

NIBS LETTER 2013 MAY
No. 580

日 生 研 究 所

2013年(平成25年)5月号 第59巻第3号(通巻580号)

挨拶・巻頭言

成功体験

.....岩田 晃(2)

獣医病理学研修会

第51回 No. 1031 イヌの甲状腺・副腎

.....三菱化学メディエンス(3)

第52回 No. 1068 ネコの脊髄

.....鳥取大学獣医病理学教室(4)

レビュー

鶏大腸菌症生ワクチン“ガルエヌテクト

CBL”の開発.....永野哲司(5)

論文紹介

マウスモデルにおいて食事性の肥満は2009

年型パンデミックH1N1ワクチンの効果

を劇的に減弱させる.....山下 龍(10)



NIBS

一般財団法人 日本生物科学研究所

NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE

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



成功体験

岩田 晃

1981年12月に京都でAMBO (Asian Molecular Biology Organization) 第1回シンポジウムが開催されました。ちょうど遺伝子組換え技術が研究レベルで実用化されて分子生物学が誕生した時代であり、大学、バイオ企業の研究所は大規模な構造改革を余儀なくされていました。主催者は日本にも欧州EMBOのような研究所を設立すべく、「DNA研究の未来」というテーマでAMBO国際学会に国内外の著名な研究者を招待したのです。その後、AMBO構想は企業の寄付を集められずに挫折しました。

当時、学部学生であった私も教授にプログラム集をもらって会議に潜り込み、教科書でしか知らない先達たちの話を聞きました。DNAの螺旋構造を発見して1962年に若くしてノーベル賞を受賞したJ. D. ワトソン博士も主催者の一人です。講演に対する質問でヒトゲノム解読は1塩基対1セントになればできると答えていました。当時は1メートルの長さのポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、3日かけて500塩基ほどの配列決定をしていたので、夢のような低価格です。

20年後、ヒトゲノム計画は2003年に終了し、約30億塩基対であることが判明しました。最新のシステムではヒトゲノム配列も1000ドルで決定できるそうで、ウイルスから人間までゲノム全長配列情報はたくさんの生物種で報告されています。大量のゲノムシーケンズデータが報告される原動力はDNAシーケンサの進歩です。蛍光基質を用いた合成反応に電気泳動を組み合わせたサンガー法の代わりに登場したパイロシーケンズ法。電気泳動を使わず、マイクロエマルジョンとPCRを組み合わせると一気に数百万ベースを読む技術です。昨年は1分子のDNAを読む手のひらサイズのDNAシーケンサが発表され、話題になりました。

ゲノム配列情報に限らず、大量の情報（ビッグデータ）が比較的簡単に生み出される時代になりました。そして、今大切なのは断片的な情報を意味ある情報に組上げる技術です。インターネット上の情報を効率的に検索するプログラムを提供したグーグル社は短期間に巨大企業へと成長しました。それでも圧倒的な量の情報から重要な情報を得るのは困難です。現実の問題では考察を合理的に進めたところで最終的な判断ができない結論が残ることが多いものです。

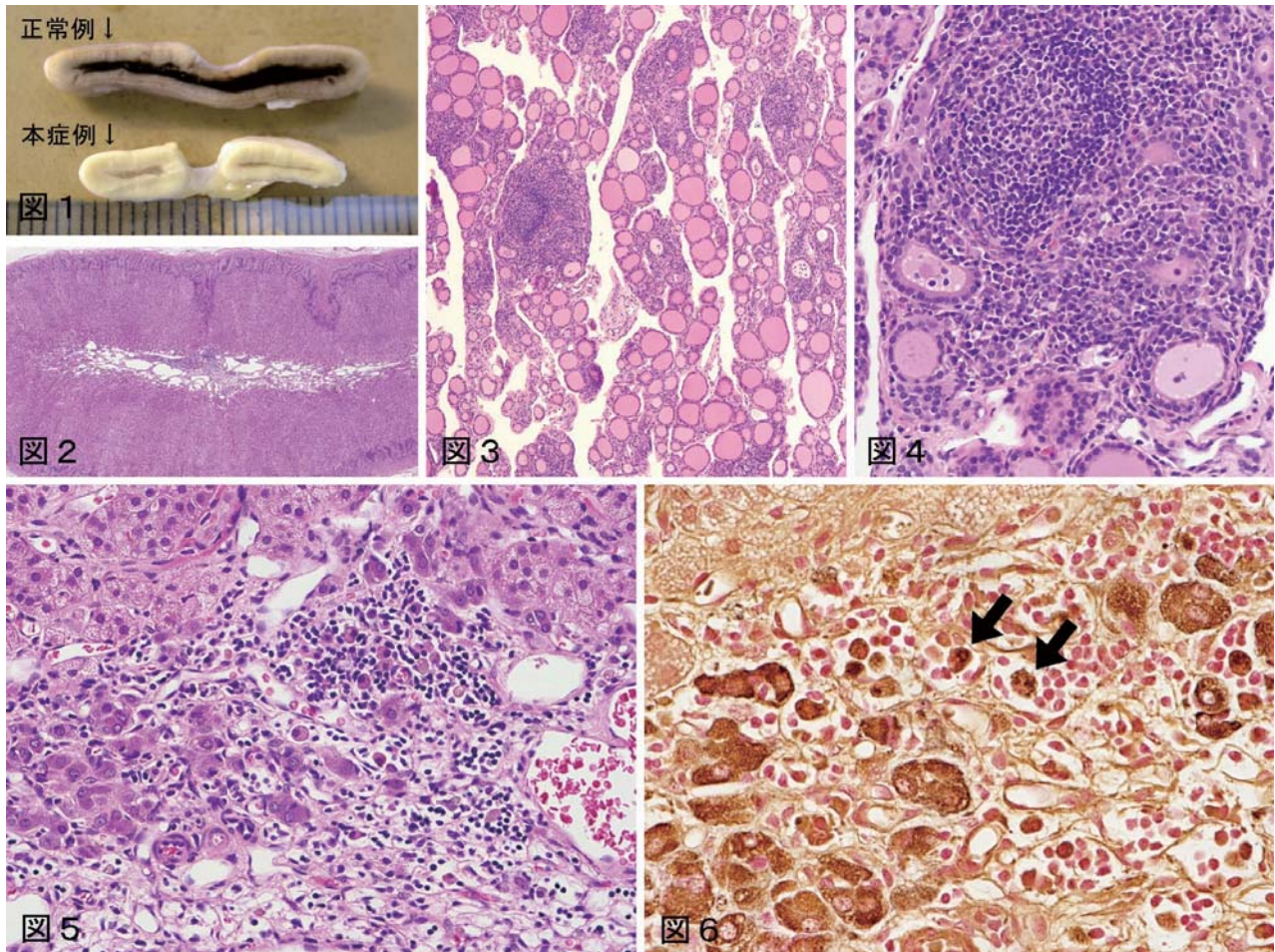
最終的に重要な価値判断は個人の体験ではないでしょうか。判断基準が欲しいために成功者の体験を拝聴する商売が成立しています。実は自然科学に従事する者は慎重に計画して実験するので必ず小さな成功体験を持っています。これこそが膨大な科学情報のなかで研究者が迷うことなく先端研究を推進できる原動力でしょう。最先端を走る研究者は膨大な情報の中から体験をもとに確かな答えを見つけるのでしょうか。

J. D. ワトソン博士は個人の全ゲノム遺伝情報を公開した最初の人物です。国際的な組織であるヒューマン・ゲノム・コンソーシアムで完全解読まで10年を要したゲノム解読ですが、この仕事は米バイオ企業454 Life Sciencesが行い、ゲノム解読に67日、費用は100万ドル（約1億2000万円）でした。

(常務理事)

イヌの甲状腺・副腎

三菱化学メディエンス 第51回獣医病理学研修会 No. 1031



動物：イヌ、ビーグル、雄、18ヵ月齢。

臨床事項：蒸留水をカテーテルにて54週間反復経口投与後に解剖した。飼育期間中の一般症状観察、解剖時の血液検査、血液生化学検査では異常は認められなかった。肉眼所見：ホルマリン固定後の副腎剖面では、正常個体の副腎と比較して髄質領域の菲薄化が認められた(図1)。両側の副腎重量が同月齢動物の平均値より低値を示した(912 mg、平均値：1260 mg)。

組織所見：甲状腺では間質および濾胞へのリンパ球浸潤が認められ(図3)、リンパ濾胞形成も散見された(図4)。副腎では髄質領域が顕著に減少し(図2)、髄質細胞の減少と共にリンパ球主体の細胞浸潤が認められた(図5)。副腎のグリメリウス染色では、萎縮した髄質細胞が散見された(図6 矢印)。

診断：リンパ球性甲状腺炎および副腎髄質の萎縮を伴うリンパ球性副腎髄質炎(Autoimmune polyendocrine syndrome (APS) を疑う)

考察：イヌのリンパ球性甲状腺炎は、血清中の抗サイログロブリンや抗サイロペルオキシターゼ自己抗体価の上

昇を示し、ヒトの橋本病に類似した自己免疫疾患と考えられている。本症例も、血清中の抗イヌサイログロブリン自己抗体価が高値(106.2%)を示した。また、副腎髄質においても髄質細胞の減少とリンパ球浸潤が認められ、これらも自己免疫に起因した病変と考えた。ヒトにおいて、自己免疫機序により複数の内分泌器官にて炎症や萎縮性病変などの機能不全を呈する病態はAPSに分類される。イヌでも、グレートピレネー犬に見られた副腎と甲状腺の萎縮を伴う下垂体炎と副腎炎が、ヒトのAPSに類似した病変として報告されている。しかし、本症例では、副腎髄質に対する自己抗体の存在を証明できなかったため、診断名にAPSを付けることに対して慎重論も出た。

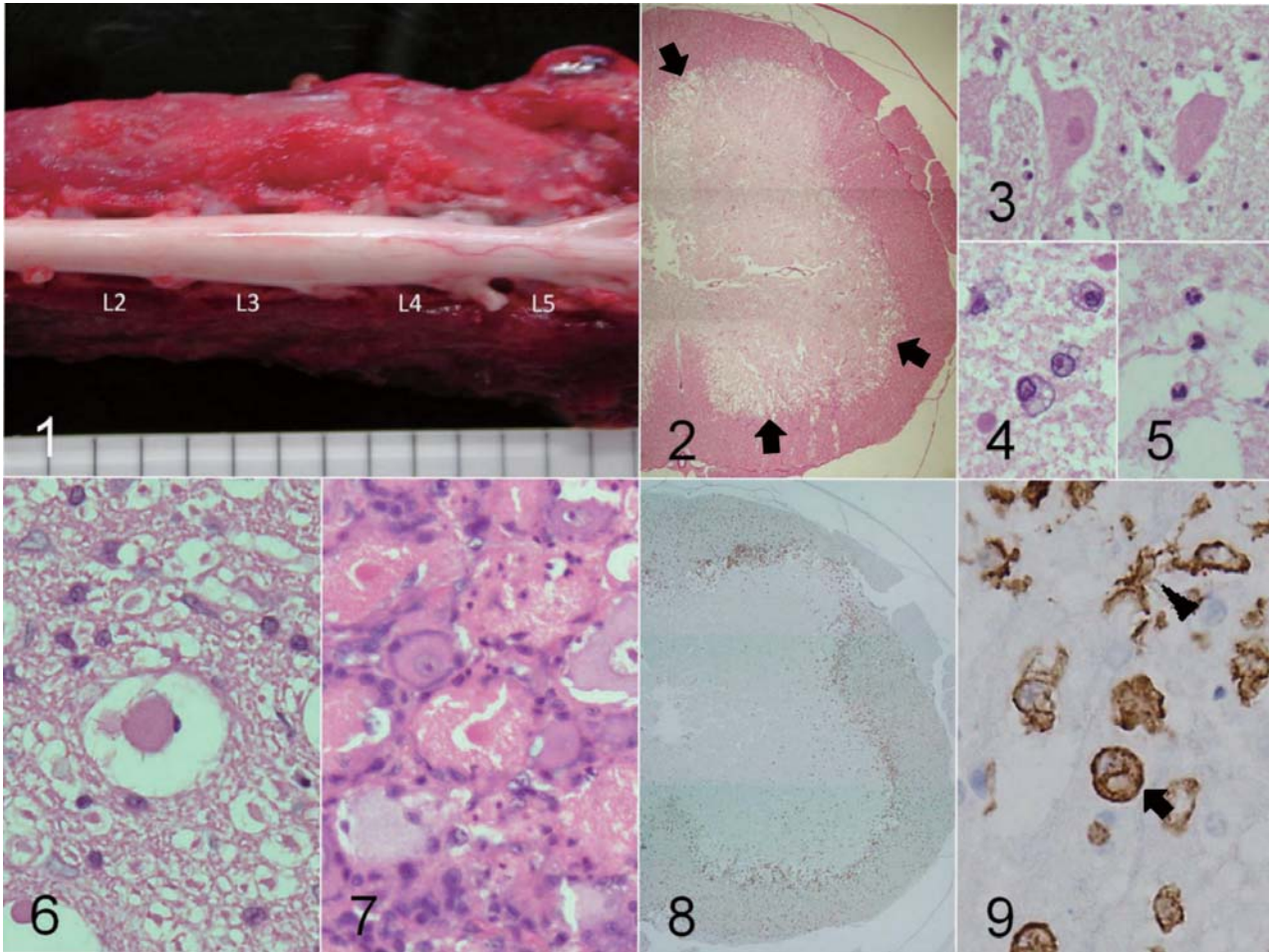
(友成由紀)

参考文献：

1. Adissu, H. A., Hamel-Jolette, A., Foster, R. A. 2010. Lymphocytic adenohipophysitis and adrenalitis in a dog with adrenal and thyroid atrophy. *Vet. Pathol.* 47: 1082-1085.

ネコの脊髄

鳥取大学獣医病理学教室 第52回獣医病理学研修会 No. 1068



動物：ネコ、シャム、雌、4ヵ月齢。

臨床事項：症例は自宅裏口で虚脱状態で発見された。外傷は無かったが、後駆は麻痺し、自力排尿は困難であった。神経学的検査では両後肢深部痛覚、両膝蓋腱反射、肛門反射および尾力が消失していた。

剖検所見：脊髄は第二腰髄から馬尾にかけて（特に腰髄が）腫大していた（図1）。第一頸髄から第一腰髄に著変は認められなかった。また、椎骨に骨折などの著変は認められなかった。解剖時、骨盤腔内の出血および右腎臓の出血性梗塞巣が認められた。

組織所見：第二腰髄から馬尾にかけて灰白質全域は海綿状を呈し染色性が低下していた（図2）。海綿状変化は灰白質と白質の境界部に特に強く認められた（図2矢印）。灰白質内の神経細胞は壊死していた（図3）。灰白質全域には泡沫状マクロファージ（図4）および好中球（図5）が浸潤し、白質にはスフェロイドが少数認められた（図6）。また、脊髄神経節に神経細胞壊死が認められた（図7）。Iba-1抗体を用いた免疫染色では脊髄灰白質と白質の境界部に多数の陽性像が認められ（図8）、Iba-1陽性細胞はマクロファージ（図9矢印）およびミクログリア様の細胞（図9矢頭）であった。脊髄に感染症、中毒ならびに代謝異常を示唆する所見は認められなかった。

診断：灰白質と白質の境界部に重度の海綿状変化を伴う脊髄灰白質壊死（Traumatic feline ischemic myelopathy）

考察：本例は組織学的に脊髄（第二腰髄から馬尾）に広範な壊死が認められ、特に灰白質と白質の境界部の変性が重度であった。本例の病変の質と分布から、原因として第二腰髄以下の脊髄における虚血が考えられた。本例の臨床症状（突然の後駆麻痺）、肉眼所見（椎骨に著変なし）および組織所見（広範な脊髄の壊死）は、Traumatic feline ischemic myelopathy の報告に一致する。本疾患の発生機序は不明であるが、腹部に強い外力（交通事故など）を受け、腹腔内の動脈に循環障害が生じるためと推定されている。本例においても骨盤腔内の出血ならびに腎臓の出血性梗塞が認められ、腹部に強い外力が加わったことが疑われた。本会では、組織学的診断における「軟化」という用語の使用の可否について議論され、ヒトの神経病理学の情報をもとに「軟化」という用語を使用しない方が良いという意見があり、上記診断名に変更した。

（櫻井 優・森田剛仁）

参考文献：

1. Summers, B. A., Cummings, J. F., de Lahunta, A. 1995. Traumatic feline ischemic myelopathy. p. 249. In : Veterinary Neuropathology, Mosby-Year Book, St. Louis.

鶏大腸菌症生ワクチン “ガルエヌテクト CBL” の開発

永野 哲司

ガルエヌテクト CBL は、我が国を初めとして世界的に問題となっている鶏大腸菌症を防除するために新たに開発された生ワクチンである。このワクチンは血清型 O78 の鶏大腸菌弱毒株 AESN1331 株を主成分とした凍結乾燥品で、効能又は効果は「鶏大腸菌症の予防」、用法及び用量は「鶏を対象とし、ワクチンを日局の生理食塩液を用いて 1,000 羽分あたり 100～300 mL に溶解し、3～4 週間隔で 2 回投与する。初回は噴霧器、第 2 回は噴霧器又は散霧器を用いて投与する」となっている。使用しているワクチン株の特徴や安全性及び有効性については、これまでに数多くの国内外の学会で紹介しており、2012 年には誌上発表した (Nagano T. *et al.*, *Microbiology & Immunology*, 56: 605-612)。ここでは、既にそれらで発表した成績の一部を紹介しながら、本ワクチンについて解説する。

初めに

鶏大腸菌症は、現時点の養鶏産業においてその対

策が最も求められている疾病の一つである。この疾病による被害は、農場における斃死率の増加や増体重の低減に留まらず、食鳥検査における廃棄率の上昇などが知られ、算定されるその被害額は莫大なものとなっている (図 1)。また、発症鶏群を抗菌剤で治療した場合は、休薬期間の問題や薬剤耐性菌の出現といった、潜在的な危険性も知られている。このような鶏大腸菌症に対し、これまでも様々な対策が講じられてきたが、本症がストレスによる一過性の免疫力低下等に起因した腸内フローラによる日和見感染症といった側面をもつため、有効な手立てがないのが現状である。その中でも、ワクチンによる対策の重要性が認識され、これまで数多くの学術論文等で鶏大腸菌症ワクチンに関する研究が発表されてきた。それらの報告の中では、菌体、膜小胞、線毛、外膜蛋白などを抗原とした不活化ワクチン、遺伝子組換え弱毒株を用いた幾つかの生ワクチン、大腸菌血清型 O78 の表面抗原遺伝子を組込んだベクターワクチンなどがそれぞれ有効であったとされているが、それらのほぼ全てが実用化に至っていない

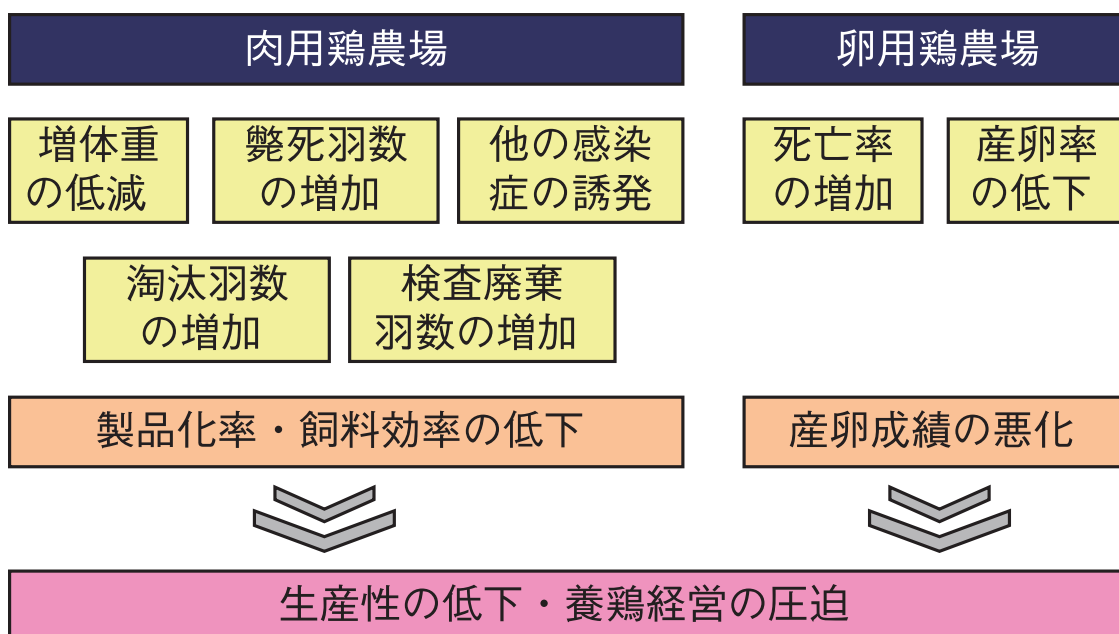


図 1 野外での鶏大腸菌症の被害の実態

い。現在、我が国で市販されているワクチンは不活化ワクチンのみであり、養鶏現場では更なる対策の選択肢を拡大するために、弱毒化生ワクチンの開発を望む声が次第に大きくなっている。

生ワクチンの開発

当研究所の長井らは、鶏大腸菌血清型 O1 の M1000 株にトランスポゾン変異を挿入したところ、サイクリック AMP レセプタータンパク質 (CRP) 遺伝子に変異が入ったクローンでは溶血性状が失われ、さらに鶏への病原性も低下したことを報告した (Nagai S. *et al.*, *Veterinary Microbiology*, 60:227-238, 1998)。これによって、鶏大腸菌の CRP 遺伝子変異株がワクチン株となる可能性が見出されたことが、鶏大腸菌症生ワクチン開発のきっかけとなった。しかしながら、この論文で用いた手法で得られた株

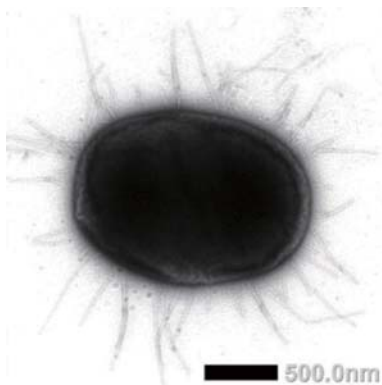


図2 AESN1331 株の電子顕微鏡像
やや丸みを帯びた菌体の周囲には線毛 (I 型線毛) が密集している

では、CRP 遺伝子へ挿入されたトランスポゾン遺伝子がしばしば脱落する結果、遺伝的に不安定であるだけでなく遺伝子組換え体に該当していた。さらに、食物としての畜産物を考えた場合に、その生産元である畜産動物に対してこのような遺伝子組換えワクチンを使用することについて、一般消費者の理解を得ることも非常に困難であると考えられた。我々はこの問題を解決すべく、この遺伝子だけを欠損した弱毒株を得る手法について検討を重ねた。その結果、自然界でも頻繁に行われている大腸菌同士の遺伝子交雑を利用し、コロニーセレクションによって遺伝子組換え体に該当しない遺伝子欠損株を選別することに成功した。これが今回報告するワクチン株 AESN1331 株 (図2) となった。

AESN1331 株の特徴

ワクチン株である AESN1331 株は、CRP 遺伝子を部分的に欠損させた遺伝子欠損株である。CRP 遺伝子の機能を失ったことで、幾つかの糖の代謝能とアミノ酸の生合成能を欠失し、様々な蛋白の発現誘導能が著しく減弱するとともに、菌の増殖性も減弱し、また病原性に関連する幾つかの機能も喪失していることが特徴である (表1)。親株の大腸菌と比べた場合、AESN1331 株では CRP 遺伝子内部において、アミノ酸に変換した場合に読み取り枠にズレが発生しない、いわゆるインフレームで 351 塩基の大きさの欠損が生じている AESN1331 株と親株

表1 AESN1331 株及び親株の性状

性状	AESN1331 (ワクチン株)	J29 (親株)
血清型	O78	O78
CRP 遺伝子のサイズ	282 bp	633 bp
DHL 寒天培地上のコロニー形態 (37°C、24hr)	<1mm 無色	2mm 赤色
トリプトファンデアミナーゼ	-	+
インドール産生性	-	+
糖分解		
グルコース、アラビノース	+	+
ラクトース、マンニトール、ラムノース、 ソルビトール、シュクロース、キシロース、 メリビオース	-	+
溶血性	-	+
16S リボゾーナル RNA シーケンスでの相同性	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>

との違いはこの欠損部位 1ヶ所だけに留まり、その他の遺伝子については全く同一の配列を示す。さらに、この欠損部分が比較的大きな領域であり、何らかの偶然によって修復されて元の病原株に戻る確率は極めて小さいことから、病原性復帰変異が起こる可能性は無視できると考えられる。

AESN1331 株は、親株と同様にアンピシリン、ジヒドロストレプトマイシン、オキシテトラサイクリンと言った多くの薬剤に対して感受性を示す。近年分離されてくる鶏大腸菌野外株の多くがこれら複数の薬剤に耐性であり、染色体上やプラスミド上に多様な薬剤耐性遺伝子が存在することが報告されている。AESN1331 株が薬剤感受性であることは、多剤耐性だけでなくニューキノロン耐性の出現などが問題となっている養鶏現場において、薬剤耐性遺伝子播種の危険性も回避する。さらに、本株は、大腸菌に有効な一般的な消毒液などによっても簡単に死滅するだけでなく、自然環境中でも増殖性がなく速やかに死滅する。AESN1331 株を実験的にマウスに噴霧投与した場合、投与後 1 日でも菌は検出されなかった。

ガルエヌテクト CBL の安全性

5 週齢鶏への静脈内攻撃試験では、 3×10^9 CFU 以上の AESN1331 株を含む培養液を接種しても鶏は死亡せず、50%致死量を算出した結果、親株と比べて約 10 倍、野外強毒株と比べると約 20 倍以上も病原性が低下していた (図 3)。また、AESN1331 株を鶏に噴霧した場合、投与後 1 日の呼吸器からは検出されたが、投与後 4 日には検出されなくなった。

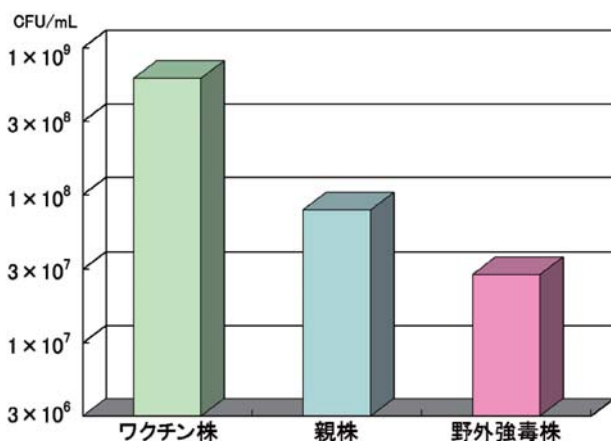


図 3 5 週齢鶏への静脈内攻撃試験での LD₅₀ 値

さらに、親株では盲腸・ファブリキウス囊、野外強毒株ではそれに加えて実質臓器等からも菌が検出されたが、AESN1331 株は呼吸器以外からは全く検出されなかった (図 4)。これらのことから、AESN1331 株は鶏体内での定着性が減弱し、唯一検出される呼吸器からも速やかに消失することが判明した。

4 日齢の SPF 白色レグホン鶏及び初生のブロイラーコマースシャル鶏に、この AESN1331 株を凍結乾燥して作製したガルエヌテクト CBL を 4 週間隔で 2 回投与しても臨床的な異常は認められず、安全であることも確認された。さらに、ガルエヌテクト CBL は初生から投与できる安全性をもつだけでなく、産卵中の鶏に投与しても臨床的異常を示さず、産出卵にも移行しないことから、投与対象の日齢には制限がなく、ワクチン成分の残留といった問題も無いことから使用制限期間もない。

ガルエヌテクト CBL の有効性

ガルエヌテクト CBL を SPF 白色レグホン鶏 (レイヤー) 及びブロイラーコマースシャル鶏 (ブロイラー) に 4 週間隔で 2 回投与し、その 2 週後に鶏大腸菌野外強毒株を静脈内攻撃して、生死を観察することで有効性を調べた。レイヤーでは、非投与対照群が全羽死亡したのに対して、何れのワクチン投与群でも死亡が抑制されて有意な羽数が生残した。さらに、ブロイラーでも非投与対照群が 9 羽死亡したのに対して、ワクチン投与群では全羽が生残した (図 5)。免疫持続期間は 2 回投与後少なくとも 10 週間であることが判明した。有効性評価に用いた静脈内攻撃試験では、死亡率以外に、臨床症状の軽減、実質臓器での病変形成の軽減並びに菌分離率の低減といった効果も確認された。

6 万 3 千羽を用いて 4 施設で実施した野外臨床試験では、初生のブロイラー鶏に噴霧投与して、3 ~

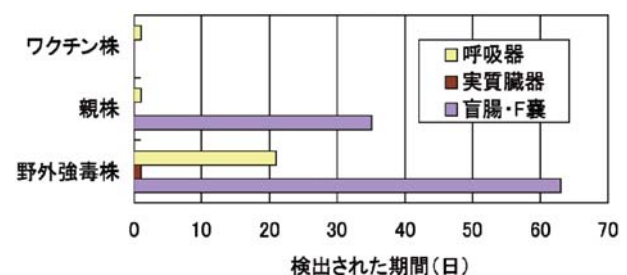
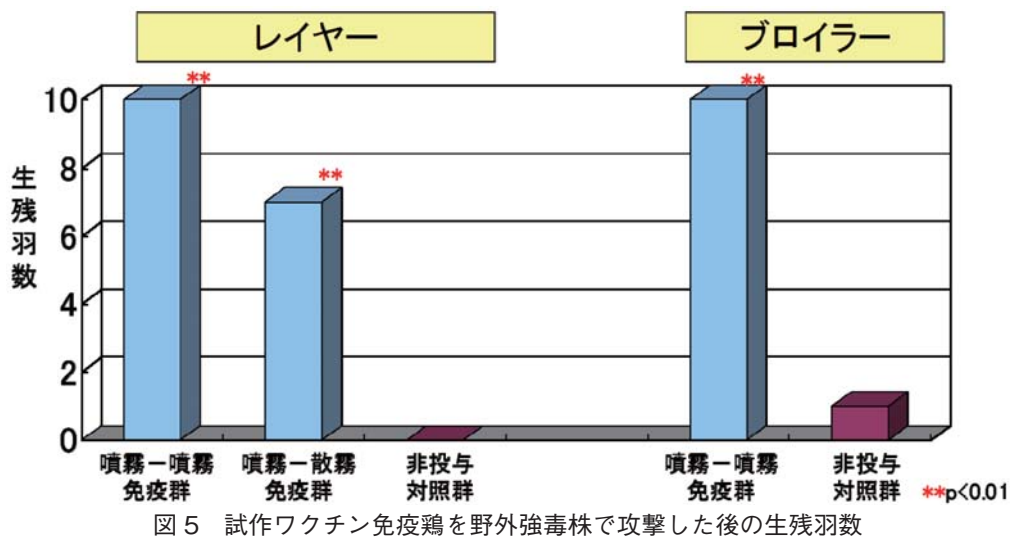


図 4 噴霧投与後の臓器ごとの菌検出期間



4週後に再度噴霧投与あるいは散霧投与を行った。その結果、1施設では急性敗血症型鶏大腸菌症の発生を防ぐことができた。亜急性型鶏大腸菌症のみが認められた別の施設では、農場での増体重や製品化率といった出荷成績でワクチンの効果が確認された。また、鶏大腸菌症の発生を明瞭に確認できなかった施設においては、一部の鶏を抽出して実施した静脈内攻撃試験でその有効性が確認された。

ワクチン投与方法について

研究・開発段階において、ガルエヌテクト CBL の能力を最大限に引き出す様々な投与方法について検討した結果、省力的でかつ現場での投与が簡単であり、何よりも鶏にとってストレスフリーな投与方法として、初回は噴霧投与、第2回目は噴霧あるいは散霧投与で行うことと設定した。細かい霧状のミストとなった AESN1331 株は呼吸によって吸入され、鼻腔、気管そして肺の上皮細胞において定着し、免疫システムに刺激を与えることで強力な防御能を鶏に付与する。

ガルエヌテクト CBL では、鶏 1羽当たりの投与量に 0.1～0.5 mL と幅を持たせた。開発段階における実験室内試験で使用した噴霧器では 1羽当たり 0.3 mL の調整で、鶏への均一な投与が可能であった。しかし、実際の現場では様々な噴霧器や散霧器が用いられ、種々の噴霧方法や散霧方法が確立されている。従って、投与量を固定した場合、投与鶏群への均一な噴霧あるいは散霧が不確実になることが危惧されたことから、投与量に幅を持たせることで現場

対応できるようにした。

また、噴霧投与及び散霧投与を選択した最大の理由として、投与対象鶏を保定する必要がなく、注射の様に痛みを伴うことがなく、飲水投与の様に投与前の断水といった措置も必要ないことから、極めてストレスフリーで鶏にやさしい投与方法であることが挙げられる。

ガルエヌテクト CBL の効能又は効果について

ガルエヌテクト CBL を用法及び用量通りに投与された鶏は、実験室内試験において敗血症型大腸菌症を模した静脈内攻撃を耐過することができ、野外臨床試験では急性敗血症型鶏大腸菌症の発生からも免れることができた。また、野外臨床試験では農場を汚染している多くの血清型の鶏大腸菌株に対しても有効性を示す結果が得られたことから、ワクチンの効能又は効果として「鶏大腸菌症の予防」とする十分な根拠が得られた。

ガルエヌテクト CBL により誘導される免疫についての考察

自然免疫から獲得免疫といった免疫システムの研究が進む中で、ウイルス感染及びウイルス生ワクチンによる免疫についてはその詳細が次第に明らかにされつつある。一方で、細菌感染においても強毒な病原菌を用いた自然免疫に関する研究が盛んに行われ、その実態が明らかにされ始めたが、生菌ワクチンによる免疫については未だ詳細が解明されないままとなっている。そのため、ガルエヌテクト CBL

を投与することで、鶏においてどのような自然免疫が誘導されて、獲得免疫へと移行しているのかを明らかにすることは今後の課題である。しかしながら、現段階でガルエヌテクト CBL を投与した鶏の鼻腔や肺において軽度な偽好酸球浸潤やリンパ球浸潤が観察され、細胞壁成分である O78LPS に対する IgG 産生も確認されている。これらのことから、ガルエヌテクト CBL を投与された鶏の体内では AESN 1331 株による刺激で免疫が活性化していることは明らかである。また、生ワクチンであることから細胞性免疫の誘導、粘膜からの免疫であることから IgA の産生も期待できると考えている。これまでに論文等で発表されている鶏大腸菌の病原性に関する研究報告から AESN1331 株の生体内での動態をイメージすると、AESN1331 株は生きた状態で鶏の呼吸器内に入り込み、I 型線毛を用いて上皮細胞に接着した後に、その粘膜細胞上あるいは貪食細胞に取り込まれた後に様々な抗原物質を分泌しているものと推察される。しかし、免疫システムに補足され貪食細胞に取り込まれた後は、ワクチン株自体に生体内での増殖性が無いことから、その後速やかに殺菌されるものと予想される。そして生体内で発現した様々な抗原物質は、菌体成分と共に抗原提示され、その結果細胞性免疫を強く誘導し、次いで液性免疫も誘導していると推定している。本ワクチンに対する宿主応答のメカニズム解明は、今後の研究・解析

に期待しているところである。

最後に

これまでの細菌ワクチンは不活化菌体抗原が主流であり、近年は細菌が分泌・発現するごく一部の抗原を含有したワクチンへと傾倒していく流れもある。しかしながら、細菌感染症を不活化菌体抗原や部分抗原だけで予防し病原体を農場から排除することが、現実には困難であることが多くの病原体で既に分かっている。例外的には、一部のヒト用ワクチンで感染時に生体内で発現される抗原物質の幾つかをコンポーネント化したワクチンが実用化されているが、動物用ワクチンでは開発・製造コスト面などから実現化までにはまだまだ長い時間を要すると思われる。一方で、今回新規に開発されたガルエヌテクト CBL は生体内で模擬的な感染を起こした後に投与鶏の免疫によって速やかに体内から排除されていると考えられ、通常の不活化抗原では起こらない高度で強力な免疫の誘導が期待できる。今後は、このような生物活性を保有するが増殖活性を持たない細菌の感染による免疫誘導、そして遺伝子組換え体には該当しない遺伝子欠損株といった2つのコンセプトに基づいた生細菌ワクチンの開発が加速され、鶏にやさしいストレスフリーなワクチンが普及していくことが期待される。

論文紹介

マウスモデルにおいて食事性の肥満は 2009 年型 パンデミック H1N1 ワクチンの効果を劇的に減弱させる

山下 龍

Diet-induced obesity dramatically reduces the efficacy of a 2009 pandemic H1N1 vaccine in a mouse model.

Kim, Y. H., Kim, J. K., Kim, D. J., Nam, J. H., Shim, S. M., Choi, Y. K., Lee, C. H. and Poo, H.

J. Infect. Dis. (2012) 205 (2) : 244–251.

論文は上記雑誌のホームページより無料で入手可能です。紙面の都合もあり、参考文献は省略し、一部を省略あるいは要約して掲載致します。

要約

様々な疾患を増悪させる危険因子である肥満は、ワクチンの効果にも悪影響を与えると考えられている。近年、A型インフルエンザウイルス H1N1 亜型の世界的流行の結果、多くの死者が認められ、より効果的なワクチン戦略の開発が必要となった。本論文では、パンデミック H1N1 インフルエンザウイルスに対するワクチンの免疫応答および予防効果における食事性肥満の影響を調査した。4週齢の C57BL/6J マウスを用い、高脂肪食群（肥満マウス）および標準食群（対照マウス）を設定し、市販されている単味の 2009H1N1 ワクチンによる免疫後、抗原特異抗体反応と中和活性を調べた。また、ワクチン接種後に、インフルエンザ A (H1N1) ウイルス (A/California/04/2009, CA/04) を接種し、発症と死亡率を調べた。その結果、ワクチンにより誘導された H1N1 特異抗体と中和活性は、肥満マウスにおいて著しく減弱した。抗体反応と同様に、ウイルス接種後の肺のウイルス力価は肥満マウスで有意な高値を示した。加えて肥満マウスでは、肺組織における炎症性サイトカインおよびケモカインの著しい増加、重度な肺炎、ならびに対照マウス (14%) に比べ高い死亡率 (100%) を示した。これらの結果は、2009H1N1 ワクチンにより誘導される予防的免疫応答および防御効果が、食事性の肥満において明らかに減弱することを示した。これらの結果は、肥満者を含むハイリスクグループのための新たなワクチン戦略の必要性を示唆している。

背景

インフルエンザはインフルエンザウイルスによる呼吸器疾患で、空気感染により広がり、強い伝染力を持つことから、世界的な罹患率および死亡率増加の原因となる。前世紀だけで3度のインフルエンザの世界的大流行（パンデミック）がみられた。すなわち 1918 年のスペインインフルエンザ、1957 年のアジアインフルエンザ、そして 1968 年の香港インフルエンザである。それらの中で、1918 年の流行は最も大きな影響を与え、世界中でおよそ 3000–5000 万人の死者を出した。2009 年には、新型の A 型インフルエンザウイルス H1N1 亜型が米国で出現し、世界保健機構 (WHO) は 21 世紀最初のインフルエンザのパンデミックを宣言した。

肥満は世界的に蔓延しており、WHO は 2015 年まで現在の傾向が続くと 23 億人の成人が標準体重を上回ることになり (BMI \geq 25)、7 億人が肥満 (BMI \geq 30) になると予測している。多くの健康問題や慢性病が、肥満（たとえば 2 型糖尿病）や脂肪組織の増加に関連するホルモンや代謝の変化と関連する。また、肥満は感染の危険因子であり、2009 年のパンデミック H1N1 ウイルス (2009H1N1) による死亡例において最も多く確認された基礎疾患であった。さらに米国疾病管理予防センターは、肥満者は 2009H1N1 に対して罹患や死亡の危険性がより高いことを示唆した。また、最近の研究において、インフルエンザウイルスに感染した肥満動物が、死亡率の増加や免疫応答の減弱を起こすことが示唆さ

れた。しかしながら、肥満はインフルエンザの症状の増悪に関連するとされるにも関わらず、インフルエンザワクチンの効果に対する肥満の影響については、ヒトあるいは動物モデルにおいてまだ研究されていない。

不活性化されたインフルエンザウイルスは、ヒトインフルエンザワクチンの主要コンポーネントであり、単味の H1N1 ワクチンはパンデミック H1N1 を制御するために広く使用されてきた。そして、観察研究により、市販されている 2009H1N1 ワクチンは免疫応答を誘導し、ウイルスに感染したヒトの死亡リスクを減らすことができることが示された。しかしながら、ワクチン戦略の大部分は健康な人々に向けて開発されている。さらに、ワクチン接種を受けた個人の健康状態がワクチンの効果に影響を及ぼすことがある。たとえば、季節性のインフルエンザワクチンの効果はハイリスクな高齢者で減弱することが報告されており、また、B 型肝炎ウイルスワクチンに対する免疫応答の減弱が肥満の感染者で認められている。しかしながら、2009H1N1 インフルエンザに関して、健康なグループと健康を害しているグループ間でのワクチン接種の効果の差に関する検討はほとんど行われていない。本研究では、高脂肪食 (HFD) の給餌により誘発した肥満マウスモデルを用いて、現行のパンデミックワクチンの効果について調査した。

材料と方法

ウイルス

攻撃に使用されたインフルエンザ A (H1N1) ウイルス (A/California/04/2009, CA/04) は、St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, TN) の Dr Robert G. Webster より提供された。

動物実験

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) の 4 週齢の雄の C57BL/6J マウスを使用した。動物は特定病原体フリーの施設 (KRIBB) で、自由摂餌 (標準飼料; Harlan Teklad, Madison, WI)、12 時間の明暗周期、 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ の環境下で 2 週間馴化した。その後、無作為に以下の 4 群に分配し、標準食 (NCD: normal-chow diet) あ

るいは高脂肪食 (HFD: high-fat diet) を 15 週間給餌した。(1) ワクチン未接種標準食 (NCD) 群 (NCD + リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、 $n = 12$)、(2) ワクチン接種標準食 (NCD) 群 (NCD + ワクチン、 $n = 13$)、(3) ワクチン未接種高脂肪食 (HFD) 群 (HFD + PBS、 $n = 12$)、(4) ワクチン接種高脂肪食 (HFD) 群 (HFD + ワクチン、 $n = 13$)。HFD には、31.6% のラードを含む改良 Western diet (D12492; Research Diets, New Brunswick, NJ) を使用した。NCD には、標準飼料 (2018S; Harlan Teklad) を使用した。10 週、12 週および 14 週に、 $1.6 \mu\text{g}$ のパンデミック H1N1 スプリットワクチン抗原 (CA/07, Green Flu-S) あるいは PBS を筋肉内に接種した。3 回目の接種 1 週間後に、50% マウス致死量 (MLD_{50}) の 10 倍量の野生型 CA/04 ウイルスを鼻腔内に接種した。その後、体重の変化と死亡率を 14 日間にわたり観察した。使用した H1N1 抗原は CA/07 (H1N1) ウイルスに由来し、WHO によりワクチン製造に推薦された株に基づいている。

血液パラメーターの解析

ウイルス接種前にイソフルランによる麻酔下で、すべての群のマウスの眼窩静脈叢より採血し、血漿中の血糖、インスリンおよびレプチン濃度を測定した。

赤血球凝集抑制試験

血漿をレセプター破壊酵素 (RDE; Denka Seiken, Campbell, CA) で処理し、血球凝集抑制試験 (HI) を行った。

抗体検査

CA/04 ウイルスの抗体価は ELISA により測定した。

肺の病理組織学検査

ウイルス接種後 8 日に、感染マウス ($n = 5-6$) を安楽殺後、肺を採材し、HE 染色標本を作製した。肺病変の程度は、炎症細胞の相対的な浸潤程度により半定量的に評価し、以下の 0 から 4 にスコア化した。0: 炎症反応なし、1: 肺の 1-25% に軽度の炎症細胞浸潤、2: 肺の 25-50% により重度の炎症、3: 肺の 50-75% に重度の炎症、4: ほぼすべての肺

組織に炎症。

定量的リアルタイム PCR

ウイルス接種後 0 日、3 日および 8 日に安楽殺したマウスの肺組織において monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES)、tumor necrosis factor α (TNF α)、interleukin (IL) -1 β 、IL-6 および IL-10 の定量を SYBR Green 法により行った。データはすべてリボソーム 18S の cDNA の発現量に対して標準化した。

統計解析

数値データは、平均 \pm 標準誤差で示した。群間の比較は、両側の Student t 検定あるいは一元配置分散分析を用い、有意水準は 5% とした。

結果

肥満は高脂肪食を与えた C57BL/6J マウスで誘発できる

ワクチンの効果に対する肥満の影響を評価するために、高脂肪食 (HFD) を 15 週間にわたり自由摂餌させることにより肥満マウスモデルを確立した。図 1A に示すように、体重は標準食 (NCD) 群に比べ高脂肪食 (HFD) 群で劇的に増加した。さらに食事性肥満 (Diet-induced obesity; DIO) の定量分析のために、血糖、インシュリンおよびレプチン濃度を測定した。これらすべてのパラメーターは、HFD 群で有意に増加した (図 1B-D)。また、すべてのパラメーターはワクチン未接種群と接種群間に

おいて違いは認められなかった (図 1)。これらの結果から、15 週間 HFD を給餌することにより C57BL/6J マウスに食事性肥満 (DIO) および肥満に関連するインスリン抵抗性の両者を誘発できることを確認し、この実験系がヒトの DIO にふさわしいモデルであることを示した。

2009 パンデミック H1N1 ワクチンの予防効果は肥満マウスにおいて減弱される

パンデミック H1N1 インフルエンザワクチンの予防効果に対する DIO の影響を評価するために、3 回目のワクチン接種後 1 週に野生型 CA/04 ウイルスを接種した。図 2A に示すように、ワクチン接種 NCD 群の生存率は、ウイルス接種後 14 日においても比較的高値 (86%) を示した。一方、ワクチン接種 HFD 群 (肥満マウス) では、ウイルス接種後 12 日を超える生存はなく、肥満が防御免疫の誘導を阻害することが示唆された。体重は、ワクチン接種 HFD 群では持続的な減少を示し、ワクチン接種 NCD 群では 8 日まで体重減少を示したが、その後回復がみられた (図 2B)。一方、ワクチン未接種 NCD 群あるいは HFD 群では、ウイルス接種後 8 日あるいは 9 日まで生存したものはおらず、体重は持続的に減少した (図 2)。

パンデミック H1N1 インフルエンザウイルスは、主に呼吸器の細胞に感染し、肺に強い炎症と傷害を引き起こし、げっ歯類のモデルでは最終的に死をもたらす。より高い死亡率を示した肥満マウスが肺組織に重度な病変を伴っていたかどうかを確認するために、ウイルス接種後 8 日の肺の HE 染色標本を検査した。図 3A に示すように、肺の病理学的スコア

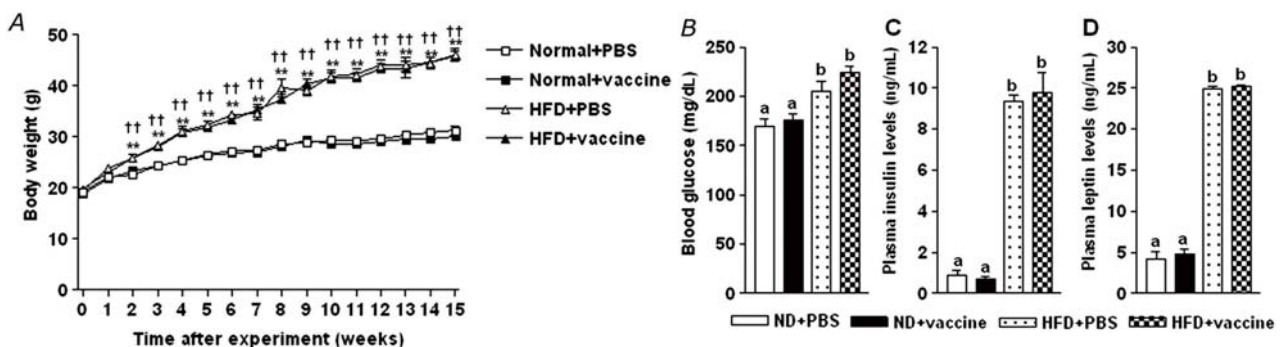


図 1 食事性肥満マウスの体重および血液パラメーターの変化

C57BL/6J マウスに標準食 (NCD) あるいは高脂肪食 (HFD) を 15 週間給餌し、体重を毎週測定した (A)。15 週における血糖 (B)、インシュリン (C) そしてレプチン (D) 濃度を測定した。

**P < 0.001, NCD + PBS vs HFD + PBS. ++P < 0.001, NCD + vaccine vs HFD + vaccine.

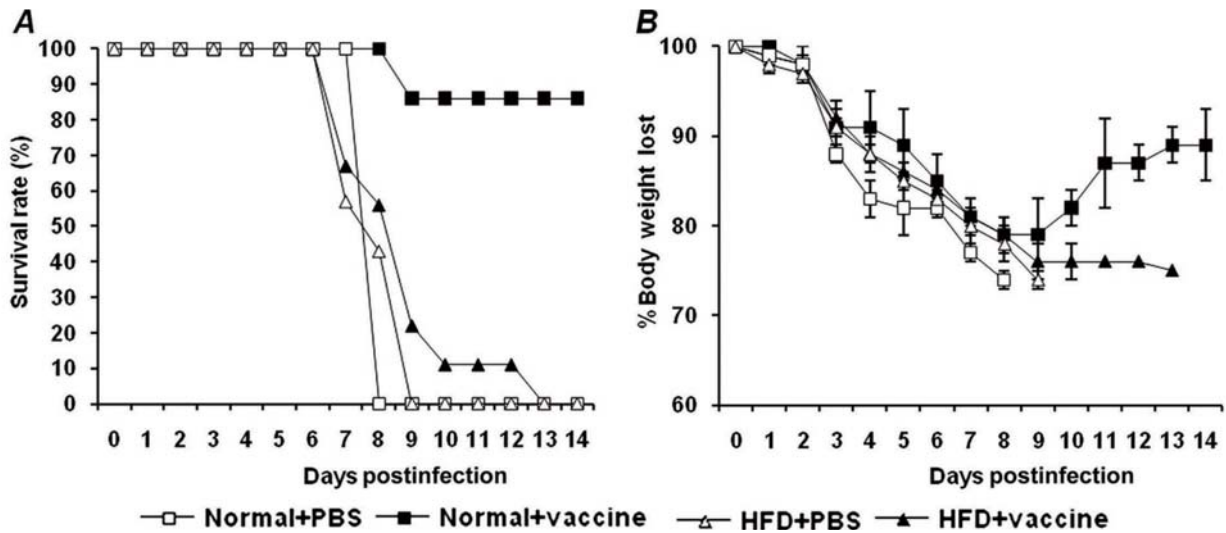


図2 パンデミック 2009H1N1 ウイルス接種後の標準食 (NCD) 給餌マウスと高脂肪食 (HFD) 給餌マウスの生存率と体重の変化
各群のマウスに H1N1 ウイルスを接種し、生存率 (A) と体重 (B) の変化をウイルス接種後 14 日間測定した。

は、ワクチン接種 NCD 群に比べワクチン接種 HFD 群で有意に高値を示した。さらに、肺の硬化がワクチン接種 HFD 群に認められたが、ワクチン接種 NCD 群では稀であった (図 3B)。肥満マウスでは、剥離性の細気管支炎、気道上皮細胞のアポトーシス、実質内のアポトーシス残渣の集積、肺胞出血および気管支血管周囲への重度の細胞浸潤を含む化膿性気管支肺炎を示し、これらの症状は NCD 群では軽度であるか、あるいは認められなかった (図 3B)。肥満マウスに認められた高い死亡率とより重度な炎症に一致して、CA/04 ウイルス接種後の肺のウイル

ス力価は、ワクチン接種 NCD 群 (幾何平均抗体価 (GMT) $2.4 \pm 0.5 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{mL}$) に比べワクチン接種 HFD 群では (GMT $3.5 \pm 0.0 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{mL}$) 有意に高値を示した。これらの結果は、DIO がマウスモデルにおいてパンデミック 2009H1N1 ワクチンの予防効果を明らかに減弱させることを示した。

2009 パンデミック H1N1 ワクチンに対する液性免疫の著しい低下が肥満マウスで認められる
インフルエンザウイルスに対する中和抗体が感染防御に重要な役割を果たし、また、スプリットワク

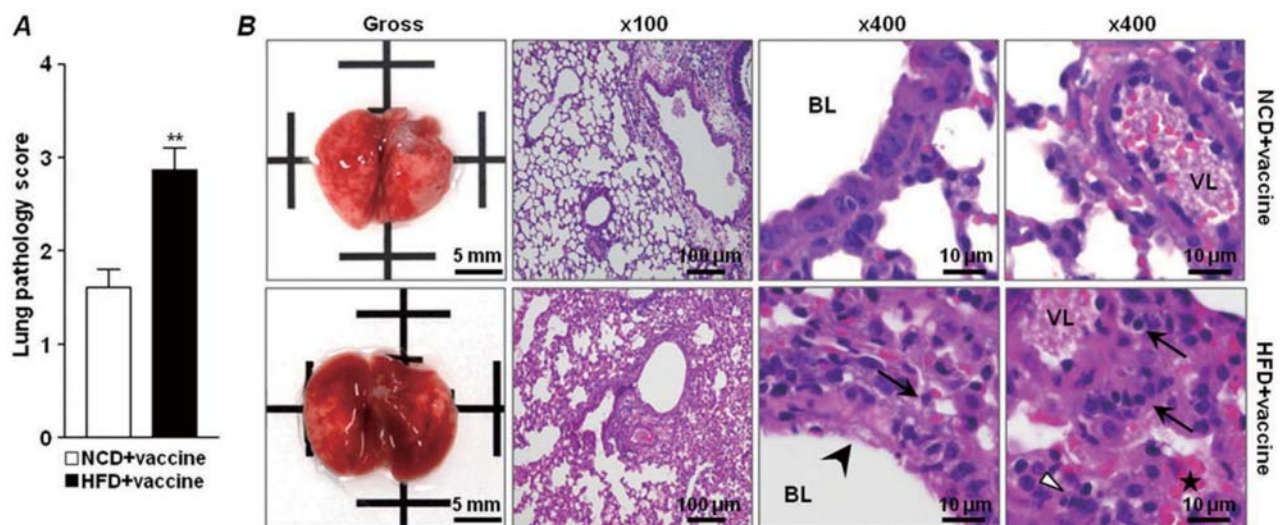


図3 2009H1N1 ウイルス接種後の食事性肥満 (DIO) マウスの肺の病理
(A) 肺の組織学的検査は (B) に示す標本でスコア化した。
(B) CA/04 ウイルス接種後 8 日の標準食 (NCD) + vaccine 群および高脂肪食 (HFD) + vaccine 群のマウスの代表的な肺の肉眼および組織 (HE 染色) 写真。HFD 給餌マウスでは、剥離性細気管支炎 (filled arrowhead)、気管支上皮細胞のアポトーシス (open arrowhead)、実質内へのアポトーシス残渣の集積 (open arrowhead)、肺胞出血 (asterisk) および気管支血管周囲への細胞浸潤 (filled arrow) が認められた。BL: 細気管支、VL: 血管。

チンはTh2に偏った液性免疫を引き起こす傾向にあることから、NCD群とHFD群(肥満マウス)でのワクチンによる抗体誘導について調べた。マウスに不活化されたスプリットCA/07ワクチン(1.6g HA protein)を3回接種し、最終接種後1週に抗体産生レベルを確認した。図4Aに示すように、HAに特異的な総IgG量は、HFD群の血清の400倍から25600倍の間で有意に低下した。産生された抗体の中和活性を調べるためにHI法を実施した。HI抗体のGMTとHI陽性血清サンプルはともにワクチン接種NCD群に比べワクチン接種HFD群で著しく減少した(図4B、4C)。これらの結果は、抗原特異抗体反応の誘導がDIOマウスで減弱することを示し、肥満マウスはワクチンを接種してもパンデミックH1N1の感染に対しより脆弱である可能性を示唆した。

2009 パンデミック H1N1 ウイルスはワクチンを接種した肥満マウスに過剰な炎症性免疫応答を引き起こす

ワクチンを接種したHFD群(肥満マウス)とNCD群にウイルスを接種し、免疫を調節するサイトカインとケモカインの発現レベルについて調べたところ、ウイルス接種前では2つのケモカイン、MCP-1とRANTESのmRNAレベルはNCD群に比べHFD群でより低値を示した。しかしながら、MCP-1とRANTESのmRNAレベルは、ウイルス

接種後3日および8日ではNCD群に比べHFD群で著しく増加した(図5A、5B)。

ケモカインの発現増加に加え、3つの炎症性サイトカイン(TNF α 、IL-1 β およびIL-6)レベルがウイルス接種後3日および8日のHFD群で劇的に増加しており(図5C-E)、この群での肺の病理組織スコアの増加とよく一致していた。興味深いことに、抗炎症性サイトカインであるIL-10もまたウイルス接種後8日のワクチン接種HFD群で有意な増加を示したことから(図5F)、増大した炎症反応によりネガティブフィードバックが刺激されたことが示唆された。これらのデータは、強い炎症性反応がHFD群のウイルス感染において引き起こされ、そしてこれらの過剰な免疫応答はワクチンを接種してもNCD群のように軽減されないことを示した。

考察

インフルエンザのパンデミックは、世界経済や世界的な保健問題と広く密接な関係を持っている。いくつかの研究において、2009H1N1感染者の間で肥満が死亡率の増加と関連していることが報告されており、肥満患者には優先的にワクチンを接種し、感染に対しては早急に治療を行うべきであることが示された。しかしながら、肥満がヒトあるいは肥満動物モデルへの2009 H1N1 ワクチンの効果に影響す

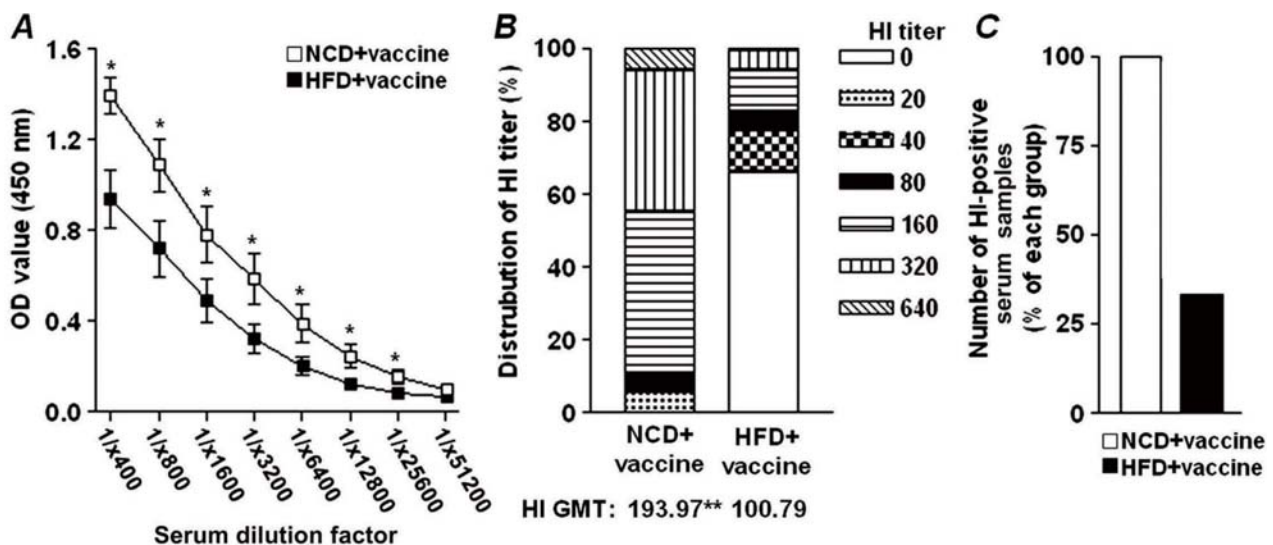


図4 ワクチンにより誘導される2009H1N1ウイルス特異抗体反応
(A) H1N1ウイルス特異血清抗体価はELISA法により検出し、450nmの吸光度を測定した。
(B)、(C) 抗体のHI活性は(B)のHI値の分布、HI陽性血清サンプルのGMT(≥ 10)、(C)陽性血清サンプル数を基に決定した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ NCD + vaccine群と比較した。

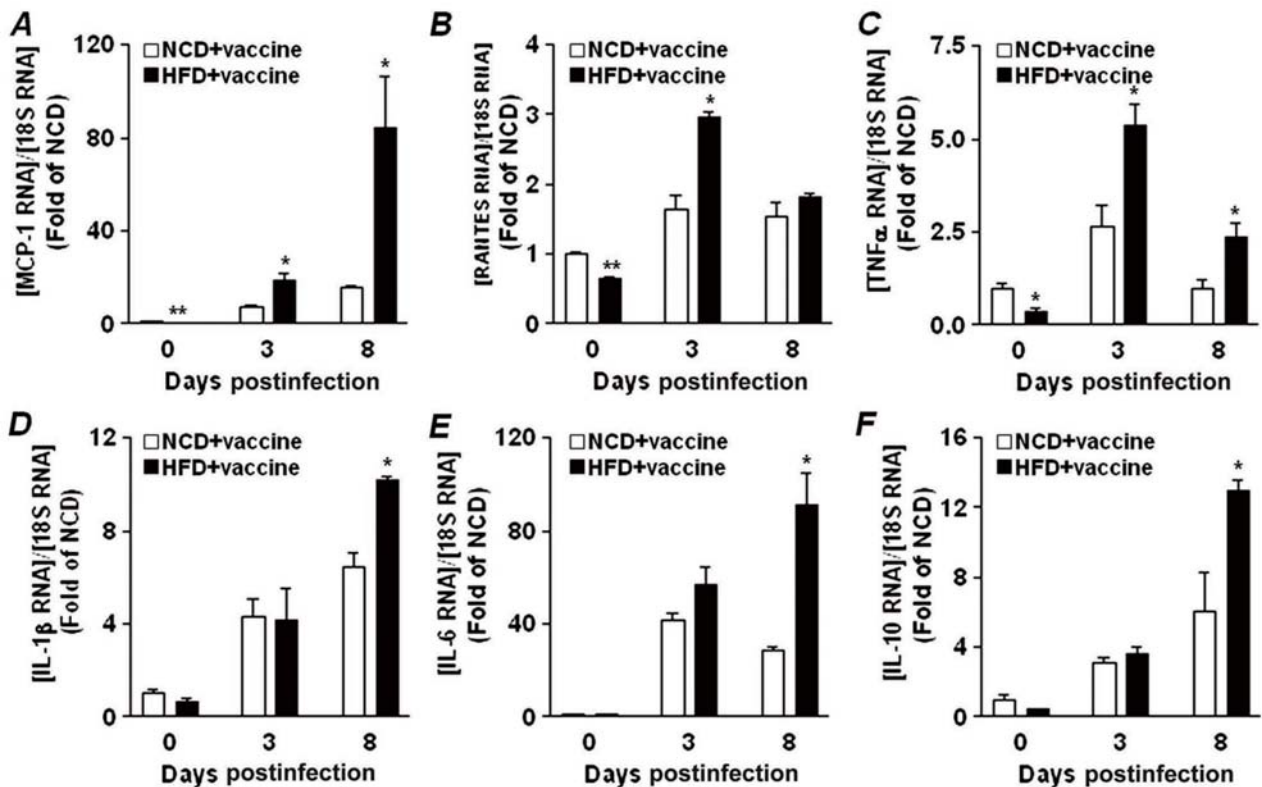


図5 2009H1N1 ウイルス接種後のワクチン接種標準食 (NCD) 給餌マウスとワクチン接種高脂肪食 (HFD) 給餌 DIO マウスの肺におけるケモカインとサイトカインの発現。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ NCD + vaccine 群と比較した。

るか否かを調べた研究は知る限りではない。我々の知る限りでは本報告が、食事性肥満 (DIO) の C57BL/6J マウスにおいて H1N1 インフルエンザワクチンの効果が著しく減弱されることを示す初めての報告である。

今回の研究において、我々は高脂肪食 (HFD) を 15 週間にわたり給餌したマウスが血糖やインシュリン、レプチン濃度に反映されるインシュリン抵抗性の兆候と食事性肥満 (DIO) を引き起こすことを示した。肥満やインシュリン抵抗性は、インフルエンザウイルス感染に対する免疫応答を障害し、パンデミック 2009H1N1 感染における致命的な合併症の潜在的な危険因子となる。さらに、DIOでのレプチンの慢性的な上昇は、免疫応答に不都合なレプチン抵抗性の状態を引き起こすと考えられる。このことに一致して、破傷風や B 型肝炎のワクチンに対する抗体反応の減弱が、ヒトの肥満において報告されている。本研究では、DIO マウスにパンデミック H1N1 インフルエンザに対する現行の単味のヒト CA/07 ワクチンを接種し、液性免疫応答について調べた。正常な抗原特異抗体反応はワクチン接種標準食 (NCD) 群において誘導されたが、

高脂肪食 (HFD) 群 (肥満マウス) では中和活性と抗体産生の著しい抑制が認められた。

インフルエンザウイルス感染により、サイトカインやケモカインが特定のカスケードにより産生される。最初に抗ウイルス性や炎症性のサイトカインが誘導され、続いて IL-6、最後に MCP-1 や RANTES などのケモカインの誘導が起こる。これらのケモカインは他の自然免疫や適応免疫細胞の動員、活性化を促進し、ウイルス感染に対する効果的な免疫応答に関与している。健康体では、これらの抗ウイルス性の免疫応答はインフルエンザウイルスの複製を制御するために十分な強さを持つが、障害された免疫状態の下では、ウイルスの複製を適切に制御できず、過剰な炎症反応が持続し、最終的には気道の構造的な傷害を引き起こす。インフルエンザウイルスに対するワクチンは、抗原に特異的な免疫応答を誘導し、ウイルス感染を防ぐかウイルスの複製を制御することにより過剰な免疫応答を鎮めることができる。本研究において、HFD 群では NCD 群に比べウイルス接種後の肺における炎症性サイトカイン (TNF α 、IL-1 β および IL-6) の著しい増加を認めた。これらのサイトカインの著しい増加に加え、肺での抗炎

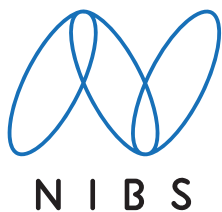
症性サイトカインである IL-10 の発現は、炎症性サイトカインを抑制し恒常性の維持に参与し、MCP-1 や RANTES のケモカインと同様に 2009H1N1 接種後の HFD 群において著しく増加した。

病理学的検査では、ワクチン接種 HFD 群は NCD 群に比べ肺実質への炎症細胞の顕著な増加を伴う重度の気道傷害と肺での高いウイルス力価を認めた。さらに、ワクチン接種 HFD 群は、NCD 群で認められた体重の回復は示さず、また、CA/04 ウイルス接種後 12 日まで生き残ったワクチン接種 HFD 群は認められなかった。一方、NCD 群のウイルス接種後 14 日の死亡率はわずかに 14%であった。これらの結果は、2009 H1N1 ワクチンにより誘導される液性免疫応答やウイルスに対する感染防御能は、DIO マウスにおいて減弱することを示した。

免疫機能の低下は、ヒトと同様に多くの肥満動物モデルにおいても認められている。高脂肪食を与えたマウスの樹状細胞は機能障害を示し、ワクチン接種後の抗 B 型肝炎の表面およびコア抗原に特異的な免疫応答の減弱の原因となることが報告されてい

る。樹状細胞の機能については本研究では直接検討していないが、肥満マウスにおける樹状細胞の機能不全がワクチン効果に障害をもたらしたと考えることは妥当である。樹状細胞に加え、肥満マウスでは、インフルエンザ感染に対する肥満動物の脆弱性の原因を裏付けるナチュラルキラー細胞の数の減少ばかりか T 細胞群の減少も示されている。とりわけ、メモリー T 細胞の応答が肥満マウスのインフルエンザ感染後に障害されることが解り、我々の見解を裏付けた。

まとめると、ワクチン接種後にパンデミック 2009H1N1 ウイルスを接種した DIO マウスでは、免疫応答の障害や過剰な炎症反応を示し、死亡率が増加することを示した。これらの結果は、従来のワクチン戦略が増加する肥満人口に対してはそれほど有効ではない可能性を示唆し、そして、このハイリスクグループへのインフルエンザワクチンについてより効果的で個々に合った戦略の開発の必要性が示された。



—— 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 580 号) 平成 25 年 4 月 25 日印刷 平成 25 年 5 月 1 日発行(第 59 巻第 3 号)
発行所 一般財団法人 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 岩田 晃
編集室 委員/山下 龍(委員長)、大嶋 篤、堤 信幸
事務/企画学術部
印刷所 株式会社 精興社
(無断転載を禁ず)