

## 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 6月10日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580347

研究課題名（和文）ウシの黄色ブドウ球菌性乳房炎における好中球介在性炎症増幅機構の役割

研究課題名（英文）Role of neutrophil mediated inflammatory reactions in the development of bovine dry-period mastitis caused by *Staphylococcus aureus* intramammary infection

研究代表者

渡部 淳 (WATANABE ATSUSHI)

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・寒地酪農衛生研究領域・主任研究員

研究者番号：60442810

研究成果の概要（和文）：牛の黄色ブドウ球菌性乾乳期乳房炎における炎症が持続的に進行する特徴的病態に、連鎖的に乳汁中に放出されるインターロイキン-8 (IL-8) (CXCL8ともいう)、好中球エラスターゼ、催炎性ラクトフェリン由来ペプチド（ラクトフェリンのエラスターゼによる分解産物）が関与することを明らかにした。また慢性乳房炎において、IL-8の分泌を抑制するトランスフォーミング成長因子-β2は炎症の鎮静化に関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The dry period bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus* infection shows characteristic pathogenesis that is lastingly developed. We showed that interleukin-8 (IL-8), leukocyte elastase, and inflammatory lactoferrin-derived peptides were released, in relation with the pathogenesis of *S. aureus* dry period mastitis, in mastitic mammary secretions. In the chronic stage of the mastitis, transforming growth factor-β2 that suppresses IL-8 secretion was suggested to be involved in subsiding of the inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：乳牛、乳房炎、黄色ブドウ球菌、好中球、インターロイキン-8、エラスターゼ、ラクトフェリン由来ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 乳房炎は酪農経営に大きな経済的損害を与える疾病であり、黄色ブドウ球菌は主要な乾乳期乳房炎の起因菌の一つである。牛の黄色ブドウ球菌性乳房炎は潜在化および慢性化しやすく、慢性化した場合、その治癒はきわめて困難となる。

(2) 乳房炎起因菌の新規感染の機会は乾乳初期と周産期に多く、分娩後の乳房炎の多くは乾乳期乳房炎に引き続いて起きると考えられる。

(3) 黄色ブドウ球菌性乳房炎を含め、乾乳期乳房炎の病態は十分に解析されていない。

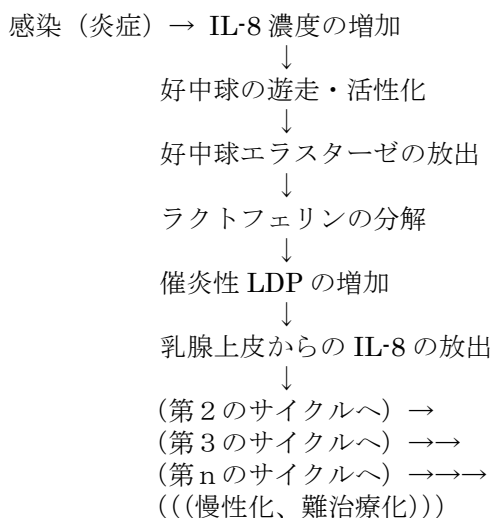
(4) 研究代表者らはインターロイキン-8 (IL-8) (CXCL8 と同じ) および好中球エラスターゼが牛の乳房炎の病態の発現に重要であることを見いだした。

① 組換え体ウシ IL-8 が乳腺上皮の機能に及ぼす影響を評価したところ、IL-8 は好中球の浸潤に加え、乳タンパク質の分泌抑制および血液-乳バリアの透過性亢進に働くことが明らかになった。

② IL-8 が乳腺組織障害に及ぼす影響を評価したところ、IL-8 は好中球エラスターゼ等の細胞外基質タンパク質分解酵素を誘導し、組織障害を起こしうることがわかった。

③ IL-8 を乾乳期の牛の乳頭槽内に投与し、実験的に乳房炎の誘発を試みたところ、好中球数の著増および凝集物の出現を伴う乳房炎を誘発できた。

これらの結果に加え、ラクトフェリンのエラスターゼによる分解の結果生ずる催炎性のペプチド (催炎性ラクトフェリン由来ペプチド: 催炎性 LDP) は乳腺上皮における IL-8 mRNA の発現を増加させることから、下記のフローチャートに示す IL-8 をメディエーターとする好中球エラスターゼ介在性炎症増幅サイクルを想定した。



(5) 実験的に黄色ブドウ球菌による乾乳期乳房炎の病態モデルを作成し、細菌学および病理学的検索を行ったところ、潜在期、急性期、亜急性期、慢性期といった種々の炎症フェーズの乳房炎モデルの作出が可能であった。亜急性期～慢性期の乳汁中には多数の死滅した好中球が含まれていた。

(6) 活性化した好中球はアポトーシスと異なる機構で細胞死を起こし、能動的に核DNAを放出しうる。放出された DNA は滑らかな繊維と球形領域を形成して網目状に広がり、

細菌を捕捉するトラップとなって、DNA と共に放出されたヒストンなどの抗菌タンパク質や好中球エラスターゼにより殺菌する好中球細胞外トラップといわれるシステムがある (図1)。

(7) IL-8 によって好中球細胞外トラップが発動することが報告されている。しかし、黄色ブドウ球菌性乳房炎における好中球細胞外トラップの誘導やその好中球エラスターゼ介在性炎症増幅サイクルとの関わりは明らかになっていない。

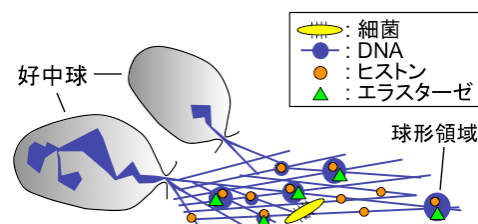


図1. 好中球細胞外トラップ (模式図)

## 2. 研究の目的

本研究は、好中球エラスターゼを介した炎症増幅機構が黄色ブドウ球菌性乾乳期乳房炎の慢性化に関わる可能性を明らかにし、その増幅機構を制御する機構を見いだすことを目的に行った。

## 3. 研究の方法

(1) 黄色ブドウ球菌性乾乳期乳房炎 (実験感染による誘発例)

泌乳後期のホルスタイン乳牛8頭 (4～6歳齢) について、乾乳直前の搾乳後、乳頭管カテーテルを用いて前方片側の乳頭槽内に黄色ブドウ球菌を接種し、前方反対側乳頭槽内には PBS のみを注入し、乳房炎を誘発した。臨床型乳房炎発症後15～41日目まで観察および材料の採取を行った。乳房内に何も注入せずに乾乳させた健康なホルスタイン乳牛4頭 (5～6歳齢) を無投与対照牛として用いた。

接種前および後、経時的に乳汁を採取した。最終的な乳汁材料の採取後、乳腺組織を採取した。

(2) IL-8 誘発乾乳期乳房炎

泌乳後期のホルスタイン乳牛8頭 (5～6歳齢) について、乾乳直前の搾乳後、乳頭管カテーテルを用いて前方片側の乳頭槽内に組換え体ウシ IL-8 を、前方のもう一方の乳頭槽内に PBS のみを投与した。

投与前および投与後28日目まで、経時的に乳汁を採取した。

### (3) 乳質、体細胞数および顆粒球数

乳汁の外観（色調、凝集物の有無）を観察した後、二重にしたガーゼで濾過し、体細胞数をブリード氏法で計測した。濾過した乳汁をサイトスピンにかけて塗抹し、ギムザ染色した体細胞標本を顕微鏡観察し、顆粒球の割合を調べた。体細胞数および顆粒球百分比より顆粒球数を算出した。

### (4) 細菌学的検査

乳汁を羊血液寒天培地に塗布して1昼夜培養した。出現したコロニーの形状や溶血の状態を観察した後、細菌を分離した。分離した細菌の16S rRNAの塩基配列を解析し、細菌の種類を同定した。また黄色ブドウ球菌の遺伝子型をパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）で調べた。細菌数（黄色ブドウ球菌数）は混釈培養法で計測した。

### (5) 生理活性物質濃度の測定

乳清中のIL-8およびトランスフォーミング成長因子（TGF）-β2濃度はELISAで測定した。好中球エラスターゼ活性はザイモグラフィで、ラクトフェリンおよび催炎性LDP濃度は定量的免疫プロット法で測定した。

### (6) 病理および免疫組織化学的試験

採取した乳腺組織（対照分房および乳房炎分房）について、組織切片を作製した。切片をヘマトキシリン-エオジン染色した標本について顕微鏡観察し、乳房炎の炎症フェーズを診断した。

乳腺組織および乳中凝集物について組織切片を作製し、黄色ブドウ球菌菌体、ヒストンタンパク質H1、H2B、H3を間接蛍光抗体法で染色した。対比染色として細胞核DNAをDAPIで染色した。アポトーシスの検出はTUNEL法により行った。

### (7) 黄色ブドウ球菌ロイコシジンの牛由来細胞に対する傷害性の検討

黄色ブドウ球菌ロイコシジンのFおよびSサブユニットには様々なバリエーションがある。既知の黄色ブドウ球菌ロイコシジンのFおよびSサブユニットの組み合わせについて、様々な濃度で牛由来の細胞（好中球、マクロファージ、単球、リンパ球、乳腺上皮細胞）の培養系に添加した。一定時間後、MTTアッセイにより致死的細胞傷害を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 牛の黄色ブドウ球菌性乾乳期乳房炎病態モデルにおける好中球エラスターゼ介在性炎症増幅サイクルの誘導

牛の黄色ブドウ球菌性乾乳期乳房炎にお

ける好中球エラスターゼ介在性炎症増幅機構の誘導と病態との関与を解明するため、実験感染により作出した黄色ブドウ球菌性乾乳期乳房炎における病態の変化と乳中のIL-8、好中球エラスターゼ、LDPおよびラクトフェリンの動態を解析した。またIL-8分泌に抑制的に働くTGF-β2濃度の動態を調査した。

① 接種菌数により潜伏期間の長短はあったが、黄色ブドウ球菌を接種した分房では全例において、乳房の腫脹、乳汁中顆粒球数の黄色ブドウ球菌の乳汁中への排菌が起きた（臨床型乳房炎発症）。臨床型乳房炎発症後1～2日目より乳中凝集物が現れはじめた。乳中顆粒球数の増加、凝集物の形成、黄色ブドウ球菌の乳中への排菌は試験終了時まで続いた。

対照PBS投与分房における乳汁中の体細胞数および顆粒球数の変化は無投与対照牛にみられる正常な乾乳に伴う変化と同程度であった。試験期間中、黄色ブドウ球菌接種分房以外の全ての分房から細菌は分離されなかった。また黄色ブドウ球菌を接種した分房から分離される細菌は、接種した黄色ブドウ球菌と同じ遺伝子型の黄色ブドウ球菌のみであった。

② 臨床型乳房炎発症後2日目以後より乳房炎分房の乳汁中において、好中球エラスターゼ活性、催炎性LDPおよびIL-8濃度の顕著な増加が認められた。好中球エラスターゼ活性、催炎性LDP、IL-8濃度の順にピークを示し、対照に比べて明らかに高いレベルを試験終了時まで維持した。ラクトフェリン濃度は催炎性LDP濃度が増加するに伴い有意に減少した。

③ 乳房炎乳汁中のTGF-β2濃度は乳房炎発症後、IL-8濃度等が著増する前から有意に減少し、好中球エラスターゼ活性、催炎性LDPおよびIL-8濃度がピークを過ぎて漸減するに伴って増加した。

④ 試験終了時に採取した乳腺組織の病理学検査から、試験終了時の乳房炎組織は概ね発症後の経過日数に従い、亜急性あるいは慢性乳房炎の状態にあった。

以上の結果から、黄色ブドウ球菌性乾乳期乳房炎の亜急性期～慢性期の病態に好中球エラスターゼ、催炎性LDPおよびIL-8が関与することが明らかとなり、好中球エラスターゼ介在性の炎症増幅サイクルが誘導されることが示唆された。

TGF-β2は乳房炎組織におけるIL-8濃度の調節に関与し、慢性期の乳房炎において、好中球エラスターゼ介在性炎症増幅を終息に導く可能性がある。

(2) 乳腺組織および乳中凝集物における好中球細胞外トラップ構造およびアポトーシスの検出

好中球エラスターゼは顆粒内タンパク質であり、細胞外に分泌されるタンパク質ではない。好中球エラスターゼの細胞外への放出は好中球の細胞死に伴って起こるものと考えられる。好中球エラスターゼの放出に好中球細胞外トラップ形成による細胞死およびアポトーシスが関与する可能性を免疫組織化学的な方法で検討した。

① 乳中凝集物中には多数の死滅した好中球が認められた。死滅した好中球の周囲に網目状になった細胞核 DNA が認められる部位が点在し、網目状の DNA 上に点在するヒストンタンパク質および黄色ブドウ球菌菌体が検出された。

② 亜急性期の乳房炎組織において、腔内にヒストンタンパク質および細胞外 DNA がみられる乳腺腔が散在していた。

③ 乳腺組織および乳中凝集物中のどちらにおいても、TUNEL 法による検出では好中球のアポトーシスはみられなかった。

以上の結果から、黄色ブドウ球菌性乾乳期乳房炎において、好中球エラスターゼの乳汁中への放出は好中球細胞外トラップの形成に伴って起きる可能性が示された。

(3) 黄色ブドウ球菌ロイコシジンの牛好中球に対する傷害性

好中球細胞死に黄色ブドウ球菌ロイコシジンが関与する可能性を検討した。

反芻動物から特徴的に分離され、牛の黄色ブドウ球菌性乳房炎から高率に分離される遺伝子型の黄色ブドウ球菌に特有な型のロイコシジンは、牛の好中球等の食細胞に対して特異的に強い致死的細胞傷害性を示した。

好中球細胞外トラップ形成に伴うものに加え、黄色ブドウ球菌ロイコシジンによる致死的細胞傷害が黄色ブドウ球菌性乳房炎における好中球細胞死に関与することが示唆された。ひいてはロイコシジンが好中球エラスターゼ放出に関与する可能性が示された。

(4) IL-8 誘発乾乳期乳房炎における乳汁中好中球エラスターゼ活性、催炎性 LDP および IL-8 濃度

組換え体ウシ IL-8 で乳房炎を誘発した場合、約 4 週間持続する臨床型乳房炎になる例

があった。持続的な臨床型乳房炎になった場合、その乳汁中に好中球エラスターゼ活性、催炎性 LDP および IL-8 濃度の持続的な増加が認められた。また催炎性 LDP 濃度が増加するのに伴い、ラクトフェリン濃度は減少した。

誘発された乳房炎が一過性であった場合、乳汁中の好中球エラスターゼ活性、催炎性 LDP および IL-8 濃度の増加は起きなかった。

IL-8 は持続的な臨床型乳房炎の誘発と関連し、好中球エラスターゼ介在性炎症増幅を誘導する因子の一つであることが示唆された。

## 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 1 件)

① Watanabe, A., Hirota, J., Shimizu, S., Inumaru, S. and Kimura, K. Single intramammary infusion of recombinant bovine interleukin-8 at dry-off induces the prolonged secretion of leukocyte elastase, inflammatory lactoferrin-derived peptides, and interleukin-8 in dairy cows, *Vet. Med. Int.*, 査読有, 2012 巻, 2012, Article ID 172072

[学会発表] (計 7 件)

① Watanabe, A., Hata, E., Hirota, J., Shimizu, S., Kadota, K., Slama, P., Chikayama, Y., Ishikawa, Y. and Kimura, K. Possible involvement of transforming growth factor-beta2 in the development of bovine dry period mastitis induced by intramammary infusion of *Staphylococcus aureus*, 31st World Veterinary Congress, 2013 年 9 月 17-20 日, プラハ, チェコ

② 秦英司, 渡部淳, 塩野浩紀, 内田郁夫, 高松大輔, 牛由来黄色ブドウ球菌に特有な病原因子 lukM/LukF' -PV は牛食細胞に強い細胞傷害性を示す, 第 17 回日本乳房炎研究会学術集会, 2012 年 10 月 12 日, 東京都

③ 秦英司, 渡部淳, 塩野浩紀, 内田郁夫, 高松大輔, ブドウ球菌ロイコシジンならびに  $\gamma$ ヘモリシンの牛由来細胞に対する細胞傷害能の解析, 第 154 回日本獣医学会学術集会, 2012 年 9 月 15 日, 盛岡市

④ Slama, P., Zbysek, S., Slamova, R., Pavlik, A., Zdenek, H., Jiri, S. and Watanabe, A. Production of bovine transforming growth factor beta 1 following stimulation with lipopolysaccharide, 22nd IUBMB & 37th FEBS Congress, 2012 年 9 月 4-9 日, セビア,

スペイン

⑤ Watanabe, A., Hirota, J., Shimizu, S., Inumaru, S and Kimura, K. CXCL8-induced mastitis during drying-off period in dairy cows: sustained secretions of CXCL8, leukocyte elastase and lactoferrin-derived peptides in mammary secretions, XXVII World Buiatrics Congress 2012, 2012年6月4日, リスボン, ポルトガル

⑥ Hata, E., Watanabe, A., Uchida, I., Tanaka, K., Tamamura, Y. and Takamatsu, D. Cytotoxicity of the staphylococcal leukocidins on bovine cells, International Union of Microbiological Societies 2011 (IUMS2011), 2011年9月7日, 札幌市

⑦ Watanabe, A., Hata, E. and Kadota, K. Pathophysiology of bovine mastitis induced by intramammary infusion of *Staphylococcus aureus* at dry-off: involvement of interleukin-8 and elastase, XXVI World Buiatrics Congress 2010, 2010年11月15日, サンチアゴ, チリ,

① 牛乳房炎に関わる黄色ブドウ球菌優勢系統の遺伝学的背景と感染実態：  
[http://www.naro.affrc.go.jp/project/laboratory/niah/2011/170e1\\_10\\_26.html](http://www.naro.affrc.go.jp/project/laboratory/niah/2011/170e1_10_26.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡部 淳 (WATANABE ATSUSHI)  
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：60442810

### (2) 研究分担者

秦 英司 (HATA EIJI)  
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：50355135

### (3) 連携研究者

木村 和弘 (KIMURA KAZUHIRO)  
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授  
研究者番号：30192561

平井 綱雄 (HIRAI TSUNAO)  
地方独立行政法人北海道立総合研究機構・畜産試験場・研究主幹  
研究者番号：80390855

木村 享史 (KIMURA TAKASHI)  
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・准教授  
研究者番号：90261338