

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：30109

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16004

研究課題名(和文)ウシ乳腺において常在細菌叢が白血球の免疫応答能に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effect of microbiome on leukocyte immune response in the bovine mammary gland

研究代表者

権平 智 (Gondaira, Satoshi)

酪農学園大学・獣医学群・講師

研究者番号：80795089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウシ乳腺におけるアミノ酸が白血球の免疫機能修飾に及ぼすメカニズムの解明を試みる。乳腺内のアミノ酸レベルをもとに、免疫担当細胞における免疫関連遺伝子の発現調節とその機能を解析することで乳腺免疫に対するアミノ酸による免疫機能修飾条件を明らかにする。乳腺腔内におけるアミノ酸の動態解析より、泌乳期によるアミノ酸バランスが異なること、特に分娩前後と乳腺感染でアミノ酸バランスが変化することが明らかとなり、乳腺腔内の乳腺上皮細胞および白血球の免疫応答をアミノ酸が調節することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウシ乳房炎は酪農業において経済的損失が最も高く、動物福祉の観点からも制御することが重要な感染症である。本研究において常在細菌叢の代謝産物(アミノ酸)に着目した乳腺感染の制御についての知見は乏しく、その成果が期待されている。乳腺環境におけるアミノ酸の免疫応答に関する役割については、十分には明らかにされていないが、アミノ酸による免疫担当細胞の機能修飾を明らかにすることで、乳腺感染に対する理解をさらに深めることができると考える。これらは、ウシ乳汁の生理学的解明にとどまらず、乳房炎の新規制御技術の構築にもつながることが期待され、畜産学・応用獣医学領域に貢献できるものである。

研究成果の概要(英文)：This study will attempt to elucidate the mechanism by which amino acids in the bovine mammary gland modulate leukocyte immune function. Based on the amino acid levels in the mammary gland, we analyzed the expression of immune-related genes and their functions in immunocompetent cells to clarify the conditions for modification of mammary gland immunity by amino acids.

The analysis of amino acid dynamics in the mammary gland revealed that the amino acid balance depending on the lactation period, especially around parturition and during mammary infection, suggesting that amino acids regulate the immune response of mammary epithelial cells and leukocytes in the mammary gland.

研究分野：獣医学

キーワード：乳房炎 アミノ酸 常在細菌叢

## 1. 研究開始当初の背景

常在細菌叢は感染症に対する生物学的バリア機能を担っている。近年、消化管において常在細菌叢の代謝産物によるアミノ酸が免疫担当細胞を活性化させることで、病原体細菌の侵入を抑制し、感染症の抑制因子となることが報告された。乳汁中にも常在細菌叢が形成されており、菌叢バランスが崩れる「dysbiosis」の概念が腸管だけでなく乳腺環境においても提唱されており、腸管と類似の免疫システムの制御が乳腺でも行われている可能性が高い。

生体の体液におけるアミノ酸レベルは生命活動を反映することが知られており、恒常性は保たれるものの、変動している。一方、常在細菌叢の代謝産物であるアミノ酸が免疫系を活性化させ、感染症に対する抵抗性が增強されることから、乳腺内のアミノ酸レベルとその常在細菌叢を明らかにすることで、生体が乳腺感染に対して抵抗性を持つかを予測できる可能性があり、これまでにない乳房炎の防除対策技術を提供できると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、乳汁の常在細菌叢は乳腺腔内の免疫修飾機能を持つことを仮説として、乳腺における常在細菌叢とアミノ酸が白血球の免疫機能修飾に及ぼすメカニズムの解明を試みる。常在細菌叢の生命活動は宿主の免疫機能を調整するため、乳腺腔内のアミノ酸レベルと乳腺感染の関連性を調べることで乳腺内のアミノ酸が白血球の免疫機能修飾を担うことを明らかにすることができる。本研究の知見は、乳房炎をコントロールする新たな方法の開発へと繋げることも出来る上、細菌叢組成やアミノ酸レベルを指標とした新たな診断技術の開発、さらには抗生剤を用いた治療に代替しうる新規・乳腺感染制御法の確立に向けた臨床応用へも期待できる。

## 3. 研究の方法

- (1) ウシの選定：乳房・乳汁の所見、乳房炎原因菌および乳の理化学的性状から既報に準じ正常および乳房炎乳に分類し供試分房および供試牛とする。
- (2) 菌叢解析：次世代シーケンサーを利用して、細菌の 16S リボソーム遺伝子による網羅的遺伝子解析により、乳腺内における常在細菌叢の組成を明らかにする。
- (3) アミノ酸の定量：乳汁および血清中のアミノ酸レベルを定量する。免疫機能に関係するトリプトファンやシステインなどを含む 40 種類のアミノ酸を質量分析 (HPLC-MS/MS) により定量分析する。得られたデータは多変量解析により、アミノ酸バランスがどのように変化しているのかを解析する。
- (4) 好中球機能の測定：既報に準じて貪食・殺菌活性、活性酸素生成、自然免疫応答能を評価する。
- (5) 乳腺上皮細胞のサイトカイン発現解析：炎症性サイトカインである IL1-、TNF-、IL-6 について、RT-PCR 法 (mRNA 発現量) を用いて評価する。

## 4. 研究成果

本研究では、乳腺における常在細菌叢とアミノ酸が白血球の免疫機能修飾に及ぼすメカニズムの解明を試みる。常在細菌叢の生命活動はアミノ酸代謝を通して宿主の免疫機能を調整することが知られている。そのため、乳腺のアミノ酸動態を理解することは、乳腺内のアミノ酸によって白血球の免疫機能修飾が担われていることを明らかにすることにつながる。乳腺内のアミノ酸レベルをもとに、乳腺内における免疫関連因子の発現調節および白血球機能を解析することで乳腺免疫に対する機能修飾条件を明らかにすることを試みた。

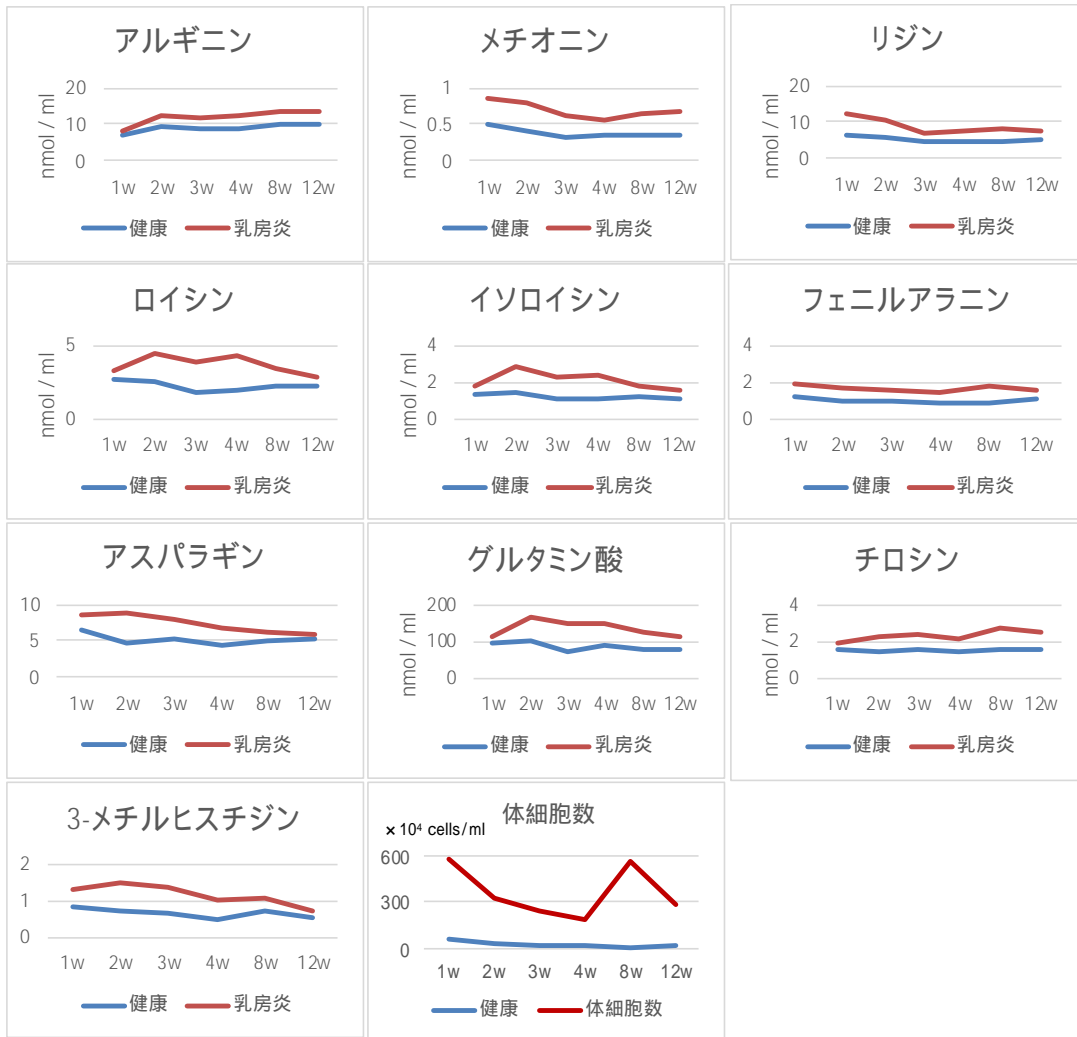


図1 ウシ乳汁におけるアミノ酸および体細胞数の推移

乳腺腔内におけるアミノ酸の動態解明についてその定量解析から、泌乳期によるアミノ酸バランスが異なることから乳期によって異なるアミノ酸の制御が行われていることが考えられた。特に分娩前後にアミノ酸バランスが変化することから乳腺腔内における免疫機能に影響を及ぼす可能性が考えられる。また、乳房炎の乳汁は健康な乳汁と比較して主に必須アミノ酸の濃度が高いことを明らかにした(図1)。乳房炎原因菌の構成成分(LPS)による乳腺上皮細胞および好中球への刺激に対する応答性(炎症性サイトカイン、活性酸素産生能)がアミノ酸により減弱することが示された。乳汁の菌叢解析については現在解析中であるが、これらの結果より、健康なウシと乳房炎のウシにおける乳汁のアミノ酸濃度は免疫担当細胞の免疫応答を調節していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 権平智、西航司、井上博紀、樋口豪紀
2. 発表標題 ウシ乳汁における体細胞数と遊離アミノ酸の関連性
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江口亜矢子、渡辺麗奈、西航司、井上博紀、権平智、樋口豪紀
2. 発表標題 ウシ乳房炎における乳中遊離アミノ酸の動態変化
3. 学会等名 第164回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------