

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07748

研究課題名(和文) 黒毛和種子牛の呼吸器粘膜免疫における T細胞の機能の解明

研究課題名(英文) Research of gd T cell function in the respiratory mucosal immune system of Japanese Black calves

研究代表者

大塚 浩通(Ohtsuka, Hiromichi)

酪農学園大学・獣医学群・准教授

研究者番号：40327458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： 黒毛和種子牛の T細胞のサイトカインならびにリンフォイドケモカインを調べたところ、黒毛和種のIL-17AならびにIFN-g、B細胞系のCXCL12、CXCL13の遺伝子量がホルスタイン種に比べて低値であった。
子牛の T細胞を抗原刺激してサイトカインの産生能を解析したところ、TNF- はLPSならびにPG刺激によってIL-17AならびにIL-23はPG刺激によって明らかに上昇した。
子牛の呼吸器粘膜における T細胞の分布様式を知るため免疫組織学的解析を行ったところ、細胞は呼吸器の他の組織に比べて扁桃に集簇しており、このうち虚弱な子牛では少数の T細胞が観察された。

研究成果の概要(英文)： The cytokines and lymphoid chemokines of T cells in the Japanese Black (JB) calves were investigated. As a result, the expression of cytokines (IL-17A, IFN-g) and B cell activate chemokine (CXCL-12, CXCL-13) in the JB calves were lower than those in the Holstein calves. In the analysis of the expression of cytokines of T cells with stimulation of bacterial antigens in calves, level of TNF- increased in the this cells with stimulation of LPS or PG, and levels of IL-17A and IL-23 increaed with PG stimulation.
In the analys of immunopathophysiological analysis to clarify the distribution pattern of T cells in respiratory mucosa in the calves, cells were found in the amygdala compared to other tissues of the respiratory tract, and lower numbers of amygdala T cells were observed in the calves with thymic atrophy.

研究分野：獣医学

キーワード： T細胞 呼吸器粘膜 誘導組織 サイトカイン リンフォイドケモカイン 黒毛和種

1. 研究開始当初の背景

黒毛和種牛は本国において脂肪交雑に長けた遺伝要素を持つ血統を交配して現在の生産に発展させてきた。黒毛和種子牛の特徴の一つに、ホルスタイン種子牛に比べて出生後から虚弱体質で免疫機能に劣っていることが挙げられ、感染症の発症率やその後の死亡率も高い。中でも T 細胞の数や機能が劣っていることをこれまで我々は明らかにしてきた。

これに対して呼吸器感染症の予防のため、本国では呼吸器感染症の原因となる病原性微生物に対する注射ワクチンが実施されているものの、黒毛和種子牛では十分な効果が得られずに呼吸器感染症が牧場内に蔓延する事例もよく見られる。近年、鼻腔への粘膜ワクチンが実用化され、生産現場で良好な成績を得ている。

子牛へのウイルス生ワクチンの接種により、T 細胞、CD8+T 細胞や CD21+B 細胞の増加や IFN- γ や IL-4 サイトカイン産生が促進するものの、黒毛和種子牛はウイルス生ワクチン接種による細胞性免疫活性がホルスタイン種に比べ劣っている。

2. 研究の目的

未だウシでは確立されていない T 細胞機能を評価するためリンフォイドケモカインの解析系を確立し、呼吸器における T 細胞の分布様式を解析して、黒毛和種子牛の呼吸器粘膜免疫機構における T 細胞の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

リンフォイドケモカインリガンドならびにレセプターの解析系の確立と黒毛和種子牛の成長と T 細胞のリンフォイドケモカインの動態を解析する

培養系を用いた抗原刺激による T 細胞のサイトカイン産生能の解析

③子牛の鼻腔粘膜における T 細胞の分布様式の解明

出生後の黒毛種子牛の T 細胞機能を低下させる要因の解析

4. 研究成果

呼吸器粘膜の免疫機構における役割を明らかにするため、リンフォイドケモカイン・サイトカインの解析系を確立した。これを用いて健康な黒毛和種子牛の成長による T 細胞のリンフォイドケモカインの動態の変化を解析するとともに、ホルスタイン種子牛と比較した。その結果、健康な黒毛和種の T 細胞のリンフォイドケモカイン・サイトカインのうち、CXCL12 や CXCL13 などの B 細胞の活性を促すケモカインの遺伝子量がホルスタイン種に比べ低値であるものの CCL9 など T 細胞の活性を促すケモカインには差がみられなかった(図 1)。また 91 日齢以降では黒毛和種における IFN- γ や IL-12A レセプタ

ーのサイトカインや受容体ならびにスカベンジャー受容体の一つである CD36 遺伝子量がホルスタイン種に比べて有意に低値であった(図 1)。

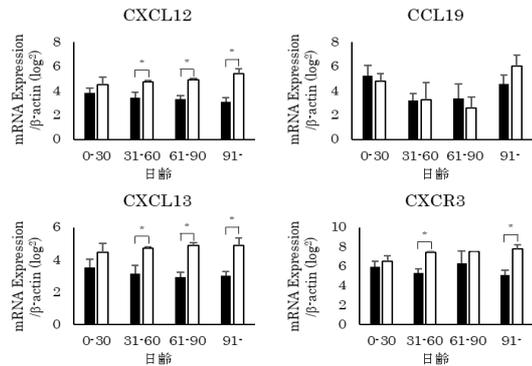


図1 末梢 γ δ T細胞のリンフォイドケモカイン mRNA
黒毛和種 (■), ホルスタイン種 (□)
平均土標準誤差, *: P<0.05

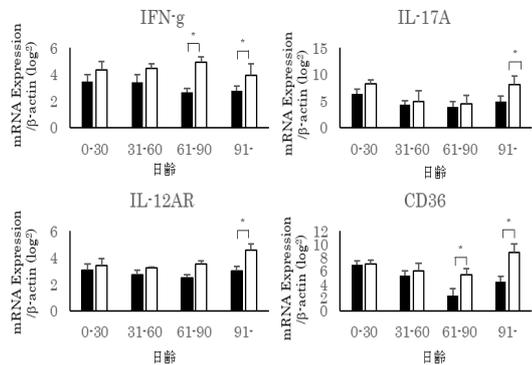


図1 末梢 γ δ T細胞のサイトカイン mRNA
黒毛和種 (■), ホルスタイン種 (□)
平均土標準誤差, *: P<0.05

健康な 2 から 3 ヶ月齢の黒毛和種子牛 15 頭と同月齢のホルスタイン種 15 頭を対象に末梢血から T 細胞を単離して 10 μ g/ml の Lipopolysaccharide (LPS) または Peptidoglycan (PG) にて刺激培養し、遺伝子発現量を解析した。その結果、LPS ならびに PG 刺激によって IL-6 ならびに IL-17 遺伝子発現量が上昇した。このことから T 細胞はグラム陰性菌とグラム陽性菌、双方の抗原を認識して刺激活性化し、免疫応答を誘導することが示された(図 2)。このことから、T 細胞は抗原の直接刺激により、サイトカインが産生されることが考えられた。

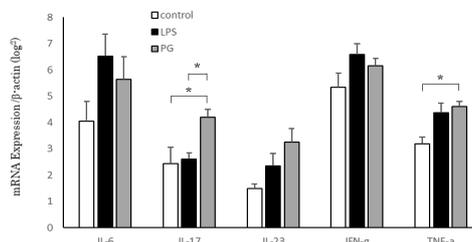


図2 黒毛和種子牛の末梢 γ δ T細胞の抗原刺激後のサイトカイン遺伝子発現
黒毛和種子牛の γ δ T細胞 (1×10^6 /ml) を 12 時間、RPM11840 培地にて lipopolysaccharide (LPS; 10 μ g/ml) または peptidoglycan (PG; 10 μ g/ml) の条件で培養
平均土標準誤差, *: P<0.05

③呼吸器組織における T 細胞の分布様式を明らかにするため、免疫組織学的解析を行った。鼻咽頭粘膜では粘膜上皮層内にリンパ球が少数散在し、粘膜固有層にはび漫性にリンパ球が分布していた。これらリンパ球には CD3 陽性 T 細胞が含まれ、さらにその一部は WC1 に陽性を示す T 細胞であった。NALT 領域においては粘膜下にリンパ濾胞を有する扁桃が免疫反応の中心であり、T 細胞はリンパ濾胞 (B 細胞領域) 外の粘膜直下の領域に分布して外来抗原の侵入に対応しているのではないかと考えられた。また、同領域における T 細胞の分布は気管支や肺と比較しても分布密度が高く、呼吸器系全体を見ても扁桃は T 細胞の主体的な反応の場であると考えられた (図 3)。以上の結果から、T 細胞は特に扁桃の B 細胞領域外の粘膜直下において侵入する外来抗原に対して主体的に応答している可能性があった。

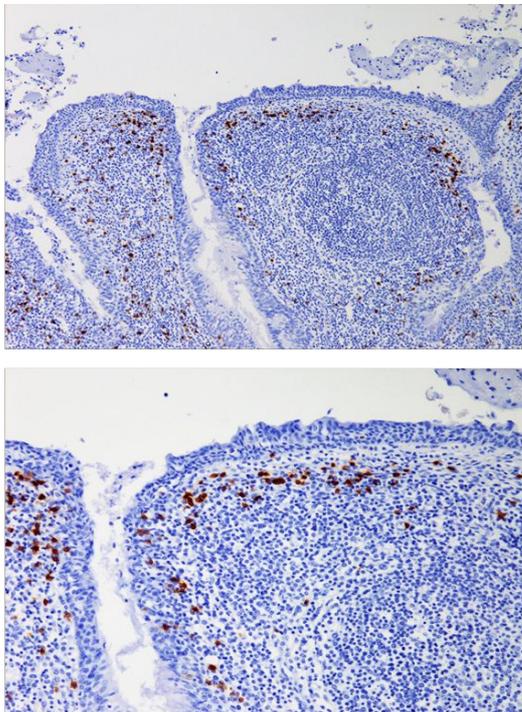


図3 咽頭扁桃WC1陽性細胞 ($\gamma \delta$ T細胞)の分布
粘膜直下の、リンパ濾胞以外の部分に主座して陽性細胞が認められる

これらを踏まえて、新生期の黒毛和種子牛への鼻腔粘膜ワクチンのチャレンジ試験として、鼻腔粘膜へのウイルス生ワクチンを接種し、その後2回目に同抗原のウイルス生ワクチンを筋肉接種したところ、2回目ワクチン接種後に IL-4 遺伝子の上昇を伴って速やかに対象の抗体価が上昇した (図示さず)。

子牛の健康状態と咽頭扁桃における T 細胞の分布との関係を明らかにするため、T 細胞の成熟臓器である胸腺との関係を調査した。胸部胸腺を HE 染色において組織学的所見から Grade1-3 に分類し、Grade1 を健常群とし Grade2-3 を胸腺萎縮群とした。Grade1 は皮髄境界が明瞭であるもの。Grade2 では皮

髄境界は明瞭であるが皮質が不規則に薄く小葉を占める割合が少ない。Grade3 では皮髄境界が不明瞭。小葉が著しく小さく、髄質の構造が小葉を占める割合が多い。咽頭扁桃の外側は長い稜線と溝によって境界されている。偽重層線毛上皮であり、上皮内にはリンパ球 (上皮内リンパ球:IEL) と杯細胞が散在性に認められ、粘膜固有層は厚く、リンパ球が豊富に存在しており一次リンパ小節や二次リンパ小節が形成されている。粘膜固有層深部に少数、粘膜下組織に多数の混合腺が形成され、腺房周囲に形質細胞やリンパ球が散在性に認められる。T 細胞 (CD3) はリンパ濾胞間領域に陽性像が多数みとめられ、上皮内に散在性に存在した。リンパ小節内や腺房周囲に少数の陽性像がみられた。型 T 細胞 (WC1) は粘膜固有層のリンパ濾胞間領域の CD3+細胞領域に散在性に認められ、粘膜上皮内にも少数陽性像がみられた。胸腺萎縮群は健常群と比較し陽性像の減少がみられた。これらのことから胸腺萎縮の見られる子牛では扁桃において T 細胞が減少しており、鼻咽頭関連リンパ細網組織における T 細胞機能が低下する可能性があった。

表 1 子牛の健康状態と扁桃における各リンパ球の分布

No (咽頭扁桃)	日齢	CD3	CD4	CD8	WC1	CD20
12216 (健常群)	16	+++	+	+	++(26%)	+++
12239 (健常群)	14	+++	++	+	++(2%)	++
12026 (健常群)	7	++	+	++	++(7%)	++
12133 (胸腺萎縮群)	38	+++	+	+	+(1%)	+++
12134 (胸腺萎縮群)	37	+++	+(微少)	+	+(微少) 4%	+++
12217 (胸腺萎縮群)	30	+++	+(微少)	++	+(微少) 20%	+++

括弧で示した%は上皮内リンパ球 (IEL) の割合を示す

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)

Ohtsuka, H., Inoue, M., Maeda, Y., Tanabe, T., Tajima, M. 2018. Effect of *Pasteurella Multocida* soluble Antigen stimulation on the in vitro Response of Peripheral Blood mononuclear Cells of Holstein Calves. *Acta Veterinaria*, 68, (in press)

Saito, N., Iio, T., Yoshikawa, Y., Ohtsuka, H., Orino, K. 2018. Heme-binding of bovine lactoferrin: the potential presence of a heme-binding capacity in an ancestral transferrin gene. *Biomaterials*. 31, 131-138.

③Tsukano, K., Kato, S., Sarashina, S., Abe, I., Ajito, T., Ohtsuka, H., Suzuki, K. 2017. Effect of acetate Ringer's solution with or without 5% dextrose administered intravenously to

diarrheic calves. J Vet Med Sci. 79,795-800.

Ohtsuka, H., Kanikawa, N., Tomioka, M., Maeda, Y., Hirose, K., Tajima, M. 2016. Immunological Effects of Chitosan on Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cells in vitro. J. Chitin Chitosan Sci. 4, 74-79.

- ⑤ Otomaru, K., Saito, S., Endo, K., Kohirumaki, M., Fukuyama, S., Ohtsuka, H. 2015. Effect of Supplemental Vitamin E on peripheral blood leukocyte population in Japanese Black Calves. J. Vet. Med. Sci. 77, 985-988.

〔学会発表〕(計8件)

大塚浩通, 茂木宏樹, 廣瀬帆南美, 村田亮, 田島誉士 出生後から生菌剤を給与したホルスタイン種子牛における早期ワクチン接種効果 平成29年度日本獣医師会年次大会 2018年2月11日 別府

小中一成, 米山修, 富田大佑, 田島誉士, 大塚浩通 平成28年度鼻粘膜ワクチンを接種した黒毛和種におけるサイトカイン動態の評価 日本獣医師会学術集会 2017年02月25日 金沢

- ③ 近藤高広, 大塚浩通, 樋口豪紀, 松田一哉, 小岩政照, 田島誉士 マイコプラズマ感染子牛における予後と免疫因子との関係 平成28年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会 2017年02月25日 金沢

大塚浩通, 中藺将友, 小岩政照, 樋口豪紀, 田島誉士 子牛のマイコプラズマ感染症とパストレラ感染症における免疫因子の比較 平成28年度獣医学術北海道地区学会 2016年09月01日 旭川

- ⑤ Hirromichi Ohtsuka, Kumi Kinouchi, Motoshi Tajima Comparison of cytokine mRNA expression in peripheral CD4+, CD8+ and T cells between healthy Holstein and Japanese Black calves 29th World Buiatrics Congress (国際学会) 2016年07月04日 Dublin

大塚浩通 乳用子牛における群管理のポイントと取り組み事例 哺乳子牛の衛生管理と疾病対策 第66回北海道獣医師大会 (招待講演) 2015年09月12日 江別

白石果穂, 前田洋佑, 大塚浩通 肺炎罹患子牛の末梢血単核球におけるTh17およびTreg遺伝子発現解析 第158回日本獣医学会学術集会 2015年09月08日 十和田

工藤哲, 大塚浩通, 工藤克典, 川井良一, 田島誉士 ホルスタイン種子牛の体型と胸腺幅及び末梢血白血球数との関連性 第5回家畜感染症学会 2015年12月04日 札幌

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 浩通(Hirromichi Ohtsuka)
酪農学園大学・獣医学群・准教授

研究者番号: 40327458

(2) 研究分担者

松田 一哉(Kazuya Matsuda)

酪農学園大学・獣医学群・准教授

研究者番号: 60405660

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()