

2. *Treponema hyodysenteriae* に対する抗菌剤のMIC測定法に 関する検討 — 特に接種菌液調製における一考案 —

山崎 俊 幸

(武田薬品工業 (株) 畜産研究開発部)*

An improved method of determining MIC against *Treponema hyodysenteriae* : agar block method for preparing inocula

Toshiyuki Yamazaki

Department of Research and Development, Animal Health
Products Division, Takeda Chemical Industries, Ltd.

Treponema hyodysenteriae (以下 *T. hyo.*) の抗菌剤感受性測定には種々な方法^{1~5)}がとられておりわが国では北井ら³⁾の方法が一般的である。しかし研究者により手技的に若干の相違がみられ標準法の設定が望まれる。接種菌液の調製において広く用いられている方法は血液寒天平板上の生育菌をかきとり懸濁液とし Mac Farland の濁度標準により調製するものである。しかし *T. hyo.* の平板上での発育は微弱なため一定の濁度の菌液を得るにはかなりの時間と労力を要する。そこで接種菌液調製の簡略化を主目的として平板から菌をかきとる代わりに培養平板から一定の大きさの寒天片を切りとり希釈液の中で強振し、その静置上清を接種菌液とする方法(寒天ブロック法と仮称)を考案し、これに関連する諸条件の検討を行った。更に本法で調製した菌液を用いてMICに及ぼす接種菌量、判定までの培養日数の影響等についても若干検討を行ったので合せて報告する。

材 料 と 方 法

菌株は主に *T. hyo.* DJ70P1および78/A(いずれも家衛試よりの分与株)を、培地は菌液調製およびMIC測定のいずれにも馬脱線血を5%添加した Trypticase soy agar (BBL)

(以下TS)を用いた。培養はGas Pak[®]嫌気システムにより37℃または42℃で行った。菌液の調製は20mlのTSを直径9cmのシャーレに分注固化し、約 $10^7/ml$ の *T. hyo.* 菌液を滴下後L型ガラス棒で塗り上げ、37℃、4日間培養した。次いで菌の発育によって生じた溶血斑の辺縁部より内径8×20mmのステンレス製棒で寒天片を切りとり、これを2mlの希釈液を入れた小試験管に移し、ミキサーで約10秒間強振後その静置上清を原菌液とした。なお希釈液には特に記載しない限りGAMプロス(ニッスイ)を用いた。Lankacidin A (LGA), carbadox (CDX), tiamulin (TML)およびlincomycin (LCM)のMIC測定のための菌接種にはマイクロプランター(佐久間製作所製)を用い5μlを接種した。

結 果

1. 希釈液中での *T. hyo.* の生存性

リン酸緩衝食塩水(PBS)(pH7.0), Trypticase soy broth(グルコース不含TSB)(BBL), 10%牛胎児血清加TSBおよびGAMプロス中での *T. hyo.* の生菌数(溶血斑により測定)の経時的変動をFig. 1に示す方法により測定した。いずれの希釈液中でも室温

* 研究協力者：末永 格, 松原幸雄, 森嶋克己

3. *Treponema hyodysenteriae* の薬剤感受性試験方法の検討 (追加発言)

足立吉数 (農水省家畜衛試)

豚赤痢トレポネーマの薬剤感受性試験は、これまで、Kitaiら(1979)の方法にもとずいて、行なわれてきたが、この方法においても(1)基礎培地 (2)血液の種類 (3)菌の浮遊のための希釈液 (4)接種菌の培養日数 (5)接種菌量 (6)判定基準等について検討を要する。しかし、一度にすべての条件を変えて検討するのは、非常な困難をとまらぬので、この試験においては、血液の種類、および接種菌量について検討した。

試験における諸条件およびその検討法

1) 薬剤感受性試験および接種菌培養のための培地：トリブチケース・ソイ寒天培地(TSAと略す；BBL)に5%羊血液を加えたものを用いた。

2) 希釈液：トリブチケース・ソイ・ブロス(TSBと略す，BBL)に10%に牛胎児血清を加えたもの、TSBのみ、ハートインフュージョン、ミューラーヒントン、リン酸緩衝液、生食、および蒸留水中での菌の生残菌数について経時的に検討した。このうち、TSBに牛胎児血清を加えたもの、および、ミューラーヒントンブロスに浮遊した菌が最もその活性を保っていた。この試験には、TSBに牛胎児血清を加えた培地を用いた。

3) 血液の種類：羊、牛、および馬の血液寒天培地を作製し、その薬剤感受性試験結果を比較した。

4) 接種菌の培養日数：72および96時間血液寒天培地で培養した菌を、McFarland No.3になるように、牛胎児血清加TSBに浮遊し、その菌液を暗視野用の菌数計算盤(日臨)で測定した値と生菌数値を比較した。72時間培養菌では、両測定値の間で、それほど大きな差はなかったが、96時間培養菌の場合、両者の間に

かなりの差のあるものも観察された。そのため、接種菌として、72時間培養菌を用いた。

5) 試験に用いる接種菌量の決定：McFarland No.3に調製した菌液を $1/10$ 、 $1/100$ に希釈し、これらの接種菌量でのMIO値を測定すると同時に、暗視野用の菌計算盤で、菌数値を測定し、その生菌数を算出した。これら調製菌液を、ミクロプランターで0.005ml、被検薬剤添加培地に接種した。

表1. 計算盤による菌数値と生菌数値との比較

| 菌名 | 1 回 | | 2 回 | |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 測定菌数 | 生菌数 | 測定菌数 | 生菌数 |
| ATCC 27164 | 2.6×10^8 | 3.1×10^8 | 3.6×10^8 | 3.5×10^8 |
| ATCC 31212 | 3.8×10^8 | 3.0×10^7 | 2.3×10^8 | 1.0×10^7 |
| Nagano-3a | 1.5×10^8 | 1.1×10^8 | 5.4×10^8 | 5.0×10^8 |

6) 判定：判定限界は、溶血環あるいは、菌のフィルム状のコロニーが確認できるところまでとし、その接種菌による溶血が、MIO値の高いところまで、尾をひく場合には、それら溶血部分から、菌をかきとり、抗菌剤無添加培地に継代することによって、菌の生死を確かめ、菌が生きているところまでをその菌に対するMIC値とした。

結果および考察

表1は、接種菌の活性を、計算盤による菌数値と生菌数値を比較することによって調べたもので、この表から、ATCC312/2の計算盤による測定値と生菌数の間でやや異っている以外、他の2株ではほぼ両菌数値が同じであった。このような活性ある菌液を薬剤感受性試験に用

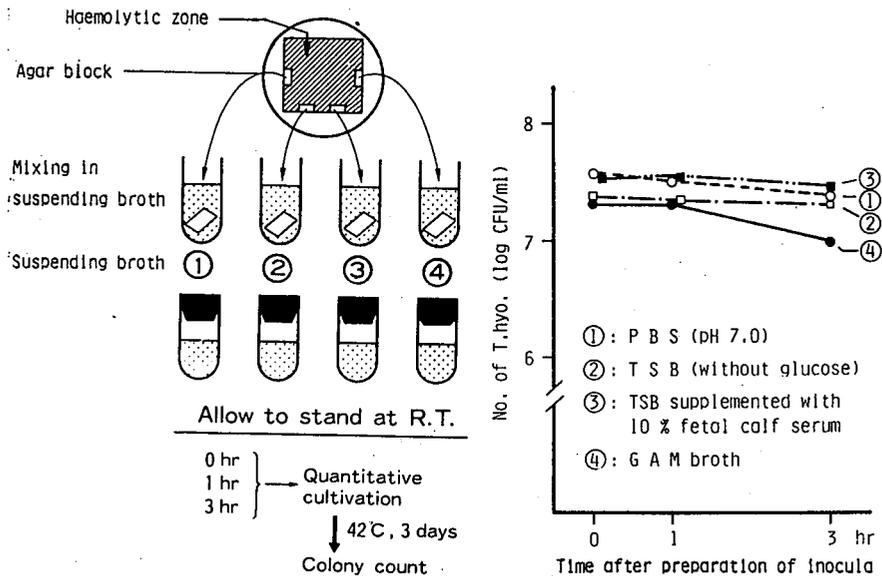


Fig. 1 Preparation of Inocula by Agar Block Method and Changes of Viability of *T. hyodysenteriae* DJ70P1 in Various Suspending Broths

1時間までの放置では菌数の変動は全くみられず3時間後に若干減少し、GAMブロスでその傾向が著明であった。しかし $10^7/ml$ 以下に減少することはなかった (Fig. 1)。

2. 培養日数、寒天片切りとり位置と生菌数

T. hyo. をTS平板に接種後2, 3, 4, 5日目に平板の溶血斑中央部と辺縁部より寒天片を切りとり寒天ブロック法により調製したそれぞれの菌液の生菌数を測定した。各単位時間毎に4枚の平板を用いて得た平均菌数を Fig. 2に示した。中央部よりの菌数は培養3日目に最高に達した後、急激に減少した。一方、辺縁部のそれは3日目に最高に達した後わずかに減少した。また Umemotoら⁶⁾の方法に準じて中央部と辺縁部より作製した走査電顕試料の観察により中央部の菌体中に菌体の中央または末端部が

球状に膨化した菌体像を多数認めた。

3. 寒天ブロック法で調製した各菌株の菌数

新鮮野外分離株13株を含め計15株の *T. hyo.* について寒天ブロック法による菌株間の菌数の差について調べた成績を Fig. 3に示した。各菌株の菌数は $1.1 \sim 3.6 \times 10^7/ml$ の範囲にあり菌株間の差は小さかった。

4. 寒天片からの haemolysin によるスポット接種時の溶血斑出現の有無

寒天ブロック法により調製した菌液をスポット接種した部分に *T. hyo.* の生育と無関係の溶血斑が出現する可能性が考えられたのでその有無を検討した。即ち、寒天ブロック法により *T. hyo.* DJ70P1の菌液(約 $10^7/ml$)を調製後寒天片を入れたまま室温に放置し調製直後および1, 3時間目に菌液の一部をそのまま、ま

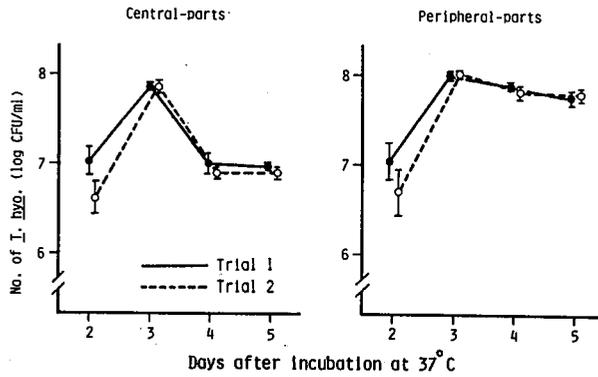


Fig. 2 Changes in Cell Number of T. hyodysenteriae DJ70P1 at Central- and Peripheral-Parts of Haemolytic Zone

Vertical bars indicate ranges.

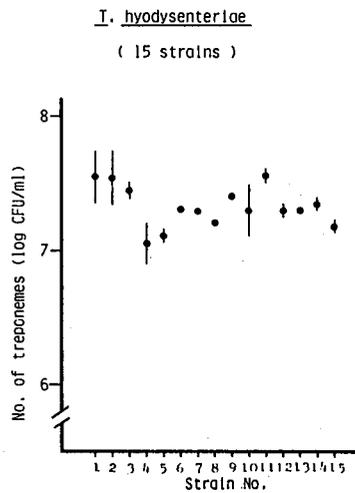


Fig. 3 Relationship between Strains of T. hyodysenteriae and Cell Number in Inocula Prepared by Agar Block Method

Vertical bars indicate ranges.

た一部は pore size 0.2 μm のメンブラン透過により除菌しその上清液それぞれ 5 μl を TS 平板上にスポットし前者は好氣的に、後者は嫌氣的に 37°C、2 日間放置した。その結果 3 日間放置したものにおいてもその菌液および除菌上清いずれのスポット部分にも溶血斑は認められなかった。

5. 接種菌量, 培養日数と薬剤の MIC

T. kyo. 78/A に対する LCA, CDX, TML および LCM の MIC に及ぼす接種菌量および MIC 判定までの培養日数の影響について検討した。培養日数と MIC については 10^6 /

ml 菌液接種時の、また接種菌量とのそれは培養 2 日目で判定した時の成績を Fig. 4 に示した。LCA を除く他の薬剤では培養日数の延長による MIC の変動は少なく、1 から 4 日目までの上昇は 2 倍であった。また LCM と TML では 2 日目以後変動はみられず CDX では 2 日目と 3 日目で一段階濃度上昇したに留まった。しかし、LCA では著明な MIC の上昇がみられた。供試した 4 薬剤ともその MIC は接種菌量の増加に伴い著しい上昇がみられたが CDX では少い菌量間での変動が小さい反面、菌量を多くした場合極端に変動した。

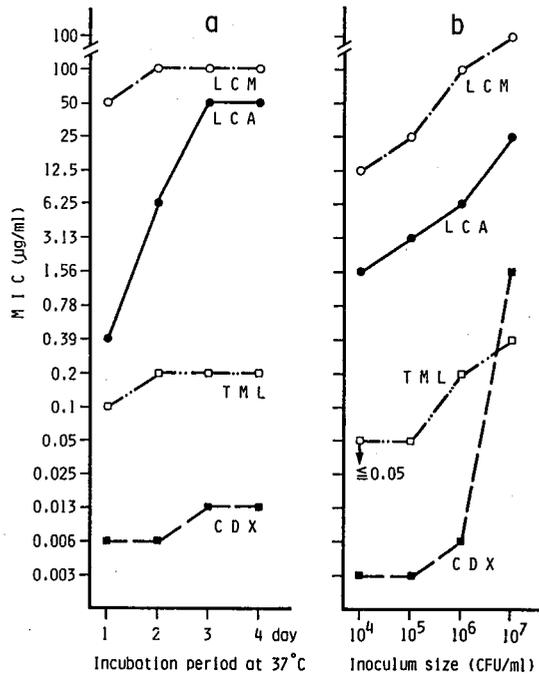


Fig. 4 Influence of Inoculum Size and Incubation Period on MIC of Antimicrobials against *T. hyodysenteriae* 78/A

a : Inoculum size : 1.2×10^6 CFU/ml.

b : MIC were determined after 2 days of incubation at 37°C.