

D . 微生物学分科会

シンポジウム

3月30日(日) 9:00~11:45 弥生講堂

病原微生物の宿主感染機構と病原性

D-S-1 - 5

3月30日 9:00 -11:45

岡田信彦 (北里大) 小沼操 (北大)

- D-S-1 腸管病原性大腸菌のタイプ III 分泌装置の高次構造とその機能
阿部章夫¹ (¹北里大・北里生命研)
- D-S-2 *Bordetella bronchiseptica* のタイプ III 分泌機構依存性エフェクター蛋白質の機能解析
桑江朝臣¹ (¹北里大・北里生命研)
- D-S-3 *Salmonella* のタイプ III 分泌機構を介した生体防御からのエスケープ機構
岡田信彦¹ (¹北里大)
- D-S-4 ポリオウイルスの病原性発現機構
野本明男¹ (¹東大院・医・微生物)
- D-S-5 リバースジェネティクスを用いた狂犬病ウイルス病原性の解析
森本金次郎¹ (¹国立感染研・ウイルス第1部)

ワークショップ

3月31日(月) 10:00~12:00 弥生講堂

プロバイオティクスは抗生物質に代わりうるか?

D-W-1 - 5

3月31日 10:00 -12:00

伊藤喜久治 (東大) 中澤宗生 (動衛研)

- D-W-1 プロバイオティクスの現状と有効性
伊藤喜久治¹ (¹東大院・農・獣公衛)
- D-W-2 ビフィズス菌の腸管免疫調節作用およびロタウイルス感染防御作用
保井久子¹ (¹ヤクルト中研)
- D-W-3 牛腸管からの大腸菌 O157 排除を目的とした生菌剤の開発
大宅辰夫¹、秋庭正人¹、伊藤博哉¹ (¹動衛研・九州)
- D-W-4 鶏における競合排除 (CE) 製品の抗サルモネラ作用
中村政幸¹ (¹北里大・家禽疾病)
- D-W-5 乳酸菌を応用した感染症対策
五十君静信¹ (¹国衛研)

一般口演

3月30日(日) 9:00~11:40 第2会場

DI-1 - 16

3月30日 9:00-9:30

間陽子 (理研)

DI-1 ウシラクトフェリンのイヌヘルペスウイルスに対する抗ウイルス作用
田仲哲也¹、中谷彰吾¹、玄学南²、玖村朗人¹、五十嵐郁男²、島崎敬一¹
(¹北大・農・酪農科学、²帯畜大・原虫研)

DI-2 イヌ Mx タンパク質の機能的解析
中村鉄平¹、浅野淳¹、高在弘¹、昆泰寛¹、高田礼人²、渡辺智正³、安居院高志¹
(¹北大院・獣・実験動物、²東大・医科研・ウィルス感染、³北大院・農・家畜改良増殖)

DI-3 ネコインターフェロン- の大腸菌系における発現および抗ウイルス活性
平修¹、水野睦子¹、佐藤久聡¹、中野克重¹、荒井節夫²、前原信敏¹
(¹北里大・獣医微生物、²北研)

3月30日 9:30-9:50

廣田好和 (動衛研)

DI-4 ブドウ球菌性エンテロトキシン-C(SEC)によるウシ乳汁細胞での TNF 依存性の NO 産生誘導機構
小峯健一¹、黒石智誠¹、小峯優美子¹、小林仁²、鎌田信一³、熊谷勝男¹
(¹ティーセル研、²宮城農短大、³日獣大)

DI-5 単核球への刺激を介したブドウ球菌性エンテロトキシン-C (SEC) による多形核白血球 (PMN) の活性化
黒石智誠¹、小峯健一¹、小林仁²、鎌田信一³、熊谷勝男¹ (¹ティーセル研、²宮農短大、³日獣大)

3月30日 9:50-10:10

後飯塚僚 (東京理科大)

DI-6 さとうきび抽出物質(SCE)によるエンドトキシンショックの防御効果
本部真樹¹、羅基貞²、アメールサイド¹、古家健二³、廣田好和¹
(¹動衛研、²動衛研・韓国忠北大学校、³新三井製糖(株)茅ヶ崎研究所)

DI-7 Effect of sugar cane extracts (SCE) on *in vitro* immunoglobulin production in dogs
羅基貞¹、アメールサイド²、本部真樹²、古家健二³、廣田好和²
(¹動衛研・韓国忠北大学校、²動衛研、³新三井製糖(株)茅ヶ崎研究所)

3月30日 10:10-10:30

国保健浩 (動衛研)

DI-8 血球ステージのマウスマラリア *Plasmodium berghei* 感染によって誘導される肝細胞傷害性細胞について
安達圭志¹、筒井ひろ子¹、中西憲司¹
(¹兵庫医大、免疫・医動物)

DI-9 初乳および初乳中サイトカインによるウシ新生子末梢血単核球のNK細胞活性の増強
山中仁木¹、萩原克郎¹、桐沢力雄¹、岩井滋¹
(¹酪農大・獣医微生物)

3月30日 10:30-10:50

阪口雅弘 (感染研)

DI-10 IL-4 変異体によるアレルギー性疾にたいする患遺伝子免疫療法
保富康宏¹
(¹三重大・医・生体防御)

DI-11 豚インターロイキン4の組換えタンパク発現とモノクローナル抗体の作製
石倉洋司¹、安達聡¹、加藤大智¹、岩田祐之¹
(¹山口大・家畜衛生学教室)

3月30日 10:50 -11:20

保富康宏 (三重大)

DI-12 ヨーネ菌 PPD に対するウシマクロファージのサイトカイン遺伝子発現のリアルタイム PCR による解析
彦野弘一¹、平山祥代¹、オドンゲリル¹、竹原一明²、森康行³、Buza Joram J.⁴、Bari Abusaleh M.⁴、
舒宇静¹、百溪英一¹
(¹動衛研・ヨーネ病チーム、²北里大・家禽疾病、³動衛研・免疫機構、⁴生研機構)

DI-13 ブタ胸腺及び末梢血リンパ球 cDNA ライブラリーの EST データベース構築による免疫系分子の網羅的同定
上西博英¹、鈴木恒平²、沢崎哲哉²、土岐大輔²、新開浩樹²、宗田吉広³、浜島紀之¹、粟田崇¹
(¹生物研、²STAFF 研、³動衛研)

DI-14 ブタ IL-21 のクローニングと発現およびマッピング
菊間礼子¹、宗田吉広¹、上西博英²、山本竜司²、田中麻衣子³、浜島紀之²、粟田崇²、
吉原一浩¹、森康行¹ (¹動衛研、²農業生物資源研究所、³STAFF)

3月30日 11:20 -11:40

林俊春 (山口大)

DI-15 ブタ *Mycoplasma hyopneumoniae* 感染における IL-18 の役割
宗田吉広¹、下地善弘¹、横溝祐一¹、森康行¹ (¹動衛研)

DI-16 カイコからのブタ IL18 の精製法の確立
長屋英和¹、宗田吉広²、榎本知晃¹、松本沙矢香¹、森康行²
(¹片倉工業・中央蚕研、²動物衛生研究所)

3月30日(日) 13:00~17:40 第2会場
DI-17 - 18, DB-1 - 26

3月30日 13:00 -13:20

小沼操 (北大)

DI-17 寄生虫駆除剤暴露ニジマスにおける血清中 C 反応性蛋白濃度の変動
松岡佑次¹、劉有昌¹、岩崎忠¹、渡来仁¹、児玉洋¹ (¹大阪府大・獣医免疫)

DI-18 組み換えイヌ上皮細胞増殖因子の発現と生物活性
田崎穂波¹、大屋賢司¹、大橋和彦¹、小沼操¹ (¹北海道大・獣医・感染症)

3月30日 13:20 -13:40

関崎勉 (動衛研)

DB-1 志賀毒素 2 型遺伝子保有ファージ溶原化による大腸菌 K-12 株の変異に関する研究
井口純¹、大澤朗¹、高木道浩²、伊豫田淳³、寺嶋淳³、渡辺治雄³
(¹神戸大・自然科学、²神戸大・農、³国立感染症研)

DB-2 牛由来黄色ブドウ球菌における表皮剥脱毒素のファージ変換
遠藤陽子¹、山田智子¹、松永和恵¹、早川裕二²、海藤敏雄¹、竹内正太郎¹
(¹福井県立大、²石川県南部家保)

3月30日 13:40 -14:00

磯貝恵美子 (北医大)

DB-3 日本で人から分離された腸管スピロヘータの遺伝学的解析と新種としての *Brachyspira ibaraki* の提唱
立花英寛¹、足立吉数¹、中村真一² (¹茨大・農、²岩手医科大学)

DB-4 A new point mutation associated with tylosin-resistance of Japanese canine intestinal spirochetes.
プラパサラクルヌビー¹、足立吉数¹、小川恭喜¹ (¹茨大・農)

3月30日 14:00-14:20

阿久澤正夫 (鹿児島大)

DB-5 *Leptospira interrogans* 共通抗原に対するモノクローン抗体を用いた抗原検出法の確立
伊藤睦美¹、迫田義博¹、潮田道子¹、井藤勇輝¹、喜田宏¹ (¹北大獣医)

DB-6 *Leptospira interrogans* 共通抗原 LipL32 に対する抗体検出 ELISA の確立
潮田道子¹、迫田義博¹、伊藤睦美¹、井藤勇輝¹、喜田宏¹ (¹北大獣医)

3月30日 14:20-14:50

児玉洋 (大阪府大)

DB-7 北西太平洋に棲息する鯨類におけるブルセラ症の血清学的、病理学的調査
大石和恵¹、銭谷亮子²、坂東武治²、後藤義孝³、内田和幸³、丸山正¹、山本三郎⁴、宮崎信之⁵、藤瀬良弘²
(¹海洋科学技術センター、海洋生態、²日本鯨類研究所、³宮崎大学、農学部、⁴感染研、細菌、⁵東大、海洋研)

DB-8 ぶり 溶血性レンサ球菌症不活化ワクチン安全・力価試験法の統一化の検討
松田路子¹、吉田照豊²、能田健¹、鈴木祥子¹ (¹動薬検、²宮崎大学・農学部)

DB-9 過去 11 年間に分離された豚丹毒菌約 800 株の血清型別および血清型 1a 型菌のアクリフラビン耐性試験と遺伝子型別
今田由美子¹、高瀬相²、早川裕二³、赤地重宏⁴
(¹動衛研・製剤センター、²富山県東部家保、³石川県南部家保、⁴三重県中央家保)

3月30日 14:50-15:10

竹内正太郎 (福井県立大)

DB-10 馬の生殖器由来 *Klebsiella pneumoniae* K1 分離株の分子疫学調査-1980 年代の子宮炎流行株の PFGE 像の解析-
高井伸二¹、猪鼻聡¹、吉田喜一郎¹、角田勤¹、椿志郎¹、樋口徹²、菊池直哉³、安斉了⁴
(¹北里大・獣医衛生、²日高農済、³酪農学園大・獣医伝染病、⁴日本中央競馬会総研)

DB-11 黄色ブドウ球菌同定用 PCR プライマーの検討ならびに北海道全域から収集した牛乳房炎乳由来黄色ブドウ球菌の毒素遺伝子および産生毒素について
秦英司¹、勝田賢²、小林秀樹¹、江口正志¹ (¹動衛研、²動衛研・七戸)

3月30日 15:10-15:40

長井伸也 (日生研)

DB-12 弱毒化 *Salmonella typhimurium* を用いた DNA ワクチンデリバリーシステムの検討
隈部志野¹、芳賀 猛¹、後藤義孝¹、村山丹穂¹、清水 佑也¹、松井英則²、宮田博規³、三浦智行⁴
(¹宮崎大・家畜微生物、²北里大・北里生命科学研、³産業医科大・動物研究センター、⁴京都大・ウイルス研)

DB-13 Secreted proteins of the multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104
Ngwai Yakubu¹、越智幸三²、足立吉数¹ (¹茨城大学・農、²食品総合研究所)

DB-14 Characterization of the 39kDa protein of avian *Pasteurella multocida* by monoclonal antibody

アルハジ アリフサム¹、澤田 拓士¹、ボラテバイアントマック¹、新中須亮¹、片岡康¹、
畠山仁²、大槻紀之³、伊藤治³

(¹日獣大・獣医微生物、²日獣大・比較細胞生物、³農水省・動薬検)

3月30日 15:40-16:10

中馬猛久 (鹿児島大)

DB-15 動物病院に来院したイヌ及びネコより分離された腸球菌の薬剤感受性

辻 登¹、村瀬敏之¹、大槻公一¹

(¹鳥取大・農・家畜微生物)

DB-16 国内における家畜由来細菌(指標菌)の抗菌性物質感受性調査(平成13年度)

小島明美¹、石原加奈子¹、江寄英剛¹、白木早苗¹、秋元京子²、佐藤剛²、田村豊¹、高橋敏雄¹

(¹農水省動薬検、²(独)肥飼検)

DB-17 平成13年度国内における家畜由来カンピロバクターの抗菌剤感受性調査と疫学解析

石原加奈子¹、小島明美¹、江寄英剛¹、白木早苗¹、田村豊¹、高橋敏雄¹(¹農水省動薬検)

3月30日 16:10-16:40

片岡康 (日獣大)

DB-18 溶血性レンサ球菌症の豚における実験感染系の検討

宇都岳彦¹、藤井誠一¹、岡田宗典¹、向井哲哉¹、小野雅章¹、柴田勲¹、阪野哲也¹、佐藤静夫¹

(¹全農家衛研)

DB-19 既報のプラーマーを用いた腺疫PCR診断法の構築とその評価

安斉了¹、桑本康¹、帆保誠二¹、片山雅一²、深山美和子²、古屋聡子²

(¹JRA 総研・栃木、²千葉県北部家保)

DB-20 腺疫菌 M-like proteins のエピトープ解析

帆保誠二¹、安斉了¹、桑本康¹、和田隆一¹

(¹JRA 総研・栃木)

3月30日 16:40-17:10

中澤宗生 (動衛研)

DB-21 コッコエースの豚大腸菌症に対する効果試験

西村昌晃¹、丸山賀子¹、田中裕美²、鈍宝宗彦²、村松昌武¹

(¹(財)畜安研、²ユニチカ株式会社)

DB-22 静脈内接種感染実験モデルにおけるヨーネ菌の動態

西森敬¹、内田郁夫¹、田中聖¹、江口正志²、西森知子¹、福田茂夫²、菊佳男³、岡田洋之³、
吉野知男³

(¹動衛研・北海道、²動衛研、³道立畜試、⁴酪農大・病理)

DB-23 インターフェロン・ガンマ検出によるヨーネ病の早期診断

森康行¹、菊間礼子¹、宗田吉広¹、吉原一浩¹、犬丸茂樹¹、横溝祐一¹

(¹動衛研)

3月30日 17:10-17:40

澤田拓士 (日獣大)

DB-24 *Pasteurella multocida* 野外分離株を用いた牛感染試験

石黒加世子¹、北島崇¹、福山新一¹

(¹(株)微生物化学研究所)

DB-25 豚 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 血清型 11 感染症の発生例と分離菌株の病原性

手塚喜代美¹、鈴木隆春¹、松本浩二¹、天野弘²(¹静岡県・中部家保、²静岡県・家畜衛生室)

DB-26 SCID マウスにおける *Coxiella burnetii* 株間の病原性解析

安藤匡子¹、長縄崇²、堀田明豊¹、山口剛士²、福士秀人²、平井克哉²

(¹岐阜連大・応用獣医、²岐阜大・家畜微生物)

3月31日(月) 9:00~12:00 第2会場
DV-1 - 18

3月31日 9:00 -9:20

松村富夫 (JRA 総研)

DV-1 ウマヘルペスウイルス1型野外変異株のウイルス性状の解析と変異遺伝子の検索

細井裕香¹、桐沢力雄¹、岡本実²、谷山弘行²、角田修男³、萩原克郎¹、岩井澁¹

(¹酪農大・獣医微生物、²酪農大・獣医病理、³社台コーポレーション)

DV-2 ウマヘルペスウイルス1型テグメントタンパク質 ORF-13 遺伝子組換えウイルスの作製および性状解析
オチルバグマジャブ¹、福士秀人²、山口剛士²、平井克哉²

(¹岐阜連大・応用獣医、²岐阜大・家畜微生物)

3月31日 9:20 -9:50

桐沢力雄 (酪農大)

DV-3 ウマヘルペスウイルス1型(EHV-1)膜糖蛋白 gE 遺伝子欠損株の生ワクチンとしての接種量検討試験

辻村行司¹、塩瀬友樹¹、近藤高志¹、松村富夫¹

(¹JRA 総研・栃木)

DV-4 ウマヘルペスウイルス9型糖蛋白質 gI および gE 組換え体のウイルス学的性状

久保田太郎¹、福士秀人¹、松村富夫²、山口剛士¹、平井克哉¹

(¹岐阜大・家畜微生物学、¹JRA 総研・栃木)

DV-5 ヘルペスウイルス gB の -helix 領域ペプチドによるウイルスの増殖阻害

岡崎克則¹、喜田宏¹

(¹北大・獣医・微生物)

3月31日 9:50 -10:20

今井邦俊 (動衛研)

DV-6 マレック病ウイルス血清型1接種鶏におけるNKレセプターの解析

高木道浩¹、張景洙²、大橋和彦²

(¹神戸大・農、²北大・獣医・感染症)

DV-7 マレック病由来腫瘍細胞株におけるMeqタンパク質の解析

岡田宰¹、張景洙²、大橋和彦²、小沼操²、高木道浩¹

(¹神戸大・農、²北大・獣医・感染症)

DV-8 マレック病ウイルス glycoprotein B 特異的イムノトキシンの構築

中村愛¹、李成一¹、大橋和彦¹、小沼操¹

(¹北海道大・獣医・感染症)

3月31日 10:20 -10:50

間陽子 (理研)

DV-9 ブタ内在性レトロウイルスのレセプター

宮沢孝幸¹

(¹JST・PRESTO・生体と制御、大阪大・微生物病研究所・エマージング感染症研究センター)

DV-10 日本国内における牛白血病ウイルス genotype の分布

Asfaw F. Yilka¹、都筑智子³、小西美佐子²、坪井孝益²、呉東来⁴、泉對博²

(¹JICA、²動衛研、³茨城県北家保、⁴ハルビン獣医研)

DV-11 ウシ アダプチンの BLV 受容体としての機能の評価

鈴木孝子¹、松原豊²、木谷裕³、小山卓美¹、池田秀利⁴

(¹動衛研・免疫研究部、²動衛研・企画調整部、³生物資源研・動物生命研、⁴動衛研・感染病研究部)

3月31日 10:50-11:10

小山卓美 (動衛研)

DV-12 BLV 産生細胞におけるアポトーシス制御

高橋雅彦¹、田島茂¹、岡田幸助²、間陽子¹ (¹理研・分子ウイルス、²岩手大・農)

DV-13 ウシ白血病ウイルス(BLV)の再活性化機構の解析

田島茂¹、間陽子¹

(¹理研・分子ウイルス)

3月31日 11:10-11:30

泉對博 (動衛研)

DV-14 モノクローナル抗体による牛白血病ウイルス表面抗原 gp51 の検出

若本裕晶¹、森田裕¹、高橋雅彦²、間陽子² (¹チッソ(株)・横浜研、²理研・分子ウイルス)

DV-15 牛白血病ウイルス(BLV) Env に対する抗体反応性とウシ MHC クラス II DR 抗原との相関性

竹嶋伸之輔¹、嘉村浩美¹、若本裕晶²、田島茂¹、今内覚³、森田裕²、小沼操³、岡田幸助⁴、間陽子¹

(¹理研・分子ウイルス、²チッソ(株)・横浜研、³北大・獣医、⁴岩大・獣医)

3月31日 11:30-12:00

宮沢孝幸 (阪大)

DV-16 国内で発生した山羊関節炎・脳脊髄炎 - 感染状況の調査と発症山羊からのウイルス分離 -

都筑智子¹、小西美佐子²、坪井孝益²、芳川恵一³、小林千穂³、泉對博²

(¹茨城県県北家保、²動衛研、³長野県松本家保)

DV-17 short interfering RNAs (siRNAs) による FIV 特異的遺伝子発現抑制

馬場健司¹、水越文徳¹、堀内弘司¹、増田健一¹、大野耕一¹、辻本元¹ (¹東大・獣医内科)

DV-18 サルノヒト免疫不全キメラウイルス強毒・弱毒分子クローンの塩基配列と増殖能との関連

三浦智行¹、阪井弘治²、篠原克明²、高橋栄治²、コズレフユリ¹、鈴木元¹、伊吹謙太郎¹、速水正憲¹

(¹京大ウイルス研、²感染研)

3月31日(月) 15:00~18:20 第2会場

DV-19 - 38

3月31日 15:00-15:30

高田礼人 (東大医科研)

DV-19 ウイルス回収効率の高い狂犬病ウイルス感染性 cDNA 作製系の確立

伊藤直人¹、高山睦代²、山田健太郎²、細川淳二²、杉山誠¹、源宣之¹

(¹岐阜大・獣医公衆衛生、²岐阜大・大学院連合獣医学研究科)

DV-20 狂犬病ウイルス RC-HL 株の N および G 遺伝子は弱毒に関与する

山田健太郎¹、伊藤直人²、高山睦代¹、細川淳二¹、杉山誠²、源宣之²

(¹岐阜大・連合獣医学研究科、²岐阜大・獣医公衆衛生)

DV-21 狂犬病ウイルスの成熟マウスでの致死感染に関与するアミノ酸の特定

高山睦代¹、伊藤直人²、山田健太郎¹、細川淳二¹、清水健太²、杉山誠²、源宣之²

(¹岐阜大・連合獣医学研究科、²岐阜大・獣医公衆衛生)

3月31日 15:30-16:00

村上洋介 (動衛研)

DV-22 外来遺伝子発現組換え麻疹ウイルスの作出

関貴弘¹、小原恭子¹、泉光輔¹、池田房子¹、小原道法²、三浦竜一¹、甲斐知恵子¹

(¹東大医科研・実験動物、²東京都臨床研・感染生体防御)

DV-23 バキュロウイルス発現系による牛疫ウイルス P 蛋白の作製

金井もえ子¹、米田美佐子¹、藤田賢太郎²、郡山尚紀¹、甲斐知恵子¹

(¹東大医科研・実験動物、²ニューヨーク州立大学)

DV-24 牛疫ウイルス Lv 株を用いた新 reverse genetics 系の確立

米田美佐子¹、関貴弘¹、池田房子¹、三浦竜一¹、小原恭子¹、甲斐知恵子¹

(¹東大医科研・実験動物)

3月31日 16:00-16:30

望月雅美 (共立製薬)

DV-25 CDV 感染による ACAT 転写活性の上昇とコレステロールエステルの蓄積

星美穂¹、米田美佐子¹、勝尾知恵¹、久樹晴美²、島崎弘幸²、小原恭子¹、甲斐知恵子¹

(¹東大医科研・実験動物、²帝京大学・医学部・第一生化学)

DV-26 イヌジステンパーウイルス N 蛋白の核移行シグナルの同定

佐藤宏樹¹、三浦竜一¹、小原恭子¹、甲斐知恵子¹ (¹東大・医科学研究所・実験動物研究施設)

DV-27 EGFP-CDV を用いたイヌ海馬におけるウイルス動態の観察

郡山尚紀¹、藤田賢太郎¹、佐藤宏樹¹、三浦竜一¹、小原恭子¹、甲斐知恵子¹

(¹東大医科研・実験動物)

3月31日 16:30-16:50

土屋耕太郎 (日生研)

DV-28 犬ジステンパー迅速診断法の開発

丹生重光¹、高山勝好¹、翁韜¹、山口良二²、小林行治¹ (¹アドテック(株)、²宮崎大・農)

DV-29 犬ジステンパーとコロナウイルス感染症の Real-Time RT-PCR 診断

橋本美知留¹、羽島隆之¹、大内敦夫¹、望月雅美¹

(¹共立製薬・臨微研)

3月31日 16:50-17:10

坂口正士 (化血研)

DV-30 Molecular characterization of the nucleocapsid protein gene of Newcastle disease virus strains in Japan and development of a restriction enzyme-based rapid pathotyping method

ファンハンミン¹、張景洙¹、真瀬昌司²、大橋和彦¹、小沼操¹

(¹北海道大・獣医・感染症、²動衛研)

DV-31 水禽由来ニューカッスル病ウイルスの鶏に対する病原性獲得機序と HN 蛋白の機能

于聖青¹、伊藤啓史¹、大友麗¹、岸田典子²、大槻公一¹、河岡義裕³、喜田宏²、伊藤壽啓¹

(¹鳥大、²北大、³東大医科研)

3月31日 17:10-17:40

堀本泰介 (東大医科研)

DV-32 中国産輸入家きん肉からのニューカッスル病ウイルス及び H9N2 亜型インフルエンザウイルスの分離と分離株の性状

衛藤真理子¹、真瀬昌司²、岸田典子³、米川和宏¹、高橋周子¹、喜田宏³、須永裕¹

(¹動物検疫所、²(独)動物衛生研究所、³北大獣医)

DV-33 中国産輸入家きん肉から分離された H9N2 インフルエンザウイルスのニワトリに対する病原性

岸田典子¹、衛藤真理子²、須永裕²、喜田宏¹ (¹北大獣医、²動物検疫所)

DV-34 強毒インフルエンザウイルスは血液凝固不全を引き起こす

村本裕紀子¹、尾崎弘一¹、高田礼人²、朴天鎬³、寸田祐嗣³、梅村孝司³、河岡義裕²、喜田宏¹

(¹北大獣医・微生物、²東大医科研・ウイルス感染、³北大獣医・比較病理)

3月31日 17:40-18:00

伊藤壽啓 (鳥取大)

DV-35 A型インフルエンザウイルス蛋白質発現において、コザック則は重要か?

前田寧子¹、堀本泰介¹、五藤秀男¹、高田礼人¹、河岡義裕¹ (¹東大医科研・ウイルス感染)

DV-36 A型インフルエンザウイルスの NS2 蛋白質に存在する NES 様配列の機能解析

堀本研子¹、堀本泰介¹、河岡義裕¹ (¹東大・医科研・ウイルス感染)

3月31日 18:00-18:20

山口成夫 (動衛研)

DV-37 A型インフルエンザウイルス粒子への M vRNA 分節の取り込み機構

前田潤子¹、河岡義裕¹ (¹東大医科研・ウイルス感染)

DV-38 インフルエンザウイルスのパッケージングを視る

野田岳志¹、相良洋²、喜田宏¹、河岡義裕³

(¹北大獣医・微生物、²東大医科研・微細形態、³東大医科研・ウイルス感染)

4月1日(火) 9:00~12:10 弥生講堂

DV-39 - 57

4月1日 9:00-9:30

吉田和生 (動衛研)

DV-39 2001年に鹿児島県で発生したチュウザン病

中嶋久仁子¹、藏園光輝¹、鬼塚剛¹、田崎道弘¹、大橋誠一²、津田知幸²

(¹鹿児島中央家保、²動衛研九州)

DV-40 競合 ELISA によるイバラキウイルス感染血清とブルータングウイルス感染血清間での類属反応の解消

清水眞也¹、後藤義之¹、豊田勇夫²、有島太一³

(¹動衛研、²長崎県南家保、³佐賀県中部家保)

DV-41 わが国及び台湾における家禽血清のフラビウイルス属ウイルスに対する抗体動向

後藤義之¹、清水眞他¹、鄭明珠²、蕭終融²、有島太一³、豊田勇夫⁴

(¹動衛研、²台湾家衛試、³佐賀県中部家保、⁴長崎県南家保)

4月1日 9:30-9:50

中村成幸 (動薬検)

- DV-42 わが国で分離された牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)の異なる5遺伝子領域における系統樹解析
長井誠¹、林みち子²、杉田繁夫³、迫田義博⁴、森正之⁵、村上俊明²、小澤正¹、山田直樹¹、
明石博臣⁶
(¹石川県北部家保、²石川県南部家保、³JRA 総研栃木、⁴北大・獣医微生物、
⁵石川県農業短大・農業資源研、⁶東大・獣医微生物)

- DV-43 北海道内で近年分離された牛ウイルス性下痢ウイルスの遺伝子型の多様性
迫田義博¹、玉井久三¹、浅野明弘²、森田大輔³、菅野宏⁴、喜田宏¹
(¹北大獣医、²北海道網走家保、³北海道十勝家保、⁴北海道上川家保)

4月1日 9:50-10:10

福所秋雄 (動衛研)

- DV-44 牛ウイルス性下痢ウイルスの遺伝子組換えによる病原性の獲得とその組換え部位の多様性
亀山健一郎¹、迫田義博¹、玉井久三¹、長井誠²、明石博臣³、泉對博⁴、喜田宏¹
(¹北大獣医微生物、²石川県北部家畜保健衛生所、³東大獣医、⁴動物衛生研究所)
- DV-45 牛ウイルス性下痢ウイルス非構造蛋白 NS3 に対するモノクローン抗体によるペスチウイルス属
共通エピトープの検出
玉井久三¹、迫田義博¹、青木博史²、中村成幸²、喜田宏¹ (¹北大獣医、²動薬検)

4月1日 10:10-10:40

菅野徹 (動衛研)

- DV-46 猫伝染性腹膜炎ウイルスのマクロファージ指向性決定領域の同定
中村一哉¹ (¹阪大微研・エマ研、²コトレヒト大学)
- DV-47 乳のみマウスの口蹄疫ウイルス O/JPN/2000 株に対する感受性
森岡一樹¹、加来義浩¹、山川睦¹、山添麗子¹、吉田和生¹、坂本研一¹
(¹動物衛生研究所 海外病研究部)
- DV-48 兎ウイルス性出血病の発生例
山本泰弘¹、疋田瑞栄¹、中岡祐司¹、田口雅持¹、萬順一²、白水彩²、三上修一³、吉井雅晃³、
加藤花名子³、池田秀利³ (¹北海道・石狩家保、²札幌市円山動物園、³動衛研)

4月1日 10:40-11:10

堀内基広 (帯畜大)

- DV-49 欠損変異プリオン蛋白を用いた正常型プリオン蛋白の機能解析
李得燦¹、作道章一¹、西村拓也¹、徐聖旭¹、佐伯圭一¹、松本芳嗣¹、小野寺節¹
(¹東京大・応用免疫)
- DV-50 免疫生化学的手法による変敗試料からの異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の検出
林浩子¹、高田益宏¹、横山隆¹、牛木祐子²、木村久美子¹、田川裕一¹、品川森一¹
(¹動衛研、²ニッピ)
- DV-51 サンドイッチ固相酵素免疫測定法による牛各種臓器の正常プリオン蛋白質の定量
山本卓司¹、牛木祐子¹、服部俊治¹、田川裕一²、木村久美子²、高田益宏²、横山隆²、
入江伸吉¹ (¹(株)ニッピ・バイオマトリックス研究所、²動物衛生研究所)

4月1日 11:10 -11:40

佐伯圭一 (東大)

DV-52 BSEスクリーニング用ELISA(OFR ELISA)の開発とその性能評価

堀内基広¹、梅谷淳²、工藤聡子¹、石黒直隆¹、横山隆³、品川森一²

(¹帯広大・獣医公衆衛生、²富士レビオ帯広研、³動衛研・プリオン病研究センター)

DV-53 抗PrPモノクローナル抗体パネルによるPrPの構造解析

金チャンラン¹、堀内基広¹、石黒直隆¹、品川森一²

(¹帯広大・獣医公衆衛生、²動衛所・プリオン研究センター)

DV-54 プリオン蛋白質と結合するペプチド性リガンドの探索

大林浩二¹、堀内基広¹、石黒直隆¹、品川森一²

(¹帯畜大・獣医公衆衛生、²動衛研・プリオン病研究センター)

4月1日 11:40 -12:10

横山隆 (動衛研)

DV-55 ヒツジおよびヤギの伝達性海綿状脳症サーベイランスとPrP遺伝子のアミノ酸多型

黒崎恭久¹、片岡那津見¹、菊地宏明¹、田村勇耕¹、石黒直隆¹、堀内基広¹、品川森一²

(¹帯広大・獣医公衆衛生、²動衛研)

DV-56 プリオンの環境汚染評価 植物への影響

三隅智子¹、石黒直隆¹、堀内基広¹、品川森一²

(¹帯広大・獣医公衆衛生、²動衛研)

DV-57 尿崩症を誘発するマウス馴化スクレイピー株の分離と解析

田村勇耕¹、堀内基広¹、石黒直隆¹、古岡秀文²、品川森一³

(¹帯畜大・獣医公衆衛生、²帯畜大・家畜病理、³動衛研・プリオン病研究センター)

D-S-1 腸管病原性大腸菌のタイプ III 分泌装置の高次構造とその機能

阿部章夫¹
(¹北里大・北里生命研)

腸管病原性大腸菌(enteropathogenic *Escherichia coli*, 以下 EPEC と略す)は乳幼児下痢の起病因菌である。EPEC は毒素産生能や宿主細胞侵入能をもたず下痢発症機構については長い間不明であったが、タイプ III 分泌装置が下痢原性に与ることが明らかになった。EPEC ではタイプ III 分泌装置を介して複数の機能性タンパク質が宿主細胞内に直接移行する。そのなかでも Tir (translocated intimin receptor) が下痢に直接関与する因子であることが知られている。下痢発症機構をさらに詳しく解析するために、EPEC のタイプ III 分泌装置について超微形態学的解析を行った。タイプ III 分泌装置の高次構造については、細胞内寄生細菌であるサルモネラと赤痢菌で解析されている。両分泌装置は鞭毛基部に類似した基部構造と、基部より突き出たニードル部から構成され、ニードル複合体と総称される。EPEC のタイプ III 分泌装置を細菌膜画分より調製しその形態を解析した結果、サルモネラや赤痢菌と類似のニードル複合体を観察したが、ニードル先端部に伸長可能な鞘状構造を認めた。免疫電子顕微鏡による解析からこの鞘状構造は、タイプ III 分泌装置によって分泌される EspA タンパク質によって形成されることを明らかにした。鞘状構造は腸管上皮定着型細菌である EPEC や腸管出血性大腸菌に固有な高次構造であり、細胞内寄生細菌であるサルモネラと赤痢菌には存在しない。解析を進めることにより、タイプ III 分泌装置の EPEC 小腸上皮定着における役割についてより多くの情報が得られるものと考えられる。

D-S-3 *Salmonella* のタイプ III 分泌機構を介した生体防御からのエスケープ機構

岡田信彦¹
(¹北里大)

Salmonella は、マクロファージに対する殺菌抵抗性を示すことにより宿主の感染防御機構からエスケープし、感染を成立させる。*Salmonella* 染色体上にコードされる *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) は、マクロファージ殺菌抵抗性に関わる重要なビルレンス遺伝子領域の一つで、32 の遺伝子から構成される。この中には、タイプ III 分泌機構と呼ばれるタンパク質分泌装置の構成遺伝子、二成分制御系の発現調節遺伝子、シャペロン分子やエフェクタータンパク質をコードする遺伝子などが含まれている。*Salmonella* は宿主細胞に侵入後、SPI-2 タイプ III 分泌機構によってエフェクタータンパク質を宿主細胞の細胞質内に分泌する。これにより、宿主細胞のファゴソーム内に存在する *Salmonella* は、*Salmonella*-containing vacuole (SCV) を形成・維持し、ファゴライソソームの形成阻害(ファゴソーム-ライソソーム融合阻害)および NADPH オキシダーゼ輸送の阻害作用によって、マクロファージによる殺菌機構から逃れる。さらに、SPI-2 により SCV 周辺に F-アクチン網が形成され、これが *Salmonella* の細胞内増殖に必須であることが明らかとなっている。このように、*Salmonella* は、感染細胞内でファゴソームの成熟、小胞輸送系および細胞骨格細線維をダイナミックに制御することにより、殺菌作用からの逃避および細胞増殖を可能にする。本シンポジウムでは、SPI-2 の構造と機能およびその発現調節機構を中心に最近の知見を概説し、*Salmonella* によるマクロファージ殺菌抵抗性の分子メカニズムについて考察する。

D-S-2 *Bordetella bronchiseptica* のタイプ III 分泌機構依存性エフェクター蛋白質の機能解析

桑江朝臣¹
(¹北里大・北里生命研)

ボルデテラを含む多くのグラム陰性病原菌は、タイプ III 分泌装置(以後、タイプ III と略記)と呼ばれる病原因子分泌装置を有している。それらの細菌ではタイプ III 依存的にエフェクターと呼ばれる蛋白質群を分泌する。エフェクターは宿主側因子と結合することによって宿主機能を制御し、感染成立に重要な役割を果たしている。しかしながら、ボルデテラのタイプ III エフェクターは未だに同定されていない。そこで本研究ではボルデテラの感染過程を分子レベルで明らかにすることを目的とし、タイプ III エフェクターの同定と機能解析をおこなった。ブタ萎縮性鼻炎の原因菌である気管支敗血症菌 *B. bronchiseptica* の野生株とタイプ III 分泌能欠損株の培養上清中に分泌された蛋白質を SDS-PAGE 等により調べた結果、野生株特異的なバンドが多数認められた。それらを TOF-MS 等を用いて解析したところ、BopB および新規蛋白質 p74 がタイプ III に依存して分泌されることを見出した。哺乳類培養細胞に BopB 変異株もしくは p74 変異株を感染させると、野生株を感染させた場合に認められるタイプ III 依存的な細胞の剥離や核の凝縮が認められなかった。この結果より野生株感染によって誘導される哺乳類細胞への傷害性には BopB と p74 の機能が必須であることが明らかになった。一方、両欠損株のウサギ赤血球に対するタイプ III 依存的な溶血活性を調べたところ、BopB 欠損株には活性が認められなかったが、p74 欠損株は野生株と同程度の活性を有していた。これらの結果から p74 はボルデテラの細胞傷害性に関わる新規エフェクターである可能性が強く示唆された。

D-S-4 ポリオウイルスの病原性発現機構

野本明男¹
(¹東大院医微生物)

ポリオウイルスは小児マヒ(急性灰白髄炎)の病因である。ヒトのみに自然感染する。経口感染し、消化管で増殖後、血流を介して中枢神経系に侵入し、主に脊髄前角の運動神経細胞で増殖し、細胞に損傷を与える。その結果、感染者の四肢に弛緩性マヒが生じる。中枢神経系への体内伝播経路としては血液脳関門透過が主であると考えられているが、骨格筋から逆行性に神経軸索内を輸送される経路も知られている。ポリオウイルス特異的な体内伝播機構および神経病原性発現機構を解析するために、ヒトポリオウイルス受容体(hPVR;CD155)遺伝子を持つトランスジェニック(Tg)マウスを作製した。この Tg マウスは、経口感染こそ成立しないが、静脈内接種や筋肉内接種には高い感受性を示し、ヒトの場合と同様の弛緩性マヒを呈した。中枢神経系の組織病理学的解析結果もヒトやサルで見られる所見と良く似ていることが判明した。この Tg マウスを使用し、上記二種類の体内伝播機構を解析し、いずれの経路も非常に効率の良い伝播であること、血液脳関門透過の機構には hPVR の関与は無いが、逆行性軸索輸送による病原性発現は hPVR 依存的であることなどを示した。強毒株と弱毒株の体内伝播効率と同様であることから、ウイルス株による神経毒性の違いは、神経細胞におけるウイルス複製効率によって決まると考えられた。最近、神経細胞は、ポリオウイルスの感染に対し抵抗性を示すことも明らかにした。

D-S-5 リバースジェネティクスを用いた狂犬病ウイルス病原性の解析

森本金次郎¹

(¹ 国立感染研・ウイルス第1部)

狂犬病の病因ウイルスである狂犬病ウイルスはゲノムとして5つの遺伝子からなる非分節マイナス鎖RNAをもつラブドウイルス科に属するウイルスである。狂犬病ウイルスには咬傷等による末梢からの侵入により中枢神経に至り狂犬病を引き起こす強毒株（野生型、街上毒株）から、末梢感染では発症しないが脳内接種で発症する株（固定毒株）脳内接種においても病原性を示さないような弱毒株まで様々な程度の病原性をもつ株が存在する。病原性の強弱は宿主内でのウイルスの増殖能力とそれに対する免疫応答の相互作用の結果（ウイルスが脳内で伝播するまでに十分な免疫応答が誘導されているか）として決まる。一般に、培養細胞での増殖の良い株ほど病原性は弱いものとなる。

狂犬病ウイルスのもつ5つのウイルスタンパク質のうち、表面糖タンパク質であるGタンパク質は宿主細胞のリセプターに結合するばかりでなく、ウイルス中和抗体の唯一の抗原であることから、Gタンパク質は狂犬病ウイルスの病原性発現に最も重要な役割を担っていると考えられている。そこで、いろいろな株のGタンパク質の挙動を解析し、さらにいろいろな株のGタンパク質をもつ組換え狂犬病ウイルスを作製し、それらと病原性の強弱の関係を解析した。本シンポジウムでは狂犬病ウイルスのGタンパク質と病原性の強弱に注目して、これまでの実験成績を紹介し、狂犬病ウイルスの病原性のメカニズムについて考察する。

D-W-1 プロバイオティクスの現状と有効性

伊藤喜久治¹

(¹東大院 農 獣公衛)

1998年のアパルシンとバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)の問題以来、家畜・家禽の成長促進を目的とした抗生物質の使用が制限されてきており、ヨーロッパでは2006年までに、使用が禁止される。それに代わるものとして、プロバイオティクス(Pb)の使用が進められている。このような事態は1976年「飼料の安全性確保および品質の改善」に関する法律が施行された際にも起こっている。現在日本では1995年にPbが飼料添加物として認可されて以来、*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Clostridium*の11菌種が製品として承認されている。Pbは「腸内微生物のバランスを改善することにより宿主動物に有益に働く生菌添加物」とFullerにより1989年定義づけられた。家畜・家禽はストレスの多い環境で飼育されており、腸内フローラのアンバランスを生じやすい。Pbは腸内フローラを正常化して、腸内フローラの本来もつバリアー機能や腸内腐敗の抑制機能を発揮させるものと考えられる。抗生物質は有害微生物を抑制することで、Pbは有用微生物を増殖させることでその有効性を発揮するが、成長促進効果については依然不明な点が多い。現在日本でのPbの承認は増体や飼料効率の改善に限られているが、今後腸管出血性大腸菌やサルモネラの排除能、免疫賦活効果による疾病予防、さらに腸内腐敗抑制による悪臭防止や肉質の改善などの有効性も承認事項として加えることによりPbの応用範囲を広げることで、抗生物質に代わるものとしてではなく、抗生物質を超えるものとして、家畜・家禽の健康維持と食の安全に寄与できるものとする。

D-W-3 牛腸管からの大腸菌 O157 排除を目的とした生菌剤の開発

大宅辰夫¹、秋庭正人¹、伊藤博哉¹

(¹動衛研・九州)

1 実験感染牛での排菌阻止試験：

実験感染には、研究室保存 *E. coli* MN157 株から誘導したナリジクス酸、リファンピシン両剤耐性株(*E. coli* MN157 NR)を用いた。生菌剤の試作には、成牛の糞便から分離した *Streptococcus bovis* LCB6 株および *Lactobacillus gallinarum* LCB12 株を選択し、両菌を 10^{10} cfu/g 含有する生菌剤を調製した。生菌剤の製造は、カルピス(株)基盤技術研究所に依頼した。約4ヶ月齢のホルスタイン種8頭に、*E. coli* MN157 NR 株を経口感染させ($10^{10.11}$ cfu/頭)、7日目に排菌を継続した4頭に対して、同製剤各 10 g/頭を朝夕2回濃厚飼料に混ぜ給与した。以後、定期的に直腸便を採取し、MPN法を併用し、排菌量を測定した(検出感度 3cfu/糞便 100g)。生菌剤投与開始後、排菌量は次第に減少し、14日目には4頭中3頭で排菌は停止した。残り1頭も、再度の生菌剤投与で排菌陰性となった。大腸菌 O157 実験感染牛の排菌は、試作生菌剤の経口投与により完全に抑制され、排菌阻止には、生菌剤の投与をきっかけとした糞便内 VFA 濃度急激な上昇が関係していることが示唆された。試験期間中の糞便(-80℃凍結保存)を検索したところ、4頭中2頭で、生菌剤投与翌日から *Bifidobacterium* spp. が急激に増加していることが確認された。

2 野外保菌牛での排菌阻止試験：

和牛肥育農場の大腸菌 O157 保菌黒毛和種(約10ヶ月齢)32頭を試験対象とし、内18頭に生菌剤を2週間連続投与した。残り14頭は無投与対照群とした。野外保菌牛を対象とした実用化試験では、排菌阻止効果は全く認められなかった。生菌剤の効果は、対象牛の品種、日齢、飼養環境等の違いで大きく異なることが明らかとなった。

これらの成績の概要と、一連の試験で得られた知見について紹介する。

D-W-2 ビフィズス菌の腸管免疫調節作用およびロタウイルス感染防御作用

保井久子¹

(¹ヤクルト中研)

[はじめに] ビフィズス菌はヒトの腸管に最優勢に棲息しており、整腸作用や種々の保健効果が解明され、近年プロバイオティクスとして広く用いられている。また、腸管には特徴的な免疫機構が存在しており、分泌型 IgA はウイルスや病原菌の体内への侵入を防御している。一方、ロタウイルス下痢症は、ヒト(乳幼児)だけではなく、豚、牛、馬などの実用動物の乳幼仔期にも発症し、経済的に大きな打撃を与える疾病である。演者らは、ビフィズス菌の分泌型 IgA 産生増強作用およびロタウイルス感染防御作用をマウスを用いて解明し、ヒトへの投与試験も試みたので報告する。[ビフィズス菌の IgA 産生増強作用] 腸管免疫組織の一つであるマウスパイエル板の細胞培養法を用いて、ヒト糞便由来のビフィズス菌の中から IgA 産生を増強する菌株(*B. breve* YIT4064)をスクリーニングした。本菌株は、同時に添加された各種ウイルスに対する抗体産生を増強し、アジュバント活性を示した。[*B. breve* YIT4064 のロタウイルス感染防御作用] 本菌株含有飼料(*B. breve* 群)または不含飼料(コントロール群)を母マウスに投与し、ロタウイルスを経口感染した後、糞便中および乳中の抗ロタウイルス IgA 産生量を比較したところ、*B. breve* 群の有意な上昇が認められた。さらに、これらの乳飲みマウスにロタウイルスを感染させ、下痢発症率を測定すると、*B. breve* 群の乳飲みマウスの下痢発症率は有意に減少した。さらに、本菌株を乳幼児(ヒト)に投与(*B. breve* 群)し、糞便中のロタウイルスの排出頻度を測定したところ、*B. breve* 群はコントロール群に比べ有意に減少した。以上の事から、本菌株は抗原特異的 IgA 産生を増強し、ロタウイルス感染を防御することが明らかになった。

D-W-4 鶏における競合排除(CE)製品の抗サルモネラ作用

中村政幸¹

(¹北里大・家禽疾病)

鶏における使用が報告されているプロバイオティクスとしては、*Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* などがある。これらの効果は報告者によって様々である。現在、野外ではこれらのプロバイオティクスより競合排除製品の使用が圧倒的に多い。

競合排除法とは、成鶏の盲腸内容あるいはその嫌気性培養物、すなわち正常盲腸内細菌叢を餌付け前のひなに投与して、早期に正常細菌叢を形成させ、後から侵入してくるサルモネラの定着・増殖を競合的に排除する方法で、1973年に開発したヌルミ博士に因んでヌルミ法とも呼ばれており、本方法は鶏サルモネラ対策の一環として世界的に活用されている。

CE法製品には、未同定細菌を用いる製品と同定細菌を用いる製品があり、現在わが国では少なくとも5製品が使用されている。これら5製品の腸管内サルモネラ定着・増殖抑制作用には若干の差のあることは報告されている。今回、同定済み細菌を用いた製品(デローチ 29)と未同定細菌を用いた製品(インテクリーン)について述べる。

前者製品では、*Salmonella* Enteritidis などのサルモネラ各血清型および *Escherichia coli* O2、O78、O157 などを用いて検討した結果、いずれに対しても定着抑制効果が認められた。また、後者製品では、投与方法(インテクリーンの寒天固化物投与、飲水添加投与、散霧投与)、投与場所(ふ化場、輸送トラック、農場)について検討した結果、投与方法として寒天固化物投与は他の投与方法と同等か、それ以上の高いサルモネラ抑制効果を示し、投与場所としてはいずれの場所での投与も効果が認められた。

以上より、CE法製品はサルモネラのみならず病原性大腸菌に対しても有効であることが明らかにされている。

D-W-5 乳酸菌を応用した感染症対策

五十君静信¹

(¹国衛研)

感染症起因微生物の生体への侵入門戸は、その多くが消化管をはじめとする粘膜であり、従って腸内菌叢の機能は、感染症の最も初期における感染の成立に非常に大きな影響を与えるといえます。これまで、プロバイオティクスあるいはプレバイオティクスとしてその機能が着目されてきた乳酸菌は、腸内菌叢の有用な機能の実体として、研究の対象とされると共に、今後その機能を高める方向でさらに育種されて行くと思います。例えば、ガセリ菌が病原体であるピロリ菌に働き排除するといった生きた乳酸菌の直接的な機能は、ガセリ菌の腸管定着能を上げるといった育種により、その効果は増強されることでしょう。病原体排除能力の高い乳酸菌の腸管での定着能を高めると、その効果を腸管内で長期に持続させる事が期待されます。

一方、感染症の予防といえば、ワクチン開発ですが、乳酸菌を抗原運搬体とする組換え経口ワクチンは、粘膜ワクチンとして実用性の高いワクチンと考えられています。直接感染症とは関連しませんが、乳酸菌組換え体は、癌の治療薬や、アレルギーの治療薬として用いることも検討されています。遺伝子組換え技術により、従来の技術では考えられなかったような高い能力や機能を持った乳酸菌が作出されることが期待されます。乳酸菌などの産生する有用物質としては、食品衛生の分野で、食品の保存にバクテリオシンの抗菌作用が積極的に利用され始めています。

ワークショップでは、組換え乳酸菌の経口ワクチンによる感染症の予防と、プロバイオティクス作用を持つ乳酸菌の腸管での定着能をあげ、感染防御に役立てる試みについて解説し、この分野の今後の展望を述べようと思います。

DI-1 ウシラクトフェリンのイヌヘルペスウイルスに対する抗ウイルス作用

田中哲也¹、中谷彰吾¹、玄学南²、玖村胡人¹、五十嵐都男²、
島崎敬一¹

(¹北大・農・酪農科学、²帯畜大・原虫研)

【目的】ラクトフェリン(LF)は哺乳動物の乳汁に多く含まれ、分子量約 80kDa の鉄結合能を持つトランスフェリン(TF)ファミリータンパク質である。その働きとして、静菌作用、抗炎症作用、免疫賦活作用など、様々な生物活性を持つことが知られている。一方、本研究の対象となるイヌヘルペスウイルス(CHV)は、一週齢前後の新生子犬に全身性出血性感染を起こす。現在のところ、CHV のサブユニットワクチン開発の可能性は強く示唆されているが、その防御効果は完全ではなく、新たな発想転換が求められている。そこで我々は、LF を動物に投与し、イヌに限らず、家畜ウイルス感染症の予防や治療へつなげるものと期待して、ウシ LF を用いて抗イヌヘルペスウイルス作用について検討した。【方法】CHV をウシ LF 添加イヌ腎細胞(MDCK)と培養し、細胞変性効果(CPE)を観察する事により CHV の増殖能の変化について検討した。また、ウシ LF の CHV に対する特異性を調べるために、ウシ TF、オボトランスフェリン(OTF)、ヒト LF、ウシ LF 加水分解物と比較した。【結果および考察】ウシ LF を CHV へ添加したところ、0.1 mg/ml 以上で顕著な CHV 増殖抑制効果が認められた。また、ヒト LF 添加群についても CHV 増殖抑制効果が見られたが、ウシ TF、OTF、LF 加水分解物添加群では無添加群と変わらなかった。従って、LF は CHV の増殖能を特異的に抑制し、また CHV 増殖抑制効果にはウシ LF の立体構造が重要である事が推定された。現在、ウシ LF の CHV 増殖抑制効果の詳細なメカニズムについては検討中である。

DI-3 ネコインターフェロン- の大腸菌系における発現および抗ウイルス活性

平修¹、水野睦子¹、佐藤久聡¹、中野克重¹、荒井節夫²、前原信敏¹

(¹北大大・獣医微生物、²北研)

【目的】インターフェロン (IFN-) は、活性化された Th1 細胞や NK 細胞から産生される抗ウイルス活性を持つ物質で、免疫の調節に重要な働きをする。IFN- は糖タンパクであり 2 量体で活性を発揮するために、その発現にはウイルスベクターを用いた動物細胞発現系が利用されており、その量産は容易ではない。そこで我々は、大腸菌発現系を用い、簡便な生産システムの確立を検討した。【方法】ヒト IL-2 で刺激したネコ T 細胞由来 cDNA から、常法に従ってネコ IFN- 遺伝子のクローニングを行った。得られた cDNA を大腸菌発現ベクターである pCR2.1 の T7 プロモーター-下流のクローニングサイトに挿入し、この組換えプラスミドを T7RNA ポリメラーゼを産生する *E.coli*BL21(DE3) 株に形質転換した。次いで、形質転換株を IPTG 存在下で大量培養し、菌体を超音波破碎後、金属キレート樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。得られた組換えネコ IFN- の力価は VSV に対する抗ウイルス作用により測定した。【結果および考察】得られた形質転換株を IPTG 存在下で培養したところ、予想される分子量の蛋白バンドが出現し、抗 His モノクローナル抗体を用いた Western blotting に供した結果、分子量約 20kDa の位置に蛋白バンドが確認されたため、ネコ IFN- が His-融合蛋白として発現していた事が確認された。発現量は 1mg/ml 程度であった。VSV を用いた抗ウイルス活性を測定したところ、 5×10^4 U mg/ml の力価が認められた。以上の成績から、大腸菌発現系を用いて活性型ネコ IFN- の生産が可能となることが分かった。今後ネコにおける様々な疾患への応用が期待される。

DI-2 イヌ Mx タンパク質の機能的解析

中村鉄平¹、浅野淳¹、高在弘¹、昆泰寛¹、高田礼人²、渡辺智正³、
安居院高志¹

(¹北大院・獣・実験動物、²東大・医科研・ウイルス感染、
³北大院・農・家畜改良増殖)

【目的】Mx タンパク質はインターフェロンにより誘導され、核内または細胞質内で発現し、ss(-)RNA ウィルスに抵抗性を示すタンパク質である。イヌに関しては、*Mx1*、*Mx2* の二種類の遺伝子が同定されているが、その抗ウイルス作用は不明である。本研究では、イヌにおけるウィルス防御機構の解明の一端として、イヌ Mx タンパク質のウィルス増殖抑制効果の解析を行った。【方法】イヌ腎上皮由来 MDCK 細胞よりイヌ *Mx* cDNA をクローニングし、イヌ Mx タンパク質の一次構造上の特徴を検討した。次にイヌ Mx 発現細胞を作製し、イヌ Mx タンパク質の細胞内局在およびウィルス増殖抑制効果を調べ、その機能的側面を明らかにした。【結果】RT-PCR 法により MDCK 細胞における *Mx* 遺伝子の発現を検討したところ、poly(I)/(C)刺激により *Mx1*、*Mx2* 遺伝子共に発現の増強が認められた。続いてこれらの遺伝子をクローニングし、予想されるアミノ酸配列を検討したところイヌ *Mx1*、*Mx2* 共に Mx タンパク質に特徴的な配列である GTP 結合領域、Leucine zipper (Lz) モチーフは保存されていた。さらに核移行シグナルの比較により共に細胞質内で発現することが予測された。抗 FLAG 抗体を用いた免疫組織化学染色により、FLAG エピトープ融合イヌ *Mx1*、*Mx2* は共に細胞質内で発現が認められた。さらに、イヌ Mx 発現細胞に組換え水疱性口炎ウィルス(VSV)を感染させたところ、イヌ *Mx2* 発現細胞では感染細胞数の有意な減少が認められたが、*Mx1* 発現細胞ではコントロールの細胞と比較して有意な差は認められなかった。以上の結果より、イヌ *Mx2* は VSV 増殖抑制効果を示すことが示唆された。

DI-4 ブドウ球菌性エンテロトキシン-C(SEC)によるウシ乳汁細胞での TNF 依存性の NO 産生誘導機構

小峯健一¹、黒石智誠¹、小峯優美子¹、小林仁²、鎌田信一³、
熊谷勝男¹

(¹ティーセル研、²宮城農短大、³日獣大)

【目的】催炎性物質であるブドウ球菌性エンテロトキシン-C(SEC)には、スーパー抗原への活性化機構や、TNF を含む炎症性サイトカインの産生誘導が知られている。誘導された TNF は肝疾患などでは、細胞内でのチトクローム P450 (CYP450)量の低下と、それに伴う NO inhibitor の発現低下を惹起し、NO の産生も亢進する。そこで本報告では、特に、泌乳牛乳腺に焦点を当て、SEC による TNF 依存性の NO 産生作用と、これに続いて起こる乳腺(MG)細胞の諸病変を追跡した。【方法】予め 3 日間、抗生物質を投与して、細菌感染を抑制した泌乳期乳腺に、SEC(100 μg)を投与し、その後、経時的に採取した、乳汁中の CMT 変法とブツ、SCC ならびに NO 量の測定を行い、同時に、被験乳腺内の MG 細胞を回収した。ウシ脾臓付着(BoSA)細胞は健康なホルスタインの脾臓から定法に従い調整し、SEC 2 μg/ml で刺激培養した。これらは、CO 還元法で CYP450 量を測定し、TNF と iNOS について解析することを目的としたものである。【結果および考察】1) SEC 投与後の乳汁には、CMT やブツが陽性となり、SCC と NO 量の増加も確認された。2) SEC 投与後の MG 細胞と BoSA 細胞には、TNF および iNOS の発現量が増強していた。BoSA 細胞の培養上清中の NO 量は、TNF 量の増加に引き続きピークとなった。3) 一方、SEC 投与後の MG 細胞と BoSA 細胞では、対照区と比べ、CYP450 量は約半分になっていた。以上の結果は、乳房炎では、SEC によって、TNF の産生が誘導され、それにより、乳汁中に流入してくるマクロファージ内の CYP450 量が低下し、MG 細胞には、NO の産生が促されることとなった。つまり、SEC は、乳腺組織に、NO 産生に基づく、Oxidative damage を惹起していることを示唆している。

DI-5 単核球への刺激を介したブドウ球菌性エンドトキシン-C (SEC) による多形核白血球 (PMN) の活性化

黒石智誠¹、小峯健一¹、小林仁²、鎌田信一³、熊谷勝男¹
(¹ティーセル研、²宮農短大、³日獣大)

【目的】これまでに我々は、SEC はブドウ球菌性ウシ乳房炎における重要な病原因子の一つである可能性を報告してきた。そこで、乳房炎病因論における SEC の役割をさらに検討する目的で、乳房炎で増加する乳汁中体細胞の主体である、PMN に対する SEC の作用について解析した。【方法】ウシ末梢血単核球 (PBMC) を SEC (1 µg/ml) 存在 / 非存在下で 20 時間培養後に、その培養上清を回収した。PMN の遊走化能はセルカルチャーインサート法により解析した。IL-8 濃度は市販ヒト IL-8 測定 ELISA キットにより、サイトカイン mRNA 発現は RT-PCR 法により解析した。PMN の生存率はトリパンブルー染色により測定した。【結果および考察】SEC で刺激した PBMC の培養上清 (PS) には PMN 遊走化誘導能が認められたが、SEC 自身および未刺激 PBMC の培養上清 (PN) には認められなかった。また、PS 中には PN に比較して有意に高濃度の IL-8 が認められ、SEC 刺激 PBMC では GRO mRNA 発現量の有意な上昇が認められた (P < 0.05)。さらに、PS 存在下で 20 時間培養した PMN では、PS 非存在下に比べて、PMA 刺激によるスーパーオキシドの産生量が有意に高値であった (P < 0.05)。加えて、同条件下で培養した場合、アポトーシスの阻害による PMN の高生存率が認められ、PMA に対する反応性の違いは PMN の Cell viability の違いによるものと考えられた。以上の結果から、SEC は PBMC への刺激を介することにより、乳腺組織内への PMN 浸潤を誘導すると共に、そのアポトーシスを阻害し、乳房炎における乳汁中体細胞数の増加を誘起することが示唆された。

DI-7 Effect of sugar cane extracts (SCE) on *in vitro* immunoglobulin production in dogs

羅基貞¹、アメルサイド²、本部真樹³、古家健二³、廣田好和²
(¹動衛研・韓国忠北大学校、²動衛研、³新三井製糖(株)茅ヶ崎研究所)

SCE are known as a biological response modifier, but there is almost little information concerning its action mechanisms. Immunological effects of SCE were studied to establish a basis for the practical use in small animal practice. Mononuclear cells (MNC) of dogs were separated by a density gradient centrifugation method. Separated cells were adjusted at 1×10^6 cells/ml in RPMI 1640 with 5% fetal calf serum. MNC were cultured with SCE (0-1,000 µg/ml) at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. After MNC culture with SCE, cytokine expression and immunoglobulin production were evaluated. IgG and IgM in culture supernatants were measured by ELISA method. mRNA expression of cytokines (IL-1, IL-6, IL-10 and TNF-α) were evaluated by RT-PCR method. MNC cultured with SCE for 24 hr showed an increase in IgM production but not IgG. The mRNA expression of these cytokines were corresponded to IgM production. These results show that SCE have a stimulating effect on immunoglobulin production of MNC.

DI-6 さとうきび抽出物質(SCE)によるエンドトキシンショックの防御効果

本部真樹¹、羅基貞²、アメルサイド¹、古家健二³、廣田好和¹
(¹動衛研、²動衛研・韓国忠北大学校、³新三井製糖(株)茅ヶ崎研究所)

【目的】さとうきび抽出物質(SCE)の成長促進効果、アジュバント効果、抗コクシジウム効果、そして免疫抑制の改善効果について既に本学会で報告している。今回、D-ガラクトサミンおよびリポ多糖体を投与することによって誘発されるエンドトキシンショックへ及ぼす SCE の効果について検索した。【方法】BALB/c マウス (6-10 週齢)の腹腔内にリポ多糖体 (LPS, 5 µg/kg)および D-ガラクトサミン(D-GalN, 1 g/kg)を投与し、エンドトキシンショックモデルを作出した。SCE (500 mg/kg)を LPS+D-GalN 投与 3 時間前、同時あるいは 3 時間後に腹腔内に接種したものをそれぞれ、3 時間前接種群、同時接種群そして 3 時間後接種群とし、SCE を接種したときの生存率への影響について検索した。【結果】LPS+D-GalN 投与 48 時間後の生存率を比較すると、生理食塩水を接種した対照群では約 7%と低いのにに対し、3 時間前接種群では、90%以上の高い生存率を示した。しかし、同時あるいは 3 時間後接種群では、対照群と比べて有意な差は認められなかった。対照群、同時接種群および 3 時間後接種群では、LPS+D-GalN 投与後 12 時間以内でマウスが死亡したのに対し、3 時間前接種群では 1 週間以上生存することが確認された。以上の成績より、SCE は LPS+D-GalN 投与により誘発されるエンドトキシンショックを防御する効果を有することが示唆された。

DI-8 血球ステージのマウスマラリア *Plasmodium berghei* 感染によって誘導される肝細胞傷害性細胞について

安達圭志¹、筒井ひろ子¹、中西憲司¹
(¹兵庫医大、免疫・医動物)

肝細胞に感染性のある病原体に宿主が感染すると、宿主の免疫系は、感染肝細胞を異物として認識して排除する結果、肝障害が引き起こされる。一方、肝障害は、肝細胞には感染しない病原体感染によっても誘導されることが知られているが、その障害誘導メカニズムは未だよく分かっていない。我々は、肝細胞に感染しない病原体により誘導される肝障害の一例である *Plasmodium berghei*(*P. berghei*)肝障害の解析を行い、自然免疫系レセプターである TLR/MyD88 系依存的に産生される IL-12 が、本肝障害に決定的な役割を果たすことを、昨年の本学会において報告した。今回は、*P. berghei*肝障害を惹起する肝細胞傷害性細胞の同定を試み、以下のような結果を得たので報告する。感染マウスから分離した肝リンパ球は、正常マウスの肝細胞を MHC 非拘束性に殺傷したが、同一個体から分離した脾細胞には肝細胞傷害活性は認められなかった。NK 活性不全マウスは本肝障害に感受性であったが、T 細胞を欠く SCID マウスは抵抗性であった。この肝リンパ球の肝細胞傷害活性は、NK 細胞および NKT 細胞を含む DX5 陽性細胞を濃縮すると増大したが、T 細胞および NKT 細胞を含む CD3 陽性細胞、或いは DX5 陽性細胞を除くと低下した。しかし、CD1d 拘束性の NKT 細胞を欠除する CD1d 欠損マウスはこの肝障害に感受性であり、感染させた欠損マウスから分離した肝リンパ球は、肝細胞傷害活性を示した。以上のことから、感染により肝臓に集積した CD1d 非拘束性の NKT 細胞が、肝細胞傷害性細胞として重要な役割を果たしていることが判明した。

DI-9 初乳および初乳中サイトカインによるウシ新生子末梢血単核球のNK細胞活性の増強

山中仁木¹、萩原克郎¹、桐沢力雄¹、岩井滋¹
(¹酪農大・獣医微生物)

我々は先に初乳中には種々のサイトカインが高濃度に存在し、これらのサイトカインが新生子血中へと移行し獲得免疫機構の修飾に重要な働きを担っていると考えられることを報告した。そこで本研究では新生子の自然免疫機構への影響を知る目的で、初乳および初乳中に検出された5種類の各サイトカインの新生子末梢血単核球(PBMC)のNK細胞活性への影響を検討した。【方法および結果】初乳乳清は本学農場ホルスタイン種乳牛から分娩直後に、PBMCは出生直後の初乳摂取前の新生子および成牛から採取した。細胞傷害性試験は、新生子および成牛PBMCを初乳あるいは初乳中濃度を参考にして希釈した各サイトカイン存在下で72時間培養した後、蛍光色素(calcein-AM)で標識した標的細胞であるヒト白血病細胞(K562)と混和後4時間培養して行い、傷害により上清中に放出された蛍光色素を測定した。その結果、初乳を2%あるいは0.4%添加した場合、新生子および成牛PBMCのNK細胞活性は増強されなかったが、10%添加により有意に増強された。その反応性は新生子と比べ成牛において高かった。また、IL-1レセプターアンタゴニスト処理により新生子および成牛PBMCのNK細胞活性は抑制されたが、IL-1、IL-6、TNF- α 、IFN- γ の各サイトカイン処理により新生子PBMCのNK細胞活性は有意に増強し、その反応性は成牛と比べ有意に高かった。【考察】以上の成績は、初乳中に存在するIL-1、IL-6、TNF- α 、IFN- γ は初乳を摂取した新生子血中へと移行し、新生子のNK細胞活性を増強する可能性を示し、新生子の自然免疫機能の活性化に関わっていることを示唆した。

DI-11 豚インターロイキン4の組換えタンパク発現とモノクローナル抗体の作製

石倉洋司¹、安達聡¹、加藤大智¹、岩田祐之¹
(¹山口大・家畜衛生学教室)

インターロイキン4(IL-4)はヘルパーT細胞2型(Th2細胞)から産生される代表的なサイトカインで、液性免疫応答における中心的な役割を果たしている。今回、豚におけるTh細胞の分類及びその機能解析、さらには産生サイトカインの定量法確立の一助とすることを目的に、組換え豚IL-4(pIL-4)をthioredoxin(Trx)との融合タンパクとして大腸菌発現系において発現・精製し、これを免疫原に用いて抗pIL-4モノクローナル抗体の作製を試みた。

Trx-pIL-4で免疫したBALB/cマウスの脾細胞とマウスミエローマ細胞P3U1をポリエチレングリコールを用いて融合したところ、最終的に6クローンの抗pIL-4抗体陽性ハイブリドーマが得られ、これらのハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体の免疫グロブリンのクラスはIgG1が5クローン、IgG2bが1クローンであった。得られたモノクローナル抗体を用いてimmunoblot解析を行ったところ、これらのモノクローナル抗体全ては大腸菌で発現させたTrx-pIL-4ならびにバキュロウィルス昆虫細胞発現組換えpIL-4を特異的に認識することが明らかとなった。さらに今回得られた6クローンのモノクローナル抗体がそれぞれ異なるエピトープを認識するかどうかを競合ELISA法を用いて解析した。この結果、6クローン中4クローンのモノクローナル抗体が競合せず、異なるエピトープを認識していることが明らかとなった。

以上、本研究では組換え豚IL-4を発現・精製し、さらに4種類の異なるエピトープを認識する抗pIL-4モノクローナル抗体を作製した。本研究で得られた組換えタンパクおよびモノクローナル抗体は、豚におけるIL-4測定系の確立を可能にするばかりでなく、基礎免疫学研究においても非常に有用なものになると考えられる。

DI-10 IL-4変異体によるアレルギー性疾にたいする患遺伝子免疫療法

保富康宏¹
(¹三重大・医・生体防御)

【目的】アレルギー・アトピー性疾患を規定している要因としてヘルパーT細胞(Th)、特にTh2細胞が深く関わっている。しかしながら最も広く用いられている治療法はステロイドによる免疫反応を抑制するものであるが使用には幾つかの問題点が残されている。インターロイキン(IL)-4はTh2反応を規定するサイトカインとして知られており、アレルギー・アトピー性疾患にも強く関与している。今回このIL-4に変異を挿入し、IL-4レセプターには結合するが、シグナルは伝えない変異体遺伝子を作製し、遺伝子免疫療法の基礎的実験を行った。【方法】マウスIL-4遺伝子をリンパ球から作製し、116QをDに、119YをDに組み換えTPA leader sequence下部に挿入しpcDNA3.1に組み込み、分泌型ベクターを作製した。対照として野生型IL-4および変異が一カ所のも作製した。治療効果を検討するためにOVAを2週間隔で2回免疫し、その1週後から5日間OVAエアゾルを吸入させる喘息モデルマウスを作製した。IL-4変異体遺伝子は初回免疫から0、7、14、21日のいずれかに50 μ gを腹腔内投与した。【結果】初回免疫から0、7、14日のいずれかに1回投与したマウスは肺胞洗浄液中に白血球、好酸球、炎症性蛋白およびIgEの産制が対照群に比較し明らかに低く正常マウスと変わらなかった。また、病理組織学的検査でも以上は認められなかった。しかしながら21日目に投与した群では治療効果は認められなかった。【総括】IL-4変異体遺伝子を用いた遺伝子免疫療法は一度の投与で抗アレルギー効果が認められ、今後ベクター等の工夫により臨床応用が可能になると考えられる。

DI-12 ヨーネ菌PPDに対するウシマクロファージのサイトカイン遺伝子発現のリアルタイムPCRによる解析

彦野弘一¹、平山祥代¹、オドングレル¹、竹原一明²、森康行³、
Buza Joram J.⁴、Bari Abusaleh M.⁴、舒宇静¹、百溪英一¹
(¹動衛研・ヨーネ病チーム、²北里大・家禽疾病、
³動衛研・免疫機構、⁴生研機構)

【目的】病原体に反応して抗原提示細胞が産生する様々なサイトカインは、免疫応答において重要な役割を果たす。しかし、ウシにおいては、ELISAなどの手法が入手困難なことから、これまで定量的解析が困難であった。ヨーネ菌はマクロファージ(Mph)指向性の細胞内寄生菌で、ヨーネ菌の病理発生は宿主の細胞性免疫の動態と深く関係する。今回は、ヨーネ菌PPDに対するウシMphのサイトカイン遺伝子発現の動態をリアルタイムPCRにより定量的に解析し、LPS(TLR4リガンド)とPGN(TLR2リガンド)と比較検討した。【方法】ウシ末梢血由来Mphにヨーネ菌PPDまたはLPS、PGNを添加し、経時的にRNAを回収し、そこに含まれるサイトカイン遺伝子をリアルタイムPCRにより解析した。【結果】IL-1、TNF- α 、IL-12 p35、IL-12 p40、iNOS、IL-10の発現は、PPD刺激後3または6時間で著しく増加し、その後24時間以内に基底値にもどる動態を示した。IL-18の発現は刺激後3時間でわずかに増加するが、12、24時間では基底値以下に減少した。LPS、PGNによるサイトカイン遺伝子の発現も、同様の動態を示した。IFN- γ の発現は、LPSにより著しく増加するが、PPDとPGNの効果は小さかった。【総括】リアルタイムPCR解析により、ヨーネ菌PPDに対するウシMphのサイトカイン遺伝子発現の動態は、TLRリガンドとほぼ同様であることが示された。また、ウシMphにおけるIFN- γ 遺伝子の発現はPPDによって誘導されず、TLR4により選択的に制御されていることが推察された。口演では、IL-10によるウシサイトカイン遺伝子発現の抑制についても報告する。

DI-13 ブタ胸腺及び末梢血リンパ球 cDNA ライブラリーの EST データベース構築による免疫系分子の網羅的同定

上西博英¹、鈴木恒平²、沢崎哲哉²、土岐大輔²、新開浩樹²、宗田吉広³、浜島紀之¹、栗田崇¹
(¹生物研、²STAFF 研、³動衛研)

【背景・目的】ブタにおける抗病性育種、あるいは家畜用薬剤の効果検討においては、遺伝子多型と機能との関連の解析、及び遺伝子発現量変化の解析等に供するための発現遺伝子データベース等の基盤整備が必要である。我々はブタ免疫系組織（胸腺等）及び末梢血リンパ球由来の完全長 cDNA を多く含むライブラリーを構築し、その EST 解析を行うと共に、それらのクラスタリング（類似配列のグループ化）、相同性解析及びデータベース格納を行うシステムを構築してブタ免疫系分子の網羅的同定を試みた。【材料・方法】ブタ由来の胸腺等の免疫系組織及び末梢血リンパ球より調製した mRNA より、主としてオリゴキャップ法により cDNA ライブラリーを構築した。EST 解析はクローンの 5'末端から行い、その結果は CAP3 等を用いてクラスタリングを行い、BLAST による相同性解析を行った。さらに EST 解析及び相同性解析結果のデータベースの閲覧用に PHP スクリプトで検索システムを構築した。【結果・考察】現在までにブタ免疫系組織・細胞を用いた EST 解析及びクラスタリングを総計 15,104 個の cDNA クローンについて行った。その他の EST 解析の結果も含めた相同性検索により、サイトカイン及びそのレセプター類、その他 CD 抗原でヒト、マウス等で既知の塩基配列と相同性の高いものの内、ブタで報告のないもの 81 遺伝子について cDNA クローンを特定した。さらに機能未知の遺伝子も含め、1,156 種類のブタ免疫系組織・細胞で発現する遺伝子を明らかにした。今後は本 EST データベースの発現解析システム構築等への応用を検討している。

DI-15 ブタ *Mycoplasma hyopneumoniae* 感染における IL-18 の役割

宗田吉広¹、下地善弘¹、横溝祐一¹、森康行¹
(¹動衛研)

【背景と目的】*Mycoplasma hyopneumoniae*(Mhp)はブタにマイコプラズマ肺炎を引き起こす病原体で、国内の養豚場に広く浸潤し、養豚産業に大きな経済的被害を及ぼしている。また、複合感染症や日和見感染症の原因病原体としてブタ呼吸器病候群の基礎疾患の 1 つに挙げられ、家畜衛生上大きな問題となっている。本研究では、ブタ Mhp 感染における IL-18 の役割について解析した。【材料と方法】Mhp 強毒株である E-1 株を実験感染させた SPF ブタから得た気管支肺胞洗浄液(BALF)および肺の肝変変化病変を実験に用いた。【結果】Mhp 実験感染ブタの BALF 中に肺炎病変の進行にともなって多量の IL-18 が検出された。しかし、同じ BALF 中の IFN- γ 濃度は逆に肺炎病変の進行とともに低下した。また、免疫染色により、肺炎病変中に多数浸潤している plasma 細胞が IL-18 と IL-18R を強く発現していた。BALF 中の抗 Mhp 抗体の動態、および健康肺と病変部から得た Total-RNA をもとにしたサイトカインの RT-PCR による分析結果は、いずれも Mhp に対する Th2 応答の増強を示した。さらに、宿主の Th1 応答の抑制と Th2 応答の増強、および plasma 細胞の分化における役割が報告されている PGE2 に関して、IL-18 は抗 CD138 抗体を用いて肝変変化病変部から分離した plasma 細胞からの PGE2 産生を増強した。【考察】これらの結果から、ブタ Mhp 感染において IL-18 は、IFN- γ 誘導因子ではなく、plasma 細胞から多量に産生されて、宿主の抗体応答に関与するとともに、PGE2 の産生誘導を通じて、宿主の Th2 応答や免疫抑制、ひいてはウイルス感染等の 2 次感染の増悪に強く関与していることが示唆された。これらの知見に基づいて、今後は本疾病の新しい制御・予防技術の開発に貢献したいと考えている。

DI-14 ブタ IL-21 のクローニングと発現およびマッピング

菊間礼子¹、宗田吉広¹、上西博英²、山本竜司²、田中麻衣子³、浜島紀之²、栗田崇²、吉原一浩¹、森康行¹
(¹動衛研、²農業生物資源研究所、³STAFF)

【背景と目的】IL-21 は、2000 年にはじめて報告され、活性化 T 細胞から産生され、T 細胞や B 細胞の増殖や NK 細胞の細胞傷害活性を増強する新しいサイトカインである。家畜における本サイトカインの利用を目指して、ブタ IL-21cDNA のクローニングとその組み換えタンパクの発現およびブタ染色体上へのマッピングを行ったので報告する。【材料と方法】ConA、PHA、PMA および抗ブタ CD3 抗体で刺激した豚末梢血リンパ球由来 cDNA から、ヒトやマウスの IL-21 の配列に基づいたプライマーを用いて PCR を行い、豚 IL-21 の cDNA をクローニングした。得られた塩基配列に基づき、活性型 IL-21 をコードする配列を pQE70 ベクターへクローニングし、大腸菌 JM109 を形質転換して発現させ、発現産物をニッケルカラムを用いて精製した。また、Radiation Hybrid 法および FISH 法を用いてブタ染色体上へのマッピングを行った。【結果】ブタ IL-21cDNA は 459bp であり、152 個のアミノ酸をコードしていた。ヒトおよびマウス IL-21 との相同性はアミノ酸レベルで 77.7%および 58.4%であり、機能的に重要と考えられるアミノ酸はいずれも保存されていた。また、大腸菌により発現した組み換えブタ IL-21 は、細胞傷害活性を有する細胞である、ブタ CD16 陽性細胞を用量依存的に増殖させる活性を有していた。さらに、RH 法および FISH 法によりブタ IL-21 は豚の 8 番染色体上(8q15.3-q23)にマッピングされた。【考察】IL-21 は自然免疫系と獲得免疫系をつなぐサイトカインと考えられており、家畜における非特異免疫系の増強や、ワクチンアジュバント等への応用が期待される。

DI-16 カイコからのブタ IL18 の精製法の確立

長屋英和¹、宗田吉広²、榎本知晃¹、松本沙矢香¹、森康行²
(¹片倉工業・中央蚕研、²動物衛生研究所)

【背景と目的】IL18 は IFN- γ の産生誘導をはじめとする様々な生理活性を有するサイトカインであり、その生理的役割の解明や家畜の様々な疾患に対する臨床応用が期待されている。これまでに著者らは、ブタ IL18 をクローニングし、バキュロウイルス発現系を用いた組換えブタ IL-18 の作製について報告した。本学会では、カイコ体液からのブタ IL18 の精製法を確立したので報告する。【材料と方法】組換えブタ IL18-Histag バキュロウイルスと組換えブタ caspase-1 ウイルスを 1:5 の力価で 5 齢 1 日目のカイコに接種した。感染 7 日後に体液を回収し、出発原料とした。回収した体液をバッファーで 10 倍希釈した後、ポリエチレングリコール(PEG)処理を 4 処理区(4、8、12、16%)設けて画分実験を行った。その後、PEG 処理により上清画分として残余したものをサンプルとし、硫酸ニッケルを結合させたキレーティングカラムで精製した。【結果と考察】PEG による前処理では、8%まではブタ IL-18 は沈殿画分に移行することなくほとんどが上清に残っていた。一方、夾雑タンパクの多くが沈殿画分へ移行した。しかし、PEG が 12%以上の濃度になると、ブタ IL-18 も完全に沈殿画分へ移行した。次にカイコ体液 30ml を材料とし、8%PEG 処理後の上清画分をニッケルカラムヘアブライシ、20mM イミダゾールで洗浄した後、100mM イミダゾールで溶出した。銀染色及びウエスタンブロットの結果より、組換えブタ IL18 が高濃度および高純度に精製できることが明らかとなった。この精製ブタ IL18 は濃度約 150 $\mu\text{g/ml}$ で、豚末梢血単核球からの IFN- γ 誘導能を保持していた。今後更に、組換えブタ IL18 を大規模な昆虫工場を用いて生産・精製し、家畜への投与試験等に利用したいと考えている。

DI-17 寄生虫駆除剤暴露ニジマスにおける血清中 C 反応性蛋白濃度の変動

松岡佑次¹、劉有昌¹、岩崎忠¹、渡来仁¹、児玉洋¹
(¹大阪府大・獣医免疫)

【目的】魚類の生理機能は水質の影響を直接受け、また魚は水中の汚染物質に長期間曝露される可能性がある。今回、C 反応性蛋白 (CRP) が水質汚染の程度または、魚の生理状態や健康状態を評価する指標として利用できるか否かを検討するため、外部寄生虫駆除剤あるいは農薬を含む飼育水にニジマスを曝露し、CRP 産生に対する影響を調べた。また、水温上昇による CRP 濃度の変化を観察した。方法：CRP 濃度はサンドイッチ ELISA により測定した。化学物質の曝露量および時間は次の通りである。ホルマリン 30ppm, 9.5 時間, あるいは 300ppm, 3.5 時間, 過マンガン酸カリウム 4ppm, 2 時間, あるいは 40ppm, 45 分, マゾテン 40ppm あるいは 400ppm, 30 分。結果：正常ニジマスの血清 CRP 濃度は $82 \pm 29 \mu\text{g/ml}$ であった。ホルマリン曝露 6 日 (30ppm) あるいは 9 日後 (300ppm) に CRP 濃度は最高となった後、18 日後には正常値よりも有意に低下した。過マンガン酸カリウム 40ppm 曝露では、14 日後に CRP 濃度は正常値よりも有意に低下した。また、マゾテン曝露では CRP 濃度は 3 日後に最高値を示した後、11 日後には正常値よりも有意に低下した。飼育水温 16.5 ~ 19.5 °C では、水温 13 °C (正常値) の場合と比べ CRP 濃度は顕著な上昇を示した。考察：3 種の化合物による曝露や飼育水温の上昇により、ニジマス血清 CRP 濃度は変化した。その変動は比較的緩慢であって、哺乳動物においてみられる急性期反応のそれと比較検討する必要がある。

DB-1 志賀毒素 2 型遺伝子保有ファージ溶原化による大腸菌 K-12 株の変異に関する研究

井口純¹、大澤朗¹、高木道浩²、伊豫田淳³、寺嶋淳³、渡辺治雄³
(¹神戸大・自然科学、²神戸大・農、³国立感染症研)

【目的】我々は 134 回本学会において、大腸菌 K-12 株が志賀毒素 2 型遺伝子保有ファージ (Stx2 ファージ) の溶原化に伴い、染色体上の複数箇所に変異が起こることを報告した。理論的には Stx2 ファージの溶原化による変異はファージ DNA 挿入部位のみに起こると予想されたが、実際に行ったパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) においてこの部位以外の複数箇所での変異が観察された。本研究では上記で観察されたファージ DNA の挿入およびその他の変異について解析をおこなったので報告する。【材料と方法】腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 株から分離した Stx2 ファージを溶原化させた大腸菌 K-12 由来株 (LE392) において、ファージ DNA 挿入部位および *Xba*I 消化による PFGE で観察された変異部位の特定をおこなった。【結果】ファージ DNA は EHEC O157 株と同じく *wrbA* 遺伝子上に一カ所だけ挿入されていた。PFGE パターンに変化を及ぼした変異の一つは *Xba*I 切断部位を含む約 40kbp DNA 断片の欠失であり、この断片には L-idonate 代謝遺伝子群の一部が含まれ、実際に変異株では L-idonate 代謝の中間産物である 5-ketogluconate の発酵能が失われた。【考察】PFGE パターンの変化より、ファージ DNA 挿入部位以外の変異は最も変化の多い溶原株で少なくとも 4 箇所起こっていると推測された。Stx2 ファージによる溶原化は単なるファージ DNA の挿入にとどまらず、染色体上のその他の部位で変異を誘導することが確認され、溶原化による遺伝子型や表現型の多型化促進が示唆された。現在、残る変異部位の解析を進めている。

DI-18 組み換えイヌ上皮細胞増殖因子の発現と生物活性

田崎穂波¹、大屋賢司¹、大橋和彦¹、小沼操¹
(¹北海道大・獣医・感染症)

【背景と目的】上皮細胞増殖因子 (EGF) は乳汁に含まれる生理活性物質の一つで、経口的に摂取され、幼獣の消化管粘膜の成長を促し病原菌の体内侵入を阻止する働きがあると考えられている。また生体内で合成され、消化管内に分泌された EGF は、粘膜面の維持や保護のほか損傷の軽化および修復の促進に寄与していることが示唆されている。我々は第 131 回本学会においてイヌ EGF cDNA 全長遺伝子のクローニングを報告したが、今回は EGF を腸管感染症に対して臨床応用することを最終目的として、成熟イヌ EGF cDNA を組み換え蛋白として発現し、その生物活性を検討した。【方法と結果】成熟イヌ EGF をコードする cDNA を PCR 法によりサブクローニングして pET32 ベクターに挿入し大腸菌発現系を用いて発現させた。組み換えイヌ EGF は 28kDa の融合蛋白 (TRX を含む) として精製された。この組み換えイヌ EGF 存在下でマウス胚由来線維芽細胞 (NIH3T3) およびイヌ腎上皮様細胞 (MDCK) を培養し MTT 法により増殖活性を検討したところ、添加濃度依存性に細胞の増殖が促進された。また組み換えイヌ EGF を $100 \mu\text{g/kg/day}$ で 5 日間、マウスに経口投与すると小腸上皮細胞が増殖することを組織学的に確認した。なおこのとき EGF 投与による体重減少および脱毛等の副作用は認められなかった。【考察】以上のことから今回調製した組み換えイヌ EGF が、生体外でも生体内でも本来 EGF が持つ生物活性を発揮することが示され、経口投与することで粘膜組織を侵入門戸とする病原体の感染症に対する予防・治療に応用できる可能性が示唆された。

DB-2 牛由来黄色ブドウ球菌における表皮剥脱毒素のファージ変換

遠藤陽子¹、山田智子¹、松永和恵¹、早川裕二²、海藤敏雄¹、竹内正太郎¹
(¹福井県立大、²石川県南部家保)

【目的】先に、私達は、牛由来黄色ブドウ球菌の一部の菌株は、新生児のブドウ球菌性熱傷様症候群の病原因子である表皮剥脱毒素 (ETA) を産生することを報告した。一方、Yamaguchi らは、最近、人由来株における ETA のファージ変換を証明し、ETA 遺伝子のファージによる水平伝搬を示唆した。そこで、今回、牛由来株の ETA 遺伝子のファージ変換について検討した。【材料と方法】牛由来 ETA 産生株 (103, 104, 175) および人由来 ETA 産生株 (1898, 1897) の計 5 株を用いた。これらの菌株をマイトマイシン C (MMC) 処理後、溶菌した培養液からファージ粒子を 1 M NaCl および 10% PEG 沈殿により分離し、CsCl 密度勾配超遠心により精製した。【結果と考察】供試菌の MMC 処理によって、5 株中 4 株で溶菌がみられ、テンプレートファージの存在が推測された。そこで、これらの溶菌液からファージ粒子を分離し、アガロースゲル電気泳動で解析したところ、約 40kb のバンドが全てのファージ液で認められた。しかし、牛由来株のファージ DNA の制限酵素切断パターンは人由来株のファージとは異なっていた。一方、CsCl 密度勾配超遠心により精製したファージ粒子の電子顕微鏡においては、六角形の頭部とフレキシブルな尾部のファージが観察された。次いで、ファージの ETA 遺伝子の保有を 2 つの PCR 法で調べたところ、ETA 遺伝子あるいはファージのアミダーゼと ETA 遺伝子の推定されたサイズのバンドがそれぞれ検出された。さらに、これらの PCR 産物のシーケンシングにおいて、ファージ DNA 中に ETA 遺伝子がアミダーゼ遺伝子に隣接して組み込まれていることが確かめられた。これらの成績から、牛由来黄色ブドウ球菌における ETA 遺伝子のファージ変換と水平伝搬の可能性が示唆された。

DB-3 日本で人から分離された腸管スピロヘータの遺伝学的解析と新種としての *Brachyspira ibaraki* の提唱

立花英真¹、足立吉数¹、中村真一²
(¹茨大・農、²岩手医科大学)

【目的】1982年デンマークで人から腸管スピロヘータが分離されたことが報告されたがその後18年間全く報告がなく2000年に我々やスカンジナビアで相次いで報告された。それはスピロヘータの分離が非常に難しく、特に発育に3週間を要することから、他の菌によるコンタミネーションがその分離をさまたげてきた。われわれは分離方法に工夫をこらしその分離に成功した。その分離菌の遺伝学的解析を行い得られた結果から新種名を提唱することができた。材料及び方法：供試菌株としては日本で人から分離された5株及び標準株6株を用いた。蛋白質の解析はLaemuli(1970)の方法に従い実施した。16SrDNAの塩基配列はOchiai(1997)の方法に従い、DNAホモロジー試験はEzakiら(1988)の方法に従い実施された。結果及び考察：スペクチノマイシン添加血液寒天培地及び0.45µmのフィルターを用いてろ過後血液寒天培地に接種し3週間培養を行った。その結果両者で菌の発育が認められた。その発育コロニーの異なるもの(ベッサリー型、顆粒型、ムコイド型)を分離しその遺伝解析を実施したところ、16SrDNAについては*B.aalborgi*と非常に類似していたが数個の塩基配列が異なっていた。そこでDNAホモロジーを調べたところ*B.aalborgi*とは50%以下のホモロジー値が得られたことから新種として *Brachyspira ibaraki* を提唱する。

DB-5 *Leptospira interrogans* 共通抗原に対するモノクローン抗体を用いた抗原検出法の確立

伊藤睦美¹、迫田義博¹、潮田道子¹、井藤勇輝¹、喜田宏¹
(¹北大獣医)

【目的】レプトスピラ病は *L.interrogans* によっておこる人獣共通感染症である。本病の病原診断は、臨床材料からのレプトスピラの分離による。しかし、レプトスピラの分離には5日間から数週間の培養が必要である。さらに顕微鏡下凝集試験で同定するには、200以上の血清型の抗血清を用意しておかねばならない。私たちは、本病を早期に迅速診断する方法を確立するために、*L.interrogans* に共通の抗原に対するモノクローン抗体を作出した。

【方法】*L.interrogans* serovar australis AkiyamiC株を抗原としてマウスを免疫し、モノクローン抗体を作出した。これらのモノクローン抗体と血清型の異なる10株のレプトスピラとの反応性をELISAにより確認した。*L.interrogans* 共通抗原を認識するモノクローン抗体を選出し、これらを用いてレプトスピラ抗原検出による診断法を検討した。

【結果】得られたモノクローン抗体は120クローンで、このうち *L.interrogans* 共通抗原を認識するモノクローン抗体は5クローン、レプトスピラ属共通抗原を認識するモノクローン抗体は2クローンであった。*L.interrogans* 共通抗原に対するモノクローン抗体はすべて外膜リポ蛋白 LipL32 を認識していることがわかった。このうちエピトープの異なる2つのモノクローン抗体を用いて抗原検出ELISAを確立した。このELISAによる抗原の検出限界は、現在のところ $10^9/50\mu\text{l}$ である。

【考察】LipL32に対するモノクローン抗体を用いた抗原検出ELISAが有効な診断法であることがわかった。現在、検出感度を向上させる方法を検討している。

DB-4 A new point mutation associated with tylosin-resistance of Japanese canine intestinal spirochetes.

ブラバサラクルヌビー¹、足立吉数¹、小川恭喜¹
(¹茨大・農)

【Objectives】Canine weakly α -hemolytic intestinal spirochetes have been reported as the cause of diarrhea in Australian and Swedish dogs. We also confirmed the high prevalence in Japanese dogs (22.6%). Their 16S rDNA sequencing was closely related to those of *B. hyodysenteriae* and *B. innocens* at the similarity rate of 98.7-99.1%. The purpose of this study was to investigate the gene mutation concerning drug resistance of canine isolates and to compared with those of reference strains, *B. hyodysenteriae* ATCC27164 and *B. pilosicoli* ATCC51139. 【Materials and Methods】Tylosin-resistant mutants were obtained by three-time subcultures of tylosin-susceptible isolates on agar containing 1 µg/ml of tylosin. 【Results and Discussion】After successive three-time passages of tylosin-susceptible isolates on blood agar containing 1 µg/ml of tylosin, the isolates acquired tylosin-resistance. The adenine at the base position 2062 of 23SrDNA has been replaced by cytosine, while, the base position 2058 of 23S rDNA changed from adenine to guanine in *B. hyodysenteriae* and *B. pilosicoli*.

DB-6 *Leptospira interrogans* 共通抗原 LipL32 に対する抗体検出 ELISA の確立

潮田道子¹、迫田義博¹、伊藤睦美¹、井藤勇輝¹、喜田宏¹
(¹北大獣医)

【目的】レプトスピラ病は、*Leptospira interrogans* によっておこる人獣共通感染症である。本病の血清診断は顕微鏡凝集反応によるが、200以上の血清型レプトスピラ生菌培養を常備する必要があることと、多検体を同時に検査することができない難点がある。そこで、病原レプトスピラの共通抗原である外膜リポ蛋白 LipL32 抗原とした抗体検出ELISAを確立した。

【材料と方法】*Leptospira interrogans* serovar autumnalis Akiyami A株の菌体からRNAを抽出し、RT-PCR法によりLipL32遺伝子をクローニングした。これを大腸菌発現ベクターにサブクローニングし、組換え蛋白として発現させた。組換えLipL32はニッケルアフィニティーカラムを用いて精製し、ELISA抗原とした。本ELISAにより、血清型の異なる6株のレプトスピラを免疫したウサギ血清および同レプトスピラを実験感染させたマウス血清中の抗LipL32抗体の検出を試みた。

【結果】本ELISAで、病原レプトスピラを免疫したウサギ血清にのみLipL32に対する抗体が検出された。さらに病原レプトスピラを実験感染させたマウス血清には、LipL32に対する抗体が検出された。

【考察】組換えLipL32を抗原とするELISAがレプトスピラ病の抗体検査法として有用であることがわかった。現在、LipL32に対するモノクローン抗体を利用して、動物種に関係なく抗レプトスピラ抗体を検出できる競合ELISAを開発している。

DB-7 北西太平洋に棲息する鯨類におけるブルセラ症の血清学的、病理学的調査

大石和恵¹、銭谷亮子²、坂東武治²、後藤義孝³、内田和幸³、丸山正¹、山本三郎⁴、宮崎信之⁵、藤瀬良弘²

(¹海洋科学技術センター、海洋生態、²日本鯨類研究所、³宮崎大学、農学部、⁴感染研、細菌、⁵東大、海洋研)

ブルセラ症はブルセラ菌による主として家畜に見られる獣疫であるが、近年、北大西洋を中心に海洋哺乳類における同症の報告が相次いでいる。そこで、これまで報告のない北西太平洋ならびに南極海に棲息する鯨類におけるブルセラ症について調査した。2000年度の北西太平洋鯨類捕獲調査(JARPNI)において捕獲した40頭のミンククジラ(*Balaenoptera acutorostrata*)、43頭のニタリクジラ(*Balaenoptera edeni*)、5頭のマッコウクジラ(*Physeter macrocephalus*)、ならびに2000/2001年度の南極海鯨類捕獲調査(JARPA)において捕獲した440頭のクロミンククジラ(*Balaenoptera bonaerensis*)を材料として、牛ブルセラ菌抗原を用いた血清凝集反応により抗体保有率を調べるとともに、現場での肉眼的観察と病変部位の病理組織学的検索を行った。北西太平洋の38%のミンククジラ、9%のニタリクジラの血清が陽性反応を示し、マッコウクジラ4個体の血清は陰性を示した。クロミンククジラ104個体からの血清サンプルも全て抗体陰性であった。また、両調査に参加した乗組員や研究者51人の血清はすべて陰性であった。ミンククジラ40頭中、雄13頭、雌1頭の精巢、子宮に顕著な乾酪化あるいは石灰化病変と間質の繊維化病変が種々の程度で見られ、組織学的には、慢性の化膿性、肉芽腫性の精巢炎、子宮内膜の化膿性病変が認められた。同様の生殖器病変は、ニタリクジラ43頭中、雌雄1頭づつで観察された。その他の鯨種では病変は観察されなかった。以上の血清学的、病理学的検索の結果は、北西太平洋に棲息する2種のヒゲクジラ(*Mysticeti*)におけるブルセラ菌の感染を示唆している。なお本発表は Ohishi et al. (2003) *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 125-136. に基づく内容である。

DB-9 過去11年間に分離された豚丹毒菌約800株の血清型別および血清型1a型菌のアクリフラビン耐性試験と遺伝子型別

今田由美子¹、高瀬相²、早川裕²、赤地重宏⁴

(¹動衛研・製剤センター、²富山県東部家保、³石川県南部家保、⁴三重県中央家保)

【目的】過去11年間に22県の各種豚丹毒から分離された豚丹毒菌の血清型による疫学解析を行い、血清型1a型菌については現行の生菌ワクチン株(小金井株、血清型1a、0.02%アクリフラビン(AF)耐性、マウス低病原性をマーカーとする)との識別を試みる。【方法】急性敗血症、じんま型、慢性型心内膜炎および関節炎由来の798株(各37、47、70、644株)を血清型別した。小金井株、藤沢株(強毒)および1a型野分分離株全386株についてAF耐性、RAPD型、リボタイプを調べ、AF耐性株と感受性株計50株についてはマウス病原性とRFLP法も調べ、ワクチン株識別法を検討した。【結果】血清型の内訳は1a385株、1b143株、2b252株、N15株、その他3株で、敗血症は1a、じんま型は2bについて1a、心内膜炎は2bと1a、関節炎は1aについて2bと1bが多かった。関節炎由来1a型菌314株の77%はAF耐性で、分離頻度は1996年から1998年には関節炎由来株(全血清型)の80%近くまで増加したが、コンバインドワクチンが中止された2000年以後急減した。1a型AF耐性株は97%が関節炎由来で、99%がプライマーD9355でワクチン株と同一のRAPD型を示した。このRAPD型を示す1a型菌は、その他の1a型菌に比べてマウス病原性が低く、全265株の92%がAF耐性で、じんま型由来の1株を除き全株が慢性型に由来した。またRAPDによる識別結果はRFLP型、リボタイプとも関連した。【総括】今回用いたRAPD法で小金井株を他の1a型菌から識別できると考えられた。小金井株とRAPD型が一致する株は慢性型関節炎由来株に多くその41%を占めた。

DB-8 ぶり 溶血性レンサ球菌症不活化ワクチン安全・力価試験法の統一化の検討

松田路子¹、吉田照豊²、能田健¹、鈴木祥子¹

(¹動薬検、²宮崎大学・農学部)

【目的】養殖産業においてもワクチンによる予防対策が普及されつつあり、ぶり 溶血性レンサ球菌症に対しては、各製造所社による開発が進められてきている。一方、これらの製剤の安全及び力価試験における試験魚の種類、体重、飼育水温、免疫期間及び攻撃菌株などが多様化してきていることから、客観的な有用性評価法の一つとして、安全及び力価試験法の統一化を検討した。【材料と方法】1)力価試験攻撃用菌株の検討: *Lactococcus garvieae*KG9502株を力価試験の攻撃用候補株とし、培地継代による菌株の安定性を確認した。Todd Hewitt Brothで25-24時間継代を20代まで繰り返し、継代2、5、10、15、20、代株については生物学的及び、血清学的性状検査を実施した。2代、20代につきブリ、カンパチに対する病原性を確認した。2)現行法と改良法の比較:3濃度のワクチン抗原量で免疫し、現行法と改良法を比較した。現行法は安全試験では飼育水温20、観察最終日25、力価試験では27であるのに対し、改良法は安全及び力価試験ともに飼育水温25とした。攻撃菌株は現行法において各製造用株、改良法においてKG9502株を用いた。【結果及び考察】*Lactococcus garvieae*KG9502株は、培地継代20代まで安定であることが確認され、力価試験の攻撃用菌株として用いることが可能であることが示された。現行法及び改良法のいずれにおいても、安全試験期間中に異常は認められず、また免疫群の生存率は投与したワクチン抗原量に応じたドーズレスポンスを示したことから、改良法は現行法と同等な評価が可能であると考えられた。

DB-10 馬の生殖器由来 *Klebsiella pneumoniae* K1 分離株の分子疫学調査-1980年代の子宮炎流行株のPFGE像の解析-

高井伸二¹、猪鼻聡¹、吉田喜一郎¹、角田勤¹、椿志郎¹、樋口徹²、菊池直哉³、安齊⁴

(¹北里大・獣医衛生、²日高農済、³酪農学園大・獣医伝染病、⁴日本中央競馬会総研)

1980年、我が国で初めて確認された馬伝染性子宮炎(CEM)の流行の沈静化に呼応するかのようにより *Klebsiella pneumoniae* 荚膜型1(K1)による化膿性子宮炎が1982年から軽種馬生産地で流行した。本菌はヒトや動物の腸管内および土壌、水、試料等の環境などに広く分布し、馬に対しても荚膜型1(K1)が最も病原性が強いことが知られている。今回、1982年から1993年に北海道日高地方で分離された馬由来 *K. pneumoniae* K1 分離株について生物学的性状、薬剤感受性試験、プラスミドプロファイル、パルスフィールドゲル電気泳動による染色体DNAのPFGE型別などの分子疫学的解析を行い、本症の流行と菌の伝搬経路を明らかにすることを試みた。使用したK1株は馬生殖器由来123株とヒト由来株6株で、その他の荚膜血清型分類された馬と牛からの分離株も加えた。馬生殖器由来123株のSM、KM、TC、CP、ABPC、SIXの6薬剤に対する薬剤感受性試験とプラスミドプロファイルによる解析から、大型プラスミドを保有する4株は6種全ての薬剤に耐性を示し、44継代培養によるこの大型プラスミド脱落株がTCとCPの感受性が回復したことから、これがRプラスミドであると推察された。馬由来K1分離株には7種の大きさの異なるプラスミドが認められ、123株中119株に約5kbの共通したプラスミドが認められた。また、PFGEによる染色体DNAのRFLP解析では馬由来K1分離株全てが極めて類似したPFGE型を示し、系統樹解析においてもこれらの株は、馬由来の他の荚膜型の株、並びにヒト及び牛由来株とは独立したクラスターを形成した。以上の成績から、82年から93年まで北海道日高地方で流行した *K. pneumoniae* による馬子宮炎が一つ或いは少数のクローンから始まった可能性が示唆された。

DB-11 黄色ブドウ球菌同定用PCRプライマーの検討ならびに北海道全域から収集した牛乳房炎乳由来黄色ブドウ球菌の毒素遺伝子および産生毒素について

秦英司¹、勝田賢²、小林秀樹¹、江口正志¹
(¹動衛研、²動衛研・七戸)

【目的】黄色ブドウ球菌(SA)を同定するために有効なPCRプライマーを設計し、そのプライマーを用いたPCRにより同定した北海道全域から収集したSA株が保有する毒素(エンテロトキシン(ETs)、TSST-1)遺伝子および産生する毒素について調査したので報告する。

【方法】PCRプライマー検討のためにSAを含む21菌種36菌株を供試した。2001年7月~2002年3月に北海道全域の牛乳房炎乳から分離されたSA 281株について、PCRによりETsおよびTSST-1遺伝子を、市販のキット(デンカ生研)により産生毒素を検出した。

【結果・考察】1)SAの同定に有効なPCRを確立した。2)乳房炎由来SA 281株中190株はいずれかの毒素遺伝子を保有しており、187株は複数の毒素遺伝子を保有していた。毒素遺伝子保有株の64.7%が *etc*、*etg*、*eti* および *tsst-1* の4種類の遺伝子を保有し、29.5%が *etg*、*eti* の2種類の遺伝子を保有していた。*etb*、*etc* および *tsst-1* 保有株の毒素産生率はそれぞれ100%、99.0%および98.4%であった。3)近年発見された *etg*、*eti* を高率に保有していた。さらにこれらの遺伝子の保有は、牛乳房炎の発病に関与する病原因子として注目されているETCの産生株に高率にみられ、牛乳房炎由来SAの重要な特性である可能性が示唆された。

【謝辞】菌株収集に協力していただいた関係各位に深く感謝する。

DB-13 Secreted proteins of the multiresistant Salmonella typhimurium DT104

Ngwai Yakubu¹、越智幸三²、足立吉数¹
(¹茨城大学・農、²食品総合研究所)

The frequent isolation, multiple antibiotic resistance and virulence of Salmonella typhimurium DT104 is of particular global concern, particularly with respect to food safety. This study compared the protein expression of a selected few isolates of Salmonella typhimurium DT104 and a non-multi-resistant strain Salmonella typhimurium L1338 (ST) with a view to identifying difference (s) unique to DT104s. Our results showed no detectable difference in the major cell protein profile. Major urea-extractable proteins: 22.4 kDa and 29.4 kDa in all isolates, 48.4 kDa (but 54.7 kDa in one DT104 and non-DT104) were observed. Protein secretion into nutrient-rich growth medium was variable, and all (except one of the DT104s) the isolates did not secrete the 38.5 kDa protein when grown iron-limited medium at 37 °C. The non-DT104, however, produced significantly (P < 0.05) less cell protein (based on protein content assay) than the DT104s. Thus, the higher cell protein content of DT104s is possible indication of increased production of protein-like determinants of virulence. These observations will further enhance our understanding of differential protein expression and possible factors contributing to the enhanced virulence of Salmonella typhimurium DT104.

DB-12 弱毒化Salmonella typhimurium を用いたDNAワクチンデリバリーシステムの検討

隈部志野¹、芳賀 猛¹、後藤義孝¹、村山丹穂¹、清水 佑也¹、松井英則²、宮田博規³、三浦智行⁴
(¹宮崎大・家畜微生物、²北里大・北里生命科学研、³産業医科大・動物研究センター、⁴京大・ウイルス研)

【背景および目的】プラスミドを導入した *S. typhimurium* はマクロファージを含めた抗原提示細胞へ貪食される。その後菌が死滅すると菌体内のプラスミドが宿主の細胞核に移行し、プラスミド上の目的遺伝子が宿主細胞で発現され、特に粘膜免疫を効率よく誘導することが明らかになってきた。この性質を利用し、同菌をDNAワクチンのベクターとして応用することへの期待が高まっているが、その機序については不明な点が多く、システムを確立するためには、多くの研究が必要である。今回はレポーター遺伝子を組込んだプラスミドを保有する *S. typhimurium* をマウスマクロファージへバクトフェクションして、同遺伝子の細胞内発現を試みた。【材料と方法】*S. typhimurium* SR-11株を基に *aroA*、*spv*、*phoP*、*rpoE* の各ビルレンス遺伝子を欠損させて弱毒化した4株 (*aroA*、*spv*、*phoP*、*rpoE*) と2337株由来 *aroA* 欠損SL7207株の計5株を用いた。*LacZ* をコードするプラスミド pCMV をこれらの菌にエレクトロポレーションで導入し、BALB/c由来腹腔マクロファージに感染させ、経時的にX-gal染色を行って細胞内のガラクトシダーゼ発現を観察した。【結果および考察】マクロファージにSL7207株をm.o.i. 5~10で感染させた場合、24時間目にガラクトシダーゼの発現を観察できた。また、*phoP*株でも、24時間でガラクトシダーゼの発現を観察できた。その他の株では発現を観察できなかった。現在、発現のための条件の検討を行っている。今後は *in vitro* における発現効率の検討とあわせて、*in vivo* での免疫誘導能についても検討していく予定である。

DB-14 Characterization of the 39kDa protein of avian *Pasteurella multocida* by monoclonal antibody

アルハジ アリフサム¹、澤田 拓士¹、ボラテバイアントマック¹、新中須亮¹、片岡康¹、畠山仁²、大槻紀之³、伊藤治³
(¹日獣大・獣医微生物、²日獣大・比較細胞生物、³農水省・動薬検)

Our previous results suggested that the 39kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* was an adherence factor to chicken embryo fibroblast (CEF) cells (129th Ann. Mtg. Jpn. Soc. Vet. Sci.). Then the present study was done to clarify the role of the 39kDa protein by using monoclonal antibody (Mab).

Mabs were prepared by immunizing BALB/c mice with a crude capsular extract (CCE) of strain P-1059 (serovar A:3), and characterization of the protein was carried out using the Mabs.

Totally 8 Mabs were obtained and all the Mabs recognized 39kDa protein antigen. By applying the Mabs to immune electron microscopy the antigen was observed on the bacterial surface of capsulated strains only. The Mabs inhibited the adherence of encapsulated strains to CEF cells. Mice passively immunized with the Mabs were protected from lethal challenge with virulent strains P-1059 and X-73(serovar A:1).

Thus the 39kDa protein was confirmed as capsular adherence factor of avian *Pasteurella multocida* and was suggested as cross-protective antigen.

DB-15 動物病院に来院したイヌ及びネコより分離された腸球菌の薬剤感受性

辻登¹、村瀬敏之¹、大槻公一¹
(¹鳥取大・農・家畜微生物)

【緒言】腸球菌 (*Enterococcus* 属菌) はヒトや動物の消化管内や外部生殖器等に常在するが、一般に病原性が弱い健康なヒトや動物に病気を起こすことはない。しかし、日和見感染症や院内感染の原因菌になることに加え、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の出現によって社会的な問題となっている。著者らは国内に流通する鶏肉より腸球菌を分離し、薬剤感受性を検討してきた。一方、伴侶動物における本菌の分布や薬剤感受性は明らかではない。そこで、動物病院に来院した動物の糞便より腸球菌を分離した。【材料及び方法】2001年4月から2002年8月までに鳥取大学農学部附属家畜病院及び個人動物病院に来院したイヌ88頭及びネコ5頭(健康診断、ワクチン接種を含む)の糞便より腸球菌の分離を行った。分離菌株の薬剤感受性試験は、NCCLSに準拠し平板希釈法によりMICを計測した。薬剤耐性遺伝子をPCR法により確認した。また、分離菌株DNAのバルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を行い、同一検体から分離された株で異なるパターンを示す場合別個の菌株とした。【結果及び考察】供試した93検体のうち19検体からVanC型VREが25株分離され、そのMIC値は4~16 mg/Lであった。ゲンタマイシン、アンピシリン、クロラムフェニコール及びテトラサイクリンに耐性を示す菌株が、それぞれ、6、5、25及び28検体から分離され、多剤耐性株も存在した。ゲンタマイシン耐性株のMICは256~2,048 mg/Lで、耐性遺伝子 *acc(6')-Ie-aph(2')-Ia* を5株において、また、*aph(2')-Ic* を1株において検出したため、ホスホトランスフェラーゼによるゲンタマイシンの修飾が耐性に関与していると思われる。以上の成績から、イヌ、ネコは多様な薬剤耐性腸球菌を保有していることが明らかになった。

DB-17 平成13年度国内における家畜由来カンピロバクターの薬剤感受性調査と疫学解析

石原加奈子¹、小島明美¹、江崎英剛¹、白木早苗¹、田村豊¹、高橋敏雄¹
(¹農水省動薬検)

【目的】人のカンピロバクター症は、主に鶏肉を原因とする食中毒である。近年、OIE等の国際機関で食用動物におけるキノロン剤使用の公衆衛生に及ぼす影響について検討され、中でも家畜由来 *C.jejuni* のフルオロキノロン耐性の出現動向が注目されている。平成13年度に家畜由来カンピロバクターの薬剤感受性および抗菌性物質の使用状況を調査した。【材料及び方法】12府県の家畜保健衛生所において採材された肥育牛90検体、肥育豚91検体、レイヤー91検体およびブロイラー88検体の糞便を調査検体とした。菌分離はCCDA培地及びCEM培地を用いて行い、生化学的性状および遺伝学的検査により菌種を同定した。薬剤感受性試験は、一濃度ディスク拡散法によりMIC値を推定した。また一部の株について、*DdeI*による *flaA* のPCR-RFLPにより遺伝子型別を行った。【結果および考察】各検体からの分離率は肥育牛28%、肥育豚50%、レイヤー48%およびブロイラー28%で、それぞれ43,76,73及び47株が分離された。分離株の耐性率はOTC(61%)、TS(29%)、NA(28%)の順に高い値を示し、フルオロキノロン耐性株も認められた。フルオロキノロン耐性株が分離された個体のうち、キノロン剤の投与が報告されたのは32例中豚1例、ブロイラー1例のみで、抗菌剤の使用歴と耐性株の分離との関連は認められなかった。各地域から分離されたレイヤーおよびブロイラー由来フルオロキノロン耐性 *C.jejuni* 17株の *flaA* のPCR-RFLP型は6つに分けられ、耐性株の多様性が示唆された。今後、過去に分離された株を含めた解析を進めていきたい。

DB-16 国内における家畜由来細菌(指標菌)の抗菌性物質感受性調査(平成13年度)

小島明美¹、石原加奈子¹、江崎英剛¹、白木早苗¹、秋元京子²、佐藤剛²、田村豊¹、高橋敏雄¹
(¹農水省動薬検、²独)肥飼検)

【目的・背景】腸球菌及び大腸菌は、人や動物が腸内細菌叢として普遍的に有することから、これら指標菌の薬剤感受性を知ることが重要である。また人において、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)や食中毒菌の志賀毒素産生性大腸菌(STEC)が大きな問題となっている。今回は、平成13年度における国内の家畜由来指標菌の抗菌性物質感受性調査結果の概要を報告する。【材料・方法】一般腸球菌は、健康な肥育牛、肥育豚、採卵鶏及びブロイラーの糞便391検体、一般大腸菌は同じく342検体から、各々を定法に従い分離した。またVCM低感受性腸球菌は糞便391検体から、STECは318検体から選択分離を行った。MIC値はNCCLSの寒天平板希釈法で調べた。【結果・考察】一般腸球菌は302株が、一般大腸菌は577株が分離された。VCM低感受性腸球菌は109株、STECは3株が分離された。腸球菌はCP、GM、KM、DSM、OTC、EM、TS、LCM、AVM及びEFMの10薬剤に対する耐性株が存在し、大腸菌ではABPC、BCM、APM、CEZ、CL、CP、CTF、CXM、DM-A、DSM、ERFX、GM、KM、NA、OA、OFLX、OTC及びTMPの18薬剤に対する耐性株が存在した。VCM低感受性腸球菌の *van* 遺伝子を調べたところ、*vanA* や *vanB* を有する株はなく、今回の調査から国内の健康家畜は所謂VREを保有していないことが示唆された。VCM低感受性腸球菌の耐性率は一般腸球菌とほぼ同等であった。STEC(O157)は、2株がVT1とVT2の両遺伝子を有し、1株はVT2遺伝子のみを有していた。これらSTECは供試薬剤のほとんどに対し感受性の傾向を示した。

DB-18 溶血性レンサ球菌症の豚における実験感染系の検討

宇都岳彦¹、藤井誠一¹、岡田宗典¹、向井哲哉¹、小野雅章¹、柴田勲¹、阪野哲也¹、佐藤静夫¹
(¹全農家衛研)

【目的】*Streptococcus suis* (*S.suis*) 2型によって起こる豚の溶血性レンサ球菌症は、豚の哺乳期から育成期にかけて敗血症、髄膜炎、心内膜炎などを起こす急性感染症であり、感染豚は神経症状を呈して死亡する。しかしながら本症の詳細な検討はなされていない。そこで今回、本症の病態を検討するために必要な実験感染系を確立するために接種菌量、接種方法及び病変形成に要する期間について検討した。【方法】8週齢CDCD豚19頭を5区(接種区4区および非接種同居区)に分け、*S.suis* 2型 S-18株(10⁷、10⁸、10⁹、10¹⁰CFU/ml)をそれぞれの豚の耳静脈に1mlずつ接種し、攻撃後14日で剖検を行った。【結果】10⁸~10¹⁰CFU/ml接種区では、40以上の発熱、元氣消失、神経症状、関節炎、起立不能などが認められ、感染後14日以内にすべて死亡したが、10⁷CFU/ml接種区では3頭が死亡し、1頭は起立不能が観察されたが生存耐過した。非接種同居区はすべて40以上の発熱が観察されたが生存耐過した。攻撃菌量の増加に伴ない平均生存日数は短縮する傾向にあった。*S.suis* の分離:感染区ではほとんどの臓器から *S.suis* が分離され、特に扁桃と関節液からの分離が顕著であった。また、非接種同居区でも感染区と同様に菌が分離され、同居感染が成立することが示唆された。【総括】以上の結果から8週齢CDCD豚に *S.suis* 2型 S-18株10⁷CFU/ml以上を1ml耳静脈に接種することで溶血性レンサ球菌症が再現された。

DB-19 既報のプライマーを用いた腺疫 PCR 診断法の構築とその評価

安斉了¹、桑本康¹、帆保誠二¹、片山雅一²、深山美和子²、古屋総子²
(¹JRA 総研・栃木、²千葉県北部家保)

腺疫の PCR 診断は、腺疫菌 (*S. equi*) の M-like protein 遺伝子 (*SeM*, *SzPSe*) の中の *SeM* をターゲットとした nested 法が報告されているが、その感度や特異性については不明確な部分もある。そこで、国内で腺疫の診断に PCR 法を導入することを目的に、既報の PCR プライマーを用いた診断法を構築してその評価を行なった。【材料と方法】PCR プライマーは Newton らの報告した PCR-2 に加えて *SeM* 内に 3 種類 (*SeM*-1,2,3)、*SzPSe* 内に 2 種類 (*SzPSe*-1,2) を nested PCR 用に設計した。PCR のプロトコルは馬伝染性子宮炎の PCR 診断と同じシヤトル法を用いた。ただし、*Tm* 値の低いプライマー (PCR-2, *SzPSe*-2) を用いた系では増幅条件を 3-step (98 1 秒、58 5 秒、72 10 秒) とした。【結果と考察】各 PCR プライマーの反応性を *S. equi* 138 株を用いて検討したところ、PCR-2 はすべての株に反応したが、他のプライマーは 1~5 株に反応しなかった。また *SzP* 遺伝子型が異なる *S. zooepidemicus* 30 株を用いて検討したところ、*SeM* 内に設計されたプライマーはすべての株に反応しなかったが、*SzPSe* 内に設計されたプライマーは一部の株に反応した。次いで PCR-2 の系を用いて、腺疫の集団発生時に 58 頭の馬から経時的に採取した鼻粘膜スワブ 1,122 検体について検討したところ、978 検体 (87.2%) が PCR・分離ともに陰性、59 検体 (5.3%) が PCR・分離ともに陽性、70 検体 (6.2%) が PCR 陽性・分離陰性、15 検体 (1.3%) が PCR 陰性・分離陽性であった。今回の成績から、既報のプライマーを用いて今回構築した PCR 法は、高い感度と十分な特異性を有する腺疫の診断法として応用価値の高いことが示唆された。

DB-21 コッコエースの豚大腸菌症に対する効果試験

西村昌晃¹、丸山賀子¹、田中裕美²、鈍宝宗彦²、村松昌武¹
(¹(財)畜安研、²ユニチカ株式会社)

【目的】コッコエース(酵素処理ヤシ油粕)を飼料添加して給与した子豚に対し、大腸菌を実験感染させた場合の下痢症状及び飼料要求率に与える影響を調べた。【方法】試験実施施設にて出生した 6 週齢の子豚 16 頭を、試験開始時の体重に基づいて、各群の平均体重が概ね等しくなるように、4 頭ずつの 4 群に分けた。試験群は、コッコエース 0.05% 給与群、コッコエース 0.1% 給与群、市販品 A 0.1% 給与群、対照群の 4 群を設定した。コッコエースおよび市販品 A は子豚人工乳前期用標準飼料 SDS No.1(日本配合飼料株式会社製)に前述の濃度になるように添加した。対照群は無添加とした。各飼料は、試験期間を通じて不断給餌した。被検物質給与開始 7 日後および 11 日後に、ストレプトマイシン(SM)耐性 *Escherichia coli* G1253 株(K88 保有)を 2.1×10^{10} CFU/頭及び 1.0×10^{10} CFU/頭経口投与した。第 1 回菌液投与後 6 日間、毎日糞便を採取し、糞便中排泄菌量を計測した。また、採取した糞便の性状をスコア化して評価した。試験開始時、第 1 回菌液投与前、試験終了時に体重を測定した。第 1 回菌液接種前から試験終了時までの飼料摂取量を測定し、飼料要求率を算出した。【結果及びまとめ】コッコエースを給与した試験群は、対照群と比較して下痢の程度は軽く、その持続期間も短かった。この効果は、市販品 A よりも優れており、添加濃度 0.1% で顕著であった。飼料要求率は、コッコエースを給与した試験群は対照群と比較して低い値を示した。この効果は添加濃度 0.05% で市販品 A よりも優れており、添加濃度 0.1% と明確な差はなかった。これらの結果から、コッコエースは、子豚に飼料添加して給与することにより、大腸菌感染による下痢症状の軽減および飼料要求率の改善に資するものと考えられた。

DB-20 腺疫菌 M-like proteins のエピトープ解析

帆保誠二¹、安斉了¹、桑本康¹、和田隆一¹
(¹JRA 総研・栃木)

腺疫の抗体価測定には、腺疫菌 (*Streptococcus equi* subsp. *equi*) の菌体表層から抽出した抗原 (熱・酸抽出抗原) が用いられているが、この抗原は、腺疫菌の亜種である *S. equi* subsp. *zooepidemicus* 抗体にも反応するため、血清診断法としての実用性に乏しい。そこで我々は、腺疫に特異的な血清診断法を開発することを目的に、腺疫菌の熱・酸抽出抗原において主要な反応性蛋白質とされる M-like proteins (*SeM*, *SzPSe*) について、合成ペプチドを用いたエピトープ解析を行った。【材料および方法】既報の推定アミノ酸一次配列に従い、*SeM* の 1-332aa および *SzPSe* の 1-272aa について、それぞれ 4 残基ずつずらした 16 残基ペプチドを合成した。また、*SeM* の中央領域および *SzPSe* の C 末端領域に存在する繰り返し配列についても、それぞれペプチド合成した。血清は腺疫菌 CF32 あるいは *S. zooepidemicus* W60 で免疫した馬および家兔血清、ならびに腺疫菌 CF32、Hidaka/95/2 および NCTC9682 を実験的に感染させた馬血清を用いた。抗体の検出は、合成したペプチドを抗原に用いた ELISA 法で行った。【結果および考察】*SeM* の 1-332aa および *SzPSe* の 1-272aa には複数の抗体反応領域が認められたが、いずれも腺疫菌免疫および感染血清、ならびに *S. zooepidemicus* 免疫血清に反応した。一方、*SeM* に存在する繰り返しペプチド (19aa) に抗体反応性は認められなかったが、*SzPSe* の PEPK 繰り返しペプチドは、腺疫菌免疫および感染血清と強く反応し、かつ *S. zooepidemicus* 免疫血清との反応性は低かった。今回の結果から、PEPK 繰り返しペプチドが腺疫の血清診断抗原に応用できる可能性が示唆された。

DB-22 静脈内接種感染実験モデルにおけるヨネ菌の動態

西森敬¹、内田郁夫¹、田中聖¹、江口正志²、西森知子¹、
福田茂夫²、菊佳男³、岡田洋之³、吉野知男³
(¹動衛研・北海道、²動衛研、³道立畜試、⁴酪農大・病理)

【目的】牛の難治性の下痢を主徴とするヨネ病は幼弱期に経口感染し、長い潜伏期の後に発症するため感染実験モデルの作出に長期間を要している。我々はヨネ菌に特異的に保有される遺伝子挿入配列 IS 900 を検出する PCR において複数の PCR 増幅産物を持つ野外分離株を報告した。今回、この複数増幅産物株 (M 型株) と従来の単一増幅産物株 (S 型株) の病原性の相違を検討するために、静脈内感染させ、菌の動態を追うとともに潜伏期の短縮を検討したので報告する。【材料と方法】実験には 25 頭の子牛 (月齢 3~10 ヶ月齢) を用いた。1 回 1~4 頭を用いて 8 シリーズの感染実験を実施した。ヨネ菌株は M 型の野外分離株 2 株と S 型である野外分離株と参照株を用いた。これらの菌株を 1 回から最高 8 回に分けた接種による単独あるいは複数型の感染モデルを検討し、その接種総菌量は $3.0 \times 10^8 \sim 3.0 \times 10^{10}$ CFU となった。定期的に糞便と血液を採取し、接種後 7, 8, 13, 15, 16 及び 18 週で剖検し、病理学及び細菌学的検討を実施した。【結果と考察】25 例中 23 例で初回接種後 4 週目から 10 週目に持続的な排菌の開始が観察された。M 型菌は S 型菌に比べて早期に持続的な排菌が始まる傾向が観察された。剖検時の肝臓菌数は初回接種後の経過週が長いほど減少する傾向が観察されたが、肝臓菌数を 1 としたときの腸間膜リンパ節、盲腸リンパ節、回腸、回腸末端部の菌数の比は経過週が長いほど高い傾向を示した。摘脾や瀧回接種例での排菌開始は差が見られなかった。以上の結果から静脈内接種されたヨネ菌が腸管に集まるメカニズムの存在が推察された。

DB-23 インターフェロン・ガンマ検出によるヨネネ病の早期診断

森康行¹、菊間礼子¹、宗田吉広¹、吉原一浩¹、犬丸茂樹¹、横溝祐一¹
(¹ 動衛研)

インターフェロン・ガンマ (IFN- γ) 産生能を指標としたヨネネ病の診断については既に多くの報告があるが、その診断基準等は未だ定まっていないのが現状である。そこで、牛 IFN- γ 測定用 ELISA、ヨーネ菌実験感染牛における IFN- γ 産生動態、及び野外出牛への IFN- γ 検査の応用と診断基準等について検討した。【方法】IFN- γ 誘導用抗原として、ヨーニン PPD (J-PPD)、ツベルクリン PPD (B-PPD)、及び Concanavalin A (Con A) を添加する系を設けた。ヘパリン加血液に抗原を添加、24 時間培養後の上清中 IFN- γ 濃度を、抗牛 IFN- γ モノクローナル抗体 (Serotec 社) とビオチン標識抗牛 IFN- γ ポリクローナル抗体を用いた ELISA により測定した。【結果及び考察】実験感染牛では、ヨーネ菌経口接種後 1 ヶ月前後から、J-PPD 刺激による IFN- γ 応答が検出され、接種後 2 年以上を経過しても、J-PPD 刺激に対する IFN- γ 産生が認められた。健康牛では Con A 刺激に対する上清中 IFN- γ 濃度が最も高い値を示したのに対し、ヨーネ菌実験感染牛及び自然感染牛では、J-PPD 刺激に対する上清中 IFN- γ 濃度が最も高い値を示した。さらに、平成 13 年度診断予防技術向上対策事業 (ヨネネ病) において、1329 頭の野外出牛について IFN- γ 検査を試験的に実施した成績より、J-PPD 刺激時の IFN- γ 濃度が、1) Con A 刺激の値よりも高い、2) B-PPD 刺激の値より 1.5 倍以上高い、3) 抗原非添加対照の値より 10 倍以上高い等の点を IFN- γ 検査の一つの判定基準とすることが妥当だと考えられた。

DB-25 豚 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 血清型 11 感染症の発生例と分離菌株の病原性

手塚喜代美¹、鈴木隆春¹、松本浩二¹、天野弘²
(¹ 静岡県・中部家保、² 静岡県・家畜衛生室)

平成 12 年 12 月に静岡県下の一貫経営豚場において、70~90 日齢の育成豚が呼吸器症状を示し、嗜血して死亡する症例がみられた。発生率は約 40% で、2 ヶ月間に 42 頭 (16.8%) が死亡した。約 70 日齢の発症豚 3 頭について病性鑑定を実施したところ、全例に肺の充出血、肝変化、胸膜癒着および全身性リンパ節腫大がみられ、組織学的には化膿性壊死性肺炎像を呈した。細菌学的検査で肺から *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) が分離され、PCR 法による毒素遺伝子の検出および血清学的検査から 11 型菌と同定された。App11 型菌の病原性と市販ワクチンによる防御効果を調べるため、8 頭の SPF 豚を 4 頭ずつ非免疫群および無毒変異型毒素含有ワクチン免疫群に分け、さらに各群の 2 頭ずつをそれぞれ 7.5×10^1 および 7.5×10^2 の生菌で攻撃した。攻撃後 1 週間臨床観察を行い、終了時に剖検した。 7.5×10^2 接種群では接種翌日から全頭が発症し、両群の各 1 頭が死亡した。 7.5×10^1 接種群では、両群に死亡豚はなかった。非免疫群では発咳、食欲不振等の重度の症状を示したのに対して、免疫群の発症の程度は軽かった。死亡豚では全例に化膿性の胸膜肺炎が認められた。生残豚の肺病変は、非免疫群では広範囲に存在し、免疫群では局限していた。以上の試験成績から、App 11 型菌は非免疫豚に対して強い病原性を示し、無毒変異型毒素含有ワクチンにより発症の程度が軽減されることが判明した。

DB-24 *Pasteurella multocida* 野外分離株を用いた牛感染試験

石黒加世子¹、北島崇¹、福山新一¹
(¹ (株) 微生物化学研究所)

【目的】呼吸器症状を示した野外出牛から分離された *Pasteurella multocida* (以下 Pm) を用いた子牛に対する感染試験を行い、病原性の確認と Pm 実験感染系の確立を試みた。

【材料と方法】1. 感染試験供試株選定: 動衛研田川裕一博士より分与を受けた Pm 野外分離株計 10 株から、人工培地での増殖性に優れ、マウスに強い病原性を示す BP165 株 (血清型 A:3) を選定した。2. 牛感染試験: 約 3 か月齢の子牛 4 頭を用い、BP165 株 10^7 または 10^8 CFU を含む培養菌液 5 mL、 10^{10} CFU を含む培養菌液 5 mL または 10 mL を、それぞれ 1 頭ずつに気管内接種した。接種後 1 週間、臨床症状の観察、体温測定を行い、 10^7 、 10^8 CFU 接種牛は 1 週間目に、 10^{10} CFU 接種牛 2 頭は 6 週間目に剖検して、肺病変形成の確認と病変部からの菌回収を行った。

【結果】供試牛はすべて、攻撃後 1~2 日間 40 以上の発熱を示し、その後も約 1 週間 39.5 以上であった。 10^{10} CFU 接種牛 2 頭では発咳が観察された。剖検所見では、すべての牛で主に肺の前葉に、境界明瞭な肝変化病変が観察され、内部には膿瘍が形成されているものもあった。病変部からの回収菌数は、攻撃後 1 週目に剖検した 2 頭では $0.5g$ あたり $10^6 \sim 10^8$ CFU、6 週目に剖検した 2 頭では 10^4 CFU であった。

【考察】呼吸器症状を示した野外出牛から分離した Pm を子牛に接種して肺病変を再現し、Pm 単独で肺炎の原因となる得ることを明らかにした。供試した BP165 株の人工培地での優れた増殖性とマウスに対する強い病原性等の性状が牛に対する病原性に関連するかどうかは不明であるが、本実験感染系は牛の肺炎に關する Pm の病原性解明のため有用性は高いと考えられる。

DB-26 SCID マウスにおける *Coxiella burnetii* 株間の病原性解析

安藤匡子¹、長縄崇²、堀田明豊¹、山口剛士²、福土秀人²、平井克哉²

(¹ 岐阜連大・応用獣医、² 岐阜大・家畜微生物)

【背景】Q 熱起因菌 *C. burnetii* は各国で多くの株が分離されている。しかし病原性評価法がなく、株間の病原性解析は進展していない。我々は、SCID マウスが Q 熱の新しい動物モデルになることを Nine Mile 株を中心に明らかにした (Infect. Immun. 2003 印刷中)。【目的】本菌の病原性評価法の開発を目的に、遺伝学的および生化学的性状の異なる株を用いて、SCID マウスに対する病原性を解析した。【材料・方法】菌は Priscilla 株を、動物は C.B-17/1cr-scidJcl マウスを用いた。感染マウス脾臓 10% 乳剤を腹腔内接種し、60 日間観察後病理学的検査を行い、Nine Mile 株感染と比較した。【結果】Priscilla 株感染 SCID マウスは、臨床症状を示したが斃死しなかった。肝腫および脾腫は Nine Mile 株感染よりも顕著であった。Priscilla 株感染 SCID マウスの心臓、肺、脾臓および腎臓では、大量の菌を含むマクロファージ主体の著しい細胞浸潤が認められ、Nine Mile 株感染マウスの組織所見と同様であった。肝臓では、細胞浸潤はグリソソ鞘に局限し組織構造が保たれており、肝細胞は正常であった。【考察】Nine Mile 株感染 SCID マウスは、臨床症状を示し斃死し、肝腫および脾腫が認められる。肝臓では、びまん性細胞浸潤により組織構造が失われ、肝細胞内にも菌が認められる。以上のように、株による病原性の相異がはじめて明確に認められたことから、SCID マウスは本菌の病原性評価モデルとして有用であると考えられる。現在、接種量と症状発現および生存日数についても検索中であり、併せて報告する予定である。今後、SCID マウスを用いて様々な由来の分離株の病原性を解析し、本菌の病原性を解明していきたい。

DV-1 ウマヘルペスウイルス 1 型野外変異株のウイルス性状の解析と変異遺伝子の検索

細井裕香¹、桐沢力雄¹、岡本実²、谷山弘行²、角田修男³、
萩原克郎¹、岩井流¹

(¹酪農大・獣医微生物、²酪農大・獣医病理、³社台コーポレーション)

【目的】2000年に当教室で生後直死馬の肺材料から分離したウマヘルペスウイルス1型(EHV-1)の5089株は、従来の株とは異なり培養細胞で増殖させると主として細胞介在性で伝播した。今回、この原因を明らかにすることを目的に、ウイルス性状の詳細な解析とウイルス遺伝子の全塩基配列の決定を試みた。【材料と方法】EHV-1の野外変異株5089と標準株HH1を用いた。培養細胞には馬皮膚株化細胞を用いた。感染細胞から抽出した5089株のウイルスDNAはBamHIで切断し、pUC18にクローニングして塩基配列決定に用いた。【成績と考察】5089株のウイルスDNAのBamHIプロファイルは1B型を示した。5089株の培養上清中と細胞内の感染価をHH1株と比較したところ、いずれも顕著に低下していた。5089株の感染価はヘパリン添加で低下せず、ウイルス蛋白をウェスタンブロット法と蛍光抗体法で解析したところ、gC蛋白の発現が認められなかった。gC mRNAの発現量をRT-PCRで調べたところ、HH1株に比べて顕著に低下していた。5089株の塩基配列を決定した結果、gCの蛋白コード領域に変異はなかったが、プロモーター領域ならびに転写活性化因子のORF5(ICP27)とORF64(ICP4)のコード領域内にアミノ酸置換が認められた。以上の成績より、5089株が主に細胞介在性で伝播したのは細胞へのウイルス吸着に重要な働きをするgC蛋白の発現がなされていないことが一因で、これはgCプロモーターの変異あるいは転写活性化因子の変異によりgC mRNAの転写が十分活性化されず、mRNAの発現量が著しく低下したためと考えられた。

DV-3 ウマヘルペスウイルス 1 型 (EHV-1) 膜糖蛋白 gE 遺伝子欠損株の生ワクチンとしての接種量検討試験

辻村行司¹、塩瀬友樹¹、近藤高志¹、松村富夫¹

(¹JRA 総研・栃木)

【目的と背景】ウマヘルペスウイルス 1 型 (EHV-1) の膜糖蛋白 gE 遺伝子欠損株 (gE 株) は、ウマに対する病原性を消失しているが、免疫原性は保持している。現在、われわれは、gE 株の生ワクチンとしての臨床応用を目指している。本研究では、ワクチン効果を得るために必要な、gE 株の筋肉内接種量 (PFU 量) を検討した。【材料と方法】初乳非摂取子馬 (28-92 日齢) 9 頭を、各 3 頭づつ 3 群に分けた (10⁶PFU 量免疫群、10⁵PFU 量免疫群および 10⁴PFU 量免疫群)。免疫群については、gE 株を左頸部筋肉内に 3 週間隔で 2 回接種し、第 2 回接種から 4 週後に、EHV-1 野生株を用いて攻撃試験を行った。攻撃試験後は、臨床症状の観察および鼻汁・血液からのウイルス分離等を実施した。なお、非免疫群の成績は、第 133 回本学術集会で発表した成績を参照した。【結果と考察】1) 非免疫群では、攻撃試験後 3~4 日間の発熱が観察されたが、10⁶PFU 量免疫群では、1 頭で発熱が完全に防御され、残りの 2 頭も一過性に 1 日だけ発熱が認められたのみであった。10⁵PFU 量および 10⁴PFU 量免疫群についても、発熱は全頭で認められたが、その期間は非免疫群と比べて短縮していた。また、その他の臨床症状 (膿性鼻漏、下顎リンパ節の腫脹) も、免疫群では認められないか、認められたとしても短期間であった。2) 鼻腔からのウイルス排出期間およびウイルス血症の検出期間は、全免疫群において、非免疫群と比較して短縮していた。以上の成績から、gE 株の 10⁴PFU 量接種で、ワクチン効果の得られることが推察された。また、その効果は接種ウイルス量に依存していると考えられた。

DV-2 ウマヘルペスウイルス 1 型テグメントタンパク質 ORF-13 遺伝子組換えウイルスの作製および性状解析

オチルバグマジャブ¹、福士秀人²、山口剛士²、平井克哉²

(¹岐阜連大・応用獣医、²岐阜大・家畜微生物)

ヘルペスウイルスはウイルス粒子内にテグメントと呼ばれるタンパク質群を有している。テグメントには転写制御因子やアポトーシス阻止因子などが含まれるが、機能不明のタンパク質が多い。これまで、テグメントタンパク質は単純ヘルペスウイルスやオーストラリアウイルスなどで解析が徐々に進んでいるが、ウマヘルペスウイルス 1 型 (EHV-1) については報告がない。今回は、EHV-1 のテグメントタンパク質の病原性への関与を調べるため、テグメントタンパク質 ORF13 遺伝子欠損組換えウイルスを作製し、性状解析を行った。EHV-1Ab4p 株を用いた。Ab4p 株 ORF12 から 14 領域を PCR 増幅しプラスミドクローニングした。ORF13 の一部を欠損させ、欠損部に GFP 遺伝子を挿入した。相同組換えにより Ab4p 株に pT7-ORF13-GFP 遺伝子を導入し、組換え Ab4p-ORF13-GFP 株を作製した。さらに、再び GFP 遺伝子を除いた欠損 ORF13 遺伝子を保有する Ab4p-ORF13 株を作製した。復帰株も作製した。MDBK 細胞における ORF13 株のブランクサイズを、牛腎由来 MDBK 細胞を用いた親株および復帰株と比較したが、ブランクサイズには、差が見られなかった。ORF13 欠損株が得られたことから、ORF13 は培養細胞における増殖に非必須であることが判った。ブランクサイズへの影響も見られなかった。現在、ハムスターを用いて感染実験を行っており、その結果も併せて報告する予定である。

DV-4 ウマヘルペスウイルス 9 型糖蛋白 gI および gE 組換え体のウイルス学的性状

久保田太郎¹、福士秀人¹、松村富夫²、山口剛士¹、平井克哉¹

(¹岐阜大・家畜微生物学、²JRA 総研・栃木)

ウマヘルペスウイルス 9 型 (EHV-9) はトムソンガゼルから分離された強い神経向性ウイルスである。EHV-9 はウマヘルペスウイルス 1 型 (EHV-1) に近縁であり、EHV-1 によるウマの神経疾患を解明するモデルとしても有用である。EHV-9 の神経向性を支配する遺伝子は解っていない。今回、EHV-9 の gE および gI 遺伝子に -ガラクトシダーゼ (lacZ) を挿入した組換え体を作製し、生物学的性状を調べたところ、病原性の減弱が見られたので報告する。【材料と方法】親株として EHV-9 P20 株を用いた。培養細胞はウシ腎臓由来 MDBK およびウマ胎児腎臓由来 FHK 細胞を用いた。分子クローニングは定法に従った。ハムスター実験感染は既報に従った。【結果】EHV-9 の gI および gE にそれぞれ lacZ を挿入したプラスミドを EHV-9 感染 FHK 細胞に形質導入した。gI 不活化ウイルス gI および gE 不活化ウイルス gE を得た。MDBK 細胞におけるブランク形成能を比較したところ、gI は野生株より小さなブランクを形成した。gE は合胞体形成を主とするブランクを形成した。gI 株をハムスターに接種したところ、LD₅₀は野生株の約 100 分の 1 であった。【考察】gI および gE の不活化により EHV-9 のブランク形成能および病原性が変化した。ブランク形成能に差が見られたことから、gI および gE は細胞間伝播やウイルスの細胞からの離脱に互いに異なる役割を担っていると考えられた。神経病原性発現に gI は関与しているが、必ずしも中心的な役割ではないことが示唆された。gE 不活化ウイルスの病原性は現在、検討中である。

DV-5 ヘルペスウイルス gB の α -helix 領域ペプチドによるウイルスの増殖阻害

岡崎克則¹、喜田宏¹
(¹北大・獣医・微生物)

一般に、エンベロープウイルスの膜融合蛋白には 2 ケ所の α -helix 領域が存在する。HIV gp41 とパラミクソウイルスの F 蛋白のこの領域に相当する合成ペプチドは各々のウイルスの膜融合過程を干渉して増殖を阻害することが知られている。ヘルペスウイルスの膜融合に与る gB にも 2 ケ所の α -helix 領域が存在することから、その領域の合成ペプチドの抗ウイルス活性を調べた。ウシヘルペスウイルス 1 (BHV1) および単純ヘルペスウイルス 1 (HSV1) gB のアミノ末端側 α -helix 領域に相当する 35 残基のペプチドを合成した。各々のウイルスを $\text{moi}=0.01$ で接種した細胞の培地中にペプチドを添加して培養したところ、濃度依存的にウイルスの増殖を抑えた。各々のペプチドの 50% ウイルス増殖阻害濃度は約 $5 \mu\text{M}$ であった。一方、 $\text{moi}=10$ では著明な増殖阻害は認められなかった。ウイルスの接種前およびウイルス接種後 1 時間の吸着時にペプチドを加えた場合には増殖阻害は認められず、吸着後に加えた場合のみウイルスの増殖が抑制された。HSV1 gB の合成ペプチドは HSV1 によるシンシウム形成を抑制した。以上の成績から、ヘルペスウイルス gB の α -helix 領域ペプチドはウイルスの膜融合過程を干渉し、cell-to-cell 感染を抑制することによってウイルスの増殖を阻害するものと考えられる。マウスを用いて HSV1 gB ペプチドの *in vivo* における抗ウイルス活性を評価する計画である。

DV-7 マレック病由来腫瘍細胞株における Meq タンパク質の解析

岡田幸¹、張景洙²、大橋和彦²、小沼操²、高木道浩¹
(¹神戸大・農、²北大・獣医・感染症)

【目的】マレック病ウイルス血清型 1 (MDV1) の強毒株には腫瘍化に重要と考えられている *meq* 遺伝子が、また弱毒ワクチン株や株化細胞においては挿入配列を含む *L-meq* 遺伝子が主に存在している。我々は第 133 回学会で、株化細胞において転写レベルで *meq*、*L-meq* さらに *bZIP* および転写活性ドメインが欠損した 400 bp の *meq* (*meq-del*) 遺伝子の発現が認められたことを報告したが、その機能については未だ不明である。今回、*meq* 遺伝子のタンパク質レベルでの解析を行った。【方法】マレック病由来細胞株 MSB1-O、MSB1-cl.18 および RP1 を薬剤 (アクチノマイシン D、エトポシド、シクロヘキサミド、デキサメタゾン) で処理し、経時的に細胞を回収後、Md5 Meq あるいは Meq-del の融合タンパク質より作製したポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロットを行い、Meq タンパク質の発現について検討した。【結果】アクチノマイシン D、エトポシドあるいはシクロヘキサミド処理した場合、アポトーシスが誘導され、約 15 kDa のバンドが増加した。しかし、デキサメタゾン処理時は、アポトーシスは誘導されず、この発現は認められなかった。また、Meq-del に対する抗体を用いた時に MSB1-O において約 40 kDa のバンドが認められたが、MSB1-cl.18 においては見られなかった。【考察】アポトーシス誘導時に発現が増加した約 15 kDa のバンドは Meq-del タンパク質であること、また MSB1-O において認められた約 40 kDa のバンドは Meq タンパク質であることが示唆され、これらは報告した RT-PCR の結果と一致していた。Meq-del タンパク質は転写制御因子として MDV1 による腫瘍化あるいは株化細胞の増殖維持に関与していることが考えられる。

DV-6 マレック病ウイルス血清型 1 接種鶏における NK レセプターの解析

高木道浩¹、張景洙²、大橋和彦²
(¹神戸大・農、²北大・獣医・感染症)

【目的】ニワトリの MHC 遺伝子中に存在する NK レセプター遺伝子 (NKR) が、マレック病ウイルス (MDV) に対する抗病性に関与することが報告された。我々はハプロタイプの異なるニワトリの NKR について比較検討したところ、MDV に感受性のニワトリでは抑制に、抵抗性では抑制性レセプターの機能が働かないことを示唆した。また、その時に用いた白色レグホーン種では抵抗性と同様の NKR の存在が認められた。今回、MDV 感染における NKR の発現の経時的变化を検討した。【方法】MDV1 の強毒株 Md5 を 1000PFU 接種したニワトリから経時的に脾臓を採材し、cDNA を作製後、NKR 遺伝子特異的プライマーを用いた PCR によって経時的变化を検討した。【結果】感染後 4 日目では NKR 遺伝子の発現が検出限界以下であったが、7~14 日目では顕著に増加した。その後 (潜伏期)、NKR 遺伝子の発現に変化は認められなかった。【考察】NK 細胞の動きが初期細胞障害期では抑制され、潜伏期前に活性化していることが示唆された。NK 細胞はヘルペスウイルス感染に深く関与していると考えられており、マウスサイトメガロウイルスの感染性に NKR が直接関与していると報告されている。今後、抵抗性あるいは感受性ニワトリを用いた更なる解析が必要である。

DV-8 マレック病ウイルス glycoprotein B 特異的イムノトキシンの構築

中村愛¹、李成一¹、大橋和彦¹、小沼操¹
(¹北海道大・獣医・感染症)

【背景と目的】鶏に悪性リンパ腫を引き起こすマレック病 (MD) はワクチンにより発症防御される数少ない腫瘍性疾病の一つである。しかし野外においてマレック病ウイルス (MDV) の病原性は増強傾向にあり、将来現行のワクチンが効力を失う危険性が示唆されている。MDV 感染の際にはウイルス糖蛋白質が主要な働きを担っているが、中でも MDV glycoprotein B (MDVgB) は液性・細胞媒介性免疫など宿主の感染防御免疫を誘導し、MDVgB 発現組み換えワクチンの防御効果も報告されている。一方イムノトキシンは特異的抗体と毒素を人工的に融合した蛋白質であり、癌細胞に特異的に結合し、細胞内から傷害を起こして標的細胞を殺す新しい癌の治療法として注目を集めている。本研究では、MDVgB 特異的イムノトキシンを作成し、その効果について検討した。【方法と結果】抗 MDVgB モノクローナル抗体産生細胞より H 鎖および L 鎖超可変領域の CDR 領域をクローニングし、遺伝子工学的に抗 gB 一本鎖抗体遺伝子を構築した。そして緑膿菌からクローニングした緑膿菌毒素遺伝子を一本鎖抗体遺伝子に結合させ、抗 MDVgB イムノトキシン (IT-gB) 遺伝子を構築した。IT-gB 遺伝子を大腸菌発現系を用いて組み換え蛋白質として発現させ、87kDa の TRX 融合蛋白質として調製した。IT-gB は MDVgB 遺伝子導入により作成した MDVgB 強制発現細胞に対して特異的に結合し、細胞傷害を示した。さらに強毒 MDV 株の感染に対して試験管内で感染阻害作用を示すことが明らかとなった。【考察】今回構築した抗 MDVgB IT-gB の *in vitro* における特異的傷害活性が明らかとなったが、今後鶏の接種実験を行って、生体内における IT-gB の感染防御ならびに抗腫瘍効果を検討する必要がある。

DV-9 ブタ内在性レトロウイルスのレセプター

宮沢孝幸¹

(¹JST・PRESTO・生体と制御、大阪大・微生物病研究所・
エマージング感染症研究センター)

ヒトは、進化の過程で β -1,3 ガラクトース転移酵素の遺伝子が不活化された。そのため、 β -ガラクトース (β -Gal) 抗原を外来抗原として認識し、抗 β -Gal 抗体が大量に誘導されている。他の動物の細胞で増殖したエンベロープウイルスは、エンベロープに β -Gal 抗原を持つので、ヒトがこのウイルスに暴露されたとしても、抗 β -Gal 抗体と補体によりウイルスが中和され、感染は成立しにくい。現在、ブタの臓器や細胞を異種間移植する方法が活発に研究されており、超急性拒絶反応を抑えるために補体制御遺伝子や糖転移酵素遺伝子を導入したブタなどが開発されている。しかし、そのような手法は、抗 β -Gal 抗体を介したウイルスに対する自然抵抗力を減弱させてしまう。ヒトに感染する可能性があるブタのウイルスのうち、最大の問題はブタ内在性レトロウイルス(PERV)である。ヒトに感染する PERV は少なくとも 2 種類 (PERV-A、 β -) 存在する。Imerge BioTherapeutics (IBT) 社と University College London (UCL) は、PERV-A の感染・増殖に必要な分子の遺伝子クローニングに成功した。我々はその遺伝子を非感受性細胞に導入することで、その分子がウイルスの Env との結合に必要な分子 (レセプター) であることを確認した。この分子は他のガンマレトロウイルスのレセプターと同じく multiple transmembrane-spanning 蛋白であったが生理学的機能は不明である。(本研究は IBT 社 (Ericsson 博士、Patience 博士ら) および UCL (Takeuchi 博士、Weiss 博士ら) との共同研究である。)

DV-11 ウシ アダプチンの BLV 受容体としての機能の評価

鈴木孝子¹、松原豊²、木谷裕³、小山卓美¹、池田秀利⁴

(¹動衛研・免疫研究部、²動衛研・企画調整部、³生物資源研・動物生命研、⁴動衛研・感染症研究部)

ウシ白血病ウイルス(BLV)の受容体として、ベルギーのグループによってクローニングされた遺伝子(BLVRcp)は、機能不明のタイプ I 膜貫通タンパク質をコードすると報告された。その後、ヒトやマウスの相同遺伝子の解析から、この遺伝子は細胞内でタンパク質輸送を担うアダプタータンパク質複合体(AP)-3 のサブユニット (アダプチン) に類似していることが示されたが、BLVRcp だけが膜貫通領域を持つ点が大きく異なっていた。今回我々は、BLVRcp が アダプチンとどのような関係にあるのか調べるため、BLVRcp と相同性の高いウシの遺伝子 (boAP-3) を再クローニングして解析した。塩基配列から、boAP-3 はヒト・マウス アダプチンと非常に高い相同性を示し、コードするタンパク質も、ヒト・マウス アダプチンと同様、膜貫通領域を持たない事が示唆された。蛍光タンパク質 GFP との融合タンパク質(GFP/)としてウシの細胞に発現させた boAP-3 は、細胞質に局在し、細胞表面には発現していなかった。更に、GFP/ が AP-3 の他のサブユニットと複合体を作ることが確認された。これらの結果より、再クローニングした遺伝子 boAP-3 は、ウシ アダプチンであることが示唆された。BLVRcp と boAP-3 の塩基配列は、タンパク質コード領域・非コード領域で共に高い相同性を示しており、BLVRcp のみに存在する膜貫通領域は、1 塩基の挿入によるフレームシフトによって形成されていた。

DV-10 日本国内における牛白血病ウイルス genotype の分布

Asfaw F. Yilkal¹、都筑智子³、小西美佐子²、坪井孝益²、呉東来⁴、
泉對博²

(¹JICA、²動衛研、³茨城県北家保、⁴ハルビン獣医研)

【目的】牛白血病ウイルス (BLV) は抗原性で分類すると 1 種類の血清型になるが、遺伝子を指標として分類すると、数種類の genotype に分類される。日本国内の各地から BLV 感染牛の血液を採材し、抹消白血球中の provirus の遺伝子を解析し、国内における BLV genotype の存在状況を調べた。

【方法】検査材料は、各地の家畜保健衛生所の協力を得て、16 道県、約 50 ケ所の BLV 汚染農場から、約 800 例の牛血液を採材し、寒天ゲル内沈降試験 (AGID) および nested PCR により BLV 感染の有無を確認した。AGID と PCR の結果を比較するとともに、PCR 陽性となった材料について、nested PCR で増幅した gp51 領域内の 420bp を 3 種類の制限酵素で切断し、その電気泳動像から分類を行った。

【結果】国内の BLV 感染牛は、大部分が 1 型であったが、東北地方では 3 型が広く分布していた。九州地方で 5 型の汚染農場が認められた。数例であるが、2 型と 4 型の感染牛が散発的に存在した。ほとんどの感染牛は 1 種類の genotype の感染であったが、複数の genotype が感染していると思われる牛が数例確認された。AGID と PCR の結果はほとんど一致したが、片方だけ陽性となる例が約 5% 存在した。AGID の抗原は 1 型で作製しているが、特定の genotype 感染農場で AGID と PCR の結果が大きく異なることはなかった。

【総括】BLV は PCR 産物の制限酵素切断像を指標とした疫学調査が可能である。既報の論文では、1 型は米国の牛で、3 型と 5 型はヨロップの牛で報告されている。国内でも特定の地域で特定の genotype が感染している傾向がある。また、AGID、PCR ともに、単独では BLV 感染牛を検出できない可能性がある。BLV 感染牛の摘発をより完璧に行う際は、両検査を併用する必要があると思われる。

DV-12 BLV 産生細胞におけるアポトーシス制御

高橋雅彦¹、田島茂¹、岡田幸助²、間陽子¹

(¹理研・分子ウイルス、²岩手大・農)

【目的】牛白血病ウイルス(BLV)は B リンパ腫である地方病性牛白血病を誘発する。これまでに、BLV 感染羊を用いた *ex vivo* 培養において、白血病の標的細胞である CD5 陰性 B 細胞にアポトーシスの抑制が誘導されることを報告してきた。そこで BLV によるアポトーシス制御機構を明らかにするため、*in vitro* 及び *ex vivo* における BLV 抗原陽性細胞のアポトーシス動態を解析したので報告する。【方法】野生型 Tax 及び BLVLTTR に対する活性が野生型に比べ顕著に高い高活性型 Tax をコードする BLV 感染性分子クローン (pWt-IF 及び pHigh-IF) を準備した。293T 細胞に一過性に導入し、caspase 活性化剤 Staurosporine (STS) を添加して培養後、活性化 caspase と BLVp24 を二重蛍光染色し、p24 陽性及び陰性細胞別にアポトーシス陽性細胞の割合を算出した。また、BLV 感染性分子クローン感染羊より分画した末梢血単核球 (PBMC) を *ex vivo* 培養し、STS で刺激した後に同様の方法でアポトーシスを検出した。【結果】2 つの pBLV-IF を導入した 293T 細胞では、BLV 抗原発現細胞に特異的にアポトーシスが同程度に観察された。次に、STS 刺激を加えると、pWt-IF を導入した細胞では、BLV 抗原発現細胞の割合の上昇と同時に、アポトーシス陽性細胞の割合が減少したが、pHigh-IF を導入した細胞では変化が認められなかった。さらに、pWt-IF 導入羊の PBMC を *ex vivo* 培養すると、STS 刺激後に BLV 抗原の発現量及びアポトーシスの活性化が観察されたが、pHigh-IF 導入羊では変化が認められなかった。【考察】STS 刺激によって BLV 抗原の発現誘導と共にアポトーシスの抑制が誘導されることから、これらには共通の経路が関わっていることが予測された。また、この経路は高活性型 Tax によって常に活性化している可能性が示された。

DV-13 ウシ白血病ウイルス(BLV)の再活性化機構の解析

田島茂¹、間陽子¹
(¹理研・分子ウイルス)

【目的】ウシ白血病ウイルス(BLV)感染個体内におけるウイルス遺伝子発現は非常に低レベルに抑えられている。しかし感染個体血液より末梢血リンパ球を分離後培養するとウイルス発現が速やかに誘導されることが知られており(再活性化)、他個体への伝播機構を考えると非常に興味深い。今回我々は、この再活性化の誘導条件およびこれに關する細胞側因子の同定を試みた。

【方法】BLV 感染および非感染牛より採血後、全血のままあるいは白血球を分離したのちに RPMI1640 培地で懸濁後、各種薬剤存在下で 2 時間 37 °C で保温した。全血は保温後に赤血球を除去した。保温処理後の細胞より、RNA あるいは細胞質画分および膜画分を分離し、それぞれ RT-PCR 解析によるウイルス RNA の定量およびウエスタンブロット解析による PKC 蛋白の活性化状態を調べた。

【結果および考察】今回我々は、採血後全血の状態では 37 °C で保温することによりウイルス RNA 量が短時間の間に著しく誘導されることを見出した。この上昇は PKC 阻害剤である H-7、及び Ca²⁺キレート剤である BAPTA/AM によって阻害された。また白血球分画におけるウイルス RNA 量の誘導は他の PKC 阻害剤でも阻害された。一方、チロシンキナーゼ阻害剤や MEK 阻害剤では誘導阻害は観察されなかった。採血により白血球中の PKC が活性化されるかを調べたところ、多くの PKC アイソタイプで活性化が確認された。そこでアイソタイプ特異的な阻害剤を用いて BLV の発現誘導を調べたところ、PKC に対し強く作用する阻害剤で著しく発現誘導が阻害された。以上より、PKC が主に BLV の再活性化に關する可能性が示唆された。

DV-15 牛白血病ウイルス(BLV) Env に対する抗体反応性とウシ MHC クラス II DR 抗原との相関性

竹嶋伸之輔¹、嘉村浩美¹、若本裕晶²、田島茂¹、今内寛³、森田裕²、小沼操³、岡田幸助⁴、間陽子¹
(¹理研・分子ウイルス、²チッソ(株)・横浜研、³北大・獣医、⁴岩大・獣医)

【目的】これまで我々は、ウシ *MHC(BoLA)-DRB3* 遺伝子の多型性と牛白血病ウイルス(BLV)誘発性白血病発症との間に相関性がある事を報告してきた。本実験では、更に詳細な機序を探るため、液性免疫の主な標的となる BLV Env gp51 抗原に対するモノクローナル抗体(Mab)の反応性と *BoLA-DRB3* 対立遺伝子の多型性ととの相関性を解析した。【方法】53 頭のウシより血清及びゲノム DNA を調整した。BLV 感染の有無はゲル内沈降反応法、組み換え gp51 を固相化した競合 ELISA 法、及び PCR 法による BLV provirus の検出により調べた。また BLV のゲノタイプは PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism 法、また、*BoLA-DRB3* 対立遺伝子は PCR-Sequence Based Typing 法により決定した。集団間の有意差検定は遺伝子頻度に基づく直接確率検定により行った。また、ヘテロ接合度の有意差検定は Fisher の直接確率検定法を用いた。【結果】BLV 感染牛の血清を標識抗-gp51Mab を用いた競合 ELISA に供した結果、陽性血清の抑制率に個体差が認められた。そこで、抑制率が平均値以上の値を示したウシを高反応性群、及び平均値以下の値を示したウシを低反応性群とし、各群の *BoLA-DRB3* 対立遺伝子を調べた。まず、両群の間で対立遺伝子頻度の差異を検定したところ、有意差は見られなかった。次に、*BoLA-DR* 鎖を構成するアミノ酸残基を比較したところ、DR⁶⁶ のヘテロ接合度が高反応性群において有意に低いことを見いだした。ヒト及びマウス DR 分子の X 線回折像をもとに、DR⁶⁶ の機能を予測したところ、MHC と T 細胞レセプター-CDR1 及び CDR2 とが相互作用するアミノ酸残基である可能性が示された。【総括】DR⁶⁶ がホモ接合体である個体において、gp51 に対する免疫応答性が強く誘導される可能性が示唆された。

DV-14 モノクローナル抗体による牛白血病ウイルス表面抗原 gp51 の検出

若本裕晶¹、森田裕¹、高橋雅彦²、間陽子²
(¹チッソ(株)・横浜研、²理研・分子ウイルス)

【目的】牛白血病ウイルス(BLV)の主要表面構造糖タンパク(gp51)に対するモノクローナル抗体を作成し、それらを用いた感染抗体や抗原測定系の開発の可能性を探索した。【方法】gp51 遺伝子を組み込んだ組み換えバキュロウイルスをカイコに感染増殖させ、得られた体液から組み換え gp51 を精製した。これを免疫原として、Balb/c マウスに接種し、最終的に 4 種のモノクローナル抗体(Mab-1,2,7,8)を得た。それぞれの Mab をベルオキシダーゼ標識した。組み換え gp51 を固相化した競合 ELISA の系で牛血清中の抗体検出及び BLV 感染 FLK 細胞及び培養液からの抗原の検出を行った。【結果】それぞれの標識 Mab を用いた競合 ELISA では牛陽性血清は全て抑制率が 80%以上であった。4 種の Mab の認識エピトープは 1 と 2 及び 7 と 8 がそれぞれ近似していた。BLV 感染 FLK 細胞の抽出液を SDS+2Me で処理してウエスタンブロット法を行なうと、SDS+2Me に耐性のエピトープを Mab-7 が強く、Mab-1 及び 2 は弱く、また Mab-8 は認識しないことが明らかとなった。これらの Mab をプレートに固相化し、BLV 感染 FLK 細胞培養上清を加え、続いて標識 Mab を反応させると、4 種の Mab は全て抗原を検出することが可能だった。【総括】BLV の抗原検出法は CC81 細胞を用いたシンシチウムアッセイや高度免疫血清を用いた蛍光抗体法などが知られている。得られた Mab は、これらに加えて新たにウエスタンブロットや ELISA による抗原検出に応用可能であると思われる。

DV-16 国内で発生した山羊関節炎・脳脊髄炎-感染状況の調査と発症山羊からのウイルス分離

都筑智子¹、小西美佐子²、坪井孝益²、芳川恵一³、小林千穂³、泉對博²
(¹茨城県東家保、²動物衛研、³長野県松本家保)

山羊関節炎・脳脊髄炎(CAE)は、レトロウイルス科の CAE ウイルス(CAEV)感染による山羊の不治性進行性疾患である。今回、国内において本疾患の初発例を確認したので報告する。

2002 年 7 月、長野県松本家畜保健衛生所より動物衛生研究所に、関節の腫脹又は呼吸器症状を呈する山羊 2 頭の病性鑑定が依頼され、病理学的検査の結果 CAE が疑われた。この 2 頭が飼育されていた農場で関節の腫脹を示す山羊やその同居山羊について、寒天ゲル内沈降試験(AGID)による抗体検査及び PCR による末梢白血球中のウイルス DNA の検出を行ったところ、30 頭中 19 頭が CAEV に感染していると判定された。症状を示す抗体陽性の 2 頭を病理解剖した結果、病理組織学的に非化膿性関節炎と乳房炎が観察された。また、関節組織、関節液、末梢白血球などを羊胎児肺細胞に接種しウイルス分離を試みた結果、1 頭の関節液から CAEV が分離された。

本疾患の感染状況を調べるため、発生農場の山羊全頭(過去の保存血清を含む)と長野県及び茨城県において、山羊が飼育されている各地の農場から臨床的に症状が疑われる個体及び任意抽出した個体について、抗体検査及び末梢白血球からのウイルス DNA 検出を行った。抗体陽性となった検体数は、発生農場で 117/196、長野県で 42/142、茨城県で 94/390 であった。茨城県で陽性山羊が存在していたのは発生農場から山羊を導入した農場に限定されていた。

現在、各地の家畜保健衛生所の協力を得て、発生農場から山羊の移動があった農場を対象に本疾患の疫学調査を行っているが、個々の農場で CAE が蔓延した形跡はなく、本疾患の伝播力は弱いと思われる。

DV-17 short interfering RNAs (siRNAs) による FIV 特異的遺伝子発現抑制

馬場健司¹、水越文徳¹、堀内弘司¹、増田健一¹、大野耕一¹、辻本元¹

(¹東大・獣医内科)

【背景と目的】short interfering RNAs (siRNAs) は 3' 末端側に 2 塩基のオーバーハングを有する約 20 塩基からなる 2 本鎖 RNA である。siRNAs は RNase を含む複合体とともに相補的な mRNA と 2 本鎖を形成し、標的 mRNA を特異的に切断する。今回、猫免疫不全ウイルス (FIV) に特異的な siRNAs を FIV 持続感染細胞に導入し、そのウイルス増殖抑制効果を検討したことで報告する。

【材料と方法】FIV Petaluma 株の gag 領域に相同性を有する siRNAs (sigag1, sigag2) および対照として哺乳類の遺伝子とは相同性のない siNS を作製した。FIV Petaluma 株持続感染ネコ線維芽細胞株 (CRFK/FIV) に、siRNAs をカチオニックリポソーム法により導入した。遺伝子導入 48 時間後に FIV gag RNA の発現を real-time sequence detection system によって定量した。また、培養上清中の逆転写酵素活性および細胞質内 FIV p24 蛋白の発現をそれぞれ RT-assay およびフローサイトメトリー法により検出した。

【結果と考察】sigag1 および sigag2 を遺伝子導入することにより、FIV gag RNA の発現量、培養上清中の逆転写酵素活性値および細胞質内 FIV p24 蛋白発現量の低下が認められた。対照である siNS 導入群ではいずれの測定においても発現量に変化は認められなかった。以上の結果より、今回作製した siRNAs は FIV 遺伝子発現を特異的に抑制することが示され、RNA 干渉作用を応用した FIV 感染症に対する新規遺伝子治療法の開発に有用な知見が得られた。

DV-19 ウイルス回収効率の高い狂犬病ウイルス感染性 cDNA 作製系の確立

伊藤直人¹、高山睦代²、山田健太郎²、細川淳二²、杉山誠一¹、源宣之¹

(¹岐阜大・獣医公衆衛生、²岐阜大・大学院連合獣医学研究科)

【背景と目的】最近、我々は狂犬病ウイルス RC-HL 株の感染性 cDNA 作製系を確立した (J. Virol., 2001)。しかし、T7RNA ポリメラーゼの発現に必要なワクチニアウイルスがストックウイルス中へ混入する可能性、ウイルス回収効率を上げるためのプラスミド導入細胞と狂犬病ウイルス高感受性細胞との共培養など、本系には様々な問題がある。そこで、ワクチニアウイルスを使わずに効率よく組換え狂犬病ウイルスを回収する新たな系を確立したので報告する。【材料と方法】T7RNA ポリメラーゼ発現プラスミドと pTK-Hyg (Clontech) を同時に導入した BHK 細胞をハイグロマイシン存在下で培養し、T7RNA ポリメラーゼ恒常発現細胞の選択を行った。また、T7 プロモーター下流のリポソーム内部侵入部位配列により翻訳効率を増強した N、P 及び L 蛋白質発現ヘルパープラスミドを新たに作製した。【結果と考察】上記の方法により、T7RNA ポリメラーゼを恒常的に発現する BHK/T7-9 細胞クローンを樹立した。次に、ルシフェラーゼを発現するミニゲノムプラスミド (第 129 回本学会) を用いて、ヘルパープラスミドの至適導入量を検討した。最も高いルシフェラーゼ活性は N、P 及び L 蛋白質発現プラスミド各々 0.4 µg、0.1 µg、0.2 µg を約 10⁶ 個の BHK/T7-9 細胞に導入した場合に得られた。この条件下で RC-HL 株ゲノムプラスミドを導入した結果、プラスミド導入後 5 日目の細胞に明瞭な CPE が認められ、その培養上清中に 2.1x10⁷ FFU/ml のウイルスが回収された。今回確立した狂犬病ウイルスの感染性 cDNA 作製系は、従来法よりもウイルス回収効率が高く、実験操作も容易であった。本系は、狂犬病ウイルスの分子レベルの機能解析や遺伝子操作によるワクチン開発に利用可能と思われる。

DV-18 サル/ヒト免疫不全キメラウイルス強毒・弱毒分子クローンの塩基配列と増殖能との関連

三浦智行¹、阪井弘治²、篠原克明²、高橋栄治²、コズレフユリ¹、鈴木元¹、伊吹謙太郎¹、速水正憲¹

(¹京大ウイルス研、²感染研)

【目的】HIV-1 由来の env 遺伝子をもちサルに感染するキメラウイルス (SHIV) とアカゲザルの感染・発症系についてウイルス遺伝子、培養細胞、感染個体の各レベルで統合的に性状解析を行うことを目的とする。【方法】強毒株として知られる SHIV89.6P 株由来の分子クローンのアカゲザル感染実験において、感染サルにおける急性期のウイルス量のピークは同程度であるが、その後アカゲザルに短期間でエイズ様症状を引き起こす強毒分子クローンと、3 年以上の経過観察でも全くエイズ様症状を引き起こさない弱毒分子クローンが得られている。両者の塩基配列を比較した後、変異部位を交換した種々の分子クローンを作製し、培養細胞レベルでの増殖能を比較解析した。【結果】強毒クローンと弱毒クローンとの間での塩基配列の違いは、全長約 10kbp 中 17 カ所であり、ORF のアミノ酸変異を伴うものは、6 カ所 (gag-P6/pol-leader, pol-RT, pol-IN, env-gp41 に 3 カ所) であった。これらの変異を組み換えたウイルスの培養細胞における性状解析を行ったところ、感染初期におけるウイルス抗原量あたりの感染価を数十倍程度増強させる変異が gag から pol 領域にかけて存在することが示唆された。【総括】今回、遺伝子上の変異が培養細胞レベルにおけるウイルスの感染価や産生能に、それぞれ独立に影響を及ぼすことが示されたが、それぞれの変異が感染個体レベルでの病原性にどのように影響を及ぼすかアカゲザル感染実験により現在検討中である。

DV-20 狂犬病ウイルス RC-HL 株の N および G 遺伝子は弱毒に関連する

山田健太郎¹、伊藤直人²、高山睦代¹、細川淳二¹、杉山誠²、源宣之²

(¹岐阜大・連合獣医学研究科、²岐阜大・獣医公衆衛生)

【背景と目的】狂犬病ウイルス RC-HL 株は脳内接種により成熟マウスに体重減少を起こすが、致死感染を起こさない弱毒型である。一方、その親株の西ヶ原株は強毒型で、神経症状を伴う致死感染を起こす。これまでに我々は、RC-HL 株のゲノムのうち G 遺伝子 Open reading frame (ORF) のみ西ヶ原株由来の R(G) 株が強毒型を示し、西ヶ原株 G 遺伝子が病原性に関与していることを明らかにしてきた (J. Virol., 2001)。しかし、西ヶ原株のゲノムのうち G 遺伝子 ORF のみ RC-HL 株由来の Ni(G) 株が強毒型を示し、RC-HL 株 G 遺伝子単独では弱毒化に関与していないことを報告した (第 134 回本学会)。このことから、弱毒化には他の遺伝子領域の関与が考えられた。そこで今回は N 遺伝子に着目し、N 遺伝子 ORF を組換えたキメラウイルスを作出して、その病原性を検討した。【材料と方法】N 遺伝子 ORF のみ RC-HL 株由来、その他はすべて西ヶ原株由来である Ni(N) 株、N および G 遺伝子 ORF が RC-HL 株由来である Ni(NG) 株をそれぞれ作出した。病原性はウイルスを脳内接種した 4 週齢の ddY 雌マウスの致死感染の有無により確認した。【結果と考察】成熟マウスにおいて、Ni(N) 株は神経症状を伴う致死感染を起こし、その LD₅₀ は 0.48FFU 以下で強毒型の西ヶ原株の 0.71FFU と大きな差はなかった。しかし、Ni(NG) 株は、成熟マウスに体重減少を示したものの神経症状・致死感染を起こさず弱毒型であった。以上から、RC-HL 株の N および G 遺伝子は弱毒に関連していることが分かった。

DV-21 狂犬病ウイルスの成熟マウスでの致死 的感染に関与するアミノ酸の特定

高山陸代¹、伊藤直人²、山田健太郎¹、細川淳二¹、清水健太²、
杉山誠²、源宣之²

(¹岐阜大・連合獣医学研究科、²岐阜大・獣医公衆衛生)

【背景と目的】我々は、これまでに、リバースジェネティクスの手法を用いて弱毒型の RC-HL 株とその親株で強毒型の西ヶ原株とのキメラウイルスを作出し、狂犬病ウイルスの病原性を解析してきた。その結果、西ヶ原株の糖(G)蛋白質のアミノ酸配列と比較して RC-HL 株で4つのアミノ酸変異が認められた242~303位の領域が成熟マウスに対する致死感染に特に重要であることを明らかにした。(第134回本学会)そこで、今回の領域についてさらに詳しく解析した。【材料と方法】242~303位に存在する西ヶ原株から RC-HL 株への4つのアミノ酸変異のうち、242、255および268位の3アミノ酸のみ西ヶ原株由来で他はすべて RC-HL 株由来のキメラウイルス R(G 242/255/268)株を作出した。また、242および255位の2アミノ酸のみ西ヶ原株由来の R(G 242/255)株および255位のアミノ酸のみ西ヶ原株由来の R(G 255)株をそれぞれ作出した。これらのキメラウイルスの致死病原性は、各ウイルスを4週齢の ddY マウスに脳内接種して確認した。致死性の復帰がみられた株については各群10匹を用いて LD₅₀ を算出した。【結果と考察】R(G 244/255/268)株を接種したマウスは西ヶ原株と同様の神経症状を示し死亡し、その LD₅₀ は 3.8FFU であった。一方、R(G 242/255)株および R(G 255)株を接種されたマウスでは、両株ともに RC-HL 株同様に体重減少のみを示して回復した。以上の結果より、狂犬病ウイルス西ヶ原株のマウスに対する致死感染には、G 蛋白質の3つのアミノ酸242位のアラニン、255位のアスパラギン酸および268位のイソロイシンの複数が関与していることが強く示唆された。今後268位の致死感染における役割について検討する予定である。

DV-23 バキュロウイルス発現系による牛痘ウイルス P 蛋白の作製

金井もえ子¹、米田美佐子¹、藤田賢太郎²、郡山尚紀¹、甲斐知恵子¹

(¹東大医科研・実験動物、²ニューヨーク州立大学)

【背景と目的】牛痘ウイルス(RPV)は、麻疹ウイルス(MV)、イヌジステンパーウイルス(CDV)等と共にパラミクソウイルス科モービウイルス属に分類される。そのウイルス粒子を構成する6つのウイルス蛋白の内、phosphoprotein(P蛋白)はウイルスゲノムの複製と転写に関与し、ウイルスの増殖に重要な役割を果たしていると考えられているが、その詳細な作用機序は明らかにされていない。我々は、P蛋白の作用の解析及び相互作用する蛋白の探索を目的として、組換えバキュロウイルスによるP蛋白の大量発現を試みた。【材料と方法】RPV L株のP遺伝子をクローニングしてバキュロウイルストランスファベクターに組み込み、これを Sf9 細胞にトランスフェクションすることにより GST 融合 P 蛋白発現バキュロウイルス(BacV-GST-P)を作製した。得られた BacV-GST-P の P 蛋白発現を、³⁵S-メチオニン抗体を用いた FA 及び ³²P-ポリクローナル抗体を用いた Western Blotting(WB)により確認した。さらに、GST-tag を利用して GST 融合 P 蛋白のアフィニティー精製を行った。【結果と考察】組換えバキュロウイルスによる GST 融合 P 蛋白の大量発現に成功した。P 蛋白はリン酸化を多く受ける事が知られているが、WBの結果、P 蛋白のバンドは予想される分子量より約20kDa大きい位置に検出されたことから、Sf9 細胞内で産生された P 蛋白分子が均一にリン酸化修飾を受けていることが示唆された。また、アフィニティー精製により組換え P 蛋白の大量精製に成功した。今後、この組換え P 蛋白を用いて P 蛋白に結合するウイルス及び宿主因子の解析を行う予定である。

DV-22 外来遺伝子発現組換え麻疹ウイルスの作出

関貴弘¹、小原恭子¹、泉光輔¹、池田房子¹、小原道法²、
三浦竜一¹、甲斐知恵子¹

(¹東大医科研・実験動物、²東京都臨床研・感染生体防御)

【目的と意義】麻疹ウイルス(MV)、牛痘ウイルス及びイヌジステンパーウイルス(CDV)を含むモービウイルス属の弱毒生ワクチンは免疫誘導能及び免疫持続効果に優れている。我々は既に CDV を用いてモービウイルスが多価ワクチン開発に有効なベクターである事を明らかにしている(第49回日本ウイルス学会)。そこで、今回は同属の MV をベクターとして用い、C型肝炎ウイルス(HCV)の膜タンパク遺伝子を挿入した組換え MV を作出し、その発現を試みた。

【材料と方法】我々が既にリバースジェネティクス系を確立している組換え MV ベクターに HCV の膜タンパクである E1、E2、E12 フラグメントを挿入し、3種の組換えウイルスをレスキューした(rMV-E1、rMV-E2、rMV-E12)。得られた組換えウイルスについて増殖曲線、HCV 膜タンパクの発現、及びその細胞内局在などの基本性状を調べた。

【結果】rMV-E1,2の増殖曲線を親 MV と比較したところ約一日遅い増殖ピークと1/4~1/12程度の最大力価を示した。HCV 膜タンパクの発現をウェスタンブロットング、免疫沈降及び間接蛍光抗体法にて確認した。それぞれ特異的な HCV 膜タンパク発現が見られ、これまでの報告通り ER への局在が確認できた。これにより rMV-E1,2の発現するタンパクは糖鎖修飾、細胞内局在が本来の HCV 膜タンパクと同様に行われていることが示唆された。

【考察】3種の組換え MV (rMV-E1、rMV-E2、rMV-E12)の作製に成功し、種々の免疫学的知見から、これらが発現する E1、E2 は本来の構造及び性質を保持していると考えられた。モービウイルスが外来タンパクの効率的な発現ベクターとして利用でき得ることが示された。

DV-24 牛痘ウイルス Lv 株を用いた新 reverse genetics 系の確立

米田美佐子¹、関貴弘¹、池田房子¹、三浦竜一¹、小原恭子¹、
甲斐知恵子¹

(¹東大医科研・実験動物)

【目的】牛痘ウイルス(RPV)では既に RBOK 株の reverse genetics 系が開発されているが、本株は動物に病原性を示さない。我々はこれまでに、実験感染ウサギに牛痘病態を再現し、病原性解析に極めて有用である RPV-L 株から、ウイルスクローニングにより病原性の高い RPV-Lv 株クローンを樹立した。今回、本株を基に新たな reverse genetics 系の確立を試みた。さらに本系を用いて V、C 蛋白の欠損組換えウイルスを作出し病原性への関与を検索した。【材料と方法】RPV-Lv 株の感染細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法で cDNA を合成した後、direct sequence により全塩基配列を決定した。RPV-Lv 遺伝子全長をコードする full genome plasmid を構築し、supporting plasmids と共に細胞に導入してレスキューを試みた。さらに、P 遺伝子内に改変を加え、V、C 蛋白欠損組換えウイルスも同様に作出した。得られたウイルスをウサギに接種し、臨床症状、臓器でのウイルス増殖性、病理組織学的変化の解析を行なった。

【結果】RPV-Lv のレスキュー、および他の組換えウイルスの回収にも成功した。組換えウイルスの B95a 細胞での増殖様式は親株とほぼ同様であった。rRPV-Lv と rRPV-Lv (V)をそれぞれ104TCID50/匹ずつウサギに接種したところ、いずれも激しい臨床症状を示した。リンパ節でのウイルス増殖および病理組織学的著変を認めた。【考察】RPV-Lv 株の reverse genetics 系を確立することができた。今後病原性発現の分子機構の解析に極めて有用と考える。また RPV の病原性発現への V 蛋白の関与は低いことが示唆された。

DV-25 CDV 感染による ACAT 転写活性の上昇とコレステロールエステルの蓄積

星美穂¹、米田美佐子¹、勝尾知恵¹、久樹晴美²、島崎弘幸²、
小原恭子¹、甲斐知恵子¹

(¹東大医科研・実験動物、²帝京大学・医学部・第一生化学)

【目的】細胞内の過剰コレステロールは ACAT(acyl-CoA:cholesterol acyltransferase)によりコレステロールエステル(CE)に変換されそのレベルは一定に保たれる。近年、麻疹ウイルス感染ラットにおいて脳内の CE 量が異常に多いことが報告されており、麻疹ウイルスと近縁なイヌジステンパーウイルス(CDV)のマウス感染モデル系を用いて脳内 CE 量の変化と ACAT 転写活性を検索したところ、CDV-KG1 株感染マウス脳内で CE 量の増加と ACAT 転写活性の上昇を確認した(第 133 会本学会)。今回我々はマウスに対しより病原性の強い CDV-Bjal 株を用いて詳細な解析を行った。また、CDV 培養細胞系を用いて CDV 感染の ACAT 転写活性への影響を検索した。【方法】6 週齢、雄の BALB/c マウスに、CDV-Bjal 株を脳内接種し、臨床症状を観察した。接種後 1、3、5、7 日に大脳を採材しガスクロマトグラフィーによる CE 量と、定量 PCR 法による ACAT 転写活性の測定を行った。また病理組織学的解析も行った。さらに、ヒトグリオーマ由来の株化細胞(MGC 細胞)に CDV-Bjal 株を moi=0.1 で接種し、ウイルスの感染力価と ACAT 転写活性を測定した。【結果と考察】マウスへの CDV-Bjal 株接種実験において、ウイルス接種群では接種後 5 日から体重が減少し、病理組織学的にも CDV 感染に特徴的な脳炎病変が認められた。また脳内 CE 量が増加し、それに相関して脳内 ACAT 転写活性が上昇した。また、MGC 細胞に CDV を接種したところウイルスの感染力価は 3 日後から、ACAT 転写活性は 5 日後から上昇した。以上の結果から CDV 感染脳において ACAT 転写活性化により CE 量が増加したこと、またその ACAT 転写活性の上昇はウイルス増殖によって誘導されたと考えられた。

DV-27 EGFP-CDV を用いたイヌ海馬におけるウイルス動態の観察

郡山尚紀¹、藤田賢太郎¹、佐藤宏樹¹、三浦竜一¹、小原恭子¹、
甲斐知恵子¹

(¹東大医科研・実験動物)

【背景と目的】イヌジステンパーウイルス(CDV)はモーピリウイルス属に属する非分節型一本鎖 RNA ウイルスである。主にイヌ科動物に呼吸器を介して伝播し、脳炎および全身性の致命的疾患を起こす。我々は CDV(Yanaka 株)のリバースジェネティック法を確立し、さらにゲノムに EGFP 遺伝子を組み込んだ CDV(EGFP-CDV)を作成した。今回我々は、EGFP-CDV を用いて、イヌ海馬に於けるウイルス動態について、海馬の器官培養を用いた研究を行った。

【材料と方法】6 ヶ月齢のビーグル犬の海馬をピプラトームでスライスし、Millicell CM(Millipore 社)を用いて器官培養を行った。海馬スライス表面に EGFP-CDV を接種し、発現した EGFP の蛍光を経時的に観察した。また、感染細胞を同定するためにニューロン(Map2abc)、アストロサイト(GFAP)、オリゴデンドロサイト(CNP)特異的マーカー抗体を用いて免疫染色を行った。

【結果】接種 2 日目から EGFP の蛍光が観察され、イヌ海馬における EGFP-CDV の感染が確認され、また cell-to-cell に伝播する様子が観察された。免疫染色の結果、EGFP-CDV 感染細胞は主に神経細胞であり、感染細胞中オリゴデンドロサイトの感染は約 20%であった。アストロサイトへの感染はほとんど見られなかった。

【まとめ】EGFP-CDV は外来遺伝子である EGFP を感染細胞中でよく発現した。本 EGFP-CDV を用いた観察により、イヌ海馬でのウイルス伝播様式は主に cell-to-cell であった。神経細胞が主な標的細胞であることが明らかになった。本組み換えウイルスは神経細胞のトレーサーとして有用と考えられる。また、外来遺伝子を発現させるウイルスベクターとしての CDV の有用性も示された。

DV-26 イヌジステンパーウイルス N 蛋白の核移行シグナルの同定

佐藤宏樹¹、三浦竜一¹、小原恭子¹、甲斐知恵子¹

(¹東大・医科学研究所・実験動物研究施設)

【目的】イヌジステンパーウイルス(CDV)を含むモーピリウイルス属は細胞質内と核内に封入体を形成し、またウイルス N 蛋白を細胞内で単独発現させると核内に移動する事が報告されている。しかしモーピリウイルス属のゲノム複製や遺伝子発現は細胞質内で行われる事が知られており、核内封入体形成や N 蛋白の核移行の意義などは明らかになっていない。今回我々はこれらの意義を解明する一端として CDV-N 蛋白の核移行シグナルの同定を行なった。

【材料と方法】CDV-N 遺伝子内の一部を順に欠失した一連の cDNA、または一部アミノ酸置換を導入した cDNA を真核細胞発現プラスミドに組み込み、Cos-7 細胞に導入後発現した蛋白の細胞内局在を蛍光抗体法を用いて観察した。また、EGFP と -galactosidase (-Gal) の融合蛋白、及び両蛋白の間に核移行シグナル配列を挿入した融合蛋白を発現するプラスミドを構築し、Cos-7 細胞に導入後発現蛋白の細胞内局在を EGFP の蛍光を指標に観察した。

【結果と考察】全長 CDV-N 蛋白は細胞質と核内の両方に分布したのに対し、5'末端近くの領域を欠失した蛋白は細胞質内にとどまった。そこでこの領域内のアミノ酸を順に Ala 置換したところ明らかに核移行が阻害される配列が同定され、核移行シグナルであると推定された。一方、細胞質に局在する性質を持つ EGFP- Gal 融合蛋白に SV40 large T 抗原の核移行シグナルを挿入すると発現蛋白は核へ移行するのに対し、N 蛋白の核移行シグナルを挿入しても発現蛋白の核移行は観察されなかった。このことから、CDV-N 蛋白の核移行はシグナル配列に加え蛋白の高次構造も関与すると推察された。

DV-28 犬ジステンパー迅速診断法の開発

丹生重光¹、高山勝好¹、翁韶¹、山口良二²、小林行治¹

(¹アドテック(株)、²宮崎大・農)

【目的】犬ジステンパー(CD)は犬の主要な感染症の一つであり、伝染性が強く、多様な症状を呈するため、臨床所見のみで CD と診断することが難しいのが現状である。演者らは、犬ジステンパーウイルス(CDV)抗原を迅速かつ簡便に検出することを目的に、イムノクロマト(IC)法による診断キットを作製し、その有用性を検討した。【材料と方法】精製 CDV を免疫用抗原として、抗 CDV ウサギ抗体を作成した。プロテイン A 等で精製した抗体を固相化用および金コロイド標識用抗体とし、IC キットを作製した。本キットの CDV に対する特異性を確認するために、ワクチン株 5 株および国内分離株 1 株を用いて試験を実施した。また、犬の感染症でみられる主要なウイルス株 5 種および、腸内細菌群 6 種について本キットの交差性を検討した。犬 500 頭より採取した各種材料について、本キットと RT-PCR 法による比較検討を行った。【結果と考察】本キットは CDV のワクチン株(DFE-HC、Fromm、Onderstepoort、Snyder Hill)、および国内分離株(KDK-1)の全ての株と反応した。犬アデノウイルス(2 型)、犬コロナウイルス、犬伝染性肝炎ウイルス、犬パラインフルエンザウイルス、犬パルボウイルスとの交差性はなかった。また、腸内細菌群とも反応しなかった。本キットを使用して、野外検体(犬 500 頭)の CDV 抗原の有無を調べた結果、8 検体が陽性と判定され、いずれも RT-PCR 陽性であった。陽性例 8 検体のうち 7 検体で膿性鼻汁等の臨床症状が観察されていた。本キットは、CDV に対する特異性を有し、簡便かつ短時間で判定可能な検査キットであり、CDV 抗原検出に有用な診断法と考えられる。

DV-29 犬ジステンパ - とコロナウイルス感染症の Real-Time RT-PCR 診断

橋本美知留¹、羽島隆之¹、大内敦夫¹、望月雅美¹
(¹ 共立製薬・臨床研)

【背景と目的】PCR法はその利便性から多くの領域で遺伝子診断法として定着している。感染症診断においては、特に病原体の分離等が技術的に難しく信頼性が低い場合は重用される傾向にある。しかし、その高い鋭敏性故に偶発的汚染による「偽陽性」が当初から指摘されてきた。特に日常的に当該微生物や臨床材料を扱う環境では恒常的問題である。そこで cross-contamination が少なく、最近応用著しい Real-Time RT-PCR (rRT-PCR) を犬ジステンパ - ウイルス (CDV) とコロナウイルス (CV) の検出に試み、通常の RT-PCR や、さらに 2nd PCR を実施したものと比較し有用性を考察した。【材料と方法】CDV ではプライマーとプローブは H 遺伝子領域に設定、標準 RNA 鋳型を用いて条件検討し、ワクチン型、Asia/H1 型、Asia/H2 型 CDV に応用できることを確認後、感染を疑う 19 頭の犬から採材した 43 検体のスワブを検査した。CV は既報 (J. Virol. Methods, 77:37, 1999) に準じ、犬と猫に由来する実験室内各種 CV 株を経て、犬 86 頭と猫 26 頭の直腸スワブを検査した。【結果と考察】今回設定した CDV rRT-PCR は RT-PCR と 2nd PCR に比較して 10 ~ 100 倍鋭敏度が高く、また定量性であることが確認された。臨床サンプルでは 12 頭由来の 26 サンプルがいずれかの RT-PCR で陽性と判定され、RT-PCR が 15 例、2nd PCR が 18 例、rRT-PCR が 23 例であった。CV では rRT-PCR は同程度の鋭敏度を示したが、臨床サンプルの陽性率は一番低く、2nd PCR が一番高かった。

DV-31 水禽由来ニューカッスル病ウイルスの鶏に対する病原性獲得機序と HN 蛋白の機能

于聖青¹、伊藤啓史¹、大友麗¹、岸田典子²、大槻一¹、河岡義裕³、喜田宏²、伊藤壽啓¹
(¹ 鳥大、² 北大、³ 東大医科研)

我々は野生水禽由来弱毒 NDV Goose/Alaska/415/91 (415 株) を鶏ヒナで継代することにより、鶏に対して致死率 100% の強毒変異株 (9a5b 株) を得ることに成功した。そしてその強毒化には F 蛋白開裂部位のアミノ酸置換が関与していることを報告した (Virology, 2002, 301: 206-211)。今回は NDV のもう 1 つのエンペロープ蛋白である HN 蛋白の強毒化への関わりについて検討した。

本実験には 415 株及び 9a5b 株を鶏ヒナの気嚢で 9 代、脳で 5 代継代して得られた一連の継代株を用いた。HN 遺伝子を RT-PCR により増幅し、その塩基配列を決定した。また、415 株及び 9a5b 株の HN 及び F 遺伝子を発現ベクターにクローニングし、動物細胞で HN 及び F 蛋白を単独あるいは共発現させ、細胞融合能、血球吸着 (HAd) 活性及びノイラミナーゼ (NA) 活性について調べた。

HN 遺伝子の解析から 415 株と 9a5b 株間の HN 蛋白の推定アミノ酸には 128 位 (P H) 495 位 (E K) 及び 573 位 (E 終止コドン) の合計 3 ケ所に置換が認められた。また、415 株の発現 HN 蛋白には HAd 及び NA 活性はほとんど認められなかったのに対し、9a5b 株の発現 HN 蛋白は高い HAd 及び NA 活性を示した。HN 蛋白と F 蛋白を共発現させる実験では 415 株 HN 蛋白あるいは 9a5b 株 HN 蛋白と 9a5b 株 F 蛋白の組合せでのみ細胞融合が見られ、それは前者においてより強かった。以上の成績から 415 株の鶏ヒナ継代による強毒化に伴って HN 蛋白の HAd 及び NA 活性が増大したことが明らかとなった。さらに、それには 128 位、495 位及び 573 位のいずれかあるいは全てのアミノ酸置換が関与していることが示唆された。

DV-30 Molecular characterization of the nucleocapsid protein gene of Newcastle disease virus strains in Japan and development of a restriction enzyme-based rapid pathotyping method

ファンハンミン¹、張景洙¹、真瀬昌司²、大橋和彦¹、小沼操¹
(¹ 北海道大・獣医・感染症、² 動衛研)

Nucleocapsid (NP) protein of Newcastle disease virus (NDV) is essential for virus replication through its interaction with the template for viral RNA synthesis, association with the P-L polymerase during transcription and replication, and most likely interaction with the M protein during virus assembly. In order to characterize the gene encoding the NP protein of some NDV strains isolated between 1930 and 2001 in Japan, and to develop a rapid method for pathotyping of the NDV strains, the nucleotide and deduced amino acid sequences of the NP genes were determined. By the comparison of deduced amino acid sequences of the NP genes, no difference was shown among velogenic strains. Phylogenetic analysis revealed that these old and new isolates were divided into two major groups. One group contains velogenic strains, and the other group contains mesogenic and lentogenic strains. Based on the results of that sequence analysis of the NP genes, one restriction enzyme, *Pst*I, was selected for the pathotyping of those NDV strains by the combination of PCR and the restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). When the reliability of this PCR-RFLP was examined, no digestion by *Pst*I was detected in the case of the NP gene products of velogenic strains whereas *Pst*I cleaved the NP gene products of mesogenic and lentogenic strains at 1 site. The results of this study suggest that, using one restriction endonuclease, *Pst*I, NDV isolates can be rapidly and simply pathotyped though biological significance of this observation remains to be elucidated in the future.

DV-32 中国産輸入家きん肉からのニューカッスル病ウイルス及び H9N2 亜型インフルエンザウイルスの分離と分離株の性状

衛藤真理子¹、真瀬昌司²、岸田典子³、米川和宏¹、高橋周子¹、喜田宏³、須永裕¹
(¹ 動物検疫所、² (独) 動物衛生研究所、³ 北大獣医)

【背景と目的】高病原性鳥インフルエンザ (HPAI) は、1925 年以降日本国内で発生していないが、香港では 1997 年以降発生を繰り返している。わが国への本病の侵入防止対策の一環として中国産輸入家きん肉のウイルス汚染状況を調査した。【材料と方法】2001 年 6 月 ~ 2002 年 12 月に抽出検査で採取した冷凍鶏肉骨髄及び正肉計 593 検体について、鶏胚を用いてウイルス分離を試み、分離されたウイルス株の同定、病原性試験及び遺伝子解析を行った。【結果】ニューカッスル病ウイルス (NDV) 13 株 (分離率 2.2%) 及び鳥インフルエンザウイルス (AIV) 14 株 (同 2.4%) が分離された。両ウイルスともに中国の広範な地域に由来するニワトリの骨髄と正肉から分離された。材料中の感染価は 0.75 ~ 3.0log₁₀EID₅₀/0.02g であった。分離 NDV 株は病原性試験 (MDT, ICPI, IVPI) で強毒株と判定され、F 蛋白開裂部位のアミノ酸配列は RRQKR-F と強毒型であった。全株の F 遺伝子が東アジアで流行している系統 (VII) に属した。分離 AIV 株は全て H9N2 亜型であり、HA 蛋白開裂部位は PARSSR-G と弱毒株のアミノ酸配列であった。3 株を静脈内に接種したニワトリは発症せず、2 株を鼻腔内接種したニワトリの骨髄や肉から AIV が回収された。全株の HA 遺伝子が中国本土でニワトリから分離されている系統 (Y280) に属していた。【考察】以上の成績は中国のニワトリに強毒 NDV と H9N2 亜型 AIV が浸潤していることを示している。HPAI ウイルスは分離されなかったが、H9 亜型のウイルスは弱毒の H5、H7 ウイルスあるいは細菌との混合感染で病原性を示すことが知られていることならびに香港で H5 亜型のウイルスが分離されていることから、これらのウイルスの監視を継続し国内への侵入防止を図る必要がある。

DV-33 中国産輸入家きん肉から分離された H9N2 インフルエンザウイルスのニワトリに対する病原性

岸田典子¹、衛藤真理子²、須永裕²、喜田宏¹
(¹北大獣医、²動物検疫所)

【目的】2001年の輸入検疫で、中国産鶏肉及び骨髄から H9N2 インフルエンザウイルスが分離された。これらのウイルスのニワトリに対する病原性を明らかにするため、2株の H9N2 ウイルスをニワトリに経鼻感染させ、諸組織からウイルス回収を試みた。さらに、*Staphylococcus aureus* に感染したニワトリに対する H9N2 ウイルスの病原性を調べた。【材料及び方法】中国の鶏肉及び骨髄から分離された A/chicken/aq-Y-135/2001 (H9N2) 及び A/chicken/aq-Y-55/2001 (H9N2) の感染鶏胚尿液を4週齢の SPF ニワトリ (白色レグホン) の鼻腔内に滴下接種した。3、7、14日後に血液、筋肉、骨髄を含む諸臓器を採取し、各組織乳剤と血液を10日齢鶏胚に接種し、ウイルスの存否を検した。*S.aureus* を感染させたニワトリを用いて同様に感染実験を行った。【結果及び考察】H9N2 ウイルスを感染させたニワトリの骨髄及び筋肉、腸管、肝臓、脾臓、腎臓などからウイルスが回収された。ただし、呼吸器以外の組織におけるウイルス価は低く、ニワトリは臨床症状を示さなかった。*S.aureus* との混合感染ではニワトリは臨床症状を示し、血液からもウイルスが検出された。以上の成績は、細菌に感染した野外のニワトリがインフルエンザウイルスに感染すると、ウイルスが血液またはリンパ液に入って筋肉及び骨髄に到達することを示している。

DV-35 A 型インフルエンザウイルス蛋白質発現において、コザック則は重要か？

前田寧子¹、堀本泰介¹、五藤秀男¹、高田礼人¹、河岡義裕¹
(¹東大医科研・ウイルス感染)

A 型インフルエンザウイルスのゲノムは8分節のマイナス鎖 RNA に分かれ、それぞれ発現量の異なるウイルス蛋白質をコードしている。真核細胞の mRNA において、AUG がスタートコドンとして効率よく機能するためには3つ前の塩基が A または G であることが重要である (Kozak 配列)。しかし、A/WSN/33(H1N1)インフルエンザウイルスの各分節非コード領域を比較すると、PB1 と NA 以外の6つの分節で AUG の3つ前の塩基が A であるのに対して、PB1 と NA の非コード領域では U である。我々は細胞内にウイルス蛋白質としてポリメラーゼと NP のみが存在する条件下で、この AUG の3つ前の塩基が蛋白質の発現量に与える影響を第133回の本集にて報告した。今回は PB1 と NA をコードする分節で AUG の3つ前の塩基を U から A に置換した変異インフルエンザウイルスを作成しその性質を調べた。各々の変異ウイルスを MDCK 細胞に接種しウイルス蛋白質の発現量を野生型ウイルスと比較したが、大きな差は認められなかった。また、MDCK 細胞に MOI=0.001 でウイルスを接種した場合の増殖も、PB1、NA に各々、あるいは両方に同時に変異を入れたウイルスとともに、親株と同様であった。変異ウイルスのマウスにおける LD50 も、いずれの変異ウイルスでも親株と差は無かった。以上の結果より、PB1 と NA を発現する分節の開始コドン(AUG)の3つ前の塩基はウイルスの増殖ならびに病原性に影響を与えない事が分った。すなわち、インフルエンザウイルス蛋白質の発現量の調節には、翻訳段階のコザック則以外のメカニズムも働いていることが示唆された。

DV-34 強毒インフルエンザウイルスは血液凝固不全を引き起こす

村本裕紀子¹、尾崎弘一¹、高田礼人²、朴天鎬³、寸田祐嗣³、梅村孝司³、河岡義裕²、喜田宏¹
(¹北大獣医・微生物、²東大医科研・ウイルス感染、³北大獣医・比較病理)

【目的】強毒インフルエンザウイルスはニワトリの全身臓器に感染し、数日間で死亡させる。特に甚急経過で死亡する例では、組織の損傷が少なく、その病態は明らかではない。強毒ウイルス感染鶏の血管内に認められる血栓は、血液の凝固異常がウイルスの病原性に関与することを示唆している。本研究では、ニワトリに強毒ウイルスを実験感染させ、強毒ウイルスがニワトリの血液凝固機構に及ぼす影響を調べた。

【材料及び方法】ウイルスは A/duck/Hong Kong/836/80(HK836) 株をバックグラウンドに HK/156/97(H5N1)株の HA をもつ強毒 HK156(dk/HK)株および HK156 の HA を弱毒型に改変した HA をもつ弱毒 HK/9-1-1 株を用いた。10⁷ EID₅₀ のウイルスを6週齢のニワトリの静脈内に接種し、組織病変、組織におけるウイルス抗原の分布を調べた。また、末梢血中の血小板数ならびに血液凝固時間を測定し、宿主の血液凝固能を調べた。

【結果と考察】弱毒 HK/9-1-1 接種鶏は症状を示さず、末梢血にウイルスが検出されなかったのに対し、強毒 HK156(dk/HK)接種鶏は接種24時間後までに70%が死亡した。接種12時間後には、全身組織の血管内皮細胞、脾臓実質細胞、血液中のマクロファージおよび単核球にウイルス抗原が認められた。強毒ウイルス接種鶏の末梢血中の血小板数は接種12時間後には感染前の40%にまで減少し、血液凝固時間は接種6時間後から有意に延長した。死亡した感染鶏の肺の細動脈内に線維素血栓が認められた。以上の成績から、強毒インフルエンザウイルス感染鶏では、血管内皮細胞、血中マクロファージあるいは単核球にウイルスが感染した結果、血液凝固が亢進して血栓を形成し、血小板や血液凝固因子が枯渇して、血液凝固不全に陥るものと考察される。

DV-36 A 型インフルエンザウイルスの NS2 蛋白質に存在する NES 様配列の機能解析

堀本研子¹、堀本泰介¹、河岡義裕¹
(¹東大・医科研・ウイルス感染)

【目的】インフルエンザウイルスは感染細胞の核内でゲノムを複製し、合成されたウイルス RNA (vRNA) はリボ核酸複合体 (RNP) として核外に輸送される。RNP の核外輸送には NS2 蛋白質が関与するがその詳細は不明である。私たちは、NS2 蛋白質が核外輸送を担う細胞因子 CRM1 と結合し RNP の核外輸送を誘導すること、NS2 蛋白質に存在する nuclear export signal (NES)様アミノ酸配列は CRM1 との結合には関与しないが、RNP の核外輸送には重要であることを報告した (Neumann et al. EMBO, 2000)。NES 様配列中の3カ所の疎水性残基に同時に変異 (M16A, M19A, L21A) を導入すると、RNP の核外輸送が阻害され、感染性ウイルスは回収されなかった。今回、この NS2 蛋白質 NES 様配列のウイルス感染における重要性をランダム変異法を用いて解析した。【方法】変異ウイルスは A/WSN/33(H1N1)を用いたリバースジェネティクス法により作製した。NS2 蛋白質の NES 様領域 (12-ILMRMSKMLQ21) をコードする30塩基を6塩基ずつ5つの領域に分け、それぞれの領域をランダム (nnnnnn) に変えた vRNA 転写用プラスミドを構築し、リバースジェネティクスを行った。回収されたウイルスをブラック純化し、それぞれの NS2 遺伝子の塩基配列を解析した。【結果と考察】5つ全ての領域で変異をもつウイルスが得られた。NES 機能に重要であると考えられるそれぞれの疎水性残基において他ものアミノ酸への置換が許容された。しかし、多くは他の疎水性アミノ酸への変異、あるいはその前後に疎水性アミノ酸を伴う変異が認められた。したがって、ウイルス感染において野生型の NES 様配列は絶対的なものではなく、ある疎水性の範囲内ではそれが機能がうることが示唆された。

DV-37 A 型インフルエンザウイルス粒子への M vRNA 分節の取り込み機構

前田潤子¹、河岡義裕¹
(¹東大医科研・ウイルス感染)

【目的】 A 型インフルエンザウイルスは 8 本の RNA 分節を遺伝子として持つ。感染細胞で合成されたウイルス RNA (vRNA) は形質膜から出芽するウイルス粒子に取り込まれる。この分節 vRNA の粒子中への取り込みについては、取り込みに関する構造 (パッケージングシグナル) が存在すると予想されていたが、その詳細はほとんどわかっていなかった。私たちの研究室では、NA、HA および NS vRNA に GFP 遺伝子を挿入した vRNA 分節を作製し、ウイルス粒子への取り込みを調べ、コード領域両末端にパッケージングシグナルが存在することを明らかにした。本研究では M vRNA のパッケージングシグナルを解明することを目的とした。【方法】 リバースジェネティクス法を用いて、M vRNA に GFP 遺伝子を挿入した変異 M vRNA がどの程度ウイルス様粒子 (VLP) に取り込まれるのかを調べた。【結果と考察】 M vRNA の非コード領域しか持たない変異 vRNA はウイルス粒子にほとんど取り込まれなかった。一方、非コード領域とコード領域の両末端を持つ変異 M vRNA は効率よくウイルス粒子中に取り込まれた。また、コード領域の 3' 末あるいは 5' のどちらか片方しか持たない変異 M 遺伝子はあまり取り込まれなかった。これらの結果は、M vRNA 分節においても、NA、HA および NS vRNA 分節と同様にパッケージングシグナルが vRNA のコード領域の両末端に存在することを示している。

DV-39 2001 年に鹿児島県で発生したチュウザン病

中嶋久仁子¹、藏園光輝¹、鬼塚剛¹、田崎道弘¹、大橋誠一²、津田知幸²
(¹鹿児島中央家保、²動衛研九州)

チュウザン病は、1985/86 年にかけて主に九州地方で発生が見られ、それ以降では 1997 年にも鹿児島県で発生が報告されている。今回、2001 年 2 月から 4 月にかけてチュウザン病を疑う疾病の発生が見られたのでその概要と原因ウイルスについて報告する。発生はいずれも黒毛和種牛で、母牛の産歴は初産から 7 産であった。また、12 例中 8 例の母牛には異常産 3 種混合ワクチンが接種されていた。先天異常子牛は体型的には何ら異常を示さず、病理解剖において大脳欠損のみもしくは水無脳症・小脳形成不全症候群 (HCH syndrome) が共通して観察された。病理組織学検査においては、大脳実質の菲薄化と石灰沈着、血管性細胞浸潤、小脳の低形成などが観察された。ウイルス検査において、12 例の母牛、子牛ともチュウザンウイルス (31 株) に対する中和抗体を血清中に保有しており、そのうち初乳未摂取の 2 頭の子牛血清及び初乳摂取子牛 3 頭の脳脊髄液においてチュウザンウイルスに対する中和抗体のみが検出され、この 5 例をチュウザン病と診断した。平成 13 年 6 月末から 11 月までのおとり牛を用いた抗体検査では、9 月以降に鹿児島県下でチュウザンウイルスに対する抗体が陽転 (37%) し、ウイルスの流行が確認された。10 月に、流行地域のおとり牛 1 頭の洗浄血球から palyam ウイルス群と思われるウイルスが分離され、交差中和試験の結果 D'Aguilar ウイルスと極めて近縁なウイルスであると考えられたが、チュウザンウイルスに対する抗血清とも低値ながら中和反応を示した。今後、本ウイルスの牛異常産への関与の可能性を検討する必要があると考えられた。

DV-38 インフルエンザウイルスのパッケージングを見る

野田岳志¹、相良洋²、喜田宏¹、河岡義裕³
(¹北大獣医・微生物、²東大医科研・微細形態、³東大医科研・ウイルス感染)

【目的】 A 型インフルエンザウイルスゲノムは 8 種類の RNA 分節からなる。8 種類の RNA 分節はウイルス増殖に必須の蛋白質をコードしている。ウイルスが増殖するためには、感染細胞から出芽する際に 8 種類全ての RNA 分節がウイルス粒子内に取り込まなければならない。ところが、8 種類の RNA 分節が 1 セットでウイルス粒子内を選択的に取り込まれるのか、あるいは適当数の RNA 分節がランダムに取り込まれ、偶然に 8 種類の RNA 分節がそろった粒子だけが増殖するのかが明らかでない。そこで、インフルエンザウイルスの遺伝子分節が粒子内に取り込まれるプロセスを形態学的に解析した。【方法】 種々の A 型インフルエンザウイルスを MDCK 細胞に接種した。細胞表面から出芽するウイルス粒子と、細胞外に放出されたウイルス粒子の超薄切片を作成し電子顕微鏡で観察した。【成績】 細胞表面から出芽するウイルス粒子内には、8 本の RNP (RNA + NP 複合体) に相当する棒状構造物が規則的に配列していた。8 本の棒状構造物は粒子上部に結合し、出芽方向と平行に並んでいた。ウイルス粒子の連続超薄切片像から、8 本の棒状構造物は長さが異なることが判った。この構造物は細胞外に放出されたウイルス粒子内では不規則に存在していた。以上の成績は、インフルエンザウイルスが出芽する際に、異なる RNPs 8 本を 1 セットで粒子内に取り込むことを示唆している。

DV-40 競合 ELISA によるイバラキウイルス感染血清とブルータングウイルス感染血清間の類属反応の解消

清水真也¹、後藤義之¹、豊田勇夫²、有島太一³
(¹動衛研、²長崎県、県南家保、³佐賀県、中部家保)

【目的】 現在、我が国では、ブルータング (BT; OIE のリスト A) の診断法として、BT のゲル内沈降反応 (AGID) が行われている。しかし、AGID 法では、イバラキウイルスとの間で類属反応が生じることが知られており、血清学的診断上問題となっている。一方、OIE の BT の診断基準では競合 ELISA 法 (以下 C-ELISA) が基準的診断法として提言されている。そこで、私たちは、C-ELISA 法でイバラキウイルスとの類属反応の問題点の解消が可能か検討した。【方法】 (1) BT 感染牛血清およびイバラキウイルス感染牛血清の中和抗体価と AGID 抗体価を求めた。(2) BT ウイルスに対するハイブリッドマ (8A3B.6 株) 由来培養上清と抗原を作製し、OIE の基準に沿った C-ELISA 法を開発し、上記血清の %Inhibition を測定した。【結果と考察】 (1) BT 感染血清において BT の血清診断では C-ELISA 法が AGID 法より中和試験の結果と一致した。(2) イバラキウイルス感染牛の中和抗体陽性血清において、AGID で認められるイバラキウイルスと BT の類属反応は C-ELISA 法では認められなかった。今後、イバラキウイルスの流行地域での BT 検査は C-ELISA が推奨される。

DV-41 わが国及び台湾における家禽血清のフラビウイルス属ウイルスに対する抗体動向

後藤義之¹、清水真他¹、鄭明珠²、蕭終融²、有島太一³、豊田勇夫⁴
(¹動衛研、²台湾家衛試、³佐賀県中部家保、⁴長崎県南家保)

【目的】人や動物に脳炎を引き起こすフラビウイルス属のウイルスは、米国などかつて流行しなかった地域で流行するようになり、わが国に侵入し発生する可能性が懸念されている。そこで、わが国に飼養されている家禽についてフラビウイルス属ウイルスの存在を明らかにするため血清疫学的調査を行った。【材料と方法】関東甲信越地方で平成8～12年に採取された家禽血清、また平成13年度台湾各地で採取された鶏血清を用いフラビウイルス属の日本脳炎ウイルス、Kunjin ウイルス、St. Louis encephalitis(SLE)ウイルス、Murray Valley encephalitis(MVE)ウイルスに対する抗体保有状況を調べた。なお抗体検査は、HmLu-1 または Vero 細胞による中和試験を実施した。【結果と考察】家禽血清では関東地方のA地域、B地域で Kunjin ウイルスに対する抗体陽性率が高く、とくにB地域では平成8年及び10年に極めて高い陽性率を示した。さらに各種家禽血清においても Kunjin ウイルスに対する抗体陽性率が極めて高かった。一方、台湾の鶏血清では Kunjin ウイルス及び MVE ウイルスに対してほぼ同程度の抗体保有率を示した。以上のことからフラビウイルス属各ウイルスは、すでにわが国及び台湾の家禽間で流行していることが明らかになった。

DV-43 北海道内で近年分離された牛ウイルス性下痢ウイルスの遺伝子型の多様性

迫田義博¹、玉井久三¹、浅野用弘²、森田大輔³、菅野宏⁴、喜田宏¹
(¹北大獣医、²北海道網走家保、³北海道十勝家保、⁴北海道上川家保)

【目的】牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)は牛に下痢や致死的な粘膜病を引き起こし、その病原性と抗原性は多様である。日本におけるBVDVの流行状況を把握するために、2000年からの3年間に北海道内で分離されたBVDV約100株の分子疫学解析を行った。

【材料と方法】BVDV 持続感染牛もしくは粘膜病発症牛からウイルス分離を行った。分離されたウイルスからRNAを抽出し、RT-PCR法によって5'非翻訳領域(5'-UTR)の遺伝子を増幅した。遺伝子産物は直接またはプラスミドベクターにクローニング後、塩基配列を決定した。さらに国内外で報告されているBVDV 分離株の遺伝子情報とともに分子系統樹を作成し、遺伝子型を決定した。

【結果】5'-UTRの遺伝子情報を基に作成した分子系統樹から、分離されたウイルスの大半はBVDV 遺伝子型1(BVDV-1)のBVDV-1a、BVDV-1bおよびBVDV-1cに分類された。またBVDV 遺伝子型2(BVDV-2)のウイルスも地域の異なる場所から複数分離されていることがわかった。なお、過去に北海道内で分離されたBVDVの遺伝子解析から、石川県や栃木県でBVDV-2が初めて国内で分離されたのと同時期である1991年には北海道内にもBVDV-2が流行していたことが確認された。

【考察】北海道内ではBVDV-1の流行が大半を占めるが、BVDV-2の流行および臨床例が存在することがわかった。またBVDV-2は1990年代前半には北海道内でも流行があったことが判明した。これらの結果は、現在日本国内で流行しているBVDVの遺伝子型が多様であることを示す。

DV-42 わが国で分離された牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)の異なる5'遺伝子領域における系統樹解析

長井誠¹、林みち子²、杉田繁夫³、迫田義博⁴、森正之⁵、村上俊明²、小澤正¹、山田直樹¹、明石博臣⁶
(¹石川県北部家保、²石川県南部家保、³JRA 総研栃木、⁴北大・獣医微生物、⁵石川県農業短大・農業資源研、⁶東大・獣医微生物)

【目的】第130回本学会において我々は、わが国の牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)の5'非コード領域(5'NCR)および抗原性状況を調べ、その多様性を報告した。今回、わが国のBVDVの遺伝子をさらに詳しく調べ、世界各国の株と比べるため、5つの遺伝子領域(5'NCR、N^{pro}、E2、NS3 および NS5B-3'NCR)の系統樹解析を行った。【材料と方法】わが国のBVDV48株の5つの遺伝子領域を部分的に決定し、GenBank データベースから入手可能な株の配列とともに近隣接合法による系統樹解析を実施した。【結果と考察】それぞれの領域の系統樹は互いによく似たグループ分類を示した。わが国のBVDVはBVDV 1およびBVDV 2に分類され、BVDV 1は1aおよび1bに加え、さらに5'NCR以外では4サブグループが認められた。我々が以前、5'NCRの解析においてBVDV 1a'に分類した3株は、5'NCR以外ではBVDV 1aとは異なるクラスターを形成した。2001年の分離株2株は、わが国の分離株の中では大きく異なった分岐を示したが、E2領域の解析においてヨーロッパのいくつかの株と類似した分岐を示した。So CP/75株は、いずれの領域においても他のグループと分岐をともにしなかった。190CP株およびデータベースから得られたILLC株およびILLNC株(米国分離株)は解析した領域によって分類が異なり、これらの株はサブグループの異なる株の組換えによるゲノムを保有するものと思われた。以上より、複数領域の遺伝子解析によって、わが国のBVDVの詳細な分類が可能で、遺伝子組換えウイルスの推定にも有用であった。

DV-44 牛ウイルス性下痢ウイルスの遺伝子組換えによる病原性の獲得とその組換え部位の多様性

亀山健一郎¹、迫田義博¹、玉井久三¹、長井誠²、明石博臣³、泉對博⁴、喜田宏¹
(¹北大獣医微生物、²石川県北部家畜保健衛生所、³東大獣医、⁴動物衛生研究所)

【目的】我々は先に牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)KS86-1cp株のウイルスゲノムが持続感染していた非細胞病原性(ncp)BVDV KS86-1ncp株と重感染させた細胞病原性(cp)BVDV Nose株の遺伝子キメラ体であることを示した。今回、BVDVの病原性獲得のメカニズムを解明するため、同様の感染実験により粘膜病発症牛から分離されたウイルスの遺伝子を解析した。

【材料と方法】3頭の持続感染牛から分離したncpBVDV(799ncp、839ncpおよび190ncp株)、持続感染牛に重感染させたcpBVDV(KS86-1cpおよびT-20株)および粘膜病発症時に分離したcpBVDV(799cp、839cpおよび190cp株)のウイルス遺伝子をRT-PCR法で増幅、クローニング後、塩基配列を決定した。次に持続感染株、重感染株および粘膜病発症後分離株のウイルス遺伝子を比較した。

【結果】粘膜病発症牛から分離したcpBVDV 遺伝子は、持続感染していたncpBVDVと重感染させたcpBVDVとのキメラ体であり、遺伝子組換え部位が799cp株ではN^{pro}領域の相同な部位、839cp株ではN^{pro}領域の異なる部位、190cp株ではNS4B領域の異なる部位であることが判った。これら3株のエンペロープ蛋白遺伝子はいずれも持続感染株に由来し、重感染させたcpBVDVの宿主遺伝子(Jiv またはユビキチン)を受け継いでいた。また799cp、839cp、190cp、KS86-1cpおよびT-20株感染細胞ではNS2-3蛋白の開裂が確認された。

【考察】持続感染牛と抗原性の異なるcpBVDVが重感染すると、両ウイルス間での遺伝子組換えが様々な部位を起点にして起こり、持続感染株と抗原性が同一のcpBVDVが出現することが明らかとなった。また、重感染株から受け継いだ宿主遺伝子がNS2-3蛋白の開裂を誘起し、病原性を獲得したものと考えられる。

DV-45 牛ウイルス性下痢ウイルス非構造蛋白 NS3 に対するモノクローン抗体によるペスチウイルス属共通エピトープの検出

玉井久三¹、迫田義博¹、青木博史²、中村成幸²、喜田宏¹
(¹北大獣医、²動薬検)

【目的】フラビウイルス科ペスチウイルス属には牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)や豚コレラウイルス(CSFV)などが属する。これらのウイルスの大半は感染細胞でCPEを示さないため、ウイルス感染に伴って産生される特異抗原の検出による診断が望まれる。そこでペスチウイルス属共通抗原と考えられるウイルス非構造蛋白 NS3 に対するモノクローン抗体を作成し、これらを用いたペスチウイルス感染症診断法の開発を企図した。【材料と方法】BVDV Nose 株を感染させた細胞の RNA から RT-PCR 法により NS3 遺伝子を増幅し、クローニングした。大腸菌発現系において組換え NS3 蛋白を発現した。ニッケルアフィニティーカラムを用いて精製した組換え NS3 蛋白を免疫原としてモノクローン抗体を作成した。モノクローン抗体と BVDV および CSFV との反応性を免疫染色法、蛍光抗体法およびウエスタンブロットング法により調べた。【結果】組換え蛋白は大腸菌で大量に発現された。Nose 株感染細胞中の NS3 蛋白と特異的に反応するモノクローン抗体が9クローン得られた。そのうち4クローンは調べたすべての BVDV および CSFV 感染細胞と免疫染色法または蛍光抗体法で反応した。さらにそのうち1クローンはウエスタンブロットング法で BVDV と CSFV の NS3 蛋白を検出し、CPE を示さないウイルス感染細胞からは 120kd (NS2-3) CPE を示すウイルス感染細胞からは 80kd (NS3) の蛋白が検出された。【考察】得られた4種のモノクローン抗体は NS3 蛋白上の共通エピトープを認識し、BVDV や CSFV 感染の診断に有用である。NS3 蛋白は細胞病原性さらには病原性に関与するものと考えられるので、これらのモノクローン抗体はペスチウイルスの病原性の解析にも有用であろう。

DV-47 乳のみマウスの口蹄疫ウイルス O/JPN/2000 株に対する感受性

森岡一樹¹、加来義浩¹、山川睦¹、山添麗子¹、吉田和生¹、坂本研一¹
(¹動物衛生研究所 海外病研究部)

【背景と目的】演者らは、第130および133回本学会において口蹄疫ウイルス日本分離株(FMDV O/JPN/2000)のホルスタイン牛、黒毛和牛、豚、綿羊および山羊に対する病原性について報告してきた。今回さらに乳のみマウスを用いた接種試験を行い、本株に対する感受性を調べたので報告する。【材料と方法】3-5日齢の乳のみBALB/cマウスを各5匹3群に分け、それぞれPBS、102TCID50および104TCID50のO/JPN/2000株を腹腔内接種して8日間臨床症状を観察した。実験に供した乳のみマウスの心臓を採取し、RT-PCRによるウイルス遺伝子の検出と培養細胞を用いたウイルス分離、抗原検出ELISAによる培養上清中からのウイルス抗原の検出を試みた。【結果・考察】104TCID50を接種した群では、接種後2日目までは何の異常も認められなかったが、接種後3-4日目にすべて死亡した。102TCID50を接種した群では、接種後4日目に1匹が症状を示し、翌5日目に同マウスを含む2匹が死亡したが、残る3匹は感染耐過した。以上のことから、本株に対する乳のみマウスのLD50は概ね102TCID50と推定された。死亡および感染耐過例の心臓乳剤を用いてRT-PCRとウイルス分離を試みたところ、死亡例においてのみFMDV特異遺伝子の増幅が確認され、ウイルスが分離された。継代3代目でようやく明瞭なCPEが確認されたが、抗原検出ELISAでは、早くも心臓乳剤接種1代目の培養細胞上清中からウイルス抗原が検出された。O/JPN/2000株に対する乳のみマウスの感受性は高く、培養細胞を用いた分離法とほぼ同程度に有用であると推測された。

DV-46 猫伝染性腹膜炎ウイルスのマクロファージ指向性決定領域の同定

中村一哉¹
(¹阪大微研・エマ研、²コトレヒト大学)

【目的】ネコのコロナウイルス感染症では多くの場合が軽度の腸炎を発症し、その後回復に向かうが、時に致死的な経過をたどる症例が観察される。致死経過を辿ったネコから分離された強毒株は弱毒株に比べ、強いマクロファージ指向性を示すことが報告されており、このマクロファージ指向性を決定する領域の同定は今後のワクチン開発に向け有効な情報を与え得ると考えられる。我々は、強毒株と弱毒株のキメラウイルスを作製し、マクロファージ指向性決定領域を同定した。【方法】キメラウイルス作製には弱毒株と強毒株由来のcDNAクローンから試験管内で合成したRNAおよびヘルパーウイルスを用いたtargeted RNA recombination法により得た。得られたキメラウイルスを一定量の感染価でマクロファージ接種して、その感染能を検討した。【結果と考察】強毒株のゲノムを背景に弱毒株のpol, 3abc, M, N遺伝子それぞれを持つキメラウイルスは強毒株と同程度のマクロファージ感染能を示した。また強毒株特有の非構造蛋白である7b遺伝子を削ったウイルスも高いマクロファージ感染性を示した。しかし、S遺伝子中C末側領域を弱毒株由来にしたばあい、顕著なマクロファージ感染能の低下が観察された。上記のキメラウイルスは全てFCWF細胞における感染・増殖能に差は認められなかった。以上の事から強毒株のマクロファージ指向性はS蛋白のC末側領域によって決定される事が示唆された。

DV-48 兎ウイルス性出血病の発生例

山本泰弘¹、疋田瑞栄¹、中岡祐司¹、田口雅持¹、萬順一²、白水彩²、三上修一³、吉井雅晃³、加藤花名子³、池田秀利³
(¹北海道・石狩家保、²札幌市円山動物園、³動衛研)

兎ウイルス性出血病(Rabbit Haemorrhagic Disease:RHD)はカリシウイルス科ラゴウイルス属に属するウサギ出血病ウイルス(RHDV)によって起こる急性、高病原性のウサギの疾病で、感染力が強いため、多数のウサギを飼育している施設では注意を要する疾病で監視伝染病に指定されている。日本では1994年の国内最初の発生以来、各地で散発的に発生している。2002年に北海道内の一動物園において、展示飼育していたウサギ15頭のうち7頭が9日間の間に死亡したため、原因検索を行った。【材料と方法】死亡したウサギ4頭について、病理組織学的検査、免疫組織学的検査、赤血球凝集試験(HA試験)RT-PCR法による遺伝子学的検査を実施。さらに健康ウサギへの感染試験を行った。【成績】剖検では、肝臓は黄褐色～赤褐色で、脆弱で煮肉様を呈していた。また肺の充出血や脾臓の軽度の腫脹が認められた。病理組織学的検査ではびまん性肝細胞壊死及び脾臓リンパ球の著しい減少が観察された。ピオチン化抗RHDV抗体を用いた免疫組織学的検査で4頭すべての肝細胞内に陽性抗原を検出した。ヒトO型血球を用いたHA試験では4頭中3頭の肝臓乳剤で凝集を確認した。RHDVに特異的なプライマーを用いたRT-PCR法では、4頭全ての肝臓と3頭の脾臓からRHDV遺伝子を検出。感染試験では1頭の肝臓乳剤を健康ウサギに接種したところ26時間後に死亡。剖検の結果、肺の出血と肝臓の一部黄色化を確認し、肝臓乳剤のHAおよびRT-PCR法でも陽性となった。以上の結果より本症例をRHDと診断した。【考察】今回の症例では、RHDVの侵入経路としては、動物販売業者から導入した中国産を含むウサギ及び来園者が考えられたが、特定には至らなかった。

DV-49 欠損変異プリオン蛋白を用いた正常型プリオン蛋白の機能解析

李得燦¹、作道章一¹、西村拓也¹、徐聖旭¹、佐伯圭一¹、
松本芳嗣¹、小野寺節¹
(¹東京大・応用免疫)

【背景】プリオン蛋白遺伝子を欠損した神経細胞株(プリオンレス神経細胞株)は、無血清培地において細胞死を引き起こすが、このプリオンレス神経細胞株にプリオン蛋白遺伝子の open reading frame (ORF)を再導入すると、無血清培地で生存することが報告されている。この結果から正常型プリオン蛋白は神経細胞のアポトーシス抑制に関与していることが考えられる。【目的】プリオン蛋白遺伝子の octapeptide-repeat domain を欠損させた欠損変異プリオン蛋白発現神経細胞株を用い、プリオン蛋白の特定領域が無血清培地における細胞死に及ぼす影響について調べた。【方法】制限酵素を用いプリオン蛋白遺伝子の octapeptide-repeat domain を欠損させた欠損変異プリオン蛋白発現ベクターを作製した。さらに構築したベクターをプリオンレス神経細胞株に導入し欠損変異プリオン蛋白発現神経細胞株を作製した。【結果と考察】プリオンレス神経細胞株にプリオン蛋白遺伝子の ORF を再導入した神経細胞株は無血清培地で生存した。Octapeptide-repeat domain を欠損させた欠損変異プリオン蛋白遺伝子を導入した神経細胞株は無血清培地で24時間後に細胞死が観察された。さらにアポトーシス特異的な核の凝縮及びDNA断片化がDAPI染色やDNAラダー検出法で観察され、無血清培地における細胞死はアポトーシスによることが認められた。以上の結果からプリオン蛋白の octapeptide-repeat domain が血清除去によるプリオンレス神経細胞株のアポトーシス抑制に関与していることが示唆された。

DV-51 サンドイッチ固相酵素免疫測定法による牛各種臓器の正常プリオン蛋白質の定量

山本卓司¹、牛木祐子¹、服部俊治¹、田川裕一²、木村久美子²、
高田益宏²、横山隆²、入江伸吉¹
(¹(株)ニッピ・バイオマトリックス研究所、²動物衛生研究所)

正常プリオン蛋白質(PrP^c)は生体内に広く分布していることが知られているが、その機能についてはまだ解明されていない。牛では異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})と呼ばれる構造異性体が中枢神経系に蓄積し、牛海綿状脳症(BSE)をひき起こす。しかし、PrP^c から PrP^{Sc} への構造変換のメカニズムについては不明な点が多い。既に作出された4種類の抗プリオン蛋白質(PrP)モノクローナル抗体を使用して牛 PrP(bPrP)検出のためのサンドイッチ固相酵素免疫測定法(ELISA)を構築した。そのうち最も高感度な bPrP 検出系による組換え bPrP(rbPrP)の検出限界値は500pg/mlであり、rbPrPの検出に関しては、既存のBSE診断キットと比べて約10倍高感度であった。このbPrP検出系を用いて正常牛の様々な組織におけるPrP^c濃度を半定量的に解析したところ脳、視床下部、下垂体(6~8µg/g)では、他の臓器(7~890ng/g)に比べて高濃度のPrP^cが認められた。牛の各組織におけるPrP^cの発現量と、既報の羊の成績を比較したところ、PrP^cの発現量には牛、羊の組織間では顕著な差は認められなかった。BSEと羊スクレイビーでは中枢神経系以外の組織におけるPrP^{Sc}の蓄積に大きな違いがあることが知られている。PrP^cの発現量・発現部位がPrP^{Sc}の蓄積に関わっているか否かについて、詳細な検討が必要である。

DV-50 免疫生化学的手法による変敗試料からの異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の検出

林浩子¹、高田益宏¹、横山隆¹、牛木祐子²、木村久美子¹、
田川裕一¹、品川森一¹
(¹動衛研、²ニッピ)

【目的】牛海綿状脳症(BSE)の診断は異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の免疫学的検出に基づいている。死亡牛のBSE検査強化により、死後時間の経過した牛を検査する場合も想定され、試料の変敗がPrP^{Sc}の検出に影響を及ぼす可能性がある。その影響を明らかにするために、エピトープの異なる抗プリオン蛋白質(PrP)抗体と変敗させたBSE脳試料中のPrP^{Sc}との反応性をウエスタンブロット法(WB)で解析した。さらに、我が国でBSE検査に用いられている市販キット(プラテリア BSE)の変敗試料への応用性について検討した。【方法】BSE感染脳組織を室温で0、1、2および4日間(4日目のみ37℃)放置し、各試料からPrP^{Sc}の検出を行った。【結果】WBでは試料の変敗はPrP^{Sc}検出結果に影響しなかった。また変敗が進むに従いPrP^{Sc}の部分消化が起こり、PrP²⁷⁻³⁰(プロテイナーゼK抵抗性のコア領域)に収束していくことが示された。プラテリアBSEで上記の試料を検査した結果、規定の組織当量ではすべての試料からPrP^{Sc}が検出され、現行検査キットの変敗試料への一定の有用性が示された。しかし、調整した試料を段階希釈して検査したところ、4日目の試料では希釈に伴って明瞭なELISA値の低下が認められた。プラテリアBSEで用いられるPrP^{Sc}捕捉抗体はPrP²⁷⁻³⁰の外側を認識しており、組織の変敗に伴いこの認識部位が消化されたためにELISA値が低下したと考えられる。変敗が著しい例では免疫組織化学検査が実施不能な場合も想定され、死亡牛の検査では試料の状態に即応したBSE検査手法ならびに判定基準の整備も必要である。

DV-52 BSEスクリーニング用ELISA(OFR ELISA)の開発とその性能評価

堀内基広¹、梅谷淳²、工藤聡子¹、石黒直隆¹、横山隆³、品川森一²
(¹帯広大・獣医公衆衛生、²富士レピオ帯広研、³動衛研・プリオン病研究センター)

【目的】食用に供される牛のBSEスクリーニングでは、一次検査にBio-Rad社のPLATELIA BSE DETECTION KITが使用されている。より簡便、高感度、あるいは信頼性の高い検査キットの開発は、検査の効率化、高感度化、あるいは精度向上につながる。従って新たなBSE検査キットの作出は重要な課題である。今回、我々が用いてきたPrP^{Sc}検出用ELISAに改良を加えてOFR ELISAを確立し、BSE検体を用いてその性能を評価した。【方法】抗原抗体反応に要する時間の短縮化を目的として、HRP標識抗PrPmAb抗体の導入を試みた。また、capture用抗体、および検出用抗体との反応条件について検討した。BSE疑似試料として、スクレイビー感染マウス脳、およびBSE非感染牛から調製した試料に組換え牛PrP(rBoPrP)を加えた試料を用いた。BSE感染牛脳をBSE非感染脳で希釈して、PrP^{BSE}の蓄積量が少ない脳を模倣した試料を作製し、最終的な感度評価を行なった。【結果】スクレイビー感染マウス脳を用いて、HRP標識抗PrP抗体を用いる直接法とビオチン化抗PrP抗体とアビジン-HRPを用いる間接法のPrP^{Sc}検出感度を比較したところ、間接法と直接法で同等の感度が得られることが判明した。rBoPrPを用いて直接法によるPrP検出感度を調べたところ、検出限界は150-300pg/wellであった。OFR ELISA、PLATELIA、および確定検査で使用されているウエスタンブロット法(WB)の検出感度をBSE感染牛脳由来試料を用いて検討した結果、OFR ELISAとPLATELIAは同等の感度を有すること、WBはこれら2種のELISAよりも4~16倍感度が高いことが明らかとなった。また、食肉衛生検査所から入手したBSE陰性検体894例は全て陰性と判定された。従って、OFR ELISAは実用化に耐えうる感度と精度を有するものと考えられる。

DV-53 抗 PrP モノクローナル抗体パネルによる PrP の構造解析

金チャンラン¹、堀内基広¹、石黒直隆¹、品川森一²
(¹帯広大・獣医公衆衛生、²動衛研・プリオン研究センター)

【目的】正常型プリオン蛋白質(PrP^C)から病原性構造異性体(PrP^{Sc})への構造転換は、プリオンの増殖機構と密接に関連する。従って、両者の構造を知ることがプリオン病病因論の理解に重要である。組換えプリオン蛋白質(rPrP)の NMR 構造が明らかとなっているが、PrP^C および PrP^{Sc} の構造は不明な点が多い。今回、抗 PrPmAb パネルを用いて、抗体が結合可能な PrP 分子上のドメインの解析を試みたので報告する。【方法】 aa56-90、aa119-127、aa137-143、aa143-149、aa147-153、aa161-169、aa219-229 の連続エpitepを認識する mAb、aa89-231、および aa155-231 の領域から構成される非連続エpitepを認識する mAb を用いた。PrP^{Sc} との反応性は ELISA により調べた。Neuro2A の細胞膜上に発現する成熟型 PrP^C との反応性はフローサイトメーター(FACS)により、細胞内 PrP^C との反応性はメタノール固定細胞を用いて間接蛍光抗体法(IFA)により調べた。【結果】 aa56-90 を認識する mAb のみが、Proteinase K(PK)処理した PrP^{Sc} と弱く反応した。それ以外の抗体は PK 処理 PrP^{Sc} とは反応しなかったが、PK 処理 PrP^{Sc} を GdnHCl で変性させることにより、全ての抗体が反応した。FACS 解析では aa56-90、aa143-149、および非連続エpitepを認識する mAb が細胞膜上に発現する PrP^C と反応した。FACS 解析では細胞膜と反応しなかった mAb も、IFA では細胞内の PrP^C とは反応した。細胞内の染色性エpitepにより異なり、aa137-143 を認識する mAb は主に粗面小胞体(ER)、aa147-153、aa219-229 を認識する mAb は部分的に ER およびゴルジ体と一致した。以上の結果は、PrP 分子の表面に位置するドメインの予測に役立つと考えられる。また、PrP^C は生合成過程で複数の構造を取ることが明らかとなった。

DV-55 ヒツジおよびヤギの伝達性海綿状脳症サーベイランスと PrP 遺伝子のアミノ酸多型

黒崎恭久¹、片岡那津見¹、菊地宏明¹、田村勇耕¹、石黒直隆¹、堀内基広¹、品川森一²
(¹帯広大・獣医公衆衛生、²動衛研)

【目的】ヒツジおよびヤギのスクレイピーは致死性の神経変性疾患であり、ヒツジに関しては国内での報告はあるが、ヤギに関してはこれまでのところ報告はない。2001年9月より日本は牛海綿状脳症(BSE)の汚染国となったことから、ヒツジやヤギへの肉骨粉を介した BSE 汚染が懸念されていた。2001年11月よりヒツジとヤギに関しても伝達性海綿状脳症サーベイランスを開始している。2002年の1年間に帯広畜産大学に寄せられたヒツジとヤギの検体(延髄と扁桃)に関して PrP^{Sc} 検査と PrP 遺伝子のアミノ酸多型解析を行ったのでその成績を報告する。【材料と方法】今回検査したヒツジは5自治体からの117検体とヤギに関しては5自治体からの40検体である。また沖繩(38個体)と八丈島(32個体)の計70個体の血液サンプルもアミノ酸多型の調査に供した。伝達性海綿状脳症のサーベイランスは延髄から調製した脳液剤中の PrP^{Sc} をウエスタンブロット法にて検査した。ヒツジのアミノ酸多型は、スクレイピーの感受性や抵抗性に関与する112番、136番、154番、171番コドンの1塩基置換を検査した。ヤギに関してはアミノ酸コード領域の塩基配列から検討した。【結果と考察】ヒツジとヤギの PrP^{Sc} 検査は全て陰性であった。検査したヒツジでは感受性の136番のバリン置換が極めて少ないのに比べ、抵抗性を示す171番アルギニン置換が多かった。ヤギ PrP 遺伝子はヒツジと同じ塩基配列であるが、アミノ酸の多型部位は102、127、142、143、146、211、240番コドンと異なっていた。ヤギの多くは感受性の多型を示したことから今後とも注意深いサーベイランスが必要であろう。

DV-54 プリオン蛋白質と結合するペプチド性リガンドの探索

大林浩二¹、堀内基広¹、石黒直隆¹、品川森一²
(¹帯広大・獣医公衆衛生、²動衛研・プリオン病研究センター)

【目的】プリオン病の病原体(プリオン)の主要構成要素である PrP^{Sc} の性状は依然不明な点が多い。PrP^{Sc} を特異的に認識する分子プローブはその性状解析や新規のプリオン病診断法の開発に有用な道具となり得る。そこで、Phage display peptide library を用いて精製 PrP^{Sc} 画分と反応する peptide 配列の探索を行った。【方法】PrP^{Sc} 画分はスクレイピー-Obihoro 株感染マウス脳から精製した。組み換えマウス PrP は各種欠損変異 rMoPrP を使用した。Phage display peptide library は Ph.D.-12 および Ph.D.-C7C(New England Biolabs, Inc)を使用し、2M GdnHCl で処理した精製 PrP^{Sc} 画分を抗原として panning を行った。Phage と PrP との反応性は ELISA により調べた。【結果】5回の panning により選抜された phage が含む peptide 配列のうち出現頻度の高かったものは、Ph.D.-C7C では KPHPYTL(Phage#1) が 29.7%、KPHPYSL が 29.7%、WLWPQHR が 24.3% であった。Ph.D.-12 では QAPHLNWWSTWL が 61.9%、ACFPWWESCLEH(Phage#7) が 19.0% であった。Phage#1 は精製 PrP^{Sc} 画分と反応し、proteinase K(PK)で処理した PrP^{Sc} とも反応した。しかし、PK 処理 PrP^{Sc} を GdnHCl で処理すると反応が消失した。従って、Phage#1 は PrP^{Sc} の高次構造を認識している可能性が示唆された。また、Phage#1 の反応性はアミノ酸配列と S-S 結合による構造に特異的であった。Phage#7 は PK 処理した PrP^{Sc} とは反応しなかったが、PK 処理 PrP^{Sc} を GdnHCl で変性させると反応した。従って、Phage#7 は変性 PrP と反応することが示唆された。Phage#7 の反応性はアミノ酸配列特異的であり、PrP コドン 155-214 内の領域と結合した。以上の結果から、Peptide phage display 法は PrP^{Sc} もしくは PrP^C 特異的な分子プローブの同定に有用なツールとなり得ることが示唆された。

DV-56 プリオンの環境汚染評価 植物への影響

三隅智子¹、石黒直隆¹、堀内基広¹、品川森一²
(¹帯広大・獣医公衆衛生、²動衛研)

【目的】ヒツジやヤギのスクレイピーは、飼育集団の中で自然感染が起き、次世代に感染が持続することが特徴である。さらに汚染した放牧場に健康な集団を導入した時にも感染が成立する。このことはプリオンにより放牧場の土壌や牧草が汚染されたことを示唆するが、その実態は不明のままである。こうした放牧場での環境汚染を評価する上で、次の4点に注目した。1) 植物の遺伝子中に動物のプリオン遺伝子に相当する遺伝子があるのか。2) 植物は土壌中からプリオンを吸収できるのか。3) 植物のエンドプロテナーゼはプリオンを分解できるのか。4) 植物細胞内でプリオン遺伝子は発現できるのか。今回は1)と2)について主に検討したので、その成績を報告する。【材料と方法】プリオン遺伝子に相当する遺伝子の検索は、マウス PrP 遺伝子をプローブにサザン法によりイネ、カボチャ、ジャガイモ、トマト、ナスの染色体 DNA を検索し、ホモロジーを示した領域を切り出し、ファージベクターにクローニングして、その領域の塩基配列を解析した。植物体のプリオン吸収実験は、マウスプリオンを用いてオーチャード、小麦、チモシーなどの植物体内への吸収・拡散をウエスタンブロット法にて解析した。【結果と考察】上記5種類の植物の内、イネに強いホモロジーを示すバンドが検出された。そのバンドに相当する領域をクローニングして6クローン(10、11、E3、N1、N9、N12)を得たが、全体の相同性は48%程度と低かった。しかし、哺乳類、鳥類、両生類、魚類で共通に保存されている PrP 遺伝子の連続した12アミノ酸の内7アミノ酸がイネでも検出された。植物体内へのプリオンの吸収と拡散は、検出されなかった。

DV-57 尿崩症を誘発するマウス馴化スクレイピー株の分離と解析

田村勇耕¹、堀内基広¹、石黒直隆¹、古岡秀文²、品川森一³
(¹帯畜大・獣医公衆衛生、²帯畜大・家畜病理、³動衛研・
プリオン病研究センター)

【目的】スクレイピー病原体を実験動物に伝達した場合、潜伏期、病変分布、及び異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の生化学的性状がスクレイピー病原体により異なることがある。これは病原体の株の違いを反映するものと考えられている。今回我々は羊スクレイピーを ICR マウスで連続継代する過程で、尿崩症を誘発するスクレイピー株 G1 を分離したので報告する。【方法】マウス馴化スクレイピー Obihiro 株、I3/I5 株、及び G1 株を用いた。ウエスタンブロットにより PrP^{Sc} の生化学的性状、及び脳内の PrP^{Sc} の蓄積量を調べた。免疫組織化学により脳内 PrP^{Sc} の分布を調べた。【結果】Obihiro 株、I3/I5 株接種 ICR マウスは潜伏期が 160 日前後であるのに対して、G1 株は 330 日前後であった。G1 株接種マウスは尿崩症を呈し、発症後飲水量が徐々に増加して極期には 60ml/日以上に達した。非接種対照群では約 10ml/日であった。G1 株の PrP^{Sc} は Obihiro 株、I3/I5 株と比較して蛋白分解酵素抵抗性が高かった。G1 株接種マウスの脳内 PrP^{Sc} 蓄積量は Obihiro 株と比較して、1/2 以下であった。G1 株と Obihiro 株の PrP^{Sc} は二糖鎖型の占める比率が高いが、I3/I5 株では一糖鎖型の比率が高かった。脳における PrP^{Sc} の局在は、Obihiro 株、I3/I5 株では大脳皮質、海馬など広範に蓄積が見られたが、G1 株では海馬に少なく、視床及び視床下部に局限していた。以上の結果から、G1 株の生物性状、PrP^{Sc} の生化学的性状は Obihiro 株、I3/I5 株とは異なることが明らかになった。G1 株感染マウスの脳における PrP^{Sc} の局在と尿崩症との関連は不明であるが、G1 株はプリオンの標的細胞親和性や株の生物性状を規定する機構の解明に有用であると考えられる。