

新たな乳房炎予防技術による乳生産性および健全性の向上（第 2 報）

河端 茜・高松英里奈・澤田芳憲

要 約 近年の遺伝的改良に伴い、乳牛の乳生産性は飛躍的に向上しているものの、乳房炎等の発症リスクが増加し、供用年数は減少傾向にある。そこで、本県が全国的に生産量を誇る梅干しの副産物（梅酢）を活用し、抗生物質を用いない新たな乳房炎予防技術の開発を試みた。県内の梅栽培農家 5 戸より回収した梅酢の成分は、pH1.7～2.3、塩分濃度 16.0～16.4%、クエン酸濃度 3.2～4.0%となり、乳房炎原因菌 7 種に対して抗菌効果を有することが明らかとなった。梅酢と同濃度のクエン酸水溶液は、梅酢と同程度の抗菌効果を示したことから、梅酢の主な抗菌成分はクエン酸であることが判明した。さらに、1 日 2 回ホルスタイン種乾乳牛の乳頭に梅酢を塗布したところ、乳頭皮膚や乳頭口にただれや炎症はみられず、ディッピング剤として利用できる可能性が示唆された。

キーワード：乳房炎，梅酢，クエン酸

諸 言

乳生産性向上を目的とした遺伝的改良により、乳牛の泌乳能力は飛躍的に上昇しており、2017 年の泌乳牛 1 頭あたりの 305 日乳量は 9,594 kg と、高乳量で推移している⁵⁾。しかし、泌乳能力の向上に伴い、2016 年は平均除籍月齢が 68.9 ヶ月と過去 5 年間で 2.3 ヶ月の供用年数の低下がみられた⁴⁾。除籍理由には様々な原因が挙げられるが、最も多いのが乳房炎等による泌乳器病である¹³⁾。

乳房炎とは病原微生物の乳房内感染によって引き起こされる疾病である。乳房炎を発症した乳牛のほとんどは、抗生物質を含有する乳房注入剤により治療を行うが、その間の生乳出荷ができないだけでなく、一度乳房炎を発症した乳牛はその後の乳生産性が低下し、経済損失に繋がる¹⁷⁾。

そこで、乳房炎の発生を低減させるため、殺菌効果を有し、かつ安全な県内産未利用資源である梅干しの抽出液（梅酢）^{3) 15)}に着目した。本県は梅の栽培が盛んであり、全国第 6 位の生産量を誇る¹²⁾。梅酢は塩漬けされた梅から滲出する果汁を含む液体であり、梅から移行したクエン酸やリンゴ酸等の有機酸が豊富に含まれて

いる¹¹⁾。第 1 報⁸⁾では、飼養牛から分離した乳房炎原因菌 7 種に対して抗菌効果が示されたことから、乳房炎の予防法として有用である可能性が示唆された。そこで、本報では梅酢の更なる抗菌効果の検証と抗菌要因の特定を行った。次に、梅酢を牛の乳頭に塗布し、乳頭に作用する影響を検証した。

材料および方法

1 乳房炎原因菌の分離

(1) 材料

・生乳

生乳は、当場で飼養する泌乳期ホルスタイン種から採取した。乳用牛群検定成績の結果をもとに、体細胞数が 30 万/ml 以上の乳牛から 4 分房の生乳を合乳したもの、あるいは乳房炎の症状を呈する乳牛の 1 乳房から採取した。採取した生乳は、原液あるいは滅菌生理食塩水で 10～10³ 倍に希釈調製し、培養に供した。

(2) 培養条件

調製後の乳汁を 5% 羊血液加寒天培地（日本 BD 株式会社，東京）に塗布し、37°C で 24 時間好気培養した。

(3) 調査項目

・菌数

培養後、培地に発育したコロニー数を計測した。

・菌種の同定

発育したコロニーに対して、グラム染色およびカタラーゼ試験を実施し、それぞれの菌属に分類した。また、判明した菌属に対しアピマニユアルキット（ビオメリュー・ジャパン株式会社、東京）を用いて菌種の同定を行った。

2 梅酢の成分および抗菌効果の検討

(1) 材料

・梅酢

2019 年 9 月上旬に、県内梅栽培農家より 5 ロットを入手した。梅酢は、原液および滅菌蒸留水で 2 倍に希釈調製し、分析に供試した。

・供試菌

1 より分離された菌および保存菌株より、*Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus lentus*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Raoultella ornithinolytica*, *Klebsiella pneumoniae* の 7 菌種を試験に供試した。

(2) 分析項目

ア pH

pH は、pH メーター (LAQUAtwin-pH-11B, 株式会社堀場製作所, 京都) を用いて測定した。

イ 塩分濃度

塩分濃度は、塩分計 (PAL-SALT, 株式会社アタゴ, 東京) を用いて測定した。

ウ クエン酸濃度

クエン酸濃度は、株式会社 JAPAN TESTING LABORATORIES (岐阜) に分析依頼し、高速液体クロマトグラフにより定量分析した。

エ 抗菌効果

抗菌効果の判定には、ペーパーディスク法を用いて検証した。マクファーランド 0.5 に調整した菌液 50 μ l をミューラーヒントン培地 (関東化学株式会社, 東京) に接種し、梅酢 25 μ l を添加したブランクディスク (直径 6 mm, 日本 BD 株式会社) を培地上に置き、37°C で 24 時間好気培養した。培養後、ディスク周囲に形成し

た阻止円の直径を計測し、岩崎らの報告⁶⁾をもとに直径 7mm 以上のものを抗菌効果ありと判定した。また、コントロールとして薬剤耐性試験用セファゾリンディスク (日本 BD 株式会社) を同一の培地上に置き、培養した。

3 梅酢の抗菌要因の特定

(1) 材料

・梅酢

2 (1) と同ロットのものを原液及び滅菌蒸留水で 2 倍希釈し、試験に供した。

・クエン酸水溶液

梅酢の平均クエン酸濃度 (3.7%) にクエン酸 (ナカライテスク株式会社, 京都) を滅菌蒸留水に溶解し、調製した。

・塩化ナトリウム (NaCl) 水溶液

梅酢の平均塩分濃度 (16.2%) に NaCl (ナカライテスク株式会社) を滅菌蒸留水に溶解し、調製した。

・乳房炎原因菌

1 より分離された菌および保存菌株より、*Staphylococcus saprophyticus*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* の 3 菌種を試験に供した。

(2) 抗菌要因特定試験

2 (2) エと同様にペーパーディスク法によってクエン酸水溶液および NaCl 水溶液の抗菌効果を判定し、最も阻止円の形成が大きいものを主たる梅酢の抗菌成分として判定した。

4 乾乳牛乳頭への梅酢の塗布頻度および濃度が与える影響

2020 年 1 月中旬の 10 日間、当场で飼養するホルスタイン種乾乳牛 4 頭の乳頭に原液あるいは 2 倍希釈した梅酢を塗布し、乳頭への影響を調べた。また、4 分房ごとに乳頭の塗布回数を設定し (表 1), 塗布頻度による影響も同様に検討した。

表 1 乳頭ごとの塗布頻度

	左	右
前	1回/3日	1回/2日
後	2回/日	1回/日

結 果

1 乳房炎原因菌の分離

当場の飼養牛 7 頭から 10 種、計 13 株の乳房炎原因菌が分離された (表 2)。内訳は、ブドウ球菌属 4 種、レンサ球菌属 1 種、腸内細菌群 5 種となった。

表 2 分離された乳房炎原因菌

No.	菌属	菌種	菌数(cfu/ml)
1		<i>Staphylococcus aureus</i>	1.0×10 ³
2		<i>Staphylococcus lentus</i>	9.5×10 ⁵
3	ブドウ球菌属	<i>Staphylococcus simulans</i>	4.8×10 ³
4		<i>Staphylococcus simulans</i>	7.2×10 ³
5		<i>Staphylococcus xylosus</i>	1.2×10 ³
6	レンサ球菌属	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5.7×10 ⁴
7		<i>Enterobacter cloacae</i>	5.6×10 ²
8		<i>Escherichia coli</i> 1	4.4×10 ³
9		<i>Escherichia coli</i> 1	4.2×10 ⁴
10	腸内細菌群	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6.6×10 ⁵
11		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6.4×10 ³
12		<i>Pantoea spp</i> 1	3.3×10 ⁴
13		<i>Raoultella ornithinolytica</i>	3.6×10 ⁴

2 梅酢の成分および抗菌効果の検討

梅酢の各成分を分析したところ、pH は 1.7~2.3、塩分濃度は 16.0~16.4%、クエン酸濃度は 3.2~4.0% となり、各成分でロットごとに有意な差は認められなかった (表 3)。

表 3 梅酢の成分

	pH	塩分濃度 (%)	クエン酸濃度 (%)
梅酢A	1.7	16.0	4.0
梅酢B	1.9	16.0	4.0
梅酢C	1.9	16.2	3.2
梅酢D	2.3	16.4	3.6
梅酢E	2.3	16.4	3.7
平均	2.0	16.2	3.7

7種の分離菌より、梅酢の阻止円直径を測定した結果、原液の梅酢では平均直径7mm以上の阻止円が全菌種で形成され、抗菌効果が認められた。一方、2倍希釈した梅酢では、2菌種でしか菌の発育を抑えることができなかった (表4)。また、*Staphylococcus saprophyticus*、*Staphylococcus lentus*、*Citrobacter freundii*、*Escherichia coli* の4菌種では10mm以上の阻止円が形成されたが、*Staphylococcus xylosus* や *Raoultella ornithinolytica*、

Klebsiella pneumoniae の3菌種では8mm以下となり、菌種によって効果が異なることが示された。

表 4 梅酢阻止円の平均直径(mm)

菌種	梅酢		cefazolin (30µg)
	原液	2倍希釈	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	12.3	8.2	31.8
<i>Staphylococcus xylosus</i>	8.0	-	11.2
<i>Staphylococcus lentus</i>	10.4	8.0	14.4
<i>Citrobacter freundii</i>	10.3	-	16.8
<i>Escherichia coli</i>	10.7	-	17.6
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	8.0	-	18.8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7.0	-	22.4

-: 阻止円の形成が認められず

3 梅酢の抗菌要因の特定

梅酢と同濃度のクエン酸水溶液および NaCl 水溶液の抗菌効果を調べた結果、クエン酸水溶液を浸み込ませたディスクでは、供試した全菌種で梅酢と同程度あるいはそれ以上の直径の阻止円が形成された。しかし、NaCl 水溶液を浸み込ませたディスクでは 1 菌種でのみしか阻止円の形成が認められなかった (表 5)。

表 5 梅酢およびクエン酸水溶液、NaCl 水溶液の阻止円の平均直径(mm)

菌種	梅酢原液	クエン酸水溶液 (3.7%)	NaCl水溶液 (16.2%)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	12.3	12.3	-
<i>Citrobacter freundii</i>	10.3	10.0	8.0
<i>Escherichia coli</i>	10.7	11.6	-

-: 阻止円の形成が認められず

4 乾乳牛乳頭への梅酢の塗布頻度および濃度が与える影響

10 日間の塗布試験終了後、原液および 2 倍希釈した両区において、乳頭皮膚や乳頭口にただれや炎症を示す個体は確認されず、最も塗布頻度の高い乳頭 (左後) と低い乳頭 (左前) への影響に差はみられなかった。

考 察

近年、ヒトの医療分野を中心として抗菌剤が効かない薬剤耐性菌の出現が世界的な問題とされている。我が国においても、「薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン」を公表し¹⁰⁾、ヒトのみならず畜産分野についても対策が強く求められている。具体的には、動物用医薬品や飼料添加剤に含まれる抗菌剤の適正かつ慎重な利用の徹

底などが挙げられる¹⁴⁾。現在、乳房炎治療は、主に抗菌剤の乳房内注入による化学療法が一般的とされているが、上述のとおり薬剤耐性菌の出現や抗菌剤の残留などのリスクが懸念されている^{2) 20)}。抗菌剤に頼らない新たな治療法や予防法への期待の高まりから、サイトカインによる乳房炎治療法^{16) 18)}やプロバイオティクス生菌剤を活用した乳房炎予防技術¹⁾などの様々な技術が確立されつつある。これらは病原微生物そのものを攻撃し作用する抗菌剤とは異なり、それらに直接作用せず牛の生体防御機能を亢進することにより病原微生物の感染に対抗する技術とされ、消費者の求める安心安全かつ高品質な牛乳生産にも大きく貢献すると考えられている^{7) 9)}。

そこで、本県においても新たな乳房炎予防技術の確立を目指し、本県の名産である梅干しの副産物、梅酢の活用に取り組んだ。2019年9月に回収されたそれぞれ農家の異なる梅酢5ロットは、pH1.7~2.3、塩分濃度16.0~16.4%、クエン酸濃度3.2~4.0%となり、農家ごとに多少の差はあるものの有意な差ではないことが示された。また、過去に県内で生産された梅酢と比較してもpHがやや低下したものの有意な差はみられず、他の成分に関しても大きな差はみられなかった¹⁹⁾。このことから、本県で生産される梅酢は生産年や農家による影響は受けず、安定的な成分を維持していることが明らかとなった。乳房炎原因菌に対する抗菌効果については本試験で供試した7菌種全てにおいて原液の梅酢で抗菌効果が認められた。第1報⁸⁾での結果も含めると12菌種に対して抗菌効果が認められた一方、菌種によってその効果に差があることが示された。

また、梅酢の抗菌成分を特定するため、梅酢と同濃度のクエン酸水溶液およびNaCl水溶液の抗菌効果を検討したところ、クエン酸がNaClより高い抗菌効果を示した。また、蒸留水で2倍希釈した梅酢では、クエン酸および塩分濃度は半減するが、pHに大きな変化みられなかった。しかし、2倍希釈した梅酢の抗菌効果は大きく低下することから、クエン酸が梅酢の主たる抗菌成分であることが判明した。岩崎ら⁶⁾によると梅干しの主な抗菌成分がクエン酸であること、クエン酸やその他微量に含まれるリンゴ酸や酢

酸といった有機酸の抗菌効果を塩分が増強させることから、梅から滲出した梅酢においてもこれらの成分が複合的に抗菌効果へ作用している可能性が示唆された。

一方、梅酢は塩分濃度が非常に高く、強い酸性物質であるため、デリケートな乳頭へ塗布することで乳頭に影響しないかが懸念された。そこで、搾乳刺激がなく比較的丈夫な乾乳牛の乳頭へ10日間の梅酢の塗布試験を行ったところ、試験前と試験終了後の乳頭口や乳頭皮膚に炎症やただれなどは認められず、影響は少ないものと考えられた。

以上のことから、クエン酸を抗菌成分として有する梅酢は多くの菌種に対して抗菌効果を示し、乾乳牛の乳頭に塗布しても影響ないことから、抗菌剤を用いない乳房炎予防技術として有効である可能性が示唆された。今後は、細胞レベルでの梅酢の影響を検証するとともに、搾乳牛に対して梅酢がヨード系ディッピング剤と代替可能かどうか、乳房炎予防効果の検証を行う。

文 献

- 1) 麻生久, 早期診断法開発とプロバイオティクス飼料による乳房炎発症抑制, 産業動物臨床医学雑誌, 9(2):98-100, 2018
- 2) Call DR・Davis MA・Sawant AA, Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production, Anim Health Res Rev, 9:159-167, 2008
- 3) 藤田きみゑ・長谷川美幸・藤田麻里・小林寅二・小笹晃太郎・渡辺能行, *Helicobacter pylori* に対する梅肉エキスの殺菌効果, 日本消化器病学会雑誌, 99:379-385, 2002
- 4) 一般社団法人家畜改良事業団, 乳用牛群能力検定成績のまとめ—平成28年度—, 2017
- 5) 一般社団法人家畜改良事業団, 平成29年度乳用牛群能力検定成績速報について(概況), 2018
- 6) 岩崎啓子・野村秀一, 梅干し中の有機酸及びアミグダリン関連物質の抗菌作用, 長崎国際大学論叢第16巻, 147-158, 2016
- 7) Kai K・Komine Y・Komine K・Asai K・Kuroishi T・Kozutsumi T・Itagaki M・Ohta M・Kumagai K, Effects of Bovine Lactoferrin by the Intra-

- mammary Infusion in Cows with Staphylococcus Mastitis during the Early Non-Lactating Period, The journal of veterinary medical science, 64(10):873-878, 2002
- 8) 河端茜・高松英里奈・谷村英俊, 新たな乳房炎予防技術による乳生産性および健全性の向上(第1報), 福井県畜産試験場研究報告, 32:37-41, 2019
- 9) 菊佳男, サイトカインを利用した新たな乳房炎治療技術の開発, 北獣会誌, (57) 83-87, 2013
- 10) 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議, 薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン 2016-2020, 2016
- 11) 三谷隆彦, 梅酢ポリフェノールの開発とその利用, 食品と開発, 45 (10) : 1-83, 2010
- 12) 農林水産省大臣官房統計部生産流通消費統計課, 令和元年産びわ, おうとう, うめの結果樹面積, 収穫量及び出荷量, 2019
- 13) 農林水産省経営局, 平成 29 年度家畜共済統計表, 2018
- 14) 農林水産省消費・安全局畜産安全管理課, 畜産物生産における動物用抗菌性物質製剤の慎重使用に関する基本的な考え方, 2017
- 15) 能勢征子・平田一郎・新井輝義・西島基弘・酒井千三・宮崎利夫, 民間伝承薬梅内エキスの腸炎ビブリオに対する抗菌作用及びその有機酸組成, 食品衛生学雑誌, 29(6) : 402-407, 1988
- 16) Ozawa T・Kiku Y・Mizuno M・Inumura S・Kushibiki S・Shingu H・Matsubara T・Takahashi H・Hayashi T, Effect of intramammary infusion of rbGM-CSF on SCC and expression of polymorphonuclear neutrophil adhesion molecules in subclinical mastitis cows, Vet Res Commun, 36:21-27, 2012
- 17) 齋藤勝宏・芳賀猛・近貞美津子・佐藤秀保・大川愛絵, 乳房炎が酪農経営, 生乳・乳製品供給に及ぼす影響, 畜産の情報 2017 年 1 月号, 54-64, 2017
- 18) Takahashi H・Komatsu T・Hodate K・Horino R・Yokomizo Y, Effect of intramammary injection of RbIL-8 on milk levels of somatic cell count, chemiluminescence activity and shedding patterns of total bacteria and S.aureus in Holstein cows with naturally infected-subclinical mastitis, J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 52:32-37, 2005
- 19) 田辺勉・山口茂・水口智越, 梅酢の給与が養豚の生産性向上に及ぼす影響, 福井県畜産試験場研究報告, 19 : 21-25, 2006
- 20) 高橋敏雄・浅井鉄夫・小島明美・原田和記・石原加奈子・守岡綾子・木島まゆみ・田村豊, 家畜衛生分野における耐性菌の現状と今後の対応, 感染症学雑誌, 80:185-195, 2006

The improvement in milk production and health performance by new preventive technique for bovine mastitis (the 2nd report)

Akane KAWABATA, Erina TAKAMATSU and Yoshinori SAWADA
Fukui Prefectural Livestock Experiment Station

Abstract

The susceptibility of Holstein cows to bovine mastitis has increased and their lifetime has tended to decrease, whereas their lactation performance has advanced dramatically with genetic improvement. We designed to develop a new preventive technique for bovine mastitis which does not use antibiotics but use ume extract, which Fukui has high yield. The pH, salinity and citric acid concentration of ume extract from 5 ume farmers in Fukui were 1.7~2.3, 16.0~16.4% and 3.2~4.0% respectively, and they had antibacterial effect to 7 species of mastitis pathogens. The main antibacterial component of ume extract was citric acid because citric acid solution with the same concentration as ume extract gave same level of antibacterial effect. It suggested that ume extract might be useful for teat disinfectant as the result of that there was no sore nor inflammation when teats of dry cow were dipped twice a day in ume extract.

Keyword: bovine mastitis, ume extract, citric acid