

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 29 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580380

研究課題名（和文）ウシ乳腺組織の免疫学的多様性とその発現調節機構に関する細胞生物学的研究

研究課題名（英文）A cell biological study of immunological diversity in bovine mammary tissue

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（和文）：本研究の展開により、乳腺感染の新たな研究モデルとして「三次元ウシ乳腺感染モデル」が構築された。本モデルにより、これまで乳汁合成細胞として認識されてきた乳腺上皮細胞の免疫学的多様性、特に乳腺感染にともなう免疫担当細胞との相互作用が明らかとなった。乳腺免疫全体における乳腺上皮細胞および免疫担当細胞の役割を包括的・網羅的に解析し、さらに細胞内情報伝達系の解析によりその制御機構を明らかにした。本申請課題は予防獣医医療における発展的研究課題であり、その成果は国内における 1 次産業の恒常的維持・発展に帰する大きな社会的意義を持つものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We created a cell culture model as a novel model of bovine mammary infection. Using this model, it was clarified that mammary epithelial cells recognized to date as milk-producing cells possess immunological diversity and are closely related to immunocompetent cells. The topic of this application is developmental research in preventative veterinary medicine and the findings are of great social significance to steady development of primary industry in Japan.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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障害要因で

ある。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の誘導により、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。乳腺免疫の特性に関する最新の学術情報は「乳腺上皮細胞が免疫担当細胞と連携して局所免疫を担う」ことである。乳腺上皮細胞は本来、乳汁産生細胞として認識されているが、一方で、リンパ球、マクロファージおよび好中球などの免疫担当細胞と協調しながら、乳腺組織における効果的な異物排除にも関与する。特に、乳腺上皮細胞がToll-like受容体等を介して細菌を直接認識し、得られた情報から免疫担当細胞の機能修飾を図ることは、乳腺免疫の研究を行う上で十分に考慮されなければならない生体応答である。このような細胞特性は「乳上皮細胞の機能的多様性」として世界的にも注目され、その機構解明が急がれている。過去の乳房炎研究は白血球機能の評価を中心とした免疫学的解析や、病原細菌の微生物学的・系統的解析を主軸としてきたが、これらの実験系は乳腺上皮細胞の「機能的多様性」を考慮しておらず、包括的・網羅的研究には至っていない。

## 2. 研究の目的

本申請課題では乳腺上皮細胞と免疫担当細胞から構成される乳腺感染モデル、すなわち、三次元感染モデル（乳腺組織混合培養系）を構築し、乳腺上皮細胞と免疫担当細胞の相互作用を解明すると共に、それらの関係を保持しながら細菌感染にともなう乳腺組織の免疫学的多様性について三次元乳腺感染モデルを構築し包括的・網羅的に解明する。得られた知見は、ウシ乳腺の免疫学的特性を明示することとまらず「効果的な乳房炎防除技術」の確立に帰結し得る、多くの有用な基礎知見を包含するものと考えられる。

三次元乳腺感染モデルを構築し、乳腺細胞および免疫担当細胞の機能的相互関係を維持しながら乳腺免疫の解明を試みる。すなわち、

- (1) 乳腺上皮細胞と免疫担当細胞を用いた三次元乳腺感染モデルの構築
- (2) 乳腺感染モデルにおける乳腺細

胞の機能的多様性とその発現調節機構の解明

(3) 乳腺感染モデルにおける免疫担当細胞の機能発現およびその制御機構の解明

(4) 乳腺感染モデルにおける免疫修飾性蛋白質の誘導とその機能的評価の4点を主軸に研究展開を図る。これらの研究では、乳腺細胞と免疫担当細胞の三次元感染モデルを用い、両細胞の機能的特性と、その発現調節機構を細胞生物学および分子生物学的手法を用いて解析する。これらの網羅的研究により、感染乳腺組織（乳房炎）における乳腺上皮細胞および免疫担当細胞の機能的特性を解明し、乳房炎防除に帰着しうる基礎的知見の構築を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 乳腺上皮細胞の三次元構築技術を用いた乳腺感染モデルの確立

- ① 乳腺上皮細胞の分離および培養
- ② 白血球分離および培養
- ③ 乳房炎原因微生物およびその代謝産物による細胞処理
- ④ 三次元混合培養技術法の確立
- ⑤ 細胞機能の評価

(2) 乳腺感染モデルにおける乳腺細胞の機能的発現とその発現調節機構の解明

- ① 乳腺上皮細胞分泌物の蛋白質分析
- ② 機能発現調節機構の解明を目的とした細胞内報伝達系の解析

(3) 乳腺感染モデルにおける免疫担当細胞の機能発現およびその制御機構の解明

- ① 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
- ② 好中球およびマクロファージの機能検索
- ③ 機能発現調節機構の解明を目的とした細胞内報伝達系の解析

(4) 乳腺感染モデルにおける免疫修飾性タンパク質の誘導とその機能評価

- ① 乳腺感染モデルにおける免疫修飾性タンパク質の誘導
- ② 乳腺感染モデルにおける免疫修飾性タンパク質の誘導機構の解析

## 4. 研究成果

(1) 乳腺上皮細胞と免疫担当細胞を用いた

### 三次元乳腺感染モデルの構築

乳腺上皮細胞の分離および培養系の確立および白血球の分離および培養法を確立した。また、これらの細胞をマトリゲルによって三次元構築し乳腺感染モデルの作出を行った。ラクトフェリン合成を確認した。

(2) 乳腺感染モデルにおける乳腺細胞の機能的多様性とその発現調節機構の解明

乳腺上皮細胞、白血球および病原性微生物(大腸菌および黄色ブドウ球菌)によって作出した三次元混合培養技術をもちい、乳腺上皮細胞由来のカゼイン等を中心とした分泌タンパク質の解析とサイトカイン遺伝子の発現について検討した。病原微生物の存在下で、タンパク質の合成は著しく抑制されるとともに、サイトカイン遺伝子はその発現が増強されることが確認された。

(3) 乳腺感染モデルにおける免疫担当細胞の機能発現およびその制御機構の解明

乳腺上皮細胞、白血球および病原性微生物(大腸菌および黄色ブドウ球菌)によって作出した三次元混合培養技術をもちい、白血球の機能およびサイトカイン遺伝子の発現について検討した。病原微生物の存在下で、白血球機能およびサイトカイン遺伝子発現はいずれも増強されることが確認された。

(4) 乳腺感染モデルにおける免疫修飾性蛋白質の誘導とその機能的評価

免疫修飾性タンパク質(ラクトフェリン: LF)の分泌メカニズムについて検討した。LFは乳腺上皮細胞および白血球の両者から分泌され、その誘導には両細胞より分泌される炎症性サイトカインがその中心的役割を担うことを明らかにした。

### 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8件)

1. Prevalence of *Mycoplasma* species in bulk tank milk in Japan. Higuchi, H., Iwano, H., Kawai, K., Gondaira, T., Nagahata, H. *Vet. Rec.* 169:442 (2011)
2. A simplified PCR assay for fast and easy screening of *Mycoplasma mastitis* of dairy cattle. Higuchi, H., Iwano, H., Kawai, K., Ohta, T., Obayashi, T., Hirose,

K, Ito, N., Yokota, H., Tamura, Y., Nagahata, H. *J. Vet. Sci.* 12: 191-193. (2011)

3. Analysis of Trace and Major Elements in Bronchoalveolar Lavage Fluid of *Mycoplasma Bronchopneumonia* in Calves. Suzuki, K., Higuchi, H., Iwano, H., Lakritz, J., Sera, K., Koiwa, M., Taguchi, K. *Biol. Trace. Elem. Res.* 145: 166-171. (2011)
4. Effects of Mycotoxin on Chemiluminescent Response and Cytokine mRNA Expression on Bovine Neutrophils. Wada, K., Nabae, A., Higuchi, H., Nagahata, M. *J. Vet. Med. Sci.* 72:1507-1511. (2010)
5. A retrospective survey of the prevalence of complex vertebral malformation carriers in 9 Holstein dairy herds in Hokkaido, Japan. Nagahata, H., Nishiyama, T., Kanae, Y., Higuchi, H., Kawai, K., Endoh, D., Hayashi, M., Kurosawa, T. *J. Vet. Med. Sci.* 71: 793-795. (2010)
6. Effects of ammonia and hydrogen sulfide on physical and biochemical properties of the claw horn of Holstein cows. Higuchi, H., Kurumado, H., Mori, M., Degawa, A., Fujisawa, H., Kuwano, A. and Nagahata, H. *Can. J. Vet. Res.* 73: 15-20 (2009)
7. Comparison of serum lipid compositions, lipid peroxide,  $\alpha$ -tocopherol and lipoproteins in captive marine mammals (bottlenose dolphins, spotted seals and West Indian manatees) and terrestrial mammals. Kasamatsu, M., Kawauchi, R., Tsunokawa, M., Ueda, K., Uchida, E., Oikawa, S., Higuchi, H., Kawajiri, T., Uchida, S. and Nagahata, H. *Res. Vet. Sci.* 86: 216-222 (2009)
8. Characterization of bacterial population of

raw milk from bovine mastitis by culture – independent PCR-DGGE method. Kuang, Y., Tani, K., Synnott, A. J., Ohshima, K., Higuchi, H., Nagahata, H. and Tanji, Y. *Biochemical Engineering Journal*. **45**: 76–81 (2009)

[学会発表] (計 17 件)

1. 北海道獣医師会 (2011) マイコプラズマ性乳房炎の摘発を目的としたバルクスクリーニングの実施とその評価 ○ 樋口豪紀・岩野英知・河合一洋・馬場幸宏・古岡みゆき、齊藤 哲・佐藤豊孝・大林 哲・小岩政照・横田 博・田村 豊・永幡 肇
2. 北海道獣医師会 (2011) 内視鏡による子牛中耳炎の病態評価および病態と臨床症状の比較 ○小岩政照、安藤貴朗、甲斐貴憲、樋口豪紀
3. 北海道獣医師会 (2011) 子牛のマイコプラズマ性中耳炎に対する治療法の検討 ○甲斐貴憲、安藤貴朗、樋口豪紀、小岩政照
4. 北海道獣医師会 (2011) 子牛のマイコプラズマ性中耳炎に対する抗菌剤による予防対策の検討 ○谷 美穂、安藤貴朗、樋口豪紀、小岩政照
5. 日本農芸化学会北海道支部夏期シンポジウム (2011) ウシラクトフェリンが骨の血管新生因子の発現誘導に及ぼす影響 ○中島恵一、中村正斗、伊藤文彰、河村あさみ、石崎明
6. 平成 23 年度栄養生理研究会 (2011) 泌乳持続性向上に関するウシ乳房の細胞生物学的解析-ラクトフェリンが乳房を構成する細胞の増殖に及ぼす影響 ○中島恵一、中村正斗、伊藤文彰
7. 日本畜産学会第 114 回大会 (2011) ラクトフェリンが乳房上皮細胞と乳腺線

維芽細胞の増殖に及ぼす影響 ○中島恵一、中村正斗、河村あさみ、伊藤文彰

8. 平成 22 年度日本酪農科学シンポジウム (2011) ラクトフェリンによる血管新生促進因子の発現誘導 ○中島恵一、中村正斗、河村あさみ、石崎 明
9. 日本畜産学会第 112 回大会 (2011) ウシ乳房上皮細胞の血管内皮増殖因子 (VEGF) 発現誘導における MAP キナーゼの関与 ○中島恵一、中村正斗、伊藤文彰、小酒井貴晴
10. 日本乳房炎研究会 (2010) 細菌の遺伝子同定から乳房炎を防除する (特にマイコプラズマ性乳房炎について) ○樋口豪紀
11. 第 150 回日本獣医学会学術集会 ウシ乳房炎由来黄色ブドウ球菌に対するバクテリオファージの有効性 ○井上裕介、岩野英知、樋口豪紀、井上博紀、高砂拓志、萩原克郎、丹治保典、永幡肇、田村豊、横田博
12. 第 152 回日本獣医学会学術集会 (2011) 子牛に対するビタミン E 剤の投与が末梢血好中球の  $\alpha$ -トコフェロール濃度に及ぼす影響 ○樋口豪紀、北川詠子、間狩明美、吉田一万、郡 和博、及川 伸、永幡 肇
13. 日本乳房炎研究会 (2010) 黄色ブドウ球菌に対する特異的ファージを用いたウシ乳房炎治療応用への可能性 ○岩野英知、樋口豪紀、井上博紀、萩原克郎、横田博、永幡肇、田村豊、
14. 日本乳房炎研究会 (2010) 牛乳房炎ファージセラピーに向けた黄色ブドウ球菌の凝集性評価 ○丹治保典、谷夏織、栗本実樹、宮永一彦、樋口豪紀、岩野英知、井上博紀、永幡 肇
15. 第 149 回日本獣医学会学術集会

(2010) 黄色ブドウ球菌の乳腺感染モデルマウスに対するフェージセラピーの検討 ○岩野英知、樋口豪紀、井上博紀、井上裕介、高砂拓志、萩原克郎、丹治保典、永幡 肇、横田 博

16. 動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会

(2010) 黄色ブドウ球菌感染症へのフェージ療法の応用 ○岩野英知、樋口豪紀、井上博紀、横田博、永幡肇、小倉俊樹、近藤明宏、丹治保典、田村 豊

17. 日本獣医師会 (2010) 牛マイコプラズマ性乳房炎の迅速簡易診断技術の開発

とその応用に関する研究 ○樋口豪紀・岩野英知・伊藤暢彦・河合一洋・草場信之・大林 哲・廣瀬和彦・横田博・永幡 肇

〔図書〕(計 件) 該当なし

〔産業財産権〕 該当なし

○出願状況 (計 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◇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〕 該当なし  
ホームページ等

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】 獣医学群

【職名】 准教授

【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】 獣医学群

【職名】 准教授

【研究者番号】 60382488

中島恵一

【所属機関】 独) 農業・食品産業技術総合研究機構

【部局名】 北海道農業研究センター

【職名】 主任研究員

【研究者番号】 70362150

(3) 連携研究者 該当なし