

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580362
 研究課題名（和文）ウシ乳腺組織における感染防御機構の解明とその機能修飾に関する研究

研究課題名（英文）immune response in bovine mammary gland infection.

研究代表者

樋口 豪紀 (HIGUCHI HIDETOSHI)

酪農学園大学・獣医学部・准教授

研究者番号：00305905

研究成果の概要：

ウシ乳房炎は生産動物の感染症において経済的損失が最も高く、畜産物の安全性を堅持する上でも大きな阻害要因となっている。乳房炎は、大腸菌や黄色ブドウ球菌など複数の病原微生物が関与する乳腺組織の感染症である。これらの原因菌は乳汁合成を阻害するとともに、乳汁に排菌された微生物は新たな感染源となる。本研究ではウシ由来乳腺上皮細胞を用い、in vitro における免疫学的多様性を評価し、乳腺細胞由来抗菌物質の動態および白血球機能との関連性を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学/獣医学・応用獣医学

キーワード：ウシ・乳房炎・乳腺上皮細胞・感染防御

1. 研究開始当初の背景

ウシ乳房炎は生産動物の感染症において経済的損失が最も高く、畜産物の安全性を堅持する上でも大きな阻害要因となっている。その制圧は獣医畜産領域における重要課題であり、早期解決が求められている。乳房炎は、大腸菌や黄色ブドウ球菌など複数の病原微生物が関与する乳腺組織の感染症である。これらの原因菌は乳汁合成を阻害するとともに、乳汁に排菌された微生物は新たな感

染源となる。さらに、微生物の認識に始まる乳腺免疫の活性化は、細胞性および液性免疫を誘導により、乳合成に関わる乳腺組織の恒常性を破綻させ、乳合成量の低下を招来する。

乳腺組織の免疫機構は乳腺細胞間リンパ球や、血液から誘導される好中球、マクロファージおよびリンパ球などの細胞成分と、それらを産生母地とするサイトカイン等の液性分子より構成されている。乳房炎に関するこれまでの研究

は、リンパ球、マクロファージおよび好中球の機能検索を主軸としたものであり、乳腺環境という特殊性については十分に考慮されてこなかった。このことは乳房炎の病理学的あるいは免疫学的理解を困難なものとし、効果的な防除法を確立する上で大きな障害となってきた。

2. 研究の目的

乳腺組織における免疫機構、特に乳腺上皮細胞による好中球およびマクロファージの制御機構について解明する。すなわち、

- (1) 乳腺上皮細胞初代培養系および免疫担当細胞との三次元混合培養技術の確立
- (2) 乳腺上皮細胞による免疫担当細胞の表面分子発現調節機構の解明
- (3) 乳腺上皮細胞による免疫担当細胞の細胞内情報伝達系制御機構の解明
- (4) 乳腺上皮細胞による免疫担当細胞の機能修飾機構の解明
- (5) 免疫修飾物質が乳腺上皮細胞および免疫担当細胞との相互作用に及ぼす影響

の5点を主軸に研究展開を図る。これらの研究では、乳腺上皮細胞と好中球およびマクロファージを主とした免疫担当細胞との相互作用について、生化学的および分子生物学的アプローチを図ると共に、乳房炎に対するより積極的な対応として、複数の免疫修飾物質が乳腺上皮細胞の機能に及ぼす影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) 乳腺上皮細胞初代培養系および免疫担当細胞の三次元混合培養技術の確立

- ① 乳腺上皮細胞の分離および培養法乳汁合成能の評価
- ② 白血球分離
- ③ 白血球混合培養技術法の確立

(2) 乳腺上皮細胞による免疫担当細胞の細胞内情報伝達系制御機構の解明

- ① 乳腺上皮細胞分泌物の蛋白質分析
- ② 細胞内情報伝達系の解析による表面分子発現機構の解明

(3) 乳腺上皮細胞による免疫担当細胞の表面分子発現調節機構の解明

- ① 乳腺上皮細胞表面分子の検索
- ② 好中球およびマクロファージにおける細胞表面分子の検索

(4) 乳腺上皮細胞による免疫担当細胞の機能修飾機構の解明 [樋口・永幡]

① 好中球およびマクロファージの機能検索

② 混合培養後の好中球およびマクロファージについて機能検査を行う

③ 混合培養後の好中球およびマクロファージについて細胞内情報伝達系の解析を行う

(5) 免疫修飾物質が乳腺上皮細胞および免疫担当細胞との相互作用に及ぼす影響

① 免疫修飾物質として畜産領域で用いられているビタミンAおよびEが乳腺上皮細胞と免疫担当細胞との相互作用に及ぼす影響について検討する。

② 混合培養系に乳房炎原因菌を添加し、その処理過程における乳腺上皮細胞と免疫担当細胞との相互作用を評価する。

4. 研究成果

(1) 混合培養において必要な白血球の乳汁および血液からの分離を行うと共に、その機能評価(活性酸素生成能/殺菌能)、白血球表面マーカーの検索、細胞内情報伝達系の解析を実施し、混合培養に必要な白血球の性状を明らかにした。

(2) 乳腺上皮細胞と白血球の混合培養により白血球の機能および細胞内情報伝達系はいずれも亢進することが明らかになった。

(3) 培養上清の解析を行ったところ、培養上清中にはラクトフェリンの顕著な上昇が認められた。ラクトフェリンは *in vitro* において免疫機能増強作用が報告されていることから、乳腺由来のタンパク質によって、好中球機能が修飾されたものと推察された。

(4) α トコフェロールは、乳腺上皮細胞および白血球の生存率を効果的に延長させるとともに、両細胞の相互作用によって誘導される機能および細胞内情報伝達系の修飾をより促進することが明らかになった。

(5) これらの結果から、本課題において、従来乳汁合成が主たる機能と考えられてきた乳腺上皮細胞が、免疫系にも影響している可能性が明らかになった。

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 Ying Kuang, Kaori Tani, Aidan Synnott, Kazuhito Ohshima, Hidetoshi Higuchi, Hajime Nagahata, Yasunori Tanji,

Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent PCR-DGGE method, *Biochem. Eng. J.* (査読有) 2008 (in press)

② Kentaro Endo, Norihiko Itoh, Seiya Maehara, Aya Shinozaki, Tomohiro Imagawa, Masato Uehara, Nahoharu Mizuno, Shouji Sasaki, Takeo Hiraga T, Hiroki Teraoka. Functional disorder of the retina in manganese-deficient Japanese quail revealed by electroretinography using a contact lens electrode with built-in light source. *J. Vet. Med. Sci.* (査読有) 2008. 70;139-144

③ Higuchi, H., Ishizaka, M. and Nagahata, H. Complement receptor type 3 (CR3)- and Fc receptor (FcR)-mediated matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) secretion and their intracellular signaling of bovine neutrophils. *Vet. Res. Commun.* (査読有) 2007. 31; 985-991

④ Nagahata, H., Ito, H., Maruta, H., Nishikawa, Y., Susukino, H., Matsuki, S., Higuchi, H., Okuhira, T. & Anri, A. Controlling highly prevalent *Staphylococcus aureus* mastitis from the dairy herd. *J. Vet. Med. Sci.* (査読有) 2007. 69;893-898

⑤ Kawai, K., Shimazaki, K., Higuchi, H. and Nagahata, H. Antibacterial activity of bovine lactoferrin hydrolusate against mastitis pathogen its effect on superoxide production of bovine neutrophils.

Zoonoses and public Health (査読有) 2007. 54;164-167

[学会発表] (計9件)

① Higuchi, H. and Nagahata, H. Complement receptor type 3 (CR3)- and Fc receptor (FcR)-mediated matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) secretion and their intracellular signaling of bovine neutrophils. 世界牛病学会 (WBC) 2008. 7. 8. Hungary.

② 北川詠子・間狩明美・樋口豪紀・永幡肇, 周産期乳牛における好中球 α -トコフェロール濃度の評価, 日本家畜衛生学会, 2008. 11. 7, 東京

③ 杉山瑞恵・田中雅委・樋口豪紀・永幡肇, *L. acidophilus*の乳腺内注入が乳汁の細胞学的・理化学的性状におよぼす影響, 日本家畜衛生学会, 2008. 11. 7, 東京

④ 樋口豪紀・岩野英知・岩野直美・横田博・永幡肇, PCR法を用いた乳房炎原因菌の迅速検出法に関する検討, 日本獣医学会学術集会, 2008. 3. 28, 神奈川

⑤ 難波江晶子・樋口豪紀・和田賢二・永幡肇. マイコトキシンとウシ白血球: 好中球化学発光能への影響. 日本獣医学会学術集会, 2008. 9. 25宮崎

⑥ 久保田友香・澤山成行・樋口豪紀・永幡肇, 搾乳過程における生乳の衛生学的ならびに理化学的性状の変化, 日本家畜衛生学会, 2007. 11. 22, 東京

⑦ 大津治子・樋口豪紀・永幡肇, 黄色ブドウ

ウ球菌に対するウシ好中球の化学発光反応、日本家畜衛生学会，2007. 11. 22，東京

⑧ 佐藤倫奈・山本千草・樋口豪紀・永幡 肇，大腸菌 (O111:B4) によるウシ好中球活性酸素生成能の抑制について，第144回日本獣医学会，2007. 9. 3，江別.

⑨ 伊藤えりな・坂井田佳奈・樋口豪紀・永幡 肇 ビタミンE剤投与がウシ白血球の α -Tocopherol量に及ぼす影響，第144回日本獣医学会，2007. 9. 3，江別

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 豪紀

【所属機関】酪農学園大学

【部局名】獣医学部

【職名】助教授

【研究者番号】00305905

(2) 研究分担者

岩野 英知

【所属機関】酪農学園大学

【部局名】獣医学部

【職名】講師

【研究者番号】60382488

永幡 肇

【所属機関】酪農学園大学

【部局名】獣医学部

【職名】教授

【研究者番号】10133571

寺岡 宏樹

【所属機関】酪農学園大学

【部局名】獣医学部

【職名】助教授

【研究者番号】50222146

(3) 連携研究者