

追 加 資 料

〔今回のシンポジウムにおける討論により *H. pleuropneumoniae* の薬剤感受性測定法に関し、標準的な方法の樹立が必要となってきたので、本会では山本孝史氏にこの点の検討を依頼した。その結果、同氏から以下の報告があったので、追加資料として掲載する。〕

Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae の薬剤感受性に及ぼす培地および 接種菌量の影響について

山 本 孝 史

(農林水産省家畜衛生試験場)

H. pleuropneumoniae の薬剤感受性に関しては多くの報告があるが供試培地の標準化はなされておらず、また最小発育阻止濃度に及ぼす培養基材の影響についても調べられていない。そこで本稿においては、基礎培地およびV因子供給源として添加する β -NAD あるいはイーストエキス等について比較するとともに接種菌量についても検討を加えた。

材料および方法

供試菌：*H. pleuropneumoniae* 株血清型 1～5 の参照株である Shope 4074, S1536, S1421, M62 および K 17 の他、2 型の野外分離株である Hp-8621 および Hp-8424 株を供試した。

供試培地：基礎培地としては、ミューラーヒントン培地 (Difco)、トリプチケースイ寒天培地 (BBL) およびブルセラブロス (Gibco) を用い、これらに β -NAD (Sigma) を最終濃度で 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ あるいは新鮮イーストエキスを 5% に加えた合計 6 種類の培地を比較した。ブルセラブロスでは、アガーノーブル (Difco) を 1.5% に添加して固形培地とした。本菌の分離培地として用いられる S 培地は、鶏肉ブイオンを自家作製しなければならぬことから、測定方法の標準化とい

う観点からは望ましくないと考えられたので本実験からは除外した。

供試薬剤：ペニシリン G (PCG)、オキシテトラサイクリン (OTC)、チアンフェニコール (TC)、カナマイシン (KM) およびスルファメトキサゾール (SMX) の 5 薬剤を供試した。

試験方法： β -NAD (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加したトリプチックソイブロス (Gifco) 2 ml に 1 集落を接種し、37°C 6 時間培養したのちリン酸緩衝液で 10^{-1} から 10^{-4} まで希釈したものを接種材料とした。接種には接種量約 5 μl のマイクロプランター (佐久間製作所) を用いた。接種された平板は、37°C 24 時間好氣的に培養したのち判定に供した。なお接種材料はさらに 10^{-6} まで希釈したのち、各希釈列より 20 μl を 5% イーストエキス加馬血液寒天培地に接種して、接種菌量を測定した。

実験成績および要約

試験した各培地の接種菌量 10^5 CFU/ml 以上 10^6 CFU/ml 未満における最小発育阻止濃度 (MIC) の比較を表 1 に示した。本表から明かなように PCG, OTC, TP および KM 等の抗生物質においては、ブルセラブロスに β -NAD を添

表 1 *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* の薬剤感受性におよぼす試験培地の影響

菌株	培地*	V-因子** 供給源	薬剤と MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
			PCG	OTC	TP	KM	SMX
Shope 4074	MH	β -NAD	0.78	1.56	0.78	6.25	3.13
		Y. ex.	0.78	1.56	0.78	12.5	100
	TSA	β -NAD	0.78	0.78	0.78	25	>100
		Y. ex.	0.78	1.56	0.78	25	>100
	BB	β -NAD	NG***	NG	NG	NG	NG
		Y. ex.	0.78	1.56	1.56	12.5	100
S1536	MH	β -NAD	0.39	0.78	0.39	6.25	3.13
		Y. ex.	0.39	1.56	0.39	6.25	100
	TSA	β -NAD	0.39	0.78	0.39	12.5	50
		Y. ex.	0.78	1.56	0.78	25	>100
	BB	β -NAD	NG	NG	NG	NG	NG
		Y. ex.	0.39	0.78	0.78	12.5	100
S1421	MH	β -NAD	0.39	0.78	0.78	6.25	1.56
		Y. ex.	0.39	1.56	0.78	6.25	50
	TSA	β -NAD	0.39	0.78	0.78	12.5	50
		Y. ex.	0.78	1.56	0.78	25	>100
	BB	β -NAD	NG	NG	NG	NG	NG
		Y. ex.	0.39	0.78	0.78	6.25	>100
M62	MH	β -NAD	0.39	0.39	0.20	6.25	0.39
		Y. ex.	0.78	0.78	0.39	6.25	12.5
	TSA	β -NAD	0.39	0.39	0.39	12.5	>100
		Y. ex.	0.78	0.39	0.39	25	>100
	BB	β -NAD	NG	NG	NG	NG	NG
		Y. ex.	0.78	0.39	0.39	12.5	>100
K17	MH	β -NAD	0.39	0.78	0.78	6.25	3.13
		Y. ex.	0.39	1.56	0.39	6.25	50
	TSA	β -NAD	0.39	0.78	0.78	12.5	25
		Y. ex.	0.39	0.78	0.78	25	100
	BB	β -NAD	NG	NG	NG	NG	NG
		Y. ex.	0.20	0.39	0.39	12.5	25
8621	MH	β -NAD	0.39	0.78	0.39	3.13	6.25
		Y. ex.	0.39	0.78	0.39	6.25	100
	TSA	β -NAD	0.39	0.78	0.39	6.25	50
		Y. ex.	0.78	0.78	0.39	12.5	>100
	BB	β -NAD	0.39	0.39	0.39	6.25	>100
		Y. ex.	0.78	0.78	0.78	12.5	>100
8424	MH	β -NAD	0.39	>6.25	0.78	6.25	3.13
		Y. ex.	0.78	>6.25	0.78	12.5	100
	TSA	β -NAD	0.39	>6.25	0.78	12.5	50
		Y. ex.	0.78	>6.25	0.78	12.5	>100
	BB	β -NAD	0.20	>6.25	0.78	6.25	50
		Y. ex.	0.78	>6.25	0.78	12.5	>100

備考: * MH; ミューラー-ヒントン培地 (Difco) TSA; トリプトソイ寒天培地 (BBL)
 BB; プルセラブロス (Gibco)+アガーノーブル (Difco)

** β -NAD; 25 $\mu\text{g/ml}$ Y, ex.; イーストエキス

*** NG; 発育せず

表 2 Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae の薬剤感受性におよぼす接種菌量の影響

培地 V-因子	菌株	接種菌量 (CFU/ml)	薬剤と MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
			PCG	OTC	TP	KM	SMX
Shope	4074	$\geq 10^5 \sim < 10^6$	0.78	1.56	0.78	6.25	3.13
		$\geq 10^6 \sim < 10^7$	1.56	1.56	0.78	12.5	>100
		$\geq 10^7 \sim < 10^8$	1.56	1.56	1.56	12.5	>100
S1536		$\geq 10^5 \sim < 10^6$	0.39	0.78	0.39	6.25	3.13
		$\geq 10^6 \sim < 10^7$	0.39	0.78	0.39	6.25	50
		$\geq 10^7 \sim < 10^8$	0.39	1.56	0.39	12.5	>100
S1421		$\geq 10^5 \sim < 10^6$	0.39	0.78	0.78	6.25	1.56
		$\geq 10^6 \sim < 10^7$	0.39	1.56	0.78	6.25	1.56
		$\geq 10^7 \sim < 10^8$	0.78	1.56	0.78	12.5	>100
MH + β -NAD	M62	$\geq 10^5 \sim < 10^6$	0.39	0.39	0.20	6.25	0.39
		$\geq 10^6 \sim < 10^7$	0.39	0.78	0.20	6.25	0.78
		$\geq 10^7 \sim < 10^8$	0.39	0.78	0.39	6.25	>100
K17		$\geq 10^5 \sim < 10^6$	0.39	0.78	0.78	6.25	3.13
		$\geq 10^6 \sim < 10^7$	0.39	1.56	0.78	6.25	>100
		$\geq 10^7 \sim < 10^8$	0.39	1.56	0.78	12.5	>100
8621		$\geq 10^5 \sim < 10^6$	0.39	0.78	0.39	3.13	6.25
		$\geq 10^6 \sim < 10^7$	0.39	0.78	0.39	6.25	25
		$\geq 10^7 \sim < 10^8$	0.39	0.78	0.39	3.13	>100
8424		$\geq 10^5 \sim < 10^6$	0.39	>6.25	0.78	6.25	3.13
		$\geq 10^6 \sim < 10^7$	0.39	>6.25	0.78	6.25	>100
		$\geq 10^7 \sim < 10^8$	0.78	>6.25	0.78	12.5	>100

加した培地を除いた各培地間でMIC値の変動はほとんど認められなかった。一方 SMX においては、ミューラーヒントン培地に β -NAD を添加した培地においてのみ感受性を示す MIC 値が得られたが、その他の培地では著しく高い値を示し、MIC 値の測定は不可能であった。またブルセラブロスに β -NAD を添加した培地では、接種菌量が 10^7 CFU/ml 未満では発育が認められず、MIC 値の測定が不可能であった。

次に接種菌量が MIC 値に及ぼす影響について、ミューラーヒントン培地に β -NAD を添加した培地における成績を表 2 に示した。接種菌量が 10^5 CFU/ml 以上 10^8 CFU/ml 未満の範囲では、PCG, OTC, TP および KM 等の抗生物質においては MIC 値にほとんど差異は認められなかったが、SMX では概ね 10^5 CFU/ml 以上 10^6 CFU/ml 未満の範囲でのみ MIC 値の測定が可能であ

った。

このように H. pleuropneumoniae の薬剤感受性の測定に際し、被検薬剤が抗生物質の場合は、培地の種類および接種菌量 (10^5 CFU/ml 以上 10^8 CFU/ml 未満) による変動はほとんど認められなかった。一方サルファ剤では、ミューラーヒントン培地に β -NAD を添加した培地を用い、接種菌量 10^6 CFU/ml 未満の場合のみ MIC の測定が可能であった。

以上の成績から、H. pleuropneumoniae の薬剤感受性の測定においても他の菌種と同様、ミューラーヒントン培地を基礎としてこれに β -NAD を添加した培地が薬剤の種類を問わず供試できることから最も優れていると考えられた。また接種菌量は 10^5 CFU/ml 以上 10^6 CFU/ml 未満に調整するのが適当であったが、これは 37°C 6 時間ブイオン培養したものの概ね 10^8 希釈であった。