

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658254

研究課題名(和文) ワクチン接種で誘発される鶏アミロイド症の病態解析と食鳥から人への伝播性の危害解析

研究課題名(英文) Pathological study of AA amyloidosis in vaccinated white hens and

研究代表者

石黒 直隆 (Ishiguro, Naotaka)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：00109521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：産卵系の鶏でのアミロイド症の発生は、細菌の不活化ワクチン接種により誘発される炎症刺激が原因であることが知られている。今回、多種類のワクチンが接種された発育鶏の大規模養鶏場で鶏アミロイド症を確認した。発症した鶏を病理解剖した処、アミロイドの沈着が観察された。特に、サルモネラの不活化ワクチンを接種した鶏でアミロイド症の潜在的病変が存在することを確認した。鶏群間でのアミロイド症の伝播を知る目的で、皮下および経口的に鶏由来のAAアミロイドを投与したところ、効率的にアミロイド症が鶏群間で伝播することを確認した。鶏アミロイド症はワクチン接種により誘発され、鶏群間で伝播することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Outbreaks of systemic amyloidosis in flocks of layers are known to be induced by repeated inflammatory stimulation with multiple vaccinations with oil-emulsified bacterins. Outbreaks of fatal AA amyloidosis were observed in vaccinated growing chickens in a large scale poultry farm. Amyloid deposits were observed in postmolten examination of dead hens, suggesting that vaccinations with Salmonella Enteritidis (SE) would be considered as a potential risk for the development of AA amyloidosis. To determine the transmission of chicken AA amyloidosis among white hens, we induced experimental AA amyloidosis in vaccinated chickens by intravenous or oral administration of chicken AA fibrils. Amyloid deposits were observed in chickens injected with SE and inoculated with chicken AA fibrils intravenously and orally. These results suggest that chicken AA amyloidosis can be induced by vaccinations, and may be transmitted among species.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、疾病予防・制御

キーワード：アミロイド ニワトリ ワクチン 伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、養鶏場での高病原性鳥インフルエンザの流行は、大規模養鶏場に大きな脅威を与えている。特に、鶏舎内での死亡羽数のモニタリングは、重要な検査項目である。我々は、A大規模養鶏場で、鳥インフルエンザは陰性であるのに、死亡羽数が飼育数の約2%に至る事件に遭遇した。その後、死亡鶏の病理検査の依頼を受けて、原因究明の調査を開始した。

(2) A大規模養鶏場では、90日齢の鶏にワクチンを接種したところ、20~25日で発症し、一部では死亡例もみられた。平成22年2月~23年2月の消耗率は1.1%~2.0%であった。死亡鶏を病理解剖した処、胸筋、肝臓、脾臓の肥大と腸管での出血および各種臓器にアミロイド沈着が観察されたことから、ワクチンによる鶏アミロイド症の発生ではないかと推察し、その後の実験を計画した。鶏アミロイド症は、炎症刺激などで誘発された血清マイロイドA蛋白質が、何らかの原因で構造変換し、シート構造を有するAAアミロイドとなり、組織内に沈着する全身性疾患である。

2. 研究の目的

ワクチン接種で検出された鶏アミロイド症の発症原因を明らかにする目的で実験を計画した。また、鶏アミロイド症の発生要因と食鳥衛生面でのリスクについて以下の4つの事項を解明することを目的とした。

(1) A 養鶏場の鶏ワクチン接種プログラムとアミロイド症発生の関係を解明する。

(2) ワクチン接種鶏でのアミロイド症の発生予防に向けた抗生剤投与方法を開発する。

(3) ワクチン成分内の免疫賦活化剤の中でアミロイド形成の誘因物質を同定する。

(4) 鶏アミロイドを分析し、異種動物(鳥類、哺乳類)への伝播性を明らかにする。

3. 研究の方法

A大規模養鶏場にて発生した鶏アミロイド症を忠実に再現するため、A養鶏場にて使用していたワクチンおよび接種部位に従って次の4種類の実験を行った。

(1) ワクチン接種によるアミロイド症の再現実験：鶏は数種類のワクチンを一度に接種することから、どのワクチンがアミロイド症発生に関与しているかどうかを突き止めることは極めて重要である。本実験では、最も炎症を引き起こす恐れのあるサルモネラワクチンに注目し、マイコプラズマ・ワクチンと比較した。実験に用いた鶏は、ジュリア・ライト系で生後70日目の雛を用いた。

(2) アミロイド症の発症実験、免疫賦活化剤の炎症作用と抗生剤による予防効果：アミロ

イド症を予防する目的で、抗炎症剤の効果について解析した。

(3) 鶏アミロイドの解析、鶏SAAに対する抗体の作成とアイソフォームの同定：

鶏SAAに対する特異抗体の作成：鶏SAAのアミノ酸配列の中で、エピトープの可能性のある部位を検索し、ペプチドを合成して抗原とし、マウスで抗体を作成した。

鶏AAアミロイドのアイソフォーム解析：鶏アミロイド症からアミロイドを生成しAAアミロイドを形成しているアイソフォームを二次元電気泳動で解析する。

(4) 鶏アミロイドの同種および異種動物への伝達実験：A大規模養鶏場でのアミロイド症の発症には、ワクチン接種による鶏アミロイド症の誘発と、アミロイド症を発症した鶏から他の鶏へのアミロイド症の伝播の可能性が考えられることから、本実験では、ワクチン接種後、経口的および経時的に鶏アミロイドを投与してアミロイド症の伝播実験を行った。

(5) AAアミロイドの検査：組織内でのAAアミロイドの検出法として、病理組織検査(ヘマトキシリン・エオジン染色{HE染色}、コンゴレッド染色)と特異抗体を用いた免疫組織検査、および電子顕微鏡観察によるアミロイド線維の検出を実施した。

4. 研究成果

(1) A大規模養鶏場での疫学調査：ワクチン接種とアミロイド症発症との関係を明らかにする目的でA養鶏場での疫学調査を実施した。その結果、アミロイド症の発生は、ある時期から多くなっていることが明らかになった。鶏の消耗率は2%に近い時期もあり、その時期に用いたワクチンについて詳しく調査した結果、サルモネラワクチンがアミロイド症発症に深く関与していることが示唆された。

(2) ワクチン接種によるアミロイド症の実験的な発症実験：A養鶏場で飼育されているジュリア・ライト系鶏25羽について、使用しているサルモネラワクチンを接種してアミロイド症の発症を検査した。その結果、25羽中22羽の臓器でAAアミロイドの沈着が、HE染色とコンゴレッド染色で明らかになった。最もAAアミロイドの沈着が激しかったのは、ワクチンを接種した胸筋であった、また、肝臓は6羽で、脾臓は9羽でAAアミロイドが検出された。腎臓や腸管ではAAアミロイドは検出されなかった。一方、サルモネラワクチンを接種していない5羽の鶏ではAAアミロイドの蓄積は、どの臓器にも観察されなかった。脾臓に観察されたAAアミロイドのHE染色とコンゴレッド染色を図1に示した。本実験により、サルモネラワクチン接種

によるA養鶏場でのアミロイド症の発生には、サルモネラワクチンが大きく関与していることが明らかとなった。



(3) 抗炎症剤投与によるAAアミロイド症発生の予防効果：ワクチン接種により誘起される炎症を抗炎症剤投与により軽減させることを試みたが、僅かな減少をもたらしたものの、AAアミロイド症を予防するにはいたらなかった。

(4) 鶏SAAに対するモノクローナル抗体の作成と鶏AAアミロイドのアイソフォーム解析：鶏SAAに特異的なモノクローナル抗体を作成する目的で、鶏SAAのアミノ酸配列を基に合成ペプチドSAA-1:CAHEQRRGGDPNFRFPAGLPSKYを合成し、BALB/cマウスに免疫した。免疫したマウスで抗体価の高いものが数匹観察されたので、細胞融合によりハイブリドマの作成を行った。しかし、残念ながら、高い抗体価を有するハイブリドマのクローニングには成功しなかった。従って、鶏AAアミロイドの免疫染色には、ペプチドを免疫してえたマウスのポリクローナル抗体を一次抗体として用いた。

鶏AAアイソフォーム解析：鶏SAA1に特異的なモノクローナル抗体を作成して鶏アミロイド症を誘発しているアイソフォームを同定しようとした。しかし、鶏SAA1に特異的なモノクローナル抗体ができなかったことから、鶏AAアミロイドのアイソフォームは決定できなかった。

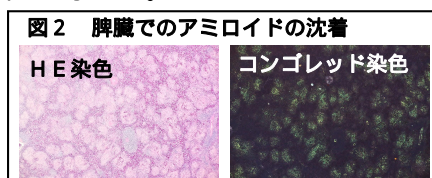
(5) 鶏アミロイド症の同種動物への伝達実験：A養鶏場で鶏アミロイド症が発生した要因には、ワクチン接種による鶏アミロイド症の誘発とその原因以外に、鶏群間でのアミロイド症の伝播が強く示唆された。そこで、アミロイド症を発症した個体が、糞便中にAAアミロイドを排泄し、鶏群間でアミロイド症が広まっていなかったかを明らかにしようとした。

実験鶏としてジュリア系、ジュリアライト系、P2系およびラインMを用いた。各系の鶏を右上の表のごとく8群に分けて実験に供した。A群とF群にはFCAとLPSを接種した。B群とG群にはa社のサルモネラワクチンを接種した。C群にはb社のサルモネラワクチンを接種した。D群とH群にはマイコプラズマワクチンを接種した。E群にはa社のサルモネラワクチンを接種した。A群、B群、C群、D群にはワクチンあるいはアジュバントを投与後、鶏AAアミロイドを腹腔内に投与した。E群には経口的に鶏AAアミロ

イドを投与した。F群、G群、H群はコントロールとして用いた。

グループ	アミロイド沈着が見られた鶏				アジュバント or ワクチン	アミロイドの投与
	Julia	J. Light	P2	Line-M		
A	0/6	0/6	0/7	0/7	FCA+LPS	
B	6/6	6/6	5/7	4/7	SE (a)	腹腔内
C	0/6	0/5	-	-	SE (b)	
D	0/6	0/6	-	-	MG	
E	5/6	3/6	-	-	SE (a)	経口
F	0/6	0/6	0/7	0/7	FCA+LPS	
G	0/6	0/6	0/7	0/7	SE (a)	なし
H	0/6	0/6	-	-	MG	

接種実験の結果を表に示した。その結果、いずれの群においてもa社のサルモネラワクチンを接種し、AAアミロイドを腹腔内あるいは経口的に接種したB群とE群でアミロイドの沈着が観察された。a社のサルモネラワクチンを接種されていてもAAアミロイドの投与がされなかったG群ではアミロイドの発症は観察されなかった。また、アジュバントあるいはb社のサルモネラワクチンやマイコプラズマワクチンを接種されたA群、C群、D群では、AAアミロイドの腹腔内投与に関わらずアミロイド症の発生はみられなかった。アミロイドが投与されなかったコントロールのF群、G群、H群ではアミロイドの沈着は見られなかった。この実験結果から、a社のサルモネラワクチンは、鶏にアミロイド症を誘発する能力が高いことが明らかとなった。また、AAアミロイドの経口投与により、腹腔内投与と同様にAAアミロイド症を発症させたことから、鶏群間において、鶏アミロイド症は経口伝播することが明らかとなった。脾臓に観察されたAAアミロイドの沈着を図2に示した。



(6) 鶏アミロイド症の異種動物への伝播実験：鶏群間でのアミロイド症の伝播は上記実験から明らかとなった。マウスなどの異種動物への伝播実験に関しては、現在、実験を進行中である。鶏群間での同種動物の伝播に比べて異種動物間での伝播は、種の壁(SAAのアミノ酸配列の違い)の影響もあり、伝達率は低いものと思われる。

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 2 件)

T. Murakami, Y. Inoshima, E. Sakamoto, H. Fukushi, H. Sakai, T. Yanai and N. Ishiguro. AA amyloidosis in vaccinated growing chickens. J. comp. Path. 査読有, 149:291-297, 2013.

DOI : org/10.1016/j.jcpa.2013.02.002

Tomoaki Murakami, Naeem Muhammad, Yasuo Inoshima, Tokuma Yanai, Masanobu Goryo

and Naotaka Ishiguro. Experimental induction and oral transmission of avian AA amyloidosis in vaccinated white hens. Amyloid, 査読有, 20:80-85, 2013. DOI:10.3109/13506129.2013.783474

〔学会発表〕(計 5件)

村上智亮、猪島康雄、酒井洋樹、福士秀人、石黒直隆、柳井徳磨、育成鶏に認められたAA アミロイド - シスの病理学的特徴、日本獣医学会、9月14日～16日、2012、岩手大学

村上智亮、猪島康雄、柳井徳磨、御領政信、石黒直隆、ニワトリを用いた実験的AA アミロイドーシスの誘発、日本獣医学会、9月14日～16日、2012、岩手大学

村上智亮、猪島康雄、石黒直隆、実験的AA アミロイドーシスの伝播、日本獣医学会、9月14日～16日、2012、岩手大学

石黒直隆、村上智亮、猪島康雄、ニワトリの肝臓における微生物汚染とアミロイド沈着、9月14日～16日、2012、岩手大学

Tomoaki Murakami, Yasuo Inoshima, Masakazu Inagaki, Eigo Sakamoto, Syouzou Sakamoto, Tokuma Yanai and Naotaka Ishiguro. Potential induction of vaccine-associated amyloid A amyloidosis in white young hens. XIII International Symposium on Amyloidosis, May, 6-10, 2012, Groningen, The Netherlands.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石黒 直隆 (ISHIGURO, Naotaka)

岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：00109521

(2) 研究分担者

柳井 徳磨 (YANAI, Tokuma)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：10242744