

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)

河端茜・高松英里奈・谷村英俊

要 約 乳牛の泌乳能力の向上に伴い、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。本県には全国トップクラスの梅の生産地があり、そこで副産物として発生する梅の抽出液(梅酢)を用いた抗生物質等を使用しない新たな乳房炎予防技術を開発するため、乳房炎原因菌に対する抗菌効果と抗菌要因を検証した。梅酢とは、梅を塩漬けした際に梅から滲出する液体であり、高塩分(12.6~19.0%)、高酸度(pH 1.53~1.87)でクエン酸を含む(3.5~4.4%)物質である。飼養牛9頭から13種、17株の乳房炎原因菌が分離され、うち8種の分離菌を用いて梅酢の抗菌効果を検討したところ、原液あるいは滅菌蒸留水で2倍希釈した梅酢において抗菌効果を示した。また、梅酢と同濃度の食塩水では抗菌効果が認められなかったことから、梅酢に含まれる他の成分が抗菌性をもたらすことが示唆された。

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乳牛の改良により、泌乳能力は劇的に上昇しており、平成29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¹⁾。しかし、泌乳能力の向上に伴い、平成28年は平均除籍月齢が68.9ヵ月と過去5年間で2.3ヵ月の供用年数の低下がみられた²⁾。除籍理由にはあらゆる原因があるが、最も多いのが乳房炎等による泌乳器病である³⁾。

乳房炎を発症した乳牛の多くは抗生物質が含まれる乳房炎軟膏を乳房内に注入し治療するが、その期間の生乳の出荷ができないだけでなく、一度乳房炎を発症した乳牛では、その後の乳生産性が低下するため、経済損失に繋がる⁴⁾。そのため、乳房炎は酪農経営に大きな経済被害をもたらす重要な疾患である。

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の抽出液(梅酢)に着目した。本県は梅の栽培が盛んであり、平成30年は約1.4tと、全国第6位の生産量を誇る⁵⁾。本県産の梅の多くは梅干し

へと加工販売されており、収穫・洗浄後に梅の重量の15~20%の粗塩を用いて塩漬けにされる。その際、塩の浸透圧により梅の果汁が滲出され、その果汁は梅酢と呼ばれる。梅酢には水分だけでなく、塩分や梅から移行したクエン酸やリンゴ酸といった有機酸等の成分が豊富に含まれている⁶⁾。また、現在梅酢の抗菌効果に関する報告はないが、擦りおろした梅果実を煮出した梅肉エキスには、*Helicobacter pylori*⁷⁾ や腸炎ビブリオ⁸⁾ への殺菌効果が報告されていることから、梅酢中の抗菌効果も期待される。しかし、発生した梅酢の一部は漬物等に利用されるために市販されているが、高塩分・高酸度であることからほとんどは産業廃棄物として大量に廃棄されている現状にある。

そこで、本研究では抗生物質を使わない新たな乳房炎予防技術を開発するため、殺菌成分を有する県内産未利用資源である梅酢を活用して乳房炎原因菌に対する抗菌効果の検証と抗菌要因の検討を行った。

さらに、梅酢の乳頭への塗布を検討した際、付着せず流れ落ちてしまわないよう、付着効果を持続させる展着剤の添加を考えた。しかし、一般的

に用いられる展着剤の多くは化学物質が主成分であり、泌乳部位である乳頭への使用は不可能である。このことから、天然由来の展着成分を探索したところ、フコイダンに着目した。フコイダンとは、モズクやワカメ、コンブ等の褐藻類に多く存在する粘質多糖類で、ぬめりの主成分である。フコイダンはその粘性の高さから胃粘膜保護効果⁹⁾だけでなく、病原性大腸菌 O-157 への抗菌効果¹⁰⁾ 疫機能の活性化効果¹¹⁾ を有することから、乳頭保護以外の付加価値も期待できる。そこで、本研究ではコンブ由来フコイダンを展着候補物質とし、梅酢との混合による親和性を検証した。

材料および方法

1 梅酢の成分分析

(1) 材料

梅酢

平成 30 年 8 月中旬に、県内梅栽培農家より 7 ロットを入手した。うち 1 ロットは市販用に紫蘇が添加されたものを使用した。梅酢は、原液あるいは滅菌蒸留水で 2～4 倍に希釈調製し、分析に供した。

(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 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。

2 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 倍に希釈調整し、培養に供した。

(2) 培養条件

調整後の乳汁を 5% 羊血液寒天培地 (日本 BD 株式会社, 東京) に塗布し、マルチガスインキュベーター (SMA-80DR, 株式会社アステック, 福岡) で 37°C 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 (ピオメリユー・ジャパン株式会社, 東京) を用いて菌種の同定を行った。

3 梅酢の抗菌効果および抗菌要因の検討

(1) 材料

・梅酢

1 (1) と同じものを使用し、原液及び滅菌蒸留水で 2～4 倍に希釈した。

・塩化ナトリウム (NaCl) 水溶液

原液及び 2 倍希釈した梅酢と同等の塩分濃度 (16.7%, 8.35%) になるように NaCl を滅菌蒸留水で調製した。

・乳房炎原因菌

分離された菌 8 種を試験に供した (表 1)。

表 1 使用した分離菌

No.	菌種
1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
2	<i>Aerococcus urinae</i>
3	<i>Citrobacter freundii</i>
4	<i>Escherichia coli</i> 1
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
6	<i>Enterobacter asburiae</i>
7	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
8	<i>Aerococcus viridans</i> 2

(2) 抗菌効果試験

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 µl 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、梅酢あるいは NaCl

水溶液 25 μl 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, 抗菌効果の判定を行った。

(3) 判定基準

抗菌効果の判定基準は, 阻止円直径が 15mm 以上を+++, 11-15mm を++, 6-11mm を+, 阻止円の形成が認められないものを-と設定した。

4 展着候補物質フコイダンの親和性

コンブ由来の粉末フコイダン(ケイマンケミカル, ドイツ)を梅酢と混合して親和性を検討した。

結 果

1 梅酢の成分分析

梅酢の各成分を分析したところ, pH は 1.57~1.87, 塩分濃度は 12.6~19.0%, クエン酸濃度は 3.5~4.4% となった (表 2)。

表 2 梅酢の各成分

ロット名	pH	塩分(%)	クエン酸(%)
A	1.75	12.6	3.8
B	1.73	17.2	3.5
C	1.57	17.0	3.7
D	1.73	17.0	3.7
E	1.73	17.2	3.6
F	1.77	16.6	3.7
G ^{**}	1.87	19.0	4.4
平均	1.74	16.7	3.8

※ 市販用梅酢

2 乳房炎原因菌の分離

当場の飼養牛9頭から13種, 計17株の乳房炎原因菌が分離された(表3)。分離菌の内訳はブドウ球菌属2種, アエロコッカス属3種, 腸内細菌群5種, その他の菌属3種となった。

3 梅酢の抗菌効果および抗菌要因の特定

分離菌8種(表1)を用いて梅酢の抗菌効果を検証したところ, 原液の梅酢では全ての菌種に対して6mm以上の阻止円が形成された(表4)。2倍希釈した梅酢においてもほとんどの菌種で阻止円が形成され, 梅酢ロットごとに抗菌効果の偏りは

表 3 分離された乳房炎原因菌

牛No.	菌種	菌数(cfu/ml)
271	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.4 × 10 ⁵
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1.0 × 10 ⁶
296	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	5.2 × 10 ⁵
	<i>Escherichia coli</i> 1	5.6 × 10 ²
	<i>Aerococcus viridans</i> 1	5.6 × 10 ²
	<i>Serratia marcescens</i>	4.0 × 10 ³
	<i>Enterobacter asburiae</i>	1.1 × 10 ⁵
297	<i>Micrococcus spp</i>	8.0 × 10 ³
	<i>Aerococcus urinae</i>	8.4 × 10 ²
300	<i>Globicatella sanguinis</i>	4.8 × 10 ²
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	7.2 × 10 ⁵
308	<i>Enterobacter asburiae</i>	6.4 × 10 ⁵
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	8.0 × 10 ⁴
310	<i>Citrobacter freundii</i>	ND
311	<i>Staphylococcus hominis</i>	1.6 × 10 ⁴
319	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	6.4 × 10 ⁴
W87	<i>Aerococcus viridans</i> 2	4.0 × 10 ²

みられなかった。

表 4 乳房炎原因菌に対する梅酢の抗菌効果

希釈倍率	梅酢		菌種								
	ロット名	ロット名	1	2	3	4	5	6	7	8	
×1	A		+++	++	+	+	+	+	+	+	+
	B		+++	+++	+	++	+	+	+	+	+
	C		+++	+++	+	++	+	+	+	+	+
	D		+++	++	+	++	+	+	+	+	++
	E		+++	++	+	+	+	+	++	+	+
	F		+++	+++	+	+	+	+	+	+	+
	G		+++	+++	++	+	++	+	++	++	++
×2	A		++	+	+	+	+	+	+	+	+
	B		+	+	-	-	-	-	+	+	+
	C		++	+	+	-	+	+	+	+	+
	D		++	+	+	-	+	+	+	-	+
	E		+	+	-	+	+	+	+	+	-
	F		++	++	+	+	-	+	+	+	-
	G		++	++	+	+	+	+	+	+	+
×4	A		+	-	-	-	-	-	-	-	-
	B		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C		+	-	-	-	-	-	-	-	-
	D		+	-	-	-	-	-	-	-	-
	E		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F		+	-	-	-	-	-	-	+	-
	G		+	-	-	-	-	-	-	+	+

さらに, 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*; No. 5) に対しても多くの梅酢で阻止円を形成し, 耐性は確認されなかった(図1)。4倍希釈した梅酢では一部の菌に対して阻止円を形成したが, 多くは菌の発育を阻止することはできなかった。

一方, 原液あるいは2倍希釈した梅酢と同程度の塩分濃度に調製したNaCl水溶液では阻止円が形成されなかった(図1)。

4 展着候補物質との親和性

粉末フコイダンと梅酢は混合後、すぐに分離し親和性は低かった。

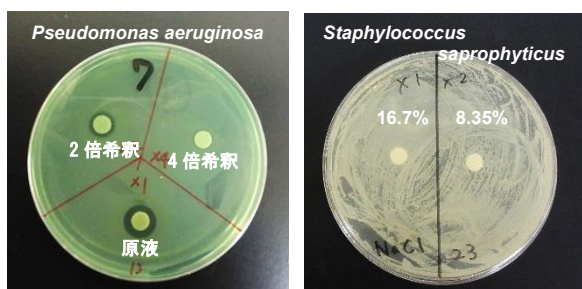


図1 乳房炎原因菌に対する梅酢およびNaCl水溶液の抗菌効果（左：梅酢、右：NaCl水溶液）

考 察

回収された梅酢の各成分の平均値はpH 1.74、塩分濃度 16.7%、クエン酸濃度 3.8%となり、過去の報告¹²⁾と比較してpHがやや高い傾向にあるが塩分、クエン酸はほぼ同濃度であることが示された。また、ロット間を比較したところ、市販用梅酢であるロットGが他のものより塩分とクエン酸濃度が高い傾向にあった。ロットGは塩漬け後の梅酢に赤紫蘇を加えてさらに漬け込まれているもので、赤紫蘇を加えない梅酢（ロットA~F）を白梅酢と呼ぶのに対し赤梅酢と呼ばれている。白梅酢は梅と塩のみから滲出するのに対し、赤梅酢には梅だけでなく紫蘇の成分も滲出することから成分に差が出たことが推察された。

場内で分離された菌に対し、原液あるいは2倍希釈の梅酢で阻止円の形成が認められたことから、乳房炎を防ぐには2倍までの梅酢が有効であることが分かった。さらに、一般的に抗生物質の治療効果が低いとされる緑膿菌に対して抗菌効果が示されたことから、環境性乳房炎を含む広範囲の乳房炎原因菌に対して梅酢が有効であることが示唆された。

また、梅酢中の塩分が抗菌作用を示すのではないかと仮説、検証したところ、梅酢に含まれる塩分濃度では阻止円が形成されなかった。岩崎と野村は、梅干しの抗菌作用に関与する成分を調査したところ、梅干し中の主な抗菌成分はクエン酸であり、その他微量に含まれるリンゴ酸や酢酸がクエン酸の抗菌作用を増強することを報告してい

る¹³⁾。さらに、梅干しに含有する濃度の上記3種の有機酸に、20%食塩水を添加した混合液では、阻止円直径がクエン酸単独のものより大きくなったことから、塩分は有機酸の抗菌効果を増強する働きをもつことを明らかにした。これらの報告から、梅干しと同様に梅酢においてもクエン酸が抗菌作用を示す主成分であり、塩分やその他有機酸が抗菌作用を増強している可能性が考えられた。

展着候補物質として挙げたフコイダンは粘度が約850 mPas（水温24℃下の15.0%フコイダン水溶液）と高い¹⁴⁾あまり、梅酢との十分に混合できずに分離した可能性が考えられた。梅酢との親和性を高めるためには、混合時の加温やホモジナイズ処理等の加工方法を検討し、今後実証していく必要がある。

乳牛の遺伝改良技術の促進により、泌乳持続性の高い乳牛が多く作出されている一方、泌乳期間の延長によるリスクが懸念されている。そのため、乾乳期間の短縮が提唱されており、現在国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）を中心とした乾乳期間短縮による飼養管理技術の開発が検討されている。乾乳期間は、胎児の急速的な成長に備えたり、ルーメン機能や乳腺細胞の回復といった大きな役割がある¹⁵⁾。一方、乾乳期は乳房炎への感染リスクが高まる期間でもあるため、主に高濃度の抗生物質を含んだ乾乳期軟膏を用いて予防する。しかし、乾乳期間の短縮により、乳房内での抗生物質の残留の恐れから乾乳期軟膏を使用できない可能性が考えられる。本研究の結果により、梅酢は塩分、クエン酸を含み、酸度が高く、乳房炎原因菌に対して抗菌効果が認められたことから、乳房炎予防に適した物質であることが明らかとなった。今後は、他の乳房炎原因菌に対する梅酢の抗菌効果試験や梅酢の抗菌要因の特定、フコイダンの加工方法の検討を継続して実施するとともに、実証試験に向けて梅酢の乳頭への影響を調べるため、乳腺上皮あるいは粘膜細胞を用いた梅酢接種試験を行う。

文 献

- 1) 一般社団法人家畜改良事業団，平成29年度乳用牛郡能力検定成績速報について（概

- 況), 2018
- 2) 一般社団法人家畜改良事業団, 乳用牛郡能力検定成績のまとめ—平成 28 年度—, 2017
 - 3) 農林水産省経営局, 平成 29 年度家畜共済統計表, 2018
 - 4) 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
 - 5) 農林水産省大臣官房統計部, 平成 30 年産びわ, おうとう, うめの結果樹面積, 収穫量及び出荷量, 2018
 - 6) 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
 - 7) 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
 - 8) 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
 - 9) Shibata H, Kimura-Takagi I, Nagaoka M, Hashimoto S, Aiyama R, Iha M, Ueyama S, Yokokura T. Properties of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus tokida* in gastric mucosal protection. *Biofactors*. 11(4):235-45. 2000
 - 10) 株式会社海産物のきむらや, 大腸菌 O-157 に対する天然海藻多糖類食品の抗菌性に関する研究報告書, 1997
 - 11) 水谷滋利, ガゴメ昆布 (*Kjellmaniella crassifolia*) フコイダンの免疫活性化作用, *Food Style* 21, 14 : 29-31, 2010
 - 12) 梅酢の給与が養豚の生産性向上に及ぼす影響, 田辺勉・山口茂・水口智越, 福井県畜産試験場研究報告, 19 : 21-25, 2006
 - 13) 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
 - 14) 飯塚真理子, メカブフコイダンの機能性, *New Food Industry*, 47 (9) : 1-7, 2005
 - 15) 社団法人農山漁村文化協会, 農学基礎セミナー新版 家畜飼育の基礎, 108-110, 2011

The improvement in milk production and health performance by new preventive technique for bovine mastitis (the 1st report)

Akane KAWABATA, Erina TAKAMATSU, Hidetoshi TANIMURA
Fukui Prefectural Livestock Experiment Station

Abstract

The susceptibility of Holstein cows to lactation disorders including bovine mastitis has increased and their lifetime has tended to decrease with their lactation performance improving. In order to develop a new preventive technique for bovine mastitis which does not use antibiotics and others, we investigated antibacterial effect and factor to mastitis pathogens of ume extract, which Fukui is one of the prefectures having the highest yield in Japan. The ume extract is liquid exuded from salting ume, and has high salinity (12.6~19.0 %) and high acidity (pH 1.53~1.87) containing citric acid (3.5~4.4 %). 17 strains within 13 species of mastitis pathogens were isolated from 9 milking cows. 8 species of the isolated pathogens were used to investigate antibacterial effect of ume extract, and antibacterial effects were found in both ume extracts which undiluted and diluted two-fold by sterile distilled water. It could be said that other factors apart from salinity in ume extract had antibacterial effects because sodium chloride solution which was the same concentration as ume extract did not have antibacterial effects.

Keyword: bovine mastitis, ume extract, citric acid