

海外出張報告書

2013年 3月 18日提出

氏名	岡川 朋弘
所属	大学院獣医学研究科 動物疾病制御学講座 感染症学教室
学年	博士課程 1年
出張先	フィリピン国立カラバオセンター (フィリピン共和国 ニエヴァ・エシハ州 ムニョス市) フィリピン大学ディリマン校 Murine Science Institute (フィリピン共和国 マニラ首都圏 ケソン市)
出張期間	2013年 2月 21日～3月 3日
目的	フィリピン国内でウシの感染症を対象として、疫学調査および免疫学的解析を実施する。その中で、海外での研究調査に必要な手技、コミュニケーション能力を向上させる。

活動内容

【概要および目的】

本研究室は 2006 年から現在まで、フィリピンカラバオセンターと共同研究を実施しており、フィリピン国内においてウシやスイギュウを対象に感染症の分子疫学調査を行い、それらの成果を原著論文 11 報として発表してきた。2012 年 8 月に行った疫学調査により、同国内の一農場において、結核、アナプラズマ症、バベシア症、トリパノソーマ症といったウシの感染症が蔓延していることが明らかになった。これらの感染症は、日本ではいずれも法定伝染病に指定されており、家畜衛生上非常に重要な疾患である。そしてフィリピン国内においては、畜産業に甚大な経済的被害を与えている。しかし、これらの感染症に対する治療法やワクチンについては、これまで数多くの研究がなされているが、効果的な制御法が未だ開発されていない疾病も存在し、新たな戦略が求められている。

私はこれまで、ウシの免疫抑制因子に注目し、慢性感染（持続感染）に伴う免疫抑制が様々な抑制因子により制御されていることを、牛白血病をモデル疾患として研究してきた。現在、牛白血病の新規制御法を確立するために、免疫抑制因子を阻害し免疫機能を再活性化する分子標的薬（キメラ抗体）を開発中である。

本研究調査の目的は、結核やヨーネ病、アナプラズマ症、バベシア症、トリパノソーマ症などの他の慢性感染症などに対しても開発中の分子標的薬が応用可能か否かを検討することである。そこで今回の研究調査では、感染症学教室の今内 覚 准教授に同行し、共同研究者である Claro Mingala 博士（フィリピンカラバオセンター主

任研究員) とフィリピン国内の農場でウシから血液を採取し、この血液を材料として免疫抑制因子の発現をフローサイトメトリー法 (FACS) により解析した。さらに、免疫抑制因子に対する抗体を用いた免疫賦活化試験を行い、その効果を検討した。

尚、本調査ではフィリピン・ルソン島南部に所在する A 農場の協力を得てウシより採材を行った。FACS 解析はフィリピン大学ディリマン校 Murine Science Institute で行い、それ以外のすべての実験はフィリピンカラバオセンターにて行った。

また、今回行った調査結果をフィリピンカラバオセンターにて報告するとともに、ウシの感染症に対する分子標的薬 (キメラ抗体) を応用した新規制御法の展望についてセミナーを実施した。



図 1. 採材した A 農場のウシ



図 2. フィリピンカラバオセンター



図 3. フィリピン大学ディリマン校
Murine Science Institute

【研究調査日程】

今回の研究調査は、2013年2月21日から3月3日までの11日間で行った。

2/21 (木)	フィリピン入国、フィリピンカラバオセンター到着
2/22 (金)	フィリピンカラバオセンター 血液・血清採取 (ウシ 2 頭・スイギュウ 31 頭) 末梢血単核球の分離、細胞染色 (FACS 用)、細胞培養 (機能試験)
2/23 (土)	フィリピン大学ディリマン校 Murine Science Institute FACS 解析
2/24 (日)	A 農場 (ルソン島南部) 血液・血清採取 (ウシ 101 頭)
2/25 (月)	フィリピンカラバオセンター 末梢血単核球の分離、細胞染色 (FACS 用)、細胞培養 (機能試験)
2/26 (火)	フィリピン大学ディリマン校 Murine Science Institute FACS 解析
2/27 (水)	フィリピンカラバオセンター RNA 抽出、ヨーネ病の診断 (ELISA)
2/28 (木)	フィリピンカラバオセンター ウシ IFN- γ ELISA (機能試験)
3/1 (金)	フィリピンカラバオセンター 講演 (今回の調査結果と分子標的薬開発の展望について発表)
3/2 (土)	フィリピン出国、日本へ帰国
3/3 (日)	



図 4. 農場の獣医師との打ち合わせ
 (A 農場にて)
 (筆者は右から 2 番目)



図 5. ウシからの採血
 (A 農場にて)



図 6. FACS 解析の様子
 (フィリピン大学にて)

【研究調査結果】

1. 疫学調査

疾病名	病原体名	陽性/検体数(頭)	陽性率(%)
結核	<i>Mycobacterium bovis</i>	102 / 不明	不明
ヨーネ病	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	10 / 101	9.9
アナプラズマ病	<i>Anaplasma marginale</i>	198 / 210	94.29
バベシア症	<i>Babesia bovis</i>	111 / 210	52.86
	<i>Babesia bigemina</i>	95 / 210	45.24
トリパノソーマ症	<i>Trypanosoma evansi</i>	2 / 210	0.95

表 1. A 農場における疫学調査の結果 (2012 年 8 月および 2013 年 2 月)

表 1 に示したように、A 農場において複数の感染症が高度に蔓延していることが明らかになった。これらの疾病が生産性に影響していることは明らかであり、現在対策を協議中である。ヨーネ病については、本調査によりフィリピン国内で初めて感染牛が確認された。このことはフィリピン国内において、更なるヨーネ病サーベイランスの必要性を示しており、今後もフィリピンカラバオセンターとの継続的な共同研究調査を予定している。

2. 免疫抑制因子の発現解析および免疫賦活化試験

ウシ (感染牛および非感染牛) 103 頭、スイギュウ 31 頭から血液を採取し、末梢血単核球を分離して実験に供した。まず、免疫抑制因子 Programmed death-1 (PD-1)、Programmed death-ligand1 (PD-L1) の発現量を FACS により解析した。その結果、*M. bovis* 感染牛の CD4⁺ T 細胞において、PD-1 の発現量が増加していることが明らかになった。その他の疾病については、発現量が高い個体も認められたが、解析に供した検体数が少なく、更なる解析が必要と思われる。

更に、末梢血単核球に抗 PD-1 抗体を添加して培養した後、IFN- γ の産生量を測定し、免疫活性化効果 (治療抗体の効果) を評価した。その結果、いずれの病原体に感染したウシでも、IFN- γ の産生量が上昇する (免疫機能が活性化する) 傾向が認められた。特に *M. bovis* 感染牛については、有意に IFN- γ の産生が増加しており、本治療抗体が結核に対する制御法となりうる可能性を示唆している。

【講演の報告】

Mingala 博士のご厚意により、3/1 (金) にフィリピンカラバオセンターにおいて、”Investigation of immunoinhibitory receptors as novel therapeutic targets for multiple infectious diseases in cattle”と題して講演を行った。フィリピンカラバオセンターの職員および中央ルソン州立大学の教員と学生を対象に、今回の調査結果とウシの感染症に対する分子標的薬（キメラ抗体）開発の展望について発表した。私にとっては英語で発表する初めての機会だったので非常に緊張したが、発表後に研究内容に対するコメントや質問を数多く頂くことができた。現在開発中の分子標的薬が「非常にユニークで、制御法として大いに期待できる」という旨のコメントを頂いたときは、嬉しい気持ちと同時に自分の研究に対する使命感を感じ、身の引き締まる思いだった。英語の発表は、それ自体が良い経験となったのはもちろんのこと、自らの研究を別の視点から改めて見直すとても良い機会になった。



図 7. 研究内容について発表する筆者
(フィリピンカラバオセンターにて)



図 8. 講演後に感謝状を授与される
今内准教授(中央左)と筆者(中央右)
(左端が Mingala 博士)

【最後に】

本調査は、実験室や器具の提供、農場やフィリピン大学への協力依頼、各種申請および手続き等、共同研究者である Mingala 博士の多大なるご助力のもと実現した。また、採材や実験には、フィリピンカラバオセンター 動物衛生研究室および A 農場の皆さまにご協力を頂いた。不慣れな環境ではあったが、日本の恵まれた環境では得がたい有意義な経験をすることができ、かつ全体を通して満足いく調査を行うことができた。この場を借りて、ご協力頂いた皆さまに心から感謝申し上げたい。