

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 III(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, 森山, 高広, 諸見, 康秀, Higoshi, Hironobu, Moriyama, Takahiro, Moromi, Yasuhide メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4112

レサズリンテストを中心とする生乳の細菌学的検査 III

日越博信* 森山高広* 諸見康秀*

Hironobu HIGOSHI, Takahiro MORIYAMA, Yasuhide MOROMI :
Bacteriological examination of raw milk with particular
reference to resazurin test III

I 緒 言

著者らはこれまでに、工場持ち込み生乳および酪農家で段階別に採取した生乳の細菌による汚染状況の調査を行ない、沖縄県の生乳における細菌学的品質の改善が急務であること、また改善の方策についても言及してきた。さらに、それらの中で、乳房乳においてあるいは工場持ち込み生乳においても、細胞数が50万/mlを越え、California Mastitis Test (CMT)で凝集し、乳房炎乳を疑わせる例があることを指摘した。^{3,4)}

乳牛の乳房炎は、乳量の減少はもちろん生乳の細菌学および理化学的品質にも悪影響を与えることから、酪農家の受ける経済的損失は極めて大きい。^{1,5,7)} そのために乳牛の乳房炎については、早くから研究がなされ多くの報告^{6,7,9)}があるが、いまだに乳房炎の発生については全国で問題にされている。

今回著者らは、本県における生乳の細菌による汚染状況を調査するとともに、乳牛の乳房炎罹患状況を知るための予備調査として、乳用牛群改良推進事業に参加している酪農家の生乳について、これまで同様レサズリンテスト (RT)、総菌数および細胞数の検査を行ない、さらにCMTによる乳房炎乳の検出を試みたので、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豊見城、糸満、具志頭、東風平、大里、南風原、玉城、佐敷、金武、宜野座の10市町村にあって、乳用牛群改良推進事業に参加を希望した17戸であり、これらはすべてミルカーを使用していた。

試料は、1979年5月～12月に各酪農家の乳牛(6～48頭)から個体別に朝搾乳されたもので、指導を受けた検定員によってバケットミルカー使用酪農家(11戸)ではバケットから、パイプラインミルカー使用酪農家(6戸)では乳量計から約100 ml採取され、冷却されて県の畜産試験場に運ばれてきた生乳である。それらの生乳から滅菌中試験管にそれぞれ約20 mlずつ移し、アイスボックスに入れて研究室に持ち帰り、直ちに実験に供した。各酪農家1～3回の検査を行ない、延べ881試料を得た。

* 琉球大学農学部畜産学科

2. RTの方法並びに総菌数、細胞数の測定方法

RTの方法は常法に従い、また総菌数および細胞数の測定方法は食品衛生検査指針¹¹⁾のブリード法を用いた。なお、これらの方法については前報^{3,4)}に記述したので、ここでは省略する。

3. CMTの方法

CMTは診断液としてPLテスト（日本全業工業）を用いて実施した。判定は判定標準表に従って凝集の程度を一、土、十、廿、卅および卅卅の6段階に、また色調の変化を一、土、十および廿の4段階に分けて行なった。しかし、今回の成績では凝集のみを乳房炎乳の判定基準とし、凝集の程度が十以上のものを陽性とした。

III 実験成績

まず、採取した延べ881試料についてのRTの成績は、酪農家を搾乳牛の飼養頭数によって3群に分け、それらの規模別に表1に示した。

Table 1. Distribution of class by resazurin test of raw milk samples

Size of farm	No. of farm	No. of sample	Class by resazurin test (One hour)					
			0	1	2	3	4	5
≤ 14 cows	4	62 (100.0)*	12 (19.4)	13 (21.0)	21 (33.9)	13 (21.0)	0	3 (4.8)
15~29 cows	11	653 (100.0)	114 (17.5)	204 (31.2)	254 (38.9)	59 (9.0)	15 (2.3)	7 (1.1)
≥ 30 cows	2	166 (100.0)	26 (15.7)	65 (39.2)	50 (30.1)	16 (9.6)	2 (1.2)	7 (4.2)
Total	17	881 (100.0)	152 (17.3)	282 (32.0)	325 (36.9)	88 (10.0)	17 (1.9)	17 (1.9)

* Number in parenthesis indicates percentage

表に示されるように、各規模の試料はほぼ0~5級に分布したが、いずれの規模においても大多数の試料が2級以下であった。この2級以下の試料の出現率は、15~29頭の中規模酪農家で最も高く、14頭以下の小規模酪農家で最も低かった。しかし、今回の試料は搾乳直後のバケツ乳が主であったが、レサズリンを全く還元しない、すなわち0級の試料は予想外に少なかった。

次いで直接個体鏡検法による総菌数の出現状況を、やはり飼養規模別に表2に示した。

ほとんどの試料は乳等省令の規準（400万/ml）以下であり、しかもそれらの大多数は100万以下であった。しかし、少数とはいえ搾乳直後の試料においてもすでに1,001万以上の例があり、注目される。

この総菌数の出現状況を規模別にみると、400万以下の試料の出現率は14頭以下の規模で79.0%、15~29頭の規模で94.8%、30頭以上の規模で90.4%であり、小規模酪農家の試料に比べて中および大規模酪農家の試料で若干よい成績を示した。

なお、表示はしなかったが、14頭以下の酪農家1戸および15~29頭の酪農家3戸、計4戸については

Table 2. Direct microscopic bacterial count of raw milk samples

Size of farm	No. of farm	No. of sample	Direct microscopic bacterial count/ml ($\times 10^4$)			
			< 100	101~400	401~1000	> 1001
≤ 14 cows	4	62 (100.0)*	41 (66.1)	8 (12.9)	8 (12.9)	5 (8.1)
15 ~ 29 cows	11	653 (100.0)	524 (80.3)	95 (14.5)	25 (3.8)	9 (1.4)
≥ 30 cows	2	166 (100.0)	125 (75.3)	25 (15.1)	8 (4.8)	8 (4.8)
Total	17	881 (100.0)	690 (78.3)	128 (14.5)	41 (4.7)	22 (2.5)

* Number in parenthesis indicates percentage

初夏（5～6月）、夏季（7～9月）および秋季（10～12月）の3回検査を行なったので、季節別に総菌数の出現状況を比較してみた。その結果、400万以下の試料の出現率は初夏で83.6%、夏季で78.7%、秋季で100%であり、秋季に比較して夏季または初夏で悪い成績を示した。

RTの級と総菌数の関係については、表3に示した。

Table 3. Relationship between resazurin test and direct microscopic bacterial count of raw milk samples

Class by resazurin test	No. of sample	Direct microscopic bacterial count/ml ($\times 10^4$)				Average
		< 100	101~400	401~1000	> 1001	
0	152 (100.0)*	145 (95.4)	7 (4.6)	0	0	20.8 \pm 44.9
1	282 (100.0)	260 (92.2)	22 (7.8)	0	0	26.2 \pm 49.9
2	325 (100.0)	252 (77.5)	66 (20.3)	7 (2.2)	0	69.0 \pm 101.5
3	88 (100.0)	30 (34.1)	29 (32.9)	24 (27.3)	5 (5.7)	334.8 \pm 386.2
4	17 (100.0)	3 (17.7)	4 (23.5)	5 (29.4)	5 (29.4)	759.9 \pm 654.0
5	17 (100.0)	0	0	5 (29.4)	12 (70.6)	2030.1 \pm 1609.0

* Number in parenthesis indicates percentage

RTで0級および1級を示した全試料と2級を示した325試料のうち97.8%は、総菌数が400万以下であり、乳等省冷の規程に合格であった。RTで3級を示した試料では67.0%が400万以下であった。しかし、この3級では総菌数が100万以下から1,001万以上の試料まであり、かなりばらつきがみられた。また、4級を示した試料においても、総菌数は100万以下から1,001万以上まで分布したが、過半数の試料は401万以上であった。なお、RTで4級を示し、総菌数が400万以下であった7試料中5は、細胞数が50万/ml以上であった。5級を示した試料では全例とも総菌数が401万以上であった。

次に、CMTによる乳房炎乳の検出状況については、凝集の程度で表4に示した。なお、表では凝集の程度が十～卍の試料を一括して示した。

Table 4. Degree of agglutination by California Mastitis Test of raw milk samples

Size of farm	No. of farm	No. of sample	Degree of agglutination by CMT		
			—	±	+ ~ 卍
≤ 14 cows	4	62 (100.0) *	51 (82.3)	5 (8.0)	6 (9.7)
15 ~ 29 cows	11	653 (100.0)	537 (81.5)	38 (5.8)	78 (11.9)
≥ 30 cows	2	166 (100.0)	130 (78.3)	23 (13.9)	13 (7.8)
Total	17	881 (100.0)	718 (81.5)	66 (7.5)	97 (11.0)

* Number in parenthesis indicates percentage

表に示されるように、CMTで凝集の程度が十以上を示し、乳房炎乳を疑わせたのは97試料で全体の11.0%であり、予想外の好成績であった。この乳房炎乳の出現率を規模別にみると、15~29頭の中規模が11.9%で最も高く、次いで14頭以下の小規模が9.7%、30頭以上の大規模が7.8%の順であったが、各規模間で大きな開きはなかった。

なお、各酪農家における乳房炎乳の出現率については表示しなかったが、ほとんどの酪農家のそれは

Table 5. Relationship between California Mastitis Test and udder cell count of raw milk samples

Degree of agglutination by CMT	No. of sample	Udder cell count/ml ($\times 10^4$)				Average
		0~25	26~49	50~99	> 100	
—	718 (100.0)*	637 (88.7)	70 (9.7)	7 (1.0)	4 (0.6)	15.6 ± 39.2
±	66 (100.0)	21 (31.8)	28 (42.4)	14 (21.2)	3 (4.6)	43.1 ± 41.7
+	45 (100.0)	9 (20.0)	15 (33.3)	12 (26.7)	9 (20.0)	58.5 ± 41.2
卍	23 (100.0)	1 (4.3)	3 (13.0)	8 (34.8)	11 (47.9)	105.0 ± 50.7
卍	19 (100.0)	0	1 (5.3)	4 (21.1)	14 (73.6)	201.8 ± 119.4
卍	10 (100.0)	1 (10.0)	0	1 (10.0)	8 (80.0)	403.6 ± 391.1
Total	881 (100.0)	669 (75.9)	117 (13.3)	46 (5.2)	49 (5.6)	

* Number in parenthesis indicates percentage

10%台以下であり、0%の酪農家も2戸あった。しかし、15~29頭の中規模に属した1戸では、乳房炎乳の出現率が42.5%であり、他酪農家に比べて異常に高い値を示した。さらに、この酪農家を含む4戸について、季節別にまとめてみたが、初夏で26.9%、夏季で22.7%、秋季で15.4%であり、乳房炎乳の出現率は次第に低くなった。

CMTによる凝集程度と細胞数の出現状況との関係を表5に示した。

ほとんどの試料は細胞数が1ml当り49万以下であったが、これらの大多数はCMTで一または±であった。CMTによる凝集の程度が強いほど細胞数は多くなる傾向を示し、凝集程度+で平均細胞数が50万を越えた。しかし、+程度を示した試料では、平均細胞数が50万以上とはいえず、過半数が49万以下であった。なお、細胞数が49万以下でありながら、CMTで卍および卍程度に強く凝集した試料が各1例みられたが、これらはRTで2級以下、総菌数が100万以下、さらにアルコールテストでも異常がなく、特殊な例と思われる。

CMTによる凝集程度とRTの級との関係を表6に示した。

Table 6. Relationship between California Mastitis Test and resazurin test of raw milk samples

Degree of agglutination by CMT	No. of sample	Class by resazurin test (One hour)					
		0	1	2	3	4	5
—	718 (100.0)*	145 (20.2)	250 (34.8)	234 (32.6)	67 (9.3)	9 (1.3)	13 (1.8)
±	66 (100.0)	5 (7.6)	17 (25.8)	38 (57.6)	3 (4.5)	1 (1.5)	2 (3.0)
+	45 (100.0)	1 (2.2)	9 (20.0)	26 (57.8)	4 (8.9)	4 (8.9)	1 (2.2)
卍	23 (100.0)	1 (4.3)	5 (21.8)	13 (56.6)	3 (13.0)	1 (4.3)	0
卍	19 (100.0)	0	0	10 (56.6)	9 (47.4)	0	0
卍	10 (100.0)	0	1 (10.0)	4 (40.0)	2 (20.0)	2 (20.0)	1 (10.0)
Total	881 (100.0)	152 (17.3)	282 (32.0)	325 (36.9)	88 (10.0)	17 (1.9)	17 (1.9)

* Number in parenthesis indicates percentage

すでに記述したように、ほとんどの試料がRTで2級以下であるため、CMTとRTの関係については明らかでなかった。しかし、CMTによる凝集の程度が卍および卍を示した試料では、RTで3級以上を示す例がやや多くなる傾向を示していた。

なお、CMTの凝集程度と総菌数の出現状況との関係についても検討してみたが、関係はほとんどみられなかった。この場合は、生菌数もしくは乳房炎起因菌の検索を行ない、関連性を検討する必要があると思われる。

IV 考 察

今回検査した試料は主としてバケツ乳であったが、全試料数の92.8%は総菌数が400万以下であり、前報⁴⁾の同様の試料についての成績に比べて若干よくなった。しかし、ごく少数例とはいえ1,001万以上の試料がみられたことは、ミルカーの洗浄、殺菌、その保管方法などにまだ問題がありそうであ

る。また、総菌数が400万以下という規準は工場持ち込み時の生乳におけるものであるため、搾乳後の生乳の取り扱い、冷却方法には十分注意して細菌数の増加を阻止する必要がある。

飼養規模別に総菌数が400万以下であった試料の出現率を比較すると、小規模酪農家では中または大規模酪農家より低い値を示し、悪い成績であった。しかし、小規模に属した4戸のうち1戸のみが極めて悪く、他の3戸は逆に非常によい成績であり、酪農家個々で著しく違っていた。なお、パイプラインミルカー使用酪農家の生乳は、バケットミルカー使用酪農家の生乳より総菌数が多いという報告⁸⁾もあるので、著者らも検討してみた。しかし、今回の成績ではそれとは逆に、バケットミルカー使用酪農家の生乳の方で総菌数が多い傾向を示した。この場合も酪農家個々で大きく異なり、搾乳器具の違いよりも、酪農家における器具の衛生管理を問題にすべきかもしれない。

季節別には前報³⁾の成績同様、夏季または初夏の試料は秋季の試料に比べて総菌数が多く、悪い成績であった。これは季節的な変動とも見なされるが、著者らの成績は途中で畜産試験場の係に報告したので、それが酪農家にも知らされて衛生面に注意を払うようになり、秋季には成績がよくなったとも考えられる。

R Tと総菌数との関係では、前報^{3,4)}および笹野¹³⁾の成績とはほぼ一致したことから、R Tで2級以下であれば総菌数は400万以下と見なして差支えない。しかし、今回の成績では、R Tで3級および4級を示した試料にも400万以下の例が多く、工場持ち込み時の生乳とは異なるようであった。これは搾乳直後の生乳と工場持ち込み時の生乳とでは細菌叢が異なること^{2,12)} またレサズリン還元力は細菌の種類によって異なること¹⁴⁾ などから、今回の3級または4級を示した試料中にはレサズリン還元力の強い細菌が存在していたのかもしれない。

一方、CMTによる乳房炎乳の検出率では、11.0%が陽性であり、意外に低い値であった。1970年および1971年に全国各地で調査された潜在性乳房炎の発生率をまとめた資料⁷⁾によると、頭数別では24~52%、平均46.6%、分房別では8~41%、平均21.9%であった。これらの成績に比較して今回の調査成績がいかによいかうかがえる。このように乳房炎乳の検出率が低かった理由としては、今回の調査対象が乳用牛群改良推進事業に積極的に参加を希望してきた酪農家であるため、乳質改善に対する関心が強く、衛生面あるいは乳牛の管理面にはとくに注意を払っていたものと考えられる。

また、乳房炎の発生率は飼養規模が大きいほど高いといわれ⁷⁾ その理由として頭数増加に伴ってミルカーの使用、飼養環境の悪化、一頭当りの管理時間の短縮などがあげられている。しかし、著者らの成績では、飼養規模別にみた乳房炎乳の出現率には大きな開きがなく、中規模に属した1戸のみが極端に高い出現率を示したにすぎなかった。さらに、試料の採取時期別に初夏、夏季および秋季に分けて乳房炎乳の出現率をみたが、次第に低率になった。これは、平間⁵⁾の北海道における調査結果とほぼ一致したが、前記のように季節的な変動なのか、あるいは著者らの成績が酪農家に知らされた結果の改善なのかは明らかでない。

CMTの凝集程度と細胞数の関係についてはすでに多くの報告^{7,9)}があり、それらによると凝集の程度が十を示した多くの試料では細胞数が50万を越え、凝集の程度が強いほど細胞数も増加した。今回の著者らの調査でもこれらとほぼ同じ成績であったが、凝集の程度が十の試料の過半数は細胞数50万未満であった。このことから、CMTで十程度の凝集を示した試料については、他の検査も行なって総合的に判断する必要があり、さらに検討したい。

CMTとR Tの関係についても検討したが、両者の間には明らかな関係を見いだせなかった。しかし、Thomas and Thomas¹⁵⁾はR Tが乳房炎乳などの異常乳の検出にも利用できることを示唆し、またKobayashi¹⁰⁾はR Tとレンネット試験を組み合わせた方法が乳房炎検出に有用であるとしていることから、これについても今後さらに検討する必要がある。

なお、CMTで十および十以上の凝集を示した試料については、*Staphylococcus*の分離も試みた。

しかし、コアグラーゼ陽性菌が少ないうえに、それが乳房内の細菌なのかあるいはバケツなどの器具由来なのか明らかでないため、本論文では取上げなかった。

V 要 約

著者らは、これまで本県における生乳の細菌学的品質を検査してきたが、今回はその一環として、乳用牛群改良推進事業に参加している酪農家の乳牛から得られた生乳について、RTを行なうとともに総菌数および細胞数を測定し、さらにCMTによる乳房炎乳の検出を試みた。

17酪農家の乳牛(6~48頭)を対象に1~3回検査を行ない、得られた延べ881試料のRTでは、0~5級に分布したが、大多数の試料(86.2%)は2級以下であった。総菌数では818試料(92.8%)が1ml当り400万以下であり、うち690試料は100万以下であった。乳牛の飼養規模別に、総菌数が400万以下を示した試料の出現率をみると、14頭以下の小規模酪農家(4戸)では79.0%、15~29頭の中規模酪農家(11戸)では94.8%、30頭以上の大規模酪農家(2戸)では90.4%であった。また、4戸の試料について季節別に400万以下の試料の出現率をみると、初夏(5~6月)が83.6%、夏季(7~9月)が78.7%、秋季(10~12月)が100%であった。

一方、CMTで凝集の程度が十~卅を示し、乳房炎乳を疑わせた試料数は97(11.0%)であり、意外に少なかった。この乳房炎乳の出現率は、小規模酪農家で9.7%、中規模酪農家で11.9%、大規模酪農家で7.8%であり、ほぼ同じ出現率であった。CMTによる凝集の程度と細胞数の関係では、凝集程度の強いほど細胞数が増加し、十程度で平均細胞数は1ml当り50万を越えた。また、CMTの凝集程度とRTの級または総菌数との関係は、いずれも明確でなかった。

貴重な試料を提供していただき、また調査にご協力いただいた沖縄県畜産試験場大動物室の大城幸盛、山内修および新田宗博の各氏並びに関係各位に感謝する。

参 考 文 献

1. Blosser, T. H. 1979 Economic losses from and the national research program on mastitis in the united states, *J. Dairy Sci.*, **62**: 119~127
2. 日越博信, 浜田輔一 1976 搾乳直後分房乳における低温細菌, *食衛誌* **17**: 27~33
3. _____, 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**: 487~496
4. _____, 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
5. 平間英夫 1969 乳牛の乳房炎の発生増加とその対策, *畜産の研究*, **23**: 1073~1077
6. 本田一良, 星野邦夫, 及川洋司, 松浦健二, 光崎研一, 吉田拓郎, 中野和彦, 斉藤武夫, 鮎瀬良一郎 1977 ウシ乳房炎に関する疫学的研究, I ウシ乳房炎の時空集積性, *Bull. Azabu Vet. Coll.*, **2**(2): 227~238
7. 飯塚三喜, 久米常夫, 原 茂, 野附巖 1979 牛の乳房炎, 東京, 日本獣医師会
8. 菊地政則, 松井幸夫 1976 バルククーラー貯蔵生乳の細菌学的品質に関する研究, *酪農科学・食品の研究*, **25**: A-119~124
9. 桐沢 統, 兼清知彦 1958 乳房炎の簡易診断法について, *日獣会誌*, **10**: 481~483
10. Kobayashi, Y. 1978 Simplified resazurin rennet test for diagnosis of mastitis,

- J. Dairy Sci., 61: 592~595
11. 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
 12. 中江利孝 1976 微生物学的見地からみた原料乳及び市乳の諸問題, 酪農科学・食品の研究, 25: A-233~240
 13. 笹野 貢, 岡田迪徳, 長南隆夫, 大浦義教 1974 レサズリン試験に関する研究, 酪農科学・食品の研究, 23: A-39~42
 14. 高野玉吉, 吉浜文雄, 加固政敏 1961 生乳細菌検査の直接鏡検法とレサズリンテストとの関係, 食衛誌, 2: 40~43
 15. 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

As a part of studies on bacteriological quality of raw milk in Okinawa Island, this survey was carried out with the resazurin test(RT), bacterial and udder cell enumerations and California Mastitis Test(CMT) for mastitis, on raw milk samples from cattle of dairy farmers participating in the Dairy Cattle Herd Improvement Promotion Project.

Each of the cows in seventeen farms(6 to 48 cows/farm) was examined on three occasions, with a total of 881 milk samples. By RT, the samples ranged from classes 0 to 5, a great majority(759 samples, or 86.2%) being found to be of class 2 or lower. The direct microscopic bacterial count was less than 4,000,000/ml in 818 samples(92.8%), of which 690 showed values of less than 1,000,000/ml. Seventy-nine per cent of the samples studied from small-size farms (4) maintaining 14 or less numbers of cows showed direct microscopic bacterial counts of less than 4,000,000/ml. Corresponding rates of the samples from middle-size farms (11) with 15 to 29 cows and those from large-size farms (2) with 30 or more cows were 94.8% and 90.4%, respectively.

Screening by CMT revealed an unexpectedly low incidence (97 samples, or 11.0%) of suspected mastitis, showing one- to four-plus reaction. The incidence was 9.7% in the group of small-size farms, 11.9% in the group of middle-size farms and 7.8% in that of large-size farms, respectively. As for interrelation of the CMT and the number of cells present in milk, the udder cell count increased progressively with increasing intensity of agglutination in the CMT; samples giving a one-plus reactions showed udder cell counts of more than 500,000/ml. There was no obvious correlation between the degree of agglutination in the CMT and the class in the RT or the direct microscopic bacterial count.