

慢性・潜在性乳房炎牛に対するステビア抽出発酵液経口投与の効果

生田健太郎*・山口悦司*・函城悦司*・高木道浩**・千田 廉***

要 約

慢性・潜在性乳房炎牛15頭に対し、ステビア抽出発酵液(以下ステビア液と呼ぶ)100mlを同量の水で希釈して3日間連続で経口投与した。搾乳毎にカリフォルニア・マスタイトイス・テスト(以下CMTと呼ぶ)変法による乳房炎診断を行い、投与前、投与の3および7日後に乳汁中の体細胞数や細菌数を調査した。投与7日後に効果判定を行った。

- 1 ステビア液の経口投与は乳量や一般乳成分には影響しなかった。
- 2 CMT変法の反応では14頭中6頭(42.9%)で著効または有効と判定された。
- 3 体細胞数の低減効果は15頭中12頭(80.0%)で著効または有効と判定された。
- 4 細菌数は15頭中9頭(60.0%)で減少した。感染分房に対する低減効果は、一般細菌では37分房中24分房(64.9%)で著効または有効と判定され、黄色ブドウ球菌では31分房中21分房(67.8%)で著効または有効と判定された。

以上より、慢性・潜在性乳房炎牛へのステビア抽出発酵液の経口投与は、乳汁中の体細胞数や細菌数の低減に有効であることが示唆された。

Effects of the Oral Use of Fermented Stevia(*Stevia rebaudiana*) Extract on Chronic or Subclinical Mastitis of Dairy Cows

Kentarou IKUTA, Etsuji YAMAGUCHI, Etsuji HAKOGI,
Michihiro TAKAGI and Yasushi CHIDA

Summary

Oral administration of stevia fermentation products were examined the recovery effect to chronic or subclinical mastitis using fifteen Holstein cows. The liquid stevia of 100 ml was diluted with same amount water before each administration. The oral treatments one time per continuously for three days in each cow. Modified California mastitis test (MCMT) was performed every milking periods. Somatic cell counts (SCC) and bacterial counts were calculated at pre-administration, 3-days and 7-days after administration. The determination of improvement effect to mastitis was performed at 7-days after administration.

- (1) The milk yield and milk compositions were not affected by administration of stevia fermentation products.
- (2) The improvement of MCMT reaction was showed 6 among 14 cows (42.9%).
- (3) The effect of SCC reduction was showed 12 among 15 cows (80.0%).
- (4) The effect of reducing the count of bacteria was showed 9 among 15 of cows (60.0%), 24 among 37 infected quarter of general bacteria (64.9%) and 21 among 31 infected quarter of *Staphylococcus aureus* (67.8%).

These results indicated that oral administration of stevia fermentation products is effective for reduction of SCC and bacterial counts in chronic or subclinical mastitis of dairy cows.

キーワード：乳牛，慢性乳房炎，ステビア，体細胞数，細菌数

2006年8月31日受理

* 兵庫県立農林水産技術総合センター淡路農業技術センター

** 神戸大学農学部

*** (株)バイセン

緒 言

安全・安心な食品を求める社会情勢を受け、酪農業界でも衛生的乳質、とくに体細胞数に対する自主規制が厳しくなりつつある。体細胞数は乳汁中に含まれる白血球や脱落した乳腺上皮細胞の総数であるが、10万個/ml 以上の場合は微生物感染に伴う白血球の増加、すなわち乳房炎によるものである¹⁸⁾。乳房炎は抗生剤の投与が主な治療法であるが、泌乳期間中の慢性・潜在性乳房炎には効果が低いため、家畜共済の診療指針⁹⁾では慢性乳房炎は治療価値が少ないとされている。しかし、牛群内の一部であっても、そのような個体乳の合乳によってバルク乳の体細胞数が大幅に増加するため、酪農家は体細胞数が高い牛の乳を廃棄したり、個体淘汰をせざるを得ない。そのため、慢性・潜在性乳房炎に対する効果的な対処法が待ち望まれている。

ステビアは南米原産のキク科植物で、一般には天然甘味料として利用されているが、免疫賦活化、抗酸化、抗菌、抗ウイルス¹⁵⁾ および抗腫瘍²²⁾ など多様な作用・効能が報告されている。わが国の畜産分野では1980年代にステビア搾り粕の飼料利用¹⁹⁾ が検討され、その後、東北大学においてルーメン内細菌叢への影響¹⁾ やプロイラー飼養におけるヒスタミン抑制効果¹⁶⁾ などの検討が行われたが、牛の乳房炎への応用に関する報告は見当たらない。そこで、ステビア抽出発酵液(以下、ステビア液と呼ぶ)を慢性・潜在性乳房炎牛に経口投与し、その効果について検討した。

材料及び方法

1 供試牛と試験期間

体細胞数が30万個/ml 以上または乳房実質の硬結や乳汁異常(ブツ)などの臨床症状を慢性的に呈していた泌乳牛15頭を供試した(表1)。試験は平成16年12月から平成17年5月にかけて実施した。

2 ステビア液の製法と理化学性状

韓国で栽培、製造されたステビア液を供試した。原料となるステビアの葉と茎を乾燥・粉碎後、粉末10kg に対し水100ℓを加え、約140℃で2~3時間煮沸してエキスを抽出し、糖度が12に達するまで濃縮した後に、36時間発酵させ、6か月間熟成した。ステビア液の理化学的性状はpHが4.14、酸化還元電位が-160mVであった。

3 ステビア液の投与方法

ステビア液100mlを水100mlで希釈し、1日1回午前9時に、3日間連続で経口投与した。

4 調査項目

乳量はミルクメーター(Fシリーズ、ツルテスト・ディストリビューター社製)で朝夕の搾乳ごとに計測した。

CMT変法による簡易乳房炎診断(PLテスト、ゼノアック社製)は朝夕の搾乳後に実施した。市販試薬の凝集判定標準における反応レベルをスコア化(-:0, ±:1, +:2, ++:3, +++:4, ++++:5)し、ついで、1日のスコア合計を検査分房数で除して日平均スコアを算出した。

一般乳成分と体細胞数は投与前、投与から3および7日後に朝夕の搾乳ごとにミルクメーターのサンプラーを介して採取した合乳を検体として、兵庫県酪農農業協同組合生乳検査所の多成分赤外線分析装置(Sys4000, Foss社製)で分析した。分析値は朝夕の乳量に基づいて加重平均した。さらに体細胞数については対数変換してリニアスコアを求めた。

乳汁細菌検査は体細胞数の計測と同じ日に実施した。搾乳前に無菌的に分房別の乳汁を採取し、37℃24時間の平板培養を行い、生育コロニー数を計測した。一般細菌はハートインフュージョン寒天培地、黄色ブドウ球菌はマンニト食塩加寒天培地、大腸菌はDHL寒天培地を用いた。

5 効果判定

効果判定は投与7日後に行った。

表1. 供試牛と効果判定

症例番号 ¹⁾	牛群 ²⁾	産次	分娩後日数 ³⁾	乳量 ^{3,4)}
1	A	5	87	28.0
2	A	3	243	26.1
3	A	2	210	29.2
4	A	1	254	20.0
5	A	2	34	33.2
6	K	5	309	
7	A	2	271	27.4
8	H	3	373	
9	H	7	157	
10	H	5	187	
11	A	2	280	31.2
12	A	1	27	15.8
13	Y	2	108	
14	A	2	304	20.2
15	A	1	125	27.4

1) 11番と14番は同一牛

2) それぞれ異なる牛舎と飼養者を示す。

A、HおよびYは繋ぎ牛舎、Kはフリーストール

3) 経口投与開始日における数値

4) :不明

CMT 変法の反応については日平均スコアが 0 となれば著効、投与前に比べ低下すれば有効、維持または増加すれば無効とした。

体細胞数については投与前に比べ半減以下となれば著効、低減すれば有効、維持または増加すれば無効とした。

細菌数については投与前に細菌が検出された分房を対象に、細菌が消失すれば著効、投与前に比べ細菌数が減少すれば有効、維持または増加すれば無効とした。

6 統計処理

乳量、一般乳成分および体細胞数のリニアスコアについて、分散分析を行い、投与前、投与 3 日後および 7 日後の平均値の差を検定し、差が認められた場合、Scheffe の F テスト²¹⁾ によって多重比較を行った。

結 果

1 乳量・一般乳成分への影響

乳量はセンター繋養牛（牛群 A）の 10 頭で計量可能であったが、症例番号 12 が乳頭皮膚炎で廃用になったため、9 頭の平均値を比較した。一方、一般乳成分は供試牛全頭の測定を行ったが、症例番号 12 は廃用になったため、14 頭の平均値を比較した。その結果、いずれの項目も投与前、投与 3 日後および 7 日後の間で差はなかった（表 2）。

2 CMT 変法の反応への影響

CMT 変法の反応に対しては 14 頭中著効 2 頭（14.3%）、有効 4 頭（28.6%）および無効 8 頭（57.1%）で、著効・有効合わせて 42.9% の有効率であった（表 3）。し

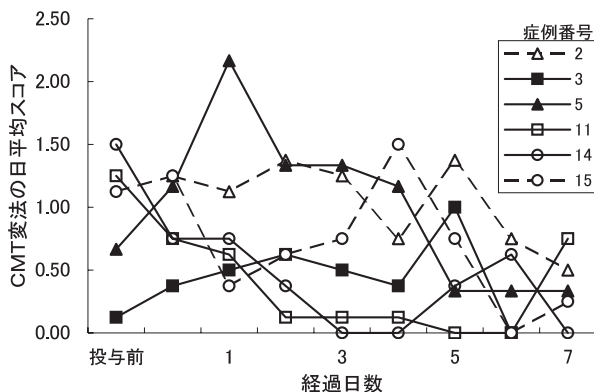


図1 ステビア液投与におけるCMT 変法の日平均スコアへの影響(著効・有効例)

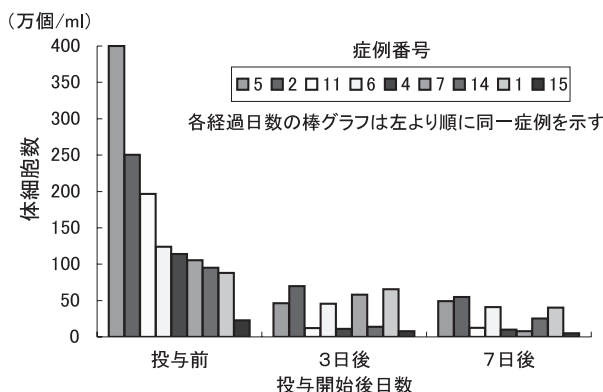


図2 ステビア液投与による乳汁中体細胞数への影響(有効例)

かし、体細胞数の減少度や効果判定とは必ずしも一致しておらず、著効または有効例 6 頭における反応レベルの日平均スコアは投与後の日数経過に伴い低下する傾向にあるものの、各個体とも大きな変動がみられた（図 1）。

表2. ステビア液の経口投与による乳量、乳成分への影響

	n	投与前	投与 3 日後	投与 7 日後
乳量 (kg/日)	9	27.7 ± 4.8	27.4 ± 3.2	27.9 ± 4.5
乳脂率 (%)	14	4.32 ± 0.68	4.11 ± 1.34	4.28 ± 1.06
乳蛋白質率 (%)	14	3.61 ± 0.48	3.52 ± 0.48	3.53 ± 0.47
無脂固形分率 (%)	14	8.90 ± 0.34	8.86 ± 0.39	8.91 ± 0.37
乳糖率 (%)	14	4.29 ± 0.28	4.34 ± 0.24	4.37 ± 0.22

値は平均 ± 標準偏差

乳量、各乳成分率はいずれも投与前と投与 3 日後または 7 日後との間に有意差なし

表3. ステビア液の経口投与による体細胞数と CMT 変法日平均スコアに対する改善効果

	CMT 変法日平均スコア (n=14)				小計 / 計(割合, %)
	著効	有効	無効	不明	
体細胞数への効果 (n=15)					
著効	1	4	3	1	9 / 15 (60.0)
有効	1		2		3 / 15 (20.0)
無効			3		3 / 15 (20.0)
小計 / 計 (割合, %)	2 / 14 (14.3)	4 / 14 (28.6)	8 / 14 (57.1)		

3 体細胞数への影響

体細胞数の低減効果は15頭中著効9頭(60.0%)、有効3頭(20.0%)および無効3頭(20.0%)で、著効・有効合わせて80.0%の有効率であった(表3)。著効例9頭における体細胞数の推移を示した(図2)。投与前に100万個/ml以上あったものが、投与3日後には約10分の1以下に低減する事例も認められ、全般的に顕著な低減傾向を示した。

4 乳汁中細菌数への影響

乳汁細菌検査の結果、大腸菌は検出されなかった。一般細菌と黄色ブドウ球菌の数は15頭中9頭(60.0%)で減少が認められたが、体細胞数の変化と必ずしも連動していなかった。

一般細菌に対する低減効果では、37分房中著効6分房(16.3%)、有効18分房(48.6%)および無効13分房(35.1%)であり、著効・有効合わせて64.9%の有効率であった。一方、黄色ブドウ球菌に対しては31分房中著効10分房(32.3%)、有効11分房(35.5%)、無効10分房(32.3%)であり、著効・有効合わせて67.8%の有効率であった(表4)。

考 察

治療試験では通常、対照区(プラセボ)を設けて効果を比較するが、本試験ではステビア液が薬品ではないことと、供試牛は慢性経過を辿っており、日常的な飲水などでは臨床症状や体細胞数が改善しないことは明白であることから対照区を設けなかった。

本試験におけるステビア液による改善効果は、体細胞数については80%の個体で、黄色ブドウ球菌についても70%近い分房でそれぞれ低減効果が見られた。久米⁷⁾によると抗生剤による乳房炎の治療成績は7~10日目において乳房の臨床症状には改善が見られたものの、体細胞数や細菌数に対する改善効果は50%に達していない。一方、組織移行性の高いマクロライド系抗生剤を用いた乾乳直前治療であれば、黄色ブドウ球菌感染分房の治療率が83%という報告⁸⁾もある。本試験では対象が泌乳期の慢性乳房炎であることを考慮すれば、ステビア液による改善効果は非常に高いものと判断される。

久米⁷⁾は20年以上前、すでに乳房炎の治療について、これまでの抗生剤を中心とした方向とは別に、生体あるいは乳房の防御機能の増強ないし調整を考えなければならないだろうと提唱している。また、有田²⁾も臨床経験から抗生剤だけで乳房炎は治らないことを説いている。

抗生剤以外の物質を投与する乳房炎治療法として、こ

表4. ステビア液の経口投与による細菌感染分房に対する改善効果

効果	一般細菌		黄色ブドウ球菌	
	分房数	割合(%)	分房数	割合(%)
著効：消失	6	16.3	10	32.3
有効：減少	18	48.6	11	35.5
無効：維持・増加	13	35.1	10	32.3
計	37		31	

れまでに塩酸レバミゾール製剤^{7,13)}、イソプロチオラン製剤⁶⁾、ビタミン剤^{11,12)}、サイトカイン¹⁴⁾および植物抽出物^{10,17)}などが検討された。

免疫調整剤である塩酸レバミゾール製剤は1~数回の経口投与によって慢性・潜在性乳房炎に対し、60~70%程度の有効率が得られている^{7,13)}。また、その作用機序はマクロファージの貪食能活性化やTリンパ球による細胞性免疫の増強が示唆されているが、殺菌効果については島田ら¹³⁾の報告を除いては不明である。さらに、本試験成績同様、治療効果が牛舎によってばらつくことから、適応症例の選択も必要であるとしている。

一方、岩田ら⁶⁾は潜在性乳房炎牛に対しイソプロチオラン製剤を14日間経口投与し、体細胞数の減少効果等を検討した結果、乳房炎の原因菌種に関わらず無投与対照群と比較して有意な減少を報告している。しかしながら、上記2つの製剤は本来乳房炎治療を目的とした薬剤ではなく、牛乳出荷に対して休薬期間の制約もあることから、ポジティブリスト制度が導入された現在では抗生剤に対する優位性はないと考えられる。

高橋¹⁴⁾は黄色ブドウ球菌性乳房炎に対して遺伝子組換え体のサイトカインの乳房内投与による治療実験を行った結果、短期感染牛に対しては高い治療効果を認めたとしている。しかし、長期感染牛に対しては十分な効果が認められなかったことと、遺伝子組換え体では安全・安心の面で消費者の理解を得るのが非常に困難であり、実用化にはかなり時間がかかるものと考えられる。

これらに対し、各種ビタミン剤投与による対処法^{11,12)}は休薬期間等の制約がなく、安全・安心の面での心配も少ないことから、抗生剤に替わる乳房炎への対処法として有用と考えられる。しかし、ビタミン剤の投与では体細胞数は低減できても細菌学的改善は期待できない¹²⁾。

大場ら¹⁰⁾はハーブの一種であるオレガノから抽出した精油成分を主体とする製品(以下アロマックスと呼ぶ)を飼料添加することにより牛群単位で体細胞数の低減に成功した事例を報告している。また、種村ら¹⁷⁾は植物多糖体を含む数種の植物乾燥粉末(以下C-UPと呼ぶ)を飼料添加することによって、バルク乳および個体乳の

体細胞数が大幅に低下し、乳中の細菌数も低減することと、乳房炎発症率の抑制や治癒率の向上など予防効果を報告している。これに関連して、吉田ら²³⁾はC-UPの作用機序として、末梢血単核球による貪食能の賦活化を確認している。これら2つの製品は植物由来の天然物であり、飼料の範疇に入ることから休薬期間等の制約がないうえ、生体が持つ免疫能を介した細菌学的改善も期待できることから、ビタミン剤に対して優位性があると考えられる。

ステビア液もこれらと同様の優位性を有する資材であると考えられるが、飼料添加による長期投与ではなく、短期の経口投与で顕著な改善効果が認められた点が異なる。従って、最終的に免疫系に働きかけて効果を表しているとしても、その作用機序は上記2つの製品とは異なると考えられる。

経口投与における作用部位として、口腔・咽喉頭粘膜、第一胃および腸管の3つが考えられる。C-UPやアロマックスでは長期の飼料添加であることから第一胃内細菌叢の変化による栄養面での改善から免疫応答が活性化された可能性や腸内細菌の活性化または腸管粘膜からの直接吸収によって免疫応答を示した可能性も考えられる。

一方、ステビア液では短期の経口投与であることから口腔・咽喉頭粘膜が作用部位である可能性が高い。Cumminsら³⁻⁵⁾はサイトカインの一種であるインターフェロン（以下INFと呼ぶ）を微量経口投与して家畜の疾患を治療する口腔内微量投与法を開発した。その作用機序も口腔咽頭蓋に親和性をもつINFが口腔内免疫系細胞に作用し、末梢血のマクロファージを活性化したり、抗体価を上昇させることによって抗ウイルス活性などを示すとしている²⁰⁾。これらのことから、本試験におけるステビア液も口腔・咽喉頭粘膜の免疫細胞を刺激してサイトカインを放出させ、サイトカインネットワークにより乳房内の好中球やマクロファージなどによる貪食を誘導させるとともに、細菌感染によって変化したサイトカインプロファイルを正常な状態に戻している可能性が考えられる。

さらに、暑熱や分娩によるストレスで免疫力が低下しているような時期や個体では、ステビア液の効果が低いという野外症例の傾向からも、このような全身的な免疫応答を介した作用機序が考えられる。

従って、ステビア液は牛舎・牛床の衛生管理とミルクの点検整備や正しい搾乳方法などの搾乳衛生が的確に実行できている酪農家で、泌乳中後期の慢性・潜在性乳房炎牛を特定して投与すれば、高い効果が期待できると考えられる。

今後は症例数を増やすことで効果の期待できる適応症状の判別法の確立や作用機序の解明に取り組みたい。

引用文献

- (1) 安藤太助・稲元民夫・中井 裕・扇元敬司(1994): ステビア(甘葉植物)のルーメン内細菌に及ぼす影響について: 第88回日本畜産学会講演要旨
- (2) 有田忠義(1991): 牛の乳房炎(チクサン出版社) 85-88
- (3) Cummins J. M., D. P. Hutcheson, M. J. Cummins, J. A. Georgiades and A. B. Richards (1993): Oral therapy with human interferon alpha on calves experimentally injected with infectious bovine rhinotracheitis virus: Arch. Immunol. Therap. Exp. 41, 193-197
- (4) Cummins J. M., J. Gawthrop, D. P. Hutcheson, M. J. Cummins and D. Zeck (1993): The effect of low dose oral human interferon alpha therapy on diarrhea in veal calves: Arch. Immunol. Therap. Exp. 41, 199-203
- (5) Cummins J. M., M. W. Beihrz and S. Krakowka (1999): Oral use of interferon: J. Interferon Cytokine Res. 19, 853-857
- (6) 岩田一孝・伊藤 篤・太田浩運・松木 晋・永幡肇(1997): 乳牛におけるイリプロチオラン製剤投与が乳汁中体細胞に及ぼす影響: 家畜診療404号, 17-22
- (7) 久米常男(1984): 牛の乳房炎 乳房の感染と抵抗 - その一断面 - (近代出版) 45-64
- (8) 三木 渉・河合一洋・大林 哲・安里 章(2002): Staphylococcus aureus 乳房炎牛に対するタイロシンの乾乳直前時治療の効果: 家畜診療 49, 19-24
- (9) 野附 巖・安里 章・平棟孝志・中野光志(1993): 家畜共済の診療指針() (全国農業共済協会) 154-275
- (10) 大場敏明・佐藤 衛・嶺 和正(2005): 生乳の体細胞数に及ぼすオレガノ精油製剤の効果: 畜産の研究 59, 187-191
- (11) 納 敏・瀬尾洋行・一条 茂・稲田一郎・江口 暢・更科孝夫(1990): 牛の乳汁中体細胞数に及ぼすビタミンA, Eの効果: 日獣会誌 43, 453-458
- (12) Sato S., H. Hori and K. Okada (1999): Effect of vitamin B 2 on somatic cell counts in milk of clinical Staphylococcus aureus mastitis: J. Vet. Med. Sci. 61, 569-571
- (13) 島田保昭・函城悦司・石田史郎・岡田啓延(1983): 牛の慢性乳房炎に対するレバミゾールの効果: 日獣

- 会誌36, 382-387
- (14) 高橋秀之 (2005): 潜在性乳房炎の早期診断とサイトカイン治療: 栄養生理研究会報 49, 59-70
- (15) Takahashi K., M. Matsuda, K. Ohashi, K. Taniguchi, O. Nakagomi, Y. Abe, S. Mori, N. Sato, K. Okutani and S. Shigeta (2001): Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*: *Antiviral Res.* 49, 15-24
- (16) Takahashi K., Y. Akiba, T. Nakano, T. Yamaguchi, M. Sato and N. Sato (2001): Effect of dietary stevia (*Stevia rebaudiana*) extract on gizzard erosion and ulceration induced by dietary histamine in broiler chicks: *J. Poult. Sci.* 38, 181-184
- (17) 種村高一・吉田正明・若林 篤・大塚義一・湯浅卓也・小黒幹史・奥田 勝・津曲茂久・武石昌敬・吉田哲 (1998): 植物多糖体 C-UP による乳牛のバルク乳・個体乳体細胞数に対する抑制効果と乳房炎の予防効果: 獣畜新報51, 109-112
- (18) 十勝乳房炎協議会 (2005): MASTITIS CONTROL (十勝乳房炎協議会) 2 - 3
- (19) 富田 司 (1986): ステビアかすの飼料的利用に関する考察: 広島農業短期大学研究報告8, 143-146
- (20) Tompkins W. A. (1999): Immunomodulation and Therapeutic effects of the oral use of interferon- γ : Mechanism of action: *J. Interferon Cytokine Res.* 19, 817-828
- (21) 柳井久江 (1998): 4 Steps エクセル統計 (星雲社) 154-155
- (22) Yasukawa K., S. Kitanaka and S. Seo (2002): Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin: *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1488-1490
- (23) 吉田 哲・中西信夫・山田浩司 (2006): 植物多糖体 C-UP による成牛および子牛の貪食能の活性化: 日獣会誌59, 315-319
-