

早期乳房炎診断キットの開発

東京大学大学院農学生命科学研究科放射線動物科学研究室・准教授 村田 幸久

■ 目 的

牛乳房炎は最も頻度の高い生産動物の感染症である。症状の出た牛では乳質が低下して出荷不能となり、症状が出ていなくても、菌の感染による乳量の低下が大きな経済的損失を招く。乳房炎による甚大な損失を回避して集乳効率を上げるには、現場における簡単、迅速、かつ高感度な検査方法の開発が必須である。

炎症の進行には、プロスタグランジンなどの脂質(メディエーター)が重要な役割を持つ。これらの脂質の産生量は、障害の部位や程度によって劇的に変化し、炎症を巧みに制御していることが明らかになりつつある。提案者は質量分析装置を用いて、乳汁に排泄される脂質の網羅的解析を行い、牛乳房炎症状の程度に比例して排泄される脂質分子の特定を進めている。これらの脂質が見つければ、牛乳房炎の診断マーカーとして非常に有用である。

一方で質量分析装置を用いた測定は、畜産現場で行えず、費用や技術面でも実用性に乏しい。これらの排泄量を現場で簡単かつ高感度に測定できる技術の開発が必須である。これらの背景をうけ本研究では、乳房炎のバイオマーカーとなる乳中の脂質の探索と、それに対する抗体の作製、これを用いた検査キット(Enzyme Immunoassay: EIA)の開発を目的とした。

■ 方 法

- ・東京大学・農学部附属牧場において飼育されている牛から乳汁を採取した。乳房炎の指標となる体細胞数を評価した。得られた乳汁を固相抽出した後、質量分析装置にかけ、158種類の脂質を対象に、濃度を測定した。
- ・マーカー候補となりうる脂質に対して、Keyhole Limpet hemocyanin を付加して抗原とし、これをマウスに免疫した。免疫したマウスの脾臓を採取して、抗体産生ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの培養上清から抗体を精製してEIA法を確立し、抗体を評価した。
- ・選択したハイブリドーマを大量培養して上清を回収し、抗体を精製した。精製した抗体を用いてEIAを行い、抗体濃度、反応温度、時間、発色原理などの条件を最適化した。

■ 結果および考察

- ・上記の方法により、乳汁中の細胞数の増加、つまり乳房炎の症状の悪化に比例して、排泄濃度が変化する脂質を12種類見出した。この中から、特に濃度の変化が大きな脂質2つを、乳房炎マーカー候補として選択した。
- ・上記の2つの脂質にKLHを付加してマウスへ免疫したところ、マウス血中のIgG濃度上昇が観察された。これらのマウスの脾臓から抗体産生ハイブリドーマ作製し、その上清の評価を評価に用いた。その結果、各脂質に対して結合する抗体を産生していると想定される6種類のハイブリドーマを選択できた。
- ・これらの抗体を精製し、それぞれの脂質に対する結合の感度と特異度を算出することで、候補となる抗体とそれを産生するハイブリドーマを選択した。得られた抗体をEIAプレートへの固相化する濃度や反応条件を最適化し、脂質濃度を適切に測定できるEIA法を確立した。

■ 結 語

本研究により、牛乳房炎時に乳汁中に産生され、病態を反映する脂質を発見することができた。また、これらの脂質に対する抗体とそれを用いたEIAシステムの構築に成功した。これらを用いれば、より簡便かつ早期に、酪農現場において牛乳房炎を検出できる可能性がある。

本研究に対して助成いただいた一般財団法人旗影会の関係者の方々、審査いただいた先生方に感謝申し上げます。