

## 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8月22日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580354

研究課題名（和文）有用微生物を用いた乳腺の感染防御能の誘導と乳腺感染の制御に関する研究

研究課題名（英文）Cellular and Immune Responses of Dairy Cows Induced by Intramammary Infusion of Lactic Acid Bacteria and Therapeutic Trials to Quarters of Cows with Mastitis.

研究代表者

永幡 肇 (Nagahata Hajime)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：10133571

研究成果の概要（和文）：

牛の乳房炎の制御を目的に乳酸菌の乳腺内注入に対する乳腺の細胞・免疫反応および治療効果を検討した。乳酸菌 *B. breve* 注入後の乳体細胞数および化学発光の有意な増加および免疫グロブリンや抗菌性蛋白の増加がおよびサイトカイン遺伝子の発現が認められた。*B. breve* 乳房内注入による治療の試みにおいて環境性乳房炎の制御効果が認められた。乳酸菌の注入により免疫細胞の乳腺への誘導とその機能の増高が微生物排除に関与しているものと推察された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to characterize the cellular and immune responses of mammary gland by intramammary infusion (IMI) of Lactic acid bacteria (LAB) in cows, and to evaluate the therapeutic effects of IMI of LAB to lactating cows with mastitis. Marked increase of SCC were found in infused quarter at 24-48 hr post infusion. Significantly increased concentrations of immunoglobulins, anti-bacterial proteins and mRNA expression of cytokines on milk leukocytes were found in cows. In therapeutic trials, IMI of LAB to quarters leads to a marked cellular and immune responses in mammary gland. The IMI of LAB may have a possible role for control of mastitis.

(key words:lactic acid bacteria, mammary gland defense, immune-therapeutic trial, bovine mastitis control)

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：乳房炎、有用微生物、白血球機能修飾、サイトカイン、乳腺感染制御

### 1. 研究開始当初の背景

良質で安全で新鮮な生乳の効率的な生産は酪農生産の上から重要な課題である。乳房炎は上記の目的を損なわせる損失の高い乳牛の疾病である。乳房炎は病原微生物の乳腺内での感染により発症しその対処法としての治療は抗生物質を用いた薬物治療が一般的に行われており、治療効果、薬剤耐性、廃棄乳など問題が残されており課題となっている。本研究では乳房炎の微生物に対して有用微生物を用いての制御を本研究の目的とした。

### 2. 研究の目的

乳房炎は泌乳牛の疾患で最も病症件数が多く減乳・廃棄乳・治療・淘汰などに起因した経済的損失は甚大である。有用物質の利用を念頭に本研究では食品規格の乳酸菌を候補として選択した。泌乳牛の乳房への乳酸菌(lactic acid bacteria:LAB)の乳腺内注入に対する乳腺の細胞性および免疫反応を検索するとともに乳房炎の制御効果を検討した。

### 3. 研究の方法

(1)有用微生物：食品規格 Lactic acid bacteria(LAB)・ *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium breve* の3種を供試した。

(2)供試牛と分房：潜在性乳房炎牛の分房乳中の乳体細胞数  $30 \times 10^4$  個/ml 及び乳房炎原因菌  $>250\text{cfu/ml}$  に該当する分房を供試牛群から抽出し試験に供試した。

(3)測定指標：乳体細胞数は自動体細胞測定装置、電気伝導度は電導度計、CMT-測定、ラクトフェリン(LF)濃度、乳成分は成分分析器、免疫グロブリン(IgG,A)は単純免疫拡散法、化

学発光反応は化学発光測定装置。

(4)体細胞の cytokine mRNA は IL1- $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  について検索した。

(5)分房に対する乳酸菌の注入：滅菌生理食塩水に懸濁した乳酸菌( $1 \times 10^9\text{cfu/ml}$ , 3ml)を乳頭より 1~3 回注入し体細胞数への影響を検討した。

(6)乳房炎分房への乳酸菌注入による微生物学的治癒ならびに体細胞数への影響について、①検討1では、乳房炎治癒効果の検討について、泌乳中期の潜在性乳房炎牛 30 頭 30 分房を 5 農場の牛群から分娩後 50~200 日、乳性状、微生物、体細胞学的基準で抽出選定した。②検討2では、体細胞数への影響について、泌乳中期で乳房炎原因菌が検出されない潜在性乳房炎牛 8 頭 8 分房を対象に乳酸菌注入後 14 日目の体細胞数の減少効果 (30 万/ml 未満) を検討した。

### 4. 研究成果

(1)乳体細胞数 30~70 万/ml にある潜在性乳房炎牛 6 頭に対して、乳酸菌 *L.lactis*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium breve* ( $1 \times 10^9\text{cfu/ml}$ ) を搾乳後に 1 回注入し乳汁中の体細胞数の動態を検討した。3 種の乳酸菌とも注入後 1 日の分房乳の体細胞数は 5~15 倍と顕著に増加しその後減少し注入後 7 日目に多くは注入前に復した。3 種の乳酸菌ともに同様の傾向を示した。

(2)乳酸菌注入の体細胞数に及ぼす注入回数 (1~3 回) の影響を検討した。*B.breve* ( $3 \times 10^9\text{cfu}$ , 死菌 3ml) を泌乳牛の搾乳後の分房に 1 日 1 回で 1~3 日間注入した。*B.breve* 注入後の分房乳の体細胞数は注入前の体細胞数レベルおよび乳腺の状態に影響されるが有意な増加が認められ注入後の体細胞数

のピークは1回注入群では注入後1日、注入2, 3日の分房群では1~2日と延長が認められた。その後体細胞数は経過に伴い減少し7日には注入前値に復した。1~3回の注入回数においては2~3回で高体細胞数の持続的な誘導が招来されることが明らかとなった。

(3) *B. breve* 注入に伴う分房の免疫反応を評価した。*B. breve* 注入分房乳を注入前、注入後1~9日間について乳中の opsonized zymosan で刺激した化学発光は注入前の分房および未刺激分房に比較して注入後1~3日間は有意な増加が認められた。その後漸次減少した。*B. breve* 注入分房の化学発光の増高に関与する細胞種を検討した。注入分房乳中の好中球の割合は注入前値から5日にかけて27~73%と増加したことから *B. breve* 注入により大量の好中球が注入分房内へ誘導され認められた化学発光の増高は誘導および刺激を受けた好中球の機能に関連しているものと考えられた。

(4) LF, IgG, IgA : *B. breve* 注入分房乳中の抗微生物蛋白 LF(80kDa)は、注入前値に比較して注入後3~5日に有意に増高した。また注入分房乳においてIgAは注入4~7日で前値に比較して有意な増加が認められた。またIgGの増高が注入2日~3日をピークに7日まで認められた。注入分房におけるLfと免疫グロブリンは乳酸菌注入に伴う乳腺の免疫刺激とその修飾作用により誘導されるものと考えられた。

(5) 乳成分(乳蛋白と乳糖)への影響: 乳酸菌注入1~9日における乳蛋白および乳糖の推移において、乳蛋白は注入後1~3日間でわずかに上昇傾向が認められたがLfは注入後2日目に有意な減少が認められた。これらの変化は乳酸菌注入に伴う乳腺内の微環境の変化が招来されたことにより乳腺細胞の乳合成機能が影響を受けて生じるものと推

察された。

(6) Cytokine mRNA 発現: 乳酸菌注入による分房乳の体細胞に発現する炎症性サイトカイン及びTh1&Th2サイトカインならびに核内調節遺伝子NF-KbのmRNA発現を注入前のそれと比較して注入後1日で増加したサイトカイン mRNA は、IL1- $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6であり、6日後においてさらに増加したサイトカインはIL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL 4, IL 6であった。核内調節遺伝子NF $\kappa$ BのmRNA発現も1日及び6日でより増強が認められた。これらの結果から、乳酸菌注入により乳腺の免疫系組織を刺激し免疫機能が活性化されていることが明らかとなった。

(7) 乳酸菌注入による乳房炎の治療的試み: 潜在性乳房炎牛の微生物学的治癒(率)に及ぼす *B. breve* 乳房内注入効果を評価した。*S. aureus* 感染分房(4)の排除はできなかった。*Coagulase* 陰性ブドウ球菌には微生物学的治癒率は67%(8/12)であった。環境性連鎖球菌には微生物学的治癒率は63%(5/8)、*C. bovis* 感染分房では微生物学的治癒率は14.2%(1/7)であった。これらから乳酸菌 *B. breve* の環境性乳房炎の原因菌の感染で発症した潜在性乳房炎の制御への効果が認められた。乳酸菌の注入により好中球・単球の乳腺炎症部位への誘導とその機能活性の増高から微生物の排除能が増強されていると考えられる。また免疫活性物質および抗菌性蛋白であるLfやIgGの誘導も微生物排除において役割を演じているものと推察された。

## 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5件)

- ① Nagahata, H., Kawai, H., Higuchi, H., Kawai, K., Yayou, K. & Chang, C. J. (2011).

Altered leukocyte responsiveness in dairy cows with naturally occurring chronic *Staphylococcus aureus* mastitis. 査読有 *J. Vet. Med. Sci.* 73(7): 885-894.

- ② Hisaeda, K., Arima, H., Sonobe, T., Nasu, M., Hagiwara, K., Kirisawa, R., Takahashi, T., Kikuchi, N. & Nagahata, H. (2011). Changes in acute-phase proteins and cytokines in serum and milk whey from dairy cows with naturally occurring peracute mastitis caused by *Klebsiella pneumonia* and the relationship to clinical outcome. 査読有 *J. Vet. Med. Sci.* 73(11): 1399-1404.
- ③ Nagahata, H., Yuge, K., Moriyama, A., Takahashi, A., Iwano, H., Higuchi, H., Mitamura, T. & Matsuyama, H. (2012). Effectiveness of slightly acidic electrolyzed water for improvement of hygienic conditions of teat liners of automatic milking system. 査読有 *Milchwissenschaft.* 67(2): 123-126.
- ④ Nagahata, H., Moriyama, A., Koshi, A., Mukai, T., Natsume, Y., Higuchi, T., Koike, N. & Ando, T.(2012). Analysis of cellular and immune responses of dairy cows induced by intramammary infusion of lactic acid bacteria and therapeutic trials to quarters of cows with mastitis. 査読無, *World Buiatrics Congress* 32-33.
- ⑤ 永幡 肇(2013). 第 27 回世界牛病学会 (World Buiatrics Congress 2012)の発表から. 査読無. 畜産の研究 67(3):375-383.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Nagahata, H., Use of slightly acidic-electrolyzed water supplying system for improvement of hygienic conditions of teat liners of automatic milking system.

15Nov2010. *World Buiatrics Congress.* SanDiego, Chile.

- ② Nagahata, H., Moriyama, A., Koshi, A., Mukai, T., Natsume, Y., Higuchi, T., Koike, N. & Ando, T.(2012). Analysis of cellular and immune responses of dairy cows induced by intramammary infusion of lactic acid bacteria and therapeutic trials to quarters of cows with mastitis. *World Buiatrics Congress*, 6Jun2012. Lisbon, Portugal.
- ③ Iwano, H., Higuchi, H., Inoue, H., Kobayashi, H., Nagahata, H., Yokota, H. & Tanji, Y.(2012). Characterization of novel *Staphylococcus aureus* bacteriophages with wide host ranges and their potential as therapeutic agents for bovine mastitis. *World Buiatrics Congress*, 6Jun2012. Lisbon, Portugal.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永幡 肇 (NAGAHATA HAJIME)  
酪農学園大学・獣医学群・教授  
研究者番号：10133571

### (2) 研究分担者

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

丹治 保典 (TANJI YASUNORI)  
東京工業大学・生命理工学研究科・准教授  
研究者番号：00282848

稲波 修 (INANAMI OSAMU)  
北海道大学・獣医学研究科・教授  
研究者番号：10193559

園元 謙二 (SONOMOTO KENJI)  
九州大学・農学研究院・教授  
研究者番号：10154717