

日生研おより

2014年(平成26年)7月号 第60巻第4号(通巻587号)

挨拶・巻頭言

理事長就任のご挨拶
.....長井伸也(2)

獣医病理学研修会

第52回 No. 1067 イヌの上顎神経
.....岩手大学(3)

第53回 No. 1080 ケツギョの肝臓・腎臓
.....大阪府立大学(4)

レビュー

生ワクチン中に混入する感染性のレトロ
ウイルスについて.....宮沢孝幸(5)

文献紹介

細菌、核酸及び抗体検出に口腔液を用
いた *Erysipelothrix rhusiopathiae*
感染の生検法の改善.....大嶋 篤(10)

お知らせ

お知らせ.....(16)
研修者・見学者受け入れ状況.....(16)



理事長就任のご挨拶

長井 伸也

2014年5月30日に開催されました当研究所の定時評議員会におきまして、上田進前理事長の後任としてこのたび理事長を拝命いたしました。大役を仰せつかり身の引き締まる思いでございますが、職責を全うすべく全力を尽くす所存でございます。

なお、当日の評議員会では、前理事長の他に、これまで長年当研究所の発展に貢献してこられました布谷鉄夫前理事、吉村巖雄前理事、佐々木伸雄前理事が退任することになりました。前理事に対する皆様方の長年に亘るご支援、ご鞭撻に深くお礼申し上げます。

前理事長および前理事の方々には、時代の潮流に則した研究およびワクチンの開発に尽力されたことはもちろんのことながら、研究所の経営の安定化に大きく貢献されました。ご就任当時はバブル崩壊後の研究所の経営状態が不安定な時期で、事業の遂行もおぼつかない状況にありました。そのような中、知恵と工夫を凝らされ、そしてあくなき努力を積み重ねられ、研究所の経営を見事に立て直されました。また、公益法人法の改正に伴い、一般財団法人日本生物科学研究所と関連組織である日生研株式会社の事業を再編成し、両組織の経営を軌道に乗せられたのも前理事の方々のご功績であります。今般、我々が安心して事業を引き継ぐことができますのも、前理事の方々のご尽力の賜物と考えております。

さて、当研究所は昭和22年(1947年)3月、戦後の混乱の中、立川の地に創立されました。その後、昭和34年(1959年)には研究開発を担う財団法人日本生物科学研究所と、ワクチンの製造と販売を担う日生研株式会社の2組織体制となり、そして平成24年(2012年)には研究開発と製造を担う一般財団法人日本生物科学研究所と、販売(薬事上は製造販売)を担う日生研株式会社とに再編され、現在に至っております。事業の中心は、一貫して動物用生物学的製剤の研究開発・製造・販売であります。関連した事業として、昭和41年(1966年)に山梨県小淵沢町(現在北杜市)に実験動物研究所が設立され、SPF鶏卵やミニブタ等の実験動物を本所の製造部門に供給するほか、他所社への販売も行っております。そのような研究所の創立の歴史から、民間の学術研究機関として、これまでニューカッスル病、豚コレラ、PED、狂犬病、鳥インフルエンザ(備蓄用)、馬インフルエンザ、その他の様々な家畜疾病に対するワクチンの研究開発と供給を通じまして、微力ながら日本の動物衛生および公衆衛生に寄与することができました。これも、先輩研究員や役職員の方々のご努力の賜物であります。

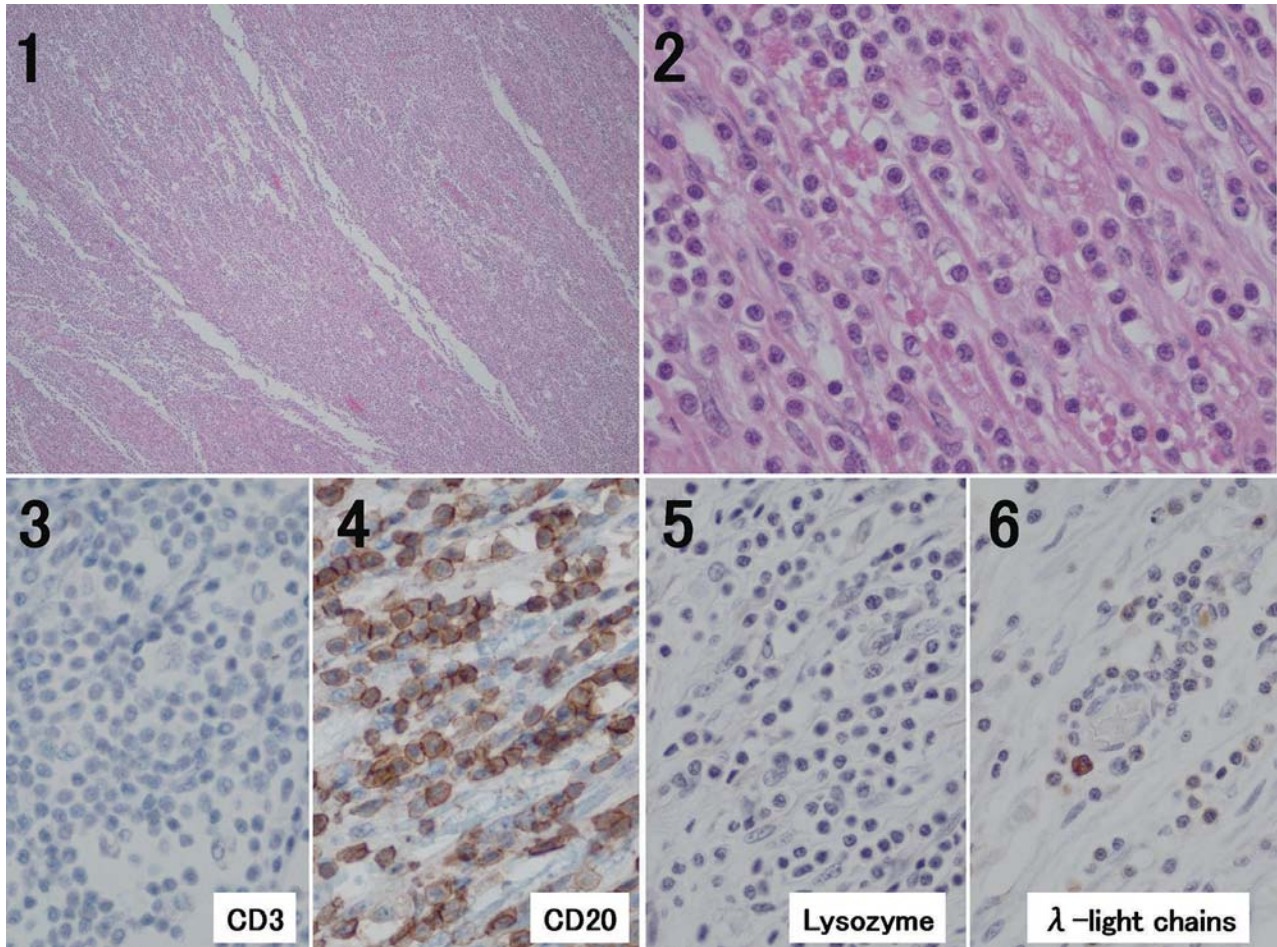
さて、私共が今後行わなくてはならないことは、先輩方から引き継いだ歴史と伝統のある病原微生物の取り扱い技術を絶やすことなく、また、日進月歩のバイオテクノロジーやバイオインフォマティクスを導入した先端的な動物用ワクチンの開発・改良・製造に邁進することです。そして、昨今は国際的な物流の活発化により、これら病原微生物がたやすく国境を越えて侵入して来るようになりました。そこで、これから動物の感染症をコントロールするためには、日本国内のみならず、地球規模での病原体の動きを制御する技術や手段の研究開発が必要となっております。この国境を越えた疾病制御技術につきましては、我々のような民間学術研究機関の方がむしろ容易に研究活動を展開できるのではないかと考えております。私どもは地球規模で動物疾病を制御することを最終目標とし、国内のみならず、世界の動物衛生・公衆衛生にも寄与できることが将来の夢でございます。

以上、当研究所の創立者である中村稔治博士に始まり、先輩諸氏により高く挙げられた明りが絶えることなく、その時代々々に則してさらに一層輝きを増すことができますよう、役職員一丸となって努力してまいりたい決意でございます。皆様には引き続き当研究所に対しまして温かいご指導とご支援を賜りますよう、何卒よろしくお願い申し上げます。

(理事長)

イヌの上顎神経

第 52 回獣医病理学研修会 No. 1067 岩手大学



動物：犬、ミニチュアダックスフンド、避妊雌、9歳。

臨床事項：2010年4月頃より両側眼瞼の下垂がみられはじめ、精密検査のために本学動物病院を受診した。神経学的検査では、両眼対光反射・角膜反射の消失、眼瞼反射・威嚇瞬き反応・上下顎の知覚などの低下、右眼縮瞳、顔面神経麻痺、側頭筋・咬筋の萎縮などが認められ、X線検査では巨大食道症と診断された。脳脊髄液の細菌検査、抗アセチルコリン受容体抗体、咀嚼筋筋炎抗体、抗GFAP自己抗体検査にはすべて陰性であった。意識状態は傾眠を示して、呼びかけには反応するものの症状の改善がみられず同月末死亡し、死後約24時間後に病理解剖を実施した。

組織所見：上顎神経のほとんどの領域において、リンパ球浸潤が重度に認められた(図1、2)。軸索は断裂、膨化していた。免疫組織化学的染色ではCD20陽性細胞が優性にみられ、CD3やlysozyme陽性細胞はほとんど認められなかった(図3-5)。λ-light chainsに陽性を示す円形細胞は散在性にみられた(図6)。浸潤リンパ球

は、Ki-67にはほとんど陰性であった。同様の病変は、胸腰髄の背根や腹根をはじめ、三叉神経、三叉神経節、馬尾などの広範な部位で認められた。

診断：犬の上顎神経におけるリンパ球性神経炎
Lymphocytic neuritis of maxillary nerve in a dog

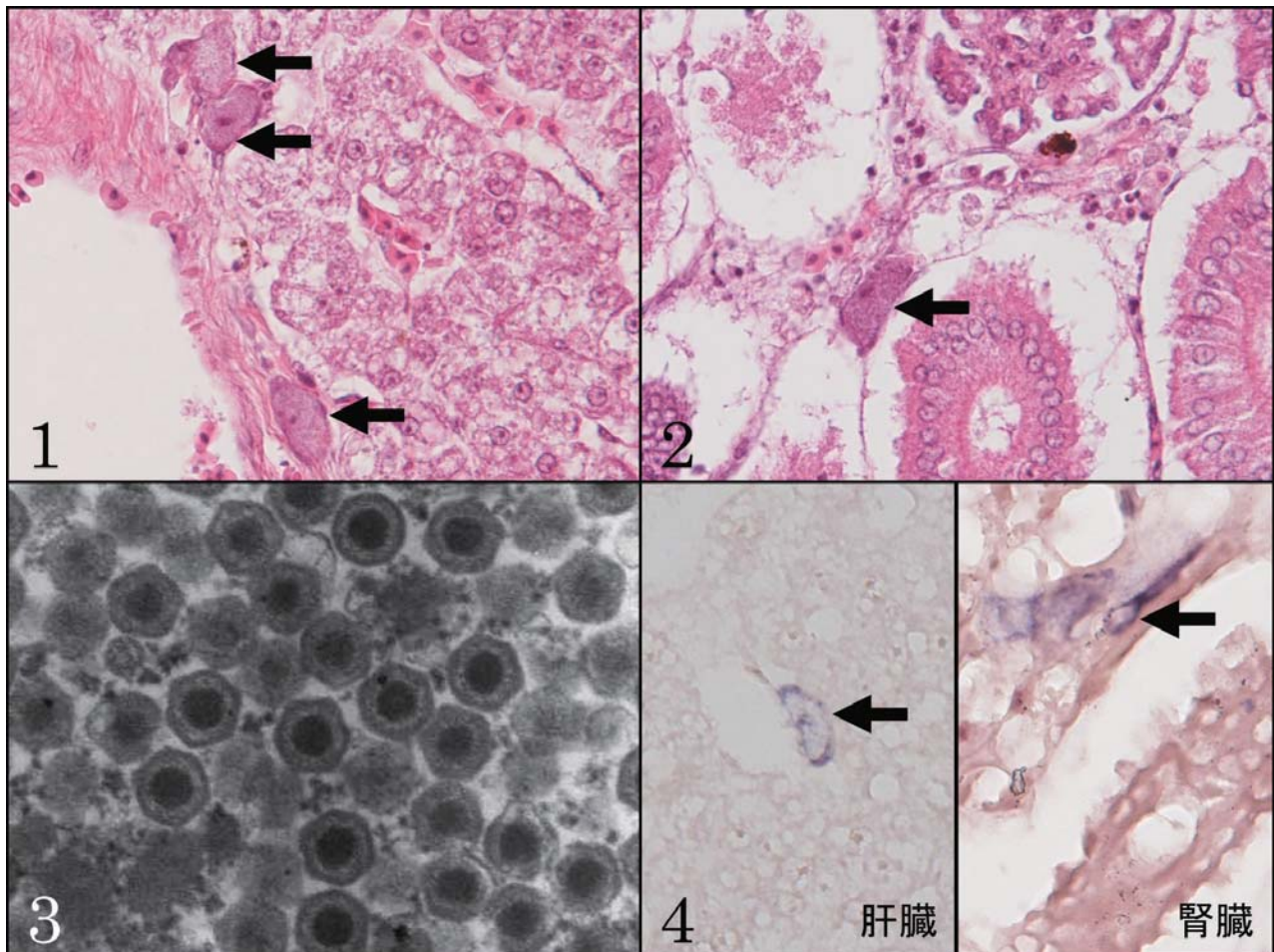
考察：犬の根神経症は、アライグマ猟犬麻痺として知られる多発性根神経炎や、主に感覚神経が障害される神経節根炎などが知られている。本症例では、胸腰髄の背根および腹根の両方に病変がみられ、さらに三叉神経や馬尾などの広範な領域にも同様の病変が認められた点が特徴的であり、従来の疾患とは一致しないものの、Pancieraらの報告したエアデルテリアの1例と類似していた。本症の原因としては免疫介在性の機序が疑われたが、確定には至らなかった。リンパ球クローナリティ検査では、TまたはBリンパ球のモノクローナルな腫瘍性病変は否定された。

(佐々木淳)

参考文献：Panciera, R. J. *et al.* 2002. *Vet. Pathol.* 39: 146-149.

ケツギヨの肝臓・腎臓

第 53 回獣医病理学研修会 No. 1080 大阪府立大学



動物：魚、ケツギヨ (*Siniperca chuatsi*)、雄、年齢不明、体重 550 g。

臨床事項：水族館において 20 年ほど群で繁殖を繰り返しながら飼育されていたが、2011 年の春には繁殖せず、春から夏にかけて消瘦する個体が現れ始めた。その後 30 匹以上いた群の約半数が次々に死亡し始め、最終的に全個体が死亡した。水族館の獣医師によって剖検され、主要臓器が当研究室に送付された。

剖検所見：肝臓、腎臓、鰓など多くの臓器で褪色が見られた。

組織所見：肝臓において、核および細胞質の肥大した好塩基性の細胞が認められた (図 1、矢印)。また、肝細胞の空胞変性も認められた。腎臓でも同様の好塩基性肥大細胞が認められ (図 2、矢印)、腎間質の造血組織の壊死も認められた。電子顕微鏡による観察で、好塩基性肥大細胞の細胞質に多数のウイルス粒子が認められた (図 3)。これらのウイルス粒子は正二十面体で、中心部にコアを有し直径はおおよそ 150 nm であった。PCR とシーケンス解析の結果、イリドウイルスの一種である

伝染性脾臓腎臓壊死ウイルス (ISKNV) の遺伝子が検出された。

診断：ケツギヨのイリドウイルス (伝染性脾臓腎臓壊死ウイルス) 感染による肝血管周囲における好塩基性肥大細胞の出現および好塩基性肥大細胞の出現を伴う腎造血組織の壊死

考察：本疾病の特徴である好塩基性肥大細胞は尿管や類洞に隣接して存在していたり、グリソン鞘内に存在していた。ISKNV の遺伝子に対する *in situ* hybridization の結果から、好塩基性肥大細胞は腎間質の線維芽細胞や、肝臓の線維芽細胞、肝星細胞などの間葉系の紡錘形細胞由来の可能性が示唆された (図 4)。

(田中夏樹・井澤武史)

参考文献：Tanaka, N., Izawa, T., Kuwamura, M., Higashiguchi, N., Kezuka, C., Kurata, O., Wada, S. and Yamate, J. 2013. The first case of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) infection in aquarium-maintained mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), in Japan. *J. Fish. Dis.* (in press).

レビュー

生ワクチン中に混入する感染性のレトロウイルスについて

宮 沢 孝 幸 (京都大学ウイルス研究所 進化ウイルス研究領域)

2010年1月に私の研究グループとグラスゴー大学の研究グループが共同で、一部の動物用生ワクチンに、感染性のレトロウイルスが混入していることを発表した [4]。この論文は、生ワクチン中に感染性の内在性レトロウイルスが混入していることを世界ではじめて示した論文であった。混入していたウイルスは RD-114 ウイルスというネコの「内在性レトロウイルス」であり、獣医の領域でもあまりなじみのないウイルスである。本稿では、内在性レトロウイルスと RD-114 ウイルスに関する基礎的な知識と生ワクチンへの混入事例をまとめた。

1. 内在性レトロウイルスとは何か？

レトロウイルスは細胞に感染すると、ウイルスがもっているゲノム RNA は DNA に逆転写される。逆転写された DNA は細胞のゲノムに組み込まれ、そこからウイルスゲノム RNA は転写され、ウイルス構成蛋白質は合成される (図 1)。レトロウイルスの DNA ゲノム (これをプロウイルスと呼ぶ) は、

細胞が活着している限り安定して維持される。すなわち、細胞に感染したレトロウイルスのゲノムは、プロウイルスとして細胞のゲノムと同化していることになる。

通常、レトロウイルスは体細胞にのみ感染するが、ごく稀に生殖細胞や初期胚にも感染することが過去にはあったと考えられる。レトロウイルスが生殖細胞に感染し、その細胞由来の受精卵が個体として発生すると、ウイルスのゲノム DNA はプロウイルスとして、その個体のすべての細胞に存在することになる。このような状態になったレトロウイルスのことを内在性レトロウイルスと呼んでいる (図 2)。内在性レトロウイルスはメンデルの遺伝の法則にのっとり、子孫に伝達される。

生体の生存に不利な内在性レトロウイルスは、長い年月の間に変異や欠失により不活化されると考えられる。逆に、生存に有利なものは不活化されずに保持される場合もある。すなわちオープンリーディングフレーム (ORF) を維持し、ゲノム内に長期間 (数百万年以上) 存在しているものもある。また、

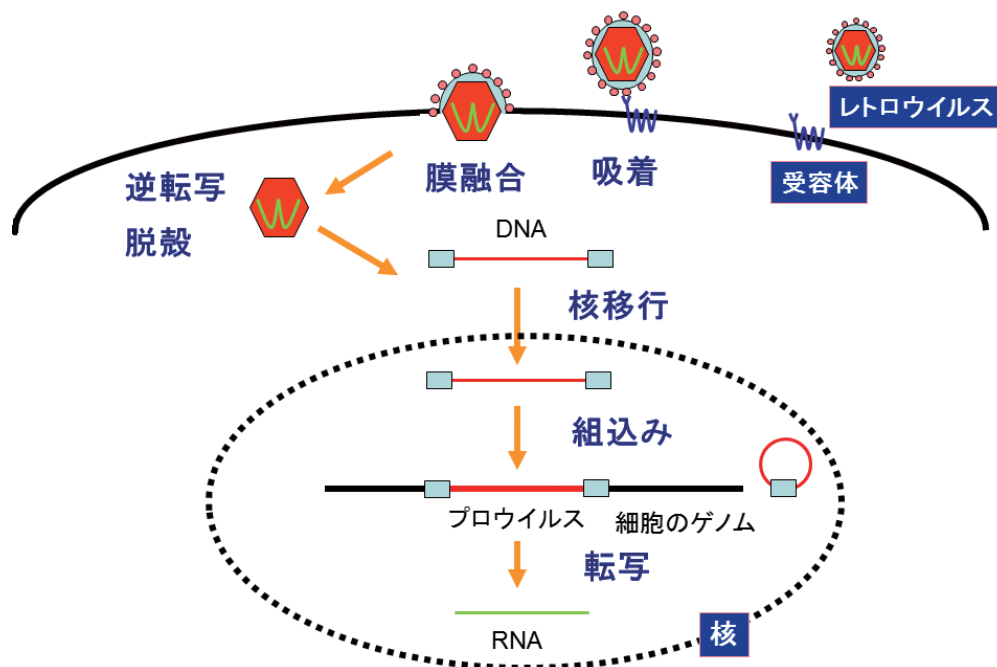


図 1 レトロウイルスの生活環

レトロウイルスのエンベロープ蛋白と細胞表面上の受容体が結合すると、ウイルスの膜と細胞膜が融合して、ウイルスの殻 (コア) は細胞質に侵入する。ウイルスのゲノム RNA は、ウイルスがもつ逆転写酵素により DNA へと逆転写される。ウイルス DNA は細胞の核内に侵入し、細胞のゲノムにウイルスがもつインテグラーゼにより組み込まれる。この状態のウイルス DNA をプロウイルスと呼ぶ。プロウイルスからウイルスのゲノム RNA が転写され、そこからウイルス蛋白が翻訳、ウイルスゲノム RNA を取り込んだウイルス粒子を形成し、細胞外へ出芽する。ここではウイルス粒子の細胞への吸着からウイルスゲノム RNA が転写されるまでの過程 (前期過程) を示す。

宿主のゲノムに入り込んだ後に、感染性を維持したまま種に固定されているものも存在するとされている。

内在性レトロウイルスに対して、感染によって個体から個体へと伝達されるレトロウイルスのことを外来性レトロウイルスと呼び、内在性レトロウイルスと区別している (図2)。獣医臨床問題になっているレトロウイルスは外来性レトロウイルスであり、それには、ネコ白血病ウイルス (feline leukemia virus : FeLV)、ネコ免疫不全ウイルス (feline immunodeficiency virus : FIV)、ウマ伝染性貧血症ウイルスやウシ白血病ウイルスなどが含まれる。

内在性レトロウイルスが単独で疾病を引き起こすものは、家畜では知られていないが、マウスにおいては内在性レトロウイルスがリンパ腫を引き起こしている例がある。また、コアラにおいては内在性レトロウイルスが白血病や免疫不全を惹起している可能性を示唆する報告もある [11]。さらに、ネコの外来性レトロウイルスである FeLV の病態には、FeLV に極めて近縁の内在性レトロウイルスが深く関与していることが明らかになっている [3]。

2. 内在性レトロウイルスと哺乳類の進化の密接な関係

内在性レトロウイルスの配列はヒトゲノム中に約 8%、マウスゲノム中に約 10% も含まれる。ヒトでは機能をもっている遺伝子の配列は、ゲノムの約 2% ほどしか占めていないので、内在性レトロウイ

ルスは遺伝子の約 4 倍をもゲノム中に占めていることになる。

内在性レトロウイルスの配列は哺乳類のゲノムで大きな割合を占めているが、その役割はまだほとんど分かっていない。マウス、ネコ、ヒツジにおいては、病原性レトロウイルスの防御に役立っている例が知られている。また真獣類の胎盤においては、内在性レトロウイルスの発現が昂進しているが、最近になって、胎盤形成において様々な内在性レトロウイルスの発現が必要であることが明らかになってきた [8]。特にヒト内在性レトロウイルスの一つである HERV-W のエンベロープ (Env) 蛋白はシンシチンとも呼ばれ、トロフォブラスト (栄養膜細胞) の融合に関与している。また、最近我々は、ウシの胎盤で発現し、ウシ胎盤特異的な三核細胞の形成に関与している内在性レトロウイルス (ウシ内在性レトロウイルス K1) を発見し、その Env 蛋白を Fe-matrin-1 と名付けた [5]。

3. ワクチン中の内在性レトロウイルスを検査したきっかけ

2006 年の 3 月に *PLoS Pathogens* 誌に興味深い論文が発表された。ヒトの前立腺ガンの患者の組織にヒトの内在性レトロウイルスとは異なるガンマレトロウイルスの配列が見つかったというのである [13]。異種指向性マウス白血病ウイルス関連ウイルス (xenotropic murine leukemia virus-related virus :

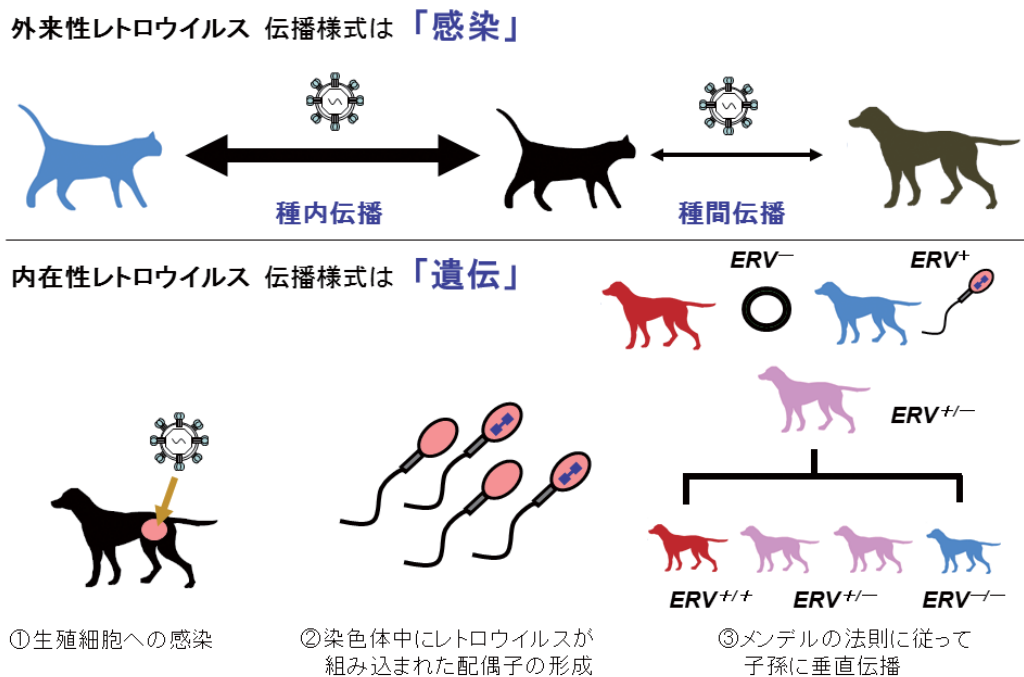


図2 外来性レトロウイルスと内在性レトロウイルスの概念図

外来性レトロウイルスは体細胞に感染し個体から個体へと感染により伝播する。通常同じ動物種に感染するが、ごくまれに異種動物に感染する。これを種間伝播という。レトロウイルスはごくまれに生殖細胞へも感染すると考えられる。感染した細胞が受精卵となり、それが個体へと発生すると、すべての体細胞と生殖細胞にウイルスゲノム DNA が組み込まれることになる。この状態のウイルスを内在性レトロウイルス (endogenous retrovirus [ERV]) と呼ぶ。種に固定化された内在性レトロウイルスは、メンデルの遺伝の法則に従って親から子供へ伝達される。

XMRV) と名付けられたウイルスは、その後の研究により前立腺ガンの組織に組み込まれていることが示され、実際にヒトの前立腺に感染していることがわかった。さらに2009年の10月には、*Science* 誌にヒトの慢性疲労症候群の患者から高率にXMRVが分離されることが報告された [1]。これらの結果から、XMRVがアメリカの一部のヒトの間で広がっていることが示唆された。XMRVは名前が示すように異種指向性のマウス白血病ウイルス (xenotropic murine leukemia virus : MLV-X) に非常に近縁なウイルスである。重要なことは、MLV-Xがマウスの内在性レトロウイルスであることである。gag 遺伝子配列の上流に24塩基対の欠損が見られることがXMRVの特徴であるが、その他の領域については、XMRVはMLV-Xとほぼ同一である。このことから、XMRVは何らかの経路により、MLV-Xかそれに似たマウスの内在性レトロウイルスがヒトに感染した結果生じたと考えられた。すなわちXMRVの発見は、「動物由来の内在性レトロウイルスが異種の動物（この場合はヒト）に感染し、病気を引き起こす可能性がある」ということを意味した。

ヒトや動物のワクチンでは、様々な動物由来の細胞を用いて製造されている。これまでも動物由来の内在性レトロウイルスが生ワクチンなどの生物学的製剤中に混入することは予想されていた。しかしながら、生ワクチン中に感染性の内在性レトロウイルスが混入しているという報告はこれまでなく、生ワクチンに混入する内在性レトロウイルスの危険性について、科学的に議論されたこともほとんどなかった。そこで我々は、市販の動物用の生ワクチン中に感染性の内在性レトロウイルスが混入しているかどうかを調べることにした。少なくとも、ブタ、ニワトリ、ネコ、マウスの細胞は感染性の内在性レトロウイルスを産生しうることが知られている。この中で我々は、ネコが持っている感染性の内在性レトロウイルス (RD-114 ウイルス) に着目して研究を進めた。

なお、ヒトに感染しているとされたXMRVではあるが、その後の調べで、実験室内コンタミ、もしくは、試薬内に混入していたウイルスゲノムを検出していたに過ぎないことが明らかとなった [7]。実際我々も、市販のRT-PCRのキットの酵素に、MLVのゲノムRNAが混入していることを明らかにした [10]。

4. RD-114 ウイルスとは何か？

RD-114 ウイルスは1972年にヒトの横紋筋肉腫由来の細胞 (RD 細胞) から分離されたレトロウイルスである [2]。当時はヒトのレトロウイルスはまだ見つかっておらず、初めてのヒトレトロウイルス

であると誤認された経緯がある。その後の調べにより、RD-114 ウイルスはヒトの外来性レトロウイルスではなく、ネコの内在性レトロウイルスであることがわかった。RD-114 ウイルスは gag-pol 領域がガンマレトロウイルス、env 領域がベータレトロウイルスのキメラウイルスである (図3) [14]。興味深いことにRD-114 ウイルスの env 領域はヒビ内在性レトロウイルスの env 領域と極めて相溶性が高い。数百万年前にヒビのレトロウイルスがネコの祖先動物に感染し、その動物が元々持っていた内在性レトロウイルスと組換えを起こして、内在化したものと推察されている。ネコ属 (Genus *Felis*) に分類される動物はすべてこのRD-114 ウイルス由来の配列をもっているとされている。

RD-114 ウイルスはネコを含む様々な動物種の細胞に感染する。ヒトの細胞に感染する際は、ASCT と呼ばれるナトリウム依存性の中性アミノ酸トランスポーターを受容体として使用する。ASCT を利用するレトロウイルスの中には、病原性をもつものも存在する。例えば、免疫抑制を引き起こす Mason-Pfizer サルウイルス、ニワトリ細網内皮症ウイルス、アヒル脾臓壊死ウイルスなどである。

RD-114 ウイルスがネコ属で長い間維持されてきたということは、このウイルスがネコ属において生体側に有利に働いていることを示唆している。興味深いことに、ヒトの胎盤形成に必要な内在性レトロウイルス (HERV-W) の受容体も ASCT であるので、ネコの胎盤形成に RD-114 ウイルスの Env 蛋白が関与している可能性も考えられる。しかしたとえ RD-114 ウイルスが宿主動物と共存していたとしても、RD-114 ウイルスがネコで非病原性であると結論することはできない。感染性の内在性レトロウイルスの活性化がガンを誘発している例も、免疫不全のマウスで見られているからである [17]。

RD-114 ウイルスはネコ細胞でも効率よく増殖する。In vitro の結果から考えれば、RD-114 ウイルスがネコの体内で活性化した場合、感受性細胞に感染し、体内で増殖する可能性は否定できない。過去の文献では、FeLV 陰性のリンパ腫で RD-114 ウイルスの発現が上昇していることが報告されており [6]、RD-114 ウイルスの (再) 感染、あるいは転座などによりリンパ腫が誘導されていることも考えられる。しかし、これまでネコのリンパ腫の発生に RD-114 ウイルスが関与しているかを調べることは困難であった。それは、ネコゲノム中には RD-114 ウイルスに類似の内在性レトロウイルスの配列が多数存在し、再感染によるものと区別が付かないからである。最近、ネコのゲノム情報が明らかになり、さらに感染性をもつ RD-114 ウイルスの塩基配列が明らかになったので、今後 FeLV 陰性のリンパ腫に RD-114 ウイルスが関与しているかどうかを調

べることは可能になると思われる。

5. ワクチンへの RD-114 ウイルスの混入とそのルート

我々は、RD-114 ウイルスの検出のために、ヒトの横紋筋肉腫由来の TE671 細胞を用いた LacZ マーカーレスキューアッセイ法を開発した [9]。RD-114 ウイルスに特異的なプライマーを用いた PCR 法でも、RD-114 ウイルスの検出は可能である。PCR 法は、手技そのものは比較的単純であるが、テンプレート DNA への PCR 増幅産物のコンタミネーションの危険性が常にあるため、擬陽性となる可能性がある。我々は LacZ マーカーレスキュー法の方が信頼できると考えている。

LacZ マーカーレスキュー法を用いて、国内で市販されているネコの混合生ワクチンを調べたところ、1 社の製品に感染性の RD-114 ウイルスの混入が認められた。さらに同様の方法でイヌの混合生ワクチンを調べたところ、2 社の製品に混入が認められた [4]。イギリスのグラスゴー大学においてもヨーロッパで市販されている混合生ワクチンで RD-114 ウイルスの混入が確認された [4]。

一部のネコ細胞は感染性の RD-114 ウイルスを産生している。RD-114 ウイルスを産生しているネコ細胞を生ワクチン製造に使用すると、生ワクチン製品中に RD-114 ウイルスが混入する。また RD-114 ウイルスはネコ細胞のみならず、イヌ細胞やヒ

ト細胞などにも感染し、効率よく増殖する。従って、シードロットのウイルス（種ウイルス）に RD-114 ウイルスが混入している場合、たとえ製造用細胞が RD-114 ウイルスを産生していなくても、RD-114 ウイルスがワクチン製造用細胞で増殖して生ワクチン中に混入することが考えられる。特にイヌパルボウイルスはネコ細胞を用いてウイルス分離することが多く、シードロットに RD-114 ウイルスが混入することが危惧される [16]。実際我々は、ネコ以外の細胞を用いて製造されている生ワクチンにも、高力価の感染性の RD-114 ウイルスを検出している [15]。

6. ワクチン中の RD-114 ウイルスは問題なのか？

イヌは RD-114 ウイルスを内在性レトロウイルスとしてもっておらず、イヌにとって RD-114 ウイルスは、外来性レトロウイルスである。言い換えれば、イヌに RD-114 ウイルスを接種することは、イヌに FeLV や FIV を接種するのと同じ意味をもっている。イヌの株化細胞（MDCK 細胞や Cf2Th 細胞など）や初代イヌ腎細胞は、RD-114 ウイルスに高感受性であり、ウイルスは良く増殖する。さらに、RD-114 ウイルスの Env 蛋白を被った遺伝子治療用のベクターを静脈内に接種すると、効率よく骨髄細胞に外来遺伝子を導入することができる [12]。このことは、高力価の RD-114 ウイルスをイヌに接種した場合、ウイルスは骨髄細胞に感染し得るこ

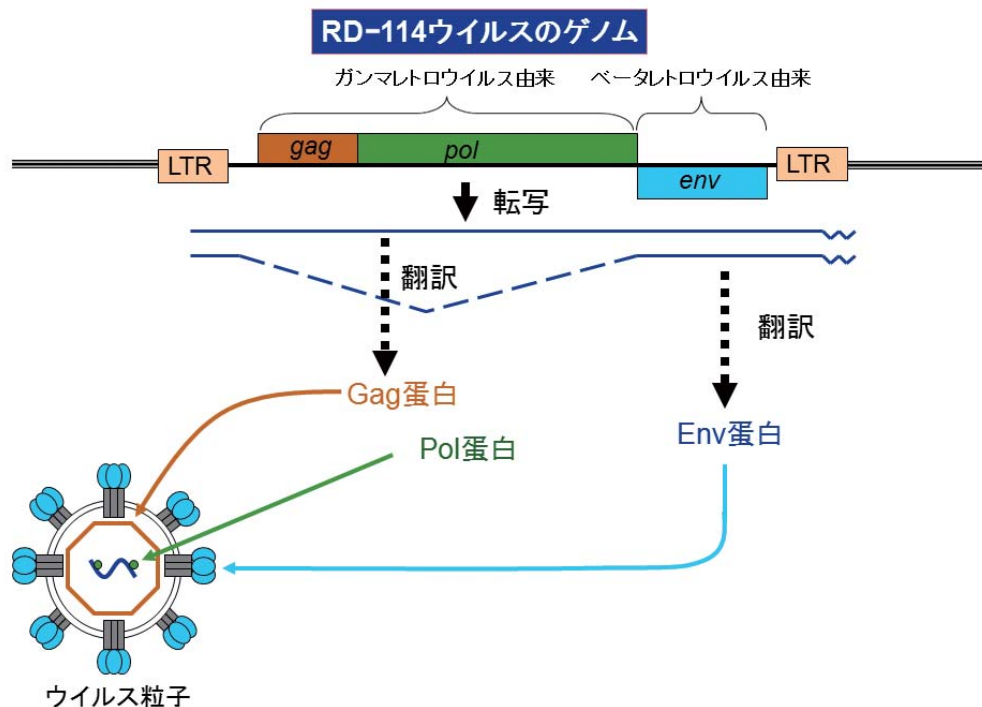


図3 RD-114 ウイルスのゲノム構造

ここでは細胞のゲノム DNA に組み込まれたプロウイルスの状態の構造を示す。RD-114 ウイルスは *gag* 遺伝子、*pol* 遺伝子、*env* 遺伝子の 3 つの遺伝子をもっている。プロウイルスの両端には長い反復配列 (LTR) が存在し、ウイルス RNA の転写を制御している。RD-114 ウイルスは、*gag-pol* 領域がガンマレトロウイルス由来、*env* 領域がベータレトロウイルス由来のキメラウイルスである。

とを示唆している。

我々は RD-114 ウイルスをイヌに接種することにより、リンパ節や脾臓、精巣にウイルス感染を確認している。また、RD-114 ウイルス感染イヌの一部では、RD-114 ウイルスに対する抗体が誘導され、中和活性も有していた (吉川ら、投稿準備中)。しかしながら、RD-114 ウイルスが感染したイヌにおいて、RD-114 ウイルスが増殖したということに関しては、確認出来ていない。

イヌにおいて RD-114 ウイルスが病原性を発揮し得るかどうかは、今のところまったく不明である。ひとたびイヌで RD-114 ウイルスの感染が成立すれば、レトロウイルスの性質上、免疫系で体内から完全に除去することは困難であると考えられる。イヌの体内において RD-114 ウイルスが増殖しなかったとしても、ウイルスゲノムの組み込み部位 (ガン遺伝子の近傍に組み込まれた場合など) によっては、腫瘍化する可能性は否定できない。

RD-114 ウイルスがイヌに感染することは明らかになったものの、RD-114 ウイルスのイヌにおける病原性は依然として不明である。レトロウイルスの性質を考慮すると、RD-114 ウイルスの病原性は、短期間の感染実験では明らかにすることはできない。腫瘍性疾患を想定した場合、病原性を明らかにするためには、感染が成立した多数のイヌを一生追跡することが必要となろう。一部の研究機関において、数頭規模で長期の感染実験を行うことができたとしても、多数のイヌ (数十頭以上) を用いた長期の感染実験は不可能である。感染実験で病原性を明確に出来ないのだとすれば、レトロウイルス感染で引き起こされ得る疾病に、RD-114 ウイルスが関与しているかを疫学的に調べるしか方法はない。RD-114 ウイルスの感染により引き起こされる可能性がもっとも高い疾患は、他のレトロウイルス感染の事例を考えると、腫瘍および免疫抑制であろう。

7. 今後取るべき対策

現在市販されている生ワクチンと過去に市販されてきた生ワクチン中に、どれほどの量の感染性 RD-114 ウイルスが混入していたかについてであるが、詳細は明らかになっていない。我々の試験においては最大 10,000 TCID₅₀/shot の RD-114 ウイルスが混入しているロットを見いだしている (なお、TCID₅₀ とは培養細胞でのウイルスの感染価を示す。) [15]。我々はごく一部のロットでしかウイルス混入量を調べていないので、これよりも多くの感染性 RD-114 ウイルスを含むワクチンロットが存在する (あるいは存在していた) 可能性はある。

生ワクチン中の RD-114 ウイルスの混入量が最大 10,000 TCID₅₀/shot にとどまれば、イヌに感染す

る可能性はほぼゼロなのかも知れない。また、RD-114 ウイルスがイヌに感染したとしても、病気を引き起こす可能性は極めて低いのもかもしれない。しかしながら、RD-114 ウイルスは感染性のウイルスである。生ワクチンは世界中のイヌに年間数百万頭接種されている。感染個体において、RD-114 ウイルスがより感染力と病原性が強いウイルスに変異する可能性は完全には否定できない。たとえ個体レベルでのリスクが極めて低くても、ウイルスが変異してイヌに広まった場合を想定すると、リスクは計り知れないものがある。従って、少なくとも、今後は RD-114 ウイルスフリーのワクチン製造に努めるべきと考えている。

引用文献

1. Lombardi, V. C., Ruscetti, F. W., Das Gupta, J., Pfost, M. A., Hagen, K. S., Peterson, D. L., Ruscetti, S. K., Bagni, R. K., Petrow-Sadowski, C., Gold, B., Dean, M., Silverman, R. H. and Mikovits, J. A. 2009. Detection of an infectious retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with chronic fatigue syndrome. *Science* **326** : 585-589.
2. McAllister, R. M., Nicolson, M., Gardner, M. B., Rongey, R. W., Rasheed, S., Sarma, P. S., Huebner, R. J., Hatanaka, M., Oroszlan, S., Gilden, R. V., Kabigting, A. and Vernon, L. 1972. C-type virus released from cultured human rhabdomyosarcoma cells. *Nat. New Biol.* **235** : 3-6.
3. Miyazawa, T. 2002. Infections of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. *Front. Biosci.* **7** : d504-518.
4. Miyazawa, T., Yoshikawa, R., Golder, M., Okada, M., Stewart, H. and Palmarini, M. 2010. Isolation of an infectious endogenous retrovirus in a proportion of live attenuated vaccines for pets, *J. Virol.* **84** : 3690-3694.
5. Nakaya, Y., Koshi, K., Nakagawa, S., Hashizume, K. and Miyazawa, T. 2013. Fematrin-1 is involved in fetomaternal cell-to-cell fusion in Bovinae placenta and has contributed to diversity of ruminant placentation. *J. Virol.* **87** : 10563-10572.
6. Niman, H. L., Stephenson, J. R., Gardner, M. B. and Roy-Burman, P. 1977. RD-114 and feline leukaemia virus genome expression in natural lymphomas of domestic cats. *Nature* **266** : 357-360.
7. Paprotka, T., Delviks-Frankenberry, K. A., Cingöz, O., Martinez, A., Kung, H. J., Tepper, C. G., Hu, W. S., Fivash, M. J. Jr., Coffin, J. M. and Pathak, V. K. 2011. Recombinant origin of the retrovirus XMRV.

- Science* **333** : 97–101.
8. Rawn, S. M. and Cross, J. C. 2008. The evolution, regulation, and function of placenta-specific genes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **24** : 159–181.
 9. Sakaguchi, S., Okada, M., Shojima, T., Baba, K. and Miyazawa, T. 2008. Establishment of a LacZ marker rescue assay to detect infectious RD114 virus. *J. Vet. Med. Sci.* **70** : 785–790.
 10. Sato, E., Furuta, R. A. and Miyazawa, T. 2010. An endogenous murine leukemia viral genome contaminant in a commercial RT-PCR kit is amplified using standard primers for XMRV. *Retrovirology* **7** : 110.
 11. Tarlinton, R., Meers, J. and Young, P. 2008. Biology and evolution of the endogenous koala retrovirus, *Cell. Mol. Life Sci.* **65** : 3413–3421.
 12. Ting-De Ravin, S. S., Kennedy, D. R., Naumann, N., Kennedy, J. S., Choi, U., Hartnett, B. J., Linton, G. F., Whiting-Theobald, N. L., Moore, P. F., Vernau, W., Malech, H. L. and Felsburg, P. J. 2006. Correction of canine X-linked severe combined immunodeficiency by in vivo retroviral gene therapy. *Blood* **107** : 3091–3097.
 13. Urisman, A., Molinaro, R. J., Fischer, N., Plummer, S. J., Casey, G., Klein, E. A., Malathi, K., Magi-Galluzzi, C., Tubbs, R. R., Ganem, D., Silverman, R. H. and DeRisi, J. L. 2006. Identification of a novel gammaretrovirus in prostate tumors of patients of homozygous for R462Q RNASEL variant. *PLoS Pathog.* **2** : e25.
 14. van der Kuyl, A. C., Dekker, J. T. and Goudsmit, J. 1999. Discovery of a new endogenous type C retrovirus (FcEV) in cats: evidence for RD-114 being an FcEVGag-Pol/baboon endogenous virus BaE-VEEnv recombinant. *J. Virol.* **73** : 7994–8002.
 15. Yoshikawa, R., Sato, E. and Miyazawa, T. 2011. Contamination of infectious RD-114 virus in vaccines produced using non-feline cell lines. *Biologicals* **39** : 33–37.
 16. Yoshikawa, R., Sato, E. and Miyazawa T. 2012. Presence of infectious RD-114 virus in a proportion of canine parvovirus isolates. *J. Vet. Med. Sci.* **74** : 347–350.
 17. Young GR, Eksmond U, Salcedo R, Alexopoulou L, Stoye JP, Kassiotis G. 2012. Resurrection of endogenous retroviruses in antibody-deficient mice. *Nature.* **491** : 774–8.

文献紹介

細菌、核酸及び抗体検出に口腔液を用いた *Erysipelothrix rhusiopathiae* 感染の生検法の改善

大嶋 篤

Improving ante mortem diagnosis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection by use of oral fluids for bacterial, nucleic acid, and antibody detection.

Luis G. Giménez-Lirola, Chao-Ting Xiao, Marissa Zavala, Patrick G. Halbur, T. Opriessnig

J. Microbiol. Methods. 2013 Feb 15 ; 92 (2) : 113–21.

紙面の都合上、本文の一部を割愛して掲載致します。

要約

豚丹毒は *Erysipelothrix rhusiopathiae* によって引き起こされる経済的に重要な疾病である。豚房単位の口腔液の収集は近年、養豚運営における感染動態の監視に利用されている。実施した検査である細菌分離、リアルタイム PCR、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 及び fluorescent microbead-based immunoassay (FMIA) を用いた抗体検出は、陰性対照 (n=32) と *E. rhusiopathiae* に実験感染させた豚 (n=112) の豚房単位の口腔液を用いて評価した。リアルタイム PCRは接種後

1日で100% (7/7 豚房) の検出力を示す鋭敏な手法である一方、*E. rhusiopathiae* の菌分離が成功したのは28.6% (2/7 豚房) のみであった。豚房単位の口腔液からの抗 *Erysipelothrix* IgM 及び IgG 抗体は FMIA では接種後4から8日、ELISAでは接種後5から8日より検出された。豚房内の感染動物数、特に抗菌剤投与のタイミングは菌分離及び ELISA の結果に影響を及ぼした。口腔液検体において、*E. rhusiopathiae* DNA は23.3%に認められたが、抗 *Erysipelothrix* IgM 及び IgG 抗体は各試料の59.6%及び5.5%に認められた。この結果から、口腔液の採取法及びリアルタイム PCR と FMIA を用いた検

出法は、豚丹毒の出現を早期に発見するのに効果的であり、よりよい治療結果を導く可能性を示している。

序論

Erysipelothrix rhusiopathiae によって引き起こされる豚丹毒は、死亡率及び増体重の低下に関連性がある豚の重要な疾病であり続けている。世界中の30から50%の家畜豚がこの細菌を扁桃あるいはリンパ節に保持しており、そのことがこの病気の流布に寄与している。急性型の豚丹毒は熱、元気消失、跛行を伴った症状が突然発生することが特徴である。急性的に感染した豚は時々死亡が認められるが、多くが皮膚に特徴的な菱形疹を発症している。亜急性型の豚丹毒ではしばしば特徴的な症状は認められず、慢性型では感染した豚群における慢性的な関節炎により跛行が発生する。

E. rhusiopathiae のコントロールの妨げになっているのは、豚群における細菌の動態をリアルタイムに検出するのに、豚を生かしたまま検査可能な方法がないためである。急性型の *E. rhusiopathiae* 感染は基本的に死後の検査であり、現在主に行われているのは病変部と思われる部位からの菌分離である。しかしながら、豚丹毒のコロニーは小さく、成長は遅く、しばしば検体が汚染されているせいで、大抵分離が困難である。

28の血清型が知られており、豚においては血清型1a、1b及び2が頻繁に認められる。加えて、*E. rhusiopathiae*、*E. tonsillarum*、*E. inopinata* sp. nov.、*E. species strain 1* 及び *E. species strain 2* を含むいくつかの既知の遺伝子型がある。さらに近年では、*E. rhusiopathiae*、*E. tonsillarum* 及び *E. species strain 2* を区別可能な新しいマルチプレックスリアルタイムPCR検査法が開発されている。

豚の口腔液の収集法及び検査法は、検査及び監視ツールとして近年確立され、養豚獣医師によって広く受け入れられている。口腔液検体は基本的に豚房内に垂らされた縄によって集められ、それによってその豚房内に飼育されている大部分の豚から収集できる。過去の研究では、生前に収集された口腔液を用いて porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), bovine virus diarrhea virus, foot-and-mouth disease virus, porcine circovirus type 2, pseudorabies virus, vesicular stomatitis virus を検出できることが確認されている。唾液検体に関する研究（特に最近の20年）は様々なヒトの病原体についてのPCR及び抗体検出法を生み出してきた（HIV, hepatitis viruses, Epstein-Barr, measles, etc.）。

養豚産業におけるこの研究の影響力は大きい。血清検体に比較して、豚群における口腔液の収集は簡便で、検体収集は基本的に一人の人間で十分であり、豚房に入らず、豚にストレスを与えない。この方法

はかなり安価なので、大規模な調査研究を促進し、豚群の各種病原体をモニタリングする機会を増加させた。

E. rhusiopathiae は汚染された飼料あるいは水の摂取または皮膚の擦過傷を介して豚に感染する。一度感染すると、動物は糞、尿、唾液及び鼻汁に菌を排出し、口腔液検体から *E. rhusiopathiae* を分離、あるいはDNAを検出できる。表面防御抗原A (SpaA) の一部 (SpaA415として設計された (rSpaA415)) を用いた2つの新しい血清学的検査方法であるELISAとFMIAは、豚血清中の抗 *Erysipelothrix* spp. IgG抗体を同定するために開発された。

この研究の目的は、*E. rhusiopathiae* を実験感染させた豚から集めた豚房単位での口腔液検体について、直接的（菌分離とリアルタイムPCR）及び間接的（ELISAとFMIA）な検出方法の両方を評価すること、ならびに検査検体として口腔液を用いた *Erysipelothrix* spp. のモニタリングについて効率的な検査手順を確立する事である。

材料と方法

2.1. 感染状況が既知である検体

2.1.1. 実験計画

E. rhusiopathiae 陽性及び陰性が既知である口腔液を得るために、血清型1a及び19の *E. rhusiopathiae* で豚を攻撃した。飼育と攻撃を含む実験手順の詳細は既報に記載した。要約すると、3週齢の雌雄33頭の豚は *E. rhusiopathiae* 陰性が確かな群から入手し、豚房当たりそれぞれ3から6頭の異なる群に分けられた（図1）。ひとつの豚房は陰性対照としての非攻撃群、6つの豚房は *E. rhusiopathiae* 参照株E1-6P（血清型1a）で攻撃し、1つの豚房は *E. rhusiopathiae* 参照株2019（血清型19）で攻撃した。血清型1aの参照株E1-6PはSpaAタンパクを発現するspaA遺伝子を持っており、血清型19の参照株2019はSpaBタンパクを発現するspaB遺伝子を持っている。血清型1aの *E. rhusiopathiae* で攻撃された豚（2A及び2B）とともに飼育されていた4頭の豚は、希釈の影響（感染と悲感染動物が同居した場合、双方が豚房の唾液検体に影響するため）を調べるための接触対照とした。検査における抗生物質投与の影響を調べるために、2A、2B、3A、3Bの豚房の豚は臨床症状が強くなる接種後2から4日の間に筋肉内にセフトオフル（Excede®、5 mg/kg、ファイザー）を単回投与した。同様に、4A及び4Bの豚房の豚には、臨床症状が起きる前に同じ抗生物質を同じ用量で投与した。口腔液は接種前7日、接種日、接種後1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、21及び28日に採取され、*Erysipelothrix* spp. 陽性検体（n=112）と陰性検体（n=32）に分けられた（図1）。口腔液は *Erysipelothrix* spp. について直接的（菌分離とリアルタイムPCR）及び間

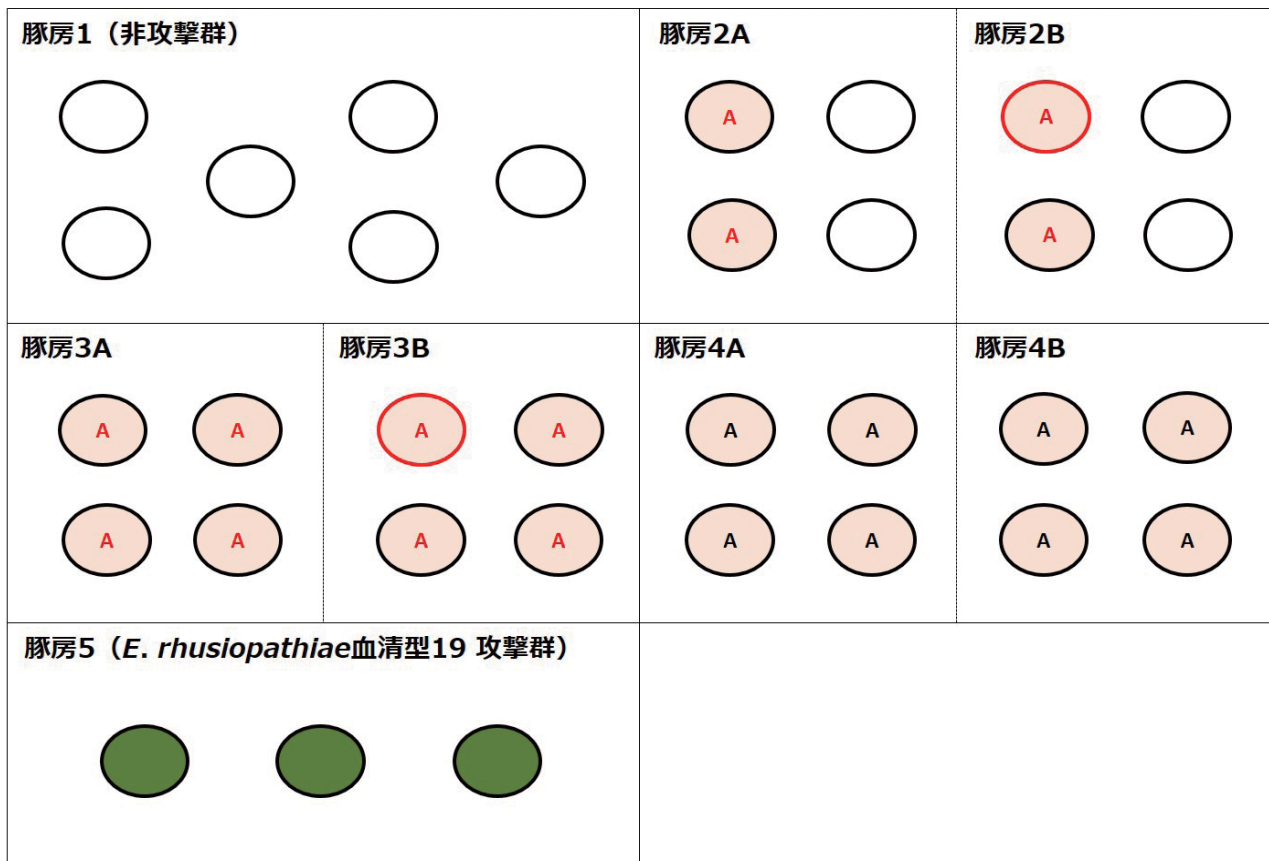


図1 実験計画と収集した検体数

豚房内の円は豚の頭数を表す。白い円は感染させなかった非攻撃豚、ピンクの円は血清型 1a の *E. rhusiopathiae* を接種した豚、緑の円は血清型 19 の *E. rhusiopathiae* を接種した豚、赤字の A は臨床症状発生後に抗生物質を投与したことを示し、黒字の A は臨床症状が認められる前（攻撃 2 日後あるいは攻撃日）に抗生物質を投与したことを示す。豚房 2B と 3B の赤線の円は、豚が接種後 2 日に豚丹毒で死亡した事を示す。豚房 1：非攻撃陰性対照群。豚房 2A 及び 2B：口腔液中の細菌量の影響を調べるために半分の豚は非攻撃のまま。

32 の陰性対照検体：豚房 1 から 18 検体、豚房 2 から 14 検体（共に感染前）。112 の陽性検体：豚房 2 から 5 の接種後 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、21 及び 28 日に得られた口腔液。

接的（ELISA と FMIA）検出法を用いて検査された。接種前 7 日、接種日、接種後 7、14、21 及び 28 日に採血し、血清はリアルタイム PCR で検査され、さらに ELISA 及び FMIA によって抗 *E. rhusiopathiae* IgM 抗体の有無を検査された。以前に ELISA と FMIA によって検出されたすべての陰性対照豚は、実験期間中は陰性のままであったが、攻撃後の豚は血清中の抗 *E. rhusiopathiae* IgG 抗体が上昇した。

2.1.2 検体採取

口腔液収集に必要な条件として、実験開始より前に、すべての動物は綿製の縄を噛む訓練をさせた。豚房単位の口腔液は既報と同様に収集した。要約すると、縄の一部はそれぞれの豚房に垂らされ、豚が縄を吸える様に 20-30 分間各豚房の前面に「縄保定器」を用いて固定した。曝露後、湿った縄の一部は 1 ガロンのプラスチック袋に入れ、縄の下部を切って縄が入った状態で袋に封をした。実験室では、口腔液は湿った縄を絞り器に通すことで機械的に抽出され、袋の下部に貯められた。その後、袋の下部の端を切り、収集された口腔液（3.5-10

mL）を 50 mL 遠沈管に注いだ。検体は 4℃、10 分 1000 × g で遠心分離してゴミ取りし、上清を 5 mL ポリスチレンチューブに入れ、検査まで -80℃ で保管した。

2.2. 感染状況が不明な野外検体の口腔液

実験検体に加えて、PRRSV の監視のために集められた検体及びアイオア州立大学に提出された検体から無作為に選択された 146 の口腔液検体も供試した。野外から収集した口腔液検体は 10 州の 28 の異なる農場の育成及び肥育豚のいずれかから得られ、それらはリアルタイム PCR、IgG 及び IgM FMIA により検査された。

結果

3.1. 感染状況が既知な検体

3.1.1. 口腔液収集と *E. rhusiopathiae* 感染の相関

口腔液検体の収集における *E. rhusiopathiae* 感染の影響は群単位で十分な検体量が収集できたかに関して評価した。すべての豚は接種前の 7 日間で縄を噛むことに興味を示し、結果としてこの期間の口腔

液検体の収集に成功した。*E. rhusiopathiae* 血清型 1a 感染前（接種前 7 日及び接種日）と後（接種後 6 日まで）における試験群 2、3 及び 4 から収集した検体量の比較から、豚の行動による影響が示唆され、結果として縄を用いて収集した口腔液量が減少した。加えて、豚房 2B 及び 3B（表 1）において接種後 2 日に 1 頭の豚の死亡が認められたため、これらの群から集められた液量が減少した。しかしながら、抗生物質投与後の接種後 6 日から、豚が縄を噛む事に再び興味を示し始め、得られる検体量が徐々に通常の状態に回復した。すべての検査日において、陰性対照群（豚房 1）と *E. rhusiopathiae* 19 に感染させた群（豚房 5）の間に得られた口腔液量に有意な差は認められなかった。

3.1.2. *E. rhusiopathiae* 陰性状態の確認

32 の陰性の口腔液は直接的（菌分離及びリアルタイム PCR）及び間接的（ELISA 及び FMIA）検出法によって検査した。陰性対照の豚房 1（n=18）から収集された口腔液はすべての検査結果において陰性であった。加えて、攻撃群の接種前（n=14）に収集された口腔液はすべての検査法において陰性であり、結果として 4 つの検査法の特異性は 100% であった。

3.1.3. 豚房の口腔液検体からの *E. rhusiopathiae* 分離

攻撃されたすべての豚の豚房単位の口腔液（n=112）における液体培地増菌法を用いた菌分離結果は表 1 に示した。血清型 1a の *E. rhusiopathiae* は豚房 4B では接種後 1 及び 2 日に分離され、豚房 3B では接種後 1、2 及び 3 日に分離された。豚房 2A、2B、3A、4A 及び 5 から収集された口腔液からの菌分離は成功しなかった。

3.1.4. 豚房単位の口腔液及び個体別の血清検体における *E. rhusiopathiae* DNA の検出

表 1 に示したように、*E. rhusiopathiae* DNA の最も早い検出日はすべての攻撃群で接種後 1 日に認められ、検出期間は接種後 1 から 8 日であった。実験感染後、最初の血清採取は接種後 7 日（おそらく急性期の後）に行い、DNA はどの血清検体からも検出されなかった。

3.1.5. 血清中の抗 *E. rhusiopathiae* IgM 及び IgG 抗体の検出

実験感染させた豚から接種後 0、7、14、21 及び 28 日に採取した血清についての抗 *Erysipelothrix* spp. IgM の動態は ELISA で接種後 7 日、FMIA で接種後 7 から 14 日に、感染した全ての群で検出された。しかしながら、FMIA を用いた IgM 力価は接種後 21 日の時点では 2B（1/3）、3B（1/4）、4A（1/4）、4B（1/4）及び 5（3/3）で検出され、接種後 28 日では 3B（1/4）にのみ検出された。IgM が

検出限界以下であった 3B 群の 1 頭を除いて、感染したすべての豚はアイソタイプが IgG に変化していることがわかった。4A 群の 2 頭と 4B 群の 1 頭は接種後 28 日まで IgM 及び IgG 陰性のままであった。

3.1.6. 豚房単位の口腔液における抗 *E. rhusiopathiae* IgM 及び IgG 抗体の検出

実験期間中の ELISA あるいは FMIA で得られた口腔液の IgM 及び IgG の分布を表 1 に示した。攻撃した全ての豚房において、抗 *Erysipelothrix* spp. の IgM 及び IgG 抗体が両検査法により検出された。最も早い IgM 抗体応答は、FMIA によって豚房 5 の接種後 4 日に、ELISA によって豚房 2B、3A、3B 及び 5 の接種後 5 日に検出された。予想された様に、FMIA 及び ELISA の両方において、曝露後日数の経過とともに豚房単位の口腔液中抗 *E. rhusiopathiae* IgG 抗体に対するシグナル強度は上昇した。しかしながら、全体的なシグナル強度は FMIA で強かった。最も早い IgG 抗体応答は、FMIA については豚房 4B と 5 の接種後 5 日に、ELISA については豚房 3B で接種後 7 日に検出された。抗 *E. rhusiopathiae* IgG 抗体は特定の豚房で FMIA によって最初に検出され、一度 FMIA によって特定の豚房に抗 *E. rhusiopathiae* IgG 抗体が検出され始めると、その後は口腔液中の抗 *E. rhusiopathiae* IgG 抗体陽性が継続した。その結果は、*E. rhusiopathiae* に対する抗体応答が接種後 12 から 14 日（表 1）で検出されなかった豚房 2B（1/3 の豚が感染）を除いて、ELISA の結果と同様であった。攻撃した豚房から採取したすべての口腔液検体は接種後 8（FMIA）あるいは 14 日（ELISA）まで抗 *E. rhusiopathiae* IgM 抗体陽性であった（表 1）。

3.2. 感染状態が不明な野外検体

3.2.1. 野外口腔液検体中の *Erysipelothrix* spp. DNA の分布

146 件の口腔液において、*E. rhusiopathiae* DNA は検体の 23.3%（34/146）に認められ、一方、*E. tonsillarum* DNA あるいは *E. sp. strain 2* DNA はいずれの検体からも検出されなかった。

3.2.2. 野外検体の口腔液における抗 *E. rhusiopathiae* IgG/IgM 抗体の分布

野外検体において、*E. rhusiopathiae* IgG 抗体は 59.6%（87/146）の検体に認められ、一方 IgM 抗体は検体の 5.5%（8/146）に認められた。PCV2 の DNA あるいは IgM/IgG 抗体は口腔液の 33.6%（49/146）には認められなかった。

考察

以前より豚群中のウイルスの動きを証明するための優れた検査用検体として用いられていた口腔液は、

E. rhusiopathiae の様な細菌の動態を証明するためにも有用である事がわかった。

おそらく臨床症状を呈する前の *E. rhusiopathiae* 感染のタイムリーな検出は、より効果的な治療を行うのに重要である。さらに、この研究の目的は口腔液検体に基づいた実験的検査方法の構築と確認、感染の初期段階からの *E. rhusiopathiae* 感染動態についてのリアルタイムな監視、および豚丹毒の発症を予想するためにこの情報を利用することであった。増菌培養による *E. rhusiopathiae* 分離、リアルタイム PCR による *E. rhusiopathiae* DNA 検出及び rSpaA415 を用いた ELISA と FMIA による抗 *E. rhusiopathiae* IgM/IgG 抗体の検出は、*E. rhusiopathiae* に実験的あるいは自然に感染した豚から集められた個々の口腔液検体に用いられた。我々の知る限りでは、既知の陽性及び陰性検体について *E. rhusiopathiae* 感染をモニタリングするために口腔液が有用かどうかの網羅的な研究は行われていなかった。本研究より得られたデータ (表 1) は、*E. rhusiopathiae* の直接的検出法 (特にリアルタイム

PCR) は間接的あるいは抗体検出法 (FMIA 及び ELISA) より接種後 4 日までは感度が高いことを示している。核酸増幅法が培養法より感度が高いことが証明され、血清学的検査と違って、感染症の急性期に有用であるということと、この結果は一致していた。口腔液において最初に検出された抗 *E. rhusiopathiae* IgM 抗体は豚房 5 の接種後 4 日であり、FMIA による最初の IgG 抗体検出は豚房 4B 及び 5 で接種後 5 日であった。口腔液における抗 *E. rhusiopathiae* IgG 抗体の早期検出は、PRRSV を実験感染させた豚から得られたデータと類似しており、抗 PRRSV IgG は接種後 7 日で検出された。さらに、接種後 5 日までの IgM 及び IgG を合わせた、全豚房単位の検出率はリアルタイム PCR (2/7) より FMIA (5/7) で高かった。接種後 5 日以降の結果から、間接検出法 (特に FMIA) は高い検出力を示し、一方直接検出法では感染から回復する接種後 9 日以降、どの陽性サンプルからも検出できなかった。感染が進むにつれて、IgM の急激な上昇が口腔液サンプルで観察され、それは血清でも裏付けられ

表 1 接種後 1 から 28 日の異なる処置条件 (図 1 より) の各豚房から得られた口腔液中の *Erysipelothrix spp.* の同定

豚房	検査法	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	21	28
2A	菌分離																
	RT-PCR	黄		黄	黄	黄		黄									
	ELISA						橙	橙	赤	赤	赤	黄					
	FMIA						橙	赤	赤	赤	赤	赤	赤	黄			
2B	菌分離																
	RT-PCR	黄		黄				黄									
	ELISA						橙	橙	赤	赤	赤	黄					
	FMIA						橙	赤	赤	赤	赤	赤	赤	赤	黄		
3A	菌分離																
	RT-PCR	黄		黄	黄	黄											
	ELISA						橙	橙	赤	赤	赤	赤	黄				
	FMIA						橙	赤	赤	赤	赤	赤	赤	赤	黄		
3B	菌分離																
	RT-PCR	黄		黄	黄	黄											
	ELISA						橙	橙	赤	赤	赤	赤	赤	黄			
	FMIA						橙	赤	赤	赤	赤	赤	赤	赤	黄		
4A	菌分離																
	RT-PCR	黄		黄					黄								
	ELISA								橙	橙	橙	黄					
	FMIA								橙	赤	赤	赤	黄				
4B	菌分離																
	RT-PCR	黄		黄					黄								
	ELISA								橙	橙	橙	黄					
	FMIA								橙	赤	赤	赤	赤	黄			
5	菌分離																
	RT-PCR	黄															
	ELISA								橙	橙	橙	赤	赤	黄			
	FMIA								橙	赤	赤	赤	赤	赤	黄		

検査方法は増菌培養法による菌分離、リアルタイム PCR (RT-PCR)、rSpaA415 を用いた間接的 IgG あるいは IgM ELISA および rSpaA415 を用いた IgM あるいは IgG FMIA を使用した。

白色は陰性を、黄色は IgM での検出を除き、すべての検査法における陽性を示す。オレンジは ELISA 及び FMIA において、IgM の検出が可能であったことを示す。赤色は ELISA 及び FMIA において、IgM と IgG 両方で陽性の検体を示す。黄色及びオレンジの枠は偽陰性の可能性がある結果を示す。豚房 1 (非攻撃対照群) はすべての検査法で陰性であった。

た。その後 IgG 量の増加につれて、IgM の減少が続いた。従って、口腔液中の IgM と IgG の割合を測定することによって、*Erysipelothrix* spp. 感染の推移と継続を同定する事が可能である。IgM は初感染時の早期に現れることから、IgM の高比率は早期の感染段階を示しており、一方 IgG の高比率は感染後期を示している。

本研究において 1) 群における感染動物数 (希釈効果)、2) 抗生物質投与のタイミング (臨床症状の認められる前か後か)、3) 使用した *E. rhusiopathiae* の病原性、4) 収集した口腔液量の 4 つの問題が考えられた。様々な検査法の成績は、同じ処置をした豚房間で少し異なっていた。本研究の条件下では、非攻撃動物に対する攻撃した動物数は検査の感受性に影響を与えた。直接法で比較した場合、いくつかの陽性検体は特定の日に於いてリアルタイム PCR が偽陰性であり (この「ギャップ」は表 1 に示した)、菌分離は実験感染を行ったすべての豚において、3B 及び 4B の豚房の豚からのみ成功した。間接検出法において、ELISA はおそらく希釈効果 (豚房 2) によって抗体量の変化に影響が認められ、一方 FMIA は抗体量が非常に少ない希釈されたサンプル (感染と非感染豚が同居する豚房から得られたサンプル) を検出できるほど十分に高感度であった。

予想された様に、抗生物質投与のタイミングはすべての検査の感受性と検出にある程度影響を及ぼした。本実験条件下では、リアルタイム PCR は菌分離に比べて多くの陽性検体を検出し、予想通り、明らかに抗生物質投与後に集められた検体は感度がよくなかった。これらの結果は、抗生物質を投与されて間もない野外検体からの病原体分離が困難なことを明らかにした。豚房 4A 及び 4B (臨床症状を呈する前に抗生物質を投与された) の抗生物質投与後 2 から 5 日に得られた口腔液では、*Erysipelothrix* spp. DNA の検出率が減少した。しかしながら、臨床兆候の出現後に抗生物質を投与された豚がいる豚房 3A 及び 3B で DNA は容易に検出された。加えて、早期の抗生物質投与によって、口腔液中の抗 *E. rhusiopathiae* IgG/IgM 抗体検出に干渉する可能性が主に ELISA で認められた。この現象は血清検体における IgM 抗体の結果と、以前に報告された IgG 抗体の血清データから支持され、豚房 4A の 2/4 と 4B の 1/4 の豚は接種後 28 日まで検出可能な液性免疫反応が認められなかった。

いくつかの研究では、多くの感染症における急性初期感染の重要なマーカーである IgA 抗体の検出が支持されている。本研究では、抗 *E. rhusiopathiae* IgM 及び IgG 抗体のみを測定した。我々の研究室で実施した抗 rSpa415 IgA 検出についての予備試験的 ELISA (not shown) では、IgA 測定は血清中及び粘膜面の抗体動態についての追加情報をもたらすが、*E. rhusiopathiae* 感染のいずれの段階においても実験室内検出法の感度を改善するものではなかった。この結果に加えて、高品質の抗ブタ IgA の二

次抗体を定期的に入手することが困難であることから、本研究に IgA 検出の結果は含まなかった。

株の病原性から見ると、直接検出法は豚房 5 の口腔液検体中の *E. rhusiopathiae* 血清型 19 を検出するのに効果的ではなかった。初めの接種後 3 日以内に臨床的に影響が認められた *E. rhusiopathiae* 血清型 1a 感染豚と異なり、*E. rhusiopathiae* 血清型 19 感染豚の群は臨床症状が認められなかった。豚房 5 では、抗 *E. rhusiopathiae* IgM 抗体は FMIA で接種後 4 日、ELISA で接種後 5 日に早くも検出された。また、豚房 5 (*E. rhusiopathiae* 血清型 19) のいずれの豚も抗生物質投与を受けなかった。

訓練していない動物から集められた口腔液では検査が難しいことが以前より報告されていた。本報告の実験条件下では、感染の急性期の動物の口腔液収集は、動物が発症し、不活発となり、縄を噛む事に興味を失ったため検体採取が困難であった。口腔スワブの収集は、直接検出法 (PCR、菌分離) の選択肢として機能したが、多くの液量を必要とする抗体検出にとって選択肢とはならなかった。縄を均一に噛んでくれなかったことは、野外条件と似た状態になる様に豚房に多くの豚を入れることによって改善されるだろう。縄にりんごやいちごの香りの様な誘引剤を利用することは、検体の回収量を改善するだろう。しかしながら、今回の結果から、検査の成功には、集まった検体量よりも細菌に対する抗体量が重要であると我々は考えている。

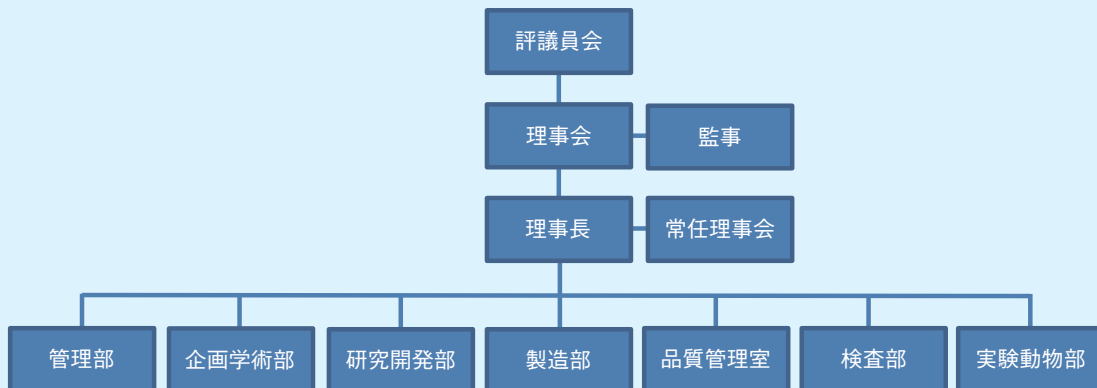
結論

実験的に感染させた豚から得られた唾液検体の分析により、リアルタイム PCR と FMIA IgM/IgG の組み合わせが *Erysipelothrix* spp. 感染の診断あるいはモニタリングに最もよい手段であった。リアルタイム PCR と FMIA IgM の両方あるいは一方が陽性で IgG が陰性の検体は、感染の急性期を示していると考えられた。IgG のみが陽性の検体は感染の慢性期を示していると考えられた。実験感染豚から得られる口腔液が少量に限られていても、利用価値の高い標本であるこの検体には大きな可能性があることが我々の研究により立証された。この新しい手段は、おそらく豚丹毒の発生を予測することができ、潜在的な生産損失を最小限にするための積極的な処置と予防を行うのに利用可能なデータを生み出す事がわかった。加えて、本稿で提案された検査手法は、豚丹毒の発生に関連したワクチン接種の有効性についても新たな知見を提供するかもしれない。この手法に関する研究は、他の細菌に対しても応用することができるだろう。

お 知 ら せ

当研究所の平成26年度定時評議員会が、去る平成26年5月30日に開催され、平成25年度の事業報告及び決算報告が承認・可決されると共に、組織、理事、監事及び評議員が新たになりましたので、お知らせいたします。

組織



評議員

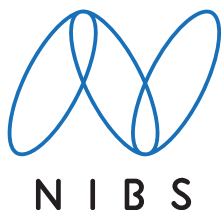
井土 俊郎 小川 博之 小野憲一郎 杉浦 勝明

理事・監事

氏名	役職	担当
長井 伸也	理事長	経営
笹川 千尋	所長	研究開発及び検査担当
岩田 晃	常務理事	製造、品質管理及び実験動物担当
草薙 公一	常務理事	企画学術担当
朱通 市次郎	常務理事	管理担当
真板 敬三	監事	
小坂 善三	監事	

平成25年度研修者・見学者受け入れ状況（平成25年4月から平成26年3月）

来所日・期間		所属機関・人数		研修・見学内容
平成25年度	8月19日～8月21日	大分県食肉衛生検査所	1名	技術習得
	8月26日～8月30日	日本獣医生命科学大学	1名	学外実習
	3月3日～3月5日	三重県中央家畜保健衛生所	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587号) 平成26年6月25日印刷 平成26年7月1日発行(第60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
<http://nibs.lin.gr.jp/>
 発行人 草薙公一
 編集室 委員/大嶋 篤(委員長)、川原史也、今井孝彦
 事務/企画学術部
 印刷所 株式会社 精興社
 (無断転載を禁ず)