

(海外実践疫学演習 海外共同研究演習) 報告書

2016 年 9 月 29 日提出

氏名	楓 龍治
所属	生化学教室
学年	博士課程 4 年
出張先	アイルランド国立研究所 Teagasc Grange Research Centre
出張期間	2016 年 8 月 2 日－2016 年 9 月 4 日
目的	ウシ乳房炎とその免疫応答に対する微生物学的実験手法の習得

活動内容 (2,000 字程度、活動内容が判る様な写真や図表を加えて下さい)

[緒論]

ウシ乳房炎は、世界各国で頻発し、甚大な経済的損失をもたらす疾病である。乳房炎の主な原因は細菌感染であり、大腸菌 (*E. coli*) や黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) などの細胞壁構成成分が好中球などの遊走を刺激することで、炎症を惹起する。

アイルランド国立研究所 Teagasc Grange Research Centre における Functional genomics 部門の Dr. Orla Keane (Dr. Orla) は生産動物の微生物の病原性に関する研究を行っている。これまで Dr. Orla は、乳房炎罹患牛より分離した *S. aureus* の分子系統解析、感染菌株にウシ乳腺上皮の免疫応答能、菌株の接着能の測定などにより、ウシ乳房炎の原因菌である *S. aureus* の株による病原性の違いを明らかにしてきた (Veterinary Microbiology 189 (2016) 24-31)。

原因菌の株の違いに応じた病原性の研究は、単なる治療とは別の視点でウシ乳房炎の制圧に貢献できる可能性があり、非常に興味深い。そこで、本活動は、ウシ乳房炎とその免疫応答に関する実験手法を習得することを目的とした。具体的には、免疫磁気分離法 (Magnetic-activated cell sorting: MACS) によりウシの血液から顆粒球 (好中球) を分離し、複数の株の *S. aureus* と貪食反応を行わせ、コロニー形成単位 (colony forming unit: CFU) を計測した。これにより、好中球の貪食反応に対する菌株の抵抗性の違いを見出すことができる。

[研究進捗]

訪問初日は、Dr. Orla が自ら研究所の各実験室、主要な実験機器、安全設備など案内して頂くとともに、研究所規則の遵守事項に関して一通り簡潔に説明して下さった。その際にラボメンバーに加えて、研究所の他の研究者の方々にも紹介して下さい、挨拶周りを兼ねることができた。その後、今回の研究プロジェクトの概要と実験手順に

関して丁寧に説明して下さい、訪問前にすでに読んでいた参考論文を改めて提示された。これは、研究目的や実験手法、そして今回の研究プロジェクトに重要な菌株に応じた特徴などを把握するために、論文を一通り再読するようにとのことだったが、理解を深めるうえで大変役立った。そして、実験機器の使い方を兼ねて、微生物学実験に必要な TSA/LB プレートや液体培地などを作製した。

翌日、凍結菌株の培養を開始した。今回は主に 4 種類の *S. aureus* (MOK006 [ST3173, CC71]、MOK023 [ST3170, CC97]、MOK032 [ST3170, CC97]、MOK043 [ST151, CC151]) と 1 種類の *E. coli* (MOK609 [ST10, CC10]) を扱い、継代培養や以後の好中球貪食実験に用いた。

ウシの血液から顆粒球（好中球）を分離・精製する MACS は、滞在中に合計 7 回行うことができた。MACS の実験手順を簡潔に述べると、赤血球の破碎、白血球ペレットの洗浄、好中球との抗体結合、抗体とのマイクロビーズ結合、磁気を利用した好中球のカラム精製である。また MACS 実験の合間に、MACS 処理に適切な細胞数や MACS 後の精製度を把握する上でフローサイトメトリーを用いた解析を行った。その際、フローサイトメトリーの適切な解析条件を検討し、FSC 2700/ SSC 3800 において解析するのが妥当であると判断し、以後その解析条件を用いた。また解析試料量（細胞数）も適切な量を検討し、プロトコールを改訂した。また、ウシの個体差（または健康状態やストレス負荷の有無など）による MACS の成績の違いを Dr. Orla に相談し、実際に 3 頭のウシで比較検討した結果、ウシの個体に応じて好中球の絶対数に大きく差がみられることを明らかにした（図 1）。その後の実験でも同一個体（Cow No.1266）から MACS 後の好中球数が血液 1mL 当たり $2.0\text{-}3.0 \times 10^6$ 、精製純度 97% 以上を得られることを再現した。これにより、細菌貪食実験に必要な細胞数を無駄なく十分に得ることができ、その個体に焦点を当て、以後実験を行った。

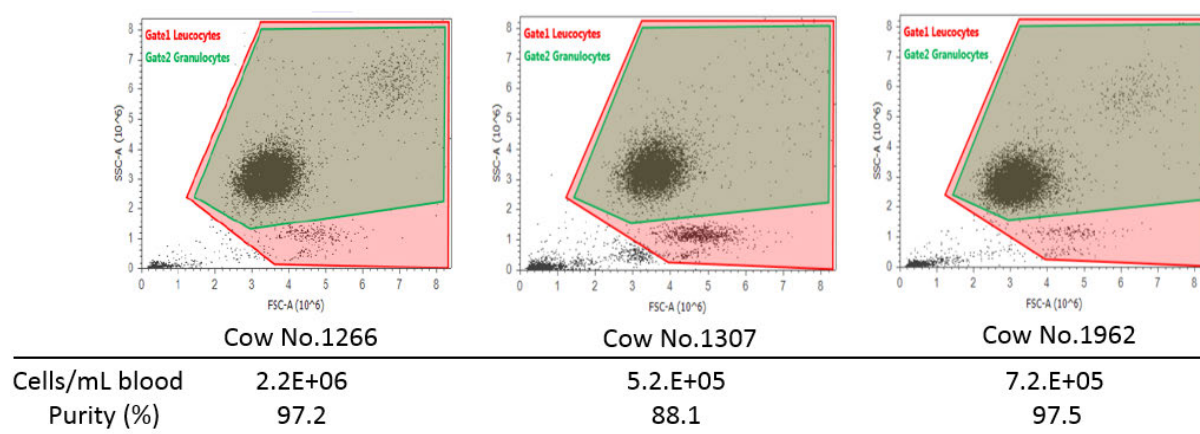


図 1. MACS 精製後のウシ好中球のフローサイトメトリー解析

好中球による細菌貪食実験は、滞在中に合計 6 回行うことができた。その実験手順に関して簡潔に述べる。精製した好中球 ($2.5 \times 10^6/\text{mL}$) と一定数の細菌 ($2 \times 10^7/\text{mL}$) を 37°C で 2 時間振盪培養したのち希釈後 TSA プレートに播種し、翌日 CFU を測定するというものである (図 2)。一定数の細菌は、 OD_{600} に基づく菌懸濁度を指標に推察される CFU/mL (4×10^8) の菌量を調整して使用するとともに、6 段階の希釈系列を設け 10^{-5} 、 10^{-6} の希釈率を用いて実際に使用した細菌数 (CFU/mL) 確認した。そして好中球を含まない細菌だけの対照群も用意し、実験群と対照群の細菌数 (CFU/mL) を比較した。その結果は、菌株に応じて $1/3$ から $1/10$ まで菌数 (CFU/mL) が減少する傾向があり、好中球貪食に対する抵抗性に差がみられた。これは、菌株の病原性の違いがウシ乳房炎の臨床症状に反映される可能性を示唆するものであり、菌株に応じた乳房炎の制圧策を考慮する上で大変役立つものと考えられる。

[結語]

日々の実験に加えて、ウシ乳房炎の研究報告会に参加した。研究プロジェクトの概要と進行度を把握するとともに、自身の研究内容の発表の機会を頂いた。ウシ乳房炎の他にも、ヒツジのクラミジア病に対する新規抗原の抗体研究や、ヒツジ胃内容物中の駆虫薬耐性の寄生虫の分子系統解析などの研究を垣間見ることができ (図 3)、生産動物疾病の病原体に対して多様な微生物学的な実験背景を学ぶことができた。また天気の良い日には日光浴をしながらお茶をするなど独特な交流をする機会もあり、日々の生活面だけでなく、将来の職業観などを話し合うことができた (図 4)。

今回の海外共同研究演習の目的であるウシ乳房炎に関連した微生物学的な実験手法を習得できたことは勿論だが、それ以外にも多種多様な研究背景や実験技術 (コツ)、ウシ (生体) の行動観察などを行うことができ、本当に実りの多い期間であった。

最後に、約一か月の滞在を快く受け入れて下さり常に親身になって指導して下さいました Dr. Orla Kean およびラボメンバーの皆様、そしてこのような大変貴重な機会を下さったリーディング大学院担当者の皆様にこの場を借りて御礼申し上げます。

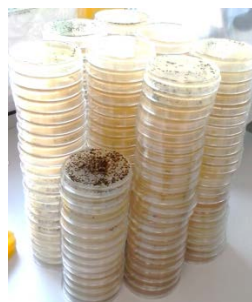


図 2 CFU 計測プレート



図 3 寄生虫の検出



図 4 日光浴とお茶会

(海外実践疫学演習 (海外共同研究演習) 指導教員評

指導教員所属・職・氏名	生化学教室	教授	木村 和弘	印
実施内容について講評を記述して下さい 今回の演習では、生化学とは別の視点から本人の博士課程の研究テーマであるウシ乳房炎の研究を海外で行う機会を得た。黄色ブドウ球菌は、日本でも重要視される乳房炎の主要な原因菌であり、ウシ乳房炎の研究を行う上でその理解を深め、さらなる実験技術を習得することは、本人の将来的な研究能力に大いに貢献することとなる。今回の演習で得た経験を生かして、今後より一層主体的に活発な研究がなせることを期待する。				

- ※1 電子媒体を e-mail で国際連携支援室・リーディング大学院担当に提出するとともに、指導教員が押印した原本を国際連携支援室・リーディング大学院担当に提出して下さい。
- ※2 本報告書はリーディングプログラム運営委員会で内容を確認します。その後、教務委員会で単位認定を受けることになります。

提出先：国際連携推進室・リーディング大学院担当

内線：9545 e-mail: leading@vetmed.hokudai.ac.jp