

動物サイトカインの利活用による家畜疾病制御技術に関する研究

宗田 吉広 (農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所)

ymuneta@affrc.go.jp

サイトカインは、免疫細胞をはじめとする種々の細胞から分泌され、生体内で極めて微量で効果を発揮して、免疫応答、感染防御、炎症反応、造血機構などを制御するタンパク質性の生理活性物質の総称であり、感染症や腫瘍、自己免疫疾患等の疾病に対する新しい制御技術開発のための有望なターゲットである。我々はこれまで、動物サイトカインの1つである豚インターロイキン18 (IL-18)の同定とそのモノクローナル抗体の製品化を通じて、動物サイトカインの利活用による家畜疾病制御技術への応用を目指した研究を行ってきたので、その概要を紹介する。

はじめに

現在、家畜疾病の多くは、従来のワクチンや抗生物質では防除の困難な病原体により引き起こされ、畜産現場では、子牛や子豚の下痢症や肺炎、ストレスや高密度飼育に起因する日和見感染症や複合感染症、あるいは乳房炎等の生産病が予防・治療の困難な難防除性疾病として大きな問題となっている。また、抗生物質の乱用に伴う耐性菌の出現が問題となり、動物における抗生物質の使用は縮小される傾向にある。さらに、最近の高病原性鳥インフルエンザや新型インフルエンザの発生、BSE、O157等の新興・再興感染症の多発から、消費者の食の安全や人獣共通感染症への関心は非常に高く、健康な動物から安全な畜産物を供給する必要性はますます高まっている。

このような背景から、動物の本来持つ免疫機構を解明し、免疫機能の活性化や制御を通じて、感染症に対する新しい診断・予防・治療技術を開発することが要望されており、その1つの柱が動物のサイトカイン研究である。動物のサイトカイン研究は、ヒトやマウスでのサイトカイン研究に比べて遅れていた分野であったが、筆者は、平成9年4月に農林水産省・家畜衛生試験場(現・動物衛生研究所)に採用されて以降、同年より農林水産省畜産対応プロジェクト研究として開始された「組換えサイトカインによる家畜疾病防除技術の開発」に参画して、現在まで一貫して動物のサイトカインとその家畜疾病制御技術への応用を目指した研究に従事してきた。

豚IL-18の同定とその検出系の開発

まず筆者らは、農林水産省畜産対応プロジェクト研究「組換えサイトカインによる家畜疾病防除技術の開発」が開始された当時、ヒトやマウスにおいて、強力なインターフェロン γ (IFN- γ)誘導能を持つサイトカインとして報告されていたIL-18と、IL-18をその前駆体から活性型へと変換するのに重要な変換酵素であるCaspase-1に着目し、それらの豚ホモログのクローニングや発現解析を行い^{1), 2)}、あわせて豚IL-18のレセプター α 鎖についても報告した³⁾。

次に、筆者らは豚IL-18の高感度検出系を確立するため、豚IL-18に対するモノクローナル抗体の作製を行った^{4), 5)}。本モノクローナル抗体および開発したサンドウィッチELISAによる豚IL-18の定量法はその特異性や検出感度が高く評価され、特許を取得できた(特許第3230220号)。さらに、イギリス・セロテック社およびオーストリア・ベンダーメドシステムズ社へのライセンス契約を締結し、抗豚IL-18モノクローナル抗体および豚IL-18ELISAキット(図1)として市販され、現在では、世界中で利活用されている。



図1 抗豚IL-18モノクローナル抗体および豚IL-18ELISAキット

豚IL-18の大量生産系の開発

サイトカインの動物への臨床応用を考えた場合、大量のサイトカインを安価に生産する系の確立は必須である。そのため筆者らは、21世紀グリーンフロンティア研究「植物・動物・昆虫を用いた有用物質生産系の確立」に参加し、昆虫細胞およびカイコの両者に感染するハイブリッドバキュロウィルスをベクターとして、カイコを宿主とした豚活性型IL-18の生産方法を開発した^{6,7)}。この手法は、豚前駆体型IL-18と変換酵素Caspase-1の共発現により、強力なIFN- γ 誘導活性を有する豚活性型IL-18を大量にかつ効率よく生産できる手法として、特許を取得できた（特許第3541216号）。最近では、豚IL-18にワクチンの有効性を増強するアジュバントとしての効果が報告されており、今後のワクチンアジュバントとしての利活用が期待される。

豚マイコプラズマ肺炎の病態への関与とその制御

次に筆者らは、農林水産省委託プロジェクト研究「人獣共通感染症の制圧のための技術開発」に参加し、豚マイコプラズマ肺炎における宿主サイトカイン応答の解析を行った。豚マイコプラズマ肺炎は*Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp)によって引き起こされる慢性肺炎で、増体率の低下や他の呼吸器病原体の2次感染を増悪させるため、世界中の養豚産業に大きな経済的損失を与えている疾病の1つである。筆者らは、実験感染によりマイコプラズマ肺炎を引き起こした豚の肺内に多量のIL-18が産生されることを見出し、IL-18が肺炎の病態においてIFN- γ 誘導因子として機能するよりはむしろ炎症性サイトカインとして肺炎の増悪や宿主の免疫攪乱をもたらすことを明らかにし⁸⁾、宿主の免疫バランスを調節することで豚マイコプラズマ肺炎を低減化できる可能性を示唆した。また、肺胞マクロファージがMhpを認識するパターン認識レセプターとして、豚トール様受容体2 (TLR2) および6 (TLR6) が重要であることを明らかにし⁹⁾、近年では、豚ゲノム情報を活用してこれらTLRにおける1塩基多型を解析し¹⁰⁾、Mhpの認識や肺炎の発症に影響を及ぼす多型を見出している。これらの成果は抗病性育種につながりうると考えられ、農林水産省プロジェクト研究「アグリ・ゲノム研究の総合的な推進」において研究を継続している。

他の家畜疾病における利活用

この間、筆者は日本学術振興会・海外特別研究員として、オーストラリア・メルボルン大学で2年間の在外研究を行い、鶏呼吸器性マイコプラズマ病を引き起こす病原体である*Mycoplasma gallisepticum*の生ワクチン株として世界中で利用されているts-11株へ鶏のサイトカインであるIFN- γ

を導入し、ワクチンの効果を改変することに成功した¹¹⁾。また、チェコ科学アカデミー微生物学研究所との共同研究では、豚の下痢症として問題となっている、サルモネラ感染症や大腸菌感染症の病態における IL-18 の関与を明らかにし^{12,13)}、現在も共同研究を継続している。

他の動物種における利活用

また、開発された豚 IL-18 のモノクローナル抗体や検出系は、他の動物種における IL-18 の検出やその役割を解析するためにも利活用されている。筆者らは牛の初乳中に IL-18 が多量に含まれていることを明らかにし、IL-18 が初乳を介した宿主の免疫賦活に関与していることを示唆した¹⁴⁾。また、東北大学の共同研究者らは、下垂体細胞など内分泌器官における IL-18 の発現を明らかにしており、本検出系が IL-18 の新たな機能解明に大きく寄与している¹⁵⁾。さらに、山羊や馬にも開発したモノクローナル抗体が利用できることが明らかとなっており^{16,17)}、今後のさらなる利活用が期待される。

ヒトのモデル動物としての利活用

豚はヒトのモデル動物としても重要であり、特に臓器移植において、豚の臓器を異種移植材料として利用したり、移植を行った際の拒絶免疫応答を調べる研究が多数行われている。我々は以前、カナダの共同研究者とともに豚の実験的肺移植における虚血再灌流障害に IL-18 が関与していることを報告している。また最近では、韓国の共同研究者らが、豚 IL-18 が異種移植後の拒絶反応の抑制に関与していることを示しており¹⁸⁾、今後、この分野での研究の進展や利活用の増加も期待される。

今後の新たな利活用へ向けての展望

近年、IL-18 はストレスと関連の深いサイトカインとしても報告されている。一方、家畜の飼養管理においてもアニマルウェルフェアという考え方が重視され、経済動物である家畜であってもストレスを極力軽減した状態で、快適性に配慮した飼養管理を行うことが重要となりつつある。現在、筆者らは、農研機構・交付金プロジェクト研究「健全性・収益性両立型養豚のための技術開発」において、IL-18 が豚の唾液中におけるストレスマーカーとなりうることを示すデータを得ており（特許出願中 2008-238416）、今後は動物にストレスをかけずに非侵襲的にストレスを評価する手法の開発など、実際の農業現場に広く役立つような技術開発を目指した研究展開も行っていきたいと考えている。

謝辞

本研究は、主として農研機構・動物衛生研究所において行われたものであり、同研究所の森康行博士、下地善弘博士、犬丸茂樹博士をはじめ多くの方々のご指導、ご助言に厚く御礼申し上げます。また国内外の多くの共同研究者の方々および研究を支援いただいた研究室の皆様にも心より御礼申し上げます。さらに、本賞にご推薦を頂きました動物衛生研究所の村上洋介所長はじめ関係各位の皆様にも深く感謝いたします。最後に、常に私の研究活動を支えてくれた家族全員に最大の感謝を表します。

発表論文

1. Muneta Y, Shimoji Y, Yokomizo Y, Mori Y. 1999. Molecular cloning of porcine interleukin-1 β converting enzyme and differential gene expression of IL-1 β converting enzyme, IL-1 β , and IL-18 in porcine alveolar macrophages. *J. Interferon Cytokine Res.*, 19, 1289-1296.
2. Muneta Y, Mori Y, Shimoji Y, Yokomizo Y. 2000. Porcine interleukin-18: cloning, characterization and expression of the recombinant protein with baculovirus system. *Cytokine*, 12, 566-572.
3. Muneta Y, Uenishi H, Yamamoto R, Yoshihara K, Yasue H, Awata T, Mori Y. 2002. Cloning, expression

- analyses, and chromosomal location of porcine interleukin-18 receptor α chain (IL-18R α). J. Interferon Cytokine Res., 22, 995-1002.
4. Muneta Y, Shimoji Y, Yokomizo Y, Mori Y. 2000. Production of monoclonal antibodies to porcine interleukin-18 and their use for immunoaffinity purification of recombinant porcine interleukin-18. J. Immunol. Methods, 236, 99-104.
 5. Muneta Y, Mikami O, Shimoji Y, Nakajima Y, Yokomizo Y, Mori Y. 2000. Detection of porcine interleukin-18 by sandwich-ELISA and immunohistochemical staining using its monoclonal antibodies. J. Interferon Cytokine Res., 20, 331-336.
 6. Muneta Y, Inumaru S, Shimoji Y, Mori Y. 2001. Efficient production of biologically active porcine IL-18 by co-expression with caspase-1 using baculovirus expression system. J. Interferon Cytokine Res., 21, 125-130.
 7. Muneta Y, Zhao HK, Inumaru S, Mori Y. 2003. Large scale production of porcine mature interleukin-18 (IL-18) in silkworms using a hybrid baculovirus system. J. Vet. Med. Sci., 65, 219-223.
 8. Muneta Y, Minagawa Y, Shimoji Y, Nagata R, Markham PF, Browning GF, Mori Y. 2006. IL-18 expression in pigs following infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. J. Interferon Cytokine Res., 26, 637-644.
 9. Muneta Y, Uenishi H, Kikuma R, Yoshihara K, Shimoji Y, Yamamoto R, Hamashima N, Yokomizo Y, Mori Y. 2003. Porcine TLR2 and TLR6: identification and their involvement in *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. J. Interferon Cytokine Res., 23, 583-590.
 10. Shinkai H, Tanaka M, Morozumi T, Eguchi-Ogawa T, Okumura N, Muneta Y, Awata T, Uenishi H. 2006. Biased distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in porcine Toll-like receptor (TLR1), TLR2, TLR4, TLR5, and TLR6 genes. Immunogenetics, 58, 324-330.
 11. Muneta Y, Panicker IS, Kanci A, Craick D, Noormohammedi A, Bean AG, Browning GF, Markham PF. 2008. Development and immunogenicity of recombinant *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strain ts-11 expressing chicken IFN- γ . Vaccine, 26, 5449-5454.
 12. Splichalova A, Trebichavsky I, Muneta Y, Mori Y, Splichal I. 2005. Effect of bacterial virulence on IL-18 expression in the amnion infected with *Escherichia coli*. Am. J. Reprod. Immunol., 53, 255-260.
 13. Splichal I, Trebichavsky I, Muneta Y, Mori Y. 2002. Early cytokine response of gnotobiotic piglets to *Salmonella enterica* serotype typhimurium. Vet. Res., 33, 291-297.
 14. Muneta Y, Yoshihara K, Minagawa Y, Nagata R, Yamaguchi T, Takehara K, Mori Y. 2005. Bovine IL-18 ELISA: Detection of IL-18 in sera of pregnant cow and newborn calf, and in colostrum. J. Immunoassay and Immunochem., 26, 203-213.
 15. Nagai Y, Ogasawara H, Taketa Y, Aso H, Tanaka S, Kanaya T, Watanabe K, Ohwada S, Muneta Y, Yamaguchi T. 2008. Bovine anterior pituitary progenitor cell line expresses interleukin-18 (IL)-18 and IL-18 receptor. J. Neuroendocrinol., 20, 1233-1241.
 16. Wu D, Murakami K, Liu N, Konishi M, Muneta Y, Inumaru S, Kokuho T, Sentsui H. 2004. Expression of equine interleukin-18 by baculovirus expression system and its biological activity. Microbiol. Immunol., 48, 471-476.
 17. Hosamani M, Mondal B, Muneta Y, Rasool TJ. 2005. Molecular characterization and expression of caprine (*Capra hircus*) interleukin-18 cDNA. Int. J. Immunogenet., 32, 293-297.
 18. Choi YS, Kim YK, Shim JH, Kim EM, Kang HS, Yoon do Y, Muneta Y, Myung PK. 2006. Immunosuppression of xenograft rejection in porcine kidney PK15 cells by porcine IL-18. Exp. Mol. Med., 38, 574-582.

特許

1. 宗田吉広、下地善弘、新井啓五、森 康行 特許第 3230220 号「ブタ由来インターロイキン 18 に対するモノクローナル抗体」平成 13 年 9 月 14 日登録
2. 宗田吉広、下地善弘、新井啓五、森 康行 特許第 3541216 号「昆虫細胞又は昆虫を用いた活性型ブタIL-18 の生産方法」平成 16 年 4 月 9 日登録
3. 宗田吉広 特許出願 2008-238416 「抗インターロイキン 18 抗体を用いた動物のストレス評価方法」平成 20 年 9 月 17 日出願

Studies on the animal disease control using animal cytokines.

Yoshihiro Muneta (National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization)

ymuneta@affrc.go.jp