

追 加 資 料

Pasteurella multocida の薬剤感受性測定法について

今回のシンポジウムにおける討論により *Pasteurella multocida* の薬剤感受性測定法について、標準的な方法の確立が必要と判断されたので、本会では「家畜・家禽由来 *P. multocida* の薬剤感受性測定法についての検討小委員会」を組織して本件の検討を行った。

その結果、小委員会から以下の報告があったので追加資料として掲載する。

小委員会の構成：村田昌芳（広島大）、坂野哲也・佐藤静夫*（全農家衛研）、沢田拓士（動薬研）、高橋 勇（日獣大）、内田幸治（ファイザー製薬）

* 小委員会座長

家畜・家禽由来 *Pasteurella multocida* の薬剤感受性測定法 (家畜抗菌剤研究会標準法)

Pasteurella multocida の薬剤感受性測定法は寒天希釈法により行うが、試験用培地の種類あるいは接種菌数などによって測定結果にかなりの差異が認められるので、比較的安定した測定結果を得るために、次の方法（測定条件）を標準法として定める。

なお以下に述べる3項目以外の術式は、全て既存の家畜抗菌剤研究会の標準法に準ずる。

(1) 感受性測定用寒天培地：次のいずれかを使用する。

Dextrose starch agar (Difco)

Mueller Hinton agar (Difco, 栄研)

(2) 感受性測定用接種菌の培養

Mueller Hinton broth (Difco) にて 37°C、18~24時間おこなう。

(3) 感受性測定用寒天培地への接種菌量

培養菌液を生理食塩液または PBS で 1,000 倍に希釈し、約 10^8 CFU/ml の菌液を作製し、接種器 (multi-inoculator; 佐久間, 武藤, Gathra 製等) を用いて接種する (この場合、実際に寒天平板培地に接種される菌量は約 10^3 CFU/0.003 または 0.005 ml である)。

但し、上記の培養法で発育が不十分とみなされる菌株 (その多くは変異株である) の培養菌液は約 100 倍に希釈して接種する。

(小委員会検討資料 1)

Pasteurella multocida の薬剤感受性測定法に関する検討

阪野哲也・山本純也・佐藤静夫 (全農家畜衛生研究所)

Pasteurella multocida の薬剤感受性測定法に関する検討はほとんどなされておらず、標準的な測定方法は未だ確立されていない。そこで、測定に用いる培地及び接種菌量等が最小発育阻止濃度

(MIC) に及ばず影響について検討した。

材料および方法

供試菌株：萎縮性鼻炎発症豚由来の ZF-714,

ZF-817, ZF-824, ZF-837 及び ZX, 並びに豚肺病変由来の Kobe 5 [1] を用いた。

供試培地：増菌用の液体培地としてトリプトンイブイオン（栄研），感受性測定用イブイオン（ニッスイ），感受性イブイオン（栄研）及び Mueller Hinton broth (Difco) について検討した。また薬剤感受性測定用の寒天平板培地として Dextrose starch agar (Difco), Mueller Hinton agar (Difco), Trypticase soy agar (BBL), YPC agar [1], 感受性測定用寒天培地（ニッスイ）及び普通寒天培地（栄研）について検討した。

方法：液体培地における増殖性の比較は，各培地 1.5 ml に同一菌量の菌液 0.1 ml を接種し，27°C で静置培養を行い，経時的に生菌数を測定した。なお菌数測定には Dextrose starch agar

を用いた。

寒天培地における増殖性の比較は，Dextrose starch agar で一夜培養した菌を Mueller Hinton broth で段階希釈した菌液の一定量を各寒天培地に接種し，37°C で18時間培養後，発育した集落数及びその直径を測定した。

測定用寒天培地の種類及び接種菌量が MIC に及ぼす影響については，oxytetracycline (OTC), kanamycin (KM) 及び sulfadimethoxine (SDMX) の MIC を Dextrose starch agar, Mueller Hinton agar 及び普通寒天培地に $10^5 \sim 10^{10}$ colony-forming units (CEU)/ml の菌液をマイクロプランター（佐久間製作所）を用い約 $5 \mu\text{l}$ ずつ接種し，37°C で18時間培養後に判定した。

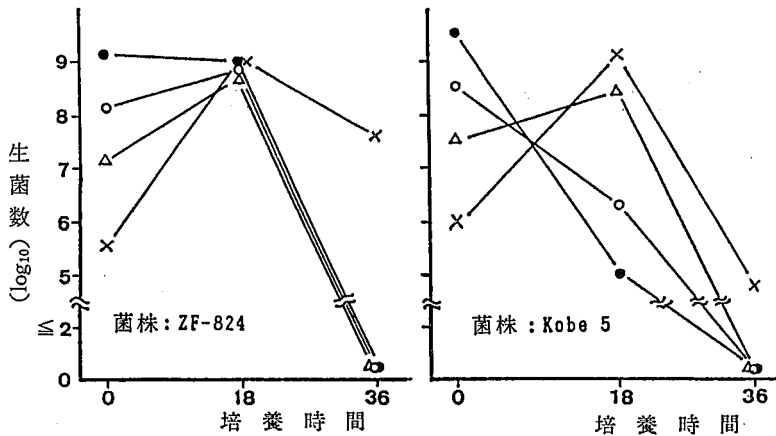


図1 トプトソイブイオン（栄研）における接種菌量と増殖性

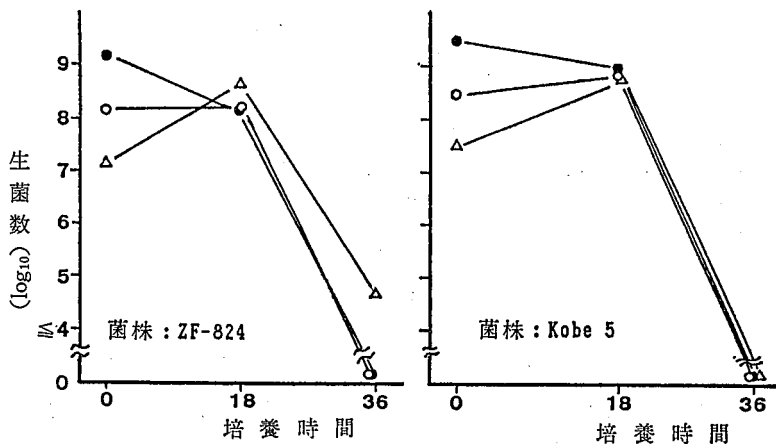


図2 感受性測定用イブイオン（ニッスイ）における接種菌量と増殖性

成績及びまとめ

1) 液体培地における増殖性

トリプトソイブイオンでは菌濃度が約 10^9 CFU/ml に達すると、急速に死滅することが明らかとなった (図 1)。

感受性測定用ブイオンにおいても菌濃度が $10^8 \sim 10^9$ CFU/ml に達すると、急速に死滅することが明らかとなり (図 2), また感受性ブイオンで

も同様な成績であった (図 4)。

Mueller Hinton broth では約 10^9 CFU/ml に達した生菌数が長時間持続することが確認された (図 3)。

これらのことから、一般細菌の薬剤感受性測定²⁾における増菌用培地として Mueller Hinton broth, 感受性測定用ブイオンあるいは感受性ブイオンのいずれかが用いられているが、*P. multocida* の増菌用培地としては Mueller Hinton broth が適していると考えられる。

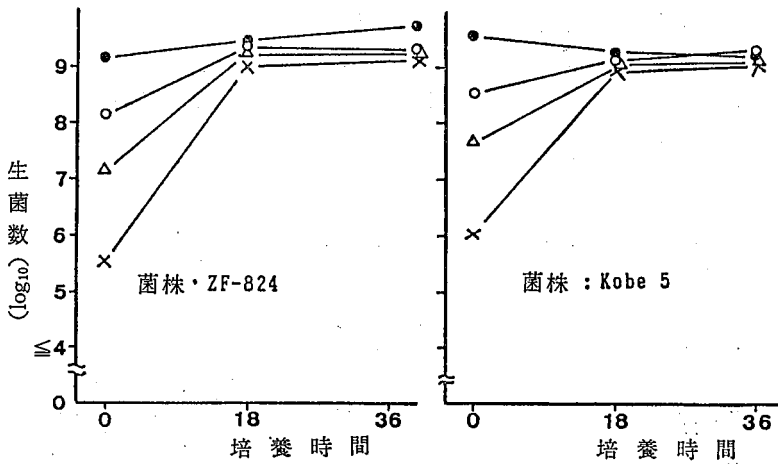
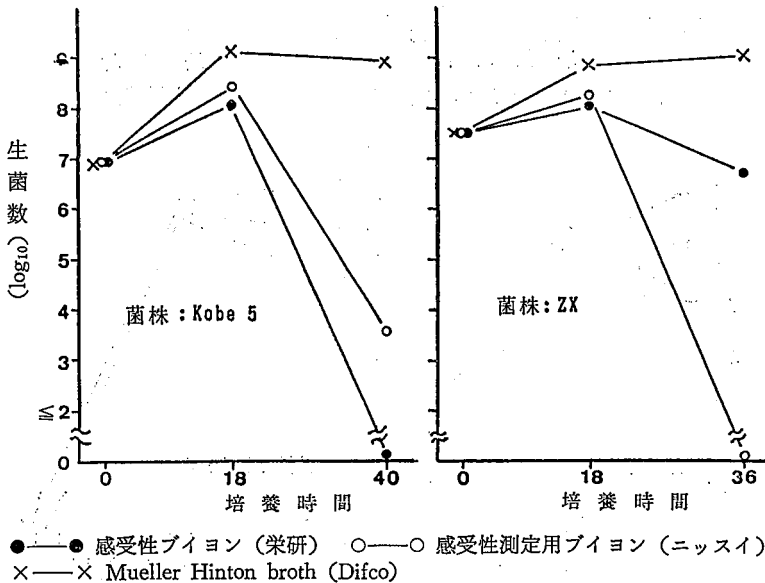


図 3 Mueller Hinton broth (Difco) における接種菌量と増殖性



●—● 感受性ブイオン (榮研) ○—○ 感受性測定用ブイオン (ニッスイ)
 ×—× Mueller Hinton broth (Difco)

図 4 感受性測定用の市販液体培地の種類と増殖性

2) 寒天平板培地における増殖性
同一菌液を各培地に接種しても、出現する集落数及びその直径は培地の種類により明らかな差が

認められた。發育性の優れていたのは Dextrose starch agar, Mueller Hinton agar の順で、次に Trypticase soy agar, YPC agar 及び普通寒天培

表 1 *P. multocida* の各種寒天平板培地における發育性

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

供試菌株：ZF-837, 培養条件：37°C 18時間

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

培地	菌数 (CFU/ml)	コロニー直径 (mm)
MHA (Difco)	4.6×10^6	0.5~1.0
MHA+cystine (50 µg/ml)	$< 1.0 \times 10^4$	はん痕
MHA+tryptophan (150 µg/ml)	4.0×10^6	1.0~1.5
YPC broth	4.1×10^6	≤0.5
YPC broth—cystine	1.7×10^7	0.5~1.0
感受性測定用寒天培地 (ニッスイ)	$< 1.0 \times 10^2$	—
Dextrose starch agar (Difco)	3.8×10^7	1.5~2.5

供試菌株：Kobe 5, 培養条件：37°C 18時間 MHA：Mueller Hinton agar

表 3 使用培地と接種菌量が MIC に及ぼす影響

菌株	菌濃度 (CFU/ml)	培地での發育性 ¹⁾			OTC の MIC ²⁾			KM の MIC			SDMX の MIC		
		MHA	DSA	STA	MHA	DSA	STA	MHA	DSA	STA	MHA	DSA	STA
Kobe-5	6.6×10^9	+ ²	+ ³	+ ²	3.2	3.2	1.6	25	50	25	100<	100<	100<
	$\times 10^8$	+ ³	+ ³	+ ²	1.6	1.6	1.6	25	50	12.5	100<	100<	100<
	$\times 10^7$	+ ²	+ ³	±	1.6	1.6	≤0.2	25	50	≤0.2	100<	100<	0.2
	$\times 10^6$	+ ²	+ ³	—	1.6	1.6	.	12.5	50	.	12.5	50	.
	$\times 10^5$	+	+ ³	—	1.6	1.6	.	6.3	25	.	3.2	50	.
ZF-817	1.7×10^9	+ ²	+ ²	+ ²	3.2	3.2	3.2	25	50	25<	100<	100<	100<
	$\times 10^8$	+ ²	+ ³	+ ²	1.6	3.2	1.6	25	50	12.5	100<	100<	50
	$\times 10^7$	+ ⁷	+ ³	±	1.6	1.6	1.6	12.5	50	1.6	25	100<	25
	$\times 10^6$	+ ²	+ ³	±	1.6	1.6	≤0.2	12.5	25	≤0.2	3.2	100	2.2
	$\times 10^5$	+	+ ²	±	1.6	1.6	≤0.2	6.4	25	≤0.2	3.2	50	1.6
ZF-837	2.1×10^{10}	+ ³	+ ³	+ ³	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<
	$\times 10^{10}$	+ ²	+ ³	+ ²	6.4	100<	1.6	25	100	12.5	100<	100<	100<
	$\times 10^8$	+ ²	+ ³	+ ²	1.6	3.2	1.6	12.5	50	6.3	100<	100<	100
	$\times 10^7$	+ ²	+ ³	+	1.6	3.2	0.4	12.5	25	6.3	12.5	100	12.5
	$\times 10^6$	+ ²	+ ³	+	1.6	1.6	0.4	12.5	25	0.8	6.3	25	12.5

培養条件：37°C 18時間 MHA：Mueller Hinton agar (Difco) DSA：Dextrose starch agar (Difco)

STA：感受性測定用寒天培地 (ニッスイ)

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

2) MIC：µg/ml ∙：測定不能

地であり、感受性測定用寒天培地最も劣った (表 1)。

薬剤感受性試験用の寒天平板培地として、Mueller Hinton agar と感受性測定用寒天培地が市販されている。しかし *P. multocida* は後者の培地において増殖性が著しく劣り、この原因として後者のみ含有されている L-cystine あるいは L-tryptophan の影響が考えられた。そこで、これらが含まれていない Mueller Hinton agar に各物質を添加、また L-cystine が含まれている YPC agar からそれを除去し、増殖性を調べたところ、L-tryptophan の有無による増殖性への影響は認められなかった。一方、L-cystine が *P. multocida* の増殖を抑制する物質の一つであることが明らかとなった (表 2)。

これらのことから、測定用の寒天平板培地としては Dextrose starch agar あるいは Mueller Hinton agar が適していると考えられる。

3) 測定用寒天平板培地の種類及び接種菌量が MIC に及ぼす影響

感受性測定用寒天培地を用いたとき、接種菌濃

度が 10^7 CFU/ml 以下では菌株によっては発育が著しく劣り、測定不能となった (表 3)。

Dextrose starch agar あるいは Mueller Hinton agar を用いた場合、OTC 並びに KM の MIC は接種菌濃度が $10^5 \sim 10^8$ CFU/ml の範囲では一定の成績であり、また SDMX では $10^5 \sim 10^8$ CFU/ml の菌濃度のときほぼ安定した成績が得られた (表 3)。

これらの成績から *P. multocida* の薬剤感受性測定においては、増菌培養には Mueller Hinton broth を用い、 37°C で一夜培養後、その菌液を約 1,000 倍に希釈 (約 10^6 CFU/ml) して検査用菌液とする。この菌液を直ちに測定用寒天平板培地である Dextrose starch agar あるいは Mueller に接種し、 37°C で一夜培養後に判定することが適切と考えられる。

文 献

- 1) Namioka, S. and Murata, M. (1961). Cornell Vet. 51, 498-507.
- 2) 五藤肇智子, 徐 慶一郎, 河喜多龍祥, 小酒井望, 三橋進, 西野武志, 大沢伸孝, 田波洋 (1981). Chemotherapy 29, 76-77.

(小委員会検討資料 2)

Pasteurella multocida の MIC 測定における 接種菌培養用培地の検討

内 田 幸 治 (ファイザー製薬農産技術センター)

Pasteurella multocida の MIC 薬剤感受性測定に際して感受性測定用寒天培地への接種菌を培養する液体培地を選択するための資料を得るため、3 種類の培地を用いて野外分離株 6 株、実験室保存株 2 株に対する発育支持力を比較した。

供試菌：*P. multocida* の野外分離株として豚由来 A 型菌として PM 8801, D 型菌として PM 8802, PM 8835, を、牛由来株 (血清型不明) として SN 8801, CN 8811, SN 8859 および参照株とし

て豚由来 A 型菌 Kobe 5 (動物医薬品検査所沢田博士分与株) ならびに D 型菌 Kobe 6 (全農家衛研・阪野博士分与株) の計 8 株を供試した。

供試培地：液体培地として Mueller Hinton broth (Difco) Lot 767498, トリプトソイブイオン (栄研) Lot 93001, 感受性ブイオン (栄研) Lot 91001 の 3 種類を使用した。

試験方法：各菌株の 5% 馬血液加ハートインフュージョン寒天培地 (栄研) 培養菌を, McFarland No. 1 の濁度になるように PBS に懸濁し、その

表 1 各種液体培地における *Pasteurella multocida* の増殖

区分	菌株名	由来	血清型	接種菌数 (CFU/0.01 ml)	培養後の菌数 (CFU/ml)		
					Mueller Hinton broth (Difco)	トリプトソイ ブイヨン(栄研)	感受性ブイヨン (栄研)
野外 分離 株	PM 8801	豚	A	2.1×10^6	1.2×10^9	6.4×10^8	4.7×10^8
	PM 8802	豚	D	1.9×10^6	8.4×10^8	4.9×10^8	1.0×10^8
	PM 8835	豚	D	4.0×10^6	1.1×10^9	4.4×10^8	2.5×10^8
	SN 8801	牛	不明	1.1×10^6	8.3×10^8	8.4×10^8	5.9×10^8
	CN 8811	牛	不明	2.6×10^6	6.3×10^8	7.8×10^8	3.7×10^8
	SN 8859	牛	不明	1.7×10^6	8.9×10^8	7.0×10^8	3.3×10^8
参照 株	Kobe 5	豚	A	2.0×10^6	5.1×10^8	5.1×10^8	3.2×10^8
	Kobe 6	豚	D	3.5×10^6	5.7×10^8	3.5×10^8	1.4×10^8

0.01 ml を上記の各培地 2 ml に接種した。37°C で18時間静置培養後、5% 馬血液加寒天培地を用い、菌数を測定した。

試験成績：供試した3種の培地においては *P. multocida* の MIC 測定における接種菌培養用培

地として十分な菌量の発育が認められた。

しかし、これら培地における増殖程度を比較すると、Mueller Hinton broth (Difco) はトリプトソイブイヨン(栄研)と同等ないしやや良好な傾向を示したが、感受性ブイヨンは前2者より劣っていた(表1)。