

日生研おより

2012年(平成24年)4月号 第58巻第3号(通巻574号)

ご挨拶

..... 上田 進 (2)

新組織図・役員名簿

..... (3)

研究所の創立から現在まで

..... (4)

獣医病理学研修会

第49回 No. 987 イヌの小脳腫瘍
..... 岩手大学 (6)

第51回 No.1032 ヒツジの脳
..... 帯広畜産大学 (7)

レビュー

経口免疫寛容の成立における腸間膜リンパ
節樹状細胞の役割 佐藤 克明 (8)

論文紹介

鳥インフルエンザ感染鶏識別に対する
NS1-ELISAの有効性 竹山 夏実 (14)

お知らせ

学会発表演題 (19)



NIBS

一般財団法人 日本生物科学研究所

NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE

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



ご挨拶

上田 進

皆様方から格別のご高配を賜りました財団法人日本生物科学研究所は、この度公益法人改革関連法に基づき内閣府より一般財団法人として認可され、平成24年4月1日より一般財団法人日本生物科学研究所として新たに出発することとなりました。顧みますと昭和22年3月戦後の混乱のなか創立され、中村稔治元所長の指導のもと牛疫、ニューカッスル病、狂犬病、日本脳炎そしてインフルエンザなどのワクチンを世に出して感染症の防疫に貢献してまいりました。なかでも中村稔治元所長の開発された牛疫ワクチンは、FAOとOIEによる2011年の牛疫撲滅宣言に至るまでの多大な貢献を認められ、FAOより感謝状が贈られております。日本からは中村稔治元所長の他、小澤義博国際獣疫事務局名誉顧問、そしてJICAに感謝状が贈られております。小澤先生には当財団の監事としてご指導頂いていたことから、当財団として誇りに思う次第です。

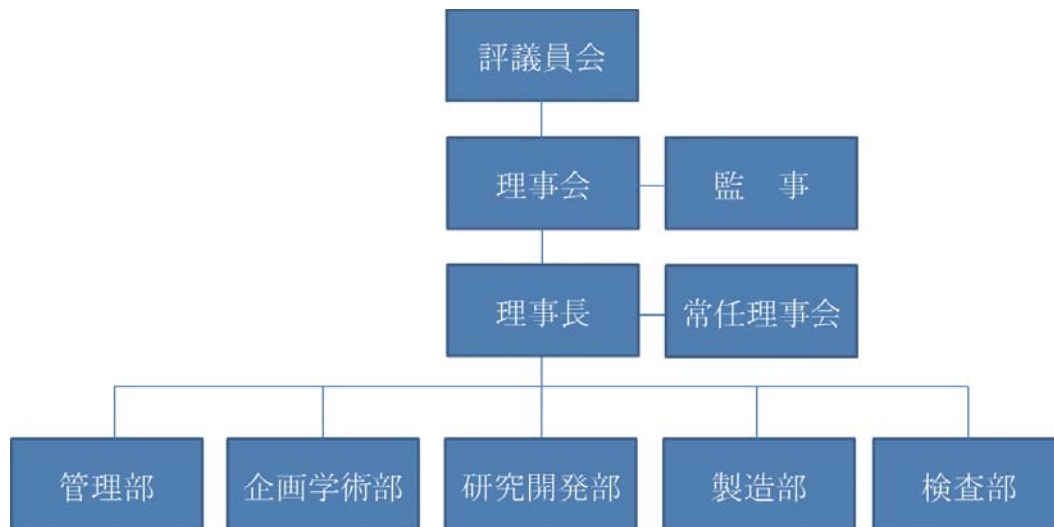
創立以来主として家畜の感染現象と免疫現象に関わる実際的な研究を行ってまいりました。この思弁を排して理論的であるとともに、実際的な思考に基づく研究姿勢は今後とも受け継いでいかねばならないと思う次第です。一方、研究所の経営は昭和34年に財団法人日本生物科学研究所と日生研株式会社とに分離して以来、日生研株式会社がワクチンなどを製造販売した利益を技術料として受け入れて運営されてまいりました。しかしながら社会環境の変化もあり、このような経営体制には無理も生じてまいりましたので、研究活動を資金面で支えるために日生研株式会社の製造部門を承継して、研究開発部、製造部、検査部、企画学術部そして管理部という組織で新たにスタートすることになりました。組織体制は変わりましたが、創立以来諸先輩によって継承されてきた有形無形の財産を発展させるべく、これからもまやかしの無い研究を実践して、斯学や斯界に貢献すべく努力してまいり所存でございます。関係各位のこれまでのご指導ご鞭撻に衷心よりお礼申し上げますとともに、今後とも一層のご指導ご鞭撻をお願い申し上げます。

(理事長)

新組織図・役員名簿

公益法人改革関連法に基づき、「財団法人 日本生物科学研究所」は、平成 24 年 4 月 1 日付で「一般財団法人 日本生物科学研究所」へ移行致しました。新たな組織体制ならびに評議員、理事及び監事の人事は下記の通りとなりましたので、お知らせいたします。

1. 組織



2. 評議員

高橋 英司 小野憲一郎 明石 博臣 小川 博之 井土 俊郎

3. 理事・監事

氏名	役職	担当
上田 進	理事長（代表理事）	経営
草薙 公一	副理事長	製造担当
布谷 鉄夫	常務理事	研究開発、検査担当
吉村 巖雄	常務理事	管理担当
小林 恒夫	常務理事	企画学術担当
岩田 晃	常務理事	研究開発担当
佐々木 伸雄	常務理事	研究開発担当
笹川 千尋	常務理事	研究開発担当
真板 敬三	監事	
小坂 善三	監事	

—研究所の創立から現在まで—

●昭和 22 年（1947） 社団法人日本生物科学研究所設立

当研究所の前々身である社団法人日本生物科学研究所は、第2次世界大戦により衰退した我国の生物科学の振興をはかる目的で、昭和22年（1947）3月1日に発足しました。自らの運営費を確保するため研究成果の一部を動物用生物学的製剤として製品化しました。



●昭和 30 年（1955） 日生研たより創刊

社団法人日本生物科学研究所の設立者の一人である中村稔治博士の立案により、研究所の内容をもっと世に知っていただくために日生研たよりを創刊しました。



●昭和 34 年（1959） 財団法人日本生物科学研究所の発足

公益法人としての純粋性を維持し、研究事業を発展させるための組織改革を行い、昭和34年（1959）12月28日、財団法人日本生物科学研究所の設立が文部大臣および農林大臣により認可されました。微生物学、病理学部門の充実、寄生虫学部門の新設。その後毒性学部門を新設しました。（日本育英会奨学金返還免除認定機関）



●昭和 41 年（1966） 附属実験動物研究所の発足

昭和41年（1966）4月、附属実験動物研究所を山梨県小淵沢町に設立。各種実験動物を開発し、生物科学の各分野における研究の推進に貢献しました。



●昭和 44 年（1969） 財団法人日本生物科学研究所青梅支所設立



昭和 44 年（1969）4 月 1 日、（財）日本生物科学研究所青梅支所を設立し、多様化する鶏の感染症に対応できる体制を確立。その後、病理学研究室、毒性学研究部門を立川より移設しました。

●昭和 53 年（1978） 財団法人日本生物科学研究所青梅移転

昭和 53 年（1978）4 月 1 日、立川本所を青梅支所内に移設。実験動物研究部門を除く、他の全研究部門の連携緊密化が実現しました。



●平成 17 年（2005）

附属実験動物研究所新試験研究棟建設
実験動物領域における新たな研究分野に対応できるよう、附属実験動物研究所（山梨県北杜市小淵沢）に先端的研究が行える設備・機器を備えた新たな試験研究棟を建設しました。

●平成 19 年（2007）創立 60 周年

創立 60 周年にあたり「振興・再興するヒトと動物の共通感染症」と題する記念シンポジウムが、東京大学弥生講堂において 10 月 2 日に、記念式典が 10 月 5 日、ホテルオークラにて開催されました。

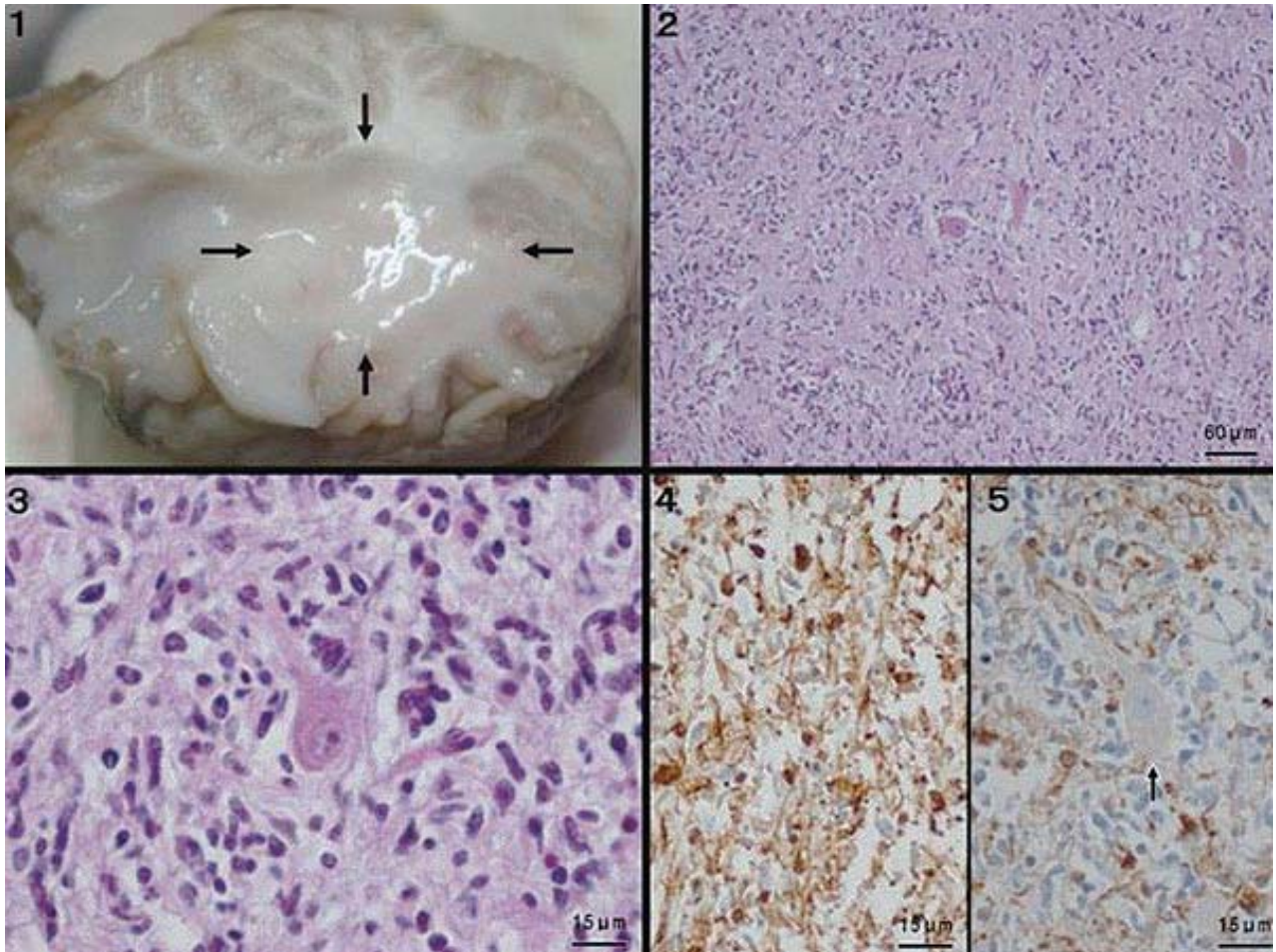


●平成 24 年（2012）

一般財団法人へ移行
公益法人改革関連法に基づき、財団法人日本生物科学研究所は、平成 24 年 4 月 1 日付で一般財団法人日本生物科学研究所へ移行致しました。

イヌの小脳腫瘍

岩手大学 第 49 回獣医病理学研修会 No. 987



動物：イヌ，セントバーナード，雄，6歳。

臨床事項：斜め歩行，転倒，ふらつきなどを主訴に某動物病院を受診。症状の改善がみられないため，2008年10月22日に岩手大学動物病院に上診された。神経学的検査では，四肢の側尺過大，伸筋トーンの低下などが認められた。同年11月6日にMRI検査を実施したところ，小脳の正中腹尾側に明瞭な腫瘍が認められた。11月17日に起立不能，昏睡などを呈し，死亡した。

肉眼所見：動物は死後48時間後に剖検された。小脳底部に融解が顕著なクリーム色の領域が認められた(図1)。大脳および脳幹には，肉眼的に著変は認められなかった。

組織所見：腫瘍細胞は小脳の右側白質を中心に増殖し，壊死や出血を伴わずに小脳灰白質，軟膜下，橋の一部などへ広範に浸潤していた(図2)。腫瘍細胞の核は，類円形，紡錘形などの多形性を示し，細胞質はほとんど認められなかった。一部では増殖した腫瘍細胞の間

に既存の神経細胞が散在性にみられたが，それらは変性，壊死などの所見を欠いていた(図3)。免疫組織化学的に腫瘍細胞は，Vimentinに陽性(図4)，GFAPには一部で陽性(図5，矢印は既存の神経細胞)，S-100，Synaptophysin，Iba1などに陰性を示した。

診断：犬の小脳における大脳神経膠腫症 *Gliomatosis cerebri in cerebellum of a dog*

考察：大脳神経膠腫症は，大脳や脊髄などの広範囲にびまん性増殖を示す膠腫であり，犬ではいくつかの報告がある[1]。それらのほとんどは大脳に病変を有するものであったが，本症例では小脳および橋の一部においてのみ腫瘍細胞の浸潤・増殖を示し，大脳神経膠腫症の発生部位として非常にまれな症例であると考えられた。

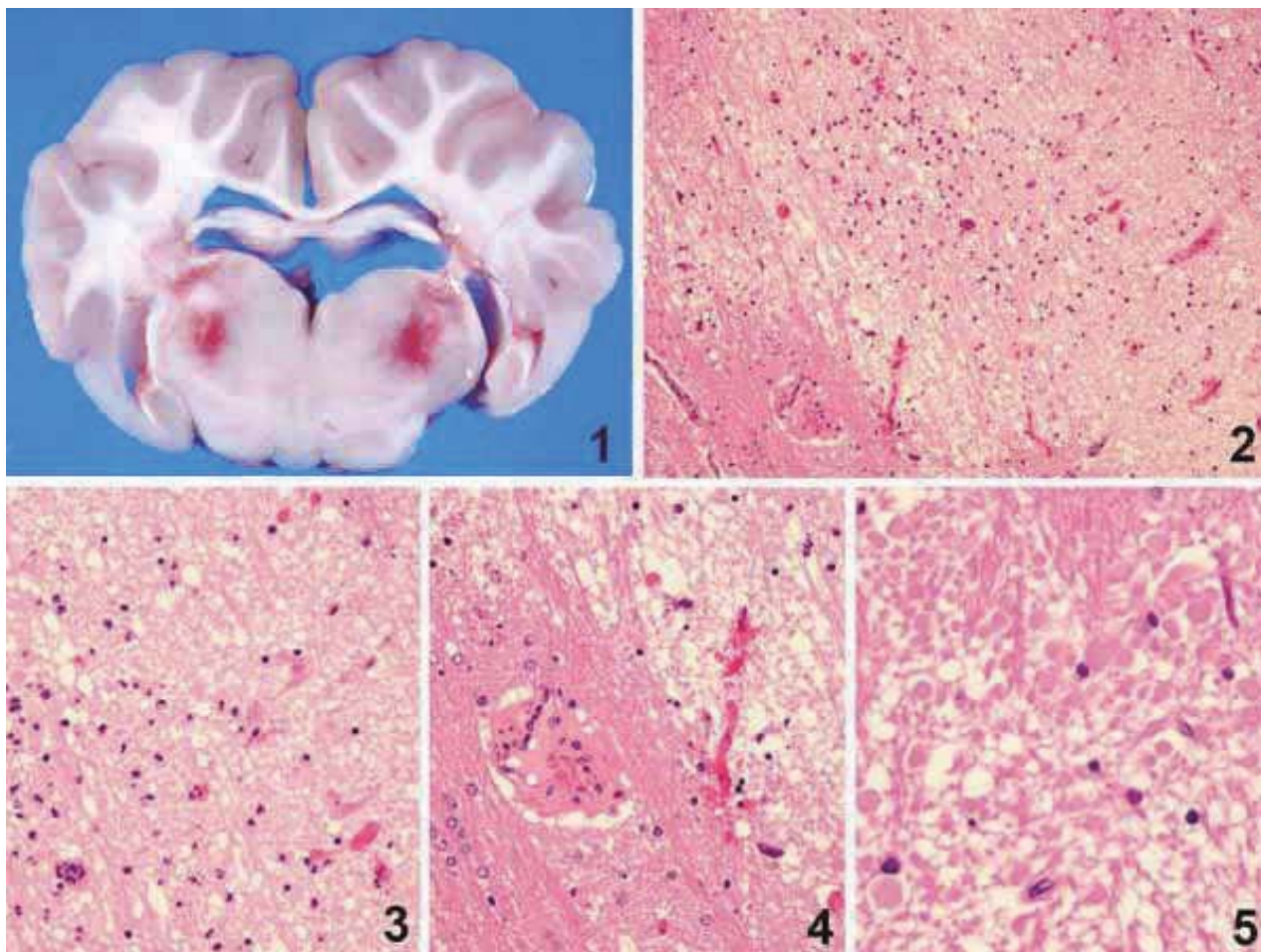
(福岡寛之・佐々木淳)

参考文献：

1. Porter, B., de Lahunta, A., and Summers, B. 2003. *Gliomatosis cerebri in six dogs. Vet. Pathol.* 40:97-102.

ヒツジの脳

帯広畜産大学 第 51 回獣医病理学研修会 No.1032



動物：ヒツジ，サフォーク，雌，49日齢。

臨床事項：2010年6月4日早朝，突然起立不能に陥った。回旋性の眼振および後弓反張の神経症状を呈したため，安楽殺後，剖検を行った。

参考事項：提出標本と同様の病変は，基底核，内包，後頭葉，中脳，小脳などにおいても，概ね両側対称性に認められている。同農場では，2010年6月2日にも，52日齢のヒツジ(サフォーク種，雌)が突然起立不能に陥り，数時間の経過で急死している。同例の病理検索では，程度は軽いものの，本例と同質の病変が確認されている。

肉眼所見：視床部において，軽度の出血を伴う淡桃色化巣が両側対称性にみられた(図1)。その他の諸臓器に著変は認められなかった。

組織所見：肉眼的に認められた淡桃色化巣に一致して淡明化巣が認められた(図2)。同部では，神経細胞の壊死および好中球浸潤が認められた(図3)。また血管周囲への血漿成分の漏出や出血像もみられた(図4)。淡明化巣周囲白質においては，膨化した軸索が集簇する部位も認められた(図5)。大脳皮質においても，程度は軽度であったが，視床部と同様の病変が認められた。

診断：大脳の多巣性壊死(巣状両側対称性脳軟化)

考察：ヒツジでは，本例でみられたような病変および病変分布がみられる疾患として，巣状両側対称性脳軟化が知られている。本疾患は，*Clostridium perfringens* type Dの産生する ϵ 毒素によるエンテロトキセミアが原因とされており，主に飼料を過食した子ヒツジに発生し，罹患ヒツジは急性ないし亜急性の経過で死亡する。また，中枢神経病変は ϵ 毒素が血行性に中枢神経系へ移行し，血管内皮細胞を障害することで起こるとされている。残念ながら，本例では ϵ 毒素の関与について検討できておらず，上記診断名とした。(中川大輔・古林与志安)

参考文献：

1. Finnie, J. W. 2003. Pathogenesis of brain damage produced in sheep by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin : a review. *Aust. Vet. J.*, **81** : 219-221.
2. Summers, B. A., Cummings, J. F., de Lahunta, A. 1995. Focal symmetrical encephalomalacia. pp. 269-270. In : *Veterinary Neuropathology*, Mosby-Year Book, St. Louis.
3. Uzal, F. A. and Songer, J. G. 2008. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **20** : 253-265.

経口免疫寛容の成立における 腸間膜リンパ節樹状細胞の役割

佐藤克明 (独立行政法人理化学研究所 横浜研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター 樹状細胞機能研究チーム)

はじめに

樹状細胞 (dendritic cells; DCs) は樹状突起を有する系統マーカー陰性、主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC) クラス II 陽性の抗原提示細胞 (antigen-presenting cells; APCs) であり、造血幹細胞よりミエロイド系やリンパ球系分化経路を経て未熟樹状細胞へ分化し、さらに様々な刺激により成熟樹状細胞に至る [1, 2]。樹状細胞は通常型樹状細胞 (conventional DCs;

cDCs) と形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid DCs; pDCs) に大別される複数のサブセットから構成される [1, 2]。病原性微生物等の外来抗原の末梢組織への侵襲により惹起された炎症状態では樹状細胞は活性化して多様なサイトカインを産生するとともにナイーブ CD4⁺T 細胞やナイーブ CD8⁺T 細胞に抗原提示と共刺激を与えて種々のエフェクター CD4⁺T 細胞や細胞障害性 T 細胞を誘導し、自然免疫と獲得免疫を繋ぐ最も強力な抗原提示細胞として免疫系を賦活化する (図 1) [1, 2]。一方、定常状態

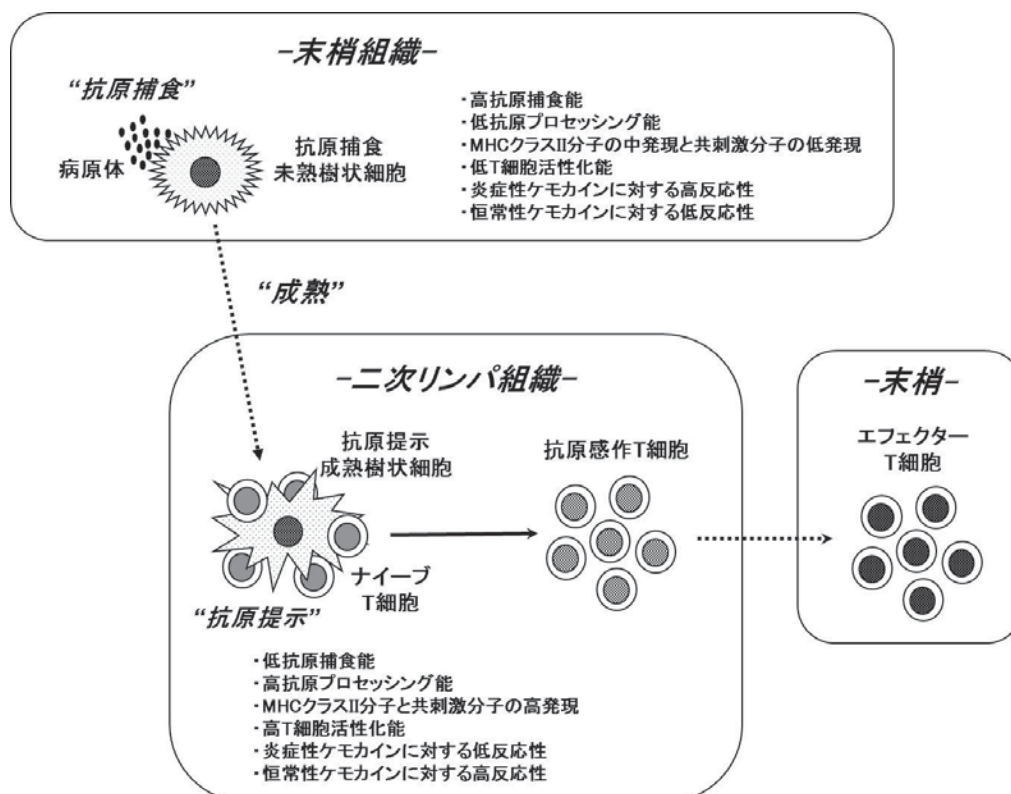


図 1 樹状細胞による抗原特異的 T 細胞の誘導

病原性微生物等の外来抗原の末梢組織への侵襲は様々な炎症性サイトカインや炎症性ケモカインの産生を誘導して局所的な炎症反応を惹起する。末梢組織に存在する未熟樹状細胞は種々の炎症性ケモカインレセプターの恒常的発現により炎症組織に移行し、パターン認識受容体を介して外来抗原を捕食する。炎症性刺激により未熟樹状細胞は成熟樹状細胞となり、1) 抗原捕食能の低下、2) 抗原プロセッシング能の増強と MHC 分子 / 抗原ペプチド複合体の細胞膜上への発現増強、3) 共刺激分子の発現増強、4) 炎症性ケモカインレセプターの発現低下による炎症性ケモカインへの遊走能の減弱、5) CCR7 の発現誘導による所属二次リンパ組織で産生される恒常性ケモカイン (CCL19, CCL21) に対する遊走能の獲得が起こる。さらに、成熟樹状細胞は所属二次リンパ組織に移行してナイーブ T 細胞に抗原提示を行い、抗原特異的エフェクター T 細胞を分化誘導して一次免疫応答を惹起する。

では末梢において樹状細胞は自己反応性 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 内在性制御性 T (naturally occurring regulatory T; nT_{reg}) 細胞の増幅, ナイーブ $CD4^+$ T 細胞から抗原不応答性 T 細胞や抗原特異的 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 誘導性 T_{reg} (inducible T_{reg} ; iT_{reg}) 細胞の生成を介して免疫寛容を誘導し, 免疫学的恒常性の維持に重要であると推測されている [1, 2]。

消化管は宿主にとって有益, あるいは有害な外来抗原に恒常的に暴露されており, 結果的に腸管免疫システムは病原性微生物に対しては type 1 T helper T 細胞 (T_H1 細胞)・ T_H17 細胞などのエフェクター $CD4^+$ T 細胞や IgA 産生プラズマ細胞細胞を誘導して防御免疫反応を惹起し [3-5], 常在細菌や食物抗原に対しては免疫学的恒常性維持のために経口免疫寛容 (oral tolerance) として知られている不応答性を成立させ [6-9], バランスを保っている。経口免疫寛容の成立には腸間膜リンパ節 (mesenteric lymph node; MLNs) において抗原特異的 $CD4^+$ T 細胞の抑制が重要と考えられており, 腸間膜

リンパ節を切除したマウスでは経口免疫寛容が成立しないことも知られている [6-9]。現在までに経口免疫寛容では粘膜固有層で食物抗原を捕食した樹状細胞が腸間膜リンパ節に移行した後, ナイーブ $CD4^+$ T 細胞に食物抗原を提示してエフェクター $CD4^+$ T 細胞よりも $CD4^+Foxp3^+iT_{reg}$ 細胞を積極的に誘導することが重要と考えられているが [6-9], 生理学的条件下でのその詳細な分子作用機序は不明である。

B7-CD28 経路 (図 2) は重要な共刺激であり, 古典的 B7-CD28 経路では APCs に発現する CD80/CD86 と T 細胞に発現する CD28/cytotoxic T-lymphocyte antigen (CTLA)-4 との結合が知られている [10, 11]。一方, B7 ホモログである B7-H1, B7-DC, B7-H2, B7-H3, B7-H4 は APCs や 非血液細胞に発現が報告されている [10-12]。B7-H1 と B7-DC は Programmed death-ligand (PD-L) 1 に結合し, CD80 が B7-H1 に結合することも示されている [10, 11]。B7-H2 は Inducible costimulator (ICOS), B7-H3 は Trem-like

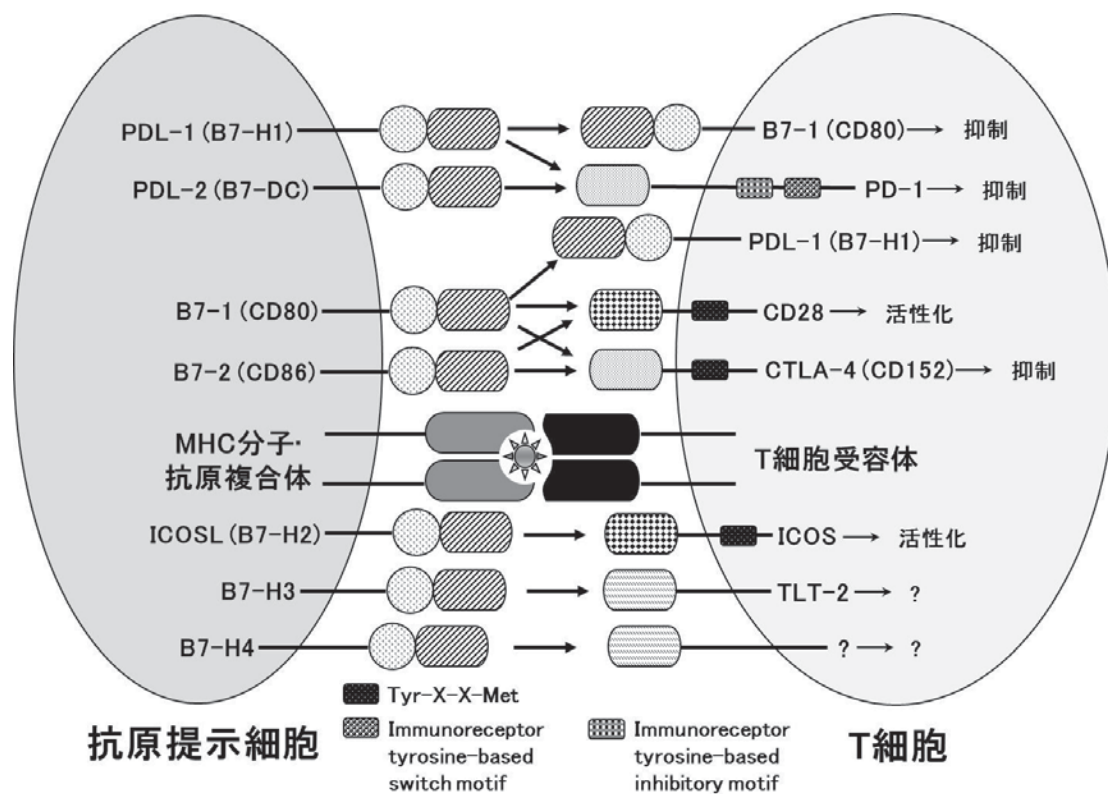


図 2 B7-CD28 ファミリー共刺激

抗原提示細胞の MHC・複合体は T 細胞の T 細胞受容体へ抗原提示される。CD28, CTLA-4, ICOS は細胞内ドメインに Tyr-X-X-Met 配列を有する。PD-1 は細胞内ドメインに immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) と immunoreceptor tyrosine-based switch motif (ITSM) を有する。CD80/CD86 : CD28, B7-H2 : ICOS の共刺激は T 細胞の活性化を誘導するが, CD80/CD86 : CTLA-4, B7-H1/B7-DC : PD-1, B7-H1 : CD80 の共刺激は T 細胞の活性化を抑制する。

transcript (TLT) -2 に結合し, B7-H4 のリガンドは不明である [10-12]。B7/CD28 ファミリーによる共刺激は T 細胞の活性化・抑制のバランスに必要なシグナルを伝え, 末梢での感染防御や自己免疫寛容の制御に関与することが報告されているが, 腸管免疫システムでのこれら B7 分子の役割は不明である [10-12]。

本稿では腸間膜リンパ節での経口免疫寛容の成立に関わる抗原特異的 CD4⁺Foxp3⁺iT_{regs} 細胞の誘導における樹状細胞に発現する B7 ファミリー共刺激分子の役割について紹介する [2]。

経口免疫寛容の成立における B7 ファミリー共刺激分子の役割

経口免疫寛容の成立における B7 ファミリー共刺激分子の役割を明らかにするために野生型 (wild-type; WT) マウスを対照として, Cd80/Cd86^{-/-} マウス, B7h1^{-/-} マウス, B7dc^{-/-} マウス, B7h2^{-/-} マウスについて卵白アルブミン (ovalbumin; OVA) をモデル抗原とした解析を行った。野生型マウスでは OVA と完全フロイントアジュバント (complete Freund's adjuvant; CFA) の皮下免疫により血清中 OVA 特異的 IgG1 産生と脾臓 CD4⁺T 細胞の OVA 特異的増殖が認められるが, 皮下免疫前の OVA の経口投与ではこれら OVA 特異的免疫応答が著しく抑制され, 経口免疫寛容が成立した (表 1)。一方, Cd80/Cd86^{-/-} マウスや B7h2^{-/-} マウスでは WT マウスと比較して OVA と CFA の皮下免疫による OVA 特異的免疫応答が著しくあるいは若干減弱していたが, OVA の経口投与により OVA 特異的免疫応答がさらに抑制された (表 1)。しかしながら, B7h1^{-/-} マウスや B7dc^{-/-} マウスでは WT マウスと比較して OVA と CFA の皮下免疫による OVA 特異的免疫応答が若干増強しており, OVA の経口投与による OVA 特異的免疫応答の抑制が認められな

表 1 経口免疫寛容の成立における B7 ファミリー共刺激分子の役割

マウスの種類	*OVA特異的免疫応答	
	OVA全身免疫	OVA経口投与+ OVA全身免疫
WTマウス	++++	+
Cd80/Cd86 ^{-/-} マウス	++	+/-
B7h1 ^{-/-} マウス	+++++	++++
B7dc ^{-/-} マウス	+++++	++++
B7h2 ^{-/-} マウス	+++	+

*血清中OVA特異的IgG₁産生とOVA特異的脾臓CD4⁺T細胞増殖

かった (表 1)。従って, B7-H1 と B7-DC は経口免疫寛容の成立に必須であることが考えられた。

腸間膜リンパ節樹状細胞の CD4⁺T 細胞活性化能における B7 ファミリー共刺激分子の役割

上述の通り, 腸間膜リンパ節は経口免疫寛容誘導のための重要な部位であると考えられていることから, 食物を提示する腸間膜リンパ節樹状細胞の性状特性を明らかにするために, 脾臓と腸間膜リンパ節での樹状細胞における機能的差異について検討した。WT マウスにおいて腸間膜リンパ節樹状細胞は脾臓樹状細胞と比較して, B7-H1, B7-DC, MHC クラス II, CD103 のより高い発現レベルを示したが, CD80, CD86, B7-H2 については同レベルの発現を示した (表 2)。また, 各 B7^{-/-} マウスでは標的分子以外の B7 ファミリー共刺激分子の発現について WT マウスとほぼ同様な結果が認められた。

表 2 樹状細胞における B7 ファミリー共刺激分子の発現

発現分子	脾臓樹状細胞	腸間膜樹状細胞
CD80	+	+
CD86	+	+
B7-H1	++	+++
B7-DC	+/-	+++
B7-H2	+	+
MHCクラスII	+++++	+++++
CD103	+/-	+++

次に脾臓樹状細胞と腸間膜リンパ節樹状細胞の CD4⁺T 細胞活性化能について, OVA 特異的 CD4⁺T 細胞を用いて比較検討した (表 3)。WT マウスでは腸間膜リンパ節樹状細胞の OVA 特異的 CD4⁺T 細胞活性化能は脾臓樹状細胞と比較して顕著に減弱していた。一方, Cd80/Cd86^{-/-} マウスや B7h2^{-/-} マウスでは WT マウスと比較してこれら樹状細胞の OVA 特異的 CD4⁺T 細胞活性化能は共に著しくあるいはやや低下していたが, 腸間膜リンパ節樹状

表 3 樹状細胞の抗原特異的 CD4⁺T 細胞活性化能

マウスの種類	OVA特異的CD4 ⁺ T細胞活性化能	
	脾臓樹状細胞	腸間膜樹状細胞
WTマウス	+++++	++
Cd80/Cd86 ^{-/-} マウス	++	+
B7h1 ^{-/-} マウス	+++++	++++
B7dc ^{-/-} マウス	+++++	++++
B7h2 ^{-/-} マウス	+++	+

細胞の方がより減弱していた。しかしながら、 $B7h1^{-/-}$ マウスや $B7dc^{-/-}$ マウスでは、腸間膜リンパ節樹状細胞は脾臓樹状細胞とほぼ同等の高い OVA 特異的 $CD4^+T$ 細胞活性化能を示した。従って、腸間膜リンパ節樹状細胞での B7-H1 と B7-DC の優位な発現が抗原特異的 $CD4^+T$ 細胞活性化能の低下に寄与していることが推察された。

腸間膜リンパ節樹状細胞の抗原特異的 $CD4^+Foxp3^+iT_{reg}$ 細胞誘導能における B7 ファミリー共刺激分子の役割

脾臓樹状細胞と腸間膜リンパ節樹状細胞による $CD4^+Foxp3^+T$ 細胞から $CD4^+Foxp3^+iT_{regs}$ 細胞への抗原特異的生成における B7 ファミリー共刺激分子の役割を明らかにするために、WT マウスと各 $B7^{-/-}$ マウスからの脾臓樹状細胞や腸間膜リンパ節樹状細胞と OVA 特異的 $CD4^+Foxp3^+T$ 細胞を transforming growth factor (TGF) - $\beta 1$ の存在下で 3 日間培養し、OVA 特異的 $CD4^+Foxp3^+iT_{reg}$ 細胞の誘導を比較検討した (表 4)。WT マウスでは腸間膜リンパ節樹状細胞は脾臓樹状細胞よりも TGF - $\beta 1$ 依存的な OVA 特異的 $CD4^+Foxp3^+iT_{reg}$ 細胞の高誘導能を示した [13, 14]。一方、これら樹状細胞の OVA 特異的 $CD4^+Foxp3^+iT_{reg}$ 細胞の誘導能は WT マウスと比較して $Cd80/Cd86^{-/-}$ マウスでは著しく増強され、 $B7h1^{-/-}$ マウスや $B7dc^{-/-}$ マウスでは顕著に減弱していた。以上の結果から、B7-H1 と B7-DC は抗原特異的 $CD4^+Foxp3^+iT_{reg}$ 細胞の生成に関与し、 $CD80/CD86$ はこれを抑制することが考えられた。従って、腸間膜リンパ節樹状細胞での B7-H1 と B7-DC の優位な発現が抗原特異的 $CD4^+Foxp3^+iT_{reg}$ 細胞の高誘導能に寄与していることが推察された。

表 4 樹状細胞の抗原特異的 $CD4^+Foxp3^+iT_{reg}$ 細胞誘導能

マウスの種類	OVA特異的Foxp3 ⁺ iT _{reg} 細胞誘導能	
	脾臓樹状細胞	腸間膜樹状細胞
WTマウス	++	++++
<i>Cd80/Cd86</i> ^{-/-} マウス	++++	+++++
<i>B7h1</i> ^{-/-} マウス	+	+
<i>B7dc</i> ^{-/-} マウス	+	+
<i>B7h2</i> ^{-/-} マウス	++	++++

腸間膜リンパ節樹状細胞の抗原特異的 T_H17 細胞誘導能における B7 ファミリー共刺激分子の役割

脾臓樹状細胞と腸間膜リンパ節樹状細胞による $CD4^+Foxp3^-T$ 細胞から T_H17 細胞への抗原特異的生成における B7 ファミリー共刺激分子の役割を明らかにするために、WT マウスと各 $B7^{-/-}$ マウスからの脾臓樹状細胞や腸間膜リンパ節樹状細胞と OVA 特異的 $CD4^+Foxp3^-T$ 細胞を TGF - $\beta 1$ とともに interleukin (IL) - 6 や CpG (Toll 様受容体 9 リガンド) の存在下で 3 日間培養し、OVA 特異的 T_H17 細胞の誘導を比較検討した (表 5)。WT マウスで

表 5 樹状細胞の抗原特異的 T_H17 細胞誘導能

マウスの種類	OVA特異的T _H 17細胞誘導能	
	脾臓樹状細胞	腸間膜樹状細胞
WTマウス	++++	++
<i>Cd80/Cd86</i> ^{-/-} マウス	++	+
<i>B7h1</i> ^{-/-} マウス	+++++	+++++
<i>B7dc</i> ^{-/-} マウス	+++++	+++++
<i>B7h2</i> ^{-/-} マウス	+++	++

は腸間膜リンパ節樹状細胞は脾臓樹状細胞よりも TGF - $\beta 1$ · IL-6 や TGF - $\beta 1$ · CpG 依存的な OVA 特異的 T_H17 細胞の低誘導能を示した [15]。また、この条件下ではこれら樹状細胞による TGF - $\beta 1$ 依存的な OVA 特異的 $CD4^+Foxp3^+iT_{reg}$ 細胞の生成がほぼ完全に阻害されていた [2]。一方、これら樹状細胞の OVA 特異的 T_H17 細胞の誘導能は WT マウスと比較して $Cd80/Cd86^{-/-}$ マウスと $B7h2^{-/-}$ マウスでは著しくあるいはやや減弱し、 $B7h1^{-/-}$ マウスや $B7dc^{-/-}$ マウスでは顕著に増強していた。以上の結果から、 $CD80/CD86$ と B7-H2 は抗原特異的 T_H17 細胞の生成に関与し、B7-H1 と B7-DC はこれを抑制することが考えられた。従って、腸間膜リンパ節樹状細胞での B7-H1 と B7-DC の優位な発現が抗原特異的 T_H17 細胞の低誘導能に寄与していることが推察された。

経口免疫寛容誘導での抗原特異的 $CD4^+Foxp3^+iT_{reg}$ 細胞の生成における B7 ファミリー共刺激分子の役割

経口免疫寛容誘導での抗原特異的 $CD4^+Foxp3^+iT_{reg}$ 細胞の生成における B7 ファミリー共刺激分子の役割を明らかにするために、WT

マウスと各 $B7^{-/-}$ マウスに OVA 特異的 $CD4^{+}Foxp3^{+}nT_{reg}$ T細胞を移入後、その翌日に OVA を経口投与した。さらに、OVA の経口投与後 11 日目に脾臓と腸間膜リンパ節での OVA 特異的 $CD4^{+}Foxp3^{+}iT_{reg}$ 細胞の生成を比較検討した (表 6)。WT マウスにおいて

表 6. 経口免疫寛容誘導での抗原特異的 $CD4^{+}Foxp3^{+}iT_{reg}$ 細胞の生成

マウスの種類	OVA特異的Foxp3 ⁺ iT _{reg} 細胞	
	脾臓	腸間膜
WTマウス	+++	+++++
Cd80/Cd86 ^{-/-} マウス	++	+++
B7h1 ^{-/-} マウス	+	+
B7dc ^{-/-} マウス	+/-	+/-
B7h2 ^{-/-} マウス	+++	+++++

OVA の経口投与により腸間膜リンパ節では脾臓と比較して OVA 特異的 $CD4^{+}Foxp3^{+}iT_{reg}$ 細胞の高い生成が認められた。また、CpG の経口投与では腸管での炎症が惹起され [16]、OVA の経口投与による脾臓と腸間膜リンパ節における OVA 特異的 $CD4^{+}Foxp3^{+}iT_{reg}$ 細胞の生成がほぼ完全に阻害されていた [2]。一方、 $Cd80/Cd86^{-/-}$ マウスでは WT マウスと比較して脾臓と腸間膜リンパ節での OVA の経口投与による OVA 特異的 $CD4^{+}Foxp3^{+}iT_{reg}$ 細胞の生成が低下していた。この *in vitro* での抗原特異的 $CD4^{+}Foxp3^{+}iT_{reg}$ 細胞の生成における $CD80/CD86$ の役割 (表 4) との違いは $Cd80/Cd86^{-/-}$ マウスでは WT マウスより血清 IL-2 濃度が低下していることから、その誘導というよりはむしろ IL-2 低濃度による増幅の阻害が考えられた [2]。一方、WT マウスと比較して $B7h1^{-/-}$ マウスでは OVA の経口投与による脾臓と腸間膜リンパ節での OVA 特異的 $CD4^{+}Foxp3^{+}iT_{reg}$ 細胞の生成は著しく減弱し、 $B7dc^{-/-}$ マウスではほぼ完全に阻害された。以上の結果から、抗原経口投与による抗原特異的 $CD4^{+}Foxp3^{+}iT_{reg}$ の誘導には $B7-H1$ と $B7-DC$ が重要であることが考えられた。

また、WT マウスと各 $B7^{-/-}$ マウスの脾臓と腸間膜リンパ節における $CD4^{+}Foxp3^{+}nT_{reg}$ 細胞の細胞数について比較検討した。その結果、WT マウスでの脾臓と腸間膜リンパ節における $CD4^{+}Foxp3^{+}nT_{reg}$ 細胞の細胞数と比較して $Cd80/Cd86^{-/-}$ マウスや $B7h2^{-/-}$ マウスでは著しくあるいはやや減弱し、 $B7h1^{-/-}$ マウスや $B7dc^{-/-}$ マウスでは差は認められ

なかった [2]。このことから、 $CD4^{+}Foxp3^{+}nT_{reg}$ 細胞の生成には $CD80/CD86$ と $B7-H2$ が必要であることが考えられた。従って、 $CD4^{+}Foxp3^{+}nT_{reg}$ 細胞と $CD4^{+}Foxp3^{+}iT_{reg}$ 細胞ではその生成に要求される $B7$ ファミリー共刺激分子は異なることが推察された。

おわりに

定常状態において腸間膜リンパ節樹状細胞での $B7-H1$ と $B7-DC$ の発現が抗原特異的 $CD4^{+}T$ 細胞の活性化抑制、 $CD4^{+}Foxp3^{+}T$ 細胞から $CD4^{+}Foxp3^{+}iT_{reg}$ 細胞への抗原特異的生成が関与する免疫寛容の誘導に必須であり、この機構が経口免疫寛容の成立を導くものと考えられた (図 3)。一方、腸内病原性微生物や常在細菌由来産物は腸間膜リンパ節樹状細胞を活性化して炎症反応を惹起させ、 $CD4^{+}Foxp3^{+}iT_{reg}$ 細胞生成を阻害するとともにエフェクター $CD4^{+}T$ 細胞を誘導し、結果的に経口免疫寛容の破綻を導くものと考えられた。従って、腸間膜リンパ節樹状細胞の $B7$ ファミリー共刺激分子を介した $CD4^{+}Foxp3^{+}iT_{reg}$ 細胞/エフェクター $CD4^{+}T$ 細胞の生成バランスの制御は腸管での免疫学的恒常性の維持に重要であることが推察された。さらに、 $B7-H1$ と $B7-DC$ を用いた食物抗原特異的 $CD4^{+}Foxp3^{+}iT_{reg}$ 細胞生成法の技術基盤の開発が食物アレルギーの予防・治療に応用できる可能性が期待された。

文 献

1. Sato, K. and Fujita S. 2007. Dendritic cells– Nature and classification. *Allergol. Int.* **56** : 183–191.
2. Fukaya, T. Takagi, H., Sato, Y., Sato, K., Eizumi, K., Taya, H., Shin, T., Chen, L., Dong, C., Azuma, M., Yagita, H., Malissen, B. and Sato, K. 2010. Crucial roles of $B7-H1$ and $B7-DC$ expressed on mesenteric lymph node dendritic cells in the generation of antigen-specific $CD4^{+}Foxp3^{+}$ regulatory T cells in the establishment of oral tolerance. *Blood* **116** : 2266–2276.
3. Tezuka, H., Abe, Y., Iwata, M., Takeuchi, H., Ishikawa, H., Matsushita, M., Shiohara, T., Akira,

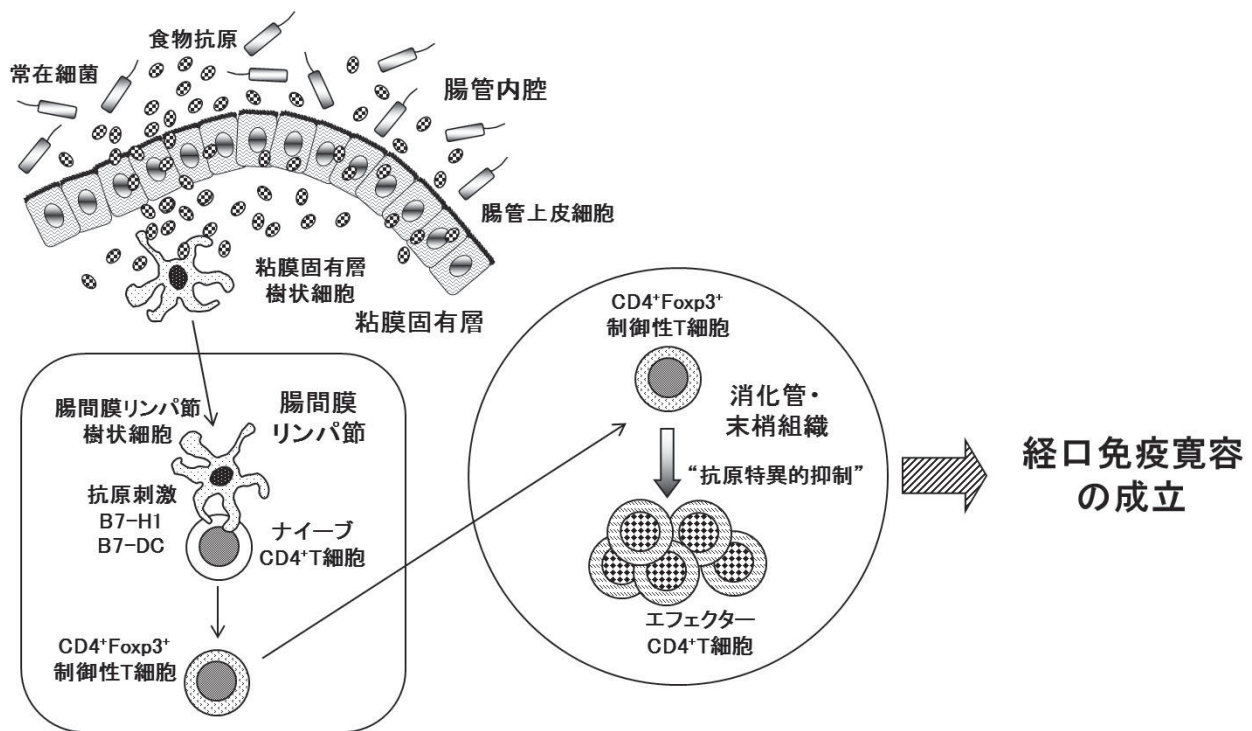


図3 腸間膜リンパ節樹状細胞による経口免疫寛容の誘導機構

粘膜固有層で食物抗原を捕食した樹状細胞が腸間膜リンパ節に移行する。腸間膜リンパ節樹状細胞はナイーブ $CD4^+T$ 細胞に食物抗原刺激と B7-H1 と B7-DC による共刺激を与え、 $CD4^+Foxp3^+$ 制御性 T 細胞細胞を誘導する。消化管や末梢組織において $CD4^+Foxp3^+$ 制御性 T 細胞は抗原特異的エフェクター $CD4^+T$ 細胞を抑制し、経口免疫寛容を成立させる。

- S. and Ohteki, T. 2007. Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature* **448** : 929-933.
4. Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M. H., Yang, B. G., Jung, Y.J., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., Kiyono, H., Miyasaka, M., Ishii, K.J. and Akira, S. 2008. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat. Immunol.* **9** : 769-776.
5. Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T., Umesaki, Y., Yamamoto, M., Onoue, M., Yagita, H., Ishii, N., Evans, R., Honda, K. and Takeda, K. 2008. ATP drives lamina propria T_H17 cell differentiation. *Nature* **455** : 808-812.
6. Tsuji, N. M. and Kosaka, A. 2008. Oral tolerance: intestinal homeostasis and antigen-specific regulatory T cells. *Trends Immunol.* **29** : 532-540.
7. Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M. W., Hintzen, G., Bernhardt, G., Förster, R. and Pabst, O. 2006. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J. Exp. Med.* **203** : 519-527.
8. Macpherson, A. J. and Smith, K. 2006. Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy. *J. Exp. Med.* **203** : 497-500.
9. von Boehmer, H. 2007. Oral tolerance: is it all retinoic acid? *J. Exp. Med.* **204** : 1737-1739.
10. Greenwald, R. J., Freeman, G. J. and Sharpe, A. H. 2005. The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* **23** : 515-548.
11. 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.
12. Yi, K. H. and Chen, L. 2009. Fine tuning the immune response through B7-H3 and B7-H4. *Immunol. Rev.* **229** : 145-151.
13. Coombes, J. L., Siddiqui, K. R., Arancibia-Cárcamo, C. V., Hall, J., Sun, C. M., Belkaid, Y. and Powrie, F. 2007. A Functionally specialized population of mucosal $CD103^+$ DCs induces $Foxp3^+$ regulatory T cells via a TGF- β and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.*

- 204 : 1757–1764.
14. Sun, C. M., Hall, J. A., Blank, R. B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J. R. and Belkaid, Y. 2007. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T_{reg} cells via retinoic acid. *J. Exp. Med.* **204** : 1775–1785.
15. Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M. and Cheroutre, H. 2007. Reciprocal T_H17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* **317** : 256–260.
16. Hall, J. A., Bouladoux, N., Sun, C. M., Wohlfert, E. A., Blank, R. B., Zhu, Q., Grigg, M. E., Berzofsky, J. A. and Belkaid, Y. 2008. Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses. *Immunity* **29** : 637–649.

論文紹介

鳥インフルエンザ感染鶏識別に対する NS1-ELISA の有効性 Detection of highly pathogenic avian influenza virus infection in vaccinated chicken flocks by monitoring antibodies against non-structural protein 1 (NS1).

竹山夏実

1. 鳥インフルエンザへの対応

インフルエンザウイルスは、水禽類を主な宿主とし腸管内に常在、あるいは水鳥の野営する湖に潜んでおり、渡り鳥の飛行ルートに沿って拡散している。ウイルス表面蛋白質のヘマグルチニン (Hemagglutinin : H) 16 種類、およびノイラミニダーゼ (Noiraminidase : N) 9 種類の系統が存在する [1]。水禽類においてインフルエンザウイルスは致死性の症状を示すことは少ないが、家禽に対して高い致死性を示す H5 および H7 亜型を有するインフルエンザウイルスは、国際獣疫事務局 (World organisation of Animal health : OIE) より、高病原性として分類される [1]。世界的に広がりを見せる高病原性鳥インフルエンザは、獣疫学・人獣共通感染症の両面から監視が重要な疾病として着目されている。OIE では鳥インフルエンザの防疫措置として、感染鶏の淘汰による抑制を第一に推奨し、「万が一、同一の移動制限区域内の複数の農場で本病が連続し、発生農場の飼養家禽の迅速な淘汰が困難となり、又は困難になると判断される場合にはワクチンの使用を検討する」としている [2]。日本ではこれまでの鳥インフルエンザ発生をすべて、発生農場内の鶏の

殺処分により終息させてきたが、同時にワクチン使用の必然性が発生する事態に備え、1) 国産不活化 H5、H7 ワクチンの開発 [3, 4, 5]、2) ワクチン接種鶏の識別・モニタリング法の確立を課題とした研究が進められてきた。2) に示す識別法の必要性とは、不活化ワクチン接種が抗体誘導・症状重篤化抑制に効果を上げる一方で、完全な感染防御に繋がらない点にある。すなわち、ワクチンの使用が、本病の発生または流行を助長することを防ぐために、ワクチン接種鶏・感染鶏群を区別することが必要不可欠となる。

2. ワクチン注射個体の識別方法

鳥インフルエンザワクチン接種を受けた鳥と野外鳥インフルエンザウイルス感染鳥を抗体産生により区別し、野外ウイルスの侵入を摘発する DIVA (differentiating infected from vaccinated animals) システムとして、NA タンパク質や、NS1 タンパク質に対する抗体を検出するシステムが提言されている [6]。NA-DIVA システムでは、野外流行株とは異なる NA 亜型を保有するワクチン株を接種し、野外流行

株に特異的な NA 抗体を検出することで野外ウイルスの侵入を摘発する。2000 年にイタリアの七面鳥で H7N1 鳥インフルエンザ流行があった際には、N7N3 ワクチンが用いられた [7]。これに応じて抗 N1 抗体を蛍光抗体法により検出する NA-DIVA システムが採用され、感染鳥と免疫鳥の識別を可能にした。ところが、後に H7N3 や H5N2 のように NA 亜型の異なる株の侵入があり、N1 の DIVA システムでは対応できないばかりか、ワクチン株と同じ NA 亜型のウイルスの侵入は NA-DIVA システムでは識別できないという欠点が生じた。

本研究において我々は、NS1-DIVA システムによる鳥インフルエンザウイルス感染鶏の迅速識別技術の開発を目指した。

インフルエンザウイルス NS1 タンパク質はウイルス粒子を構成せず、ウイルスが生体内に感染・増殖した場合に宿主細胞内で産生され、宿主のサイトカイン遺伝子等の転写抑制に働く [8]。高病原性鳥インフルエンザウイルスは鶏体内でよく増殖する為、ウイルスの抗 NS1 抗体が感染鶏体内で産生されると推察される。一方、国内で開発された鳥インフルエンザワクチンは、ウイルス接種した発育鶏卵の漿尿液を回収してホルマリン等の不活化処理を施しているため、NS1 タンパク質の混入は極めて低いと考えられる。馬インフルエンザウイルスをマウスに実験感染させた試験において、ELISA により抗

NS1 抗体検出が可能であり、不活化ウイルス投与群では抗体が検出されないことが先に実証されていた [9]。そのためこの方法を応用し、鳥インフルエンザ感染鶏血清中の NS1 抗体を ELISA により検出する方法を確立した。

3. NS1 をターゲットとした ELISA による抗体検出

3-1. NS1-ELISA の確立

鳥インフルエンザウイルスの NS1 は A および B の 2 種類の allele が存在する [10]。日本で分離された鳥インフルエンザウイルス株 Chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1) および Chicken/Ibaraki/1/05 (H5N2) のシーケンス解析の結果、これらの NS1 はそれぞれアミノ酸 225, 230 残基より構成され、各々 allele A と allele B に分類されることが分かった。これら Yamaguchi-NS1 (allele A), Ibaraki-NS1 (allele B) をヒスチジンタグ付加タンパク質として大腸菌発現系にて発現・精製した。Yamaguchi-NS1, Ibaraki-NS1 の抗原交差性を確認するため、精製抗原を用いて作製した鶏免疫血清を用いてホモあるいはヘテロ allele の NS1 抗原に対する ELISA を実施した。Yamaguchi-NS1 (allele A) に対する反応性は抗 Yamaguchi-NS1, 抗 Ibaraki-NS1 血清いずれにおいても同程度であったが、Ibaraki-NS1 (allele B) に対する反応性は抗 Ibaraki-NS1 血清に比べて抗 Yamaguchi-NS1 血清で劣る

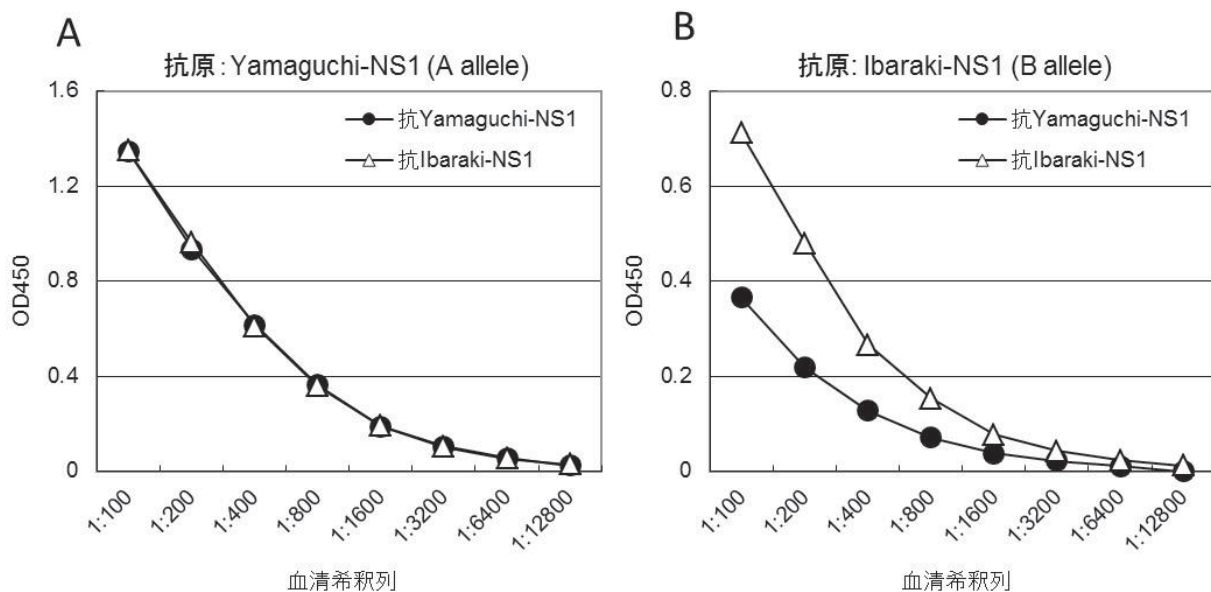


図1 Yamaguchi-NS1 と Ibaraki-NS1 の交差性

Yamaguchi-NS1 抗原(A) および Ibaraki-NS1 抗原(B) に対してホモ・ヘテロの鶏免疫血清を用いた ELISA を行った

傾向が認められた (図 1)。Allele 分類によらず NS1 抗体を検出するため、我々の NS1-ELISA 抗原は Yamaguchi-NS1 を選択し、鳥インフルエンザウイルス未感染の鶏血清サンプル 137 検体より求めた E 値 (0.000 ~ 0.397) の平均値 +4.4 × 標準偏差値よりカットオフ値を 0.3 と定めた。また、この ELISA における E 値算出法は下記の通りである。

$$E \text{ 値} = (\text{被検血清の抗原吸着ウエルの OD 値} - \text{被検血清の抗原非吸着ウエルの OD 値}) / (\text{参照血清の抗原吸着ウエルの OD 値} - \text{参照血清の抗原非吸着ウエルの OD 値})$$

3-2. 鳥インフルエンザウイルス野外株感染鶏の NS1 抗体産生

高病原性鳥インフルエンザウイルス A/Turkey/England/63 (H7N3) および、低病原性鳥インフルエンザウイルス A/Chicken/Ibaraki/1/05 (H5N2) 株を実験感染させた鶏の、感染後 HI 抗体価と E 値の推移を測定した (図 2)。Ty/England (H7N3) 感染を耐過した鶏 6 個体は全て、感染後 1 週目より HI 抗体価の上昇が認められ、これに相関して E 値は感染後 1 週目より陽転し、経過観察期間の 8 週間、常に陽性であった。反面、Ck/Ibaraki (H5N2) 感染では、感染後の HI 抗体価が Ty/England (H7N3)

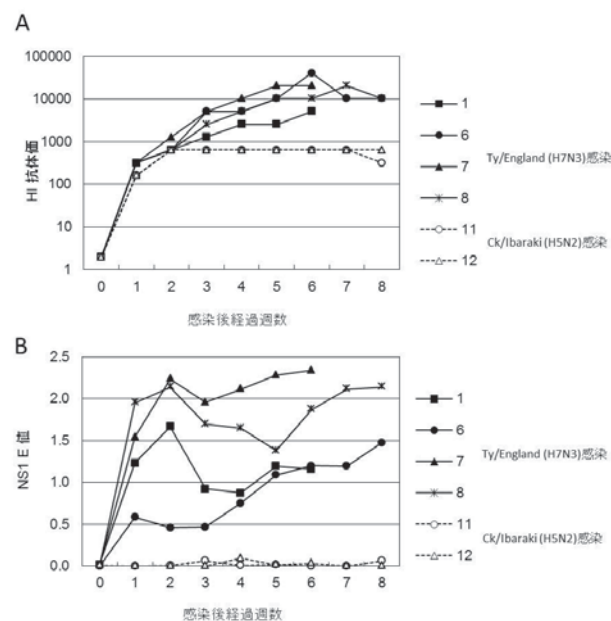


図 2 高病原性鳥インフルエンザ Ty/England (H7N3) 株および低病原性鳥インフルエンザ Ck/Ibaraki (H5N2) 株の感染耐過鶏の経時的 HI 抗体価 (A) および NS1 E 値 (B)

感染鶏と比較して 1/10 程度と低く、E 値は陰性を維持した。この結果から、インフルエンザウイルスに対する抗体産生が著しい高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染した鶏であれば、少なくとも感染後 1 週目より NS1-ELISA による感染検出が可能であることが示された。

3-3. H5 鳥インフルエンザワクチン注射鶏の NS1 抗体産生

鳥インフルエンザワクチン注射鶏で NS1 抗体が産生されないことは、NS1-ELISA を DIVA システムとして応用する必要条件である。国内製造 H5 亜型鳥インフルエンザワクチン [Dk/Hokkaido/Vac-1/04 (H5N1)] を 4 週齢で注射後、経時的に採取した血清を用いて E 値を測定した (表 1)。また別の群については初回注射後 52 週目に 2 回目のワクチン注射を行った。初回ワクチン注射後 20 週目に、20 羽中 4 羽で E 値が陽転したが、34 週目にはこれら全ての鶏で NS1 抗体は陰性に戻った。さらに 4 羽中 1 羽については免疫後 52, 56 週目で再度 E 値が上昇し NS1 抗体陽性となった (E 値は 0.685, 0.514)。反復免疫を行った群では、2 回目の免疫から 4 週目までの観察では NS1 抗体の上昇は認められなかった。これらの観察結果から、ワクチン注射鶏により鶏集団の中では NS1 抗体陽性となる個体が出現する可能性はあるが、その頻度は低いと推察される。

4. H5 鳥インフルエンザワクチン注射後の感染を識別できるか

最後に、野外での鳥インフルエンザ蔓延防止対策として最も重要な要素となる、ワクチン注射鶏での鳥インフルエンザウイルス感染検出に対する NS1

表 1 H5 不活化ワクチン注射鶏の経過血清による NS1-ELISA

H5ワクチン 注射回数	初回ワクチン からの経過週数	使用鶏羽数	NS1-ELISA 陽性	
			羽数	E値平均
1	3	19	0	-
1	6	20	0	-
1	20	20	4	0.668
1	34	20	0	-
1	52	20	1	0.685
1	56	38	1	0.514
2 ¹⁾	2	36	0	-
2 ¹⁾	4	37	0	-

1) 初回ワクチンから 56 週目に 2 回目のワクチン注射

-ELISA の汎用性を検証した。我々は、10羽1群とした実験鶏を H5 亜型ワクチンで1回ないし2回注射後、異なる経過週に高病原性鳥インフルエンザウイルス Ck/Yamaguchi (H5N1) 株を経鼻攻撃した。感染前のワクチン株に対する HI 抗体価および NS1-ELISA による判定、また攻撃後の群毎の致死率と咽頭・クロアカスワブからのウイルス分離率を求めた (表2)。初回ワクチン投与から6週目の群では HI 抗体価の幾何平均は1,040と高値であったが、経過週が52週となる頃にはその値は10まで低下した。このときの攻撃後の組織ウイルス分離率は86%と高くなっていることから、ワクチンのウイルス増殖抑制効果が激減する傾向が認められた。また、初回ワクチン後56週目に追加ワクチンを投与した別の群においては、2回目のワクチン後14、46週経過後も HI 抗体価はそれぞれ493、226と高く、ウイルス分離も認められなかったため、2回のワクチン注射がよりウイルス増殖抑制に有効な免疫を誘導したことが明らかになった。NS1-ELISA について、1回目ワクチン後6週ではウイルス分離と同等の10% (10羽中1羽) で陽性となり、またウイルス52週のウイルス分離個体6羽のうち4羽が NS1-ELISA 陽性と判定された。20週目でウイルス分離された1個体については NS1-ELISA は陽性と判定されなかったことから、検出感度はウイルス分離率より低いながらも、これに相関した形で NS1-ELISA 陽性率も変動することが類推される。すなわち NS1-ELISA により、ワクチン注射群においてワクチン株に対する HI 価が低下し、高病原性株の感染を許容した状況下で産生された NS1 抗体を検出することが可能であった。

5. まとめ

本研究で確立した鳥インフルエンザウイルス感染検出のための NS1-ELISA は、ウイルス分離法に比較すると検出感度は低いが、同方法と比較してより簡便・迅速に群あるいは農場毎のスクリーニングを可能にする。野外農場のモニタリングに本システムを応用するには、ワクチン注射群の中から十分な数の血清サンプルを得て陽性率を算出して一次スクリーニング結果とし、陽性判定となった群をウイルス分離により確定診断することが、野外インフルエンザウイルス感染浸潤状況を把握する望ましい方法と考えられる。本研究で我々は、不活化ワクチンに含まれない NS1 タンパク質に着目して ELISA を構築したが、ワクチン開発には今後更なる展開が期待される。一部分のウイルス抗原のみ保有するサブユニットワクチン等が鳥インフルエンザウイルスでも採用されれば、野外ウイルス株とワクチンとの抗原の差が明瞭になり、より高感度な診断技術の確立も目指すことができるであろう。

感染の判別技術は野外ウイルスを蔓延させないためにも大変重要である。しかしながらそれにも増して、冒頭にも述べたとおり、ワクチンを投与せずに鳥インフルエンザについて清浄化を維持することが我々の国の最優先課題である (平成24年3月時点で、日本は平成23年6月以降、鳥インフルエンザ清浄国である)。

本研究成果は、下記論文を編集・日本語訳して掲載いたしました。

表2 H5 不活化ワクチン注射後、Ck/Yamaguchi (H5N1) 攻撃鶏の血清による NS1-ELISA

H5ワクチン 注射回数	ワクチン注射後 Ck/Yamaguchi 攻撃週	致死率	組織からの ウイルス分離率 ^{1), 2)}	HI抗体価の 相乗平均 ^{1), 3)}	NS1-ELISA 陽性率 ^{1), 4)}
1	6週	0% (0/10)	10% (1/10)	1040	10% (1/10)
1	20週	12.5% (1/8)	14% (1/7)	101	0% (0/7)
1	34週	12.5% (1/8)	0% (0/7)	123	0% (0/7)
1	52週	12.5% (1/8)	86% (6/7)	10	57% (4/7)
2 ⁵⁾	14週	0% (0/8)	0% (0/8)	493	0% (0/8)
2 ⁵⁾	46週	0% (0/8)	0% (0/8)	226	0% (0/8)

1) 感染耐過鶏から得たデータのみ

2) ウイルス分離は感染後2あるいは4日目に咽頭スワブあるいはクロアカスワブからの分離率

3) 攻撃日 (攻撃前) 血清サンプルの HI 抗体価

4) 攻撃前後で NS1-ELISA が陽転した個体の割合

5) 初回ワクチンから56週目に2回目のワクチン注射

Vet Microbiol. 2011 Jan 27 ; 147(3-4) : 283-91.
 Takeyama N, Minari K, Kajihara M, Isoda N, Sakamoto R, Sasaki T, Kokumai N, Takikawa N, Shiraiishi R, Mase M, Hagiwara J, Kodama T, Imamura T, Sakaguchi M, Ohgitani T, Sawata A, Okamatsu M, Muramatsu M, Tsukamoto K, Lin Z, Tuchiya K, Sakoda Y, Kida H.

参考文献

- Alexander, D.J., 2007. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine*. **25** : 5637-5644.
- Alexander, D.J., 2009. Avian influenza. In : Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris: World Organization for Animal Health (OIE) .
- Isoda, N., Sakoda, Y., Kishida, N., Soda, K., Sakabe, S., Sakamoto, R., Imamura, T., Sakaguchi, M., Sasaki, T., Kokumai, N., Ohgitani, T., Saijo, K., Sawata, A., Hagiwara, J., Lin, Z., Kida, H., 2008. Potency of an inactivated avian influenza vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 reassortant virus generated between isolates from migratory ducks in Asia. *Arch. Virol.* **153** : 1685-1692.
- Soda, K., Sakoda, Y., Isoda, N., Kajihara, M., Haraguchi, Y., Shibuya, H., Yoshida, H., Sasaki, T., Sakamoto, R., Saijo, K., Hagiwara, J., Kida, H. 2008. Development of vaccine strains of H5 and H7 influenza viruses. *Jpn. J. Vet. Res.* **55** : 93-98.
- Sakabe, S., Sakoda, Y., Haraguchi, Y., Isoda, N., Soda, K., Takakuwa, H., Saijo, K., Sawata, A., Kume, K., Hagiwara, J., Tuchiya, K., Lin, Z., Sakamoto, R., Imamura, T., Sasaki, T., Kokumai, N., Kawaoka, Y., Kida, H., 2008. A vaccine prepared from a non-pathogenic H7N7 virus isolated from natural reservoir conferred protective immunity against the challenge with lethal dose of highly pathogenic avian influenza virus in chickens. *Vaccine*. **26** : 2127-2134.
- Suarez, D.L., Das, A., Ellis, E., 2007 Review of rapid molecular diagnostic tools for avian influenza virus. *Avian Dis.* **51** : 201-208.
- Capua, I., Terregino, C., Cattoli, G., Mutinelli, F., Rodriguez, J.F. 2003. Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol.* **32** : 47-55.
- Xing, Z., Cardona, C.J., Adams, S., Yang, Z., Li, J., Perez, D., Woolcock, P.R. 2009. Differential regulation of antiviral and proinflammatory cytokines and suppression of Fas-mediated apoptosis by NS1 of H9N2 avian influenza virus in chicken macrophages. *J. Gen. Virol.* **90** : 1109-1118.
- Ozaki, H., Sugiura, T., Sugita, S., Imagawa, H., Kida, H., 2001. Detection of antibodies to the non-structural protein (NS1) of influenza A virus allows distinction between vaccinated and infected horses. *Vet. Microbiol.* **20** : 111-119.
- Suarez, D.L., Perdue, M.L., 1998. Multiple alignment comparison of the non-structural genes of influenza A viruses. *Virus Res.* **54** : 59-69

学会発表演題 (2011年10月～2012年3月)

●第4回日本カンピロバクター研究会総会

期 日：2011年12月3日

開 催 地：麻布大学

発表演題：Campylobacter jejuni のヒト臨床由来株におけるエリスロマイシン耐性と 23S rRNA 遺伝子内の intervening sequence (IVS), V ドメイン及びエリスロマイシン耐性の相関

○田積晃浩¹, Jiru Xu², Lei Han², 三澤尚明³, Jon E Moore⁴, B Cherie Millar⁴, 松田基夫⁵ (¹Nippon Institute for Biological Science, ²Dept Immunol Patho Biol, Sch Med, Xi'an-Jiaotong Univ, China, ³宮崎大・農・獣医公衆衛生, ⁴Dept Bacteriol, N Ireland Public Health Lab, Belfast City Hosp, UK, ⁵麻布大院・環境保健・遺伝子)

●2012年 信州大学 国際動物バイオテクノロジー会議

期 日：2012年1月31日

開 催 地：信州大学

発表演題：Avian Stem Cells for Regeneration of Muscular Dystrophy Chickens by Means of Germline Chimeras

○Akira Fujiwara¹, Makoto Mizutani², Tetsuo Nunoya², Kohzy Hiramatsu³, Tamao Ono³, Hiroshi Kagami³ (¹Nippon Institute for Biological Science, Laboratory Animal Research Station, ²Avian Bioscience Research Center, Nagoya University, ³Faculty of Agriculture Shinshu University)

●先進医用ブタの開発と前臨床研究拠点形成プロジェクト第2回公開シンポジウム：ブタの医用動物への展開

期 日：2012年3月22日

開 催 地：鹿児島大学稲盛会館

発表演題： α 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子ノックアウト (GalT-KO) ミニブタの作出

○島津美樹

●平成24年度日本水産学会春季大会

期 日：2012年3月26日～3月30日

開 催 地：東京海洋大学品川キャンパス

発表演題：マハタのウイルス性神経壊死症に対する不活化ワクチンの有効性と安全性

○黒田丹¹, 佐竹弘守¹, 加藤哲雄¹, 布谷鉄夫¹, 山下浩史², 羽生和弘³, 田中真二³, 森広一郎⁴, 中井敏博⁵ (¹日生研, ²愛媛県農林水産研究所水産研究センター, ³三重県水産研究所, ⁴独立行政法人水産総合研究センター, ⁵広島大学大学院生物圏科学研究科)

発表演題：マハタ養殖施設におけるウイルス性神経壊死症不活化ワクチンを用いた臨床試験

○黒田丹¹, 佐竹弘守¹, 加藤哲雄¹, 布谷鉄夫¹, 山下浩史², 羽生和弘³, 田中真二³, 森広一郎⁴, 中井敏博⁵ (¹日生研, ²愛媛県農林水産研究所水産研究センター, ³三重県水産研究所, ⁴独立行政法人水産総合研究センター, ⁵広島大学大学院生物圏科学研究科)

●第 52 回獣医病理学研修会

期 日：2012 年 3 月 27 日

開 催 地：大宮ソニックシティ

発表演題：ラットの卵巣結節

○山下龍

●第 153 回日本獣医学会

期 日：2012 年 3 月 27 日～3 月 29 日

開 催 地：大宮ソニックシティ

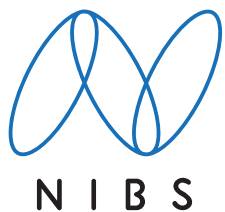
発表演題：組換え犬顆粒球コロニー刺激因子の犬における抗原性の評価

○山元哲，武藤隆司，土屋剛嗣，岩田晃

発表演題：複数種の細菌感染を伴う豚サイトメガロウイルス病の解析

○鈴木敬之，平 修，佐藤哲郎，田積晃浩，上塚浩司，富岡ひとみ，長尾亜貴，土井邦雄，
布谷鉄夫発表演題：17 β -estradiol (E2) を混餌投与した雄のニホンウズラの腎糸球体病変の進展過程

○山下龍，大嶋篤，渋谷一元，土井邦雄



—— 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 574 号) 平成 24 年 3 月 25 日印刷 平成 24 年 4 月 1 日発行(第 58 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)1056(企画学術部) FAX : 0428(33)1036
 発行人 林 志鋒
 編集室 委 員/堤 信幸(委員長)，大嶋 篤，山下 龍
 事 務/企画学術部
 印刷所 株式会社 精興社
 (無断転載を禁ず)