

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 Athipoo Nuntaprasert

IL-4 と IL-6 免疫反応の重要な調節因子であり、ブタにおいても重要と考えられる。本研究の目的は、ブタ IL-4/IL-6 の蛋白を発現し、それらの解析法を確立し、実際に生体に用いた際の効果を検索することによってそれらのブタでの免疫調節機能の基礎的研究への道を開くことである。本研究では組換えブタ IL-4/IL-6 の発現系の確立、抗ブタ IL-4/IL-6 抗体の作製とその性状解析、サンドイッチ ELISA ならびに ELISPOT システム確立と試験管内でのブタ由来細胞に対する両組換えサイトカインの生物活性の研究への応用を行った。さらに生体内で、正常状態、あるいは LPS、細菌感染といったブタの免疫システム刺激因子の前処理における組換えブタ IL-4/IL-6 の効果について解析を行った。

第一章では、組換えブタ IL-4 の発現ならびに精製とサンドイッチ ELISA、ELISPOT システムを確立した。ブタ IL-4 cDNA をクローニングし、大腸菌、バキュロウイルス、ほ乳類細胞発現系を用いてそれぞれの組換え蛋白を発現させた。さらに、ブタ IL-4 に対する 2 種類のポリクローナル抗体と 4 種類のモノクローナル抗体(mAb)を作製し、ブタ IL-4 の検出と精製に利用した。ここで作製した抗ブタ IL-4 抗体はサンドイッチ ELISA や ELISPOT システムへ応用できた。これらの系で、*M. pleuropneumoniae* を感染させたブタの BALF(肺胞還流液)サンプルでブタ IL-4 レベルを測定し、細菌感染群でサイトカインレベルが高い傾向であることを示した。これらの成果はバキュロウイルスが生物活性をもつサイトカインの発現に非常に有用なベクターであり、臨床研究に応用可能であることも示した。

第二章では、ブタ免疫細胞および LPS 誘導による炎症後サイトカイン産生への rSwIL-4 の影響を解析した。rSwIL-4 での処理により CD4 陽性 T 細胞やブタ樹上細胞 (Mo-DC) を誘導し、未熟 Mo-DC からの IL-6 産生が抑制された。また、rSwIL-4 を LPS と同時に添加すると LPS 刺激後の肺胞マクロファージから TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-18 の分泌が抑制された。一方、LPS 刺激 1 時間前に rSwIL-4 処理すると TNF- α と IL-18 の分泌が増加した。さらに、育成豚に LPS 処理 1 時間前にバキュロウイルス発現 rSwIL-4 を投与すると、炎症性サイトカイン、とくに TNF- α と IL-18 が増加し、エンドトキシンショック時の呼吸不全感受性が高くなった。以上より、炎症性サイトカイン産生へのブタ IL-4 の影響は投与のタイミングによる事が明らかとなった。

第三章では、組換え IL-6 発現と精製によるサンドイッチ ELISA 法の確立を行なった。大腸菌、バキュロウイルス、ほ乳類細胞による組換えブタ IL-6(rSwIL-6)発現を行い、糖鎖付加がブタ IL-6 の活性に影響すると考えられた。また、各系で発現した rSwIL-6 の精製法を確立した。精製 rSwIL-6 を用いてポリクローナル抗体も作製し、これを用いて SwIL-6 を測定するサンドイッチ ELISA 法を確立した。この ELISA 法で、マイトジェンや *A. pleuropneumoniae*、*M. pleuropneumoniae* を実験的に感染させたブタの血漿あるいは BALF サンプルで刺激した単球の培養上清中の可溶性ブタ IL-6 を測定したところ、細菌感染させた

ブタのサンプル中には IL-6 が産生されていることが示された。このように、SwIL-6 精製法と検出系の確立に成功した。

第四章では、ブタにおける急性期蛋白産生と *Streptococcus suis* 抵抗性に対する組換えブタ IL-6 の影響を解析した。バキュロウイルス発現 rSwIL-6 は試験管内、生体内両方で急性期蛋白合成誘導能があり、*S. suis* serotype 2 などのブタの細菌感染に対して、rSwIL-6 を投与することで免疫機能と抵抗性を増加させる可能性が示された。この rSwIL-6 は副作用のない強力な免疫調整機能を示し、有用と考えられる。

本研究で得られた rSwIL-4/ IL-6 とその生物活性とブタへの応用についての情報は、ブタの免疫学的基礎研究やブタの感染症に対する免疫療法・ワクチンの開発に貢献すると考えられる。また、ブタの疾病発症における IL-4/ IL-6 の果たす役割は未だ詳細な研究がなく、本研究で確立した発現サイトカインや測定技術は、このような研究に解析手段を与えるものとする。よって、審査員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものとした。