

NIBS LETTER 2012 JANUARY  
No. 572

# 日生研たより

2012年(平成24年)1月号 第58巻第1号(通巻572号)

## 挨拶・巻頭言

年頭のご挨拶

.....上田 進(2)

## 獣医病理学研修会

第50回 No.1018 猫の皮膚腫瘍

日本獣医生命科学大学獣医病理学教室(3)

## レビュー

世界牛疫撲滅達成を顧みて

.....小澤 義博(4)

## 発表論文紹介

(1)「イヌ顆粒球コロニー刺激因子の発現と精製」

(2)「シクロフォスファミドで誘導した好中球減少症の組換えイヌ顆粒球コロニー刺激因子による回復促進」・山元 哲(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.gr.jp/>

## 年頭のご挨拶

上田 進

謹んで新年のご挨拶を申し上げます。旧年中は皆様方に一方ならぬご指導、ご支援を頂き、衷心より感謝申し上げます。

昨年は3月11日、これまでに経験したことのない巨大地震が発生し、大津波が東日本一帯を襲い、未曾有の被害が発生しました。さらに福島第一原子力発電所の事故による放射線被害は、広範囲にしかも非常に長期間に及ぶ最悪の事態となっております。我々日本人は広島、長崎での被爆、そしてビキニ環礁での漁船「福竜丸」の乗組員の被爆から堅持されてきた非核三原則も曖昧になるなか、原子力発電は核の平和利用として「安全神話」が作られてきました。放射線はもともと人間をはじめとして生物の生存とは相容れないものです。経済成長を金科玉条として、そのエネルギー源としてこの地震列島に54基もの原子力発電所が建設されていることは、やはり異常としか言えないのではないのでしょうか。我々は過去に自滅していった多くの文明についての歴史から、自滅の原因の一つとして生態系の再生限界を超えたことを学んでいます。ロナルドライトが「暴走する文明」で記しているように、マンモスを一頭ではなく二頭殺すことをおぼえた旧石器時代のハンターたちは、進歩をなしとげた。しかし、群れ全体を断崖絶壁から追い落として二百頭いっぺんに殺すことをおぼえたのは、進歩し過ぎだった。彼らはしばらく羽振りのいい生活を送ったが、そのあと飢えてしまった。我々の置かれている現状も同様で、地球全体の自然資本を食い潰しつつあります。進歩と謂う毘のなかで、まさに暴走する文明に歯止めをかける必要性を痛感させられた3月11日でした。

ところで年頭に当たりまして、公益法人法の改正に伴う当研究所の今後についてご紹介いたします。当研究所は一般財団法人として昨年の12月に内閣府に申請いたしました。一般財団法人を運営していくために、日生研株式会社の製造部門を財団に移し、財団は薬事法上の製造業を取得して動物用医薬品の製造を行うこととなります。製造部門が加わることで組織の変更はありますが、事業目的はこれまでと変わることはなく、ただ収益事業として動物用医薬品、医療機器の開発、そしてそれらの製造及び供給が事業として加わることとなります。これからもご指導ご鞭撻のほどお願い申し上げます。

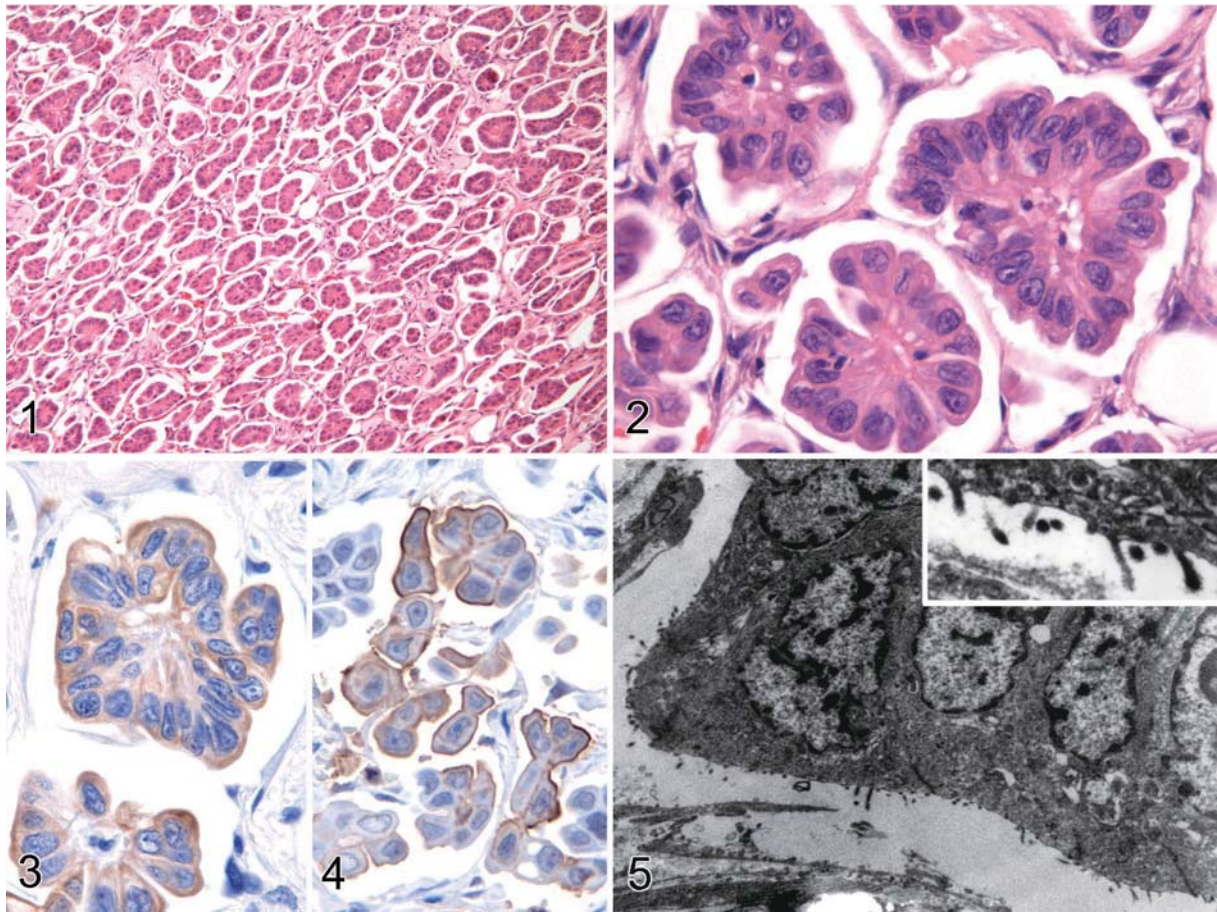
最後に、今年一年の平穏無事と皆様方のご健勝とご多幸を祈念いたしまして、ご挨拶とさせていただきます。

(理事長)



## 猫の皮膚腫瘍

日本獣医生命科学大学獣医病理学教室 第50回獣医病理学研修会標本 NO. 1018



動物：ネコ，日本猫，避妊雌，18歳。

臨床事項：右頬に約2cm大の痂皮形成を伴う腫瘍が認められた。皮下組織との固着はなし。血液生化学検査では異常なし。他に既往歴なし。

肉眼所見：大きさ2.1 × 1.8 × 0.6 cmの円盤状の腫瘍で、表面に潰瘍を伴い、やや硬結感を有する。

組織所見：腫瘍組織は非被包性で、真皮に局限していた。数十個の腫瘍細胞からなる充実性ないし偽管状の小細胞集塊が多数認められ、集塊は蜂の巣状の間質の空隙に浮遊するかのよう存在していた(図1)。腫瘍細胞は円柱状ないし不整形で、好酸性細胞質と類円形核を有し、核分裂像も散見された(図2)。腫瘍巣辺縁では、腫瘍細胞の皮筋への浸潤とリンパ管侵襲を認めた。免疫染色では、cytokeratin AE1/AE3, CAM5.2(図3), CEAに陽性を示した。特にCEAは、正常アポクリン腺では内腔を縁取るように染まるのに対し、腫瘍では細胞塊の外縁が染まる傾向にあった(図4)。一方、vimentin, cytokeratin 14,  $\alpha$ -SMA, p63, S-100等には陰性を示した。超微形態学的に、腫瘍細胞塊の外縁に微絨毛が観察された(図5, 挿入図：一部拡大)。

診断：微小乳頭状増殖パターンを示すアポクリン腺癌(Apocrine carcinoma with micropapillary growth pattern)

考察：微小乳頭状増殖パターンを示す癌は、ヒトの乳腺、肺、膀胱、腸管等の臓器で報告され、予後の悪い組織型として注目されている。ヒトの乳腺WHO分類では“*Invasive micropapillary carcinoma*”として、日本の乳癌取扱い規約では“*浸潤性微小乳頭癌*”として、独立した組織型として扱われている。ネコやイヌの乳腺に

おいても報告があり、新しいイヌの乳腺腫瘍分類では“*Carcinoma-micropapillary invasive*”の項目が設けられた。浸潤性微小乳頭状増殖の特徴は、腫瘍細胞が腺腔面を間質側に向けた(*inside-out pattern*)、中心に結合織を伴わない小集塊を形成することである。腫瘍細胞は間質と接着していないため、ホルマリン固定組織では収縮により腫瘍細胞塊と間質の間に特徴的な空隙が形成される。この増殖パターンの形成過程は解明されていないが、腫瘍細胞が間質との接着機能を失った結果、浸潤増殖していく過程で、腺腔面を外側に向けて塊を形成すると推察される。本症例は剖検が行われなかったが、臨床検査では他臓器に腫瘍が確認されていないため皮膚原発であると思われる。免疫染色結果からアポクリン腺由来と考えられる。(吉村久志)

参考文献：

1. Tavassoli, F. A. and Devilee, P. eds. 2003. WHO Classification, Tumours of the Breast and Female Genital Organs, IARC Press, Lyon.
2. 日本乳癌学会 / 編 2008年 臨床・病理 乳癌取扱い規約 第16版
3. Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R. and Zappulli, V. 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet. Pathol.* 48: 117-131.
4. Machida, Y., Yoshimura, H., Nakahira, R., Michishita, M., Ohkusu-Tsukada, K. and Takahashi, K. 2011. Cutaneous invasive micropapillary carcinoma of probable apocrine sweat gland origin in a cat. *J. Vet. Diagn. Invest.* (in press)

## 世界牛疫撲滅達成を顧みて

小澤義博 (国際獣疫事務局 名誉顧問)

WHO が 1980 年に天然痘の撲滅達成を宣言したが、これは世界から淘汰した最初の人の伝染病であった。当時、FAO (ローマ) の動物衛生課長を務めていた筆者は、ジュネーブ (WHO) を訪れ撲滅運動のノウハウを勉強し、その頃アフリカとアジアで流行していた牛疫と比較し、淘汰可能な動物のウイルス病であるという確信を得た。本病についての詳細は 2011 年に出版された新版・家畜の海外悪性伝染病を参照されたい [1]。

当時アフリカでは、JP15[2] と呼ばれた牛疫撲滅運動 (1962-1976 年) が終了し、アフリカの牛疫は一応淘汰されたかにみられた。しかし 1980 年前後から牛疫が再び西部と東部アフリカで徐々に広がりはじめ、さらに中部アフリカにも広がり、新たなキャンペーンの必要性がアフリカ統一機構 (OAU/IBAR) により叫ばれるようになった。これに対して、EEC は OAU/IBAR の野外活動の支援を表明し、FAO はワクチンの製造と管理、診断技実の改善や監視体制の強化を支援することを決め、1986 年に Pan-African Rinderpest Campaign (PARC) を開始することになった。

一方、南アジアでは、1982 年にネパールからインドにかけて牛疫が急激に広がり始め FAO の支援がはじまった。当時、中近東でも牛疫の散発的発生が続いていたので、アフリカだけでなく中近東と南アジアに撲滅運動を広げることにより世界の牛疫撲滅が可能になると考え、1987 年に FAO の専門家委員会 [3] を開き、牛疫撲滅運動をすべての感染地域に拡大する案が承認された。この会議の直後、中近東におけるキャンペーン (West Asia Rinderpest Eradication Campaign (WAREC)) と南アジアにおけるキャンペーン (SAREC) の計画が立案され、1989 年からすべての感染地域における牛疫撲滅運動が開始された。

かくも短期間に世界レベルでの牛疫撲滅計画を立てることが出来たのには、二つの理由が考えられる。第一は欧州では昔からの経験で牛疫に対抗する術を知っており、1920 年代はじめにインドからオランダに寄港した船の牛が持ち込んだ牛疫に対抗すべく、1924 年にパリに新しい国際機関 (OIE) が設立され

欧州の防疫体制が強化され、牛疫の再侵入を阻止することができるようになっていたこと。第 2 は中国を含む東アジアや東南アジアの牛疫は、中村稔治先生 (日本生物科学研究所元所長) の開発された家兎継代により弱毒化した L 株由来のワクチンの使用により 1970 年代までに牛疫撲滅が達成されていたからである (図 1)。中村先生の開発された L 株と LA 株は、組織培養ワクチンが普及する 1960 年代以前に、アフリカや中近東および東アジアで最も安全かつ有効な牛疫ワクチンとして FAO により認められ、先生自らその普及と指導を果たされた。しかしアフリカや中近東や南アジアでは兎や卵を使ったワクチンの製造が出来ない国が多かったため、牛疫は各地域で拡大を続けた。

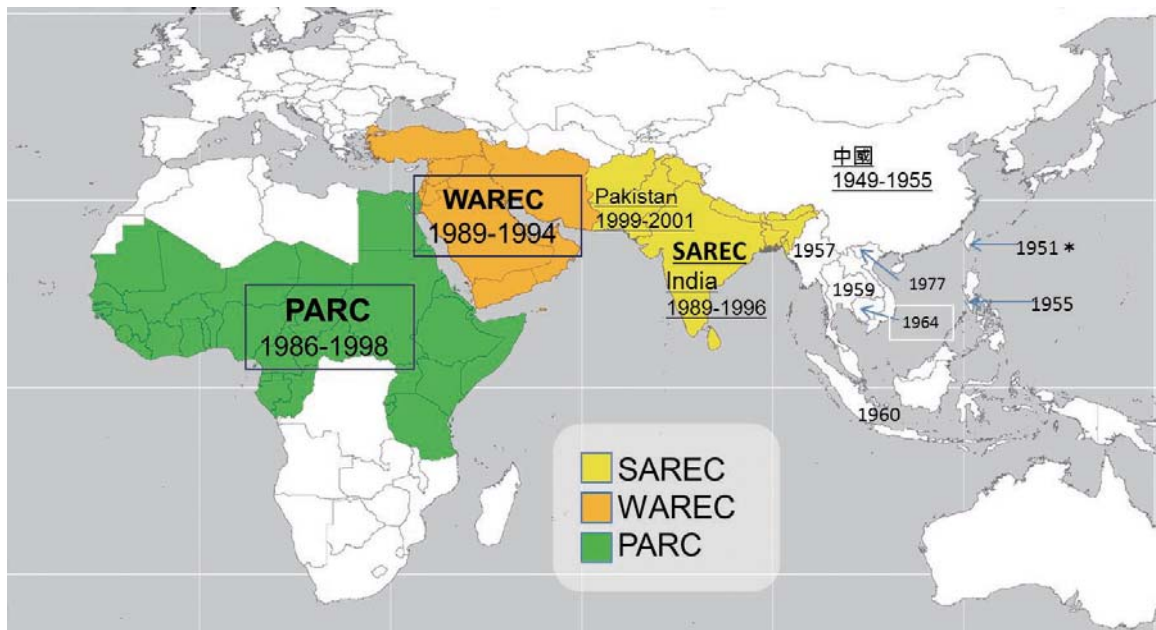
以下は 1980 年代に牛疫が拡大を続けたアフリカ、南アジア、中近東の順にそれぞれの地域における牛疫対応の歴史と問題点を整理して考察したものである。当時の牛疫の発生地域は図 2 にしめしてある。

### 1) アフリカのキャンペーン (PARC)

1976 年に JP15 キャンペーンが終了した時点では、アフリカの牛疫は一応制圧されたと考えられていた。しかし 1980 年初めになると、東部アフリカ (エチオピア) と西部アフリカ (マリ) の両端から再び牛疫が広がりはじめ、瞬く間に中部アフリカにまで広がっていった。東部アフリカのウイルスは比較的弱毒の Lineage 1 [4] であったが、西部のウイルスは Lineage 2 に属する強毒のウイルスであった。FAO は約 60 の小規模のプロジェクトで OAU/IBAR の支援を続けたが、国別の援助だけでは間に合わなくなり、OAU は FAO と EEC の支援のもと再びアフリカの感染国すべてを含むキャンペーン (PARC) を 1986 年に発足させることになった。

PARC では、EEC は主として獣医行政による野外活動を支援し、FAO は主としてワクチンの製造・品質管理及び牛疫の診断技術の強化を中心に OAU を支援することになった。そのため FAO はエチオピアとマリの研究所に FAO の Regional Reference Labs を設立し、アフリカで製造されたすべて





\*東南アジアの国々の年号は牛疫が淘汰された年

図1 地域別撲滅運動の年代表：PARC, WAREC, SAREC

の組織培養 (Plowright) ワクチン [5] の品質管理を行うと同時に、各国の診断技術の改善のために必要な材料の供給と、訓練を中心に支援を続けることになった。このキャンペーンは1986年に開始されたが、この時点ではまだアジアや中近東を含めた世界レベルの撲滅運動に至っていなかった。

しかしインドを中心とした南アジアにおける牛疫の広がりや、中近東における散発的拡大が続き、このままではアフリカにおける牛疫撲滅を達成しても、国際貿易が盛んになった今日では、再びアフリカに牛疫の侵入が繰り返される可能性が高かったため、中近東および南アジアに撲滅運動を拡大する計画を立て、1987年にFAOの専門家会議をローマで開催した [3]。この会議で牛疫の撲滅運動を世界レベルに拡大する計画の承認を得たので、中近東にWAREC、南アジアにSAREC計画をたて、両地域における撲滅運動が1989年に開始されることとなった。従って1989年以後の活動は、世界レベルでの牛疫撲滅運動と考えられる。

その後アフリカのPARCは1998年まで続き、監視体制をさらに強化するためPan-African Programme for the Control of Epizootics (PACE)と名前をかえ、2006年まで牛疫の監視を継続した。従ってアフリカにおける牛疫撲滅運動は1986年から20年間続いたことになる。しかしアフリカにおいて牛疫と診断されたのはケースは、2001年にケニアのMeru Parkで発見されたケースが最後で、それ以降は発見されなかった。つまり、アフリカの牛疫撲滅に要した期間は15年であったことになり、それか

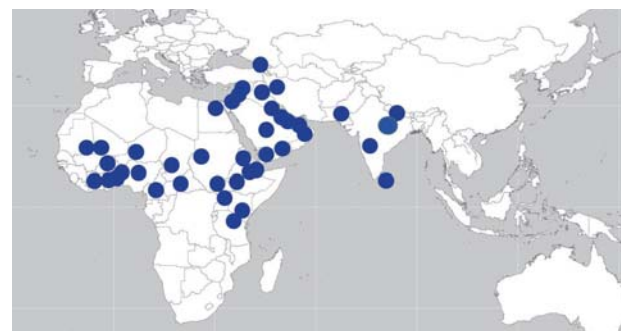


図2 1980年代の牛疫の分布

ら更に10年間監視期間を経て撲滅宣言がだされたことになる。

## 2) 南アジアのキャンペーン (SAREC)

1982年にインドで牛疫が急激に広がりだし、首都ニューデリー近郊まで拡大すると、FAOの支援の要請があり、筆者がインドに赴き、その対応を協議した。約3億円の資金が必要であったが、当時FAO (UNDP) の資金が不足していたので支援者を募った結果、EECが出資を申し出た。しかしインドはFAO/UNDP以外の援助を好まず、FAOが関与したかたちで、支援を続けることになった。また隣国のパキстанはインドと協力したキャンペーンを拒み、南アジア地域のキャンペーン (SAREC) の発足には幾つかの難問があった。結局、インドは自国中心のキャンペーン (Rinderpest Operation Zero) をFAOとEECの支援を得て1989年に発足した。このキャンペーンは1996年まで続きインド

のみならずネパールやブータンやスリランカとも協力し、牛疫の制圧に成功した。このキャンペーンでもインドとネパールで製造された組織培養ワクチン (Plowright) が使用された。インドにおける牛疫の最後のケースは 1995 年であった。

一方、パキスタンは湾岸諸国の石油産出国に生きた水牛や牛を輸出していたので、自国に牛疫が存在することを否定し続けた。しかし筆者も含めた多くの FAO の専門家が調査に入り牛疫の存在が確認されたので、インドのキャンペーンが終了後、直ちにパキスタンにおけるキャンペーンを開始するよう説得し、1999 年に撲滅運動が開始された。ワクチン接種後もサーベイランスが継続されたが、2001 年にパキスタンで報告された感染例が、南アジアにおける最後の牛疫感染例となり、南アジアにおける牛疫の撲滅が達成された。

### 3) 西アジアのキャンペーン (WAREC)

FAO は 1962 年に中近東 5 か国を中心に Near East Animal Health Institute (NEAHI) を設立し、牛疫を主要な病気の一つとしてエジプトを拠点として活動が始まった。まずワクチンとして組織培養ワクチン (Plowright) を使用することを決め、その製造方法と牛疫診断技術の普及に務めた。この活動は次第に中近東のすべての国に拡大し、イラクに本部を移してからもその活動は続けられた。

FAO が 1987 年に開いた専門家会議 [3] で、牛疫の撲滅運動を世界レベルに拡大することを決めると、直ちに西アジア諸国全体を包括する FAO (UNDP)

プロジェクト (WAREC) が計画され、イラク (バクダット) に本部を置き、1989 年に活動が開始された。牛疫撲滅運動は順調に進められたが、1990 年にイラクで戦争が始まり、WAREC の本部は、一時的に FAO (ローマ) に移され、1992 年にはジョルダン (アマン) に本部がおかれた。幸いにも戦争により南アジアからの家畜の輸入が止まり、牛疫の新たな侵入もなく、1994 年に WAREC の活動は終了した。中近東においては牛や水牛の数は他の地域と比べると少なく、牛疫の発生が長期間にわたって継続するような大牧場や野生動物の関与が見られなかったことも幸いした。また 1962 年から続いた牛疫の知識と経験が功を奏したためであると考えられる。

### 4) FAO と OIE の牛疫撲滅に果たした主な役割

#### a) 撲滅成功の秘訣 (OIE Pathway)

1989 年の時点でアフリカ、中近東と南アジア地域における牛疫ワクチンの接種運動がはじまったが、その後の監視体制の手順と基準がまだ決められていなかった。筆者は 1988 年に FAO を退職し、OIE の最高顧問に就任したので、牛疫の監視システムに関する OIE 基準をつくるべく、1989 年に疫学の専門家会議 [6] をパリで開いた。この会議で決められた重要な点は、ワクチン接種後の感染動物の監視期間を、症状を示した動物 (Clinically positive animals) の監視期間 (3 年) と症状を示さない感染動物 (Sub-clinical sero-positive animals) の監視期間 (2 年) に分けて監視する期間を決めたことであった (図 3)

OIE はこの監視方法により、いわゆる無症状の牛

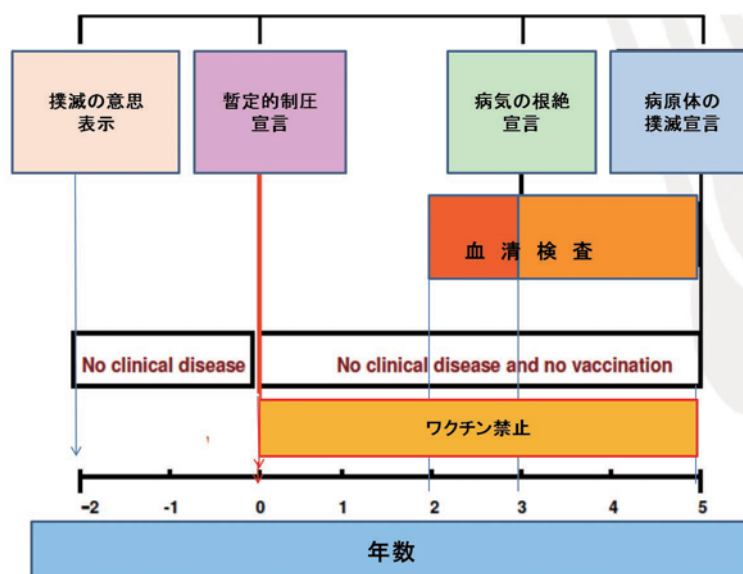


図3 牛疫サーベイランスの経路 (OIE Pathway)

疫感染動物やキャリアの根絶を各国に義務付け、2000年からはOIEにより承認された「牛疫清浄国リスト」を毎年公表することにした。このおかげで、1970年代のアフリカのJP15キャンペーンのように、牛疫に感染はしていたが無症状の動物を見逃さないようにすることが出来た。これが今回牛疫の撲滅を成功させた大きな要因の一つと考えられる。

今日ではこの監視方法は「OIE Pathway」とよばれ、牛疫以外の家畜伝染病の制圧にも応用されるようになってきている。

#### b) FAO/OIEによる世界の牛疫監視体制の強化

1994年にFAOはEMPRESとよばれる家畜伝染病に対する危機管理対応計画を発足させ、世界の牛疫撲滅(GREP)をその第一の目標とすることを決めた。その実際の活動は1995年頃に始まり、OIEと協力し、OIE Pathwayの監視体制を、当時残っていた牛疫感染地域に当てはめ、2003年までに牛疫の発症例をゼロにし、2005年には「暫定的に牛疫の制圧」を宣言し、2008年までの抗体調査により牛疫の不顕性感染例の不在を証明し、2010年に牛疫撲滅宣言を出す計画をたてた。

この計画通りにアフリカ、中近東、南アジアの牛疫撲滅計画は進行し、牛疫の最後の感染例は2001年以後見られなくなった。しかし、その後も国際監視活動が2008年まで続けられたが牛疫の感染例が全く見つからなかった。そこで2010年に撲滅宣言が出される予定であったが、その前にFAOとOIEの合同調査委員会により最終確定調査を行うことになり、2009年12月に筆者をふくむ7人の委員の最初の会合(写真1)がFAO(ローマ)で開かれた。この委員会は2011年1月の最終委員会までに合計4回開かれ、2011年5月にOIE(パリ)の世界獣医代表者会議の総会において牛疫の撲滅が宣言された。次いで2011年6月にFAO(ローマ)で開かれた農業関係大臣の総会において正式に牛疫撲滅宣言が発表された。この会議において、日本の中村稔治先生、JAICA、および筆者らの貢献に対して感謝状が送られた。

#### c) 今後の国際活動計画

##### (i) 緊急時の対応策

牛疫の撲滅は達成されたとはいえ、まだ研究所などには牛疫ウイルスが保管されているので、故意か間違いで流出する可能性が消えてはいない。万一、牛疫が発生した場合にはFAO/OIEによる国際的対応の計画を立てておく必要がある。発生した場合に



写真1: Joint FAO/OIE Committee on Global Rinderpest Eradication

使用するワクチンの保管センターや派遣する国際支援部隊も決めておく必要がある。また、テロリストによる攻撃に対応する考慮が必要である。

##### (ii) 牛疫ウイルスの隔離と保存

いま世界の数多くの研究所には、牛疫ウイルスや昔のワクチン株や遺伝子などが保存されている。FAO/OIEはその大凡の場所と保存材料は把握しているが、いまだそれらをどう収拾し、保管もしくは処理するかは決まっていない。また緊急時のワクチン・バンクをどこに置くかもきまっていない。これらの問題を審議・決定するため、出来るだけ早くFAO/OIE合同委員会を開く必要がある。

##### (iii) PPRの研究と撲滅

2010年10月にローマで開かれたFAOシンポジウム[7]において、牛疫撲滅後に世界レベルで撲滅可能な病気の一つとして、小反芻獣疫(PPR)の可能性について討議した。PPRは牛疫と非常によく似たウイルスであり、研究もかなり進んできている。またこの病気の分布地域も牛疫とよく似ている。しかし小反芻の頭数は牛・水牛の頭数より遥かに多いのみならず、遊牧民は多くの地域で国境を越えて遊牧を続けているので、ワクチン接種やPPRの監視は、牛疫より遥かに難しくなる。キャンペーンを始める前に、十分なフィージビリティ・スタディーを各地域で行う必要がある。また使用するワクチンも同時に比較検討し、撲滅運動開始以前に決めておく必要がある。

#### 5) おわりに

1962年に私がFAOの研究専門官として中近東に赴く途中、ローマのFAO本部でエジプトに行かれる中村先生と偶然お会いする機会があった。先生は



牛疫の LA ワクチンの製造法をエジプトに伝授される途中で、筆者はイランに行く途中でした。それから 50 年近くたったいま、先生に牛疫撲滅達成をご報告出来るのは全く感無量である。

今回、長年の牛疫の歴史に終止符をうつことが出来たのは、先生はじめ、数多くの日本の研究者、JICA および行政官の弛まざる努力のたまものであり、獣医師の誇りとして語り継いでゆくべきことであると思う。たまたま私の存命中に牛疫撲滅が達成されたことは、全く幸運であったと感謝の気持ちで一杯である。

#### 参考文献

1. 小澤義博, 佐々木正雄. 2011. 新版・家畜の海外悪性伝染病. チクサン出版社
2. Lepisier, H. E. 1971. The General technical report on OAU/STRC Joint Campaign against Rinderpest in Central and West Africa. 1-203.
3. FAO, Report of the Expert Consultation on Global Strategy for Control and Eradication of Rinderpest. Rome. 16-20 Feb. 1987.
4. Barrett, T. *et al.* 2006. Rinderpest and PPR. *Academic Press*. pp179.
5. Plowright, W. 1962. The application of monolayer tissue culture techniques in rinderpest research. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 57 : 253-276.
6. OIE, Report of the Expert Consultation on Rinderpest Surveillance Systems. Paris. 16-18 Aug. 1989.
7. FAO, Symposium on the Global Rinderpest Eradication. Peste des Putits Ruminants, Rome. 14 Oct. 2010

#### 発表論文紹介

##### (1) 「イヌ顆粒球コロニー刺激因子の発現と精製」

Expression and purification of canine granulocyte colony-stimulating factor (cG-CSF).

Akira Yamamoto, Akira Iwata, Toshiki Saito, Fumiko Watanabe, Susumu Ueda *Veterinary Immunology and Immunopathology* 130 : 221-225, 2009

##### (2) 「シクロフォスファミドで誘導した好中球減少症の組換えイヌ顆粒球コロニー刺激因子による回復促進」

Recombinant canine granulocyte colony-stimulating factor accelerates recovery from cyclophosphamide-induced neutropenia in dogs.

Akira Yamamoto, Miyuki Fujino, Takeshi Tsuchiya, Akira Iwata  
*Veterinary Immunology and Immunopathology* 142 : 271-275, 2011

山元 哲

小動物の腫瘍の治療に化学療法が選択される場合、主要な副作用は好中球減少症であり、感染のリスクを伴う。そのため、抗がん剤は高用量で使用する時は、補助剤として人体用の顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) が使用される場合がある。イヌに人体用の組換え G-CSF を頻回投与すると、抗ヒト G-CSF 抗体が産生され、その後のヒト G-CSF の投与に反応しなくなるばかりではなく、抗体が内因性の G-CSF の作用も中和してしまうため、好中球減少症が発現する [1, 2, 3]。組換えヒト G-CSF を長期にわたってイヌに投与するのは危険であり、イヌの組換え G-CSF 製剤が待望されている。

本研究では *Brevibacillus choshinensis* HPD31 株を

発現系に使用した。野生株 HPD31 株はヒゲタ醤油社研究所 (現・研究開発部) が銚子市内の土壌より分離した。本菌株は昭和 61 年より遺伝子組換え実験の宿主として研究に利用されてきている。*B. choshinensis* の分泌する細胞壁構成蛋白質 (HWP, 菌体外分泌蛋白質) は分子量 120 kDa の蛋白質であり、培養経過に伴って培養液中に遊離し、蓄積される。①大量のタンパク質を分泌生産していること、②菌体外にタンパク質分解酵素やエンドトキシンを分泌しないという 2 点において本菌株は生産技術に適している [4, 5]。例えば研究試薬ヒト上皮細胞増殖因子生産や組換え動物用医薬品生産などの組換えタンパク質製剤の生産宿主として実績がある。



**[論文 1]**  
組換えイヌ顆粒球コロニー刺激因子 (cG-CSF) の  
発現と精製タンパク質の生体への投与

cG-CSFcDNA ORF 全体を含む DNA 断片は PCR 法を応用して合成した。HWP のプロモーターを有する発現用ベクターにシグナルシーケンス部分のない cG-CSFcDNA をクローニングし、発現用プラスミド pNY326-cG-CSF を構築した。

発現用プラスミドを *B. choshinensis* HPD31 に導入しこのクローンを Bb/cG とした。Bb/cG は 20 L の T2Nm 培地 (1% ポリペプトン, 0.2% Yeast Extract, 0.5% 肉エキス, 1% グルコース, 50 µg/mL ネオマイシン, pH7.0) で 65 時間培養した。培養上清の cG-CSF の発現を確認したが、発現量が安定しなかった。また、組換えバキュロウイルスによりネコ G-CSF (fG-CSF: 立体構造は天然の G-CSF に近いと考えられる) を発現した培養上清では生物活性が  $5.4 \times 10^4$  U/mL であったのに対して、Bb/cG 培養上清中の生物活性は  $3.2 \times 10^3$  U/mL と低値であった。

Western blot の結果をスキャナで取り込み、各サンプルのバンドを画像処理ソフトウェアで定量化して、数値を arbitrary unit (AU) で表した。生物活性の値を AU で除した値を推定の比活性とした。Bb/cG 培養上清中の cG-CSF 発現量は、標準検体の 0.71 倍と計測されたことから、発現タンパク質の比活性は fG-CSF の 10 分の 1 以下と見積もられた。

cG-CSF には 5 つのシステイン残基がある。*B. choshinensis* HPD31 で発現させると 1 つ余分なシステインがあり、そのためタンパク質分子内のジスルフィド結合が間違っ形成されているのではないかと推測した。そこで、ヒト G-CSF ではフリーとされている 17 番目のシステインをセリンとした cG-CSF (cG-CSF (C17S)) を発現させた。cG-CSF (C17S) を発現させた培養上清中では  $6.7 \times 10^4$  U/mL と活性の上昇がみられた。加えて、置換前の cG-CSF の比活性は 1.7 であったのに対し、cG-CSF (C17S) では 18 と比活性も 10 倍に上昇した。cG-CSF (C17S) を発現した上清の AU は標準検体の 1.37 倍であり、比活性は 0.91 倍であった。比活性がバキュロウイルスを用いて発現した fG-CSF と同等であったため、天然な構造に近い G-CSF が産生されたと考えられる。

cG-CSF (C17S) を導入した *B. choshinensis* HPD31 株 (以下選択したクローンを Bb/GC (C17S) とし、組換え cG-CSF (C17S) を単に cG

-CSF と記載する) を T2Nm 培地で 48 ~ 65 時間培養した。培養上清は遠心し、0.22 µm 孔のフィルターで処理して除菌した後、硫酸アンモニウム沈殿、Butyl Sepharose FF レジンおよび DEAE Sepharose FF レジン (GE ヘルスケア社) を使用したカラムクロマトグラフィにより精製した。溶出画分を限外ろ過によりエンドトキシンを除去した。精製の最終産物は比活性が約  $8 \times 10^6$  U/mg であり、SDS-PAGE の CBB 染色で単一バンドであることが確認された。エンドトキシン活性は 0.31 EU/mL 未満であった。

実験用ビーグル犬 (8 ヶ月齢, 体重約 10 kg) 8 頭を 4 群に分け、125, 25, 5, 1 µg/頭の用量の精製 cG-CSF を各群 2 頭ずつ 2 日間連日で皮下投与した。

G-CSF による好中球動員効果は末梢血中の白血球数を測定することにより確認できる。5, 25 および 125 µg/頭の用量で投与したイヌにおいて、投与 1 日後には総白血球数が cG-CSF 用量に依存して増加していたことから、生体での生物活性をもつことが確認できた。投与を終了してから 2 日後には投与前の白血球数に戻っていた。投与後の白血球を種類別に解析したところ、好中球数が増加しており、総白血球数の増加に寄与していた。投与した cG-CSF の容量に依存して好中球数が増加したが、5 µg/頭で投与した場合にはほとんど効果がみられず、25 µg/頭と 125 µg/頭での差はほとんどなかった (図 1)。使用したイヌの体重が約 10 kg であったことより、cG-CSF の作用が末梢血中の好中球数の増加として現れるのは、投与容量が 2.5 µg/kg 体重以上のときであり、用量を 12.5 µg/kg 体重に増やしても効果は増強されないと考えられるが、実際の治療への応用を考えた場合は、さらに詳細な用量の検討が必要である。cG-CSF の投与の間、体温の上昇、食欲の減退あるいは元気消失などの臨床症状はなく、また、投与部位に炎症などの反応も見られなかったことから、今回の投与条件での安全性も示された。

本研究により発現・精製され、生体での効果が確認された cG-CSF は、イヌに対して有効な好中球数回復薬となり得ることがわかった。投与期間が短いため、抗体産生の問題は検討できなかった。

**[論文 2]**  
シクロフォスファミドで誘導した好中球減少症の組  
換えイヌ顆粒球コロニー刺激因子による回復促進

実験用ビーグル犬 (5 ヶ月齢, 体重約 10 kg) 6

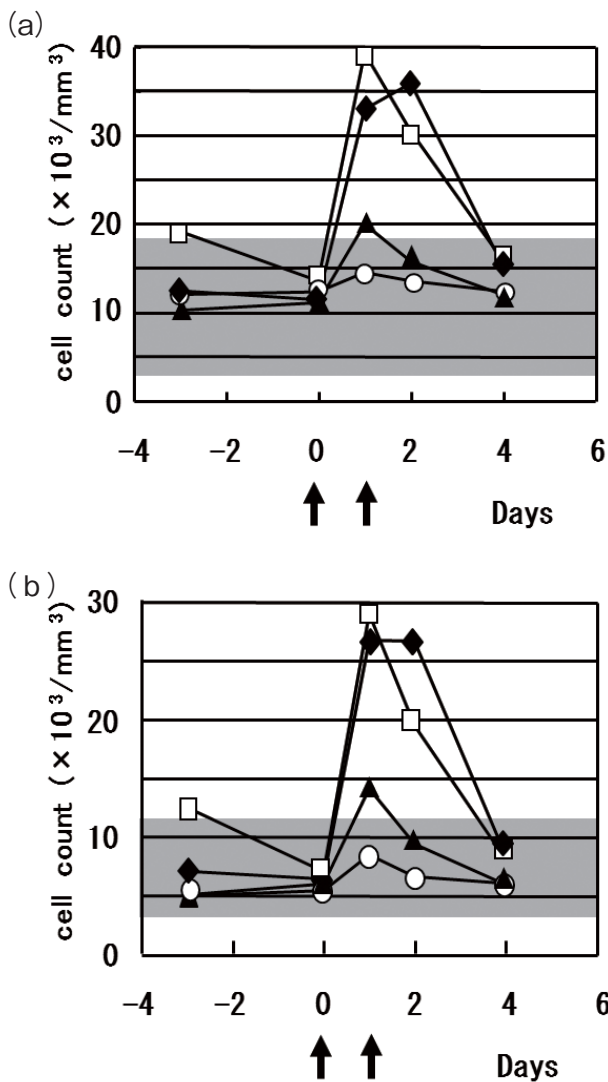


図1 cG-CSFを投与したイヌの白血球数の変化  
Day0, 1でcG-CSFを皮下投与した(矢印)健康犬の  
day -3, 0, 1, 2, 4での白血球数の変化  
(a) 総白血球 (b) 好中球。  
cG-CSF投与量○: 1 $\mu$ g/頭, ▲: 5 $\mu$ g/頭, □: 25  
 $\mu$ g/頭, ■: 125  $\mu$ g/頭, 灰色部分: 正常範囲

頭を使用し、塩野義製薬社製のシクロフォスファミド(以下CPAと略記する。商品名エンドキサン)を400 mg/m<sup>2</sup>で静脈内に投与して好中球減少症を誘導した。副作用を防ぐため、メスナ(商品名ウロミテキサン; 塩野義製薬社製)およびテルモ社製の乳酸リンゲル(商品名ソルラクト)を投与した。臨床症状の観察、体温測定を毎日行った。18日間1クールとし、休薬期間として前の試験の終了と次の試験の開始までは14日以上設け、CPAの投与間隔としては1ヶ月以上とした。1クールの試験ではcG-CSF投与用量を1用量ずつあるいは1用法ずつ試験した。G-CSFの薬理効果は治療的投与と予防的投与という2つの方法で確認した。治療的投与はG-CSFの投与量を変えて4クール、予防的投与は1クールで、合計5クールの試験を行った。

各イヌよりCPA投与の前後で血液を採取し、顆粒球数を測定し、cG-CSF非投与群との有意差をWilcoxonの符号付き順位差検定により検出した。

(A) 治療的投与方法

Henryら著The Compendium[8]およびDobsonとGorman著「Cancer Chemotherapy in Small Animal Practice」[9]を参考にして、CPA投与後、好中球数が1,000個/mm<sup>3</sup>以下になった場合あるいは、2,000個/mm<sup>3</sup>以下で39.5℃以上の発熱を伴う場合に好中球減少症であると規定した。

そこで、まず規定した好中球減少症の条件に当てはまると確認した後に、好中球減少症の改善のためcG-CSFを投与する方法で薬理効果を試験した。1日1回皮下投与し、顆粒球数が条件の範囲にあるときには投与を続けた。各クールでは0, 2.5, 5または10  $\mu$ g/kgのcG-CSF投与用量を1用量ずつ試験した。

CPA投与の5~9日後に規定した好中球減少症を示した。そこで、cG-CSFを治療的に投与したが、顆粒球数が翌日に顕著に増加しはじめるイヌはいなかった。cG-CSF投与の回数はイヌによって差があり、2.5  $\mu$ g/kgの用量でcG-CSFを投与した場合、2頭のイヌでは1回だけの投与であったが、3頭のイヌで2回投与、1頭で3回投与しなければならなかった。cG-CSFの治療的投与では、非投与の場合に比べて回復が促進された。試験結果は(I) nadirという顆粒球数が最低値を示す時点からCPA投与前にまで回復するのに要した日数と(II)顆粒球

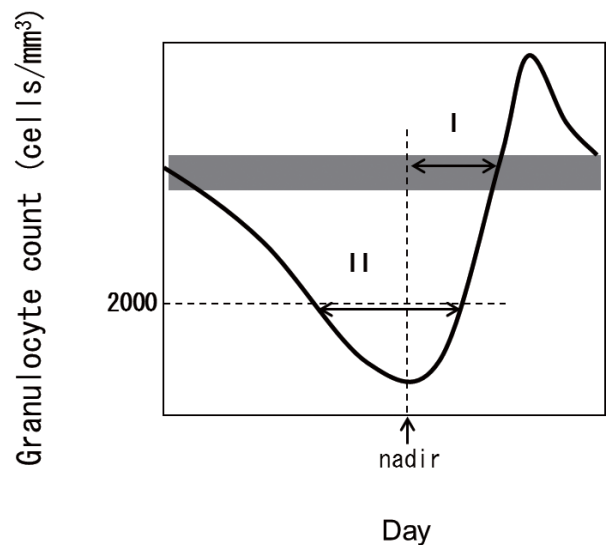


図2 好中球減少症の回復を示す指標  
(I): 顆粒球数がnadirからCPA投与前まで回復するのに要した期間  
(II): 顆粒球数が2000/mm<sup>3</sup>以下である期間

数が  $2000 \text{ 個}/\text{mm}^3$  以下の日数の指標で比較した (図2)。治療的投与では (I) の期間は非投与群と有意差があり, 約 1.5 日以上短縮が見られたが, (II) の期間は有意差が見られなかった (図3)。

### (B) 予防的投与法

予防的投与として, 前記 (A) の実験において CPA の作用が強く出るイヌ 3 頭に CPA 投与後 2~4 日, 残りの 3 頭に CPA 投与後 3~5 日の連日 3 日間, 好中球数とは無関係に  $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}$  の用量で cG-CSF を 1 日 1 回皮下投与した。規定した好中球減少症となった場合にも追加の cG-CSF は投与しなかった。予防的投与では, 治療的投与より早期に顆粒球数の増加が開始した。予防的投与では (I), (II) の両方の期間で非投与群と有意差があり, 日数の短縮がみとめられた (図3)。

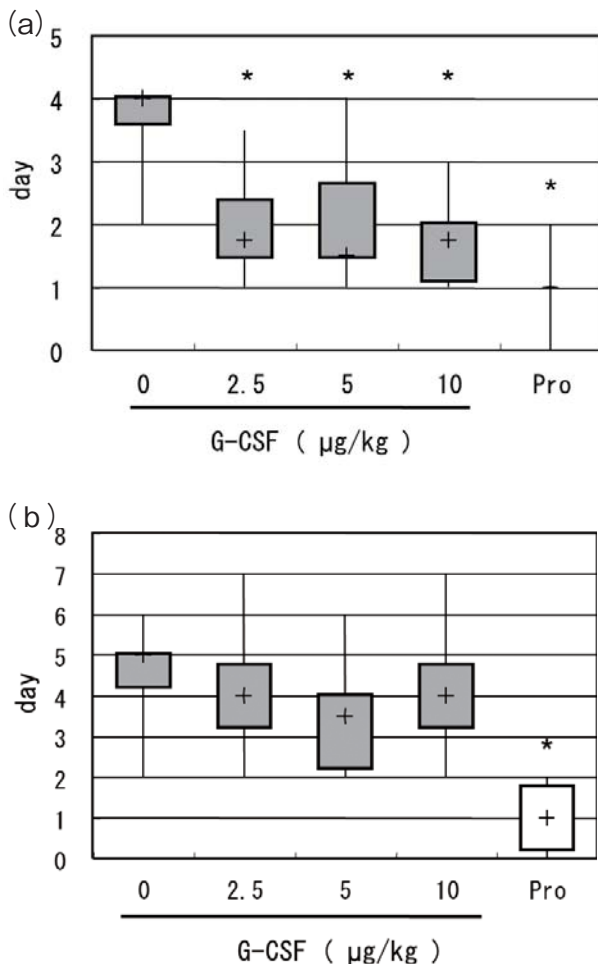


図3 cG-CSF 投与による好中球減少期間の短縮  
(a) nadir からの回復日数 (図2の (I))  
(b) 顆粒球数が  $2000/\text{mm}^3$  以下の日数 (図2の (II))  
灰色カラム: 治療的投与試験 (数値は投与した G-CSF 量), 白カラム: 予防的投与試験  
\*:  $p < 0.05$

本研究では好中球減少症時にも cG-CSF の投与により好中球は末梢血中に動員されたが, その効果は健常犬への G-CSF 投与と比較すると, 増加に転じる時期に遅れがあった。G-CSF 投与により末梢血に好中球が動員されるのは骨髄での分化が完了した後となるため, cG-CSF 投与から回復までの遅れが現れたと推測された。好中球数の回復後, 一過性の好中球数増多症がみられた。これは, 骨髄と末梢血とでの回復時間のズレによるものと考えられる。

現在, cG-CSF が市販されていないために小動物臨床で使用される人体用の G-CSF は, イヌに長期使用すると G-CSF に対する抗体が産生される可能性がある。今回の試験では, cG-CSF を定期的に試験犬へ投与したが, 全試験を終了した後, 血中の抗体産生は認められなかった。過去の報告でも, イヌ G-CSF をイヌに投与した場合に G-CSF に対する抗体は産生されていない [6, 7] ことから, 種特異的な G-CSF を投与するかがりは安全性が高いと考えられる。

本研究で試験した使用法のように cG-CSF が小動物臨床で使用可能となれば, 高用量での癌化学療法が実行でき, 癌の完全緩解や薬剤抵抗性の腫瘍が発生するのを防止できる効果が期待できる。しかし, 使用法を決定するには, 実際に担癌犬を用いた多くの試験が必要である。また, 抗原性の問題もより詳細に検討する必要がある。

(研究員)

### 参考文献

1. Hammond, W. P. *et al.* 1991. *J. Clin. Invest.* **87**: 704-710.
2. Lothrop Jr., C. D. *et al.* 1988. *Blood.* **72**: 1324-13283.
3. Cowgill, L. D. *et al.* 1998. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **212**: 521-528.
4. Udaka, S. *et al.* 1989 *Genet. Eng. Rev.* **7**: 113-146.
5. Takagi, H. *et al.* 1989 *Agric. Biol. Chem.* **53**: 691-699.
6. Schuening, F. G. *et al.* 1989. *Blood.* **74**: 1308-1313.
7. Ogilvie, G. K. *et al.* 1992. *J. Vet. Intern. Med.* **6**: 44-47.
8. Henry, C. J. 1998. *The Compendium.* **20**: 728-734.
9. Dobson, J. and Gorman, N. T. 1993. *Cancer Chemotherapy in Small Animal Practice (Library Vet Practice)*



## 学会発表演題 (2011年4月～2011年9月)

## ● 15th International Congress of Mucosal Immunology

期 日：2011年7月5日～7月9日

開 催 地：パリ大学, フランス

発表演題：Oral rice-based vaccine induces active and passive immunity against enterotoxigenic E coli-mediated diarrhea in pigs.

○ N. Takeyama<sup>1</sup>, D. Tokuhara<sup>2</sup>, K. Oroku<sup>1</sup>, M. Mejima<sup>2</sup>, S. Kurokawa<sup>2</sup>, Y. Takahashi<sup>2</sup>, M. Kuroda<sup>3</sup>, T. Hiroiwa<sup>2</sup>, Y. Chen<sup>2</sup>, A. Chubachi<sup>2</sup>, T. Nochi<sup>2</sup>, T. Masumura<sup>4</sup>, K. Tanaka<sup>4</sup>, T. Kodma<sup>1</sup>, S. Nagai<sup>5</sup>, T. Nunoya<sup>1</sup>, H. Kiyono<sup>2</sup> and Y. Yuki<sup>2</sup> (<sup>1</sup> Nippon Institute for Biological Science, <sup>2</sup> Department of Microbiology and Immunology, Institute of Medical Science, University of Tokyo, <sup>3</sup> Rice Physiology Research Team, National Agriculture Research Center, Japan, <sup>4</sup> Graduate School of Agriculture, Kyoto Prefectural University, <sup>5</sup> Nisseiken Co. Ltd)

## ● 第 152 回日本獣医学会学術集会

期 日：2011年9月19日～9月21日

開 催 地：大阪府立大学

発表演題：SPF 鶏を用いた鶏壊死性腸炎実験モデルの構築

○川原史也, 魚谷勇介, 鈴木敬之, 上塚浩司, 布谷鉄夫

発表演題：わが国における NetB 毒素遺伝子陽性 *Clostridium perfringens* の分離状況

○魚谷勇介, 小高由希乃, 高橋欣也, 川原史也, 林志鋒

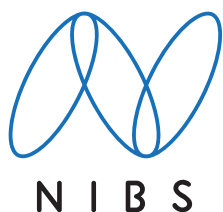
## ● 動物用ワクチン-バイオ医薬品研究会 2011 年秋 総会・シンポジウム

期 日：2011年9月21日

開 催 地：大阪府立大学

発表演題：リアルタイム PCR を用いた豚サイトカイン mRNA の発現解析法

○竹山夏実



—— 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 572 号) 平成 23 年 12 月 25 日印刷 平成 24 年 1 月 1 日発行(第 58 巻第 1 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)