

学位論文題名

Molecular cloning and quantification of llama
and camel cytokines

(ラマとラクダのサイトカイン遺伝子のクローニングと定量)

学位論文内容の要旨

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、アジアや中南米で使役家畜として用いられているラクダ科動物(ラクダおよびラマなど)のサイトカイン遺伝子は同定されておらず、感染症などに対する免疫応答の詳細も明らかでない。そこで、本研究はラクダおよびラマのサイトカイン遺伝子の同定、定量法の確立およびサイトカイン動態の解析を目的に以下の研究を行った。

ラクダおよびラマのサイトカイン遺伝子の同定を目的に、末梢血単核球(PBMC)を分離し concanavalin A (Con A)存在下で刺激培養後、mRNA を抽出し cDNA を合成した。既知のウシサイトカイン遺伝子配列よりプライマーを作成し逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)法およびクローニングシーケンス法によってインターロイキン(IL)-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12p35、IL-12p40、IL-13、インターフェロン(IFN)- γ および腫瘍壊死因子(TNF)- α の cDNA のヌクレオチド配列を決定した。予想されるアミノ酸配列をラクダとラマ間で比較した結果、高い相同性(96.4%~100%)が示され、さらに他の哺乳動物との比較においても、ブタやウシのサイトカイン遺伝子と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、得られたラマのサイトカイン遺伝子情報から特異的なプライマーを構築し、リボポリサッカライド(LPS)存在下で刺激培養した PBMC の各サイトカインの発現の推移を Real-time RT-PCR 法により解析した。その結果、各サイトカインの発現は LPS 濃度依存性に増大し、刺激後 12~24 時間で最高値を示した。また、同プライマーはラクダのサイトカイン遺伝子の定量も可能であることが確認され、本法によってラマおよびラクダのサイトカイン mRNA の定量が可能となった。

最後に、*Brucella abortus* S19 (*B. abortus* S19) ワクチン株をラクダに接種し、確立した Real-time RT-PCR 法によりサイトカインプロファイルを検討した。その結果、ワクチン接種群の IFN- γ および IL-6 はコントロール群に対して高く、特に IFN- γ は2週間高値を持続した。*B. abortus* S19 ワクチンは *Brucella* 感染症に対し有効であることが示されており、今回の結果からラクダの *Brucella* 感染症に対する防御反応には細胞性免疫型サイトカイン(Th1)である IFN- γ が重要なかわりを持つことが示唆された。

本研究で、ラクダおよびラマのサイトカイン遺伝子が同定され他の哺乳動物と高い相同性を保有していること、ならびに、この遺伝子情報によってサイトカインの定量法が確立された。同法を用いた *B. abortus* S19 ワクチン接種ラクダのサイトカインプロファイル解析からワクチン接種によって IFN- γ が強く誘導されることが明らかとなった。これらのことから、本研究によってラクダ科動物の病態解析やワクチン効果判定にサイトカインプロファイルによる解析が有用であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	小沼	操
副査	教授	斉藤	昌之
副査	教授	稲葉	睦
副査	助教授	大橋	和彦

学位論文題名

Molecular cloning and quantification of llama and camel cytokines

(ラマとラクダのサイトカイン遺伝子のクローニングと定量)

ラクダ科動物(ラクダおよびラマなど)のサイトカイン遺伝子は同定されておらず、感染症などに対する免疫応答の詳細も明らかでない。本研究はラクダおよびラマのサイトカイン遺伝子の同定、定量法の確立およびサイトカイン動態の解析を行った。

まず、ラクダおよびラマのサイトカイン遺伝子を同定するため末梢血単核球を分離し、刺激培養後、mRNA を抽出し cDNA を合成した。既知のウシサイトカイン遺伝子配列よりプライマーを作成し逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)法およびクローニングシークエンス法によってインターロイキン(IL)-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12p35、IL-12p40、IL-13、インターフェロン(IFN)- γ および腫瘍壊死因子 α の各遺伝子配列を決定した。予想されるアミノ酸配列は、ブタやウシのサイトカイン遺伝子と高い相同性を保有していた。次に、サイトカイン遺伝子の定量法として Real-time RT-PCR 法を用いてラマおよびラクダのサイトカイン遺伝子の定量法を確立した。

最後に、*Brucella abortus* ワクチン株をラクダに接種し、確立した Real-time RT-PCR 法によりサイトカインプロファイルを検討した。その結果、ワクチン接種群では、IFN- γ および IL-6 は対照群に比較して高く、特に IFN- γ は感染後 1 週間高値を持続し、*Brucella* 感染症に対する防御反応には細胞性免疫に重要な Th1 型サイトカインである IFN- γ が重要なかわりをもつことが示唆された。

以上のように申請者は、ラクダおよびラマのサイトカイン遺伝子を同定しその定量法を確立した。

本研究はラクダ科動物ではじめてサイトカインプロファイル解析を可能としたものであり、ラクダ科動物の病態解析に重要な知見を提供した。よって審査員一同は申請者が博士(獣医学)の学位をうける資格を有すると認めた。