

琉球大学学術リポジトリ

レサズリンテストを中心とする生乳の細菌学的検査 IV(畜産学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 日越, 博信, 八幡, 辰正, 森下, 龍郎, 佐伯, 雅子, 宇治, 達哉, Higoshi, Hironobu, Hachiman, Tatsumasa, Morishita, Tatsuro, Saeki, Masako, Uji, Tatsuya メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4068

レサズリンテストを中心とする 生乳の細菌学的検査 IV

日越博信*・八幡辰正*・森下龍郎*・佐伯雅子*・宇治達哉*

Hironobu HIGOSHI, Tatsumasa HACHIMAN, Tatsuro MORISHITA
Masako SAEKI, Tatsuya UJI: Bacteriological examination of raw
milk with particular reference to resazurin test IV

I 緒 言

著者らは、沖縄県の生乳における細菌の汚染状況を知る目的で、まず工場持ち込み生乳について、次いで酪農家で段階別に採取した生乳、乳牛個別別に採取した生乳などについて調査を行ない、それぞれの成績を報告してきた^{4,5,6)}。これらの報告における生乳試料には直接のつながりはないが、総括すると生乳中の細菌数（主に直接個体鏡検法による総菌数）は搾乳後次第に増加し、工場持ち込み時には大多数の生乳が食品衛生法の規格である400万/mlを越えていた。

細菌数が次第に増加する原因については、幾つかあげられるが、なかでも生乳の冷却方法、酪農器具類の洗浄・消毒およびその後の器具類の保管方法に不備のあることがうかがわれた。しかし、乳牛個別別に採取した生乳であっても、細菌数はすでに400万/mlを越えるものがあり、なかには1,000万/ml以上の例もみられた。これは、上記の不備な点を改善するのみでは細菌数の減少につながらず、乳牛自体についても問題にすべきであると思われた。

そこで今回は、乳牛の各分房ごとに採取した生乳（分房乳）について、これまで同様レサズリンテスト（以下RT）、総菌数および細胞数を測定するとともに、生菌数の測定ならびに菌株の分離を行ない属までの同定を試みたので、得られた成績を報告する。

II 実験材料および方法

1. 調査対象酪農家と試料の採取方法

今回の調査対象酪農家は、沖縄本島南部の4町村における計6戸である。これらの酪農家は11～24頭の搾乳牛を飼養し、バケツまたはパイプラインミルクカーを使用していた。

試料は、外見的に異常の認められない搾乳牛について、1980年7～8月（夏季）に104頭および11～12月（秋季）に97頭から、それぞれ分房ごとに採取し、夏季には405試料、秋季には375試料、延べ780試料を得た。試料の採取は各酪農家の夕方搾乳時に行ない、まず乳房を清拭した後、70%アルコール綿で乳頭を消毒し、最初の3搾りを捨て、滅菌中試験管に約20mlずつ採取した。得られた試料は5℃以下のアイスボックスに入れて実験室に持ち帰り、直ちに実験に供した。

* 琉球大学農学部畜産学科

* 琉球大学農学部学術報告 28 : 239～245 (1981)

2. RTの方法, 総菌数および細胞数の測定方法

RTは常法⁸⁾に従って行ない、1時間培養の成績を採用した。総菌数および細胞数の測定はブリード法⁷⁾を用いて行なった。

3. 生菌数の測定方法と菌株の分離

生菌数の測定は標準寒天平板培養法⁷⁾に従い、標準寒天培地“栄研”を用いて35℃2日培養後出現した集落数を測定した。菌株の分離は夏季試料についてのみ行ない、1試料当たり5～6株を無作為に釣菌し、純化した後保存株とした。なお、生菌数の測定を行なった試料は各乳牛とも前分房の2試料である。

4. 分離菌株の同定

同定は形態学および生化学的性状によってBergey's Manual of Determinative Bacteriology²⁾ならびに医学細菌同定の手びき¹⁰⁾に準拠して行なった。同定に用いた主な試験項目はグラム染色性、形態、芽胞の有無、運動性、色素産生能、オキシダーゼ産生能、カタラーゼ産生能などである。

III 実験成績

供試した分房乳延べ780試料におけるRTの成績は、季節別に表1に示した。

Table 1. Distribution of class by resazurin test of raw milk samples from individual quarters of udder

Season	No. of sample	Class by resazurin test (One hour)					
		0	1	2	3	4	5
Summer	405	19 (4.7)*	188 (46.4)	164 (40.5)	23 (5.7)	8 (2.0)	3 (0.7)
Autumn	375	23 (6.1)	170 (45.4)	143 (38.1)	33 (8.8)	2 (0.5)	4 (1.1)
Total	780	42 (5.4)	358 (45.8)	307 (39.4)	56 (7.2)	10 (1.3)	7 (0.9)

*Number in parenthesis indicates percentage

RTでは、夏季および秋季試料ともに0～5級に分布し、また各級における試料の出現率も夏季と秋季で近い値を示した。ほとんどの試料は2級以下であったが、直接採取した新鮮な分房乳でありながらレサズリンを還元しない、すなわち0級の試料が意外に少なかった。また、少数とはいえ3級以上の試料がみられるが、これらのほとんどは後述のように細胞数が50万/ml以上であり、これがRTに影響していると思われる。

次いで総菌数の出現状況を表2に示した。

Table 2. Direct microscopic bacterial count of raw milk samples from individual quarters of udder

Season	No. of sample	Direct microscopic bacterial count/ml ($\times 10^4$)			
		≤ 0.5	0.6 ~ 5.0	5.1 ~ 10.0	> 10.1
Summer	405	263 (64.9)*	103 (25.5)	19 (4.7)	20 (4.9)
Autumn	375	263 (70.1)	97 (25.9)	6 (1.6)	9 (2.4)
Total	780	526 (67.5)	200 (25.6)	25 (3.2)	29 (3.7)

* Number in parenthesis indicates percentage

総菌数は、夏季および秋季ともにほとんどの試料が5万/ml以下であった。この5万/ml以下の試料の出現率は夏季に比べて秋季でやや高かった。逆に総菌数の多い10.1万/ml以上の試料についてみると、夏季の20試料ではすべてが100万/ml以下であったのに対し、秋季の9試料では3試料が100万/mlを越え、秋季試料には総菌数の極端に多い例がみられた。

35℃ 2日培養による生菌数の出現状況は、表3に示した。なお、夏季の1試料で生菌数の測定不能があったが、表ではこれを 10^4 に含めた。

Table 3. Viable bacterial count of raw milk samples from individual quarters of udder at 35℃ for 2 days

Season	No. of sample	Viable bacterial count/ml				
		10^0	10^1	10^2	10^3	10^4
Summer	198	45 (22.7)*	55 (27.8)	48 (24.2)	39 (19.7)	11 (5.6)
Autumn	187	19 (10.2)	50 (26.7)	59 (31.5)	46 (24.6)	13 (7.0)
Total	385	64 (16.6)	105 (27.3)	107 (27.8)	85 (22.1)	24 (6.2)

* Number in parenthesis indicates percentage

分房乳における生菌数は、1ml当り 10^0 台から 10^4 台の範囲にあったが、多くの試料のそれは 10^1 ~ 10^3 台であった。季節別にみると、夏季試料では多くが 10^0 ~ 10^2 台に、秋季試料では多くが 10^1 ~ 10^3 台にあり、上記の総菌数の出現状況とは若干異なり秋季試料に生菌数の多い傾向を示した。

なお、表示はしなかったが、夏季試料については、5℃10日培養による低温細菌数の測定も行なった。その結果、99.0%の試料は1ml当り10個未満であり、分房乳中には低温細菌がほとんど存在しないこと

Table 4. Incidence of organisms isolated from raw milk samples at 35°C incubation

Organism	No. of strain (%)
Staphylococcus	273 (57.1)
Micrococcus	42 (8.8)
Streptococcus	15 (3.1)
Corynebacterium	28 (5.9)
Acinetobacter	18 (3.8)
Flavobacterium	9 (1.9)
Alcaligenes	1 (0.2)
Unclassified	92 (19.2)
Total	478

を示していた。

また、細胞数の出現状況についても表には示さなかったが、その概要は後述の表 6 からうかがえる。全体では 1ml 当り 0.5 万またはこれ以下から 1,000 万以上までの範囲にあったが、61.3% の試料は 25 万以下であった。しかし、細胞数による乳房炎の基準、50 万以上の例が 187 試料 (24.0%) もあった。この細胞数 50 万以上の試料の出現率は、夏季 (20.5%) に比べて秋季 (27.7%) に高く、とくに後者の試料では 100 万以上の出現率が高かった。

夏季試料については生菌数を測定後に菌株の分離を行ない、それらの同定を試みその成績を表 4 に示した。

同定された細菌の種類では *Staphylococcus* (57.1%) が圧倒的に多く、次いで多かったの

は *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Streptococcus* などであった。未同定の菌株でもグラム陽性の球菌が過半数を占め、これを含むグラム陽性の球菌および桿菌が全体の 85.7% に達した。なお、これらの細菌の出現率と RT の級の間にはとくに関連性はみられなかった。

次に、RT と生菌数の関係を表 5 に、また細胞数との関係を表 6 に、それぞれ示した。

Table 5. Relationship between resazurin test and viable bacterial count

Class by resazurin test	No. of sample	Viable bacterial count/ml				
		10^0	10^1	10^2	10^3	10^4
0	23	5 (21.7)*	8 (34.8)	8 (34.8)	2 (8.7)	0
1	173	34 (19.7)	51 (29.5)	48 (27.7)	32 (18.5)	8 (4.6)
2	152	22 (14.5)	40 (26.3)	46 (30.3)	35 (23.0)	9 (5.9)
3	26	3 (11.5)	4 (15.4)	5 (19.3)	11 (42.3)	3 (11.5)
4	7	0	2 (28.6)	0	2 (28.6)	3 (42.8)
5	4	0	0	0	3 (75.0)	1 (25.0)
Total	385	64 (16.6)	105 (27.3)	107 (27.8)	85 (22.1)	24 (6.2)

* Number in parenthesis indicates percentage

RT の級と生菌数の関係は、表 5 から RT で 3 級以上の試料数が少ないため余り明らかではないが、RT の級が大きいほど生菌数も多くなる傾向は示していた。すなわち、RT の 0 級および 1 級では多くの試料が生菌数 10^2 台以下であり、また 2 級では $10^1 \sim 10^3$ 台が、3 級では $10^2 \sim 10^3$ 台が、さらに 4 級および 5 級では $10^3 \sim 10^4$ 台が、それぞれ多い傾向を示した。なお、RT と総菌数の関係については、ほと

Table 6. Relationship between resazurin test and udder cell count

Class by resazurin test	No. of sample	Udder cell count/ml ($\times 10^2$)				
		≤ 5	6 ~ 25	26 ~ 49	50 ~ 99	≥ 100
0	42	20 (47.6)*	12 (28.6)	6 (14.3)	4 (9.5)	0
1	358	143 (39.9)	152 (42.5)	42 (11.8)	18 (5.0)	3 (0.8)
2	307	34 (11.1)	115 (37.5)	66 (21.5)	62 (20.2)	30 (9.7)
3	56	1 (1.8)	1 (1.8)	1 (1.8)	11 (19.6)	42 (75.0)
4	10	0	0	0	1 (10.0)	9 (90.0)
5	7	0	0	0	0	7 (100.0)
Total	780	198 (25.4)	280 (35.9)	115 (14.7)	96 (12.3)	91 (11.7)

* Number in parenthesis indicates percentage

んどの試料の総菌数が5万/ml以下であったため、明らかではなく採上げなかった。

RTと細胞数との関係は、表6に示したように、細菌数との関係に比べてより明らかであり、とくにRT2級以下と3級以上とで細胞数の出現状況が異なっていた。すなわち、RTで0級および1級のほとんどは細胞数が25万以下であり、また2級の大多数は50万未満であった。これに対し、RTで3級以上のほとんどの試料は細胞数が50万以上であり、とくに4級および5級では100万以上であった。これらの成績は、細菌数だけでなく細胞数もRTに影響することを示している。しかも細胞数が50万以上の生乳は乳房炎と見なされるため、今回のような分房乳におけるRTの成績が乳房炎の検出にも役立つかも知れない。

なお、この調査で用いた分房乳については、California Mastitis Test (CMT)による乳房炎の検出、同陽性乳汁からの黄色ブドウ球菌の分離、分離菌株の薬剤感受性についても検索中であり、これらの成績ならびにRTとCMTの関係などについては別の機会に報告したい。

IV 考 察

著者らは、1977年の工場持ち込み生乳の調査以来、本県の生乳における細菌の汚染状況を明らかにするとともに、細菌の汚染源を探索しつつさかのぼって今回の分房乳の調査まで進めてきた。今回および前回までの成績を総括すると、すでに記述したように分房乳ではほとんどの試料が総菌数5万/ml以下であるのに対し、工場持ち込み生乳では大多数の試料が400万/ml以上であり、この間に細菌数が著しく増加したことを示している。しかし、一連の調査で用いた試料は直接のつながりがなく、また工場生乳の成績は4年前のものであるため関連させて論じるべきではないかもしれない。さらに現在では、県酪農組合の指導の下に、ほとんどの酪農家がバルククーラーを設置して生乳を冷却しているし、生乳の輸送にもタンクローリーが使用され、本県でも細菌学的な面からの乳質改善にはかなり気を配るようになった。

バルククーラーの使用およびタンクローリーによる生乳の輸送は、低温細菌の増殖とそれによる品質悪化という新たな問題が発生してくる。しかし、調査した分房乳には低温細菌がほとんどみられず、ま

た中温細菌数も多くは 10^3 台以下であり、分房乳中に細菌が存在していたとしても多くは中温細菌に属するものと見なせる。これらの細菌の増殖を抑え、新たな汚染を防止できれば細菌学的に良質な原料乳を得ることができる訳で、そのためには生乳の冷却温度を 5°C 前後に保つことと、ミルカーを含む生乳の触れる酪農器具類の完全な洗浄・消毒を行なう必要がある³⁾。

一方、RTは主として生乳の鮮度判定の目的で細菌数の大略を推定するのに応用されるもので、今回の分房乳のように極めて新鮮で、細菌数も少ない場合には、RTを上記の目的で実施する意義はほとんどないと思われる。実際に、今回のRTの成績は大多数の試料が2級以下であり、またRTの成績と細菌数との関係も明確ではなかった。しかし、RTと細胞数の間には関連性があるように思われ、とくにRTで3級以上の73試料中70試料(95.9%)は細胞数が50万以上であった。この細胞数が50万以上というのは乳房炎の基準にもされている⁹⁾ことから、すでにThomas (S)とThomas (B)¹¹⁾も示唆しているように分房乳におけるRTは乳房炎の検出方法の一つとして応用できそうである。RTの級と乳房炎の判定については今後も試料数を増やして検討したいが、今回の成績から3級以上は異常乳と見なしてよいと思われる。RTで2級の試料については、細胞数50万以上の試料が30.0%もあったから、要注意の生乳として他の検査も行なううえで判断すべきであろう。

35°C 2日培養による生菌数測定後に分離された菌株の種類では、*Staphylococcus* (57.1%)が圧倒的に多く、このほかに*Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*などを含むグラム陽性の細菌が85.7%を占め、グラム陰性の細菌は少なかった。分房乳または乳房乳から分離される細菌は、グラム陽性の細菌とくに球菌類が多いとされ^{1,3)}、今回の成績でもそれが裏付けられた。なお、細菌の種類とRTの級の間に関連性はみられなかった。

V 要 約

著者らは1977年以来沖縄県の生乳における細菌の汚染状況を調査してきた。今回はその一環として乳牛の各分房から直接採取した生乳について調査を行ない、次のような成績を得た。

夏季(1980年7~8月)および秋季(11~12月)に採取した延べ780試料におけるRTの成績では0~5級に分布したが、ほとんどの試料(90.6%)は2級以下であった。総菌数は93.1%の試料が5万/ml以下であった。また 35°C 2日培養による生菌数は、 10^0 /ml台から 10^4 /ml台の範囲にあったが、多くの試料のそれは 10^1 ~ 10^3 /ml台であった。細胞数は76.0%の試料が49万/ml以下であったが、100万/ml以上の試料も11.7%みられた。細胞数が100万/ml以上の試料の多くはRTで3~5級を示した。分離菌株の種類では*Staphylococcus* (57.1%)が最も多く、次いで*Micrococcus* (8.8%), *Corynebacterium* (5.9%), *Acinetobacter* (3.8%), *Streptococcus* (3.1%)の順であったが、これらの出現頻度とRTの級の間に関係はみられなかった。

試料の採取にご協力いただいた各酪農家ならびに県酪農組合久場良保氏に感謝する。

引 用 文 献

1. Bacic, B., Jackson, H. and Clegg, L. F. L. 1968 Distribution of bacteria in milk drawn directly from the cow's udder, *J. Dairy Sci.*, 51: 47~49
2. Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. 1974 *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams & Wilkins, Baltimore
3. 日越博信, 浜田輔一 1976 搾乳直後分房乳における低温細菌群, *食衛誌*, 17: 27~33

4. ———, 大城盛徳, 赤嶺辰雄, 田港朝明 1977 レサズリンテストを中心とする生乳の細菌学的検査, 琉大農学報, 24: 487 ~ 497
5. ———, 久場良保, 大城義正 1978 レサズリンテストを中心とする生乳の細菌学的検査 II, 琉大農学報, 25: 411 ~ 420
6. ———, 森山高広, 諸見康秀 1980 レサズリンテストを中心とする生乳の細菌学的検査 III, 琉大農学報, 27: 315 ~ 322
7. 厚生省環境衛生局監修 1973 食品衛生検査指針 I, 東京, 日本食品衛生協会
8. ————— 1978 食品衛生検査指針 II, 東京, 日本食品衛生協会
9. 村瀬信雄 1976 牛の乳房炎: 一つの考え方, 日獣会誌, 29: 307 ~ 315
10. 坂崎利一訳 1974 Cowan & Steel 医学細菌固定の手びき, 第2版, 東京, 近代出版
11. Thomas, S. B. and Thomas, B. F. 1974 The development of dye reduction test for the bacteriological grading of raw milk 2: Resazurin test, Dairy Inds., 39: 31~34

Summary

We have been making surveys to explore the extent of bacterial contamination of raw milk in Okinawa Prefecture since 1977. This report presents the results of bacteriologic examination of raw milk specimens collected directly from individual quarters of the udder of cattle.

A total of 780 samples obtained during summer (July-August, 1980) and autumn (November-December, 1980) ranged from class 0 to 5 on resazurin tests, a great majority (90.6%) being found to be class 2 or lower. The direct microscopic bacterial count was less than 50,000/ml in 93.1% of the specimens. The viable bacterial count on a 2-day incubation at 35°C ranged from <10 to <10⁵/ml, being between 10¹ and 10³/ml in a great majority of the specimens. In 76.0% of all specimens the udder cell count was less than 490,000/ml, while 11.7% showed counts of not less than 1,000,000/ml. A large majority of the samples containing not less than 1,000,000/ml were found to be between classes 3 and 5 on the resazurin test. Most frequently isolated bacteria from raw milk were those of the genus *Staphylococcus* (57.1%), followed, in order, by *Micrococcus* (8.8%), *Corynebacterium* (5.9%), *Acinetobacter* (3.8%), and *Streptococcus* (3.1%).