

# ウロコルチン遺伝子の発現を指標とした ヨーネ病の診断法

ヨーネ病研究チーム 上席研究員

百溪 英一

MOMOTANI, Eiichi

## 多様な診断パラメーターのニーズ

ヨーネ病は、抗酸菌の一種であるヨーネ菌に起因する慢性肉芽腫性下痢性伝染病である。わが国の牛群におけるヨーネ病汚染は拡大傾向にあり、2004年には発生頭数が1,100頭を超えた最大の家畜衛生上の重要課題である。さらに欧米ではヨーネ菌の牛乳汚染や人体感染の報告も出されているため、公衆衛生上、食品衛生上もこの病気に対する清浄化のニーズは非常に高まっている。

ヨーネ病は経口的にヨーネ菌に感染することで成立するが、個体レベルでの感染経過の差異が他の疾病に類をみないほど大きい。しかも、感染のステージにより免疫状態や排菌の状態が大きく変わるため、一定の診断法で診断できる時期が限られており、現在用いられている免疫診断法や細菌分離法でも全ての感染動物を診断するに至っていない。

## ウロコルチンについて

ウロコルチン (Ucn) は、コルチコトロピン放出因子 (CRF) ファミリーに属する神経ペプチドであり、副腎皮質ホルモンの分泌制御に関与していることが知られている。これらの神経ペプチドは免疫抑制に関与する副腎皮質ホルモンの産生を中枢性に促す作用があるが、Ucnでは末梢では免疫を促進する作用も示唆されており、不明な点が多い。しかし、牛においてはUcnの存在を証明するデータも存在しなかったため、その遺伝子のクローニングから着手し、最終的に牛の末梢血単核細胞をLPSで24時間刺激した試料から、3'-ないし5'-RACE法などにより牛ウロコルチンのcDNAをクローニングした(図1)。これは、新規ペプチドとして遺伝子データベースに登録された(登録番号AB201710)。

```

1 cgataacctg gcaggcggca ccatgaagac ggccggacgc gcggcggttc tggccgcgct
61 gctgctcctg gcacagctgc gcccggaag cagccagtgg agcccgagg aggagcggc
121 ggccgcccgg gtccgagatc cgaggctgct ctggagccct gggacacgga accacggcgg
181 cggggcccgc gcgctcctct tgctgctggc agagcgcttc ccgcccggcc gggcggagca
241 gggccgatgg ggcacggga cggcaggcga gcggccgca cgggacgacc ctcccctgtc
301 cattgacctc accttcacc tgctacggac cctgctggaa ctgcgcccga cgcagagcca
361 gaggagcgc gccgagcaga accgcatcat attcgattcg gtggcaagt gatcagcggg
421 tctggggccc cgagaatctt gacccccaat gctccacctc agggttgaga cgtgagcgc
481 aggaactgac caagtctctc agggctagag cggcctaggg ataccctgag cagcatccgc
541 gttaccggtt ttaataaaa gtgctgaaga gc //
    
```

図1. 牛マクロファージ由来ウロコルチン遺伝子 (cDNA) の配列

## ヨーネ病の免疫抑制現象の解明

著者らはヨーネ病の免疫診断に最も大きな支障をきたしている、感染後の細胞性免疫の低下と、液性抗体の上昇の著しい遅延の免疫病理発生機序の解明を行ってきているが、ヨーネ病に特徴的な特異的な免疫抑制機序にこれらの神経ペプチドが関与しているのではないかという仮説を立てた。そのため、得られた遺伝子配列を元にして、リアルタイム RT-PCR 法による特異的な遺伝子発現の定量系を確立した。この反応により増幅された PCR 産物を図2に示す。

この方法によりわずかな遺伝子の発現変動の把握が定量的にできるようになった。この技術を用いて動衛研で維持されているヨーネ菌実験感染牛と健康牛の末梢血液中のUcnの遺伝子発現が、24時間という培養期間中にどのように変化するのか、そしてヨーネ菌抗原刺激により血液細胞中のUcnの遺伝子発現がどのように変動するのかを解析したところ、ヨーネ菌感染牛においてUcnの遺伝子発現が、ヨーネ菌刺激により著しく抑制されてしまっているという事実が明らかとなった。

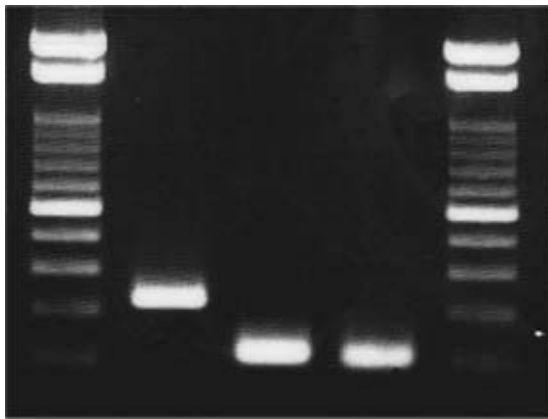


図2. レーンは左から分子マーカー、牛CRH、牛Ucn（プロダクトサイズ112bp）、GAPDH（内部標準）

Ucnは末梢の免疫促進作用に関与するというこれまでの報告から、この発現抑制現象はヨーネ病における免疫抑制と関連している可能性が示唆された。同時に、その変動を健康牛の発現パターンと統計学的に比較することにより、有意な差異を示すことを見だし、Ucnがヨーネ菌感染牛と健康牛を見分ける診断的パラメーターにも利用できることを発見して、特許化を進めることとした。この方法は牛の血液を採取し、ヨーネ菌ライセート抗原を添加、無添加で、一晚培養して血液細胞中のUcn mRNAを定量RT-PCR法により測定し、ヨーネ菌抗原無添加血液培養での測定値をA、抗原添加培養血液での測定値をBとして、 $(A-B)/A=C$ という数式を適用すると、ヨーネ菌感染牛ではC値が0.3以上となり、感染非感染の判定が可能になるものである。

診断法としての感度を高くするためにヨーネ菌全菌体抗原を用い、無刺激時の培養においてみられるUcnの発現上昇と組み合わせることにより、ヨーネ病感染動物と健康動物の区別が明確になるようにした。

この成果は、動物種を問わずUcnの発現変動が

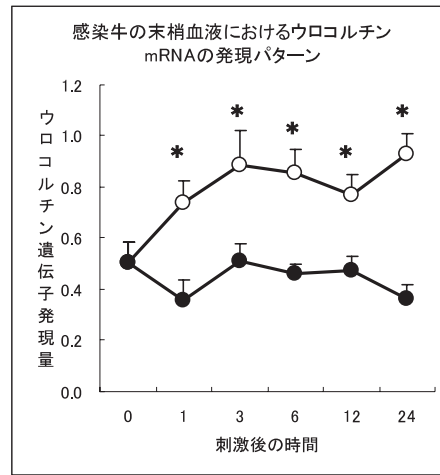


図3. ●ヨーネ菌抗原添加、○無添加 n=5の平均値 \* :  $p < 0.05$

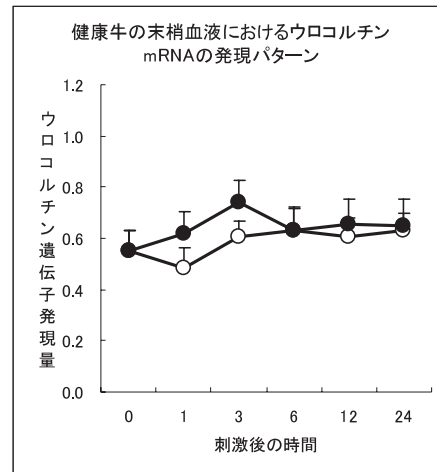


図4. ●ヨーネ菌抗原添加、○無添加 n=5の平均値

感染症において定量的に観察されたという報告はなく、さらにUcnの発現変動を感染症診断に応用するという報告もされておらず、病理発生機序を解明する基盤的な意味と実用性をもった研究成果と考えている。

(「ヨーネ病診断用プライマーおよびウロコルチン遺伝子の発現定量法によるヨーネ病の診断法」特許出願番号 特願 2005-291868.)