東京農総研研報 11：19-24，2016

（短報）

乳房炎牛および健康牛における乳房内細菌叢の比較

森本直樹*

東京都農林総合研究センター

摘　要

乳房炎牛と健康牛との乳房内生乳の生菌数と菌叢とを比較した。生菌数は，乳房炎乳が 5.07±1.14 log cfu/mL,健康乳は 3.86±0.81 log cfu/mL であり，有意差は認められなかった。Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)により，乳房炎乳と健康乳から分離した細菌は，*Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidemidis, Escherichia coli, Klebsiella pneumonia, Streptococcus agalactiae, Streptococcus disgalactiae, Corynebacterium bovis, Enterobacter sp., Pseudomonas sp., Serratia sp., Proteus sp.*で,すべて乳房炎の原因菌であった。*S.aureus* は，乳房炎乳の 81%,健康乳の 44%から分離された。この結果は，*S.aureus* が乳房内に存在した場合，乳房炎を発症しやすくなることを示唆する。泌乳期の乳房内は無菌ではなく，乳房炎の原因菌が菌叢を形成する。

キーワード：牛乳房炎，細菌叢，黄色ブドウ球菌，DGGE
東京都農林総合研究センター研究報告 11: 19-24, 2016
2015 年 9 月 25 日受付，2015 年 11 月 9 日受理

緒　言

牛乳房炎は，酪農経営において大きな経済被害をもたらす重要な疾患である。乳房炎の約 90%は細菌が原因であり，原因細菌が乳頭口から乳房内へ侵入・増殖することで引き起こされる。原因細菌の種類と牛の生体防御能との関係により，様々な症状と経過をたどり，廃用となる場合も多い。一般的な乳房炎対策は，乳頭口から細菌が侵入しやすくなるような搾乳作業や飼養管理をしない，飼養環境中の原因菌を少なくする，牛の免疫機能を弱めない飼養管理を行うなどである。効果は認められてはいるものの，乳房炎の根絶には至らず，依然として乳房炎発症件数は減少していない。これらの方法は，乳房内は無菌もしくは原因菌が存在しないのを前提とした対策である。一方で、越智ら(1958)は，健常な乳牛の乳房内には細菌が存在しフローラを形成する，Branka et al.(1967)は，生乳中には数千個/mL の細菌が存在し産次を重ねるごとに増加する，報告をしているが半世紀前の文献である。比較的新しい報告では，中野(1998）が健常な泌乳牛の乳房内には数百個/mL の細菌が存在すると述べるが，根拠となる具体的データは示されていない。

すなわち，健康な牛乳房内は無菌であるという十分な科学的根拠がないにもかかわらず，乳房内は無菌であることが前提の防除対策が実施され続けているのである。乳房内に細菌が常在した場合，乳房炎の発症と全く関係がないとは考え難い。その場合，乳房炎の防除対策は，原因細菌が新たに乳房内に侵入し発症する場合だけではなく，乳房内に存在する細菌によって発症する場合も考慮し，再検討する必要がある。そこで，乳房炎牛と健康牛との乳房内における細菌の存在確認および菌叢解析の比較をおこなった。

*著者連絡先　Email　n-morimoto@tdfaff.com

材料および方法

1. 生乳の採取

生乳は同一農場で飼養する泌乳期のホルスタインから採取した。採取方法は，臨床上健康な乳房の場合，乳頭口からカテーテル（外径 2mm 内径 1mm 長さ 80mm：シリコン製）を乳槽内に挿入後，シリンジで生乳を吸引した。臨床上乳房炎の乳房（乳房炎と判断し治療等を実施した乳房）の場合，前絞りの後，乳頭周辺を消毒し手絞りにより採取した。採取数は，健康牛 16 頭および乳房炎牛 13 頭からの 116 分房分とした。

2. 生乳の分析

(1) 体細胞数の測定

生乳中の体細胞はブリード法で測定した。

(2) 培養法による菌数測定

生乳を滅菌生理食塩水で希釈し，5%馬脱繊維血液加ブレインハートインフュージョン寒天培地（日水製薬）に塗布した。37℃・48 時間培養後，出現したコロニー数を測定した。

(3) DGGE による菌叢解析

生乳を 10 倍量の 5%馬血液加ブレインハートインフュージョンブイヨンに添加し，37℃・24 時間，振盪培養した。培養液を遠心分離（5000rpm・15min）後，沈渣物を Beads Beat 法(ニッポンジーン：ISOFECAL for Beads Beating)により DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型とし，以下の条件で PCR 反応に供した。PCR の反応条件は，（94℃-120 秒→(94℃-15 秒，50℃-30 秒，68℃-30 秒)×30)，プライマーは 16SrRNA の V6～V8 領域増幅用(f:5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGAACGCGAACCTTACA-3'，r:5-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3')を用いた。PCR 反応後の溶液を精製し，DGGE に供した。DGGE は，DCode システム（BioRad）を用い，ゲル濃度 8%，変性濃度勾配 30%-70%，58℃・50V・18 時間の条件で泳動した。ゲルを染色（SYBR Green I ）し，出現したバンドを観察した。ゲル観察時に菌種の特定を容易にするため，マーカーを作成し検体と同様に DGGE に供した。マーカーの作成は以下の方法で行った。乳房炎の原因菌（*S.aureus*, *S.epidemidis*, *E. coli*, *K. pneumonia*, *S. agalactiae*, *S. disgalactiae*, *C. bovis*）のゲノム DND を抽出し，検体と同じ条件で PCR 反応を行い，反応後の溶液を精製した。DGGE ゲルの画像を観察した際，検体のバンドがマーカーのバンドと同位置に検出された場合には同一菌種と判定した。全てのマーカーと異なる位置にバンドが出現した場合は，ゲルからバンドを切り取り,DNA 抽出後，16SrRNA の V6～V8 領域の塩基配列をシークエンスし，菌種を同定した。

結果および考察

1. 体細胞数の比較

体細胞の大部分は，乳房内の免疫機能を担う好中球やリンパ球などで，健康な乳房内においても数万個/mL 程度が存在する。一般に，体細胞数 30 万個/mL 以上が乳房炎と定義され,採取した 116 検体のうち体細胞数上の乳房炎に該当したのは 21 検体であった。臨床上乳房炎症状を示した 13 分房からは 10 検体，臨床上健康な 103 分房からは 11 検体で，臨床症状上の乳房炎と体細胞数上の乳房炎とは必ずしも一致しなかった。

2. 生菌数の比較

生乳中の生菌数は，体細胞数 30 万個/mL 以上の乳房炎乳 5.07±1.14 log cfu/mL に対し，体細胞数 30 万個/mL 未満の健康乳は 3.86±0.81 log cfu/mL であった（表 1）。有意差は認められないが，乳房炎乳は健康乳に比べ生菌数の平均値が 10 倍以上ある。採取した 116 検体の中で，生菌数が検出限界（10 個/mL）以下の生乳が 1 検体あったが，ほぼすべての生乳から生菌が検出された。以上から，泌乳期の乳房内には，乳房炎症状の有無および体細胞数に関係なく，生きた細菌が存在することが判明した。

表 1　乳牛の乳房内から採取した生乳中の生菌数と菌種数

	生菌数（log cfu/ml）	菌種数[c)]（種/検体）
健康乳[a)]　(n=95)	3.86　± 0.81 [d)]	3.3　± 1.3
乳房炎乳[b)]（n=21)	5.07　± 1.14	3.1　± 1.2

a)体細胞数30万個/mL未満の生乳
b)体細胞数30万個/mL以上の生乳
c)DGGEゲルを染色後検出したバンド数
d)平均±標準偏差

牛の乳頭口と乳腺房は乳頭管でつながり，乳腺房の入り口はロゼッテと呼ばれる襞状の弁がある。この弁は細菌が乳房内へ侵入するのを物理的に防ぐが，搾乳時はこの弁が開口し，細菌侵入リスクが高くなる。乳房炎防除対策において搾乳作業管理が最も重要視されているのは，牛乳房の本構造に基づく。一方，自然環境下では仔牛が断続的に乳頭を吸引し続けるため，人為的搾乳と比べ細菌の侵入リスクは高い。仔牛の哺乳行動による乳房内への細菌侵入を完全に防ぐことは困難であり，乳房内の免疫システムは細菌の侵入を前提として機能していると考えられる。

3. 細菌叢の比較

DGGE 法によって生乳中から分離した菌種数は，乳房炎乳 3.1±1.2 種/検体に対し，健康乳 3.3±1.3 種/検体であり，有意差は認められない（表 1）。分離した菌種は,*S.aureus, S.epidemidis, E.coli, K.pneumonia, S.agalactiae, S.disgalactiae, C.bovis, Enterobacter sp., Pseu-domonas sp. ,Serratia sp., Proteus sp.*であった。それらの菌種は，乳房炎症状の有無に関係なく，乳房炎乳および健康乳の両方から分離され，全てが乳房炎の原因となり得る菌種であった（図 1）。

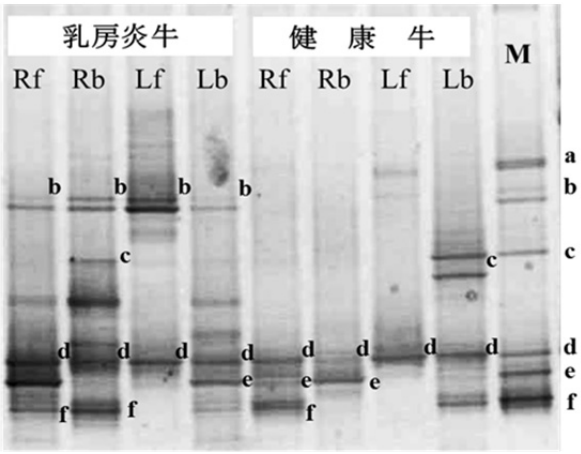

図１　DGGE 法による乳房炎牛と健康牛との乳房内細菌叢の比較

※**Rf**:右前乳房, **Rb**:右後乳房, **Lf**:左前乳房, **Lb**:左後乳房
※Lane M : marker
a:*S.epidemidis*, **b**:*S.aureus*, **c**:*K.pneumoniae*, **d**:*Streptococcus spp*., **e**:*E.coli*, **f**:*C.bovis*

分離した菌種を乳房炎乳と健康乳とで比較した。*S.aureus* は，乳房炎乳の 81%から分離されたのに対し，健康乳の 44%から分離された（図 2）。この結果は，*S.aureus* が乳房内に存在すると体細胞数が高くなる，すなわち乳房炎を発症しやすくなることを示唆している。細菌は種によって異なる抗原をもつ。牛生体にとって強い抗原性をもつ菌種が乳房内に存在した場合，免疫系の反応がより大きくなる。*S.aureus* は，耐熱性菌体内毒素を産生することから，乳房内の免疫系を強く刺激する抗原を有すると考えられる。

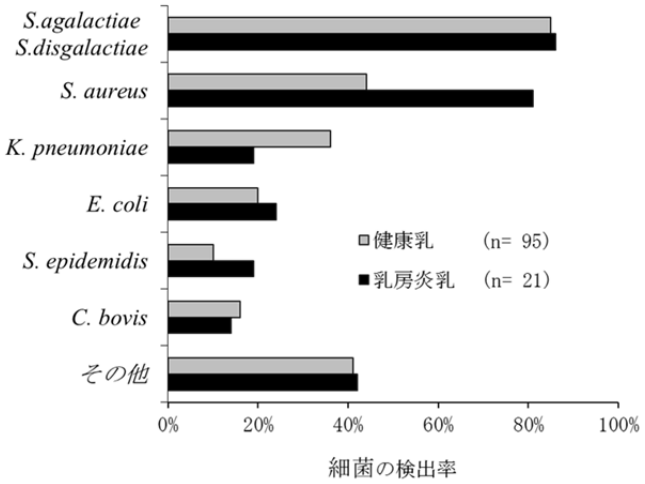

図２　乳房炎乳と健康乳から分離した細菌の菌種別検出率の比較

日本では，乳房炎の 6～7 割は *S.aureus* が原因であると言われる（菊,2010）。*S.aureus* が乳房内に感染すると，乳房内に微小膿瘍を形成し，有効な抗生物質を投与しても乳房内から完全に排除することが難しい。また，他個体・他乳房への感染拡大を起こしやすく，乳房炎原因菌の中で最も注視が必要な菌とされている。農場内において *S.aureus* の伝播を防止するには，乳房内の細菌をモニタリングすることで保菌牛・保菌乳房を特定し，その情報を飼養管理に生かすことが必要となる（三好,2013）。

乳房炎の発症を防ぐには，乳房内に原因菌が感染することを防止するだけでは不十分である。乳房内への菌の侵入と定着を前提とし，生体にとって抗原性の高い細菌を侵入・定着させないことと，乳房の免疫系を過剰に活性化させず乳房内の細菌活動を抑制することが必要となる。

乳房炎について論じるには，乳房炎の定義を明確にする必要がある。牛乳房は正常な泌乳活動を維持するため，乳腺上皮細胞から分泌される抗菌性物質と免疫細胞である体細胞とが，乳房内に侵入した細菌などの異物を排除している(山口,2010)。よって，体細胞数と生菌数および両者の比率が乳房炎の程度を知る指標となりうるが，健常値の範囲は個体差や乳房差も大きく，特定の値によって乳房炎か否かを判別することは難しい。しかし，泌乳期の乳房内が，生きた細菌と免疫機能とがせめぎ合う動的平衡状態にあるとすれば，泌乳期の乳牛は,程度の差はあるとしても全て乳房炎であると言うこともできる。

引用文献

越智勇一.勝部泰次(1958).日本獣医学雑誌,20:39-43
越智勇一.勝部泰次(1958).日本獣医学雑誌,20:83-86

Branka,B.(1967) Distribution of bacteria in milk drewn directly from the cows udder. J.Dairy science.51:47-49.
中野覚(1997)生乳の広域流通と乳質. Dairy japan,10:127-140.
菊佳男(2010).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.(2):63-74.
三好志郎(2013).臨床獣医.31.(5):10-16.
山口高弘(2010):ウシの免疫機能と乳腺免疫.日本家畜臨床感染症研究会誌.5.(3):109-113

Comparing the bacterial flora in the udder of mastitis cows and healthy cows.

naoki morimoto*

Tokyo Metropolitan Agriculture and Forestry Research Center

Abstract

Comparing the bacterial flora in the udder of mastitis cows and healthy cows. Number of live bacteria, mastitis milk 5.07±1.14 log cfu/mL,healthy milk is 3.86±0.81 log cfu/mL, nosignificant difference was observed. Bacterial species were separated by DGGE is, *S.aureus,S.epidemidis, E.coli, K.pneumonia, S.agalactiae, S.disgalactiae, C.bovis, Enterobacter sp., Pseudomonas sp., Serratia sp. and Proteus sp.. S.aureus* was isolated from 44% of healthy milk, it was isolated from 81% of mastitis milk. From this result, when the *S.aureus* is present in the milk tank, suggesting that it easily exhibits mastitis symptoms. Milk tank of lactation is not a sterile, it was found that there is a cause bacteria of mastitis.

Keywords: cow mastitis, bacterial flora, Staphylococcus aureus, DGGE

Bulletin of Tokyo Metropolitan Agriculture and Forestry Research Center, 11: 19-24, 2016

*Corresponding author:n-morimoto@tdfaff.com