

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：30109

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658260

研究課題名(和文)ウシ乳房炎の新規高度治療技術の開発に関する獣医衛生学的研究

研究課題名(英文)Basic study for development of a novel method for bovine mastitis

研究代表者

樋口 豪紀(HIGUCHI, HIDETOSHI)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：00305905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マイコプラズマは乳汁の産生を阻害する大きな要因である。本研究では、マイコプラズマに対する乳腺および末梢血白血球の免疫応答性を評価するとともに、新規治療技術の開発を目的とした分析系の確立を試みた。本研究はマイコプラズマに対する乳腺上皮細胞および末梢血白血球の応答性を評価することに成功し、さらに、乳腺上皮細胞、白血球の混合培養系を確立した。これらの研究データは、現在、難治性とされるマイコプラズマ性乳房炎の新規治療技術を開発するうえで重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mycoplasma bovis is known as a significant pathogen and cause of large economic losses in beef and dairy calves worldwide. Numerous factors appear to play an important role in the development of disease during infection with M. bovis, e.g., inhibition of immune cell proliferation and induction of lymphocyte apoptosis. However, the mechanisms involved in M. bovis infections have not been explored and remain incompletely understood. We investigated the major cytokine mRNA expression of bovine mammary epithelial cells and bovine PBMC stimulated with M. bovis, and established mixed culture system for the evaluation of phage function. We clarified significant changes of cytokine gene expression of PBMC stimulated with M. bovis, and established mixed culture system consisted with mammary epithelial cells and PBMC. These results are important to develop novel methods to treat mycoplasma mastitis in dairy cows.

研究分野：獣医衛生学

キーワード：乳房炎 乳腺上皮細胞 PBMC 高度治療技術

1. 研究開始当初の背景

ウシ乳房炎は病原性微生物が乳腺に侵入することによって引き起こされる急性および慢性感染症の一種であり畜産学的な対応はもとより公衆衛生学的にも早急な解決が望まれる疾患である。ウシ乳房炎の最新知見は「これまでの技術では対応できない難治性乳房炎の国内における急速な感染拡大」である。近年、抗生物質治療に極めて不応答な乳房炎の存在が顕在化している。その原因微生物は「マイコプラズマ: *Mycoplasma*」である。ウシ乳房炎では劇症型で泌乳が停止する、抗生物質への応答性が極めて低い、といった特徴がある。

2. 研究の目的

本研究では乳腺上皮細胞の培養系を用い、ウシ乳腺に対するマイコプラズマの病原性を評価するとともに、マイコプラズマに対し高い殺滅効果を発現するファージの機能評価に必要な試験系の開発を試みる。

3. 研究の方法

乳腺上皮細胞（初代培養細胞）のマイコプラズマに対する免疫応答性の評価

供試菌株: *M. bovis*

評価項目: IL1beta, IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL12, IL13, IL17A, IL18, IFN gamma, TNF alpha, TGF-beta の遺伝子発現量をリアルタイムPCRにより評価

PBMC のマイコプラズマに対する免疫応答性の評価

供試菌株: *M. bovis*

評価項目: IL1beta, IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL12, IL13, IL17A, IL18, IFN gamma, TNF alpha, TGF-beta の遺伝子発現量をリアルタイムPCRにより評価

ファージの機能評価に必要な試験系の開発

1) 供試細胞: ウシ乳腺上皮細胞(初代培養) PBMC

2) 試験系: トランスウェルを用いたウシ乳腺上皮細胞 PBMC の混合培養系の構築

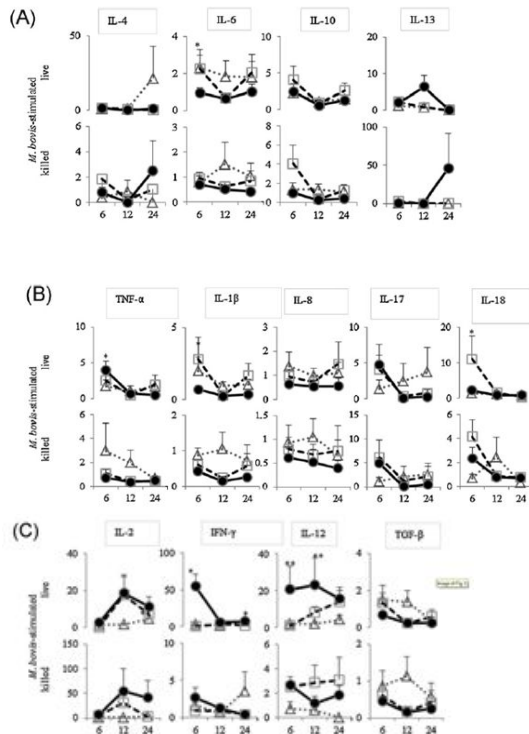
4. 研究成果

乳腺上皮細胞（初代培養細胞）のマイコプラズマに対する免疫応答性の評価

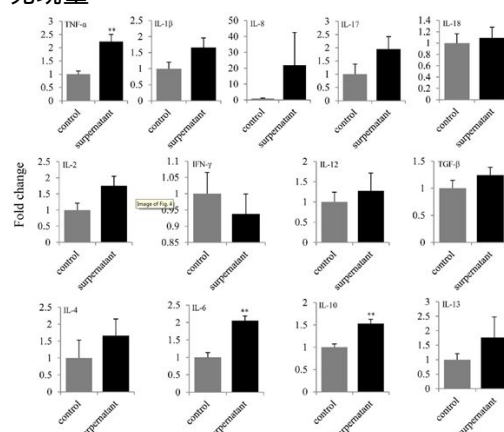
マイコプラズマに対する乳腺上皮細胞の免疫応答性をサイトカイン遺伝子の発現量により評価したが有意な変化は認められなかった。

PBMC のマイコプラズマに対する免疫応答性の評価

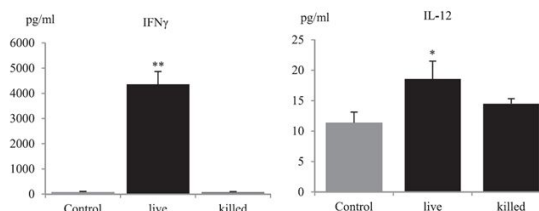
菌体に対するサイトカイン遺伝子の発現量



M. bovis 培養上清に対するサイトカイン遺伝子の発現量



M. bovis により誘導される培養細胞上清中のサイトカイン濃度



ファージの機能評価に必要な試験系の開発

トランスウェルを用いたウシ乳腺上皮細胞 PBMC の混合培養系を構築し、ファージの機能評価系を作出した。乳腺上皮細胞およびPBMCの機能評価を実施し、それらが正常に機能することを確認した。

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9件)

1. Antimicrobial Susceptibilities of Mycoplasma Isolated from Bovine Mastitis in Japan. Kawai, K., Higuchi, H., Iwano, H., Iwakuma, A., Onda, K., Sato, R., Hayashi, T., Nagahata, H. and Oshida, T. Anim. Sci. J. 86: 96-99. (2013)
2. Mycoplasma species isolated from intramammary infection of Japanese dairy cows. Higuchi, H., Gondaira, S., Iwano, H., Hirose, K., Nakajima, K., Kawai, K., Hagiwara, K., Tamura, Y., Nagahata, H. Vet. Rec. 172:557. (2013)
3. Effects of vitamin E supplementation on cellular α -tocopherol concentrations of neutrophils in Holstein calves. Higuchi H., Ito E, Iwano H, Oikawa S, Nagahata H. Can J Vet Res. 77:120-125. (2013)
4. Relationship between concentration of lingual antimicrobial peptide and somatic cell count in milk of dairy cows. Kawai, K., Akamatsu, H., Obayashi, T., Nagahata, H., Higuchi, H., Iwano, H., Oshida, T., Yoshimura, Y., Isobe, N. Vet. Immunol. Immunopathol. 15:298-301. (2013)
5. Amino acid substitutions in GyrA and ParC are associated with fluoroquinolone resistance in Mycoplasma bovis isolates from Japanese dairy calves. Sato, T., Okubo, T., Usui, M., Higuchi, H., Tamura Y. J. Vet. Med Sci.75:1063-1065. (2013)
6. Reliability in somatic cell count measurement of clinical mastitis milk using DeLaval cell counter. Kawai, K., Hayashi, T., Kiku, Y., Chiba, T., Nagahata, H., Higuchi, H., Obayashi, T., Itoh, S., Onda, K., Arai, S., Sato, R., and Oshida, T. Anim. Sci. J. doi: 10.1111/asj.12136. (2013)
7. Temporal Changes in Environmental Health Risks and Socio-Psychological Status in Areas Affected by the 2011 Tsunami in Ishinomaki, Japan. Makita, K., Inoahita, K., Kayano, T., Uenoyama, K., Hagiwara, K., Asalawa, M., Ogawa, K., Kawamura, K., Noda, J., Sera, K., Sasaki, H., Nakatani, N., Higuchi, H., Ishikawa, N., Iwano, H. and Tamura, Y. Environ. Pollution 1: 1-20. In press (2013)

8. Mycoplasma infection in the uterus of early postpartum dairy cows and its relation to dystocia and endometritis. Ghanem, M. E., Higuchi, H., Tezuka, E., Ito, H., Devkota, B., Izaike, Y. and Osawa, T. 79: 180-185 (2012)
9. Effectiveness of slightly acidic electrolyzed water for improvement of hygienic condition of teat liners of automatic milking system. Nagahata, H., Yuge, K., Moriyama, A., Iwano, H., Higuchi, H., Mitamura, T. and Matuyama, H. Milchwissenschaft 67: 123-126. (2012)

[学会発表](計4件)

1. 樋口豪紀・岩野英知・権平智・永幡肇「動物のマイコプラズマ感染症」第42回日本マイコプラズマ学会学術集会 慶応義塾大学(2015)
2. 根布貴則・山本剛史・権平智・岩野英知・松田一哉・小岩政照・樋口豪紀・永幡肇「酪農場で発生した子牛のマイコプラズマ性関節炎」第42回日本マイコプラズマ学会学術集会 慶応義塾大学(2015)
3. 山本剛史・根布貴則・権平智・岩野英知・松田一哉・小岩政照・樋口豪紀・永幡肇「酪農場で発生したマイコプラズマ性乳房炎の一例」第42回日本マイコプラズマ学会学術集会 慶応義塾大学(2015)
4. 権平智・樋口豪紀・岩野英知・永幡肇「Mycoplasma bovis がウン好中球のサイトカイン mRNA 発現量および活性酸素産生能に及ぼす影響」動物のマイコプラズマ感染症」第42回日本マイコプラズマ学会学術集会 慶応義塾大学(2015)

[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：
出願年月日：
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 樋口豪紀(HIGUCHI,Hidetoshi)
酪農学園大学 獣医学群
研究者番号：00305905

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：