

海外インターンシップ報告書

2017 年 4 月 7 日提出

氏名	西森 朝美
所属	獣医学研究科 感染症学教室
学年	博士課程 3 年
活動先名	シドニー大学獣医学部（オーストラリア・カムデン）
期間 ① （出発日―帰札日） ② （インターンシップ 実施開始日―終了日）	① 2017 年 2 月 13 日-3 月 25 日 ② 2017 年 2 月 15 日-3 月 24 日

・活動目的及びインターンシップ先を選択した理由

受け入れ先である Richard Whittington 教授らの研究チームは、ヨーネ菌 (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; MAP) 感染時における細胞・分子レベルでの免疫応答をはじめとして、感染細胞内の代謝経路、試験管内でのワクチンスクリーニング、乳製品における疫学調査など幅広い視点から研究を行っている。特筆すべき点として、同大学は大中動物（ウシ・ヒツジ等）の感染実験が可能な農場施設を用いて世界でも類を見ない大規模な感染実験を行っており、野外サンプルや疫学調査だけでは得られない詳細な知見を報告してきた。中でも、近年行われたヒツジ 70 頭以上を使用した MAP 感染実験では、ワクチンを接種してもヨーネ病を発症する群と発症しない群で宿主の応答が異なることを示し、ワクチン防御の可否を予測する早期マーカーの検索に貢献した。私は将来、家畜の伝染性疾病を対象として、現在の専門を生かした獣医学および免疫学分野の研究に進みたいと考えており、マウスなどのモデル動物のみに収まらず対象の家畜自体を用いた感染実験系に非常に興味がある。また、現在の博士課程研究ではウシを用いた臨床実験を国内施設との共同研究により行っているが、日本国内では大中動物を用いた感染実験が行える施設は少なく、そのノウハウを学べる機会が不足していると感じている。そこで、実際にウシやヒツジを使った感染実験を大規模に行っている施設を訪れ、動物の管理・取り扱いや感染実験の組み立て方について学ぶことは今後の研究において重要だと考えた。受け入れ先での指導担当として、渡航前のスケジュール調整や宿泊施設の紹介、滞在中の実験指導・ディスカッションなどを行ってくれた主任研究員の Kumudika de Silva 氏は、2015 年にアメリカのキーストーンで開催された獣医免疫に関する国際学会に出席した際に知り合った。その後、日本での担当教員である今内准教授を通して、2016 年夏にオーストラリアで開かれた国際獣医免疫学会への参加に伴い本研究チームと直接顔を合わせてのミーティングが実現した。互いの人となりがある程度知っていたこと、受け入れ先の設備をあらかじめ確認できたことはインターンシップ先を選択する上で大きなアドバンテージとなった。



図 1. 受け入れ研究室外観



図 2. Whittington 教授と



図 3. de Silva 氏ご家族と

・ 活動内容 ・ 成果

ヨーネ病は病原体が感染してから発症までの潜伏期間がとても長く、感染実験に時間を要することが知られている。特にウシでは糞便への排菌が始まるまで2年以上かかることも珍しくなく、発症までの宿主応答を時間経過で追うのは難しい。一方ヒツジの場合、ウシに比べて感受性のため感染6ヵ月後ごろから宿主の応答が観察され、1年以内に腸管で病変を呈する個体も見られる。オーストラリアでは羊毛・羊肉産業が盛んであり、ウシの病態モデルとしてだけではなく、ヒツジのヨーネ病感染応答そのものを研究することは非常に重要である。Whittington 教授および de Silva 氏らは数年前にヒツジを70頭以上用いた大規模な感染実験を行っており、現在も凍結保存したサンプルを用いて解析を継続している。経過観察にも解析にも時間を要する研究であるため、インターンシップを計画した時点では次の感染実験まで1年以上の期間があり、今回の滞在期間中は感染実験の経過を直接見ることはできなかった。そこで、本インターンシップでは(1)凍結保存サンプルを用いた宿主免疫因子の解析、(2)マクロファージ細胞株での *in vitro* 感染実験、(3)実験農場の見学および検体採取、(4)研究検討会・勉強会への参加を行った。

(1) 凍結保存サンプルを用いた宿主免疫因子の解析

過去に行われたヒツジの MAP 感染実験において、末梢血単核球 (PBMC) および腸管病変部の組織切片が凍結サンプルとして保存された。私はこれまでの研究でウシ由来の生材料を使用することが多かったため、最初に凍結サンプルの保存条件やスケール、溶解後の処理方法を学び、生材料との扱いの違いを理解した。続いて、ヒツジの末梢血中における細胞サブセットを調べるため、フローサイトメトリー法で細胞マーカーを染色し各細胞の比率を確認した。ウシとヒツジでは種差や使用する抗体の違いから細胞比率に違いが見られ、また凍結溶解後の PBMC においては細胞マーカーの発現が低下する傾向があるため、何度か検討を重ねて最適条件を模索する必要があった。最終的に、ヨーネ病の病態進行に関わると考えられる宿主免疫因子について、フローサイトメトリー法および免疫蛍光染色法を用いて、PBMC および組織切片における発現量の違いを複数個体由来のサンプルで解析した。また、抗原に対する T 細胞の増殖応答を比較するため、MAP 抗原を用いた PBMC の刺激培養を行った。

(2) マクロファージ細胞株での *in vitro* 感染実験

ヨーネ病において菌体は主に宿主のマクロファージに感染することが知られている。今回のインターンシップでは、感染実験による凍結サンプルの解析と並行して、ヨーネ病の感染・病態メカニズムの解明に応用できる *in vitro* 感染モデルの実験手順を修得した。実験に使用した細胞はウシ由来のマクロファージ細胞株であり、細胞のサイズが大きく接着性で増殖が速いのが特徴である。この細胞に MAP 生菌を加えて培養すると、細胞が菌体を貪食し感染が成立することから、細胞内における菌の代謝や感染細胞の形態・機能変化を観察する方法として適している。今回は感染後の細胞表面マーカーの発現量の変化を調べるため、プレートおよびチャンバースライドで細胞を培養し、MAP 感染後の表面抗原をフローサイトメトリー法および免疫蛍光染色法を用いて評価した。また、一般的に末梢血中にはマクロファージが含まれていないため、PBMC 由来の単球からマクロファージを分化させて *in vitro* 試験に応用する初代培養法の手順を学んだ。これはヨーネ病だけでなく他の細胞内寄生菌やウイルスの感染モデルとしても応用できることから、将来的に有用なスキルと考えている。

(3) 実験農場の見学および検体採取

滞在期間中、ヨーネ病の感染実験を直接見ることはできなかったが、ヒツジの趾間腐乱の予防ワクチンの開発のため、原因菌である *dichelobacter nodosus* の感染実験を行っていた。そこで、大中動物を用いた *in vivo* 実験に必要な動物管理や施設の運用についての知識を修得するため、実験農場を訪れヒツジの検体採取に参加した。感染実験では、15 種の組み換えタンパク質をワクチン候補として各 12 頭ずつ試験しており、合計 180 頭のヒツジから採血を行った。またちょうど試験終了の時期とも重なったため、薬物投与による安楽殺および埋却処理の見学・補助を行った。これはオーストラリアにおける実験動物処理の基準や動物福祉を学ぶ上で貴重な経験となった。

(4) 研究検討会・勉強会への参加

受入先の研究室では定期的に様々なミーティングを開いており、複数の研究グループで進捗や実験室・設備に関する情報を共有したり、グループ内で研究に関連する論文についてラフなディスカッションを行ったり、15 分程度のプレゼンを持ち回りで行い内容の評価や改善点を話し合ったりと、様々な目的に応じた話し合いを行っていた。これらのミーティングに参加するほか、論文発表のローテーションに組み込んでもらい、日本の大学の仕組みやカリキュラム、北海道大学の特色、博士課程の研究内容などを紹介した。

・今後のキャリアパスを考える上でどのようにプラスになったか。

私は将来の職として研究職を希望しており、卒業後は現在の専門を生かした獣医学および免疫学分野に進みたいと考えている。現在の対象疾病である牛白血病はウシのウイルス感染性の慢性疾患であり、日本国内で多くの発生が報告されているものの病態進行のメカニズムや白血病発症の主要因子など未だ不明なことが多い。また、通常発症には 3~8 年の期間を要すると言われてい

るが、感受性であるヒツジの感染モデルでは早期に白血病が発症するため、ヒツジを用いた感染実験が主に海外のグループで広く行われている。卒業後、家畜の伝染病を標的とした研究者としてポジションを得られた際は、ヒツジの感染実験の規模・動物管理の知識を修得できた今回の経験が大いに役立つと考えている。また印象的だったこととして、受け入れ先の研究チームの人数は大学院生を含めて 8 人と決して多くなく、就業時間も日本に比べて短いにもかかわらず、各々の役割分担をはっきりさせることで効率化を図っている点だった。施設設備や研究室の体制を学ぶことで、大規模な感染実験がどのように実現したのか肌で体感することができ、またチームとしての研究体制は今後の自身の研究において見習う点が多いと感じている。さらに、受け入れ先の研究室ではラボマネジメントに非常に力を入れており、例えばビジターとして研究に参加するためには、バイオセーフティや緊急時対応に関する 20 ページ以上の書類を読んだ上でウェブトレーニングを受講しなければならない、実際に実験を行うまで 1 週間ほどの期間が必要であった。また、コンピュータツールを用いてグループ間での試薬管理・検索を容易にしていたり、試薬の調整を細かく記録し、いつ・だれが・どのように調整したのか遡って確認できるようにしたり、過去の実験サンプルを全て保存できるよう巨大な冷蔵室・冷凍室を備えていたり、研究室の立ち上げや体制改善の参考になる事柄を数多く学べたと思う。

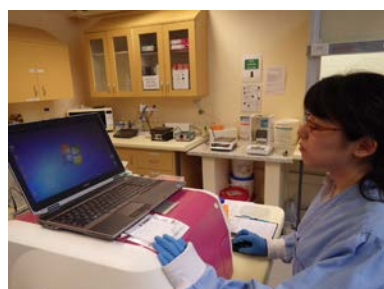


図 4. 研究室での実験風景



図 5. 実験農場での採材



図 6. 広大なフリーザー室

・後輩へのアドバイス

今回の活動では、受け入れ先の相手と顔を合わせた経験があったためにスムーズに進んだ事柄が多く、出来る限りインターンシップ前に関係を作っておくことは大切だと感じました。リーディングプログラムでは国際学会参加の旅費を補助する制度も整っているため、有効に活用できると良いと思います。実際、私が de Silva 氏と交流をもつきっかけとなったアメリカ、オーストラリアの国際学会は LP 経費を使っただけの出張でした。また、現地に赴いて初めて分かることも少なくないので、滞在期間は不足の事態に備えて少し長めに見積もっておくことを勧めます。さらに英語に関して、渡航前に出来るだけインプットの時間を作っておき、滞在中はアウトプットに集中できる環境を整えておけば、よりスキル向上に役立てただろうという思いがあり、私自身も含めて今後の反省としていきたいと思っています。

指導教員確認欄	指導教員所属・職・氏名 獣医学研究院 感染症学教室 教授 大橋 和彦 印
---------	---

- ※1 電子媒体を e-mail で国際連携推進室・リーディング大学院担当に提出するとともに、指導教員が押印した原本を国際連携推進室・リーディング大学院担当に提出して下さい。
- ※2 インターンシップ先の担当者が活動内容を証明した文書（署名入り）を提出して下さい。
- ※3 本報告書はリーディングプログラムキャリアパス支援委員会で内容を確認します。その後、教務委員会で単位認定を受けることになります。

提出先：国際連携推進室・リーディング大学院担当

内線：9545 e-mail: leading@vetmed.hokudai.ac.jp