

NIBS LETTER 2011 SEPTEMBER
No. 570

日生研おより

2011年(平成23年)9月号 第57巻 第5号(通巻570号)

挨拶・巻頭言

大震災雑感

.....佐々木伸雄(2)

獣医病理学研修会

第50回 No. 1016 ウサギの外耳道と中耳

.....参天製薬株式会社(3)

レビュー

インフルエンザワクチンの課題と

新規品への期待.....堀本泰介(4)

文献紹介

実験的に感染させた豚群で調査した App

の診断検査法の評価.....李知恩(9)



NIBS

財団法人 日本生物科学研究所

NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE

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

大震災雑感

佐々木伸雄

この6月から理事に任命され、この巻頭言の依頼を受けた。私自身の関連分野について書くように依頼されたのではあるが、どうしてもこの大震災について、雑感を書きたい衝動が勝っている。

高校生の頃、たまたまプレートテクトニクス理論、というものを読み、なるほど、だからアフリカ大陸西側と南米大陸東側はくっついていたのだ、と感動した。しかも、その証拠のひとつが、地質調査から得られた共通する古生物の存在に関するデータであることに非常に強い興味を引かれた。しかし、大学ではグータラやっていたおかげで、理学部地球物理学科には全く入れるレベルではなく、ついにデモシカで獣医さんになる以外の道はなかった（後悔している訳ではない）。プレートテクトニクス理論は、地球の内部を明らかにする素晴らしいものと思ったが、それはつまり、このようなとんでもない災害はいつでも起こりうることを説明するものでもあった。

今回の地震の規模は、9世紀半ばに発生した貞観地震以上とされているが、その可能性は、2009年から指摘されていた。これは地質調査により過去の津波の痕跡から出されていたものであり、従来想定されていた津波の高さ4～5メートルよりずっと高い津波の来襲を予見していたものであった。いつ来るかわからない津波であり、原発が対応する前に今回の津波が来襲したことは非常に大きな不幸ではあるが、その詳細は今後の検証に任せる以外にない。

昨年夏に高校時代の同級生が吉村昭のファンであり、彼からこれ読んでみない？ と渡されたのが「三陸海岸大津波」であった。全く偶然であり、その同級生とは、「まさか今回の津波が起こるとは」、とお互い絶句した。古老からの聞き取り調査を土台にしたこの本でも、津波の恐ろしさ、その高さについて記載されており、おそらくそのことも土台となって、例の高さ10メートルのスーパー堤防や防災策が練られていたものと思うが、今回の巨大地震はそれを超えてしまった。自然は人が想定する、浅はかな規模を簡単に越えてしまうが、同時に、人は数世代を経る中で、案外その出来事を継承できなかつたり、忘れてしまうものなのかもしれない。

阪神大震災のときに、まだ存命であった吉村昭が文芸春秋に寄稿した論文が、この6月号に記載されている。その中で、関東大震災の9月1日の防災記念日に出た番組で、東京都の地震防災責任者が関東大震災後の調査報告書を全く目にしていないことに驚いたと記されている。関東大震災のもっとも重大な被害は火災によるものであろうが、その発火原因について、44カ所は薬品の落下による、との調査結果が記載されているという。宮城県沖地震時に東北大から出火したが、その原因が薬品の落下であったことはかなりキチンと受け継がれ、現在は大学においても薬品の落下防止対策はかなり徹底されている。これは、過去の歴史から学んだよい例であろう。一方、江戸時代、火災の多かった江戸市中では、幕府により、大火のときに大八車を引き出したものは厳罰に処す、というおふれが出ていたという。しかし、関東大震災では、その教訓は生かされなかった。大八車が消火活動を阻み、またそれに引火して火災を広げたと記載されている。阪神大震災時にもおそらくこの教訓は生かされていなかったと思う。また、これも現在全く生かされていないが、緊急時のリュックサック（多分不燃性ではないと思う）も、これに引火すると危険である、と東京大空襲時に吉村昭は父親から怒鳴られたそうである。関東大震災時に食料は持ち出さなくとも、24時間以内に多くの被災者は食料と水を手に入れたそうであり、少なくとも餓死者はいない。

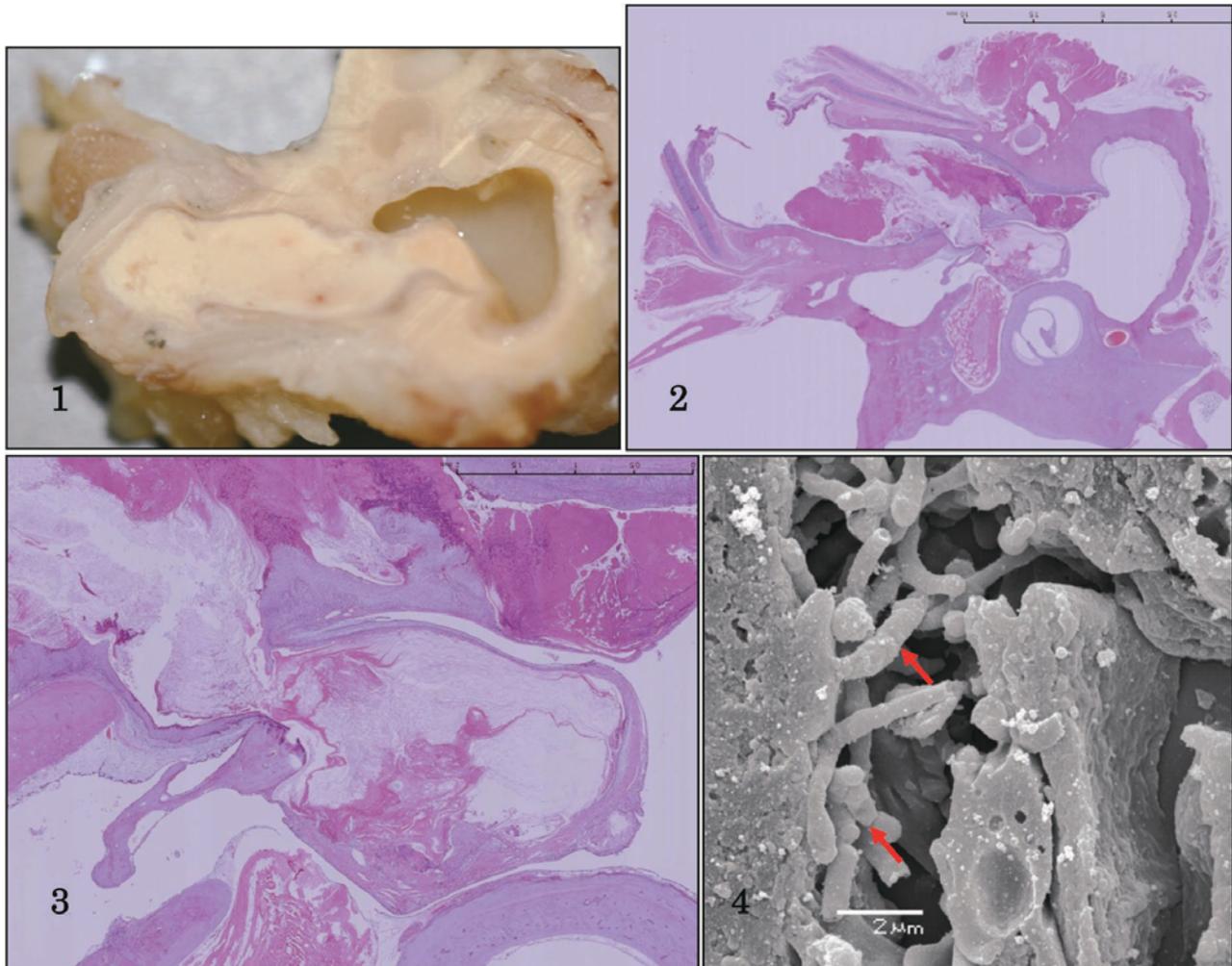
三陸のある村落で、「これより下に家を建てるべからず」という石碑があり、そのため津波の被害を免れた、ということが吉村昭の本にも書かれ、また今回の津波に関する新聞記事でも目にした。おそらく、人間は歴史に学ばないのではなく、このような常に目にする形で記録を残さないと忘れられてしまう、ということなのかもしれない。

最近は大学の環境安全活動に関しても、常にリスクに関する文書化がはかられ、それはある意味ではばからしく、そのような書類の作成に関わるのは時間の浪費以外の何者でもない、と感ずることがしばしばである。しかし、ある意味で、「文書化」は「見える化」であり、それが常に同じ考え、危険に対する備えを共有するのかもしれない。とすると、今までなんでこんなばからしい作業を我々に強いるのか、と文句を言っていたが、そろそろその考えを引っ込めるときがきたのかもしれない、と最近考えている。

(理事)

ウサギの外耳道と中耳

参天製薬株式会社 第 50 回獣医病理学研修会標本 No. 1016



動物：ウサギ（日本白色種，Kbl:JW），雄，2歳8か月齢，体重3,771g。

臨床事項：本症例は2007年5月に入荷後，点眼薬の薬効試験に供されていた。2008年3月左斜頸に気づき，その後徐々に斜頸の程度が顕著になり試験にも使われなくなった。2009年11月末に鑑定殺のためペントバルビタールの静脈内投与による麻酔下で，腹大動脈から放血し安楽死させた。

肉眼所見：左側外耳孔がオカラ状頰廢物によって閉塞しており，左側頭骨鼓室部が腫大していた。その他の臓器に異常はなかった。ホルマリン固定後外耳道に沿って側頭骨を縦断したところ，耳道のほぼ全長に亘って頰廢物が充満し，鼓室は拡張していた（図1）。

組織所見：耳道内には，剥離した表皮の角質や細胞屑などから成る好酸性頰廢物が蓄積していた（図2）。外耳道から鼓膜まで表皮はび漫性に過形成を起し，偽好酸球などの炎症性細胞が浸潤していた。鼓膜の皮膚側は部分的に基底膜が断裂し，鼓室にむけて膨張性にコレステロール肉芽腫が形成されていた（図3）。中耳粘膜は水腫性に肥厚していた。鼓膜に近接した耳道では特に表皮棘細胞の過形成が目立ち（図3），耳道腺の肥大も

顕著であった。また，好酸性頰廢物内にはPAS反応陽性，グロコット染色陽性，グラム染色陰性，チールネルゼン染色陰性の桿菌が散在性に認められた。走査電子顕微鏡で観察すると5-6 μ m長のフィラメント状菌で，しばしば隔壁様構造（図4矢印）を有していた。よって，細菌は緑膿菌と思われた。

診断：コレステロール肉芽腫を伴った慢性外耳炎

考察：出題症例以外の健常ウサギにおいても，外耳道皮膚には炎症性細胞浸潤を伴った表皮のびらんや痂皮形成がしばしば認められた。ウサギでは耳道に炎症が生じやすいものと思われ，本症例は慢性炎症のため耳道内に頰廢物が蓄積したものと考えられる。緑膿菌は日和見感染したものと思察される。頰廢物によって耳道の内圧が高まったため，鼓膜表皮が破綻して中耳側に突出し肉芽腫を形成したものと思われる。フロアからは，耳道腺の肥大や表皮棘細胞の過形成は腫瘍性的変化ではないかとの意見もあったが，本例では耳道内の炎症が強く，すべての組織変化をそれに対する反応とみて矛盾しないことから，腫瘍については否定的に考えている。

（勝田 修）

インフルエンザワクチンの課題と新規品への期待

堀本泰介（東京大学大学院農学生命科学研究科獣医微生物学研究室）

はじめに

インフルエンザは毎年流行する急性呼吸器疾患である。ウイルスの抗原性が頻繁に変化（抗原ドリフト）するものの、自然免疫と過去の感染記憶やワクチン接種で誘導される交叉防御免疫により、通常は一過性に経過する。しかし、乳幼児や基礎疾患のある老年者における死亡例は珍しくない。対して、全く異なる抗原性（抗原シフト）のウイルスが出現すると免疫がナイーブであるため、世界的大流行（パンデミック）により多くの人々が犠牲になる [11]。前世紀には3度のパンデミック、スペイン風邪（1918年：H1N1ウイルス）、アジア風邪（1957年：H2N2ウイルス）、香港風邪（1968年：H3N2ウイルス）があった。また、1977年のソ連風邪（H1N1ウイルス）ではH1抗体を持たない若年層で中規模の流行があった。そして、2009年6月、WHOは今世紀最初のパンデミックの発生を宣言した。ソ連型ウイルスとは抗原性の異なるブタ由来のA/H1N1ウイルスによるパンデミックである。今後しばらくは、パンデミックウイルスに派生するA/H1N1ウイルス、A香港型（H3N2）ウイルス、およびB型

ウイルスの三種類が、季節性インフルエンザとして人社会で流行を繰り返すと予想される。

インフルエンザの防御には抗ウイルス薬とワクチンが用いられる。特に、NA阻害薬を中心とした抗インフルエンザ薬は有効な治療法である。しかし、過去でそうであったように薬剤耐性ウイルスの出現と流行は避けられないと思われる。したがって、ワクチンがインフルエンザ制御のための不可欠な武器である [12]。

1. 季節性インフルエンザワクチン

現在、わが国では不活化ワクチンが用いられる。ワクチン製造株を発育鶏卵で増殖させ、超遠心精製した後、エーテルで膜脂質成分を取り除き、ホルマリンにより不活化したものである。主要防御抗原である赤血球凝集素（HAタンパク質）を含む“スプリットタイプ”である。国によっては、“全粒子タイプ”あるいは“サブユニットタイプ”の不活化ワクチンが用いられている（図1）。A型（H1N1, H3N2）およびB型の三種類の製造株が、WHOの流行予測を基に毎年選定され、三価ワクチンとして

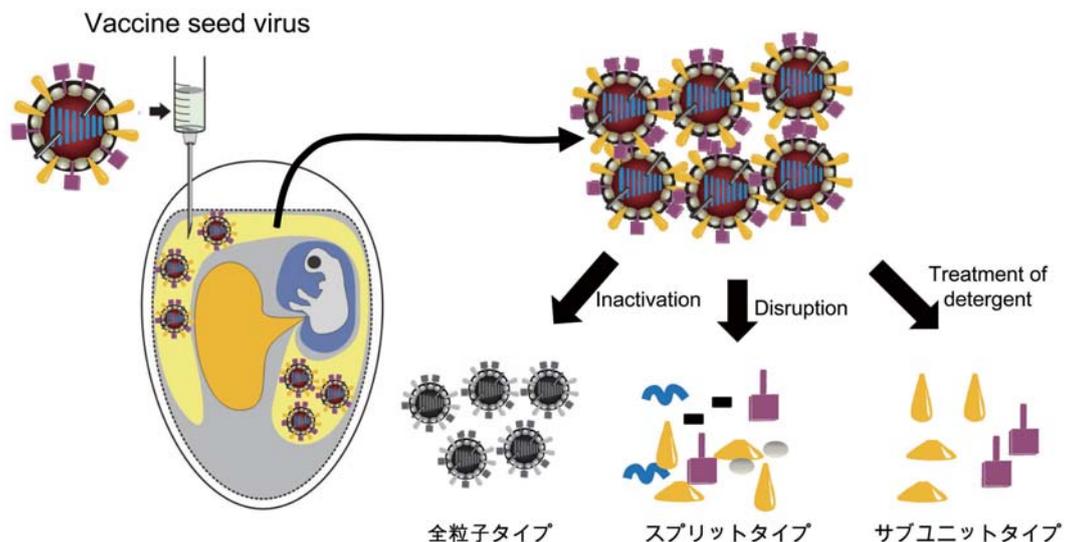


図1 不活化ワクチン製造工程

ワクチン製造株を発育鶏卵に接種し、培養する。ウイルスを回収し精製後、不活化し、ワクチンとする。

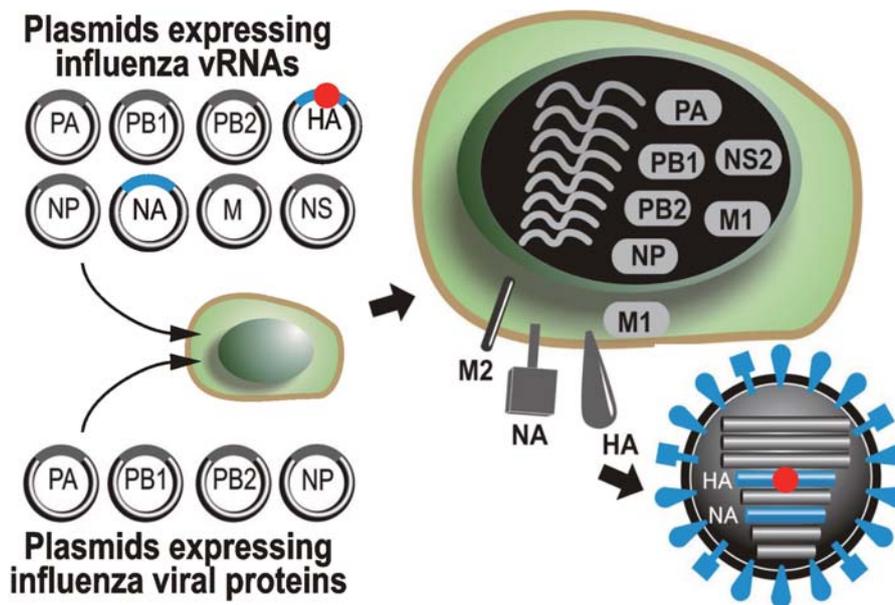


図2 リバースジェネティクスによる H5N1 ワクチン製造株の作製

WHO が推奨するヒト不活化ワクチン作製のため、ウイルス遺伝子分節を合成するプラスミドを 8 種類用意する。この内、HA, NA 遺伝子は高病原性 H5N1 ウイルス由来であり、その他の遺伝子は発育鶏卵高増殖 PR8 株由来である。HA 遺伝子は、開裂部位コード配列を弱毒型に改変する（赤丸で示す）。ウイルス遺伝子分節の転写・複製に必要な蛋白質（PR8 由来）を発現する 4 種類のプラスミドを用意する。合計 12 種類のプラスミドをワクチン作製用 Vero 細胞に導入する。培養上清にワクチン製造株が回収される。発育鶏卵で増殖させ、不活化後、ワクチンとする。

皮下接種（あるいは筋肉内接種）される。ウイルスの侵入口である上部気道に粘膜免疫（分泌型 IgA 抗体）は誘導されないため、感染そのものを阻止する効果は低いものの、血中に中和抗体を誘導し、体内でのウイルスの広がりを抑えることにより症状の重篤化を軽減させる。健康成人では、ワクチン株と流行株の抗原性が一致した場合の発病防止効果は 70% 以上である。免疫の持続期間は短く、抗原変異に対応して頻繁にワクチン株を更新する必要がある。さらに、交叉防御能をもつ細胞障害性 T 細胞は、標的抗原（内部タンパク質由来ペプチド）が提示されないため誘導されない。しかし、作製が容易で、安全性が高く、保存性も悪くなく実用的である。現在、世界中における鶏卵を用いた季節性ワクチンの生産能力はおよそ 8 億ドーズに上る [2]。

一方、米国では鼻腔内噴霧型の弱毒生ワクチン（FluMist: MedImmune）も併用される（ただし 2 歳から 49 歳を対象とする）。生ワクチンは自然感染を模倣する免疫応答を誘導するので効果が高い。鼻腔内接種により粘膜および細胞性免疫も誘導され、ある程度の抗原変異にも対応できる。また、鼻への噴霧接種は小児においてメリットである。このワクチンは内部タンパク質に複数の変異をもつ低温馴化の弱毒ウイルスを基にしている [10, 14]。流行ウイ

ルス由来の HA, NA 遺伝子と入れ換えた遺伝子交雑ウイルスを A 型（H1N1, H3N2）および B 型それぞれで作製し、発育鶏卵で増殖させたものを混合して用いる。重篤な副作用等の問題点は報告されておらず、不活化ワクチン以上の有効性が示されている。しかし、これら季節性ワクチンの有効性には年によりばらつきが見られる。これは、頻繁な抗原変異を伴うウイルスの性質上避けられない。現行システムでワクチンの有効性を高める方法は、確実な流行予測に基づく適切な製造株の選択以外にはない。一方、発育鶏卵を基材とするワクチン製造は迅速で確実なワクチン生産には障害となる。特に、最近の H3N2 ウイルス分離株は鶏卵での増殖性が概して芳しくない。また、鶏卵での増殖中に抗原変異ウイルスが出現し、ワクチン効果が低くなる可能性も指摘されている。

2. H5N1 プレパデミックワクチン

1996 年に中国で出現し、今なお問題となっている H5N1 鳥ウイルスはすべて高病原性であり、鶏卵胎児を早期に殺してしまうため、品質の高いウイルス液が回収できない。また、ワクチン製造者に対する安全面や、高度な封じ込め生産施設の必要性から

も、高病原性ウイルスをそのままワクチン製造株として用いることは難しい。十分なワクチン効果を得るためには抗原性が流行株と同じである必要があり、なおかつ鶏卵で良く増殖するような弱毒ウイルスがワクチン製造株として理想的である。しかし、そのような自然分離株は存在しないため、リバーシジェネティクスを用いてワクチン製造株が作製されている(図2)。病原性を規定するHA開裂部位コード領域を低病原性型に改変(例えばRERRRKKRからRETRに変更)した流行ウイルス由来のHA(H5)遺伝子とNA(N1)遺伝子、それ以外の遺伝子分節(6種類)はWHOが推奨する鶏卵高増殖性であるPR8株(ドナーウイルス)に由来する組換えウイルス(PR8/H5N1遺伝子交雑体)である。このウイルスを製造株として作製された不活化ワクチンが、現在H5N1プレパンデミックワクチンとして先進国を中心に備蓄されている[12]。

各国でH5N1プレパンデミックワクチンの臨床試験が行われたが、通常の季節性ワクチンと同様にスプリットタイプでアジュバントを使用しない場合には、季節性ワクチンに比べ免疫原性が極めて低いことが報告された。そこで、ヨーロッパ、日本などでは全粒子タイプにアジュバント(アルミニウムアジュバントなど)を併用するという剤形を採用している。今後、H5N1プレパンデミックワクチンが広く接種されるという状況にならないことを期待する。

3. 組織培養インフルエンザワクチン

ワクチン製造基材としての発育鶏卵の弱点を克服するため、分離、製造母体として培養細胞を用いたワクチンの生産が期待されている。実際、一部はすでに承認されており、MDCK細胞を製造基材としたH1N1パンデミックワクチン(Novartis)が日本でも特例承認され、輸入されたことは記憶に新しい。現時点では、組織培養ワクチンが安定供給されるまでには至っていないものの、鶏卵の供給量にも左右されず、卵アレルギーの問題も解決され、また、より抗原性の近いワクチンの作製が期待できるため、今後はインフルエンザワクチン製造の主流となるのは確実である。用いる細胞としては、哺乳動物細胞のほかに、鳥由来細胞、昆虫細胞、植物細胞などが検討されている。現在の開発状況についてまとめて

みたい(表1)。

1) 不活化ワクチン

2001年にオランダで、MDCK細胞を基材としたサブユニットワクチンが承認され(Solvay)[17]、また、2002年には同じくオランダでVero細胞を基材とした不活化全粒子ワクチンが承認された(Baxter)。後者はその後の臨床試験で発熱などの副反応が問題となり、剤形をスプリットタイプに変更し、2010年にオーストラリアで承認を取得している。2009年にはMDCK細胞由来のアジュバント添加季節性サブユニットワクチンがロシアで製造承認申請されている(Petrovax)。2007年には浮遊MDCK細胞由来不活化サブユニットワクチンが承認された(Novartis)[4]。同様に、MDCK細胞由来のMF59アジュバント添加のパンデミックH1N1ワクチンが欧州で承認され、日本でも特例承認された[1]。

その他開発中ではPer.C6細胞由来不活化サブユニットワクチン(季節性およびH7N1)(Sanofi Pasteur)やMDCK細胞のマイクロキャリア培養法によるアジュバント添加不活化全粒子ワクチン(季節性およびH5N1)(Nobilon)が臨床試験に進んでいる[8, 18]。まだ研究段階ではあるが、アヒル胚幹細胞由来EB66細胞を用いたワクチン開発が、GlaxoSmithKline, CSL, 化血研などで進んでいる[6]。他の国内メーカーでは、デンカ生研、阪大微研、北里研究所がMDCK細胞を用いたワクチン開発を進めている。

2) 弱毒生ワクチン

FluMistをもつMedImmuneは、MDCK細胞を用いた低温馴化弱毒生経鼻ワクチン(季節性およびH5N1)の開発を進めている[15]。AVIR Green Hills BiotechnologyはNS1欠損弱毒生経鼻ワクチンの臨床試験を行っている。NS1欠損ウイルスはインターフェロン産生のないVero細胞で効率良く増殖するが、体内では弱毒化する特徴を利用したものである[20]。その他、EB66細胞などを用いた弱毒生ワクチンの開発も視野に入れている(Nobilon)。

3) 遺伝子組み換えワクチンなど

バキュロウイルス発現系を用いて昆虫細胞でHAタンパク質(やNAタンパク質)を発現させサブユ

表 1 組織培養インフルエンザワクチンの開発状況

培養細胞	種類	主な開発企業	開発状況
Vero 細胞 (アフリカミドリザル腎臓由来)	不活化ワクチン	Baxter	承認 (欧) (季節性, H5N1)
	弱毒生ワクチン	AVIR Green Hills Biotechnology	NS1 欠損 (臨床試験中)
MDCK 細胞 (イヌ腎臓由来)	不活化ワクチン	Solvay, Petrovax	承認 (欧) (季節性)
		Novartis	承認 (季節性, 新型 H1N1) (欧) 特例承認 (新型 H1N1) (日)
		Nobilon	臨床試験中
	デンカ生研, 阪大微研, 北里研	研究中	
弱毒生ワクチン	MedImmune	低温馴化 (季節性, H5N1) (臨床試験中)	
Per.C6 細胞 (ヒト胎児網膜由来)	不活化ワクチン	Sanofi Pasteur	臨床試験中
EB66 細胞 (アヒル胚幹細胞由来)	不活化ワクチン	GlaxoSmithKline, 化血研	研究中
	弱毒生ワクチン	Nobilon	研究中
昆虫細胞	組換えワクチン	Protein Sciences, UMNファーマ	承認申請中 (米), 臨床試験中 (日)
		Novavax	VLP, 臨床試験中
植物細胞	組換えワクチン	iBioPharma, Fraunhofer USA	一部臨床試験中

ニットワクチンとする試みが米国で承認申請中である (Protein Sciences) [19]。わが国でも, UMNファーマが臨床試験を実施している。植物細胞で発現させた組換え HA サブユニットワクチンの開発も進んでいる (iBioPharma, Fraunhofer)。

ウイルス様粒子 (VLP : virus-like particle) をワクチンとする試みも一部は臨床試験段階に進んでいる。表面抗原 (HA と NA) と M1 タンパク質をレンチウイルスベクターやバキュロウイルスベクターでヒト細胞あるいは昆虫細胞で発現させた VLP や, 植物細胞で発現させた VLP などのワクチン効果が調べられている [3, 7, 16]。

その他, アデノウイルスをベクターとするワクチンや, DNA ワクチン, M2 膜蛋白質の細胞外領域を標的とする“ユニバーサルワクチン”などの研究も展開されており [5, 9], 実験室レベルでの有効性は示されている。今後の進展に期待したい。

4) 半生ワクチン

私たちの研究室では, 東京大学医科学研究所 (河岡義裕教授) と協力し, 半生ワクチンの開発に取り組んでいる。これは, 細胞に一回だけ感染し防御抗原を発現するが, もはや感染性ウイルスは産生されない組換えウイルスをリバーシジェネティクスの手

法で作成し, ワクチンとして応用する方法である。生ワクチン同様, 局所分泌型 IgA 抗体を含む液性免疫と細胞性免疫の両方を誘導するため高い免疫効果が期待できるのみならず, 感染性ウイルスが産生されないため安全性にも優れている。例えば, ウイルスの増殖に必須である HA タンパク質の開裂部位を欠損させた組換えウイルスを半生ワクチンとして応用できないかと考え研究を進めている。この場合, 正常な HA タンパク質を発現する細胞で組換えウイルスを増幅させる必要があり, 発育鶏卵に匹敵するまでのウイルス量は期待できないものの, マウスモデルを用いた鼻腔内接種により高いワクチン効果が観察された。現時点では, 浮遊細胞の活用などにより高力価のウイルス回収方法を改善する必要があるものの, 新規ワクチンの有望な戦略であると考えている。

最後に

インフルエンザに限らず, 理想のワクチンは効果, 安全性, 経済性, ハンドリングなど全てに優れるものである。そのゴールを目指して様々な開発研究が展開されている。従来の発育鶏卵を基材とするワクチン製造に替わり, 組織培養を基材とする方針は必

至であり、早期に実用化可能な研究を優先的に進めていく必要がある。その中でも、わが国で臨床試験段階にある粘膜免疫の誘導を目的とした経鼻接種不活化ワクチンの開発 [13]、あるいは作用機序を鑑みた新規アジュバントの開発などが優先課題であろう。特に、培養細胞（迅速性・柔軟性から浮遊細胞系を使用）を用いて製造された高力価のウイルスや抗原を高度に精製し、有効かつ安全なアジュバントを組み合わせた経鼻接種型のワクチンが、最も有望な次世代インフルエンザワクチンではないかと個人的には考えている。

参考文献

1. Clark, T. W., Pareek, M., Hoschler, K., Dillon, H., Nicholson, K. G., Groth, N. and Stephenson, I. 2009. Trial of 2009 influenza A (H1N1) monovalent MF59-adjuvanted vaccine. *New Engl. J. Med.* **361**: 2424-2435.
2. Collin, N., de Rades, X. and World Health Organization H1N1 Vaccine Task Force. 2009. Vaccine production capacity for seasonal and pandemic (H1N1) 2009 influenza. *Vaccine* **27**: 5184-5186.
3. D' Aoust, M. A., Couture, M. M., Charland, N. et al. 2101. The production of hemagglutinin - based virus - like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnol. J.* **8**: 607-619.
4. Doroshenko, A. and Halperin, S. A. 2009. Trivalent MDCK cell culture-derived influenza vaccine Optaflu (Novartis Vaccines). *Expert Rev. Vaccines* **8**: 679-688.
5. Fiers, W., De Filette, M., El Bakkouri, K., Schepens, B., Roose, K., Schotsaert, M., Birkett, A. and Saelens, X. 2009. M2e - based universal influenza A vaccine. *Vaccine* **27**: 6280-6283.
6. Genzel, Y. and Reichl, U. 2009. Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **8**: 1681-1692.
7. Haynes, J. R., Dokken, L., Wiley, J. A., Cawthon, A. G., Bigger, J., Harmsen, A. G. and Richardson, C. 2009. Influenza - pseudotypes Gag virus - like particle vaccines provide broad protection against highly pathogenic avian influenza challenge. *Vaccine* **27**: 530-541.
8. Heldens, J. G., Glansbeek, H. L., Hilgers, L. A., Haenen, B., Stittelaar, K. J., Osterhaus, A. D. and van den Bosch, J. F. 2010. Feasibility of single - shot H5N1 influenza vaccine in ferrets, macaques and rabbits. *Vaccine* **28**: 8125-8131.
9. Hoelscher, M. A., Garg, S., Bangari, D. S., Belser, J. A., Lu, X., Stephenson, I., Bright, R. A., Katz, J. M., Mittal, S. K., and Sambhara, S. 2006. Development of adenoviral - vector - based pandemic influenza vaccine against antigenically distinct human H5N1 strains in mice. *Lancet* **367**: 475-481.
10. Hoffmann, E., Mahmood, K., Chen, Z., Yang, C. F., Spaete, J., Greenberg, H. B., Herlocher, M. L., Jin, H. and Kemble, G. 2005. Multiple gene segments control the temperature sensitivity and attenuation phenotypes of ca B/Ann Arbor/1/66. *J. Virol.* **79**: 11014-11021.
11. Horimoto, T. and Kawaoka, Y. 2005. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nature Rev. Microbiol.* **3**: 591-600.
12. Horimoto, T. and Kawaoka, Y. Strategies for developing vaccines against H5N1 influenza A viruses. *Trend Mol. Med.* **12**: 506-514.
13. Ichinohe, T., Tamura, S., Kawaguchi, A., Ninomiya, A., Imai, M., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Takahashi, H., Sawa, H., Mitchell, W. M., Strayer, D. R., Carter, W. A., Chiba, J., Kurata, T., Sata, T. and Hasegawa, H. 2007. Cross - protection against H5N1 influenza virus infection is afforded by intranasal inoculation with seasonal trivalent influenza vaccine. *J. Infect. Dis.* **196**: 1313-1320.
14. Jin, H., Lu, B., Zhou, H., Ma, C., Zhao, J., Yang, C. F., Kemble, G. and Greenberg, H. 2003. Multiple amino acid residues confer temperature sensitivity to human influenza virus vaccine strains (FluMist) derived from cold - adapted A/Ann Arbor/6/60. *Virology* **306**: 18-24.
15. Liu, J., Shi, X., Schwartz, R. and Kemble, G. 2009.

- Use of MDCK cells for production of live attenuated influenza vaccine. *Vaccine* **27**: 6460–6463.
16. Mahmood, K., Bright, R. A., Mytle, N., Carter, D. M., Crevar, C. J., Achenbach, J. E., Heaton, P. M., Tumpey, T. M. and Ross, T. M. 2008. H5N1 VLP vaccine induced protection in ferrets against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 influenza viruses. *Vaccine* **26**: 5393–5399.
17. Medema, J. K., Meijer, J., Kersten, A. J. and Horton, R. 2006. Safety assessment of Madin Darby canine kidney cells as vaccine substrate. *Dev. Biol. (Basel)* **123**: 243–250.
18. Pau, M. G., Ophorst, C., Koldijk, M. H., Schouten, G., Mehtali, M. and Uytdehaag, F. 2001. The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines. *Vaccine* **19**: 2716–2721.
19. Treanor, J. J., Campbell, J. D., Zangwill, K. M., Rowe, T. and Wolff, M. 2006. Safety and Immunogenicity of an inactivated subvirion influenza A (H5N1) vaccine. *N. Eng. J. Med.* **354**: 1343–1351.
20. Wacheck, V., Egorov, A., Groiss, F., Pfeiffer, A., Fuehrer, T., Hoeflmayer, D., Kundi, M., Popow-Kraupp, T., Redlberger-Fritz, M., Mueller, C. A., Cinatl, J., Michaelis, M., Geiler, J., Bergmann, M., Romanova, J., Roethl, E., Morokutti, A., Wolschek, M., Ferko, B., Seipelt, J., Dick-Gudenus, R. and Muster, T. 2010. A novel type of influenza vaccine: safety and immunogenicity of replication-deficient influenza virus created by deletion of the interferon antagonist NS1. *J. Infect. Dis.* **201**: 354–362.

文献紹介

実験的に感染させた豚群で調査した App の診断検査法の評価

李 知 恩

Evaluation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* diagnostic tests using samples derived from experimentally infected pigs

Veterinary Microbiology, Volume 148, Issues 2–4, 24 March 2011, Page 246-251

G.Costa , S. Oliveira , J. Torrison , S.Deer

Room 225 VMC, 1365 Gortner Ave, St Paul, MN 55108, United States

要約

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) の診断における新たな血清型検査法が近年導入されているが、これらの検査法で不顕性感染豚が検出可能であるかは不明である。そのため、80頭の豚を無作為に、血清型 1, 3, 5, 7, 10, 12, 15 接種群および無接種の対照群に分けて試験を行った。血液検体と口咽頭スワブ検体は接種前と接種後 7 週連続で採集した。血清検体は Swinecheck[®] APP ELISA および Multi -APP

ELISA (モントリオール大学) で検査した。菌接種後 49 日目に全ての豚を安楽殺した。咽頭および肺の組織からは菌を分離培養、もしくは PCR で検出した。Multi - APP ELISA は Swinecheck[®] APP ELISA に比べ、一週間早く陽転を検出した。最も早いものは感染 (接種) 後 1 週間 (血清型 10)、遅いものは 3 週間 (血清型 1) で抗体が陽転した。感染後 49 日目の抗体陽転率は血清型によって異なり、血清型 10 では 4 頭 (44%)、血清型 15 では 9 頭 (100%) であった。感染後 49 日目の血清型反応で

は31頭がいずれかの血清型で陽転し、その中の15頭は咽頭スワブでPCRによりApp菌が検出された。Swinecheck® APP ELISAでは血清型間で交差反応は認められなかった。肺炎を起こした2頭の豚の肺組織からApp菌が分離できたが、扁桃からは常在菌のため菌分離は不可能だった。本研究ではApp菌の不顕性感染を検出するために、最近利用可能になった診断ツールを総合評価した。

1. 背景

Actinobacillus pleuropneumoniae (App)は豚の胸膜肺炎の原因菌であり感染力が高く、世界的に養豚産業の経済的損失をもたらしている (Jessing *et al.*, 2003; Gottschalk *et al.*, 2003; Dreyfus *et al.*, 2004)。この病原体はほとんどのアメリカの豚群では存在しない。したがって、陰性状態のモニタリングは陽性動物の輸入を阻止する非常に重要な役割を担っている (Gottschalk *et al.*, 2003)。

現在市販されているApp ELISAは3種類知られており、一つ目はBiovet社の血清型特異的Swinecheck® APP ELISAで、二つ目はモントリオール大学のMulti-APP ELISA、そして三つ目はIDEXX社のCheckit APP-ApxIV® ELISAである。Swinecheck® APP ELISAおよびMulti-APP ELISAは類似した抗原、Appのlong chain lipopolysaccharides (LC-LPS)をターゲットとしている。Checkit APP-ApxIV® ELISAはApp感染時に産生される種特異的毒素をターゲットとしている (Schaller *et al.*, 1999)。経験上、LC-LPSとApxIVの検査結果はしばしば一致せず、これはターゲットとしている抗原が異なることや感度・特異性の相違からと考えられる。予期せぬ結果や矛盾した結果は、病歴や菌分離およびPCRによる保菌の検出によって解決できる (Scaller *et al.*, 2001; Fittipaldi *et al.*, 2003)。

不顕性感染の検出も含めて、どの様なApp感染診断検査が入手できるのか、もしくはどの様な診断検査の組合せによってApp感染を正確に診断可能かは現在のところ情報がない。今までの報告ではそれぞれのApp診断検査を個々に評価しており、同時に複数のApp診断検査を比較検討した報告がなかった。今回の研究目的は、7つの血清型のAppを試験的に不顕性感染させた豚群に対して複数のApp診断検査法を用いた感染の検出能力を評価すること

である。

2. 材料および方法

動物

試験には、病歴やPCRおよび血清検査 (Checkit APP-ApxIV® ELISA)でApp菌陰性の豚 (86週齢)を使用した。豚は無作為に8群に分けられ、1群あたり10頭とした。各群にはそれぞれ異なる血清型のApp菌を接種し、その内の一群は陰性対照群とした。接種後49日目で全ての豚を安楽殺し、解放後は病変を評価した。

菌株

試験感染には、アメリカの野外で最も有病率が高いApp菌株、American Type Culture Collection (ATCC)から、血清型1 (4074)、血清型3 (1421)、血清型5 (K17)および血清型7 (WF83)のレファレンス株を接種した。また、血清型10 (22009)、12 (1096)および15 (HS143)は提供されたものを接種した (Blackall *et al.*, 2002)。血清型10のApp菌は過去6年間検出されなかったが、今回の試験豚からSwinecheck® APP ELISAで抗体が検出されたので検討対象となった。

接種およびチャレンジ

接種前にチャレンジ菌株の増殖曲線を作成した。対数増殖期の急激な成長カーブ時期 (PPLO培地6時間培養)から菌液を採取し、PBSで 10^6 CFU/mLに濃度調整した。調整2時間以内の菌液を、それぞれの鼻腔内に1mLずつ接種した。

臨床症状

チャレンジ菌の感染による臨床症状をモニターするため、接種直後の3日間は連続で体温を測定し、その後は週一回間隔で体温測定を行った。元気消失症状や明らかな呼吸器症状を示した豚および41°C以上の発熱を示す豚にはセフトオフルナトリウム (セフェム系抗生物質)を二日間3mg/kgで筋肉注射した。

血液検体

チャレンジ菌接種前 (0日)から週一回間隔で7週間、豚の採血を行い、血清を分離した。分離血清はSwinecheck® APP ELISAおよびMulti-APP

ELISA で検査した。Swinecheck® APP ELISA は血清型 1, 9, 11, 血清型 2, 血清型 3, 6, 8, 血清型 4, 7, 血清型 5, 血清型 10, 血清型 12 に対する抗体を感知するが、各血清型の鑑別は出来ない。また、血清型 15 に対する抗体は血清型 3, 6, 8 の抗原で感知されると報告している (Gottschalk, 2007)。一方、Multi-APP ELISA はすべての App LC-LPS 抗原に対する抗体を検出するので血清型の鑑別は出来ない。血清型間の交差反応は App 菌接種後 49 日目の血清から Swinecheck® APP ELISA で検査した。

咽頭スワブ

咽頭のスワブは接種前 (0 日) から週一回間隔で 7 週間採取した。2 つのスワブを用意し、菌分離および DNA 抽出に用いた。

剖検

全ての豚の肉眼所見を評価した。咽頭のスワブ、扁桃および肺のスワブを App 菌分離や PCR 用にそれぞれ採取した。

統計解析

抗体検査ツールである Swinecheck® APP ELISA および Multi-APP ELISA で感染豚の検出率 (陽転率) を比較検討し、その比較により生存分析を行った。

3. 結果

実験的感染

App 菌濃度 10^6 CFU/mL で接種した結果、血清型 1, 3, 7, 10 および 15 接種群では接種後 49 日目で血清検査および扁桃の PCR 検査により App 菌が検出され、感染が成立した。血清型 5 および 12 接種群では同様の検査でどちらとも菌が検出されず、感染は成立しなかった。

臨床症状および剖検所見

接種後 24 時間で呼吸困難や元気消失が血清型 10 および 15 の接種群で現れた。また、血清型 10 の接種群では発熱症状 (直腸温度が 41°C 以上) も認められ、抗生剤治療 (セフトオフルナトリウム 3mg/kg) を二日間行ったが、1 頭が死亡し肺出血や壊死の病変が認められた。一方、血清型 15 接種群では、一頭が肢の負傷によって接種後 3 週間目で安楽殺され (感染の影響によるものではない)、App の特徴

的な所見 (胸膜の出血や壊死) が認められた。血清型 5 (n=1), 7 (n=4), 10 (n=4) および 15 (n=2) の接種群では接種後 49 日目で肺や胸腔壁の軽度な繊維索性癒着が認められた。血清型 1, 3 および 12 の接種群では病変は特に認められなかった。

菌分離

App 菌は一週間隔で採取した口咽頭スワブからは分離されなかった。唯一 App 菌が分離されたのは、胸膜病変部位のスワブからで、感染 3 日目で死亡した血清型 10 接種群の 1 頭と、感染 21 日目で死亡した血清型 15 接種群の 1 頭の計 2 頭のみであった。

PCR

咽頭の菌採取で使用したスワブ (BD BBL CultureSwab™) はケース底にゲルベースの培地があるため、これが PCR の効率を悪くしたと思われる。今回のスワブ検体の PCR 検査は不安定で再現性がなく、接種後 49 日目の扁桃の PCR 検査法のみが唯一信頼性があると考えられた。血清型 1, 3, 7, 10 および 15 接種群では App 菌が検出され、感染が成立した。また、血清型 5 および 12 の接種群や非接種群の PCR 検査で App 菌は検出されなかった (表 1)。

血清検査

表 1 に血清検査および PCR の結果をまとめた。血清型 5, 12 の接種群や非接種群で陽転は検出されず、ELISA でも検出されなかった。この結果は接種後 49 日目の扁桃の PCR 検出法の結果と同様だった。Multi-APP ELISA は Swinecheck® APP ELISA に比べ、血清型 1, 3 および 10 の接種群で一週間早く陽転を検出した。血清型 7 および 15 接種群の場合、両方の ELISA から接種後 2 週間目で陽転を検出した (Fig. 1)。陽転率が最も高い (89% から 100%) 血清型 7 および 15 接種群に比べ、血清型 1, 3 および 10 接種群では最も陽転率が低かった。また、接種後 49 日目の扁桃の PCR 検出法の陽転率と比較時、ELISA の陽転率は低い傾向であった (表 1)。

生存分析

接種から抗体が陽転するまでの期間を 'time to event' の変数とした。接種豚群中、半数が陽転した時点を生存中央値とし、50% が陽転した時点とした (日にちで表している)。この時、陽転しなかつ

表 1 血清検査および PCR 反応結果のまとめ

血清型 N		Swinecheck [®] APP ELISA		Multi-APP ELISA		PCR (+)
		早期検出 (週)	+/- 疑い / 接種後 49 日目	早期検出 (週)	+/- 接種後 49 日目	
1	10	5 ^b	4/1/5	3	5/5	1
3	10	3	1/4/5	2	5/5	3
5	10	-	0/0/10	-	0/0	0
7	9 ^b	2	8/0/1	2	8/1	5
10	9 ^b	2	1/3/5	1	4/5	3
12	10	-	0/0/10	-	0/0	0
15	9 ^b	2	5/2/2	2	9/0	3
control	9 ^b	-	0/0/9	-	0/9	0

a 血清型 1, 5 および 7 では感染後 4 週間目のデータは得られなかった。

b 感染後 49 日目の豚群。2 頭 (血清型 10 および 15) が菌接種後 App 菌による肺炎で死亡。接種前、血清型 7 および非接種群で各 1 頭、2 頭が死亡。

た検体は対象外とした。疑い検体 (陽転がはっきりしないもの) を除外した時, Multi-APP ELISA の

生存中央値 (28 日) は Swinecheck[®] APP ELISA の生存中央値 (49 日) より有意に低く ($p=0.04$) (Fig. 2), 疑い検体を陽性とした時の有意差は特に認められなかった。

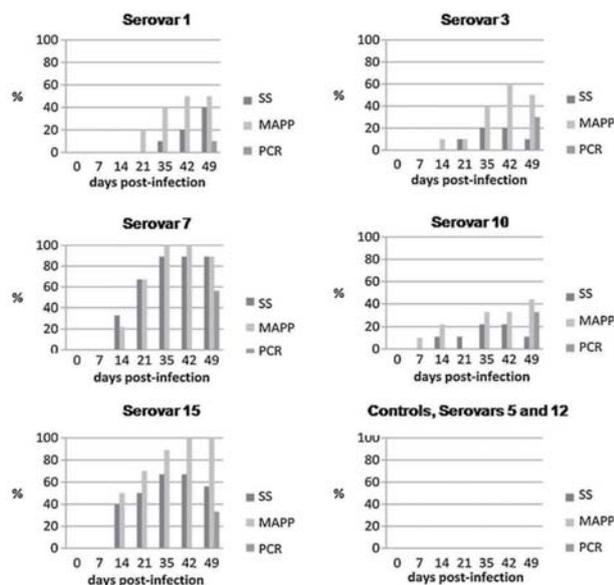


Fig. 1 Multi-APP(MAPP)および serovar-specific(SS) (Swinecheck[®] APP ELISA)ELISA の陽転率。接種後の日にち別および接種後 49 日目の PCR も含む。

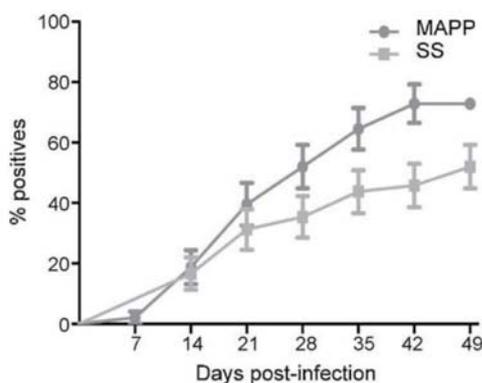


Fig. 2 接種から陽性転換検出までの生存分析。Multi-APP および serovar-specific (Swinecheck[®] APP ELISA) を比較検討した。(疑い検体は陰性とした。)

4. 考察

今回の研究目的は、7つの血清型の App を試験的に不顕性感染させた豚群に対して、複数の App 診断検査法を用いて感染の検出能力を評価することである。App 菌を 10^6 CFU/mL 濃度で接種することで試験的な不顕性感染を再現した (Fittipaldi *et al.*, 2003)。血清型 1, 3, 7 および 15 の接種豚群では不顕性感染が成立した。しかし、血清型 5 および 12 接種豚群では感染が成立せず、血清型 10 の接種豚群では接種後 24 ~ 48 時間後に明らかな臨床症状を示した。すべての豚群を同じ濃度で接種しているが、血清型によって病原性やコロニー形成は様々であることは、Frey や Jacobsen らによって報告されている (Frey, 1995 ; Jacobsen *et al.*, 1996)。一方、アメリカの野外で主に検出される血清型 5 や 12 の接種豚群の感染が成立しなかったのは予期せぬ結果であった。血清型 12 は 10^6 CFU/mL の濃度で陽転検出すると報告されており (Grondahl-Hansen *et al.*, 2003), 血清型 5 は $10^8 \sim 10^9$ CFU/mL で明らかな胸膜肺炎の病変が再現したと報告されている (Ueda *et al.*, 1995)。しかし、今回の血清型 5 および 12 接種群で不顕性感染を成立させるには接種濃度を高める必要があったと思われる。また、血清型 10 接種群で重度な臨床症状が現れたことも想定外で、実際、血清型 10 の App 菌感染による臨床症状は野外でも、試験的感染でも報告がない。

初期の研究計画では Biovet 社の血清型特異的 Swinecheck[®] APP ELISA とモントリオール大学の Multi-APP ELISA, そして IDEXX 社の Checkit APP-ApxIV[®] ELISA を比較検討する予定であったが, IDEXX 社から要求を拒否されたため, 今回は二つの検査のみで研究を行う事になった。Swinecheck[®] APP ELISA と Multi-APP ELISA は App 菌の LC-LPS に対する抗体を検出するが, Multi-APP ELISA は一週間前に陽転を検出した。この ELISA は App 菌の全血清型に対する LC-LPS を抗原としているため, より完全な形の抗原として陽転を早期に検出したと考えられる。

今回の Swinecheck[®] APP ELISA の結果から血清型 3, 6, 8 抗原で血清型 15 に対する抗体を検出できることが明らかになり, Gottschalk ら (2007) の報告と一致している。S/P 比 (血清・PCR 結果の比) では, 血清型 3 に比べ, 血清型 15 感染検体数が多かった (データは載せていない)。また, 接種後 49 日目の試験感染させた血清型 1, 3, 7, 10 および 15 の血清を Swinecheck[®] APP ELISA の抗原で交差反応を調べたところ, 交差反応は認められなかった。

一週間隔で咽頭スワブから App 菌を採取し, PCR 検査で検出を試したが結果は得られず, これは菌採取時にスワブケースの底のゲルベース培地が PCR の感度を干渉したと考えられた。また, 菌分離も常在菌のため厳しい結果となった。咽頭からの App 菌分離は Ueda らから報告されているが (Ueda *et al.*, 1995), 今回その再現は出来なかった。免疫磁気による App 菌分離も報告されているが (Gagné *et al.*, 1998), このような手法を持ち合わせていなかったため不可となった。一方, 接種後 49 日目で解放した豚の扁桃 PCR からは菌が検出された。この結果は血清型 1, 3, 7, 10 および 15 の接種群の感染確認や血清型 5 および 12 接種群の非感染確認に有用であった。

咽頭 PCR から菌が検出された検体数は, 接種後 49 日目の抗体が検出された血清数より下回ったが直接的な関連はないと思われる。この相違は血清検査では咽頭の App 菌が感知出来ず, 実際陰性血清にもかかわらず PCR では陽性の検体も検出され, 鼻から鼻へ感染が成立したものと考えられた。

5. 結論

今回の研究結果から, Multi-APP ELISA をスク

リーニング検査に推奨する。また, Swinecheck[®] APP ELISA は豚群で流行している App 菌の血清型を診断する際に有用と思われた。また, Multi-APP ELISA で陽性と判定された検体が Swinecheck[®] APP ELISA で陰性と判定された場合は, 1~2 週間後に検体を再採取し, Swinecheck[®] APP ELISA で再検査する事によって, 感度の違いによる結果を解決出来ると考えた。

6. References

- Blackall, P. J., Klaasen, H. L., van den Bosch, H., Kuhnert, P., Frey, J., 2002. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet. Microbiol.* **84**, 47-52.
- Dreyfus, A., Schaller, A., Nivollet, S., Segers, R. P., Kobisch, M., Mieli, L., Soerensen, V., Hussy, D., Miserez, R., Zimmermann, W., Inderbitzin, F., Frey, J., 2004. Use of recombinant ApxIV in serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections, development and prevalidation of the ApxIV ELISA. *Vet. Microbiol.* **99**, 227-238.
- Frey, J., 1995. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol.* **3**, 257-260.
- Fittipaldi, N., Broes, A., Harel, J., Kobisch, M., Gottschalk, M., 2003. Evaluation and field validation of PCR tests for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in subclinically infected pigs. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 5085-5093.
- Gagné, A., Lacouture, S., Broes, A., D'Allaire, S., Gottschalk, M., 1998. Development of an immunomagnetic method for selective isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 from tonsils. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 251-254.
- Gottschalk, M., 2007. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes, pathogenicity and virulence. In: *Proc. AASV, Orlando, FL*, pp. 381-384.
- Gottschalk, M., Broes, A., Mittal, K. R., Kobisch, M., Kuhnert, P., Lebrun, A., Frey, J., 2003. Non-pathogenic *Actinobacillus* isolates antigenically and biochemically similar to *Actinobacillus pleuropneumoniae*: a novel species. *Vet. Microbiol.* **92**, 87-101.

8. Grondahl-Hansen, J., Barfod, K., Klausen, J., Andresen, L.O., Heegaard, P.M., Sorensen, V., 2003. Development and evaluation of a mixed longchainb lipopolysaccharide based ELISA for serological surveillance of infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 6 and 12 in pig herds. *Vet. Microbiol.* **96**, 41-51.
9. Jacobsen, M. J., Nielsen, J. P., Nielsen, R., 1996. Comparison of virulence of different *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes and biotypes using an aerosol infection model. *Vet. Microbiol.* **49**, 159-168.
10. Jessing, S. G., Angen, O., Inzana, T. J., 2003. Evaluation of a multiplex PCR test for simultaneous identification and serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 5, and 6. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4095-4100.
11. Mittal, K. R., Higgins, R., Lariviere, S., 1983. Determination of antigenic specificity and relationship among *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes by an indirect hemagglutination test. *J. Clin. Microbiol.* **17**, 787-790.
12. Rayamajhi, N., Shin, S. J., Kang, S. G., Lee, D. Y., Ahn, J. M., Yoo, H. S., 2005. Development and use of a multiplex polymerase chain reaction assay based on Apx toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *J. Vet. Diagn. Invest.* **17**, 359-362.
13. Schaller, A., Djordjevic, S. P., Eamens, G. J., Forbes, W. A., Kuhn, R., Kuhnert, P., Gottschalk, M., Nicolet, J., Frey, J., 2001. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene apxIVA. *Vet. Microbiol.* **79**, 47-62.
14. Schaller, A., Kuhn, R., Kuhnert, P., Nicolet, J., Anderson, T. J., MacInnes, J. I., Segers, R. P., Frey, J., 1999. Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiol.-UK* **145**, 2105-2116.
15. Ueda, Y., Ohtsuki, S., Narukawa, N., 1995. Efficacy of florfenicol on experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. *J. Med. Sci.* **57**, 261-265.

(研究員)



—— テーマは「生命の連鎖」——
 生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを快いリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士の揮毫

日生研たより 昭和30年9月1日創刊(隔月1回発行)
 (通巻570号) 平成23年8月25日印刷 平成23年9月1日発行(第57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/平 修(委員長), 堤 信幸, 黒田 丹
 事務/企画学術部
 印刷所 株式会社 精興社
 (無断転載を禁ず)