

## 牛肺炎における肺サーファクタント蛋白質の動態

宮本 亨\*

(平成 23 年 9 月 2 日 受付)

### The concentration of bovine serum surfactant protein in normal and pneumonic cattle

Toru MIYAMOTO\*

#### はじめに

牛の呼吸器病は、肉用牛の疾病分類別事故件数で 2 位、死廃頭数で 3 位と我が国の畜産業において大きな損耗要因となっている。発症には環境、栄養、病原体など様々な要因が複雑に絡み合っており、その防除は容易ではない。呼吸器病の低減化のためには、早期診断・治療および病態の的確な把握が必要であるが、現在のところ血液で診断し得る牛の肺疾患特異的のマーカーは確立されていない。

肺サーファクタントは肺胞Ⅱ型上皮細胞から分泌される脂質・蛋白質複合体で、肺胞内腔を覆う液相表面に薄層を形成して存在し肺胞の気相-液相界面において表面張力を低下させることにより肺胞の虚脱を防止している。肺サーファクタントの主成分はホスファチジルコリンなどのリン脂質と 4 種類のサーファクタント蛋白質 (SP-A, SP-B, SP-C, SP-D) である。このうち SP-B, SP-C は、リン脂質とともに肺胞表面における界面活性作用に参与している。また SP-A, SP-D は、カルシウム依存性に糖

質に結合する C 型レクチン (コレクチン)・スーパーファミリーに属する蛋白質として知られ、肺胞腔における自然免疫機能 (細菌やウイルスの凝集, オプソニン化作用, マクロファージによる異物処理, 直接的殺菌作用など) に重要な役割を果たすことが明らかとなっている (図 1<sup>1)</sup>)。

SP-A, SP-D は、そのほとんどが肺胞Ⅱ型上皮細胞で合成され、肺に障害がおこると肺組織から循環血液中に漏出するため、これらの血中濃度は肺組織の障害の程度を

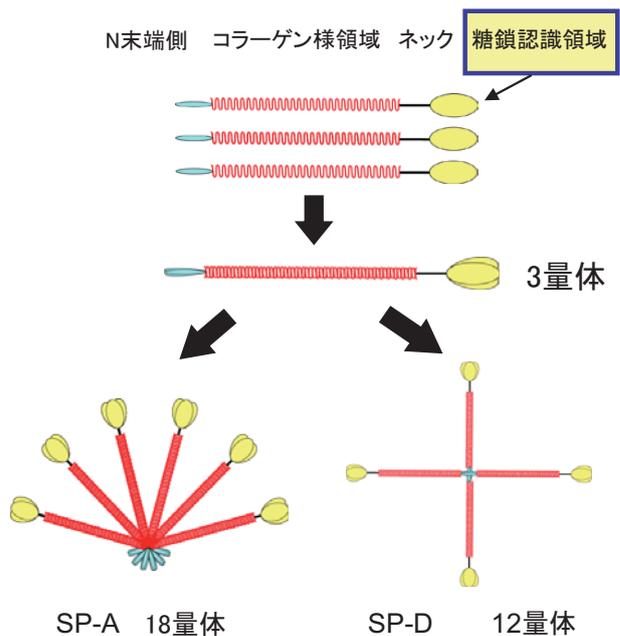


図 1. SP-A, SP-D の構造

動物衛生研究所 病態研究領域  
Pathology and Pathophysiology Research Division, National  
Institute of Animal Health

\* Corresponding author; Toru MIYAMOTO  
Pathology and Pathophysiology Research Division, National  
Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki  
305-0856, JAPAN  
Tel: 029-838-7864  
Fax: 029-838-7864  
E-Mail: miyomoto@affrc.go.jp

反映すると考えられる。人では肺蛋白症、間質性肺炎などの診断に有用な肺特異的診断マーカーとして市販キットによる血中濃度の測定が行われている<sup>2)</sup>。また家畜でも馬において実験的な細菌性肺炎で初期に血中SP-D濃度が上昇することが報告されている<sup>3)</sup>。牛の肺炎時における血中SP濃度の変動に関する報告はないが、肺炎における病理学的変化とSPの動態、特に血中濃度との関係を明らかにできれば、早期診断や効果的予防に有用な情報が得られるものと期待できる。

### 牛 SP-A, SP-D 測定系の確立

牛肺胞洗浄液 (BALF) からマンノース-セファロース 6B カラムによって牛 SP-A, SP-D を精製し、それらを抗原とする抗体を作製した。次いで SP-D について家兎由来のポリクローナル抗体を用いて、BALF や肺ホモジネート中の SP-D が測定可能な ELISA<sup>4)</sup> を、また SP-A に関してモノクローナル抗体 (図 2) を利用して血清中の SP-A を測定することが可能な ELISA を確立した。また肺由来ではないが、牛における炎症マーカーとしての有用性が期待されるハプトグロビン (Hp) についても、簡易な測定法 (ヘモグロビン結合試験 (HBA)) の開発を行った。

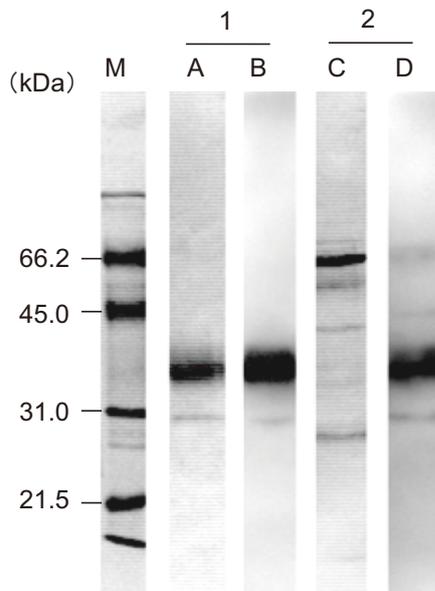


図 2. 抗牛 SP-A モノクローナル抗体の特異性  
A, C: 牛 BALF (原液)  
B, D: 精製牛 SP-A (B; 5 µg/ml, D; 50 µg/ml)  
1: ウェスタンブロットティング  
2: クーマシー染色

### 野外牛における血清 SP-A 濃度

牛の血清中 SP-A 濃度の日齢による推移について検討するため、臨床的に健康な F1 牛 (20 日齢 (13-24 日, n=14), 100 日齢 (90-123 日, n=9), 200 日齢 (181-213 日, n=20), 300 日齢 (306-328 日, n=20) から採血し、血清中 SP-A 濃度を測定した (図 3)。20 日齢では 2.7 ng/ml と低値であったが、100 日齢では 7.7 ng/ml と有意に上昇した。200 日齢, 300 日齢では、それぞれ 5.6 ng/ml, 6.4 ng/ml とやや低下したが、20 日齢に比べると有意に高かった。牛血清中 SP-A 濃度は、少なくとも生後約 30 日までは低値であるが、その後 90 日頃までに上昇すると考えられる。なお、図には示していないが、ホルスタイン種でもほぼ同様の傾向が見られている。

### 実験的肺炎における血清中 SP-A 濃度の変化

これらの抗体や測定系を用いて、子牛肺炎の原因となる *Mannheimia haemolytica* (Mh) や牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス (bPIV-3) を実験的に子牛に接種し、血液や肺組織中における SP の発現を病理学的、生化学的に観察し、血中 SP-A 濃度の肺障害マーカーとしての有用性、肺炎の病態との関連について検討した。

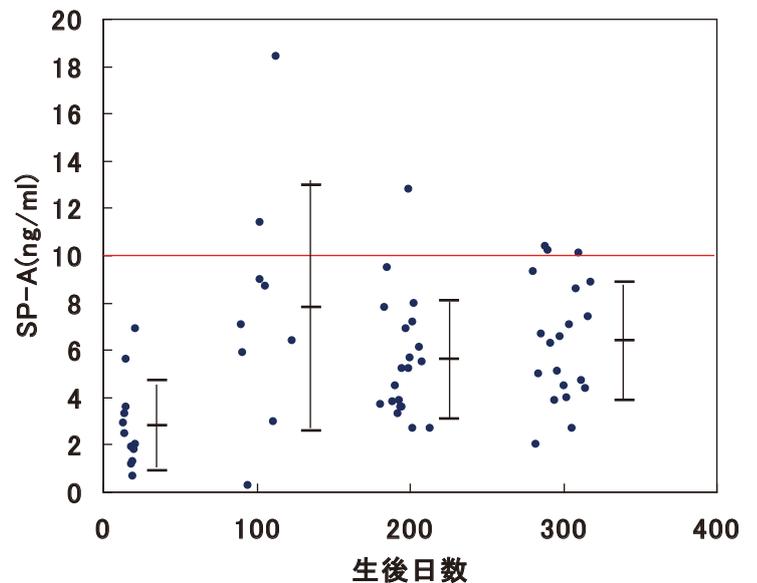


図 3. 牛血清 SP-A の日齢による変動

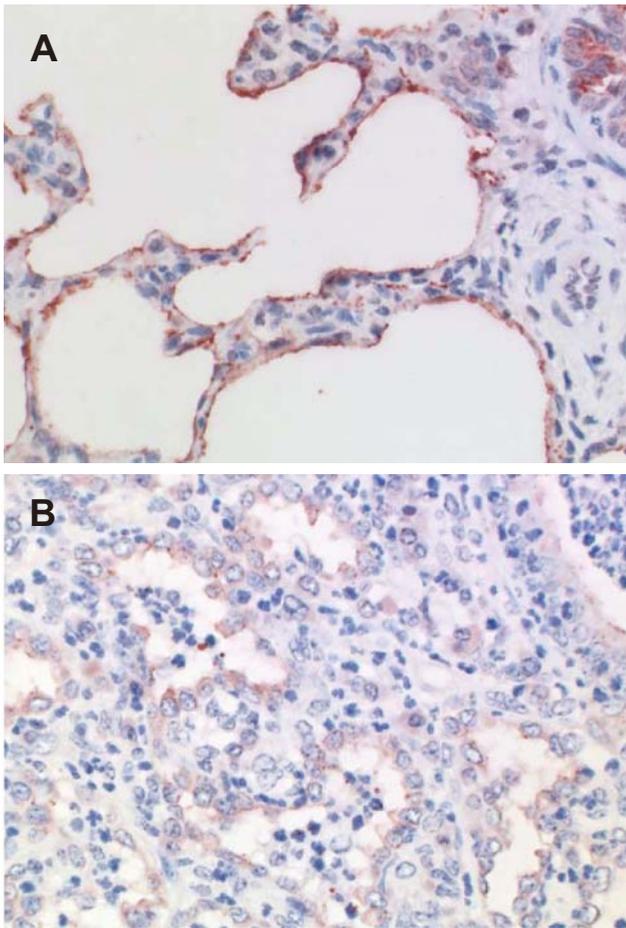


図4. Mh 接種肺 SP-A 免疫染色 (×40)  
A: 正常 B: 左前葉後部 (接種後7日)

#### Mh 接種試験

10頭の子牛(2-3ヶ月齢, ♂)を, 2群に分けて, 細菌液 (*Mannheimia haemolytica* 1型  $1.7 \times 10^7$  CFU/ml) 培養液あるいは無菌培養液をファイバースコープを用いて左肺前葉後部に 10 ml ずつ接種した。接種後0日から7日まで毎日血液を採取し, 接種後7日(一部は接種後3日)に解剖した。血清中 SP-A 濃度は ELISA で, 血清中 Hp 濃度は HBA 法によって測定した。

接種後1日から体温, 呼吸数とともに血清中 Hp 濃度も著しく増加(～3,000  $\mu\text{g/ml}$ )した。Hp 濃度は, 肺炎病変の強さ(病変面積)を反映していた。血清中 SP-A 濃度は接種3日以降に軽度増加(～14 ng/ml)した。正常な肺胞の免疫組織学的観察では, 肺胞壁に沿って線状に SP-A 陽性反応が観察された(図4, A)のに対し, 肺炎病巣内の肺胞ではこれが消失し, 好中球やマクロファージの細胞質で SP-A 陽性反応が観察された。接種後3日および7日には, 肺炎病巣に SP-A 陽性の II 型肺胞上皮細胞の増殖が観察され(図4, B), 同時に組織中の SP-A mRNA レ

ベルも上昇していた。血清中 SP-A 濃度上昇は, II 型肺胞上皮細胞の増殖と産生された SP-A の血中への漏出による可能性がある。

#### bPIV-3 接種試験

子牛(2-3ヶ月齢, ♂)を3群に分け, bPIV-3 感染細胞の培養液(BN1株  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/10 ml)あるいは非感染細胞の培養液を左肺前葉後部に 10 ml および両鼻腔内に各 2.5 ml ずつ接種した(AB- 群, n=6: bPIV-3 接種のみ, 接種後7日および14日に3頭ずつ解剖。AB+ 群, n=6: bPIV-3 接種直後からアンピシリン(1 g/日/頭)を連日投与, 接種後21日に解剖。対照群, n=3: 細胞培養液接種, 2頭にはアンピシリン(同上)を連日投与, 接種後21日に解剖)。

ウイルス接種牛では接種後1日から5日まで発熱ならびに呼吸数の増加が観察された。AB- 群では血清中 SP-A 濃度が接種後6日から12日に増加(8-20 ng/ml)した。AB+ 群でもほぼ同時期に血清中 SP-A 濃度が増加したが, 3頭中2頭は著しく高い値(53, 63 ng/ml)を示した。対照群では全期間を通じて 5 ng/ml 以下であった。血清中 Hp 濃度は AB- 群で接種後6日から14日に上昇(200-1,400  $\mu\text{g/ml}$ )したが, AB+ 群並びに対照群ではほとんど上昇しなかった。bPIV-3 接種牛の肺組織では接種後7日にケラチン陽性の II 型肺胞上皮細胞の広範な増殖が観察された。したがって bPIV-3 感染後6日から12日の血清中 SP-A 濃度の上昇は II 型肺胞上皮細胞の増殖と関連している可能性がある。また細菌検査の結果から, AB- 群では細菌検査により AB- 群6頭のうち, Hp 濃度の上昇が大きかった3頭から *P. multocida* が検出されたことから, この群における血清中 Hp 濃度の上昇は細菌(*P. multocida*)の二次感染を反映したものと考えられる。

#### おわりに

これまでの結果から, 血清中 SP-A 濃度は細菌やウイルスの感染による肺炎の進行に伴って上昇することが示され, 肺炎の指標になり得ることが示唆されたが, 感染した病原体によりその上昇の時期や程度は変わると考えられる。細菌およびウイルス感染試験の結果をもとに子牛における肺炎の症状と血中 SP-A 並びに Hp の動態を模式図に示した(図5)。ウイルス感染の場合(上), 数日にわたる発熱と呼吸数の増加に続いて血清中の SP-A が大きく増加するが, 炎症マーカーである Hp にはほとんど変化が認められない。しかし細菌による二次感染がある場合(下)には, 発熱と呼吸数の増加に続いて, 血清中 SP-A

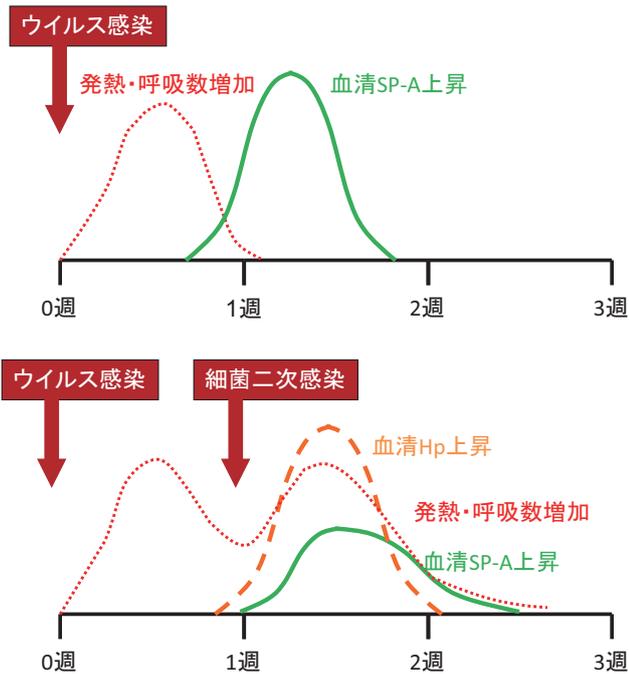


図5. 子牛肺炎に伴う体温，血清 SP-A および血清 Hp の変動（模式図）

濃度が軽度上昇するとともに血清中の Hp が増加する。Hp の上昇は，ウイルス感染初期には上昇せず，おそらく細菌感染に特徴的であり，その炎症の強さを反映していると考えられる。また SP-A の上昇は II 型肺胞上皮細胞の増殖と関連し，肺胞上皮の修復を示す指標になるのではないかと考えられる。これらの点については今後詳しく検討していく必要がある。

肺炎において血清中 SP-A 濃度が増加する機序についてはまだ不明な点も多く，病理学的検査と合わせてさらに検討する必要がある。今後は野外における正常牛，肺炎罹患牛の血清中 SP-A 濃度および Hp 濃度の経時の変化に関する知見を収集し，炎症症状との相関を明らかにすることにより，治療方針決定に資する肺特異的な疾患マーカーとしての有用性を確認したい。

#### 参考文献

- 1) Sano, H., Kuroki, Y.: The lung collectins, SP-A and SP-D, modulate pulmonary innate immunity. *Mol. Immunol.* 42, 279-287 (2005).
- 2) Takahashi, H., Sano, H., Chiba, H. & Kuroki, Y.: Pulmonary surfactant proteins A and D: innate immune functions and biomarkers for lung diseases. *Curr. Pharm. Des.* 12, 589-598 (2006).
- 3) Hobo, S., Niwa, H. & Anzai, T.: Evaluation of serum amyloid A and surfactant protein D in sera for identification of the clinical condition of horses with bacterial pneumonia. *J. Vet. Med. Sci.* 69, 827-830 (2007).
- 4) Miyamoto, T., Takanashi, M., Horino, R., Yamanaka, H., & Narita, M.: Development of enzyme-linked immunosorbent assay for bovine surfactant protein D in bronchoalveolar lavage fluid. *J. Vet. Med. Sci.* 72, 1337-1343 (2010).