

琉球大学学術リポジトリ

ウシの潜在性乳房炎に関する研究 : II. 潜在性乳房炎乳汁の細菌検査成績(畜産学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 日越, 博信, 八幡, 辰正, Higoshi, Hironobu, Hachiman, Tatsumasa メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4010

ウシの潜在性乳房炎に関する研究

II. 潜在性乳房炎乳汁の細菌検査成績

日越博信*・八幡辰正*

Hironobu HIGOSHI and Tatsumasa HACHIMAN: A study of latent mastitis of cattle II. Results of bacteriological examination of latent mastitis milk

Summary

Aerobic bacteria were tested in the milk samples obtained from 162 quarters of 93 cows as a part of the survey for latent mastitis of milk cows in Okinawa Prefecture. A diagnosis of latent mastitis was made in cows in A and B areas of the northern part of this Prefecture. Studies were conducted on quarters milk with a degree of agglutination of +~++++ by California mastitis test and the following results were obtained:

Among the 162 samples cultured, bacteria were detected in 159, or 98.1% and a total of 1,003 strains were isolated. *Staphylococcus (Sta.) epidermidis* was found most frequently, 52.6%; followed by *Streptococcus (Strep.)*, 14.1%; *Corynebacterium (Coryne.)*, 10.0%; and *Sta. aureus*, 8.0%. These 4 kinds of bacteria constituted 84.7% of the total bacterial strains tested. As to each area, the order of frequency of appearance of these 4 kinds of bacteria was identical with the A area described above (862 strains), while scarcely and *Coryne.* was isolated in B area (141 strains) where *Sta. aureus* occupied the third position.

The frequency of isolation of *Sta. aureus* was higher as the degree of agglutination by CMT was more pronounced. Frequency of isolation of *Sta. epidermidis*, on the other hand, was higher as the degree of agglutination declined. The frequency of isolation of *Strep.* was the highest in samples with degree of agglutination of +++++, and that of *Coryne.* was the highest in those with degree of agglutination of +++.

* 琉球大学農学部畜産学科

緒 言

乳牛の乳房炎は、臨床症状の明らかな臨床型と臨床症状のみられない潜在性とに大別される。これらの乳房炎からは、多種類の細菌が分離されている^{4~9, 11~14)}。乳房炎は、そのような細菌が直接の原因となり、それに乳牛側の素因、各種の誘因が加わって発症するとされている^{4, 5, 7, 11, 14)}。

国内・外をとわず乳牛の約半数は何らかの乳房炎に罹患しているとされ、本病の防除は酪農経営の面および乳衛生の面から重要な課題である^{1, 4, 5, 17)}。とくに潜在性乳房炎の場合は、乳汁も正常乳と区別できないため、酪農家も多大な損失を被っていることに気付かないでいる。わが国においても各地で潜在性乳房炎の調査が行われているが、近年になって本病が増加の傾向を示しているともいわれ^{5, 8)}、その対策がますます重要になってきた。

一方、近年沖縄県においても酪農が盛んになりつつあるが、それに伴って本県の乳牛についても潜在性乳房炎に対する対策が必要になってきていると思われる。しかし、本病の発生状況はほとんど不明であり、防除対策を立てるまでにいたっていないのが現状であろう。そこで著者らは、1980年以来本県南部および北部地区の2, 3の地域で潜在性乳房炎の発生状況を調査してきた。そしてその結果は、本県における潜在性乳房炎の頭数別および分房別陽性率が、他府県におけるそれらより高いことを報告した³⁾。今回、1981年の北部地区における2地域の調査で、潜在性乳房炎と判定された乳汁の細菌学的検査を行ったので、その成績を報告する。

実験材料および方法

1 供試材料

培養に供した試料については、表1に示した。

Table 1. Materials used for isolation of organisms

Areas	No. of farms	No. of cattles	No. of samples * examined	No. of mastitic samples **	No. of samples incubated	No. of positive samples for organisms
A	10	103	400	135	134	132 (98.5%) ***
B	5	45	175	28	28	27 (96.4%)
Total	15	148	575	162	162	159 (98.1%)

* Samples obtained from each quarter of the udder of cattle

** Samples above plus one by CMT

*** Incidence of organisms in samples incubated

試料は、1981年6月～12月に沖縄県北部地区のAおよびB地域の計15酪農家の148頭から、分房ごとに採取した乳汁である。これらの試料は採取後、5℃以下のアイスボックスに納めて実験室に持ち帰った。到着後直ちにPLテスター(日本全薬)を用いてCalifornia mastitis test (CMT)を行い、凝集程度が+以上を陽性とした。その結果、94頭の163試料が陽性と判定されたが、A地域における1頭の1試料を除く93頭の162試料が、細菌検査のために培養に供された。

2 細菌の培養および分離方法

細菌の培養には5%牛血液加普通寒天培地(栄研)平板を用いた。試料の0.1 mlを平板培地に滴下塗

布し、35℃で2日好氣的培養を行い、出現した集落数を測定した。

菌株の分離は、集落数が24個以下の場合1株、25～100個の場合2～3株、101個～500個の場合2～4株、501個以上の場合3～5株を基準に釣菌した。

3 分離菌株の同定方法

分離菌株の同定は、医学細菌同定の手びき¹⁶⁾に準拠して行った。なお、同定のための主な試験項目はグラム染色性、形態、芽胞の有無、運動性、嫌氣的条件下での発育、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験、Oxidation-fermentation試験、Voges-Proskauer試験、Methyl red試験、インドール産生能、硫化水素産生能、クエン酸塩の利用性、コアグララーゼ産生能、pH9.0での発育、42℃での発育などである。

実 験 結 果

CMTによって潜在性乳房炎と判定され、培養に供された試料は93頭の162試料であり、これらのうち98.1%から細菌が検出された(表1)。なお、この検出率はAおよびB地域ともほぼ同じであった。

細菌の検出された159試料について、血液寒天平板上の細菌数(0.1ml当り)をCMTの凝集程度別に、表2に示した。

Table 2. Relationship between California mastitis test and bacterial counts of quarters affected by latent mastitis

Agglutination degree by CMT	No. of samples	Bacterial counts on blood agar (/0.1ml)				
		≤ 24	25~100	101~500	501~1000	1001 ≤
+	66 (100) *	2 (3.0)	11 (16.7)	27 (40.9)	9 (13.6)	17 (25.8)
++	42 (100)	3 (7.1)	6 (14.3)	5 (11.9)	13 (31.0)	15 (35.7)
+++	39 (100)	2 (5.1)	3 (7.7)	10 (25.6)	11 (28.2)	13 (33.4)
++++	12 (100)	0 (1 (8.3)	2 (16.7)	4 (33.3)	5 (41.7)
Total	159 (100)	7 (4.4)	21 (13.2)	44 (27.7)	37 (23.3)	50 (31.4)

* Number in parenthesis indicates percentage

表に示されるように、凝集程度に関係なくほとんどの試料で細菌数は25個以上であった。しかし、凝集程度+では500個以下の試料が多く、++以上では501個以上の試料が多かった。この501個以上の試料の出現率は、CMTの凝集程度が強いほど高い傾向を示した。

分離された合計1,003株の菌株については、属または種の段階まで同定した。それらの種類は地域別に、表3に示した。

全体では未同定を含めて14種類に分けられた。なかでも *Staphylococcus (Sta.) epidermidis* は過半数の529株(52.6%)を占め圧倒的に多かった。次いで *Streptococcus (Strep.)* が141株(14.1%)、*Corynebacterium (Coryne.)* が100株(10.0%)、*Sta. aureus* が80株(8.0%)の順に多かった。これら4種類の細菌が全分離菌株の84.7%に達した。

これら4種類の細菌について地域別にみると、A地域では上記と全く同じ順位であり、またそれぞれの種類の分離頻度もほぼ同じであった。他方、B地域ではA地域に比較して分離される細菌の種類が少なく、また *Coryne.* も1株(0.7%)のみであった。この *Coryne.* を除く他3種類の出現順位はA地域とほぼ同じであった。しかし、それぞれの種類の分離頻度は両地域で異なり、*Sta. aureus* および *Strep.* はB地域の方が高く、*Sta. epidermidis* は逆にA地域の方が高かった。

Table 3. Incidence of organisms isolated from quarters affected by latent mastitis, according to areas

Organisms	A area	B area	Total
	862 strains	141 strains	1,003 strains
<i>Staphylococcus aureus</i>	58 (6.7)	22 (15.6)	80 (8.0)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	467 (54.3)	62 (44.1)	529 (52.6)
<i>Streptococcus</i>	109 (12.6)	32 (22.7)	141 (14.1)
<i>Micrococcus</i>	14 (1.6)	1 (0.7)	15 (1.5)
<i>Corynebacterium</i>	99 (11.5)	1 (0.7)	100 (10.0)
<i>Pseudomonas</i>	13 (1.5)	0	13 (1.3)
<i>Vibrio</i>	3 (0.3)	4 (2.8)	7 (0.7)
<i>Bacillus</i>	3 (0.3)	0	3 (0.3)
<i>Escherichia coli</i>	1 (0.1)	0	1 (0.1)
Yeast	20 (2.3)	1 (0.7)	21 (2.1)
Unclassified			
Gram (+) rods	29 (3.4)	10 (7.1)	39 (3.9)
Gram (+) cocci	11 (1.3)	0	11 (1.1)
Gram (-) rods	30 (3.5)	8 (5.6)	38 (3.8)
Gram (-) cocci	5 (0.6)	0	5 (0.5)

* number in parenthesis indicates percentage

Table 4. Incidence of organisms in quarters, according to agglutination degree by California mastitis test

Organisms	Agglutination degree by CMT				Total
	+	++	+++	++++	
	66 samples	42 samples	39 samples	12 samples	159 samples
<i>Staphylococcus aureus</i>	6 (9.1)	6 (14.3)	8 (20.5)	5 (41.7)	25 (15.7)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	52 (78.8)	34 (81.0)	27 (69.2)	6 (50.0)	119 (74.8)
<i>Streptococcus</i>	19 (28.8)	11 (26.2)	11 (28.2)	4 (33.3)	45 (28.3)
<i>Micrococcus</i>	6 (9.1)	1 (2.4)	2 (5.1)	0	9 (5.7)
<i>Corynebacterium</i>	13 (19.7)	12 (28.6)	14 (35.9)	3 (25.0)	42 (26.4)
<i>Pseudomonas</i>	3 (4.5)	1 (2.4)	1 (2.6)	0	5 (3.1)
<i>Vibrio</i>	1 (1.5)	0	1 (2.6)	1 (8.3)	3 (1.9)
<i>Bacillus</i>	2 (3.0)	1 (2.4)	0	0	3 (1.9)
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	1 (8.3)	1 (0.6)
Yeast	3 (4.5)	0	2 (5.2)	1 (8.3)	6 (3.8)
Unclassified					
Gram (+) rods	9 (13.6)	3 (7.1)	7 (17.9)	0	19 (11.9)
Gram (+) cocci	1 (1.5)	1 (2.4)	3 (7.8)	0	5 (3.1)
Gram (-) rods	7 (10.6)	5 (11.9)	6 (15.4)	3 (25.0)	21 (13.2)
Gram (-) cocci	1 (1.5)	1 (2.4)	1 (2.6)	0	3 (1.9)

* Number in parenthesis indicates percentage

次に、各種細菌の検出状況をCMTの凝集程度別の試料数で、表4に示した。

全体では、前記の分離菌株における出現順位と同じく、試料数でも*Sta. epidermidis*は最も高率(74.8%)に検出された。次いで*Strep.*(28.3%)、*Coryne.*(26.4%)、*Sta. aureus*(15.7%)の順であった。

*Sta. epidermidis*はCMTの各凝集程度でそれぞれ最も高い検出率を示したが、その検出率は凝集程度が弱いほど高い傾向を示した。*Sta. aureus*は、前菌種とは逆にCMTの凝集程度が強いほど高い検出率を示した。しかも本菌種は、凝集程度の強い++++の試料では*Sta. epidermidis*に次いで検出率が高かった。

*Strep.*および*Coryne.*は、前2者菌種ほど明らかな傾向を示さず、やや異なった検出状況であった。すなわち、*Strep.*は凝集程度+~+++の試料ではほぼ同じ検出率であったが、++++ではこれらより若干高かった。また、*Coryne.*は++以上の試料で比較的高い検出率を示したが、+++の試料において最も高く、次いで++であった。

なお、地域別の試料数における各種細菌の検出状況は表示しなかったが、*Sta. epidermidis*は両地域とも1位の検出率であった。しかし、この菌種の検出率は、A地域では78.0%であったのに対し、B地域では59.3%であった。また、*Coryne.*もこれと同様にB地域(3.7%)に比較してA地域(31.1%)が高かった。*Strep.*(A地域25.0%、B地域44.4%)および*Sta. aureus*(それぞれ15.2%と18.5%)は、前2者とは逆にB地域の方が高く、地域によって検出率が若干異なっていた。

考 察

乳牛における臨床型または潜在性乳房炎乳汁からは、多種類の細菌が分離されるが^{4~9, 11~15)}、それらは健康な乳牛の乳汁からも分離されている^{2, 5, 10, 14)}。このことから越智・勝部¹⁴⁾は、正常な乳汁にみられる細菌は正常細菌叢であり、乳房炎は乳牛に何らかの要因が加わった場合に細菌が増殖して発症する、いわゆる自発性感染症であるとした。

一方、村瀬¹¹⁾は正常細菌叢といわれる細菌も、乳房内で増殖したかたちでみられる場合は感染であり、それらは正常細菌叢でないとした。村瀬¹¹⁾および久米ら⁹⁾は、本来乳房内は無菌であるとの立場で、新鮮乳汁0.1 ml中に同一菌種が25個以上存在する場合を有意に増殖したとみなしている。そして、彼らは細菌数がこれ以上、細胞数が1 ml当り50万以上およびpHが6.5以上の3者の組み合わせで、見かけ上健康な乳房を乳汁感染、乳房感染、非臨床型乳房炎に区分し、これらはいずれも潜在性乳房炎の範ちゅうに入れた。

今回、著者らが検査した潜在性乳房炎乳汁の95.6%は、細菌数が0.1 ml当り25個以上であり、その多くは100個以上であった。また、細菌数はCMTの凝集程度が強いほど多い傾向を示した。著者らは、村瀬¹¹⁾および久米ら⁹⁾のように3群に区分することは試みなかったし、また上記の細菌数がすべて有意に増殖したか否かも判断できなかった。それは、今回のような釣菌方法では同一菌種が25個以上であったとはいえないからである。しかし、血液寒天平板上の集落の性状から、大多数の試料は1種類または2, 3種類の細菌がそれぞれ25個以上あったと考えている。さらに、前報告³⁾で記述したように、CMTで+程度の試料では過半数が細胞数50万/ml未満であったが、++以上の試料では大多数が細胞数50万以上であり、pHも6.5以上であった。これらと今回の成績から大多数の試料は、村瀬¹¹⁾と久米ら⁹⁾の区分した乳房感染または非臨床型乳房炎に含めることができよう。

臨床型または潜在性乳房炎乳汁から検出される主な細菌は*Sta. aureus*、*Strep.*、*Sta. epidermidis*であり、他に調査対象牛群あるいは地域によって*Coryne.*、*Micrococcus*、*Bacillus*、グラム陰性桿菌などが多い^{4~9, 11~15)}。今回、著者らが分離した1,003株では*Sta. epidermidis*が過半数を占めて圧倒的に多く、次いで*Strep.*、*Coryne.*、*Sta. aureus*の順であり、これら4種類の細菌で全菌株の84.7%に達した。また、試料数でみた場合もこれら細菌の検出順位は同じであった。これらの細菌が潜

在性乳房炎乳汁から検出される上位の4種類であることは久米ら⁸⁾、中村¹³⁾の成績と一致するが、彼らの成績とは検出率または順位が若干異なった。これは、調査地域あるいは対象牛群の違いによるものと考えられる。実際に、今回の調査でもA地域とB地域では、検出される細菌の種類、それぞれの検出率、順位などが若干異なっていた。

細菌の検出率はCMTの凝集程度によってかなりの違いがみられた。すなわち、*Sta. aureus*は凝集程度の強いほど検出率が高く、また*Strep.*もややその傾向がみられた。しかし、*Sta. epidermidis*はその逆に凝集程度の弱いほど高く、*Coryne.*は中等度の凝集で高い傾向を示した。これらの成績は、Schalmら⁴⁾が*Sta.*および*Strep.*の検出率はCMTのスコアの大きい方で高かったとする報告と一致する。さらに、久米ら⁹⁾が*Sta. epidermidis*は乳汁感染、乳房感染、非臨床型乳房炎と進むにつれて次第に減少し、*Strep.*は逆であったとする報告とも類似している。また久米ら⁸⁾は、*Sta. aureus*と*Strep.*のある種は臨床型乳房炎の発症と細胞数増加に深い関係があるとし、越智・勝部¹⁵⁾も臨床型乳房炎では*Strep.*が重要であると述べている。著者らは*Strep.*を種まで同定しなかったが、この*Strep.*と*Sta. aureus*は、先人が記述したように細胞数の増加に関連し、乳腺組織への影響が他の細菌より大きいと考えられる。

*Sta. epidermidis*は、一般的に非病原性かあるいは病原性が弱いとみなされ、重要視されていなかった。しかし、本菌種は前記のように潜在性乳房炎における主要な細菌であり、また検出率が低いとはいえ臨床型乳房炎からも分離されている。Schalmら⁴⁾および久米ら⁸⁾は、*Sta. epidermidis*が細胞数の増加に関連しているとした。このようなことから近年になって本菌種の病原性が見直されると同時に、これをさらに詳細に分類することが試みられている^{18,19,20)}。著者らの成績でも、*Sta. epidermidis*の検出率はCMTの凝集程度が強いほど低くなったことから、本菌種の病原性はそれほど強くないといえるかもしれない。しかし、分離菌株数の過半数が本菌種であったことから、やはり乳腺組織への影響は無視できないであろう。今後は本菌種の詳細な分類とCMTとの関連を検討する必要があると考えている。

以上、主に検出率の高かった4種類の細菌について記述したが、この他にも多くの種類が検出された。そのような細菌が正常細菌叢なのか、または感染したものとみなすかは、それぞれの細菌の病原性とも関連しており、今後の問題である。しかし、本県の潜在性乳房炎乳汁の細菌叢は他府県のそれとほぼ同じであることが判明した。これを基に本県における潜在性乳房炎について、細菌学的な面からの防除方法を検討する手懸りができたとみなせよう。

摘 要

沖縄県における乳牛の潜在性乳房炎に関する調査の一環として、本島北部地区のAおよびB地域で本乳房炎と判定された93頭の162分房について、好気性細菌の検査を行ない、次のような成績を得た。

培養に供した162試料のうち159試料(98.1%)で細菌が検出され、これらの試料から合計1,003株の細菌が分離された。分離された菌株では*Sta. epidermidis*(52.6%)が最も多く、次いで*Strep.*(14.1%)、*Coryne.*(10.0%)、*Sta. aureus*(8.0%)の順であり、これら4種類の細菌で全菌株の84.7%を占めた。また、地域別にみたこれら4種類の細菌の出現順位は、A地域では上記と全く同じであったが、B地域では*Coryne.*がほとんど分離されず、*Sta. aureus*が3位であった。

*Sta. aureus*はCMTによる凝集程度の強い試料ほど分離される頻度が高く、*Sta. epidermidis*は逆に凝集程度の弱い試料ほど高かった。また、*Strep.*は凝集程度++++の試料で、*Coryne.*は+++の試料で、それぞれ分離頻度が最も高かった。

引用文献

1. Blosser, T. H. 1979 Economic losses from and the national research program on mastitis in the united states, *J. Dairy Sci.*, **62** : 119~127
2. 日越博信, 浜田輔一 1976 搾乳直後分房乳における低温細菌群, *食衛誌*, **17** : 27~33
3. _____, 八幡辰正, 仲本聖輝, 香西 献, 宇治達哉, 藤沢倫彦 1982 ウシの潜在性乳房炎に関する研究 I California mastitis test (CMT) による検出状況, *琉大農学報*, **29** : 217~223
4. 保坂安太郎訳 1973 Schalm, Carroll, Jain 牛の乳房炎, 1版, 東京, 学窓社
5. 飯塚三喜, 久米常夫, 原 茂, 野附 巖 1979 牛の乳房炎, 1版, 東京, 日本獣医師会
6. Jain, N. C. 1979 Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis, *J. Dairy Sci.*, **62** : 128~134
7. 久米常夫 1980 牛病学, 1版, 607~621, 東京, 近代出版
8. _____, 平棟孝志, 村瀬信雄 1970 牛の臨床型および潜在性乳房炎と乳汁の細菌叢, *家畜衛試研究報告*, **61** : 37~44
9. _____, _____, _____ 1970 牛の潜在性乳房炎の臨床, 細菌および病理学的観察, *家畜衛試研究報告*, **61** : 64~72
10. McDonald, J. S. 1979 Bovine mastitis, *J. Dairy Sci.*, **62** : 117~118
11. 村瀬信雄 1971 牛の乳房炎:細菌学の分野から, *家畜衛試研究報告*, **62** : 83~101
12. _____ 1976 _____ :一つの考え方, *日獣会誌*, **29** : 307~315
13. 中村茂美 1977 乳房炎由来黄色ブドウ球菌の薬剤感受性試験成績について, *家畜診療*, **167** : 33~35
14. 越智勇一, 勝部泰次 1958 牛の乳房炎に関する研究 I. 健康牛乳房内における正常細菌叢について, *日獣誌*, **20** : 39~43
15. _____, _____ 1958 _____ II. 乳房炎牛における乳房内細菌叢について, *日獣誌*, **20** : 83~86
16. 坂崎利一訳 1974 Cowan 医学細菌同定の手びき, 2版, 東京, 近代出版
17. 嶋 功 1981 乳房炎防除の手引, 札幌, 酪農総合研究所
18. 新城敏晴, 宮崎千鶴, 浜名克己, 大塚宏光, 幡谷正明 1981 未経産牛乳房炎に関する研究 第18報 分房由来のコアグラゼ陰性ブドウ球菌について, *宮大農報*, **27** : 397~402
19. Sincoaway, H., 久米常夫 1981 牛の乳汁由来コアグラゼ陰性ブドウ球菌の分類と病原性. I. 生化学的性状およびフェージ型別による分類, *家畜衛試研究報告*, **81** : 8~14
20. _____, _____ 1981 _____ II. 毒素および酵素の産生能と病原性, *家畜衛試研究報告*, **81** : 15~19