

組換え型ウシ顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子乳房内投与による黄色ブドウ球菌性乳房炎の治療効果に関する研究

菊 佳男¹⁾, 水野 恵²⁾, 尾澤知美¹⁾, 松原朋子¹⁾, 櫛引史郎³⁾, 新宮博行³⁾, 犬丸茂樹¹⁾, 林 智人^{1)*}

Therapeutic effect of intramammary infusion of recombinant bovine Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor on *Staphylococcus aureus* mastitis

Yoshio KIKU¹⁾, Megumi MIZUNO²⁾, Tomomi OZAWA¹⁾, Tomoko MATSUBARA¹⁾, Shiro KUSHIBIKI³⁾, Hiroyuki SHINGU³⁾, Shigeki INUMARU¹⁾ & Tomohito HAYASHI^{1)*}

試験目的

酪農経営に多大な被害を与える疾病である乳房炎の治療は、抗生物質の使用が中心であるが、薬剤耐性菌出現の危険性等の「食の安全性」の観点から、これに替わる治療法の開発が求められている。免疫制御作用を有するサイトカインを用いた治療技術は、免疫系の賦活化を介した間接的な原因菌排除が期待できるため、薬剤耐性菌の出現を回避する可能性を有しており、乳房炎治療への応用が検討されている。

マクロファージや好中球の持つ貪食機能および抗原提示機能を亢進させるサイトカインである顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) の乳房炎罹患乳房への投与は、乳房内のそれら免疫細胞を賦活化させる働きがあるため、次世代の乳房炎治療剤となることが期待できる。実際に、これまで我々は、遺伝子組換えウシ (rb) GM-CSF の乳房炎罹患乳房内への注入が、乳房炎罹患乳房の体細胞数ならびに黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*; SA) 数を低減させる効果を有することを確認してきた。その一方で、その効果には個体差が見られ、rbGM-CSF を用いた乳房炎治療が有効である牛と有効でない牛が存在することも同時に明らかとなった。そのため、rbGM-CSF 治療を従来の抗生物質治療に替わる技術とするためには、あらかじめ rbGM-CSF による治療効果が期待できる罹患牛の特性を明らかにすることが有効である。しかしながら、現在のところその個体差、すなわち rbGM-CSF 乳房内投与による治療効果の誘導要因が不明であるため、その特性は明らかにされていない。

本試験は、SA を原因菌とする乳房炎罹患牛に対して、rbGM-CSF 乳房内投与による乳房炎治療の有効性の検証を行うと同時に、それによる治療効果の高い個体の臨床所見および乳汁ならびに血液性状について検証し、rbGM-CSF の効果が期待できる罹患牛の特性を明らかにすることを目的とした。

- 1) (独) 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 (〒305-0856 茨城県つくば市観音台 3-1-5)
- 2) 鳥取県倉吉家畜保健衛生所 (〒682-0017 鳥取県倉吉市清谷町 2 丁目 132)
- 3) (独) 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 (〒305-0901 茨城県つくば市池の台 2)

- 1) National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-0856 Japan.
- 2) Tottori Prefecture Kurayoshi Livestock Hygiene Service Center, 2-132 Seidanicho, Kurayoshi, Tottori, 682-0017 Japan
- 3) National Institute of Livestock and Grassland Science, National Agriculture and Food Research Organization, 2 Ikenodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-0901 Japan

* Corresponding author; Tomohito HAYASHI (National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-0856 Japan
Tel/Fax: +81-29-838-7780,
E-mail: hayatomo@affrc.go.jp)

試験方法

泌乳中期のホルスタイン牛のべ180頭から乳房炎に罹患している個体を選出し、次いでそれらの罹患分房の中からSA感染が確認された13分房(13頭)を供試した。

午前の搾乳後、rbGM-CSF(400 μ g/5ml)を罹患乳房内集合乳管部に無菌的に投与し、その後14日間の臨床症状の観察および乳汁ならびに血液検査を行った。末梢血および乳汁の採取は、投与前(0日)、投与後6時間、1、2、3、7および14日に実施した。

検査項目は、各供試牛の臨床症状の観察に加え、乳汁検査においてはCalifornia Mastitis Test(CMT)変法、体細胞数(/mL)、細菌検査(CFU/mL)および白血球貪食機能(CPM/mL)の測定を行った。乳汁におけるCMT変法による結果は、陰性、擬陽性(\pm)、陽性(1+, 2+および3+)と評価し乳房炎の重篤度を表示した。血液検査においては、白血球数(/ μ L)および白血球分類の測定(/ μ L)ならびに白血球貪食機能(CPM/mL)の解析を行った。乳汁および血液中白血球の貪食機能は、ルミノメーターを用いた化学発光能(CL能: Chemiluminescence)法により評価した。

また、効果の群分けは、rbGM-CSF投与後14日の時点でCMT変法の結果が陰性となった牛群をCMT改善群とし、陰性以外の牛(\pm ~3+)群をCMT非改善群と定義した。

成績概要

供試牛13頭中、CMT改善群は5頭、非改善群が8頭であり、CMT改善率は38.5%であった。臨床症状は、投与後6時間において、体温が両群ともに0.2~0.4度の一過性の上昇が観察され、そのとき投与分房では軽度の熱感がみられた。CMT変法の結果は、投与前においてCMT改善群は \pm ~2+, 非改善群は \pm ~3+で差は無かったが、それぞれ投与後6時間において一過性に上昇した後に漸減し、CMT改善群では投与後14日に陰性となり、一方、非改善群では投与後3~7日に再上昇し、投与後14日に投与前の状態(\pm ~2+)となった。投与後7日および14日においては2群間に差がみられた。体細胞数に関しても、CMT変法スコアと同様にCMT改善群は投与後14日において減少が確認されたが、非改善群では投与前の値に戻った。SA数は、投与前においてCMT改善群が10の3乗台(CFU/mL)、非改善群が10の4乗台(CFU/mL)であり、CMT改善群が非改善群に比して有意に低値であった。投与後は両群ともに一過性に減少したが、2群間に有意な差はなかった。血液CL値は、rbGM-

CSF投与前において2群間に差はなかったが、投与後6時間ではCMT改善群が非改善群に比して有意に高値となった。一方、乳汁CL値は、両群ともに投与後6時間で一過性に上昇した。その後、CMT改善群のCL値は減少を続け、投与後14日では非改善群に比して有意に低値となった。末梢血白血球数の推移は、試験期間中両群ともに大きな変動はなく、2群間の差はなかった。そのうち、リンパ球数は両群ともに試験期間を通して変動は見られなかったが、単球数は両群間に差は無いものの、投与後2日目以降に投与前に比較して低値となる傾向があった。一方、顆粒球数においては、rbGM-CSF投与後両群とも減少し、投与後1日で両群ともに試験期間中の最低値を示したが、その後両群ともに増加に転じ、CMT改善群では投与後2日、非改善群は投与後7日に投与前の値に回復した。このときの顆粒球数は、投与後2日および3日においてCMT改善群が非改善群に比して有意に高い値を示した。

考 察

乳房内rbGM-CSF投与によって、投与後14日の時点でSA性乳房炎罹患牛の約4割においてCMT変法スコアが陰転したが、CMT改善群と非改善群の比較において、その効果と投与前のCMT変法スコアおよび体細胞数との間には明らかな関連性は見出せなかった。しかしながら、乳汁中のSA数に関しては、投与前のSA数が10の3乗台(CFU/mL)の乳房炎に対してrbGM-CSFによるCMT改善効果が認められたが、10の4乗台(CFU/mL)の乳房炎に対しては十分な効果が得られない傾向にあり、投与時点での乳汁中SA数がCMT改善効果に影響を与えることが示唆された。一方、過去のrbGM-CSFによる乳房炎治療試験の報告では、感染期間の長い乳房炎牛に比べ、感染初期の乳房炎牛に体細胞数の低減効果が顕著であることが明らかにされている。これらのことから、感染初期かつSA数が10の3乗台(CFU/mL)の乳房炎罹患牛に対して、rbGM-CSFによるCMT改善効果が期待できると考えられた。

本試験ではCMT改善効果の検証と同時に、その個体の臨床経過観察および血液、乳汁中の白血球貪食機能解析ならびに血液白血球分類を実施し、rbGM-CSFのCMT改善効果の誘導要因探索、すなわちGM-CSFを感染局所に投与させることによる全身および乳房局所の免疫細胞の動態についても検証した。その結果、rbGM-CSF乳房内投与により、乳房内の体細胞数の増加および細菌貪食機能の亢進がみられたことから、rbGM-CSFが

顆粒球等の機能的な貪食細胞を乳槽内に誘導したことが示唆された。加えて血液中顆粒球数の一時的な減少が認められたことから、乳房内に投与した rbGM-CSF が、乳房内の免疫細胞あるいは乳腺細胞への刺激を経て、二次的・三次的刺激によって血液中から乳房局所への好中球等の貪食細胞の移入を促したことが推察された。しかしながら、顆粒球数の減少は、血管壁への接着による一時的なものである可能性もあるため、現在、血液顆粒球の接着因子についての解析を実施している。また、乳汁中の貪食機能は、CMT 改善群および非改善群ともに rbGM-CSF 投与後一過性の上昇を示し、その後減少したが非改善群では投与後 7 日以降に再上昇した。このことから、CMT 改善群では貪食機能を有する細胞の一時的な増加によってその効果を誘導することができたが、非改善群においてはその作用だけでは感染を制御できず、投与後 7 日以降も乳房外からの細胞の移入が継続されていることが考えられた。また、この時期は、自然免疫系による抗原提示が示された後の時期と考えられ、さらには乳房内への rbGM-CSF 投与を行った場合に、乳汁中へ T 細胞が誘導される時期であることも既報に示されている。現在、rbGM-CSF による CMT 改善効果の差異が、この時期の抗原提示細胞ならびにリンパ球機能と関連性を有するか調査しているところである。一方、両群の血液中顆粒球数は投与後一時的な減少があった後に回復したが、その回復の時期は CMT 非改善群が改善群よりも遅かった。また、CMT 非改善群では血液中の貪食機能が改善群に比べ一時的に低値を示したことから、効果の低い個体では乳房局所に顆粒球が移行した後に、顆粒球

を速やかに血液中に補う機能が不十分であり、またその顆粒球も十分な細菌貪食機能を得ていない可能性等が考えられた。

今回、CMT 改善群と非改善群ともに rbGM-CSF 投与後、乳汁 CL 能が上昇したことから、rbGM-CSF は乳房内における貪食機能等の自然免疫系機能を亢進させる働きがあることが示された。同時に自然免疫による抗原提示が考えられる時期以降において、CMT 改善群では乳汁中の体細胞数や CL 能が収束した一方で、非改善群では CMT 変法スコア、体細胞数および CL 能ともに治療前の状態への回帰がみられた。これらのことから、CMT 改善群と非改善群との差には、自然免疫系の細菌排除の応答性ならびに抗原提示の発動が関与することが推察されたが、今後はそれらの細胞機能について、さらなる詳細な知見の積み重ねが必要であることが考えられた。

本試験において、著者らは rbGM-CSF の SA 性乳房炎に対する治療効果を調べるために乳房内投与試験を行ったところ、CMT 改善効果を有する場面があることを見出した。さらに、それによる CMT の改善牛と非改善牛の間では、rbGM-CSF 投与時の乳汁中 SA 数および末梢血中への顆粒球の誘導に差があることを確認し、これらが CMT の改善効果の有無に関与していることを示唆した。現在、rbGM-CSF 乳房内投与による CMT 改善効果の臨床的意義を明らかにするために、改善効果が明らかな牛の特性解明に取り組んでいる。その解明により、rbGM-CSF の臨床応用への可能性および適応を示すことができると考えられる。