

日生研おより

2013年(平成25年)9月号 第59巻第5号(通巻582号)

挨拶・巻頭言

「グローバル人材」

.....布谷鉄夫(2)

獣医病理学研修会

第52回 No. 1049 ネコの頸部リンパ節

.....ACVP 日本人会 (JaGA) (3)

第52回 No. 1063 イヌの精巣上体腫瘍

日本獣医生命科学大学獣医病理学教室 (4)

第53回 No. 1086 ブタの小脳

.....一般財団法人 日本生物科学研究所 (5)

論文紹介

Dipeptidyl peptidase 4 は新興ヒトコロ

ナウイルス - EMC の機能的レセプター

である.....小玉敏明(6)

Mycoplasma hyopneumoniae : 疾病

からワクチンまで.....田積晃浩(12)

お知らせ

学会発表演題.....(19)



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/>



「グローバル人材」

布谷鉄夫

酷暑も漸くおさまり朝夕秋の涼風を感じるこの頃である。今年は最高気温が塗り替えられた上、猛暑日の期間と地点数が過去最高を記録するなど全国的に厳しい暑さとなった。この酷暑に加え、干ばつ、ゲリラ豪雨、スーパーセルに起因すると思われる竜巻被害など、このところの“極端気象”にグローバルな異変を感じざるを得ない。これら自然現象には時々の情報を的確に把握しながら、災害を最小限に留めるべく行動をとるしか今のところ奇策は無いようである。

さて、“グローバル人材”という言葉が最近よく見聞きする。若い世代の“内向き志向”を克服し、国際的な産業競争力の向上や他国間との絆強化の基盤としてグローバルな舞台に積極的に挑戦し活躍できる人材である。この用語については随所で解説されているが、“未知の世界や厳しい環境に積極的に飛び込み、課題を解決するために自ら考え、最後までやり抜く精神的タフさ”というのが共通概念である。背景に、グローバル化による世界各国との経済社会の一体化が進展し、環境などを含む国境を越えた諸問題への取組みが求められる中、自国・他国にとらわれず活躍できる人材の育成・登用が急務となっている現状がある。

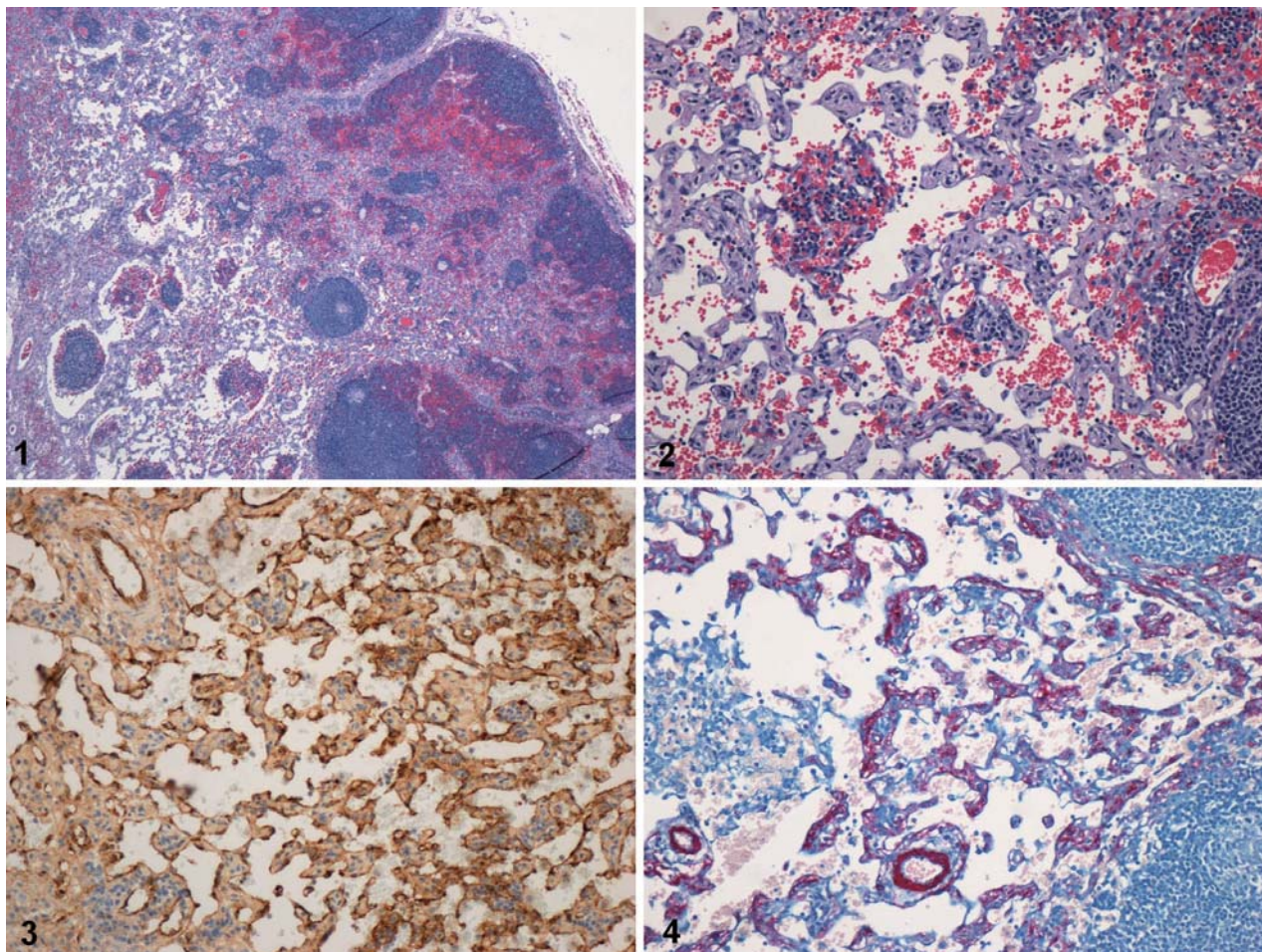
話題の書「採用基準」(伊賀泰代著)を読了し、どこか曖昧で一人歩きしているようなこの言葉の本質的な意味が透けて見えてきた。マルチナショナル企業と呼ばれる多国籍企業が多く生まれる米国では、常に世界を学ぶ土壌と価値観があり、その中心的教育をビジネススクールが担っているという。多様な国々の同級生と学生生活を送ることで、将来世界で働くために必要なそれぞれの国の考え方や国民感覚を学ぶ、留学生は米国人にとって「外国人サンプル」になっている。例えば、日本人の“はい”は英語の“Yes”とは異なり、“日本人と議論するときは、こういうことに気をつけないと本音が引き出せない”の如くである。これに比べ、我が国の大学等では、積極的に留学生を受入れているところでも一部の国に偏り、キャンパス内で世界を体感できる環境というよりは少子化による学生の減少を海外留学生で埋め合わせているのが現実であると著者は分析する。そしてグローバル人材に求められる最も必要な資質がリーダーシップであるとしている。リーダーシップとは“部下を率いる上司の力量”のような狭い話でなく、ポストや役職に係わらず組織の全員が発揮すべきもので、天賦の才でも自然に身につくものでもなくスポーツや勉強と同様に誰でも訓練を積み重ねれば身に付けられるスキルである。日本人に欠けているものは英語力でも論理的思考でもなくリーダーシップであり、それは特別な出来事が起きた時に必要なものではなく、日常的に誰もが発揮するものであるとし、身近な事例をいくつか挙げている。例えば、事故で電車が止まるとタクシー乗り場には長蛇の列が出来るが、その様な場合、海外では必ず誰かが相乗りを誘い始め時間やコストの節約を提案する。しかし、日本では誘いの声をかける人は極めて稀で黙々と列に並び、車が来ると非効率であることが分かっているにもかかわらず一人一台独占して乗ってしまう。日頃からリーダーシップを発揮したことがない人は見知らぬ人の前で相乗りを誘う一言が出せず、あるいは自分がそんなことをやる必要はないと思ってしまう。電車の中で高齢者が乗車してきて自分の前に立つと、席を譲ろうと思っても見知らぬ人の前では恥ずかしくて声が出ず、眠ったふりをし、あるいは自分より若い人が譲るべきと思ってしまうのもそうかもしれない。また、会議には出席するが、話を聞くだけで一言も発言せず数時間を無駄に過ごしてしまう。例え稚拙であっても何かを発言すれば、他の人の思考を整理したり刺激したりする可能性があり、会議の結果が変わるかもしれない。この種の話は尽きないが、リーダーシップの視点から考え直すと多くの事例が理解しやすくなる。要するに、グローバル人材に必要な基本的資質は学歴や地頭の良さではなく、目前の問題解決や目標達成に積極的に関わっていきこうとするリーダーシップであり、組織に必要なのは卓越したカリスマリーダーではなく、リーダーシップを発揮できる人の総量(リーダーシップキャパシティ)が一定レベルを超えることであると結論している。

確かに、いろいろな問題に直面した場合、それは“責務として割り当てられた役目の人の仕事”であって、“自分はそんなことをやるべきではない、やる必要は無い”と割り切り、指示を待つフォロワーの集団となるか、“個別メンバーとして成果を出すことはもちろん、チーム全体の意見を纏め上げてチームとしての結束力を高めることもまた、自分の責務”と考える集団になるかでは、後者が圧倒的に生産性が高くなるのが容易に想像できる。

(常務理事)

ネコの頸部リンパ節

ACVP 日本人会 (JaGA) 第 52 回獣医病理学研修会 No. 1049



動物：ネコ、短毛種、去勢オス、年齢不明。

臨床事項：1 cm ほどの皮下腫瘤を腹側頸部に認め、経過観察をしたところ 8 ヶ月後の再検時には 2.4 cm となっていた。腫瘍を疑い、外科的切除を行った。その他の臨床症状は認められなかった。

組織所見：腫瘍は腫張したリンパ節であり、び慢性に出血とうっ血を認める。リンパ球は高度に枯渇し、髓質の部分では特に顕著である (図 1)。髓質域では、拡張した髓洞がメッシュ状の毛細血管様構造によって置き換えられており、さらに同様の構造が傍皮質および皮質部分へリンパ洞を中心に広がるが、もともと存在するリンパ節の構造は破壊されることなく比較的良く保たれている。血管様構造は血管内皮に似た紡錘形細胞が並び、これらの細胞に異型性は認めない (図 2)。リンパ門部の脈管 (輸出リンパ管・静脈) は、リンパあるいは血漿で高度に拡張する。免疫染色では、内皮様の紡錘形細胞は Factor VIII related antigen に強陽性を示し (図 3)、血管壁の部分では SMA の発現も認められたことから (図 4) 血管に類似した構造が増殖していることが示唆された。

診断：ネコリンパ節の蔓状血管化 (Feline Plexiform Vascularization of Lymph node)

考察：ネコリンパ節の蔓状血管化は、毛細血管の増殖とリンパ球の枯渇を伴ったリンパ節腫大を特徴とする病変で、頸部や鼠径リンパ節に単独に起こることが多

い。類似病変として、ヒトでは Vascular transformation of lymph node sinuses や Nodal angiomatosis が知られており、またウサギを使った実験では、輸出リンパ管を縛った場合、あるいはリンパ節静脈とリンパ管を不完全に縛った場合に同様な病変が再現されている。病理発生機序は現在のところ不明だが、ヒトでは血栓症、重度の虚血性心不全、癌患者などに見られることから、リンパや静脈の流れが阻害されることによって起こると思われる。ただ、ネコの場合、リンパ節以外の病変は認められず、罹患個体は健康であることが多い。研修会では、リンパ管が血管化を起こしているのか、それとも新たに血管形成が起きているのかが議論となった。この点を検証するため、大阪府立大学の井澤先生のご協力により、リンパ管内皮マーカーである Prox1 で染色していただいた。しかし残念ながらネコの組織に対する Prox1 の反応性はイヌより弱く、本症例でははっきりとした染色性は確認できなかった。今後ほかのリンパ管に対するマーカーでさらに検討する必要があると思われる。

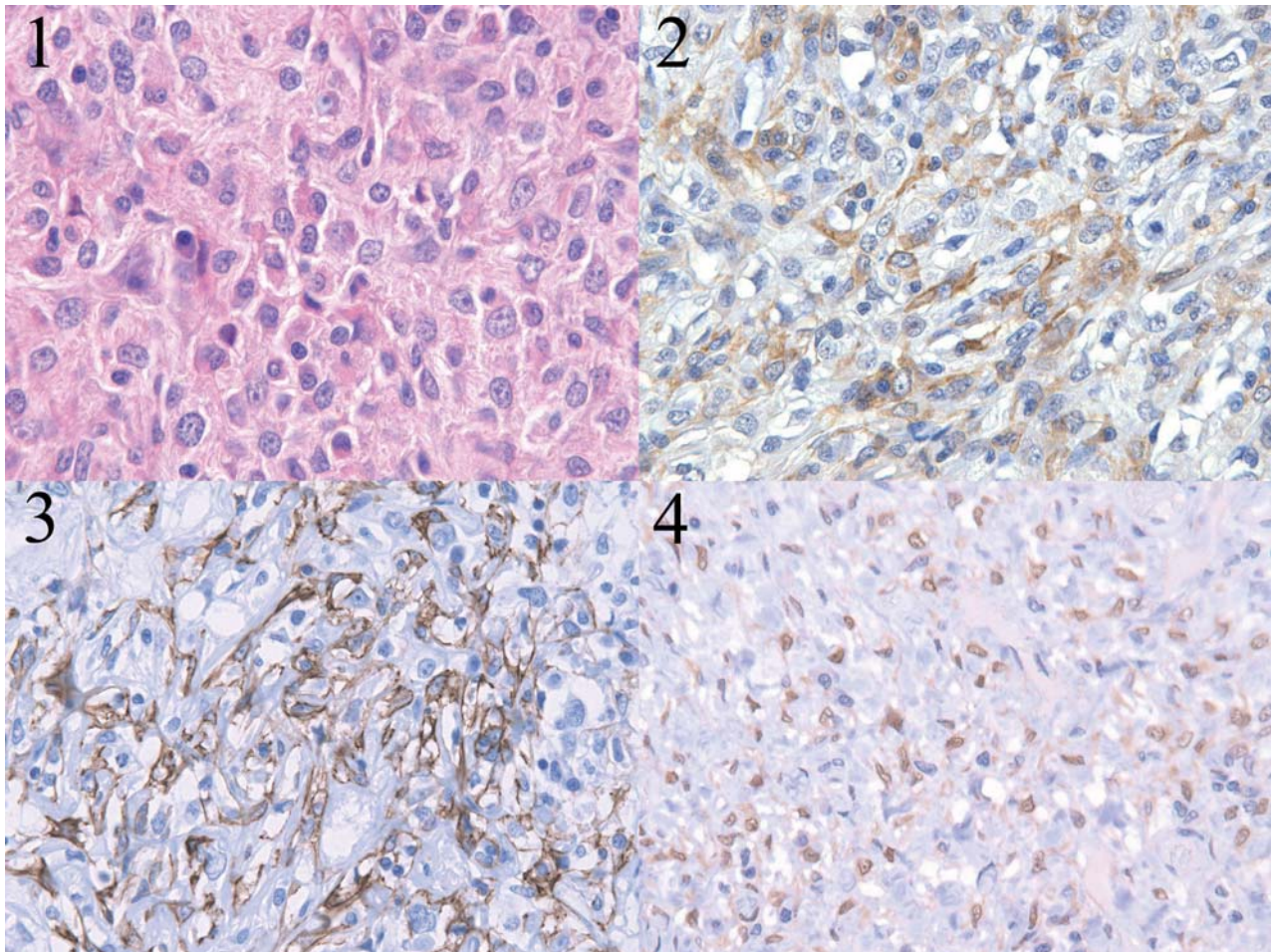
(田邊美加)

参考文献：

1. Lucke, V. M., Davies, J. D., Wood, C. M. and Whitbread, T. J. 1987. Plexiform vascularization of lymph nodes: an unusual but distinctive lymphadenopathy in cats. *J. Comp. Pathol.* 97(2) : 109-119.

イヌの精巣上体腫瘍

日本獣医生命科学大学獣医病理学教室 第52回獣医病理学研修会 No. 1063



動物：イヌ、ミニチュア・ダックスフント、雄、13歳。
臨床事項：左側精巣の腫大に気づき、二週間後に外科的に摘出された。他に既往歴なし。
肉眼所見：左精巣上体は7.0×4.5×3.5 cmに腫瘍化していた。精巣は同腫瘍に圧排され高度に萎縮していた。また、精巣断面にも1.5×0.7×0.7 cmの小腫瘍を認めた。精巣上体、精巣の腫瘍はともに乳白色充実性であった。
組織所見：精巣上体腫瘍では、大型淡明核と明るい細胞質を有する大型腫瘍細胞と、クロマチンに富む小型核で、好酸性の細胞質を有する小型腫瘍細胞のびまん性増殖がみられた(図1)。一部の腫瘍細胞は細胞質内に脂肪滴を有していた。これらの腫瘍細胞は白膜を破り精巣実質内に軽度浸潤していた。精巣内小腫瘍では、多角形腫瘍細胞が充実性に増殖し、異型核分裂像もみられた。細胞質は弱好酸性微細顆粒状ないし淡明で、しばしば脂肪滴を有していた。免疫染色では、精巣上体、精巣内両腫瘍ともにandrogen receptor、3β-HSD(図2)、WT-1に陽性で、さらに精巣上体腫瘍はα-SMA(図3)、desmin、S-100(図4)にも陽性を示した。一方、両腫瘍ともcytokeratin AE1/AE3、inhibin-αには陰性であった。電顕では、精巣上体腫瘍の大型明細胞の細胞質内に少量の脂質と伸長したミトコンドリアがみられた。小型細胞は細胞質内に多数の細フィラメントと発達した粗面小胞体を含み、隣接細胞との間で細胞突起の

interdigitationを形成していた。

診断：悪性性索/性腺間質腫瘍(Malignant sex cord/gonadal stromal tumor)

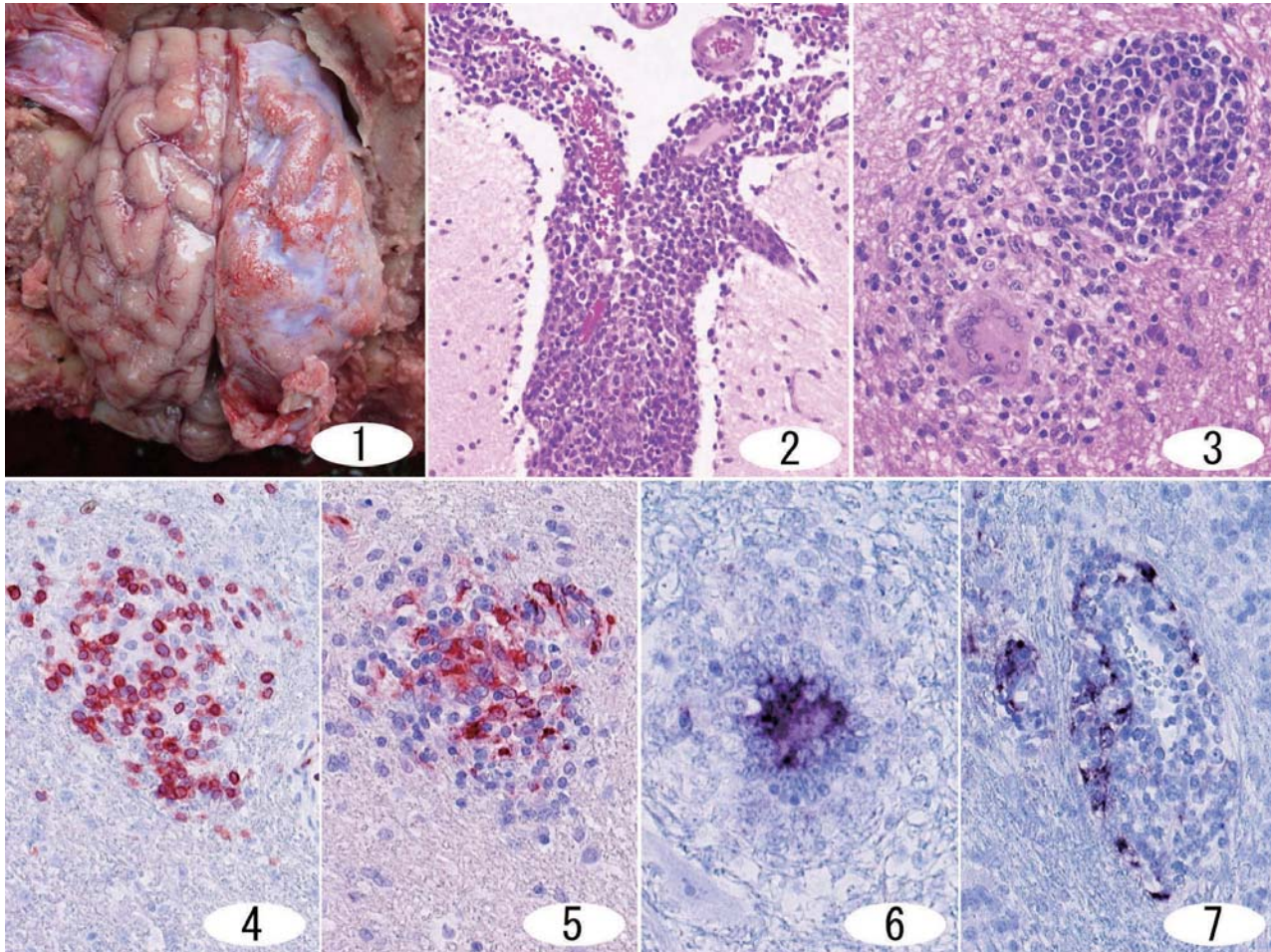
考察：免疫染色結果および電顕所見により、精巣上体腫瘍は一部Leydig細胞、筋様細胞への分化がみられたが、全体に分化度の低い腫瘍であった。また、顕著な核異型、高い増殖活性、広範囲の壊死、精巣実質内への浸潤像など悪性の所見がみられたことから、悪性性索/性腺間質腫瘍と診断した。ヒトの性索/性腺間質腫瘍の構成細胞として筋様細胞が報告されているが、イヌでは初めてである。精巣内腫瘍は悪性Leydig細胞腫と診断された。(安井潤紀)

参考文献：

1. Eble, J. N., Sauter, G., Epstein, J. I. and Sesterhenn, I. A. 2004. WHO Classification, Tumors of the urinary system and male genital organs. IARC Press, Lyon.
2. Maekawa, M. K., Kamimura, K. and Nagano, T. 1996. Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch. Histol. Cytol.* **59** : 1-13.
3. Du, S., Powell, J., Hii, A. and Weidner, N. 2012. Myoid gonadal stromal tumor: a distinct testicular tumor with peritubular myoid cell differentiation. *Hum. Pathol.* **43** : 144-149.

ブタの小脳

一般財団法人 日本生物科学研究所 第 53 回獣医病理学研修会 No. 1086



動物：ブタ、雄、101日齢。

臨床事項：症例は繁殖母豚 500 頭規模の一貫経営農場での飼育豚で、病性鑑定を目的として鑑定殺された。鑑定殺時には起立不能、全身性の痙攣及び眼球震顫を呈していた。

剖検所見：大脳及び小脳で硬膜の白濁並びに脳溝部軟膜の混濁（図 1）が認められ、橋右外側から右小脳脚では膿瘍の形成が見られた。その他の臓器では全身リンパ節の腫大、右肺中葉の一部で暗赤色調無気肺領域が認められた。

組織所見：髄膜ではリンパ球・マクロファージなどの単核細胞を主体とする炎症細胞の中等度から重度浸潤が認められた（図 2）。小脳皮質及び髄質では単核細胞の囲管性細胞浸潤及び小肉芽腫が多数認められ、多核巨細胞も伴っていた（図 3）。小肉芽腫は CD3 陽性の T リンパ球と lysozyme 陽性のマクロファージからなり（図 4、5：連続切片）、多核巨細胞の形成は髄膜、皮質分子層、顆粒層及び髄質で広く認められた。また膿瘍近傍の領域で好中球の浸潤が見られた。豚サーコウイルス 2 型（PCV2）に対する免疫染色及び in situ hybridization（ISH）では、前者で陰性となり、後者では血管周囲や髄膜に浸潤する単核細胞、多核巨細胞及び小肉芽腫において PCV2 陽性像が認められた（図 6、7）。また小脳乳剤の PCR あるいは RT-PCR によるウイルス学的検査では陽性、PRRS ウイルス、オーエスキー病ウイルス、日本脳炎ウイルス、ブタテシオウイルスは陰性であった。細菌学的検査では橋・小脳の膿瘍及び大脳からアルカナバクテリウム・ピオゲネスが検出された。また TUNEL 法によりアポトーシスの検出を試みたところ、小脳皮質及び髄質に見られる小型濃縮核及び髄膜や血管周囲に浸潤するマクロファージの細胞質において多数の陽性像が認められた。その他臓器ではリンパ組織におけるリンパ球の減少と多核巨細胞

を伴う肉芽腫性炎、間質性・カタル性気管支肺炎、多核巨細胞を伴う間質性腎炎などが認められ、それら臓器においても PCR、ISH 及び免疫染色により PCV2 が検出された。

診断：小肉芽腫性病変を伴う豚のリンパ・組織球性髄膜脳炎（PCV2 感染の関与を疑う）

考察：本症例は PCV2 の全身性感染の病態を示しており、中枢神経病変はその一部と考えられた。また PCV2 に対する免疫染色と ISH の結果の相違は検出感度の違いによるものと推察された。PCV2 感染に起因する中枢神経病変の報告は少なく、本例は既報と比較して巨細胞形成が顕著であった。また単核細胞浸潤を主体とする髄膜脳炎が重度であり、一部では好中球の浸潤を伴っていた。この要因としては、病態の経過や提出標本近傍の膿瘍で検出されたアルカナバクテリウム・ピオゲネス感染の関与も考えられた。（鈴木敬之）

参考文献：

1. Corr ea, A. M., Zlotowski, P., de Barcellos, D. E., da Cruz, C. E. and Driemeier, D. 2007. Brain lesions in pigs affected with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19(1) : 109–112.
2. Seeliger, F. A., Br ugmann, M. L., Kr uger, L., Greiser-Wilke, I., Verspohl, J., Segal es, J. and Baumg artner, W. 2007. Porcine circovirus type 2-associated cerebellar vasculitis in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected pigs. *Vet. Pathol.* 44(5) : 621–634.
3. Drolet, R., Cardinal, F., Houde, A. and Gagnon, C. A. 2011. Unusual central nervous system lesions in slaughter-weight pigs with porcine circovirus type 2 systemic infection. *Can. Vet. J.* 52(4) : 394–397.

論文紹介

Dipeptidyl peptidase 4 は新興ヒトコロナウイルス -EMC の機能的レセプターである

小玉 敏明

Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC.

Raj VS, Mou H, Smits SL, Dekkers DH, Müller MA, Dijkman R, Muth D, Demmers JA, Zaki A, Fouchier RA, Thiel V, Drosten C, Rottier PJ, Osterhaus AD, Bosch BJ, Haagmans BL.

Nature 14 ; 495 (7440) : 251-254. 2013.

要約

多くのヒトコロナウイルスは、軽度の上部気道疾患を引き起こすが、免疫応答不全のヒトにおいては重篤な肺疾患を誘発する。しかしながら、SARS コロナウイルスは、全身感染により致死率約 10% におよぶ重篤な下部呼吸器疾患を引き起こす。最近、他のコロナウイルス (human coronavirus-Erasmus Medical Center, hCoV-EMC) が、重篤で時に致死的な下部気道感染を呈した患者から同定され、ウイルス遺伝子解析によって、コウモリのコロナウイルスに近縁である事が明らかにされた。本研究で著者らは、dipeptidyl peptidase 4 (DPP4 または CD26) を hCoV-EMC の機能的なレセプターとして同定した。DPP4 はウイルス感受性 Huh-7 細胞のライセートから、hCoV-EMC スパイクタンパク質のレセプター結合 S1 領域と特異的に共精製され、抗 DPP4 抗体は、Huh-7 ならびにヒト気管支上皮初代細胞の hCoV-EMC 感染を抑制した。さらに、ヒトならびにコウモリ (*Pipistrellus pipistrellus*) の DPP4 を非感受性 COS-7 細胞に発現させる事によって hCoV-EMC 感染が成立した。hCoV-EMC が異種動物の進化において保存されてきた DPP4 を機能的レセプターとして使用する事を解明した事は、hCoV-EMC の宿主域解明の手がかりを提供し、更に、この新興ヒトコロナウイルスの病原性・疫学の理解に貢献し、治療戦略の開発を促進するかも知れない。

本文

コロナウイルスは、広範囲の哺乳動物・鳥類に感染し、その宿主特異性は主にウイルススパイク (S) タンパク質の細胞表面レセプターへの結合能によって決定される。コロナウイルスは、S タンパク質の異種動物のレセプターへの適応性から人獣共通感染症となる可能性があり、その可能性はコウモリ由来と考えられる SARS 原因病原体である SARS-CoV に最も顕著に証明されている。最近、新しいコロナウイルスとして hCoV-EMC が現在まで 13 人の患者で同定され、そのうち 7 人が重篤な呼吸器疾患、またあるケースでは腎不全を伴い死に至っている。hCoV-EMC は遺伝学的に、コウモリコロナウイルスの HKU4 と HKU5 に近縁であり、ウイルス遺伝子断片の系統解析ではオランダのコウモリ (*Pipistrellus*) で見つけられたコウモリコロナウイルスに近縁である。近年の分子疫学的研究によって、SARS-CoV に非常に近縁なウイルスを含む少なくとも 60 の新規コウモリコロナウイルスの存在が明らかになった。ヒトの hCoV-EMC 感染事例が単一の感染源からの伝播に起因していないようである事から、hCoV-EMC の感染疫学はヒト母集団内での閉鎖的なウイルス循環または介在動物宿主からの反復的なウイルスの持ち込みによると考えられる。この新規コロナウイルスのレセプターをタイムリーに同定し、その生物学的性状をよりよく理解する事は、本ウイルスの人獣共通感染症である可能性と発病機序の解明ならびに治療戦略の構築に重要な手掛りを提示する。現在まで、二つのタイプのコロナウイル

スのレセプターが同定されている：ベータコロナウイルスの Maus肝炎ウイルスは免疫グロブリン関連 carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule (CEACAM) を細胞侵入に使用するが、数種のアルファ/ベータコロナウイルスでは、hCoV-229E と数種の動物コロナウイルスが使用する aminopeptidase N (APN または CD13) と SARS-CoV が使用する angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) の二種のペプチダーゼがレセプターとして同定されている。加えて、シアル酸が数種のコロナウイルスのレセプターとして機能するようである。

以前著者らが行なった最初の実験は、hCoV-EMC が ACE2 を細胞侵入のレセプターとして使用

しない事を示した。そこで、まずアミノ末端に位置するレセプター結合スパイク領域 S1 の細胞結合性と細胞のウイルス感受性の相関性を、S1 領域をヒト IgG の Fc 部位に融合させた分子量約 280 kDa のジスルフィド結合 2 量体組換えタンパク質を用いて解析した。免疫蛍光ならびに FACS 解析によって特異性の高い S1 の結合がアフリカミドリザル腎臓細胞 (Vero) とヒト肝細胞 (Huh-7) において認められ、コウモリ由来腎細胞では、中程度の染色が検出されたが (図 1)、アフリカミドリザル腎臓由来 COS-7 細胞での S1 結合は検出されなかった (図 1b)。更に、ネココロナウイルスの S1 領域はこれらの細胞には特異的に結合せず、ネコ胎仔 FCWF

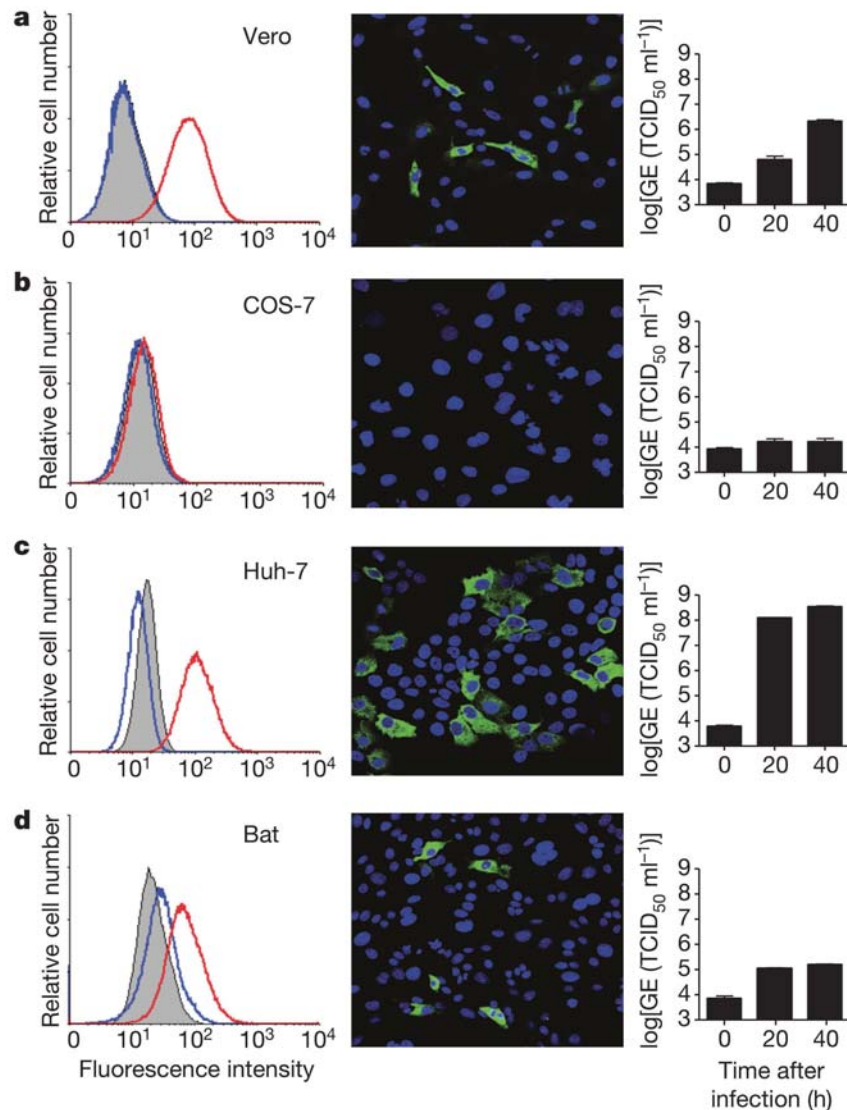


図 1 hCoV-EMC S1 の細胞結合は、hCoV-EMC 感染と相関する

a-d. 左パネルは FACS 解析による Vero (a)、COS-7 (b)、Huh-7 (c)、コウモリ細胞の hCoV-EMC S1-Fc 結合 (赤線) を示す。ネコ CoV S1-Fc タンパク質の結合 (青線) と非反応対照細胞 (灰色) を陰性対照として使用した。中央パネルでは、hCoV-EMC 感染細胞を NSP4 非構造タンパク質に対する抗血清により視覚化した。右パネルは、ウイルス感染後 0、20、40 時間の感染細胞培養上清中の hCoV-EMC RNA レベルを TaqMan アッセイにより定量し、ウイルスゲノム数に相当する TCID₅₀ として示した。エラーバーは標準誤差を示す。

細胞に強い結合性を示した。hCoV-EMC S1 のこれらの細胞に対する結合性は、それぞれの細胞の hCoV-EMC に対する感受性とウイルス感染細胞培養上清中のウイルスゲノムの検出結果と相関した (図 1)。hCoV-EMC S1 領域は、他の動物種細胞にも結合性を示したが、概してその反応性は SARS-CoV S1 と比較するとより限定されていた。

S1 に結合する細胞表面タンパク質を同定するため、Vero ならびに Huh-7 細胞から S1-Fc キメラを用いてタンパク質のアフィニティ分離を行なった。hCoV-EMC S1-Fc タンパク質により、Huh-7 細胞ライセートから非還元条件下で 110 kDa の分子量を示すタンパク質が抽出され、SARS-CoV S1-Fc タンパク質では抽出されなかった (図 2a)。質量分析により当該タンパク質は dipeptidyl peptidase 4 (DPP4, DPP IV または CD26) と同定された。同様の結果が、Vero 細胞を用いて得られた (data not shown)。著者らは、引き続き可溶性 (non-membrane-anchored) DPP4 と ACE2 を作製し、hCoV-EMC

S1-Fc タンパク質が DPP4 に特異的に結合し、逆に SARS S1-Fc タンパク質は ACE2 と特異的に結合する事を見出した (図 2b)。また、Vero 細胞の hCoV-EMC 感染は可溶性 DPP4 により抑制されたが可溶性 ACE2 では抑制されなかった。さらに、非感受性 COS-7 細胞にヒト DPP4 を一過性に発現させる事により、hCoV-EMC S1-Fc タンパク質結合感受性を COS-7 細胞表面に付与する事ができた。これらのデータは、hCoV-EMC S1 の直接かつ特異的なヒト DPP4 との結合を示している。

DPP4 タンパク質は、著者らが *P. pipistrellus* コウモリ細胞から得た DPP を含み、異種動物間でそのアミノ酸配列、特にカルボキシ末端が高度に保存されている。次に、著者らはヒト抗 DPP4 ポリクローナル抗体を用いて、感受性・非感受性細胞での DPP4 発現を解析した。抗 DPP4 抗体の特異的な反応性は、ヒトならびにコウモリ DPP4 をトランスフェクトした細胞での染色により確認し (図 3a)、コウモリ DPP4 を発現した COS-7 細胞表面での hCoV

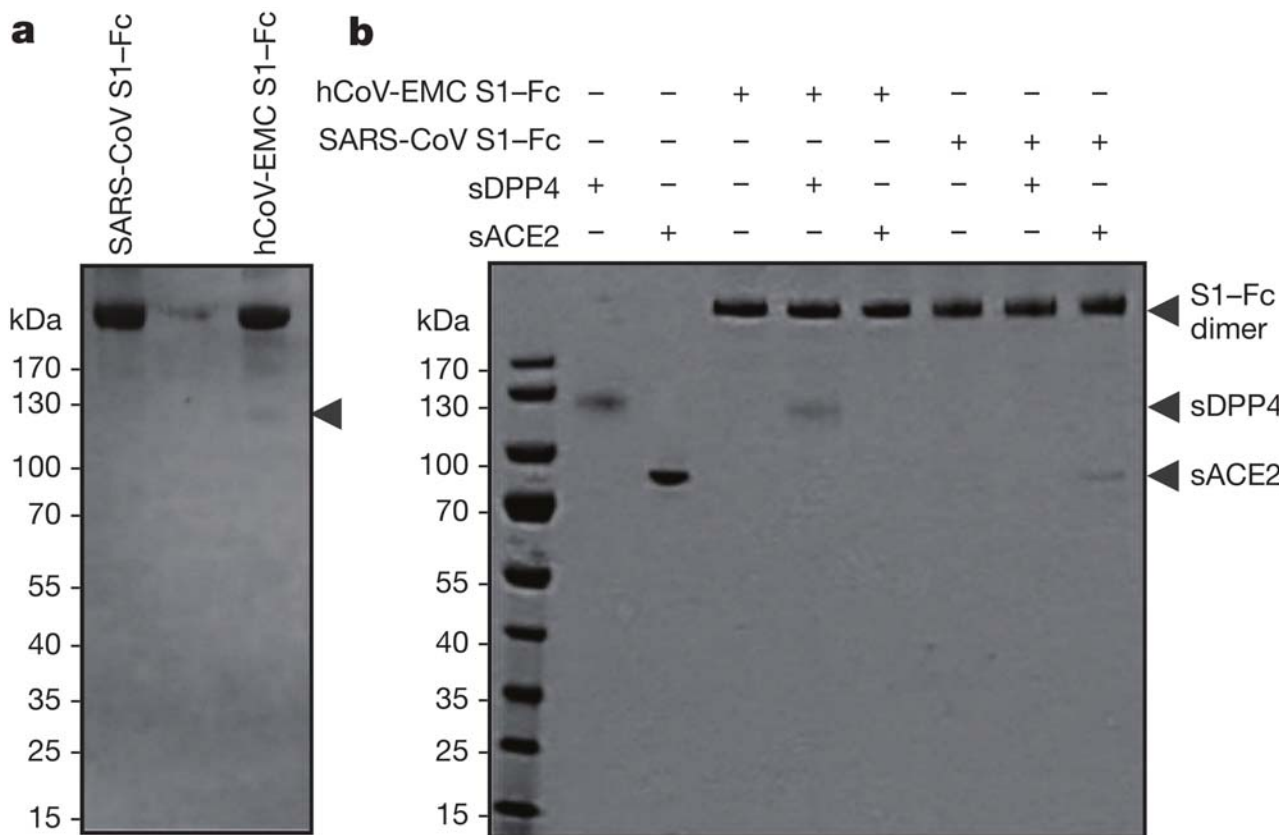


図 2 hCoV-EMC S1 の DPP4 結合

a. Huh-7 細胞ライセートを hCoV-EMC または SARS-CoV S1-Fc タンパク質とインキュベートし、アフィニティにより分離されたタンパク質を非還元条件下でタンパク質電気泳動を行なった。矢頭は hCoV-EMC S1-Fc タンパク質により特異的に分離された ~110 kDa の DPP4 タンパク質の位置を示す。b. hCoV-EMC と SARS-CoV S1-Fc タンパク質を可溶性 DPP4 (sDPP4)、可溶性 ACE2 (sACE2) またはモックとインキュベートした後、プロテイン A セファロースアフィニティ分離を経て、非還元条件下でタンパク質電気泳動を行なった。

-EMC S1-Fc の結合を検出した (図 3a)。hCoV-EMC 感染に対する感受性と hCoV-EMC S1-Fc タンパク質の細胞表面結合性に一致して、Vero ならびに Huh-7 細胞では高いレベルの DPP4 の細胞表面での発現が抗体の反応性から判定され、コウモリの細胞では低いレベルの抗体結合が認められたが、COS-7 細胞では有意な抗体の反応性は見られなかった (図 3b)。従って、細胞株における DPP4 の細胞表面発現は、hCoV-EMC 感受性と hCoV-EMC S1 の細胞表面結合性と相関した。DPP4 発現

がヒト初代気管支上皮培養細胞 (図 3c) ならびにヒト気管肺組織 (図 3d) において、非線毛細胞 (tubulin IV 陰性) の先端面で検出される事は、DPP4 発現と hCoV-EMC 感染の関連性をより強固にした。加えて、ヒト気管支上皮培養細胞での hCoV-EMC 感染は、DPP4 を発現する非線毛細胞に局在するようであった (図 3e)。

DPP4 がウイルス感染において本質的な役割を果たしているか確定するため、ウイルス感染前に感受性細胞をポリクローナル DPP4 抗血清で前培養を行

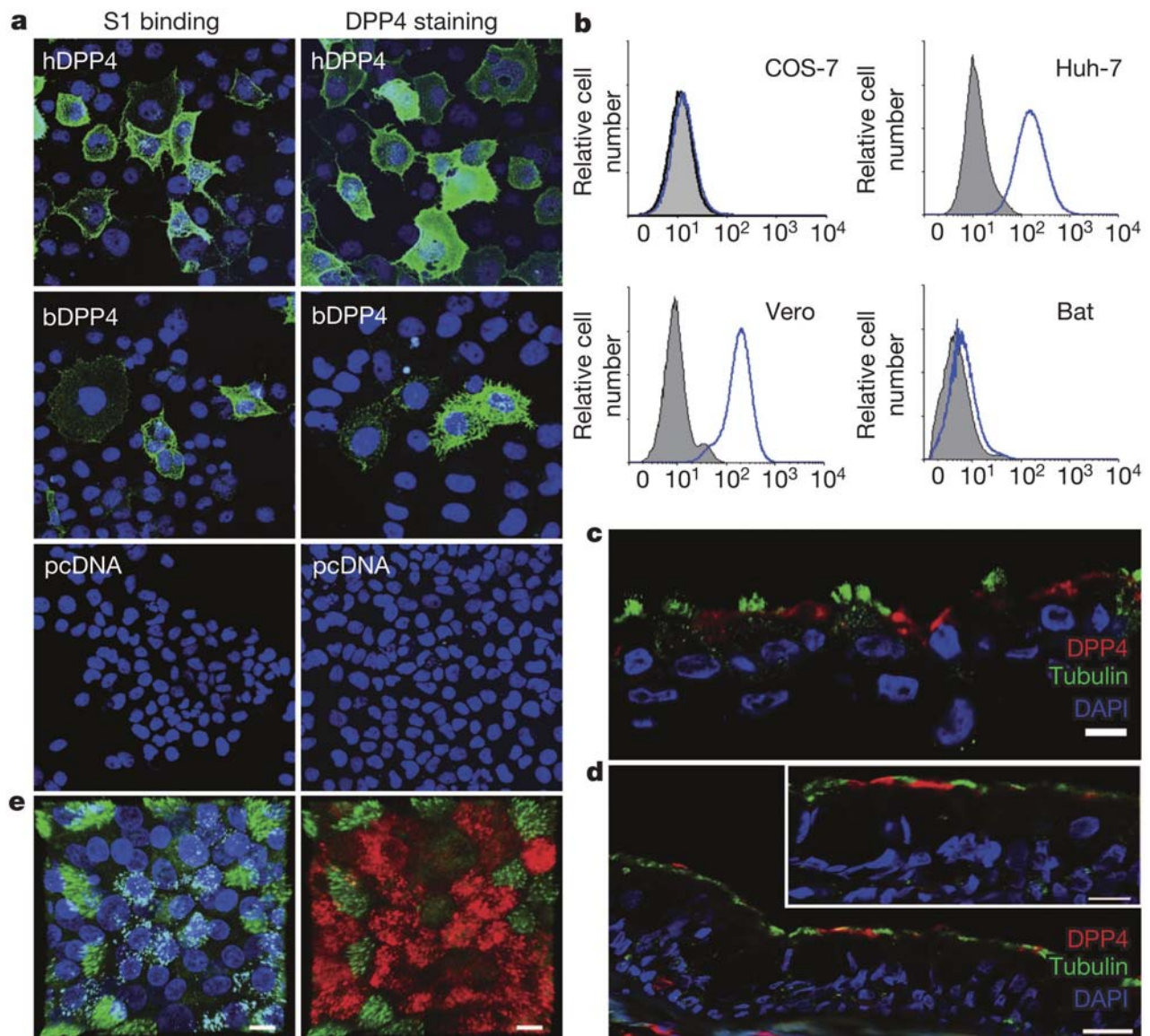


図 3 DPP4 は hCoV-EMC 感受性細胞株とヒト気管支上皮細胞に発現する

a. ヒト DPP4 (hDPP4)、コウモリ DPP4 (bDPP4) をコードするプラスミドまたは陰性対照プラスミドを導入した COS-7 細胞での S1 結合と DPP4 に対するポリクローナル抗血清による染色性を解析した。b. 同様に、COS-7、Huh-7、Vero およびコウモリ細胞の DPP4 に対する抗血清による反応性 (青線) または陰性対照正常ヤギ血清に対する反応性 (灰色) を解析した。c, d. DPP4 発現はヒト初代気管支上皮細胞培養 (c) とヒト気管支組織 (d) においても認められ、その発現は β -tubulin IV (緑) 陰性の非線毛細胞の先端側に局在するようであった。e. hCoV-EMC 感染初代ヒト気管支上皮細胞培養において、DPP4 を発現する非線毛細胞 (赤) に局在すると見られる 2 本鎖ウイルス RNA (青緑色) が検出された。免疫染色は、 β -tubulin IV (線毛細胞、緑)、DPP4 (赤)、二本鎖 RNA (hCoV-EMC、青緑色) と DAPI (細胞核、青) に対する抗体を用いて行なった。すべてのスケールバーは $10 \mu\text{m}$ 。

なった。抗血清によって Huh-7 細胞のウイルス感染、ウイルス産生ならびにウイルス誘導細胞障害が強く抑制されたが、対照血清または ACE2 抗体ではウイルス感染は抑制されなかった (図 4a)。加えて、ヒト気管支上皮細胞の感染は、DPP4 抗体によって用量依存的に阻止された (図 4b)。次に著者らは、DPP4 の発現が hCoV-EMC 感染に対する感受性を付与するか検討を行った。ヒト DPP4 発現プラスミドをトランスフェクションした COS-7 細胞は、効率的に hCoV-EMC に感染し、感染細胞内にウイル

ス非構造タンパク質 (図 4c)、培養上清中にウイルス RNA (図 4d) ならびに感染性ウイルスの存在が証明された。同様に、コウモリ DPP4 の COS-7 細胞での発現は、その効果は低いものの hCoV-EMC 感受性を付与した (図 4c)。異なる動物種 (ネコ、マウス、イヌ) の非感受性細胞にヒト DPP4 をトランスフェクションしても hCoV-EMC 感染を許容したが、hCoV-NL63、hCoV-229E、hCoV-OC43 等の他のヒトコロナウイルスはヒト DPP4 をトランスフェクションした細胞に感染できなかった。以上の

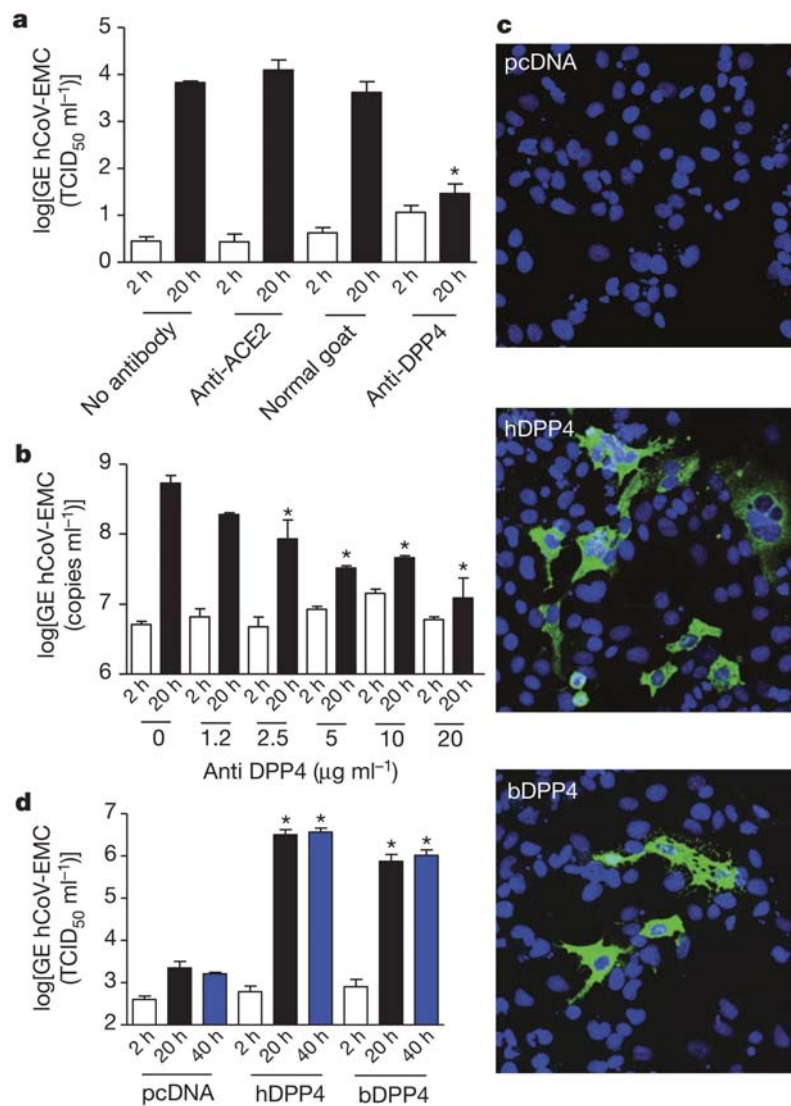


図 4 DPP4 はウイルス感染に必須である

a. DPP4 に対する抗体による Huh-7 細胞の hCoV-EMC 感染の抑制。ウイルス感染後 2 時間 (白) と 20 時間 (黒) の培養上清中の hCoV-EMC RNA を TaqMan アッセイにより解析した。3 試験の結果から得られた delta-Ct 値を示す (one-way ANOVA 検定、* $P < 0.05$; $n = 3$ /group)。b. ヒト初代気管支上皮細胞の感染は、DPP4 抗体により用量依存性に抑制される: 感染後 2 時間 (白)、20 時間 (黒) を示す (one-way ANOVA 検定、* $P < 0.05$; $n = 3$ /group)。c. ヒト DPP4 (hDPP4)、コウモリ DPP4 (bDPP4) をコードするプラスミドまたは陰性対照プラスミド (pcDNA) をトランスフェクションした COS-7 細胞を感染効率 (moi) 1 で hCoV-EMC に感染させ 1 時間培養した。細胞を 2 回洗浄しウイルス感染後 8 時間に染色を行ない (原倍率 $\times 200$)。d. ウイルス感染後 2 時間 (白)、20 時間 (黒)、40 時間 (青) の上清を採取し、TaqMan アッセイを用いて hCoV-EMC RNA を計測した。3 試験の結果から得られた RNA 量を TCID₅₀ 値に換算して示す (one-way ANOVA 検定、* $P < 0.05$; $n = 4$ /group)。全てのエラーバーは標準誤差を示す。

結果から、著者らのデータは、ヒト・コウモリ由来 DPP4 が hCoV-EMC の機能的なレセプターとして作用する事を証明した。

DPP4 は ACE2 と APN の次にコロナウイルスのレセプターとして同定された 3 番目のエキソペプチダーゼである。DPP4 は、細胞表面に 2 量体として存在する 766 アミノ酸からなる多機能のタイプ 2 膜貫通糖タンパク質で、ホルモンやケモカインのプロリンアミノ酸の後のジペプチドを優先的に切断する事により、これらの生理活性を制御する。APN と ACE2 のタンパク質分解活性がコロナウイルスの感染には重要ではない事から、コロナウイルスによるペプチダーゼの利用は、その酵素活性ではなく、ウイルス感染の主要組織である上皮・内皮系組織に豊富に存在する事に関連するようである。この考えに一致して、hCoV-EMC 感染は、DPP4 抑制剤である sitagliptin、vildagliptin、saxagliptin あるいは P32/98 によって阻止されない。DPP4 はまた、インクレチン (incretin、インスリン分泌促進因子) を分解する事によりグルコース代謝に主要な役割を果たし、更に T 細胞活性化、ケモタキシスの変調、細胞接着、アポトーシス、腫瘍原性の制御に係る事が示唆されている。ヒトでは、DPP4 は主に腎臓・小腸・肝臓・前立腺の上皮細胞と活性化リンパ球に発現しているが、循環血液中では可溶性として存在する。現時点において、hCoV-EMC は上部呼吸器スワブ、尿、唾液、気管吸引液からのみ検出されているが、*in vivo* におけるウイルスの細胞特異性はあまり理解されていない。DPP4 が非線毛気管支上皮細胞で発現しているという著者らの知見は、報告されている DPP4 の腎臓での発現と共に、hCoV-EMC 感染による臨床症状の発現部位と一致している。SARS-CoV を含むほとんどの呼吸器系のウイルスが上部ならびに下部気道で広範囲に分布する線毛細胞に強い細胞特異性を持つ事は、hCoV-EMC の細胞特異性に比較して特筆するべきであろう。

hCoV-EMC の疫学的な経緯ははまだ謎であるが、SARS-CoV ならびに hCoV-NL63 と同様にコウモリを起源として、中間保有動物種が存在するようである。DPP4 の種の進化における保存と hCoV-EMC がコウモリ DPP4 を機能的なレセプターとして使用する観点から、ウイルスの宿主動物種変換は驚く現象ではないだろう。ヒト ACE2 との結合性を

高める SARS-CoV S1 領域の適応性変異は、少なくとも人獣共通ウイルス伝播の一端を説明している。hCoV-EMC S1 と DPP4 の結合インターフェースの更なる解析は、本ウイルスの宿主適応プロセスまたは新規宿主において DPP4 をレセプターとして使用する関連コロナウイルスの存在を解明するかもしれない。

血清中の可溶性 DPP4 レベルの変動は、2 型糖尿病とウイルス感染を含む多くの病態生理学的コンディションに関連するという報告があり、変動する可溶性 DPP4 レベルの hCoV-EMC 病原性への関与を研究する事は重要である。肺の損傷における可溶性 ACE2 の保護的作用と一致して、SARS-CoV 感染後の ACE2 発現のダウンレギュレーションが、疾患の重篤度に影響する事が知られている。また、DPP4 がケモカイン・サイトカインの反応に重要である事から、hCoV-EMC レセプターの *in vivo* でのダウンレギュレーションがこのウイルスの病原性に影響を与える可能性が想定できる。しかしながら、*in vitro* の予備的な知見ではあるが、S1 の DPP4 結合による DPP4 の発現または酵素活性の有意なダウンレギュレーションは Huh-7 細胞では認められず、これはおそらく細胞膜での DPP4 の活発なりサイクリングに起因すると推測される。DPP4 発現レベルの操作または S1 領域とレセプターとの結合反応部位を標的とした阻害剤の開発は、hCoV-EMC 感染に対する治療機会を提供するだろう。将来的な研究としては、hCoV-EMC の DPP4 結合を阻害する抗体を誘導するような効果的なワクチンの研究開発を目指さなければならない。

方法の概要

hCoV-EMC 感染とその検出

hCoV-EMC ウイルスストックは以前報告された方法により調整した。Vero、COS-7、コウモリ腎細胞は、hCoV-EMC に 1 時間感作し、1% 牛胎児血清を含む培地で培養した。ホルムアルデヒド固定細胞は、hCoV-EMC と交差するウサギ抗 SARS-CoV NSP4 抗体を用い、通常のプロトコールに従い FITC 標識ブタ抗ウサギ二次抗体によって染色を行った。ウイルス増殖は定量的 PCR により定量した。

タンパク質発現

ヒト IgG の Fc 領域と融合した hCoV-EMC、SARS-CoV ならびに FIPV の S1 結合部位と可溶性 DPP4 と ACE2 は、方法全文に記載した方法により発現させ精製を行なった。

S1-Fc タンパク質を用いた DPP4 の細胞表面発現の測定

S1 の細胞結合は、 2.5×10^5 の細胞を $15 \mu\text{g/ml}$ の S1-Fc タンパク質と感作させた後、FITC または Dylight-488 標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体とインキュベートしフローサイトメトリーで解析を行なった。

紙面の都合上、参考文献、補足データ、方法全文は、割愛して掲載致します。

論文紹介

Mycoplasma hyopneumoniae : 疾病からワクチンまで

田 積 晃 浩

Mycoplasma hyopneumoniae : From disease to vaccine

Simone Simionatto, Silvana Beutinger Marchioro, Dominiek Maes, Odir Antonio Dellagostin

Veterinary Microbiology 165 : 234–242, 2013.

要約

Mycoplasma hyopneumoniae は世界中の養豚産業に影響を及ぼす、豚流行性肺炎の病原体である。ワクチン接種はこの疾病の管理や予防のために費用対効果の高い方法である。*M. hyopneumoniae* 感染症を制御しようと試みるにもかかわらず、養豚産業では深刻な経済的損失は収まらない。ゲノム情報を基にした研究結果より、*M. hyopneumoniae* の生物学的特性や病原性を理解するために役立つ情報が得られ、より効果的なワクチンや診断検査の開発に寄与している。この総説では、病原性や制御手段にまつわる *M. hyopneumoniae* の特徴について論じたい。

1. 序文

呼吸器病は養豚産業界で最も重要な衛生問題であ

る。*M. hyopneumoniae* は豚における慢性呼吸器病である流行性肺炎 (enzootic pneumonia; EP) の主要な病原体である。この感染症は世界中の殆どの地域に高い割合 (38–100%) で存在し、*M. hyopneumoniae* の感染症は深刻な経済的損失を引き起こす。

M. hyopneumoniae が気道の線毛上皮細胞に定着することで、その細胞が傷害され、感染した豚は2次病原体の侵入を起こしやすくなる。上皮細胞への傷害は、過酸化水素やスーパーオキシドラジカルのようなマイコプラズマの毒性の代謝産物によっても引き起こされる。豚は終生にわたり感受的であるが、特に肥育時の終末期に最も発症する。しかし、免疫を持たない群においては、離乳豚や繁殖豚も含めて全ての時期に病気を発症する。

M. hyopneumoniae によって引き起こされる感染症を診断するために、様々な手法が使用されている。

臨床症状や病理学的変化は EP の推定的診断であり、確証診断のためには臨床検査が必要とされる。*M. hyopneumoniae* の培養は診断の至適基準ではあるが、この手法は日常的には使われていない。これは、Friis 培地による病原体の分離が非常に困難であるといった理由がある。加えて、他のマイコプラズマ種の存在が、*M. hyopneumoniae* の発育を減少させる事により、更に分離を困難なものへとする。潜在的に感染している動物から *M. hyopneumoniae* が培養できなかったからといって、その群内での感染を否定することはできない。免疫蛍光 (Immunofluorescence ; IF) 試験もまた頻繁に実施されている。血清学的検査は群の健康状態を観察するのに使用されるが、これは個々の動物の診断には適さない。近年では、*M. hyopneumoniae* 感染症の診断には PCR 検査が最も感度の高い技術である。

EP の制御には管理方法や飼育条件の最適化、抗生物質の使用及びワクチン投与に重点をおくべきであろう。アジュバントを含む不活化された *M. hyopneumoniae* の全細胞溶解物を成分とする市販ワクチンが複数存在し、世界中で使用されている。これらのワクチンは臨床症状を軽減させる事に効果的に働いているが、病変の形成に対する効果はあまり得られない。

この総説では *M. hyopneumoniae* の病因や病原性に関する性状及び制御対策について論じたい。特にポストゲノム時代に提案されてきたワクチン接種法の戦略に重点をおきたい。

2. 病因性

マイコプラズマはモリキューテス綱に属し、細胞の小ささや細胞壁の欠如によって他の細菌と表現型的に区別されている。マイコプラズマと他の細菌の間には根本的な違いがあるにもかかわらず、多くの分子生物学的なマイコプラズマの特性はグラム陽性細菌に類似している。マイコプラズマは自由生活し、自己複製能を有する最小の微生物である。マイコプラズマは高い A+T 含有量 (約 70%) の小さなゲノム (580–1350 kb) を持っている。ゲノム配列が解析された豚のマイコプラズマ (J、232、7447 及び 168 株) はその殆どが *M. hyopneumoniae* である。

その小さなゲノムのため、マイコプラズマは代謝

に限界を持ち、更に生合成経路を殆ど持たない。それらの生合成経路の欠如は、マイコプラズマが発育環境中から、アミノ酸、プリンとピリミジン及び膜構成物を得る必要があるということの意味している。更に、*in vitro* の培養は非常に困難であり、殆どのマイコプラズマ種は培養することができない。*M. hyopneumoniae* は *in vitro* で培養することが可能であるが、培地への血清の添加を必要とし、Friis 培地で増殖させられる。*M. hyopneumoniae* の培養と分離は非常に困難で手間がかかり、しばしば成功しない。そのため、*M. hyopneumoniae* の分離は日常的な診断には用いられない。更に、*M. hyorhinis* (豚の気管に存在する) や *M. flocculare* (形態学、増殖性及び抗原性の観点で *M. hyopneumoniae* に似ている非病原性の種) のような他のマイコプラズマによるコンタミネーションが頻繁に生じる。

マイコプラズマの気難しい性質や遺伝系の欠如は、マイコプラズマのタンパク質の構造や機能を解明しようとする生物学的な理解を妨害する。マイコプラズマ種は宿主の免疫応答による検出や排除を回避するための手法を発達させてきた。ある研究では *M. hyopneumoniae* の複雑な転写機構が報告され、そして未だ理解されていない転写調節に関与する機構の存在が示唆された。*M. hyopneumoniae* は接着や宿主の免疫機構の調節が可能なアドヘジン (adhesin)、モジュリン (modulin)、アグレシン (aggresin) 及びインペジン (impedin) を産生することができる。更に、*M. hyopneumoniae* の表面抗原は膜を貫通するように存在している事が明らかとされている。*M. hyopneumoniae* は選択的にその分泌タンパク質を切断することで、表面構造を変化させることも病原性の 1 つである。

分子技術によって、*M. hyopneumoniae* にはゲノミクスやプロテオミクスのレベルで大きな相違があることが示された。また、Vicca らは実験感染の結果より得られた低、中、高病原性の株間にもそれらの違いがある事を示している。Villarreal らは *M. hyopneumoniae* の低病原性株の感染は、高病原性株の感染や発症を防御しないことを示した。しかし、これら株間の臨床的意義の違いを精査する事は今後必要である。

3. 病原性

M. hyopneumoniae は豚にのみ感染する宿主特異的病原体である。*M. hyopneumoniae* の病原性や特に病原因子は未だよく知られていない。*M. hyopneumoniae* は感染動物の咳からの飛沫感染によって蔓延する。*M. hyopneumoniae* は吸入に際して、粘膜毛様体のエスカレーターやグリコシル化ムチンの密な層に打ち勝たなければならない。これらは、細菌の定着に際して表面の複合多糖や細胞外マトリックス成分を利用する細菌の接着因子へのおとりとして産生されている。*M. hyopneumoniae* は呼吸器の線毛上皮に接着し、まず初めに線毛運動障害、線毛の破壊及びおそらく上皮細胞死を引き起こす。

呼吸器線毛組織での生物の接着、遷延性炎症反応の刺激、自然免疫や適応免疫応答の抑制と調節は、この生物の定着や感染における重要なステップであると認識されている。その結果、感染した動物は他の呼吸器系の病原体の感染に対して感受性が高まる。

この線毛への正確な接着様式は、まだ完全には明らかにされていない。既にいくつかの接着に関わるタンパク質が明らかにされている。*M. hyopneumoniae* の P97/P102 ファミリーに属する多機能性接着因子は Mhp182 (P102)、Mhp183 (P97)、Mhp493 (P159)、Mhp494 (P216)、Mhp683 (P135)、Mhp271、Mhp107 及び Mhp108 (P116) を含む。これらの接着因子は液体培養中、更に *in vivo* の実験感染した豚体内でも発現している。P97、P216、P102、Mhp271、Mhp107 及び Mhp683 の断片が豚の線毛へ結合することが報告されている。P97 は *M. hyopneumoniae* で初めて接着因子として同定された。P97 は気管上皮細胞の線毛に存在しているレセプターとして認識されており、病原因子と考えられている。R1 と同定されている P97 の C 末端の一部は線毛への結合を担っており、8 個の R1 リピードが線毛結合に必須である。このアミノ酸リピードの追加や削減に伴う変異は、免疫機構による認識を干渉するタンパク質をつくりだすかもしれない。しかし、他の因子やタンパク質もまた接着に必要である。

P102 タンパク質は P97 と同一のオペロンの 1 つであり、その発現は線毛への病原体の結合に関与しているとされているが、*in vivo* の感染中でも発現

しているため、病原性にも関与していると推察されている。これらの発見以外には、P102 の役割やそのパラログは未だ明確にはされていない。Seymour らは *M. hyopneumoniae* 232 株において、広範囲に発現している P102 のパラログである P116 タンパク質の表面での発現やタンパク質プロセシングの解析を行った。その結果、このタンパク質は *M. hyopneumoniae* 感染症の過程に伴う多機能性の病原性決定因子であると示唆された。更に彼らは、P102 は多様な結合能を持つタンパク質であり、*M. hyopneumoniae* の表面にプラスミノーゲンとフィブリノーゲンを補充するというを示した。

実際に、P102 と P97 は *M. hyopneumoniae* の細胞表面にプラスミノーゲンとフィブリノーゲンの供給を可能とする多岐の結合能力を有するタンパク質である。*M. hyopneumoniae* の表面へのプラスミノーゲンとフィブリノーゲンの結合は、量依存的でそして飽和状態であり、P102 や P97 のこれら 2 つのタンパク質は感染機構の中で重要な標的でもある。プラスミノーゲンは豚の肺の気管支肺胞液中で大量に存在しており、哺乳動物のプラスミノーゲンの活性化物質によるプラスミンへの変換が促進される過程で、*M. hyopneumoniae* はプラスミノーゲンを結合する表面受容体を提示している。従って、線毛上皮に定着している *M. hyopneumoniae* は、自身の細胞表面上にプラスミノーゲンを隔離し、プラスミンへの変換を促進しているようである。この過程は組織侵入性や全身性の感染への効果をもたらしている。*M. hyopneumoniae* は主に呼吸器の病原体ではあるが、複数の研究によって、体内の複数の臓器からも分離されることが報告されている。これはリンパや血流を介して行き渡っているのかもしれない。この病原体は実験感染させた豚やその接触豚の肝臓、脾臓及び腎臓からも再分離され、そして *M. hyopneumoniae* の DNA も同一組織から検出された。しかしこの体内での広がりは一時的なものであり、EP の進展に伴うものではないようである。

M. hyopneumoniae は免疫機構を乱す効果を持っている事が知られているが、その実態はよく解っていない。*M. hyopneumoniae* によって刺激された肺胞マクロファージやリンパ球は、肺病変やリンパ組織過形成の原因である炎症性サイトカインを産生する。これは病変が進行することへの免疫応答の関与

を示唆している。一般的にマイコプラズマは宿主の自然防御から逃れる能力を有している。多くの病原体は表面抗原を変える遺伝的機構を使用することが知られており、それ故に宿主の免疫応答から逃れ、慢性的な感染を可能としている。

3株の *M. hyopneumoniae* のゲノム解析と比較解析は、病原性への関与が示唆される株特異的な領域を同定することを可能とした。Integrative conjugal element (ICE) は病原性を有する2株 (7448 及び 232) に存在していることが明らかとなった。この結果より、ICE は遺伝的組換え現象と病原性に関与している mobile DNA element である可能性が示唆された。更に、*M. hyopneumoniae* の感染中に免疫機構によって認識されるタンパク質が数多く報告されており、それらは生理的機能及び病原性への関与の両方あるいは一方に重要な役割を果たしているかもしれない。感染中におけるこれらの抗原の役割とこの生物の病原性のメカニズムを解明することは今後の研究課題であろう。

4. 管理方法

M. hyopneumoniae によって引き起こされる感染症は、管理方法の最適化、バイオセキュリティ、飼育条件及び抗生物質やワクチンの使用等の併用によって制御することが可能である。管理方法の向上はこの感染症を制御するうえでは最も重要であり、特に *M. hyopneumoniae* が検出された場合には第一に講じられるべき対策である。

テトラサイクリンやマクロライドのような抗生物質は EP のような呼吸器病の治療によく使用される。病原体が気管の表面に定着しているため、気管の粘膜や分泌液中で高い濃度に達した抗生物質だけが、*in vivo* で効果を発揮することが可能となる。効果的な抗生物質で治療された豚では、臨床症状や肺病変及び2次感染が軽減される。*M. hyopneumoniae* の感染症を制御するために薬剤治療プログラムを実施しているにも関わらず、しばしば部分的な防御しか達成されないことがある。この現象は、治療を終了した際にアウトブレイクが起こるといったことに矛盾しているかもしれない。予防的または戦略的な豚の薬物療法は抗生物質耐性の発生を防ぐために可能な限り最小限に抑えることもまた必要であろう。

アジュバントを含む不活化全菌体のワクチン (単独または抗生物質との併用) は世界中で *M. hyopneumoniae* の制御のためによく利用されている。アメリカ合衆国の85%以上の群において、*M. hyopneumoniae* に対するワクチン投与が行われている。ワクチン投与の効果は多くの研究によって証明されている。ワクチン投与は感染豚に有益な効果をもたらすが、これらの効果は豚群によって様々である。その違いは感染レベル、感染の時期、感染している *M. hyopneumoniae* の株やその他の複雑な因子によって生じている。しかし、ワクチン投与はこの感染症を制御するための最も効果的な療法であると現在も考えられている。この *M. hyopneumoniae* ワクチンを投与することの主な利点は、体重増加率 (2-8%) や飼料要求率 (2-5%) の向上、飼養期間の短縮、臨床症状と肺病変の軽減及び治療経費の削減である。

現在、世界中で市販されている *M. hyopneumoniae* のワクチンは感染症を制御するための重要な手段である。しかし前述のように有益な効果があるにも関わらず、このワクチンは部分的な防御性しか付与できず、上皮細胞への *M. hyopneumoniae* の定着を阻止することができない。近年の市販ワクチンは気管内における微生物の数を減らし、結果的に個体や、運がよければ群内の感染レベルを低下させられることを多くの研究が証明している。ワクチン投与は臨床症状や肺病変を顕著に軽減するが、*M. hyopneumoniae* の伝播を減少させることには限界がある。これらの発見は、ワクチン投与単独では豚群内の *M. hyopneumoniae* を排除することや好ましい結果に達するには不十分であるという事を裏付けており、ワクチン投与は前述のような他の管理システムと併用して実施すべきである。

ワクチン投与の異なった戦略 (単回や2回投与のワクチン投与プロトコル) は、特に農場のニーズや生産システム、群のタイプ、感染パターン、養豚家の選好に依存して採り入れられてきた。ワクチンを投与するか否かの決定は、農場での採算性やワクチンの使用がこの感染症によって生じる経済損失へもたらす効果に依存している。*M. hyopneumoniae* に対するワクチンは広く使用されているにも関わらず、病原体の伝播への効果や異なった株への効果、免疫応答への効果等のような面で明瞭にされていないこ

とが多くあり、更なる研究が必要である。一方で、粘膜抗体や全身免疫応答がこの感染症の制御に重要であると示唆する研究もある。2つの市販されているワクチンは血清中に特異的な抗体の産生を誘導するけれども、その抗体応答は両ワクチン間で異なっている可能性もあり、更に動物間における血清陽転率は30-100%といった違いがある。特異的抗体の誘導と肺炎に対する防御の関係性は明確にされていない。豚を用いた攻撃実験では、血清中の抗体濃度と *M. hyopneumoniae* に対する防御性は相関しないことが示されている。それ故に、血清中の抗体の有無や濃度は防御免疫を評価する最善の方法であるとはいえない。

全ての入手可能な市販の *M. hyopneumoniae* ワクチンは、死滅させた培養菌体（バクテリア）から造られており、懸濁された菌体内にそれぞれ異なったアジュバントを含んでいる。アジュバントはそれぞれ異なった特質を持っているが、一般的に外来の物質（抗原）に対する免疫応答を刺激し活性化させる。アルミニウム塩のようないくつかのアジュバントは比較的マイルドと考えられている。一方で、オイルを基にしたアジュバントは通常エマルジョン（オイルと水の混合）を形成しており、より強い反応性と長い持続性が特徴である。市販ワクチンにおけるアジュバント成分の違いは、免疫応答の誘導の種類や防御のレベルに影響を及ぼしているであろう。

近年の EP を制御するために使用している市販ワクチンは、殆どがもともとはイギリスのある豚群から分離された J 株を基にしている。しかし、ここでこの株は世界中の他の豚群で蔓延している *M. hyopneumoniae* の株に類似した特徴を有しているのかといった疑問が生じてくる。野外条件下でのワクチン効果に見られる多様な結果は、この様な豚群で蔓延している株とワクチン株間での抗原性の違いによるものかもしれない。

ワクチン投与の効果とは別に、母子細胞性免疫や新生豚の防御に關与する抗体の役割もまた完全には解明されておらず、能動免疫への干渉に関して理解する必要がある。母子抗体がワクチン効果に干渉するか否かの問題にかかわらず、ある研究で約1週齢の豚に *M. hyopneumoniae* バクテリアを1回投与したところ、強毒株による攻撃での肺病変の軽減と長期間の防御免疫の誘導が確認されたといった報告が

ある。早期のワクチン投与は、離乳時期前後で抗体陽転するように計画すべきである。その時期は異なる母豚由来の豚が一緒にされ、そして初めて感染性の攻撃に直面する時であり、更に様々な重篤な肺炎因子に暴露されるリスクが増す時である。Meynsらは保育期の6週間で豚は感受性が増し、感染するのであると推察している。これらの結果は、早期の制御戦略の重要性を強く支持している。

5. 新規の実験的ワクチン

現行のワクチンはバクテリアを基に構成されているが、それらの効能には疑問が残る。これらのワクチンは、*in vitro* での *M. hyopneumoniae* の培養が難しいといった理由から、生産コストが非常に高い。そのため、EP に対してより効果的で低コストのワクチンを開発する必要がある。組換え DNA 技術は市販ワクチンのこの問題を解決するために利用することが可能である。*M. hyopneumoniae* 4株のゲノムの塩基配列が決定されてきたが、候補ワクチンとして評価された組換え抗原は殆どない。この病原体のゲノムは小さく、分泌タンパク質や表面タンパク質は限られているため、リバースワクチン学的手法には好都合である。しかし、*Mycoplasma* 種は特殊な遺伝的コードを使用している。アミノ酸のトリプトファンは、多くの生物で利用される TGG ではなく、一般的に終始コドンである TGA によってコードされている。この違いは、組換えタンパク質を生産するために最も魅力的なシステムである大腸菌内での遺伝子発現を *M. hyopneumoniae* の TGA コドンは阻害する。しかし、TGA を TGG に置換させる変異によってこの問題を解決することができる。Simionattoらは *M. hyopneumoniae* からの14個の遺伝子を対象に、PCR法により TGA コドンのサイトダイレクト変異を実施し、大腸菌内でのこれら遺伝子のクローニングと発現を可能にした。

M. hyopneumoniae の感染症に対してより防御能の高い新規ワクチンを開発しようとする研究に絶え間ない努力が向けられている。EP に対するより効果的なワクチンを開発しようと、*M. hyopneumoniae* の投与方法や剤型の異なった組換えタンパク質の評価が様々な研究によって行われてきた。それらの組換えタンパク質や、その他には弱毒化された細菌やウ

ウイルスに付随されたもの、粘膜アジュバントと融合されたものが個別に開発され、更にそれら抗原の混合化もまた研究されてきた。これらの内いくつかの組換えタンパク質は豚での実験的な攻撃試験で使用されているが、殆どのものはマウスでのみ評価されている。これらの抗原によって誘導される免疫には相違がみられ、それはワクチンの構成物や投与経路、正しいホールディング及び翻訳後修飾の両方あるいは一方の違いによって生じた抗体産生に依存しているのかもしれない。しかしこれらの研究は、これらの新規ワクチンのアプローチが、新たな EP 制御戦略に経済的な意義をもたらす可能性を示唆した。表 1 には、これまでに試験的な *M. hyopneumoniae* ワクチンの研究で使用されてきた抗原、アジュバント、ベクター及び経路を要約した。

M. hyopneumoniae の重要な接着因子として同定されている P97 アドヘジンタンパク質は、最もよく研究されており、*M. hyopneumoniae* に対する防御能を有する抗原であると考えられている。P97 アドヘジンに関しては様々な研究によって、異なった剤型のワクチンが試験されてきた。King らは P97 アドヘジン組換えタンパク質を基にしたサブユニットワクチンは豚において顕著な防御を誘導しなかったと報告した。しかし、P97 の C 末端 (R1) 領域を *Pseudomonas toxin A* と融合した際に、免疫された

マウスと豚は R1 に対する特異的な免疫応答を誘導した。P97 タンパク質を発現する組換え *Erysipelothrix rhusiopathiae* 株の経口ワクチンは、*M. hyopneumoniae* の感染による肺病変を軽減した。これは *E. rhusiopathiae* は豚の免疫系への外来抗原のワクチンベクターと成り得ることを意味しているのかもしれない。

ワクチンにおける抗原とは別に、免疫時のアジュバントや投与経路もまた防御には重要な役割を果たす。粘膜アジュバントや鼻腔内ワクチンは、粘膜免疫を増強させ得る新たな手法として注目されている。Conseicao らはアジュバントである大腸菌の易熱性エンテロトキシンの B サブユニットと融合した P97 の R1 サブユニット (rLTBR1) を含む非経口性の組換えサブユニットワクチンはマウスにおいて R1 に対する全身性および粘膜免疫を誘導すると報告した。Shimoji らは、P97 の R1 領域を発現する *E. rhusiopathiae* の弱毒株の Y-19 を用いて鼻腔内免疫を行った際に、攻撃に対して肺病変の軽症化が認められたことを報告した。しかし、そこでは液性や細胞性免疫応答は確認されなかった。更に、Okamba らは、P97 の C 末端領域を発現する不完全アデノウイルス (rAdP97c) を用いて、鼻腔内に免疫したマウスが全身性の Th1/Th2 免疫応答と局所免疫を産生したことを報告している。これに関しては豚にお

表 1 *M. hyopneumoniae* に対する実験的ワクチンの概要

Antigen	Kind of vaccine	Vector/adjuvant	Specie	Route	Challenge infection	Reference
P97	Recombinant Subunit	Freund's	Pig	IM ^b	Yes	King et al. (1997)
NrdF (R2)	Recombinant Vector	<i>Salmonella typhimurium</i> aroA SL3261	Mice	Oral	No	Fagan et al. (1997)
P97 (R1)	Recombinant Vector	<i>Pseudomonas</i> exotoxin A	Mice and pig	SC ^c and IM	No	Chen et al. (2001)
NrdF (R2)	Recombinant Vector	<i>Salmonella typhimurium</i> aroA SL3261	Pig	Oral	Yes	Fagan et al. (2001)
P42	DNA	pcDNA3	Mice	IM	No	Chen et al. (2003)
P97 (R1R2)	Recombinant Vector	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> YS-1	Mice and pig	SC and IN ^d	No	Shimoji et al. (2003)
P97 (R1)	Recombinant Vector	<i>Salmonella typhimurium</i> aroA CS332	Mice	Oral	No	Chen et al. (2006a)
NrdF (R2)	Recombinant Vector	<i>Salmonella typhimurium</i> aroA CS332	Mice	Oral	No	Chen et al. (2006b)
P97 (R1)	Recombinant Subunit	LTB	Mice	IM and IN	No	Conseicao et al. (2006)
P97 (R1)	Recombinant Vector	Adenovirus	Mice	IM and IN	No	Okamba et al. (2007)
P97 (R1R2)	Recombinant Vector	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> Koganei	Pig	Oral	Yes	Ogawa et al. (2009)
P97 (R1)	Recombinant Vector	Adenovirus	Pig	IN	Yes	Okamba et al. (2010)
P36	Recombinant Vector	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> SLW36	Mice	IM	No	Zou et al. (2011)
34 ^a	Recombinant Subunit	Aluminun	Mice	IM	No	Simionatto et al. (2012)
P37, P42, P46, P95	Recombinant Subunit and DNA	Aluminun and pcDNA3	Mice	IM	No	Galli et al. (2012)

^a 34 previously uncharacterized recombinant proteins of *M. hyopneumoniae* were evaluated in this study.

^b Intramuscularly;

^c Subcutaneously;

^d Intranasal.

いても市販ワクチンとの比較実験が実施されており、rAdP97c は炎症性の応答と気管での *M. hyopneumoniae* の数を顕著に減少させた。更に体重の平均増加率も僅かに向上した。しかし、バクテリアを基にした市販ワクチンの方がより効果的な防御免疫を産生していた。これらの結果は、この抗原によって産生される免疫の種類は、ワクチンの構成物や、免疫の経路、使用されたアジュバントまたはベクターの違いに影響される可能性を示唆している。

M. hyopneumoniae の P97 の R1 領域または ribonucleotide reductase (NrdF) の R2 サブユニットを所有している *Salmonella typhimurium* aroA CS332 を経口的に免疫されたマウスにおいて、液性または粘膜性の免疫応答はなかったが、Th1 の免疫応答が確認された。しかし、NrdF R2 サブユニットが *S. typhimurium* aroA SL3261 で発現された際には、粘膜免疫応答がマウス内で確認された。免疫された豚を使用した際には、この抗原は実験的な *M. hyopneumoniae* の感染によって引き起こされる肺病変を軽症化させることができた。

組換えサブユニットワクチンの他にも、マウスにおける DNA ワクチンの免疫応答の研究が行われている。熱ショックタンパク質を基にした DNA ワクチンに対する顕著な免疫応答が確認されている。マウスにおけるこの DNA ワクチンの免疫は Th1 と Th2 の両方の免疫応答を誘導し、更に、免疫された動物からの抗血清は *M. hyopneumoniae* の発育を阻止することが明らかとされた。同様の結果は、P48 抗原を用いた DNA ワクチンでも報告されている。マウスにおいて、INF- γ レベルの上昇を伴った Th1 及び Th2 両方の免疫応答が確認されている。以上のように、DNA ワクチンは EP に対するより効果的なワクチン開発の将来有望な戦略になり得るであろう。

それら抗原の免疫学的特性や肺病変の軽症化があるにも関わらず、市販ワクチンと同等またはそれ以上の防御力を持つものはまだ確認されていない。多価ワクチンは他のものと比較すると *M. hyopneumoniae* に対して優れた防御能を示している。DNA 及びタンパク質ワクチンとして *M. hyopneumoniae* の 5 つの抗原 (P97、P97R1、NrdF、P36 及び P46) の解析が行われた。DNA ワクチンとしてこれらの混合抗原を免疫されたマウスの血清中には P97 と P36

だけの IgG が産生されることが証明された。DNA ワクチンとして抗原 (P97、P97R1、NrdF、P36 及び P46) の混合物の筋肉内への免疫は、抗体応答が抗原依存的であると同時に、Th1 免疫応答を誘導した。同じ抗原を組換えサブユニットワクチンとして皮下免疫した場合、液性と Th1 免疫の応答が誘導された。DNA 及びサブユニットワクチンを併用した場合、液性と Th1 の両方の応答が確認された。更に、市販ワクチンを免疫したマウス血清中には P97 に対する抗体は認められず、これは不活化全菌体ワクチン内にはこの抗原の発現が欠如していることを意味しているのかもしれない。

M. hyopneumoniae のタンパク質の免疫原性の同定や性状を解析することは、ワクチンの改良のために重要な手法である。マイコプラズマの特殊なコドンは難問ではあるが、Simionatto らおよび Marchioro らは大腸菌内での *M. hyopneumoniae* の遺伝子のクローニングと発現を既に報告している。宿主免疫応答の主要な標的であり、宿主の組織への接着や傷害等の相互作用に関連している表面または分泌型の 34 個の *M. hyopneumoniae* 遺伝子に関する抗原性や免疫原性が研究されている。マウスで試験されたそれらの抗原のいくつかは *M. hyopneumoniae* に対する効果的なワクチンの可能性を示した。マウスの免疫応答は単純には他の動物種に置き換えて考えることは出来ないが、これらの結果は組換えサブユニット抗原として将来有望なワクチンの開発を助長するものである。

現在、市販されているワクチンより優れた制御能を持つワクチンの実用化には、まだ多くの障害があるけれども、それらのワクチンの大部分は実験的及び野外環境下の豚で評価されなければならない。現在までに、実際に豚を使用した実験的な *M. hyopneumoniae* の攻撃試験は僅かであり、それらでは肺炎の病変部を軽症化させるといった部分的な防御しか確認されていない。

6. 結論と展望

豚の健康改善に結びつく管理方法の最適化や飼育環境の改善と同時に、戦略的な治療及びワクチン投与の両方あるいは一方を行うことでは *M. hyopneumoniae* による感染の排除を保証することはできない。それ

らは経済的観点からは有益であるけれども、この感染症の継続的な制御はもたらされない。

市販されているワクチンは *M. hyopneumoniae* の感染症を限局化するために使用されているが、その正確な防御機構は殆ど知られていない。より効果的なマイコプラズマに対するワクチン開発が試みられており、組換え DNA 技術によるワクチンは有望な代替物の可能性を示している。更に、宿主の免疫応

答を研究することが、防御や病変の軽症化の両方に働く免疫応答の役割を理解するために必要である。今後の研究では、新たな候補ワクチンの効果は豚を使用して評価し、それらの作用機序を解明することが重要であろう。

紙面の都合上、参考文献は割愛させて頂きました。

学会発表演題 (2012 年 4 月～2013 年 3 月)

●第 59 回日本実験動物学会総会

期 日：2012 年 5 月 24 日～5 月 26 日

開 催 地：別府国際コンベンションセンター (大分県別府市)

発 表 演 題：NIBS 系体細胞クローンミニブタ胚の体外培養における発生率の改善

○島津美樹、堀井渉、佐野順一、齋藤敏樹、布谷鉄夫 (日生研)

発 表 演 題：充電可能なテレメトリー送信機を用いた NIBS 系ミニブタにおける心電図記録とその評価

○堀井渉¹、片桐公一¹、桑原正貴²、佐野順一¹、齋藤敏樹¹、土井邦雄¹、布谷鉄夫¹ (¹ 日生研、² 東京大学大学院農学生命科学研究科比較病態生理学教室)

●22nd International Pig Veterinary Society Congress

期 日：2012 年 6 月 10 日～6 月 13 日

開 催 地：国際コンベンションセンター (大韓民国、濟州島)

発 表 演 題：Development of an enzyme-linked immunosorbent assay of using lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 15 as antigen for serological diagnosis in experimentally infected pig herds.

○Jina Lee、Ho To、Nobuyuki Tsutsumi、Akira Iwata (Nippon Institute for Biological Science)

●第 39 回日本毒性学会学術年会

期 日：2012 年 7 月 17 日～7 月 19 日

開 催 地：仙台国際センター (宮城県仙台市)

発 表 演 題：NIBS 系ミニブタの腎機能に関する基礎データ

○片桐公一^{1,2}、堀井渉¹、小野珠乙³、佐野順一¹、上塚浩司¹、齋藤敏樹¹、土井邦雄¹、布谷鉄夫¹ (¹ 日生研、² 信州大学大学院総合工学系研究科、³ 信州大学農学部食料生産科学科)

発 表 演 題：ウサギにおけるイヌ G-CSF の影響

○泉幸子、齋藤敏樹、上塚浩司、山元哲、岩田晃、土井邦雄 (日生研)

●第 154 回日本獣医学会学術集会

期 日：2012 年 9 月 14 日～9 月 16 日

開 催 地：岩手大学 (岩手県盛岡市)

発 表 演 題：高齢の台湾小耳種豚でみられた副腎髄質の増殖性病変の病理学的解析

○上塚浩司¹、鈴木敬之¹、富岡ひとみ¹、チェンバース・ジェームズ²、内田和幸²、中山裕之²、土井邦雄¹、布谷鉄夫¹ (¹ 日生研、² 東京大学獣医病理学教室)

●動物用ワクチン-バイオ医薬品研究会 2012 年秋 総会・シンポジウム

期 日：2012 年 9 月 14 日

開 催 地：岩手大学（岩手県盛岡市）

発 表 演 題：鶏大腸菌症生ワクチンの投与方法について

○永野哲司（日生研）

●第 16 回日本ワクチン学会学術集会

期 日：2012 年 11 月 17 日～11 月 18 日

開 催 地：パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

発 表 演 題：MucoRice-CTB, as oral vaccine for the prevention of enterotoxigenic *E. coli*-mediated diarrhea in pigs.○Natsumi Takeyama^{1, 2}、Kazuki Oroku¹、Daisuke Tokuhara²、Shinya Nagai³、Hiroshi Kiyono²、Yoshikazu Yuki²（¹ Nippon Institute for Biological Science、² Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo、³ Nisseiken Co. Ltd.）

●第 53 回獣医病理学研修会（第 155 回日本獣医学会学術集会）

期 日：2013 年 3 月 28 日

開 催 地：東京大学駒場キャンパス（東京都目黒区）

発 表 演 題：豚の小脳

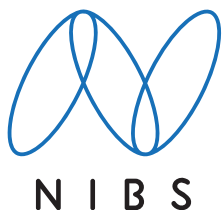
○鈴木敬之（日生研）

●日本家禽学会 2013 年度春季大会

期 日：2013 年 3 月 29 日

開 催 地：安田女子大学（広島県広島市）

発 表 演 題：GSP 系ニワトリに出現した pink-eyed dilution 突然変異体の眼病変

○渋谷一元¹、山下龍¹、大嶋篤¹、木下圭司²、水谷誠²、松田洋一²（¹ 日生研、² 名古屋大学大学院生命農学研究科附属鳥類バイオサイエンス研究センター）

—— 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 582 号) 平成 25 年 8 月 25 日印刷 平成 25 年 9 月 1 日発行(第 59 巻第 5 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)