

体細胞種別判定 (DSCC) に係る調査試験報告

1. 緒論

乳房炎は酪農乳業界全体に、経済的ならびにアニマルウェルフェア上、大きな損失をもたらす疾病の一つであり、過去数十年間、乳房炎の監視、予防およびコントロールに多大な労力が費やされてきた。北海道の体細胞数は記録を取り始めた 2006 年以降、合乳ベースの加重平均値で 20 万/ml を下回り低位で推移しているが、個体乳におけるリニアスコア 5 (28.3 万/ml) 以上の頭数割合はここ数年 15% で推移している。これは、NMC (National mastitis council, アメリカ) が牛群検定成績における体細胞数リニアスコアの推奨値 (NMC Fact Sheet, 2016) として示している 10% 以下には及ばず、個々の酪農家にとって乳房炎は依然、課題として残されている。

これまで乳房炎感染牛の発見および感染状況のモニタリングには、乳中の免疫細胞の総数を表す体細胞数 (SCC) が用いられてきている。個体レベルにおける感染、非感染を判定する最適な SCC の閾値は、20 万/ml とされ (IDF, 2013)、潜在性乳房炎の発見に有効とされているが、研究者の間では、感染ステージを判断することで、より効果的な処置に繋げることができる新たなバイオマーカーの開発が検討されてきた。そのひとつが、感染ステージによって免疫細胞の種別割合が変化することに着目した体細胞種別判定 (DSCC) 技術であるが、多検体を測定する装置が存在しなかったため調査研究分野の使用に限定されてきた。しかし、最近になって牛群検定用の高能力測定機が利用可能になり、乳房の健康管理の新たなパラメーターとして DSCC に注目が集まるようになってきた。

DSCC は、3 種類の免疫細胞のうち好中球とリンパ球の合計割合をパーセントで表し、マクロファージの割合は $100 - \text{DSCC}$ で表される (Damm et al., 2017)。これらの異なる免疫細胞の割合は感染後に変動する。健康な乳房から採取した乳サンプルでは、リンパ球とマクロファージが全細胞のほとんどを占めるが、感染すると好中球の割合が急激に増加する (Halasa et al., 2020)。好中球の役割は、侵入した病原体を攻撃し、急性炎症反応の初期段階に乳腺を防御することにある (Damm et al., 2017、Oviedo-Boyso et al., 2007)。病原体の制圧に成功した後、数日間で好中球の割合は減少し、マクロファージが細菌や組織の残渣を除去する (Sordillo et al., 1997)。しかし、細菌が免疫反応を生き延びた場合、炎症は持続し重度になる可能性があり、乳腺組織が損傷し産乳量の減少を招く (Sordillo et al., 1997)。

多くの研究者は、DSCC は SCC と組合せて使うことを提唱しており、これらの閾値を用いて乳房の健康状態を 4 つに分類することができる。SCC の閾値は 20 万/ml が主流として用いられる一方で、DSCC の閾値については諸説あり、2020 年の研究報告では主要な乳房炎起因菌による感染牛の発見に最適な閾値として 65% が推奨されている (Schwarz et al., 2020b)。

本会では DSCC 測定機能を装備した CombiFoss 7DC (CF7) の導入を契機に、一部地域

に限定した個体乳およびバルク乳測定値の収集を開始し、併せて今後の検討に資するため基礎的な解析を行った。DSCC に関しては研究者間で解釈に相違がみられ、生産現場における活用方法も確立されていないことから、最新の研究論文と本会で行った解析結果を交えながら、今後の活用方法の可能性について考察したので報告する。

2. 方法

2.1 データ収集

2021年1月～6月間にCF7を用いてルーティン検査を実施したN地域の個体乳（月間約2～3万検体、300～500農場）ならびにバルク乳試料（月間約900～1,000農場）から、DSCCおよびSCCデータを取得した。対象農場を固定しなかったため月毎に検査農場が異なる場合があった。月別の個体数ならびに農場数については表1および表2に示した。SCCの結果が<5万/mlを示したデータにおけるDSCCについては、測定機性能の仕様範囲外であり信頼性が低いとの理由から0%とした。個体乳については牛群検定成績からさらに詳細な情報を取得した。

2.2 データ解析

DSCCならびにSCCの閾値は、それぞれ65%および20万/mlとして、これらの数値から個体乳を下記に示したA～Dの4グループに分類した。この分類はSchwarzらが提唱している乳房健康グループ（UHG: Udder health groups）に基づいており、彼らは各グループの乳房健康状態について、A：健康/正常、B：乳房炎の疑いあり、C：（潜在性）乳房炎、D：慢性/持続性乳房炎としている（Schwarz et al., 2021）。UHGの4グループに分類した個体乳データを以下のとおり集計した。

A：	DSCC	≦65%	SCC	≦20万/ml
B：	DSCC	>65%	SCC	≦20万/ml
C：	DSCC	>65%	SCC	>20万/ml
D：	DSCC	≦65%	SCC	>20万/ml

2.2.1 月別、搾乳日数別、および産次別のUHG集計

2.2.2 2ヶ月連続データによるUHG間の移動

2021年1～4月に行った月1回、合計4回の検査において、2ヶ月間連続してデータが得られた個体乳26,621検体について、1回目の検査結果に基づき4グループに分類し、以下のとおり集計を行った。

2.2.2.1 1回目の検査でグループAに分類された個体を参照として用い、グループB、C、Dの個体が、2回目の検査でSCC>20万/mlになるオッズ比

2.2.2.2 1回目の検査でグループAに分類された個体を参照として用い、グループB、C、Dの個体が、2回目の検査でSCC ≤20万/mlになるオッズ比

2.2.2.3 乳房炎の新規感染率および乳房炎増加率（対前月）の推定モデル

乳房炎の対前月増加率は次式により推定した。1回目の検査結果により分類した各UHGから、2回目検査でグループAに移動した頭数割合を移動係数 α （定数）とした。1回目検査でグループA（健康）の個体が、2回目の検査でA以外になった割合を新規感染率 $(100-\beta)$ とした。2回目検査のグループA個体数を δ とし、任意の新規感染率と移動係数 α を用いて、2回目検査におけるグループA頭数を計算し、1回目検査のグループA個体数 γ との比率を乳房炎増加率として推定した（表4を参照）。

$$100 - ((100 - \beta) \delta + \sum (((100 - \beta) \delta / \alpha_{(A)}) \alpha_{(B,C,D)})) / \gamma$$

ここで、A, B, C, Dはグループ名を示す。

3 結果

3.1 調査データの概要およびUHG分布

個体乳調査データの概要およびUHGを表1に示した。調査期間におけるUHG比率の平均値は、グループAが73.6%（72.6~74.5）、グループBが9.3%（8.5~10.3）、グループCが13.8%（12.6~14.4）、グループDが3.3%（2.6~3.8）であった。2021年1月の個体牛UHG分布の事例を図1に示した。他の月の分布についても同様の傾向であった。

表1 個体乳調査データの概要ならびにUHG分布

年・月	農場数	合計頭数	戸当り頭数	産次	DIM	日乳量	SCC	U H G			
								A	B	C	D
	戸	頭	頭	産	日	kg	万/ml	%	%	%	%
2021.1	304	22,270	73	2.6	194	28.8	16.4	74.4	9.4	12.6	3.6
2021.2	331	24,681	75	2.6	193	28.8	18.6	74.5	8.5	13.3	3.7
2021.3	269	21,477	80	2.6	194	28.7	19.4	73.2	8.8	14.1	3.8
2021.4	444	31,817	72	2.6	194	29.3	18.7	74.3	9.0	13.7	3.0
2021.5	467	31,843	68	2.6	196	29.5	18.6	73.2	9.4	14.3	3.1
2021.6	484	33,073	68	2.6	196	30.4	19.1	72.6	10.3	14.4	2.6

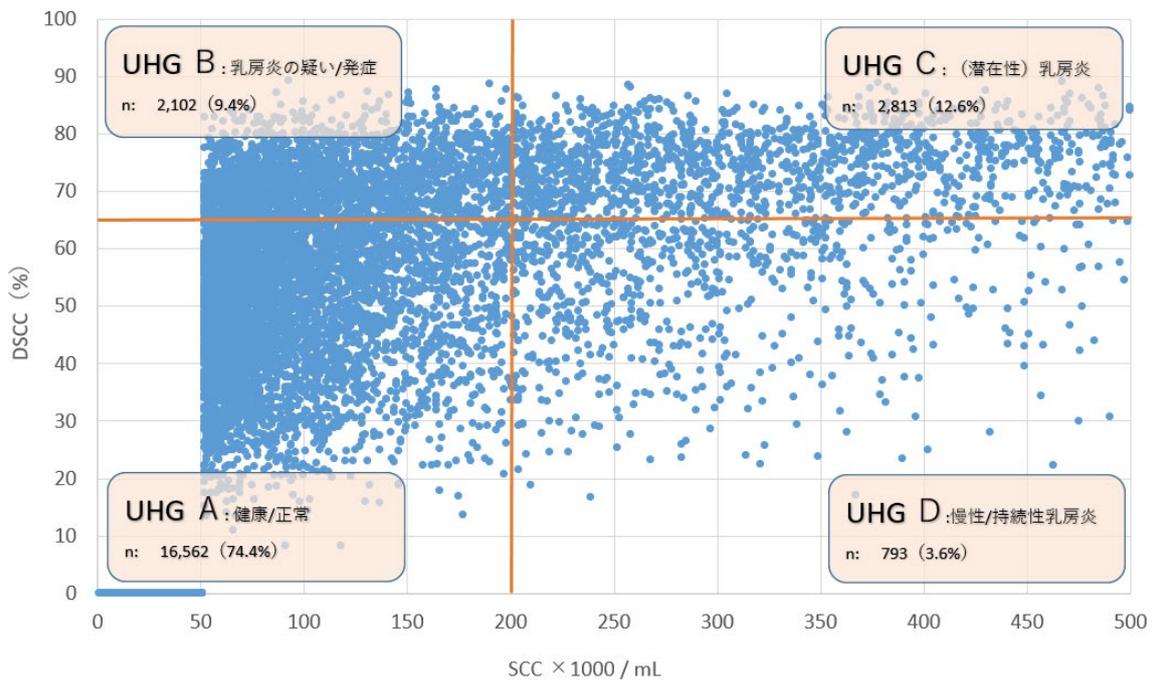


図1 個体牛のUHG分布(2021年1月)

バルク乳調査データの概要およびDSCCを表2に示した。調査期間における平均SCCは17.1万/mlであり、DSCCの平均値は71.7%であった。

表2 バルク乳調査データの概要ならびにDSCC

年・月	農場数	SCC	DSCC ¹⁾		
			平均	最小	最大
	戸	万/ml	%	%	%
2021.1	935	17.2	71.0	37.2	84.2
2021.2	918	17.2	71.7	38.0	85.0
2021.3	1058	17.0	71.4	32.7	83.6
2021.4	904	17.0	71.0	28.6	85.5
2021.5	941	17.1	72.1	38.5	82.7
2021.6	913	17.0	72.9	42.3	83.3

1) SCC ≧ 5万/mlについては集計から除外した

全調査期間における搾乳日数(DIM)別UHG分布を図2に示した。泌乳後期に向かうほど、グループAは減少し、逆にグループCおよびDが増加する傾向にあり、特にグループDではDIM 301日以降で顕著であった。グループBについては乳期を通してほぼ一定であった。

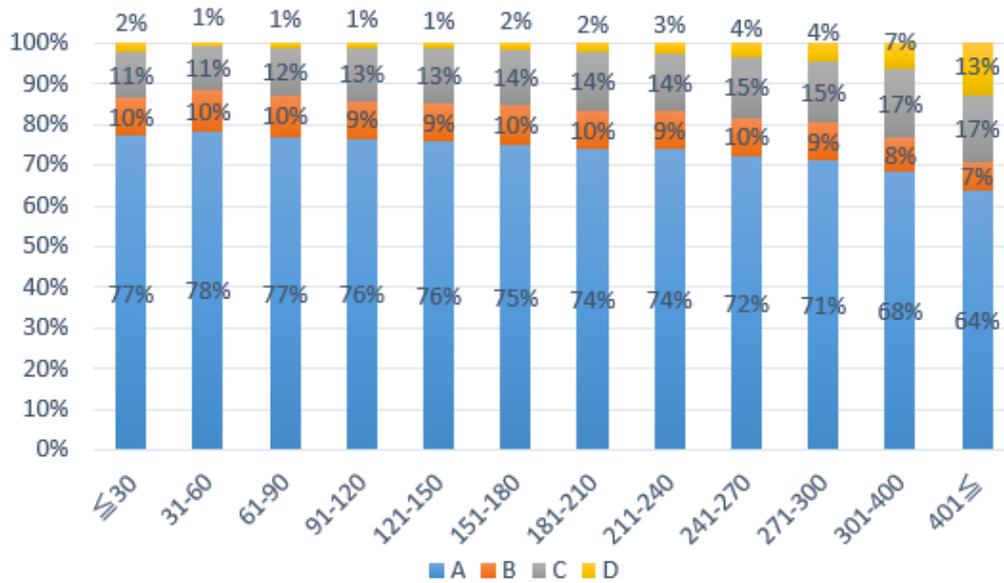


図2 DIM別のUHG分布

UHG別の産次、DIM、および日乳量の平均値を表3に示した。産次はグループAが最も低く、グループB、C、Dの順に高くなった。DIMはグループDが他のグループと比べ顕著に高かった。日乳量は、グループAならびにBがほぼ同じ値を示し、グループDは顕著に低かった。

表3 UHG別の産次、DIM、および日乳量

UHG	頭数 頭	割合 %	産次 産	DIM 日	日乳量 kg
A	121,615	73.6	2.5	188	29.9
B	15,376	9.3	2.6	184	30.3
C	22,828	13.8	3.1	211	28.0
D	5,342	3.3	3.3	307	19.9

産次別のUHG分布を図3に示した。グループAは初産で最も高く(79%)、産次が進むにつれ低下し6産以降では61%であった。グループBは産次間でほぼ一定であった。グループCは産次が進むにつれ増加した。グループDは4産以降一定であった。

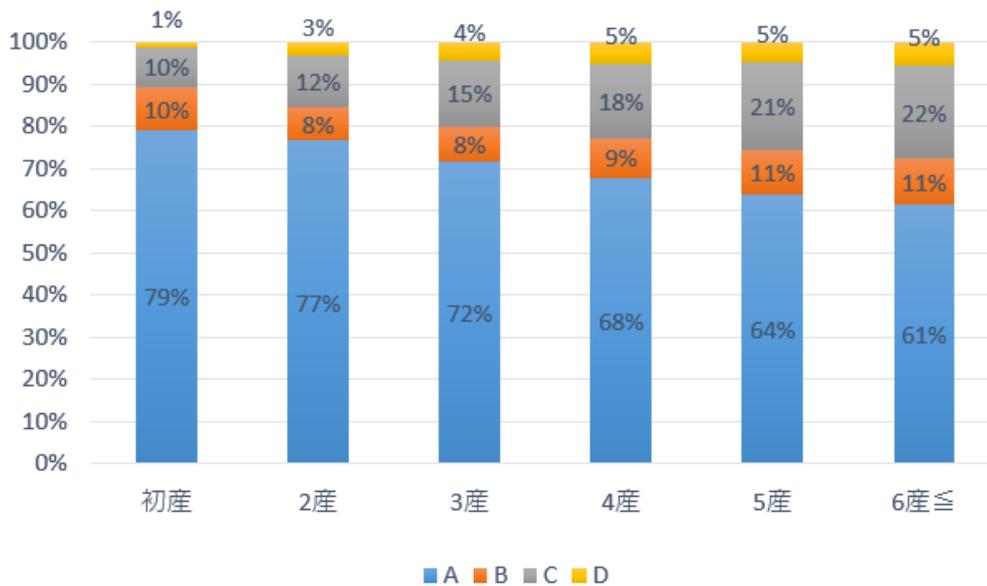


図3 産次別 UHG 分布

3.2 2ヶ月連続データによる UHG 間の個体移動

2ヶ月連続したデータが得られた個体牛 26,621 頭が、1回目の検査結果により分類した UHG から 2回目検査の UHG へ移動した個体の内訳を表4および図4に示した。1回目検査でグループ A であった個体の 88.2% は 2回目検査でもグループ A に残った。1回目検査でグループ A から他グループへ移動した 12.8% の個体については新規感染牛と判断した。1回目検査でグループ B、C、D に分類された個体のうち、それぞれ 47.2%、24.9%、33.9% は 2回目検査でグループ A に分類された。2回目検査のグループ A 全頭数の割合としては、グループ B からが 5.4%、グループ C からが 4.3%、グループ D からが 1.5% であった。これらの UHG 間の個体移動モデルを図5に示した。

表4 2ヶ月連続データによる UHG 間の個体移動

UHG	1回目検査		2回目検査		
	頭数	比率	1回目A%	2回目A頭数(δ)	2回目A%(α)
A	(γ)20037	75.3	(β)88.2	17667	88.8
B	2292	8.6	5.6	1081	5.4
C	3416	12.8	4.5	851	4.3
D	876	3.3	1.7	297	1.5

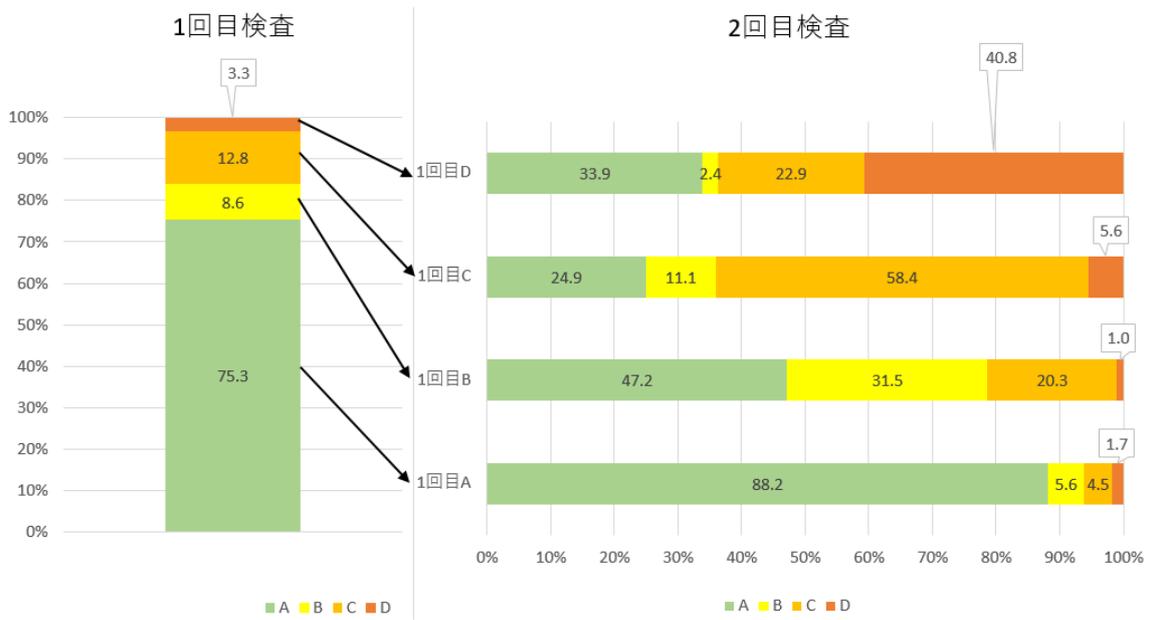
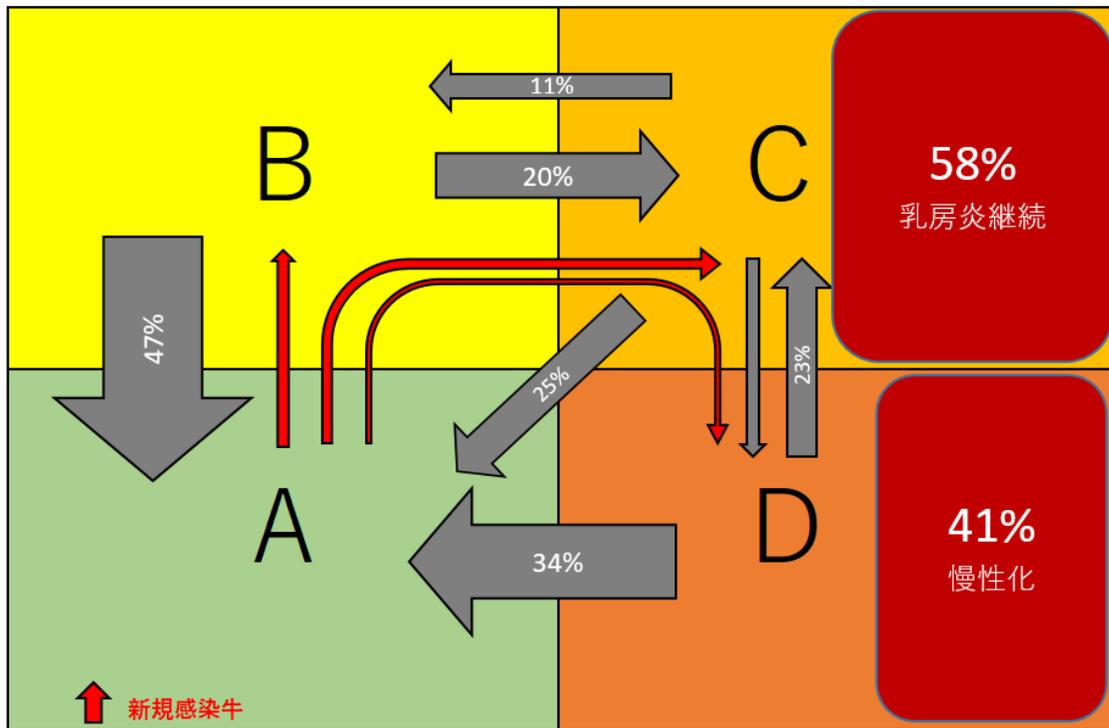


図4 2ヶ月連続データによる UHG 間の個体移動



矢印の太さと数値は移動元の相対割合を示す

図5 UHG 間の個体移動モデル

3.2.1 次回検査で SCC >20 万/ml になるオッズ比

表 5 に示したとおり、グループ B の個体が、次回の検査で >20 万/ml になる確率はグループ A と比較して 4.10 (95%CI : 3.65-4.61, P<0.001) という有意に高いオッズ比を示した。グループ C (オッズ比 : 26.87, 95%CI : 24.52-29.42, P<0.001) および D の個体についても (オッズ比 : 26.52, 95%CI : 22.80-30.89, P<0.001)、グループ A と比較すると有意に高いオッズ比を示した。

表5 次回検査で>20万/mlとなるオッズ比

UHG	オッズ比	95%CI	P値
B	4.10	3.65-4.61	<0.001
C	26.87	24.52-29.42	<0.001
D	26.52	22.80-30.89	<0.001

※グループAを参照とし各UHGのオッズ比を計算した

3.2.2 次回検査で SCC ≤20 万/ml になるオッズ比

グループ C (オッズ比 : 0.04, 95%CI : 0.03-0.04, P<0.001)、および D (オッズ比 : 0.04, 95%CI : 0.03-0.04, P<0.001) の個体は、グループ A と比較して次回検査で SCC ≤20 万/ml になることは有意に低かった。グループ B (オッズ比 : 0.24, 95%CI : 0.22-0.27, P<0.001) の個体についても、グループ A と比較して有意に低いオッズを示した (表 6)。

表6 次回検査で≤20万/mlとなるオッズ比

UHG	オッズ比	95%CI	P値
B	0.24	0.22-0.27	<0.001
C	0.04	0.03-0.04	<0.001
D	0.04	0.03-0.04	<0.001

※グループAを参照とし各UHGのオッズ比を計算した

3.2.3 乳房炎の新規感染率および増加率 (対前月) の推定

推定モデルを使いシミュレーションした結果を図 6 に示した。乳房炎の新規感染率が 15% および 20% の際の増加率はそれぞれ 5.0%、10.5% となった。増加率が 0% の際の新規感染率は 10.6% であった。今回調査対象とした N 管内の新規感染率は 11.8% で、乳房炎増加率は 1.4% であった。

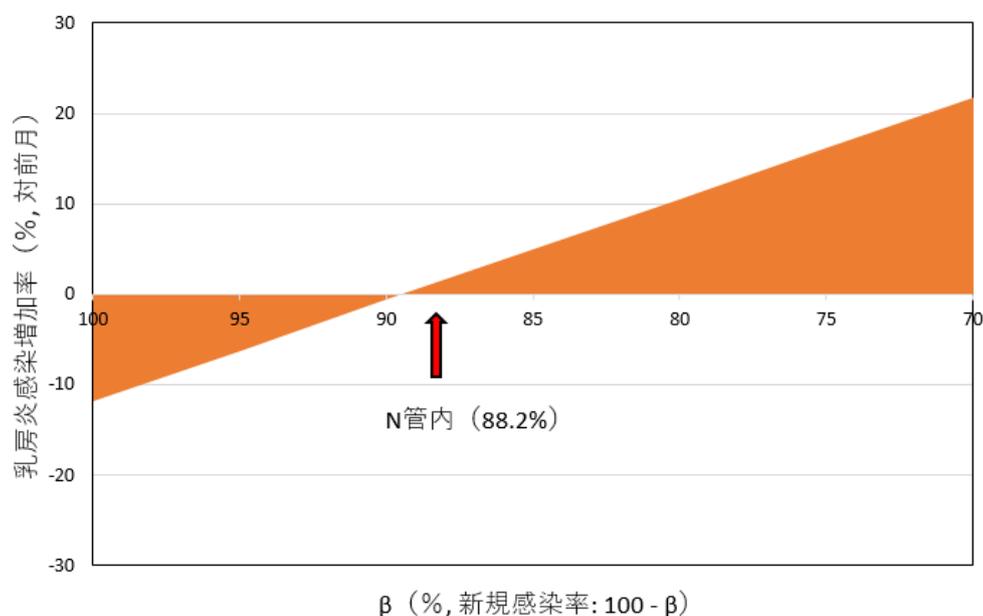


図6 乳房炎新規感染率と増加率（対前月）の関係

牛群平均 SCC レベルが、低（ ≤ 10 万/ml）、中（20 万/ml 前後）、高（30～50 万/ml）の農場をそれぞれ 7 戸抽出し、各レベルグループの UHG および乳房炎の新規感染率を表 7 に示した。グループ A 比率は、SCC レベル低、中、高の順に高かった。SCC レベル中、高の比較では、グループ B 比率は変わらず、グループ C および D 比率は、レベル高の方が著しく高かった。新規感染率については、SCC レベル低が 7.4% と最も低く、レベル中および高は、レベル低の 2 倍以上の値を示した。各 SCC レベルの新規感染率を図 6 のグラフに当てはめて感染増加率を推定したところ、レベル低はマイナス増加、レベル中は約 5%、レベル高は約 10% の増加率を示した。

表7 SCCレベルグループ（各7戸）のUHG分布および新規感染率

UHG	全体	SCCレベル		
		低	中	高
	%	%	%	%
A	75.3	91.7	70.6	52.2
B	8.6	4.5	12.7	12.3
C	12.8	3.4	14.7	27.2
D	3.3	0.3	2.0	8.3
新規感染率(%)	11.8	7.4	15.6	17.8
SCC(万/ml)	18.3	7.5	20.9	40.5

4 考察

DSCC の多検体分析装置は登場して間もないため、海外の研究においても今のところ、国/地域を対象とした大規模データによる分析結果の報告事例は少ない。2021 年の Schwarz (Schwarz et al., 2021) らの論文において、一定規模のデータ数による分析結果が紹介されたため、今回我々が実施した結果について検証を試みた。調査対象とした N 管内の UHG 分布において、グループ A (健康/正常) の割合は 2 ヶ月連続データでは 75.3% であり、Schwarz らが報告したいずれの国/地域の数値よりも高い値を示した。その中では、69.5%であったスペインのデータと最も近かった。グループ A は、SCC \leq 20 万/ml および DSCC \leq 65% の個体が該当し、乳房の健康状態は「健康/正常」と分類することから、N 管内の乳房炎防除は良好にコントロールされているものと考えられた。図 1 に示した DSCC および SCC グラフの個体分布は、Schwarz ら (Schwarz et al., 2020b) および、Fourdraine (Fourdraine, 2019) が示した分布と類似していた。

グループ A および B の個体の日乳量は、平均産次数および搾乳日数はほぼ同じにも関わらず殆ど差はなかった。一方、グループ C および D の個体は、A および B よりも日乳量は少なかった。グループ C および D は、A および B よりも DIM が多く、特に D については平均で 300 日を超えており、これらの影響も受けているものと考えられた。以上の傾向については、Bobbo ら (Bobbo et al., 2020) の報告と同様であった。

DSCC を活用することのメリットとして、SCC 情報だけでは見つけられない感染初期段階の個体の早期発見が挙げられる。具体的には、グループ B に分類される SCC \leq 20 万/ml および DSCC $>$ 65% の個体が感染初期段階と考えられ (Schwarz et al., 2020a)、これらの個体は、主要病原菌による感染がグループ A と比較すると 3 倍の頻度で検出される (Schwarz et al., 2019, 2020b)。また、グループ B の個体は、DHI の次回検査で SCC $>$ 20 万/ml のオッズ比がグループ A と比較すると有意に高くなり、次回以降の検査における \leq 20 万/ml のオッズ比については逆に低くなることが報告されている (Schwarz et al., 2021)。今回我々の行った調査においても、グループ B の個体が次回検査で $>$ 20 万/ml になる確率はグループ A と比較すると有意に高かった (オッズ比: 4.10)。一方、次回検査で SCC \leq 20 万/ml の確率はグループ A との比較で、いずれのグループについても有意に低い値を示した。グループ B の個体のうち、約半数はグループ A となり次回検査までの間に自然治癒したものと考えられたことから (図 4)、グループ B の個体に対しては抗生物質治療を避けた方がよく、清潔で乾燥した牛床の提供や適正な搾乳衛生といった一般的な予防措置に焦点を当てることが有効である (Schwarz et al., 2021)。

グループ D の個体は、Schwarz (Schwarz et al., 2021) らの報告によると、慢性/持続性乳房炎と考えられ、除籍になる可能性が DIM 300 日以上の泌乳後期牛の次に高かったとしている。実際の淘汰理由は未調査のため不明であったが、過去の SCC 結果において $>$ 20 万/ml が複数回観察されたことが可能性として示唆された。しかし、グループ D の個体の多くが慢性/持続性乳房炎を示しているとは限らず、好中球が細菌を排除した後の免疫反

応の一過程を表しているとも考えられる。事実、我々の調査においても、グループ D のうち 34%の個体は次回検査においてグループ A に分類された。このことが乳房内の細菌が完全に排除され乳房炎が完治したことを示すとは限らないが、少なくとも淘汰等の重要な決定を下す際は、複数回の検査結果から判断すべきであろう。

今回の調査における 2 回連続検査（乳検の 2 ヶ月連続検査）の解析結果から、UHG 間の個体移動の実態が明らかになった。グループ A の個体を健康牛とすると、グループ A から他グループへの移動は、新規感染（あるいは再発）と考えられる。また、他グループからグループ A への移動については、乳房内から細菌が除去されたことで体細胞数が減少した、つまり治癒したものと考えられる。このような個体の移動量（割合）が、乳房炎感染の増加あるいは減少傾向を推定する指標とならないか検討した。淘汰あるいは治療等の処置を考慮しない場合、新規感染数と他グループからグループ A への移動を表す自然治癒数の収支が 0 であるならば乳房炎増加率は 0 と考えられる。新規感染数が自然治癒数を継続的に上回るようであれば乳房炎感染は増加傾向に、その逆であれば減少傾向にあるものと解釈することができる。今回、感染増加率の推定に用いた UHG 間移動量の係数は、N 地域の調査対象牛全頭 26,621 頭に基づいて計算した。この試算に基づくと、N 地域全体として乳房炎増加率は 0 に近く、乳房炎防除は良好にコントロールされていることが伺えた。事実、N 地域における乳検成績の SCC は過去 2 年間、平均で 18 万/ml 台と低位で推移している。同時に行った 7 牛群単位の試算によると、SCC レベルによって乳房炎増加率に違いがあることが確認された。ただし、UHG 間の個体移動量は、牛群間の UHG 分布の違い、牛の健康状態に起因する免疫応答の違い、感染ステージ、慢性化の程度など、個体あるいは牛群間で異なるため、一律の係数を全ての牛群に適用し正確な感染増加率を推定することは困難である。しかし、この調査で示した推定モデルについてはさらなる検討が必要であるものの、地域単位を初めとするマクロレベルでの解析には有効ではないかと考える。さらに、今回の調査では入手できなかった淘汰、治療等の付加情報を追加することで、より詳細な感染動向の把握が可能になるものと期待される。我々が検討した UHG 間の個体移動モデルから、乳房炎の新規感染率（グループ A から他グループへの個体移動割合）を 10%以下に抑えることが乳房炎をコントロールする上での管理目標となるのではないかと考えられた。

以上のとおり、DSCC は、月 1 回定期的実施する牛群検定検査により取得し、連続データとして解析することで、より詳細で有効な情報を提供できる可能性があり、将来的に乳房炎防除管理の新たなモニタリングツールと成り得るものと考えられる。今後も牛群管理にとって、より有効な活用法の検討を継続するとともに、従来よりも情報量が増えることへの対応として、情報活用のためのアプリケーション開発等も必要になってくるものと考えられる。

（小坂英次郎、國川尚子、中野まどか）

文献

NMC Fact Sheet, 2016 National Mastitis Council Fact Sheet: THE VALUE AND USE OF DHI SOMATIC CELL COUNTS, The DHI somatic cell count program is a valuable tool for monitoring and evaluating a herd's mastitis control program. The Value and Use of Dairy Herd Improvement Somatic Cell Count

IDF (International Dairy Federation). 2013. Guidelines for the use and interpretation of bovine milk somatic cell count. Bull. IDF 466/2013.

Damm et al., 2017 Damm M, Holm C, Blaabjerg M, Bro MN, Schwarz D. Differential somatic cell count—a novel method for routine mastitis screening in the frame of dairy herd improvement testing programs. *J. Dairy Sci.* (2017) 100:4926–40. doi: 10.3168/jds2016-12409

Halasa et al., 2020 Tariq Halasa, Carsten Kirkeby, Differential Somatic Cell Count: Value for Udder Health Management, *Front. Vet. Sci.* 7:609055. doi: 10.3389/fvets.2020.609055

Oviedo-Boyso et al., 2007 Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcon JJ, Cajero-Juarez M, Ochoa-Zarzosa A, Lopez-Meza JE, Bravo-Patino A, Baizabal-Aguirre VM. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J. Infect.* (2007) 54:399–409. doi: 10.1016/j.jinf.2006.06.010

Sordillo et al., 1997 Sordillo LM, Shafer-Weaver K, DeRosa D. Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.* (1997) 80:1851–65. doi: 10.3168/jdsS0022-0302(97)76121-6

Schwarz et al., 2019 D. Schwarz, Z. Lipkens, S. Piepers, S. De Vlieghe, Investigation of differential somatic cell count as a potential new supplementary indicator to somatic cell count for identification of intramammary infection in dairy cows at the end of the lactation period *Prev. Vet. Med.*, 172 (2019), Article 104803, 10.1016/j.prevetmed.2019.104803

Schwarz et al., 2020a D. Schwarz, S. Kleinhans, G. Reimann, P. Stückler, F. Reith, K. Ilves, K. Pedastsaar, L. Yan, Z. Zhang, M. Valdivieso, M.L. Barreal, R. Fouz, Investigation of dairy cow performance in different udder health groups defined based on a combination of somatic cell count and differential somatic cell count *Prev. Vet. Med.*, 183 (2020), Article 105123

Schwarz et al., 2020b D. Schwarz, D.E. Santschi, J. Durocher, D.M. Lefebvre, Evaluation of

the new differential somatic cell count parameter as a rapid and inexpensive supplementary tool for udder health management through regular milk recording, *Prev. Vet. Med.*, 181 (2020), Article 105079, [10.1016/j.prevetmed.2020.105079](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105079)

Schwarz et al., 2021 D. Schwarz, S. Kleinhans, G. Reimann, P. Stückler, F. Reith, K. Ilves, K. Pedastsaar, L. Yan, Z. Zhang, R. Lorenzana, M. Barreal, R. Fouz, Associations between different udder health groups defined based on a combination of total and differential somatic cell count and the future udder health status of dairy cows, *Prev. Vet. Med.*, 192 (2021), Article 105374

Fourdraine, 2019 Robert Fourdraine, Using differential somatic cell count to improve udder health, InfoLytics, AgSource Cooperative, Verona, United States, ICAR Conference 2019

Bobbo et al.,2020 Bobbo T, Penasa M, Cassandro M. Combining total and differential somatic cell count to better assess the association of udder health status with milk yield, composition and coagulation properties in cattle. *Ital. J. Anim. Sci.* (2020) 19:697–703. doi: [10.1080/1828051X20201784804](https://doi.org/10.1080/1828051X20201784804)