

黄色ブドウ球菌の乳頭槽内接種による乾乳期乳房炎病態モデルの作出

渡部 淳¹⁾, 秦 英司²⁾, 門田耕一¹⁾, 高橋雄治¹⁾

Development of an experimental model of mastitis in dry-period of lactation induced by intramammary infusion of *Staphylococcus aureus*

Atsushi WATANABE¹⁾, Eiji HATA²⁾, Kouichi KADOTA¹⁾ & Yuji TAKAHASHI¹⁾

はじめに

乾乳期は乳房および乳腺分泌液（乳汁）に触れる機会が減るため、乳房炎の早期発見が困難となり、慢性化しやすい。特に黄色ブドウ球菌（SA）による乳房炎は潜在化しやすいため、より早期発見が難しくなると考えられる。乾乳期に潜在化した乳房炎や慢性化した乳房炎は、分娩後の乳房炎発症に影響すると考えられる。よって乾乳期乳房炎の早期診断・予後診断に基づき的確な処置を施すことは、分娩後の乳房炎発症による生産性の障害を低減する上で重要である。

乾乳期乳房炎の早期診断および予後診断を行うためには、細菌感染の成立から炎症の慢性期に至る病態についての知見と理解が必要である。しかし SA によるものも含め、乾乳期乳房炎の発症機序および病態生理はほとんど調べられていない。そこで、病態解明、診断および治療法開発に資するため、SA による牛の乾乳期乳房炎の病態モデルを作出することを試みた。

試験方法

予め乳からの細菌分離が認められないことを確認したホルスタイン種の泌乳牛5頭を試験に供した。乾乳直前の搾乳後、対照としてリン酸緩衝生理食塩水（PBS）5ml を左前乳頭槽内に、5 ml の PBS に浮遊させたバルク乳由来の SA 株（65 あるいは 5 cfu）を右前乳頭槽内に、それぞれ乳頭管カテーテルを用いて接種した。臨床

症状を発症後 18～21 日目まで観察すると共に、経時的に乳汁を採取した。肉眼的に乳汁の様子（凝集物の有無等）を観察し、ブリード氏法で乳汁中の体細胞数を計測した。羊血液寒天培地を用いて乳汁中の SA を分離・計数し、分離された SA と接種菌株の遺伝子型の同一性をパルスフィールドゲル電気泳動法で確認した。血液-乳バリアの透過性の指標である乳清中の血清アルブミン濃度を、一元放射免疫拡散法で測定した。乳清中のエラストラーゼ活性をザイモグラフィで調べ、エラストラーゼによる基底膜分解の指標として、エラスチン由来のペプチドを免疫プロットングで検出した。

病態の概要

65 cfu の SA を接種した分房では、接種後 1 日目に SA が分離され始め、体細胞数の増加が観察された（発症 1 日目）。発症と同時に乳房（分房部分）に腫脹、硬結、熱感が観察され始め、熱感はその 6 日後まで、腫脹および硬結は試験終了時まで継続して観察された。発症 6 日目には体細胞数が 1×10^8 /ml を超え、乳汁中に凝集物が出現し始めた。血清アルブミン濃度の増加は発症 3～6 日目に観察され始め、以後高値（対照分房の 5～10 倍）を持続した。乳清中のエラストラーゼ活性およびエラスチン由来ペプチドは、発症 3～6 日目以降、試験終了時まで検出された。

5 cfu の SA を接種した分房では、接種後 6 または 36 日目に SA が分離され始め、体細胞の増加が観察された（発症 1 日目）。発症と同時に乳房（分房部分）に腫脹、硬結、熱感が観察され始め、熱感はその 2～6 日後まで、腫脹および硬結は試験終了時まで継続して観察された。

1) 動物衛生研究所 環境・常在疾病研究チーム
2) 動物衛生研究所 細菌・寄生虫病研究チーム

発症1または3日目には体細胞数が $1 \times 10^8/\text{ml}$ を超え、乳汁中に凝集物が出現し始めた。血清アルブミン濃度は発症3日目から増加した（対照分房の2～10倍）。SAの潜伏期間が長かった1例では、発症前に血清アルブミン濃度が高値（対照分房の2～3倍）で推移した期間（発症前8～4日まで）があった。全例に共通して、乳清中エラスターゼ活性およびエラスチン由来ペプチドは、発症3日目から試験終了時まで検出された。

5および65 cfuのSAを接種した牛に共通して、対照分房における体細胞数および血清アルブミン濃度は通常の乾乳に伴う増加の範囲内で推移した。また試験期間中、乳清中エラスターゼ活性およびエラスチン由来ペプチドは検出されなかった。

SA接種分房において、血清アルブミン濃度の増加、エラスターゼ活性の上昇およびエラスチン由来ペプチドの出現はほぼ並行して観察された。これはエラスターゼによって基底膜が分解された結果、血液-乳バリアの透過性が高まったことを意味するであろう。

発症後18～21日後の乳腺組織切片（ヘマトキシリン-エオジン染色標本）について病理組織学的検査を行った。全例共通して間質は水腫性に肥厚し、形質細胞、リンパ球および好中球の浸潤がみられた。リンパ球の浸潤が優勢な部位もあったが、全体的には形質細胞の浸潤が優勢であった。腺腔内への細胞浸潤については、多数の好中球が浸潤している腺胞が局所的に散見されたが、全体的には少数のマクロファージおよびリンパ球が浸潤している腺胞が多くみられた。また上皮の剥離および消失が散見された。以上から亜急性の乳房炎と診断された。

今回SAを接種した全例で乾乳期乳房炎を誘発することができた。接種した菌数および潜伏期間の長短にかかわらず発症後の病態は類似していた。よってSAを乳頭

槽内に接種して誘発した本乳房炎実験例は、SAによる乾乳期乳房炎の一病態モデルとして利用可能と考えられる。

今後の課題

実際の乾乳期乳房炎では5 cfuのSAを接種した場合のように、ある程度の潜伏期間を経て発症するケースが多いかもしれない。少数例のみの検討ではあるが、5 cfuを接種した分房におけるSAの潜伏期間は6日または36日と異なっていた。SAの潜伏期間の長短は牛の個体側の要素に影響されると思われるが、その要因は明らかではない。SAの潜伏期間における宿主側の反応には乾乳期乳房炎の早期診断に有用な指標が含まれている可能性がある。よってSAの潜伏期間におけるSA-宿主間のインタラクションの解明は今後の重要な課題の一つと考えられる。

今回、血液-乳バリアの透過性亢進と関連した乳汁中のエラスターゼ活性上昇を観察した。血液-乳バリアの透過性亢進に加え、黄色ブドウ球菌による乳房炎の慢性化過程では、エラスターゼが関与する炎症増幅機構（好中球の活性化 → エラスターゼ放出 → ラクトフェリンの分解 → 乳腺上皮からのIL-8分泌増加 → 好中球の遊走・活性化）が働くことが示唆されている。しかし病態の中でこれらに関連づけて解析した例はなく、十分に実証されていない。慢性化は黄色ブドウ球菌による牛乳房炎の治療可否の分かれ目と考えられるが、このエラスターゼが関与する炎症増幅機構は乳房炎慢性化の一つの目安となるかもしれない。現在、乳汁中のIL-8およびラクトフェリン由来ペプチドの濃度を指標に加え、乳房炎慢性化とエラスターゼが関与する炎症増幅機構との関連について検討中である。