

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23880004

研究課題名（和文） マイコプラズマ高抗病性種豚の免疫調節作用の解明

研究課題名（英文） Elucidation of immunological mechanisms in swine selected for resistance to Mycoplasmal pneumonia

研究代表者

島津 朋之 (SHIMAZU TOMOYUKI)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：20616437

研究成果の概要（和文）：ブタマイコプラズマ性肺炎（MPS）を選抜形質として造成した MPS 抗病性選抜ブタの免疫特性について解析を行った。末梢血単核球の微生物成分に対する反応性は MPS 抗病性ブタの方が低く、また、in vivo における MPS ワクチンに対する反応性も MPS 抗病性ブタのリンパ球反応性が弱い可能性が示唆された。その一方、サイトカインに関しては抗病性豚においてワクチン接種後 IFN-g の高発現が認められた。これらの特徴が MPS 病変の減少に重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The immunophenotype of a novel swine line genetically selected to reduce the incidence of pulmonary lesions caused by MPS was analyzed in this study. The reactivity of peripheral blood mononuclear cells stimulated with bacteria-associated component was lower in MPS selected animal rather than conventional pigs, and the reactivity of lymphocyte to MPS vaccine sensitization in vivo was also lower in the MPS selected pigs. Meanwhile, the induction of IFN-g was higher in MPS selected pigs after vaccine sensitization. These immunological characteristics are considered to be important for the reduction of MPS lesions

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2011 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2012 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用動物科学

キーワード：抗病性、ブタ、免疫

1. 研究開始当初の背景

ブタ呼吸器慢性疾病であるマイコプラズマ性肺炎（MPS）はマイコプラズマハイオニューモニエによって引き起こされる疾患である。MPS の感染率は非常に高く、罹患による内臓廃棄、発育遅延による飼料代の加算コス

ト、投薬治療費による経済的被害は甚大なものであり養豚農家に大きな負担となっている。さらに、近年の安全・安心に対する関心増大による抗菌性添加剤使用禁止の動きから被害増加が予想されている。現状の対応策としてはワクチネーションなどが挙げられ一定以上の効果を見せているが、感染率自体

は高い状態を維持しており新たな対策が必要となっていた。

これまでに「マイコプラズマ性肺炎病変を選抜形質とした5世代のランドレース種系統造成試験」から、マイコプラズマに対する抗病性を遺伝的に高めた豚集団の造成を完了している。これらのブタに関する基礎的な免疫学的特徴解析から、病変の減少に伴い顆粒球・リンパ球比率や食能などの自然免疫能や細胞性免疫能が高まり、液性免疫能である特異的抗体産生能が抑制されることが明らかとなっており、選抜にともない免疫学的特性が変化していることが示唆されている。これらの変化がMPS病変の減少に何らかの影響を与えていると考えられるが、この抗病性選抜ブタの免疫能の変化に焦点をあてた研究は行われておらず、抗病性育種の基礎的知見を深める意味において免疫学的な詳細を明らかにする必要があった。

2. 研究の目的

本研究では、本抗病性育種豚の詳細な免疫調節機構を明らかにし抗病性の原因となる変化を解明する。それにより、疾病抵抗性に優れた免疫指標の開発など安全・安心に配慮した革新的抗病性育種システムの基礎を築くことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 定常時における抗病性ブタの血中免疫細胞構成比を明らかにするため、B細胞、T細胞、顆粒球、単球、NK細胞などの血中存在比を解析した。

(2) ザイモサンを用いて、定常時血液の食能活性を測定した。

(3) 定常時の血液よりリンパ球を分離・培養し、マイコプラズマハイオニューモニエ菌体や、微生物成分を認識することが知られているパターン認識受容体 (Toll-like receptor (TLR)) に対するリガンド刺激による免疫応答を解析した。また、TLRの発現解析を行った。

(4) 上記分離細胞のリンパ球幼若化活性について解析した。

(5) MPSワクチン接種後の免疫応答の違いについて明らかにするため、供試豚(各12頭×2群)より継時的に採血を行い(ワクチン二次接種日を0日とし、-14, -7, 0, 2, 7, 14日の計6回)、-7と0日において、採血後にMPSワクチンを異物として接種した。得られた血液に関して、上記1~4と同様の解析を行った。また、血清を採取し、血中の液性免疫刺激因子であるサイトカインの産生量の変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 定常状態におけるマイコプラズマ性肺

炎抗病性豚と対照豚の免疫能の比較を行った。その結果、ミエロイド細胞、T細胞、B細胞、NK細胞の血中存在比に系統間の違いがない、また、細胞増殖試験において、マイコプラズマ刺激における対照豚の増殖能が若干低い傾向を示したものの(p=0.08)、リポポリサッカライド(LPS)やコンカナバリンA(ConA)刺激区に系統間に違いがないことが明らかとなった。さらに、ザイモサンを用いた食能活性試験にも系統間に違いが認められず、骨髄の細胞分布にも違いが認められなかった。一方、末梢血単核球を微生物成分を認識する受容体(TLR)のリガンド(FSL-1; TLR2, 6複合体のリガンド, LPS; TLR4のリガンド)やマイコプラズマ菌体で刺激し、刺激後のサイトカイン発現量を系統間において比較したところ、IL-1b, TNF α , IFN γ , TGF β の発現量には系統間に違いが認められなかったが、IL-10の発現量は抗病性豚において有意に高い(FSL-1, LPS刺激区)ことが明らかとなった(図1)。

マイコプラズマハイオニューモニエ菌体を

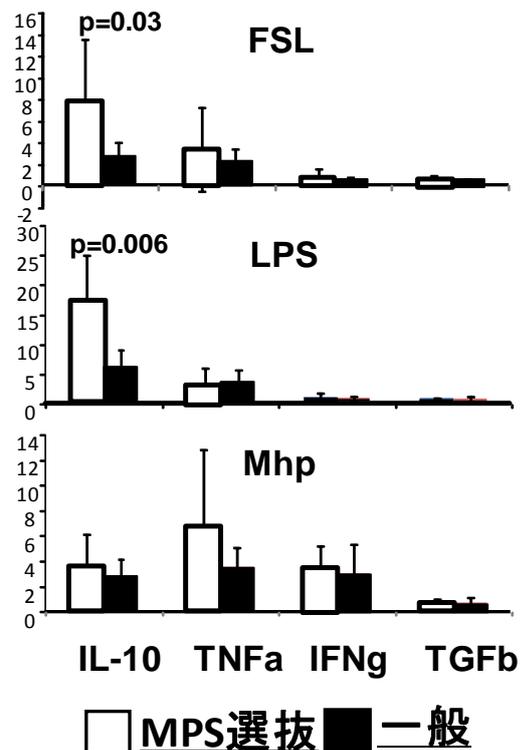


図1 血液リンパ球の微生物成分認識受容体リガンドに対する免疫応答性

認識する受容体としてはTLR2とTLR6の発現が報告されている。また、LPSに対する反応性も系統間に違いが認められたことから、これら受容体についての解析を行ったが、これらのレセプターのmRNA発現量には違いが認められなかった。このことから初期応答に重要な微生物成分パターン認識受容体発現量

の多寡は抗病性に関連していないと考えられる。

(2) *in vivo* における MPS に対する反応性を明らかとするため、マイコプラズマハイオニューモニエ菌体を含む MPS ワクチンを使用し、マイコプラズマ抗病性ブタのマイコプラズマ抗原に対する免疫応答について検討した。食食能に関しては MPS ワクチン接種後の増加割合が MPS 抗病性ブタにおいて高くなる傾向が認められたが、一般対照ランドレースとの間に有意差は認められなかった。免疫担当細胞種については T 細胞, B 細胞, ミエロイド細胞を解析し, T 細胞については更に細分化した分析を行い, ヘルパー T 細胞, 細胞障害性 T 細胞, 制御性 T 細胞の細胞割合を解析した。その結果, MPS ワクチン接種後, 一般ランドレース種において B 細胞割合が有意に増加し (図 2A), ミエロイド細胞割合は有意に減少することが明らかとなった (図 2B)。一方, MPS 抗病性ブタにおいては 2 日から 7 日目においてミエロイド細胞割合が有意に増加した (図 2B)。また, T 細胞全体の割合としては系統間に違いが認められなかったが (図 2C), ヘルパー T 細胞においては系統間に違いが認められ, 一般対照ブタにおいてはワクチン接種 7 日目に細胞数が増加したが, MPS 抗病性ブタにおいては細胞数に変化が認められなかった (図 2D)。一方, 細胞障害性 T 細胞と制御性 T 細胞には系統間の差は認められなかった。

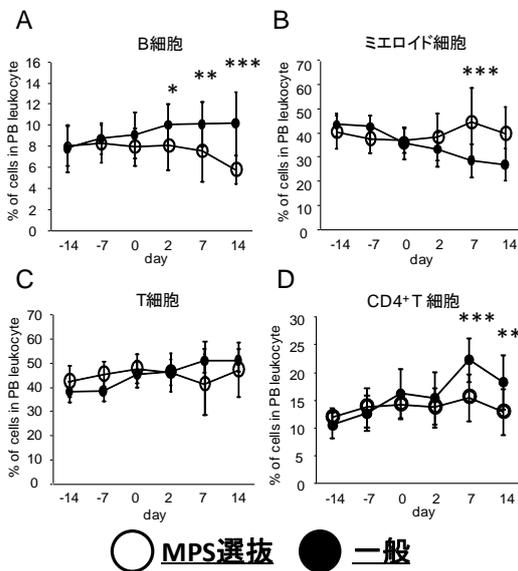


図2 ワクチン接種後 (-7 と 0 日) の血中細胞割合の変化

さらに, 血液細胞を用いた幼若化反応において有意差が認められた。ワクチン接種後の血液細胞を採取し *in vitro* においてマイコ

プラズマ菌体, LPS, ConA で刺激したところ, ワクチン接種後の細胞において系統間に有意差が認められ (図 3), LPS, ConA 刺激区において MPS 病変選抜ランドレース種の幼若化反応が一般ランドレース種に比べ低いということが明らかとなった (図 3)。また, 定常時における幼若化反応とワクチン接種後の幼若化反応の相対的な比較から LPS と ConA だけではなく, マイコプラズマ菌体に対しても反応性が弱いことが明らかとなった。

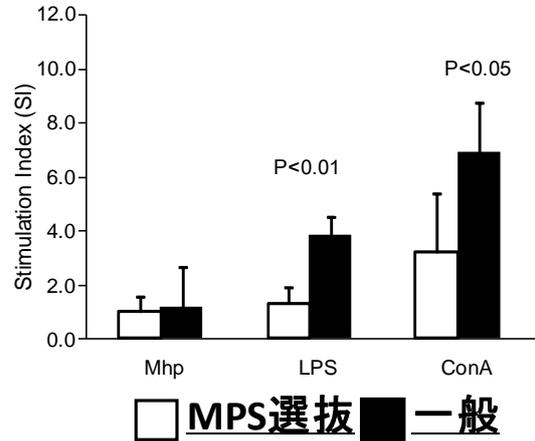


図3 ワクチン接種後の末梢血単核球細胞幼若化活性 (Mhp; マイコプラズマハイオニューモニエ菌体)

免疫的な変化をもたらす要因となりうる活性因子として免疫調節因子であるサイトカインがある。解析の結果, TNF- α , IL-13, IL-17 などのサイトカイン産生量には差が認められなかったが, IFN- γ の産生量がワクチン接種 14 日目に選抜豚が一般豚に比べ有意に高い値を示すことが明らかとなり, 有意差は認められなかったが IL-10 においても同様な結果が得られた (図 4)。

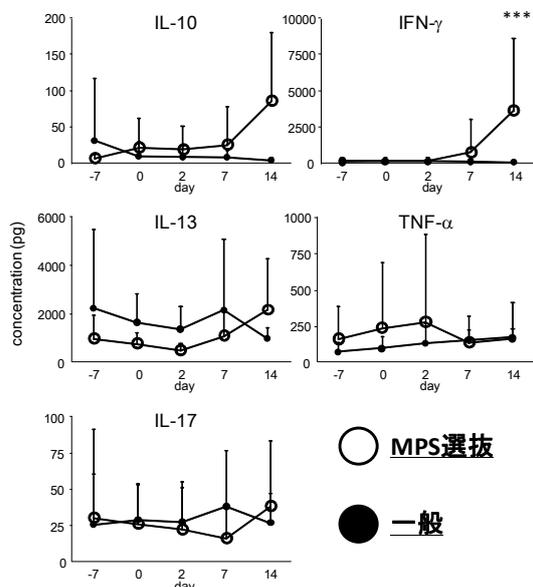


図4 血中サイトカイン濃度の変化

異物接種後の MPS 病変選抜ブタのリンパ球割合に変化が見られなかった。これは、マイコプラズマ病変の形成にリンパ球系の過剰反応が一因と報告されていることを考えると、マイコプラズマ病変を減少させる方向に選抜した過程でリンパ球の反応性の減弱化が促されたことを示唆するものと考えられる。また、MPS 病変選抜ランドレース種の幼若化反応が一般対照ブタに比べ弱かったことはこの仮説を裏付ける結果と考えられる。

免疫反応の低減に関わるものとして抗炎症性サイトカイン IL-10 があるが、本研究において IL-10 産生量が増加しており、これがその原因となった可能性がある。しかし、IFN- γ はマイコプラズマ感染において重要なサイトカインであり Th1 反応の代表的なサイトカインとして知られていることから、このサイトカインの選抜による発現増加は、免疫応答における Th1, Th2, Th17, Treg などの応答のベクトルが変わったことがマイコプラズマ病変の減少に繋がった可能性を示唆しているのかもしれない。

以上の結果から、MPS 抗病性の根拠の一端を示すことができ、これらの基礎的知見は、将来的な免疫形質選抜指標を提供することに繋がっていくものと期待される。

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 1 件)

- ① Shimazu T, Borjigin L, Katayama Y, Li M, Satoh T, Watanebe K, Kitazawa H, Roh S, Aso H, Kazuo K, Suda Y, Sakuma A, Nakajo M, K.Suzuki, Immunological characterization of peripheral blood leukocytes using vaccine for mycoplasmal pneumonia of swine (MPS) in swine line selected for resistance to MPS. Animal Science Journal. 査読有, 2013, (巻数、ページ数未定) in press, DOI: 10.1111/asj.12058

[学会発表] (計 7 件)

- ① 島津朋之・陸拾七・片山雄貴・佐藤匠・大津良輔・遠藤雅士・北澤春樹・麻生久・加藤和雄・須田義人・佐久間晶子・中條満・鈴木啓一, 一般ランドレースと大ヨークシャー種の MPS ワクチンに対する免疫応答の比較, 日本畜産学会第 116 回大会, 広島市, 安田女子大学キャンパス 2013 年 3 月 30 日
- ② T.Shimazu, J.Riku, Y.Katayama, M.Li, T.Sato, H.Kitazawa, H.Aso, K.Katoh, Y.Suda, A.Sakuma, M.Nakajoh, K.

Suzuki. Changes in peripheral blood leukocytes in swine selected line for resistance to MPS. The 63rd Annual Meeting of the EAAP, Bratislava, Slovakia, 2012 年 8 月 29 日

- ③ 島津朋之・陸拾七・片山雄貴・李美花・佐藤匠・北澤春樹・麻生久・加藤和雄・須田義人・佐久間晶子・中條満・鈴木啓一, マイコプラズマ抗病性選抜豚の MPS ワクチン刺激に対する免疫応答, 第 96 回日本養豚学会, 武蔵野市, 武蔵野スイングホール, 2012 年 3 月 23 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島津 朋之 (SHIMAZU TOMOYUKI)
東北大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号: 20616437