

生乳中化学発光能測定による体細胞数の推定および測定手法の開発 Milk Chemiluminescence Activity Estimates for Milk Somatic Cell Count in Dairy Cattle

稲田 司・猪野敬一郎*・野中敏道・清島和生**

Tsukasa INADA, Keiichirou INO, Toshimichi NONAKA, Kazuo KIYOSHIMA

要 約

フィールドにおける乳房炎診断法開発のため、生乳中化学発光能測定技術による生乳中化学発光能と生乳中体細胞数(SCC)の関係について検討した。生乳中体細胞数 5,000 ~ 620,000 (/ml)の生乳サンプル 108 検体を用い、オプソニン化ザイモザン(OPZ)添加後 5 分間の化学発光能を測定した。

その結果、5 分間の化学発光能(5minsCL 能)および最終 10 秒間の化学発光能(10secsCL 能)と体細胞数間に、《 $SCC(10^3/ml) = 13.6678 + 0.0022 \times 5minsCL$ 能》および《 $SCC(10^3/ml) = 14.7124 + 0.0575 \times 10secsCL$ 能》の回帰式が得られた。この結果、生乳中化学発光能は乳房炎診断法として有効であり、特に、10secsCL 能測定法は測定時間が短いため、フィールドでの活用が可能であると考えられる。

キーワード：化学発光能、体細胞数、乳房炎

I 緒言

乳房炎は乳用牛の死産原因の中で最も多い疾病の1つであり、特に高温多湿の西南暖地においては分娩前後に感染・発症が多発し、酪農経営に与える損失は甚大である。乳房炎防除のため、フィールドにおける乳房炎診断法としてMCMT法やEC測定が普及している。これらの診断法は乳房炎乳の検出方法としては有効であるが、比較的体細胞数が少ない生乳中の体細胞数の変動等については把握することが困難である。初期の乳房炎診断法としては蛍光光学細胞測定機による生乳中体細胞数測定法が活用されているが、測定機器は非常に高額で大型機器であるため設置場所が限られ、特に遠隔地等ではサンプル輸送等に問題が残る。

乳房炎発症時に生乳中体細胞の大勢を占める好中球は血液と生乳に共通して存在しており、自然免疫反応として細菌感染時の感染部位への遊走、貪食および殺菌という免疫反応が感染初期の段階でおこり、免疫系の中でもっとも初期反応が優れている。この免疫反応における酸素依存型殺菌系において、異物を貪食・殺菌する時にNADPHオキシダーゼ系の作用によりスーパーオキシドラジカルが生成され、過酸化水素、ヒドロキシラジカル等の活性酸素の生成につながる⁴⁾。化学発光能測定法は、活性酸素の生成や消費の際に動員される電子をルミノール存在下で光子に変換して計数化する方法で、好中球の殺菌活性を高感度で評価できる指標であり⁹⁾、医学から畜産分野へと応用が進められている。乳房炎診断関係では、乳房炎評価における生乳中化学発光能の有効性につ

いて報告され⁶⁾、特に生乳中化学発光能と体細胞数およびPLテスト値間に高い相関関係がみられるため、乳房炎診断指標の1つとして期待されているが、従来の測定手法では1検体あたりの測定時間に長時間を要するとともに評価が発光量であるため、フィールドにおける乳房炎診断法として迅速かつ活用しやすい診断法には至っていない。

そこで、生乳中化学発光能測定の迅速化および評価方法の開発を目的として、フィールドにおける生乳中化学発光能測定手法を検討するとともに、乳房炎評価法としての生乳中化学発光能による生乳中体細胞数の推定について併せて検討した。

II 材料および方法

試験はつぎの2つの実験により実施した。

1 実験1

生乳中化学発光能を5分間測定し、5分間生乳中化学発光能積算値(以下「5minsCL 能」と生乳中体細胞数との関係について検討した。生乳サンプルには2002年5月から6月までに搾乳した当研究所繋留のホルスタイン種搾乳牛の個体合乳でMCMT法による凝集「+」および色調「+」以上を除く108検体を用いた。

2 実験2

実験1の5分間測定した生乳中化学発光能の最終10秒間の生乳中化学発光能積算値(以下「10secsCL 能」とを用い体細胞数との関係について検討した。

化学発光能測定用供試薬は生乳希釈液として HEPES

* : 熊本県阿蘇地域振興局 ** : 熊本県農林水産部畜産課

添加フェノールレッド不含ハンクス緩衝液を用いた。増光用ルミノール液はルミノール 2.5mg に P B S 5ml を加えトリエチルアミンを 40 μ l 添加した後、0.45 μ m フィルターを用いて濾過し、不溶ルミノールを除去した。細胞刺激用オプソニン化ザイモザンはザイモザン 0.07g に健康牛血清 7ml を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間振とう後、4 $^{\circ}$ C、2,000rpm で 15 分間遠心した。上清を除去後 HEPES 添加フェノールレッド不含ハンクス緩衝液を加え 10mg/ml に調整した。生乳中化学発光能の測定には、ケミルミネッセンス測定器（ルミネッセンス PSN-AB2000、アト）を用いた。生乳中化学発光能の測定方法は、生乳サンプル 100 μ l に HEPES 添加フェノールレッド不含ハンクス緩衝液 400 μ l を加え 37 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベーションし、その後ルミノール液を 20 μ l 加え 37 $^{\circ}$ C、5 分間インキュベーションを行い、さらにオプソニン化ザイモザンを 20 μ l を添加した後、5 分間測定をおこなった。生乳中体細胞数は（社）熊本県生乳検査協会において蛍光光学細胞測定機（フォソマティック 360）により測定をおこなった。統計処理は最小自乗法により回帰分析を行った。

III 結果

図 1 に実験 1 における生乳中体細胞数階層別の経時的生乳中化学発光能の推移を示した。MCMT 法による凝集「+」および色調「+」以上を除いた供試乳 108 検体の生乳中体細胞数を測定した結果、体細胞数は 5,000 ～ 620,000 (/ml) であった。体細胞数 10 万/ml 未満の階層では発生する化学発光は非常に微弱で、測定時間内の変動はほとんどみられないが、体細胞数の高い階層においては測定開始時点から高値を示し、測定時間 5 分間においては経時的に増加し、その傾向は体細胞数の高い階層において顕著であった。

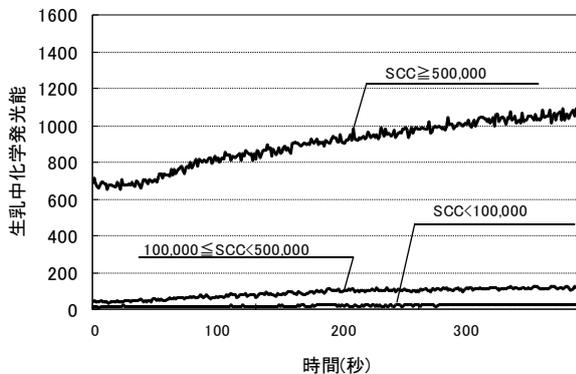


図 1 生乳中体細胞数階層別の生乳中化学発光能の経時的推移

図 2 に生乳中体細胞数と 5mins C L 能の関係を示した。生乳中体細胞数と 5mins C L 能には高い正の相関 ($R = 0.86$) がみられ、生乳中体細胞数の 5mins C L 能に対する回帰は有意 ($P < 0.01$) で、 $y = 13.6678 + 0.0022 x$ ($R^2 = 0.74$) の回帰直線が得られ、その標準誤差は 61.699 ($10^3/ml$) であった。

図 3 に実験 2 における生乳中体細胞数と 10secs C L 能の関係を示した。実験 1 と同様に生乳中体細胞数の 10secs C L 能に対する回帰は有意 ($P < 0.01$) で、 $y = 14.7124 + 0.0575 x$ ($R^2 = 0.75$) の回帰直線が得られ、その標準誤差は 60.659 ($10^3/ml$) であった。

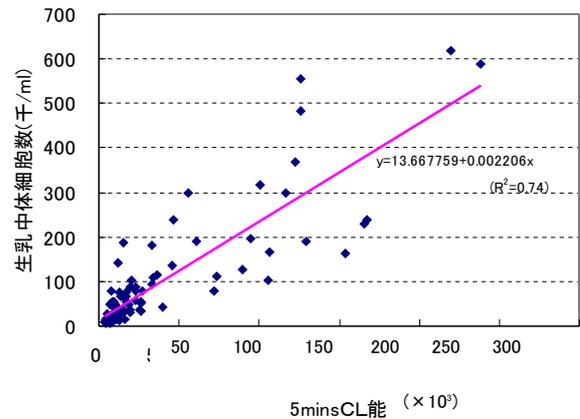


図 2 生乳中体細胞数と 5mins C L 能の関係

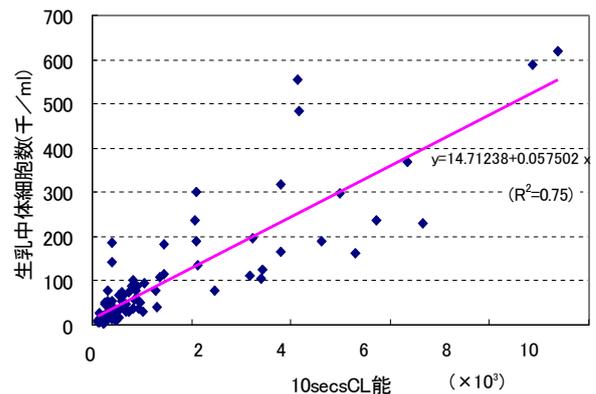


図 3 生乳中体細胞数と 10secs C L 能の関係

IV 考察

従来の乳房炎診断技術としてフィールドにおいて最も活用されている MCMT 法は、生乳中の体細胞数の増加と pH の変化を試薬との反応である「凝集」および「色

調」により乳房炎乳を判断する方法であり、生乳中の体細胞数が上昇した乳房炎の発症乳の検出には有効である。しかし、生乳中体細胞数が少ない場合や生乳中の白血球分画においてリンパ球が優勢となる場合はMCMT法では反応が出にくく2)、乳房炎感染初期乳や日和見的に牛乳中体細胞数の増加を引き起こすCNS (*Coagulase negative staphylococci*) 等による感染乳など生乳中体細胞数が低い状態では経時的変化を把握することは困難である。一方、細菌等の侵入・感染に対して好中球等食食細胞が酸素依存型の殺菌系として活性酸素を生成・放出する際にルミノール存在下で得られる化学発光能は、種々の好中球機能判定指標の中でも感度・客観性に優れた指標6)であるため、近年では畜産分野においてカウ・コンフォートに向けた科学的ストレス判定指標として、各種飼養試験に活用されているところである9, 10)。生乳中体細胞数と生乳中化学発光能は相関が高く1, 6)、生乳中化学発光能は測定開始直後から上昇をつづけ、測定開始後約 20 分前後で最高値に達する5)。特に、生乳中体細胞数の多い生乳については、化学発光能は測定開始時から高値を示し、急激な測定値の上昇がみられる。その特性を応用して、化学発光能測定技術を乳房炎診断に応用する研究が進められている3, 7, 8)。

今回の試験においては、フィールドにおける乳房炎診断法として測定時間が短時間で客観的な判定が可能になるように、従来化学発光能測定に用いられているオプソニン化ザイモザン添加後連続測定による測定時間5分間の化学発光能連続測定法(以下「5mins CL能測定法」)およびオプソニン化ザイモザン添加4分50秒後の10秒間の化学発光能を測定する生乳中化学発光能測定法(以下「10secs CL能測定法」)による生乳中体細胞数の推定値と生乳中体細胞数の関係について検討を行った。MCMT法により凝集「+」および色調「+」以上となった生乳については、検査時において乳房炎乳と判定可能であるため、今回の試験においてはMCMT法により凝集「+」および色調「+」以上となる「乳房炎」と判定されなかった生乳を対象とした。その結果、5mins CL能および10secs CL能と生乳中体細胞数はともに高い正の相関関係にあり、それぞれの測定法によるCL能に対する生乳中体細胞数の回帰は有意であるため、両測定法での生乳中化学発光能による生乳中体細胞数の推定が可能であると考えられる。

生乳中化学発光能を測定する場合、通常5mins CL能測定法のように細胞刺激剤としてオプソニン化ザイモザンを添加後連続して生乳中化学発光能の積算値を測定3, 5, 7, 8)する。一方、10secs CL能測定法は、生乳中化学発光能の経時的反応特性を応用した測定法で、オプソニ

ン化ザイモザン添加4分50秒後の10秒間の生乳中化学発光能積算値を測定する方法である。測定以外の前処理に14分50秒を要するが、測定時間は10秒間であるため、10秒間隔で前処理および測定を行えば、5mins CL能測定法に比べ、短時間で多検体の測定が可能である。前述のとおり10secs CL能測定法による測定値と生乳中体細胞数は高い相関関係にあり、生乳中体細胞数は、体細胞数(10³/ml) = 14.7124 + 0.0575 × 10secsCL能(R²=0.75)と推定することが可能であるため、指導機関および生産者にとって客観的な乳房炎診断法として活用が容易と考えられる。また、測定機器はサイズ(寸法220mm(W)×270mm(D)×176mm(H)、重量6kg)がコンパクトで、車への積み込みも容易であることから、フィールドにおいて短時間での乳房炎診断が可能である。

また、生乳中化学発光能は、乳房炎発症牛において、MCMT法により「乳房炎」と診断される前に大きく上昇したという報告がある6)。このことは、生乳中体細胞数測定法よりもさらに早期の乳房炎感染乳検出の可能性を示しており、本手法を活用した早期診断技術の向上が期待される。

V 引用文献

- 1) 稲田 司・猪野敬一郎・清島和生：熊本県農業研究センター畜産研究所試験成績書(平13), 11-12, 2001.
- 2) 勝見 淳・溝本朋子・木嶋東子・山口 亮：家畜診療 第382号, 23-27, 1995.
- 3) 川角 弘・高橋絃子・松江登久・吉田達行・吉村 格・高橋秀之・菅原盛幸：第8回日本乳房炎研究会講演要旨, 8, 2003.
- 4) 笹田昌孝：活性酸素(生物での生成・消去・作用の分子機構), 3024-3030. 共立出版株式会社, 東京, 1988.
- 5) 関戸希和子・野末紫央・志村 仁・原田弘子・庭野正人・板垣光明・高橋正博・野呂明弘：臨床獣医 19(12), 32-35, 2001.
- 6) 高橋秀之：環境ストレス低減化による高品質乳生産マニュアル, 33-42. 農林水産省北海道農業試験場, 札幌, 1997.
- 7) 高橋秀之・新井鐘蔵・小泉伸夫・犬丸茂樹・横溝祐一・渡辺 淳・尾台昌治・白戸綾子・坪井祐治・布藤雅之・松江登久・清水聖勝：家畜衛生研究成果情報 13, 5-6, 2000.
- 8) 布藤雅之・高橋秀之・松江登久：第8回日本乳房炎研究会講演要旨, 9, 2003.
- 9) 村田英雄：日本畜産学会報 66(11), 976-978, 1995.
- 10) 村田英雄：日本畜産学会報 68(1), 86-90, 1996.

Summary

Milk Chemiluminescence Activity Estimates for Milk Somatic Cell Count in Dairy Cattle

Tsukasa INADA, Keiichirou INO, Toshimichi NONAKA and Kazuo KIYOSHIMA

A hundred and eight milk samples were investigated in order to develop the mastitis diagnosis by milk chemiluminescence activity on the field. Somatic cell counts (SCC) of milk samples were 5,000 ~ 620,000(/ml). Milk chemiluminescence activities were measured for 5 minutes after adding opsonized zymosan in milk samples. In correlation between 5 minutes chemiluminescence activity(5minsCL) and SCC, the regression $\langle \text{SCC} (10^3/\text{ml}) = 13.6678 + 0.0022 \times [5\text{minsCL}] \rangle$ was obtained. And in correlation between the last 10 seconds chemiluminescence activity(10secsCL) of 5minsCL and SCC, the regression $\langle \text{SCC} (10^3/\text{ml}) = 14.7124 + 0.0575 \times [10\text{secsCL}] \rangle$ was obtained. These results indicate that milk chemiluminescence activity is effective for the mastitis diagnosis and especially the method of measurement of 10secsCL is useful for the mastitis diagnosis on the field, it is required to measure with in a few minutes.