

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580410

研究課題名(和文) 乳牛の乳腺免疫機能に及ぼす性ステロイドホルモンの影響に関する研究

研究課題名(英文) Effect of steroid hormone on immune function in mammary gland

研究代表者

磯部 直樹 (ISOBE, NAOKI)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：80284230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：性ステロイドホルモンが乳腺免疫機能に及ぼす影響および体内の常在細菌が死ぬことにより放出される細菌成分によって乳房炎が発症する可能性について検証した。エストロゲン(E)を投与すると、乳量が顕著に減少した。また細菌成分を注入した時、E投与区の方がプロゲステロン(P)投与区に比べて抗菌因子の乳中濃度が高かった。また、血中に細菌成分を注入すると、乳腺においてその成分が検出されると同時に、炎症が誘起された。以上の結果から、Eは乳量を減少させることによって乳中抗菌因子濃度を高め、細菌感染に対応していることおよび、体の他の部分から細菌成分が移行することによっても乳房炎が起り得ることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim was to explore the effect of steroid hormone on mammary immune function and the possibility that microbiota components can transfer to mammary gland. Estrogen caused the reduction of milk yield. When the microorganism components was infused into mammary gland, innate immune factors concentration in milk was high in the estrogen-injected animals compared to that in progesterone-injected animals. Intravenous injection of microorganism component induce inflammation of mammary gland. These results strongly suggest that estrogen reduces milk yield to elevate the concentration of innate immune factors, resulting in the establishment of strong defense system in mammary gland. It is also demonstrated that microbiota components can transfer to the mammary gland, which causes the mastitis. These findings contain noble and new knowledge and insights and can contribute to the protection and treatment of mastitis in the future. results strongly suggest that

研究分野：家畜生体機構学

キーワード：乳房炎 抗菌因子 ホルモン

1. 研究開始当初の背景

乳房(乳腺)の炎症である乳房炎は一般的に乳頭から細菌が侵入することで誘起される。これは乳牛に多発し、死産率の極めて高い疾病で、日本で年 700 億円という多大な損害を出している。細菌が侵入するとその成分を乳腺上皮細胞の Toll-like receptor (TLR) が認識し、自然免疫が開始される。まず種々の抗菌因子(ラクトフェリン, 抗菌ペプチド等)を分泌し細菌を攻撃する。また、乳腺上皮細胞はサイトカインおよびケモカインを分泌して好中球およびリンパ球を動員し、炎症を引き起こす。我々は自然免疫を担う抗菌ペプチドである lingual antimicrobial peptide (LAP; β -defensin の一つ)に焦点を当て乳牛の乳房における働きを検討してきた。そこで我々は乳房の乳腺上皮細胞で LAP タンパクが合成され乳汁中に分泌されていることおよびリポ多糖(LPS:グラム陰性菌成分)を乳腺に注入すると、LAP の乳汁中濃度が劇的に増加することを明らかにした。

細菌が乳房に侵入しても臨床的な乳房炎にならない時もある。これは細菌の量や病原性にもよるが、それよりも動物の免疫機能の健全性によるところが大きい。私は排卵期では黄体期に比べて牛乳中の LAP や他の抗菌因子の濃度が高いことを発見した。排卵時は血中エストロジオール(E:卵胞から分泌)濃度が高くプロゲステロン(P:黄体から分泌)濃度が低くなり、黄体期は逆に E が低く P が高くなる。また、E と P は乳腺上皮細胞にレセプターを持つことから、E や P が乳腺に直接作用していると考えられることから、性ステロイドホルモンが乳腺の免疫機能を局所的に変化させ、乳房炎発症に影響を及ぼしていることが考えられるがこれらについてはほとんど検討されていない。

一方、細菌は乳頭を介して乳腺に侵入し乳房炎が起きるといわれているが、血管内に LPS を注入すると乳腺で炎症が起こることから、体の他の部位から細菌やその成分が血液を介して乳腺へ移行する可能性もある。局所免疫機能や上皮細胞バリア機能が低下して、普段は病原性のない常在細菌やその成分が粘膜上皮を通して組織内に侵入し血流を介して乳腺へ到達して炎症を起こすことも考えられる。これが証明されれば新規な乳房炎発症経路の解明に結びつく。

2. 研究の目的

性ステロイドホルモンの乳腺免疫機能の調節機構を解明するとともに、内因性細菌による新たな乳房炎発症機序を追及することである。

3. 研究の方法

(1) 細菌成分による乳腺の免疫機能変化に及ぼす性ステロイドホルモンの影響
腔内留置型黄体ホルモン剤(CIDR)を挿入し P 濃度が高くなった 4 日目に LPS あるいはグラ

ム陽性菌(SA)の死菌を投与した(P区)。また、CIDRを挿入した7日後に Prostaglandin (PG)投与と同時に CIDR を除去、その2日後から5日連続で E を投与した。E 投与開始2日後に LPS および SA の死菌を投与した(E区)。投与後経時的に乳汁と血液を採取した。

(2) 細菌成分による培養乳腺上皮細胞の免疫機能変化に及ぼす性ステロイドホルモンの影響

実験2では乳腺細胞の免疫機能に及ぼすステロイドホルモンの影響を *in vitro* でさらに詳しく調べた。牛乳から乳腺上皮細胞を単離して培養し、培地に P あるいは E を添加するとともに LPS を添加して経時的に培地を採取するとともに上皮細胞から mRNA を抽出した。それらの抗菌因子およびサイトカインの発現を測定した。

(3) 内因性成分による乳房炎誘起

血中に分泌された細菌成分が乳房に移行して炎症が誘起されるのかどうかを調べるために、LPS を血中に注入し、乳汁を経時的に採取した。

4. 研究成果

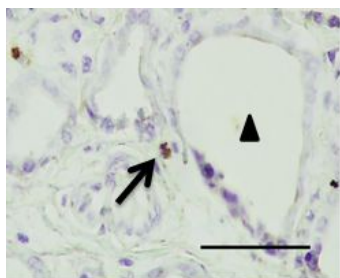
(1) E区およびP区のヤギの乳腺に LPS を注入した時、乳中体細胞数(SCC)は両区において LPS 投与後数時間後から顕著に増加したが、E区の方が高値を長期間維持し続けた。E区の SCC は LPS 投与1日から7日後までP区に比べて有意に高かった。乳中ラクトペルオキシダーゼ(LPO)活性およびラクトフェリン(LF)濃度はE区のみで LPS 投与後に投与前に比べて有意に高くなり、この値はP区に比べても有意に高かった。乳中ディフェンシン(LAP)および S100A7 濃度は両区とも LPS 投与後増加する傾向が認められたが、有意ではなかった。以上の結果から、高Eの方が、高Pより LPS 投与後の自然免疫反応が強いことが示唆された。したがって、発情期における大腸菌等のグラム陰性細菌による感染では自然免疫がより活発に機能すると考えられた。

次に、E区およびP区のヤギの乳腺にグラム陽性細菌である *Staphylococcus aureus* (SA)の死菌を注入し、経時的に乳汁を採取して、抗菌ペプチド濃度を測定した。乳量はE区において有意に減少したがP区では変化しなかった。乳中体細胞数(SCC)は両区において SA 投与後数時間後から顕著に増加したが、E区の方が高値を長期間維持し続けた。乳中ディフェンシン(LAP)およびラクトフェリン(LF)濃度はE区の方がP区に比べて有意に高くなった。以上の結果から、血中E濃度が高い時に SA を投与すると、乳量を低下させることにより自然免疫因子の濃度を増加させていることが示唆された。

(2) 乳汁から乳腺上皮細胞(MEC)を単離・培養して、増殖させる方法を確立し、EがMEC

の自然免疫機能に及ぼす影響を調べた。その結果、LPS を添加すると、抗菌因子 (LAP、ラクトフェリン) およびサイトカイン (IL-1b) の mRNA 発現が増加した。しかし、E を添加すると、これらの mRNA 発現は変化しないかあるいは低下した。実験 (1) の結果からヤギに E を投与すると乳量が激減したことから考え合わせると、E によって乳量が低下し、それによって乳中の抗菌因子の濃度が増加し、細菌感染を予防していると考えられた。

(3) 乳頭からの細菌感染以外の経路による乳房炎の可能性を探るために血中に LPS を注



入した後、乳房の免疫染色を行った結果、LPS が乳房に移行したことを確認した (図中矢印)。さらに、乳中体細胞数及び抗菌因子の濃

度が増加していたことから、体内の別の場所からの細菌成分によって乳房炎が起こり得る可能性を示唆した。

これらの結果はステロイドホルモンが乳房の自然免疫機能に及ぼす影響を調べた最初の報告である。この結果を利用して、乳房炎の効率的かつ安全な治療法の開発を推進できる。また、乳頭口からの細菌感染以外の経路によっても乳房炎が起こり得ることを示したことは非常にインパクトがある。例えばルーメンアシドーシスによってルーメン内の細菌が死に至った時にも乳房炎が起こり得ることを示しており、今までとは異なる視点での乳房炎予防法が必要であることを強く示唆している。

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 11 件)

1. Srisaikhon S, Suksombat W, Yoshimura Y, Isobe N (2015) Goat cathelicidin-2 is secreted by blood leukocytes regardless of lipopolysaccharide stimulation. *Animal Science Journal* (in press) 査読有
2. Kawai K, Korematsu K, Akiyama K, Okita M, Yoshimura Y, Isobe N (2015) Dynamics of lingual antimicrobial peptide, lactoferrin concentrations and lactoperoxidase activity in the milk of cows treated for clinical mastitis. *Animal Science Journal* 86(2), 153-158 査読有 doi: 10.1111/asj.12269.
3. Sugino T, Isobe N 他 10 名 10 番目 (2014) Effects of calcium salts of

medium-chain fatty acids on plasma metabolite and hormone concentrations in early lactating dairy cows. *Animal Production Science* 54, 1699-1702 査読有

4. Isobe N, Iwamoto C, Kubota H, Yoshimura Y (2014) Relationship between somatic cell count in milk and reproductive function in peripartum dairy cows. *Journal of Reproduction and Development* 60(6):433-437 査読有 doi: 10.1262/jrd.2014-065
5. Zhang GW, Lai SJ, Yoshimura Y, Isobe N (2014) Messenger RNA expression and immunolocalisation of psoriasin in the goat mammary gland and its milk concentration after an intramammary infusion of lipopolysaccharide. *The Veterinary Journal* 202(1): 89-93 査読有 doi:10.1016/j.tvjl.2014.06.013
6. Zhang GW, Lai SJ, Yoshimura Y, Isobe N (2014) Expression of cathelicidins mRNA in the goat mammary gland and effect of the intramammary infusion of lipopolysaccharide on milk cathelicidin-2 concentration. *Veterinary Microbiology* 170: 125-134 査読有 doi: 10.1016/j.vetmic.2014.01.029
7. Isobe N, Shibata A, Kubota H, Yoshimura Y (2013) Lingual antimicrobial peptide and lactoferrin concentrations and lactoperoxidase activity in bovine colostrum are associated with subsequent somatic cell count. *Animal Science Journal* 84(11): 751-756 査読有 doi: 10.1111/asj.12113.
8. Kawai K, Isobe N 他 7 名 9 番目 (2013) Relationship between concentration of lingual antimicrobial peptide and somatic cell count in milk of dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 153(3-4):298-301 査読有 doi: 10.1016/j.vetimm.2013.03.002.
9. 磯部直樹 (2013) ウシ乳腺における lingual antimicrobial peptide (LAP) の役割. *家畜診療* 60(7): 419-424. 査読無
10. Huang YQ, Morimoto K, Hosoda K, Yoshimura Y, Isobe N (2012) Differential immunolocalization between lingual antimicrobial peptide and lactoferrin in mammary gland of dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 145(1-2): 499-504. 査読有 doi: 10.1016/j.vetimm.2011.10.017.
11. Morimoto K, Kanda N, Shinde S, Isobe N (2012) Effect of enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine on innate

immune function of bovine mammary gland infused with lipopolysaccharide. Journal of Dairy Science 95(9): 5067-5074. 査読有 doi: 10.3168/jds.2012-5498.

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 三浦千佳: Estradiol がウシ乳腺上皮細胞の抗菌因子およびアクアポリンの発現に及ぼす影響. 日本畜産学会第 119 回大会 2015 年 3 月 28 日-29 日、宇都宮大学(栃木県宇都宮市)
2. 西川萌美: ヤギ乳中白血球からのカテリシジンの分泌とそのリポ多糖に対する作用. 日本畜産学会第 119 回大会 2015 年 3 月 28 日-29 日、宇都宮大学(栃木県宇都宮市)
3. Miura C: Messenger RNA expression of innate immune factors in bovine mammary epithelial cells cultured with estradiol. The 16th AAAP Animal Science Congress, 10-14 Nov. 2014, Yogyakarta, Indonesia
4. Srisaikham S: Secretion of cathelicidin-2 from goat leukocyte. The 16th AAAP Animal Science Congress, 10-14 Nov. 2014, Yogyakarta, Indonesia
5. Isobe N: Association of reproductive performance with somatic cell count in milk of dairy cows. The 16th AAAP Animal Science Congress, 10-14 Nov. 2014, Yogyakarta, Indonesia
6. 磯部直樹: 周産期乳牛における乳房炎が繁殖機能に及ぼす影響. 第 19 回日本乳房炎研究会学術集会, 2014 年 10 月 10 日, 南青山会館(東京都南青山)
7. 久枝啓一: 乳牛の高体細胞数乳汁の保存時間による生菌数の変化と自然免疫因子との関係. 第 19 回日本乳房炎研究会学術集会, 2014 年 10 月 10 日, 南青山会館(東京都南青山)
8. 三浦千佳: 培養ウシ乳腺上皮細胞の抗菌因子発現に及ぼす estradiol の影響. 日本畜産学会第 118 回大会, 2014 年 3 月 26-27 日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)
9. S. Srisaikham: Effect of Intravenous Lipopolysaccharide Injection on Cathelicidin-2 Concentration in Goat Plasma. 日本畜産学会第 118 回大会, 2014 年 3 月 26-27 日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)
10. 磯部直樹: 抗菌ペプチド S100A7 のヤギ乳腺での産生. 第 18 回日本乳房炎研究会, 2013 年 10 月 11 日、南青山会館(東京都南青山)
11. 磯部直樹: 現場に還元するための乳房炎研究. 第 18 回日本乳房炎研究会, 2013 年 10 月 11 日、南青山会館(東京都南青山)
12. Kawai K: Relationship between concentrations of non-specific antimicrobial proteins in milk and pathological condition in bovine mastitis. The 31st World Veterinary Congress, 17-20 Sep. 2013, Prague, Czech Republic
13. Zhang GW: Existence of cathelicidin-2 in goat mammary gland. 日本畜産学会第 117 回大会, 2013 年 9 月 9-10 日、新潟大学(新潟県新潟市)
14. 張恭偉: mRNA expression and protein localization of S100A7 in goat mammary gland. 日本畜産学会第 116 回大会, 2013 年 3 月 28 - 30 日、安田女子大学(広島県広島市)
15. Isobe N: Increase of innate immune factor in milk of dairy cows during estrous stage. The 15th AAAP Animal Science Congress, 26-30 Nov. 2012, Thammasat University, Bangkok, Thailand
16. 磯部直樹: 牛乳中ラクトペルオキシダーゼ活性と体細胞数との関係. 第 17 回乳房炎研究会, 2012 年 10 月 12 日、南青山会館(東京都南青山)
17. 吉田礼未: ウシ乳腺における LAP の抗菌性に及ぼす S-S 結合の影響. 第 62 回関西畜産学会, 2012 年 9 月 13-14 日、ホテルアパローム紀の国(和歌山県和歌山市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/anat/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯部 直樹 (ISOBE NAOKI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授

研究者番号: 80284230

(3) 連携研究者

沖田美紀 (OKITA MIKI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・助教
研究者番号: 30611842