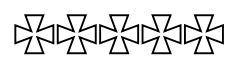




日本獣医師会学会関係情報



日本産業動物獣医学会・日本小動物獣医学会・日本獣医公衆衛生学会

----- 日本獣医師会学会からのお知らせ -----

平成24年度 日本獣医師会獣医学術賞 産業動物部門「獣医学術学会賞」

産地区—8

鶏サルモネラ症に対する卵内接種リポソームワクチンの開発

渡未 仁¹⁾, 塔 娜¹⁾, 弓場英司²⁾, 河野健司²⁾, 関屋幸男³⁾

1) 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科, 2) 大阪府立大学大学院工学研究科,

3) 日本バイオロジカルズ

背 景

現在、鶏サルモネラ症予防のために不活化油性アジュバントワクチンの接種が行われている。しかしながら、養鶏の現場においては、ワクチン接種の安全性、確実性、省力化の観点からワクチンの卵内接種が注目されている。卵内接種ワクチンの開発において、ワクチン抗原を羊膜腔内から鶏胚の免疫担当細胞へデリバリーする技術が重要となるが開発されていない。これまで我々は、免疫担当細胞への抗原搬送能に優れるリポソームにpH感受性膜融合能を持たせ、抗原提示細胞内への抗原の内化を可能にするデリバリーシステムを構築している。

目 的

本研究では、免疫担当細胞への抗原搬送能に優れるリポソームに、発育鶏卵の鶏胚を包む羊膜腔内での安定性を持たせ鶏胚へのワクチネーションを可能にし、鶏サルモネラ症の予防に効果的な免疫応答を誘導できる卵内接種用リポソームワクチンの開発を目指した。

材 料 と 方 法

卵黄レシチン (egg PC), ジパルミトイルホスファチジルセリン (DPPS), コレステロール (Chol) あるいは、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC), DPPS, Chol からなる脂質組成に、サクシニル化ポリグリシドール (SucPG) を脂質重量比で30%添加し、マーカーとしてカルボキシフルオレセイン (CF) を封入した。作製したリポソームを90%羊膜腔液含有PBSに懸濁し、37℃で2時間反応させ、封入されたCFがどの程度放出されるかにより安定性を解析し、羊膜腔液内で安定性を示すリポソームの脂質組成を明らかにした。次に、羊膜腔液内で安定性を示すリポソームに不活化 *Salmonella* Enteritidis (SE) 破砕抗原を封入し、卵内接種リポソームワクチンを作製した。卵内接種リポソーム

ワクチンをSPF発育鶏卵(18日齢)の羊膜腔内に接種(12.5~375µg SE/50µl)し、孵化率について調べるとともに、孵化後、4週目と8週目に血清を採取し、SE抗原に対する抗体(IgG並びにIgA抗体)の誘導の有無についてELISAを用いて解析した。

結 果

羊膜腔液内で安定性を示すリポソームの脂質組成について検討した結果、egg PC : DPPS : Chol = 4 : 1 : 2 (モル比) 並びに egg PC : DPPS : Chol = 2 : 1 : 0.5 (モル比) の脂質組成からなるリポソームは、封入しているCFを90%羊膜腔液存在下でそれぞれ20.1 ± 1.2%, 12.8 ± 0.3% 放出した。一方、egg PC : DPPS : Chol = 1 : 1 : 0.5 (モル比) の脂質組成からなるリポソームにおいては90%羊膜腔液存在下でのCFの放出量は0%であり、羊膜腔液存在下でよい安定性を示すことが明らかとなった。羊膜腔液内で安定性を示す脂質組成のリポソームにSE破砕抗原を封入し卵内接種リポソームワクチンを作製し、種々のdoseで卵内接種を行った。その結果、リポソームワクチンの卵内接種による孵化率に対する影響は、いずれのdoseでも認められなかった。孵化後4週目の血清においては25µg/egg以上の抗原接種量で有意に高い抗SE抗体価(IgG並びにIgA抗体)が確認された。さらに、8週目の血清においても有意に高い抗SE抗体(IgG並びにIgA抗体)の誘導が確認された。

考 察

今回、羊膜腔液存在下で安定性を示すリポソームの脂質組成を明らかにすることができた。SE破砕抗原を封入した羊膜腔液内で安定性を示すリポソーム(卵内接種リポソームワクチン)は、いずれのdoseでも発育鶏卵への卵内接種により孵化率に影響を与えることはなかった。このことは、卵内接種リポソームワクチンが発育鶏

に対して高い安全性を持つことを示している。その理由として、1. リポソームを構成する脂質は生体組織に存在するものであり、生体に対して何ら毒性を持たないこと、2. 封入されているSE破砕抗原がリポソーム外に漏れ出ることなく抗原提示細胞に取り込まれていることによるものと考えられる。また、卵内接種リポソームワクチンを卵内免疫した結果、孵化後4週目と8週目に血清において抗SE抗体（IgG並びにIgA抗体）の誘導が確

認された。このことは、羊膜腔液内で安定性を示す卵内接種リポソームワクチンが、卵内接種後18日齢の発育鶏の口から体内に取り込まれ粘膜関連リンパ組織において封入抗原を抗原提示細胞にデリバリーできていることを示している。本研究の結果から、鶏サルモネラ症に対する卵内接種用リポソームワクチン開発の可能性が示された。

平成24年度 日本獣医師会獣医学術賞 小動物部門「獣医学術学会賞」

小地区—18

高アンモニア血症を呈したジヒドロピリミジナーゼ欠損症の猫の1例、 動物における世界初例報告

柴田多嘉子¹⁾、泉 憲明¹⁾、成田正斗²⁾、新井 賢³⁾、張 春花⁴⁾、大和 修⁵⁾

1) いずみ動物病院・愛知県、2) なりた犬猫病院・愛知県、3) 新井獣医科病院・愛知県、

4) ミルスインターナショナル、5) 鹿児島大学

はじめに

高アンモニア血症の原因となる疾患には、慢性腎不全や門脈体循環シャントを含む肝疾患の他、尿素代謝異常などの先天代謝異常症が挙げられるが、ヒト医学ではさらに稀な疾患も含まれる。今回我々は原因不明の高アンモニア血症を呈する猫に対して、長期にわたり各種検査を実施し、これまでに動物で報告のなかったジヒドロピリミジナーゼ（DHP）欠損症を確定診断した。その経緯及び概要を報告する。

症 例

雑種猫、年齢不明（推定10歳以上）、去勢雄、体重4.5kg。一過性の流涎と散瞳、呼吸促迫、意識レベルの低下、攻撃性を認めた。なお、症例は3年前に保護された当時より、総胆汁酸は高値でないものの常に高アンモニア血症を呈し、チック様の頭部の揺れが度々見られていたため低蛋白食を給餌していた。

検査及び治療経過

アンモニアの軽度高値、総胆汁酸の高値（以前は正常値）以外の一般検査成績はほぼ全て正常範囲内で、頭部CT及び門脈造影検査でも異常は認められなかった。

次に尿中代謝産物測定を行ったが診断には至らなかったためタンデムマス分析を行ったところ、高アンモニア血症を起こす可能性のある22種の先天代謝異常症が除外された。また、血漿アミノ酸分画検査ではアルギニン濃度とシトルリン濃度が尿素代謝異常症の鑑別に有用であるが、尿素代謝異常症を示唆するような所見は得られなかった。しかし、一般食負荷時に再度行った尿中代謝

産物測定では、ウラシルとチミンの増加及びジヒドロウラシルとジヒドロチミンの著増を認めた。これはヒトのDHP欠損症と同様の結果であることから、同疾患が示唆された。さらに猫DPYS遺伝子を解析した結果、ヒトDHP欠損症患者と同様の変異（c1303G>A）のホモ接合体であることが判明し、分子レベルでDHP欠損症が確定診断された。なお、この変異は集団調査（1,000頭）では認められなかったため、キャリア頻度は極めて低いものと考えられた。

現在、初回発作から3年が経過し、高アンモニア血症の対症療法を行っているが肝性脳症の症状は定期的に見られている。

考 察

高アンモニア血症の原因となる疾患の確定は、腎疾患や肝疾患以外は非常に困難である。また、肝性脳症を呈する症例に侵襲的な検査が実施しづらいことも診断を困難にしている。したがってDHP欠損症などの稀な先天代謝異常症は動物においても一定の確率で潜在しており、そのほとんどが診断に至っていないと推測される。そこで今回実施した尿中代謝産物測定は、非侵襲的かつ高分解能であるため、DHP欠損症を含む代謝異常症の診断に有用であると考えられた。本疾患は治療法のない先天疾患だが、より早期に診断できれば食餌療法などの適切な処置により重症化を遅らせ、症例のQOLを高めることができると思われる。一方、ヒトにおけるDHP欠損症の報告も非常に稀であるが、動物での報告は本症例が初めてであり、ヒトのDHP欠損症のモデルとしても貴重な情報を提供すると期待される。

MALDI-MSを用いた病原微生物の同定と分子疫学ツールとしての有用性評価

谷口喬子¹⁾, 比嘉万理子¹⁾, 佐伯祐二²⁾, 岡山明彦²⁾, 林 哲也³⁾, 三澤尚明^{1) 4)}

- 1) 宮崎大学農学部獣医学科獣医公衆衛生学講座, 2) 宮崎大学医学部内科学講座免疫感染病態学分野,
3) 宮崎大学医学部感染症学講座微生物学分野, 4) 宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター

はじめに

最近, 菌体の主要な構成タンパク質であるリボソームタンパク質群を, マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry: MALDI-MS) により測定し, 得られたマスマスペクトルのパターンを比較することによって微生物を同定する手法が提案されている。この手法は, 分離菌の生化学的性状検査や16S rRNA遺伝子塩基配列を用いた従来法に比べ, 迅速簡便かつ低コストで行うことが可能である。菌が分離されていればマスマスペクトルに基づく同定までに数分しか要さず, さらに, 平板培地に形成された単一コロニー程度の菌体量があれば解析可能で, 微生物の生育条件 (培地, 時間等) によって判定結果が影響されにくいという利点もある。現在細菌, 真菌, 酵母など3,000種以上のライブラリがあるが, 独自に菌株のライブラリを作成して, 同定・系統解析を行うこともできる。そこで我々は, このMALDI-MSを用いて重要な食中毒菌を含むカタラーゼ陽性*Campylobacter*属菌のライブラリを作成し, 菌種レベルでの同定が可能か評価した。さらに, 新興感染症として医療現場で問題となっているが, 16S rRNA遺伝子の塩基配列や生化学的性状検査では同定できない人獣共通感染症の1種である*Helicobacter cinaedi*について, MALDI-MSの同定・疫学ツールとしての有用性を評価した。

材料及び方法

血液寒天培地で培養した*Campylobacter*属の*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. fetus*, *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis*の基準株について, 70%ギ酸とアセトニトリルで抽出したタンパク質のマスマスペクトルをMALDI-MS (Bruker Daltonics) にて測定した。得られたマスマスペクトルは, MALDI Biotyper 2.0 softwareを用いて解析し, *Campylobacter*属菌のライブラリを作成した。当研究室保有の*Campylobacter*属菌120株の

マスマスペクトルパターンについて, 作成したライブラリと照合することによってこれらを同定した。次に, *Helicobacter*属菌の*H. cinaedi*, *H. bilis*, '*H. rappini*', *H. canis*, *H. mustelae*, *H. fennelliae*, *H. pylori*についても同様にマスマスペクトルを取得し, 菌種間のマスマスペクトルパターンを比較した。さらに人の血液, 糞便及び犬, 猫, ハムスターの糞便から分離した71株の*H. cinaedi*について, マスマスペクトルパターンに基づいた系統解析を行った。

成績及び考察

当研究室保有の*Campylobacter*属菌120株は, 以前16S rRNA遺伝子塩基配列を用いた手法及びMultiplex PCR法によって同定した株である。これらの株のマスマスペクトルパターンを, 今回新たに作成した*Campylobacter*属菌のライブラリと照合したところ, すべての株について同じ菌種であると同定できた。即ち, 独自に作成したライブラリを用いた同定方法は, 16S rRNA遺伝子塩基配列を用いた手法及びMultiplex PCR法に代わる迅速かつ簡便な手法として有効であることが確認できた。*H. cinaedi*, *H. bilis*, '*H. rappini*'は, 16S rRNA遺伝子塩基配列において, 98%以上の相同性を示し, さらに生化学的性状が乏しいため, これらを識別するのが困難であった。しかしながら, *H. cinaedi*のマスマスペクトルパターンは他2菌種と明らかに異なっており, これにより*H. cinaedi*を迅速かつ簡便に同定することが可能になった。またその他の*Helicobacter*属菌と鑑別することができた。人, 犬, 猫, ハムスターから分離した由来の異なる*H. cinaedi* 71株の系統解析では, 人由来株と動物由来株で異なるクラスターを形成したことから, 有用な疫学ツールとなりうることが示唆された。以上の結果から, MALDI-MSを用いることにより, カタラーゼ陽性*Campylobacter*属菌及び人獣共通感染症の原因菌として重要視されている*Helicobacter*属菌の簡易迅速同定が可能であり, 診断法としての有用性が示された。