

13. 原虫病に関する牛サイトカイン mRNA の <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション法による検出									
〔 要約 〕 サイトカインは、免疫系に關与する生理活性物質であり、免疫担当細胞の増殖や分化に關わることで、動物の生体防御反応の中心的役割を果たしている。 <i>In situ</i> ハイブリダイゼーション法による牛サイトカイン mRNA の検出が可能となった。									
国際農林水産業研究センター 畜産草地部、国際家畜研究所 (ILRI)						連絡先	0298(38)6308		
部会名	国際農業	専門	生理	対象	乳用牛	肉用牛	分類	研究	

〔 背景・ねらい 〕

サイトカインとは、免疫系、造血系、内分泌系、および神経系に關与する生理活性物質であり、細胞の増殖や分化に關与する。免疫応答に重要な役割を果たしているサイトカイン遺伝子の発現を検出することは、サイトカインを免疫補強剤として利用した組換型ワクチンの開発など、免疫系の制御方法の確立にとって有用である。牛タイレリア症や牛トリパノソーマ症の発病には、TNF-αのような炎症性サイトカインや、原虫を殺すために有効な細胞性免疫の誘導を抑制する IL-10が重要な役割を担うと考えられている。ILRI の強い要望により、局所で牛サイトカイン mRNA の検出が可能となる *in situ* ハイブリダイゼーション法の確立を目指した。

〔 成果の内容・特徴 〕

- ジゴキシゲニン標識 RNA プローブを用いて、TNF-α、IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12p35 の各サイトカイン mRNA の *in situ* ハイブリダイゼーション法による検出が、細胞をスライドガラスに張りつけたサイトスピン標本上で可能となった (表1)。
- 前処理方法を検討した結果、検出するサイトカインによって最も適切な前処理方法が異なることが明らかとなった (表1)。IL-4と IL-12P35の検出には、トライトン X-100処理が有効であった。
- 牛トリパノソーマ症では、感染後 CD5陽性 CD11b 陽性B細胞の増数と、IL-10産生の増加がみられる。CD11b 陽性B細胞では、IL-10が検出されたが (図1a)、一方、CD11b 陰性B細胞では、IL-10は検出されなかった (図1b)。牛B細胞のサブポピュレーションによって、サイトカインの産生が異なることが明らかになり、この細胞群が牛トリパノソーマ症の病理発生に關与することが示唆された。
- タイレリア・パルバ原虫感染形質転換細胞株7株において、サイトカイン mRNA の発現を検索したところ、程度は様々であったが検索した全ての細胞株で、IL-2と IL-10が検出された (データ略)。感染細胞の増殖には IL-2が、病理発生には IL-10が關与することが考えられた。

〔 成果の活用面・留意点 〕

- 本研究で得られた *in situ* ハイブリダイゼーション法による牛サイトカイン mRNA の検出は、原虫疾患以外の、他の疾病の免疫応答を解析する上でも、大変有用である。
- 上記のサイトカインに加えて、国際家畜研究所 (ILRI) で作られた検出用プローブ (TNF-β、IFN-α、IL-1α、IL-1β、IL-3、IL-5、IL-7、IL-12p40、IL-15) を入手したので、今後の利用が望まれる。

〔 具体的データ 〕

表1 牛サイトカイン mRNA の検出のための *in situ* ハイブリダイゼーション法における前処理方法の比較

サイトカイン	無処理	0.02N 塩酸	0.25% トライトン	塩酸処理後 トライトン処理
TNF-α	＋*	＋	－	－
IFN-γ	＋	＋	＋	＋
IL-2	＋	＋	＋	－
IL-4	－	－	＋	－
IL-6	＋	＋	＋	＋
IL-10	＋	＋	＋	＋
IL-12p35	－	－	＋	－

*：＋、陽性；－、陰性。

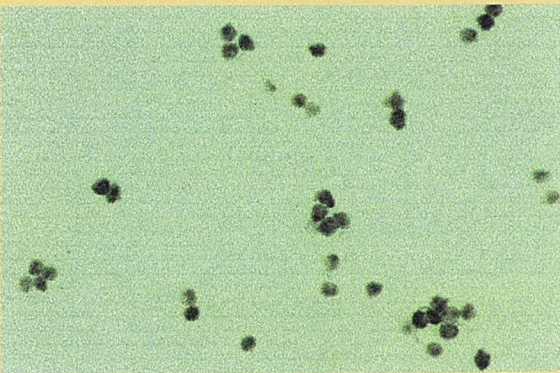


図1a CD11b 陽性B細胞にみられた IL-10mRNA の発現



図1b CD11b 陰性B細胞では IL-10mRNA の発現がみられない

〔 その他 〕

研究課題名：ピロプラズマ病のワクチン開発に関する研究
－アフリカ東海岸熱における牛免疫担当細胞の免疫病理学的研究－
予 算 区 分：経常
研 究 期 間：平成9年度 (平成6～9年)
研究担当者：松原 豊
発表論文等：投稿準備中。