

乳房炎発症前に乳汁中で増加するシクロフィリン A の乳房炎誘起能

浅野貴史・遠藤佑真*・浦川めぐみ*・吉村 梢*・桂 哲平*・熊谷弘明

小堤知之・庄 涛*・渡邊康一*・野地智法*・麻生 久*

(宮城県畜産試験場・*東北大学大学院農学研究科)

Mastitis-inducing ability of cyclophilin-A increases in milk before onset of mastitis

Takafumi ASANO, Yuma ENDO*, Megumi URAKAWA*, Kozue YOSHIMURA*, Teppei KATSURA*, Hiroaki KUMAGAI,

Tomoyuki KOZUTSUMI, Tao JOAN*, Koichi WATANABE*, Tomonori NOCHI* and Hisashi ASO*

(Miyagi Prefectural Livestock Experiment Station・*Tohoku University Graduate School of Agriculture)

1 はじめに

現在の乳房炎の診断方法は、乳房炎の発症によって誘導される乳汁中の体細胞数を指標としており、必ずしも早期発見・早期治療が行われているとは言えず、農家にとって治療コストが大きな負担となる。そのため、乳汁中体細胞数が上昇する前の乳房炎予備軍を特定できるようなウシ乳房炎早期診断法の開発が望まれる。

シクロフィリン A は細胞質タンパク質で、主に上皮細胞から分泌され、免疫細胞を遊走させる白血球遊走因子として知られている^{1)、2)、3)}。先行研究において分娩後 60 日間で乳房炎に罹患した個体の 4 分房における体細胞数とシクロフィリン A 濃度を調べたところ、どの分房においても乳汁中体細胞数は乳房炎基準値を超える上昇が確認され、その数日前に乳汁中シクロフィリン A 濃度の上昇が確認された。しかしながら、乳汁中に分泌されたシクロフィリン A によって免疫細胞が動員され、乳汁中体細胞数が上昇したかは不明である。そこで乳頭孔からシクロフィリン A を注入することで乳汁中体細胞数の増加を誘導する乳房炎誘起能の有無を検証した。

2 試験方法

(1) 試験概要

1 分房を対照分房とし、乳房ごとに異なる量の組換えウシシクロフィリン A を乳頭へ注入する。経時的に分房別乳汁を採取し、乳汁中体細胞数、化学発光能 (CL 能)、乳汁中シクロフィリン A 濃度を測定した。

(2) 試験材料

PBS 投与試験より、体細胞数の上昇が認められなかった宮城県畜産試験場で飼養しているホルスタイン種経産牛 2 頭 (供試牛 A、供試牛 B) を選定し投与試験を行った。東北大学でウシシクロフィリン A 遺伝子を組み込んだ大腸菌を 50L 培養し、非常に精製度が高い組換えウシシクロフィリン A を作成した。組換えウシシクロフィリン A の投与量は各分房 10ml で、供試牛 A は右前 PBS、右後 200ng/ml、左前 1μg/ml、左後 10μg/ml を注入し、供試牛 B は右前 PBS、右後 10μg/ml、左前 100μg/ml、左後 1mg/ml を注入した。

本研究における動物実験は宮城県畜産試験場動物実験規定に基づき、動物倫理的配慮を十分に払い行った。

(3) 投与方法

投与日の夕方搾乳後に分房別に 0.5cm 乳頭投与ゾンテを用いて組換えウシシクロフィリン A を注入した。投与乳汁の採取は投与数日前から約 2 週間の乳汁を経時的に採取した。

(4) 測定項目

① 乳汁中体細胞数

宮城県畜産試験場で生乳成分/体細胞数測定装置コンビフォス 7 を用いてフローサイトメトリー方式に基づき測定。

② 化学発光能

宮城県畜産試験場で化学発光能測定装置テトラライトを用いて測定

③ 乳汁中シクロフィリン A 濃度

東北大学で ELSA 法を用いて 60 倍希釈したスキムミルクを測定。

3 試験結果及び考察

供試牛 A はシクロフィリン A を投与した 3 分房で投与翌日から濃度依存的に乳汁中の体細胞数と CL 能が急上昇して異常値となり、6 日後には正常値まで低下した。また、乳汁中のシクロフィリン A 濃度は投与後翌日に最も投与濃度の高い左後分房で急上昇し、3 日後には正常値まで低下した (図 1)。供試牛 B は分房別に右前 PBS、右後 100μg、左前 1mg、左後 10mg と高濃度のシクロフィリン A を投与したところ、供試牛 A と同様に投与した 3 分房で投与翌日から濃度依存的に乳汁中の体細胞数と CL 能が急上昇して異常値となり、最も投与濃度の高い左後分房においては乳汁中のシクロフィリン A 濃度が投与後翌日に急上昇し、その後低下した (図 2)。

シクロフィリン A 注入による乳汁中の体細胞数は、数日間高値を示したがその後正常値に低下した。これは、体細胞を動員した後に搾乳によってシクロフィリン A が体外へ排出されたために、一過性の乳房炎を引き起こしたと考えられる。また、シクロフィリン A 注入による乳汁中の体細胞数の上昇は即時的であった。細菌感染では菌の侵入・乳腺上皮細胞への接着・

炎症誘起因子の放出など様々な過程を経る必要があるが、シクロフィリンAのみを注入した場合は、これらの過程を介さずに、シクロフィリンAによって炎症が誘導されることを示唆するものであった。

4 まとめ

シクロフィリンA投与分房では、乳汁中体細胞および炎症の判定が可能なCL能が濃度依存的に上昇したことから、シクロフィリンAは乳汁中体細胞を動員して乳房炎を誘起することが判明した。

引用文献

- 1) Arora, K. ; Gwinn, W. M. ; Bower, M. A. ; Watson, A. ; Okwumabua, I. ; MacDonald, H. R. ; Bukrinsky, M. I. ; Constant, S. L. 2005.

Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses. *J. Immunol.* 175(1): 517-522.

- 2) Satoh, K. ; Nigro, P. ; Matoba, T. ; O'Dell, M. R. ; Cui, Z. ; Shi, X. ; Mohan, A. ; Yan, C. ; Abe, J. ; Illig, K. A. ; Berk, B. C. 2009. Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms. *Nat. Med.* 215(6): 649-56.
- 3) Takanashi, S. ; Nochi, T. ; Abe, M. ; Itaya, N. ; Urakawa, M. ; Sato, K. ; Zhuang, T. ; Umemura, S. ; Hayashi, T. ; Kiku, Y. ; Kitazawa, H. ; Michael, T. R. ; Watanabe, K. ; Aso, H. 2015. Extracellular cyclophilin A possesses chemotactic activity in cattle. *Veterinary Research.* 46: 80-89.

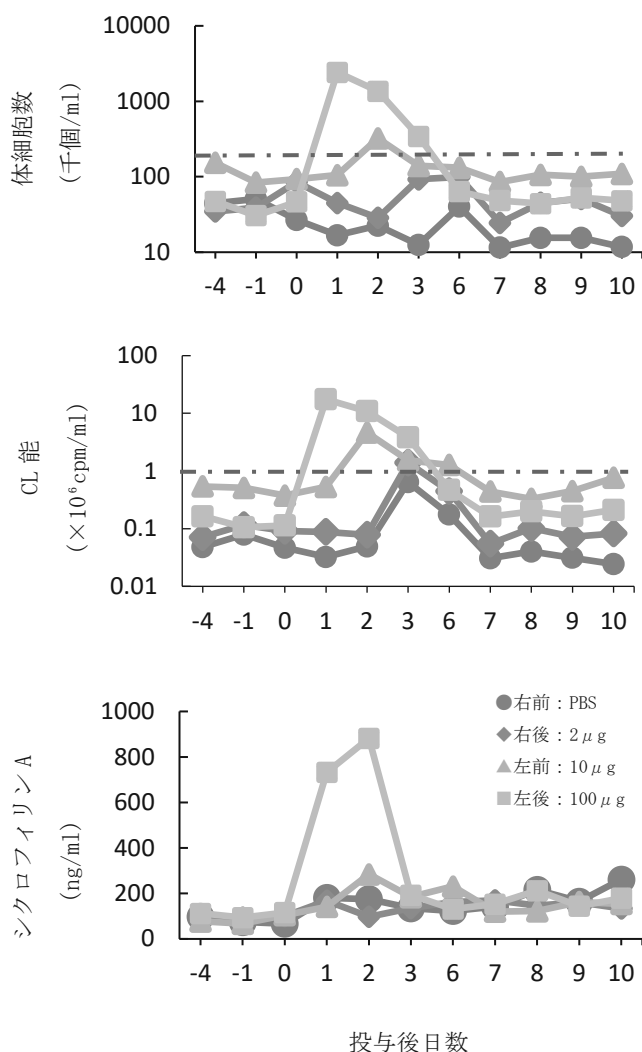


図1 投与前後の推移 (供試牛 A)

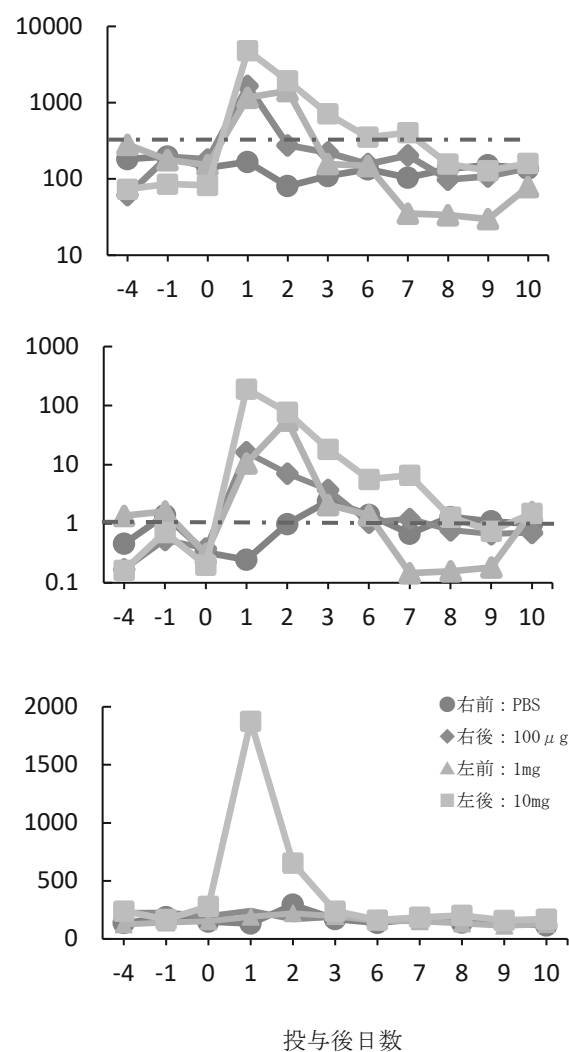


図2 投与前後の推移 (供試牛 B)