

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450432

研究課題名(和文) 有用微生物を用いた牛乳腺の分子免疫学的修飾と感染制御に関する研究

研究課題名(英文) Intramammary infusion of food-grade lactic acid bacteria (*Bifidobacterium breve*) on cellular and immuno-modulatory functions in mammary glands and therapeutic trials on bovine mastitis in dairy cows.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は牛乳房炎の薬物治療に代わりうる治療法の開発を目標に食品規格の乳酸菌(LAB:B. breve)を乳房炎分房に注入し、乳腺の細胞および免疫学的な反応性を明らかにするとともに、乳房炎分房にLABの注入を実施してその治癒効果を評価した。乳房炎分房へのLAB注入により乳腺の防御に重要な役割を担う自然免疫が有意に誘導されることを明らかにした。乳酸菌を用いた乳房炎の治療に選択的な有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to evaluate the efficacy of lactic acid bacteria (LAB) by intramammary infusion for control of bovine mastitis. Methods: LAB, *Bifidobacterium breve* (3×10^{11} IUs/ml) was infused quarters with mastitis of 48 lactating cows after milking once a day for 2 days. Pathogens, somatic cell counts (SCC), lactoferrin (LF) and IgG and A, chemiluminescence (CL), and mRNA expressions of Th1, 2- cytokines on milk cells were evaluated. Results: SCC and CL responses were increased ($P < 0.05$) in quarters by LAB infusion. LF and IgG, A were also induced in milk on day 3 to day 7. Cytokines IL-1, TNF- and IL-6 were elevated in milk by LAB infusion. Environmental mastitis pathogens, coagulase negative staphylococci and streptococci, were eliminated 50-60% by LAB infusion. In mastitis quarters with no pathogens, SCC in 80% quarters returned to the recovered normal range on day 14 by LAB infusion. The use of LAB appears to be a possible approach for controlling bovine mastitis.

研究分野：農学

キーワード：乳房炎 有用微生物 乳腺感染制御 乳酸菌 乳体細胞

1. 研究開始当初の背景

良質で安全な生乳の効率的な生産は乳生産の上から重要である。乳房炎は乳牛の病気でも最も発生率も多く経済的な損失が高くその制圧が求められている。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であるが、治療効果、薬剤耐性や薬物残留など問題が残されている。抗生剤を用いた治療に代わりうる方法の一つとして、乳房炎に対する微生物を用いた感染制御の評価が待たれていた。

2. 研究の目的

乳房炎は泌乳牛の疾患でも最も病傷件数が多く減乳・廃棄乳・治療・淘汰などに起因しその経済的損失は甚大である。有用微生物の効果的な利用のため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討するとともに野外での応用試験から乳房炎の制御効果の評価を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 有用微生物：食品規格 Lactic acid bacteria(LAB)- *Bifidobacterium breve* (*B. breve*) をこれまでの評価から選択し供試した。

(2) 供試牛と分房：潜在性乳房炎牛の分房乳の乳体細胞数 30 万/ml 及び乳房炎原因菌 250cfu/ml 以上に該当する乳房炎分房および両者 2 項目で基準に満たない乳の正常分房を供試した。

(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を用いて測定した。

(4) 体細胞の cytokinem RNA は IL1- , IL-8, TNF- , IFN- , IL-12 について real

time PCR を用いて測定した。

(5) 分房への乳酸菌の注入：乳酸菌 (1×10^9 cfu/ml, 3ml) を搾乳後の乳頭に 2 回注入し供試乳を採取するとともに体細胞数および化学発光反応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、潜在性乳房炎牛の乳性状、原因微生物、体細胞学的基準で抽出し選定した。また乳房炎原因菌が検出されない潜在性乳房炎牛の分房を対象に乳酸菌注入前、注入後 1, 2, 3, 5, 7 および 14 日目の体細胞数を測定しその効果 (30 万/ml 未満) を検討した。

4. 研究成果

(1) 体細胞数の増加を示す潜在性乳房炎牛 7 頭に対して、乳酸菌 *B. breve* (1×10^9 cfu/ml, 3ml) を搾乳後の分房に 2 回注入し注入前、注入後 1, 2, 3, 5, 7 および 14 日の乳汁中の体細胞数を測定した。乳酸菌注入後 1 ~ 2 日の分房乳の体細胞数は 5 ~ 30 倍と増加しその後減少し注入後 7 日後に多くは注入前のそれに復した。

(2) *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 ~ 14 日間について乳中のオプソニン化ゼイモザンで刺激した化学発光反応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 日間で有意な増加が認められた。その後漸次減少した。注入分房乳中の好中球の割合は *B. breve* 注入による好中球が注入分房内へ誘導されることで増加し、化学発光の増高は乳腺内で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。

(3) 乳成分の変化：乳酸菌注入 1 ~ 7 日において、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 ~ 5 日目に有意な増加が認められた。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に伴う乳腺細胞の乳合成機能および乳腺細胞への刺激により招来されるものと推察された。

(4) 抗微生物蛋白である LF および免疫グロ

ブリン IgG, IgA : *B.breve* 注入分房乳中の 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 日で注入前値に比較して有意な増加が認められた。また IgG の増高が注入後 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) 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 mRNA 発現を注入前のそれらと比較した。注入後に増加したサイトカイン mRNA は、IL1- , IL-8, TNF- , IFN- , IL-4, IL-6 であった。これらの結果から、乳酸菌注入により乳腺の自然免疫が刺激され免疫機能が活性化されることが明らかとなった。

(6) 乳酸菌注入による乳房炎制御 : 乳房炎牛の微生物学的治癒 (率) に及ぼす *B.breve* の乳房内注入による効果を評価した。コアグラゼ陰性ブドウ球菌に感染した分房の微生物学的治癒率は 60 ~ 70 % であった。環境性連鎖球菌の微生物学的治癒率は 50 ~ 60 %、しかし *S. aureus* 感染分房の微生物学的治癒率は 27 % であった。また、体細胞数 30 万/ml 以上を示す分房で乳房炎原因菌が検出されない「原因菌未検出の分房」への *B.breve* 注入による治癒率 (30 万/ml 以下に復する) は 70 ~ 80 % であった。これらの成績から乳酸菌 *B.breve* による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乳腺炎症部位への白血球の誘導と自然免疫の増高による機能活性から微生物の排除が高まっているものと推察される。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考えられた。乳酸菌の注入により乳腺のクリアランスが高まることで異物排

除能が誘導されていることが示唆された。野外の乳房炎への本法の応用試験から環境性乳房炎に対する選択的な治療として抗生剤による治療に代替しうる方法としての可能性が示された。

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 8 件)

Hagiwara, S., Mori, K., Okada, H., Oikawa, S. & Nagahata, H. 2014. Acute *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle: daiagnostic parameters associated with poor prognosis. 査読有 *J. Vet. Med. Sci.* 76(11): 1431-1436.

堀口 萌、権平 智、樋口豪紀、永幡 肇 (2014). 牛乳房炎分房への *Bifidobacterium breve* 注入に伴う乳腺の反応性とサイトカイン遺伝子発現 . 査読無 家畜衛生学雑誌 . 40 (3): 118 - 119 .

Tiantong, A., Peng, H-Y., Chen, S-H., Piamya, P., Liu, W-B., Chen, M-T., Yu, C., Nagahata, H. & Chang, C-J. 2015. Intramammary infusion of an *Enterococcus faecium* SF68 preparation on promoted the involution of drying off Holstein cows partly related to neutrophil-associated matrix metalloproteinase 9. 査読有 *Anim. Sci. J.* 86:111-119.

澤田知佳、丸山久美子、浅井友紀子、國分千尋、権平 智、河合一洋、樋口豪紀、永幡 肇 (2015). 牛乳房炎分房への *Bifidobacterium breve* およびラクトフェリン分解産物注入に伴う乳腺の反応性とサイトカイン産生への影響 . 査読無 家畜衛生学雑誌 . 41 (3): 84 - 85 .

Hagiwara, S., Mori, K. & Nagahata, H. 2016. Predictors of fatal outcomes resulting from acute *Escherichia coli* mastitis in dairy cows. 査読有 *J. Vet. Med. Sci.* 78(5): 905-908.

國分千尋、浅井友紀子、澤田知佳、丸山久美子、権平 智、樋口豪紀、永幡 肇 (2 0 1 6) . 牛乳房炎分房への *Bifidobacterium breve* 注入に伴う乳腺の反応性とサイトカイン産生 . 査読無 家畜衛生学雑誌 . 4 2 (3) : 1 4 0 - 1 4 1 .

Nagahata, H., Horiguchi, M., Tamiya, A., Gondaira, S., Higuchi, H. & Kawai, K. 2015. Intramammary infusion of lactic acid bacteria and therapeutic effects on mastitis in dairy cows. 査読無 XVII *International Congress on Animal Hygiene* (ISAH2015): 132-133.

永幡 肇 (2017). 第 29 回世界牛病学会 (World Buiatrics Congress 2016) の発表から . 査読無 . 畜産の研究 71(4):295-306. (科研課題の発表を紹介)

[学会発表] (計 6 件)

堀口 萌、権平 智、樋口豪紀、永幡 肇 (2 0 1 4) . 牛乳房炎分房への *Bifidobacterium breve* 注入に伴う乳腺の反応性とサイトカイン遺伝子発現 . 日本家畜衛生学会第 8 1 回大会、東京

Nagahata, H., Horiguchi, M., Tamiya, A., Gondaira, S., Higuchi, H. & Kawai, K. 2015. Intramammary infusion of lactic acid bacteria and therapeutic effects on mastitis in dairy cows. 査読無 XVII *International Congress on Animal Hygiene* (ISAH2015). 9June2015. Kosice, Slovakia

澤田知佳、丸山久美子、浅井友紀子、國分千尋、権平 智、河合一洋、樋口豪紀、永幡 肇 (2 0 1 5) . 牛乳房炎分房への *Bifidobacterium breve* およびラクトフェリン分解産物注入に伴う乳腺の反応性とサイトカイン産生への影響 . 日本家畜衛生学会第 8 3 回大会、東京 .

Nagahata, H., Horiguchi, M., Gondaira, S. & Higuchi, H. (2016). Evaluation of intramammary infusion of lactic acid

bacteria and therapeutic effects on mastitis in dairy cows. *World Buiatrics Congress*, 3July2016. Dublin, Ireland.

國分千尋、浅井友紀子、澤田知佳、丸山久美子、権平 智、樋口豪紀、永幡 肇 (2 0 1 6) . 牛乳房炎分房への *Bifidobacterium breve* 注入に伴う乳腺の反応性とサイトカイン産生 . 日本家畜衛生学会第 8 5 回大会、東京 .

Nagahata, H., Yuge, K., Moriyama, A., Higuchi, H. & Kawai, K. (2016). Effectiveness of slightly acidic electrolyzed water for improvement of hygienic conditions of milking system. 6th *IDF International Mastitis Conference*. Nantes, France.

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・教授
研究者番号 : 00305905

(3) 研究分担者

今内 覚 (KONNAISATORU)
北海道大学大学院・獣医学研究科・准教授
研究者番号 : 40396304

(4) 連携研究者

遠藤 大二 (ENDOU DAIJI)
酪農学園大学・獣医学群・教授
研究者番号 : 40168828