農場における真菌および Thermoactinomyces の調査

安里 章^{*1)} 瀬尾昌克^{*2)}

(昭和 61 年 9 月 19 日受理)

Fungi and Thermoactinomyces Detected on Stock Dairy Farms
AKIRA ANRI (Veterinary Clinic and Training Center, Federation of
Hokkaido Agricultural Mutual Aid Association, Ebetsu, Hokkaido 069) et al.

SUMMARY

A survey on fungi and Thermoactinomyces was carried out on bedding, hay and house dust on 3 dairy farms. Twenty-six species of 17 genera of fungi were isolated from bedding and hay, both of which had been baled with the roll baler, and 25 species of 13 genera of fungi from house dust. *Microsporysphaera rubro-rubescens* which belongs to Thermoactinomyces was isolated from house dust on one. Fungi isolated on every farm were *Aspergillus fumigatus* from bedding and hay, and *Cryptococcus uniguttulatus* and *Debaryomyces hansenii* from house dust. The number of fungi in bedding, hay and house dust was more than 10^4 /g.

Serologically, the human beings and dairy cows on these farms were found to have no significantly high titers against any particular fungal species and Thermoactinomyces.

要 約

北海道北見市の3戸の農場において、敷ワラ、乾草および house dust について真菌および Thermoactinomyces の検索を行った。ロールペーラーで梱包された敷ワラと乾草から17属26種、家庭内の house dust から13属25種の真菌を分離し、3戸中1戸の house dust からは Thermoactinomyces に含まれる *Microsporysphaera rubro-rubescens* を分離した。3戸から共通して分離された真菌は、敷ワラと乾草では *Aspergillus fumigatus* であり、house dust では *Cryptococcus uniguttulatus* と *Debaryomyces hansenii* であった。敷ワラ、乾草および house dust のそれぞれ1g中の総菌数は 10^4 以上であった。なお、農場で発生した農夫肺症の患者および飼育牛について血清学的検査を行ったが、これら分離菌に対して高い抗体価を保有するものはなかった。

近年、敷ワラおよび乾草をロールペーラーにより梱包することが普及してきたが、梱包内部は発酵熱で著しく高温となり、しばしば自然発火するほどである。したがって、梱包の内部は高温菌である真菌や Thermoactinomyces が繁殖する恰好の場といえる。

1983年より1984年にかけて北海道の道東地方に14例の農夫肺症 (Farmer's lung disease: FLD) が発生した¹²⁾。FLDは過敏性肺炎の1つで、被微牧草に繁殖する Thermoactinomyces に属する *Microsporysphaera faeni* (*M. faeni*) および *Thermoactinomyces vulgaris* (*T. vulgaris*) が抗原となり発病するとされている^{9,10,12)}。そこで、本症患者が発生した3戸の農場と、患者の発生のない2戸の農場を対象として、公衆衛生上の観点から敷ワラ、乾草および住宅

内の house dust 中の真菌および Thermoactinomyces を調査するとともに、患者および乳牛の真菌および Thermoactinomyces に対する抗体の保有状況について調査したので報告する。

1. 材料および方法

1) 検査対象農場

検査対象酪農家は FLD 患者の発生した北海道北見市内の専業酪農家3戸 (A, B および C) である。

患者の発症時の年齢、性別および *M. faeni* と *T. vulgaris* に対する counter immuno-electrophoresis 法^{14,21)} (CIE) による血清沈降抗体保有状況を表1に示した (*M. faeni* に対して1例, *T. vulgaris* に対して3例が陽性)。

また、同地域内の患者の発生のない2戸 (D および E) の酪農を営む農場を検査した。

2) 供試材料および検査方法

(1) 敷ワラと乾草: 5戸の農場の牛舎内ないしは倉庫

*1) 北海道農業共済組合連合会家畜臨床講習所 (江別市元野幌612)

*2) セオ臨床検査センター (北海道岩見沢市7条東1丁目)

表1 農夫肺症患者の *Micropolyspora faeni* と *Thermoactinomyces vulgaris* に対する抗体保有

農場	年齢	性別	沈降抗体*	
			<i>M. faeni</i>	<i>T. vulgaris</i>
A	56	女	—	+
B	66	男	+	+
C	28	女	—	+

注) *: counter immuno-electrophoresis 法による
+ : 陽性 — : 陰性

内にロールベラーにより梱包された敷ワラ (麦稈) と、乾草の可能な限り深部から2, 3点ずつ試料を採取した。A, B, DおよびE農場では1984年4月に, C農場では1984年5月に採材した。

糸状菌はBARRON²⁾, BOOTH³⁾, ELLIS⁵⁾, GAMS⁷⁾, NELSON¹⁶⁾, RAMIREZ¹⁷⁾, RAPER^{18, 19)} に従い同定した。また、酵母はBARNETT¹⁾ と LODDER¹³⁾, 放線菌はBUCHANAN⁴⁾ に従い同定した。培地としては、抗生物質無添加のサブロー寒天培地および5% 羊血液加寒天培地を用い、25℃, 37℃, 42℃ および55℃ の各温度で培養した。

敷ワラと乾草それぞれ1g中の総菌数は、培養温度別にサブロー寒天による混釈培養により真菌のみの総菌数を測定した。

(2) **house dust** : 1984年9月に患者発生酪農家の住宅内から電気掃除器を用いてhouse dustを採取し、敷ワラおよび乾草と同じように真菌およびThermoactinomycetesの分離同定と、house dust 1g中の総菌数を測定した。

(3) **血清学的検査** : A, B, DおよびEの4戸の農場に飼養されている0~11才齢ホルスタイン種乳牛を各農場から4頭ずつ無作為に抽出して採血し、血清を分離した。補体結合反応 (CF) により、各抗原について血清抗体価を測定した。また、患者3名の回復時の血清 (北見赤十字病院より提供) と、酪農とは無関係の都市生活者の血清 (北海道岩見沢市セオ臨床検査センター職員) についても検査した。

抗原とした菌種は、牛では敷ワラ、乾草およびhouse dustから分離した *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Byssoschlamyces nivea* と *Rhizopus nigricans* および保存菌の *Humicola* spp. と *Micropolyspora thermovirida* であ

表2 敷ワラと乾草から分離した菌種

農 場	A		B		C		D		E	
菌 種	b*	h**	b	h	b	h	b	h	b	h
<i>Absidia corymbifera</i>					+	+				
<i>Absidia</i> spp.					+	+				
<i>Alternaria alternata</i>			+	+			+	+		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+		+	+				
<i>Aspergillus fumigatus</i>								+		
<i>Byssoschlamyces nivea</i>							+			
<i>Cladosporium cucumerinum</i>			+	+			+			
<i>Cryptococcus gastricus</i>								+		
<i>Cryptococcus luteolus</i>								+		
<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>							+	+		
<i>Emmericella nidulans</i>					+					+
<i>Emricelopsis</i> spp.			+							
<i>Epicoccum purpula</i>			+							
<i>Fusarium solani</i>								+		
<i>Hansenula anomala</i> var. <i>anomala</i>		+								
<i>Hansenula subpelliculosa</i>									+	+
<i>Mucor pusillus</i>					+					
<i>Mucor</i> spp.	+	+	+	+			+	+	+	+
<i>Paecilomyces lilacinus</i>					+	+				
<i>Paecilomyces variotii</i>	+	+			+	+	+			
<i>Rhizopus ligefaciens</i>			+	+			+			
<i>Rhizopus nigricans</i>	+									
<i>Rhodotorula rubra</i>							+			
<i>Scoptulariopsis brevicaulis</i>							+			
<i>Syncephalastrum racemosum</i>			+							

注) *: 敷ワラ ** : 乾草 *** : 分離されたことを示す

った。また、患者および対照とした都市生活者は、敷ワラ、乾草および house dust から分離した *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani*, *Scopulariopsis brevicaulis* と *Thermomyces lanuginosus* および保存菌の *Acremonium kiliense*, *Cladosporium* spp., *Cryptococcus albidus*, *Humicola fuscoatra*, *Humicola* spp., *Microspolyspora rubrobrunea*, *Microspolyspora thermovirida*, *Rhizopus* spp. と *Thielavia minor* であった。

CF は、梅毒の緒方法に準拠して実施した。抗原としては、それぞれの菌種を 3 カ月培養して得られた培養液 (yeast 加サブロー液体培地) を透析、濃縮し多糖体を分離し、これを適当濃度 (50% 溶血価を測定) に溶解したものを使用した。

2. 結 果

1) 敷ワラと乾草からの分離菌

4 通りの温度で培養した結果、分離した真菌の菌種は 17 属 26 種であった (表 2)。 *Aspergillus fumigatus* をすべての農場の検体から、 *A. niger* は患者発生農場のすべての敷ワラから分離された。農場ごとに異なる傾向はあるが、敷ワラと乾草の両者から同一種類の真菌が分離された。

2) 敷ワラ、乾草および house dust 1 g 中の総菌数

A 農場の敷ワラ 3 点、C 農場の敷ワラ 2 点および乾草 2 点、さらに患者が発生した 3 戸の家の house dust それぞれ 1 g 中の培養温度別総菌数を表 3 および表 4 に示した。それぞれの菌数は、糸状菌、酵母および酵母様真

表 3 敷ワラと乾草 1 g 中の総菌数

培養温度		0~4℃	28℃	45℃
A 農場				
敷ワラ	(1)	2.2×10^3	1.7×10^4	0
	(2)	0	2.4×10^4	0
	(3)	2.3×10^3	1.8×10^4	0
培養温度		30℃	37℃	46℃
C 農場				
乾草	(1)	1.1×10^6	6.3×10^5	5.5×10^5
	(2)	1.7×10^7	1.2×10^7	1.5×10^6
敷ワラ	(1)	4.2×10^6	1.5×10^7	2.5×10^7
	(2)	2.8×10^7	4.8×10^7	4.4×10^7

表 4 House dust 1 g 中の総菌数

培養温度		0~4℃	28℃	45℃
農 場				
A		1.8×10^4	5.7×10^4	2.4×10^4
B		1.8×10^5	1.8×10^5	1.2×10^4
C		2.7×10^4	3.4×10^4	1.5×10^4

菌を合計した総菌数を示した。

A 農場の敷ワラ 3 点はいずれも 45℃ で発育はみられなかった。C 農場の敷ワラ 2 点にはいずれも 46℃ において 1×10^7 個以上が発育したが、これらはすべて酵母様真菌であった。

house dust 1 g 中の総菌数は 3 戸とも $1 \times 10^4 \sim 1.8 \times 10^5$ 個であった。3 戸とも 45℃ で発育がみられ、1 g 中の総菌数はいずれも 1×10^4 個台であった。

3) house dust の菌 叢

患者が発生した住居の house dust から分離した菌種は 14 属 26 種であった (表 5)。 *Cryptococcus uniguttulatus* と *Debaryomyces hansenii* が 3 戸から共通して分離された。 *Cryptococcus* 属の菌が多く分離され、C 農場の house dust からは *Thermoactinomyces* に含まれる *M. rubrobrunescens* が分離された。

4) 牛の抗体保有状況

16 頭の牛の抗体価を測定したが、全例が抗体を保有していなかった。

5) 人の抗体保有状況

患者および都市生活者の抗体価を表 6 に示した。

表 5 House dust から分離した菌種

菌 種	農 場		
	A	B	C
<i>Alternaria alternata</i>	+	*	
<i>Aspergillus fumigatus</i>		+	+
<i>Aspergillus niger</i>		+	
<i>Aspergillus versicolor</i>		+	
<i>Candida chiropterorum</i>		+	+
<i>Cryptococcus amyloletus</i>		+	
<i>Cryptococcus curvatus</i>		+	+
<i>Cryptococcus flavus</i>			+
<i>Cryptococcus hungaricus</i>		+	
<i>Cryptococcus lupi</i>		+	
<i>Cryptococcus luteolus</i>	+		
<i>Cryptococcus magnus</i>	+		
<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	+	+	+
<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	+	+
<i>Filobasidiella neoformans</i>	+		
<i>Lipomyces anomalus</i>	+	+	
<i>Microspolyspora rubro-rubescens</i>			+
<i>Phaffia rhodozyma</i>			+
<i>Rhodospiridium dactyloides</i>	+		
<i>Rhodospiridium diobovatum</i>		+	
<i>Rhodotorula minuta</i>			+
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>			+
<i>Rhodotorula pallida</i>			+
<i>Saccharomycopsis capsularis</i>			+
<i>Thermomyces lanuginosus</i>			+
<i>Torulopsis candida</i>	+		

注) *: 分離されたことを示す

表6 患者および都市生活者の抗体保有状況

抗原とした菌種	患 者	A	B	C	都 市 生 活 者
<i>Acremonium kiliense</i>		1: 4 (+)	1: 32 (+)	1: 2 (+)	1: 1 (-)
<i>Alternaria alternata</i>		1: 8 (+)	1: 32 (+)	1: 2 (+)	1: 1 (-)
<i>Aspergillus fumigatus</i>		1: 32 (+)	1: 32 (+)	1: 2 (+)	1: 1 (-)
<i>Cladosporium</i> spp.		1: 32 (+)	1: 64 (+)	1: 1 (-)	1: 1 (-)
<i>Cryptococcus albidus</i>		1: 16 (+)	1: 32 (+)	1: 2 (+)	1: 1 (-)
<i>Fusarium solani</i>		1: 4 (+)	1: 32 (+)	1: 2 (+)	1: 1 (-)
<i>Humicola fuscoatra</i>		1: 8 (+)	1: 8 (+)	1: 2 (+)	1: 1 (-)
<i>Humicola</i> spp.		1: 4 (+)	1: 16 (+)	1: 2 (+)	1: 1 (-)
<i>Micropolyspora rubro-brunea</i>		1: 8 (+)	1: 8 (+)	1: 4 (+)	1: 1 (-)
<i>Micropolyspora thermovirida</i>		1: 8 (+)	1: 32 (+)	1: 2 (+)	1: 1 (-)
<i>Rhizopus</i> spp.		1: 4 (+)	1: 32 (+)	1: 2 (+)	1: 1 (-)
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>		1: 4 (+)	1: 32 (+)	1: 2 (+)	1: 1 (-)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>		1: 2 (+)	1: 16 (+)	1: 1 (-)	1: 1 (-)
<i>Thielavia minor</i>		1: 2 (+)	1: 32 (+)	1: 2 (+)	1: 1 (-)

注) (+): 陽性 (-): 陰性

A および B は検査したすべての菌種に対して抗体を保有し、B の抗体価は全体に高い傾向にあった。C は *Cladosporium* spp. および *Thermomyces lanuginosus* 以外の菌種に対して抗体を保有していたが、抗体価はほとんどが 1: 2 であった。

3 名の患者とも *M. rubro-brunea* および *M. thermovirida* に対する抗体を保有していた。

対照とした都市生活者は、各菌種に対する抗体を全く保有していなかった。

3. 考 察

FLD は *Thermoactinomyces* を吸入抗原とする過敏性肺炎の 1 つである¹⁰⁾。本菌は被微牧草などで繁殖し酪農環境下に大量に存在する²⁰⁾ので、FLD は酪農従事者にとって職業病的色彩が濃い。本間ら⁹⁾は、北海道幌延町において FLD 患者が発生した 2 戸の酪農を営む農場の乾草中から *M. faeni* と *T. vulgaris* を検出した。著者らの検索ではこれらの菌は分離されなかったが、多数の真菌が分離された。分離菌は農場ごとに異なる傾向がみられたが、患者発生の有無による差はみられなかった。

A 農場の敷ワラから分離した真菌は C 農場のそれと比較して 1 g 中の総菌数が少なく、45℃ における発育はみられなかった。この差違は、試料のサイズおよび試料内の真菌の分布にバラツキがあったためと思われる。しかし、患者の発生がない 2 農場の敷ワラ、乾草および house dust 1 g 中の総菌数を測定していないので、これらに付着する菌量と患者発生との関連については不明であった。

含水率 30% のものをコンパクトペールし、約 45 日間開放牛舎に貯蔵した乾草から分離した真菌は 10 属 13 種、このうち *Aspergillus* 属が 4 種あったと報告されて

いる⁷⁾。分離菌種は著者らのロールペーラーで梱包されたものと差違があるが、乾草内部の通風の良否や付着菌種の差に起因すると思われた。

Cryptococcus は夏型過敏性肺炎の原因抗原と考えられている²²⁾ので、house dust の中より *Cryptococcus* 属の菌種が多数分離され、さらに患者 3 人とも *Cryptococcus albidus* に対する抗体を保有していたことは、今後さらに検討する必要がある。

FLD 患者は必ずしも *M. faeni* または *T. vulgaris* に対する抗体を保有しているわけではないが、酪農従事者の FLD の発生率は約 1~2% である¹⁰⁾。本間ら⁹⁾は北海道幌延町において 261 名の酪農従事者の 33.7% が *M. faeni* と *T. vulgaris* の両方またはどちらかに抗体を保有していたと報告している。さらに、今野ら¹²⁾は北海道北見市において健康な酪農従事者 90 名の抗体保有率は 27.7% であったと報告している。

今回の調査では、分離菌または保存菌を抗原として、患者 3 名と都市生活者の CF 抗体価を測定したが、特定の菌種に対する高い抗体価は得られなかった。しかし、対照とした都市生活者の抗体価はすべて陰性であったのに対し、3 名の患者は抗原としたほとんどの菌種に対して 1: 2~1: 64 の抗体を保有しており、さらに本間ら⁹⁾の報告と同様、高齢者ほど抗体価の高いことが明らかになった。

なお、患者は 3 名とも *M. rubro-brunea* および *M. thermovirida* に対する抗体を保有していたことから、CIE による血清沈降抗体の検索を定期的に行う必要があると思われた。

対象とした農場で飼養していたホルスタイン乳牛では、若齢のためか、あるいは飼育年限が短期間のためかは不明であるが、敷ワラ、乾草および house dust から分離

した菌種および保存菌に対する抗体を保有していたものはなかった。

Thermoactinomycetes の発育には水分含量や温度が深く関係し、水分が 16~19% 以上で、発酵熱が 40~60℃ の場合には旺盛に発育する²⁾。このため、乾草および敷ワラの水分調整は真菌対策上とくに重要な問題である²⁾と考えられる。

終わりにあたり、患者血清を提供していただいた北見赤十字病院の今野孝彦内科部長および分離真菌の同定にご助言をいただいた(財)食品薬品安全センター秦野研究所の高島浩介先生に深謝する。

引用文献

- 1) BARNETT, J. A.: *Yeasts, Characteristics and Identification*, 400, Cambridge (1983).
- 2) BARRON, G. L.: *The Genera of Hyphomycetes from Soil*, Robert E. Kriger Publishing Company (1968).
- 3) BOOTH, C., SHIPTON, W. A.: *Trans. Br. Mycol. Soc.* 49 (4) 665~667 (1966).
- 4) BUCHANAN, R. E., GIBBONS, N. E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Eight Edition (1975).
- 5) ELLIS, M. B.: *Dematiaceous Hyphomycetes*, Commonwealth Mycological Institute (1971).
- 6) FESTENSTEIN, G. N.: *J. Gen Microbial.*, 41, 389~407 (1965).
- 7) GAMS, W.: *Cepharosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes)*, p. 52, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1971).
- 8) 本間行彦, 南 幸論, 松崎道幸, ほか: 日胸疾会誌, 17 (12) 775~781 (1971).
- 9) 本間行彦, 松崎道幸: 免疫と疾患, 4 (3) 369~373 (1982).
- 10) 河合 健, 尾中章男, 味沢 篤, ほか: アレルギーの臨床, 7, 12~15 (1983).
- 11) 北見農試専技室: 普及ミニ情報, No. 16 (1983).
- 12) 今野孝彦, 種市幸二, 知本武久, ほか: 北海道医学雑誌, 60 (2) 299~302 (1985).
- 13) LODDER, J.: *The yeast, a Taxonomic Study*, North-Holland Pbu. Co., Amsterdam, London (1970).
- 14) 松崎道幸, 本間行彦, 寺井継男, ほか: 日胸会誌, 21 (9) 829~833 (1983).
- 15) 中沢次夫: アレルギーの臨床, 7, 16~20 (1983).
- 16) NELSON, P. E., TOUSSOUN, T. A., MARASAS, W. F. O.: *Fusarium Species*, The Pennsylvania State University Press (1983).
- 17) RAMIREZ, C.: *Manual and Atlas of the Penicillia*, Elsevier Biomedical Press (1982).
- 18) RAPER, K. B., FENNELL, D. I.: *The Genus Aspergillus* (1965).
- 19) RAPER and THOMA: *Manual of Penicillia*, Hafner Publishing Company (1968).
- 20) 高島浩介: 獣医界, 124, 14~24 (1984).
- 21) 寺井継男, 与沢浩一, 常田育宏, ほか: 日胸疾会誌, 18 (8) 506~511 (1980).
- 22) 山本正彦, 吉川公章, 橋上 裕: アレルギーの臨床, 7, 42~44 (1983).

健保略称
強ミノC

慢性肝疾患の 肝機能異常を改善する...

●適応症 「慢性肝疾患における肝機能異常の改善」

●用法・用量 1日1回, 40mlを静脈内に注射する。
年齢, 症状により適宜増減する。

■グリチルリチン製剤

強力ネオミノファーゲンシー

包装 20ml 5管・30管, 5ml 5管・50管, 2ml 10管・100管

➡使用上の注意などについては, 添付文書をご参照下さい。

株式会社 ミノファーゲン製薬本舗 営業本部 〒107 東京都港区赤坂8-10-22 TEL (402) 6201