

6. 生体由来物質が生乳抗菌性物質残留検査に与える影響

奈良県家畜保健衛生所 業務第一課

中西 晶

要 約

生乳の抗菌性物質残留検査に使われているペーパーディスク法(PD法)は、生体由来物質(リゾチーム、ラクトフェリン)で阻止円が形成される。阻止円を形成した乳房炎乳からは、リゾチーム、ラクトフェリン、ウシIgGが検出された。抗生物質の使用がないにも係わらず、抗菌性物質残留事故が発生した農場の合乳からもラクトフェリン、ウシIgGが検出された。生体由来物質が抗菌性物質残留事故を起こした可能性が示唆された。

1. はじめに

乳業メーカーに搬入されたタンクローリー乳は、受け入れ時に抗菌性物質残留検査が行われる。判定までに5時間かかるため、陽性がでた時点で他農場の生乳と混合された状態にあり、すべてが廃棄される。その損失負担は原因農場の責任となる(図1)。抗生物質の使用がないのにこのような抗菌性物質残留事故が発生し、その原因追及を試みた。

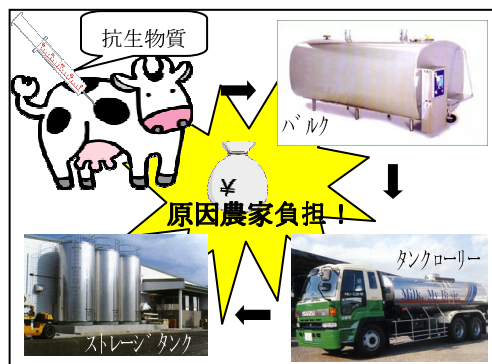


図1 抗菌性物質残留事故

2. 発生概要

平成18年12月28日～平成19年1月9日に、県内のA農場(飼養頭数:搾乳牛19頭、育成牛5頭、子牛1頭)で抗菌性物質残留事故が発生した。乳業メーカーでの抗菌性物質残留検査でタンクローリー乳とバルク乳が共に陽性となり、35tもの生乳が廃棄された。

原因究明のため、乳業メーカーで以下の検査が行われた。

- ① 畜主への聞き取りから、乳房炎治療のため抗生物質を使用している牛の生乳は廃棄し、それ以外の牛への抗生物質の使用はないことを確認した。
- ② 飼養環境中(バルク乳、水、飼料、敷料等)に抗生物質の混入がないか調べたが(抗生物質の分別法)、異常なし。
- ③ 搾乳牛の血液検査は、異常なし。
- ④ 原因牛摘発のため、個別の生乳を用いて抗菌性物質残留検査を実施した。バルク乳では、1月4日まで陽性が出た。個別検査では、ほとんどの牛において陽性を示した。1月14日にすべての牛が陰性となった。その間、陰性であったものが陽転することもあった。1月7日の検査で陽性となった牛の生乳を廃棄することで、10日から出荷が再開された(図2)。

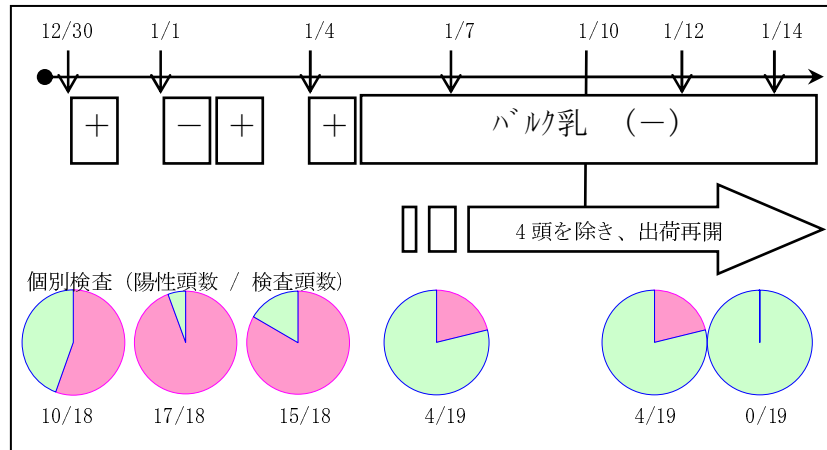


図2 A農場の抗菌性物質残留検査結果

3. 生体由来抗菌性物質のPD法への影響

抗菌性物質残留検査は、ペーパーディスク法(PD法)¹⁾で行われる。試験菌含有寒天平板に検体を含ませたペーパーディスクを置き、培養する。抗菌性物質が含まれていると、阻止円が形成される。PD法は主にペニシリンの検出を目的としており、検体をペニシナーゼ処理後再試験し、阻止円が形成されなければペニシリンによるものと推定できる。

生体由来抗菌性物質に注目し、PD法への影響を調べた。リゾチームとラクトフェリンでは阻止円が形成され、これらはトリプシン処理で失活する。牛IgGとラクトペリキターゼでは阻止円は形成されない。ペニシリンはペニシナーゼで失活する。前処理を行うことで原因を予測することができる(表1)。

表1 生体由来抗菌性物質のPD法への影響

抗菌性物質	濃度(阻止円直径)	未処理	トリプシン処理	ペニシナーゼ処理
リゾチーム	1 mg / ml (13.5 mm)	+	—	+
ラクトフェリン	10 mg / ml (12 mm)	+	—	+
ウシIgG	10 mg / ml	—	—	—
ラクトペリキターゼ	10 mg / ml	—	—	—
ペニシリン	1/1000 IU / ml (16 mm)	+	+	—

4. 生乳の体細胞数

生体由来抗菌性物質は、白血球中にあるので正常な生乳にも多少は含まれる。しかし、乳房炎時には体細胞数(主に白血球数)が増加するため、特に増加する。A農場の体細胞数は、11月下旬から12月下旬にかけて50万個/mlを超えていた(図3)。事故の3日前、12月27日には117万個/mlと急激に増加していた。

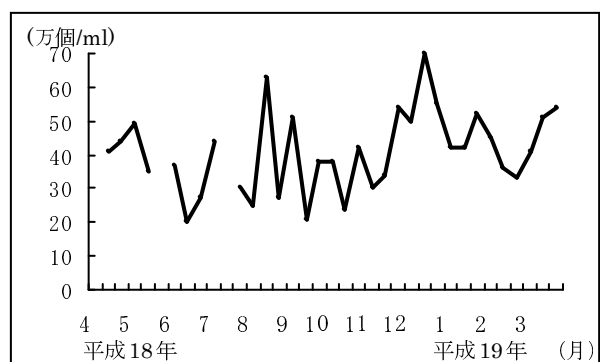


図3 A農場の生乳の体細胞数の変化

5. 生体由来抗菌性物質の測定

生体由来抗菌性物質がどのような乳汁にどれぐらい含まれているかを検討するため、以下の検査を実施した。

1) 材料

A 農場合乳 2 検体、マイグラスマ乳房炎乳 5 検体、大腸菌やレンサ球菌等の細菌性乳房炎乳 7 検体、体細胞の多い農場のバルク乳 2 検体 (79 万個/ml、64 万個/ml)、体細胞の少ない農場 (6 万個/ml) のバルク乳 2 検体を用いた。

2) PD 法¹⁾

継代保存(a)した試験菌(*Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*)を増菌用培地(b)で3代継代(55℃、22±2時間)し、試験菌混合用培地(c)に1/5量加え、シャーレに分注(8ml/枚)する(表2)。検体を浸漬させたペーパーディスクを平板上に置き、培養(55℃、5時間)後、判定(8mm以上の阻止円形成で陽性)する。

検体の前処理は、未処理、トリプシン処理²⁾(1%トリプシン溶液を1/10量添加し、室温10分静置後、トリプシン活性を止めるため85度10分で熱処理)、ペニシラーゼ処理(10⁻⁴IU/ml ペニシラーゼ溶液を1/10量添加し、室温10分静置)を行なった。

表2 PD法に使用する培地の組成

菌株保存用培地(a)	増菌用培地(b)	試験菌混合用培地(c)
酵母エキス :2g 肉エキス :1g ペプトン :5g 食塩 :5g 寒天 :15g DW :1,000ml	酵母エキス :1g トリプトン :2g グルコース :0.05g DW :100ml	酵母エキス :1g トリプトン :1g グルコース :0.2g 寒天 :3g DW :200ml
pH7.4±0.1調整後、 121℃、15min間滅菌	pH8.0±0.1調整後、 121℃、15min間滅菌	pH7.0±0.1調整後、 121℃、15min間滅菌

3) 測定項目

リゾチーム測定(溶菌活性測定、SDS電気泳動法、キナーゼ活性染色 SDS電気泳動:東海大学農学部バイオサイエンス科タンパク質化学研究室 荒木先生)、ラクトフェリン測定(エロステック ウィン・IgGプレート)、ウィンIgG測定(エロステック ウィン・Lfプレート)を行った。

4) 結果(表3、図4)

①PD法

A 農場合乳と乳房炎乳では未処理で阻止円が形成された。この阻止円はトリプシン処理で失活した。細菌性乳房炎乳はペニシラーゼ処理でも失活した。

②生体由来抗菌性物質の測定

細菌性乳房炎乳にリゾチームが検出された。バルク乳では体細胞数の違いによるラクトフェリン値及びウィンIgG値の差はなかった。バルク乳と比べるとA 農場合乳とマイグラスマ乳房炎乳でラクトフェリンとウィンIgGが多く検出された。

表 3 生体由来抗菌性物質の測定結果

		A 農場合乳	マイコプラズマ乳房炎乳	細菌性乳房炎乳	ハル乳
PD 法	未処理	2/2	5/5	7/7	0/4
	ペニシリン処理	0/2	0/5	6/7	
	トリプシン処理	0/2	0/5	0/7	
リゾチーム		0/2	0/1 (4/5 は未実施)	7/7	0/4
ラクトフェリン		2/2	4/5	0/7	4/4
ウシ IgG		2/2	5/5	1/7	4/4

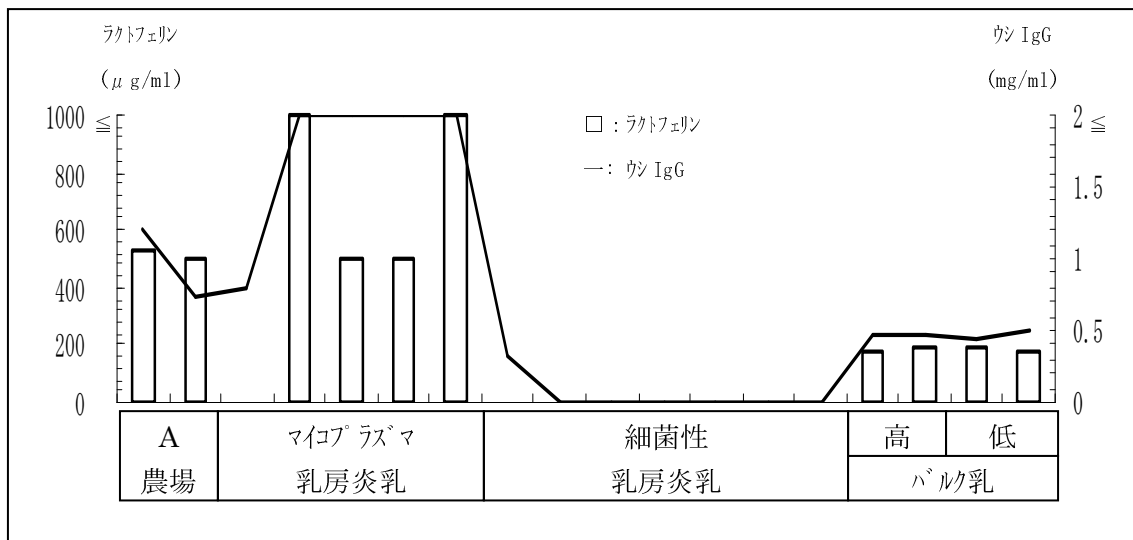


図 4 ラクトフェリン及びウシ IgG の測定結果

6. 考察

PD 法では、A 農場合乳と乳房炎乳で阻止円が形成された。

細菌性乳房炎乳からはリゾチームが、A 農場合乳とマイコプラズマ乳房炎乳からはラクトフェリンとウシ IgG が、ハル乳でみられる正常値よりも高い値で検出された。阻止円は、リゾチームやラクトフェリンなどの生体由来抗菌性物質によって形成されたと思われる。また、このような物質が乳房炎時に増加することが今回の結果からも明らかになった。このことから、A 農場でも何らかの乳房炎があった可能性が示唆された。

細菌性乳房炎乳にはペニシリン処理で失活するものがあった。これらの検体からはリゾチームが検出されている。これは、リゾチーム標準品で見られた反応と異なる。乳汁中には未知の物質があり、これは相互に影響し合っていると考ええる。

今回の経験で、生体由来物質が PD 法になんらかの影響を及ぼすことがわかった。

本事例のような事故を予防するためにも、酪農家に向けて、よりいっそうの搾乳衛生指導を行っていききたいと思う。

参考文献

- 1) 食品衛生検査指針 理化学編 (1991)
- 2) 生乳検査時におけるペーパーディスク法に関する乳固有の抗菌因子の影響 (抗生物質等の日常検査法に対する乳固有の抗菌因子の影響に関する試験) 根釧農試研究通信 第5号 研究成果