

乳房炎の病態と乳汁中白血球における サイトカイン mRNA 発現との関係についての検討

太 田 晴 喜

連合獣医学研究科獣医学専攻臨床獣医学講座（博士課程 1 年）

1. 目 的

畜産業界において、泌乳期の乳牛の乳房炎は農家の経済と牛乳の安全性に大きな影響を及ぼすことから、乳房炎罹患牛の早期診断・治療はもちろんのこと、その予防のために疾病の発現を早期に予測する方法の確立が切望されている。乳房炎の発症には乳房における免疫応答が密接に関係していると考えられていることから、乳房における免疫応答を評価することにより、乳房炎の発症を予測できる可能性が高いと考えられる。しかしながら、乳房炎の発症前後における乳房および乳汁中の免疫担当細胞の反応について詳細に検討した報告はほとんど認められない。そこで本研究では、乳房炎発症前後における泌乳期の乳牛の乳汁を用いて、そこに含有される免疫担当細胞の評価および免疫担当細胞のサイトカイン mRNA の変化を比較することによって、乳房炎の発症と免疫応答との関係の一端を明らかにすることを目的とした。

2. 方 法

（1）供試牛

本研究には、帯広畜産大学畜産フィールド科学センターで飼育しているホルスタイン種経産泌乳牛42頭を用いた。乳房炎罹患牛を含む泌乳中期から後期の牛20頭においては1週間毎に4週目まで、搾乳時に50mlの乳汁を採取した。また乳汁採取開始から4週目に血液を10ml採取した。また乳房炎罹患牛を含む泌乳初期から最盛期の牛22頭においては1週間毎に8週目まで同様に乳汁を採取し、開始から4週毎に血液を10ml採取した。

（2）乳汁の処理

乳汁は遠心後乳脂肪とホエーを捨て、沈渣をPBSにて3回遠心洗浄した。洗浄後の沈渣をISOGEN（ニッポンジーン）にて溶解し、実験に供するまで-80℃で冷凍保存した。

（3）血液の処理

血液から単核球を比重遠心法で分離し、分離した単核球をPBSにて3回遠心洗浄を行った。洗浄後の沈渣をISOGEN（ニッポンジーン）にて溶解し、実験に供するまで-80℃で冷凍保存した。

（4）total RNA の抽出

ISOGEN で処理した細胞溶解液を QIA シュレッター（QIAGEN）によりホモジナイズした。ホモジナイズ後の細胞溶解液にクロロフォルムを添加攪拌し遠心した。遠心後 RNA を含有する液層を採取し、2-プロパノールを添加攪拌して10分間室温で静置したのちに遠心した。遠心後得られた

RNA の沈渣を70%エタノールで洗浄し、乾燥後 DEPC 処理水で RNA を溶解した。RNA 溶解液の濃度を分光光度計で測定し、cDNA 合成に供した。

(5) RT-PCR 法

Total RNA 1 μ g を oligo(dT)₁₂₋₁₈ をプライマーとして 10mM dNTP と逆転写酵素を用いて 30℃ で 10 分間、続いて 42℃ で 60 分間の処理を行い cDNA を合成した。合成した cDNA について、IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , TGF- β のプライマーを用い PCR を行った。PCR は、cDNA とサイトカインの各プライマー、PCR 用バッファー、25mM MgCl₂, dNTP ならびに rTaq ポリメラーゼを混合して 94℃ で 1 分間、55–60℃ で 2 分間、72℃ で 1 分間を 1 サイクルとし、これを 30 サイクル繰り返し、最後に 72℃ で 5 分間の 1 サイクルを行った。PCR 産物は、エチジウムブロマイドを含有した 2 % のアガロースゲルで 100V, 60 分間電気泳動し、トランスイルミネーターで各サイズの PCR 産物のバンドを確認した。確認後、ゲルをデジタル画像でコンピューターに取り込み、各バンドを NIH Image で解析した。

3. 結 果

乳汁中の細胞を収集するに当たり、乳汁中の脂肪分の除去に苦労した。いくつかの方法を試行して見た結果、冷却により乳汁中の脂肪分を固形化して除去することが細胞を収集する上で重要であることが判明した。また、牛の末梢血中の単核球を分離する際にヒトや犬と同様の比重遠心法を用いたが、牛では同様の方法では細胞の収集率が低くなった。そこで、比重遠心分離の際の遠心の回転数と時間を検討した。その結果、遠心の回転数を少なくすることにより牛の末梢血単核球の収集率が高くなることから、牛の末梢血はヒトや犬よりも比重が重いものと考えられた。

末梢血単核球の cDNA を各サイトカインのプライマーで PCR したところ、多数のバンドが検出されるプライマーが多く認められたため、各プライマーのアニリング温度を検討した。その結果、各プライマーのアニリング温度は、IL-1 β は 58℃, IL-2 は 55℃, IL-4 は 56℃, IL-6 は 56℃, IL-8 は 56℃, IL-10 は 55℃, IL-12 は 60℃, IFN- γ は 55℃, GM-CSF は 58℃, TNF- α は 55℃, TGF- β は 55℃ であった。

4. 考 察

今回乳汁中の細胞や血液中の末梢血単核球の収集法の確立と各サイトカインのプライマーを用いた RT-PCR 法の確立に時間を費やしてしまった。乳汁中および血液中の含有細胞数に関しては、個体間において、また各同一個体内においても変動が認められることから、今後の実験によりそれらの免疫担当細胞のサイトカイン mRNA の変化を確認し、供試牛の病態を併せて考察できるよう現在実験継続中である。

キーワード：乳房炎, 乳汁, 白血球, サイトカイン