

－農林水産省委託プロジェクト研究－

生産システム革新のための研究開発

優れたワクチン開発のための技術開発

平成28年度 最終年度報告書

平成29年3月

国立研究開発法人  
農業・食品産業技術総合研究機構

<別紙様式3. 平成28年度の最終年度報告書>

I-1. 年次計画

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	24	25	26	27	28	機関	研究室
1. 黄色ブドウ球菌性乳房炎に対する粘膜免疫誘導型ワクチンの開発 (1) 黄色ブドウ球菌用ワクチン抗原の探索・精製とそれによる誘導される特異免疫の解析法の確立 (2) クオラムセンシングの阻害を利用した黄色ブドウ球菌性乳房炎に対するワクチン手法の開発 (3) 乳房炎ワクチン用高機能リポソームの構築と乳腺組織でのワクチン効果の検証 (4) マウス乳房炎モデルを用いたワクチン効果の検証 (5) ウシ乳房炎モデルおよびフィールド牛群を用いたワクチン効果の検証	ワクチン抗原を探索					農研機構・動衛研	病態研究領域・寒地酪農衛生ユニット
	抗オートインデューサー (AI) における病原因子の発現阻害確						
	粘膜免疫を効率よく誘導するリポソームの最適化					農研機構・動衛研	病態研究領域・寒地酪農衛生ユニット
	ワクチン抗原のマウス乳房炎モデルを用いた検証					北海学園大	工学部生命工学科
	ワクチン抗原特異的粘膜免疫誘導の検証					東北大学大学院	農学研究科応用生命科学専攻
ワクチン抗原特異的粘膜免疫誘導の検証					東北大学大学院	農学研究科応用生命科学専攻	
ワクチン抗原特異的粘膜免疫誘導の検証					酪農学園大学	獣医学群獣医学類	
ワクチン抗原特異的粘膜免疫誘導の検証					農研機構・動衛研	病態研究領域・寒地酪農衛生ユニット	
ワクチン抗原特異的粘膜免疫誘導の検証					麻布大学獣	医学部獣医学科	

## I-2. 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者
	機関	研究室	
研究開発責任者			
1. 黄色ブドウ球菌性乳房炎に対する粘膜免疫誘導型ワクチンの開発	農研機構・動衛研	病態研究領域・寒地酪農衛生ユニット	○林 智人
(1) 黄色ブドウ球菌用ワクチン抗原の探索・精製とそれによる誘導される特異免疫の解析法の確立	農研機構・動衛研	病態研究領域・寒地酪農衛生ユニット	△林 智人 (内田郁男) 菊佳男 秦英司 長澤裕哉
(2) クオラムセンシングの阻害を利用した黄色ブドウ球菌性乳房炎に対するワクチン手法の開発	農研機構・動衛研 北海学園大	病態研究領域・寒地酪農衛生ユニット 工学部生命工学科	△渡部 淳 小山芳一
(3) 乳房炎ワクチン用高機能リポソームの構築と乳腺組織でのワクチン効果の検証	東北大学大学院	農学研究科応用生命科学専攻	△麻生 久 野地智法
(4) マウス乳房炎モデルを用いたワクチン効果の検証	酪農学園大学	農学研究科応用生命科学専攻 獣医学群獣医学類	△野地智法 樋口豪紀 岩野英知
(5) ウシ乳房炎モデルおよびフィールド牛群を用いたワクチン効果の検証	農研機構・動衛研 麻布大学獣	病態研究領域・寒地酪農衛生ユニット 医学部獣医学科	△林 智人 菊 佳男 長澤裕哉 河合一洋

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

小課題番号	1001	研究期間	平成24～28年度
中課題名	優れたワクチンの開発のための技術開発		
小課題名	1、黄色ブドウ球菌性乳房炎に対する粘膜免疫誘導型ワクチンの開発		
小課題責任者名・研究機関	林 智人・農研機構・動物衛生研究部門・病態研究領域・寒地酪農衛生ユニット		

## 1) 研究目的

搾乳牛の乳房炎は、乳量低下や乳質悪化による経済的な損失が極めて大きいことから、原乳生産現場で最も防除が望まれている疾患である。平成21年度に日本獣医師会が獣医師・農家を対象として行った調査「畜産現場における新たな動物医薬品のニーズ調査 (I) (乳牛関係部門)」でも、乳房炎は新たに動物医薬品等の開発・実用化が必要な病気等の第1位にあげられ、必要とする薬品としても乳房炎ワクチンが第1位にあげられている。細菌性乳房炎の原因菌の中でも特に黄色ブドウ球菌 (SA) は、強感染性かつ難治性であることから早急な予防対策が望まれている。

しかし現在のところ国内動物製薬企業による乳房炎ワクチンの開発は1剤もない。一方、海外ではいくつか乳房炎ワクチン製剤が販売となっているが、そのいずれにおいても乳房炎予防の有効性が安定して認められる商品が少ないのも現状である。本課題では、細菌感染防除に有効とされる分泌型IgA抗体の感染局所へ誘導させることが可能とされる新しいコンセプトの粘膜免疫の考え方を導入し、黄色ブドウ球菌 (SA) に対する乳房炎ワクチン開発の可能性を検討する。研究期間の終了までに、経粘膜免疫誘導に適したワクチン抗原候補の検索・精製を行い、経粘膜免疫の効果的誘導の技術開発を試みる。

## 2) 研究成果

### 平成24年度

1. 全菌体成分全てを含む抗原は、2種の遺伝学的背景を示す菌株群 (Clonal Complex ; CC) 97型および CC705型) からそれぞれ代表的な菌を株化し (CC97 : 1006株ならびに CC705 : 1001株)、LB培地にて純培養を行い、ウシ鼻粘膜免疫を連続して行える量を確保した。またサブユニット抗原は、SA性乳房炎が明確である乳汁をプローブとしたSAのDNAライブラリースクリーニングを行い、今年度は鉄代謝に関連した一群の遺伝子 Isd (iron regulated surface determinant) A、BおよびHをクローニングし、それぞれの遺伝子をタンパク発現ベクターである pGEX-6P-1 に挿入して大腸菌でタンパクを産生させ、親和性カラムにより個々のタンパクを精製した (図1)。

また、SAが有する抗原を総体的に検出することを目的として、新しい抗体評価システム Bacteria plated ELISA (BacELISA) を開発した。これにより、血清中および乳汁中のSA抗原に対する分泌型IgA特異的抗体の定量解析が可能となった (図2)。

2. 乳房炎および正常の乳腺上皮細胞は、共にシクロフィリンAを発現していた。特に、乳房炎発症乳腺では乳腺上皮、乳汁および浸潤部位で強く染色され、乳汁中への分泌が確認された。一方、炎症の進行に伴い間質が肥大して乳腺胞が委縮した乳腺上皮では発現が弱かった。乳汁中シクロフィリンAは、正常乳においても微量検出されたが、乳房炎と診断された乳房乳では大量に検出された (図3)。さらに、乳汁中シクロフィリンAは乳房炎マーカーの化学発光能 (CL能) と高い相関を示し、CL能が低値で乳汁中シクロフィリンAが高い乳が確認された乳牛は、今後乳房炎を発症する予備軍である可能性が考えられた (図4)。本研究により、リンパ球遊走因子シクロフィリンAは乳房炎初

期において免疫細胞の動員などの炎症を誘導し、乳房炎早期診断マーカーとなり得る可能性が示唆され、ウシ乳房炎モデルおよびフィールド牛群を用いたワクチン効果検証への応用が可能出ることが判明した。

また、ワクチン用pH感受性膜融合ポリマーの検討に関しては、合成された多分岐型pH感受性融合ポリマーの中で60分岐のポリマーが脂質膜との相互作用におけるpH応答性が最も高いことを確認した（表1、図5）。

- 牛バルク乳由来 SA の 30 株の *agr* 型解析から既知の I~IV 型の全型が得られたが、23 株が I 型であった。反芻動物に特徴的であり、牛バルク乳から高率に分離される CC97 および CC705 の SA については、CC97 の全ておよび CC705 菌株の一部が I 型、CC705 菌株の一部が II 型であった（表 2）。AIP-1 および AIP-2 に対応するワクチン抗原を設計した（図 6）。

具体的データ

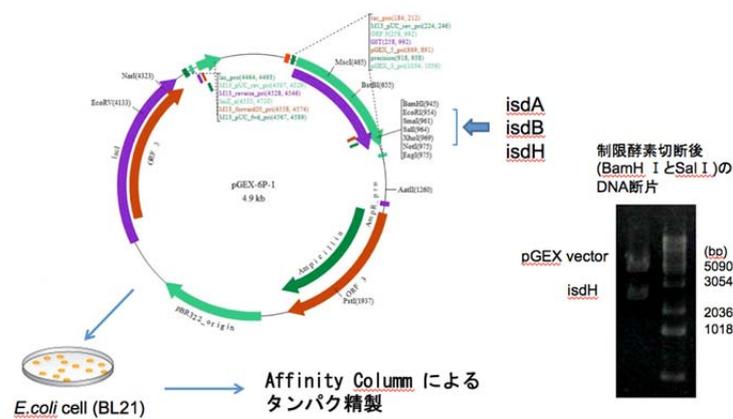


図1、SA用ワクチン抗原の遺伝子組換えによるタンパク精製

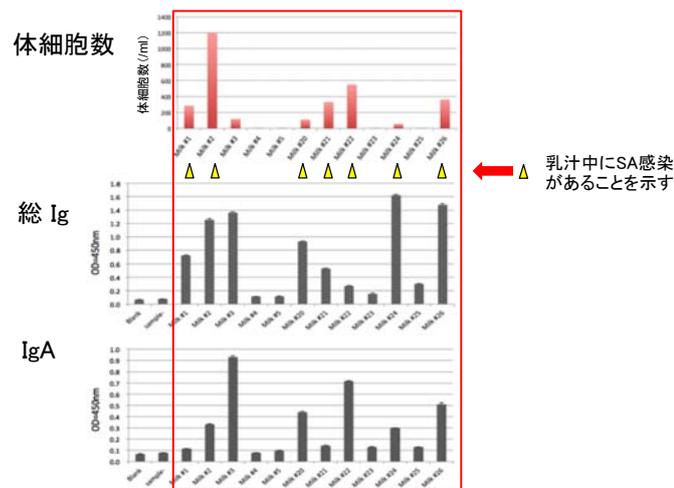


図2、乳汁中のSA特異的抗体のBacELISA解析（総 Ig および IgA）

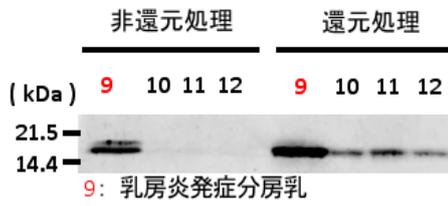


図3、乳汁中シクロフィリンAのウェスタンブロット解析

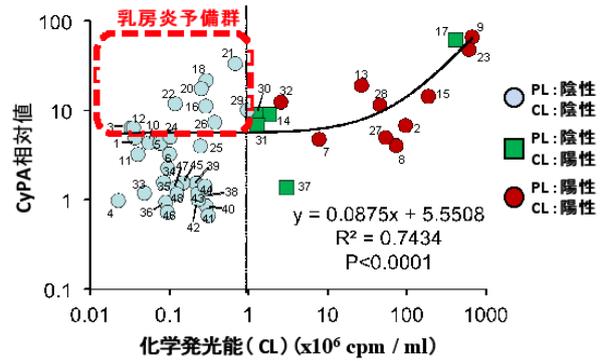


図4、乳汁中シクロフィリンAとCL能との相関

表1、新規pH感受性膜融合ポリマー

Polymer	Hydroxyl unit/%	Carboxyl unit/%	Anchor unit/%
MGlu-HPG10	0	100	-
MGlu-HPG20	0	100	-
MGlu-HPG40	0	100	-
MGlu-HPG60	5	95	-
Linear MGluPG76	10	90	-
MGlu-HPG10-C10	0	88	12
MGlu-HPG20-C10	0	90	10
MGlu-HPG40-C10	0	90	10
MGlu-HPG60-C10	5	85	10
Linear MGluPG76-C10	10	75	15

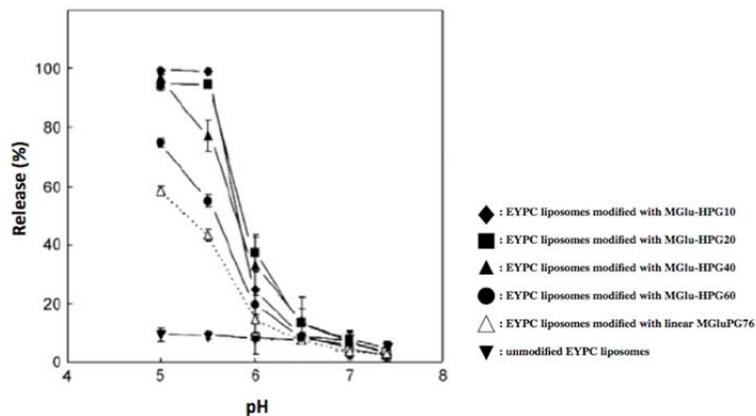


図5、多分岐型・直鎖型pH応答性ポリマー修飾リポソームのpH感受性能

表2. 牛バルク乳由来SAのagr型および遺伝学的背景

agr 型(AIP)	菌株数	遺伝学的背景 MLST, CC
I (AIP-1)	23	5, 6, 8, 15, 20, 25, 45, 88, 97, 705, singleton
II (AIP-2)	5	705
III (AIP-3)	1	singleton
IV (AIP-4)	1	singleton

MLST: multilocus sequence typing

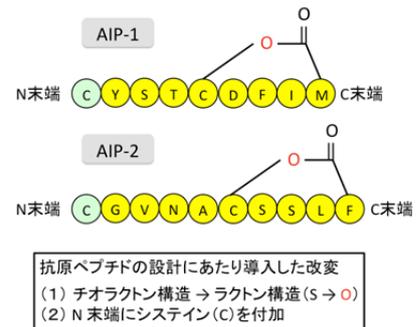


図6. SAのAIP-1およびAIP-2に対応する抗原の設計

ラクトン構造に改変し構造安定性を高め、システインを付加しキャリアタンパク質との

## 平成25年度

- 鉄/ヘム取り込み関連蛋白 Isd-A、-B、-H のサブユニット抗原に加えて、本年度はフィブリノゲン結合蛋白(ClfA)、ファイブロネクチン結合蛋白 (FnbP)の結合ドメインを組換え蛋白として作出した(図1)。組換え蛋白に対する乳汁中抗体についてウェスタンブロッティングにより解析したところ、IsdA、-B、-H 抗体は正常牛の乳汁においても検出され、ClfA 抗体は重症例からのみ検出された。しかし FnbP 抗体は検出されなかった(図2)。
- 全身免疫により、血漿中の抗 AIP-1 および2 特異抗体価(IgG および A) を上げることができたが、乳中の抗 AIP 抗体価の増加は僅かなものにとどまった(図3)。
- 生体膜への融合能について蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)法を用いて解析した結果、いずれのリポソームにおいても、重合度の違う新規 pH 感受性膜融合ポリマー修飾によりエンドソーム膜との膜融合が認められた(図4-A)。特に、EYPC/DOPE リポソームは EYPC リポソームに比べいずれのポリマー修飾でも高い膜融合を示した。また、Mglu-HPG60 を修飾した場合、EYPC リポソーム、EYPC/DOPE リポソームのいずれにおいても高い膜融合能を示す傾向が認められた(図4-A)。さらに、ポリマー修飾 EYPC/DOPE リポソームの樹状細胞内分布を調べた結果、いずれのポリマー修飾においても、ローダミンの蛍光と NBD の蛍光が樹状細胞内に観察され、リポソーム膜とエンドソーム膜との融合が確認された(図4-B)。しかしながら、ポリマー非修飾リポソームにおいては、ローダミンと NBD の蛍光が樹状細胞内に観察されなかった(図4-B)。また SA 抗原封入リポソームの封入抗原の経時的安定性を確認したところ、3 週後で 17%、4 週後で約 30%の SA 抗原がリポソームから離脱することが分かった(表1)。

精製カラム中に溶出バッファーを添加することにより、スブチリシンが活性化してC末端にタグが無い組換えウシCyPA蛋白を精製した。精製した組換えウシCyPA蛋白は、100 ng/mlに至適濃度が存在するリンパ球遊走能を有することが判明した(図5)。作成したウシCyPAサンドウィッチELISAは、組換えウシCyPA蛋白の1 ng/mlから1 μ/mlまでの範囲で良好な検出性能を発揮できることが判明した(図6)。開発したELISAを用いて乳汁中のCyPAを定量することにより乳房炎発症初期段階の判定が可能となり、ウシ乳房炎モデルおよびフィールド牛群を用いたワクチン効果検証への応用が可能である。

- SA 死菌のワクチン抗原としての免役原性の評価を行った(図7)。SA 死菌の BALB/c マウスへの腹腔投与によって、①SA に反応する IgM タイプの自然抗体が免疫前のマ

ウスの血清中に既に存在していること、②SA 特異的 IgM 抗体の力価は、SA 死菌の免疫によって高まること、③SA 死菌の免疫によって、SA 特異的 IgG 抗体も新たに作り出されること、④SA 特異的 IgG 抗体の力価は、SA 特異的 IgM の抗体の力価と比較し低いこと、⑤SA 特異的 IgA 抗体の産生は、SA 死菌の腹腔投与では誘導されないこと、が明らかとなった。以上の結果から、SA 死菌はワクチン抗原としての免疫原性を有しているものの、IgM から IgG や IgA へのクラススイッチを促すためには、SA 死菌投与によって誘導される免疫応答を効果的に増強させることが可能なアジュバントや、効果的なデリバリーシステムとの併用が必要不可欠であることが明らかとなった。

SAワクチンの効果判定において、SAに対するウシの基礎的な免疫応答能の評価が重要な指標と考えられる。本研究では、主要なサイトカインに着目しSAに対するウシ末梢血単核球および好中球の応答性について評価した(図8)。その結果、SA生菌刺激によって単核球ではTNF $\alpha$ 、IL17、IL18、IL2、IFN $\gamma$ 、TGF $\beta$ 、IL4、IL10およびIL13のmRNA発現量が増強し、IL16およびIL8の低下が確認された。好中球ではTNF $\alpha$ 、IL16、IL8、IFN $\gamma$ およびIL12のmRNAの発現増強が確認された(図9)。両細胞ともSA死菌に対しサイトカインのmRNAの発現増強は確認されなかった。これらの結果はSAに対する生体の免疫応答の一端を示す結果であり、SAワクチン開発における基礎知見として重要であると考えられる。

5. 乳房炎既往歴のない初産搾乳牛を用い、SA 株の生菌を乳房内に投与することにより慢性型乳房炎モデルの作出条件を確立したところ、25 CFU/分房の条件で慢性乳房炎の発症誘導が可能であることが分かった。また、乳房炎既往歴のない初産搾乳牛を用い、SA1006 株の死菌を鼻腔粘膜免疫することによる牛粘膜ワクチンモデル実験を試みた(図10)。今回鼻腔粘膜に長時間ワクチン抗原を留めることを考え、粘稠性を確保するポリアクリル酸ナトリウムをSA1006株死菌と混合した溶液により鼻腔粘膜免疫したところ、乳汁中にSA特異的IgA抗体が乳汁中に分泌されることが確認された(図11)。現在SA特異的IgA抗体価の測定を継続しているが、十分に抗体価が上昇した時点において、慢性型乳房炎モデル作出条件において感染予防の実験を行う予定である。

## 具体的データ

1. 黄色ブドウ球菌用ワクチン抗原の探索・精製とそれによる誘導される特異免疫の解析法の確立

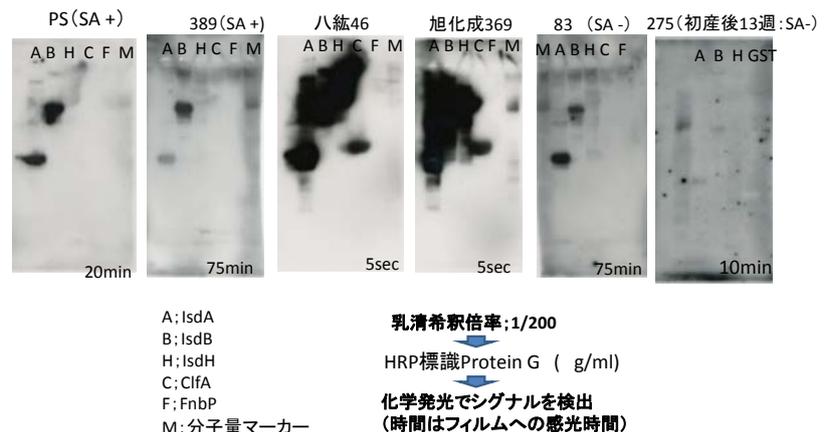
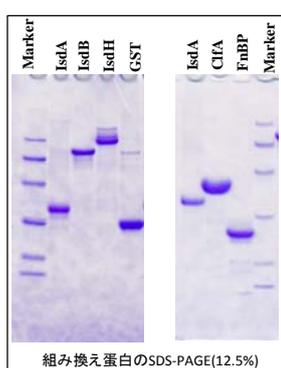


図1 サブユニットワクチン抗原候補分子

図2乳汁を用いたウエスタンブロッティング

2. クオラムセンシングの阻害を利用した黄色ブドウ球菌性乳房炎に対するワクチン手法の開発

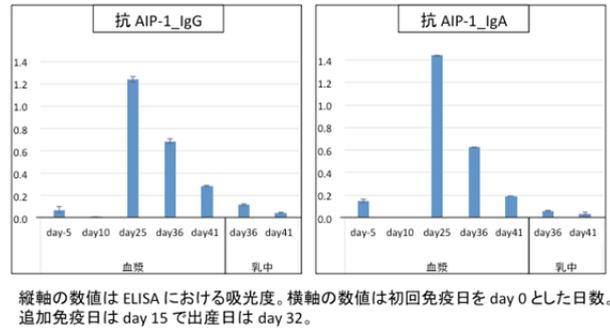


図3. AIP-1を免疫したマウスにおける血漿および乳中抗体

3. 乳房炎ワクチン用高機能リポソームの構築と乳腺組織でのワクチン効果の検証

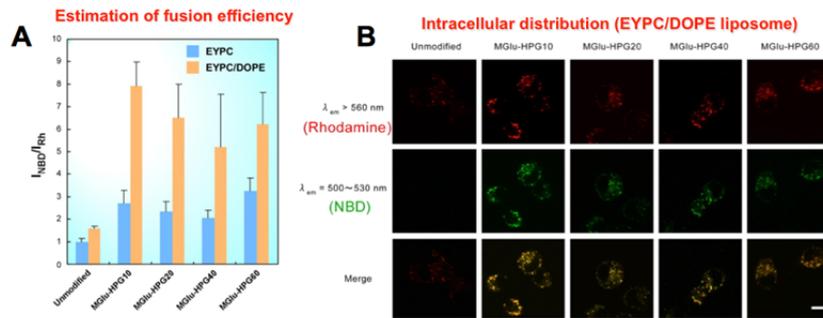


図4 樹状細胞内におけるリポソームの融合

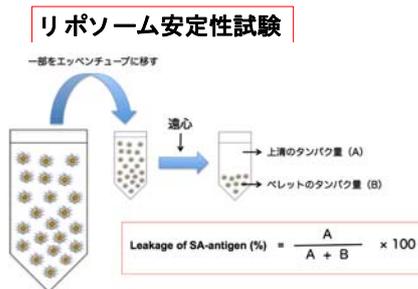


表1 SA抗原封入りポソームの封入抗原の経時的安定性評価

Liposomes	Leakage of SA-antigen (%)						
	Day 0	Day 1	Day 5	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Sup.	—	2.3	1.9	1.3	1.7	1.9	1.6

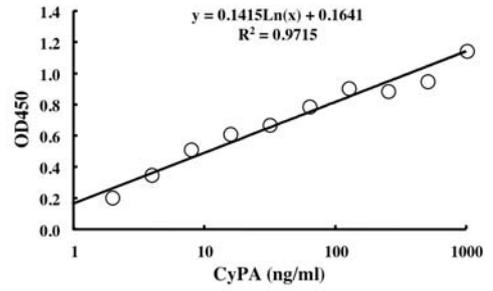
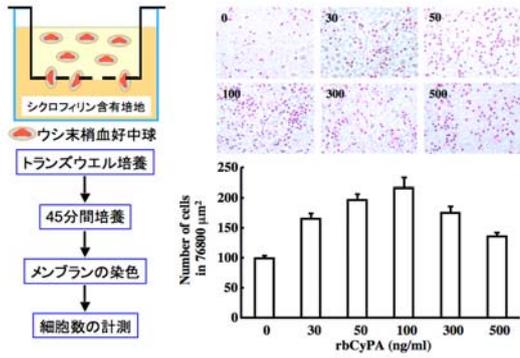


図5 組み換えウシシクロフィリンA(rbCyPA)の活性確認：細胞遊走能

図6ウシシクロフィリンAのELISA

4. マウス乳房炎モデルを用いたワクチン効果の検証

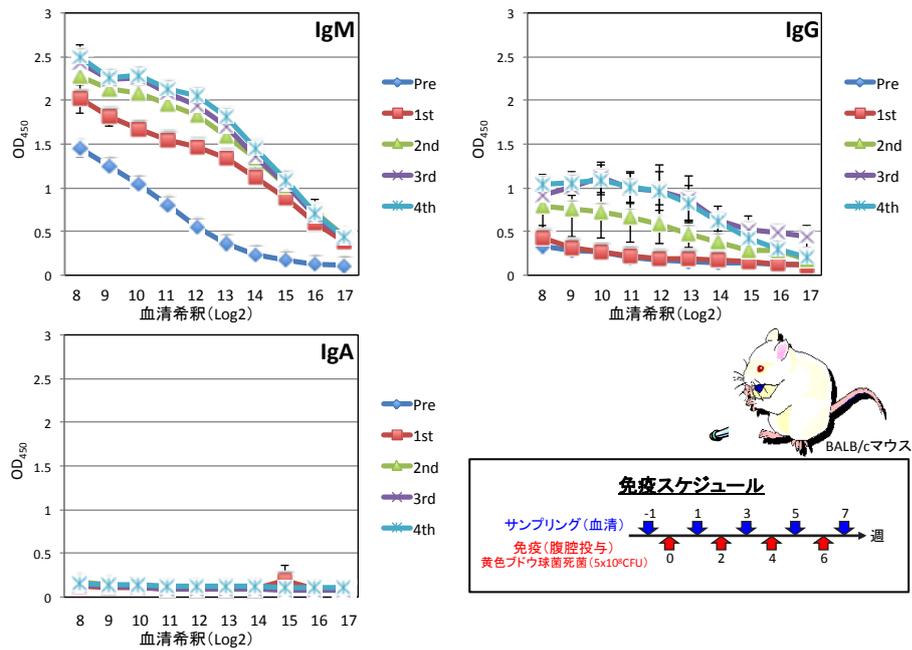


図7 黄色ブドウ球菌 (SA) 死菌のワクチン抗原としての免役原性の評価 (マウス腹腔へのSA死菌投与によって誘導される血清中SA特異的免疫応答)

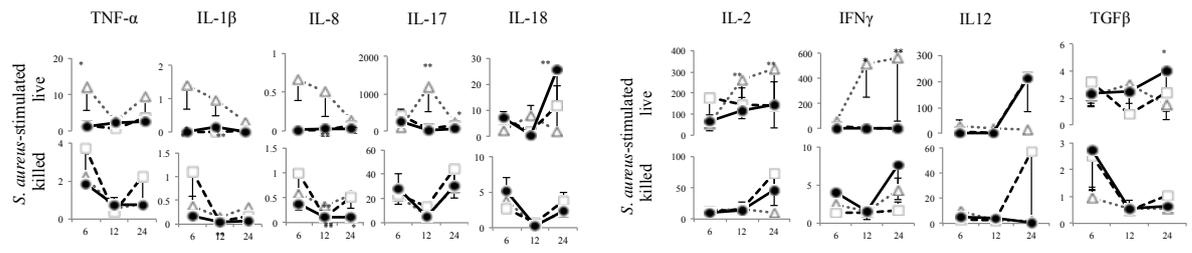


図8-① SA刺激による単核球のmRNA発現量

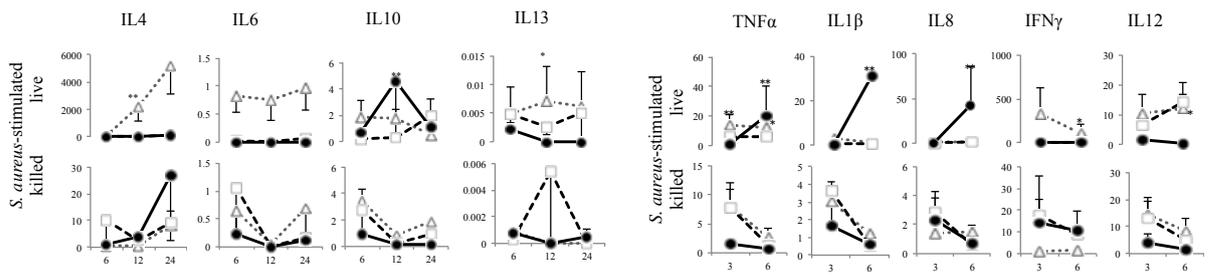


図8-② SA刺激による単核球のmRNA発現量

図9 SA刺激による好中球のmRNA発現量

5. ウシ乳房炎モデルおよびフィールド牛群を用いたワクチン効果の検証



**免疫:**  
 ポリアクリル酸ナトリウムで粘稠性の黄色ブドウ球菌1006株死菌(死菌:  $10^{10}$ )含水溶液を作製し、鼻腔投与

図10 SA死菌の鼻腔投与

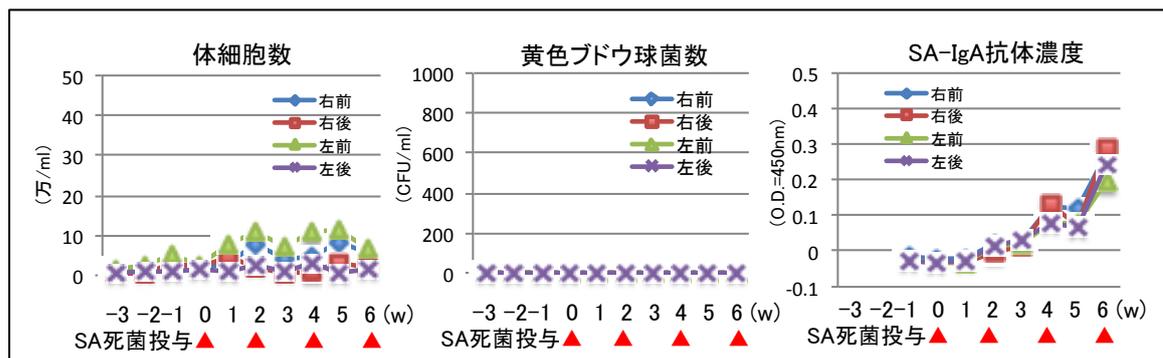


図11 乳汁中の体細胞数、SA 菌数、SA特異的 IgA 抗体価

### 平成26年度

1. 組み換え蛋白に対する乳汁中抗体についてウエスタンブロッティングにより解析した。IsdA、IsdB、IsdH は正常牛の牛においても検出され、ClfA 抗体は重症例から検出され、FnbP に対する抗体を有するものは検出できなかった。71 検体の牛乳汁中 IgA 抗体について調査した結果、抗 IdsA、IdsB、IdsH のいずれも場合も、SA 陽性牛の ELISA 値は SA 陰性のものに比較して有意に高くなった ( $P < 0.05$ )。
2. 全身免疫により、血漿中の抗 AIP-1 および-2 特異抗体価 (IgG および A) を上げることができた (図 X)。アジュバントとして CTB を用いた経鼻粘膜免疫による抗 AIP-1 抗体価の測定結果については解析中である。抗 AIP-1 モノクローナル IgA 抗体 (1 クローン) を得た。これはクオラムセンシング阻害に必要な抗 AIP-1 IgA 抗体価を評価するために利用できる。
3. 実験区の乳汁中体細胞数は黄色ブドウ球菌接種後 6 日以内に乳房炎発症の基準である 28.3 万個/ml 以上になったのに対して、対照区の乳汁中体細胞数は低い値で推移していた。また、実験区では黄色ブドウ球菌が検出されて細菌数が上昇し、乳房炎の発症が確認された。実験区の乳汁中シクロフィリン A 濃度は乳房炎発症時に増加して高い値を継続したが、対照区では増加しなかった (図 1)。乳房炎発症前の分房別乳汁および合乳中シクロフィリン A 濃度の平均値はそれぞれ 97.5ng/ml および 63ng/ml であったのに対し、乳房炎発症後では 988.5ng/ml および 623ng/ml となって 10 倍量に増加していた。合乳においても、乳房炎発症時にシクロフィリン A 濃度の上昇が確認された。また、体細胞数とシクロフィリン A 濃度の相関は、分房別乳で  $R^2=0.76$ 、合乳で  $R^2=0.41$  であり、共に強い相関が確認された (図 2、図 3)。乳房炎発症乳の合乳汁中シクロフィリン A 濃度は 150ng/ml 以上であることが判明し、今後は例数を増加させることにより、乳房炎発症牛を検出できる乳汁中シクロフィリン A 濃度の閾値を確立できることが判明した (図 4)。乳汁中のシクロフィリン A は、乳腺上皮細胞が合成して乳汁へ分泌されるが、体細胞数と乳汁中シクロフィリン A 濃度には強い相関が認められることから、シクロフィリン A はその白血球遊走能により体細胞数を増加させて炎症を引き起し、乳房炎発症に関与している可能性があることが確認された。また、実験区では乳汁中シクロフィリン A 濃度が感染後も高い状態であったことから、乳房炎の慢性化を助長する要因の一つであることが示唆された。合乳中シクロフィリン A 濃度が感染前に比べて乳房炎発症後に 10 倍に上昇したことは、分房別乳測定に比較して簡便性が高くなると共に、測定経費の削減が可能となる。以上より、健常牛から乳房炎発症に移行する合乳中シクロフィリン A 濃度の閾値を明らかにすることにより、乳汁中シクロフィリン A 濃度測定によるワクチン効果判定と早期乳房炎診断が可能になることが判明した。
4. 黄色ブドウ球菌死菌とコレラ毒素を経鼻投与することで唾液、鼻洗浄液、膣洗浄液中に、経膣投与することで膣洗浄液中に、経肛門投与することで膣洗浄液および糞便中にコレラ

毒素特異的 IgA 抗体が誘導された。また、乳汁中のコレラ毒素特異的 IgA 抗体は、経口投与を除く、経鼻、経膺、経肛門の3つの投与方法によって確認され、3群間で有意な差は認められなかった。一方で、黄色ブドウ球菌特異的 IgA 抗体の力価は、どの試験区においても非常に低値であるか、検出限界以下であった。これらの結果は、経鼻投与が乳汁中に IgA 抗体産生を誘導するための優れた抗原投与方法であることを強く物語っていた。一方で、乳房炎ワクチンとして黄色ブドウ球菌の死菌を使用することは、抗原性に課題が残ることが明らかとなり、本プロジェクトで進めている乳房炎ワクチンの抗原デリバリーシステムの開発の重要性が改めて示唆された。

5. 乳腺に抗原特異的免疫を誘導する前感作抗原候補の乳汁中の抗体価を解析した。また鼻腔粘膜経路で SA 由来抗原を前感作した牛は、前感作なしの牛と比較し、SA 乳房内感染から短時間で SA 特異的 IgA 抗体を強く乳汁中に誘導できることを確認した。

### 具体的データ

1. 黄色ブドウ球菌用ワクチン抗原の探索・精製とそれによる誘導される特異免疫の解析法の確立

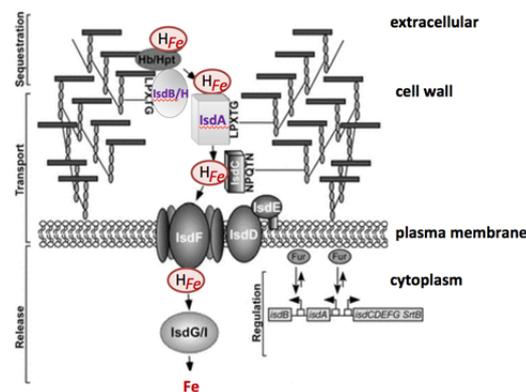
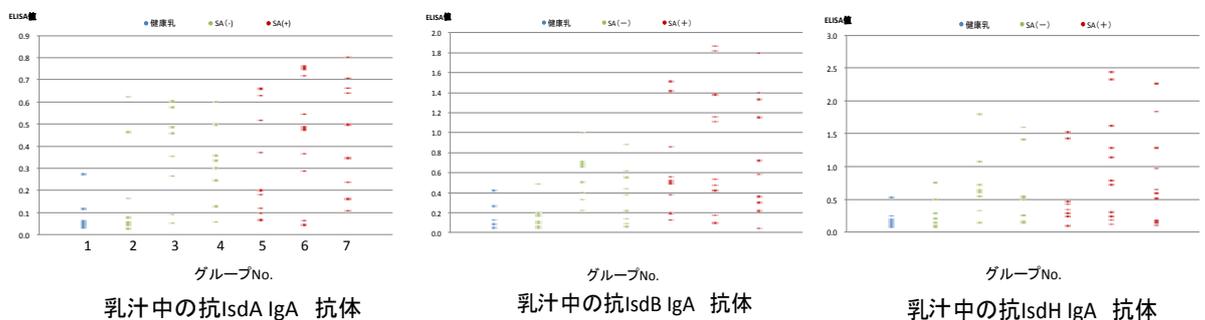


図1 鉄/ヘム取り込みシステムに関わるワクチン抗原候補のIsdA,IsdBおよびIsdH蛋白



- |                            |                             |
|----------------------------|-----------------------------|
| グループ1: 健康牛                 | グループ: 5 SA(+), 体細胞数 40>     |
| グループ2: SA (-), 体細胞数 40万>   | グループ: 6 SA(+), 体細胞数 40-200万 |
| グループ3: SA (-), 体細胞数40-200万 | グループ: 7 SA(+), 体細胞数 >200万   |
| グループ4: SA (-), 体細胞数 >200万  |                             |

図2 重症度の異なる乳房炎乳汁中における抗-IsdA、抗-IsdB、抗-IsdH IgA抗体価

2. クオラムセンシングの阻害を利用した黄色ブドウ球菌性乳房炎に対するワクチン手法の開発

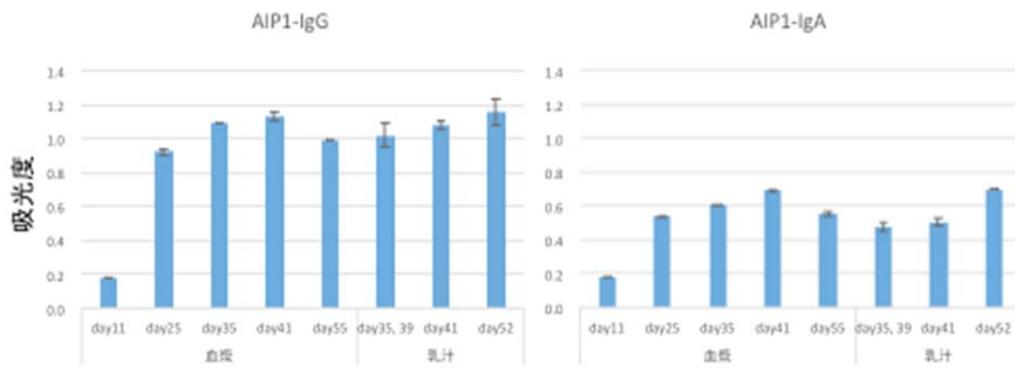


図3 AIP-1を全身免疫したマウスにおける血漿および乳中抗体

- c) 乳房炎ワクチン用高機能リポソームの構築と乳腺組織でのワクチン効果の検証

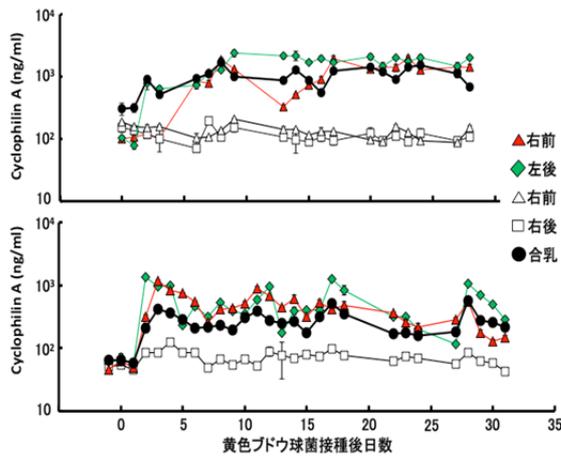
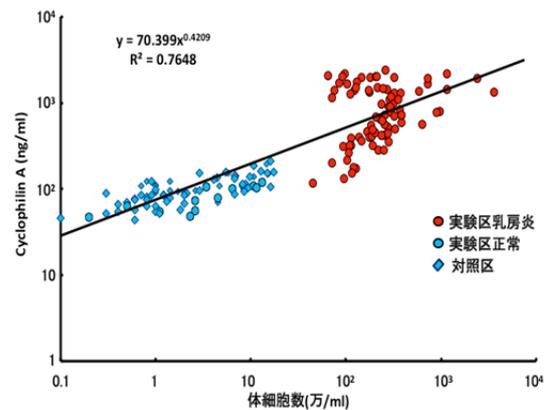
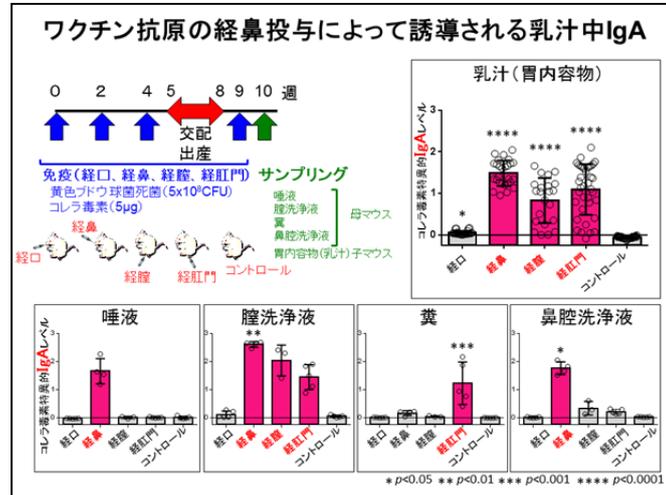


図4. 黄色ブドウ球菌感染後の乳汁中シクロフィリンA濃度



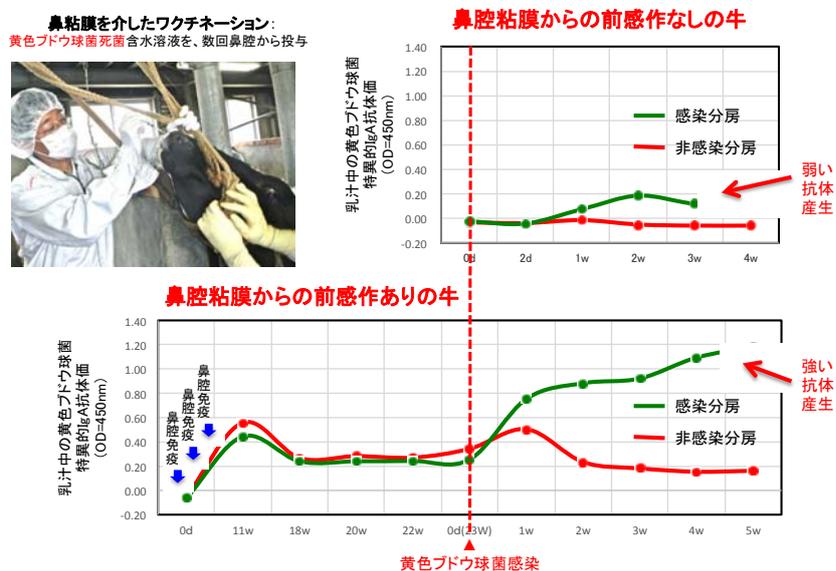
図? 2. 分房別乳汁中の体細胞数とシクロフィリンA濃度の相関

d) マウス乳房炎モデルを用いたワクチン効果の検証



図? ワクチン抗原の経鼻投与によって誘導される乳汁中IgA

e) ウシ乳房炎モデルおよびフィールド牛群を用いたワクチン効果の検証



図? 乳汁中における黄色ブドウ球菌に対するIgA抗体価の推移 (上: 前感作なし下: 前感作あり)

平成27年度

1. 鉄/ヘム取り込み関連蛋白、IsdA, IsdB, IsdH に加えて、本年度は、ClfA (クランピン

グ因子結合蛋白)、FnBP(ファイブロネクチン結合蛋白)の結合ドメインを組み換え蛋白として作出した(図1)。IsdA、IsdB、IsdHは正常牛および乳房炎罹患牛においても検出され(図2)、組み換え蛋白に対する乳汁中抗体についてウエスタンブロッティングにより解析した。興味深いことに、ClfAやFnBPに対する抗体は乳房炎罹患牛の乳汁からは検出できないことが多かったが、ポリアクリル酸ナトリウムとSA死菌あるいはナノゲルとSA死菌との組合せで鼻腔前感作した牛では、SA乳房感染後、ポリアクリル酸ナトリウムとの組合せにおいてClfAが、ナノゲルとの組合せにおいてClfAとFnBPに対する抗体価をそれぞれ上昇させる効果があることが示唆された(図3)。

2. リポソーム包埋AIP-1(10 µg)を経鼻免疫した場合は、SASを用いて全身免疫した場合に比べ、IgA抗体価で約1/5、IgG抗体価で約1/18程の上昇であった(図4)。rTRAPをSASを用いて全身免疫して得た血漿中にIgAおよびIgG抗体価の上昇を確認した(図5)。

乳房炎乳から分離した野外株SA03を用い、腹腔内投与によるマウス生存率を求め、SAの投与量と経過時間による生存率を比較検討した結果、SAが $10^7$ CFUより多くなると、マウスの生存率を劇的に減少させ、 $5 \times 10^7$ CFU以上でマウスは致死となった(図6)。菌数 $3 \times 10^7$ CFU/100ulをマウス腹腔内に投与し、時間経過による生存率を調べたところ、投与後9時間から生存率が低下し、24時間で40%の生存率となった。以上から、SA03を用いたマウス腹腔内投与試験では、 $3 \times 10^7$ CFU/100ulから $5 \times 10^7$ CFU/100ulの投与量でワクチン効果試験を行うことが可能であると明らかとなった(図6)。

3. これまで行った実験牛6頭の乳汁中生菌数、黄色ブドウ球菌数、体細胞数およびシクロフィリンA濃度をまとめたところ、感染乳房では全ての検査項目が黄色ブドウ球菌接種後6日以内に乳房炎発症の基準以上になったのに対して、非感染乳房対照区の乳汁中では低い値で推移していたことより、感染実験は成功していた(図7)。乳汁中の体細胞数とシクロフィリンA濃度との相関を比較したところ、ワクチンの無有に依らず高い相関が認められた(図8)。しかしながら、乳汁中体細胞数20万個/ml以上の乳汁中シクロフィリンA濃度は、ナノゲルワクチン感作群がワクチン無群に比較して低い傾向が認められた(図9,10)。そこで、これまで実験に供した6頭の黄色ブドウ球菌数、体細胞数およびシクロフィリンA濃度を感染後30日間の平均値で比較した(図11,12)。ナノゲルワクチン感作群2頭の乳汁中シクロフィリンA濃度の平均値は有意に低いことが判明し、乳汁中体細胞数の平均値でも1頭で最も低い値となった。ポリアクリル酸ワクチン感作は1回の実験であるが、黄色ブドウ球菌数、体細胞数およびシクロフィリンA濃度の平均値で最も高い値となった。乳汁中のシクロフィリンAは、乳腺上皮細胞が合成して乳汁へ分泌されるが、体細胞数と乳汁中シクロフィリンA濃度には強い相関が認められることから、シクロフィリンAはその白血球遊走能により体細胞数を増加させて炎症を引き起し、乳房炎発症に関与している可能性があることが確認された。また、ナノゲルワクチン感作牛では、乳汁中体細胞数が高い乳汁であっても、乳汁中シクロフィリンA濃度が低い値であったことより、炎症誘起に至る状態が緩和されていたと考えられた。以上より、健常牛から乳房炎発症に移行する合乳中シクロフィリンA濃度の閾値を明らかにすることにより、乳汁中シクロフィリンA濃度測定によるワクチン効果判定と早期乳房炎診断が可能になることが判明した。

4. ナノゲルを用いて黄色ブドウ球菌の死菌を被覆し、それをマウスに経鼻投与することで、乳汁中に黄色ブドウ球菌特異的IgA産生を誘導することが可能であった(図13)。黄色ブドウ球菌は抗原性が非常に低く、単独で経鼻投与しても、乳汁中に黄色ブドウ球菌特異的IgA産生を誘導することは極めて難しいことから、本成果は、ナノゲルの優れた抗原デリバリー効果をウシでも実証できる可能性があることを意味する。興味深いことに、コレラ毒素をアジュバントとして併用した場合、黄色ブドウ球菌特異的IgA産生は誘導されなかった。このことは、コレラ毒素を併用することで鼻粘膜上皮細胞が損傷を受け、ナノゲルの抗原デリバリー効果が消失されたことを示唆していた。また、黄色ブドウ球菌の死菌をナノゲルで被覆せずにコレラ毒素と共に経鼻投与した場合も、黄色ブドウ球菌特異的IgA産生は誘導されなかった。血清中の黄色ブドウ球菌特異的IgG産生も、乳汁中のIgAと同様の結果であった。また、コレラ毒素特異的血清中IgG

および乳汁中 IgA は、ナノゲルの有無に関わらず、コレラ毒素をアジュバントとして用いた試験区で認められた。これらの結果は、ナノゲルを用いることで、アジュバント非存在下でも黄色ブドウ球菌に対する免疫応答を誘導可能であることを意味していた。

5. 今年度までに実施した乳房炎歴のない初産牛の6頭のSA死菌による鼻腔前感作あり(3頭)および前感作なし(3頭)の乳汁中に誘導されるSA特異的IgA抗体の実験結果をまとめた(図14、図15)。SA死菌による前感作ありの3頭に関しては、1頭がポリアクリル酸ナトリウムとSA死菌との組合せ、2頭がナノゲルとSA死菌との組合せでの感作である。この実験の結果、乳汁中のSA特異的IgA抗体価は、前感作ありの牛で感染後すみやかな抗体価の上昇が認められた。一方、前感作なしの牛では抗体価の強い上昇は見られなかった。この結果は、乳腺におけるSA特異的な免疫学的メモリーの形成が局所のリンパ節等で形成されたか、あるいは鼻腔で形成されたSA特異的なメモリーB細胞が粘膜帰巢経路により乳腺にホーミングしたことにより、感染後速やかな免疫反応が誘導された可能性が示唆された(図15)。

これまでの前感作した牛3頭の中で、最もSA特異的IgA抗体価が高かったSA死菌+ナノゲルで鼻腔前感作した牛の5週目の乳汁を用い、*in vitro*の細菌培養および乳腺上皮細胞の培養実験でSAの増殖抑制活性およびSAが持つ乳腺上皮細胞障害に対する抑制効果を解析した(図16)。その結果、SAにより前感作した牛の乳汁を培養培地に添加した場合、SAの増殖が抑制された(図17)。さらにその乳汁は、SAとの共培養による乳腺上皮細胞の死細胞数の増加を抑制することが示された(図18)。以上より、牛の鼻腔を介してSA死菌を前感作して得た乳汁のSAの増殖抑制活性およびSAに対する乳腺上皮細胞障害抑制活性が確認できた。

鼻腔を介した抗原の認識から乳腺において液性免疫が誘導されることは上記の実験において明らかに出来たが、抗原感作の出発点となる鼻腔でのSA死菌を取込む感作部位は未だ不明であった。そこでFITC標識SA死菌を牛の鼻孔から約15cmのカテーテルを用いて左の鼻腔へ投与し、1時間後に安楽殺して主要な粘膜上皮組織および頭部を中心としたリンパ節を回収し、回収したリンパ節中におけるSA死菌を取込んだ細胞の割合をフローサイトメーターにより測定し、SA死菌が取込まれたリンパ節の解析をした(図19)。その結果、回収したリンパ節中におけるSA死菌陽性細胞の割合は、投与部位に近い口蓋扁桃や耳管扁桃、舌扁桃および従隔リンパ節で比較的高く、咽頭扁桃で最も高かった。一方、投与部位から遠位の腸間膜リンパ節や鼠径リンパ節ではSA死菌陽性細胞の割合は低かった。本実験の結果、咽頭扁桃が鼻腔からのSA死菌を最も取込む部位であることが示された。

牛の咽頭扁桃において、CD20(B細胞マーカー)陽性細胞が多数存在するリンパ濾胞が存在し、リンパ濾胞および上皮層とリンパ濾胞の間にIgA産生細胞が多数存在することが判明した(図20)。またIgAは、鼻腔粘膜および咽頭扁桃上皮細胞上にも局在していた(図20)。また、SA-FITCを鼻腔投与し、1時間後の咽頭扁桃におけるSA-FITC陽性細胞が未投与の牛と比較して15.3%存在し、咽頭扁桃には、SA-FITC陽性細胞とCD45(白血球マーカー)、MHC class II(抗原提示細胞マーカー)並びにCD11c(樹状細胞マーカー)と共染色される細胞群が存在した(図21)。以上より、咽頭扁桃はSA-FITCに対する特異的免疫応答の場となっていることが示唆された。

鼻腔でのSA死菌の取込み部位の解析に併せて、鼻腔粘膜上皮におけるSA死菌を取込んだCytokeratin 18(CK18:M細胞マーカー)陽性細胞の有無を免疫染色法、さらに走査型電子顕微鏡を用いて、SA死菌を感作した組織から菌が取り込まれる超微細構造を画像から確認した。その結果、咽頭扁桃上皮層のSA陽性CK18細胞の解析でSA陽性細胞が存在することが判明した(図22)。さらに走査型電子顕微鏡により、咽頭扁桃上皮層にM細胞の特徴である繊毛を持たない細胞が存在することが確認された(図22)。これらの結果から、咽頭扁桃に存在するM細胞様細胞におけるSA死菌の取り込みが確認でき、この部位のM細胞様細胞が抗原感作の出発点となっている可能性が示唆された。

具体的データ

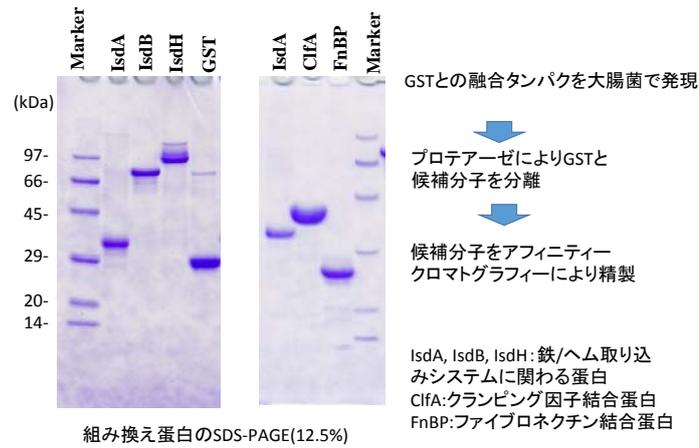


図1 これまでに作製した黄色ブドウ球菌に対するワクチン抗原候補分子

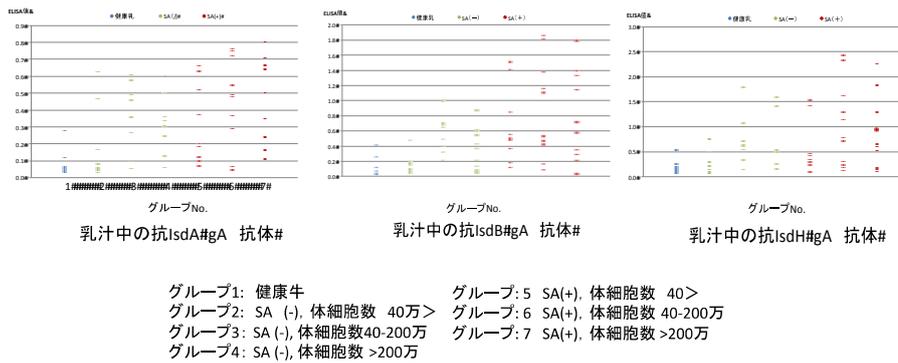


図2 重症度の異なる乳房炎乳汁中における抗-IsdA、抗-IsdB、抗-IsdH IgA抗体価

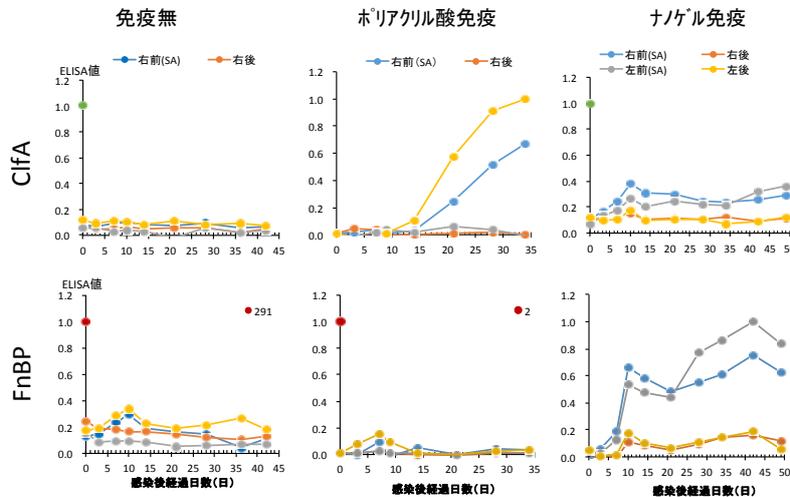
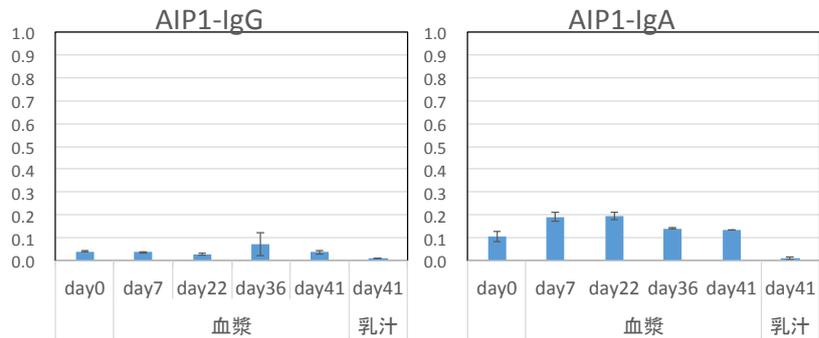


図3 前感作をした牛の黄色ブドウ球菌感染後の乳汁中CifAおよびFnBPに対するIgA抗体価



- day 0, 14, 28 に 10  $\mu\text{g}/\text{head}$  で径鼻免疫
- Sigma Adjuvant System を用いた全身免疫の1/5 (IgA抗体) ~1/18 (IgG抗体)の抗体価

図4 リポソーム包埋 AIP-1 を径鼻免疫したマウスの血漿中抗体価

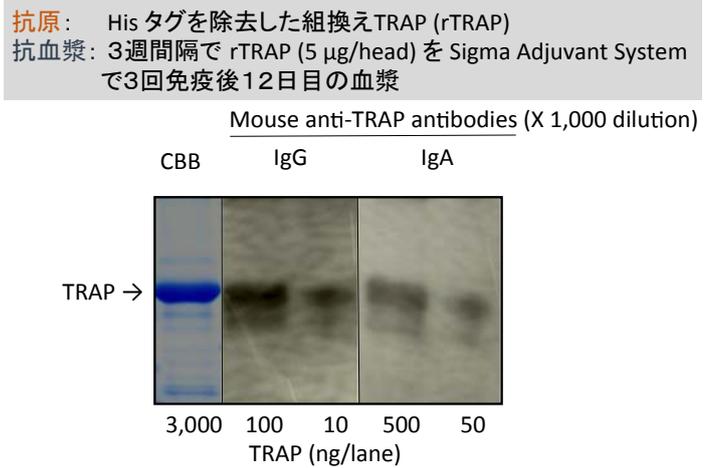
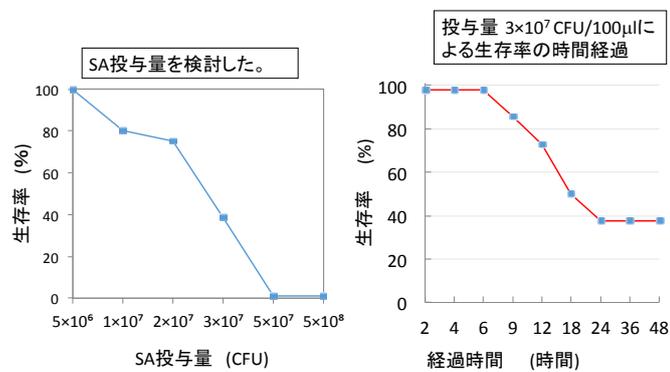


図5 マウス抗TRAP抗体の検出



ddY系8-10週齢雄マウスを用いて、SAを腹腔内に投与し、48時間後まで生存を観察

図6 黄色ブドウ球菌腹腔内投与におけるマウスの生存率

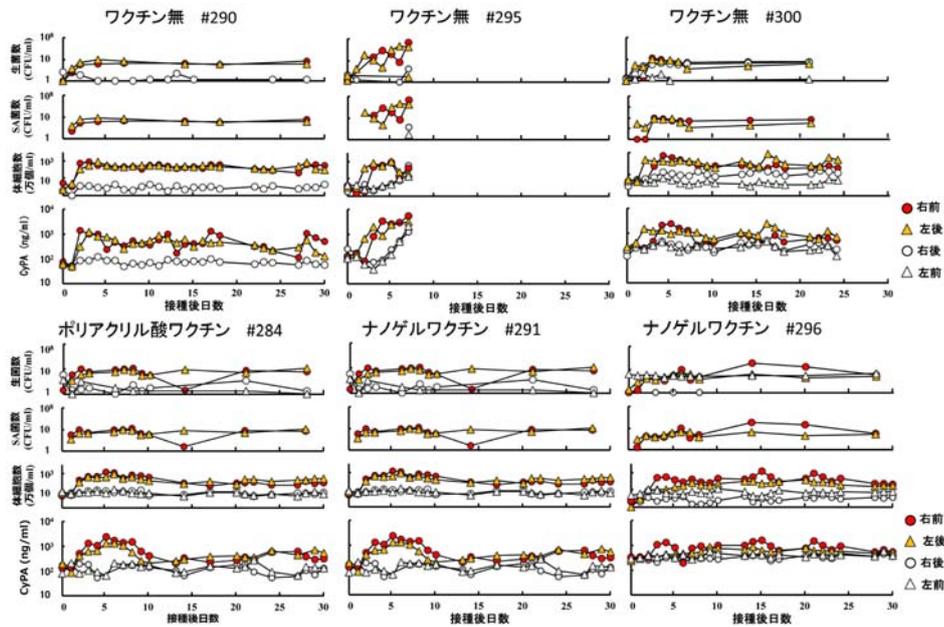
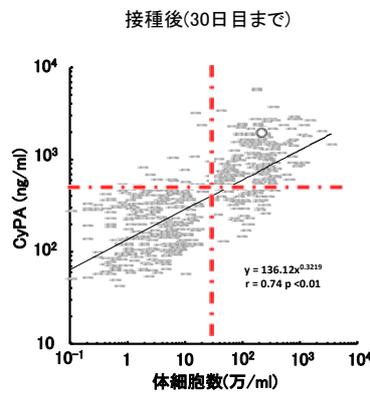
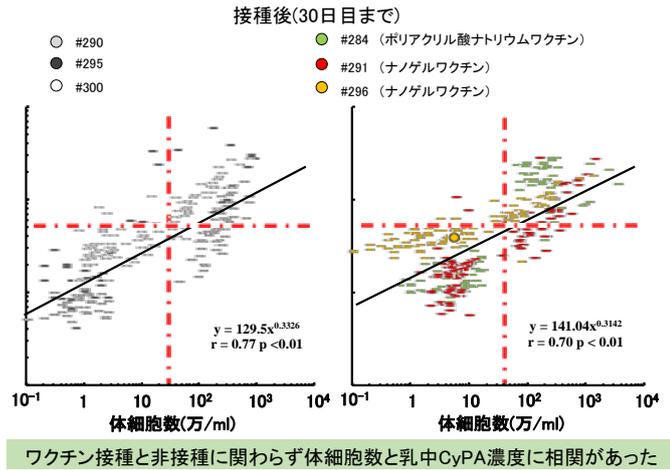


図7 黄色ブドウ球菌接種後の乳中シクロフィリンAの変動 (まとめ)



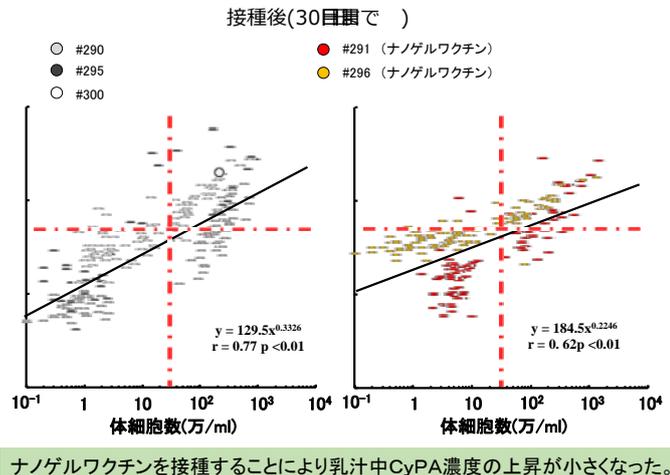
体細胞数と乳中CyPA濃度に相関があった

図8 乳汁中シクロフェリン (CyPA) 濃度と体細胞数との相関性



ワクチン接種と非接種に関わらず体細胞数と乳中CyPA濃度に相関があった

図9 ワクチン接種による相関性の違い



ナノゲルワクチンを接種することにより乳中CyPA濃度の上昇が小さくなった。

図10 ワクチン接種による体細胞数とCyPAとの相関性の違い

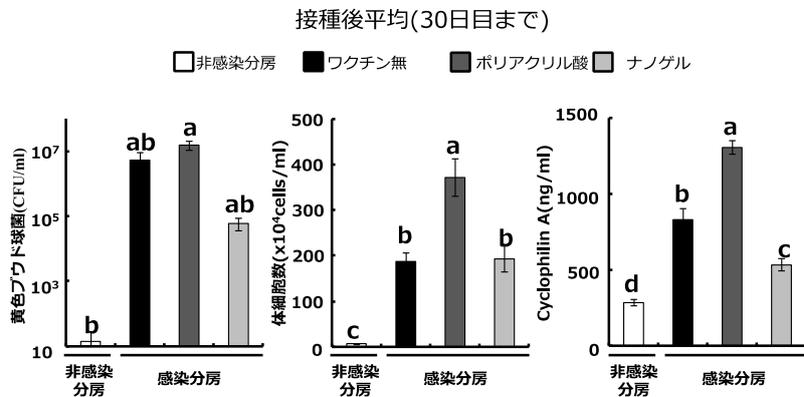


図11 ワクチン接種によるCyPA濃度の違い

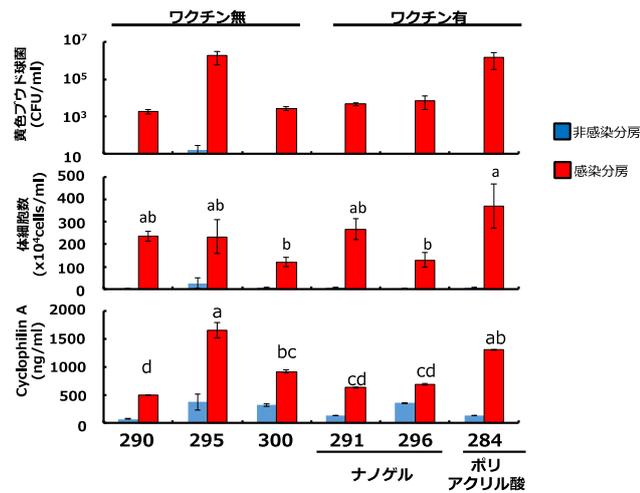


図12 ワクチン接種によるC y P A濃度の違い接種後平均 (30日目まで)

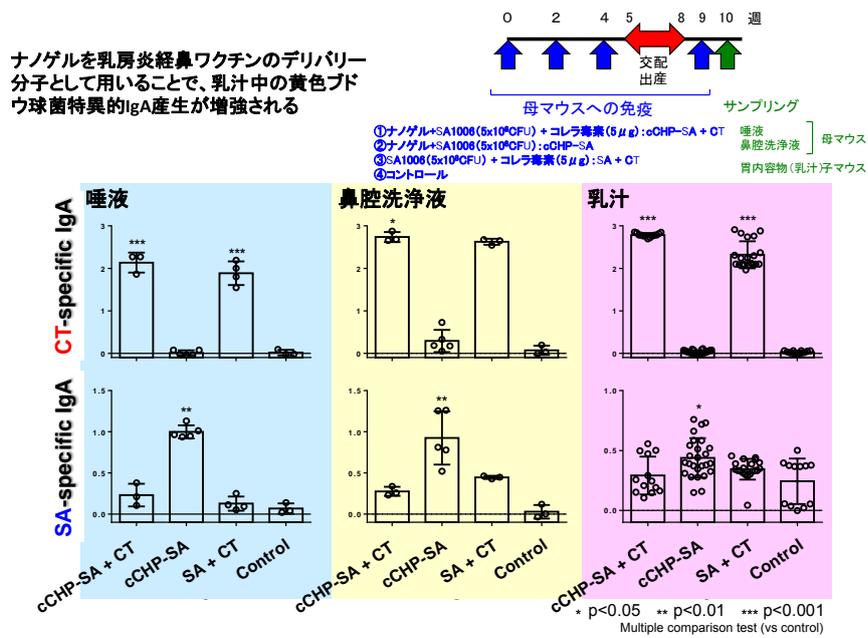


図13 マウスにおいて黄色ブドウ球菌死菌とナノゲルの組合せは、乳汁中の黄色ブドウ球菌特異的IgA産生が増強される

黄色ブドウ球菌1006株死菌含水溶液  
(ナノゲル or ポリアクリル酸ナトリウム含有)  
を製し、鼻腔に隔週で免疫

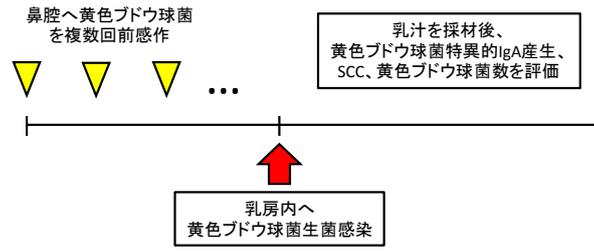


図14 牛における鼻腔前感作のプロトコール

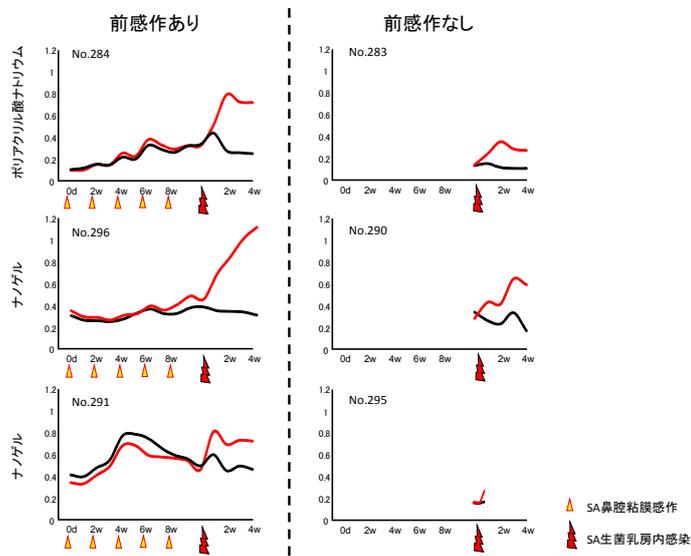


図15 鼻腔前感作あり・なしにおける、乳汁中SA特異的IgA抗体価の変動

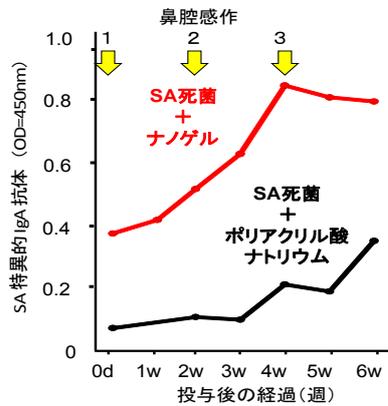


図16 ナノゲルおよびポリアクリル酸ナトリウムを用いた前感作段階での乳汁中SA特異的IgA抗体価の比較

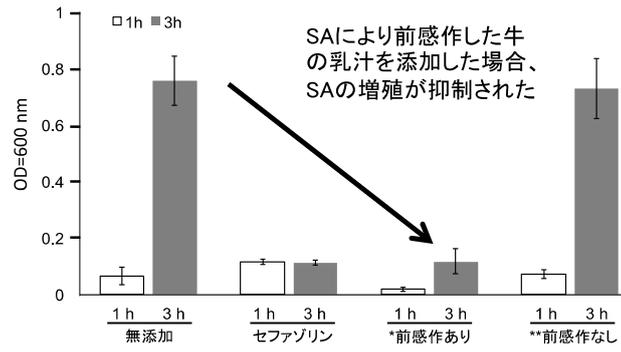


図17 鼻腔からの前感作で得た乳汁のSA増殖抑制活性

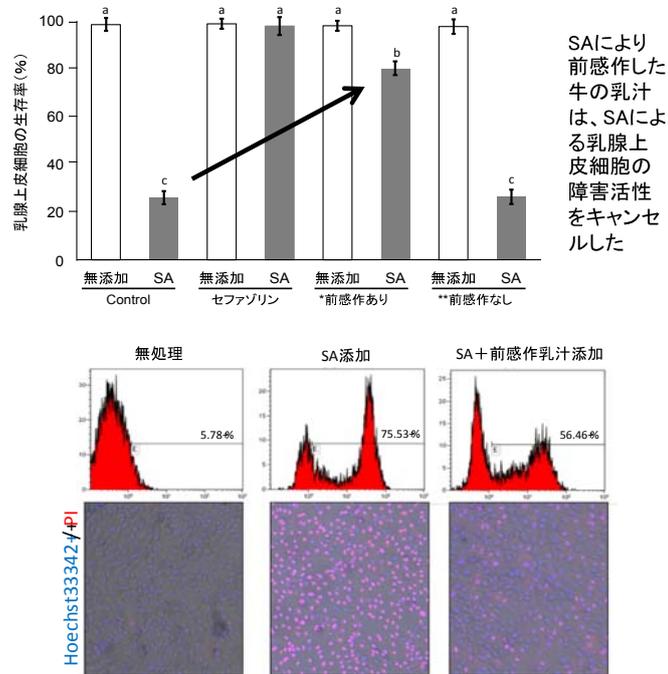


図18 鼻腔からの前感作で得た乳汁のSAの乳腺上皮細胞障害抑制活性

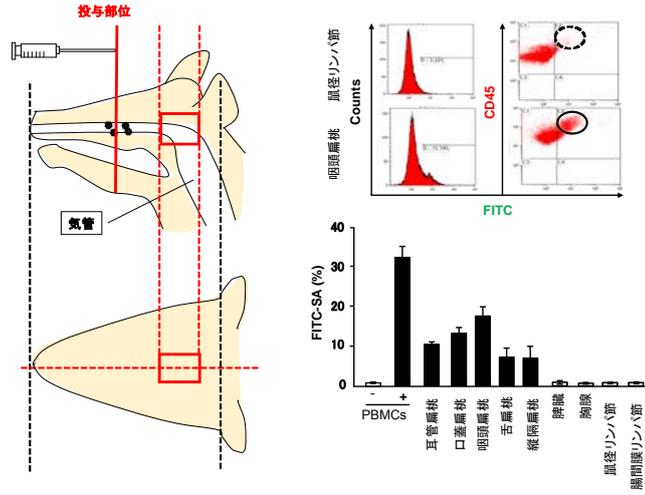


図19 SA-FITCを鼻腔投与した各リンパ節におけるSA-FITC陽性細胞の割合

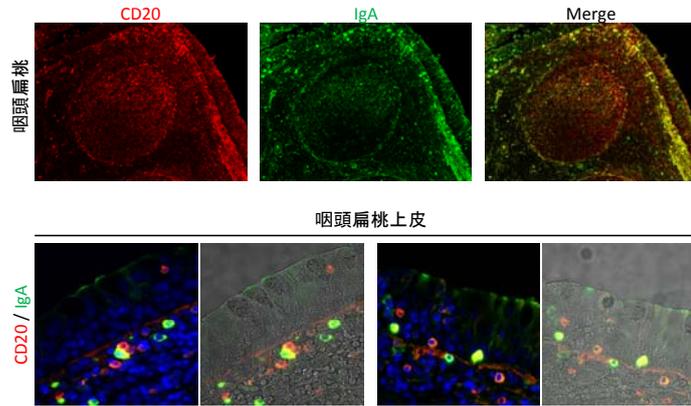


図20 咽頭扁桃におけるCD20およびIgA陽性細胞の局在

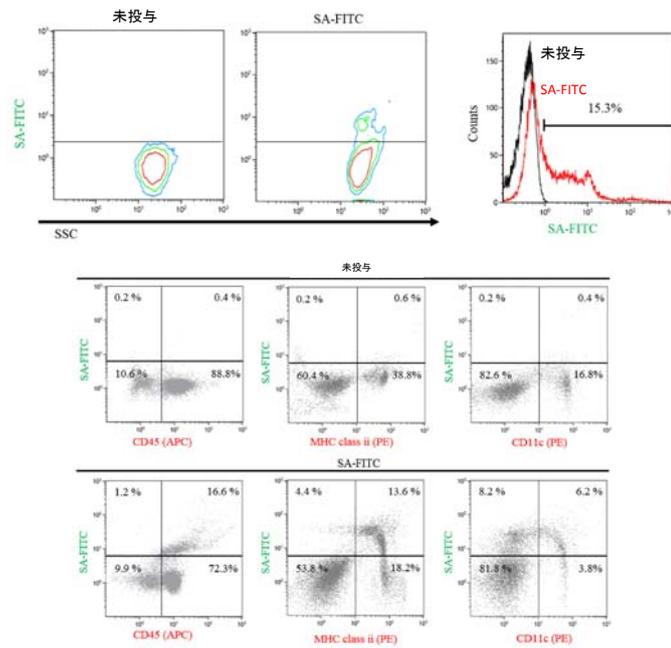


図21 咽頭扁桃における白血球、抗原提示細胞および樹状細胞のSA-FITC陽性細胞の割合

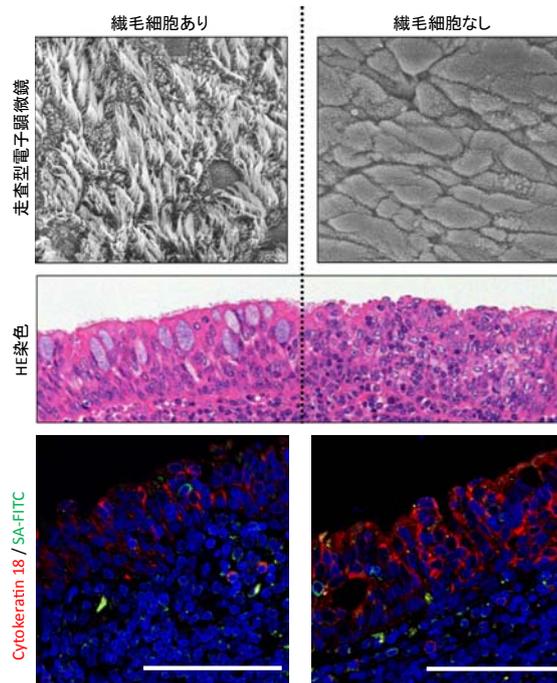


図22 SA-FITCを鼻腔投与した咽頭扁桃上皮細胞におけるSA-FITCの取り込み

平成28年度

1. IsdA, IsdB, IsdHに加えてClfA、FnBPの組換え蛋白として作出し、これまでに5種の単離ワクチン候補抗原を作製した。IsdA, IsdB, IsdHの乳汁中抗体価は乳房炎の重症度に伴い高くなることがELISAで検出されたが、ClfAやFnBP抗体は乳房炎罹患牛でも検出が出来なかった。ポリアクリル酸ナトリウム+SA死菌、あるいはナノゲル+SA死菌

- との組合せで鼻腔前感作した牛では、IsdA、IsdB、IsdHの乳汁中抗体価は早期にプラトーに達し、ClfA とFnBP に対する抗体価を上昇させることが可能であった(図1)。
- クオラムセンシングに関連する2種類の物質(AIP および TRAP) に対応する抗原を作製し、マウスを用いてそれらの抗原に対する効果的な全身免疫の方法を見出した。抗AIP および TRAP 抗体価を評価するELISAを開発した。抗AIP 抗体は黄色ブドウ球菌の溶血毒素等の病原因子の発現を阻害することを示した。乳牛並びにマウスを用いた黄色ブドウ球菌の実験感染に対する感染防御試験に組換えTRAPを供した。
  - 今年度は、フィールド牛6頭の乳汁中シクロフィリンA濃度を測定した。乳房炎を発症しなかった3頭の乳汁中体細胞数およびシクロフィリンA濃度は変動も少なく、低い値であった。搾乳期間中に乳房炎を発症した3頭の乳汁中シクロフィリンA濃度は、乳汁中体細胞数が異常値になる前もしくは同時期に高い値となることが確認された(図2)。乳汁中シクロフィリンA濃度と乳汁中の体細胞数あるいは化学発光能との相関解析では、健康牛の乳汁中シクロフィリンA濃度は500ng/ml以下であったが、乳房炎発症牛のシクロフィリンA濃度は乳房炎を発症していない時期においても500ng/ml以上の高い値の乳汁が多く認められた(図3)。そこで、健康牛全サンプルの乳汁中シクロフィリンA濃度平均と乳房炎を発症する前の乳汁中シクロフィリンA濃度の平均を比較したところ、乳房炎発症牛では発症するまえから有意に高い値となっていることが判明した(図4)。よって、乳汁中シクロフィリンA濃度の測定は、健康牛および乳房炎予備群を検出できることが確認された(図5)。本研究課題でこれまで行った実験牛6頭の乳汁中生菌数、黄色ブドウ球菌数、体細胞数およびシクロフィリンA濃度をまとめたところ、感染乳房では全ての検査項目が黄色ブドウ球菌接種後6日以内に乳房炎発症の基準以上になったのに対して、非感染乳房対照区の乳汁中では低い値で推移していたことより、感染実験は成功していた(図6)。そこで、これまで実験に供した6頭の黄色ブドウ球菌数、体細胞数およびシクロフィリンA濃度を感染後30日間の平均値で比較した(図7)。乳汁中の黄色ブドウ球菌数ではワクチン効果が認められなかった。ナノゲルワクチン感作群2頭の乳汁中シクロフィリンA濃度の平均値は無感作牛に比較して有意に低いことが判明し、乳汁中体細胞数が高い乳汁であっても、乳汁中シクロフィリンA濃度が低い値であったことより、ナノゲルワクチンは炎症誘起に至る状態を緩和する効果が確認された。
  - ナノゲル乳房炎ワクチンを開発する上で重要である、乳腺でのIgA産生を促す分子メカニズムを明らかにするための研究を、マウスモデルを用いて実施した。IgA産生細胞の乳腺への細胞遊走には、乳腺上皮細胞が分泌するケモカインの一つであるCCL28が、また分泌されたIgAの乳腺間質から乳腺房腔への放出には、同じく乳腺上皮細胞が合成するPolymeric Immunoglobulin Receptor (Poly-Ig Receptor)が重要な役割を果たしている。本研究では、CCL28とPoly-Ig Receptorの乳腺上皮細胞での遺伝子発現が、授乳刺激によって誘導されていること(乳腺での2つの遺伝子発現は、妊娠期には全く認められず、出産後授乳刺激が継続することで向上すること、さらには離乳後に速やかに消失すること)、また乳腺に存在する細菌とは無関係に促されること(授乳中の無菌マウスでも、それらの遺伝子発現に異常は認められないこと)を明らかにした。これらの研究成果は、今後、IgA誘導型の乳房炎粘膜ワクチンを開発する上で、その効果をさらに向上可能なアジュバント開発等に貢献可能な内容であった。
  - 今年度までに実施した乳房炎歴のない初産牛の6頭のSA死菌による鼻腔前感作あり(3頭)および前感作なし(3頭)の乳汁中に誘導されるSA特異的IgA抗体、体細胞数、SA菌数、血清中白血球数および乳量低減割合の実験結果をまとめた(図、図)。SA死菌による前感作ありの3頭に関しては、1頭がポリアクリル酸ナトリウムとSA死菌との組合せ、2頭がナノゲルとSA死菌との組合せでの感作である。この実験の結果、乳汁中のSA特異的IgA抗体価は、前感作ありの牛で感染後すみやかな抗体価の上昇が認められた。一方、前感作なしの牛では抗体価の強い上昇は見られなかった。この結果は、乳腺におけるSA特異的な免疫学的メモリーの形成が局所のリンパ節等で形成されたか、あるいは鼻腔で形成されたSA特異的なメモリーB細胞が粘膜帰巢経路により乳腺にホーミングしたことにより、感染後速やかな免疫反応が誘導された可能性が示唆された(図)。乳汁中の体細胞数の変動は、前感作ありの牛が感染後に体細胞数の増加を抑制していることを示した。このことは感染乳房で産生誘導されたSA特異IgA抗体がSA数の増加を抑制したことにより自然免疫の主役の好中球(体細胞の主)が低

く抑えられたことを示唆している。実際に血清中白血球数の実験結果、SA 前感作により、感染初期（感染後 1 週間以内）における血清中白血球数の減少が抑制されることを確認した。このことは、SA の前感作により、全身性免疫の発動を抑制することが出来たことを示しており、SA 前感作による乳汁中体細胞数の減少は全身免疫に頼らず局所の粘膜免疫の発動が効果的に起こっていることを示唆している。乳汁中の黄色ブドウ球菌の変動は、前感作ありの牛が感染後に SA の増加を抑制していることを示している。このことは感染分房で産生誘導された SA 特異 IgA 抗体の作用が SA 数の増加を抑制したことを示唆している。SA 性乳房炎による乳量低減割合は、SA 前感作により感染後 2 週間から有意に低減の抑制が示された。さらに、これらの SA 感染モデル牛を感染後 4 週間以降病理解剖し、乳房内の状況について組織形態学的解析による詳細な検討を行った。その結果、SA 前感作により、SA 凝集体の発現の消失や線維芽細胞の肥大化が抑制され、乳汁産生部位である乳腺上皮細胞の損傷を抑えることが明らかとなった。これらの結果、SA 前感作のメリットとして、乳房炎による乳量低減を低く抑えることが出来、乳牛の乳汁生産を高く維持できる、ということが示された。

### 具体的成果

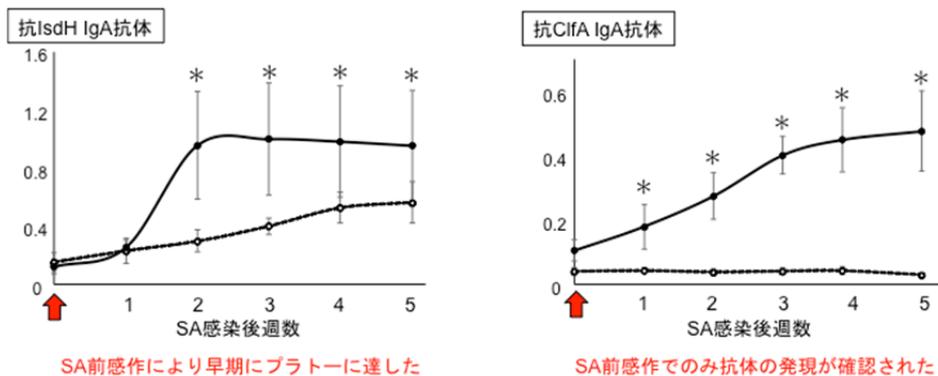


図 1 SA死菌を前感作したウシのSA感染後の乳汁中IsdHおよびClfAに対するIgA抗体価

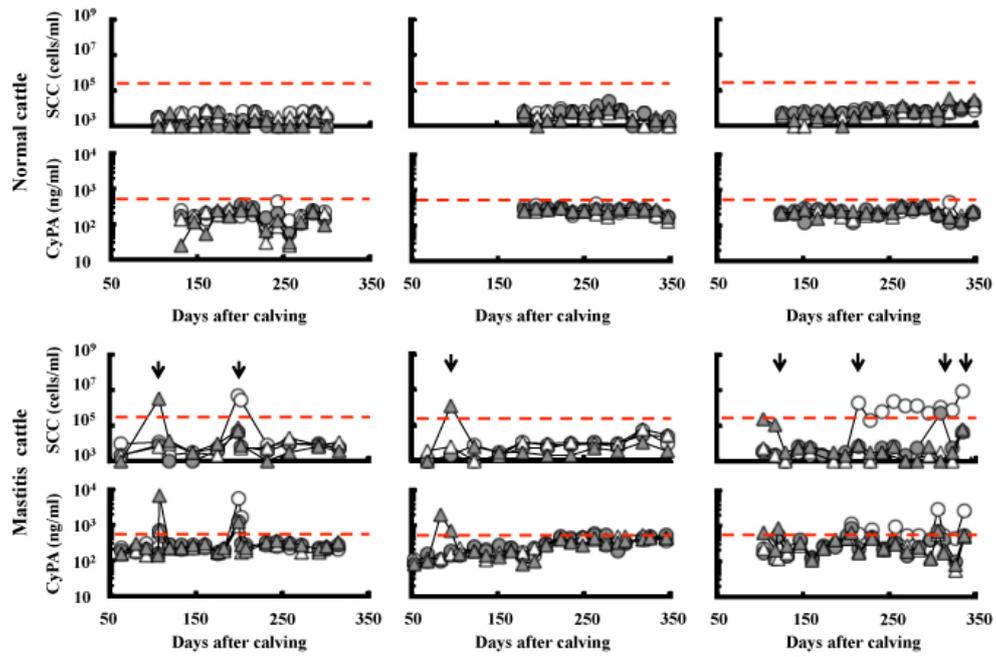


図2 フィールド牛の乳中体細胞数とシクロフィリンA濃度の変動（↓は抗生剤治療）

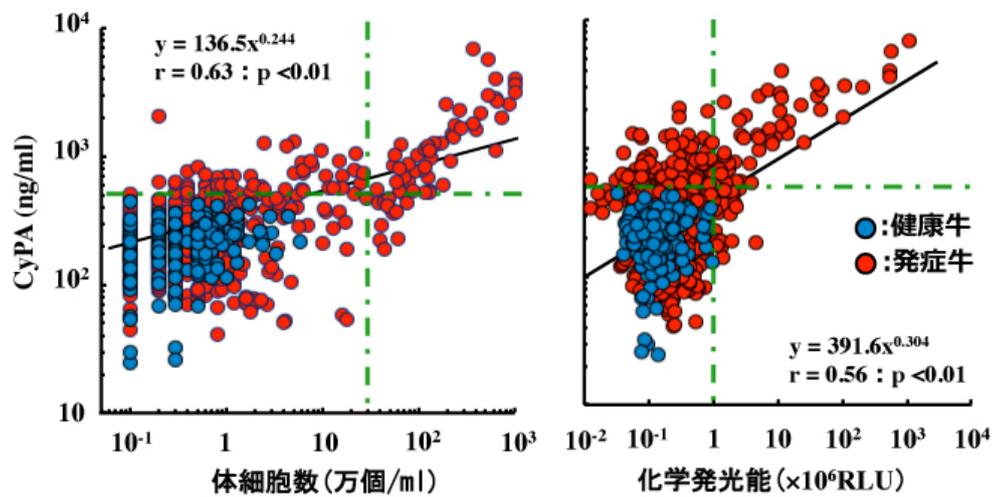


図3 フィールド牛の乳中シクロフィリンA濃度と乳汁中の体細胞数あるいは化学発光能との相関解析

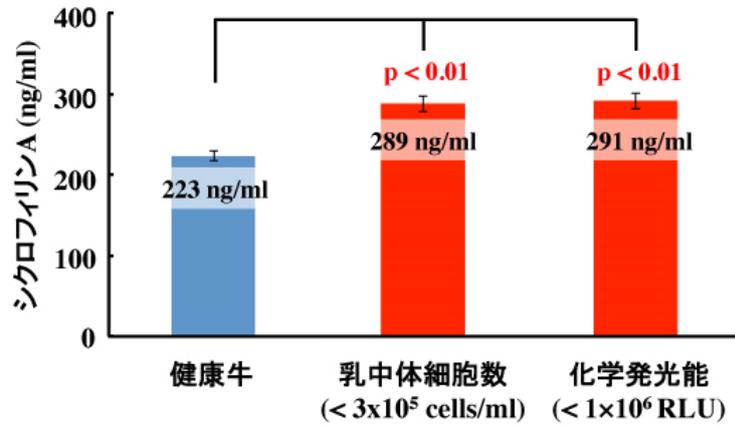


図4 フィールド牛における乳房炎発症前の乳汁中の体細胞数あるいは化学発光能との乳中シクロフィリンA濃度

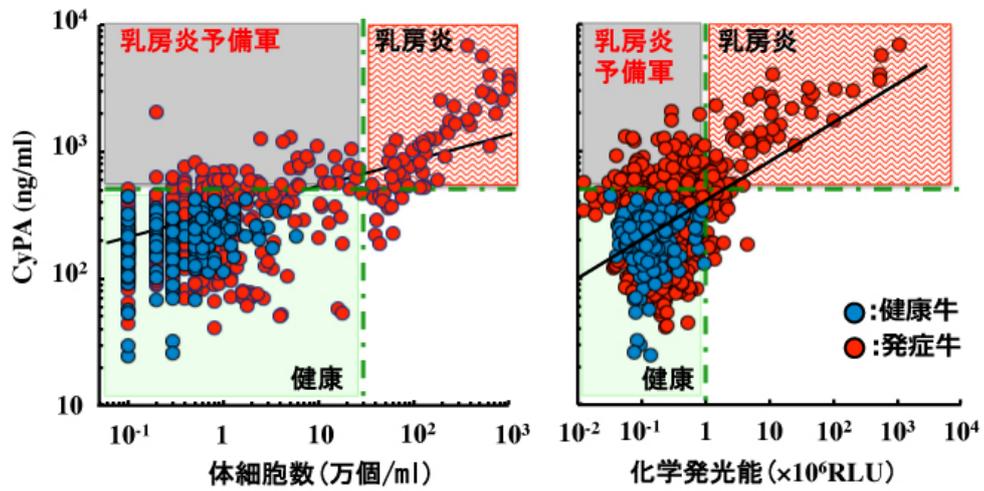


図5 フィールド牛における乳中シクロフィリンA濃度と乳房炎発症の関係

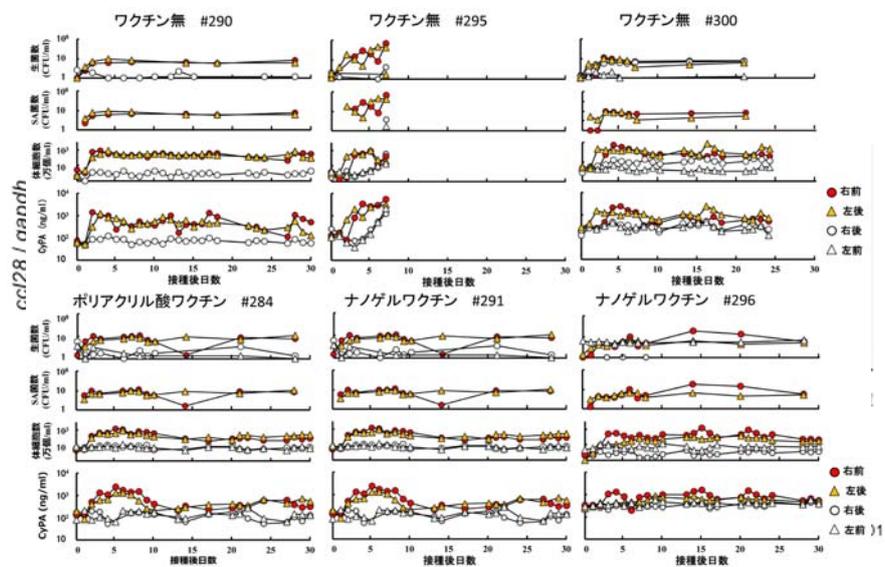


図6 黄色ブドウ球菌接種後の乳中シクロフィリンAの変動(まとめ)

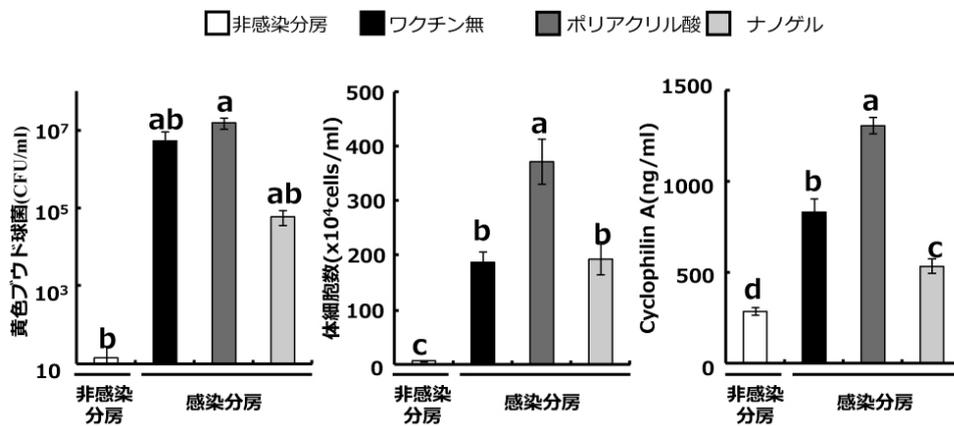


図7 ナノゲルワクチン接種の有効性



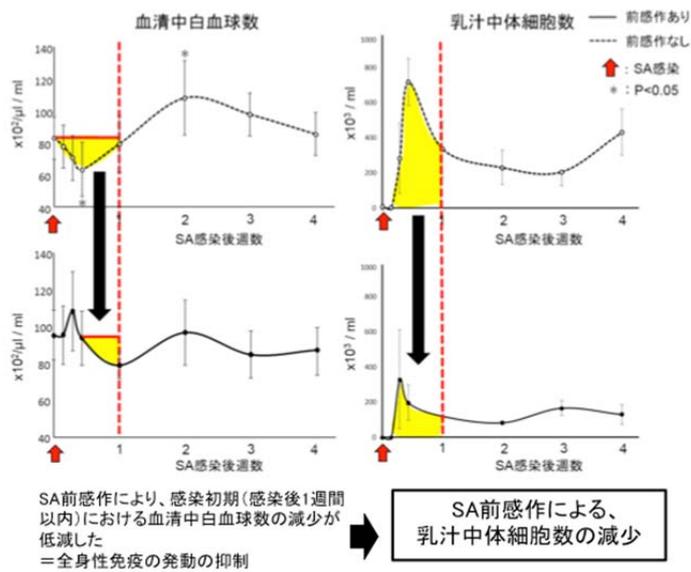


図10 前感作あり・なしにおける血清中白血球数および体細胞数の比較

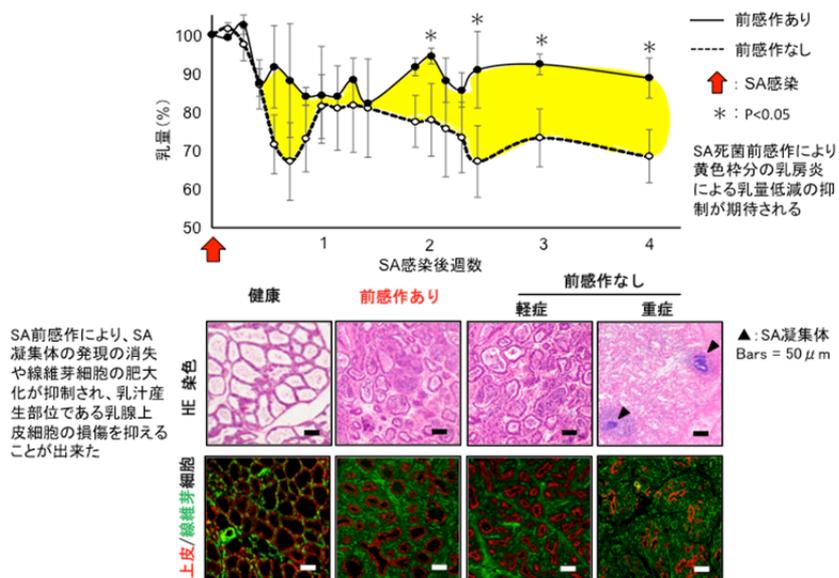


図11 SA前感作あり・なしにおける乳房炎による乳量低減の比較と乳腺組織の病理解析

### 3) 成果活用における留意点

研究期間の成果を、今後フィールド牛群等を用いて実証研究に進める。

#### 4) 今後の課題

1. マウスあるいは牛を用い、これまでに精製した5種の単離抗原をカクテル化し、免疫実験あるいは感染実験に用いてワクチン抗原としての有効性を解析する。
2. AIP あるいは TRAP の乳用牛に対する効果的な粘膜免疫手法を開発し、感染防御試験につなげることが課題である。
3. ナノゲルワクチン感作群の乳汁中シクロフィリンA濃度の平均値は無感作牛に比較して有意に低いことが判明したことから、乳汁中体細胞数が高い乳汁であっても、乳汁中シクロフィリンA濃度が低い値であったことより、今後はフールド牛群を用いた実証試験を行い、ナノゲルワクチンは炎症誘起に至る状態を緩和する効果を確認する。
4. ナノゲル乳房炎ワクチンを開発する上で重要である、乳腺でのIgA産生を促す分子メカニズムを、マウスモデルを用いて実施し、IgA産生細胞の乳腺への細胞遊走には、乳腺上皮細胞が分泌するケモカインの一つであるCCL28が、また分泌されたIgAの乳腺間質から乳腺房腔への放出には、同じく乳腺上皮細胞が合成するPolymeric Immunoglobulin Receptor (Poly-Ig Receptor) が重要な役割を果たしていることを明らかにした。今後はフールド牛群を用いた実証試験を行い、牛でこのようなイベントが起こっているかを確認する。
5. 乳汁中のSA特異IgA抗体の変動は、ワクチンありの牛が感染後に強い抗体の産生誘導があることを示している。このことは乳腺に免疫学的記憶がワクチンにより成立したことを示唆しているが、まだ記憶の機序にわからないことがあるので今後の課題でもある。また、SA数の増加を抑制する作用機序にもわからないことが多いので今後の課題でもある。

<別紙様式3. 平成28年度の最終年度報告書>

I-1. 年次計画

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	24	25	26	27	28	機関	研究室
1. 新技術を用いたBVDワクチン及び効果的な接種法の開発							
(1) BVD野外流行株の解析と不活化抗原の作出	主たる流行株の解析とウイルス不活化法の検討					動物衛生研究部門	ウイルス・疫学研究領域 牛ウイルス・発病制御ユニット
(2) リポソーム不活化ワクチンの開発	リポソームワクチンの作出とマウスに対する免疫応答					動物衛生研究部門 大阪府立大学	ウイルス・疫学研究領域 牛ウイルス・発病制御ユニット 農学部 獣医環境科学分野 獣医免疫学教室
(3) 牛パラインフルエンザ3型 (PIV3) を用いた遺伝子組み換えウイルスワクチンの開発	BPIV3のリバースジェネティクス系の確立とハムスターに対する免疫応答					筑波大学	医学医療系 生命医科学領域 環境微生物学
(4) DNAワクチンの構築	DNAワクチンの作出とマウスにおける免疫応答					岩手大学	農学部 共同獣医学科
(5) 牛を用いた新型ワクチンの効果検証	上記試作ワクチンの子牛における免疫誘導試験・攻撃試験及び妊娠牛の感染陽性試験					動物衛生研究部門	ウイルス・疫学研究領域 牛ウイルス・発病制御ユニット

## I-2. 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者
	機関	研究室	
研究開発責任者	動物衛生研究部門 疾病対策部		◎國保健浩（～2016.3） ◎吉原一浩（2016.4）
小課題責任者	動物衛生研究部門 ウイルス・疫学 研究領域	発病制御ユニット 牛ウイルスユニット	○亀山健一郎（2014.3） ○坪井孝益（2014.4～）
実行課題			
(1) BVD野外流行株の解析と不活化抗原の作出	動物衛生研究部門 ウイルス・疫学 研究領域	牛ウイルスユニット 発病制御ユニット	△ 坪井孝益 亀山健一郎
(2) リポソーム不活化ワクチンの開発	動物衛生研究部門 ウイルス・疫学 研究領域 大阪府立大学	牛ウイルスユニット 発病制御ユニット  農学部 獣医環境科学分野 獣医免疫学教室	△ 坪井孝益 亀山健一郎 渡未 仁
(3) 牛パラインフルエンザ3型 (PIV3) を用いた遺伝子組み換えウイルスワクチンの開発	筑波大学	医学医療系 生命医科学領域 環境微生物学	△ 竹内 薫
(4) DNAワクチンの構築	岩手大学	農学部 共同獣医学科	△ 村上賢二
(5) 牛を用いた新型ワクチンの効果検証	動物衛生研究部門 ウイルス・疫学 研究領域	牛ウイルスユニット 発病制御ユニット	△ 坪井孝益 亀山健一郎

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

中課題番号		研究期間	平成24～28年度
小課題番号	*1002	研究期間	平成24～28年度
中課題名	優れたワクチン開発のための技術開発		
小課題名	新技術を用いたBVDワクチンおよび効果的な接種法の開発		
小課題責任者名・研究機関	坪井孝益・農研機構 動物衛生研究部門		

## 1) 研究目的

牛ウイルス性下痢・粘膜病（BVD-MD）は国内の牛群に広く認められ、成牛での下痢や繁殖障害を主徴とした伝染疾病であるが、特に胎仔期の感染によって持続的にウイルスを排泄するとともにウイルス陽性の子牛を生産する持続感染牛（PI牛）となり、主要な感染源となって本病の拡大を招く。本病の予防には市販ワクチンが流通しているものの感染母牛から胎仔への感染阻止能が不十分であるため垂直感染によってPI牛が生産され続けることで結果的に重大な経済的損失をもたらす。垂直伝播を阻止し得る新たな機序による3種のワクチン開発に取り組む。

## 2) 研究成果

農研機構 動物衛生研究部門

### 野外分離株の系統樹解析

野外BVDウイルス分離分与株のE2領域による系統樹解析を行い、40株は1b型に属するBVDウイルスと判別され、次に2aが29株、1aが21株、1cが13株と続き、E2領域に基づく4つの主要な遺伝子型を認めた。さらにこの系統樹解析に基づき攻撃試験用の1a型のNCP株の代表として Tochigi/1/1株が選定された他、1b型のCP株としてはG株等が選定された。

### BVDVの増殖性と不活化法の検討

BVDVNose株の各種細胞の増殖性では回転培養法がMDBK細胞、MDBKSY細胞ともに有効であり、またBFM細胞はいずれ（回転・静置）の培養法も高い力価を示したが、細胞維持の点が問題であった。BVDVNo.12のMDBKSY細胞による回転培養による増殖性ではNose株とほぼ同様な増殖性を示したが、1b株のG1株では1a型の両ウイルス株よりも増殖性が劣る傾向を示し、1b型の一株ではさらに+株よりも増殖性が劣る傾向を示した。次に不活化処理としてBVDVNose株に対するホルマリン効果では、時間経過に合わせウイルス価の低下を確認し、また濃度別の各0.1%、0.05%、0.01%混和後の37℃及び4℃での培養を比較検討し、4℃で0.05%の処理がより本ウイルス不活化法として適するとした。

### BVDVNose株のMDBKSY細胞における大量培養時の増殖性

上記の結果を踏まえ、MDBKSY細胞によるローラー瓶（RB）培養を行った。本RBにおける各ウイルス価でスムーズ表面RBでは力価で $10^{6.5-7.0}/TCID_{50}$ を認めたが、プリーツ表面RBは $10^{7.0-7.5}$ 、ガラス製RBは $10^{7.0-7.75}$ の力価を示し、3種の中で毎回高力価が得られ、かつより扱いやすい手

法はプリーツ表面RBであった。大量培養後の各試料のホルマリン処理不活化ウイルス液に対して濃縮装置を使用した効率的なウイルス回収を行うとともに、スクロース密度勾配による精製後の総蛋白量の測定では、プリーツ表面RB、ガラス製RBにおいて約1000  $\mu$ g/ml以上の蛋白量が回収可能であること明確にした。

#### 成牛(妊娠牛)における感染陽性試験

胎齢90日の抗体陰性妊娠牛において顕著な発熱を示さず、また流産も認めなかった。感染後約2ヶ月後の剖検では胎子を確認するとともに、母牛はウイルス感染から回復しウイルスが排除されたが、その胎盤及び胎子の全身に感染した事が示された

### 農研機構動物衛生研究部門・大阪府立大学

#### リポソーム封入不活化BVDVワクチン

##### マウスにおける免疫応答

マウスの試験では陽性対照の市販ワクチンでは4~8倍の抗体価、フロイントのアジュバントの混和の試作品では16~32倍の抗体価を示した。さらにリポソーム封入不活化ワクチンでは筋肉内接種において200  $\mu$ g接種マウスで128倍の抗体価を示した。

##### 子牛における免疫応答、

子牛1頭の筋肉内接種により、1回目は16倍、2回目256倍、3回目2048倍の抗体価が認められ、さらに追加1頭の免疫誘導でも同様に抗体価2000倍以上を示し、攻撃試験後の発熱や白血球減少が認めなかった。

### 筑波大学

#### BPIV3組換えワクチン

##### BPIV3のリバースジェネティクス系確立のためのウイルスゲノム解析

BN-CE株およびBN-1株間のウイルス遺伝子の変異塩基箇所を調べたところ、3'リーダ領域(23塩基目)、P遺伝子領域(1942塩基目)、F遺伝子(5951塩基目)およびL遺伝子(9822、13031および13550塩基目)の計6塩基(翻訳領域5塩基、非翻訳領域1塩基)に置換が確認された。アミノ酸変異はF蛋白質およびL蛋白質内で各1箇所の合計2箇所に存在すると推測された。

##### rBPV3の回収とE2蛋白質の発現確認

共培養上清をMDBK細胞に感染させ、感染3日後からCPEが観察された。さらに、野生(wt)rBPV3由来の培養上清を用いてRT-PCRを行い、PCR産物はNheIで切断され、プラスミド由来のrBPV3であることを確認した。同様にE2発現rBPV3(E2-rBPV3)由来の培養上清からは、E2遺伝子特異的なRT-PCR産物の増幅を確認した。wt-rBPV3、E2-rBPV3の増殖曲線をそれぞれ測定したところ、最大 $1.0 \times 10^{11}$ 、 $6.3 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/mlに達した。間接蛍光抗体法により、E2-rBPV3感染48時間後にE2タンパク質の発現が確認された。完全長cDNAよりrBPV3の作出に成功し、さらにrBPV3完全長cDNA内に組み込んだE2タンパク質の発現を認めた。

##### ハムスターを用いたE2-rBPV3感染実験。

膜内在性領域を除きBVDV E1タンパク質分泌用signal配列を付加したE2タンパク質遺伝子(E2 C+E1 signal)をBPIV3の完全長cDNAのN遺伝子とP遺伝子の間に組み込み、BPIV3のリバースジェネティクス法により感染性ウイルスを回収した。E2タンパク質の発現をE2タンパク質に対するモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法(FA)及びウェスタンブロットティング(WB)法により確認した。次にE2-rBPV3-G感染MDBK細胞の細胞膜表面上のE2蛋白質をFA法により検出するとともにWB法でもE2蛋白質を確認した。当該組み換えPIV3のハムスターへの鼻腔内接種を行ったところ、1回免疫ではBVDVに対し4~16倍を示したが、2回免疫後には128~256倍のBVDV抗体を確認した。またPIV3抗体価は1000倍以上を示した。(H27)

## BN-CE株による組換えワクチンの作出

VSVの細胞外輸送シグナル、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインを付加したBVDV E2タンパク質を組込んだワクチン株 (BN-CE株) 由来の改良型BPIV3を構築した。追ってハムスターに対する免疫応答の有無を行う予定である。

## 岩手大学

### DNAワクチン

#### 試作DNAベクターの作出とマウスの免疫応答

DNAベクターを導入したCOS7細胞におけるE2蛋白の発現をanti-E2モノクローナル抗体を用いてウェスタンブロット解析したところ、delta C ワクチンを導入した細胞では、E2蛋白が細胞内で発現していることを確認した。シグナル配列を付加した3つのDNAベクター (E1、tPA、G) 導入細胞では、それらの細胞におけるE2蛋白の発現量はdelta C導入細胞に比べて極めて高いこと、培養上清中にもE2蛋白が分泌されていることを確認した。DNAベクターで免疫したマウス血清中のBVDVに対する中和抗体の有無を調べたところ、E1とG免疫群では、全てのマウスで、delta C免疫群では6匹中5匹、tPA免疫群では4匹で抗体が検出され、E1とG免疫群の幾何平均抗体価±標準偏差 (157.41±2.29と161.37±1.83) は、delta CおよびtPA免疫群 (2.64±1.46、10.8±1.49) に比べて有意に高かった。

#### マウスにおけるDNAベクターおよび不活化BVDV液との同時接種

DNAベクターと不活化ワクチンを同時に接種したところ、ベクター単体の接種以上に中和抗体価の上昇が認められた。また、その中和抗体価は不活化BVDV液1/5量 (100  $\mu$  L) においてもマウスにおける通常の不活化BVDV液の接種量 (500  $\mu$  L) の中和抗体価と比較し、GM値で10倍以上高かった。

#### マウスに対する用量依存性試験及びBVDV2型を発現するDNAベクター接種による免疫応答

100  $\mu$  g から400  $\mu$  g の容量に応じた抗体上昇が認められるが、800  $\mu$  g と400  $\mu$  g での相異は少ないとなり、マウスにおいて400  $\mu$  g がプラトーに達すると推察された。

#### 子牛における免疫応答

- ①子牛2頭にBVDV1a\_Nose\_E2 $\Delta$ C-E1 DNAベクター400  $\mu$ g/頭を大腿上部筋肉に接種後、3週間目に同量を追加接種 (2回) したが、ともに抗体陰性を示した。
- ②子牛2頭にBVDV1a\_Nose\_E2 $\Delta$ C-E1 DNAベクター500  $\mu$ g/頭を、1頭に同ベクター1mg/頭を27G針先3 mmの2段針 (トップ社) を用いて大腿上部皮内に100  $\mu$ Lずつ5カ所に接種し、さらに2週間隔にて計3回追加接種を行ったところ、500  $\mu$ gの1頭は陰性となったが、もう1頭は16倍を示し、また1mgでは32倍を示した。
- ③抗体陰性子牛2頭において発熱等の臨床症状を認め、経時的検査で白血球減少症を示したが、2週間後の剖検では、各組織からのウイルス分離は陰性となった。一方それぞれのリンパ系組織 (各種リンパ節や扁桃等) より遺伝子が多数検出された。
- ④不活化BVDV液を使用した子牛2頭の抗体上昇は1回目では認められず、2回目において16倍あるいは32倍の抗体価を確認した。一方不活化BVDV液とDNAベクター1mgとの混合接種では128倍となった。攻撃試験後の各組織からの遺伝子検出では抗体陰性牛と同様に各組織から多数のウイルス遺伝子が検出された。血清中のウイルス血症の確認では、陰性牛が明瞭な分画を示したが、上記の接種をした3頭は不鮮明となった。

### 3) 成果活用における留意点

#### DNAワクチン

##### リポソームワクチン

通常のウイルス学に沿ったウイルス増殖、精製により作製したウイルス液を不活化させることで、原則どのようなウイルスでも細胞接種による増殖が可能であれば、本手法によるワクチン開発が容易に可能となる。

本報告では筋肉内接種での手法をとったが、さらに眼結膜への接種でも効果が立証されれば、その2つの手法の組み合わせも可能となる他、その接種回数も2回で現市販ワクチン効果を超える中和価を示す可能性がある。

##### PIV3組換えワクチン

実験室経代株 (BN-1 株)、ワクチン株 (BN-CE 株) 両方のリバーシジェネティクス系を作ったので、牛パラインフルエンザワクチンの弱毒化機構の解析に使える可能性がある。

牛パラインフルエンザウイルス 3 型は培養細胞で非常に効率良く増えるので、組換えタンパク質の大量調製に使える可能性がある。

本ウイルスは繊毛を有した呼吸器の上皮細胞に特異的に感染するので、ヒトに感染するウイルスを含めた呼吸器感染ウイルスの感染機構の解析に使える可能性がある。

#### 4) 今後の課題

特徴を持ったBVDV新型ワクチンの試作品(プロトタイプ)の作出には全て成功し、それぞれの実行課題で今後はリポソームワクチンでは筋注以外の眼結膜接種による研究があり、組換えBPIV3では子牛への接種試験が望まれ、さらにDNAワクチンではDNAベクターの抗体惹起力を増強させるためのアジュバントや投与方法の研究や、細胞性免疫の研究もあるだろう。

次なる研究期間において直ちに実用化(製造販売)に至る成績にはなりえないと思われるが、その芽となる有効な成績あるいは他の研究分野に応用しうる成績も得られたと思われる。

その選定されたワクチンが成雌牛の子宮内に侵入したウイルスを排除しうるか否か? 妊娠牛準備の前段階での検討が必要かと思われる。その結果を踏まえ、最終的には免疫誘導された多数の妊娠牛を準備し、攻撃ウイルス接種後の垂直感染阻止を認める研究(試験)が将来実施できることを望む。

<別紙様式3. 平成28年度の最終年度報告書>

I-1. 年次計画

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室			
	24	25	26	27	28	機関	研究室		
リポソームを用いた安全なPRRSウイルス用の経鼻多価ワクチンの開発	組換えタンパク質の作製					国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門	ウイルス・疫学研究 領域		
	感染性cDNAクローンの作製							国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門	ウイルス・疫学研究 領域
	リポソームを用いた経鼻多価ワクチンの開発								

## I-2. 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者
	機関	研究室	
研究開発責任者	農研機構 動物衛生研究部門	ウイルス・疫学研究領域	◎ 高木道浩
リポソームを用いた安全なPRRSウイルス用の経鼻多価ワクチンの開発			
1、抗原の作出 (1) 組換えタンパク質の作製	同上	同上	○ 高木道浩 井関博
(2) 感染性cDNAクローンの作製	同上	同上	○ 高木道浩 井関博
2、リポソームを用いた経鼻多価ワクチンの開発	同上	同上	○ 高木道浩 井関博 川篤健司 芝原友幸 渡来仁
	大阪府立大学	病態研究領域 獣医免疫学教室	

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

中課題番号		研究期間	平成24～28年度
小課題番号		研究期間	平成24～28年度
中課題名	優れたワクチンの開発のための技術開発		
小課題名	リポソームを用いた安全なPRRSウイルス用の経鼻多価ワクチンの開発		
小課題責任者名・研究機関	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門・ウイルス・疫学研究領域・高木道浩		

### 1) 研究目的

豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) は国内の農場に広く常在し、子豚の呼吸障害および母豚での流死産等を引き起こす伝染性疾病である。PRRSウイルスは北米型と欧州型の二つに大別されるが、同型のウイルス株間でも極めて多様な遺伝子変異が見られる。これまで国内では主に北米型ウイルスの浸潤が知られていたが、最近、欧州型の侵入が明らかとなった。国内では弱毒生ワクチンが使用されているが、生ワクチンは免疫原性が高いものの病原性が復帰する可能性があり、欧州ではワクチン接種豚がワクチン類似株によるPRRSを発症した例が報告されている。また、ウイルスの多様性のため完全な防御効果は期待できない。PRRSの効果的な予防には遺伝的多様性に対応可能で、安全なワクチンの開発が必要であり、本課題においては、獲得免疫に加えて粘膜免疫の誘導が期待できるリポソームを活用した、1) 複数のウイルス株に由来する感染防御抗原を組合せた複合型サブユニット蛋白質ワクチン、2) リバースジェネティクス法を活用した人為的変異導入ウイルスをワクチン株とする不活化遺伝子組換え型多価ワクチンの開発を目指す。

### 2) 研究成果

国内における各クラスター北米型PRRSウイルスの分離株の病原性は感染初期に一過性の発熱が認められたものの顕著な臨床症状は見られないが、感染後の血清中ウイルス量に違いがあることが明らかとなった。バキュロウイルスを用いた北米型PRRSウイルス組換えタンパク質の発現量は少なく、ワクチン抗原量に十分ではなかった。また、豚に対するリポソーム製剤のアジュバント効果について、抗原と封入したリポソーム製剤を筋肉内接種、あるいは1%ヒアルロン酸と混和したものを経鼻接種した場合、抗体産生が確認された。

### 3) 成果活用における留意点

国内における各クラスター北米型PRRSウイルス感染実験では病原性が異なっているが、現場においては今回の得られた結果と比べて異なる可能性があることに留意する必要がある。農場においては、1) 品種、2) 飼育環境、3) その他の病原体、複合感染などにより病原性が変動することに留意する必要がある。

リポソーム製剤によるアジュバント効果は確認され、接種部位などには炎症反応など認

められなかったが、さらにアジュバントとしての効果を検討する必要がある。

#### 4) 今後の課題

組換えタンパク質の発現が少量であったこと、抗原としてPRRSウイルスの多くの構造タンパク質が関与していること、またPRRSウイルスは遺伝的多様であることから、これらに対応可能であると考えられるPRRSウイルス感染性cDNAクローンを作製し、上記問題に対応できるワクチン開発を引き続き実施する予定である。また、ワクチン効果を増強させるための粘膜免疫に有効なアジュバントを探索する必要がある。

<別紙様式3. 平成28年度の最終年度報告書>

I-1. 年次計画

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	28	29	30	31	32	機関	研究室
1. 効率的DDSの改良のための新規の高機能性ワクチンキャリアの開発 (1) 新規pH感受性膜融合ポリマーの開発  (2) 新規pH感受性膜融合ポリマー修飾リポソームによる樹状細胞内への抗原デリバリーシステム (ワクチンキャリア) の確立  (3) 新規pH感受性膜融合ポリマーを修飾したワクチンキャリアの最適化  (4) 家畜 (牛) における免疫誘導実験  (5) 家畜 (牛・豚) における免疫誘導実験	pH感受性膜融合ポリマーの開発 ⇔	リポソーム型ワクチンキャリアの開発 ⇔	リポソーム型ワクチンキャリアの最適化 ⇔	牛を使った免疫応答の解析 ⇔	牛・豚を使った免疫応答の解析 ⇔	大阪府立大学	生命環境科学研究科 工学研究科
	大阪府立大学	生命環境科学研究科 工学研究科					
	大阪府立大学	生命環境科学研究科 工学研究科					
	大阪府立大学	生命環境科学研究科 工学研究科					
	大阪府立大学	生命環境科学研究科 工学研究科					

I - 2. 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者
	機関	研究室	
研究開発責任者	大阪府立大学大院	生命環境科学研究科	◎渡未仁
		工学研究科	△河野健司
		同	△弓場英司

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

中課題番号		研究期間	平成24～28年度
小課題番号	2001	研究期間	平成24～28年度
中課題名	優れたワクチンの開発のための技術開発		
小課題名	次世代のワクチン開発に資する免疫活性化技術の研究開発		
小課題責任者名・研究機関	渡末 仁・大阪府立大学大学院生命環境科学研究科		

#### 1) 研究目的

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pH感受性膜融合能を持たせることにより、抗原提示細胞内へのワクチン抗原の内在化を可能にし、家畜の感染症予防に効果的な免疫応答を効率良く誘導できる高機能性ワクチンキャリアーの開発を目的とする。

#### 2) 研究成果

本研究の目的を達成するために、まず平成24年度に様々な新規pH感受性膜融合ポリマーを開発した。平成25年度には、前年度に開発した各新規pH感受性膜融合ポリマーの中から、ワクチンキャリアーとして最適なポリマー(MGlu-HPG60)を明らかにできた。平成26年度においては、新規pH感受性膜融合ポリマー修飾リポソームの経鼻免疫により、全身および粘膜局所に免疫応答を誘導出来ることを確認し、最適なアジュバントとして $\alpha$ -GalCerを同定することによりリポソームを最適化した。平成27年度においては、牛に対して最適化リポソームワクチンの経乳頭免疫により、血清ならびに乳汁中に抗体産生が確認でき、牛に対するワクチンキャリアーとしての有用性を明らかにした。さらに平成28年度においては、最適化リポソームワクチンの点眼免疫とリポソームワクチンの低コスト化が可能な陽性荷電脂質(DDAB)修飾リポソームの点眼あるいは経乳頭免疫により全身および粘膜局所に免疫応答の誘導が牛と豚で確認できた。これらの成果から、家畜の感染防御に有効な粘膜免疫応答ならびに全身免疫応答を効果的に誘導できる新規の高機能性ワクチンキャリアーが開発でき、到達目標は達成できた。

#### 3) 成果活用における留意点

本研究課題によって得られた研究成果を普及・活用させるためには、動物衛生研究所や都道府県の畜産試験場、農学系の他大学との共同研究や研究連携の強化を進め、牛、豚等の家畜を用いた感染防御試験の拡大を図り、その有効性を明らかにして行く。さらに得られた研究成果については論文や学会、雑誌等で広く発表することにより、リポソーム粘膜ワクチンの有用性を動物用医薬品企業にアピールし、企業との共同研究や連携に繋げる。このことにより、産業動物において重要な粘膜感染症に対する新規粘膜ワクチン開発へと発展させ、低コストのリポソーム粘膜ワクチンの実用化を目指す。

#### 4) 今後の課題

これまでの研究成果から、家畜に対して新規pH感受性膜融合ポリマー修飾リポソームのみな

らず陽性荷電脂質 (DDAB) 修飾リポソームのワクチンキャリアーとしての有用性が明らかとなった。これにより、家畜に対する最適な免疫応答の誘導のためのワクチンキャリアーの選択肢が広まるとともにリポソームワクチン製剤化のコスト低減に向けた取り組みがし易くなり、家畜の感染症予防に効果的な免疫応答を効率良く誘導できる高機能性ワクチンキャリアーの事業化が大きく前進する事が予想される。しかしながら、今後の課題として、多くの家畜を使った免疫誘導実験ならびに攻撃試験を実施し、ワクチンキャリアーとしての安全性ならびにその有用性を明らかにするなど、リポソームワクチンの事業化を加速させるためによりいっそうの取り組みが必要である。

<別紙様式3. 平成28年度の最終年度報告書>

I-1. 年次計画

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	24	25	26	27	28	機関	研究室
(1) 家畜・家禽に使用できる汎用性ワクチンベクタープラットフォーム技術の開発  ・ ウイルス及び細菌性病原体由来外来抗原の豚丹毒菌ベクターにおける発現解析  ・ 牛、豚、鶏など各動物種における免疫応答の解析及びワクチン効果の検証						農研機構	細菌・寄生虫研究領域 細胞内寄生菌ユニット
	弱毒化ベクター候補株の作製、外来抗原の発現 						
						農研機構	細菌・寄生虫研究領域 細胞内寄生菌ユニット
作製したベクターワクチン候補株を利用しワクチン効果を確認する。 							

## I-2. 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者
	機関	研究室	
<p>(1) 家畜・家禽に使用できる汎用性ワクチンベクタープラットフォーム技術の開発</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ ウイルス及び細菌性病原体由来外来抗原の豚丹毒菌ベクターにおける発現解析</li> <li>・ 牛、豚、鶏など各動物種における免疫応答の解析及びワクチン効果の検証</li> </ul>	農研機構	細菌・寄生虫研究領域 細胞内寄生菌ユニット	◎△小川洋介 △江口正浩 △西川明芳

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

中課題番号		研究期間	平成24～28年度
小課題番号	2002	研究期間	平成24～28年度
中課題名	優れたワクチンの開発のための技術開発		
小課題名	家畜・家禽に使用できる汎用性ワクチンベクタープラットフォーム技術の開発		
小課題責任者名・研究機関	小川洋介・農研機構動物衛生研究所細菌・寄生虫研究領域		

### 1) 研究目的

豚丹毒菌を用い、複数の動物で利用できるワクチンベクタープラットフォーム技術の開発を行うため、ワクチンベクターとして利用できる安全で免疫誘導能に優れた弱毒株を遺伝学的理論に基づき構築する。また、多価ベクターワクチンを開発するには、ウイルスや細菌性の様々な病原体の多様な異種抗原を豚丹毒菌に効率よく発現させるための技術が必要となる。そこで、本研究では、豚丹毒菌における効率のよい異種抗原の発現技術を開発するとともに、牛、豚、鶏を用いて各動物種に適したワクチンネーション免疫応答の解析、各種動物の感染症をモデルとした免疫誘導の効果の検証等、ワクチンベクターの実用化を目的とする応用研究を行う

### 2) 研究成果

これまで、豚丹毒菌に感受性が高い無菌豚に皮内接種しても豚に症状を起こすことができず、さらに、経口投与することで、現行の生ワクチン株と同様に血中抗体価を上昇させることのできる、安全で免疫誘導能に優れたワクチンベクター候補株を作製することに成功した。また、この株へ組み込み発現させるための外来抗原遺伝子として、豚浮腫病原菌大腸菌stx2e遺伝子、豚流行性下痢PEDウイルスS1遺伝子、鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルスVP2遺伝子、牛アカバネ病ウイルス中和抗原遺伝子のクローニングに成功した。しかし、ワクチンベクター候補株への恒常的な発現は確認できていない。

### 3) 成果活用における留意点

開発したワクチンベクター候補株は、現行の生ワクチンに比べて極めて安全であることが証明されており、今後は生ワクチンとしても利用できる。

### 4) 今後の課題

異種微生物由来の外来抗原遺伝子をベクター株へ効率よく経常的に発現させるには、外来遺伝子のコドン頻度、発現プロモーターの選択、外来遺伝子と結合させるためのキャリアタンパク質の選択が重要と考える。最適な組み合わせで実験を行う必要がある。

<別紙様式3. 平成28年度の最終年度報告書>

I-1. 年次計画

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	28	29	30	31	32	機関	研究室
1. ヒストフィルス・ソムニ菌体表面蛋白質遺伝子改変株を用いた牛呼吸器病に対する弱毒生ワクチンの開発						農研機構 動物衛生研究部門	細菌・寄生虫研究領域 病態研究領域
	<p>誘導される抗体評価系の確立</p> <p>←—————→  </p> <p>生菌免疫による宿主免疫応答と</p> <p>防御効果の評価</p> <p>←—————→</p>						

## I-2. 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者
	機関	研究室	
1. ヒストフィルス・ソムニ菌体表面蛋白質遺伝子改変株を用いた牛呼吸器病に対する弱毒生ワクチンの開発	農研機構 動物衛生研究部門	細菌・寄生虫研究領域 病原機能解析ユニット  病態研究領域 病理ユニット	○ 星野尾歌織 上野勇一  木村久美子 (2014.4～) 播谷亮 (~2016.3)

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

中課題番号		研究期間	平成24～28年度
小課題番号	2003	研究期間	平成24～28年度
中課題名			
小課題名	ヒストフィルス・ソムニ菌体表面蛋白質遺伝子改変株を用いた牛呼吸器病に対する弱毒生ワクチンの開発		
小課題責任者名・研究機関	星野尾歌織・農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門		

### 1) 研究目的

ウイルス・細菌等の混合感染により重篤化しやすい子牛の肺炎は、ひとたび発症すれば治癒しても完全な肺機能の回復は難しく、経済的損失が大きい。*Histophilus somni*はその原因細菌のひとつであり、現在予防には不活化ワクチンが使用されているが、皮下・筋肉内の投与経路による不活化ワクチンでは本菌の侵入門戸である粘膜面への抗体誘導は困難なため、感染自体を防ぐことは難しい。本課題では、本菌の重要な病原因子である菌体表面蛋白質IbpAの機能領域DR1DR2を遺伝子改変により肺炎由来野生株2336株から欠失させて弱毒化した $\Delta$ DR1DR2株について、経鼻投与による防御免疫の付与能を検証し、単回投与で粘膜免疫を誘導して感染自体を防御可能な弱毒生ワクチンの開発手法を確立することを目標とした。

### 2) 研究成果

牛に $\Delta$ DR1DR2株の生菌懸濁液を鼻腔内に1回噴霧接種することで*H.somni*に対する特異抗体の誘導が可能であること、個体によっては気道内に生菌が数週間にわたり定着し、解剖時の扁桃からも生菌が分離されることが確認された。これにより、 $\Delta$ DR1DR2株は牛において疾病を引き起こすことなく長期間にわたり免疫刺激を付与し得ることが明らかとなった。また、生菌免疫牛においては野生株攻撃後の臨床症状が対照群よりも軽微で、肺内での菌の排除も速やかな傾向にあった。これらのことから、*H.somni*のDR1DR2領域を遺伝子改変により欠失させることで、新たな弱毒生ワクチンの候補株が作出できる可能性が示唆された。

### 3) 成果活用における留意点

本研究で用いた遺伝子改変株は輸入株2336を親株として作製されているため、ワクチンの実用化にあたっては、日本国内で分離された株を親株として改めて遺伝子改変株を作出する必要がある。親株の候補についてはゲノム解析等を行い、検討中である。

### 4) 今後の課題

本研究において、実験感染による肺炎発症には宿主の胸腺重量も影響することが明らか

となっており、これを考慮しつつ統計学的な解析を行うのに十分な例数を確保するため、免疫防御試験を追加で実施中である。また、生菌免疫により誘導された抗体の *H.somni* に対する細胞毒性中和能等の解析による防御免疫付与能の評価を検討している。

<別紙様式3. 平成28年度の最終年度報告書>

I-1. 年次計画

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	24	25	26	27	28	機関	研究室
1. DDS担体用人工ウイルス様粒子を用いた牛パピローマワクチンの開発						動物衛生研究所	
(1) 牛パピローマウイルス様中空粒子 (BPV-VLP) の生産技術および精製技術の検討	←→						
(2) 多価BPV-VLPの生産技術の確立			←→				
(3) BPV遺伝子型特異的検出法の確立	←→						
(4) BPVによる動物実験系の確立	←→						
(5) 牛を用いたBPV-VLPの免疫誘導法および効果の検証			←→				
(6) 牛を用いたBPV-VLPのワクチン効果の検証			←→				

I - 2. 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者
	機関	研究室	
研究開発責任者	動物衛生研究所		△前任者渡辺聡子(～2016.3) 後任者芝原友幸(2016.4～)  前任者畠間真一(～2015.3) 後任者菅野徹(2015.4～)

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

中課題番号		研究期間	平成24～28年度
小課題番号		研究期間	平成24～28年度
中課題名	優れたワクチンの開発のための技術開発		
小課題名	次世代のワクチン開発に資する免疫活性化技術の研究開発		
小課題責任者名・研究機関			

#### 1) 研究目的

牛パピローマウイルス (BPV) の感染によって引き起こされる乳頭腫症は、全国的に高い頻度で発生し効率的な酪農経営の妨げとなっているが、現在のところ確立された予防法や治療法がない。BPVは現在14の遺伝子型に分類され、搾乳障害をひきおこす乳頭腫症の病変部からはBPV6が最も多く検出される。また、重篤な症状を引きおこすBPV9による被害も大きいことが知られており、対処方針の決定には遺伝子型の決定が重要である。

ウイルス様中空粒子 (Virus Like Particle:VLP) はウイルス類似の外観や抗原性を有するが内部にウイルスゲノムを含まないため、最も安全なワクチンと考えられる。本研究ではバキュロウイルス発現系を用いてBPVのVLPを作製し、牛乳頭腫症ワクチンとしての効果を牛での感染実験を通じて実証することを目指す。

#### 2) 研究成果

- ① BPVの遺伝子型を簡便、迅速、特異的に判定できるLAMP法およびPCR-RFLP法を確立した。(H24～25)。
- ② BPV6由来の乳頭腫病変乳剤を乳房に接種することにより、接種部位に上皮性乳頭腫の腫瘍を人為的に発生させることを可能とした (H25～H27)。
- ③ 昆虫細胞株あるいは蚕の蛹にBPVのL1遺伝子を導入した組換えバキュロウイルスを接種することにより、細胞核内に野生型BPVとほぼ同じ大きさ、形を有するウイルス粒子 (BPV-VLP) を生産させることができた。BPV-VLPはヘパリンカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィー、陽イオン交換カラムクロマトグラフィーのいずれでも精製が可能で、蛹を宿主とすることにより大量の (約0.5mg/頭) 精製BPV-VLPを得ることができた (H24～H27)。
- ④ BPV6-VLPを接種することにより、牛にBPV特異抗体を誘導することができたが、BPV6-VLPの接種により乳頭腫症の発症予防効果の確認には至らなかった。

#### 3) 成果活用における留意点

外部資金等を活用して新薬開発に向けた当該VLPのワクチンのBPVに対する予防・治療効果の検討を行う。

#### 4) 今後の課題

BPV6-VLPの投与量、投与時期、アジュバントの添加等を検討し、BPV6-VLPのワクチン効果を再検討する必要がある。

<別紙様式3. 平成28年度の最終年度報告書>

I-1. 年次計画

課題名	研究年度					研究内容
	24	25	26	27	28	
(1) PCV由来VLPの大量製造技術の確立	←→					PCV由来の組換え型VLPの生産、精製技術を確立する
(2) PCVの遺伝子改変および遺伝子発現の技術	←→					外来遺伝子を発現する組換えPCVを構築する技術を開発する
(3) PCV由来VLPへの薬剤封入、付加、修飾技術の開発			←→			哺乳動物細胞発現用コンストラクト (DNA) を組換え型VLPの内部、表面に効率的に導入する技術を開発する。
(4) PCV由来VLPの免疫賦与効果の検証				←→		DNA修飾した組換え型VLPを用いて、修飾DNAがコードする外来抗原に対する免疫能を動物実験により評価する
(5) PCV生ウイルスワクチンベクターの免疫賦与効果の検証				←→		擬似PCVによる、PCVおよび外来抗原に対する免疫賦与効果を検証する

I - 2. 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者
	機関	研究室	
研究開発責任者	動物衛生研究所	病態研究領域 病態研究領域 ウイルス・疫学研究領域 病態研究領域	◎前任者国保健浩（2014. 4～2016. 3） ◎後任者新井鐘蔵（2016. 4～） △前任者鈴木孝子（2014. 4～2015. 3） △後任者新井鐘蔵（2015. 4～2016. 3）

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

中課題番号		研究期間	平成24～28年度
小課題番号	2005	研究期間	平成24～28年度
中課題名	優れたワクチンの開発のための技術開発		
小課題名	優れたワクチン開発のための抗原送達技術の開発		
小課題責任者名・研究機関			

#### 1) 研究目的

粘膜組織への抗原の輸送は有効な細胞性免疫を誘導する上で重要であるが、Th1-Th2細胞間の拮抗などにより標的抗原に特異的な免疫能を付与することは困難である。特に産業動物においては「安全性」や「残留性」といった食品衛生上の要請も同時にクリアする必要があることから、適切なワクチン接種技術を確立する必要がある。本課題では、呼吸器指向性にDNA輸送することが可能な担体を開発する。本年度は候補となる豚サーコウイルス（PCV）由来VLPの大量製造を目的としてPCV外殻タンパク質（ORF2）遺伝子発現系を確立する。

#### 2) 研究成果

- ① PCV1 ORF2遺伝子の発現系を構築し、リコンビナントの生産ならびに検出に成功した。(H24)
- ② 糖タンパク質の糖鎖形成に寄与するヨトウガの新規糖分解酵素（GlcNAcase 1）を同定し、生化学的特性の一部を明らかにした。(H25)
- ③ Hisタグ融合型組換えPCV1 ORF2タンパク質を生産し、アフィニティークロマトグラフィーによる精製系を確立した。(H26)
- ④ 精製したHisタグ融合型組換えPCV1 ORF2タンパク質を用いてPCV1様中空粒子を作製した(H27)
- ⑤ Hisタグ融合型組換えPCV1 ORF2タンパク質上に付加されるN結合型糖鎖がRNA干渉による昆虫特異的糖分解酵素活性の抑制により変化することを明らかにした。また、当該酵素遺伝子を標的とするゲノム編集に利用するDNA切断酵素を昆虫細胞の核内で発現可能な発現ベクターを作製した。(H27)
- ⑥ DNA切断酵素発現ベクターの改良、標的遺伝子同定用のガイドRNA発現ベクターを構築ならびにDNA切断効率評価用のベクターを構築し、ゲノム編集を実施した。(H27)

#### 3) 成果活用における留意点

#### 4) 今後の課題

目的とする糖鎖改変型の組換えPCV1 ORF2タンパク質を発現することが可能な昆虫細胞株を樹立する必要がある。

<別紙様式3. 平成28年度の最終年度報告書>

I-1. 年次計画

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	24	25	26	27	28	機関	研究室
2. 次世代のワクチン開発に資する免疫活性化技術の研究開発 (6) 乳汁免疫の増強を目的とした免疫賦活化技術の開発						農研機構 動物衛生部門	ウイルス・疫学研究領域
	妊娠マウスモデルによるアジュバントの予備試験 						
	乳腺組織へのIgA産生細胞移行機構解明 						
	豚流行性下痢ウイルスの乳汁免疫の基盤的知識の獲得 						

I - 2. 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者
	機関	研究室	
2. 次世代のワクチン開発 に資する免疫活性化技術 の研究開発 (6) 乳汁免疫の増強を 目的とした免疫賦活化技術 の開発	農研機構 動物衛 生研究部門	ウイルス・疫学研究 領域	○ 宮崎 綾子 鈴木 亨(~2017.3) 大橋 誠一(2017.4~)

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

中課題番号		研究期間	平成24～28年度
小課題番号		研究期間	平成24～28年度
中課題名	優れたワクチンの開発のための技術開発		
小課題名	乳汁免疫の増強を目的とした免疫賦活化技術の開発		
小課題責任者名・研究機関	農研機構 動物衛生部門 ウイルス病研究領域 宮崎 綾子、大橋 誠一		

### 1) 研究目的

哺乳豚における腸管感染症は発育遅延や飼料効率の低下を引き起こし、養豚経営に経済的損失を与える。その予防には、母子免疫、特にIgA抗体を含んだ乳汁を継続的に吸飲することによって成立する乳汁免疫が大きな役割を果たしている。乳汁中IgA抗体価を高めるには、応答性リンパ球群を効果的に母豚乳腺組織へ移行（ホーミング）させる必要がある。豚では腸管への免疫刺激により乳汁中へIgA産生を誘導できるとの報告があるものの、乳腺組織へのリンパ球移行機構の詳細が未解明であるために、効率的にリンパ球の移行を促進することができるワクチンアジュバントの開発が進んでおらず、哺乳豚における腸管感染症予防の障壁となっている。

そこで、本課題では、母豚乳腺組織へのリンパ球移行機構の解明を通じ、哺乳豚の腸管感染症予防に重要である乳汁免疫、特に乳汁へのIgA抗体産生を効果的に誘導できるワクチンアジュバントを開発することを目的とする。なお、平成25-26年の国内における豚流行性下痢（PED）の流行を受けてPEDワクチン改良への要望が高まったことから、平成26年度よりPEDワクチン改良に必要な乳汁免疫の基盤的知識を得ることに目的を変更した。

### 2) 研究成果

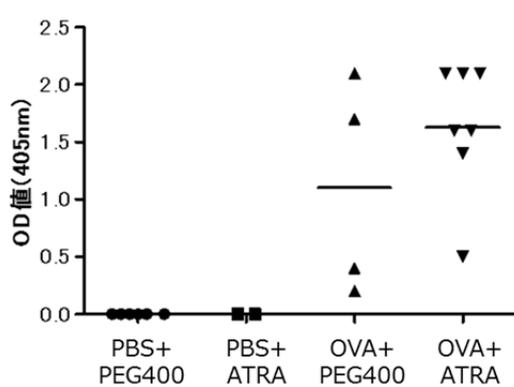
(1) 妊娠マウスモデルによるAll-trans retinoic acid (ATRA) の乳汁免疫アジュバントとしての有効性確認

前述の通り、豚では腸管免疫と乳汁免疫との関連が豚伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV) の感染実験や野外症例から明らかにされている。そこで我々は、活性化したT細胞とB細胞の腸管移行に関与するCCR9等の細胞表面分子の発現に重要な役割を果たす、ATRAについて乳汁免疫アジュバントとしての有効性を妊娠マウスモデルにより検討した。

まず、雌マウス (BALB/c、4週齢) を一群6匹で4群に分け、試験群には1週間おきに3回オボアルブミン (OVA) 50 µgとATRA 150 µgを皮下接種した。3回目の接種から1週後に交配し、分娩予定日1週前に再度免疫を行った。対照群3群にはPBSとATRAの溶媒であるPEG400、PBSとATRA、またはOVAとPEG400をそれぞれ等量接種した。定期的に血液および乳汁を採取しTotal IgA量とOVA IgA抗体価を測定した。(動物実験計画書：承認番号第12-060号)

その結果、試験群と対照群とで試験期間中の血清および分娩後7日目の乳汁中のTotal IgA量ならびにOVA IgA抗体価に明確な差は認められなかったものの、試験群の分娩日乳

汁中OVA  
果から、*A*  
きる可能



認められた (図1)。これらの結  
り効率的にIgAを乳汁中に誘導で  
図1 妊娠期にATRAをアジュバントとしてOVAを  
皮下接種したマウス (試験群、OVA+ATRA)  
における分娩日の乳汁中OVA IgA抗体価。  
PBS+PEG4000, PBS+ATRAおよび  
OVA+PEG400は対照群。バーは平均値を示  
す。

## (2) TGEV感染による乳汁へのIgA抗体誘導機構の解明

ATRAの妊娠マウスモデルにおける有効性確認と平行し、我々は妊娠豚へのTGEV実験感染により乳汁へのIgA抗体誘導機構の解明に取り組んだ。

まず、TGEV抗体陰性の未経産妊娠豚6頭を導入、2頭には分娩5週前に豚継代TGEV SH17株 10 mlを経口投与、2頭には市販ワクチンを分娩5週および2週前に皮下接種、残る2頭には対照として細胞培養培地 10 mlを経口投与した。分娩日および分娩7日目の乳汁中中和抗体価を測定、分娩7日目に解剖し乳腺におけるIgAの分布を免疫組織化学染色により観察するとともに、乳腺より単核球を分離しTGEV IgA抗体産生細胞数を計測した。また、セルソーター (BD, FACSAriaII) により単離したIgA陽性細胞よりTotal RNAを抽出、RNAseqによりTGEV接種豚と関連して発現が変化する遺伝子の特定を試みた (動物実験計画書: 承認番号第12-061号)。

TGEVを2頭に接種した結果、1頭 (#83) では食欲不振が観察されたものの、1頭 (#104) では下痢や食欲不振等の臨床症状は観察されなかった。ワクチン接種豚と対照豚では試験期間を通じて糞便でのウイルス遺伝子も検出されず、臨床症状も認められなかった。

分娩日および分娩7日目の乳汁中TGEV中和抗体を測定した結果を図2に示す。TGEV接種豚2頭の分娩日の乳汁中抗体価はそれぞれ512倍と64倍であったが、分娩7日目には128倍と4倍と、1/4~1/16まで低下していた。抗体価は不顕性感染であった#104で低く、また低下率も大きい傾向が認められた。一方、ワクチン接種豚では分娩日の抗体価はそれぞれ1024倍とTGEV接種豚と比較して高かったものの、分娩7日後の乳汁中抗体価の低下はTGEV接種豚と比較して急速であり、分娩日と比較して1/64~1/128まで減少していた。なお、乳腺におけるTGEV IgA抗体産生細胞はウイルス接種豚でのみ検出された。分娩7日目の乳腺におけるIgA陽性細胞およびIgAの分布を観察した結果、IgA陽性細胞数に豚群間での大きな差異は認められなかったものの、TGEV接種豚でより広汎にIgAが分布する傾向が認められた (図3)。これらの結果より、TGEV感染により分娩後のTGEV IgA抗体産生細胞の乳腺への局在が効率的に誘導されるとともに、分娩後の乳腺におけるIgA分泌が活発になる可能性が示唆された。このメカニズムを解明するために、乳腺よりIgA陽性細胞を単離し、mRNAの発現解析を実施する予定であったが、単離できたIgA陽性細胞数が少なかったために解析に十分なRNAが得られず、解析不可能であった。

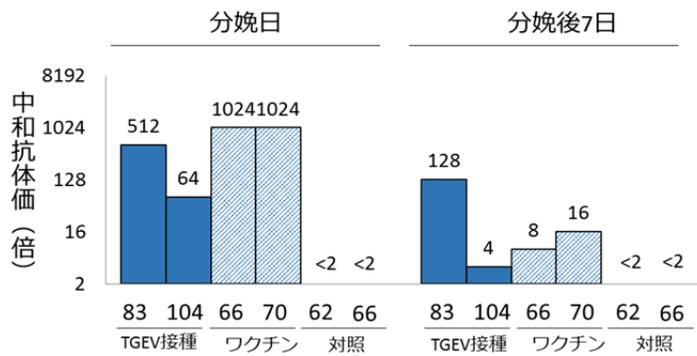


図2 TGEV接種豚、TGEVワクチン接種豚および対照豚の分娩日および分娩7日目の乳汁におけるTGEV中和抗体価

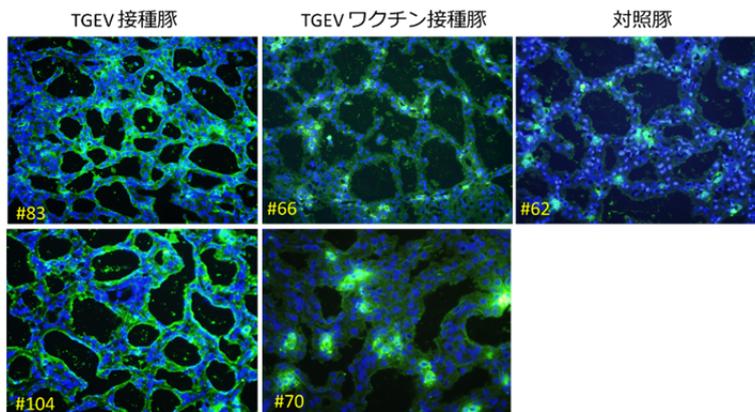


図3 TGEV接種豚、TGEVワクチン接種豚および対照豚の分娩7日目の乳腺におけるIgA陽性細胞とIgAの分布。IgAを緑色 (FITC)、細胞核を青色 (DAPI) で染色している。

### (3) PEDV感染による乳汁へのIgA抗体誘導機構の解明

当初、次に妊娠豚におけるATRAの乳汁免疫アジュバントとしての有効性について検討する予定であった。しかし、平成25-26年度の国内におけるPED流行をうけて、PEDワクチンの効果向上に不可欠であるPEDV感染による乳汁へのIgA抗体誘導機構の解明へと計画を変更した。

まず、未経産妊娠豚6頭を導入、うち2頭には分娩前4週目に無菌豚継代PEDV OKN-1/2013株10 mlを経口投与、2頭には分娩5週および2週前に市販生ワクチンを用法にしたがって筋肉内投与、残る2頭には対照として細胞培養培地のみを経口投与した。血液と分娩後の乳汁を経時的に採取しPEDV 中和抗体価、IgGおよびIgA抗体価を測定した。また、経時的に乳腺組織を胸部および腰部乳房の2箇所より採取、免疫組織化学染色で乳腺におけるIgA陽性細胞数を1箇所につき4視野 (計2箇所8視野) で計測するとともに、IgA陽性面積をImage Jソフトウェアを使用して計測した。また、乳腺組織よりRNAを抽出しIgA産生細胞の移行に関与する遺伝子4種 (CCL25, CCR9, CCL28およびCCR10) についてmRNA定量による発現解析を行った。(動物実験計画書：承認番号 第14-014号)

その結果、PEDV接種豚では、血清中中和抗体価はワクチン接種豚と比較して高めに推移する傾向が認められたものの、血清中IgG抗体価の推移はワクチン接種豚とほぼ同様であった(図4)。一方、乳汁中の中和抗体とIgG抗体はPEDV接種豚において分娩7日目でもそれぞれ45倍と905倍と高く維持されていたものの、ワクチン接種豚ではどちらも検出限界以下まで低下していた。さらに、PEDV接種豚では接種後1週目より分娩後7日目まで検出可能であった血清中および乳汁中IgA抗体がワクチン接種豚では試験期間を通じて検出限界以

下であった。

次に、乳腺におけるIgA陽性細胞数とIgA陽性面積の経時的変化について検討を行った結果、PEDV接種豚において、接種後1週後（分娩3週間前）から分娩7日後にかけてIgA陽性細胞数とIgA陽性面積が対照豚よりも高めに推移する傾向が認められた（分娩7日後のIgA陽性細胞数を除く）（図5）。一方、ワクチン接種豚では、1回目ワクチン接種3週後（分娩2週前）のIgA陽性細胞数とIgA陽性面積が対照豚よりも高い値を示したものの、それ以外では対照豚と同程度か下回る値であった（図5）。これらのことから、妊娠期のPEDV感染は分娩前でも乳腺へのIgA産生細胞の移行を促し、IgA分泌を効率的に誘導している可能性が示唆された。なお、我々が実施した妊娠豚へのPEDV接種試験では、腸管以外でのウイルス増殖は確認されておらず、発症極期に解剖した場合でも乳腺および乳汁でウイルス遺伝子が検出されていないことから、PEDV接種豚ではPEDVの腸管感染による免疫刺激が乳腺へのIgA産生細胞の局在や効率的なIgA分泌を誘導したと考えられる。

最後に、乳腺へのリンパ球移行に関与する遺伝子として、主に小腸で発現し、小腸へのリンパ球移行へ関与すると考えられているCCL25およびそのリンパ球側受容体であるCCR9、ならびに主に鼻粘膜、唾液腺および大腸に発現するとともに分娩前後に発現が増加するCCL28とそのリンパ球側受容体であるCCR10の4遺伝子について乳腺におけるmRNA発現を経時的に解析した。

PEDV接種豚において、IgA抗体価とIgA陽性面積値の高かった分娩7日目においてCCL25のmRNA発現が対象豚と比較して1.8倍に増加していたものの、その他ではIgA抗体価、IgA陽性細胞数、そしてIgA陽性面積に関連して発現量が大きく変化する遺伝子が認められなかった。これらのことから、分娩後のCCL25の高発現が効率的なIgA分泌に寄与した可能性が示唆された一方、今回測定していない他の分子も分娩前のIgA産生細胞の移行やIgA分泌に関与している可能性が示唆された（図6）。

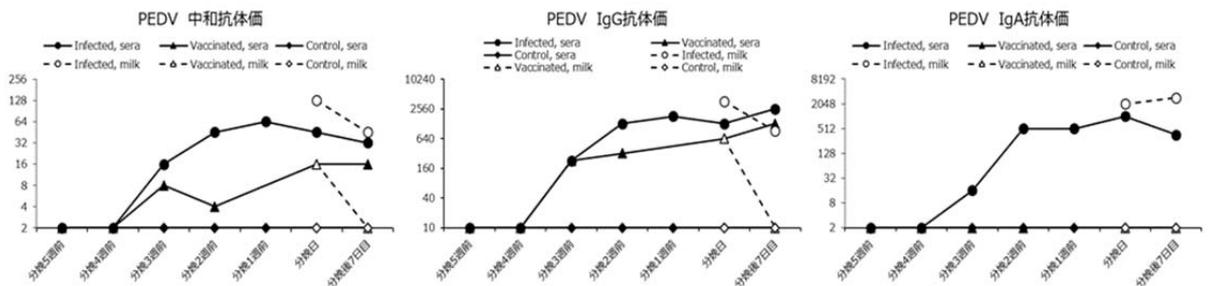


図4 PEDV接種豚またはワクチン接種豚の血清中および乳清中における中和抗体価、IgA抗体価およびIgG抗体価の推移。各群2頭の幾何平均値を示す。

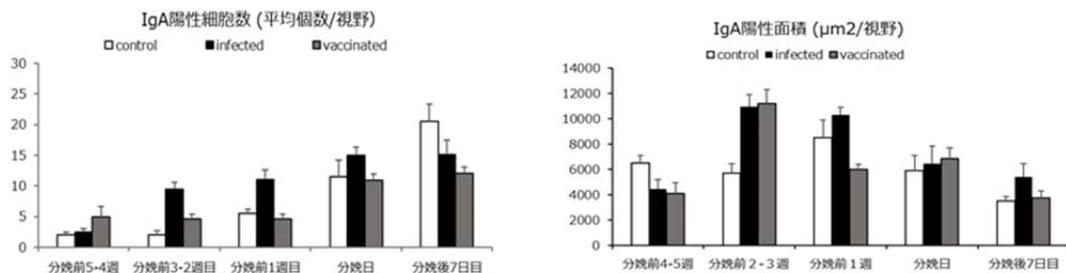


図5 PEDV接種豚またはワクチン接種豚の乳腺におけるIgA陽性細胞およびIgA陽性面積の推移。各サンプリング時に1頭の胸部および腰部の乳腺より計2検体を採取し、1検体につき4視野（計16視野/4検体/2頭/群）

を観察した平均値を示す。

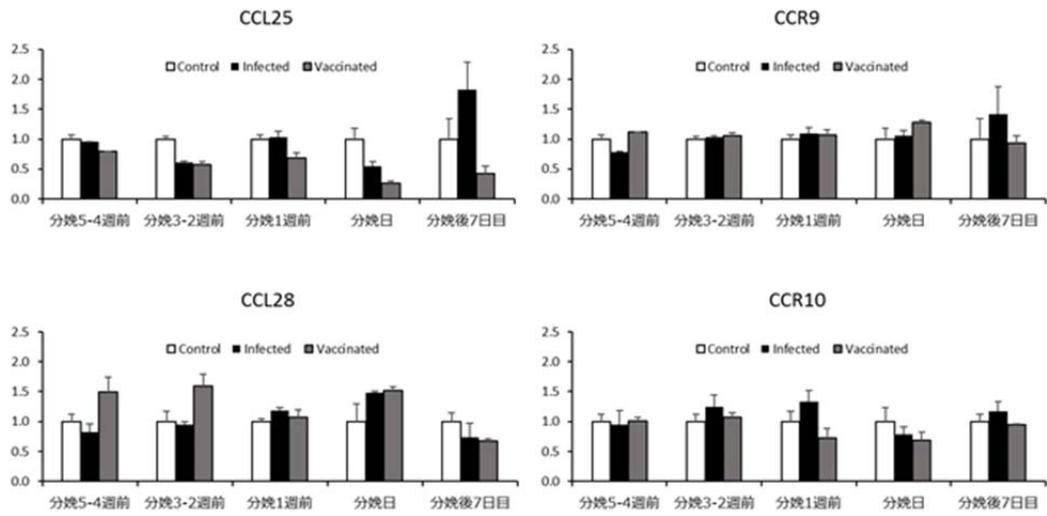


図6 PEDV接種豚またはワクチン接種豚の乳腺におけるCCL25とCCL28、ならびにそれぞれの受容体であるCCR9とCCR10のmRNA相対発現量。対照豚群における内部標準遺伝子に対する各遺伝子の相対発現量を1として各検体における遺伝子発現量を相対値で求めた。結果は3種類の内部標準遺伝子（PPIA, RPL4, YWHAZ）で得られた相対値の平均を示す。

### 3) 成果活用における留意点

特になし

### 4) 今後の課題

IgA産生細胞の乳腺移行にかかわる他の分子機構を今後明らかにする必要がある。

Ⅲ 研究成果一覧【公表可】

課題番号 11105375

中課題名 優れたワクチンの開発のための技術開発

成果等の集計数

課題番号	学術論文		学会等発表(口頭またはポスター)		出版図書	国内特許権等		国際特許権等		PCT	報道件数	普及しうる成果	発表会の主催(シンポジウム・セミナー)	アウトリーチ活動
	和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得					
11105375	7	18	49	12	3	0	2	0	0	0	0	2	6	0

(1)学術論文

区分:①原著論文、②その他論文

整理番号	区分	タイトル	著者	機関名	掲載誌	掲載論文のDOI	発行年	発行月	巻(号)	掲載ページ
1	①	The cell wall component lipoteichoic acid of Staphylococcus aureus induces chemokine gene expression in bovine mammary epithelial cells.	Yoshio KIKU, Yuya NAGASAWA, Fuyuko TANABE, Kazue SUGAWARA, Atsushi WATANABE, Eiji HATA, Tomomi OZAWA, Kei-ichi NAKAJIMA, Toshiro ARAI and Tomohito HAYASHI	動衛研	J. Vet. Med. Sci.		2016	5	78(9)	1505 - 1510
2	②	総説 粘膜免疫機構に立脚した乳房炎粘膜ワクチン開発	林智人	動衛研	産業動物臨床学会誌		2016	11	7(3)	131-139
3	①	Cyclophilin A is a new M cell marker of bovine intestinal epithelium.	Hondo T, Someya S, Nagasawa Y, Terada S, Watanabe H, Chen X, Watanabe K, Ohwada S, Kitazawa H, Rose MT, Nochi T, Aso H	東北大	Cell Tissue Res.		2016	5	364	585 - 597
4	①	黄色ブドウ球菌(SA)性乳房炎とSA排菌牛に対する粘膜免疫誘導治療法の検討	岡本隆行、林智人	動衛研	家畜診療		2016	10	63(10)	607 - 615

5	②	Complete Genome Sequences of Bovine Parainfluenza Virus Type 3 Strain BN-1 and Vaccine Strain BN-CE.	Ohkura Tら	筑波大学	Genome Announcement		2013	1	1 (1)	pii:e00247-12. doi:10.1128/genomeA.00247-12
6	①	Efficiency of pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes as a vaccine carrier.	Watarai S	大阪府立大学	Scientific World Journal.		2013	2	903234	
7	①	A liposome-based antigen delivery system using pH-sensitive fusogenic polymers for cancer immunotherapy.	Yuba Eら	大阪府立大学	Biomaterials		2013	7	34 (12)	3042 - 3052
8	①	Infection of the upper respiratory tract of hamsters by the bovine parainfluenza virus type 3 BN-1 strain expressing enhanced green fluorescent protein.	Ohkura Tら	筑波大学	Virology		2015	1	476	134 - 140
9	①	Survey for detecting persistently infected cattle with bovine diarrhea in Japan.	Kameyama Kら	動物衛生研究部門	J Vet.Med.Sci		2016	8	78 (8)	1329 - 1331
10	②	豚繁殖・呼吸障害症候群(PRRS)の現状と最新の学術的知見	高木道浩	農研機構動物衛生研究部門	日本豚病研究会報		2014	2	63	1-5
11	②	豚繁殖・呼吸障害症候群(PRRS)の最新情報	高木道浩	農研機構動物衛生研究部門	日本豚病研究会報		2017	2	69	7-12
12	①	Application of pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes for development of mucosal vaccines.	Watarai Sら	大阪府立大学	Veterinary Immunology and Immunopathology		2014		158	62-72
13	①	Evaluation of stearylamine-modified liposomes for the oral vaccine adjuvant.	Watarai S, Sasaki Y	大阪府立大学	Journal of Infectious Diseases and Therapy		2014		2	141
14	①	Capsular polysaccharide of Erysipelothrix rhusiopathiae, the causative agent of swine erysipelas, and its modification with phosphorylcholine.	施 芳、原田知享、小川洋介、小野裕、亀山真由美、宮本亨、江口正浩、下地善弘	農研機構動物衛生研究部門	Infection and Immunity		2012	11	80	3993 - 4003
15	①	Immunostimulatory effects of recombinant Erysipelothrix rhusiopathiae expressing porcine interleukin-18 in mice and pigs.	小川洋介、皆川遊、施 芳、江口正浩、宗田吉広、下地善弘	農研機構動物衛生研究部門	Clinical and Vaccine Immunology		2012	9	19	1393 - 1398
16	①	Collagen adhesin-nanoparticle interaction impairs adhesin's ligand binding mechanism.	AS Devi, Yohsuke Ogawa, Yoshihiro Shimoji, S Balakumar, Karthe Ponnuraj	農研機構動物衛生研究部門	Biochimca et Biophysica Acta		2012	9	1820	819-828

17	①	Characterization and identification of a novel candidate vaccine protein through systematic analysis of extracellular proteins of <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> .	Shi Fang, Yohsuke Ogawa, Akiyuki Sano, Tomoyuki Harada, Jiro Hirota, Masahiro Eguchi, Eiji Oishi, Yoshihiro Shimoji	農研機構動物衛生研究部門	Infection and Immunity		2013	12	81	4333 - 4340
18	①	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> exploits cytokeratin 18-positive epithelial cells of porcine tonsillar crypts as an invasion gateway.	Tomoyuki Harada, Yohsuke Ogawa, Masahiro Eguchi, Shi Fang, Masumi Sato, Kazuyuki Uchida, Hiroyuki Nakayama, Yoshihiro Shimoji	農研機構動物衛生研究部門	Veterinary Immunology and Immunopathology		2013	6	153	260- 266
19	①	Phosphorylcholine and SpaA, a choline-binding protein, are involved in the adherence of <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> to porcine endothelial cells, but this adherence is not mediated by the PAF receptor.	Harada T, Ogawa Y, Eguchi M, Shi F, Sato M, Uchida K, Nakayama H, Shimoji Y	農研機構動物衛生研究部門	Veterinary Microbiology		2014	5	172	216- 222
20	①	Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> .	Yamazaki Y, Oba E, Kashiwagi N, Sugita K, Shiiba K, Baba Y, Shimoji Y, Yamazaki W	農研機構動物衛生研究部門	Letter in Applied Microbiology		2014	4	58	362- 369
21	①	Development of an SNP-based PCR assay for rapid differentiation of a Japanese live vaccine strain from field isolates of <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> .	Shiraiwa K, Ogawa Y, Eguchi M, Hikono H, Kusumoto M, Shimoji Y	農研機構動物衛生研究部門	Journal of Microbiological Methods		2015	7	117	11- 13
22	①	Development of a novel PCR-RFLP assay for improved detection and typing of bovine papillomaviruses.	Kawauchi K, Takahashi C, Ishihara R, Hatama S	農研機構動物衛生研究部門	J Virol Methods.218:23-6		2015	6	218	23- 26
23	②	北海道十勝地域における牛乳頭腫の有病率:と畜場での調査	門平睦代、畠間真一、岩佐光啓	農研機構動物衛生研究部門	産業動物臨床医学雑誌		2014	7	15 (1)	24- 28
24	②	食道の乳頭腫による牛の死亡事例と牛パピローマウイルス1型の関与	畠間真一	農研機構動物衛生研究部門	臨床獣医		2014	12	32	40- 43
25	②	豚流行性下痢～概説と乳汁免疫について～平成26年から流行を見せている豚流行性下痢症の概況と対策、特に母豚免疫の重要性と効果的対策の詳説	宮崎綾子、鈴木亨、大橋誠一	農研機構動物衛生研究部門	日本動物用医薬品協会会報		2014	10	51	3-15

## (2)学会等発表(口頭またはポスター)

整理番号	タイトル	発表者名	機関名	学会等名	発行年	発行月
1	Distribution of accessory gene regulator groups in <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from bovine mastitic milk in Japan.	渡部淳、小山芳一、秦英司、内田郁夫、近山之雄、菊佳男、林智人	農研機構動物衛生研究部門、北海学園大学	World Congress on Controversies, Debates & Consensus in Veterinary Medicine	2014	10
2	Characteristics of mastitic mammary secretions from Holstein cows at 8-12 days before parturition	渡部淳、平井綱雄、秦英司	農研機構動物衛生研究部門、(地独)道総研畜産試験	World Buiatrics Congress 2016	2016	7
3	黄色ブドウ球菌のin vitroでの増殖阻害を可能にするウシポリクローナル抗体の作製	古川睦実、米山裕、秦英司、岩野英知、樋口豪紀、安藤太助、佐藤美佳、林智人、菊佳男、長澤裕哉、新實香奈枝、宇佐美克紀、佐々木志保、伊藤駿、渡邊康一、麻生久、野地智法	東北大学、農研機構動物衛生研究部門、酪農学園大学	東北畜産学会	2016	9
4	乳汁中に黄色ブドウ球菌特異的IgA抗体を誘導させる鼻腔を介した抗原取り込み機序の解析	長澤裕哉、菊佳男、野地智法、麻生久、田邊扶由子、菅原和恵、石川義春、門田耕一、林智人	農研機構動物衛生研究部門、東北大学	第158回日本獣医学会	2015	9
5	乳腺へ黄色ブドウ球菌特異的液性免疫を惹起させる鼻腔・扁桃部を介した抗原取込み機序の解析	長澤裕哉、菊佳男、林智人	農研機構動物衛生研究部門	第20回日本乳房炎研究会・学術集会	2015	10
6	ウシ咽頭扁桃は鼻腔投与した黄色ブドウ球菌に対する免疫応答の場になる	長澤裕哉、菊佳男、田邊扶由子、菅原和恵、石川義春、野地智法、市居修、昆泰寛、麻生久、門田耕一、林智人	農研機構動物衛生研究部門、東北大学、北海道大学	第159回日本獣医学会	2016	9
7	ウシの咽頭扁桃は鼻腔から投与した黄色ブドウ球菌死菌に対する免疫応答の場となる	長澤裕哉、菊佳男、田邊扶由子、菅原和恵、石川義春、市居修、昆泰寛、門田耕一、林智人	農研機構動物衛生研究部門、北海道大学	第21回日本乳房炎研究会・学術集会	2016	10
8	黄色ブドウ球菌性乳房炎における乳汁中乳腺上皮細胞の割合は乳腺組織の損傷を反映する	長澤裕哉、菊佳男、菅原和恵、田邊扶由子、石川義春、市居修、野地智法、麻生久、昆泰寛、門田耕一、林智人	農研機構動物衛生研究部門、東北大学、北海道大学	第6回家畜感染症学会	2016	12
9	Colonization of <i>Staphylococcus aureus</i> in the mucosal inflammatory area in the case of severe clinical bovine mastitis.	長澤裕哉、菊佳男、小山芳一、野地智法、麻生久、林智人	農研機構動物衛生研究部門、北海学園大学、東北大学	World Congress on Controversies, Debates & Consensus in Veterinary Medicine	2016	7
10	pH応答性ポリグルシドール修飾リポソームによる抗腫瘍免疫の誘導	弓場英司ら	大阪府立大学	第61回高分子学会	2012	5
11	pH-sensitive polymer-modified liposomes as an antigen delivery system for cancer immunotherapy	弓場英司ら	大阪府立大学	The 44th International Symposium on Macromolecules, IUPAC World Polymar Congress	2012	6

12	抗腫瘍免疫誘導のためのpH応答性ポリマー修飾リポソーム	弓場英司ら	大阪府立大学	第28回日本DDC学会	2012	7
13	Application of pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes for development of mucosal vaccine	渡来仁ら	大阪府立大学	The 6th International Veterinary vaccine and	2012	7
14	pH応答性ポリマー修飾リポソームを用いた抗原デリバリーとがん免疫治療への応用	弓場英司ら	大阪府立大学	第21回日本組織適合性学会	2012	9
15	リポソームを応用した犬用経粘膜ワクチンの開発	清水遙介ら	大阪府立大学	第154回日本獣医学会	2012	9
16	効率的な抗腫瘍免疫誘導のためのpH感受性ポリマー修飾リポソームの設計	弓場英司ら	大阪府立大学	第61回高分子討論会	2012	9
17	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	渡来仁ら	大阪府立大学	平成24年度日本産業動物獣医学会	2012	10
18	牛パラインフルエンザウイルス弱毒生ワクチンBN-CE株及び野外分離株BN-1株の遺伝子解析	大倉喬ら	筑波大学	第60回日本ウイルス学会	2012	11
19	pH-sensitive polymer-modified liposome based antigen delivery system for cancer immunotherapy	弓場英司ら	大阪府立大学	2nd International Conference on Biomaterials Science in	2013	3
20	Analysis of Complete Genome Sequences of Bovine Parainfluenza Virus Type 3 BN-1 and Vaccine Strain BN-CE for Reverse Genetics.	大倉喬ら	筑波大学	15th International Negative Strand Viruses Meeting, Spain	2013	6
21	経粘膜リポソームワクチン用アジュバントの検討	原怜史ら	大阪府立大学	第156回日本獣医学会	2013	9
22	リポソームを応用した腫瘍ワクチンの開発	岡崎誠治ら	大阪府立大学	第156回日本獣医学会	2013	9
23	pH感受性リポソームを応用した犬用経鼻ワクチンによる免疫誘導	清水遙介ら	大阪府立大学	第156回日本獣医学会	2013	9
24	牛感染症に対する新規ワクチンベクターとしての組換え牛パラインフルエンザ3型ウイルス作製の試み	大倉喬ら	筑波大学	第61回ウイルス学会学術集会	2013	11
25	牛ウイルス性下痢ウイルス1b型の子牛における病原性	坪井孝益ら	農研機構動物衛生研究部門	第61回ウイルス学会学術集会	2013	11
26	国内で分離された牛ウイルス性下痢ウイルスの遺伝子型の推移	亀山健一郎ら	農研機構動物衛生研究部門	平成25年度獣医学術学会年次大会	2014	3
27	Transition of bovine viral diarrhea virus subgenotypes in Japan.	亀山健一郎ら	農研機構動物衛生研究部門	The 3rd Thailand-Japan Joint Conference on Animal Health	2014	7
28	リポソームを応用した犬用歯周病粘膜ワクチンの開発	清水遙介ら	大阪府立大学	第157回日本獣医学会	2014	9
29	リポソームを応用した経皮ワクチンの開発	三上幸恵ら	大阪府立大学	第157回日本獣医学会	2014	9
30	リポソームを応用した腫瘍ワクチンによる免疫誘導の解析	岡崎誠治ら	大阪府立大学	第157回日本獣医学会	2014	9
31	牛ウイルス性下痢・粘膜病に対するDNAワクチンの構築	内藤郁慶ら	岩手大学	第157回日本獣医学会	2014	9
32	牛ウイルス性下痢・粘膜病—その多様な病態と持続感染牛の重大性—	坪井孝益	農研機構動物衛生研究部門	第42回東北家畜衛生協議会検討会 秋田	2014	10
33	牛ウイルス性下痢ウイルス1b型が1a型不活化ワクチン接種子牛に及ぼす影響	坪井孝益ら	農研機構動物衛生研究部門	第62回日本ウイルス学会学術集会 横浜	2014	11

34	牛パラインフルエンザウイルス3型BN-1株のハムスターにおけるトロピズム	竹内薫ら	筑波大学	第62回日本ウイルス学会学術集会 横浜	2014	11
35	Development of liposomal intraocular vaccine for canine periodontitis.	清水遙介ら	大阪府立大学	The 4th Kobe International Conference on the Care for All Creatures -ICAC KOBE	2015	7
36	Application of pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes for development of cancer vaccines.	岡崎誠治ら	大阪府立大学	The 4th Kobe International Conference on the Care for All Creatures -ICAC KOBE	2015	7
37	Cell tropism and pathogenicity of bovine parainfluenza type 3	竹内薫ら	筑波大学	Robert Lamb Symposium (Northwestern University, Evanston, IL, USA)	2015	7
38	陽性荷電脂質修飾リポソーム粘膜ワクチンの免疫誘導効果の解析	伊東彩ら	大阪府立大学	第158回日本獣医学会	2015	9
39	新規pH感受性ポリマー修飾リポソームワクチンの免疫誘導効果の解析	今岡侑輝ら	大阪府立大学	第158回日本獣医学会	2015	9
40	リポソームを応用した犬用歯周病粘膜ワクチンの開発:感染防御能の評価	清水遙介ら	大阪府立大学	第158回日本獣医学会	2015	9
41	リポソームを応用した腫瘍ワクチンによる治療効果の解析	岡崎誠治ら	大阪府立大学	第158回日本獣医学会	2015	9
42	マンノース修飾リポソームを応用した制御性T細胞の誘導を可能にするワクチンの開発	藤原典子ら	大阪府立大学	第158回日本獣医学会	2015	9
43	膜タンパク質を欠損する牛パラインフルエンザウイルス3型の性状	高田麻里奈ら	筑波大学	第63回日本ウイルス学会学術集会	2015	11
44	腫瘍細胞を抗原とした腫瘍ワクチン(自家腫瘍ワクチン)による免疫応答の解析	樋口裕梨ら	大阪府立大学	第159回日本獣医学会	2016	9
45	生殖系の感染症に対する経膣リポソームワクチンの開発	田邊会理ら	大阪府立大学	第159回日本獣医学会	2016	9
46	リポソームを応用した自家腫瘍ワクチンによる治療効果の解析	岡崎誠治ら	大阪府立大学	第159回日本獣医学会	2016	9
47	リポソームを応用したI型インターフェロン誘導法の開発	松本佳奈子ら	大阪府立大学	第159回日本獣医学会	2016	9
48	欠損型牛パラインフルエンザウイルス3型の相互補完的回収方法の検討	高田麻里奈ら	筑波大学	第64回日本ウイルス学会学術集会(札幌)	2016	10
49	Pathogenicity of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in Japan.	高木道浩	農研機構動物衛生研究部門	3rd the Thailand-Japan Joint Conference on Animal Health 2014	2014	7
50	国内で分離された北米型PRRSウイルス株の病原性	高木道浩	農研機構動物衛生研究部門	第157回日本獣医学会学術集会	2014	9
51	腫瘍細胞を抗原とした腫瘍ワクチン(自家腫瘍ワクチン)による免疫応答の解析	樋口裕梨、岡崎誠治、岩崎忠、弓場英司、河野健司、渡末仁	大阪府立大学	第159回日本獣医学会	2016	9
52	生殖系の感染症に対する経膣リポソームワクチンの開発	田邊会理、岩崎忠、渡末仁	大阪府立大学	第159回日本獣医学会	2016	9

53	リポソームを応用した自家腫瘍ワクチンによる治療効果の解析	岡崎誠治、岩崎忠、弓場英司、河野健司、渡来仁	大阪府立大学	第159回日本獣医学会	2016	9
54	リポソーム型点眼ワクチン/経乳頭ワクチン～家畜(牛)における免疫誘導～	渡来仁	大阪府立大学	動物用ワクチン～バイオ医薬品研究会 2016年シンポジウム	2016	9
55	ウシ乳房炎に対する乳頭接種型新規リポソームワクチンの開発:経乳頭免疫による免疫応答の解析	渡来仁、塔娜、弓場英司、河野健司、小岩政照	大阪府立大学	平成28年度日本産業動物獣医学会(近畿)	2016	10
56	牛呼吸器病由来 <i>Pasteurella multocida</i> における <i>pfhB1</i> 、 <i>pfhB2</i> 遺伝子の保有および発現状況の解析	星野尾歌織	農研機構動物衛生研究部門	第87回日本細菌学会総会	2014	3
57	Epidemiology, clinical characteristics and prevention measures for bovine papillomavirus type 9 induced papillomatosis.	Shinichi Hatama, Michiko Sakakibara, Ryoko Ishihara, Satoko Watanabe, Koichi Kadota, Yukino Tamamura, Ikuo Uchida	動物衛生研究所	9th International Congress of Veterinary Virology	2012	9
58	北海道十勝地域における牛乳頭腫の有病率:と畜場での調査	門平睦代、畠間真一ら	動物衛生研究所	第157回日本獣医学会学術集会	2014	9
59	バキュロウイルス発現系による牛パピローマウイルス様粒子の作製	渡辺聡子、畠間真一、飯塚哲也、芝原友幸、菅野徹	動物衛生研究所	第158回日本獣医学会学術集会	2015	9
60	組換えバキュロウイルスによる牛パピローマウイルス主要外殻タンパクL1遺伝子の発現とウイルス様粒子の作製	渡辺聡子、畠間真一、芝原友幸、菅野徹	動物衛生研究所	第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会合同大会	2015	12
61	ハスモンヨトウ ( <i>Spodoptera frugiperda</i> ) 由来の新規ヘキサミンダーゼ遺伝子の単離	国保健浩、Hoang Vu Dang	動物衛生研究所	第35回日本分子生物学会	2012	11

(3) 出版図書

区分: ①出版著書、②雑誌(学術論文に記載したものを除く、重複記載をしない。)、③年報、④広報誌、⑤その他

整理番号	区分	著書名(タイトル)	著者名	機関名	出版社	発行年	発行月
1	①	動物微生物学・動物感染症学 乳房炎	林智人	全国動物保険看護系大学協会カリキュラム検討委員会編	インターズー出版	2016	3
2	①	牛病学(第三版)(牛乳頭腫症)	明石博臣、江口正志、神尾次彦、加茂前秀夫、酒井豊、芳賀猛、眞鍋昇/編		近代出版	2013	10
3	①	動物用ワクチンとバイオ医薬品—新たな潮流—	國保健浩	動物用ワクチン～バイオ医薬品研究会編	文永堂出版	2017	7

## (4) 国内特許権等

区分: ①育成者権、②特許権、③実用新案権、④意匠権、⑤回路配置利用権

整理番号	区分	特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	機関名	出願番号	出願年月日	取得年月日
1	②	アカバネウイルスに対して中和活性を有する抗体を誘導するペプチド	小川洋介、下地善弘、江口正浩	農研機構	農研機構	特願2014-032120 (特6373601)	2014/2/21	2018/7/28
2	②	CDP-グリセロールグリセロフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子欠損豚丹毒菌とその利用	下地善弘、小川洋介、白岩和真、江口正浩	農研機構	農研機構	特願2015-169017 (特6342860)	2015/8/28	2018/5/25

## (5) 国際特許権等

区分: ①育成者権、②特許権、③実用新案権、④意匠権、⑤回路配置利用権

整理番号	区分	特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	機関名	出願番号	出願年月日	取得年月日	出願国
		該当無し							

## (6) 報道等

区分: ①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映、④その他

整理番号	区分	記事等の名称	機関名	掲載紙・放送社名等	掲載年月日	備考
		該当無し				

## (7) 普及に移しうる成果

区分: ①普及に移されたもの・製品化して普及できるもの、②普及のめどがたったもの、製品化して普及のめどがたったもの、③主要成果として外部評価を受けたもの

整理番号	区分	成果の名称	機関名	普及(製品化) 年月		主な利用場面	普及状況
1	②、③	安全で効果の高い豚丹毒生ワクチン候補株	農研機構	2015	1	動物医薬品の製造	
2	②、③	豚丹毒菌生ワクチン株と野生株とを識別できるPCR法の開発	農研機構	2015	1	家畜保健衛生所等における家畜伝染病の病性鑑定、食肉検査	

## (8) 発表会の主催(シンポジウム・セミナー等)の状況

整理番号	発表会の名称	機関名	開催場所	年月日	参加者数	備考
1	第2回乳房炎サマーキャンプ	大学乳房炎教育懇談会	宮城県大崎市 川渡公民館	2016/8/22	60	
2	第8回動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会シンポジウム	動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会	日本大学獣医学部	2016/9/8	100	H28年度日本獣医学会学術集会開催期間の関連シンポジウムとして開催
3	第40回大動物臨床研究会シンポジウム	大動物臨床研究会	酪農学園大学	2016/11/5	160	
4	動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会2012年シンポジウム	生物科学安全研究所	岩手県盛岡市 岩手大学	2012/9/14	60	鶏サルモネラ症に対するリポソーム点眼ワクチン(渡来)
5	平成24年度日本獣医師会年次大会シンポジウム	日本獣医師会	大阪府大阪市 大阪国際交流センター シェラトン都ホテル 大阪	2013/2/10	60	
6	動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会2016年シンポジウム	生物科学安全研究所	神奈川県藤沢市 日本大学	2016/9/8	68	新しい動物用ワクチンの開発に向けて(國保) リポソーム型点眼ワクチン/経乳頭ワクチン～家畜おける免疫誘導～(渡来) 牛ウイルス性下痢・粘膜病におけるDNAワクチンの開発(村上)

## (9) アウトリーチ活動の状況

区分:①一般市民向けのシンポジウム・講演会及び公開講座・サイエンスカフェ等、②展示会及びフェアへの出展・大学及び研究所等の一般公開への参画、③その他(子供向け出前授業等)

整理番号	区分	アウトリーチ活動	機関名	開催場所	年月日	参加者数	主な参加者	備考
		該当無し						