

特集Ⅱ 豚赤痢トレポネーマの薬剤感受性測定法の検討

1. 抗菌性物質に対する *Treponema hyodysenteriae* の試験管内感受性試験方法についての若干の検討

内田 幸治 ・ 原田 良昭 ・ 杉村 雄二  
(台糖ファイザー・農産技術センター)

In vitro Sensitivity Studies of Antimicrobial Agents  
against *Treponema hyodysenteriae*.

Koji UCHIDA , Yoshiaki HARADA , Yuji SUGIMURA  
Agricultural Technical Center, Pfizer - Taito Co., Ltd.

*Treponema hyodysenteriae* (*T. hyo.*) の薬剤感受性試験については、わが国では1975年、柏崎ら<sup>1)</sup>が報告したのが最初で、その後Kitaiら<sup>2)</sup>を始めとし数名の研究者からの報告が<sup>3)4)6)7)</sup>ある。そのほとんどは柏崎および北井の方法に準じ実施している。1977年、高橋<sup>5)</sup>は柏崎らの行っている*T. hyo.* の最小発

育阻止濃度(MIC)測定法をまとめ、試案として提示した。その試案を要約すると表1のとおりである。

著者ら<sup>6)</sup>も柏崎らの行っている方法に準じ、1981年の分離*T. hyo.* 株のMICを測定し報告した。表2はその後に実施した1982~83年の分離9株(5農場由来)のMICの成績である。

表1. *T. hyodysenteriae* の薬剤感受性試験法(試案)  
高橋(1977)<sup>5)</sup>

- |                                |
|--------------------------------|
| 1) 接種菌増菌用培地                    |
| 感受性測定用培地                       |
| トリプトソイ寒天培地あるいは                 |
| ブレインハートインフュージョン寒天培地            |
| +                              |
| 5%馬脱繊血または5%羊脱繊血                |
| 2) 接種菌液の調製                     |
| 3~4日培養した培地から                   |
| 5%血清加食塩水でかきおとす                 |
| 3) 接種菌量                        |
| 10 <sup>7</sup> / ml になるように希釈し |
| その1白金耳量                        |
| 4) 培養条件                        |
| 嫌気下(ガスバック) 37℃ 3~4日間           |
| 5) 判定                          |
| 塗抹部分の溶血の有無                     |

表2. *T. hyodysenteriae* 9株のMIC

薬 剤	MIC (μg/ml)						
	≤0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	… >100
CBD	5	4					
OQD				4	5		
TML				8	1		
TS							9

1982~83年分離株、5農場由来

1981年分離株と類似したMICを示し、タイロシン(TS)に対しては全例が耐性であった。著者らはこれらの予備試験の中で*T. hyo.* はキノキサリン系薬剤[カルバドックス(CBD)およびオラキンドックス(OQD)]において、接種菌数によってMICが大きく変動すること

を経験した。今回、著者らは①接種菌数、②判定日数、③培地中の使用血液、の3点について比較検討した。

材料および方法

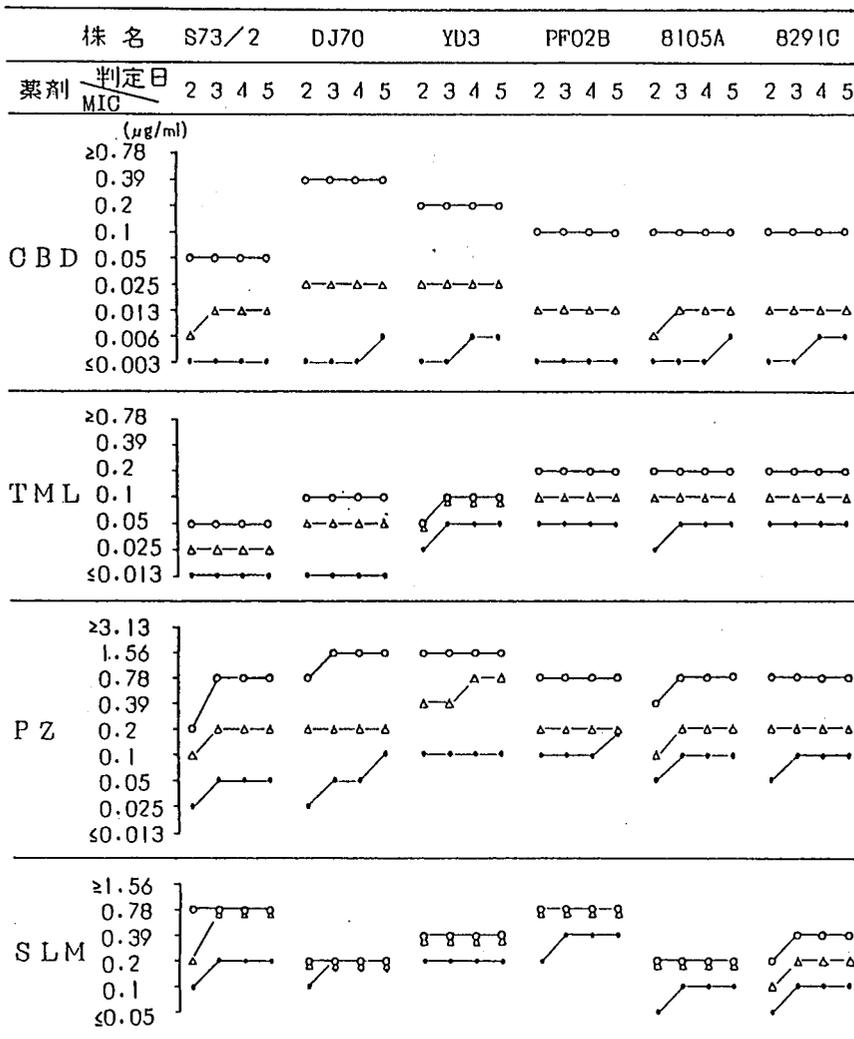
供試 *T. hyo.* 株：農水省分与の3株 (S73/2, DT70, YD3) および著者らが1981~82年に分離した3株の計6株を用いた。

供試薬剤：CBD, チアムリン (TML),

ナゾン (PZ), サリノマイシン (SLM), アミノベンジルペニシリン (ABPC), オキシテトラサイクリン (OTC) およびTSの7薬剤を用いた。

接種菌液の作成：5%羊または馬血液 (日本バイオテスト) 加トリプトソイ寒天 (栄研) に、37℃, 3日間、嫌気培養 (グローブボックス) 後、菌をかきとり、5%牛胎児血清 (GIBCO) 加トリプトソイブイオン (栄研) に浮遊させた。

表3. *T. hyodysenteriae* のMICの変動(1)



接種菌数：○→10<sup>8</sup>、△→10<sup>7</sup>、□→10<sup>6</sup> CFU/ml—各0.003ml

培地内血液：羊

さらに同浮遊液で $10^8$ ,  $10^7$  および  $10^6$  CFU/mlになるように希釈した。

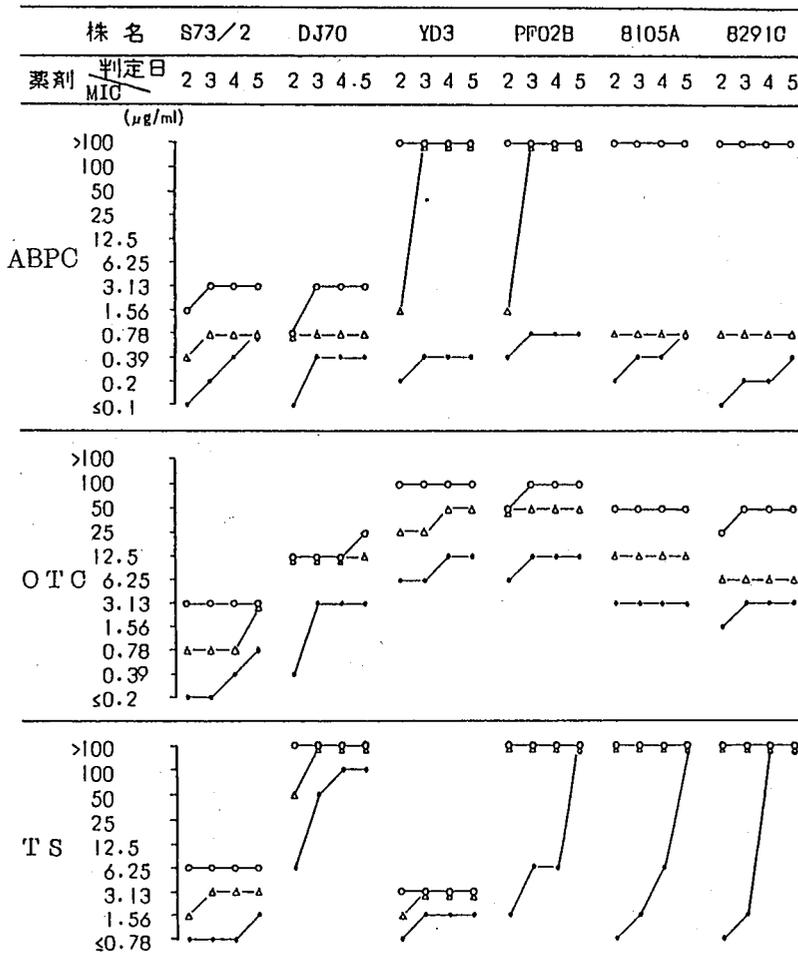
MICの測定：各被検菌液を多目的タイピングアパレーター（武藤器械店）を用い、各薬剤の希釈液を含んだ測定用培地（5%羊または馬血液加トリプトソイ寒天）に接種した。接種液量は約0.003mlである。37℃, 5日間、嫌気培養を行い、2日目から毎日β型溶血の形成の有無を観察し、MICを測定した。

## 結 果

表3および4に接種菌数および判定日数によるMICの変動を示す。培地内の血液は接種菌作成および測定用とも羊である。

接種菌数の比較：TMLおよびSLMでは、接種菌数による差は小さく $10^8$  CFU/mlの菌液（ $10^8$ ）接種（接種菌量は $10^5$ 個）のMICは $10^6$ 接種（同 $10^3$ 個）より、いずれの判定日においても8倍以内であった。一方、その他

表4. *T. hyodysenteriae* のMICの変動(2)



接種菌数：○→ $10^8$ 、△→ $10^7$ 、□→ $10^6$  CFU/ml—各0.003ml

培地内血液： 羊

の5薬剤(CBD, PZ, ABPC, OTC, TS)ではその差はさらに大きく、特にABPCでは $10^8$ 接種で $>100\mu\text{g}/\text{ml}$ と耐性値を示したのに対し、 $10^6$ 接種では $0.78\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下と感受性を示した株が4株認められた。 $10^7$ 接種は各薬剤、各判定日数とも $10^8$ 接種と $10^6$ 接種のほぼ中間のMICを示した。

判定日数の比較：全体に判定日数が長くなるとMICの上昇が認められたが、その多くは2日目と3日目の間であり、その差も4倍以内であった。しかし、ABPCでの $10^7$ 接種では2日目と3日目を比較して、感受性域から耐性域へと128倍以上も上昇した株が2株認められた。3日目から5日目まで、 $10^8$ および $10^7$ 接種では、各薬剤ともほぼ同じMICで推移した。TSでの $10^6$ 接種では3日目以後もMICの上昇が大きく、感受性域から耐性域へと上昇した株が3株認められた。

培地中の血液の比較：表5に羊および馬血液加培地における*T. hyo.*のTSに対するMICの比較を示す。3日目の判定では、 $10^8$ および $10^7$ 接種でのMICは、両血液ともほぼ一致した。しかし、 $10^6$ 接種ではその差は大きく、馬のほうが羊よりも低いMICになる傾向が認められた。一方、4日目の判定では各接種とも血液差は認められず、MICはほぼ一致した。TS以外の他の薬剤でも同様の傾向であった。

接種菌作成用培地に馬血液を、測定用培地に羊血液を用いた場合(およびその逆)、同種血液を用いた時よりも*T. hyo.*の発育が悪くMICも低かった。

#### 考察およびまとめ

接種菌数については、多くの薬剤において $10^8$ と $10^6$ 接種(接種菌量で $10^5$ と $10^3$ 個)の間で、MICに大きな差が認められた。 $10^7$ 接種( $10^4$ 個)では $10^8$ と $10^6$ 接種のほぼ中間のMICを示した。判定日数については、 $10^8$ お

よび $10^7$ 接種では3日目以降安定したMICを示したが2日目では若干低かった。 $10^6$ 接種では3日目以降もMICの変動が大きかった。したがって、接種菌数は $10^7$  CFU/mlの菌液を接種(菌量で $10^4$ 個)が、判定日数は3日が適当と考えられた。この条件で得られたMICは既知<sup>1)2)3)4)6)</sup>の成績とほぼ一致している。

培地内の血液については、羊および馬血液加培地とも、3日目以降 $10^8$ および $10^7$ 接種でほぼMICは一致した。 $10^6$ 接種では羊のほうが馬よりMICが高くなる傾向であった。したがって、 $10^7$ 接種では血液差は認められず、どちらの血液でもかまわないと判断された。しかし、その場合は接種菌作成用と測定用の培地に同種の血液を用いるべきである。

以上のことから、表1に示した高橋の試案<sup>5)</sup>が、ほぼ裏づけられた。又、安定した菌数を得ることが、*T. hyo.*のMIC測定上もっとも重要と考えられた。

#### 文 献

- 1) 柏崎 守, 高島俊弘, 久米常夫(1975) 第82回日本獣医学会講演要旨, 101.
- 2) Kitai, K., Kashiwazaki, M., Adachi, Y., Kume, T. and Arakawa, A. (1979). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 15: 392-395.
- 3) 北井和久(1983). 家畜抗菌剤研究会報, 4: 11-16.
- 4) 西坂周允, 足立吉数, 渡瀬 弘(1981) 日本養豚研究会誌, 18: 203.
- 5) 高橋 勇(1977). 動物用医薬品・飼料添加物・新飼料の有用性評価法, 小華和忠ら編, 155-192, フジテクノシステム, 東京.
- 6) 内田幸治, 原田良昭, 塚口 誠(1983) 日獣会誌, 36: 21-24.
- 7) 山崎俊幸, 末永 格, 生川憲明(1983) 第97回日本獣医学会講演要旨, 153.

表5. 羊および馬血液加培地における  
*T. hyo.* のTSに対するMICの比較

