牛乳による乳房炎検出方法に関する研究

I 初乳および常乳の Catalase activity と乳房炎検出上の意義について

長 沢 太 郎・棚 橋 保・葛 谷 泰 雄

(岐阜大学農学部)

Studies on methods for the detection of bovine mastitis by milk

I Catalase activity of colostrum and normal milk and its significance on the detection of bovine mastitis.

T. NAGASAWA, T. TANAHASHI, and Y. KUZUYA

(Faculty of Agriculture, Gifu University)

目 的

従来、乳房炎の検出のために乳汁を利用する方法は種々考案されているが、Catalase activity による方法はかなり広く行なわれている。即ち HUCKER¹⁾ は clinical および subclinical の乳房炎を検出する方法として極めて有効であると述べ、PROUTY²⁾ は細胞数、Catalase test B. T. B. 試験法の間には一般的に相関関係が認められ、白血球の増加により Catalase test 陰性を示す割合の減少は B. T. B. 試験法のそれよりも著しいと報告し、また HALVERSEN³⁾ らは細胞数、Catalase test, pH, 塩素試験等の中で Catalase test が細胞数検査法と共に最も信頼に値すると主張している。しかしその測定方法には Smith 醗酵管を利用するものが多く、従つて測定に時間を要し、精度もかなり低い。そこで我々はこの点を改良し、乳房炎検出方法として Catalase activity を応用する際の基礎とするために、Warburg 検圧計を使用し、初乳および常乳の Catalase activity, あるいは貯蔵温度や経過時間の影響等について明らかにすると共に、細胞数、pH 等との関連性についても検討を加えた。

I 材料及び方法

1. 試 料

供試牛は、主として名古屋市内のなるべく飼養条件の同じな専業牧場に飼養されているホルスタイン、又はその雑種であつて、初乳 activity 測定用には初乳期にあるものを、また常乳 activity 測定用には初乳期及び泌乳末期以外にあるものを用いた。試料は、各分房の foremilk でなしに、完全に搾り切つた後によく混合し、できるだけ無菌的に採取した。ただし Hotis test 用には、各分房の foremilk の混合乳を用いた。

2. 方 法

a. Catalase activity の測定

Warburg 検圧計を使用し、主として藤田⁴⁾の方法によ
日畜会報, 27, (4).

つた。即ち、試料1.5ccに0.3mH₂O₂の0.1cc及び1.5ccの緩衝液を添加し、38°C で30分間に発生する酸素の量をμl. で示した。なお緩衝液の混合割合は下記の通りである。即ち0.154m NaCl 950, 0.154m NaH₂PO₄ 7.5, 0.11mNa₂HPO₄ 42.5 の割合に混合したもの100分に対し、0.154mNaHCO₃ を2分の割合にして、そのpHは約7.7である。

b. 細胞数

PRESCOTT 及び BREED⁵⁾ の方法により 60 視野を測定し、染色には Giemsa 液を使用した。

c. Hotis test

判定は MURPHY⁶⁾ の主張を参考として、次のように行なつた。即ち色調については無関係に、沈殿のあるもの即ち管底または管壁に黄色・橙色・鉄錆色などの flake または ball を生ずるものを陽性とした。

d. 細菌検査

細菌数は Hotis test 用の試料について、直接鏡検法により60視野を計算して求めた。染色液には Newman-Lampert strain Formula No.2 を使用した。なお菌種の鑑定は、Hotis test 判定後の試料によつた。

e. Smith 醗酵試験

Smith の醗酵管を用い、常法⁷⁾によつた。

f. pH

pH は硝子電極によつて測定した。

II 結果及び考察

1. 初乳の Catalase activity

供試牛は4~5頭で、その中には Hotis test 陽性のものも含まれているが、今分娩後1週間の Catalase activity の消長を示すと、第1表の通りである。

即ち初乳の Catalase activity の平均値は、分娩後の日数の経過によつて著しく減少するが、後述する Hotis test 陰性の常乳に比べると、著しく値が高く、また乳房炎の既往症を有するものの約2倍の値であつて、分娩後

第1表 初乳の Catalase activity の消長

分娩後の 経過日数	供試頭数	Catalase activity $\mu\text{l}/1.5\text{cc}$	細胞数 単位千/cc	Hotis test と菌型					酸 度 %	pH	比 重	脂 肪 %
				Flake	連鎖球菌	双球菌	葡萄球菌	桿菌				
1	4	4271.6	19071	-1 +3	4	2	2	2	0.288	6.35	1.046	4.55
2	4	1938.5	14060	-2 +2	3	4	1	2	0.205	6.46	1.035	4.50
3	4	1773.4	8930	-2 +2	3	4	1	2	0.188	6.53	1.031	4.83
4	5	1677.5	9162	-1 +4	4	5	2	2	0.177	6.65	1.032	4.87
5	5	1274.7	4406	-1 +4	4	4	3	2	0.163	6.69	1.031	4.93
6	5	808.8	3080	-1 +4	4	4	2	2	0.163	6.65	1.032	3.37
7	5	1040.1	5651	-1 +4	4	5	2	2	0.144	6.79	1.029	4.35

第2表 A区の Catalase activity

試験 番号	Catalase activity $\mu\text{l}/1.5\text{cc}$	Smith 醗酵試 験 cc	細胞数 千/cc	細菌数 千/cc	菌 型				酸度 %	pH	比重	脂肪 %
					連鎖球菌	双球菌	葡萄球菌	桿菌				
1	69.8	0	43	55			+	+	0.162	6.70	1.0306	4.60
3	39.6	0	84	134	+	+		+	0.203	6.51	1.0306	2.70
5	29.3	0	43	33		+		+	0.198	6.65	1.0293	3.00
6	49.0	0.6	294	87		+		+	0.207	6.55	1.0317	2.93
7	60.8	1.0	721	37		+		+	0.167	6.41	1.0309	3.30
10	53.0	1.0	310	33		+		+	0.163	6.40	1.0271	5.00
12	69.2	0.6	410	177		+		+	0.194	6.63	1.0307	4.40
15	49.1	1.2	450	201	+	+	+	+	0.162	6.60	1.0305	4.95
16	36.6	1.0	470	54		+	+	+	0.180	6.65	1.0310	4.45
17	103.0	1.2	354	100		+	+	+	0.171	6.70	1.0319	3.60
18	56.8	0.7	420	167		+	+	+	0.162	6.79	1.0325	3.20
19	66.9	0.7	587	33		+	+	+	0.162	6.65	1.0325	3.50
20	40.4	0.4	33	2	+	+	+	+	0.158	6.69	1.0316	3.85
21	68.1	0.7	237	53		+	+	+	0.140	6.70	1.0342	3.80
24	33.7	0	33	20		+	+	+	0.153	6.58	1.0304	2.90
25	65.0	0.9	237	44		+	+	+	0.137	6.75	1.0309	3.50
26	53.4	0.3	33	44		+		+	0.122	6.67	1.0281	3.10
30	44.5	0.6	450	54		+	+		0.209	6.50	1.0342	3.95
34	54.0	1.4	53	20		+		+	0.155	6.70	1.0332	3.70
36	97.9	1.4	804	54		+		+	0.176	6.50	1.0302	3.00
39	74.5	0.4	224	10		+		+	0.162	6.54	1.0319	3.55
47	111.8	5.6	1,619	1,113	+	+			0.194	6.40	1.0309	3.70
53	58.5	0.6	86	20	+	+		+	0.198	6.48	1.0319	3.10
54	64.8	0.4	33	20		+	+		0.180	6.58	1.0333	3.65
55	71.6	1.3	527	44		+	+	+	0.149	6.54	1.0282	3.10
56	78.7	1.8	594	33		+		+	0.162	6.60	1.0311	3.70
平均	61.5	0.9	348	102	+				0.170	6.60	1.0311	3.62
8	79.7	1.3	2,471	67		+	+	+	0.132	6.73	1.0287	5.60
22	114.9	1.0	988	120		+	+	+	0.158	6.80	1.0340	6.00
23	173.7	4.6	1,810	334		+	+	+	0.124	6.81	1.0279	3.90
27	84.2	0.4	1,152	54		+		+	0.131	6.70	1.0277	3.30
48	161.3	3.6	734	69		+			0.151	6.70	1.0294	3.40
平均	122.8	2.2	1,431	129					0.139	6.75	1.0295	4.44
総平均	71.4	1.1	523	106					0.165	6.62	1.0309	3.76

1週間経過しても、まだ常乳の範囲には下がらない。一方細胞数は、Catalase activity と平行して、1週間後には1/3の565万に減少した。

2. 常乳の Catalase activity

牛群を乳房炎の経歴と Hotis test の成績によりA, B, Cの3区に分けた。A区は乳房炎の既往症なく Hotis test 陰性のもの、B区は同様に既往症なく、Hotis test 陽性のもの、C区は乳房炎の既往症があるが現在は勿論

治癒し、外観的には全くの常乳を分泌するものである。各区の測定結果を表示すれば下記の通りである。

A区において、Catalase activity は最高173.7 μl 、最低29.3 μl 、平均71.4 μl で、平均細胞数は 52 3,000、pHは6.62、Smith 醗酵試験は1.1ccである。従つて細胞数・pH, Smith 法等の諸点から総合判断をすれば、この71.4 μl なる値は一応、潜在性乳房炎の疑いのない健康牛の Catalase activity を示すものといえる。しかし Hotis test は乳房炎の検出方法として勿論完全なものとは認められないから、この検査で陰性のものの中には、潜在性乳房炎を疑い得るものも若干含まれることが当然考えられる。従つて細胞数50万、pH6.70を標準とし、この二つについて陽性なものを求めると、31例中5例即ち16.1%あつて、その平均 activity は122.8 μl 、平均細胞数は 143 万、pH 6.75、Smith 法は

2.2cc となり、細胞数、pH、スミス法いずれも増加し、潜在性乳房炎の疑いが大となるが、連鎖球菌は全然見いだされず、葡萄球菌が2例検出されたのみである。31例から以上の5例を除いた残りの26例、即ち83.9%では、平均 activity は遙かに低くて61.5 μl 、細胞数は 34 8,000、pH6.60である。このように完全な常乳の Catalase activity は61.5 μl であるが、後述(実験3)するように、Catalase activity は潜在性乳房炎の有無のみ

第3表 B区の Catalase activity

試験 番号	Catalase activity $\mu\text{l}/1.5\text{cc}$	Smith 発酵試 cc	細胞数 千/cc	細菌数 千/cc	菌 型				酸度 %	pH	比重	脂肪 %
					連鎖 球菌	双球 菌	葡萄 球菌	桿菌				
14	73.0	0.9	404	67		+	+	+	0.189	6.52	1.0279	5.50
15	49.1	1.2	450	201		+	+	+	0.162	6.60	1.0305	4.95
41	111.8	0.8	100	33	+	+	+	+	0.180	6.59	1.0312	3.60
42	183.1	1.2	143	10	+	+		+	0.162	6.61	1.0308	4.50
43	112.0	0	36	20	+	+		+	0.167	6.60	1.0317	3.25
45	89.5	1.6	303	43	+	+			0.171	6.60	1.0309	3.08
平均	103.1	1.0	240	62					0.172	6.59	1.0305	4.15
4	48.4	0	287	77		+	+	+	0.155	6.70	1.0310	2.68
9	168.6	3.3	4,175	201	+	+	+	+	0.144	6.66	1.0286	5.00
11	111.1	2.5	2,872	112		+	+	+	0.158	6.60	1.0342	3.35
13	1059.6	5.1	23,169	568		+	+	+	0.131	6.80	1.0338	4.70
28	116.3	3.3	167	33	+		+	+	0.131	6.78	1.0302	4.40
29	09.7	2.8	895	20		+		+	0.160	6.67	1.0322	4.45
31	94.5	2.6	1,486	33	+	+			0.160	6.70	1.0337	4.47
35	133.8	3.9	1,450	67	+	+	+	+	0.173	6.62	1.0322	3.60
38	104.5	1.8	1,105	33	+	+	+	+	0.131	6.60	1.0335	3.34
49	205.1	2.3	1,690	33	+	+			0.140	6.68	1.0274	4.95
50	71.4	1.4	437	10	+	+			0.175	6.70	1.0329	4.15
51	135.0	3.0	1,596	43	+	+		+	0.180	6.61	1.0314	3.65
平均	196.6	2.7	3,277	103					0.153	6.68	1.0318	4.06
総平均	165.4	2.1	2,265	89					0.159	6.65	1.0313	4.09

備考 Hotis test の Flake の程度は試験番号41, 42は, ++, 他は+であった。

第4表 C区の Catalase activity

試験 番号	Catalase activity $\mu\text{l}/1.5\text{cc}$	Smith 発酵試 cc	細胞数 千/cc	細菌数 千/cc	菌 型				酸度 %	pH	比重	脂肪 %
					連鎖 球菌	双球 菌	葡萄 球菌	酸菌				
2	60.0	—	153	78	+		+	+	0.153	6.71	1.0309	3.20
32	128.4	3.0	83	33	+	+			0.153	6.70	1.0310	4.42
33	439.5	7.6	6,145	53	+	+			0.173	6.61	1.0320	3.37
46	149.5	4.3	1,472	53	+	+			0.149	6.71	1.0314	3.00
52	168.1	3.2	310	33	+	+	+		0.171	6.62	1.0294	3.50
57	1446.2	*	25,217		+	+	+		0.135	7.05	1.0294	4.20
58	1217.3	*	18,430	1,058		+	+	+	0.108	6.99	1.0287	3.55
59	721.2	*	5,408	436	+	+			0.122	7.00	1.0279	4.50
平均	541.3		7,152	249					0.146	6.80	1.0301	3.72

備考 1 * 発生酸素多量のため測定不能 2 Hotis test の Flake の程度は, 試験番号2は++, 他は+であった。

第5表 A, B, C 3区の平均結果の比較

試験 区	試験 例数	Catalase activity $\mu\text{l}/1.5\text{cc}$	細胞数 千/cc	細菌数 千/cc	菌 型				Smith 法 cc	酸 度 %	pH	比重	脂肪 %
					連鎖 球菌 例	双球 菌 %	葡萄 球菌 例	桿菌 %					
A	31	71.4	523	106	620.0	3096.8	1550.0	2686.7	1.1	0.165	6.62	1.0309	3.76
B	18	165.4	2,265	89	1266.7	1794.4	950.0	1477.8	2.1	0.159	6.65	1.0313	4.09
C	8	541.3	7,152	249	787.5	787.5	450.0	225.0	—	0.146	6.80	1.0301	3.72

数240,000, 細菌数62,000, pH6.59である。このように細胞数, 細菌数ともにA区より少ないにもかかわらず, 高い activity を示した原因については, 今後の研究に待たなければならない。Catalase activity と細胞数との間には, A区における以上に高度の相関関係が認められ $r=0.98$ であつて, 後述の試験結果(3)ともよく一致する。

C区の Catalase activity は非常に高く, 最高1446.2 μl , 最低60.0 μl , 平均 541.3 μl 。で, A区の約7.6倍を示し, 細胞数もこれに伴い急激に増加して 7,152,000 となり, Catalase activity と細胞数との相関関係は $r=0.97$

にかかわらず, 白血球の増減によつても変化するから, その生理的変動を考慮し, 常乳の Catalase activity は約70 μl , 程度と考えるのが妥当であろう。

一方本試験法と SMITH 法との間にはかなり密接な関係が認められ, $r=0.33$ であるが, しかし細かく見ると, たとえば, SMITH 法で1.0ccのものが本試験法では, 60.8, 53.0, 36.6, 114.9 μl のように変動する。従つて SMITH 法は, その精度から考えて, 乳房炎検出方法としては適当でないといえよう。また Catalase activity と白血球数との間では, $r=0.58$ であつて, かなりの相関関係が認められる。

B区の Catalase activity は最高1059.6 μl , 最低48.4平均165.4 μl であつてA区に比し, 2.3 倍も高い値であるが, SMITH 法によるものは2.1cc であつた。細胞数は著しく高く, A区の値の約4.3倍で最高23,169,000, 最低36,000, 平均2,265,000であつた。なお細胞数50万, pH6.70以下のものは18例中6例, 即ち33.3%で, その activity の平均は103.1 μl , 細胞

であつた。なお SMITH 法では非常に値が高く, 測定不能が8例中4例も出ている。

A, B, C 3区の平均結果を一括表示すれば, 第5表の通りである。

即ち潜在性乳房炎の程度が大となるに従つて, (1)細菌数は著しく増加し, (2)連鎖球菌の検出割合が飛躍的に増大し, (3)牛乳の酸度, pHはアルカリ側に傾くが, A, B両区の差異は僅少で, C区は著しくアルカリ側に近づく。勿論この程度の pH でも, 市販の乳房炎検出試験紙で検出することは不可能である。

これを要するに、本試験法による Catalase activity を乳房炎検出方法として用いる場合には、次のようにいえよう。即ち常乳の activity は約70 μ l.程度であるがこれが増加して165 μ l.程度となれば、潜在性乳房炎の疑いが生じ、さらに増大して540 μ l.程度となれば、ますますその疑いが濃厚となる。

3. Catalase activity と白血球数との関係

KONIG, SELIGMANN⁸⁾ らは、牛乳中の Catalase の大部分が細菌に由来するとし、また VAN DER VELDEN⁸⁾ は

細胞物質に関係があると述べている。従つてこの点を明きらかにすることは、Catalase index を乳房炎検出のために利用する場合、極めて重要なことである。この目的のために、搾乳直後の新鮮乳について1分間 2,000~3,000回転、5分間の遠心分離を連続7回行ない白血球をほとんど完全に除去した後、Catalase activity を測定し、分離前のものと比較した結果は、次表のごとくである。

即ち Catalase activity が0~100 μ l の範囲にあるも

第6表 Catalase activity と白血球数との関係

Catalase activity μ l/1.5cc	例数	Catalase activity			白血球数			細菌数			比重	酸度 %	pH	脂肪 %
		原乳 μ l/1.5cc	分離後 μ l/1.5cc	原乳に対する %	原乳	分離後	原乳に対する %	原乳	分離後	原乳に対する %				
0~100	5	72.9	46.9	64.3	220,000	0	0	075,000	23,000	30.7	1.032	0.147	6.51	2.77
101~200	10	132.1	70.9	53.7	604,000	3,000	0.5	65,000	24,000	36.9	1.032	0.169	6.61	3.61
201 以上	4	678.3	141.3	20.8	9298,000	10,000	0.1	63,000	24,000	38.1	1.031	0.131	6.82	3.86

備考 細胞外に分泌される酵素の影響をなるべく少なくするように努めたが、搾乳より測定までに1~1.5時間を要した。

のは、遠心分離後、その activity は64.3%に減少し、白血球は完全に除去されるから、この activity は細菌に基づくものといえる。しかしながら一方、生乳細菌中のかなりの部分を占める乳酸菌、並びに嫌気性菌は、Catalase 作用を有しないとはいえ、遠心分離により細菌の70%も除去されることを考えれば、生乳中の細菌に由来する Catalase activity は、この数値よりもさらに大きなものと考えるのが妥当であろう。さらにCatalase activity が増加して101~200 μ l程度となれば、白血球に基づくものは増加し、生乳中の Catalase activity の46.3%に達し、201 μ l 以上となれば79.2%と飛躍的に増加

する。即ち潜在性乳房炎の疑いが大となるにつれて、Catalase activity のうち、白血球に由来する割合が増大し、(2)の実験結果に示されたごとく、activity と白血球との間に密接な相関関係が認められることになる。

4. 試料の貯蔵温度及び経過時間の影響

搾乳後の貯蔵温度及び経過時間が Catalase activity に及ぼす影響を知ることは、乳房炎検出方法として本試験法を適用する際の基礎的事項である。そこで搾乳直後の乳汁を10°, 20°, 30° Cにそれぞれ2.5時間と5時間放置した後、Catalase activity を測定したところ、その結果は第7表の通りであつた。

第7表 貯蔵温度と経過時間の影響

貯蔵温度	経過時間	例数	Catalase activity μ l/1.5cc	酸度 %	pH	細菌数 千/cc	細胞数 千/cc	比重	Hotis test と菌型				
									Flake	連鎖状 球菌	双球菌	葡萄状 球菌	桿菌
	直後	4	70.4	0.147	6.71	59	427	1.032	—4	0	4	4	4
10° C	2時30分	4	76.9	0.147	6.70								
	5時	4	87.3	0.151	6.68								
20° C	2時30分	4	73.2	0.150	6.67								
	5時	4	82.2	0.155	6.66								
30° C	2時30分	4	75.5	0.153	6.65								
	5時	4	83.5	0.159	6.63								

Catalase activity が貯蔵温度及び経過時間によって増加する傾向があるか否かにつき、分散分析により有意性を検討した結果、 $F=3.32(F_{1,8}10.01)=4.01$, $F_{1,8}(0.05)=2.66$ であつて、5%の有意水準では有意性が認められるが、1%では認められない。即ち10°, 20°, 30° Cにそれぞれ2時間30分と5時間放置すれば、細菌数は、59,000から69,000, 104,000, 140,000に増加し、Catalase activity も増加する傾向が認められるが、その間本質的な差異がないと考えるのが妥当であろう。

要 約

Catalase activity を乳房炎検出に利用する目的で、Warburg 検圧計を使用し、初乳および常乳の Catalase activity を測定した。またこの activity と白血球、pH 等との関連性や、貯蔵温度及び経過時間の activity への影響についても検討した。

主要な結果は次の通りである。

1. 初乳は、常乳よりも Catalase activity が著しく

高く、第1日目は $4271.6\mu\text{l}/1.5\text{cc}$ で、時間の経過により減少するが、1週間経過しても常乳の範囲まで低下しない。

2. 乳房炎の既往症がないものから生産された Hotis test 陰性の試料では、Catalase activity の平均は $71.4\mu\text{l}/1.5\text{cc}$ 、同じく Hotis test 陽性のものでは $165.4\mu\text{l}$ 、乳房炎の既往症を有するが現在では治癒し外観的には常乳を分泌するものからの試料では $541.3\mu\text{l}$ 、である。従って Catalase activity が増大して $165\mu\text{l}$ 程度になれば、潜在性乳房炎を疑い得るし、 $540\mu\text{l}$ 程度となれば、その疑いはいよいよ濃厚となる。

3. 常乳の Catalase activity の約 $2/3$ は細菌に基づくものであるが、この activity が増大するにつれてその割合は減少し、細胞によるものの比率が著しく上昇して約 80% に達する。

4. 牛乳を 10° 、 20° 、 30°C にそれぞれ2時間30分と5時間貯蔵しても、Catalase activity に有意の差が

認められない。

本研究は文部省試験研究費によった。

(1956. 4. 23. 受付)

文 献

- 1) HUCKER, G. J., TRUDELL, F. and JENNINGS, W. S.
New York Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. No. 199
(1932)
- 2) PROUTY, C. C. J. Dairy Sci., 17, (2): 78, (1934)
- 3) HALVERSEN, W. V., CHERRINGTON, V. A. and
HANSEN, H. C. Ibid. 17, (4): 295, (1934)
- 4) 藤田秋治 検庄法と其応用: 386, (1949)
- 5) LITTLE, R. B. and PLASTRIDGE, W. N.
Bovine mastitis, 504, (1949)
- 6) " " : 154, ()
- 7) " " : 128, ()
- 8) 里正義 乳学第1巻乳汁編: 329, (1955)

Résumé

For the purpose of detecting bovine mastitis by catalase activity, the catalase activity of colostrum and normal milk was determined gasometrically by measuring the volume of oxygen set free with Warburg's manometer. Moreover, we conducted experiments not only on the relationship between the activity and the leucocyte count and pH, but also on the influence of the storage temperature and period of time on the activity. The main results obtained are as follows:

1. Colostrum shows higher activity than normal milk. Though the average activity is $4271.6\mu\text{l}$ per 1.5cc one day after calving and decreases remarkably with the lapse of time, it does not reduce to the level of normal milk even one week after calving.
2. The catalase activity of the milk, giving a ne-

gative Hotis test, from cows with no history of mastitis is $71.4\mu\text{l}$. That of the milk, giving a positive Hotis test, from the similar cows, is $165.5\mu\text{l}$. That of the milk from cows which have history of mastitis but are producing apparently normal milk is $541.3\mu\text{l}$. Therefore, a catalase activity of $165\mu\text{l}$ or higher would indicate a suspicion of sub-clinical mastitis, so that the activity as high as $540\mu\text{l}$ would especially be a strong indication.

3. In normal milk, a greater part (about $2/3$) of the catalase activity is caused by bacteria, whereas in mastitis-infected milk a greater percentage (about 80%) of the activity is caused by leucocytes.
4. In experiments where milk was stored at 10° , 20° and 30°C for $2\frac{1}{2}$ and 5 hours, respectively, no difference in activity was noticed among them.