

14. 黄色ブドウ球菌による乳房炎の効率的な検査方法の検討

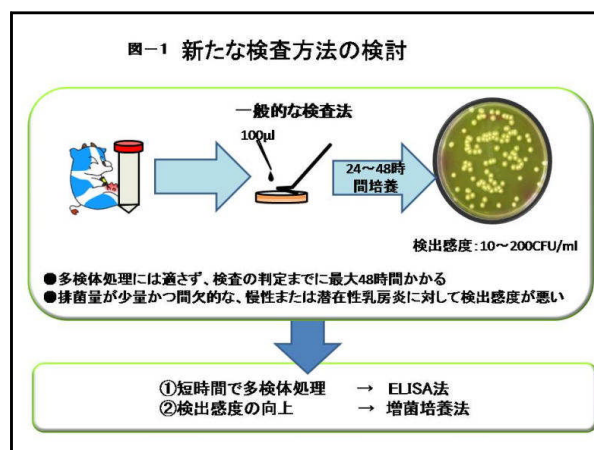
豊後大野家畜保健衛生所

○（病鑑）山田倫史、（病鑑）人見徹、森迫望、
梅木英伸、久々宮仁三、阿部正八郎

【はじめに】

黄色ブドウ球菌（以下、SA）は、乳房炎においてはもっとも発生頻度が高く、伝染性が強い上、治療しても潜在性又は慢性に経過するものが多いといわれている。このため、潜在性または慢性牛は、新たな感染源となるとともに、体細胞を増加や乳量の低下等の経済的損害の他に、食品衛生上でも重要な菌である。

現在、一般的な乳房炎におけるSA検査法は、検体である乳汁を平板培地に接種する方法が採られているが、この方法は、サンプル毎に培地に接種するため多検体処理には適さず、検査の判定までに最大48時間かかるとともに、排菌量が少なくかつ間欠的な慢性又は潜在性乳房炎に対しては、検出感度が悪く、適していない。このため、今回新たに、短時間で多検体処理可能なELISA法の検討と、検出感度の向上を目的として増菌培養法の検討を行ったので、報告する。（図-1）



【方法】

1. ELISA法の検討

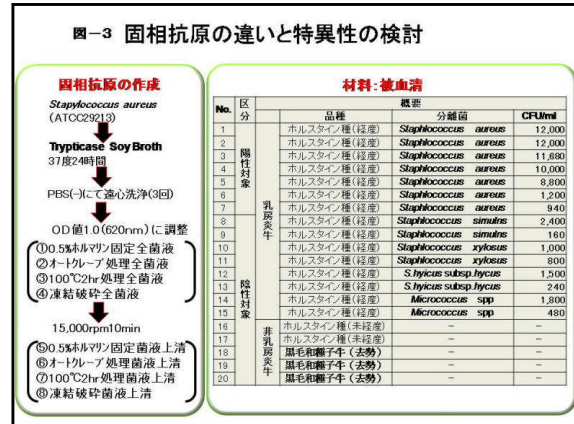
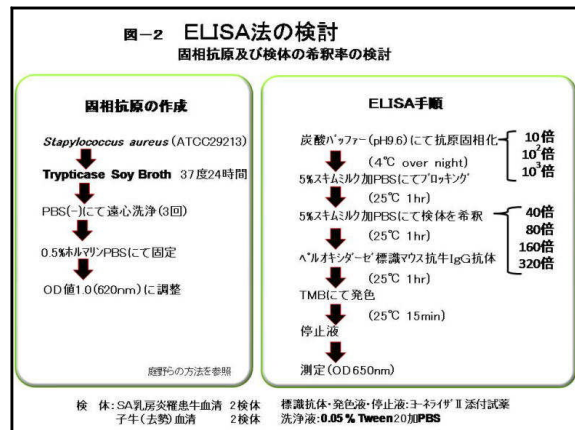
ELISA法については、2002年庭野らは、SA Wood46株のホルマリン死菌液を用いて、ELISA法を実施したところ、乳房炎歴のある個体に対してOD値が高値を示す検体が認められる傾向があるとの報告している。今回は、この庭野ら方法を改良し、実際の乳房炎分離個体との比較を行い分離成績との比較するとともに、その特異性を向上するための検討を下記の3項目について行った。

①固相抗原及び検体（血清）の希釈率の検討（図-2）

固相抗原は、ATCC29213株を用いホルマリン固定後、620nmにてOD値1.0に調整した物を10~1,000倍まで10倍希釈で行い、血清はSAによる乳房炎罹患が確認された牛血清2検体と黒毛和種子牛去勢の血清2検体を用いて、40倍から2倍希釈で320倍まで実施した。

②固相抗原の作成方法の違いの検討（図-3）

固相抗原には、620nmで吸光度値1.0に調整した全菌液をホルマリン固定、オートクレーブ処理、100度2時間処理、凍結破碎処理をしたものと、これら4種の全菌液の遠心上清の計3種類にて検討を実施した。供試血清は①と同時ものを使用した。

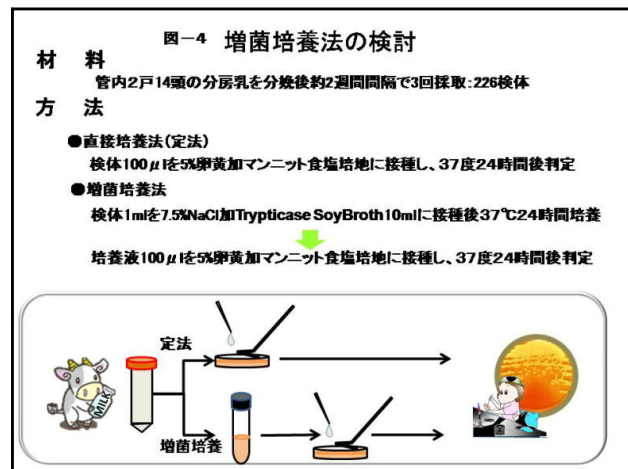


③特異性とSA分離成績との比較

上記①及び②で得られた条件で、分房乳においてSAが940~12,000CFU/ml分離された7検体と、SAと同属の環境性ブドウ球菌による乳房炎罹患牛の6検体、SAと同じ科のマイクロコッカス科の乳房炎罹患牛の2検体、及び非乳房炎罹患牛として、未経産及び去勢の5検体の計20検体にて比較を実施した。

2. 増菌培養法の検討 (図-4)

材料は、管内2戸の酪農家で飼養されている14頭の分娩後約2週間間隔で3回採取した分房乳計226検体を用いて行い、平板培地に接種する直接培養法と、検体1mlを7.5%NaCl加Trypticase Soy Broth 10mlに接種後37℃24時間培養し、その後、培養液を5%卵黄加マンニット食塩培地(以下MSE)に接種し培養する増菌培養法にて比較検討を行った。



【結果】

ELISA法の検討

①固相抗原及び検体(血清)の希釈率の検討

固相抗原希釈では、10倍~100倍では吸光度の大きな低下は見られないものの全般的には漸減した。このことから、吸光度1.5になる250倍希釈を設定した。血清は、陽性血清と陰性血清のと差が最も大きい160倍希釈を設定した。(図-5)

②固相抗原の作成方法の違いにおけるの検討

凍結破碎処理の上清を用いたものにおいて、マンホイットニーのU検定において危険率5%未満において有意差を求めた。(図-6)

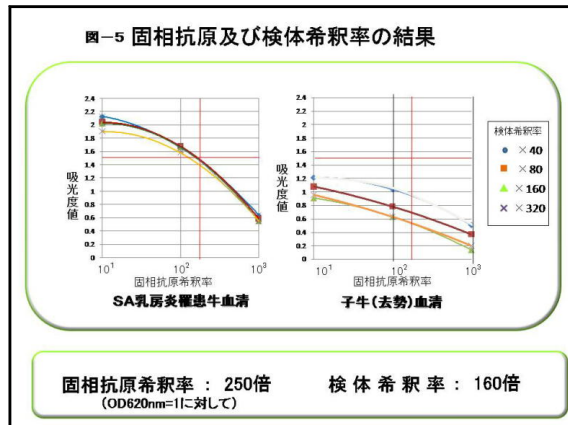


図-6 固相抗原の違いと特異性の結果

被血清	菌数 CFU/ml	全菌液				上清			
		凍結破碎	凍結	凍結	凍結	凍結破碎	凍結	凍結	凍結
1 陽性対象	<i>S. aureus</i> 12,000	0.047	0.068	0.064	0.199	0.032	0.010	0.082	0.085
2 陽性対象	<i>S. aureus</i> 12,000	0.319	0.201	0.016	0.073	0.126	0.087	0.051	0.049
3 陽性対象	<i>S. aureus</i> 11,999	0.097	0.121	0.057	0.101	0.025	0.064	0.022	0.025
4 陽性対象	<i>S. aureus</i> 10,000	0.089	0.110	0.007	0.008	0.021	0.023	0.025	0.043
5 陽性対象	<i>S. aureus</i> 8,800	0.030	0.061	0.051	0.030	0.029	0.027	0.059	0.040
6 陽性対象	<i>S. aureus</i> 1,200	0.180	0.125	0.024	0.063	0.028	0.049	0.041	0.030
7 陽性対象	<i>S. aureus</i> 940	0.138	0.118	-0.029	0.032	0.028	0.053	0.091	0.058
8 陰性対象	<i>S. subsp.</i> 2,400	-0.023	0.042	0.069	0.071	-0.006	-0.032	0.022	0.017
9 陰性対象	<i>S. subsp.</i> 160	-0.023	-0.009	0.029	0.086	0.001	-0.022	0.022	0.008
10 陰性対象	<i>S. xylosox</i> 1,000	0.028	0.043	0.078	0.110	0.010	0.001	0.022	0.011
11 陰性対象	<i>S. xylosox</i> 800	0.043	-0.008	0.061	0.077	0.001	-0.032	0.020	0.007
12 陰性対象	<i>S. hyicus subsp. hyicus</i> 1,500	-0.044	0.044	0.006	0.112	0.011	-0.019	0.018	0.004
13 陰性対象	<i>S. hyicus subsp. hyicus</i> 240	0.043	-0.007	-0.009	0.070	0.050	0.045	0.023	0.011
14 陰性対象	<i>Micrococcus spp.</i> 1,800	0.041	-0.008	0.057	0.074	0.001	-0.030	0.019	0.007
15 陰性対象	<i>Micrococcus spp.</i> 480	0.030	0.048	0.067	0.085	0.012	0.050	0.022	0.013
16 陰性対象	ホルスタイン種(未経産)1	0.025	0.011	0.071	0.100	0.009	0.001	0.015	0.012
17 陰性対象	ホルスタイン種(未経産)2	-0.015	-0.028	0.025	0.115	0.001	-0.029	0.014	0.007
18 陰性対象	黒毛和種子牛(去勢)1	-0.040	-0.004	0.005	0.071	0.010	-0.017	0.000	-0.011
19 陰性対象	黒毛和種子牛(去勢)2	0.039	-0.024	-0.008	0.105	0.045	0.041	-0.008	-0.008
20 陰性対象	黒毛和種子牛(去勢)3	0.002	-0.011	0.031	0.088	0.016	-0.001	0.005	-0.000

凍結破碎上清による抗原を用いた場合、SAが 10^4 CFU/ml以上分離された検体について有意に陽性を示した

③特異性とSA分離成績との比較

①及び②の結果より、凍結破碎処理を行った菌液の上清により実施し比較した場合、SAが概ね 10^4 以上分離された検体について特異性が確認され、SA以外の菌による乳房炎罹患牛とは、交差を示さなかった。

増菌培養法の検討

直接培養において、陽性の検体は、増菌培養においても陽性を示した。

また、直接培養において、分離陰性を示した検体222検体中3検体が、増菌培養法で陽性を示した。この、陽性を示した3検体は、経時的に連続して分離されてはいなかった。(図-7)

図-7 増菌培養法の結果

個体番号	乳房	分離後12時間		分離後24時間		分離後36時間		増菌培養
		直接培養	増菌培養	直接培養	増菌培養	直接培養	増菌培養	
1	右前	+	+	+	+	NT	NT	増菌培養 (培養前(培養後))
	右後	-	-	-	-	NT	NT	
	左後	-	-	-	-	NT	NT	
2	右前	-	-	-	-	-	-	増菌培養 SA(-) SA(+)
	左前	-	-	-	-	-	-	
	左後	-	-	-	-	-	+	
3	右前	-	-	-	-	-	+	増菌培養 SA(-) SA(+)
	右後	-	-	-	-	-	+	
	左前	-	-	-	-	-	-	
4~14	右前	-	-	-	-	-	-	増菌培養 SA(-) SA(+)
	右後	-	-	-	-	-	-	
	左前	-	-	-	-	-	-	

増菌培養法は、直接培養法に比べ、検出率が高い。

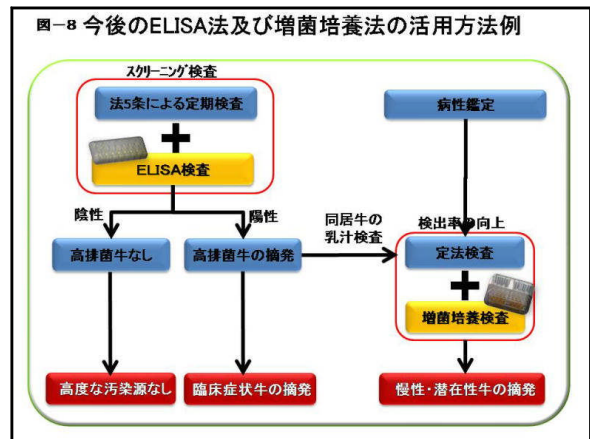
【まとめ及び考察】

ELISA法の検討においては、凍結破碎後遠心分離した抗原が最も検出感度がよく、条件として、抗原は250倍、被血清は60倍が最も良好であった

この条件のもとでELISA法を実施した場合、SAが 10^4 CFU/ml以上分離された検体について有意に陽性を示し、SA以外の乳房炎牛の血清とは交差が認められなかった。これは、凍結破碎がSAの細胞膜成分であるタイコ酸等が効率よく破碎され、抗原提示がされた可能性が推察される。

一方、増菌培養法は、直接培養で陰性を示した222検体中2検体が増菌培養法により分離されたが、経時的に連続して分離陽性は示しめさなかった。このことより、増菌培養法は1個体あたり複数回実施することで、慢性または潜在性感染牛の摘発に適した方法であると思われた。

これらの結果から、今回検討した検査法の活用方法の一例として、日常の病性鑑定において増菌培養法を組み入れることで、SAの検出率が向上することが期待できるとともに、ELISA法を家畜保健衛生所が実施している定期検査時に希望者に対して実施することで、SAの高排菌牛の摘発のためのスクリーニングとして実施し、その後の、同居牛の乳汁検査において、増菌培養を用いることで、慢性及び潜在性乳房炎の摘発に利用できるものと思われる（図-8）。



今後は、ELISA法においては毒素性ショック症候群毒素やブドウ球菌産生エンテロトキシンに対する抗体についても検討を行い、精度の向上を図るとともに、増菌培養法においては、培地の組成の検討等により感度の高い検査法の検討を行いたい。