

潜在性乳房炎における炎症性サイトカインの遺伝子発現

松井 司・明間基生・佐藤智之・吉田茂昭・荻野聡介¹・竹内正太郎¹

Expression of Inflammatory Cytokine Genes in Milk Somatic Cells from Subclinical Mastitis Dairy Cattles

Tsukasa MATSUI, Motoo AKEMA, Tomoyuki SATO, Shigeaki YOSHIDA, Sousuke OGINO and Shoutarou TAKEUCHI

¹ 福井県立大学生物資源学部

要 約

体細胞数低減対策を確立するために、その増加要因である乳房炎の発生機序の解明が求められている。そこで、酪農の現場で得られた高体細胞乳中の細胞を使って、炎症反応に深く関わっているとされる炎症性サイトカインの遺伝子発現を調べる基礎的実験を行った。

炎症性サイトカインのうち、乳房への感染実験により遺伝子発現が確認されているインターロイキン（以下「IL」）-6、IL-8、IL-12、顆粒球・単球コロニー刺激因子（以下「GM-CSF」）、腫瘍壊死因子（以下「TNF- α 」）およびインターフェロン- γ （以下「INF- γ 」）について、体細胞からmRNAを抽出し、DNAに逆転写(reverse transcription: 以下「RT」)したうえで、ポリメラーゼ連鎖反応(以下「PCR法」)を行い、それぞれの遺伝子発現を調べた。

その結果、IL-8については、全ての検体で遺伝子発現していて、IL-6およびINF- γ については一部の検体で遺伝子発現していた。酪農の現場で見られる慢性化した潜在性乳房炎においては、感染初期の臨床事例と同等と思われるこれまでに報告されている感染実験とは違った遺伝子発現の特徴があることが示唆された。

I 緒 言

生乳中の高体細胞数が酪農経営を悪化させる一要因となっていて、その対策が求められている。このために、体細胞数の増加に関わる慢性化した潜在性乳房炎の発生機序の解明が試みられている。

一方、炎症性サイトカインは免疫や炎症の調整機能に深くかかわっていると考えられているが、これまでに酪農の現場で問題となっている

潜在性乳房炎から分離した体細胞中のサイトカインの遺伝子発現を調べた報告はない。

そこで、高体細胞乳におけるサイトカインの遺伝子発現状況を調べて、潜在性乳房炎の発生機序解明や発生防止対策につながる可能性のある基礎的研究を行った。

II 材料と方法

1 供試牛と検体採取の方法

当场繋養のホルスタイン種搾乳牛 12 頭(延べ 40 頭)の、45 分房(延べ 122 分房)を試験に供した。供試分房から採取した乳汁 122 検体については、体細胞数を計測し、試験期間中に個体あるいは分房の体細胞数がおよそ 300 千/ml 以上で潜在性乳房炎の疑いのある分房を選択し、41 検体について細菌培養検査を実施し、33 検体について炎症性サイトカインの遺伝子発現試験を実施した。

平成 19 年 5 月 29 日から 10 月 24 日の期間中に 9 回にわたり朝の搾乳時に検体を採取し、その日のうちに試験に供した。検体は全て分房ごとに採取することとし、最初の数搾りをストリップカップに捨てた後に、約 70~100 ml の乳汁を手搾りにて採取した。

2 体細胞計測

乳汁中の体細胞数は、蛍光光学式体細胞測定機(Fossomatic 90:Foss Electric 社製 or Soma Scope MK II :Delta Instruments 社製)を用い、それぞれの常法によりフローサイトメトリー方式にて自動計測した。

3 細菌培養検査

検体の乳汁 100 μl を 3 種類の選択培地(血液寒天培地、ブドウ球菌培地、DHL 培地)に塗布し、血液寒天培地は 5%CO₂、95%air の気相下で、それ以外は 100%air の気相条件下で、37℃で 24 時間培養した。発育したコロニーから釣菌してグラム染色性と形態を確認し、検体 1 ml 中の菌数を計測した。

4 炎症性サイトカイン遺伝子の発現試験

Jai-Wei LEE らの報告¹⁾を参考にして、炎症反応に深く関わっていると言われる表 1 に示した 6 種類のサイトカインについて遺伝子発現を調べた。

表 1 調べたサイトカイン

① IL-6	B細胞刺激因子	インターロイキン-6
② IL-8	好中球走化因子	インターロイキン-8
③ IL-12	細胞障害性リンパ球成熟因子	インターロイキン-12
④ GM-CSF	顆粒球・単球コロニー刺激因子	
⑤ TNF-α	腫瘍壊死因子	
⑥ IFN-γ	インターフェロンγ	

その方法は図 1 に示すとおりで、乳汁中の体細胞から mRNA を抽出し、逆転写酵素を用いて RNA を鋳型とした DNA を合成し、その DNA を鋳型として PCR 法を行い、各サイトカインに対応する mRNA の存在を調べた。

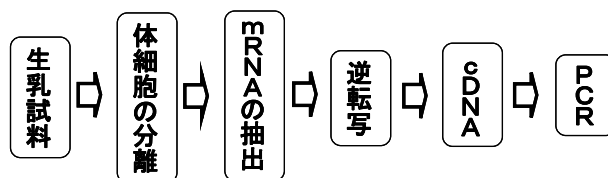


図 1 RT-PCR

PCR 法は表 2 の塩基配列を持つプライマーを用いて、図 2 に示すサイクルを 50 回繰り返すことにより行った。

表 2 使用したプライマー

Table 1. Sequences of primers for bovine cytokines and β-actin in RT-PCR.

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	Length	Accession
① IL-6	IL-6.f209	TCATTAAGCGCATGGTCGACAAA	105	NM173923
	IL-6.r313	TCAGCTTATTTTCTGCCAGTGTCT		
② IL-8	IL-8.f251	CACTGTGAAAATTCAGAAATCATTGTTA	105	NM173925
	IL-8.r355	CTTCACAAATACGTGCACACACCTTC		
③ IL-12	IL-12.f823	TTATTGAGTCTCGTGTAGAAGCTG	115	U11815
	IL-12.r737	GGTCTCAGTTGCAGGTTCTTGG		
④ GM-CSF	GM-CSF.f170	AGTAATGACACAGAAGTCGTCTCTG	87	U22385
	GM-CSF.r256	GCCGTTCTTGTACAGCTTCAGG		
⑤ IFN-γ	IFN-γ.f296	TCATTAAGCGCATGGTCGACAAA	185	M29867
	IFN-γ.r480	TCAGCTTATTTTCTGCCAGTGTCT		
⑥ TNF-α	TNF-α.f2377	TGTTCTCAAGCCTCAAGTAACAAGC	418	AF011926
	TNF-α.r2794	CCATGAGGGCATTGGCAGATC		
C β-actin	β-actin.f38	CCTTTTACAACGAGCTGGGTGTG	391	AH00130
	β-actin.r428	ACGTAGCAGAGCTTCTCCTTGATG		

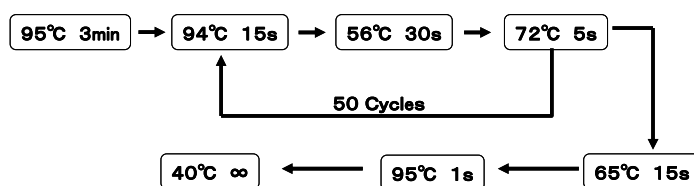


図 2 増幅サイクル

III 結果

1 細菌検査結果

検査した 41 検体の 83%にあたる 34 分房から、血液寒天培地に発育するグラム陽性の球菌が検出され、レンサ球菌と判定された。同じく 37%にあたる 15 分房から、ブドウ球菌培地に発育するグラム陽性の球菌が検出され、ブドウ球菌と判定された。大腸菌と判定される D

H L培地に発育するグラム陰性の桿菌が検出されたのは、2%にあたる1分房のみからであった(表3)。

表3 細菌検査結果

CFU/ml	連鎖球菌	ブドウ球菌	大腸菌	総菌数
0~<10	0	14	31	0
≤10~<100	7	12	9	7
≤100~<1000	11	11	1	11
≤1000~<10000	20	4	0	20
≤10000~	3	0	0	3
合計	41	41	41	41
≤100率	83%	37%	2%	83%

2 炎症性サイトカインの遺伝子発現状況

試験に供したサイトカインのうち、IL-8については、100%にあたる33検体で(+)(++)と強く発現していた。IL-6については48%にあたる16検体で、INF-γについては24%にあたる8検体で(±)(+)と弱く発現していた。

IL-12、GM-CSF、TNF-αの3種類については、発現した検体は見られなかった(表4)。

表4 RT-PCR結果

	-	±	+	++	計
IL-6	17	6	10	0	33
IL-8	0	0	8	25	33
IL-12	33	0	0	0	33
GM-CSF	33	0	0	0	33
INF-γ	25	4	4	0	33
TNF-α	33	0	0	0	33
β actin	0	0	33	0	33

IV 考 察

細菌検査の結果から、供試牛群で高体細胞の原因となっている潜在性乳房炎の起原菌のほとんどがレンサ球菌かブドウ球菌であり、環境常在菌の感染による潜在性乳房炎が蔓延していることが推測される。このような状況下で、調べた炎症性サイトカインのうち、IL-8が最も頻繁に発現し、次いでIL-6およびTNF-

γが一部で発現していたということになる。

Jai-Wei LEEらの報告¹⁾では、大腸菌やブドウ球菌を実験的に感染させた分房の乳汁中の体細胞においては、今回調べた6種類の炎症性サイトカインのすべてが感染後数時間で発現し始め、それらが時間の経過とともに徐々に減少することから、今回の発現パターンとは違っている。また、岡田ら²⁾による培養乳腺上皮細胞における炎症性サイトカインの発現パターンや、田中ら³⁾による乳汁中から分離したリンパ球における炎症性サイトカインの遺伝子発現パターンとも違っていることから、今回確認されたパターンは酪農の現場でしばしば見られる慢性化した潜在性の乳房炎特有の発現パターンであると思われる。

IL-8は好中球走化性因子とも呼ばれ、その遺伝子組換え体によるウシ乳房炎の治療効果等が報告^{4),5)}されているが、今回確認された潜在性乳房炎の乳汁中体細胞での発現とも関連すると思われる。さらに、尾形らは自然免疫活性化に関すると言われている Toll-like Receptor 2 (TLR 2)の刺激物質で培養ウシ乳腺上皮細胞を刺激するとIL-8が発現すると報告⁶⁾しており、ウシの乳房炎においては、その炎症反応にIL-8が深く関与していると考えられ、今回の我々の実験が、ウシ乳房における炎症反応のメカニズム解明とその治療法や発生予防法の基礎的知見になる可能性を示唆している。

今後は、乳房炎に罹患していない乳汁や急性乳房炎の乳汁での各サイトカインの遺伝子発現を確認し今回の結果と比較検討するとともに、比較定量が可能なリアルタイムPCR法を用いて、各サイトカインの発現量を検討する試験等を継続することとしている。

参考文献

- 1) Jai-Wei LEE et al. Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. *Vet. Res.* 37:219-229. 2006.
- 2) 岡田洋之. 正常ならびに乳房炎乳腺および培

- 養乳腺細胞でのサイトカイン発現.第 6 回日本乳房炎研究会要旨集.2001.
- 3)田中沙智ら.抹消血と乳汁の CD 4+T 細胞と CD 8+T 細胞におけるサイトカイン発現.第 1 1 回日本乳房炎研究会 Proceedings. 5-8.2007.V
- 4)阿部憲章ら.潜在性乳房炎の DDS を用いた IL-8 治療における治癒例と非治癒例の比較.第 1 1 回日本乳房炎研究会 Proceedings. 27-32.2007.
- 5) Takahashi H.et al.Effect of intramammary injection of RbIL-8 on milk levels of somatic cell count,chemiluminescence activity and sheddingpatterns of total bacteria and S.aureus in Holstein cows with naturally infected-subclinical mastitis.J.Vet.Med. B 52,32-37.2005.
- 6)尾形旦子ら.ウシ乳腺上皮細胞における Toll-like Receptor2(TLR2)の発現と TLR2 刺激を介したサイトカインの産生.第 1 2 回日本乳房炎研究会要旨集.7.2007.

Expression of Inflammatory Cytokine Genes in Milk Somatic Cells from Subclinical Mastitis Dairy Cattles

Tsukasa MATSUI, Motoo AKEMA, Tomoyuki SATOU, Shigeaki YOSHIDA,
Sousuke OGINO¹ and Shoutarou TAKEUCHI¹

¹ FUKUI Prefectural University

The study of the generation mechanism of mastitis is requested in order to establish countermeasures for the decrease of the number of somatic cell counts(SCC) in milk. Therefore, we did a basic experiment that examined the gene expression of some inflammatory cytokines. We used the high SCC milk obtained on the dairy farming. The expression of inflammatory cytokines, including interleukin (IL)-6, IL-8, IL-12, granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), tumor necrosis factor (TNF)- α , and interferon (IFN)- γ , in milk somatic cells was characterized by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in subclinical mastitis dairy cattle. As a result, the gene of IL-8 appeared by all samples. Additionally, the gene of IL-6 and IFN- γ appeared by a part of sample. It was suggested that characterization of the gene expression in this experiment is different from the infectious experiment that had been reported so far.