

4. 豚由来 *Pasteurella multocida* の薬剤感受性

阪野 哲也 (全農家畜衛生研究所)

薬剤感受性測定方法の検討

Pasteurella multocida の薬剤感受性測定法について、若干の検討を行なった。

(1) 材料および方法

①各種寒天培地における発育性の比較： YPC Agar¹⁾, Dextrose Starch Agar (DSA : Difco), Mueller Hinton Agar (MHA : Difco), 感受性測定用寒天培地 (麦法ミュールヒントン培地 : ニッスイ), Trypticase Soy Agar (TSA : BBL) および普通寒天培地 (栄研) を使用した。DSA で 37°C 18時間培養した *P. multocida* ZF-837 株または Kobe-5 株を PBS に浮遊し、 10^{-5} ~ 10^{-8} の段階希釈液 0.1 ml を培地に塗抹して 37°C, 18時間培養後、発育したコロニー数から生菌数を測定し、また単在するコロニーの直径を測定した。

②使用培地と接種菌量が MIC (Minimum inhibitory concentration) に及ぼす影響： Kobe-5 株の各濃度の菌液 (10^9 ~ 10^5 CFU/ml) に対する OTC, KM および SDMX の MIC を DSA, MHA および感受性測定用寒天培地を用い測定した。なお、培養は 37°C, 18時間とした。

(2) 成績

①各種寒天培地における発育性の比較

ZF-837 株の菌液の生菌数を各種寒天培地で測定した結果、表 1 のように DSA では 1.1×10^9 CFU/ml, MHA, YPC Agar, TSA は 10^8 CFU/ml であったが、感受性測定用培地では 10^6 CFU

表 1 *P. multocida* の各種寒天培地における発育性

培地	菌数 (CFU/ml)	コロニー直径 (mm)
Dextrose starch agar	1.1×10^9	2.5~3.0
Mueller Hinton agar	7.8×10^8	1.5~2.0
感受性測定用寒天培地	$< 1 \times 10^6$	—
YPC agar	4.8×10^8	0.5~1.0
Trypticase soy agar	3.4×10^8	1.0~1.5
普通寒天培地	5.7×10^8	0.5

供試株：ZF-837, 37°C 18時間培養後判定。

/ml 未満であった。

MHA と感受性測定用培地の主成分はほぼ同様であるにもかかわらず、後者における発育性が劣った。そこで後者にのみ含有されている L-Cysteine (50 µg/ml) または L-Tryptophan (150 µg/ml) を添加した MHA に、Kobe-5 株を接種し発育性を比較した。その結果、表 2 のように L-Cysteine による *P. multocida* の発育抑制が認められた。

②使用培地と接種菌量が MIC に及ぼす影響 10^5 ~ 10^9 CFU/ml の菌液を抗菌剤無添加培地にマイクロプランターでスポットし、37°C で18時間培養することにより表 3 のように、DSA では 10^5 CFU/ml, MHA で 10^6 CFU/ml 以上の菌液で、MIC 測定に十分な菌苔の形成が認められた。一方、感受性測定用培地では 10^8 CFU/ml 以上の菌液でのみ菌苔の形成が認められた。

接種菌量と MIC の関係を各培地で比較した結果、OTC の MIC は、MHA および DSA の両培地では差が認められず、 10^5 ~ 10^8 CFU/ml の菌液では、いずれも 1.6 µg/ml であった。KM においても、MHA を用いての測定では 10^7 CFU/

表 2 L-cystine, L-tryptophan が *P. multocida* の発育に及ぼす影響

培地	菌数 (CFU/ml)	コロニー直径 (mm)
Mueller Hinton agar (MHA; DIFCO)	4.6×10^6	0.5~1.0
MHA+L-cystine (50 $\mu\text{g/ml}$)	$<1.0 \times 10^4$	痕跡
MHA+L-tryptophan (150 $\mu\text{g/ml}$)	4.0×10^6	1.0~1.5
感受性測定用培地 (ニッスイ)	$<1.0 \times 10^2$	
Dextrose starch agar (DIFCO)	3.8×10^7	1.5~2.5

供試株: Kobe-5 培養 37°C 18時間

表 3 使用培地と接種菌量が MIC に及ぼす影響

菌濃度 (CFU/ml)	Mueller Hinton agar				Dextrose starch agar				感受性測定用寒天培地			
	発育 ¹⁾	OTC	KM	SDMX	発育	OTC	KM	SDMX	発育	OTC	KM	SDMX
6.6×10^9	+ ²	3.2 ²⁾	25	100<	+ ³	3.2	50	100<	+ ²	1.6	25	100<
$\times 10^8$	+ ²	1.6	25	100<	+ ³	1.6	50	100<	+ ²	1.6	12.5	100<
$\times 10^7$	+ ²	1.6	25	100<	+ ³	1.6	50	100<	±	≤0.2	≤2.0	≤0.2
$\times 10^6$	+ ²	1.6	12.5	12.5	+ ³	1.6	50	50	-	.	.	.
$\times 10^5$	+	1.6	6.3	3.2	+ ³	1.6	25	50	-	.	.	.

供試菌株: Kobe-5 培養: 37°C 18時間

1) 発育: 抗菌剤無添加培地における発育の程度 +³: 濃厚な菌苔状 +²: 菌苔状 +: 集落単在 ±: 痕跡
-: 発育せず

2) MIC: $\mu\text{g/ml}$

ml 以上, DSA で 10^6 CFU/ml 以上の菌液を接種することにより安定した MIC が得られ, MHA が 25 $\mu\text{g/ml}$, DSA が 50 $\mu\text{g/ml}$ の値であった。しかし, これら以下の菌液濃度では MIC の低下が認められた。SDMX においても, DSA または MHA に 10^7 CFU/ml 以上の濃度の菌液をスポットすることにより安定した MIC が得られたが, これ以下の濃度では MIC の低下が認められた。

(3) まとめ

P. multocida の発育性は DSA, 次で MHA の順で良好であった。薬剤感受性測定には, 入手の容易性および他菌種の発育性から後者の使用が望ましいと考えられる。

接種菌量は, MHA を用いて測定する場合は 10^7 CFU/ml の菌液が適当と考えられるが, 使用培地との関連性が大きいので, 使用培地とともに統一することが望まれる。

豚由来 *P. multocida* の薬剤感受性

各地で飼育されている豚の肺病変部および鼻腔から分離された 363 株について薬剤感受性を測定した。

(1) 材料および方法

①供試菌株: 肺病変由来は計 182 株で, その分離年次と分離地等の内訳は, 1979年(千葉, 茨城)が45株⁵⁾, 1983年(茨城, 岩手, 秋田)が37株(茨城血清型: A)⁶⁾, 1985~1986年(各地の20農場)が83株(血清型: A)⁷⁾, および1986年(秋田, 山形, 新潟, 石川)が17株(血清型 A: 14株, D: 13株)であった。

鼻腔由来は計 181 株で, その分離年次と分離地等の内訳は1985~1986年(茨城, 千葉, 島根, 広島, 山口)分離が80株(血清型 A: 71株, D: 9株)⁷⁾, 1987~1988年(北海道, 山形, 茨城, 千葉, 岡山, 広島, 大分, 宮崎)が101株(血清型 A: 26株, D: 75株)であった。

なお、莢膜血清型はヒアルロニダーゼ試験⁶⁾およびアクリフラビン試験⁷⁾により実施した。

②MIC 測定法：1979年の分離株については Heart Infusion Agar (HIA : Difco) または MHA (栄研) を用い⁵⁾、1983年分離株および1985~1986年分離株については 0.5% Yeast extract (Difco) 添加 MHA (栄研) を用い^{6,7)}、これら以外の株については MHA (Difco) を用いて、平板希釈法により実施した。培養条件は、いずれも 37°C、約18時間とした。

(2) 成績

①1979年に肺病変から分離された45株に対しては、いずれの薬剤の MIC も一峰性の分布を示した。全株の発育を最も低濃度 ($\leq 0.8 \mu\text{g/ml}$) で阻止したのは OTC, PCG, ABPC および CER で、次で MCIPC, CP, PZ および TMP であった ($\leq 3.2 \mu\text{g/ml}$)。中濃度 ($\leq 12.5 \mu\text{g/ml}$) で阻止したのは GM, KM, LCM, NA, CL, FZ および RFP であった。一方、SDMX および BCM は高濃度 ($\geq 25 \mu\text{g/ml}$) でないと発育を阻止できなかった⁵⁾。

②1983年に肺病変から分離された37株に対し、極めて低濃度 ($\leq 0.8 \mu\text{g/ml}$) で全株の発育を阻止したのは OXA および OTC であり、中濃度 ($25 \mu\text{g/ml}$) で阻止したのは CL, SPCM, TML および HgCl_2 であった。一方、SM, KM, CP および ABPC は二峰性の分布を示し、耐性株の出現頻度は SM が18株 (48.6%)、ABPC が6株 (16.2%)、KM および CP が各3株 (8.1%) で、耐性型は表4のとおりであり、二剤あるいは三剤耐性株は限られた農場から分離されていた⁶⁾。

③1985~1986年に鼻腔および肺病変から分離さ

れた計163株について、CP, SM, KM, SPCM, ABPC, OTC および CL の感受性を調べた。その結果、鼻腔由来80株のうち、CP 耐性が13株 (血清型 A : 6株, D : 7株) 認められた。一方、肺病変由来83株 (いずれも血清型 A) における耐性株出現頻度は、SM が27株, CP が4株, ABPC および KM が各3株であった。

薬剤耐性型をみると、鼻腔由来の耐性株(13株)はいずれも Cp 単剤耐性であり、肺病変由来の耐性株 (27株) では、Sm Km Cp が2株, Sm Ap または Sm Cp が5株そして Sm が20株であった⁷⁾。

④1986年に東北・北陸地方で飼育されていた豚の肺病変から分離した17株と、参照株として用いた Kobe 5株⁴⁾ (1961年以前に豚からの分離株) について、MIC を測定し比較した。その結果表5に示すように、全株の発育を低濃度で阻止したのは ABPC, OXA であり、次で OTC, ST (SCPD : 5+TMP : 1), FZ および TML の順であった。CP (TPH) 耐性が2株, SM 耐性が6株認められ、耐性型をみると Sm Cp が2株 (いずれも血清型 D, 秋田由来), Sm が4株 (いずれも血清型 A, 秋田・山形由来) であった。一方、新潟および石川由来株では耐性株が認められず、耐性株は限られた農場から分離される傾向にあった。

OTC, KM および TML の1986年分離株に対する MIC は、Kobe-5 株に対する値よりも、2~4倍大きい傾向にあった。この3薬剤はいずれも、現在、養豚場で多用されているものであり、その影響によるかは不明であるが、今後さらに調査を続ける必要がある。

⑤1987~1988年に各地の豚の鼻腔から分離した血清型 D (75株) の薬剤感受性は表6に示すとおりで、低濃度 ($\leq 3.2 \mu\text{g/ml}$) で全株の発育を阻止したのは OXA, OTC であり、次で ABPC, FZ ($\leq 6.3 \mu\text{g/ml}$), ST ($\leq 12.5 \mu\text{g/ml}$) であった。耐性を示したのは SM が37株, CP が6株, KM および ABPC が各1株であった。これら耐性株のうち、SM 耐性株が分離された養豚場は全国的に散在していたが、他の耐性株は少数例の農場からのみ分離された。耐性型別の出現頻度では Sm

表4 豚肺病変由来 *P. multocida* A型の薬剤耐性型

耐性型	株数	分離場所
Sm Km Cp	3	秋田
Sm Ap	6	茨城
Sm	9	茨城, 岩手
—	19	茨城, 岩手, 秋田

供試菌株：1983年分離

表 5 豚肺病巣由来 *Pasteurella multocida* の薬剤感受性分布

薬剤名	最小発育阻止濃度 (MIC : $\mu\text{g/ml}$)										
	≤ 0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.3	12.5	25	50	100	100<
OTC	3 ^{a)}	6		7	1						
ABPC	▲ 17										
KM					▲	12	5				
SM						1	8	1	1		6
TML			▲	3	10	4	▲				
CP	1	14						2			
TP		▲	14		1						2
FZ			▲	3	13	1	▲				
OXA	17										
SDMX	▲								2		15
ST ^{b)}			5	2	1	9					▲

a) : 菌株数 b) ST : (SCPD : 5+TMP : 1) ▲ : Kobe—5 株の MIC 値
 供試株 : 1986年 秋田, 山形, 新潟, 石川由来の17株 (A型 : 14, D型 : 3)

 表 6 豚鼻腔由来 *Pasteurella multocida* D型の薬剤感受性分布

薬剤名	最小発育阻止濃度 (MIC : $\mu\text{g/ml}$)										
	≤ 0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.3	12.5	25	50	100	100<
OTC	18 ^{a)}	39	9	7	2						
ABPC	71	2	1			1					
KM					3	41	16	13			2
SM						4	19	10	5		37
TML			1	5	23	32	10	4			
CP	1	46	19	2	1	4	1	1			
TP		6	60			1	4			3	1
FZ			2	5	48	20					
OXA	72	1	1	1							
SDMX					1		2	5	1	6	60
ST ^{b)}	1	16	25	16	7	7	3				

a) : 菌株数 b) : ST : (SCPD : 5+TMP : 1 合剤)
 供試株 : 1987~1988年, 北海道, 山形, 茨城, 千葉, 岡山, 広島, 大分, 宮崎由来75株

Km Cp が1株, Km Ap が1株, Sm Cp が5株および Sm が31株で, 感受性株が37株であった。

また, 同時期に鼻腔内から分離した血清型 A (26株) における耐性株の出現状況は, 前述の D 型とほぼ同様であり, Sm Km Cp が1株, Sm Cp が2株および Sm が9株であった。

(3) まとめ

1979年~1988年に豚から分離した計 363 株の成

績を集計したのが表 7 であり, 薬剤耐性株が 114 株 (31.4%) で, SM, KM, CP および ABPC に対する耐性が認められた。耐性株のうち, SM の単在耐性が多く (61.4%) で, 他の耐性株のほとんどは SM と KM, CP あるいは ABPC との 2 または 3 剤耐性であった。

鼻腔由来株と肺病変由来における耐性株の出現状況には明らかな違いは認められず, また血清型による違いも認められなかった。

従来, 我が国では豚の *P. multocida* 感染は主

表 7 豚由来 *P. multocida* の薬剤耐性 (1979-1988)

由来	株数	血清型	株数	耐性型	株数 (%)
肺病変	182	A	134	Sm Km Cp	5 (3.7)
				Sm Ap	9 (6.7)
				Sm Cp	6 (4.5)
				Sm	29 (21.6)
				感受性	85 (63.5)
D	3	Sm Cp	2 (66.7)		
		感受性	1 (33.3)		
未検査	45	感受性	45 (100)		
鼻腔	181	A	97	Sm Km Cp	1 (1.0)
				Sm Cp	2 (2.1)
				Sm	9 (9.3)
				Cp	6 (6.2)
				感受性	79 (81.4)
		D	84	Sm Km Cp	1 (1.2)
				Km Ap	1 (1.2)
				Sm Cp	4 (4.8)
				Sm	32 (38.1)
				Cp	7 (8.3)
感受性	39 (46.4)				

注) 耐性株合計 114 株 (31.4%)

に肺炎の原因としてのみ考えられていたが、最近、豚の萎縮性鼻炎にも大きく関与していることが明らかにされだしてきた³⁾。一方、本感染症の予防を目的としたワクチンは市販されておらず、その対策は基本的な衛生対策と併せて抗菌剤の投与によるところが大きいことから、有効な薬剤の選択は重要である。今までの検査成績によると、多剤耐性株は少ないが、養豚場で使用されている KM, ABPC および CP (TP) の耐性菌が出現しつつあることなどから、今後とも本菌の薬剤感受性の推移について注意を払うことが必要であろう。

要 約

我が国の豚の肺病変および鼻腔から1979~1988年に分離した363株について、薬剤感受性を調べた。OTC, OA または NA に対し全株とも強い感受性を示した。薬剤耐性株は114株 (31.4%) で、このうち単剤耐性が72.8% で他は2または

3剤耐性であった。耐性型では Sm (61.4%) が最も多く、次いで Sm Cp (12.3%), Cp (11.4%), Sm Ap (8.8%) と Sm Km Cp (6.1%) であった。肺病変および鼻腔由来株とも同様な薬剤感受性であり、また血清型による違いも認められなかった。

野外菌株の分離、収集に協力いただいた全農東北、佐倉、中国衛生検査分室および飼料科学研究所日向工場の各位に深謝する。また今回報告した内容は全農家畜衛生研究所の清水幹夫、山本純也、種田貴至ほかと共に実施したものである。

文 献

- 1) Carter, G.R. and Rundell, S.W. 1975. Identification of type A strains of *P. multocida* using staphylococcal hyaluronidase. *Vet. Rec.*, 96: 343.
- 2) Carter, G.R. and Sabronto, P. 1973. Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavine. *Am. J. Vet. Res.*, 34: 293-294.
- 3) 河合 透, 大石紳二, 岡本 宏, 本田 隆, 野中富士男, 徳山幸夫, 酒井英史, 官原徳治, 種子野章, 花木琢磨, 江藤正信. 1989. 毒素産生 D 型 *Pasteurella multocida* の AR 起病性, 第107回日本獣医学会講演要旨, 128.
- 4) Namioka, S. and Murata, M. 1961. Serological studies on *Pasteurella multocida*. I. A simplified method for capsule typing of the organism. *Cornell Vet.*, 51: 498-507.
- 5) Shimizu, M., Kuninori, K., Sakano, T. and Terashima, T. 1982. Antibiotic susceptibility of *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* isolates from swine. *Jan. J. Sci.* 44: 359-363.
- 6) 山本純也, 清水幹夫, 阪野哲也, 矢挽輝武, 深見直, 桜井謙一郎, 高浜伸嗣. 1984. 豚由来 *Pasteurella multocida* および *Actinobacillus pleuropneumoniae* の薬剤感受性, 第97回日本獣医学会講演要旨, 155.
- 7) 山本純也, 種田貴至, 清水幹夫, 阪野哲也, 岡田宗典, 佐藤静夫. 1987. 豚由来 *Pasteurella multocida* の薬剤感受性とプラスミド・プロファイル, 第103回日本獣医学会講演要旨, 121.

Antibiotic Susceptibility of *Pasteurella multocida* Isolated from Swine

Tetsuya SAKANO

(Zen-Noh Institute of Animal Health)

A Total of 363 strains of *Pasteulla multocida* isolated from porcine pneumonic lung and nasal swab samples in Japan during the period 1979 to 1988 were submitted for the antibiotic sensitivity tested.

All of the strains were highly susceptible to OTC and OA or NA. Of the 363 strains examined, 114 (31.4%) were drug resistant strains, of them 83 (72.8%) and 31 (27.2%) were resistant to single and multiple (2 or 3) drugs tested, respectively. Sm resistant strains were most frequent isolated (61.4%), followed by Sm Cp (12.3%), Cp (11.4%), Sm Ap (8.8%) and Sm Km Cp (6.1%). The antibiotic susceptibility of the strains were almost same regardless of their origin (pneumonic lung or nasal swabs) or serovars (A or D).

討 論 (座長：佐藤静夫)

質問 (谷地田俊介, シオノギ製薬): 血清型と MIC 測定による耐性パターンとの関係を見ていますが, その目的をおしえて下さい。

答 (阪野哲也): 一般にブタではA型は肺炎, D型はAR との関係が大きいとされていますので, 臨床的に応用する場合の参考として整理してみました。結果的には血清型と MIC に関係は認められませんでした。

質問 (沢田拓士, 動薬検): 血清型は簡易同定法だけでみえていますか? 特にアクリフラビン試験は信頼性に乏しいので publication 等に際しては血清学的に抑えておく必要がある。

答 (阪野哲也): ヒアルロニターゼおよびアクリフラビン試験を中心に行った。今後, 血清学的につめたい。