

機関番号：82111  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19780236  
 研究課題名（和文） 潜在性乳房炎罹患牛におけるウシ組換えサイトカイン乳房内投与の治療効果  
 研究課題名（英文） Effect of intramammary infusion of recombinant bovine cytokines on CMT score and milk mononuclear cell populations in Holstein cows with subclinical mastitis  
 研究代表者  
 菊 佳男 (KIKU YOSHIO)  
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・主任研究員  
 研究者番号：70370179

研究成果の概要（和文）：酪農経営に甚大な被害を与える乳房炎の治療は、抗生物質中心であるが、その多用による薬剤耐性菌の出現が危惧されている。生体の生理活性物質であるサイトカインを利用した乳房炎治療技術の確立は、この薬剤耐性菌の問題を解決できる可能性がある。本試験において乳房炎罹患分房内にウシサイトカイン GM-CSF、IL-8 を単独および併用投与したところ、全群で乳房炎治療効果が示され、特に GM-CSF において顕著だった。全群で乳汁中食細胞機能が亢進したことから、自然免疫系を介した治療効果であることが示唆され、さらに GM-CSF では T 細胞系の機能亢進も誘導したことから獲得免疫系も含めた効果と考えられた。

研究成果の概要（英文）：The effect of intramammary infusion of recombinant bovine (rb) cytokine on mononuclear cell populations in udders, and CMT score was investigated. Twenty-one cows with naturally occurring subclinical mastitis were infused rbGM-CSF, rbIL-8 and the combination of the two into the udders. Milk samples were collected from the udders on days 0, 1/4, 1, 2, 3, 7 and 14 after infusions of all cytokines. The CMT score sharply rose between days 1/4 and 2, and was followed by a smooth decline to low pre-infusion levels between days 7 and 14. Interestingly, the percentage of CD14+ cells increased on days 1 and 2 after infusion of rbGM-CSF only. Subsequent to this increase in CD14+ cells, CD4+ and CD8+ cells also increased on days 2 and 3, suggesting that the infusion of rbGM-CSF enhanced cellular immunity in the mammary gland. In contrast, the percentages of CD4+ and CD8+ cells decreased on days 1/4 and 1 after infusion of rbIL-8 and the combination respectively. However, the mechanism of this decrease following the infusion of the two is not understood and this calls for future work in this area. These results demonstrate that the intramammary infusion of rbGM-CSF induces the alteration of mononuclear cell populations in milk, and that it may have potential as a therapeutic agent for subclinical mastitis of dairy cows.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	630,000	3,730,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、臨床獣医学

キーワード：治療、乳房炎、サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

わが国の乳用牛の死産病傷事故原因の中で最大の問題となっている乳房炎は、病原微生物の乳房内感染によって引き起こされ、乳質ならびに泌乳量の低下を招く疾病である。そして、その経済的損失総額は甚大であり年間約 800 億円と試算されている。そのうち、肉眼的に症状を示さないものの乳汁中の起因菌や体細胞などの炎症性産物が増加している潜在性乳房炎は、乳房炎発生件数の 7-8 割を占めており、特に黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*; SA) 由来乳房炎は、菌の組織定着力が強固で慢性経過をたどりやすく、ひとたび罹患すると完治することが難しい難防除性疾患とされている。また、酪農現場では経験的な抗生物質治療が中心であり、過剰な治療による薬剤耐性菌の出現や薬剤残留の問題も「食の安全性」の観点から問題となっている。これらのことから抗生物質の使用を避けようとする世界的な動きが強まっており、次世代の治療薬の開発が期待されている。

## 2. 研究の目的

酪農経営を脅かす最大の疾病である乳房炎に対する治療は、抗生物質の使用を中心に行われてきているが、薬剤耐性菌出現の危険性から抗生物質に替わる次世代治療薬の開発が世界的に求められている。これまで、潜在性乳房炎罹患牛に対する遺伝子組換えウシ (rb) サイトカインの乳房内投与が、乳房炎治療効果を有することを確認してきたが、その治癒メカニズムについては不明な点が多い。

本研究において、難治性である SA 性潜在性乳房炎罹患牛に対し、rb 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、rb インターロイキン 8 (IL-8) を乳房内に単独および併用投与することによって、その治療効果ならびに生体防御機構へ及ぼす影響を免疫学的に評価し、その作用を比較検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 供試動物及び乳房炎診断基準

乳房炎簡易診断基準である California Mastitis Test (CMT) 変法で乳房炎と診断された SA 由来の潜在性乳房炎に罹患しているホルスタイン牛 21 頭の罹患乳房を供試した。そ

のうち 6 頭を rbGM-CSF 投与試験、9 頭を rbIL-8 投与試験、6 頭をそれらの併用投与試験に用いた。

### (2) サイトカイン濃度及び試験期間

対照期間 (リポソーム包埋サイトカイン不含対照液 (NC) を投与) 7 日間の観察の後、リポソーム包埋サイトカイン rbGM-CSF (n=6; 400・g/5mL) 及び rbIL-8 (n=9; 1mg/5mL) の単独または併用 (n=6; 単独投与時と同濃度) 投与を実施し、投与後 14 日間の経過観察を行った。なお、併用投与時には rbGM-CSF 投与後、6 時間の間隔を経て、rbIL-8 の追加投与を行った。

### (3) 採材方法

血液及び乳汁の採材は、NC 投与直前 (サイトカイン投与後-7日)、投与後 0.25、1、2 及び 3 日に行い、それに続いてサイトカイン投与直前 (サイトカイン投与後 0 日)、投与後 0.25、1、2、3、7 及び 14 日に行った。

### (4) 効果判定

サイトカイン投与後 14 日に乳汁検査を実施し、California Mastitis Test (CMT) 変法によって治療効果を判定した。

### (5) 調査項目

試験期間において次の調査項目について観察及び解析を行った。臨床症状の観察では、体温、乳房の発赤及び腫脹の有無の観察を行った。血液解析では、血液一般検査、白血球食機能解析 (化学発光能: CL 能)、単核球ポピュレーション解析を実施した。乳汁解析では、体細胞数、総菌数、SA 数、CL 能、単核球ポピュレーション解析を実施した。

## 4. 研究成果

(1) サイトカイン投与が CMT 値に与える影響

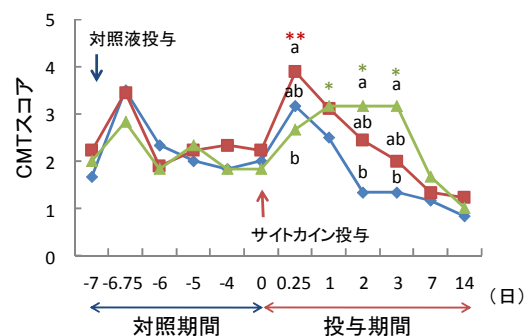


図1. 陰性対照およびサイトカイン投与後のCMT値の変化 (◆: rbGM-CSF、■: rbIL-8、▲: 併用投与。異符号間に有意差あり。アスタリスクはサイトカイン投与前との比較(\*: p<0.05、\*\*: p<0.01))

サイトカイン投与後 14 日間の経過観察を行ったところ、いずれのサイトカイン投与も投与後 14 日に、サイトカイン投与前に比較し、CMT 変法のスコアを低減させた (図 1)。投与前の CMT スコアを 1 として投与後のスコアを比較した場合、その効果は rbGM-CSF 単独投与が他に比較し高かった (表 1)。

表1. サイトカイン投与前および投与後効果判定時のCMTスコアならびにその比率

サイトカイン	CMTスコア		投与前のスコアを1とした時の投与後のスコア
	投与前	投与後	
rbGM-CSF (n=6)	2.00 ± 0.37	0.83 ± 0.40	0.39 ± 0.18
rbIL-8 (n=9)	2.22 ± 0.28	1.22 ± 0.40	0.48 ± 0.17
併用 (n=6)	1.83 ± 0.31	1.00 ± 0.41	0.43 ± 0.19
陰性対照 (n=21)	2.00 ± 0.20	2.05 ± 0.18	1.10 ± 0.08

### (2) サイトカイン投与が乳汁 CL 能に与える影響

サイトカイン投与が乳汁 CL 能に与える影響について図 2 に示した。NC 投与は乳汁 CL 能を一時的に上昇させたが、大きな影響を示さなかった。また、rbGM-CSF 及び rbIL-8 投与後 0.25 日において、乳汁 CL 能は投与前に比較し有意に上昇した。一方、併用投与における乳汁 CL 能は、rbGM-CSF 及び rbIL-8 の連続投与にそれぞれ反応し、ブースター効果様の反応を示し、投与後 1 日において最高値となった。いずれの投与方法においても、投与後 14 日においては、投与前の値に回復した。これらのことから、いずれの投与方法も乳汁中貪食細胞機能を亢進させることが示された。

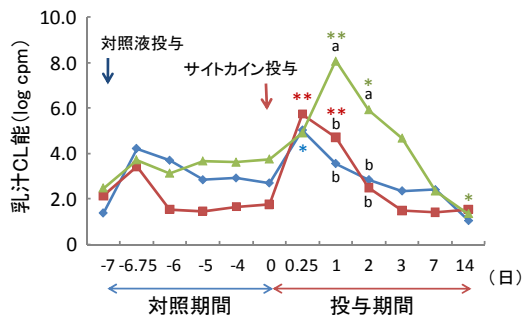


図2. 陰性対照およびサイトカイン投与後の乳汁CL能の変化 (◆; rbGM-CSF, ■; rbIL-8, ▲; 併用投与。異符号間に有意差あり。アスタリスクはサイトカイン投与前との比較(\*; p<0.05, \*\*; p<0.01))

### (3) サイトカイン投与が乳汁単核球ポピュレーションに与える影響

乳汁単核球ポピュレーションは、NC 投与後の大きな変動は見られなかった。rbGM-CSF 投与後 1 日から、CD14+細胞率が上昇 (図 3a) し、その後、投与後 2~3 日において CD4+及び CD8+細胞率が上昇した (図 3b, c)。rbIL-8 投与後は、CD14+細胞率の減少が見られた (図 3a) が、CD4+及び CD8+細胞率に大きな影響は無かった (図 3b, c)。併用投与後は、CD14+及び CD4+細胞率の減少が見られた (図 3a, b) が、CD8+細胞率は一定の変化を示さなかった

(図 3c)。これらのことから、rbGM-CSF 単独投与は、

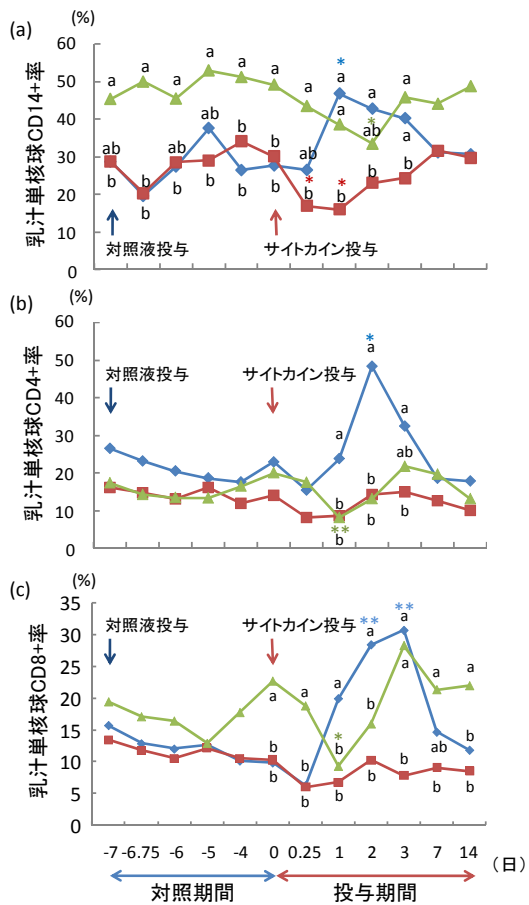


図3. 陰性対照およびサイトカイン投与後の乳汁単核球 (a) CD14+, (b) CD4+, (c) CD8+ 率の変化 (◆; rbGM-CSF, ■; rbIL-8, ▲; 併用投与。異符号間に有意差あり。アスタリスクはサイトカイン投与前との比較(\*; p<0.05, \*\*; p<0.01))

他の投与方法に比較し乳汁中単核球構成に大きな影響を与え、細胞性免疫の誘導を行うことが示された。

### (4) サイトカイン投与が血液単核球ポピュレーションに与える影響

血液単核球ポピュレーションは、NC 投与ならびに各サイトカイン投与後に大きな変動は見られなかった (図示せず)。

## 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 6 件)

- ① Yoshio Kiku, Tomomi Ozawa, Shiro Kushibiki, Madoka Sudo, Kouhei Kitazaki, Noriaki Abe, Hideyuki Takahashi, Tomohito Hayashi, Decrease in bovine CD14 positive cells in colostrum is associated with the incidence of mastitis after calving, Vet. Res. Commun., 査読有、2010、34巻、197-203.

- ② 菊佳男、尾澤知美、阿部憲章、櫛引史郎、大橋傳、犬丸茂樹、保田立二、高橋秀之、林智人、黄色ブドウ球菌性乳房炎罹患牛に対するリポソーム包埋rbIL-8 乳房内投与による治療効果の検討、日本乳房炎研究会報、査読有、2010、14 卷、45-48.
- ③ 尾澤知美、菊佳男、水野恵、宮本亨、犬丸茂樹、櫛引史郎、新宮博行、土田修一、林智人、ウシ分房内rbGM-CSF投与による体細胞数低減関連因子の探索、日本乳房炎研究会報、査読有、2010、14 卷、41-44.
- ④ 菊佳男、岡田洋之、堤隆一、尾澤知美、林智人、高橋秀之、実験的大腸菌性乳房炎における臨床症状と血中サイトカインの関係、日本乳房炎研究会報、査読有、2009、13 卷、57-60.
- ⑤ 林智人、窪田宗広、岩崎圭子、坂口謙吾、安部良、大塚浩通、菊佳男、尾澤知美、高橋秀之、乳房炎乳汁から迅速かつ効率よく黄色ブドウ球菌を分離する方法の開発、日本乳房炎研究会報、査読有、2009、13 卷、39-47.
- ⑥ 尾澤知美、菊佳男、犬丸茂樹、長谷川三喜、櫛引史郎、林智人、高橋秀之、ウシ組換えGM-CSF乳房内投与が潜在性乳房炎牛の乳汁及び末梢血好中球に及ぼす影響、日本乳房炎研究会報、査読有、2009、13 卷、61-64.

[学会発表] (計 15 件)

- ① Yoshio Kiku, Tomomi Ozawa, Shigeki Inumaru, Shiro Kushibiki, Hideyuki Takahashi, Mugia G. Kimani, Tomohito Hayashi, Effect of intramammary infusion of rbGM-CSF, rbIL-8 and their combination on CMT score and Milk Mononuclear Cell Populations in Holstein cows with subclinical mastitis, 5th IDF Mastitis conference, 2010. 3. 22-24, New Zealand
- ② 菊佳男、尾澤知美、犬丸茂樹、櫛引史郎、大橋傳、新宮博行、中村真弓、阿部憲章、濱村圭一郎、北崎宏平、高橋秀之、林智人、黄色ブドウ球菌性乳房炎罹患牛に対する遺伝子組換えウシGM-CSF、IL-8 およびその併用乳房内投与による治療効果の検討、平成 21 年度日本獣医師会学会年次大会、2010. 1. 30、宮崎
- ③ 菊佳男、尾澤知美、犬丸茂樹、櫛引史郎、大橋傳、新宮博行、中村真弓、阿部憲章、濱村圭一郎、北崎宏平、高橋秀之、林智人、遺伝子組換えウシサイトカイン乳房内投与による黄色ブドウ球菌性乳房炎治療効果の検討、第 4 回日本家畜臨床感染症研究会学術集会、2009. 12. 11、江別
- ④ 菊佳男、尾澤知美、阿部憲章、櫛引史郎、大橋傳、犬丸茂樹、保田立二、高橋秀之、

林智人、黄色ブドウ球菌性乳房炎罹患牛に対するリポソーム包埋rbIL-8 乳房内投与による治療効果の検討、第 14 回日本乳房炎研究会学術集会、2009. 10. 23、つくば

- ⑤ 尾澤知美、菊佳男、水野恵、宮本亨、犬丸茂樹、櫛引史郎、新宮博行、土田修一、林智人、ウシ分房内rbGM-CSF投与による体細胞数低減関連因子の探索、第 14 回日本乳房炎研究会学術集会、2009. 10. 23、つくば
- ⑥ 菊佳男、尾澤知美、櫛引史郎、犬丸茂樹、保田立二、高橋秀之、林智人、リポソーム包埋rbIL-8 乳房炎罹患乳房内投与による乳汁および末梢血単核球ポピュレーションへの影響と乳房炎治療効果の検討、第 148 回日本獣医学会学術集会、2009. 9. 27、鳥取
- ⑦ 尾澤知美、菊佳男、水野恵、宮本亨、犬丸茂樹、櫛引史郎、新宮博行、土田修一、林智人、ウシ分房内rbGM-CSF投与による体細胞数低減関連因子の探索、第 148 回日本獣医学会学術集会、2009. 9. 27、鳥取
- ⑧ 林智人、尾澤知美、菊佳男、松原朋子、高松大輔、麻生久、山口高弘、黄色ブドウ球菌接触刺激による培養ウシ乳腺上皮細胞の炎症関連遺伝子の発現解析、第 148 回日本獣医学会学術集会、2009. 9. 25、鳥取
- ⑨ 菊佳男、尾澤知美、櫛引史郎、犬丸茂樹、林智人、長谷川三喜、保田立二、高橋秀之、リポソーム包埋rbGM-CSF乳房炎罹患乳房内投与による乳汁および末梢血単核球表面抗原への影響と乳房炎治療効果の検討、平成 20 年度日本獣医師会学会年次大会、2009. 1. 24、岩手
- ⑩ 菊佳男、岡田洋之、堤隆一、尾澤知美、林智人、高橋秀之、実験的大腸菌性乳房炎における臨床症状と血中サイトカインの関係、第 13 回日本乳房炎研究会学術大会、2008. 11. 7、つくば
- ⑪ 林智人、窪田宗広、岩崎圭子、坂口謙吾、安部良、大塚浩通、菊佳男、尾澤知美、高橋秀之、乳房炎乳汁から迅速かつ効率よく黄色ブドウ球菌を分離する方法の開発、第 13 回日本乳房炎研究会学術大会、2008. 11. 7、つくば
- ⑫ 尾澤知美、菊佳男、犬丸茂樹、長谷川三喜、櫛引史郎、林智人、高橋秀之、ウシ組換えGM-CSF乳房内投与が潜在性乳房炎牛の乳汁および末梢血好中球に及ぼす影響、第 13 回日本乳房炎研究会学術大会、2008. 11. 7、つくば
- ⑬ Yoshio Kiku, Tomomi Ozawa, Shigeki Inumaru, Shiro Kushibiki, Tomohito Hayashi, Hideyuki Takahashi, Effect of

Intramammary Injection of Liposomal rbGM-CSF on Milk and Peripheral Blood mononuclear cells of Subpopulation in Holstein Cows with Naturally Infected-subclinical Mastitis、International Conference of Mastitis control、2008.10.1、Netherland

- ⑭ Tomohito Hayashi、Munehiro Kubota、Keiko Iwasaki、Kengo Sakaguchi、Ryo Abe、Hiromichi Ohtsuka、Yoshio Kiku、Tomomi Ozawa、Hideyuki Takahashi、Rapid and Effective Method for Separation for Staphylococcus aureus from Somatic Cells in Mastitis Milk、International Conference of Mastitis control、2008.10.1、Netherland
- ⑮ Tomomi Ozawa、Yoshio Kiku、Shigeki Inumaru、Sanki Hasegawa、Shiro Kushibiki、Tomohito Hayashi、Hideyuki Takahashi、Effect of Intramammary Injection of RbGM-CSF on Neutrophils Function of Blood and Milk in Holstein Cows with Subclinical Mastitis、International Conference of Mastitis control、2008.10.1、Netherland

[図書] (計4件)

- ① Yoshio Kiku、他、Wageningen Academic Publishers、Mastitis Control : Effect of Intramammary Injection of Liposomal RbGM-CSF on Milk and Peripheral Blood Mononuclear Cells of Subpopulation in Holstein Cows with Naturally Infected-subclinical Mastitis、2008、pp.160.
- ② Tomohito Hayashi、Yoshio Kiku、他、Wageningen Academic Publishers、Mastitis Control : Rapid and Effective Method for Separation for Staphylococcus aureus from Somatic Cells in Mastitis Milk、2008、pp.304.
- ③ Tomomi Ozawa、Yoshio Kiku、他、Wageningen Academic Publishers、Mastitis Control : Effect of Intramammary Injection of RbGM-CSF on Neutrophils Function of Blood and Milk in Holstein Cows with Subclinical Mastitis、2008、pp.161.
- ④ Yoshio Kiku、他、VetLearn、MASTITIS RESEARCH INTO PRACTICE: Effect of intramammary infusion of rbGM-CSF, rbIL-8 and their combination on CMT score and milk mononuclear cell populations in Holstein cows with subclinical mastitis、2010、pp.698.

[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

菊 佳男 (KIKU YOSHIO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究  
機構・動物衛生研究所・主任研究員

研究者番号：70370179

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：