

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-279388

(P2004-279388A)

(43) 公開日 平成16年10月7日(2004.10.7)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569	GO 1 N 33/569	F
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50	Z
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	N

審査請求 未請求 請求項の数 4 書面 (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願2003-113461 (P2003-113461)	(71) 出願人	503015503 シゲタ動物薬品工業株式会社
(22) 出願日	平成15年3月12日 (2003. 3. 12)	(72) 発明者	西尾 義行 富山県小矢部市小森谷4569番地1 シゲ タ動物薬品工業株式会社内

(54) 【発明の名称】 乳汁中の病原性微生物の検出法および獣畜類への病原性微生物の感染の有無を検査するため生乳汁を用いる検出法

(57) 【要約】

【課題】 乳汁あるいは獣畜類への病原性微生物の感染の有無を検査するため、獣畜類から搾乳した生乳汁を用いることにより1回に多数の検体を検査することを可能にした。

【解決手段】 乳汁への病原性微生物の感染の有無を検査する方法としては、用途別の培地を用いて分離同定する方法が汎用されていた。また、獣畜類に関しては、血漿中に存在する病原性微生物に対する抗体の有無を調べる方法が多く用いられていた。これらの方法はいずれも、煩雑で、しかも、多人数を要した。そこで、より簡便な方法を探索したところ、血漿中同様に獣畜類から搾乳された乳汁にも抗体が存在することを見出した。この乳汁を用いて抗体を検出する方法により、乳汁あるいは獣畜類への病原性微生物の感染の有無を正確かつ迅速に検査することを可能にした。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

乳汁および獣畜類を対象に病原性微生物の感染の有無を検査するため、検体試料として乳汁を用いる抗体検出法。

【請求項2】

乳汁および獣畜類を対象に病原性微生物の感染の有無を検査するため、検体試料として乳汁を用いるELISA法（酵素免疫測定法）。

【請求項3】

乳汁および獣畜類を対象にQ熱菌の感染の有無を検査するため、検体試料として乳汁を用いる抗体検出法。

10

【請求項4】

乳汁および獣畜類を対象にQ熱菌の感染の有無を検査するため、検体試料として乳汁を用いるELISA法（酵素免疫測定法）。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は、病原性微生物の検査において病原性微生物に対応する抗体を検出することにより、1回に多数の検体を検査する方法である。

【0002】

【従来技術】

獣畜類の乳汁あるいは食肉は無菌なものでなく、Q熱菌あるいはサルモネラ菌など病原性微生物により、しばしば感染している。この感染している生乳汁あるいは生肉を食べた人は、病原性微生物に感染し罹患するケースがある。このため、食用として飼育されている獣畜類については、全数、病原性微生物への感染の有無を検査する必要がある。ところが、食用獣畜類は、極めて多数飼育されているため、従来は、これら獣畜類の全数を検査することはできていなかった。

20

【0003】

本発明により、病原性微生物に感染している食用獣畜類の全数について検査することを可能にした。

【0004】従来方法

従来、獣畜類の病原性微生物への感染の有無を検査する方法としては、次の方法があった。

30

1. 検査用試料としては、血液、痰あるいは化膿汁などが用いられていた。

2. 測定法としては、次の3つの方法が行われていた。

1) 血液を用いて、ELISA法（酵素免疫測定法）あるいは蛍光抗体法（IFA）などによる病原性微生物に対する抗体を検出し確認する方法。

2) 血液および痰などの検体試料を用いて、PCR（Polymerase chain reaction）法により病原性微生物に特異的なDNA配列を検出し確認する方法。

3) 血液および痰など体液を電子顕微鏡で観察し形態的に同定する方法。

【0005】

40

【発明が解決しようとする課題】

食用獣畜類のように病原性微生物の検出を必要とし、しかも、多数の検体試料について検査する際の問題点は、検査する対象である検体試料にあった。

【課題を解決するための手段】

【0006】

病原性微生物への感染の有無を検査する方法のうち、比較的多数の検体を処理できる方法はELISA法（酵素免疫測定法）である。前処理なしで測定できる試料であれば、1回、数100検体以上の測定が可能である。

【0007】

このELISA法による獣畜類の検査には、検体試料として血液が汎用されている。

50

【0008】

ところが、血液を用いるには前処理として採血が必要である。採血に当っては、牛など大型動物を固定する極めて難しく、時間がかかる作業がある。さらに、この採取した血液を遠心で分離し血漿を分取する煩雑な工程がある。

【0009】

そこで、血液と同じ抗体が存在し、しかも前処理工程が簡単な方法を探し出すため研究を重ねた。その結果、獣畜類の乳汁に血漿と同じ抗体が存在することを見出した。そこで、乳汁をELISA用の検体試料とすることにより多数の乳汁あるいは獣畜類への病原性微生物検査を可能にした。

【0010】

【発明の実施の形態】

乳汁あるいは獣畜類への病原性微生物の感染の有無を検査する検体試料として、乳汁を用いた。乳汁を検体試料とすることで、乳汁あるいは食用獣畜類の全数検査のような多数の検体試料を測定することを可能にした。

【0011】

【本検出法の原理】

本検出法の原理は、はじめに、検査目的とする病原性微生物あるいはこの培養液を抗原として用いる。次に、この抗原に抗体を含む乳汁を加え反応させる。さらに、この抗原抗体反応体に標識抗体を加え結合させた後、発色剤を加え発色させる。この発色の大きさは、乳汁中に含まれる抗体量に従うので、吸光度を測定し、これを抗体強度とする。

【0012】

【Q熱菌に対する抗体が血漿と同様乳汁中に存在することの確認】

Q熱菌・Coxiella burnetii (コクシエラ・バーネティ) に対する抗体が、生牛乳中に存在するか否かを検討した。

【0013】(A) 試験方法

1) 抗原液の調製法

Q熱菌・Coxiella burnetii (コクシエラ・バーネティ) アメリカ株、Nine Mile 菌を細胞培養し、この培養液を重炭酸緩衝液で希釈した液を抗原液として用いた。

2) 抗体液の調製法

血漿検査でQ熱菌への抗体が存在することが確認されている牛について、この牛から搾乳した生乳汁を検体とした。この乳汁をポリソルベート加リン酸緩衝液で10倍、50倍、80倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、800倍、1000倍および2000倍に希釈し、抗体液とした。

3) ELISA法による反応

抗原液をマイクロプレートの各穴に分注し、4℃で一夜放置した。この放置したマイクロプレートの各穴に抗体液100μlを加え37℃で1時間インキュベートした後、反応液を捨てた。次に、この各穴にパーオキサイド標識抗体100μlを入れ37℃で1時間放置した後、この標識反応液を捨てた。残った各穴に発色剤・4-フェニレンジアミン塩素酸・過酸化水素水混合液100μlを加え37℃で30分間反応させた。30分経過後、2M硫酸50μlを加え発色反応を停止した。直ちに、各穴について492nmにおける吸光度を測定した。

4) 抗体強度

各穴について492nmでの吸光度を測定し抗体強度とした。

【0014】(B) 試験結果および考察

血漿検査でQ熱に対する抗体の存在が確認されている牛について、この牛から搾乳した生乳汁の抗体強度を調べ、この結果を図1に示した。乳汁の濃度が高くなる、すなわち、希釈倍率が小さくなるにつれ、吸光度が大きくなる「正」の用量反応曲線を示した。したがって、血漿中と同様に牛の乳汁中にもQ熱の抗体が存在することが分かった。

【0015】

10

20

30

40

50

【乳汁と血漿の抗体強度の関係】

Q熱菌・*Coxiella burnetii* (コクシエイラ・バーネティ) に対する抗体について、牛の血漿中に存在するものと牛乳中存在するものと同じか否かを検討した。

【0016】(A) 試験方法

検体試料としては、Q熱菌に対する抗体の存在が確認されている牛血漿とこの牛より搾乳した牛乳を用いた。上記の「Q熱菌に対する抗体が血漿と同様乳汁中に存在することの確認」の項、(A) 試験方法に準じて操作した。すなわち、牛乳および血漿のいずれも10倍、50倍、80倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、800倍、1000倍および2000倍に希釈しELISA測定用の試料を調製し、以下、同様に操作して試験を行った。

10

【0017】(B) 試験結果**1) 牛乳と血漿の抗体強度に関する反应用量曲線**

前項の「Q熱菌に対する抗体が血漿と同様乳汁中に存在することの確認」に示した(B) 試験結果のとおり、牛乳の抗体濃度が高くなる、すなわち、希釈倍率が小さくなるにつれ吸光度は大きくなった。また、図1に示したとおり、血漿においても抗体濃度が高くなるにつれて吸光度は大きくなった。しかも、牛乳と血漿の用量反応曲線は平行的であった。

2) 同一牛における牛乳と血漿の抗体強度の関係

前もって、血漿の抗体が陽性であることが確認されている5頭の牛について、この血漿と牛乳の抗体強度を比較した。図2に示したとおり、いずれの牛においても牛乳と血漿の抗体強度は近似値であった。すなわち、5頭の牛に関し、血漿の抗体強度が大きい牛から搾乳した牛乳は、平行的に抗体強度は大きく、また、血漿の抗体強度が小さい牛から搾乳した牛乳の抗体強度は小さかった。

20

【0018】(C) 考察

牛乳および血漿の抗体強度に関する用量反応曲線は、いずれも抗体濃度が高くなる、すなわち、希釈倍率が小さくなるにつれ、抗体強度も大きくなる「正」の関係であった。また、5頭の牛について試験したところ血漿の抗体強度と牛乳の抗体強度は近似値で平行的であった。したがって、牛乳から検出した抗体と血漿から検出した抗体は、Q熱菌に対する同じ抗体であることを検証した。

【0019】**【本試験法の再現性】**

本試験の再現性を検討するため、陽性コントロールと陰性コントロールで調べた。陽性コントロールとしては、Q熱菌に対する抗体の存在が確認されている牛乳と血漿、また、陰性コントロールとしては、Q熱菌に対する抗体が存在していないことが確認されている牛乳と血漿を用いた。各陽性コントロールおよび陰性コントロール共に各マイクロプレートの2穴ずつに入れ、マイクロプレート400枚について調べた。表1に示したとおり、陽性コントロールはいずれも基準値以上の吸光度を示し「陽性」を示した。また、陰性コントロールはいずれにも発色せず「陰性」を示した。よって、本試験法の再現性は保証されていることが検証された。

30

【0020】**【実施例1】牛400頭について生牛乳を用いてのQ熱菌への感染検査**

40

【0021】(A) 試験方法**1) 牛乳の搾乳法**

牛は識別できるよう個別に番号札をつけた。この各々の牛から牛番号を記載した容器に搾乳した牛乳を入れ検体試料とした。

2) ELISA用試料液の調製法および試験方法

前項の「Q熱菌に対する抗体が血漿と同様卵黄中に存在することの確認」、(A) 試験方法に準じて行った。ただし、ELISA法での測定試料液としては100倍希釈液を用いた。

3) 試験の繰り返し回数

同じ生牛乳について、試験は3回繰り返し行った。

50

【0022】(B) 試験結果および考察

牛400頭について、これらの牛から搾乳した生牛乳についてQ熱菌に対する抗体の有無を検査した。表2に示したとおり、400頭の牛に対して8.3%の33頭が陽性であった。3回の繰り返し試験のいずれも同じ結果となった。したがって、今回の検査では、8.3%の牛がQ熱菌陽性であった。

【0023】

【発明の効果】

本発明により、畜産業者が搾乳している生乳汁および飼育している牛など獣畜類について病原性微生物への感染の有無を全数検査することを可能にした。

【図面の簡単な説明】

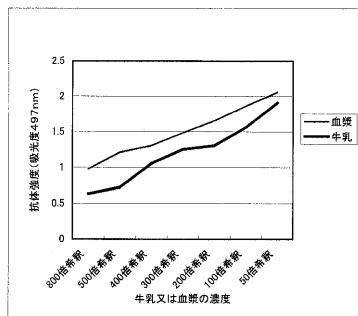
【図1】Q熱菌に感染した牛乳あるいは血漿の濃度と抗体強度との関係を説明したグラフである。(「Q熱菌に対する抗体が血漿と同様乳汁中に存在することの確認」の項)

【図2】同一牛における牛乳と血漿の抗体強度の関係を説明したグラフである。(「乳汁と血漿の抗体強度の関係」の項)

【表1】マイクロプレート400枚を用いて試験の再現性を確認した表である。(「本試験の再現性」の項)

【表2】牛400頭について生牛乳を用いてQ熱菌への感染検査の結果。(実施例1)

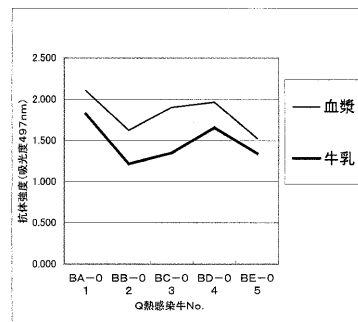
【図1】



【表1】

試料		検査プレート枚数 (穴数)	陽性プレート枚数 (穴数)	陰性プレート枚数 (穴数)
卵黄	陽性	400枚	400枚	0枚
	コントロール	(800穴)	(800穴)	(0穴)
	陰性	400枚	0枚	400枚
血漿	陽性	400枚	400枚	0枚
	コントロール	(800穴)	(800穴)	(0穴)
	陰性	400枚	0枚	400枚
コントロール	(800穴)	(0穴)	(800穴)	

【図2】



【表2】

繰返試験	検査牛	陽性牛	陰性牛	判定不能	陽性コントロール	陰性コントロール
1回目	400頭	33頭 (8.3%)	367頭	0個	すべて陽性	すべて陰性
2回目	400頭	33頭 (8.3%)	367頭	0個	すべて陽性	すべて陰性
3回目	400頭	33頭 (8.3%)	367頭	0個	すべて陽性	すべて陰性

专利名称(译)	牛奶中病原微生物的检测方法和使用原料奶检测兽医动物中是否存在病原微生物感染的检测方法		
公开(公告)号	JP2004279388A	公开(公告)日	2004-10-07
申请号	JP2003113461	申请日	2003-03-12
[标]申请(专利权)人(译)	重田动物药业		
申请(专利权)人(译)	重田动物药业有限公司		
[标]发明人	西尾義行		
发明人	西尾 義行		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/50 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/569.F G01N33/50.Z G01N33/53.N		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CB21 2G045/FB03 2G045/JA01		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：通过使用从野生动物和家畜挤奶的新鲜奶来检查许多标本，以检查病原微生物感染牛奶或野生动物和家畜的发生。

ŽSOLUTION：抗体存在于从野生动物和家畜以及血浆中挤出的奶中。通过该使用牛奶检测抗体的方法，可以准确且迅速地检查致病微生物对乳或野兽和家畜的感染的发生。 Ž

試 料		検査	陽性	陰性
		プレート枚数 (穴数)	プレート枚数 (穴数)	プレート枚数 (穴数)
卵黄	陽性	400枚	400枚	0枚
	コントロール	(800穴)	(800穴)	(0穴)
	陰性	400枚	0枚	400枚
	コントロール	(800穴)	(0穴)	(800穴)
血浆	陽性	400枚	400枚	0枚
	コントロール	(800穴)	(800穴)	(0穴)
	陰性	400枚	0枚	400枚
	コントロール	(800穴)	(0穴)	(800穴)