

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850215

研究課題名(和文) 乾乳期における組換え牛サイトカイン乳房内投与による難治性乳房炎治療技術の開発

研究課題名(英文) Development of treatment technology for bovine mastitis by recombinant bovine cytokine intramammary infusion at dry-off.

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・動物衛生研究部門病態研究領域・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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：乾乳時における組換え牛顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(rbGM-CSF)の乳房内注入が、乳房炎治療あるいは予防効果を有する可能性について検証した。乾乳時に、乳房炎罹患牛(治療試験)ならびに健康牛(予防試験)の乳房内にrbGM-CSF(400 µg/乳房)を注入し、分娩後1ヶ月間の乳汁体細胞数及び総菌数等の変化について調査した。

治療試験では乳汁総菌数及び体細胞数は乾乳時に比べ分娩後に低値となり、予防試験では分娩後の新規感染は見られなかった。乾乳時のrbGM-CSF乳房内投与は、既存の乳房内感染菌の減少及び新規感染の阻止に関連しており、乳房炎治療あるいは予防効果を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to investigate the effect for treatment or prevention of bovine mastitis of the intramammary infusion of recombinant bovine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rbGM-CSF) produced in transgenic silkworm as a dry cow therapy. As the treatment or preventive trials, the infected or non-infected quarter were assigned at drying-off to an intramammary infusion of rbGM-CSF (400 µg/quarter) solutions. Each milk sample was collected for bacteriological examination and somatic cell count (SCC) at dry-off and a month after calving. In the treatment trial, total bacterial counts and SCC in milk was lower at 0, 7, 14 and 28 days after calving than at dry-off. In the prevention trial, the new intramammary infection of all cows was not detected after calving. These results suggest that the intramammary infusion of rbGM-CSF at drying off has a high potential as an agent of dry cow therapy.

研究分野：臨床獣医学、獣医免疫学

キーワード：乳房炎 牛 サイトカイン 治療 予防

1. 研究開始当初の背景

乳用牛の病傷事故原因として大きな問題である乳房炎は、病原微生物が乳房内に侵入することによって炎症を引き起こし、乳質や泌乳量を低下させる疾患である。乳房炎は、乳用牛(成牛)の病傷事故件数の3割以上を占める疾患であるが、その大部分の症例に対して抗菌剤治療が行われている⁽¹⁾。酪農生産現場においては、その中でも特に、搾乳牛に対する乾乳時処置として泌乳期に感染した乳房炎治療および乾乳初期における新規乳房内感染予防の2つの効果を期待した抗菌剤投与が広く行われている。

その一方で、動物用医薬品による抗菌剤過剰使用による薬剤耐性菌の問題は、これまでも大きな国際的課題であると言われていた。これについて、2015年G7エルマウ・サミット(ドイツ)では最重要課題の1つとして議論され、「薬剤耐性との闘いは、既存および将来の抗微生物薬の効果の保全並びに新しい抗微生物薬、ワクチン、代替的な治療および迅速な診断ツールのための研究開発に取り組むべき」であることが示された。このことから、乳房炎に対する新たな治療・予防技術の開発は、抗菌剤使用量の低減や薬剤耐性菌問題に大きく貢献することが期待できることから、獣医畜産領域に限らず One Health の概念からも求められた課題であると言える。

これまでに我々は、泌乳期において遺伝子組換えカイコ発現系で作出した牛顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(TGrbGM-CSF)の乳房内投与が乳房炎治療効果を有することを確認しているが、乾乳時処置に関する有用性については明らかにしていない⁽²⁾。我々の開発したTGrbGM-CSFが、現在一般的に使用されている抗菌剤の乾乳時処置効果と同等以上であれば、抗菌剤に置き換わってTGrbGM-CSFの利用が行われ、抗菌剤使用量及び薬剤耐性菌出現リスクの減少に繋がる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

乾乳時における乳房炎罹患分房ならびに健康分房へのTGrbGM-CSF注入が、乳房炎の治療あるいは予防効果を有する可能性について検証する。

3. 研究の方法

(1) 供試分房の選定

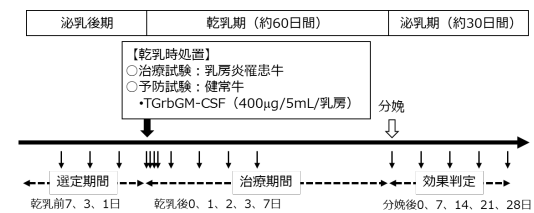
乾乳3日前に供試牛の4分房の乳汁細菌検査によって菌種および菌数を確認し、乾乳直前にはCalifornia Mastitis Test(CMT)法および体細胞数(SCC)測定により罹患程度を確認した。それによって、乳汁中から細菌が検出されず体細胞数が10万個/mL未満の分房を健康分房とし、細菌が検出され体細胞数が30万個/以上の分房を乳房炎分房とした。

(2) TGrbGM-CSFの乳房内注入および検査方

法

潜在性乳房炎罹患牛5頭(治療試験、原因菌:コアグラージェ陰性ブドウ球菌(CNS, n=2)、無乳性レンサ球菌(SAG, n=1)、環境性レンサ球菌(OS, n=1)、黄色ブドウ球菌(SA, n=1))ならびに健康牛4頭(予防試験)を用い、各供試牛からTGrbGM-CSF注入分房を1分房ずつ選出した。乳汁検体は、乾乳後0日(D00d)、分娩後0日(L00d)、7日(L07d)、14日(L14d)および21日(L21d)に採取し、CMT試験、体細胞数測定および細菌学的検査を実施した(図1)。

図1 乳房炎罹患牛と健康牛の乳汁および血液サンプリングのタイムコース



(3) TGrbGM-CSF 乳房内投与による治療効果の評価

分娩後0から4週目までの乳性状検査結果(細菌数および体細胞数)から、乾乳導入時におけるTGrbGM-CSF乳房内投与による治療および予防効果を評価した。

4. 研究成果

乾乳導入時に健康分房および乳房炎分房にTGrbGM-CSFを注入することによって、供試牛は乾乳期間中に臨床症状および血液学的指標に異常を示すことはなかった。

治療試験では、原因菌であるCNSはL07d、L21d、SAGはL00d、OSはL07dで消失した。乳汁生菌数はD00d(平均±標準誤差; 3.9±0.1 log10 cfu/mL)に比較し、L00d、L07d、L14d、L21d(2.0±0.5、1.2±0.8、1.1±0.7、0.7±0.7 log10 cfu/mL)と減少し、L07d、L14d、L21dでは有意に低値であった。また、体細胞数はD00d(48.4±19.4万個/mL)に比較し、L00d、L07d、L14d、L21d(236.4±186.5、87.8±53.1、55.3±41.9、32.6±14.1万個/mL)と漸減した(表1)。

表1. 乳房炎罹患牛への乾乳時TGrbGM-CSF乳房内投与による分娩後の乳汁生菌数および体細胞数の変化(治療試験)

乳房炎牛 (治療試験)	乾乳時		分娩後			
	D00d	L00d	L07d	L14d	L21d	L28d
乳汁生菌数 (log10 cfu/mL)	3.9±0.1	2.0±0.5	1.2±0.8*	1.1±0.7*	0.7±0.7*	ND
体細胞数 (万個/mL)	48.4±19.4	236.4±186.5	87.8±53.1	55.3±41.9	32.6±14.1	11.5±6.1

平均±標準誤差、*: p<0.05、D00dとの比較

予防試験では、乳汁生菌数はL00d、L07dおよびL14dにおいて乳房炎原因菌は検出さ

れず、新規感染は見られなかった。体細胞数については、D00d (13.8±3.6 万個/mL) に対して、L00d、L07d、L14d、L21d (256.4±238.1、18.9±6.1、10.4±8.3、5.1±2.0 万個/mL) と分娩直後に関しては高値を示したが、その後は乾乳時と同等あるいはそれ以下となった(表2)。

表2. 健康牛への乾乳時 TGrbGM-CSF 乳房内投与による分娩後の乳汁生菌数および体細胞数の変化(予防試験)

健康牛 (予防試験)	乾乳時			分娩後		
	D00d	L00d	L07d	L14d	L21d	L28d
乳汁生菌数 (log10 cfu/mL)	ND	ND	ND	ND	0.8±0.8	0.6±0.6
体細胞数 (万個/mL)	13.8±3.6	256.4±238.1	18.9±6.1	10.4±8.3	5.1±2.0	10.0±4.0

平均±標準誤差

乳房炎に対して抗菌剤の有効性は明らかであり、今後も抗菌剤の使用なくして乳房炎の治療は考えられないが、過剰な使用は人や動物に負の影響を与えることが危惧されている。本研究によって、乾乳時の TGrbGM-CSF 乳房内投与が、既存の乳房内感染菌の減少あるいは新規感染の阻止に有効であることが示唆され、乳房炎治療あるいは予防を目的とした新たな乾乳時処置技術となる可能性が示された。泌乳期に加え、乾乳時においても TGrbGM-CSF の乳房炎防除効果が期待されることから、TGrbGM-CSF が抗菌剤使用量の低減に貢献できると考えられた⁽²⁾。バキュロウイルス-昆虫細胞発現系で作製した rbGM-CSF では、貪食細胞活性や乳汁中白血球細胞構成への影響、好中球の走化性亢進等が、泌乳期の乳房炎治療効果に関与していることが報告されている⁽³⁻⁵⁾。今後は、乾乳時処置における TGrbGM-CSF の作用機序についても明らかにすると共に、抗菌剤(乾乳軟膏)の効果と比較検証し、TGrbGM-CSF の優位性や同等性を明らかに示すことが、TGrbGM-CSF を動物用医薬品として実用化に繋げるために必要であると考えられる。

本研究の成果より、TGrbGM-CSF は動物用医薬品市場における新たな乳房炎治療あるいは予防のバイオ動物用医薬品として期待できることが示された。今後は、乾乳時における TGrbGM-CSF を用いた乳房炎防除試験を更に実施するとともに、製剤化のプロセスを熟知した動物用製剤企業と連携しながら、実用化に向けて TGrbGM-CSF の安定性評価や薬理作用、作用機序についての解析を進める必要がある。

<引用文献>

- (1) 農林水産省経営局、平成 25 年度家畜共済統計表(2013)
- (2) 菊佳男、他、遺伝子組換えカイコ発現系で作出した牛 GM-CSF の乳房内投与による乳房炎治療効果、日乳会報、19、

37-40(2015)

- (3) Takahashi H, et al., Effect of intramammary injection of rboGM-CSF on milk levels of chemiluminescence activity, somatic cell count, and Staphylococcus aureus count in Holstein cows with S. aureus subclinical mastitis, Can J Vet Res, 68, 182-187 (2004)
- (4) 菊佳男、他、遺伝子組換え牛 GM-CSF 乳房内投与により治療効果を示す黄色ブドウ球菌性乳房炎罹患牛の臨床病理学的特徴、日乳会報、15、29-32(2011)
- (5) Ozawa T, et al., Effect of intramammary infusion of rbGM-CSF on SCC and expression of polymorphonuclear neutrophil adhesion molecules in subclinical mastitis cows., Vet Res Commun, 36, 21-27 (2012)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Yoshio Kiku, Yuya Nagasawa, Fuyuko Tanabe, Kazue Sugawara, Atsushi Watababe, Eiji Hata, Tomomi Ozawa, Kei-ichi Nakajima, Toshiro Arai, Tomohito Hayashi, The cell wall component lipoteichoic acid of Staphylococcus aureus induces chemokine gene expression in bovine mammary epithelial cells, J.Vet.Med.Sci., 査読有、78 巻、in press (2016)

菊佳男、平林晴飛、長澤裕哉、湯浅泰子、宮澤光博、立松謙一郎、大田方人、犬丸茂樹、林智人、遺伝子組換えカイコ発現系で作出した牛 GM-CSF の乾乳時乳房内投与の効果、日本乳房炎研究会報、査読無、20 巻、63-66 (2016)

Hiroataka Unno, Mika Inada, Akiyoshi Nakamura, Michie Hashimoto, Keiko Ito, Koji Hashimoto, Masaru Nikaido, Eiji Hata, Tomohito Hayashi, Yoshio Kiku, Ken Katsuta, Yuuichi Tagawa, Kazuhiro Kawai, Improved rapid and efficient method for Staphylococcus aureus DNA extraction from milk for identification of mastitis pathogens, J.Vet.Med.Sci., 査読有、77 巻、1007-1009 (2015)

菊佳男、わが国における牛乳房炎の発生状況ならびにその問題点と対策 乳牛の乳房炎に関する全国アンケート調査から、家畜感染症学会誌、査読無、4 巻、109-132 (2015)

菊佳男、櫛引史郎、宮澤光博、立松謙一郎、大田方人、犬丸茂樹、林智人、遺伝子組換えカイコ発現系で作出した牛 GM-CSF の乳房内投与による乳房炎治療

効果、日本乳房炎研究会報、査読無、19巻、37-40 (2015)

Kazuhiro Kawai、Tomohito Hayashi、Yoshio Kiku、Tomoyuki Chiba、Hajime Nagahata、Hidetoshi Higuchi、Tetsu Obayashi、Seigo Itoh、Ken Onda、Sachiko Arai、Reiichiro Sato、Toshio Oshida、Reliability in somatic cell count measurement of clinical mastitis milk using DeLaval cell counter、Anim.Sci. J.、査読有、84巻、805-807 (2013)

〔学会発表〕(計 8件)

大田方人、林智人、菊佳男、犬丸茂樹、バキュロウイルス-細胞系由来ウシ顆粒球マクロファージコロニー刺激因子粗精製試料の安定性：乳汁中での凍結融解と温度処理、第88回日本生化学会大会、2015年12月2日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

菊佳男、抗生剤使用量の低減化に向けた乳房炎防除戦略、農研機構シンポジウム「国際化する農業における動物衛生研究の展開」、2015年11月20日、JA共済ビル(東京都・千代田区)

長澤裕哉、菊佳男、野地智法、麻生久、田邊扶由子、菅原和恵、石川義春、門田耕一、林智人、乳汁中に黄色ブドウ球菌特異的IgA抗体を誘導させる鼻腔を介した抗原取り込み機序の解析、第158回日本獣医学会学術集会、2015年9月9日、北里大学獣医学部(青森県・十和田市)
Yoshio Kiku、Haruhi Hirabayashi、Yuya Nagasawa、Mitsuhiro Miyazawa、Ken-ichiro Tatematsu、Masato Ohta、Tomohito Hayashi、Effect of intramammary infusion of recombinant bovine GM-CSF produced in transgenic silkworm at drying-off on mammary gland involution in dairy cows、Congress on Controversies in Bovine Health, Industry and Economics (CoBo)、2015年8月28日、ベルリン(ドイツ)

菊佳男、櫛引史郎、宮澤光博、立松謙一郎、大田方人、林智人、犬丸茂樹、黄色ブドウ球菌性乳房炎に対する遺伝子組換えカイコ発現系で作出した牛 GM-CSF 乳房内投与の治療効果、平成26年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会(岡山)、2015年2月15日、岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

Yoshio Kiku、Shiro Kushibiki、Mitsuhiro Miyazawa、Ken-ichiro Tatematsu、Masato Ohta、Shigeki Inumaru、Tomohito Hayashi、Effect of intramammary infusion of recombinant bovine GM-CSF produced in transgenic silkworm on milk somatic cell count in Holstein cows with subclinical mastitis、28th World Buiatrics

Congress、2014年7月28日、ケアンズ(オーストラリア)

大田方人、林智人、菊佳男、犬丸茂樹、ウシ顆粒球マクロファージコロニー刺激因子生物活性の乳汁存在下での測定方法の検討、第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月22日、国立大学法人岐阜大学(岐阜県・岐阜市)

Yoshio Kiku、Tomomi Ozawa、Eiji Hata、Yuusuke Daiji、Hiroshi Maehana、Nobuyuki Yoshiura、Yasuhiro Hashimoto、Kenji Matsuyama、Tomohito Hayashi、Relationship between the count of somatic cells in quarter milk and the bacterial counts of Staphylococcus aureus and Escherichia coli、31st World Veterinary Congress、2013年9月18日、プラハ(チェコ共和国)

〔図書〕(計 3件)

田島誉士、阿部信介、柿沼清市、今内覚、信本聖子、安富一郎、菊佳男、牛の感染症の対策・防除を考える、株式会社緑書房、臨床獣医、pp11-39(2015)

菊佳男、乳房炎防除に向けた新たなアプローチ、中央畜産会、畜産コンサルタント、pp42-45(2015)

菊佳男、抗生物質に代わる乳房炎治療法～サイトカインの活用～、酪農学園大学エクステンションセンター、酪農ジャーナル、pp18-20(2014)

6. 研究組織

(1) 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病態研究領域・上級研究員

研究者番号：70370179