

# 日 生 研 報

2017年(平成29年)10月号 第63巻第4号(通巻605号)

## 挨拶・巻頭言

源流……………朱通市次郎(2)

## レビュー

動物由来耐性菌をめぐる国際情勢と  
わが国の現状……………田村 豊(3)

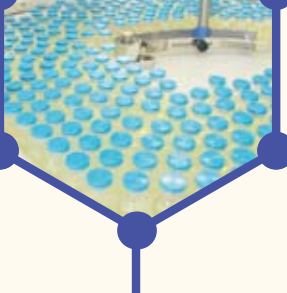
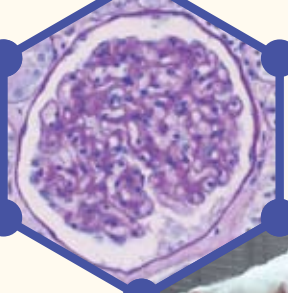
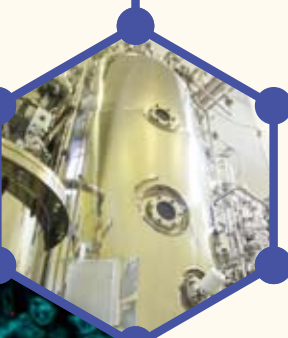
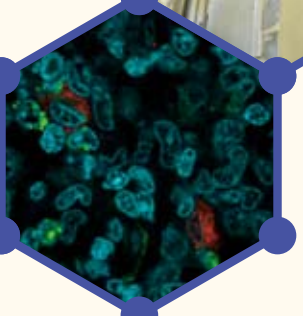
## 文献紹介

ジカウイルス感染症に対する修飾 mRNA  
ワクチンプロジェクト……………小野 浩輝(7)

## 学会参加記

66th Western Poultry Disease  
Conference(WPDC)……………永野 哲司(14)

The 8th Asian Pig Veterinary Society  
Congress……………大嶋 篤(16)



## 源流

朱通市次郎

今夏の北九州はじめ各地の記録的な豪雨による土砂崩れ、浸水等の災害に遭われた皆様および関係者の皆様には、心からのお見舞いを申し上げますとともに、一刻も早い復旧、生活の立て直しをお祈り申し上げます。

さて、7年ほど前、メタボ状態の私を見かねた先輩から日帰りトレッキングに誘われ、連れて行って頂いたのが初秋の笠取山でした。慣れない山行に膝は悲鳴を上げ、靴ずれに苦しみました。森林と清流に触れながら十二分にトレッキングを楽しむことが出来、帰りの気分は爽快であったことが思い出されます。

笠取山（標高 1,953 m）は、奥秩父山塊の主脈の一つで埼玉県秩父市と山梨県甲州市の境にあり、最終盤に挑む山頂までの一直線の急坂とその手前の草原、更に荒川、富士川及び多摩川の分水嶺を示す小さな石柱がある大変印象深い山であります。弊所のある青梅市のほぼ中央を多摩川が西から東へ貫流しておりますが、多摩川の源流こそ笠取山の山頂南側直下にある水干で、ここから一ノ瀬川、丹波川、奥多摩湖を経て、多摩川となり東京湾に注ぎ込んでおります。また、笠取山南斜面の山林一帯は東京都の水源涵養林としてよく管理されており、登山道等の整備状況から窺うことが出来ます。弊所創業時の立川市曙町の研究・製造施設が老朽化し、手狭となった折、移転先候補地の第一条件はワクチン製造に適する良い水が出ることであり、何ヶ所かのボーリング調査の結果、青梅の現在地に決定したものと聞いております。移転後、半世紀を経ますが今も大切に利用しております。

お陰様で、本年、弊所は創業 70 周年を迎えることが出来ました。弊所の発展に尽力されている役職員はもとより草創以来の先輩の方々、また、日頃よりご指導とご鞭撻を賜っております関係諸機関・取引先の皆様に心から御礼申し上げます。

弊所は昭和 22 年 3 月に東京都の認可を得て社団法人日本生物科学研究所として発足、その後、昭和 34 年に文部科学省および農林水産省共管の財団法人に改組（収益部門は日生研株式会社として承継）、平成 24 年から一般財団法人に移行し、今日に至っております。

社団法人の設立発起人は、戦後の学術研究の衰退を危惧し、畜産業の振興と公衆衛生の向上に資する人畜衛生、特に伝染病の予防に関わる民間研究機関の必要性を痛感した学界および産業界有識者の方々であります。設立発起人会の発足日が昭和 21 年 10 月 1 日であったことから、この日を創立記念日として、毎年式典を催し、意義を留めております。

草創期以来、民間研究所として幾多の財政的苦境や困難な障害を役職員が一丸となって団結し乗り越えて来られたのは、「学術の振興及び畜産の発達並びに公衆衛生の進歩に寄与する」という創立理念にあると思います。大先達の方々の社会貢献への志の高さと学術研究に対する情熱の強さを実感いたします。来し方の 1 年を改めて振り返り、創立の志しを自らに問いつつ、企業倫理と行動規範を見つめ直し、社会との信頼関係を再構築してまいる所存です。何卒、皆様には倍旧のご支援とご指導を賜りますようお願い申し上げます。

（注）水干：沢の行き止り

（常務理事）

## 動物由来耐性菌をめぐる国際情勢とわが国の現状

田村 豊 (酪農学園大学 獣医学群 動物薬教育研究センター)

### はじめに

医療における耐性菌の地球規模での蔓延が深刻な事態となっている。2013年にアメリカ疾病予防管理センターは、年間200万人以上が耐性菌感染症に罹患し、23,000人以上が死亡すると推定している。また、英国政府はこのまま何ら耐性菌対策を取らなければ、2050年までに1,000万人が耐性菌感染症で死亡し、死亡者の多くはアジアとアフリカであることを警告した。このように現在、薬剤耐性菌は人類に対する最も大きな脅威となっている。

このような耐性菌を選択する要因である抗菌薬は、医学のみならず獣医学分野でも盛んに利用されており、特に安価で安全な畜産物の安定的な生産に大きく貢献している。しかし、抗菌薬が畜産分野で汎用されるに伴い、薬剤耐性菌が選択・増加したことも事実である。近年、食用動物に使用される抗菌薬により選択された耐性菌が、食物連鎖を介してヒトの健康に影響することが懸念され、その封じ込め対策を検討する多くの国際会議が開催されている[1]。最近、WHO（世界保健機関）総会において採択されたWHO Global Action Plan on Antimicrobial resistance（WHO国際行動計画）は耐性菌対策の基本的な考えをOne Health\* approachとし、その後開催されたG7サミットでも支持されたことから世界的な活動へと進展した。

そこで今回は、進展が著しい動物由来耐性菌に関する国際動向とそれに伴うわが国の動きを紹介するとともに、動物由来耐性菌の現状を紹介したい。

\* One Healthとは、ヒト・動物・環境の健康を維持していくには、どの一つの健康も欠かすことができないとの認識に立ち、それぞれの健康を担う関係者が緊密な協力関係を構築することにより、これらの3者の健康を維持・推進していくとするものである（山田章雄, 2010. 日獣会誌 63: 556-557.）。

### I. 薬剤耐性菌をめぐる国際情勢

従来、食用動物への抗菌薬の使用により出現した耐性菌がヒトの健康に影響する可能性は否定できな

いが、科学的な根拠は明らかでないとされてきた。しかし、2003年に開催されたWHO、FAO（国連食料農業機関）、OIE（国際獣疫事務局）共催の国際会議では、食用動物に使用される抗菌薬によって耐性菌が選択・増加し、それがヒトに伝播してヒトの健康に影響する十分な証拠が蓄積されていると結論付けられた[2]。したがって、この会議以降、国際機関では食用動物由来耐性菌のヒトに対するリスクは明らかであり、そのリスク低減のためのリスク管理の時代に移行した。

先にも述べたように医療における耐性菌の蔓延を背景として耐性菌対策が大きく動いたのは、2015年5月のWHO総会において国際行動計画が採択されたことである。この基本的な考えがOne Health approachであり、その一角を担う獣医領域も無関心ではいられない状況となっている。戦略的目標として、①普及啓発・教育、②サーベイランス・モニタリング、③感染予防・管理、④抗微生物薬適正使用、⑤研究開発・創薬の各項目が掲げられている。また6月に開催されたG7エルマウ（ドイツ）サミットでもWHOの方針が支持され首脳宣言の附属書に「薬剤耐性（AMR）と闘う共同の努力」が記載されている。首脳宣言の中でAMRに関する記載は初めてのことと思われ、いまやAMRは世界経済や国際紛争に匹敵する課題ということであろう。2016年5月に開催されたG7伊勢志摩サミットでも耐性菌対策は重要な課題とされ、国際保健のためのG7伊勢志摩ビジョンの中でAMR対策の強化が示されている。さらに耐性菌問題はG7諸国のみの問題でないことから、2016年9月の第71回国連総会において薬剤耐性に関するHigh-level Meetingが開催され、耐性菌対策が地球規模での課題となった。

WHO国際行動計画の採択に伴って、2年以内に加盟各国で行動計画を策定することが義務付けられた。そこで厚生労働省を中心に取りまとめ作業が行われ、2016年4月に「薬剤耐性対策アクションプラン（2016-2020）」（行動計画）が内閣府から発出された。内容はWHO国際行動計画に記載された5項目に関する具体的な内容が記載されるとともに、わが国独自に⑥国際協力が追加された。今後AMR対策に対して日本はアジアのリーダーシップを取る

との強い意志を示したことになる。また、通常は努力目標を示す傾向が強いものの、今回設定した行動計画には数値による成果指標についても記載されており、毎年の評価とともに2020年までの達成が国際約束することになった。具体的に動物に対しては、最も使用量が多く耐性菌も多い大腸菌のテトラサイクリン耐性率を現在の45%から33%以下に低下することと、医療に対する影響が大きいと考える大腸菌の第3世代セファロスポリンおよびフルオロキノロン耐性率をG7各国の数値と同程度とすることである。したがって、今後、使用量の削減や使用法の制限のための方策など規制強化は免れないと思われる。

## II. わが国の食用動物由来耐性菌に対する対応

食用動物由来耐性菌のヒトの健康に対する影響が次第に明らかになるにつれ、国際機関で耐性菌の封じ込め対策が盛んに議論されるようになった。WHO（1998）は食用動物由来耐性菌対策として以下の4点を勧告した[6]。つまり、①研究の推進、②薬剤耐性モニタリングの実施、③リスク評価の実施、④抗菌薬の慎重使用の励行である。そこで農林水産省は、WHOの勧告に従って全ての項目について対応している。以下に簡単に農林水産省の各項目に対する対応状況について説明したい。

### 1. 家畜衛生分野における薬剤耐性モニタリング体制（JVARM）の設立

農林水産省は1999年から動物医薬品検査所を中心に全国の家畜保健衛生所とネットワークを構築し、家畜衛生分野における全国的な薬剤耐性モニタリングを開始した。本モニタリング体制は、開始から18年を経過し、国内外にJVARM（Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program）として広く知られている（[http://www.maff.go.jp/nval/tyosa\\_kenkyu/taiseiki/index.html](http://www.maff.go.jp/nval/tyosa_kenkyu/taiseiki/index.html)）。JVARMでは、大きく3つのモニタリングを実施している。まず、食用動物における抗菌薬の使用量の調査として、毎年、実際の使用量ではないものの有効成分の純末換算量による製造量または輸入量を明らかにし、動物種ごとの推定販売割合について調査し公表している。また、病原細菌や健康動物由来食品媒介性病原細菌（サルモネラとカンピロバクター）や指標細菌（大腸菌と腸球菌）に関する耐性調査を実施している。また、2016年の行動計画に基づいて、近い将来、水産分野あるいは伴侶動物分野に関する薬剤耐性モ

ニタリングも実施することになっている。

### 2. 食品媒介性健康影響評価の実施

現在、内閣府の食品安全委員会において、農林水産省から諮問されている飼料添加物として指定されている抗菌薬およびそれと同系統の動物用医薬品の使用により選択される耐性菌と、新規の抗菌薬である動物用医薬品の承認又は再審査に際しての食品媒介性健康影響評価が実施されている[5]。これは、いわゆるリスク評価といわれるもので、食品を介してヒトに対し危害因子となる食用動物由来耐性菌をハザードとして特定し、それについて農場での発生評価、ヒトへの曝露評価、それに影響評価を行って、ヒトの健康に対するリスクを推定している。これまでモネンシンナトリウムなどの抗菌性飼料添加物14成分と抗菌性の動物用医薬品10成分の評価が終了している。

### 3. リスク管理措置の設定

食品安全委員会によるリスク評価が終了すれば、農林水産省によりリスクの低減化対策が実施されることになる。食用動物に使用されるフルオロキノロン薬のリスク評価が終了したことを受け、農林水産省は「動物用抗菌性物質製剤のリスク管理措置策定指針」を発出した（<http://www.maff.go.jp/nval/risk/title.html>）。その目的は、畜水産動物に対する有効性と安全性の確保と、科学的知見に基づくリスク管理措置を策定することとされている。特に、ヒトの健康に対する悪影響を低減化することを最優先とすることである。このリスク管理策定指針に基づいて、牛・豚用フルオロキノロン薬のリスク管理措置について公表されている。具体的には、第二次選択薬として使用することを徹底すること、投与後一定期間内（3日程度）に効果判定を実施し効果が無い時は抗菌薬を変更すること、国および製造販売業者が実施する薬剤耐性モニタリングを充実することとされている。

### 4. 慎重使用のガイドラインの制定

薬剤耐性菌の出現要因として最も重要なことは、抗菌薬の過剰使用と誤用にあるとされている。したがって、抗菌薬の使用に関しては、OIEやCODEXなどの国際機関や多くの国で慎重使用の指針が作成されている。OIEでは、「獣医療における動物用抗

菌薬の責任ある慎重使用」[4]を定めている。またCODEXでは、責任ある慎重使用を推進するため、ガイダンス「抗菌薬耐性の最小化及び抑制のための実施規範」[7]を定めている。ここでいう慎重使用とは、抗菌薬を使用すべきかどうかを十分に検討した上で、抗菌薬の適正使用により最大限の治療効果を上げ、耐性菌の選択を最小限に抑えるように使用することである。つまり、従来の適正使用より、さらに注意して抗菌薬を使うことを意味する。農林水産省は、2013年に畜産分野において抗菌薬を使用する際の獣医師及び生産者を中心とした責任ある慎重使用ガイドラインに相当する「畜産物生産における動物用抗菌性物質製剤の慎重使用に関する基本的な考え方」を発出した([http://www.maff.go.jp/j/shouan/tikusui/yakuzi/pdf/prudent\\_use.pdf](http://www.maff.go.jp/j/shouan/tikusui/yakuzi/pdf/prudent_use.pdf))。これによると、適切な飼養衛生管理による感染症予防、適切な病性の把握及び診断、抗菌剤の選択及び使用、関係者間の情報の共有を基本とすることが示されている。

### Ⅲ. わが国における抗菌薬の使用量と食用動物由来耐性菌の現状

JVARMが開始されることによって、食用動物における耐性菌の検出状況が次第に明らかになってきた([http://www.maff.go.jp/nval/tyosa\\_kenkyu/taiseiki/index.html](http://www.maff.go.jp/nval/tyosa_kenkyu/taiseiki/index.html))。そこで今回、動物における治療用抗菌薬の使用量とともに、健康食用動物由来大腸菌の各種薬剤に対する大まかな耐性状況について紹介したい。

#### 1. 抗菌性物質の使用量

2001年と2002年の平均によると純末換算量として人体用抗菌薬は509トン使用されているに対し、動物では医薬品として994トン、成長促進を目的とした抗菌性飼料添加物が168トン、農薬として371トンが使用されている。つまり、人体用の2倍強の抗菌薬が動物に使用されていることになる。動物種別に使用量を見ると、医薬品としての抗菌薬の約500トンが豚に使用され、ついで養殖魚、ブロイラーが続いている。また、抗菌薬の系統別に見ると350～400トンがテトラサイクリンであり、次いでいるサルファ剤の100トンに比べ圧倒的に多い。したがって、動物に使用される抗菌薬の約50%が豚に主にテトラサイクリンが使用されていることになる。今後、行動計画に従ってテトラサイクリンの使用等の規制の強化は避けられない。

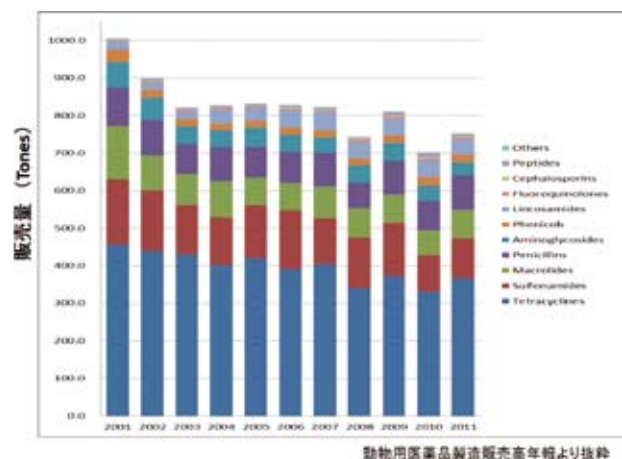


図1 動物用抗菌薬の販売量 (純末換算量)

一方、経時的な治療用抗菌薬の販売量の推移をみると明らかに減少傾向が認められ、2001年の1,000トンから2011年の750トンに低下している(図1)。

#### 2. 食用動物由来大腸菌の薬剤耐性状況

薬剤耐性菌対策を進展させるためには、先に述べたわが国の各種対策の効果を検証する必要がある。JVARMは発足以来同じ方法でサンプリングを実施し、同じ方法で薬剤感受性を調べていることから、健康動物由来大腸菌を用いた経時的な薬剤感受性の推移により検証した。図2は2000年から2011年に全国各地の外見上健康な食用動物(牛、豚、ブロイラー、レイヤー)の糞便から分離した大腸菌を用いたものである。動物種により抗菌薬の種類によって耐性率に高低があるものの、動物種に関わらず右肩下がりな減少傾向にあることが認められる。したがって、抗菌薬の使用量に反映した結果であり、現在の耐性菌対策が有効に機能していることを示している。ただし、動物種や抗菌薬によって高い耐性率を示していることも認められていることから、更なる使用量の低下が望まれる。

一方、概ね多くの抗菌薬に対する耐性率が減少しているのに対し、ブロイラー由来株の第三世代セファロスポリンに対する耐性率は上昇傾向が伺える(図3)。この傾向は牛、レイヤーや豚由来大腸菌に比べても極めて特異的な傾向にあった。鶏に用いるセファロスポリン薬は承認されておらず、一般的に高価であることから経済性からも使用は考えにくい。そこで耐性菌増加の原因を調査したところ、利便性から汎用されているワクチンの卵内自動接種システムにおいて、消毒薬代わりにワクチンに動物用第三世代セファロスポリン薬のセフチオフルを混入する実態が明らかにされた[3]。そこで2012年3月に

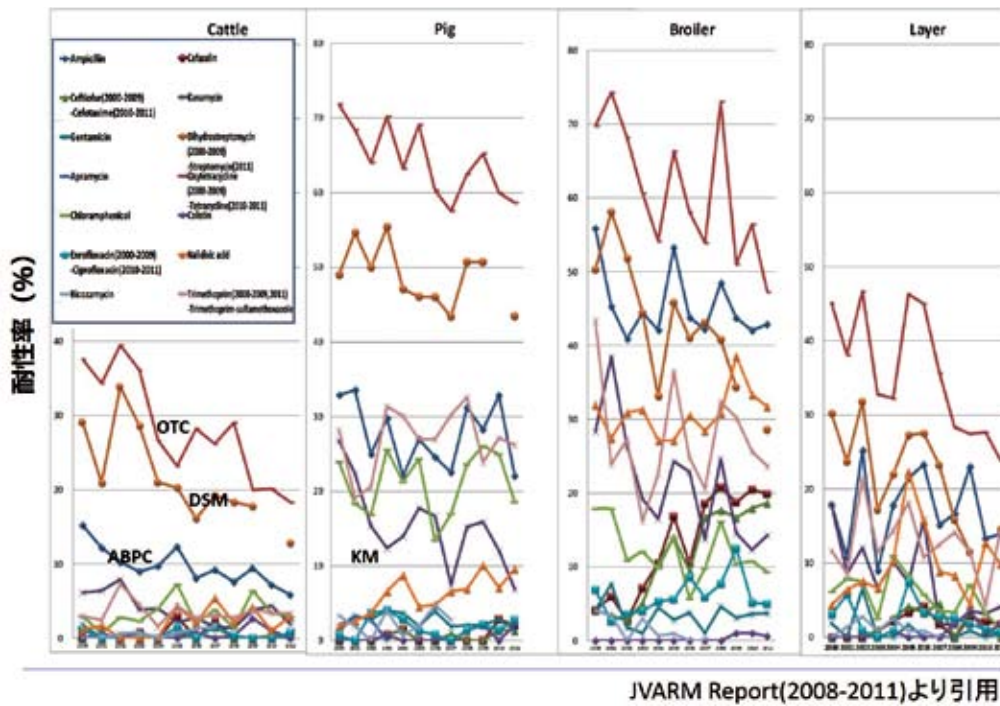


図2 大腸菌における薬剤耐性率の推移 (2000年 - 2011年)

農林水産省の指導により養鶏団体が自主的に使用を規制した。その結果、2013年にはベースラインである約5%まで耐性率が低下している。

おわりに

2015年のWHO国際行動計画の採択を契機に、地球規模でOne Healthに基づく耐性菌対策の強化にシフトしている現状を紹介した。その流れの中で現在、わが国もOne Healthによる耐性菌対策を構築しようと厚生労働省を中心に農林水産省や環境省が活発に活動している。わが国が策定した行動計画は5年間の成果指標が定められており、進捗状況が毎年評価されることになっている。したがって、これまで以上に動物における抗菌薬の使用は規制強化の方向に進めことは間違いない。今後は抗菌薬の使用量の低下措置を実践するとともに、ワクチン等の感染症の予防対策の推進がクローズアップされるものと思われる。

これまで農林水産省は、WHOの勧告に対して真摯に対応し、耐性菌を制御するためのあらゆる方策を講じてきた。今回紹介したように、先進国から遅れたものの、JVARMを設立し畜産現場における耐性菌の出現動向を監視するシステムを確立した。また、食品安全委員会では、抗菌性飼料添加物や治療用抗菌薬の食品媒介性健康影響評価を順次進めている。特に最近、牛、豚、鶏用フルオロキノロン薬の評価を終了し、リスクの程度は「中程度」とされた

ことは特筆に値することである [5]。このリスク評価結果を基に農林水産省で設定されたリスク管理方針についても紹介した。幸いに使用制限がかかることなく今後も使用できることは、獣医療にとって抗菌化学療法 of “最後の砦” を残せた意義は大きい。治療用の抗菌薬の販売量はこの10年間で25%の低下を認められ、それに伴って健康な食用動物由来大腸菌の耐性率も低下傾向にあることを示した。これはこれまでのリスク管理方針が有効に機能していることを示したものであると考えられる。ただし、依

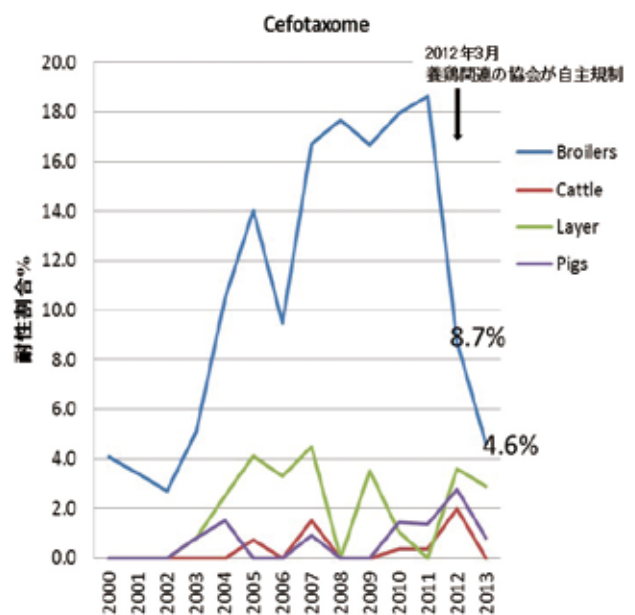


図3 食用動物由来大腸菌のセファロスポリン耐性の推移

然として抗菌薬の種類によっては高い耐性率を維持しており、更なる低減化対策が求められる。

今回、耐性率の推移の中で、例外としてブロイター由来大腸菌の第三世代セファロスポリン耐性率の急激な増加を紹介した。原因としてワクチンの自動卵内接種システムに消毒薬代わりに抗菌薬が使用されていたことだった。今回の事例はJVARMを稼動するに当たって二つの教訓を我々に示してくれた。まずは同じ方法で耐性菌をモニタリングすることにより異常値を早期に検出し、改善することによって耐性率をベースラインまで低下することができたことである。これは介入 (intervention) といわれるもので異常値が検出されたら直ぐに対策を講じることでJVARMの有用性を示すことができた。また、抗菌薬の適応外使用を中止することにより、短期間で耐性率をベースラインまで押し下げることができ、抗菌薬の慎重使用が極めて重要であることを示した。したがって、臨床獣医師はどのような抗菌薬であっても、使用すれば必ず耐性菌を選択することを念頭に、抗菌薬の治療効果を最大限にし、耐性菌の出現を最小化する投与を考えるべきである。その意味で、農林水産省が抗菌薬の責任ある慎重使用のガイドラインを提示したことは適時を得た対応であり、新規の抗菌薬が開発されにくい現在において、既存抗菌薬を末長く使用するためにも、全ての臨床獣医師が抗菌薬の使用に当たってこの考え方を順守することをお願いしたい。

#### 参考文献

1. 浅井鉄夫, 2010. 家畜を介した耐性菌汚染 日本と世界・現状と対策, 臨床と微生物. **37**: 635-639.
2. FAO/OIE/WHO, 2003. Joint FAO/OIE/WHO expert workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: scientific assessment, Geneva, December 1-5.
3. Hiki M, Kawanishi M, Abo H, Kojima A, Koike R, Hamamoto S, and Asai T. 2015. Decreased resistance to broad-spectrum Cephalosporin in *Escherichia coli* from healthy broilers at farms in Japan after voluntary withdrawal of Ceftiofur, *Foodborne Pathogens and Diseases* **12**: 639-643.
4. OIE, 2003. *OIE international standards on antimicrobial resistance*. p. 17-27.
5. 大倉尚子, 2017. 薬剤耐性菌の食品健康影響評価. 日獣会誌. **70**: 84-88.
6. WHO, 1998. Use of quinolones in food animals and potential impact on human health, Report and proceedings of a WHO meeting, Geneva, June 2-5.
7. WHO, 2000. WHO Global principals for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food, Geneva, June 5-9.

#### 文献紹介

## ジカウイルス感染症に対する修飾 mRNA ワクチンプロジェクト

小野浩輝

Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection.

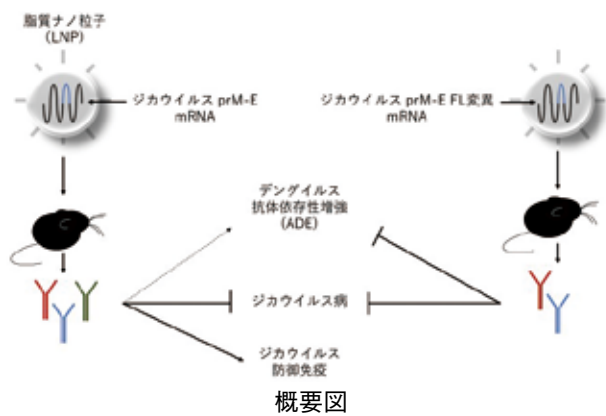
Justin M. Richner., Sunny Himansu., *et al.*

*Cell* 2017. **186**(6): 1114-1125.

#### 概要

ジカウイルス (Zika virus: ZIKV) 感染症の出現以降、安全で効果的なワクチンの開発が世界的に取り組まれてきた。我々は、野生型もしくは変異型 ZIKV 構造遺伝子をコードした脂質ナノ粒子 (Lipid nanoparticle: LNP) 被包型 mRNA (mRNA LNP)

ワクチンを開発し、マウスを用いてその免疫原性と防御性を試験した。prM-E mRNA を被包する LNP から形成されたウイルス様粒子を 2 回投与することで、ZIKV に対する高い中和抗体価 (~1/100,000) を示し、感染ウイルスを消滅させる免疫を獲得させた。デングウイルス (Dengue virus: DENV) への交差反応性抗体を誘導する ZIKV ワクチンの理論上



の懸念を除外するため、我々は E タンパク質中のフュージョンループ (Fusion loop : FL) エピトープの保存領域を欠損させる変異型 prM-E RNA をデザインした。この変異型は、培養細胞もしくはマウスにおいて ZIKV を防御し、さらに DENV 感染を増強させる抗体の産生を減少させた。変異型 mRNA ワクチンは ZIKV 感染症を防ぐことが可能で、ワクチン接種後に懸念される DENV 感染を増強するリスクを減少させた。

## はじめに

ZIKV は 1947 年にウガンダのジカ森林に生息するアカゲザルより同定された。もともと ZIKV はヤブカ属の蚊とヒトを除く霊長類の間で循環していたものが、偶発的にアフリカとアジアの一部のヒトへと溢流したと考えられている。2010 年以前は、ZIKV 感染症は頭痛、発疹、結膜炎、筋痛を伴う自己限定的な熱病とされていたが、特に西半球における ZIKV の拡散状況においては、年々重篤な臨床症状が観察されるようになってきた。妊娠期間中に胎児へと感染すると、胎盤機能不全、大脳石灰化や小頭症といった先天性奇形、流産などを引き起こす。成人が ZIKV に感染すると、麻痺や多発性神経炎を特徴とする自己免疫疾患であるギラン・バレー症候群へと繋がる。男女間もしくは男性間での性行為感染に関して報告があり、感染後 6 か月間持続的に精液や精子、膣分泌液から ZIKV が検出されたとする報告がある。現在、ZIKV 感染症はアメリカ、アジアにおける国際的な疾患となっている。

ZIKV はフラビウイルス属フラビウイルス科のエンベロープを有する RNA ウイルスで、11 kb 程度のプラス鎖 RNA を有する。細胞質内での RNA 翻訳によって、3 つの構造タンパク質 [カプシド (C)、膜前駆/膜 (prM/M)、エンベロープ (E)] と 7 つ

の非構造タンパク質 [NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5] に分節されるポリタンパク質を産生する。ZIKV は、正二十面体に整列した 60 の prM-E ヘテロ三量体で構成される未成熟なウイルス粒子の状態の小胞体内腔へと出芽する。ウイルスは分泌経路を通過する際、ゴルジネットワークにおける酸性環境が prM 中のフーリン切断領域の露出を引き起こす。prM が切断されて細胞外に放出された pr ペプチドは、表面に格子状に配置するホモ 2 量体のエンベロープ蛋白に配置され、成熟した感染性粒子となる。ZIKV の E タンパク質は 3 つの外部ドメイン [DI、DII、DIII] から構成され、これらが中和抗体のターゲットとなる。ZIKV に対するモノクローナル抗体 (Monoclonal antibodies : mAb) は、E タンパク質領域の外部ドメイン 3 つ全てのエピトープのみならず、四次構造を構築する多重領域内部あるいは二量体連結部をも認識している。ZIKV の中和抗体は、感染性ウイルスもしくは不活化ウイルス粒子によって誘導されるが、それに加えて、M-E または prM-E をコードする DNA プラスミドを免疫することでも誘導される。後者では、分泌型サブウイルス粒子 (Subviral particles : SVP) が産生される場合があることが報告されている。

ZIKV の遺伝子型は African 型と Asian/American 型の 2 つの系統が存在するが、抗体の中和能にはなら影響を及ぼさないことから、ZIKV は単一の血清型として分類されている。ZIKV は、DENV や黄熱ウイルス (YFV)、ウエストナイルウイルス (WNV)、日本脳炎ウイルス (Japanese encephalitis virus : JEV)、ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) といった病原体と関連があり、中でも特に DENV の 4 つの血清型と最も近縁で、ウイルス E タンパク質中のアミノ酸配列相同性は 54~59% を示す。

胎児や新生児に対する感染や先天的障害を与える危険性から、ZIKV に対する予防対策を緊急に確立する必要がある。いくつかの研究グループは、マウスおよびヒト以外の霊長類において ZIKV 血症を防御する性質を有する中和抗体を誘導するサブユニット [prM-E、M-E DNA プラスミド、アデノウイルスベクター] もしくは不活化ワクチンプラットフォームを開発した。これら候補ワクチンの中には、既にヒトでの臨床試験が予定もしくは開始されているものもある。

ZIKV と DENV 間の遺伝子配列類似性に起因する抗 ZIKV ヒト抗体の DENV に対する交差反応は、ワクチン開発における争点となっている。交差反応



性抗体は、防御に貢献する可能性が限られており、それは培養細胞試験における多くの広域反応性抗フラビウイルス mAb の中和活性限界と一致する。DENV に初感染すると、ホモ血清型に対する抗体反応を誘導するが、その一方でヘテロ血清型の DENV に二次感染すると致死的ショック症候群を引き起こす。このことは少なくとも一部は抗体依存性感染増強 (Antibody-dependent enhancement of infection: ADE) に起因する。すなわち、最初に感染した血清型のウイルスで誘導された交差反応性抗体は、その後に感染した異なる血清型の病態を Fc $\gamma$ 受容体を発現する細胞内で増強する。この現象は DENV と ZIKV が非常に密接な関係にあり、また ZIKV 流行域でのワクチン接種者や流行域への旅行者の間凡そ 3 億 9 千万人がその後 DENV に暴露されることなどから、ZIKV のワクチン接種にとって重要な課題になるであろう。事実、ZIKV の自然感染に由来する E タンパク質中の高度に保存された DII ドメインにおけるフュージョンループ (Fusion loop in DII of E: E-DII-FL) に対する交差反応性抗体は、培養細胞およびマウスにおいて DENV の感染性を増強させることが出来る。これらの実験室データは確定的なものではなく、ZIKV の液性免疫が DENV の病理発生に及ぼす影響を証明するためには年単位の期間がかかる疫学調査が求められる。交差反応性抗体の誘導を減少させるようなワクチン戦略は、患者を重篤な DENV 感染症へ感作させるリスクを最小化するかもしれないし、DENV 感染症の病理発生に関わる ZIKV の免疫の臨床的関連を証明するであろう。

我々は、LNP に野生型 (Wild-type: WT) もしくは変異型 ZIKV の構造遺伝子をコードした修飾 mRNA を包含させた汎用性ワクチンプラットフォームを開発した。DNA プラスミドベースのワクチンとは異なり、mRNA は染色体中に統合され

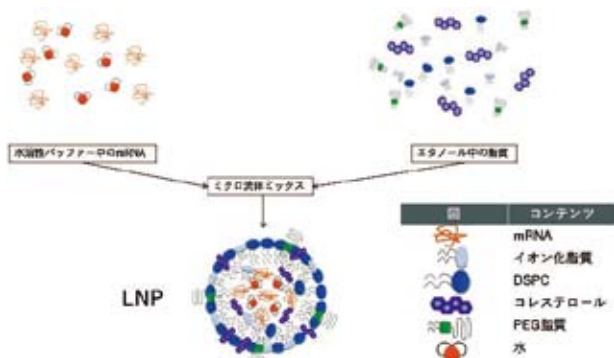


図 1 LNP ワクチン作製法

ることは無く、変異原性や発がん性のリスクはない。最近、非増殖型もしくは自己増殖型の mRNA ベースのワクチンが、マウスにおける A 型インフルエンザや、霊長類における HIV に対する液性免疫反応の誘導に用いられている。我々の修飾非自己増幅型 mRNA ワクチンは、目的の抗原をコードする翻訳領域、翻訳効率と細胞内安定性を最適化する 5' および 3' の非翻訳領域、非特異的自然免疫活性を抑制する独自のヌクレオチドを含む、最適化された mRNA を有する。mRNA は Toll-like 受容体と RIG-I-like 受容体を通して自然免疫を刺激する。自然免疫を刺激するアジュバント効果は、タンパク質ワクチンのアドバンテージであるが、その一方で非特異的免疫反応は mRNA の翻訳も阻害し、mRNA ワクチンの抗原発現と免疫原性を減少させるこのことはウリジンヌクレオチドをシュードウリジンや 5-メチルシチジンのような自然発生の塩基の修飾と置換することで克服できる。そこで、ZIKV の prM-E をコードした修飾 mRNA を 2 遺伝性もしくは獲得性自然免疫不全マウスに 2 回免疫したところ、重篤感染を防御する高い中和抗体を誘導した。実質的に mRNA ワクチンはいかなる遺伝子配列でも組み込むことが出来るため、E-DII-FL における免疫優勢交差反応性エピトープを無効にするような変異をコードする修飾 mRNA 免疫原を作製した。これらの mRNA はマウスにおいて ZIKV に対する防御抗体を誘導し、かつ、培養細胞において DENV 感染を増強させる交差反応性抗体の産生と、マウスにおける DENV の病原性を最小化することができた。

## 結果

ZIKV に対する mRNA ワクチンプラットフォーム *in vivo* でタンパク質発現を高度に誘導する、筋肉内投与用の修飾 mRNA を被包化した最適化 LNP を作出するためのワクチンプラットフォームを作製した (図 1)。原理証明のため、type 1 (N7mGpppGm) cap、最適化した 5' および 3' の非翻訳領域、ヒト

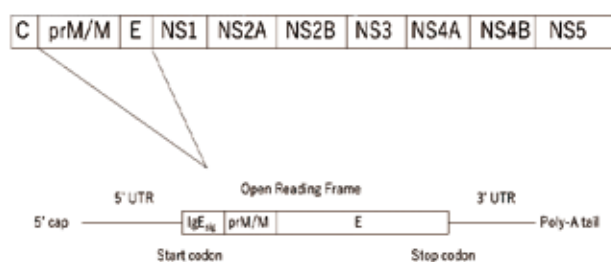


図 2 ZIKV 遺伝子(上)および IgE<sub>sig</sub>-prM-E(下)

IgE のシグナル配列、ZIKV Asian 株 (America 株とのアミノ酸配列同等性 99% <) の全長 prM および E 遺伝子をコードした修飾 mRNA をデザインした (図 2)。修飾 mRNA は酵素処理で統合した後、LNP に被包化した。293T もしくは HeLa 細胞と IgE signal-prM-E (IgE<sub>sig</sub>-prM-E) mRNA を含む LNP をインキュベートすることで、約 30 nm の SVP の効率的な発現と分泌が得られた。これらは電子顕微鏡や培養上清中 ZIKV の構造タンパク質に対するウエスタンブロット、マススペクトロメトリーなどで確認された。

### AG129 マウスにおけるワクチン有効性

IgE<sub>sig</sub>-prM-E LNP の免疫原性と防御性についてはまず、type I および II IFN シグナル反応を欠いた免疫不全マウスで評価した。8 週齢の *Ifnar1*<sup>-/-</sup>*Ifngr*<sup>-/-</sup> AG129 マウスの雄雌を 5 群に分け、IgE<sub>sig</sub>-prM-E LNP の 2 μg あるいは 10 μg を、陰性対照として非翻訳 RNA LNP (プラセボ) の 10 μg を投与した。群 1、3、5 はワクチン投与後 21 日目に等量の追加免疫を実施したが、群 2 および 4 では実施しなかった (表 1)。免疫後 42 日目にマウスの静脈切開を行い、中和抗体価を測定した。IgE<sub>sig</sub>-prM-E LNP を追加免疫した群では、ZIKV の中和抗体価は高値 [EC50: 1/10,000、EC90: 1/1,000] を示し、追加免疫を行っていない群の抗体価は低値を示した。免疫後 42 日目に、ZIKV P6-740 株で攻撃を行った結果、陰性対照群は ZIKV 感染によって全頭が死亡した。IgE<sub>sig</sub>-prM-E LNP ワクチンを 2 μg もしくは 10 μg 投与して追加免疫を行った群および、10 μg 単回投与した群は 1 頭を除いて感染耐過した。一方で、2 μg 単回投与したマウスは 60% の生存率で中間表現型を示した。体重変化と死亡率には相関が見られ、IgE<sub>sig</sub>-prM-E LNP ワクチンを投与したマウスでは異常は見られなかったが、一方で陰性対照群は攻撃後 10 日目頃から体重減少が見られた。

表 1 AG129 マウスを用いた免疫群の設定

群	ワクチン	dose	抗原刺激	追加免疫	ZIKV	n
1	IgE <sub>sig</sub> -prM-E	10 μg	Day 0	Day 21	Day 42	10
2	IgE <sub>sig</sub> -prM-E	10 μg	Day 0	NA	Day 42	10
3	IgE <sub>sig</sub> -prM-E	2 μg	Day 0	Day 21	Day 42	10
4	IgE <sub>sig</sub> -prM-E	2 μg	Day 0	NA	Day 42	10
5	プラセボ	NA	Day 0	Day 21	Day 42	10

### C57BL/6 でのワクチン有効性

免疫正常マウスで IgE<sub>sig</sub>-prM-E LNPs ワクチンの免疫原性および有効性を評価するために、8 週齢の C57BL/6 WT マウスの筋肉内に 10 μg の IgE<sub>sig</sub>-prM-E LNP を投与した。これらの動物は接種後 4 週目 (追加免疫前)、8 週目および 18 週目 (攻撃後) に静脈切開を行い、中和抗体価を測定した。中和抗体価は追加免疫前の血清では比較的低値を示したが、追加免疫後 4 週で抗体価はピークの値 [EC50: 1/10,000] を示し、1 回目のワクチンを接種してから 18 週まで上昇し続けた。致死性の攻撃モデルを作製するために、2 mg のブロッキング用 anti-*ifnar1* 抗体を攻撃前日に受身投与した後、マウス感受性 ZIKV African 株 10<sup>6</sup> focus-form-unit (FFU) で攻撃した。IgE<sub>sig</sub>-prM-E LNP ワクチンで免疫された全てのマウスは致死性の ZIKV 感染に防御したのに対して、非免疫対照群の生存率は 30% であった。IgE<sub>sig</sub>-prM-E mRNA LNP で免疫されたマウスは体重減少を示さず、攻撃後 5 日目の血清中でウイルス血症は認められなかった。

### 免疫優勢 E-DII-FL 欠損修飾ワクチンの抗 ZIKV 防御反応の誘導

フラビウイルス E タンパク質領域の DII ドメインに存在する FL エピトープは高度に保存されており、ヒトにおいて免疫優性である。ZIKV の感染、もしくは ZIKV の構造タンパク質を免疫すると DENV との交差反応性抗体を誘導することが出来るが、一方で ADE によって DENV 感染および病態を増強する可能性がある。このリスクを最小化するために、FL 特異抗体の抗体活性を失活させる 4 つの変異 [T76R、Q77E、W101R、L107R] を E-DII-FL 内あるいはその近位 (prM-E FL) に導入した。また、IgE リーダー配列を JEV の配列 (JEV<sub>sig</sub>) と置換することで mRNA LNP の別系列を作製し、宿主シグナルペプチターゼ切断有効性を高める他のフラビウイルスの prM-E DNA ワクチンを、最適化したコドンを使用して作製した (表 2)。ウエスタンブロットによる分析では WT および FL ミュータント mRNA を HeLa 細胞にトランスフェクションした後の培養上清における SVP の分泌レベルは同等であることが示され、FL エピトープを認識する mAb (WNV E60) を使用することで prM-E FL mRNA の FL の消失が確認された。

免疫応答性が正常な 8 週齢の BALB/c マウス

(雌)へ、IgE<sub>sig</sub>-prM-EもしくはJEV<sub>sig</sub>-prM-E LNP (WTもしくはFL ミュータント)を2 µg および10 µg 投与し、投与後4週目に追加免疫を実施した。初回免疫から8週後、ZIKV レポーターウイルス粒子 (Reporter virus particles : RVP) を用いて中和活性を解析した。IgE<sub>sig</sub>-prM-E LNP もしくは IgE<sub>sig</sub>-prM-E FL LNP を2 µg あるいは10 µg 投与したマウスでは、同様の中和抗体価 [EC50: ~1/5,000] を示した。WT JEV<sub>sig</sub>-prM-E LNP を2 µg および10 µg 投与したマウスは高い中和抗体価 [EC50: ~1/100,000, EC90: ~1/10,000] を示した。しかし、ミュータント JEV<sub>sig</sub>-prM-E FL LNP を投与した群では、中和抗体価は低値 [EC50: 1/10,000, EC90: ~1/500] を示した。

初回のワクチン接種後から13週目までに、anti-infar1 blocking 抗体をあらかじめ投与した後、ZIKV Dakar 41519 株で攻撃した。攻撃後3日目の血清でウイルス血症の検査を実施した。JEV<sub>sig</sub>-prM-E LNP を2 µg もしくは10 µg 投与した群では、高い中和抗体価と一致して、ウイルス血症は測定限界値以下であった。すべてのワクチン群 (IgE<sub>sig</sub>-prM-E LNP (WT および FL) および JEV<sub>sig</sub>-prM-E FL LNP) では、いくらかの動物ではウイルス血症に耐えたが、それらのレベルはプラセボの10~100-fold 以下であった。マウスは攻撃後7日目で安楽殺し、脾臓、子宮、脳からZIKV のRNA含有量を測定した。prM-E LNP で免疫したほとんどのマウスの脾臓で、ZIKV のRNA含有量は顕著に低値 [>100-fold] を示し、子宮および脳からはRNAは検出されなかったが、非免疫対照群では、組織1gあたり10<sup>5</sup>から10<sup>6</sup> FFUのZIKVが検出された。IgE<sub>sig</sub>-prM-E FL LNP もしくは JEV<sub>sig</sub>-prM-E FL LNP を2 µg 免疫したマウスでは防御がやや下がり、非免疫対照群よりもはるかに低値ではあるが数匹のマウ

スの脾臓と脳からウイルスRNAが検出された。

このモデルにおけるZIKVの完璧な防御と免疫との相関を証明するために、mRNA LNP ワクチンからのEC50値とマウスの血清と脾臓から回収したウイルスRNA量を比較した。この解析によって、中和抗体価と血清および組織から回収したZIKV RNA量が逆相関すること、また、ウイルス血症と組織内ウイルス拡散を完全に防ぐEC50カットオフ値が~1/10,000であることを明らかにした。次に、ウイルス血症および組織への感染をほぼ完全に防御したJEV<sub>sig</sub>-prM-E LNP ワクチンが感染ウイルスを消滅させる免疫を獲得できるのかを試験した。JEV<sub>sig</sub>-prM-E mRNA ワクチンを2 µg もしくは10 µg dose 免疫したマウスのほとんど(80-90%)が、感染性ZIKV 攻撃後1週間目の中和抗体価の上昇は認められなかった。これに対して、IgE<sub>sig</sub>-prM-E もしくは JEV<sub>sig</sub>-prM-E FL ワクチンを投与し、破綻的なウイルス血症と組織負荷を示したほとんどの動物(82-100%)は、既往反応の誘導と一致して攻撃後にEC50 および EC90 の顕著な上昇を持続した。

#### DII フェージョンループエピトープの変異は培養細胞およびマウスにおいてADEを減少させる

FL 変異ワクチンが、交差反応増強抗体の誘導を減少させるかどうかを評価するため、DENV 血清型1 (DENV-1) RVP を免疫してから8週後に得た血清を希釈してインキュベートし、活性化ヒトFc-γ receptor IIA (D32A) を発現するK562細胞での感染を評価した。WT IgE<sub>sig</sub>-prM-E もしくは JEV<sub>sig</sub>-prM-E LNP を免疫したマウスから得られた血清全てが鐘型の正の準抗体増強曲線を示す一方で、IgE<sub>sig</sub>-prM-E FL もしくは JEV<sub>sig</sub>-prM-E FL LNP から得た血清を免疫したマウスから得た血清の多くは、高濃度時のみ増強したものの有効性は大幅に低下した。実際に、最高増強力価 (Peak enhancement titer : PET) はFL 変異体で免疫したマウスの100-fold 以下であった。同様の増強効果における減少あるいはPET時の感染細胞の分画が観察された。以上の培養細胞を用いた試験から判断すると、ZIKV E 遺伝子へのFL 変異の導入は、DENV への増強抗体の産生を減少させた。

これらの結果の生理的意義を判定するために、AG129 マウスで確立されているDENVに対するADE受動導入モデルを用いて、IgE<sub>sig</sub>-prM-E および IgE<sub>sig</sub>-prM-E FL、もしくは JEV<sub>sig</sub>-prM-E および JEV<sub>sig</sub>-prM-E FL を免疫したマウスの血清を調

表2 BALB/c マウスを用いた免疫群の設定

群	ワクチン	dose
1	IgE <sub>sig</sub> -prM-E	10 µg
2	IgE <sub>sig</sub> -prM-E	2 µg
3	IgE <sub>sig</sub> -rM-E FL	10 µg
4	IgE <sub>sig</sub> -prM-E FL	2 µg
5	JEV <sub>sig</sub> -prM-E	10 µg
6	JEV <sub>sig</sub> -prM-E	2 µg
7	JEV <sub>sig</sub> -prM-E FL	10 µg
8	JEV <sub>sig</sub> -prM-E FL	2 µg
9	プラセボ	NA

べた。始めに、Raji-DCSIGNR細胞にて確立されたRVP法を用いて、プールしたZIKV血清のDENV血清型2(DENV-2)の相対中和活性を評価した。FL特異的mAbを用いた試験と一致して、IgE<sub>sig</sub>-prM-EもしくはJEV<sub>sig</sub>-prM-Eを免疫したマウスから得たプール血清は、IgE<sub>sig</sub>-prM-E FLもしくはJEV<sub>sig</sub>-prM-E FLを免疫した動物とは異なり、培養細胞においてDENV-2の感染を防ぐことができた。このことは、交差反応抗体(FL特異のような)はWTで免疫したマウスからのみ産生されてFLミュータントワクチンで免疫したマウスからは産生されず、活性化Fc- $\gamma$ 受容体を欠損するRaji-DCSIGNR細胞における感染を中和出来ることを示している。次に、プール血清をAG129マウスに非致死量のDENV-2で攻撃する1日前に投与した。WTのIgE<sub>sig</sub>-prM-EもしくはJEV<sub>sig</sub>-prM-E LNPを免疫したマウスから得た血清1  $\mu$ L、10  $\mu$ Lもしくはポジティブコントロールとしてanti-prM mAb(2H2)をAG129マウスに投与した結果、一様にADEによる重篤な病態と致死的な感染を引き起こした。IgE<sub>sig</sub>-prM-E FLもしくはJEV<sub>sig</sub>-prM-E FL LNPを免疫したマウス血清を投与した場合は、罹患率および致死率が顕著に低下した。

## 考察

ZIKVの出現により、その感染をコントロールするための対応策を早急に確立する必要が出てきた。我々はprM-Eタンパク質をコードした修飾mRNAをLNPに被包化したZIKVワクチンプラットフォームを開発した。近年、mRNAベースのワクチンはマウスにおいてA型インフルエンザあるいはヒト以外の霊長類においてHIVに対する液性免疫の誘導に用いられたが、それらが自己増殖RNAやプロタミン複合型mRNAを用いている点は、我々が開発したプラットフォームとは異なる。我々は修飾mRNAの輸送にLNPを選択したが、それはsiRNAのデリバリーが臨床試験にて検証されて来ており、他の非ウイルスデリバリーシステムと比較して耐容性が優れているためである。原理証明試験として、LNPでデリバリーされた修飾mRNAが致死的なZIKV感染に対するIFNシグナルを遺伝的もしくは後天的に欠損した数種類のマウス[129 Sv、BALB/c、C57BL/6]において中和抗体を誘導することを示した。IgE<sub>sig</sub>-prM-E LNPによって誘導された中和抗体価は、これら3種のモデルマウスで一

律に高値(50%中和抗体価: ~1/10,000)を示した。mRNA LNPワクチンによって誘導された防御反応には持続性があり、追加免疫から14週間でも、攻撃されたマウスはZIKVに罹患および死亡を示さなかった。さらに、prMのシグナル配列とコドンの使用を適正化したJEV<sub>sig</sub>-prM-Eを用いることで、大多数のマウスにおいて感染ウイルスが消滅するような、より強力な免疫応答(EC50: ~1/100,000、EC90: ~1/10,000)を誘導することができた。JEV<sub>sig</sub>-prM-EがIgE<sub>sig</sub>-prM-E mRNAよりも高い免疫原性を示した要因はこの時点では不明であった。

他のZIKVワクチン候補がマウスでウイルス血症をIgG価~1/2,000で防御を示していたが、これらの内いくつかの試験は、IFNシグナリングの拮抗作用が種特異的に欠損し効率的にZIKV感染をしない免疫応答マウスを攻撃試験に用いていた。ヒト以外の霊長類でのDNAプラスミドあるいは不活化ワクチンを用いた受動伝達および攻撃試験では、大半のZIKV感染動物のウイルス血症を防御するのにマイクロ中和試験で1/100もしくはRVP法で1/1,000の中和抗体価が必要であることが示唆されている。しかしながら、標的組織中からウイルスが検出されず、既往性の液性免疫応答の形跡がないことから判断されるように、完全排除型免疫に関して評価した報告はない。ワクチン開発において、最重要な問題は妊娠時の防御と、胎盤および胎児感染に伴う傷害を防御し得る完全排除型免疫が必要かどうかの相互関連性が問題として残っている。anti-ifnar1処理を施した感受性マウスにおいては、完全排除型免疫を獲得するのに必要な中和抗体価は、ウイルス負荷もしくは死亡率を抑えるのに必要な中和抗体価よりも実質的に100~1,000倍高値だった。母子感染を完全に防ぐ免疫防御の相互関連を証明するために、妊娠動物における免疫試験が計画された。

プラットフォームに多用途性があるため、保存されたE-DII-FL領域に対するmAbおよびポリクローナル抗体の活性を消失させる変異を導入したmRNA LNPワクチンをデザインした。FL変異mRNAワクチンは非妊娠BALB/cマウスに中和抗体反応を誘導し、脳および子宮へのウイルス播種を防御した。さらに、FL変異ZIKVワクチンは血清抗体反応を誘導し、培養細胞においてDENV-1感染におけるADEを低減させ、AG129マウスにおいてはDENV-2感染における免疫増強をもたらした。我々の結果は、G106RとL107Dの変異を導入することでFLエピトープを変化させたDENV-1 DNA

プラスミドワクチンを用いた過去の試験の結果と類似している。その試験では、交差反応性を低減させた一価 DENV-1 DNA ワクチンを免疫されたマウスでは、DENV-2 感染に対する免疫増強を減じていた。我々の FL 変異 mRNA LNP ワクチンは ADE を最小化した。一方、各 WT LNP と比較して JEV<sub>sig</sub>-prM-E-FL LNP での中和抗体価は低値 (~7-fold decrease in EC50) であった。しかしながら、IgE<sub>sig</sub>-prM-E WT および IgE<sub>sig</sub>-prM-E FL ワクチン間で、中和抗体の顕著な違いは認められなかった。さらなる研究が求められるが、FL を変異させた mRNA LNP の誘導する中和反応は弱い可能性がある。原因としては、(a) 産生する SVP に安定性がない、(b) FL を欠損することによって中和エピトープが変化する、(c) ZIKV SVP 中の FL の変異によって、EDE 抗体で観察されるような FL に近接したエピトープに結合する中和抗体の産生を妨げる、といったことが考えられる。このように、FL 変異 LNP を用いることにはトレードオフがある。DENV 感染の交差反応および ADE を軽減させられる一方で、中和活性および完全排除型免疫を付与する可能性も減少する。FL 保存領域内を改変させ交差性反応を減少させた第二世代の FL 変異 LNP はより一層免疫原性であろう。

我々の mRNA LNP ZIKV ワクチンプラットフォームは、サブユニットベースもしくは不活化ウイルス粒子を用いたアプローチに焦点が集まる増大するパイプラインに加わるものである。3つの研究グループが、マウスおよびヒト以外の霊長類において中和抗体を誘導させ、ウイルス血症と致死的なウイルス攻撃を防御することが出来る ZIKV M-E もしくは prM-E 遺伝子をコードした DNA プラスミドワクチンを報告した。ZIKV M-E 遺伝子をコードしたアカゲザルアデノウイルスベクターワクチンは、4頭のアカゲザルに1回投与後に中和抗体を誘導した。アルミニウムアジュバント加不活化 ZIKV ワクチンを2回接種した BALB/c マウスもしくはアカゲザルは中和抗体と細胞性免疫を誘導し、さらにウイルス血症および尿、脳脊髄液、結腸直腸粘液、頸膈部分分泌液中のウイルス RNA 産生を抑制した。可溶性 E タンパク質三量体を産生するヒトアデノウイルスベクターワクチンは中和抗体を産生し、1週齢のマウスにおいて ZIKV の攻撃を防御した。これら全てのワクチンプラットフォームでは有効性の見込みはあるものの、いずれも理論的に交差反応性抗体の産生については評価されておらず、DENV

感染や疾患を増強する可能性がある。一方で、*in vitro* やマウスで証明することが出来る DENV の感染および疾患の増強が ZIKV ワクチンに対する臨床的な懸念となるかどうかについて検討されなければならない。疫学的な証明が無い中で、ヒトでの交差反応を軽減した変異体ワクチンの評価を正当化することは、特に我々の WT JEV<sub>sig</sub>-prM-E コンストラクトによって誘導される非常に強力な反応と比較した場合、免疫原性の低下という観点から見て難しいかもしれない。しかしながら、修飾 mRNA プラットフォームは緊急の疫学的データに素早く対応できる点で良い立ち位置にある。

我々は、中和能を最適化し、不要な交差反応の制限を容易に操作できる LNP 被包型修飾 mRNA を利用した ZIKV ワクチンの作出に関して記載した。JEV<sub>sig</sub>-prM-E mRNA LNP は、種々の動物で完全排除型免疫を付与する顕著な中和抗体価を誘導した。我々の結果と同様に、最近 ZIKV 感染症に対する候補ワクチンとして prM および E 遺伝子をコードした LNP 被包化 mRNA の有用性が報告されている。このプラットフォームの持つ柔軟性は、今後他のフラビウイルスで防御反応あるいは免疫優勢ヘルパー CD4 T 細胞エピトープを増強することが出来るタンパク質 (NS1 など) をコードした mRNA をさらに導入することが可能になる。今後、これらの mRNA ワクチンの免疫原性と防御効果を、妊娠マウス、ヒト以外の霊長類、そして最終的にヒトで評価する試験を実施していくことになる。

参考文献は割愛させていただきます。

## 所感

生ワクチンや不活化ワクチンといったスタンダードとは異なる、mRNA ワクチンプラットフォームという新たな可能性に期待させられる内容だと感じた。ジカ熱は海外ではアジアを中心に広く浸透しているが、国内においても 2014 年に海外から帰省した日本人が発症したという事例があった。さらに同年、ZIKV の近縁である DENV が都内で流行した報道はまだ記憶に新しい。温暖化と同時に蚊の分布域が拡大することで、ZIKV が国内に再び侵入してくる危険性は大きいにあると思う。動物の感染症も含め、未だ有効なワクチンの無い感染症が、こういった新しい技術で感染防御できると新たな可能性が開けてくると思う。

## 学会参加記

## 66th Western Poultry Disease Conference (WPDC)

場所：アメリカ、カリフォルニア州

会期：2017年3月20日～22日

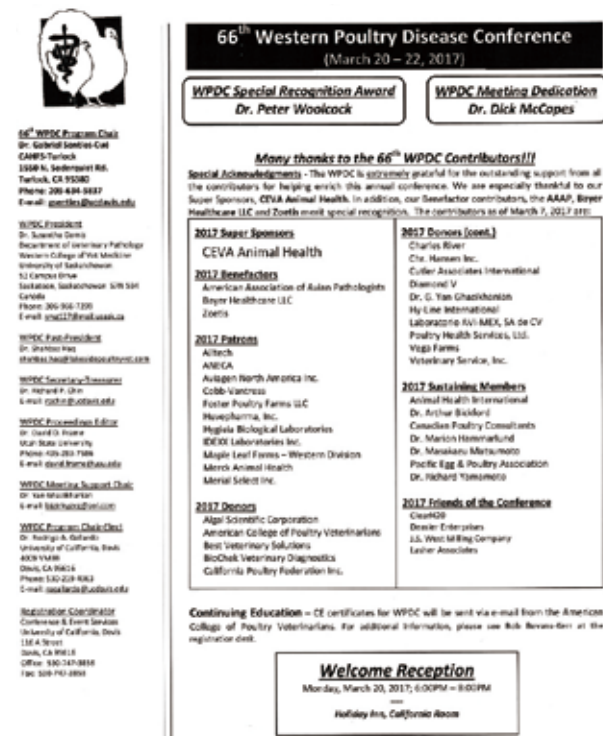
永野 哲司

2017年3月20日から22日にかけてアメリカ・カリフォルニア州サクラメントで開催された66th Western Poultry Disease Conference (WPDC)に参加しましたので、その概要について紹介します。

会議は、Dr. Gabriel Senties-Cue [Turlock Laboratory, California Animal Health & Food Safety, UC DAVIS]の主催でサクラメント市内のダウンタウンにあるHoliday Inn Capitol Plaza (図1)で2日半にかけて開催されました(図2、3)。招待講演5題及び口頭発表57題はそれぞれのトピックス毎に10のセッションに分かれて発表され、ポスター発表14題は開催期間中ずっと休憩室に掲示されながら、2日目午前中のコーヒープレイクの時にディスカッションタイムが設けられていました。各セッションのトピックス及び全体的なプログラムを表1で紹介していますので、そのセッション毎に概要を紹介していきます。

◇第一日目：「診断」では、Dr. Hoerrが招待講演で今後の診断方法の改良について独自の見解を紹介していた。その他には、1つのスワブ検体から *Mycoplasma gallisepticum* (MG)・*M. synoviae* (MS)・伝染性喉頭気管炎 (ILT) ウイルスを同時に検出できるPCR法、検出時間30秒で検出感度が $10^1$ CFU/mLのサルモネラ検出法、より効率的な伝染性気管支炎 (IB) ワクチンのテイク確認方法、IB ウイルス抗体をより高感度に検出するキットの紹介

がありました。引き続き「診断(続き)」では、Dr. Leungが次世代DNAシーケンシングの鶏病診断への応用について講演をしました。その他には、*Salmonella Enteritidis* (SE) 不活化ワクチンの副反応がIBワクチンのテイクには深刻な影響を与えないこと、発育停止卵の原因には腸球菌が関与してい



**66<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference**  
(March 20 – 22, 2017)

**WPDC Special Recognition Award**  
Dr. Peter Woolcock

**WPDC Meeting Dedication**  
Dr. Dick McCopes

**Many thanks to the 66<sup>th</sup> WPDC Contributors!!!**

**Special Acknowledgments** - The WPDC is extremely grateful for the outstanding support from all the contributors for helping enrich this annual conference. We are especially thankful to our Super Sponsors, CEVA Animal Health. In addition, our Sponsoring contributors, the AAAP, Bayer Healthcare LLC and Zoetis merit special recognition. The contributors as of March 7, 2017 are:

<b>2017 Super Sponsors</b> <b>CEVA Animal Health</b> <b>2017 Benefactors</b> American Association of Avian Pathologists Bayer Healthcare LLC Zoetis <b>2017 Patrons</b> Alltech ANSCA Avulgen North America Inc. Cobb-Vantress Foster Poultry Farms LLC Hovosharma, Inc. Megalix Biological Laboratories IDEXX Laboratories Inc. Maple Leaf Farms - Western Division Merck Animal Health Merial Select Inc.	<b>2017 Donors (cont.)</b> Charles River Ciba Hoeslin Inc. Cytel Associates International Diamond V Dr. G. Yan Ghazvini Hy-Line International Laboratorios Avil Mex, SA de CV Poultry Health Services, Ltd. Vegg Farms Veterinary Service, Inc. <b>2017 Sustaining Members</b> Animal Health International Dr. Arthur Siskind Cawston Poultry Consultants Dr. Mariano Hernandez Pacific Egg & Poultry Association Dr. Richard Tomason <b>2017 Friends of the Conference</b> Clear20 Drexler Education ILS West Milling Company Leiber Associates
--	--

**Continuing Education** - CE certificates for WPDC will be sent via e-mail from the American College of Poultry Veterinarians. For additional information, please see Bob Nevejan at the registration desk.

**Welcome Reception**  
Monday, March 20, 2017, 6:00PM - 8:00PM  
Holiday Inn, California Room

図2 66th Western Poultry Disease Conference Proceeding



図1 Holiday Inn Capitol Plaza



図3 学会会場

ることを MALDI/TOFMS で証明したこと、サンプル中に 10 コピーの遺伝子が存在すれば検出できる鳥インフルエンザ (AI) ウイルス検出用のリアルタイム PCR キット、California Animal Health and Food Laboratory における診断サービスの内容について紹介がありました。「AI、ニューカッスル病 (ND)」では、メリーランド州及びミネソタ州での高病原性 AI 発生事例について詳細な報告がなされました。さらに、高病原性 AI と低病原性 AI の薬剤感受性に関する報告、ND ウイルスの HN タンパクは多様性が高くウイルスの増殖にも関与していることが紹介されました。「ND、IB、伝染性ファブリキウス嚢病 (IBD)、ILT、マレック病 (MD)」では、ND ウイルスの F タンパク、HN タンパク、L タンパク及び NP タンパクと病原性との関連性が紹介され、IB ウイルスに感受性又は抵抗性を示す鶏で IgA の分泌に差が認められること、インディアナ州においてブロイラーで発生した ILT がレイヤーに拡大した事例、MD ワクチンが鶏貧血ウイルス (CAV) に汚染されていたことを発端としたアルゼンチンでの CAV 感染事例などについて発表がありました。

◇**第二日目**：「封入体肝炎 (IBH)、アストロウイルス」では、Dr.Cardona が疾病予防と生産効率をバランス良く維持させることが生産現場では如何に難しいかを詳細に講演しました。さらに、ジョージア州での IBH 発生事例を調べると血清型 7 及び 11 主体から 8a 及び 8b 主体に流行ウイルスが移行していること、アデノウイルス血清型 8b 及び 11 で作製した生及び不活化ワクチンがホモ血清型だけでなくヘテロ血清型に対しても有効であったこと、アストロウイルス B 群の特定のサブグループが White Chick 病に関係していることが ELISA を用いた種鶏の調査で示唆されたことなどが発表されました。「栄養学、レオウイルス」では Dr.Mireles が、有機農法の定義やガイドラインについて講演し、幾つかの問題点を提起しました。その他には、ワクチンを投与していた種鶏群で発生したカリフォルニア州における変異株を原因としたレオウイルス感染事例、カナダのブロイラーから分離されるレオウイルスをクラスター解析した結果、クラスター 2、4、5 及び 6 の野外ウイルスは現行ワクチンでは防除できないことが判明したこと、近年ジョージア州で分離されるレオウイルス野外株が S1 タンパクのシーケンスで 6 つに分類されてそれぞれの抗原性も異なっていること、カリフォルニア州で分離されたレオウイルスを分子遺伝学的に解析したところ細かく幾つかのクラスターや遺伝子型に分類されたことなどが報告さ

れました。WPDC AWARDS の昼食会後の午後のセッションは初めにセッション I 「ワクチネーション、飼養管理」を、その後セッション II 「細菌感染症」を聴講しました。「ワクチネーション、飼養管理」では、Ceva 社の IBron ワクチン (Ga08 株) のテイク確認は気管スワブよりも Cloanal Cleft スワブが高感度であることが紹介されました。さらに、シデロフォアレセプターとポリンを抗原とした家きんコレラに対するオイルアジュバントワクチンの有効性と、シデロフォアレセプターを抗原としたサルモネラオイルアジュバントワクチンの有効性が紹介されました。「細菌感染症」では、ミネソタ州で分離されたカンピロバクター分離株が薬剤耐性と分子疫学で幾つかのグループに分けられたこと、オーストラリアのコマーシャルブロイラーでは 14 日齢及び 21 日齢でカンピロバクターの汚染が広がっていること、ミシシッピ州のブロイラー農場で分離されたサルモネラの多くの株が 5～9 薬剤に耐性であったこと、バチルス属菌を含有する生菌製剤 Gallipro を *in ovo* で投与してもヒナに対して安全で孵化後はエンテロコッカスの腸管内定着を抑制する効果を示すことが発表されました。また、庭先養鶏などで飼育されるペット鶏を診療する獣医師の業務などについても紹介されました。

◇**第三日目**：「寄生虫、疫学」では、Dr. Mullens が吸血原虫の生態について詳細で総説的な講演を行いました。その他には、コクシジウムワクチン投与方法の改良として新しい組成のゲルを用いた方法がより効果的にワクチンテイクさせることが紹介され、またオレガノ抽出物を飼料添加することでコクシジウムの糞便中 OPG を低減することに成功した事例が紹介されました。

◇**ポスター発表**：ブロイラーでの食塩中毒事例、メキシコでの封入体肝炎事例、ND 及び IB ワクチンを投与した鶏の IgA の定量解析、ウズラにおいて致死性が高かった大腸菌症事例、核酸を卵内接種したヒナの孵化後のマクロファージの反応性に関する検討、強毒株に対する Vectormune ND の有用性、庭先養鶏に関する幾つかの情報などが紹介されました。

## 所感

私自身が WPDC に参加するのは、56th のラスベガス開催、58th のサクラメント開催を含めて 3 回目となりました。8 年前にサクラメントで開催された時と同じ会場だったので、当時ポスター発表した時に英語での質疑応答が大変だった事を思い出しま

した。当時もそうでしたが、WPDCはアメリカ、カナダ及びメキシコを中心とした鶏病・養鶏獣医師の集まりで、学会と言うよりも顔見知り獣医師が情報交換に集まった勉強会の様なアットホームな雰囲気を感じます。発表される演題も、最先端の研究や解析ではなく、現地調査の報告やより実践的な検討に関する紹介が中心で、臨床的な知識・情報の収集には良い機会だと思います。次回 67th WPDCは、2018年4月15～18日の日程でアメリカ・ユタ州・ソルトレイクシティのソルトレイクシティ・マリオット・シティ・センターで開催されます。

表1 プログラム全体と各セッション名

月 日	時 間	テ ー マ	
3月20日	7:50	Welcome; Opening Remarks	
	8:00-9:45	診断	
	10:15-12:00	診断 (続き)	
	13:30-15:00	鳥インフルエンザ、ニューカッスル病	
	15:30-16:45	ニューカッスル病、伝染性気管支炎、伝染性ファブリキウス嚢病、伝染性喉頭気管炎、マレック病	
	18:00	Welcome Reception	
3月21日	8:00-9:45	封入体肝炎、アストロウイルス	
	10:15-12:00	栄養学、レオウイルス	
	12:00-13:30	WPDC Awards Luncheon	
		Session I	Session II
	13:30-15:00	症例報告、細菌感染症	ワクチネーション、飼養管理
	15:30-16:45	細菌感染症	飼養管理、防疫対策
3月22日	8:00-10:45	寄生虫、疫学	
	10:45	Concluding Remarks; Adjourn	

## 学会参加記

# The 8th Asian Pig Veterinary Society Congress

場所：中国、武漢

会期：2017年5月12日～5月15日

大 嶋 篤

### 概要

2017年5月12日から15日に中華人民共和国(中国)の武漢市で開催されたアジア養豚学会(The 8th Asian Pig Veterinary Society Congress (APVS))に参加する機会を得ましたので、その概要について紹介いたします。

武漢市は中国、湖北省の東部に位置しており、経済的重要性から大幅な自治権を持つ副省級市に指定されている。日本からの渡航に際しては、成田空港から武漢天河国際空港まで約4時間(時差は約1時間)と、移動の負担はほとんど感じない近さであった。武漢天河国際空港に到着後、東湖付近にある学会会場まで約40kmをタクシーで移動した。その途中、揚子江(長江)を渡る二七長江大橋の上から見たその川の大きさと雄大さは、自分が今中国にいるということを強く感じさせる印象的なできごとであった。学会で用意してもらったホテル(インターナショナルホテルチューティアンガンドン)から会場までは約1.5kmの距離にあり、会場とホテル間はシャトルバスが運行されていた。周辺の治安も良く、会場からホテルまでの緑豊かな道のりを毎日歩いて移動することが可能であった(写真1)。

学会会場は、東湖国際会議場中心(写真2)で行

われ、中国全土から参加者が集まったこともあり、参加者約1,200人と非常に活気のある学会であった。学会会場での実質的運営については華中農業大学の学生が中心となって運営されている様であった。個人的な印象としては約7割が中国からの参加者であり、残りが他のアジアやヨーロッパからの参加者という印象であった。企業ブースは、日本でも聞きなれた海外企業から中国の国内企業まで20程度の企業が出展しており、期間中を通して多くの人で賑わっていた。

講演会場は約1,200人収容可能な大ホールが1つと400人程度収容可能な小ホールが3つ用意されて



写真1 学会会場とホテルの間の道のり





写真2 East Lake International Conference Center (学会会場)の入口

おり、朝は大ホールのみで講演が行われ、昼食後に小ホールで並行してセッションが行われた。ポスター発表は235題であり、発表会場はメインの講演が行われている会場の上の2階に設置されていた。学会では、養豚に関する様々な報告が行われ、主には微生物由来の疾病であり、その疾病に対するワクチン及び抗生物質の利用について報告されていた(表1)。

学会初日にリージョンレポートとして中国、日本、大韓民国(韓国)、フィリピン、タイ、ベトナム及び台湾から発表された各国の疾病状況や、養豚あるいは豚肉に関する経済情報について、本稿でその概要(特に中国、韓国、フィリピン、ベトナム及び台湾)を紹介する。

### 学会内容紹介

中国では、豚の飼養頭数は2015～2016年で約4億頭であり、若干減少傾向にある様であった。疾病としては、狂犬病、豚コレラ(CSF)、豚繁殖呼吸障害症候群(PRRS)、豚流行性下痢(PED)、豚伝染性胃腸炎(TGE)、豚口ウイルス(PoRV)及び豚サーコウイルス2型(PCV2)等のウイルス性の疾病についての発表に多くの時間が割かれていた。PCV2については遺伝子型の情報も提供され、2015～2016年にかけて割合の変化はあるものの、2b及び2dが70%以上の割合で検出されていた。また、新たな遺伝子型であるPCV3が2017年に検出されたことも報告された。細菌性疾病としては、*Streptococcus suis* (*S. suis*) 及び *Haemophilus parasuis* (*Hps*) の血清型の分布について述べられ、*S. suis* では血清型2が最も多く、次いで7、9、3、1及び5が認められ、*Hps* では血清型5が最も多く、次いで4、13、12、14、10及び1が認められるとのことであった。

韓国では、2011年の口蹄疫によって、農家数及び豚の飼養頭数が減少し、その後豚の飼養頭数は持

ち直したものの、農家数は、減少傾向にあり養豚の大規模化が進んでいるとのことであった。韓国内で消費される肉としては豚肉が最も多いこともあり、韓国内の1人当たりの豚肉消費量は年々増加している(2011年の約1.2倍)。疾病としては、PRRSが最も注目されており、年間でかなりの損失を生じている。細菌性疾病では、浮腫病や *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) の情報提供が行われ、Appについては、分離株中の血清型の割合が2008年～2010年頃は5型、2型、1型の順で分離率が高かったのに対して、近年では1型が非常に多く認められるようになったという発表が個人的に興味深かった。また、記憶に新しいこととして、2017年に口蹄疫の再発があり、韓国内での伝播の経緯等が発表された。

フィリピンでは、豚肉の需要は高く、生産量は年々増加傾向にあり、その増加に関するロードマップが示されていた。疾病としてはやはり、PRRSが注目されており、次いで、CSFやPCV2といったウイルス性疾病があがっていた。また、発表の多くを薬剤耐性菌の問題にさいており、その対策に力を入れていることが伺われた。

ベトナムでは、肉製品(鶏、豚及び牛)全体の消費量が増加傾向にあり、豚肉の消費量はその半分を占める割合であった。一方、そのkg当たりの生産

表1 プログラムの概要

月日	時間	テーマ
5月12日	15:30-17:30	APVS 委員会
	18:30-20:30	ウェルカムディナー
5月13日	9:00-12:00	オープニングセレモニー キーノートプレゼンテーション カントリー/リージョンレポート (中国、日本、韓国、フィリピン、タイ、ベトナム、台湾)
	13:30-15:30	パラレルセッション トピック1:呼吸器疾病 トピック2:消化器疾病 トピック3:繁殖疾病
	16:00-18:00	サテライトミーティング
5月14日	8:30-12:00	プレナリーセッション 1. PRRS (中国での現状) 2. <i>S. suis</i> (疫学と病原性について) 3. PCV (拡大と変化について) 4. 疾病管理の改善について
	13:30-15:30	トピック1:ウイルス性疾病 トピック2:細菌性疾病 トピック3:豚寄生虫疾病及びその他
	16:00-18:00	サテライトミーティング
5月15日	9:30-11:50	プレナリーセッション 1. PEDの制御について 2. 狂犬病の予防及び制御 3. 人獣共通感染症の出現と再興 4. バイオセキュリティを用いた疾病制御と予防
	13:30-16:00	1. 食用動物への抗生物質の使用 2. バイオセキュリティを利用した抗菌剤使用量の削減 3. 中国での養豚産業の拡大
	16:20-17:30	クロージングセレモニー
	18:00-19:00	ファラウェルディナー

コストは他国と比べて高く、今後の課題であると思われる。養豚産業においても10頭程度のバックヤード養豚から、小～中規模（母豚5～20頭、肥育豚30～100頭）の養豚へとシフトしている様であり、豚肉の消費量の推移から考えても、今後の養豚産業は他国同様の大規模養豚へとシフトして行くと考えられる。疾病については、2016年の口蹄疫のアウトブレイク（政府からの補助によってワクチン接種が行われた）、PRRS（ヨーロッパ型及び北米型）、PED及びTGEウイルスの陽性率、PCV2の陽性率等のウイルス性疾患について現状が報告された。PCV2では、その陽性率がベトナムの北部（少ない）と南部（多い）で異なるといった発表であった。

台湾では、1人当たりの肉製品（豚肉含む）の消費量に大きな変化はなく、豚の飼養頭数は近年減少している様であった。豚の生産性に影響を与える疾病として繁殖に関するものではPRRS、パルボウイルス及び日本脳炎、子豚ではTGE、大腸菌、PED、

PoRV、育成豚ではPRRS、PCV2、マイコプラズマ等に加え、それらの複合疾病としての豚呼吸器病候群、豚コレラ、口蹄疫等が挙げられた。

### 所感

本学会の開催において、私自身はAppワクチンに関する研究成果をポスター発表する機会を得ることができ、その発表準備、外国への渡航、発表と普段経験することができない、非常に刺激的な時間を過ごすことができました。学会初日の登録の際には自分自身の不備もあり、運営の方々（おそらく華中農業大学の学生の方と思われる）に非常に丁寧かつ、手厚い対応をして頂いたことをこの場を借りて御礼申し上げたいと思います。

次回のAPVSは2019年に韓国、釜山で行われる予定であり、すでにホームページがアップされています。

## お詫びと訂正

日生研たより2017年7月号の記載に誤りがありました。正しくは以下の通りです。

P.8 (誤) mAbs 及び Apx I を組み合わせた (正) Mabs 及び Apx I を組み合わせた

P.9 (誤)

Shimatsu Y<sup>1)</sup>, Horii W<sup>1)</sup>, Nunoya T<sup>1)</sup>, Iwata A<sup>1)</sup>, Fan J<sup>1)</sup>, Ozawa M<sup>1)</sup>.

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

(正)

Shimatsu Y<sup>1)</sup>, Horii W<sup>1)</sup>, Nunoya T<sup>2)</sup>, Iwata A<sup>2)</sup>, Fan J<sup>3)</sup>, Ozawa M<sup>4)</sup>.

1) NIBS Laboratory Animal Research Station, Nippon Institute for Biological Science, 3331-114 Kamisasao, Kobuchisawa, Hokuto, Yamanashi 408-0041, Japan

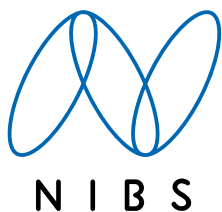
2) Headquarters, Nippon Institute for Biological Science, 9-2221-1 Shinmachi, Ome, Tokyo 198-0024, Japan

3) Department of Molecular Pathology, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi, 1110 Shimokato, Chuo, Yamanashi 409-3898, Japan

4) Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima-city, Kagoshima 890-8520, Japan

P.17 (誤) 藤原哲夫 (正) 藤井哲夫

読者の皆様ならびに関係各位にご迷惑をおかけしましたことをお詫びするとともに、ここに訂正させていただきます。



—— テーマは「生命の連鎖」——

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

表紙題字は故中村稔治博士の揮毫

日生研たより 昭和30年9月1日創刊(年4回発行)  
 (通巻605号) 平成29年9月25日印刷 平成29年10月1日発行(第63巻第4号)  
 発行所 一般財団法人 日本生物科学研究所  
 〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目2221番地の1  
 TEL: 0428(33)1520(企画学術部) FAX: 0428(33)1036  
 http://nibs.lin.gr.jp/  
 発行人 草薙公一  
 編集室 委員/近内将記(委員長)、手島香保、小野浩輝  
 事務/企画学術部  
 印刷所 株式会社 精興社  
 (無断転載を禁ず)