

平成28年度畜産関係学術研究委託調査 報告書

高感度遺伝子検査法によるロボット搾乳機導入酪農場におけるSA（黄色ブドウ球菌）罹患率調査

代表者

酪農学園大学 獣医学群 獣医生化学ユニット
教授 岩野英知

共同研究者

酪農学園大学 獣医学群 獣医衛生学ユニット
教授 樋口豪紀
酪農学園大学 循環農学群 畜産衛生学ユニット
教授 高橋俊彦

要約

本研究では、ロボット搾乳機導入酪農場における、黄色ブドウ球菌の罹患率調査を行う事を目的とした。黄色ブドウ球菌による乳房炎は伝染性乳房炎に分類され、発症初期は治癒する例もあるが、一般的に治療しにくい潜在性乳房炎となり、バルクスクリーニング検査の結果6～8割の農家で黄色ブドウ球菌が検出されるという報告もある。近年、省力化、効率化を目指してロボット搾乳機導入による新しい形態の酪農場が増えてきている。ロボット搾乳機により、黄色ブドウ球菌の罹患率がどの程度であるか正確に見極め適切な対応策をとって行く必要がある。本研究高感度な遺伝子検査による簡便高感度な検査により、ロボット搾乳機導入農場の黄色ブドウ球菌性乳房炎罹患率を調査した。

序論

我が国の酪農業は他国と比較して極めて品質の高い、衛生的かつ安全な生乳を消費者に提供している。一方で、日本の酪農業を取り巻く社会情勢は極めて厳しい局面を迎えている。我国の酪農形態において重要な役割を担う濃厚飼料は、そのほとんどを欧米諸国からの輸入に依存しているが、昨今の天候不順や化石燃料の高騰によって価格が急騰し、日本の酪農経営を強く圧迫している。また、国内でも後継者不足や就農者の高齢化によって酪農家戸数が減少し、それにともない飼養頭数も減少の一途をたどっている。このような状況で酪農経営を恒常的に発展させるためには、経営基盤のさらなる強化（生産コストの低下等）に資する、新たな「酪農技術」の構築が強く求められる。

我国の酪農産業において最も高い経済損失をもたらす原因の一つとして「乳房炎」が挙げられる。乳房炎はウシの乳腺組織に微生物が侵入することによって発生する炎症性の疾病であり、結果として①産乳量の低下、②衛生的乳質の低下、③成分的乳質の低下を招来し生乳価値を著しく低下させる。国内における乳房炎の被害額は800億円とも試算されている。乳房炎の多くは基本的に細菌によって引き起こされ、主要な菌種として大腸菌や黄色ブドウ球菌（SA）が挙げられる。大腸菌はウシの糞便に由来するもので、環境を汚染した糞便が原因となり、乳頭口から乳腺組織に侵入する（環境性乳房炎）。その多くは明確な症状を呈し、農場内で顕在化することから、治療をはじめとして、感染個体の早期対応が可能となる。一方、SAは搾乳器具や人の手指を介して個体間を伝搬する微生物であり、それによる乳房炎は伝染性乳房炎（ウシからウシに伝染する乳房炎）として位置付けられている（1、2）。SAによる乳房炎は大腸菌のそれとは異なり、明確な臨床症状を示さない症例が多く、そのため、発見されにくく、発見しても具体的な対応を実施しない農場も多い。しかし、SAによる経済損失の90%は産乳量の低下に起因するものであることから、農場に感染牛を保有することは、酪農経営者にとって潜在的に大きな経済損失を抱えることとなる。国内では約60%の農場においてバルクタンクからSAが検出されるとの報告

もなされている。さらに、SAは乳腺組織の深部に感染巣を形成し、バイオフィルムによって薬物や免疫細胞の作用を回避することが可能になる。このことは、個体におけるSAの感染が長期間にわたって継続し、その間、農場が長きにわたり潜在的に大きな経済損失を抱え得る可能性を示唆している。

このようなSAのリスクを回避し生産性の効率化を図るため、農場において正確かつ迅速にSAを検出し、それらを排除するための検査系を構築することが喫緊の課題として位置付けられている。

近年、省力化、効率化を目指してロボット搾乳機導入による新しい形態の酪農場が増えてきている。その背景には、酪農人口の減少と飼養頭数の増加という背反する現象がある。農業者人口は高齢化とともに減少の一途をたどっているが、一方、生産の効率化を目的とした大規模化、すなわち法人経営の割合が高まっている。法人経営では少ない作業員で最大の経済効果を導かなければならないため、省力化と低コスト化が強く求められ、結果として搾乳ロボットが選択されている。搾乳ロボットの導入は、人の手がかからないため人からの感染リスクは減少する一方で、個体の状態を把握する時間が少なくなり、感染症の蔓延に対して早い段階で適切な対応がとれない、というリスクは増大する。従来型の酪農形態で6～8割の感染率にも及ぶことがあるというSA感染が、ロボット搾乳機導入農場においてどのくらいの感染率を示すのかは、まず早急に明らかにする必要がある。今後、日本酪農の生き残り、発展にとって、ロボット搾乳機導入とその効率的な使用は国策とも言うべき課題であり、本調査によるSA感染率のデータは生産現場にとって重要な情報となり、畜産業の経営体質の強化に資する報告となる。

そこで本研究では、PCRを基本技術とする遺伝子解析技術を用い、高感度、かつ迅速にSAを検出する基本技術を構築するとともに、メカニカルな側面において将来の酪農技術の基軸となる搾乳ロボットシステムを導入している酪農場において、その有用性を評価した。

材料・方法

<農家の選定>

100頭規模の搾乳頭数の農場で、ロボット搾乳機を導入している2農場とパーラー搾乳による1農場を選定した。3農場合わせて述べ頭数495頭分の乳サンプルを検査に用いた。農場の詳細は、A農場：ロボット搾乳牛群（77頭117サンプル）、B農場：パーラー搾乳牛群（124頭124サンプル）、C農場ロボット搾乳牛群（102頭254サンプル）である。個体乳の採集は、北海道酪農検定協会の乳牛検定用の生乳から現地で分取した。その際、滅菌したスポイド、チューブを用い、個体ごとに新しいものに取り替え分取した。

<培養法>

各乳汁サンプルは、従来法にならい、滅菌したエーゼを用いて血液寒天培地上に1エーゼ分（10 μ l）を塗布し、一晚37 $^{\circ}$ Cで培養してコロニー性状ならびに二重溶血を確認した。二重溶血を確認したコロニーは、引き続きコアグラージェ試験を行い、二重溶血コロニーとコアグラージェ陽性反応によりSAと判定した。

<前培養PCR法による判定>

まず、乳（約30 μ l）を高塩添加LB液体培地（7.5%NaCl）に接種して一晚37 $^{\circ}$ Cで培養した。そのうち5 μ lを取り、PCR反応液に加えリアルタイムPCRにて検出した。プライマーは、既報により以下のものを用いた（3）。femA-2F：
5' -AACTGTTGGCCACTATGAGT-3'、femA-2R：5' -CCAGCATTACCTGTAATCTCG-3'。
リアルタイム反応液は、Takara MightyAmp SYBR Plusを用いた。

結果と考察

本調査では、従来から行われている血液寒天培地とコアグラージェ試験によるSAの同定に加え、前培養PCR法による同定試験も行った（図1）。本研究で使用した培養法は国内外において広く用いられている方法であり、その原法はNational Mastitis Council（NMC：米国乳房炎協議会）によって推奨された世界的に用いられている方法である。本課題で用いた遺伝子検査法では、従来の培

養法より検出感度が30～70%程高いことが明らかとなっており、これまで見過ごされてきた感染牛を摘発できる可能性があると考えた。SA性乳房炎は世界的にも、大きな問題となっているが、その感染頭数は増加傾向にあり、減少の様相は現状として認められていない。本研究の結果より、従来の培養法では、実際の感染を見落としている可能性もあり、このことが国内外においてSA性乳房炎が減少しない一要因になっている可能性も示唆された。

<従来法と前培養PCR法の比較>

今回用いた全サンプルの結果について、培養法と前培養PCR法で比較した(表1)。のべ頭数495頭に対してPCRにより陽性と判定されたのは22% (109サンプル) に対して、従来の培養法では7% (35サンプル) であった。前培養PCR法の検出感度が従来の培養法より3倍程度高い事が分かった。また、両者の一致率は80.6%であった。このことは、前培養PCR法において、前培養により細菌数そのものが増えると同時にPCRにより感度が格段に上がったためとだと推察された。一方で前培養PCRにおいて陰性、培養法で陽性となり結果が一致しないサンプルも少なからずあった(11サンプル、2.2%)。これは、血液寒天培地上でのコロニー目視検査とコアグラゼ試験では、正確な同定が難しい場合があるのではないかと推察された。

<農場間の陽性率の比較>

次に各農場間における個体乳のSA陽性率を比較した(表2)。A農場では、ロボット牛群(77頭、117サンプル)を検査した結果、前培養PCR法により1.7%(2サンプル)が陽性であった。B農場では、パーラー搾乳牛群(124頭、124サンプル)を検査した結果、前培養PCR法により25%(31頭)が陽性であった。C農場では、ロボット牛群(102頭、254サンプル)を検査した結果、前培養PCR法により29.9%(76サンプル)が陽性であった。以上の結果を比較すると、A農場<B農場<C農場の順で陽性率が高くなっていることが分かった。北海道酪農検定検査協会の乳検のデータより、各農場での体細胞数を比較すると、A農場<B

農場<C 農場の順で体細胞数が高くなり、SA の陽性率と一致した結果となった（表 3）。これらの結果により、SA はどの牛群でも感染牛が存在していることが明らかとなった。また、ロボット牛舎でも適切な搾乳衛生や飼養管理などにより、SA の感染をほぼ制圧できる場合と、高感染牛群となってしまう可能性があることが分かった。実際に高感染牛群の C 農場を見学した際に、ロボット搾乳機やその周囲の衛生管理に問題があると感じられた。また C 農場では、3 産以上で極端に体細胞数が増加していた（表 3）。これは、臨床症状をはっきりと示さない潜在性の感染牛群が長年存在していることを示し、そのことが高度感染牛群の原因と考えられた。従来の培養法では、SA の感染制圧は難しいということかもしれない（前培養 PCR 法では従来法よりも 3.6 倍ほど感度が高い 表 2）。A 農場はロボット搾乳機をうまく使用し、適切な搾乳衛生を行う事によって SA の感染をうまくコントロールし、その結果牛群の体細胞数も 9 万という数値になったと考えられる。一方で B 農場は同規模のパーラー搾乳牛群であるが、25% が陽性となった。近年ロボット搾乳機の精度も上がり、適切なメンテナンスと搾乳衛生により、人の手を介すパーラー搾乳より SA の感染機会が少ないとも考えられた。これまでの報告においても、バルク乳の体細胞レベルは牛群内の罹患率と相関すると言われており（4、5）、たとえ体細胞数が 30 万以下の牛群であっても牛群内のバイオセキュリティが改善することで、さらなる体細胞数の減少、潜在的な乳房炎牛の減少も期待できることが明らかとなった。

SA は二つのリスクを有する。一つはヒトへの健康被害をもたらす食中毒原因菌としての側面である。もう一点は、ウシに対する慢性感染症のリスクである。SA が慢性感染症を引き起こす原因としては、多くの乳房炎原因菌の中で、唯一、スーパー抗原を持つことである。スーパー抗原は乳腺免疫を強く攪乱させる結果、有効な免疫応答を誘導できないばかりか、乳腺における炎症応答を促進することで、生乳の合成を抑制する。このことが、SA 性乳房炎の最大のリスクである。本法は早期発見、早期摘発により、これらの応答を回避しうる革新的な技術である。現状では培養法が用いられているが、PCR に比較して感度、特異度共に、不十分であることが確認された。SA 性乳房炎の発見が遅れると、SA が乳

腺組織内に定着し、乳腺細胞による乳汁産生を抑制するばかりか、持続的排菌により感染拡大の原因にもなる。本課題で構築した技術は、これらの問題を解決へと導き得る有効な畜産技術であることが研究結果から示唆された。

<本法の社会的優位性>

日本における農業産出額は平成26年の調査では8兆3639億円に及んでいる。そのうち、畜産産出額は全体の35%、すなわち2兆9448億円をしめる。生乳はその内の6697億円をしめる一大産業に位置付けられている。しかし、日本は酪農産業においては未だ後進国であり、諸外国の牛乳乳製品の自給率が80（イギリス）～200%（オランダ）を示す中で、我国の自給率はわずかに65%である。さらに飼養管理において、高騰を極める輸入穀物への依存度が高いことも経営基盤を揺るがす大きな要因の一つとされている。

我が国における酪農の安定的発展と、生乳の国内需給量を確保する上で生産コストの低減は重要な課題である。また、その中で、最も経済損失の高い乳房炎をどのように制御するかは、獣医畜産領域に課せられた大きな課題である。平成7～26年度の我国の乳牛に関する飼養動向を見ると、酪農家戸数は半減している一方、一戸あたりの飼養頭数は倍増している。すなわち、この20年余りで日本は急激な経営規模の拡大が図られたことになる。しかし、酪農家戸数の減少は、飼養頭数の増加だけで補うことはできず、結果として、平成7年に850万トンであった我国の生乳生産量は平成25年度には750万トンまで、約20年間で100万トン減少した。さらに、経営規模拡大が急激に先行するなかで飼養管理技術が十分に確立されず、結果として酪農家における一人当たりの労働時間は2405時間/年に及んでいる。これは、労働基準法で規定されている労働時間を15%以上も上回るものである。さらに、農業従事者の平均年齢は酪農において、55.7歳を示しており、永続的な酪農の維持に暗い影を落としている。このような酪農産業を取り巻く状況を考える時、大規模経営による生産コストの低減や、そういった酪農技術に対応しうる疾病防除技術の構築が重要となる。本課題では経営技術の主軸を「ロボット」として位

置付けている。ロボットは、省力化とともにその技術革新によって、正確な動作による適切な搾乳を行うことが可能である。すなわち、人の手による搾乳では成し得なかった、病原性細菌の侵入を極力制圧することが可能となる。このようなロボットの優位性はマイコプラズマ性乳房炎ですでに証明されている。マイコプラズマは高度感染性微生物の一種であり、牛群内で極めて迅速に蔓延するとともに、乳腺の機能を不可逆的に阻害し、酪農業に極めて甚大な経済的および経営者の精神的ダメージをもたらす。しかし、本感染症は、搾乳器具を介して感染拡大することから、搾乳後に薬剤による自動洗浄機能を正確に動かすロボット搾乳機では、感染は広がりにくいことが示されている。これら衛生面からも優位性があり、さらに省力化を考える時、ロボットを日本酪農の基盤技術として位置づけることは非常に有用であると考察された。

我々が本研究で開発した SA の検出技術は、このロボットの従来機能に付加することで、さらなる生産コストの低減を可能にするものである。SA による乳房炎は、沈黙の病気であり、大腸菌などによるそれとは異なり明確な臨床症状を示さない。そのため、酪農経営者や獣医師も時として見落とす場合も多い。しかし、この病気の最大の経済的損失は産乳量の減少、すなわち「減乳」によって引き起こされる。乳房炎による経済損失は、治療や個体の淘汰費用などによるものはわずか 10%程度にとどまり。残りの 90%は酪農経営者が全く意識できないなかでの「減乳」である。全国的なサーベイでも、概ね 60%以上のバルク乳から SA が検出されることを考えると、国内において SA 性乳房炎による経済損失は、極めて大きいものであることは容易に想像されることである。

我々はこの潜在的な経済損失の低減を目的に本法を開発した。本法は多検体の同時処理を可能にする技術であると同時に、培養法では見逃していた多くの感染個体を検出することを可能とした。これによって、高感度かつ迅速に感染個体に対する対応が可能となる。SA はバイオフィーム等により、乳房内に微小膿瘍を形成し、その結果として、長期定着が引き起こされる。しかし本法によって、早期に摘発された場合は、抗生物質による治療等も可能であり、結果として SA 性乳房炎の制圧を可能にするものである。将来的には本技術をロボット

システムに組み込み、自動検出により、さらなる効率化が可能になることも強く期待されるものである。また、生産現場で問題となるその他の微生物、すなわち大腸菌や連鎖球菌、マイコプラズマ、真菌、藻類の早期診断において、本法の基本原理を導入することが可能であり、将来的には「乳房炎を発生させないロボットシステム」の構築も決して夢ではないと考えられる。本研究で開発した技術は、高い優位性と経済性を兼ね備えたものであり、日本ブランドとして海外に売り込むことも可能になる。

以上のことから総括として、本技術は世界的にも高い優位性を持ったものであり、将来、酪農経営基盤を盤石なものとする主要な酪農技術になり得ることが強く期待される。今後さらに技術的改良を進めることは、国内外における恒常的な酪農産業の発展において重要になることが強く期待されるものである。

結論

以上をまとめると、高感度な前培養 PCR 法では、黄色ブドウ球菌感染牛を的確に摘発することができ、その結果と牛群の体細胞数が一致していた。また、ロボット搾乳機は、適切なメンテナンスと搾乳衛生を実施して用いることで、黄色ブドウ球菌の感染をしっかりとコントロールできる可能性が明らかとなった。さらに、臨床的な乳房炎罹患牛が牛群内に認められなくても、乳中の体細胞数が高い牛群では潜在的な SA 罹患牛がいる可能性が高いことが明らかとなった。黄色ブドウ球菌罹患牛を摘発するには、従来行われてきた培養法では十分ではなく、本研究で用いた前培養 PCR 法のような感度が高く正確な方法を用いることが必要であると推察された。我が国における酪農業の安定的発展と、生乳の国内需給量を確保する上で生産コストの低減は重要な課題である。またその中で、最も経済損失の高い乳房炎をどのように制御するかは、獣医畜産領域に課せられた大きな課題である。国際市場による競争激化や輸入飼料高騰による経済的圧迫、さらに国内における農家戸数の減少、飼養頭数の減少、酪農家の過重労働（労働基準法を超える労働時間）、後継者の減少などといった様々な問題点を総合的に解決するためには、抜本的な酪農技術の見直しが必要であり、

その基幹技術として、ロボットの位置付けは極めて大きなものになることが予測される。そうした中で、その特性を生かしうる乳房炎防除技術として本課題で確立した黄色ブドウ球菌の検出技術は高い優位性を有するものである。今後、さまざまな規模やロボット機種 of 牛群に対して同様の調査を行い、黄色ブドウ球菌による潜在性乳房炎の現状を把握し、ロボット搾乳と感染症コントロールの適切な導入による酪農経営の新しい方法として提案できるよう研究を進めて行きたい。

引用論文

- 1) MelleMBERGER RW, Troyer B. Control of *Staphylococcus aureus* through herd segregation. In: Proceedings of the 33rd Annual Meeting of the National Mastitis Council, Orlando, FL. Madison (WI) : National Mastitis Council:1994. P.364-5.
- 2) Nickerson SC. Preventing new *Staphylococcus aureus* mastitis infection. Vet. Med. 1993; 33:368-373.
- 3) Ishihara K, Shimokubo N, Sakagami A, Ueno H, Muramatsu Y, Kadosawa T, Yanagisawa C, Hanaki H, Nakajima C, Suzuki Y, Tamura Y. Occurrence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in an academic veterinary hospital. Appl Environ Microbiol. 2010; 76(15): 5165-74.
- 4) Jayarao BM, Pillai SR, Sawant AA, et al Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. J. Dairy Sci. 2004; 87: 3561-73.
- 5) Eberhart RJ, Hutcinson LJ, Spencer SB. Relationships of bulk tank somatic cell counts to prevalence of intramammary infection to induces of herd production. J. Food Prot. 1982; 45: 1125-8.