

原 著

ATP 拭き取り検査による搾乳前乳頭壁清浄度の評価

榎谷雅文^{1), 2)†}木田克弥²⁾宮本明夫²⁾

1) 北海道デーリイマネージメントサービス(有) (〒085-1211 阿寒郡鶴居村下雪裡5-9)

2) 帯広畜産大学大学院畜産学研究所 (〒080-8555 帯広市稲田町西2線11)

(2013年4月23日受付・2013年9月6日受理)

要 約

乳牛の搾乳前乳頭壁清浄度をATP拭き取り検査(ATP検査)法で評価し、バルク乳質との関係を明らかにすることを目的として、清拭後の乳頭壁(180頭)の細菌拭き取り検査(細菌検査)とATP検査を同時に実施し、さらに酪農家35戸においてATP検査を実施した。ATP検査基準値として、細菌発育陰性83件のATP検査値の平均値と平均値+標準偏差を設定した。ATP検査基準値に基づき3階層に分類し、階層別に180頭の乳頭壁細菌検査結果と酪農家35戸の年間バルク乳質を比較検討した。ATP検査基準値の上昇に伴い乳頭壁細菌数は増加($P<0.01$)し、バルク乳中体細胞数($P<0.01$)、総菌数($P<0.01$)も増加した。ATP検査法は細菌検査結果とバルク乳質を反映し、その基準値として500(RLU)以下を清浄とすることが妥当と思われた。

—キーワード：ATP拭き取り検査，ATP基準値，細菌拭き取り検査，搾乳前乳頭壁清浄度，バルク乳質。

----- 日獣会誌 66, 847~851 (2013)

バルク乳の衛生的乳質(バルク乳質)を向上させるためには搾乳前準備作業(搾乳作業)を精度高く行い、維持することが重要である。Galtonら[1, 2]、Rasmussenら[3]、Magnussonら[4]は、清拭工程や清拭材料の違いにより清拭後の乳頭壁細菌数は異なり、さらにバルク乳質や乳房炎発生率まで異なると報告している。

しかしながら、乳頭壁清浄度を評価する上で、従来の細菌拭き取り検査(細菌検査)法は費用と専門的知識、専門設備を必要とし、結果判定までに時間を要する。それに対してATP拭き取り検査(ATP検査)法は、その場で迅速に結果を得ることができる衛生状況の診断手法であり、食品工場製造ラインの清浄度判定や洗浄方法の改善に用いられている検査法である。その基本原理は、すべての生物細胞が持つエネルギーであるATP(Adenosine Tri-Phosphate)をルシフェリン-ルシフェラーゼ発光反応を利用して測定するものであり、ATP化学発光量は(ATP検査値、測定単位RLU: Relative Light Unit)、純粋培養した細菌数とは強い正の相関を持つが、生菌に含まれるATP(生体内ATP)と生物由来の汚れ(有機物)や残渣(遊離ATP)の合計ATP量を測定するため、

細菌検査の結果と完全には一致しないといわれている。しかし“汚れ”の評価法として、食品汚染微生物や微生物栄養源存在のよい指標として活用されている[5-7]。

Fingerら[8]は、ATP検査法により搾乳前の乳頭壁清浄度を評価しようと試み、細菌数判定には感度と特異性に難点はあるものの、搾乳従事者に対して搾乳作業工程が乳頭壁清浄度に影響を及ぼすことを示す教育用ツールとして用いるには有効な方法であると報告している。

このように清拭後の乳頭壁清浄度の高低は、バルク乳質や乳房炎発生に大きな影響を与えるという認識が一般化しているものの[1, 3, 4]、その具体的な衛生管理に言及した報告はみられない。本研究は、ATP検査法による搾乳直前の乳頭壁清浄度の評価基準を設定し、その実用性を検討することを目的として行った。

材料及び方法

予備試験：搾乳作業の各工程における乳頭壁清浄度の変化をATP検査法で評価可能か否かを確認するために、一般酪農場の搾乳牛15頭を用いて予備試験を行った。搾乳作業工程において、乳頭清拭前、湿った布タオル1枚による清拭後、再清拭後(湿った布タオル8頭、パー

† 連絡責任者：榎谷雅文(北海道デーリイマネージメントサービス(有))

〒085-1211 阿寒郡鶴居村下雪裡5-9 ☎0154-64-2306 FAX 0154-64-2977

E-mail: enoki@seagreen.ocn.ne.jp

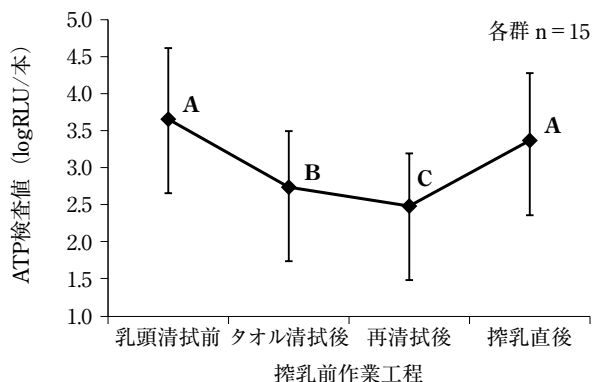


図1 搾乳前準備作業工程による乳頭壁ATP検査値の推移
 平均値±標準偏差 BC : $P < 0.05$

AB, AC : $P < 0.01$

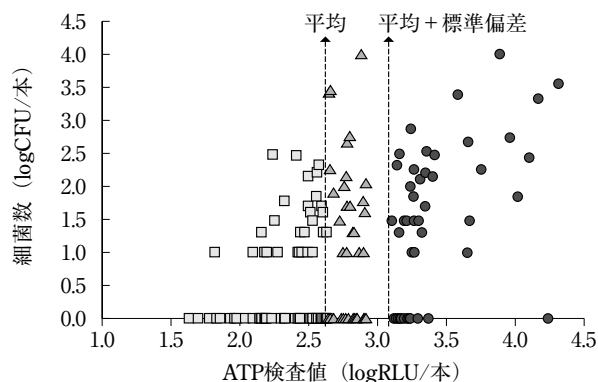
パートオル7頭), 及び搾乳終了直後の合計4回, 後分房の1乳頭に対してATP検査を行い, その値を比較した。ATP検査は, 拭き取り綿棒として抽出試薬(界面活性剤, ルシフェリン, ルシフェラーゼなど含有)付きキット(クリーントレースUXL100, 住友スリーエム(株), 東京)を使用し, ATP測定機器(携帯型ルミノメーターUNG3, 住友スリーエム(株), 東京)を用いて測定した。

ATP検査基準値設定試験: 帯広畜産大学畜産フィールド科学センターの搾乳牛延べ180頭(実施期間2012年1~3月, 60頭を3回実施)を供試した。搾乳作業工程は, ヨード剤によるプレディッピング後, 前搾り(1乳頭約10回)を行い, さらに殺菌剤(次亜塩素酸Na, 200ppm)に浸し, 手で絞った布タオル1枚を用いて乳頭を清拭した。乳頭清拭後の各牛の同じ乳頭1本に対して, ATP検査と細菌検査を同時に実施した。

細菌検査は, 拭き取り綿棒(Culture Swab, 日本ベクトン・ディッキンソン(株), 東京)を用い, 拭き取り後10mlの滅菌水に綿棒を懸濁して菌液を作成した。懸濁菌液1mlを採取し, 5%羊血液加寒天培地(日本ベクトン・ディッキンソン(株), 東京), クロムアガー寒天培地(日本ベクトン・ディッキンソン(株), 東京)に塗布し, 35℃で18~20時間(最大48時間)好気培養後, 拭き取り当たりの細菌数(CFU: Colony Forming Units)を測定した。

ATP検査, 細菌検査ともに乳頭壁の拭き取り法は, 乳頭壁に対する拭き取り圧を等しくするために, 綿棒はペンを持つように保持し, 片手で乳頭先端を固定して, 乳頭壁側面を綿棒の面を変えて上から下へ2回擦り取った。

ATP検査値と細菌検査結果について, 両者間の相関を調べ, 細菌検査において細菌発育を認めなかったサンプルのATP検査値を対数変換して, 平均値と平均値+標準偏差を求め, それぞれをATP検査基準値とした。乳頭壁細菌数について, ATP検査基準値の平均以下



□ ATP-L n=69 △ ATP-M n=62 ● ATP-H n=49

$$Y = 0.8795x - 1.4853 \quad R^2 = 0.1712 \quad (P < 0.01)$$

細菌発育陰性を除く場合

$$Y = 0.6274x - 0.0261 \quad R^2 = 0.1766 \quad (P < 0.01)$$

図2 乳頭壁細菌数とATP検査値の相関
 細菌数log0 = 細菌発育陰性「0」と示す

(ATP-L群), 平均から平均+標準偏差(ATP-M群), それ以上(ATP-H群)の3階層に区分して比較した。

バルク乳質試験: 2011年2月~2012年8月に酪農家35戸(府県11戸, 北海道24戸)において, 搾乳立会時に各酪農家8頭の1乳頭に対して, 搾乳時の乳頭清拭直後にATP検査を実施した。検査酪農家の乳牛飼養法は, つなぎ牛舎18戸, 放し飼い牛舎17戸で, 約20頭から600頭が搾乳されていた。

搾乳立会の前1年間の生乳出荷伝票(年36旬報)から, バルク乳中体細胞数(SCC: Somatic Cell Counts)と総菌数(TBC: Total Bacterial Counts)を調査した。ATP検査値を基に, 酪農家35戸のバルク乳質をATP-L群, ATP-M群, ATP-H群に区分けし, 3階層間で比較した。

統計処理: ATP検査基準値設定試験における乳頭壁細菌数とATP検査値の関係を, ピアソンの相関分析で検討するとともに, ATP検査基準値による3階層間の乳頭壁細菌数及び35戸の酪農家のバルク乳中体細胞数, 総菌数をKruskal Wallis検定比較し, 有意な($P < 0.05$)場合にはさらに多重比較を行った。

成 績

予備試験において, 乳頭壁のATP検査値は搾乳作業工程が進むに従って低下し, 搾乳直後には上昇する有意な($P < 0.01$)変化がみられた(図1)。

ATP検査基準値設定試験において, 清拭直後の乳頭壁ATP検査値は 2.8 ± 0.5 (平均±標準偏差, logRLU/本, $n = 180$), 乳頭壁細菌数は 1.0 ± 1.0 (平均±標準偏差, logCFU/本)となり, 両者の相関係数は0.41($P < 0.01$)で, 緩やかな正の相関がみられた。細菌発

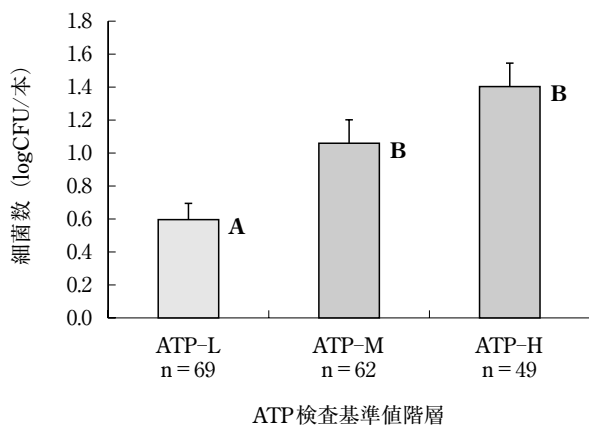


図3 ATP検査階層別の乳頭壁細菌数
平均, 標準誤差 AB: $P < 0.01$

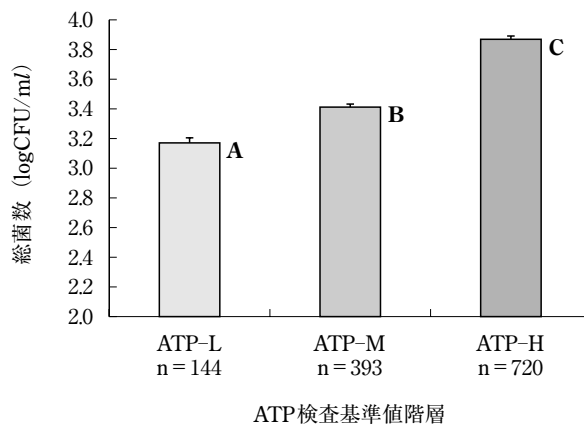


図5 ATP検査階層別のバルク乳質 (総菌数)
平均, 標準誤差 ABC: $P < 0.01$

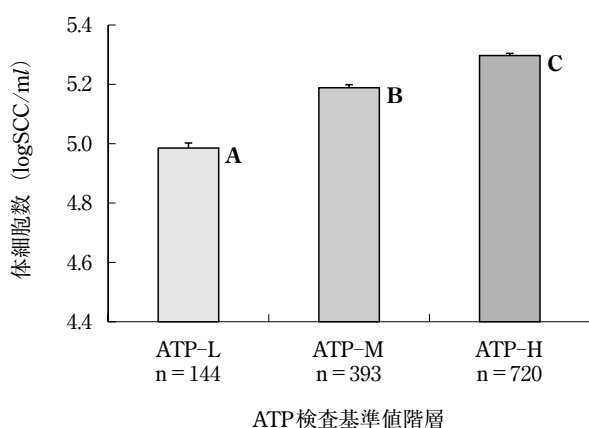


図4 ATP検査階層別のバルク乳質 (体細胞数)
平均, 標準誤差 ABC: $P < 0.01$

育陰性83件を除いた場合の相関は、相関係数0.42 ($P < 0.01$)であった。細菌発育陰性83件のATP検査値は、1.6~4.2 (logRLU/本)の範囲に分布し、平均値±標準偏差は 2.6 ± 0.5 (logRLU/本)で、平均値(2.6)と平均+標準偏差(3.1)をATP検査基準値として設定した(図2)。

ATP検査値階層別の乳頭壁細菌数(平均±標準誤差, logCFU/本)は、ATP-L群(0.6 ± 0.1 , $n = 69$), ATP-M群(1.1 ± 0.1 , $n = 62$), ATP-H群(1.4 ± 0.2 , $n = 49$)の順に高くなり、ATP-L群は他の2群よりも有意($P < 0.01$)に低かった(図3)。

またATP検査値で階層区分した酪農家35戸のバルク乳中体細胞数(平均±標準誤差, logSCC/ml)はATP-L群(5.0 ± 0.02 , $n = 144$), ATP-M群(5.2 ± 0.01 , $n = 393$), ATP-H群(5.3 ± 0.01 , $n = 720$)の順に高くなり、3階層間に有意($P < 0.01$)に差がみられた(図4)。

またバルク乳中総菌数(平均±標準誤差, logCFU/ml)はATP-L群(3.2 ± 0.02), ATP-M群(3.4 ± 0.02), ATP-H群(3.9 ± 0.02)の順に高くなり、3階

層間に有意($P < 0.01$)に差がみられた(図5)。

考 察

予備試験において搾乳作業工程でのATP検査値は、清拭前に比較して大きく低下し、2回目の清拭後は最も低下することが確認され、ATP検査が乳頭壁の清浄度評価に応用できる可能性が示された。一方、搾乳直後のATP検査値は再上昇しており、これは搾乳後の乳頭壁に付着している牛乳中のATPに反応したものと考えられた。これがATP検査の異常値を導く可能性を示唆したため、重要な注意事項として以降の試験では活用し臨んだ。

ATP検査基準値設定試験において、ATP検査値と細菌数の関係では強い正の相関はみられなかった。その理由としてATP検査は細菌以外の乳頭皮膚上皮細胞の持つATPや汚れ(有機物; 糞など)などにも反応するためと考えられ、細菌発育陰性データのATP検査値の上昇は、清拭後の乳頭壁の汚れに反応したためと考えられる。

細菌検査は清拭後の乳頭壁細菌を検出することにより、細菌汚染の指標となる。一方ATP検査は細菌検出のみならず乳頭壁に残る汚れ(有機物; 糞など)までも検出するため、衛生状況(洗浄確認)の指標といわれている[6]。本研究で設定したATP-L群の乳頭壁細菌数の平均は0.6 (logCFU/本)と低く、衛生状況の向上が細菌汚染の低減化に間接的に関わっている可能性を示した。

本研究においてATP検査基準値を設定する際に、乳頭壁の汚染指標である細菌は、清拭後の乳頭壁では陰性であるべきと考え、細菌発育陰性データを乳頭壁清浄度が正常な範囲とみなし、平均(2.6)と平均+標準偏差(3.1)の低い範囲の値をATP検査基準値とした。

ATP検査基準値設定試験におけるATP検査値と細菌数の関係は、過去の報告[6]にあるように完全に一致

してはいないが、緩やかな正の相関関係を示していた。さらにATP検査値3階層別の乳頭壁細菌数は、有意な差を持って階層が上がるごとに増えていた。ATP-L群でも乳頭壁細菌は検出されているが、その最大値は2.47 (logCFU/本：実数300個)であり、搾乳後大量の牛乳で希釈されることを考えると、十分に高い乳頭壁清浄度と考えられる。

35戸の酪農家のバルク乳質比較においても、ATP-L群の乳質は他の2群に比較して有意な差を持って優れていた。ATP-L群の酪農家4戸 (n = 144, 4戸×36旬報)のバルク乳質は、年間を通じて体細胞数10万個/ml以下、総菌数1,000個/ml程の最良質乳であった。このようにATP検査基準値は、清拭後の乳頭壁細菌数と優れたバルク乳質を反映していた。

ATP検査基準値2.6 (logRLU/本)は、実数換算では438 (RLU)であり、平均値+標準偏差3.1 (logRLU/本)は1,261 (RLU)となる。食品加工業界では、手洗い後の手指の一般的な衛生管理基準値は1,000 (RLU)以下 (本研究使用機器の基準)とされている [6]。諸橋ら (特定給食施設における調理従事者等の手洗い方法の検討, 北海道文教大学研究紀要, 34, 81-85 (2010))は、学校給食などより衛生基準が厳しい場所の手指の衛生管理基準は500 (RLU)以下にすべきと報告している。今回設定したATP検査基準値は、これらの目安とはほぼ一致する値であり、手指と乳頭の違いはあるものの、ともに食品に関わる皮膚という材質の清浄度判定基準値として妥当であると思われた。

また本研究において、ATP検査基準値による乳頭壁清浄度とバルク乳質の関係評価に際し、酪農家のATP検査は1回のみであり、検査実施頭数は1戸当たり8頭と少なかった。しかし、酪農家は毎日の搾乳において、習慣的に同じ手順で乳頭清拭をすると推測される。ATP検査回数やATP検査頭数が少ないながらも、ATP検査値とバルク乳質との間に有意な関係が確認されたことから、ATP検査基準値は酪農家の乳頭壁清浄度を正しく評価しているものと考えられた。

乳頭壁清浄度とバルク乳質の関係において、清拭後の乳頭壁残存細菌が多くなれば搾乳中に牛乳に混入する可能性が大きくなり、その結果バルク乳中総菌数は上昇する。同じくバルク乳中体細胞数が高いことは、搾乳牛が潜在性乳房炎に罹患していることを意味する。本田ら (本田善文, 長谷川三喜, 市来秀之: ライナー内における乳の逆流, 畜産草地研究所成果情報, 5 (2005)), 板垣ら [9]は、ライナーズリップが生じなくとも搾乳中のライナーゴム

の拍動ごとに牛乳の逆流現象 (牛乳で乳頭が洗われる現象)は起きると報告している。清拭後の乳頭壁ATP検査値が高いことは、乳頭壁に細菌や汚れ (有機物)が多いことを示し、牛乳の逆流現象による細菌の乳頭槽内への侵入の危険性を高め、その結果バルク乳質悪化の原因になると考えられる。これはバルク乳質が年間を通じて優れている酪農家は、乳頭壁ATP検査値が低いという結果からも示されている。

以上の結果より、ATP検査による乳頭壁清浄度判定基準として、500 (RLU)以下 (本研究使用機器の基準)を清浄とすることが妥当であると思われた。また、携帯型ATP測定機器と検査抽出試薬キット使用によるATP検査法は、その迅速性、簡便性、現場適応性を生かして乳頭壁の衛生管理に用いることが可能であり、乳頭壁の衛生管理の改善を繰り返すことにより、バルク乳質改善に貢献できると考えられる。

本研究に協力いただいた酪農家及び関係機関の方々、帯広畜産大学「うし部」学生の皆様に深謝する。

引用文献

- [1] Galton DM, Petersson LG, Merrill WG : Effects of premilking udder preparation practices on bacterial counts in milk and on teats, J Dairy Sci, 69, 260-266 (1986)
- [2] Galton DM, Peterson LG, Merrill WG : Evaluation of udder preparations on intramammary infections, J Dairy Sci, 71, 1417-1421 (1988)
- [3] Rasmussen MD, Galton DM, Petersson LG : Effects of premilking teat preparation on spores of anaerobes bacteria, and iodine residues in milk, J Dairy Sci, 74, 2472-2478 (1991)
- [4] Magnusson M, Christiansson A, Svensson B, Kolstrup C : Effect of different premilking manual teat-cleaning methods on bacterial spores in milk, J Dairy Sci, 89, 3866-3875 (2006)
- [5] 今井一洋 : バイオ・ケミルミネセンスハンドブック, 近江谷克裕編, 154-173, 丸善株式会社 (2006)
- [6] 伊藤 武 : 新しい衛生管理法ATP拭き取り検査, ATP迅速検査研究会監修, 1-62, 鶏卵肉情報センター (2009)
- [7] 浅川 篤, 山本司志朗, 川崎 晋, 川本伸一 : 化学発光法による微生物迅速検査技術, Japan Food Science, 44, 34-39 (2005)
- [8] Finger R, Sicho WM : Bioluminescence as a technique to evaluate udder preparation, J Dairy Sci, 84, 818-823 (2001)
- [9] 板垣昌志 : 乳牛の潜在性乳房炎における乳頭口異常と検出される細菌について, 家畜診療, 49, 685-695 (2002)

Evaluation of Teat Skin Cleanliness During Milking at a Dairy Farm Using
an ATP-Bioluminescence Assay

Masafumi ENOKIDANI^{1), 2)†}, Katsuya KIDA²⁾ and Akio MIYAMOTO²⁾

1) *Hokkaido Dairy Management Services, 5-9 Simo-seturi, Turui Village, Akan-gun, 085-1211, Japan*

2) *Department of Animal and Food Hygiene, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, 080-8555, Japan*

SUMMARY

The aim of this study is to clarify the relationship between teat skin cleanliness just after cleaning and the hygienic quality of raw milk during milking as evaluated by an ATP-bioluminescence assay. The teat skin of 180 cows after cleaning was tested using both an ATP-bioluminescence assay and a bacteriological swab test. Furthermore, 8 cows were examined by an ATP-bioluminescence assay at each of 35 dairy farms with respect to the cleanliness of their teat skin. As a standard ATP value, the data obtained from the bacteria-negative group (n = 83) was used to categorize the results into 3 classes (ATP ranks): LOW, below average (L); MID, between average and average + SD (M); and HIGH, above average + SD (H), respectively. These 3 different ATP ranks were examined to verify their correlation to the bacteriological swab test values and the hygienic quality of raw milk at 35 dairy farms. The bacterial numbers based on the bacteriological swab test on the teat skin increased ($P < 0.01$) along with the ATP ranks. Similarly, the somatic cell counts ($P < 0.01$) and the bacterial counts ($P < 0.01$) in the raw milk increased along with the 3 different ATP ranks. Therefore, during milking an ATP-bioluminescence assay is a convenient and reliable method for evaluating the cleanliness of teat skin just after cleaning, and is equivalent to a bacteriological swab test. In conclusion, this study suggested that the ATP standard value for teat skin cleanliness is under 500 RLU using an ATP-bioluminescence assay on the teats. — Key words : ATP-bioluminescence assay, ATP standard value, bacteriological swab test, cleanliness of teat skin during milking, raw milk hygienic quality.

† Correspondence to : Masafumi ENOKIDANI (*Hokkaido Dairy Management Services*)

5-9 Simo-seturi, Turui Village, Akan-gun, 085-1211, Japan

TEL 0154-64-2306 FAX 0154-64-2977 E-mail : enoki@seagreen.ocn.ne.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 66, 847 ~ 851 (2013)