

乳房炎スクリーニング検査への取り組み（第一報）

西部家畜保健衛生所西讃支所

○ 高橋茂隆・上村知子

笹田裕司・十川政典

1. はじめに

関係機関の努力にもかかわらず、香川県における平成 20 年度の生乳の平均体細胞数は四国四県全体の平均よりも悪く、管内の多くの酪農家は対策に苦慮している。彼らの中には自らが農場で乳房炎の原因菌をチェックしたいという希望を持っているが、現実的には実施は不可能である。そのため、当所では PL テスト (CMT 変法) なみに農場で実施できる乳房炎のスクリーニング検査法を提案し、普及させたいと考えた。今回は、その第一段階である。

2. スクリーニング検査法のポイント

まず、農場でのスクリーニング検査に用いる培地を選定するために、食品加工過程の汚染度チェックなどの食品衛生分野で使用されている市販の簡易検出紙（以下試験紙）を用いる試験紙法と乾式フィルム状培地（以下フィルム）を用いるフィルム法について検討した。コントロールには血液寒天培地を使用する血寒法を用いた。

対象とする菌種は重要なものに絞り、ブドウ球菌（以下ブ菌）のうちの伝染性黄色ブドウ球菌（以下 SA）と夏期に多発する大腸菌群とした。

さらに、感度、簡便性、培養方法なども重要と考えた（表 1）。

<試験紙法>

試験紙は培地成分を染ませたろ紙が乾燥・滅菌した状態でビニール袋に入っており、ブ菌用と大腸菌群用がある。判定には紫外線ライトが必要であるが、安価なものは 2000 円弱で入手可能である。乳汁 1ml を滅菌スポイトで接種し 37℃で 24 時間培養すると、ブ菌は黒色、大腸菌群は青色のスポットとして見られる。また、紫外線の照射によりライトブルーの蛍光が出現すると SA あるいは大腸菌の可能性があり、非常に簡易に識別できる（図 1）。

<フィルム法>

フィルムは特殊な膜面に培地成分を含んでおり、これもブ菌用と大腸菌群用がある。乳汁 1ml を接種し 37℃で 24 時間培養すると、ブ菌用の培地にはブ菌は赤紫色と黒色のコロニーが発育する。それに特殊な紙のディスクを装着し、さらに 3 時間以内の培養を行って SA が発育するとピンクのゾーンが出現する。（図 2）。大腸菌群用は、大腸菌群が発育するとコロニーの周りにガスが産生し、培地の色が濃く変化する（図 3）。

表 1 スクリーニング検査法のポイント

1. 培地選定：試験紙法、フィルム法、血寒法
2. 対象菌種
○黄色ブドウ球菌 (SA)
○大腸菌群
3. 感度
4. 簡便性
5. 培養方法

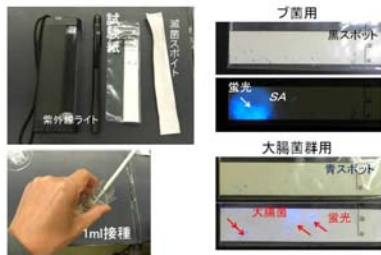


図1 試験紙法

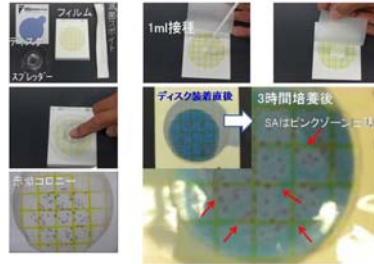


図2 フィルム法(ブ菌用)

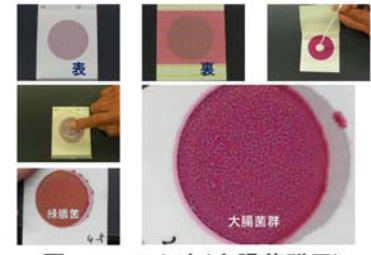


図3 フィルム法(大腸菌群用)

3. 試験 1

<材料及び方法>

供試菌株は、乳房炎原因菌の SA4 株、大腸菌群 3 株、緑膿菌 1 株、レンサ球菌 2 株を用いた。菌株を試験紙法、フィルム法、血寒法の 3 法により常法の 37°C、24 時間培養した後、発育した菌数を測定し、一元配置分散分析法で比較した (表 2)。

<成績>

SA は試験紙法、フィルム法ともに 4 株全てがブ菌用培地にのみ発育した (表 3)。表中に赤字で示したとおり、試験紙には蛍光が、フィルムにはピンクゾーンが全てに確認された。また、3 つの培地間の菌数に有意な差はなかった。大腸菌群は 3 株全てが試験紙法、フィルム法ともに大腸菌群用培地にのみ発育し、これも 3 つの培地間の菌数に有意な差はなかった (表 4)。また、試験紙では大腸菌 2 株が発色し、クレブジェラは発色しなかった。その他の菌種は、常法の 24 時間の培養では発育しなかった (表 5)。

表2 試験1(材料及び方法)

① 材料	
乳房炎原因菌	4株
SA	4株
大腸菌群	3株(大腸菌 2株、クレブジェラ 1株)
緑膿菌	1株
レンサ球菌	2株(<i>Sagalactiae</i> , <i>S.bovis</i> 各1株)
② 方法: 各菌株を試験紙法、フィルム法、血寒法で培養	
条件: 37°C、24時間、好気培養	
判定: スポット数、コロニー数を測定し、比較	
(一元配置分散分析法)	

表3 試験1(SA成績)

菌株	ブ菌用培地		大腸菌群用培地		血寒
	試験紙	フィルム	試験紙	フィルム	
SA1	96	137	0	0	150
SA2	71	82	0	0	91
SA3	90	110	0	0	124
SA4	38	44	0	0	52
GM	69	86	0	0	97

ブ菌用培地と血寒には有意差なし($p>0.01$)

*赤字は蛍光あるいは、ピンクゾーンを確認できたもの

表4 試験1(大腸菌群成績)

菌株	ブ菌用培地		大腸菌群用培地		血寒
	試験紙	フィルム	試験紙	フィルム	
大腸菌1	0	0	42	68	60
大腸菌2	0	0	128	201	170
クレブジェラ	0	0	111	132	170
GM	0	0	84	122	120

大腸菌群用培地と血寒には有意差なし($p>0.01$)

*赤字は蛍光を確認できたもの

表5 試験1(その他の菌種成績)

菌株	ブ菌用培地		大腸菌群用培地		血寒
	試験紙	フィルム	試験紙	フィルム	
緑膿菌	0	0	0*	0*	100
<i>Sagalactiae</i>	0	0	0	0	28
<i>S.bovis</i>	0	0	0	0	39

*培養2日目に試験紙に黄緑スポット、フィルムにコロニーを確認

4. 試験 2

<材料及び方法>

実際に乳汁を用いた多検体処理が実施可能かどうか、1農場 30 頭 120 検体の乳汁について SA をターゲットに試験紙法と血寒法により常法の 37°C、24 時間培養し、SA の発育した検体数を比較した (表 6)。

<成績>

試験紙に蛍光が見られたか、あるいは血寒に溶血が見られたことから、SAが疑われた検体は1割に認められ、それらのうち8検体が一致した(表7)。最終的には試験紙法、血寒法ともに1頭2検体のみがSAと同定され、それらは一致した。

表6 試験2(材料及び方法)

① 材料	1農場 30頭 乳汁120検体
② 方法	;試験紙法(ブ菌用)、血寒法
	対象菌種; SA
条件	;37°C、24時間、好気培養
判定	;SAの分離検体数を比較

表7 試験2(成績)

	検体	蛍光	溶血	SA同定
試験紙法	120	12	-	2
血寒法	120	-	16	2

(赤字)は一致したもの

5. 試験3

<材料及び方法>

乳房炎の発生が多い夏期だけでも、常温で培養できないか 30°Cで試験紙法と血寒法により培養を行った(表8)。なお、供試菌株はSA4株、大腸菌群3株を用いた。

<成績>

30°CではSAは2株が試験紙法では発育せず、血寒法でもその2株は非常に発育が悪かった。一方、大腸菌群は両法で十分に発育した(表9)。

表8 試験3(材料及び方法)

① 材料	乳房炎原因菌
	SA 4株
	大腸菌群 3株(大腸菌 2株、クレブジェラ 1株)
② 方法	;各菌株を試験紙法、血寒法で培養
条件	;30°C、24時間、好気培養
判定	;各培地の菌数を測定し、比較

表9 試験3(成績)

菌株	試験紙法		血寒法
	ブ菌用	大腸菌群用	
SA1	0	-	50(発育悪い)
SA2	0	-	100(発育悪い)
SA3	127	-	120
SA4	110	-	133
大腸菌1	-	35	40
大腸菌2	-	210	237
クレブジェラ	-	141	173

* 赤字は蛍光を確認できたもの

6. 検査コストの比較

1検体あたりのスクリーニング検査のコストを比較した(表10)。試験紙法はブ菌用と大腸菌群用を合わせても114円となり、最も高いフィルム法と比べ4分の1程度であった。

表10 検査コストの比較

	O1検体あたりのスクリーニング検査コスト(円)		
	ブ菌用	大腸菌群用	両方
試験紙法	57	57	114
フィルム法	310	132	442
血寒法	284	284	284

7. スクリーニング検査法としての評価

スクリーニング検査法としての各法の評価を行った(表11)。試験紙法は、農家にとって最もポイントが高いと思われる簡易性の点で優れており、汚染も少ない。さらに、血寒法と比べ感度も変わらないうえに100倍量の検体を接種するため、検出率も高まる。さらに、検査コストや保管のし易さにも優れていることから試験紙法はスクリーニング検査に適した検査法であると考えた。一方、フィルム法は試験紙法と血寒法の間時的なもので、農場でのスクリーニング検査には適さないと考えた。

表11 スクリーニング検査法としての評価

	簡易性	汚染	検出率*	汎用性	コスト	保管	総合
試験紙法	◎	○	○	×	○	○	○
フィルム法	△	△	○	×	×	×	△
血寒法	×	×	△	○	△	△	×

* 特定菌株

8. 夏期以外の対応

夏期以外の季節に培養できないか検討した。経営面で余裕があれば、温度管理が確実なポータブルインキュベーターの使用が推奨される。しかし、農家の経営状態を考慮し、設備が不要で農家に負担の掛からない方法として牛体に貼り付けて使用ができるかどうかを検討した(図4)。



図4 夏期以外の対応

まず、牛の体表温度がどの程度か放射温度計により測定した。測定日は、牛舎内の温度が7°Cと非常に寒い日であったが、乳房などの毛が薄い部位や剃毛した部位は35°C前後の温度であった。一方、上臍部や頸部などは30~31°Cで、それ以外は28°C以下であった。この結果から、剃毛すれば十分温度はとれるということと、剃らない場合は体の動きや汚れの付き難さを考慮して上臍部に貼り付けることが適当と考えた。

次に、牛体への接着効果を検討した(表12)。農家の使い勝手を考慮し、剃毛した部位としていない体毛上に貼り付け、両者を比較した。

表12 牛体への接着効果の検討

剃毛	あり なし	
	あり	なし
瞬間接着剤	◎	○ 少量×
木工用ボンド(+瞬間接着剤)	-	● 非常に強固
荷造り用テープ(超強力)	△ 部位による	×
ガムテープ、両面テープ(超強力)	×	×

剃毛したものは第四胃変位の手術跡を利用し、剃毛していないものとともに上臍部に試験紙を張り付けた。対象の牛については係留され、神経質ではなく、舐めようとししないものを前提とした。なお、汚れをとるなどの特別な処理は実施していない。

その成績は、剃毛したほうが接着効果もよく、農家にとっては手間ではあるものの温度が十分とれる点や剃毛する場所が選択できるなど利点が大きく、第四胃変位の手術跡の利用や専用牛をつくるなど、工夫次第で省力化は可能である。

接着のための資材別では、瞬間接着剤が極めて短時間に接着するうえ、適度に接着し、容易に剥がせた。ただし、少量の場合は剥がれる可能性がある。木工用ボンドは接着に時間が掛かるうえ、一旦接着してしまえば強固に接着するため剥がす時にビニール袋が破損するか大量に体毛が抜けるなどの弊害が見られた。また、テープ類はほとんど接着しなかった。

9. まとめ及び考察

農場でできる乳房炎スクリーニング検査をテーマに、試験紙法とフィルム法についてSAと大腸菌群の発育菌数などを調査した結果、37°Cではコントロールの血寒法以上の良好な成績を得た。また、30°CではSAは発育が悪いものの、大腸菌群は十分に発育し、夏期には常温で培養できることが示唆された。試験紙法とフィルム法を比較すると、試験紙法は簡易性やコスト、保管のし易さの点で優れており、スクリーニング検査に適した検査法であると判断した。また、今回は菌を使用していないが、試験紙法は牛体への貼り付けにより常時の培養が可能であると推察された。

さらに、本試験紙法を農場で使用することによって、難治性のSAや毒急性の大腸菌のチェックが酪農家自身にも可能になるとともに、乳房炎の早期発見・早期治療についても期待ができるため、酪農家にとって大変なメリットがある。ただし、今回は成績を示さなかったが、CNSの一部はSAあるいは大腸菌と判定された例もあり、家畜保健衛生所での詳細な検査は必須である。

今後は野外試験として数戸の農場で使用することで問題点の抽出とその改善を行い、農家に普及させたい。