

## 【論 説】 産業動物

## 低pHルーメン液はサルモネラ感染予防につながるのか？

藤原 正俊

北海道釧路家畜保健衛生所（釧路市大楽毛127番地の1）

-----北獣会誌 66, 77~79 (2022)

これまでに、北海道の家畜保健衛生所においては、ルーメン発酵の正常化がサルモネラ対策の早期沈静化に繋がるという成績を報告してきた<sup>[1-3]</sup>。一方で、ルーメン内の酸性環境がサルモネラの増殖を抑制すると紹介している研究報告もある<sup>[4]</sup>。言うまでもなく過度のルーメンの酸性化は牛体に悪影響があり、紹介された論文の中でもその様な状態を推奨している訳ではないが、果たしてサルモネラ感染に対してはルーメンの酸性化に予防的な効果があるのか、様々な知見を基に検証することとした。

## ルーメン内でのサルモネラ増殖性に関する研究

まず、ルーメン液でのサルモネラの増殖動態については、1979年にChambersらにより報告されている<sup>[5]</sup>。ルーメン液にサルモネラを接種し、24時間後に菌数を調べた*in vitro*の試験であるが、揮発性脂肪酸（VFA）濃度が高く、低pHのルーメン液では、サルモネラが著しく減少したという報告である。その後の1988年のMattilaらの報告からは、pH6.7以上のルーメン液内でサルモネラはよく増殖すると読み取れる<sup>[6]</sup>。さらに2000年のAndersonらの報告では、ルーメン液をpH5.6と6.8のバッファーで2倍希釈したものにサルモネラを接種すると、pH6.8では菌数の減少が見られないが、pH5.6では24時間後に検出限界以下となった<sup>[7]</sup>。これらの報告を見ると確かにルーメン環境は低pHであった方がサルモネラの感染予防に適しているのかもしれない。しかし、より低pHである第四胃を通過して腸管で増殖するサルモネラが、ルーメン程度の酸性度に影響されるのだろうか？そこで次章ではサルモネラの酸耐性についての知見を紹介する。

## サルモネラの酸耐性

Linらの報告によると、世代時間は延長するもののサルモネラはpH4.0でも増殖可能であった<sup>[8]</sup>。対数増殖期にあるサルモネラをpH3.3の培地に接種すると2時間後に1/1,000に生菌数が減少した。しかし、興味深いことにpH5.8または4.3の酸性下で慣らした後では、pH3.3の培地でもほとんど死滅しなくなった。これはルーメンで弱酸性環境に曝された方が、第四胃の強酸性環境に対する抵抗性を獲得する可能性を示唆している。実際にルーメン液で24時間培養した後に、pH2.5の人工胃液に接種した試験報告もある<sup>[9]</sup>。この報告が今回の考察に欠かせないデータで、オープンアクセスの論文であることから図を拝借させていただく。最も低いpH5.77のルーメン液から人工胃液へ暴露したものでは2時間後にはサルモネラは死滅したが、pH6.11以上のルーメン液ではコントロールよりも生残しているのである（図1）。一見、Linらの報告と矛盾するようであるが<sup>[8]</sup>、恐らくこういうことであろう。1969年に低pHの条件でVFAは濃度および温度依存的に殺菌作用を示すと報告されており<sup>[10]</sup>、pH5.77のルーメン液ではVFAの作用により24時間後には90%以下ではあるがサルモネラを殺菌させるほどの傷害を与え、その後人工胃液により殺滅された。一方で、正常範囲のpHでは傷害というレベルには達せず、逆にストレス耐性を獲得させる結果となったのであろう。これまでの*in vitro*の試験結果により、VFA濃度が高く、低pHのルーメン液はサルモネラに対し殺菌的に作用することに疑いはないが、紙一重で傷害にも酸耐性の付与にもなり得ると考えられる。

連絡責任者：藤原 正俊 北海道釧路家畜保健衛生所  
〒084-0917 釧路市大楽毛127番地の1  
TEL 0154-57-8725 E-mail : fujihara.masatoshi@pref.hokkaido.lg.jp

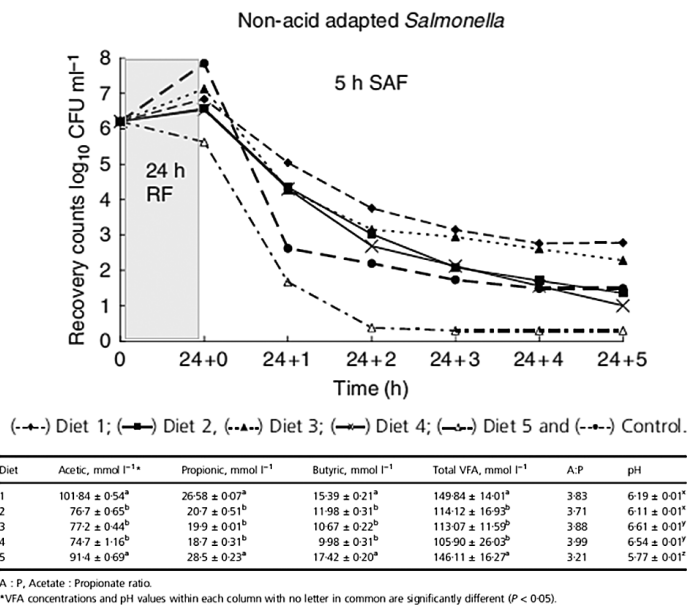


図1. 各給餌条件のルーメン液にサルモネラを接種し、37°C24時間培養後にpH2.5の人工胃液に接種した際のサルモネラ生菌数<sup>[9]</sup>

各給餌条件のルーメン液組成は下表のとおりで、Diet 5のみ24時間後にはわずかにルーメン液中でサルモネラ菌数が減少し、人工胃液で2時間後には死滅しているが、他の条件ではルーメン液中で菌数が増加し、人工胃液接種後もコントロールよりも生残している

### in vitro 試験の問題点

さて、これまで様々な試験結果を紹介してきたが、*in vitro*の問題点も考えなければならない。1点目は閉鎖された培養環境であり、採食や飲水、唾液の嚥下など、絶えず変動するルーメン環境とは異なること。2点目はルーメン液で24時間培養後の結果を示しているものがほとんどであるが、主な増殖部位が腸管であるサルモネラにとって第一～四胃は生きて通過しさえすれば病原性を発揮することである。先に紹介したルーメン液をpH5.6のバッファーで2倍希釈した試験<sup>[7]</sup>では、24時間後にサルモネラが検出限界以下となったが、3時間後ではサルモネラは増えていた。pH5.6のルーメン環境でもサルモネラは増殖するが、限局された環境中では、例えば糖の分解による更なるpHの低下など、菌の増殖に伴う環境変化により死滅したと考えられる。さらに、pH5.0におけるVFAの殺菌試験では、37°Cでの4時間後の殺菌率は99%以下であり、即効性は認められていない<sup>[10]</sup>。ルーメン液中に浮遊するサルモネラ菌は随時下部消化管に送られている。液体成分は1時間に10～20%が第一胃を通過し、起床時では5.9時間でルーメン液が更新されるという報告がある<sup>[11]</sup>。24時間後の試験をもって、ルーメン液の殺菌効果を論ずることは実情にそぐわないだろう。

### in vivo の試験結果

それでは*in vivo*の試験結果はどのようなのでしょうか。1968年にBrownlieは、十分な給餌量では48時間後にはルーメン内および糞便中からサルモネラが消失したが、給餌量の削減や給餌間隔の延長を行うと長期間サルモネラが検出され続けると報告している<sup>[12]</sup>。しかし、詳細を読むと様々な給餌条件下において使用しているサルモネラ株や接種量が異なっていたため、給餌条件とサルモネラの定着性を安易に比較できるものではなかった。この報告で注目すべきは、充分量を給餌された牛のルーメンpHは最低でも6.5程度であり、実験感染後24時間では糞便からサルモネラが分離されたことである。この結果から、早期にサルモネラを排除できるルーメン環境であっても、サルモネラは生きて腸管へ到達したということが明らかである。残念ながら、著者が見つかることができたルーメン環境に注目した*in vivo*のサルモネラ実験感染報告はこの1報のみである。

### サルモネラの生存戦略

最後にサルモネラの生存戦略を考えたい。VFAが高濃度で低pHのルーメン環境が、サルモネラにとって生存しにくい環境であることはこれまで述べてきた。その

様な環境下でサルモネラは細胞内侵入に関わる遺伝子発現を増強しているという報告がある<sup>[13]</sup>。この報告は *in vitro* でかつ遺伝子の発現のみを確認したものであり、実際に細胞内侵入率が高まるのかは定かではないが、ルーメン液に暴露されたサルモネラは消化管の上皮細胞内に待避しようとすることを示唆している。先に紹介した *in vivo* の感染実験<sup>[12]</sup>では、ルーメン液内のサルモネラ菌量は最大で $10^6$ CFU/100 mlで、大体は $10^3$ CFU/100 ml程度と極めて少ない数で推移していることから、サルモネラはルーメン液中で増殖しているというよりは、上皮細胞内へ侵入・増殖し、放出されたサルモネラがルーメン液に浮遊している、という可能性も否定はできない。

## ま と め

ルーメン環境がサルモネラ感染の防御壁となるか検証してきた。高濃度のVFAかつ低pHがサルモネラに殺菌的に作用することに疑いはないが、即効性はなく、第四胃に到達するまでには殺滅されないことは明らかであり、ルーメン環境がサルモネラ感染成立の大きな障壁になるとは考えにくい。*In vitro* の殺菌試験結果のみを基に、サルモネラの対策として安直にルーメンを酸性化させてサルモネラを死滅させる、と考えるのは非常に危険である。サルモネラの清浄化達成には清掃消毒、保菌牛の隔離、抗生物質やプロバイオティクス製剤の投与など、様々な対策を複合的に行うことを求められる。藪崎<sup>[14]</sup>は大豆粕給与の中止により乳中尿素窒素を低下させること(ルーメン内でのアンモニア産生抑制からルーメンpHの低下にも寄与)により、長期間続いた対策農場で清浄化につながったと報告し、また、増子ら<sup>[3]</sup>は統計学的にルーメン発酵異常と陰転率の低下の関連を証明している。これらのことから、ルーメン機能の改善が牛体内からの早期排除に寄与すると考えられるが、感染予防に寄与するというのは飛躍しすぎていると考える。

## 引用文献

- [1] 嘉納由希子、中岡祐司、小岸憲正、田中保幸、登丸享介、工藤克典、塩野浩紀、加藤一典、加藤昌克：成牛のサルモネラ症清浄化困難事例における給与飼料変更手法の検討、臨床獣医、24、76-80 (2006)
- [2] 榊原伸一、安倍秀美、一條 満、竹田 博、梅澤直孝、安本守宏：管内一酪農場におけるサルモネラ症の発生とルーメン発酵異常との関連について、北海道第59回家畜保健衛生業績発表集録、49-54 (2018)
- [3] 増子朋美、早川 潤、小林和美、高橋弘康：サルモネラ症発生農場におけるルーメン発酵状態の解析～乳検データの活用～、北海道第66回家畜保健衛生業績発表集録、90-94 (2011)
- [4] 草刈直仁、仙名和浩、及川 学、平井綱雄：飼養衛生から見た乳牛のサルモネラ症発生要因に関する一考察、日獣会誌、65、757-761 (2012)
- [5] Chambers PG, Lyons RJ: The inhibitory effect of bovine rumen fluid on *Salmonella typhimurium*, Res Vet Sci, 26, 273-276 (1979)
- [6] Mattila T, Frost AJ, O'Boyle D: The growth of salmonella in rumen fluid from cattle at slaughter, Epidemiol Infect, 101 337-345 (1988)
- [7] Anderson RC, Buckley SA, Kubena LF, Stanker LH, Harvey RB, Nisbet DJ: Bactericidal effect of sodium chlorate on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium DT104 in rumen contents *in vitro*, J Food Prot, 63, 1038-1042 (2000)
- [8] Lin J, Lee IS, Frey J, Slonczewski JL, Foster JW: Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*, J Bacteriol, 177, 4097-4104 (1995)
- [9] Lenahan M, Kelly S, Fanning S, Bolton DJ: The effect of bovine diet on *Salmonella* survival in synthetic abomasal fluid, J Appl Microbiol, 109, 2060-2068 (2010)
- [10] Goepfert JM, Hicks R: Effect of volatile fatty acids on *Salmonella typhimurium*, J Bacteriol, 97, 956-958 (1969)
- [11] 左 久、Christopherson RJ: 寒冷暴露牛の熱生産と消化機能に対するアドレナリン作動性受容体遮断の影響、栄養生理学会報、35、53-69 (1991)
- [12] Brownlie LE, Garu FH: Effect of food intake on growth and survival of *Salmonellas* and *Escherichia coli* in the bovine rumen, J Gen Microbiol, 46, 125-134 (1967)
- [13] Durant JA, Corrier DE, Rick SC: Short-chain volatile fatty acids modulate the expression of the *hilA* and *invF* genes of *Salmonella Typhimurium*, J Food Prot, 63, 573-578 (2000)
- [14] 藪崎尚弘: MUNとサルモネラ症、Dairy Japan、12、20-24 (2018)