

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07692

研究課題名(和文) 抗菌因子の高濃度暴露による難治性乳房炎治療プログラムの開発

研究課題名(英文) Treatment of mastitis using temporal cessation of milking

研究代表者

磯部 直樹 (Isobe, Naoki)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：80284230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲン(E)とショート乾乳(3日間のみ搾乳を停止する処理)を併用した時の乳汁中抗菌因子の変化を調べることにより、難治性の乳房炎を治療する新たなプログラムを開発することを目的とした。Eの投与またはショート乾乳を実施すると、乳量は一時的に減少し、抗菌因子の乳中濃度は有意に増加した。次にE投与とショート乾乳を同時に行うと、ショート乾乳だけに比べて乳中抗菌因子がさらに増加した。以上のことから、ショート乾乳中にEを投与すると、抗菌因子濃度が飛躍的に上昇し、乳腺の免疫機能が強化され、乳房炎治療に有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim was to explore the effect of estrogen and temporal cessation of milking for 3 days on mammary immune function in order to develop new mastitis treatment system. Estrogen injection or temporal cessation of milking reduced milk yield and increased antimicrobial components concentration in milk. Combination of E treatment and temporal cessation of milking upregulated antimicrobial components in milk dramatically compared with that only temporal cessation of milking. These results suggest that temporal cessation of milking together with E augmented innate immune function which can be utilized to the treatment of mastitis.

研究分野：家畜生体機構学

キーワード：乳房炎 エストラジオール 抗菌因子 ショート乾乳 乳量

## 1. 研究開始当初の背景

乳房炎による損害は国内で年間 700 億円以上であり、減少する兆しは全くない。したがって、乳房炎を防除することが酪農業界にとって急務である。乳房炎は乳頭から細菌が侵入によって起こる。その中でも黄色ブドウ球菌等による慢性の難治性乳房炎が近年増えている。これらの乳房炎の治療は抗生物質を長期間用いる方法が主流であるが、牛乳の出荷ができず、耐性菌の出現も危惧される。したがって、抗生物質を使わない新たな治療法が期待される。

我々は、乳腺でいくつかの抗菌因子が合成・分泌されており、これらが乳腺の局所免疫に重要な役割を果たすことを示してきた。科研費（基盤 C, 平成 24~26 年）による研究成果において、エストロゲン（E）を投与すると、乳量が減少し、抗菌因子濃度が上昇することを発見した。乳汁および抗菌因子はいずれも乳腺上皮細胞で産生されることから、乳汁合成と抗菌因子合成のメカニズムは異なる制御を受けている可能性がある。

この詳細が明らかになると、乳量を減少させることによって抗菌因子を濃縮することが可能となり、乳房炎防除・治療の有効な方法になりうるという考えに至った。しかし、E が乳腺上皮細胞に及ぼす影響についての報告はほとんどない。

抗菌因子の発現を増強させるには細菌成分であるリポ多糖（LPS）を乳腺に注入することが効果的であることを明らかにしている。プロバイオティクスを経口投与することにより消化管抗菌因子の遺伝子発現が増加するが、乳腺におけるプロバイオティクスの影響は全く分かっていない。

さらに、難治性の乳房炎を治療する方法として数日間搾乳を停止するショート乾乳法が開発された。この方法はショート乾乳開始時に抗生物質を注入し、この抗生物質を長期間乳房内に留まらせ、作用を長持ちさせることを目的に行う。この方法は開発されたばかりであり、その効果はまだ完全には明らかにされていない。また、3 日間搾乳を停止する方法が最良の方法なのかについても全く不明である。

## 2. 研究の目的

E とショート乾乳を併用すれば、E で乳量を減少させ、ショート乾乳で抗菌因子を乳腺内に止め置き、細菌を長期間攻撃し続けることができるかと仮説を立てた。そこで、本研究では、E とショート乾乳を併用した新たな乳房炎治療プログラムを開発するために、この手法を用いた時の乳量および抗菌因子を調べた。

## 3. 研究の方法

### (1) 乳腺の乳生産に及ぼすエストロゲン（E）の影響

In vivo 試験では E を 4 日間筋中投与し、

乳量及び乳汁成分を測定した。乳汁は乳糖、乳蛋白、乳脂質および抗菌因子（LAP）の濃度を測定した。

In vitro 試験において、牛乳から乳腺上皮細胞を単離し、1 か月間増殖させた後、種々の濃度の E を添加した培地で培養した。培養後の培地は抗菌因子（LAP, TAP）の濃度測定、上皮細胞は抗菌因子、水輸送蛋白（アクアポリン）、密着結合分子（Claudin-1, 6）の遺伝子発現解析に用いた。

### (2) 乳腺の抗菌因子産生に及ぼすショート乾乳の影響

3 日間搾乳を停止（ショート乾乳）し、その前 3 日間および後 7 日間では 1 日 1 回搾乳した。その乳汁を用いて、乳量、体細胞数、抗菌因子（ラクトフェリン、カテリシジン-7）の濃度を測定した。

### (3) 乳腺の抗菌因子産生に及ぼすプロバイオティクスの影響

プロバイオティクスとして、酵母を乳房に注入し、経時的に乳汁を採取して、乳量、体細胞数および抗菌因子（カテリシジン-7）の濃度を測定した。

### (4) E およびショート乾乳を併用した治療プログラムの開発

3 日間搾乳を停止するとともに搾乳停止日から 4 日間毎日エストロゲンを投与した。少量の乳汁を毎日サンプリングして乳量、体細胞数および抗菌因子（カテリシジン、ラクトフェリン、goat beta-defensin-1, S100A7）の濃度を測定した。

## 4. 研究成果

(1) In vivo 試験の結果、乳量が E 投与により有意に減少し、乳中 LAP 濃度は E により増加する傾向が認められた。乳糖、乳蛋白、乳脂質については E による変化は認められなかった。

In vitro 試験の結果、培地に E を添加するとアクアポリン 7 および Claudin-1, 6 の mRNA 発現が有意に減少したが、抗菌因子である LAP や TAP の発現や培地中の濃度は減少しなかった。

以上の結果から、E による水チャネル分子および密着結合分子発現の減少により、乳量が低下し、それによって乳中抗菌因子の濃度が増加すると推察された。したがって、E を利用することにより乳房炎の予防・治療の可能性が示された。

(2) ショート乾乳後に乳量は一時的に減少し、逆に体細胞数は増加した。抗菌因子であるラクトフェリン、カテリシジン-7 の乳中濃度はショート乾乳後に有意に増加した。これらのことから、ショート乾乳を行うことによって乳量が減少し、それによって抗菌因子の乳中濃度が増加すると考えられた。

(3) 酵母投与 24 時間後に乳量が一時的に増加したが、体細胞数およびカテリシジン-7 の濃度は有意には変化しなかった。したがって、酵母の投与は抗菌因子濃度には影響しないと思われた。

(4) エストロゲンを投与した時、ショート乾乳後の搾乳再開後に乳量が非投与区と比較して有意に低くなり、搾乳再開後 4 日目の体細胞数 (SCC) が非投与区と比較して有意に高くなった。また、乳中カテリシジン濃度はショート乾乳数日目において、ラクトフェリン濃度はショート乾乳中から搾乳再開後において非投与区と比較して有意に高くなった。

以上のことから、ショート乾乳中にエストロゲンを投与すると、これらの相乗効果によって、搾乳再開後の乳量がさらに減少することで抗菌因子濃度が相対的に上昇し、一時的な自然免疫機能の強化が図れることが示唆された。

これらの成果はこれまでに全く報告されていない新規的なものであり、これらの成果を応用して乳房炎を治療することが可能と考えられる。今後は、3 日間乾乳という方法が最適な方法なのかどうか、例えば、2 日間あるいは 4 日間ではどうか、あるいは 1 日おきではどうかなど、さらに詳細に検討する必要があると考えられる。また、乳量がある程度低下してしまうので、これらを回復するための方策も考える必要がある。

#### 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 12 件)

1. Matsukawa S, Ueno K, Sugino T, Yoshimura Y, Isobe N (2018) Effects of colostrum whey on immune function in the digestive tract of goats. *Animal Science Journal* (in press) 査読有
2. Elgawish RA, Isobe N (他 4 名 6 番目) (2018) Changes in plasma concentrations of S100A7 and S100A8 in dairy cows during pregnancy. *Reproduction in Domestic Animals* (in press) 査読有
3. Shinozuka Y, Okita M, Isobe N (他 4 名 7 番目) (2018) Blood ionized calcium levels and acute-phase blood glucose kinetics in goats after intramammary infusion of lipopolysaccharide. *The Journal of Veterinary Medical Science* 80(2) 242-246 査読有 doi: 10.1292/jvms.17-0615
4. Elgawish RA, Yoshimura Y, Isobe N (2018) Microcystin-LR modulates the

- expression patterns of proinflammatory cytokines and apoptotic gene in the liver of chicken. *Journal of Poultry Science* 55(1): 70-77 査読有 doi: <https://doi.org/10.2141/jpsa.0170054>
5. Ghanem M, Nishibori M, Isobe N, Hisaeda K (2018) Detection of the APAF1 mutation in Holstein cows and mummified fetuses in Japanese dairy herds. *Reproduction in Domestic Animals* 53:137-142 査読有 doi: 10.1111/rda.13081
  6. Srisaikham S, Isobe N, Suksombat W (2017) The inhibitory effect of sodium thiocyanate and sodium percarbonate rations on microorganism growth in raw milk samples as an effective treatment to extend milk quality during storage. *Songklanakar in Journal of Science and Technology* 39(1): 77-89 査読有 doi: 10.14456/sjst-psu.2017.9
  7. Koshiishi T, Watanabe M, Miyake H, Hisaeda K, Isobe N (2017) Cellular and soluble components decrease the viable pathogen counts in milk from dairy cows with subclinical mastitis. *The Journal of Veterinary Medical Science* 79(8): 1389-1393 査読有 doi: 10.1292/jvms.17-0269
  8. Kuwahara K, Yoshimura Y, Isobe N (2017) Effect of steroid hormones on the innate immune response induced by *Staphylococcus aureus* in the goat mammary gland. *Reproduction in Domestic Animals* 52: 579-584 査読有 doi: 10.1111/rda.12948
  9. Isobe N (2017) Control mechanisms for producing antimicrobial factors in ruminant mammary gland. *Animal Science Journal* 88(7):937-943 査読有 doi: 10.1111/asj.12808
  10. Yamasaki A, Yoshimura Y, Isobe N (2017) Changes in the concentrations of somatic cell counts, lingual antimicrobial peptide and lactoperoxidase activity in milk at periovulatory period in dairy cows. *Animal Science Journal* 88(3): 484-488 査読有 doi: 10.1111/asj.12644
  11. Hisaeda K, Isobe N (他 4 名 6 番目) (2016) Change in viable bacterial count during preservation of milk derived from dairy cows with subclinical mastitis and its relationship with antimicrobial components in milk. *The Journal of Veterinary Medical Science* 78(8):1245-1250 査読有 doi: 10.1292/jvms.16-0049
  12. Srisaikham S, Suksombat W, Yoshimura Y, Isobe N (2016) Goat cathelicidin-2 is

secreted by blood leukocytes regardless of lipopolysaccharide stimulation. *Animal Science Journal* 87(3): 423-427 査読有 doi: 10.1111/asj.12438

〔学会発表〕(計 33 件)

1. Fika Yuliza Purba: Changes in S100A8 concentration in milk after intra-mammary infusion of lipopolysaccharide. 日本畜産学会第 124 回大会 2018 年
2. 磯部直樹: 乳牛の前絞り乳における抗菌因子の濃度変化. 第 22 回日本乳房炎研究会学術集会 2017 年
3. 久枝啓一: 乳牛の潜在性乳房炎におけるセラメーラの効果. 第 22 回日本乳房炎研究会学術集会 2017 年
4. 佐藤太郎: スコア 臨床型乳房炎を発症した原因菌発育陰性牛への対応. 第 22 回日本乳房炎研究会学術集会 2017 年
5. 兒玉望: ヤギにおける妊娠中期の乳房炎が妊娠機能に及ぼす影響. 平成 29 年度第 67 回関西畜産学会大会 2017 年
6. 磯部直樹: 3 日間の搾乳停止が乳腺自然免疫機能へ及ぼす影響. 日本畜産学会第 123 回大会 2017 年
7. 西川萌美: ヤギ乳腺上皮細胞におけるカテリシジン-7 の遺伝子発現に及ぼす微生物刺激の影響. 日本畜産学会第 122 回大会 2017 年
8. 磯部直樹: 乳房炎の防除管理について 酪農経営支援研修会 2017 年
9. 磯部直樹: 乳腺の抗菌因子と乳房炎防除管理. 第 3 回広島大学酪農技術セミナー 2017 年 招待講演
10. 磯部直樹: 乳房炎防除のための自然免疫機能の利用. 第 22 回日本乳房炎研究会学術集会 2017 年 招待講演
11. 磯部直樹: 乳房炎と自然免疫機構. 第 21 回大動物臨床教育セミナー 2017 年 招待講演
12. 磯部直樹: ショート乾乳と抗菌因子. *Bovine Mastitis Research (BMR)* 2017 年 招待講演
13. 磯部直樹: ルーメンアシドーシスによる乳房炎について. ルーメン研究会 2017 年 招待講演
14. 磯部直樹: 乳房炎と自然免疫機構. 大動物臨床研究会第 7 回東京シンポジウム 2017 年 招待講演
15. 松川 祥子: 初乳乳清の経口投与がヤギ消化管の免疫機能に及ぼす影響. 平成 28 年度第 66 回関西畜産学会大会 2016 年
16. 西川萌美: ヤギ乳腺におけるカテリシジン-7 の発現・分泌とその乳房炎との関係. 第 21 回日本乳房炎研究会学術集会 2016 年
17. 兒玉望: 乳房炎がヤギの内分分泌機能に及ぼす影響. 第 109 回日本繁殖生物学会大会 2016 年
18. 磯部直樹: 黄色ブドウ球菌により誘起されたヤギ乳腺の自然免疫応答に及ぼす性ステロイドホルモンの影響. 第 109 回日本繁殖生物学会大会 2016 年
19. 西川萌美: カテリシジン-7 のヤギ乳腺における発現および乳房炎との関係. 第 3 回乳房炎サマーキャンプ 2016 年
20. 兒玉望: 乳房炎が妊娠ヤギの内分分泌機能に及ぼす影響. 第 3 回乳房炎サマーキャンプ 2016 年
21. Ueda J: Effect of temporary cessation of milking on antimicrobial components in goat milk. *The 17th AAAP Animal Science Congress* 2016 年
22. Kodama N: Effect of mastitis on pregnancy function in prepartum goats. *The 17th AAAP Animal Science Congress* 2016 年
23. Matsukawa S: Effect of oral administration of colostrum on immune function in the goat digestive tract. *The 17th AAAP Animal Science Congress* 2016 年
24. Isobe N: Effect of steroid hormone on innate immune response induced by *Staphylococcus aureus* in mammary gland of goat. *The 17th AAAP Animal Science Congress* 2016 年
25. 西川萌美: ヤギ白血球におけるカテリシジン-7 の発現とそのリポ多糖に対する作用. 日本畜産学会第 121 回大会 2016 年
26. 磯部直樹: 乳房炎と自然免疫機構. 第 40 回大動物臨床研究会 2016 年 招待講演
27. Nishikawa M: Reaction of Cathelicidin-2 secreted from goats milk leukocytes to lipopolysaccharide. *The 6th International Seminar on Tropical Animal Production (ISTAP)* 2015 年
28. Isobe N: Changes in pathogen number during preservation of milk derived from mastitic dairy cows. *The 6th International Seminar on Tropical Animal Production (ISTAP)* 2015 年
29. 三浦千佳: Estradiol はウシの乳量を減少させ乳汁中の抗菌因子濃度を上昇させる. 第 20 回日本乳房炎研究会学術集会 2015 年
30. 西川萌美: ヤギ乳中白血球におけるカテリシジン-7 の発現とそのリポ多糖に対する作用. 第 20 回日本乳房炎研究会学術集会 2015 年
31. 磯部直樹: 乳牛の高体細胞数乳汁における保存中生菌数の変化と抗菌因子との関係. 日本畜産学会第 120 回大会 2015 年
32. 三浦千佳: ウシ乳腺における水チャネルおよび密着結合分子の発現に及ぼす

- Estradiol の影響 . 平成 27 年度第 65 回  
関西畜産学会大会 2015 年
33. 植田丈: リポ多糖の血中投与がヤギ乳房  
炎に及ぼす影響 . 平成 27 年度第 65 回関  
西畜産学会大会 2015 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/anat/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

磯部 直樹 (ISOBE NAOKI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授

研究者番号 : 80284230

### (3)連携研究者

沖田 美紀 (OKITA MIKI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・助教  
研究者番号 : 30611842