

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るので、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：トリプテケース・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：トリプテケース・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

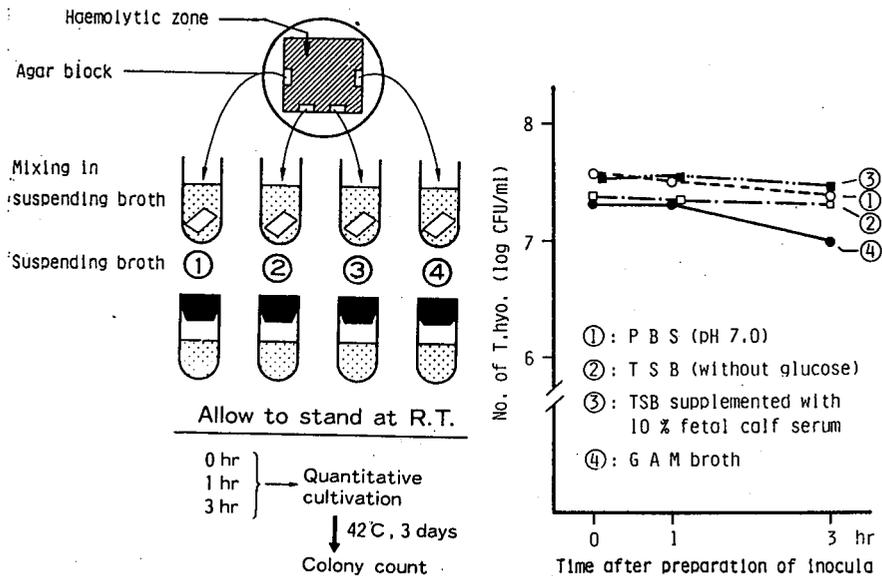


Fig. 1 Preparation of Inocula by Agar Block Method and Changes of Viability of *T. hyodysenteriae* DJ70P1 in Various Suspending Broths

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

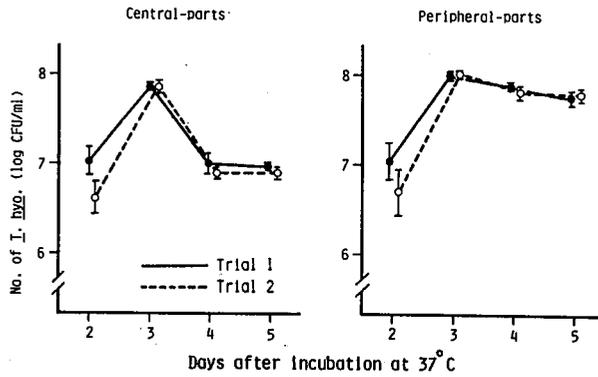


Fig. 2 Changes in Cell Number of T. hyodysenteriae DJ70P1 at Central- and Peripheral-Parts of Haemolytic Zone

Vertical bars indicate ranges.

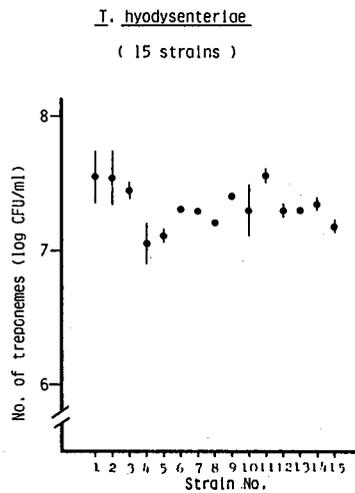


Fig. 3 Relationship between Strains of T. hyodysenteriae and Cell Number in Inocula Prepared by Agar Block Method

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。

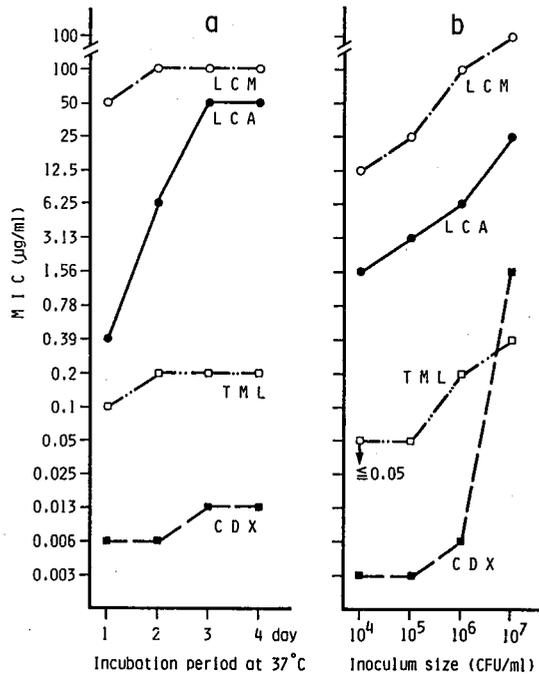


Fig. 4 Influence of Inoculum Size and Incubation Period on MIC of Antimicrobials against *T. hyodysenteriae* 78/A

a : Inoculum size : 1.2×10^6 CFU/ml.

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

考 察

供試した4種の希釈液中での *T. hyo.* の生菌数は室温1時間放置で全く減少はみられず3時間でわずかに減少する希釈液もあったがいずれも $10^7/ml$ 以上の菌数を保持した。従って短時間に菌液調製が可能な寒天ブロック法では供試した希釈液はいずれも用いうる。しかしその選択に経済的要素を加味するならばPBS, TSB, GAMプロス, 10%牛胎児血清加TSBの順となる。

スピロヘータでは長期間の培養, 生育環境の悪化等により異常形態を示すことが古くから報告されている⁶⁻⁸⁾。*T. hyo.* DJ70P1を用いた検討で溶血斑中央部の生菌数が培養3日目以後急激に減少し, 走査電顕的観察により中央部では菌体の一部が球状に膨化した像が多数認められたことより中央部での *T. hyo.* の陳旧化が示唆された。従って新鮮で生存性の高い菌液を得るには辺縁部の寒天片を用いることが妥当と判断された。なお辺縁部の菌数も3日目以後わずかに減少する傾向がみられたが菌株間で生育速度に遅速があることから本法では培養4日目の平板を用いた。

薬剤を含まないTS平板に *T. hyo.* を接種した場合, $10^7/ml$ 菌液接種では培養1日目に, また $10^6/ml$ では2日目に明瞭なβ溶血斑を生じ充分な菌の発育が示唆された。従って前者では培養1日目に, 後者では2日目にMIOの判定を行うことに支障はないと考えられた。なお, $10^6/ml$ 菌液接種で2日目に判定したMIO値は他の研究者³⁻⁴⁾が報告している値に近似した。

ま と め

T. hyo. の接種菌液調製法の簡略化について検討を行い寒天ブロック法を考案した。本法は簡単な操作で約 $10^7/ml$ の菌液を調製しうるので多数の菌株の薬剤感受性測定を実施する場合の菌液調製に有用である。

T. hyo. に対する抗菌剤のMIOは接種菌量の影響を受け易く, また薬剤によっては培養日数の延長によりその値に著しい変動を示すものがある。従って接種菌量と培養日数は再現性の高いデータを得る為に特に留意する必要がある。

文 献

- 1) Degeeter, M.J. and Harris, D.L. (1975). J. Anim. Sci., 41, 1333-1338.
- 2) Williams, M.S. and Babcock, W.E. (1976). VM/SAC., 71:957-959.
- 3) Kitai, K., Kashiwazaki, M., Adachi, Y., Kume, T. and Arakawa, A. (1979). Antimicrob. Agents and Chemther., 15:392-395.
- 4) Kinyon, J.M. and Harris, D.L. (1980). 2nd International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnostics. Lucerne, Switzerland. pp 39, 125-128.
- 5) 内田幸治(1983)。家畜の耐性菌研究会報 4号:5-10.
- 6) Umemoto, T., Namikawa, I. and Yamamoto, M. (1984). Microbiol. Immunol., 28:11-22.
- 7) Bryant, M.P. (1952). J. Bact., 64, 325-335.
- 8) Ozekalowski, J.W. and Eaves, G. (1954). J. Bact., 67:619-627.

いた。表2は、羊、牛および馬の血液寒天培地でのキタサマイシンのMIC値を示したもので、菌の浮遊濃度を、McFarland No.3に調製し、これをさらに1/10、1/100に希釈した菌液を接種した場合の値である。この値から、McFarland No.3では、羊血液の場合に比べ、牛および馬では、そのMIC値が、やや高い傾向にあった。しかし、1/10あるいは1/100希釈菌液を用いたならば、いずれの血液を用いても、ほぼ同じ値が得られるものと考えられた。

ただ、気をつけなければならないのは、接菌培養のために用いた血液と同じ種類の血液を薬

剤感受性試験のための培地作製に用いた方がよい。何故なら、菌株によっては、血液が異なることによって発育の悪くなるものがあるからである。

以上の結果から、少なくとも、菌の活性を保っているかぎり適性な菌量を接種するならばかなり再現性の高い値が得られるものと考えられた。しかし、これら使用した培地いずれもが、かなりの血清成分を含んでおり、抗菌剤の活性への影響も否定できない。これらの問題点を含め、先に示した諸条件についてさらに検討していく必要がある。

表2. 羊、牛、および馬の血液加寒天培地でのキタサマイシンの抗菌活性 (MIC値)

菌名	菌の濃度 (Mc 3)	羊		牛		馬	
		1 ²⁾	2 ²⁾	1	2	1	2
ATCC 27164	1/1	6.25	3.13	6.25	1.56	2.50	3.13
	1/10	0.78	0.78	3.13	1.56	1.56	1.56
	1/100	0.78	0.78	1.56	0.78	1.56	0.78
ATCC 31212	1/1	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	1/10	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	1/100	100	50	>100	100	>100	50
Nagano-3a ¹⁾	1/1	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	6.25
	1/10	1.56	1.56	3.13	1.56	3.13	3.13
	1/100	0.78	0.78	1.56	—	3.13	0.78

1) Nagano-3a は weak beta 性の溶血を示す

2) 1および2は、1および2回目の成績を示す。