

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20780214  
 研究課題名（和文） 在来種家畜における抗病性因子の同定と遺伝子背景の解析  
 研究課題名（英文） Immunological and genetic analysis of disease resistant native livestock  
 研究代表者  
 今内 覚（KONNAI SATORU）  
 北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授  
 研究者番号：40396304

研究成果の概要（和文）：アフリカ大陸、アジア、南米などに生息する在来種家畜は、感染症をはじめとした疾患に対して抵抗性を示す。そこで抗病性家畜のサイトカインプロファイルならびに遺伝子多型解析を行なった。その結果、疾患抵抗性を示す家畜は TNF- $\alpha$  および IFN- $\gamma$  の発現が感受性家畜より高かった。また同遺伝子のプロモーター領域に遺伝子多型が認められ転写活性能が高いことも明らかとなった。このようなサイトカイン応答能の差が疾患感受性に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To attempt to identify immunological and genetic factors promoting the disease susceptibility in native livestock, cytokine profiles were analyzed, and then determined whether there are any polymorphisms in the cytokine genes. We found that the expression levels of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  and transcription activities of the promoter/predicted enhancer region of the genes were higher in individuals with disease resistant than in susceptible individuals. These data suggest that the findings could at least in part contribute to the disease resistance in native livestock.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：在来種家畜、抗病性、疾患感受性、遺伝子多型、サイトカイン、IFN- $\gamma$ 、原虫感染症、ウイルス感染症

## 1. 研究開始当初の背景

病気にかかりにくい、かかりやすいは環境要因とともに宿主の遺伝的要因があげられる。ヒトでは各種疾患における免疫応答性の差が人種や家系によって異なっていること

が確認されており、これらは個々の免疫応答制御遺伝子が多型に富むことが理由であるとされている。このような免疫制御因子の一つであるサイトカインは多くの疾患と密接に関係し、その発現の差によって病態の予後

を左右している。しかしながら、その発現には個体差があり疾患感受性に大きく影響を与えている。そのような背景から近年、関連遺伝子の多型解析が行なわれ多型が導く発現の個体差が感染症をはじめ癌、自己免疫疾患、移植後免疫など疾患感受性を規定する一つの因子であることが明らかとなってきた。しかし、家畜において、疾患感受性を規定する抗病性関連遺伝子や因子の同定は、ほとんど行われていなかった。

## 2. 研究の目的

アフリカ大陸、アジア、南米などに生息する在来種家畜は、感染症をはじめとした疾患に対して抵抗性を示すが、その詳細な機序は明らかではない。申請者はこれまで、在来種家畜は外来種が致死性である原虫感染症に罹患しても無症状であることを明らかにしてきたが、その詳細な機序については未だ不明な点が多かった。そこで本研究では、在来種家畜の感染症に対する詳細な防御機構を明らかにすることを目的とした。疾患感受性機序が分子生物学的に明らかになれば、未だ原因が明らかになっていない疾患の発症機序解明や抗病性家畜の開発において大きな発展をもたらすと考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) まず、家畜における種々の感染症の分子疫学調査を、日本をはじめアジア(フィリピン、中国、モンゴル)、アフリカ(ザンビア、ケニア)および南米(ペルー、ボリビア、チリ)で行った(タイレリア症、トリパノソーマ病、バベシア症、トキソプラズマ症、アナプラズマ症、ネオスポラ原虫症、牛白血病ウイルス感染症、牛ウイルス性下痢症ウイルス症)。また、これらの病原体感染家畜における免疫学的解析、すなわちサイトカイン発現プロファイル解析を行なった。

(2) 各家畜のサイトカイン定量法を樹立した後、モンゴルで土着ラクダを用いたブルセラ病ワクチン接種実験、フィリピンで土着水牛を用いた不活化口蹄疫ウイルスワクチン接種実験、ザンビアで牛のタイレリア・パルバ原虫接種実験を行ない、それぞれの家畜における免疫応答能を解析した。

(3) 異なる疾患感受性を示した家畜において、品種間のサイトカイン発現比較解析を行なうとともに、同遺伝子の多型解析を行なった。また、遺伝子多型から導かれる遺伝子発現の差を転写レベルで解析するために多型部を含むプロモーター領域をPCR法により増幅後、ルシフェラーゼアッセイ法により評価した。

(4) 節足動物媒介感染症において、吸血時の節足動物由来因子もまた宿主への病原性に関与すると考え、EST法、RACE法などで病原体伝播関連遺伝子を同定した。

## 4. 研究成果

(1) アフリカ大陸、アジア、南米などに生息する在来種家畜は、感染症をはじめとした疾患に対して抵抗性を示すが、その詳細な機序は明らかではなかった。水牛(カラバオ)はフィリピンの代表的な家畜の一つであり、外来種である Riverine 種ならびに土着種である Swamp 種が分布する。フィリピンにおいて水牛の感染症の分子疫学調査はなされておらず、どのような感染症が問題となっているかは不明である。また、Swamp 種は他種に比べ疾患抵抗性を示すといわれているが、水牛の免疫学的解析はなされておらずその詳細は不明であった。そこで本研究は、フィリピンの水牛における血液病原体の分子疫学調査ならびに Riverine 種および Swamp 種の比較免疫学的解析を目的に以下の項目について検討した。

フィリピン・ルソン島およびミンダナオ島において水牛 572 頭から血液を採取し、牛ウイルス性下痢症ウイルス(BVDV)、牛白血病ウイルス(BLV)、*Anaplasma marginale* (*A. marginale*) および *Babesia bigemina* (*B. bigemina*) について PCR 法による検出を試みた。その結果、それぞれの感染率は、BVDV は 7.5%、BLV は 21.2%、*A. marginale* は 16.8%、*B. bigemina* は 5.1%であった。フィリピンにおいて初めて BVDV が検出されたことから、その遺伝子型を解析した結果、今回検出された型は BVDV1b 型であった。また、BVDV および BLV 感染において、Riverine 種(11.0%と 33.5%)の方が Swamp 種(0.6%と 13.4%)より感染率が高かった。

免疫制御因子であるサイトカインは疾病の進行に密接に関与している。しかし、水牛のサイトカイン遺伝子は同定されていない。そこで、Swamp 種および Riverine 種などから末梢血単核球(PBMC)を分離しマイトージェン存在下で刺激培養後、mRNA を抽出し cDNA を合成した。既知の家畜サイトカイン遺伝子配列よりプライマーを設計し PCR 法およびクローニングシークエンス法によりインターロイキン(IL)-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12p35、IL-12p40、インターフェロン(IFN)- $\gamma$  および腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )の遺伝子配列を決定した。予想されるアミノ酸を水牛の品種間で比較した結果、高い相同性(98.6%~100%)が示され、また牛属の家畜にも高い相同性を示した。

次に、サイトカイン mRNA の定量法の確立を目的に、得られた水牛のサイトカイン遺伝子情報から特異的プライマーを構築し、不活

化口蹄疫(FMD)ウイルスワクチンを接種した水牛のサイトカインの推移を Real-time PCR 法により解析した。その結果、ワクチン接種後 2 週目から、Th1 サイトカイン(IL-2、IL-12p40 および IFN- $\gamma$ )の上昇が認められた。また、本法を BVDV、BLV、*A. marginale* および *B. bigemina* 感染水牛のサイトカイン発現解析にも応用し、水牛のサイトカイン定量解析に有効であることを示した。

最後に、Swamp 種および Riverine 種間のサイトカイン発現能の差について Real-time PCR 法を用いて解析した。その結果、Riverine 種に比べ Swamp 種が IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  を多く発現していた。さらに両品種の IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域の遺伝子解析を行った結果、多型が認められたことからルシフェラーゼアッセイ法による転写活性能を比較検討した。その結果、Swamp 種の同領域は Riverine 種に比べ高い IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  の転写活性能を持つことが明らかとなった。

本研究で、フィリピンの水牛が BVDV、BLV、*A. marginale* および *B. bigemina* に感染していることが明らかになった。Swamp 種および Riverine 種間のサイトカイン遺伝子同定ならびに発現解析から両品種間に IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  の発現の差があることが示された。さらに、遺伝子多型および異なる転写活性能が認められたことから、今後の品種間における疾患抵抗性解析に寄与する情報を得たと考えられた。

(2) 牛の東海岸熱(East Coast fever: ECF)は、タイレリアパルバ原虫(*Theileria parva*: *T. parva*)によって引き起こされる原虫疾患で、東および南アフリカで発生し急性で極めて致死率が高いことからアフリカ諸国で問題となっている重要疾患の一つである。その致死率は 100%にも至る。我々が開発した原虫定量法で研究調査を行った結果、アフリカに古来より生息する在来種(ザンビア在来種: サンガ種, ケニア在来種: ボラン種, ゼブー種)は *T. parva* に感染するが、ホルスタイン種(外来種)が致死性的であった原虫感染量に達しても無症状であることが明らかとなった。しかし、なぜこのような疾患感受性の極端な差が導かれるかについては明らかではなかった。そこでザンビア大学獣医学部で、ホルスタイン種を用いて感染実験を行なった。その結果、*T. parva* 感染ダニ暴露後 10 日目から原虫が検出され、原虫の増加とともに病態は悪化した。このときのサイトカイン動態をモニターした結果、IL-1 $\beta$  および IL-6 の著しい増加が認められ死に至った。このことから本症の重篤な病態には、他の悪性熱発疾患同様、炎症性サイトカイン、すなわちサイトカインストームが深く関与することが明らかとなった。し

かし、その詳細な機序については未だ不明な点が多い。現在、これまでの家畜の疾患感受性研究から導かれた、『在来種家畜は感染症に対しなぜ至適な免疫制御が可能なのか?』について現在継続解析中である。

#### 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 27 件)

① Mingala C.N., Konnai S, Ikebuchi R, Onuma M, Ohashi K. Characterization of CTLA-4, PD-1 and PD-L1 of swamp and riverine type water buffaloes. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*(査読有),2010.(in press).

② Mori A, Konnai S, Yamada S, Hidano A, Murase Y, Takano A, Kawabata H, Ito T, Onuma M, Ohashi K. Two novel Salp 15-like immunosuppressant genes from salivary glands of *Ixodes persulcatus* Schulze tick. *Insect Mol Biol.*(査読有), 2010.(in press).

③ Ikebuchi R, Konnai S, Sunden Y, Onuma M, Ohashi K. Molecular cloning and expression analysis of bovine programmed death-1. *Microbiol. Immunol.*(査読有),2010.(in press).

④ 今内 覚, 田島 誉士, 小沼 操, 大橋 和彦. <特集>増加傾向にある牛白血病の現状と対策(2) 診療・生産現場からの声に対して, 家畜診療(査読無(招待論文)),2010 年, 57 巻 4 号:1-7.

⑤ Konnai S, Mekata H, Mingala C.N., Abes N.S., Gutierrez C.A., Herrera R.V., Dargantes A.P., Witola W.H., Cruz L.C., Inoue N., Onuma M., Ohashi K. Development and application of a quantitative real-time PCR for the diagnosis of Surra in water buffaloes. *Infect. Genet. Evol.*, (査読有) 2009,9: 449-452.

⑥ Konnai S, Nakajima C, Imamura S, Yamada S, Nishikado H, Kodama M, Onuma M, Ohashi K. Suppression of cell proliferation and cytokine expression by HL-p36, a tick salivary gland-derived protein of *Haemaphysalis longicornis*. *Immunology*(査読有), 2009,126: 209-219.

⑦ Mekata H, Konnai S, Witola W.H., Inoue N., Onuma M., Ohashi K. Molecular detection of trypanosomes in cattle in South America and genetic diversity of *Trypanosoma evansi* based on expression-site-associated gene 6. *Infect. Genet. Evol.*(査読有), 2009,9: 1301-1305.

- ⑧ Yamada S, Konnai S, Imamura S, Ito T, Onuma M, Ohashi K. Cloning and characterization of *Rhipicephalus appendiculatus* voraxin  $\alpha$  and its effect as anti-tick vaccine. *Vaccine*(査読有), 2009,27: 5989-5997.
- ⑨ Yamada S, Konnai S, Imamura S, Simuunza M, Chembensofu M, Chota A, Nambota A, Onuma M, Ohashi K. PCR-based detection of blood parasites in cattle and adult *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Vet. J.*(査読有), 2009,182: 352-355.
- ⑩ Yamada S, Konnai S, Imamura S, Simuunza M, Chembensofu M, Chota A, Nambota A, Onuma M, Ohashi K. Quantitative analysis of cytokine mRNA expression and protozoan DNA load in *Theileria parva*-infected cattle. *J. Vet. Med. Sci.*(査読有), 2009,71:49-54.
- ⑪ Kano R, Konnai S, Onuma M, Ohashi K. Microarray analysis of host immune responses to Marek's disease virus infection in vaccinated chickens. *J. Vet. Med. Sci.*(査読有), . 2009,71: 603-610.
- ⑫ Kano R, Konnai S, Onuma M, Ohashi K. Cytokine profiles in chickens infected with virulent and avirulent Marek's disease viruses: interferon-gamma is a key factor in the protection of Marek's disease by vaccination. *Microbiol. Immunol.*(査読有),2009,53: 224-232.
- ⑬ Imamura S, Vaz I. da S, Konnai S, Yamada S, Nakajima C, Onuma M, Ohashi K. Effect of vaccination with a recombinant metalloprotease from *Haemaphysalis longicornis*. *Ex.App.Acarol.*(査読有), 2009,48: 345-358.
- ⑭ Logullo C, Witola W.H, Andrade C, Abreu L, Gomes, J. Vaz I. da S, Imamura S, Konnai S, Ohashi K. Onuma M. Expression and activity of glycogen synthase kinase during vitellogenesis and embryogenesis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol.*(査読有), 2009,161: 261-269.
- ⑮ Mingala C.N, Konnai S, Tajima M, Onuma M, Ohashi K. Classification of new BVDV isolates from Philippine water buffalo using the viral E2 region. *J. Basic Microb.* (査読有), 2009,49: 495-500.
- ⑯ Mingala C.N, Konnai S, Cruz L.C, Onuma M, Ohashi K. Comparative moleculo-immunological analysis of swamp and riverine type water buffaloes responses. *Cytokine*(査読有), 2009,46: 273-282.
- ⑰ Mingala C.N, Konnai S, Venturina Fe A, Onuma M, Ohashi K. Quantification of water buffalo (*Bubalus bubalis*) cytokine expression in response to inactivated foot-and-mouth disease (FMD) vaccine, *Res. Vet. Sci.*(査読有).2009,87:213-217.
- ⑱ Saito Y, Konnai S, Yamada S, Imamura S, Nishikado H, Ito T, Onuma M, Ohashi K. Identification and characterization of antimicrobial peptide, defensin, in the taiga tick, *Ixodes persulcatus*. *Insect Mol Biol.*(査読有),2009,18:531-539.
- ⑲ 今内 覚, 田島 誉士, 小沼 操, 大橋 和彦. <総説>牛白血病ウイルス感染症の現状と対策 -清浄化の道、まずは新たな感染を防ぐことから-, 北海道獣医師会雑誌(査読無(招待論文)),2009年, 53巻9号:529-534.
- ⑳ Konnai S, Mingala C.N, Sato M, Abes N.S, Venturina F. A, Gutierrez C.A, Sano T, Omata Y, Cruz L.C, Onuma M, Ohashi K. A survey of abortifacient infectious agents in livestock in Luzon, the Philippines, with emphasis on the situation in a cattle herd with abortion problems. *Acta Trop.*(査読有), 2008,105: 269-273.
- ㉑ Konnai S, Mekata H, Odbleg R, Simmunza M, Chembensof M. Witra W.H, Tembo M.E, Chitanbo H, Inoue N, Onuma M, Ohashi K. Detection of *Trypanosoma brucei* in field-captured tsetse flies and identification of host species fed on by the infected flies. *Vector Borne Zoonotic Dis.*(査読有),2008,8: 565-574.
- ㉒ Konnai S, Saito Y, Nishikado H, Yamada S, Imamura S, Mori A, Ito T, Onuma M, Ohashi K. Establishment of a laboratory colony of taiga tick *Ixodes persulcatus* for tick-borne pathogen transmission studies. *Jpn. J. Vet. Res.*(査読有),2008,55: 85-92.
- ㉓ Murao T, Omata Y, Kano R, Murata S, Okada T, Konnai S, Asakawa M, Ohashi K, Onuma M. Serological survey of *Toxoplasma gondii* in wild waterfowl in Chukotka, Kamchatka, Russia and Hokkaido, Japan. *J. Parasitol.*(査読有), 2008,94:830-803.
- ㉔ Mekata H, Konnai S, Simmunza M, Chembensof M, Kano R, Witra W.H, Tembo M.E, Chitanbo H, Inoue N, Onuma M, Ohashi K. Prevalence and Source of Trypanosome Infections

in Field-Captured Vector Flies (*Glossina pallidipes*) in Southeastern Zambia. J. Vet. Med. Sci.(査読有),2008,70:923-928.

▮ Yamada S, Ito Y, Imamura S, Konnai S, Ito T, Onuma M, Ohashi K. *Rhipicephalus appendiculatus*: characterization of a testis-associated protein. Exp. Parasitol. (査読有),2008,120: 337-342.

▮ Odbileg R, Purevtseren B, Gantsetseg D, Boldbaatar B, Buyannemekh T, Erdenebaatar J. Konnai S, Onuma M, Ohashi K. Cytokine Responses in Camels (*Camelus bactrianus*) Vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 Vaccine. J. Vet. Med. Sci.(査読有), 2008,70: 197-201.

▮ Imamura S, Konnai S, Vaz I da S, Yamada S, Nakajima C, Ito Y, Tajima T, Yasuda J, Simuunza M, Onuma M, Ohashi K, Effects of anti-tick cocktail vaccine against *Rhipicephalus appendiculatus*. Jpn J Vet Res.(査読有), 2008,56:85-98.

[学会発表] (計 15 件)

① 今内 覚, 新規動物用ワクチンならびに新規治療法の開発, 日本生物科学研究所第二研究会講演会(招待講演),2010年3月29日、(日本生物科学研究所・青梅市)

② 今内 覚, 新規動物用ワクチンならびに新規治療法の開発, 動物用ワクチンパイオ医薬研究会改組設立記念シンポジウム(招待講演), 2010年3月25日、(日本獣医生命科学大学・武蔵野市)

③ 今内 覚, 牛の難治性疾病に対する新規ワクチン戦略, 平成21年度日本獣医師会学会年次大会・特別企画 (招待講演)2010年1月29日、(ワールドコンベンションセンターサミット・宮崎市)

④ 柿沼清市, BLV 感染経産牛群と未感染経産牛群における白血球サブポピュレーションの比較, 平成21年度日本獣医師会学会年次大会, 2010年1月29日、(ワールドコンベンションセンターサミット・宮崎市)

⑤ 大塚浩通, 分娩時における牛白血病ウイルス感染乳牛の末梢および乳汁白血球サブポピュレーション, 平成21年度日本獣医師会学会年次大会, 2010年1月29日、(ワールドコンベンションセンターサミット・宮崎市)

⑥ 今内 覚, 牛難治性慢性感染症における免

疫疲弊化機序の解明と免疫賦活法の試み, 第4回日本家畜臨床感染症研究会総会・学術集会(招待講演),2009年12月11日、(酪農学園大学・江別市)

⑦ 今内 覚, 牛白血病ウイルス感染症の現状と対策, 北海道獣医師会根室支部大動物臨床部会講演会(招待講演),2009年11月20日、(共済センター・中標津町)

⑧ 今内 覚, シュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) におけるライム病ボレリア伝播関連遺伝子の同定, 第148回日本獣医学会学術集会, 2009年9月25日、(とりぎんセンター・鳥取市)

⑨ 池淵 良洋, ウシ PD-1/PD-L1 の同定と牛白血病ウイルス感染ウシにおける発現解析, 第148回日本獣医学会学術集会, 2009年9月25日、(とりぎんセンター・鳥取市)

⑩ 肥田野 新, シュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) 由来 Salp16 様遺伝子の同定および発現解析, 第148回日本獣医学会学術集会, 2009年9月25日、(とりぎんセンター・鳥取市)

⑪ 今内 覚, 牛白血病ウイルス(BLV)感染症対策, 第60回北海道獣医師大会産業動物獣医学会シンポジウム (招待講演)2009年9月4日、(北海道大学・札幌市)

⑫ 今内 覚, *Theileria parva* 感染牛に認められた炎症性サイトカインストーム, 第146回日本獣医学会学術集会, 2008年9月24日、(ワールドコンベンションセンターサミット・宮崎市)

⑬ 目堅 博久, ペルー共和国およびボリビア共和国における牛トリパノソーマ病の分子疫学調査, 第146回日本獣医学会学術集会, 2008年9月24日、(ワールドコンベンションセンターサミット・宮崎市)

⑭ 森 亜紀奈, シュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) 唾液腺由来免疫抑制因子の同定および発現解析, 第146回日本獣医学会学術集会, 2008年9月24日、(ワールドコンベンションセンターサミット・宮崎市)

⑮ Mingala C.N., Immuno-molecular analysis of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  of swamp and riverine type water buffaloes, 第146回日本獣医学会学術集会, 2008年9月24日、(ワールドコンベンションセンターサミット・宮崎市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

今内 覚 (KONNAI SATORU)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授  
研究者番号：40396304

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし