

日 生 研 報

2017年(平成29年)7月号 第63巻 第3号(通巻604号)

挨拶・巻頭言

山歩き雑感……………真板 敬三(2)

発表論文紹介

Actinobacillus pleuropneumoniae
血清型 2, 3, 4, 6, 8 及び 15 における
ApxIIA と ApxIIIA の遺伝子的及び抗原性
の特徴
…………… To Ho (和訳; 大嶋 篤)(3)

ヒトアポリボ蛋白(a) 遺伝子導入 NIBS
系ミニブタの作出……………島津美樹(9)

学会参加記

第48回 全米養豚開業獣医師協会年次
大会……………林志佳(13)

お知らせ

学会発表演題……………(17)
平成29年度定時評議員会開催……………(18)
研修者・見学者受け入れ状況……………(18)



山歩き雑感

真板敬三

低山歩きが趣味である。山は春夏秋冬それぞれで素晴らしい姿を見せヒトを感動させてくれるが、登っている最中は周囲の景色を愛でるなどという余裕はなく、もっぱら足元とほんの数メートル先の状況を確認するのが精一杯というのが実情である。かなり若い頃は一刻も早く昼飯の場所に着き缶ビールを飲もうというケシカラヌ心得で歩いていたため、尾根筋に至る植林地はただ暗く陰気な場所で早くそこを抜け明るい雑木帯に入ろうとシャカシャカ先を急いでいた。最近では急ごうにも体が待ったをかけるため自ずと歩くペースは遅くなり植林地の様子に眼が向くようになったが、そこで気になるのは多くの植林地で森林というイメージからすると木々の間隔が狭く太さにバラツキがあり立ち枯れも目立ち、また、如何なる力が働いたのか直径30～40cmもの立木が縦に裂け片方がだらりと垂れ下がり、中には両側がなくなりまるで大きな楊枝が地面から突きでた様の無残な光景が随所に見られることである。さらに間伐された木々がそのまま放置され、あるいは1mほどの長さに横挽きされたまま野積されている。聞くところによると植林地での間伐が適切に行われなため木々の成長にムラが出る、また、杉や檜のように垂直に幹が伸びる樹木では枝打ちが定期的に行われないと、春先に降る湿雪の重みに枝葉が耐えかね幹本体が縦に裂けるそうである。原因は安価な輸入材が大量に出回ったため国内林業が立ち行かなくなり、山林作業者の離職や後継者不足から戦後の建材需要が一巡した後に行われた膨大な面積の植林地の維持・管理が困難になったことが大きい。林業の凋落に加え薪炭・蚕糸需要の衰退、ナメコ、シイタケ等キノコ類の工場生産への移行が山村の経済崩壊に拍車をかけたのである。山は標高数百メートルの低山であっても危険はつきものである。尾根筋を離れ急峻な山腹の植林地を抜け勾配が緩やかになるとじきに辺りが開けてくる。そのような場所は以前緩い傾斜地を石組で均した桑畑か野菜畑だったようで、隅に崩れた作業小屋があり脇には実のなる木を植えてある。春先には真っ青な空に満開の梅が清々しい香りを放ち、その下ではサンシュユが黄色の花をつけ早春に彩りを添えている。ほどなく民家がポツポツ現れ、もう林道は近いとホッとする瞬間であるがそれらは全て廃屋でどこにもヒトはいない。環境維持のため里山保全の大切さが叫ばれて久しいが、それには里山が再びヒトの生活の場になることが最も単純かつ継続性ある方策であり、まずはそこでの生活維持に十分な収入を得る施策を考案・実行すべきであろう。放棄された田畑での太陽光や風力発電、間伐材チップを用いたバイオマス発電が提案されている。しかし、山間部の気象条件で安定した発電が可能か疑問だしバイオマス発電も採算レベルの技術開発は道半ばの段階であろう。観光産業の誘致はブームの去ったスキー場やゴルフ場、廃墟と化した民宿の悲惨な状況を見ればとても恒久的施策とは思えない。山村での生活維持には林業経営の安定化が一番であり、それには大きな設備投資なしに経済的にも成り立つ間伐材の利用が手っ取り早いのではなからうか。欧米の公園に行くと木材チップが散策路や植え込みに厚く敷かれているが、日本でも最近ガーデニング資材としての利用が増え、ホテルや一部の公園で見られるようになった。これを全国の遊歩道、公園、学校等の公共施設に広めるのはどうだろう。さすれば中国、東南アジアの景気高揚に伴う住宅建材市況の好転と相まって山村経済浮揚のきっかけになるのではないか。でも経常経費が増えてお役人は嫌がるかなあ？ こんなことを山歩きの途中で考えている。

(評議員)

Actinobacillus pleuropneumoniae 血清型 2, 3, 4, 6, 8 及び 15 における ApxIIA と ApxIIIA の遺伝子的及び抗原性の特徴

To Ho (和訳; 大嶋 篤)

Genetic and antigenic characteristics of ApxIIA and ApxIIIA from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 2, 3, 4, 6, 8 and 15.

To H¹, Nagai S¹, Iwata A¹, Koyama T¹, Oshima A¹, Tsutsumi N¹.

¹Nippon Institute for Biological Science, 9-2221-1 Shinmachi, Ome, Tokyo 198-0024, Japan.

Microbiol Immunol. 2016. **60**(7) : 447-458.

要約

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) によって産生される Apx 毒素は、新世代ワクチンの必須成分である。本研究では、血清型 2, 3, 4, 6, 8 及び 15 の *apxIIA* 及び *apxIIIA* 遺伝子をクローニングし、配列を決定した。血清型 2, 3, 4, 6, 8 及び 15 の ApxIIA タンパク質のアミノ酸配列は、血清型 1, 5, 7, 9 及び 11 ~ 13 のものとはほぼ同一であった。イムノブロット法において、血清型 2 及び 15 由来の rApxIIA が、種々の血清型に感染した動物由来の血清と強く反応することを示した。アミノ酸配列の解析によって、ApxIIIA タンパク質が血清型 2 の株に 1 つ、血清型 3, 4, 6, 8 及び 15 の株に 2 つの変異体を有することを明らかにした。マウスにおける交差防御の研究では、rApxIIIA/2 あるいは rApxIIIA/15 の投与は、ApxIII/15 及び ApxIII/2 を発現する血清型 3, 4, 6, 8, 15 及び 2 の App 株による攻撃に対して防御効果を与える。同様に、ウサギ抗 rApxIIIA/2 あるいは抗 rApxIIIA/15 血清を投与されたマウスは、血清型 2 及び 15 による攻撃に対して防御されることが明らかとなった。我々は ApxIIA 及び ApxIIIA タンパク質間での抗原性及び配列類似性を明らかにした。これは、App による疾患に対する有効なワクチンの開発に役立つと考えられる。

序論

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) は豚胸膜

肺炎を引き起こす。15 個の血清型が知られており、ApxI、ApxII、ApxIII 及び ApxIV と呼ばれる RTX 毒素をそれぞれに産生する。App の病原性には様々な要因 (RTX 毒素、CPS、LPS 及び鉄輸送システム) があるが、臨床症状と典型的な豚胸膜肺炎の増悪の第一要因は Apx 毒素である。App のすべての血清型は ApxI と ApxIII の分泌に基づき 2 つの大きなグループに分けることができる。1 つは ApxI 及び II を分泌する血清型 1, 5a, 5b 及び 9 からなるグループ、もう 1 つは ApxII 及び III を分泌する血清型 2, 3, 4, 6, 8 及び 15 からなるグループである。ApxI は強い溶血性及び細胞毒性、ApxII は弱い溶血性と細胞毒性、ApxIII はブタの好中球及び肺胞マクロファージに対する強い細胞毒性を有する。

Apx 毒素は、細菌感染に対する防御を付与するワクチンの必須要素である。近年、市販されているトキソイドワクチンは App の様々な血清型に対して強力な防御を付与することが知られている。しかしながら、ApxI、ApxII、ApxIII 及び 42 kDa の外膜タンパク質からなるワクチンは血清型 15 の HS143 株による攻撃において、ブタを防御することができなかった。

このトキソイドワクチンの失敗は ApxII と ApxIII の違い及び血清型 15 の特異的な莢膜多糖によるものと考えられる。

様々な交差防御の研究が報告されており、初期の研究によると、① 1 つの血清型による鼻腔内接種はホモ及びヘテロの血清型両方の攻撃に対する免疫を付与する、② 菌体抗原による防御は血清型

特異的であり、LPSの抗原性を共有する血清型間では交差防御する可能性があることが報告されている。たとえば、血清型2の不活化ワクチンを投与されたブタは血清型1、5、6あるいは8による攻撃に対して防御されず、血清型4あるいは5のワクチンでは血清型2の攻撃に対し、動物は防御されない。しかしながら、血清型1から6を含むワクチンは血清型2、3あるいは8での攻撃に対して完全な防御を付与した。なぜなら、血清型8は血清型3及び6の両方のLPSの抗原決定基を共有しているためと考えられる。加えて、ApxIあるいはApxI及びApxIIより作られたトキソイドワクチンは血清型1による攻撃を完全に防御した。Inzanaらの報告によると、血清型5での攻撃に対して、ブタにおいてApxIを50 µg含むワクチンの2回投与では防御は認められず、マウスにおいてApxIを25 µg含むワクチンの2回投与では防御が認められた。最近では、マウスにおいてApxIのN末端部を20 µg含むワクチンの2回投与において、ホモあるいはヘテロの血清型に対して交差防御を示すことがSeahらによって報告されている。ワクチンの違い（不活化、弱毒化及びトキソイドワクチン）、投与経路、1用量当たりの容量あるいは抗原濃度に対する免疫応答の差異、動物種の違い（ブタあるいはマウス）及びチャレンジ方法（エアロゾル、鼻腔内あるいは気管内攻撃）などの各研究における違いが、実験結果の矛盾を生み出していると考えられる。App血清型の構成あるいはワクチンにおける抗原決定基（血清型におけるApx毒素あるいはCPS及びLPSを含むタンパク質）の違いが交差防御試験の結果のばらつきに影響していると考えられる。CPSあるいはLPSが完璧な防御をもたらさないことはよく知られているが、ブタでは、ホモ株による攻撃に対して臨床症状、豚胸膜肺炎の増悪及び死亡率を低減させ、強い交差防御を示すある種の血清型の集団（例えば、血清型1、9及び11、3、6、8及び15、4及び7、5a及び5b）が交差防御を示すのは、それらのCPS及びLPSが類似あるいは同一であることによる。上記の理由とApx毒素の強力な免疫原性によって、3つの特異的なApxA毒素を含む市販のトキソイドワクチン（ApxIA、ApxIIA及びApxIIIA）ならびにその地域で最も流行している血清型の菌体成分を含むワクチン

チンが、様々な血清型に対する強力な防御を誘導する理由を説明することができる。

抗Apx抗体が様々な血清型に対して交差防御を示すかどうかに対する疑問を明らかにすることは、効果的なワクチン設計に重要である。この目的のために、我々はApp血清型2、3、4、6、8及び15のApxIIA及びApxIIIAの遺伝子的ならびに抗原性の解析を行った。

材料と方法については割愛させていただきます。

結果

apxIIA 及び *apxIIIA* 遺伝子のシーケンス解析

血清型2、3、4、6、8及び15の*apxIIA*のORFsは2868塩基から成り、956個のアミノ酸を持つタンパク質をコードしている。血清型2、3、4、6、8及び15の*apxIIA*のORFsの大きさは血清型1、5、7、9及び11～13と類似している。ApxIIAの予想される分子量は約103 kDaである。血清間のApxIIAのアミノ酸配列の類似性は99.3%から100%であった。

シーケンス解析の結果、血清型2の推定上の*apxIIIA*のORFsは3150塩基（あるいは基準株1536株は3147塩基）で1050個のアミノ酸がタンパク質をコードしており、血清型3、4、6、8及び15は3156塩基で1052個アミノ酸がタンパク質をコードしている。ApxIIIAタンパク質の予想される分子量は約120 kDaである。これらアミノ酸配列の類似性において、ApxIIIAは2つのバリエーションがあり、1つは血清型2、もう1つは血清型3、4、6、8及び15に認められる。ApxIIIAバリエーション間のアミノ酸配列の類似性はApxIIIA/2では99.05%から100%、ApxIIIA/15では99.71%から100%であり、これら2つバリエーション間の類似性は95.32%から96.38%であった。アミノ酸配列の相同性において、ApxIIIAは2つの異性体を有し、1つは血清型2、もう一方は血清型3、4、6、8及び15から成る。各ApxIIIA異性体のアミノ酸配列の相同性は、ApxIIIA/2では99.05%から100%、ApxIIIA/15では99.71%から100%であり、これら2つの異性体の間の相同性は95.32%から96.38%である。血清型2のApxIIIAは血清型3、4、6、8及び15のカ

ルボキシル末端が異なっている。特に、ノナペプチドリピートとカルボキシ末端の間に位置する、107のアミノ酸残基(878~984)は血清型2と血清型3、4、6、8及び15の間で異なっている。これらの結果は、オリジナルと対立遺伝子変異型という2つの異なるApxIII Aの型があることを示唆している。

各ApxIII Aのアライメント解析により、2つの多形領域(878~914及び947~970残基)の間に位置する922~942残基間の保存されたアミノ酸配列(WFKE[G]GNK[S]YNHKIEQIVDKNGR)が明らかとなった。そして、アミノ酸配列の*in silico*解析によると、血清型2のApxIII Aの878~984残基の三次元構造は血清型3、4、6、8及び15のApxIII A配列と異なっている。アミノ酸領域の疎水性プロファイルは2つのApxIII A異性体間でも異なっている。まとめると、これらの結果はアミノ酸配列の一次構造だけでなくApxIII Aタンパク質の高次構造にも変異があることを示唆している。

rApxII A及びrApxIII Aの発現と精製

血清型2及び15のapxII A Δ CA::His_{x6}で識別されたDNA断片はその大きさが3043塩基(172塩基がapxIIC、2850塩基がapxII A、18塩基がHisタグ、3塩基が停止コドン)であることが、増幅したDNA断片のシーケンズ解析から明らかとなった。そのDNA断片をクローニングベクターpGEM-T Easy内でクローニングし、rApxII Aタンパク質はlacZプロモーターを用いて発現した。精製したrApxII Aタンパク質はSDS-PAGEにおいて103 kDaに明瞭なバンドが認められた。血清型2及び15のapxIII A Δ CA::His_{x6}で識別されたDNA断片はそれぞれ3234塩基(81塩基がapxIIC、3132塩基がapxIII A、18塩基がHisタグ、3塩基が停止コドン)及び3240塩基(81塩基がapxIIC、3138塩基がapxIII A、18塩基がHisタグ、3塩基が停止コドン)であった。前記の方法と同様に精製したrApxIII AはSDS-PAGEにおいて約120 kDaに単一バンドとして認められた。

rApxII A及びrApxIII Aタンパク質のポリクローナル抗体への反応性

様々な血清型のAppに感染したブタ及びマウス

の血清に対する、rApxII A及びrApxIII Aタンパク質の反応性について、イムノブロットング法を用いて調べた。血清型2、3、4、6、8及び15に感染したマウス由来の血清はrApxII A/2(血清型2由来の組み換えrApxII Aタンパク質)及びrApxII A/15(血清型15由来)のタンパク質に非常に強く反応し、様々な血清型間のApxII Aタンパク質と同様の抗原性を示した。同様に、App血清型2ならびに3、6、8及び15(それぞれApxIII A/2及びApxIII A/15を発現)に感染したブタ及びマウスの血清はrApxIII A/2及びrApxIII A/15タンパク質に強く反応した。これらの結果は、様々な血清型(ApxIII Aを発現する)に感染した動物も2つのrApxIII Aタンパク質に反応する抗体を作ること示している。

能動免疫試験

続いて、我々はrApxIII A/2あるいはrApxIII A/15の投与によって交差防御が可能かについて検討した。この目的のために、rApxIII A/2及びrApxIII A/15タンパク質をマウスに2回投与し、その後ApxIII A/2を発現するApp血清型2の885-3株及びSHP-1株ならびにApxIII A/15を発現するS1421株(血清型3)、M-62株(血清型4)、Femo(血清型6)、405株(血清型8)及びHS143(血清型15)を腹腔内投与し、攻撃した。

ApxIII A/2を発現するApp血清型2の885-3株及びSHP-1株で攻撃後、対照群のマウス10頭は元気消失や食欲不振といった臨床症状を示し、3日以内に全頭死亡し、一方、rApxIII A/2及びrApxIII A/15で投与した群のマウスは試験終了日(7日)まで全頭生残した(表1)。ApxIII A/15を発現する血清型15のHS143株で攻撃した場合は3日以内に9匹(90%)の対照マウスが死亡したが、rApxIII A/2及びrApxIII A/15を投与したマウスは10匹(100%)生残した。rApxIII A/2あるいはrApxIII A/15のいずれかを投与したマウスは、ホモ株だけでなく、ヘテロ株(ApxIII A/2を発現するApp血清型2あるいはApxIII A/15を発現する血清型15のHS143株)によっても防御された。これらの結果は、rApxIII A/2あるいはrApxIII A/15いずれかを投与したマウス及び対照マウスに、ApxIII A/15を発現する種々の血清型のApp株を投

表1 様々な App 血清型での攻撃後 1 週の rApxIII A/2 あるいは rApxIII A/15 投与マウスの生残率

群	攻撃株(血清型)													
	885-3(2)		SHP-1(2)		HS143(15)		S1421(3)		M62(4)		Femo(6)		405(8)	
	生残率	p値	生残率	p値	生残率	p値	生残率	p値	生残率	p値	生残率	p値	生残率	p値
rApxIII A/2投与	100%	0.0000	100%	0.0000	100%	0.0001	100%	0.0010	100%	0.0001	100%	0.0034	100%	0.0010
rApxIII A/15投与	100%	0.0000	100%	0.0000	100%	0.0001	100%	0.0010	100%	0.0001	100%	0.0034	100%	0.0010
対照	0%		0%		10%		30%		10%		40%		30%	

与した場合の結果に類似していた。rApxIII A/2 あるいは rApxIII A/15 を投与した群の全てのマウスが生存していたのに対し、非投与対照群の 70%、90%、60% 及び 70% が App 血清型 3、4、6 及び 8 での攻撃後に死亡した。統計学的解析において、rApxIII A/2 あるいは rApxIII A/15 を投与したマウス群間での生残数に有意な差は認められなかった。しかしながら、対照群と rApxIII A/2 あるいは rApxIII A/15 を投与した群との間に統計学的な有意差が認められた。これらの結果は、このマウス攻撃モデルにおいて rApxIII A がホモあるいはヘテロの ApxIII A を発現する App による攻撃に対して交差防御を付与することを示している。

受動免疫試験

次に、抗 rApxIII A/2 及び抗 rApxIII A/15 血清がホモ及びヘテロ血清型の攻撃に対して交差防御を付与できるかどうかを調べた。各 10 匹の動物からなる群に、抗 rApxIII A/2 あるいは抗 rApxIII A/15 血清を 18 時間間隔で 2 回投与し、血清型 2 及び 15 に属する株を高濃度あるいは低濃度で攻撃し、臨床症状及び死亡について毎日 7 日間観察した。

血清型 2 及び 15 の高濃度での攻撃において、抗 rApxIII A/2 あるいは抗 rApxIII A/15 血清で処置したマウスでは 4～5 匹のみ (40%～50%) が 4、5 及び 6 日目に死亡したのに対し、対照群のマウスは 9～10 匹 (90%～100%) が 3 日以内に死亡した (表 2)。血清型 2 及び 15 の低用量での攻撃において、

抗 rApxIII A/2 あるいは抗 rApxIII A/15 血清で処置したマウスの 10 匹 (100%) が攻撃後 7 日まで生存したが、対照群のマウスは 3 日以内に 9 匹 (90%) 死亡した。これらの結果から、抗 rApxIII A/2 及び抗 rApxIII A/15 血清が、ホモ及びヘテロの血清型 (ApxIII A を発現する) 株による攻撃に対する防御を付与すると考えられた。

rApxIII A/2 及び rApxIII A/15 抗原に対する抗体応答

組換えタンパク質 (rApxIII A/2 及び rApxIII A/15) を投与したマウス及び血清型 2 の 885-3 株及び血清型 15 の HS143 株でそれぞれ攻撃したブタにおける体液性の抗体応答について、ヒスチジンタグを付与した ApxIII A/2 及び ApxIII A/15 タンパク質ならびに Histag-COOH を対照タンパク質としてコートした抗原を用いた ELISA で評価した。rApxIII A/2 あるいは rApxIII A/15 の投与または 885-3 株及び HS143 株での攻撃によって、ホモ及びヘテロの rApxIII A 抗原に対する抗体は有意に増加したが、対照抗原である rSpaC253 に対しては増加しなかった。ホモの抗原を用いて得られた ApxIII A 特異的抗体は、ヘテロの抗原で認められたものとはほぼ同等であった。

考察

最近の研究によると、ApxI、ApxII 及び ApxIII (ApxI 及び III よりは関与が弱い) が豚胸膜肺炎の

表2 様々な App 血清型での攻撃後 1 週の抗 rApxIII A/2 血清あるいは抗 rApxIII A/15 血清投与マウスの生残率

群	攻撃株(血清型)							
	885-3(2)				HS143(15)			
	H		L		H		L	
生残率	p値	生残率	p値	生残率	p値	生残率	p値	
抗rApxIII A/2血清投与	50%	0.0098	100%	0.0001	60%	0.0191	100%	0.0001
抗rApxIII A/15血清投与	50%	0.0098	100%	0.0001	50%	0.0510	100%	0.0001
対照	0%		10%		10%		10%	

臨床的徴候及び特徴的な出血性病変の発症に関与していることが示唆されている。多くの研究から、ApxI 及び II の両方あるいはいずれか一方の毒素に対する抗体は、ApxI 及び II の両方あるいはいずれか一方及び ApxIII を産生する App 血清型 1、2、5 及び 10 のホモ及びヘテロ株による攻撃に対して防御を示すことが明らかとなっている。血清型 2、3、4、6、8 及び 15 由来の ApxIII の防御効果に関する情報はほとんど報告されていない。さらに、新世代のワクチンを用いた近年の研究において、ワクチンが HS143 株 (血清型 15) の攻撃に対して、有意な防御を付与できないことが示された。病気に対するより効果的なワクチン開発のための基礎データを得るために、本研究では、血清型 2、3、4、6、8 及び 15 からの ApxIIA 及び ApxIIIA の遺伝子的及び抗原性の特性を調べた。

apxII 遺伝子はすでに血清型 5 については Chang ら、血清型 9 は Smits らによって同定及び特定されている。後に、Jansen らは、*apxIIA* 遺伝子が、血清型 6 を除いた血清型 1～9、11 及び 12 の参照株に存在し、これらは高度の配列類似性を有していることを報告した。これらの発見は、ゲノム DNA の制限酵素断片の遺伝子解析の結果及び 3.2 kbp の *apxIIA* 遺伝子の PCR 増幅産物の結果に基づいている。彼らの結果は、他の研究者によって報告された結果と併せて、ApxIIA タンパク質が血清型 1～9、11～13 及び 15 の参照及び野生株の間で高度の配列類似性 (99.3%～100%) を有することを示した。さらに、rApxIIA タンパク質 (血清型 2 及び 15 の *apxIIA* 遺伝子から調製) 及び ApxIIA ポリクローナル抗体 (血清型 2、3、4、6、8 及び 15 に感染したマウス由来) のイムノブロット法で認められた強い反応は、血清型 2、3、4、6、8 及び 15 の ApxIIA タンパク質が他の血清型のものと遺伝子的及び抗原的に非常に類似していることを示唆している。

本研究で行われたシーケンス解析により、*apxIIIA* 遺伝子が、血清型 3、4、6、8 及び 15 と血清型 2 のみの 2 つの変異体に分類されると示唆された。ノナペプチドリピートとカルボキシル末端の間に位置する 2 つの多型領域 (アミノ酸残基 878～914 及び 947～970) における血清型 2、3、4、6、8 及び 15 の 2 つの ApxIIIA 変異体間の配列に違いが認められた。2 つの多型領域は、保存領域 (922

～942 塩基) に存在する。保存されたアミノ酸配列が、ロイコトキシンの 840～871 のエピトープあるいは HlyA の 914～936 のエピトープの配列と類似しており、これらの毒素が白血球の $\beta 2$ インテグリン受容体あるいは赤血球のグリコフォリン受容体に結合し、毒性を発現するために非常に重要な部位であることは注目すべき点である。

他の RTX 毒素にもアミノ酸の相同配列があることが知られており、大腸菌の HlyA、*Mnnheimia haemolytica* のロイコトキシン、*Bordetella pertussis* 由来のアデニル酸シクラーゼ毒素及び *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 由来のロイコトキシンなどが、同様の機能で作用することが知られている。

興味深いことに、ApxIA タンパク質は、Apx 毒素の中でも血清型 1、9 及び 11 型と血清型 5 及び 10 型の 2 種類がある。C 末端では、37 個のアミノ酸のうち 17 個が 2 つの ApxIA 変異体の間で異なる。C 末端領域の最後の 50 残基は、HlyB/HlyD 型トランスロケーターによる ApxIA 及び HlyA の細胞外への分泌に必要であると考えられている。したがって、2 つの ApxIA 変異体は分泌過程に特徴が認められる。ApxIA のアミノ酸配列の相違と同様に、ApxIIIA の配列の違いは、この領域の二次構造及び疎水パターンの違いに寄与する。よって、この領域が ApxIIIA のタンパク質分泌に関与していると推定される。

血清型 2 あるいは 15 に由来する 2 つの rApxIIIA タンパク質が、血清型 2、3、4、6、8 及び 15 の攻撃に対する交差防御を示すことは、Dom ら、Rycroft ら、Macdonald 及び Rycroft による以前の報告の結果と一致する。Dom らは、ブタ肺胞マクロファージの活性に対する血清型 2 及び 3 の毒性は、血清型 2 あるいは 3 の不活化された App 株で吸着したホモ及びヘテロの回復期のブタ血清によって中和されることを報告した。Rycroft らもまた、血清型 2 由来の天然及び組換え ApxIIIA によるブタ肺胞マクロファージに対する細胞傷害活性が、血清型 3 の感染後の回復期のブタ血清によって中和されることを発見した。

精製された rApxIIIA/2 及び rApxIIIA/15 タンパク質を投与したマウスでは、rApxIIIA/2 及び rApxIIIA/15 タンパク質に対する ELISA において、強い体液性免疫応答が認められた。rApxIIIA/2 あるいは rApxIIIA/15 の投与によって誘導された免疫

応答は、血清型 2 及び ApxIII A/2 及び ApxIII A/15 をそれぞれ発現する血清型 3、4、6、8 及び 15 の App による攻撃を十分に防御した。受動免疫試験の結果は、能動免疫実験から得られた結果と一致する。この結果は、ApxIII A の投与によって誘導される防御が、ホモあるいはヘテロの ApxIII A を発現する特定の血清型に限定されないことを明らかにした。この結果とイムノプロット法の結果から、血清型 2、3、4、6、8 及び 15 に感染したマウス由来の抗 rApxIII A/2 あるいは抗 rApxIII A/15 マウス血清は、血清型 2 の代表的な株により産生された rApxIII タンパク質と強く反応することが明らかとなった。さらに、それぞれ血清型 2 (885-3 株) あるいは 15 (HS143 株) に感染したブタの回復期の血清が、イムノプロット及び ELISA に利用されていることから明らか様に、rApxIII A/2 及び rApxIII A/15 タンパク質と同等に反応する。同様に、ApxI A タンパク質は 2 つの変異体を有し、*apxI A* 遺伝子から得られた組換え N 末端断片 (残基 40 ~ 380) は、血清型 1、5 及び 10 の攻撃に対してマウスを防御すると報告されている。ApxIII A によるマウスの交差防御に関する我々の結果は、Tumamao らの結果と異なっており、市販のトキソイドワクチンを投与したブタは HS143 株 (血清型 15) の攻撃に対して、有意な防御を与えることができないことを示した。Tumamao らの結果と我々の結果との間の相違の理由は明らかではないが、ブタとマウスという実験系の違いがあり、移行抗体の影響及び ApxIII A 濃度の違いの両方あるいはいずれかによるものと考えられる。同様の結果が ApxI A について報告されている。ApxI の N 末端断片を投与されたマウスは、複数の血清型の攻撃に対して防御が認められる。ApxI A あるいは ApxI A 抗血清を投与されたマウスでは防御が認められるが、ApxI A を投与されたブタでは、ホモ株の攻撃に対して防御されなかったと別の研究で報告されている。Tumamao らの最近の報告によると、市販のトキソイドワクチンを投与したブタは、ApxI、ApxIII、42 kDa の外膜タンパク質及び血清型 1 特異的多糖に対する有意な抗体を産生したが、血清型 15 特異的多糖については十分ではなく、攻撃濃度が高濃度という条件ではあるが、血清型 1 に対しては防御が認められ、血清型 15 に対しては認められなかった。これらの知見は、他の研究者に

よって報告された結果とあわせて、血清型 15 特異的多糖に対する抗体の不在が、市販のトキソイドワクチンによる HS143 株 (血清型 15) に対する防御効果が限定されたものとなるという結果と一致している。

抗 rApxIII A/2 抗体あるいは rApxIII A/15 抗体が血清型 2 及び 15 による攻撃に対してマウスを防御するメカニズムは、本研究では明らかにされていない。それにもかかわらず、Crujisen、Dom 及び Udeze ならびに Kadis らは、抗 Apx 抗体がブタの好中球あるいは単球及び多形核白血球内の細菌の取り込み及び死滅を増強することを示している。抗 rApxIII A 抗体は、毒素の活性部位に近い、生物学的に活性な部位あるいはエピトープに結合し、その後、ApxIII A に対し強固に結合した抗体が毒素の活性を減少あるいは完全に排除し、毒素と好中球あるいは食作用との相互作用を減少させる。毒素に対する中和抗体は細菌による細胞障害を抑制すること及び多形核白血球は、抗体による作用がない食細胞より、オプソニン化された細菌を明らかに高い割合で取り込むことはよく知られている。しかしながら、Apx 毒素に対する抗体とともに荚膜多糖や膜タンパクの表面に露出したエピトープは、効率的な細胞性の食作用及び App の被包化に必要である。抗 Apx 抗体は、細菌表面上の Apx タンパク質に結合し、食細胞による細菌取り込み及び死滅を増強する。マクロファージ内では、細菌への抗体の結合により、細菌の酸化的破裂が誘発され、細菌の複製も妨げる。

十分な抗体が受動免疫された場合、あるいは適量量の細菌を感染させた場合、試験動物のほとんどは生存すると考えられる。過去のいくつかの研究により、毒素で能動免疫されたマウスあるいはブタ、または ApxI 特異的抗体を投与したマウスあるいはブタが、ホモの血清型株による攻撃に対して防御されることが示された。防御における CPS 及び LPS に対する抗体の役割は、他の研究者によって報告されている。興味深いことに、大石らは、CPS に対する mAb のみ、あるいは ApxI に対する mAb のみをマウスに投与するより、血清型 5 の CPS に対する mAbs 及び ApxI を組み合わせて投与する方が、血清型 5 で攻撃された場合のマウスの生残率は高かった。さらに、市販のトキソイドワクチンの防御

効果を評価した最近の研究により、特定の血清型 (CPS 及び LPS を含む) に対する抗体ならびに 3 つの App 毒素 (ApxI、ApxII 及び ApxIII) に対する抗体が、豚胸膜肺炎に重要な役割を果たしていることが示されている。本研究は、血清型 2、3、4、6、8 及び 15 の ApxIIA タンパク質が、遺伝子的及び抗原的に他の血清型の ApxIIA タンパク質と非常に類似していることならびに ApxIIIA タンパク質は抗原的に非常に類似した 2 つの ApxIII 変異体を有することを明らかにした。App によって引き起こされる豚胸膜肺炎に対するより、安全でより効果的なワクチン開発において、Apx 毒素の抗原の類似性が考慮されるべきである。

参考文献につきましては割愛させていただきます。

所感

本研究において、App のもつ RTX 毒素である Apx 毒素に対する抗体の存在が App の感染に対して重要な役割を示すことが明らかとなった。また、App には現在知られている中でも 16 個の血清型が存在し、その各血清型間での交差防御効果については報告によって様々であることから、App が共通にもつ Apx 毒素に対するワクチンはその感染制御に重要と考えられる。今回、同じ App の ApxIIIA 間でも各血清型間において遺伝子的に若干の差異があることが明らかとなった。その違いがブタへの免疫原性において、どの程度あるいはこういった違いを生じるのかについては非常に興味深い。

発表論文紹介

ヒトアポリポ蛋白 (a) 遺伝子導入 NIBS 系ミニブタの作出

島津美樹

Production of human apolipoprotein (a) transgenic NIBS miniature pigs by somatic cell nuclear transfer.

Shimatsu Y¹, Horii W¹, Nunoya T¹, Iwata A¹, Fan J¹, Ozawa M¹.

¹ Nippon Institute for Biological Science, 9-2221-1 Shinmachi, Ome, Tokyo 198-0024, Japan.

Exp. Anim. 2016. **65**(1) : 37-43

背景

2014 年、世界保健機関は 2000 年から 2012 年までの間の死亡原因上位 10 を公表し、その第 1 位は虚血性心疾患、第 2 位は脳血管障害が占めた。これら疾患の大部分は動脈硬化が起因となり得る。

リポ蛋白 (a) (リポ (a)) は動脈硬化の危険因子として注目されており、糖蛋白に富んだアポリポ蛋白 (a) (アポ (a)) と低比重リポ蛋白 (LDL) のアポリポ蛋白 (B) (アポ (B)) の結合により構築されている。リポ (a) の生理学的機能は不明確な部分が多いが、酸化リン脂質中で選択的に高濃度となることが解明された。さらに、選択的にアテローム性動脈硬化障害を引き起こすことから、アポ (a)

はアテローム性動脈硬化障害に対するプロトロンビンの潜在性、コレステロール、脂質および炎症誘発性酸化リン脂質との深い関連性を有していると考えられている。アポ (a) はヒト、旧世界ザルおよびハリネズミしか有さない非常に特殊な蛋白であるため、ヒトアポ (a) 遺伝子を導入したウサギが作出され、動脈硬化症研究に成果をもたらした。

ブタのコレステロール代謝とリポ蛋白代謝、さらに、コレステロールと脂肪に対する生体反応はヒトに類似しており、コレステロール関連疾患の動物モデルとして使用されている。雑食性であることも有用性が高い。本研究は、動脈硬化症動物モデルとなり得るヒトアポ (a) 遺伝子導入 NIBS 系ミニブタ作出を目的に行った。

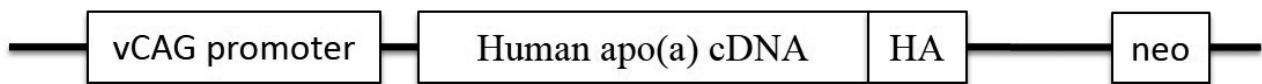


図1 pC-apo (a) HA コンストラクトの構築

材料及び方法

供試動物

1～4才齢の9頭のNIBS系ミニブタを仮腹動物に供試した。動物のケアと取り扱いは日生研実験動物福祉並びに動物実験管理に関する規程に従った。

ベクターの構築

本研究では、図1に示すプラスミドベクターを用いた。アポ(a)にはヘマグルチニン(HA)タグを付け、プライマー配列ATCCCTCTCTGTGCATCCTCTおよびCGAATTATTTCTCATCATTCCCTCAAとテンプレートとしてアポ(a) cDNAを用いた。T4 DNAポリメラーゼでプラントエンドさせた後、PCR産物のクローニングを行った。

ドナー細胞とトランスフェクション

生後1日齢の雄および10日齢の雌のNIBS系ミニブタ1頭ずつを由来とする腎由来初代培養細胞へアポ(a)を導入し、G418で遺伝子導入細胞株を選択後、免疫染色でアポ(a)発現株を樹立した。7～10代継代した細胞をドナー細胞として用いた。

レシピエント卵子

食肉センターから採材したブタ卵巣から卵子を回収した後、島津らの報告に従い、卵子の体外成熟培養、更に、体外成熟卵子の裸化処理を行い、レシピエント卵子を準備した。

核移植

マイクロマニピュレーターを用いて核移植操作を行った。再構築した胚に対して、直流パルスを用いた電気刺激および6-ジメチルアミノプリンによる化学物質刺激を施した。

胚移植

島津らの報告に従い、仮腹ミニブタの発情を人為的にコントロールした。開腹下にあるミニブタの片側の卵管膨大部に少量の培地と共に再構築直後の胚を挿入することで、移植を行った。

遺伝子診断

得られたすべての子ブタは、既報に従い、ヒトアポ(a)遺伝子を解析した。

血清中リポ(a)および脂質の解析

作出された遺伝子導入ミニブタの血清中リポ(a)、総コレステロールおよび中性脂肪を解析した。

精液性状検査

性成熟後の遺伝子導入ミニブタ(雄)の精液性状を島津らの報告に従い検査した。

結果

3頭の雄のヒトアポ(a)遺伝子導入NIBS系ミニブタの作出に成功し、その効率は1.1%を示した(表1および図2)。しかし、2頭(Tg #6および

表1 ヒトアポ(a)遺伝子導入NIBS系ミニブタの作出効率

総胚数	移植胚数	仮腹ブタ数	分娩ブタ数(%)	子ブタ数	子ブタ数/ 移植総胚数(%)
275 ^a	136, 139	2	1 (50)	3 ^d	3/275 (1.1)
937 ^b	133.9 ± 9.5 ^c	7	4 (57)	8 ^e	8/937 (0.9)

a ドナー細胞は生後1日齢の雄の子ブタから樹立した。

b ドナー細胞は生後10日齢の雌の子ブタから樹立した。

c 平均 ± 標準偏差

d 子ブタの娩出時体重は300、480および480gであった。

e 4頭の死産と1頭の胎子ミイラ変性を含む子ブタの娩出時体重は309 ± 82.0gであった。



図2 ヒトアポ (a) 遺伝子導入 NIBS 系ミニブタに関する PCR 解析

#7) は生後 1~2 日齢で仮腹ブタの下敷きとなり圧死した。雌の遺伝子導入ミニブタは 8 頭得られ効率は 0.9%であったが、正常に生まれた 3 頭中 1 頭 (Tg #11) は、出生後間もなく仮腹ブタと分娩房の間に挟まれ圧死した。また、4 頭 (Tg #5、#8、#9 および #10) の死産と 1 頭 (Tg #4) の胎子ミイラ変性が含まれた。なお、胎子ミイラ変性の個体の DNA は精製に至らなかった。

1 頭 (Tg #3) の雄および 2 頭 (Tg #1 および #2) の雌のヒトアポ (a) 遺伝子導入ミニブタの長期間の飼育に成功した (写真 1)。Tg #1 の血清中リポ (a) 濃度は対照個体と同様に調査したすべてのポイントにおいて 1 mg/dL 以下を示したのに対し、Tg #2 および #3 では高値で推移した。特に、Tg #3

の数値は加齢に伴う上昇が認められた (図 3)。血清中総コレステロール値はすべてのミニブタで同様なパターンを示したが、中性脂肪については、Tg #1 の数値がほかの遺伝子導入ミニブタおよび対照個体に比較して高値であった (図 4)。10 ヶ月齢に達した Tg #3 の精液性状を検査したところ、精液量 57.5 mL、精子運動性 13.0% および精子濃度 6,600 万精子 /mL であった (表 2)。

考察

本研究において、動脈硬化症研究に有用なモデルとなり得るヒトアポ (a) 遺伝子導入 NIBS 系ミニブタの作出に成功した。ミニブタの作出効率は以前



写真 1 ヒトアポ (a) 遺伝子導入 NIBS 系ミニブタ 3 頭 (左端: 雄 Tg #3、2 ヶ月齢、6.3 kg、中央: 雌 Tg #2、3 ヶ月齢、9.8 kg、右端: 雌 Tg #1、4 ヶ月齢、12.7 kg)

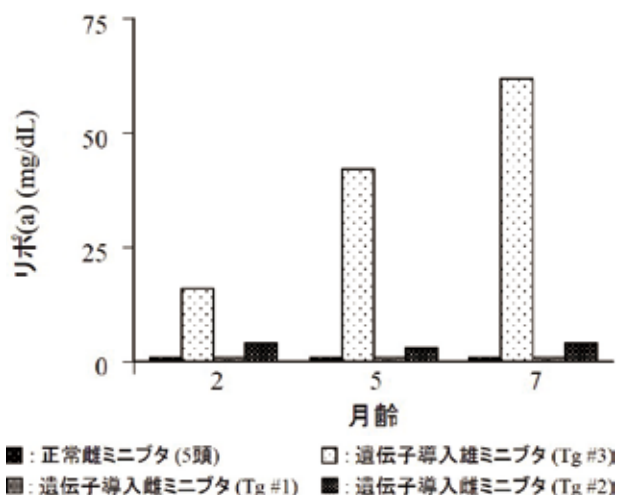


図3 ヒトアポ (a) 遺伝子導入 NIBS 系ミニブタに関する血清中リポ (a) 濃度の解析

報告した我々のデータ、さらに、家畜ブタでの報告と同様な値であった。ミニブタは家畜ブタと比較した場合、サイズおよび扱い易さでアドバンテージが高い。NIBS系ミニブタは1993年に確立され、1歳齢の体重は約30kgであり比較的温厚な性格を有する。

リポ (a) は動脈硬化の危険因子として注目されており、糖蛋白に富んだアポ (a) と LDL のアポ (B) の結合により構築されている。アポ (a) はヒト、旧世界ザルおよびハリネズミしか有さない非常に特殊な蛋白であることから、我々は核移植技術によりヒトアポ (a) 遺伝子を導入した NIBS 系ミニブタの作出を立案し、成功した。

本研究では、アポ (a) 濃度の指標として血清中リポ (a) の解析を行った。その結果、遺伝子導入ミニブタ3頭中2頭(雄雌1頭ずつ)のリポ (a) 濃度が高く、特に雄のブタの数値は加齢に伴い上昇していた。残り1頭(雌)では1mg/dL以下を示した。濃度測定に用いたラテックス凝集比濁法は1mg/dL以下の正確な数値を測定できなかったため、この雌のミニブタの血清中リポ (a) 濃度は明らかではない。一方、通常ブタはリポ (a) を有さないため、1mg/dL以下を示した対照個体となるミニ

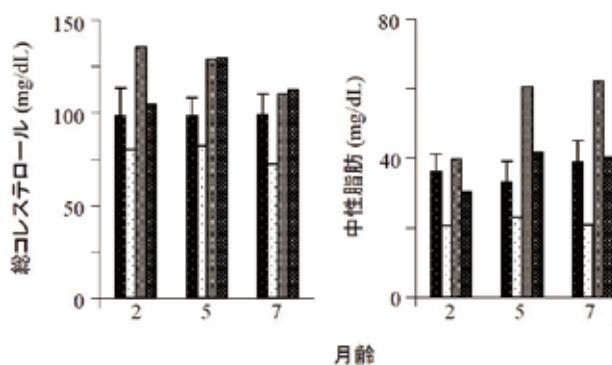


図4 ヒトアポ (a) 遺伝子導入 NIBS 系ミニブタに関する血清中総コレステロール濃度および中性脂肪濃度の解析

ブタの値は0であったと考えられた。今回、ヒトアポ (a) 遺伝子は山梨大学範教授より提供頂いた。教授らのグループはヒトアポ (a) 遺伝子を導入したウサギの作出に成功し、血中のリポ (a) 濃度は約3mg/dLであったことを報告している。また、得られた遺伝子導入ウサギのヒトにおけるアポ (a) レベルとしては相対的に低いものと結論付けている。

ところで、ヒトおよびブタでは肝臓のアポ (B) mRNA 編集酵素1 (APOBEC-1) の発現が認められず、ウサギにおいては発現が非常に低い。これらの種では、APOBEC-1はカイロミクロンを構成するアポ (B) -48と超低比重リポ蛋白 (VLDL) および LDL を構成するアポ (B) -100のうちアポ (B) -100のみを産生するため、ヒトアポ (a) 遺伝子導入ミニブタは、ヒトアポ (a) と APOBEC-1によるアポ (B) -100の結合に成功したと考えられた。

一方、コレステロールエステル転送蛋白 (CETP) は、高比重リポ蛋白 (HDL) からアポ (B) を含有するリポ蛋白までコレステロールエステルの転送に触媒作用をおよぼし、コレステロール逆輸送経路のために重要な蛋白であると考えられると共に、アテローム性動脈硬化症防御作用に関与する。ブタは

表2 ヒトアポ (a) 遺伝子導入 NIBS 系ミニブタ (Tg #3) の精液性状

精液量 (mL)	精子運動性 (%)	精子濃度 (x 10 ⁸ /mL)	総精子数 (x 10 ⁸)
57.5 ± 8.29	13.0 ± 0.2	0.66 ± 0.18	30.2 ± 2.3

平均 ± 標準偏差

CETP 活性を有さない、もしくは、極めて低いことが知られており、ヒトアポ (a) 遺伝子導入ミニブタの CETP 活性値を調べることは病態を解析する上で重要である。

ヒトアポ (a) 遺伝子導入ミニブタの精液性状は、ほかの系統ミニブタで報告されているデータと比較して差異は認められなかった。しかし、精子の運動性および濃度において若干低い傾向が認められ、通常の人工授精には用いることは困難である。そのため、子宮深部人工授精技術を検討する必要があると考えられた。

また、一般にブタは精液性状の個体差が大きく、原因として遺伝的要因が大きく関与していることが

報告されている。本研究におけるヒトアポ (a) 遺伝子と精液性状の関係は定かではないが、ドナー細胞由来のミニブタの遺伝的背景についても調査する必要があると考えられた。

本研究において、動脈硬化症研究に有用なモデルとなり得るヒトアポ (a) 遺伝子導入 NIBS 系ミニブタの作出に成功した。今後、同病態ミニブタのコロニーを確立する予定である。

参考文献につきましては割愛させていただきます。

本稿は *Exp Anim* 2016; **65**(1):37-43 に掲載された論文を編集・日本語訳したものである。

学会参加記

第 48 回 全米養豚開業獣医師協会年次大会 (48th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians)

場所：アメリカ・コロラド州
期間：2017 年 2 月 25 日～28 日

林 志 佳

はじめに

米国養豚開業獣医師協会 (AASV) は米国の養豚開業獣医師を中心に、関連産業従事者ならびに研究者を含め、40 カ国以上に約 1,300 の会員をもつ団体である。今回、私は AASV の第 48 回年次総会に、ポスター発表を行った当所の佐藤研究員と共に参加した。本年の開催地であるコロラド州デンバー市へは、日本からの直行便も飛んでおり、機上からだけでなく、市内に移動してからも常に遠景に見える雄大なロッキー山脈が印象的であった。会場であるハイアットリージェンシーホテル (写真 1) のあるダウンタウン周辺は、16 番通りを中心に飲食店や土産物屋が並び、のんびりと落ち着いた雰囲気であった。総会はホテルの 2 フロアを利用し、同時に最大 4 部屋でセッションが行われた (写真 2)。総会には

1,200 人程度が参加しており、3 日間で 2 題の基調講演と 100 題を超える一般口演、60 点のポスター発表があった。企業ブースも 80 を超える出展があり、非常に盛況であった。本学会参加記では、感染症に関する演題の中で、筆者が興味深く感じた演題について報告する。

興味深かった演題

演題：近年の 2 型強毒株 PRRSV に対する、広範な中和抗体 (Broadly neutralizing antibodies to recent, virulent type 2 PRRSV isolates)

演者：Michael P. Murtaugh (University of Minnesota)

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス (PRRSV) は、高頻度に遺伝子変異を起こすウイルスであり、多様な抗原性の野外株が存在する。ウイルスエンベロー



写真1 大会会場のホテル(左) およびホテルからのウェルカムボード(右)

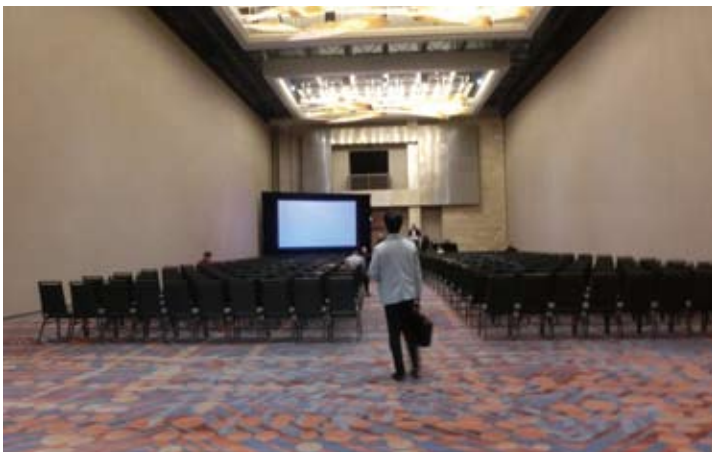


写真2 口頭発表会場(左) およびポスター発表会場(右)

プを構成する遺伝子の中で、主要な中和抗体を誘導する GP5 糖蛋白質をコードする ORF5 遺伝子領域に変異が集中するため、抗原交差性を乏しくさせていることは、PRRSV の制御を難しいものとする一因と考えられている。演者らは高病原性株の発生した農場または繰り返し馴致をされた繁殖母豚群において、広範な中和スペクトラムを有する抗体があることを発見した。

ワクチン、馴致および自然感染のために複数の PRRSV に感染歴のある農場の繁殖雌豚から血清を採取し、ELISA 法の原理を応用した中和試験法によって、遺伝子型が 1 型の SDEU 株およびレリストッド株、2 型の VR2332 株および MN184 株、2 型

の強毒株である MW174 株および NC134 株に対する中和抗体価を測定した。

ワクチン接種を受けている繁殖母豚から採取された血清 20 検体は、全検体がワクチン株 VR2332 株への 15 ~ 256 倍の中和抗体価を示した。90% が MN186 株に 4 ~ 60 倍、1 型である SDEU 株に対しても 20% が 4 ~ 8 倍の中和抗体価を示した。強毒株である MW174 株の流行のあった 2 農場の繁殖母豚から採取された 10 検体は、全検体とも VR2332 株、MN184 株、MW174 株および NC134 株、さらに 1 型である SDEU 株に対して中和活性を持っており、そのうち 22% が 256 倍以上の高い中和抗体価を示した。このように複数のウイルス株に感染歴

をもつ個体は、多様な抗原性のウイルスに対して高い中和抗体価を有することが示された。

この現象をワクチンとして再現できれば、多くの PRRSV 株に対して交差免疫を誘起することができ、PRRSV の撲滅に有用であると感じた。演者らはこの多様な免疫応答の元となるメカニズムについては未解明であると論じており、さらなる研究が待たれる。

演題：Senecavirus A に関する感染実験の総説 (Senecavirus A: Overview of experimental studies)

演者：Alexandra Buckley (Oak Ridge Institute for Science and Education and National Animal Disease Center)

Senecavirus A (SVA) は口蹄疫ウイルスと同じピコルナウイルス科に属し、突発性水泡病 (Idiopathic Vesicular Disease/ IVD) の原因として知られていた。2015 年夏頃から米国において IVD が散見されるようになり、早期病変からの分離ならびに病態再現のための感染実験によって、その原因が SVA であることが明らかとなった。本発表ではこれまでに行われた SVA の実験感染について、総括的に報告された。

豚に 2015 年に米国で分離された株 (SVA 15-41901SD) 10^6 TCID₅₀/mL を 5 mL 点眼投与し、病態の再現性、垂直・水平感染の成立要件、免疫応答および最小感染量を検討した。

接種 3～5 日後頃から蹄冠部に病変が見られ始め、その 2～3 日後に鼻部に病変が形成され、12 日目ごろまでに完治した。接種 7～10 日目にはウイルス血症が認められ、直腸および口腔スワブには 4 週間後まで SVA が検出された。妊娠豚では、分娩の 10 日以前に感染した母豚の子豚から SVA は検出されず、垂直感染は成立しなかった。しかし、母乳ならびに糞便中に SVA は検出された。群内での水平伝播の動態について検討したところ、感染から 2 週間以内に豚の鼻同士が接触することによって伝播が成立した。攻撃の 4.5～5 か月前に初めて SVA に暴露されていた候補豚は、256～4,096 倍の中和抗体価を示し、攻撃後もウイルスは検出されず、病変も認められなかったことから、SVA に対する感染防御免疫を獲得していることが示された。SVA の最

小感染量は、 $10^{2.5}$ TCID₅₀/mL であった。

本ウイルスはこれまでに日本での発生報告はないが、今後日本に侵入してくる可能性はある。SVA の疾病コントロールのためには、本発表で紹介されたような地道な知見の積み重ねが重要であると感じた。

演題：母豚および哺乳子豚における *Mycoplasma hyorhinis* および *Mycoplasma hyosynoviae* の共感染 (*Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma hyosynoviae* dual colonization of dams and piglets prior to weaning)

演者：Maria Pieters (University of Minnesota)

Mycoplasma hyorhinis は、哺乳豚に多発性漿膜炎および関節炎を引き起こし、死亡の重要な一因として関心を集めるようになっている病原体である。一方、*Mycoplasma hyosynoviae* は、10 週齢以上の豚に重度の関節炎を引き起こす。アイオワ州立大学獣医診断研究所 (ISU-VDL) の調査では、2003 年から 2010 年の間に米国中西部で 431 例の跛行を診断した。そのうち全体の 17% を *Mycoplasma* 種によるものと診断した。さらに、2010 年にはその頻度は 37% まで増加し、注目を集めている病原体群である。本発表では母豚およびその哺乳子豚の同一群の中での両 *Mycoplasma* の感染動態を調査した。

跛行の既往歴のある農場の母豚 29 頭およびその子豚 120 頭から、分娩後 1 および 3 週に扁桃スワブを採取し、種特異的リアルタイム PCR で両 *Mycoplasma* ゲノムを検出した。

母豚における *M. hyorhinis* の検出率は、分娩後 1 週および 3 週でそれぞれ 72% および 65%、*M. hyosynoviae* はそれぞれ 55% および 48.3% であった。両 *Mycoplasma* の検出された個体に相関は無く、混合感染していない個体も多く認められた。子豚における *M. hyorhinis* の検出率は、分娩後 1 週および 3 週でそれぞれ 8.3% および 50%、*M. hyosynoviae* はそれぞれ 0% および 0.9% と *M. hyorhinis* が分娩後 3 週で *M. hyosynoviae* に比べて優位に高い検出率であったのに対し、*M. hyosynoviae* はほとんど検出されなかった。同一群で飼養されている母豚およびその哺乳子豚においても、これまでの報告にあるとおり、*M. hyorhinis* は哺乳豚で感染し、*M. hyosynoviae* は離乳期以降に感染することが示された。本研究では、両 *Mycoplasma* の検出された個体は必ずしも混

合感染しておらず、一方の感染がもう一方の感染に影響を及ぼしているかは不明のままであり、感染動態に関するさらなる研究が求められる。

呼吸器症状を引き起こす *M. hyopneumoniae* に比べて、関節炎を引き起こす両 *Mycoplasma* は日本においてはあまり関心を集めていないが、米国での診断数が増加しているとのことで、今後の動向に注目したい。

ポスター発表

題名：豚デルタコロナウイルス (PDCoV) の3週齢豚における病原性および免疫応答の検討 (Evaluation of pathogenesis and antibody responses of porcine deltacoronavirus in 3-week-old weaned pigs)

発表者：Qi Chen *et al.* (Iowa State University)

豚デルタコロナウイルス (PDCoV) は、2014年に米国で初めて報告された比較的新しいウイルスである。一般にその病原性は、豚流行性下痢ウイルスおよび豚伝染性腸炎ウイルスに比較すると、弱いとされている。本研究では3週齢離乳豚にPDCoVを実験感染させ、その病原性および免疫応答を検討した。

3週齢の離乳豚15頭ずつを2群に分け、一群目には3および8週齢時の2回 (PDCoV/PDCoV群)、二群目には8週齢時のみ (Neg/PDCoV群) にPDCoV USA/IL/2014株 10^5 TCID₅₀/pig を経口投与した。初回接種後7日に各群5頭を安楽殺し、接種後42日に全頭を安楽殺した。個体別に血清と直腸スワブ、群ごとに糞便と口腔液を採材し、リアルタイムPCR法を用いてPDCoVゲノムRNAを定量化した。3週齢時の接種後7日目の消化管は、病理学的検査およびPDCoV特異的免疫染色に供した。血中抗体価は中和試験によって測定した。

PDCoVを接種された3週齢の離乳豚は、感染後4～21日にわたって、軽度の下痢を呈した。8週齢での接種後には、いずれの群も症状を呈さなかった。PDCoV/PDCoV群の接種後7日に安楽殺した豚の中・遠位空腸および回腸では、Neg/PDCoV群に比べて腸絨毛の有意な萎縮が認められた。また、免疫染色では遠位空腸および回腸において、PDCoV抗原が検出された。直腸スワブ、糞便および口腔液中

のウイルス排泄量は、初回接種後7日にピークを迎えた後、次第に減少し、8週齢での接種後にはいずれの群の検体からもウイルス排泄は認められなかった。末梢血中の中和抗体価は、3週齢での接種後7日に陽転し、14～42日まで高値を維持した。以上の成績から、8週齢豚に比べて3週齢豚はPDCoVに対する感受性が高いことが示された。

PDCoVは北米および日本を含むアジアで報告されているため、若齢豚での下痢症の原因として今後注視すべきであると考えている。

題名：メタノール酵母によって産生されたキメラタンパク質および免疫賦活剤を用いたワクチン候補の検討 (Evaluation of a vaccine prototype using a chimeric protein and a molecular enhancer produced by *Pichia pastoris* fermentation)

発表者：Aura Villamil *et al.* (Universidad de Concepción)

離乳後多臓器性発育不良症候群 (PMWS) は、離乳期の豚に発育不良を引き起こすウイルス性疾患で、世界各国で多発している。その主な原因である豚サーコウイルス2型 (PCV2) の感染制御のために、4社からワクチンが市販されている。ワクチン抗原となる組換えタンパク質の発現系には、細菌、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞を用いた多様な系が開発されており、それぞれの発現系は、糖鎖修飾のされ方や大量培養の容易さなどの独自の特色を持つ。本研究では *Pichia pastoris* (メタノール酵母) に、ワクチン抗原としてのPCV2カプシドのキメラタンパク質および免疫賦活剤としてのインターフェロン α (IFN- α) を発現させ、これを用いて3週齢豚に免疫および攻撃試験を実施した。

P. pastoris によって発現させたPCV2カプシドキメラタンパク質の投与群、IFN- α との混合投与群、PCV2カプシドタンパク質を投与した陽性対照群、陰性対照群の4群を設定した。アジュバントにはwater-in-oilアジュバント (ISA 15A/セピック社) を8対2で混合した。3週齢時にワクチン抗原を2mL筋肉内投与し、その3週後に同様に追加投与した。攻撃は追加投与後2週に $1 \times 10^{4.75}$ TCID₅₀/mLのPCV2液を10mL経鼻接種した。攻撃後4週間にわたり臨床症状を観察し、血清中のPCV2ゲノム量をリアルタイムPCR法によって定量した。

攻撃後の試験期間中に臨床症状を発現した個体は観察されなかった。群間で体重に有意な差は認められなかった。初回投与後1日に全頭で体温が40℃程度に上昇したが、翌日までに平熱に下がった。キメラタンパク質投与群およびIFN- α との混合投与群では、攻撃後の血清中のウイルスゲノムDNA量が、陽性対照群と同様に、陰性対照群に比較して有意に減少し、ウイルス血症を抑制した。しかし、キメラタンパク質投与群とIFN- α との混合投与群の間で成績に有意な差は認められなかったことから、本研究で作出したIFN- α は、免疫賦活剤として機能していないと考えられた。しかしながら、本研究で作出した*P. pastoris*由来キメラタンパク質は、PCV2ワクチン抗原として有用であることが示された。

近年、サブユニットワクチン、ベクターワクチンおよびDNAワクチンなどの新たな技術を用いたワクチンの研究開発や新規アジュバントの検討が盛んである。新興・再興感染症や既存病原体の遺伝的多様性に素早く対応し、効果が高いだけでなく、製造コストを抑えたワクチン供給のためには、このような新技術が積極的に活用されるとよいと感じた。

参考文献につきましては割愛させていただきます。

おわりに

日生研に入所して1年目にして、このような海外の学会に参加する機会を得た。豚のワクチン開発の道を駆け出したところであり、自身の勉強不足を感じることもあったが、世界での養豚業界のスケールの大きさに触れ、論文上の名前では知らなかった先生方の発表を直接聞いたことは、今後もワクチン分野からの豚病制御という道を邁進する決意をさらに大きくする原動力となった。

本会の基調講演では、21世紀にはいり、養豚規模の拡大とグローバル化に伴う人とモノの移動の拡大、それによる世界規模での感染症の蔓延への懸念が述べられた。島国の日本といっても、他国で蔓延している感染症が容易に侵入、蔓延し得る状況を実感した。今後も起こりうる感染症の同時多発的流行に対応するためには、臨床の現場と研究開発の現場の間でより緊密に情報を共有し、現状に即した新薬や情報をなるべく早く臨床現場に還元することが重要であると感じた。そのためには、産官学がよりいっそう連携し、新技術を積極的に導入した新薬開発、情報や技術を共有し運用できる環境作りを推し進め、協力して防疫対策やワクチン開発、薬剤耐性菌対策にあたる努力が必要であると感じた。

学会発表演題 (2016年10月～2017年3月)

●第4回 日本先進医工学ブタ研究会

会 期：2016年10月7日～10月8日

開 催 地：東レ総合研修センター (三島)

発表演題：NIBS系ミニブタにおける薬物代謝および体内動態

○斉藤敏樹¹⁾、北条隆男²⁾、藤原哲夫¹⁾、坂本裕二¹⁾

¹⁾ 日生研、²⁾ (株)中外医科学研究所

●地球環境・食糧・資源のための植物バイオ第160委員会

会 期：2016年10月19日

開 催 地：大阪科学技術センター

発表演題：MucoRice-CTBを応用した豚大腸菌下痢症の経口ワクチン

○竹山夏実 (日生研)

● The 48th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians

会 期：2017年2月25日～2月28日

開 催 地：Hyatt Regency Denver, America

発表演題：Adaptation of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) to Vero cells

○ Tetsuo Sato, Kazuki Oroku, Aki Nagao, Yoshiaki Furuya, Osamu Taira, Nobuyuki Tsutsumi
(Nippon Institute for Biological Science)

● 第4回 獣医病理学専門家協会学術集会スライドフォーラム

会 期：2017年3月30日～3月31日

開 催 地：タワーホール船堀

発表演題：Leucocytozoon caulleryi のメガロシズント形成による肉芽腫性胸腺炎

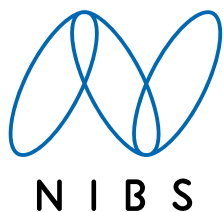
○近内将記 (日生研)

平成 29 年度定時評議員会開催

当研究所の平成 29 年度定時評議員会が、去る平成 29 年 6 月 16 日に開催され、平成 28 年度の事業報告及び決算報告が承認・可決されました。

研修者・見学者受け入れ状況 (平成 28 年 4 月から平成 29 年 3 月)

来所日・期間	所属機関・人数	研修・見学内容
平成 28 年	4 月 28 日	東京農工大学農学部 4 名 施設見学
	7 月 13 日～7 月 14 日	東京都立あきる野学園 1 名 現場実習
	8 月 15 日～8 月 25 日	株式会社ピグレッツ 1 名 検査実習
	8 月 25 日	麻布大学獣医学部 1 名 施設見学
	8 月 29 日	全農家畜衛生研究所 5 名 施設見学
	10 月 17 日～10 月 28 日	株式会社日本チャンキー 2 名 検査実習
	12 月 7 日	東京都立青峰学園 1 名 現場実習
平成 29 年	2 月 23 日	株式会社食環境衛生研究所 3 名 施設見学
	2 月 27 日～2 月 28 日	東京都立青峰学園 1 名 現場実習



—— 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(年 4 回発行)
(通巻 604 号) 平成 29 年 6 月 25 日印刷 平成 29 年 7 月 1 日発行(第 63 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/近内将記(委員長)、手島香保、小野浩輝
事 務/企画学術部
印刷所 株式会社 精興社
(無断転載を禁ず)