

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06398

研究課題名(和文) 乳脂肪が牛の乳房内マクロファージの機能的多様性に及ぼす影響の解析

研究課題名(英文) Investigation of effect of milk fat to diversity in mammary macrophages function.

研究代表者

大塚 浩通(Ohtsuka, Hiromichi)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：40327458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：乳牛の乳汁中マクロファージのM1/M2変化における脂肪酸の影響について検証した結果、末梢血単球に比べてM2に反応することが観察された。また培養系にてマクロファージは乳を取り込んでM2活性が促進することが示された。さらに単球の脂肪酸のうち6であるリノール酸の添加培養によりM2が促進したことから、リノール酸を多く含む乳は乳汁中のM2マクロファージを活性化させる可能性があった。一方で細菌が検出された乳においてIL-6やIL-8などM1系のサイトカイン遺伝子発現量が高いことが示され、乳牛の乳房では細菌の侵入によりM1の機能活性を促しながら恒常性を維持しているものと示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では泌乳牛の乳汁マクロファージがM2マクロファージを優性に維持されており、細菌の侵入に対してM1マクロファージが反応して炎症に至るのを防いでいることが示唆された。またリノール酸はマクロファージをM2マクロファージに誘導することが考えられ、乳房炎の発症予防を考慮する上で、脂肪酸が過多になるような飼養管理を軽減させるなど実際の飼料設計を計画するための配慮すべき知見となる。

研究成果の概要(英文)：The effects of fatty acids on M1/M2 phenotypes of macrophages were examined with the presence of milk from dairy cows. The levels of M2-macrophage cytokines in mammary macrophages were higher than in peripheral blood monocytes. Increased IL-10 and TGF- β mRNA expression levels were observed in peripheral blood monocytes after culturing with milk in vitro. It suggested that milk modulates macrophage towards M2 phenotype. Since M2-related cytokines such as IL-10 and TGF- β mRNA expression levels of monocytes increased in culturing with linoleic acid (6), exposure to milk containing linoleic acid may up-regulate M2 macrophage function in cows. On the other hand, mRNA expression levels of M1-related cytokines such as IL-6 and IL-8 were high in cells obtained from milk with bacteria. These results suggest that macrophages maintain M2 phenotype in milk from lactating dairy cows, and M1 phenotype macrophages are activated in the invasion of bacteria.

研究分野：獣医学

キーワード：マクロファージ M1/M2 乳汁 脂肪酸 サイトカイン・ケモカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳牛の乳房炎は乳房内への細菌の侵入と増殖によって炎症が惹起され、その結果、乳質の悪化や泌乳量が低下する乳牛において最も被害の大きい疾患である。乳房の細菌感染に対する防御能として抗菌物質や抗体などの液性物質の分泌の他にマクロファージが主体となる細胞性免疫が存在し、侵入する微生物を処理している。粘膜組織である乳房が他の粘膜組織と大きく異なる点は、栄養分を分泌し続け、それを槽内に滞留させることにあるため他の組織に比べて細菌が増殖しやすい環境にあることであり、マクロファージは不断に乳汁内で侵入・増殖する細菌に対して抗菌活動を継続しなければならない。この乳房内に遊走したマクロファージは乳腺上皮細胞が生産した乳脂肪などの乳を取り込みつつ抗菌作用を担わなければならないため、他の臓器に遊走したマクロファージとは異なる何らかの機能障害に至ることが仮定される。脂肪酸は免疫機能に直接影響するとされ、6は炎症に3は抗炎症にマクロファージ機能を誘導することが知られているが、乳中にも脂肪酸は含まれているため牛においても乳汁中の脂肪酸が遊走したマクロファージ機能に対して炎症または抗炎症としての応答に影響する可能性がある。しかし乳汁存在下でのマクロファージの機能変化、特に乳中の3や6などの脂肪酸の増減がマクロファージ機能の変化については不明である。

2. 研究の目的

乳牛において乳槽内に遊走し乳脂肪を取り込んだマクロファージに起る多様性的変化について明らかにする目的で、M1/M2のサイトカイン・ケモカインプロファイルの評価系を確立し、乳脂肪の取り込みによりマクロファージの機能がどのように変化するかを明らかにし、乳房内での動態について調査する。

3. 研究の方法

牛の乳房内マクロファージ単離系を確立し M1/M2 マクロファージの関連因子の解析系による機能評価

乳汁からの体細胞、更に乳汁マクロファージの単離のために抗ウシ CD14 ならびに CD68 抗体を用い磁性ビーズとカラムによる単離を試みた。また単離細胞を対象としたサイトカイン・ケモカインプロファイル解析系を確立した。解析対象として、M1 マクロファージが産生するとされる炎症性サイトカイン・ケモカイン、またその他にマクロファージの産生物質として IL-1 β 、IL-6、IL-8、CCL5、CXCL10、CXCL11、Batf2、pentraxin (PTX) 3、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 3、また M2(a,b,c) マクロファージが産生する IL-10、TGF- β 、CCL1 (M2b)、CCL13 (M2a)、CCL14 (M2a)、CXCL13 (M2c)、Arginase1 (M2a, c)、polyamine oxidase (PAO, M2a, c)、を選択、サイトカイン・ケモカインならびにその他のマクロファージ産生因子を対象として各マーカーの乳汁体細胞における遺伝子発現量の関連性を評価するとともに乳汁体乳房炎原因細菌の有無による違いについても解析した。

マクロファージに対する脂肪酸の効果の評価

培養系にて末梢単球ならびに単離した乳汁マクロファージを用い、脂肪酸であるリノール酸()、リノレン酸()ならびにオレイン酸を用い、また乳を添加培養してサイトカインならびにケモカインリガンドの遺伝子発現量を解析した。

乳牛における乳汁中栄養素・脂肪酸と M1/M2 マクロファージの関連因子との関係

乳汁中の脂肪酸濃度と単離した体細胞・マクロファージのサイトカインならびにケモカイン遺伝子発現量を解析した。

乳房炎罹患牛の乳中細菌と体細胞サイトカインの遺伝子発現量

臨床型乳房炎罹患牛の体細胞の M1/M2 マクロファージの関連因子の解析を実施した。

4. 研究成果

80頭の臨床的に健康な乳牛の乳を対象にマクロファージ関連因子の mRNA 遺伝子を解析したところ IL-1 β 、IL-6、IL-8、arginase1、CCL1、CXCL13 の間で各々有意な正の相関性、IL-10、TGF- β 、PTX3、CCL5、CCL14 の間で有意な正の相関性が見られたが、各サイトカイン・ケモカインと免疫因子間には強く相関する項目はなかった。なお、今回、選考したその他の因子と列挙した因子においては強い相関性は得られなかった。これらのことから、IL-1 β や IL-6 などの M1 が産生する因子と IL-10 や TGF- β など M2 が産生する因子に大きく大別出来ることが示された。また本解析によってウシのケモカインやマクロファージ関連因子の M1/M2 分布がヒトやマウスのもので異なった。一方で細菌陽性群の IL-1 β 、IL-6、IL-8、arginase1、Batf、CCL1 および CXCL13 の mRNA 発現量は細菌陰性群に比べて有意に高かったが、M2 の因子には差がなかった。また細菌陽性群の SCC は細菌陰性群に比べ高い傾向にあったものの有意な差は認められず、また、これらの免疫因子の遺伝子発現量と産次数や分娩後日数とは関連性は認められなかった(表 1、2)。

表1 各免疫因子間の相関性

	IL-18	IL-6	IL-8	IL-10	TGF-β	Arginase1	Batf	PTX	CCL1	CCL5	CCL14	CXCL13
IL-6	0.623*											
IL-8	0.803*	0.7615*										
IL-10	-0.236	-0.239	-0.366									
TGF-β	-0.306	-0.437	-0.448	0.511*								
Arginase1	0.673*	0.921*	0.791*	-0.194	-0.407							
Batf	0.505*	0.789*	0.620*	-0.179	-0.484	0.758*						
PTX	0.588*	0.887*	0.674*	-0.128	-0.442	0.875*	0.864*					
CCL1	0.519*	0.818*	0.601*	-0.147	-0.425	0.779	0.852*	0.851*				
CCL5	-0.206	-0.352	-0.441	0.714*	0.642*	-0.316	-0.393	-0.314	-0.287			
CCL14	-0.175	-0.132	-0.332	0.604*	0.448*	-0.133	-0.144	-0.063	-0.010	0.763*		
CXCL13	0.548*	0.772	0.546*	-0.213	-0.329	0.742*	0.675*	0.829*	0.768*	-0.263	-0.067	
SCC	-0.027	0.062	0.122	-0.300	-0.105	-0.047	0.120	0.005	0.001	-0.364	-0.430	0.053

*:P<0.05

表2 健康乳における細菌の有無による体細胞中免疫因子遺伝子発現量の比較

	細菌陽性群	細菌陰性群	
IL-18	2.43±0.13	1.99±0.08	*
IL-6	4.88±0.25	4.07±0.13	*
IL-8	9.18±0.23	8.32±0.18	*
IL-10	7.55±0.52	6.93±0.39	
TGF-β	5.51±0.50	5.22±0.35	
Arginase	6.51±0.30	5.54±0.20	*
Batf	3.30±0.21	2.69±0.11	*
PTX	3.42±0.26	2.78±0.11	*
CCL1	3.33±0.25	2.64±0.11	*
CCL5	7.33±0.66	7.07±0.37	
CCL14	5.15±0.38	4.80±0.26	
CXCL13	3.62±0.30	2.82±0.13	*
SCC	13.12±7.40	7.67±2.49	

平均±標準誤差SE

*:P<0.05

マクロファージに対する脂肪酸の効果の評価

乳汁マクロファージのサイトカイン・ケモカイン遺伝子の特徴を明らかにするため末梢血単球と比較したところ、単球に比べ乳汁マクロファージにおいてIL-10、TGF-β、CCL5ならびにCCL14遺伝子発現量が明らかに高かった(図1)。これを踏まえ10%FCS加RPMI1640培地にて成牛末梢血単核球(PBMC)を培養したところ、6時間1%乳添加後に10 μgペプチドグリカン(PG)刺激の条件において無添加対照に比べIL-10遺伝子発現量が有意に上昇した(図2)。さらにPBMCからCD14陽性細胞を単離して同様の培養条件で養系し、IL-10遺伝子発現量において有意差がみられた(図3)。次に末梢単球から単離したCD14陽性細胞を用い、脂肪酸であるリノール酸(6)、リノレン酸(3)ならびにオレイン酸を各10mmol添加、6時間培養したところリノール酸添加においてIL-10、TGF-βならびにCCL5遺伝子発現量が無添加対照に比べて明らかに高い値となり、またCD14陽性細胞においても同様の因子において有意差を認めた(図4)。しかし脂肪酸添加培養したマクロファージをPG刺激した条件では明らかな免疫因子の変化はみられなかった。

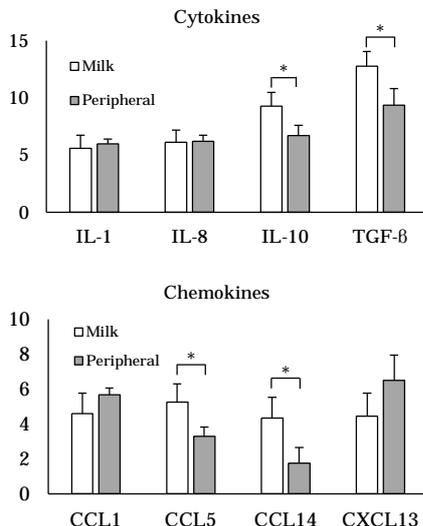


図1 末梢ならびに乳汁CD14陽性細胞におけるサイトカイン・ケモカイン遺伝子発現量の比較(相対値)
平均±標準誤差(N=6) *:P<0.05

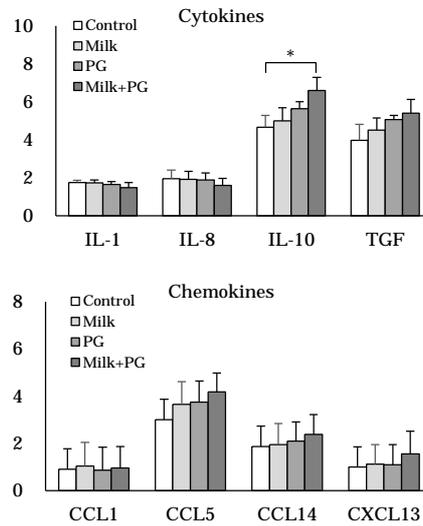


図2 末梢単核球への1%乳添加培養によるサイトカイン・ケモカイン遺伝子発現量の比較(相対値)
平均±標準誤差(N=6) *:P<0.05

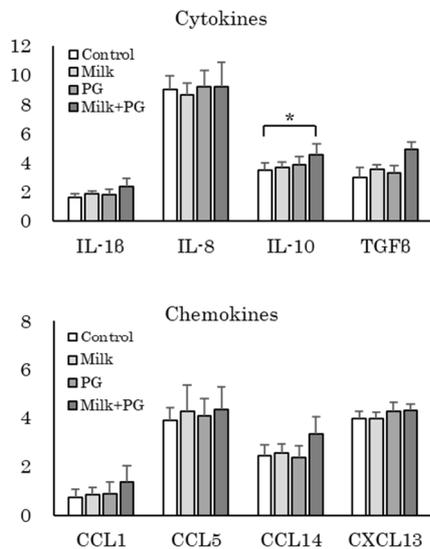


図3 末梢CD14陽性細胞への1%乳添加培養によるサイトカイン・ケモカイン遺伝子発現量の比較(相対値)

平均±標準誤差(N=6) *;P<0.05

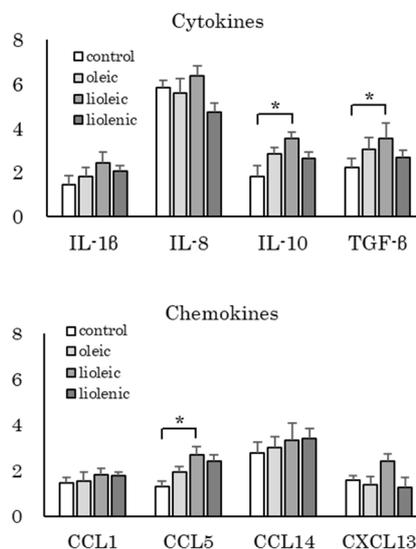


図4 末梢CD14陽性細胞への脂肪酸添加培養によるサイトカイン・ケモカイン遺伝子発現量の比較(相対値)

平均±標準誤差(N=6) *;P<0.05

乳牛における乳汁中栄養素・脂肪酸と M1/M2 マクロファージの関連因子との関係

70 頭の臨床的に健康な乳牛を対象に乳栄養素と体細胞の乳汁中の脂肪酸濃度と単離した体細胞・マクロファージのサイトカインならびにケモカイン遺伝子発現量を解析した結果、乳脂肪率と CCL14 遺伝子発現量とに $R=-0.393$ で有意な負の相関性があったものの他の乳栄養素と各因子の間には有意な関連は見られなかった。また乳中脂肪酸と各因子との関係においてリノレン酸と CCL14 と間に $R=0.405$ で有意な正の相関性がみられたが、それ以外の項目間には統計的な関連はみられなかった。

乳房炎罹患牛の乳中細菌と体細胞サイトカインの遺伝子発現量

28 頭の乳房炎罹患牛の乳を対象に乳体細胞数と体細胞の M1/M2 マクロファージの関連因子の mRNA 遺伝子量との関連を調査したが相関する項目は得られなかった。また認められた 3 つの細菌の *Staphylococcus aureus* (SA)、Coagulase-negative *Staphylococci* (CNS)、*Streptococcus spp.*ならびに検出不可の検体のうち、難治性乳房炎の原因菌とされる SA が検出された検体では体細胞数は他のものに比べて著しく上昇していた。また CNS ならびに検出不可の検体の IL-8 ならびに arginase1 遺伝子発現量は健康対照の検体に比べて有意に高い値であったのに対して SA の検体では健康対照との間に有意な差を認めなかった(図 4)。

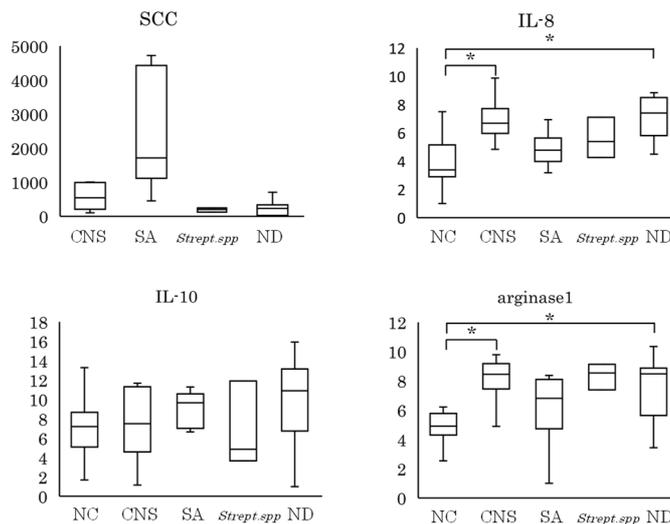


図5 乳房炎罹患牛の乳中細菌と体細胞サイトカインの遺伝子発現量(相対値)
*;P<0.05

【考察】今回の結果から、臨床的に健康な泌乳牛において乳房炎の所見は認められないものの乳房内に細菌が存在することが確認できた。このような細菌が存在する乳房の乳体細胞では、IL-1 や IL-6 などの M1 系因子の遺伝子発現量が高くなっていることから M1 が活性化していることが示唆された。一方で末梢単球は乳槽内に遊走して乳汁マクロファージは乳を取り込んで M2、

特に M2a として機能する可能性があった。すなわち健康な乳汁マクロファージは M2 が主体となっているものの、継続的に侵入する細菌に対して M1 となって処理し恒常性を維持している可能性があった。これに対して、リノール酸はウシの単球の M2 反応を促進することが示唆されたが、乳汁内におけるリノール酸濃度と関連性を示すことは出来なかった。臨床型乳房炎において SA 分離乳の体細胞において IL-8 ならびに arginase1 遺伝子発現の上昇が認められなかったことから SA 感染性乳房炎が難治性となる理由の一つとして M1 の反応不良が影響するかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohtsuka H, Ohsawa M, Murakami K, Murata R, Kato T, Tajima T	4. 巻 85
2. 論文標題 Changes in mRNA of immune factors expressed by milk somatic cells of Holstein cows with hypocalcemia after calving.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Can J Vet Res .	6. 最初と最後の頁 72-76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aung M, Ohtsuka H, Izumi K.	4. 巻 103
2. 論文標題 Effect of yeast cell wall supplementation on peripheral leukocyte populations and mRNA expression of cytokines in lactating dairy cows	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Dairy Sci.	6. 最初と最後の頁 5634-5640
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3168/jds.2019-17660	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kosenda K, Yabashi E, Takeda S, Ohtsuka H.	4. 巻 85
2. 論文標題 Effect of live yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> supplementation on immune factors in Japanese Black calves during the growth periods.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci.	6. 最初と最後の頁 290-295
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.22-0437. Epub 2023 Jan 23.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Murakami K, Fukuhara T, Kure S, Shimosakai T, Sato S, Kosenda K, Ohtsuka H.	4. 巻 87
2. 論文標題 Levels of mRNA of immune factors expressed by milk somatic cells of healthy Holstein lactating cow.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Can. J. Vet. Res.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 呉俊祐、福原知謹、林智人、長澤裕哉、田島右副、小千田圭吾、大塚浩通
2. 発表標題 健康牛における乳汁マクロファージの免疫関連因子と乳成分との関連性
3. 学会等名 第11回家畜感染症学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 呉俊祐、小千田圭吾、大塚浩通
2. 発表標題 乳汁及び脂肪酸がウシマクロファージのM1/M2分極化に与える影響
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 呉俊祐、小千田圭吾、村田亮、村上賢司、大塚浩通
2. 発表標題 健康な乳牛における乳体細胞の免疫関連因子発現と細菌との関係性
3. 学会等名 令和4年度北海道獣医師会地区学会
4. 発表年 2022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
研究分担者	村田 亮 (Murata Ryou) (50590311)	酪農学園大学・獣医学群・講師 (30109)	

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
---------	---------