

琉球大学学術リポジトリ

豚丹毒菌の抗生物質に対する感受性およびペニシリン耐性株誘出の試み(畜産学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 金城, 俊夫, 町田, 宗純, Kinjo, Toshio, Machida, Sojun メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4442

豚丹毒菌の抗生物質に対する感受性 およびペニシリン耐性株誘出の試み*

金城俊夫** 町田宗純***

Toshio KINJO and Sojun MACHIDA : Sensitivity of *Erysipelothrix insidiosa* strains to antibiotics and trials of artificial induction of penicillin resistant strains in vitro

I 緒 言

豚丹毒はその予防接種の普及に拘わらず、なお毎年その発生をみている。

沖縄においても、ここ数年豚コレラが全く発生してないのに対し、豚丹毒は常在化しているようで、毎年全飼養頭数の約1%位に発生し続けており、養豚家に経済的損失を与えている。

本病はその病型より急性敗血症型、尋麻疹型、心内膜炎型、関節炎型などに型別されており、なかでも生前診断の比較的困難な心内膜炎型の増加が注目されている。

このような慢性型心内膜炎の増加の原因が本病治療に特効薬とされているペニシリンおよびその他の抗生剤の不適当な使用によるものでなからうかと想定して、各病型由来豚丹毒菌の抗生物質感受性試験を実施した。

なお、人工的にペニシリンに対する耐性株の誘出の試みも同時に行なったので、その大要を報告する。

II 実験材料および方法

1 供試菌株

沖縄各地で自然発生した豚丹毒豚より著者らが分離した26株、札幌と畜場に搬入された豚より森永および金城(5)が分離した14株および農林省家畜衛生試験場北海道支場・村瀬博士より分与された各血清型(8)を含む8株の計48株を供試した。

2 使用抗生物質

市販の次の6種の抗生物質を使用した。ペニシリン(PC)、ストレプトマイシン(SM)、オキシテトラサイクリン(TC)、クロラムフェニコール(CM)、エリスロマイシン(EM)、カナマイシン(KM)。

* 本研究の要旨は第75回日本獣医学会(昭和48年4月)において報告した。

** 琉球大学農学部畜産学科

*** 沖縄県家畜衛生試験場

琉球大学農学部学術報告, 20: 335~341 (1973)

3 薬剤感受性試験

感受性試験は寒天平板希釈法で、その最小発育阻止濃度 (MIC) を求める方法によった。

培地は馬肉水で作成したブイヨンおよび寒天に0.1%にトウイーン80を、5%に仔牛血清をそれぞれ加えたものを使用した。

各抗生物質を所定の最終濃度の10倍になるよう蒸留水で2倍段階希釈しておき、これを寒天培地に1/10量加えて、20mlずつ平板に分注して固めた。このようにして準備した平板培地表面に、予め保存用クックドミート培地よりブイヨン培地に移植、培養された各菌株を1白金耳画線培養した。37°C48時間培養後、菌の発育の有無を判定した。

4 PC耐性株誘出法

48株中20株を選びそれぞれを100mlのブイヨンで37°C、40時間培養し、接種菌液を作った。

PCを2u/mlになる如く加えた寒天平板培地 (15ml) および5%牛血清加トリプトースホスフェートプロス (Difco) (10ml) を各菌株毎にそれぞれ20枚および100本用意した。

培養菌液を平板には0.2mlずつ、試験管内液体培地には0.5mlずつ移植し、37°C48時間培養後、菌の発育を観察した。

III 実 験 成 績

1 豚丹毒菌の各種抗生物質に対する感受性

供試48株の6種の抗生物質に対するMICの分布は表1の如くである。

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics against *Erysipelothrix insidiosus* strains

表 1. 豚丹毒菌に対する各種抗生物質の最小発育阻止濃度 (MIC)

Antibiotic	MIC (μ g, unit/ml)													Average MIC	
	<0.05	0.05	0.10	0.19	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100		>200
PC			2.1* (1)**	16.7 (8)	72.9 (35)	8.3 (4)									0.384
EM	83.3 (40)	14.6 (7)					2.1 (1)***								<0.050
TC						12.5 (6)	83.3 (40)	2.1 (1)		2.1 (1)					1.723
CM								4.2 (2)	79.2 (38)	16.6 (8)					7.162
SM									2.1 (1)	4.2 (2)	74.9 (36)	16.7 (8)	2.1 (1)		29.817
KM												2.1 (1)		97.9 (47)	>200

* Percentage of the total number of strains (48 strains)

** Number of strains

*** The strain showed by gothic is the same one. See text

まず特効薬とされているPCに対しては、48株ともに0.10から0.78単位に分布し、平均MICは0.384単位で、高い感受性を示している。

使用した薬剤中、EMは最も低濃度で効力があり、1株を除き全例0.05マイクログラム(μg)あるいはそれ以下で発育阻止効果が現われている。

TCは0.78から12.5 μg の間に分布し、平均MICは1.723、次いでCMが3.13から12.5の間で平均7.162となっている。

SMに対しては50 μg 以上にMICのある耐性株も認められ平均MICも29.817と高い値を示し感受性が低くなっている。

KMは上述の成績とは全く異り、1株が25 μg に分布した以外、47株はすべて試験した最高濃度の200 μg にも耐性であった。

25 μg にMICのあった1株は著者が最近心内膜炎型により斃死した自然例より分離したものであるが、表1で特にゴジックにして示してあるようにKMの他EM、TC、SMに対しても他の株と異った感受性を示している。

次にどの病型から分離されたか、その由来の明らかな株21株と、抗生物質が一般に使用されるようになった以前に分離されたと思われる8株についてPCについての感受性を比較した。

その結果は表2の如くで、急性敗血症型由来10株の平均MICは0.371単位、また蕁麻疹型由来の4株のそれは0.269で、その慢性化したものと考えられている心内膜炎型由来7株は0.363と僅かにMIC値が高くなっているが、耐性化した菌によって慢性型の心内膜炎が発生するといえる有意の差は認められなかった。

Table 2. Comparison of penicillin sensitivity among strains of *E. insidiosa* isolated from different forms of erysipelas and also strains not exposed to penicillin

表 2. 豚丹毒各種病型由来の菌および抗生物質使用前に分離された菌のペニシリン感受性の比較

Strain isolated from	No. of strain tested	MIC (unit/ml)				Average MIC
		0.098	0.195	0.391	0.781	
Septicemia	10	0	1	9	0	0.350
Urticaria	4	1	1	2	0	
Endocarditis	7	0	1	6	0	
Erysipelas*	8	0	1	7	0	

* Erysipelas outbreaked at the time before usage of penicillin

これら3つの病型由来21株の平均MICは0.350で、この値はPC使用前分離株の0.366と差なく、従ってPC使用によって本菌の耐性化が起るといふ事実は認められなかった。

2 ペニシリン耐性株の誘出の試み

前項の成績で、豚丹毒菌が自然界でPC使用に拘わらずそれに対し耐性化しない事実が明らかになったので、本試験では逆に人為的に in vitroでPC耐性株の作出を試みた。

試験に供した20株、何れも前述の方法による突然変異耐性株の誘出には成功してない。

従って豚丹毒菌はPCに対しては他の菌種に比して感受性が高く、しかも安定したものであろうと考え

られる。

IV 考 察

豚丹毒は細菌性の人獣共通伝染病で食肉衛生上も重要な疾病とされている。

わが国における豚丹毒の発生状況を農林省の家畜衛生統計よりみると、1963年には1,996頭の発生が、翌1964年には14,153頭に達し、以来毎年増加の傾向をたどっている。

沖縄における1965年以降7年間の発生状況をみると、表3の如く毎年全飼養頭数の約1%に発生しており、他府県のそれより高率で、これら発生豚による経済的損失は無視できない。

Table 3. Occurrence of swine erysipelas in Okinawa

表 3. 沖縄における豚丹毒の発生状況

Year	Number of swine breded	Swine erysipelas	
		No. of positive	percent of positive
1965	168,675	1,563	0.93
1966	191,779	1,355	0.71
1967	167,071	1,724	1.03
1968	174,362	2,298	1.32
1969	228,513	2,128	0.93
1970	249,811	2,890	1.16
1971	187,128	2,394	1.28
Total	1,366,739	14,352	1.05

なお、これらの数字は各市町村獣医師の発生報告をもとに作成されたもので、病型別のそれは明らかでない。

しかし、森永および金城 (1970) が1963年から1969年の7年間にわたって札幌と畜場に搬入された計24万余頭の豚について蛍光抗体法(6)を加味して調べた成績によると表4の通りで、全陽性頭数に対する慢性の心内膜炎型頭数の占める割合が年々増加していることが明らかである。

Table 4. Detection of swine erysipelas at the Sapporo abattoir

表 4. 札幌と畜場における豚丹毒の摘発状況

Year	Number of swine inspected	Number of erysipelas detected			percent of positive	percent of endocarditis*
		Urticarial form	Endocarditis form	Total		
1963	25,488	11	0	11	0.043	0
1964	24,061	23	1	24	0.099	4.2
1965	29,475	20	2	22	0.074	9.1
1966	44,214	13	3	16	0.036	18.8
1967	43,199	26	15	41	0.095	36.6
1968	34,103	7	4	11	0.032	36.4
1969	41,259	14	16	30	0.072	53.3
Total	241,799	114	41	155	0.064	26.4

* Percentage of endocarditis to total number of erysipelas

この成績はと畜場に出荷された豚についてのもので、必ずしも実際の野外の発生状況をそのまま反映しているものではないが、ただと殺解体後はじめて診断が可能な心内膜炎型が増加している事実は、食肉衛生上このような病豚を全廃せねばならないことから注目する必要があると考えられる。

このような背景から、本実験は慢性型の心内膜炎が増加している原因を究明すべく企画した。

抗生物質特に PC は豚丹毒菌に対し特効薬とされ (1, 7, 9), 本症の治療に広く使用されている。そこでこの PC の適切でない使用法が耐性株を産み、それら耐性株によって慢性型の心内膜炎が漸増しつつあるのでなからうかと想定した。

このような観点からの実験報告もいくつかあげられる。すなわち、Fussganger (1958) は豚丹毒菌 3 株を用い PC 加培地に 10 ヶ月間培養して耐性化の有無をみているが、全く変化がなかったといい、また Kielstein (1961) も同様 75 株を用い 6 ~ 8 か月間毎日 PC 培地に継代を繰返したが 3 株のみが僅かに耐性化の傾向が認められたと報告している。

また本実験実施中に、この点に関しての詳細な研究が畦地 (1971) によって報告された。

氏らは各種病型由来豚丹毒菌 57 株について、抗生物質を中心とした 2 種のサルファ剤を含む計 26 種の化学療法剤に対する感受性を調べ、また同時に PC 添加寒天培地に 20 代累代培養することにより PC 耐性株の誘出をも試みている。その成績によると、PC の MIC は 0.182 単位で著者らの 0.384 単位より低く、豚丹毒菌が PC に対しなお高い感受性を持っていることを示している。その他の抗生物質についても両者ではほぼ同様の感受性パターンを得ている。

畦地らも実験室保存株と野外分離株あるいは異なる病型より由来した株間に感受性に著しい差を認め得ず、抗生物質使用に起因すると考えられる耐性株は確認できなかったといい、さらに累代継代による実験的 PC 耐性豚丹毒菌の作出にも成功しなかったと報告している。これらの成績は著者らの今回のそれとほぼ軌を同じくしているものといえる。すなわち、著者らの実験でも、例数は少ないが、急性の敗血症型あるいは蕁麻疹型由来の株と、その慢性化したものと考えられる心内膜炎型由来株の間に PC 感受性に差なく、さらに PC 使用前に分離されたと思われる保存株と近年分離された株との間にも同じく差が認められなかった。また人工的に突然変異による PC 耐性株の作出を試みたが成功してない。

このような事実から、豚丹毒菌は他の菌種に比較して PC に対して感受性が極めて高くしかも非常に安定した状態で維持されているものと考えられる。

従って、今回の実験成績あるいは前述の報告等から、慢性の心内膜炎型豚丹毒の増加の原因を PC 耐性株出現に結びつけようとした意図は妥当ではなかったといえる。さらに他の視点からの究明が必要であろう。

なお本実験の過程で、最近著者が心内膜炎型豚丹毒で斃死した 1 例の病巣より分離した菌が抗生物質感受性の面で他の菌株と異なるということを見出した。

この株は表 2 のゴジックで示したものであるが、例えば EM に対する MIC はその 1 例のみが 1.56 で、他の 47 株はすべて 0.05 あるいはそれ以下に分布しており、大きな差がみられる。KM に対しては従来より豚丹毒菌は感受性がないものとされ、逆にこの性質を利用して分離用培地に KM を $400 \mu g/ml$ 加えることが推奨されていたが、この 1 株は $25 \mu g/ml$ に MIC があり、他の 47 株すべてがテストした最高濃度 $200 \mu g$ でもなお発育可能であったのと全く異った性状を示した。

今後この性状を 1 つの指標にして、本菌の薬剤耐性の問題など遺伝学的研究の 1 つの手がかりが得られるのでなからうかと考えられるので、さらに検討を加えたい。

V 結 論

慢性型豚丹毒の増加の原因を、PC その他の抗生物質の適切でない使用による耐性株の出現によるも

のでなからうかと想定した。そこで各種病型より分離された計43株について6種の抗生物質に対する感受性試験を平板希釈法によりMICを求める方法で実施した。さらに人工的にPC耐性株を誘出する試みも同時に行ない以下の結果を得た。

1. 供試豚丹毒菌の抗生物質に対する感受性は、PCに対してはMICが0.10から0.78単位の間であり平均0.394で高い感受性のあることが示された。EMには最も感受性高く平均MIC 0.050 μ g以下で、TCには1.723 μ g、CMには7.162 μ g以下であった。SMに対しては感受性が低く、平均29.817 μ gで他の抗生物質に比し本菌に対する抗菌作用が弱い。またKMには1例を除きすべて抵抗性であった。
2. 慢性型、急性型豚丹毒から由来した菌株間あるいは抗生物質が広く使用されるようになった時点以前に分離され保存されている菌株と最近分離された菌株との間にPCに対する感受性に差は認められなかった。
3. 20株についてそれぞれをPC 2 u/ml加固型および液体培地に移植、培養し、人工的に耐性株の作出を試みたが全く成功しなかった。
4. 以上の成績より、豚丹毒菌はPCに対して感受性が高く、しかも安定した状態で保持されていることが明らかで、従って慢性型豚丹毒が漸増している事実を耐性菌出現に因果関係を求めることはできなかった。
5. EM、TC、KMに対する感受性が他の株と全く異なる1株を心内膜炎型より分離したが、今後この性質が本菌の遺伝学的研究の一つの指標として使用可能であろうと考えられる。

文 献

1. Aitken, W. A. 1949 Penicillin in swine erysipelas, North Amer. Vet., **30**: 25~28
2. 畦地速見・中村久・米沢昭一・佐藤修司・高橋勇・鈴木勝夫 1971 各種病型由来豚丹毒菌株の化学療法剤に対する感受性, 日獣会誌, **24**: 92~97
3. Fussganger, R. 1958 Zur Frage der Penicillin Resistenz der Rotlaufbakterien, Vet-med. Nachr., **1**: 23~26
4. Kielstein, P. 1961 Zur Bakteriellen chemoresistenz des Rotlaufferregers, Arch. Exp. Vet Med., **15**: 1161~1164
5. 森永修正・金城俊夫 1970 札幌と畜場における豚丹毒摘発状況ならびにその分離株の性状について, 日獣会誌, **23**: 523~527
6. ———・工藤幸也・金城俊夫 1968 螢光抗体法による豚丹毒の診断, 北海道獣会誌, **12**: 11~14
7. Moynihan, I. W. and Stovell, P. L. 1954 The sensitivity of *Erysipelothrix rhusiopathiae* to antibiotics and its relation to chemotherapy, Proc. Ann. Meeting Amer. Vet. Med. Ass., **91**: 327~332
8. Murase, N., Suzuki, K., Nakahara, T., Araumi, W. and Hashimoto, K. 1959 Studies on the typing of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Serological behaviours of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pigs, Jap. J. Vet. Sci., **21**: 113~121
9. Politynska-Banas, E. 1965 Susceptibility of various phago and serotypes of *Erysipelothrix insidiosa* to antibiotics, Bull. Vet. Inst. Pulawy, **9**: 78~81

SUMMARY

The increasing prevalence of the endocarditis form which belonged to chronic form of swine erysipelas was outstanding. The authors supposed that the fact might be resulted from prevalence of antibiotic resistant strains of *Erysipelothrix insidiosa*.

The present study, therefore, examined for sensitivity to 6 antibiotics by means of plate dilution method using 48 strains of *E. insidiosa* which isolated from different forms of swine erysipelas.

1. All the strains tested were sensitive to penicillin (PC) of which average minimum inhibiting concentration (MIC) was 0.384 units. Erythromycine (EM) was the most effective and its MIC was $0.050\mu\text{g}$, followed by oxytetracycline (TC) 1.723, chloramphenicol 7.162, and streptomycine 29.817. All the strains except one were resistance to kanamycine (KM) .

2. There were no differences in sensitivity to PC among the strains isolated from acute and chronic forms and also among stock cultures which supposed to be not exposed to PC and recently isolated strains.

3. Artificial induction of PC resistant strain in vitro was difficult to make any of the resistant strain.

4. From the above results, PC was consistently found to be more effective antibiotic against *E. insidiosa*. The possibility of the erysipelas organism becoming resistance to PC was negated.

5. One strain of which patterns of sensitivity to EM, TC and KM were different from others was isolated from endocarditis form. This character may possibly be used as one of genetical markers of *E. insidiosa*.