

乳汁検査における新たな検査法の試みと課題

○藤本洋平・宮本博幸・矢彦沢小百合
(長野県伊那家畜保健衛生所)

要約

一般乳汁細菌検査（細菌培養法）は、1～2日の培養が必要であり、また培地上で菌が発育しない乳房炎（非発育性乳房炎）では、原因の特定は困難である。広島大学鈴木教授が2022年に発表した新たな検査法（迅速検出法）は、迅速かつ非発育性乳房炎でも菌体の検出を可能にする検査法であり、この迅速検出法を細菌培養法と同時に実施することで、迅速検出法を活用するにあたっての課題がみられた。試験検査で依頼のあった乳汁について、細菌培養法と迅速検出法とで検査を実施した。細菌培養法は定法のとおり実施した。迅速検出法は、乳汁10 mLを3000 rpm、5分間遠心、上清を除去した。沈渣を生理食塩水1 mLで懸濁、うち10 µLをスライドガラスに広げ、グラム染色し鏡検した。結果、細菌培養法で分離困難な検体において菌体を検出したが、全体として細菌培養法よりも菌体の検出率は低下した。迅速検出法は、検査の性質を理解し、細菌培養法の弱点である迅速性等を補えるものと考察された。今後は臨床獣医師と緊密に連携し、本法を有効に活用していきたい。

はじめに

従来の乳汁検査は、一般乳汁細菌検査（以下、細菌培養法）によって行われる。細菌培養法は、乳汁を数種類の寒天培地に塗布し、24～48時間培養後、それぞれの培地に形成されたコロニーの性状から、乳房炎原因菌を同定する検査法として広く用いられている。一方で、判定に時間がかかることや菌が発育しない非発育性乳房炎の場合、原因の特定は困難である。これらの問題により、原因菌に即した迅速な初診治療が行えないことから、抗生剤の濫用、それによる薬剤耐性菌の出現

が起り、不必要な薬剤投与の実施によって不必要な休薬期間が起り、結果的に大きな経済的損失に繋がる。これらの課題に対し、筆者らは広島大学の鈴木直樹教授らが2022年に発表した、乳グラム染色による乳房炎原因微生物の迅速検出法（以下、迅速検出法）(N. Suzuki et. al. *J. Vet Med. Sci.* 2022)を試みた。この迅速検出法は、乳汁中に含まれる菌体の形状及び、グラム染色性を短時間で確認できるため、乳房炎原因菌の菌種を推定することが可能とされている。これにより、短時間で原因菌の推定が可能となり、また

菌の発育に関係なく菌の検出も可能になることが期待され、抗生剤の濫用を防止するとともに、甚急性乳房炎等の緊急性の高い疾患に対する新たな検査法として期待できる。以上から、この迅速検出法と従来の細菌培養法とを同時に実施し、その活用方法について検討を行った。

材料・方法

検体は、管内の臨床獣医師4名より一般乳汁細菌検査として依頼された乳汁30検体（13農場）を用いて検査を実施した。

〔細菌培養法〕

乳汁 25 μ L を 5%羊血液加寒天培地 (Trypticase[®] Soy Agar with 5% Sheep Blood, 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)、DHL 寒天培地 (島津ダイアグノスティクス株式会社)、マンニト食塩加寒天培地 (BBL[™] Mannitol Saly Agar, 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)、X-SA 寒天培地 (島津ダイアグノスティクス株式会社)、エドワード培地 (改良型) (関東化学株式会社) 及びサブロー寒天培地 (日水製薬株式会社) に塗布、37°C、5%CO₂ 環境下で 24 時間培養し、形成されたコロニーについて菌種を判定した。24 時間でコロニーの形成が認められなかった場合はさらに 24 時間培養し、菌の判定を行った。

〔迅速検出法〕

乳汁 10 mL を 3000 rpm, 5 分間遠心し、乳脂肪層、脱脂乳層及び細胞層に分離させ、そのうちの乳脂肪層と脱脂乳層を除去、残った細胞層を滅菌生理食塩水 1 mL に懸濁した。次に懸濁液 10 μ L を分取し、スライドガラスに展開、風乾させ、メタノールにより固定を行い、定法のとおりグラム染色を行った。その後、顕微鏡を用いて 1000 倍の視野で観察した。

結果

細菌培養法で菌分離が確認された検体は 30 検体中 24 検体であり、6 検体は非発育性乳房炎であった。分離された菌のグラム染色像とグラム染色像毎の株数は、グラム陽性球菌が 20 株、グラム陽性桿菌が 1 株、グラム陰性桿菌が 3 株、酵母様真菌が 2 株であった (表 1)。

表 1. 細胞培養法での分離菌

グラム染色像	株数	分離菌
		<i>S. aureus</i>
グラム(+)球菌	20	CNS
		<i>Streptococcus</i>
グラム(+)桿菌	1	<i>Corynebacterium</i>
		<i>E. coli</i>
グラム(-)桿菌	3	<i>Klebsiella</i>
酵母様真菌	2	酵母様真菌

迅速検出法で細菌または真菌が観察された検体は 30 検体中 20 検体であり、グラム陽性球菌は 18 株、グラム陽

性桿菌は3株、グラム陰性桿菌は1株、酵母様真菌は1株検出された。細菌培養法と比較して全体的に検出率は低下した。一方で、グラム陽性桿菌については上昇した(表2)。また、実際に顕微鏡下でみられた菌体の様相は図1-1に示したとおり、破線で示した白血球内部に菌体が存在していることが分かった。

表2. 迅速検出法と細菌培養法の検出株数の比較

グラム染色像	迅速検出法	細菌培養法
グラム(+)球菌	18	20
グラム(+)桿菌	3	1
グラム(-)桿菌	1	3
酵母様真菌	1	2

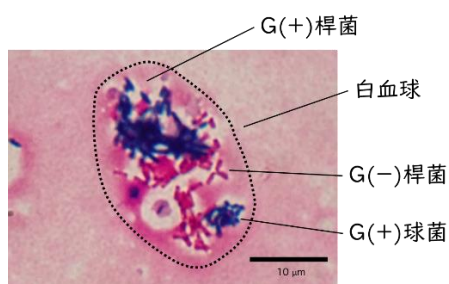


図1. 迅速検出法にて観察された菌体

次に、迅速検出法で観察された菌体と、細菌培養法で分離された菌種と菌量の関連について調べた。結果、グラム陽性球菌、桿菌、グラム陰性桿菌が

観察された検体では、細菌培養法により *E. coli* が >20,000 cfu/mL、*Streptococcus* が >20,000 cfu/mL、CNS が 600 cfu/mL 分離された(図2-1)。次に、*S. aureus* が >20,000 cfu/mL 分離された検体では、図2-2で示した通り、ぶどうの房状のグラム陽性球菌が観察された。また、非発育性乳房炎であった検体からは、図2-3に示すようなグラム陽性球菌が観察された。さらに、酵母様真菌が >20,000 cfu/mL 分離された検体では、図2-4に示したとおり、大型のグラム陽性に染色される菌体が多数観察された。

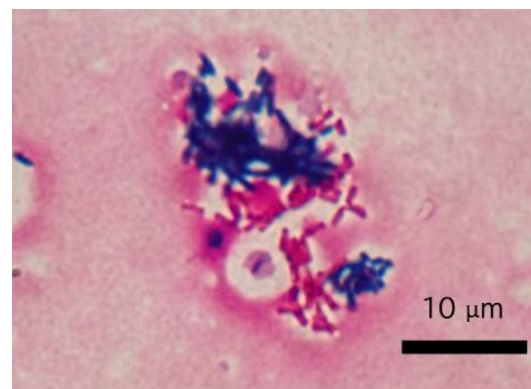


図2-1. 迅速検出法の観察像①

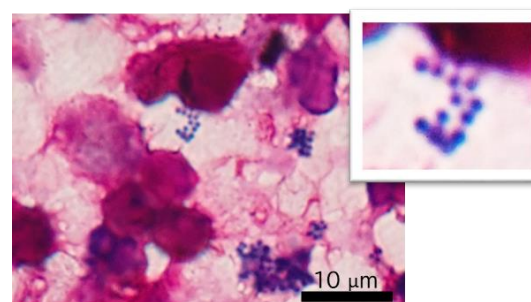


図2-2. 迅速検出法の観察像②

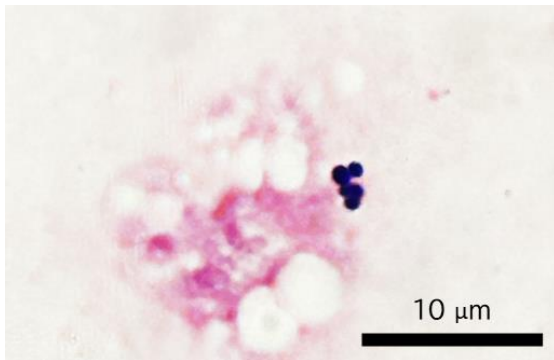


図 2-3. 迅速検出法の観察像③

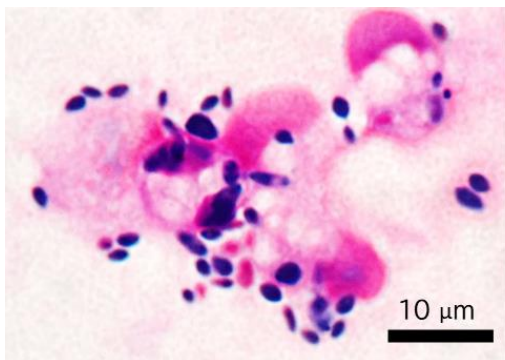


図 2-4. 迅速検出法の観察像④

また、検体数の多かったグラム陽性球菌における検査感度と特異度を求めたところ、感度は80%であり、特異度は100%と、細菌培養法に対し、一定の感度と高い特異度が得られた(表3)。

表 3. グラム陽性球菌における検査感度と特異度

	細菌培養法	
	+	-
迅速検出法	+	16
	-	4

さらに、迅速検出法により菌体が見られる視野数から検出強度を設定し、細菌培養法で得られたコロニー数を予測できると判断し、検出強度と分離コロニー数を比較した。検出強度は表4に示したとおりである。検出強度と分離コロニー数の相関は、決定係数が約0.39と明らかな相関は認められなかった(図3)。

表 4. 検出強度

検出強度	10 視野中に みられた視野数
+	1 視野
++	2 ~ 4 視野
+++	5 ~ 9 視野
++++	10 視野

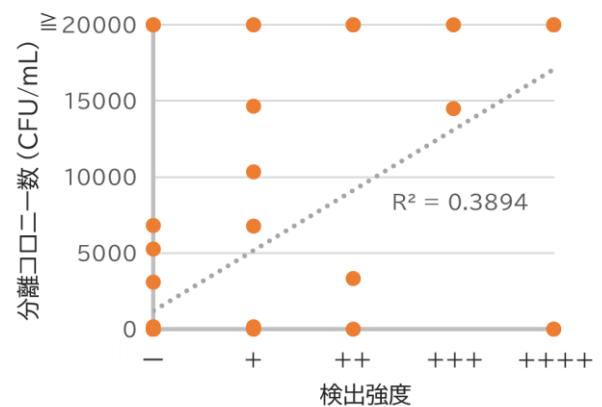


図 3. 検出強度と分離コロニー数の相関

迅速検出法は細菌培養法と比較して客観性が低い検査法であるため、5人の検査者を設定し、それぞれの検査結

果を調べたところ、検査感度もしくは特異度に大きなばらつきが認められた（表5）。

表5. 検査者毎の検査感度と特異度
[感度（特異度），%]

	検査者				
	1	2	3	4	5
G(+) 球菌	80 (100)	80 (25)	75 (100)	40 (100)	40 (75)
G(+) 桿菌	0 (87)	0 (96)	0 (83)	0 (83)	0 (83)
G(-) 桿菌	33 (100)	0 (81)	33 (100)	65 (95)	33 (100)
酵母様真菌	50 (100)	50 (100)	50 (100)	50 (100)	50 (100)

考察

迅速検出法は、これまで細菌培養法では、結果が判明するまでに1日以上要したものが、30分程度で菌種を推定することが可能であった。また、非発育性乳房炎乳汁にも検査対応が可能であり、さらに、細菌培養法では、増殖の速い菌に負けていた遅発育性菌にも対応可能であった。一方で、検査の難易度から、検査者毎の結果に大きなばらつきが起こった。また薬剤感受性試験を実施するには細菌培養法が必須であることがわかった。検査時間の大幅な短縮は、臨床獣医師に速報として結果を伝えることが期待でき、また非発育性乳房炎への抗生剤使用の可否についても一つの根拠として提示できると考えられる。一方で、検査者毎の検査結果のばらつきについて、各検査者に検査の感想を聞き取ったところ、「壊れた白血球の核もグラム陽

性に染色されてしまい、菌体との区別が困難であった。また、菌体が明らかで、数も多い場合はいいが、1～2視野しか認められない場合、夾雑物との区別がつかず、判定に自信を持てなかった。しかし、培養結果と照らし合わせながら観察することで、菌体と夾雑物との区別がつくようになっていった。」とのことで、菌体を正しく検出するには、検査者の習熟が必要であることが分かった。また、本検査の活用について、管内の臨床獣医師に意見を求めたところ、「甚急性乳房炎の原因菌を推定できるのは助かる。全ての検体で実施したいとは思わないが、状況によっては依頼したい。」とのことで、甚急性乳房炎への対応に活用できるのではと考えられる。

最後に

迅速検出法の活用には、臨床獣医師と検査の性質を共有し、管内酪農家に、適切な抗生剤の使用を指導する必要がある。それにより、薬剤耐性菌の出現を予防し、投薬に係る費用の削減、廃棄乳の減少につなげていきたいと考えている。