ラットの実験的乳腺炎におけるリゾチームの消長

飯塚三喜・元井霞子

(農林省家畜衛生試験場)

リゾチームは生体内で β -glucosaminidase 作用を持ち、また粘膜、結合織など組織内のムコ多糖体の生成及び代謝にも関与するといわれ、抗ウイルス・抗菌作用、抗炎症作用、組織修復作用など多様な生体防禦機能に関与するといわれている¹⁾。いっぽう、リゾチームの乳汁内濃度については高低両説²⁻⁴⁾があるが、牛の乳房炎における防禦的役割りについては未だ確説がない。

著者らは乳房炎、アルコール不安定乳などの異常乳症発生機序の基礎的研究として、ラットの乳腺組織を利用し、乳房炎の初期発病機構を検討しているが、上記のような薬理作用を持つリゾチームが乳房炎の初期にどのような変化を示すかを研究するため、先に報告⁵⁻⁷⁾した性ホルモンと数種のウシ乳房炎起因菌を処置したラットの実験的乳房炎について、乳腺組織内リゾチームを中心とした初期変動を検討したので報告する。

材料及び方法

供試動物：泌乳 14 日目の Wistar-Imamichi 系の体重 300~350 g のラット 190 匹である。

使用菌株：乳牛由来の *Streptococcus fecalis*, *Streptococcus bovis*, *Staphylococcus aureus* の黄色コロニー (Y) 形成株と白色コロニー (W) 形成株及び *Escherichia coli* の 5 株である。

分析項目と方法：乳腺内リゾチームの測定は、乳腺 1 g を摂取し、これに pH 6.2 の M/15-リン酸緩衝液 1 ml を加え、ホモジェナイザーで粉碎し、緩衝液 8 ml を添加後よく混ぜ、2,000 rpm で 5 分間遠沈する。上清 1 ml を別の試験管にとり、9 ml の緩衝液を加えて希釈する。その 3 ml をとり、日本公定書協会の方法⁸⁾により行った。

その他の項目としてグルコサミンは Boas 法⁹⁾によった。また、乳腺の炎症性反応の程度を確認するために乳

汁を胸部及び腹部の乳頭から試験管内に搾乳し、乳汁 pH を pH メーター (日立堀場製) により、乳汁中白血球数は Breed 法¹⁰⁾によって測定した。

試験方法：実験 1. 1 群 5 匹の泌乳 14 日目ラットに estradiol monobenzoate (EB) の 1 回 10 μ g を飯塚ら⁶⁾の方法に従って 3~8 回 (第 1 回注射後、第 2 回は 2 時間、第 3 回は 4 時間、第 4 回 6 時間、第 5 回 20 時間、第 6 回 22 時間、第 7 回 44 時間、第 8 回 46 間時目) 皮下注射し、第 1 回注射後 5, 8, 24 及び 48 時間に放血殺し、乳腺組織内のリゾチーム、グルコサミンならびに乳汁中の pH 及び白血球数を測定した。

実験 2. 実験 1 と同様に泌乳ラットに EB を皮下注射し、第 1 回注射後 2 時間目に 1 群に *Staphylococcus aureus* (w) の 20×10^8 個を、他群に *Streptococcus fecalis* の 7×10^8 個を乳頭口から乳腺内に注入した。そして、実験 1 と同様の経過時間で放血殺し、同様の項目について分析した。なお、対照に細菌のみ接種群と無処置群を置いた。

実験 3. 牛乳房炎由来の数種の細菌 (前記 6 株) について、リゾチームの *in vitro* における細菌発育抑制効果を検討した。リゾチーム (エーザイ KK 製) の 5.0, 12.5, 25, 50, 125 及び 250 の各 μ g/ml 濃度のものを調製し、その各々の 1 ml とあらかじめ増殖培養してある上記細菌培養液 1 ml (約 $10^4 \sim 10^5$ 菌量のもの) を加え、37°C, 1 時間感作した。その 1 ml を 9 ml のハートインフュージョンブロス培養液に添加し、37°C, 24 時間培養した。その培養液の混濁度を分光光度計 (波長 660 m μ) の吸光度で読みとり比較した。この際、リゾチーム無添加の菌培養液の吸光度を a とし、各濃度のリゾチーム添加群の吸光度を b として差引き、a に対するその差の割合 ($(a-b/a) \times 100$) を発育抑制率として示した。

実験成績

1. EB 処置ラットの乳腺におけるリゾチーム活性

EB の 1 回当たり 10 μ g を泌乳ラットに数回皮下注射し、第 1 回注射後 5, 8, 24 及び 48 時間にそれぞれ放血殺し、乳腺組織のリゾチーム、グルコサミン、乳汁

Activity of lysozyme in rat mammary gland induced experimentally mastitis. IIZUKA, Miki and Yoshiko MOROI (National Institute of Animal Health, Kodaira, Tokyo 187)

Japan. J. Anim. Reprod. 24(1), 1978.

pH 及び乳汁中白血球数を測定した。その成績を表 1 に示した。リゾチームは EB 投与後、時間の経過と共に漸次増加の傾向で 24 時間で最高を示し、グルコサミンもおおむねこれに平行した。乳汁 pH 及び白血球数は 5~8 時に高値を示した。

2. ブドウ球菌及びレンサ球菌接種乳腺におけるリゾ

チーム活性

前記 1 の実験と同様の処置をした泌乳ラットに *Staphylococcus aureus* あるいは *Streptococcus fecalis* をそれぞれ乳腺に接種して発症せしめ、経時的に各成分の動態を調べた。その成績を表 2 (ブドウ球菌接種群) と表 3 (レンサ球菌接種群) に示した。

Table 1. Changes in lysozyme, glucosamine, milk pH and milk leucocyte counts of rat mammary gland treated with estradiol benzoate

Treatment	Time after treatment hrs.	Mammary gland		pH of milk	Leukocyte count in milk $\times 10^4/\text{ml}$
		Lysozyme $\mu\text{g/g wet wt}$	Glucosamine mg/g wet wt		
EB ¹⁾ (30 μg)	5	12.8	1.46	7.2	25
None		12.2	1.08	6.8	3
EB (40 μg)	8	16.4	1.83*	7.3	38
None		12.2	1.07	6.8	7
EB (60 μg)	24	20.9*	1.93*	7.1	23
None		13.2	1.26	6.8	4
EB (80 μg)	48	17.3	1.35	6.9	18
None		13.2	1.26	6.8	5

¹⁾ EB=estradiol benzoate, * $P < 0.05$.

Table 2. Changes in lysozyme, glucosamine, milk pH and milk leucocyte counts of rat mammary gland after treatment with estradiol benzoate and *Staphylococcus aureus*

Treatment	Time after treatment hrs.	Mammary gland			pH of milk	Leukocyte count in milk $\times 10^4/\text{ml}$
		Lysozyme $\mu\text{g/g wet wt}$	Glucosamine mg/g wet wt	Total number of bacteria		
<i>Sta. aureus</i> ²⁾ + EB ¹⁾ 30 μg	5	19.4*	1.15	11×10^4	6.8	23
<i>Sta. aureus</i>		15.1	0.96	14×10^4	6.7	14
<i>Sta. aureus</i> + EB 40 μg	8	21.9*	1.30	26×10^3	7.2	65
<i>Sta. aureus</i>		18.9	1.13	31×10^3	7.0	63
<i>Sta. aureus</i> + EB 60 μg	24	25.2*	1.76	28×10^3	6.9	39
<i>Sta. aureus</i>		16.6	1.52	19×10^3	6.8	25
<i>Sta. aureus</i> + EB 80 μg	48	20.7*	1.65	29×10^3	6.9	35
<i>Sta. aureus</i>		15.7	1.37	37×10^3	6.8	10
None		13.2	1.31		6.8	2

¹⁾ EB=estradiol benzoate, * $P < 0.05$.

²⁾ Number of bacteria inoculated in mammary gland = 20×10^8 .

Table 3. Changes in lysozyme, glucosamine, milk pH and milk leukocyte counts of rat mammary gland after treatment with estradiol benzoate and *Streptococcus fecalis*

Treatment	Time after treatment hrs.	Mammary gland			pH of milk	Leukocyte count in milk $\times 10^4/\text{ml}$
		Lysozyme $\mu\text{g/g wet wt}$	Glucosamine mg/g wet wt	Total number of bacteria		
<i>Str. fecalis</i> ²⁾ + EB ¹⁾ 30 μg	5	15.2	1.55	14×10^3	7.4	20
<i>Str. fecalis</i>		16.2	1.35	17×10^3	7.2	10
None		12.2	1.08		6.8	1
<i>Str. fecalis</i> + EB 40 μg	8	23.2*	1.71	21×10^4	7.3	78
<i>Str. fecalis</i>		17.7	1.63	57×10^3	7.3	27
None		12.2	1.07		6.8	3
<i>Str. fecalis</i> + EB 60 μg	24	26.3*	1.98*	20×10^4	7.1	60
<i>Str. fecalis</i>		24.4*	1.74	22×10^5	7.0	15
None		13.2	1.26		6.8	4
<i>Str. fecalis</i> + EB 80 μg	48	24.7*	2.16	21×10^3	7.0	13
<i>Str. fecalis</i>		25.5*	2.07	12×10^4	7.1	7
None		15.9	1.60		6.8	3

¹⁾ EB=estradiol benzoate, * $P < 0.05$.

²⁾ Number of bacteria inoculated in mammary gland = 7×10^3 .

EB+ブドウ球菌接種群 (以下 EB+ブ菌群), EB+レンサ球菌接種群 (以下 EB+レ菌群) とともに時間の経過につれてリゾチームは増加し, 24 時間で最高を示し, グルコサミンも同様の傾向を示した。また, EB+ブ菌群は対照の菌接種のみ群に比しリゾチーム, グルコサミンが高かったが, EB+レ菌群は菌接種のみの群とほとんど差がなかった。乳汁 pH 及び白血球数は処置後それぞれ増加し, 異常値を示した。細菌数の変化には著しい動きはなかったが, ブ菌群は接種直後の 5 時間目にやや増加したのみで, 経時的変動はほとんどなかった。レ菌群は 24 時間目にやや増加の傾向を示したが, 両菌群とも EB 投与による差は認められなかった。

3. 乳房炎起因菌に対するリゾチームの抗菌作用

ウシ乳房炎起因菌に対するリゾチームの抗菌作用を *in vitro* の方法で検討した。その成績は図 1 のようで, *Streptococcus fecalis* を除いた他の菌はリゾチームの濃度に平行して菌の発育抑制率を高めた。しかし, *Streptococcus fecalis* のみはリゾチーム濃度差による一定の傾向を示さなかった。また各菌株別の比較では *Strep-*

tococcus bovis が最も発育抑制率高く, ついで *Staphylococcus aureus* (W) 株, 同じく (Y) 株, *Escherichia coli* の順であった。

考 察

リゾチームは生体内の各種体液及び組織に含まれ, 多彩な薬理作用を有することが知られている。乳汁についても MUTOVIN²⁾, SHAHANI ら³⁾及び TODOROV⁴⁾ の報告があり, MUTOVIN は健康牛の新鮮乳には多量のリゾチームが含まれ, 乳房炎牛及び老令牛の乳汁中には少ないとしている。SHAHANI らはその濃度は低く平均 $13 \mu\text{g/ml}$ であったとしているが, TODOROV は 356 例の常乳で $2 \sim 80 \mu\text{g/ml}$, 470 例の乳房炎乳で $30 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ であったとし, 報告にかなりの幅がみられる。本報ではラット乳腺内のリゾチーム濃度であるから, 牛乳中とは必ずしも比較はできないが, 無処置乳腺組織内のリゾチーム濃度はおおむね $12 \sim 13 \mu\text{g/g wet wt.}$ であった。なお, *in vitro* の試験ではおおむね同様濃度 ($5 \mu\text{g/ml}$ 以上) で抗菌性を示した。また, ラットの実験的乳腺炎ではリ

Fig. 1. Inhibitory action of lysozyme on bacterial growth.

ゾチームの消長は各試験群とも増加の傾向で 24 時間で最高を示したが、EB+菌接種群は EB のみあるいは菌のみ接種群よりも高値を示した。このことは、これらの薬物あるいは異物（細菌）投与による生体の初期防衛反応の現れと思われた。

リゾチームはブドウ球菌及びレンサ球菌の一部に対し、溶菌酵素として菌の発育を抑制する作用が強いとされている¹¹⁾が、本報に使用した菌株で *in vitro* (図 1 参照) においてリゾチームに感受性の強いブドウ球菌は、*in vivo* の試験 (表 2) でも菌の発育が悪く、経時的菌数の変動が認められなかったが、*Streptococcus fecalis* のようにリゾチームに耐性の強い株は *in vivo* の試験 (表 3) でも少量ながら菌数が増加した。これらの変化は乳腺組織内のリゾチームの菌株に対する感受性の差を示すものと考えられる。

リゾチームは粘膜、血管、結合織などの生体内組織の基質であるムコ多糖類代謝を改善し、各種の原因による組織の障害を防衛、かつ修復するといわれている¹²⁾が、本成績でもリゾチームとグルコサミンは EB 投与、菌接種群とも処置後 24 時間まではおおむね平行増加の傾向

を示した。

鶴見¹³⁾は方法のいかに問わず、刺激物が注射された場合炎症部位におけるヘキサミンは 24 時間以内に急激に増量し、そのレベルは正常時の 2～4 倍に達するという。そして修復過程がおこり、膠原線維が活発に形成されるようになるとそのレベルは次第に正常に復するという。しかし、本試験においては各実験群ともグルコサミン値に大きな変動は認められなかった。これは刺激物の強弱、炎症反応の強弱あるいはラット乳腺中グルコサミンの特質などが影響しているものと思われるので、今後検討する必要がある。

ラット、マウスによる実験の乳腺炎に関しては多くの報告¹⁴⁻¹⁶⁾があり、化学的、生理学的及び病理学的にその変化を追究している。HAWK ら¹⁷⁾は性周期による子宮内膜炎の発症機序から乳房炎における炎症機転にも性ホルモンが関与していることを示唆し、めん羊、ウサギを使って検討した。さらに飯塚ら^{8,9)}は泌乳ラットを使用し、EB 投与による乳腺の炎症性反応は一過性には 1 回 10 µg で十分としたが、反応を持続させるためには、さらに 2～5 時間間隔で連続投与する必要があることを示唆した。したがって、本試験においても乳腺の炎症性反応を維持させるため同様の手段を用いた。その結果、乳汁 pH 及び白血球数の変化から本試験においても乳腺の炎症性反応は維持されたものと考えられる。

要 約

乳房炎、アルコール不安定乳などの異常乳発生機序の基礎的研究の一つとして、estradiol monobenzoate あるいは菌接種によるラットの実験的乳腺炎におけるリゾチーム、グルコサミンなどの変動とウシ乳房炎起因菌のリゾチームに対する *in vitro* の抵抗性を検討し、次のような成績を得た。

1) 泌乳 14 日目のラットに EB 10 µg を 3～8 回皮下注射し、第 1 回注射後 5, 8, 24 及び 48 時間目の乳腺組織内成分の変動をみたところ、リゾチームは時間の経過とともに漸増し、24 時間で最高を示し、グルコサミンもおおむねこれに平行した。

2) 同様の実験で第 1 回の EB 注射後 2 時間目にブドウ球菌あるいはレンサ球菌を乳頭口から注入し、同様の経過時間で乳腺組織内成分の変動を観察した。EB+ブドウ球菌接種群、レンサ球菌接種群ともに時間の経過につれてリゾチーム、グルコサミンは増加し、24 時間で最高を示した。また対照の菌のみ接種群、前記の EB のみ投与群よりもやや高値を示した。

3) 6 株のウシ乳房炎起因菌の培養液 1 ml に 5.0~250 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で濃度を変えたリゾチムをそれぞれ添加し、一定感作後これらを培養して菌の発育状態を分光光度計で比濁した。*Escherichia coli* はリゾチムの濃度差によって、リゾチム無添加培養液に比し、6~30% の発育抑制を示し、同様に *Streptococcus bovis* は 16~62%, *Staphylococcus aureus* 黄色コロニー株は 8~46%, 同じく白色コロニー株は 23~57% の発育抑制を示したが、*Streptococcus fecalis* は一定の傾向を示さず、抑制率も 10~20% であった。

稿を終わるに当たって、リゾチム測定用の基質である *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 粉末菌体を提供下さったエーザイ株式会社に謝意を表します。

文 献

- 1) PODIO, G: 2nd Int. Symp. lysozyme, 1961.
- 2) MUTOVIN, V. I.: *Veterinaria* 40, 54, 1963.
- 3) SHAHANI, K. M., R. C. CHANDAN & R. M. PARRY: *Biochem. Biophys. Acta* 110, 389, 1965.
- 4) TODOROV, D: *Vet. Med. Nanki. Sof.* 9, 63, 1972.
- 5) 飯塚(三)・元井(霞)・笹本(修)・小笠(晃): *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.* 7, 112, 1967.
- 6) 飯塚(三)・元井(霞)・小笠(晃)・佐藤(静): 日獣学誌 29 (学会号), 132, 1967.
- 7) 飯塚(三)・元井(霞): 日獣学誌 32 (学会号), 195, 1970.
- 8) 日本公定書協会: 新医薬品とその試験法 薬事時報社 p. 51, 1973.
- 9) BOAS, N. F.: *J. Biol. Chem.* 204, 553, 1953.
- 10) PRESCOTT, S. C. & R. S. BREED: *J. Inf. Dis.* 7, 632, 1910.
- 11) FLEMING, A.: *Proc. Roy. Soc. B* 93, 306, 1922.
- 12) BOLLET, A. J., J. F. GOODWIN & D. V. ANDERSON: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 99, 418, 1958.
- 13) 鶴見(膠): 代謝 2, 721, 1965.
- 14) MILLER, C. E.: *Mich. Agr. Exp. Sta. Res. Rep.* (121), 1970.
- 15) CHANDLER, R. L.: *J. Med. Microbiol.* 3, 273, 1970.
- 16) CHANDLER, R. L.: *Brit. J. Exp. Path.* 51, 639, 1970.
- 17) HAWK, H. W., H. F. RIGHTER & T. H. BRINSFIELD: *Amer. J. Vet. Res.* 24, 428, 1963.

Summary

A study on the mechanism of abnormal milk secretion, which is one of the inflammatory response of the mammary gland, was conducted by administering estradiol monobenzoate (EB) or bacteria to lactating rats.

In the first experiment, lysozyme and glucosamine in the mammary gland, and pH and leukocyte count in the milk were determined at intervals 5, 8, 24 and 48 hours after EB administration. The concentration of lysozyme and glucosamine in the mammary gland increased gradually with the lapse of time. The highest levels of leukocyte count and pH of milk were found at 8 hours after the first injection of EB.

In the second experiment, chemical components in the mammary gland as same in the first experiment were determined at intervals of 5, 8, 24 and 48 hours after administering EB+*Staphylococcus aureus* or EB+*Streptococcus fecalis*. Lysozyme and glucosamine in the mammary gland of two groups administered EB+bacteria increased gradually with the lapse of time.

In the third experiment, the inhibitory action of lysozyme on bacterial growth was examined with *Escherichia coli*, two strains of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus bovis* and *Streptococcus fecalis* isolated from field materials of bovine mastitis. That is, 1 ml of bacterial suspension incubated in broth for 24 hours and 1 ml of 5 to 250 $\mu\text{g/ml}$ of lysozyme were mixed, and reacted at 37°C for 1 hour. They were incubated with heart infusion broth for 24 hours and numbers of grown bacteria were shown by turbidity in broth medium. Turbidity measurements were read as optical density at 660 m μ with spectrophotometer.

The rate of growth inhibitory action of the lysozyme on each bacteria was 6 to 30% to *Escherichia coli*, 16 to 62% to *Streptococcus bovis*, 8 to 46% to *Staphylococcus aureus* (yellow colony) and 23 to 57% to *Staphylococcus aureus* (white colony) and *Streptococcus fecalis* was a low rate of 10 to 20% and no difference was found along the concentration of lysozyme.