

報告

牛乳中ペルオキシダーゼと乳房炎との関係について

清本紗弓¹・猪ノ口愛¹・吉村幸則²・磯部直樹²

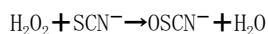
¹広島大学生物生産学部

²広島大学大学院生物圏科学研究科

背景および目的

乳房炎は、乳房内に侵入した微生物の定着と増殖によって起きる乳管系や乳腺組織の炎症であり、泌乳量の減少、乳質の低下、牛乳の廃棄、治療費など多大な経済損失をもたらす。乳房炎は一旦罹患すると治癒する確率が極めて低いため、早期診断・早期治療が重要となる。しかし、現在行われている California mastitis test (CMT) および体細胞数 (SCC) 測定法などは、かなり進行した乳房炎に対して有効な診断法であり、早期診断という点で不十分である。

そこで、乳房炎の早期診断の指標物質として、乳汁中の自然免疫担当物質であるラクトペルオキシダーゼ (LPO) に着目した。LPOは抗菌作用のあるタンパクであり、細菌に非特異的に反応し、細菌の侵入に対して初期段階で多量に生産されると考えられる。LPOはチオシアネート (SCN⁻) を抗菌性のヒポチオシアネート (OSCN⁻) に酸化する反応を触媒する (Thomas and Aune, 1978)。



このヒポチオシアネートが、細菌の呼吸や解糖系に関わる酵素のスルヒドリル基 (SH 基) を酸化し、酵素を変性することで細菌の代謝を阻害し、細菌の増殖を阻止する (Thomas and Aune, 1978)。LPO は様々な動物種の乳汁中で検出されており、動物種、品種や泌乳サイクル (Zapico et al., 1991)、個体差 (Medina et al., 1989) など多くの要因によってその濃度が変化することが報告されている。しかし、ウシの乳汁中ペルオキシダーゼと乳房炎との関係についての報告はほとんどない。

また、エストロゲン濃度の低下がペルオキシダーゼ活性の低下を引き起こす (Matsubara and Machado, 1991) と報

告されている。正常な発情周期を示す個体では、エストロゲン濃度が低下するとプロゲステロン濃度は増加する (Starbuck et al., 2006) ので、プロゲステロン濃度増加に伴いラクトペルオキシダーゼ活性の低下が考えられる。しかし、ウシ乳汁中のプロゲステロンとラクトペルオキシダーゼの関係は明らかになっていない。

本実験では牛乳中のペルオキシダーゼ活性と乳房炎との関係を調べ、乳房炎の早期診断に役立てることを目的とした。

材料および方法

広島大学大学院生物圏科学研究科附属瀬戸内圏フィールド科学教育研究センター西条ステーションで飼育されているホルスタイン種乳牛のうち、分娩後 0 日から乾乳開始までのウシ 17 頭を用いた。供試牛の年齢は平均 4.2 歳、産次数は平均 2.4 であった。週一回、夕方 4 時の搾乳時に乳汁を採取し、直ちに研究室に持ち帰った。

乳房炎診断として直接顕微鏡検査による体細胞数測定および California mastitis test (CMT) 変法による検査を行った。体細胞数測定は牛乳 2.5 μl をスライドガラスの 1cm 角上に塗抹し、キシレンで固定した後、Propidium Iodide で染色し、蛍光顕微鏡下で体細胞数を測定した。CMT 変法では CMT 試薬 1ml に牛乳 1ml を加え、シャーレを前後左右に傾斜混合し、凝集の程度により判定した。

次に、Tetramethylbenzidine (TMB) を基質とした牛乳中のペルオキシダーゼ活性の測定を行った。TMB と過酸化水素を含む緩衝液と牛乳とを混合し、655nm における吸光度を測定した。

さらに、ELISA 法を用いて牛乳中プロゲステロン(P4)濃度の測定を行った。二次抗体(ヤギ抗ウサギ IgG 抗体)でコーティングしたプレートを作成し、抽出した脱脂乳中の P4、ペルオキシダーゼ標識 P4、ウサギ P4 抗体をプレートに添加して競合させ、2 時間培養した後、吸光度を測定し、同時に測定したスタンダードより牛乳中 P4 濃度を算出した。

相関係数および 2 区間の有意性の検定には t 検定を、3 区間以上の有意性の検定には分散分析の後、Duncan の多重比較検定を行い、危険率 0.05% 以下を有意と判定した。

結果および考察

1. 泌乳期における牛乳中ラクトペルオキシダーゼ活性および体細胞数の変化

初産のウシ 7 頭のうちの 4 頭(No. 19、21、22、23)は泌乳開始直後にラクトペルオキシダーゼ活性が平均 11.81~17.74U/ml と高値を示した後、徐々に低下して、末期まで平均 3.80~4.58U/ml の値を示した(図1)。残りの初産のウシ(No. 2、5、6)では、そのようなラクトペルオキシダーゼ活性の変化はみられなかった(図1)。2 産から 6 産のウシ(No. 3,4,9,12,13,14,15,20,26,28)のラクトペルオキシダーゼ活性は泌乳期を通して低値を維持した。牛乳中ラクトペルオキシダーゼ活性と体細胞数の変化は一致しておらず、全牛乳サンプルにおける両者の相関を調べたが、有意な相関は認められなかった($r^2=0.00005$)。したがって、牛乳中ペルオキシダーゼを測定することにより乳房炎の早期診断をすることは困難と考えられた。

しかし、ラクトペルオキシダーゼ活性が分娩後 2 ヶ月以内に 2 週続けて 10U/ml 以上の高値を示したウシとそうでないウシの分娩後 1 ヶ月以降の体細胞数の平均を比較した(図2)ところ、前者の体細胞数は後者に比べて有意に低くなった。このことから、泌乳初期に牛乳中ラクトペルオキシダーゼ活性の上昇が認められたウシではその後、乳房炎に罹患しにくい、つまり泌乳初期のラクトペルオキシダーゼ活性の一過性の上昇がその後の乳房炎原因菌に対する抵抗力を強化している可能性が示唆された。

2. 産次数とラクトペルオキシダーゼ活性および体細胞数との関係

産次数別のラクトペルオキシダーゼ活性を図3に示した。産次数の増加に伴ってラクトペルオキシダーゼ活性は低下する傾向があり、初産と他の区との間には有意差が認められた。また、産次数別の体細胞数を図4に示した。初産のウシは平均体細胞数が 50 万個/ml 以下であったが、2 産以上のウシでは体細胞数は増加し、初産と他の 2 区との間には有意差が認められた。したがって、産次を重ねるに連れてラクトペルオキシダーゼ活性が低下し、乳房炎にかかりやすい可能性が考えられる。これは、高齢牛ほど過去の泌乳期を通して細菌の侵入する機会が多かったことが考えられる。

3. CMT 変法の判定結果とラクトペルオキシダーゼ活性および体細胞数との関係

CMT 変法において、凝集が強いほど、牛乳中体細胞数が増加したが、ラクトペルオキシダーゼ活性は一定の傾向が認められなかった。これは先ほどの全牛乳サンプルにおける牛乳中ペルオキシダーゼと体細胞数との相関は認められなかったという結果と一致する。

4. プロゲステロン濃度とラクトペルオキシダーゼ活性および体細胞数との関係

全ての牛乳サンプルをプロゲステロン濃度 1ng/ml 以上および未満に分類し、それぞれのラクトペルオキシダーゼ活性および体細胞数を調べ、表1に示した。プロゲステロン濃度が 1ng/ml 以上の時に、ラクトペルオキシダーゼ活性は有意に低くなっていた。体細胞数においては両区間に有意な差は認められなかったが、1ng/ml 以上の時に高くなる傾向があった。また、発情周期におけるラクトペルオキシダーゼ活性の変化を調べてみると(図5)、有意差は認められなかったもの、プロゲステロン濃度の増加に伴ってラクトペルオキシダーゼは減少する傾向があった。さらに、人工授精で受胎した場合および受胎しなかった場合のラクトペルオキシダーゼ

活性および体細胞数を調べると(図 6)、人工授精後のラクトペルオキシダーゼ活性は、受胎牛および不受胎牛間に差は認められなかったが、体細胞数においては、有意な差はなかったものの、受胎した場合の方が不受胎の場合に比べて人工授精後の体細胞数が高い傾向を示した。これらのことから、プロゲステロン濃度が増加するとき、ラクトペルオキシダーゼ活性は低下し、体細胞数は増加する傾向が認められたため、プロゲステロン濃度の高い黄体形成時に乳房炎に罹患しやすい可能性が考えられた。

表 1. 牛乳中プロゲステロン濃度と

ラクトペルオキシダーゼ活性および体細胞数との関係

プロゲステロン濃度 (ng/ml)	LPO 活性 (U/ml)	体細胞数 (×1000/ml)
<1	4.5 ^a	1020 ^a
>1	3.5 ^b	1134 ^a

^{a, b} : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

以上の結果より、乳房炎に罹患しているウシの乳汁ではラクトペルオキシダーゼ活性が必ずしも高くなり、早期診断に役立つ十分な結果は得られなかった。しかし、泌乳初期でラクトペルオキシダーゼ活性の一過性の上昇が認められたウシにおいては、その後全泌乳期を通じて体細胞数が増加しなかったため、泌乳初期にラクトペルオキシダーゼ活性が低いウシでは、そうでないウシよりも乳房炎に罹患しやすい可能性が考えられた。

引用文献

- Matsubara, L. S., and Machado, P. E. (1991) Age-related changes of glutathione content, glutathione reductase and glutathione peroxidase activity of human erythrocytes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 24:449-454.
- Medina, M., Gaya, P., and Nunez, M. (1989) The lactoperoxidase system in ewes' milk: levels of lactoperoxidase and thiocyanate. *Letters in*

applied microbiology 8:147-149.

Starbuck GR, Gutierrez CG, Peters AR, Mann GE. (2006)

Timing of follicular phase events and the postovulatory progesterone rise following synchronisation of oestrus in cows. *Veterinary Journal* 172:103-108.

Thomas, E. L. and Aune, T. M. (1978) Lactoperoxidase,

peroxide, thiocyanate antimicrobial system: Correlation of sulfhydryl oxidation with antimicrobial action. *Infection and immunity* 20:456-463.

Zapico, P., Gaya, P., De Paz, M., Nunez, M., and Medina,

M. (1991) Influence of breed, animal, and days of lactation on lactoperoxidase system components in goat milk. *Journal of dairy science* 74:783-787.