

牛乳房炎起炎性Aspergillus fumigatusの発育に及ぼす細菌の影響

著者	雨宮 淳三, 森 紀子, 岡本 嘉六
雑誌名	鹿児島大学農学部學術報告=Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University
巻	36
ページ	191-195
別言語のタイトル	Participation of Bacteria to the Growth of Aspergillus fumigatus with Reference to the Bovine Fungal Mastitis
URL	http://hdl.handle.net/10232/1750

牛乳房炎起炎性 *Aspergillus fumigatus* の発育に及ぼす細菌の影響

雨宮淳三・森 紀子・岡本嘉六

(獣医公衆衛生学研究室)

昭和60年8月5日 受理

Participation of Bacteria to the Growth of *Aspergillus fumigatus* with Reference to the Bovine Fungal Mastitis

Junzo AMEMIYA, Noriko MORI and Karoku OKAMOTO

(Laboratory of Veterinary Public Health)

緒 言

真菌性乳房炎は *Candida* 属によるものが多いが、*Aspergillus fumigatus* による症例報告が近年目立っている^{1, 4, 5, 6, 10, 11, 13}。真菌性乳房炎は、宿主の免疫能の低下に伴って発症する自発性感染症と考えられており、細菌性乳房炎による局所障害が真菌の定着・増殖を促進し化学療法後の菌交代現象として発症することが多いとされている^{2, 8, 9}。*A. fumigatus* などの糸状菌は増殖様式と菌糸体の伸長の点で細菌や酵母類より乳房内での発育に不利であるとも考えられるが²、その発症機序についての詳細な実験報告はみられない。

他方、正常乳房内といえども無菌状態ではなく、その細菌叢が真菌の発育に関与していることも考えられる。前報³において、*Candida* 属の乳中での発育が細菌によって抑制されること、その細菌には非病原性の乳酸菌も含まれることを明らかにした。

本研究においては、乳房炎の起炎菌の一つである *A. fumigatus* の発育における細菌のかかわりを検討した。

材 料 と 方 法

1. 使用菌株

実験に供した *A. fumigatus* は野外の牛より分離したものである。*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus acidophilus* は前報³と同一株を用いた。使用にあたっては、*A. fumigatus* についてはサブロー寒天培地(栄研)で2日間、各細菌については滅菌牛乳(LL乳)で1日間、それぞれ前培養したものを接種材料とした。

2. 分生子の発育

前培養した *A. fumigatus* に LL 乳を加えて分生子浮遊液をつくった。分生子数、細菌数をそれぞれ

10³/ml とした LL 乳を 37°C の恒温槽で振盪培養し、0, 1, 2, 4 日目に試料を採取した。*A. fumigatus* の数については、サブロー寒天培地に抗生物質(*S. aureus* と *L. acidophilus* に対しては oxytetracycline 2.5 mg 力価、*P. aeruginosa* に対しては gentamicin 5.8 μg 力価)とともに試料 0.1 ml を塗布し、2 日後に生じた集落数とした^{7, 12}。細菌数については前報³に準じた。*S. aureus* との混合培養群については、培養1日目に oxytetracycline (最終濃度 1.5 mg 力価/ml) を添加した場合についても検討した。

3. 菌糸の発育

前培養した細菌液を塗布した標準寒天平板の中央に、約 0.5 mm 平方大の *A. fumigatus* 集落塊を置き 37°C で培養した。また、細菌液を塗布する際に抗生物質を加えた場合についても検討した。培養し、1, 2, 3 日目の *A. fumigatus* 集落の長径を測定した。

結 果

1. 乳中 *A. fumigatus* 分生子に対する細菌の影響

LL 乳に *A. fumigatus* 分生子と細菌を接種した場合のそれぞれの集落形成数を Fig. 1 に図示した。分生子のみを接種した群の *A. fumigatus* 数は、1 日目には接種分生子数よりわずかに多く、2 日目以降は 100 倍以上となった。*P. aeruginosa* と混合培養した群では、*A. fumigatus* 数は減少し接種分生子数より有意に少なくなった。*S. aureus* との混合培養群では、観察期間中 *A. fumigatus* 数は変わらず、1 日目以降対照群より有意に少なかった。*L. acidophilus* との混合培養群では、*A. fumigatus* 数は 2 日目以降対照群より有意に少なかった。

S. aureus との混合培養群に抗生物質を添加した場合の *A. fumigatus* 数は、2 日目には対照群より少ないものの無添加群より多く、4 日目には対照群と有意差

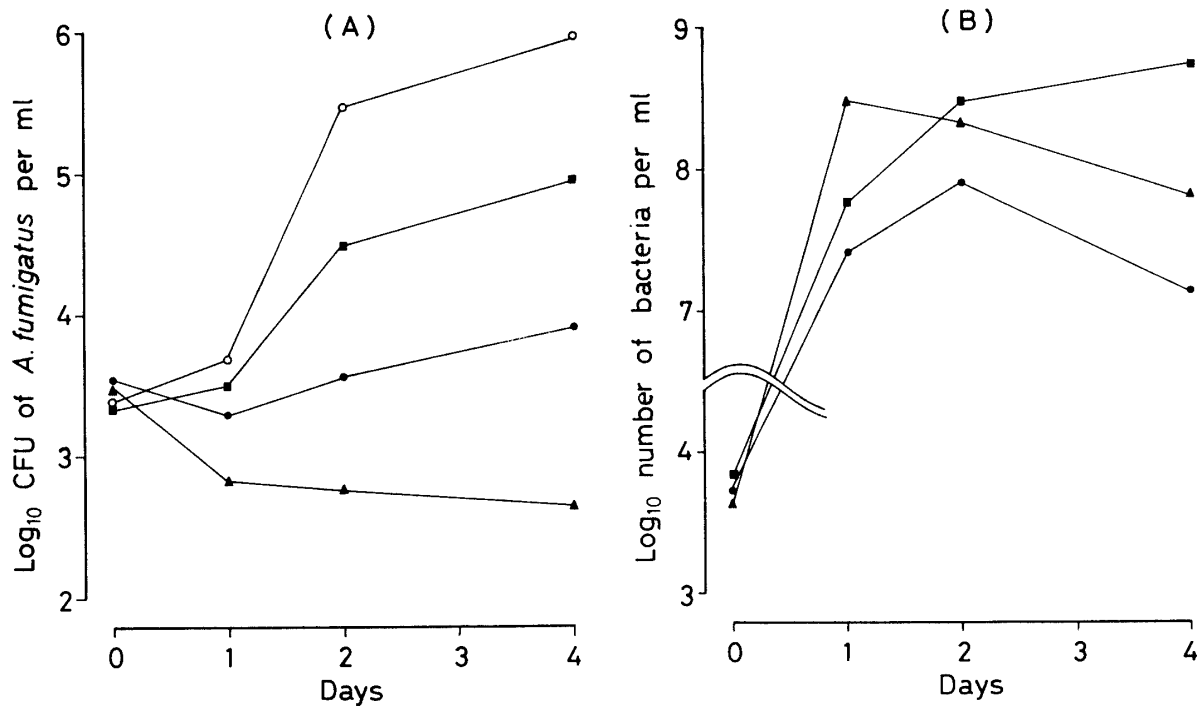


Fig. 1. Growth curves of *A. fumigatus* (A) and bacteria (B) cultured simultaneously. After inoculation of the conidia of the fungi and/or bacteria in the long-life milk, the propagules counts (CFU: colony forming unit) were determined by surface plating on the Sabouraud agar^{7,12}.

○—○: Control without bacteria,
 ●—●: *S. aureus*,
 ■—■: *L. acidophilus*,
 ▲—▲: *P. aeruginosa*.

Table 1. Effects of *S. aureus* on the conidia of *A. fumigatus* in the LL-milk with or without the antibiotic*¹

	day 0	day 1	day 2	day 4
Control	3.39 ± 0.04 (10)* ²	3.69 ± 0.10 (7) (5%)* ³	5.46 ± 0.15 (9) (1%)	5.95 ± 0.29 (8) (1%)
<i>S. aureus</i>	3.55 ± 0.06 (10)	3.30 ± 0.10 (6) (1%)	3.57 ± 0.07 (8) (5%) (1%)	3.91 ± 0.21 (7) (1%)
<i>S. aureus</i> + antibiotic	3.61 ± 0.11 (6)	3.11 ± 0.17 (6)	4.67 ± 0.40 (6)	5.76 ± 0.10 (6)

*¹: Added on day 1 to suppress the bacterial growth.

*²: Log₁₀ CFU of *A. fumigatus* ± standard error (number of samples)

*³: Level of significance between the two cases.

がなくなった (Table 1).

他方、いずれの細菌についても、*A. fumigatus* との混合培養による影響はほとんど認められず、培養 1 日目以降は 10⁷/ml 以上となった。

2. *A. fumigatus* 集落に対する細菌の影響

標準寒天平板の *A. fumigatus* 集落はすみやかに大きくなり、3 日目にはその直径が約 4.5 cm となった (Table 2)。事前に LL 乳を塗布した場合、1 日目に 2.81 ± 0.18 cm と対照群より大きかったものの、2 日目

以降は有意差がなかった。

いずれの細菌を塗布した群についても、*A. fumigatus* 集落は 1 日目以降有意に小さかった。また、塗布する細菌数を 1/10 に減じて各細菌による抑制の程度は変わらなかった。*A. fumigatus* 集落に対する抑制の程度は、*P. aeruginosa*, *L. acidophilus*, *S. aureus* の順に大きかった (Fig. 2)。

細菌を塗布する際に抗生物質を添加すると、*A. fumigatus* 集落の大きさは対照群と同等あるいはそれ

Table 2. Effects of bacteria on the growth of *A. fumigatus* on the plate count agar

Treatment	day 1	day 2	day 3
Control	2.31 ± 0.08 (8)* ¹	3.36 ± 0.31 (6)	4.50 ± 0.36 (6)
+LL-milk	2.81 ± 0.18 (9)* ²	3.81 ± 0.32 (9)	4.46 ± 0.35 (9)
+oxytetracycline	2.14 ± 0.10 (6)	3.90 ± 0.29 (6)	4.68 ± 0.32 (6)
<i>S. aureus</i>	1.58 ± 0.12 (6)* ²	2.23 ± 0.06 (6)* ²	2.70 ± 0.16 (6)* ²
<i>S. aureus</i> (1/10)* ³	1.69 ± 0.07 (6)* ²	2.30 ± 0.18 (6)* ²	2.48 ± 0.19 (6)* ²
<i>S. aureus</i> + antibiotic	2.77 ± 0.45 (6)	3.79 ± 0.33 (6)	5.28 ± 0.30 (6)
<i>P. aeruginosa</i>	1.04 ± 0.10 (6)* ²	1.13 ± 0.07 (6)* ²	1.22 ± 0.06 (6)* ²
<i>P. aeruginosa</i> (1/10)	1.40 ± 0.19 (6)* ²	1.55 ± 0.20 (6)* ²	1.56 ± 0.21 (6)* ²
<i>P. aeruginosa</i> + antibiotic	2.82 ± 0.15 (6)	3.69 ± 0.25 (6)	4.60 ± 0.38 (6)
<i>L. acidophilus</i>	1.23 ± 0.14 (6)* ²	1.62 ± 0.13 (5)* ²	1.75 ± 0.12 (5)* ²
<i>L. acidophilus</i> (1/10)	1.46 ± 0.15 (6)* ²	2.05 ± 0.33 (6)* ²	2.12 ± 0.29 (6)* ²
<i>L. acidophilus</i> + antibiotic	2.88 ± 0.36 (6)	4.26 ± 0.47 (6)	5.03 ± 0.33 (6)

*¹: Major axes (cm) of colonies of *A. fumigatus* ± standard error (number of samples).

*²: Significant difference ($P < 0.05$) between the control and the other.

*³: 0.3ml of 10 fold dilution of precultured bacteria were streaked on the agar before the inoculation of *A. fumigatus*.

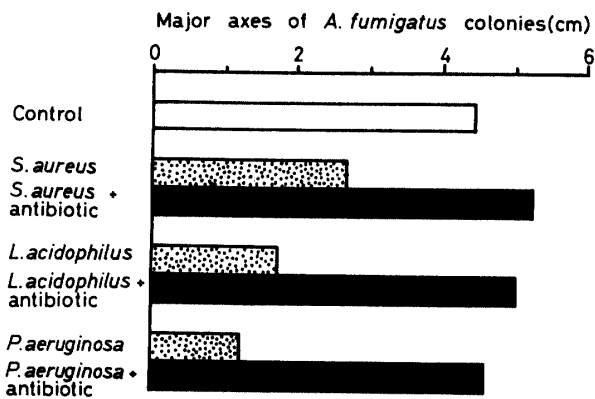


Fig. 2. Effects of bacteria on the growth of *A. fumigatus* on day 3. About five square mm of colonies of the fungi were inoculated on the center of the plate count agar on which the bacteria were previously streaked with or without antibiotics to suppress them. The lengths of major axes of *A. fumigatus* colonies were measured daily.

以上となった。また、抗生物質のみを塗布した群の集落の大きさは、実験期間を通して対照群と等しかった。

考 察

LL 乳に接種した分生子の動向は希釈平板法によったが、糸状菌の定量法には種々の問題点があげられている^{7, 12)}。今回用いた方法では、菌糸体の断片化の程度によって集落数が異なることが考えられるが、集落

数の分散が小さかったことから乳中 *A. fumigatus* の動向は充分反映されていると思われる。

実験に供した *A. fumigatus* は 2 日間の前培養で分生子が得られるなど発育がきわめて速い株である。対照群の集落数が 2 日目以降急激に増加したことは、菌糸体の発育と分生子の形成によるものと思われる。分生子と *P. aeruginosa* あるいは *S. aureus* を混合培養した場合に *A. fumigatus* 集落数は接種数以下となり、*S. aureus* を抗生物質で抑制すると集落数は対照群と同等にまで増加した。このことは、これらの細菌が分生子の発芽を抑制していることを示している。

寒天平板における菌糸体の発育は細菌によって著明に抑制され、また、抗生物質により細菌の増殖を抑制すると集落の大きさは対照群と同等になった。これらの成績は牛乳房内と条件を異にするが、乳房内では菌糸体の発育は不利であるとの見解²⁾もあり、これらの細菌が乳房中でも菌糸体の発育に抑制的であると考えられる。

L. acidophilus は乳房中から高頻度に検出される非病原性の細菌である。この細菌が LL 乳中の分生子あるいは寒天平板上の菌糸体の発育に抑制効果を示したことは、乳房内の各種の非病原性細菌叢が *A. fumigatus* の発育に関与している可能性を示唆する。

他方、細菌の増殖に対して *A. fumigatus* はほとんど影響しなかった。また、*A. fumigatus* に対する抑制の程度は、細菌数と平行せず、むしろ細菌の種類に

よって異なるものと考えられた。菌交代現象の一側面として、抗生物質が真菌の栄養源となって発育を促進するとの主張^{8,9)}もあるが、今回の実験においては抗生物質独自の影響は認められなかった。

本実験における以上の知見は、*A. fumigatus* による乳房炎の発症に乳房内の細菌叢が関与していることを示すものと思われる。

要 約

糸状菌による乳房炎における細菌のかかわりについて実験的検討を加えた。

A. fumigatus 分生子と細菌を LL 乳中で混合培養したところ、*A. fumigatus* の集落形成数は細菌によって抑制され、その程度は *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *L. acidophilus* の順に大きかった。とくに、前 2 者は分生子の発芽を抑制することが示された。

細菌を塗布した寒天平板における *A. fumigatus* 集落の発育は、細菌によって抑制され、その程度は *P. aeruginosa*, *L. acidophilus*, *S. aureus* の順に大きかった。これにより、細菌が *A. fumigatus* の菌糸の伸長を抑制することが示された。

いずれの実験においても、抗生物質の添加により細菌を抑制すると、*A. fumigatus* の発育は対照群と同程度に回復した。他方、*A. fumigatus* は細菌の発育にほとんど影響しないことが示された。

以上の成績により、これらの細菌が *A. fumigatus* の分生子の発芽や菌糸の伸長を抑制することが明らかになった。とくに *L. acidophilus* についての知見は、乳房内に常在する非病原性細菌が *A. fumigatus* による乳房炎の発症に関与している可能性を示している。

謝辞 本実験の一部は森永奉仕会研究奨励金によって行われたものであり、謝意を表します。

文 献

- 1) Ainsworth, G. C. and Austwick, P. K. C.: A survey of animal mycoses in Britain: General aspects. *Vet. Rec.*, **67**, 88-97 (1955)
- 2) Ainsworth, G. C. and Austwick, P. K. C.: Fungal diseases of animals. p. 81-88, Commonwealth Agricultural Bureau, Slough (1973)
- 3) 雨宮淳三・吉見玲子・岡本嘉六: 牛乳房炎起炎性 *Candida* 属の乳中発育に及ぼす細菌の影響. 鹿大農学術報告, **35**, 119-125 (1984)
- 4) Hakogi, E., Yoden, M., Hohrai, E., Watanabe, K. and Tabuchi, K.: Bovine mycotic mastitis: A case caused by *Aspergillus fumigatus*. *Bull. Azabu Univ. Vet. Med.*, **2**, 99-107 (1981)
- 5) 井上 貢・山田 完・金子 晋・小崎哲一・久米常夫: *Aspergillus fumigatus* が分離された牛の乳房炎. 日獣会誌, **32**, 626-630 (1979)
- 6) 岩田一孝・伊藤幸市・長原克己・瀬尾昌克: *Aspergillus fumigatus* による牛乳房炎. 家畜診療, **214**, 26-30 (1981)
- 7) Jarvis, B., Seiler, D. A. L., Ould, A. J. L. and Williams, A. P.: Observations on the enumeration of moulds in food and feedingstuffs. *J. Appl. Bacteriol.*, **55**, 325-336 (1983)
- 8) 久米常夫: 乳房炎の微生物. 飯塚三喜ら共著, 牛の乳房炎, p. 183-187, 日本獣医師会, 東京 (1979)
- 9) 久米常夫: 真菌による牛の乳房炎. 家畜診療, **254**, 3-12 (1984)
- 10) 松岡俊和・金子文男・逸見明臣・浅見 清・小林祐義・井上 勇: *Aspergillus fumigatus* によるカビ性乳房炎の発生例について. 獣医畜産新報, **719**, 337-341 (1981)
- 11) Thompson, K. G., di Mena, M. E., Carter, M. E. and Carman, M. G.: Mycotic mastitis in two cows. *New Zealand Vet. J.*, **26**, 176-177, (1978)
- 12) 宇田川俊一・松田良夫: 食品菌類ハンドブック. p. 215-222, 医歯薬出版, 東京 (1984)
- 13) 吉沢 弘: *Aspergillus fumigatus* による乳房炎の治療例について. 家畜診療, **205**, 45-49 (1980)

Summary

Experimental studies were carried out to examine the participation of bacteria in the bovine fungal mastitis.

The conidia of *A. fumigatus* were inoculated into the LL milk with or without bacteria, and thereafter daily determinations were made concerning the Colony forming unit (CFU) of the fungi on the Sabouraud's agar. In case of *P. aeruginosa*, the number of CFU turned out to be less than that of the conidia initially inoculated, in *S. aureus* the CFU remained the same throughout the experimental period, and in *L. acidophilus* the CFU was noted to be significantly less than in the control.

On the plate count agar previously streaked with bacteria were inoculated the small fragment of the colony of *A. fumigatus*, the sizes of which were measured daily. In the cases of *P. aeruginosa*,

L. acidophilus and *S. aureus* the sizes were larger in the increasing order, but each of them was significantly smaller than the control.

In either case, the addition of antibacterial agents into the media was followed by the disappearance of the suppressive effects of bacteria. On the contrary, growth of any bacteria was little affected by *A. fumigatus*.

These results indicate that the budding of conidia or the growth of hiphae might be inhibited by the bacteria coexisting with the fungi. Moreover, it was suggested by the ascertained results in the case of *L. acidophilus* that the normal flora in the udder might be suppressive to the fungi.