

乳房炎罹患牛の早期発見のための乳汁を用いた 化学発光能の測定と活用方法の検討

山木康嗣 布野秀忠 来間正展 村尾克之¹⁾

要約 乳汁化学発光（CL）能を活用して乳房炎牛を早期発見するため、2つの試験を実施した。試験1では当センターでホルスタイン種牛の個体乳806検体および分房乳283検体供試し、乳汁CL能測定時間の短縮について検討を行った。乳汁CL能測定時間を5、10、15、20分間とし、各測定時間における乳汁CL能と体細胞数の関係について回帰分析した結果、相関測定時間を5分とした場合においても、20分間とした場合と同様に高い相関が認められた（相関係数0.92、 $p < 0.001$ ）。測定時間5分における回帰式 $Y = 1.1452X - 2.3236$ （ Y ：乳汁CL能（log）、 X ：体細胞数（log））をもとにより、乳汁CL能を指標とした乳房炎診断基準を作成し、2戸の農場で繋養中のホルスタイン種牛43頭を用いて、診断基準の有効性について調査した。CL能測定値を指標とした判定によって、2農場43頭のうち6頭（14.0%）が乳房炎牛と診断された。CMT変法検査で乳房炎として摘発された牛は2頭（4.7%）であり、それらはCL能による判定でも乳房炎と診断された。検査牛のうち、CL能による判定で正常とされた牛は32頭（74.4%）であった。これら正常と診断された牛の中で、体細胞数の判定で乳房炎と診断された牛は存在しなかったが、疑乳房炎と診断された牛は6頭存在した。CL能測定に要した時間は、1農場あたり1時間程度であった。試験2では当センターの平成19年6月中の14日間（Day1-Day14）のバルク乳（平均バルク乳量423.0kg）を供試し、バルク乳CL能と牛群中の乳房炎罹患状況との関連性を調査した。調査期間内にバルク乳CL能上昇したのは3回であり、いずれの日も牛群中に乳房炎罹患と診断される個体が存在した。バルク乳CL能上昇時のDay3およびDay9のバルク乳CL能の前日からの変動は3.67および2.51倍であった。バルク乳体細胞数の変動は前日の1.15および1.50倍でありバルク乳CL能の変動に比べ小さなものであった。

以上のことから、乳汁CL能測定時間は5分間に短縮できること、バルク乳CL能をモニタリングすることにより、乳房炎罹患牛の存在を推測できることから、これらを組み合わせることにより効率的かつ早期に乳房炎罹患牛を摘発できると推察された。

キーワード：乳用牛 化学発光 体細胞数 乳房炎 バルク乳

近年の遺伝的改良によって、乳用牛、特にホルスタイン種の泌乳量は飛躍的に向上し、牛群検定成績によれば過去15年間で約1,400kg（305日乳量）もの増加となっている。同時に、生産病としての乳房炎が大きな問題として顕在化した。乳房炎は乳用牛疾病の20から25%を占めるほど多発し¹⁾、乳牛1頭当たり年間5万円の損失と試算²⁾され、経済的損失は甚大である。乳房炎の予防対策については、搾乳技術の改善、搾乳機器の点検、飼養環境の改善などの対策が考えられ、実践されている。その一方で、牛群内で罹患牛を早期に発見し、慢性化させないための現場で利用可能な方策は少ない。現在、日常的に用いられている乳房炎の検査方法としてCalifornia乳房炎試験（CMT変法）、体細胞数法、電気伝導率法（EC法）等³⁾が用いられているが、CMT変法やEC法は感染初期の検出が困難であり、体細胞数法は比

較的早期の乳房炎を検出可能であるが測定機器が大型かつ高価格であり現場での検査には不向きである。

好中球などの貪食細胞は体内進入した異物を貪食するが、その際に放出される微量な光、すなわち化学発光（Chemiluminescence：CL）はその定量が可能となっており、近年CL測定値（CL能）を利用した乳房炎診断に関する研究が進められている^{4,5)}。しかしながら、乳汁中CL能の測定は、1検体当たりの測定時間が長く⁶⁾、牛群全頭の測定には数時間を要し、牛群から効率的に乳房炎牛を摘発するには多くの労力を要する。

そこで、本研究では乳汁中CL能を活用し乳房炎牛を効率的に摘発するため、試験1として乳汁中CL能測定時間短縮化による乳房炎簡易診断について検討し、試験2としてバルク乳CL能測定による牛群中での乳房炎早期発見について検討した。

材料および方法

試験 1

本試験では、まず、乳汁CL能測定値に及ぼす測定時間の影響を調べた。供試サンプルは、当センターで繋養の27頭のホルスタイン種牛から平成18年4月から平成19年11月の期間中に搾乳した個体乳806検体および分房乳283検体とし、乳汁CL能および体細胞数を測定した。乳汁CL能の測定は高橋ら⁶⁾の方法に準拠して行った。乳汁サンプル50 μ lに5mM-HepesEagle's-MEMを450 μ lおよびルミノール液10 μ lを添加して37 $^{\circ}$ Cで3分間静置し、オプソニン化ゼイモザン10 μ lを加えて攪拌後、化学発光測定装置Tetralight (Tokken Inc) を用いて37 $^{\circ}$ Cで発光量(Relative Light Unit: RLU)を測定した。CL能測定時間は5、10、15および20分の4区分を設定した。体細胞数の測定は、社団法人島根県畜産振興協会生乳検査所に依頼した。測定値の解析は、各サンプルの乳汁CL能および体細胞数それぞれの測定値を常用対数に変換した後、回帰分析を行った。目的変数は乳汁CL能、説明変数は体細胞数として、両者の関係を解析し、Bloweyら⁷⁾の体細胞数による乳房炎診断基準を当てはめて、乳汁CL能による乳房炎判定基準を作成した。

さらに、農場レベルでの乳房炎判定への利用性を調べた。供試サンプルは2戸の農場で繋養中のホルスタイン種牛の個体乳(n=43)とし、CMT変法検査、CL能および体細胞数を測定し、有効性を比較した。CMT変法検査はP.Lテスター(日本全薬工業(株))を用いて行った。

試験 2

本試験では、バルク乳サンプルのCL能と牛群中の乳房炎罹患状況との関連性を調べた。

調査期間は19年6月中の14日間(Day1-Day14)とし、供試サンプルは、当センター繋養の15頭のホルスタイン種牛由来の個体乳および1日分をプールしたバルク乳を用いた。供試牛の産次別の頭数内訳は、1産が4頭、2産が5頭、3産以上が6頭であった。バルク乳サンプルは前日の夕方搾乳分と当日朝の搾乳分がプールされたバルクタンクから8:30に十分な攪拌を行った後に採取し、バルク乳CL能上昇時には同日夕方搾乳時(16:00)に個体別サンプルの採取を行った。採取サンプルのCL能、体細胞数及びCMT変法検査は試験1と同様な方法で行ったが、バルク乳CL能の測定時間は20分とし、多検体処理が必要な個体乳CL能の測定時間は5分とした。

このほか、搾乳時における乳汁中凝固物の発生状況、乳房の外貌所見などを観察した。

結 果

試験 1

対数化した乳汁CL能および体細胞数との回帰分析結果は、表1に示したとおりで、全ての測定時間区分において、有意な相関(p<0.001)が認められた。測定時間が20分の時の相関係数は0.95であり、他の区分と比べて最も高かった。また、測定時間5分の場合でも相関係数は0.92であり、高い相関が認められ、最も短い測定時間となる5分での回帰式を作成した(図1)。

$$Y=1.1452X-2.3236$$

ただし、Yは乳汁中CL能(log)、

Xは体細胞数(log)

さらに、この回帰式から、CL能を指標とした乳房炎診断基準値を算出した(表2)。

今回算出したCL能を指標とした乳房炎診断基準値を用い、実際に農場で乳房炎判定を行った結果は表3に示した。CL能測定値を指標とした判定によって、2農場43頭のうち6頭(14.0%)が乳房炎牛と診断され、これらの牛のCL能は11,000RLU以上で、体細胞数は300,000個/ml以上のレベルであった。CMT変法検査で乳房炎として摘発された牛は2頭(4.7%)であり、それらはCL能による判定でも乳

表1 測定時間別の乳汁CL能と体細胞数の回帰分析

項目	測定時間				
	5 min	10min	15min	20min	
データ数	1,089	1,089	1,089	1,089	
回帰係数	傾き	1.145	1.226	1.255	1.263
	切片	-2.324	-2.585	-2.676	-2.708
決定係数R ²	0.85	0.88	0.89	0.90	
相関係数	0.92	0.94	0.94	0.95	
P値	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

表2 乳汁CL能による乳房炎診断基準値

体細胞数 (個/ml)	乳汁CL能 (RLU)	判定区分 ¹⁾
150,000未満	4,000未満	正常
150,000~400,000	4,000~10,000	疑乳房炎
400,000以上	10,000以上	乳房炎

1) Bloweyら体細胞数に基づく区分

正常:非感染,疑乳房炎:感染が疑われる,乳房炎:感染が存在する。

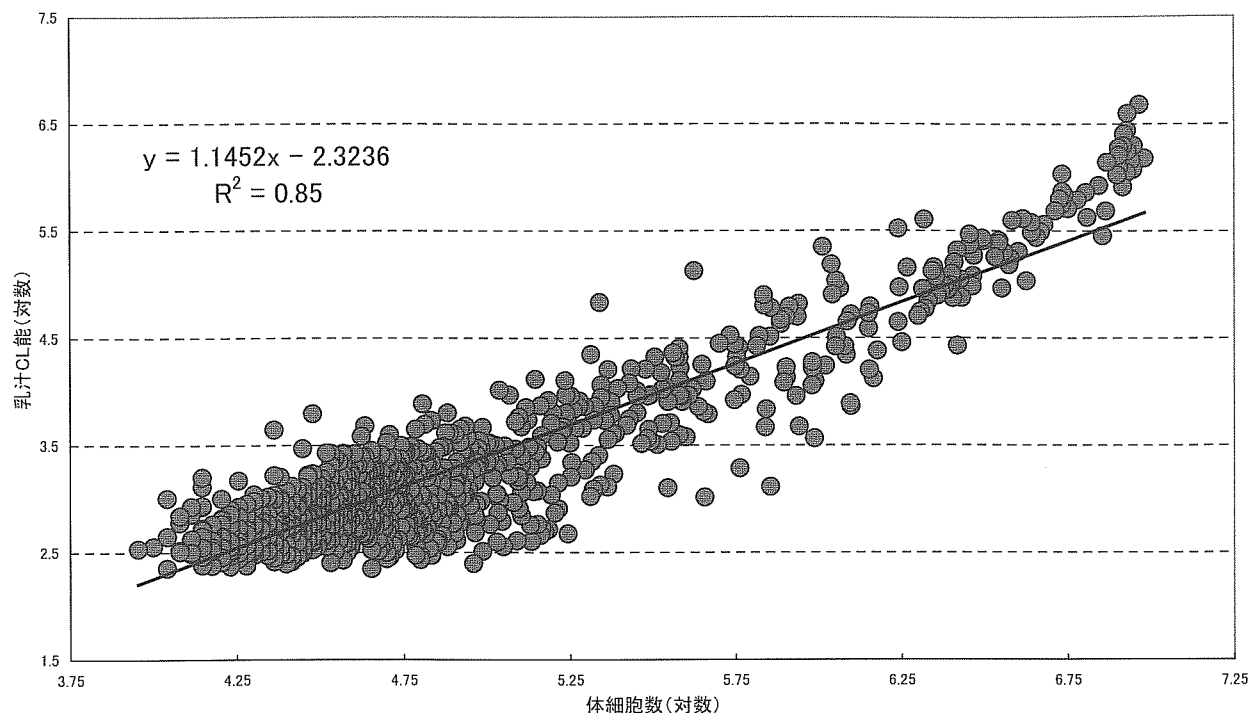


図1 測定時間を5分に設定したときの乳汁CL能と体細胞数の関係

表3 農場における体細胞数およびCL能による乳房炎判定成績 (n=43)

体細胞数		CL能		
判定 ¹⁾²⁾	例数	判定 ¹⁾³⁾		
		n	sm	m
n	26	26	0	0
sm	11	6	4	1
m	6(2)	0	1	5(2)
合計	43	32	5	6

1) 正常(n) 疑乳房炎(sm) 乳房炎(m)

2) Bloweyら(1999)の体細胞数による判定. nは150,000未満, smは150,000以上400,000未満, mは400,000以上

3) 推定式 $Y=1.1452X-2.3236$ から算出したCL能による判定. nは4,000未満, smは4,000以上10,000未満, mは10,000以上

4) ()内はCMT変法スコア「+」以上の個体.

房炎と診断された。また、全ての検査牛のうち、CL能による判定で正常とされた牛は32頭(74.4%)であったが、これら正常と診断された牛の中で、Bloweyらの体細胞数による判定で疑乳房炎と診断された牛は6頭存在した。それら6頭の疑乳房炎牛の体細胞数は160,000から200,000個/ml、CL能は1,200~3,600RLUの範囲内であった。一方、CL能についてすべてのサンプル測定に要した時間は、1農場あたり1時間程度であった。

試験2

供試牛の平均分娩後日数は 201.5 ± 124.4 日 (mean \pm S.D)、試験期間中の平均バルク乳量は 423.0 ± 32.2 kg (mean \pm S.D)であった。試験期間中のバル

ク乳CL能および体細胞数の推移は図2のとおりであった。バルク乳CL能が10,000RLU以上に上昇したのはDay3、Day9およびDay10でありそれぞれ10,600、11,600および19,400RLUであった。この時の個別検査成績および乳房炎判定結果は、表4に示した。乳房炎の判定には試験1で作成した乳汁CL能による乳房炎診断基準値を用いた。Day3では乳房炎1頭、疑乳房炎3頭、Day9では乳房炎1頭、疑乳房炎1頭、Day10では乳房炎1頭、疑乳房炎1頭と判定され、バルク乳CL能上昇時には、いずれも牛群中に乳房炎罹患と診断される個体が存在した。No.89号牛はDay3に左後分房に熱感、乳汁凝固物が認められ、No.78号牛はDay9では臨床症状は呈さなかったが、Day10では右前分房に乳汁凝固物を認め

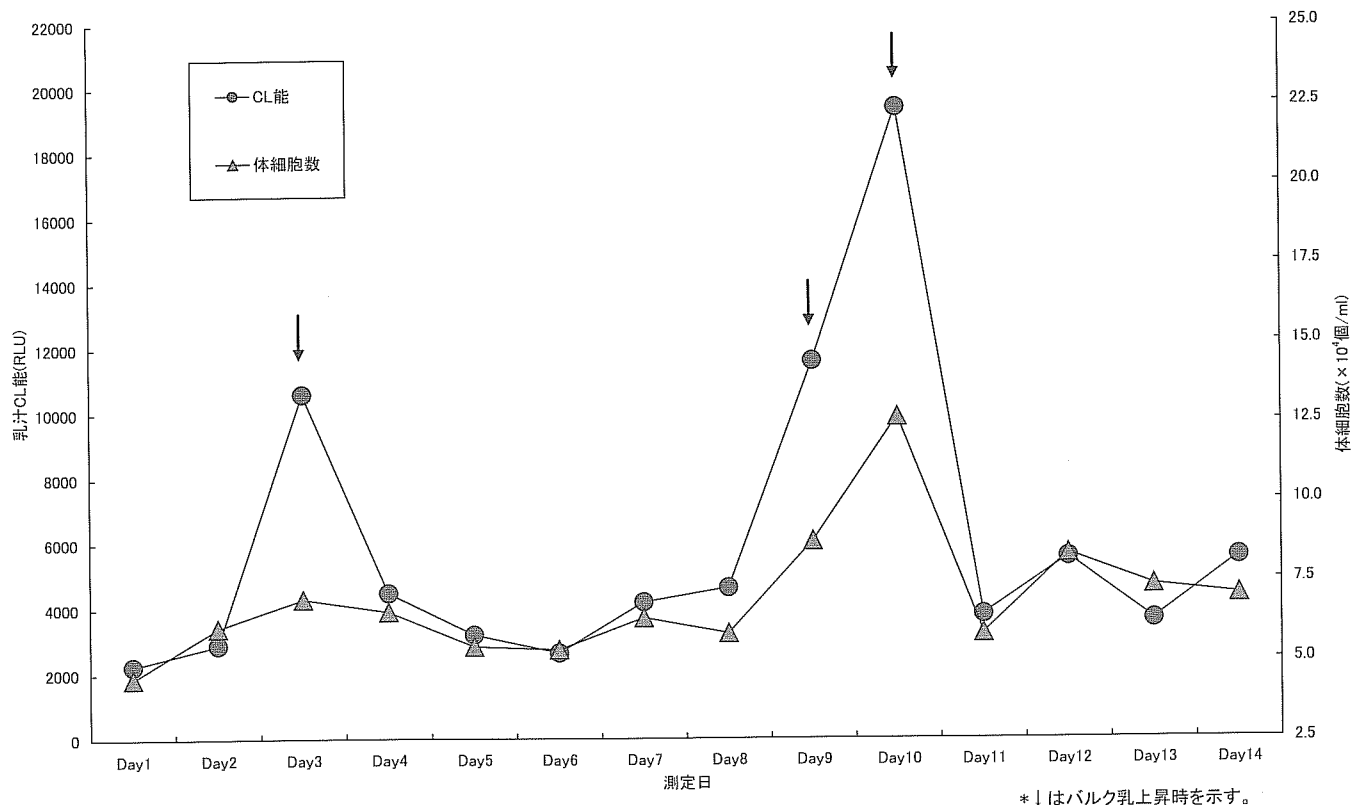


図2 バルク乳CL能と体細胞数の推移

表4 バルク乳CL能上昇時における個体乳検査結果及び乳房炎判定成績

Day3 (バルク乳CL能：10,600)						Day9 (バルク乳CL能：11,600)						Day10 (バルク乳CL能：19,400)					
個体No	CL能(RLU)	体細胞数(×10 ⁴ 個/ml)	CMT変法スコア	乳汁中凝固物	判定 ¹⁾	個体No	CL能(RLU)	体細胞数(×10 ⁴ 個/ml)	CMT変法スコア	乳汁中凝固物	判定 ¹⁾	個体No	CL能(RLU)	体細胞数(×10 ⁴ 個/ml)	CMT変法スコア	乳汁中凝固物	判定 ¹⁾
51	5,450	21.0	-	無	sm	51	3,230	18.0	-	無	n	51	3,760	14.2	-	無	n
64	733	5.1	-	無	n	64	556	3.3	-	無	n	64	740	6.4	-	無	n
77	6,040	23.6	-	無	sm	77	965	7.7	-	無	n	77	9,030	38.6	-	無	sm
84	1,120	5.7	-	無	n	78	24,000	95.8	+	無	m	78	59,400	174.0	++	有	m
85	387	3.3	-	無	n	84	820	7.1	-	無	n	84	970	5.6	-	無	n
89	273,000	350.7	+++	有	m	85	378	2.3	-	無	n	85	479	3.6	-	無	n
93	389	4.9	-	無	n	93	692	3.8	-	無	n	93	508	3.6	-	無	n
97	892	6.5	-	無	n	97	5,800	17.4	-	無	sm	97	1,130	5.7	-	無	n
102	1,020	4.2	-	無	n	99	310	1.8	-	無	n	99	293	2.3	-	無	n
104	5,400	22.7	-	無	sm	102	385	3.9	-	無	n	102	570	3.5	-	無	n
105	744	6.1	-	無	n	104	2,990	21.7	-	無	n	104	2,450	20.7	-	無	n
108	585	3.8	-	無	n	105	806	5.5	-	無	n	105	958	5.8	-	無	n
110	649	3.7	-	無	n	108	462	2.9	-	無	n	108	350	2.4	-	無	n
						110	494	4.2	-	無	n	110	560	4.6	-	無	n

1) 推定式 $Y=1.1452X-2.3236$ から算出したCL能による判定. 正常(n)は4,000未満, 疑乳房炎(sm)は4,000以上10,000未満, 乳房炎(m)は10,000以上

た。No.89号牛はDay3に、No.78号牛はDay10に抗生物質による治療を実施したため、出荷停止とした。そのためDay4およびDay11にはバルク乳CL能が低下した。Day3の前日からのバルク乳体細胞数の変動は前日の1.15倍であったが、バルク乳CL能の変動は3.67倍であった。Day9の前日からのバルク乳体細胞数の変動は前日の1.50倍であったが、バルク乳CL能の変動は前日の2.51倍であった。

考 察

乳汁CL能測定法を農場で活用するためには、多くのサンプルを短時間で測定する必要があることから、試験1で乳汁CL能測定時間の短縮化について検討した。乳汁CL能測定時間を5、10、15、20分間とし、各測定時間における乳汁CL能と体細胞数の関係について回帰分析した結果、相関測定時間を5分とした場合においても、20分間とした場合と同様に相関係数0.92と高い相関が認められた ($p < 0.001$)。このことから、測定時間を5分とした場合においても実用上十分な検査が可能であると考えられた。

乳房炎判定指標として、体細胞数は重要な指標として利用されており、健康な分房の基準は体細胞数が200,000個/ml以下、300,000個/ml以上では細菌感染が疑われ、体細胞数500,000個/ml以上であればその分房に異常があるとの報告⁸⁻¹⁰⁾が多い。しかしながら、対象のサンプルが分房乳ではなく個体乳となると健康で体細胞数が少ない他の分房乳で薄められる場合が多く、Bloweyら⁷⁾は個体乳における体細胞数による乳房炎判定指標として150,000個/ml以下では非感染、150,000~400,000個/mlでは感染が疑われ、400,000個/ml以上では感染が存在すると報告しており、本試験ではこのBloweyらによる判定指標に準拠して、測定時間5分における回帰式 $Y = 1.1452X - 2.3236$ (Y : 乳汁中CL能 (log)、 X : 体細胞数 (log)) により体細胞数を換算して、乳汁CL能を指標とした乳房炎診断基準値を作成した。

この乳汁CL能を指標とした乳房炎診断基準値を用い、実際に農場で乳房炎判定を行った結果、CL能測定による判定によって、2農場43頭のうち6頭(14.0%)が乳房炎牛と診断されたが、CMT変法検査で乳房炎として摘発された牛は2頭(4.7%)であり、CL能測定ではCMT変法検査に比べて4頭多く乳房炎牛を摘発することができ、CL能による乳房炎の発見率はCMT変法よりも高いものと考えられた。またCL能による判定で正常とされた牛は32頭(74.4%)であったが、これらの中で体細胞数の

判定で疑乳房炎と診断された牛は6頭存在した。体細胞数測定では形態的に一括して細胞数を計測するため、乳房炎と直接関係ない細胞まで測定されてしまう。これに対して、CL能測定は病原細菌を殺処理するために機能亢進された貪食細胞の殺菌能を測定するので、乳房炎に直接関与している細胞の機能を検査することができると高橋ら¹¹⁾は報告しており、このためCL能と体細胞数による判定は必ずしも一致しなかったと考えられるが、CMT変法検査で乳房炎として摘発された牛はCL能による判定でも乳房炎と診断されたこと、また、CL能による判定で正常とされた牛の中で、体細胞数による判定で乳房炎と診断された牛は存在しなかったことから、今回作成した乳汁CL能を指標とした乳房炎診断基準値は農場レベルで十分に活用できるものと考えられた。また、CL能測定に要した時間は2戸とも1時間程度であったことから、搾乳作業終了時に結果を酪農家に告知することが可能である。体細胞数検査を生乳検査機関に依頼した場合に比べ、乳汁CL能測定法は結果を得るまでの時間が短縮化され、乳房炎罹患牛の早期発見、早期治療につながるものと推察された。

牛群からの乳房炎罹患牛を摘発するために搾乳牛全頭の乳汁検査を実施することは労力的負担が大きいため、牛群中から効率的に乳房炎牛を摘発するため、牛群全体の代表サンプルであるバルク乳に着目し、試験2でバルク乳CL能を経時的に測定することが乳房炎の早期発見に有効であるか検討した。

バルク乳CL能が上昇したのはDay3、Day9およびDay10の3回であり、バルク乳CL能上昇時には、いずれも牛群中に乳房炎罹患と診断される個体が存在した。バルク乳CL能上昇時のDay3およびDay9のバルク乳CL能の前日からの変動は3.67および2.51倍であったことから、今回用いた牛群ではバルク乳CL能が前日の2.5倍程度に増加した場合に、牛群中に乳房炎牛が存在する可能性があると考えられた。また、Day3およびDay9のバルク乳体細胞数の変動は前日の1.15および1.50倍でありバルク乳CL能の変動に比べ小さなものであったことから、バルク乳CL能はバルク乳体細胞数に比べ、牛群中の乳房炎罹患状況を感知しやすいものと推察された。また、高橋ら¹²⁾は乳房炎発生に伴う乳汁CL能と体細胞数の反応の比較を行い、体細胞数は乳汁CL能が上昇した1日目以降に増加した事例を報告しており、バルク乳においても体細胞数の上昇にさきがけてCL能が上昇する可能性があるとし唆された。これ

らのことから、バルク乳CL能を経時的に測定し、バルク乳CL能の上昇を起点として、搾乳牛全頭の乳汁CL能を測定することで牛群から乳房炎牛を効率的に摘発できるものと考えられた。

以上のことから、乳汁CL能測定時間は5分間に短縮できること、バルク乳CL能をモニタリングすることにより、乳房炎罹患牛の存在を推測できることから、これらを組み合わせることにより乳房炎罹患牛を効率的かつ早期に発見できると推察された。

謝 辞

本試験の実施にあたり、ご助言、ご指導いただいた家畜病性鑑定室の関係諸氏に感謝の意を表します。また、現地実証試験にご協力いただいた農業技術センター技術普及部ならびに東部農林振興センター農業普及部の関係諸氏に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 久米常夫. 牛の乳房炎 乳房の感染とその抵抗. 近代出版, 8-9. 東京. 1984
- 2) 社団法人中央酪農会議. 良質乳生産ガイド, 10. 2004
- 3) 安里 章. 牛乳汁中におけるCMT変法, 電気伝導度及び微生物学的検査所見の関連. 家畜診療, 343: 41-44. 1992
- 4) 長内 悟ら. 日本獣医畜産大学研究報告, 49: 40-45. 2000
- 5) 高橋秀之ら. 家畜衛生研究成果情報, 13: 5-6. 2000
- 6) 高橋秀之. 環境ストレス低減化による高品質乳生産マニュアル (農林水産省北海道農業試験場編), 33-42
- 7) Blowey, R., Edmondson. 酪農家と獣医師による牛の乳房炎コントロール. チクサン出版, 126-127. 東京. 1999
- 8) International Dairy Federation. A monograph on bovine mastitis. IDF Doc., 76. 1971
- 9) Marcus, E. et al. Journal of Dairy Science, 77: 619-627. 1994
- 10) Nielen, M. et al. Journal of Dairy Science, 78: 1039-1049. 1995
- 11) 高橋秀之. 栄養生理研究会報, 49(2): 59-70. 2005
- 12) 高橋秀之. 畜産技術, 7: 2006