

NIBS LETTER 2015 MAY
No. 592

日生研おより

2015年(平成27年)5月号 第61巻第3号(通巻592号)

挨拶・巻頭言

選択……………杉浦勝明(2)

獣医病理学研修会

第54回 No. 1114 ニワトリの眼球
……………日生研(3)

第54回 No. 1116 イルカの背部皮膚腫瘍
……………大阪府立大学(4)

レビュー

馬の感染症……………辻村行司(5)

論文紹介

豚の呼吸器における生体防御について
……………手島香保(11)



選択

杉浦勝明

私事ではございますが、今年還暦を迎えるに当たり、今までの人生を少しばかり振り返っては、残りの人生をどう生きようか考える今日この頃です。人並みの成功と失敗を経験してきて思うのは、人生というのは選択の連続だということです。そこで、今日は「選択」というテーマについて、書こうと思います。

今年1月末、イスラム国の人質となっていた後藤健二さんが殺害されました。イスラム国が後藤さんと湯川さんの映像を公開してからお二人が殺害されるまで、その救出を巡って世間が論ずるときに自己責任という言葉が飛び交いました。危険とわかっている地域に、自らの選択で出向いたのだから、覚悟はできていたはずであるし、万一助からなかったとしても仕方がないのではないか、という議論です。これに関しては、様々な意見があると思いますが、結果的には後藤さんも湯川さんも最悪の形でご自分の選択の責任を取ることになったわけです。文字通り、命を賭してジャーナリストとしての職を全うされた後藤さんには多くの人が敬服の意を抱かれたことと思います。私もその一人です。

しかし一方で、イスラム国に捕らえられたジャーナリストの中には、イスラム国の宣伝係になることで死を免れている人もいます。とあるニュースコメンテーターは、そのようなジャーナリストに関して、「魂を売って」生き延びている、という言い方をしていました。そこには非難めいた響きがあり、大変厳しい指摘のように私には思えました。しかし、そのジャーナリストも、後藤さんと同じように大きな決断をしたのではないのでしょうか。生き延びるために、自分が最も正しいと思う道を選んだのだと思います。彼は「魂を売った」のではなく、彼なりの信念に従ったのだと思います。

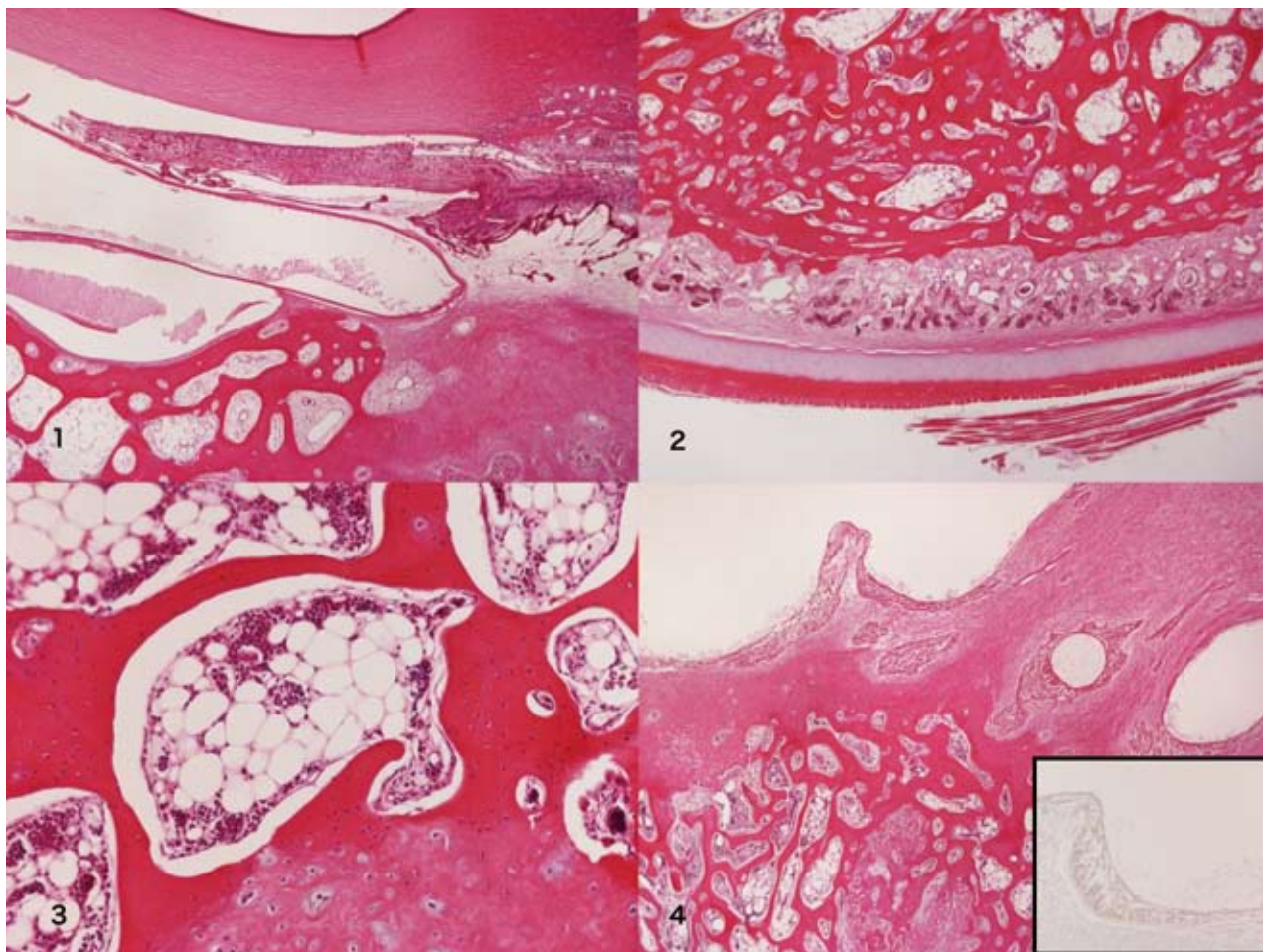
このように、自分の命とジャーナリストとして社会に果たすべき使命を天秤にかけなければならぬような難しい決断を迫られることはほとんどありませんが、研究開発の分野においても当然、自分の決断が自分だけでなく、社会、ひいては次世代に直接的、間接的に大きな影響を及ぼすこともあるでしょう。世代ごとに価値観は変わっていくので、次世代のための決断をするというのは難しいことですが、負の遺産を残さないように決断をしていかなければなりません。

自分の価値観を確立し、他人に批判されても揺るがない強さを持つことは、年に関係なく難しいことですが、人生折り返し地点を過ぎた今、自分にとって、そして社会にとって本当に大切なことは何であるかを自らに問いかけながら、日々ますます精進を重ねていきたいと思えます。

(評議員)

ニワトリの眼球

第 54 回獣医病理学研修会 No. 1114 日生研



動物：ニワトリ、GSP/pe 系、雄、52 週齢。

臨床事項：本症例はファヨウミ種由来の近交系である GSP 系ニワトリに出現した不完全アルビノ様個体である。起源種に比較して羽装の黒色部の淡明化がみられ、成長とともに眼球の突出、白濁を示してくることから、眼球の病態を検索するために送付され、剖検に供された。

肉眼所見：外観において、両側の眼球は軽度に腫大および突出し、水晶体が混濁していた。眼球は高度に硬化しており、固定後の切断ができなかったため、EDTA 脱灰後に切断した。眼球内部には灰白色充実性硬組織が充満し、眼内組織の判別ができなかった。

組織所見：角膜に異常所見はなく、虹彩および毛様体は形態の変形、色素細胞における色素の減少、軽度の炎症性細胞の浸潤が認められた。水晶体では水晶体線維の融解・消失がみられ、水晶体嚢を残すのみであった（図 1）。眼内には硝子体、網膜および櫛膜を巻き込んで骨組織が増生し、充満していた（図 2）。眼底部において、網膜色素上皮は認められず、骨組織の外側にはブルッフ膜様構造が認められ、その外周には線維化して増生した

脈絡膜、軟骨層を含む強膜が認められた（図 2）。これらの骨組織は海綿骨様の形態を示し、骨髓腔を形成し、その中には破骨細胞および造血細胞が観察された（図 3）。骨組織の表層あるいは内部にはチュブリン抗体陽性の神経網膜断片が観察された（図 4 および挿入図）。

診断：GSP/pe 系ニワトリにおける眼内骨形成（網膜色素上皮の分化転換を疑う）

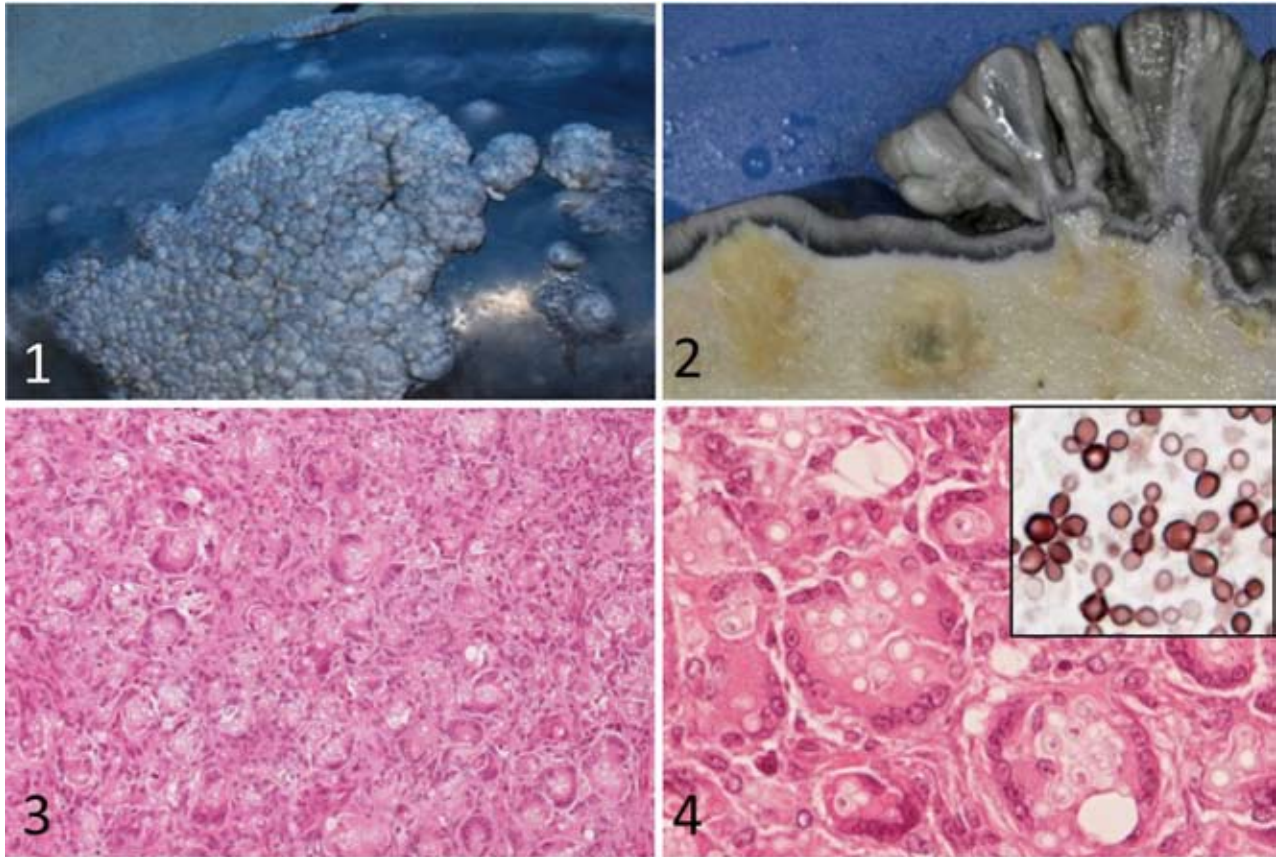
考察：眼内における骨の形成はヒトおよび動物でも報告があり、ヒトでは慢性眼内疾患に関連して認められている。網膜色素上皮細胞は神経外胚葉由来であるが、培養条件によって上皮 - 間葉転換を起こすことが知られている。本症例も組織学的にその発生母体として網膜色素上皮が疑われた。（渋谷一元）

参考文献：

1. Yoon, Y. D., Aaberg, T. M. Sr., Wojno, T. H., Grossniklaus, H. E., *Am. J. Ophthalmol.*, 1998, **125**: 558-559.
2. Vemuganti, G .K., Honavar, S. G., Jalali, S., *Indian J. Ophthalmol.* 2002, **50**: 183-188.

イルカの背部皮膚腫瘍

第54回獣医病理学研修会 No. 1116 大阪府立大学



動物：バンドウイルカ (*Tursiops truncatus*)、雄、推定17歳齢。

臨床事項：捕獲後、水族館で飼育されていた個体で、搬入時より背部皮膚に創痕が認められていた。背部皮膚の膨隆が急速に拡大し、約25×25cmに及ぶカリフラワー状腫瘍を形成した(図1)。フルコナゾール等による治療を行うも、病変は拡大傾向を示し、急速に元気消失と呼吸速迫を呈して死亡した。

肉眼所見：背部皮膚には、灰白色カリフラワー状腫瘍が多数形成されていた。ホルマリン固定後の剖面では、表皮の乳頭状増殖が認められ、表皮直下から真皮では黄白色～黄色の結節性病巣が多発していた(図2)。

組織所見：肉眼的に乳頭状を呈していた部分では、表皮の乳頭状過形成と過角化が認められ、真皮・皮下組織では、主に多核巨細胞からなる肉芽腫性炎症の像を呈していた(図3)。また、巨細胞やマクロファージの細胞質内に、多数の厚い壁を有する酵母様細胞(直径10μm前後)が孤在もしくは細い頸管によって連鎖して認められた(図4、挿入図はグロコット染色)。

診断：表皮の乳頭状増殖を伴う真菌性肉芽腫性皮膚炎(ラカジオーシス様疾患) Fungal granulomatous dermatitis with papillary epidermal hyperplasia (Lacaziosis-like disease)

考察：本症例で認められた肉眼および組織所見は、ヒトとイルカにおいて報告されているラカジオーシス(原因真菌：*Lacazia loboi*)のものとは一致した。ラカジオーシスは、アマゾン川流域の風土病として知られていた慢性肉芽腫性皮膚真菌症である。本症例の原因真菌の遺伝子配列は既報の*L. loboi*と完全には一致しなかったが(84%の相同性)、イルカではヒトの症例とは異なった遺伝型の菌種が原因である可能性もあり、発生地域や動物種を考慮した上での今後の解析が待たれる。

(田中美有・山手丈至)

参考文献：

Ueda et al. Two Cases of Lacaziosis in Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) in Japan. *Case Reports in Veterinary Medicine*. vol. 2013, Article ID 318548, 9 pages, 2013.

馬の感染症

辻村行司（日本中央競馬会競走馬総合研究所栃木支所）

はじめに

家畜伝染病予防法で定められた監視伝染病のうち、馬を対象とするのは、家畜伝染病の8疾病、届出伝染病の13疾病である（表1）。これらのうち、平成10年以降に日本国内で発生報告のある疾病は、流行性脳炎（日本脳炎）、馬伝染性貧血、破傷風、馬インフルエンザ、馬鼻肺炎、馬伝染性子宮炎、馬パラチフスの7疾病である。また、監視伝染病には含まれないが、国内で発生が問題となる感染症としては、ゲタウイルス感染症、ウマロタウイルス病などが挙げられる。一方、馬ウイルス性動脈炎は、これまで日本国内で発生はないが、世界各地で発生が認められ、日本への侵入が警戒される感染症の一つである。これらの感染症は、馬産業に大きな経済的損失を与えることから、予防法、診断法および治療法の研究が行われ、ワクチンや診断液が開発されてきた。本稿では、馬産業にとって重要な感染症のうち、筆者が研究対象とするウイルス感染症について紹介していきたい。

1. 日本脳炎：法定伝染病

家畜の流行性脳炎の病原体としては、フラビウイルス科フラビウイルス属の日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、トガウイルス科アルファウイルス属の東部馬脳炎ウイルス、西部馬脳炎ウイルス、ベネズエラ馬脳炎ウイルスなどが知られる。ただし、現在までに日本国内で発生報告がある疾病は日本脳炎のみである。馬はヒトとともに、日本脳炎ウイルスに対して感受性が高いとされるが、その発症率は1%未満と推定されている。日本脳炎ウイルスは主に水田地域に生息するコガタアカイエカによって媒介され、豚が増幅動物である。感染豚は通常発症しないが、妊娠豚では早死産が認められる場合がある。一方で、豚の体内でウイルスはよく増殖し、蚊を感染させるのに十分な高いウイルス血症が比較的長期間維持される。馬やヒトは、感受性が高い一方で、体内でウイルスがあまり増殖せず、蚊を感染させることはないと考えられるため、終末宿主とされている。日本における馬の日本脳炎の大きな流行は

表1 馬の感染症

監視伝染病		監視伝染病以外
家畜伝染病	届出伝染病	
<u>流行性脳炎*</u>	類鼻疽	<u>ゲタウイルス感染症*</u>
狂犬病	<u>破傷風*</u>	<u>ウマロタウイルス病*</u>
水胞性口炎	トリパノソーマ病	
炭疽*	ニパウイルス感染症	
ピロプラズマ病	<u>馬インフルエンザ*</u>	
鼻疽	馬ウイルス性動脈炎	
<u>馬伝染性貧血</u>	<u>馬鼻肺炎*</u>	
アフリカ馬疫	馬モルビリウイルス肺炎	
	馬痘	
	野兎病	
	<u>馬伝染性子宮炎</u>	
	<u>馬パラチフス</u>	
	仮性皮疽	

1) 平成10年以降に日本国内で発生報告のある疾病を下線で示した（輸入検疫での摘発を除く）。

2) *：日本国内でワクチンが市販されている疾病

1947年と1948年に認められ、このことを契機に日本脳炎ワクチンの接種が開始された(図1)。ワクチンが有効であったこと、また、衛生環境の改善や水田・養豚場が郊外に移ったことから、日本脳炎の発生数は大幅に減少し、馬における発生は近年ほぼ認められない(図2)。しかしながら、国立感染症研究所の調査では、日本各地で飼養されている豚において、未だウイルスが広く分布していることが示されている。実際に2003年には鳥取県において、ワクチン未接種馬1頭で日本脳炎の発生が報告された。したがって、今後も定期的なワクチン接種や馬の飼養環境を衛生的に保つことが重要である。

2. 馬伝染性貧血：法定伝染病

本病の病原体の馬伝染性貧血ウイルスは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)と同じレンチウイルス属に

属し、終生持続感染するため感染馬の淘汰が必要となる。特徴的な症状は、回帰熱と貧血であり、急性型では数日の経過で斃死する。一方、慢性型では感染当初は1か月に1、2回の再発を繰り返すが、その間隔は次第に長くなり、多くは初感染後1年以内に臨床症状が消失する。ただし、低レベルでのウイルス増殖が続いて、他馬への感染源となる。馬伝染性貧血ウイルスは、主にサシバエやアブなどの節足動物の媒介によって伝播するが、垂直感染や医原性感染も知られる。過去に報告のある汚染注射針の使い回しによる感染は、最近はほとんど認められないが、その一方で問題となるのが汚染血液や血漿の投与で、2006年にアイルランドでは汚染血漿の投与が原因の発生が起きている。日本国内では、過去には数千頭の発生が認められていたが(図3)、馬の飼養頭数の減少と徹底した摘発淘汰のおかげで近年ではほとんど発生がない(図4)。このように日本国内は

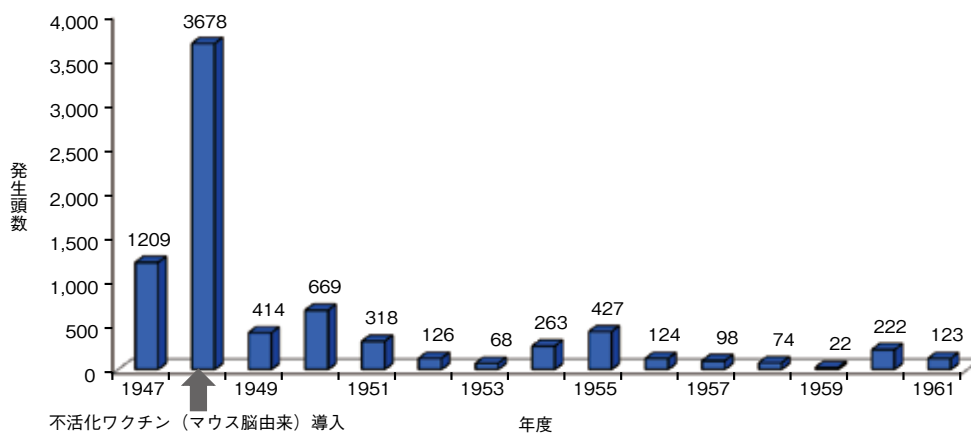


図1 日本における馬の日本脳炎の発生状況(1947-1961)

※農林水産省の家畜衛生統計を元に作成した。

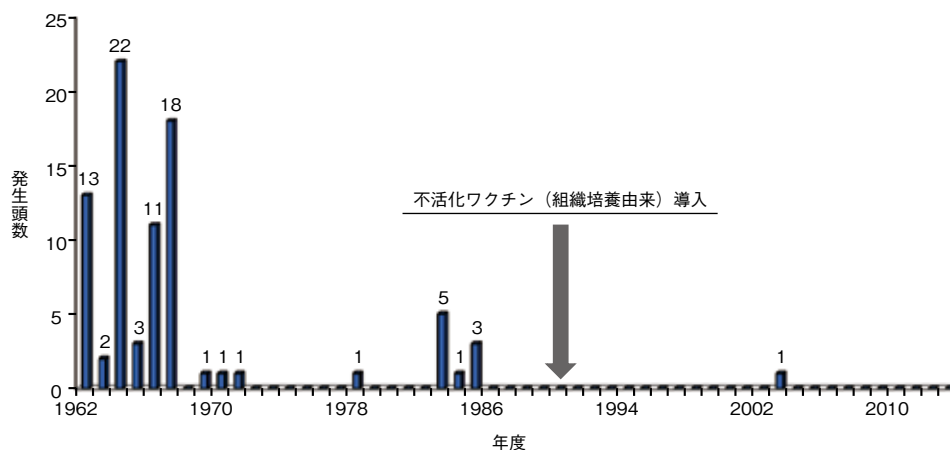


図2 日本における馬の日本脳炎の発生状況(1962-2013)

※農林水産省の家畜衛生統計を元に作成した。

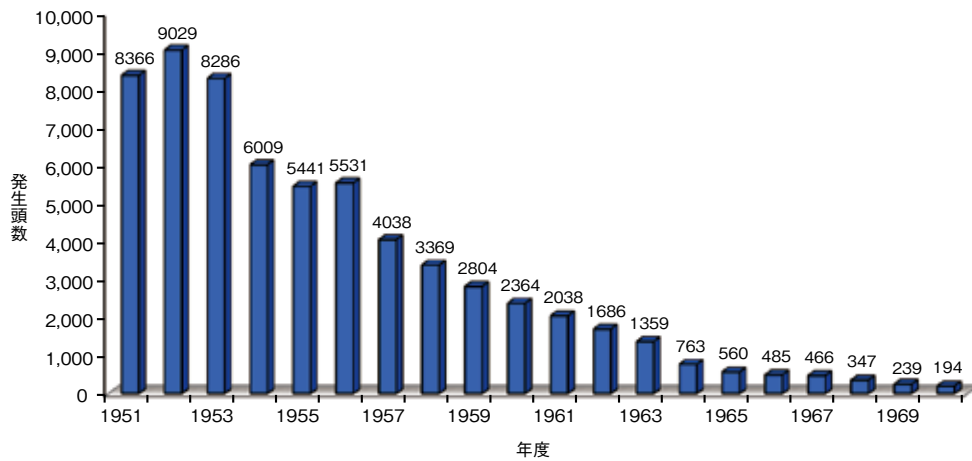


図3 日本における馬伝染性貧血の発生状況（1951-1970）

※農林水産省の家畜衛生統計を元に作成した。

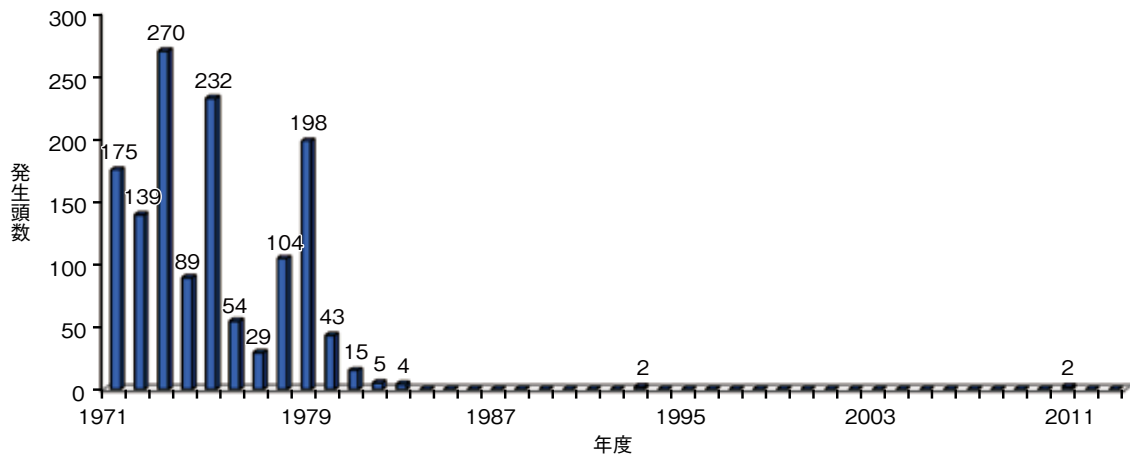


図4 日本における馬伝染性貧血の発生状況（1971-2013）

※農林水産省の家畜衛生統計を元に作成した。

ほぼ清浄化されたと考えられていた馬伝染性貧血であるが、2011年に日本在来馬（宮崎県・御崎馬）由来の馬で発生が認められた。長年の定期的な検査で、競走馬や乗馬など日本の軽種馬については馬伝染性貧血の清浄性がほぼ確認されているが、今後は一部の日本在来馬など未検査の馬群の調査を進める必要があると考えられている。また、アメリカ、カナダ、ヨーロッパ各国などで近年も発生が続いていることから、海外からの侵入防止も重要である。

3. 馬インフルエンザ：届出伝染病

世界各地で現在流行している馬インフルエンザウイルスは、H3N8重型のA型インフルエンザウイルスである。発熱を伴う急性呼吸器疾患で、発症馬は頸を延ばして非常に苦しそうな咳をする。馬インフルエンザの最も重要な特徴は、このような咳などを

介して空気感染するために伝染力が極めて強いという点で、そのことを示す例として、2007年の日本国内での流行時の一施設における発生概況を紹介する。日本中央競馬会の美浦（茨城県）および栗東（滋賀県）トレーニング・センターでは、それぞれ約2,000頭の競走馬が飼養され、レースに向けた調教が行われている。2007年8月15日に美浦、栗東の両トレーニング・センターで馬インフルエンザの発生が認められ、その後の栗東トレーニング・センターにおけるウイルス伝播は以下に示す通りであった。翌16日の時点で全119厩舎のうち14厩舎で陽性馬が認められたが、17日はそれが62厩舎に拡大し、最終的には陽性馬を確認した厩舎は92厩舎にまで及んだ（8月28日時点）。また、トレーニング・センター内で発熱馬が多くなるのは通常は冬期の3か月間（1～3月）であるが、2007年の流行では1か月足らずで、冬期の平均発熱頭数の倍以上の

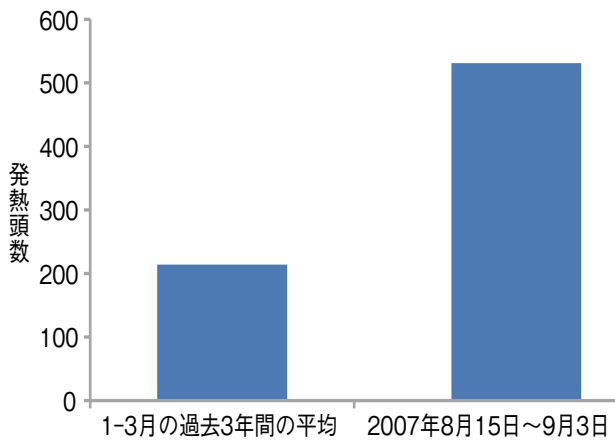


図5 冬期発熱頭数と馬インフルエンザ流行時の発熱頭数の比較

※ Yamanaka, T. et al. 2008. *J. Vet. Med. Sci.* 70: 623-625 のデータを元に作成した。

発熱馬が認められた(図5)。このように強い伝染力を持つことから、馬産業において馬インフルエンザは防疫上最も重要な感染症の一つと考えられている。日本国内では、前述の2007年に加えて1971年にも流行があり、当時はワクチン接種が行われていなかったため、発生規模が大きく、発症馬の臨床症状も比較的重かった。その結果、延べ9週間にわたり関東地方での中央競馬開催が中止となった。一方、2007年はワクチン接種馬群での発生であったため発熱頭数が抑えられ、その臨床症状も軽度であったことから、競馬開催の中止は2日間にとどめることができた。このように、馬インフルエンザへの防疫対策として、ワクチン接種が非常に重要であるが、ヒトのインフルエンザと同様に変異株が常に出現するため、定期的なワクチン組成の変更が必要である。また、発生時の蔓延防止のために迅速な診断が必要

であることから、ヒト用の簡易検査キットが臨床応用されている。なお、2008年7月の北海道での発生以降は日本国内で馬インフルエンザの発生はなく、清浄性が保たれている状況である。しかしながら、海外では頻繁に発生が認められることから、その侵入防止が重要となる。

4. 馬ウイルス性動脈炎：届出伝染病

馬ウイルス性動脈炎は、日本国内でこれまでに発生のない疾病である。本病の病原体である馬動脈炎ウイルスはアルテリウイルス科に属する。臨床症状は発熱、結膜炎、陰囊の腫大など多様であるが、妊娠馬の流産が最も大きな問題となる。呼吸器症状を示す馬からの飛沫感染でウイルスが伝播するが、感染した雄馬の一部がウイルスキャリアーとなって精液中にウイルスを排出し、交配時に雌馬に感染させる可能性がある。日本は現在までのところ本病の清浄国であるが、国内の生産地に広がった場合に重大な被害の発生が予測される。海外では、アメリカ、ヨーロッパ、オセアニアなどで発生が報告されており、過去10年の間に輸入検疫で摘発も行われている(表2)。したがって、海外からの本病の侵入については今後も警戒する必要がある。なお、侵入時に使用するために、日本国内で不活化ワクチンが備蓄されている。

5. 馬鼻肺炎：届出伝染病

本病の病原体は、ウマヘルペスウイルス1型およ

表2 輸入検疫における馬ウイルス性動脈炎摘発状況(2004-2013)

年	輸入頭数	陽性頭数	仕出国
2004	5,478	1	カナダ
2005	5,492	0	—
2006	6,423	0	—
2007	5,987	1	アイルランド
2008	4,688	111	カナダ
2009	4,482	2	カナダ
2010	5,294	0	—
2011	3,710	1	ドイツ
2012	2,954	0	—
2013	3,683	0	—

※農林水産省の動物検疫年報を元に作成した。

び4型 (EHV-1および4) である。呼吸器疾患は EHV-1と EHV-4のいずれによっても引き起こされるが、流産の原因となるのは主として EHV-1である。加えて、EHV-1は神経麻痺を引き起こす場合もある。感染馬の鼻汁、流産胎仔・胎盤には多量のウイルスが含まれ、これらの飛沫を介して感染が広がる。また、道具やヒトの手を介した間接的な感染も問題となる。ウイルスは鼻腔粘膜での増殖後、リンパ球に感染して全身に伝播する。その後、子宮に達すると流産、中枢神経系に達すると神経麻痺を引き起こす。また、リンパ球内のウイルスは、一定期間を経過すると、潜伏状態となり、生涯体内から排除されることはない。その後、ストレス等により免疫機能が低下すると、ウイルスが再活性化し、鼻汁中に排出されたウイルスが環境中にばらまかれる。生産地での馬鼻肺炎流産の発生は年間30件前後と多くはないが(図6)、発生した際の経済的損失が大きいことから、最も警戒されているウイルス感染症の一つである。また、EHV-1は冬期の競走馬の集団発熱の原因としても重要である。馬鼻肺炎の防疫対策として重要なことは、外部からのウイルスの侵入阻止と発生時の蔓延防止措置である。まず、輸送や環境変化のストレスから潜伏ウイルスを再活性化させるリスクの高い新規導入馬は、一定期間隔離する必要がある。また、生産牧場では、繁殖雌馬群と他の馬群を可能な限り分けて飼養することが望まれる。特に、EHV-1に対してナイーブな若齢の育成馬群にウイルスが侵入した場合、同馬群でウイルスが増幅する可能性が高いことから注意が必要である。次に、発生時には蔓延防止のため、流産胎仔・

胎盤の適切な処理、汚染場所の消毒、発症馬の隔離等を行うことが重要となる。ワクチンについては、一定の効果が認められているため、妊娠馬等への接種が行われている。ただし、ワクチン接種馬群においても、前述の外部からの侵入阻止、発生時の蔓延防止対策を確実に実施することが必要である。

6. ゲタウイルス感染症：監視伝染病以外

ゲタウイルスは、トガウイルス科アルファウイルス属に属する。発熱、発疹および下肢部の浮腫が特徴的な症状である。発疹や浮腫は、通常発熱後1週間程度で観察される。ゲタウイルスは日本脳炎ウイルスと同様に蚊によって媒介され、豚が重要な増幅動物である。ただし、日本脳炎ウイルスとは異なり、馬の体内でもウイルスが比較的良好に増殖し、馬も増幅動物になりうると考えられている。日本国内で馬での発生が最初に確認されたのは1978年で、この年は美浦トレーニング・センター(茨城県)の開場の年にあたる。美浦トレーニング・センターの周辺には豚舎が多く存在しゲタウイルスが分布していたと考えられ、そのような環境にナイーブな馬群が移動してきたことが発生の原因と推察される。この期間中の発熱馬は571頭に上った(図7)。そこで、直ちにワクチン開発が進められ、翌年から接種が始まった。その後、長年にわたり散发例を除いて発生はなかったが、2014年に美浦トレーニング・センターで流行が起こった(図8)。本流行はワクチン接種馬群での発生であったため、発熱馬が33頭に抑えられたと推察されるが、30年以上にわたって

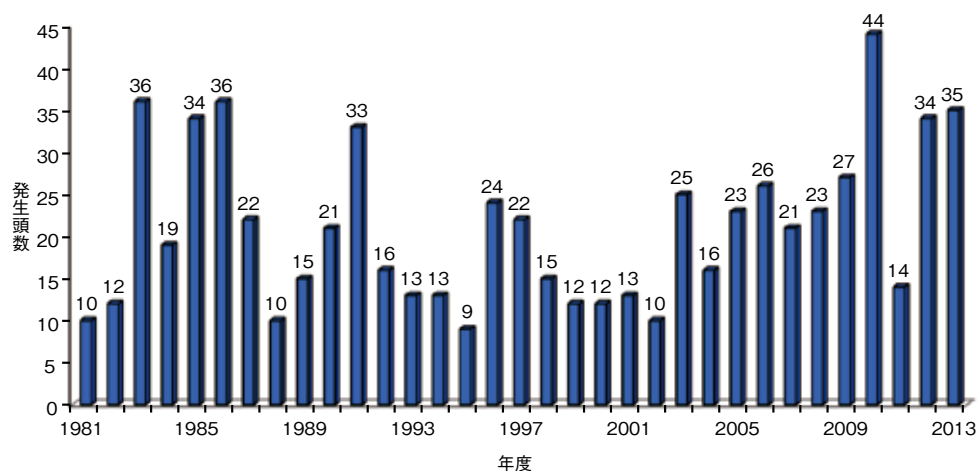


図6 日本における馬鼻肺炎(流産)の発生状況(1981-2013)

※軽種馬防疫協議会資料を元に作成した。

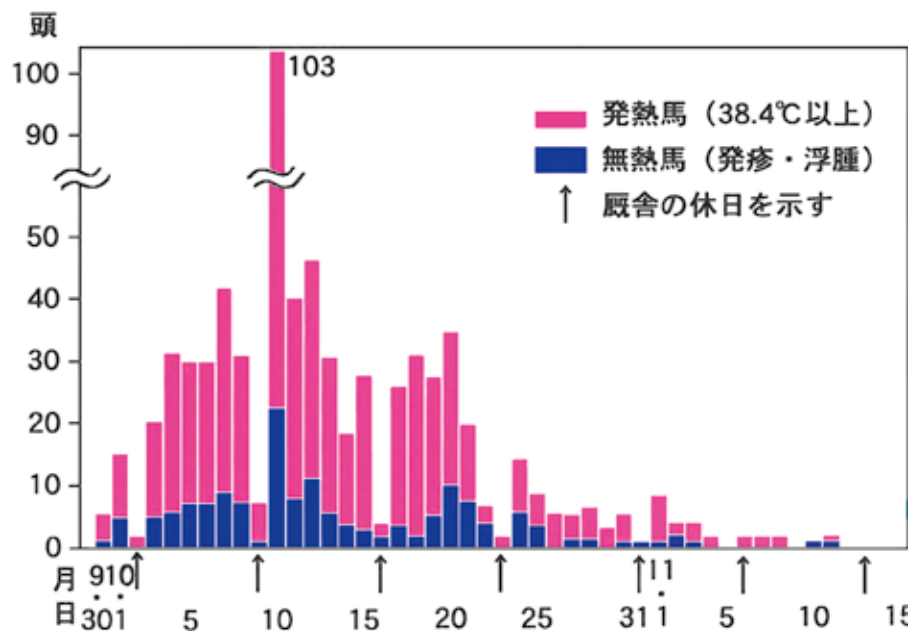


図7 美浦トレーニング・センターにおけるゲタウイルス感染症の発生状況 (1978年)
 ※公益社団法人中央畜産会発行『馬の感染症 (第4版)』より引用した。

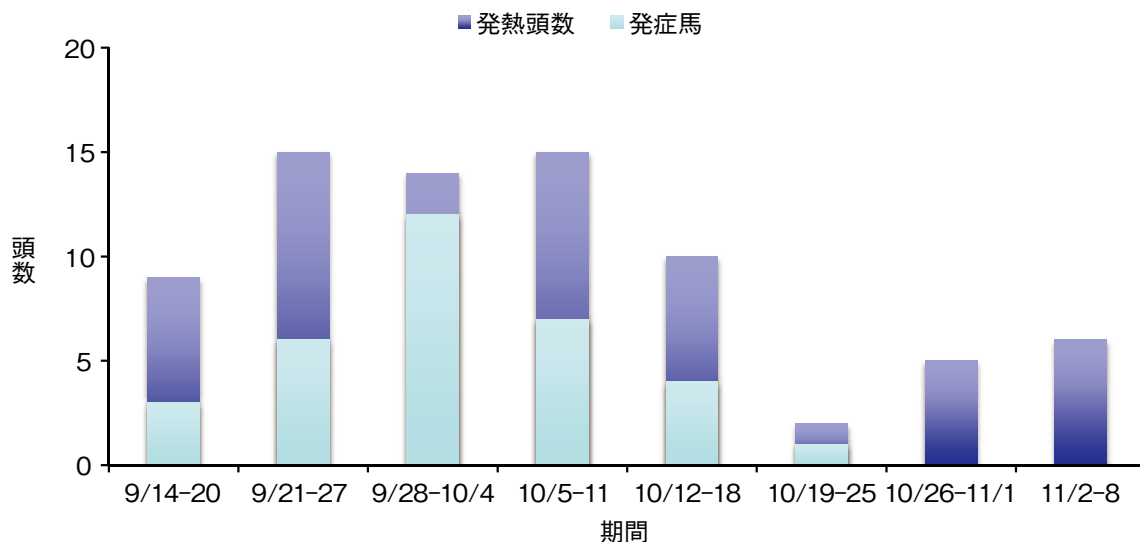


図8 美浦トレーニング・センターにおけるゲタウイルス感染症の発生状況 (2014年)

流行のなかった本病が再発した原因について今後解析が必要と考えられる。なお、予防対策としては、日本脳炎と同様に、定期的なワクチン接種や馬の飼養環境を衛生的に保つことが重要である。

7. ウマロタウイルス病：監視伝染病以外

ウマロタウイルスはA群ロタウイルスに分類される。子馬の急性下痢症が主な臨床症状である。ウイルスは糞口感染で伝播し、小腸の絨毛上皮細胞に感染して、感染細胞を破壊することで吸収不良を引き起こす。1～3か月齢の子馬に多発し、5月～8月にかけて発生が増加する。ウマロタウイルスに対

する防疫対策で重要なことは、発生時の蔓延防止措置である。感染馬の下痢便中には大量のウイルスが含まれ、かつ排出されたウイルスは環境中において安定で消毒薬への抵抗性も比較的強い。したがって、発生時には簡易キットを用いて迅速診断を行い、速やかに発症馬の隔離、適切な薬剤を用いた消毒を実施する必要がある。また、治療については、脱水補正のための輸液、抗胃潰瘍薬の予防的投与を行う。ワクチンは妊娠馬に接種して、初乳を介して子馬に抗体を付与することを狙ったもので、一定の予防効果があると考えられている。ただし、現在日本国内ではG3とG14の2種類遺伝子型が流行しているが(表3)、ワクチンに含まれるウイルスはG3型のみ

表3 日本国内におけるウマロタウイルスの各遺伝子型の分布 (2003-2008)

年	検体数	陽性数	各 G 遺伝子型陽性数		
			G3 (%)	G14 (%)	G3, G14 両陽性 (%)
2003	426	210	65(30.9)	140(66.7)	5(2.4)
2004	476	219	152(69.4)	47(21.5)	20(9.1)
2005	362	231	81(35.1)	111(48.0)	39(16.9)
2006	318	184	94(51.1)	56(30.4)	34(18.5)
2007	260	157	54(34.4)	60(38.2)	43(27.4)
2008	176	148	16(10.8)	88(59.5)	44(29.7)
合計	2018	1149	462(40.2)	502(43.7)	185(16.1)

※ Nemoto, M. et al. 2011. *Vet. Microbiol.* 152: 67-73 より引用、一部改編

である。G14型をワクチンに加える必要があるかどうかについては、今後の検討課題である。

なお、本稿は公益社団法人中央畜産会発行の馬感染症テキストの情報を元に作成されたものである。

同テキストは軽種馬防疫協議会のホームページ (<http://keibokyo.com>) で閲覧可能であるので、ご参照いただきたい。

誤記がございましたので下記のとおり修正いたしました。

P5L3: 12疾病 13疾病
表1: 差し替え

2018年(平成30年)6月 日生研たより編集室

論文紹介

豚の呼吸器における生体防御について

手島香保

動物の体は、皮膚と粘膜によって外界と接し、これらは絶えず様々な異物に暴露されている。その中でも気道は吸入された抗原に絶えず暴露されており、侵入した抗原に対する生体防御機構が存在する。気道における防御機構は、線毛運動による物理的防御、リゾチームなどによる化学的防御、抗体や貪食細胞による免疫学的防御に大別される。近年、呼吸器が重要な器官として注目され、粘膜ワクチンの可能性を含めその重要性が認識されている。また、豚における呼吸器感染症罹患率は増加していることから、その有用性は注目すべきであると考え。今回はワ

クチンと関連する免疫学的防御と物理的防御について論文を2報紹介する。

紹介論文1

投与方法の違いによる豚 *Mycoplasma hyopneumoniae* 168株弱毒ワクチンの免疫原性の比較

Comparison of immune responses to intranasal and intrapulmonary vaccination with the attenuated *Mycoplasma hyopneumoniae* 168 strain in pigs.

Pengcheng LI et al., *The Journal of Veterinary Medical*

Science Jan 30, 2015

1. 背景

Mycoplasma hyopneumoniae (*Mhp*) は、二次感染症として多発するマイコプラズマ肺炎の原因菌であり、世界各国で頻発し、養豚業に大きな経済的損失を与えている。*Mhp* の主な感染経路である気管支には、咽頭扁桃や耳管扁桃といったリンパ組織が存在し、経鼻ワクチンによってこれらのリンパ組織からサイトカインや抗体産生を誘導できると考えられており、2011年にはPRRSVに対して経鼻投与による感染防御効果が報告されている。近年、中国では*Mhp*168株の筋肉内注射によるワクチンが広く普及しているが、病原体は気管支上皮で増殖するため、筋肉内投与では十分な効果が得られないことが問題であった。筋肉内注射に代わって、肺内投与が検討されている。2008年にはWeeらによって、15 μ gのインフルエンザ抗原を皮下に投与した場合と同等の血中抗体価を、0.04 μ gの肺内投与によって得られることが報告されている。この実験の投与方法を調べてみたところ、保定した羊に対して気管支鏡を用いていた。このように手技的な問題から肺内投与に関する報告は依然少ない。

経鼻投与と肺内投与により、それぞれ上部気道と下部気道の免疫が誘導されたが、弱毒*Mhp*168株ワクチンによってどのような免疫が誘導されるかは明らかでない。本研究では、豚を用いて、弱毒*Mhp*168株ワクチンを経鼻投与、肺内投与、筋肉内投与し、投与方法によって誘導される免疫の違いが見られるかを比較した。なお著者は、局所粘膜免疫の指標として*Mhp*特異的sIgA抗体産生量、液性免疫の指標としてIL-6、IL-10、IFN- γ 産生量とIgA、IgG抗体産生細胞数、細胞性免疫の指標としてCD4陽性T細胞数とCD8陽性T細胞数を設定し、これらを指標とした。

2. 方法

24頭の健康な新生豚を4群に分けて試験に用いた。弱毒*Mhp*168株1ml (10^6 CCU)を筋肉内に7日齢時に1回投与する群、鼻腔内に7日齢時と10日齢時に2回投与する群、肺胞内に7日齢時に1回

投与する群、生理食塩水を鼻腔内に7日齢時と10日齢時に2回投与する群(対照群)に分け、それぞれ免疫した。

なお、今回行われた肺内投与は、2010年にZhi-Xing Fengらが報告した弱毒*Mhp*168株を肺内投与後に攻撃を実施した論文を引用し、8-15日齢の新生豚に右肩甲骨後縁の第2肋骨と第3肋骨間に投与する方法を用いた。

投与方法によって免疫後のサイトカイン(IFN- γ 、IL-6、IL-10)の産生量と*Mhp*特異的sIgA産生量に相違が見られるかを調べる為に、初回投与から0、3、5、7、14、21、28、35、42日後に鼻腔スワブを採取した。採取した鼻腔スワブを1mlのPBSで洗浄し、その洗浄液を遠心後、上清を回収した。その上清を用いて、サイトカイン(IFN- γ 、IL-6、IL-10)産生量については、市販のELISAキットで測定した。また*Mhp*特異的sIgA産生量については、*Mhp*P67R1タンパクを抗原としたindirect ELISAにて測定した。

さらに、投与方法によって免疫後のCD4陽性T細胞数とCD8陽性T細胞数、IgA産生細胞数とIgG産生細胞数に違いが見られるかを調べる為に、初回投与から6週後に全頭を安楽殺し鼻腔組織(鼻腔後部、咽頭扁桃、耳管扁桃)、気管、気管分岐部、肺および肺門リンパ節を採取した。CD4陽性T細胞数とCD8陽性T細胞数については、採取した肺および肺門リンパ節をブアン固定後、抗豚CD4マウス抗体、抗豚CD8マウス抗体による免疫組織化学染色を実施した。またIgA産生細胞数とIgG産生細胞数については、採取した鼻腔組織(鼻腔後部、咽頭扁桃、耳管扁桃)、気管、気管分岐部をブアン固定後、抗豚IgAウサギ抗体、抗豚IgGウサギ抗体による免疫組織化学染色を実施した。それぞれ免疫組織化学染色した後、各組織につき10カ所の陽性細胞の割合を算出した。

3. 結果

3.1 サイトカイン産生量(IL-6、IL-10およびIFN- γ)の比較

免疫5日後の鼻腔スワブ中のサイトカイン量を比較したところ、筋肉内投与群ではIFN- γ が対照群に比べて有意に上昇していた。経鼻投与群ではIL-

6 産生量が対照群に比べて有意に上昇していた。肺内投与群では、IL-6、IL-10 および IFN- γ 産生量が対照群に比べて有意に上昇していた。

3.2 T細胞数 (CD4、CD8) の比較

CD4陽性T細胞数とCD8陽性T細胞数は、肺においては肺胞壁に広く認められ、肺門リンパ節においては、リンパ小節に多く認められ、皮質ではわずかであった。投与方法で比較した場合、肺においては、筋肉内投与した群と肺内投与した群が他の群に比べて有意にCD4陽性T細胞数とCD8陽性T細胞数が上昇していた。また肺門リンパ節においては、肺内投与した群が他の群に比べてCD8陽性T細胞の数が有意に上昇していた。経鼻投与した群においては、肺、肺門リンパ節中のCD4陽性T細胞数とCD8陽性T細胞数は対照群と同等であった。

3.3 IgA および IgG 産生細胞数の比較

鼻腔粘膜や気管のIgA産生細胞とIgG産生細胞は、粘膜固有層および気管腺の周囲に分布し、気管上皮細胞の外側面には特に多く存在した。投与方法で比較した場合、気管においては、肺内投与した群、経鼻投与した群、筋肉内投与した群が対照群に比べてIgA産生細胞およびIgG産生細胞数共に有意に上昇していた。鼻腔粘膜においては、IgA産生細胞数は肺内投与した群、経鼻投与した群、筋肉内投与した群が対照群に比べて有意に上昇していた。一方

IgG産生細胞は経鼻投与した群と筋肉内投与した群が対照群に比べて優位に上昇したのに対し、肺内投与した群は対照群と同等であった。

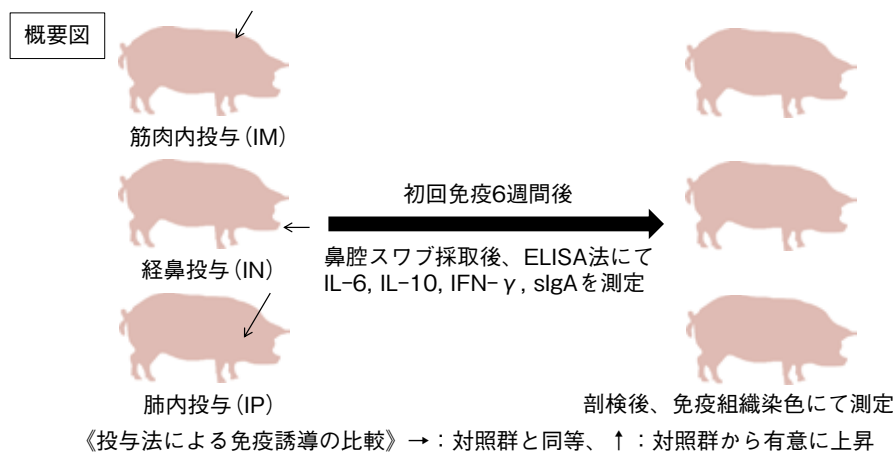
3.4 Mhp 特異的 sIgA 産生量の比較

初回免疫7、14、21、28日後の鼻腔スワブ中のMhp特異的sIgA産生量は、肺内投与群、経鼻投与群、筋肉内投与群全てが対照群に比べて有意に上昇していた。また肺内投与した群では、初回免疫7、21、35日後の鼻腔スワブ中のMhp特異的sIgA産生量は、経鼻投与した群、筋肉内投与した群、対照群に比べて有意に上昇していた。

4. 考察

本研究より、経鼻投与は呼吸器における局所での細胞性免疫と液性免疫を上昇させ、更に肺内投与では経鼻投与に比べてより強い免疫誘導が起こることが明らかとなった。これは鼻腔粘膜の表面積がヒトでは150cm²であるのに対して肺の表面積が140m²であるという報告や、豚における肺中のリンパ球数はパイエル板のリンパ球数と同等であるという報告から、肺に抗原が入った場合、多くのリンパ球を含む広範囲の粘膜表面と長く接することで、より強い免疫誘導が起こったと推察された。

また興味深い点として、肺内投与は経鼻投与に比



	IL-6			IL-10			IFN- γ			CD4		CD8		IgA		IgG		sIgA
	スワブ	スワブ	スワブ	肺	肺門リンパ	肺	肺門リンパ	鼻粘膜	気管	鼻粘膜	気管	スワブ	スワブ					
IM	→	→	↑	↑	→	↑	→	↑	↑	↑	↑	3w ↑	5w →					
IN	↑	→	→	→	→	→	→	↑	↑	↑	↑	3w ↑	5w →					
IP	↑	↑	↑	↑	→	↑	↑	↑	↑	→	↑	3w ↑	5w ↑					

べて鼻腔や気管と離れているにもかかわらず、IFN- γ 産生量や sIgA 産生量が高かった。これは、腸管における免疫誘導が乳腺に影響を及ぼしたという報告や、豚において PRRSV を用いて経鼻免疫した際に、肺の特異抗体量と Th1 型サイトカイン産生量が上昇したという報告から、経鼻・経口投与で感作されたリンパ球が遠隔の腸管や生殖器などへも到達し、全身の粘膜が防御されるという粘膜免疫循環帰巢 (CMIS) によると推察した。

結論として、著者らは、弱毒 *Mhp168* 株を肺内投与した場合、呼吸器において細胞性免疫と液性免疫を誘導することを示した。

5. 所感

細胞性免疫と直接作用する局所での粘膜免疫が鍵とされるマイコプラズマ感染において、サイトカインと免疫細胞を指標として、投与方法による免疫原性の違いを評価した論文である。著者の行った肺内投与によってワクチンが肺にまで達しているのかという点が論文には示されていないが、同量の抗原を用いて投与方法を比較しているという点で興味深い論文であった。

紹介論文 2

気道中の粒子は腹側に集まり排除される

Assessing mucociliary transport of single particles in vivo shows variable speed and preference for the ventral trachea in newborn pigs.

Mark J. Hoegger et.al., *Proc Natl Acad Sci USA*. Feb 11, 2014 ; 111 (6) : 2355-60

1. 背景

肺の粘膜線毛輸送 (MCT) は、異物を排除する役割を果たし、この輸送機構が破綻することで喘息、慢性気管支炎、嚢胞性線維症といった呼吸器病を引き起こすと考えられている。しかし、MCT の破綻によってこれらの呼吸器病が引き起こされるのか、呼吸器病によって MCT が破綻し病状を悪化させるのかは明らかになっていなかった。これまで MCT による異物の排除経路を探る為に、気管支に入れた

テフロン粒子の動向を気管支鏡にて観察する方法や、X線で撮影する方法がとられていたが、肺の複雑な構造からこれらの方法では限界があった。また、これまでヒトの代替モデルとして、マウスや犬が用いられていたが、新生マウスにおいては線毛細胞がなく、成マウスにおいては咽頭と上部気管に少し粘液腺が存在するが、肺小葉内では欠落しているといった構造の違いが明らかとなり、他の代替動物で経時的に観察撮影できる方法が必要であった。著者らは、粘液腺の増殖や成熟パターンがヒトと類似していることやマウスよりヒトの呼吸器の大きさに近いことから豚を代替モデルとして採用し、肺内の個々の粒子の3次元の位置変化を、MDCTを用いて経時的に撮影することで、気管から肺内にかけての粒子の動向を捉えた。

2. 方法

新生豚を試験に用いた。タンタル箔より型抜きし、直径 $350 \mu\text{m}$ x 厚さ $25 \mu\text{m}$ の大きさ、平均質量 $55 \mu\text{g}$ のタンタル粒子を作製した。タンタル粒子を投与する為に、新生豚は、アセプロマジンとケタミンおよびプロポフォルを併用して全身静脈麻酔を行い、自発呼吸できる状態を維持した。麻酔後、気管にカテーテルを挿管し、パフを用いてカテーテルから 15-30 個のタンタル粒子を気管へ投与した。

粒子を観察する為に、投与後すぐにカテーテルを抜去し、128 列のマルチスライス CT (Siemens Somatom) を使用して、仰臥位にて頭部から胸部にかけて 10 分間 (15 秒間隔にて 40 スライス) 撮影した。画像再構成条件は、スライス厚 : 0.6 mm 、再構成間隔 : 0.3 mm とし、体軸方向に連続した横断像を取得した。取得した画像から 3 D 像を再構成した後、Image J を用いて、個々のタンタル粒子の経時的な位置変化をトレースした。なお、水を 0 HU として相対値で表される X 線吸収値は、組織が 200 HU 以下であったのに対して、タンタル粒子は 500 HU と高値を示し、容易に検出可能であった。

粒子がどのくらいの速さで排除されるのかを調べる為に、トレースした位置を XYZ 座標 (X: 左 - 右, Y: 背側 - 腹側, Z: 吻側 - 尾側) にて表記し、各点とその 60 秒後の点との距離から各点毎の分速を算出した。

粒子の速度(mm/min)

$$= \sqrt{((X_{n+4}-X_n)^2 + (Y_{n+4}-Y_n)^2 + (Z_{n+4}-Z_n)^2) / (t_{n+4}-t_n)}$$

n: スキャン番号、X・Y・Z: 各点間の距離(mm)、
t: 時間(min)

なお、自発呼吸により生じたノイズを排除する為に、3点(右前葉起始部、気管支分岐部、肺尖)の平均位置を算出し、平均値から1mm以上のずれが生じた画像は排除した。

また粒子が管腔の腹側と背側のどちらを通過するのかを調べる為に、著者らは撮影した横断像上に、管腔の中心を円の中心、管腔壁の最腹側点を0度、管腔壁の最背側点を180度とする動径座標を設定した。更に管腔の中心点を (X_c, Y_c) 、管腔壁の最腹側点を (X_a, Y_a) 、粒子のある管腔壁の点を (X_p, Y_p) とし、粒子の位置を余弦定理により管腔壁の最腹側点からの角度として算出した。

腹側からの角度

$$(\theta) = \text{Arccos}((a^2 + b^2 - c^2) / (2ab))$$

$$a = \sqrt{(X_c - X_a)^2 + (Y_c - Y_a)^2}$$

$$b = \sqrt{(X_c - X_p)^2 + (Y_c - Y_p)^2}$$

$$c = \sqrt{(X_a - X_p)^2 + (Y_a - Y_p)^2}$$

更に管腔壁上の線毛の走行に偏りがあるかを調べる為に、右前葉起始部近位の気管を分離し氷上リングル液中に静置した。1-4時間後、矢状面断にて左右に二分し、平面に広げて37℃のリングル液に浸した。二つの気管腔壁上の線毛運動を、CCDカメラを搭載した落射型顕微鏡(Nikon, A1R)を用いて撮影した。撮影した1秒間の動画を用いて、線毛運動の基軸と吻尾軸の角度(ω)と線毛運動による区画毎の光強度の変化周期(Hz)を算出し、線毛

の走行に極性があるかを調べた。

3. 結果

まず粒子の輸送速度について、7頭の豚に投与した57個の粒子の平均を算出したところ、平均 $6.9 \pm 0.7 \text{ mm/min}$ であった。しかし個々の粒子の最高速度の平均は最低速度の平均の4倍あり、10分間の運動時間の割合毎の粒子数を算出したところ、100%が35個/57個であったのに対して、90-0%も23個/57個であったことから、粒子によって速度が異なることが示唆された。

次に粒子の輸送経路について、輸送開始時(0分時)の横断面像と輸送終了時(観察終了地点の咽頭到達時、または10分後)の横断面像を画像解析し、7頭の豚に投与した55個の粒子の腹側からの角度を算出した。輸送開始時と輸送終了時の角度を比較したところ、輸送開始時には0度から180度まで均一に位置していたが、輸送終了時にはほぼ90度以下に位置していた。このことから輸送によって粒子は腹側に集積されることが示唆された。著者らは重力による影響を否定する為に、伏臥位にて同様の実験を行ったところ、やはり粒子は腹側に集積された。更に、著者らは粒子が腹側を通過するという要因として、線毛の走行に注目した。線毛の走行について、気管の最腹側を0度として時計回りに-45度、-90度、-135度、-180度の地点、半時計回りに45度、90度、135度、180度の地点の全9箇所に分けて、それぞれの区画内の7-16個の線毛細胞から走行を調べた。0度の地点では、吻尾軸と平行に走行していたのに対して、-45度、-90度、-135度、45度、

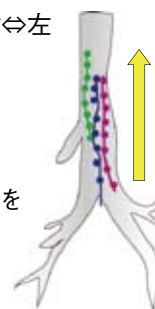
概要図

仰臥位にて麻酔下で気管チューブを挿管
→Tantalum diskを気道内に吹き込む

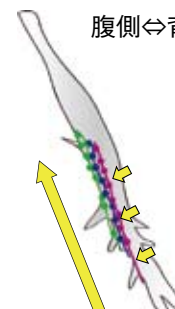


マルチスライスCTを用いて胸部を撮影

右⇔左



腹側⇔背側



腹側に集積後、排除される

90度、135度の地点では、全ての線毛が指向的に最腹側へと走行していた。また、線毛運動の頻度について、同様に9箇所に分けた後、それぞれの区画内の15-30個の線毛細胞について運動頻度を調べた。どの地点においても、10-15 Hzの周期で光が反射していた。これらのことから、粒子は、気管の円周上のどの位置からでも、線毛の走行によって腹側に集積し咽頭へと輸送されることが示唆された。

4. 考察

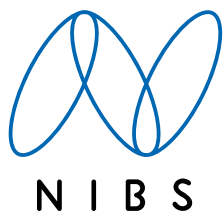
本研究において、気管中の粒子は線毛運動の向きによって気管の腹側へ集積し、その後咽頭へと輸送されることが示された。これは、豚において粘液腺の数が気管の背側に多く分布しているという報告もあることから、背側から分泌された粘液が粒子を捕らえながら腹側へ集約することで、広範囲に分散している場合と比べて咳による空気圧を効率よく活用して排除できるのではないかと推測した。著者らはこの経路を、車が高速道路の入り口から本線に入る動きの様であると表現していた。しかし高速道路の車とは違い、気管中の粒子の速度はそれぞれが独立している点が異なる。

今回の方法の欠点について、放射性物質であるためヒトへの応用が困難である点、線毛に対する鎮静剤の影響が否定できない点、diskの大きさによる影響、3次気管支以降で同様かは不明である点を挙げていた。

結論として、著者らは、豚を用いて気管中の粒子は線毛運動の向きによって気管の腹側へ集積し咽頭へと輸送されることを示した。この結果は、喘息や遺伝性の嚢胞性線維症の機序解明に有用であると考えられた。

5. 所感

気管支と肺胞上皮には多くの線毛が存在し病原体が侵入を効率よく排除する働きをしていることは知られていたが、実際にどのような経路を通過してどのくらいの速さで輸送されるのか明らかではなかった。今回明らかになった特徴的な経路、線毛運動の指向性の研究の中で、細菌、ウイルスの物理的排除因子に関しても明らかになってくるのか、今後の発展に注目したい。



—— 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592号) 平成27年4月25日印刷 平成27年5月1日発行(第61巻第3号)
 発行所 一般財団法人 日本生物科学研究所
 〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目2221番地の1
 TEL: 0428(33)1520(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/今井孝彦(委員長)、大嶋 篤、手島香保
 事務/企画学術部
 印刷所 株式会社 精興社
 (無断転載を禁ず)