

## 4. 豚由来 *Haemophilus (Actinobacillus)* *pleuropneumoniae* の薬剤感受性と肺炎に 対するオキシテトラサイクリンの効果

阪野 哲也 (全農家畜衛生研究所)

### 1. 薬剤感受性測定法 (Minimum inhibitory concentration (MIC) 測定法)\*

日常の検査業務において実用可能な MIC 測定方法を検討するため、若干の検討を行なった。

#### 1) 材料と方法

測定用培地の検討：酵母エキスを1および2%添加,あるいは1%  $\beta$ -NAD を約 0.1 ml 培地表面に塗抹した感受性測定用寒天培地 (ニッスイ, 栄研), ミュラーヒントン培地 (栄研, Difco, BBL) およびハートインフュジョン寒天培地 (栄研) における *Haemophilus pleuropneumoniae* の発育性を比較した。

接種菌量の検討：寒天培地で一夜培養した菌を PBS に混釈し,  $10^{10}$ ~ $10^5$  CFU/ml の菌液に調整後, 各菌液における MIC 値を比較検討した。

なお, これら試験における培養条件は, 5% 炭酸ガス下で, 37°C, 20時間とした。

#### 2) 成績

測定用培地：*H. pleuropneumoniae* は感受性測定用培地のみではほとんど発育しないが, 培地に酵母エキスを2%添加することによりチョコレート寒天培地と同程度の発育性が認められた。一方, 感受性測定用培地の表面に  $\beta$ -NAD を塗抹することにより, さらに良好な発育性を得ることができた (表 1)。これら発育性には感受性測定用培地およびミュラーヒントン培地, さらにその製造メーカーによる差は認められなかった。

接種菌量： $10^6$  CFU/ml の菌液を1スポット

\* 供試薬剤の名称は, 本会制定の略号表によった。

表 1 酵母エキス添加,  $\beta$ -NAD 塗抹と *H. pleuropneumoniae* の発育

| 基礎培地                | 処 方                 | 発育性 |
|---------------------|---------------------|-----|
| 感受性測定用寒天培地 (ニッスイ)   | 無 処 置               | ±   |
| "                   | 酵母エキス1% 添加          | ±   |
| "                   | " 2% 添加             | +   |
| "                   | 1% $\beta$ -NAD 塗 抹 | ++  |
| ハートインフュジョン寒天培地 (栄研) | "                   | ++  |
| チョコレート寒天培地          | 無 処 置               | +   |

接種方法： $10^7$  CFU/ml の菌液を1スポット接種  
培養方法：37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20時間  
++：菌苔状 +：集落単在 ±：斑痕

表 2 *H. pleuropneumoniae* の接種菌量と MIC

| 薬剤名  | 菌株 | 接種菌濃度 (CFU/ml) と MIC ( $\mu$ g/ml) |                 |                 |                 |                 |
|------|----|------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|      |    | $4 \times 10^9$                    | $4 \times 10^8$ | $4 \times 10^7$ | $4 \times 10^6$ | $4 \times 10^5$ |
| NA   | 1  | 1.6                                | 1.6             | 1.6             | 0.8             | 0.8             |
|      | 2  | 1.6                                | 1.6             | 1.6             | 1.6             | 1.6             |
|      | 3  | 1.6                                | 1.6             | 0.8             | 0.8             | 0.8             |
|      | 4  | 1.6                                | 1.6             | 1.6             | 0.8             | 0.8             |
| SDMX | 1  | >100                               | 100             | 25              | 25              | 25              |
|      | 2  | >100                               | 100             | 25              | 25              | 25              |
|      | 3  | >100                               | >100            | >100            | >100            | >100            |
|      | 4  | >100                               | 25              | 12.5            | 12.5            | 12.5            |
| OTC  | 1  | 0.4                                | 0.4             | $\leq 0.2$      | $\leq 0.2$      | $\leq 0.2$      |
|      | 2  | 0.8                                | 0.4             | 0.4             | 0.4             | 0.4             |
|      | 3  | 0.4                                | $\leq 0.2$      | $\leq 0.2$      | $\leq 0.2$      | $\leq 0.2$      |
|      | 4  | 0.4                                | $\leq 0.2$      | $\leq 0.2$      | $\leq 0.2$      | $\leq 0.2$      |
| FZ   | 1  | 0.4                                | $\leq 0.2$      | $\leq 0.2$      | $\leq 0.2$      | $\leq 0.2$      |
|      | 2  | 0.8                                | $\leq 0.2$      | $\leq 0.2$      | $\leq 0.2$      | $\leq 0.2$      |
|      | 3  | 0.4                                | $\leq 0.2$      | $\leq 0.2$      | $\leq 0.2$      | $\leq 0.2$      |
|      | 4  | 0.4                                | $\leq 0.2$      | $\leq 0.2$      | $\leq 0.2$      | $\leq 0.2$      |

測定用培地：1%  $\beta$ -NAD を 0.1 ml 塗抹した薬剤感受性培地 (ニッスイ)  
培養条件：37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20時間

接種したときの集落は単在しており、一方、 $10^8$  CFU/ml 以上の菌液では濃厚な菌苔状を呈し、いずれも MIC 測定には不相当と考えられた。 $10^7$  CFU/ml の菌液を接種すると、MIC 測定に適した発育状況であった。

接種菌量が MIC 値に及ばず影響をみると、 $10^9$  あるいは  $10^8$  CFU/ml と高濃度の菌液を接種したときの MIC 値は大きくなる傾向にあり、 $10^7$  cfu/ml 以下の菌液ではほぼ一定の値であった。例えば、SDMX において、 $10^7$  CFU/ml 以下の菌液を接種すると耐性株と感受性株の区別は明らかであるが、 $10^9$  CFU/ml では全株とも耐性株と判定される成績であった (表 2)。

これらの成績などから、*H. pleuropneumoniae* の MIC 測定方法として、次の方法が実用的と考えられる。すなわち、接種菌液は寒天培地で1夜培養した菌を PBS に混釈し  $10^7$  CFU/ml に調整する。測定用培地はミュラーヒントン培地または薬剤感受性測定用寒天培地の表面に、1%  $\beta$ -NAD を約 0.1 ml 塗抹して用いる。培養は5%炭酸ガス下で、 $37^\circ\text{C}$ 、18~20時間行なう。

## 2. 豚由来の *H. pleuropneumoniae* の薬剤感受性

### 1) 材料と方法

1979~1988年に、全国各地で屠殺豚あるいは剖検豚の肺病変部から分離した276株、ならびに

1985~1987年に中国地方で飼育されている豚の鼻腔由来の43株について、MIC 値を測定した。なお、1981~1982年に分離した株については凝集反応法により血清型を検査した。

### 2) 成績

①1979年に茨県下の屠畜場で採取した胸膜肺炎の病巣由来24株<sup>1)</sup>は、いずれの薬剤に対しても一峰性の分布を示し、耐性株は認められなかった。特に CER と TMP は極めて低濃度 ( $\leq 0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) で全株の発育を阻止し、次に RFP, CL, ABPC さらに CP および OTC が低濃度で発育を阻止した。

②1981~1982年に全国各地で屠殺された66頭の胸膜肺炎病巣から分離した130株では、OTC, ABPC, SM および SDMX に対して二峰性の分布を示し、他の薬剤には一峰性の分布であった。特に、低濃度で全株の発育を阻止したのは TMP, OXA で、ついで CL, ABPC および CP などであった (表 3)。

血清型においては、供試した130株中127株が2型であり、残り3株はいずれも3型であった。なお、3型の3株はいずれも千葉県下の一養豚場から出荷された2頭から分離された株であった。

この調査で認められた耐性株の耐性型は、Sa, Sm, Tc, Ap の4薬耐性が3株、Sa 単在耐性が8株であった。4薬耐性の3株はいずれも血清型

表 3 豚肺病変由来 *H. pleuropneumoniae* の薬剤感受性 (1981~1982)

| 薬剤名  | Minimal inhibitory concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) |     |     |     |     |     |      |    |    |     |      |
|------|--|-----|-----|-----|-----|-----|------|----|----|-----|------|
|      | $\leq 0.2$   | 0.4 | 0.8 | 1.6 | 3.2 | 6.3 | 12.5 | 25 | 50 | 100 | >100 |
| OTC  | 114 <sup>1)</sup>  | 2   | 10  | 1   |     | 1   | 2    |    |    |     |      |
| CP   | 34   | 92  | 2   | 2   |     |     |      |    |    |     |      |
| ABPC | 43   | 83  | 1   |     |     |     |      | 2  | 1  |     |      |
| KM   |  |     | 2   | 35  | 38  | 45  | 10   |    |    |     |      |
| SM   |  |     | 2   | 3   | 14  | 39  | 69   |    |    |     | 3    |
| CL   | 78   | 47  | 4   | 1   |     |     |      |    |    |     |      |
| KT   |  |     |     |     |     | 7   | 121  | 2  |    |     |      |
| TS   |  |     |     |     |     | 2   | 60   | 67 | 1  |     |      |
| TML  |  |     | 2   | 7   | 121 |     |      |    |    |     |      |
| OXA  | 129  | 1   |     |     |     |     |      |    |    |     |      |
| SDMY |  | 2   | 4   | 12  | 23  | 49  | 18   | 11 |    | 6   | 5    |
| TMP  | 125  | 5   |     |     |     |     |      |    |    |     |      |

1): 菌株数

表 4 *H. pleuropneumoniae* の薬剤耐性型と血清型

| 薬剤耐性型          | 菌株数 | 血清型 | 分離場所                  |
|----------------|-----|-----|-----------------------|
| Sa, Sm, Tc, Ap | 3   | 3   | 千葉                    |
| Sa             | 8   | 2   | 香川                    |
| 感受性株           | 119 | 2   | 茨城, 徳島, 香川,<br>兵庫, 鳥取 |

は3型であり, Sa 単耐性株はいずれも香川県で分離された株であった(表4)。

この成績から, わが国で豚の胸膜肺炎の原因となっている *H. pleuropneumoniae* の大部分は血清型が2型であり, また多薬耐性を示す株は一部の養豚場からのみ分離され, まだ全国的に浸潤していないと推測された。

③肺病巣由来株における耐性株出現頻度(表5)をみると, 上記①, ②以外では, 1985~1986年に広島, 島根で発症豚あるいは屠殺豚の肺病巣から分離した26株のうち, SM 耐性が3株認められた。

1986~1987年に広島, 島根, 鳥取で分離された34株では, 耐性を示したのは1株で, その耐性型は Ap, Tc, Km であった。

1986~1987年に, 抗菌薬を多用している東北地方の養豚場から分離した13株においても, ABPC 耐性の1株が認められたのみであった。

1987年~1988年に広島, 島根の十数農場で分離した49株では, ABPC に4株, OTC 5株およびCP, TP に各2株ずつ耐性株が認められたが, これらはいずれも限られた2農場由来株であった。

④鼻腔由来の43株においては, OTC 耐性が7株, SM 耐性が1株分離された(表6)。

同一豚あるいは同一養豚場において, 鼻腔由来株と肺病変由来株間における血清型, 薬剤感受性さらには病原性が同一であるかについては興味をもっているが, 未だ判断できる成績を得ていない。

表 5 豚肺病変由来 *H. pleuropneumoniae* における薬剤耐性株の出現状況

| 分離年       | 供試株数 | 薬剤と耐性株数 |     |    |    |    |    |     | 備 考                   |
|-----------|------|---------|-----|----|----|----|----|-----|-----------------------|
|           |      | ABPC    | OTC | CP | KM | SM | TP | TML |                       |
| 1979      | 24   | 0       | 0   | 0  | 0  | 0  | —  | —   | 茨城                    |
| 1981~1982 | 130  | 3       | 3   | 0  | 0  | 3  | —  | 0   | 茨城・千葉・徳島,<br>香川・兵庫・鳥取 |
| 1985~1986 | 26   | 0       | 0   | 0  | 0  | 3  | 0  | 0   | 広島・島根                 |
| 1986~1987 | 34   | 1       | 1   | 0  | 1  | —  | 0  | 0   | 広島・島根・鳥取,<br>耐性株は同一株  |
| 1986~1987 | 13   | 1       | 0   | 0  | 0  | 0  | —  | 0   | 新潟・山形・秋田              |
| 1987~1988 | 49   | 4       | 5   | 2  | 0  | —  | 2  | 0   | 広島・島根<br>耐性株は限定農場由来   |

耐性限界値(単位:  $\mu\text{g/ml}$ ); ABPC 6.3, OTC 6.3, CP 6.3, KM 100, SM 100, TP 6.3, TML 25  
—: 検査せず (全農家畜衛生研究所, 全農中国畜衛生検査分室)

表 6 豚鼻腔由来 *H. pleuropneumoniae* における薬剤耐性株の出現状況

| 分離年       | 供試株数 | 薬剤と耐性株数 |     |    |    |    |    |     | 備 考         |
|-----------|------|---------|-----|----|----|----|----|-----|-------------|
|           |      | ABPC    | OTC | CP | KM | SM | TP | TML |             |
| 1985~1986 | 26   | 0       | 0   | 0  | 0  | 1  | 0  | 0   | 広島・島根・山口・岡山 |
| 1986~1987 | 17   | 0       | 7   | 0  | 0  | 0  | 0  | 0   | 広島・岡山       |

耐性限界値(単位:  $\mu\text{g/ml}$ ); ABPC 6.3, OTC 6.3, CP 6.3, KM 100, SM 100, TP 6.3, TML 25  
—: 検査せず (全農中国畜衛生検査分室)

### 3. 胸膜肺炎の汚染農場における抗菌剤の投与効果

野外において、*H. pleuropneumoniae* が単独で浸潤している養豚場は少なく、ほとんどは *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* あるいは *Streptococcus pyogenes* などと混合感染を起こし、類似した呼吸器症状を呈していることが多い。従って、予防・治療対策を立てるには、まず農場に浸潤している病源体と、その汚染の程度を把握する必要があり、さらに基本的な飼育管理・衛生管理にも配慮し、豚に対するストレスを軽減しなければならない。このような、基本的対策が十分になされていないと、優れた抗菌薬を投与しても期待する効果を得られないことが多い。

今回、全農中国衛生検査分室が対応した胸膜肺炎が高度に浸潤している大規模養豚場における抗菌薬の投薬例について検討した。

#### 1) 養豚場の概要

養豚場の規模：母豚が約 700 頭、肥育豚が約 7,000 頭。

経過と検査結果：重度な呼吸器症状を示し、へ

い死豚が多発していた。へい死豚および発症豚の剖検所見ならびに細菌検査結果から、*H. pleuropneumoniae* による胸膜肺炎と診断された。

#### 2) 投薬プログラムと観察検査項目

投薬プログラム：従来の投薬内容を変更し、離乳時から60日齢までの間に、約1週間、OTC 240 ppm の飼料添加を3～4回行ない、さらに90日齢と120日齢に約1週間 OTC の 200 ppm を飼料添加した。

観察および検査：へい死豚については剖検を実施した。分離した *H. pleuropneumoniae* について経時的に薬剤感受性を測定した。

#### 3) 成績

胸膜肺炎によるへい死頭数の推移：抗菌薬の投薬期間が含まれている約60～130日齢と、投薬終了以降（130日齢～屠畜場出荷）におけるへい死頭数の推移をみると、前者では投薬開始以降は減少の傾向にあったが、後者では改善の傾向は認められなかった（図1）。このことは、薬剤が投与されている期間は、病勢の進行は抑制されているが、投薬が終了すれば病勢は再度回復するものと推測される。

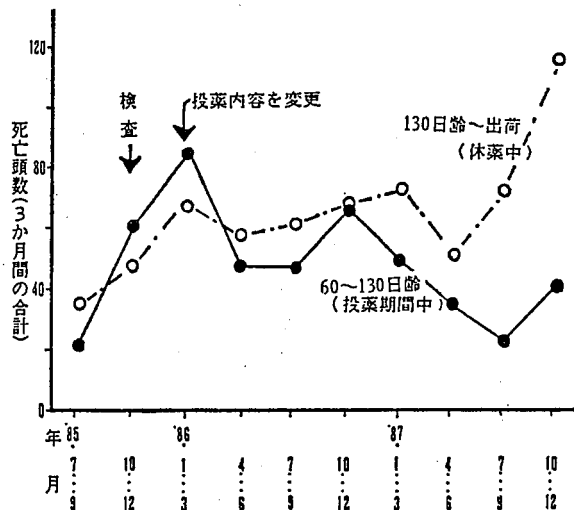


図1 OTCを長期間使用している養豚場における胸膜肺炎による死亡頭数の推移 (全農中国家畜衛生検査分室)

表 7 OTC の長期間使用養豚場における薬剤耐性 *H. pleuropneumoniae* の出現状況

| 分離年   | 数  | 薬剤と耐性菌出現頻度 |      |    |    |    |     |     |
|-------|----|------------|------|----|----|----|-----|-----|
|       |    | OTC        | ABPC | SM | KM | CP | THP | TML |
| 1985* | 3  | 0          | 0    | 0  | 0  | 0  | 0   | 0   |
| 1986  | 18 | 0          | 0    | —  | 0  | 0  | 0   | 0   |
| 1987  | 1  | 0          | 0    | —  | 0  | 0  | 0   | 0   |
| 1988  | 25 | 0          | 0    | —  | 0  | 0  | 0   | 0   |

\* : 投薬開始直前 — : 検査せず

(全農中国家畜衛生検査分室)

分離した *H. pleuropneumoniae* の薬剤感受性：いずれの年にも耐性株は認められず、特に OTC の使用を 2～3 年間継続した 1987～1988 年の分離株においても、OTC に対する感受性の低下は認められなかった (表 7)。

このように、*H. pleuropneumoniae* は抗菌薬の使用を続けても耐性株は出現し難いと考えられ、無計画に投与薬剤を変更し多種の抗菌薬を使用する必要はないと考えられる。しかし、本菌に汚染された農場を抗菌剤投与のみで清浄化することは困難であり、基本的な飼育衛生管理方法の改善と併せて実施すべきである。

この報告内容は、全農家畜衛生研究所および全農中国衛生検査分室で得た成績による。特に、野外での貴重な症例等を提供いただいた日高第五郎氏に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) Shimizu, M., Kuninori, K., Sekano, T., and Terashima, T. 1982. Antibiotic susceptibility of *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* isolates from swine. Jpn. J. Vet. Sci. 44 : 359-363.

### Antibiotic Susceptibility of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* and Effect of Dietary Supplementation with Oxytetracycline Against Pneumoniae of Fattening Pigs

Tetsuya SAKANO

(Zen-Noh Institute of Animal Health)

Antibiotic susceptibility patterns were determined of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolated from pneumonic porcine lung tissues (276 strains) and nasal swab samples (43 strains) in 1979～1988. Minimal inhibitory concentration of drugs were determined by the agar dilution method by the Japanese Society of Antimicrobials for Animals. The surface of each Mueller-Hinton agar plate was coated with a 0.1 ml of  $\beta$ -NAD solution (10 mg/ml). The plates were incubated 18-20 hours at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>.

Drug susceptibility of *H. pleuropneumoniae* from lung, all of the strains were sensitive to tiamulin, and nearly all were sensitive to kanamycin, chloramphenicol. About 1～3% of them were resistant to ampicillin, oxytetracycline and streptomycin. Drug

susceptibility of *H. pleuropneumoniae* from nasal, all of the strains were sensitive to ampicillin, chloramphenicol, kanamycin, thiamphenicol and tiamulin and a bit of strains were resistant to oxytetracycline (16.3%) and streptomycin (2.3%).

A field study was conducted to assess the efficacy of a oxytetracycline by dietary supplementation in a swine herd affected with pleuropneumoniae. Mortality of swine was decreased during the treatment, but was increased after the treatment.