

# 日生研おより

2016年(平成28年)9月号 第62巻 第5号(通巻600号)

## 挨拶・巻頭言

病理学と日生研……………山手丈至(2)

## 獣医病理学研修会

第55回 No. 1122 ラットの小腸腫瘍  
……………株式会社 LSI メディエンス(3)

第55回 No. 1126 シベリアオオカミの肺腫瘍  
……………東京農工大学(4)

## 文献紹介・後編

Maternal antibodies: clinical significance,  
mechanism of interference with immune  
responses, and possible vaccination  
strategies

(移行抗体: 臨床的意義、免疫反応との干渉の  
メカニズム、ワクチン接種戦略)

……………布谷鉄夫(5)

## 発表論文紹介

豚毒素原性大腸菌(ETEC)毒素に対する  
能動および受動免疫を誘導するコメ型  
経口ワクチン—ムコライズ-CTB—

……………竹山夏実(12)

お知らせ……………(16)



## 病理学と日生研

山手 丈至

日本生物科学研究所（以下日生研）の定款の第3条に、「当法人は、生物科学特に動物の生理及び病理についての研究調査を行うとともに、それらを応用した動物用医薬品等の開発、製造を行い、学術の振興及び畜産の発達並びに公衆衛生の進歩に寄与することを目的とする。」とある。私の専門は動物（獣医）病理学である。私なりに病理学についてあらためて考えてみた。

ウイルスや細菌などが原因で感染症が起こる。病因は単一でも、宿主の種、品種、年齢、性、免疫状態、栄養状態、環境状態や治療効果など多様な二次的な要因により、複雑な結果（症状や病態）が導かれる。それゆえに、一例一例の症例を研究調査し、原因と結果を結びつける複雑なプロセス「病理発生」を科学的に探究する必要がある。それが病の本質を理解する学問である「病理学」と捉えている。一方で大事なことは、病という異常を知るには正常（生理）を知る必要がある。正常と異常の理解、すなわち動物の「生理と病理」に基づいた基礎研究を進め、その成果に基づいて動物医薬品等の応用的な開発が初めて展開でき、それが畜産振興や公衆衛生を通じた社会貢献に繋がる。日生研の定款第3条には、この基本姿勢が実にコンパクトに分かりやすく謳われている。

では、病理学を通じた病の本質はどのように探究されるべきだろうか？ 病理学の基本的なアプローチは肉眼解剖（剖検）と顕微鏡観察による診断病理学と考える。臨床現場あるいはフィールドでみられる病畜の病態を的確に知る上で必須である。一方、それを科学的に実証する必要がある。それが、実験病理学と捉えている。その逆もしかりで、実験的に観察された病態を理解することで、正確な診断が可能となり、病の予防や治療に役立てることができる。「診断病理学と実験病理学」は別ものではなく表裏一体となって相互に協調することで、病理学は深化し、かつ進化している。

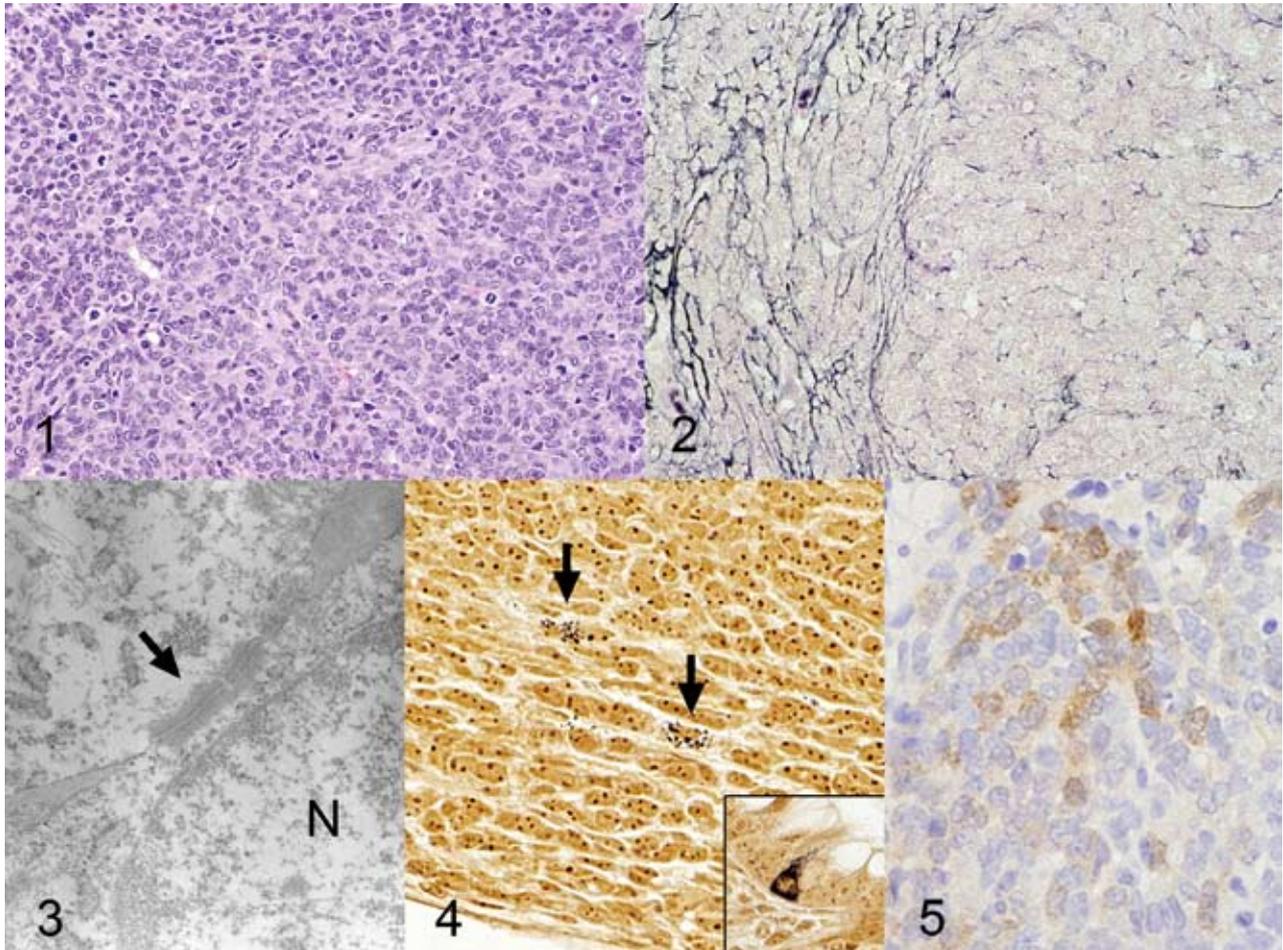
さて、いまでこそ病の本質は多様な手法により解明されつつある。しかし、紀元前から中世においては、病は妖魔や呪術が元凶と信じられていた。紀元前、ヒポクラテスは「体液病理学説」を提唱した。病を初めて科学的に説明したとして、彼は医学の父と称されている。体液、特に血液の異常は病の一つの原因である。時代は下り、1858年、ウイレルヒョウは「細胞病理学説」を提唱した。病は細胞から生じる。現代の形態病理学の礎となる考えである。多彩な細胞が相互に機能することで調和を保ち、その乱れが病に繋がる。この現象はよくよく考えると不可思議である。人は考える葦である。私たちはものごとを考える力があり、議論し、行動することで能動的に社会を作り上げている。しかし、細胞同士は、無意識に機能し合い調和を保ち、一方、無意識の状態で乱れが生じ病となる。すなわち、体は意識と無意識により機能している。病理学は、無意識に生じる細胞の異常を解明する学問でもある。ウイレルヒョウは、細胞病理学説とともに、「**Between animal and human medicine there is no dividing line - nor should there be**」との概念を提示している。ヒトや動物の病を区別して考えることはできない。すなわち人獣共通感染症や、多彩な動物間の病を「比較病理学的」に解析することの重要性がこの言葉には込められている。

「釈迦に説法」であったかもしれない。私は若い時期に日生研の故「田島正典先生」から病理学の基本を教えていただいた。実験手技や論文作成法など、今になって考えると一つひとつ丁寧な指導をしていただいた。間違いなくかなり出来が悪かったと思う。本当に感謝に堪えない。第3条は、日生研の創設当初から脈々と受け継がれる生命科学に対する基本姿勢が示されていると思う。半世紀以上の歴史を有する日生研の諸先達に心より敬意を表したい。

（評議員）

## ラットの小腸腫瘍

第 55 回獣医病理学研修会標本 No. 1122 株式会社 LSI メディエンス



動物：ラット、F344/DuCrIcrlj、雌、115 週齢。

臨床事項：本例はがん原性試験のための背景データ集積試験に供されたラットで、計画解剖されるまで特筆すべき臨床症状は認められなかった。

肉眼所見：空腸壁に直径 2 cm 大の腫瘍が認められた。断面は乳白色～淡桃色で、腫瘍中央部は壊死に陥っていた。その他の臓器に肉眼的病変は認められなかった。

組織所見：腫瘍は空腸壁内に認められ、内腔側は広範囲にわたり壊死に陥っていた。腫瘍内では、短紡錘形～類円形の細胞が密に増殖していた。増殖パターンは索状あるいは小胞巣状で、細胞境界不明瞭な上皮様の細胞がシート状に配列する部分も認められた (図 1)。多くの有糸分裂像が観察された。鍍銀染色では、好銀線維がこれらの増殖細胞を数個～数十個単位で取り囲む胞巣状あるいは索状の配列が明瞭に認められた (図 2)。透過型電子顕微鏡検査では、細胞間接着装置であるデスモソームが観察された (図 3 矢印、N: 核)。神経内分泌顆粒を染色する Sevier-Munger 法では、少数ながら陽性顆粒を

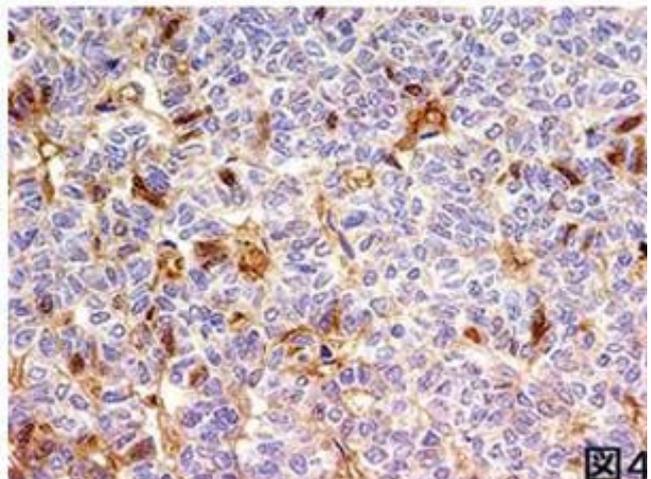
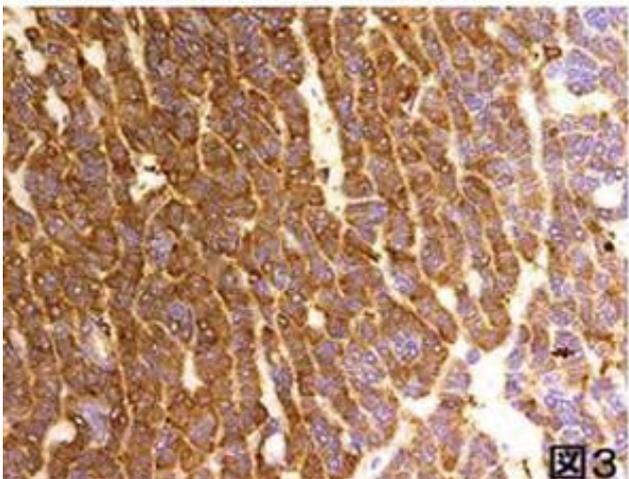
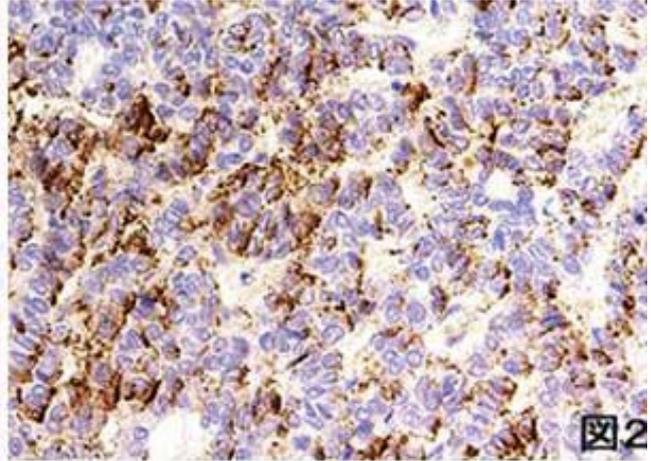
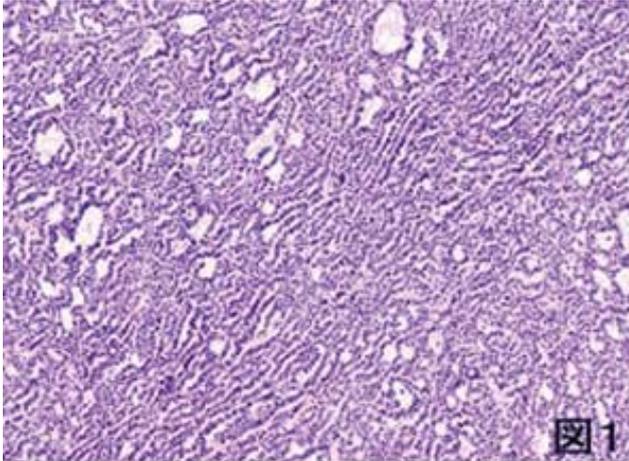
有する増殖細胞が認められた (図 4 矢印、Inset: 同切片上の internal positive control である腸管上皮層の神経内分泌細胞)。グリメリウス染色では陽性顆粒を有する増殖細胞は認められなかった。免疫染色では、多くの増殖細胞が Vimentin 陽性、部分的に Cytokeratin wide と PGP9.5 (図 5) に陽性を示した。αSMA、Desmin、c-kit、CD34、S-100、Synaptophysin、NSE、Iba-1、PNL2 はいずれも陰性であった。

診断：神経内分泌細胞への分化を伴う未分化癌

考察：HE 染色では上皮性か非上皮性かの判断が困難であったが、鍍銀染色の染色パターンおよび電子顕微鏡検査でデスモソームが認められたことから本腫瘍は上皮性腫瘍であると判断された。さらに Sevier-Munger 法で陽性顆粒を有する細胞や PGP9.5 抗体に陽性を示す細胞が認められたことから、一部の腫瘍細胞は神経内分泌細胞への分化を示していると考えられた。しかし、大多数の腫瘍細胞は形態学的にも免疫組織化学的にも特徴に乏しいため、上記診断名に至った。(山田直明)

## シベリアオオカミの肺腫瘍

第 55 回獣医病理学研修会標本 No. 1126 東京農工大学



動物：シベリアオオカミ、17 歳、雌。

臨床事項：某動物園にて飼育されていたが、2014 年 6 月 18 日、死亡しているのを発見された。死亡時、泡沫状嘔吐物を床上に認めた。死亡前日までの栄養状態は良好であった。

肉眼所見：右肺がほぼ腫瘍に置換され、胸壁に癒着していた。

組織所見：腫瘍は細胞質の乏しい小型の均一な腫瘍細胞のリボン状、索状の増殖巣からなり、一部では充実性増殖や管腔様構造をとり内腔に粘液（PAS、Alcian blue 陽性）を有する部分もみられた（図 1）。核分裂像は認められなかった。壊死、うっ血および血栓形成が散見された。免疫染色および特殊染色により、腫瘍細胞は AE1/AE3 陽性、Vimentin 陰性を示し、Chromogranin A（図 2）、NSE（図 3）、NCAM に一部陽性、TTF-1 に散在性に陽性を示した（図 4）。PCNA 陽性細胞率は 1.3% と低かった。Synaptophysin、グリメリウス染色、PGP9.5、VIP、Glucagon、Somatostatin、Insulin および S-100 は

陰性であった。

診断：神経内分泌腫瘍 Neuroendocrine tumor

考察：動物の肺腫瘍の WHO 分類によると<sup>1</sup>、本症例は形態学的特徴と神経内分泌マーカーに対する陽性所見から、小細胞癌あるいは神経内分泌腫瘍に相当すると考えられた。ヒトの小細胞癌では、高い増殖活性と TTF-1 高陽性率が低・中グレードの神経内分泌腫瘍（カルチノイド）との鑑別点とされている<sup>2</sup>。動物の肺神経内分泌系腫瘍においてそれらの詳細な情報がないものの、本症例は低い増殖活性と TTF-1 低陽性率から、神経内分泌腫瘍と診断した。切片上で腫瘍と肺実質との連続性が明瞭でないとの指摘を受けたが、TTF-1 陽性を示す甲状腺に異常はなく、肺由来の可能性が高いと判断した。

（白木彩子・吉田敏則）

参考文献：

1. Dungworth, D. L. *et al.*, 1999. Second series, Volume VI. pp. 16-21. AFIP, Washington DC.
2. Beasley, M. B. 2008. *Diagn. Histopathol.* 14 : 465-473.

## Maternal antibodies: clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies

### (移行抗体：臨床的意義、免疫反応との干渉のメカニズム、ワクチン接種戦略)

布谷 鉄夫

Stefan Niewiesk (Department of Veterinary Biosciences, The Ohio State University, Columbus, OH, USA)

Frontiers in Immunology 2014, Volume 5 (Article 446) : 1-15

#### 移行抗体によるワクチン接種の抑制のメカニズム

##### 抗体のフィードバック機構

移行抗体存在下における予防接種後の血清陽転の抑制のメカニズムについての研究は殆んどなされていないため、抗体フィードバック制御のデータが抗体による B 細胞抑制メカニズムを洞察するのに用いられてきた。抗体フィードバック制御とは、ナイーブなマウスに抗原 [通常羊赤血球 (SRBC)] と抗原特異的モノクローナル抗体を同時に接種すると抗原特異抗体の産生を減少あるいは抑制する現象である。この現象が SRBC やキーホールリンペット・ヘモシアニン (KLH) のような粗大粒子の抗原でも起こる点に注目する必要がある。抑制は投与する抗体量とその親和性で増加するが、IgG アイソタイプには依存しない。B 細胞応答と対照的に、ヘルパー T 細胞応答は抑制されない。さらに、投与した抗体が減少すると免疫復帰が誘発される。この現象については 2 つの主な仮説、エピトープ・マスキングと、Fc $\gamma$ -受容体 IIB (Fc $\gamma$ RIIB) を介しての B 細胞制御によって説明できるかもしれない。

##### エピトープ・マスキングによる B 細胞反応の抑制

羊赤血球特異的抗体は SRBC 上のわずかな高反復エピトープを認識する。エピトープ・マスキングの理論は十分な抗体が使用された場合に抗体がこれらのエピトープを覆い隠し B 細胞認識から逃れることができると仮定している。当初、B 細胞による認識を抑制する (エピトープ特異的抑制) ためにはすべてのエピトープが抗体によって覆われなければ

ならないと考えられた。しかし、1 つのエピトープに対するモノクローナル抗体が B 細胞による全ての粒子抗原の認識を抑える (エピトープ非特異的抑制) ことができることが明らかになった。高濃度の抗体では、立体障害がこの抑制を説明するかもしれないと議論されてきた。しかし 0.4 mg ( $2 \times 10^6$  抗体分子に相当) の低濃度の抗体でさえ、 $10^8$  個の SRBC に対する抗体反応を抑えることが可能である。抑制のメカニズムとしてのエピトープ・マスキングは、Fc $\gamma$ RIIB を介しての B 細胞制御と云う競合メカニズムに結び付けて常に議論されてきた。

##### Fc $\gamma$ -receptor IIB への IgG 結合による B 細胞反応の抑制

B 細胞は表面に唯一の Fc $\gamma$ 受容体として Fc $\gamma$ RIIB を発現している。B 細胞受容体 (BCR) に特異的な IgG が可変領域の抗原結合ドメインを介して BCR に、そして定常領域を介して Fc $\gamma$ RIIB にそれぞれ結合することが *in vitro* で明らかにされている。BCR と Fc $\gamma$ RIIB の間の架橋を介して、Fc $\gamma$ RIIB のチロシンベースの抑制モチーフが BCR のチロシンベースの活性化モチーフに隣接している。この隣接が、抗原特異的な B 細胞活性化の抑制に導く。*In vitro* では、免疫マウスの脾臓から集めた SRBC 特異的 B 細胞は SRBC の添加によって抗体産生を活性化させることができ、それは ELISPOT の系で検出される。この活性化は SRBC 特異的 IgG を加えることによって抑制されるが、それは SRBC と複合体を形成して BCR と Fc $\gamma$ RIIB とを結合させるためである。これとは対照的に、IgG の定常領域

(Fc) を欠く F (ab')<sub>2</sub> フラグメントは、これらのレセプター間で架橋は形成されず B 細胞刺激を抑制することができない。同様に、Fc $\gamma$ RIIB の $\gamma$ 鎖をコードする遺伝子を欠損させたマウス B 細胞は、SRBC 特異的 IgG によって抑制されない。これら *in vitro* のデータは B 細胞応答を抑制制御する際の Fc $\gamma$ RIIB の役割についての議論の焦点となっている。これとは対照的に、生体内で得られるデータでは、IgG が Fc $\gamma$ RIIB へ結合することにより B 細胞応答を抑える能力を明確には実証していない。このメカニズムを裏付けるものとして、IgG を抑制性 Fc $\gamma$ RIIB に結合させるのに欠かせない定常領域 (Fc) のグリコシル化が抑制のために必須であることを証明するデータがある。加えて、F (ab')<sub>2</sub> フラグメントは完全な IgG とは対照的に抗原特異的な反応抑制をしないことがいくつかの研究で明らかになっている。しかし、他の研究では F (ab')<sub>2</sub> フラグメントと完全な IgG との間にはほとんど違いが無いこと、そして遺伝的に Fc $\gamma$ RIIB (Fc $\gamma$ RI と Fc $\gamma$ RIII いずれも) を欠損させたマウスでも、IgG によって抑制が依然誘導されることなどが明らかとなった。後者の研究に関しては 2 つの技術的なコメントが残されている。遺伝子組換えマウスを使った研究では、通常の $\gamma$ 鎖 (Fc $\gamma$ R) の欠損は、Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIB と Fc $\gamma$ RIII の欠如につながる。結果として、これらのマウスは B 細胞コンパートメントに限定されない多様な免疫学的異常を示した。抗原注射の後、これらのマウスは著しく強い抗体反応を起こし B 細胞応答と抗体価を制御するフィードバック・メカニズムが欠如していた。

### **IgM の CD21/CD19/CD81/Leu-13 シグナル複合体への結合による B 細胞反応の刺激**

抗体のフィードバック制御の研究において、抗原と抗原特異的 IgM を同時接種すると抑制性 IgG の存在下でも抗体反応を増強させることが判明した。これらのデータは Fc $\gamma$ RIIB を介しての抑制シグナルが補体受容体 2 (CR2) (CD21/CD19/CD81/Leu-13) 複合体経路の刺激によって取り除かれていることを示している。*In vitro* では、抗原、IgM および補体蛋白質 C3d の複合体は BCR と CR2 に架橋を形成し B 細胞活性化に導く。CD21 と結合する C3d は補体蛋白質 C2 および C4 が関わる補体の古

典的経路の活性化とともに産生される。マウスでは架橋は抗原特異的 IgM と抗原の存在下で B 細胞反応を増強させるが、それは抗原単味と比較すると 100 倍の強さとなる。IgM によるこの免疫増強は、CD21 遺伝子欠損マウスあるいはワクチン接種に先立って補体を欠如させたマウスや、抗原欠如の状況下では見られない。これらのデータは IgM の刺激により取り除かれ得る B 細胞活性化に関わる IgG の制御的役割を示しており、単純なエピトープ・マスキングの考え方に異議を唱える根拠となっている。

### **移行抗体存在下でのワクチン接種後に起こる血清陽転抑制のメカニズム**

抗体フィードバック・メカニズムのモデル (エピトープ・マスキングと Fc $\gamma$ RIIB を介しての B 細胞抑制) で実施された研究に基づくメカニズムに加えて、さらに 2 つのメカニズムが移行抗体によるワクチンの抑制にある役割を果たしていると仮定されてきた：それらはマクロファージによるワクチン抗原の除去と移行抗体によるワクチンウイルスの中和である。

#### **マクロファージによる抗原除去**

マクロファージが血中の抗体・ウイルス複合体を除去し免疫反応を無効にしてしまうのではないかと推測されてきた。しかし、この仮説を支持する実験的証拠はなく、またそれは移行抗体存在下での免疫後になぜ T 細胞反応が検出されるものの B 細胞反応が優先的に妨げられるのかについて説明していない。Fc レセプターを介した抗原 - 抗体複合体の貪食が免疫反応を変えるという唯一の証拠は、それが IL-10 産生を増加させるためであるというマウスにおける成績である。IL-10 の増加は T 細胞反応を Th2 方向に向けさせるが抗体応答は減少させない。これまでのところ、マクロファージによる抗原 - 抗体複合体の除去が抗体応答に影響を及ぼすという証拠はない。

#### **弱毒生ワクチンの中和**

移行抗体存在下でワクチンが奏功しないことについてしばしば指摘されている説明は、ワクチンウイルスの中和であり、ウイルス抗原量がある閾値以下に減ることによって免疫認識を阻害するというもの

である。この仮説に対して異議を唱える3つの事実がある：移行抗体は増殖性の弱毒生ワクチンのみならず非増殖性の蛋白質ワクチンも抑制すること、麻疹ウイルス蛋白質（中和抗体による影響を受けない）を発現するベクターワクチンによる免疫も移行抗体によって抑制されること、中和能を持たない抗体でも弱毒生ワクチンによる免疫をブロックすること、などである。

### エピトープ・マスキングによるB細胞阻害

エピトープ・マスキングとは、ワクチンのB細胞エピトープが抗体に被われてB細胞によって認識されないことである。この効果は血中の抗体濃度に依存し、完全なIgG抗体と定常領域を欠くIgG抗体（F(ab')<sub>2</sub>）の両方でも見られるはずである。しかし、実験的には1種類の高濃度抗体より3種類の低濃度抗体の方がワクチンを阻害する効率は高く、完全なIgG抗体だけがワクチンをブロックできることが証明された。また、その後の抗体産生の抑制は抑制する抗体によって認識されるエピトープに特異的ではなかった。

### BCRとFcγRIIBの架橋によるB細胞抑制

エピトープ・マスキングのメカニズムを立証できなかった成績とは対照的に、FcγRIIBと移行抗体の間の相互作用が重要であることがわかった。*in vitro*でも*in vivo*でも、IgGはB細胞反応をブロックできるがF(ab')<sub>2</sub>フラグメントは出来ない。コックトナラットではFcγRIIBとは結合しないFc領域を持つモノクローナル抗体はB細胞反応を阻害できない。これらのデータはIgG抗体とワクチンとの複合体形成による抑制メカニズムを裏付けている。この複合体はB細胞表面の（ワクチン抗原を認識する）BCRと（IgG抗体のFc領域を結びつける）FcγRIIB受容体との間に架橋を形成する。架橋はB細胞の増殖と抗体産生を阻害する抑制性シグナルを送ることになる（図1A）。このメカニズムはB細胞の枯渇を防ぐために過度なB細胞応答を避けようとする進化の過程で発達した。IgG抗体が感染または予防接種後にすでに存在しているならば、より多くの抗体を産生する必要はないからである。基本的に、移行抗体はより多くの抗体を産生する必要がないというシグナルにもなる。しかし、活発な免疫

反応による抗体産生とは対照的に、受動的に移行した抗体は次第に減少し、乳幼児は十分なB細胞反応や抗体応答がない状態に置かれることになる。

### 抑制されたB細胞のIgM刺激

B細胞抑制の制御モデルを支持する更なる証拠は、*in vitro*と*in vivo*におけるB細胞の刺激に関わるIgMの役割によって提供される。B細胞の負のフィードバック調整はワクチン接種あるいは移行抗体を受けたかどうかにかかわらず、同程度のIgG力価を保有する子供でも機能するはずである。しかし、免疫された子供は再免疫により更なる抗体を産生するが、移行抗体を保有する子供は産生しないか産生しても非常に低い力価である。この現象は、能動免疫後のIgMの存在によって（少なくとも一部は）説明され得る。IgMはワクチンと補体蛋白質（C3d）との複合体を形成する。この複合体はB細胞表面でCR2を保有するBCRと架橋を形成する（図1B）。架橋は*in vitro*でB細胞を活性化し*in vivo*ではBCRとCD32の架橋による阻害を部分的に取り除く。その結果いくらかのIgG抗体が産生される。CR2の刺激（促進）効果に関わる重要な構成要素はC3dと結合するCD21鎖である。この現象は、エピトープ・マスキングでなくB細胞調整のモデルと一致する。

### I型インターフェロンは移行抗体の存在下でB細胞を刺激する

移行抗体存在下で実験的にB細胞を刺激するもう一つの方法は、I型インターフェロン（IFN）の誘導である。CD21がC3dとIFNαに同等の親和性で結合することから、IFNαにはB細胞刺激で機能的な役割があるかもしれないことが証明されている。すなわち、ヒトB細胞株を例にするとIFNα刺激は多くのB細胞遺伝子発現を活性化する。生体内では、B細胞はIFN受容体とCD21（CR2の一鎖）の両方を抗体産生を刺激する機能的IFN受容体として利用する（図1C）。高レベルのI型IFNを誘導する1つの方法は、免疫アジュバントとしてTLR-3とTLR-9に作用する物質を共用することである。二つの受容体を使用するため、生体内でのI型IFNの誘導はB細胞反応を強く刺激し移行抗体存在下での免疫後の抗体レベルを回復させる。この現象は、

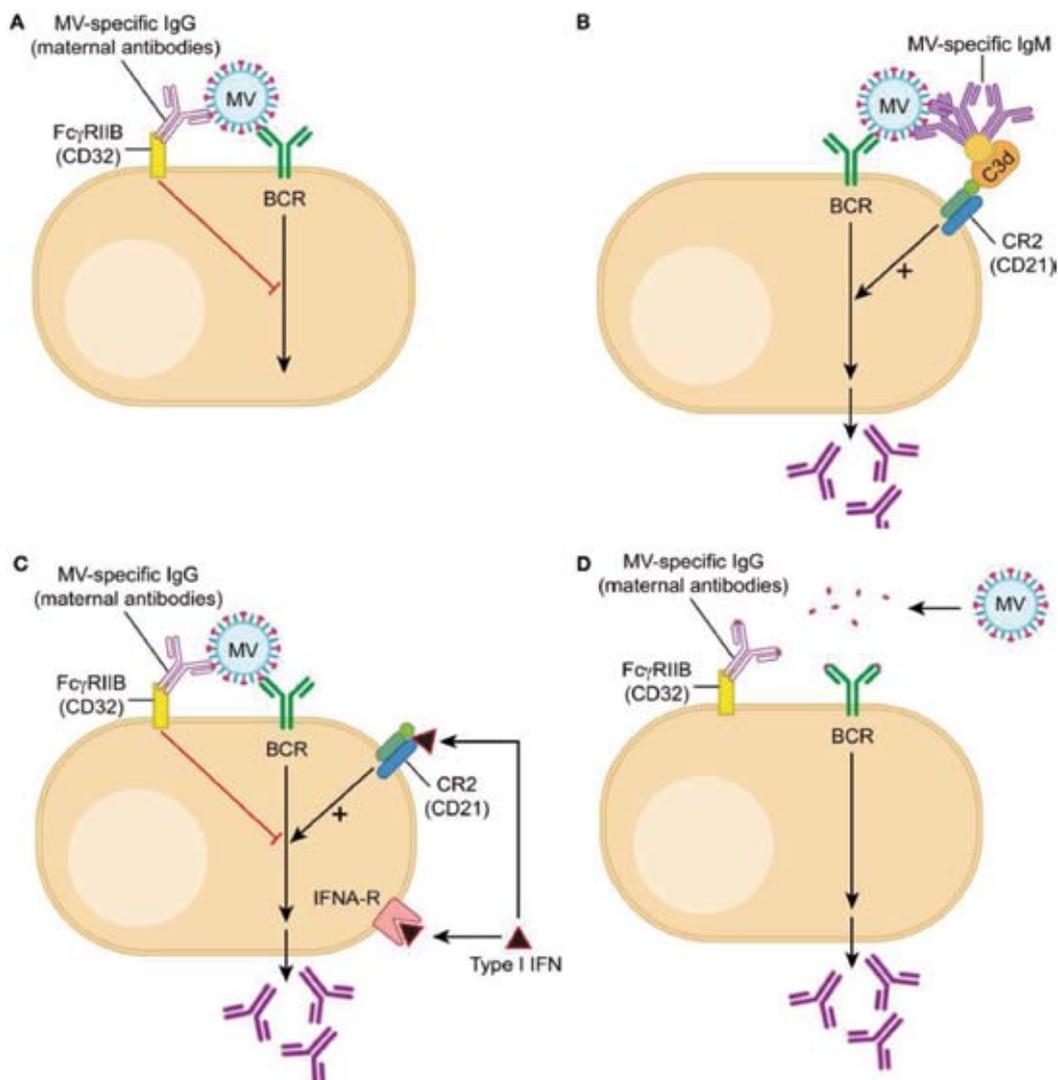


図1 移行抗体 (IgG) 存在下での B 細胞活性化モデル

B 細胞は 3 つの信号を介して刺激を受ける；一つ目は B 細胞受容体 (BCR) による抗原の認識、二つ目は CD40/CD40 リガンドを介した T 細胞との相互作用、三つ目は I 型インターフェロンまたは IL-6 のようなサイトカインである。(A) 移行抗体存在下では最初のシグナルは BCR と Fc $\gamma$ RIIB との架橋によって下方制御を受ける。もし MV 特異的 IgG が MV に結合すると、その定常領域は IgG の定常領域に対する受容体 (Fc $\gamma$ RIIB) と結合する。Fc $\gamma$ RIIB は B 細胞上の唯一の Fc 受容体で IgM や IgA などの他の免疫グロブリンとは結合しない。Fc $\gamma$ RIIB のチロシンベース抑制性モチーフは BCR のチロシンベース活性化モチーフに近接し抑制シグナルを送る。(B) もし MV 特異的 IgM が MV に結合すると、それは C3d を介して CD21 (補体受容体 2) に結合し陽性シグナ CD21/CD19/CD83/Leu-13 複合体の一部となる。オプソニン C3d は IgG には結合しない。(C) IFN $\alpha$  (I 型インターフェロン) は IFN 受容体と CD21 の両方に結合し強力な陽性シグナルを出す。移行抗体存在下でも B 細胞の抗体産生を刺激する。(D) 移行抗体存在下におけるワクチン接種の可能性あるアプローチの一つは、BCR と Fc $\gamma$ RIIB が架橋にならないような抗原抗体複合体にするためワクチン抗原を小さくする事である。この一例として移行抗体存在下での RSV に対する実験的なワクチン接種がある。

エピトープ・マスキングでなく B 細胞調節の Fc $\gamma$ RIIB 介在性抑制のモデルと一致する。新生児では、免疫は移行抗体の抑制作用だけではなく未成熟な免疫系によっても影響を受けている。新生コットンラットでは I 型 IFN の産生は移行抗体存在下でも未熟 B 細胞を刺激する。

### B 細胞の抑制には Fc $\gamma$ RIIB の関与が重要

麻疹ウイルスワクチン接種のコットンラット・モ

デルでは、移行抗体とワクチンとの複合体が BCRs と Fc $\gamma$ RIIB の間に架橋を形成し B 細胞を抑制することが示された。3 つ以上のエピトープを認識する抗体の混合物は同じ抗体濃度の 1 つの抗体より抑制的であった。これらのデータは Fc $\gamma$ RIIBs のオリゴマー化が B 細胞増殖と抗体分泌に干渉する抑制シグナルとして必要であるという最近の考え方を支持する。しかし、効果的なオリゴマー化のためには異なる抗体の数だけでなく抗原の大きさも重要なよう

である。ジニトロフェニル (DNP) グループに特異的な受動的抗体は SRBC (4-5  $\mu\text{m}$ ) に結合した DNP による免疫を抑制するが、KLH (30 と 33 nm の 2 つのサブユニット) と結合した DNP による免疫では抑制しなかった。同様に、移行抗体によって抑制される麻疹ウイルスはその表面に複数のエпитオープ [少なくとも 13 個の hemagglutinin (MV-H) および 6 個の fusion 蛋白質 (MV-F)] を保有する大きな抗原 (250-450 nm) である。これらのデータは効果的に (抗原-抗体複合体として) BCRs と Fc $\gamma$ RIIBs との架橋を形成させるためには一定の大きさの抗原が必要であることを示す (図 1D)。中和 B 細胞エпитオープを含有する小さなポリペプチドによる免疫では移行抗体による抑制を逃れるという報告はこの概念と一致する。

#### 試験ワクチンの作製と評価

既承認ワクチンおよび候補ワクチンを移行抗体の存在下で免疫した場合の効果については多くの研究成績がある。実験的ワクチンの成功例および失敗例が、ワクチン抗原を発現するさまざまなベクター系あるいはサイトカインとの組合せで報告されている。ワクチンが移行抗体の低い状態で使われる時、その予防効果の判断に T 細胞反応の測定と動物モデルにおける組織学的変化のような指標が使われるならば成否を最も簡単に証明できる。移行抗体存在下でのワクチン効果を説得力を持って証明するためには、ワクチン接種時の移行抗体レベルが高くなければならず、中和抗体を免疫学的パラメータとして、防御は臨床症状が見られない臨床有効性としてあるいはウイルス/細菌量の有意な減少として測定されなければならない。これらの基準によると、移行抗体存在下での免疫の成功例はほとんど存在しない。従って、この領域での一層の研究が必要となる。移行抗体存在下で接種可能なワクチンの開発を考える時に、成功の鍵と思われる 3 つの選択肢が浮かび上がる: IgG レベルの低い部位での接種、抗原の持続的な発現、I 型 IFN 産生を刺激するアジュバントとの接種である。移行抗体が抑制的に働くのは IgG アイソタイプであり、それは血中より低濃度であるが気道や眼の分泌物および唾液などにも存在する。移行抗体存在下の動物モデルでベクターシステムが皮下ま

たは筋肉内以外の免疫経路で奏効した報告がある。実験的なアプローチでは、接種部位 (例えば、口、目、鼻) での IgG 濃度の低さをワクチン接種の奏効に関係づけることができた。抗原の持続的発現の概念は、移行抗体存在下での反復免疫が抗体応答に繋がるという知見に基づいている。もしベクターシステムが抗原を持続的に発現するなら、抗体価が非常に低いレベルまで低下した時に B 細胞応答が刺激されると考えられる。この概念の一例は、弱毒マレック病ウイルス (MDV) をベクターとして伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) 蛋白質を発現させたワクチンが鶏に持続感染し移行抗体存在下でもよい免疫をもたらすことが挙げられる。I 型 IFN の産生はそれが組織培養や移行抗体存在下での実験系で B 細胞反応を誘導することができることに基づいている。この概念の一例は I 型 IFN 産生を誘導するアジュバントのブタ免疫である。

#### 幼児の間接免疫としての母体免疫による移行抗体の産生

幼児は免疫学的に未熟であるため、国によっては新生児に BCG 予防接種を行う例外があるものの、通常 2-3 ヶ月齢 (国固有の免疫スケジュールによる) より前に予防接種を行うことはない。より早い時期に予防するため 2 つの予防接種戦略、すなわちココーニング (cocooning) と母体免疫、が議論され或は実施されている。ココーニングは、幼児と接触するすべての人々を免疫して病原菌の伝播と感染の危険性を最小にする方法である。この方法は効果的であるが時に実施し難い場合がある。最近、より注目を集めている概念が母体免疫 (maternal immunity) である。移行抗体は幼児の免疫系が発達段階で敏感な時期に幼児を感染症から守る手段として提案された。もし移行抗体価が防御水準まで達せられれば免疫系が未熟な段階にあっても感染症から守ることが可能となる。加えて、若齢の動物は免疫系に依存しない宿主反応 (例えば胃腸感染後の上皮細胞の速やかな再生) によって感染症に対処する適応能力が高い。母体免疫は母体の免疫系が完全に成熟していて予防接種に充分反応するため、母体を守ると同時に幼児にも高レベルの移行抗体を与える。移行抗体の防御レベルと減少の動力学についての研究に基づけば、生後 6 ヶ月程度まで有効な高レベル

の抗体を誘導することは理論的に可能である。

## 1. 母体免疫の成功例

破傷風、インフルエンザウイルス、百日咳の予防接種例がある。1961年、ある影響力のある調査で、新生児の破傷風予防と死亡率の減少において破傷風トキソイドによる母体免疫の有効性が実証された。その後、WHO Maternal-Neonatal Tetanus (MNT) 廃絶プログラムにより新生児死が1980年代後期の787,000人から2008年の59,000人まで減少した。WHOキャンペーンの最終的なゴールは、MNTを1,000出生児あたり1人以下にすることである。母体免疫のもう一つの成功例はインフルエンザ予防接種である。インフルエンザウイルス感染は妊婦で深刻な問題となり、妊娠の前・中・後期の免疫は感染による重篤な臨床結果を大幅に減らすとともに子供への予防効果も実証されている。母体免疫は移行抗体を増加させ、6ヵ月を超えてインフルエンザウイルス感染が確認された症例の41-63%の減少と新生児の入院の39-91%の減少につながった。加えて、無細胞性百日咳菌抗原ワクチンによる百日咳の予防接種は移行抗体価を上昇させ、幼児を百日咳から保護することが証明された。予防接種研究のメタ分析では、コクーニングと母体免疫が臨床疾患を有意に減らし、それはまた費用対効果も高いことがわかった。これらの3つの例においては不活化ワクチンが使われた点に注目する必要がある。原則として、母体免疫は同様に他のワクチン（弱毒生ワクチン）や感染症にも適用され得る。しかし、肺炎球菌（多糖類）ワクチンによる母体免疫では幼児を臨床疾患から防御できないと報告されている。

## 2. 母体免疫をめぐる主な問題

母体免疫の効果を体系的に研究するために、いくつかの問題が考慮されなければならない。効果的な母体免疫では、抗体は特定の感染症防御と免疫学的に相関しなければならず、そして臨床的に評価しえる効果と相関し、防御可能な力価のレベルが明らかにされなければならない。主要な事は、母体に予防接種をするための最適期と免疫スケジュールを決めることである。移行抗体の最適な移行を得るための母体免疫法についてはほとんど情報が無い。現在のガイドラインは妊娠母体と胎児を防御するために免

疫することを目標としており、普通、妊娠前と妊娠中の免疫に分けている。実際面では、妊娠期間中だけ予防接種を受け、通常弱毒生ワクチンよりは不活化ワクチンによる免疫が推薦されている。子供の移行抗体価は母体の抗体価が低い場合は母体血清よりも高く、母体の抗体価が高い場合は母体血清よりも低くなることが多くの研究で知られている。そのカットオフ値は総IgG濃度で15 g/L程度である。この現象は胎盤バリアを超えてFcRn (neonatal Fc receptor) を介したIgGの移動によって説明することができる。もしFcRn分子が飽和になると、IgGは小嚢内のリソソーム酵素によって分解される。しかし、抗体の移動は母体血中の総IgG濃度のみならずアイソタイプ組成にも依存している。FcRnの結合親和性はIgG1で最も高く、IgG4、IgG3、IgG2の順で弱くなる。そのため、IgG1は例えばIgG2よりも多く経胎盤性に移動できる。この選択的移動メカニズムは特定のワクチンに対する抗体がなぜ他より効率的に移動できるかを説明する。通常、T細胞依存性の抗原（蛋白質）に対する抗体はIgG1アイソタイプで、T細胞非依存性抗原（多糖類）に対するIgG2アイソタイプの抗体より効率的に移動できる。このような知見から、新生児や乳幼児を感染防御するには妊娠中の母体に有効性のあるワクチンを使用することが望ましいと考えられる。しかし、それぞれのワクチンによる母体からの移行抗体価には、非常に効果的なワクチンでも変えられない閾値がある。この仮説は今後より大規模な臨床研究において実験的に実証されなければならない。子供の移行抗体価に影響しているもう一つの要因は在胎月齢である。母体から子供へのIgGの移行は13週齢から始まる。しかし、FcRn受容体の発現は妊娠後期（28週以降）から増加しその後移行するIgGは上昇して出生前の最後4週間に最高量になる(> 50%)。持続的な抗体応答を誘導しない比較的效果の弱いワクチンであれば、それを妊娠後期に投与するのも選択肢であるかもしれない。百日咳のようなあまり効果の良くないワクチンでもこの時期に投与すればより効果的であることが証明されてきている。母体免疫についてさらに考慮すべき点は母子の栄養状態である。一般論として栄養は免疫反応に影響するが、母体内の抗体レベルに影響するかどうかはわかっていない。しかし栄養不足の子供は、理由は明らかで

ないが移行抗体価が低いことがわかっている。母体年齢、体重、経産回数、出産形態などの要因は経胎盤抗体移行には影響しない。ヒトとは対照的に、畜産動物では免疫スケジュールを容易に繁殖動物にいつでも適用できる点で分かりやすい。畜産動物では一般的に、抗体の移行が出生後の短時間でもっぱら初乳中の抗体に依存しているため出生時の移行抗体価が高ければ免疫の時期は関係しない。

### 3. 母体免疫はRSウイルス感染症にどのように作用するか？

特定疾患に対する母体免疫が子供に再現性のある防御可能な抗体上昇をもたらすかどうかを明らかにするためには、免疫によって誘導されるIgGの総量と抗体の特性を考慮しなければならない。RSV感染症を例にあげると、本症は成人では重篤な呼吸器感染を引き起こし年配者ではインフルエンザに次ぐ死亡をもたらすウイルス感染症である。また、子供では下部気道がウイルス感染を起こし特に1ヶ月以内の乳幼児や新生児で問題となる。現在、ワクチンや治療法はなく新生児に安全で有効なワクチンが開発できるかどうか焦点になっている。新生児への免疫は依然不明瞭であるため、その代替として最初の6か月間を移行抗体によって新生児や乳幼児を防御出来る、母体に接種可能なワクチンができればそれを使用することである。しかし、移行抗体がRSV感染症に対して有益な効果を持つかどうかに関しては論争の焦点となっている。RSV特異抗体は生後6ヵ月間子供に存在し、半減期は推定1.5ヵ月である。移行抗体の防御効果を確認した研究がある一方、確認できなかった報告もある。現在、早産児（在胎月齢による）にはRSV感染への予防としてモノクローナル抗体が投与される。この予防に使われる抗体は高い親和性を有するので効果的である。この抗体と対照的に、自然に産生される抗体は親和性が弱いため中和能が低い。従って、ワクチン接種によって母体に高親和性抗体を産生させることが重要となる。RSVに対する中和抗体はfusion protein (F)とglycoprotein (G)に結合する。しかし、G蛋白質を欠損させたRSVワクチンでもウイルス攻撃に対して防御することが証明されたことから、ワクチン開発における多くの関心はF蛋白質に集中して来ている。ウイルス粒子の表面には、融合蛋白質

が折り畳み構造を取っているため融合を仲介する融合ペプチド (pre-fusion F) は外界から保護されている。引き金が引かれると、融合蛋白質は展開して (post-fusion F) 細胞膜と融合を開始する。RSV感染症の予防に用いられる抗体、Palivizumabは、融合前後の双方のF蛋白質と結合する。最近、pre-およびpost-fusion F蛋白質の構造が明らかになり、最も効果的な*in vitro*中和抗体がpre-fusion Fと結合することが証明されたことから、pre-fusion Fに対する抗体を増加させることがワクチンの究極的なゴールになるという考え方に傾いてきている。この知見に基づけば、臨床試験では標的 (G蛋白質ならびにpre-およびpost-fusion F蛋白質) に対する抗体の総量ばかりでなく親和性も測定する必要がある。抗体は胎盤を介して移行するが、それらはFcRnへの結合能に基づいてRSVへの親和性ではないため、母体血中での抗体濃度に応じて飽和すると思われる。もし親和性の高い抗体の割合が低い場合には、移行抗体は高い防御レベルに達することができないかもしれない。他の感染症と同様に、移行抗体のレベルが例え低くてもRSVに特異的なB細胞応答や抗体反応を妨げることが明らかになっているので、母体免疫により移行抗体が増加しても課題は残るであろう。

#### 要約および展望

移行抗体によってワクチンが抑制される多くの例がヒトや動物で存在する。B細胞の抑制はワクチン・抗体複合体によるBCRとFcγRIIBとの間の架橋を介して起こる。この基本的メカニズムは、我々の現在の臨床的アプローチの可能性と限界を理解するのに、そして新しいワクチンの開発や試験に役立つ。この知見はまた、幼児を一般の感染症から守るメカニズムとしての母体免疫の概念を評価し発展させるのに役立つ。母体免疫の潜在的な利点は、母体の防御と子の感染に対する感受性を遅らせることである。しかし、多くの推定では子供は6ヵ月を超えては防御されず完全な免疫学的成熟は12ヵ月後まで達成されないことである。母体免疫についての未解決の問題は、移行抗体存在下で如何に免疫をすべきかということである。

## 発表論文紹介

# 豚毒素原性大腸菌 (ETEC) 毒素に対する能動 および受動免疫を誘導する コメ型経口ワクチン—ムコライス-CTB—

竹山夏実

Oral rice-based vaccine induces passive and active immunity against enterotoxigenic *E. coli*-mediated diarrhea in pigs.

Natsumi Takeyama *et. al.*, 2015. *Vaccine* **33**: 5204–5211.

## 1. 背景

毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *Escherichia coli*: ETEC) は、ヒトおよび畜産動物において細菌性下痢症を引き起こす原因菌となる。畜産動物での ETEC 発生は経済的な損失に繋がるため無視できない疾病の1つと言える。畜産豚での ETEC 発症による致死率は高くはないものの、哺乳期や離乳期の仔豚においてコクシジウムやロタウイルスとの複合感染により下痢症状が増悪することもある。そのため、農場の衛生管理ならびにワクチン接種プログラムにより腸管感染症のリスクを下げる必要がある。

幼若豚を ETEC 感染症から防御するために従来は妊娠豚にワクチンを接種するが、ETEC 下痢症の発生時期および誘導する抗体サブクラスについて課題が残されている。ETEC は哺乳期および離乳期にかけての発症リスクが高い。また、ETEC は非侵襲性細菌であり、腸管粘膜上 (腸管腔内) で増殖することから、哺乳中の仔豚には、母豚からのミルクを介した受動免疫により分泌型 IgA (Secretory IgA: SIgA) が供給されることが望ましい。抗原特異的 SIgA を誘導するには、不活化抗原の筋肉内投与では十分でないため、粘膜ワクチンが候補となる。また、離乳後は SIgA の供給が遮断されることから、なるべく速やかに仔豚へ能動免疫を付与すること必要となる。

ETEC による下痢症は、ETEC が産生する2つの毒素が原因となる。易熱性毒素 (heat labile enterotoxin: LT) および耐熱性毒素 (heat stable enterotoxin: ST) である。公表されている論文において F4 線毛抗原陽性 ETEC の LT 遺伝子を取り除

くと、2週齢の仔豚への ETEC チャレンジ試験でによる下痢症状が起きなくなるという結果が出ている (ST 遺伝子を欠損させても下痢症状が発症することから、ST と比較して LT 産生がより下痢症状に影響を与えると推察される。また、コレラ毒素 (Cholera toxin: CT) や LT を用いて豚をあらかじめ免疫しておくことで、LT 産生 ETEC による下痢発症を抑えられたという報告もある。豚に感染する ETEC は5種類の線毛タイプが知られているが、LT は線毛タイプ間での相違性はほとんどないため、ETEC 下痢症のワクチン抗原として LT をターゲットとすることとした。

筆者らはヒトの旅行者下痢症ワクチンとして、コレラ毒素 B サブユニット (CTB) を種子に発現するイネ (MucoRice-CTB: ムコライス-CTB) を作出してきた。遺伝子組換え技術をイネに応用したムコライス-CTB は、種子の状態で室温保管ができ、また投与に医療機器を必要としないという特徴を有している。マウスやサルを用いた経口免疫で、ムコライス-CTB が CT に対する中和抗体を誘導することや、CT と相同性の高い LT を持つ ETEC をマウスに投与した際の腸内水分貯留量を抑制することを確かめてきた。

この論文では豚の ETEC を対照としてムコライス-CTB が大腸菌症の経口ワクチンとして受動免疫および能動免疫を誘導する効果について研究成果をまとめた。

## 2. 実験方法

### 2.1 実験動物

ムコライス-CTB 投与の妊娠豚試験では12週齢

NIBS ミニブタを2匹、能動免疫試験ではメス2ヶ月齢 NIBS ミニブタを使用した。また、対照試験となる組換え CTB 抗原 (rCTB) の筋肉内接種では2ヶ月齢の家畜豚を使用した。

## 2.2 ムコライス-CTB および ETEC 株

温度および光量を制御した植物チャンバーで育成したムコライス-CTB を用いた。発現させる CTB のアミノ配列は、CTB 生来の配列を使用した。

攻撃用 ETEC 株については動物衛生研究所より分与された ETEC-S7 株 (LT, STb, STa 遺伝子保有、F18 線毛タイプ) を用いた。

## 2.3 免疫方法

ミニブタ妊娠豚試験では 670 mg のムコライス-CTB を、分娩予定日の6週前より2週間隔で3回、母豚に混餌投与し、分娩後5日目に等量の dose を追加投与した。2ヶ月齢ミニブタ試験では 670 mg のムコライス-CTB を PBS に混合して強制胃内へ投与、あるいは混餌により経口投与とした。対照群には日本晴 (野生米) を 670 mg 経口投与した。rCTB は 100 µg/dose をフロイントアジュバントと混合し、臀部筋肉内に投与した。

## 2.4 ELISA

枯草菌で発現し、精製した CTB あるいは LTB を 1 µg/mL に調整し、96 ウェル ELISA プレートに播種した。3% スキムミルク-PBS でブロッキングを行い、IgG 検出には豚血清を 1:200 希釈、乳清 1:50、IgA 検出には血清を 1:40、乳清を 1:50、腸管洗浄液を 1:2 に希釈して使用した。二次抗体として HRP 標識抗ブタ IgG/IgA 抗体を 1:10,000 希釈で播種し、検出は TMB 基質にて行った。

## 2.5 ETEC 腸管ループアッセイ

2ヶ月齢ミニブタに対し、最終免疫後1週目に ETEC を腸管ループ内に投与する試験を実施した。10<sup>6</sup> CFU/mL に調整した ETEC-S7 菌液を麻酔、沈静下で結紮した 6 cm 長の小腸ループ内に投与し、18 時間後にループ内に貯留した水分量を計測した。

## 3. 結果

### 3.1 ムコライス-CTB は母豚免疫で受動免疫を誘導した

豚は胎盤抗体移行のシステムを持たないため、新生期仔豚の ETEC 感染を防御するためにはムコライス-CTB を母豚に免疫し、乳汁を介した受動免疫を仔豚に付与する必要がある。2匹の妊娠ミニブタに、それぞれ出産予定日6週前より2週間隔で3回、670 mg のムコライス-CTB 粉末 (CTB 抗原含有量 1.9 mg に相当) を餌と混合して与えた。No. 1 および2の母豚で初回免疫より3週目で CTB 特異的な血清中 IgG および IgA の上昇が認められた (図1)。分娩日より免疫母豚からは経時的に搾乳も行い、乳清中の抗体を調べた。分娩当日に採取された初乳中には血清中よりも高い CTB-IgG、IgA が認められることが分かった。分娩後2週までの母豚抗体推移を追ったところ、CTB-IgG の血清中抗体価は安定して推移するが (図1A および C)、乳清中 IgG は分娩後5日目に向けて急激に低下した。母豚 No. 2 では10日目まで継続して CTB-IgG 量が低下した。一方、IgA サブクラスは IgG とは異なる傾向が認められた。分娩後経過に伴う抗体価の減少は比較的ゆるやかであり、ほぼ全ての測定ポイントで血清

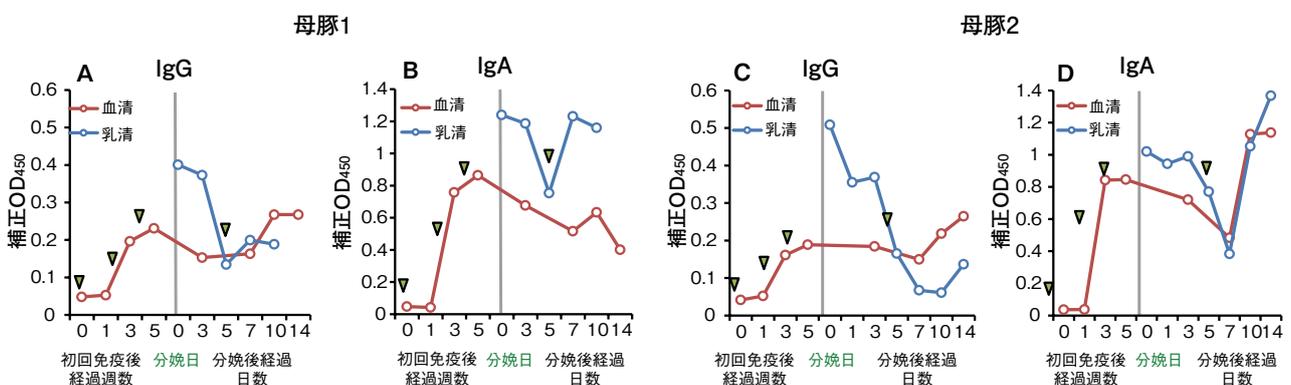


図1 ムコライス-CTB 免疫母豚の血清および乳清中 CTB-IgG (A, C) および IgA (B, D)。母豚 No. 1 (A, B) および No. 2 (C, D) の、それぞれ分娩前後の血清および乳清の CTB 抗体を ELISA にて経時的に測定した。初回免疫後経過週および分娩日を区切りに分娩後経過日数を横軸に示した。先頭は免疫実施日。

中よりも高い値を持続した (図 1B および D)。分娩後 5 日目にムコライス-CTB の追加免疫を実施したところ、血清および乳清ともに IgG 価には若干の上昇傾向が認められた。追加免疫による IgA の応答は IgG より顕著であり、母豚 No. 1 では 7 日目に、母豚 No. 2 では 10 日目に、初乳と同程度まで CTB-IgA 量が回復することが分かった。腸管感染症である ETEC 下痢発症防御に関係する毒素中和抗体としては常乳中に含まれる抗体が重要であるが、初乳中に含まれ腸管上皮より新生豚血中に取り込まれる抗体を測定した。母豚 No. 2 より出生した 5 匹の仔豚について、試験期間中に代用乳で飼育する群 2 匹および母乳で飼育する群 3 匹を設定した。図 2 に示すように、出生後 CTB-IgG、IgA の新生豚血中抗体濃度は、母乳群 1 日目に於いて初乳と同程度まで高い値を示し、抗体の移行が確認された。代用乳で飼育した新生豚の血中には CTB 特異的抗体は検出されなかった。血中濃度は IgA で低下が著しく IgG では低下が緩やかであった。

### 3.2 ムコライス-CTB は離乳期のブタに対する粘膜免疫を誘導した

次に、離乳後のミニブタ対してもムコライス-CTB が抗体産生を誘導するかを確認するため、5 匹の 2 ヶ月齢 NIBS ミニブタに 2 週間隔で 4 回のムコライス-CTB 経口投与を行った。No. 1-3 は強制胃内投与、No. 4、5 は混餌投与を実施した。No. 6-8 は対照群として、日本晴 (野生米) の粉末を経口投与した。初回免疫より経時的に採血を行い、血中 CTB 特異的抗体価を測定したところ、少なくとも 3 回以上免疫することでムコライス-CTB により免疫した全ての個体で CTB-IgG および IgA の産生、上

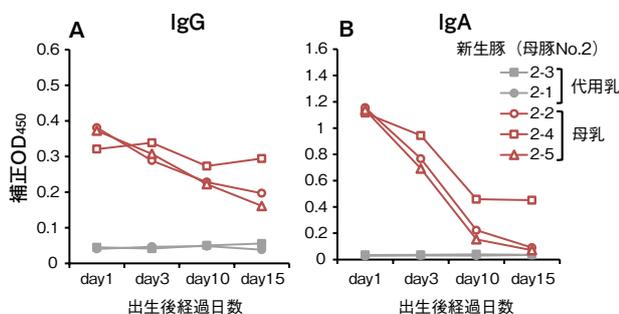


図 2 母豚 No. 2 の産子を 2 群に分け、それぞれ代用乳および母乳で飼育した際の仔豚血中 CTB-IgG (A) および IgA (B) の推移。出生後 1、3、10、15 日目に仔豚より採血し、CTB 抗体を ELISA にて測定した。

昇を認めた (図 3A および B)。混餌投与にて免疫を行った No. 4、5 については強制胃内投与群と比較して CTB-IgA の上昇が高い傾向が認められた。またこのとき、血清 CTB-IgA は LTB 抗原とも交差性を持つことが示され、交差率の高い個体 (No. 4) では OD450 の値が CTB と比べて 68.6% となった (図 4A)。組換え CTB を筋肉内投与した豚 (図 3C および D) では高い CTB-IgG の応答があったにもかかわらず、血清中 CTB-IgA の上昇を伴わない結果であったため、CTB の筋肉内投与と比較してムコライス-CTB の経口投与が IgA の誘導に有効であったことが示された。

### 3.3 ムコライス-CTB による免疫はループ法による ETEC 下痢症を防御した

ムコライス-CTB 免疫による ETEC 下痢症防御効果を調べるため、最終免疫後 1 週目に直接攻撃の代替え法としてミニブタの腸管に結紮部位を作成し、ETEC-S7 株 (LT 産生株) を  $10^6$  CFU/dose で投与した。1 匹について 3 個のループを作成し、各ループ内に貯留した水分量を翌日計測した。3 ループの平均値は、対照群 (野生米投与) でそれぞれ 8.8 mL、23.9 mL、27.3 mL (3 匹) であり、ムコライス-CTB 免疫群では 5.4 mL、4.7 mL、2.7 mL、2.7 mL (4 匹) となり、有意に水分貯留が抑制される結果を得た (図 4B)。PBS のみを投与したループでは対照群、免疫群いずれにおいても水分貯留は観察されなかった。この結果より、ムコライス-CTB 免疫により LT が原因の ETEC 下痢症を交差防御できることが示唆された。

また、ムコライス-CTB を投与したミニブタの腸管腔内にも IgA が分泌されているかを調べるため、腸管ループアッセイ実施後の解放時に、ループ作成を行わなかった上部および下部小腸を結紮して PBS 洗浄により粘液を採取し ELISA を実施した。対照ミニブタ No. 7 および No. 8 では CTB 抗体が検出されなかったが、ムコライス-CTB を免疫したミニブタの腸管で IgA 産生が認められた (図 4C)。離乳後ミニブタへムコライス-CTB を経口投与することで腸管粘膜免疫を誘導することが可能であった。

## 4. 考察

新生期および離乳期における ETEC 感染による

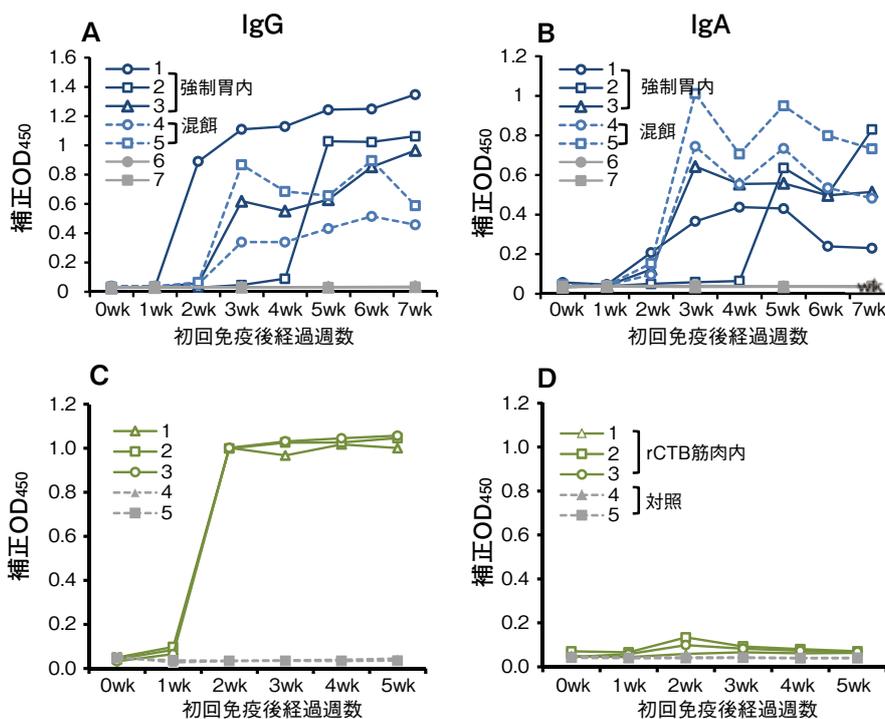


図3 ムコライス-CTB免疫肥育豚の血清中CTB抗体の推移 (A、B)、および組換えCTBを筋肉内投与下肥育豚のCTB抗体の推移 (C、D)。IgG (A、C) およびIgA (B、D) をそれぞれELISAにて測定した。ムコライス-CTBは0、2、4、6週目に強制胃内あるいは混餌にて投与、組換えCTBはフロイントアジュバントと混合し、0、2週目に筋肉内接種した。

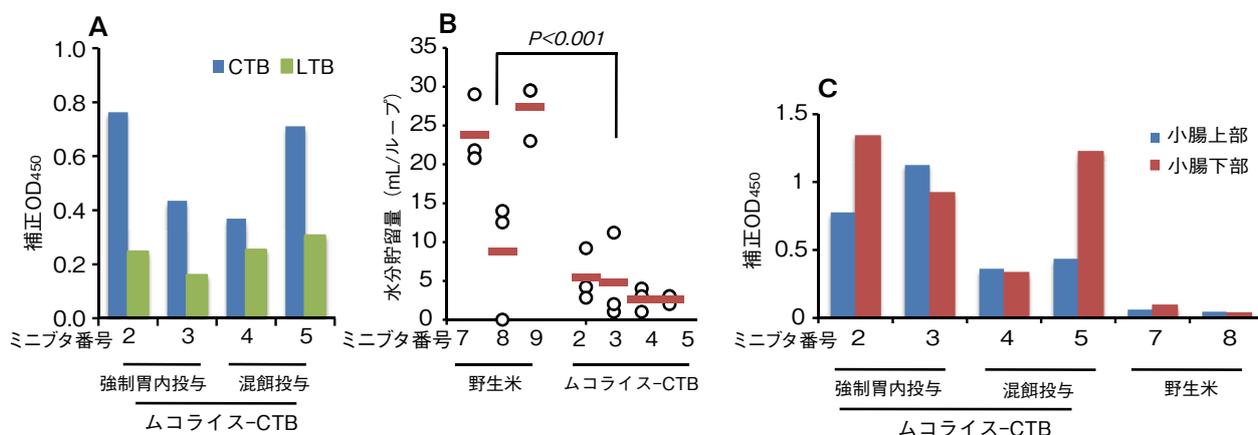


図4 ムコライス-CTB免疫肥育豚の免疫応答およびETEC防御効果。ムコライス-CTB免疫ミニブタ血清についてLTBとの交差性を確かめるため、LTB-IgAを測定し、CTBへの反応性を比較した (A)。ムコライス-CTB免疫群および対照群 (野生米投与) についてETECを投与する腸管ループアッセイを実施し、処置後のループ内水分貯留量を計測した (B)。ムコライス-CTBを強制胃内あるいは混餌で投与したミニブタの小腸上部および下部の粘膜の洗浄液によりCTB-IgAを測定した (C)。対照群と比較して、免疫群の水分貯留量は $P < 0.001$  ( $t$ 検定) にて有意に抑制された。

下痢症は、世界的にも畜産豚の死亡原因の1つとなっている。その感染機序からもETECに対する有効なワクチンとしては粘膜免疫を誘導し、また新生期は母豚からの受動免疫、離乳期には速やかに能動免疫を誘導するものが必要になる。市販されている豚大腸菌症ワクチンは、妊娠豚に対してF4線毛タイプ等を保有した大腸菌の不活化菌体を筋肉内投与するものが多い。筋肉内注射によって誘導される

IgGは母豚の初乳より仔豚小腸Fcレセプターを介して血流に取り込まれ、仔豚体内にETECに対する抗体を付与する。しかしながら、冒頭にも供述したとおりETECは腸管腔で増殖するため、管腔内に分泌する毒素を中和するためには乳汁からの分泌型IgAの安定供給が望ましいと考えられる。別の論文の報告で、生きた大腸菌を経口投与で腸管に定着させて局所粘膜免疫を誘導する効果が知られてい

るが、不活化させた菌を経口投与してもこのような効果は認められない。

本論文では CTB を発現させたイネ種子を粉碎して抗原とし、豚に粘膜免疫を誘導できるかを検証した。受動免疫が成立するかを確認するため、妊娠豚に対して妊娠期間中に 3 回、分娩後 5 日目に母豚にムコライス-CTB を経口投与した。免疫母豚は、2 週間継続して乳汁中に毒素中和活性を持つ抗体産生を分泌したことから、ムコライス-CTB は、通常不活化抗原での免疫惹起が難しい消化管において粘膜免疫を誘導することが示され、母豚から新生豚への能動免疫を可能にした。

更に、離乳後の肥育豚に対するムコライス-CTB の経口免疫では母豚での結果と同様に、経口免疫により筋肉内注射では誘導されない血清中 IgA の誘導を認めた。このとき腸管粘膜においても CTB 特異的 IgA の誘導が認められ、また産生された抗体は ETEC 産生毒素サブユニットである LTB とも交差反応性を示した。抗体産生の結果に相関し、ループ内投与した ETEC による下痢の症状が緩和されたことから、能動免疫法によってもムコライス-CTB が ETEC 下痢症発症予防につながる粘膜免疫効果を付与することが期待される。

F4 あるいは F18 線毛抗原を保有する ETEC 株は、世界的にも広く分離され、これらの菌のうち約 60% が LT 遺伝子を持つ株であることが知られている。大腸菌症の予防に線毛抗原が利用される例もあるが、下痢の直接的原因である毒素を中和する免疫は線毛の血清型に影響を受けずに、幅広い大腸菌株に有効であると考えられる。一方で、ETEC の病原性には EAST1 や AIDA1 といった他の分子の関与も報告されているため、ムコライス技術を応用して複数の大腸菌抗原をワクチンとすることも検討できる。今回、ムコライス-CTB が受動免疫および能動免疫可能なワクチン抗原であることを示したが、離乳豚に対して能動免疫を開始するタイミングは今後の課題となる点である。

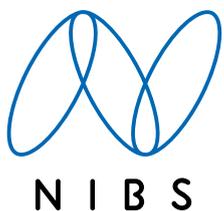
植物を応用した動物用ワクチンや治療用抗体は様々な技術により実用化が目指されているが、家畜用ワクチンは安価に製造できるシステムが望まれる。ムコライスは、食用でありかつ保存性が高いイネ種子に抗原を発現するシステムである。発現蛋白質の精製工程を省略してワクチンとして調整でること、医療用機器を用いず餌との混合のみで投与ができることから、従事者および動物双方にやさしいストレスフリーのワクチンを実現できる可能性が高い。

編集室からのお知らせ

日生研たよりの一部記載に誤りがありました。正しくは以下の通りです。

2016 年 5 月号	第 62 巻第 3 号 (通巻 598 号) 4 ページ	(誤) 石井三都了夫	(正) 石井三都夫
2016 年 7 月号	第 62 巻第 4 号 (通巻 599 号) 19 ページ	(誤) 104.7 pfu	(正) 10 <sup>4.7</sup> pfu

読者の皆様ならびに関係各位にご迷惑をおかけしましたことをお詫びするとともに、ここに訂正させていただきます。以下の通りです。



—— 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 600 号) 平成 28 年 8 月 25 日印刷 平成 28 年 9 月 1 日発行(第 62 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/手島香保(委員長)、今井孝彦、近内将記  
事務/企画学術部  
印刷所 株式会社 精興社  
(無断転載を禁ず)