

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 28 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380174

研究課題名（和文） ウシ乳房炎制圧へのファージセラピーの実践的応用研究

研究課題名（英文） Applied research of phage therapy for bovine mastitis

研究代表者

岩野 英知 (IWANO HIDETOMO)

酪農学園大学・獣医学群・准教授

研究者番号：60382488

研究成果の概要（和文）：本研究では、「ウシ乳房炎」に対して、ファージセラピーの開発、検討を行った。乳房炎原因菌の *Staphylococcus aureus* (SA) に対して溶菌活性の高い 2 種類のファージを分離し、野外 SA 株に対する溶菌効果を調べ、乳房炎モデルマウスを用いて生体内でのファージの効果検討を行った。その結果、我々の分離したファージは、乳房炎乳から分離した SA99 株すべてに対して高い溶菌活性を示し、また、乳房炎モデルマウスを用いた試験においても効果を示した。

研究成果の概要（英文）：In this work, we isolated novel two bacteriophages for *Staphylococcus aureus* (SA) with wide host ranges from sewage, and examined carefully their potential as therapeutic agents using experimental murine mastitis. All 99 strains of SA isolated from distinct ruminants with mastitis were completely lysed by SA bacteriophage. SA bacteriophage inhibited the SA growth in the mammary gland of experimental murine mastitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2012年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	12,700,000	3,810,000	16,510,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：臨床獣医学

キーワード：ファージセラピー、黄色ブドウ球菌、牛乳房炎、MRSA

1. 研究開始当初の背景

乳房炎は病原微生物によって引き起こされる感染症であるため、乳房炎治療においては抗生物質がその中心的な役割を担ってきた。特に、新規（新世代）抗生物質の開発が加速度的に進められる中、獣医医療における使用量も増加の一途をたどっている。日本は

「抗生物質大国」と言われ年間 2210 トン以上の抗生物質が使用されている。使用内訳は人の医療用に 500 トン、家畜の治療用に 1000 トン、農薬として 400 トン、家畜飼料の添加剤（成長促進剤）として 230 トンである。家畜に投与された抗生物質は鶏肉・豚肉・牛肉などの畜産物に残留するだけでなく、動物の

排泄物を介し野菜への移行も懸念されている。こうした状況において、近年、薬剤耐性菌の出現が顕在化している。当初はヒト医療分野での問題であったが、家畜およびその生産物からの検出についても多くの報告がなされるようになり、その対応は獣医畜産領域でも課題となっている。しかし、獣医領域において抗生物質の使用に変わりうる治療技術は未だ確立されておらず、薬剤耐性菌の出現およびこれに関する食品安全の堅持について十分な検討がなされていない。そこで本研究では、抗生物質に変わりうる治療技術として細菌にのみ感染し、死滅させるウイルス（ファージ）を使ったファージセラピーをウシ乳房炎治療に展開しようというものである。

2. 研究の目的

我々は、これまで東京工業大学のグループと共同研究を行い、乳房炎原因菌の *Staphylococcus Aureus* に対するファージ（野外株）を数十種類分離し、**ファージの有効性を試験管内で確認し、特許出願を果たし、論文公表も行った** (*Appl Environ Microbiol.* 2009 **75**,4483-90)。これまでの研究で、有効なファージの選択、*in vitro* での溶菌効果試験を終え、さらに乳房炎モデルマウスの系を立ち上げ、予備試験を終えている段階であり、いよいよ生体内での治療効果を確認、詳細な条件検討に入る段階にある。本申請では、小動物（マウス）を用いた実験で生体内でのファージの溶菌効果を確認し、将来的なウシ乳房炎治療展開の足がかりとなる知見を得る。本研究で得られた知見は、革新的なウシ乳房炎治療の提案となる可能性があり、酪農産業における生産性の向上、そして国民に対しては食の安全を確保することにつながる。さらに、あらゆる細菌感染、特に抗生物質耐性菌制圧への新たな治療法として、伴侶動物医療、ヒト医療への応用も期待できる。

3. 研究の方法

1) SA 溶菌ファージの分離

汚水から複数の SA 溶菌ファージを定法により分離し、プラークの形成具合で、SA に対する特異性を調べた。

2) 乳房炎モデルマウスを用いたファージの効果判定

ほ乳中の母親マウス（産後7～10日）を使用して、乳房炎モデルマウスの方法を確認し、生体内でのファージ効果を確認した。乳腺内に SA (10^5 CFU) を特殊微細針で注入し、その後、ファージ (10^7 PFU) の量を注入し、2日後に安楽死させ乳腺内の菌量を平板法にて計測した。本研究のすべての動物実験は、本学動物実験委員会の審査を受け、適正に行われた。

4. 研究成果

本研究での成果を以下に示す。

1) 乳房炎乳由来 SA に幅広く効くファージを獲得できた。

我々が分離したファージの中で、特に溶菌活性の高いものでは、ウシ乳房炎由来の SA 野外株 99 種類のすべてに溶菌することが判明し、乳房炎由来 SA に対して効果が高いことが分かった。

2) 多剤耐性の SA 株にも有効なファージを分離できた。

多剤耐性の SA 株に対しても溶菌効果が高いことが明らかになった。

3) 乳房炎モデルマウスでのファージの効果を確認できた。

- ①乳房炎モデルマウス用いた実験により、ファージが乳腺内の SA に対して溶菌による増殖抑制効果を示し、生体内でもファージの溶菌効果を示すことができた。
- ②乳腺内の SA に対して、腹腔内、静脈内投与でも効果的であることがわかり、特に静脈内へのファージの投与は、新たな経路として期待できる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 9 件）

1. Higuchi, H., Ito, E., Iwano, H., Oikawa, S. and Nagahata, H. 2012. Effects of vitamin E supplementation on cellular a-tocopherol concentrations of neutrophils in Holstein calves. *Can. J. Vet. Res.*
2. Suzuki K, Higuchi H., Iwano H., Lakritz J, Sera K, Koiwa M, Taguchi K. 2012. Analysis of trace and major elements in bronchoalveolar lavage fluid of *Mycoplasma bronchopneumonia* in calves. *Biol. Trace. Elem. Res.* Feb;145(2):166-71.
3. Fukumoto S, Hanazono K, Komatsu T, Iwano H., Kadosawa T, Uchide T. 2012. L-Type Amino Acid Transporter 1 (LAT1) Expression in Canine Mammary Gland

4. Komatsu T, Iwano H, Ebisawa M, Watabe A, Endo Y, Hirayama K, Taniyama H, Kadosawa T. Pathological classification of canine mammary tumor based on quantifying mRNA levels of hormonal receptors, SATB1, and snail in tissue and fine needle biopsy samples. *J. Vet. Med. Sci.* (2012), 74(6):719-26
 5. Higuchi H, Iwano H, Kawai, K., Ohta, T., Obayashi, T., Hirose, K., Itoh, N., Yokota, T., Tamura, Y. and Nagahata, H. 2011. A simplified PCR assay for fast and easy mycoplasma mastitis screening in dairy cattle. *J. Vet. Sci.*, **12**: 191-193.
 6. Higuchi H, Iwano H, Gondaira, S., Kawai, K., Nagahata, H. 2011. Prevalence of Mycoplasma species in bulk tank milk in Japan. *Vet. Rec.*, **169**:442.
 7. Suzuki, K., Higuchi H, Iwano H, Lakritz, J., Sera, K., Koiwa, M., Taguchi, K. 2011. Analysis of trace and major elements in bronchoalveolar lavage fluid of mycoplasma bronchopneumonia in calves. *Biol. Trace. Elem. Res.* 145:166-171.
 8. Nishikawa M., Iwano H, Yanagisawa R., Koike N., Inoue H, and Yokota H. 2010. Placental Transfer of Conjugated Bisphenol A and Subsequent Reactivation in the Rat fetus. *Environ. Health Perspect.* 118, 1196-1203*coresponding auther
 9. Hashimoto H, Takami Y, Sonoda E, Iwasaki T, Iwano H, Tachibana M, Takeda S, Nakayama T, Kimura H, Shinkai Y. Histone H1 null vertebrate cells exhibit altered nucleosome architecture. *Nucleic Acids Res.* 2010;383533-45.
- [学会発表] (計 8 件)
1. 2012年6月 World buiatrics congress 2012 (Lisbon) ポスター発表
発表題目: Characterization of novel Staphylococcus aureus bacteriophages with wide host ranges and their potential as therapeutic agents for bovine mastitis. 発表者: Iwano, H., Higuchi, H., Inoue, H., Kobayashi, H., Nagahata, H., Yokota, H., Tanji, Y., Tamura, Y.
 2. 2010年 第150回日本獣医学会学術集会 発表題目: 黄色ブドウ球菌の乳腺感染モデルマウスに対するファージセラピーの検討 発表者: 岩野英知、樋口豪紀、井上博紀、井上裕介、高砂拓志、萩原克郎、丹治保典、永幡肇、横田博
 3. 2010年 平成22年度北海道獣医師大会 発表題目: 北海道におけるウシ乳房炎由来マイコプラズマ種の浸潤調査 発表者: 伊藤暢彦、樋口豪紀、岩野英知、河合一洋、大林哲、永幡肇
 4. 2010年 乳房炎研究会 発表題目: 黄色ブドウ球菌に対する特異的なファージを用いたウシ乳房炎治療応用への可能性、発表者: 岩野英知、樋口豪紀、井上博紀、萩原克郎、横田博、永幡肇、丹治保典、田村豊
 5. 2011年 平成23年度北海道獣医師大会 発表題目: マイコプラズマ性乳房炎の摘発を目的としたバルクスクリーニングの実施とその評価、発表者: 樋口豪紀、岩野英知、河合一洋、永幡肇
 6. 2011年 第152回日本獣医学会学術集会 発表題目: ウシ乳房炎由来ブドウ球菌に対するバクテリオファージの有効性と体内動態、発表者: 小林弘典、岩野英知、樋口豪紀、井上博紀、丹治保典、永幡肇、横田博、田村豊
 7. 2012年 第153回日本獣医学会学術集会 発表題目: 乳房炎由来ブドウ球菌に対するバクテリオファージの有効性と体内動態、発表者: 小林弘典、岩野英知、樋口豪紀、井上博紀、萩原克郎、丹治保典、永幡肇、田村豊、

- 横田博
8. 2012年 第153回日本獣医学会学術集会 発表題目: Mycoplasma bovis がウシ単核球サイトカイン mRNA の発現量に及ぼす影響、発表者: 権平智、樋口豪紀、岩野英知、永幡肇

〔図書〕(計3件)

1. 岩野英知(共著)「犬と猫の早期疾病診断学」 チクサン出版社(緑書房) 予防動物医学研究会編(新井敏郎ほか) 2011年、90-93: がん(乳腺腫瘍)
2. 岩野英知 2012年 「バクテリオファージ」による乳房炎治療への応用酪農ジャーナル(酪農学園大学エクステンションセンター) 65: 4月:32-3432-34
3. 岩野英知 2012年 細菌の生き残り戦略～最も繁栄している生物の仕組み～ The Japanese Society for Animal Vaccine and Biomedical Research NEWS letter 5:11-13

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩野 英知 (IWANO HIDETOMO)
酪農学園大学・獣医学群・准教授
研究者番号: 60382488

(2) 研究分担者

樋口 豪紀 (HIGUCHI HIDETOSI)
酪農学園大学・獣医学群・准教授
研究者番号: 00305905

井上 博紀 (INOUE HIROKI)
酪農学園大学・農食環境学群・准教授
研究者番号: 90305904

(3) 連携研究者

()

研究者番号: