

【総説】

サイトカインを利用した新たな乳房炎治療技術の開発

菊 佳 男

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
(〒062-0045 札幌市豊平区羊ヶ丘4)

乳房炎の現状

わが国の乳用牛病傷事故原因として大きな問題である乳房炎は、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。平成21年度家畜共済統計表によると、乳用牛等に係る病傷病類別事故件数は1,416,584件であり、その中でも乳房炎に代表される泌乳器疾患は最も事故件数が多く、426,593件を数え全体の30.1%を占める^[1]。乳房炎によって酪農家は、1) 生産乳量・乳品質の低下、2) 淘汰更新費、3) 治療費、4) 出荷制限期間の生乳廃棄などの損失を被っている^[2]。臨床症状の見えない潜在性乳房炎による乳量および乳質低下も加味すると、乳房炎全体の損害はさらに甚大となる。一方、近年、乳用牛等飼養頭数が年々減少しているのに反し、乳房炎を含む泌乳器病の発生件数はむしろ増加傾向にあり、近年の獣医療技術や搾乳機の性能の向上にも関わらず、依然として乳房炎防除は厳しい状況にあることが示されている(図1)。

乳房炎を引き起こす病原微生物は140種以上知られており、その多様性が治療を困難にしている。黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*: SA) は代表的な伝染性乳房炎の原因菌であり、また大腸菌群や連鎖球菌などは代表的な環境性乳房炎の原因菌である。病原微生物の関与(病原因子)が乳房炎の原因であることは事実であるが、それ以外の畜舎環境や搾乳環境など(環境性因子)と生体の防御機能(宿主因子)も密接に絡み合っており、本疾病は発症に至る^[3]。そのため、乳房炎を防除していくためには、病原因子、環境性因子および宿主因子の多岐に渡る要因を把握し、それぞれに適した飼養管理、診療、治療および予防を行うことが重要と考えられる。

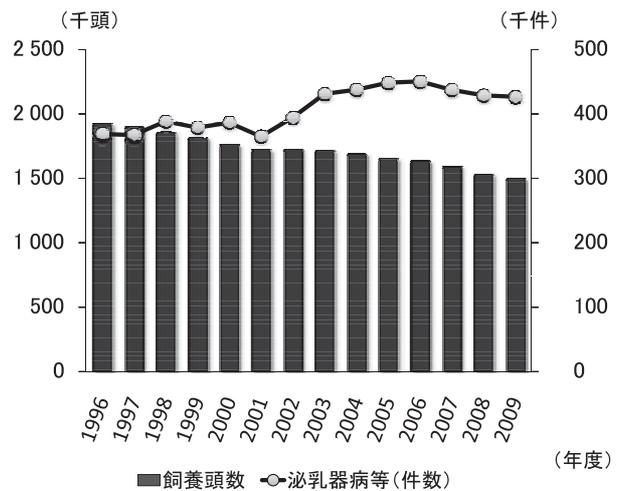


図1 乳用牛等の飼養頭数と泌乳器病等件数 (家畜共済統計表より作図)

現在の乳房炎治療

現在の乳房炎治療は、抗生剤を用いた化学療法が一般的である。獣医師は、乳房炎原因菌に対して薬剤感受性試験によって効果のある抗生剤を確認しながら治療を行う^[4]。また、生産現場において診療時に臨床症状や飼養環境などから乳房炎原因菌を推測し、抗生剤を選択することも多い。しかしながら、それらの過程を経ても良好な治療効果が得られず慢性化に至ることも少なくない。この現状は、原因菌に対して最適な抗生剤が投与されていない可能性や過剰に抗生剤投与を行ってしまう危険性を否定できない。抗生剤に依存した治療の側面には、酪農家の乳房炎治療費の増大だけでなく、社会的影響として、抗生剤の分解あるいは無毒化を行う因子を獲得した薬剤耐性菌の発現・拡散や抗生剤の残留問題を助長することが危惧される^[5-6]。これらの問題に取り組むこと

連絡責任者：菊 佳男 (動衛研寒地酪農衛生研究領域)

TEL : 011-851-2175 FAX : 011-853-0767

E-mail : yokiku@affrc.go.jp

は、消費者の求める安全かつ高品質な生乳を提供する生産者ならびに畜産関係者と、それをサポートする獣医療従事者の重要な責務と考えられる。

これらの取り組みとして、抗生剤の使用量低減やそれに替わる治療薬の開発が国内外で試みられている^[7-12]。著者らは、牛の免疫機能をコントロールする作用を持つ生体由来のタンパク質であるサイトカインに注目し、それをを用いた乳房炎治療の可能性を検討している。

サイトカインとバイオ医薬品

動物は免疫システムを利用し、個々の健康を維持している。生体内に細菌やウイルスなどの微生物が侵入（感染）する際に、生体は皮膚や粘膜等による機械的バリアに引き続いて自然免疫ならびに獲得免疫を作動することによって、その侵入の阻止あるいは排除（無毒化）を行う（図2）。免疫の制御システムは、人も牛も基本的には同じと考えられているが^[13]、そのシステムを作動させるために免疫細胞やその周辺細胞の間では多くの情報伝達物質が産生されており、細胞間において情報交換が行われている。それら産生された物質をサイトカインと呼んでおり、現在では数百種類を越える存在が明らかにされている。代表的なものとして、インターフェロン、インターロイキン、腫瘍壊死因子、ケモカイン、コロニー刺激因子、増殖因子などが存在する（表1）。いずれも、免疫系の調節や炎症反応の惹起、細胞の分化・増殖、抗腫瘍作用等に関連しており、生体の恒常性の維持に重要な役割を担っている^[14]。

サイトカインはその種類ごとに様々な機能を有するが、生体の免疫機能を高めるサイトカインは、人や動物の医療分野においてバイオ医薬品としてすでに活用されはじめている。特に人の医療分野では、抗ウイルス作用を持つサイトカインとしてインターフェロンが良く知られて

おり、ウイルス性肝炎などの感染症治療薬として実際に使われている。一方、獣医療分野においても、愛玩動物分野では犬型あるいは猫型インターフェロンが犬や猫のアトピー性皮膚炎あるいは感染症治療薬として市販されており、産業動物分野でも人型のインターフェロンが子牛のロタウイルス感染症対策に使用された。これらのようにサイトカインをはじめとするバイオ医薬品が、獣医療分野においても従来の技術では防除が困難であった疾病に対して、新たな切り札として利用されはじめており、その成果が上がってきている。著者らは、泌乳期の乳房炎に対して牛型のサイトカインを利用した治療試験を平成9年より開始しており、その治療効果についての知見を蓄積している^[7-9,15-18]。

サイトカインによる乳房炎治療のねらい

乳汁中に含まれる白血球や乳腺上皮細胞等の細胞の総数を体細胞数として表すが、感染乳房から得られる体細胞数は大部分が白血球である。乳房内に病原微生物が侵入した場合、乳房内ではそれを排除するために血液中から乳腺腔内に好中球を中心とした白血球が動員され、それら白血球は抗菌物質の放出や細胞内への取り込み（貪食作用）によって侵入した病原微生物を破壊する。そのため、健康な乳房内は無菌的であるため体細胞数は非常に低い値を示すが、病原微生物が乳房内に侵入・増殖した場合は、それを阻止するために体細胞数は上昇することになる。もし、体細胞数が一時的に上昇した場合でも、その後、微生物を排除できたならば体細胞数は徐々に減少するが、完全に排除できなかった場合は、その間にも白血球の動員が継続されるため慢性的に体細胞数は高値となる。

抗生剤治療とサイトカイン治療は、それぞれ標的が異なる治療法である。抗生剤治療は、侵入した病原微生物に直接作用し病原微生物を減らす治療であるが、それらに対して著者らの行っているサイトカイン治療は、それら

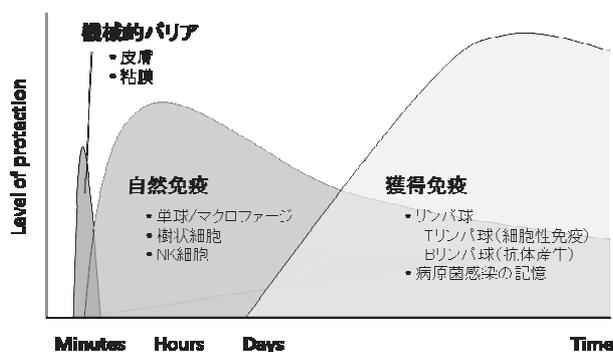


図2 病原微生物に対する生体防御反応の構成

表1 代表的なサイトカインの種類とその働き

サイトカインの種類	産生する主な細胞	主な働き
炎症・免疫反応の調節		
インターロイキン1	マクロファージ、リンパ球	発熱、炎症の誘導
インターロイキン2	Tリンパ球、NK細胞	T細胞の分化、増殖
インターフェロン	マクロファージ、リンパ球	抗ウイルス作用 マクロファージの活性化
血球の分化・増殖を促進		
コロニー刺激因子	マクロファージ、リンパ球など	白血球の増殖・分化を誘導
エリスロポエチン	腎臓細胞	赤血球を成熟・分化
細胞の死を誘導		
腫瘍壊死因子(TNF-α)	マクロファージ、その他	炎症誘導、癌細胞の破壊

表2 乳房炎治療における抗生剤治療に比較したサイトカイン治療の利点

	抗生剤治療	サイトカイン治療
原因菌	直接作用 (薬物耐性菌の危険性)	直接作用なし
免疫応答	免疫系の攪乱	免疫の増強作用 抗菌作用の増強
乳生産物	薬剤残留の危険性	ウシ生体成分由来であり安全性が高い

に直接作用せずに牛の生体防御機能を高めることによって感染に対抗する治療技術である。乳房炎罹患乳房内にサイトカインを投与した場合、サイトカインは乳房内に存在する免疫細胞に働きかけ、それらの機能の増強や更なる免疫細胞の動員を促進させる。すなわち、一時的に乳房内の免疫細胞機能の質と量を高めることによって、侵入した微生物を排除することを期待している。また、著者らが開発したサイトカインは、遺伝子組換え技術を用いて生産した牛型であるため異物としての残留の危険性がなく、それに加えて、抗生剤とは異なり薬剤耐性菌の出現もないことから、安全性が高いと考えられる。さらに、著者らの保有する高感度のサイトカイン測定系において、投与後の乳汁中サイトカイン濃度を測定したところ、投与したサイトカインは投与後6時間で乳汁中から大部分排出され、投与後1日で検出感度以下になることを確認しており、乳汁中への残留がないことも明らかにしている。また同時に、投与したサイトカインが血液中へ移行されないことも確認している。サイトカインを乳房炎の治療に用いる上で考えられる利点を表2にまとめた。

サイトカインによる乳房炎治療試験

(独)農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所では、現在、牛型および豚型のサイトカイン14種類を所有している。そのうち乳房内の免疫細胞機能を高める効果が期待できる牛型のサイトカインとして、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)とインターロイキン8(IL-8)の泌乳期乳房炎に対する治療効果を検討した。GM-CSFは顆粒球およびマクロファージ系前駆細胞に作用して、その分化・成熟を促進するサイトカインであり、IL-8は好中球への走化性活性(chemotaxis)および脱顆粒・酵素放出(exocytosis)を促すサイトカインである^[14]。それぞれ生体における炎症形成の重要なメディエーターであるが、本研究はこれらのサイトカインを用いることにより一時的に乳房内に機能的な顆粒球等を集合させ、乳房内の免疫機能を高める



写真1 カテーテルを用いた乳房炎罹患乳房内へのサイトカイン投与

ことによって乳房炎治療に繋げることを目的としている。

供試牛として、黄色ブドウ球菌(SA)性乳房炎に罹患している泌乳中期のホルスタイン牛(乳汁中体細胞数(SCC):平均70万 cells/ml)を選出し、各組換え牛(rb)サイトカイン(rbGM-CSF:400 mg/5 ml/乳房、rbIL-8:1 mg/5 ml/乳房)ならびに陰性対照(PBS:5 ml)を罹患乳房内に注入した(写真1)。その結果、乳房炎の指標となるカリフォルニア・マスタイティステスト(CMT)変法のスコア^[19]が、投与後14日において投与前に比較し、陰性対照投与においてはスコア 2.00 ± 0.20 から 2.05 ± 0.18 とほぼ変化が無かったことに対し、rbGM-CSF投与ではスコア 2.00 ± 0.37 から 0.83 ± 0.40 、rbIL-8投与ではスコア 2.22 ± 0.28 から 1.22 ± 0.40 と両者ともに減少した(表3)。このことから、rbGM-CSFならびにrbIL-8の乳房内投与は、乳房炎治療効果が期待できることが示された。観察期間中の病態解析を行ったところ、各サイトカイン投与後6時間から1日においては、CMTスコアならびに貪食細胞活性の指標として利用されている乳汁化学発光(CL)値が著増し、その後漸減した。また、投与後1日から3日にかけてrbGM-CSF投与牛では、乳汁中のCD14(単球/マクロファージ)、CD4(ヘルパーT細胞)およびCD8(細胞傷害性T細胞)陽性細胞率が増加し、一方、rbIL-8投与牛においてはその反応は見られなかった。これらのことから、両者の効果は、サイトカインの投与後すぐに、乳房内の好中球などの貪食細胞機能が亢進したことによるものと示唆され、GM-CSF投与群では、それに加えて乳房内への単球/マクロファージおよびTリンパ球を誘導した効果と考えられた。これらの免疫応答はGM-CSFならびにIL-8の期待された作用であるが、著者らはCMT

表3 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		投与前スコアを1とした時の投与後スコア
	投与前	投与後	
rbGM-CSF	2.00±0.37	0.83±0.40	0.39±0.18
rbIL-8	2.22±0.28	1.22±0.40	0.48±0.17
陰性対照	2.00±0.20	2.05±0.18	1.10±0.08

平均±標準誤差

スコアの結果と単球およびリンパ球系への作用が得られることから、GM-CSFの方がIL-8よりも治療効果が期待できると考えている。

各サイトカイン投与群においてCMTスコアの低減効果が示されたが、一部の個体においては治療が有効ではなかった。サイトカインが有効な乳房炎罹患牛の特性を明らかにするために、泌乳期のSA性乳房炎に対してrbGM-CSF投与によって、投与前よりSCCを低減する群（低減群）と低減しない群（非低減群）との間でその特徴を比較検討した。両群間の投与前の血液学的ならびに細菌学的検査を実施したところ、低減群は非低減群に比較し、治療時のSA数が10の3乗レベルに対して10の4乗レベルと1オーダー少なく、アルブミン/グロブリン（A/G）比も高い傾向にあり、治療効果と菌数ならびに感染期間との関連性が示唆された。さらに、末梢白血球の免疫細胞構成を解析したところ、非低減群は低減群に比較して、試験期間を通してCD21陽性細胞（B細胞）率が高値を示しており、高い抗体産生状態すなわち感染経過が長期間にわたっていることが考えられた。これは、rbGM-CSFは発症後1カ月以内のSA性乳房炎罹患牛に対して高い治療効果を示すが、感染経過が長期の罹患牛に対しては治療効果が低いことを示したTakahashiらの報告と一致する^[8]。また、投与後6時間から1日において両群ともに血液顆粒球数が一時的に減少するが、低減群では減少後のその回復が早いことも特徴にあげられた。さらに、投与後1日から3日において低減群では乳汁中のCD14、CD4およびCD8陽性細胞率の増加の程度が、非低減群に比べ大きかった。これらの結果は、rbGM-CSFによって効果があらわれる乳房炎罹患牛は、血液中に顆粒球を補充する機能が高く、乳房内に単球/マクロファージやリンパ球を誘導する機能に優れていることを示唆しており、また、rbGM-CSFの治療効果が期待できる乳房炎罹患牛の特徴として、感染初期あるいは軽度感染であることを示している。

以上のことから、rbGM-CSFによる乳房炎治療は、乳房炎の発症時期やSA数があらかじめ把握されている

牛を対象とすることにより、治療効果の精度を高めることが可能になると考えられた。

今後の研究展開

抗生剤の有効性は明らかであるが、過剰な使用は人や動物に負の影響を与える可能性があるため、その使用を低減させていく必要がある。著者らはこれまで得られた知見から、近い将来にサイトカインがバイオ医薬品として、抗生剤とともに新たな乳房炎治療薬となる可能性があると考えている。現在は本稿で紹介した研究に加え、それらの実験から得られた結果を活かして、抗生剤とサイトカイン治療の併用療法（抗生剤の使用量は低減させる）や乾乳期サイトカイン治療技術についての研究を進めている。また、プロジェクト研究として、GM-CSFを含めた牛型サイトカインの大量生産技術の開発とGM-CSFが乳房炎治療効果を示す免疫学的あるいは薬理的な機序の解明が行われており、生産現場で活用できる安価で効率的な治療技術を提供する実用化研究が行われている。この技術が確立されれば、生産者の経済損失を低減させるだけでなく、より良質な牛乳を消費者に提供することにもつながると考えられる。

本研究は、(独)農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所ならびに畜産草地研究所の研究員および業務科職員に加え、岩手県、栃木県、群馬県、山梨県、鳥取県、福井県、島根県、香川県ならびに福岡県の試験場および家畜保健衛生所の職員の方々の協力によって行われた。ご協力いただいた関係各位に深謝する。

引用文献

- [1] 農林水産省経営局、平成21年度家畜共済統計表、東京（2010）
- [2] 十勝乳房炎協議会（TMC）、Mastitis control、安里章他編、第1版、4-8、十勝乳房炎協議会（TMC）、帯広（2005）
- [3] 菊 佳男、林 智人：生産病として位置づけられる乳牛の一般環境性感染症とその防除対策について、関東畜産学会報、59、1-13（2008）。
- [4] 菊 佳男、乳牛における乳房炎の診断、治療、予防に関する全国アンケート：日本家畜臨床感染症研究会誌、5、63-73（2010）
- [5] 高橋敏雄、浅井鉄夫、小島明美、原田和記、石原加奈子、守岡綾子、木島まゆみ、田村 豊：家畜衛生分野における耐性菌の現状と今後の対応、感染症学雑誌、80、185-195（2006）

- [6] Call DR, Davis MA, Sawant AA : Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production, *Anim Health Res Rev*, 9, 159-167 (2008)
- [7] Takahashi H, Komatsu T, Hodate K, Horino R, Yokomizo Y : Effect of intramammary injection of RbIL-8 on milk levels of somatic cell count, chemiluminescence activity and shedding patterns of total bacteria and *S. aureus* in Holstein cows with naturally infected-subclinical mastitis, *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 52, 32-37 (2005)
- [8] Takahashi H, Odai M, Mitani K, Inumaru S, Arai S, Horino R, Yokomizo Y : Effect of intramammary injection of rboGM-CSF on milk levels of chemiluminescence activity, somatic cell count, and *Staphylococcus aureus* count in Holstein cows with *S. aureus* subclinical mastitis, *Can J Vet Res*, 68, 182-187 (2004)
- [9] Ozawa T, Kiku Y, Mizuno M, Inumaru S, Kushibiki S, Shingu H, Matsubara T, Takahashi H, Hayashi T : Effect of intramammary infusion of rbGM-CSF on SCC and expression of polymorphonuclear neutrophil adhesion molecules in subclinical mastitis cows, *Vet Res Commun*, 36, 21-27 (2012)
- [10] Bouchard DS, Rault L, Berkova N, Le Loir Y, Even S : Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*, *Appl Environ Microbiol*, 79, 877-885 (2013)
- [11] Petzl W, Günther J, Pfister T, Sauter-Louis C, Goetze L, von Aulock S, Hafner-Marx A, Schubert HJ, Seyfert HM, Zerbe H : Lipopolysaccharide pretreatment of the udder protects against experimental *Escherichia coli* mastitis. *Innate Immun*, 18, 467-477 (2012)
- [12] Baravalle C, Dallard BE, Cadoche MC, Pereyra EA, Neder VE, Ortega HH, Calvinho LF : Proinflammatory cytokines and CD14 expression in mammary tissue of cows following intramammary inoculation of *Panax ginseng* at drying off, *Vet Immunol Immunopathol*, 144, 52-60 (2011)
- [13] 林 智人 : 免疫学における新知見と大動物臨床への橋渡し(1)=免疫システムと基礎用語=、日本家畜臨床感染症研究会誌、2、1-7 (2007)
- [14] Ian RT : *Veterinary Immunology : an introduction*, 7th ed, 133-144, Saunders, Pennsylvania (2004)
- [15] Inumaru S, Kokuho T, Mori Y, Watanabe S, Takamatsu H : High efficient production of bovine GM-CSF by baculovirus system, suitable for animal experiments and cytokine agent preparations, *Cytokine*, 9, 901 (1997)
- [16] 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、14、45-48 (2010)
- [17] 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 : ウシ乳房内 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、14、41-44 (2010)
- [18] 菊 佳男、水野 恵、尾澤知美、松原朋子、櫛引史郎、新宮博行、犬丸茂樹、林 智人 : 遺伝子組換え牛 GM-CSF 乳房内投与により治療効果を示す黄色ブドウ球菌性乳房炎罹患牛の臨床病理学的特徴、日本乳房炎研究会報、15、29-32 (2011)
- [19] Middleton, JR., Hardin, D, Steevens, B, Randle, R, Tyler, JW : Use of somatic cell counts and California mastitis test results from individual quarter milk samples to detect subclinical intramammary infection in dairy cattle from a herd with a high bulk tank somatic cell count, *J Am Vet Med Assoc*, 224, 419-423 (2004)