

平成 21 年 6 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19580374

研究課題名 (和文) 黄色ブドウ球菌由来スーパー抗原性毒素に対する牛乳腺上皮細胞の免疫応答機構解明

研究課題名 (英文) Effect of staphylococcal superantigen on the immuneresponsibility of the bovine mammary epithelial cells.

研究代表者

林 智人 (HAYASHI TOMOHITO)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・主任研究員

研究者番号：90297630

研究成果の概要：

牛乳房に感染した黄色ブドウ球菌が産生するスーパー抗原が乳房炎症あるいはその重症化に関与している可能性が示唆された。実際の黄色ブドウ球菌感染では、乳房内で感染巣を形成した細菌がスーパー抗原を産生し、そこに存在するT細胞がスーパー抗原によって非特異的に活性化され、その刺激により産生されるサイトカイン(特に IFN- $\gamma$ )の作用を受けて BMEC の IL-15 遺伝子の発現上昇が起これ、その結果として炎症の誘導あるいは重篤化が起こるといふ機序の可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 (分科)、臨床獣医学 (細目)

キーワード：黄色ブドウ球菌、スーパー抗原性毒素、乳腺上皮細胞、免疫応答、ウシ乳房炎

## 1. 研究開始当初の背景

搾乳家畜牛における黄色ブドウ球菌性乳房炎は、国内外を問わず高い発生率を示し、畜産経営上最も深刻な損失を与える感染性疾患である。この黄色ブドウ球菌による乳房炎病態では、感染した菌が免疫系の無秩序な活性化誘導する外毒素、いわゆるスーパー抗原を高率に産生することが知られている。これまで我々は、黄色ブドウ球菌を感染菌とした乳房炎罹患牛では、このスーパー抗原が原因となり乳腺T細胞が非特異的に活性化されることを見だし、その結果として炎症性サイトカインが感染乳腺局所で高頻度で産生されていることを世界に先駆けて明らかにした。したがって黄色ブドウ球菌由来スーパー抗原は、免疫系反応の誘導を介することに

より乳腺細胞を活性化する作用があることを強く示唆している。しかしながら、臨床個体で見られる疾患発症あるいは炎症の重篤化を誘導する炎症誘導機序は未だ不明な点が多い。今後は細胞レベルでの実験からその機序を明らかにする必要がある。

## 2. 研究の目的

黄色ブドウ球菌による乳房炎病態では、感染した菌が免疫系の無秩序な活性化誘導する外毒素、いわゆるスーパー抗原を高率に産生することが知られている。しかしながら、臨床個体で見られる疾患発症あるいは炎症の重篤化を誘導する炎症誘導機序は未だ不明な点が多い。本研究では、期間内で黄色ブドウ球菌自体あるいは菌由来スーパー抗原の

関与が示唆されている黄色ブドウ球菌性乳房炎の炎症局所（乳腺組織）で反応する免疫関連分子および遺伝子の動態、さらにはその際の牛の乳腺における自然免疫系機構を明らかにすることを目的としている

### 3. 研究の方法

本研究では、期間内において以下の実験を行い、黄色ブドウ球菌と菌由来スーパー抗原の関与が示唆されている黄色ブドウ球菌性乳房炎の炎症局所（乳腺組織）で反応する免疫関連分子および遺伝子の動態、さらにはその際の牛の乳腺における自然免疫系機構を明らかにすることを目的とした。

1、乾乳期および泌乳期の乳腺上皮細胞を初代培養し、その培養に健常あるいは臨床乳房炎由来の乳腺内に存在する体細胞、免疫細胞を加え共培養することにより、乳腺組織構造を *in vitro* で再構築する実験系を確立する。

2、再構築した乳腺組織の実験系にスーパー抗原加え、その刺激において発現が変化すると考えられる各種炎症性サイトカインやケモカインを関与する細胞集団ごとに RT-PCR を用いて遺伝子発現解析をし、菌由来スーパー抗原による炎症誘導あるいは免疫系、特に T 細胞の活性化に関与する分子を *in vitro* で解明する。

3、ウシの自然免疫機構のレセプターである Toll Like Receptor (TLR) の RT-PCR 解析システムを樹立すると共に、スーパー抗原刺激での各乳腺構成細胞の TLR の発現パターンを共培養実験系を用いて明らかにする。

これらの実験を行うことにより、黄色ブドウ球菌が産生するスーパー抗原により乳腺組織の炎症誘導あるいは炎症反応の増強が黄色ブドウ球菌性乳房炎の乳腺免疫応答を伴う発症機構、特に自然免疫機構の解明が期待出来ると考えた。

### 4. 研究成果

乳房炎発症時主に障害を受ける細胞は乳腺上皮細胞 (BMEC) であるが、この細胞に及ぼす細菌性スーパー抗原の間接的な影響を検討することを本年度の目的とした。免疫細胞を介したスーパー抗原が及ぼす乳腺上皮細胞の障害機序を明らかにすることができれば、大動物臨床において切望されている黄色ブドウ球菌性乳房炎の治療法の開発および予防法の開発に繋がる。本年度の研究により、以下の成果を得ることが出来た。

1、細菌性スーパー抗原で刺激した免疫細胞由来の液性因子を BMEC に作用させることにより、BMEC の IL-15 mRNA の発現が誘導されることが明らかにされ、免疫細胞由来

のサイトカイン遺伝子プロファイルによりそれを誘導する因子が IFN- $\gamma$  である可能性が示唆された。

2、遺伝子組換え型ウシ IFN- $\gamma$  単独で BMEC を刺激しても同様に IL-15 mRNA の発現上昇が見られたことから、BMEC の IL-15 mRNA の発現上昇を誘導する主な因子は IFN- $\gamma$  であることが示唆された。

3、T細胞をスーパー抗原で刺激すると IFN- $\gamma$  mRNA の発現上昇がみられたことから、BMEC の IL-15 mRNA の発現上昇を誘導する IFN- $\gamma$  の主な産生細胞は T細胞であることが示唆された。

4、BMEC と T細胞の共培養の実験により、スーパー抗原の刺激が T細胞の反応を介して BMEC に伝達されるのは 6時間以内に起こることが明らかにされた。

以上のことから、乳房に感染した黄色ブドウ球菌が産生するスーパー抗原は、乳腺の炎症に関与している可能性が強く示唆された。実際の黄色ブドウ球菌感染では、乳房内で感染巣を形成した細菌がスーパー抗原を産生し、そこに存在する T細胞がスーパー抗原によって非特異的に活性化される。そのとき産生されるサイトカイン（特に IFN- $\gamma$ ）の作用を受けて BMEC の IL-15 遺伝子の発現上昇が起こり、その結果として炎症の誘導あるいは重篤化が起こるといった機序の可能性が示唆された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① 林智人、窪田宗広、岩崎圭子、坂口憲吾、安部良、大塚浩通、菊佳男、尾澤知美、高橋秀之、乳房炎乳汁から迅速かつ効率よく黄色ブドウ球菌を分離する方法の開発、日本乳房炎研究会報、13、39-47、2009、査読あり
- ② 菊佳男、岡田洋之、堤隆一、尾澤知美、林智人、高橋秀之、実験的大腸菌性乳房炎における臨床症状と血中サイトカインの関係、日本乳房炎研究会報、13、57-60、2009、査読あり 乳房炎乳汁から迅速かつ効率よく黄色ブドウ球菌を分離する方法の開発、日本乳房炎研究会報、13、39-47、2009、査読あり
- ③ 尾澤知美、菊佳男、犬丸茂樹、長谷川三喜、櫛引史郎、林智人、高橋秀之、ウシ組換え GM-CSF 乳房内投与が潜在性乳房炎牛の乳汁および末梢血好中球に及ぼす影響、日本乳房炎研究会報、13、61-64、2009、査読あり
- ④ 窪田宗弘、林智人、岩崎圭子、大塚浩通、

小比類卷正幸、川村清市、坂口謙吾、安部良、Rapid and effective method for separation of Staphylococcus aureus from somatic cell in mastitis milk. Journal of Dairy Science、第90巻、4100-4107、2008、査読あり

- ⑤ Zhao J、林智人、Saarinen S、加藤秀人、今西健一、切代照雄、安部良、内山竹彦、三好(秋山)徹、Infection and Immunity、Cloning, expression and characterization of the superantigen streptococcal pyrogenic exotoxin-G from Streptococcus dysgalactiae、第75巻、1721~1729、2007、査読あり

[学会発表] (計8件)

- ① 林智人、全身性免疫と粘膜性免疫、第3回日本家畜臨床感染症研究会学術集会、2008年12月5日、福岡
- ② 林智人、窪田宗広、岩崎圭子、坂口憲吾、安部良、大塚浩通、菊佳男、尾澤知美、高橋秀之、乳房炎乳汁から迅速かつ効率よく黄色ブドウ球菌を分離する方法の開発、第13回日本乳房炎研究会学術大会、2008年11月7日、つくば
- ③ 菊佳男、尾澤知美、櫛引史郎、犬丸茂樹、林智人、長谷川三喜、保田立二、高橋秀之、リボソーム包埋 rbGM-CSF 乳房炎罹患乳房内投与による乳汁および末梢血単核球表面抗原への影響と乳房炎治療効果の検討、平成20年度日本獣医師会学会年次大会、009/1/23、盛岡
- ④ 菊佳男、岡田洋之、堤隆一、尾澤知美、林智人、高橋秀之、実験的大腸菌性乳房炎における臨床症状と血中サイトカインの関係、第13回日本乳房炎研究会学術大会、2008年11月7日、つくば
- ⑤ 尾澤知美、菊佳男、犬丸茂樹、長谷川三喜、櫛引史郎、林智人、高橋秀之、ウシ組換え GM-CSF 乳房内投与が潜在性乳房炎牛の乳汁および末梢血好中球に及ぼす影響、第13回日本乳房炎研究会学術大会、2008年11月7日、つくば
- ⑥ Tomohito Hayashi、Munehiro Kubota、Keiko Iwasaki、Kengo Sakaguchi、Ryo Abe、Hiromichi Ohtsuka、Yoshio Kiku、Tomomi Ozawa、Hideyuki Takahashi、Rapid and Effective Method for Separation for Staphylococcus aureus from Somatic Cells in Mastitis Milk、International Conference of Mastitis control、2008年9月30日、オランダ
- ⑦ Yoshio Kiku、Tomomi Ozawa、Shigeki Inumaru、Shiro Kushibiki、Tomohito Hayashi、Hideyuki Takahashi、Effect of Intramammary Injection of Liposomal RbGM-CSF on Milk and Peripheral Blood

Mononuclear Cells of Subpopulation in Holstein Cows with Naturally Infected-subclinical Mastitis、International Conference of Mastitis control、2008年9月30日、オランダ

- ⑧ Tomomi Ozawa、Yoshio Kiku、Shigeki Inumaru、Sanki Hasegawa、Shiro Kushibiki、Tomohito Hayashi、Hideyuki Takahashi、Effect of Intramammary Injection of RbGM-CSF on Neutrophils Function of Blood and Milk in Holstein Cows with Subclinical Mastitis、International Conference of Mastitis control、2008年9月30日、オランダ

[図書] (計5件)

- ① 林智人、家畜診療、「免疫」システムを担う組織・細胞・分子とその機能的役割、2008、10
- ② 林智人、技術の窓、PCR法による乳汁中黄色ブドウ球菌特異遺伝子の迅速検出法、2008、1
- ③ Tomohito Hayashi、Munehiro Kubota、Keiko Iwasaki、Kengo Sakaguchi、Ryo Abe、Hiromichi Ohtsuka、Yoshio Kiku、Tomomi Ozawa、Hideyuki Takahashi、Wageningen Academic Publishers、Mastitis Control : Effect of Intramammary Injection of Liposomal RbGM-CSF on Milk and Peripheral Blood Mononuclear Cells of Subpopulation in Holstein Cows with Naturally Infected-subclinical Mastitis、2008、4
- ④ Yoshio Kiku、Tomomi Ozawa、Shigeki Inumaru、Shiro Kushibiki、Tomohito Hayashi、Hideyuki Takahashi、Wageningen Academic Publishers、Mastitis Control : Effect of Intramammary Injection of Liposomal RbGM-CSF on Milk and Peripheral Blood Mononuclear Cells of Subpopulation in Holstein Cows with Naturally Infected-subclinical Mastitis、2008、4
- ⑤ Tomomi Ozawa、Yoshio Kiku、Shigeki Inumaru、Sanki Hasegawa、Shiro Kushibiki、Tomohito Hayashi、Hideyuki Takahashi、Wageningen Academic Publishers、Mastitis Control : Effect of Intramammary Injection of RbGM-CSF on Neutrophils Function of Blood and Milk in Holstein Cows with Subclinical Mastitis、2008、4

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]  
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 智人 (HAYASHI TOMOHITO)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研  
究機構・動物衛生研究所・主任研究員

研究者番号：90297630

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者