

NIBS LETTER 2009 SEPTEMBER
No. 558

日生研たより

2009 年(平成 21 年)9 月号 第 55 卷 第 5 号(通巻 558 号)

挨拶・巻頭言

どうあるべきか

.....梅村 孝司 (2)

獣医病理学研修会

第 48 回 No. 969 イヌの眼窩腫瘍

.....日本大学獣医病理学研究室 (3)

第 48 回 No. 970 マウスの小脳腫瘍

.....東京農工大学獣医病理学教室 (4)

レビュー

リポソームワクチンによる粘膜免疫の誘導
～ウシ乳房炎に対するリポソーム
ワクチン～

渡来 仁 (5)

58th Western Poultry Disease
Conference & American College of
Poultry Veterinarians Work Shop
参加報告

永野 哲司 (12)

お知らせ

新人紹介

(15)



NIBS

財団法人 日本生物科学研究所

NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE

<http://nibs.lin.go.jp/>

どうあるべきか

梅村 孝司

還暦を迎えました。干支が5巡し、人生の中締めだそうです。振り返れば大学に職を得て30年近くになり、この間は「自分は何をしたいのか」よりも「自分はどうあるべきか」を優先させて生きて来たと、今後この呪縛から逃れられそうにありません。そんなコチコチ頭が研究と人生についての独断を以下に綴ります。

「ピカピカの新車を運転することが目的で、それを運転してどこへ行くのかは二の次という風潮が近頃は強くなった」と尊敬する先輩教授が嘆いておられました。確かに、ゲノム、レセプター、サイトカイン、アポトーシス、再生医療などのキーワードが卒業論文の中に入らないと学部学生にさえ納められない時代です。一方で、最先端研究、(動物や自然との) 触れ合い、地球に優しい、サステナビリティ、生物の保全などの流行語で思考が止まっており、その先で何を指すのかという意識が恐ろしく希薄な、手段と目的を取り違えている若者が多いように思われます。いつの時代も、理想は高く、具体の道筋には暗いのが若者だから、我々が特段に憂慮する必要はないのかも知れませんが、この傾向はやはり心配です。

私達が研究する場合はまず仮説を立て、それを証明するために最も効率的な手法と手順を考えます。同様に、論文作成においても、まず論文を発表する目的(帰着点、メッセージ)を考え、そこから遡ってディスカッションを組み立てます。日常生活においても、様々な問題や課題に対して我々はこのように対応しています。状況が混沌とすればするほど、どこを目指すべきかをまず真剣に考え、それに向かって漕ぎ出す方策を考えます。最も重要なのは正しい仮説あるいは目標を立てることであり、次いでそれを証明するあるいはそこに至る道筋を比較検討して最善を選択することであり、どの道を行きたいという判断が先に来るものではありません。これは誰にとっても当たり前の手順だと思いますが、流行に流されて目的意識の希薄な若者の将来構想を聞くたび、何が目的でこの研究(実験)をしたのか、ディスカッションでは何が言いたいのかよく分からない研究論文を見かけるたび、インパクトファクターの高い雑誌に論文を掲載することを至上目的としている研究者に出会うたび、諸々の将来が心配になります。

私達は何のために研究するのか? 何のために生きるのか? 25年ほど前に故越智勇一先生から「人間の本性は金銭欲や食欲や性欲などではない。全ての人間に共通した本性は真美善に対する憧れで、真は科学、美は芸術、善は宗教に現れている。」とお聞きし、感動しました。私はこの言葉の語源を未だ知りませんが、「真」は真理を明らかにすること、「美」は美しいもの、素晴らしいものを創造すること、「善」は人の役に立つことだと思います。因みに、クラーク博士の「青年よ大志を抱け」は有名ですが、それは以下のように続いています。Boys, be ambitious! Be ambitious not for money or for selfish aggrandizement, nor for that evanescent thing which men call fame. Be ambitious for knowledge, for righteousness, and for the uplift of your people. Be ambitious for the attainment of all that a man ought to be. (青年よ大志を抱け。金銭や自己の栄達や名声と呼ばれる儚いものに憧れるのではなく、知識や正義、そして人々を向上させることに意欲的であれ。そして、人のあるべき姿を具現するために大志を抱け)。明治時代のアメリカ人教師も「真美善」と全く同じ理想を語っています。この様に、「真美善」は洋の東西を問わず、時代や民族を超えて人間の普遍の理想であり、それを具現した人は真の尊敬を集めます。我々のささやかな研究や日常生活もどこかで、いつかこの理想に合うものであって欲しいものですし、そうでなくては、まず自分自身が結局は満足できないと思います。

人は誰も、空より生じ、空に帰る。

人の一生に貴賤無く、勝ち負けもない。

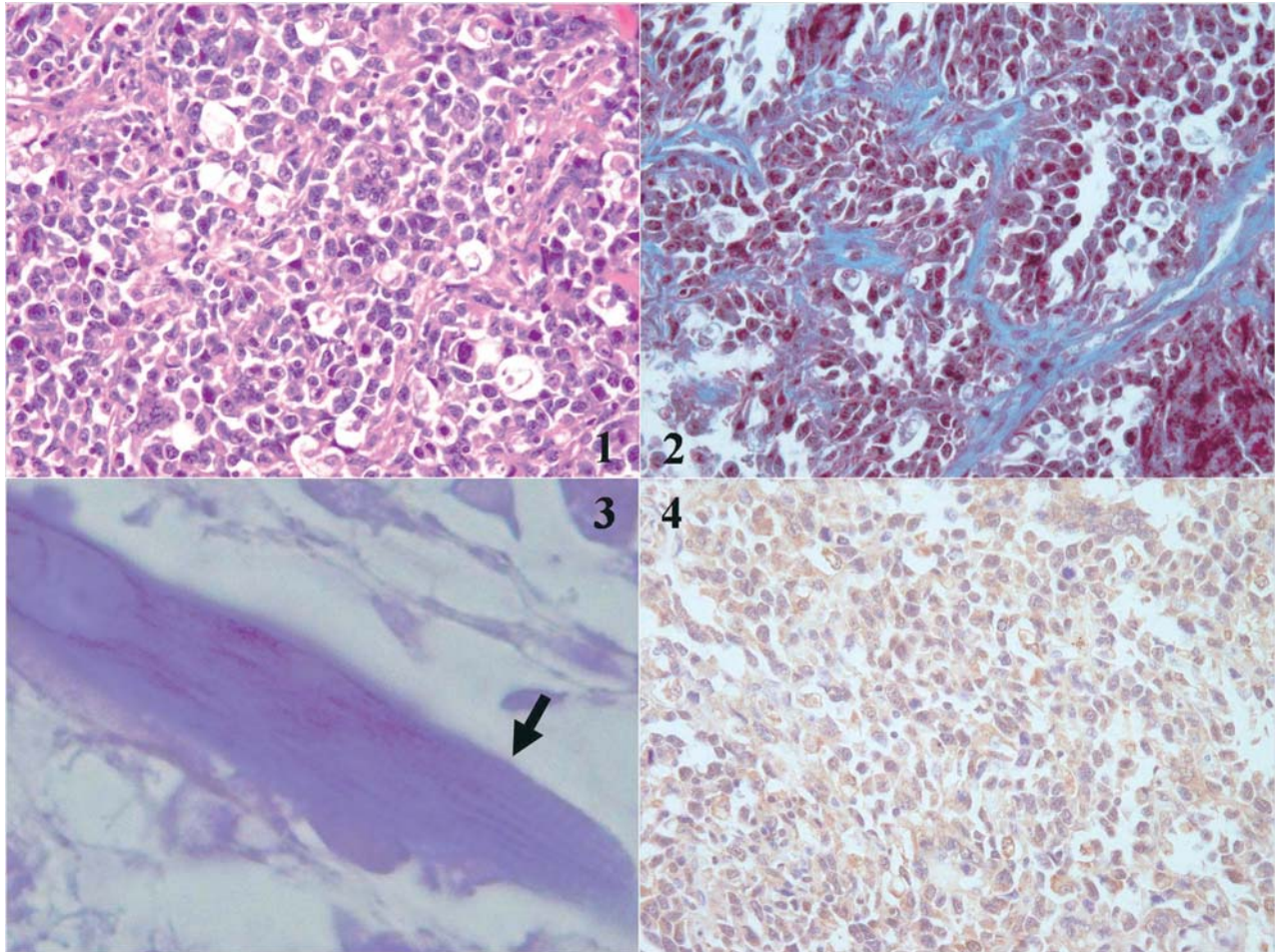
ただ、己が生きた意味を知ることができた人は幸せである。

還暦を迎えた私の決意です。

(北海道大学大学院獣医学研究科 教授, 日本生物科学研究所 評議員)

イヌの眼窩腫瘍

日本大学獣医病理学研究室 第 48 回獣医病理学研修会 No. 969



動物：イヌ，ミニチュアシュナウザー，雄，3歳6ヶ月齢，体重 9.2 kg。

臨床事項：1週間ほどで急速に右眼が腫脹。同居の猫に引掻かれた可能性を考慮し抗生物質にて治療。4日後，改善しないためスタンプ標本を作製したところ悪性腫瘍を疑う所見を認める。11日後，右眼球全摘出手術。手術時に眼窩の骨融解と右側顎下リンパ節の腫脹を認める。術後23日目，手術部位に腫瘍が再発。

肉眼的所見：腫瘍は右眼球後部に発達し，眼球は突出，偏在。視神経を確認できなかったため腫瘍内に巻き込まれていると推測した。腫瘍の大きさは $4.5 \times 5 \times 4$ cm。断面は白色，充実性，中等度の硬度。眼球との境界は明瞭。

組織所見：腫瘍と眼球との連続性はなく結合組織で区画されていた。N/C 比の高い大型，多角形あるいは紡錘形の腫瘍細胞がび漫性に増殖し（図1），辺縁部では浸潤像が認められた。腫瘍細胞の核は大小不同，多形で，異型核や多核細胞が多数存在し，核分裂像も豊富であった。腫瘍細胞が線維性結合組織からなる胞巣状の隔壁に

沿って付着するような配列が認められた（図2：マッソントリクローム染色）。一部の細胞において伸長する好酸性細胞質内に PTAH 染色で染色される横紋が証明された（図3：矢印）。免疫染色において腫瘍細胞はビメンチン，デスミン，ミオグロビン（図4）で陽性， α SMA では間質のみ陽性を示した。

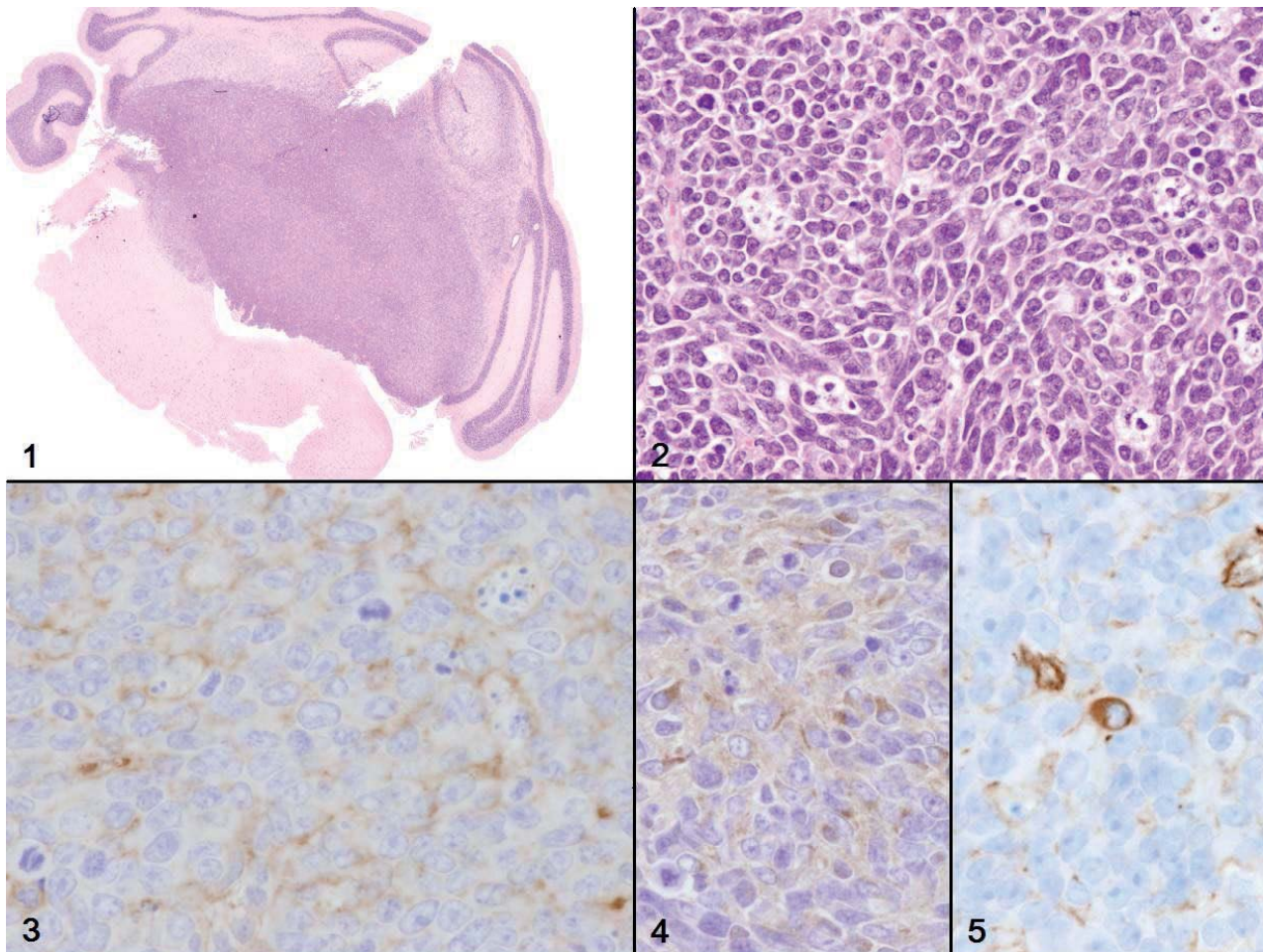
診断：横紋筋肉腫，多形型（Pleomorphic rhabdomyosarcoma）

考察：過去の研修会においてグリア系および髄膜系起源の犬の眼窩内腫瘍が報告されている。今回も視神経を巻き込んで発達していることより同様の腫瘍が疑われたが，デスミンおよびミオグロビンの免疫組織化学的所見より横紋筋肉腫と診断した。横紋筋肉腫の好発部位として口腔内領域（特に舌，硬口蓋）が挙げられているが，眼窩内における発生は非常に稀である。今回の症例は標本作製部位により横紋が明瞭な細胞も示されたが，形態学的に多形型の腫瘍細胞が優勢の場合，他の腫瘍との鑑別が重要と考えられた。

（渋谷 久）

マウスの小脳腫瘍

東京農工大学獣医病理学教室 第48回獣医病理学研修会標本 No. 970



動物：p53 ホモ欠損マウス，雄，19 週齢。

臨床事項：本マウスは，無処置飼育 19 週目に神経症状を示したため，殺処分した例である。

剖検所見：剖検で小脳底部に ϕ 5～7 mm の白色腫瘍が確認された。

組織所見：本腫瘍は小脳原発（図 1）で，卵円～楕円形で辺縁不整な核と乏しい胞体を持つ異型性を伴った細胞の充実性増殖を特徴としていた。多くの細胞が 1 個の核小体を容れ，アポトーシス及び有糸分裂像は多数認められるも，壊死巣はなかった。リボン状配列やロゼットといった特定の分化を示す所見は認められなかった（図 2）。免疫染色では，一部の細胞で Synaptophysin（図 3），MAP2（図 4），及び S-100 は陽性であったが，GFAP 及び Vimentin 等のグリア細胞マーカーは陰性であった。神経外胚葉幹細胞マーカーの Nestin（図 5）は陽性であった。

診断：小脳神経芽腫（Cerebellar neuroblastoma）

考察：本症例は組織学的所見と Nestin 陽性所見から，異型性の強い胎児性腫瘍であると考えられた。Nestin は神経幹細胞のみならず，発達途上の放射状グリア細胞やバグマングリア細胞での発現も知られている。しかし本症例の場合，Nestin 陽性細胞は GFAP や Vimentin 陽性ではなかったことから，グリア細胞ではなく幹細胞の性格を示すものと考えられた。また，Synaptophysin や MAP2 の陽性細胞も出現しており，神経細胞への分化傾向が窺えた。p53 ホモ欠損マウスでは，更に PARP 等の遺伝子改変を行った場合では髄芽腫が高率に発生す

るが，p53 ホモ欠損のみでは小脳胎児性腫瘍の発生は稀である。以上より，本来であれば同じ遺伝子改変マウスに発生する複数の小脳腫瘍でその生物学的特性を検討して総合的に判断すべきであり，ラット・マウスの誘発脳腫瘍では GFAP の反応性が悪いという問題点が残るものの，本症例を検討した限りでは，産業動物における神経腫瘍の WHO 分類に従った場合，小脳神経芽腫と診断するのが適切であると考ええる。

（吾郷恭平，渋谷 淳）

参考文献：

1. Koestner, A. *et al.* 1999. Histological Classification of Tumors of the Nervous System of Domestic Animals. pp. 25-26. *In*: World Health Organization, International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals, 2nd series (Shulman, F. Y. ed.), The Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D. C.
2. Wetmore, C. *et al.* 2000. *Cancer Res.* **60**:2239-2246.
3. Burger, P. C. and Scheithauer, B. W. 2007. Tumors of the Central Nervous System. pp. 251-294. *In*: AFIP Atlas of Tumor Pathology, 4th series (Silverberg, S. G. and Sobin, L. H. eds.), American Registry of Pathology, Washington, D. C.
4. Wang, X. *et al.* 2007. *Mol. Cell. Biol.* **27**:7935-7946.
5. Tong, W. M. *et al.* 2003. *Am. J. Pathol.* **162**:343-352.
6. Yan, C. T. 2006. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:7378-7383.

レビュー

リポソームワクチンによる粘膜免疫の誘導 ～ウシ乳房炎に対するリポソームワクチン～

渡 来 仁 (大阪府立大学)

はじめに

感染症の多くは粘膜を介して感染する。そのため粘膜感染を防止できる粘膜ワクチンは感染症を予防する上で特に有効である。従来から行われている注射によるワクチンは、全身免疫を効率よく誘導できるが、病原微生物の感染部位である粘膜局所には免疫応答を誘導できない。粘膜局所に免疫応答を誘導するための粘膜ワクチンを開発するためには、粘膜免疫誘導組織へ効率よくワクチン抗原をデリバリーできるシステムの構築が重要となる。しかしながら、粘膜局所の免疫機構を刺激し、粘膜上に抗原特異的な免疫応答（粘膜免疫）を誘導できるデリバリーシステムはまだ開発されていない。

近年、粘膜免疫誘導組織にワクチン抗原を送達させるシステムとしてリポソームが注目されている。リポソームは脂質二重層から成る人工マイクロカプセルである。そのため種々の病原体の抗原決定基をもつ物質をその膜上に再構成することができるだけでなくカプセル内に封入することもできる。この様なリポソームは、免疫担当細胞への抗原の提示をより有効なものとするように働くため、ワクチンキャリアとしてのリポソームの応用研究が多くなされている。しかしながら、これまでのワクチンキャリアとしてのリポソームでは免疫応答の誘導が不十分であり問題があった。そこで筆者は、効率の良い免疫誘導能をリポソームに持たせるために新たにpH感受性膜融合高分子を構築した。新規pH感受性膜融合高分子を修飾したリポソームは高い免疫応答を誘導できることから、家畜における感染症予防のための新規リポソームワクチンとして応用が可能である。今回、ウシ乳房炎予防のための粘膜ワクチン（経鼻ワクチン）開発のために新規pH感受性膜融合高分子修飾リポソームを応用したので、その概要を紹介する。

粘膜免疫

動物において粘膜は、生体が直接外界と接し無数の病原微生物や外来抗原などの異物と直接接触する最前線である。外部環境と接する界面の粘膜は、同じく外界と接する皮膚に比べて数百倍の表面積を有しており、さまざまな病原微生物にとって動物体内に侵入する主要な経路となっている。そのため、あらゆる異物の体内への侵入を阻止する上で、粘膜面における免疫防御機構が重要な役割を果たしている。例えば、消化管や呼吸器などの粘膜は、絶えず暴露されているウイルス、細菌などの微生物、異物の侵入を阻止するために、粘膜免疫を誘導する誘導組織と実際に粘膜免疫が機能する実行組織からなる共通粘膜免疫機構（common mucosal immune system：CMIS）を形成し、粘膜局所において生体防御を営んでいる（図1）[9, 10]。消化器・呼吸器の粘膜面に存在する粘膜関連リンパ組織（mucosa-associated lymphoid tissue：MALT）はその中核をなし、ほ乳類では鼻咽頭関連リンパ組織（nasopharynx-associated lymphoid tissue：NALT）、気管支関連リンパ組織（bronchus-associated lymphoid tissue：BALT）、腸管関連リンパ組織（gut-associated lymphoid tissue：GALT）がある。また鳥類では、ハーダー腺もMALTとして機能している（図1）。これらいずれかのMALTの粘膜面を介して侵入してきた抗原は、粘膜免疫誘導組織の上皮細胞層に存在するM細胞によって取り込まれ、その後、下層に存在するマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞へ効率的に抗原が送達され、抗原特異的な粘膜免疫が誘導される[1, 4, 7]。

このように、粘膜免疫が誘導されるためには、粘膜面を介した抗原の取り込みが必要であり、従来行われている筋肉内や皮下へのワクチン接種では誘導されない。感染症の多くは粘膜を介して起こる。そ

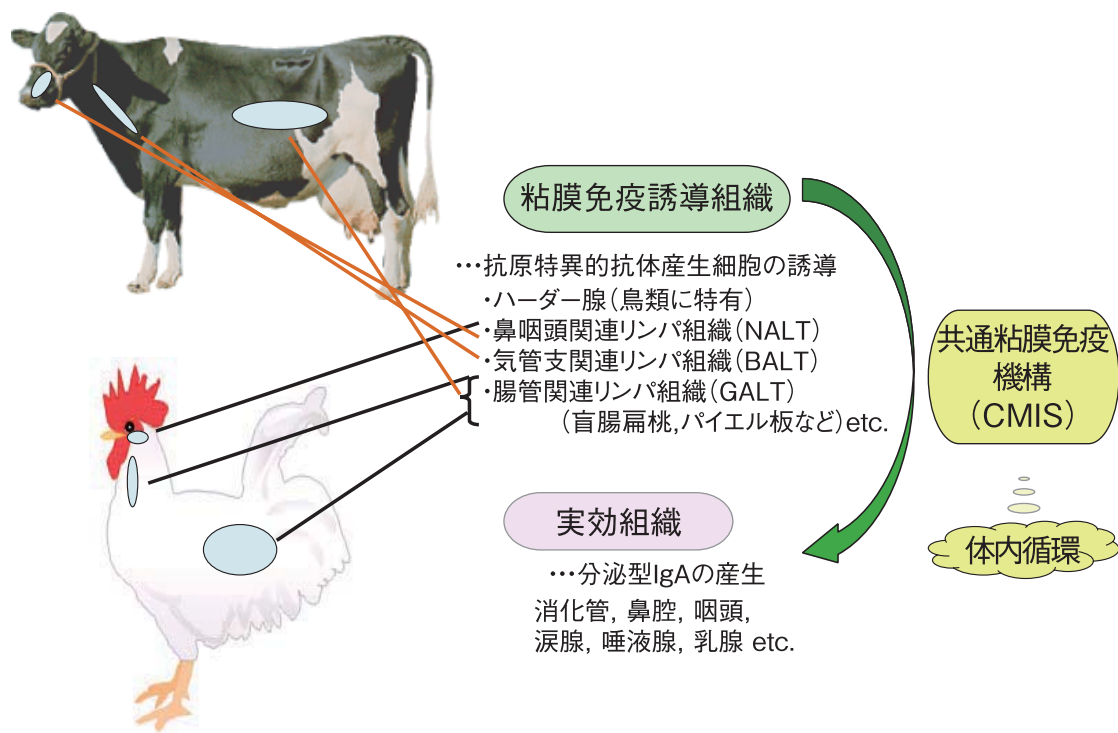


図1 粘膜免疫システム

のため、効果的な予防法の手段として、粘膜免疫が重要となっている。さらに、粘膜面を介した免疫誘導は、粘膜局所のみならず全身における免疫も活性化できることから、感染症予防において臨床への応用が期待されている。

pH 感受性膜融合高分子修飾リポソーム

1) pH 感受性膜融合高分子

粘膜免疫を効率よく誘導するためには、粘膜免疫誘導組織にワクチン抗原を送達させる必要がある。近年、ワクチン抗原のキャリアー [抗原デリバリーシステム, (ADS)] として人工マイクロカプセルであるリポソームが注目されており、多くの応用研究がなされている [2, 3, 5, 6, 8, 12-14]。

リポソームの ADS としての有用性を高めるためには、リポソームに新たな機能を与え、しかも、高いパフォーマンスを実現することが重要となる。リポソームに新たな機能とパフォーマンスの向上を持たせるためには、温度、pH、光など、さまざまな刺激や環境変化に対して感受性を有する高分子を修飾し機能化させる必要がある。ADS としてのリポソームを考えた場合、高い免疫応答を誘導するためには樹状細胞内に効率よく封入抗原をデリバリーする必要がある。そのためには、抗原を封入したリポ

ソームが、樹状細胞に取り込まれた後、エンドソーム膜と融合することが重要である。そのため筆者らは、エンドソームの持つ特殊環境である弱酸性の環境下で膜融合を起こす pH 感受性膜融合高分子 [サクシニル化ポリグリシドール (SucPG) ならびにメチルグルタリル化ポリグリシドール (MGluPG) : 図2] を構築し、これらの高分子を修飾した新規 pH 感受性膜融合リポソームを考案した (図2)。

図2に示すように、pH 感受性膜融合高分子である SucPG ならびに MGluPG はいずれもカルボキシル基 ($R-COOH$) を有している。カルボキシル基 ($R-COOH$) は、中性環境下ではプロトン (H^+) が電離してカルボキシラートアニオン ($R-COO^-$) となる。そのため、pH 感受性膜融合高分子を修飾したリポソーム膜表面は、中性下においてはカルボキシラートアニオン ($R-COO^-$) を発現し、陰性に荷電し安定化する。陰性に荷電したリポソームは樹状細胞の持つスカベンジャーレセプターを介して細胞内に特異的に取り込まれる事が知られている。取り込まれた後、樹状細胞のエンドソーム内においてリポソームを修飾している pH 感受性高分子のカルボキシラートアニオン ($R-COO^-$) がプロトン (H^+) 化され、再度カルボキシル基 ($R-COOH$) が構成される。エンドソームの酸性環境下で形成されたリポソームの pH 感受性膜融合高分子のカルボキシ

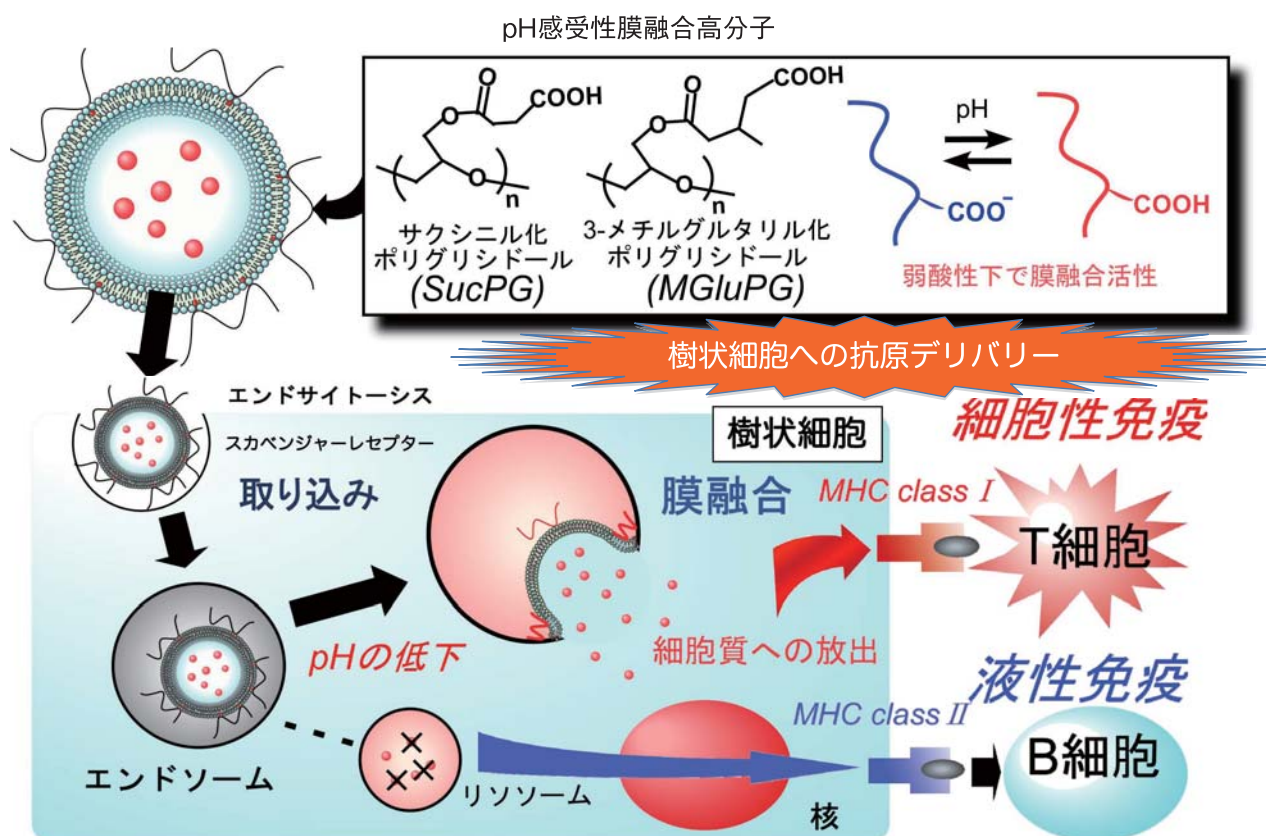


図2 pH感受性膜融合高分子修飾リポソームによる樹状細胞内への抗原の搬送

ル基 (R-COOH) は、エンドソーム膜のリン酸極性基と水素イオン結合し、リポソーム膜とエンドソーム膜が膜融合を引き起こす。その結果、リポソーム内に封入された物質（抗原）が樹状細胞内へ移行し、効率の良い免疫応答（液性免疫、細胞性免疫）を誘導する。この様に、リポソームへの pH 感受性膜融合能の賦与は、樹状細胞内に効率よく封入抗原をデリバリーし、免疫誘導するうえで重要な機能となる。

実際に pH 感受性膜融合高分子である SucPG を修飾した pH 感受性膜融合高分子修飾リポソームに蛍光物質であるカルセインを封入し、ウシマクロファージ細胞株である MP3 細胞を用いて細胞質内へのカルセインのデリバリーについて調べて見ると、pH 感受性膜融合高分子修飾リポソームによりカルセインが MP3 細胞に導入され、細胞質内にカルセインの蛍光が観察された（写真 1）。この結果は、カルセインが pH 感受性膜融合高分子修飾リポソームにより効率よく MP3 細胞の細胞質に導入されていることを示しており、pH 感受性膜融合高分子修飾リポソームをワクチンの ADS として使用した場合、樹状細胞内に効率よく封入抗原をデリバリーで

きることを示唆するものである。

2) pH 感受性膜融合高分子修飾リポソームによる粘膜免疫誘導

そこで、pH 感受性膜融合高分子修飾リポソームが粘膜ワクチンの ADS として機能し、免疫応答を誘導するかについて明らかにするために、モデル抗原として卵白アルブミン（OVA）を SucPG を修飾した pH 感受性膜融合高分子修飾リポソームに封入

SucPG リポソームによるウシマクロファージ細胞 MP3 内へのカルセインの導入

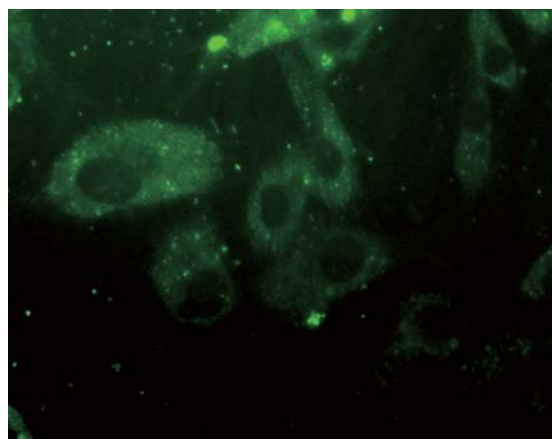


写真 1 pH 感受性膜融合高分子修飾リポソームを用いた細胞内への物質の搬送

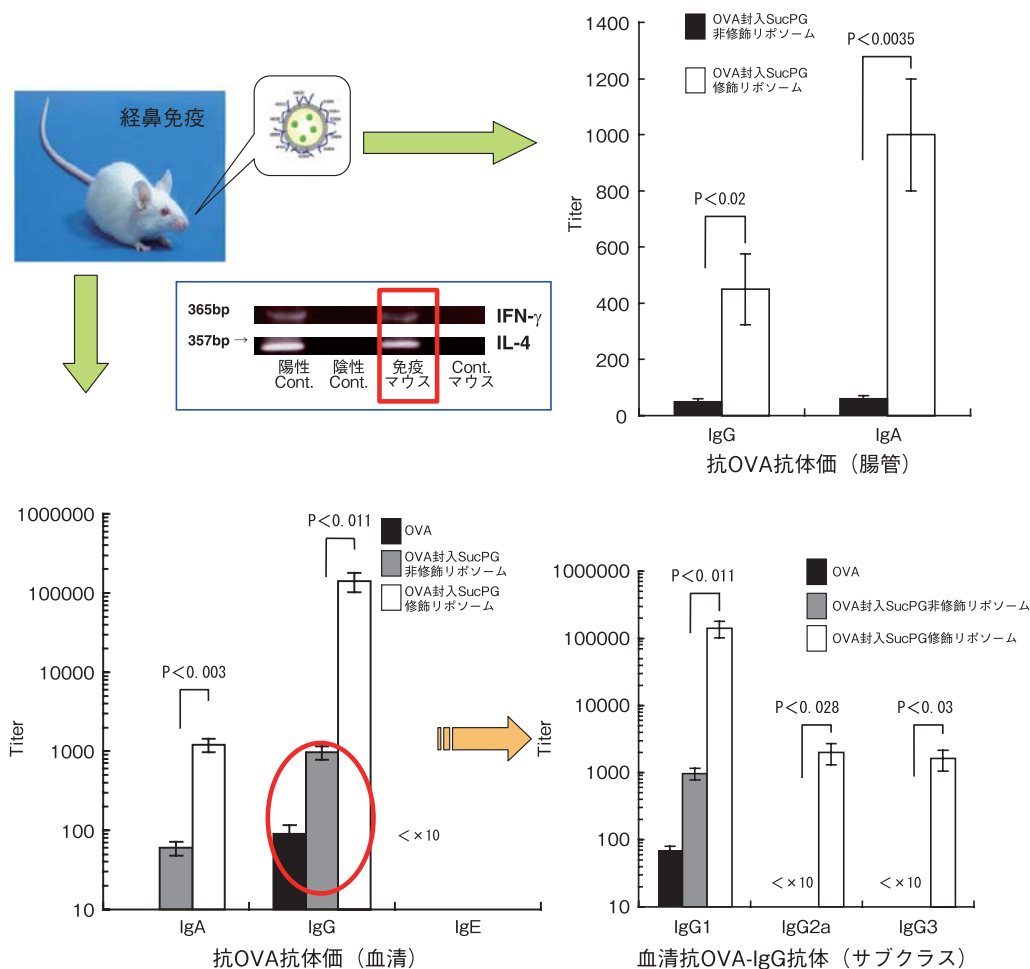


図3 pH感受性膜融合高分子修飾リポソームによる免疫応答

させ、マウスに経鼻免疫を行った。その結果、SucPGを修飾したリポソームは、SucPGを修飾していないリポソームで免疫した場合に比べ血清ならびに腸液中に有意に高い抗OVA抗体(IgG, IgA)を誘導した(図3)。IgE抗体の誘導はなかった。さらに、血清中の抗OVA-IgG抗体のサブクラスについて解析した結果、SucPGを修飾していないリポソームで免疫した場合においては、Th2タイプのサブクラスであるIgG1のみ誘導されていたが、SucPGを修飾したリポソームではTh2タイプのサブクラスであるIgG1のみならず、Th1タイプのサブクラスであるIgG2aならびにIgG3の誘導を認めた(図3)。さらにサイトカインのmRNAについてRT-PCR法により解析した結果、SucPGを修飾したpH感受性膜融合高分子修飾リポソームで免疫したマウスの脾臓リンパ球においてインターフェロン(IFN)- γ ならびにIL-4のmRNAの発現が認められた(図3)。同様の免疫応答の結果は、MGluPGを修飾したpH感受性膜融合高分子修飾リポソーム

を用いて経鼻免疫した場合においても認められた。特に、MGluPG修飾リポソームはSucPG修飾リポソームに比べ高い免疫応答を誘導できることが示された(論文投稿準備中)。これらの結果は、pH感受性膜融合高分子(SucPGあるいはMGluPG)修飾リポソームを応用した経鼻ワクチンは、全身免疫ならびに粘膜局所免疫を効率よく誘導でき、しかも、誘導される免疫応答は、液性免疫、細胞性免疫の両者であることを示している。

ウシ乳房炎用リポソームワクチン

1) ウシにおける免疫誘導効果

上述した免疫誘導能に優れたpH感受性膜融合リポソームが、ウシにおいてもマウスと同様に粘膜ワクチンとして機能することを明らかにするためにウシを用いて解析を行なった。具体的には、高い免疫応答を誘導できるpH感受性膜融合高分子(MGluPG)を修飾したリポソーム(MGluPGリポソーム

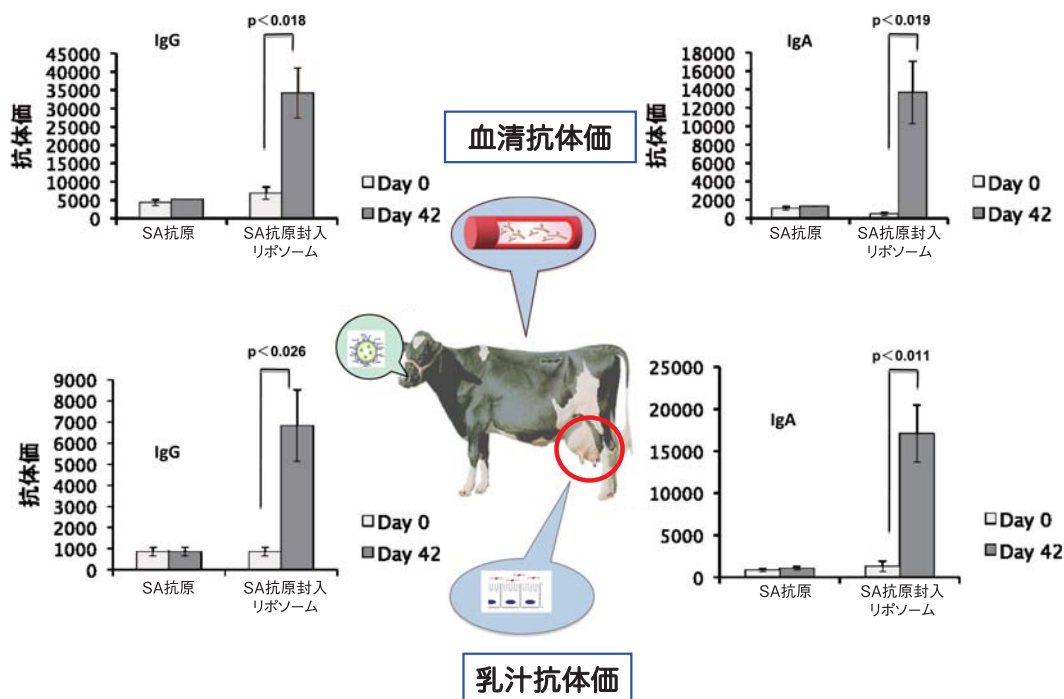


図4 黄色ブドウ球菌（SA）抗原封入 MGLuPG リポソーム経鼻免疫牛における免疫応答

ム）に黄色ブドウ球菌（SA）の破碎抗原を封入し、7～10歳の乳牛（1群3頭）に2週間間隔で3回経鼻免疫を行い、全身ならびに乳房局所における免疫誘導効果について調べた。経鼻免疫の抗原量は、1頭1回当たり5mg（破碎抗原のタンパク量）とした。図4に示すように、SA抗原封入 MGLuPG リポソームを乳牛に経鼻免疫した結果、免疫前に比べ、免疫後42日目においては血清ならびに乳汁中に有意に高い抗SA抗体（IgG, IgA）の誘導が確認された。血清中では、IgA抗体に比べて高いIgG抗体が誘導されたのに対して、乳汁中においては、IgG抗体に比べ、高いIgA抗体が誘導された。一方、SA抗原のみを経鼻免疫した場合においては、血清、乳汁中、いずれにおいても抗SA抗体（IgG, IgA）の誘導が確認されなかった。この結果は、MGLuPG修飾リポソームを応用したウシ経鼻ワクチンは、全身免疫ならびに粘膜局所免疫を効率よく誘導でき、粘膜ワクチンとして機能していることを示唆している。さらに、経鼻ワクチン接種牛の末梢血リンパ球を用いてTh1サイトカインであるインターフェロン（IFN）- γ のmRNAの発現についてRT-PCR法により解析した結果、免疫牛の全例においてインターフェロン（IFN）- γ のmRNA（77bp）の発現が確認された（写真2）。これらの結果は、MGLuPGリポソームを応用した経鼻ワクチンは、ウシにおいて

液性免疫のみならず細胞性免疫も誘導できることを示唆するものである。さらに、SA抗原封入 MGLuPG リポソームのウシへの経鼻投与による免疫誘導効果は、ウシ乳房炎に対する新規リポソーム経鼻ワクチン開発の可能性を示すものである。

2) 乳房炎発症防御効果

ウシにおいて、SA抗原を封入した新規pH感受性膜融合高分子修飾リポソーム（MGLuPGリポソーム）の経鼻免疫により、全身ならびに乳房局所においてSAに対して高い免疫応答が誘導できた（図4）。そこで、SAに対する免疫誘導牛の乳房内へSAを接種し、SA抗原封入 MGLuPG リポソームワクチン

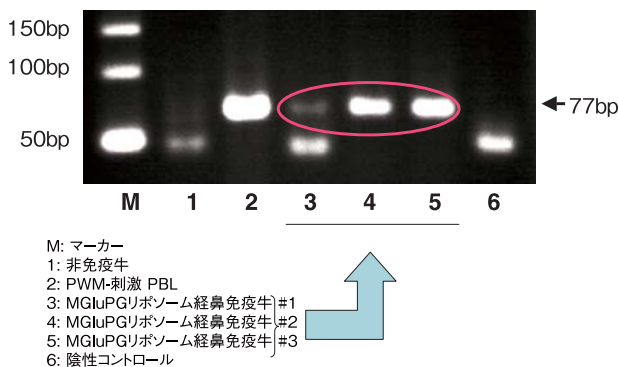


写真2 黄色ブドウ球菌（SA）抗原封入 MGLuPG リポソーム経鼻免疫牛由来末梢血リンパ球におけるインターフェロン- γ mRNA の発現解析

表 黄色ブドウ球菌 (SA) 感染後の乳汁からの菌の分離

群*	SA 陽性頭数 / 実験に供した頭数							
	感染前	1 日目	2 日目	3 日目	4 日目	5 日目	6 日目	7 日目
Cont.	0/3 (0.0)	0/3 (0.0)	3/3 (100)	3/3 (100)	3/3 (100)	3/3 (100)	3/3 (100)	3/3 (100)
Vac.	0/3 (0.0)	0/3 (0.0)	0/3 (0.0)	0/3 (0.0)	0/3 (0.0)	0/3 (0.0)	0/3 (0.0)	0/3 (0.0)

* Cont., コントロール群 ; Vac., ワクチン接種群
カッコ内は % を表す。

による乳房炎発症防御効果について、乳汁中からの SA の分離、乳汁体細胞数の変化を指標に試験を行った。

まず、ワクチン接種群、ワクチン非接種群の乳牛の乳房内へ乳頭から 100 CFU の SA を感染させ、その後、乳汁から SA の分離を行った。その結果、ワクチンを接種していないコントロール群 (Cont. 群) の乳牛においては、接種後 2 日目から実験期間中の間、実験に供した乳牛全例の乳汁から SA が分離された (表)。一方、ワクチン接種群 (Vac. 群) においては、実験期間中、いずれの乳牛の乳汁からも SA は分離されなかった (表)。さらに、乳汁体細胞数の変化について調べた結果、コントロール群 (Cont. 群) の乳汁においては、菌接種後 2 日目で体細胞数が乳汁 1 ml 当たり 20 万を超え、3 日目以降は乳汁 1 ml 当たり 30 万以上の高い値を示し、乳房炎を発症した (図 5)。しかしながら、ワクチン接種群 (Vac. 群) においては、実験期間中、体細胞

数は、乳汁 1 ml 当たり 10 万以下で推移し、乳房炎の発症は認められなかった (図 5)。この結果は、SA 抗原封入 MGlucPG リポソームワクチンにより乳房内の粘膜局所に誘導された免疫応答が SA の感染防御に有効に働いていることを示しており、今後のウシ乳房炎ワクチンの開発において、新規 pH 感受性膜融合高分子修飾リポソームワクチンが有望であることを示唆している。

おわりに

今回、新たに構築した pH 感受性膜融合高分子を修飾したリポソームのワクチンキャリアーとしての高い免疫誘導能と、それを応用したウシ乳房炎粘膜 (経鼻) ワクチンの開発について概説した。pH 感受性膜融合高分子をリポソームに導入することにより、抗原提示細胞である樹状細胞の細胞質内にワクチン抗原を効率よく送達できる機能をリポソームに与え

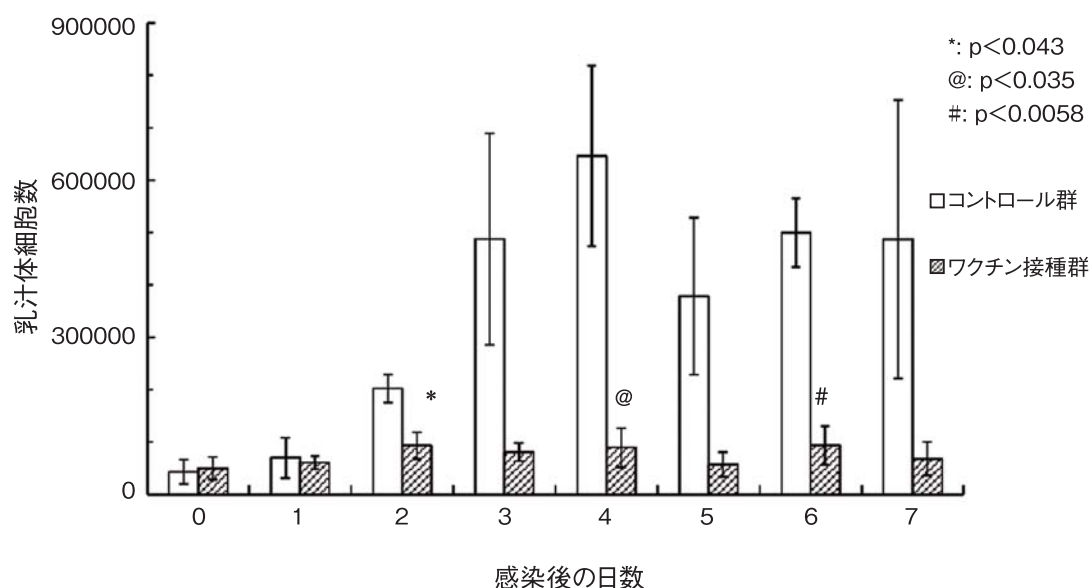


図 5 黄色ブドウ球菌 (SA) 抗原封入 MGlucPG リポソーム経鼻免疫牛における免疫応答

ることができた。この機能は、ワクチン抗原送達システムとしてのリポソームが、高い免疫応答を効果的に誘導する上で重要な機能となる。リポソームのpH感受性膜融合能による樹状細胞の細胞質内への封入抗原の内在化は、免疫誘導（液性免疫ならびに細胞性免疫）に役立つ抗原搬送システムであり、感染防御に効果的なワクチン開発に不可欠の新技术といえる。pH感受性膜融合高分子修飾リポソームを応用したウシ乳房炎発症予防の新規経鼻ワクチンは、乳房内粘膜にIgAを中心とした免疫応答を効率よく誘導でき、誘導された免疫応答は原因菌の乳房粘膜への定着阻止に有効に働くと考えられ、ウシ乳房炎ワクチンとして機能することが示唆された。そのため、pH感受性膜融合高分子修飾リポソームを応用したリポソームワクチンの技術は、実際の感染症予防に効果的な免疫応答を誘導できる有用な技術であるといえる。また、封入抗原を樹状細胞の細胞質内へ内在化できる本技術は、感染防御に有効な細胞性免疫応答を効率よく誘導できる。これまで生ワクチンでしか誘導することが出来なかった細胞性免疫応答が本技術を応用することにより不活化抗原でも誘導でき、より安全性の高いワクチン開発が可能となる。今後、pH感受性膜融合高分子修飾リポソームを応用したワクチンの技術が、多くの家畜感染症のワクチン開発のための新規技術として応用されることを期待している。

キーワード：リポソーム，膜融合リポソーム，粘膜免疫，粘膜ワクチン，ウシ，乳房炎

引用文献

1. Brandtzaeg, P., Farstad, I. N. and Haraldsen, G. 1999. Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. *Immunol. Today* **20**:267-277.
2. Fukutome, K., Watarai, S., Mukamoto, M. and Kodama, H. 2001. Intestinal mucosal immune response in chickens following intraocular immunization with liposome-associated *Salmonella Enterica* Seroovar enteritidis antigen. *Dev. Comp. Immunol.* **25**:475-484.
3. Han, M., Watarai, S., Kobayashi, K. and Yasuda, T. 1997. Application of liposomes for development of oral vaccines: Study of *in vitro* stability of liposomes and antibody response to antigen associated with liposomes after oral immunization. *J. Vet. Med. Sci.* **59**:1109-1114.
4. Hiroi, T., Iwatani, K., Iijima, H., Kodama, S., Yanagita, M. and Kiyono, H. 1998. Nasal immune system: distinctive Th0 and Th1/Th2 type environments in murine nasal-associated lymphoid tissues and nasal passage, respectively. *Eur. J. Immunol.* **28**:3346-3353.
5. Irie, T., Watarai, S. and Kodama, H. 2003. Humoral immune response of carp (*Cyprinus carpio*) induced by oral immunization with liposome-entrapped antigen. *Dev. Comp. Immunol.* **27**:413-421.
6. Irie, T., Watarai, S., Iwasaki, T. and Kodama, H. 2005. Protection against experimental *Aeromonas salmonicida* infection in carp by oral immunisation with bacterial antigen entrapped liposomes. *Fish Shell. Immunol.* **18**:235-242.
7. Kunkel, E. J. and Butcher, E. C. 2003. Plasma-cell homing. *Nat. Rev. Immunol.* **3**:822-829.
8. Li, W., Watarai, S., Iwasaki, T. and Kodama, H. 2004. Suppression of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis excretion by intraocular vaccination with fimbriae incorporated in liposomes. *Dev. Comp. Immunol.* **28**:29-38.
9. McDermott, M. R. and Bienenstock, J. 1979. Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of B immunoblasts into internal, respiratory, and genital tissues. *J. Immunol.* **122**:1892-1898.
10. Mestecky, J. 1987. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J. Clin. Immunol.* **7**:265-276.
11. Tana, Watarai, S., Isogai, E. and Oguma, K. 2003. Induction of intestinal IgA and IgG antibodies preventing adhesion of verotoxin-producing *Escherichia coli* to Caco-2 cells by oral immunization with liposomes. *Lett. Appl. Microbiol.* **36**:135-139.
12. Uemura, A., Watarai, S., Ohnishi, Y. and Kodama, H. 2005. Protective effect of anti-ganglioside anti-

- bodies against experimental *Trypanosoma brucei* infection in mice. *J. Parasitol.* **91**:73-78.
13. Watarai, S., Han, M., Tana and Kodama, H. 1998. Antibody response in the intestinal tract of mice orally immunized with antigen associated with liposomes. *J. Vet. Med. Sci.* **60**:1047-1050.
14. Watarai, S., Tana, Inoue, K., Oguma, K., Naka, K. and Kodama, H. 2000. Inhibitory effect of intestinal anti-globotriaosylceramide IgA antibody on verotoxin-induced cytotoxicity. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**:449-453.

58th Western Poultry Disease Conference & American College of Poultry Veterinarians Work Shop 参加報告

場所：Sacramento, California, USA
期間：2009年3月22日～3月25日

永野 哲 司

はじめに

2009年3月にアメリカ・カリフォルニア州サクラメントにおいて、58th Western Poultry Disease Conference (WPDC) 及び American College of Poultry Veterinarians (ACPV) Work Shop が開催され、参加する機会を頂きましたのでその概要を報告いたします。

成田よりサンフランシスコを経由して到着したサクラメント国際空港は想像していたよりも小さな空港で、日本人観光客も訪れないアメリカ西部の偏狭な片田舎に着いた印象を受けた。しかし、そこから高速道路を使ってタクシーで15分程の市街地に入ると、多くのビルディングの中にカリフォルニア州の立派な州庁舎が建ち、Light Rail と呼ばれる路面電車が街中を走る大きな都市であった。街の傍を流れるサクラメント川（写真1）沿いには、ゴールドラッシュ時代の町並みを再現したオールドサクラメントがあり、多くのアメリカ人観光客が訪れる観光

地になっていた。市街地には大きなショッピングモールもあったが、不況の影響かシャッターが閉じられている店舗をいくつも見かけた。街全体として治安は良いようであったが、滞在中に日本人の姿を見かけることはなく、一人での出張と拙い語学力も重なり、不安を感じずにはいられなかった。このように、一昨年に参加したカジノの街ラスベガスとは



写真 1

一転したサクラメントの風景に少し戸惑いながら、学会を迎えることとなった。

WPDC 及び ACPV ワークショップが開催されたのは、前述のオールドサクラメントの傍に建つ Holiday Inn Capitol Plaza (写真2) で、中規模ながら立派な コンベンションホール (写真3) を備えるホテルであった。まず始め、3月22日に ACPV ワークショップが開催され、約 300 名が参加して終了後に全員に修了証書が配布された。翌 23 日～25 日の 2 日間半にかけて WPDC が開催され、アメリカ、カナダ、メキシコ、イタリア、イギリス、イスラエル、ブラジル、オーストラリア、バングラデシュ、中国、日本と国際色豊かな 182 名が参加した。講演や質疑応答は、ジョークが飛び交う和やかな雰囲気の中で行われたが、突如として発せられるアメリカンジョークの多くは理解しがたく、笑うタイミ



写真 2



写真 3

ングを失ったことが数度となくあった。また、各国の鶏病専門家たちが、ポスター会場などで楽しくそして陽気に親交を深めつつも、真剣に最新情報の交換を行っている姿を多く見かけた。

以下に、ワークショップ及び学会の概要について簡単に紹介する。

ACPV Work Shop について

「Salmonella in Poultry: Epidemiology, Regulations, Detection, and Interventions」と題して、14 題の教育講演がなされた。現在のところ、アメリカでは採卵鶏よりもむしろ肉用鶏のサルモネラ汚染が問題視されていた。全般的な分離状況については、Thompson が最も高頻度に分離されること、ゲンタマイシン耐性株が高率に分離されること、長期的な推移では Kentucky の分離率が上昇していることが示された。鶏卵に限ると Heidelberg が高率に分離されていることも示された。イギリスでは、ヒトの Enteritidis 食中毒の発生は減少したものの依然として問題であることが示された。イギリスでの菌分離状況では、最も高頻度に分離される血清型は Livingstone であることが示された。また、疫学情報として重要な指標とされているファージ型について、以前から優位であったファージ型 4 が減少して他の様々なファージ型株が増えていること、培地での継代によって分離株のファージ型が変異してしまう問題を指摘していた。サルモネラワクチンについては、USDA の P. Holt 博士から米国で使用されている生ワクチン及び不活化ワクチンの紹介があった。その発表のなかで、不活化ワクチンは臓器への播種を抑えること、生ワクチンは侵入・増殖を抑えることでそれぞれ効果を発揮すると紹介していた。さらに、Heidelberg, Kentucky, Berta を抗原としたブロイラー種鶏用 3 価ワクチンの有効性についても紹介していた。その他に、ナノテクノロジーを応用した新規サルモネラ検出方法や、食鳥処理工程でのサルモネラ汚染の問題などについて講演があった。

58th WPDC について

演題は、サルモネラ、カンピロバクター、クロストリジウム、鳥インフルエンザ、伝染性喉頭気管炎、

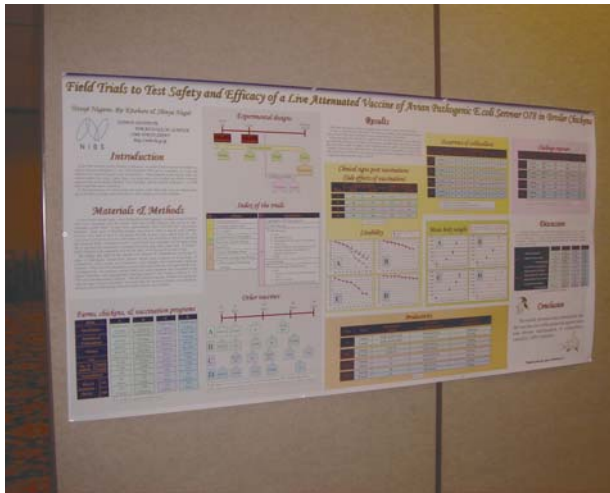


写真 4

コクシジウム、大腸菌症、マイコプラズマ、伝染性気管支炎など多岐に亘り、病性鑑定報告を加えて、招待講演 8 題、口頭発表 45 題、ポスター発表 14 題で行われた。その中で、当研究所からは、「Field trials to test safety and efficacy of a live attenuated vaccine using a mutant of avian pathogenic *E. coli* serovar O78 in broiler chickens」の演題をポスターで発表した（写真 4）。

招待講演では、淘汰と出荷制限を基本対策とした低病原性鳥インフルエンザの防除成功事例、養鶏関係者向けのマスコミ対策等が紹介された。興味深い症例として、ペンシルバニア地区から *Enterococcus suis* を原因とした骨髄炎及び関節炎、原因不明の結膜炎、ブラキスピラ症、伝染性コリーザによる眼瞼浮腫、七面鳥の *Mycoplasma iowae* 感染症、狩猟鳥のマイコプラズマ症が、カナダ西部地区から、サルモネラ症、七面鳥の白血病、クロストリジウム症、低病原性鳥インフルエンザ、鶏痘などの報告があった。*Enterococcus* 骨髄炎は一般演題でも発表があり、アメリカで近年問題となっているようである。

口頭発表では、ワクチンに関する演題が比較的多かった。七面鳥の皮膚炎に対するクロストリジウム毒素ワクチン、インフルエンザ HA 抗原を組み込んだ組換えアデノウイルスワクチン、Fort Dodge Animal Health 社製の鶏大腸菌生ワクチン、*Mycoplasma synoviae* (MS) 生ワクチン、インターベット / SPAH 社製の組換え HVT ワクチン、Merial 社の IBDV の VP2 遺伝子を組み込んだ組換え HVT ワクチンなどについて有効性を示したデータの発表が

あった。発生報告では、バングラディッシュでの鳥インフルエンザ H9 発生事例、イタリアでの伝染性喉頭気管炎の発生状況、*M. iowae* 感染により背骨が変形する事例、北カリフォルニア州で流行している高病原性 IBDV の事例、*Enterococcus cecorum* による骨髄炎及び関節炎、トリコモナス症などが発表された。研究発表では、IBV の RT-PCR 型別、Metapneumovirus 感染における CD8 陽性 T 細胞の働き、病原性の異なる IBDV 株の遺伝子系統樹解析などが発表された。鶏大腸菌症の事例報告では、非臨床的な感染が生産性に大きな影響を与えていることが紹介された。鶏大腸菌生ワクチンについては、血清型 O1, O2 又は O18 株に対して有効性を示したデータが紹介された。MS 生ワクチンについては、日本全薬工業株式会社の宗像氏から採卵鶏投与での成績が発表された。

ポスター発表では、前述の鶏大腸菌生ワクチンについて七面鳥でも有効であった成績が発表されたほかに、エルサルバドルの野外ブロイラーに用いたところ、血清型 O5, O79, O143 感染に対して有効性を示した成績が報告された。エルサルバドルの野外応用例では、実際に野外で効果を発揮するには、継続的に使用することや複数回投与が必須であるとコメントしていた。また、イタリアでの Metapneumovirus 感染の報告などもあった。

最後に、来年度 59th WPDC は 2010 年 4 月 18 日～21 日にカナダ・バンクーバーの The Fairmont Hotel Vancouver で開催されることが告げられた。さらに、2011 年にサクラメント、2012 年にフェニックス、2013 年にサクラメント、2014 年にメキシコ



写真 5

と開催地が予告され、今後しばらくは隔年でのサクラメント開催が決定したことも発表された。

あとがき

海外での様々な情報収集をするべく、出発前に本屋を数軒まわって観光ガイド本を捜したものの、サクラメント観光を紹介した情報誌を入手することができなかった。もともと時間的な余裕もなかったが、学会以外の情報収集は極めて乏しいものとなってしまった。その中で唯一、滞在期間中に州庁舎を見学したが、当然のようにアーノルド・シュワルツェネッガー州知事の姿を見かけることはなかった（写真5）。少しは期待していただけに残念であった。また、学会終了後に訪れたオールドサクラメントの町並みは開拓時代のアメリカの雰囲気を十分に感じることができるものであった（写真6）。ただ、日本人の感覚で言えば日光江戸村か東映太秦村みたいなものかと考えながら、一人寂しく散策したことを

思いだす。

最後に、末筆で恐縮ですが、今回の学会発表の機会を与えてくださった関係者の方々、並びに発表データの収集及びとりまとめについてご助力頂きました諸氏に深謝いたします。

（主任研究員）



写真6

新人紹介

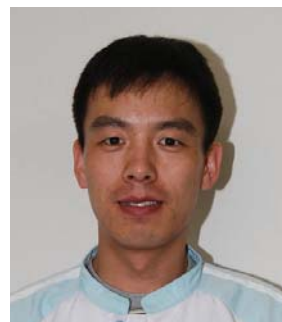


小玉 敏明（こだま としあき）

昭和34年2月生まれ、高知県高知市出身。山口大学農学部獣医学科を1984年3月に卒業し、大学院では東京大学の医科学研究所（農学系研究科）において、サル免疫不全ウイルス（SIV）の研究に携わった。当時は現在6年制の獣医系大学がまだ4年制であった頃であり、同研究所にて1986年3月に修士課程を修了後、1990年3月には博士課程を修了して農学博士号を取得した。博士論文はもちろんSIV研究に関するものであり、そのタイトルは、「Species-specific adaptive mutation of simian immunodeficiency virus（SIVの種特異的な適応変異）」であった。さらにSIVの研究を続ける場所を求めて渡米し、Harvard Medical SchoolのNew England Primate Research Centerでのpostdoctoral fellowを経て、Oregon Health Science UniversityのOregon National Primate Research Center、さらにUniversity of Pittsburgh School of Medicineにて研究職に従事し、SIVを用いたAIDSウイルス病原性機序の解明を目的として研究を続けてきた。大学院から25年間、SIV一筋のウイルス研究者である。平成21年4月に主任研究員として入所し、研究2部の配属となった。趣味は、マリンスポーツ、特にスノーケリングと海釣り。物腰は柔らかいが、筋が通らないことには妥協しない静かなファイター型。会話の中にとろろ英単語を差し込む独特な小玉語をあやつる。日生研のウイルス研究の発展のために彼の指導力が大いに期待される。（KU記）

張 国宏 (ちょう こくこう・Zhang Guohong)

昭和 50 年 12 月生まれ。中国吉林省輝南県出身。延辺大学農学院動物医学部を平成 12 年 6 月に卒業後、同大学修士課程に進学し、「*Eperythrozoon suis* 感染豚における Dot-ELISA を利用した抗体測定系の確立」について研究を行った。学位取得後、同大学予防獣医学研究室助教授を経て、平成 16 年に来日し、平成 21 年 3 月に帯広畜産大学大学院畜産学研究科博士課程を修了した。同課程では、本研究所 OB である玄学南教授のもとで「トキソプラズマ症に対する組換えワクチン開発」について精力的に研究を行い、多くの研究成果を上げている。本年 4 月に入所し研究 2 部へ配属されたが、これまでの専門知識を活かしてコクシジウム症などの原虫病について担当する予定である。学生時代に友人達と北海道内を車で旅行し、函館の夜景や富良野のラベンダー畑を見て感動したことが良い思い出になっているという。まだ、西日本には足を延ばしたことがなく、歴史の色濃い京都や独自文化の大阪などを巡ることが次の目標である。本人曰く趣味はないと言うが、ここまでくれば立派な趣味である。日本各地を訪れて、日本の歴史文化をよく知れば、祖国との共通性を感じつつ、またその違いには驚くことであろう。近年、アジア圏の連携を求める動きに伴い、日中の人材交流も盛んになっている。ぜひ、彼には日中、延いてはアジアの架け橋となるような研究者になってもらいたい。(FK 記)



八木原 紘子 (やぎはら ひろこ)

昭和 55 年 8 月、埼玉県生まれ。日本獣医生命科学大学獣医学部を卒業後、同大学大学院獣医生命科学研究所獣医学専攻に進学。在学中は獣医臨床病理学教室に所属し、「犬のケラチノサイト分化関連蛋白質に関する研究」をテーマとして学位を取得した。また、大学の付属病院にて犬および猫の診察業務（腫瘍科、血液内科）にも携わってきた経験をもつ。大学院修了後の本年 4 月、当研究所に入所し、企画学術部に配属された。現在、研究ならびに開発を推進する立場として、動物用生物学的製剤等の開発に関わる基礎知識の習得に日々励んでおり、「仕事を早く覚え、日生研の未来を支えられる一員として成長していきたい」と力強い抱負を語っている。趣味は映画鑑賞、カラオケ、ショッピング、温泉巡りなどで、今年からはスポーツも始めようと思い、まずは冬にスキークの合宿を予定しているとのことである。毎朝 5 時半には自宅を出発し、片道約 2 時間半の通勤時間を有効に活用すべく、さらにはネイティブ英語を身につけるため、ポータブル DVD プレイヤーで吹き替えなしの海外ドラマの鑑賞に耽っているとのこと。最近「ER 緊急救命室」に嵌っているようである。明朗闊達な性格を覗かせている新人は、既に環境にとけ込んでおり、今後の活躍が大いに期待される。(ZL 記)



—— 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、研究の持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 558 号) 平成 21 年 8 月 25 日印刷 平成 21 年 9 月 1 日発行(第 55 巻第 5 号)
発行所 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)1056(企画学術部) FAX: 0428(33)1036
発行人 林 志鋒
編集室 委員/竹山夏実(委員長), 入江拓也, 佐藤寛子
事務/企画学術部
印刷所 株式会社 精興社
(無断転載を禁ず)