプラズマは血行性の経路を除外する事は出来ないが、耳管の感染が上行して中耳に感染すると考えられている。

検査診断

最も安価で迅速な診断法は血清学的検査である。特に間接 ELISA は抗体価を測定しマイコプラズマが侵襲している事を示すことが出来る [18]。健康的な抗体陰性の牛も *M. bovis* が潜在しているといった報告があるが、通常それは臨床疾患が顕著である群での一部分である。アメリカの研究者等 [16] とは異なり、我々のイギリスでの経験では、健康な群から *M. bovis* が見つかった事はない。ELISA の利点の1つは、抗生物質治療は培養法では検出が出来ないレベルにまでマイコプラズマの数を減らしてしまう可能性があるが、ELISA の結果には化学療法の影響が及ばないという事である。高い抗体価を示す牛が 20% 以上存在した場合、それは進行中の感染症であることを示唆するであろう。

従来のマイコプラズマの分離や同定法は数週間かかる手間取る作業であり、時には細菌の汚染や分離を阻害する抗生物質の使用といった理由で偽陰性の結果が得られた。それ故にマイコプラズマの存在は、しばしば労力を費やすため又は、疾患には関係していない *M. bovirhinis* のような共生生物が優位に早く成長し、得られた結果を誤解させていたため、研究は発展しなかった。RT-PCR [25] を含む PCR は、一度に1つの *Mycoplasma* 種しか検出できないが、より迅速で感度のよい診断法である。変性剤濃度勾

配ゲル電気泳動法 (DGGE) とのコンビネーション PCR は新しい種や培養の出来ない種、更には混在したマイコプラズマも同時に検出する事が可能である [14]。DNA マイクロアレイ技術は DGGE の利点を多く提供し、より利用者に使いやすい。この技術は操作が容易で安価であり、同時に PCR と同程度の感度で多くの異なった細菌種や又は標的遺伝子の特異性の高いスクリーニングを可能とする [24]。日常的に分子検査を実施していない検査室では、*M. bovis* 検出のためには複雑な装置を必要としないサンドイッチ ELISA を用いるのが好ましいであろう。その結果は、このマイコプラズマでは PCR/DGGE に匹敵する [5]。

牛の鼻腔スワブからの PCR 検査には、マイコプラズマを検出する様々な手法があり、結果は散発的であるため当てにならない。気管支洗浄から得られた検体は、気道下部に侵襲している病原体を含むためより難しい。興味深い事に、Sachse 等 [25] は肺炎の牛の鼻腔スワブよりも結膜スワブの方が *M. bovis* の検出率は良いと報告している。肺 (理想的には病変と正常部位の境界)、肺洗浄、気管のスワブ及び関節液が死後検査に必要な試料である。

治療と管理

マイコプラズマはペニシリンやセファロスポリンに耐性である事はよく知られているが、過去 10 年間の研究で、一般的によく使用されるフルオロキノロンを含む抗生物質に *in vitro* で耐性を示す株が増加しているといった報告がある [19]。様々な感染症に効果的な抗生物質の能力は、生体内でのそれらの抗炎症性効果や *H. somni* や *M. haemolytica* のような他の細菌感染への作用に強く関連している。近年、マイコプラズマはバイオフィームを形成することで、化学療法や宿主の免疫応答へ抵抗性を示すといった報告がされた [15]。歴史的に、環境中のマイコプラズマの残存率は牛のマイコプラズマ病では危険因子としては考慮されてこなかったが、近年の研究で、*M. bovis* は過酷な条件下で生存するだけでなく更なる病原性を獲得するといったことが報告された [13]。今後は、マイコプラズマのバイオフィームの役割を解析する事と、それらをどのように対処するかといった事が必要である。

M. bovis に対するワクチンの発展を阻害する大きな理由の1つは、信頼性のある多産の動物モデルが存在しない事である。更に、*M. bovis* は株間での病原性に差異があるという事が明らかであり、適切な株を選択する事が重要である。市販されているワクチンはアメリカでいくつかあるが、それらの効果は不明瞭であり、アメリカ以外では使用許可が下りて

いない。多くの実験的ワクチンは効果がないか、逆に傷害を与えるが、サポニンで不活化した *M. bovis* のあるワクチンは安全で免疫原性を示し、異なった株の攻撃を防いだ [20]。このワクチンを用いた野外農場の若い牛を対象とした試験では、感染率を低下させ死亡率と治療費を顕著に減少させた [17]。

農場では手に負えないマイコプラズマの残存によって起こる静かで迅速なマイコプラズマの拡がりへの対処法は、耳垂れ、鼻汁、中程度の発熱、涙目及びからぜきのような症状を見せた際に、早期に診断する事である。

Currin[7]によると、マイコプラズマ肺炎の治療で最も重要な2つの点は早期診断と長期療法である。彼は効果的な抗生物質を10日から14日間、継続的に投与する事を推奨している。もしこれを行わなければ牛の30～70%が再発し、さらに肺の損傷を招き、更なる治療が必要となると述べている。メタフィラキスをグループ全体に投与した実験では、牛の20%だけが臨床症状を示した。これは病気だけの管理を目的とした場合には抗生物質の使用量の削減を可能とする [28]。

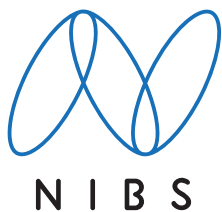
今後

Wise等 [29]による *M. bovis* の完全ゲノム塩基配列の決定によって、827個の遺伝子 (*M. haemolytica* が約3,000個の遺伝子であるのに対して) をコードしている100万塩基超の小さな環状ゲノムが明らかとなった。この小さなゲノムサイズにも関わらず、*M. bovis* は複数の遺伝子群と、宿主の免疫応答を避けるための表面抗原の可変性発現機構を有している。このゲノム情報やその他の病原因子の解析によって、今後数年間で *M. bovis* の疫学に役立つ分子型別法や何らかの制御基準の構築が可能となるであろう。今後3年間におけるEMIDA (Emerging and Major Infectious Disease of Livestock) のプロジェクトにおいて、このデータはヨーロッパに蔓延する牛マイコプラズマ病を我々が理解するのに役立つものと思われる。このプロジェクトは牛呼吸器病の詳細、マイコプラズマと他の呼吸器病原体との関連性、診断法 (特にマイクロアレイ法) の発達、*M. bovis* の流行の疫学的追跡を可能とする分子型別法の開発、野外株の薬剤感受性の監視とその試験の発展、及び農場で効果的な *M. bovis* に対するワクチンの開発に寄与するであろう。

参考文献

- Arcangioli, M-A., Duet, A., Meyer, G., Dernburg, A., Bezille, P., Poumarat, F. and Legrand, D. 2008. The role of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease outbreaks in veal calf feedlots. *Vet. J.* **177** : 89-93.
- Ayling, R. D., Barden, G., Bradley, D., Mcauliffe, L. and Nicholas, R. A. J. 2010. *Mycoplasma* species identified from cattle in England and Wales between 2001 and 2009. Proceedings of the 18th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Chianciano Terme, July 11 to 16, 2010. p 109
- Ayling, R. D., Nicholas, R. A. J., Wessells, J., Hogg, R. and Byrne, W. 2005. Isolation of *Mycoplasma bovis* from the brain tissue of calves. *Vet. Rec.* **156** : 391-392.
- Blackburn, P., Brooks, C. and Ball, H. J. 2008. Filtration of homogenized tissue samples to improve the diagnostic detection of *Mycoplasma bovis* by sandwich ELISA. *Vet. Rec.* **163** : 514-515.
- Blackburn, P., Mcauliffe, L., Nicholas, R. A. J. and Ball, H. J. 2010. Comparison of methods for detecting mycoplasmas in calf pneumonia cases. *Vet. Rec.* **166** : 561-562.
- Caswell, J. F., Bateman, K. G., Cai, Y. and Castillo-Alcala, F. 2010. *Mycoplasma bovis* in respiratory disease of feedlot cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **26** : 365-379.
- Currin, J. F. 2007. Mycoplasma in beef cattle. Virginia Cooperative Extension, Virginia Tech. www.ext.vt.edu/pubs/beef/400-304.html. Accessed November 10, 2010.
- Farshid, M. S., Clark, E. G., Janzen, E., West, K. and Wobeser, G. 2002. Co-infection with bovine viral diarrhoea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. *Canadian Vet. J.* **43** : 863-868.
- Gerchman, I., Levisohn, S., Mikulla, I. and Lysnyansky, I. 2009. In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolated in Israel from local and imported cattle. *Vet. Microbiol.* **137** : 268-275.
- Hanzlicek, G. A., White, B. J., Renter, D. G., Anderson, D. E. and Larson, R. L. 2011. Associations between the prevalence of Mollicutes and *Mycoplasma bovis* and health and performance in stocker calves. *Vet. Rec.* **168** : 21-25.
- Houghton, S. B. and Gourlay, R. N. 1983. Synergism between *Mycoplasma bovis* and *Pasteurella haemolytica* in calf pneumonia. *Vet. Rec.* **113** : 41-42.

12. Khan, L. A., Miles, R. J. and Nicholas, R. A. J. 2005. Hydrogen peroxide production by *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* and effect of *in vitro* passage on a *Mycoplasma bovis* strain producing high levels of hydrogen peroxidase. *Vet. Res. Commun.* 29 : 181–188.
13. McAuliffe, L. 2010. Secrets of a successful minimalist—safety in numbers? *Microbiologist* 11 : 33–36.
14. McAuliffe, L., Ellis, R., Lawes, J., Ayling, R. D. and Nicholas, R. A. J. 2005. 16S rDNA and DGG E : a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *J. Med. Microbiol.* 54 : 1–9.
15. McAuliffe, L., Ellis, R. J., Miles, K., Ayling, R. D. and Nicholas, R. A. J. 2006. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environment persistence and survival. *Microbiol.* 152 : 913–922.
16. Maunsell, F. P. and Donovan, G. A. 2009. *Mycoplasma bovis* in young calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 25 : 139–177.
17. Nicholas, R. A. J. 2010. The other *M bovis*, *Mycoplasma bovis*. *UK Vet* 15 : 41–3.
18. Nicholas, R. A. J. and Ayling, R. D. 2003. *Mycoplasma bovis*, disease, diagnosis and control. *Res. Vet. Sci.* 74 : 105–112.
19. Nicholas, R., Ayling, R. D. and McAuliffe, L. 2008. Bovine respiratory disease. In *Mycoplasma Diseases of Ruminants*. CABI. pp 133–154.
20. Nicholas, R. A. J., Ayling, R. D. and Stipkovits, L. 2002. An experimental vaccine for calf pneumonia caused by *Mycoplasma bovis*. *Vaccine* 20 : 3569–3575.
21. O' Farrell, K., Dillon, P., Mee, J., Crosse, S., Nolan, M., Byrne, N., Reidy, M., Flynn, F. and Condon, T. 2001. Strategy for restocking Moorepark after depopulation following BSE. *Irish Vet. J.* 54 : 70–75.
22. Poumarat, F., Chazel, M., Tardy, F. and Calavas, D. 2009. Ruminant mycoplasmoses in France : the 2003–2008 survey. In *Mycoplasma : a Review of Developments Over the Last Decade*. Gran Canaria, June 10 to 12, 2009. p 32.
23. Radaelli, E., Luini, M., Loria, G. R., Nicholas, R. A. J. and Scanziani, E. 2008. Studies of *Mycoplasma bovis* infections in veal calves and adult cattle. *Res. Vet. Sci.* 85 : 282–290.
24. Sachse, K., Hotzel, H., Slickers, P., Ellinger, T. and Ehrlich, R. 2005. DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydophila* spp. *Molecular and Cellular Probes* 19 : 41–50.
25. Sachse, K., Salam, H. S., Diller, D., Schubert, E., Hoffmann, B. and Hotzel, H. 2010. Use of a novel RT-PCR technique to monitor and quantitate *Mycoplasma bovis* infection in cattle herds with mastitis and respiratory disease. *Vet. J.* 186 : 299–303.
26. Strugnell, B. W., McAuliffe, L., Longmire, K. and Ellis-Iversen, J. 2011. *Mycoplasma wenyonii* associated with clinical signs in lactating dairy cows after herd wide bluetongue vaccination. *Cattle Practice* 19 : 75–80.
27. Tschopp, R., Bonnemain, P., Nicolet, J. and Burnens, A. 2001. Epidemiologische studie der riskfaktoren für *Mycoplasma bovis*-infektionen bei mastkalbern. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 143 : 461–467.
28. Williams, M. 2010. The seven deadly sins of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Practice* 41 : 1–2.
29. Wise, K. S., Calcutt, M. J., Foecking, M. F., Roske, K., Madupu, R. and Methe, B. A. 2011. Complete genome sequence of *Mycoplasma bovis* type strain PG45 (ATCC 25523). *Infect. Immun.* 79 : 982–983.



—— 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571号) 平成23年10月25日印刷 平成23年11月1日発行(第57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/平修(委員長), 堤信幸, 黒田丹
 事務/企画学術部
 印刷所 株式会社 精興社
 (無断転載を禁ず)