

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：24405

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16002

研究課題名(和文)牛における自然免疫記憶機構の解明とそれを応用した革新的呼吸器病予防法の検討

研究課題名(英文)Elucidation of innate immune memory mechanism in cattle and examination of innovative respiratory disease prevention method

研究代表者

石川 真悟 (Ishikawa, Shingo)

大阪公立大学・大学院獣医学研究科 ・准教授

研究者番号：00755887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：牛呼吸器感染症の新規予防法を検討するために、気管支肺胞洗浄液(BALF)中免疫因子の解析手法を確立し、その特徴を調べた。その結果、BALF中では肺胞マクロファージによる自然免疫応答が重要であり、肺胞マクロファージ自身が機能変化することにより調節されていることが示唆された。肺胞マクロファージの機能に影響を与える因子として鼻腔粘膜ワクチン(MLV)に着目したところ、MLV自身が肺胞マクロファージの自然免疫エフェクター活性を向上させる作用があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

呼吸器感染症は畜産現場において最も大きな経済的損失を引き起こす感染症である。その制御は獣医療における重要課題であり、ワクチネーション、抗菌薬の予防的投与をはじめとした様々な予防対策が研究・実践されてきたが、減少せずむしろ増加傾向にある。我々の研究では、呼吸器における非特異的な自然免疫応答に焦点を当て、世界で初めて牛の呼吸器粘膜における免疫機構解析手法を確立し、自然免疫エフェクター機構の活性化手法を明らかにした。

本研究成果は、学術的にはもちろん、自然免疫を活用した牛呼吸器病制御という革新的な制御手法を確立するための基盤として、社会に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate new preventive methods for bovine respiratory tract infections, we established a method to analyze immune factors in bovine bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and investigated their characteristics. The results suggest that the innate immune response by alveolar macrophages is important in BALF and is regulated by functional changes in the alveolar macrophages themselves. Focusing on nasal mucosal vaccine (MLV) as a factor affecting the function of alveolar macrophages, it was suggested that MLV itself enhances the innate immune effector activity of alveolar macrophages.

研究分野：予防獣医学

キーワード：牛呼吸器病 自然免疫 肺胞マクロファージ 鼻腔粘膜ワクチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

牛の呼吸器病のコントロールは産業動物獣医療における最も重要な課題の一つであり、ワクチネーション、抗菌薬の予防的投与等様々な方法が検討されてきた。しかし、牛の呼吸器病は牛呼吸器症候群(BRDC: Bovine Respiratory Disease Complex)、Complexとも呼ばれるように、複数の病原ウイルスおよび細菌が複雑に絡み合って発症する複合病であり、特定の病原体にターゲットを絞るのが難しい。さらに、ワクチンが存在せず、開発が困難であると考えられる *Mycoplasma* 属が重症化に関わっているため、未だそのコントロールには至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、牛呼吸器における自然免疫機構を明らかにし、鼻腔粘膜ワクチンを用いて活性化することが可能かどうかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験1: ホルスタイン種子牛 (n=6) について、新生子期(15-19日齢)、幼子期(41-48日齢)として分け、気管支肺胞洗浄(BAL)により気管支肺胞洗浄液(BALF)を採取した。BALFを用いてフローサイトメトリー(FACS)を実施し、その細胞分画および表面抗原発現について解析した。さらに52-62日齢の結核なホルスタイン種子牛(n=4)から採取したBALFから肺胞マクロファージを分離し、IFN- γ により刺激培養し、その機能変化を解析した。

実験2: 30-42カ月齢の健康な黒毛和種子牛から採取したBALFから肺胞マクロファージを分離し、市販の鼻腔粘膜ワクチン(TSV[®]-3: MLV)により刺激培養し、*in vitro*におけるその機能変化を解析した。

実験3: MLVを実際に牛に投与し、投与前後でBALFを回収し、どのような免疫学的変化が*in vivo*で起こるのかを解析した。継続的な変化および詳細な機能変化について解析するための試験として、実験動物施設においてホルスタイン種子牛を投与群3頭、非投与群3頭に分けて、投与前、投与後1、3、7、14、21、28日に採材を実施した(実験施設試験)。さらに、実際の牛の飼養環境での変化を解析するために、牧場飼育牛(黒毛和種)を用いて投与群10頭、非投与群10頭に分けて、投与後14日に採材した。採材したBALFについて、免疫細胞分画およびサイトカイン濃度を解析した(農場試験)。

4. 研究成果

実験1: BALFには様々な夾雑物が含まれていたり、自家蛍光が強い免疫細胞が含まれていたりしたため、そのままFACSで細胞分画および表面抗原発現を解析するのが困難であった。そこで、死細胞染色とゲーティングを工夫することにより、細胞分画および表面抗原発現を解析する手法を確立した。その結果、基本的には健康な牛のBALF中ではほぼ100%肺胞マクロファージが占めているが、何らかの刺激によりリンパ球、好中球が浸潤してくることが明らかとなった。また、牛の肺胞マクロファージは興味深いことにマウスやヒトとは異なる特徴的な表面抗原発現パターンを示していた。具体的には、補体受容体の一種であるCD21が健康な個体では強発現している一方で、抗原提示に関わるMHC Class IIの発現がほとんど認められなかった。また、無刺激の状態でも非常に高い貪食能を有していた。この特徴を持つ肺胞マクロファージをIFN- γ で刺激培養するとCD21発現がほとんど消失し、MHC Class II発現が上昇した。mRNA発現量についても同様の変化が認められたことから、遺伝子発現量を変化させることにより調節されていると考えられた。以上から、牛のBALF中(下気道から肺胞領域)においては、肺胞マクロファージによる自然免疫応答が重要であり、肺胞マクロファージ自身が機能変化することにより調節されていることが示唆された。

実験2: BALFから分離した肺胞マクロファージを市販のMLVで刺激培養したところ、炎症に関わるサイトカインであるTNF- α 、抗ウイルス能を有するI型インターフェロンであるIFN- α 、貪食した病原体の消化能に関わるiNOSのmRNA発現量が、MLV濃度依存的に上昇した。この上昇は、UV照射により感染能を失活させたMLVでも同様に認められた。以上から、MLVの構成成分(病原体関連分子パターン)には、肺胞マクロファージの自然免疫エフェクター活性を向上させる作用があることが明らかとなった。

実験3: 実験施設試験では、投与群において投与翌日にBALF中の細胞分画が変化していた。よって、MLVは、気管支肺胞領域の免疫細胞に直接作用していることが考えられた。一方で、*in vitro*試験で確認されていた肺胞マクロファージにおけるmRNA発現量については投与群、非投与群間で有意な差は認められなかった。*in vivo*においても鼻腔粘膜生ワクチンに含まれている病原体関連分子パターンが肺胞マクロファージを刺激することにより自然免疫関連因子に変化が起こるといふ仮説を有していたが、BALを繰り返し実施したことにより、BALで使用した内視鏡による機械的刺激がおこり、ダメージ関連分子パターンが放出されてしまったのではないかと考えられた。今後は、採材手法や試験プロトコルを見直し、*in vivo*におけるMLVの影響をより詳細に解明していきたい。

農場試験の結果、投与群では非投与群と比較して投与群でIL-17A濃度が上昇していた。牛の呼吸器粘膜免疫におけるIL-17Aの役割については不明な点が多いが、ヒトやマウスで病原体排除において重要な役割を果たしていることが報告されており、今後IL-17Aの詳細な機能を明ら

かにすることで、in vivo での MLV の作用および牛の呼吸器粘膜免疫機構の解明に繋がることが期待される。

以上の研究成果から、牛の呼吸器感染症を制御するために、牛呼吸器における自然免疫機構が重要な役割を果たしていること、その自然免疫機構は MLV 等の外部刺激により調整することが可能であることが明らかとなった。今後、自然免疫の調節機構の詳細についてさらに研究を進めることによって、牛呼吸器病の革新的な予防法の開発に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shingo Ishikawa, Masataka Miyazawa, Chiho Tanaka, Ryoma Uesawa, Juri Nishizawa, Ryoko Uemura, Ikuo Kobayashi, Seiji Hobo	4. 巻 244
2. 論文標題 Interferon gamma, lipopolysaccharide, and modified-live viral vaccines stimulation alter the mRNA expression of tumor necrosis factor , inducible nitric oxide synthase, and interferon in bovine alveolar macrophages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Veterinary Immunology and Immunopathology	6. 最初と最後の頁 110378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vetimm.2021.110378.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shingo Ishikawa, Masataka Miyazawa, Yoshinori Zibiki, Rie Kamikakimoto, Seiji Hobo	4. 巻 84
2. 論文標題 Flow cytometric analysis of bronchoalveolar lavage fluid immune dynamics in calves	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 548-557
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.21-0522.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中千穂、石川真悟、宮澤昌嵩、地挽良典、古賀靖啓、津曲圭太、林淳、濱野剛久、帆保誠
2. 発表標題 3. 鼻腔粘膜ワクチン(TSV®-2)が牛の肺胞マクロファージに与える影響
3. 学会等名 第68回九州地区獣医師大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------