

搾乳環境における緑膿菌の生態に関する研究

雨宮 淳三・高瀬 公三・佐藤 平二

(昭和 52 年 8 月 31 日 受理)

Ecological Studies on *Pseudomonas aeruginosa* in Milking Environments

Junzo AMEMIYA, Kozo TAKASE and Heiji SATO

(Laboratory of Veterinary Public Health)

緒 言

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) はヒトおよび動物の腸管内、下水、土壌、植物など広く自然界に存在しているが、先に著者らは前報²⁾にて Schalm^{33,34)}、井上¹⁵⁾ の報告の如く生乳より高率に緑膿菌が分離されることを報告した。このような乳汁汚染は搾乳環境から乳房内への汚染によるものと考えられるが搾乳環境の緑膿菌の分布状況についての報告はみあたらない。そこで今回著者らは Lanyi¹⁸⁾ の標準型別血清による分類を用いて搾乳環境における緑膿菌の生態と乳汁汚染の関係を明らかにしようとした。

家畜の緑膿菌感染症に関しては種々の総説^{17,20,36,37)}があり本菌による乳房炎についても Schalm³⁴⁾、清水³⁸⁾、吉田⁴⁵⁾ らが詳述しておりその発生は増加の傾向があり、本菌による乳房炎は難治性乳房炎とみられ、本菌が伝達性薬剤耐性因子をもつことも関連し緑膿菌の搾乳環境における生態を知ることは極めて重要であり、加えて本菌の乳質におよぼす影響は少ないのでこれらの点からも緑膿菌の汚染状況についてしらべた。

材料および方法

A 被検又は検査材料および採取方法

材料採取は 1975 年 9 月 25 日から 1976 年 7 月 5 日のあいだに行ない、対象地区を鹿児島市近郊にし、ミルクプラントに集る集乳罐 (酪農家 20 戸) より緑膿菌が多数分離された酪農家の中から選んだ (5 戸)。種子島 (8 戸) は参考程度とした。調査対象とした各酪農家の飼育頭数は 12~16 頭が 3 戸、28 頭が 1 戸、52 頭が 1 戸であった。

1) 新鮮分房乳はあらかじめ牛の乳頭を温湯で清拭したのち、手搾りで最初の 2~3 搾りは捨て、4 分房合わせて 1 検体とし約 20 ml を滅菌大型試験管に採

取、延べ 148 頭、592 分房について行なった。臨床上の乳房炎を呈していたのは種子島の 1 頭だけであった。

2) 体表材料はき甲部約 50 cm² をあらかじめ生理食塩液に浸した滅菌脱脂綿で拭き取り、そのまま増菌培地に移した。体表材料はできるかぎり新鮮分房乳採取牛より採取し、延べ 97 頭について行なった。

3) 畜舎の床材料は各畜舎あたり 3~7 カ所より糞便、おがくずなどの混合物約 2 g を滅菌シャーレに採取、そのうち 1 g を増菌培地に移した。

4) 土壌材料は各畜舎の周囲 2~6 カ所で表面より 1~3 cm 下の土壌約 2 g を滅菌シャーレに採取、そのうち 1 g を増菌培地に移した。

5) 空中落下菌は 2 戸の酪農家において実施した。大型シャーレ (直径 14.3 cm) に市販の NAC 寒天培地 (栄研) 30~40 ml を流し込んで作成した平板を畜舎の中央、高さ約 2 m の場所で 1 時間開放し、37°C で 48 時間培養した。

6) 集乳罐乳は、鹿児島市内のミルクプラントに午前中に搬入された畜舎別集乳罐より 10 ml ずつ滅菌大型試験管に採取し、集乳罐 78 本 (酪農家 20 戸) について実施した。

B 菌の分離と同定

増菌培地はブイヨン培地にクリスタルバイオレットを 1 ppm の割で加えたものを、また選択分離培地には市販の NAC 寒天培地 (栄研) を使用した。採取した新鮮分房乳と集乳罐乳の材料はそのまま 37°C で 24 時間増菌培養した。その他の材料は前述の増菌培地に移したのち 37°C で 24 時間増菌培養した。増菌後 NAC 寒天培地に一白金耳塗抹、37°C で 48 時間培養し、形成された色素産生集落を普通寒天培地平板に再度分離培養後、釣菌保存した。1 シャーレ内に形状の異った集落がある場合は全て釣菌した。空中落下菌用平板からは形成された全ての集落を釣菌した。分離

した菌株のうち、以下の生化学的性状を満たすものを緑膿菌と同定した。すなわち、グラム染色陰性桿菌、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性、O-F 試験酸化、クエン酸塩利用、グルコン酸々化反応陽性および 42°C 発育陽性の性状をもつ菌である。試験方法は常法によったが、特に O-F 試験にはヒュー・レイフソン培地(栄研)と藪内ら⁴⁴⁾ の PYP 培地を、クエン酸塩利用試験にはシモンズのクエン酸塩培地を用い、グルコン酸々化反応試験は新井³⁾ らの方法で行なった。42°C 発育試験は 5 ml のブイオン培地に 37°C で一夜ブイオン培養した菌を一白金耳接種後、42°C の温湯中で 24 時間培養し、明らかな混濁を認めたものを陽性とした。

C. 血清型別について

緑膿菌と同定された菌株を Lanyi¹⁸⁾ の 24 型 13 群の型別血清を使用し、Sato³²⁾ らの Concavity Slide Agglutination Technique によって型別した。すなわち、分離菌株を普通寒天培地に 24 時間培養後白金耳で菌体をかき取り、3 ml の生理的食塩液に浮遊させ濃厚菌液とした。この濃厚菌液を沸湯水中で 2 時間加熱し、加熱菌体抗原液を作成した。この加熱菌体抗原液と 24 型の標準型別血清を毛細ピペットで一滴ずつ、マイクロタイター・ディスコ・トレイ(富永製作所)で混合し、振盪機(Rotator: サクラ精機)で 30 分ゆっくり振盪したのち一晚静置し凝集の有無を肉眼で判定した。全ての型別血清と凝集しなかったもの、あるいは群以上の型別血清と凝集したものは未分類株(Unclassified-Group)とし、それぞれ U-、U+ とした。

D 分離菌株の性状

1) 低温での発育試験

搾乳環境由来株および当研究室保存の豚肉由来株あわせて 167 株について低温での発育能を調べた。あらかじめ 37°C で 24 時間ブイオン培養した菌を一白金耳取り、5 ml のハートインフュージョンブイヨン(栄研)に接種後、7、10、および 15°C のそれぞれの温度で培養した。7 および 10°C では 14 日間、15°C では 5 日間発育を観察し、その発育状態を 4 段階に分けた。すなわち、全く発育しない株を-、わずかに発育する株を+、中等度に発育する株を++、十分に発育する株を+++とした。

2) カゼイナーゼ活性

新鮮分房乳由来株と搾乳環境由来株とのカゼイナーゼ活性を比較するために、新鮮分房乳、体表、畜舎の床、土壌からの各由来株の中からアトランダムに 2 株

ずつ取り供試した。ただし、新鮮分房乳由来株のうち 1 株は潜在性慢性感染と思われた分房より分離されたものであり、他の 1 株は一過性に乳房に感染したと思われた 7°C 発育可能な株である。これらの供試した株とその由来は以下の通りである。OM 11, PM 472 (新鮮分房乳由来), OF 4, SF 81 (床由来), QB 51, PB 472 (体表由来), SS 92, RS 82 (土壌由来)。カゼイナーゼ活性の測定は坂崎³⁰⁾ の方法を参考にした。すなわち、寒天濃度を 1.6% に調整した酵母エキス寒天培地を 50°C に保ち、これに同温度に保った 10% の脱脂粉乳を 1/10 量加え、均等に混合したのちシャーレに厚さ 2 mm の平板を作る。この平板に一夜ブイオン培養した菌を穿刺し、25°C で 5 日間培養した。24 時間毎に接種菌によって作られる透明環の巾を測定しカゼイナーゼ活性の比較を行なった。

成 績

1. NAC 寒天培地の選択性について

本実験に選択分離用培地として用いた NAC 寒天培地の緑膿菌選択性を、O および P 畜舎の 4 回にわたり採取された材料について一応検討を試みた成績が Table 1. である。NAC 寒天培地上で発育し、緑、黄緑の色素を産生した 342 株のうち、緑膿菌と同定されたのは 155 株で選択分離率は 46.1% であった。材料別によって差が大きく、新鮮分房乳が最も高く 66.2%、続いてミルクプラント生乳が 63.2%、土壌が 60.4%、畜舎の床材料が 52.2%、一方空中落下菌が 22.6%、体表材料が 18.3% であった。

2. 緑膿菌の検出状況

乳および搾乳環境材料からの緑膿菌の検出状況を各畜舎別にまとめて Table 2. に示した。総検体数 346 例のうち 103 例 (29.8%) が緑膿菌陽性であった。材料別にみると新鮮分房乳 20.9%、体表 14.4%、畜舎の床材料 40.7% および土壌 81.0% であった。畜舎別にみると、O 畜舎で飼育されていた搾乳牛は 4 頭だけであったが、毎回全頭の新鮮分房乳より緑膿菌が検出された。ただし、3 回目の材料採取は 1 頭が乾乳期であったため 3 頭より行なった。P、Q および R 畜舎の新鮮分房乳からは分離される時期と分離されない時期があった。すなわち、P 畜舎においては 9 月に 25 頭のうち 7 頭より、Q 畜舎においては 6 月に 10 頭のうち 2 頭より、R 畜舎においては 6 月に 12 頭のうち 4 頭よりそれぞれ分離されたが、その他の時期には分離されなかった。また S 畜舎の新鮮分房乳からは毎回分離されなかった。種子島の 8 戸の酪農家より得た新鮮

Table 1. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* on NAC agar medium from milk and milking environments

Materials	Mammary quarter raw milk	Plant raw milk	Body surface (Withers)	Barn floor	Barnyard soil	Barn air	Total
No. of strains grown on NAC agar medium	65	38	93	67	48	31	342
No. of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains	43	24	17	35	29	7	155
Isolation rate of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66.2 (%)	63.2	18.3	52.2	60.4	22.6	46.1

Table 2. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from milk and milking environments

Barns	No. of samples positive/total				Sampling date
	Mammary quarter raw milk	Body surface (Withers)	Barn floor	Barnyard soil	
O	4/4	1/4	6/7	•	Sep. 25 '75
	4/4	0/4	0/5	2/2	Nov. 7 '75
	3/3	0/4	0/3	3/5	Jan. 27 '76
P	7/25	5/12	5/7	3/3	Sep. 26 '75
	0/25	2/12	4/7	3/3	Nov. 26 '75
Q	0/7	2/8	0/6	5/6	Jan. 16 '76
	2/10	0/10	3/5	4/5	June 24 '76
R	0/10	0/12	0/4	2/4	Feb. 2 '76
	4/12	2/12	1/5	5/5	June 25 '76
S	0/10	0/10	2/5	4/4	Feb. 14 '76
	0/8	2/9	3/5	3/5	Jul. 5 '76
T*1	7/30	•*2	•	•	June 8 '76
Total (%)	31/148 (20.9)	14/97 (14.4)	24/59 (40.7)	34/42 (81.0)	

*1: Tanegashima (8 Barns)

*2: Not tested

分房乳 30 例のうち 7 例から緑膿菌が分離され、鹿児島市近郊の 20.3 % に比べると高い分離率を示した。体表からの分離率は P 畜舎では 29 % と最も高く、Q と S 畜舎で 11 %、O と R 畜舎で 8 % であった。床材料からの分離率は P 畜舎で 64.3 %、S 畜舎で 50 %、O 畜舎で 40 %、Q 畜舎で 33 %、R 畜舎では 11 % であった。O、Q および R の畜舎の 1, 2, 11 月の床材料からは全く分離されなかった。土壌からの分離率は各畜舎とも大差はなく、平均 81.0 % であり床材料の 40.7 % に比較すると高い値であった。ミルクプラント生乳 78 検体 (酪農家 20 戸) からは 24 検体 (15 戸) 30.8 % より緑膿菌が分離された。

3. 分離された緑膿菌の血清型別

乳および搾乳環境より得られた緑膿菌株を Lanyi¹⁸⁾ の標準型別血清によって 13 群に群別した。O, P, Q, R, S の 5 畜舎由来株の血清型別結果を Table 3.

(I ~ IV) に、種子島の乳由来株の血清型別結果を Table 4. に、さらにミルクプラント生乳由来株の血清型別結果を Table 5. に示した。得られた 257 株のうち 237 株が 10 群にすなわち Group-I (以下 G 1) G 3, G 4, G 5, G 6, G 7, G 9, G 10, G 11, G 13 に分類できた。残り 20 株のうち 11 株はどの型血清とも反応せず、9 株は 2 つ以上の型血清群と反応した。これらは未分類株としそれぞれ U-, U+ として分類した。

畜舎別に分離された緑膿菌の血清型をみると、O 畜舎 Table 3-I. においては乳より毎回分離された菌は全て G 6 であった。初回の床由来株は G 3, G 6 および未分類株であった。土壌由来株は G 3, G 4, G 6, G 13 および未分類株であり、このうち G 3 と未分類株は毎回分離された。P 畜舎 Table 3-II. においては乳より初回分離された菌は G 1, G 3, G 4,

Table 3. Serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from milk and milking environments

I. O-Barn

Materials ^{*1}		Lanyi's serogroups													U— ^{*2}	U+ ^{*2}
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
1-st	MM	• ^{*3}	•	•	•	•	4	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	B S	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	1	•
	B F	•	•	5	•	•	3	•	•	•	•	•	•	•	1	1
2-nd	MM	•	•	•	•	•	4	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	B S	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	B F	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	S	•	•	3	•	•	•	•	•	•	•	•	•	3	1	•
3-rd	MM	•	•	•	•	•	3	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	B S	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	B F	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	S	•	•	7	2	•	4	•	•	•	•	•	•	2	1	•
Total				15	2		18							5	4	1

*1: MM...Mammary quarter raw milk
 B S...Body surface (Withers)
 B F...Barn floor
 S...Barnyard soil

*2: U—...One strain does not react with any antisera.

U+...One strain reacts with two or more antisera.

*3: None of strain.

II. P-Barn

Materials		Lanyi's serogroups													U—	U+
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
1-st	MM	2	•	2	1	•	•	•	•	1	•	•	•	•	•	1
	B S	4	•	•	2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	B F	1	•	3	7	•	3	•	•	•	•	•	•	•	•	1
	S	•	•	5	5	•	2	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	B A*	2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	1
2-nd	MM	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	B S	2	•	•	•	1	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	B F	•	•	6	2	1	1	•	•	•	•	•	•	•	•	1
	S	•	•	5	2	•	1	•	•	•	2	•	•	•	•	•
Total		11		21	19	2	7			1	2					4

*: BA...Barn air

III. Q-Barn

Materials		Lanyi's serogroups													U—	U+
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
1-st	MM	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	B S	•	•	•	1	•	•	•	•	•	•	•	•	1	•	•
	B F	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	S	•	•	4	•	2	•	•	•	•	•	2	•	2	2	•
	B A	•	•	•	2	•	•	•	•	•	2	•	•	•	•	•
2-nd	MM	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	1	•	•	•	1
	B S	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	B F	•	•	2	•	4	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	S	•	•	1	•	2	•	•	•	•	4	3	•	1	•	•
Total				7	3	8					6	6		4	2	1

IV. R-Barn

Materials		Lanyi's serogroups														U—	U+
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			
1-st	MM	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
	BS	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
	BF	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
	S	•	•	•	3	•	•	1	•	•	•	•	•	3	•	•	
2-nd	MM	•	•	•	•	•	•	•	•	•	4	•	•	•	•	•	
	BS	•	•	2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
	BF	3	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
	S	•	•	4	2	•	•	5	•	•	•	•	•	3	1	•	
Total		3		6	5			6			4			6	1		

V. S-Barn

Materials		Lanyi's serogroups														U—	U+
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			
1-st	MM	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
	BS	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
	BF	7	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
	S	•	•	4	7	•	•	2	•	•	•	•	•	•	•	1	
2-nd	MM	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
	BS	•	•	•	•	•	1	•	•	•	1	•	•	•	•	•	
	BF	•	•	•	•	12	•	•	•	•	•	•	•	•	3	•	
	S	•	•	3	•	2	•	3	•	•	•	•	•	•	•	•	
Total		7		7	7	14	1	5			1				3	1	

VI. Total of 5 Barns

No. of strains isolated	Lanyi's serogroups														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	U—	U+
226	21	•	56	36	24	26	11	•	1	13	6	•	15	10	7
Frequency of sero-group (%)	9.3		24.8	15.9	10.6	11.5	4.9		0.4	5.8	2.7		6.6	4.4	3.1

Table 4. Serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from milk (Tanegashima)

No. of samples	No. of strains isolated	Lanyi's serogroups														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	U—	U+
30	7 (23.3%)	•	•	•	5	2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•

G 9 および未分類株であった。体表由来株は G 1, G 4 および G 5 であった。床由来株は G 1, G 3, G 4 G 5, G 6 および未分類株であり、このうち G 3, G 4, G 6 および未分類株は毎回分離された。土壌由来株は G 3, G 4, G 6 および G 10 であり、このうち

G 3, G 4, G 6 は毎回分離された。空中落下菌よりは G 1 と未分類株が分離された。Q 畜舎 Table 3-Ⅲ. においては 2 回目に乳より分離された菌は G 11 と未分類株であった。体表由来株は G 4 と G 13 で、床由来株は G 3, G 5 であった。土壌由来株は G 3, G

Table 5. Serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from plant raw milk

No. of samples	No. of strains isolated	Lanyi's serogroups															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	U--	U+	
78	24 (30.8%)	.	.	.	8	5	8	1	2	

5, G10, G11, G13 および未分類株であり G3, G5, G11, G13 は毎回分離された。空中落下菌よりは G4, G10 が分離された。R 畜舎においては、2 回目の乳より分離された菌は全て G10 であった。体表由来株は G3 で、床由来株は G1 であった。土壌由来株は G3, G4, G7, G13 および未分類株であり、G4, G7, G13 は毎回分離された。S 畜舎 Table 3-V. においては乳より分離されず、体表由来株は G6, G10 であり、床由来株は G1, G5 および未分類株であった。土壌由来株は G3, G4, G5, G7 および未分類株であり G3, G7 は毎回分離された。

材料別にみると、新鮮分房乳由来株は G1, G3, G4, G5, G6, G9, G10, G11 の 8 群および未分類株であり、体表由来株では G1, G3, G4, G5, G6, G10, G13 の 7 群および未分類株、床由来株では G1, G3, G4, G5, G6 の 5 群および未分類株でありさらに土壌由来株では G3, G4, G5, G6, G7, G10, G11, G13 の 8 群および未分類株が存在していた。

また全ての畜舎に共通してみられたのは、G3, G4 および未分類株であり、4 畜舎においては G10 が、3 畜舎においては G1, G5, G6 および G13 が共通してみられた。一方、ひとつの畜舎のみから分離されたのは G9 と G11 であり、いずれの材料からも分離されなかったのは G2, G8, G12 であった。

5 畜舎を総合した血清型の出現頻度は Table 3-VI. に示した。すなわち、G3, G4, G6, G5, G1 の順で上位 5 型が全体の 72.1 % を占めた。

種子島の乳より分離された 7 株の血清型は Table 4. に示した。5 株が G4 に、2 株が G5 に型別できた。

ミルクプラント生乳より分離された 24 株の血清型別は Table 5. に示した。8 株が G4 に 5 株が G5 に、8 株が G6 に型別された。どの抗血清とも反応しなかった株が 1 株、2 つ以上の抗血清と反応をした株が 2 株、計 3 株が未分類株であった。なお全般を通じて同一牛の乳から同時に異った血清型は分離されなかつた。

た。

4. 分離菌株の性状

1) 低温での発育試験

搾乳環境より分離された緑膿菌 129 株と当教室保存の豚肉由来緑膿菌 38 株を 3 種の温度条件、すなわち 15, 10, および 7°C で 14 時間培養し、その発育状態を観察した。結果は Table 6 (I~IV). に示した。

15°C では 1 日で約 80 % が発育を示し、3 日以内には供試株全てが発育を示し、5 日後には全て十分な発育を示した。10°C では培養 3 日目に既に 40 % の株が発育を示し、その内でも十分な発育を示した株が新鮮分房乳 および 床材料由来株 にそれぞれ 1 株ずつであった。しかし、約 60 % の株は全く発育を示さなかった。7 日目では十分な発育を示した株が 17 株とふえ、逆に全く発育しなかったのは 8 株 4.8 % に減少した。十分な発育を示したのは土壌由来株が 8 株と最も多く、次いで新鮮分房乳 および 床材料由来株 がそれぞれ 4 株ずつであった。14 日目では 93 株 56 % が十分な発育を示した。全く発育しなかった 5 株は床材料由来株であった。7°C では培養 3 日目で発育のみられたのはわずかに 11 株 6.6 % であった。7 日目では 32 株 19 % が、14 日目には 52 株 31 % が発育を示したが、十分な発育を示したのはわずかに 11 株 6.6 % であった。7°C での発育状態を由来別にみると、土壌由来株が最も発育がよく 40 株のうち 26 株 65 % が発育を示した。次に発育が良いのは体表由来株で、19 株のうち 9 株 47 % が発育した。床材料由来株は 25 株のうち 8 株 32 % が発育した。冷凍豚肉由来株は 6 株のうち 2 株が発育した。新鮮分房乳由来株は 33 株のうち 6 株 18.2 % が発育した。全く発育しなかったのはミルクプラント生乳由来株と豚膿瘍由来株であった。7°C での供試株を血清型別してみると Table 6-IV. が示すように G1, G3, G7, G9, G13 の 5 型の発育がよく 40 % 以上の株が発育した。特に G13 はそのほとんどが発育を示した。供試株 167 株のうち 7°C, 14 日間で発育を示したのは 32 株、31.1 % であった。

2) カゼイナーゼ活性

カゼイナーゼ活性の結果は Figure 1. に示した OM

Table 6. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from milk, milking environments and pork at 15, 10 and 7°C

I. 15°C

Source of strains examined	No. of strains examined	Incubation period (days)												
		1				3				5				
		—	+	++	+++*1	—	+	++	+++	—	+	++	+++	+~+++ (%)
Mammary quarter raw milk	16	2	13	1	•*2	•	1	5	10	•	•	•	16	(100.0)
Plant raw milk	12	•	12	•	•	•	•	7	5	•	•	•	12	(100.0)
Body surface	10	1	9	•	•	•	•	6	4	•	•	•	10	(100.0)
Barn floor	12	1	11	•	•	•	•	7	5	•	•	•	12	(100.0)
Barnyard soil	16	6	10	•	•	•	•	2	14	•	•	•	16	(100.0)
Fresh meat	14	4	8	2	•	•	•	9	5	•	•	•	14	(100.0)
Refrigerated meat	6	1	3	2	•	•	•	1	5	•	•	•	6	(100.0)
Swine subcutaneous abscess	3	3	•	•	•	•	•	•	3	•	•	•	3	(100.0)
Total (%) ^{*3}	89	18	66	5	•	•	1	37	51	•	•	•	89	(100.0)
		(20.2)				(0.0)				(0.0)				

*1: —; no growth

*2: none of strain

*3: no growth

+; poor growth ++; moderate growth +++; good growth

II. 10°C

Source of strains examined	No. of strains examined	Incubation period (days)												
		3				7				14				
		—	+	++	+++	—	+	++	+++	—	+	++	+++	+~+++ (%)
Mammary quarter raw milk	33	20	9	3	1	1	20	8	4	•	•	16	17	(100.0)
Plant raw milk	12	10	2	•	•	•	5	7	•	•	•	•	12	(100.0)
Body surface	19	12	6	1	•	•	17	2	•	•	4	9	6	(100.0)
Barn floor	25	12	6	2	1	5	11	5	4	5	•	5	15	(80.0)
Barnyard soil	40	16	23	1	•	•	12	20	8	•	1	14	25	(100.0)
Fresh meat	29	24	4	1	•	1	18	10	•	•	2	17	10	(100.0)
Refrigerated meat	6	•	5	1	•	•	•	5	1	•	•	•	6	(100.0)
Swine subcutaneous abscess	3	2	1	1	•	1	1	1	•	•	•	1	2	(100.0)
Total (%)	167	100	56	9	2	8	84	58	17	5	7	62	93	(97.0)
		(50.9)				(4.8)				(3.0)				

III. 7°C

Source of strains examined	No. of strains examined	Incubation period (days)												
		3				7				14				
		—	+	++	+++	—	+	++	+++	—	+	++	+++	+~+++ (%)
Mammary quarter raw milk	33	30	3	•	•	27	6	•	•	27	4	1	1	(18.2)
Plant raw milk	12	12	•	•	•	12	•	•	•	12	•	•	•	(0.0)
Body surface	19	14	5	•	•	11	7	1	•	10	7	2	•	(47.4)
Barn floor	25	24	•	1	•	21	3	•	1	17	3	3	2	(32.0)
Barnyard soil	40	38	2	•	•	29	10	1	•	14	9	10	7	(65.0)
Fresh meat	29	28	1	•	•	28	1	•	•	28	1	•	•	(3.4)
Refrigerated meat	6	6	•	•	•	4	1	1	•	4	•	1	1	(33.3)
Swine subcutaneous abscess	3	3	•	•	•	3	•	•	•	3	•	•	•	(0.0)
Total (%)	167	156	10	1	•	135	28	3	1	115	24	17	11	(31.1)
		(93.4)				(80.8)				(68.9)				

IV. 7°C (serogroup)

Lanyi's serogroups	No. of strains examined	Incubation period (days)												
		3				7				14				
		—	+	++	+++	—	+	++	+++	—	+	++	+++	+~++ (%)
1	18	16	2	.	.	13	4	1	.	10	6	2	.	(44.4)
2	2	2	.	.	.	2	.	.	.	2	.	.	.	(0.0)
3	33	32	1	.	.	24	9	.	.	19	3	8	3	(42.4)
4	28	28	.	.	.	27	1	.	.	24	2	1	1	(14.3)
5	16	15	.	1	.	13	1	1	1	13	.	1	2	(18.8)
6	46	42	4	.	.	42	4	.	.	41	5	.	.	(10.9)
7	4	4	.	.	.	3	1	.	.	2	1	.	1	(50.0)
9	2	2	2	1	1	(100.0)
10	1	1	.	.	.	1	.	.	.	1	.	.	.	(0.0)
13	14	11	3	.	.	8	5	1	.	1	6	4	3	(33.3)

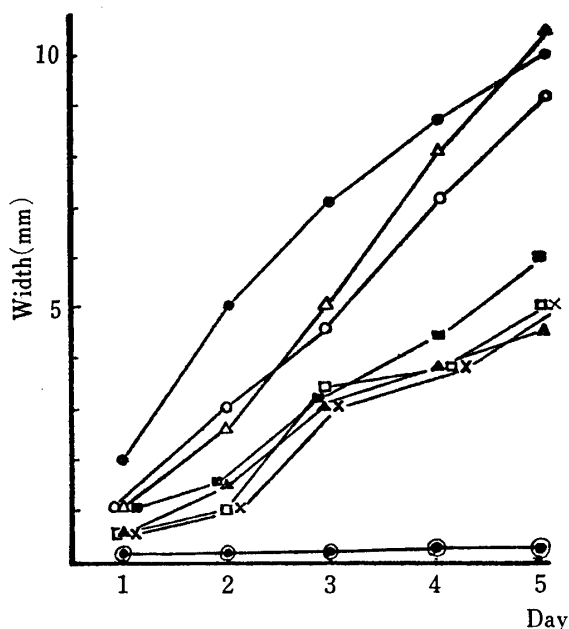


Fig. 1. Caseinase-activity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from milk and milking environments.

■...OF 4 ●...OM 11 △...PB 472
 ○...PM 472 □...QB 51 ▲...RS 82
 ○...SF 81 ×...SS 92

11 株は1日目に既に他の株の2倍以上の活性を示した。PB 472 株は4日目までは OM 11 株より活性は低かったが、5日目にはこれを上回った。PM 472 株は5日間計測する活性は示さなかった。OF 4, QB 51, SS 92, RS 82 はほとんど同程度の活性を示した。

考 察

過去において、緑膿菌の選択分離用培地としている培地が使用されている。Ringen ら²⁹⁾ は選択剤として緑膿菌により産生されたピオシアニンを加

えた培地を使用している。Rowbury ら¹⁹⁾ は選択剤としてセトリマイドを添加した培地を考案し、以後 Brown⁵⁾ および Mossel²²⁾ によりセトリマイド添加培地についていくつかの改良がなされている。BBL ではこれらの培地をさらに改良した Pseudosel カンテン培地 (BBL) を考案した。Solari ら³⁹⁾ は流動パラフィンを単一炭素源とした選択培地を作成した。五島ら^{8,7)} は Tinne⁴⁰⁾ の培地のセトリマイドとナリジキンの添加量の組み合わせを工夫し、さらに選択能の優れた培地 (NAC 寒天培地) を考案した。著者は、この NAC 寒天培地を使用した。本培地はセトリマイドが 0.02 %, ナリジキン酸が 0.0015 % が添加されており、その選択能については五島ら^{8,7)}、野宮ら²⁴⁾ の報告がある。五島らは病的材料から分離された緑膿菌、一般腸内細菌、ビブリオ、グラム陽性菌など 24 菌群について調べており、緑膿菌以外で発育したのはクレブシエラ 2 株だけであったと報告している。しかし、野宮らは土壌で 12.5 %, 淡水で 44.7 %, マウス、モルモットの口腔、肛門、腸管で 85.7~100 %, 動物の病的材料で 80 %, さらにイヌの肛門、牛乳で 100 % の選択率を報告している。今回の著者の成績でも材料別にかなりの変動がみられ、新鮮分房乳で 66.2 %, 土壌で 60.4 %, 床で 22.6 %, 体表にいたっては 18.3 % であった。土壌で 60.4 % と比較的高かったのは、採取地を畜舎の周囲に限定したためと思われる。

本培地に接種する前の増菌培地によっても選択率は違ってくると思われるが、一般に自然界材料からの NAC 寒天培地による緑膿菌の選択率は低下するのではないかと思われる。本培地上で色素を産生する菌のうち典型的な緑膿菌と同定し得なかった菌が、緑膿菌とは全く無縁な菌なのか、あるいは培地によって本来の性状が変化してしまった緑膿菌なのかは、これらの

菌の詳細な同定を行っていないので明確にはできない。いずれにせよ、NAC 寒天培地で自然界材料から緑膿菌を分離する場合、本培地上で緑色あるいは黄緑の色素産生集落を、即緑膿菌と判断することには問題があると考えられた。さらに、本培地では普通寒天培地などに比べ緑膿菌の発育能は低下することや、Hart ら¹⁰⁾ が述べているようにセトリマイドの最少発育阻止量のきわめて小さい緑膿菌は本培地上で発育しないことなどから、このような緑膿菌は見逃される可能性があり、今後は他の培地との組み合わせも必要であろう。

緑膿菌は下水、淡水、土壌、植物など自然界に広く存在していることが明らかにされている。Green ら⁹⁾ は栽培中の新鮮な野菜よりまた Trust ら⁴¹⁾ は鑑賞魚類用の水槽から緑膿菌を分離している。Ringén ら²⁹⁾ は自然界からの緑膿菌の検索を行ない、ヒトの糞便および下水から、土壌や淡水など他の材料に比して非常に高い検出率を得ており、緑膿菌の自然の棲息部位はヒトの腸管内および下水汚物であろうと結論している。Highsmith ら¹¹⁾ は小川の水より 100 % 緑膿菌を検出し、しかも大腸菌や腸球菌と同程度の、あるいはそれ以上の汚染量であり、糞便汚染の指標細菌としての長所もあると述べている。わが国では野宮ら²⁴⁾ が自然界（土壌・下水・淡水など）より緑膿菌の分離を試み、土壌より 7.8 %、淡水より 32.8 % という検出率を報告している。著者らは土壌の 81 % をはじめとして、床、体表、空中より高い検出率を得ているが、これは採取地を畜舎およびその周囲に限定したためと考えられ、搾乳環境の特徴ともみられる。

緑膿菌による乳房炎の発生は既に 1922 年 Mundhenk²³⁾ により報告されており、その発生率は他の起炎菌に比し年々増加の傾向にある。元来、緑膿菌はヒトおよび動物に対する病原性は弱く、菌力よりも宿主側の抵抗力の強弱に左右されることが多い。しかし、ひとたび発症をみると本菌のもつ多剤耐性のため、容易に難治性となり、しかも重篤な症状を示すようになる。Malmo ら²¹⁾ は 1 群 120 頭中 13 頭の牛が緑膿菌の感染による乳房炎をおこし、そのうち 3 頭が死亡、さらに治療したと思われた 1 頭が 19 カ月後に第二次感染の感染源となった例を報告している。Schalm ら³³⁾ は牛の実験的緑膿菌性乳房炎に関する実験で興味ある結果を得ている。すなわち、乳汁中に少数の緑膿菌が存続していても細胞数が正常に近づいている間は乳房炎に至らず、また他の病原菌の感染している分房に緑膿菌を接種しても慢性感染は成立しなかったと述

べ、さらに菌が慢性感染するためには乳房内に侵入する菌の量は白血球の滲出を刺激しないほど少量であろうと述べている。

わが国での緑膿菌性乳房炎の発生報告は少く、最近になって清水³⁸⁾、大野²⁷⁾、井上¹⁵⁾ らによって報告されているにすぎない。その分房発生率は大野らによれば 7.3 %、井上らによれば 9.9 % である。一方、緑膿菌の搾乳環境における分布と乳汁汚染に関する報告も比較的少い。Schalm ら³⁴⁾ は約 3000 頭の乳牛のうち 10 % が、群によっては 20~40 % が緑膿菌を帯有していたと述べ、わが国でも大野²⁷⁾ 井上¹⁵⁾ らが酪農家によっては 20 % という高い緑膿菌分離分房率を示すことを報告している。今回の著者らの成績では、鹿児島市近郊で 20.3 %、種子島で 23.3 %、平均して 20.9 % の分離率を得た。このような高い分離率が得られたのはあらかじめ集乳罐乳の検出成績より乳汁汚染の高いと思われた酪農家を選んだこと、あるいは分房別でなく個体別であったという理由が考えられるとしても、鹿児島および種子島における緑膿菌による乳汁汚染が非常に高いことが想像された。種子島の乳汁汚染については、先に著者ら²⁾ が南部の中種子町付近の乳房炎乳より 5.8 % の検出率を得ているが、今回の北部の健康牛の乳汁より得られた成績と比較するにはそれぞれ例数が少ない。なお、今回の北部の乳汁中にも乳房炎乳が 1 例ありこれからも緑膿菌が分離された。

次に検出率の季節的影響についてみると、新鮮分房乳からの菌分離については鹿児島県の P、Q、R の 3 畜舎では主として夏期に分離され、冬期には分離されなかったが、潜在性慢性感染と思われた O 畜舎の場合は季節にかかわらず菌が分離された。例数が少なく、明確ではないが一般に菌の分離は夏期に多く冬期に少ない傾向があるようである。これに対して搾乳環境とりわけ土壌からの検出率に季節的変動はみられなかった。Sharma ら³⁵⁾ は *Streptococcus uberis* の乳汁汚染は牛体表（乳房）からの菌分離と平行して夏少なく、冬多いと報告しているが、緑膿菌の場合はこのような傾向は認められず、*Streptococcus uberis* とは明らかに異った様相を示しているとみられる成績であった。

一方、2 畜舎内での試験ではあったが、空中落下菌よりしばしば緑膿菌が検出されたことは体表からの菌分離と共に、比較的多数の緑膿菌が畜舎内に浮遊していると思われた。

また、それぞれの畜舎の搾乳環境から全て緑膿菌は分離されたが、新鮮分房乳からの緑膿菌分離状況には

畜舎別によって違いがみられた。すなわち、S 畜舎のように常に分離されない場合、O 畜舎のように特定の血清型の菌が毎回分離される場合、それに P, Q, R 畜舎のように分離される時とされない時のある場合、以上の3つのケースがあった。O 畜舎の場合は単一血清型の菌が全頭の乳房内に慢性感染したと考えられる珍しいケースであり、P, Q, R 畜舎の場合はいくつかの血清型の菌による一過性の乳房内感染と考えられた。これら新鮮分房乳より分離された緑膿菌は G 1, G 3, G 4, G 5, G 6, G 9, G 10, G 11 の8群および未分類株に分類されたが、各々の畜舎毎に違いがみられ、それぞれの搾乳環境より分離された血清型のごく限られたものであった。特に O, R 畜舎の場合はそれぞれ G 6, G 10 による特定の血清型が同時に多数の牛から分離されており、このような成績は大前²⁶⁾ 井上¹⁵⁾ らによって報告されているように、舎内感染したものとみられる興味あるケースと思われた。

新鮮分房乳より分離された菌とその搾乳環境との関係については次の3つのことが考えられた。すなわち、第一に O 畜舎の G 6 の菌のように環境とは完全に独立して乳房内に定着してしまう場合、第二に P 畜舎の G 1, G 3, G 4, Q 畜舎の G 11 の菌のように環境より一過性に乳房内に感染し、その後は定着しないまま消失してしまうと思われる場合、第三に P 畜舎の G 9, R 畜舎の G 10 の菌のようにその由来が不明の場合の3つである。以上のうち、分房乳と搾乳環境における菌の消長から第二の経過をたどる菌が多いと考えられた。さらに各畜舎の床および土壌においては次のことが観察された。すなわち、床からは菌の検出され易いときと検出されにくいときとがあり、さらに菌の血清型も採取時によっていろいろ変化しており、床における緑膿菌の菌相は常に変化しているようであった。このような変化は飼育頭数の少い畜舎において著明であった。一方、土壌においては検出率、血清型共に床のそれに比べて一定しており、比較的安定した菌相を形成しているものと考えられた。

今回の試験で特に注目したいのは、O 畜舎で材料採取途中で持続して全頭の新鮮分房乳より特定の血清型の菌が分離されたことである。この畜舎は家屋と棟伝いになっており、床はコンクリートで、床上の汚物は常時片づけられており、きわめて衛生状態良好な環境である。にもかかわらず、このような集団感染が発生していた。これは、緑膿菌の乳房内感染が他の細菌性乳房感染と異り、必ずしも飼養管理状態の良否とは関係しないという吉田⁴⁵⁾ の報告を裏付けているよう

である。このような潜在性慢性感染と思われる例としては Schalm ら³⁴⁾ が5年間緑膿菌を排出しつづけた牛を観察している。O 畜舎の乳汁より毎回分離された菌は G 6 であるが、G 6 の菌は1回目の材料採取において床から検出されているが以後2回の試みでは床から全く検出されなかった。これはこの G 6 の菌が乳房内から床上に排菌されていないか、あるいは排菌されていても直ちに消滅してしまうか、この2つが考えられる。したがって、4頭に感染した経路も感染分房から床、床から他の分房へと菌が伝播したと考えるよりむしろ、ミルカーを介して直接分房から分房へ感染したと考えられる。さらに、この感染分房乳より分離された OM 11 株は Figure 1 に示されるようにカゼイナーゼ活性においても興味ある成績を示した。すなわち、この OM 11 株は同じこの畜舎の床より分離された同じ G 6 の菌である OF 4 株やその他のいろいろな株と比較してもカゼイナーゼ活性が高かった。この OM 11 株が乳房内に侵入する以前よりカゼイナーゼ活性が高かったのか、あるいは侵入後カゼインに富んだ乳房という特殊な環境に順応した結果高くなったのか不明であるが、いずれにしてもこの OM 11 株は乳房を刺激せず、乳房内で生存しつづけており、生体側と一定の共存状態を保っていると思われた。菌の酵素活性と乳房内感染との関連性については未だ不明であるが、興味ある問題であろう。

低温細菌に関する定義は研究者によってまちまちであるが、国際酪農連盟主催の『低温細菌に関するゼミナール』において結論された定義によると「酪農および乳業においては低温菌とは生育の至適温度とは関係なく、7°C 以下で生育できる微生物を言う」となっている¹⁾。今回の実験ではこの定義に従い、7°C 14 日以内に発育した菌を低温菌とした。

牛乳中の低温細菌に関する報告は多く、わが国では矢野^{42, 43)}、小川²⁵⁾、日越^{12, 13, 14)} らが一連の研究を行っている。しかし、*Pseudomonas* 全般について考察されており、緑膿菌にまでは言及されていない。また緑膿菌の発育温度域については明確な表現はなされていない。Lusis²⁰⁾ は 4~42°C、小枝¹⁷⁾ は 20~42°C、Caselitz⁹⁾ は 5~42°C とまちまちである。Azuma⁴⁾ や Olsen²⁸⁾ らは紫外線やバクテリオファージを使って、0°C で発育する低温性緑膿菌の誘導に成功しており、Juffs¹⁶⁾ は彼の実験の中で 5°C で発育を示す株を使用している。今回の実験で乳および搾乳環境由来株の中には 7°C 以下で発育をする低温性緑膿菌が少なからず存在していることが明らかにされた。殊に新鮮

乳房乳から低温性緑膿菌が分離されたことは非常に興味がある。著者らが前報²⁾で述べている酸素活性能と考えあわせると、低温下での乳質に及ぼす本菌の影響も考慮する必要がある。株数が少なく、一概には言えないが、これら低温性緑膿菌の分布は Table 6-Ⅲ. が示すように菌の由来に多少の関連が認められた。すなわち土壌や床など自然環境由来株の中に低温菌が多くみられた。このことは搾乳環境からの緑膿菌が年間を通じて顕著な変動を示さなかったことからもうかえる。Olsen²⁸⁾らは緑膿菌の低温株を誘導する際に下限発育温度が 11°C から 0°C に変化すると共に上限発育温度も 44°C から 32°C に低下するのを観察しており、また Samagh³¹⁾らは緑膿菌ときわめて類似した性質を持ちながら低温で発育し、42°C で発育しない菌を 42°C での発育能を失った低温性の緑膿菌であると述べている。今回の実験では緑膿菌同定の段階において 42°C で発育しない株は緑膿菌と同定しなかったが、Olsen²⁸⁾、Samagh³¹⁾らのいう 42°C 発育不能の低温性緑膿菌も自然界には存在する可能性があると思われ、もしそうであれば緑膿菌の分類に一考を要することになる。なお成績には記載していないが 7°C で発育を示した株を 37°C で 30 回継代培養を繰り返した結果、ほとんどの株は低温での発育能が低下することが明らかにされた。

要 約

乳および搾乳環境より 257 株の緑膿菌を分離 Lanyi¹⁸⁾の標準型別血清により血清型別を行い、分離された緑膿菌の生態について検討した。その結果の主なるものは次の通りであった。

1. 新鮮分房乳 148 検体のうち 31 検体、すなわち 20.9% より緑膿菌が分離され、8 血清型 (G 1, G 3, G 4, G 5, G 6, G 9, G 10, G 11) と未分類株に分類された。一方、搾乳環境からは 202 株が分離され、9 血清型 (G 1, G 3, G 4, G 5, G 6, G 7, G 10, G 11, G 13) と未分類株に分類された。

2. それぞれの搾乳環境から、毎回緑膿菌は分離されたが、新鮮分房乳からの分離状況には畜舎別に違いがみられた。すなわち、毎回分離される畜舎、分離されるときとされないときのある畜舎、それに毎回分離されない畜舎の 3 つのケースがあった。

3. 一畜舎内の複数牛の新鮮分房乳より特定の血清型の菌が分離されたケースがあり、舎内感染が疑われた。この中で、潜在性慢性感染と思われる興味ある 1

事例に遭遇した。

4. 土壌においては毎回ほぼ一定した血清型の菌が分離され、安定した菌相を保っていると思われた。一方、床においては毎回異った血清型が分離される場合が多く、菌相は変化しているものと思われた。

分離された緑膿菌の性状については次の結果が得られた。

1) 乳および搾乳環境より分離された緑膿菌のほとんどが 10°C で発育を示し、7°C で発育を示す低温性緑膿菌も少なからず存在していることが明らかにされた。新鮮分房乳からも 7°C 発育株が 6 株分離された。

2) カゼイナーゼ活性の高い緑膿菌が、潜在性慢性緑膿菌感染と思われた分房乳より分離された。

謝 辞

本研究遂行にあたり、材料採取において御協力して頂いた鹿児島共同乳業 K.K. 野村浩平氏、西之表市農業共済組合家畜診療所蓮子昭夫氏に謝意を表する。本研究の一部は森永奉仕会研究奨励会によって行なわれたことを附記し謝意を表します。

文 献

- 1) 栗飯原景昭・矢野信礼：食品衛生の微生物。145, 朝倉書店, 東京 (1970)
- 2) 雨宮淳三・リム・セン・キャッツ・佐藤平二：乳肉より分離された緑膿菌の血清型別と酵素産生能について。鹿大農学術報告, 29, 31-37 (1976)
- 3) Arai, T., Enomoto, S. and Kuwahara, S.: Determination of *Pseudomonas aeruginosa* by biochemical test methods. I. An improved method for gluconate oxidation test. *Jap. J. Microbiol.*, 14, 49-56 (1970)
- 4) Azuma, Y., Newton, S. B. and Witter, L. D.: Production of psychrophilic mutants from mesophilic bacteria by ultraviolet irradiation. *J. Dairy Sci.*, 45, 1529-1930 (1960)
- 5) Brown, V. I. and Lowbury, E. J. L.: Use of an improved cetrimide agar medium and other culture method for *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Path.*, 18, 752 (1965). (cit. in 本間ら：緑膿菌とその感染症, p. 27)
- 6) Caselitz, F. H.: *Pseudomonas-Aeromonas* und ihre humanmedizinische Bedeutung. Veb Gustav Fisher Verlag, Jena, p. 107 (1966). (cit. in 本間ら：緑膿菌とその感染症 p. 607)
- 7) Goto, S. and Enomoto, S.: Nalidixic acid cetrimide agar - A new selective plating medium for the selective isolation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Jap. J. Microbiol.*, 14, 65-72 (1970)

- 8) 五島瑛智子・榎本省二：緑膿菌の分離同定について。モダンメディア, **16**(4), 195-203 (1970)
- 9) Green, S. K., Schroth, M. N., Cho, J. J., Kominos, S. D. and Vintanza-Jack, V. B.: Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol.*, **28**(6), 987-991 (1974)
- 10) Hart, A., Moore, K. E. and Tall, D.: A comparison of the British Pharmacopeia (1973) and United State Pharmacopeia (1975) methods for detecting *Pseudomonads*. *J. Appl. Bact.*, **41**(2), 235-242 (1976)
- 11) Highsmith, A. K. and Abshire, R. L.: Evaluation of a Most-Probable-Number technique for the enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol.*, **30**(4), 596-601 (1975)
- 12) 日越博信・浜田輔一：搾乳直後分房乳における低温細菌群。食衛誌, **17**(1), 27-33 (1976)
- 13) 日越博信・浜田輔一：工場持込時生乳における低温細菌群。食衛誌, **17**(1), 34-39 (1976)
- 14) Higoshi, H., Hamada, S. and Doi, M.: Studies on the growth temperature of psychrotrophic bacteria: Growth at various incubation temperatures of psychrotrophic *Pseudomonas* originated from raw milk and raw meat. *Jap. J. Vet. Sci.*, **37**, 165-177 (1975)
- 15) 井上 貢・山田 完・加藤清人・金子 晋・宮田 基・清水 健：千葉県下における牛緑膿菌性乳房炎の実態調査成績。日獣会誌, **29**(11), 620-624 (1976)
- 16) Juffs, H. S.: Effect of temperature and nutrients on proteinase production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Bact.*, **40**, 23-32 (1976)
- 17) 小枝鉄雄：動物の緑膿菌感染症。日獣会誌, **29**(8), 429-433 (1976)
- 18) Lanyi, B.: Serological properties of *Pseudomonas aeruginosa*, I. Group-specific somatic antigens. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, **13**, 295-316 (1967)
- 19) Lowbury, E. J. L. and Collins, A. G.: The use of a new cetrimide product in a selective medium for *Pseudomonas pyocyanea*. *J. Clin. Path.*, **8**, 47 (1955). (cit. in 本間ら：緑膿菌とその感染症。p. 27)
- 20) Lysis, P. I.: *Pseudomonas aeruginosa*. *Vet. Bull.*, **41**, 169-176 (1971)
- 21) Malmo, J., Robinson, B. and Morris, R. S.: An outbreak of mastitis due to *Pseudomonas aeruginosa* in a dairy herd. *Austral. Vet. J.*, **48**, 137-139 (1972)
- 22) Mossel, D. A. A., De Vor, H. and Eelderink, I.: A further simplified procedure for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in contaminated aqueous substrata. *J. Appl. Bact.*, **41**(2), 307-309 (1976)
- 23) Mundhenk, R. L.: Bovine mastitis. *North Am. Vet.*, **3**, 101 (1922) (cit. in *Am. J. Vet. Res.*, **16**, 511 (1955))
- 24) 野宮文三・河原條勝己・渡辺忠洋・田村早苗：緑膿菌に関する研究。I. 緑膿菌の自然界および動物とくにマウス、モルモットからの検出について。日細誌, **27**(5), 641-648 (1972)
- 25) 小川益男：牛乳の低温細菌に関する研究。東京農工大学術報告, **11**, 1-88 (1968)
- 26) 大前憲一・寺門誠致・小山敬士・小枝鉄雄・畦地速見・清水健：動物由来緑膿菌の薬剤感受性と血清型について。日獣会誌, **27**(8), 386-390 (1974)
- 27) 大野浩三郎・高島聖二・井上 貢・大木雅行・古閑 設・金子 晋・鈴木達郎：緑膿菌性乳房炎について。獣産新報, 655, 26-29 (1976)
- 28) Olsen, and Metcalf, E. S.: Conversion of mesophilic to psychrophilic bacteria. *Science*, **162**, 1288-1289 (1968)
- 29) Ringen, L. M. and Drake, C. H.: A study of the incidence of *Pseudomonas aeruginosa* from various natural sources. *J. Bact.*, **64**, 841-845 (1952)
- 30) 坂崎利一：培地学各論 (I), p. 110-112, 納屋書店, 東京 (1968)
- 31) Samagh, B. S. and Cunningham, J. D.: Numerical taxonomy of the genus *Pseudomonas* from milk and milk products. *J. Dairy Sci.*, **55**(1), 19-24 (1971)
- 32) Sato, H. and Diena, B. B.: A rapid quantitative microtitration of *Pseudomonas aeruginosa* antibody. *Can. J. Microbiol.*, **20**, 473-476 (1974)
- 33) Schalm, O. W., Lasmanis, J. and Carroll, E. J.: Experimental *Pseudomonas aeruginosa* mastitis in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, **28** (124), 697-707 (1967)
- 34) Schalm, O. W., Carroll, E. J. and Jain, N. C.: Bovine Mastitis. Lea and Febiger, Philadelphia, (1971)
(保坂安太郎訳：牛の乳房炎, p. 289-290, 学窓社, 東京 (1973))
- 35) Sharma, R. M. and Packer, P. A.: Occurrence and ecologic features of *Streptococcus uberis* in the dairy cow. *Am. J. Vet. Res.*, **31**(7), 1197-1202 (1970)
- 36) 清水 健：家畜家禽の緑膿菌感染症とその対策 (1) 畜産の研究, **28**(9), 1047-1052 (1974)
- 37) 清水 健：家畜家禽の緑膿菌感染症とその対策 (2) 畜産の研究, **28**(10), 1181-1186 (1974)
- 38) 清水 健：牛の緑膿菌性乳房炎。畜産の研究, **29**(1), 146-150 (1975)
- 39) Solari, A. A., Dato A. A., Herrero, M. M., Cremachi, M. S. D., Reid, M. I., Salgado,

- L. P. and Paineira, M. T.: Use of a selective enrichment medium for the isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from feces. *J. Bact.*, **84**, 190-193 (1962)
- 40) Tinne, J. E., Godon, J. E., Godon, A. M., Bain, W. H. and Nackey, W. A.: Cross-infection by *Pseudomonas aeruginosa* as a hazard of intensive surgery. *Bri. Med. J.*, **4**, 313 (1967) (*cit. in* 本間ら: 緑膿菌とその感染症. p. 27)
- 41) Trust, T. J. and Bartlett, K. H.: Occurrence of potential pathogens in water containing ornamental fishes. *Appl. Microbiol.*, **28**(1), 35-40 (1974)
- 42) 矢野信礼・森地敏樹・見坊寛: 冷蔵牛乳における低温細菌の増殖・畜産試験場研究報告, **28**, 41-45 (1974)
- 43) 矢野信礼・森地敏樹: 牛乳から分離した低温細菌. 畜産試験場研究報告, **28**, 47-56 (1974)
- 44) 蔵内英子・田中幹枝・和田文子: PYP (Peptone-Yeast extract-Phenolred) 基礎培地. 新しい糖分解試験用半流動基礎培地について. メディアサークル, **20**(6), 171-176 (1974)
- 45) 吉田信行: 緑膿菌性乳房炎. 家畜診療, **130**, 3-10 (1974)

Summary

The bovine mastitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* was reported elsewhere. Much interest has been taken to this organism for its remarkable characters *i. e.* low sensitivity to antibiotics and world-wide range of distribution.

However, studies on the distribution of *Ps. aeruginosa* around milk and milking environments are not reported sufficiently. Furthermore, it seems that *Ps. aeruginosa* in raw milk plays a role in food-hygiene.

This paper deals with the serotyping of *Ps. aeruginosa* strains isolated from raw milk and milking environments around Kagoshima area, using a modification of Lanyi's serogrouping-schema. And a few characters, such as caseinase activity and the capacity of growth at low temperature were also investigated.

The results are as follows,

1. *Ps. aeruginosa* was isolated from 31 specimens in 148 specimens of raw milk obtained directly from mammary quarters. (one specimen from one cow)

The isolated *Ps. aeruginosa* strains were classified into 8 serogroups (Group 1, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11) and untypable groups. On the other hand, 202 strains of *Ps. aeruginosa* isolated from milking environments consisting of body surfaces of cows, barn floor, barn-around-soil and barn air specimens, were classified into 9 serogroups (1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 13) and untypable groups.

2. *Ps. aeruginosa*, however, was isolated always from the respective environments, and three different isolation patterns were seen in specimens of raw milk, according to the respective barns. The first pattern was the one in which *Ps. aeruginosa* was isolated from mammary quarters raw milk constantly, the second pattern was the one in which it was isolated occasionally, the third pattern was the one in which it was not isolated at all.

3. As a certain amount of serogroup strains of *Ps. aeruginosa* was isolated from some specimens of mammary quarters raw milk of cows in the same barn, barn-acquired infections were suspected. Especially one case was found, which was to be suspected of being latent chronic infection.

4. It seemed that distribution of *Ps. aeruginosa* in barn-around-soil was stable in serogroup, but in barn floor it seemed to be unstable.

5. Most strains of *Ps. aeruginosa* isolated from milk and milking environments grew at 10°C, and there were strains capable of growing at 7°C in milking environments. Moreover, 6 strains capable of growing at 7°C were isolated from mammary quarters raw milk.

6. A strain from mammary quarters raw milk of cows suspected to be a latent chronic infection, showed a very high caseinase activity.