

NIBS LETTER 2010 NOVEMBER
No. 565

日生研おより

2010年(平成22年)11月号 第56巻第6号(通巻565号)

挨拶・巻頭言

老いについて

.....土井邦雄(2)

獣医病理学研修会

第49回 No. 986 イヌの小脳

日本獣医生命科学大学獣医病理学教室(3)

第50回 No. 1007 ネコの腎臓

.....(財)日本生物科学研究所(4)

第50回 No. 1020 イヌの乳腺部腫瘍

.....北里大学獣医病理学研究室(5)

第50回 No. 997 イヌの鼻粘膜

.....山口大学獣医病理学教室(6)

レビュー

難治性慢性疾病における免疫疲弊化機序の
解明と新規治療法への応用

— 獣医医療への応用にむけて —

.....池淵良洋, 今内 寛, 寸田祐嗣,

小沼 操, 村田史郎, 大橋和彦(7)

発表論文紹介

豚丹毒菌とその他のエリシペロトリックス

属菌種の検出および鑑別のための

定量的リアルタイムPCR法の開発

.....ToHo, 小山智洋, 長井伸也,

土屋耕太郎, 布谷鉄夫(11)

お知らせ

学会発表演題 (12)



NIBS

財団法人 日本生物科学研究所

NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE

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

老いについて

土井 邦雄

この夏、転居を機に、長年押入れの奥で眠っていた懐かしい書物の数々に再会することが出来た。そのなかに、高峰秀子・松山善三夫妻の共著もあり、再読していて、「野郎というものは、女性への興味が薄らぐと共に、過去への強い郷愁と、学問という不可思議なる道楽に走る。」という一文に遭遇した。昔読んだ時には何の感慨も覚えなかったのに、この度は違った。改めて我が身を振り返ると、このところ女性への興味は確実に薄れ、また、折に触れて遠い過去の日常が鮮やかに脳裏に蘇るようになった。加えて、仏教史に登場する仏法者への人間的興味から、仏教書を読み漁っている。仏教書を耽読することを学問とは言うまいが、不可思議なる道楽であることには違いあるまい。これはつまり、私が老年期に一步足を踏み入れたということの証であろうか。一説によると、ヒトは65歳を区切りに老年期に移行するという。

近年、日本人の寿命は大幅に延びたと言われている。しかし、延びたのは老年期であって、決して幼少年期や青壮年期が延びた訳ではない。つまり、体力の衰えを実感しつつ、意識的にであれ無意識的にであれ、寿命の尽きる瞬間に向かって歩み続ける期間が延びた訳で、こうなると寿命が延びたことを素直に喜ぶことも難しく、老年期を生きる新たな覚悟が必要になってくる。老いは昔から人間の大きい関心事で、古代ローマ時代のキケローをはじめ多くの人々によって様々に語られて来た。また、老いを扱った文学作品も数多い。何程かの参考になろうかと、それらの書物を読み漁った結果、老いの輪郭はおぼろげながら見えて来たような気はするものの、私には未だ、「老いを正面から我が身に引き受けることこそが、生の道程の最後に現れる課題である。」(黒井千次)といった心構えも覚悟も出来てはいない。

科学の世界では、20世紀になって色々な動物種を用いて老化の生物学的な指標が追及され(東大獣医病理学教室におけるイヌの脳の老人斑に関する研究もその一つ)、1990年代以降には個体および特に細胞レベルで老化のメカニズムに関する研究が急速に進展し、所謂老化関連遺伝子に関する知見の蓄積も加速している。それと並行して、最近ではanti-aging drugsの開発をはじめ、老化を防止し、寿命を延ばそうという試みも盛んになりつつある。こうした流れの中にあって、「老化とは、実は生命活動を正常に保つために不可欠なしくみである。」(近藤祥司)という指摘は重要であると思われる。また、健康・老化・寿命を一括して、時間軸、生態学、文学などの多角的な視点から解析し、人といのちの文化誌として纏めた黒木登志夫氏の著書は、医学の世界に身を置く著者がヒトの老化の二側面(肉体的および精神的側面)を総合的に捉えようとした試みとして興味深い。

ところで、古代ローマからルネサンスに至るイタリアを舞台に、多くの著書を上梓している塩野七生氏によれば、ヒトに年齢があり、老いるのに似て、組織にも年齢があり、老いるという。ヒトは肉体的にも精神的にも老い、ついには寿命が尽きる。一方、組織の老いとは、組織としての理念の揺らぎ、施策の継続性の欠如、即応力の鈍化などの総決算としての自信の喪失であるらしく、こうした現象は如何なる形態の組織にも生じ得る。逆に言えば、組織としての自信を堅持することで、組織の老いを阻止出来るということになる。それには先ず、組織のトップがその組織の「基本理念」とそれを実現する「意志」を明確に示し、組織の全構成員がその精神を共有することが肝要であろう。次いで、理念を実現するための施策を決定し、それを実行する中枢機能を、柔軟な思考力と異質なものをも取り込む包容力を持ち、かつ、「不幸でさえも滋養にしてしまう」若さ(塩野七生)を兼ね備えた少人数の集団に託すべきであると考え。組織も所詮ヒトの集合体で、構成員はいずれヒトとして老いて行く。しかし、明確な理念、それを実現するという強固な意志、および一貫した施策が組織内で継承される限り、組織は老いることなく存続し、あまつさえ、若い構成員の斬新な発想によって、若返ることも可能であろう。すなわち、個人のそれとは違って、組織の老化は幸いにも可逆的であり得る。

私にとって老いは未だ半ば観念の域を出ず、また、悟道の境地にも程遠い。従って、今しばらくは「未熟な」一老年として、「諸行無常、諸法無我、涅槃寂靜、一切皆苦」の世の中を気儘に彷徨っていたいと願っている。

(東京大学名誉教授・財団法人日本生物科学研究所常務理事)

イヌの小脳

日本獣医生命科学大学獣医病理学教室 第49回獣医病理学研修会 No. 986

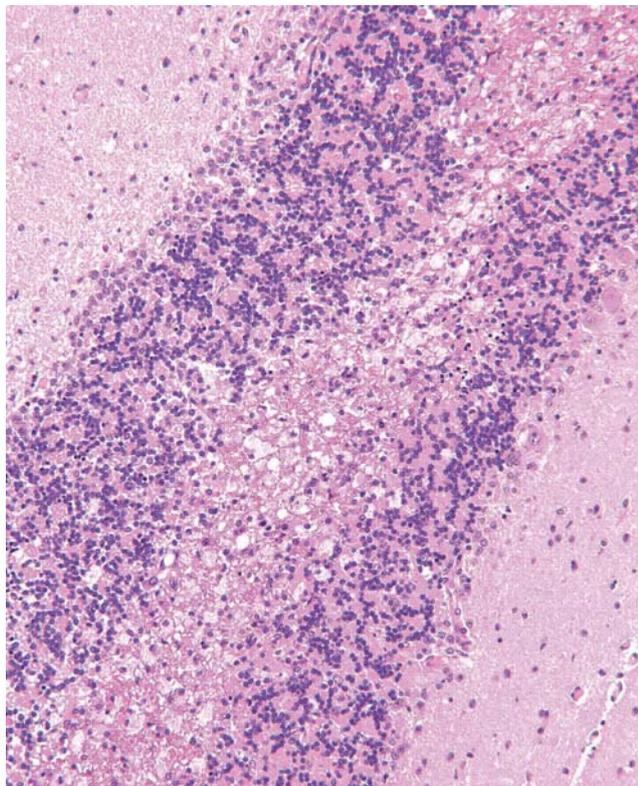


図1

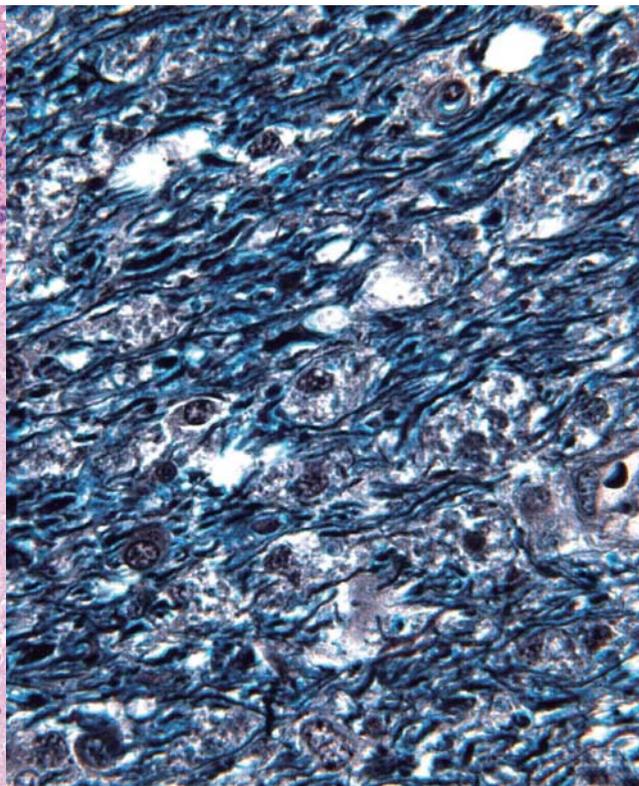


図2

動物：イヌ，ミニチュアダックスフンド，避妊雌，12歳。

臨床事項：1年以上にわたり，副腎皮質機能低下症による低Na血症を持続していた。治療中に重度低Na血症（110 mEq/L）がみられたため，食塩3gの給餌，生理食塩水の点滴によるNa補正を試みた。補正により血中のナトリウム値は25時間で16 mEq/L上昇した。補正3日後，起立困難，震え，痙攣がみられた。症状はさらに悪化し，意識消失，遊泳運動がみられた。9日目には予後不良と判断され，安楽死された。

肉眼所見：両側副腎皮質の高度萎縮。大脳の表面血管樹枝状充盈の他には著変認めず。

組織所見：左右対称に小脳小葉白質板を中心に空胞病巣がみられた（図1）。病巣部ではボディアン・LFB二重染色において髄鞘崩壊と比較的保存された軸索が認められ，残存する軸索間にはLFB陽性顆粒を含む髄鞘貪食細胞が多数みられた（図2）。重度病巣では病変は小脳灰白質にまで及んでおり，顆粒層の多くの細胞にアポトーシス（TUNEL法により）が認められた。同様の病変は間脳視床，大脳白質にもみられた。副腎は特発性副腎皮質萎縮症と診断された。

診断：小脳髄質髄鞘融解（Myelinolysis）

考察：本病変は一種の脱髄であるが，慢性アルコール中毒や重度栄養失調の患者で報告され，多発性硬化症などの脱髄と区別され，Myelinolysisと命名された¹⁾。後にこの病因は急激なNa補正であることが明らかになった²⁾。本症例も慢性副腎皮質機能低下症に随伴した低ナトリウム血症に対する急激なナトリウム補正後に神経症状を呈し，解剖学的に限局した領域に脱髄巣がみられる特徴的な組織所見が得られた。イヌでは病変は視床でみられることが多いが³⁾，本症例は視床よりも小脳の方が顕著であった。本疾患では急激なナトリウム補正が原因であることは明らかであるが，浸透圧の変化がどのような機序で髄鞘融解をひき起こすのかは未だ不明である。

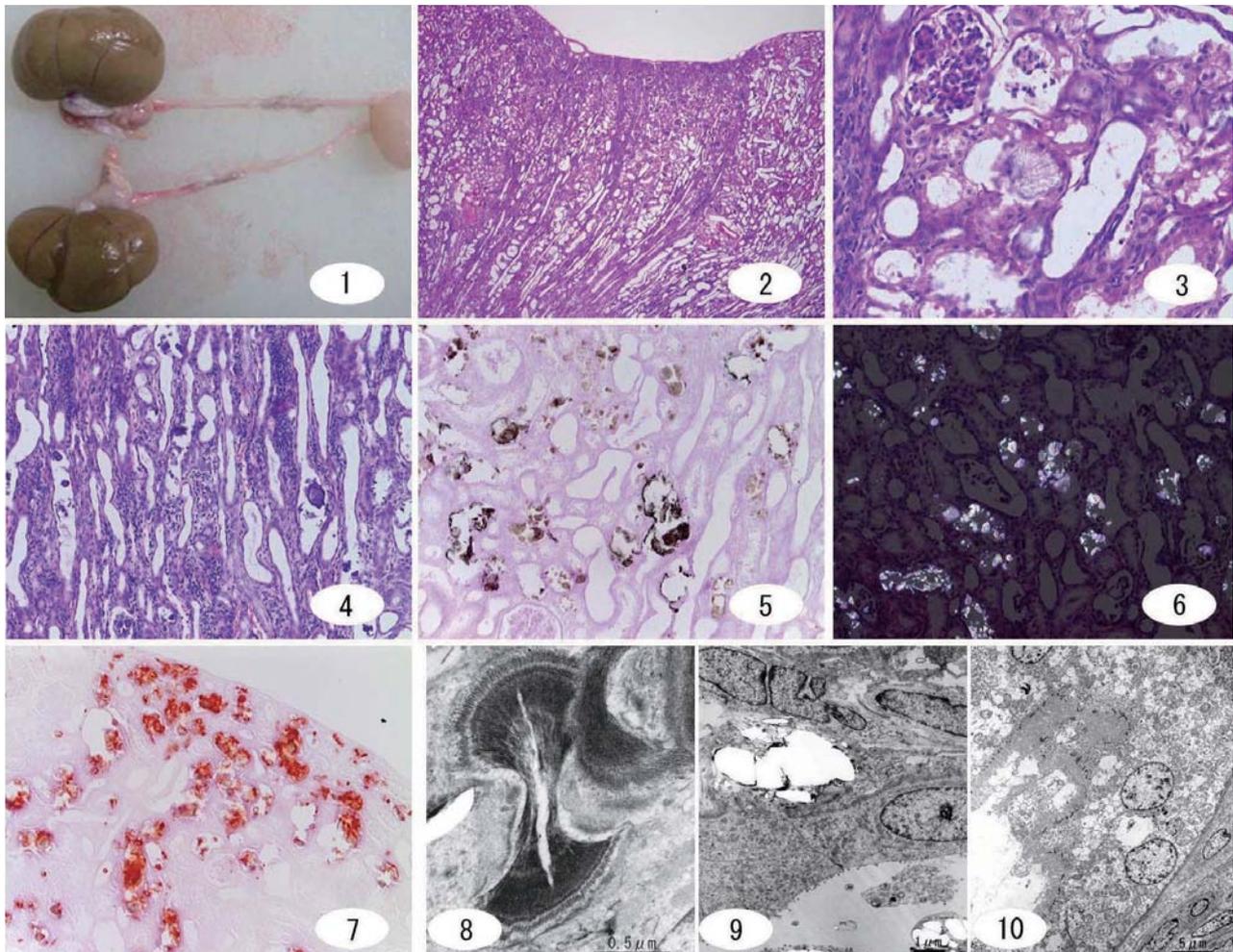
（佐々木菜保子，高橋公正）

参考文献：

1. Adams, R. and Victor, M. 1959. *Arch. Neurol. Psychiat.* **81**:154-172.
2. Sterns, R. H., et al. 1986 *New Engl. J. Med.* **12**:1535-42.
3. O' Brien, D.P., et al. 1994. *J. Vet. Int. Med.* **8**:40-48.

ネコの腎臓

(財)日本生物科学研究所 第50回獣医病理学研修会 No. 1007



動物：ネコ，雑種，雌，3ヶ月齢。

臨床事項：症例は某所において，研究用に飼育されていたネコで，出生時より成長不良が認められた。2009年6月18日から数回にわたり実施した血液化学検査より，BUN及びcreatinineの上昇が認められたため，同年6月26日に安楽殺後病理解剖され，左右腎臓が病性鑑定の目的で弊所に送られてきた。

剖検所見：左右の腎臓はどちらも硬結及び一部癥痕化を呈し（図1），剖面では皮質の菲薄化が認められた。その他の臓器には肉眼的に異常は認められなかった。

組織所見：皮質の表層部の癥痕巣（図2），尿細管の拡張及び結晶状物の沈着，尿細管上皮細胞の変性・壊死及び扁平化（図3），尿細管間質の一部において軽度から中等度の結合織の増生及びリンパ球浸潤が認められた（図4）。尿細管に認められた結晶状物は無色透明～好塩基性，滑車様ないし角柱様の構造を示し（図3），コッサ染色では褐色～黒褐色に染色され（図5），偏光下では複屈折性を示した（図6）。また，アリザリンレッドS染色ではpH7.0及びpH7.0に2M酢酸処理を加えた条件下で淡赤色に染色され（図7），pH4.2及びpH7.0に0.1N塩酸処理を加えた条件下でその染色性は消失した。これらの結果から本結晶状物はシュウ酸カルシウム（CaOx）結晶と同定された。糸球体ではボーマン嚢に好酸性漿液物の貯留が散見されたが，毛細血管基底膜の肥

厚あるいはメサンギウムの増生は顕著ではなかった。腎臓表面の血管において石灰沈着を伴う器質化血栓が認められた。病変部の電顕検索では尿細管上皮内において放射状構造を示すCaOx結晶が認められ（図8），CaOx ghostが尿細管上皮及び尿細管間質において散見された（図9）。多くの近位尿細管上皮でミトコンドリアの膨化及び崩壊を伴う細胞質の空胞化が認められた（図10）。
診断：シュウ酸カルシウム（CaOx）結晶の沈着を伴う尿細管上皮の変性・壊死及び間質性腎炎（シュウ酸塩腎症）

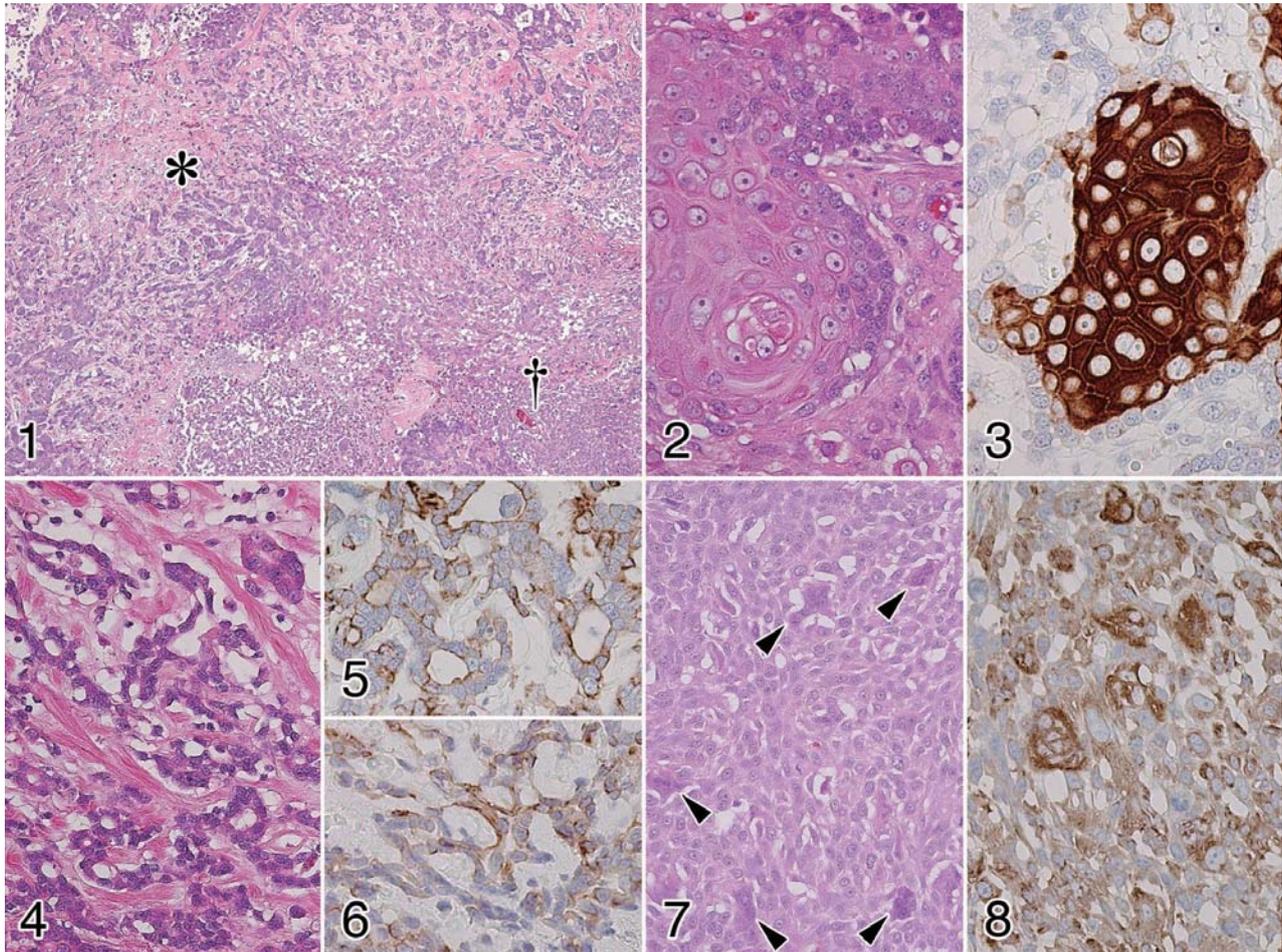
考察：シュウ酸症は主に腎臓にCaOx結晶が沈着する疾病であり，重度になると腎不全や全身性のCaOx結晶の沈着に発展する。その発生機序により原発性と続発性に分類されるが，本症例は室内で食餌管理下のもとで飼育されていたことや，同腹のネコで同様の肉眼病変が観察されていたことから，原発性のシュウ酸塩腎症が疑われた。（鈴木敬之）

参考文献：

1. Danpure, C. J. and Rumsby, G. 2004. Molecular aetiology of primary hyperoxaluria and its implications for clinical management. *Expert Rev. Mol. Med.* 6:1-16.
2. De, Lorenzi, D., Bernardini, M. and Pumarola, M. 2005. Primary hyperoxaluria (L-glyceric aciduria) in a cat. *J. Feline Med. Surg.* 7:357-361.

イヌの乳腺部腫瘍

北里大学獣医病理学研究室 第50回獣医病理学研修会 No. 1020



動物：イヌ，シーザー，避妊雌，10歳。

臨床事項：右第三乳腺から第四乳腺にかけて硬結腫瘍が触知されたため，本学附属動物病院にて摘出した。3ヶ月後来院時には右第三乳腺および第五乳腺に腫瘍が認められ，X線検査で肺に結節が1個確認された。

肉眼所見：初診時の腫瘍の大きさは約2×3×3cmであった。断面は白色から黄白色，充実性で，小型の空隙が1ヵ所認められた。

組織所見：上皮性腫瘍（図1，*）と非上皮性腫瘍（図1，†）が接し，互いに浸潤していた。上皮性腫瘍は基底様細胞に縁取られ，扁平上皮への分化を示し（図2），cytokeratin AE1/AE3に陽性であった（図3）。基底様細胞から連続して腺構造を形成する領域も見られ（図4），AE1/AE3およびcytokeratin 19に陽性を示した（図5，6）。非上皮性腫瘍細胞は多角形から紡錘形で充実性に増殖し（図7），多核巨細胞も多数認められた（図7，矢頭）。免疫染色ではvimentinのみ陽性で（図8），筋上皮，筋線維，骨，組織球，白血球に関連する抗原は全て陰性であった。

診断：腺扁平上皮癌および多核巨細胞を特徴とする未分

化肉腫（癌肉腫）

考察：本例は多数の多核巨細胞を伴う非上皮性腫瘍が特徴的であった。巨細胞が出現する非上皮性腫瘍として骨肉腫，組織球肉腫，悪性線維性組織球腫が知られているが，本例ではvimentinを除く間葉系および白血球系抗原は全て陰性であり，超微形態学的にも特定の細胞，組織への分化を示す所見は得られなかった。提出標本では上皮性，非上皮性腫瘍は離れて存在していたが，一部で互いに浸潤（混合）し，再発病巣でも双方の成分が混在していたことから，癌肉腫と診断された。

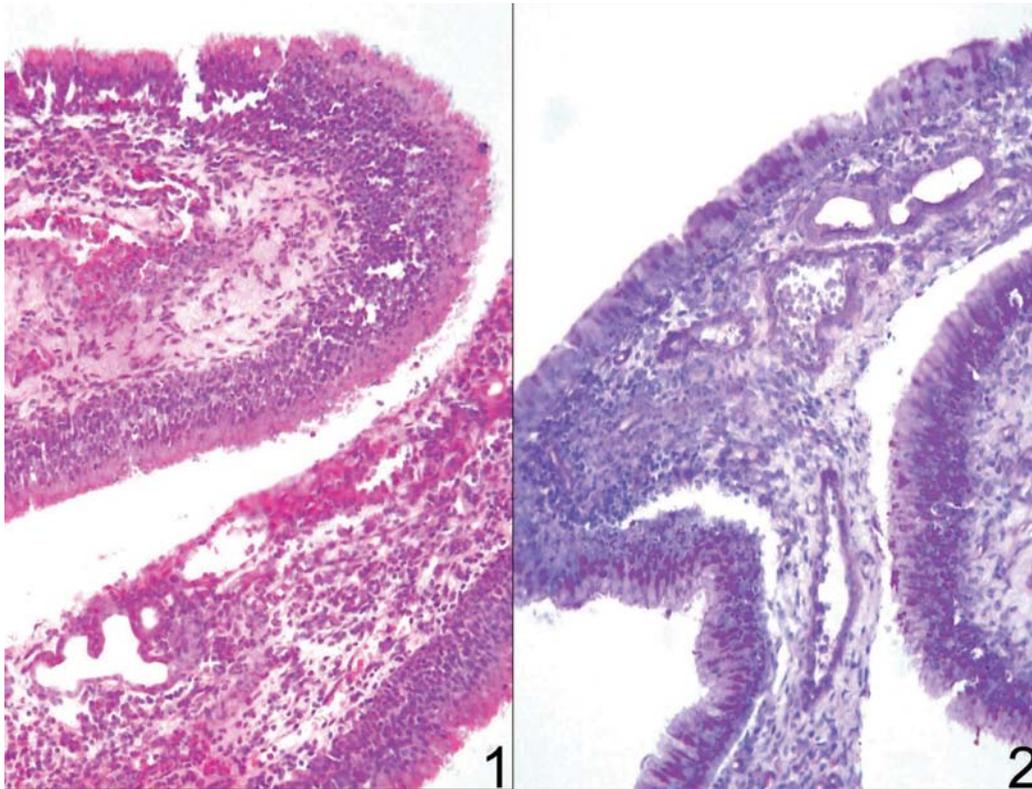
（畑井 仁）

参考文献：

1. Misdorp, W., Else, R. W., Hellmen, E. and Lipscomb, T. P. 1999. WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals, 2nd series Vol. 7. Mammary Tumors of the Dog and the Cat., AFIP, Washington, D. C.
2. Misdorp, W. 2002. Tumors of the Mammary Gland. pp.575-606. In: Tumors in Domestic animals, 4th ed. (Meuten, D. J. ed.), Blackwell, Iowa.

イヌの鼻粘膜

山口大学獣医病理学教室 第 50 回獣医病理学研修会 No. 997



動物： イヌ，ミニチュアダックスフント，雄，3歳。
臨床事項・肉眼所見： 2009年8月20日，一週間前からの突然のくしゃみ，逆くしゃみ，右側鼻孔からの黄色で粘稠性の高い膿状の鼻汁を主訴に開業医を受診。血液検査で好中球増加とCRP上昇が認められ，マルボフロキシンとメロキシカムを投与。2009年8月23日，依然として鼻汁が認められ，鼻汁の塗抹検査で多数の好中球・好酸球と球菌が認められた。鼻汁の培養検査で *Staphylococcus aureus* が検出されたため，セファレキシンを処方。2009年9月8日，鼻腔内視鏡で，鼻粘膜の充血・腫脹，鼻腔内に多量の粘稠な鼻汁の貯留を認め，洗浄・吸引は困難であった。洗浄時，鼻甲介のヒダの間に粘膜の色と異なる赤桃色の線状の鼻粘膜組織が採取され，生検検査を依頼された。洗浄後，右側鼻腔からの鼻汁は減少したが，左側からも鼻汁が認められるようになった。プレドニゾン投薬後，症状は改善し，その後無処置で2日に1度，軽度のくしゃみがみられる程度で現在も経過観察中である。プレドニゾン処置前血清の多くのアレルギー（室内吸入群，花粉群，食物群）特異的IgE測定は陰性であった。

組織所見： 鼻粘膜は全体に肥厚していた。粘膜上皮層では杯細胞は著しく肥大，過形成／化生（図1：HE）による粘液産生が著明であった（図2：PAS）。一部に粘膜のびらん・潰瘍を認め，上皮内に好酸球が浸潤し，それらを破壊し，上皮は解離し海綿状を示していた。また，基底膜の不規則な硝子様肥厚と断裂を認めた。粘膜固有層は水腫性で，多数の好酸球を主体とし，次いでリンパ球・プラズマ細胞，一部好中球を混じた浸潤が見られ，肥満細胞は殆ど認められなかった。さらに充血・出血・鬱血がみられ，血管は拡張して内皮細胞は肥大し，好酸

球が接着し，内腔に多数の好酸球を認めた。鼻腺の粘液産生は亢進し，表皮と同様に好酸球が浸潤し，粘液細胞は破壊され，軽度の線維化も認めた。細菌・真菌・寄生虫は認められなかった。免疫組織化学染色では，粘膜固有層および血管内のリンパ球はCD4，IL-4，IL-5，IL-13，CD79aを発現し，IFN- γ 発現リンパ球は少数であった。好酸球もIL-4，IL-5，IL-13陽性で，リンパ球・好酸球はVLA-4陽性，血管内皮細胞はVCAM-1陽性，上皮・好酸球はEotaxin-2陽性を示した。

診断： イヌの慢性好酸球性鼻炎

考察： 本症例の特徴的な組織学的所見は上皮層の杯細胞の過形成と好酸球にリンパ球を混じた浸潤であり，ヒトの非アレルギー性の好酸球性鼻茸の組織像に類似していた¹⁾。リンパ球は免疫組織化学的にはTh2細胞が主体で，I型アレルギーが関与しないアレルギーによる鼻炎が強く示唆された。プラズマ細胞の存在は何らかの抗原に対する特異的免疫反応が成立している可能性が示唆されるが，アレルギーは特定されず，非アレルギー性の可能性もあり，診断名は犬の慢性好酸球性鼻炎とした。なお，好酸球性鼻炎はアレルギーによるとの記載もある²⁾。また，これまで本例と類似の組織所見を示す報告は見られない。（中嶋朋美，林俊春）

参考文献：

1. Ferguson, B. J. 2000. Eosinophilic mucin rhinosinusitis : a distinct clinicopathological entity. *Laryngoscope* 110:799-813.
2. Caswell, J. L. and Williams, K. J. 2007. Rhinitis in respiratory system. pp. 534. *In*: Jubb, Kennedy and Palmer's. Pathology of Domestic Animals. 5th ed. Vol. 2. (Maxie, M. G. ed.), Elsevier Saunders, Philadelphia.

難治性慢性疾病における免疫疲弊化機序の解明と新規治療法への応用 — 獣医医療への応用にむけて —

池淵良洋, 今内 覚, 寸田祐嗣, 小沼 操, 村田史郎, 大橋和彦 (北海道大学大学院獣医学研究科)

1. 背景

感染症や腫瘍ワクチン開発において、その研究過程では試験管レベル (*in vitro*) で、抗ウイルス効果や抗腫瘍効果が認められたにもかかわらず、実際の免疫動物では期待された効果が認められなかったり、効力が弱いという事例は多い。なかでも慢性感染症に対するワクチン開発は困難を極める。ヒトのウイルス感染症において、ヒト免疫不全症ウイルス (HIV) 感染症やヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 感染症などは代表的なワクチン不在の疾患である。これらの感染症の共通点は慢性感染症である。長年、多くの研究者がワクチン開発に取り組んできたにもかかわらず実用化に至っていない背景には、生体内でのワクチン効果の低さという点である。近年、このような難治性慢性感染症疾患が、なぜワクチン実用化に至らないかの理由の一端が明らかになりつつある。すなわち、ワクチンの問題ではなくウイルス感染細胞や腫瘍細胞が兼ね備える免疫回避システムが原因であることが明らかとなってきた。事実、ワクチン接種によって誘導されるエフェクター細胞は、免疫動物内に多く認められるにもかかわらず、抗ウイルス効果や抗腫瘍効果を発揮していないのである。ヒト、サルおよびマウスなどのウイルス感染細胞や腫瘍細胞とエフェクター細胞を解析した結果、細胞上に発現する免疫制御因子の関与が明らかとなってきた。いわゆる、免疫抑制受容体 Programmed death 1 (PD-1) とそのリガンド Programmed death ligand 1 (PD-L1) である。感染細胞や腫瘍細胞では PD-L1 の発現が亢進する一方、エフェクター細胞上の PD-1 の発現も亢進し、お互いが結合する。その結果、本来、感染細胞や腫瘍細胞の排除のために作用するエフェクター細胞を休眠状態 (これをリンパ球の疲弊化 (exhaustion) という) へと陥れることによって免疫回避を行っていることが明らかとなってきた [2, 7, 39]。幸いこのエフェクター細胞の疲弊化は可逆的であることも明らかとされている。すなわちエフェクター細胞上の PD-1 とウイルス感染細胞や腫瘍細胞上の PD-L1 の結合を妨げてやることで本来の感染細胞や腫瘍細胞に対する傷害活性を回復することが証明されている。これまで、生体内でワクチン効果が認められない理由はワクチン選定の不備として考えられてきた

が、少なくとも *in vitro* で傷害効果等が明らかであるものについては、ワクチンには問題がなく、宿主側の要因であった可能性を示唆するものである。すなわち、この免疫抑制機序を解除することさえ可能ならばエフェクター細胞が従来持つ抗病原体や抗腫瘍効果を回復、増強することが期待される。現在、ヒトの慢性感染症や腫瘍疾患では、この PD-1/PD-L1 機構に注目が集まり基礎研究から応用研究まで多くの研究が進められている。しかし、ウシ等の産業動物では、PD-1/PD-L1 機構の免疫抑制機能は明らかにされておらず研究も進んでいない。

2. PD-1 およびそのリガンドとは

免疫反応において重要な点は、生体外から侵入する有害な病原体の抗原を特異的に排除することおよび自己組織の抗原は特異的に免疫寛容することである。PD-1, PD-L1 および PD-L2 は近年同定された細胞膜上の免疫抑制受容体とそのリガンドであり、B7-CD28 ファミリーに属している。この2つの分子からなる PD-1/PD-L1 機構は T 細胞による過剰な免疫反応を抑制し、免疫寛容に強く関与していることが解明されている。PD-L1 が PD-1 に結合することで抑制性シグナルが細胞内に伝達され、近傍の CD3/CD28 からの活性化シグナルを阻害して免疫抑制作用が起こっていると考えられている [30, 35]。PD-1 からの抑制性シグナルを受けた T 細胞は抗原提示などの活性化刺激を受けても反応しないアネルギーという状態に陥る。通常の生体内では、例えば、胎盤などの免疫学的寛容が起きやすい組織では PD-L1 が恒常的に発現しており、自己抗原反応性 T 細胞の PD-1 と結合することで、正常組織を免疫系システムによる破壊から保護していることが示唆されている [12]。また、PD-1 との結合による逆シグナルは送られないとされてきた PD-L1 が、共刺激因子である B7-1 (CD80) と結合することで抑制性シグナルを細胞内に送る可能性が示唆されている [3]。また、PD-1 は樹状細胞やマクロファージにも発現しており、自然免疫の制御にも関与している可能性が報告されている [13, 44]。このように PD-1 / PD-L 機構は生体内の免疫寛容システムの一つとして機能しており、研究が盛んに行われているが、全貌は未だ解明されていない。

PD-1, PD-L1 および PD-L2 は多くの種類の細胞に発現しており, 免疫活性化刺激により発現が誘導されることが知られている。ヒトにおいて, PD-1 は主に活性化 T 細胞や B 細胞, また, 機能は解明されていないが樹状細胞や活性化単球, ナチュラルキラー T 細胞の細胞膜にも発現している [20]。休止期の T 細胞では発現が確認されないが, やはり活性化により誘導されることが報告されている [1]。一方, PD-L1 は活性化 T 細胞, 樹状細胞, 単球, 血管内皮細胞, 肝臓の間質細胞, 角質細胞など, 造血系に限らず, 非造血系の細胞にも広く発現している [20, 29]。また I 型あるいは II 型 Interferon (IFN) により PD-L1 の発現が誘導または増強される [8, 32]。一方, PD-L2 は PD-L1 と対照的に, 樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞などに限局して発現している [20]。

3. PD-1/PD-L1 機構による免疫疲弊化

PD-1/PD-L1 機構は正常時のみではなく疾患時にも関与することが明らかになりつつある。特に慢性感染症での報告が多い。前述の HIV 特異的 CD8⁺ T 細胞 [7, 39], HTLV-1 感染者の CD8⁺ T 細胞, HTLV 特異的 CD8⁺ T 細胞 [23] や C 型肝炎ウイルス (HCV) 特異的 T 細胞 [40] などでは PD-1 の発現上昇が報告されている。また, PD-L1 発現の上昇も B 型肝炎ウイルス (HBV) [5], HIV [43] や HTLV [23] に関する研究などで報告されている。これらの病原体は免疫抑制機構である PD-1/PD-L1 機構を免疫回避に利用して生体内で生存していると考えられている。また, 慢性感染症だけではなく, 膵臓癌 [27] や成人 T 細胞白血病 [23, 36] などの腫瘍性疾患においても PD-1/PD-L1 機構の関連が示唆されている。これらの報告以外にも, 他のウイルス感染症, 自己免疫疾患, 細菌感染や寄生虫感染でも関連があることが報告されており, PD-1/PD-L1 機構はエフェクター細胞の機能不全, すなわち免疫疲弊を引き起こしている様々な疾患において, 非常に重要な役割を果たしている。

これらの PD-1 および PD-L1 の発現解析と同時に, 抗 PD-1 または抗 PD-L1 抗体を用いて PD-1 と PD-L1 との結合を阻害する研究も数多く行われている。抗体投与により結合を阻害すると, *in vitro* で, HIV 特異的 T 細胞の増殖能やサイトカイン産生能, エフェクター分子発現の上昇 [7, 39], HTLV 特異的 CD8⁺ T 細胞のサイトカイン産生能の上昇 [23], サル免疫不全ウイルス (SIV) 特異的 CD4⁺ T 細胞の増殖能の上昇 [41] などの報告がある。さらに *in vivo* でも, SIV 特異的抗体価の上昇やウイルス量の減少や SIV 感染サルの生存率の上昇 [42], リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) 特

異的 CD8⁺ T 細胞の増殖能やサイトカイン産生能の上昇 [2] などが報告されている。以上のように, PD-1 または PD-L1 特異的抗体投与により, 免疫疲弊に陥った免疫細胞の再活性化を誘導し, ウイルスの排除や腫瘍退縮効果が証明され, 慢性感染症などの治療や新規ワクチン開発への応用の可能性が示唆されている。特筆すべき点としては, 治療として生体へ抗体投与した場合の懸念される副作用が, 現在のところないとされている点である [42]。最新の知見では, メラノーマや大腸癌などの癌患者に対して PD-1 抗体による新規治療 (第 I 相臨床試験) が米国で行なわれ, 副作用を認めない抗腫瘍効果が報告されている。

このように, ヒトの慢性感染症や腫瘍疾患では, この PD-1/PD-L1 機構に注目が集まり基礎研究から応用研究まで多くの研究が進められ治療やワクチンが頓挫している疾患の新規制御法の一つとして期待されている。現在, 我々はウシ, 水牛およびニワトリの PD-1 および PD-L1 遺伝子を同定し, これらの因子の機能解析を行なっている。また, 種々の感染症における免疫抑制状態と PD-1/PD-L1 機構との関係について解析を進めている。ここでは, 牛白血病ウイルス (BLV) 感染症をモデルとした PD-1/PD-L1 機構の解析結果を紹介し, 獣医師医療への応用の可能性を紹介したい。

4. BLV 感染症の現状

BLV はレトロウイルス科に属し, その遺伝子構造は HTLV と最も近縁である [31]。感染血液を介して B 細胞に感染したのち長期間持続感染する [24, 34]。感染牛の大部分は無症候感染 (AL) 牛であるが, 感染牛の 20 ~ 30% ではポリクローナルな B 細胞の異常増殖を呈する持続性リンパ球増多症 (PL) を引き起こす。さらに感染牛の 2 ~ 3% は B 細胞性の白血病である地方病型牛白血病 (EBL) を引き起こし, リンパ節に悪性リンパ肉腫が形成され, 予後不良で死に至る [33]。近年, 北海道を含む全国で, 感染牛の増加傾向が見られ, 将来的な BLV 汚染の拡大と EBL 発症数の増加が懸念されている。しかし現在のところ, 実用的なワクチンや治療法がなく, 迅速な対策や治療法の開発が求められている。本症は長年の研究にもかかわらず, 未だワクチンが樹立されていない感染症である。しかし, 抗ウイルス作用を導くような CTL エピトープや Th エピトープの同定はすでに報告されている [4, 9, 11]。これらのエピトープマッピングを基盤としたワクチン開発が試みられ, これまで, ペプチドワクチン, DNA ワクチン, ワクチニアウイルスワクチンなど種々のワクチンによる治療が行なわれ, 生体内でのエフェクター細胞の誘導が確認されるものの期待さ

れた感染防御効果は得られておらず実用化に至っていない [17]。

5. ウシ PD-1/PD-L1 遺伝子の同定

3' および 5' RACE 法によりウシ PD-1 および PD-L1 遺伝子を同定した [14]。その結果、ウシ PD-1 の予想アミノ酸配列は、機能が明らかであるヒト PD-1 と 72.9%、マウス PD-1 と 65.6% の相同性を示した。今回同定したウシ PD-1 を他の動物種の PD-1 と比較した結果、細胞内領域にある二箇所の Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM ; I/L/V/S/TxYxxL/V/I) [6] が完全に保存されていた。PD-1 の ITIM には二つのチロシン脱リン酸化酵素 SHP-1 および SHP-2 が誘導され、抑制性シグナルが細胞内に伝達される [28, 35]。このことから、ウシ PD-1 もヒトおよびマウス PD-1 と同様に、本因子への刺激により抑制性シグナルが細胞内に伝達される可能性が高いと考えられた。一方、ウシ PD-L1 予想アミノ酸配列は、ヒト PD-L1 と 85.2%、マウス PD-L1 と 80.7% の相同性を示した (投稿中)。興味深いことに近年、フグあるいは牛と同じ偶蹄目である豚においても PD-L1 遺伝子の発現ならびに PD-L1 による T 細胞性免疫の抑制機能が報告されている [15, 38]。今回、決定したウシ PD-L1 予想アミノ酸配列は、他の動物種と比較してブタ PD-L1 とより高い相同性を示していることから、同様の免疫抑制機能に関与していることが予想された。以上の予想アミノ酸配列の比較や発現解析から、ウシ PD-1 および PD-L1 は PBMC において T 細胞性免疫の活性化により発現が上昇し、免疫抑制を誘導している可能性が示唆された。

6. BLV 感染牛における PD-L1 発現解析

ヒト肝細胞ではアデノウイルスや HBV 感染により PD-L1 mRNA 発現が上昇し [25]、また HBV 患者の樹状細胞あるいは HCV 患者の T 細胞、単球系細胞や B 細胞でも PD-L1 の発現上昇が報告されている [5, 16]。さらには、抗 PD-L1 抗体処理により T 細胞の機能が回復することも同時に報告されている。このように PD-1/PD-L1 機構の免疫抑制機能と慢性感染症との関連が示唆されていることから、フローサイトメトリーを用いて BLV 感染の様々な病態ステージにおける PD-L1 発現解析を行った。その結果、病態が進行した BLV 感染牛 (PL および EBL 牛) の PBMC で PD-L1 発現上昇が認められた (投稿中)。すなわち、PD-L1 発現は BLV 感染の病態進行を示す白血球数、ウイルス量およびウイルス力価と正の相関を示した。本症は CD5⁺ B 細胞に感染することに起因する腫瘍疾患である。そこで

EBL 牛および PL 牛における PD-L1⁺ 細胞の同定を試みた結果、IgM⁺ 細胞あるいは CD5⁺ 細胞でやはり PD-L1 発現の上昇が認められ、BLV-gp51⁺ 感染細胞でも PD-L1 の発現が確認された (投稿中)。

今回の結果から BLV 感染症においても、異常に増殖した B 細胞を中心とした PD-L1 発現亢進が本症の免疫抑制やウイルスの持続感染に関与するものと推察された。HIV 感染症の場合、PD-1 および PD-L1 発現上昇の機序は 3 つの仮説が唱えられており [19]、1) 同一抗原の慢性的抗原提示による PD-1 発現上昇 [37]、2) HIV ウイルスタンパク質 Nef による PD-1 発現上昇 [26]、3) IL-2 や IL-7 などのサイトカインによる PD-1 または PD-L1 発現上昇である [21]。BLV 感染においても慢性感染による長期間の抗原提示や、Th2 型へのサイトカイン環境の変化が報告されている [18, 22]。現在、本症における PD-L1 発現機序について解析を行なっている。

7. PD-1/PD-L1 制御による牛白血病ウイルス増殖抑制効果

病態が進行した本症では、ウイルスを排除するためのサイトカイン産生能やリンパ球増殖能の低下など免疫抑制が顕著である [18, 22]。そこで、PD-1/PD-L1 システムの遮断により免疫抑制状態が回復するか否かについて検討した。すなわち、PL 牛や白血病・肉腫発症牛からリンパ球を分離し、PD-L1 抗体を使い PD-1/PD-L1 ブロック試験を行った。その結果、コントロール抗体添加では変化が認められなかったが、PD-L1 抗体を添加することで、IFN- γ および IL-2 の分泌能回復効果が得られた。このときのウイルス動態を検討した結果、PD-L1 抗体の添加によりウイルス増殖を顕著に抑制することが明らかとなった。

以上より、ウシ PD-1/PD-L1 機構が免疫抑制に関与することが示唆され、BLV 感染症の発症機構の一部と考えられた。現在、PD-1 やその他の免疫制御因子の発現解析、病態が進行した牛における PD-L1 発現上昇機序の解析や PD-1 と PD-L1 との結合阻害による生体内での免疫活性効果および抗ウイルス効果の検討を行なっている。

8. 獣医医療への応用にむけて

2009 年、HIV ワクチン開発のモデルとして行なわれている SIV 感染サルにおいて、PD-1 抗体の賦与による *in vivo* 内でのウイルス排除効果が報告された [10, 42]。また、前述のとおりメラノーマや大腸癌などの癌患者に対する第 I 相臨床試験もすでに開始されている。今回の我々の結果でも *in vitro* 下ながらウシ PD-1/PD-L1 システムの制御により免

疫抑制状態下にある BLV 感染ウシ由来のリンパ球の機能を回復し、ウイルス増殖を抑制する効果が得られた (投稿中)。割愛したが、正常牛においても同法により免疫増強効果が得られている。今後、生体内においてワクチン効果が増強されるか、ウイルス排除が可能か否かについて臨床試験を行なう予定である。

参考文献

- Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H. and Honjo, T. 1996. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int. Immunol.* **8**:765-772.
- Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B. G., Allison, J. P., Sharpe, A. H., Freeman, G. J. and Ahmed, R. 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**:682-687.
- Butte, M. J., Keir, M. E., Phamduy, T. B., Sharpe, A. H. and Freeman, G. J. 2007. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* **27**:111-122.
- Callebaut, I., Vonèche, V., Mager, A., Fumière, O., Krchnak, V., Merza, M., Zavada, J., Mammerickx, M., Burny, A. and Portetle, D. 1993. Mapping of B-neutralizing and T-helper cell epitopes on the bovine leukemia virus external glycoprotein gp51. *J. Virol.* **67**:5321-5327.
- Chen, L. G., Zhang, Z., Chen, W. W., Zhang, Z. D., Li, Y. G., Shi, M., Zhang, J. Y., Chen, L. P., Wang, S. D. and Wang, F. S. 2007. B7-H1 up-regulation on myeloid dendritic cells significantly suppresses T cell immune function in patients with chronic hepatitis B. *J. Immunol.* **178**:6634-6641.
- Daeron, M., Jaeger, S., Du Pasquier, L. and Vivier, E. 2008. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunol. Rev.* **224**:11-43.
- Day, C. L., Kaufmann, D. E., Kiepiela, P., Brown, J. A., Moodley, E. S., Reddy, S., Mackey, E. W., Miller, J. D., Leslie, A. J., DePierres, C., Mncube, Z., Duraiswamy, J., Zhu, B. G., Eichbaum, Q., Altfeld, M., Wherry, E. J., Coovadia, H. M., Goulder, P. J. R., Klenerman, P., Ahmed, R., Freeman, G. J. and Walker, B. D. 2006. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* **443**:350-354.
- Eppihimer, M. J., Gunn, J., Freeman, G. J., Greenfield, E. A., Chernova, T., Erickson, J. and Leonard, J. P. 2002. Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells. *Microcirculation* **9**:133-145.
- Gatei, M. H., Naif, H. M., Kumar, S., Boyle, D. B., Daniel, R. C., Good, M. F. and Lavin, M. F. 1993. Protection of sheep against bovine leukemia virus (BLV) infection by vaccination with recombinant vaccinia viruses expressing BLV envelope glycoproteins: correlation of protection with CD4 T-cell response to gp51 peptide 51-70. *J. Virol.* **67**:1803-1810.
- Finnefrock, A. C., Tang, A. M., Li, F. S., Freed, D. C., Feng, M. Z., Cox, K. S., Sykes, K. J., Guare, J. P., Miller, M. D., Olsen, D. B., Hazuda, D. J., Shiver, J. W., Casimiro, D. R. and Fu, T. M. 2009. PD-1 blockade in Rhesus Macaques: impact on chronic infection and prophylactic vaccination. *J. Immunol.* **182**:980-987.
- Hislop, A. D., Good, M. F., Mateo, L., Gardner, J., Gatei, M. H., Daniel, R. C., Meyers, B. V., Lavin, M. F. and Suhrbier, A. 1998. Vaccine-induced cytotoxic T lymphocytes protect against retroviral challenge. *Nat. Med.* **4**:1193-1196.
- Holets, L. M., Carletti, M. Z., Kshirsagar, S. K., Christenson, L. K. and Petroff, M. G. 2009. Differentiation-Induced post-transcriptional control of B7-H1 in human trophoblast cells. *Placenta* **30**:48-55.
- Huang, X., Venet, F., Wang, Y. L., Lepape, A., Yuan, Z., Chen, Y., Swan, R., Kherouf, H., Monneret, G., Chung, C. S. and Ayala, A. 2009. PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proc. Natl. Acad. Sci., U S A* **106**:6303-6308.
- Ikebuchi, R., Konnai, S., Sunden, Y., Onuma, M. and Ohashi, K. 2010. Molecular cloning and expression analysis of bovine programmed death-1. *Micro. Immunol.* **54**:291-298.
- Jeon, D. H., Oh, K., Oh, B. C., Nam, D. H., Kim, C. H., Park, H. B., Cho, J., Lee, J. R., Lee, D. S. and Lee, G. 2007. Porcine PD-L1: cloning, characterization, and implications during xenotransplantation. *Xenotransplantation* **14**:236-242.
- Jeong, H. Y., Lee, Y. J., Seo, S. K., Lee, S. W., Park, S. J., Lee, J. N., Sohn, H. S., Yao, S., Chen, L. and Choi, I. 2008. Blocking of monocyte-associated B7-H1 (CD274) enhances HCV-specific T cell immunity in chronic hepatitis C infection. *J. Leukoc. Biol.* **83**:755-764.
- Kabeya, H., Ohashi, K., Oyonbileg, N., Nagaoka, Y., Aida, Y., Sugimoto, C., Yokomizo, Y. and Onuma, M. 1999. Up-regulation of tumor necrosis factor alpha mRNA is associated with bovine-leukemia virus (BLV) elimination in the early phase of infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **68**:255-265.
- Kabeya, H., Ohashi, K. and Onuma, M. 2001. Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection. *J. Vet. Med. Sci.* **63**:703-708.
- Kaufmann, D. E. and Walker, B. D. 2009. PD-1 and CTLA-4 Inhibitory cosignaling pathways in HIV infection and the potential for therapeutic intervention. *J. Immunol.* **182**:5891-5897.
- Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. and Sharpe, A. H. 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **26**:677-704.
- Kinter, A. L., Godbout, E. J., McNally, J. P., Sereti, I., Roby, G. A., O' Shea, M. A. and Fauci, A. S. 2008. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J. Immunol.* **181**:6738-6746.
- Konnai, S., Usui, T., Ohashi, K. and Onuma, M. 2003. The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR. *Vet. Microbiol.* **94**:283-294.
- Kozako, T., Yoshimitsu, M., Fujiwara, H., Masamoto, I., Horai, S., White, Y., Akimoto, M., Suzuki, S., Matsushita, K., Uozumi, K., Tei, C. and Arima, N. 2009. PD-1/PD-L1 expression in human T-cell leukemia virus type 1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients. *Leukemia* **23**:375-382.
- Mirsky, M. L., Olmstead, C. A., Da, Y. and Lewin, H. A. 1996. The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. *J. Virol.* **70**:2178-2183.
- Muhlbauer, M., Fleck, M., Schutz, C., Weiss, T., Froh, M., Blank, C., Scholmerich, J. and Hellerbrand, C. 2006. PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis. *J. Hepatol.* **45**:520-528.
- Muthumani, K., Choo, A. Y., Shedlock, D. J., Laddy, D. J., Sundaram, S. G., Hirao, L., Wu, L., Thieu, K. P., Chung, C. W., Lan-

- karaman, K. M., Tebas, P., Silvestri, G. and Weiner, D. B. 2008. Human immunodeficiency virus Type 1 Nef induces Programmed death 1 expression through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *J. Virol.* **82**:11536-11544.
27. Nomi, T., Sho, M., Akahori, T., Hamada, K., Kubo, A., Kanehiro, H., Nakamura, S., Enomoto, K., Yagita, H., Azuma, M. and Nakajima, Y. 2007. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**:2151-2157.
28. Okazaki, T., Maeda, A., Nishimura, H., Kurosaki, T. and Honjo, T. 2001. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci. U S A* **98**:13866-13871.
29. Ozkaynak, E., Wang, L., Goodearl, A., McDonald, K., Qin, S., O'Keefe, T., Duong, T., Smith, T., Gutierrez-Ramos, J. C., Rottman, J. B., Coyle, A. J. and Hancock, W. W. 2002. Programmed death-1 targeting can promote allograft survival. *J. Immunol.* **169**:6546-6553.
30. Parry, R. V., Chemnitz, J. M., Frauwirth, K. A., Lanfranco, A. R., Braunstein, I., Kobayashi, S. V., Linsley, P. S., Thompson, C. B. and Riley, J. L. 2005. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol. Cell Biol.* **25**:9543-9553.
31. Sagata, N., Yasunaga, T., Tsuzuku-Kawamura, J., Ohishi, K., Ogawa, Y. and Ikawa, Y. 1985. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci., U S A* **82**:677-681.
32. Schreiner, B., Mitsdoerffer, M., Kieseier, B. C., Chen, L. P., Hartung, H. P., Weller, M. and Wiendl, H. 2004. Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **155**:172-182.
33. Schwartz, I. and Levy, D. 1994. Pathobiology of bovine leukemia virus. *Vet. Res.* **25**:521-536.
34. Schwartz, I., Bensaid, A., Polack, B., Perrin, B., Berthelemy, M. and Levy, D. 1994. In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. *J. Virol.* **68**:4589-4596.
35. Sheppard, K. A., Fitz, L. J., Lee, J. M., Benander, C., George, J. A., Wooters, J., Qiu, Y. C., Jussif, J. M., Carter, L. L., Wood, C. R. and Chaudhary, D. 2004. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3 zeta signalosome and downstream signaling to PKC theta. *FEBS Letters* **574**:37-41.
36. Shimauchi, T., Kabashima, K., Nakashima, D., Sugita, K., Yamada, Y., Hino, R. and Tokura, Y. 2007. Augmented expression of programmed death-1 in both neoplastic and non-neoplastic CD4(+) T-cells in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int. J. Cancer* **121**:2585-2590.
37. Streeck, H., Brumme, Z. L., Anastario, M., Cohen, K. W., Jolin, J. S., Meier, A., Brumme, C. J., Rosenberg, E. S., Alter, G., Allen, T. M., Walker, B. D. and Altfeld, M. 2008. Antigen load and viral sequence diversification determine the functional profile of HIV-1-specific CD8(+) T cells. *Plos Med.* **5**:790-804.
38. Sugamata, R., Suetake, H., Kikuchi, K. and Suzuki, Y. 2009. Telectost B7 expressed on monocytes regulates T cell responses. *J. Immunol.* **182**:6799-6806.
39. Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E. A., Gimmig, S., Bessette, B., Boulassel, M. R., Delwart, E., Sepulveda, H., Balderas, R. S., Routy, J. P., Haddad, E. K. and Sekaly, R. P. 2006. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8(+) T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat. Med.* **12**:1198-1202.
40. Urbani, S., Amadei, B., Tola, D., Massari, M., Schivazappa, S., Missale, G. and Ferrari, C. 2006. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J. Virol.* **80**:11398-11403.
41. Velu, V., Kannanganat, S., Ibegbu, C., Chennareddi, L., Villinger, F., Freeman, G. J., Ahmed, R. and Amara, R. R. 2007. Elevated expression levels of inhibitory receptor programmed death 1 on simian immunodeficiency virus-specific CD8 T cells during chronic infection but not after vaccination. *J. Virol.* **81**:5819-5828.
42. Velu, V., Titanji, K., Zhu, B. G., Husain, S., Pladevega, A., Lai, L. L., Vanderford, T. H., Chennareddi, L., Silvestri, G., Freeman, G. J., Ahmed, R. and Amara, R. R. 2009. Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature* **458**:206-210.
43. Wang, X. C., Zhang, Z., Zhang, S. Y., Fu, J. L., Yao, J. X., Jiao, Y. M., Wu, H. and Wang, F. S. 2008. B7-H1 up-regulation impairs myeloid DC and correlates with disease progression in chronic HIV-1 infection. *Europ. J. Immunol.* **38**:3226-3236.
44. Yao, S., Wang, S., Zhu, Y., Luo, L., Zhu, G., Flies, S., Xu, H., Ruff, W., Broadwater, M., Choi, I. H., Tamada, K. and Chen, L. 2009. PD-1 on dendritic cells impedes innate immunity against bacterial infection. *Blood* **113**:5811-5818.

発表論文紹介

豚丹毒菌とその他のエリシペロトリックス属菌種の検出 および鑑別のための定量的リアルタイム PCR 法の開発

Development of quantitative real-time polymerase chain reaction for detection of and discrimination

between *Erysipelothrix rhusiopathiae* and other *Erysipelothrix* species.

J. Vet. Diagn. Invest. 21, 701-706 (2009)

ToHo, 小山智洋, 長井伸也, 土屋耕太郎, 布谷鉄夫

豚丹毒菌とその他のエリシペロトリックス属菌種を組織材料から検出および鑑別するための増菌培養

を組み合わせた定量的リアルタイム PCR (qPCR) 法を開発し, 検証した。SYBR Green を用いた

qPCR法の標的は、エリシペロトリックス属菌種の16SリボソームRNA遺伝子および豚丹毒菌の莢膜形成に参与する遺伝子とした。qPCR法の特異性は、エリシペロトリックス属菌種の各株および他の関連菌種を用いて評価した。qPCR法の検出限界は、1反応あたり5CFUであった。豚丹毒菌を添加した関節および脾臓材料から抽出したDNAを用いたqPCR法の感度は、培養菌液そのものから抽出したDNAを用いたqPCR法の感度と同等であった。豚丹毒菌により実験感染した豚3頭およびマウス50匹から得た組織材料88検体ならびに、自然感染豚

3頭および未感染豚11頭から得た組織材料36検体を用い、本qPCR法を評価した。本qPCR法と、直接qPCR法および従来の細菌培養法について、検出感度を比較した。増菌培養を組み合わせたqPCR法は、細菌培養法および組織材料からの直接qPCR法より検出感度が高く、豚丹毒菌およびその他のエリシペロトリックス属菌種の検出に要する作業時間を大幅に短縮できた。したがって、本qPCR法はエリシペロトリックス属菌種の検出および鑑別に臨床応用が可能な方法であると考えられた。

学会発表演題 (2010年4月～9月)

9th International Veterinary Immunology Symposium

期 日：2010年8月16日～8月20日

開催地：東京（タワーホール船堀）

発表演題：Oral delivery of enteric-coated TGE vaccine protects piglets from TGE by passive transfer of maternal antibodies.

○N. Takeyama¹, T. Sato¹, T. Hosokawa¹, I. Sato¹, M. Sugiyama², H. Yamada¹ and K. Kusanagi¹ (¹Nippon Institute for Biological Science, ²Freund Corporation).

発表演題：Acquired immunity against bovine *Eimeria* is species-specific but not cross-protective.

○F. Kawahara¹, G. Zhang¹, Y. Tamura², M. Koiwa³, M. Onuma² and T. Nunoya¹ (¹Nippon Institute for Biological Science, ²Hokkaido University, ³Rakuno Gakuen University).

第150回日本獣医学会学術学会

期 日：2010年9月16日～9月18日

開催地：帯広畜産大学

発表演題：牛コクシジウム原虫の遺伝子学的解析と種鑑別PCR法の確立

○川原史也¹, 張 国宏¹, 田村 悠², 小岩政照³, 小沼 操², 布谷鉄夫¹ (¹日生研, ²北海道大学大学院, ³酪農学園大学)

発表演題：*Eimeria tenella* メロゾイト表面タンパク質 Mzp5-7 cDNA のクローニング及び組換えタンパク質のELISA法への応用

○張 国宏, 藤野美由紀, 川原史也, 岩田 晃, 布谷鉄夫 (日生研)



—— 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565号) 平成22年10月25日印刷 平成22年11月1日発行(第56巻第6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/黒田丹(委員長), 竹山夏実, 鈴木敬之
事務/企画学術部
印刷所 株式会社 精興社
(無断転載を禁ず)