

Mycoplasma bovis に対するウシの
免疫学的応答性に関する研究

酪農学園大学大学院

獣医学研究科

獣医学専攻博士課程

権平 智

獣医衛生学ユニット

指導教員 教授 永幡 肇

2015 年度

目 次

緒論	1
第 I 章 <i>M. bovis</i> 刺激下におけるウシ免疫担当細胞および乳腺上皮細胞の網羅的遺伝子発現解析	
1. 序文	4
2. 材料と方法	6
3. 結果	13
4. 考察	41
5. 小括	44
第 II 章 <i>M. bovis</i> 刺激がウシ免疫担当細胞の機能発現に及ぼす影響	
1. 序文	45
2. 材料と方法	47
3. 結果	52
4. 考察	72
5. 小括	76
第 III 章 <i>M. bovis</i> の乳房内感染とウシ乳腺の免疫学的応答性	
1. 序文	77
2. 材料と方法	78
3. 結果	84
4. 考察	107
5. 小括	111
第 IV 章 総括	112
謝辞	115
引用文献	116

緒論

マイコプラズマは Tenericutes 門 Mollicutes 網に属する真正細菌の一種であり、菌体は 0.15~0.8 μm と真正細菌中で最も小さく、ゲノムサイズも 680~2220 kbp 程度である[53]。マイコプラズマは動物、昆虫および植物に広く感染域をもつことが知られており、現在までにおよそ 190 種のマイコプラズマが同定されている[57]。マイコプラズマは細胞壁を持たず、人工培地での増殖が可能な最小の微生物とされている[53]。マイコプラズマ属は牛肺疫の原因微生物 (*Mycoplasma mycoides subspecies mycoides small colony variant*) として、1898 年に Nocard と Roux により初めて分離培養された[45]。現在、この病原体には有効なワクチンが存在することもあり、日本および欧米諸国を含む先進国においてこの疾病は制御されており、問題となる地域は主にアフリカに限定されている[44]。

ウシから分離されるマイコプラズマとして約 30 菌種が報告されており[44]、それらは、肺炎、乳房炎、中耳炎および関節炎などを引き起こすことが報告されている[38]。特にマイコプラズマ性乳房炎は近年、国内における発生率の増加が問題になっている[82]。本病に対する有効なワクチンは未だ開発されておらず、また効果的な治療法も確立されていないことから淘汰対象となる事例が多い[38, 44]。その対策技術の構築は世界的にも重要な課題として認識されている。

マイコプラズマ性乳房炎の発生は 1960 年にイギリスで初めて報告された[17]。マイコプラズマ性乳房炎の乳汁から分離されるマイコプラズマとして *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*)、*M. bovis genitalium*、*M. californicum*、*M. arginini*、*M.*

bovirhinis、*M. alkalescense*、*M. canadense*、*M. dispar*、*M. gallinarum*、*M. alvi*、*M. leachii*、*M. bovoculi* および *M. canis* の 13 菌種が報告されている[1, 20, 27, 37, 58, 64]。特に *M. bovis* はマイコプラズマ性乳房炎牛から最も高率に分離され[20]、泌乳停止、乳房の腫脹および硬結などの重篤な臨床症状を起こし[52, 70]、甚大な経済的損失を招来する[38]。*M. bovis* によるマイコプラズマ性乳房炎は牛群内において高い伝染性を有するため、その制圧は困難であることが報告されている[50]。

M. bovis の病原性について、Jacques ら[71]は、*M. bovis* が単核球系細胞の増殖阻害により免疫抑制を引き起こすこと、また Vanden ら[74]も、*M. bovis* から分泌された蛋白質が白血球の増殖を抑制することを報告している。また宿主細胞のアポトーシスを起こすことも報告されている[73]。しかし、*M. bovis* が単核球の免疫応答に関連したサイトカイン発現への影響は充分には明らかにされていない。*M. bovis* による乳房炎では、乳腺腔内に顕著な好中球の浸潤が認められるが、*M. bovis* の排除には至らないため[13]、*M. bovis* が好中球の免疫応答から回避する機構を持つものと考えられている[32]。しかし、*M. bovis* に対する好中球の免疫応答性は充分に解明されていない。*M. bovis* の免疫回避機構として、異なるサイズバリエーションで高頻度で変化する可変性表層リポ蛋白（Variable surface lipoproteins (VSPs)）が知られている[6]。しかし、他の *M. bovis* の病原性因子は解明されておらず不明な点も多い。また、近年、*M. bovis* がウシ乳腺上皮細胞の免疫応答に関連した mRNA 発現量に影響を及ぼすことが報告されている

[80]。しかし、他の乳房炎原因菌種との比較はなされておらず、また、*M. bovis* に対する乳腺上皮細胞の免疫応答性についても充分には解明されていない。

これらを解明することはマイコプラズマ性乳房炎に対する効果的な予防および治療技術の確立に向けた重要な基礎的知見になりうるものと考えられる。

本研究では、*M. bovis* 感染に対するウシ末梢血単核球、末梢血好中球およびウシ乳腺上皮細胞の免疫応答に関連した遺伝子発現を明らかにする目的で、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、定量的リアルタイム PCR 法による免疫応答に関連する遺伝子の発現量について検討した（第 I 章）。

次に、*M. bovis* 感染に対するウシ単核球および好中球の免疫応答性を明らかにする目的で、*M. bovis* が単核球のサイトカイン産生量および細胞増殖能に及ぼす影響を評価するとともに、好中球の Nitric Oxide (NO) 産生能および Neutrophil extracellular traps 形成に及ぼす影響を検討した（第 II 章）。

さらに、マイコプラズマ性乳房炎におけるウシの免疫応答を明らかにする目的で、*M. bovis* の乳房内注入が全身および局所免疫応答に及ぼす影響を評価するとともに、単核球の網羅的遺伝子発現解析を行った（第 III 章）。

以上、マイコプラズマ性乳房炎について、その免疫学的病態の特性を明らかにする目的で、*M. bovis* が免疫担当細胞および乳腺上皮細胞の遺伝子発現および細胞機能に及ぼす影響を明らかにすることを意図して研究を展開した。

第 I 章 *M. bovis* 刺激下におけるウシ免疫担当細胞および乳腺上皮細胞の網羅的 遺伝子発現解析

1. 序文

伝染性乳房炎に分類されるマイコプラズマ性乳房炎は、近年、国内における発生率の増加が問題になっている[82]。*M. bovis* は乳房炎原因菌の 1 種であり、マイコプラズマ性乳房炎で最も高率に分離される菌種である。*M. bovis* に対するウシ乳腺の免疫応答について、Kauf ら[30]は、*M. bovis* をウシ乳房へ注入することにより、末梢血中の白血球数および血小板数が減少し、さらに乳汁中の Interleukin-8 (IL-8)、Tumor necrosis factor α (TNF- α)、IL-1 β 、IL-10、IL-12、および Interferon- γ (IFN- γ) 量が増加したことを報告している。これらのサイトカインは、細胞間シグナル伝達物質として、血球の増殖、分化、活性化および抑制にかかわる重要な機能を有しており、単核球、好中球および乳腺上皮細胞は乳腺組織においてそれらの主要な産生細胞とされている。一方、これらサイトカインを含む *M. bovis* 感染に関わる免疫関連物質について遺伝子レベルでの解明は充分に行われていない。これまで、乳房炎原因菌である *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) および *Escherichia coli* (*E. coli*) 感染に対する乳腺上皮細胞の遺伝子発現解析について、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 および IL-8 の mRNA 発現量は *S. aureus* に比較し *E. coli* 刺激においてより急激に上昇するなど[21]、細胞の応答性は菌種により異なることが示されている[23]。そこで本研究では、*M. bovis* 刺激下における免疫担当細胞および乳腺上皮細胞の網

羅的遺伝子発現解析により *M. bovis* に対する免疫学的応答性についてその解明を試みた。

2. 材料と方法

1) 菌液調整

供試菌として、*M. bovis* (ATCC25523)、*S. aureus* (ATCC6538P)、*E. coli* (NBRC14237) を用いた。*M. bovis* は Hayflic 培地 (関東化学、東京) に接種し 37°C、48 時間培養した。得られた菌液は、16,000 ×g、4°C、30 分の条件で遠心処理後、上清を除去しリン酸緩衝生理食塩水 (PBS、ニッスイ製薬、東京) に再懸濁した。菌数は菌液をマイコプラズマ用寒天培地 (関東化学、東京) に接種後、37°C、5%CO₂ 下で、4 日間培養し平板希釈法により算定し PBS を用いて希釈し 10¹¹ CFU/ml に調整した。*S. aureus* および *E. coli* はブレインハートインフュージョン培地 (ニッスイ、東京) にて 37°C、24 時間培養後、平板希釈法により算定し調整した。*M. bovis* は 70°C、5 分、*S. aureus* および *E. coli* は 75°C、30 分で熱処理し死菌とした。各菌液は使用まで -80°C で保存された。

2) 単核球および好中球

(1) 供試動物

2012 年 4 月から 2015 年 11 月に酪農学園大学附属農場で飼養されていた臨床的に健康な泌乳中期のホルスタイン種雌牛 (3 歳齢) 5 頭を用いた。

(2) 供試血液

採血は頸静脈よりヘパリンナトリウム加真空採血管 (Terumo、東京) を用

い、常法に準じて行った。

(3)単核球および好中球の分離と培養

血液からの単核球および好中球分離は、Ficoll-conray 比重遠心法を用いて行った。遠心管（50ml）に血液 10ml を入れ、PBS を 25ml 添加した。その下層に Ficoll-conray 液（比重 1.078）10ml を重層し、300 ×g、20℃で 30 分間、遠心分離した。遠心処理後、単核球層を採取し PBS で洗浄後、10% ウシ胎児血清

（Fetal bovine serum（FBS））加 RPMI-1640 培養液（Sigma Aldrich、東京）に懸濁し氷上で保持した。好中球は赤血球層に 0.2% 塩化ナトリウム溶液 10ml を加え、赤血球を溶解させた後、直ちに 1.6% 塩化ナトリウム溶液を等量加えた。

280 ×g、4℃、5 分間の遠心処理後、得られた好中球は Hank's balanced salt solution（HBSS、ニッスイ、東京）に懸濁し、氷上で保持した。3ml の

10%FBS 加 RPMI-1640 培養液に浮遊させた単核球（ 4×10^6 cells）または好中球

（ 1×10^7 cells）を 60mm プラスチックシャーレ（Iwaki、東京）に播種し、次いで生菌または死菌 *M. bovis*、*S. aureus* または *E. coli* を感染多価（Multiplicity of

infection : MOI 比）10、100 および 1000 となるよう添加した。好中球は 3 および 6 時間、単核球は 6、12 および 24 時間、37℃、5%CO₂ 下で培養した。培養

終了後、直ちに細胞を 0.25%トリプシン EDTA（Sigma Aldrich、東京）で剥離し PBS で洗浄後、ペレットに 100 μl の RNA later stabilization solution

（Ambion、米国）を重層し、氷上で 15 分間静置後、これを除去し total RNA（tRNA）抽出まで -80℃で保存した。

3) 乳腺上皮細胞

ホルスタイン種泌乳牛より得られた乳腺上皮細胞は中島恵一博士（北海道農業研究センター）より分与された。*M. bovis*、*S. aureus* または *E. coli* の生菌または死菌を 10、100 および 1000 の MOI 比で乳腺上皮細胞に添加し、6、12 および 24 時間 37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。培養終了後、直ちに細胞を 0.25%トリプシン EDTA 溶液（Sigma Aldrich、東京）で剥離し、ペレットを RNA later stabilization solution（Ambion、米国）で処理後-80°Cで保存した。

4) Total RNA 抽出

回収した単核球、好中球および乳腺上皮細胞から、Total RNA purification kit（Jena Bioscience、ドイツ）を用いて tRNA を抽出し、TURBO DNA-free kit（Ambion、米国）にて 37°Cで 120 分反応させ、脱 DNA 処理を行った。その後、水層の 10 分の 1 量の 3 M 酢酸ナトリウムと 2.5 倍量の 100%エタノールを加えて混和し、15,000 ×g で 15 分間遠心を行った。上清を除去し、70%エタノールを加えて軽く混和した後、再び 10 分間遠心した。上清を除去して真空乾燥後、RNA free 超純水により抽出した。

5) 網羅的遺伝子発現解析

単核球、好中球および乳腺上皮細胞は *M. bovis*（MOI1000）で刺激した。単

核球と乳腺上皮細胞は培養 6 時間後、好中球は 3 時間後に細胞を回収し、tRNA (1 μ g 以上かつ 100-500 ng/ μ l) を網羅的遺伝子発現解析に供試した。遺伝子発現データセットはアジレント 1 色マイクロアレイプラットフォーム (4 \times 44K Bovine オリゴ DNA マイクロアレイ、grid ID 023647) より得られた。サンプルはそれぞれ R のパッケージソフト (agilp) を用いて正規化を行った [15]。その後、エクセルを用いて *t* 検定で $p < 0.025$ かつ発現量が対照と比較して 2 倍以上の遺伝子を抽出し順序化した。遺伝子アノテーションは bioDBnet を用いて行い [41]、遺伝子オントロジーエンリッチメント解析は BioMart enrichment tool を使用した [62]。

6) Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

上記 4) にて抽出した単核球、好中球および乳腺上皮細胞の tRNA 1 μ g を供試した。各々に 5 \times RT Buffer (東洋紡、大阪) 4 μ l、10 mM dNTP (タカラバイオ、滋賀) 2 μ l、5 pmol/ μ l Oligo dt (タカラバイオ、滋賀) 1 μ l、ReverTra ace (東洋紡、大阪) 1 μ l、超純水を加え 20 μ l としたものを RT (+) とした。また、ReverTra ace の代わりに同量の超純水を加えたものを RT (-) とし、サーマルサイクラー (Bio-Rad、米国) を用いて 42 $^{\circ}$ C 60 分、99 $^{\circ}$ C 5 分加熱し cDNA 化した。各サンプルの cDNA 1 μ l を使用し、 β -actin プライマーおよび Taq DNA polymerase を用いて初期変性 94 $^{\circ}$ C 2 分、熱変性 94 $^{\circ}$ C 30 秒、アニーリング 60 $^{\circ}$ C 30 秒、伸長反応 72 $^{\circ}$ C 30 秒で 40 サイクル反応させた後、電気泳動まで 4 $^{\circ}$ C で保

存した。増幅産物に Loading buffer を添加し、10 μ l を 1.5%アガロースゲルで 30 分間電気泳動を行った。アガロースゲルはエチジウムブロマイドで 30 分間染色し、紫外線照射下で RT (+) および RT (-) を確認した。

7) 定量的リアルタイム PCR

使用したプライマーセットを表 1-A および B に示した。それぞれのプライマーセットは融解曲線分析を行い単一の産物が増幅されていることを確認し、また BLAST 解析により標的遺伝子のみが増幅していることを確認した。qRT-PCR 反応は Thunderbird Sybr qPCR mix (東洋紡、大阪) と CFX Connect real-time system (BioRad、米国) を用い使用法に準拠して行った。反応条件は初期変性 95°C 5 分、熱変性 95°C 15 秒、アニーリング 60°C 30 秒、伸長反応 72°C 30 秒、これらを 1 サイクルとし、40 サイクル行った。PCR 後、融解曲線分析を行い、反応液の温度を 55°C から 0.5°C ずつ 95°C まで上昇させ、SYBR Green I のシグナルを検出した。 β -actin および tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta polypeptide (YWHAZ) を参照遺伝子として標準化した。

8) 統計処理

多群検定は Kruskal-Wallis 検定を、多重比較検定は Steel-Dwass 検定を用いて行い、有意水準 5% ($p < 0.05$) 以下、1% 以下 ($p < 0.01$) を有意とした。成績は平均値 \pm 標準誤差で示した。

表 1-A RT-PCR による遺伝子評価に使用したプライマー

Gene name	Primer sequence (5'-3')	Amplicon size (bps)	Accession number	Reference
β-actin	F: AGC AAG CAG GAG TAC GAT GAG	241	NM_173979.3	[55]
	R: ATC CAA CCG ACT GCT GTC A			
YWHAZ	F: GCA TCC CAC AGA CTA TTT CC	120	GU817014.1	[63]
	R: GCA AAG ACA ATG ACA GAC CA			
IL-1β	F: AGT GCC TAC GCA CAT GTC TTC	114	NM_174093.1	[25]
	R: TGC GTC ACA CAG AAA CTC GTC			
IL-2	F: CCA GAG AGA TCA AGG ATT CAA TGG	108	NM_180997.2	[46]
	R: CAG CGT TTA CTG TTG CAT CAT CA			
IL-4	F: ACG CTG AAC ATC CTC ACA ACG	125	NM_173921.2	[46]
	R: CGC CTA AGC TCA ATT CCA ACC			
IL-6	F: ATC AGA ACA CTG ATC CAG ATC C	145	NM_173923.2	[46]
	R: CAA GGT TTC TCA GGA TGA GG			
IL-8	F: GAA GAG AGC TGA GAA GCA AGA TCC	142	NM_173925.2	[46]
	R: ACC CAC ACA GAA CAT GAG GC			
IL-10	F: AAG GTG AAG AGA GTC TTC AGT GAG C	110	NM_174088.1	[46]
	R: TGC ATC TTC GTT GTC ATG TAG G			
IL-12p40	F: CAT CAG GGA CAT CAT CAA AC	135	NM_174356.1	[77]
	R: AAC GTC AGG GAG AAG TAG GA			
IL-13	F: CCA GAA GGT GCC GCT GTG CAA T	159	NM_174089.1	
	R: GAG GGC TTG TGA GGA CAG AGT GC			
IL-17A	F: TGG TGG CTC TTG TGA AGG CAG G	193	NM_001008412.2	
	R: TCA GGG TCC TCA TTG CGG TGG A			
IL-18	F: CTA TTG AGC ACA GGC ATA AAG ATG	130	NM_174091.2	[67]
	R: TGA TCT GAT TCC AGG TCT TCA TCA			
IFN-γ	F: TCA AAT TCC GGT GGA TGA TCT GC	150	NM_174086.1	[46]
	R: GAC CAT TAC GTT GAT GCT CTC CG			
TNF-α	F: TCT TCT CAA GCC TCA AGT AAC AAG C	418	NM_173966.3	[34]
	R: CCA TGA GGG CAT TGG CAT AC			
TGF-β	F: TTC TTC AAC ACG TCC GAG CTC	141	NM_001166068.1	[33]
	R: AGC GCC AGG AAT TGT TGC TAT			

F, forward; R, reverse; bps, base pairs

表 1-B RT-PCR による遺伝子評価に使用したプライマー

Gene name	Primer sequence (5'-3')	Amplicon size (bps)	Accession number	Reference
TLR2	F: CAT TCC CTG GCA AGT GGA TTA TC R: GGA ATG GCC TTC TTG TCA ATG G	195	NM_174197.2	[24]
TLR4	F: CTT CCC GGG GGA TGT TTC AA R: CCT GAG GCG GTT TCT ACT CG	169	NM_174198.6	
Lactoferrin	F: GTG GAT GGC AAG GAA GAC TTG R: CAA AGA GCT GGA AGC TCC GA	90	NM_180998.2	[43]
β -defensin	F: TCT TCT GGT CCT GTC TGCT R: CCG AAC AGG TGC CAA TCT GT	130	NM_175703	[65]
CXCL10	F: CTC GAA CAC GGA AAG AGG CA R: AAA CCG AAG TCC ACG GAC AA	126	NM_001046551	
IL-27	F: CGG TTG CTA CAC TCC TTG GAA R: TCA GCC AAG AGG TCA CTC CA	140	NM_001164653	
SLAMF1	F: AGT CTG GAC CTT CAG GCA AC R: GTA CAG GCA GCC AAG GTG TA	144	NM_174184	
SLAMF7	F: TCC TGA AGA GAT GCC CGA GT R: ATC TGA CAA CAT GGG CAG GG	142	NM_001191358	
IL-17F	F: TGG GTC ACA AGT GCA ACA GA R: TCA GGC CAA CCT CAT CTG TAT T	143	NM_001192082	
BATF	F: CCC AGT GAT GGG TCA AGC AT R: AGC CCT TGC CAG ATT GGT TT	112	NM_001206278	
IL-36A	F: GTG GAG GCT GTC CTG TGA TT R: AGC AGA GAA CAA CCC TCA TCC	115	XM_005192441	
NOS2	F: CTT GAT TGC ACC GCT TGG AG R: CAA GAG GCA GAC TGG GGT TT	122	NM_001076799	
CXCL2	F: TCA GGA AGT GTG TCT CAA CCC R: TTC TGT AGG GGC AGG GTC TA	143	NM_174299	
CCL24	F: CCA GGC AGG AGT GAT CTT CA R: CCC TAG CGG AGG CTT TCT TC	122	NM_001046596	
KDM4D	F: GAT GGA CAA TCC TGC CCC AA R: AGG ACC TAG TTC ACG GGT CA	146	XM_005215772	

F, forward; R, reverse; bps, base pairs

3. 結果

1) *M. bovis* 刺激下におけるウシ単核球、好中球および乳腺上皮細胞の網羅的遺伝子発現解析

M. bovis 感染にともなうウシ単核球、好中球および乳腺上皮細胞の免疫応答を解明する目的で、*M. bovis* 刺激にともなう各細胞の遺伝子発現量を網羅的に解析した。単核球で 106 遺伝子が有意な ($p < 0.025$ かつ 2 倍以上の発現量) 増加を示し 61 遺伝子が有意な ($p < 0.025$ かつ 2 倍以上の発現量) 減少を示した。好中球では 61 遺伝子が有意な ($p < 0.025$ かつ 2 倍以上の発現量) 増加を示し、30 遺伝子が有意な ($p < 0.025$ かつ 2 倍以上の発現量) 減少を示した

(図 1)。乳腺上皮細胞では lysine (K)-specific demethylase 4D (KDM4D) が有意な ($p < 0.025$ かつ 2 倍以上の発現量) 減少を示した。

有意な変化を認めた遺伝子群について表 2-A から D (単核球) および表 3-A から C (好中球) に示した。増加した遺伝子の内、単核球ではサイトカイン (IL-36A、IL-17F、IL-27、IFN- γ) の他にケモカイン (chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10)) が *M. bovis* 刺激によって強く誘導された。また signaling lymphocytic activation molecule family member 1 (SLAMF1) および SLAMF7、IFN- γ の誘導因子である interferon regulatory factor 1 (IRF1)、また basic leucine zipper transcription factor, ATF-like (BATF) についても強い誘導が確認された。好中球では *M. bovis* 刺激により nitric oxide synthase 2, inducible (iNOS) の発現量が最も高くランキングされ、また chemokine (C-C motif) ligand 24 (CCL24)

および CXCL2 の有意な発現増加も認められた。これらの遺伝子について、単核球では有意差は認められなかった。一方、単核球および好中球に共通して有意な ($p < 0.025$ かつ 2 倍以上の発現量) 発現量の差が認められた遺伝子数は 25 であった (図 2)。それらは主としてサイトカインやケモカイン等、免疫応答に関連する遺伝子であり、増減も一致していた (図 3)。

M. bovis 刺激にともなう単核球および好中球における遺伝子の機能解析において、単核球の機能的応答は、免疫応答に関連する遺伝子が最も多く発現しており、次いでストレス応答に関連する遺伝子の増加が認められた (図 4 および表 4)。好中球でも同様に免疫応答に関連する遺伝子が最も高く順序化された (図 5 および表 5)。

2) リアルタイム PCR による網羅的遺伝子発現解析の検証および定量化

網羅的遺伝子発現解析の結果をリアルタイム PCR により検証した (図 6)。

M. bovis 刺激下における好中球 iNOS、IL-36A、BATF、SLAMF1、SLAMF7 および CXCL2 の mRNA 発現量は対照と比較し有意に ($p < 0.01$) 増加し、CCL24 の mRNA 発現量は有意に ($p < 0.01$) 減少した。同様に *M. bovis* 刺激にともなう単核球における IL-36A、BATF、IL-27、IFN- γ 、SLAMF1 および SLAMF7 の mRNA 発現量は有意に ($p < 0.01$) 増加し、CCL24 の mRNA 発現量は有意に ($p < 0.01$) 減少した。*M. bovis* 刺激に対する乳腺上皮細胞における KDM4D の mRNA 発現量は対照と比較し減少傾向を示した。

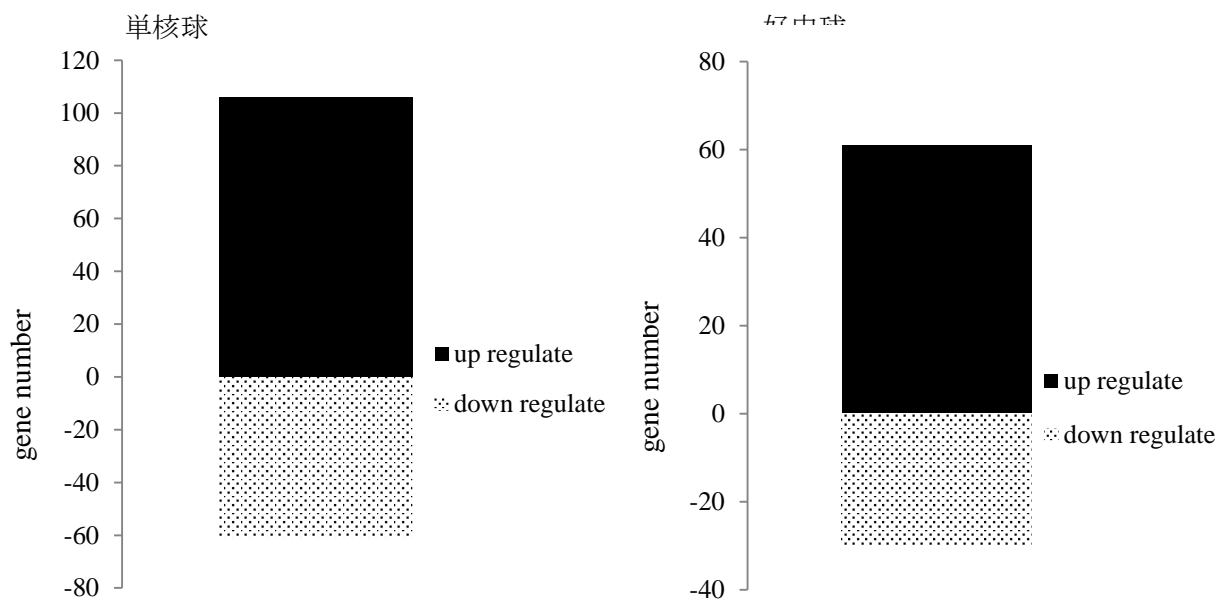


図1 *M. bovis* 刺激下における単核球および好中球の網羅的遺伝子発現解析において有意差が認められた遺伝子数

表 2-A *M. bovis* 刺激下における単核球の網羅的遺伝子発現解析において有意差が認められた遺伝子

Ensembl Transcript ID	Gene Name	Description	log(FC)
ENSBTAT00000028036	ADM	adrenomedullin	4.66
ENSBTAT00000015156	RUSC2	RUN and SH3 domain containing 2	3.61
ENSBTAT00000023167	GJB2	gap junction protein, beta 2	3.55
ENSBTAT00000010644	SELENBP1	selenium binding protein 1	3.44
ENSBTAT00000039533	CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	3.32
ENSBTAT00000065203	IL36A	interleukin 36, alpha	3.31
ENSBTAT00000028016	CTSK	cathepsin K	3.25
ENSBTAT00000020701	HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1	3.22
ENSBTAT00000010425	SLAMF1	signaling lymphocytic activation molecule family member 1	3.06
ENSBTAT00000022393	IL17F	interleukin 17F	2.90
ENSBTAT00000037557	DECR2	2,4-dienoyl CoA reductase 2, peroxisomal	2.88
ENSBTAT00000046258	MICAL2	Protein-methionine sulfoxide oxidase	2.73
ENSBTAT00000029804	GAB1	GRB2-associated binding protein 1	2.63
ENSBTAT00000029274	LTBP2	latent transforming growth factor beta binding protein 2	2.59
ENSBTAT00000023979	IL27	interleukin 27	2.58
ENSBTAT00000001585	SLAMF7	SLAM family member 7	2.53
ENSBTAT00000016634	IFNG	interferon, gamma	2.43
ENSBTAT00000035684	BATF	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like	2.32
ENSBTAT00000027538	ABCA1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	2.13
ENSBTAT00000056271	RIN2	ras and Rab interactor 2	2.11
ENSBTAT00000027423	TCN1	transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	2.10
ENSBTAT00000008074	CDA	cytidine deaminase	2.07
ENSBTAT00000028880	RGS1	regulator of G-protein signaling 1	1.98
ENSBTAT00000005986	DHRS9	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	1.93
ENSBTAT00000045866	SLC48A1	solute carrier family 48 (heme transporter), member 1	1.91
ENSBTAT00000009698	LHFPL2	lipoma HMGIC fusion partner-like 2	1.91
ENSBTAT00000025930	ITPKC	inositol-trisphosphate 3-kinase C	1.90
ENSBTAT00000061349	CDK6	cyclin-dependent kinase 6	1.85
ENSBTAT00000003028	HSD3B7	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 7	1.85
ENSBTAT00000020764	TNFRSF4	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4	1.84

表 2-B *M. bovis* 刺激下における単核球の網羅的遺伝子発現解析において有意差が認められた遺伝子

Ensembl Transcript ID	Gene Name	Description	log(FC)
ENSBTAT00000032697	-	Uncharacterized protein	1.83
ENSBTAT00000013956	LSMEM1	leucine-rich single-pass membrane protein 1	1.81
ENSBTAT00000043753	LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3	1.75
ENSBTAT00000014591	NFKBIZ	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta	1.70
ENSBTAT00000000950	NDRG1	N-myc downstream regulated 1	1.70
ENSBTAT00000004034	SMTN	smoothelin	1.69
ENSBTAT00000023937	CD164	CD164 molecule, sialomucin	1.68
ENSBTAT00000001987	CALCB	calcitonin-related polypeptide beta	1.59
ENSBTAT00000000679	PLEKHA8	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 8	1.58
ENSBTAT00000063695	NAGLU	N-acetylglucosaminidase, alpha	1.54
ENSBTAT00000056121	-	Uncharacterized protein	1.50
ENSBTAT00000019242	AKAP2	A kinase (PRKA) anchor protein 2	1.49
ENSBTAT00000023511	SCNN1D	sodium channel, non voltage gated 1 delta subunit	1.46
ENSBTAT00000006742	SLC31A2	solute carrier family 31 (copper transporters), member 2	1.46
ENSBTAT00000010311	PPA1	pyrophosphatase (inorganic) 1	1.45
ENSBTAT00000021808	OPTN	optineurin	1.45
ENSBTAT00000056911	GBP2	Uncharacterized protein	1.43
ENSBTAT00000000046	PYCR1	pyrroline-5-carboxylate reductase 1	1.41
ENSBTAT00000048452	FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	1.41
ENSBTAT00000004127	SLC25A33	solute carrier family 25, member 33	1.37
ENSBTAT00000011652	SORT1	sortilin 1	1.37
ENSBTAT00000026855	GCLM	glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	1.35
ENSBTAT00000044218	IRF1	interferon regulatory factor 1	1.34
ENSBTAT00000027449	IDO1	indoleamine 2,3-dioxygenase 1	1.33
ENSBTAT00000014282	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	1.33
ENSBTAT00000060994	HK2	hexokinase 2	1.32
ENSBTAT00000003943	GADD45G	growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	1.31
ENSBTAT00000000977	BCL2A1	BCL2-related protein A1	1.30
ENSBTAT00000018010	LGALS8	lectin, galactoside-binding, soluble, 8	1.30

表 2-C *M. bovis* 刺激下における単核球の網羅的遺伝子発現解析において有意差が認められた遺伝子

Ensembl Transcript ID	Gene Name	Description	log(FC)
ENSBTAT00000019526	ADAMTS2	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 2	1.30
ENSBTAT00000013111	XCL1	chemokine (C motif) ligand 1	1.28
ENSBTAT00000064242	TXNRD1	thioredoxin reductase 1	1.27
ENSBTAT00000013173	ITGB3	integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	1.26
ENSBTAT00000018501	RRAD	Ras-related associated with diabetes	1.26
ENSBTAT00000004181	ASNS	asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)	1.24
ENSBTAT00000036314	MPP7	membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55 subfamily member 7)	1.23
ENSBTAT00000029116	FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	1.23
ENSBTAT00000047899	RBPM5	RNA binding protein with multiple splicing	1.22
ENSBTAT00000043182	BHLHE41	basic helix-loop-helix family, member e41	1.21
ENSBTAT00000006419	MTHFD2	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	1.21
ENSBTAT00000018420	SH3BP4	SH3-domain binding protein 4	1.20
ENSBTAT00000013950	IFRD1	interferon-related developmental regulator 1	1.20
ENSBTAT00000010532	FLCN	folliculin	1.19
ENSBTAT00000022976	DRAM1	DNA-damage regulated autophagy modulator 1	1.19
ENSBTAT00000045141	TNFSF14	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14	1.17
ENSBTAT00000011347	TRAF3IP2	TRAF3 interacting protein 2	1.16
ENSBTAT00000012983	GPR171	G protein-coupled receptor 171	1.16
ENSBTAT00000013121	TRIM25	tripartite motif containing 25	1.15
ENSBTAT00000001785	USP38	ubiquitin specific peptidase 38	1.15
ENSBTAT00000025884	ICAM2	intercellular adhesion molecule 2	1.14
ENSBTAT00000006773	LPGAT1	acyl-CoA:lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1	1.13
ENSBTAT00000018897	CCDC86	coiled-coil domain containing 86	1.13
ENSBTAT00000009356	STEAP3	STEAP family member 3, metalloredutase	1.13
ENSBTAT00000018370	BCAT1	branched chain amino-acid transaminase 1, cytosolic	1.12
ENSBTAT00000055062	TNFAIP8L1	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 1	1.11
ENSBTAT00000017658	PNPLA8	patatin-like phospholipase domain containing 8	1.11
ENSBTAT00000011388	SULT1A1	sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1	1.10
ENSBTAT00000015575	CRYL1	crystallin, lambda 1	1.09

表 2-D *M. bovis* 刺激下における単核球の網羅的遺伝子発現解析において有意差が認められた遺伝子

Ensembl Transcript ID	Gene Name	Description	log(FC)
ENSBTAT00000045223	TMEM251	transmembrane protein 251	1.09
ENSBTAT00000004312	NOL6	nucleolar protein family 6 (RNA-associated)	1.09
ENSBTAT00000046966	SOBP	sine oculis binding protein homolog (<i>Drosophila</i>)	1.08
ENSBTAT00000034126	SPSB1	splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 1	1.08
ENSBTAT00000045329	RASGEF1B	RasGEF domain family, member 1B	1.08
ENSBTAT00000031822	SH3BP5	SH3-domain binding protein 5 (BTK-associated)	1.07
ENSBTAT00000015413	MAP3K8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	1.04
ENSBTAT00000019102	PRKX	protein kinase, X-linked	1.04
ENSBTAT00000008333	CIRH1A	cirrhosis, autosomal recessive 1A (cirhin)	1.03
ENSBTAT00000033962	SOAT1	sterol O-acyltransferase 1	1.03
ENSBTAT00000053511	TMEM243	chromosome 4 open reading frame, human C7orf23	1.02
ENSBTAT00000010428	SLC38A6	solute carrier family 38, member 6	1.02
ENSBTAT00000015599	SGMS1	sphingomyelin synthase 1	1.02
ENSBTAT00000006709	TMEM2	transmembrane protein 2	1.02
ENSBTAT00000046976	PTPLA	3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 1	1.02
ENSBTAT00000010206	SLC1A4	solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4	1.01
ENSBTAT00000006825	SYS1	SYS1 Golgi-localized integral membrane protein homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	1.01
ENSBTAT00000065058	ISG20	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa	1.00

表 3-A *M. bovis* 刺激下における好中球の網羅的遺伝子発現解析において有意差が認められた遺伝子

Ensembl Transcript ID	Gene Name	Description	log(FC)
ENSBTAT00000009062	NOS2	nitric oxide synthase 2, inducible	4.68
ENSBTAT00000018774	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	3.97
ENSBTAT00000030280	TM9SF2	transmembrane 9 superfamily member 2-like	3.82
ENSBTAT00000035684	BATF	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like	3.49
ENSBTAT00000001702	PPP1R15A	protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A	3.05
ENSBTAT00000025930	ITPKC	inositol-trisphosphate 3-kinase C	2.70
ENSBTAT00000065203	IL36A	interleukin 36, alpha	2.70
ENSBTAT00000039536	CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	2.57
ENSBTAT00000013608	ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	2.55
ENSBTAT00000028574	MAFF	v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F	2.55
ENSBTAT00000008074	CDA	cytidine deaminase	2.54
ENSBTAT00000001585	SLAMF7	SLAM family member 7	2.53
ENSBTAT00000063922	SESN2	sestrin 2	2.51
ENSBTAT00000010425	SLAMF1	signaling lymphocytic activation molecule family member 1	2.40
ENSBTAT00000014591	NFKBIZ	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta	2.23
ENSBTAT00000013956	LSMEM1	leucine-rich single-pass membrane protein 1	2.21
ENSBTAT00000029804	GAB1	GRB2-associated binding protein 1	2.20
ENSBTAT00000011265	ATF3	activating transcription factor 3	2.07
ENSBTAT00000013855	SMIM3	small integral membrane protein 3	2.01
ENSBTAT00000015850	MTTP	microsomal triglyceride transfer protein	2.01
ENSBTAT00000019132	-	Uncharacterized protein	1.99
ENSBTAT00000055625	-	Uncharacterized protein	1.96
ENSBTAT00000013950	IFRD1	interferon-related developmental regulator 1	1.95
ENSBTAT00000029790	TBC1D9	TBC1 domain family, member 9 (with GRAM domain)	1.94
ENSBTAT00000008135	IRAK2	interleukin-1 receptor-associated kinase 2	1.85
ENSBTAT00000013959	PROK1	prokineticin 1	1.85
ENSBTAT00000004034	SMTN	smoothelin	1.82
ENSBTAT00000063461	KRTAP12-2	keratin-associated protein 12-2	1.81

表 3-B *M. bovis* 刺激下における好中球の網羅的遺伝子発現解析において有意差が認められた遺伝子

Ensembl Transcript ID	Gene Name	Description	log(FC)
ENSBTAT0000006709	TMEM2	transmembrane protein 2	1.73
ENSBTAT00000056271	RIN2	Ras and Rab interactor 2	1.68
ENSBTAT00000019242	AKAP2	A kinase (PRKA) anchor protein 2	1.60
ENSBTAT00000011866	UPK1B	uropod protein 1B	1.60
ENSBTAT00000007454	NEU1	sialidase 1 (lysosomal sialidase)	1.51
ENSBTAT00000010787	PRKCSH	protein kinase C substrate 80K-H	1.48
ENSBTAT00000021808	OPTN	optineurin	1.44
ENSBTAT00000004288	TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	1.42
ENSBTAT00000045223	TMEM251	transmembrane protein 251	1.42
ENSBTAT00000010532	FLCN	folliculin	1.40
ENSBTAT00000018010	LGALS8	lectin, galactoside-binding, soluble, 8	1.38
ENSBTAT00000013983	MAP2K3	mitogen-activated protein kinase kinase 3	1.37
ENSBTAT00000006419	MTHFD2	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	1.36
ENSBTAT00000030667	ABHD5	abhydrolase domain containing 5	1.35
ENSBTAT00000015794	RRAS2	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2	1.33
ENSBTAT00000016760	B4GALT5	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 5	1.31
ENSBTAT00000001785	USP38	ubiquitin specific peptidase 38	1.27
ENSBTAT00000017614	SLC3A2	solute carrier family 3 (amino acid transporter heavy chain), member 2	1.21
ENSBTAT00000052423	LMNB1	lamin B1	1.20
ENSBTAT00000004751	PRDX1	peroxiredoxin 1	1.16
ENSBTAT00000018753	WDR77	WD repeat domain 77	1.16
ENSBTAT00000012886	GPD2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)	1.16
ENSBTAT00000050220	BIRC2	baculoviral IAP repeat containing 2	1.16
ENSBTAT00000056382	CRTC2	CREB regulated transcription coactivator 2	1.15
ENSBTAT00000066124	PTBP1	polypyrimidine tract binding protein 1	1.12
ENSBTAT00000019774	GPN2	GPN-loop GTPase 2	1.08
ENSBTAT00000047899	RBPM5	RNA binding protein with multiple splicing	1.08
ENSBTAT00000044257	TUBB2B	tubulin beta 2B class IIB	1.07

表 3-C *M. bovis* 刺激下における好中球の網羅的遺伝子発現解析において有意差が認められた遺伝子

Ensembl Transcript ID	Gene Name	Description	log(FC)
ENSBTAT00000015041	ZC3H12A	zinc finger CCCH-type containing 12A	1.07
ENSBTAT00000064114	ACSL5	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5	1.02
ENSBTAT00000027224	PAF1	Paf1, RNA polymerase II associated factor, homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	1.02
ENSBTAT00000006773	LPGAT1	lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1	1.02
ENSBTAT00000025580	USP14	ubiquitin specific peptidase 14 (tRNA-guanine transglycosylase)	1.02

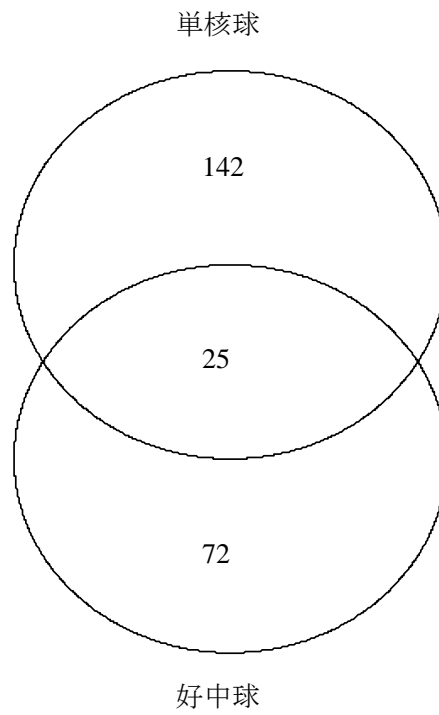


図2 *M. bovis* 刺激下における単核球および好中球の網羅的遺伝子発現解析で有意差が認められた遺伝子数のベン図

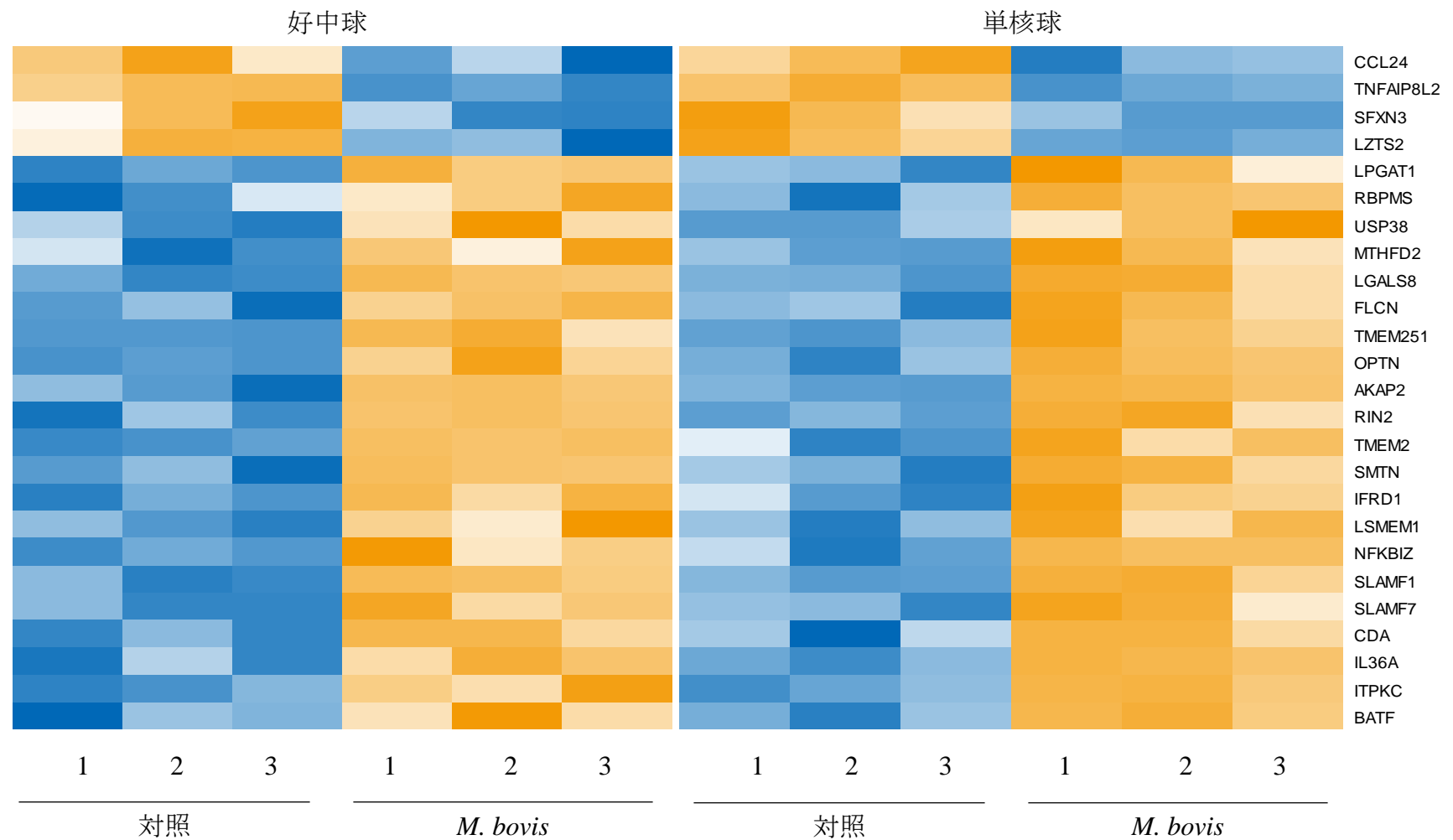


図3 *M. bovis* 刺激下における単核球および好中球の網羅的遺伝子発現解析で有意差が認められた共通遺伝子のヒートマップ解析

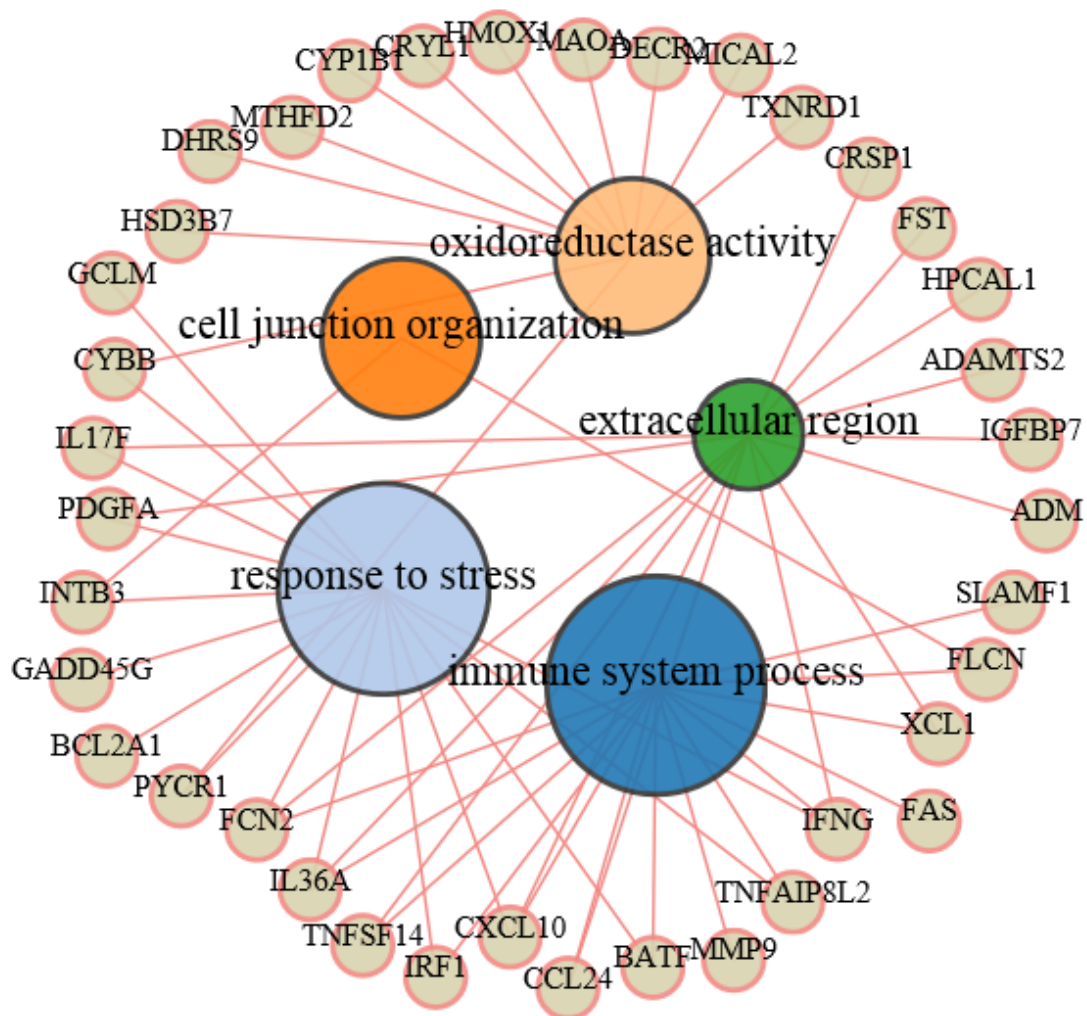


図4 *M. bovis* 刺激下における単核球において有意差が認められた遺伝子の遺伝子オントロジーエンリッチメント解析

表 4 *M. bovis* 刺激下における単核球において有意差が認められた遺伝子の遺伝子オントロジーエンリッチメント解析

Description	P-Value	Corrected P-Value
immune system process	8.16E-06	0.00115902
response to stress	0.0014402	0.204508
cell junction organization	0.0114984	1
oxidoreductase activity	0.0122468	1
extracellular region	0.0210089	1
cellular amino acid metabolic process	0.0350541	1
lysosome	0.0395078	1
cell adhesion	0.0401127	1
cell motility	0.0441828	1

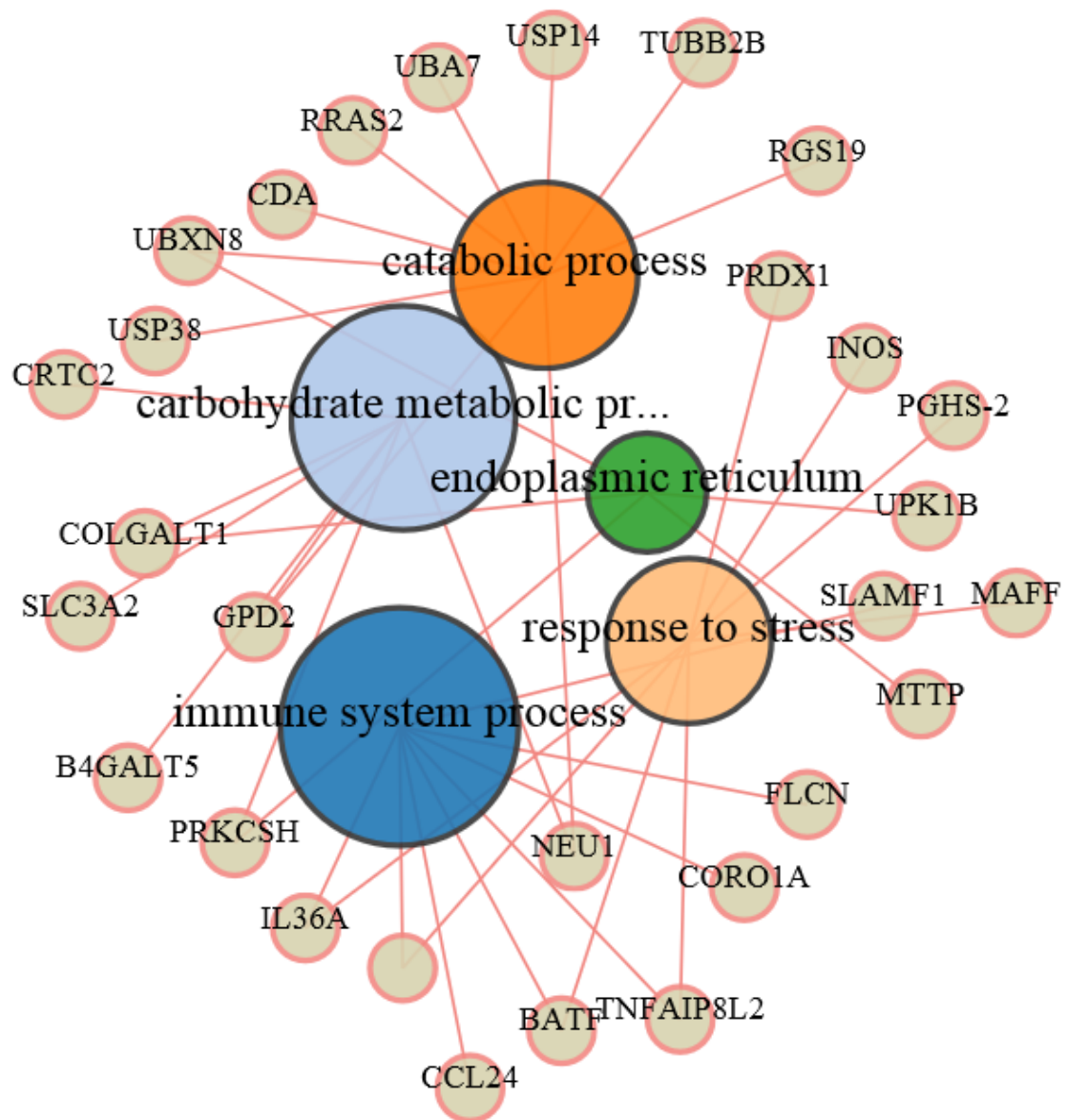


図5 *M. bovis* 刺激下における好中球において有意差が認められた遺伝子の遺伝子オントロジーエンリッチメント解析

表 5 *M. bovis* 刺激下における好中球において有意差が認められた遺伝子の遺伝子オントロジーエンリッチメント解析

Description	P-Value	Corrected P-Value
immune system process	5.68E-04	0.0806246
carbohydrate metabolic process	4.49E-03	0.637681
catabolic process	0.0152978	1
response to stress	0.0212556	1
endoplasmic reticulum	0.0342777	1
cytoplasm	0.0359709	1
locomotion	0.0372123	1
embryo development	0.0428116	1

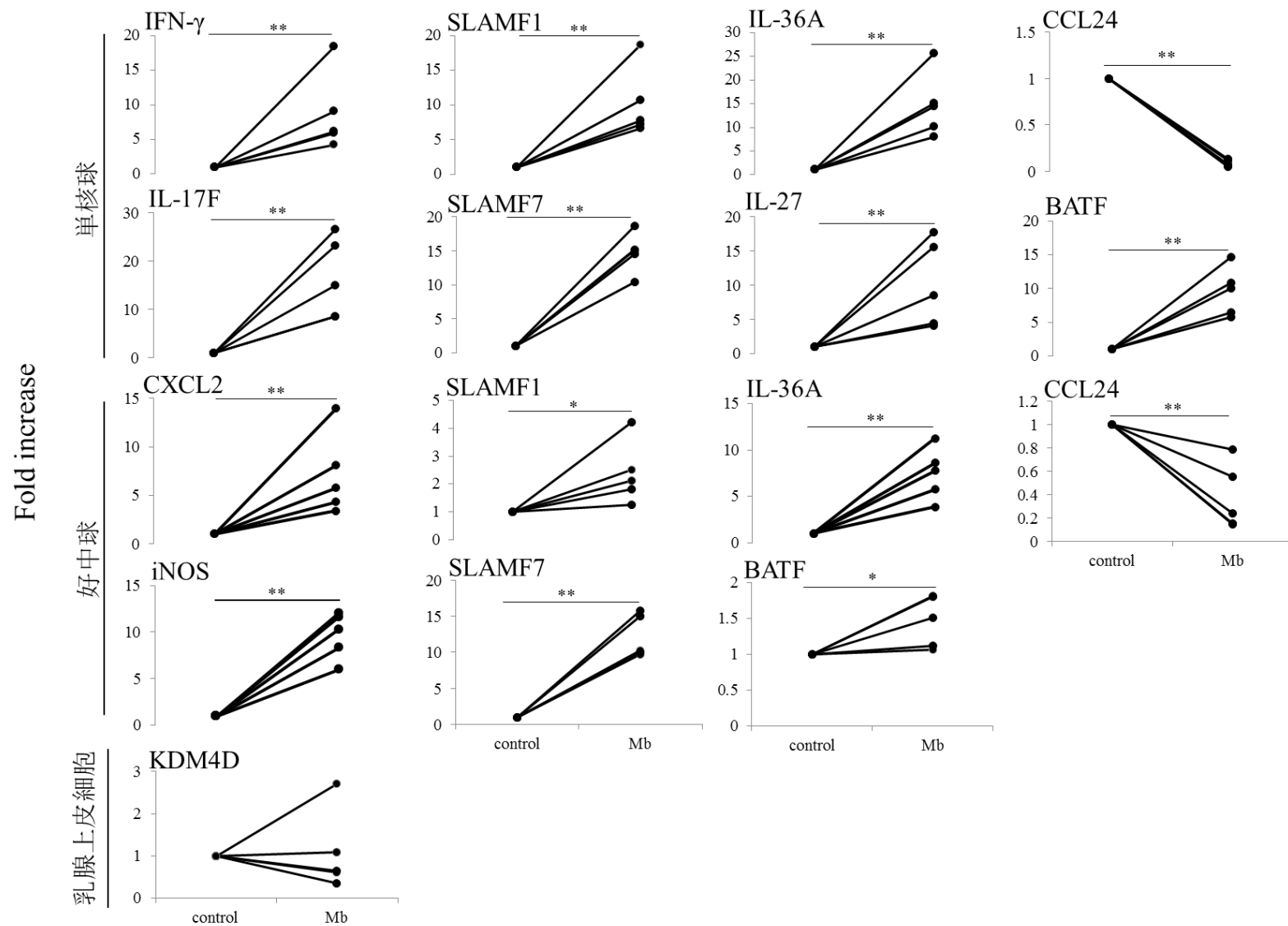


図6 リアルタイム PCR による網羅的遺伝子発現解析の検証および定量化 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$)

3) *M. bovis*、*S. aureus* および *E. coli* 刺激下における乳腺上皮細胞サイトカイン mRNA 発現量の比較

M. bovis 刺激下における乳腺上皮細胞のサイトカイン、ケモカイン、抗菌ペプチドおよび Toll like receptors (TLRs) の mRNA 発現量を代表的な乳房炎原因菌種である *S. aureus* および *E. coli* 刺激と比較した (図 7)。 *M. bovis* の死菌

(MOI 1000) 刺激下における乳腺上皮細胞の IL-1 β 、IL-6 および TNF- α は培養 12 時間後で有意な ($p < 0.01$) 増加を示した (図 7-A)。一方、*S. aureus* 刺激は *M. bovis* と同様に、時間依存的な増加傾向を示し、生菌刺激では培養 24 時間後で IL-1 β (MOI 10)、IL-6 (MOI 1000) および TNF α (MOI 1000) の mRNA 発現量が有意な ($p < 0.01$) 増加を示した。また、*E. coli* では *M. bovis* 刺激と同様に刺激後 12 時間で有意差が認められたが、MOI 10 刺激においても有意な増加を示した (IL-1 β : 生菌 ; $p < 0.01$ 、死菌 ; $p < 0.05$ 、IL-6 : 生菌 ; $p < 0.01$)。IL-8 の mRNA 発現量は *M. bovis* では対照と比較して有意差を認めなかったが、生菌刺激は時間依存的に増加する傾向が認められた。*S. aureus* の生菌 (MOI 1000) では *M. bovis* と同様に時間依存的に増加する傾向が認められ、刺激後 24 時間で有意 ($p < 0.05$) に増加した。しかし、*E. coli* では刺激後 12 時間でピークを示し (生菌を MOI 10 で刺激 ; $p < 0.01$ 、MOI 100 ; $p < 0.05$ 、死菌を MOI 1000 で刺激 ; $p < 0.05$)、24 時間で (死菌を MOI 1000 で刺激 ; $p < 0.05$) 刺激から 6 時間の値と同程度の値まで推移した (図 7-B)。抗菌ペプチドである Lactoferrin (Lf) および β -defensin に関して、*M. bovis* 刺激では Lf および β -

defensin の mRNA 発現量は対照と比較して変化を認めなかったが、*S. aureus* 刺激および *E. coli* 刺激は時間依存的にそれらは増加する傾向が認められた（図 7-C）。*M. bovis* の死菌を MOI 1000 で刺激したところ、6 時間後に TLR2 の mRNA 発現量に有意な ($p < 0.05$) 増加を認め、生菌刺激では時間依存的に増加する傾向が認められた。*S. aureus* 生菌での刺激では、*M. bovis* と類似した推移を示し、24 時間で有意な ($p < 0.05$) 増加を示した。一方、*E. coli* では 6 時間（生菌または死菌（MOI 10 または 100）刺激； $p < 0.01$ ）および 12 時間（生菌（MOI 10 または 100）刺激； $p < 0.05$ 、死菌刺激（MOI 1000； $p < 0.01$ 、MOI 100； $p < 0.05$ ））で高値を示し、24 時間で減少する傾向が認められた（図 7-D）。*M. bovis* の死菌を MOI 1000 で刺激したところ、12 時間後に TLR4 の mRNA 発現量に有意な ($p < 0.05$) 増加が認められた。一方、*S. aureus* の死菌刺激では有意差を認めなかったが、*M. bovis* と類似した発現量の推移を示した。また、*E. coli* の死菌では、刺激後 6 時間で TLR4 の mRNA 発現量は有意な（MOI 10； $p < 0.05$ 、MOI 100； $p < 0.01$ ）増加を示し、12 時間でも有意な（MOI 100； $p < 0.05$ 、MOI 1000； $p < 0.01$ ）増加を示した。

4) *M. bovis*、*S. aureus* および *E. coli* 刺激下における単核球サイトカイン mRNA 発現量の比較

単核球のサイトカイン mRNA 発現量は *M. bovis* の生菌または死菌で（MOI 10、100 および 1000）刺激し培養後 6、12 および 24 時間で評価した（図 8-A

から C)。また *M. bovis* との比較のために、*S. aureus* および *E. coli* が単核球のサイトカイン mRNA 発現量に及ぼす影響についても同様に評価した。*M. bovis*、*S. aureus* および *E. coli* の生菌刺激下における単核球サイトカイン mRNA 発現量はそれぞれの死菌刺激と比較して増加傾向を示した。*M. bovis* 生菌を MOI 1000 で刺激したところ、6 時間で TNF- α の mRNA 発現量は有意な ($p < 0.05$) 増加を示したのに対し、*S. aureus* および *E. coli* 刺激においては MOI 10 で有意な ($p < 0.01$ 、 $p < 0.05$) 増加を示した。IFN- γ の mRNA 発現量について、*M. bovis* の生菌を MOI 1000 で刺激したところ、6 および 24 時間で有意に ($p < 0.05$) 増加したが、*S. aureus* では MOI 10 の刺激で有意差 (生菌刺激で 6 時間 ; $p < 0.01$) を認めた。IL-12 の mRNA 発現量は *M. bovis* の生菌を MOI 1000 で刺激したところ 6 時間で有意に ($p < 0.01$) 増加し、12 時間まで高値を維持し、24 時間においても対照よりも高値であった。一方、*S. aureus* の生菌では、MOI 10、100 および 1000 で有意な (MOI 10 で刺激後 6 時間 ; $p < 0.01$ 、MOI 100 ; $p < 0.01$ 、MOI 1000 で刺激後 24 時間 ; $p < 0.05$) 増加を認めた。また、*E. coli* の生菌では MOI 10 において、6 時間で有意な ($p < 0.01$) 増加を認め、MOI 1000 でも 24 時間で有意な ($p < 0.01$) 増加が認められた。IL-1 β および IL-18 の mRNA 発現量は *M. bovis* の生菌を MOI 100 で刺激したところ 6 時間後に有意な ($p < 0.05$) 増加を示した。一方、*S. aureus* の生菌では MOI 1000 で刺激すると培養後 12 時間において IL-18 の mRNA 発現量は有意に ($p < 0.01$) 増加した。IL-2 の mRNA 発現量は *M. bovis* の生菌を MOI 10 で刺

激したところ 24 時間後に有意な ($p < 0.01$) 増加を認め、*S. aureus* では刺激後 12 および 24 時間において有意な ($p < 0.01$) 増加を認めた。IL-6 の mRNA 発現量は *M. bovis* の生菌 (MOI 10) 刺激後、6 時間で有意な ($p < 0.01$) 増加を認めたが、*S. aureus* および *E. coli* 刺激では有意差は認められなかった。

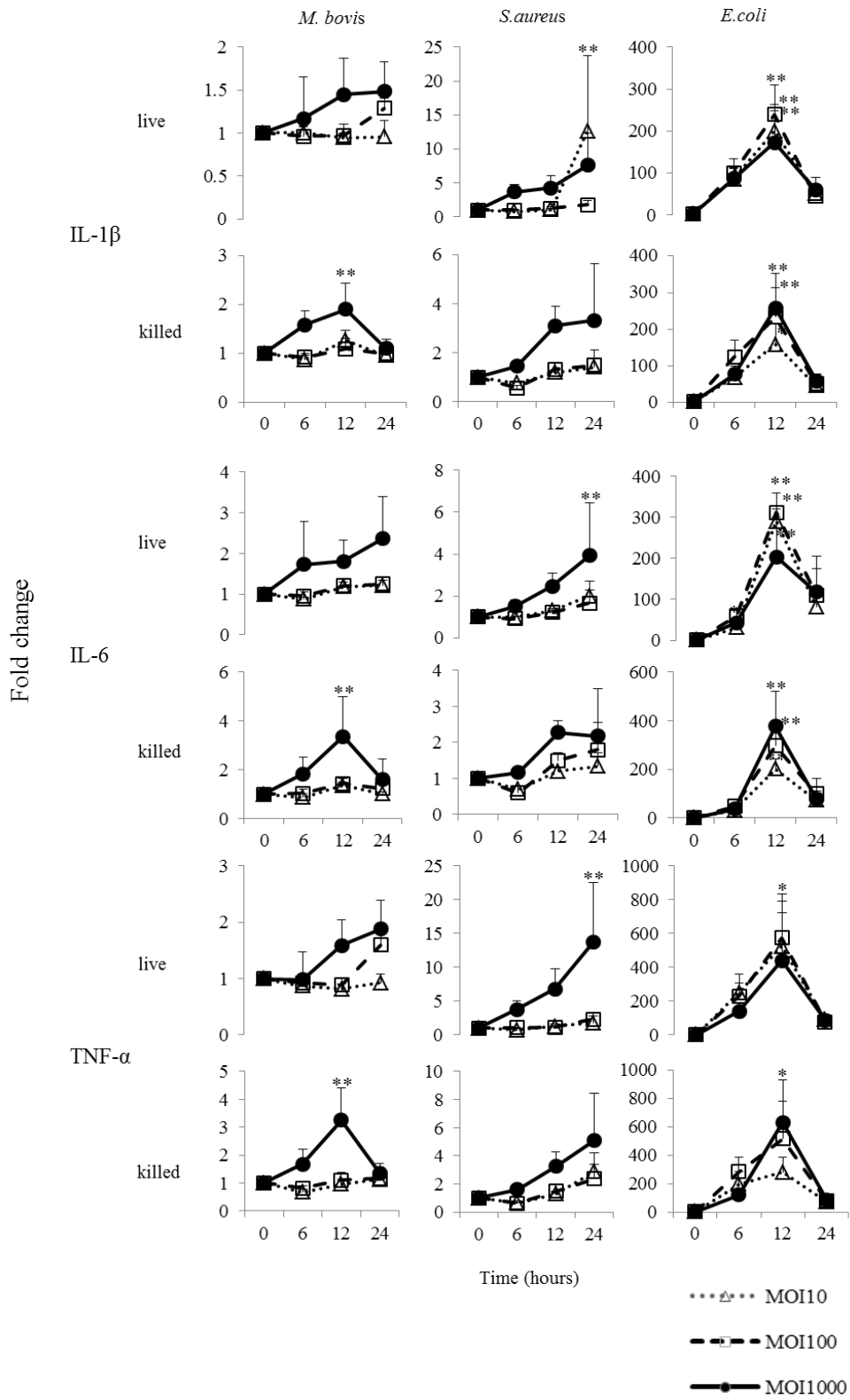


図 7-A *M. bovis*、*S. aureus* および *E. coli* 刺激下における乳腺上皮細胞の炎症性サイトカイン mRNA 発現量 (N=5、mean \pm SE、* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$)

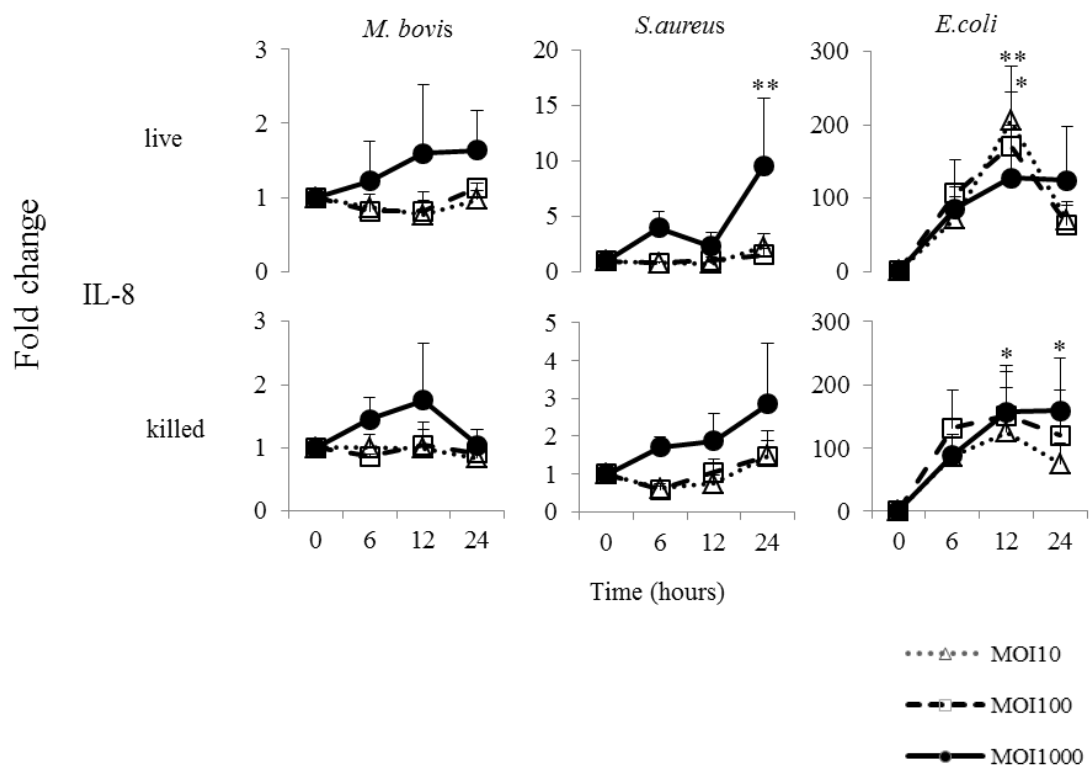


図 7-B *M. bovis*、*S. aureus* および *E. coli* 刺激下における乳腺上皮細胞 IL-8 の mRNA 発現量 (N=5、mean ± SE、* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$)

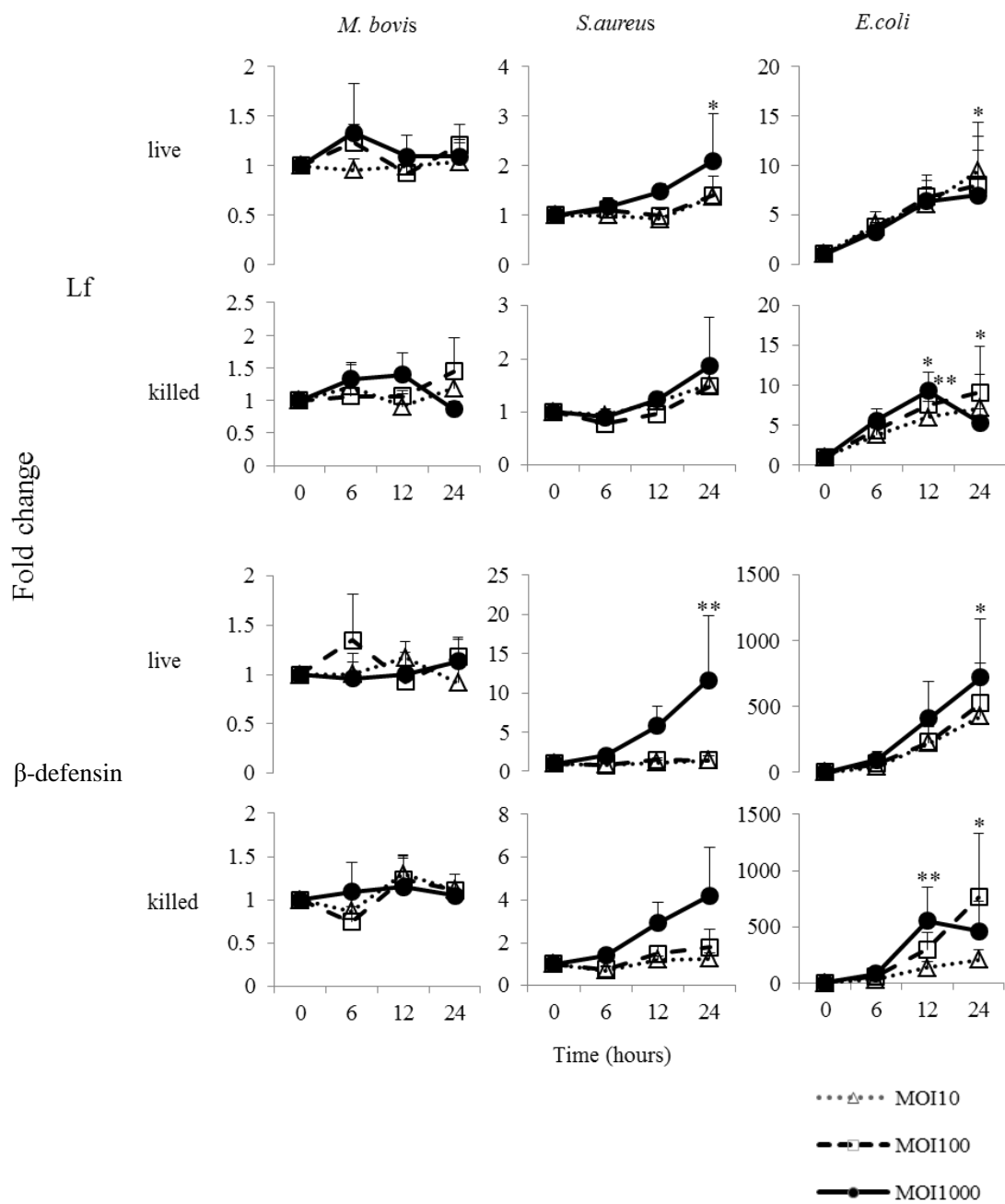


図 7-C *M. bovis*、*S. aureus* および *E. coli* 刺激下における乳腺上皮細胞の抗菌ペプチド mRNA 発現量 (N=5、mean \pm SE、* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$)

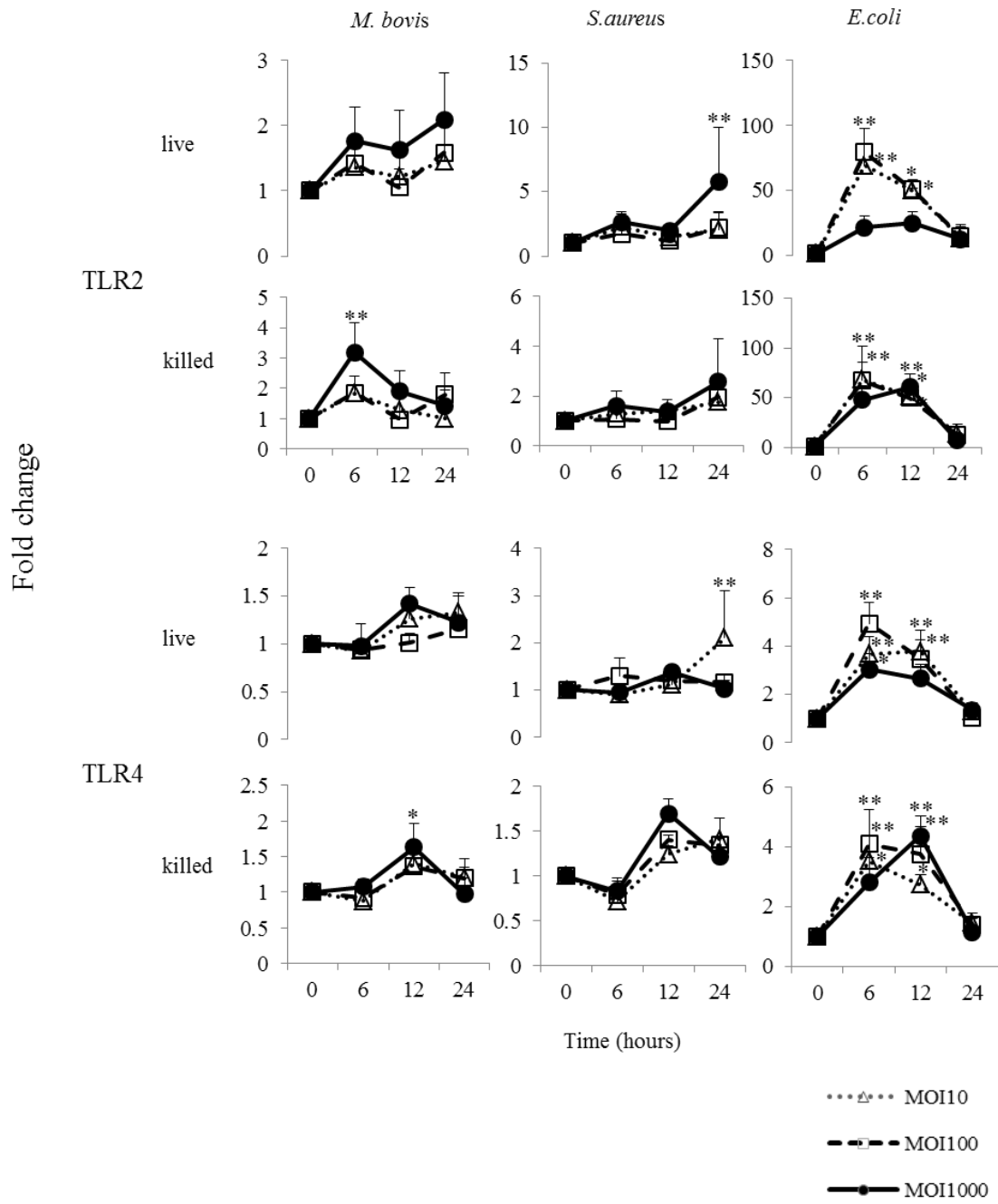


図 7-D *M. bovis*、*S. aureus* および *E. coli* 刺激における乳腺上皮細胞 TLRs の mRNA 発現量 (N=5、mean ± SE、* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$)

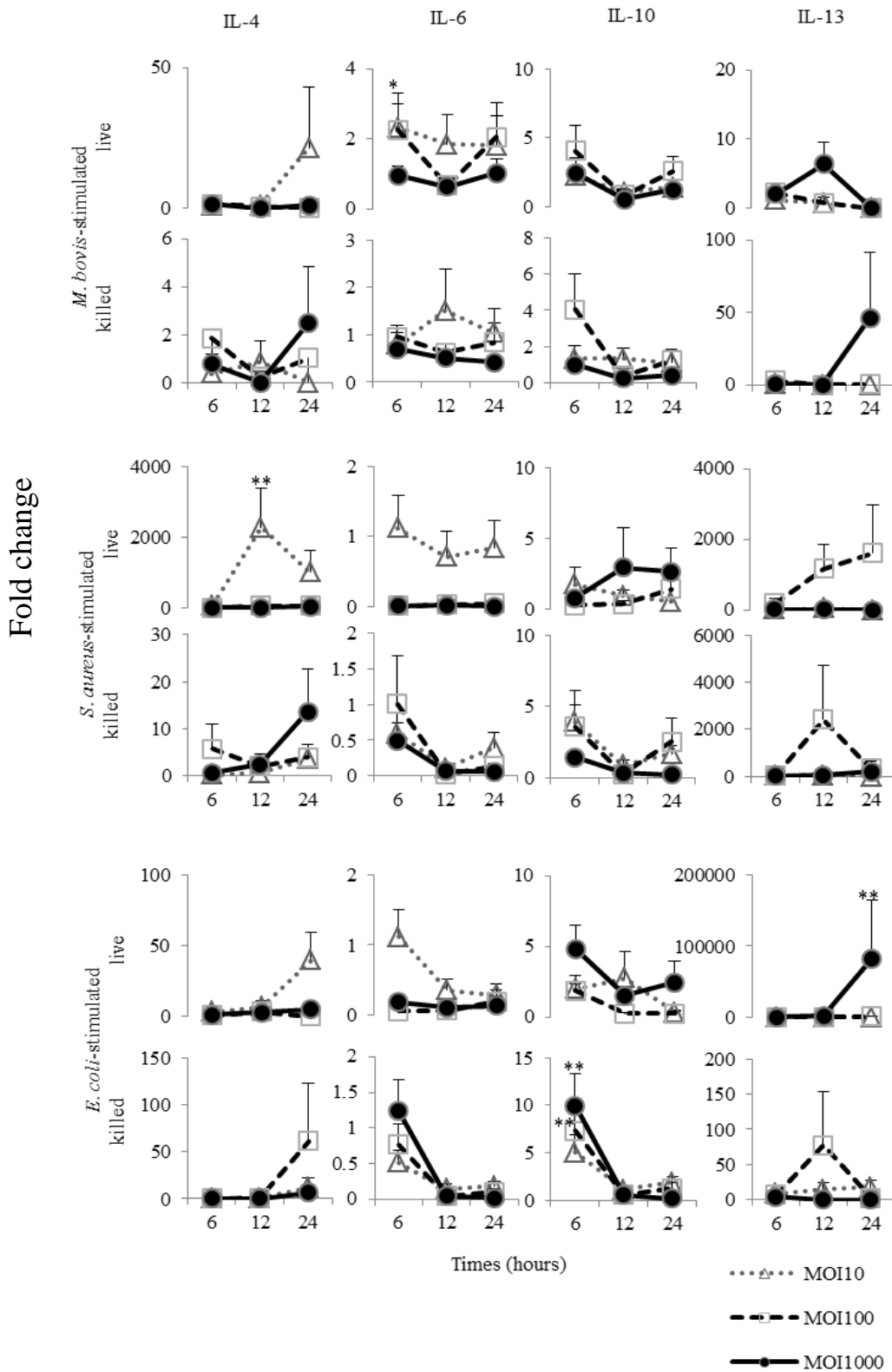


図 8-A *M. bovis*、*S. aureus* および *E. coli* 刺激下における単核球のサイトカイン mRNA 発現量 (N=5、mean ± SE、* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$)

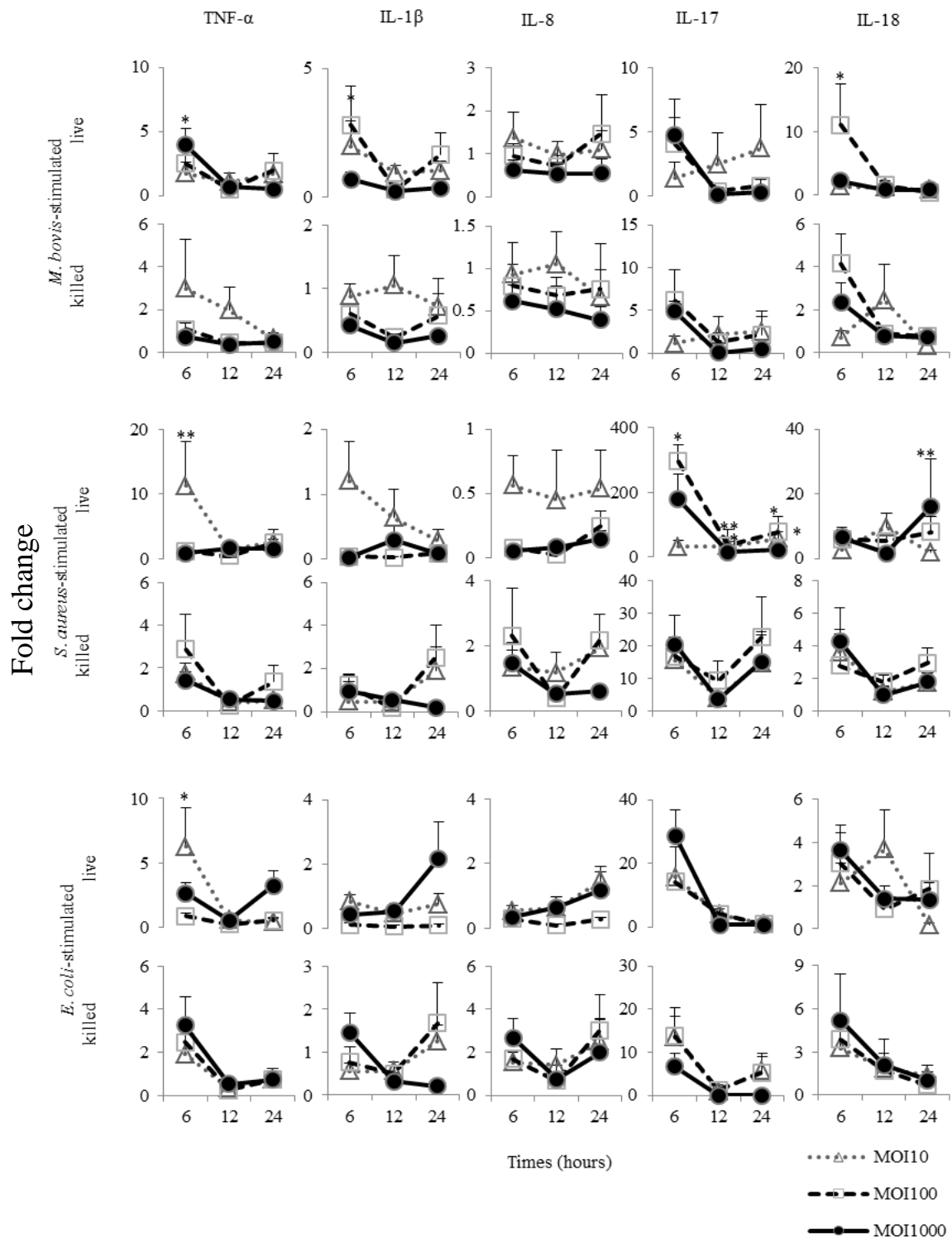


図8-B *M. bovis*, *S. aureus* および *E. coli* 刺激下における単核球のサイトカイン mRNA 発現量 (N=5、mean \pm SE、* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$)

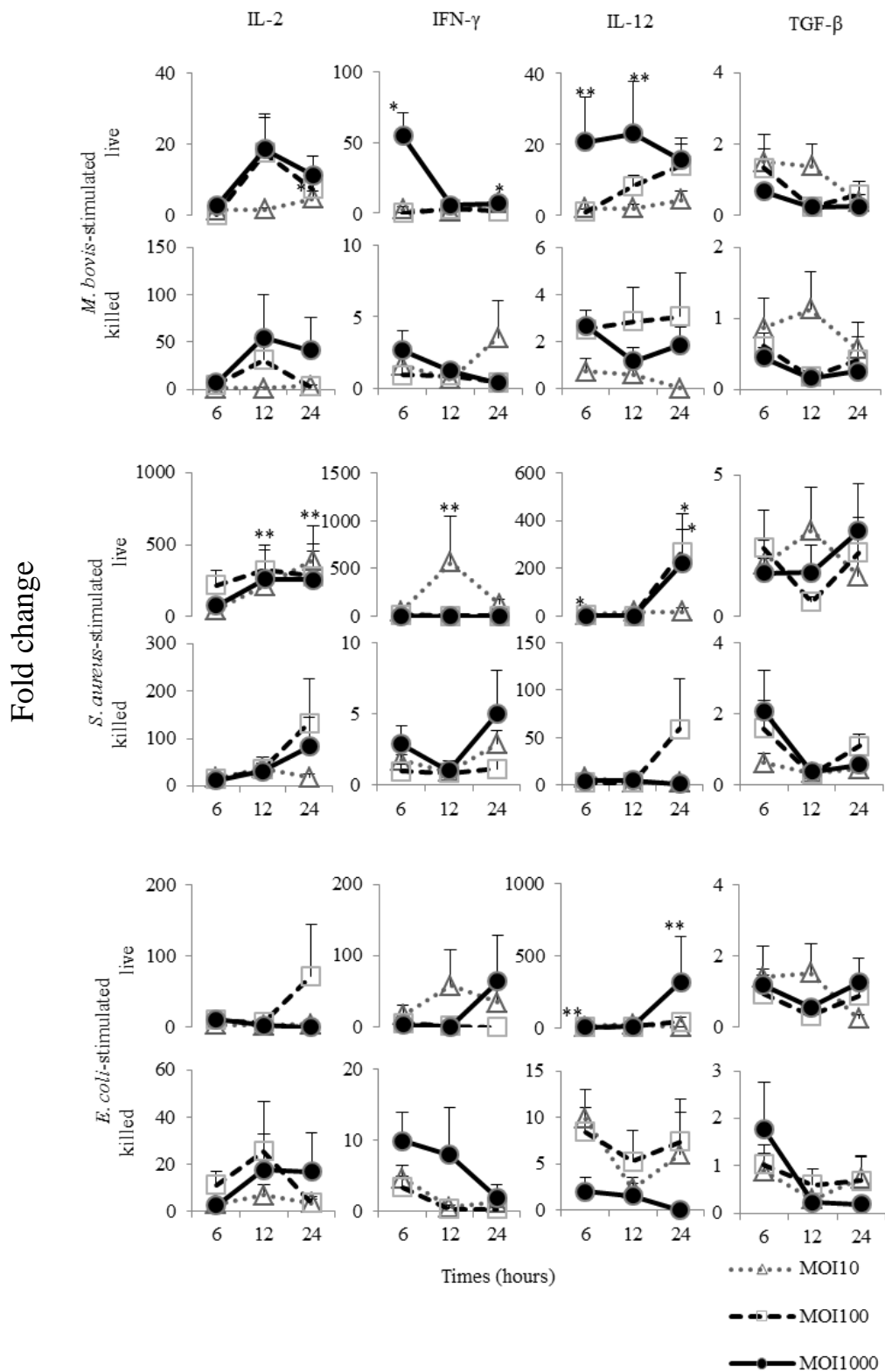


図 8-C *M. bovis*, *S. aureus* および *E. coli* 刺激下における単核球のサイトカイン mRNA 発現量 (N=5、mean \pm SE、* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$)

4. 考察

M. bovis が免疫担当細胞および乳腺上皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響を解明する目的で、本研究では網羅的遺伝子発現解析およびリアルタイム PCR を用いたサイトカイン mRNA 発現量の定量を試みた。

単核球においては、IFN- γ 、IL-27 および IL-17F などの Th1 および Th17 サイトカインの他、SLAMF1、SLAMF7 および BATF など免疫応答抑制に関連する遺伝子発現量も増加することが明らかとなった。IL-27 は Th17 細胞の分化を抑制させる一方、Th1 細胞の分化を促進させる[28]。IFN- γ は細胞性免疫を活性化させる主要なサイトカインの一つである[54]。一方で、SLAMF1 は IL-12 の発現量を抑制し、IFN- γ 産生も抑制させることが報告されている[59]。同様に SLAMF7 も免疫応答に抑制的な作用を有し、活性化単球による炎症性サイトカイン産生を抑制させることが報告されている[31]。BATF は Programmed cell death protein 1 (PD-1) の発現量を増加させ、T 細胞の細胞増殖を抑制させる作用を有する[51]。*M. bovis* はリンパ球の増殖を抑制させることが報告されており[74]、これらの免疫応答抑制に関連する遺伝子発現の増加が、*M. bovis* による免疫応答抑制機構に関与している可能性が示唆された。

好中球では *M. bovis* により iNOS、IL-36A および CXCL2 や、炎症性サイトカインの mRNA 発現量が増加することが明らかとなった。iNOS は NO を産生することで抗菌活性を発現し、また Neutrophil extracellular traps 形成にも関与することが報告されている[47]。CXCL2 は抗菌活性を持ち[79]、好中球の活性

化（プライミング）に關与するケモカインである[76]。

M. bovis 刺激にともなう単核球および好中球の網羅的遺伝子発現解析結果から、単核球および好中球共通の免疫応答に關連する遺伝子発現が認められ、IL-36A の mRNA 発現量が増加することが明らかとなった。IL-36A は IL-1 ファミリーに屬し IL-1F6 としても知られており、NF- κ B および MAPK シグナル経路を活性化させて炎症を誘導する[69]。また、CCL24 の遺伝子発現も共通して減少したが、この遺伝子は単核球および活性化 T リンパ球を抑制させるとともに強力な血球分化抑制作用を有することが知られている[48]。遺伝子オントロジーエンリッチメント解析においても、免疫に關わる応答が最も高い数値を示し、*M. bovis* に対する活発な免疫応答性が認められた。一方で SLAMF1、SLAMF7 および BATF の遺伝子発現量も共通して増加しており、*M. bovis* は免疫応答抑制にも關連している可能性が考えられた。

乳腺上皮細胞において、刺激後 6 時間で KDM4D の有意な発現量の低下を認めた。KDM4D は脱メチル化酵素の一つとして知られており、この酵素の働きとして、NF κ B 近傍の遺伝子を脱メチル化させることにより炎症性サイトカインの発現量が増加することが報告されている[81]。このことは、KDM4D が減少することでサイトカインの発現量が抑制されることを示唆している。このことから *M. bovis* の生菌は免疫応答を抑制する機構を有する可能性が考えられた。*M. bovis* の生菌での刺激で乳腺上皮細胞の炎症性サイトカイン mRNA 発現量の増加が認められるとの報告もあり[80]、本研究においては *M. bovis* 刺激下

におけるウシ乳腺上皮細胞の炎症性サイトカイン mRNA 発現量は、有意差は認められなかったものの、生菌刺激で時間依存的に増加傾向を示した。このことは *M. bovis* は免疫応答を抑制するのみならず、促進させる働きを持つことを示唆している。

乳腺上皮細胞の mRNA 発現量は、*M. bovis* と *S. aureus* 刺激で類似していることが明らかとなった。マイコプラズマ性乳房炎の臨床症状は *E. coli* による乳房炎と異なり、*S. aureus* による乳房炎のそれに類似しているとみられているが [12, 66]、本研究の結果はそれと一致するものであった。*M. bovis* 刺激にともなう単核球における IFN- γ 、IL-12 および TNF- α の mRNA 発現量について、MOI 10 および MOI 100 刺激では発現量に変化が認められなかったが MOI 1000 刺激で有意に増加することを認めた。一方、*S. aureus* および *E. coli* 刺激では MOI 10 および MOI 100 刺激でこれらのサイトカイン発現量は有意に増加したことから、*M. bovis* による単核球の免疫応答が引き起こされるためには、他の菌種よりも高い MOI 比での刺激が必要であることが明らかとなった。

5. 小括

M. bovis 刺激下におけるウシ免疫担当細胞および乳腺上皮細胞の網羅的遺伝子発現解析を小括すると以下のとおりである。

- 1) *M. bovis* 刺激により単核球では IFN- γ 、IL-17F、IL-27 および IL-36A などの Th1 または Th17 免疫応答に関連する mRNA 発現量の増加を示し、好中球では iNOS、CXCL2 および IL-36A など抗菌活性に関連する mRNA 発現および炎症性サイトカイン mRNA 発現量の増加が認められた。
- 2) *M. bovis* 刺激下における単核球および好中球に共通した遺伝子発現に関して、免疫応答抑制に関与する BATF、SLAMF1 および SLAMF7 の mRNA 発現量の増加が認められた。
- 3) *M. bovis* 刺激下における乳腺上皮細胞は、免疫応答を促進させる KDM4D の mRNA 発現量を減少傾向にさせることが明らかとなった。
- 4) *M. bovis* 刺激下における乳腺上皮細胞の免疫に関連する mRNA 発現量は *E. coli* とは異なる応答を示し、*S. aureus* に類似することが明らかとなった。また、*M. bovis* 刺激下における単核球のサイトカイン mRNA 発現は MOI の増加により誘導されることが明らかとなった。

第 II 章 *M. bovis* 刺激がウシ免疫担当細胞の機能発現に及ぼす影響

1. 序文

M. bovis は乳房炎を引き起こす原因菌種であり、その臨床症状として顕著な乳汁中体細胞数の増加が認められる[52]。マイコプラズマ性乳房炎では感染部位において、好中球の顕著な浸潤が認められるが、*M. bovis* は殺菌されることなく長期間生存し[30]、壊死領域に *M. bovis* の生存が確認される[32]。

近年、好中球における自然免疫応答の一つとして Neutrophil extracellular traps (NETs) 形成が注目されている。NETs は、好中球が自身の核酸を抗菌活性物質とともに細胞外へ放出することで、網目状の核酸により病原体を物理的に絡め取り、排除するものと考えられている[10]。NETs はサイトカインまたは細菌、ウイルス、真菌および寄生虫により誘導されることが報告されているが[26]、NETs に抵抗性を示す微生物の存在も証明されている[68]。しかし、*M. bovis* が NETs の形成やその消去に及ぼす影響については不明である。

単核球のサイトカイン産生について、*M. bovis* 刺激下では T 細胞、NK 細胞および $\gamma\delta$ T 細胞の IFN- γ 産生は増加することが報告されている[71]。一方、単核球について、*M. bovis* 刺激に伴う TNF- α および IFN- γ の産生増加は認められないが、IL-10 産生の増加を示すことが報告されている[42]。しかし、*M. bovis* の宿主細胞に対する機能制御への関与についての詳細は明らかにされていない。

本章では、*M. bovis* が好中球の NO 産生能および Neutrophil extracellular traps 形成に及ぼす影響を評価するとともに、単核球のサイトカイン産生量および細

胞増殖能に及ぼす影響を検討した。

2. 材料と方法

1) 単核球および好中球

第 I 章-2-1) の方法に準拠して行った。

2) NETs の形態的評価

好中球 (1×10^6 cells) を 10%FBS 加 RPMI1640 培養液 (100 μ l) に浮遊させ、0.001% ポリ L リジンコートのカバーガラス (Matsunami glass、東京) 上に播種し、直径 35mm のシャーレの中に静置した。好中球は 37°C5%CO₂ 条件下で 1 時間培養し、ローダミン (octadecyl rhodamine B chloride、Sigma Aldrich、米国) で染色した *M. bovis* (10^7 CFU)、Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA; Merck Millipore、米国) (最終濃度 100 nM)、Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (最終濃度 5 mM) を処置し、37°C5%CO₂ 下で 3 時間培養した。その後、好中球を PBS で洗浄し、核酸染色試薬として 4,6-diamidino-2-phenylindole, dilactate (DAPI) で処理した。PBS で洗浄後 Fluoromount (Diagnostic Biosystems、米国) でマウントし共焦点顕微鏡 (Nikon、東京) を使用して観察した。

3) NETs の定量

好中球の NETs 形成は核酸の蛍光強度に基づいて評価した。まず好中球 (5×10^5 cells) に PMA (最終濃度 100 nM) 刺激を 37°C5%CO₂ 条件下で 3 時間行い、その上清を分取した。上清に SYBR green I (Toyobo、東京) および ①*M.*

M. bovis (5×10^4 、 5×10^5 、 5×10^6 および 5×10^7 CFU) または② *M. bovis* (5×10^6 CFU) および EDTA (最終濃度 0.005、0.05、0.5 および 5 mM) を加え 30 分 37°C で蛍光強度を MyiQ-icycler (Bio-Rad Laboratories、米国) で測定した。

4) Reactive oxygen species (ROS) の定量

M. bovis 刺激下における好中球の細胞外 ROS 産生を定量するためにルミノール依存性化学発光反応を実施した。ルミノール 10 μ l (最終濃度 10 mM) を好中球 (2×10^5 cells/well) に添加し 37°C 5 分の条件下で前培養し、*M. bovis* 10 μ l (MOI 10、100 または 1000) および PMA (最終濃度 100 μ g/ml) を添加し、化学発光反応は 37°C 30 分間ルミノメーター (ATTO、東京) を用いて測定した。結果は発光強度の積分値で算出した。*M. bovis* 刺激下における好中球の細胞内 ROS 産生を定量するために、好中球 (2×10^5 cells/well) に *M. bovis* (MOI 1000) 10 μ l を添加し 37°C 5% CO₂ 下で、30 分間測定を行った。その後 Muse Oxidative stress kit (Millipore、ドイツ) を用いてプロトコルに従い Muse cell analyzer (Millipore、ドイツ) で測定した。

5) Nitric oxide (NO) 産生の定量およびアポトーシス細胞の検出

M. bovis 刺激下における好中球の NO 産生およびアポトーシス細胞数を評価するために、好中球 (2×10^5 cells/well) に 10 μ l の *M. bovis* (MOI 1000) を添加し 37°C 5% CO₂ 条件下で、1、3 および 6 時間培養を行った。Muse nitric oxide

kit または Muse Annexin V and dead cell kit (Millipore、ドイツ) を用い Muse cell analyzer (Millipore、ドイツ) で測定した。

6) *M. bovis* のヌクレアーゼ活性

M. bovis のヌクレアーゼ活性は 1.5%アガロース電気泳動法を利用して評価した。*M. bovis* (10^9 、 10^8 、 10^7 および 10^6 CFU) は Nuclease reaction buffer (25 mM Tris-HCl、pH 8.8、10 mM CaCl₂、10 mM MgCl₂) 50 μ l 中での 2 本鎖 λ フェージ DNA (New England BioLabs、東京) 500 ng と室温で 5、15 および 30 分インキュベートした。ポジティブまたはネガティブコントロールとして、それぞれ DNase I (1.8unit/ μ l、Takara、滋賀) または DNase free water を添加した。インキュベーション後、サンプル (10 μ l) はローディングバッファーを添加し、アガロースゲル電気泳動法 (100V、30 min) により泳動を実施した。ゲルはエチジウムブロマイド染色後、UV transilluminator により観察した。

7) 好中球の *M. bovis* 殺菌活性に及ぼす影響

好中球を 96 穴プレート (TrueLine、米国) に 5×10^4 cells/well で播種し、37°C 5%CO₂ 条件下で 30 分培養した後、NETs 誘導剤として PMA (最終濃度 100 nM) を添加し 3 時間の培養を行った。好中球には貪食抑制剤として Cytochalasin D (最終濃度 20 μ g/ml、Sigma Aldrich、米国) を添加し 30 分のインキュベーションを行った後、MOI 10 の *M. bovis* を添加し、EDTA (最終濃

度 5 mM) を添加し 30 分間インキュベーションした。溶液はマイコプラズマ用寒天培地に播種され、37°C5%CO₂ 条件下で 1 週間培養しコロニーを計数し生存率は CFU として算出された。

8) *M. bovis* 刺激にともなう単核球の増殖反応試験

単核球の増殖反応に及ぼす *M. bovis* の影響をマイトジェン存在下で評価した。マイトジェンとして concanavalin A (ConA; Wako、大阪) および phytohemagglutinin (PHA; Sigma Aldrich、米国) を用いた。96 穴プレートに単核球を播種 (2×10^5 cells/well) し 37°C5%CO₂ 条件下で培養した。5 μ g の ConA または PHA および *M. bovis* (生菌または死菌) を 72 時間刺激したのち、測定キット (Cell counting kit-8、Dojindo、熊本) を用いて測定した。

9) *M. bovis* 刺激にともなう単核球のサイトカイン産生量

単核球 (4×10^6 cells) は 37°C 5% CO₂ 条件下で *M. bovis* (MOI1000) の生菌または死菌刺激を 24 時間行い、上清を分取し測定まで-70°C で保存した。上清中の IFN- γ 産生量は Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キット (Bovine IFN- γ ELISA reagent kit, Thermo Fisher Scientific、米国) を用いて評価した。さらに、IL-12 産生量についても ELISA キット (ELISA kit for Interleukin 12A (IL12A), Uscn Life science、米国) を用いて測定した。

10) *M. bovis* 刺激にともなう単核球の LDH 誘導

LDH はキット (CytoTox 96 Non-radioactive cytotoxicity assay, Promega、東京) を使用して製品のプロトコルに従い誘導量を定量した。

11) 統計処理

多群検定は Kruskal-Wallis 検定を、多重比較検定は Steel-Dwass 検定を用いて行い、有意水準 5% ($p < 0.05$) 以下、1%以下 ($p < 0.01$) を有意とした。成績は平均値 \pm 標準誤差で示した。

3. 結果

1) *M. bovis* 刺激下におけるウシ好中球のアポトーシス細胞および死細胞の検出

ウシ好中球の Annexin 陽性かつ 7-AAD 陰性（早期アポトーシス）細胞数の割合は、対照の 1 時間（2.54%）と比較して 3（4.36%）および 6 時間（9.92%）で有意に（ $p < 0.05$ ）増加した（図 9）。一方、*M. bovis* 刺激にともなう Annexin 陰性かつ 7-AAD 陽性（アポトーシス以外の細胞死）細胞数の割合は対照の 1 時間（0.20%）と比較して 3 時間（0.96%）および 6 時間（1.52%）で有意に（ $p < 0.05$ ）増加した。Annexin 陰性かつ 7-AAD 陰性（生細胞）細胞の割合は、対照および *M. bovis* 刺激で時間依存的に減少傾向を示したが、有意差は認められなかった。Annexin 陽性かつ 7-AAD 陽性（後期アポトーシスおよびネクローシス）細胞の割合は *M. bovis* 刺激で時間依存的に増加傾向を示したものの有意差は認められなかった。

2) *M. bovis* 刺激下におけるウシ好中球の NO 産生能、化学発光能および細胞内活性酸素産生能

M. bovis 刺激にともなう好中球の NO 産生能は刺激後 1 および 3 時間で対照と比較して有意な（ $p < 0.05$ ）増加を示した（図 10）。*M. bovis* の MOI 10、100 および 1000 刺激におけるウシ好中球の活性酸素産生は対照と比較して有意差は認められなかった（図 11）。PMA 単独刺激におけるウシ好中球の活性酸素産生は未刺激対照に比較して有意に（ $p < 0.05$ ）増加し、同様に PMA および *M.*

bovis との共刺激で対照と比較して有意な ($p < 0.05$) 増加が認められた。一方で、細胞内の活性酸素産生能は *M. bovis* 刺激、PMA 刺激および *M. bovis* および PMA 共刺激で対照と比較して有意な ($p < 0.05$) 増加を示した (図 12)。

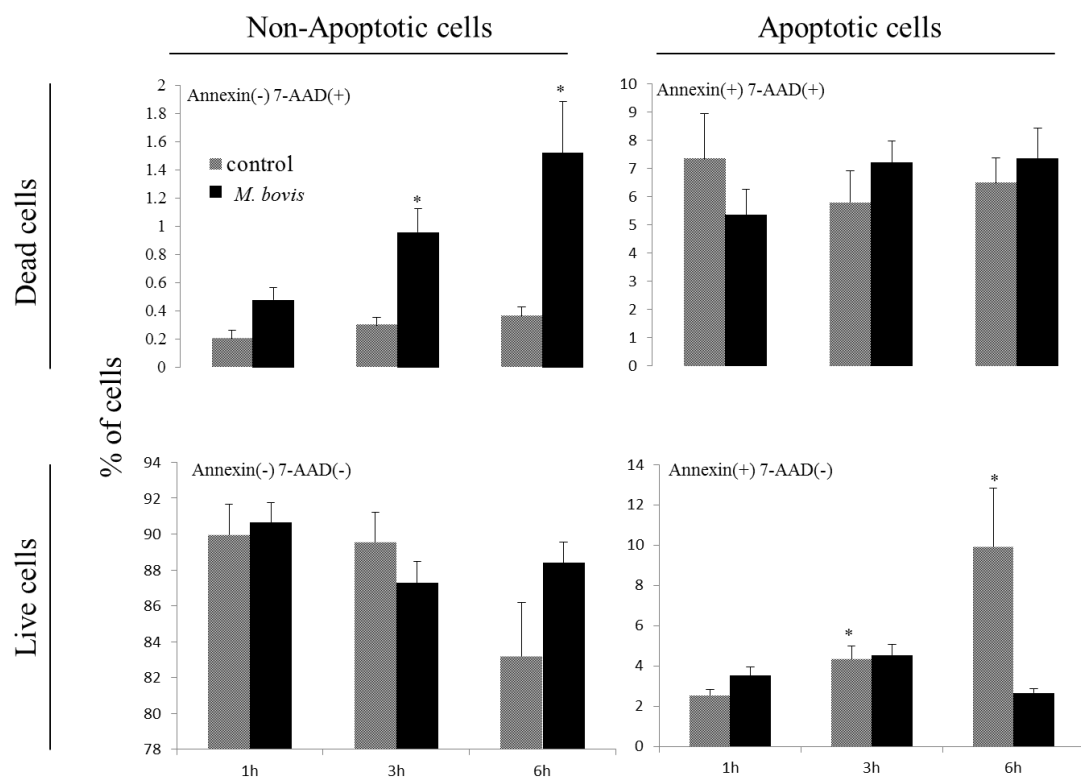


図9 *M. bovis* 刺激にともなう好中球のアポトーシスおよび死細胞の割合 (N=5、mean ± SE、* : $p < 0.05$)

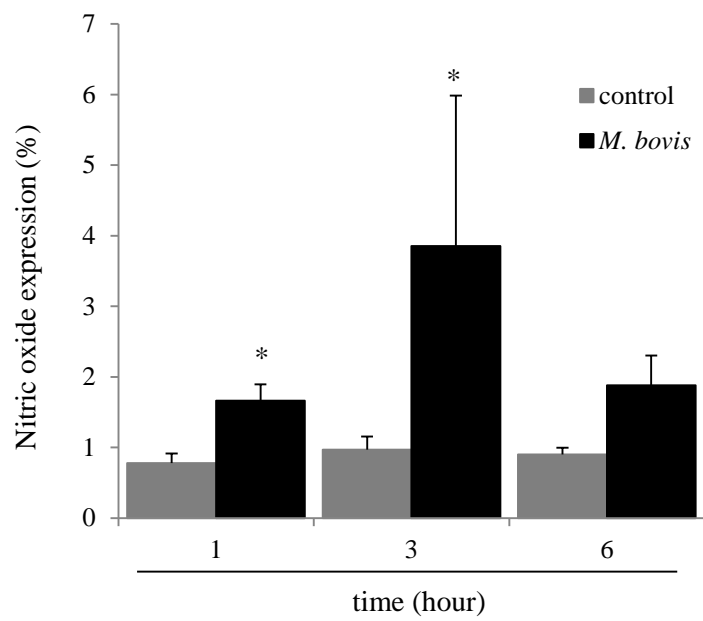


図 10 *M. bovis* 刺激にともなう好中球の NO 産生細胞数の割合
(N=5、mean ± SE、* : $p < 0.05$)

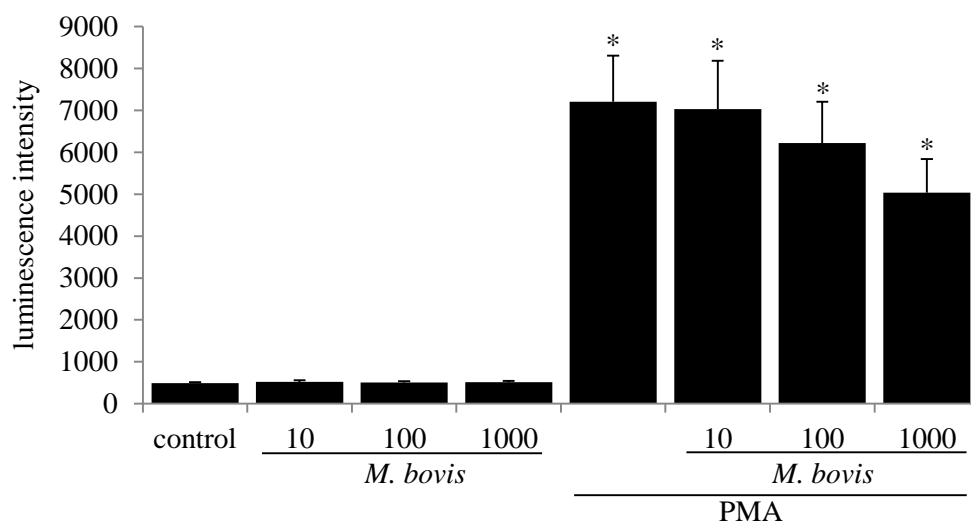


図 11 *M. bovis* 刺激にともなう好中球の細胞外活性酸素産生能
(N=5、mean ± SE、* : $p < 0.05$)

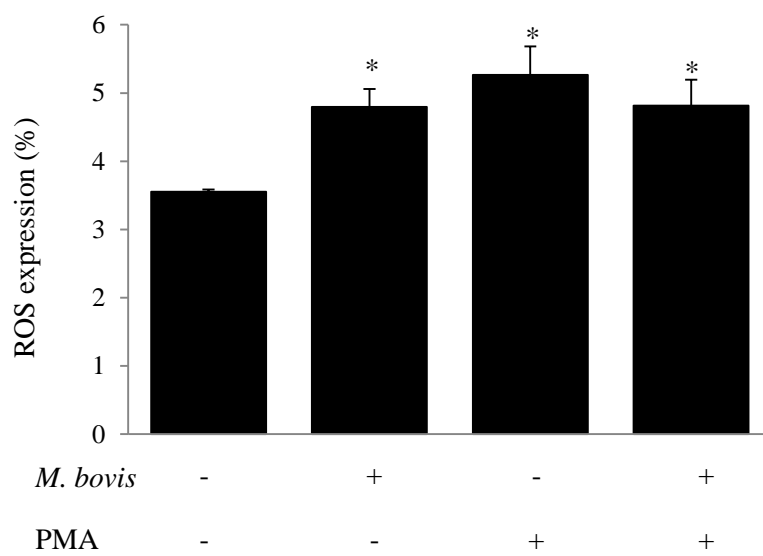


図 12 *M. bovis* 刺激にともなう好中球の細胞内活性酸素産生能
(N=5、mean ± SE、* : $p < 0.05$)

2) *M. bovis* 刺激下におけるウシ好中球の NETs 形成

M. bovis 単独刺激では NETs 形成は認められず (図 13C)、PMA 刺激では NETs 形成が認められたものの (図 13B)、PMA および *M. bovis* 共刺激下では NETs 形成は認められなかった (図 13D)。PMA 刺激後に *M. bovis* を添加すると NETs 形成が認められなかったが (図 14C)、PMA 刺激後に *M. bovis* および EDTA を添加すると NETs 形成が確認された (図 14B)。PMA 刺激後に EDTA を添加しても NETs 形成に影響は認められなかった (図 14A)。

3) *M. bovis* 刺激下における NETs の定量

PMA 刺激下における好中球の培養上清について、核酸蛍光強度を調べたところ、対照、*M. bovis* 単独刺激および *M. bovis* と PMA 共刺激に比較して有意に ($p < 0.05$) 高値を示した (図 15)。*M. bovis* 添加に対する NETs の核酸蛍光強度は時間依存的および菌数依存的減少を示し (図 16)、刺激後 2 分以降 (2.5×10^7 および 2.5×10^8 CFU/ml) および刺激後 4 分以降 (2.5×10^9 CFU/ml) で PMA 単独刺激における培養上清の核酸蛍光強度と比較して有意に ($p < 0.05$) 減少した。*M. bovis* および EDTA 添加に対する NETs の核酸蛍光強度は EDTA 濃度 0.5 および 5mM でそれぞれ NETs 単独の蛍光強度と比較して有意に増加し (それぞれ $p < 0.05$ および $p < 0.01$)、また EDTA 濃度依存的に増加傾向を示した (図 17)。*M. bovis* 単独の添加では時間および菌数に伴う蛍光強度の変化は認められなかった。

4) *M. bovis* ヌクレアーゼ活性の測定

M. bovis (10^9 CFU) 添加にともなう λ フェージ DNA について、インキュベート後 5 分で DNase free 水添加と比較しバンドの濃度が減弱し、15 および 30 分後にバンドは消失した (図 18-1, 5)。*M. bovis* (10^8 CFU) 添加ではインキュベート後 5、15 および 30 分後に DNase free 水添加と比較してバンド濃度の減弱が認められた (図 18-2, 5)。DNase 添加では DNA のバンドは消失した (図 18-6)。

5) NETs 誘導条件下での EDTA 添加下における *M. bovis* 生存率の測定

ウシ好中球に対する PMA および *M. bovis* の共刺激による *M. bovis* の生存率は *M. bovis* 単独刺激と比較して有意な差は認められなかった。ウシ好中球に対して PMA および *M. bovis* 共刺激条件下において EDTA を添加すると、*M. bovis* の生存率は PMA および *M. bovis* 共刺激と比較して有意に ($p < 0.05$) 減少した (図 19)。

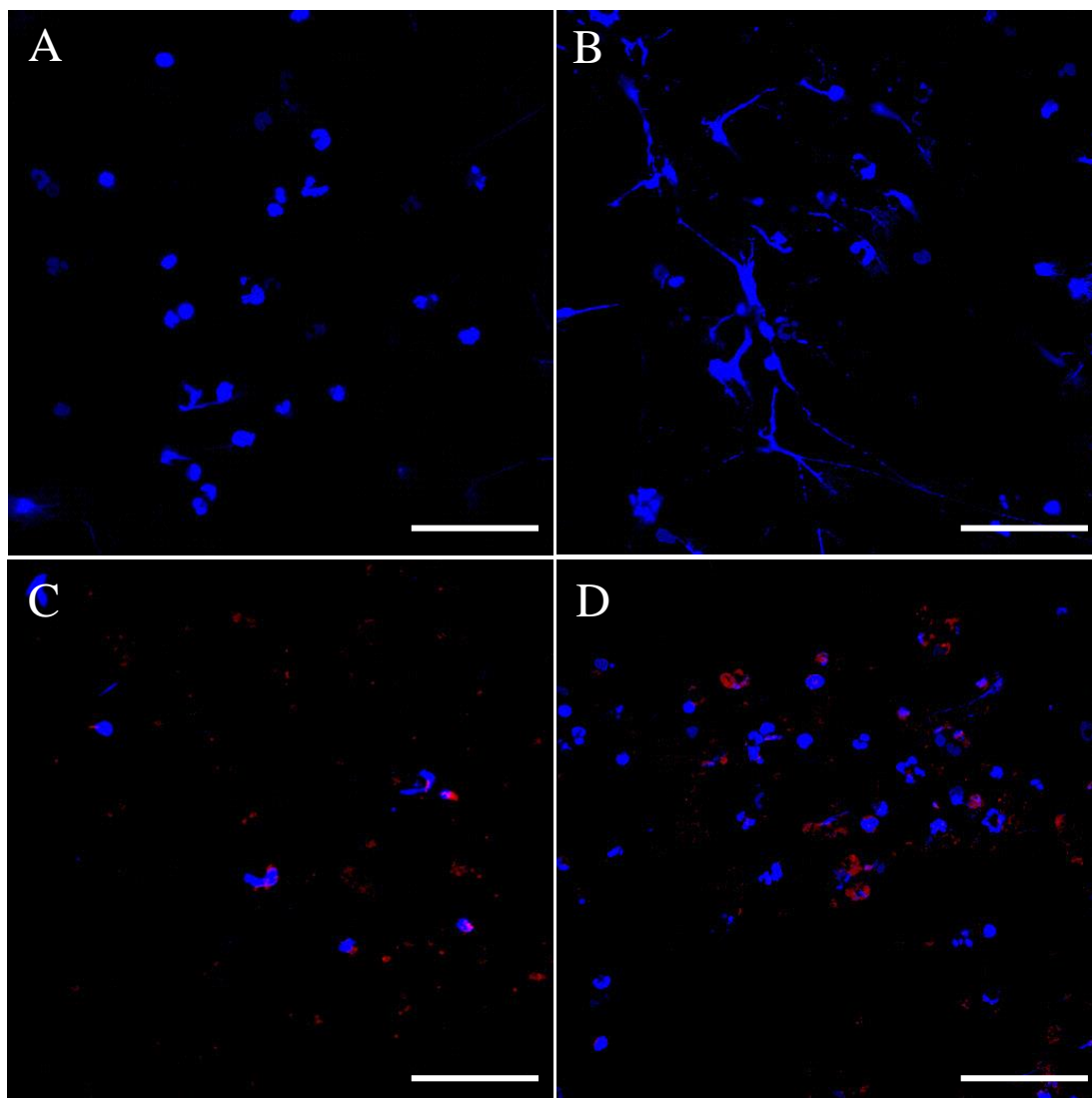


図 13 *M. bovis* 刺激にともなうウシ好中球の NETs 形成能 (A : コントロール、B : PMA、C : *M. bovis*、D : *M. bovis* および PMA)

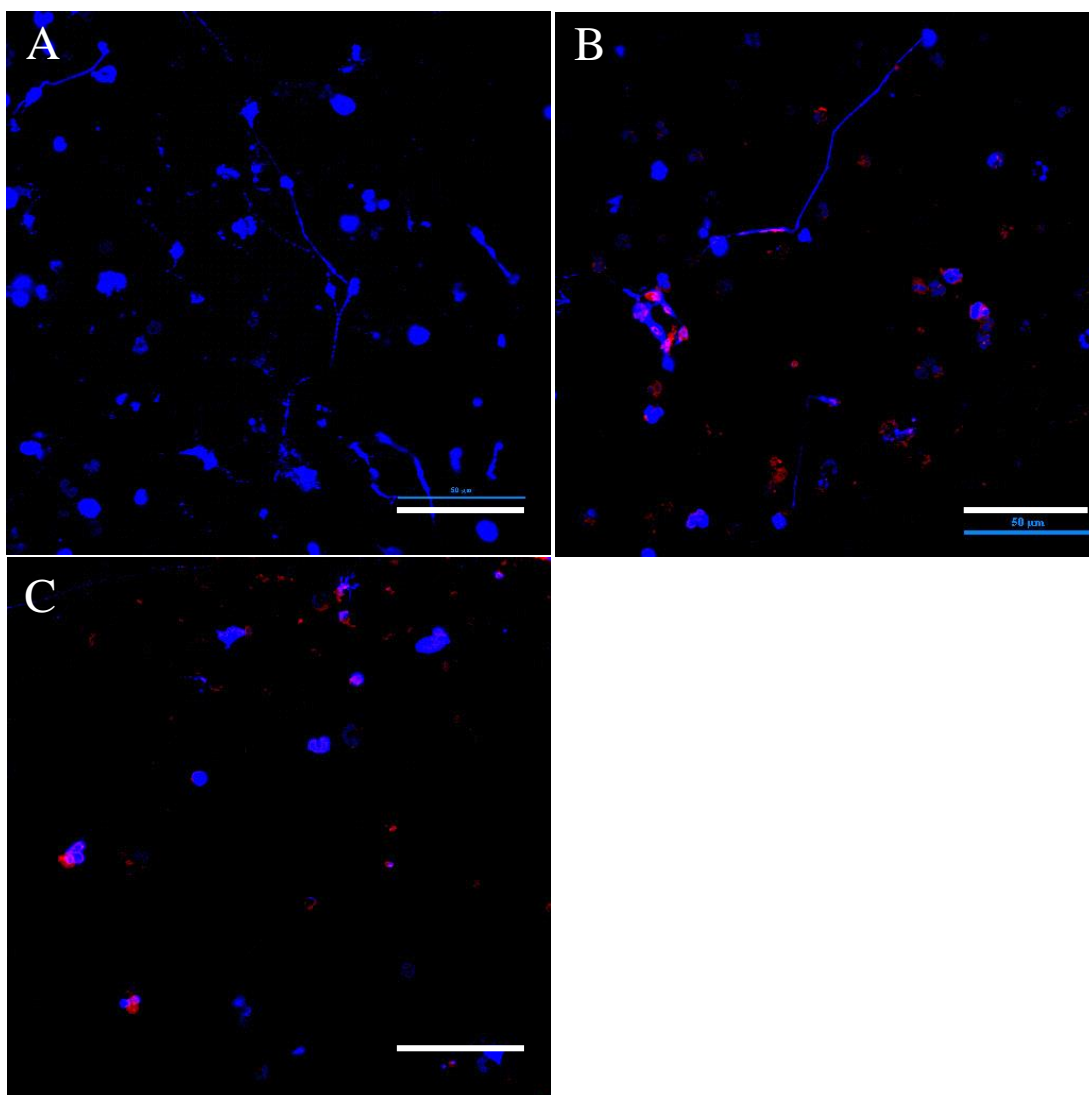


図 14 *M. bovis* 刺激にともなうウシ好中球の NETs 形成能 (A : PMA 刺激後に EDTA 添加、B : PMA 刺激後に *M. bovis* および EDTA 添加、C : PMA 刺激後に *M. bovis* 添加)

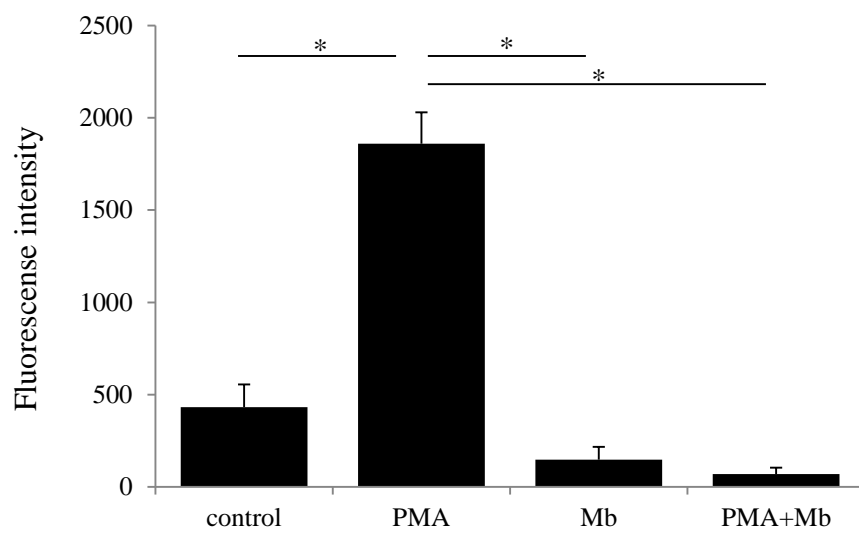


図 15 *M. bovis* 刺激にともなうウシ好中球の NETs 形成能 (Mb : *M. bovis*、N=5、mean ± SE、* : $p < 0.05$)

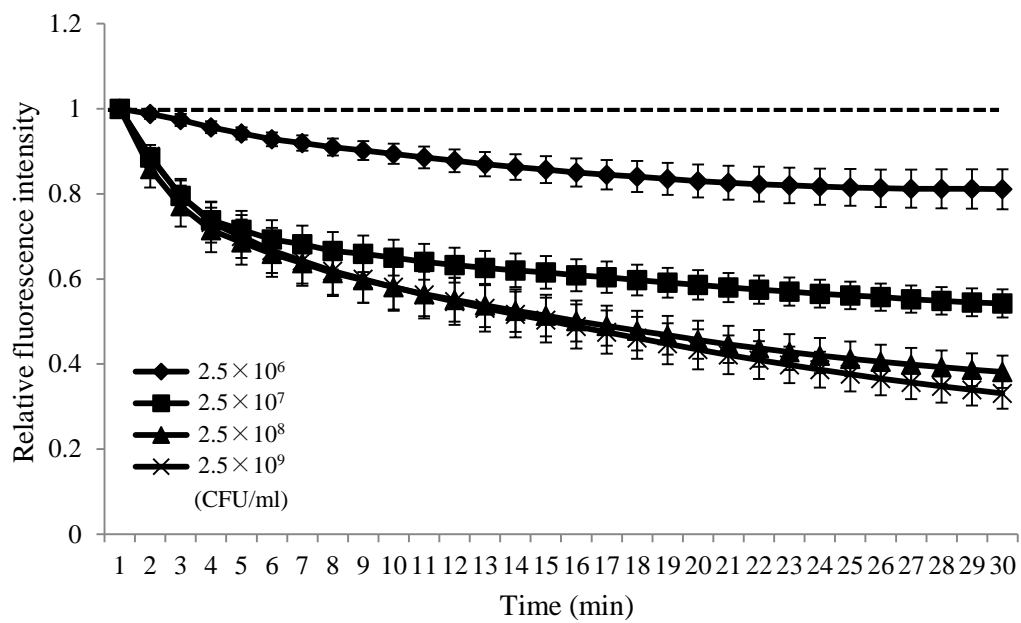


図 16 PMA により誘導された NETs に及ぼす *M. bovis* 添加の影響
 (N=5、mean ± SE、PMA で刺激した好中球の培養上清 (誘導された NETs) における核酸蛍光強度を 1 (点線) とした)

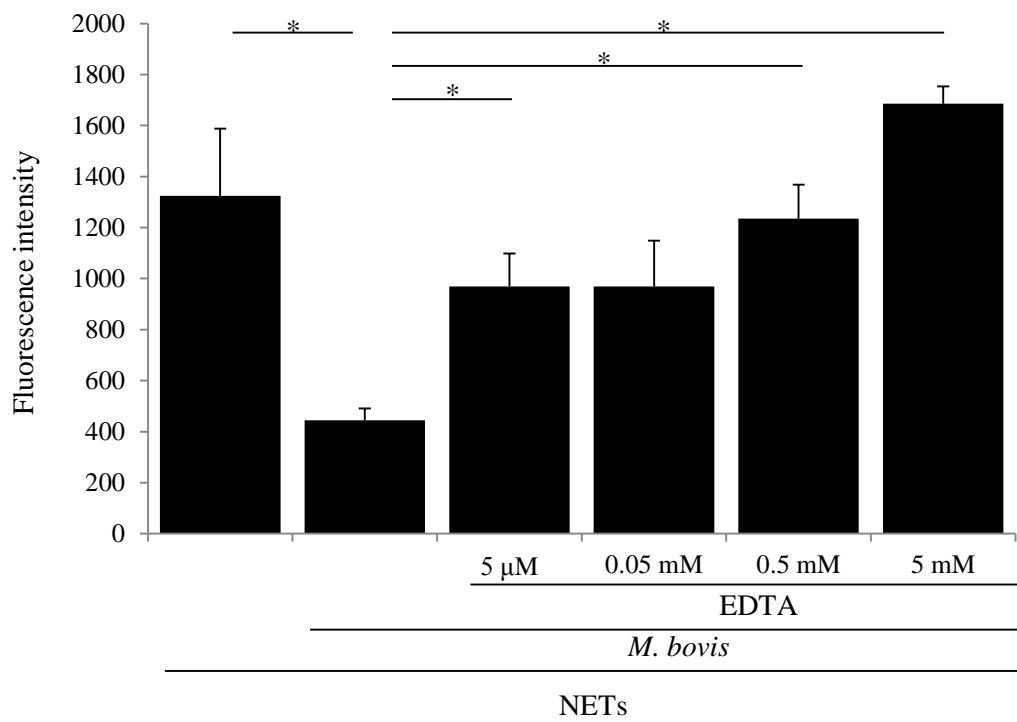


図 17 PMA により誘導された NETs に及ぼす *M. bovis* および EDTA 添加の影響 (N=5、mean ± SE、* : $p < 0.05$)

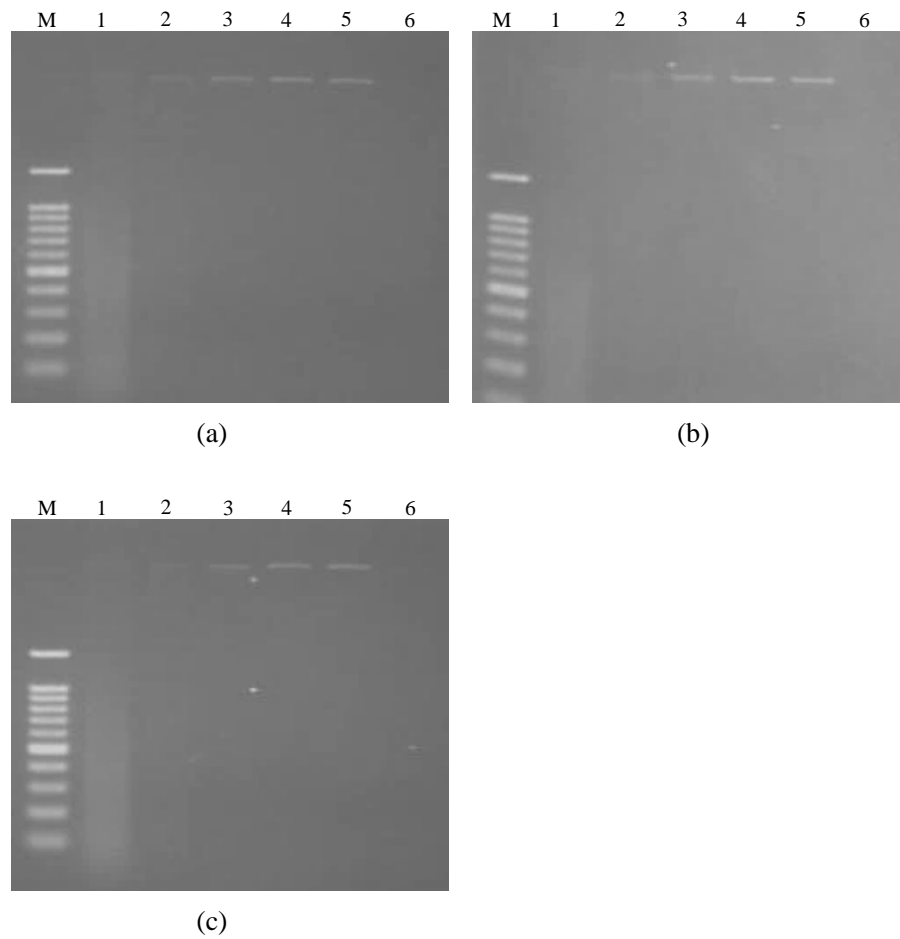


図 18 λ ファージ DNA に対する *M. bovis* ヌクレアーゼ活性の影響 (1; 10^9 、2; 10^8 、3; 10^7 、4; 10^6 CFU、5; DNase free water および 6; DNase I)

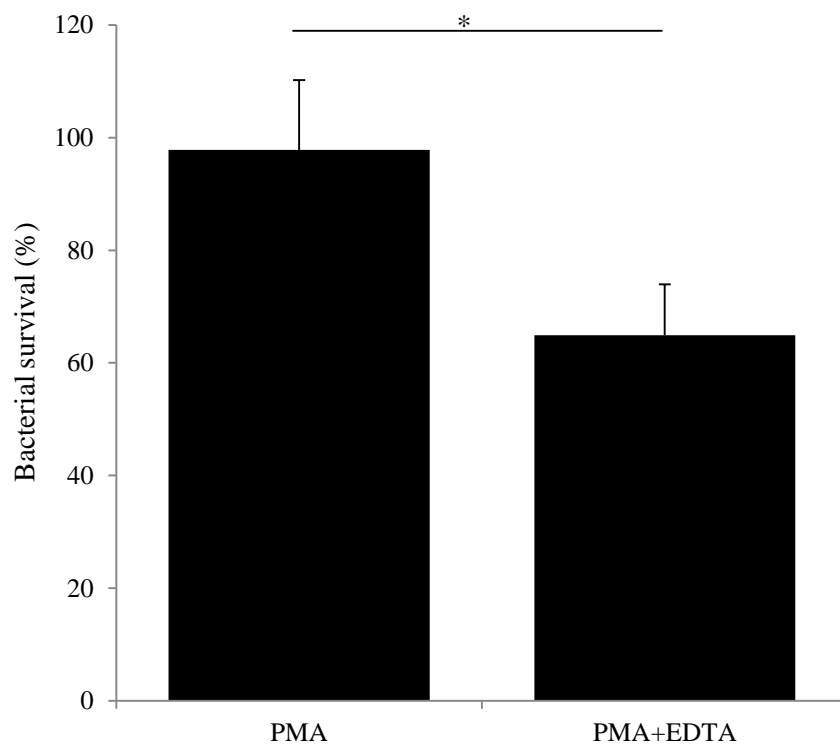


図 19 NETs 誘導条件下において EDTA 添加が *M. bovis* の生存率に及ぼす影響
(N=5、mean ± SE、* : $p < 0.05$)

5) *M. bovis*、ConA および PHA 刺激にともなう単核球の増殖反応試験

M. bovis およびマイトジェン刺激にともなう単核球の増殖反応を評価した (図 20)。 *M. bovis* の生菌を MOI1、10 および 100 で刺激すると無刺激対照と比較して有意な ($p < 0.01$) 単核球増殖反応を示した。 *M. bovis* の生菌 (MOI 10 および 100) および ConA 共刺激は ConA 単独刺激と比較し有意な ($p < 0.05$ および $p < 0.01$) 増殖反応の増加を示し、 *M. bovis* の生菌 (MOI 100) および PHA との共刺激においても PHA 単独刺激と比較し有意な ($p < 0.05$) 増加を示した。 *M. bovis* の生菌 (MOI 100) および ConA 共刺激は *M. bovis* および PHA 共刺激よりも有意に ($p < 0.05$) 高値を示した。死菌 *M. bovis* (MOI 100) 刺激は対照と比較して有意な ($p < 0.05$) 単核球増殖反応を示した。

6) *M. bovis* 刺激にともなう単核球のサイトカイン産生量

M. bovis 刺激下における単核球の IFN- γ および IL-12 産生量を ELISA により定量した (図 21)。単核球 IFN- γ および IL-12 の産生量は *M. bovis* の生菌刺激でそれぞれ対照と比較し有意な ($p < 0.01$ および $p < 0.05$) 増加を示した。 *M. bovis* の死菌刺激下における単核球 IFN- γ および IL-12 産生量に変化は認められなかった。

7) *M. bovis* およびマイトジェン刺激にともなう単核球からの LDH 誘導

M. bovis 刺激下における単核球の LDH 誘導は対照と比較して有意差は認めら

れなかった (図 22)。 *M. bovis* 刺激 (MOI 10 および 100) および PHA の共刺激では PHA 単独刺激と比較して有意な ($p < 0.05$ および $p < 0.01$) LDH 誘導量の増加が認められた。 *M. bovis* 死菌の単独刺激または死菌とマイトジェンの共刺激では対照と比較して低値を示す傾向が認められた。

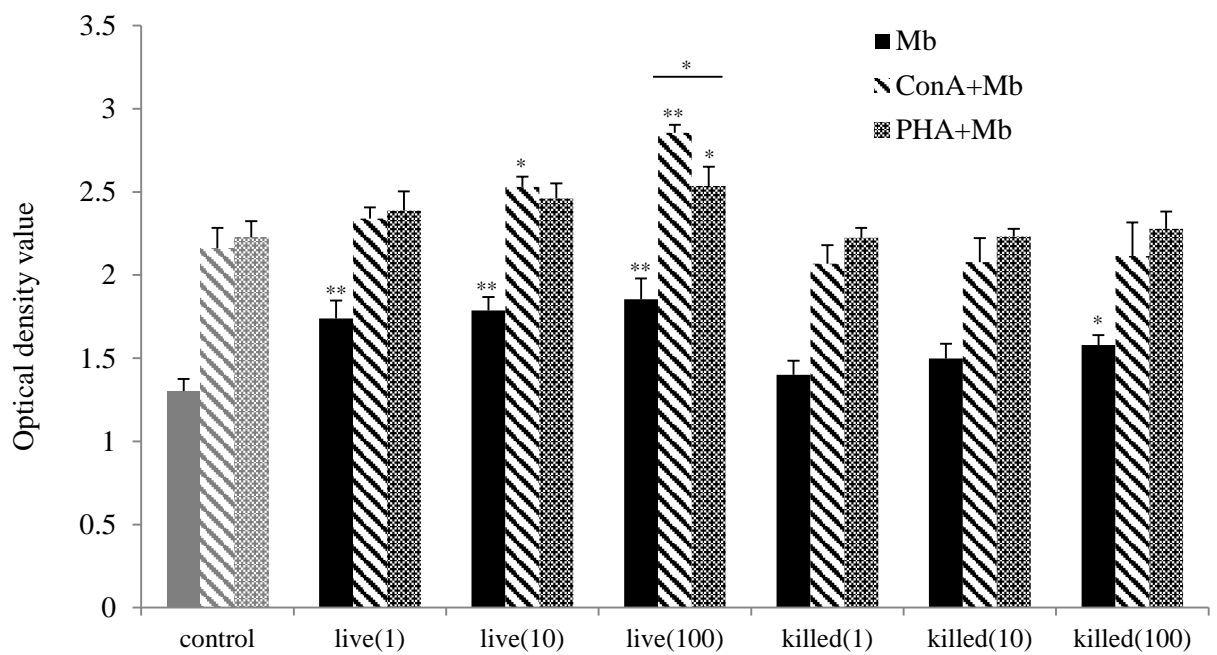


図 20 マイトジェン刺激に誘導されるウシ単核球の細胞増殖能に及ぼす *M. bovis* の影響 (N=5、mean ± SE、* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$)

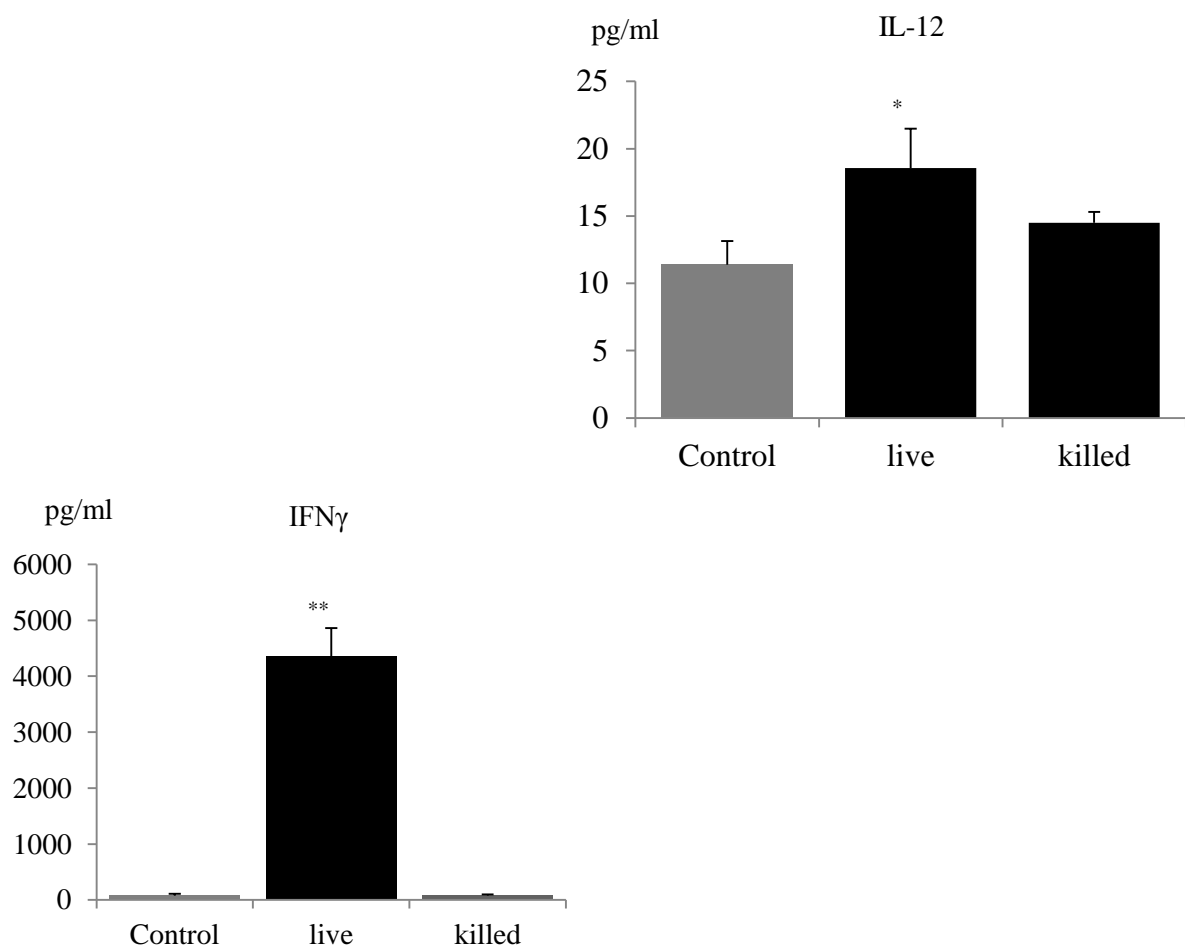


図 21 *M. bovis* の生菌または死菌刺激下におけるサイトカイン産生量 (N=5、mean \pm SE、* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$)

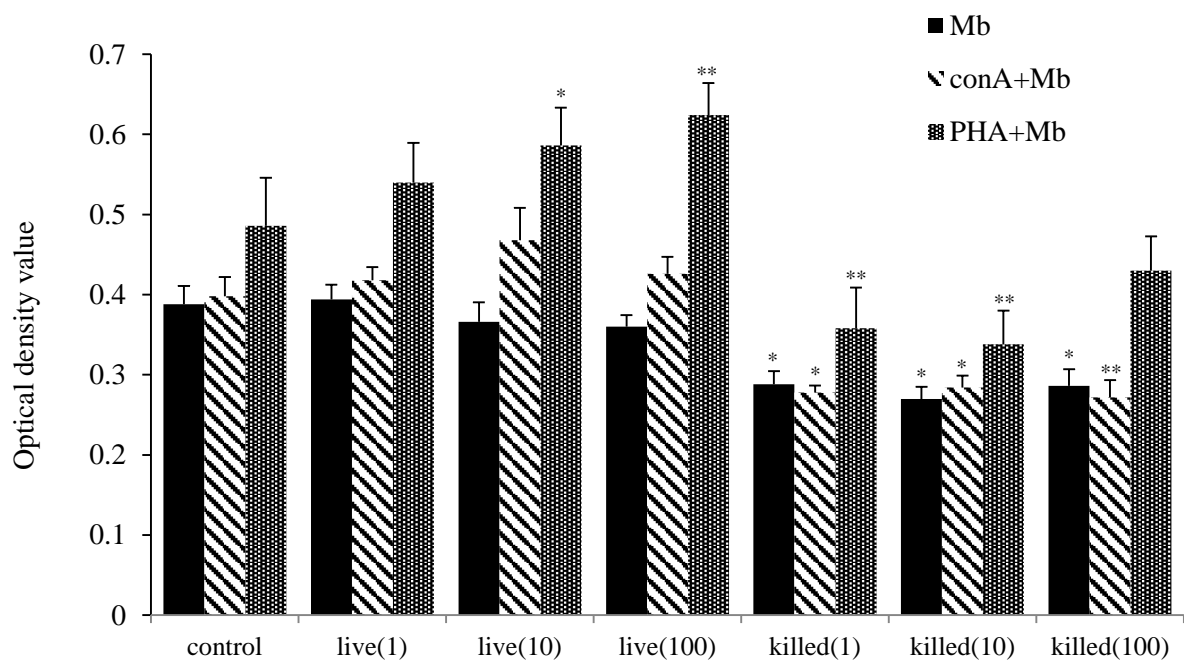


図 22 *M. bovis* およびマイトジェン刺激下におけるウシ単核球の LDH 誘導
(N=5、mean ± SE、* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$)

4. 考察

M. bovis の病原因子については、未だ十分に解明されておらず、生体の自然免疫応答性についても不明な点が多い。好中球の自然免疫応答能の一つである NETs は好中球自身の核酸を顆粒成分とともに細胞外へ放出し、微生物を物理的に補足し殺菌作用を示すことが知られている[10]。これらは自然免疫において重要な役割を担うが[26]、マイコプラズマのそれらに対する影響については解明されていない。NETs に対する微生物のエスケープ機構の一つとして、ヌクレアーゼの関与が *S. aureus*、*Streptococcus suis* および *Vibrio cholerae* で報告されている[8, 18, 60]。本研究ではマイコプラズマ種における NETs エスケープ機構についてその解明を試みた。

M. bovis 刺激下において好中球は対照と比較して、アポトーシス以外での細胞死を誘導することが明らかとなった。アポトーシス以外の細胞死として、NETs 形成をともなう細胞死である NETosis が関連していることが考えられた。

M. bovis の単独刺激にともなう好中球の活性酸素産生について、細胞内ではその産生を認めたものの、細胞外では認められないことが明らかとなった。また、PMA および *M. bovis* との共刺激における好中球の細胞外活性酸素産生量は菌数依存的に減少する傾向が認められた。マイコプラズマ種は活性酸素に対する抵抗因子を持つことが知られている[16, 29]。これらのことから好中球は *M. bovis* 刺激によって活性酸素産生能を持つが、*M. bovis* は細胞外の活性酸素

を減弱させることが示唆された。NETs 形成に活性酸素は必須であることが知られているため、潜在的に *M. bovis* は NETs 形成を誘導することが考えられた。さらに、好中球の NO 産生は NETs 形成に寄与するという報告があり [47]、本研究においても *M. bovis* 刺激下における NO 産生が認められた。

本研究において好中球に対する PMA 刺激では NETs 形成が認められたのに対し、PMA および *M. bovis* との共刺激では NETs 形成が認められないことが明らかとなり、*M. bovis* は NETs 形成を抑制することが示唆された。また、NETs 誘導の後に *M. bovis* を加えることで NETs 形成の消失を認めた。しかし、この NETs 消失は EDTA を添加することで抑制され、NETs 形成が認められた。このことから、*M. bovis* は形成された NETs を分解することが示唆された。*M. bovis* のヌクレアーゼ活性にはカルシウムイオンおよびマグネシウムイオンが重要な働きをすることが知られている [61]。このため、EDTA を添加することで *M. bovis* のヌクレアーゼ活性が抑制された結果、NETs 形成の分解が抑制されたことに起因した現象と推察される。核酸の蛍光強度の結果から、*M. bovis* は菌数依存的かつ時間依存的に NETs を分解することが明らかとなり、これらの反応が EDTA を添加することで抑制されることも明らかとなった。また、*M. bovis* がヌクレアーゼ活性を持つことが電気泳動法の結果より確認された。

NETs 存在下における *M. bovis* の生存率は、EDTA 添加により減少することが明らかとなった。このことから、EDTA により *M. bovis* のヌクレアーゼ活性が抑制された結果、*M. bovis* が NETs により殺菌されたことが示唆された。

M. bovis のヌクレアーゼは NETs からのエスケープ機構としての関与から、*M. bovis* の病原性因子の一つと考えられる。また、*M. bovis* のヌクレアーゼ活性の抑制は NETs による捕捉を容易にするため、*M. bovis* 感染症に対する有効な治療技術の開発において有用な知見と考えられる。

M. bovis 刺激下において単核球の細胞増殖が認められ、さらに、マイトジェンとの共刺激においても同様の細胞増殖が認められた。しかし、Vanden ら[74]は、*M. bovis* はマイトジェン刺激による細胞増殖を抑制させることを報告しており、本研究ではこれらとは異なる結果が得られた。そのメカニズムは明らかにされていないが、菌株により免疫応答性が異なるとの報告もあり[75]、さらなる研究が必要である。

M. bovis の生菌は単核球の IFN- γ および IL-12 産生量を増加させることが明らかとなった。生菌が IFN- γ 産生量を増加させることは以前の報告と一致した[71]が、*M. bovis* の死菌による影響はこれまで検討されていなかった。本研究において、死菌による刺激ではこれらのサイトカイン産生は認められず、単核球の免疫応答は *M. bovis* の生菌が重要な役割を持つことが示唆された。

M. bovis 刺激にともなう単核球の LDH 産生量を測定することで、*M. bovis* による単核球の細胞傷害性に及ぼす影響を評価した。*M. bovis* の単独刺激では LDH 誘導が認められないことが明らかとなり、また、マイトジェン存在下における *M. bovis* 刺激は、マイトジェンの種類により異なる反応を示すことが明らかとなった。*M. bovis* による細胞傷害性について、Lu ら[36]は、ウシ肺微小血管の上皮

細胞および大動脈上皮細胞に強い細胞傷害性を示さないことを報告しており、本研究の結果からも、*M. bovis* は単核球の細胞傷害を誘導しないことが示唆された。

5. 小括

M. bovis 刺激下におけるウシ免疫担当細胞の機能的解析を小括すると以下のとおりである。

1. *M. bovis* の単独刺激で NETs 形成は認められず NETs 形成誘導剤である PMA との共刺激でも認められなかった。*M. bovis* は形成された NETs を消失させ、この現象は EDTA 存在下では抑制された。NETs による *M. bovis* の生存率は EDTA 存在下で減少した。*M. bovis* は自身のヌクレアーゼにより好中球の NETs から回避し、*M. bovis* のヌクレアーゼは病原性因子として関与しているものと考えられる。

2. *M. bovis* によるウシ単核球に対する細胞毒性は低く、また、*M. bovis* は単核球の細胞増殖能を促進させることが明らかとなった。生菌 *M. bovis* はサイトカイン産生能を有することが明らかとなった。*M. bovis* に対するウシ単核球の免疫応答は生菌で死菌より反応性が得られたことから菌の活性因子が重要な役割を担うと考えられる。

第Ⅲ章 *M. bovis* の乳房内感染とウシ乳腺の免疫学的応答性

1. 序文

M. bovis は伝染性乳房炎の原因菌種の一つであり、マイコプラズマ性乳房炎を引き起こす主要な菌種である[20]。多くは乳房局所における重度の炎症を惹起し、泌乳量の減少や、突然の泌乳停止を招来する[52]。激しい臨床症状を示す症例では食欲不振、乳房リンパ節の腫脹および顕著な高体細胞数を示し、乳産生の減少、泌乳停止に至る[52, 70]。しかし、*M. bovis* 乳房内感染にともなうウシ血清中の免疫関連物質の動態については充分には明らかとなっていない。また、*M. bovis* による乳房炎は牛群内において高い伝染性を示し、同一個体内において非感染乳房に感染が拡大することも知られている[13]。*M. bovis* による乳房炎において乳汁中白血球は、感染初期に多形核顆粒球の遊出が認められ、次いでマクロファージおよび形質細胞を含む単核球が出現することが報告されている[72]。しかし、*M. bovis* による乳房炎において、全身および乳腺の免疫応答については明らかにされていない。本章では *M. bovis* による乳房内感染にともなうウシの免疫応答を明らかにする目的で、*M. bovis* 乳房内注入による実験感染を実施し、全身および乳腺局所の免疫応答について解析を行った。

2. 材料と方法

1) 供試動物

酪農学園大学附属農場にて飼養されていた臨床的に健康なホルスタイン種雌牛3頭（3～5歳齢）を用いた。感染実験（動物実験：VH14CV号）は酪農学園大学における病原体等実験計画申請書（実験番号14-04）に従い、酪農学園大学附属動物病院の感染動物管理病棟（承認番号VTH031EK：ABSL2）で実施された。

2) *M. bovis* の乳房内注入

(1) *M. bovis* の調整

供試菌として、*M. bovis* の基準株である PG45 株（ATCC25523）を用いた。Hayfric 培地（関東化学、東京）に接種し 37℃で 48 時間培養して得られた菌液は、20,000 g、4℃、40 分間の条件で遠心処理後、上清を除去し PBS で洗浄を行い、さらに 20,000 g、4℃、10 分間遠心し PBS に再懸濁した。菌数は平板希釈法により算定し最終的な菌数を 1×10^4 CFU/ml に調整した。

(2) 注入方法

上記 2)-(1)で調整した菌液 5 ml を供試牛の A 分房（左前）に注入した。対照として滅菌 PBS を D 分房（右後）に 5ml 注入した。

3) 体細胞数の測定

体細胞数は蛍光光学式体細胞測定装置（Fossomatic90; Foss Electric、デンマーク）を用いて常法に従い測定した。

4) 菌数の測定および菌の検出

採乳は *M. bovis* 乳房内注入前 (D0) および注入から 1 日目 (D1)、D3、D7 および D14 に滅菌スピッツに無菌的に行った。乳汁中の菌数は上記 2)-(2)に準じて実施した。*M. bovis* の検出は、*M. bovis* 特異的プライマーを用いて PCR を実施し、増幅産物をアガロースゲル電気泳動法で確認した。採乳した乳サンプル 100 μ l をマイコプラズマ用液体培地（関東化学、東京）3 ml に接種し、37°C で 2 日間増菌培養した。PCR は、C1000 Thermal Cycler（Bio-rad、米国）を使用し、熱変性 94°C 30 秒、アニーリング 61.2°C 20 秒、伸長反応 72°C 1 分（以下 45 サイクル）、最終伸長反応 72°C 5 分の条件で実施した。

5) *M. bovis* 感染牛の一般血液検査

採血は *M. bovis* 乳房内注入前 (D0)、D1、D3、D7 および注入から 14 日目 (D14) に、頸静脈および尾静脈より EDTA 加真空採血管およびプレーン真空採血管を用い常法に準じて行った。プレーン真空採血管からの血液は 4°C で 8 時間静置後、2,400 g、4°C、30 分間の条件で遠心処理し血清を分離した。血清は分離後 -80°C にて冷凍保存した。EDTA 真空採血管は桿状核 (%)、分葉核 (%)、リンパ球 (%)、

単球 (%)、好酸球 (%) および好塩基球 (%) の割合、また総白血球数 (WBC ($10^2/\mu\text{L}$))、赤血球数 (RBC ($10^4/\mu\text{L}$))、ヘモグロビン量 (HGB (g/dl))、ヘマトクリット (HCT (%))、平均赤血球容積 (MCV (fL))、平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH (pg))、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC (g/dl)) および血小板数 (PLT ($10^4/\mu\text{L}$)) を算出した。血清から総蛋白量 (TP (g/dl))、アルブミン (ALB (g/dl))、アルブミン/グロブリン比 (A/G 比)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST (IU/l))、 γ -グルタミルトランスぺプチターゼ (GGT (IU/l)) および Fe ($\mu\text{g}/\text{dl}$) の値を算出した。

6) ELISA 法

(1)血清の分離

頸静脈および尾静脈より常法に従って採血し、 4°C で 8 時間静置後、 $2,400\text{ g}$ 、 4°C 、30 分間の条件で遠心処理し血清を分離した。血清は分離後 -80°C にて冷凍保存し測定に供試した。

(2)乳清の分離

乳房乳 2 ml をスピッツ管に無菌的に採取し、 $19,000\text{ g}$ 、 4°C 、30 分間の条件で遠心処理後、乳清 1 ml を -80°C にて冷凍保存した。

(3)抗原調整

抗原として、*M. bovis* の基準株を用いた。基準株は Hayfric 培地 (関東化学、東京) にて 37°C で 5 日間培養した。得られた菌液は界面活性剤で処理し、抗原

とした。

(4)ELISA 法による Optical Density (OD 値) の測定

Nunc イムノプレート (Thermo Scientific、米国) に炭酸緩衝液で 50 µg/ml に調整した抗原液を 1 well あたり 100 µl 加え、吸着を行った後、血清または乳清を添加しスキムミルクでブロッキング後、37°C で 1 時間静置した。上清を吸引除去し、洗浄後 Protein-G 抱合西洋わさびペルオキシダーゼを添加した。37°C で 1 時間静置後、3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic Acid (ABTS) 溶液を加え、吸高値 (OD 415 nm) を測定し、各検体の抗体価を測定した。

7) *M. bovis* 感染牛の末梢血単核球における網羅的遺伝子発現解析

(1)単核球の分離

採血は *M. bovis* 乳房内注入前 (D0) および注入から 7 日目 (D7) に、頸静脈よりヘパリンナトリウム加真空採血管を用い、常法に準じて行った。血液からの単核球分離は、第 II 章- 2 -2) -(3)の方法に準拠して行った。

(2)Total RNA 抽出

第 I 章- 2 -4) の方法に準拠して行った。

(3)網羅的遺伝子発現解析

単核球は D0 および D7 の tRNA (1µg 以上かつ 100-500 ng/ µl) を各 3 サンプルずつ網羅的遺伝子発現解析に供試し、第 II 章- 2 -5) の方法に準拠して行った。

8) *M. bovis* 感染牛の乳汁および末梢血におけるフローサイトメトリーを用いた単核球動態解析

採血は D0、1、3、7 および 14 に、頸静脈よりヘパリンナトリウム加真空採血管を用い常法に準じて行った。血液および乳汁からの単核球分離は、Ficoll-conray 比重遠心法を用いて行った。遠心管 (50ml) に血液 10ml (乳汁は 1×10^7 の体細胞数) を入れ、PBS (ニッスイ、東京) 25ml を加えて希釈した。その下層に比重 1.078 に調整した Ficoll-conray 液 10ml を重層し、 $300 \times g$ 、 20°C の条件下で 30 分間遠心分離した。遠心処理後、単核球層を採取し、得られた単核球は PBS で洗浄した。CD4、CD8、CD14、CD21 および WC1 に対する抗体を感作させ、暗室 15 分後、 $500 \times g$ 、 4°C の条件下で 5 分間遠心後 PBS により洗浄を行い、再度同条件で遠心後、1%パラホルムアルデヒド PBS 溶液に浮遊させて解析まで暗室 4°C で静置した。

9) *M. bovis* 刺激下における単核球の増殖反応試験

D0 および剖検前に採血した血液および剖検時に採材した脾臓、右乳房リンパ節および左乳房リンパ節の単核球における *M. bovis* またはマイトジェン (ConA; Wako、大阪) 刺激下における増殖反応を評価した。第 II 章-2-7) に準じて行った。それぞれ 96 穴プレートに播種 (2×10^5 cells/well) された単核球は 37°C $5\% \text{CO}_2$ 条件下において、 $5 \mu\text{g}$ の ConA、死菌 *M. bovis* (PG45、野外株 5 株 (#1 から #5)) と 72 時間培養した後、測定キット (Cell Counting Kit-8、Dojindo、熊本) を用い

て評価した。

10) 統計処理

成績の統計処理は、Kruskal-Wallis 検定および Steel-Dwass 検定を用いて行い、有意水準 5% ($p < 0.05$) 以下、有意水準 1% 以下 ($p < 0.01$) を有意とした。成績は平均値 ± 標準誤差で示した。

3. 結果

1) *M. bovis* 注入にともなう乳汁中の菌数の推移

M. bovis 注入にともなう乳汁中の菌数の推移を図 23 に示した。A 分房（左前）では各個体において 7～11 日目でピークを示し $10^8 \sim 10^9$ CFU/ml まで増加した。その後 10～14 日目にかけて減少が認められた。また、菌が検出されるまでの時間は各個体で異なり No.1 では注入から 12 時間後、No.2 では 2 日後、No.3 では 4 日後に菌が検出された。B 分房（左後）では各個体で菌が検出され、特に No.2 では 9～12 日目で 1.4×10^7 CFU/ml まで顕著な増加が認められた。

2) *M. bovis* 注入にともなう乳汁中体細胞数の推移

M. bovis 注入にともなう乳汁中体細胞数の推移を図 24 に示した。A 分房（左前）の平均体細胞数は注入後 1 日目と比較し、注入後 2 日目に増加、5 日目で一度減少し、再度増加して 8 日目で $1900 \times 10^4 \pm 615 \times 10^4$ cells/ml となりピークを示した。その後も体細胞数の減少と増加を繰り返した。B 分房の平均体細胞数は 10 日目までと比較し、注入後 11 日目から 13 日目にかけて増加が認められ、ピークを示した 13 日目には $680 \times 10^4 \pm 290 \times 10^4$ cells/ml となり、14 日目で減少した。C および D 分房（右前および右後）の平均体細胞数は注入後 14 日目まで増加が認められたものの 30×10^4 cells/ml 以下で推移した。

3) *M. bovis* 注入にともなう血清抗体価の推移

M. bovis 注入にともなう血清抗体価の推移を図 25 に示した。各感染個体において注入日から 7 日目までの平均 OD 値は No.1 で 0.665、No.2 で 0.937、No.3 で 0.812 を示し OD 値の変動は認められなかった。その後 OD 値は上昇し、ピーク時には No.1 で 1.426、No.2 で 1.773、No.3 で 1.443 を示した。No.1 では OD 値は 10 日目から 20 日目まで減少することなく推移した。

4) *M. bovis* 注入にともなう乳清抗体価の推移

M. bovis 注入にともなう乳清抗体価の推移を図 26 に示した。A 分房（左前）の平均の OD 値は注入後 9 日目に上昇しその後 14 日目まで急激に上昇し 1.205 ± 0.119 を示した。B 分房の平均の OD 値は 10 日目からわずかに上昇し始め、14 日目で 0.544 ± 0.119 を示した。C および D 分房の平均 OD 値は B 分房（左後）と同様 10 日目で上昇したがその上昇は 0.4 までにとどまった。

5) *M. bovis* 注入にともなうウシの一般血液検査の推移

M. bovis 注入にともなうウシ血清の一般性状の推移を表 6-1 から 6-3 に示した。白血球数は 14 日目が最も高く 101.67 ± 11.33 ($10^2/\mu\text{L}$) を示した。分葉核好中球の割合は注入から 1 日目で減少しはじめ、3 日目で最低値を示し $31.3 \pm 8.9\%$ となり、その後上昇し注入後 14 日には注入前値とほぼ同程度の $55.7 \pm 6.8\%$ を示した。一方、リンパ球は注入後上昇し、注入後 7 日目には最高

値 $52.7 \pm 12.3\%$ となり、注入後 14 日には注入前値とほぼ同程度の $38 \pm 4.9\%$ を示した。単球について注入前の割合は $7.0 \pm 1.5\%$ であったが注入後 3 日目に最高値 $9.3 \pm 2.7\%$ を示し、注入後 7 日目で減少し $4.3 \pm 2.9\%$ となり、注入後 14 日目で最低値 3.3 ± 3.3 を示した。好酸球の割合は注入後 3 日目で最高値 $8.7 \pm 1.5\%$ を示し、注入後 7 日目も $7.0 \pm 2.1\%$ となったが、注入後 14 日目には注入前とほぼ同程度の $3.0 \pm 0.6\%$ を示した。血清中の鉄は注入前 ($113 \pm 15.6 \mu\text{g}/\text{dl}$) と比較して注入後 1 日 ($122 \pm 29.9 \mu\text{g}/\text{dl}$)、3 日 ($136.67 \pm 38.1 \mu\text{g}/\text{dl}$) および 14 日目 ($181.67 \pm 32.9 \mu\text{g}/\text{dl}$) で増加傾向を示した。

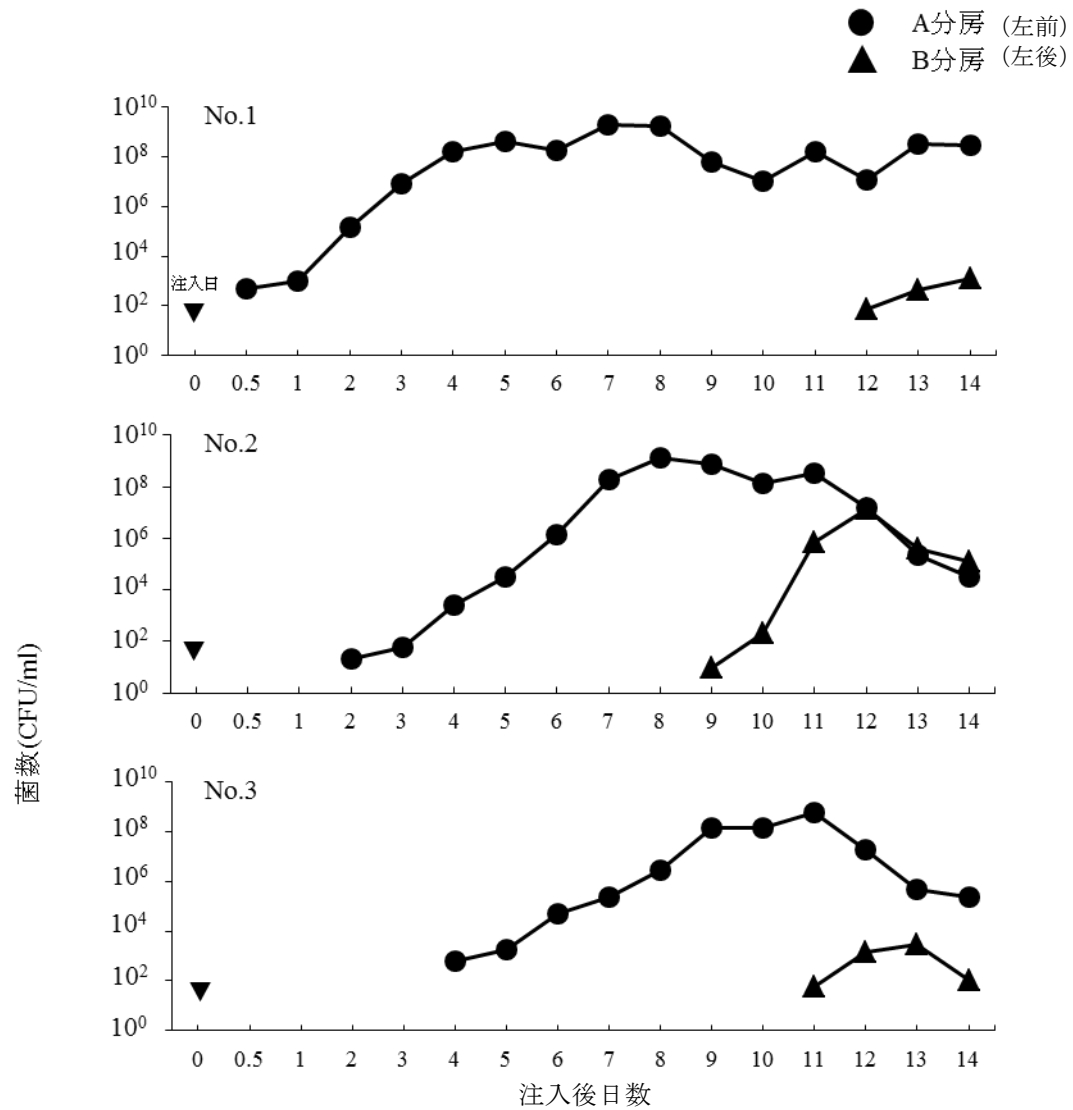


図 23 *M. bovis* 注入にともなう乳汁中の菌数の推移 (A および B 分房)

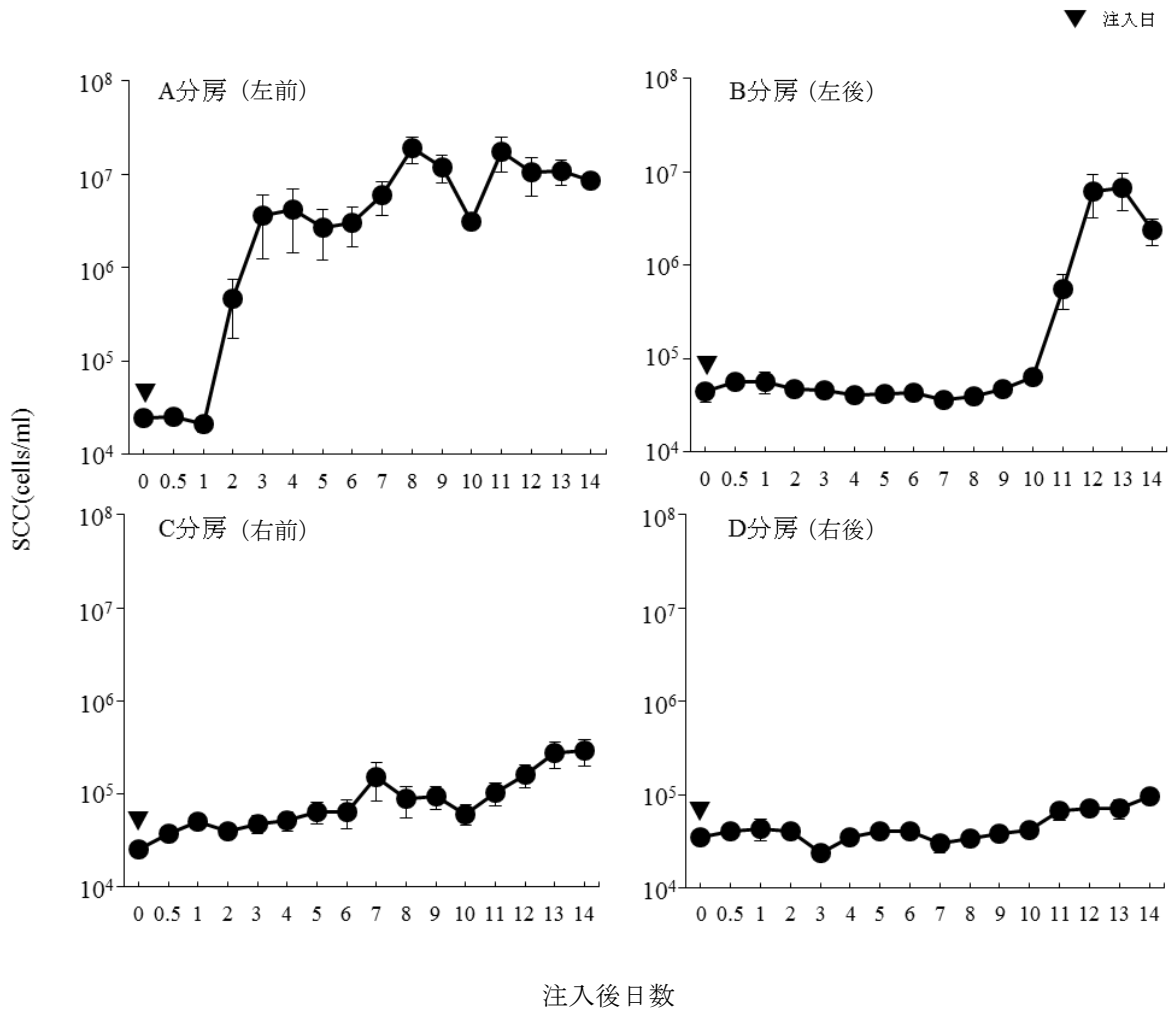


図 24 *M. bovis* 注入にともなう乳汁中体細胞数の推移
(N=3、mean ± SE)

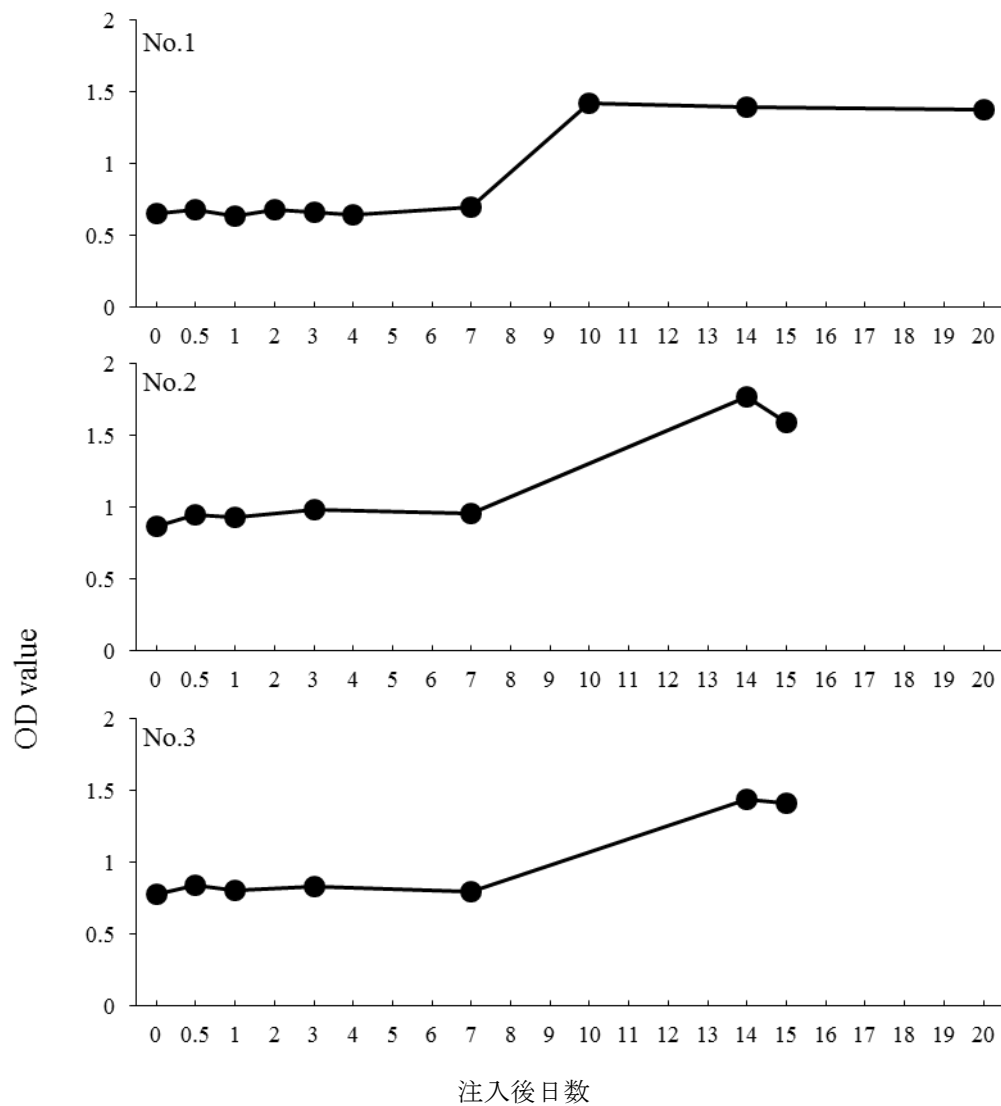


図 25 *M. bovis* 注入にともなう血清抗体価の推移
(N=3、mean ± SE)

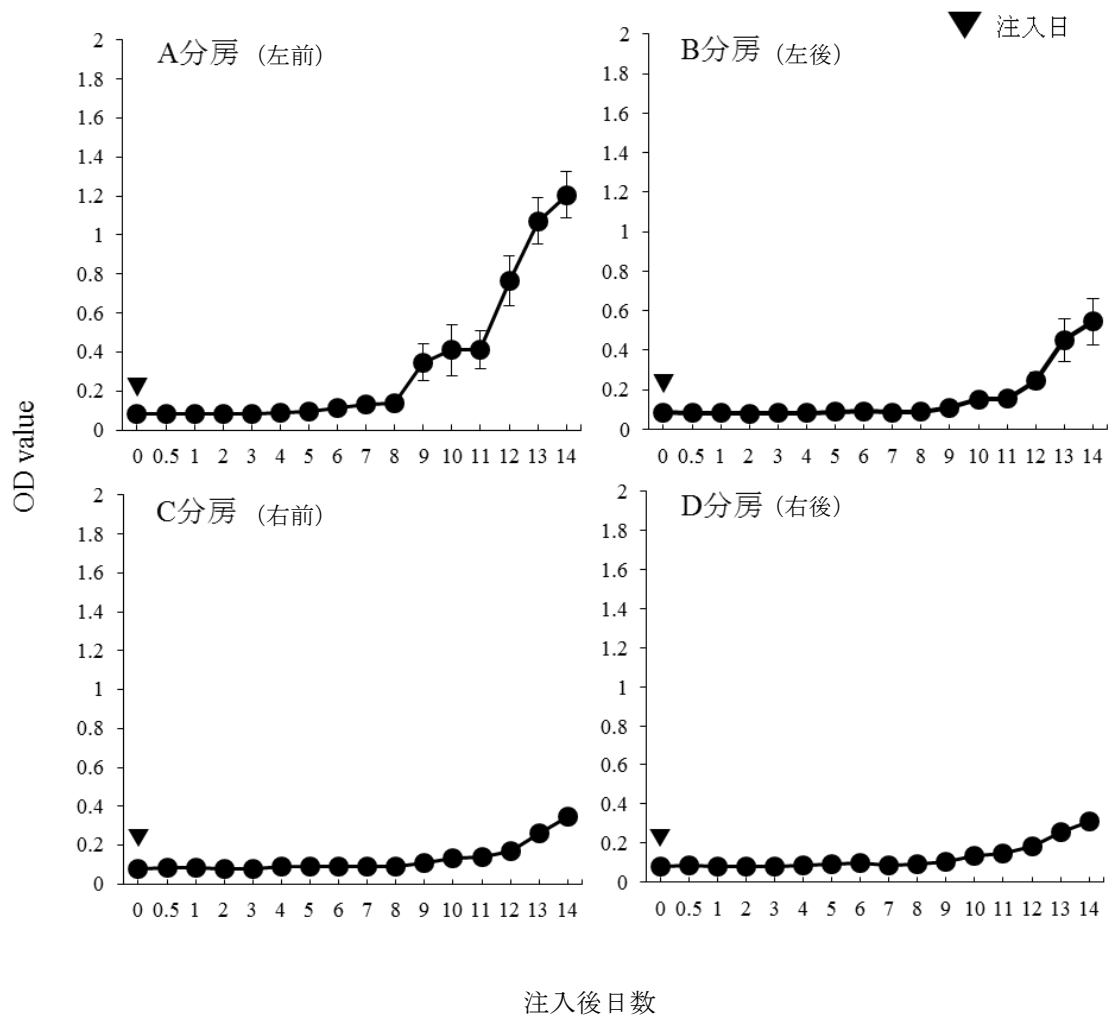


図 26 *M. bovis* 注入にともなう乳清抗体価の推移
(N=3、mean ± SE)

表 6-1 *M. bovis* の乳房内注入にともなう実験牛の血液学的所見の推移

	D0	D1	D3	D7	D14
WBC (10 ² /UL)	66.33±3.53	65.33±6.39	75.67±0.33	65±18.56	101.67±11.33
RBC (10 ⁴ /UL)	671.67±6.69	671.33±7.54	655.33±11.26	712±39.8	654.67±20.28
HGB (g/dl)	10.33±0.5	10.47±0.58	10.47±0.57	10.9±0.64	9.9±0.31
HCT (%)	31.87±0.69	31.6±0.87	30.83±0.99	33.8±1.31	31.3±0.35
MCV (fL)	47.43±0.88	47.07±0.99	47.03±0.99	47.57±0.81	47.87±0.95
MCH (pg)	15.37±0.75	15.57±0.71	15.97±0.62	15.37±0.93	15.13±0.64
MCHC (g/dl)	32.4±1.02	33.07±0.97	33.93±0.81	32.27±1.78	31.63±1.14
PLT (10 ⁴ /UL)	36.52±2.48	46.47±6.83	43.9±10.25	65.6±16.3	48.67±9.38

WBC：総白血球数、RBC：赤血球数、HGB：ヘモグロビン量、HCT：ヘマトクリット、MCV：平均赤血球容積、MCH：平均赤血球ヘモグロビン量、MCHC：平均赤血球ヘモグロビン濃度、PLT：血小板数

(N=3、mean ± SE)

表 6-2 *M. bovis* の乳房内注入にともなう実験牛の末梢血白血球の推移

	D0	D1	D3	D7	D14
桿状核 (%)	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
分葉核 (%)	51.67±1.45	45.67±9.4	31.33±8.88	36±10.69	55.67±6.77
リンパ球 (%)	37.33±4.26	43.67±10.14	50.33±9.68	52.67±12.25	38±4.93
単球 (%)	7±1.53	6.67±2.96	9.33±2.73	4.33±2.85	3.33±3.33
好酸球 (%)	3.67±1.2	4±2.65	8.67±1.45	7±2.08	3±0.58
好塩基球 (%)	0±0	0±0	0.33±0.33	0±0	0±0

(N=3、mean ± SE)

表 6-3 *M. bovis* の乳房内注入にともなう実験牛の血清生化学的所見の推移

	D0	D1	D3	D7	D14
TP (g/dl)	7.43±0.2	7.4±0.3	7.5±0.25	7.4±0.35	7.97±0.12
ALB (g/dl)	3.83±0.12	3.77±0.19	3.83±0.17	2.5±1.21	3.73±0.03
A/G 比	1.08±0.11	1.05±0.09	1.05±0.08	0.67±0.29	0.88±0.04
AST (IU/l)	133±38.04	130.33±41.28	113±27.18	101.67±16.46	97±4.51
GGT (IU/l)	40.67±5.67	40.33±5.84	40.67±6.17	41.67±9.17	40.67±6.69
Fe (µg/dl)	113±15.59	122±29.87	136.67±38.11	98±54.01	181.67±32.92

TP：総蛋白量、ALB：血清アルブミン、A/G 比：アルブミン/グロブリン比、AST：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、GGT：γ-グルタミルトランスぺプチターゼ、Fe：血清鉄

(N=3、mean ± SE)

7) *M. bovis* 注入にともなう実験牛の末梢血単核球および乳中単核球ポピュレーションの推移

M. bovis 注入にともなう実験牛の末梢血単核球および乳中単核球ポピュレーションの推移をフローサイトメーターを用いて解析を行った（図 27-1 および 27-2）。*M. bovis* 注入にともなう CD4 陽性細胞割合は末梢血単核球では増加傾向を示したが、乳中単核球では注入後 1 日目で減少し、その後注入分房では増加傾向を示した。CD8 陽性細胞は末梢血単核球では注入後 7 日目まで増加傾向を示し、注入分房の乳中単核球では注入後 1 日目に最低値を示しその後増加傾向を示し、注入後 7 日目に最高値を示したが、非注入分房では注入前と比較し注入後 1、3、7 および 14 日で低値を示した。CD4/CD8 比について、血中および注入分房では、注入前と比較して注入後 1、3 および 7 日目は減少傾向を示し、注入後 14 日目で最高値を示した。CD14 陽性単球は注入後 7 日目で血中および非注入分房で最低値を示したが、注入分房では最高値を示した。

8) 単核球に対する *M. bovis* 刺激

M. bovis の注入前および注入後 14 日目における実験牛の末梢血単核球の細胞増殖能は、ConA 刺激で増加傾向を示したものの、*M. bovis* 刺激では変化を認めなかった（図 28）。*M. bovis* の注入後 14 日目の乳房リンパ節由来の細胞および脾臓細胞の *M. bovis* 刺激にともなう細胞増殖能には変化を認めなかった。

9) 末梢血単核球の網羅的遺伝子発現解析

M. bovis による乳房内感染牛における末梢血単核球の免疫応答を明らかにする目的で、*M. bovis* の乳房内注入後 7 日目において網羅的遺伝子発現解析を行った。Transglutaminase 3 (TGM3) が有意な ($p < 0.025$ かつ発現量が 2 倍以上) 増加を示し、46 遺伝子が有意な ($p < 0.025$ かつ発現量が 2 倍以上) 減少を示した (図 29)。有意な ($p < 0.025$ かつ発現量が 2 倍以上) 変化が認められた遺伝子群を表 8-1 から 8-3 に示した。機能に関連した遺伝子群の有意差は認められなかったが、cell morphogenesis、次いで immune system process に関連する遺伝子群が増加した (図 30 および表 9)。網羅的遺伝子発現解析の結果をリアルタイム PCR により検証した (図 31)。*M. bovis* の注入後 7 日目における単核球 complement factor D (CFD)、ficolin 1 (FCN1) および tumor necrosis factor superfamily member 13 (TNFSF13) の mRNA 発現量は対照と比較し有意に (CDF および TNFSF13 : $p < 0.01$ 、FCN1 : $p < 0.05$) 減少した。

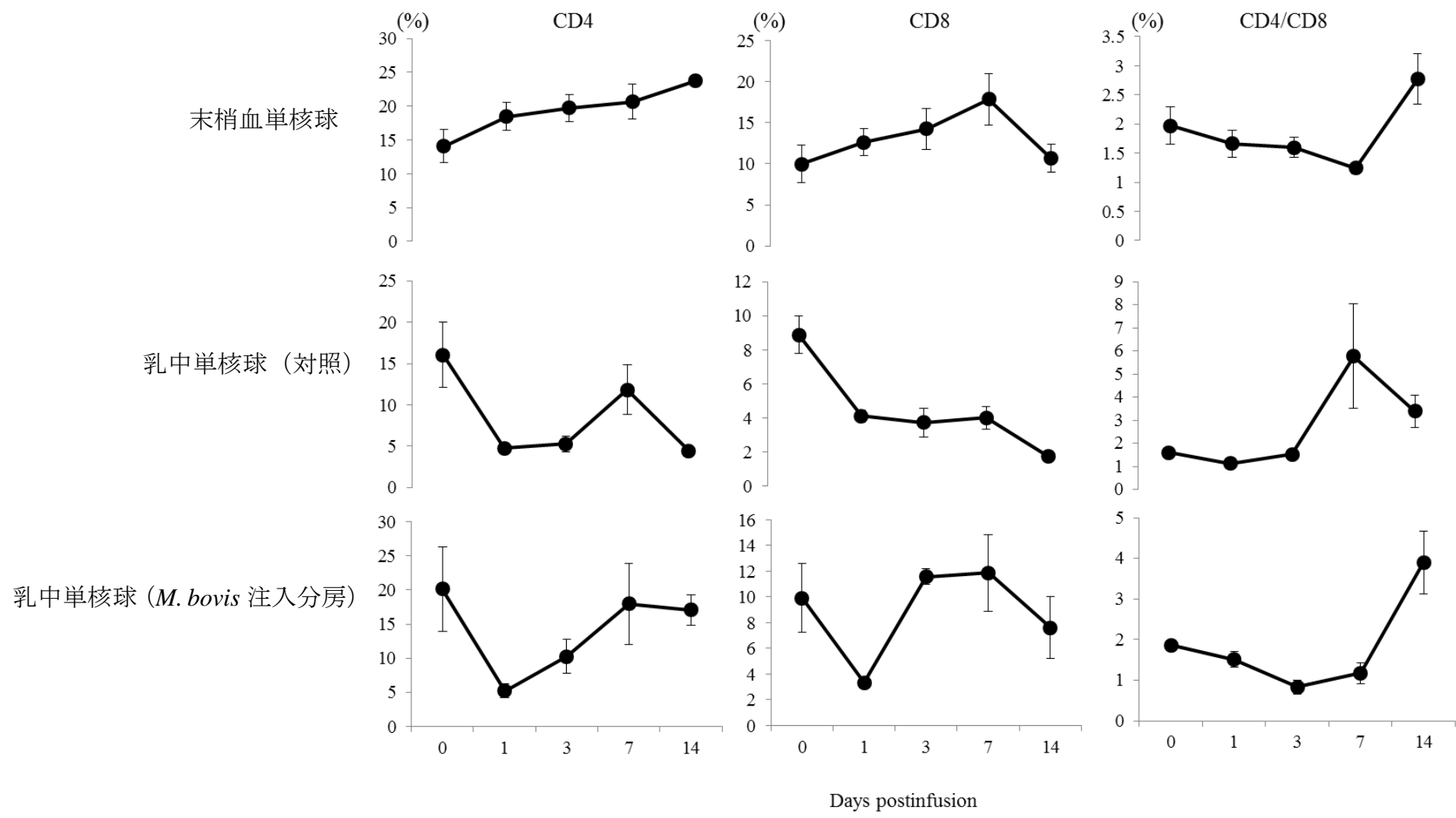


図 27-1 *M. bovis* の乳房内注入にともなう実験牛の末梢血単核球および乳中単核球ポピュレーションの推移 (N=3、mean ± SE)

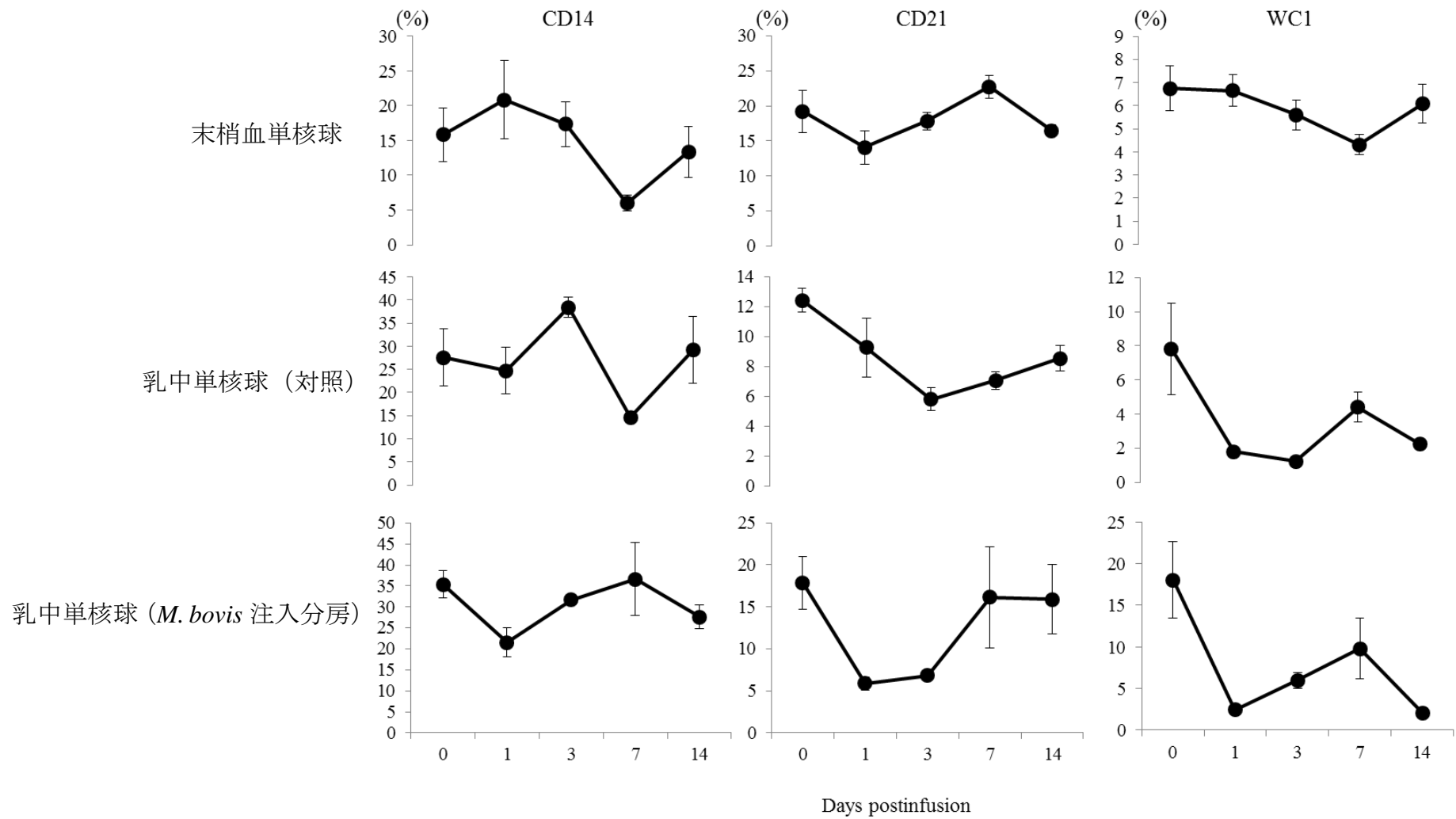


図 27-2 *M. bovis* の乳房内注入にともなう実験牛の末梢血単核球および乳中単核球ポピュレーションの推移
(N=3、mean ± SE)

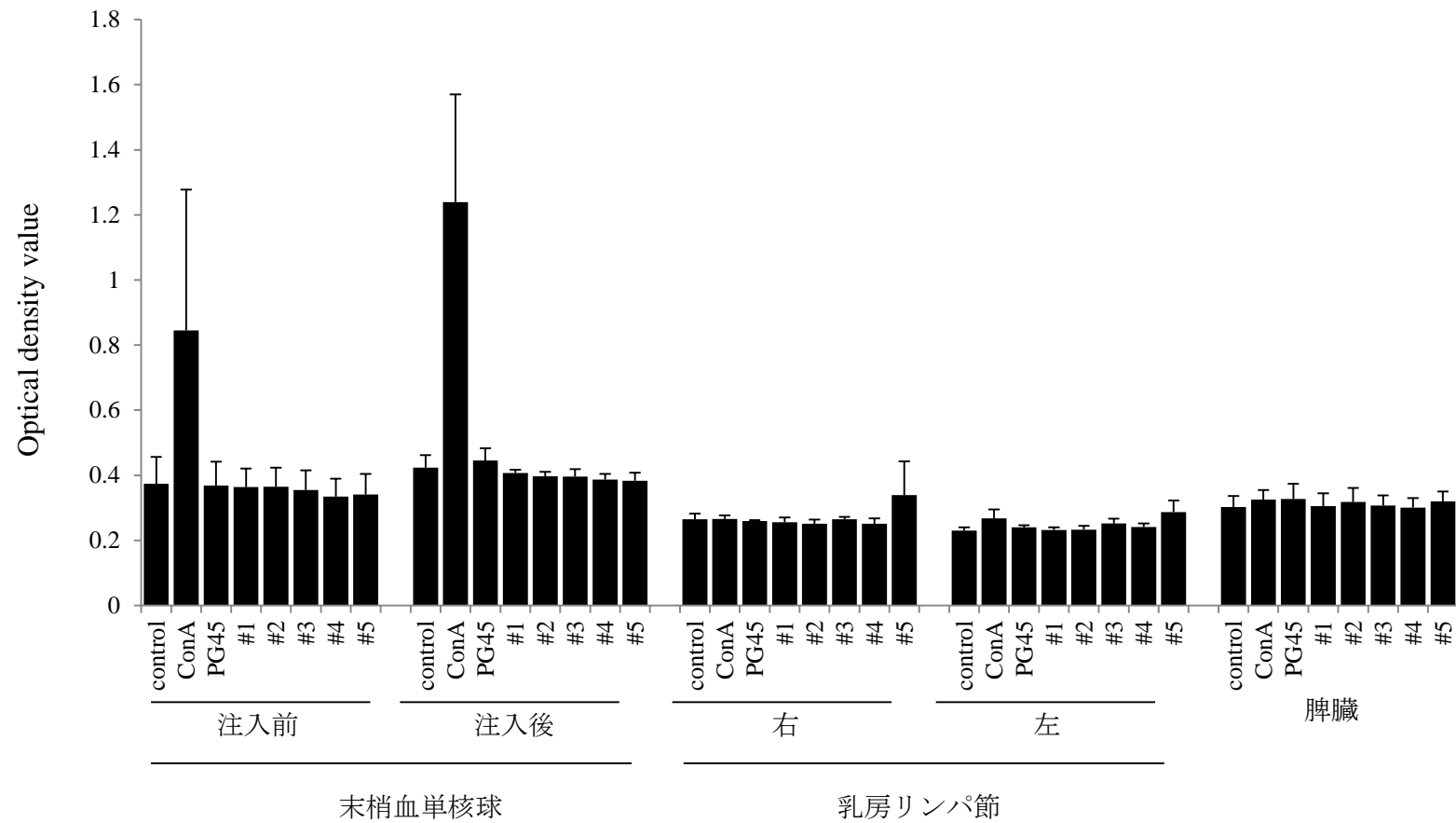


図 28 *M. bovis* の乳房内注入にともなう末梢血、乳房リンパ節および脾臓の単核球の細胞増殖反応 (N=5、mean ± SE)

表7 リアルタイム PCR による網羅的遺伝子発現解析の検証および定量化に使用したプライマー

Gene name	Primer sequence (5' -3')	Amplicon size (bps)	Accession number
CFD	F: CAC TGA GCG AAT GAT GTG CG	143	NM_001034255
	R: TAC CGG GCT TCT TGT GGT TG		
FCN1	F: TGG AGA GAA AGG AGA GTC GGG	179	NM_001010996
	R: GGA AAA CGG TCC ACC CCC		
TNFSF13	F: ATC TAG CGG CGG TTT GAG AC	120	NM_001034647
	R: TGA GGA TGG GGC TTC TTG TG		

F, forward; R, reverse; bps, base pairs

CFD : complement factor D、FCN1 : ficolin 1、TNFSF13 : tumor necrosis factor superfamily member 13.

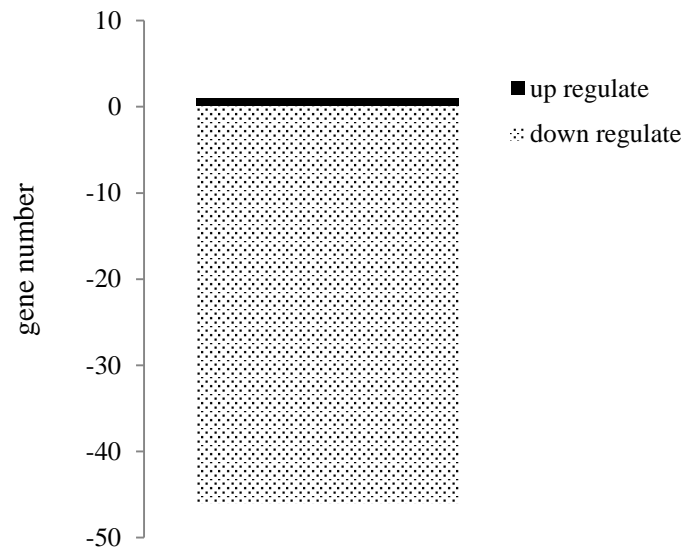


図 29 *M. bovis* の注入にともなう末梢血単核球の網羅的遺伝子発現解析において有意差が認められた遺伝子数

表 8-1 *M. bovis* の乳房内注入にともなう実験牛の末梢血単核球の網羅的遺伝子発現解析において有意差が認められた遺伝子

Ensembl Transcript ID	Gene Symbol	Description	log(FC)
ENSBTAT00000006432	TGM3	transglutaminase 3	2.96215
ENSBTAT000000037991	IFT27	intraflagellar transport 27	-2.1218
ENSBTAT000000015339	GDA	guanine deaminase	-2.04713
ENSBTAT000000008157	IFT27	intraflagellar transport 27	-1.88162
ENSBTAT000000011924	MMP19	matrix metalloproteinase 19	-1.62223
ENSBTAT000000021759	VNN2	vanin 2	-1.58925
ENSBTAT000000017935	CYP27A1	cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1	-1.57239
ENSBTAT000000043778	CTNND1	catenin (cadherin-associated protein), delta 1	-1.54126
ENSBTAT000000036255	ZNF618	zinc finger protein 618	-1.49977
ENSBTAT000000027862	SIRPB1	signal-regulatory protein beta 1	-1.47762
ENSBTAT000000063284	CFD	complement factor D (adipsin)	-1.45001
ENSBTAT000000008933	EHD4	EH-domain containing 4	-1.44665
ENSBTAT000000009971	KIAA1598	KIAA1598 ortholog	-1.44087
ENSBTAT000000001412	PILRA	paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha	-1.40061
ENSBTAT000000024068	LYPD3	LY6/PLAUR domain containing 3	-1.39777
ENSBTAT000000012815	FGL2	fibrinogen-like 2	-1.39103
ENSBTAT000000019526	ADAMTS2	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 2	-1.3762
ENSBTAT000000020104	USHBP1	Usher syndrome 1C binding protein 1	-1.36989
ENSBTAT000000026323	PRKCDBP	protein kinase C, delta binding protein	-1.36905

表 8-2 *M. bovis* の乳房内注入にともなう実験牛の末梢血単核球の網羅的遺伝子発現解析において有意差が認められた遺伝子

Ensembl Transcript ID	Gene Symbol	Description	log(FC)
ENSBTAT00000015898	BATF3	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3	-1.36115
ENSBTAT00000013165	IGSF8	immunoglobulin superfamily, member 8	-1.35422
ENSBTAT00000065290	VSTM1	V-set and transmembrane domain containing 1	-1.34393
ENSBTAT00000066000	FCN1	ficolin (collagen/fibrinogen domain containing) 1	-1.34049
ENSBTAT00000014308	CMBL	carboxymethylenebutenolidase homolog (Pseudomonas)	-1.34012
ENSBTAT00000011785	RAP1GAP	RAP1 GTPase activating protein	-1.33949
ENSBTAT00000002383	SNX10	sorting nexin 10	-1.32922
ENSBTAT00000025261	KCNT1	potassium channel, subfamily T, member 1	-1.30885
ENSBTAT00000002385	SLC2A6	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 6	-1.29401
ENSBTAT00000000950	NDRG1	N-myc downstream regulated 1	-1.25956
ENSBTAT00000048850	SPSB2	splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 2	-1.24715
ENSBTAT00000019496	NAPRT	nicotinate phosphoribosyltransferase	-1.23282
ENSBTAT00000044038	PPARG	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	-1.20929
ENSBTAT00000065623	FCN1	ficolin (collagen/fibrinogen domain containing) 1	-1.18554
ENSBTAT00000011388	SULT1A1	sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1	-1.15616
ENSBTAT00000006742	SLC31A2	solute carrier family 31 (copper transporter), member 2	-1.14466
ENSBTAT00000000231	LOC781146	lysozyme	-1.14342
ENSBTAT00000007041	DES	desmin	-1.13228
ENSBTAT00000026052	TBC1D2	TBC1 domain family, member 2	-1.11302

表 8-3 *M. bovis* の乳房内注入にともなう実験牛の末梢血単核球の網羅的遺伝子発現解析において有意差が認められた遺伝子

Ensembl Transcript ID	Gene Symbol	Description	log(FC)
ENSBTAT00000021077	FLTP	cilia and flagella associated protein 126	-1.10914
ENSBTAT00000016300	AKR7A3; AKR7A2	aldo-keto reductase family 7, member A3 (aflatoxin aldehyde reductase)	-1.09308
ENSBTAT00000020664	DLC1	DLC1 Rho GTPase activating protein	-1.07505
ENSBTAT00000001463	ANXA4	annexin A4	-1.03832
ENSBTAT00000033792	FAM63A	amily with sequence similarity 63, member A	-1.03101
ENSBTAT00000020985	EFNB1	ephrin-B1	-1.03058
ENSBTAT00000028416	SCAMP5	secretory carrier membrane protein 5	-1.02145
ENSBTAT00000000141	TNFSF13; TNFSF12	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13, tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12	-1.01578
ENSBTAT00000017923	MARVELD1	MARVEL domain containing 1	-1.00297

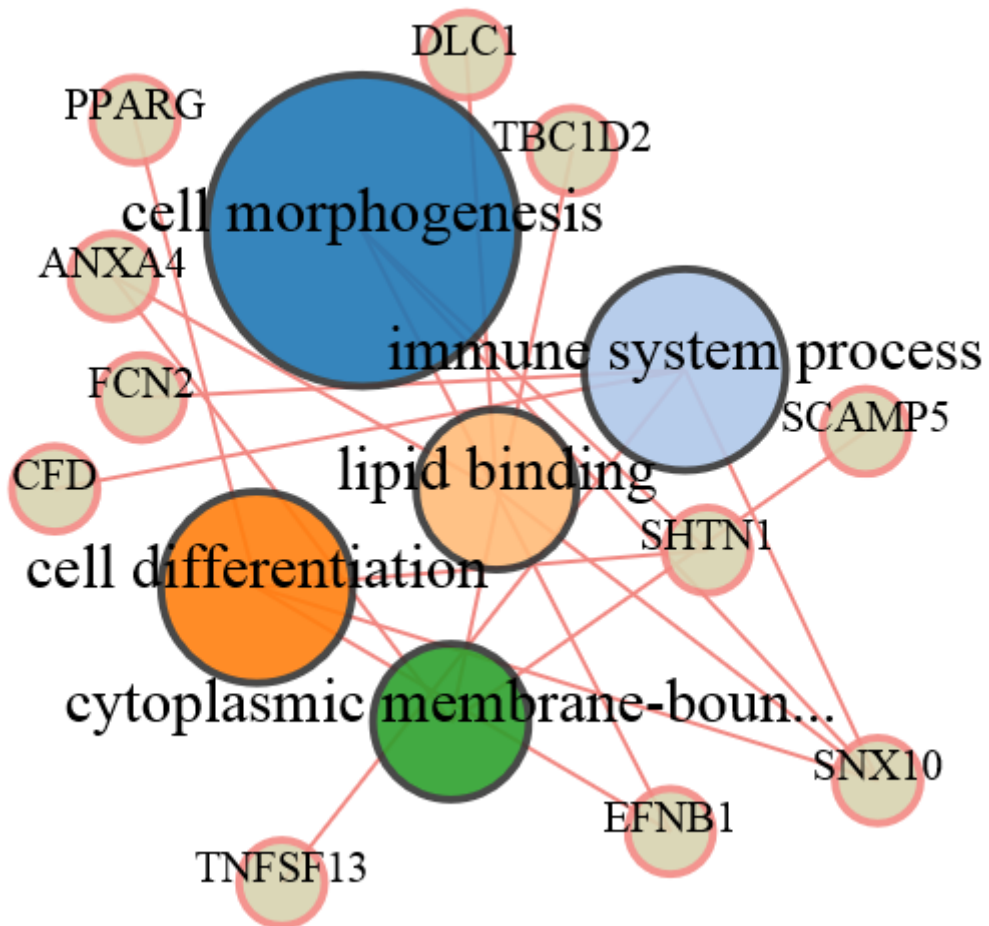


図 30 *M. bovis* の乳房内注入にともなう実験牛の末梢血単核球において有意差が認められた遺伝子の遺伝子オントロジーエンリッチメント解析

表 9 *M. bovis* の乳房内注入にともなう実験牛の末梢血単核球で有意差が認められた遺伝子の遺伝子オントロジーエンリッチメント解析

Description	P-Value	Corrected P-Value
cell morphogenesis	0.00237093	0.336672
immune system process	0.0106972	1
cell differentiation	0.0114526	1
lipid binding	0.013824	1
cytoplasmic membrane-bounded vesicle	0.0141485	1
hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds	0.0160528	1
catabolic process	0.0172952	1
anatomical structure development	0.0226945	1
extracellular matrix organization	0.0261284	1
endosome	0.0295421	1
cell wall organization or biogenesis	0.0389424	1

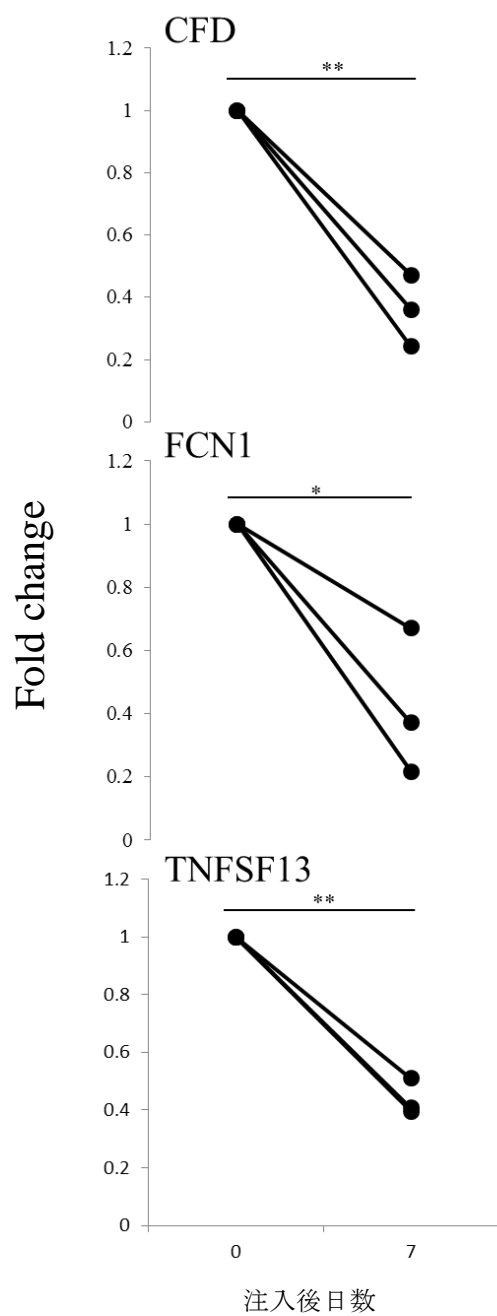


図 31 リアルタイム PCR による網羅的遺伝子発現解析の検証および定量化
 (* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$)

CFD : complement factor D、FCN1 : ficolin 1、TNFSF13 : tumor necrosis factor superfamily member 13.

4. 考察

伝染性乳房炎に分類されるマイコプラズマ性乳房炎は、近年、国内における発生率の増加が問題になっている[82]。本病に対する有効なワクチンは未だ開発されておらず、さらに抗生剤治療に対する反応も乏しいことから淘汰対象として扱われる症例も多い[14, 52]。*M. bovis* はマイコプラズマ性乳房炎牛から高率に分離され、泌乳停止、乳房の腫脹および硬結などの重篤な臨床症状を引き起こす[52]。しかし、マイコプラズマに対する免疫応答については十分に解明されておらず、これらを明らかにすることはウシに対する *M. bovis* の病原性および宿主の免疫応答を解明する上で重要である。本研究では *M. bovis* に対するウシの免疫応答性を解明することを目的とし、乳房内に *M. bovis* を注入し、乳汁中の菌数、体細胞数および血清、乳清抗体価、単核球ポピュレーション、また、血液一般検査、単核球の細胞増殖能および末梢血単核球の網羅的遺伝子発現を評価することにより *M. bovis* に対するウシの免疫応答について検討した。

M. bovis の乳房内注入により、本研究ではいずれの個体でも乳汁中において最大 $10^8 \sim 10^9$ CFU/ml の菌が検出された。Bannerman ら[2, 3]は、他の乳房炎原因菌である *E. coli*、*S. aureus*、*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) を乳房内に注入した時に検出される菌数は $10^3 \sim 10^5$ CFU/ml であり、本研究で検出された *M. bovis* の菌数はそれらと比較して $10^3 \sim 10^6$ 倍高値を示すことが確認された。このことから、他の菌と比較し *M. bovis* による乳房炎では排菌数は高値を示すことが明らかとなった。菌の注入は A 分房のみであったが、すべての感染

個体で B 分房からも菌が検出されたことから、Boothby ら[9]の報告にもあるように、注入した菌が何らかのメカニズムにより非注入分房に移行し、感染した可能性が示唆された。

A 分房の平均体細胞数はピーク時に $37.0 \pm 3.8 \times 10^6$ cells/ml を示した。

Bannerman ら[2, 3]は、乳房炎原因菌を乳房内に注入し体細胞数を測定しており、*E. coli* で $44.9 \pm 5.0 \times 10^6$ cells/ml、*S. aureus* で $32.1 \pm 5.9 \times 10^6$ cells/ml、*P. aeruginosa* で $62.9 \pm 6.4 \times 10^6$ cells/mL と報告している。これらの結果から、*M. bovis* 注入では *S. aureus* 感染とほぼ同程度の体細胞数が誘導されることが明らかになった。

マイコプラズマに対するウシ乳腺の免疫応答について、Kauf ら[30]は、*M. bovis* をウシ乳房へ注入することより、好中球減少症、白血球減少症および血小板減少症が引き起こされることを報告している。本研究においても好中球は *M. bovis* 注入後、末梢血では減少傾向が認められたが、白血球数は増加傾向を示した。単球は末梢血では減少する傾向が認められ、感染分房では増加する傾向が認められた。リンパ球は末梢血中では増加傾向を示し、感染分房では CD8 陽性 T 細胞の割合が増加することが認められた。*E. coli* の乳房内感染において CD8 陽性 T 細胞が乳汁中で優勢になることが報告されており[39]、本研究の結果から、*M. bovis* の乳房内感染にともなう免疫応答は *E. coli* による乳房炎に類似することが示唆された。

血清中 Fe の減少は細菌の増殖性を抑制させるための一般的な宿主防御機構であり [35]、*S. aureus* および *E. coli* による乳房炎罹患牛の血清中の Fe 濃度は減少することが報告されている [19, 40]。マイコプラズマ種の鉄要求性は示されていないが、菌体に鉄を含有すること [49] および鉄貯蔵性が報告されている [5]。本研究において末梢血中の Fe 濃度の上昇傾向が認められたが、この傾向は *M. bovis* による乳房炎の臨床症状のひとつの特徴と考えられた。血清抗体価は注入後 7 日目以降に上昇し、10 日目から 14 日目までほぼ同値で推移した。血清抗体価は No.2 でやや高値を示したが各個体ともほぼ同程度の値で推移した。乳清抗体価は 8 日目以降に顕著な上昇が認められ、14 日目まで上昇を続けた。乳清中の抗体量が急激に増加した要因は明らかではないが、Burton ら [11] の報告にあるように、乳腺の炎症により大量の血清抗体が乳汁中へ移行した可能性が推察される。また、正常乳房でも抗体価の上昇が認められたことから乳房リンパ節においても抗体が産生されている可能性が推察される。しかし、乳房リンパ節の細胞への *M. bovis* 抗原再刺激では、細胞増殖が確認されず、末梢血単核球および脾臓細胞でも *M. bovis* 刺激による細胞増殖は認められなかった。このことは *M. bovis* 特異抗原に対する抗体産生が行われていないか、または免疫機能抑制が関与していることを示唆している。網羅的遺伝子発現解析において、46 遺伝子の減少が認められ、機能解析の結果からも、免疫反応系に関する機能の減少が示唆された。補体の活性化に関係する 2 つの遺伝子の減少が認められ、ficolin 1 (FCN1) はレクチン経路 [22]、complement factor D (CFD)

は代替経路の活性化に関与する遺伝子である[78]。また、tumor necrosis factor superfamily member 13 (TNFSF13) は B 細胞の分化に関与している[7]。これらのことから、*M. bovis* 乳房内感染に伴う生体の免疫応答抑制を引き起こすメカニズムの存在が考えられた。Rodrigues ら[56]は牛肺疫感染牛における末梢血単核球の網羅的遺伝子発現解析で、有意な変化を認めた遺伝子の 85%が減少し、末梢血における免疫応答は局所における免疫応答と一致しないことを報告している。本研究においても同様に局所の免疫応答と全身における免疫応答は一致していないものと考えられる。

5. 小括

1. 分房への *M. bovis* 注入は他の乳房炎原因菌と比較し分房乳中に高い排菌数が認められたが、体細胞数は他の菌で誘導されるそれらと比較して低値を示すことが明らかとなった。

2. マイコプラズマ性乳房炎における乳汁中の単核球について、*M. bovis* 乳房内注入により CD14 陽性細胞および CD8 陽性細胞が末梢血において減少および *M. bovis* 注入分房乳で増加することが明らかとなり、*M. bovis* 排除に細胞性免疫が重要な役割を担うことが示唆された。

3. マイコプラズマ性乳房炎の罹患により、血清や乳清に特異抗体が誘導されることが明らかとなった。しかし乳房リンパ節、脾臓細胞および末梢血単核球における *M. bovis* 再刺激では細胞増殖は確認されず、*M. bovis* 感染による免疫応答抑制機構の存在が示唆された。

第IV章 総括

本研究では、*M. bovis* に対するウシ宿主細胞の免疫応答を解明することを目的とし、免疫担当細胞である単核球、好中球ならびに感染局所としての乳腺上皮細胞に着目し、これらの遺伝子的小および機能的な検討を行うとともに、*M. bovis* 乳房内注入により引き起こされたマイコプラズマ性乳房炎の生体に及ぼす影響を検討し、以下の結果を得た。

1. *M. bovis* 刺激下におけるウシ免疫担当細胞の網羅的遺伝子発現解析

M. bovis 感染下におけるウシ末梢血単核球、末梢血好中球およびウシ乳腺上皮細胞の免疫応答に関連した遺伝子発現を明らかにする目的で、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、定量的リアルタイム PCR 法により免疫応答に関連する遺伝子発現量を検討した。*M. bovis* はウシ単核球および好中球の免疫応答関連遺伝子の発現を増加させることが明らかとなり、単核球 IFN- γ 、IL-17F、IL27 および IL-36A の mRNA 発現量増加を示した。好中球 NOS2、CXCL2 および IL-36A の mRNA 発現量増加が認められた。*M. bovis* 刺激下における単核球および好中球に共通した遺伝子発現に関して、免疫応答抑制に関する mRNA (BATF、SLAMF1 および SLAMF7) 発現増加が認められた。*M. bovis* 刺激下における乳腺上皮細胞の免疫に関連する mRNA 発現量は *E. coli* とは異なる応答を示し、*S. aureus* に類似することが明らかとなった。また、*M. bovis* 刺激下における単核球のサイトカイン mRNA 発現は菌数の増加に

より誘導されることが明らかとなった。以上の結果より、*M. bovis* 感染において、単核球は Th1 または Th17 免疫応答、また免疫応答抑制に関連する遺伝子を増加させ、好中球は抗菌活性および炎症反応に関連する遺伝子の増加が確認された。また、*M. bovis* の免疫応答の誘導は一定の菌数で起こるものと考えられた。

2. *M. bovis* 刺激がウシ免疫担当細胞の機能発現に及ぼす影響

M. bovis 感染下におけるウシ単核球および好中球の機能的な免疫応答を明らかにする目的で、単核球のサイトカイン産生量および細胞増殖能を評価するとともに、好中球の NO 産生能および Neutrophil extracellular traps 形成に及ぼす影響を検討した。*M. bovis* の生菌は単核球の細胞増殖およびサイトカインを産生することが明らかとなった。*M. bovis* の単独刺激では NETs 形成は認められず NETs 形成誘導剤である PMA との共刺激でも認められなかった。*M. bovis* は形成された NETs を消失させるが、この現象は EDTA 存在下では抑制された。NETs による *M. bovis* の生存率は EDTA 存在下で減少した。以上の結果から、*M. bovis* は自身のヌクレアーゼにより好中球の NETs から回避していることが示唆され、*M. bovis* のヌクレアーゼは一病原性因子と考えられた。

3. *M. bovis* の乳房内感染とウシ乳腺の免疫学的応答性

マイコプラズマ性乳房炎に対するウシの免疫応答を明らかにする目的で、*M. bovis* 乳房内注入による血清および乳清中 *M. bovis* 特異的抗体価、体細胞数、一般血液検査および乳汁中単核球ポピュレーションの動態を評価するとともに、単核球の網羅的遺伝子発現解析を行い、乳房リンパ節の細胞増殖能を検討した。*M. bovis* 注入は他の乳房炎原因菌と比較し高い排菌数が認められたが体細胞数は他の菌で誘導されるそれらと比較して低値を示すことが明らかとなった。マイコプラズマ性乳房炎における乳中単核球の推移は、*M. bovis* 乳房内注入により CD14 陽性細胞および CD8 陽性細胞が末梢血において減少したが、*M. bovis* 注入分房乳中で増加することが明らかとなった。マイコプラズマ性乳房炎の罹患により、血清および乳清において *M. bovis* 特異抗体が誘導されることが明らかとなった。しかし、乳房リンパ節、脾臓細胞および末梢血単核球における *M. bovis* 再刺激では細胞増殖は確認されなかった。以上のことから *M. bovis* 排除には細胞性免疫および液性免疫が重要な役割を担うこと、また、*M. bovis* 感染による単核球の免疫応答能の抑制が示唆された。

以上の研究から、マイコプラズマ性乳房炎に関して、免疫担当細胞の分子生物学的および機能的な変化を明らかにするとともに、*M. bovis* の乳房内注入による生体の免疫応答の一部を解明した。本研究はマイコプラズマ性乳房炎の理解において有用な基礎的知見を示したものと考えられる。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、終始懇切なる御指導と御校閲を賜った本学獣医衛生学ユニット 永幡 肇教授および樋口豪紀教授に深甚なる謝意を表します。また、貴重な御助言と御校閲を賜った獣医細菌学ユニット 菊池直哉教授、獣医生化学ユニット 岩野英知准教授に謝意を表します。研究の遂行に貴重な御助言と臨床材料の提供を頂いた生産動物内科Ⅱ 小岩政照教授、また、病理学的解析において御指導を頂きました獣医病理学ユニット 谷山弘行教授ならびに松田一哉准教授に心から御礼申し上げます。研究の遂行にご協力を頂いた農研機構北海道農業研究センター 中島恵一博士、ならびに動物衛生研究所 林 智人博士および菊 佳男博士に深謝致します。本研究において貴重な御助言を賜りました、北海道大学 今内 覚准教授、ならびに鹿児島大学生物機能分子研究室 橋口周平助教に感謝の意を表します。血液採材の採取に当たり御協力を頂いた、本学付属農場の各位に深謝致します。最後に本研究に御協力を頂いた獣医衛生学ユニットの各位に感謝します。

引用文献

1. Ayling, R. D., Bashiruddin, S. E. and Nicholas, R. A. 2004. *Mycoplasma* species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 and 2000. *Vet. Rec.* **155**: 413-416.
2. Bannerman, D. D., Chockalingam, A., Paape, M. J. and Hope, J. C. 2005. The bovine innate immune response during experimentally-induced *Pseudomonas aeruginosa* mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **107**: 201-215.
3. Bannerman, D. D., Paape, M. J., Lee, J. W., Zhao, X., Hope, J. C. and Rainard, P. 2004. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**: 463-472.
4. Barile, M. F. and Leventhal, B. G. 1968. Possible mechanism for *Mycoplasma* inhibition of lymphocyte transformation induced by phytohaemagglutinin. *Nature* **219**: 750-752.
5. Bauminger, E. R., Cohen, S. G., Labenski de Kanter, F., Levy, A., Ofer, S., Kessel, M. and Rottem, S. 1980. Iron storage in *Mycoplasma capricolum*. *J. Bacteriol.* **141**: 378-381.
6. Behrens, A., Heller, M., Kirchhoff, H., Yogev, D. and Rosengarten, R. 1994. A family of phase- and size-variant membrane surface lipoprotein antigens (Vsps) of *Mycoplasma bovis*. *Infect. Immun.* **62**: 5075-5084.

7. Belnoue, E., Pihlgren, M., McGaha, T. L., Tougne, C., Rochat, A. F., Bossen, C., Schneider, P., Huard, B., Lambert, P. H. and Siegrist, C. A. 2008. APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. *Blood* **111**: 2755-2764.
8. Berends, E. T., Horswill, A. R., Haste, N. M., Monestier, M., Nizet, V. and von Kückritz-Blickwede, M. 2010. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J. Innate. Immun.* **2**: 576-586.
9. Boothby, J. T., Jasper, D. E. and Thomas, C. B. 1986. Experimental intramammary inoculation with *Mycoplasma bovis* in vaccinated and unvaccinated cows: effect on the mycoplasmal infection and cellular inflammatory response. *Cornell Vet.* **76**: 188-197.
10. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y. and Zychlinsky, A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**: 1532-1535.
11. Burton, J. L. and Erskine, R. J. 2003. Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **19**: 1-45, v.
12. Bushnell, R. B. 1984. Mycoplasma mastitis. *Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract.* **6**: 301-312.
13. Byrne, W., Markey, B., McCormack, R., Egan, J., Ball, H. and Sachse, K. 2005.

- Persistence of *Mycoplasma bovis* infection in the mammary glands of lactating cows inoculated experimentally. *Vet. Rec.* **156**: 767-771.
14. Bürki, S., Frey, J. and Pilo, P. 2015. Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Microbiol.* **179**: 15-22.
 15. Chain, B. 2012. agilp: Agilent expression array processing package. R package version 3.2.0., ed.
 16. Chen, J. R., Weng, C. N., Ho, T. Y., Cheng, I. C. and Lai, S. S. 2000. Identification of the copper-zinc superoxide dismutase activity in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.* **73**: 301-310.
 17. Davidson, I. and Stuart, P. 1960. Bovine mastitis caused by a mycoplasma. *Vet. Rec.* **72**: 766.
 18. de Buhr, N., Neumann, A., Jerjomiceva, N., von Köckritz-Blickwede, M. and Baums, C. G. 2014. *Streptococcus suis* DNase SsnA contributes to degradation of neutrophil extracellular traps (NETs) and evasion of NET-mediated antimicrobial activity. *Microbiology* **160**: 385-395.
 19. Erskine, R. J. and Bartlett, P. C. 1993. Serum concentrations of copper, iron, and zinc during *Escherichia coli*-induced mastitis. *J. Dairy Sci.* **76**: 408-413.
 20. Fox, L. K., Kirk, J. H. and Britten, A. 2005. Mycoplasma mastitis: a review of transmission and control. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* **52**: 153-160.

21. Fu, Y., Zhou, E., Liu, Z., Li, F., Liang, D., Liu, B., Song, X., Zhao, F., Fen, X., Li, D., Cao, Y., Zhang, X., Zhang, N. and Yang, Z. 2013. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* elicit different innate immune responses from bovine mammary epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **155**: 245-252.
22. Garred, P., Honoré, C., Ma, Y. J., Munthe-Fog, L. and Hummelshøj, T. 2009. MBL2, FCN1, FCN2 and FCN3-The genes behind the initiation of the lectin pathway of complement. *Mol. Immunol.* **46**: 2737-2744.
23. Gilbert, F. B., Cunha, P., Jensen, K., Glass, E. J., Foucras, G., Robert-Granié, C., Rupp, R. and Rainard, P. 2013. Differential response of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system. *Vet. Res.* **44**: 40.
24. Goldammer, T., Zerbe, H., Molenaar, A., Schuberth, H. J., Brunner, R. M., Kata, S. R. and Seyfert, H. M. 2004. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**: 174-185.
25. Griesbeck-Zilch, B., Osman, M., Kühn, C., Schwerin, M., Bruckmaier, R. H., Pfaffl, M. W., Hammerle-Fickinger, A., Meyer, H. H. and Wellnitz, O. 2009. Analysis of key molecules of the innate immune system in mammary epithelial cells isolated from marker-assisted and conventionally selected cattle. *J. Dairy Sci.* **92**: 4621-4633.

26. Hermosilla, C., Caro, T. M., Silva, L. M., Ruiz, A. and Taubert, A. 2014. The intriguing host innate immune response: novel anti-parasitic defence by neutrophil extracellular traps. *Parasitology* **141**: 1489-1498.
27. Hirose, K., Kawasaki, Y., Kotani, K., Tanaka, A., Abiko, K. and Ogawa, H. 2001. Detection of mycoplasma in mastitic milk by PCR analysis and culture method. *J. Vet. Med. Sci.* **63**: 691-693.
28. Iwasaki, Y., Fujio, K., Okamura, T. and Yamamoto, K. 2015. Interleukin-27 in T cell immunity. *Int. J. Mol. Sci.* **16**: 2851-2863.
29. Jenkins, C., Samudrala, R., Geary, S. J. and Djordjevic, S. P. 2008. Structural and functional characterization of an organic hydroperoxide resistance protein from *Mycoplasma gallisepticum*. *J. Bacteriol.* **190**: 2206-2216.
30. Kauf, A. C., Rosenbusch, R. F., Paape, M. J. and Bannerman, D. D. 2007. Innate immune response to intramammary *Mycoplasma bovis* infection. *J. Dairy Sci.* **90**: 3336-3348.
31. Kim, J. R., Horton, N. C., Mathew, S. O. and Mathew, P. A. 2013. CS1 (SLAMF7) inhibits production of proinflammatory cytokines by activated monocytes. *Inflamm. Res.* **62**: 765-772.
32. Kleinschmidt, S., Spargser, J., Rosengarten, R. and Hewicker-Trautwein, M. 2013. Long-term survival of *Mycoplasma bovis* in necrotic lesions and in phagocytic cells as demonstrated by transmission and immunogold electron

- microscopy in lung tissue from experimentally infected calves. *Vet. Microbiol.* **162**: 949-953.
33. Langelaar, M. F., Weber, C. N., Overdijk, M. B., Müller, K. E., Koets, A. P. and Rutten, V. P. 2005. Cytokine gene expression profiles of bovine dendritic cells after interaction with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (M.a.p.), *Escherichia coli* (*E. coli*) or recombinant M.a.p. heat shock protein 70. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **107**: 153-161.
34. Lee, J. W., Bannerman, D. D., Paape, M. J., Huang, M. K. and Zhao, X. 2006. 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.
35. Lokken, K. L., Tsolis, R. M. and Bäumlner, A. J. 2014. Hypoferremia of infection: a double-edged sword? *Nat. Med.* **20**: 335-337.
36. Lu, X. and Rosenbusch, R. F. 2004. Endothelial cells from bovine pulmonary microvasculature respond to *Mycoplasma bovis* preferentially with signals for mononuclear cell transmigration. *Microb. Pathog.* **37**: 253-261.
37. Mackie, D. P., Finlay, D., Brice, N. and Ball, H. J. 2000. Mixed mycoplasma mastitis outbreak in a dairy herd. *Vet. Rec.* **147**: 335-336.
38. Maunsell, F. P., Woolums, A. R., Francoz, D., Rosenbusch, R. F., Step, D. L., Wilson, D. J. and Janzen, E. D. 2011. *Mycoplasma bovis* infections in cattle. *J.*

- Vet. Intern. Med.* **25**: 772-783.
39. Mehrzad, J., Janssen, D., Duchateau, L. and Burvenich, C. 2008. Increase in *Escherichia coli* inoculum dose accelerates CD8+ T-cell trafficking in the primiparous bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* **91**: 193-201.
 40. Middleton, J. R., Luby, C. D., Viera, L., Tyler, J. W. and Casteel, S. 2004. Short communication: influence of *Staphylococcus aureus* intramammary infection on serum copper, zinc, and iron concentrations. *J. Dairy Sci.* **87**: 976-979.
 41. Mudunuri, U., Che, A., Yi, M. and Stephens, R. M. 2009. bioDBnet: the biological database network. *Bioinformatics* **25**: 555-556.
 42. Mulongo, M., Prysliak, T., Scruten, E., Napper, S. and Perez-Casal, J. 2014. In vitro infection of bovine monocytes with *Mycoplasma bovis* delays apoptosis and suppresses production of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha but not interleukin-10. *Infect. Immun.* **82**: 62-71.
 43. Nakajima, K., Nakamura, M., Gao, X. D. and Kozakai, T. 2008. Possible involvement of prolactin in the synthesis of lactoferrin in bovine mammary epithelial cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**: 1103-1106.
 44. Nicholas, R. A. 2011. Bovine mycoplasmosis: silent and deadly. *Vet. Rec.* **168**: 459-462.
 45. Nocard and Roux. 1990. The microbe of pleuropneumonia. 1896. *Rev. Infect.*

- Dis.* **12**: 354-358.
46. O'Gorman, G. M., Park, S. D., Hill, E. W., Meade, K. G., Mitchell, L. C., Agaba, M., Gibson, J. P., Hanotte, O., Naessens, J., Kemp, S. J. and MacHugh, D. E. 2006. Cytokine mRNA profiling of peripheral blood mononuclear cells from trypanotolerant and trypanosusceptible cattle infected with *Trypanosoma congolense*. *Physiol. Genomics* **28**: 53-61.
47. Patel, S., Kumar, S., Jyoti, A., Srinag, B. S., Keshari, R. S., Saluja, R., Verma, A., Mitra, K., Barthwal, M. K., Krishnamurthy, H., Bajpai, V. K. and Dikshit, M. 2010. Nitric oxide donors release extracellular traps from human neutrophils by augmenting free radical generation. *Nitric Oxide* **22**: 226-234.
48. Patel, V. P., Kreider, B. L., Li, Y., Li, H., Leung, K., Salcedo, T., Nardelli, B., Pippalla, V., Gentz, S., Thotakura, R., Parmelee, D., Gentz, R. and Garotta, G. 1997. Molecular and functional characterization of two novel human C-C chemokines as inhibitors of two distinct classes of myeloid progenitors. *J. Exp. Med.* **185**: 1163-1172.
49. Pollack, J. D., Merola, A. J., Platz, M. and Booth, R. L. 1981. Respiration-associated components of Mollicutes. *J. Bacteriol.* **146**: 907-913.
50. Punyapornwithaya, V., Fox, L. K., Hancock, D. D., Gay, J. M. and Alldredge, J. R. 2012. Time to clearance of mycoplasma mastitis: the effect of management factors including milking time hygiene and preferential culling.

- Can. Vet. J.* **53**: 1119-1122.
51. Quigley, M., Pereyra, F., Nilsson, B., Porichis, F., Fonseca, C., Eichbaum, Q., Julg, B., Jesneck, J. L., Brosnahan, K., Imam, S., Russell, K., Toth, I., Piechocka-Trocha, A., Dolfi, D., Angelosanto, J., Crawford, A., Shin, H., Kwon, D. S., Zupkosky, J., Francisco, L., Freeman, G. J., Wherry, E. J., Kaufmann, D. E., Walker, B. D., Ebert, B. and Haining, W. N. 2010. Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat. Med.* **16**: 1147-1151.
52. Radaelli, E., Castiglioni, V., Losa, M., Benedetti, V., Piccinini, R., Nicholas, R. A., Scanziani, E. and Luini, M. 2011. Outbreak of bovine clinical mastitis caused by *Mycoplasma bovis* in a North Italian herd. *Res. Vet. Sci.* **91**: 251-253.
53. Razin, S., Yogev, D. and Naot, Y. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1094-1156.
54. Riollet, C., Rainard, P. and Poutrel, B. 2000. Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.* **480**: 247-258.
55. Robinson, T. L., Sutherland, I. A. and Sutherland, J. 2007. Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **115**: 160-165.
56. Rodrigues, V., Holzmuller, P., Puech, C., Wesonga, H., Thiaucourt, F. and

- Manso-Silván, L. 2015. Whole Blood Transcriptome Analysis of *Mycoplasma mycoides* Subsp. *mycoides*-Infected Cattle Confirms Immunosuppression but Does Not Reflect Local Inflammation. *PLoS One* **10**: e0139678.
57. Rottem, S. 2003. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol. Rev.* **83**: 417-432.
58. Roy, J. P., Francoz, D. and Labrecque, O. 2008. Mastitis in a 7-week old calf caused by *Mycoplasma bovis*. *Vet. J.* **176**: 403-404.
59. Réthi, B., Gogolák, P., Szatmari, I., Veres, A., Erdős, E., Nagy, L., Rajnavölgyi, E., Terhorst, C. and Lányi, A. 2006. SLAM/SLAM interactions inhibit CD40-induced production of inflammatory cytokines in monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **107**: 2821-2829.
60. Seper, A., Hosseinzadeh, A., Gorkiewicz, G., Lichtenegger, S., Roier, S., Leitner, D. R., Röhm, M., Grutsch, A., Reidl, J., Urban, C. F. and Schild, S. 2013. *Vibrio cholerae* evades neutrophil extracellular traps by the activity of two extracellular nucleases. *PLoS Pathog.* **9**: e1003614.
61. Sharma, S., Tivendale, K. A., Markham, P. F. and Browning, G. F. 2015. Disruption of the membrane nuclease gene (MBOVPG45_0215) of *Mycoplasma bovis* greatly reduces cellular nuclease activity. *J. Bacteriol.* **197**: 1549-1558.
62. Smedley, D., Haider, S., Durinck, S., Pandini, L., Provero, P., Allen, J., Arnaiz, O., Awedh, M. H., Baldock, R., Barbiera, G., Bardou, P., Beck, T., Blake, A.,

Bonierbale, M., Brookes, A. J., Bucci, G., Buetti, I., Burge, S., Cabau, C.,
Carlson, J. W., Chelala, C., Chrysostomou, C., Cittaro, D., Collin, O., Cordova,
R., Cutts, R. J., Dassi, E., Di Genova, A., Djari, A., Esposito, A., Estrella, H.,
Eyras, E., Fernandez-Banet, J., Forbes, S., Free, R. C., Fujisawa, T., Gadaleta,
E., Garcia-Manteiga, J. M., Goodstein, D., Gray, K., Guerra-Assunção, J. A.,
Haggarty, B., Han, D. J., Han, B. W., Harris, T., Harshbarger, J., Hastings, R.
K., Hayes, R. D., Hoede, C., Hu, S., Hu, Z. L., Hutchins, L., Kan, Z., Kawaji,
H., Keliet, A., Kerhornou, A., Kim, S., Kinsella, R., Klopp, C., Kong, L.,
Lawson, D., Lazarevic, D., Lee, J. H., Letellier, T., Li, C. Y., Lio, P., Liu, C. J.,
Luo, J., Maass, A., Mariette, J., Maurel, T., Merella, S., Mohamed, A. M.,
Moreews, F., Nabihoudine, I., Ndegwa, N., Noirot, C., Perez-Llamas, C.,
Primig, M., Quattrone, A., Quesneville, H., Rambaldi, D., Reecy, J., Riba, M.,
Rosanoff, S., Saddiq, A. A., Salas, E., Sallou, O., Shepherd, R., Simon, R.,
Sperling, L., Spooner, W., Staines, D. M., Steinbach, D., Stone, K., Stupka, E.,
Teague, J. W., Dayem Ullah, A. Z., Wang, J., Ware, D., Wong-Erasmus, M.,
Youens-Clark, K., Zadissa, A., Zhang, S. J. and Kasprzyk, A. 2015. The
BioMart community portal: an innovative alternative to large, centralized data
repositories. *Nucleic. Acids Res.* **43**: W589-598.

63. Spalenza, V., Girolami, F., Bevilacqua, C., Riondato, F., Rasero, R., Nebbia,
C., Sacchi, P. and Martin, P. 2011. Identification of internal control genes for

- quantitative expression analysis by real-time PCR in bovine peripheral lymphocytes. *Vet. J.* **189**: 278-283.
64. Stipkovits, L., Somogyi, M., Asvanyi, B., Toth, A. and Szathmary, S. 2013. Short communication: role of *Mycoplasma arginini* in mastitis caused by *Streptococcus dysgalactiae*. *J. Dairy Sci.* **96**: 1661-1667.
65. Strandberg, Y., Gray, C., Vuocolo, T., Donaldson, L., Broadway, M. and Tellam, R. 2005. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine* **31**: 72-86.
66. Sutra, L. and Poutrel, B. 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* **40**: 79-89.
67. Tao, W. and Mallard, B. 2007. Differentially expressed genes associated with *Staphylococcus aureus* mastitis of Canadian Holstein cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **120**: 201-211.
68. Thammavongsa, V., Missiakas, D. M. and Schneewind, O. 2013. *Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. *Science* **342**: 863-866.
69. Towne, J. E., Garka, K. E., Renshaw, B. R., Virca, G. D. and Sims, J. E. 2004. Interleukin (IL)-1F6, IL-1F8, and IL-1F9 signal through IL-1Rrp2 and IL-

- 1RAcP to activate the pathway leading to NF-kappaB and MAPKs. *J. Biol. Chem.* **279**: 13677-13688.
70. van der Burgt, G., Main, W. and Ayling, R. 2008. Bovine mastitis caused by *Mycoplasma bovis*. *Vet. Rec.* **163**: 666.
71. van der Merwe, J., Prysliak, T. and Perez-Casal, J. 2010. Invasion of bovine peripheral blood mononuclear cells and erythrocytes by *Mycoplasma bovis*. *Infect. Immun.* **78**: 4570-4578.
72. van der Molen, E. J. and Grootenhuis, G. 1979. An investigation of the pathology of *Mycoplasma mastitis* in the cow. *Vet. Q.* **1**: 126-133.
73. Vanden Bush, T. J. and Rosenbusch, R. F. 2002. *Mycoplasma bovis* induces apoptosis of bovine lymphocytes. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **32**: 97-103.
74. Vanden Bush, T. J. and Rosenbusch, R. F. 2004. Characterization of a lympho-inhibitory peptide produced by *Mycoplasma bovis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**: 336-341.
75. Wiggins, M. C., Woolums, A. R., Hurley, D. J., Sanchez, S., Ensley, D. T. and Donovan, D. 2011. The effect of various *Mycoplasma bovis* isolates on bovine leukocyte responses. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **34**: 49-54.
76. Wright, H. L., Thomas, H. B., Moots, R. J. and Edwards, S. W. 2013. RNA-seq reveals activation of both common and cytokine-specific pathways following neutrophil priming. *PLoS One* **8**: e58598.

77. Xu, G., Li, Y., Yang, J., Zhou, X., Yin, X., Liu, M. and Zhao, D. 2007. Effect of recombinant Mce4A protein of *Mycobacterium bovis* on expression of TNF- α , iNOS, IL-6, and IL-12 in bovine alveolar macrophages. *Mol. Cell Biochem.* **302**: 1-7.
78. Xu, Y., Ma, M., Ippolito, G. C., Schroeder, H. W., Carroll, M. C. and Volanakis, J. E. 2001. Complement activation in factor D-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 14577-14582.
79. Yang, D., Chen, Q., Hoover, D. M., Staley, P., Tucker, K. D., Lubkowski, J. and Oppenheim, J. J. 2003. Many chemokines including CCL20/MIP-3 α display antimicrobial activity. *J. Leukoc. Biol.* **74**: 448-455.
80. Zbinden, C., Pilo, P., Frey, J., Bruckmaier, R. M. and Wellnitz, O. 2015. The immune response of bovine mammary epithelial cells to live or heat-inactivated *Mycoplasma bovis*. *Vet. Microbiol.* **179**: 336-340.
81. Zhu, Y., van Essen, D. and Saccani, S. 2012. Cell-type-specific control of enhancer activity by H3K9 trimethylation. *Mol. Cell* **46**: 408-423.
82. 草場 信之. 2010. 牛マイコプラズマ性乳房炎に挑む 北海道における牛マイコプラズマ性乳房炎の現状. *臨床獣医* **28**: 12-15.