

令和元年6月19日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08065

研究課題名（和文）乳房炎実験感染牛での遺伝子組換え蚕由来牛GM-CSFの乾乳期治療に関する実践研究

研究課題名（英文）Study on dry cow therapy with bovine GM-CSF produced in transgenic silkworm for experimental bovine mastitis.

研究代表者

菊 佳男（KIKU, YOSHIO）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・上級研究員

研究者番号：70370179

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：薬剤耐性菌出現の観点から、乳用牛の乾乳時に行われている全頭全乳房への抗菌薬注入が再考されている。本研究では、乾乳前に実験的に黄色ブドウ球菌（SA）性乳房炎を作出し、乾乳時に組換え蚕由来牛顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（TGrbGM-CSF：400 µg/乳房）を乳房内注入することによる乳房炎治療の可能性を検証した。

乾乳時のTGrbGM-CSF乳房内注入では、乾乳期間中にSAを排除することはできず、分娩後もSA乳房炎を発症した。今回の結果では、実験的SA乳房炎罹患牛に対するTGrbGM-CSFの乾乳期治療効果は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の日本における乳用牛の乾乳期管理は、乳房炎の治療および予防の確実性と効率性から、乾乳軟膏（抗菌薬）を乾乳導入時に全頭全乳房へ注入することが一般的である。一方で、薬剤耐性菌の出現は世界的にも喫緊の課題として取り上げられており、酪農現場においても抗菌薬の慎重使用が求められている。

本研究では、泌乳期乳房炎治療薬として効果が認められている組換え蚕由来牛顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（TGrbGM-CSF）を、乾乳軟膏の代わりに乾乳時に用いてその効果を検証した。その有効性が認められたならば、乾乳時に抗菌薬を使用せずに安全な乾乳を迎えることができ、抗菌薬使用量の低減に効果的な手段となる。

研究成果の概要（英文）：Antimicrobial resistance is becoming a concern and is making the dairy industry rethink treating all cows at dry off, often termed blanket dry cow treatment. The objective of this study was to investigate the effect for treatment of experimental *Staphylococcus aureus* (SA) mastitis of the intramammary infusion of recombinant bovine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (TGrbGM-CSF: 400 µg/quarter) produced in transgenic silkworm as a dry cow therapy.

The intramammary infusion of TGrbGM-CSF at dry-off failed to eliminate SA during dry period and occurred SA mastitis after calving. The present results did not show the effective dry cow therapy of TGrbGM-CSF for experimental SA bovine mastitis.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：牛 乳房炎 乾乳期治療 実験感染 サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在の日本における乳用牛の乾乳期管理は、乳房炎の治療および予防の確実性と効率性から、長期間持続する乾乳軟膏(抗菌薬)を乾乳導入時に全頭全乳房へ注入することが一般的である。一方で、薬剤耐性(AMR)の問題は世界的にも喫緊の課題として取り上げられており、酪農現場においても抗菌薬の慎重使用が求められている。このことから、近年、AMRの観点から乾乳軟膏の使用は再考すべき課題と考えられている。

我々は、抗菌薬使用の低減化に繋がる乳房炎治療薬として、牛の免疫機能を高めることが期待できる牛顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(bGM-CSF)を、遺伝子組換えカイコを用いて低コストで作製する技術を確認してきた。また、それを用いて、泌乳期乳房炎に対する治療効果を検証したところ、約80%の乳房炎罹患牛の症状を改善することを確認している。

組換え蚕由来 bGM-CSF (TGrbGM-CSF) を用いた乾乳期治療が抗菌薬と同等もしくはそれ以上の治療効果が得られたならば、抗菌薬の使用を低減させる新たな乳房炎治療技術として非常に有望なものとなることが考えられる。また、治療効果が確認されれば、TGrbGM-CSF の乾乳時処置によって乾乳直後や分娩直後の新規乳房内感染の多発時期における乳房炎予防技術となる可能性も期待できる。

2. 研究の目的

牛の乳房炎治療は抗菌薬使用が中心であるが、薬剤耐性菌出現への懸念から使用量の低減が求められている。我々は、抗菌薬低減技術としてサイトカインによる乳房炎治療の有効性を示してきたが、高額な生産コストが課題であった。その課題に対して、近年、遺伝子組換えカイコを用いたタンパク質の低コスト調整技術が確立され、それによる牛顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(TGrbGM-CSF)の生産が可能となり、泌乳期乳房炎に対して高い治療効果を有することが示された。本研究では、実験的に黄色ブドウ球菌性乳房炎を作出し、泌乳期以上に高い治療効果が期待できる乾乳期において、TGrbGM-CSF 乳房内投与の治療効果を明らかにする。

3. 研究の方法

実験感染の予備試験として、乾乳時に17乳房を用いて、1乳房に対して生理食塩水(5 ml/乳房) 抗菌薬(セファゾリン 250 mg/乳房) および TGrbGM-CSF (0.4 mg/5 ml/乳房) をそれぞれ注入し、乾乳期間中あるいは分娩後の乳房炎発生状況を検討した。乾乳期間中の臨床症状の観察、分娩後0、7、14、21 および 28 日における乳汁および血液性状の検査を行った。

次に、泌乳後期の乳用牛を用いて実験的 SA 乳房炎罹患乳房を作出し、それに対する TGrbGM-CSF の乾乳期治療効果ならびに生体反応性について、抗菌薬治療によって得られた結果と比較検証した。供試牛(4頭)の4つの乳房(A、B、C、D)を乾乳前3~1日に生理

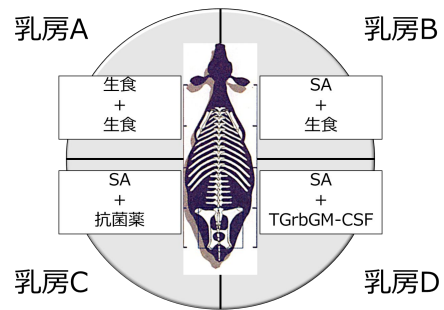


図1. 供試乳房の区分

的食塩水(生食:5 ml)あるいはSA(20 cfu/5ml) 乾乳時に生食、抗菌薬(セファゾリン 250 mg/乳房)あるいはTGrbGM-CSF(0.4 mg/5 ml/乳房)を注入した。即ち各乳房は、乳房A(対照)、乳房B(SA)、乳房C(SA+抗菌薬)、乳房D(SA+TGrbGM-CSF)として評価した(図1)。

SA 感染後0、1~3 日ならびに乾乳日まで一般状態の観察とともに、乳汁検査(菌種、菌数および体細胞数)ならびに血液検査を行った。乾乳期治療後は、乾乳後0、1、2、3、7、14、21 および 28 日まで一般状態の観察と、血液一般性状および免疫機能の解析を行った。分娩後は、分娩後0、7、14、21 および 28 日まで血液・乳汁を採取し、乳性状検査による治療経過の確認および血液・乳汁の一般性状および免疫機能解析を行った。分娩後0~28 日の検体を用いて TGrbGM-CSF の治療効果を、体細胞数、CMT 法および細菌検査結果から評価した(図2)。

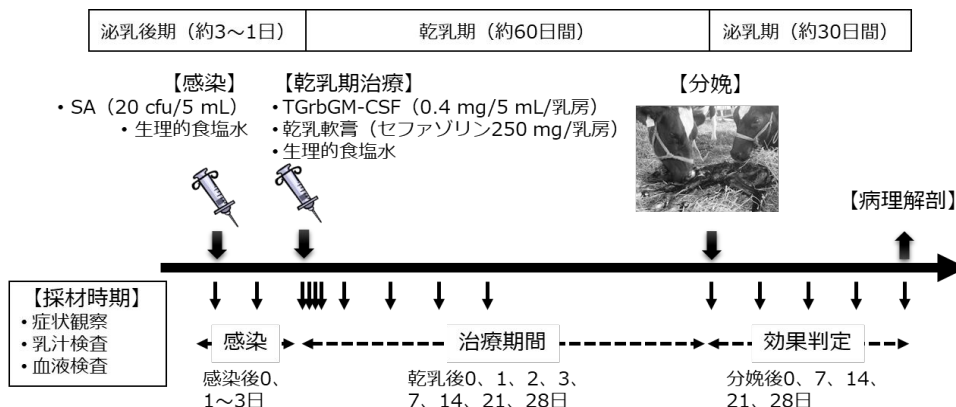


図2. 実験感染および治療試験のタイムコース

4. 研究成果

- (1) 乾乳時無処置（生食注入）は乾乳期間中の乳房内感染リスクがあった。乾乳時に感染状況確認の実施やそれに応じた薬剤の処方、あるいは乳頭シール等の利用が望ましいと考えられた。
- (2) 乾乳前日の SA 乳房内感染では感染不成立のことがあり、乾乳 3 日前の SA 感染では感染が成立した。SA 感染翌日の抗菌薬や TGrbGM-CSF 注入は、SA 感染成立を阻止する可能性があると考えられた。
- (3) 予備試験において、乾乳時に生食注入した場合、9 乳房中 2 乳房で乾乳期間中に乳房炎を発症した。残り 7 乳房中 1 乳房において、分娩後 1 週以降乳房炎となった。乾乳時に抗菌薬を注入した場合、乾乳期間中あるいは分娩後に異常となった乳房は 3 乳房中 0 乳房であった。乾乳時に TGrbGM-CSF を注入した場合、乾乳期間中に異常を示した乳房は 5 乳房中 0 乳房であったが、分娩後 1 週以降乳房炎となった乳房は 2 乳房であった。但し、群間に差は無かった（表 1）。群間の差が見られなかったことから、乾乳時の感染状況、分娩後の乳房炎発症に関連すると思われた。

表1. 乾乳時注入物質による乾乳期間中および分娩後の乳房炎発生状況

乾乳時注入物質	生理食塩水	抗菌薬	TGrbGM-CSF
注入乳房数（乳房）	9	3	5
乾乳期間中に乳房炎発症（乳房）	2	0	0
分娩後に乳房炎発症（乳房）	1	0	2

- (4) 乾乳前 3～1 日に SA 感染させた後、乾乳時に生食あるいは TGrbGM-CSF 乳房内注入を行った結果、乾乳期間中の臨床症状の変化は無かったが、分娩直後から乳汁中に SA が検出された。また、両群ともに類似した体細胞数を推移し、高体細胞数であった。但し、群間に差は無かった（図 3）。乾乳前に SA 感染させた乳房に対する乾乳時の TGrbGM-CSF 乳房内注入では、乾乳期間中に SA を排除することはできず、分娩後も SA 乳房炎を発症した。今回の実験では、実験的 SA 乳房炎罹患牛に対する TGrbGM-CSF の乾乳期治療効果は得られなかった。

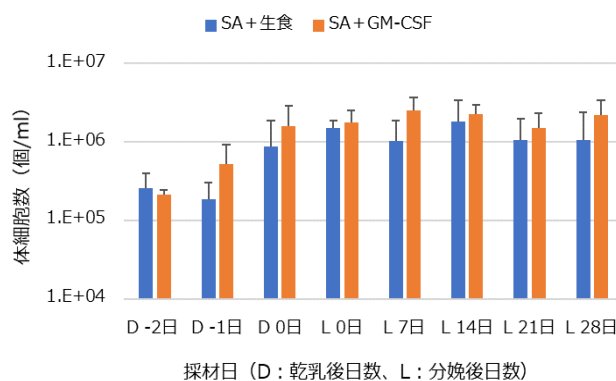


図3. 乾乳前 2～1 日に SA 感染させた後、乾乳時に生食あるいは TGrbGM-CSF 乳房内注入したときの体細胞数の変化

- (5) 実験感染牛に対する結果と自然発症牛に対する結果は、異なることも多く見られるため、SA 自然発症牛に対する TGrbGM-CSF の効果も確認する必要がある。また、本課題は TGrbGM-CSF の乾乳時治療試験であったが、治療効果だけでなく、健常牛の乾乳時に TGrbGM-CSF を乳房内注入することによる乳房炎予防効果の検証も、抗菌薬使用量の低減を考える上で必要な課題と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

菊佳男、櫛引史郎、宮澤光博、立松謙一郎、大田方人、犬丸茂樹、尾澤知美、新宮博行、長澤裕哉、林智人、組換えカイコ発現系で作製した GM-CSF の泌乳期乳房炎治療技術としての有用性、日本乳房炎研究会報、査読無、22、35-38、2018.

Kiku Yoshio, Ozawa Tomomi, Takahashi Hideyuki, Kushibiki Shiro, Inumaru Shigeki, Shingu Hiroyuki, Nagasawa Yuya, Watanabe Atsushi, Hata Eiji, Hayashi Tomohito, Effect of intramammary infusion of recombinant bovine GM-CSF and IL-8 on CMT score, somatic cell count, and milk mononuclear cell populations in Holstein cows with Staphylococcus aureus subclinical mastitis, Veterinary Research Communications, 査読有, 41, 175-182, 2017.
DOI: 10.1007/s11259-017-9684-y.

〔学会発表〕(計 4件)

菊佳男、組換えカイコ発現系で作製した牛 GM-CSF を用いた泌乳期乳房炎治療技術の開発、平成 29 年度日本獣医師会年次大会学術集会(大分)、2018.

Kiku Yoshio, Effect of intramammary infusion of recombinant bovine GM-CSF produced in transgenic silkworm on udder health and immune response traits in Holstein cows with Staphylococcus aureus mastitis, The 2018 International Bovine Mastitis Conference, 2018.

Kiku Yoshio, Treatment of Staphylococcus aureus mastitis with recombinant bovine GM-CSF, The 30th World Buiatrics Congress 2018 Sapporo, 2018.

菊佳男、サイトカインを利用した新たな乳房炎治療技術の開発、平成 28 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会(石川)、2017.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：宮澤 光博

ローマ字氏名：Miyazawa Mitsuhiro

所属研究機関名：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

部局名：生物機能利用研究部門

職名：ユニット長

研究者番号(8桁)：90370684

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。