

## Antibody Engineering and Transgenic Technology in Chickens

ニワトリにおける抗体エンジニアリング  
とトランスジェニックテクノロジー堀内 浩幸<sup>a, b)</sup>

Hiroyuki Horiuchi

山下 裕輔<sup>a)</sup>

Yusuke Yamashita

西田 憲正<sup>b)</sup>

Kensho Nishida

古澤 修一<sup>a, b)</sup>

Shuichi Furusawa

松田 治男<sup>a, b)</sup>

Haruo Matsuda

<sup>a)</sup> 広島大学大学院生物圏科学研究科免疫生物学研究室  
東広島市鏡山1-4-4Laboratory of Immunology, Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University  
1-4-4, Kagamiyama, Higashi-hiroshima-shi, Hiroshima 739-8528, Japan<sup>b)</sup> 広島県産業科学技術研究所

東広島市鏡山3-10-32

Hiroshima Prefectural Institute of Industrial Science and Technology  
3-10-32, Kagamiyama, Higashi-hiroshima-shi, Hiroshima 739-0046, Japan

## Summary

The chicken is an ideal candidate for the efficient production of valuable bioactive proteins such as antibodies, enzymes and cytokines for a wide variety of industries and experimental laboratories. The cost of breeding animals is low, each egg contains a large amount of protein, and each hen lays many eggs per year. In addition, the phylogenetic difference between chickens and mammals allows the production of antibodies against specific epitopes of conserved mammalian proteins. In order to utilize these excellent properties, we have been advancing research into antibody engineering and transgenic technology in chickens.

We have generated numerous chicken monoclonal antibodies that recognize prion proteins (PrP) using cell fusion and phage display

techniques. We have also developed chicken-human and chicken-mouse chimeric antibodies and a simple method for humanizing a chicken monoclonal antibody. Our research into transgenic chicken technology has led us to discover that chicken leukemia inhibitory factor (LIF) is necessary for the culture of embryonic stem (ES) cells. Furthermore, the phosphorylation of STAT3 by LIF is required for the maintenance of the undifferentiated state of chicken blastodermal cells (candidate cells of chicken ES cells), as well as mouse ES cells. We have also carried out further development of chicken ES cell lines. We now aim to unite the two key technologies of antibody engineering and transgenics and would like to develop new biotechnological approaches for expanding our work with chickens.

## 1. はじめに

ニワトリはその卵に代表されるように、産業動物として極めて優れた特性をもつが、研究対象としても古くから発生生物学分野において格好の実験動物として用いられてきた。また免疫学の研究分野では、ニワトリを用いた研究が基礎免疫学の発展に大きく貢献してきたことは周知の事実である。このようにニワトリは、膨大な基礎研究成果の蓄積を提供しつつ、私たちの生活に密着した稀な生物種であるといえる。

著者らは早くから、ニワトリの持つユニークな免疫学

上の特徴に注目し、基礎から応用へ向けた研究を展開してきた。そして1989年にモノクローナル抗体の利用技術を、ニワトリでも可能とした<sup>1)</sup>。ニワトリは哺乳動物よりも進化的に下等な動物として位置づけられているが、免疫能力は精緻であり抗体産生能力においては、哺乳動物よりも優位な点さえ保持している。またこのことは、ニワトリ抗体を研究や産業に応用していく上でマウスやヒト型の抗体を凌ぐ特性を獲得することに繋がっている。さらに著者らは、ニワトリの免疫系サイトカインの研究の過程で、マウス胚性幹 (ES) 細胞の培養に必要であった白血病阻害因子 (LIF) をニワトリで発見し<sup>2)</sup>、ニワトリES細胞株の樹立に向けた研究を展開している。

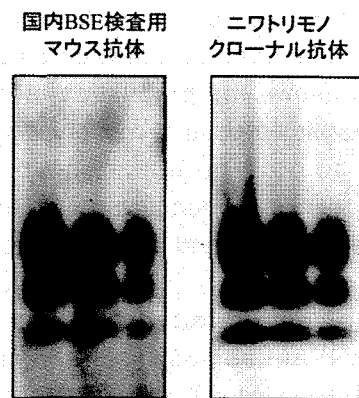
著者らは、将来ニワトリの抗体作製技術とES細胞を利用したトランスジェニック作製技術を融合させ、さらにニワトリ抗体の応用範囲を拡充させるための研究を推進している。本稿では、ニワトリ抗体の有用性から著者が有する抗体エンジニアリングの技術及びニワトリES細胞を用いたトランスジェニックテクノロジーについて、これまでの研究成果を中心に紹介したい。

## 2. ニワトリ抗体の有用性

ニワトリ抗体はIgM、IgYおよびIgAが知られているが、特にIgYは系統発生的に哺乳動物IgGとは別のクラスターに分類され、他の鳥類や両生類とともにIgYクラスターに属している。ニワトリ抗体の有用性のひとつは、ニワトリが哺乳動物と遺伝的距離が離れていることに起因している。すなわち、抗原となるタンパク質が哺乳動物間では高度に保存されている場合が多いが、このようなタンパク質もニワトリでは相同性が低い場合が多い。このようなタンパク質に対する抗体を作製する場合、哺乳動物間で抗原を免疫しても産生される抗体のバリエーションは狭められてしまう。これに対して、ニワトリを免疫動物として用いれば、産生される抗体のバリエーションの拡大が見込まれ、哺乳動物では作製できないような抗体を得ることができる可能性が高い。このニワトリ抗体の有用性を示す良い例として、ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病や牛海綿状脳症 (BSE) の原因タンパク質として知られる、プリオンタンパク質 (PrP) が挙げられる。PrPは哺乳動物間のアミノ酸の相同性において、約90%と高度に保存されたタンパク質であるが、ニワトリPrPとは40%前後の相同性に止まっている (表1)。国内のBSE検査用抗体として用いられている44B1抗体などは、マウスモノクローナル抗体であるが、これらはPrPの遺伝子を排除したノックアウトマウスを利用して作られている。もちろん野生型マウスにヒトやウシのPrPを免疫しても抗体を作製することは可能ではあるが、多種多様なエピトープを認識する抗体を作製し、その中から

用途に合わせた有用抗体を選抜したい場合には、ノックアウトマウスの利用など免疫動物の工夫が必要となる。著者らはPrPの免疫動物にニワトリを用いることで、これまでに多数種のニワトリモノクローナル抗体を作製しており<sup>3,4)</sup>、これらの中にはPrPのウエスタンブロッティング解析において、国内のBSE検査用マウスモノクローナル抗体よりもバックグラウンドが少なく、また検出感度が優れている抗体も存在していた (図1)。このように、哺乳類動物間で高度に保存された抗原に対して抗体を作製したい場合、ニワトリは格好の免疫動物となる。特に近年、ヒトの疾患モデルとして様々な変異マウスが作製されているが、このようなマウスの病態解析等にモノクローナル抗体を利用したい場合など、ニワトリモノクローナル抗体は強力なツールになると考えられる。著者のグループは、このニワトリの免疫動物としての特性とモノクローナル抗体作製技術を用いて、PrP以外にも

### A. バックグラウンドの比較



### B. 検出感度の比較

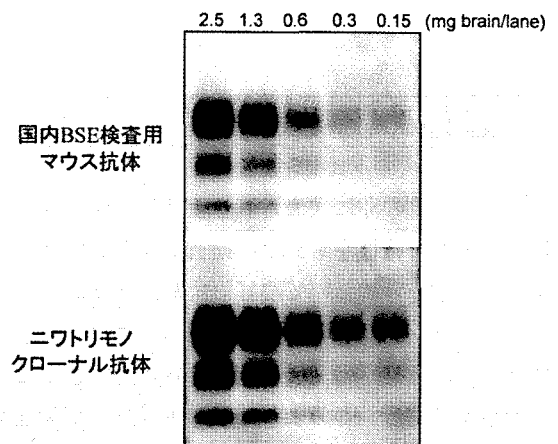


表1. 異種動物間におけるPrPの相同性 (%)

	マウス	ヒト	ウシ
ニワトリ	37.5	39.7	40.3
マウス	—	87.5	84.4
ヒト	—	—	88.0

図1. BSE脳サンプルを用いたウエスタンブロッティング解析同一サンプルを、国内BSE検査用マウス抗体とニワトリモノクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティング解析を行い、検出後のバックグラウンド (A) と検出感度 (B) を比較したもの。

様々な抗原に特異的な有用抗体群をすでに保有している。

ニワトリ抗体は、免疫動物としてのニワトリの有用性以外にも、検査抗体として優れた特性を示すのではないかと注目されている。検査抗体で重要な問題点は、抗体の非特異的反応であり、この非特異的反応が検査抗体の精度に大きく影響する。抗体を用いて免疫組織化学染色やフローサイトメトリー解析を行う場合、細胞に抗体を反応させるため細胞膜表面に存在するFc受容体が問題となる。Fc受容体は、抗体の抗原特異性とは無関係に抗体のFc部位と結合してしまい、これが非特異的反応となって現れる。しかし、ニワトリ抗体は哺乳動物細胞のFc受容体に結合しないため、抗体のFc部位による非特異反応を回避できるわけである。

その他、ニワトリ抗体は哺乳動物の補体系を活性化しないなどの特徴を有しており、今後の研究の進展次第でこれらの点もニワトリ抗体の有用性として注目されるかもしれない。

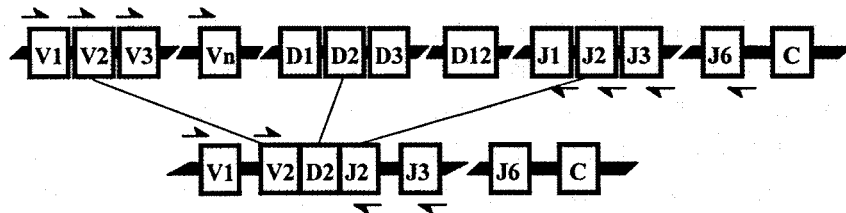
### 3. ニワトリ抗体エンジニアリングと今後の課題

ニワトリモノクローナル抗体の作製には、免疫ニワト

りから得られる脾臓リンパ球との細胞融合に使用する、チミジンキナーゼ欠失ニワトリB細胞株の樹立が大きく貢献したり。その後、このB細胞株は、さらに改良が加えられ、融合効率などが改善されている。この手法を用いることで、国内外でいくつかの有用なニワトリモノクローナル抗体が作製されてきたが、この細胞融合法の最大の欠点は、マウスの系と比較して抗体産生量が劣ることであった。マウスの場合、細胞融合法により作製した抗体産生ハイブリドーマをマウス腹腔内に移植することで高濃度のモノクローナル抗体を含む腹水が得られるが、この手法もニワトリでは確立されていない。そこで著者は、この問題点を克服するために、ニワトリの抗体産生ハイブリドーマの培養方法の改良を行うとともに、遺伝子工学的にニワトリモノクローナル抗体を作製する方法を確立した。

ニワトリ抗体は、遺伝子工学的に応用しやすい、遺伝子構造上の特徴を有する。抗体の多様性は、抗原結合部位を構成するH鎖可変部 (VH) とL鎖可変部 (VL) のアミノ酸配列に依存するが、VHとVLの構造の多様性は、これらをコードする遺伝子断片 (V、D、J) の組み合わせや、体細胞突然変異によって生み出される。マウス抗体遺伝子の場合、最初に複数種のV遺伝子と12種のD遺伝子及び6種のJ遺伝子の遺伝子再構成により機能的な抗原結合部位を構成することから、この領域をPCRで増幅し

#### A. マウス抗体遺伝子 (遺伝子再構成)



#### B. ニワトリ抗体遺伝子 (遺伝子変換)

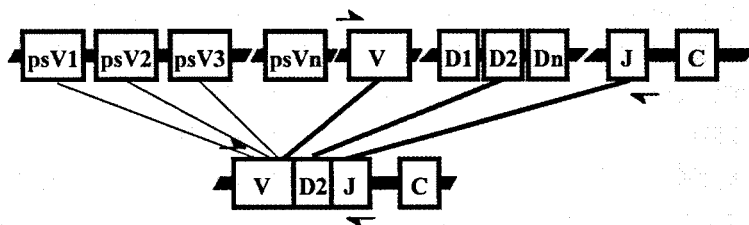


図2. マウスおよびニワトリにおける抗体の多様性獲得機構の比較

マウス抗体は遺伝子再構成 (A) によって抗体の多様性を獲得するため、目的の抗体遺伝子がどのV遺伝子とJ遺伝子を使用しているかわからない。そのため再構成したVDJ遺伝子を増幅するためには、複数種のプライマーを必要とする。ニワトリ抗体は遺伝子変換 (B) によって抗体の多様性を獲得するため、1種のV遺伝子とJ遺伝子を使用している。そのためニワトリのVDJ遺伝子を増幅するためには、基本的に1種のプライマーを準備すればよい。

組換え抗体として利用するには、複数種のプライマーセットを準備する必要がある(図2A)。これに対してニワトリ抗体遺伝子の場合、1種のV遺伝子と複数種のD遺伝子及び1種のJ遺伝子から構成され、抗体の多様性はV遺伝子の上流に複数存在する偽遺伝子(psV)の一部が、ランダムにV遺伝子内に挿入される遺伝子変換によって獲得している。すなわちニワトリの場合、基本的に抗原結合部位遺伝子の両端は1種の遺伝子であるため、この領域をPCRで増幅し組換え抗体として利用するには、1種のプライマーセットを準備するだけで良い(図2B)。著者らのこれまでの経験からも、目的のマウス抗体遺伝子をクローニングするには、かなりの苦勞を強いられたが、ニワトリ抗体遺伝子の場合、比較的容易にクローニングすることが可能であった。

まず著者らは、このニワトリ抗体遺伝子の特徴を利用し、フェージ発現型の組換え抗体の作製技術の開発に着手し、フェージ発現型抗体<sup>5)</sup>、またそこから単鎖型抗体(scFv)やFab型といった可溶性抗体の作製、さらに遺伝子組換えIgY型ニワトリモノクローナル抗体の大量生産系を構築した。最近、非免疫ニワトリの脾臓細胞からナイーブ抗体ライブラリーの作製に成功し、免疫からモノクローナル抗体作製までの期間を数ヶ月から数週間に短縮することを可能にしている。またニワトリ抗体の汎用性の拡大を計るために、抗原結合部位のみをニワトリ抗体由来にしたキメラマウス化、もしくはキメラヒト化抗体の作製も可能にしている<sup>6)</sup>。近年、抗体は単に抗原の検出や診断薬としての利用だけではなく、抗体医薬として非常に注目されている。医薬品として抗体を利用するためには人体に投与する必要がある、抗原性の面から考えてもヒト型抗体であることが望ましい。そこで著者らは、ヒト抗体遺伝子の抗原認識に必要な最小限の領域(CDR)のみをニワトリ抗体に置換する方法も、すでに構築している<sup>7)</sup>。

これまで述べてきたように、ニワトリ抗体はマウス抗体とは異なる側面で極めて有用なツールとして利用可能であり、またその技術もほぼ確立されている。しかし、ニワトリを普段活用していない人たちにとっては、ニワトリの取り扱いを含め実際のでないために、自らニワトリ抗体を作製することまで考えが至らないという実態がある。一方、抗体カタログをつぶさに眺めると如何に数多くのニワトリ抗体が市販されているかという点にも気付くであろう。今後著者らは、より有益なニワトリモノクローナル抗体の開発を進めるとともに、そのアピール

にも努めていきたいと考えている。

## 4. トランスジェニックニワトリ開発の現状

鶏卵は、高タンパク質食品として知られているように、鶏卵成分中の約13%がタンパク質である。また卵白中にはIgMやIgAが、卵黄中には高濃度のIgYが存在する。これらの抗体はすべて母親由来であり、この抗体の卵黄への移行能を利用して、産卵鶏に抗原を免疫し特異抗体を卵に蓄積させることが可能である。この現象を利用し、抗原検出用のポリクローナル抗体を鶏卵で作製したり、細菌や細菌成分に対する特異抗体が蓄積した鶏卵を機能性食品や家畜の飼料へ応用することが既に行われている。しかし、鶏卵中に移行する抗体は全てポリクローナル抗体であり、その特異性の面において個体差が生じる可能性がある。また、これらの抗体を産業へ利用するためには、抗原の大量調製と持続的な供給が必須となる。もし抗原に対して均一な特異性と高親和性を有したモノクローナル抗体を鶏卵中に蓄積できれば、鶏卵抗体の用途はさらに拡大するものと思われる。この技術を可能にするのが遺伝子組換え技術を活用したトランスジェニックニワトリの開発である。もちろん、ニワトリにおいて汎用性のあるトランスジェニック技術が開発されれば、鶏卵の高い生産性を背景に有用タンパク質生産の新産業の創出も可能であると考えられる。

1980年に世界で初めて遺伝子導入マウスの作製の成功が報告されて以来、他の動物種でも同様の技術が可能かどうか研究が進められてきた。これはニワトリでも例外ではなく、種々の方法が試行錯誤されてきた。一方、マウスを用いた実験系では1981年にES細胞株が樹立されると、単なる遺伝子導入だけではなく相同遺伝子組換えを利用したジーントラップ法が可能となり、ゲノムの狙った位置に遺伝子を導入したり、特定の遺伝子のみを削除(ノックアウト)することが可能となった。このマウスES細胞を用いたジーントラップ法は、その後の遺伝子機能解析法の主流となっている。一方、その他の動物では、1997年のヒツジを用いた体細胞クローン技術が開発され、トランスジェニック動物作製に利用されている。ニワトリでは、胚が卵黄上に位置し、また多精子受精で複数の雄性前核が存在するため1細胞期の核操作が極めて困難であり、マイクロインジェクションによる遺伝子導

入や体細胞クローン技術は成功していない。ニワトリではこれまでに、トランスジェニックニワトリの成功例として3つの方法が報告されている。ひとつ目は、精子ベクター法と呼ばれる方法で、導入したい遺伝子を精子認識抗体を介して精子に結合させ、受精時に遺伝子を導入する方法である<sup>8)</sup>。この方法を開発したBioAgri社はすでに国内外のいくつかの製薬メーカーと共同でタンパク質製薬の試験生産を始めていると聞いているが、方法論自体を疑問視する研究者も多い。2つ目は、トランスジェニックニワトリの成功例として最も知られている、ウイルスベクター法である。外来遺伝子を複製欠失のレトロウイルスに導入し、ウイルスの感染能を利用してニワトリ胚に遺伝子を導入する方法であり、緑色蛍光タンパク質であるEGFPや特異抗体を発現するトランスジェニックニワトリが作製されている<sup>9),10)</sup>。しかし、ウイルスベクターの安全性が完全に保証されていないため、食品や医薬品への応用は、まだまだハードルが高そうである。3つ目は、長年、ニワトリES細胞の開発に取り組んでいたEtchesらのグループが、培養可能にしたニワトリ始原生殖細胞にEGFPを導入し、トランスジェニックニワトリの作製に成功したと報告している<sup>11)</sup>。トランスジェニック動物を作製する際、重要なのは改変遺伝子が次世代にも反映されることであり、生殖細胞に改変遺伝子が導入されていなければならない。彼らの技術は、生殖細胞の元となる始原生殖細胞の培養を可能とし、その細胞に遺伝子導入を行っているため、この技術が成熟すれば汎用性の高いトランスジェニックニワトリの作製に道が開けると考えられる。但し、彼らの研究成果で残念なのは、培養可能な始原生殖細胞を用いているにもかかわらず、ランダムインテグレーションで遺伝子を導入していることである。トランスジェニック動物を作製するのにES細胞や培養可能になった始原生殖細胞（胚性生殖細胞；EG細胞という）を用いる最大の利点は、ジーントラップ法が可能となる点であり、彼らの手法でジーントラップ法が可能かどうか興味深い点である。以上、これまでに報告されているトランスジェニックニワトリの現状を列記したが、これらの方法は、いずれもランダムインテグレーションによる遺伝子導入のみを可能にした技術であり、ジーントラップ法が可能ならESやEG細胞株が作製されれば、一気にトランスジェニックニワトリの活用が広がるものと期待される。

## 5. ニワトリLIFの発見

ニワトリにおいて、初めてES細胞が報告されたのは1996年のPainらの論文である<sup>12)</sup>。ニワトリは哺乳動物と発生様式が異なるため、マウスや霊長類ES細胞で用いられる胚盤胞の内部細胞塊が存在しない。しかし、ニワトリでは、放卵直後の胚盤葉細胞を他の胚へ移植することで生殖系列キメラが作製できることが知られており、ES細胞の候補と考えられていた。Painらは、この胚盤葉細胞をマウスES細胞の改変培養用培地をもとに長期継代培養に成功し、また培養初期の胚盤葉細胞から生殖系列キメラニワトリの作製に成功していた。筆者らは、この論文が発表された当初からひとつの疑問を持っていた。それは彼らが使用していた培地に添加するサイトカインがすべて哺乳動物由来であった点である。著者らはニワトリ免疫系サイトカインの解析から、ニワトリと哺乳動物のサイトカインではその相同性が極めて低いことを認識していた。すなわち、ニワトリの細胞を培養するのに哺乳動物由来サイトカインでは効果がないのではないかと、ということである。この疑問を解決するために著者らは、マウスES細胞の未分化維持に必要なLIFをニワトリでクローニングした<sup>2)</sup>。その結果、著者らの予想通りニワトリと哺乳動物のLIFでは、アミノ酸レベルでの相同性が40%前後であることが判明した。またLIFによるマウスES細胞株の未分化維持には、LIFとLIF受容体の結合による細胞内情報伝達物質であるSTAT3のリン酸化が重要であるが、マウスLIFを胚盤葉細胞に作用させても胚盤葉細胞のSTAT3のリン酸化が誘導されないことも突き止めた（図3）。すなわち、PainらがES細胞の培養に使用していたマウス由来LIFは、ニワトリES細胞の未分化維持には機能していなかった可能性が高い。一方で最近、再生医療への応用へ向けた霊長類ES細胞株

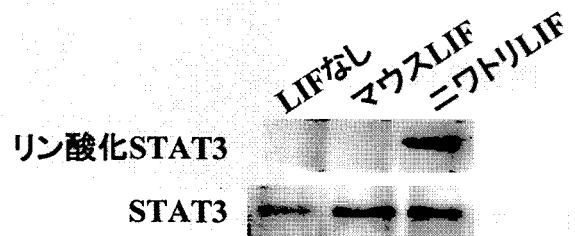


図3. LIF刺激胚盤葉細胞におけるSTAT3のリン酸化  
放卵直後の受精卵から回収した胚盤葉細胞を、マウスもしくはニワトリLIFで30分間刺激後、細胞内のリン酸化STAT3をウエスタンブロッティング法により検出したもの。リン酸化STAT3は、ニワトリLIFで刺激した胚盤葉細胞のみで検出された。

の樹立が相次いでおり、その解析が盛んに行われている。それらの研究成果によると、霊長類ES細胞は、その未分化維持にLIFは効果がないことが示されている。霊長類ES細胞にLIFを作用させるとSTAT3のリン酸化は正常に起こっているにもかかわらず、未分化維持にはその他の要因が関係しているようである。このように、LIFのES細胞に対する未分化維持活性は、動物種により異なることが考えられる。そこで著者らは、ニワトリLIFによるSTAT3のリン酸化が、胚盤葉細胞の未分化維持に重要であるかどうかを試験した。著者らは、ニワトリLIFの検出のために作製したモノクローナル抗体の中に、ニワトリLIFによるSTAT3のリン酸化を特異的に阻害する抗体が含まれていることを発見した<sup>13)</sup>。そこで、この抗体を胚盤葉細胞培養系に添加して細胞の形態を観察したところ、抗体添加群すなわちSTAT3のリン酸化を阻害することで、胚盤葉細胞の分化形態である囊胞性胚様体がLIFのみを添加したものより早く出現することがわかった。また、ニワトリLIF非添加群に阻害抗体のみを添加した胚盤葉細胞では、囊胞性胚様体がさらに早く出現す

ることもわかった (図4)。培養胚盤葉細胞のLIF mRNAの発現解析を行ったところ、培養開始1日目に強く発現していることから (図5)、どうやら培養胚盤葉細胞は培養開始直後に自らLIFを産生し、オートクラインに作用していることが強く示唆された。すなわち、胚盤葉細胞は培養開始からしばらくの間、自らが産生するLIFにより未分化状態を維持していることになる。これはPainらが培養初期の胚盤葉細胞から生殖系キメラニワトリの作製に成功していることと一致しているものと思われる。これらの研究結果は、ニワトリES細胞を未分化のまま長期に培養を続けるには、外部からニワトリLIFを継続的に供給しなければならないことを示唆している。

## 6. トランスジェニックニワトリの今後

現時点で安定的にトランスジェニックニワトリを作製する方法は、ウイルスベクター法に限られているようであるが、前述のとおりウイルスベクター法では遺伝子改変技術が遺伝子導入に限られ、また、その応用範囲も限局されてしまうことは否めない。これらの現状を打破するには、生殖細胞に分化可能で*in vitro*で安定に培養可能なESもしくはEG細胞株の樹立が必要であると考えられる。

Etchesらのグループは昨年、数種のニワトリES細胞株からヒト抗体を産生するキメラニワトリの作製に成功したと報告している<sup>14)</sup>。しかし残念ながら作製されたキメラニワトリはいずれも体細胞キメラのみで生殖系キメラ体は作製できておらず、トランスジェニック体にはなっていない。すなわち、彼らの培養系ではES細胞株が生殖細胞への分化能を保持していないことを示している。これまでの研究成果から、ニワトリES細胞の候補

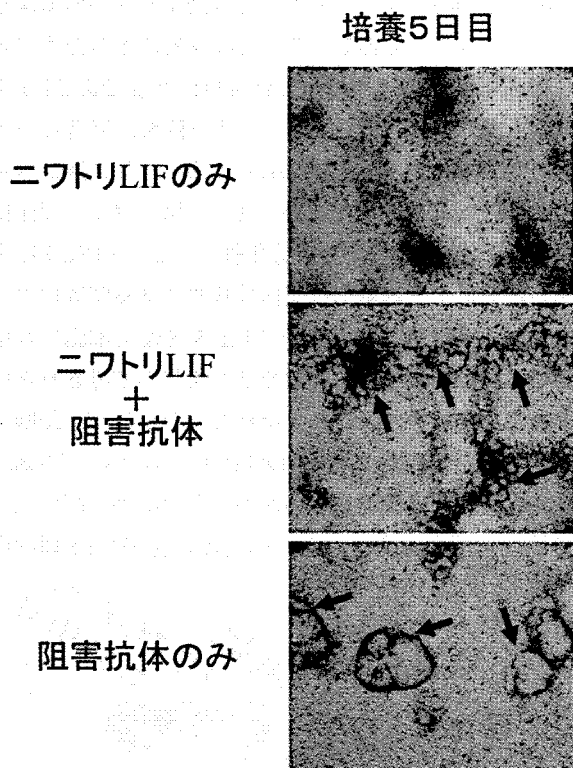


図4. ニワトリLIFやSTAT3のリン酸化阻害抗体を加えて培養した胚盤葉細胞  
ニワトリLIFやSTAT3のリン酸化阻害抗体を加えて5日間培養した胚盤葉細胞の増殖形態。阻害抗体を加えて培養したものには、胚盤葉細胞の分化形態である囊胞性胚様体 (矢印) が出現していた。囊胞性胚様体はニワトリLIFと阻害抗体を同時に加えたもので培養4日後から、阻害抗体のみを加えたものでは培養3日後から観察された。

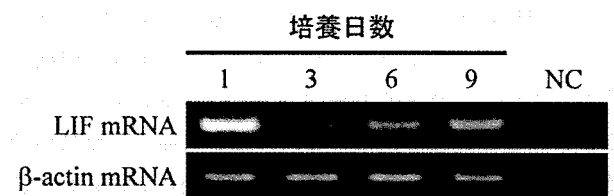


図5. 培養胚盤葉細胞を用いたLIF mRNAの発現解析  
培養胚盤葉細胞から継続的にmRNAを回収し、RT-PCRによりLIF mRNAの発現解析を行った。cDNA量は、ハウスキーピング遺伝子の1種である $\beta$ -actinの発現量をもとに均一化した。LIF mRNAは培養1日目で最も強く検出された。NCはcDNAを含まない陰性対照。

である胚盤葉細胞中には、生殖細胞への分化能を有している細胞が存在することが明らかであり、報告されたES細胞株は生殖細胞の前駆細胞が含まれていなかったのか、もしくは培養中にその分化能が消失してしまったものと思われる。彼らは著者らとは異なり、ニワトリLIFを使用しない培地で、ESもしくはEG細胞株の作出に取り組んでおり、このことが実験結果に反映されているかどうかはまだ不明であるが、著者らが培養している胚盤葉細胞と彼らが培養しているES細胞とでは、明らかに増殖形態が異なるようである。いずれにしてもマウスES細胞と同等のニワトリESやEG細胞株が作製されれば、ニワトリでもジーントラップ法が可能となり、基礎研究分野への貢献と鶏卵を用いた新規産業への応用展開が十分に期待される。著者らは現在、ニワトリLIFを用いた培地を基盤に上記要件を満たしたES細胞株の樹立に取り組んでいるところである。

本稿で紹介した筆者らの研究成果は、新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業（生物系特定産業技術研究支援センター）および知的クラスター創成事業（文部科学省）などの支援により、広島大学生物圏科学研究科免疫生物学研究室並びに広島県産業科学技術研究所松田プロジェクトで行われたものであり、関係各位に感謝の意を表すものである。

## 引用文献

- 1) S. Nishinaka, H. Matsuda and M. Murata, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **89**, 416-419 (1989).
- 2) H. Horiuchi, A. Tategaki, Y. Yamashita, H. Hisamatsu, M. Ogawa, T. Noguchi, M. Aosasa, T. Kawashima, S. Akita, N. Nishimichi, N. Mitsui, S. Furusawa and H. Matsuda, *J. Biol. Chem.*, **279**, 24514-24520 (2004).
- 3) H. Matsuda, H. Mitsuda, N. Nakamura, S. Furusawa, S. Mohri and T. Kitamoto, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **23**, 189-194 (1999).
- 4) N. Nakamura, A. Shuyama, S. Hojyo, M. Shimokawa, K. Miyamoto, T. Kawashima, M. Aosasa, H. Horiuchi, S. Furusawa and H. Matsuda, *J. Vet. Med. Sci.*, **66**, 807-814 (2004).
- 5) N. Nakamura, M. Shimokawa, K. Miyamoto, S. Hojyo, H. Horiuchi, S. Furusawa and H. Matsuda, *J. Immunol. Methods*, **280**, 157-164 (2003).
- 6) N. Nishibori, T. Shimamoto, N. Nakamura, M. Shimokawa, H. Horiuchi, S. Furusawa and H. Matsuda, *Biologicals*, **32**, 213-218 (2004).
- 7) N. Nishibori, H. Horiuchi, S. Furusawa and H. Matsuda, *Mol. Immunol.*, **43**, 632-642 (2006).
- 8) K. Chang, J. Qian, M. Jiang, YH. Liu, MC. Wu, CD. Chen, CK. Lai, HL. Lo, CT. Hsiao, L. Brown, J. Jr. Bolen, HI. Huang, PY. Ho, PY. Shih, CW. Yao, WJ. Lin, CH. Chen, FY. Wu, YJ. Lin, J. Xu and K. Wang, *BMC Biotechnol.*, **19**, 1-13 (2002).
- 9) MJ. McGrew, A. Sherman, FM. Ellard, SG. Lillico, HJ. Gilhooley, AJ. Kingsman, KA. Mitrophanous and H. Sang, *EMBO Rep.*, **5**, 728-733 (2004).
- 10) M. Kamihira, K. Ono, K. Esaka, K. Nishijima, R. Kigaku, H. Komatsu, T. Yamashita, K. Kyogoku and S. Iijima, *J. Virol.*, **79**, 10864-10874 (2005).
- 11) MC. van de Lavoie, JH. Diamond, PA. Leighton, C. Mather-Love, BS. Heyer, R. Bradshaw, A. Kerchner, LT. Hooi, TM. Gessaro, SE. Swanberg, ME. Delany and RJ. Etches, *Nature*, **441**, 766-769 (2006).
- 12) P. Pain, ME. Clark, M. Shen, H. Nakazawa, M. Sakurai, J. Samarut and RJ. Etches, *Development*, **122**, 2339-2348 (1996).
- 13) Y. Yamashita, A. Tategaki, M. Ogawa, H. Horiuchi, K. Nishida, S. Akita, H. Matsuda and S. Furusawa, *Dev. Comp. Immunol.*, **30**, 513-522 (2006).
- 14) L. Zhu, MC. van de Lavoie, J. Albanese, DO. Benhouwer, PM. Cardarelli, S. Cuisson, DF. Deng, S. Deshpande, JH. Diamond, L. Green, EL. Halk, BS. Heyer, RM. Kay, A. Kerchner, PA. Leighton, CM. Mather, SL. Morrison, ZL. Nikolov, DB. Passmore, A. Pradas-Monne, BT. Preston, VS. Rangan, M. Shi, M. Srinivasan, SG. White, P. Winters-Digiaccio, S. Wong, W. Zhou and RJ. Etches, *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1159-1169 (2005).

PROFILE

**堀内 浩幸**

広島大学大学院生物圏科学研究科  
免疫生物学研究室  
広島県産業科学技術研究所  
助手  
学術博士

1988年広島大学生物生産学部卒業、1990年同大学生物圏科学研究科修了、1992年同大学大学院生物圏科学研究科助手、現在に至る。

**山下 裕輔**

広島大学大学院生物圏科学研究科  
免疫生物学研究室  
農学修士

2003年広島大学生物生産学部卒業、2005年同大学大学院生物圏科学研究科修了、現在、同研究科博士課程後期に進学し研究中。

**西田 憲正**

広島県産業科学技術研究所  
研究員  
工学博士

1997年広島大学工学部卒業、2001年同大学大学院先端物質研究科博士課程修了、日本学術振興会特別研究員、2002年独立行政法人水産総合センター瀬戸内海区生産研究所研究員、2004年財団法人ひろしま産業振興機構広島県産業科学技術研究所研究員、現在に至る。

**古澤 修一**

広島大学大学院生物圏科学研究科  
免疫生物学研究室  
広島県産業科学技術研究所  
教授  
医学博士

1979年東邦大学理学部卒業、帝京大学医学部助手、1981年ハーバード医科大学研究助手、1985年ニューヨーク大学医学部主任研究員、1990年同客員準教授、順天堂大学医学部助手、1992年農林水産省家畜衛生試験場主任研究員、1995年広島大学生物生産学部助教授、2004年同大学大学院生物圏科学研究科教授、現在に至る。

**松田 治男**

広島大学大学院生物圏科学研究科  
免疫生物学研究室  
広島県産業科学技術研究所  
教授  
農学博士

1970年山口大学農学部卒業、1975年大阪府立大学農学研究科（獣医学）博士課程修了、1976年大阪大学微生物学研究所助手、1977年徳島大学医学部助手、1980年岡山大学医学部助手、1981年広島大学生物生産学部助教授、1994年同大学生物生産学部（現同大学大学院生物圏科学研究科）教授、現在に至る。