

鹿児島における乳及び乳房炎乳よりの糸状菌の分離について

雨宮淳三・田代哲之*

(家畜微生物学研究室・*家畜外科学研究室)

昭和53年8月31日 受理

Isolation of Fungi from Milk and Mastitis Milk in Kagoshima

Junzo AMEMIYA and Tetsuyuki TASHIRO

(Laboratory of Veterinary Public Health, *Laboratory of Veterinary Surgery)

緒 言

糸状菌に起因する乳房炎¹⁾は、菌交代症としても興味をもたれている。

又生乳中に糸状菌が存在しそれが乳質に影響を及ぼすとみられる。近年又食品中の糸状菌はマイコトキシンに関連し注目されている。最近では中江ら²⁾の搾乳環境の糸状菌に関する報告があるが、著者らは南九州地方で健康乳牛、乳房炎罹患乳牛の乳等どの様に糸状菌が存在するか調査を行ったので報告する。

前報³⁾の乳中の酵母についての報告に関連する調査でもある。

材料および方法

乳の検体はミルクプラントでの受入れ生乳及び畜舎で直接搾乳した分房乳である。前者はプラントに搬入される集乳かんより採取したもので、鹿児島市所在のプラントと、比較のため福岡県所在のプラントで行い、3月と6、7月に行った(昭和49年～50年)。

分房乳の検体は鹿児島県下、飼養条件の異なる処(購入飼料依存都市近郊型(鹿児島市、伊集院、日吉、市来)草依存山間型(栗野、霧島))と地域を離して種子島(草依存型)等で、夫々健康乳牛、乳房炎罹患乳牛(临床上慢性乳房炎と診断されるもの)より検体を採取した。

Table 2 と Table 3-A の検体は比較のため乳房炎罹患牛と同一畜舎内及び近接地所在の健康乳牛より行い、主に一頭一分房乳を検体にした(検体採取 昭和46年～昭和49年)。

Table 3-B の検体は、临床上慢性乳房炎とみられるものの中 1ml 細胞数50万以上のもので閉乳直前の検体である。同一個体の各分房を夫々検体とし、同一分

房乳について二回目に行ったものは、1週間間隔をおいた検体である。なお乳房炎罹患乳牛は過去に於て抗生物質で治療が行われた牛である(検体採取昭和50年)。分離培養については、使用培地はペニシリンストレプトマイシン添加サブロー寒天培地を使用し、乳は、そのまま又は10倍希釈し、それらの一定量を平板培地全面に塗布し培養する方法を用い、室温と37°Cで培養した。参考にした細菌数は Breed 法、培養法によった。糸状菌については Gilman⁴⁾ Barron⁵⁾の著書を参考にした。

成績および考察

1. ミルクプラント受入れ生乳について ミルクプラントでの生乳(混合乳)よりの糸状菌検出率は Table 1 の如くで検体数の約半数から糸状菌が検出された。3月と夏期のデータで福岡、鹿児島とも夏期が3月に比べ検出率が低かった。

なお Breed 法で菌糸の認められたのは福岡3月の検体45検体中の4検体でそれ以外は認められなかった。培養により主に検出された菌の種類とその出現度(検体に対する比)(Table 4)は、*Phycomycetes* 9.2%(その中の大半が *Mucor* spp.) *Aspergillus* spp. 4.2%, *Penicillium* spp. 4.9%, *Cladosporium* spp. 12% *Fusarium* spp. 11.3%, *Geotrichum* spp. 15.5% であり、中江ら²⁾の工場受入れ生乳よりの検出菌種の *Geotrichum* spp. 34.1%, *Aspergillus* spp. 12.2%, *Fusarium* spp. 12.2%, *Penicillium* spp. 7.3%, *Phoma* spp. 4.9% *Cladosporium* spp. 2.4%, と比較して菌種では大体同様な傾向にあった。しかし *Phoma* spp. は検出されず。 *Mucor* spp. は検出された。又 *Cladosporium* spp. の出現度は高かった。

2. 分房乳について Table 2 と Table 3-A が示す

Table 1. Isolation of fungi from dairy plant raw milk

Sampling place	Fukuoka		Kagoshima		Total
	March	June	March	July	
No. of samples	45	54	22	21	142
No. of positive samples	25	22	12	12	71 50%
No. of dominant strains isolated	26	25	15	15	81
Species of dominant strains isolated					
<i>Phycomycetes</i>	9	3	1		13
(<i>Mucor</i> spp.)	(8)	(3)	(1)		(12)
<i>Aspergillus</i> spp.	2	4			6
<i>Penicillium</i> spp.	3	3	1		7
<i>Cladosporium</i> spp.			5	12	17
<i>Fusarium</i> spp.	9		7		16
<i>Geotrichum</i> spp.	3	15	1	3	22

Table 2. Isolation of fungi from mammary quarters milk of the normal cows

Sampling place	Tanegashima	Kurino	Ijuin	Kagoshima city	Total
No. of samples	40	30	36	39	145
No. of positive samples	1	6	6	10	23 15.9%
No. of dominant strains isolated	1	7	6	13	27
Species of dominant strains isolated					
<i>Phycomycetes</i>	1			2	3
(<i>Mucor</i> spp.)	(1)			(2)	(3)
<i>Aspergillus</i> spp.		2		3	5
<i>Penicillium</i> spp.		7	2	5	14
<i>Cladosporium</i> spp.			1		1
<i>Fusarium</i> spp.			2		2
<i>Geotrichum</i> spp.			1	3	4

様に夫々同一時点で採取した検体よりのデータを比較して種子島、栗野、伊集院、鹿児島市夫々の地区での慢性乳房炎罹患乳牛よりの検出率は夫々の地区の健康乳牛よりの検出率より高かった。

健康乳牛の分房乳よりの検出率は145検体中23検体で15.9%であるのに乳房炎罹患乳牛のそれよりは82検体中40検体48.8%と高いデータであった。

Table 3-B も慢性乳房炎罹患乳牛の分房乳についてのデータであるが、一頭の牛の各分房より検体を採取した。糸状菌の検出率は44.7%で Table 3-A の検出率に近い。両方を合せ慢性乳房炎罹患乳牛と臨床的に診断された牛の分房乳185検体中86検体(46.4%)より糸状菌が分離された。主に検出された菌種とその出現度は (Table 4) 健康乳牛分房乳で *Mucor* spp. 2%, *Aspergillus* spp. 3.4%, *Penicillium* spp. 9.7%, *Cladosporium* spp. 0.7%, *Fusarium* spp. 1.4%, *Geotrichum* spp. 2.8% で乳房炎罹患乳牛で *Mucor* spp. 1.6%, *Aspergillus* spp. 14.1%, *Penicillium* spp. 21.6%

%, *Cladosporium* spp. 0.5%, *Fusarium* spp. 1.6%, *Geotrichum* spp. 8.6% であり、菌種とそれらの検出総数に占める夫々の割合は同様な傾向にあり夫々の中で検出頻度の高い菌種はどちらも *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Geotrichum* spp. で、*Fusarium* spp. *Cladosporium* spp. は少なかった。健康乳牛の分房乳とプラント受入れ生乳とについて、夫々の検出菌種の検出総数に占める割合をみるに、健康乳牛では *Penicillium* spp. が半数を占め次に *Aspergillus* spp. *Geotrichum* spp. と高く、*Cladosporium* spp., *Fusarium* spp. が低い受入れ乳では *Geotrichum* spp. *Cladosporium* spp. *Fusarium* spp. と高い順である。*Cladosporium* spp., *Fusarium* spp. は搾乳後汚染する機会の多い菌種とみられる。

Table 5 は Table 3-B の検体で酵母検出状況と細菌数 (Breed 法による) との関係をも示したもので又それらの検体の中35検体については1週間間隔をおいて検体を採取したデータである。なおその間抗生物質

Table 3. Isolation of fungi from mammary quarters milk of the cows with mastitis

(A)

Sampling place	Tanegashima		Kurino	Ijuin	Kagoshima city	Total
	I	II				
No. of samples	20	24	5	24	9	82
No. of positive samples	6	3	4	23	4	40 48.8%
No. of dominant strains isolated	7	4	4	24	4	43
Species of dominant strains isolated						
<i>Phycomyces</i>	2					2
(<i>Mucor</i> spp.)	(2)					(2)
<i>Aspergillus</i> spp.	2			2		4
<i>Penicillium</i> spp.	5	1	4	22	1	33
<i>Cladosporium</i> spp.						
<i>Fusarium</i> spp.					2	2
<i>Geotrichum</i> spp.	1				1	2

(B)

Sampling place	Hiyoshi	Ichiki	Kirishima	Total
No. of Samples	53	33	17	103
No. of positive samples	32	7	7	46 44.7%
No. of dominant strains isolated	32	7	7	46
Species of dominant strains isolated				
<i>Phycomyces</i>	1			1
(<i>Mucor</i> spp.)	(1)			(1)
<i>Aspergillus</i> spp.	20		2	22
<i>Penicillium</i> spp.	1	4	2	7
<i>Cladosporium</i> spp.	1			1
<i>Fusarium</i> spp.		1		1
<i>Geotrichum</i> spp.	9	2	3	14

の使用はされなかった。細菌の段階は Breed 法（個体）で400万以下を十400万～800万を卅800万以上を卅とし、酵母は、菌数 1ml 中 10^3 台以上を卅、それ以下を十とし、糸状菌は10倍希釈 0.1ml で平板全面に著明に発育したもの以上を卅とした（室温7日）。

グループ名 A,B,C は Table 3-B の夫々、日吉、市来、霧島の採取地別のものでDは Table 3-A の種子島 (I) の検体である。最後番号の 1, 2, 3, 4 は同一個体の分房番号である。A, B, C, D 夫々のケースで糸状菌、酵母が分離され、糸状菌の分離された検体は Table 3-B の 103 検体中 46、3-A の種子島20検体中 6 合せて123検体中52検体であるが、糸状菌のみの検出された検体は38検体で、酵母の検出されたものは123検体中36検体であり、酵母のみ検出された検体は22検体であって、糸状菌と酵母両方検出された検体は14検体と、糸状菌酵母いずれかが検出された60検体に比べかなり少ない。

2回サンプリングした35例中、糸状菌の出現を見るに、一回目に検出されなかった例は35例中23例である

が、そのうち6例は二回目に検出された。一回目に検出された例は12例であるが内9例は、二回目には検出されなかった。二回目にも又検出された例は3例であるが、内2例は一回目と菌種が異なったものであった。一・二回とも糸状菌が検出された例でも2回とも同じ菌種が検出された検体は1例と少い (Breed 法でも菌糸が認められたものである)。その例を継続して乳槽内に同一糸状菌が存在したものと推定しても糸状菌が乳槽内に定着する例はきわめて少いものとみなされる。

一頭の乳牛の各分房からともに検出される菌種は、*Aspergillus* spp. *Geotrichum* spp. であり、又検出された糸状菌の菌数が多い例は糸状菌の検出された36検体中の10検体であり *Aspergillus* spp. *Penicillium* spp. に限られていた。外界より汚染される機会の多い菌種かどうかとも問題であるが糸状菌の種類により乳槽内に侵入し乳槽内に存在し易い菌種としづらい菌種があるとするれば、*Geotrichum* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. は前者であろう。

一般に乳房が接触する土壌、糞には糸状菌が多く存

Table 4. Frequency of occurrence of fungi isolated from milk

Fungi	No. of samples	Percentage of occurrence per samples			Total
		Plant raw milk	Mammary quarters milk		
			Normal	Mastitis	
	142		145	185	472
	8.5%		2%	1.6%	4%
<i>Mucor</i> spp.	4.2		3.4	14.1	7.8
<i>Aspergillus</i> spp.	4.9		9.7	21.6	12.9
<i>Penicillium</i> spp.	12		0.7	0.5	4
<i>Cladosporium</i> spp.	11.3		1.4	1.6	4.4
<i>Fusarium</i> spp.	15.5		2.8	8.6	8.9
<i>Geotrichum</i> spp.					

在するので乳槽も又糸状菌に汚染される機会が多い。今回分房乳より検出された糸状菌は乳槽内に存在していたものとみられ、それらは Ainsworthら¹⁾の指摘する様に外界から汚染したものと考えられるが、一旦乳槽内に入った糸状菌は当然生乳に移行するものとみられる。

そのことは、分乳房より分離された糸状菌の菌種がプラント受入れ生乳に見いだされることからもうかがえる。

一方搾乳時又は搾乳後、混入異物、用具等にて外界より糸状菌が直接、生乳に入ることも当然考えられるのでプラント受入れ生乳から検出される糸状菌には乳槽由来と外界由来のものが含まれているものとみられる。

又これらのデータより、糸状菌は健康乳牛の乳槽内よりもはるかに高い比率で、慢性乳房炎罹患乳牛の乳槽内に存在する傾向がみられたが、乳槽内に定着する例は多くないとみられた。分房乳中に糸状菌が検出されたとしてもそれを直ちに乳房炎と関連させてみることは一考を要することをデータは示している。

Table 5. Occurrence of fungi, yeasts, and bacteria from mammary quarters milk of the cows with mastitis. Refer to table 3 (A...Hiyoshi, B...Ichiki, C...Kirishima, D...Tanegashima I)

	Fungi	Yeasts	Bacteria	F	Y	B *
1) A-1-1	++ <i>Asp.</i>	—	+	—	+	+
A-1-2	—	—	+			
A-2-1	+ <i>Asp.</i>	—	+	—	++	+
A-2-2	+ <i>Asp.</i>	—	+			
A-2-3	+ <i>Geo.</i>	—	+++			
A-2-4	+ <i>Asp.</i>	—	+	—	+	+
A-3-1	+ <i>Geo.</i>	—	+			
A-3-2	+ <i>Geo.</i>	—	+			
A-3-3	+ <i>Geo.</i>	—	++			
A-3-4	+ <i>Geo.</i>	—	+			
A-4-1	—	+	+	+ <i>Geo.</i>	—	+++

	F	Y	B	F	Y	B *
A-5-1	+ <i>Asp.</i>	—	+			
A-5-2	+ <i>Asp.</i>	—	++			
A-5-3	+ <i>Geo.</i>	—	+			
A-5-4	+ <i>Asp.</i>	—	+			
A-6-1	+ <i>Asp.</i>	+	+	+ <i>Pen.</i>	—	+
A-6-2	+ <i>Geo.</i>	—	++			
A-6-4	+ <i>Asp.</i>	+	+	+ <i>Pen.</i>	—	+
A-7-1	++ <i>Asp.</i>	—	+	—	—	+
A-7-2	—	—	+			
A-7-4	++ <i>Asp.</i>	—	+	—	—	+
A-8-3	—	—	+	—	—	+++
A-8-4	—	—	+	—	—	+
A-9-1	—	++	+			
A-9-2	+ <i>Asp.</i>	—	+			
A-9-3	++ <i>Asp.</i>	+	+			
A-9-4	+ <i>Asp.</i>	++	+			
A-10-3	++ <i>Asp.</i>	—	+++			
A-10-4	+ <i>Asp.</i>	—	+			
A-11-1	+ <i>Asp.</i>	—	+			
A-11-2	+ <i>Asp.</i>	—	+			
A-11-3	+ <i>Asp.</i>	—	+			
A-11-4	+ <i>Asp.</i>	—	+			
A-12-1	—	—	+			
A-12-2	—	—	+			
A-12-3	—	—	++			
A-12-4	—	—	+			
A-12-5	—	—	+++			
A-12-6	—	—	+++			
A-12-7	++ <i>Pen.</i>	+	++			
A-13-2	—	—	++			
A-13-3	+ <i>Geo.</i>	—	+			
A-13-4	+ <i>Geo.</i>	—	+			
A-14-1	+ <i>Muc.</i>	++	+	—	—	+
A-14-2	—	—	++	—	—	+
A-14-3	—	—	+	—	—	++
A-14-4	—	—	++	—	—	+
A-15-1	—	—	+			
A-15-2	—	—	++			
A-15-3	+ <i>Clado.</i>	—	++			
A-16-2	—	+	+			
A-17-3	—	++	+			
A-17-4	—	+	++			
2) B-1-1	++ <i>Pen.</i>	++	+	—	—	+
B-1-2	—	—	+	—	++	+
B-1-4	—	—	+	—	—	+
B-2-1	++ <i>Pen.</i>	++	+++	—	—	+

	F	Y	B	F	Y	B*
B-2-2	—	—	++	—	—	+
B-2-3	—	—	++	—	—	+
B-2-4	—	—	++	—	—	+
B-3-1	+Geo.	+	+	—	—	—
B-3-3	+Fusa.	—	++	—	—	—
B-4-1	—	++	##	—	—	++
B-4-2	—	++	##	+Pen.	—	++
B-4-3	—	+	##	+Pen.	+	##
B-4-4	—	—	##	—	—	+
B-5-1	—	—	##	—	—	##
B-5-2	—	+	##	—	—	##
B-5-3	—	+	##	—	—	##
B-5-4	—	—	##	—	—	##
B-6-3	—	—	+	—	—	—
B-6-4	—	—	+	—	—	—
B-7-1	—	—	++	—	—	—
B-7-2	—	—	+	—	—	—
B-7-3	+Pen.	—	++	—	—	—
B-7-4	+Pen.	—	+	—	—	—
B-8-2	—	—	+	+Geo.	—	+
B-8-3	++Geo.	—	++	—	—	—
B-8-4	—	—	+	—	—	—
B-9-1	—	—	++	+Pen.	—	+
B-9-2	—	—	##	—	—	+
B-9-3	—	+	++	+Pen.	—	+
B-10-1	—	—	+	—	—	—
B-10-2	—	—	++	—	—	—
B-10-3	—	—	++	—	—	—
B-10-4	—	+	##	—	—	—
3) C-1	+Geo.	+	##	—	—	—
C-2	+Asp.	+	##	—	—	—
C-3	+Geo.	+	##	—	—	++
C-4	++Asp.	+	##	+Asp.	+	++
C-5	—	+	##	—	—	—
C-6	—	+	##	—	—	—
C-7	+Geo.	—	##	—	—	—
C-8	+Pen.	+	##	—	—	—
C-9	—	+	##	—	—	—
C-10	—	+	+	—	—	—
C-11	—	+	+	—	—	—
C-12	—	+	##	—	—	—
C-13	—	—	++	—	—	—
C-14	—	—	+	—	—	—
C-15	—	—	++	—	—	—
C-16	—	++	++	—	—	—
C-17	+Pen.	—	##	—	—	—
4) D-1	+Pen.	—	++	—	—	—
D-2	—	—	++	—	—	—
D-3	++Pen.	—	++	—	—	—
D-4	—	—	+	—	—	—
D-5	—	—	+	—	—	—
D-6	+Asp.	—	+	—	—	—
D-7	—	—	+	—	—	—
D-8	+Pen. Asp.	—	—	—	—	—
D-9	—	—	+	—	—	—
D-10	—	—	+	—	—	—
D-11	—	—	+	—	—	—
D-12	—	—	+	—	—	—
D-13	+Pen.	—	+	—	—	—
D-14	—	+	+	—	—	—

	F	Y	B	F	Y	B*
D-15	—	+	+	—	—	—
D-16	—	—	++	—	—	—
D-17	—	—	++	—	—	—
D-18	—	++	+	—	—	—
D-19	—	—	++	—	—	—
D-20	+Pen.	—	++	—	—	—

Fungi. —: no growth +: growth ++: good growth
 Yeasts. —: no growth +: growth ++: good growth
 Bacteria. ...Breed method (I.M.C.) +: 4×10^6, ++: <math>4 \times 10^6 > 8×10^6, +++: > 8×10^6
 *Sampling interval is 1 week

要 約

鹿児島地方で健康乳牛、乳房炎罹患乳牛の分房乳、およびミルクプラント受入れ生乳について糸状菌の検索を行い次のデータを得た。

1. ミルクプラントでの集乳かん別の受入れ混合生乳の供試検体142検体の50%から糸状菌が検出され、主に検出された糸状菌の種類とその出現度は *Mucor* spp. (8.5%), *Aspergillus* spp. (4.2%) *Penicillium* spp. (4.9%), *Cladosporium* spp. (12%), *Fusarium* spp. (11.3%), 及び *Geotrichum* spp. (15.5%) であった。
2. 健康乳牛の分房乳145検体の15.9%から糸状菌が検出され主に検出された糸状菌の種類とその出現度は、*Mucor* spp. (2%), *Aspergillus* spp. (3.4%), *Penicillium* spp. (9.7%), *Cladosporium* spp. (0.7%) *Fusarium* spp. (1.4%) 及び *Geotrichum* spp. (2.8%) であった。
3. 慢性乳房炎罹患乳牛の分房乳185検体の46.7%より糸状菌が検出され、主に検出された糸状菌の種類とその出現度は、*Mucor* spp. (1.6%), *Aspergillus* spp. (14.1%), *Penicillium* spp. (21.6%), *Cladosporium* spp. (0.5%), *Fusarium* spp. (1.6%), 及び *Geotrichum* spp. (8.6%) で健康乳牛の分房乳と比較し糸状菌の検出率が高かった。

文 献

- 1) Ainsworth, G.C. and Austwick, P.K.C.: *Fungal Diseases of Animals*. p.81-88, Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough, England, (1973)
- 2) 中江利孝・片岡啓・米屋武文: 牛乳および搾乳環境における糸状菌分布. 日畜会報, 47(7), 402-410 (1976)
- 3) 雨宮淳三・田代哲之: 鹿児島における乳牛の乳並びに糞よりの酵母の分離について, 鹿大農学術報告, 28, 113-117 (1978)
- 4) Gilman, J.C.: *A Manual of Soil Fungi*. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa (1966)
- 5) Barron, G.L.: *The Genera of Hyphomycetes from Soil*. Williams & Wilkins Co., Baltimore (1968)

Summary

From the veterinary point of view, investigations of filamentous fungi in raw milk are desirable not only for the obtaining of information on the mycotic mastitis, but also for getting the basic knowledge necessary for the ascertainment of a role of fungi on the quality of milk.

The isolation of filamentous fungi from dairy plant raw milk and mammary quarters milk of cows including cows with chronic mastitis was carried out, and the results obtained are summarized as follows,

1. 50% of 142 dairy plant raw milk samples were positive mycologically. Common species of isolates are *Mucor* spp. (Percentage of occurrence per samples 8.5%), *Aspergillus* spp. (4.2%), *Penicillium* spp. (4.9%), *Cladosporium* spp. (12%), *Fusarium* spp. (11.3%), and *Geotrichum* spp. (15.5%).

2. 15.9% of 145 mammary quarters milk samples of the healthy cows were positive mycologically. Common species of isolates are *Mucor* spp. (2%), *Aspergillus* spp. (3.4%), *Penicillium* spp. (9.7%), *Cladosporium* spp. (0.7%), *Fusarium* spp. (1.4%), and *Geotrichum* spp. (2.8%).

3. 46.7% of 185 mammary quarters milk samples of the cows with chronic mastitis were positive mycologically. Common species of isolates are *Mucor* spp. (1.6%), *Aspergillus* spp. (14.1%), *Penicillium* spp. (21.6%), *Cladosporium* spp. (0.5%), *Fusarium* spp. (1.6%), and *Geotrichum* spp. (8.6%).