成績概要書（2010 年 1 月作成）

研究課題：牛へのサイトカイン経口投与が免疫応答に及ぼす効果（684691）
担当部署：畜試　基盤研究部　感染予防科
協力分担：北海道大学　人獣共通感染症リサーチセンター
予算区分：外部資金（畜産技術協会）
研究期間：2007～2008 年度（平成 19～20 年度）

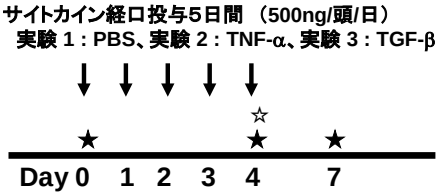
１．目的

牛の初乳中には免疫調節作用をもつ様々なサイトカインが分泌され、腸管を介してこれらのサイトカインが作用し、新生子牛の免疫系の刺激・活性化に重要な役割を果たしていると考えられている。このような免疫調節作用をもつサイトカインの作用機序を明らかにし、牛の難治性ウイルス感染症や複合感染症に対する新しい動物用医薬の素材として利用することが試みられている。本研究では、牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）持続感染をモデルとして、サイトカイン（腫瘍壊死因子；TNF-α、形質転換増殖因子；TGF-β）の経口投与が牛の免疫系に及ぼす影響と BVDV 持続感染牛に対する効果について検討した。

２．方法

試験牛；BVDV 持続感染牛２頭およびウイルス非感染牛３頭
サイトカイン投与実験計画；右図のとおり
調査項目；

1）白血球における遺伝子発現のマイクロアレイ解析（☆）
2）白血球における遺伝子発現のリアルタイム PCR 定量（★）
3）臨床症状の観察、末梢血リンパ球サブポピュレーション解析および BVDV 持続感染牛の血清・鼻腔内スワブ中 BVDV 定量（★）



TNF-α；腫瘍壊死因子、TGF-β；形質転換増殖因子

３．成果の概要

1）マイクロアレイ解析の結果、BVDV 持続感染牛の末梢血白血球ではウイルス非感染牛と比較して、抗ウイルス応答に関連する 2’,5’-オリゴアデニル酸合成酵素（OAS-1）、MX 蛋白質（MX2）遺伝子が発現亢進していた。ウイルス非感染牛および BVDV 持続感染牛ともに TGF-β経口投与により、細胞増殖・接着因子に関連した遺伝子が発現亢進し、ウイルス非感染牛では炎症応答に関与するインターロイキン（IL）-17 遺伝子の発現亢進が認められた（表１、表２）。
2）リアルタイム PCR 定量の結果、BVDV 持続感染牛における OAS-1、MX2 遺伝子発現の増加およびウイルス非感染牛への TGF-β経口投与による IL-17 遺伝子発現の増加が認められ（図１、図２）、マイクロアレイ解析データが確認された。
3）TNF-α および TGF-β経口投与による臨床症状の変化はなく、TGF-β 経口投与後に牛末梢血中のγδT 細胞が増加したが（表３）、BVDV 持続感染牛の血中および鼻腔内ウイルス量の減少は認められなかった。

これらの成績より、サイトカイン（TNF-α および TGF-β）経口投与は BVDV 持続感染牛のウイルス排泄量を減少できなかった。一方、ウイルス非感染牛においては TGF-β経口投与により IL-17 遺伝子の発現亢進と末梢血γδT 細胞数の増加が認められ、牛の感染防御能を活性化できる可能性が示唆された。

表１　BVDV 持続感染牛で発現亢進した遺伝子（マイクロアレイ解析）

遺伝子	生物学的作用	発現量の変化
Majpr histocompatibility complex	免疫応答 抗原提示	222.9
Interferon-stimulated gene 15	抗ウイルス応答	9.8
Myxovirus resistance 2 (MX2)	抗ウイルス応答	7.5
2',5'-oligoadenylate synthetase (OAS-1)	免疫応答 抗原提示	7

PBS 最終投与 4 時間後（Day4）の BVDV 持続感染牛のウイルス非感染牛に対する遺伝子発現量の変化を示した。

表２　TGF-β投与により発現亢進した遺伝子（マイクロアレイ解析）

遺伝子	生物学的作用	発現量の変化
ウイルス非感染牛		
Arachidonate 12-lipoxygenase	細胞増殖・接着	11.3
T cell receptor delta chain		9.8
Interleukin (IL)-17	炎症応答	6.5
Plasminogen	血液凝固	4
BVDV持続感染牛		
Complement factor B	自然免疫	13.9
Collagen, type XI	細胞接着	6.1
Arachidonate 12-lipoxygenase	細胞増殖・接着	4.9
Fibroblast growth factor	細胞増殖・接着	4.9

PBS 投与時に対する TGF-β最終投与 4 時間後（Day4）の遺伝子発現量の変化を示した。

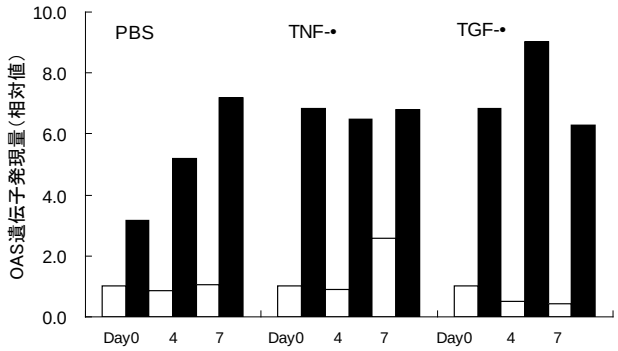


図１ サイトカイン（TNF-αおよびTGF-β）投与による OAS 遺伝子発現量の変化（リアルタイム PCR 定量）

□ウイルス非感染牛（n=3）■BVDV 持続感染牛（n=2）

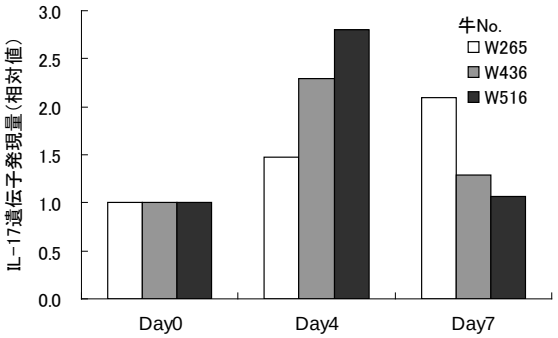


図２ TGF-β投与による IL-17 遺伝子発現量の変化（リアルタイム PCR 定量）

表３　TGF-β 投与による牛末梢血中γδ T 細胞数の変化

試験牛	牛番号	γδT 細胞数（/μl）		
		Day 0	Day 4	Day 7
ウイルス非感染牛	W265	2027	3490	2911
	W436	1640	3213	2899
	W516	1487	3089	2075
BVDV 持続感染牛	769	583	1368	1146
	772	248	524	306

用語解説

TNF-•；ウイルス感染細胞の障害、リンパ球の活性化など多くの機能をもつサイトカイン。

TGF-•；細胞の増殖・分化を制御するサイトカイン。

OAS と MX2; ウイルス感染細胞が産生するインターフェロンが誘導する抗ウイルス応答に関与する蛋白質。ウイルスの複製阻害に作用する。

IL-17；リンパ球が産生するサイトカインで、好中球が介在する炎症反応に関与する。

γδT 細胞；腸管粘膜に多く存在するリンパ球で、細胞内病原体に対する初期の免疫応答に関与する。

４．成果の活用面と留意点

TGF-β投与の成績は牛の腸管感染症に対する新たな予防治療法の研究開発に活用できる。

５．残された問題とその対応