

牛インターロイキン1に関する研究

— 初期サイトカインとしての発現動態の解明 —

伊 藤 隆 司

1994

牛インターロイキン1に関する研究

—初期サイトカインとしての
発現動態の解明—

伊藤隆司

1994年

目 次

I	序文	-----	1
II	材料と方法	-----	5
	1. 細胞		
	2. poly(A) ⁺ RNAの分離		
	3. プライマーオリゴヌクレオチド		
	4. RT-PCR法		
	5. RT-PCR生成物の解析		
	6. RT-PCR生成物の半定量化		
	7. ノーザンブロットおよびドットブロット法		
	7-1. ノーザンブロット法		
	7-2. ドットブロット法		
	8. in situ hybridization 法		
	9. 牛IL-1生物活性の測定		
	10. 肺胞マクロファージ培養上清中からのIL-1 α 及び β の精製		
	11. 単クローン抗体の作成とその性状解析		
	11-1. 単クローン抗体の作成		
	11-2. IL-1活性中和（阻止）試験		
	11-3. イムノグロブリンクラスの決定		
	11-4. ウェスタンブロッティングによる認識蛋白の決定		
	12. 単クローン抗体を用いたELISAによるIL-1 β の測定		
III	実験成績	-----	12
	1. 牛末梢血単核球、単球及び肺胞マクロファージの分離	-----	12
	2. RT-PCR法による牛IL-1 α 及びIL-1 β mRNAの検出	-----	12

- 2-1. poly(A)⁺RNAの分離
- 2-2. RT-PCR法による牛IL-1 α 及びIL-1 β mRNAの検出
 - 2-2-1. RT-PCR法の条件決定
 - 2-2-2. PCR生成物の解析—制限酵素切断パターンによる同定
 - 2-2-3. RT-PCR法の検出感度
 - 2-2-3-1. テンプレート poly(A)⁺RNA濃度による検出感度
 - 2-2-3-2. サンプル細胞数による検出感度
 - 2-2-3-3. PCRサイクル数による検出感度
 - 2-2-4. RT-PCR法により生成されたcDNAフラグメントのプロープとしての応用
 - 2-2-4-1. ノーザンブロットおよびドットブロット法
 - 2-2-4-2. in situ hybridization 法
- 2-3. RT-PCR法を用いたIL-1遺伝子発現検出に基づく牛免疫機能の検討
 - 2-3-1. in vitroにおけるIL-1mRNA生成動態
 - 2-3-2. LPS投与牛におけるIL-1mRNA生成動態
 - 2-3-3. IL-1 β mRNA量の個体差

3. 牛IL-1活性測定とIL-1 β に対する単クローン抗体 ----- 17

- 3-1. 牛IL-1生物活性の測定とin vitroにおけるIL-1産生動態
- 3-2. 肺胞マクロファージ培養上清中IL-1の精製
- 3-3. 単クローン抗体の作成とその性状解析
- 3-4. ELISAによるIL-1の測定

IV	考察 -----	19
V	総括と結語 -----	24
	謝辞 -----	28
	引用文献 -----	29
	表及び図 -----	41

I 序文

サイトカインとは細胞、主として免疫系細胞が産生、分泌する高分子ペプチドであり、各種細胞間情報伝達物質として、生体において重要な機能を担っている。すなわち、生体への異物の侵入に際し、感染防御、免疫反応と炎症反応等において、特異抗体、細胞性免疫と共に非特異的防御因子として重要な役割を果たしている。

ヒトあるいは実験動物において、現在までに明らかにされているサイトカインの種類としては次のものがあげられる。たとえば、T細胞とマクロファージは活性化されるに伴いIL（インターロイキン）-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8（chemotactic factor）、GM-CSF（顆粒球マクロファージコロニー刺激因子：granulocyte-macrophage colony-stimulating factor）、G-CSF（顆粒球コロニー刺激因子：granulocyte colony-stimulating factor）、IFN（インターフェロン） α 、IFN γ 、TNF α （腫瘍壊死因子：tumor necrosis factor-alpha）、リンフォトキシンなどさまざまなサイトカインを産生する。さらに、ストローマ細胞や内皮細胞などもM-CSF（マクロファージコロニー刺激因子：macrophage colony-stimulating factor）、IL-6、IL-7、LIF（白血病抑制因子：leukemia inhibitory factor）、IFN β 、GM-CSF、G-CSFなどを産生する。これらのサイトカインは発現ベクターによるクローニングをはじめとする遺伝子工学的手法の進歩により、過去10年近くの間にはほとんどすべての既知のサイトカインの遺伝子がクローニングされた。さらにIL-10、IL-11、IL-12などの新しいサイトカインも次々と同定されている。これらのサイトカインはある場合には構成的に、またある条件下では誘導的に産生され、リンパ球等血液細胞、内皮細胞、肝細胞などの各細胞コンパートメント間に張りめぐらされたサイトカインネットワークを通して生体防御反応に関与している。また、一連のサイトカインが神経細胞、血液多能性幹細胞や発生初期の胚幹細胞や始原生殖細胞などの増殖と分化にも関与していることが明らかになりつつある。このように、サイトカインは他の一連の増殖因子とともに、免疫応答反応や炎症反応に代表される生体防御反応にとどまらず、神経系や発生生物学に及ぶ広範な領域にその機能を発揮している。

獣医領域におけるサイトカイン研究も近年盛んに行われており、ウシのサイトカインに関する報告も増加してきている。cDNAの同定されたウシのサイトカインとしてはIL-1 α ^{26, 36)}、IL-1 β ^{27, 36)}、IL-2^{7, 35, 56)}、IL-4¹⁸⁾、IL-6¹⁷⁾、IFN α ⁶⁸⁾、IFN β

²⁹⁾、IFN γ ⁶⁾、TNF α ¹²⁾、GM-CSF^{28, 37)}などがあげられる。また、ヒトで報告されている他のサイトカインの一生物学的活性を指標として、サイトカイン様因子として報告されているものもある⁷³⁾。

インターロイキン1 (IL-1) はヒト、マウス、ウサギ、ネコ、ブタ、ウシ等の動物種で報告されている^{16, 24, 25)}。特にヒトIL-1に関しては詳細な研究がなされている。それによると、IL-1は主としてマクロファージ系の細胞から分泌される、約17kDaの蛋白質であり、等電点の異なるIL-1 α (等電点約5) とIL-1 β (等電点約7) の2種類が存在する。IL-1 α とIL-1 β は共に同一のIL-1レセプターに結合し、同一の作用を発揮するとされている。IL-1は他のサイトカインと同様、多様な生物活性を持っている。最も重要な機能はヘルパーT細胞からのIL-2の産生を誘導し、このIL-2を介してT細胞の分化・増殖を促進する点にある⁴⁰⁾。また、B細胞の分化・増殖^{31, 65)}や多核白血球の増殖・化学遊走性³⁴⁾にも影響している。さらに、IL-1は免疫系細胞に対して作用を示すばかりでなく、脳に対しては内因性発熱因子として作用したり^{16, 31)}、肝細胞に対しては炎症作用を発揮する急性期蛋白質の産生を促進し^{15, 50)}、更に、滑膜細胞に対してはコラゲナーゼやプロスタグランジン産生を誘導するなど⁴¹⁾、炎症反応にも関与している。

ウシIL-1は1988年、Maliszewski らによりcDNAがクローニングされ、その塩基配列が決定された³⁶⁾。また、大腸菌による蛋白の発現も報告されている³⁶⁾。しかし、彼らの報告はIL-1の物質としての分子生物学的研究にとどまり、生体防御反応に関わるサイトカインとしての動態、すなわち、産生細胞内での遺伝子発現から分泌およびそのカイネティクス等についてはふれられていない。また、IL-1の生物活性はヒト、マウスにおいてもマウス胸腺細胞のマイトジェン存在下での増殖増強作用を指標として測定されているが³⁹⁾、この方法ではIL-1 α 及び β の区別が不可能であり、IL-1 α および β の総合的な活性を測定していることになる。したがって生物学的測定法ではIL-1活性が α によるものであるのか β によるものであるのかの区別が不可能である。

本研究はこのような背景に基づいて、IL-1の免疫学的イニシエーターとしての作用、特に、疾病におけるIL-1産生の意義、さらにIL-1産生の個体差と疾病に対する免疫応答誘導との関連性等を解明することを目的として行われたものである。そのために、遺伝子工学的手法を用いたウシIL-1遺伝子発現の微量検出法及び、産生量

の多いといわれているIL-1 β を特異的に測定する、新しいIL-1測定法を確立した。

本論文は大きく分けてウシIL-1遺伝子検出と蛋白としてのIL-1検出とから成る。

まず、mRNAの検出については、ウシ末梢血単核球および肺胞マクロファージにおけるIL-1遺伝子の転写について検討した。

近年、特定のDNA断片を特異的な一組のプライマーと高温でのDNAポリメラーゼ活性を有するTaqポリメラーゼを利用し、短時間に数十万倍にも増幅することのできるPCR (polymerase chain reaction) 法^{42, 59, 60, 61)}が遺伝子工学手法として開発され、医学、農学、法医学などの領域で爆発的に広がっている。また、PCR法はTaqポリメラーゼを用いてDNAを増幅する反応であるが、逆転写酵素反応によるcDNA合成と組み合わせることによりRNAの解析にも応用可能である。実例として、Rappoleeらは創傷治癒におけるマクロファージの果たす役割を明らかにするため、これが生体内において各増殖因子を産生しているかどうかの検討にPCR法を応用し、この遺伝子検出法に対して combined reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) との名称を用いている⁵¹⁾。本論文では、すでに報告されているウシIL-1 α および β cDNAの塩基配列のデータよりそれぞれ一組のプライマーを合成し、ウシ末梢血単核球および肺胞マクロファージより調整したmRNAをテンプレートとしてRT-PCR法によりIL-1遺伝子発現を検討した。また、この方法により増幅されたIL-1 cDNAをプローブとして利用し、mRNAの出現をノーザンブロット、あるいはドットブロットハイブリダイゼーション法により検出した。さらに細胞あるいは組織におけるIL-1mRNAの位置情報を得るためにin situ hybridization 法を行った。

次に蛋白としてのIL-1について述べる。IL-1の生物活性の測定については前述のように、マウス胸腺細胞のマイトジェン存在下での増殖増強作用を指標として測定し、mRNAの生成と細胞培養上清中のIL-1活性との関連を明らかとした。更に、肺胞マクロファージの産生する天然型のIL-1 α と β を精製し、そのうちのIL-1 β を免疫原とし、in vitro stimulation法を用いて、単クローン抗体の作出を試みた。単クローン抗体作製技術は1975年に Köhler & Milstein²²⁾によって初めて抗体を分泌するB細胞とミエローマ細胞のハイブリドーマが作製されて以来、今日まで、様々な抗原物質に対する単クローン抗体を作り出してきた。と同時に、その技術は個々の研究室あるいは研究者により改良が行われてきた。B細胞を in vitro で抗原刺激する方法は、抗血清作製のために発展してきた生体に免疫する方法に比較して、抗体

産生量では劣るものの、条件によってははるかに少量の抗原で効率の高いB細胞の刺激が期待できる。従って、この刺激されたB細胞とミエローマ細胞を融合させてハイブリドーマを作製すれば、ごく少量の抗原で単クローン抗体を得ることができる。実際、ある種のホルモンや増殖因子に対する単クローン抗体作製の報告がされている^{3, 32, 33, 46, 53})。天然型IL-1 β は抗原として極めて微量しか得られないため、*in vivo*免疫原として必要十分量を得ることは困難である。そこで、この*in vitro* stimulation 法を応用し、肺胞マクロファージ由来のIL-1 β を抗原として単クローン抗体を作製した。そのうちの1抗体を使用し、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) でのIL-1 β の測定法に応用した。その結果、従来の、生物学的測定法と同程度の感度で、培養単球及び肺胞マクロファージの産生するIL-1の測定が可能となった。

II 材料と方法

1. 細胞

ウシ末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells / PBMCs) は、健康牛頸静脈よりヘパリン加血液を採取し、フィコール・コンレイ比重遠心法 (比重 = 1.081) により分離した。培養液にはRPMI1640培地 (Gibco; 2mM L-グルタミン、25mM HEPES、 5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール、100IU/mlペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン、10%牛胎仔血清添加: 以下RPMI-10%FCS) を用いた。また、PBMCsのうち単球のみを調製する場合には、37°C、2時間の付着操作後、非付着細胞を洗浄除去し、単球とした。

ウシ肺胞マクロファージ (alveolar macrophage / AM) は健康牛の気管支肺胞洗浄液より細胞を回収し、付着法により分離した。これらの付着細胞は固定羊赤血球の貪食能陽性、非特異的エステラーゼ染色陽性、酸フォスファターゼ染色陽性により、AMであることを確認した。

2. poly(A)⁺RNAの分離

PBMCsあるいはAMをリポポリサッカライド (LPS; Sigma社製、E. coli由来) 20 μ g/mlで一定時間刺激後、それぞれの細胞からオリゴdTセルロースクロマトグラフィーでpoly(A)⁺RNAを抽出した¹¹⁾。poly(A)⁺RNAの精製にはmRNA精製キット (Pharmacia) を用い、OD₂₆₀の吸光度よりRNAを定量した。エタノール沈澱したpoly(A)⁺RNAは最終的に25-50ng/ μ lの濃度にTEバッファー [10mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM NaCl、1mM EDTA] に溶解した。

RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 法には原則として、50-100ngのpoly(A)⁺RNAを用いた。

3. プライマーオリゴヌクレオチド

IL-1 α および IL-1 β cDNAの増幅に用いたプライマーは Maliszewskiら³⁶⁾により報告されたIL-1 α およびIL-1 β のcDNAの塩基配列の情報に基づき、DNAシンセサイザー (ABI社製) により合成した。IL-1 α およびIL-1 β 特異的プライマーの塩基配列を表1に示す。また、コントロールとしてハウスキーピング遺伝子であるウシ β -アクチン¹⁴⁾を同時に検出するための特異的プライマーの塩基配列をあわせて表1に示す。

4. RT-PCR法

前述のように分離精製した、poly(A)⁺RNA 50-100ngをテンプレートとしてRT-PCR法によりIL-1 α およびIL-1 β mRNAを検出した。RT-PCR法はRNA-PCRキット (Takara) を用いた。逆転写反応 (RT) およびPCR反応時の反応液組成はそれぞれ表2に示す。RT反応時のプライマーとしては 1) ランダムヘキサマー、2) オリゴd (T)₁₆、3) 特異的下流プライマーの3種類を使用した。また、RT反応条件は42°C、15分で行い、つづいて99°C、5分で逆転写酵素を失活させた (逆転写酵素はcDNAに結合しているため、そのままPCRを行うと反応を阻害する)。つづいて行うPCR反応条件は 1) 熱変性: 95°C、1分 (1回目の熱変性のみは3分)、2) プライマーアニーリング: 55°C、1分、3) 伸長反応: 72°C、1分で行い、原則として35サイクルで実施した。

5. RT-PCR生成物の分析

PCR反応液 (生成物) の10 μ lを4%アガロース (NuSieve 3:1 Agarose FMC) ゲル電気泳動により泳動後、エチジウムブロマイド染色し検出した。また、検出された、DNAフラグメントは8種類の制限酵素による切断パターンによりその特異性を同定した。

6. RT-PCR生成物の半定量化

4%アガロース (NuSieve 3:1 Agarose FMC) ゲル電気泳動により泳動後、イメージアナライザー (BIO-PROFIL:MS機器) で半定量化した。

7. ノーザンブロットおよびドットブロット法

7-1. ノーザンブロット法

分離、精製したpoly(A)⁺RNAを1 μ g、0.1 μ g、0.01 μ gに段階希釈し、1.5%アガロースゲル電気泳動を行った。アガロースゲル電気泳動は0.66Mホルムアルデヒド加条件で、1 \times MOPS [20mM MOPS (3-N-モホリノプロパンスルホン酸)、5mM 酢酸ナトリウム、1mM EDTA] 電気泳動液を用いた。電気泳動後、キャピラリーブロッティング法により20 \times SSPE (1 \times SSPE=0.18M NaCl/0.01M NaH₂PO₄/1mM EDTA) 溶液中でナイロンメンブレン (アマーシャム社製、Hybond-N⁺) にブロットした。ノーザンハイブリダイゼーションのプロープとしてはRT-PCR生成物を簡易精製 (Takara:SUPREC02使用) 後、³²P-ATPでアイソトープラベルしたものを用いた (RANDOM PRIMED DNA LABELING KIT/United States Biochemical Corporation社製を使用)。ハイブリダイゼーション溶液としては5 \times SSPE、5 \times Denhardt溶液、0.5%SDS、100 μ g/m¹サケ精子DNAを用い、65 $^{\circ}$ Cで2時間プレハイブリダイゼーション後、プロープを加え65 $^{\circ}$ Cで20時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後のメンブレンは洗浄後、オートラジオグラフィーを行った。

7-2. ドットブロット法

ノーザンブロット法と同様に段階希釈したpoly(A)⁺RNAをドット・プレート (Advantec) を用いてナイロンメンブレンにブロットした。以下、ノーザンブロット法と同じプロープを用いてハイブリダイゼーションを行った。

8. in situ hybridization 法

細胞あるいは組織におけるIL-1mRNAの位置情報を得るためにin situ hybridization 法を行った⁷²⁾。AMを前述の方法により採取し、ポリ-L-リシンをコートした細胞培養用プレート（スミロンセルタイトPLシャーレ；住友ベークライト）に培養した。LPS（20 μ g/ml）で12時間刺激後、4%ホルムアルデヒド、5%酢酸、0.9%NaCl溶液で20 $^{\circ}$ C、30分間、固定した。固定後、70%エタノール中で4 $^{\circ}$ Cにて保存し、ハイブリダイゼーション実施直前にエタノールを除去し、室温にて乾燥させた。ハイブリダイゼーション溶液（60%脱イオン化ホルムアミド、0.3M NaCl、0.03M $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 、10mM EDTA、25mM NaH_2PO_4 pH7.4、5%Dextran sulfate、250 μ g/ml salmon sperm DNA、250 μ g/ml yeast RNA）で42 $^{\circ}$ Cで2時間、プレハイブリダイゼーションを行った後、プローブを加え、42 $^{\circ}$ Cで16時間、同組成の溶液中でハイブリダイゼーションを行った。プローブの調製は、RT-PCR生成物を4%低融点アガロースゲル電気泳動により泳動後、特異的フラグメントをゲル中より切り出して回収し、ジゴキシゲニン-dUTPを用いたランダムプライムシステム（Boehringer Mannheim Biochemica）によりDNA標識して用いた。ハイブリダイゼーション後、プローブを除去し、洗浄操作を行った後、ペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体（0.1M Tris-HCl pH 7.5、0.15M NaCl、2%家兎血清で適当濃度に希釈して使用）と37 $^{\circ}$ Cで2時間、反応させた。最終的に、DAB（1.39mM diaminobenzidine、0.01% H_2O_2 、50mM Tris-HCl pH 7.3）を基質として発色させ、顕微鏡によりmRNAシグナルを観察した。

9. ウシIL-1生物活性の測定

ウシIL-1生物活性の測定はヒトおよびマウスのIL-1測定法と同様、C3H/HeJマウス（遺伝的にLPS不応答である）胸腺細胞の増殖を指標に行った³⁹⁾。すなわち、C3H/HeJマウスの胸腺細胞を 1×10^7 /mlにRPMI-15%FCS培地に浮遊し、96ウェル細胞培養用プレートに150 μ l/ウェル播き込み、検体50 μ lと0.2% (v/v) PHA (phytohemagglutinin) -P (Gibco) を加え、37 $^{\circ}$ C、72時間培養した。培養終了前、24時間（48-72時間）³H-チミジン (NEN) 0.5 μ Ci/ウェルでパルスラベルした。培養終了後、セルハーベスター (LABO MASH: LABO SCIENCE CO., LTD.) を用い細胞を採取し、風乾後、液体シンチレーションカウンターにより³Hの放射活性を測定した。

10. 肺胞マクロファージ培養上清中からのIL-1 α 及び β の精製

ウシ肺胞マクロファージをLPSで24時間刺激した培養上清からIL-1 α 及びIL-1 β を次の方法で精製した。まず、培養上清を3,000rpm、10分間遠心し細胞片を除去後、220nmフィルター濾過した。つづいて、限外濾過法（ミリポア社製、ミニタンを使用）により分子量30,000から10,000の成分を濃縮した。さらに液体等電点電気泳動法（バイオラッド社製、ロトフォアを使用）によりpI3-10の各コンパートメントに精製した。各コンパートメント画分は透析によりアンフォライトを除去後、IL-1生物活性をC3H/HeJマウス胸腺細胞を用いて測定した。

11. 単クローン抗体の作成とその性状解析

11-1. 単クローン抗体の作製

前述の方法により肺胞マクロファージ培養上清からウシIL-1 β を精製し、免疫原としてin vitro stimulation法により単クローン抗体を作製した（図1）。すなわち、 1×10^7 /mlのBALB/Cマウス脾細胞を2.5mlずつ、6ウェル細胞培養用プレートの4ウェルに分注した。ついで、ムラミルジペプチド (MDP) を最終濃度40 μ g/ml、アジュバントとして各ウェルに加えた。精製IL-1 β 溶液（約100 μ g/ml）を各ウェルにそれぞれ

れ1、5、20、50 μ l 加え、FCS濃度を20%にした後、37°Cで4日間培養した (in vitro stimulation)。4日後、感作脾細胞 (総数約 1×10^8 個) とマウスミエローマ細胞P3U1 (約 5×10^7 個) をポリエチレングリコール4000により定法により融合させた。融合細胞はHAT培地により選択した。スクリーニング (コロニー形成ウェル上清中の抗体の有無) は精製IL-1 β を抗原とした、ELISAにより行い、ELISA陽性細胞はシングルセルマイクロマニピュレーター法によりクローニングした。

11-2. IL-1活性中和 (阻止) 試験

無血清培地 (コスモ・バイオ、Cosmedium 001) によるハイブリドーマ培養上清からイムノグロブリンを飽和硫酸塩析法により濃縮、精製した。この精製抗体 (100 μ g/ml) 50 μ l と肺胞マクロファージ由来および末梢血単球由来のIL-1、50 μ l とを混合し、37°Cで2時間インキュベートした後、マウス胸腺細胞を用いてIL-1活性を測定した。

11-3. イムノグロブリンクラスの設定

Zymed社製のEIA-Kitを用いてイムノグロブリンクラスを設定した。

11-4. ウェスタンブロットィングによる認識蛋白の同定

精製IL-1 β を12%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるSDS-PAGE²³⁾後、ニトロセルロース膜に転写し、精製抗体とによるウェスタンブロットィング法により単クローン抗体の認識する蛋白を同定した。

12. 単クローン抗体を用いたELISAによるIL-1 β の測定

被検検体（マクロファージ等培養上清等）50 μ lをELISA用プレートに乾燥固相化した（37 $^{\circ}$ C）。つづいて1%牛血清アルブミン（BSA）/PBS [Dulbecco's phosphate buffered saline (NaCl 8.0g/l, KCl 0.2g/l, Na₂HPO₄ 1.15g/l, KH₂PO₄ 0.2g/l)] によりブロッキングをおこなった。次に精製抗体（中和活性を有する抗体及び有しない抗体）を10 μ g/ウェルに加え、37 $^{\circ}$ C、1時間反応させた。二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgを37 $^{\circ}$ C、1時間反応させた。基質としてオルトフェニレンジアミン（OPD）を用いて発色させ、3N H₂SO₄で反応停止後、ELISAプレートリーダーにより吸光度（492nm）を測定した（図2）。

Ⅲ. 実験成績

1. 牛末梢血単核球、単球及び肺胞マクロファージの分離

ヘパリン加血液10mlから約 1×10^7 個の単核球が得られ、2時間の付着操作により約 $1-1.5 \times 10^6$ 個の単球が得られた(図3)。また、気管支肺胞洗浄液より成牛1頭当たり約 $1-2 \times 10^6$ 個の細胞を回収し、付着法によりAMを分離した(図4)。これらの付着細胞はグルタルアルデヒド固定羊赤血球の貪食能陽性(図5A)、非特異的エステラーゼ染色陽性(図5B)、酸フォスファターゼ染色陽性(図5C)により、AMであることを確認した。

2. RT-PCR法による牛IL-1 α 及びIL-1 β mRNAの検出

2-1. poly(A)⁺RNAの分離

末梢血単核球および肺胞マクロファージ 1×10^6 個から約0.5-1.0 μ gの poly(A)⁺ RNAが精製された。

2-2. RT-PCR法による牛IL-1 α 及びIL-1 β mRNAの検出

2-2-1. RT-PCR法の条件決定

原則として50ngのpoly(A)⁺RNAをテンプレートとして前述の条件によりRT-PCRを実施した。RT反応時のプライマーとしては一般に 1) ランダムヘキサマー、2) オリゴd(T)₁₆、3) 特異的下流プライマーの3種類が使用可能であるが本実験においてもこの3種類のプライマーの何れを用いてもよい結果が得られた。すなわち、4%アガロースゲル電気泳動の結果、予想したサイズのバンドを検出した(IL-1 α :424bp、およびIL-1 β :394bp) (図6)。

2-2-2. PCR生成物の解析—制限酵素切断パターンによる同定

PCR生成物の同定のため、8種類（BamHI、EcoRI、HindIII、HinfI、KpnI、PstI、SacI、XbaI）の制限酵素による切断パターンを調べた。その結果、IL-1 α およびIL-1 β ともに Maliszewski らの報告した塩基配列と完全に一致した切断パターンを示し、PCR生成物の特異性が同定された。すなわち、IL-1 α については増幅されたcDNAフラグメント（424bp）内部にHindIIIサイトが1カ所、HinfIサイトが2カ所存在し、HindIIIの場合、317bpと107bpの断片に、HinfIの場合154bp、146bp、124bpの断片に切断された（図7A）。IL-1 β については増幅されたcDNAフラグメント（394bp）内部にHindIIIサイトが1カ所、PstIサイトが1カ所存在し、HindIIIの場合301bpと93bpの断片に、PstIの場合326bpと68bpの断片に切断された（図7B）。他の制限酵素については内部にサイトが存在せず、増幅されたcDNAフラグメントは切断されなかった。

2-2-3. RT-PCR法の検出感度

2-2-3-1. テンプレート poly(A)⁺RNA濃度による検出感度

PBMCsを20 μ g/mlのLPSで24時間刺激した後、poly(A)⁺RNAを抽出した。テンプレートとしてこの poly(A)⁺RNAを0.1ngから1fgまで10倍段階希釈しRT-PCR法を実施した。その結果、IL-1 α では最少 poly(A)⁺RNA、0.01ng、また、IL-1 β では最少0.1pgの濃度で検出可能であった（図8）。

2-2-3-2. サンプル細胞数による検出感度

PBMCsを 1×10^7 から 1×10^2 まで10倍段階希釈し、培養した。20 μ g/mlのLPSで24時間刺激した後、poly(A)⁺RNAを抽出し、全量をテンプレートとしてRT-PCR法を実施した。その結果、最少 1×10 のPBMCsから抽出した poly(A)⁺RNAで検出可能であった（図9）。

2-2-3-3. PCRサイクル数による検出感度

PBMCsを20 μ g/mlのLPSで24時間刺激した後、poly(A)⁺RNAを抽出した。一定量、50ngのpoly(A)⁺RNAをテンプレートとし、PCRのサイクル数を5、10、15、20、25、30、35、40としてRT-PCR法を実施した。その結果、サイクル数25以上で検出可能であった(図10)。

2-2-4. RT-PCR法により生成されたcDNAフラグメントのプロープとしての応用

2-2-4-1. ノーザンブロットおよびドットブロット法

分離、精製したpoly(A)⁺RNAを1 μ g、0.1 μ g、0.01 μ gに段階希釈し、1.5%アガロースゲル電気泳動を行った。プロープとしてはIL-1 β のRT-PCR生成物(394bp)を簡易精製(宝酒造SUPRECO2使用)後、³²P-ATPでアイソトープラベルしたものを用いた(ペーリンガーマンハイムランダムプライムラベリングキット使用)。ハイブリダイゼーション溶液としては5 \times SSPE、5 \times Denhardt溶液、0.5%SDS、100 μ g/mlサケ精子DNAを用い、65 $^{\circ}$ Cで2時間プレハイブリダイゼーション後、プロープを加え65 $^{\circ}$ Cで20時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後の、メンブレンは洗浄後、オートラジオグラフィーを行った。その結果、poly(A)⁺RNA濃度、1 μ gおよび0.1 μ gにおいて約2.0kbの単一バンドを検出した(図11)。この結果はMaliszewskiらの報告と一致し、このことによりRT-PCR生成物のノーザンブロット法におけるプロープとしての有用性が示された。ドットブロット法においても同様の結果が得られた(図12)。検出感度の観点よりRT-PCR法とノーザンブロット法とを比較検討してみると、前者では前述のようにIL-1 β では最少0.1pgの濃度で検出可能であったのに対し、後者では0.1 μ gが検出限界であり、計算上では10⁶倍、RT-PCR法の方が高感度であった。

2-2-4-2. in situ hybridization 法

AMをLPS (20 μ g/ml) で12時間刺激後、固定した。対照としてLPS刺激しない細胞を準備した。プローブはRT-PCR生成物を精製後、ジゴキシゲニン-dUTPによりDNA標識して用いた。ペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を反応させ、最終的に、DABを基質として発色させ、顕微鏡によりmRNAシグナルを観察した。その結果、対照とした細胞においてもいわゆる活性化マクロファージ（形態的には線維芽細胞様）が認められ、IL-1 β mRNAが検出された（図13A）。また、LPSで12時間刺激した細胞においては活性化マクロファージが増加し、IL-1 β mRNAの検出される細胞が増加していた。しかし、形態的には円形を示す細胞においてはIL-1 β mRNAが検出される細胞と検出されない細胞が存在した（図13B）。これらの結果から、同じ肺胞のマクロファージであっても一部の細胞がIL-1 β mRNAを発現し、細胞間のバラツキが大きいことが示された。同一の種類 of 細胞でも機能的にはかなり差があるものと考えられた。

2-3. RT-PCR法を用いたIL-1遺伝子発現検出に基づく牛免疫機能の検討

これまでに述べてきたIL-1遺伝子発現検出法を応用し、実際の牛免疫機構におけるIL-1の動態について検討を加えた。

2-3-1. in vitroにおけるIL-1mRNA生成動態

1×10^6 個のPBMCsを20 μ g/mlのLPSで0（対照；いわゆる restingの状態）、3、6、9および24時間刺激した後、poly(A)⁺RNAを抽出し、RT-PCRを実施した。PCR20サイクルの条件ではIL-1 α および β mRNAはresting細胞では検出されなかったが、IL-1 α mRNAはLPS刺激後、3、6、9時間で、また、IL-1 β mRNAはLPS刺激後、3、6、9、24時間で検出された（図14A）。しかし、PCRサイクル数を25サイクルに増やした場合にresting細胞においてもIL-1 β mRNAが認められ（図14B）、さらに35サイクルの条件ではIL-1 α mRNAも認められた（図14C）。これらの結果より、牛PBMCsではLPS等の刺激のない、いわゆるrestingの状態であってもきわめて低レベルではあるが、構成

的（持続的）にIL-1 α およびIL-1 β mRNAの合成が認められることが明らかとなった。さらに、LPS刺激により短時間（3時間以内）でIL-1 α および β mRNA量の上昇が認められ、また、IL-1 α mRNAの出現が一過性を示すことが明らかとなった。

2-3-2. LPS投与牛におけるIL-1mRNA生成動態

健康牛（体重350-400kg）にE. coli由来のLPSを0.02mg/kg、静脈内投与した。投与後、30分、1、2、4、6時間後に頸静脈より採血し、直ちにPBMCsを分離し、つづいてpoly(A)⁺RNAを精製した。50ngのpoly(A)⁺RNAをテンプレートとしてRT-PCR法を実施した。その結果、IL-1 α mRNAはLPS投与後30分で認められ、2-4時間後にはピークに達し、6時間で減少した（図15A）。これに対しIL-1 β mRNAはLPS投与後、30分で認められ、1時間後にはピークに達し、2、4、6時間でも引続き認められた（図15B）。これらの結果より、in vivoにおいてもLPS投与後、極めて短時間でmRNA合成を認め、いわゆる early phaseのサイトカインとして炎症に深く関与することが示された。また、in vitroにおいても認められた IL-1 α mRNA出現の一過性も認められた。また、RT-PCR生成物の4%アガロースゲル電気泳動後の、イメージアナライザー（BIO-PROFIL:MS機器）で解析し、IL-1 α およびIL-1 β mRNAの半定量化を試みた結果を図16, 17に示した。

2-3-3. IL-1 β mRNA量の個体差

RT-PCR法を用いて健康牛の末梢血単核球におけるIL-1 β mRNA量を個体毎に検出した。その結果、いわゆるrestingの状態においても低レベルのmRNAが認められ、その量は個体により差を認めた（図18）。

3. 牛IL-1活性測定とIL-1 β に対する単クローン抗体

3-1. 牛IL-1生物活性の測定とin vitroにおけるIL-1産生動態

牛PBMCsを10 μ g/mlのLPSで24時間刺激した培養上清中のIL-1活性をC3H/HeJマウス胸腺細胞の増殖を指標により測定した(図19)。測定結果の一例を図20に示す。IL-1活性はcpm(count per minute)で示した。また、場合によりコントロールcpmの2倍のcpmを示すサンプルの希釈倍数を1単位として示した。1 \times 10⁶個のPBMCsを20 μ g/mlのLPSで0(対照;いわゆるrestingの状態)、3、6、9、24および48時間刺激した後、培養上清を回収しIL-1活性を測定した。その結果、刺激後3時間以降で活性が認められ、24、48時間後には高活性が認められた(図21)。

3-2. 肺胞マクロファージ培養上清中IL-1の精製

牛BAMをLPSで24時間刺激した培養上清からIL-1 α 及びIL-1 β を前述の方法で精製した。液体等電点電気泳動の結果、pI \approx 5およびpI \approx 7-10付近に2つの活性のピークが認められ、LPSで刺激した牛肺胞マクロファージ培養上清中においても明らかにIL-1 α とIL-1 β の活性が認められた(図22)。

3-3. 単クローン抗体の作成とその性状解析

精製ウシIL-1 β を免疫原としてin vitro stimulation法により単クローン抗体を作成し、最終的に12クローンのハイブリドーマを得た。これら牛IL-1 β に対する単クローン抗体の性状を表3に示す。表に示すようにイムノグロブリン(Ig)クラスは同定できたものはすべてIgMであり、ウェスタンブロッティングによる結果は6クローンで分子量約15kの蛋白を認識していた(図23)。IL-1活性中和(阻止)試験の結果、2クローン(1E8、1H9)に中和活性が認められたが、いずれも100%活性を阻害するものではなく部分的な中和活性であった(図24)。

3-4. ELISAによるIL-1の測定

単クローン抗体（クローン1H9）を用いたELISAによるIL-1 β の測定を試み、マウス胸腺細胞を用いたバイオアッセイの結果と比較した。その結果、図25に示すようにバイオアッセイと同程度の感度で培養上清中のIL-1の測定が可能であった。すなわち、ELISAによる測定の場合、本検体はバックグラウンドのOD値（0.05）の2倍（0.1）以上の値を示す、検体の最高希釈倍数を1単位とすると32単位となる。また、バイオアッセイによる測定の場合、同様に、バックグラウンドのcpm（約5,000cpm）の2倍（約10,000cpm）以上の値を示す、検体の最高希釈倍数を1単位とすると32単位となる。

IV. 考察

既に述べたように著者らは牛IL-1 α およびIL-1 β mRNAの極めて高感度で特異的な検出法としてRT-PCR法を確立した。さらに牛肺胞マクロファージの産生する天然型のIL-1 α およびIL-1 β の存在を確認し、その内のIL-1 β を抗原としてin vitro stimulation法を応用してIL-1 β に対する単クローン抗体を作出した。そして、この単クローン抗体を用いたELISAによるIL-1 β 測定法を確立した。

RT-PCR法による遺伝子発現検出の応用例としてはChellyらによる各種組織におけるジストロフィン遺伝子発現の定量的解析への応用⁸⁾、Kawasakiらの報告した慢性骨髄性白血病に認められるBCR-ABL融合mRNAの検出への応用²⁰⁾、およびRappoleeらによる創傷部位のマクロファージにおける各種サイトカインの発現の解析への応用⁵¹⁾が文献上最も早く認められるものであろう。現在までに、RT-PCR法は微量な遺伝子発現の検出⁶⁹⁾、少量のサンプルにおける遺伝子発現の解析⁵²⁾、遺伝子発現量の定量的解析^{1, 8, 48, 70, 71)}など数多くの幅広い分野での応用が報告されている。また、cDNAクローニングへの応用例として、PowellらはPCR法をcDNAのクローニングに応用することにより組織特異的なアポリポタンパク質mRNAプロセシングの解析を行っている⁴⁹⁾。また、Toddらはインスリン依存性糖尿病患者のHLA遺伝子多型性の解析への応用を報告している⁶⁶⁾。このようにRT-PCR法を応用した報告は数多いが、特に家畜のサイトカイン遺伝子に関する報告としては、牛IL-4cDNA¹⁸⁾、豚IL-6cDNA³⁸⁾、羊GM-CSFcDNA⁴³⁾のクローニングに関する報告の他、牛IL-2mRNA¹⁹⁾、豚・羊・牛IL-6mRNA³⁸⁾発現に関する報告と数限られている。本研究において著者らはRT-PCR法による牛IL-1 α およびIL-1 β mRNA検出法を確立した。

RT-PCR法によるIL-1 α およびIL-1 β mRNA検出法は極めて微量な発現を検出可能とし、たとえばLPS等の刺激のないいわゆる restingな状態の牛末梢血単核球においてもIL-1 α およびIL-1 β mRNAの出現の認められることが明らかとなった。また、検出感度については10個以上の極めて数少ない細胞からさえ特異的にIL-1 α およびIL-1 β mRNAが検出可能となった。また、RT-PCR法では従来mRNAの発現検出法として頻用されてきたノーザンブロッティング法と比較し約 10^6 倍高感度にIL-1 α および

IL-1 β mRNAが検出可能となった。RT-PCR生成物の応用例も既に述べたようにノーザンブロッティング法あるいはドットプロット法におけるプローブとして有用であることが示された。さらにin situ hybridization法におけるプローブとしても有用であった。特に in situ hybridization法は染色体、細胞、組織にある特定の塩基配列を有する核酸（ゲノムDNA、mRNA、ウイルス等の病原体）の所在（位置情報）を明らかにする方法として一般的に行われるようになってきた^{2, 72)}。牛肺胞マクロファージにおけるIL-1 β mRNAをin situ hybridization法により検出したところ、同じ肺胞のマクロファージであっても一部の細胞がIL-1 β mRNAを転写し、細胞間のバラツキが大きいことが示された。同一の種類の細胞でも機能的にはかなり差があるものと考えられた。ヒト、マウスについてはin situ hybridization法による細胞、組織中のサイトカインmRNA検出に関しては既に数多くの報告があるが、牛のサイトカインに関する報告は未だなく、本研究による肺胞マクロファージにおけるIL-1 β mRNAの検出が最初のものである。in situ hybridization法は今後、炎症をはじめとする種々の病態における、各組織でのIL-1をはじめとしたいわゆる炎症性サイトカインのmRNA検出法として頻用されるであろう。

さて、このように確立したRT-PCR法を用いて実際の牛免疫応答におけるIL-1mRNAの動態について検討を加えた。その結果、in vitroあるいはin vivoにおいて若干の差は認められるものの末梢血単核球におけるIL-1 α およびIL-1 β mRNAの出現はLPS刺激後極めて短時間（30分-3時間）で認められ、ヒトやマウスのIL-1mRNAと同様な動態を示すことが明らかとなった。このことは牛においてもIL-1 α およびIL-1 β はいわゆる初期サイトカイン（early phaseサイトカイン）として生体防御反応の初期の非特異的な炎症反応に深く関わることを示唆している。すなわち、感染に伴う生体防御反応は初期の非特異的な炎症反応と後期の特異免疫応答に分けることができ、初期反応としての発熱、急性相蛋白の産生、食細胞の浸潤などの非特異的な炎症反応はIL-1を代表としたいわゆる初期サイトカインの関与するものである。初期反応でマクロファージやB細胞により処理された抗原はMHC（主要組織適合抗原：major histocompatibility complex）のクラスII分子とともに対応するT細胞に提示され、刺激を受けたT細胞からはIL-2、IL-4、IL-5、IFN γ などの後期サイトカインが産生される。また、健康牛のいわゆるrestingな状態での末梢血単核球におけるIL-1 β mRNAを検出した結果、個体により差を認めた。この結果は単に牛個体の飼育環境を

含めた状況の差によるものか免疫遺伝学的な個体差によるものかは明らかではないが、感染時においてIL-1mRNA合成の差により、その後が続いて起きる免疫反応の個体差として現れ、ひいては疾病に対する感受性、抵抗性を規定するもののひとつとして捉えられるかもしれない。本研究ではIL-1についてのみ、その発現・産生について検討したが、既に述べたように炎症反応、免疫応答の発現は種々のサイトカインによって制御されており（サイトカインネットワーク）、他のサイトカイン、たとえば、初期サイトカインであればIL-6、TNF α の発現を同時に検討する方がより良い解析が可能であろう。すでにヒトでは、ある状態（疾病に限らず）における特定細胞での複数のサイトカインmRNAを同時に検出するための手法と理論が打ち出されている。すなわち、サイトカインマッピング [cytokine MAPPING (message amplification phenotyping)]⁴⁾といわれるもので極めて少数の細胞あるいは組織における各種サイトカインmRNAをRT-PCR法により検出し、健康組織あるいは病的組織における各種サイトカインmRNA発現の特徴に基づき疾病の診断に応用するというものである。牛のサイトカインについてもIL-1をはじめとして各種のサイトカインmRNAの検出にRT-PCR法が応用され、牛サイトカインマッピングによる病気の診断がされるであろう。

ところで、これまで述べてきたようにRT-PCR法によるIL-1mRNA検出に関してはあくまで定性的なものであるがRT-PCR法による遺伝子発現の定量的解析への応用に関する報告もある^{1, 8, 48, 70, 71)}。たとえば、Chellyらは筋ジストロフィーに関連する遺伝子、ジストロフィンの発現を定量的に検出する目的に応用している⁸⁾。彼らはジストロフィンmRNAと内部対照としてアルドラーゼA mRNAを同じサンプルチューブで同時に増幅し、2-5サイクルごとの増幅産物を定量し各遺伝子の増幅効率とおのこの量比を求めることによって、増幅前の遺伝子量を内部対照に対する相対的量比として計算するというものである。また、Wangらは内部対照として人工的に作製した合成RNAを用い、各種サイトカインなどのmRNAを定量する方法について報告している⁷¹⁾。これは目的遺伝子と同じプライマーで異なるサイズとして増幅可能な塩基配列を有するものであり目的遺伝子の絶対的な量を知ることができる。しかし、これらの方法は内部対照を準備しなくてはならずその手技も煩雑なものでありこれらの方法とは別にRT-PCR産物の電気泳動像（DNA量）を直接デンシトメーターで測定し便

宜上の単位 (area等) を使用し相対的な定量を実施している報告も見られる⁵⁶⁾。著者らもRT-PCR産物の電気泳動像を直接、イメージアナライザーにより半定量した結果、よい結果が得られた。もちろん絶対的なmRNA量を示すものではないが簡易的方法で応用価値の高い方法であると思われた。

既に述べたように組換え体 (リコンビナント) サイトカインを用いた牛の免疫機構の解明に関する研究が可能となってきた。これまでに報告されている牛のリコンビナントサイトカインとしては、IL-1 β ^{5, 13)}、IL-2^{13, 54, 67)}、IFN α ^{44, 47)}、IFN γ ^{10, 63, 64)}、TNF α ^{9, 45)}、GM-CSF³⁷⁾、G-CSF²¹⁾があげられるが、現在のところ限られた研究室でのみ利用されているにすぎない。本研究では牛IL-1の発現動態と免疫機構を中心に検討したが、その過程においてRT-PCR法により全長の牛IL-1 β cDNA (801bp) のクローニングに成功した。今後、発現ベクターを用いて大腸菌等での発現を試みリコンビナント牛IL-1 β を作製することが可能となるであろう。また、今後、リコンビナントサイトカインが臨床応用されることになるであろうが、安全性の問題を十分検討しなければならない。また、感染症の予防・治療薬としての有効利用をはかるためには詳細なIL-1の作用やサイトカインネットワークの解明が必要であろう。この点に関しても、著者らの手法あるいは牛IL-1発現に関する知見はきわめて有効なものと考えられる。

蛋白質としての牛IL-1について述べれば、牛肺胞マクロファージの培養上清から天然型のIL-1 α およびIL-1 β を精製した。IL-1についてはヒトをはじめとする種々の動物種において等電点の違いからpI \approx 5のIL-1 α とpI \approx 7のIL-1 β が存在し、それぞれ異なる遺伝子にコードされていることが明らかとなっている。精製の結果から明らかのように、IL-1 α に比べIL-1 β の産生量が多く、mRNA量においてもIL-1 β の方が多いことと一致した。IL-1測定法としては前述のようにマウス胸腺細胞を用いたバイオアッセイが用いられているが、血清あるいは乳汁など生体成分中のIL-1測定は不可能とされており、今後、ELISAを用いた高感度な測定法の確立が必要である。著者らはin vitro stimulation法を応用してIL-1 β に対する単クローン抗体を作出した。そして、この単クローン抗体を用いたELISAによるIL-1 β 測定法を確立した。このELISAによるIL-1 β 測定法に関しては既に述べたように細胞培養上清中のIL-1 β

をバイオアッセイと同程度の感度で測定可能であったが残念なことに高感度測定法としては改良が必要であろう。すなわち、単クローン抗体に加えIL-1に対するポリクローナル抗体（高度免疫血清）を作出し、単クローン抗体とともにサンドイッチELISA法を試みる等の改良が考えられる。また、*in vitro stimulation* 法により得られたハイブリドーマの特徴として抗体産生量が*in vivo stimulation* 法により得たハイブリドーマよりも少ないこと、ほとんどのハイブリドーマのIgクラスがIgMであることがあげられ、*in vitro stimulation* 法そのものの改良も必要であろう。

本研究ではIL-1誘導物質として*in vitro*あるいは*in vivo*においてもLPSを使用した。しかし、サイトカインの誘導物質としては病原体を含み極めて多くの物質が考えられ、その物質によりサイトカインの発現動態が異なるものと考えられる。また、ヒトやマウスにおいては特定の病原体感染にともなうIL-1産生異常が報告されている。たとえば、ヒトにおいてサイトメガロウイルス感染により単球からのIL-1産生が低下すること³⁰⁾、また、マウスのある種のマクロファージ細胞株では同じサイトメガロウイルス感染によりIL-1産生が促進されること⁶²⁾、さらにインフルエンザウイルスあるいはRSウイルス (respiratory syncytial virus) 感染によるヒトのマクロファージからのIL-1産生に関する報告⁵⁷⁾がされている。牛においても、本研究により確立されたIL-1mRNA検出・定量法、また、IL-1 β 測定法を応用しさまざまな感染症におけるIL-1動態を検討することにより特異的なIL-1産生異常（産生低下、産生亢進）が確認されれば特定の感染症の診断、予後判定が可能となるであろう。

V. 総括と結語

本研究は牛IL-1の免疫学的イニシエーターとしての作用、特に、疾病におけるIL-1産生の意義、さらにIL-1産生の個体差と疾病に対する免疫応答誘導との関連性等を解明するための新技法の確立を目的として行われたものである。そのために、RT-PCR法を用いた牛IL-1遺伝子発現の微量検出法及び、産生量の多いといわれているIL-1 β の測定法として単クローン抗体を用いたELISAを確立し、これらの手法を用いてIL-1遺伝子発現および産生性について検討を加えた。

本研究の成果は下記のように総括される。

1. 牛末梢血単核球、単球及び肺胞マクロファージの分離

健康牛の頸静脈からヘパリン加血液を採取し、フィコール・コンレイ比重遠心法（比重=1.081）により単核球を分離した。その結果、ヘパリン加血液10mlから約 1×10^7 個の単核球が得られ、さらに2時間の付着操作により約 $1-1.5 \times 10^6$ 個の単球が得られた。肺胞マクロファージは健康牛の気管支肺胞洗浄液より細胞を回収し、付着法により分離した。その結果、成牛1頭当たり約 $1-2 \times 10^8$ 個の肺胞マクロファージが分離された。これらの付着細胞は固定羊赤血球の貪食能陽性、非特異的エステラーゼ染色陽性、酸フォスファターゼ染色陽性によりマクロファージであることが確認された。

2. RT-PCR法による牛IL-1 α 及びIL-1 β mRNAの検出

牛末梢血単核球および肺胞マクロファージを $20 \mu\text{g/ml}$ のLPSにより一定時間刺激し、両細胞から分離、精製したpoly(A)⁺RNAをテンプレートとしてRT-PCR法によるIL-1 α 及びIL-1 β mRNAの検出法を確立した。RT反応条件は 42°C 、15分で行い、続いて 99°C 、5分で逆転写酵素を失活させた。そしてPCR反応条件は、1) 熱変性： 95°C 、1分（1回目の熱変性のみは3分）、2) プライマーアニーリング： 55°C 、1分、3) 伸長反応： 72°C 、1分で行い、原則として35サイクルで実施した。RT反応時のプライマーとしては一般に 1) ランダムヘキサマー、2) オリゴd(T)₁₈、3) 特異的下流プライマーの3種類が使用可能であるが本実験においてもこの3種類のプライマーの何れを用いて

もよい結果が得られた。すなわち、4%アガロースゲル電気泳動の結果、予想したサイズのバンドを検出した (IL-1 α :424bp、およびIL-1 β :394bp)。これらのRT-PCR生成物は制限酵素切断パターンにより同定した。

RT-PCR法の検出感度を検討したところ、LPSで24時間刺激した末梢血単核球において、IL-1 α では最少 poly(A)⁺RNA、0.01ng、また、IL-1 β では最少0.1pgの濃度で検出可能であった。また、サンプル細胞数による検出感度としては、最少 1 \times 10⁶の細胞から抽出した poly(A)⁺RNAで検出可能であった。さらに、PCRサイクル数による検出感度としては、50ngのpoly(A)⁺RNAをテンプレートとした場合、サイクル数25以上で検出可能であった。また、ノーザンブロット法に比べ約10⁶倍、RT-PCR法の方が高感度であった。

RT-PCR産物の応用について検討した結果、ノーザンブロット法、ドットブロット法およびin situ hybridization 法におけるプローブとして極めて有用であった。

RT-PCR法を用いてin vitroにおけるIL-1遺伝子発現動態を検討した結果、末梢血単核球ではLPS等の刺激のない、いわゆるrestingの状態であってもきわめて低レベルではあるが、構成的(持続的)にIL-1 α およびIL-1 β mRNAの存在が認められることが明らかとなった。さらに、LPS刺激により短時間(3時間以内)でIL-1 α および β mRNA量の増加が認められ、また、IL-1 α mRNAの出現が一過性を示すことが明らかとなった。また、LPS投与牛におけるIL-1遺伝子発現動態について検討した結果、in vivoにおいてもLPS投与後、極めて短時間でmRNAの出現を認め、いわゆる early phaseのサイトカインとして炎症に深く関わることが示された。また、in vitroにおいても認められた IL-1 α mRNA出現の一過性も認められた。さらに、IL-1 β mRNA生成の個体差を検討した結果、その量は個体により差を認めた。

3. 牛IL-1活性測定とIL-1 β に対する単クローン抗体

肺胞マクロファージの培養上清から液体等電点電気泳動法により精製したIL-1 β を免疫原としてin vitro stimulation法により単クローン抗体を作成した。この単クローン抗体を用いたELISAによりIL-1 β の測定を試み、マウス胸腺細胞を用いたバイオアッセイの結果と比較した。その結果、バイオアッセイと同程度の感度で培養上清中のIL-1の測定が可能であった。マウス胸腺細胞を用いたバイオアッセイおよびELISAを用いて末梢血単核球の産生するIL-1を測定した結果、刺激後3時間以降で

活性が認められ、24、48時間後には高活性が認められた。

以上のようにIL-1 α およびIL-1 β mRNAの生成はLPS刺激後極めて短時間（30分-3時間）で認められた。このことはIL-1 α およびIL-1 β はいわゆる初期サイトカイン（early phaseサイトカイン）として生体防御反応の初期の非特異的な炎症反応に深く関わることを示唆している。すなわち、感染に伴う生体防御反応は初期の非特異的な炎症反応と後期の特異免疫応答に分けることができ、初期反応としての発熱、急性相蛋白の産生、食細胞の浸潤などの非特異的な炎症反応はIL-1を代表としたいわゆる初期サイトカインの関与するものである。初期反応でマクロファージやB細胞により処理された抗原はMHCのクラスII分子とともに対応するT細胞に提示され、刺激を受けたT細胞からはIL-2、IL-4、IL-5、IFN γ などの後期サイトカインが産生される。また、健康牛のいわゆるrestingな状態での末梢血単核球におけるIL-1 β mRNAを検出した結果、個体により差を認めた。この結果は単に牛個体の飼育環境を含めた状況の差によるものか免疫遺伝学的な個体差によるものかは明らかではないが興味を持たれるところである。すなわち、感染時のIL-1遺伝子発現の差がその後が続いて起きる免疫応答の個体差として現れ、ひいては疾病に対する感受性、抵抗性を規定するもののひとつとして解析することが可能となれば今後の家畜臨床免疫研究の方向付けとして有意義であると考えられる。

RT-PCR法による牛IL-1 α およびIL-1 β mRNA検出に関する報告はIL-2およびIL-6につづくものであり、今後、さらに数多くのサイトカインに応用され、サイトカインネットワークの詳細の解明に役立つであろう。また、単クローン抗体を用いたELISAによるIL-1 β 測定法も牛IL-1 β の簡易測定法として有用である。

近年、牛のIL-1、IL-2、IFN、TNF α 、CSFなどの遺伝子が単離され組換え体サイトカインを用いた免疫機構の解明に関する研究が可能となってきた。牛におけるサイトカインの臨床応用は、感染症の予防、治療効果を目的としたものである。特に感染症による廃用率が高い子牛に対し、未熟な生体防御機能の増強を目的としたサイトカインの利用が考えられる。また、周産期やストレス負荷時などに低下した免疫機能を回復させるための利用も考えられる。さらに、組換え体ワクチンの免疫効果の増

強を目的としたサイトカインのアジュバント効果が提示されている。しかし、感染症の予防、治療薬としての有効利用をはかるためには個々のサイトカインの詳細な作用に加えて、サイトカインネットワークの詳細の解明が必要であろう。多くの組換え体サイトカインの作出、サイトカイン遺伝子発現の検出法あるいはサイトカイン活性測定法の確立により家畜の免疫機構解明はめざましく発展するであろう。

謝辞

本稿をまとめるに臨みご校閲を賜った麻布大学田淵 清教授、小西信一郎教授、藤谷英男教授、本研究の遂行から原稿取りまとめまで終始ご指導を賜った農林水産省家畜衛生試験場の児玉 道博士、中島靖之博士に謹んで感謝いたします。

引用文献

- 1) Becker-Andre, M. & Hahlbrock, K. 1989. Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATY). *Nucleic Acids Res.* 17: 9437-9446.
- 2) Bernaudin, J-F., Yamauchi, K., Wewers, M. D., Tocci, M. L., Ferrans, V. J. & Crystal, R. G. 1988. Demonstration by in situ hybridization of dissimilar IL-1 β gene expression in human alveolar macrophages and blood monocytes in response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 140: 3822-3829.
- 3) Boss, B. D. 1984. An improved in vitro immunization procedure for the production of monoclonal antibodies against neural and other antigens. *Brain Res.* 291: 193-196.
- 4) Brenner, C. A., Tam, A. W., Nelson, P. A., Engleman, E. G., Suzuki, N., Fry, K. E. & Larrick, J. W. 1989. Message amplification phenotyping (MAPPING): A technique to simultaneously measure multiple mRNAs from small numbers of cells. *Biotechniques* 7: 1096-1103.
- 5) Canning, P. C. & Baker, P. E. 1990. Selective alteration of bovine neutrophil responses by recombinant bovine interleukin-1 β . *Vet. Immunol. Immunopathol.* 26: 1-12.
- 6) Cerretti, D. P., McKereghan, K., Larsen, A., Cosman, D., Gillis, S. & Baker, P. E. 1986. Cloning, sequence, and expression of bovine interferon- γ . *J. Immunol.* 136: 4561-4564.

- 7) Cerretti, D. P., McKereghan, K., Larsen, A., Cantrell, M. A., Anderson, D., Gillis, S., Cosman, D. & Baker, P. E. 1986. Cloning, sequence, and expression of bovine interleukin 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 3223-3227.
- 8) Chelly, J., Kaplan, J-C., Maire, P., Gautron, S. & Kahn, A. 1988. Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature* 333: 858-860.
- 9) Chiang, Y-W., Murata, H. & Roth, J. A. 1991. Activation of bovine neutrophils by recombinant bovine tumor necrosis factor- α . *Vet. Immunol. Immunopathol.* 29: 329-338.
- 10) Chiang, Y-W., Roth, J. A. & Andrews, J. J. 1990. Influence of recombinant bovine interferon gamma and dexamethasone on pneumonia attributable to *Haemophilus somnus* in calves. *Am. J. Vet. Res.* 51: 759-762.
- 11) Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. & Rutter, W. J. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299.
- 12) Cludts, I., Cleuter, Y., Burny, A. & Droogmans, L. 1993. Cloning and characterization of the tandemly arranged bovine lymphotoxin and tumour necrosis factor-alpha genes. *Cytokine* 5: 336-341.
- 13) Daley, M. J., Coyle, P. A., Williams, T. J., Furda, G., Dougherty, R. &

- Hayes, P. W. 1991. Staphylococcus aureus mastitis: Pathogenesis and treatment with bovine interleukin-1 β and interleukin-2. J. Dairy Sci. 74: 4413-4424.
- 14) Degen, J. L., Neubauer, M. G., Degen, S. J. F., Seyfried, C. E. & Morris, D. R. 1983. Regulation of protein synthesis in mitogen-activated bovine lymphocytes. J. Biol. Chem. 258: 12153-12162.
- 15) Dinarello, C., A. 1984. Induction of acute phase reactants by interleukin-1. Adv. Inflammation Res. 8: 203-225
- 16) Dinarello, C., A., Cannon, J. G., Mier, J. W., Bernheim, H. A., LoPreste, G., Lynn, D. L., Love, R. N., Webb, A. C., Auron, P. E., Reuben, R. C., Rich, A., Wolff, S. M. & Putney, S. D. 1986. Multiple biological activities of human recombinant interleukin 1. J. Clin. Invest. 77: 1734-1739.
- 17) Droogmans, L., Cludts, I., Cleuter, Y., Kettmann, R. & Burny, A. 1992. Nucleotide sequence of bovine interleukin-6 cDNA. DNA Sequence 2: 411-413.
- 18) Heussler, V. T., Eichhorn, M. & Dobbelaere, D. A. E. 1992. Cloning of a full-length cDNA encoding bovine interleukin 4 by the polymerase chain reaction. Gene 114: 273-278.
- 19) Heussler, V. T., Eichhorn, M., Reeves, R., Magnuson, N. S., Williams, R. O. & Dobbelaere, D. A. E. 1992. Constitutive IL-2 mRNA expression in lymphocytes, infected with the intracellular parasite *Theileria parva*. J. Immunol. 149: 562-567.

- 20) Kawasaki, E. S., Clark, S. S., Coyne, M. Y., Smith, S. D., Champlin, R., Witte, O. N. & McCormick, F. P. 1988. Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 5698-5702.
- 21) Kehrli, M. E., Goff, J. P., Stevens, M. G. & Boone, T. C. 1991. Effects of granulocyte colony-stimulating factor administration to periparturient cows on neutrophils and bacterial shedding. J. Dairy Sci. 74: 2448-2458.
- 22) Kohler, G. & Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256: 495-497.
- 23) Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- 24) Lederer, J. A. & Czuprynski, C. J. 1989. Production and purification of bovine monocyte-derived interleukin 1. Vet. Immunol. Immunopathol. 23: 201-211.
- 25) Lederer, J. A. & Czuprynski, C. J. 1989. Species preference of bovine thymocytes and fibroblasts for bovine interleukin 1. Vet. Immunol. Immunopathol. 23: 213-222.
- 26) Leong, S. R., Flaggs, G. M., Lawman, M. & Gray, P. W. 1988. The nucleotide sequence for the cDNA of bovine interleukin-1 alpha. Nucleic Acids Res. 16: 9053.

- 27) Leong, S. R., Flaggs, G. M., Lawman, M. & Gray, P. W. 1988. The nucleotide sequence for the cDNA of bovine interleukin-1 beta. *Nucleic Acids Res.* 16: 9054.
- 28) Leong, S. R., Flaggs, G. M., Lawman, M. J. P. & Gray, P. W. 1989. Cloning and expression of the cDNA for bovine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 21: 261-278.
- 29) Leung, D. W., Capon, D. J. & Goeddel, D. V. 1984. The structure and bacterial expression of three distinct bovine interferon- β genes. *Biotechnology* 2: 458-464.
- 30) Lewis, M. A., Slater, J. S., Leverone, L. I. & Campbell, A. E. 1990. Enhancement of interleukin-1 activity by murine cytomegalovirus infection of a macrophage cell line. *Virology* 178: 452-460.
- 31) Lipsky, P. E., Thompson, P. A., Rosenwasser, L. J. & Dinarello, C. A. 1983. The role of interleukin 1 in human B cell activation: Inhibition of B cell proliferation and the generation of immunoglobulin-secreting cells by an antibody against human leukocytic pyrogen. *J. Immunol.* 130: 2708-2714.
- 32) Luben, R. A., Brazeau, P., Bohlen, P. & Guillemin, R. 1982. Monoclonal antibodies to hypothalamic growth hormone-releasing factor with picomoles of antigen. *Science* 218: 887-889.
- 33) Luben, R. A. & Mohler, M. A. 1980. In vitro immunization as an adjunct to the production of hybridomas producing antibodies against the lymphokine

osteoclast activating factor. *Mol. Immunol.* 17: 635-639.

34) Luger, T. A., Charon, J. A., Colot, M., Micksche, M. & Oppenheim, J. J. 1983. Chemotactic properties of partially purified human epidermal cell-derived thymocyte-activating factor (ETAF) for polymorphonuclear and mononuclear cells. *J. Immunol.* 131: 816-820.

35) Magnuson, N. S., Spies, A. G., Nissen, M. S., Buck, C. D., Weinberg, A. D., Barr, P. J., Magnuson, J. A. & Reeves, R. 1987. Bovine interleukin 2: Regulatory mechanisms. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 17: 183-192.

36) Maliszewski, C. R., Baker, P. E., Schoenborn, M. A., Davis, B. S., Cosman, D., Gillis, S. & Cerretti, D. P. 1988. Cloning, sequence and expression of bovine interleukin 1 α and interleukin 1 β complementary DNAs. *Mol. Immunol.* 25: 429-437.

37) Maliszewski, C. R., Schoenborn, M. A., Cerretti, D. P., Wignall, J. M., Picha, K. S., Cosman, D., Tushinski, R. J., Gillis, S. & Baker, P. E. 1988. Bovine GM-CSF: Molecular cloning and biological activity of the recombinant protein. *Mol. Immunol.* 25: 843-850.

38) Mathialagan, N., Bixby, J. A. & Roberts, R. M. 1992. Expression of interleukin-6 in porcine, ovine, and bovine preimplantation conceptuses. *Mol. Reprod. Dev.* 32: 324-330.

39) Meltzer, M. S. & Oppenheim, J. J. 1977. Bidirectional amplification of macrophage-lymphocyte interactions: Enhanced lymphocyte activation factor

production by activated adherent mouse peritoneal cells. J. Immunol. 118: 77-82.

40) Mizel, S. B. 1982. Interleukin 1 and T cell activation. Immunol. Rev. 63: 51-72.

41) Mizel, S. B., Dayer, J-M., Krane, S. M. & Mergenhagen, S. E. 1981. Stimulation of rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocyte-activating factor (interleukin 1). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 2474-2477.

42) Mullis, K. B. & Faloona, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In "Methods in Enzymology" 155: 335-350

43) O'Brien, P. M., Rothel, J. S., Seow, H-F. & Wood, P. R. 1991. Cloning and sequencing of the cDNA for ovine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Immunol. Cell Biol. 69: 51-55.

44) Ohmann, H. B. & Babiuk, L. A. 1984. Effect of bovine recombinant alpha-1 interferon on inflammatory responses of bovine phagocytes. J. Interferon Res. 4: 249-263.

45) Ohmann, H. B., Campos, M., Snider, M., Rapin, N., Beskorwayne, T., Popowych, Y., Lawman, M. J. P., Rossi, A. & Babiuk, L. A. 1989. Effect of chronic administration of recombinant bovine tumor necrosis factor to cattle. Vet. Pathol. 26: 462-472.

- 46) Pardue, R. L., Brady, R. C., Perry, G. W. & Dedman, J. R. 1983. Production of monoclonal antibodies against calmodulin by in vitro immunization of spleen cells. *J. Cell Biol.* 96: 1149-1154.
- 47) Peel, J. E., Kolly, C., Siegenthaler, B. & Martinod, S. R. 1990. Prophylactic effects of recombinant bovine interferon- α I 1 on acute Salmonella typhimurium infection in calves. *Am. J. Vet. Res.* 51: 1095-1099.
- 48) Powell, E. E. & Kroon, P. A. 1992. Measurement of mRNA by quantitative PCR with a nonradioactive label. *J. Lipid Res.* 33: 609-614.
- 49) Powell, L. M., Wallis, S. C., Pease, R. J., Edwards, Y. H., Knott, T. J. & Scott, J. 1987: A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* 50: 831-840.
- 50) Ramadori, G., Sipe, J. D., Dinarello, C. A., Mizel, S. B. & Colten, H. R. 1985. Pretranslational modulation of acute phase hepatic protein synthesis by murine recombinant interleukin 1 (IL-1) and purified human IL-1. *J. Exp. Med.* 162: 930-942.
- 51) Rappolee, D. A., Brenner, C. A., Schultz, R., Mark, D. & Werb, Z. 1988. Developmental expression of PDGF, TGF- α and TGF- β genes in preimplantation mouse embryos. *Science* 241: 1823-1825.
- 52) Rappolee, D. A., Mark, D., Banda, M. J. & Werb, Z. 1988. Wound macrophages express TGF- α and other growth factors in vivo: Analysis by mRNA phenotyping.

Science 241: 708-712.

- 53) Reading, C. L. 1982. Theory and methods for immunization in culture and monoclonal antibody production. *J. Immunol. Methods* 53: 261-291.
- 54) Reddy, P. G., Blecha, F., Minocha, H. C., Anderson, G. A., Morrill, J. L., Fedorka-Cray, P. J. & Baker, P. E. 1989. Bovine recombinant interleukin-2 augments immunity and resistance to bovine herpesvirus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 23: 61-74.
- 55) Reddy, P. G., McVey, D. S., Chengappa, M. M., Blecha, F., Minocha, H. C. & Baker, P. E. 1990. Bovine recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhancement of bovine neutrophil functions in vitro. *Am. J. Vet. Res.* 51: 1395-1399.
- 56) Reeves, R., Spies, A. G., Nissen, M. S., Buck, C. D., Weinberg, A. D., Barr, P. J., Magnuson, N. S. & Magnuson, J. A. 1986. Molecular cloning of a functional bovine interleukin 2 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 3228-3232.
- 57) Roberts, N. J., Prill, A. H. & Mann, T. N. 1986. Interleukin 1 and interleukin 1 inhibitor production by human macrophages exposed to influenza virus or respiratory syncytial virus. *J. Exp. Med.* 163: 511-519.
- 58) Rolfe, F. G., Hughes, J. M., Armour, C. L. & Sewell, W. A. 1992. Inhibition of interleukin-5 gene expression by dexamethasone. *Immunology* 77: 494-499.

- 59) Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. 1985. A novel method for the prenatal diagnosis of sickle cell anemia. *Am. J. Hum. Genet.* 37: 172.
- 60) Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- 61) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- 62) Smith, P. D., Armstrong, G. R., Rook, A. H., Miyake, Y., Manischewitz, J. F., Pearson, G., Wahl, L. M. & Wahl, S. M. 1985. Cytomegalovirus infection depresses monocyte production of interleukin-1 (IL-1). *J. Leukocyte Biol.* 37: 746.
- 63) Sordillo, L. M. & Babiuk, L. A. 1991. Controlling acute *Escherichia coli* mastitis during the periparturient period with recombinant bovine interferon gamma. *Vet. Microbiol.* 28: 189-198.
- 64) Sordillo, L. M. & Babiuk, L. A. 1991. Modulation of bovine mammary neutrophil function during the periparturient period following in vitro exposure to recombinant bovine interferon gamma. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 27: 393-402.

- 65) Staruch, M. J. & Wood, D. D. 1983. The adjuvanticity of interleukin 1 in vivo. *J. Immunol.* 130: 2191-2194.
- 66) Todd, J. A., Bell, J. I. & McDevitt, H. O. 1987. HLA-DG β gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 329: 599-604.
- 67) Torre, P. M., Konur, P. K. & Oliver, S. P. 1992. Proliferative response of mammary gland mononuclear cells to recombinant bovine interleukin-2. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 32: 351-358.
- 68) Veran, B., Cohen, S., Grosfeld, H. & Shafferman, A. 1986. Isolation of bovine IFN- α genes and their expression in bacteria. In "Methods in Enzymology" 119: 464-474.
- 69) Veres, G., Gibbs, R. A., Scherer, S. E. & Caskey, C. T. 1987. The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science* 237: 415-417.
- 70) Volkenandt, M., Dicker, A. P., Banerjee, D., Fanin, R., Schweitzer, B., Horikoshi, T., Danenberg, K., Danenberg, P. & Bertino, J. R. 1992. Quantitation of gene copy number and mRNA using the polymerase chain reaction. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* 200: 1-6.
- 71) Wang, A. M., Doyle, M. V. & Mark, D. F. 1989. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 9717-9721.

72) Wiethage, T., Voss, B., Pohle, T., Fisseler-Eckhoff, A. & Muller, K. M. 1991. Localization of elastase and tumor necrosis factor α mRNA by non-radioactive in situ hybridization in cultures of alveolar macrophages. Path. Res. Pract. 187: 912-915.

73) Winstanley, F. P. & Eckersall, P. D. 1992. Bioassay of bovine interleukin-1-like activity. Res. Vet. Sci. 52: 273-276.

表1. RT-PCR法に用いたプライマーの塩基配列

mRNA 種類	5'上流プライマー	3'下流プライマー	増幅サイズ (bp)	文献
牛 IL-1 α	5'-CTCTCTCAATCAGAAGTCTTCTATG-3'	5'-CATGTCAAATTTCACTGCCTCCTCC-3'	424	26, 36)
牛 IL-1 β	5'-AAACAGATGAAGAGCTGCATCCAA-3'	5'-CAAAGCTCATGCAGAACACCACTT-3'	394	27, 36)
牛 β -アクリン	5'-ACGTGGCCTTGGACTTCGAGCAGG-3'	5'-GCTGGAAGGTGGACAGGGAGGCCAGCA-3'	405	14)

表2. RT-PCR 法における反応液組成

2-1. 逆転写酵素反応

試薬	最終濃度	使用量
MgCl ₂	5mM	4μl
10×PCR Buffer*	1×	2μl
滅菌蒸留水		1μl
dGTP	1mM	2μl
dATP	1mM	2μl
dTTP	1mM	2μl
dCTP	1mM	2μl
RNase Inhibitor	1 U/μl	1μl
Reverse Transcriptase	2.5U/μl	1μl
Random Hexamers	2.5μM	1μl
or		
Oligo d(T) ₁₆	2.5μM	1μl
or		
下流PCRプライマー	0.1μM	1μl
サンプルRNA	50-100ng	2μl
		20μl/サンプル

2-2. PCR反応

MgCl ₂	2mM	4μl
10×PCR Buffer*	1×	8μl
滅菌蒸留水		65.5μl
AmpliTaq DNA Polymerase	2.5U/100μl	0.5μl
		78μl/サンプル
上流PCRプライマー	0.1μM	1μl
下流PCRプライマー	0.1μM	1μl
		100μl/サンプル

* 10×PCR Buffer : 100mM Tris-HCl (pH8.3), 500mM KCl

表3. 牛IL-1 β に対する単クローン抗体の性状

Clone No.	ELISA OD ₄₉₂ (Cont \leq 0.1)	Ig Isotype	Western Blotting による認識蛋白分子量
1F4-1	0.286	M	15k
1F4-2	0.366	M	15k
1A4-2	0.280	-	
1F4-3	0.390	M	15k
1C1-2	0.147	M	
1B2-3	0.275	M	
1D10-1	0.247	-	15k
1B2-2	0.141	-	
1C3-2	0.419	-	
1E8-4	0.360	M	
1H9-1	0.879	M	15k
1C1-1	0.150	M	15k

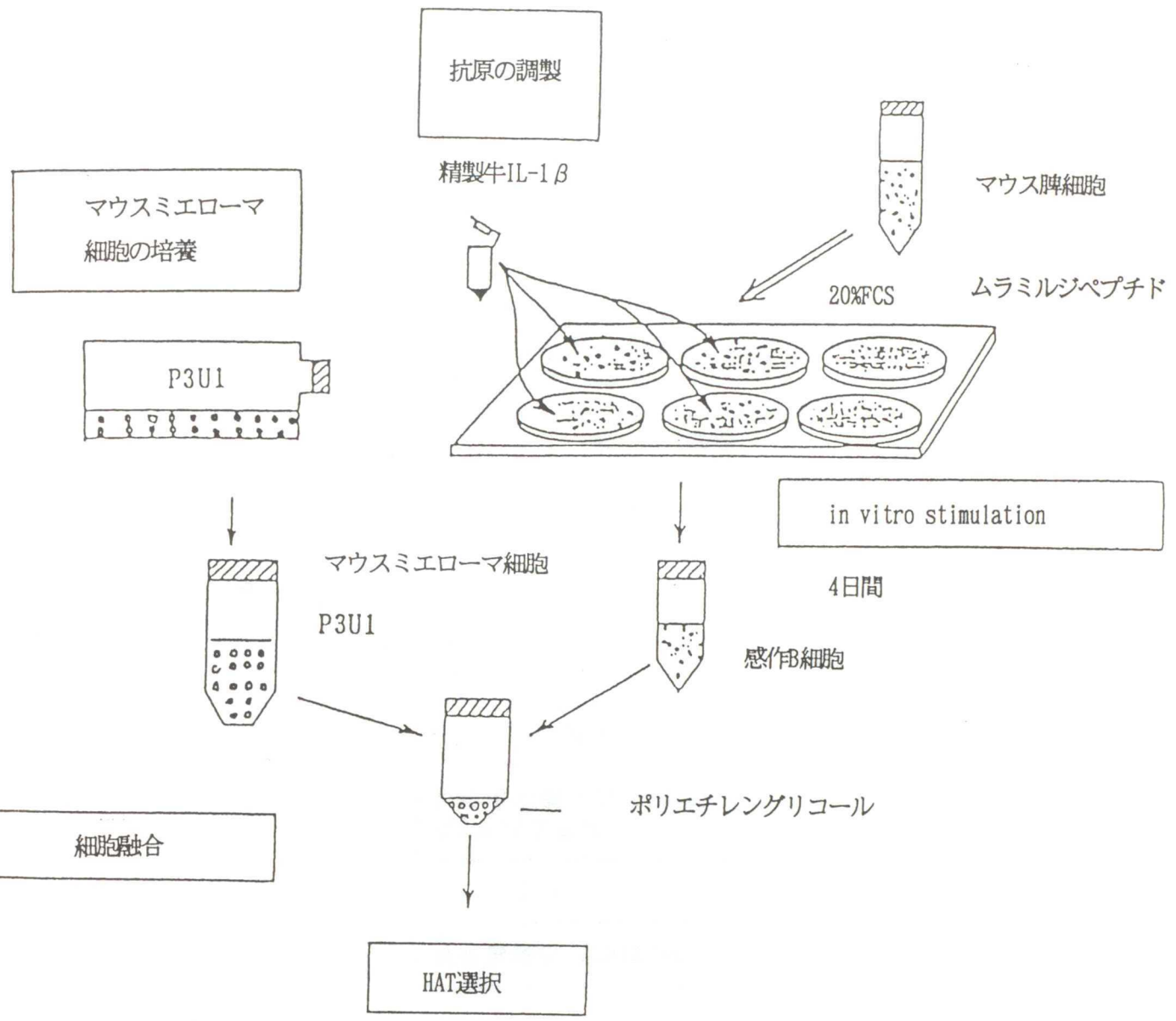


図1. in vitro stimulation 法による単クローン抗体の作製

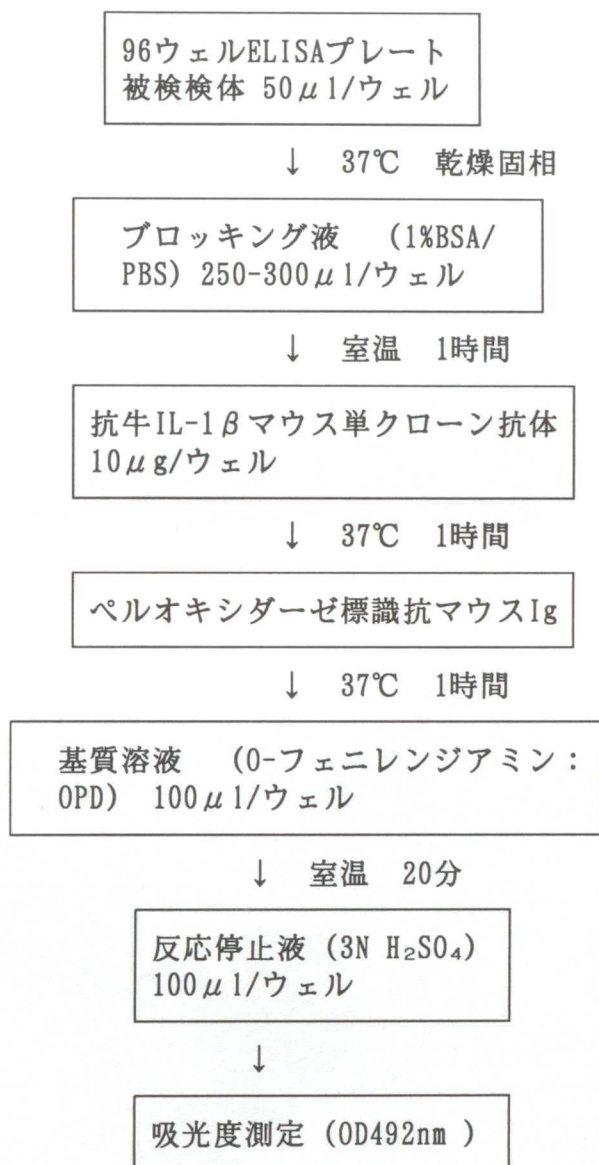
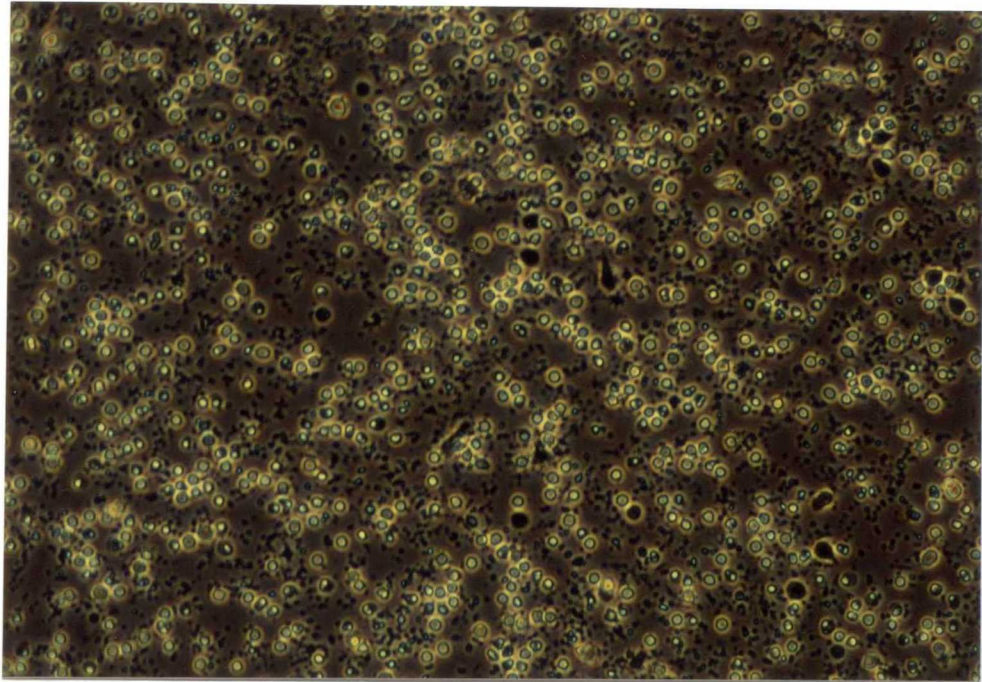


図2. ELISAによる牛IL-1 β の測定

A



B

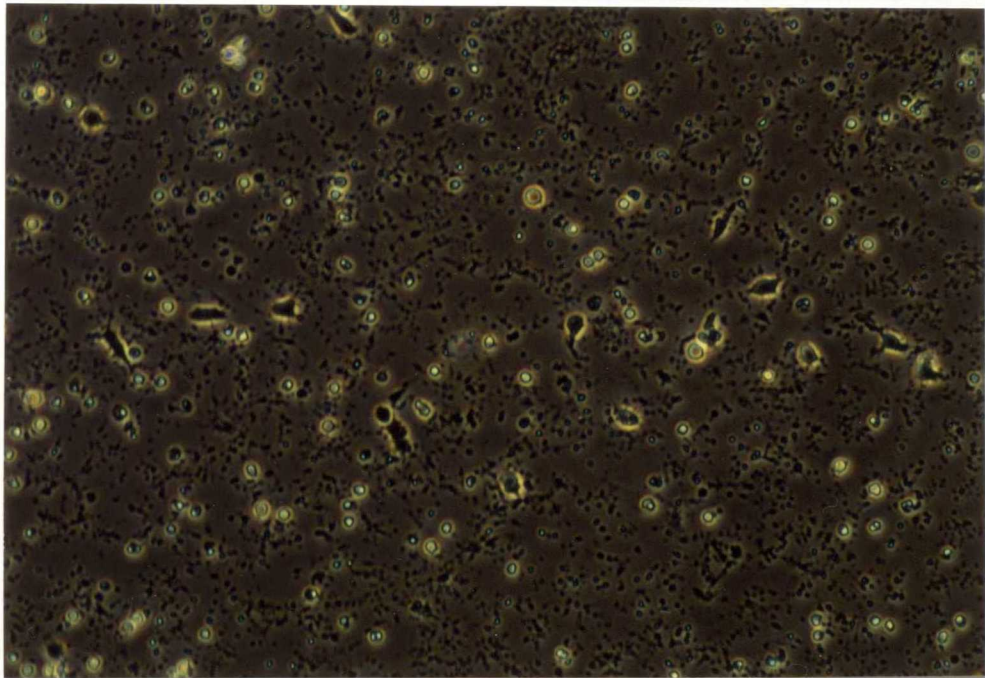
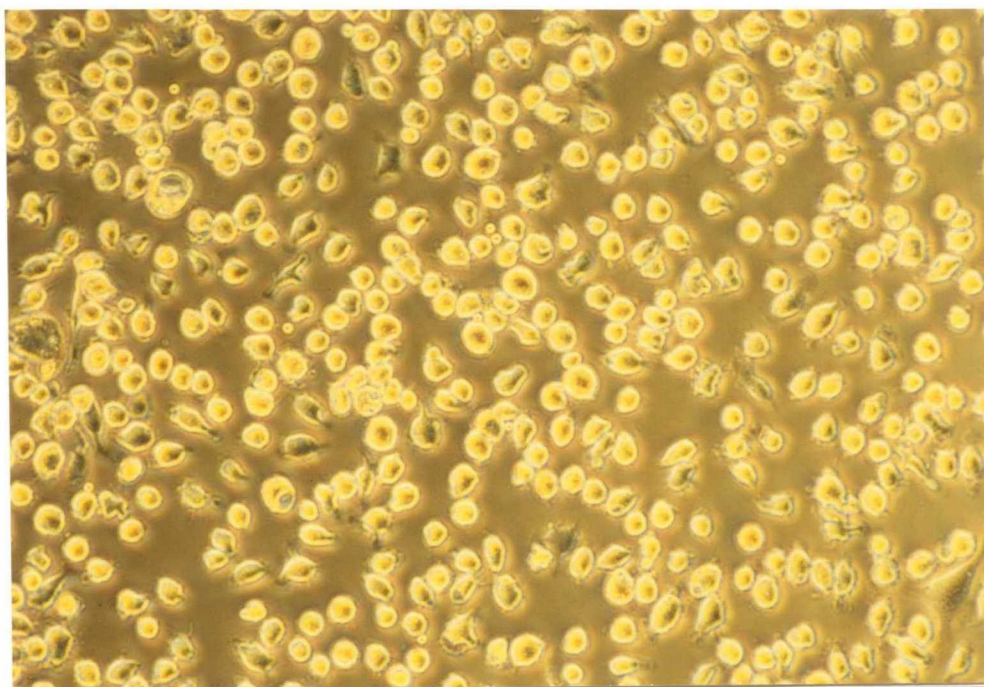


図3. 培養牛単球

A. 無刺激 B. LPS刺激24時間

A



B

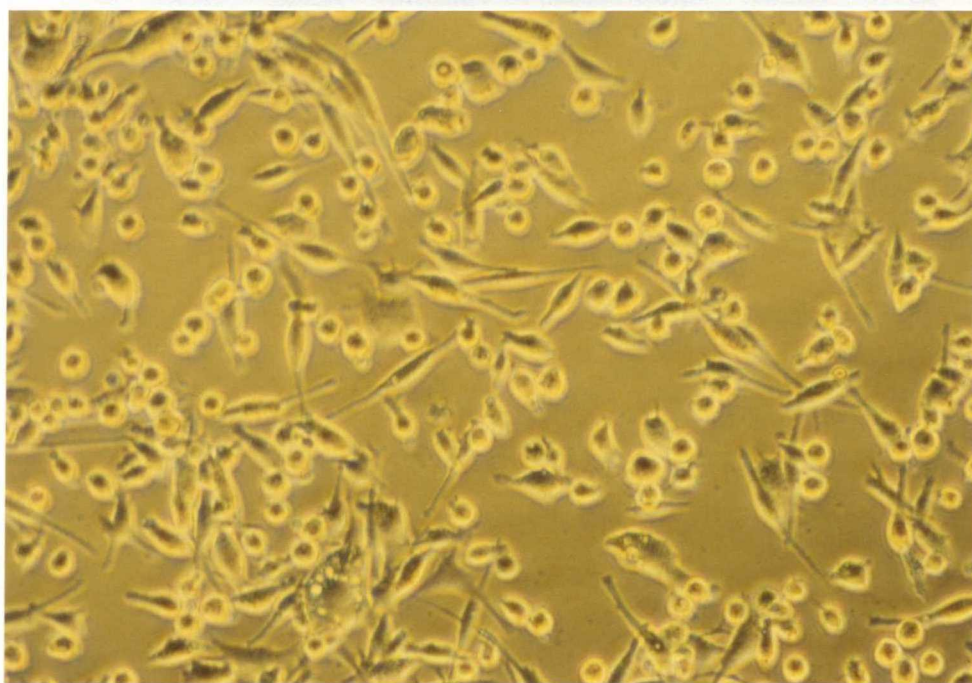
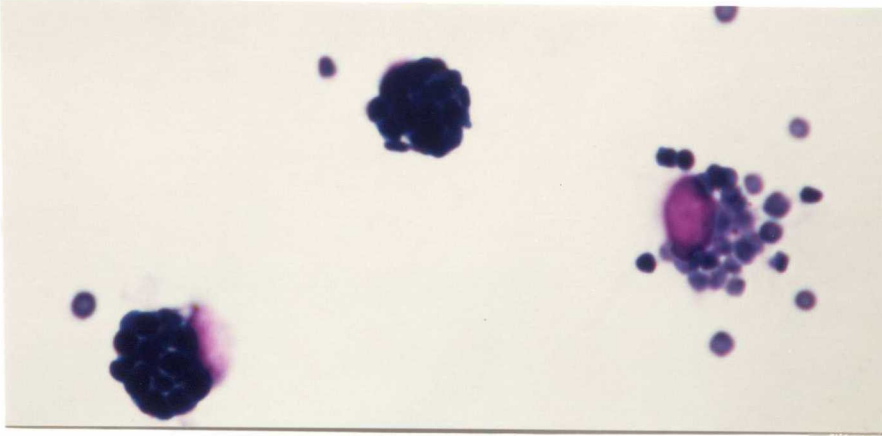


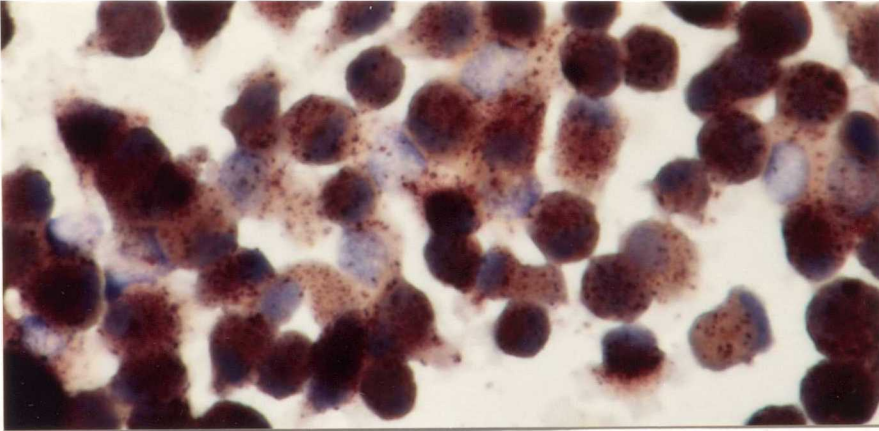
図4. 培養牛肺胞マクロファージ

A. 無刺激 B. LPS刺激24時間

A



B



C

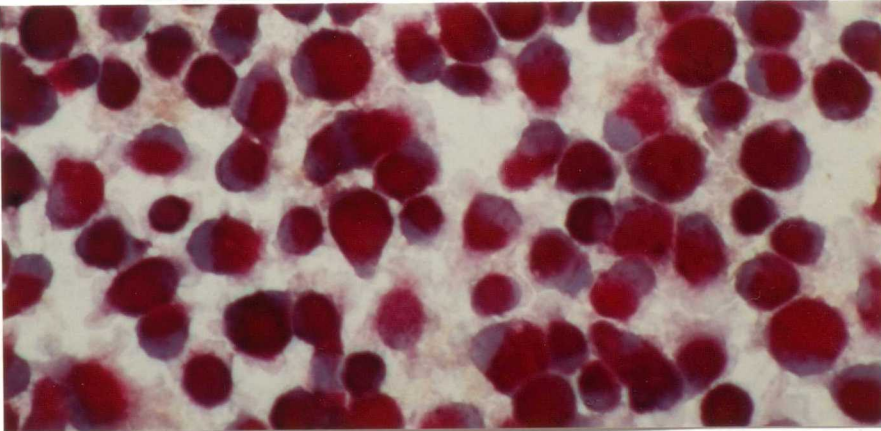


図5. 牛肺胞マクロファージの性状

- A. グルタルアルデヒド固定羊赤血球貪食像
- B. 非特異的エステラーゼ染色陽性像
- C. 酸ホスファターゼ染色陽性像

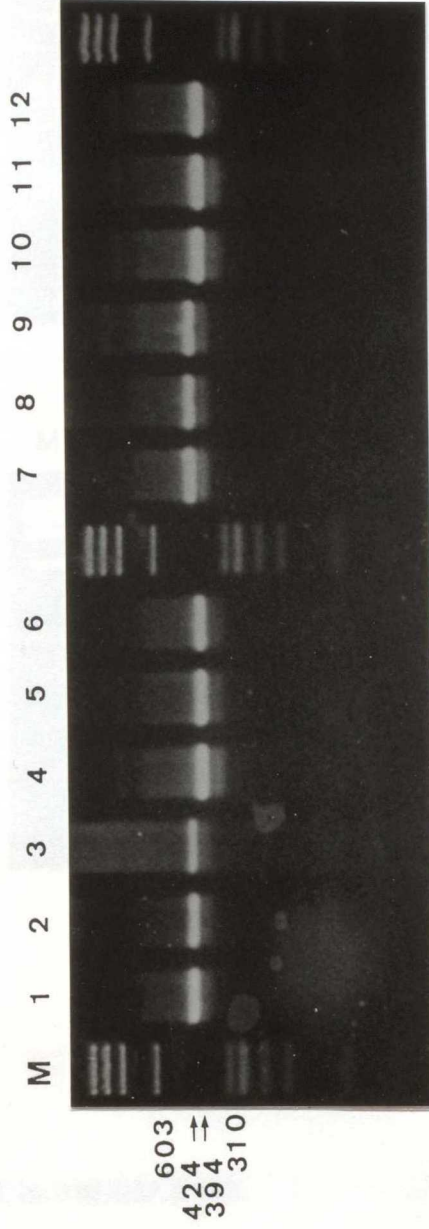


図6. RT-PCR法による牛IL-1 mRNAの検出

レーン 1-3, 7-9: IL-1 α (424bp)

レーン 4-6, 10-12: IL-1 β (394bp)

レーン 1-6: PBMCs; レーン 7-12: AM

「RT反応時のプライマー種類」

レーン 1, 4, 7, 10: ランダムヘキサマー; レーン 2, 5, 8, 11: オリゴd(T)₁₆;

レーン 3, 6, 9, 12: 下流PCRプライマー

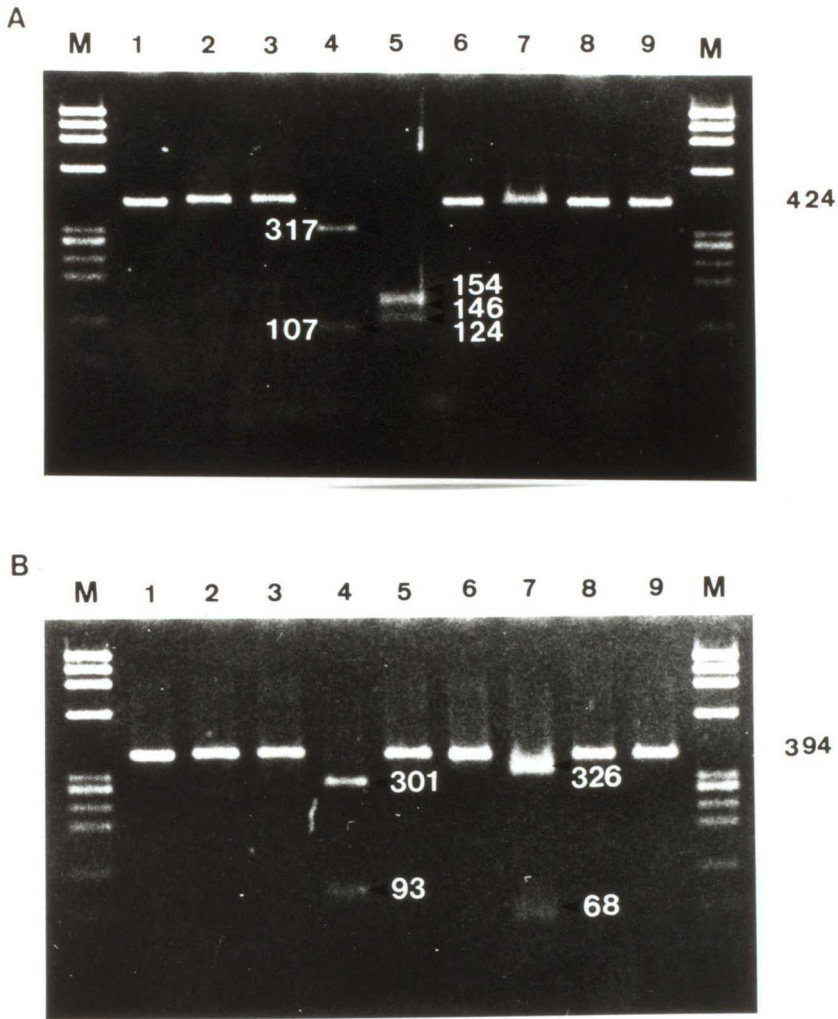


図7. RT-PCR産物の制限酵素切断パターンによる同定

A. IL-1 α (424bp) , B. IL-1 β (394bp)

レーン 1. Uncut, レーン 2. BamH I, レーン 3. EcoR I, レーン 4. HindIII,
 レーン 5. Hinf I, レーン 6. Kpn I, レーン 7. Pst I, レーン 8. Sac I,
 レーン 9. Xba I

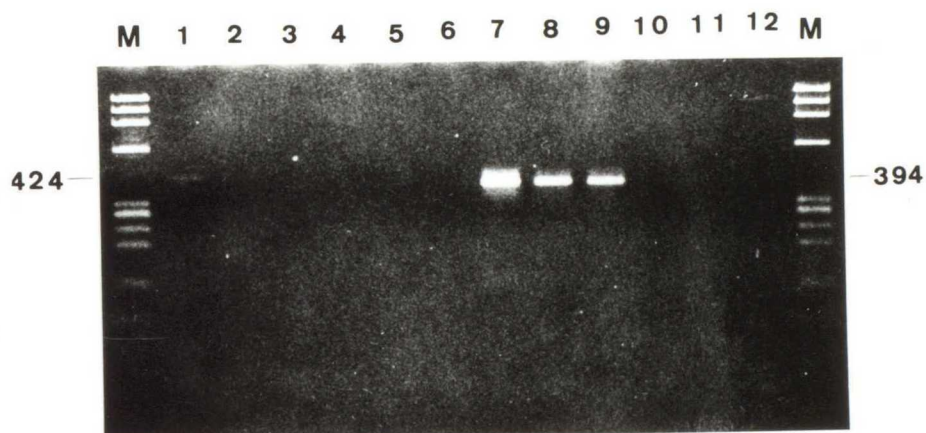


図8. テンプレート poly(A)⁺RNA濃度による検出感度

レーン 1-6: IL-1 α ; レーン 7-12: IL-1 β

「poly(A)⁺RNA濃度」レーン 1,7: 0.1ng; レーン 2, 8: 0.01ng;

レーン 3,9: 1pg レーン 4,10: 0.1pg; レーン 5,11: 0.01pg; レーン 6,12: 1fg

(RT-PCR反応液 100 μ lのうち 10 μ lを電気泳動に使用しているので
検出感度としては IL-1 α の場合 0.01ng、IL-1 β の場合 0.1pgとなる。)

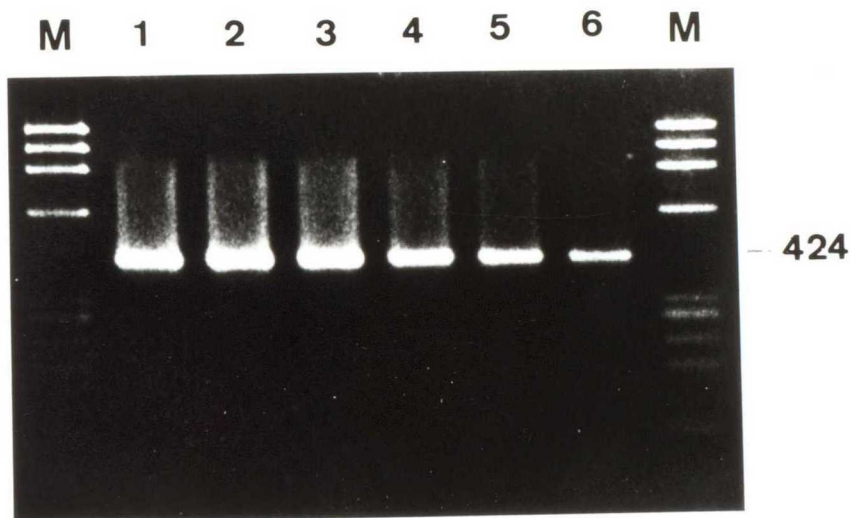


図9. サンプル細胞数による検出感度

末梢血単核球におけるIL-1 α mRNAの検出

レーン 1: 1×10^7 個; レーン 2: 1×10^6 個; レーン 3: 1×10^5 個;
 レーン 4: 1×10^4 個; レーン 5: 1×10^3 個; レーン 6: 1×10^2 個

(RT-PCR反応液 100 μ lのうち 10 μ lを電気泳動に使用しているの
 検出感度としては 1×10^1 個となる。)

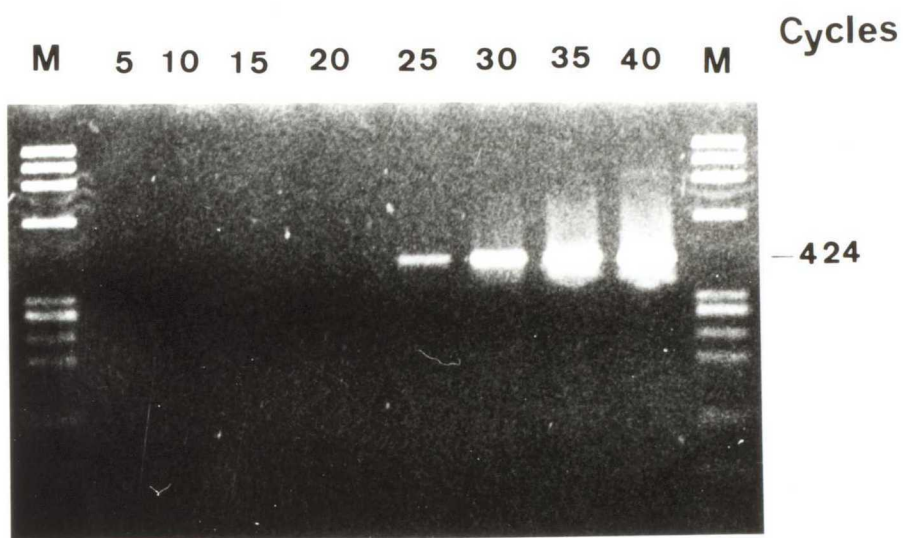


図10. PCRサイクル数による検出感度

poly(A)⁺RNA、50ngの場合、PCRサイクル25以上で検出可能であった。
(IL-1 α :424bp)

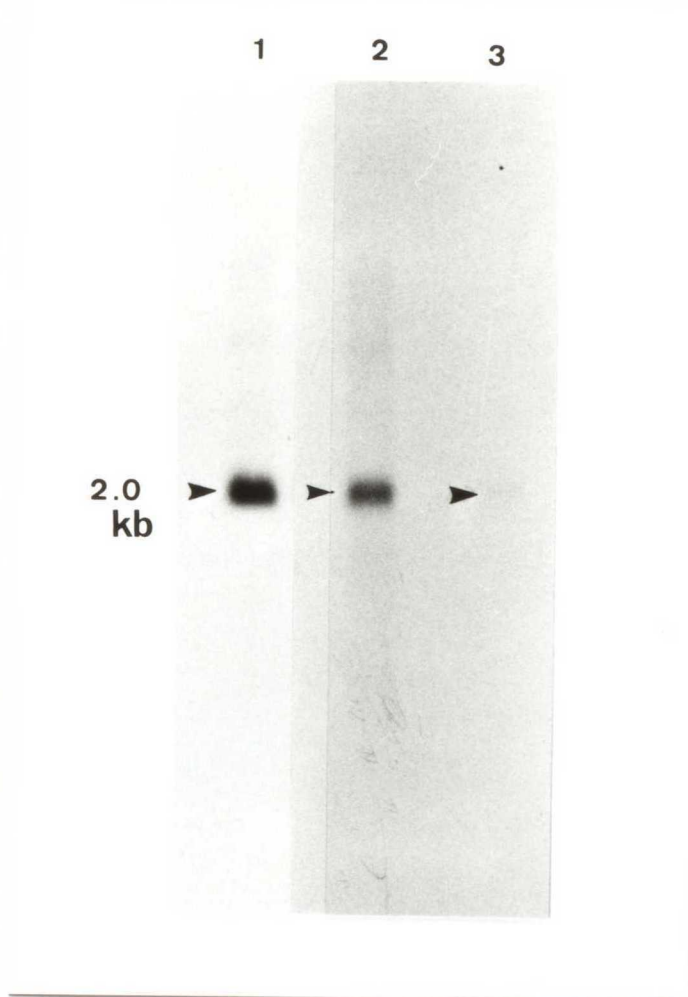


図11. ノーザンブロット法によるIL-1 β mRNAの検出

RT-PCR産物をプローブとして使用

レーン 1: 1 μ g poly(A)⁺RNA; レーン 2: 0.1 μ g poly(A)⁺RNA;

レーン 3: 0.01 μ g poly(A)⁺RNA

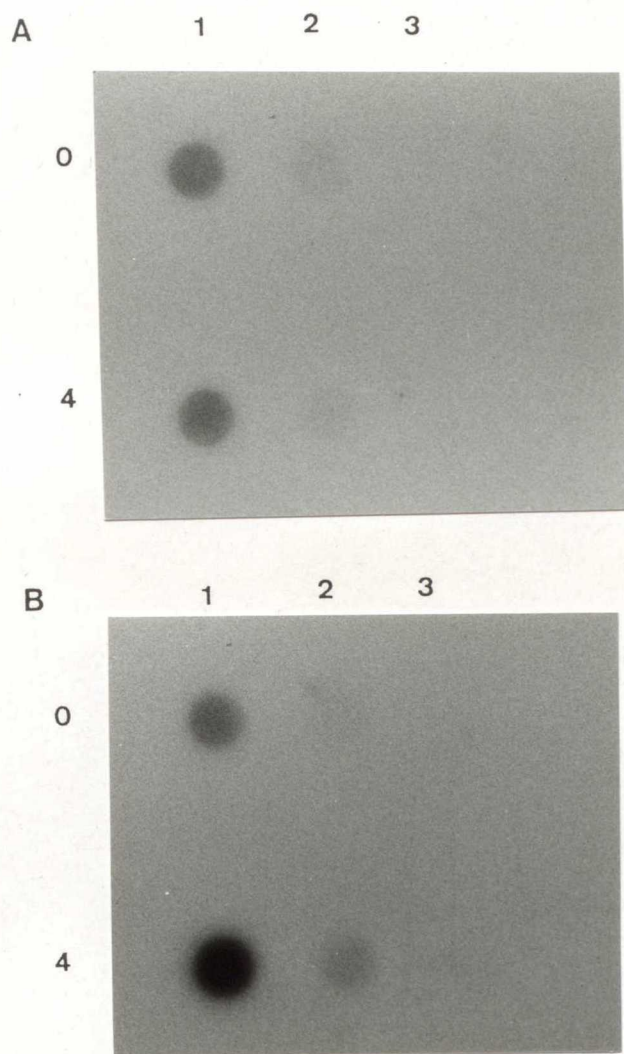


図12. ドットプロット法によるIL-1 α 、IL-1 β mRNAの検出

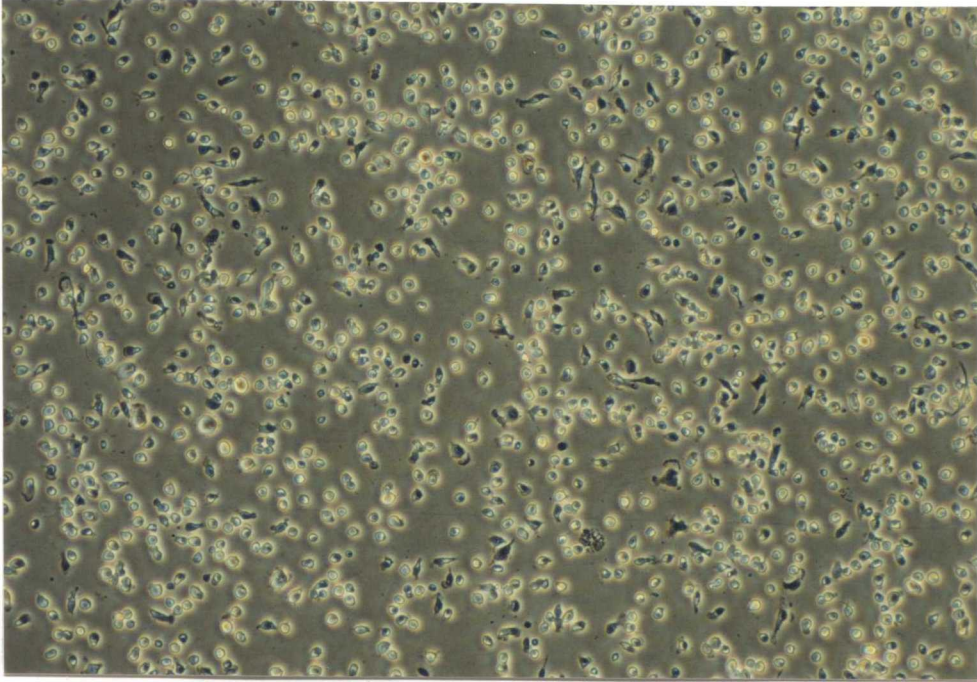
RT-PCR産物をプローブとして使用

A. IL-1 α B. IL-1 β

A., B. ともに上段は無刺激PBMCs、下段はLPS刺激4時間PBMCs

レーン 1: 0.1 μ g poly(A)⁺RNA; レーン 2: 0.01 μ g poly(A)⁺RNA;
 レーン 3: 1ng poly(A)⁺RNA

A



B

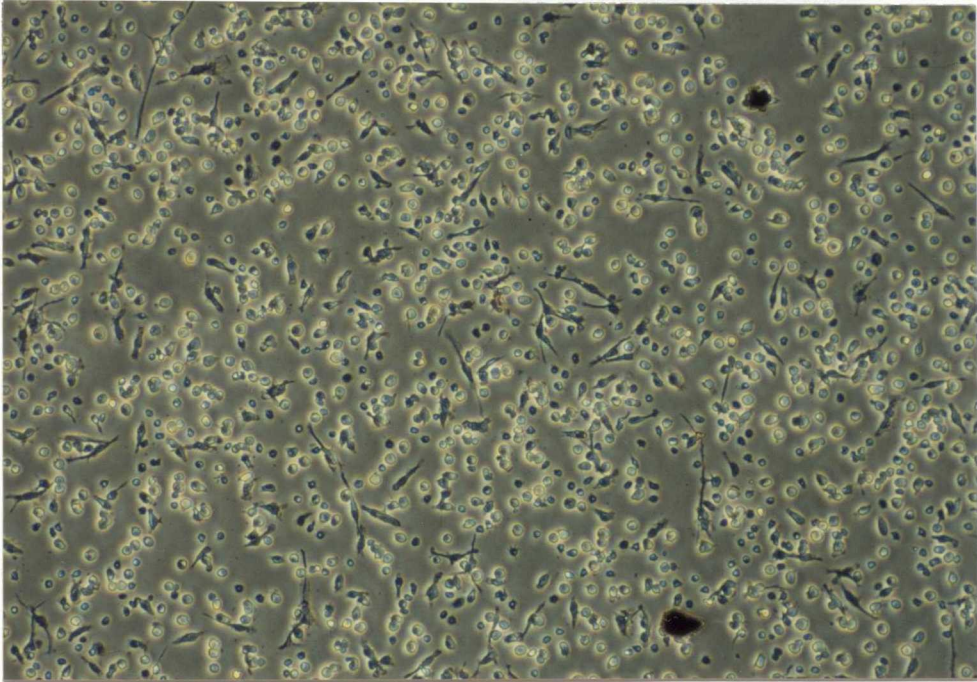


図13. in situ hybridization法による牛肺胞マクロファージにおけるIL-1 β mRNAの検出

A. 無刺激 B. LPS刺激12時間

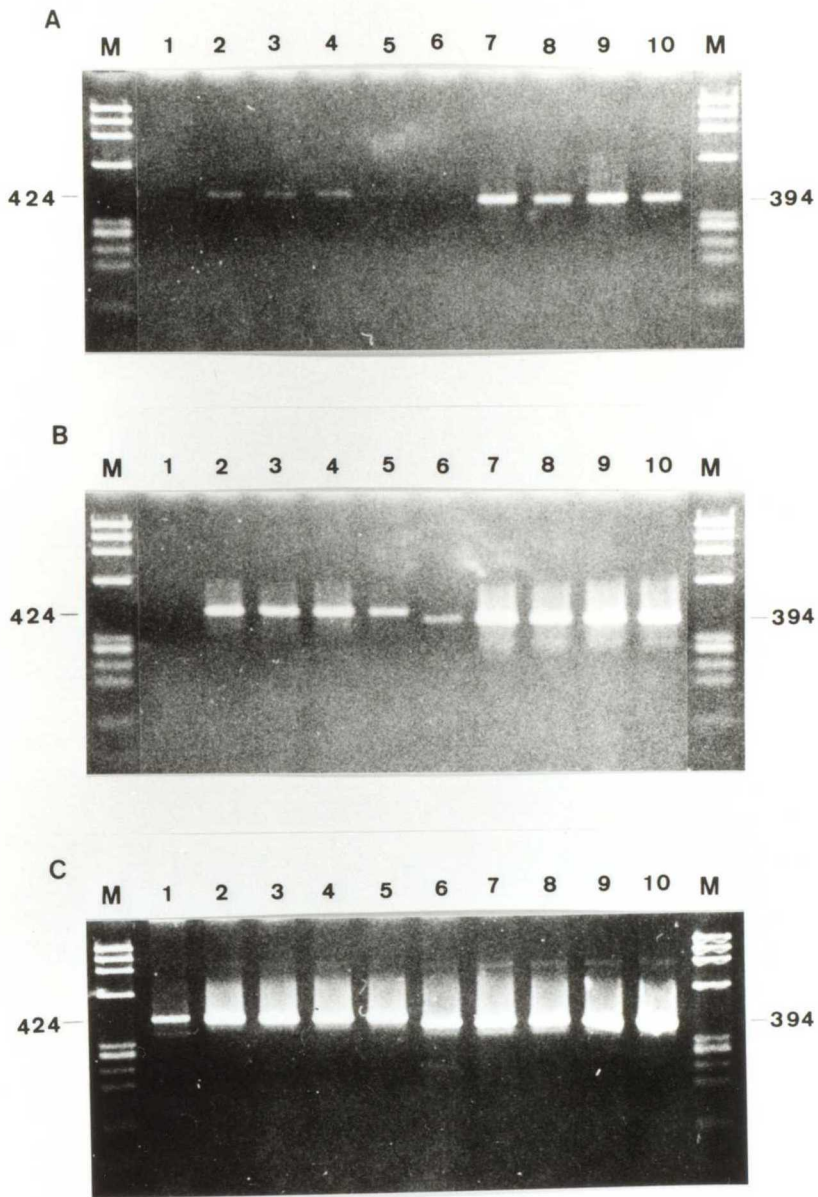


図14. IL-1mRNA発現のカイネティクス

レーン 1-5: IL-1 α ; レーン 6-10: IL-1 β

レーン 1,6: LPS刺激後 0時間; レーン 2,7: 3時間; レーン 3,8: 6時間

レーン 4,9: 9時間; レーン 5,10: 24時間

A: PCR 20サイクル B: 25サイクル C: 35サイクル

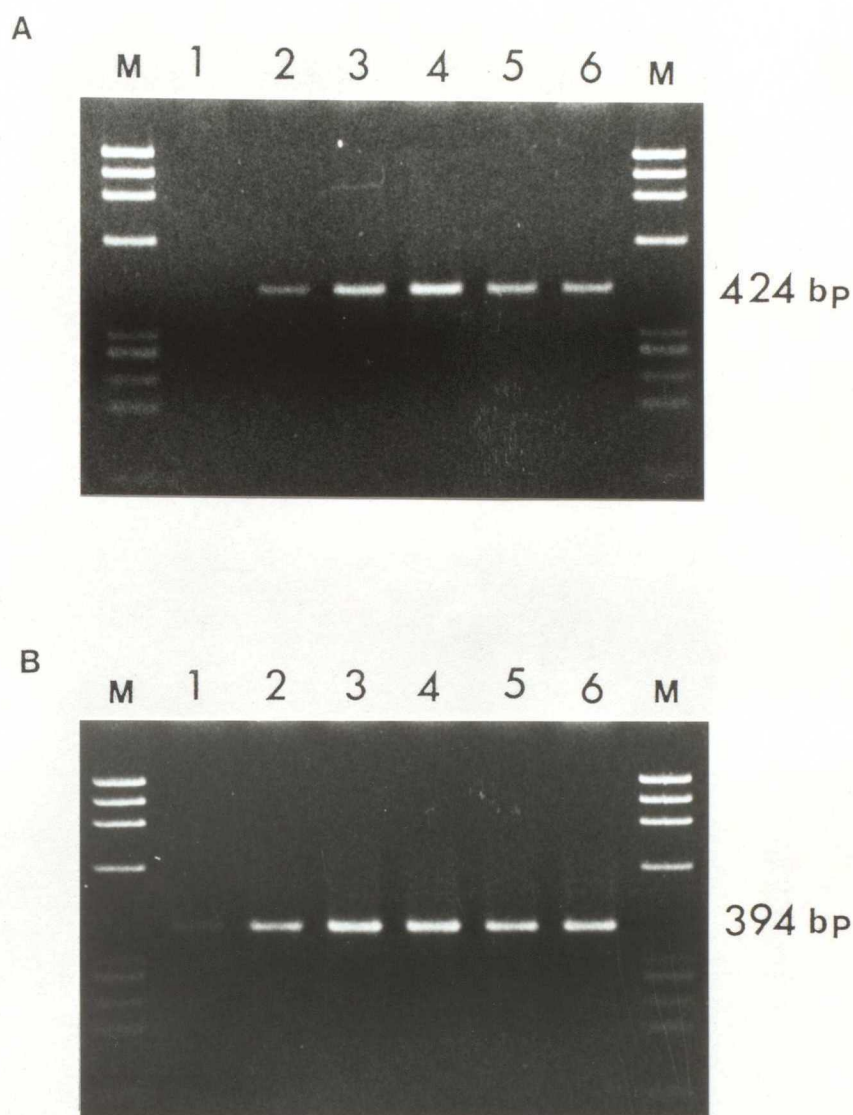


図15. LPS投与牛におけるIL-1mRNAの検出

A. IL-1 α B. IL-1 β

レーン 1: LPS投与前; レーン 2: LPS投与後30分; レーン 3: 投与後1時間;
 レーン 4: 投与後2時間; レーン 5: 投与後4時間; レーン 6: 投与後6時間

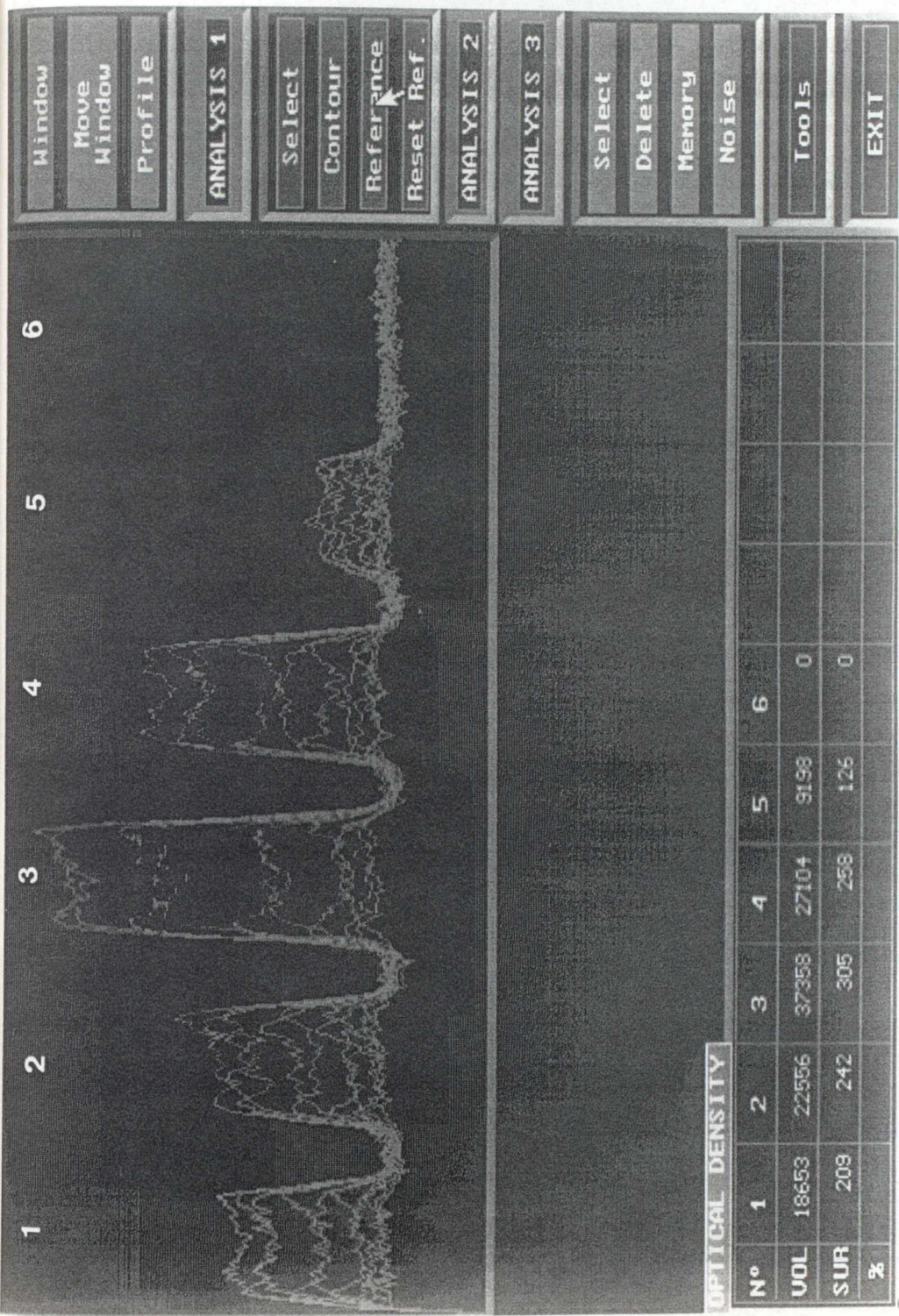


図16. イメージアナライザーを用いたIL-1 α mRNAの半定量化

レーン 1: LPS投与前; レーン 2: LPS投与後30分; レーン 3: 投与後1時間;
 レーン 4: 投与後2時間; レーン 5: 投与後4時間; レーン 6: 投与後6時間

イメージアナライザー (BIO-PROFIL:MS機器) OPTICAL DENSITY解析による便宜上の単位 (vol.) により定量化

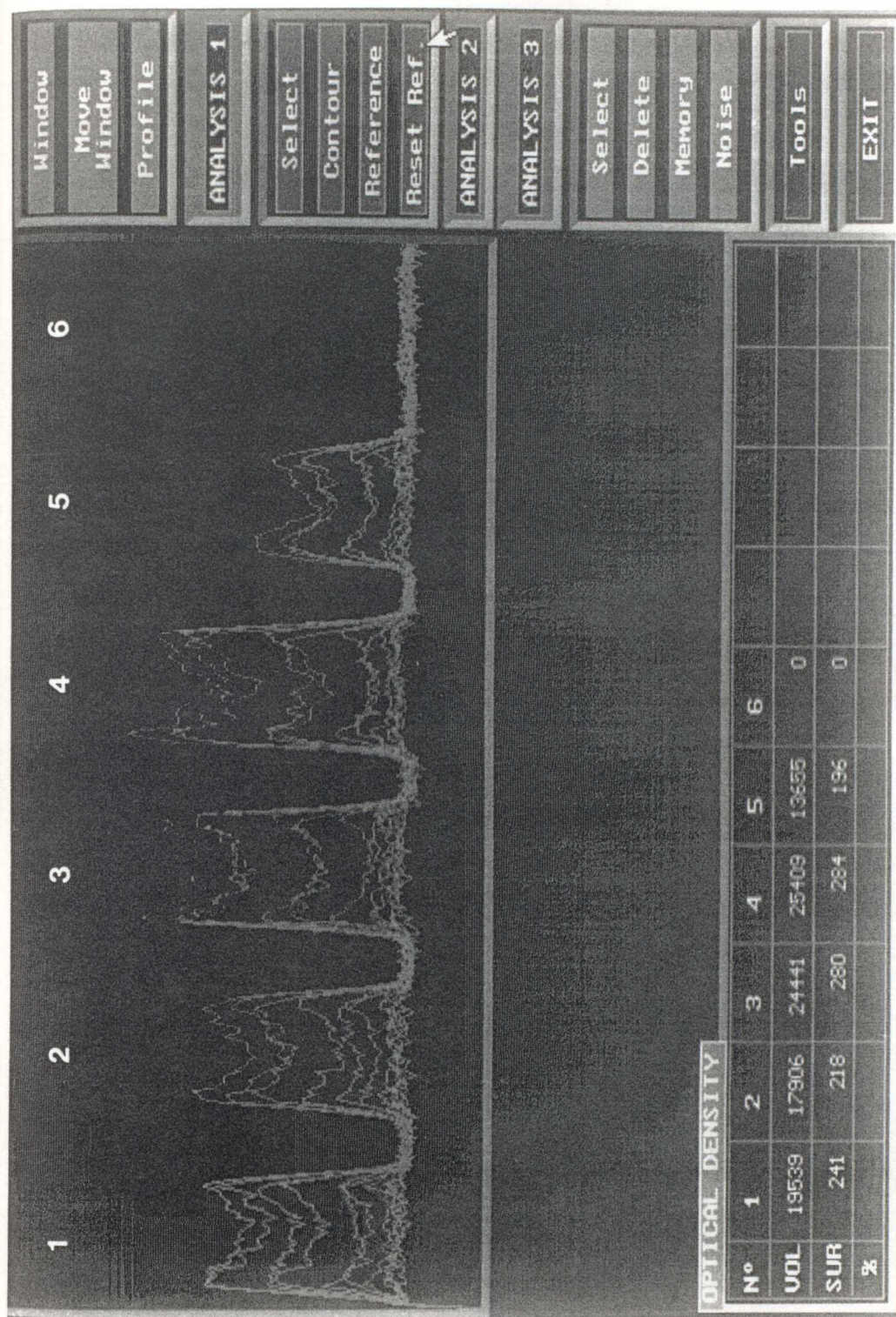


図17. イメージアナライザーを用いたIL-1 β mRNAの半定量化

レーン 1: LPS投与前; レーン 2: LPS投与後30分; レーン 3: 投与後1時間;
 レーン 4: 投与後2時間; レーン 5: 投与後4時間; レーン 6: 投与後6時間

イメージアナライザー (BIO-PROFIL:MS機器) OPTICAL DENSITY解析による便宜上の単位 (vol.) により定量化

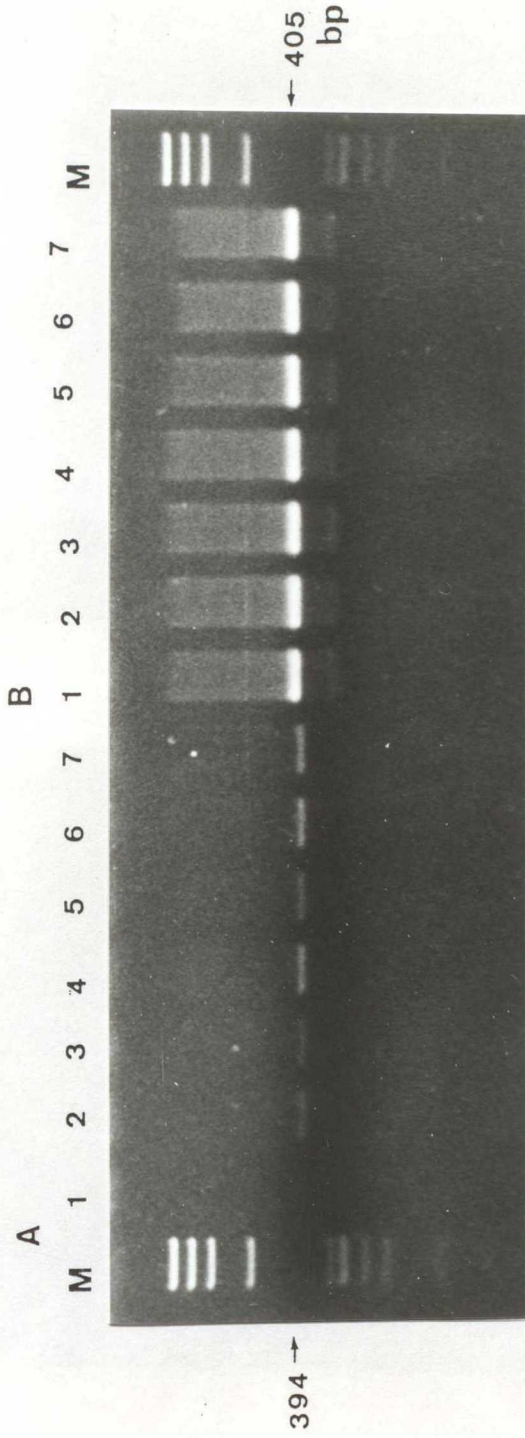
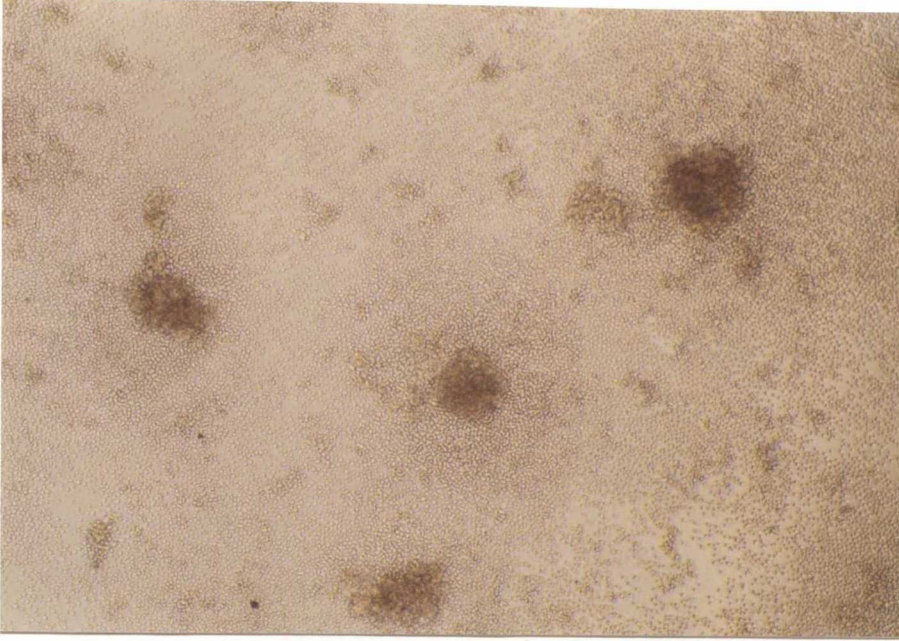


図18. 健康牛PBMCsにおけるIL-1 β mRNA量の個体差

A. IL-1 β B. β -アクトチン
 レーン 1-7が牛個体 1-7に対応
 PBMCsから抽出したpoly(A)⁺RNA、50ngを用いてRT-PCR (PCR30サイクル) を実施

A



B

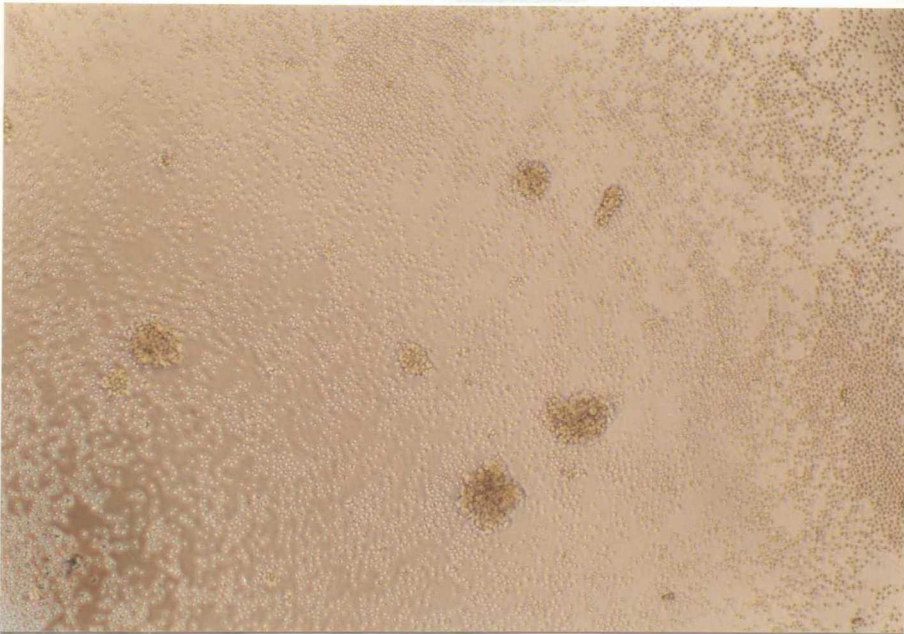


図19. C3H/HeJマウス胸腺細胞を用いたIL-1活性の測定

- A. IL-1により増殖したマウス胸腺細胞
- B. 対照

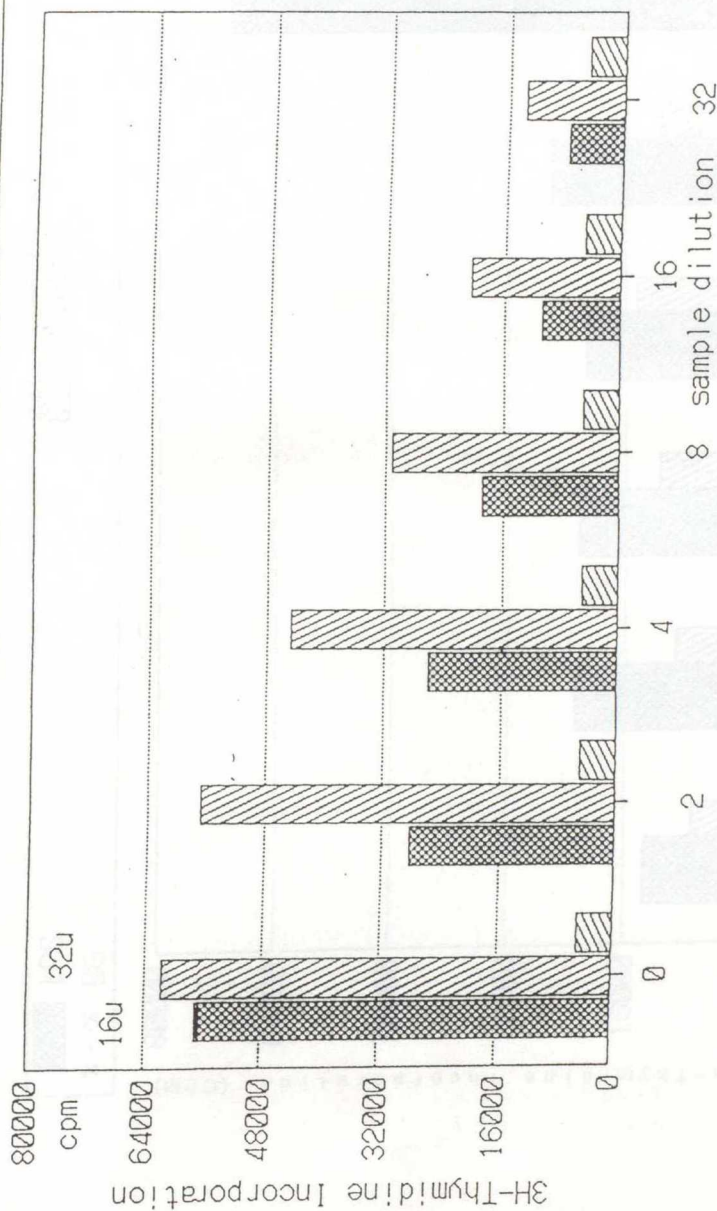
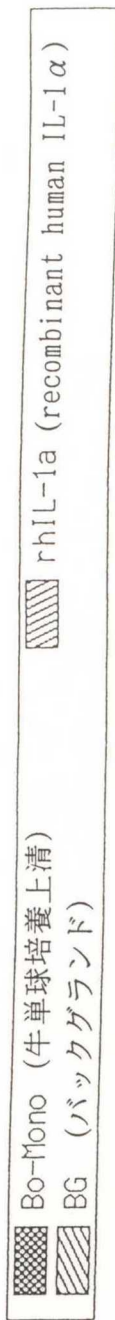


図20. 牛単球培養上清中のIL-1活性

C3H/HeJマウス胸腺細胞を用いてIL-1活性を測定
同時に recombinant human IL-1αの活性を測定

バックグラウンドの cpm (約5,000cpm) の 2倍 (約10,000cpm) の cpmを示す、
検体の最高希釈倍数を1単位とすると、本検体は16単位、rhIL-1αは32単位となる。

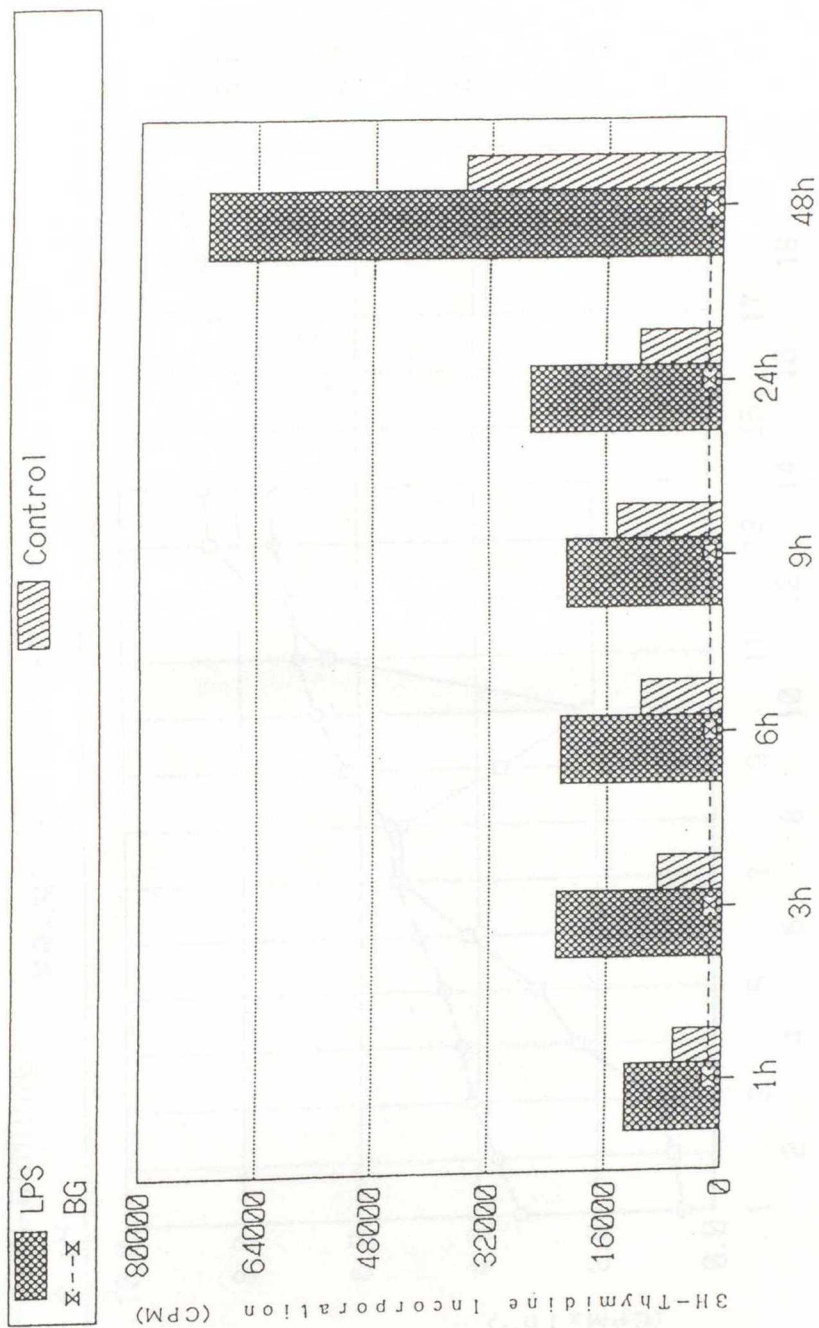
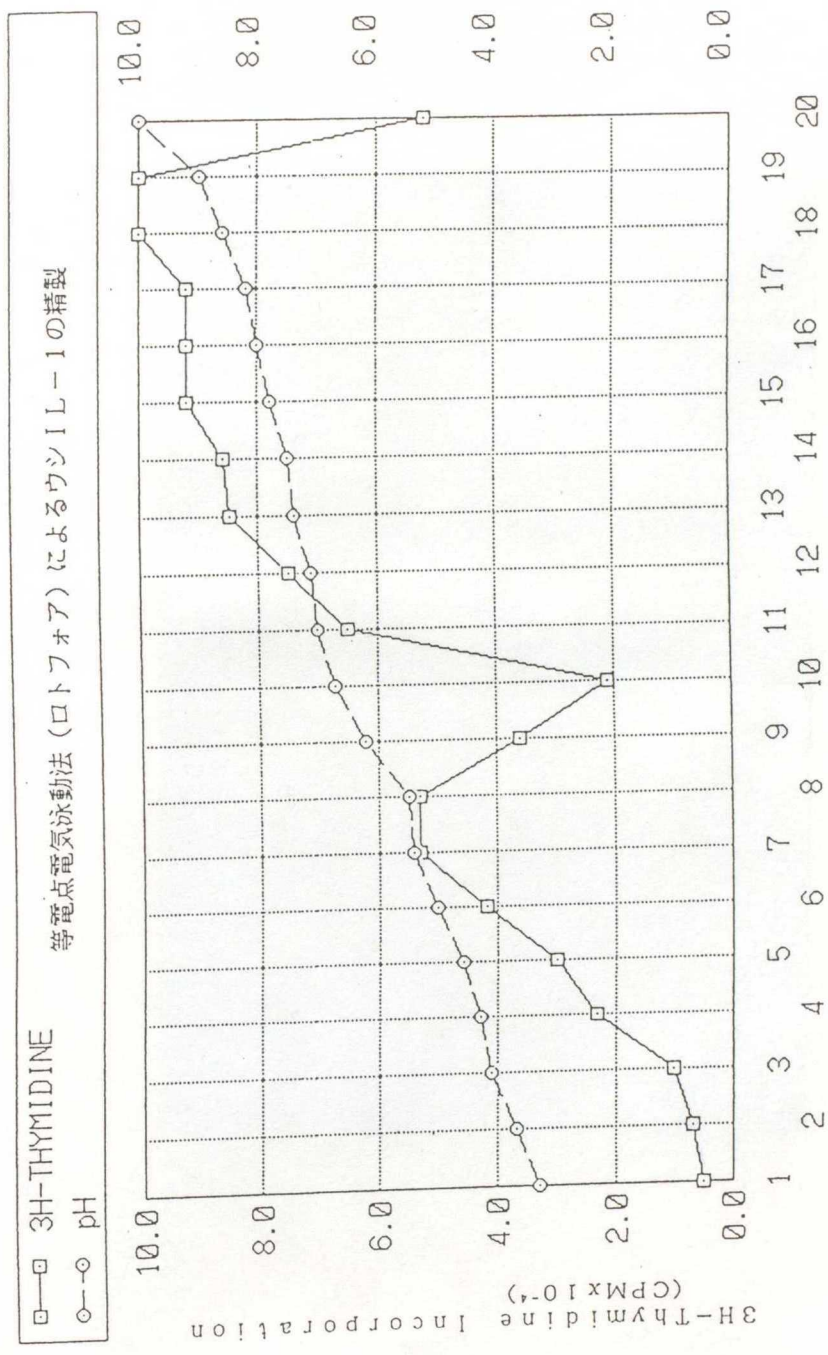


図21. in vitro におけるIL-1産生動態
 PBMCsをLPSで刺激し、3、6、9、24、48時間後の
 IL-1活性をC3H/HeJマウス胸腺細胞を用いて測定



コンパートメントNo.

図22. 肺胞マクロファージ培養上清中IL-1の精製

液体等電点電気泳動法 (ロトフォア) による精製

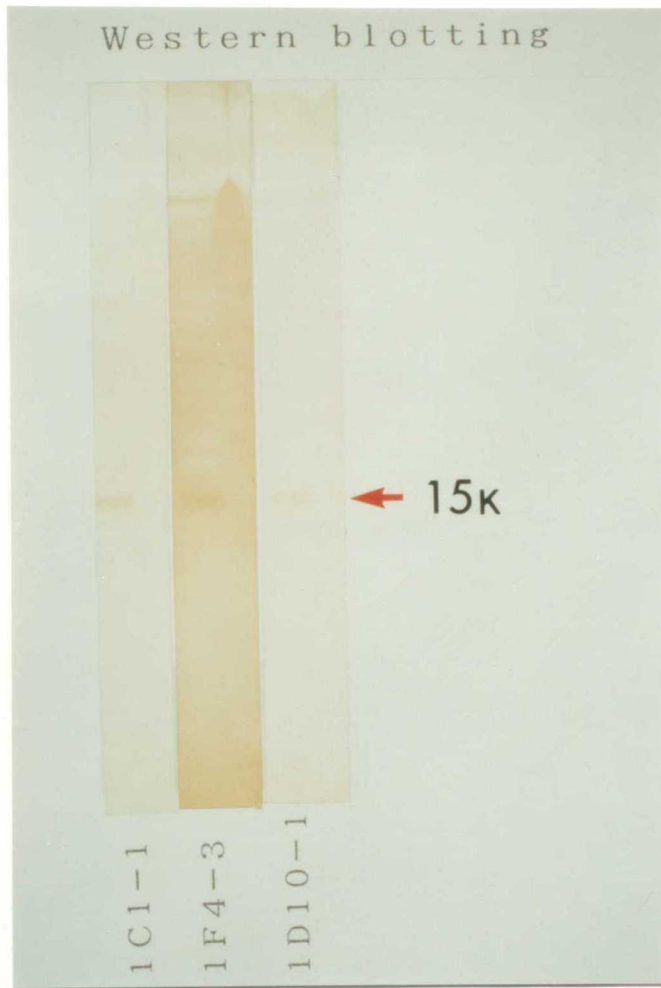


図23. ウェスタンブロッティング法による単クローン抗体認識蛋白の解析

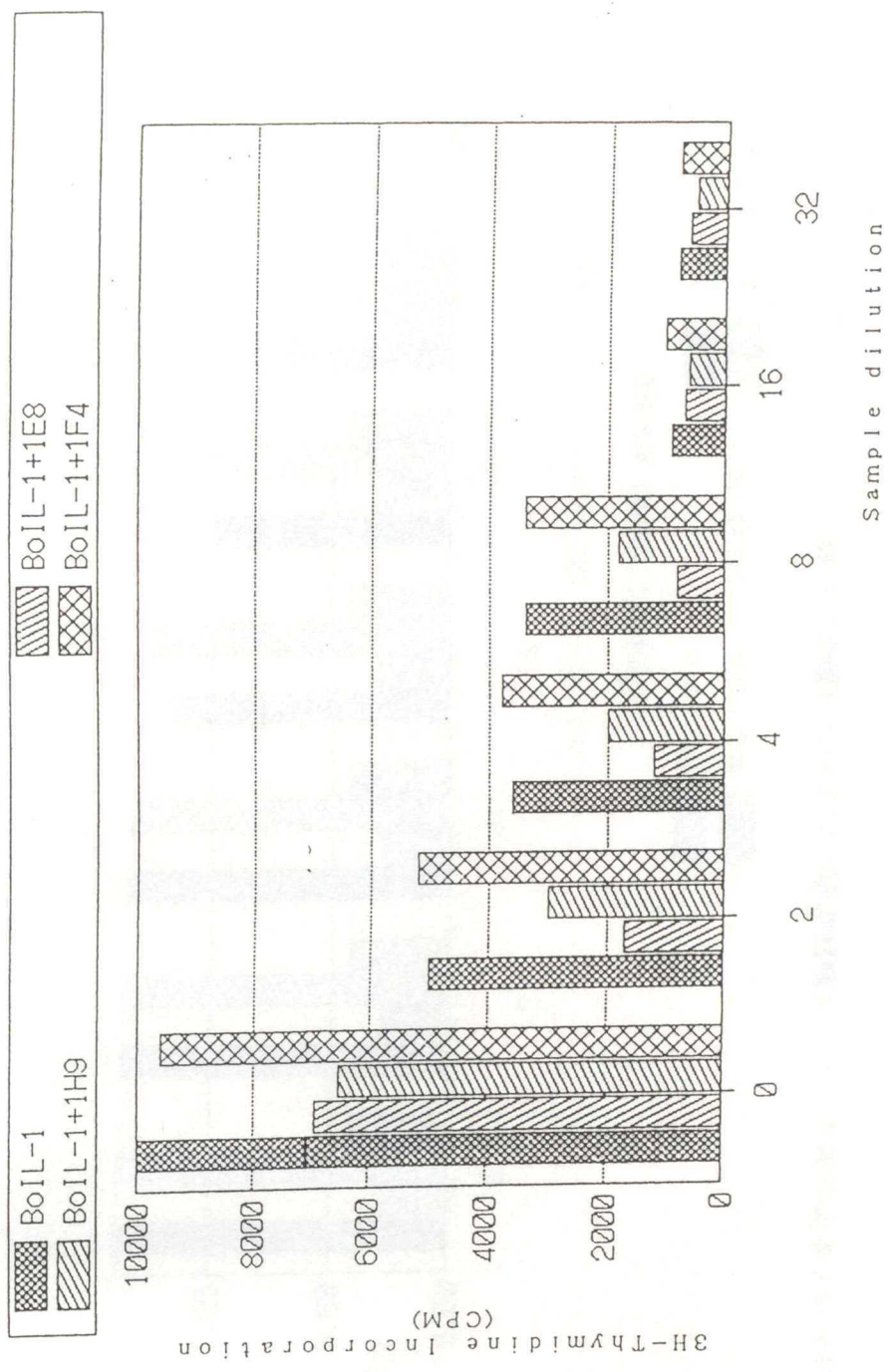


図24. 単クローン抗体によるIL-1活性中和（阻止）試験

単クローン抗体 1E8, 1H9 には中和活性が認められた

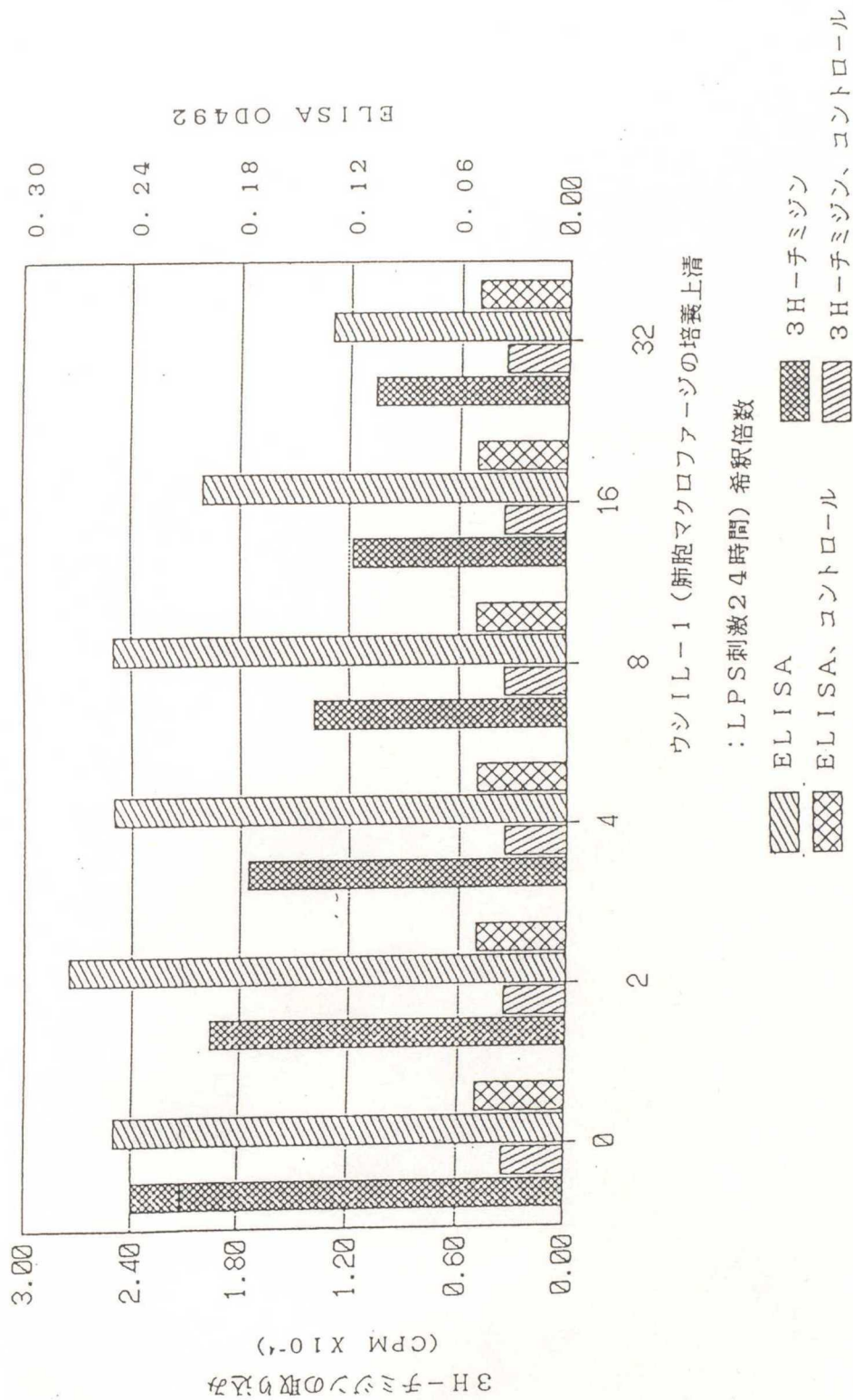


図25. ELISAとバイオアッセイ (マウス胸腺細胞) によるIL-1測定と比較

ELISA: バックグラウンドの OD値 (0.05) の2倍 (0.1) 以上の値を示す、検体の最高希釈倍数を1単位とすると、本検体は32単位

バイオアッセイ: バックグラウンドの cpm (約5,000cpm) の2倍 (約10,000cpm) の cpmを示す、検体の最高希釈倍数を1単位とすると、本検体は32単位