

NIBS LETTER 2015 JULY
No. 593

日 生 研 報

2015年(平成27年)7月号 第61巻第4号(通巻593号)

挨拶・巻頭言

何処に向かう獣医臨床……………小野憲一郎(2)

獣医病理学研修会

第53回 No.1071 イヌの心臓
……………株式会社 LSI メディエンス(3)

レビュー

馬のワクチネーションプログラム
……………松田芳和(4)

論文紹介

サルモネラ生ワクチンと不活化ワクチンが
誘導する免疫応答と防御の関係について
……………今井孝彦(10)

お知らせ

お知らせ……………(16)
研修者・見学者受け入れ状況……………(16)



一般財団法人 日本生物科学研究所

NIBS NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE

何処に向かう 獣医臨床

小野憲一郎

獣医学ならびに関連学問領域の発展・進歩にともなって、獣医臨床も著しい進展を遂げている。動物の病気の診断・治療を通じて社会に貢献することが命題の一つである獣医臨床において、小動物診療（個体診療）では専門分野に分化・特化した専門診療が社会的な要求となってきた。一方、産業動物臨床では対象動物の飼養戸数は減少し飼育頭数は増加する多頭飼育化がここ数十年続いている。40 数年前、恩師であり、亡くなられた臼井和哉先生が「僕の夢は丸の内に立体駐車場のスタイルで肥育牛育成センターを作ることだ」と言われていたことを思い出す。今後ますます多頭化が進み、養鶏、養豚などのように企業化が進むものと思われる。これに対応し、産業動物診療では個体診療から群管理へと、予防獣医学や「食の安全」に関連する管理獣医学への取り組みに重点が置かれるようになってきている。

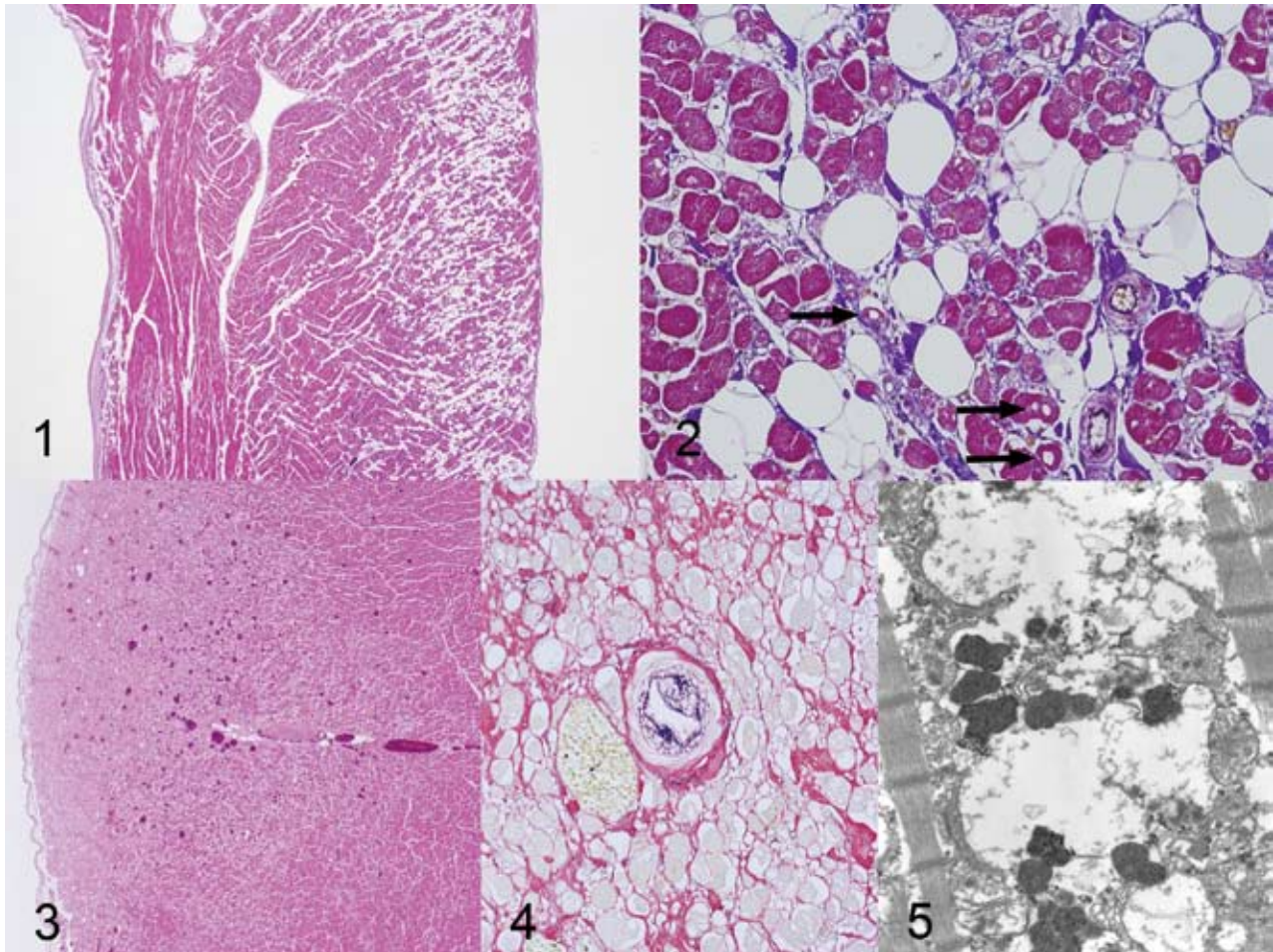
これら獣医臨床を支える獣医学教育にも大きな変革が起こっている。まず国際基準を満たす獣医学教育を行うため、卒業時まで身につけるべき必須の能力（知識・技能・態度）の到達目標と近年の獣医学の進歩や社会的ニーズを考慮した講義科目 51 科目（臨床獣医学教育分野 23 科目）、実習科目 19 科目のコアカリキュラムが策定された。このカリキュラムを実施するにあたり、教員数の増加と教育資源の有効活用を図るため、平成 24 年度から北海道大学・帯広畜産大学共同獣医学課程、山口大学・鹿児島大学共同獣医学部、東京農工大学・岩手大学共同獣医学科が設立された（この他、平成 21 年度には鳥取大学・岐阜大学・京都産業大学で連携教育も試行されている）。しかしながら、卒前教育が前提とはいえ、いずれの科目についてもレベルの向上に必要な研究に携わる教員確保は想定されていない。米国の獣医学部では教育スタッフと研究スタッフを抱える傾向が強く、また我が国の医学部臨床分野では診療スタッフと研究スタッフを備える大学がほとんどである。「医学教育コアカリキュラムの概念と位置づけ」には「——生命科学・医学や科学技術の進歩により、医学の情報量は著しく増え（中略）限られた大学教育課程の中で（中略）すべて完全に修得することは不可能であり（中略）卒後臨床研修以降（中略）専門領域の能力向上を図り（中略）社会に貢献する——」とある。この専門診療に従事する医師の育成には、卒後臨床研修体制の整備と「——当該医療機関に勤務する医師一人に対して主たる診療科名を原則 2 つ以内とし——」とした厚生労働省通知による所が大きいと思われる。一方、獣医臨床では社会的要求の高い、専門分野に分化・特化した診療を担う獣医師の養成は、現在のところ一部学会に委ねられている。専門診療科目は社会の要求に見合ったものである必要があり、的確に選定しなければならない。医療では細分化・特化の結果、専門以外の知識・技術を欠く弊害を招くに至り、再編を余儀なくされた。

獣医臨床においても、卒後研修体制の整備、専門診療獣医師の在り方、標榜診療科の制限、獣医師会の関わり方など、様々な観点からの検討が必要な時期に来ていると思われる。

（評議員）

イヌの心臓

第 53 回獣医病理学研修会 No. 1071 株式会社 LSI メディエンス



動物：イヌ、ボクサー、雌、7歳。

臨床事項：3歳時に心電図によるモニタリングで心室性期外収縮、心室性頻拍が認められた。その後特筆すべき臨床症状は無く経過したが、7歳時に突然死したため剖検が行われ、心臓のみが当研究室に送付された。

肉眼所見：ホルマリン固定後標本より、摘出された心臓は右室壁がやや菲薄化し、心外膜下は全周性に黄色を呈していた。

組織所見：右室壁心筋層の外層から中層にかけて心筋細胞の線維脂肪性置換が認められた(図1、2、図2エラスチカ・マッソントリクローム染色)。残存する心筋細胞には大小不同が認められ、しばしば空胞を有していた(図2矢印)。これらの空胞はオイルレッドO陰性であった。また、シュモール法で青緑に染色される褐色色素(リポフスチン)を有する心筋細胞も多く認められた。心筋細胞間には単核細胞浸潤が散在性に認められたが、心筋の壊死像は観察されなかった。左室壁外層には、右室壁よりも浅層に局限した心筋細胞の線維脂肪性置換が認められた。左室心筋細胞は全層性に肥大し、心筋細胞内にはリポフスチンが認められた。左室壁心筋層内層から乳頭筋部には線維化した領域が複数認められた(図3)。同領域の心筋細胞は萎縮し空胞が多数認められ、同領域を支配する小動脈には内膜肥厚が認められた(図4、エラスチカ・ワンギーソン染色変法)。ホルマリン固定標本からの戻し電顕では、右室左室とも、心

筋細胞内にはリポフスチンと考えられる高電子密度の顆粒状物を容れる単層の膜で覆われた胞状構造が認められたが、心筋細胞内に脂肪の存在を示唆する所見は認められなかった(図5)。

診断：心筋の線維脂肪性置換、左心室壁内層から乳頭筋部の間質線維化を伴う(ボクサー犬の不整脈原性右室心筋症(ARVC))

考察：ヒトのARVCの特異な例として心筋の脂肪細胞分化の報告があり[1]、獣医領域においても同様の分化を示唆する記述がある[2]。しかし、本症例の心筋細胞内空胞に脂肪は認められなかった。ボクサー犬のARVCで左心室壁内層に動脈内膜肥厚を伴う線維化の見られた報告はなく、その機序を確定するには至らなかった。本会では心筋の変性壊死を診断名に含めるかどうか議論になり途中で終了したが、再検討した結果、上記診断名としたい。(山田直明)

参考文献：

1. d'Amati, G., di Gioia, C. R., Giordano, C. and Gallo, P. 2000. Myocyte transdifferentiation: a possible pathogenetic mechanism for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **124**: 287-290.
2. 町田登. 2012. 日本獣医循環器学会獣医循環器認定医プログラム 講座34 犬と猫の心筋症—総論—. *Veterinary Circulation.* **1**(1): 78-81.

レビュー

馬のワクチネーションプログラム

松田 芳和 (日本中央競馬会 馬事部防疫課)

はじめに

馬に使用されている主なワクチンとしては、馬インフルエンザ、日本脳炎、破傷風、馬のゲタウイルス感染症および馬鼻肺炎に対するものがある。特に競走馬や乗用馬などの軽種馬群においては、軽種馬防疫協議会（農林水産省を含めた競走馬や乗用馬等の関係団体で構成された協議会）が定めた予防接種要領（表1）に基づき、馬インフルエンザ、日本脳炎および破傷風の3種類のワクチンの接種が推奨されている。具体的には、馬インフルエンザは基礎免疫後に半年に1回の補強接種を実施、日本脳炎は流行期前の5月以降に2回接種、破傷風は基礎免疫後

に年1回の補強接種を実施することとなっている。

日本中央競馬会（JRA）では、これら3種類に加え、馬のゲタウイルス感染症および馬鼻肺炎の予防接種も実施している。馬のゲタウイルス感染症は、日本脳炎と同様に流行期前の5月以降に接種する必要がある。馬鼻肺炎に関しては、若齢馬における冬季の呼吸器疾患（発熱）を予防するため、2歳馬（明け3歳馬）に対して接種している。これまで不活化ワクチンを使用してきたが、今シーズン（2014年12月以降）から新たに開発された生ワクチンに切り替えたところであり、更なる効果が期待される。

一方、北海道を中心とする生産地においては、各種疾病の蔓延防止および本会施設内への疾病侵入阻止を目的とし、1998年から開始された「育成馬等予防接種推進事業」を通じ、本会施設への入厩前の育成馬を対象とする予防接種（馬インフルエンザ、日本脳炎、破傷風）を推進している。2007年の馬インフルエンザ流行による被害を最小限に抑えた要因の一つとして、本事業が果たした役割は大きいといえる。また、その流行後には、1歳馬への補強接種の追加や接種対象を繁殖牝馬へ拡大するなど、防疫体制がさらに強化されている。育成期から競走期にかけての競走馬に対するワクチネーションプログラムは表2に示すとおりである。

表1 軽種馬防疫協議会の定める「馬の予防接種要領」

馬インフルエンザ

- 初回は使用説明書に基づいて2回接種（基礎免疫）し、以降半年に1回（春季・秋季）の補強接種を実施すること。
- ※ただし、予防接種間隔が1年を越えた場合は、再度基礎免疫から実施すること。

日本脳炎

- 使用説明書に基づいて流行期前の5月～6月に毎年2回接種すること。
- ※この期間内に接種が完了していない場合でも、必ず10月末までに接種すること。

破傷風

- 初回は使用説明書に基づいて2回接種（基礎免疫）し、翌年からは年1回の補強接種を実施すること。
- ※ただし、前年度の接種歴がない場合は、再度基礎免疫から実施すること。

表2 競走馬の予防接種プログラム

		1歳			2歳			3歳				4歳以上			
		1～3月	5月	秋	5～6月	秋	12月	1月	2月	5～6月	秋	5～6月	秋		
標準	馬インフルエンザ	●	●	◎	○	○				○		○	○	○	● 基礎免疫 ◎ 初回補強接種 ○ 補強接種 3種混合 日脳・ゲタ混合
	日本脳炎	●	●	○	●	●				●	●	●	●		
	破傷風	●	●	(○)	○					○		○		○	
JRA	馬インフルエンザ	●	●	◎	○	○				○		○	○	○	
	日本脳炎	●	●	○	●	●				●	●	●	●	●	
	破傷風	●	●	(○)	○							○		○	
	ゲタウイルス感染症									●	●	○			
	馬鼻肺炎								△	△	△				

生産地や育成牧場で接種
 (育成馬等予防接種推進事業)

馬用ワクチン開発の経緯と接種体制の変遷 馬インフルエンザワクチン株の変更

馬インフルエンザウイルスはA型インフルエンザに属し、その抗原性から1型（H7亜型）と2型（H3亜型）の2種類に大別される。特に馬2型ウイルスは抗原性が変異しやすいため、流行を起しやすいとされる。

我が国では、1969年に日本生物科学研究所（日生研）と競走馬総合研究所（栃木支所）が共同でワクチン開発に着手していたところ、1971年に馬インフルエンザが流行した。翌1972年の春に野外試験が開始され、同年の秋に初代ワクチンが製品化された。このワクチンには馬1型としてA/equine/Praque/56株（H7N7）、馬2型としてA/equine/Miami/1/63株（H3N8）および流行株であるA/equine/Tokyo/2/71株（H3N8）が用いられた。

数年が経過し、世界各国での流行を繰り返すうちに、ウイルス株の抗原性が少しずつ変異していることが明らかとなった。我が国でも初代ワクチン株であるA/equine/Miami株と流行株の間に、かなりの抗原性の差が認められることが判明した。そこで、栃木支所が中心となり、関係各機関で検討した結果、A/equine/Newmarket/1/77株（H7N7）、A/equine/Tokyo/2/71株（H3N8）およびA/equine/Kentucky/1/81株（H3N8）の3株をワクチン製造用株とすることで合意され、1985年に新ワクチンが承認された（第2代ワクチン）。さらに、1992年に香港で流行した際に分離された株と第2代ワクチン株との間

に抗原性の差が確認された。そこで、1995年に馬防疫検討会「馬インフルエンザワクチンに関する専門会議」が設置され、株変更の必要性が検討され、当時の流行株であるアメリカ系統株の導入が決定された。1996年にA/equine/Tokyo/2/71株（H3N8）に代えてA/equine/La Plata/93株（H3N8）を加えた新ワクチンが承認された（第3代ワクチン）。

2000年に至り、第3代ワクチン株では当時のヨーロッパにおける馬2型流行株をカバーできない可能性が生じたため、再び「馬インフルエンザワクチンに関する専門会議」が設置され、ワクチン株の変更の必要性が検討された。第3代ワクチンの馬2型株（H3N8）は、いずれもアメリカ型であるため、ヨーロッパ型を組み入れる必要性が指摘された。ワクチン製造用株としての適性を検討した結果、A/equine/Avesta/93株が適当であるとの結論に達し、A/equine/Kentucky/1/81株に代えてA/equine/Avesta/93株を加えた新ワクチンが2003年に承認された（第4代ワクチン）。

近年では、アメリカ型がさらに変異し、1つの新しい系統（フロリダ亜系統）を形成していることが報告されはじめ、2005年に世界獣疫事務局（OIE）は、2004年以降に世界各国で分離された株のほとんどがフロリダ亜系統に属するウイルスであること、新旧アメリカ系統株の抗原性状が互いに大きく異なっていること等を鑑み、フロリダ亜系統株をワクチンに含めるよう勧告した（図1）。これを受け、2007年5月の馬防疫検討会「馬インフルエンザワ

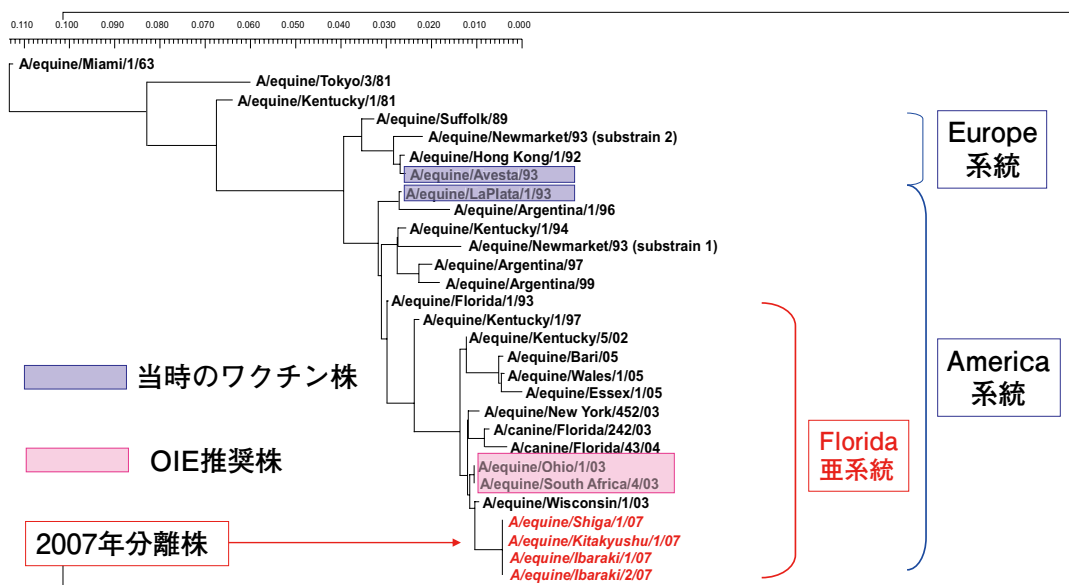


図1 2007年時点のEIV2型の進化系統樹

ワクチンに関する専門会議」において、フロリダ亜系統に対応した株を加える必要性が指摘された。また、馬1型(H7N7)は1980年の分離を最後に報告がないことから、ワクチン株に含める必要はないと判断された。さらに、株変更を迅速化する新しいシステムの構築が必要であるとも提言された。その直後の8月にフロリダ亜系統株による馬インフルエンザが流行した。新たなワクチンには馬1型のA/equine/Newmarket/1/77株に代えて、国内で分離されたA/equine/Ibaraki/1/07株を加えることとなり、2009年に承認された(第5代ワクチン)。

一方、2008年に社団法人日本動物用医薬品協会が事業主体となり、動物用インフルエンザワクチン実践的株変更法確立事業(3ヵ年計画)が立ち上げられた。この事業においてワクチン株を迅速に変更するための制度が検討され、2011年に動物用インフルエンザワクチン国内製造用株選定委員会が設立された。以降は、毎年春季に本委員会が開催され、株変更の要否、候補株選定、製造用株としての適正確認等が検討されることとなった。

その後、フロリダ亜系統株による流行が世界的に継続し、北米大陸とユーラシア大陸でそれぞれ個別に進化してクレード1およびクレード2に分化した

(図2)。OIEはワクチンにこれら2株を含めるよう推奨するようになった。このことを踏まえ、2014年の動物用インフルエンザワクチン国内製造用株選定委員会において、ワクチンの株の変更が検討され、既に発生がないヨーロッパ系統株のA/equine/Avesta/93株、および旧アメリカ系統株のA/equine/La Plata/93株は不要とされ、A/equine/Ibaraki/1/07株(クレード1)に動物検疫所の輸入検疫馬から分離されたA/equine/Yokohama/13/10株(クレード2)を加えた2株に変更することが決定した(第6代ワクチン)。

JRA に入厩するための 馬インフルエンザワクチン接種条件

JRAでは1971年の流行を踏まえ、初代ワクチンが開発された以降、1973年から入厩条件としてワクチン接種を義務付けることとした。当初は基礎免疫完了後、年1回の補強接種を実施することとしていたが、基礎免疫完了後の初回補強接種の重要性、入厩前に十分な抗体価を保持する必要性等を考慮し、現行の入厩条件は表3のとおり定めている。

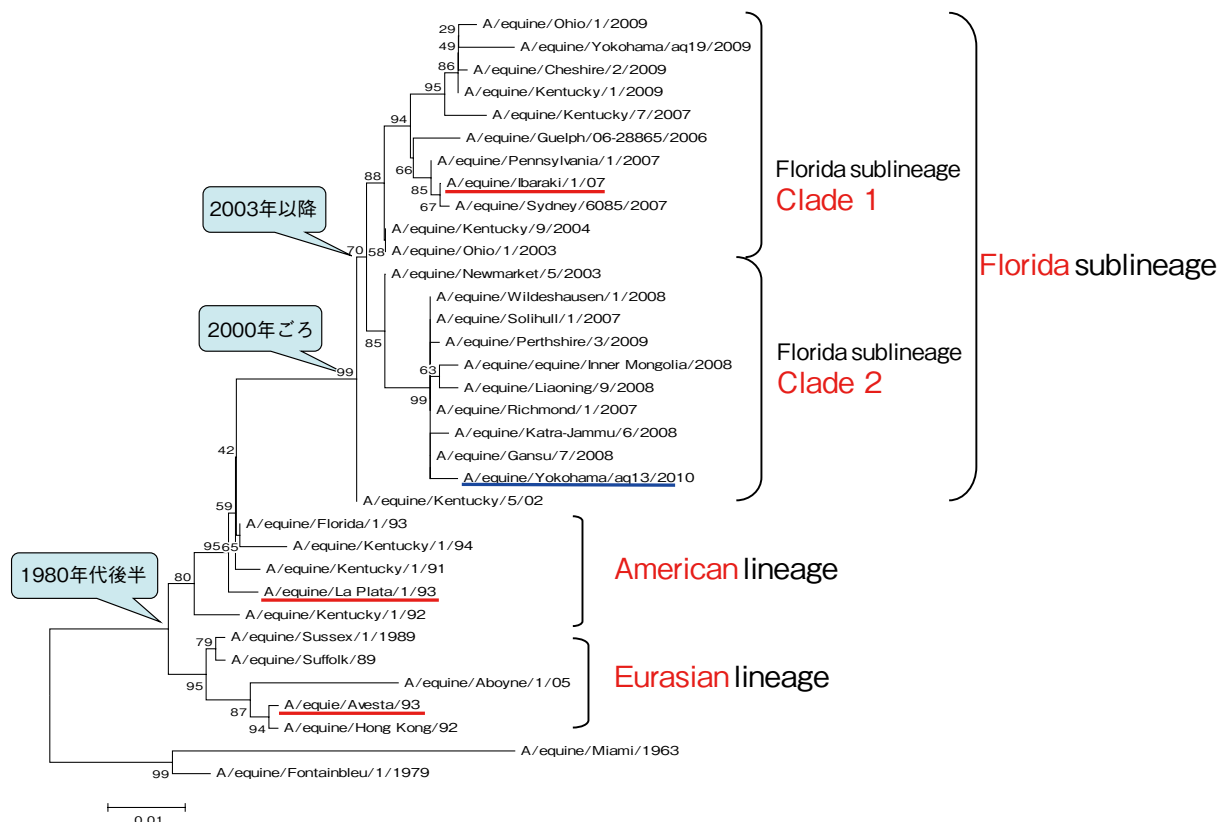


図2 2010年時点でのEIV2型の進化系統樹

文献2から引用

表3 JRAに入厩するための馬インフルエンザワクチン接種条件

【新入厩馬（本会施設に初めて入厩する馬）】

- ① 基礎免疫として2週間以上2ヶ月以内の間隔で2回接種されていること。
- ② 基礎免疫完了後4週間以上7ヶ月以内に初回補強接種されていること。
その後のすべての補強接種は1年を越えない間隔で接種されていること。
- ③ 入厩前2週間から7ヶ月の期間に補強接種が実施されていること。

【再入厩馬（新入厩馬以外の馬）】

- ① 前回の入厩以降、すべての補強接種は1年を越えない間隔で接種されていること。
- ② 入厩前2週間から7ヶ月の期間に補強接種が実施されていること。

(注1) 内国産馬の基礎免疫は1歳時の春期に、外国産馬の基礎免疫は輸入後速やかに実施するのが理想的。

(注2) 軽種馬防疫協議会から半年に1回（春季と秋季）の補強接種が推奨されている。

馬の日本脳炎

日本脳炎は、ヒトや馬に脳炎を起す人獣共通感染症であり、馬で日本脳炎ウイルスが分離されたのは1942年である。1947年から1948年にかけてヒトと馬において全国規模で大流行（1947年1,216頭、1948年3,678頭の馬が発症）したのを契機に馬用ワクチンが開発され、1948年から野外での使用が開始された。さらに1958年からは改良ワクチンによる集団接種が全国的に行われるようになり、発生頭数は暫時減少した。しかしながら、関東近郊の牧場で1983年に5頭、1984年に1頭、1985年に3頭が摘発されたことから、ワクチンの見直しが必要となった。そこで、栃木支所は日生研と協力し、哺乳マウス由来のワクチン株（中山株）から組織培養由来の北京株に変更した新たな不活化ワクチンを開発し、1990年に製品化された。同時に新しいワクチンプログラムとして、毎年5月以降に2回接種する方法を樹立し、現在に至る。

2003年にワクチン未接種の農用馬1頭に発生が認められたものの、近年、ワクチン接種馬での発症例の報告はない。

馬のゲタウイルス感染症

美浦トレーニング・センターにおいて、開場した1978年に、発熱、発疹、四肢の浮腫を主症状とする原因不明の疾患が流行（722頭が発症）し、ゲタウイルスが原因であることが判明した。翌1979年には栗東トレーニング・センターでも小規模な流行がみられたが、迅速に開発されたワクチンの接種を開始した1980年以降、JRA施設内での発生は認められなくなった。ところが、2014年に実に35年ぶ

りに美浦トレーニング・センターにおいて、発症が確認された（最終的に33頭が発症）。栗東トレーニング・センターでも、1頭確認されたが、同馬は入厩直前まで美浦トレーニング・センター近隣の牧場に飼養されていたことから、入厩時すでに感染していた可能性が高いと考えられた。

本病の予防にはワクチンが非常に有効とされ、適切な接種が行われていれば発症しないと考えられていたが、2014年の事例ではワクチン接種が行われていた馬においても発症が認められた。その原因の一つとして、発症した2歳馬の一部はその時点で基礎免疫接種が完了していなかったことから、免疫が十分に付与されていなかったことが考えられた。また、ワクチン未接種の新入厩馬の抗体調査を行ったところ、美浦トレーニング・センターでの流行と同時期に、茨城県および千葉県内の周辺牧場においてゲタウイルスが流行していたことが示唆された。したがって、周辺牧場を含めた地域全体でウイルスが蔓延した結果、美浦トレーニング・センターの馬がウイルスに曝される機会が増加し、ワクチンによる集団防御が破綻したと推察された。

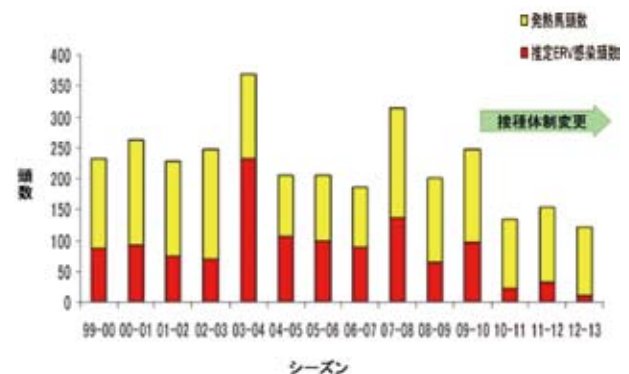
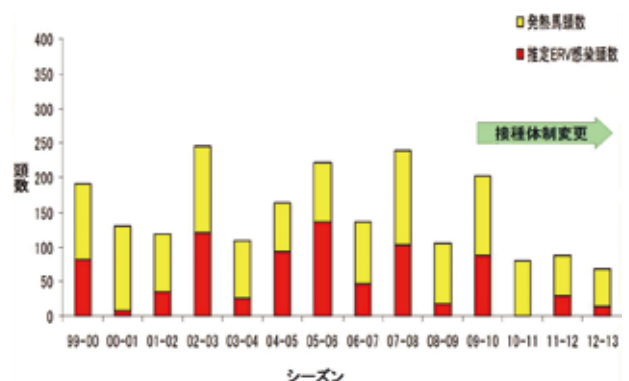
図3 発熱馬頭数と推定 ERV 感染馬頭数の推移（栗東）
文献 3, 4 から引用図4 発熱馬頭数と推定 ERV 感染馬頭数の推移（美浦）
文献 3, 4 から引用

表4 3歳馬のERV ワクチン接種率

流行期	栗東	美浦
2006-2007	41.4	46.0
2007-2008	47.4	44.8
2008-2009	54.3	53.1
2009-2010	99.4	99.8
2010-2011	99.4	98.3
2011-2012	99.6	88.6
2012-2013	99.5	98.4
2013-2014	100.0	97.0

1期目から高い接種率

全頭接種

流行抑制

文献 3, 4 から引用

破傷風

破傷風は、土壌に生息している破傷風菌の感染によって産生される毒素により筋肉の強直や痙攣を起す急性感染症である。1951年、幻の名馬と呼ばれたトキノミノル号が破傷風にかかり死亡するというショッキングな出来事が起こった。このトキノミノル号の死亡が契機となり、農林省は破傷風の予防液に関する研究に積極的に取り組むこととなった。農林省の要請に応じて、JRAも接種試験等に協力し、その後2年を経ずに破傷風トキソイドが開発された。JRAの所属馬にこのトキソイドが接種されるようになり、破傷風の発症馬は認めていない。

馬鼻肺炎
ワクチン開発の経緯

馬鼻肺炎 (ERV) は、ウマヘルペスウイルス1型 (EHV-1) あるいは4型 (EHV-4) の感染による伝染性疾患の総称であり、発熱性呼吸器疾患、流産および神経疾患が含まれる。我が国では、1957年に流産胎仔から EHV-4 が初めて分離され、1959

年には発熱した子馬からも EHV-4 が分離された。また、1967年には米国からの輸入妊娠馬の流産に端を発し、生産地で流産が多発 (日高90頭、千葉6頭)、いわゆる「流産の嵐」と称される大流行が起こった。この際に EHV-1 が初めて分離された。この流行を契機にワクチン開発が検討されることとなった。ワクチン開発には、栃木支所と日生研が共同で着手し、数年の時間を要した後、1979年に流産予防用として不活化ワクチンが承認された。その後、抗原力価を高めた改良ワクチンが1992年に承認・製品化された。

不活化ワクチンの接種体制の変遷と集団免疫効果

JRA施設においては、1973年に若歳馬を中心に呼吸器型が発生した以降、毎年、若歳馬で散発的な発生が認められた。1989年には栗東トレーニング・センターで呼吸器型が流行 (一部で神経型) したため、ワクチン接種が検討され、1994年から若歳馬を対象に野外試験を開始した。

当初は、トレーニング・センターに入厩する若歳馬 (11月~12月の2歳馬、翌年1月~3月の3歳馬) のうち、入厩検疫時の ELISA 抗体価の低い馬を対象に試験的な接種を開始した。ワクチン接種を開始し、約10年経過したところで効果を検証したところ、接種を開始する以前の10年間と比較し、冬季の若歳馬の発熱頭数が明らかに減少していることが確認された。そこで、2009年12月から、接種対象を流行期にトレーニング・センターに在厩している全ての若歳馬およびこの期間中に入厩する若歳馬に拡大し、概ね1月の間隔で3回を上限とする接

表5 ERV 感染馬に占める4歳以上の割合

流行期	栗東				美浦			
	3歳	4歳以上	合計	4歳以上 (%)	3歳	4歳以上	合計	4歳以上 (%)
2006-2007	53	6	59	10.2	15	2	17	11.8
2007-2008	76	16	92	17.4	25	4	29	13.8
2008-2009	38	3	41	7.3	6	1	7	14.3
2009-2010	52	9	61	14.8	33	13	46	28.3
2010-2011	6	1	7	14.3	0	0	0	-
2011-2012	17	2	19	10.5	15	1	16	6.3
2012-2013	3	2	5	40.0	6	1	7	14.3
合計	245	39	284	13.7	100	22	122	18.0

文献 3, 4 から引用

種体制に変更した。

この若齢馬全頭接種体制に変更したところ、最初のシーズン（1期目）はそれまでと同程度の流行が認められたものの、2期目となる2010年-2011年シーズン以降、3期連続で流行規模が小さくなったことが明らかとなった（図3・図4）。このERV流行抑制が1期目から見られなかった理由を検証するため、各流行期におけるワクチン接種率を調査した。3歳馬のワクチン接種率は、両トレーニング・センターとも全頭接種開始前は50%程度だったが、全頭接種開始後1期目から99%前後に上昇していた（表4）。これは3歳馬の接種率が上昇しただけではERVの流行に対する集団免疫効果が十分に得られないことを示している。そこで4歳以上の馬群に着目し、2006年-2007年シーズンから2012年-2013年シーズンのERV感染による発熱馬の年齢を調査したところ、4歳以上の頭数の割合は期間中の合計で、栗東では13.7%、美浦では18.0%であった（表5）。この結果から4歳以上の馬群も少なからず流行に関与していることが示唆された。そこで、4歳以上を含めた在厩馬全体のワクチン接種率を検証したところ、両トレーニング・センターとも全頭接種開始前は50%程度だったが、2009年-2010年以降の4期で、栗東では77.9、85.3、91.1、95.7%、美浦では79.3、87.8、88.0、95.1%と段階的に上昇していた（表6）。以上のことから、若齢馬全頭接種を導入したことで在厩馬全体の接種率が段階的に上昇し、2期目から集団免疫効果が発揮され、ERVの流行を抑制したと考えられた。

生ワクチンの開発

現在、国内で市販されている馬鼻肺炎不活化ワクチンは、抗体の持続期間が短いため、流行期間中の予防効果を継続するためにはワクチン接種を3回実施する必要がある。さらに、不活化ワクチンでは、ヘルペスウイルスに対する防御に重要な細胞性免疫（活性化したリンパ球による働き）の誘導が難しいとされている。一方、生ワクチンは、一般的に細胞性免疫の誘導能が高いことが知られ、他の動物のヘルペスウイルス感染症では、既に臨床応用が行われている。以上の理由から、組換えウイルスを用いた生ワクチンの開発に向け、栃木支所と日生研と共同

表6 在厩馬全体のERVワクチン接種率

流行期	栗東	美浦
2006-2007	48.0	50.3
2007-2008	51.3	48.6
2008-2009	53.2	51.2
2009-2010	77.9	79.3
2010-2011	85.3	87.8
2011-2012	91.1	88.0
2012-2013	95.7	95.1
2013-2014	96.0	95.4

文献3, 4から引用

で研究が進められ、2014年8月に馬用ワクチンでは初めてとなる生ワクチンが発売された。

JRAでは、2014年-2015年シーズンから生ワクチンに切り替え、接種回数も3回から2回（概ね1ヶ月間隔）に変更した。生ワクチンによる集団免疫効果に関しては、数期経過した後に検証する予定である。

参考文献

- 今川浩. 2006年. 馬用ワクチンの開発・改良の経緯. 馬の科学. Vol.43 No.1 : 32-38
- Yamanaka T, Cullinane A, Gildea S, Bannai H, Nemoto M, Tsujimura K, Kondo T, Matsumura T. The potential impact of a single amino-acid substitution on the efficacy of equine influenza vaccines. Equine Vet J. 2014 Apr 28. doi : 10.1111/evj.12290. [Epub ahead of print] PMID : 24773030 [PubMed - as supplied by publisher]
- 坂内天, 前尚美, 大出浩隆, 根本学, 辻村行司, 山中隆史, 近藤高志, 松村富夫. 2015年. トレーニング・センターにおけるウマヘルペスウイルス1型ワクチンの接種率向上による集団免疫効果. 馬の科学. Vol.52 No.1 : 2-12
- Bannai H, Mae N, Ode H, Nemoto M, Tsujimura K, Yamanaka T, Kondo T, Matsumura T. Successful control of winter pyrexias caused by equine herpesvirus type 1 in Japanese training centers by achieving high vaccination coverage. Clin Vaccine Immunol 2014. 21 : 1070-1076.
- 軽種馬防疫協議会. 2005年3月発行. 馬の感染症 (第3版)

論文紹介

サルモネラ生ワクチンと不活化ワクチンが誘導する免疫応答と防御の関係について

今井 孝彦

Humoral and cellular immune response generated by different vaccine programs before and after *Salmonella* Enteritidis challenge in chickens.

Rafael Antonio Casarin Penha Filho *et.al.*, 2012 *Vaccine* 30, 7637–7643,

1. 要約

世界中の消費者に安全なサルモネラフリー食物を提供するため、養鶏産業においてはサルモネラワクチンに高い需要がある。生ワクチン (LV) または不活化ワクチン (KV) の使用の基準は、それぞれのワクチンによって誘導される免疫機構の違いによるが、*Salmonella* Enteritidis (SE) に対するワクチンは多くの国で広く使用されている。本研究では、市販のバクテリア (不活化ワクチン; KV) と弱毒 *Salmonella* Gallinarum 変異株 (生ワクチン; LV) を4つの異なるワクチンプログラム (LV、LV+LV、KV、LV+KV) で投与した。SEによる攻撃1日前と攻撃1、6、9日後に、液性免疫 (IgM、IgG と分泌型 IgA) と細胞性免疫 (CD8 陽性 T 細胞) 応答、IL-10、IL-12、IFN- γ の産生量を評価した。攻撃後、全ての鶏の組織で CD8 陽性 T 細胞の増加が認められたが、不活化ワクチンで免疫された鶏は CD8 陽性 T 細胞数が少なく、免疫グロブリンのレベルは高かった。ワクチン投与群では、全ての群でサイトカインの発現量が上昇したが、攻撃後に低下した。一方で、対照群では攻撃後にサイトカイン発現量の上昇が認められた。IL-10 の量は不活化ワクチン免疫群で攻撃1日後に最も高くなったが、これは不活化ワクチン投与群では弱い細胞性免疫応答しか誘導できないことに起因するかもしれない。盲腸扁桃において、攻撃1日前の IFN- γ の発現はワクチン2回投与群 (LV+LV、LV+KV) で上昇し、攻撃後の CD8 陽性 T 細胞の数は LV のみで免疫した群 (LV、LV+LV) で上昇した。本研究ではサルモネラ生ワクチンが誘導する CD8 陽性 T 細胞による免疫応答が、不活化ワクチンによって誘導される

血清中の抗体価の上昇と比べて効率がよいことを紹介する。一方、グループ E (LV+KV) では、腸管内腔における高い IgA の分泌が認められ、この IgA と CD8 陽性 T 細胞がサルモネラ感染に対する高い防御能を示すことが期待できるかもしれない。

2. 背景

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Enteritidis (SE) は世界的に流行している病原体で、養鶏産業を行う国々では 1990 年代から認識されてきた。毎年、世界中で食物を介して数百万件のサルモネラ症が起こり、死者数は 155,000 人に達すると推定されている。鶏肉や鶏卵は、食物を介した SE の主たる感染源であると考えられ、現在までに鶏にワクチンを投与することによって SE 感染を抑制できることが示されている。

2 種類のサルモネラワクチン (生ワクチンと不活化ワクチン) は異なるメカニズムで機能する。不活化ワクチンは多くの国で採卵鶏 (レイヤー) のワクチネーションプログラムに使用されている。これらのワクチンのほとんどは SE 抗原とアジュバントを成分としており、液性免疫応答を高め、鶏をサルモネラ症から守る。一方で、弱毒サルモネラ株を使用した生ワクチンは細胞性免疫を刺激するが、必ずしも高い抗体産生を誘導しない。宿主特異性を高めヒトへの感染のリスクを低下させるため、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum (SG) が鶏のサルモネラ症に対する生ワクチンとして鶏に対し広く使用されている。

サルモネラのような細胞内寄生菌に対する免疫応答には、Toll 様受容体 (TLRs) のような宿主のパ

ターン認識受容体 (PRRs) による病原体関連分子パターン (PAMPs) やサイトカイン産生を通じたシグナルなど多くの因子が関与しており、それらは免疫応答の働きを調節する上で重要な役割を果たしている。炎症性サイトカインは自然免疫応答の引き金となり、サイトカインの走化性活性は貪食細胞やナチュラルキラー細胞、マクロファージや偽好酸球など、SE に対する初期の免疫応答に重要な細胞を誘導する。現在までにこれらの自然免疫応答が SE の定着阻害に重要な役割を果たしていることが示されているが、獲得免疫は SE に対してさらに早く、また特異的な免疫応答をもたらす。

CD8 陽性 T 細胞は感染細胞を認識し傷害する。ナイーブ CD8 陽性 T 細胞は抗原提示細胞を介して抗原刺激を受け、CD8 陽性 T 細胞を二種類の細胞へと分化させる。それが細胞傷害性 T 細胞 (CTL) とメモリー T 細胞である。生ワクチンがこれらの CD8 陽性 T 細胞を刺激するという研究は過去に実施されている。CTL への分化は主に IL-12 が関与している。また、IL-12 はサルモネラ感染初期における防御免疫応答に必須のサイトカインである Interferon- γ (IFN- γ) の産生を誘導する。IL-10 は炎症応答を抑制したり、マクロファージを非活性化する調節性サイトカインである。IL-10 は T helper 1 (Th1) 細胞による IFN- γ 発現を負に制御し、Th2 細胞の増殖や抗体産生を促進する。

サルモネラに対する防御の指標として抗体価の測定を用いることは、矛盾する結果が出ると報告されている。すなわち、血清中の IgG 濃度と腸内の SE 量が相関しないことが、過去の研究で示されている。一方、別の野外試験によるとワクチン投与群でサルモネラ菌の保有率が低いほど、高い抗体価を有しているとの報告もある。IgA は局所免疫に重要な役割を果たす。IgA は粘膜表面で分泌され、腸管内腔への菌の定着を阻害する。さらに IgA は受動免疫によりヒナに移行し、新たに生まれたヒナを感染から守る。

上述の通りサルモネラに対する免疫機構は研究されてきたが、野外で適用できるワクチンプログラムによって付与される獲得免疫を調べることも重要である。本研究では、市販のバクテリン (不活化ワクチン) と新しいワクチン候補である弱毒 SG 株 (生ワクチン) を用いて 4 つのワクチンプログラムによ

り鶏を免疫し、各群について SE による攻撃試験と CD8 陽性 T 細胞数、抗体価とサイトカインの発現を調べた。

3. 実験方法

3.1 実験動物

SE に感受性を持つ白色採卵鶏の雌鶏 120 羽を孵化日に導入した。これらの鶏全てを細菌学および血清学的な試験に供し、サルモネラに感染していないことを確かめた。

3.2 細菌株とワクチン

フェージ型 PT4、PT8、PT13a 抗原の SE を含むオイルエマルジョンバクテリン (不活化ワクチン) を上頸部皮下に投与した (0.3 mL/bird)。cobS と cbiA 遺伝子を欠損し、シアノコバラミンを合成できないが、SE に対して抗原性のある弱毒 SG 株を生ワクチンとして使用した。侵襲性のある SE 株である PT4 株を攻撃株として使用した。使用した菌は Luria-Bertani (LB) 培地を 37°C、24 時間振盪培養 (100rpm) することで調製した。生ワクチンおよび SE 攻撃株はリン酸緩衝液 (PBS) (pH7.4) で希釈し、 10^8 CFU/bird を経口的に素嚢内投与した。

3.3 試験系

鶏は 20 羽ずつ 5 つの群に分け、5 日齢と 25 日齢の両方またはいずれか一方の日に免疫した (表 1)。45 日齢で全ての鶏を攻撃した。ワクチン非投与かつ非攻撃群をサイトカインの定量試験の陰性対照として使用した。

3.4 採材と細菌学的解析

攻撃 1 日前と攻撃 1、6、9 日後にそれぞれの群の

表 1 ワクチンプログラム

グループ	鶏の数	1 回目(5 日齢)	2 回目(25 日齢)
A	20	—	—
B	20	LV	—
C	20	LV	LV
D	20	—	KV
E	20	LV	KV

LV: 生ワクチン、KV: 不活化ワクチン

5羽から血液を採取し、採材を行うため頸椎脱臼法により安楽殺した。解剖後、腸管内腔を2 mLのphenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) バッファーで洗浄し、4℃、2000rpmで30分間遠心し、上清を-20℃で保存した。免疫組織化学的解析および定量PCR解析に使用する脾臓、肝臓、盲腸扁桃は無菌的に採材し、液体窒素で急速に凍結した後、-80℃で保存した。

脾臓と盲腸は細菌学的解析にも使用した。試料1グラム当たりのSEの生菌数を、底を10とした対数値で示した。濃縮後に生菌数が検出されたサンプル ($\leq 10^2$ CFU/g) については、計算上 $2(\log_{10}$ of CFU/g) で表した。

3.5 抗体産生

血清中のIgGとIgM、腸管内腔洗浄液中の分泌型IgAはSE抗原を用いたELISA法にて測定した。OD値を測定し、以下の公式を用いてE値を算出した。

$$E \text{ 値} = (\text{OD sample} - \text{OD negative control}) / (\text{OD positive control} - \text{OD negative control})$$

3.6 免疫組織化学的解析

CD8陽性T細胞数を調べるため、免疫組織化学的解析を実施した。肝臓と盲腸扁桃の凍結組織切片(8 μ m)を氷冷したアセトンで固定した。切片に抗ニワトリCD8 α^+ 抗体を加えて4℃で一晩インキュベート後、3,3'-diaminobenzidine (DAB)を用いて検出した。組織切片は光学顕微鏡でランダムに撮影し、染色された領域の割合を算出した。

3.7 RNA分離と逆転写

脾臓と盲腸扁桃からRNAを抽出し、Nanodropとアガロースゲル電気泳動により純度を調べた後、

逆転写によりcDNAを合成した。cDNAは-20℃で保存した。

3.8 定量的リアルタイムPCR

リアルタイムPCRは50 ngのcDNA、0.5 μ Mのプライマー、12.5 μ LのMaxima SYBR Green 2X、0.2 μ LのPlatinum Taq DNA polymeraseを用いて25 μ Lの反応系で行った。プライマーの配列とアニーリング温度は表2に示した。各々のサイトカインのmRNAの発現量比は18Sや対照群の鶏や非攻撃群の鶏を基準として、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法により算出した。

3.9 統計解析

各サンプリング日における、グループ間の差はKruskall-Wallis検定とBonferroni検定を用いて比較した。 $p < 0.05$ を統計学的に有意であるとした。

4. 結果

4.1 SEの分離

各々のワクチンプログラムの有効性をSE攻撃株の脾臓および盲腸内容物における分離菌数によって調べた。

脾臓では感染1日後に対照群(グループA)とグループBとEで、サンプルを濃縮したときのみ菌が検出されたが、有意差は認められなかった。感染6日後、全てのグループから攻撃菌が検出された。グループEは対照群と比べ、攻撃菌の分離数が有意に減少していた。攻撃9日後では、脾臓におけるSEの量は低下し、全てのグループ間で統計的有意差は無かった。

盲腸内容物においては、攻撃菌の分離量は対照群で非常に高かった ($>10^5$ CFU/g)。攻撃1日後では、

表2 各グループにおける排菌数の比較

グループ	ワクチン	排菌数					
		脾臓			盲腸内容物		
		1dpi	6dpi	9dpi	1dpi	6dpi	9dpi
B	LV	→	→	→	↓	↓	↓
C	LV+LV	→	→	→	↓	↓	↓
D	KV	→	→	→	↓	→	→
E	LV+KV	→	↓	→	↓	↓	↓

→: 対照群(グループA)と同等 ↑: 対照群から有意に上昇 ↓: 対照群から有意に減少

dpi: 攻撃後日数

表3 各グループにおける免疫応答の比較

グループ	ワクチン	抗体応答			CD8 陽性 T 細胞の数								
		IgG	IgM	IgA	肝臓				盲腸扁桃				
					1dbi	1dpi	6dpi	9dpi	1dbi	1dpi	6dpi	9dpi	
B	LV	→	→	→	↑	→	↓	↓	↓	→	↑	↓	↑
C	LV+LV	→	→	→	↑	↓	↓	↓	↓	→	→	→	↑
D	KV	↑	↑	↑	→	↓	→	↓	↓	→	↑	↓	→
E	LV+KV	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓	→	↑	↓	→

→：対照群(グループA)と同等 ↑：対照群から有意に上昇 ↓：対照群から有意に減少

dbi：攻撃前日数
dpi：攻撃後日数

全ての免疫群でSEが検出されたが、対照群と比べてその量は有意に低下していた。攻撃6日後と9日後の細菌量は、グループB、C、Eで有意に低下したものの、不活化ワクチンを1回投与したグループDでは、SEの量は対照群と差が認められなかった。

4.2 血清中の抗体量

IgMとIgG量は、不活化ワクチンを投与したグループDとEで有意に高かった。対照群、グループB、Cでは、IgMやIgGの量はどのサンプルでも比較的少なかった。攻撃9日後にIgMは対照群とグループCで若干上昇した。対照群や生ワクチンのみを投与した群であるグループB、CのIgG量は、攻撃6日後に増加した。

4.3 腸管内腔における分泌型IgAの産生

攻撃1日前に全てのグループでIgAの量は同等であった。攻撃6日後までに、グループDとEでIgAの産生が有意に増加した。感染9日後では、グループEは他のグループよりIgA量が有意に増加した。有意差はないもののグループBとCで感染後9日後までの分泌型IgA量が増加した。一方で、対照群のIgA量は低いままであった。

4.4 IL-12、IFN- γ 、IL-10の発現

攻撃前の脾臓と盲腸扁桃におけるIL-12の発現量は、対照群と比べて全ての免疫群で有意に高かった。攻撃後、免疫群のIL-12の発現量は減少し、盲腸扁桃においては対照群と有意差が無くなった。

攻撃前の脾臓と盲腸扁桃におけるIFN- γ の発現量は、対照群と比べて免疫群で有意に高かった。盲

腸扁桃におけるIFN- γ 発現量はグループCとEで攻撃1日前に、グループEで攻撃6日後に、他のグループと比べて有意に上昇した。

攻撃1日前の脾臓におけるIL-10発現量は、全ての免疫群で対照群と比べ顕著に増加していた。攻撃1日後では脾臓におけるIL-10発現量が、グループDを除く全てのグループで減少した。盲腸扁桃においては、IL-10発現量はグループCとEで攻撃前と比べて上昇しており、グループEにおける発現量のピークは攻撃6日後であった。

4.5 CD8陽性T細胞数

免疫組織化学によってCD8陽性T細胞の肝臓および盲腸扁桃における数を評価した。攻撃1日前、全てのグループの盲腸扁桃におけるCD8陽性T細胞の量は少なかった。攻撃1日後、対照群を含む全てのグループで盲腸扁桃におけるCD8陽性T細胞の増加が認められた。攻撃6日後では、対照群とグループCでCD8陽性T細胞の数が他のグループより有意に高くなり、攻撃9日後ではグループBとCで最も高い値を示したが、グループDとEはCD8陽性T細胞の量は有意に低く、対照群と同程度であった。

攻撃後、全てのグループで肝臓におけるCD8陽性T細胞数が増加し、最も増加したのは対照群であった。グループDではCD8陽性T細胞数は一定であり、経過観察中に有意に増加することはなかった。攻撃6日後には、全ての免疫群間でCD8陽性T細胞の量に差は認められなかった。しかし、攻撃9日後ではグループBとCはグループDとEより肝臓におけるCD8陽性T細胞の量が多かった。

5. 考察

生ワクチンと不活化ワクチンが鶏の免疫応答に及ぼす影響を調べる研究は、ワクチンの作用機序を解明する上で重要である。生ワクチンは病原性復帰がよく問題になる一方で、不活化ワクチンは細胞性免疫の惹起能が弱いと言われ、サルモネラワクチンの使用法はいつも論争的になっている。過去にも報告があるように、不活化ワクチンは液性免疫を刺激するが、それだけではサルモネラ感染をコントロールするには不十分であることが本研究でも示された。しかし、不活化ワクチンはバイオセキュリティプログラム下で使用した際には、サルモネラの蔓延を防ぐ効果があることが過去に示されている。

生ワクチンによって惹起される免疫応答は、病原性のある株が鶏に感染した時と同様の過程で生じる。野生株と同様、SG 変異株も消化管から宿主の体内に侵入し内臓に定着する。さらに、遺伝子組換え体 (GMO) であるワクチン株はラフ型株と比べて病原性復帰のリスクが少ない。攻撃後、生ワクチンは SE の排菌数を減少させた。攻撃 9 日後に、生ワクチンのみで免疫しているグループ B と C において、盲腸扁桃において最も高い CD8 陽性 T 細胞の誘導を示した。

攻撃前に、CD8 陽性 T 細胞の減少が認められたが、これは過去の報告通り免疫後から攻撃までの間に CD8 陽性 T 細胞が基底レベルへと戻ったことを示唆している。攻撃後は、グループ B と C で CD8 陽性 T 細胞の量はコンスタントに増加した。このことはグループ B と C に属する鶏において、メモリー CD8 陽性 T 細胞が増殖していることを示唆している。さらに、生ワクチンのみを使用した群 (グループ B と C) では、CD8 陽性 T 細胞数が多い状態が長期間持続した。生ワクチンと不活化ワクチンを両方免疫したグループ E では、不活化ワクチンのみを接種した群 (グループ D) と同様、CD8 陽性 T 細胞の量は少なかった。一方で対照群では、おそらく肝臓への細菌の侵襲性により、肝臓への早い細胞傷害性 T 細胞の誘導が認められた。

生ワクチンを 1 回投与した鶏 (グループ B) は攻撃前に脾臓における IFN- γ 産生量が最も高くなった。IFN- γ はマクロファージの活性化に重要な役割を果たすが、免疫群において攻撃後の IFN- γ 量

は低下した。この現象は対照群において攻撃後に誘導された自然免疫応答と明らかに異なっており、IFN- γ が獲得免疫機構の惹起と関連性があるかもしれない。

パラチフス菌によるチフス性疾患は、高頻度で消化管のみで発生する。このように、細菌の進入はまず腸の粘膜や腸管関連リンパ組織 (gut associated lymphoid tissue ; GALT)、特に盲腸扁桃で阻止しなくてはならない。このことを考慮して今回の結果を見てみると、盲腸扁桃において最も高い IFN- γ 産生量がグループ C と E で認められており、攻撃 6 日後では IFN- γ の発現量はグループ E で有意に上昇し、このグループでは感染初期における SE の定着と進入を阻害できると考えられる。IFN- γ 産生と初期のサルモネラ菌のクリアランスには関連性があることが過去に報告されており、実際、盲腸内容物におけるサルモネラ菌数のコントロールはグループ A と D に比べ、グループ C と E で明らかに早かった。しかし、攻撃 1 日後には免疫群における IFN- γ の量が減少し、対照群と同程度になった。このことは、免疫群における獲得免疫系の発達は単に IFN- γ だけに依存していないことを示唆している。

IL-12 には IFN- γ の産生を刺激する重要な役割があり、これによってナイーブ CD8 陽性 T 細胞や CTL を誘導したり、CD8 陽性メモリー T 細胞を発達させたりする。本研究では、攻撃前の免疫群で IL-12 発現量が高くなっていることを示した。実際、攻撃 1 日前に盲腸扁桃における IL-12 の発現量は対照群と比べて全ての免疫群で高かった。対照群では IL-12 発現量が低く、それに伴って CD8 陽性 T 細胞数も少なくなっているが、その結果抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の免疫応答が弱く、鶏はサルモネラ菌感染に感受性になるのかもしれない。

生ワクチンは細胞性免疫の発達を刺激すると考えられている。グループ B と C における CD8 陽性 T 細胞数は SE の量が減少するにつれて増加した。それゆえに攻撃 6 日後と 9 日後では、生ワクチンで 1 回以上免疫した群 (グループ B、C、E) で SE の排菌数が減少した。一方で、グループ D では免疫グロブリンのレベルは非常に高いが、排菌数の減少は認められなかった。

生ワクチンと不活化ワクチンの組み合わせは包括

お 知 ら せ

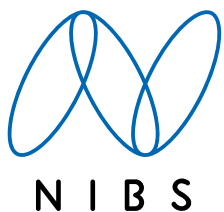
当研究所の平成 27 年度定時評議員会が、去る平成 27 年 5 月 29 日に開催され、平成 26 年度の事業報告及び決算報告が承認・可決されました。尚、平成 27 年 6 月 1 日現在の理事及び監事は下記の通りです。

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
草薙 公一	常務理事	企画学術
齋藤 敏樹	常務理事	製造、品質管理及び実験動物
朱通 市次郎	常務理事	管理
真板 敬三	監事	
小坂 善三	監事	

研修者・見学者受け入れ状況 (平成 26 年 4 月から平成 27 年 3 月)

来所日・期間		所属機関・人数		研修・見学内容
平成 26 年	6 月 23 日～6 月 24 日	グローバルピッグファーム株式会社	2 名	技術習得
	8 月 4 日～8 月 8 日	麻布大学	1 名	学外実習
	8 月 4 日～8 月 8 日	日本獣医生命科学大学	1 名	学外実習
	8 月 20 日～9 月 5 日	日本全薬工業株式会社	1 名	技術習得
	10 月 20 日	株式会社ジャパンファーム	1 名	技術習得
平成 27 年	2 月 6 日	日本大学	2 名	施設見学



—— 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 593 号) 平成 27 年 6 月 25 日印刷 平成 27 年 7 月 1 日発行(第 61 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)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)