

日 生 研 報

2015年(平成27年)9月号 第61巻第5号(通巻594号)

挨拶・巻頭言

実験動物福祉……………齋藤敏樹(2)

獣医病理学研修会

第53回 No. 1075 ウシの肺
……………鹿児島大学(3)

第54回 No. 1115 イヌの大腿部腫瘍
……………摂南大学(4)

第54回 No. 1097 ラットの胸腔内腫瘍
……………株式会社 LSI メディエンス(5)

レビュー

国内におけるフェレットコロナウイルスの検出
……………平 修(6)

研究設備紹介

植物で動物用医薬品を開発する一適切な
製造設備の整備……………竹山夏実(9)

論文紹介

アメリカ大陸で分離された *Avibacterium*
paragallinarum 血清型 B-1 における
遺伝子型、病原性及び免疫原性について
……………高橋真理(12)



実験動物福祉

齋藤敏樹

「動物の愛護及び管理に関する法律」(動物愛護管理法)が平成24年に改正され、翌年施行されました。平成17年の改正による実験動物福祉体制の仕組みは維持されました。

動物愛護管理法の平成17年の改正で動物取扱業の適正化(登録制の導入、動物取扱責任者の選任、動物取扱業の範囲の見直し等)が図られましたが、第10条の通り「畜産農業に係るもの及び試験研究用又は生物学的製剤の製造の用に飼養又は保管しているもの」は動物取扱業から除外されています。そして動物を科学上の利用に供する場合の配慮として、3Rの原則(苦痛の軽減、使用数の削減、代替法の利用)が第41条に定められました。今回の改正において、実験動物の動物取扱業からの除外及び第41条については変更されておらず、実験動物福祉体制のさらなる充実が実験動物関係者に課せられました。動物愛護管理法の基本原則となる適切な給餌、給水、健康管理、動物の種類や習性等を考慮した飼養又は保管については、全ての動物に適用されることは言うまでもありません。

飼養及び保管に関する基準も平成25年に改正されており、家庭動物等、展示動物、実験動物及び産業動物についてそれぞれ基準が定められています。「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」において、3Rの原則、委員会の設置、本基準及び機関内規定の遵守状況の自己点検並びにその結果の公表、出来る限り外部検証を受けること等が記されており、実験動物生産機関や動物実験実施機関を問わず自己点検・評価を行い、その結果を公表することが求められています。外部検証については努力義務となっていますが、昨今の動物福祉に対する社会的関心の高さから近い将来義務化される方向に進んでいくのではないのでしょうか。しかし問題が無いわけではありません。外部検証を行う第三者機関としては(公財)日本実験動物協会、(公財)ヒューマンサイエンス振興財団、国立大学法人動物実験施設協議会、公私立大学実験動物施設協議会の各機関があります。これら各機関の評価方法、チェックシートの内容、認証の有効期間などが独自に設定されていることから、検証の評価基準の統一性を問題視する意見があります。これらの問題点を改善するためには、各機関の間で情報共有を図り、関係者で協議し、出来る限り基本的な検証体制の統一化を図る努力が必要でしょう。国際的な機関としてはご存知の通り「AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) International」があり、日本でも認証施設が増えてきています。今後、グローバルな展開を進めていく施設ほどAAALAC認証を受ける必要性が高まると推測されます。

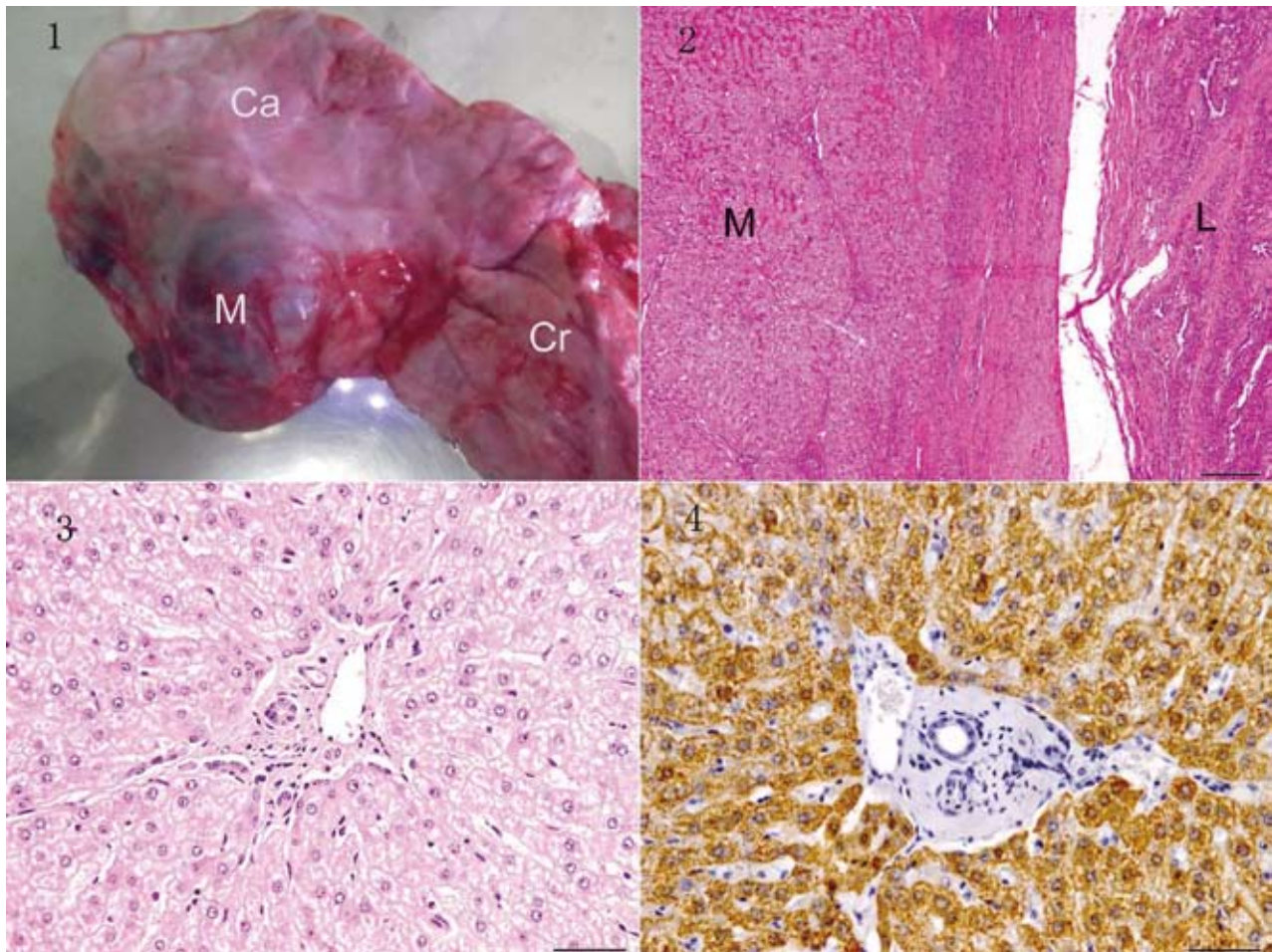
もう一つ動物取扱業から除外されている産業動物においては、「産業動物の飼養及び保管に関する基準」で衛生管理及び安全の保持、導入・輸送上の配慮、危害防止、生活環境の保全について定められています。産業動物では「Animal welfare」という考え方が定着しており、飼養管理指針が民間機関により策定されています。畜産業界においても、これら飼養及び保管の基準と飼養管理指針を遵守した生産管理体制を充実させていくことが必要になると思います。

動物愛護管理法の次の見直しは平成30年頃に着手すると思われます。今回改正時の検討会において様々な意見が出されたと聞き及んでおり、次回の改正に際しても大きな議論が起こるのではないのでしょうか。実験動物生産業が動物取扱業から除外されている最も大きな理由は、機関内規定による自主管理、情報公開、そして外部検証受けることで透明性を確保することに他なりません。実験動物に関わるものはその点を十分に認識し、積極的に情報公開に取り組むことが必要です。

(常務理事)

ウシの肺

第 53 回獣医病理学研修会 No. 1075 鹿児島大学



動物：牛、黒毛和種、雌、28ヵ月齢、体重794 kg。
臨床事項：本症例は熊本県で生産され、宮崎県で肥育された後、健康状態の良好な一般畜として、福岡県のと畜場に搬入された。病歴や投薬歴はない。と殺前の生体検査では異常な症状は認められなかった。放血殺にてと殺後、通常のと畜検査を行った。
剖検所見：解体後検査において、左肺前葉後部に直径約6 cmの単発性腫瘍が認められた(図1: Cr: 前部, Ca: 後部, M: 腫瘍)。腫瘍は類円形で弾力に富み、充実性で、断面は赤褐色を呈していた。腫瘍は限局性で、肺組織とは境界明瞭であった。横隔膜や腹腔内の肝臓とは肉眼的な連絡は認められなかった。肺以外の全身諸臓器に肉眼的な著変はみられなかった。
組織所見：腫瘍は限局性に形成され、線維性結合組織に囲まれており、肺組織との境界は明瞭で、組織学的に規則的かつ放射状に配列する肝細胞索で構成されていた(図2: L: 肺, M: 腫瘍)。また、肝小葉が明瞭であり、中心静脈、小葉間胆管と小葉間動脈と小葉間静脈が存在する肝三つ組構造が認められた(図3)。これらの細胞に腫瘍性変化はみられなかった。鍍銀染色では類洞に沿って肝細胞索が規則的に配列し、細網線維が豊富に認められた。ホール染色では胆汁産生はみられなかった。抗Hepatocyteモノクローナル抗体を用いた免疫染色では腫瘍内の肝細胞は陽性を示し、腫瘍内の小葉間胆管は陰性を示した(図4)。
診断：肺内異所性肝

考察：ヒトの胸腔内異所性肝の報告では、胚の発生時における先天的な異常、過去の外傷や横隔膜ヘルニアから続発する後天的な異常、心臓移植手術時に腹腔内の肝臓の一部が血行性に胸腔に播種する場合などが発生機序として考えられている。本症例は手術歴や既往歴がなく、肉眼的に横隔膜ヘルニアが認められなかったことから、先天的な異常により生じた可能性が考えられた。胸腔内異所性肝への血液供給について、腹腔内の肝臓や横隔膜とは肉眼的な連続性はなく、周囲組織または血管から血液供給を受けていた可能性が考えられたが、肉眼的および組織学的に腫瘍と肺を連絡する血管を確認できず、血液供給の詳細は不明であった。また、胸腔内異所性肝の胆汁排泄について、腫瘍と連続する胆管を検出することはできず、組織学的にも胆汁産生はみられなかったことから、胆汁排泄は行われていなかった可能性が高い。胸腔内異所性肝はヒトや動物において報告が少なく、極めてまれな症例と考えられた。

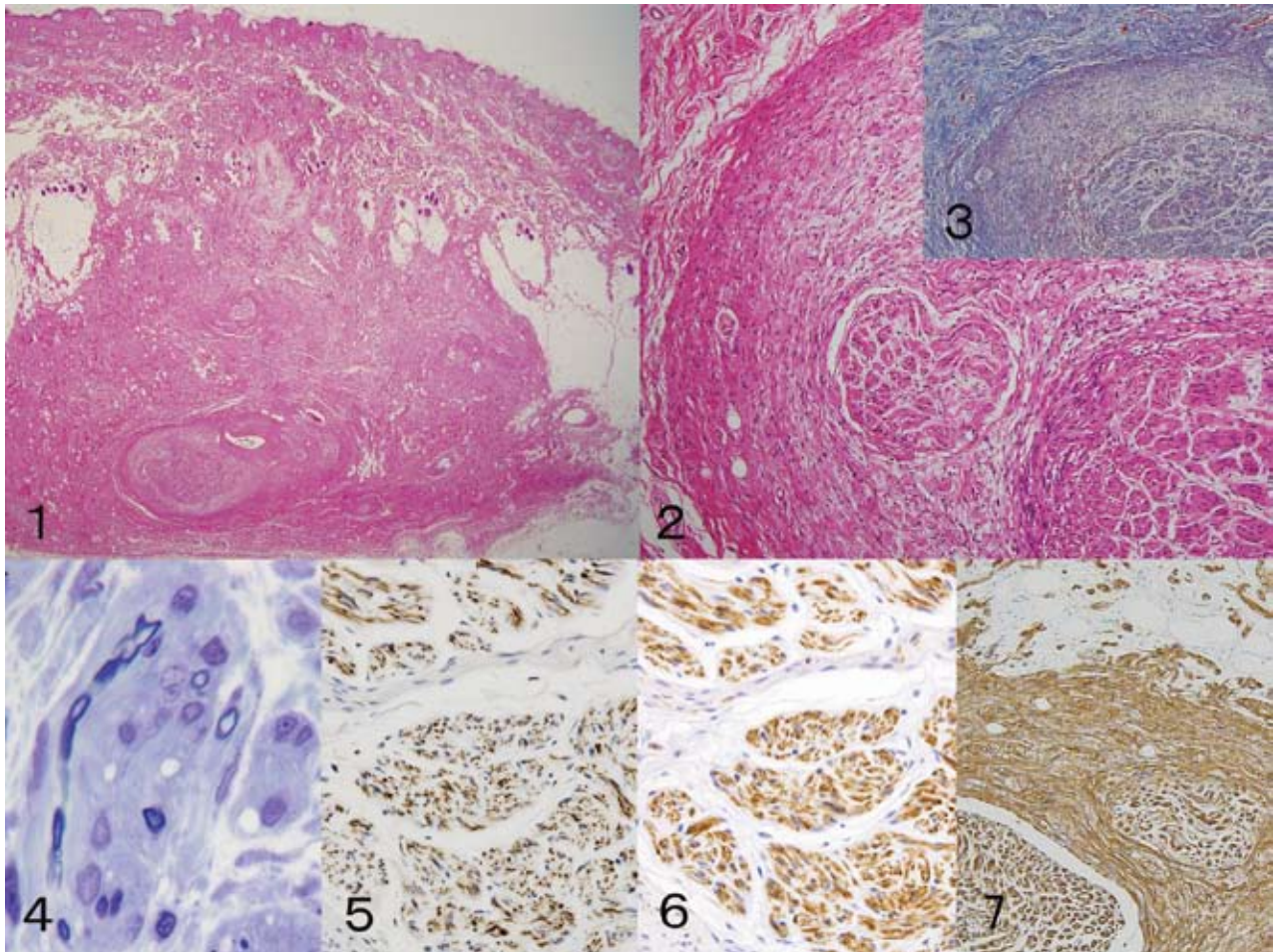
(一三達郎・三好宣彰)

参考文献：

1. Tancredi, A., Cuttitta, A., de Martino, DG. and Scaramuzzi, R. 2010. Ectopic hepatic tissue misdiagnosed as a tumor of lung. *Updates. Surg.* **62**: 121-123.
2. Hifumi, T., Kawaguchi, H., Yamada, M. and Miyoshi, N. 2014. Intrathoracic ectopic liver in a cow. *J. Vet. Med. Sci.* **76**: 711-713.

イヌの大腿部腫瘍

第 54 回獣医病理学研修会 No. 1115 摂南大学



動物：イヌ、パピヨン、雄、11歳8ヶ月齢。

臨床事項：以前より自噛していた左大腿部に、直径12×16mm大で痂皮を伴う腫瘍が1個形成された。カラーを装着し、抗生剤及びステロイド剤の外用薬で治療したが、良化しなかった。約2年で腫瘍が増数したため、触知可能な範囲の全腫瘍を摘出し、病理検査に供した。

組織所見：触知可能な腫瘍が真皮から皮下組織に形成され、大型の腫瘍周囲の皮下組織に小さな腫瘍が複数認められた。各腫瘍では様々に腫大した末梢神経束が観察された(図1、2)。腫大神経束周囲ではしばしば神経周膜が肥厚し、膠原線維も増生していた(図3；マッソントリクローム染色)。腫大神経束は神経線維と腫大したシュワン細胞の増殖で構成されており、準超薄切片のトルイジンブルー染色により、肥大したシュワン細胞内に埋もれるように、散在性に有髄神経を認めた(図4)。免疫染色では、腫大神経束内はneurofilament陽性(図5)とGFAP陽性(図6)の成分が同程度に認められた。肥厚した神経周膜はtype IV collagenとnerve growth factor receptor陽性(図7)を示した。神経周膜内にはGFAPとPGP 9.5陽性の小神経束も含まれ、一部の大き

な腫瘍ではこれらが共に周囲の線維化領域に伸長していた。腫瘍を構成するいずれの成分もki-67に陰性を示した。

診断：神経束の腫大及び神経周膜の過形成を伴う多発性外傷性神経腫(Multiple traumatic neuroma with swollen nerve fascicles and perineurial hyperplasia)

考察：当初腫大した神経束をルクソールファーストブルー染色にて無髄神経と判断したが、準超薄切片のトルイジンブルー染色にて髄鞘をしばしば認め、有髄神経と肥大したシュワン細胞と考えられた。神経束内の変化は外傷性神経腫に類似しており、神経束周囲の変化は外傷性神経腫の一亜型であるMorton's神経腫に類似していた。臨床所見及び組織所見より、慢性的な自噛を原因とする特異な組織像を示す外傷性神経腫と考えられた。

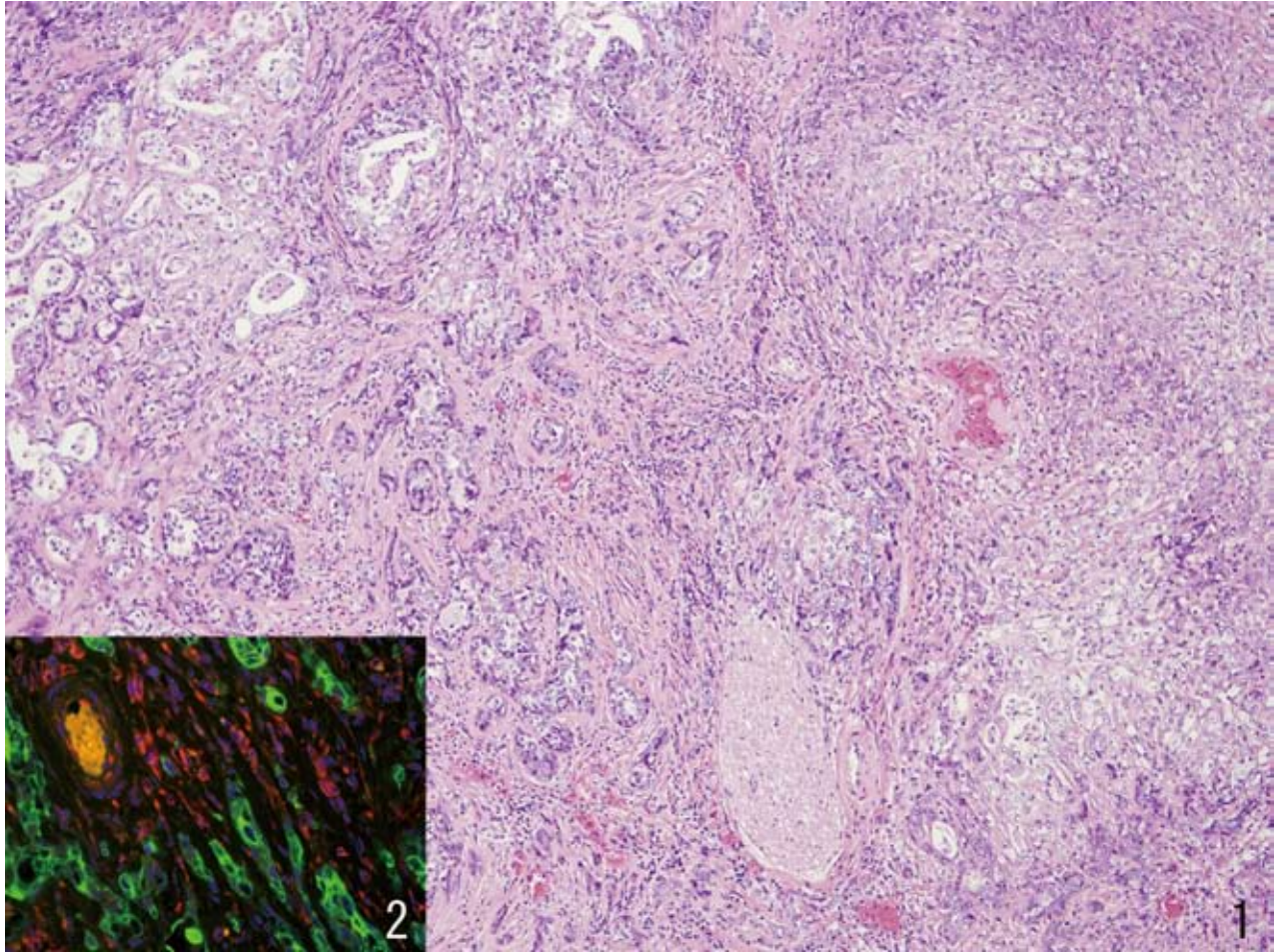
(阿野直子)

参考文献：

1. Gross, T. L, Carr, S. H. 1990. Amputation neuroma of docked tails in dogs. *Vet Pathol* **27** : 61-62.
2. Weiss, S.W. GJ 2013. Benign tumors of peripheral nerves. pp. 784-854. *In* : Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors, 6th ed. St. Louis. Mosby.

ラットの胸腔内腫瘍

第 54 回獣医病理学研修会 No. 1097 株式会社 LSI メディエンス



動物：ラット、F344/DuCrIcrlj、雌、96 週齢。

臨床事項：本症例はがん原性試験の背景データ集積試験に供された動物である。94 週齢から呼吸不整が見られ、96 週齢時に死亡した。

剖検所見：前縦隔から左胸腔内に 30 × 30 × 25 mm 大の充実性、硬固な灰白色腫瘍が認められた。腫瘍の表面は滑沢で、肺、胸壁、心嚢、横隔膜と癒着していた。断面には多数の結節と壊死巣が混在していた。胸腺は腫瘍に巻き込まれ、確認できなかった。

組織所見：腫瘍は腫瘍性の上皮細胞が多様な形態像を示していた (図 1)。角化を伴う扁平上皮様、腺管状ないし嚢胞状、明らかな管腔を形成しないリボン状ないし小柱状、異型性の強い多核ないし巨核細胞様。それらの腫瘍細胞増殖巣が様々な程度で混在し、間質は豊富な結合組織で区画されていた。これら腫瘍細胞は anti-cytokeratin wide (緑色) に陽性を示したが、anti-vimentin (赤色) は陰性で、二重蛍光抗体染色では両者は merge しなかった (図 2)。

診断：胸腺癌 Thymic carcinoma (悪性胸腺腫 Malignant thymoma)

考察：類症鑑別には肺癌と中皮腫が挙げられた。肺腫瘍との鑑別点は、1. 肺腫瘍は齧歯類の縦隔への浸潤転移は稀である事。2. 肺腫瘍は胸腺癌のように形態が多様ではない事。3. 肺腫瘍は間質結合組織に乏しい事。中皮腫との鑑別点は、1. 中皮腫 (胸腔内) は漿膜表面に拡がり、肺内浸潤は稀である事。2. 中皮腫の腫瘍細胞は Cytokeratin と Vimentin に double positive である事が挙げられる。また本症例は anti-mesothelin に陽性であったが、ヒトでは mesothelin は thymic carcinoma にも陽性を示すため、必ずしも確定診断には用いられない。このように、胸腺癌の診断は主に形態的に行われ、免疫組織学的検索はその補助である。ラットでは胸腺上皮細胞腫瘍の single immunomarker は存在せず、ヒトでは胸腺癌の診断は消去法により行われる。胸腺癌は極めて報告が少なく、またその形態像も variation に富み、診断が極めて困難な腫瘍の一つである。 (黒滝哲郎)

参考文献：

1. Khoury T, et al. 2011. *Int. J. Exp. Pathol.* **92**(2) : 87-96.
2. Pan CC, et al. 2003. *Hum. Pathol.* **34**(11) : 1155-1162.
3. Howroyd P, et al. 2009. *Toxicol. Pathol.* **37**(3) : 351-358.

国内におけるフェレットコロナウイルスの検出

平 修

はじめに

1993年、米国東海岸において複数のフェレットブリーダーまたはオーナーより、明緑色下痢を主徴とするフェレットの疾患が報告された(1)。当初、その特徴的な臨床症状よりグリーンスライム病と呼称されていたが、ミンクにおける同様の症例報告より、伝染性カタル性腸炎(epizootic catarrhal enteritis; ECE)と再定義された(2)。ECE自体による致死率は低いものの(5%)、多頭飼育下では高い罹患率(90-100%)を示し、高齢のフェレットにおいては重篤な症状(削瘦、元気消失、嘔吐、食欲不振など)を示した(1,3)。ECEの原因としては形態・免疫組織学的解析により、コロナウイルス様粒子が確認されていたが、後の研究においてグループ1のコロナウイルス(豚伝染性胃腸炎ウイルス、豚伝染性下痢ウイルス、犬コロナウイルス、猫コロナウイルス)に分類される遺伝子配列が確認された(1,4)。本ウイルスはフェレット腸コロナウイルス(ferret enteric coronavirus; FECV)と命名され、同時期に米国、ブラジルにおいて報告された(5,6)。

近年、猫伝染性腹膜炎(FIP)に類似した化膿性肉芽腫性炎を呈したフェレットから本ウイルスの検出が報告されており、Martínezらは腎臓、脾臓、肝臓、リンパ節等の病変部位を用いた免疫染色により、抗FIPV抗体と反応する抗原の存在を確認して

いる(7-11)。遺伝子配列解析より、本ウイルスはFECVに近縁であることが明らかにされたが、特徴的な変異箇所がウイルスタンパク質のS領域に存在したため、その臨床症状の特徴と併せて、フェレット全身性コロナウイルス(ferret systemic coronavirus; FRSCV)と命名され、FECVはFRECVと改められた(5,7)。FRECVとFRSCVの病態との関連性は明らかにされておらず、体内分布における知見も少ない。そこで、著者らは日本国内におけるフェレットコロナウイルス(ferret coronavirus; FRCV)の分布状況を解析する目的で、患畜として来院したフェレットを無作為に抽出し、その糞便からのウイルス分離を試みた。

材料及び方法

供試サンプル

2008年から2010年の間に東京及び神奈川の動物病院に患畜(一部健康診断目的含む)として来院した62頭のフェレット(2ヶ月齢から8歳〔年齢中間値:5歳、雄36頭、雌26頭〕;下痢、食欲不振等の主訴の他、健常個体も含む)より糞便を採取した。

RT-PCR

常法に従って10%糞便乳剤よりRNAを抽出した

表1 フェレットコロナウイルス検出プライマー

Primer	Sequence
FRCV 共通プライマー	5'-ACAGGTGGTTCTTTACTACC-3'
	5'-TGTAGG CACAGTTTTAGCAC-3'
FRSCV 検出プライマー	5'-CTGGTGTTTGTGCAACATCTAC-3'
	5'-TCTATTTGCACAAAATCAGACA-3'
FRECV 検出プライマー	5'-GGCATTTGTTTTGATAACGTTG-3'
	5'-CTATTAATTCGCACGAAATCTGC-3'

後に、表1 (4, 5) に示したプライマーを用いて RT-PCR を行った。FRCV の N 蛋白遺伝子領域を増幅する共通プライマーを用いて検出された陽性個体のみを、S 遺伝子領域の変異部を検出する型別プライマーを用いて RT-PCR を実施した。

ウイルス分離

RT-PCR によって陽性が確認された検体を下記方法でウイルス分離に供した。CRFK 細胞、fcwf-4 細胞、MPK 細胞および HRT-18 細胞を単層培養させた後に、 10^{-1} から 10^{-3} まで希釈した検体を接種した。維持培養液には最終濃度 $0.5 \mu\text{g/mL}$ となるように調整した結晶トリプシンを添加した。細胞変性効果 (CPE) の有無にかかわらず、一週間隔で計 3 代継代培養を行った。なお、継代時の培養上清を用いて RT-PCR も実施した。

結果

RT-PCR

FRCV 遺伝子は 62 検体中 7 検体で確認された (11.3%)。陽性検体を型別したところ、7 検体中 5 検体で FRSCV が検出され、残る 2 検体が FRECV であった。何れの検体からも共感染は認められなかった。表 2 に RT-PCR の結果及び、当該フェレットの特徴的な臨床症状その他を記す。

ウイルス分離

何れの細胞にも特徴的な CPE は認められず、培養上清中からも遺伝子は検出されなかった。

考察

ECE 症例の多くは無症状または軽度の下痢を主徴とするが、副腎疾患やヘリコバクター胃炎を併発している老齢のフェレットにおいては、重篤に転帰することが知られている (1)。本ウイルスは、多くのコロナウイルス感染症同様に下痢を主徴とするものと考えられてきたが、近年国内でも報告されているように、ネコの FIP に類似した全身性肉芽腫性炎を呈した個体の病変部からもウイルス抗原の検出が認められている (10)。遺伝子配列解析の結果、本ウイルスは腸から分離される FRECV と、肉芽腫性病変部から分離された FRSCV の二つの遺伝子型に分かれることが報告されているが、猫コロナウイルス同様に、ウイルス変異のメカニズムに関しては知られていない。

今回、著者らが調査に用いたフェレットの糞便からは 62 検体中 7 検体から FRCV の遺伝子が検出され、Terada ら (12) の報告よりも低い検出率となったが、検体採取期間、地域などが影響していると考えられる。

上述したように、FRSCV は全身性肉芽腫性炎との関連性が示唆されているが、今回の結果からは、臨床症状と各遺伝子型ウイルスの関連性は明らかに出来なかった (表 2)。また、FRECV は腸に局限するコロナウイルスと考えられているが、FIP に類似した角膜潰瘍を呈したフェレットからも分離されていることより (13)、ECE 型のウイルス (FRECV) が FIP 様のウイルス (FRSCV) に突然変異を起こすという仮説は再考の余地がありそうである。今回、

表 2 RT-PCR による型別と臨床症状

検体番号	年齢	性別	型別	臨床症状
16	2 ヶ月	雌	FRECV	健常
17	3 歳	雌	FRECV	軽度下痢
20	8 歳	雌	FRSCV	重度消瘦、慢性下痢
31	5 歳	雄	FRSCV	下痢、嘔吐、試験開腹により化膿性肉芽腫性炎と診断
33	6 歳	雌	FRSCV	脱毛、軽度下痢
39	6 歳	雌	FRSCV	元気消失、虚脱、水様便
43	4 歳	雄	FRSCV	下痢

著者らは種々の細胞を用いてウイルス分離を試みた
が、特徴的な CPE を得ることが出来ず、遺伝子の
増幅も検出する事は出来なかった。猫コロナウイル
スは血清型・遺伝子型の違いにより、タイプ I、タ
イプ II の二つの型に大別されるが、野外発生例の
多いタイプ I のウイルス分離が困難なことが知られ
ており、FRCV に関しても同様のことが起こる可能
性が考えられた。

FRCV の遺伝子型、病態型、生物型との関連性は
未解明の箇所が多いが、FIP の病態モデルとなる可
能性も高いため、今後の研究が期待される。

(研究員)

参考文献

- Williams BH, Kiupel M, West KH, Raymond JT, Grant CK, Glickman LT. Coronavirus-associated epizootic catarrhal enteritis in ferrets. *J Am Vet Med Assoc.* 2000 Aug 15 ; 217(4) : 526-30.
- Gorham JR, Evermann JF, Ward A, Pearson R, Shen D, Hartsough GR, et al. Detection of coronavirus-like particles from mink with epizootic catarrhal gastroenteritis. *Can J Vet Res.* 1990 Jun ; 54(3) : 383-4.
- Murray J, Kiupel M, Maes RK. Ferret coronavirus-associated diseases. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2010 Sep ; 13(3) : 543-60.
- Wise AG, Kiupel M, Maes RK. Molecular characterization of a novel coronavirus associated with epizootic catarrhal enteritis (ECE) in ferrets. *Virology.* 2006 May 25 ; 349(1) : 164-74.
- Wise AG, Kiupel M, Garner MM, Clark AK, Maes RK. Comparative sequence analysis of the distal one-third of the genomes of a systemic and an enteric ferret coronavirus. *Virus Res.* 2010 Apr ; 149(1) : 42-50.
- Gregori F, Catroxo MHB, Lopes V da S, Ruiz VL de A, Brando PE. Occurrence of ferret enteric coronavirus in Brazil (Preliminary Report). *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2010 Aug 17 ; 47(2) : 156-8.
- Garner MM, Ramsell K, Morera N, Juan-Sallés C, Jiménez J, Ardiaca M, et al. Clinicopathologic features of a systemic coronavirus-associated disease resembling feline infectious peritonitis in the domestic ferret (*Mustela putorius*). *Vet Pathol.* 2008 Mar ; 45(2) : 236-46.
- Martínez J, Ramis AJ, Reinacher M, Perpiñán D. Detection of feline infectious peritonitis virus-like antigen in ferrets. *Vet Rec.* 2006 Apr 15 ; 158(15) : 523.
- Martínez J, Reinacher M, Perpiñán D, Ramis A. Identification of group 1 coronavirus antigen in multisystemic granulomatous lesions in ferrets (*Mustela putorius furo*). *J Comp Pathol.* 2008 Jan ; 138(1) : 54-8.
- Michimae Y, Mikami S-I, Okimoto K, Toyosawa K, Matsumoto I, Kouchi M, et al. The First Case of Feline Infectious Peritonitis-like Pyogranuloma in a Ferret Infected by Coronavirus in Japan. *J Toxicol Pathol.* 2010 Jun 14 ; 23 : 99-101.
- Perpiñán D, López C. Clinical aspects of systemic granulomatous inflammatory syndrome in ferrets (*Mustela putorius furo*). *Vet Rec.* 2008 Feb 9 ; 162(6) : 180-4.
- Terada Y, Minami S, Noguchi K, Mahmoud HYAH, Shimoda H, Mochizuki M, et al. Genetic characterization of coronaviruses from domestic ferrets, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2014 Feb ; 20(2) : 284-7.
- Lindemann DM, Eshar D, Schumacher LL, Almes KM, Rankin AJ. Pyogranulomatous panophthalmitis with systemic coronavirus disease in a domestic ferret (*Mustela putorius furo*). *Vet Ophthalmol.* 2015 Apr 28.

植物で動物用医薬品を開発する —適切な製造設備の整備—

竹山夏実

植物の応用性

植物の遺伝子組換え技術は約 30 年前に遡り、1986 年にはじめて Ti プラスミドを用いてタバコの葉およびヒマワリにそれぞれヒト成長ホルモンとノーパリン合成酵素を発現させた例がある。これに続き、マウスモノクローナル抗体 H および L 鎖の遺伝子を同一の植物（タバコ）内で発現させ、機能をもつタンパク質の合成に成功し、植物遺伝子組換え技術は飛躍的に進歩してきた。現在では一部ではあるが大腸菌、哺乳細胞でのタンパク質発現系に代わり、植物をバイオリクターとして医薬品や研究試薬を合成させている。シグマアルドリッチ社より販売されている TrypZean[®]（ウシトリプシン）は、トウモロコシを用いて作出されており、2002 年より販売されている。

植物を利用したタンパク質発現の利点として、1) 大量のタンパク質の合成が可能であること、2) 常温で比較的安定して保存が可能であること、3) 動物由来の病原体による汚染がないこと、4) 食品あるいは実験目的で利用されている植物は全ゲノム配列が明らかにされており、遺伝子改変後の追跡が行いやすいことが挙げられる。植物遺伝子組換え技術を端的に説明すると、まず大きく安定的発現（ゲノムに遺伝子を導入する方法）および一過性発現（植物ウイルスベクターやプラスミド由来の遺伝子から目的タンパク質を発現する方法）に分けられる。安定的発現では核あるいは葉緑体のゲノムに目的遺伝子を導入し、この形質はいずれの場合も植物の世代を越えて受け継がれてゆく。組換え植物作出には時間を要するが、一旦系統が確立されると、通常の植物栽培と同等の方法で組換え体を得る事ができるため、毎回の遺伝子操作を必要としない。また、核ゲノムへの遺伝子導入は、葉緑体ゲノムを利用したり一過性発現をさせる手法と異なり、葉に加えて種子や果実、地下茎（ジャガイモなど）をタンパク質発

現の部位として選択することが可能である。一方で、一過性発現ではベクター構築から組換え植物作出までを短期間で進めることができ、そのぶん研究開発も早いペースで進められている。Magniflection（マグニフェクション）あるいは Agroinfiltration（アグロインフィルトレーション）と呼ばれる技術では、加圧により成長後の植物体にベクターを文字通り浸透させ、わずか 3 週間程度で大量のタンパク質を得る事ができる。

文献を検索すると、実験室レベルでは数多くの異種タンパク質が植物での発現に成功しており技術躍進を再認識させられるが、実際に商品化された植物由来医薬品は少ない。動物用医薬品に限定すると、国内ではホクサン株式会社、国立研究開発法人産業総合研究所の共同研究のもと、平成 25 年に動物用医薬品製造販売承認を動物用医薬品として得た、イチゴ（果肉）で作出されたイヌ歯肉炎に対するイヌインターフェロンアルファがある。また、アメリカでは Dow AgroScience LCC（Indianapolis, IN）が、タバコ浮遊細胞を利用して鶏ニューカッスルウイルスのヘマグルチニン/ノイラミニダーゼを発現させ、2006 年に USDA からの製造販売許可を取得している。ヒト用ワクチンに至っては、第 II 相試験まで進めているものがいくつか報告されているが、製造販売承認を得た製品はまだ存在しない。以下に法的規制と設備面からの課題を紹介する。この状況には、当然技術や有効性の向上も課題であるが法的規制および設備面からもいくつかのクリアすべき条件があると考えられる。

法的規制

組換え植物を栽培するためにはいくつかの規制がかかってくる。第一に 2004 年から施工された「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（カルタヘナ法）である。

2015年5月の時点で、194カ国がこの法を遵守するカルタヘナ議定書に締結しており、日本も含まれている（外務省HPより）。この条約の目的にある「生物多様性の保全」に関して、遺伝子組換え植物の栽培は大きく影響を与えるため、導入遺伝子が野生種との交配により環境中に拡散することを防がなくてはならない。遺伝子組換え植物を栽培する区域を申請するには、一種使用（主に屋外：拡散防止措置がない状態での栽培）および二種使用（施設内：拡散防止措置を行って栽培する場合）がある。食用の遺伝子組換え植物、特に栽培成績向上に影響するような病害虫耐性、除草剤耐性などの特質を付与させたものは主に一種使用となる。一方で、医薬品開発研究や製造に使用する遺伝子組換え植物は、現在日本ではその大半が二種使用で栽培されている。

野外栽培と比較すると建物内での栽培は当然コストが高くなるが、医薬品用植物栽培に建物内での栽培を選択する必然性はカルタヘナ法とは別の観点からも存在する。医薬品は製造ロット毎に品質が安定している必要があり、例えばワクチンであれば組換え植物に含まれる抗原量、不純物等が一定の範囲内に納まっていなければならない。野外のように気候、天災、害虫等の影響を多大に受ける環境では、品質の均一性を確保することが難しいと想像される。2005年に世界保健機構（WHO）が提出した報告書「WHO informal consultation on scientific basis for regulatory evaluation on candidate human vaccines」では、これまでは医薬品として生来の成分が有効性を持つハーブなどに適応していた Good Agricultural and Collection Practices（GACP）を、医薬品（ワ

クチン）を作出する植物の栽培工程にも適用する考えを示した。今ではこの考えは植物由来医薬品製造に定着しており、栽培工程から、GMP登録を済ませた設備を利用する必要がある。

閉鎖系温室の構造

2014年10月に日生研内に遺伝子組換え植物を栽培する目的として建築した閉鎖系温室について、遺伝子拡散防止措置を含めてその構造を紹介する。現在、我々の施設では組換えイネを使用して経口投与可能なワクチン開発を進めている。今回の紹介では組換えイネの詳細な説明は省略しているが、機会があればこちらも日生研たよりの誌面で取り上げていくつもりである。

閉鎖型の温室を建設する際にまず選択する点は人工光を利用するか、あるいは自然光を利用するかである。前者の利点は、均一な温度、日照条件を設定することが可能であり、季節に関係なく一定した日数で栽培を行うことができる。最近ではナトリウムランプやメタルハライドランプに代わり、薬物栽培に加え、イネのように高い照度が必要な植物に応用できるLEDの開発も進んでいる。一方、後者は運転コストに関しては人工光と比較すると低コストであり、冬季の温度を植物育成に十分な数値で維持することができれば、光源を太陽に頼ることで植物の栽培が十分に可能となる。日生研の閉鎖系温室は太陽光を利用したものであり、写真1に示すように4つの独立した栽培室を持つ。それぞれの栽培室には空調設備が個別に設けられており、使用しない栽培

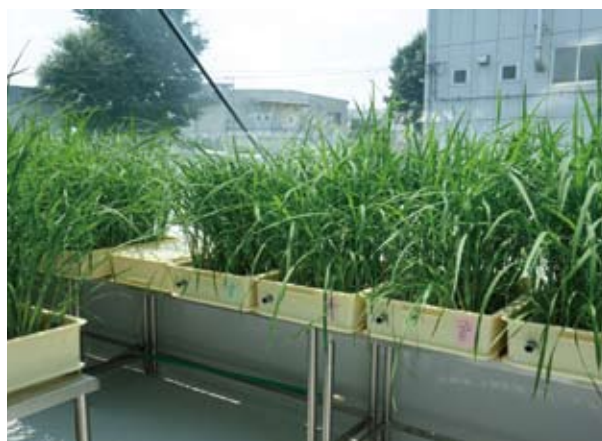


写真1

（左）日生研閉鎖系温室の全景。独立して温度制御が可能な栽培室が並列に4室並ぶ。
（右）栽培室内部から撮影。イネは有機用土を敷いたコンテナで栽培。移植1ヶ月後の様子。

室の空調は停止することが可能である。空調は自動タイマーにより2段階の温度切り替え設定があり、現在は午前7時から午後7時を昼設定(28℃)、反対の12時間を夜設定(25℃)として試験栽培を行っている。栽培室を構成するガラスは2枚合わせの構造により強度を上げており、つなぎ目は完全に密閉されているため、外気の直接的な侵入はない。各栽培室には80 cm程度の高さの架台を設置し、その上に適度な大きさのコンテナを置いて組換えイネを栽培している。イネの葉丈は100 cm程度に達するため、ヒトの目線より高い位置に出穂を確認することができる。日々、各栽培室の設定；実測温度、湿度、光合成有効光量子束密度を測定し記録をして栽培管理をしている(写真2)。

温室の構造から組換え植物が、野外へ漏れる可能性のある経路は、①空調、②排水、③ヒトおよび物品の動線の3点である。それぞれに必要な対策を講



写真2

栽培の様子。入室にはつなぎ、および使い捨て防具を着用して入室する。光量子計を用い、栽培室内に注ぐ光合成有効光量子束密度を測定中。

じている。まず、空調の排気経路にはプレフィルター(写真3中央)の次にHEPAフィルターを配置しており、花粉等の細かい物質も栽培室より外に漏出しない構造になっている。閉鎖系温室の排水は全て自動的に外部タンクにプールされ、適濃度となるように次亜塩素酸ナトリウムを添加して滅菌処理を施した後、翌日早朝にタンクより排水する仕組みをとっている。種子を取り外した後のイネは作業室に設置した高圧滅菌機(写真3右)で不活化処理をした後に温室より搬出している。日常の作業ではイネが外から持ち込む害虫や病原体で汚染されない為の配慮も兼ねて、更衣室でつなぎ、手袋、マスク、帽子を着用して入室する。特に出穂後は花粉の付着の可能性を考慮して使い捨てのつなぎを使用し、退出時には全てをオートクレーブするよう対応している。また空調システムにより、外気に対して閉鎖系温室内部は陰圧となっており(写真3左)、出入口の開閉時に植物体が外に出ない配慮を施した。

今後の取り組み

2014年10月に本閉鎖系温室で栽培をスタートさせ、2015年8月現在で3作目の組換えイネ栽培を実施しており、年間で3作の栽培スケジュールをこなせるよう運用している。土、栽培密度、収穫時期などいくつかの項目はまだ検討中ではあるが、早い段階でこれらの条件を固めてゆき、経口ワクチンとして用いる組換えイネの作出、開発を進めてゆきたい。

(研究員)



写真3

閉鎖系温室内設備の一部、(左)外気との差圧を測定するマンメーター。(中央)栽培室の空調排気口：プレフィルターの次にHEPAフィルターを介している。(右)前室に設置されたオートクレーブ。収穫後の植物体等の滅菌に使用する。

論文紹介

アメリカ大陸で分離された *Avibacterium paragallinarum* 血清型 B-1 における遺伝子型、病原性及び免疫原性について

高橋 真理

Genotyping, Pathogenicity, and Immunogenicity of *Avibacterium paragallinarum* Serovar B-1 Isolates from the Americas. *Avian Diseases* 58 : 293-296, 2014

要約

Avibacterium paragallinarum は鶏伝染性コリエーザの原因菌である。Kume 法による 9 種類の血清型のうち、血清型 B-1 はアメリカ大陸に分布している。この研究では、Kume 法による血清型 B-1 の株がエクアドル (7 株)、メキシコ (7 株) 及びパナマ (2 株) で分離され、遺伝子型別を行った。さらに、分離されたパナマの 1 株、エクアドルの 1 株及びメキシコの 2 株は、血清型 B-1 の参照株である 2671 株を元にしたワクチンの攻撃試験に使用した。ERIC-PCR 法 (腸内細菌の反復遺伝子間コンセンサス配列を基にした PCR 法) で遺伝子型を決定した結果、16 種類の分離株と 2 種類の参照株で、10 通りの ERIC パターンに分類された。異なる 3 カ国で分離された株の中に共通する ERIC パターンはなかった。ワクチン接種後の攻撃試験では、パナマで分離された 1 株は他の 3 つの野外分離株よりも低い病原性を示した。交差防御を調べたところ、2671 参照株で作製したワクチンを接種し、エクアドル分離株で攻撃した鶏群は 40% の防御率であり、ホモ株による防御率より顕著に低かった。他の 3 つの野外分離株はホモ株の攻撃と同様な防御を示した。

背景

伝染性コリエーザはパスツレラ科の *Avibacterium paragallinarum* による鶏の急性呼吸器疾患である。養鶏産業において、*Av. paragallinarum* 感染の影響は大きく、その経済的損失は育雛期間における増体

率の低下と、レイヤーの産卵率の低下 (10-40%) に起因する。

Av. paragallinarum の血清型別には 2 つの手法が使用されている。Page 法は、スライド凝集を元に、3 種類の血清型である A、B 及び C を判別することを目的として確立された。Kume 法は赤血球凝集抑制試験 (HI) を元に、3 種類の血清群である I、II 及び III で構成される 7 種類の血清型を判別する。後の研究によって、Kume 法に 2 種類の血清型が加わった。したがって、Kume 法による名称は、血清群 I、II 及び III から血清群 A、C、B にそれぞれ変更され、新しい Kume 法による血清型 A、B 及び C は、Page 法による血清型の A、B 及び C にそれぞれ相当する。Kume 法による 9 種類の *Av. paragallinarum* 参照株を用いた完全交差防御試験では、血清型 A、B 及び C は異なる 3 つの免疫原性を示すことが確認されている。

これまで Page 法における血清型 B は、アルゼンチン、ブラジル、中国、エクアドル、エジプト、インドネシア、メキシコ、ペルー、フィリピン、南アフリカ、スペイン、アメリカ合衆国及びジンバブエで確認された。さらに、Kume 法における血清型 B-1 はドイツと南アフリカで確認された。アメリカ大陸においては、Kume 法の血清型 B-1 はエクアドル、メキシコ、パナマ及びアメリカ合衆国で確認された。

この研究の目的は、エクアドル、メキシコ及びパナマで分離された血清型 B-1 の遺伝子型、病原性及び免疫原性の調査である。

材料と方法

細菌：

エクアドルの7株、メキシコの7株及びパナマの2株を野外株として分離した。また、血清型 B-1 の参照株として 0222 株及び 2671 株を使用した。

抗血清：

以前の研究において作製した9種類の参照株に対するウサギ抗血清と、エクアドルで分離された Lavetec 01 株に対する抗血清を用いた。

赤血球凝集素：

Brain-heart infusion 培地で1晩培養した菌を用いて、赤血球凝集抗原を調製した。赤血球凝集抗原は遠心分離で回収し、洗浄した後、4℃で保存した。

血清型別：

エクアドルの7株とパナマの2株は既に血清型が決定されているが、今回の実験で再度血清型を決定した。メキシコで分離された株も同様にして血清型を決定した。

ERIC-PCR：

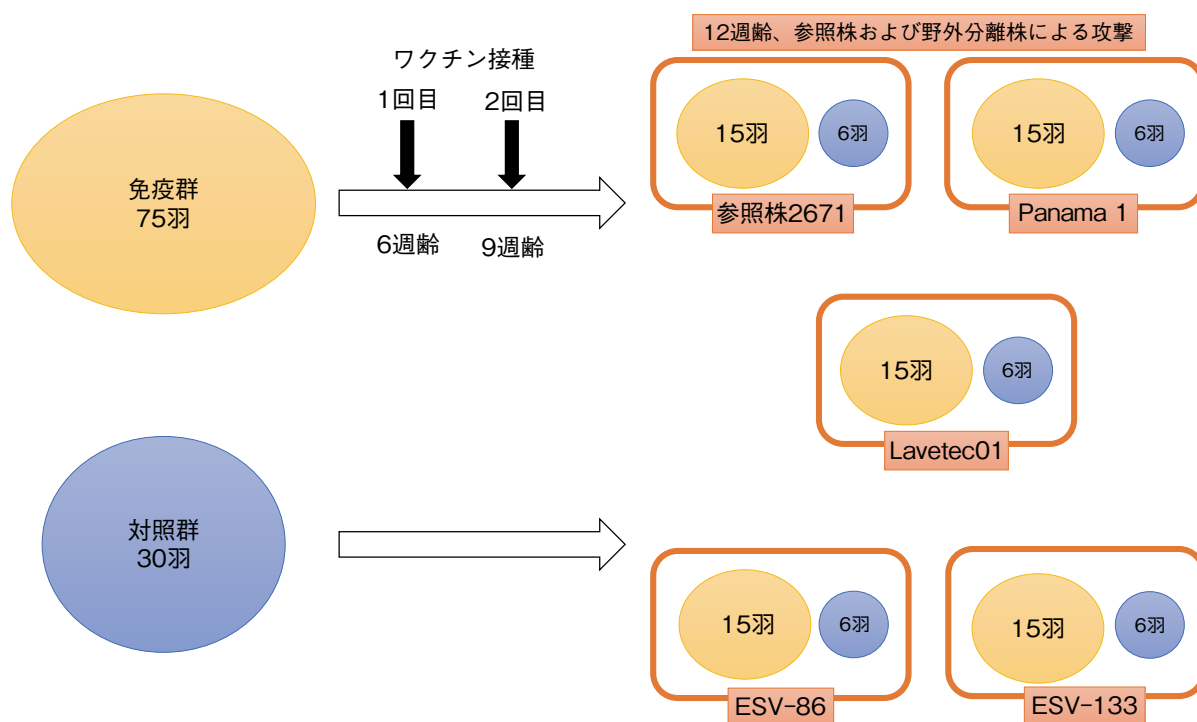
野外分離株の遺伝子型は ERIC-PCR 法で型別し

た。参照株である 0222 株と 2671 株、及び野外分離株の Panama1 株と Panama2 株は ERIC-PCR 法によって既に型別されているが、比較のために今回の調査に加えた。

ワクチネーション、攻撃試験：

5 週齢で *Mycoplasma gallisepticum* フリー、*Mycoplasma synoviae* フリーの臨床的に健康な SPF 鶏（レグホン種）105 羽を用い、すべて個体識別した。抗生物質非添加の飼料と水を不断給餌した。これまでの報告に従って、2671 参照株に対する不活化ワクチンを製造した。簡潔に説明すると、まず参照株を液体培地で1晩培養した。生菌数を測定し、0.01% チメロサルを添加して不活化した。生菌数測定の結果から 5×10^8 CFU/mL に調製し、最終濃度が 10% となるように水酸化アルミニウムゲルを加えた。6 及び 9 週齢時に、合計 75 羽の鶏にワクチンを 1mL 皮下接種した。2 回目のワクチン接種から 3 週間後、すべての鶏から採血し、ワクチン接種鶏及び対照鶏がそれぞれ 15 羽及び 6 羽含まれるように 5 群に再区分した。攻撃試験には *Av. paragallinarum* 参照株、または野外分離株を 0.2mL (5×10^8 CFU/mL) ずつ点鼻攻撃した（図 1）。攻撃後 2 日から 7 日まで、臨床症状を記録した。臨床症状スコアの判定基準は表 2-1 の通り設定した。感染防御は、伝染性コリー

図 1 試験方法 概略図



ザの臨床所見と *Av. paragallinarum* の再分離で判定した。

血清学的試験：

ワクチン接種した鶏の血清は、攻撃株（2671 参照株、Panama 1 株、Lavetec 01 株、ESV-86 株及び ESV-133 株）の赤血球凝集素を用いた HI 試験に用いた。力価は、赤血球凝集活性を完全に阻害する血清サンプルの最高希釈倍数の逆数として表した。

結果

Av. paragallinarum のすべての参照株と分離株は血清型 B-1 に属することが確認された（表 1）。

本研究で用いた攻撃株は、鶏に対する病原性があり、伝染性コリーザの典型的な臨床症状を示した。ワクチン未接種鶏において、2671 参照株、Lavetec 01 株、ESV-86 株及び ESV-133 株の感染による臨床症状スコアは、それぞれ 1.1、1.6、1.2 及び 1.8 で

あり、有意差は認められなかった（表 2-2）。しかし、Panama 1 株の感染による臨床症状のスコアは有意に低い値（0.6、 $p<0.05$ ）を示した。5 種類の株間において、発症率と菌分離率には有意差は認められなかった（表 2-2）。

2671 参照株で攻撃したすべてのワクチン接種鶏は感染を防御した。Panama 1 株、ESV-86 株、及び ESV-133 株で攻撃した鶏における防御率は、それぞれ 87%、94% 及び 81% であった。しかし、Lavetec 01 株で攻撃した鶏における防御率は 40% であり、ホモ株で攻撃した群と比較して有意に低い値（ $p<0.05$ ）を示した。対照群の防御率は 0% であった（表 3）。

HI 抗体価は攻撃株由来の赤血球凝集素を使用して測定した。ホモ株を攻撃株として用いた群の HI 価が最も高かったが（表 3）、ESV-86 株及び ESV-133 株に対する HI 価との間に有意な差は認められなかった（ $p>0.05$ ）。Panama 1 株及び Lavetec 01 株に対する HI 価は、2671 参照株、ESV-86 株及び

表 1 本研究で用いた *Avibacterium paragallinarum* 株の由来

株	分離年	分離国	ERIC-PCR 遺伝子型
0222	1977	アメリカ	I
2671	1980	ドイツ	II
Panama 1	2007	パナマ	III
Panama 2	2007	パナマ	III
Lavetec 01	2001	エクアドル	IV
Lavetec 13	2001	エクアドル	V
Lavetec 17	2001	エクアドル	IV
Lavetec 33	2001	エクアドル	IV
Lavetec 21	2004	エクアドル	IV
Lavetec 30	2004	エクアドル	IV
Lavetec 32	2004	エクアドル	IV
ESV-85	2008	メキシコ	VI
ESV-86	2008	メキシコ	VII
ESV-87	2008	メキシコ	VIII
ESV-131	2008	メキシコ	IX
ESV-132	2008	メキシコ	IX
ESV-133	2008	メキシコ	IX
ESV-184	2008	メキシコ	X

表 2-1 臨床所見のスコアリングと判定基準

スコア	判定基準
0	臨床症状なし
1	鼻汁またはわずかな顔面腫脹
2	鼻汁と中等度の顔面腫脹
3	多量の鼻汁と重度な顔面腫脹
4	スコア 3 と肉垂の腫脹または結膜炎

ESV-133 株に対する HI 価よりも有意に低い値を示した ($p < 0.05$)。ワクチン未接種の対照鶏では HI 抗体は検出されなかった (表 3)。

考察

本研究で用いたすべての *Av. paragallinarum* の株は、血清型 B-1 (2761 参照株) に対する抗血清によって確認され、以前報告されたエクアドルとパナマでの分離株の型別結果を裏付けた。

これまでの報告によると、ERIC-PCR 法は *Av. paragallinarum* に対して有用な遺伝子型別方法である。エクアドル、メキシコ及びパナマ分離株に加え、それぞれアメリカ合衆国及びドイツで分離された 0222 及び 2671 参照株間において、共通する ERIC

パターンは認められなかった。メキシコで分離された血清型 B-1 の 13 株を用いた以前の研究では、8 通りの ERIC パターンが得られた。同様に、本研究ではパナマやエクアドル分離株と比較して、メキシコ分離株で多様性が認められた。

本研究では、使用したすべての株は鶏に対して病原性が認められた。重要な知見として、Panama 1 を接種した鶏の臨床症状は、他の 3 種類の野外分離株及び 2671 参照株を接種した鶏と比べて、顕著に軽度であった (表 2-2)。0222 参照株 (アメリカ合衆国)、Spross 株 (グアテマラ)、南アフリカで分離された 2 種類の野外分離株を用いた研究では、すべての株は血清群 B に属するが、臨床症状の有無、肉眼的病変及び攻撃菌の再分離において相違が報告された。さらに、*Av. paragallinarum* の血清群 B / 血清型 B-1 に属する分離株における病原性の違いに関する解析が進行中である。

交差防御試験において、2671 参照株のワクチンを接種し、エクアドルの分離株である Lavetec 01 株で攻撃した鶏群のみ、低い防御率を示した。血清群 B に属する株間における交差防御の違いは既に報告されている。実際に、エクアドル分離株は交差防御が弱いという問題によって、市販ワクチンに含まれるようになった。

表 2-2 ワクチン未接種対照群の臨床所見の平均スコアと発症率、及び菌分離率の結果

攻撃後	参照株 2671	野外分離株			
		Panama 1	Lavetec 01	ESV-86	ESV-133
2 日	0.5	0.3	0.4	0.4	0.8
3 日	0.5	0.5	0.6	0.9	2.2
4 日	0.7	0.7	1.8	1.3	1.8
5 日	1.5	0.8	2.2	1.6	2.3
6 日	1.8	0.8	2.6	1.7	2.0
7 日	1.8	0.8	2.4	1.7	1.8
平均スコア ^{**}	1.1 ± 0.3 ^a	0.6 ± 0.8 ^b	1.6 ± 0.7 ^a	1.2 ± 0.8 ^a	1.8 ± 1.1 ^a
発症率 (%)	100	83	100	83	100
菌分離率 (%)	100	83	100	100	100

^{**} Panama 1 の平均スコアは他の株に比べ顕著に低く、a と b の間に有意差が認められた。 ($p < 0.05$)

表3 HI抗体価 (log₁₀) と防御率の結果

	参照株 2671	野外分離株				ワクチン未接種 対照群
		Panama 1	Lavetec 01	ESV-86	ESV-133	
HI抗体価 (log ₁₀)	1.50 ^a	1.25 ^b	1.30 ^b	1.48 ^a	1.50 ^a	0
防御率 (%)	100 ^a	87 ^a	40 ^b	94 ^a	81 ^a	0

aとbの間に有意差が認められた。(p<0.05)

血清学の観点から、2671参照株のワクチンを接種し、その後2671参照株とメキシコの分離株であるESV-86株及びESV-133株を用いたHI試験では、パナマ及びエクアドルの野外分離株を用いた場合と比較して有意に高いHI抗体価 (p<0.05) を示した。また、2671参照株のワクチンを接種し、2671参照株とメキシコの分離株であるESV-86株とESV-133株で攻撃した鶏は高い防御率とHI抗体価を示したが、エクアドルの分離株であるLavetec 01株で攻撃した鶏は低いHI抗体価と防御率(40%)を示した。さらに、パナマ分離株で攻撃した鶏は、高い防御率(87%)を示す一方、低いHI抗体価を示した(表3)。以上の結果から、他の研究グループが示唆しているのと同様に、HI抗体価と防御率に相関関係は認められなかった。

2671参照株のワクチンを接種し、エクアドルの分離株であるLavetec 01株で攻撃した鶏で見られた低い防御率(40%)は、抗原性の違いが存在している可能性がある。しかしながら、Lavetec 01株及び2671参照株に対する抗血清と、2671参照株とPanama 1株、ESV-86株及びESV-133株の赤血球凝集素を使用したHI交差試験で、顕著な抗原性の違いがないことが示唆された。2671参照株のワクチ

チンを接種し、エクアドルの分離株であるLavetec 01株で攻撃した鶏の防御率が40%であることは、分離株の高い病原性や、莖膜といった赤血球凝集素以外の抗原の役割によって説明できるかもしれない。

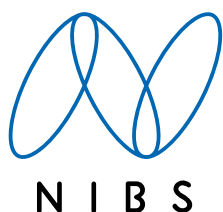
結論として、本研究の結果は、アメリカ大陸、特にメキシコで分離された、血清型B-1の株間において顕著な遺伝的多様性の存在を示している。既に*Av. paragallinarum*の血清型AもしくはCで示されているように、野外分離株内の病原性の違いも存在している。そして、1種類の野外分離株と参照株の間で交差防御が弱いことも示された。

所感

日本における伝染性コリィザはこれまでA及びC型株による発生があり、A及びC型株に対するワクチンの使用によってその発生はまれとなっている。しかし、コリィザB型株による伝染性コリィザが他国で発生しており、B型野外株の調査についての内容が興味深かった。

今後も国際的な動向を見る姿勢を維持していきたい。

(研究員)



—— 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594号) 平成27年8月25日印刷 平成27年9月1日発行(第61巻第5号)
発行所 一般財団法人 日本生物科学研究所
〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目2221番地の1
TEL: 0428(33)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)