

## 日本家畜臨感染症研究会シンポジウム要旨

## 子牛肺炎におけるサーファクタント蛋白質の動態

動物衛生研究所 病態研究領域

宮本 亨

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うる牛の肺特異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、肺胞を覆う液相表面に薄層を形成し、肺胞の気相-液相界面にあって、その表面張力を低下させて肺胞の虚脱を防止している生理活性物質である。サーファクタントの主成分はリン脂質であるが、4種類の蛋白質、サーファクタント蛋白質 (SP-A, SP-B, SP-C, SP-D) が含まれている。このうち SP-A, SP-D の2種類は、カルシウム依存性に糖質に結合するC型レクチン・スーパーファミリー (コレクチン) に属する蛋白質で、肺胞表面における界面活性作用のみならず、肺胞腔における自然免疫 (細菌やウイルスの凝集、オプソニン化作用、マクロファージへの取り込み促進、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。(Sano & Kuroki, *Mol. Immunol.* 42:279-287, 2005)

SP-A, SP-D は、そのほとんどが肺胞Ⅱ型上皮細胞のみで合成されており、肺に障害がおこると、肺組織からの漏出する結果、その血中

濃度は障害の程度を反映して上昇すると考えられる。ヒトでは肺蛋白症、間質性肺炎などで上昇する肺特異的診断マーカーとしての有用性が確認されており、市販キットによる血中濃度の測定が行われている。また家畜でも馬において実験的細菌性肺炎で感染初期に血中 SP-D 濃度の上昇が報告されている (Hobo et al., *J. Vet. Med. Sci.* 69:827-30, 2007)。牛の SP に関する研究はまだ少なく不明な点が多いが、肺炎時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、呼吸器病の診断・予防のための有用な情報が得られるものと期待できる。

我々は、これまで牛肺胞洗浄液 (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、それらの抗体の作成を行ってきた。SP-D については、ポリクロナール抗体を用いて、BALF や肺ホモジェネート中 SP-D 測定可能な ELISA を、また SP-A に関しては、抗牛 SP-A モノクロナール抗体を作成して血清 SP-A を測定可能な ELISA を確立した。また肺由来ではないが、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) の開発を行った。

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 パラインフルエンザ 3 型ウイルス (PIV-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ている。

Mh 接種試験では、接種後 1 日目から体温、呼吸数とともに血清 Hp 濃度も著しく増加（～3000  $\mu\text{g/ml}$ ）した。血清 SP-A 濃度は接種後 3 日目以降に軽度増加（～14  $\text{ng/ml}$ ）した。免疫組織学的観察では、正常部位では肺胞壁に沿った線状の SP-A 陽性反応が観察されたのに対し、肺炎病巣内ではこれが消失しており、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、7 日目には、SP-A 陽性を呈する II 型肺胞上皮細胞の増殖が観察され、同時に組織中 SP-A mRNA も上昇していた。血清 SP-A 上昇は、II 型肺胞上皮細胞の増殖と、そこで産生された SP-A の一部が血中に漏出した結果ある可能性がある。

PIV-3 接種試験牛では、体温、呼吸数が接種後 1-6 日目で上昇した。血清 SP-A および Hp 濃度は接種後 6-12 日目に増加（SP-A: 8-20  $\text{ng/ml}$ 、Hp: 200-1400  $\mu\text{g/ml}$ ）した。た

だし細菌検査および病理学手的検査の結果から、この Hp 濃度上昇は細菌による二次感染に伴う炎症を反映したものと考えられる。そこで、PIV-3 接種期間中、抗生物質アンピシリンを連日投与する実験も行ったところ、Hp の上昇はほとんど見られず、SP-A 濃度接種後 7 日目に顕著に増加した（50-60  $\text{ng/ml}$ ）。接種後 7 日目には、II 型上皮細胞の増殖が観察されることから、Mh 接種の場合と同様、血清 SP-A 濃度の上昇は肺胞上皮の修復と関連している可能性がある。

これまでの結果から、牛血清 SP-A 濃度が細菌やウイルス感染による肺炎によって上昇すること、すなわち肺障害指標になり得ることが示唆されたが、血清 SP-A 濃度の変動要因については病理学的検査と合わせてさらに検討する必要がある。また今後は野外における正常、肺炎子牛の血清 SP-A や Hp 濃度の継時的変動に関するデータを収集、解析し、治療方針決定に対する有用性を検討してゆきたい。