

3. 家畜由来の *Pasteurella multocida* の薬剤感受性 特にピリドンカルボン酸系薬剤と汎用抗菌性物質 に対する感受性の比較

高橋 勇 (日本獣医畜産大学)

Pasteurella multocida (以下、*P. multocida*) は、他のグラム陰性桿菌に比べると、一般に各種抗菌性物質に感受性が高いとされているが、最近では SM^{*}、TC、PC などに耐性の菌の出現が報告されている^{1,8,9)}。

今回、著者らは家畜由来の本菌について、A) ピリドンカルボン酸系^{**}の新薬剤のオフロキサシン (OFLX) と既存の汎用抗菌性物質に対する感受性の比較試験、B) OFLX と同系統の既存薬剤に対する感受性の比較試験の二つを行った。

その結果、本菌は OFLX に対し、供試した既存薬剤のいずれよりも、すぐれた感受性を示すことが明らかにされたので、以下その成績を報告する。

材料と方法

1. 使用菌株：上記 A) の試験では、1982~84 年に国内の 7 県において豚 (27 株) と牛 (8 株) から分離された *P. multocida* (いずれも大部分が肺炎由来) に対照株 2 株 (Kobe 5, Kobe 6)

* 薬剤名の略号は本会制定の略号表参照。

** 本系統の抗菌剤はピリドンカルボン酸を必須の基本構造としており、ナリジキシン酸など本稿の表 4 にあげた薬剤が本系統の代表例である。近年、本系統薬剤の改良、発展は著しく、表 4 のうちで、オフロキサシン (OFLX) やノルフロキサシン (NFLX) のような新薬剤が多数登場した。これらはニューキノロンともよばれ、それ以前の本系統薬剤と比べて、グラム陽性・陰性菌の大部分に強い抗菌力を示すほか、いくつものすぐれた特色をもつ (本誌の解説欄を参照)。

を加え、計 37 株を用いた。これらの血清型 (莢膜抗原) は、A 型 26 株、D 型 11 株である (両型とも上記対照株を含む)。また実験 B) では、以上の 37 株とともに、1986 年に国内 6 県で豚から分離された 39 株を追加して、計 76 株を用いた。その血清型は A 型 63 株、D 型 13 株である。

2. 供試薬剤：上記の感受性試験 A) では、OFLX ならびに表 2 に示した既存の 14 種の汎用薬剤を用いた。実験 B) では、表 4 に示したように、OFLX とともに同系統の既存 4 薬剤を用いた (これらのうちで動物薬は OXA と NA)。

3. 使用培地：後述の実験成績に基づいて、増菌培地にはトリプトソイブイオン (BBL) を用い、感受性測定用培地には Dextrose starch agar (Difco) を、それぞれ用いた。ただし、SMX、TMP ならびに両者の合剤の感受性試験の場合には、文献⁷⁾と後述の実験結果に基づき、7.5% ウマ溶血液加の感受性測定用培地 (ニッスイ) を用いた。

4. 薬剤感受性試験法：寒天培地希釈法により行った。供試菌は、上記増菌地で 37°C、18 時間培養し、10⁶ CFU/ml に調製後、その 0.005 ml を感受性測定用培地に接種した。この培地は 37°C で 18 時間培養後、MIC を判定した。

成績

1. 使用培地の検討成績

本菌属は栄養要求性が厳しく、その薬剤感受性

表 1 *P. multocida* 感受性試験用培地の検討

| | |
|--|---|
| 1) 接種菌培養用培地の検討 | |
| トリプトソイブイオン (BBL) での本菌培養後の発育はよかったが、6株を用いて検討した結果、株間で差が認められた。 | |
| (代表例) | |
| 発育の良好な株 (SP 210) : | 37°C; 7.5時間後 (3.6×10 ⁹ CFU/ml) |
| | 37°C; 24時間後 (2.3×10 ⁹ CFU/ml) |
| 発育のやや不良な株 (SP 169) : | 37°C; 7.5時間後 (7.6×10 ⁸ CFU/ml) |
| | 37°C; 24時間後 (1.4×10 ⁸ CFU/ml) |
| 2) 感受性測定用培地の検討 | |
| 次の5種類の培地を用いて比較をおこなった。 | |
| | 発育程度 (株数) |
| (1) 感受性測定用寒天培地 (ニッスイ) | - (8) |
| (2) 感受性測定用寒天培地 (ニッスイ)+酵母エキス+白糖 | - (8) |
| (3) 感受性測定用寒天培地 (ニッスイ)+ウマ溶血液 (7.5%)* | 卅 (8) (SA, TMP, 両者合剤用) |
| (4) DSA 培地 (DIFCO)** | 卅 (8) |
| (5) DSA 培地 (DIFCO)+ウマ溶血液 (7.5%) | 卅 (8) |

(注) **DSA 培地: プロテオーゼペプトン No. 3 (15g), デキストロース (2g), 可溶性デンプン (10g), 塩化ナトリウム (5g), 第2リン酸ナトリウム (3g), ゼラチン (20g), 寒天 (10g), 1000 ml 分

測定法については、標準法がないので、次の検討を実施した。

1) 接種菌増菌培地の検討: 本菌の発育はトリプトソイブイオンが良好であるが、菌株により肉眼的な発育程度の差が認められる場合がある。そこで肉眼的に発育が良好な株と不良な株につき菌数を調べた。その結果、表1の1)のように、発育良好な株では、ほぼ 10⁹ CFU/ml に達し、一方、発育不良な株では、ほぼ 10⁸ CEU/ml であった。この点を考慮して前述の通りに接種菌液を調製した。

2) 感受性測定用培地の検討成績: この目的に用いる培地の条件としては、被検菌の発育がよく、かつ抗菌性物質の作用を阻害するような物質を含まないものであること、さらに培地の調製時にあまり手数がかからないものであることが必要である。

以上の目的に適合する培地を検討するため、表1の2)に示した6種の培地を選んで、本菌の発育度を比較した。その結果、一般の薬剤の場合には、そのうちで(4)の培地が、また SMX, TMP ならびに両者の合剤の場合には、(3)の培地が、それぞれ適当であると判定した。

3) *P. multocida* の OFLX と既存の汎用薬剤に対する感受性の比較試験成績

試験成績は表2に示した。この表で明らかなように、本菌は供試した15薬剤のうちで OFLX に最も高い感受性を示した。その分布幅は狭く、0.05~0.1 µg/ml で分布のピーク値ならびに MIC₅₀ 及び MIC₉₀ の値 (それぞれ被検株の50% 及び90%が発育を阻止される濃度) は、いずれも 0.1 µg/ml であった。

その他の薬剤の場合、SMX を除いて、いずれも MIC₅₀ の分布のピーク値との値は一致した。一方、MIC₉₀ の値は半数以上の薬剤の場合にはその2~4倍の値であった。そこで、今回の各薬剤に対する本菌の感受性の比較にあたっては、主として MIC₅₀ の値によることとし、さらに必要な場合には MIC₉₀ の値も参考とした。以下、感受性が高かった薬剤から順に示すと、次の通りであった。

まず、本菌が高感受性 (0.1~0.8 µg/ml) を示した薬剤は、TMP, OXA, ABPC, CP, TP の5剤であった。これらに次いで比較的高感受性~中等度感受性 (1.56~6.25 µg/ml) を示した薬剤は、SMX-TMP 合剤, DOXY, OTC, TML の4剤であった。なお、これらのうちで OTC と TML は MIC₉₀ がともに 12.5 µg/ml で、他の2剤の値より4~8倍大きかった。

一方、本菌がやや低感受性~低感受性 (12.5~

表 2 *P. multocida* 37株の OFLX と既存の14薬剤に対する感受性の比較 (MIC)

| MIC μg/ml | 0.025 | 0.1 | 0.39 | 1.56 | 6.25 | 25 | 100 | 400 | >800 | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ |
|--------------|-------|-----|------|------|------|----|------|-----|------|-------------------|-------------------|
| | 0.05 | 0.2 | 0.78 | 3.13 | 12.5 | 50 | 200 | 800 | | | |
| OFLX | 1* | 15* | 21 | | | | | | | 0.1 | 0.1 |
| OXA | | 2* | 14 | 19* | 1 | 1 | | | | 0.2 | 0.2 |
| DOXY | | | | 4** | 13 | 14 | 5 | | | 1.56 | 3.13 |
| OTC | | | | 1* | 1* | 24 | 6 | 4 | | 3.13 | 12.5 |
| SM | | | | | | | 18* | 12* | 3 | 1 | 3(>400) |
| KM | | | | | | | 1* | 11* | 25 | 50 | 50 |
| SPCM | | | | | | | 8* | 29* | | 25 | 25 |
| ABPC | | | 19* | 16* | | | 1 | 1 | | 0.2 | 0.4 |
| CP | | | 2** | 26 | 9 | | | | | 0.4 | 0.8 |
| TP | | | | 7** | 30 | | | | | 0.8 | 0.8 |
| TS | | | | | | 1 | 3* | 2* | 8 | 23 | 50 |
| TML | | | | | | 3 | 25** | 9 | | 6.25 | 12.5 |
| SMX | | | | | | | 3* | 1 | 14 | 1* | 2 |
| TMP | | 7* | 17 | 13* | | | | | 3 | 5 | 8 |
| SMX-TMP 合剤 | | | | 1 | 12** | 24 | | | | 50 | >800 |
| | | | | | | | | | | 0.1 | 0.2 |
| | | | | | | | | | | 1.56 | 1.56 |

1. 表中の薬剤名の略号は本会制定の略表による。
2. 表中の数字は当該 MIC 値を示した株数を示す。また * 印の数はその中に含まれている対照株数を示す。カッコ内は MIC の値を示す。
3. 太字は MIC の分布ピークを示す。
4. MIC₅₀, MIC₉₀ は、それぞれ 50% および 90% の株が示した MIC 値。
5. SMX-TMP 合剤は、SMX(20) : TMP(1) の配合比率。

表 3 薬剤別耐性株の検出頻度と耐性型

A) 薬剤別耐性株の検出頻度

| 薬 剤 | 耐性株数(%) | 薬 剤 | 耐性株数(%) |
|------|---------|------|-----------|
| OFLX | 0 | ABPC | 2 (5.7) |
| OA | 0 | CP | 0 |
| DOXY | 1 (2.9) | TP | 0 |
| OTC | 1 (2.9) | TS | 0 |
| SM | 3 (8.6) | TML | 0 |
| KM | 0 | SMX | 13 (37.1) |
| SPCM | 0 | TMP | 0 |

検出率は野外株35株に対する比率 (%)。

B) 耐性型

| 耐 性 型 | 株 数 | 耐 性 型 | 株 数 |
|---------|-----|----------|-----------|
| SMX | 9 | SMX. SM. | 2 |
| SMX. SM | 1 | ABPC | |
| SMX. TC | 1 | 計 | 13(35.1%) |

50 μg/ml) を示したものは、アミノグリコシド系各薬剤 (SM, SPCM, KM) ならびに TS であった。さらに SMX の場合には、MIC の分布が 6.25 ~ >800 μg/ml と広範囲にわたり、その

MIC₅₀ が 50 μg/ml, MIC₉₀ が >800 μg/ml であった。これは下記のように供試株中で耐性株が約 1/3 存在したことによる。

なお、以上の各薬剤の場合とも血清型の違いによる明らかな薬剤感受性の差は認められなかった。

以上の各薬剤に耐性と判定された株【MIC のピーク値のほぼ 8 倍以上を示す株。あわせて対照株の MIC も参考とした) は、表 3 の A) に示したように、DOXY と OTC でそれぞれ 1 株 (2.9%), ABPC で 2 株 (5.7%), SM で 3 株 (8.6%), SMX では 13 株 (37.1%) であった。なお残りの薬剤の場合、耐性と判定された株は認められなかった。これらの個々の株について、耐性型 (以下 DOXY と OTC の耐性は TC と一括して表示) をみると、同じ表の B) に示したように、1 ~ 3 剤耐性の 4 型に分類され、SMX 型が 8 株、SMX SM 型と SMX, TC 型が各 1 株、SMX, SM, ABPC 型が 2 株で、合計 13 株 (37.1%) に達し、いずれの耐性型にも SMX が加わっている点が注目された。なお、これらの耐性株の OFLX に対する感受性は、他の株と同様であった。

表 4 *P. multocida* 76株の OFLX と既存のピリドンカルボン酸系薬剤に対する感受性の比較 (MIC)

| MIC μg/ml | 0.012 | 0.05 | 0.2 | 0.78 | 3.13 | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ | |
|--------------|-------|------|------|------|------|-------------------|-------------------|------|
| | 0.025 | 0.1 | 0.39 | 1.56 | 6.25 | | | |
| OFLX | 2* | 5* | 67 | 2 | | 0.05 | 0.05 | |
| NFLX | | | 31** | 45 | | 0.1 | 0.1 | |
| PPA | | | | .5** | 60 | 11 | 1.56 | 3.13 |
| OXA | 1 | 15 | 52** | 8 | | 0.1 | 0.2 | |
| NA | | | | 13 | 62** | 1 | 0.8 | 0.8 |

1. 表 2 の 1 を参照。なお, NFLX はノルフロキサシン, PPA はピペミド酸の略号。

2. 表 2 の 2 を参照。 3. 表 2 の 3 を参照。 4. 表 2 の 4 を参照。

また耐性株は, すべて1984年に神奈川県ほか2県で分離された株に限られ, 同一地域の分離株は耐性型が共通する場合が多く, 血清型は全株ともA型であった。

3) *P. multocida* の OFLX と既存のピリドンカルボン酸系 4 薬剤に対する感受性の比較

上述の通り, 本菌は OFLX に高い感受性を示すことが判明した。そこで供試株を追加し, 76株を用いて本菌の OFLX 感受性の再確認とともに既存の同系 4 薬剤 (OXA も含む) との感受性の比較を行った。

その結果, 表 4 に示した通り, 本菌の感受性 (MIC₅₀ 値で示す) は, OFLX に対して最も高く (0.05 μg/ml), 以下, NFLX* と OXA (ともに 0.1 μg/ml), NA (0.8 μg/ml), PPA* (1.56 μg/ml) の順であった。すなわち, 同系の薬剤でも OFLX と PPA の値には32倍の開きが認められた。なお*印の NFLX はノルフロキサシン, PPA はピペミド酸の略号である。

総括と考察

今回の成績から, *P. multocida* は供試18薬剤中で OFLX に最も高い感受性を示し, その MIC₅₀ は 0.05~0.1 μg/ml であった。この値を他の供試薬剤の値と比べると, 1/2~1/456 (SMX と比較の場合は <1/8192) であった。本菌の OFLX などニューキノロン感受性に関しては, これまでに報告がない。なお今回の OFLX に関する感受性成績は, 従来報告されている *E. coli* など腸内細菌の成績²⁻⁴⁾ と比べて, 同等かやや高い傾向にあった。

次に今回の成績中, 汎用抗菌性物質に対する本菌の感受性をみると, TMP, OXA, ABPC, CP, TP などに高感受性で, 以下 SMX-TMP 合剤, DOXY, OTC, TML の順に比較的高感受性~中等度感受性であったが, アミノグリコシド系 3 剤, TS, SMX には低感受性であった。これらの成績は, 従来の文献^{5,6)} とほぼ同一の傾向である。

次に, 今回の供試株中で, 以上のうち 4 薬剤に耐性の株が35.1%認められた。その主体は SMX 単剤耐性株で, その他は SMX に SM, ABPC, TC などの耐性が付加した 2~3 剤耐性株が若干みられた。これらは血清型がすべてA型であったが, 分離地や耐性型が共通する場合が多く, しかもA型が供試株の約 70% を占める点などから, A型が特に耐性化しやすいとはいえなかった。また, 今回の成績はこれまでの報告^{8,9)} に比べて, SM, TC 系, PC 系などの耐性が低率である点, CP 耐性がなかった点などで差があるが, これは分離株の地域差や現地における使用薬剤の差などが関与しているものと思われる。

文 献

- 1) Chang, W.H. and Carter, G.R. 1976, J. Am. Vet. Med. Asso. 169 : 710-712.
- 2) 五藤嗟智子, 藤本輝男, 辻 明良ほか. 1984, Chemotherapy, 32 (S-1) : 22-46.
- 3) 西野武志, 田中真由美, 河端繁勝ほか. 1984, Chemotherapy, 32 (S-1) : 62-63.
- 4) 佐藤謙一, 井上松久, 三橋 進. 1984. Chemotherapy, 32 (S-1) : 1-12.
- 5) Shimizu, M., Kuninori, K., Sakano, T. et al. 1982. Jpn. J. Vet. Sci. 44 : 259-363.

- 6) Stevens, D.L., Higbee, J.W., Oberhofer, T.R. et al. 1979. Antimicrob. agents Chemother. 16: 322-324.
- 7) ST 合剤研究会. 1973, Chemotherapy, 21: 67-76.
- 8) 山本純也, 清水幹夫, 阪野哲也ほか. 1984. 第97回日本獣医学会講演要旨, 155.
- 9) 山本純也, 種田貴至, 清水幹夫ほか. 1987. 第103回日本獣医学会講演要旨, 121.
- 研究協力者: 吉田孝治, 東出義弘, 沢田拓士ほか.
本研究の詳細(成績の1)を除く)は Chemotherapy, 37: 399~404 (1989) に発表した.

Susceptibility of Animal Isolates of *Pasteurella multocida* to Ofloxacin and Commonly Used Antimicrobial Agents

Isamu TAKAHASHI

(Department of Veterinary Microbiology, Nippon Veterinary and Zootechnical College, Musashino, Tokyo)

The susceptibility of *Pasteurella multocida* isolates from animals (mainly from porcine pneumonic lungs) to ofloxacin (OFLX) and the 17 other commonly used antimicrobial agents was determined. The results are as follows. (1) All of the 37 isolates were highly susceptible to OFLX (MIC_{50} : 0.025-0.1 $\mu\text{g/ml}$), followed by trimetprim, oxolinic acid (OXA), ampicillin (ABPC), chloramphenicol, and thiamphenicol (MIC_{50} : 0.1-0.8 $\mu\text{g/ml}$). The susceptibility of the isolates to a combination product of sulfamethoxazole (SMX)-trimethoprim (20:1), doxycycline (DOXY), oxytetracyclin (OTC), and tiamulin was moderate (MIC_{50} : 1.56-6.25 $\mu\text{g/ml}$). The isolates showed relatively low susceptibility (MIC_{50} : 12.5-50 $\mu\text{g/ml}$) to streptomycin (SM), kanamycin, spectinomycin and tylosin. SMX showed the lowest activity against the isolates (MIC : 25-800 $\mu\text{g/ml}$). (2) A total of 13 (35.1%) isolates were resistant to SMX, SM, ABPC or DOXY · OTC. Several different resistance patterns were found. Isolates resistant only to SMX were most frequent (8 isolates), followed by those resistant to the combination of SMX and SM, ABPC, or TC (5 isolates). Those resistant isolates were susceptible to OFLX as well as the other isolates. (3) The susceptibility of the 76 isolates to OFLX and the 4 other pyridoncarboxylic derivatives was determined. The highest distribution of MIC_{50} of OFLX, OXA, nalidixic acid, or pipemidic acid was observed at 0.05 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 0.8 $\mu\text{g/ml}$, or 1.56 $\mu\text{g/ml}$, respectively.