

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20380167

研究課題名（和文） 遺伝子組み換えオオムギを用いた家畜疾病予防法（食べるワクチン）開発のための基礎研究

研究課題名（英文） Fundamental study on the development of edible vaccine for animal diseases using recombinant barley.

研究代表者

松本 安喜（YASUNOBU MATSUMOTO）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：90251420

研究成果の概要（和文）：本研究は、オオムギを用いた食べるワクチンの開発を目指し、感染防御抗原である豚回虫 As16 および毒素産生性大腸菌 fedF 抗原をコードする遺伝子を、従来のアグロバクテリウム法に加え、花粉（microspore）への遺伝子導入法によりオオムギへの導入を試みた。アグロバクテリウム法では、fedF 導入および As16 導入オオムギ各 1 個体ずつの再分化体が得られたが、PCR により染色体への導入遺伝子の組み込みは確認されなかった。花粉への遺伝子導入では、コムギでは再生体を得られたが、オオムギ花粉を用いた実験では、再生体は得られず、さらなる改善が要された。

研究成果の概要（英文）：This study was carried out to establish barley edible vaccine in which *Ascaris suum* As16 gene or enterotoxigenic *Escherichia coli* fedF gene were introduced. Microspore transformation protocol as well as standard *Agrobacterium*-based transformation method has been performed. Only one plant was regenerated from each of *Agrobacterium*-based As16 or fedF transformation, respectively, however, they were both negative for those gene integration in PCR. No plants were regenerated from gene introduced barley microspores, though plants were successfully regenerated when wheat microspores were used. Improvement in the transformation condition would be necessary.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2009 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	12,000,000	3,600,000	15,600,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：（畜産学・獣医学）・（応用獣医学）

キーワード：食べるワクチン、オオムギ、経口免疫、家畜、疾病予防法

1. 研究開始当初の背景

畜産業界における感染症対策として用いられる飼料添加物としての抗生物質投与がバンコマイシン等に対する耐性（緑膿菌）の出現の要因となること、抗生物質が残留する可能性があること、さらに、化学療法剤や抗生物質の過度の使用

により薬剤耐性病原体を出現させる可能性があることから、ワクチンの重要性が増している。産業動物では、ワクチンコストを抑えなければ、利益を生むことができなくなる。植物によるワクチン抗原の作製は、非常に低コストで大量に産生できることから注目されており、

1992年より、狂犬病ウイルス、口蹄疫ウイルス、大腸菌外毒素、コレラ毒素などのウイルスや細菌の蛋白が、タバコ、トマト、ジャガイモレタスなどの植物において作出されてきた。穀類は、可食部位である種子の水分含量が14%程度と低く、単位重量あたりの蛋白含量が6~12%程度とジャガイモの1.6%等に比べ高く、単位重量あたりのワクチン蛋白含量を高めることが期待できる。これまでに、我々は、ブタ回虫の感染防御抗原であるAs16蛋白の遺伝子をイネに導入し、コメ1グラムあたり54 μ g程度のAs16蛋白を産生させることに成功し、さらに、その組換えコメをマウスに投与することにより、ブタ回虫感染防御効果があることを示した。イネは、わが国において、遺伝子導入技術も確立され、今後も新機能開発米の確立が期待されるが、一方で、コメがトウモロコシ、コムギとともに3大穀物であることから、ヒトの食料との競合やヒトの消費のコメへの組換え米の混入の危険性を避けるため、家畜用の食べるワクチンのキャリアーとして、ヒトの消費の割合の比較的的低く、なおかつ現在家畜飼料として利用されているオオムギを用いることを考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究は、ワクチン発現媒体としてオオムギに注目し、ブタ回虫症およびブタ大腸菌症をモデルとして、組換えオオムギの種子を用いた食べるワクチンの有効性を検討することを目的とした。感染防御抗原である豚回虫As16および毒素産生性大腸菌fedF抗原をコードする遺伝子を、オオムギの種子貯蔵蛋白の一つであるホルデインD (D-Hordein, Hor3)のプロモーターの下流に組込み、オオムギの胚乳に導入遺伝子産物を蓄積するような発現ベクターを構築し、オオムギへの導入を試みた。また、粘膜免疫候補抗原を探索する過程で、新たに人獣共通感染症であるリーシュマニア症に対する感染防御抗原を認めため、それについても合わせて食べるワクチンへの応用を期待し、解析を進めた。

3. 研究の方法

①コドン改変導入遺伝子の作製

豚回虫As16遺伝子 (accession No. AB089179) は、豚型配列を鋳型とし、コムギ型に改編したプライマーを用いてPCR法によりコドン変換した。大腸菌fedF遺伝子 (accession No. Z26520) は、配列中のグアニン+シトシン (G+

C) の全塩基に対する割合を63%とし、コドン使用をオオムギ型に改変した塩基配列を設計し、コドン改変した遺伝子を、リン酸化した合成オリゴDNAをライゲーション反応により連結することにより合成した。腸粘膜表面に対する親和性を高めるため、GM1-ガングリオシドに対する結合性を有する大腸菌由来の易熱性エンテロトキシンBサブユニット (LTB) 遺伝子 (accession No. EU113242) に関しても、fedF遺伝子と同様に合成した。

②Gateway system (invitrogen)を利用したオオムギ種子貯蔵蛋白発現用ダブルカセットベクター pAM470_Hor_Sig の作製

pET61-DEST (Novagen)、pAM470を鋳型として、pET61-DESTからattR1サイト、ccdB遺伝子、attR2サイトを含む約1000bpのDNAフラグメントを、pAM470からNosターミネーターを含むDNAフラグメント約1000bpを、attRサイトが上流となるようお互いを重ねるプライマーを用いて増幅・精製した。これらをアニールさせたのち、両端のプライマーを用いてPCR法により連結・増幅し、約2000bpのバンドからDNAフラグメントを得た。次に、オオムギ、ゴールデンプロミス種のシュートからIsoplant II (Nippon Gene)を用いて抽出した染色体DNAを鋳型とし、Hordein 3プロモーター領域を、attRサイトが下流となるようお互いを重ねるプライマーを用いてPCRにより増幅・精製した。得られた増幅断片を、先に得たattR-Nosターミネーター配列とアニール後両端のプライマーを用いてPCR法により連結・増幅し、約2500bpのバンドからDNAフラグメントを得た。このHordein 3プロモーターおよびGateway配列を含む発現カセットの両端に配置した制限酵素HindIII、ScaI切断部位で切断し、ワシントン州立大学のDiter von Wettstein博士から分与頂いたダブルカセットベクターpAM470 (図1)のHindIII-ScaIフラグメントとライゲーション反応により連結し、Gateway Destination Vectorとして機能するpAM470_Hor_Sigを作製した (図2)。オオムギ遺型に遺伝子改変したLTB配列を、Gateway pDONR ZeoベクターにBP反応により挿入し、pDONRZeo-LTBを得た。As16遺伝子およびfedF遺伝子を制限酵素BamHI、SacIで切断し、pDONRZeo-LTBのLTB遺伝子の下流にコドンフレームを合わ

せて挿入した。得られた pDONRZeo-LTB_As16 および pDONRZeo-LTB_fedF を制限酵素 *ApaI* で切断後、pAM470_Hor_Sig と LR 反応させ、pAM470 ダブルカセットベクターに *Hordein 3* プロモーターを含む発現ユニットを含む pAM470_LTB_As16、pAM470_LTB_fedF を作製した。

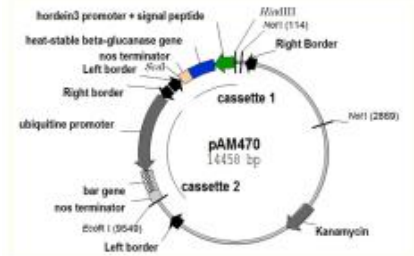


図 1. pAM470 ベクター

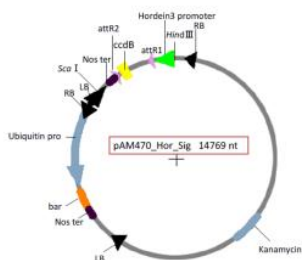


図 2. pAM470_Hor_sig ベクター

③オオムギへのアグロバクテリウム法による遺伝子導入

③-1) アグロバクテリウムおよびオオムギ：ワシントン州立大学の Diter von Wettstein 博士から分与された *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 株をカルベニシリン、アンピシリン含有固体 LB 培地上で培養し、得られたシングルコロニーを用いて、エレクトロポレーションによってプラスミドを導入し、カナマイシンでスクリーニングを行い遺伝子組換えアグロバクテリウムを作製した。遺伝子導入にはゴールドエンプロミス種のオオムギ (*Hordeum vulgare*) を材料として用いた。

③-2) 培地：遺伝子導入および再分化の方法は Harvath らの方法に準じた (図 3)。培地に用いた CIM0 (pH 5.8) はムラシゲ・スクーグの培地に 30 g/L maltose、1.0 mg/L thiamine-HCl、0.25 g/L myo-inositol、1.0 g/L casein hydrolyzate、0.69 g/L L-proline、2.5 mg/L dicamba (和光純薬)を加え、3.5 g/L phytigel (Invitrogen)で固形化して作製した。また、CIM4 は CIM0 に 5 mg/L bialaphos と 200 mg/L timentin

を添加したもの、CIMg は CIM4 に 0.1 mg/L 6-benzyl-aminopurine を添加して作製した。シュート形成培地 (pH 5.6) はムラシゲ・スクーグ培地の硝酸アンモニウムの濃度を 165 mg/L に改変した培地に 62 g/L maltose、0.4 mg/L thiamine-HCl、0.1 g/L myo-inositol、1 g/L casein hydrolyzate、0.75 g/L glutamine、1 mg/L 6-benzyl-aminopurine を添加し、3.5 g/L phytigel で固形化して作製した。RGM は CIM4 から dicamba を除いた組成である。

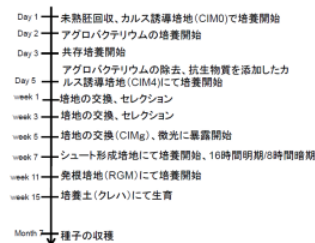


図 3. アグロバクテリウムを用いた遺伝子導入法

③-3) 遺伝子導入：未熟胚から誘導した 509 個のカルスを用いてアグロバクテリウム AGL1-LTB-As16 と共存培養を行い、803 個のカルスを用いて AGL1-LTB-fedF と共存培養を行った。また、20 個のカルスは共存培養を行わずに再分化を誘導した。共存培養を行わなかったカルスに関しては、CIM4 培地の代わりに CIM0 を使い、bialaphos と timentin を除いた組成の CIMg と SGM と RGM を用いて再分化を誘導した。

③-4) 導入遺伝子の検出：再分化して得られた植物体、および植物体まで成長しなかったカルスから染色体 DNA を抽出し、PCR によって遺伝子導入の有無を確認した。プライマーは、アグロバクテリウムにより導入される LB および RB に挟まれた領域を基に作成したものと、pAM470 の導入カセット外の領域を基に設計したものをそれぞれ使い、植物染色体に導入された遺伝子断片と、混入したアグロバクテリウムに由来する増幅断片を区別した。一部の PCR 増幅産物については、クローニング後、塩基配列を決定した。

④オオムギおよびコムギ小孢子 (microspore) への遺伝子導入 明期 24°C ± 2°C、暗期 20°C ± 2°C で、18 時間明期、6 時間暗期で温室内で栽培された Bob、Merlin、Lysiba、Meresse 種のオオムギ (*Hordeum vulgare*) およ

び Bob White、Chris 種のコムギ (*Triticum aestivum*) を用いた。小孢子への遺伝子導入法はコムギ小孢子を用いて確立されているため、陽性対照としてコムギも並行して処理した。

④-1) 小孢子の分離：第一苞穎から芒が 2 cm 程でた状態に成長したコムギを第 2 節で切り取り、第一苞穎以外の葉を全て取り除いた。これらの穂 6-10 本を、前処理として 100 mL の 0.05% 硫酸銅水溶液または 0.05% 硫酸銅 + 0.4 M マニトールに浸し、10-14 日間 4°C 暗所に放置した。葉と茎を取り除き 10% コマーシャルブリーチで 10 分間処理後、滅菌 DW で 3 回洗浄した。殺菌した穂を約 1 cm 大に切り、0.4 M マニトールで満たしたカップ内で破碎した。試料を 100 μ m メッシュで濾し、濾液を 50 μ m メッシュに乗せ、混雑物を除き、50 μ m 上のサンプルを 45 mL の 0.4 M マニトールに懸濁した。900 rpm で 5 分間遠心し上清を取り除いて 4 mL の 0.4 M マニトールに懸濁し、10 mL の 21% マルトースの上に重層し、500 rpm で 3 分間遠心した。小孢子を含む層を回収し、10 mL の 0.4 M マニトールで 2 回洗浄し、遺伝子導入に用いた。オオムギの小孢子はコムギの小孢子分離のプロトコルに準じたが、前処理に 1490 mg/L KCl、120 mg/L MgSO₄、110 mg/L CaCl₂、140 mg/L KH₂PO₄ を 0.4 M マニトールに溶解させたもの (pH 7.0) を用い、前処理に用いる穂の数を 13-15 本とした。また、50 μ m メッシュに代えて 38 μ m メッシュを用いた。

④-2) エレクトロポレーション：洗浄したマイクロスポアを 1.5 mL のエレクトロポレーションバッファー (98.1 mg/L アセトシリンゴン含有 0.4 M マニトール) に懸濁し、最終濃度 20 ng/ μ L となるようプラスミド pAM470_LTB または pAM470_LTB_As16 を添加して室温で 5 分間インキュベートした。その後、氷冷した 0.2 mm ギャップのエレクトロポレーション用キュベットに 500 μ L ずつ加え、表 1 の条件でエレクトロポレーションを行った。

④-3) カルス誘導：エレクトロポレーションを行ったサンプルを 60 x 15 mm ディッシュに移し、コムギ小孢子には 2-2.5 mL の 0.1% コルヒチン添加 NPB-99 培地を加えて、マイクロスポアの密度が 1×10^4 - 1×10^7 /mL となるようにし、同種の子房を 6-8 個加えてディッシュをパラフィルムで封じて 28°C 暗所にて共培養した。また、オオムギの小孢子にはカルス誘導培地として IMI を

用いた。

④-4) コルヒチン除去：カルス誘導開始から 5-7 日経過したサンプルを 0.4 M マニトールで洗浄してコルヒチンを除去し、3 mL の NPB-99 または IMI 培地で新しい子房 6-8 個と 28°C 暗黒条件で共培養を行った。

④-5) 再分化：約 2 mm 程に成長したカルスを 100 mm ディッシュの固体培地 1 枚につき約 20 個ずつ植え替えた。この際用いた培地は、コムギのカルスでは MMS5 培地に CuSO₄·5H₂O 5 mg/L; Ascorbic acid, 5 mg/L 加え、Phytigel (Promega) で固形化した。また、オオムギのカルスには IMR を用いた。

④-6) 再分化体の形質転換の有無の確認：再分化体の葉から CTAB 法を用いて抽出した DNA を鋳型として、導入プラスミドを基に設計したプライマーを用いて PCR 法により導入遺伝子の組み込みを確認した。

⑤ 大腸菌産生 fedF 蛋白の産生と、マウス抗血清の作製

⑤-1) fedF 蛋白の産生：上記の fedF 遺伝子の接着領域 (FedF50aa) を BamHI および SalI の制限酵素切断配列を含むプライマーで増幅し、pMAL-cRI (Invitrogen) に導入した。同様に pTrcHisB (Invitrogen)、pGEX5X3 (Amersham)、pET-19B (Novagen)、pPROEX HTa (Invitrogen) も用いたが、蛋白発現量が低い、不溶化するなどの理由により、以後は pMAL-cRI のみを用いた。pMAL-cRI からは、精製用にマルトース結合蛋白 (MBP) と fedF の融合蛋白が産生される。また、FedF の腸上皮細胞接着領域と GFP の融合タンパク質を作製するため、pIRES2-EGFP (Clontech) から PCR により増幅した EGFP 遺伝子を fedF の下流に融合したのも同時に作製した。発現ベクターを大腸菌 BL21 株に導入し、最終濃度 0.1-0.5 mM の IPTG により目的遺伝子の発現を誘導した。菌体を超音波破碎し、マルトースゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行った。透析後、試料中のタンパク質濃度をブラッドフォード法により測定した。

⑤-2) マウス抗血清の作製：埼玉実験動物から購入した ddy 雌 6 週齢マウス 13 頭を用いた。5 頭に MBP-fedF50aa 融合蛋白を、5 頭には MBP を Freund's アジュバント (FCA/FIA) とともに 3 回免疫した。残り 3 頭は、PBS をアジュバントとともに接種した。

⑤-3) マウス血清中の抗体の検出：免疫

後、各マウスから血清を得、定法により ELISA 法により抗 fedF 抗体を検出した。

4. 研究成果

①オオムギへのアグロバクテリウム法による遺伝子導入

ゴールドエンプロミスの未熟胚から誘導したカルスにアグロバクテリウム法により fedF、As16 両遺伝子を導入させた結果を表 1 に示した。アグロバクテリウム感染後、シュートを形成しなかったカルス (fedF 導入体 7 株、As16 導入体 3 株) より DNA を抽出し、PCR 法により pAM470 中の導入カセット (fedF、As16、bar の各遺伝子領域) および導入されないプラスミド領域 (塩基配列の 4000bp、6500bp、9000bp 付近の 3 か所) を基に設計したプライマーを用いて増幅した。その結果、すべてのカルスにおいて、導入遺伝子領域の増幅産物を得られた。しかしながら、ほとんどの試料からは、同時に導入カセット外のベクター配列も増幅され、カルスにアグロバクテリウムの混入が示唆された。As16 遺伝子導入カルスの 1 株で、検出限界の 200 倍の DNA を鋳型に用いてもベクター領域が増幅されない株があり、導入成功率は不明であるが、カルスへの遺伝子導入には成功していると考えられる。ピアラホスにより枯死するカルスがあること、および、bar 発現がユビキチンプロモーターでドライブされており、植物体内で発現することも、カルスへ導入された遺伝子からの除草剤耐性遺伝子発現であることを示唆している。培養土で生育した再分化体の葉から染色体 DNA を抽出し、導入遺伝子の PCR 法による検出を試みたところ、fedF 遺伝子導入オオムギでは、特異的な増幅が認められなかった。一方、As16 遺伝子導入オオムギでは、As16、bar 領域について、ともに pAM470_LTB_As16 の PCR 産物のバンドとは異なるサイズの明瞭なバンドが増幅された (図 4)。この PCR 産物の塩基配列を決定したところ、As16 プライマー増幅産物は As16 遺伝子と 44-46% の相同性しか示さず、bar プライマー増幅産物は bar 遺伝子と 43-46% の相同性しか認められなかった。そこで、BLAST サーチを行ったところ、As16 プライマー増幅産物 (740bp) はプライマー配列から 150~363bp の領域がオオムギ遺伝子配列 (accession No. AK373865) と、437~634bp の領域が先の配列と連続するオオムギ遺伝子配列とそれぞれ 97% の相同性を示した。bar プライマー増幅産物 (916bp) はプライマー配列から 15~653bp の領域がオオムギの第 5 染色体

にある DNA 配列 (accession No. AY268139) と 90% の相同性を示した。また、増幅配列の一部に pAM470_LTB_As16 のライトボーター配列と 82% のホモロジーを有する 17 塩基が含まれていたことから、As16 遺伝子導入よりオオムギ染色体に変異が入ったと考えられる。本研究で得られた、植物体へ成長しなかったカルスからは理論値とほぼ同じ通りのサイズのバンドが増幅されたことから、ほとんどの遺伝子挿入は理論通りに行われたと思われる。

本研究において、アグロバクテリウム法を用いて遺伝子導入を試みた全カルス数に対して得られた再分化植物体数の割合は 0.15% であった。一方、アグロバクテリウム未感染のカルスでは 20 個全てが再分化し、そのうち培養土に植え替えた 10 個全てが成体となった。基本的なところであるが、感染に用いたアグロバクテリウムの除去、未熟胚の採取や培養条件等に検討の余地があると思われる。

アグロバクテリウム	感染カルス数	シュート形成	シュート+根	培養土での成長
AGL1-LTB-fedF	803	16	3	1
AGL1-LTB-As16	509	6	1	1
未感染	20	20	20	-

表 1. アグロバクテリウム法によるオオムギへの遺伝子導入結果

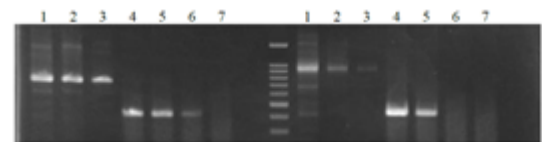


図 4. As16 遺伝子導入オオムギ染色体 DNA からの PCR 法による bar および As16 遺伝子検出
 レーン 1~3 は、As16 導入オオムギ DNA、レーン 4~6 は導入プラスミドを濃度を変えて鋳型とした。レーン 7 は野生型オオムギ DNA

②オオムギおよびコムギ小孢子への遺伝子導入

オオムギ小孢子を用いた遺伝子導入では、再分化体を得ることができなかった。コムギ小孢子を用いた遺伝子組換えサンプル場合は、Chris 種の小孢子から 5 つの再分化体を得、そのうち一つが自家受粉により結実した。これら 5 つの再分化体の葉から抽出した染色体 DNA を鋳型として PCR 法により遺伝子導入の有無を確認したところ、特異的な増幅は確認されず、形質転換体を得られなかった。オオムギの小孢子は、コムギのものより小さく (図 5)、エレクトロポレーション

ンに用いる小胞子の数、電圧や電気容量について詳細な条件検討する必要がある。また、コルヒチン処理を行う時期についても、まだ条件が確立されておらず、本研究からもシュートと根が再分化した後に行うことで植物体の生存率を上げられる可能性が示唆された。今回は pAM470 を用いたが、よりコンパクトなベクターを用いることにより導入効率上がるかもしれない。また、小胞子は pH の変化に敏感なため、初期に抗生物質などによる選択ができないが、コルヒチン処理によりホモ 2 倍体を得られることから、形質転換体を得、効率的に解析するのに大変有用な手法である。今後も条件を検討し、オオムギ小胞子からの形質転換法を確立したいと考える。



図 5. オオムギ小胞子

③大腸菌産生 fedF 蛋白の産生とマウス抗血清の作製

pMAL-cRI に fedF50aa 遺伝子および fedF50aa-EGFP 融合遺伝子を大腸菌 BL21 導入し、IPTG 添加により蛋白産生を誘導したところ、SDS-PAGE により、目的蛋白の産生および可溶化が確認された。fedF50aa-EGFP が蛍光を発することが確認できたので、ETEC が接着するとされるヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞に添加し培養したが、Caco-2 細胞への接着は観察されなかった。接着試験は、今後、豚腸上皮初代培養細胞を用いて再検討する必要があると考えられる。また、MBP-fedF を接種したマウスから、経時的に回収した血清を用いて MBP-fedF を抗原とした ELISA を行ったところ、反応性が検出された (図 6)。

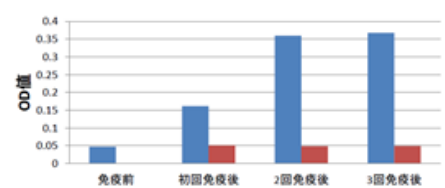


図 6. fedF50aa 免疫マウス血清を用いた ELISA の結果

fedF 抗体を用い、今後 fedF を発現する組換えオオムギの摂食 (免疫) 試験の評価に利用できるように、in vitro の接着阻止試験系を確立したい。

④リーシュマニア粘膜免疫候補抗原の解析

Leish-111f 経鼻投与した 2 週間後に、Leishmania major PM2 株を投与マウスの尾根部に接種したところ、1 回~6 回投与マウスのすべてで病変の形成が阻止された (図 7、論文①)。次に Leish-111f のペプチドライブラリーを用い、粘膜免疫マウスにおいて認識される Th1 エピトープ領域を同定した。さらにペプチドの経鼻免疫により、マウスにおいてある程度の感染防御効果を認めた。

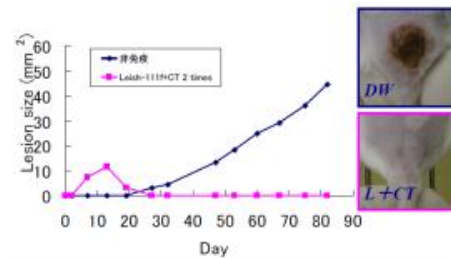


図 7. Leish-111f 経鼻免疫マウスにおける感染後病変形成阻止

⑤その他の成果

家禽ニューカッスル病への応用を考え、インドネシアにおいて、強毒内蔵型株を分離した (論文②)。また、コムギ共生パントエア菌抽出成分経口投与による免疫賦活効果を認め (文献③)、オオムギを用いた食べるワクチン経口投与時への免疫増強手段となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Sakai S, Takashima Y, Matsumoto Y, Reed SG, Hayashi Y, Matsumoto Y. Intranasal immunization with Leish-111f induces IFN-gamma production and protects mice from Leishmania major infection. Vaccine, 査読有、Vol. 28, 2010, pp. 2207-2213.
- ② Adi A. A. M, Astawa NM, Putra KS, Hayashi Y, Matsumoto Y. Isolation and Characterization of a Pathogenic Newcastle Disease Virus from a Natural Case in Indonesia. J. Vet. Med.

Sci.、査読有、Vol. 72(3): 2010. Pp. 313-319.

- ③ Hebishima T, Matsumoto Y, Soma GI, Kohchi C, Watanabe G, Taya K, Hayashi Y, Hirota Y. 2010. Immune Recovery Effects of Immunopotentiator from Pantoea agglomerans 1 (IP-PA1) on Low Antibody Productions to *Salmonella Enteritidis* Vaccine and Sheep Red Blood Cells in Dexamethasone-Treated Stressed Chicken Models. J. Vet. Med. Sci.、査読有、Vol. 72(4), 2010, pp. 435-442.

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 安喜 (YASUNOBU MATSUMOTO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：90251420

(2) 研究分担者

山川 隆 (YAMAKAWA TAKASHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：20134520

林 良博 (HAYASHI YOSHIHIRO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：90092303

(H20→H21：研究分担者)

(3) 連携研究者

辻 尚利 (TSUJI NAOTOSHI)

独立行政法人農業・食品生産技術総合研究機構・動物衛生研究所・主任研究員

研究者番号：70355171