

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

雨宮淳三・田代哲之*

(昭和52年8月31日 受理)

Occurrence of Yeasts from Materials from Dairy Cows in Kagoshima

Junzo AMEMIYA and Tetsuyuki TASHIRO*

(Laboratory of Veterinary Public Health,

* Laboratory of Veterinary Surgery)

緒 言

ある種の酵母特に *Candida* sp. に属する数種は牛の乳房炎の起因菌とされ、殊に乳房炎治療のための抗生物質の使用による菌交代症として注目されてきているのは衆知のことである^{1,9)}。わが国でもその発生が報告されている^{4,12)}。また酵母は乳質にも影響を及ぼす。ところで自然界に広く存在する酵母^{8,13)}が実際如何なる様相で搾乳時に存在するかわが国では基礎的調査が充分でない。

外国では酵母性乳房炎の報告の外に、牛の排泄物よりまた盲腸よりの酵母分離の報告^{6,8,14)}があるとともに、健康牛乳房炎罹患牛の乳より分離比較した報告^{2,9,10,11)}がある。しかしそれぞれ別個になされている。著者らは南九州地方で、健康乳牛、乳房炎罹患牛を対象に、それらの乳および乳房汚染に影響の多いとみなされる糞について酵母とくに *Candida* sp. の調査を行なったので報告する。

材料および方法

飼育地域と飼料条件の異なる(購入飼料依存都市近郊型、草依存山間型)数カ所を選びそれぞれの地区で臨床および臨床検査上健康牛および乳房炎罹患牛とされるものについてそれらから個別別に乳、糞を採取し酵母を検出した。乳の採取にあたって分房乳別の検体採取をむねとしたが一部分房乳混乳検体もあり、データの処理は個別にした。乳は乳頭を清拭し二・三回しばった後の乳をとり、糞は排糞直後のものを採取した。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あるいは希釈し、糞は希釈しそれらの一定量を平板培地表面にとりガラス棒にて全面に塗布し培

養する方法を用い、37°C、室温で5日観察し、コロニーを数え菌数の測定を行なった。菌の同定は Lodder⁷⁾ および飯塚、後藤の著書⁸⁾に準拠しその型態、糖類の発酵性、資化性を調べ行なった。なお、乳房炎罹患牛はすべてなんらかの抗生物質が使用された症例である。

成績および考察

1. 糞よりの酵母の分離状況

Table 1 の如くで健康牛、乳房炎罹患牛を含め68例中酵母が検出されたもの48例で約70%に及んだ。糞1gあたり酵母数が 10^5 台は1例のみで 10^3 、 10^4 台のものが多い。また例数が少なく明確でなかったが成牛に比べ仔牛の方が検出度、検出酵母数が高い傾向にあった。糞中の菌数は飼料が同じグループで必ずしも一定せず、糞中の酵母数は飼料の影響よりも個体差によるものとみられる。

2. 乳よりの酵母の分離状況

Table 2 の如くで健康牛の分離状況は飼養地区により差がみとめられるが135例中検出されなかったもの(35例)および検出されても1ccあたり酵母数が100以下で培養法で数えるのに問題がある例(53例)であり、 10^2 、 10^3 台のものは47例で 10^3 台のものは7例であった。

乳房炎罹患牛では3地区75例で検索の結果検出されなかったもの(57例)1ccあたり100以下のもの9例で 10^2 、 10^3 台のものは9例で 10^3 台のものは4例であった。

乳1cc中 10^2 、 10^3 台検出されたものの検出率は健康牛で約35%乳房炎牛で約12%、 10^3 検出されたものの検出率は健康牛で約5%、乳房炎牛で約5%で、健康牛よりの検出率が乳房炎罹患牛のそれと比べ、

Table 1. Isolation of yeasts from the bovine feces

Sampling place	No. of sampled cows	No. of samples graded by no. of yeasts per g				
		10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	<10 ¹
Kagoshima city	21 Normal, adult	1	5	9	3	3
	9 Normal, calf		6	1	2	0
Osumi	10 Normal, adult		5		2	3
Kirishima	9 Mastitis		2	2	2	3
Tanegashima	19 Mastitis		3	3	2	11
Total	68	1	21	15	11	20

Table 2. Isolation of yeasts from mammary glands milk

Sampling place	No. of sampled cows	No. of samples graded by no. of yeasts per cc		
		10 ³	10 ²	<10 ¹
Normal				
Kagoshima city	44	2	2	40
		<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	
		<i>C. parapsilosis</i>	<i>Torulopsis</i> sp.	
Ijuin	23		10	13
Tanegashima	68	5	28	35
		<i>Sacch.</i> sp.		
		<i>C. krusei</i>		
Total	135	7	40	88
Mastitis				
Kirishima	25	1	2	22
		<i>C. tropicalis</i>	<i>Torulopsis</i> sp.	
Ijuin	30	2	1	27
		<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	
Tanegashima	20	1	2	17
		<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	
Total	75	4	5	66

10³ 台で同様であるが 10² 台を含めると健康牛が高いデータであった。一般に乳房炎罹患牛と健康牛よりの酵母検出率は乳房炎罹患牛のそれが高い報告である。Mehnert ら⁹⁾ (健康牛 250 頭から 3.1%, 分房に異常のある 100 頭 118 分房より 26.4%) Monga ら¹⁰⁾ (健康牛 0.9% 乳房炎牛, 6.7%), Farnsworth²⁾ (健康牛分房より 3.2%)。検体数と検体採取法 (一部分房乳混乳を供用) で以上の報告と直接比較し得ないが、当地方では健康牛からもかなり酵母が検出されるデータであった。Rey Fernández¹¹⁾ のスペインでの報告の低湿地域でその検出率が高かったというデータと考え合せ九州地方の高温高湿の気候的条件が飼育条件とともに影響しているのかも知れない。このことはまた参考に行なったミルクプラントでの混合乳の調査でも

季節的に高温高湿の 6 月が 3 月に比べ明瞭な差が認められていることから推測される (Table 5)。なお、比較的多く酵母の検出された例で酵母が乳房炎と何らかの関係があったものと推測されるが、細菌がそれぞれ検出されており、また 1 例糸状菌も認められ酵母のみが検出されたのではなく、またその上酵母による乳房炎と決定するには臨床上の資料が充分でなかった。

3. 乳と糞よりの酵母検出数の関連について

搾乳時に糞の汚染はない状態で通常搾乳されるとしても糞の牛体への付着がみられる状態であるので糞中の酵母数が多いことが乳房内に酵母が入りやすい関係にあるとも推測されるので糞中の酵母数と乳中のそれとの関連を 7 頭の乳牛で調べてみた。

その結果が Table 3 で特に関連は認められないデ

Table 3. Relation between the numbers of yeasts isolated from feces and the numbers from mammary glands milk

Sampled cows	No. of isolated yeast from the feces (per g)*				No. of isolated yeasts from mammary glands milk (per cc)		
	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	1st Exam.	2nd Exam.	3rd Exam.
No. 1			+		neg.	neg.	neg.
2				+	3×10 ²	3.5×10 ²	6×10 ²
3		+			neg.	neg.	neg.
4	+				neg.	neg.	neg.
5			+		5×10 ²	1.4×10 ²	4×10 ²
6			+		neg.	neg.	neg.
7		+			neg.	neg.	neg.

* Averaged number of 3 times examinations were graded by order

Table 4-A Species of dominant strains isolated from the bovine feces

Species	Number of strains	Species	Number of strains
<i>Candida albicans</i>	3	<i>Torulopsis glabrata</i>	3
<i>C. tropicalis</i>	11	<i>Torulopsis</i> sp.	2
<i>C. krusei</i>	7	<i>Pichia fermentans</i>	2
<i>C. parapsilosis</i>	2	<i>Pichia</i> sp.	1
<i>C. utilis</i>	2	<i>Saccharomyces</i> sp.	5
<i>C. stellatoidea</i>	2		
<i>Candida</i> sp.	3		

Table 4-B Species of dominant strains isolated from mammary glands milk

Species	Number of strains	Species	Number of strains
<i>Candida tropicalis</i>	2	<i>Torulopsis glabrata</i>	3
<i>C. krusei</i>	8	<i>Saccharomyces</i> sp.	4
<i>C. parapsilosis</i>	1		

Refer to table 2

一タであった。なお牛の体表での酵母の存在をみるため7頭について乳房に近い下腹部体表 30×30 cm を滅菌布でぬぐいとりそれを滅菌蒸留水で震盪しその液を培養に供した。いずれも200以上500以下で10²台であった。これによると数は少ないが体表にも酵母は存在し乳頭より乳腺内に侵入する機会のあることを示している。

4. 糞および乳より分離された酵母の種類について

A 糞 糞より菌数10³台以上検出されたものについて同定を試みた。同定できたもの43株はTable 4-Aである。*Candida* sp.に属するものが大半を示め、*Candida* sp.のうちでも*Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*に属するものが主であった。乳房炎起因性菌が比較的多く検出された。

B 乳 健康牛の乳より10³台で検出されたもの乳房炎罹患牛では10²台で検出された検体の中菌数の多

いものを含め、それぞれの優勢株18株について同定した結果はTable 4-Bである。*C. tropicalis* 2, *C. krusei* 8, *C. parapsilosis* 1, *Torulopsis glabrata* 3, *Saccharomyces* sp. 4であった。乳房炎起因性の*Candida* sp.が乳房炎罹患牛からも健康牛からも分離された。Table 5は参考のためミルクプラントで集乳地域別に集乳かんよりサンプリングした混合乳よりのデータである。両地域での検体採取は3月、6月の二季であるが両地域とも6月が3月と比べ明らかに検出酵母数が多く季節差が認められた。また、地域差も認められた。検出酵母の種類は詳細に検索していないが*Candida* sp., *Torulopsis* sp., *Saccharomyces* sp., *Pichia* sp.の外に*Rhodotorula* sp.に属するものがかなり認められた。

Weigt¹⁵⁾は、酵母性乳房炎は非衛生的搾乳或いは、乳房取扱いによってうつされたりひきおこされるので

Table 5. Isolation of yeasts from dairy plant milk

Sampling place (date)	No. of sampling	No. of samples graded by no. of yeasts per cc		
		10 ³	10 ²	10 ¹
Fukuoka (March)	39	5	12	22
Fukuoka (June)	43	9	11	23
Kagoshima (March)	30		14	16
Kagoshima (July)	41	2	24	15

なく酵母に汚染した抗生物質で以前に治療された牛におこると報告している。酵母汚染の抗生物質の使用は問題であろうが著者らの調査で乳房炎に関係のない健康牛の中から比較的多く酵母が検出されることから汚染した抗生物質の使用とは別に、何らか普通の乳腺内細菌汚染と同様な方法で酵母が乳腺内に侵入するものとみられる。

前述の糞中の酵母数と乳中の酵母数との関係から推定するに肉眼的にみた非衛生状態（例えば酵母を含む糞が乳房に付着していると云った）の牛の乳中に必ずしも酵母が存在するとはかぎらないので非衛生的な取り扱いが必ずしも酵母性乳房炎をひきおこす要因とはならないが、衛生的に取り扱われたとしてもまた乳腺内に酵母が存在しないとも云えない。乳腺内に入った酵母が増殖する要因またそれらが乳房炎をおこす要因について種々推定された報告もなされているが、著者らのデータはそれに言及しうるものではない。ただ Farnsworth ら³⁾の実験的に抗生物質使用または不使用にわけて *C. krusei* を乳腺内に接種し、両群に差を認められなかったと云う報告は、著者らの調査での、健康牛群、乳房炎罹患牛群の乳からの *C. krusei* の検出状況と考え合せ興味あるものとみなされる。

乳房炎からの酵母の検出にあたって当然糸状菌が問題になるが、糸状菌の検出については別に報告する予定である。今回の酵母の検索で乳房炎分房別のデータを検討した結果からは酵母の検出されたものの中酵母のみのケースが 2/3、糸状菌をともなったものが 1/3 であって、酵母が分離されなく糸状菌のみ分離されたケースはなかった。

Rey Fernández¹⁾ は酵母数と糸状菌との間に逆の相関があるとしているがその様な結果ではなかった。なお、健康牛を含めて地域別で検討をしたところ検出率がどちらも高いというケースはなく、酵母と糸状菌の検出率が高いところでは片方の検出率は極めて低かった。

要 約

鹿児島地方で健康乳牛および乳房炎罹患乳牛の糞および乳より、酵母の検索を行ない、次のデータを得た。

1) 68 頭の乳牛の糞より酵母を検索し、検出率は 70% で菌数は 1g あたり 10³~10⁴ 台のものが大半であった。検出株の種類は *Candida* sp., *Torulopsis* sp., *Saccharomyces* sp., *Pichia* sp. 等で *Candida* sp. の中では *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* に属する株数が多かった。

2) 健康乳牛 135 頭乳房炎罹患牛 75 頭の乳より酵母を検索した結果 1cc あたり 10² 台以上を示すものそれぞれ 47 例、9 例 10³ 台でそれぞれ 7 例、4 例で乳房炎罹患牛よりの検出率は健康牛のそれより高くなかった。検出酵母数の多かったものの種類は *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *Torulopsis glabrata*, *Saccharomyces* sp., であった。

3) 糞中の酵母数と乳中のそれとの間には関連はなかった。

4) ミルクプラントでの集乳かん別の混合生乳のほとんど全部から酵母は検出され、その半数は 1cc あたり 10²~10³ 台でその数は地域差、季節差が認められた。

謝 辞

検体の採取にあたり、鹿児島県農業共済家畜診療所一氏明治氏、野尻盛喜氏、富永正興氏、郡山不二夫氏、本学の故吉本義徳技官の御協力に負うところが多く、厚く謝意を表します。又研究の一部は森永奉仕会の研究奨励金によったことを記し、謝意を表します。

文 献

- 1) 東 量三：カンジダ症；越智勇一編家畜伝染病学. p. 631-638, 南江堂, 東京 (1970)
- 2) Farnsworth, R. J. and Sorensen, D. K.: Prevalence and species distribution of yeast in mammary glands of dairy cows in Minnesota. *Canadian J. of Comparative Medicine*,

- 36, 329-332 (1972)
- 3) Farnsworth, R. J. and Sorensen, D. K.: Effect of penicillin, dihydrostreptomycin and prednisolone treatment of experimental *C. krusei* infections of the mammary glands of dairy cattle. *Canadian J. of Comparative Medicine*, **39**(3), 340-348 (1975)
- 4) 福永 伸・太田垣公利・清水亀平次・白幡敏一・小西辰雄・一条 茂: *Candida tropicalis* による牛乳房炎例について. 日獣会誌, **20**, 107-109 (1967)
- 5) 飯塚 広・後藤昭二: 酵母の分類同定法. 東京大学出版会, 東京 (1969)
- 6) Krabisch, P. and Amtsberg, G.: Zum Vorkommen von Hefen im Untersuchungsmaterial von Haus- und Zootieren. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **81**(2), 40-42 (1974)
- 7) Lodder, J.: *The yeasts*, North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1970)
- 8) Lund, A.: Ecology of yeasts. In Cook, A. H. (ed), *Chemistry & Biology of Yeasts*, 763-91, Academic Press Inc., New York (1958)
- 9) Mehnert, B., Ernst, K. and Gedek, W.: Hefen als Mastitiserreger beim Rind. *Zbl. Vet. Med., Reihe A*, **11**, 97-121 (1964)
- 10) Monga, D. P. and Kara, D. S.: Prevalence of mycotic mastitis among animals in Haryana. *Indian J. of Animal Sciences*, **41**(9), 813-816 (1971) *cit. in Rev. of Medical & Vet. Mycology*, **8**(2), 183 (1973)
- 11) Rey Fernández, M.: Incidence of yeasts in milk supplies in Leon. *Anales de la Facultad de Veterinaria de Leon*, **18**(1), 95-150 (1972),
- 12) 高桑一雄・池本安夫・杉村崇明・金城俊夫: *Candida albicans* による牛乳房炎について. 日獣会誌, **19**, 100-104 (1966)
- 13) 椿 啓介: 酵母の生態, 橋谷義孝編, 酵母学, 136-151, 岸波書店, 東京 (1967)
- 14) van Uden, N. and Do Karmo Sousa, L.: Yeasts from the bovine caecum. *J. gen. Microbiol.*, **16**, 385-395 (1957)
- 15) Weigt, U.: Untersuchungen über die bovine Hefemastitis unter besondere Berücksichtigung ihrer Entstehung. *Habilitationschrift. Tierärztliche Hochschule*, Hannover, 160 (1973) *cit. in Rev. of Medical and Vet. Mycology*, **12**(1), 84 (1977)

Summary

From the veterinary point of view, ecological investigations of yeasts on dairy cows are desirable not only to obtain information on the relationship between the bovine yeast flora and the bovine yeast diseases, particularly yeast mastitis, but also to obtain basic knowledge necessary for the ascertainment of a role of yeast on the quality of milk.

The isolation of yeasts from mammary glands milk and from feces of dairy cows including cows with mastitis was carried out, and the results obtained are summarized as follows.

1) 70% of fecal samples of 68 cows were positive (>100 colonies per g), and most of their counts were ranged from the level of 10^3 to 10^4 per g.

C. krusei, *C. tropicalis*, *T. glabrata*, and *Saccharomyces* sp. were frequently isolated.

2) From mammary glands milk sample, 47 of 135 healthy cows positive (>100 per cc), and 9 of 75 cows with mastitis were positive by unexpectedly low rate.

Strains from the high count samples are identified belonging to *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *T. glabrata*, and *Saccharomyces* sp..

3) Special relationship between the count of mammary glands milk and the feces was not to be recognized.

4) From all of dairy plant milk samples yeasts were isolated and their average count level is 10^2 per cc. It was found that their counts differed in accordance with the areas and seasons in which they were counted.