

氏 名(本籍) 小 峯 優 美 子

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 7 0 5 号

学位授与年月日 平 成 18 年 3 月 2 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 ウシ乳房炎における催炎性ラクトフェリンの作用と診断・治療への応用に関する研究

論文審査委員 (主 査) 教 授 小 原 嘉 昭

(副 査) 教 授 山 口 高 弘

助教授 加 藤 和 雄

助教授 佐々田 比呂志

論文内容要旨

1、緒論

乳房炎は古くから様々な治療法が試みられ、それらのいくつかの治療法は実際に野外において応用されている。しかしながら、現在においても乳用牛の疾病の中で死廃事故原因の上位に位置している(平成 11 年度調査 ; 家畜共済加入頭数 1,1965,00 頭中で死廃 18,718 頭、傷病 356,978 頭で、ほぼ 375,000 頭の被害)。また、死廃事故に至らなくとも罹患後の出荷停止による経済的損失額は甚大である。乳房炎発症を抑制することは酪農経営上も非常に重要な課題である。

乳房炎の発症多発時期は乾乳導入前後と分娩前後であるが、分娩前後に発症するものの多くは乾乳期中の細菌感染に由来する。しかしながら、現状での乾乳期細菌感染および乳房炎の対策は、乾乳導入時に抗生物質軟膏を乳房内に注入するのみであり、発症が無ければ分娩まで乳房に触れることは少ない。また、乾乳期における有効な診断方法は、発熱、食欲不振、乳房の腫張などの臨床症状によるもののみである。

乳房内細菌感染では、泌乳ステージをまたがる細菌の常在化により慢性乳房炎への移行を招く。特に、黄色ブドウ球菌 (*S.aureus*) による乳房炎では、慢性化しやすく、難治性の乳房炎となる場合が多い。山形、宮城両県における調査では、乳房炎の臨床症状が認められない乾乳牛乳汁中から、そのステージによっては 40~80%の割合で *S.aureus* が検出された。このことは、これまでよりもより効果的な乾乳期乳房炎対策を施すことが急務であることを示している。すなわち、乾乳期乳房炎の早期発見のための新規診断法と、乾乳期に有効な治療法の開発を行うことである。

そこで、本研究では、今まで臨床症状以外では診断が困難であった、乳汁を用いた乾乳期乳房炎の早期診断方法を検討した。さらに、*S.aureus* を起因

菌とする、難治性の臨床型乳房炎に対する新規治療法を検討した。

2、乳房炎乳汁に増加するラクトフェリンの性状と生理的作用の解析

乾乳期または乳房炎時には乳汁中ラクトフェリン(Lf)濃度が上昇することが報告されている。しかしながら、増加したLfの働きと性状についてはほとんど報告されていない。そこで、乾乳期乳房炎乳汁中Lfの性状および生理作用を解析した。LfはConcanavalin A (Con A) に対する親和性の変化を解析した。その結果、市販Lfならびに健康乳汁ではCon Aに対する親和性の高いLf (高Con A親和性Lf) のみが含まれ、市販Lfと高Con A親和性Lfはほぼ同様の生化学的性状を示した。一方、乳房炎乳汁にはCon Aに対する親和性の低いLf (低Con A親和性Lf) が多く含まれるようになり、市販Lf、高Con A親和性Lfとは異なる生化学的性状を示した。そして、このCon A親和性の違いを利用し、乳汁中からウシLf抗体を結合させたCNBr activated Sepharose 4BでLfを分離した後、Con A Sepharose 用い、高Con A親和性Lfと低Con A親和性Lfを分離し、その性状を解析した。その結果、市販Lfでは86kDa、高Con A親和性Lfでは86、56kDaの分子群、低Con A親和性Lfでは、38、23、22、19kDaの分子群が認められた。そのうち23kDa以下の分子群ではラクトフェリンモノクローナル抗体に反応しなかった。次いで、各分子のN末端アミノ酸解析を行い位置を特定したところ、86、38kDaはLf分子のNローブの先頭から開始し、23、22kDa分子群では237または285番目のアミノ酸残基から開始後、Nローブ側とCローブ側にまたがる形で位置していた。56、19kDaではほとんど完全にCローブ側のみに含まれる形で位置していた(図1)。生理学的性状については、低Con A親

和性 Lf では他の Lf に比べ抗菌能と鉄結合能が低下し、脾臓付着細胞および末梢血単核球に対して炎症を惹起する作用、すなわち催炎性を有していた(図 2)。低 Con A 親和性 Lf の乳房内投与においては細胞浸潤ならびに炎症性サイトカイン mRNA 発現を誘導した(図 3)。

以上より、乳房炎乳汁に多く含まれる低 Con A 親和性 Lf は 38kD 以下の分子群で、正常な Lf で認められる抗菌活性および鉄結合能が低下し、各種細胞ならびに生体に対して催炎性を有していた。

3、低 Con A 親和性ラクトフェリンの産生機構の解析

低 Con A 親和性 Lf は 38kDa 以下の分子群に小分子化されていた。データには示さないが、予備試験での乳房炎乳汁由来細胞を用いた RT-PCR 法では、Lf タンパク質のうち、N ロープの N 末端域、C 末端域、C ロープの C 末端域の mRNA 発現が確認された。すなわち、Lf タンパク質が正常な長さで分泌された後、プロテアーゼによって分解され、小分子化したことが予想された。プロテアーゼのうち、乳房炎乳汁での活性上昇、炎症時に浸潤してくる多形核白血球からの産生ならびにブドウ球菌からの産生が報告されているエラスターゼに着目し、低 Con A 親和性 Lf の産生要因となっているかどうか検討した。

その結果、乳房炎乳汁中ではエラスターゼ活性と低 Con A 親和性 Lf 濃度の上昇が確認された。さらに、乳房炎乳汁から分離した低 Con A 親和性 Lf とエラスターゼ処理した市販 Lf では、各種電気泳動法での泳動パターンがよく相似し、低 Con A 親和性 Lf の産生にエラスターゼが関与していることが推察された(図 4)。また、低 Con A 親和性 Lf 分子中、生物活性の報告が多

いNローブ側に配列を持ち、且つ、ラクトフェリシンのアミノ酸配列を含まない23および22kDa分子群を用い、乳房炎の報告がされているヒト、ヤギ、ヒツジLfと相同性の高い部分で合成ペプチドを4つ作成したところ、その内の1つが催炎性を有し、炎症性サイトカインならびに細胞内転写因子の一つである Nuclear factor κ B (NF κ B) を活性化していた (図5)。

以上より、ブドウ球菌性乳房炎乳汁に含まれる低 Con A 親和性 Lf は *S.aureus* や多形核白血球から産生されるエラスターゼにより正常な Lf が分解された結果生じたものである可能性が示唆された。また、低 Con A 親和性 Lf、エラスターゼ処理 Lf ならびに合成ペプチドで乳腺上皮株化細胞 (BMEC) を刺激培養した場合、NF κ B の活性化に基づく炎症性サイトカイン mRNA 発現の増強が認められた。

また、これらの結果に基づき、催炎作用を有するアミノ酸配列を含んだ低 Con A 親和性 Lf を催炎性 Lf と呼称した。

4、催炎性ラクトフェリンを指標とした乾乳期乳房炎診断法の検討

泌乳期乳房炎の診断基準は、臨床症状、乳汁中体細胞数、起因菌数の3つである。このうち、乳汁中体細胞数は、28.3 万個/ml 以上 (北海道 NOSAI 研修所) を乳房炎牛であると診断する。体細胞数は感染している細菌数に比例すると考えられ、上記体細胞数を超えている個体の80%以上は細菌感染牛とみなされている。*S.aureus* は200 個/ml 以上の検出で黄色ブドウ球菌性乳房炎と診断される (NOSAI 山形)。

しかしながら、乾乳導入期には生理的に体細胞数が急激に上昇して300 万個/ml を超えることもある。また、乾乳期に乳汁中細菌検査が行われることは稀であり、起因菌数の明確な基準もなく、これら泌乳期での数値を乾乳期

乳汁にそのまま当てはめることは出来ない。現行においては、臨床症状を中心に乾乳期乳房炎を診断している。そこで本章では、乳汁中の催炎性 Lf を乾乳期の乳房炎診断の指標に応用することを検討した。その結果、催炎性 Lf 含有率が乾乳期のどの時期についても乳房炎症状に相関して有意に上昇した (図 6)。また、臨床上健康とみなされている分房乳について乳汁中低 Con A 親和性 Lf 含有率の高いもの (50%以上) と低いもの (50%未満) とに分類したところ、含有率の低いものでは 1 割の分娩後乳房炎発症率であったのに対して、高いものではその 7 割で分娩後に乳房炎を発症した (図 7)。また、乾乳期ブドウ球菌性乳房炎を治療後、治癒したものとしなかったものについて、乳汁中催炎性 Lf 含有率の推移を調べたところ、治癒した分房では治療後 3 日目から含有率の有意な低下が認められ、7 日目にはさらに含有率が低下した (図 7)。

以上の結果から、乾乳期乳汁中催炎性 Lf 含有率は乳房炎の症状とよく相関し、治療経過、発症予測および乾乳期の乳房管理に応用可能な診断マーカーとなる可能性が示唆された。また、催炎性 Lf は正常 Lf がエラスターゼにより分解され産生されることから、多形核白血球の浸潤を伴う炎症であれば、大腸菌等、他の起因菌による乳房炎に対しても応用可能であると推察された。

5、乾乳期臨床型乳房炎に対するラクトフェリン・抗生物質の併用治療試験

乳房炎の治療には抗生物質が広く用いられる。しかしながら、感染した細菌が複雑に分岐する乳管内に入り込み、十分な抗生物質の作用を受けないまま乳腺内に定着することも少なくない。また、抗生物質を多用することにより耐性菌が出現する危険性を考え、Lf のような安全性が高い抗菌物質を乳房

炎の治療に応用することはこれまでも何例か報告されている。しかしながら、これまでの報告では、潜在性乳房炎や毒性が弱いコアグララーゼ陰性ブドウ球菌での有効例であり、より毒性の強い *S.aureus* による乳房炎での有効例は報告されていない。そこで本章では、抗生物質と Lf を組み合わせて乾乳期乳房炎を治療することにより、抗生物質または Lf 単剤での治療に比べて、より有効な治療効果が得られるか検討を行った。その結果、乾乳期の臨床型黄色ブドウ球菌性乳房炎に対し、抗生物質・Lf 併用治療群では、投与後 7 日目に 80% 近い乳房で臨床症状が消失し、分娩後もほぼ同様の割合で正常乳汁の分泌が認められた。一方、単剤投与では治癒率約 50%、分娩後正常乳汁分泌率は 20~40% にとどまった (図 8)。併用治療群では乳汁中催炎性 Lf 含有率ならびに TNF- α mRNA 発現の有意な低下が認められた (図 9)。また、BMEC を用い Lf の作用機構を解析したところ、催炎性 Lf では TNF- α mRNA の発現と NF κ B の活性化が認められたが、Lf との共培養では TNF- α mRNA 発現の有意な低下、転写因子 NF κ B 活性抑制が認められた (図 10)。

これらの結果から、乾乳期ブドウ球菌性臨床型乳房炎に対して抗生物質と Lf とを併用して治療することにより、Lf もしくは抗生物質いずれの単剤治療群よりも、臨床症状の改善ならびに分娩後の再発率の点において優れた治療成績が得られた。

6、まとめ

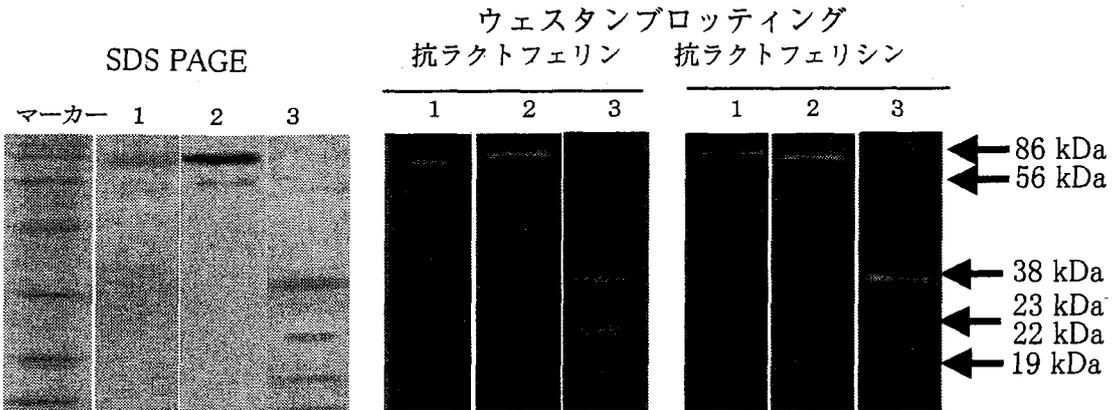
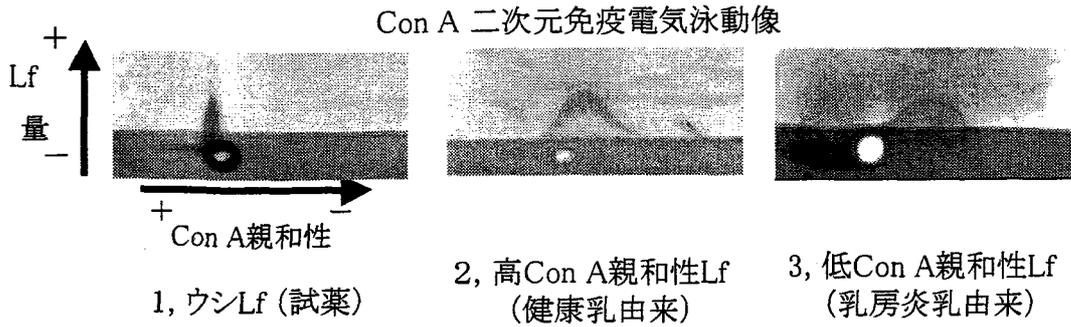
- 1) 乳房炎乳汁中の Lf には Con A に対する親和性が低い Lf 分子が存在していた。この低 Con A 親和性は低分子化した Lf で、抗菌作用を喪失し、鉄結合能も低下していた。また、炎症性サイトカインの mRNA 発現能

の増強や、乳房内投与による白血球の浸潤などの催炎性を有していた。このことは、乳房炎乳汁や乾乳期乳汁に含まれる Lf には、期待されるような抗微生物活性がないだけでなく、かえって炎症を増悪させている可能性があることを示唆する。また、乳房炎症状と Lf 濃度は必ずしも相関しない可能性があることも示唆された。

- 2) 乳房炎乳汁はエラスターゼ活性を有していた。また、市販 Lf をエラスターゼで処理した場合、乳房炎乳汁から分離した低 Con A 親和性 Lf (催炎性 Lf) とよく相似した生化学的性状を示した。また、エラスターゼ処理 Lf または催炎性 Lf 分子中に含まれる分子群からアミノ酸 10 残基前後のペプチドを 4 種類作製したところ、その 1 種類で催炎性が認められた。これらの結果から、催炎性 Lf は感染したブドウ球菌または炎症によって浸潤してきた多形核白血球が産生するエラスターゼによる Lf 分解産物である可能性が示唆され、その分子中の GQRDLLFKDSAL の配列部分が催炎性に強く関わっている可能性が示唆された。また、その催炎性は、転写因子 NF κ B の活性化に基づく、炎症性サイトカインなどの炎症メディエーター産生誘導によるものであることが示唆された。
- 3) 乾乳期乳房炎の症状と乳汁中催炎性 Lf 含有率とがよく相関し、含有率が 50%未満の検体においては分娩後の乳房炎発症は低率にとどまった。また、乳房炎の治癒に伴って含有率が有意に減少していた。このことは、催炎性 Lf 含有率が乳房炎に対して有効な診断マーカーになると共に、治療後の予後経過を判定する指標になり得ることをも示唆している。これまでの臨床症状による乾乳期乳房炎の診断に加え、これらの指標により乾乳期乳房の状態を把握して適切に対応することにより、乳房炎の早期発見を期待出来る。
- 4) 乾乳期黄色ブドウ球菌性臨床型乳房炎において、抗生物質と Lf を併用し

て治療した場合、それぞれの単剤投与治療に比べて、臨床症状の改善ならびに再発率の減少の点において優れていた。さらに、BMECにおいて催炎性 Lf 刺激後に上昇した、炎症性サイトカイン mRNA 発現と細胞内転写因子の NF κ B 活性化が、正常 Lf との共培養により有意に低下した。このことから、抗生物質と Lf を併用した場合の治療効果は、抗生物質の抗菌作用と、正常 Lf による NF κ B の活性の抑制効果に基づく抗炎症作用によるものであることが示唆された。

以上の結果から、抗生物質と Lf の併用療法により乾乳期乳房炎が適切に治療でき、その結果、分娩以降泌乳期での乳房炎発症をより効果的に抑制することが期待できる。



乳汁より分離した高Con A親和性Lfと低Con A親和性Lfの分子量およびN末端アミノ酸配列

	分子量	N末端アミノ酸配列	ウシLf分子中位置
①	86 kDa	APRKNVRWCTISQPE	1-15
②	56 kDa	NLRETAEEVKARYTRVV	330-346
③	38 kDa	APRKNVRWCTISQPE	1-15
④	23 kDa	APVDAFKECHLAQVP	237-251
⑤	22 kDa	SFQFLGSPPGORDLLFK	285-301
⑥	19 kDa	RYTRVVWCAVGPEEQ	341-355

Lf分子中推定位置模式図

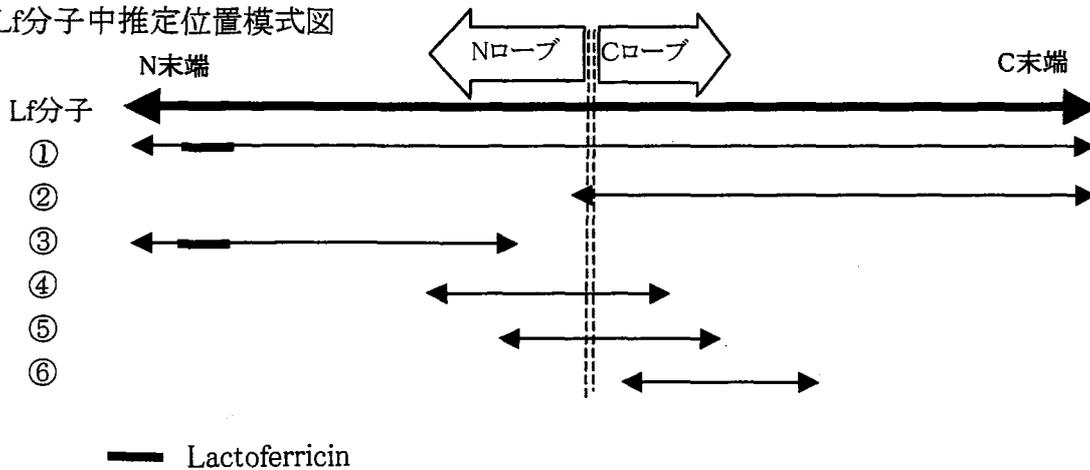
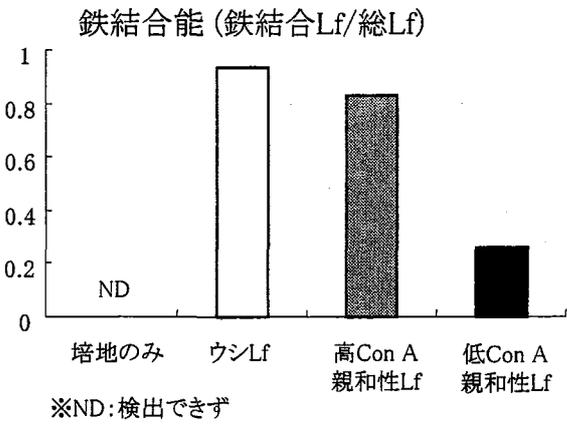
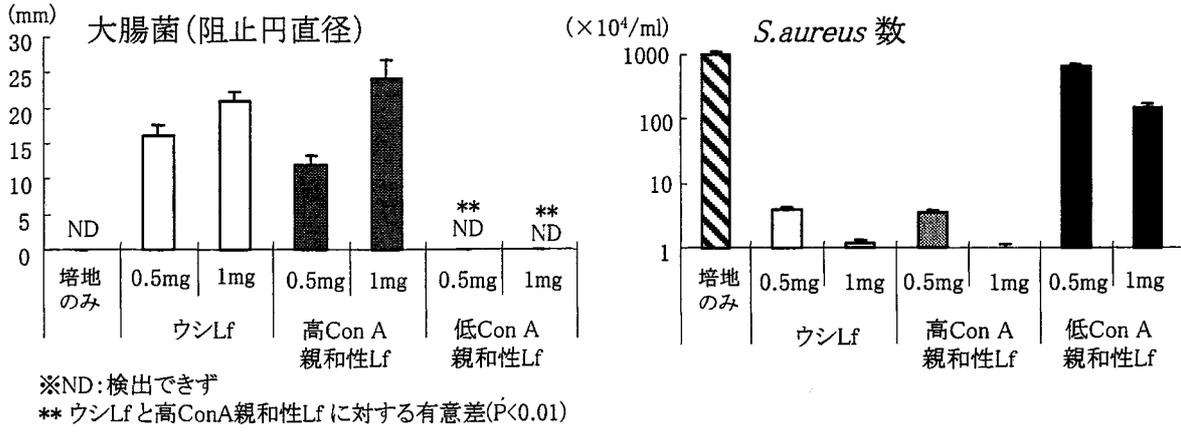


図1、健康または乳房炎乳汁から分離したLfの生化学的性状、分子量およびN末端アミノ酸配列



Con A親和性の異なるLfによるスーパーオキシドおよびサイトカインmRNA産生誘導能

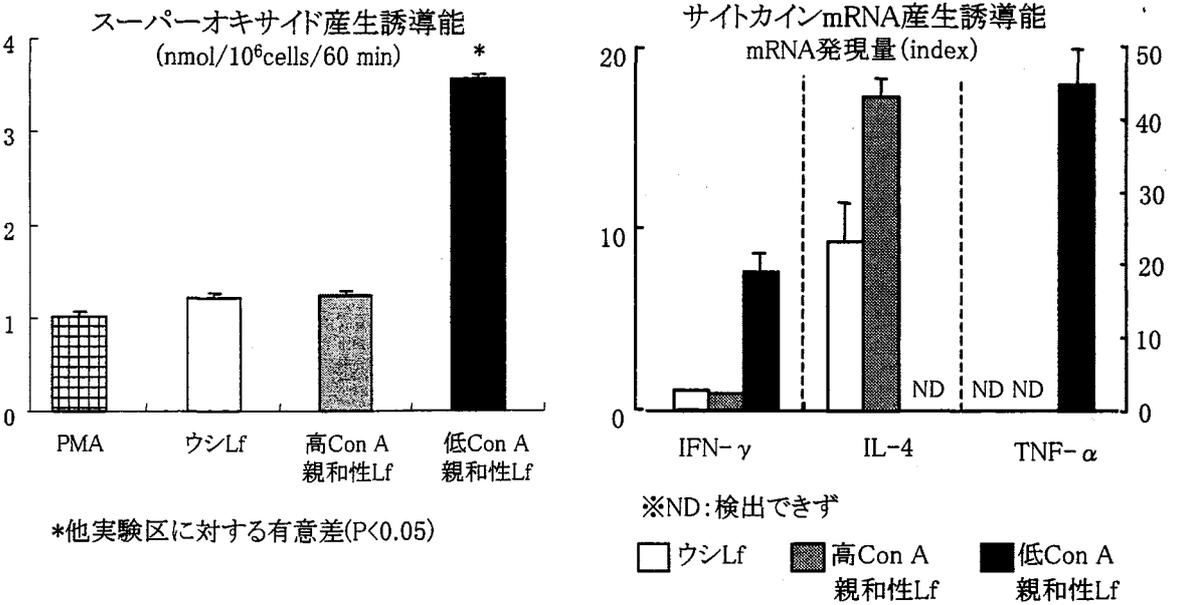


図2、Con A親和性の異なるLfによる抗菌活性、鉄結合能、催炎性の差異

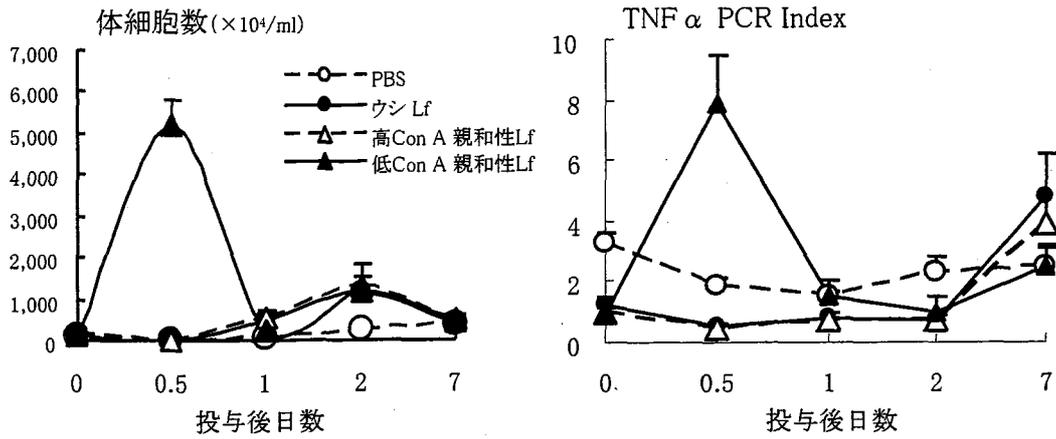


図3、Con A親和性の異なるLfの乳房内投与による細胞浸潤および炎症性サイトカインmRNA発現誘導の差異

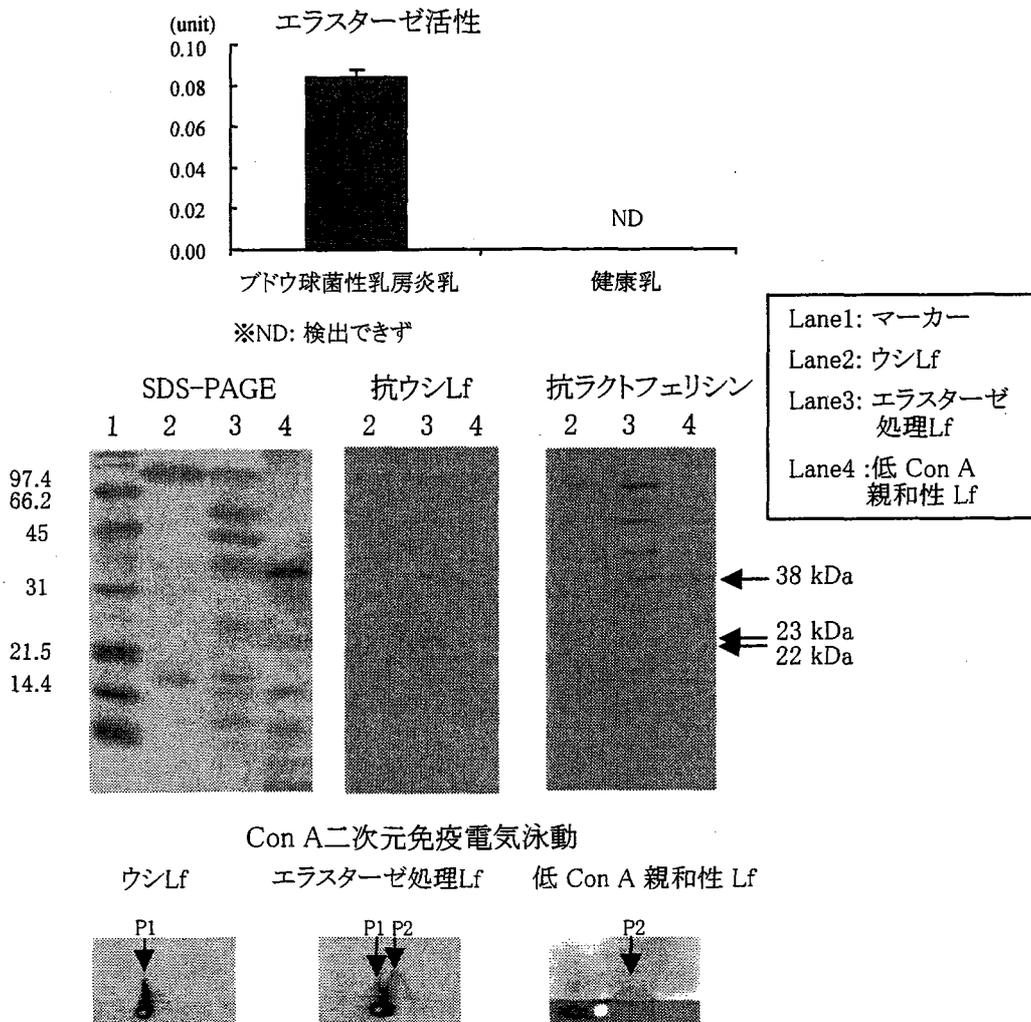


図4、乳房炎乳中エラスターゼ活性と種々のLf分子での生化学的性状

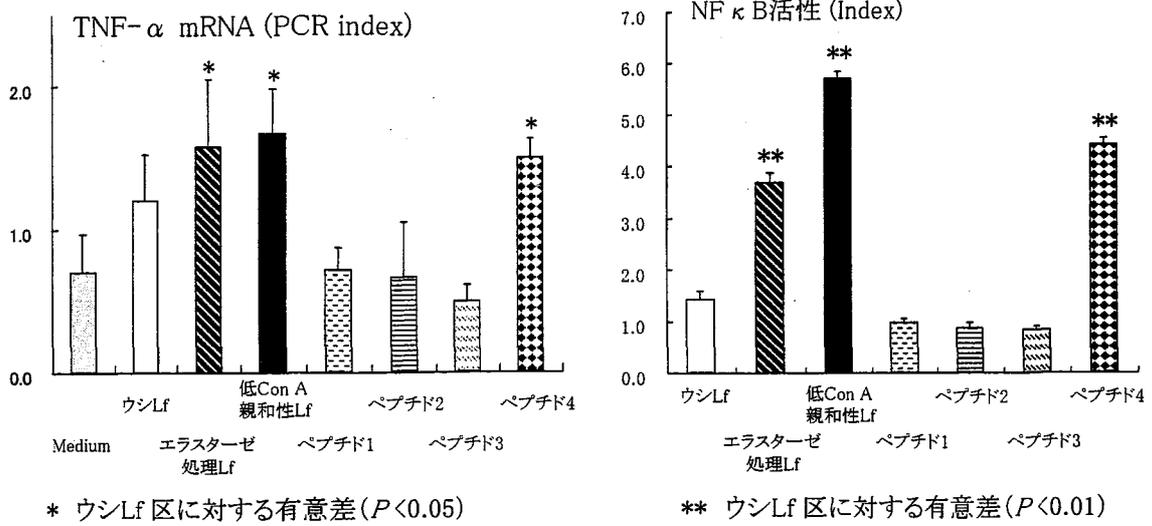


図5、種々のLfを用いたTNF- α mRNA発現および転写因子NF- κ B活性化誘導能

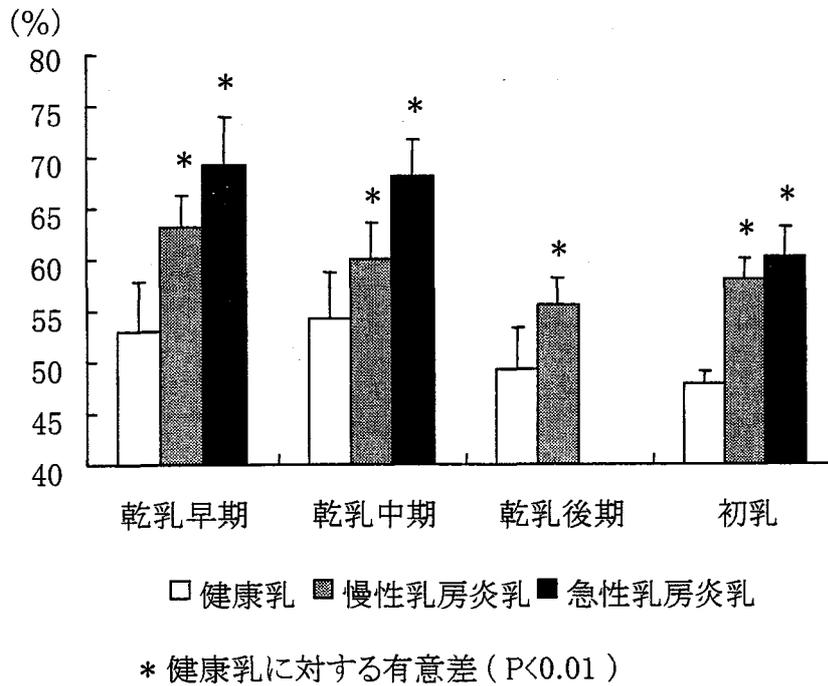
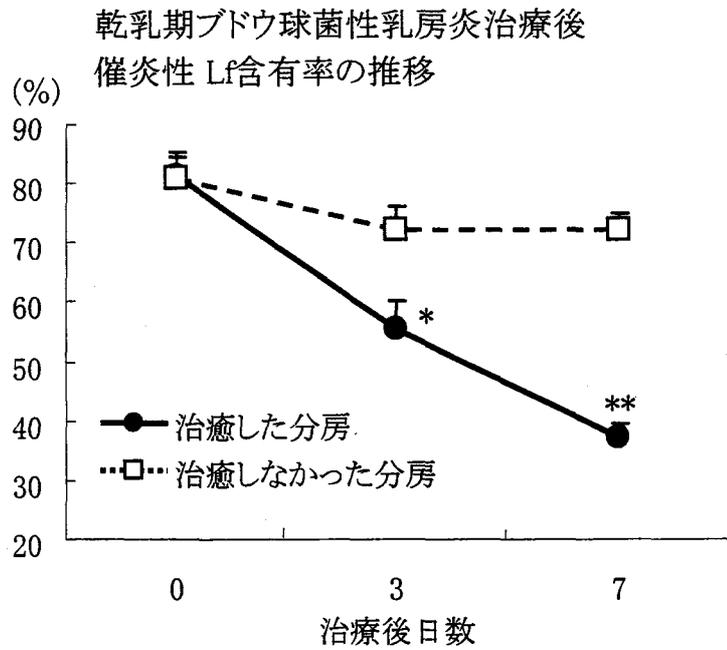
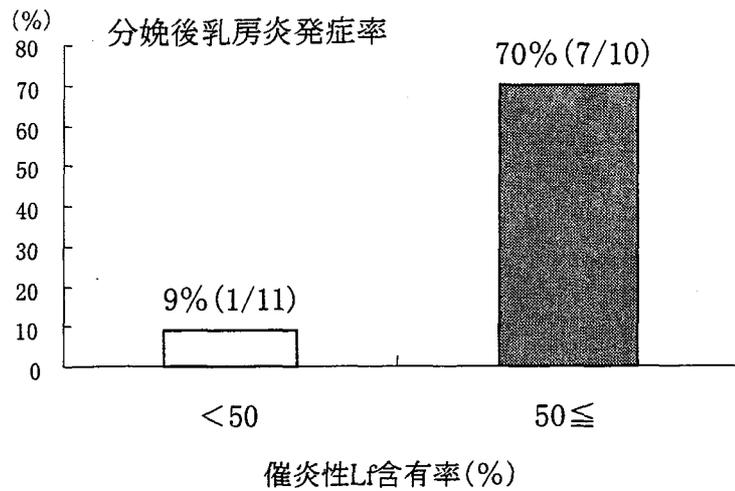


図6、乾乳期乳房炎症状およびステージ別乳汁中催炎性Lf含有率



治癒・・・臨床症状、起因菌共に消失したもの
 *、** 各日数において治癒しなかった分房に対する有意差
 (*:P<0.05、**:P<0.01)

図7、健康分房乳中 催炎性Lf含有率による分娩後乳房炎発症率
 および乾乳期ブドウ球菌性乳房炎治療後 催炎性Lf含有率の推移

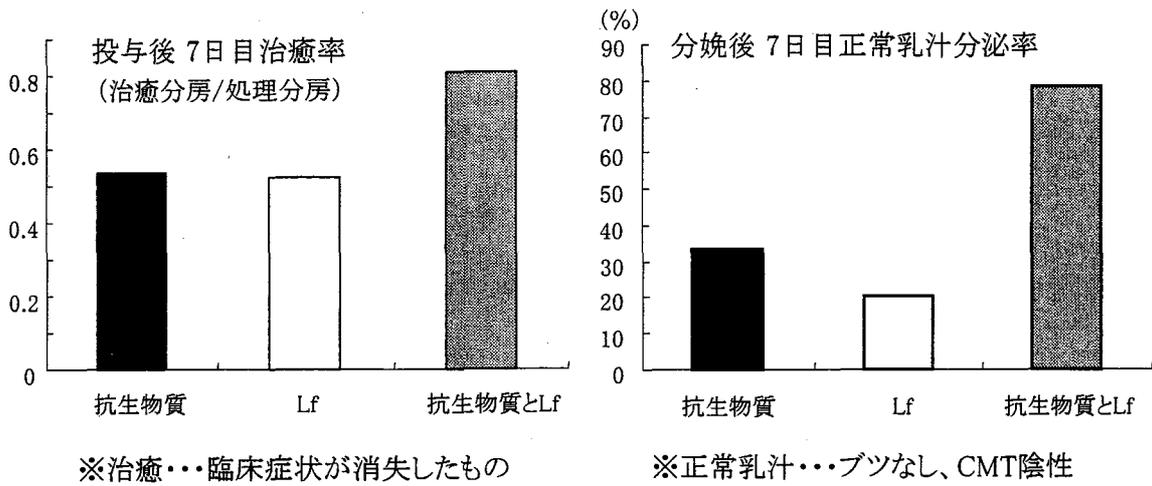


図8、乾乳期黄色ブドウ球菌性臨床型乳房炎に対する
抗生物質とLfの併用治療効果

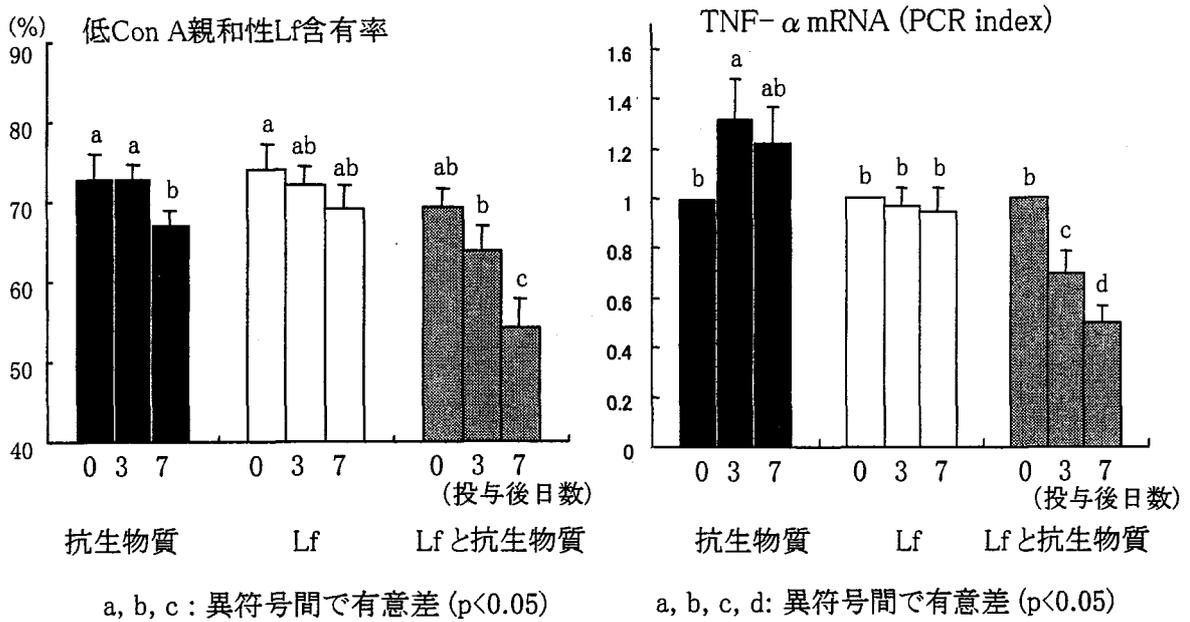
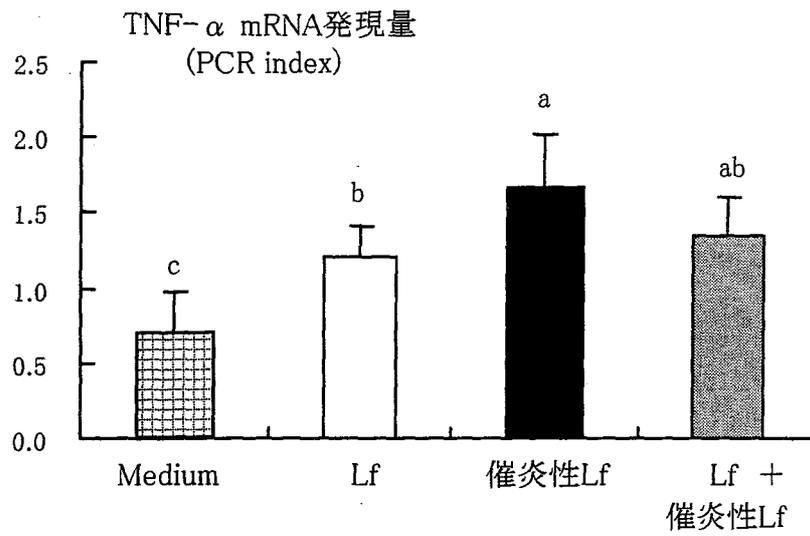
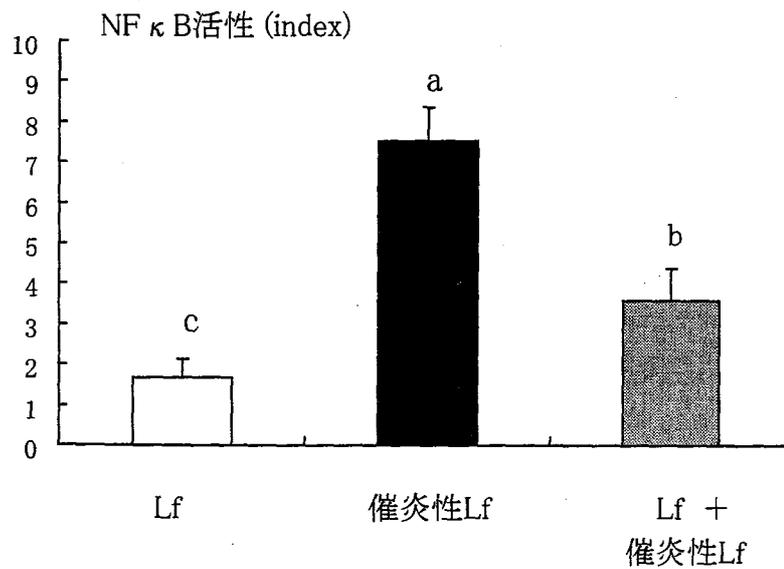


図9、乳房内投与後催炎性Lf含有率およびTNF α mRNA発現量の推移



a, b, c: 異符号間で有意差 ($p < 0.05$)



a, b, c: 異符号間で有意差 ($p < 0.05$)

図10、BMECにおける催炎性LfでのTNF- α mRNA発現
および転写因子NF κ B活性化誘導と正常Lfでの抑制作用

論文審査結果要旨

乳房炎は乳用牛疾病の中で死産事故原因の上位にランクされ、罹患率の高さから経済的損失は甚大である。当然ながら、いくつかの治療法が古くから考案され試みられてきた。最近の一般的な治療法は、黄色ブドウ球菌に対する抗生物質の使用であるが、決定的な治療法には未だ至っていない。このような事情を背景にして、本研究は、乾乳期乳房炎の早期発見のための新規診断法と乾乳期に有効な治療法の開発を目的とした。

まず、乳房炎乳汁中のラクトフェリン (Lf) の性状を、Concanavalin A (ConA) に対する親和性の変化から解析した結果、乳房炎乳汁中には正常な乳汁中には含まれない低 ConA 親和性 Lf が含まれることを発見した。この低 ConA 親和性 Lf は、抗菌能と鉄結合能が低下しており、炎症性サイトカイン mRNA 発現を誘導し、炎症を惹起することを示した。

また、乳房炎乳汁を解析した結果、低 ConA 親和性 Lf は正常な Lf が切断された小さな分子量を持つ Lf 断片であること、さらに乳房炎乳汁中には低 ConA 親和性 Lf とエラスターゼ濃度が高いことを発見した。さらに、エラスターゼ処理を行った Lf や Lf の一部に炎症性サイトカイン mRNA を増強する作用があることを示した。

以上の結果に基づいて、実際に、乳汁中の低 ConA 親和性 Lf 含有率と乳房炎症状との相関性を検討した。その結果、低 ConA 親和性 Lf 含有率は乾乳期のどの時期においても乳房炎症状と有意に高い相関があることを示した。低 ConA 親和性 Lf 含有率の低い分房での乳房炎発症率は 10%であったのに対し、含有率の高い分房での乳房炎発症率は 70%であった。

続いて、乾乳期臨床型乳房炎に対する Lf および抗生物質の併用による乳房炎の治療効果について検討した。今まで、潜在性乳房炎や毒性が低いコアグララーゼ陰性ブドウ球菌では有効であるが、より毒性の強い *S. aureus* に対しても有効な治療法は確立していない。しかし、Lf および抗生物質を併用した結果、投与後 7 日目に 80% の分房で臨床症状が消失し、分娩後もほぼ同様の割合で正常乳汁の分泌が認められた。

以上のように、新規な乳房炎治療法の開発を目的として、乳房炎乳汁中のラクトフェリン (Lf) に着目し、乳房炎の炎症が Lf のエラスターゼによる分解産物 (低 ConA 親和性 Lf) であることを発見し、乾乳期臨床型乳房炎の治療を可能にする技術の開発に貢献することが出来た。よって審査員一同は、本論文の著者が博士 (農学) の学位を授与されるのに値するものと判定した。