

学位論文題名

# Comparative immuno-epidemiological assessment of swamp and riverine type water buffaloes

(Swamp 種および Riverine 種水牛の比較免疫学解析および  
感染症分子疫学調査)

## 学位論文内容の要旨

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 種などが分布する。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行われておらずその詳細も不明である。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検討を行った。

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%の感染率であった。フィリピンにおいて初めて BVDV が検出されたので、その遺伝子型を解析したところ、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感染症などの病態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 を抽出してサイトカイン遺伝子のクローニングを行った。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ケンス法により水牛のインターロイキン(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。そして予想されるアミノ酸配列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でのサイトカイン発現の推移を Real-time PCR 法により解析した。その結果、FMD 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* 野外感染水牛のサイトカイン発現解析にも応用し、本法が水牛のサイトカイン定量解析に有効であることが示された。

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/エンハンサー領域には遺伝子多型が認められた。そこでルシフェラーゼアッセイ法による同領域の転写活性能を比較検討した結果、Swamp 種の同領域は Riverine 種のものに比べ高い 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定量法の開発から両品種間に IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  の発現の差

があることが示された。また、遺伝子多型および異なる転写活性が認められたことから、今後の品種間における疾患感受性解析に寄与する情報を得たと考えられた。

# 学位論文審査の要旨

|    |      |    |    |
|----|------|----|----|
| 主査 | 教授   | 大橋 | 和彦 |
| 副査 | 教授   | 木村 | 和弘 |
| 副査 | 准教授  | 今内 | 寛  |
| 副査 | 名誉教授 | 小沼 | 操  |

## 学位論文題名

### Comparative immuno-epidemiological assessment of swamp and riverine type water buffaloes

(Swamp 種および Riverine 種水牛の比較免疫学解析および  
感染症分子疫学調査)

水牛はフィリピンの代表的な家畜の一つであり、外来種の Riverine 種や土着種の Swamp 種などが分布するが、水牛の感染症の疫学調査は少なく、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、その詳細な機構も不明である。そこで本研究では、フィリピンの水牛における病原体の分子疫学調査を行い、Riverine および Swamp 種の比較免疫学的解析を行った。

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* および *Babesia bigemina* について PCR 法による検出を試みた。その結果、BVDV は 7.5%、BLV は 21.2%、*A. marginale* は 16.8%、*B. bigemina* は 5.1% の感染率であった。フィリピンにおいて初めて BVDV が検出されたので、その遺伝子型を解析した結果、BVDV1b 型であった。また、Swamp 種より Riverine 種の方が高い BVDV および BLV 感染率を示した。

サイトカインは疾病の進行に密接に関与しているが、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 および Riverine 種のインターロイキン(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- $\alpha$ )の遺伝子クローニングを行い、その塩基配列を決定した。予想されるアミノ酸を水牛の品種間で比較した結果、高い相同性が示され、また牛とも高い相同性を示した。次に、水牛のサイトカイン mRNA の定量できる Real-time PCR 法を樹立して、不活化口蹄疫(FMD)ウイルスワクチンを接種した水牛でのサイトカインの推移を解析した。その結果、FMD 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* 野外感染水牛のサイトカイン発現解析にも応用し、本法が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。

さらに Swamp 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結果、Riverine 種に比べて、Swamp 種が IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  をより高く発現していた。両品種間で IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  遺伝子の転写制御配列に遺伝子多型が認められたので、ルシフェラーゼレポーターアッセイ法により同配列の転写活性を比較した。その結果、Riverine 種に比べて Swamp 種の同配列は高い IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  の転写活性を持つことが明らかとなった。

以上より、フィリピンの水牛が種々の病原体に感染していることが明らかになった。また Swamp および Riverine 種間で転写制御配列における遺伝子多型に起因するサイトカイン発現量の差が示され、両種間の疾患感受性に関与している可能性が示唆された。

本研究により、フィリピンに生息する水牛に感染する病原体種が同定され、水牛の免疫応答や疾患感受性を解析するための有用な情報が提供された。よって、審査委員一同は、クラロ・ニエゴス・ミンガラ君の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。