

日生研おより

2013年(平成25年)7月号 第59巻第4号(通巻581号)

挨拶・巻頭言

「地球温暖化」?

.....佐々木伸雄(2)

獣医病理学研修会

第52回 No.1057 ウシの皮膚

.....帯広畜産大学家畜病理学教室(4)

第52回 No.1069 イヌの胸髄部腫瘍

.....大阪府立大学獣医病理学教室(5)

レビュー

腸内フローラの機能と利用法

.....伊藤喜久治(6)

発表論文紹介

犬への *Babesia microti* 感染実験

Experimental infection of dogs with

Babesia microti.....大森崇司(11)

お知らせ

訃報.....(15)

お知らせ.....(16)

研修者・見学者受け入れ状況.....(16)



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/>



「地球温暖化」？

佐々木伸雄

今年の東京は、2月までの寒さから一転、3月に異常な暖かさが続き、急に桜が開花してしまい、桜祭りの担当者を慌てさせた。しかし、北国ではその暖かさがなく、4月には日本全体が再び寒くなり、北海道では季節外れの雪が降り、桜の開花前線もしばらく動きを止めてしまった。先日盛岡の先生にお聞きしたら、今年は梅と桜の開花が例年よりかなり遅く、かつほぼ同時に咲き出したそうで、北海道並みの状況だったようである。

一方、地球的規模で見れば、「地球温暖化」は今や最大のキーワードであり、世を挙げてその防止に取り組まなければならない状況にあるという。地球全体の気候については、1970年代以降、温暖化、寒冷化を巡って多くの議論があったが、最終的に、国連のもとに置かれた「気候変動に関する政府間パネル：IPCC」において、多くの科学者の議論をもとに「今後、地球規模で温暖化する」と結論づけられた。たぶん、その可能性は高いに違いない。これを受けて、政治、経済等すべての分野で、地球温暖化が当然の事象として受け入れられ、これが話題に出ない日はないといった状況である。しかし、素直でない自分としては、地球科学がまだまだ未解明の多い分野であることから、「本当かいな」とやや斜に構えている。

最近、本当に地球が温暖化するのか、という議論が月刊誌等にも取り上げられ、興味を持って読んでいる。もちろん、炭酸ガス排出量は増加の一途であり、化石燃料をどんどん使うことが良いことと思っている訳ではない。さらに深刻な問題である、ブラジルや中国、ロシアなどの森林伐採の広がりや過剰で大規模な灌漑については、きわめて重大な課題だと思っている。このような状態が続けば、必ずや地球規模でその報いがくるであろうことは十分に理解している（中国の河川やアラル海の状況を見るまでもなく）。しかし、単純に「地球温暖化」と言われると、どうなのだろうか。

地球には、長い歴史の中で多くの寒冷期が存在する。約1.2万年前の氷河期終了以降、地球は温暖化し、縄文時代には今よりもかなり暖かく、海面も高かった時代があった。青森の三内丸山遺跡はおそらく海辺にあったと推測されているが、今の位置を見るとずいぶん内陸にある。その後も地球には何回となく寒い時期（小氷期）が出現したが、最も有名なのはマウンダー極小期（1645-1715年）に出現したもので、有名なロンドン、テムズ川の全面凍結という事実が知られている（極小期は太陽の黒点活動が小さい時期、という意味）。最近、国立天文台教授、常田佐久先生が「太陽に何が起きているか」という本を出版した（文春新書、2013）。常田教授は、人工衛星「ひので」を用い、太陽活動について詳細で最先端の解析を行っている研究者であり、そのデータをもとにこの本は書かれている。

常田教授は、地球が寒冷化すると述べている訳ではなく、最近の異常な太陽の黒点活動等から、地球寒冷化ということが危惧される、と述べている。黒点は、驚くべきことに、ガリレオの時代から過去400年以上の記録がきちんと残されており、その活動の変動と実際の地球規模の気候との関係が調べられている。太陽の黒点活動（数）は11年周期で変動し、黒点数の多い時期は太

陽の活動が活発である。ところが、ある期間黒点数が非常に少ない時期が存在し、その時期は、過去の寒かったいわば小氷期と考えられる時期と一致している。最も有名なものは前述したマウンダー極小期であるが、それ以外にも、ダルトン極小期（1790-1830年）等が知られており、この時期も地球では寒冷化現象が起きている。当時の天皇、公家、僧侶などの日記や年代記における桜の開花から予測した気温をみると、マウンダー極小期、ダルトン極小期の時期の京都の冬は、今より平均2.5度低かったと推測されるという。

さらに、太陽の黒点活動の弱い時期には、地球に到達する宇宙線量が増加するが、それによって生じる炭素14、ベリリウム10の量がそれぞれ植物中、氷雪中に残されることから、過去の宇宙線量、すなわち太陽の黒点活動が推測できるという。その解析から、過去の地球の寒冷化と黒点活動との因果関係が示唆されている。

最近の太陽黒点の活動は、過去にないようなレベルにまで弱まっており、かつマウンダー極小期、ダルトン極小期と同様、11年周期より延長している。さらに「ひので」の解析によって、太陽の磁場が4重極構造というきわめて特殊と考えられる構造になっており（昨年新聞、テレビ等で報道された）、これはマウンダー極小期の黒点出現の偏りと同じ現象が起きているのではないかと推測される。このような事実は、今後十数年間の中で、過去の極小期と同様、地球の寒冷化、小氷期の出現の可能性を示唆する現象かも知れない。

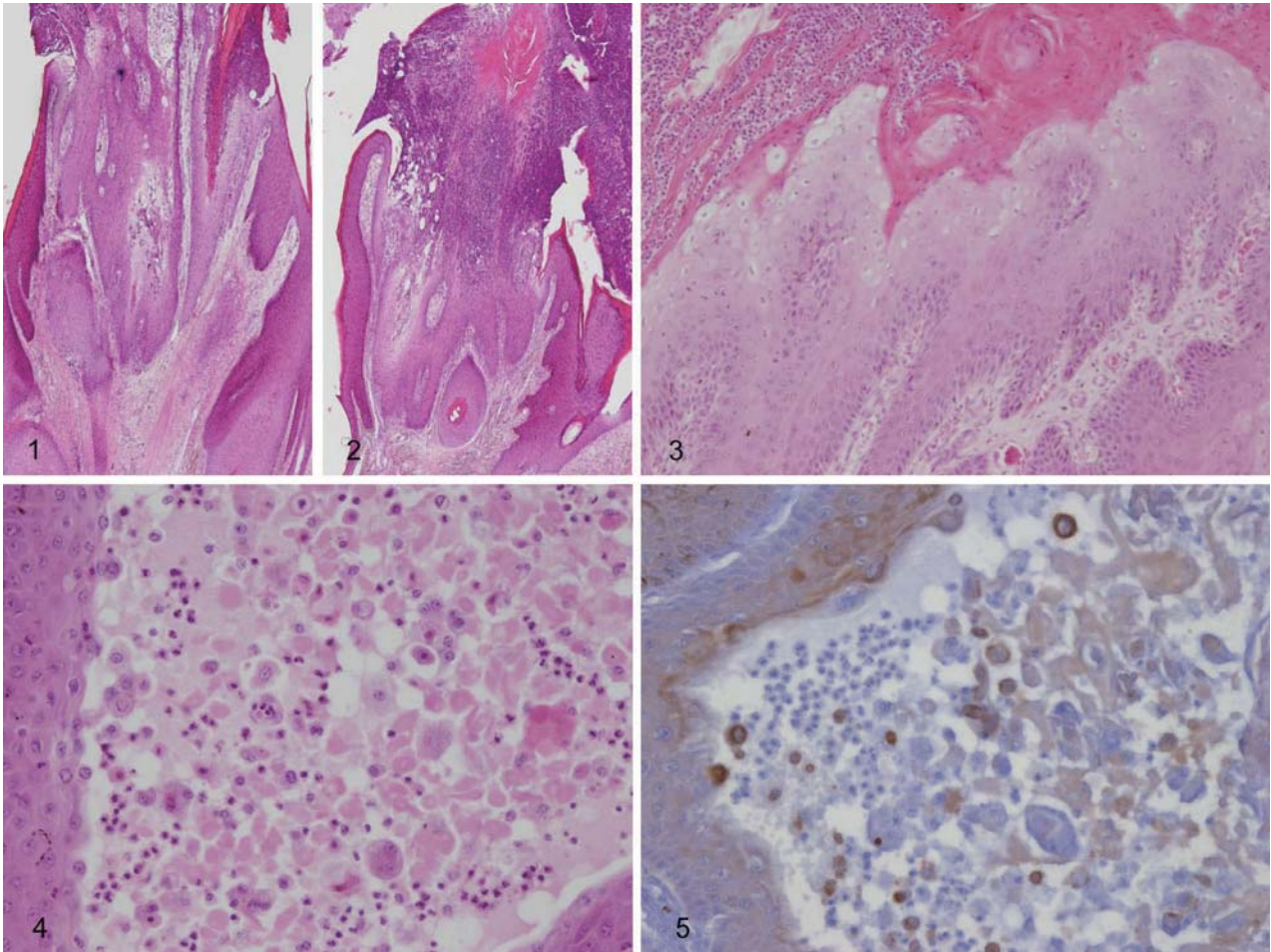
平成5年（1993年）の冷害を覚えていると思うが、この年は作柄が平年の74%であり、日本は米の緊急輸入をした。我が家では子供たちは大喜びで夜にラーメンやパスタを食べていたが、たった1回の冷害でここまで日本人の米食生活は脅かされる。もしこのような冷害が連続して2-3年起きたら、日本の食はどうなるのだろうか。過去の歴史を見れば、作物がとれず、飢餓や餓死が起これば、その国には戦争や様々な争いが起きた。冷害は非常に怖い現象である。極論を言えば、地球温暖化は食べられるが、地球寒冷化は食べられない時代ではないか。

もちろん、地球の天気には多くの要因が関与しており、予測は困難である。また、地球規模の気候変動に対しては、根本的な対策は立てようがない。我々はスーパークールビズ活動に則って、粛々とエネルギーを節約しながら過ごすのみである。

(常務理事)

ウシの皮膚

帯広畜産大学家畜病理学教室 第52回獣医病理学研修会 No. 1057



動物：ウシ、黒毛和種、雌、11ヵ月齢。

臨床事項：7ヵ月齢時より、右肩から前腕にかけて線状に分布する表面が化膿した表皮の疣状肥厚がみられた。抗生物質軟膏やイベルメクチンによる加療を実施し、経過を観察したところ、病変部の面積はわずかに縮小したが、依然として皮膚病変は広範に認められた。なお、同居牛では、本例のような皮膚病変は認められていない。
肉眼所見：線状に分布する同様の皮膚病変は、右乳房の尾側面から右前位乳頭にかけての領域および鼠径部でも散在性に認められた。

組織所見：表皮は乳頭状過形成を呈し、表層では痂皮形成が認められた（図1および2）。また、好酸球を含む高度の炎症細胞浸潤を伴った重篤な錯角化性過角化も認められた（図3）。さらに、表皮表層には複数の膿疱が形成されており、膿疱内には棘融解細胞、好酸球および好中球がみられた（図4）。抗サイトケラチンを用いた免疫染色では、膿疱内の棘融解細胞が陽性を示した（図5）。PAS染色およびチール・ネルゼン染色では、病原体は認められなかった。また、抗ウシパピローマウイルス抗体を用いた免疫染色でも陽性所見は得られなかった。
診断：炎症性線状疣状表皮母斑（Inflammatory linear verrucous epidermal nevus）

考察：本例の病変は、肉眼的には線状・片側性に分布す

る表皮の疣状肥厚を、組織学的には表皮の錯角化性過角化、棘細胞融解の出現を伴う表皮内膿疱の形成、および好酸球・好中球を主体とする炎症性細胞浸潤を特徴としていた。これらの病理像は、ヒトやイヌでの発生が知られている炎症性線状疣状表皮母斑の特徴像と一致していた。また、PAS染色等で病原体が認められなかったこと、およびパピローマウイルス抗原が検出されなかったことから、炎症性線状疣状表皮母斑と診断した。本疾患では、病変は胎生期に皮膚へと分化する細胞の拡張方向を示す Blaschko 線に沿って生じる線状の病巣分布が特徴的とされている。本疾患の原因として、ヒトでは遺伝的要因の関与が疑われている。イヌでは、コッカー・スパニエルで複数の発生報告があるものの、原因は不明とされている。

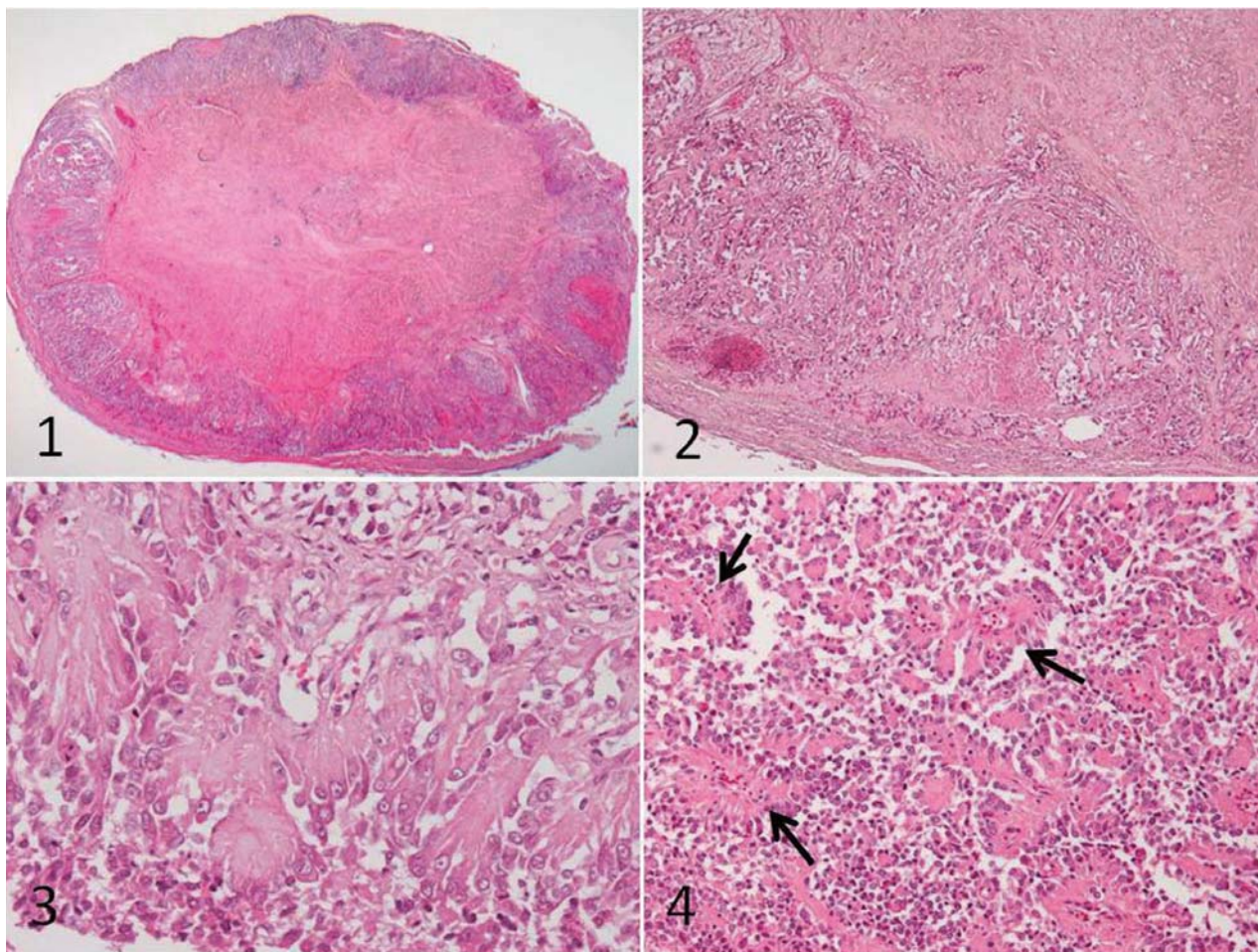
（千葉史織・古林与志安）

参考文献：

1. Gross, T. L., Ihrke, P. J., Walder, E. J. and Affolter, V. K. 2005. *Skin Diseases of the Dog and Cat, Clinical and Histopathologic Diagnosis*, 2nd ed, Blackwell Science Ltd, Oxford.
2. Benigno, K. E. and Scott, D. W. 2001. Idiopathic linear pustular acantholytic dermatosis in a young Brittany Spaniel dog. *Vet. Dermatol.* 12 : 209-213.

イヌの胸髄部腫瘍

大阪府立大学獣医病理学教室 第 52 回獣医病理学研修会 No. 1069



動物：イヌ、チワワ、雄、7歳齢。

臨床事項：疼痛反応、跛行、一般状態の悪化を主訴に近医を受診。保存療法を行うも病状が進行し、両後肢完全麻痺となったため、本学獣医臨床センターに来院。MRI検査により、第12および13胸髄右側に腫瘍を認め、片側椎弓切除術にて腫瘍を切除した。術後、一時的に症状の改善が認められたが、徐々に一般状態が悪化。初診から約10ヵ月後に呼吸困難を呈して死亡したため、当教室にて剖検を実施した。

剖検所見：第12および13胸髄に直径約1.5 cmの黄白色～淡桃色の腫瘍が認められた。第2頸髄から第4腰髄では、同様の腫瘍が髄膜相当部に全周性に認められ（図1）、第5・6頸髄では脊髄実質内への明らかな浸潤性増殖が確認された。

組織所見：提出標本（第10胸髄）では、好酸性の細胞質を有する類円形～紡錘形の腫瘍細胞がびまん性に増殖し、乳頭状・放射状配列を示す部位も認められた（図2、3）。腫瘍細胞は中程度から強い異型性を示し、有糸分裂像がしばしば観察され、壊死巣も認められた。腫瘍細胞は脊髄実質へも浸潤し、実質部分には正常構造は残存しておらず、完全に癒痕化していた（図1）。また、第

12および13胸髄部の腫瘍では、腫瘍細胞の血管を中心とした乳頭状配列も認められた（図4；矢印）。さらに、肺において、脊髄で認められたものと同様の腫瘍細胞の結節性増殖が確認された。免疫染色では、腫瘍細胞はvimentinに強陽性、S-100に一部が陽性を示し、GFAPには陰性であった。上皮系マーカー（CK AE1/AE3およびE-cadherin）についても追加検討を行ったが、明らかな陽性所見は認められなかった。

診断：悪性髄膜腫 Malignant meningioma

考察：今回の症例は、腫瘍細胞の脊髄実質への浸潤性増殖と肺への遠隔転移が認められ、悪性所見が顕著であった。また、組織学的には、腫瘍細胞の乳頭状増殖が特徴的であり、非常に稀な髄膜腫であると考えられた。

（田中美有・桑村 充）

参考文献：

1. WHO Histological classification of tumors of the nervous system of domestic animals. 1999. pp. 27-29.
2. Motta, L., Mandara, M. T. and Skerritt, G. C. 2012. Canine and feline intracranial meningiomas: An updated review. *Vet. J.* **192** (2) : 153-165.

腸内フローラの機能と利用法

伊藤喜久治 (日本エスエルシー株式会社 ピピオフジグループ)

1. 腸内フローラの構成ならびに生態学的研究

腸内フローラ研究は大きく二つの流れがある。一つは腸内フローラの構成、生態に関する研究、もう一つが腸内フローラの機能に関する研究。前者は1681年にオランダのLeevenhoefが手製の顕微鏡で糞便中の菌を観察したことに始まる。その後1800年代のPasteurやKochによる細菌学の基礎が確立し、1886年より大腸菌、*Bifidobacterium bifidum*、*Lactobacillus acidophilus*などの代表的な腸内菌が次々と発見された。そして1935年にEggerthとGagnanが成人の腸内には嫌気性菌が最優勢であることを発見し、腸内フローラ研究は飛躍的に発展した。特に1950-1960年代は絶対嫌気性菌 (Extremery-Oxygen-Sensitive (EOS) Anaerobes) を培養する試みがなされ、ロールチューブ法、グループボックス法、Plate-in-bottle法などの新たな培養方法が考案された (図1)。1990年代からはWooseらの16S rRNAの塩基配列を基とした新たな細菌分類法が確立し、各種分子生物学的手法が開発された。例えば、FISH法、プライマー法、クローニング法、

マイクロアレー法、パターン解析法としてDGGE法、TGGE法、T-RFLT法などが腸内フローラ解析の主な方法となってきた。さらに近年高速シーケンサーが登場して安価で安易にメタゲノム解析が行えるようになった。

腸内フローラ構成に関する基本的概念は既に1960年代に確立し [1]、ヒト腸内では嫌気性菌が99%以上を占め、大腸菌や乳酸菌などはごくわずかであること、生後すぐには大腸菌、腸球菌、ビフィズス菌が最優勢に定着し、離乳期から徐々に嫌気性菌が定着して、健康な成人ではその構成はほぼ安定するが個人差が大きいこと、老年期はビフィズス菌が減少し大腸菌や腐敗菌の代表であるウエルシュ菌が増加することが明らかにされている。また、消化管各部位では口腔内では腸内とは異なる種類の菌が多く定着しているが、胃、小腸上部では $10^3 \sim 10^4/g$ と著しく低い菌数となるが、小腸下部、大腸では嫌気性菌が定着し $10^{11}/g$ 程度の菌数となる。ヒトでは腸内の乳酸菌は*Bifidobacterium*が主であるが*Lactobacillus*が主となる動物では小腸上部での総菌数は $10^8 \sim 10^9/g$ と高い菌数となる。菌種に関して

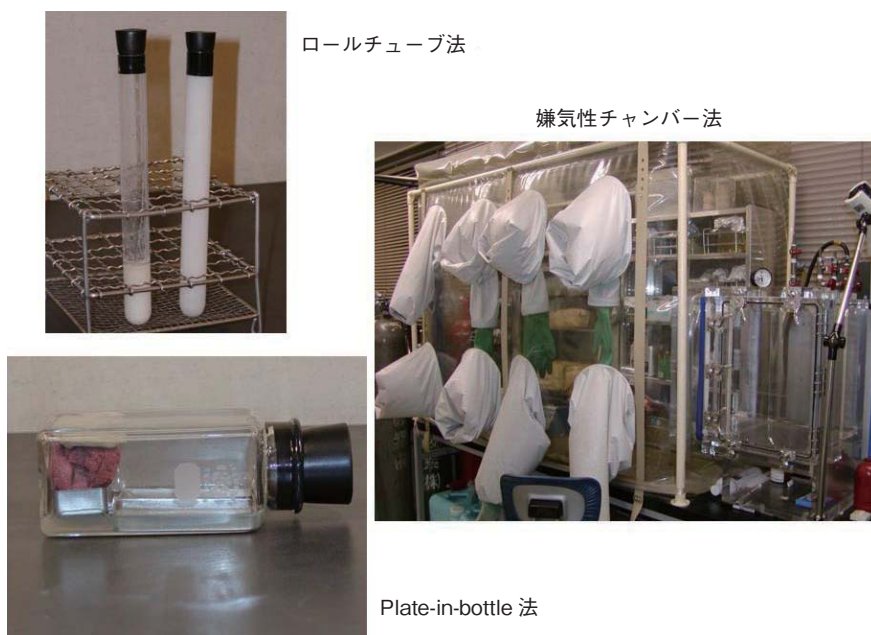


図1 EOS 嫌気性菌の培養装置

Bifidobacterium は、乳幼児型と成人型が明らかに異なり [2、3]、その理由として乳幼児型の *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* は乳中のオリゴ糖をより効率よく利用できることが報告された [4]。

近年メタゲノム解析が進み、IBD (Inflammatory Bowel Disease) 患者と健常者とは細菌構成グループが異なり同じ IBD 患者でも UC (Ulcerative Colitis) 患者と CD (Crohn's Disease) 患者では大きく異なること [5]、双子の姉妹、兄弟でも基本的な部分では類似しているがそれぞれ個体差が大きく、それまで想定されていた以上にヒトの腸内フローラは個体差が大きいことが報告された [6]。また、6 か国 38 人のメタゲノム解析の結果、body mass、年齢、性などに関係なく *Bacteroides*、*Prevotella*、*Ruminococcus* のバランスにより大きく三つのタイプ (entero type) に分けられると報告され [7]、興味あることに重要な働きをする酵素遺伝子は必ずしも最優勢菌に存在せず、低い菌数で定着している菌にも見られたという。食生活と腸内菌の関係において、日本人の腸内に海藻の糖質を分解する酵素をコードする遺伝子が腸内菌からみつき欧米人のメタゲノムデータには存在しないことから、日本人が海藻類を多く食べることにより海洋細菌から伝播されることを示した [8]。

メタゲノム解析によりこれまでにみられない腸内フローラの新たな一面が明らかにされるようになってきたが、腸内フローラの基本的概念は 1960 年代の研究と大きく変わることはない。

2. 腸内フローラの機能研究

初めに腸内フローラの機能に言及したのは Pasteur の「腸内フローラ不可欠論」で、1885 年のことである。この説は腸内フローラがないと動物は生きていくことができないというものだった。1945 年に Reyninens が無菌ラットの繁殖に成功したことで否定されたが、無菌動物と通常動物を比較することで腸内フローラが生体生理にいかに関与しているかが明らかとなった。

一方、1907 年に Mechnikoff は「ヨーグルトの不老長寿説」を発表し、ヨーグルトの摂取により腸内腐敗を抑制し長寿に繋がるとしたもので、その後の機能性食品としての Probiotics、Prebiotics、Bio-

genics の研究開発へと進む。さらに遺伝子改変動物による病態モデル動物の作出、さらにそれらは無菌化することによりその病態が消失するという報告が相次いだことで腸内フローラと病気との関係が明らかにされるようになってきた。初期は IBD モデル [9] で、その後発ガン [10、11]、アレルギーモデル [12]、Familial Amyloidotic Polyneuropathy [13]、リウマチ [14]、メタボリックシンドローム [15] など次々に報告されている。今後腸内フローラの機能研究は急速に発展した OMICS 技術を用いた解析が不可欠となっている。

3. 腸内フローラと代謝

図 2 に示すように、腸内菌は宿主の摂取した食物や医薬品を腸内菌が代謝して各種栄養素や毒素ばかりでなく機能性物質を生成し、種々の生体機能や病気に深く関わりをもっていることが明らかにされてきた。そのなかで腸内フローラが肥満に関与するという論文はかなりのインパクトを与えた [16、17]。理屈としては腸内菌により食物を生体の利用しやすい有機酸に変換することで肥満を誘導するというもので、*Firmicutes* > *Bacteroides* の菌バランスでは肥満に、逆では痩せる方向になる。しかしこの説には追試が難しく、疑問視する声も多い。むしろ腸内菌の endotoxin による慢性炎症説 [18] が支持されている。

胆汁酸の代謝はまず肝臓からタウリン、グリシンの抱合型として腸内に分泌され、腸内菌の酵素により脱抱合され一次胆汁酸となり、さらに脱水酸化反応、酸化反応、還元反応などにより二次胆汁酸となる。二次胆汁酸の deoxycholic acid (DCA) や lithocholic acid (LCA) は発ガンのプロモーターとして特に大腸がんの発生に大きく関与している。高脂肪食をとると胆汁の分泌量が増え、それに伴い DCA や LCA が増えることで大腸がんが増えると考えられる [19]。また、IBD モデルである IL-10^{-/-} マウスに脂肪を多く与えるとタウロコール酸が増量し IBD を憎悪するとの報告もある [20]。腸内菌による胆汁酸代謝は複雑で in vitro の結果と in vivo での結果が異なることも多く、一つの反応も数種の菌の組み合わせが必要となる場合もある [21、22]。著者らも 20 人の胆汁酸組成を調べたが 1/4 でほとんど

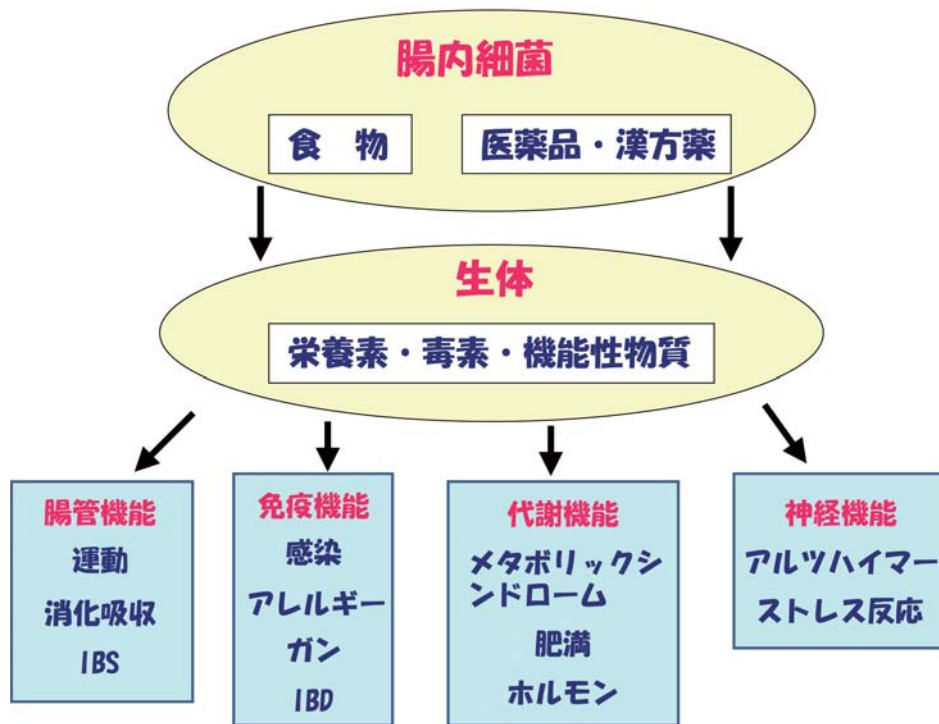


図2 腸内フローラ、食品・医薬品と生体

DCA や LCA が検出されないヒトもいた。これは腸内菌構成の違いによるものと考えられる。

腸内菌は食物中のたん白質や脂質を分解し、腸内腐敗産物や発ガン物質、毒素を生成し、生体に多くの害作用を及ぼし病気や老化のもととなるが、逆に食物成分を分解し機能性物質を産生する。例えば、イソフラボンからエコール、タンニンからエラグ酸やフェノール酸、カテキンから 5-(3, 5-dihydroxyphenyl)-4-hydroxyvaleric acid、植物リグナンからエンテロラクトンやエンテロジオール、ルチンからケルセチンが産生される。しかし、これらの代謝は個人差が大きく、腸内フローラの差と考えられる。オリゴ糖は腸内でビフィズス菌や乳酸菌が選択的に利用し腸内環境を改善する作用を持つ。漢方薬の効果は腸内フローラとの関係なしには理解できない [23]。「漢方薬の効果に個人差があるのも食の好みや腸内環境の差を反映した菌叢の個人差のためである」と表現されている [24]。

Nicolson [25、26] はプロテオミクス技術を用いて腸内代謝の研究を行っているが、一つの物質の代謝経路は極めて複雑だが腸内菌による代謝は最終的に物質レベルでとらえなければならないとしている。

4. 腸内フローラとストレス反応

腸内フローラの神経系への影響については IBS が注目されているが、決定的な証拠はまだ得られていない。ストレス反応については興味ある報告がある [27]。無菌マウスと SPF マウスでの拘束ストレスに対して血中の ACTH や Corticosterone が無菌マウスで著しい上昇を示す。無菌マウスに *Bifidobacterium* を定着させると SPF マウスレベルに低下するが、病原大腸菌 (EPEC) を定着させると無菌マウスより高いレベルになる。この結果は腸内フローラの構成によりストレスに対する反応性が変わることを示唆している。

5. 腸内フローラと免疫

前述した病態モデル動物の無菌化による病態の消失は免疫が関係したものが多。腸内フローラと免疫に関して注目を浴びたのが乳幼児のアレルギーと腸内フローラの関係で、腸内に *Bifidobacterium* や *Lactobacillus* の菌数が低い乳幼児ではアレルギーの症状が顕著で、このような乳幼児にプロバイオティクスとして *Bifidobacterium* や *Lactobacillus* を投与するとアレルギースコアが顕著に低下した [28]。腸内の *Bifidobacterium* や *Lactobacillus* が Th1-Th2 バランスを改善することでアレルギー反応が予防できるものと考えられた。その後免疫と腸内フローラ

との関係は多数の報告がなされている。マウスの腸内フローラでも Th17 を誘導するのは segmented filamentous-bacteria (SFB) で [29]、Treg の誘導は Fusiform shaped bacteria を中心とした *Clostridium* 株の組み合わせで行われることが報告され [30]、SFB は主に小腸部での免疫機能に関与し、*Clostridium* は主に大腸部での免疫機能に関与している [31]。また、マウスの T cell のプロリフェレーションは親の腸内フローラの違いが大きく影響すること [32] など報告されている。SFB の存在は AID (activation-induced cytidine deaminase) 欠損マウスでは病態発現に関与する [33、34] こと、*Bacteroides* の存在は *Helicobacter hepaticus* による腸炎を抑制するが、IL-10 産生を増強することで IL-17 の産生を抑制すると考えられ [35]、さらに *Bacteroides* は腸管での IgA の産生を促す機能を持つ [36]。

6. 終わりに

腸内フローラの機能についてはまだまだ解明しなければならぬ点も多く、Probiotics、Prebiotics はその応用例であるが、まだまだその機序については不明な点が多い。しかし、宿主の健康維持や正常な生理機能を発揮するために腸内フローラの正常化は不可欠であることは明らかとなってきた。特に家畜、家禽ではストレス環境に置かれることが多く、生体の免疫機能をレベルアップさせることはワクチン効果を上げるためにも重要な点であると考えられる。

参考文献

- Mitsuoka, T. 1982. Recent trends in research on intestinal flora. *Bifido. Microflora* **1** : 3-24.
- Mitsuoka, T. and Kaneuchi, C. 1977. Ecology of the bifidobacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* **30** : 1799-1810.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., Fukuda, M. and Oyaizu, H. 1999. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl. Environm. Microbiol.* **65** : 4506-4512.
- Sela, D. A., Chapman, J., Adeuya, A. *et al.* 2008. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis* reveals adaptation for milk utilization within the infant microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105** : 18964-18969.
- Qin, J., Li, R., Raes, J. *et al.* 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464** : 59-65.
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T. *et al.* 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* **457** : 4153-8.
- Arumugan, M., Raes, J., Pelletier, E. *et al.* 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473** : 174-180.
- Hehemann, J.-H., Correc, G., Barbeyron, T., Helbelt, W., Czjzek, M. and Michel, G. 2010. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature* **464** : 908-912.
- Matsumoto, S., Watanabe, N., Okabe, Y. and Umesaki, Y. 1999. Enteric bacteria and their roles in inflammatory bowel disease. *Biosci. Microflora* **18** : 1-9.
- Kudo, S., Uchida, K., Funabashi, H. *et al.* 2001. Intestinal microflora are necessary for development of spontaneous adenocarcinoma of the large intestine in T-cell receptor β chain p53 double-knockout mice. *Cancer Res.* **61** : 2395-2398.
- Narushima, S., Itoh, K., Mitsuoka, T. *et al.* 1998. Effect of mouse intestinal bacteria on incidence of colorectal tumors induced by 1, 2-dimethylhydrazine injection in gnotobiotic transgenic mice harboring human prototype c-Ha-ras genes. *Exp. Anim.* **47** : 111-117.
- Tsuda, M., Hosono, A., Yanagibashi, T. *et al.* 2010. Intestinal commensal bacteria promote T cell hyporesponsiveness and down-regulate the serum antibody responses induced by dietary antigen. *Immunol. Lett.* **132** : 45-52.
- Noguchi, H., Ohta, M., Wakasugi, S. *et al.* 2002. Effect of the intestinal flora on amyloid deposition in a transgenic mouse of familial amyloidotic polyneuropathy. *Exp. Anim.* **51** : 309-316.
- Abdollahi-Roodsaz, S., Joosten, L. A. B., Koenders, M. I. *et al.* 2008. Stimulation of TLR2 and

- TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J. Clin. Invest.* **118** : 205–216.
15. Vijay–Kumar, M., Aitken, J. D., Carvalho, F. A. *et al.* 2010. Metabolic Syndrome and altered gut microbiota in mice lacking toll–like receptor 5. *Science* **328** : 228–231.
16. Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A. *et al.* 2006. An obesity–associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444** : 1027–1031.
17. Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. and Gordon, J. I. 2006. Human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444** : 1022–1023.
18. Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Fava, F. *et al.* 2007. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high–fat–diet–induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* **50** : 2374–2383.
19. 内田清久 . 2009. 胆汁酸と大腸癌 . 胆汁酸と胆汁 , 三省堂書店 , 東京 . pp. 129–136.
20. Devkota, S., Wang, Y., Mush, M. W. *et al.* 2012. Dietary–fat–induced taurocholic acid promotes pathobiot expansion and colitis in IL–10^{–/–} mice. *Nature* **487** : 104–108.
21. Narushima, S., Itoh K., Miyamoto, Y. *et al.* 2006. Deoxycholic acid formation on gnotobiotic mice associated with human intestinal bacteria. *Lipids* **41** : 835–843.
22. Takamine, F. and Imamura, T. 1985. 7 β –dehydroxylation of 3, 7–dehydroxy bile acid by a *Eubacterium* species strain c–25 and stimulation of 7 β –dehydroxylation by *Bacteroides distasonis* strain k–5. *Microbiol. Immunol.* **24** : 1247–1252.
23. 服部征雄 . 2012. 漢方薬の薬効には腸内細菌が関与する . 腸内細菌学雑誌 **26** : 159–169.
24. 田代眞一 . 1993. 漢方薬はなぜ効くのか : 現代薬理学から見た漢方薬の作用 . 医学の進歩 **13** : 1771–1802.
25. Nicolson, J. K. and Lindon, J. C. 2008. Metabonomics. *Nature* **455** : 054–1056.
26. Martin, F. – P. J., Sprenger, N., Yap, I. K. S. *et al.* 2009. Tanor ganismal gut microbiome–host metabolic crosstalk. *J. Proteome Res.* **8** : 2090–2105.
27. Sudo, N. Chida, Y., Aiba, Y. *et al.* 2004. Postnatal microbial colonization programs programs the hypothalamic–pituitary–adrenal system for stress response in mice. *J. Physiol.* **558** : 263–275.
28. Isolauri, E., Arvola, T., Sütas, Y., Moilanen, E. and Salminen, S. 2000. Probiotic in the management of atopic eczema. *Clin. Exp. Allergy* **30** : 1604–1610.
29. Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N. *et al.* 2009. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* **139** : 485–498.
30. Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T. *et al.* 2011. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* **331** : 337–341.
31. Umesaki, Y., Setoyama, H., Matsumoto, S., Imaoaka, A. and Itoh, K. 1999. Differential roles of segmented filamentous bacteria and clostridia in development of the intestinal immune system. *Infect. Immun.* **7** : 3504–3511.
32. Nagura, T., Hachimura, S., Kaminogawa, S., Aritsuka, T. and Itoh, K. 2005. Characteristic intestinal microflora of specific pathogen–free mice bred in two different colonics and their influence on postnatal murine immunocyte profiles. *Exp. Anim.* **54** : 143–148.
33. Fagarasan, S., Muramatsu, M., Suzuki, K. *et al.* 2002. Critical roles of activation–induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science* **298** : 1421–1427.
34. Suzuki, K., Meek, B., Doi, Y. *et al.* 2004. Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA–deficient gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101** : 1981–1986.
35. Mazmanian, S. K., Round, J. L. and Kasper, D. L. 2008. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* **453** : 620–625.
36. Yanagibashi, T., Hosono, A., Oyama, A. *et al.* 2009. *Bacteroides* induce higher IgA production than *Lactobacillus* by increasing activation–induced cytidine deaminase expression in B cell in murine peyer’s patches. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73** : 372–377.

犬への *Babesia microti* 感染実験 Experimental infection of dogs with *Babesia microti*

大森 崇司

背景

Babesia microti (*B. microti*) はダニが媒介する赤血球内寄生原虫で、ヒトと齧歯類に感染する人獣共通感染症の原因として知られており、感染した宿主は発熱や貧血を主訴とした症状を呈する [3、5、7、8、9、14、21]。

ヒトにおける *B. microti* 感染は欧米や東南アジアなど世界各国で報告されており [4、6、10、15、17、18、22]、日本国内では胃潰瘍手術の際に使用した輸血用血液を介した感染が初の報告であった [15]。その後の野外調査にて、野生の齧歯類やダニから *B. microti* が検出され、日本国内にも本原虫が浸潤している可能性が強く示されている [16、21]。

B. microti はこれまでヒトと齧歯類にのみ感染すると考えられていたが、貧血を呈した犬（臨床症例）より小円形の赤血球内寄生体が検出され [1、2、20]、その遺伝子配列を調査した結果、*B. microti* に最も類似した原虫であるとの報告がなされた [1]。このことは、*B. microti* が犬に感染性を有する *B. gibsoni* や *B. canis* に加え、新たなバベシアであることを示唆するが、実験的にそれを検証した報告はされていない。

そこで、*B. microti* の犬に対する感染性や病態を検証するために、マウス由来の *B. microti* を犬に投与し、その感染経過を観察した。

材料と方法

供試動物

2歳齢のビーグル犬2頭ならびに6週齢の ddy マウスを使用した。

B. microti

東京大学より分与され、ddy マウスにて当研究所で継代維持している *B. microti* (Munich strain) を

使用した。

B. microti の犬への投与方法

B. microti 感染マウスより心臓採血を行い、得られた血液の赤血球数と寄生率を計数し、 1×10^8 個の感染赤血球を犬の頸静脈より投与した。

赤血球数ならびに寄生率の計数

赤血球数は血球計算盤を用いて計数した。寄生率は犬血液塗抹標本にライト・ギムザ染色を施し、顕微鏡下で計数した。

Packed cell volume (PCV)

キャピラリー毛細管に血液を入れ、ヘマトクリット遠心機にて遠心分離を行い、ヘマトクリット計測器にて計測した。

Polymerase chain reaction (PCR)

Persing 等の報告 [13] に準拠し、*B. microti* に特異的な遺伝子増幅産物の検出を行った。

間接蛍光抗体法 (Indirect immunofluorescence test : IFAT)

Terkawi 等の報告 [19] に準拠し実施した。

結果

赤血球数は1頭目 (dog A) で投与後18日目より減少を認め、投与後32日目に最も減少し、その後は正常レベルまで回復した (図1-A)。2頭目 (dog B) は投与後25日目より減少を認め、投与後32日目に最も減少し、その後は正常レベルまで回復した (図1-B)。一方、PCVは2頭共に大きな変動は認められなかった (図1-A、図1-B)。

B. microti 投与犬の血液塗抹標本には、投与前には認められていなかった小円形の原虫が確認された (図2-A)。赤血球内の原虫は2頭共に投与後35日目より認められ、最も寄生率が上昇したのは dog A で投与後49日目に0.87%、dog B は投与後53日目に1.34%であった (図1)。

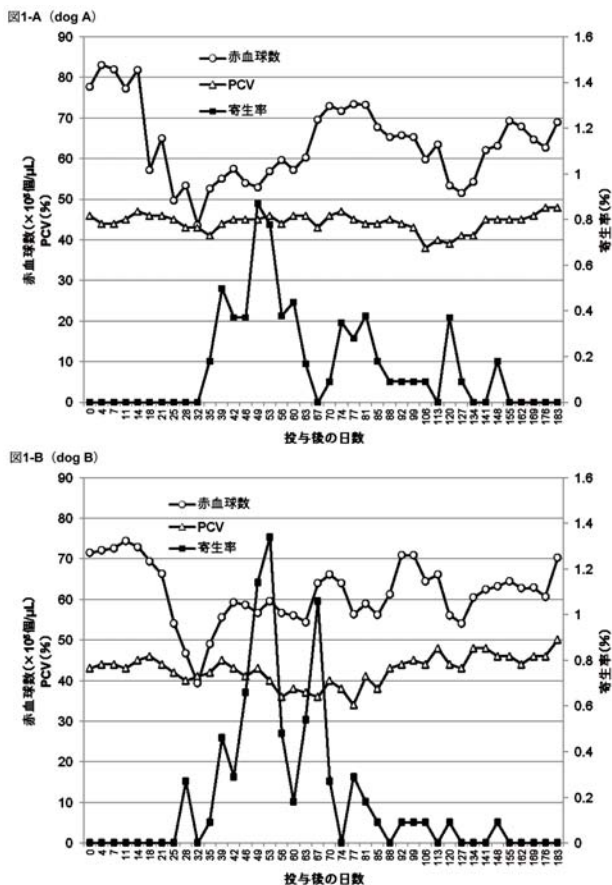


図1 赤血球数、PCV、寄生率の推移
(図1-A: dog A、図2-B: dog B)

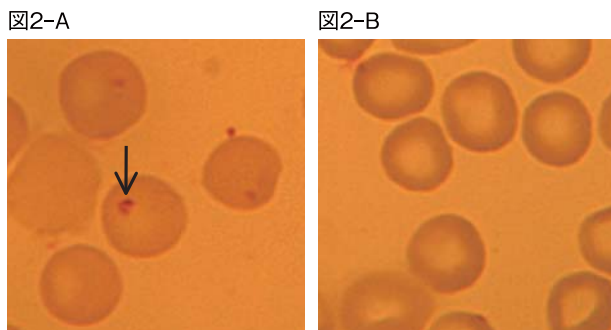


図2 *B. microti* 投与犬の血液塗抹像
(図2-A: 投与後、図2-B: 投与前)

PCRにより、*B. microti* 投与犬の赤血球から *B. microti* に特異的な遺伝子増幅産物が確認され、それは *B. microti* 感染マウスの赤血球を用いた場合と同一のDNAサイズであった(図3)。加えて、*B. microti* 投与犬ならびに *B. microti* 感染マウスの赤血球から抽出したDNAを用いて16S-like Small Subunitのシーケンスを実施したところ、Gen Bank登録の *B. microti* (Sequence accession number: M93660)と99%の相同性を示した。間接蛍光抗体法により、*B. microti* 投与犬の赤血球は *B. microti* 感染マウスの血清に反応し(図4-A)、*B.*

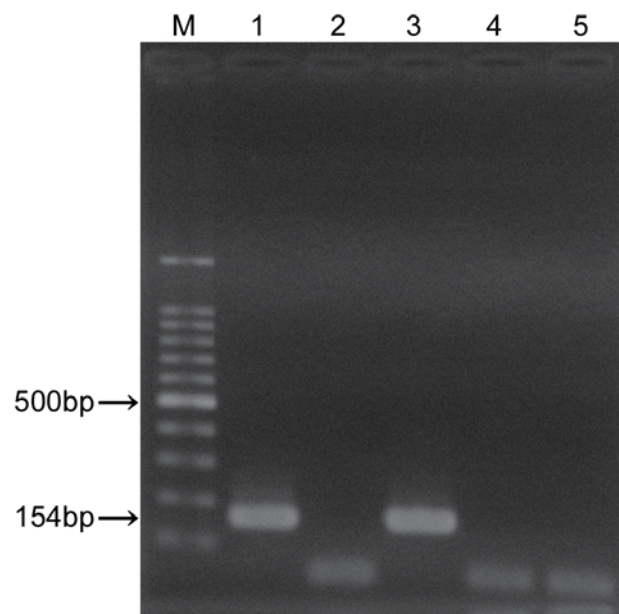


図3 PCRによる *B. microti* 特異的遺伝子増幅産物の確認

M: 100 bp ladder

レーン1: *B. microti* 感染マウスの赤血球

レーン2: *B. microti* 非感染マウスの赤血球

レーン3: *B. microti* 投与後の犬赤血球

レーン4: *B. microti* 投与前の犬赤血球

レーン5: 陰性対照

microti 投与犬の血清にも反応した(図4-B)。

まとめ

B. microti はヒトと齧歯類に感染することが知られている[14]一方、犬に対する *B. microti* の感染性や病原性については明らかでない。*B. microti* 様の赤血球内寄生原虫の自然感染例が犬においても報告されているが[1、2、20]、実験的な再現はなされていない。

今回、我々は *B. microti* 感染マウスの赤血球を犬に投与し感染経過を観察した。投与犬の赤血球内には投与後35日目より原虫が検出され、その後寄生率の上昇を認めた。投与犬の赤血球のPCRにより *B. microti* に特異的な遺伝子増幅産物が確認され、間接蛍光抗体法で *B. microti* 感染マウスの血清と反応したことなどから、投与犬の赤血球に認められた原虫は *B. microti* であることが確認された。加えて、間接蛍光抗体法にて *B. microti* 投与犬の赤血球が *B. microti* 投与後の犬の血清と反応したことから、犬においても *B. microti* に対する免疫応答が生じたと考えられる。これらの事実は、*B. microti* が犬に対

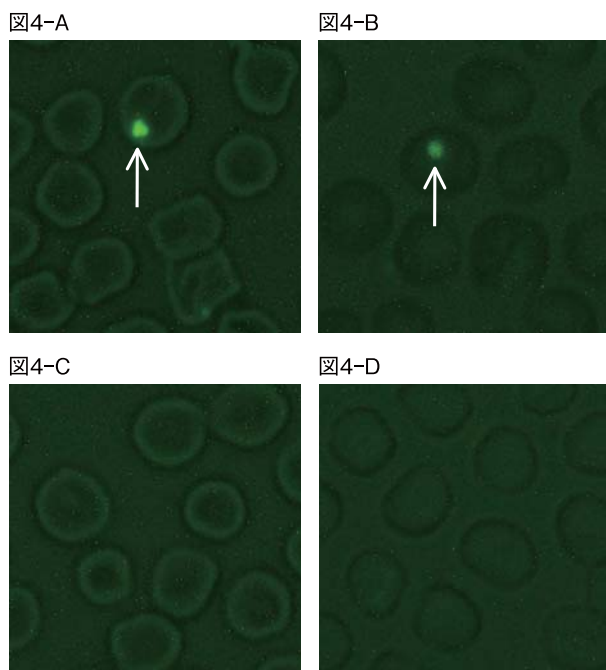


図4 間接蛍光抗体法による *B. microti* の検出

B. microti 投与後の犬赤血球に

図4-A : *B. microti* 感染マウスの血清を反応

図4-B : *B. microti* 投与後の犬の血清を反応

図4-C : *B. microti* 非感染マウスの血清を反応

図4-D : *B. microti* 投与前の犬の血清を反応

し感染性を有していることと、犬赤血球内で増殖することを示している。

B. microti 投与犬の赤血球数は一時的に減少したが、PCVに大きな変化は認められず [11]、臨床症状も認められなかった。一方、*B. microti* 様寄生体の感染が確認された野外症例では、バベシア感染に特徴的な臨床症状を呈していた [2、20]。今回の実験で臨床症状が認められなかったのは、本来は犬にとって異物となり得るマウス赤血球を材料としていることや、*B. microti* 感染赤血球を静脈内投与したこと、即ち自然例とは異なる経路で感染させたことに起因するのかもしれないが、その詳細は不明である。

犬を用いた *B. gibsoni* の感染実験では、今回の実験で用いた投与量よりも少ない量で感染が成立し、貧血や血小板減少症などの症状が発現する [12]。従って、*B. microti* は、従来から犬バベシアとして知られている *B. gibsoni* よりも犬に対する病原性が低いかもしれない。また、自然界において *B. microti* はダニにより媒介されるが、今のところダニによる犬への *B. microti* 感染は報告されていない。今後、ダニを媒介させた感染実験を行うなど更なる

検証が必要ではあるが、*B. microti* は病原性は低いものの、犬バベシア症の原因の1つになるものと推測された。

本稿は The Journal of protozoology research (2011) 21(2), 78-84 に掲載された論文を編集・日本語訳したものです。

参考文献

1. Camacho, A. T., Pallas, E., Gestal, J. J., Guitián, F. J., Olmeda, A. S., Goethert, H. K. and Telford, S. R. 3rd. 2001. Infection of dogs in north-west Spain with a *Babesia microti*-like agent. *Vet. Rec.* **149** : 552-555.
2. Camacho, A. T., Guitián, E. J., Pallas, E., Gestal, J. J., Olmeda, A. S., Goethert, H. K., Telford, S. R. 3rd. and Spielman, A. 2004. Azotemia and mortality among *Babesia microti*-like infected dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **18** : 141-146.
3. Chen, D., Copeman, D. B., Burnell, J. and Hutchinson, G. W. 2000. Helper T cell and antibody responses to infection of CBA mice with *Babesia microti*. *Parasite Immunol.* **22** : 81-88.
4. Eskow, E. S., Krause, P. J., Spielman, A., Freeman, K. and Aslanzadeh, J. 1999. Southern extension of the range of human babesiosis in the eastern United States. *J. Clin. Microbiol.* **37** : 2051-2052.
5. Gray, J., von Stedingk, L. V., Gürtelschmid, M. and Granström, M. 2002. Transmission studies of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks and gerbils. *J. Clin. Microbiol.* **40** : 1259-1263.
6. Hildebrandt, A., Hunfeld, K. P., Baier, M., Krumbholz, A., Sachse, S., Lorenzen, T., Kiehntopf, M., Fricke, H. J. and Straube, E. 2007. First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **26** : 595-601.
7. Igarashi, I., Suzuki, R., Waki, S., Tagawa, Y., Seng, S., Tum, S., Omata, Y., Saito, A., Nagasawa, H., Iwakura, Y., Suzuki, N., Mikami, T. and Toyoda, Y. 1999. Roles of CD4 (+) T cells and gamma interferon in protective immunity against *Babesia*

- microti* infection in mice. *Infect. Immun.* **67** : 4143–4148.
8. Ike, K., Takeuchi, K., Uchida, Y. and Imai, S. 2005. Hematological findings and antibody responses in Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) infected with *Babesia microti*. *J. Vet. Med. Sci.* **67** : 57–460.
9. Kjemtrup, A. M. and Conrad, P. A. 2000. Human babesiosis : an emerging tick-borne disease. *Int. J. Parasitol.* **30** : 1323–1337.
10. Kogut, S. J., Thill, C.D., Prusinski, M.A., Lee, J. H., Backerson, P. B., Coleman, J. L., Anand, M. and White, D. J. 2005. *Babesia microti*, upstate New York. *Emerg. Infect. Dis.* **11** : 476–478.
11. Matijatko, V., Mrljak, V., Kis, I., Kucer, N., Forsek, J., Zivicnjak, T., Romić, Z., Simec, Z. and Ceron, J. J. 2007. Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Vet. Parasitol.* **144** : 242–50.
12. Matsuu, A., Koshida, Y., Kawahara, M., Inoue, K., Ikadai, H., Hikasa, Y., Okano, S. and Higuchi, S. 2004. Efficacy of atovaquone against *Babesia gibsoni* in vivo and in vitro. *Vet. Parasitol.* **124** : 9–18.
13. Persing, D. H., Mathiesen, D., Marshall, W. F., Telford, S. R., Spielman, A., Thomford, J. W. and Conrad, P. A. 1992. Detection of *Babesia microti* by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30** : 2097–2103.
14. Ruebush, M. J. and Hanson, W. L. 1979. Susceptibility of five strains of mice to *Babesia microti* of human origin. *J. Parasitol.* **65** : 430–433.
15. Saito-Ito, A., Tsuji, M., Wei, Q., He, S., Matsui, T., Kohsaki, M., Arai, S., Kamiyama, T., Hioki, K and Ishihara, C. 2000. Transfusion-acquired, autochthonous human babesiosis in Japan : isolation of *Babesia microti*-like parasites with hu-RBC-SCID mice. *J. Clin. Microbiol.* **38** : 4511–4516.
16. Saito-Ito, A., Yano, Y., Dantrakool, A., Hashimoto, T. and Takada, N. 2004. Survey of rodents and ticks in human babesiosis emergence area in Japan : first detection of *Babesia microti*-like parasites in *Ixodes ovatus*. *J. Clin. Microbiol.* **42** : 2268–2270.
17. Shih, C. M., Liu, L. P., Chung, W. C., Ong, S. J and Wang, C. C. 1997. Human babesiosis in Taiwan : asymptomatic infection with a *Babesia microti*-like organism in a Taiwanese woman. *J. Clin. Microbiol.* **35** : 450–454.
18. Siński, E., Bajer, A., Welc, R., Pawełczyk, A., Ogrzewalska, M. and Behnke, J. M. 2006. *Babesia microti* : prevalence in wild rodents and *Ixodes ricinus* ticks from the Mazury Lakes District of North-Eastern Poland. *Int. J. Med. Microbiol.* **40** : 137–143.
19. Terkawi, M. A., Jia, H., Zhou, J., Lee, E.G., Igarashi, I., Fujisaki, K., Nishikawa, Y. and Xuan, X. 2007. *Babesia gibsoni* ribosomal phosphoprotein P0 induces cross-protective immunity against *B. microti* infection in mice. *Vaccine* **25** : 2027–2035.
20. Zahler, M., Rinder, H., Schein, E. and Gothe, R. 2000. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Vet. Parasitol.* **89** : 241–248.
21. Zamoto, A., Tsuji, M., Kawabuchi, T., Wei, Q., Asakawa, M. and Ishihara, C. 2004. U.S.-type *Babesia microti* isolated from small wild mammals in Eastern Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **66** : 919–926.
22. Zamoto, A., Tsuji, M., Wei, Q., Cho, S. H., Shin, E. H., Kim, T. S., Leonova, G. N., Hagiwara, K., Asakawa, M., Kariwa, H., Takashima, I. and Ishihara, C. 2004. Epizootiologic survey for *Babesia microti* among small wild mammals in northeastern Eurasia and a geographic diversity in the beta-tubulin gene sequences. *J. Vet. Med. Sci.* **66** : 785–792.

訃 報

高橋英司 先生

当所評議委員を長きに亘り務められた高橋英司先生（東京大学名誉教授）は、2013年1月20日にご逝去されました（享年72歳）。心から哀悼の意を表し、ご冥福をお祈り申し上げます。

先生は1967年に東京大学農学部畜産獣医学科をご卒業後、大学院に進学され1972年同大学院農学系研究科畜産獣医学博士課程を終了されるとともに農林水産省家畜衛生試験場に奉職されました。

1985年からは東京大学に助教授として移られ、1990年に教授に就任されました。2001年に東京大学をご退官されるまで一貫して獣医学の教育と研究に専心され、特にご専門のRNAウイルスの研究では牛のアカバネ病ウイルスと流産との関連を突き止められました。

その後、2002年に帝京科学大学アニマルサイエンス学科教授に就任され、さらに活躍の場をコンパニオンアニマルにまで広げられ、2011年にご退官されるまで、教育ならびに研究にご尽力されました。

先生には東京大学にてご教鞭を執られる傍ら、1996年から16期の長きに亘り当所の評議員として運営にご協力賜りました。

ここに改めて高橋英司先生のご功績・功労を偲び、謹んでご冥福をお祈り申し上げます。

鮫島都郷 先生

当所元常務理事の鮫島都郷先生は、2013年4月25日にご逝去されました（享年81歳）。心から哀悼の意を表し、ご冥福をお祈り申し上げます。

先生は1954年に鹿児島大学農学部獣医科をご卒業後、当所に入所されました。1976年研究・製造第1部長に就任されてから長きに亘り、馬、牛、豚ウイルスの研究、ワクチンの開発および製造にご尽力され、1985年日生研株式会社取締役、1994年当所常務理事に就任されました。1998年にご退職後、当所評議員として、また、2003年に監査役として当所の運営にご尽力頂きました。

ここに改めて鮫島先生のご功労を偲び、謹んでご冥福をお祈り申し上げます。

今村泰久 先生

当所元部長の今村泰久先生は、昨年2012年6月20日にご逝去されました（享年81歳）。心から哀悼の意を表し、ご冥福をお祈り申し上げます。

先生は1953年に宮崎大学農学部獣医科をご卒業後、当所に入所されました。1975年研究・製造第3部長兼整備部長、1981年品質管理部長兼第6部長、1985年日生研株式会社取締役に就任されました。1994年にご退職されるまで、製剤業務、品質管理業務を統括され、また、犬プラズマ製剤の原料輸入に途を開いて頂きました。

ここに改めて今村先生のご生前のご尽力に感謝し、謹んでご冥福をお祈り申し上げます。

(岩田 晃)

お 知 ら せ

当研究所の平成 25 年度定時評議員会が、去る平成 25 年 5 月 31 日に開催され、平成 24 年度の事業報告及び決算報告が承認・可決されると共に、評議員の選任が行われました。現在の評議員、理事、監事は、下記の通りです。

評議員

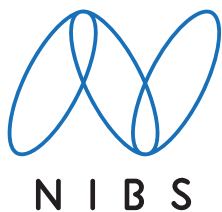
井土 俊郎 小川 博之 小野憲一郎 杉浦 勝明 (新任)

理事・監事

氏 名	役 職	担 当
上田 進	理事長	経営
草薙 公一	副理事長	製造担当
布谷 鉄夫	常務理事	研究開発、検査担当
吉村 巖雄	常務理事	管理担当
岩田 晃	常務理事	企画学術、研究開発担当
笹川 千尋	常務理事	研究開発担当
佐々木 伸雄	常務理事	研究開発担当
真板 敬三	監事	
小坂 善三	監事	

研修者・見学者受け入れ状況 (平成 24 年 4 月から平成 25 年 3 月)

来所日・期間		所属機関・人数	研修・見学内容
平成 24 年	5 月 10 日	JICA 集団研修 9 名	獣医技術研修
	7 月 5 日	狂犬病予防対策協議会 19 名	視察研修
	7 月 3 日～7 月 4 日	株式会社ジャパンファーム 2 名	技術習得
	9 月 7 日	麻布大学 1 名	施設見学
平成 25 年	2 月 18 日～2 月 19 日	日本配合飼料株式会社 1 名	技術習得



—— 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 581 号) 平成 25 年 6 月 25 日印刷 平成 25 年 7 月 1 日発行(第 59 巻第 4 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)