

ルーメン液の凍結保存及び保存器具の滅菌条件が リポ多糖体濃度に及ぼす影響

松本拓也¹⁾ 大橋 傳²⁾ 澤田 浩²⁾ 新井鐘蔵^{2)†}

1) 兵庫県姫路家畜保健衛生所 (〒670-0081 姫路市田寺東2-10-16)

2) 独農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所 (〒305-0856 つくば市観音台
3-1-5)

(2011年1月18日受付・2011年11月21日受理)

要 約

牛のルーメン液の凍結保存及びルーメン液を保存する器具の滅菌条件の違いがリポ多糖体 (LPS) 濃度へ及ぼす影響について調べた。採取したルーメン液を凍結・融解しても、LPS濃度に有意な変化は認められなかった。また、ルーメン液をLPSフリーでない器具に保存してもLPS濃度に有意な変化は認められなかった。以上のことから、採取後ただちに凍結保存したルーメン液はLPS濃度の測定に活用できるものと考えられた。

——キーワード：牛，リポ多糖体，ルーメン液。

----- 日獣会誌 65, 278～280 (2012)

リポ多糖体 (LPS) はグラム陰性菌の外膜を構成する成分で、生体においては発熱、血液凝固系の促進、炎症反応の亢進等の生物活性を示す [1, 2] ことが知られている。ルーメンアシドーシスを呈した牛では、ルーメン液中のグラム陰性菌の死滅に伴い、ルーメン液LPS濃度の著増が起こり [3]、食欲不振や消化器障害などが発現する [4, 5]。このためルーメン液LPS濃度の測定はルーメンアシドーシスの病態評価に有用と考えられる [2-8]。LPS濃度の測定に用いるルーメン液は、通常は採取後速やかに10,000g以上の遠心加速度で遠心分離をして細菌や夾雑物を除去し、その上清を凍結保存してLPS測定に用いる [5-8]。しかし、高速遠心分離機を保有しない臨床現場では、採取したルーメン液を速やかに遠心分離することができない。採取したルーメン液をそのまま凍結保存できればサンプル処理が容易となるが、グラム陰性菌を凍結・融解すると菌の死滅が生じる [9, 10] ため、上清中のLPS濃度の増加を招く恐れがある。また、採取したルーメン液をLPSフリーでない容器に保存した報告 [7] もあり、保存容器の滅菌の有無がルーメン液LPS濃度の測定値に及ぼす影響について不明な点もある。

そこで本研究では、採取したルーメン液の凍結保存がLPS濃度の測定値に及ぼす影響について調べるととも

に、ルーメン液の保存器具の滅菌条件の違いがLPS測定値へ及ぼす影響について検討した。

材料及び方法

供試動物：健康なホルスタイン種雌牛5頭 (成牛3頭、育成牛2頭、平均体重472kg) を用いた。牛には粗飼料 (チモシー乾草) と市販の配合飼料を主体とした1日2回の制限給餌を行った。

ルーメン液の採取と前処理：ルーメン液の採取は、同一日の朝の採食前と採食3時間後に行った。胃汁採取器 (ルミナー、富士平工業株、東京) を用いてルーメン液300mlを経口採取し、LPSフリーのフラスコ内に氷冷保存した。なお、胃汁採取器は水洗・乾燥した未滅菌のものを用いた。

採取したルーメン液は、LPS測定用に次の3通りの処理を実施した。①採取したルーメン液をただちに遠心分離 (遠心加速度12,000g, 30分, 4℃) し、上清をLPSフリーの試験管 (乾熱滅菌試験管、生化学バイオビジネス株、東京) に入れ-30℃で凍結保存した (対照)。②採取したルーメン液を、そのままLPSフリーの試験管に入れ-30℃で凍結保存した (原液1)。③採取したルーメン液を、そのままLPSフリーでない試験管 (中性洗剤で洗浄後、水洗・自然乾燥した試験管) に入れ

† 連絡責任者：新井鐘蔵 (独農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所)

〒305-0856 つくば市観音台3-1-5 ☎・FAX 029-838-7795 E-mail : sarai@affrc.go.jp

-30℃で凍結保存した(原液2)。なお、凍結サンプルはLPS測定の日日に室温で融解し、対照はそのまま、原液1及び2は遠心分離(遠心加速度12,000g, 30分, 4℃)した上清をLPS濃度の測定に用いた。また、採取したルーメン液を速やかに2重ガーゼでろ過したろ液をpHと揮発性脂肪酸の測定に用いた。

ルーメン液LPS濃度の測定: LPS濃度の測定は、比濁時間分析法[6]により実施した。上清をLPSフリーの蒸留水(注射用蒸留水, 大塚製薬㈱, 東京)で10,000倍に希釈し、100℃10分の加熱処理を実施した。得られた溶液100 μ lにLimulus Amebocyte Lysate (LAL)試薬(リムルスES-Jテストワコー, 和光純薬工業㈱, 大阪)を100 μ l加え、37℃で加温し、トキシノメーター(ET201, 和光純薬工業㈱, 大阪)を用いてLPS濃度を測定した。なお、LPSの測定操作にはすべてLPSフリーの器具を用いた。

ルーメン液pHの測定: pHメーター(PHL-30型, 東亜ディーケーケー㈱, 東京)を用いて、ろ液のpHを測定した。

揮発性脂肪酸(VFA)の測定: ろ液を遠心分離(遠心加速度12,000g, 30分, 4℃)して、上清を-30℃で凍結保存し、VFAの測定に用いた。VFAの測定はガスクロマトグラフ法(GC-17A, 島津製作所㈱, 京都)[11]を用いて実施した。

統計解析: 各前処理サンプル間のLPS濃度の比較は一元配置分析(ANOVA)により実施した。採食前後のLPS濃度, pH, VFA濃度の比較はStudent's-*t*検定により実施した。それぞれ危険率5%未満を有意な差とした。測定値は平均 \pm 標準偏差で示した。

成 績

対照と原液1及び2のルーメン液LPS濃度は、すべてのサンプルで同等の測定値を示し、群間及び採食前後における有意差は認められなかった(図)。

ルーメン液pHは、採食前は 7.34 ± 0.07 で、採食3時間後には 7.13 ± 0.27 に低下したが有意差はなかった。

総VFA濃度は、採食前は 71.5 ± 5.1 mmol/lで、採食3時間後には 81.5 ± 13.6 mmol/lと増加したが有意差はなかった。

考 察

本試験において、採取したルーメン液をただちに遠心分離して得られた上清(対照)と、採取したルーメン液を一度凍結して融解後に遠心分離をして得られた上清(原液1)についてLPS濃度を比較したところ、同等の測定値を示したことから、ルーメン液の凍結・融解はLPS濃度に大きな影響を与えないことが示唆された。グラム陰性菌は死滅すると、菌体自身が持つ蛋白分解酵素

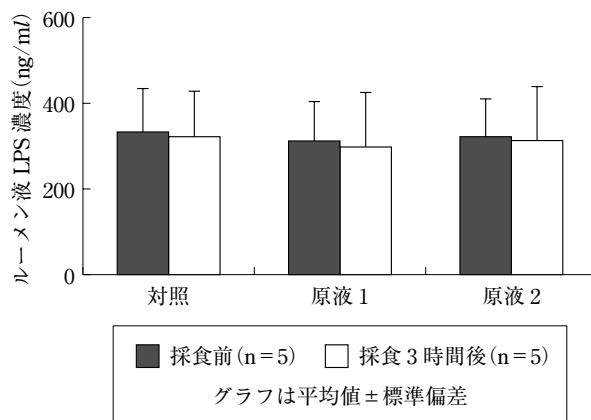


図 ルーメン液の凍結保存及び保存器具の滅菌条件の違いによるLPS濃度の比較

対 照：ルーメン液を遠心分離した上清をLPSフリーの試験管に入れて凍結保存

原液1：ルーメン液をそのままLPSフリーの試験管に入れて凍結保存

原液2：ルーメン液をそのままLPSフリーでない試験管に入れて凍結保存

により自己融解が生じ、LPSを遊離することが報告されている[3, 12-14]。ルーメン液LPS濃度の増加は、ルーメン液中のグラム陰性菌の死滅が大きな要因[3]であるが、今回実施したルーメン液の凍結・融解処置では、グラム陰性菌の死滅に伴うLPS増加を必ずしも誘発しなかったことになる。グラム陰性菌である大腸菌は、凍結・融解により細胞膜、細胞壁やDNAなどに損傷を受け生存率が下がる[9]が、ルーメン液の凍結・融解によるグラム陰性菌の死滅への影響については不明であり、今後、ルーメン液の構成成分とグラム陰性菌の耐凍性の関連についての検討が必要であると考えられた。

採取したルーメン液をLPSフリー(原液1)及びLPSフリーでない(原液2)試験管にそれぞれ保存した場合のLPS濃度を比較したところ、有意な差は認められなかった。もともと健康な牛でも、ルーメン液には高濃度のLPS(数百ng/ml)が含まれている[4]。このため、LPSフリーでない容器にルーメン液を保存しても、容器内でのコンタミネーションによる影響が少なかったものと推察された。臨床現場で日常的に牛のルーメン液を採取する場合、使用する胃汁採取器や保存容器をすべてLPSフリーにすることは準備の面で困難を伴う。実際に胃汁採取器については、LPSフリーの操作をしない場合が多い[5-8]。臨床目的であれば、LPS測定用のルーメン液の採取・保存については、厳密な条件を満たさなくとも活用が可能であると考えられた。

ルーメン液のLPS濃度については採食に伴う変化は認められなかった。粗飼料主体の給与を行いルーメン環

境が安定している場合、ルーメン液のLPS濃度は採食に伴い大きく変化しないことが報告 [6] されており、これと一致した。

以上のことから、臨床現場で経口採取したルーメン液をそのまま凍結保存しておけば、後日、必要に応じてLPS濃度の測定に活用できるものと考えられた。

最後に、本試験の分析にご協力いただいた、動物衛生研究所の亀田千江子氏に深謝する。

引用文献

- [1] 横地高志：エンドトキシンの活性，エンドトキシン新しい治療・診断・検査，中野昌康，児玉正智編，45-51，講談社，東京（1995）
- [2] 横地高志：エンドトキシンの活性，エンドトキシン新しい治療・診断・検査，中野昌康，児玉正智編，304-312，講談社，東京（1995）
- [3] Nagaraja TG, Bartley EE, Fina LR, Anthony HD : Relationship of rumen gram-negative bacteria and free endotoxin to lactic acidosis in cattle, *J Anim Sci*, 47, 1329-1337 (1978)
- [4] 元井菫子：ルーメン環境の変化と反芻動物の疾病，新ルーメンの世界，板橋久雄編，562-566，(社)農山漁村文化協会，東京（2004）
- [5] Gozho GN, Plaizier JC, Krause DO, Kennedy AD, Wittenberg KM : Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response, *J Dairy Sci*, 88, 1399-1403 (2005)
- [6] Motoi Y, Oohashi T, Hirose H, Hiramatsu M, Miyazaki S, Nagasawa S, Takahashi J : Turbidimetric-kinetic assay of endotoxin in rumen fluid or serum of cattle fed rations containing various levels of rolled barley, *J Vet Med Sci*, 55, 19-25 (1993)
- [7] Emmanuel DG, Dunn SM, Ametaj BN : Feeding high proportion of barley grain stimulates an inflammatory response in dairy cows, *J Dairy Sci*, 91, 606-614, (2008)
- [8] Khafipour E, Krause DO, Plaizier J : A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation, *J Dairy Sci*, 92, 1060-1070 (2009)
- [9] 柳田友道：物理ストレスに対する反応，微生物科学2. 成長・増殖・増殖阻害，482-487，学会出版センター，東京（1981）
- [10] 檜枝光太郎：凍結・乾燥による微生物の致死および遺伝的变化，微生物の生態8—極限環境の微生物，微生物生態研究会編，50-52，学会出版センター，東京（1980）
- [11] 須藤恒二：ルーメンの検査，牛の臨床検査法，中村良一，米村寿男，須藤恒二編，第6章39-42，(社)農山漁村文化協会，東京（1973）
- [12] 横地高志：細菌学総論，病原微生物学，矢野郁也，内山竹彦，熊沢義雄編，36，東京化学同人，東京（2002）
- [13] 櫻井 純：細菌の増殖，イラストレイテッド微生物学，第1版，33-34，南山堂，東京（1993）
- [14] 佐藤勇治：第1編獣医細菌学総論，新編獣医微生物学，梁川 良，笹原二郎，坂崎利一，波岡茂郎，清水悠紀臣，伊沢久夫，大林正士，長谷川篤彦編，10-11，養賢堂，東京（1989）

Effects of Freeze-Storing of Rumen Fluid and Sterilization Conditions on Lipopolysaccharide Concentrations of Ruminal Fluid

Takuya MATSUMOTO*, Tsutai OOHASHI, Hiroshi SAWADA and Shozo ARAI†

* *Himeji Central Livestock Hygiene Service Center, 2-10-16 Taderahigashi, Himeji, 670-0081, Japan*

SUMMARY

We examined the effects of freeze-storing rumen fluid and of sterilization conditions on ruminal lipopolysaccharide (LPS) concentrations. There was no significant difference in LPS concentrations between the supernatants of freeze-stored and fresh rumen fluid. Moreover, there was no significant difference in LPS concentrations between rumen fluids stored in LPS-free and non-LPS-free containers. The results of the present study indicate that freeze-stored rumen fluid can be used to determine ruminal LPS concentrations.

—Key words : cattle, lipopolysaccharide, rumen fluid.

† *Correspondence to : Shozo ARAI (National Institute of Animal Health)*

3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan

TEL · FAX 029-838-7795 E-mail : sarai@affrc.go.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 65, 278 ~ 280 (2012)