

日生研おより

2015年(平成27年)3月号 第61巻第2号(通巻591号)

挨拶・巻頭言

「課題立国」を考える

.....笹川千尋(2)

獣医病理学研修会

第54回 No. 1108 レッサーパンダの肝臓

.....宮崎大学(4)

文献紹介

牛ウイルス性下痢ウイルス-1の

サブグループ間における血清学的関係

.....佐藤亮一(5)

プロイラーの壊死性腸炎：病因に関する

最新のレビュー.....張国宏(8)

お知らせ

編集後記.....(12)



「課題立国」を考える

笹川千尋

私がまだ大学院生の頃は、研究者・技術者が不足する時代が来るとは想像すらできなかった。しかし2013年2月に日経新聞に掲載された「科学技術立国を支える人材に厚みを」と題する記事はその現実を思い起こさせてくれた。この記事が出された動機は、その数日前に発表された「理系女子研究者によるSTAP細胞の発見」があった。STAP細胞の顛末はともかく、その記事では日本の科学技術を支える労働人口の減少と女性研究者の少ない現状が述べられていた。女性研究者の占める研究者人口の比率は、日本はわずか14%で、英国の38%、米国の34%と比べ大きく見劣りすることが指摘されている。記事では、科学技術を支える理系の女性の割合を増やすためには、女性研究者育成に向けた政策立案の段階から女性や若手が積極的に関わるのが提案されていた。記事では大学と企業の研究者総数の減少にも触れている。2013年3月の時点で研究者総数は84万人で、とりわけ企業の研究者・技術者は、2012年より一年間で2%も減少したと述べている。この傾向は私が大学に奉職していた時期にすでに実感していた。国立大学では大学教員の定数削減が長く続き、特に2000年に国立大学が法人化して以後は、大学院志望者数も次第に減少していった。これらとの因果関係は定かではないが、2007年を境に我が国から世界の上位10%にランクされる論文生産数は先進国のなかで唯一減少し、カナダ、イタリアに後塵を排するまでに凋落した。拠点的な大学の世界ランキングも同様に下降傾向にある。

研究者・技術者を支える若手人材不足の問題は、総務省の「労働力調査」のホームページからも明らかだ。15歳～64歳の労働総人口は、2000年には6,274万人であったが、2025年には5,610万人へと減少が予測されている。総人口に占める労働人口の割合も、2010年までは63.8%であったものが2060年までに50.9%になり、総人口も2010年の1億2800万人をピークに、2050年までに9000万人へと減少し、最終的には8,000万人台にまで減ることが予測されている。因みに65歳以上の高齢人口は、2010年の23.0%から2060年には39.9%へとアップして、65歳以上が3人に1人となる社会を迎える（2014年、総務省ホームページ、少子高齢化・人口減少社会参照）。

この原因が出生率の低下にあり、その結果生じる「人口減少という課題」を解決する方法は分かっているが、それを実行できる社会ができていないところに問題の難しさがあると言われている。この課題を克服するためには、「女性の社会進出をさらに促進させる」ことが残された最後の手段であると認識されるようになってきた。政府はすでに少子化対策と同時に、女性の社会進出を加速させるため様々な政策を打ち出してきたが、残念なことにまだその効果は見えていない。しかし、女性が結婚・出産後も安心して職場に復帰できるシステムと、その後の地位向上を促進するための報道が多くなってきたのは喜ばしいことである。昨年12月22日の日経新聞には、各国の大企業における女性役員の割合を比較したデータが掲

載されていた。フランスの24%を筆頭に日本は僅か2%である。人口の少ないスカンジナビア諸国では女性役員の比率は高く、少ない人的資源を女性がカバーしている現実を示唆していた。

一方で私の身の回りで明るいニュースもあった。昨年から今年始めに、私が関係する複数の大学の中堅女性研究者3人が出産した。その中の1人は40歳半ばでの初産にもかかわらず、母子ともに元気に経過し、お母さんは産後2ヶ月で研究室へ復帰した。総務省は暮れの12月12日、国内企業、大学、公的機関などの女性研究者が、2013年度末に13万6000人となり、過去最多を記録したことを公表した。幸い、私の勤務している日生研でも女性研究者、女性職員の積極活用への取り組みが少しずつ実を結び、産休を取り、産後も職場復帰を果たす例が増えている。大学・企業が地元の市町村と連携して、出産・子育て、学童保育の支援に取り組むことは、女性が男性と同等に活躍できる社会を築く土台であり、これこそが先進国としての地位に相応しい社会ではないだろうか。

翻って、日本は明治開国以来常に多くの課題を抱えて発展してきた。例えば地下資源が乏しいという課題がある。食料自給自足ができないという課題もある。さらに地震、津波、台風、豪雪等の、自然災害の脅威にも向き合って生きて行かねばならない。さらには、地球温暖化や国境を超えて拡大する新型感染症に対する課題もある。我々はこれらの課題に悩まされ生活しているが、私が東大医科研に在職していた頃、小宮山東大総長が医科研の視察にこられ講堂で講演された時の言葉を今でも忘れない。総長は、我が国が明治開国以来発展をとげてこられた理由として、上述の課題を列挙して、日本ほど多くの課題を抱えて発展できた国は希有であると言われた。即ち、「我が国がこれまで発展を維持することができたのは、我が国が幾多の課題を抱え、それらを克服する努力と英知を常に結集して新たな技術を創造してきたからである」と述べ、日本は正に「課題立国」で成り立っているとされた。

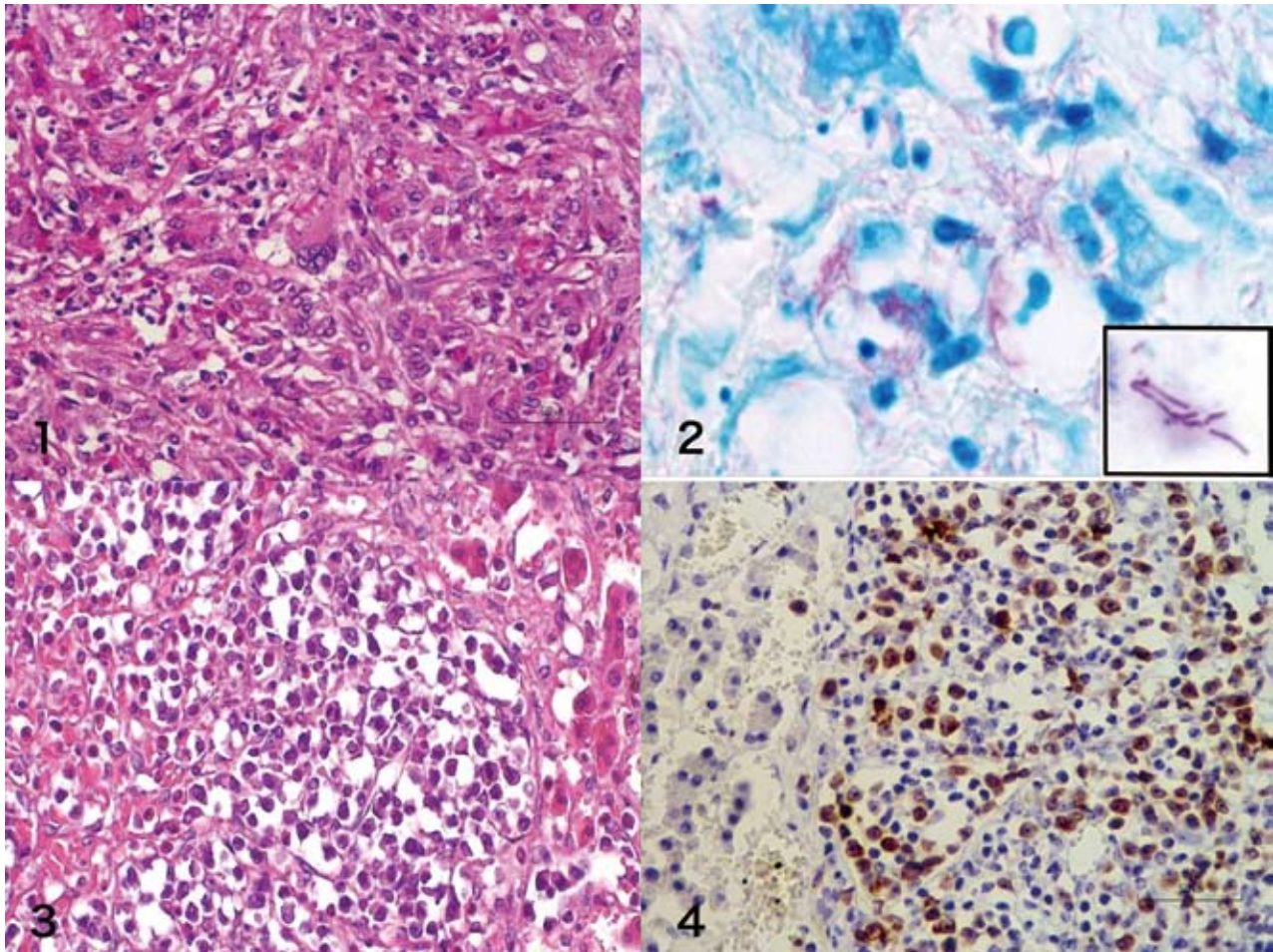
昨年末、LEDの発明により3名の日本人研究者がノーベル物理学賞を授賞した。これも「電気エネルギーの課題」克服に貢献している。福島第一原発4号機の使用済み核燃料の回収も無事終了し、これから廃炉までの長い道のりが始まったばかりだが、これを通じて未知なる多くの新技術が開発されつつあると聞く。

今年もまだ始まったばかりで、どのような課題が個人、社会、国に待ち受けているかわからない。しかし新たな幾多の課題が待ち受けていることだけは確かであり、我々はそれらの課題を糧に、素晴らしい未来を構築することに秀でた国民であることに自信を持ち進むべきではないだろうか。女性の社会進出が欧米並みになり、出生率も上昇し、冒頭のべた課題が克服され、若い優秀な男女が私達の職場へも押し掛ける日が訪れるのを密かに待っている。

(所長)

レッサーパンダの肝臓

第 54 回獣医病理学研修会 No. 1108 宮崎大学



動物：レッサーパンダ、雄、9歳。

臨床事項：2012年12月にある動物園に導入され、その時点で全身に皮膚病変を認めた。2013年1月頃、抗生剤により皮膚病変は改善されたが、リンパ節の腫大が認められた。投薬を継続したが、4月死亡した。

肉眼所見：被毛粗剛で高度に消瘦していた。肝臓全葉において直径5～30mm大の黄～乳白色結節の多発、左側腎臓断面の白色巣、黄褐色透明腹水、肺各葉に直径約3mm大の乳白色結節が認められた。体表および腹腔内リンパ節、特に腋窩リンパ節は高度に腫大し、断面は乳白色を呈していた。

組織所見：肝臓全葉において、多巣状性に肉芽腫病変を認めた。肉芽腫中心部は壊死し、周囲を類上皮細胞、リンパ球、好中球が取り囲むように浸潤し、一部多核巨細胞が散見された(図1)。チール・ネルゼン染色において、主に壊死巣で陽性菌を確認した(図2)。門脈域では、大型淡明核と好酸性細胞質を有するリンパ球様腫瘍細胞の増殖を認め、一部ではリンパ管や実質内にも浸潤していた。同細胞の異型性は強く、核分裂像を多数認め、明瞭な核小体を有していた(図3)。免疫組織化学的染色において、腫瘍細胞は、CD3(図4)、Ki-67およびPCNAの各抗体にいずれも陽性を示した。一方、CD20抗体に陰性を示した。その他臓器では、肺、左側

腎臓、体表ならびに腹腔リンパ節において上記と同様の所見を認めた。また、右側腎臓ではリンパ腫病変のみを、脾臓では肉芽腫性炎のみを確認した。

診断：レッサーパンダにみられたT細胞リンパ腫を伴う抗酸菌による肉芽腫性肝炎(レッサーパンダにみられたT細胞リンパ腫を伴う非結核性抗酸菌症)

考察：特殊染色結果より、肉芽腫は抗酸菌感染に起因することが示唆された。肉芽腫病変部から、非結核性抗酸菌の一種 *Mycobacterium gastri* が分離・同定された。免疫組織化学的染色結果より、異型リンパ球は増殖活性の高いT細胞由来の腫瘍細胞であることが明らかとなった。肉芽腫周囲では、高度に線維化していたことから、*M. gastri* に感染後、リンパ腫を発症したと推察された。ヒトでは、慢性炎症がリンパ腫の発症要因に挙げられており、本症例についても同様の病理組織発生機序が考えられた。ヒトでは、B細胞リンパ腫またはT細胞リンパ腫を伴う抗酸菌症が報告されているが、動物ではフェレットの一例のみであり、本症例は貴重な症例と考え出題した。

(福家直幸・平井卓哉)

参考文献：

Saunders, G. K., Thomsen, B. V. 2006. Lymphoma and *Mycobacterium avium* infection in a ferret (*Mustela putorius furo*). *J. Vet. Diagn. Invest.* **18**(5) : 513-515.

文献紹介

牛ウイルス性下痢ウイルス-1のサブグループ間における血清学的関係

佐藤 亮一

Serological relationships among subgroups in bovine viral diarrhea virus genotype 1 (BVDV-1)

Gizem Alpay and Kadir Yesilbag

Veterinary Microbiology 2015 Jan 30 ; 175(1) : 1-6.

紙面の都合により要約は割愛致しました。

1. 序論

牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) はフラビウイルス科ペスチウイルス属に分類されており、エンベロープを有する一本鎖 RNA ウイルスである。ウイルス RNA の高度保存領域 (5' UTR) における塩基配列の違いによって、2つの遺伝子型である BVDV-1 及び BVDV-2 に分けられる。現在までに、BVDV-1 には少なくとも 18 種類のサブグループ (BVDV-1a ~ BVDV-1r) が、BVDV-2 には 4 種類のサブグループ (BVDV-2a ~ BVDV-2d) が報告されている。

BVD による経済的損失の原因としては、下痢、発咳、増体量の低下、感染抵抗性の低下に伴う罹患率の増加、胎仔への持続感染の成立及び粘膜病による致死の転帰が挙げられる。上記を踏まえ、ヨーロッパでは地域または国家レベルでの BVDV 根絶プログラムが組織されている。

同一遺伝子型に属しサブグループの異なる BVDV 株を用いた交差中和試験は、それらの抗原性及び遺伝学的相違を解明する上で重要である。野外株における抗原性の相違は、診断解析のみならず予防にも影響を与える。BVDV のサブグループ間における血清学的関係性に関する研究がいくつか存在する。特定の BVDV 株を実験感染或いはワクチネーションして得られた血清は、サブグループの異なる株に対して十分な免疫効果を得ることが出来ないとの報告がある。また、BVDV-1 サブグループの地域分布における多様性が報告されている。そのため、BVDV のサブグループ間における血清学的関係性を明確にすることは、効果的な防御戦略の一助となる。

本研究では、BVDV-1 サブグループの代表的な株間における血清学的関係について調査した。本研究の目的は、地域限定的もしくは世界各地で流行している BVDV-1 のサブグループ間における血清学的類似性を決定する事である。

BVDV-1 のサブグループから 6 種類のウイルス (BVDV-1a、-1b、-1d、-1f、-1h 及び -1l) を交差中和試験に用いた。ウイルスは系統的解析とモノクローナル抗体との反応性によって選択された。

免疫に用いたウイルスは SFT-R 細胞 (羊胎仔胸腺由来株化細胞) を用いて培養した。交差中和試験には MDBK 細胞 (牛腎臓由来株化細胞) を用いた。この際、牛胎仔血清及び株化細胞は BVDV 抗原及び抗体のいずれも陰性であった。本研究に用いた全てのウイルス株は NCP 株 (培養細胞に細胞変性効果を示さないウイルス) (表 1) であるため、間接免疫ペルオキシダーゼ法 (後述) によってウイルスの増殖を確認した。

2.2. 免疫抗原の調製

SFT-R 細胞で増殖させた各ウイルス培養液は、間接免疫ペルオキシダーゼ法によってウイルスの増殖を確認した後、限外ろ過法によって濃縮した。透析後、濃縮ウイルス浮遊液中のタンパク質を定量した。ウイルスの不活化はバイナリーエチレンイミンによって実施した。ウイルスが不活化されたことを確認するため、各不活化ウイルス液を MDBK 細胞に接種し 3 回盲継代後、間接免疫ペルオキシダーゼ法を実施した。

2.3. 羊への免疫

本試験で用いた高度免疫血清は羊を用いて作出した。1-5 歳齢のアワシ羊を 1 群当たり 3 頭として 7 群 (このうち 1 群は対照群) 用意した。事前の検査結果より、全ての羊はペスチウイルスの抗原及び抗体のいずれも陰性であった。試験群である 6 群には、各不活化ウイルス浮遊液 (2 mg/mL) とフロイント完全アジュバントを等量混合して皮下に 3 回接種した。4 回目には不活化ウイルス浮遊液とフロイント不完全アジュバントを等量混合して接種した。対照群には不活化ウイルス浮遊液の代わりに PBS を用いて、同様に皮下接種した。免疫後 0、15、30、45、60 及び 75 日目に血清サンプルを採材し非働化した。

2. 材料と方法

2.1. ウイルスの調製

表1 羊への免疫と交差中和試験に用いた BVDV 株

ウイルス株	BVDV-1 サブグループ	生物型	分離された年
BVDV-TR2	BVDV-1a	NCP	1999
BVDV-TR12	BVDV-1b	NCP	2000
BVDV-TR11	BVDV-1d	NCP	1999
BVDV-TR38	BVDV-1f	NCP	1999
BVDV-TR23	BVDV-1h	NCP	1997
BVDV-TR1	BVDV-1ℓ	NCP	1999

2.4. 交差中和試験

継時的に採材した6種類の血清（免疫後0、15、30、45、60及び75日目に採材）を用いて、ホモ株のBVDVに対する中和抗体価を測定した。ホモ株のウイルスに対して最も高い中和抗体価を示した血清を用いて、ヘテロ株のウイルスに対する交差中和抗体価を測定した。簡潔に記すと、非働化済みの血清を2倍階段希釈し24ウェルプレートに400 μ L加えた。そこへ100 TCID₅₀に調製したウイルス液を等量加え37 $^{\circ}$ Cで1時間吸着させた。吸着後、等量のMDBK細胞（2 \times 10⁵ cells/mL）を加え、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂気相下で3日間培養し、間接免疫ペルオキシダーゼ法によって中和抗体価を測定した。

2.5. 間接免疫ペルオキシダーゼ法

本研究で用いたBVDVは全てNCP株であるため、増殖させたウイルスの確認や中和抗体価の測定には間接免疫ペルオキシダーゼ法を用いた。交差中和試験における中和抗体価の測定には、24ウェルプレートで培養したMDBK細胞を熱固定（80 $^{\circ}$ C、3時間）して用いた。各ウェルにO-D-glucopyranosideを0.5%含むPBSを200 μ L加え、室温で10分間静置した。洗浄と抗体希釈にはTween-PBS（0.05% Tween20 in PBS）を用いた。3回洗浄後、BVDVの非構造タンパク質であるNS3を特異的に認識するマウス由来モノクローナル抗体を加え、室温で90分間反応させた。同様の操作をビオチン標識抗マウス抗体及びHRPO標識ストレプトアビジンを反応させる工程で行った。基質液（2 mg AEC in 0.3 mL DMF、4.7 mL Na-acetate buffer (pH 5.5) 及び0.05% H₂O₂）を加え、30分以内に細胞内が赤く染色された場合を陽性とした。ウイルスの増殖を50%阻害する血清の最大希釈倍率を中和抗体価とみなした。抗原の近縁性（R値）は下記の公式によって求めた。

$$R = 100 \times \sqrt{(AB \times BA) / (AA \times BB)}$$

公式中のAB及びBAは、それぞれBウイルス株に対するAウイルス免疫血清、及びAウイルス株に対するBウイルス免疫血清の中和抗体価を示す。AAとBBは各血清とそのホモ株のウイルスに対する中和抗体価を示す。抗原の類似性が高ければR値は100もしくは100に近い値を示す。

3. 結果

3.1. 免疫抗原の作製

間接免疫ペルオキシダーゼ法によって、全てのウイルス株がSFT-R及びMDBK細胞で増殖することを確認した。

不活化前のウイルス力価は表2の通りである。ウイルス濃縮液のタンパク質濃度は7.8–18 mg/mLの範囲であった。ウイルス不活化工程後、いずれのウイルス濃縮液も細胞への感染を認めなかった。この結果から、免疫抗原には感染性ウイルスが残存していないことが示された。

3.2. 交差中和抗体価

BVDV-1のサブグループ間における交差中和抗体価を表3に示す。ヘテロ株に対する中和抗体価と比較し、ホモ株に対する中和抗体価は高い値を示した。全てのBVDV免疫血清は、中和抗体価に差を認めるものの、全てのヘテロ株のウイルスに対して中和活性を有した。BVDV-1f免疫血清はBVDV-1a及びBVDV-1bに対して弱い中和活性を示した（1:20）。同様に、BVDV-1a及びBVDV-1b免疫血清はBVDV-1fに対して弱い中和活性を示した。BVDV-1f免疫血清はBVDV-1dに対して強い中和活性を示した（1:1280）が、BVDV-1d免疫血清はBVDV-1fに対して弱い中和活性を示した（1:40）。BVDV-1a免疫血清はBVDV-1ℓに対して弱い中和活性を示した（1:80）。BVDV-1h及びBVDV-1ℓ免疫血清の中和抗体価は、いずれのサブグループのウイルス株に対しても高い値を示した。交差中和抗体価を基に、1型BVDVのサブグループ間における血清学的近縁度（R値）を表4に示した。BVDV-1a及びBVDV-1bと、BVDV-1fの間では抗原の相同性が最も低く、R値はいずれも1.5と1.1であった。最も高いR値（R=50）は、BVDV-1aとBVDV-1b、BVDV-1bとBVDV-1h、BVDV-1fとBVDV-1ℓ及びBVDV-1hとBVDV-1ℓ間で認められた。

4. 考察

牛ウイルス性下痢症（BVD）は世界中に広く分布しており、毎年数百万ドル規模の経済的損失の原因となっており、多くの国ではBVDの制御と予防

表2 羊への免疫に使用したウイルス株の不活化前感染価

ウイルス株	BVDV-1 サブグループ	ウイルス感染価 (TCID ₅₀ /mL)
BVDV-TR2	BVDV-1a	10 ^{5.45}
BVDV-TR12	BVDV-1b	10 ^{7.7}
BVDV-TR11	BVDV-1d	10 ^{6.45}
BVDV-TR38	BVDV-1f	10 ^{7.7}
BVDV-TR23	BVDV-1h	10 ^{6.7}
BVDV-TR1	BVDV-1ℓ	10 ^{8.45}

を重要視している。BVDVは2つの遺伝子型に分類され、系統発生及び中和解析によってこれらの遺伝子型はさらにサブグループに分けられることが明らかとなった。臨床症状と遺伝学的サブグループ間の関連性が指摘されているが、まだ明らかにはされていない。BVDVサブグループ間における血清学的関係性の解明は、診断、予防及び制御に極めて重要である。

遺伝学的相違は、一般的にサブグループ間の抗原性の相違に反映される。BVDV株間における抗原の多様性は、モノクローナル抗体による解析によって解明されている。交差中和試験は、上記に加え、サブグループ間の血清学的関係性を解明するのに有効な手段である。過去の研究では、BVDV-1とBVDV-2間における抗原性の相違について実施しており、異なる遺伝子型に対するワクチン防御能は低いことが示された。臨床症状を予防するには1:256の中和抗体価では不十分であり、Beerらは1:512以上の中和抗体価がBVDV感染症の防御に必要であることを報告した。いくつかの研究グループが血清学的に異なるウイルスが高度に存在する可能性を示唆している。BVDV-1においては少なくとも18種類の遺伝学的サブグループが報告されている。+鎖のBVD-RNAにおける高い変異率は、遺伝学的のみならず抗原的にも多様性を生じさせる。

血清学的関係性と交差中和抗体価を解明することは、BVDVの制御と予防にとって重要である。

本研究では、BVDV-1サブグループ間における血清学的関係性を解明した。交差中和試験には、トルコ国内で分離されたBVDV-1ℓを含む異なるサブグループから6種類の野外分離株を用いた。

本研究の結果より、最も高い抗体価はホモ株に対して得られた(表3)。血清の抗体価は、交差中和試験に用いるウイルス株の種類によって変動した。これは明らかに、遺伝学的相違により生じた血清学的相違が影響している。BVDV-1f免疫血清はホモ株だけでなくBVDV-1dに対しても高い中和抗体価(1:1280)を示した。BVDV-1hとBVDV-1ℓに対する中和抗体価は中程度であったが、BVDV-1aとBVDV-1bに対する中和抗体価は顕著に低い値であった(1:20)(表3)。同様に、BVDV-1a及びBVDV-1b免疫血清は、BVDV-1fに対して低い中和抗体価(いずれも1:20)を示した。一般的にワクチン株として用いられているBVDV-1aは、異なるサブグループのウイルスに対してもある程度有効な防御能が得られると考えられる。本研究の結果より、BVDV-1a免疫血清はBVDV-1aやBVDV-1bのみならず、世界的分布しているBVDV-1dに対しても高い中和活性を有することが示された。しかしながら、BVDV-1a免疫血清はBVDV-1fと

表3 BVDV-1 サブグループのウイルスに対する高度免疫羊血清の中和抗体価

BVDV-1 ウイルス	免疫血清						対照血清
	BVDV-1a	BVDV-1b	BVDV-1d	BVDV-1f	BVDV-1h	BVDV-1ℓ	
BVDV-1a	1:1280	1:640	1:320	1:20	1:640	1:1280	<1:5
BVDV-1b	1:1280	1:2560	1:1280	1:20	1:2560	1:640	<1:5
BVDV-1d	1:1280	1:80	1:1280	1:1280	1:1280	1:640	<1:5
BVDV-1f	1:20	1:20	1:40	1:1280	1:320	1:1280	<1:5
BVDV-1h	1:320	1:1280	1:160	1:640	1:5120	1:1280	<1:5
BVDV-1ℓ	1:80	1:160	1:320	1:320	1:1280	1:1280	<1:5

表4 BVDV-1 サブグループ間における抗原の近縁性 (R 値)

	BVDV-1a	BVDV-1b	BVDV-1d	BVDV-1f	BVDV-1h	BVDV-1ℓ
BVDV-1a	100	50	12.5	1.5	17.6	25
BVDV-1b	50	100	17.6	1.1	50	17.6
BVDV-1d	12.5	17.6	100	17.6	17.6	35.3
BVDV-1f	1.5	1.1	17.6	100	17.6	50
BVDV-1h	17.6	50	17.6	17.6	100	50
BVDV-1ℓ	25	17.6	35.3	50	50	100

BVDV-1 ℓ に対する中和能は低く（それぞれ1:20及び1:80）、これは防御に有効とされる中和抗体価を大きく下回っている。BVDV-1fはヨーロッパの国々では一般的であるが、BVDV-1 ℓ はトルコ全域とフランスの一部で報告されている。現在、様々な国でBVDVの制御及び根絶プログラムが存在する。これらのプログラムのいくつかはワクチン接種戦略を担っているため、上記したワクチン株と野外株間における血清学的相違を考慮すべきである。

BVDV-1サブグループのいくつかは地域限定的にみられる。例えば、BVDV-1cはオーストラリアに、BVDV-1mは中国に分布している。本研究ではBVDV-1c及びBVDV-1mのウイルス株を用いていない。これらのウイルスを用いたさらなる解析は、BVDV-1の血清学的関係性についての理解を深めると考えられる。

日本におけるBVDVサブグループ（BVDV-1a, -1b, -1c, -1n, -1o及びBVDV-2a）の研究では、ホモ株に対する抗体価はヘテロ株に対する抗体価と比較すると、少なくとも4倍高いことが報告された。本研究では、BVDV-1a免疫血清はホモ株であるBVDV-1aに対してのみならず、ヘテロ株のBVDV-1b及びBVDV-1d株に対してもの高い中和抗体価（1:1280）を示した。ホモ株及びヘテロ株に対して得られた同等の中和抗体価は、日本の報告と異なる結果であった。Couvreurらも本研究結果と同様の結果を報告している。

サブグループ間における血清学的類似性はR値で示した。R値が25以下であれば、その抗原性の相違は顕著である。一方、R値が25以上であれば、

サブグループ間の相同性は高い。Bachofenらは交差中和試験によってBVDV-1サブグループ（BVDV-1a, -1b, -1h, -1k, -1e）における類似性を報告した。BVDV-1aと-1b、BVDV-1hと-1a、BVDV-1hと-1b間におけるR値はそれぞれ35-42、33-40及び50である。RidpathらはBVDV-1aと-1bのR値を36と、Becherらは24.2と報告した。

BVDV-1fと他の株間におけるR値は、BVDV-1 ℓ を除き、低い値を示した。この結果は、BVDV-1fの中和エピトープと他のウイルス株の中和エピトープが異なることを示唆している。BVDV-1a、BVDV-1b及びBVDV-1h間における類似性は、BachofenらのR値と同じ傾向を示した。

診断解析及びワクチネーションにおける血清学的多様性の効果については議論の余地があるが、いくつかの研究グループは、BVDV-1aワクチンのBVDV-1bサブグループに対する抗体反応が低いと報告している。本研究では、BVDVサブグループ間における相同性を明確にした。ヨーロッパとトルコに分布しているBVDV-1hとBVDV-1 ℓ に対する抗血清を用いた場合、他のサブグループに対して高い交差中和抗体価（1:320-1:2560）を示す。これらの抗体価は感染を防御するのに十分と考えられる。

BVDV流行株との交差防御を決定づけるにはさらなる研究が必要だが、中和抗体価を考慮すると、BVDV-1hとBVDV-1 ℓ はBVDV-1サブグループの中で際立って高い中和抗体価を示している。本研究の結果はBVDV-1h及びBVDV-1 ℓ はBVDV-1fよりもワクチン候補株として有用であることを明確にした。

文献紹介

ブロイラーの壊死性腸炎：病因に関する最新のレビュー

張 国宏

Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis.

L. Timbermont, F. Haesebrouck, R. Ducatelle & F. Van Immerseel

Avian Pathol. 2011 Aug 40(4) : 341-7.

紙面の都合により要約及び図は割愛致しました。

背景

腸の疾病は生産物の損失、死亡率の増加、動物福祉の低下、鶏肉製品への汚染につながるため、家禽産業において重要な課題である。壊死性腸炎は、Parishによって初めて報告されている。壊死性腸

炎はブロイラーでよく発生する病気であり、世界の養鶏産業に巨大な経済的損失をもたらしている。壊死性腸炎によるブロイラー産業の経済的損失は、世界的にみると年間20億ドルに達すると見込まれている。壊死性腸炎の病原菌である*Clostridium perfringens*（ウェルシュ菌）は、グラム陽性で芽胞

形成性の嫌気性菌である。

EUでは、成長促進剤として抗生物質を動物飼料へ添加することが禁止されている。耐性菌の拡散を懸念するため世界的にも抗菌性の成長促進剤の使用が減り続けている。このことは壊死性腸炎などの経済的損失が高い重要な病気の発生が増加する原因ともなっている。

臨床症状と病変

壊死性腸炎は通常4週齢前後のプロイラーに発生する。そして、世界各地の養鶏場で発生している。壊死性腸炎は急性で臨床症状の顕著なタイプと慢性的で症状が不顕性であるタイプに分けられる。

急性の壊死性腸炎：典型的な急性型の壊死性腸炎の特徴は、多くの場合、特に前触れもなく急激に大量の死亡が発生することである。この病気の進行はとても早く、1-2時間以内に死亡率が50%に達することも多い。

不顕性のウェルシュ菌感染症：この数年間、この不顕性感染が流行していた。不顕性感染の場合、顕著な臨床病状がなく、死亡率の高まりもない。慢性的な腸管粘膜の損傷によって消化吸収が不良となり、増体の低下や飼料転換効率の悪化を招き、生産に損失をもたらす。不顕性感染の間、腸管の傷害により細菌が胆管および門脈血流に到達する。肝臓においてウェルシュ菌が大量に増殖することにより、胆管肝炎になる。また、肝臓は腫脹して退色し、赤または白の病巣が散在する。肝病変は、多くの場合、臨床病状がなかった鶏群の食鳥検査において発見される。この肝病変が原因となり、食鳥処理過程で廃棄される鶏の数が大きく増加している。一般に、急性の壊死性腸炎の発生は高い死亡率をもたらすものの、明確な症状のない不顕性感染のほうがより重要であると認識されている。なぜならば、症状がなく治療も行われないため、結果的に家禽生産において大きな経済的損失をもたらすからである。

腸管の病変：肉眼病変は通常、小腸に局限して発生するが、ほかの臓器に発生することもあり得る。例えば肝臓、腎臓である。剖検時には通常、十二指腸、空腸および回腸の壁が薄く、そしてガスの充満により膨満している。急性の壊死性腸炎の特徴は、小腸の大部分が黄褐色もしくは胆汁色を呈する偽膜で覆われる粘膜の壊死病変である。典型的な不顕性感染の事例では、変色した不定形の物質が粘膜表面に付着していたり、粘膜表面が窪んだような形の潰瘍が認められたりする。

壊死性腸炎の初期における病理組織学的検査では、ウェルシュ菌に対する強い炎症反応が認められる。粘膜固有層には多数の炎症性細胞、主に偽好酸球が浸潤している。最も重要な初期の変化は、粘膜上皮

細胞の基底膜と粘膜固有層の境界面で認められる。この領域では、粘膜固有層や上皮細胞間の構造が乱れるとともに浮腫が存在する。後期段階では、腸管の3分の1から2分の1も占める粘膜の凝固壊死が認められる。これらの部位では、絨毛の上皮細胞の壊死が明らかである。壊死部と生存組織との境界は明瞭であり、その境界には偽好酸球の集簇が認められる。もし偽膜が存在する場合には、組織片、壊死細胞、細胞の破片や粘液に包まれた多数の細菌塊を含んでいる。血管の充血が粘膜固有層および粘膜下組織中で認められる。大きいグラム陽性桿菌は壊死領域には存在するが上皮内には侵入せず、粘膜上皮細胞に付着することも確認されていない。

誘発要因

栄養：壊死性腸炎を進行させる重要な因子の一つは、ウェルシュ菌の増殖にとって有利となる腸内環境である。飼料の性質は壊死性腸炎の発生を左右する重要な非細菌性の因子である。難消化性、水溶性および非澱粉性の多糖類を多く含む食物は壊死性腸炎を誘発する要因となる。すなわち、小麦、ライ麦、オート麦および大麦は壊死性腸炎の危険因子である一方で、トウモロコシは危険因子ではない。これらの作用は、消化物の粘度の違いに関連し、栄養素の消化率を下げ、腸管内の通過時間を延長させることと関連するようである。魚粉のように動物性タンパク質を豊富に含む場合にも壊死性腸炎の発生率を増加させることが報告されている。一般的に、消化しにくいタンパク質を比較的高濃度に含む飼料は、消化管内においてもタンパク質濃度を高め、細菌の栄養となって働くであろう。

飼料中の脂肪もウェルシュ菌の数に影響を与える。植物性脂肪よりも動物性脂肪の方が更にその効果が顕著である。飼料の物理的な形態、大きさも壊死性腸炎の発生率に影響を及ぼす。粒子の大きさが均一に整った飼料よりも、大きい粒子と小さい粒子が混在する飼料のほうが壊死性腸炎を誘発しやすいと考えられている。

ストレス：飼料以外では、プロイラーにストレスを与えるような因子であれ全て壊死性腸炎の誘発因子となり得る。これは、ストレスが腸内環境を壊死性腸炎が発生しやすい状況に変えることによる。飼料の変更（スターターから育成用への移行）は壊死性腸炎の発生に関連している。さらには、ニワトリ貧血病、ガンボロ病またはマレック病ウイルスのような免疫抑制性の病原体は腸管感染に対する抵抗性を低下させて疾病を増悪させる。また、飼育環境中の鶏の密度の増加も壊死性腸炎の要因となる。ヨーロッパにおいては、飼育密度は33 kg/m²、もしくはある特定の条件下では42 kg/m²と法律で制

限されている。

コクシジウム症：壊死性腸炎を引き起こす最もよく知られている要因は、コクシジウムによって引き起こされる粘膜の損傷である。コクシジウム症の多くは壊死性腸炎が起きる前あるいは同時に発生する。ウェルシュ菌とコクシジウム原虫が協調して働き、壊死性腸炎を引き起こすことが実験感染において証明されている。ウェルシュ菌とコクシジウム原虫の共感染あるいは高用量の市販の弱毒コクシジウム生ワクチンとの併用は、ウェルシュ菌単独あるいはコクシジウム原虫単独の感染よりも鶏の腸管病変の保有率や死亡率を高める結果となった。コクシジウム原虫は小腸で増殖し、細胞内でライフサイクルを営むことで結果的に上皮細胞を傷害する。血漿タンパク質は腸管の上皮層で生じた隙間から腸管内腔に漏れ出し、ウェルシュ菌の増殖、成長に利用されることとなる。また、コクシジウム原虫感染が粘液の産生を増強するT細胞媒介性の炎症反応を誘導する。この亢進したムチン産生は、ムチンを利用する能力に長けたウェルシュ菌にとって増殖に有利な環境を提供することとなる。

家禽病原性ウェルシュ菌株の存在：健康なブロイラーでは腸内のウェルシュ菌の数量は0から 10^5 CFU/gの範囲にあるのが一般的である。一方、壊死性腸炎に罹患した鶏の腸内には、 10^6 から 10^8 CFU/gものウェルシュ菌が存在する。しかし、腸管内に大量のウェルシュ菌が含まれていても、必ずしも壊死性腸炎になるとは限らない。すなわち、ウェルシュ菌の数だけが直接的に壊死性腸炎の発生を左右するわけではない。実際、全てのウェルシュ菌が壊死性腸炎を引き起こすことができるわけではない。家禽に対して病原性を示すためには、家禽に対する固有の病原因子を保有している必要がある。ウェルシュ菌が13種類のアミノ酸の合成能力を持たないことも重要な知見である。このため、栄養素が豊富な環境下では、ウェルシュ菌の爆発的な増殖が促進され、腸管内の毒素産生も増加することにつながる。傷害が誘発されるような状況では菌数が多い方が、より重篤な症状を引き起こすことが予測されるが、それも家禽に対して病原性のある菌がいる場合だけである。誘発因子は重要ではあるが、むしろ壊死性腸炎を引き起こすためには、家禽病原性ウェルシュ菌株が存在することが必須なのである。

バクテリオシン

バクテリオシンが壊死性腸炎の病態において重要な役割を担っている可能性がある。パルスフィールドゲル電気泳動または増幅断片長多型解析により、健康な鶏群では異なる遺伝子型のウェルシュ菌が混在することがわかった。それに対し、壊死性腸炎を

発症した鶏群から分離されたウェルシュ菌は、それぞれの鶏群で遺伝学的に単一なものであった。自然な回復または治療の後、鶏は再び複数の遺伝子型のウェルシュ菌を保有していた。壊死性腸炎発生群から単一の菌株が分離されるという現象は複数の研究によって示されており、これが壊死性腸炎の発生において不可欠であることがわかってきた。他の壊死性腸炎由来の菌株あるいは病原性の強い菌株、弱い菌株と混合して実験感染させたとしても、この分離された優勢かつ病原性のあるウェルシュ菌株は壊死性腸炎を再現することができる。他の菌株の成長を抑制する物質の分泌は、健康な鶏から分離される菌株からよりも、野外発生事例で分離された菌株において、より多く認められる。細菌が産生するこの有毒なタンパク質は他の菌株の成長を抑制し、バクテリオシンと呼ばれる。宿主体内でウェルシュ菌がバクテリオシンを産生する報告はないが、腸管内における病原性の強いウェルシュ菌株によるバクテリオシン産生が他のウェルシュ菌株を駆逐するのであろう。他の菌株の増殖を抑制することは、栄養の獲得競争において重要な一面である。

コラーゲン分解酵素

Olkowskiらの研究により、壊死性腸炎の最初の病理変化はコラーゲン分解酵素の活性によるものであると報告した。絨毛の損傷は基底膜と腸細胞の側面部から発生し、その後、粘膜固有層へと拡散していく。一方で、上皮の傷害はこれに遅れて生じる。壊死性腸炎の初期における病理学的な機序を考える上で、細胞外基質やタイトジャンクションに影響を及ぼすタンパク質分解性の何らかの成分が関与しているかのように、形態学的変化からも推測されている。実際に壊死性腸炎に罹患しているブロイラーでは、腸粘膜の細胞外基質は破壊が進む、あるいは消失している。

野外発生事例から分離されたウェルシュ菌は、いくつもの活性の高いコラーゲン分解酵素を分泌し、鶏を用いた実験感染では、対照鶏と比べて腸組織におけるコラーゲン分解酵素の活性が高いと判明した。そのため、壊死性腸炎の病態がコラーゲン分解酵素によって誘導された結果であり、粘膜の損傷がある場合や宿主と病原体の干渉により宿主由来のメタロプロテアーゼが活性化している場合には、その作用が増強するものと考えられた。

毒素産生

これまで、発病鶏および正常の鶏から分離されたウェルシュ菌は全てA型であり、 α 毒素を産生しており、 α 毒素が家禽の壊死性腸炎の主要な病原因

子だと考えられていた。しかし、壊死性腸炎に罹患した鶏から分離されたウェルシュ菌と健康な鶏から分離されたウェルシュ菌間には、体外で産生する α 毒素の量に明確な差異は認められていない。もう一つの研究では、腸管内の α 毒素の量と病変の程度に相関が認められていない。壊死性腸炎に罹患した鶏から分離されたウェルシュ菌は α 毒素遺伝子を取り除かれても、他の野生型と同様に壊死性腸炎を引き起こす事ができた。壊死性腸炎の病変において好中球、リンパ球および形質細胞が多量に浸潤する様子から、 α 毒素の関与は疑わしいと考えられる。 α 毒素が主体となって引き起こすことが証明されているガス壊疽では、白血球の浸潤はなく、炎症性反応も認められない。マウスの実験モデルでは、 α 毒素遺伝子を取り除かれたウェルシュ菌はガス壊疽を引き起こすことができないが、強い炎症反応を引き起こすことができる。このように、壊死性腸炎における免疫系の細胞の浸潤は、 α 毒素の自然免疫に対する既知の効果と矛盾しているのである。

最近では、ブロイラーの壊死性腸炎と関わる新しい毒素の存在が証明されている。ウェルシュ菌のB様毒素(NetB毒素)は、 β -バレル孔形成毒素ファミリーの一員である。この毒素は鶏の肝癌細胞株において円形化や溶解を引き起こし、細胞膜に直径1.6-1.8nmの細孔を形成することが示された。LeppらはNetB毒素遺伝子が約85 kbのプラスミド上に配置されていることを報告した。VirSR二成分シグナル伝達系は、NetB毒素の発現を調節する。ウェルシュ菌の濃度が高まった時にVirSRシステムが活性化し、NetB毒素生産が促進される。ウェルシュ菌の濃度が高い時に限りNetB毒素が産生される。すなわち、菌が増えて獲得できる栄養が逼迫する可能性があるためであり、これは効果的に環境へ適応した結果である。そして、NetB毒素により損傷した宿主細胞は、ウェルシュ菌の増殖のための十分な栄養を提供するであろう。

感染実験において、NetB毒素遺伝子を欠損させた変異体は壊死性病変を形成することはできないが、野生型NetB毒素遺伝子を補完した株は野外株と同様に病原性を再度示すようになる。NetB毒素の壊死性腸炎における働きは、野外発生事例の知見から類推されており、大部分の壊死性腸炎由来のウェルシュ菌はNetB毒素遺伝子を保有する一方で、非壊死性腸炎由来のウェルシュ菌はほとんどこの遺伝子を保有していないことによる。この遺伝子を保有する菌株は乳牛から一株が発見された以外には、全て家禽由来のウェルシュ菌株から見出されている。また、いくつかのグループが、各国のNetB毒素遺伝子を保有するウェルシュ菌について研究を行っている。カナダの研究では、壊死性腸炎のブロイラーから分離されたウェルシュ菌は95% (41株中39株)

がNetB毒素遺伝子陽性であった。一方、健康な鶏の場合はわずか35% (20株中7株)が陽性であった。アメリカの報告では、壊死性腸炎から分離されたウェルシュ菌はNetB毒素遺伝子の陽性率は58% (12株中7株)であったが、健全な細菌叢由来のウェルシュ菌では8.75% (80株中7株)のみ陽性であった。NetB毒素遺伝子は壊死性腸炎と密接に関連するにもかかわらず、これまでのいずれの研究においても壊死性腸炎から分離される一部のウェルシュ菌はNetB毒素遺伝子が陰性であり、健康な鶏から分離されるウェルシュ菌の一部はNetB毒素遺伝子が陽性である。壊死性腸炎は複数の要因により誘発される疾病であるため、NetB毒素遺伝子陽性の菌株でも誘発因子が存在しなければ壊死性腸炎を引き起こさないであろう。壊死性腸炎を引き起こすことができるが、NetB毒素遺伝子が陰性であるウェルシュ菌は未知な病原因子を有しているのかも知れない。しかしながら、ある感染実験ではNetB毒素遺伝子陰性のウェルシュ菌は壊死性腸炎を誘発することができなかった。NetB毒素遺伝子が必須の病原因子である事を確認するために、健康な鶏から分離されたNetB毒素遺伝子陽性菌株と壊死性腸炎から分離されたNetB陰性菌株の発病能力を比較することが重要である。多数のNetB毒素遺伝子陽性および陰性菌株を用いた最近の研究によると、壊死性腸炎を引き起こす能力とNetB毒素を産生する能力は一致することを示している。

接着性

最近では、ウェルシュ菌が細胞外基質分子に結合できることが判明している。宿主の腸管粘膜上皮と腸の細胞外基質分子(ECMMs)に付着する能力は、多くの病原性細菌によって用いられる戦略である。ECMMsは通常、健康な腸管粘膜上皮には露出されていないが、ウェルシュ菌が分泌する毒素、コラーゲン分解酵素およびコクシジウムの感染による組織損傷の結果、露出される。それらは壊死性腸炎の進行のために重要な要因となる。

病原性ウェルシュ菌は、非病原性ウェルシュ菌よりもIII型、IV型のコラーゲンおよびフィブリノゲンに良く結合することが示されている。NetB毒素遺伝子陽性で病原性の強いウェルシュ菌は、NetB陽性だが病原性が中程度のウェルシュ菌と比較して高い水準でIII型、IV型およびV型のコラーゲン、フィブリノゲン、ラミニン並びにビトロネクチンに結合することが可能であった。これはNetB毒素遺伝子の存在が壊死性腸炎の進行において重要な因子であり、ECMMsに付着する能力と相乗的に機能することを示唆している。

この仮説は、Wadeらの研究によって証明されて

いる。病原性ウェルシュ菌で見つかったある遺伝子は、病原性の強い株では変異していた。変異体は *in vitro* で固定された ECMMs に結合する能力が変化していた。さらに重要なことは、同じ遺伝子の変異株は、腸内環境に適応する能力が低下し、疾病モデルでは病原性の顕著な低下を示した。ECMMs に接着する能力は、ウェルシュ菌の病原性の発揮及び腸内環境への適応において重要な役割を有している。

総括

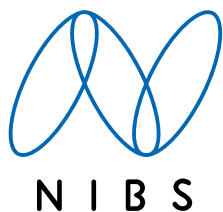
a 毒素がプロイラーにおける壊死性腸炎に不可欠な病原因子ではないことが示された後、新しい病原因子が提案され壊死性腸炎の発生に関して新たな洞察が得られている。簡潔にまとめると、コクシジウム原虫は細胞内で増殖する段階で上皮細胞を傷害することによって血漿タンパク質の漏出を引き起こす。また、Collier らによると、コクシジウム感染が腸内の粘液産生を増強する。これらは、ウェルシュ菌が利用可能な栄養素を増加させ、増殖に有利な環境を作り出す。実際、ウェルシュ菌は 13 個のアミノ酸を生成する能力を欠損しているが、粘液を基質として利用することができる。コクシジウム感染は、腸内のウェルシュ菌の爆発的な増殖を引き起こす重要な誘発因子である。ウェルシュ菌は毒素だけでなく、バクテリオシンを産生する。非病原性のウェルシュ菌と比較して、病原性ウェルシュ菌では有意に高い割合でバクテリオシンの産生が認められる。他の菌株を阻害することにより、病原性の強い株がコクシジウム感染によって引き起こされる栄養素の増

加から利益を得ることができる。Olkowski らは、壊死性腸炎の初期段階に見られる形態学的変化が、コラーゲン分解酵素の作用と一致していることを報告した。実際に、病理学的変化は上皮細胞の基底側及び側面から始まり、その後徐々に粘膜固有層へと進行していく。宿主由来のコラゲナーゼと病原体から分泌されたコラーゲン分解酵素の両方が重要な役割を持つ可能性がある。病原性ウェルシュ菌はコラーゲン分解酵素を分泌することができ、実験感染されたプロイラーの腸内では様々なコラーゲン分解酵素が高濃度で認められている。さらには、NetB 毒素は、家禽の壊死性腸炎の発生において極めて重要である。一つの例外を除いて、これまで鶏由来のウェルシュ菌においてのみ、NetB 毒素が見つまっている。NetB 毒素を産生する能力と壊死性腸炎を引き起こす能力は完全に相関していた。NetB 毒素は *in vitro* で鶏の上皮細胞に細孔を形成する。活性はまだ *in vivo* では確認されていないが、細胞死をもたらす孔を細胞に形成することによって壊死病変を引き起こすことができる。これが、壊死性腸炎の初期もしくは後期段階、どちらに参与しているかどうかは不明である。コクシジウム原虫、ウェルシュ菌の毒素及びコラーゲン分解酵素により粘膜が損傷を受けると、露出した ECMMs に病原性ウェルシュ菌が結合し腸管内に定着するために、より深刻な病変を引き起こすことができる。ウェルシュ菌の増殖に有利な環境だけでなく、宿主特異的な病原因子を保有した株の存在がプロイラーにおける壊死性腸炎の発生に必要である。

編集後記

花冷えの時節でございますが、皆様におかれましてはいかがお過ごしでしょうか。さて今年度の編集委員で行ってまいりました編集作業は、今号をもって終了させて頂く事になりました。不慣れた点から行き届かない部分が多々ありました事をこの場をお借りし深くお詫び申し上げます。次年度は、今井孝彦、手島香保、大嶋篤が編集を担当致します。

読者の皆様におかれましては、季節柄どうかご自愛下さい。今後とも、引き続き日生研たよりをご愛読賜りますよう、宜しくお願い申し上げます。



—— 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 591 号) 平成 27 年 2 月 25 日印刷 平成 27 年 3 月 1 日発行(第 61 巻第 2 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)