

## 豚丹毒菌の培養方法に関する検討

村北佳史\*, 田村和義\*, 伊東大輔\*, 川崎成人\*, 中川善宏\*\*

Comparison of methods for culturing *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Yoshifumi MURAKITA, Kazuyoshi TAMURA, Daisuke ITOH, Naruto KAWASAKI, Yoshihiro NAKAGAWA

## Abstract

Swine Erysipelas caused by *Erysipelothrix rhusiopathiae* is occasionally found in slaughter inspection. It is recognized as a cause of infection in humans, so it is important to establish how to distinguish *E. rhusiopathiae* from other bacteria. We tried to compare the methods for isolating *E. rhusiopathiae* using various antibiotics. All *E. rhusiopathiae* strains we isolated from pigs had resistance to six antibiotics, gentamicin, kanamycin, bacitracin, vancomycin, neomycin, and novobiocin. However the number of *E. rhusiopathiae* cultured with the various antibiotics was decreased. These results suggested that we should use culture medium both with and without antibiotics when we isolate *E. rhusiopathiae*.

## Key Words

豚丹毒 Swine Erysipelas, 抗生物質 antibiotics

## 1 緒言

豚丹毒は、豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) の感染によって起こる豚の疾病であり、敗血症型、皮膚型、心内膜炎型、関節炎型に分類される。これらは全てと畜場法に基づくと殺及び解体禁止、全部廃棄対象疾病に指定されており、また人に類丹毒を起こす等、人獣共通感染症としても重要である。本市と畜場においては、平成 22 年度に 51 頭が全部廃棄となっている。

と畜検査（解体後検査）において豚丹毒を疑い保留されると、病変部から豚丹毒菌を検出するかどうかで合否判定を行う。しかし、関節炎型豚丹毒の場合、病変部で菌数が少ないと報告<sup>1)</sup>されており、液体培地による増菌後、分離培地に塗抹することが有効である。

増菌培地には、他の細菌のコンタミネーションを防ぐ目的で、様々な抗生物質を添加するが、今回、その抗生物質の種類と濃度に対し検討を行い、若干の知見を得たので報告する。

## 2 試料及び方法

## (1) 細菌学的検査

平成 22 年 5 月から 12 月の間に本市と畜場に搬入

され、関節炎型豚丹毒を疑い保留した 41 例について、関節液、絨毛及び内腸骨リンパ節を検体とし、次の方法により、検査を実施した。

## ア 培養

表 1 のように抗生物質を加えた tween80 加トリプトソイブイオン液体培地で検体を無菌的に 24~48 時間培養後、遠心分離し、その沈渣を血液寒天培地に塗抹した。

## イ 菌種の同定

血液寒天培地上の豚丹毒菌が疑われるコロニーについて、グラム陽性小桿菌、カタラーゼ試験陰性であったものについて、Takeshi らの報告<sup>2)</sup>による豚丹毒菌に特異的なプライマー (ER1F, ER1R) を用いて PCR を行い、陽性となったものを豚丹毒菌と同定した。

## (2) 薬剤感受性試験

(1)で豚丹毒菌と同定されたもののうち、20 株を用いて薬剤感受性試験を行った。ゲンタマイシン、カナマイシン、バシトラシン、バンコマイシン、ネオマイシン、ノボビオシン、オキシテトラサイクリン、アンピシリンの 8 薬剤について最少発育阻止濃度 (MIC: minimum inhibitory concentration) を、寒天平板希釈法により求めた。

\* 京都市衛生環境研究所 食肉検査部門

\*\* 退職

(3) 抗生物質が増菌に与える影響の検討

抗生物質フリー培地から分離された豚丹毒菌 5 株を用いて、液体培地に 1cfu/ml となるように菌を接種し、(1)の抗生物質及びそれを 10 倍希釈したものを添加して 6 時間培養後、標準寒天培地を用いて、その生菌数を測定した。

(4) 統計解析

数値は平均値±標準誤差で表した。各群の数値間の有意差検定には ANOVA を行い、事後検定には Scheffe 法を用いた。

3 結果及び考察

(1) 抗生物質による分離成績の違い

関節炎型豚丹毒を疑い保留した 41 例のうち、9 例が合格し、32 例で豚丹毒菌を検出し全部廃棄の措置を取った。添加する抗生物質ごとにみると、ゲンタカナ培地は 19 例、6 種混合培地は 22 例、抗生物質フリー培地は 25 例で豚丹毒菌を検出した。抗生物質フリー培地のみで豚丹毒菌が検出できた事例は 7 例あり、抗生物質が豚丹毒菌の発育を阻害している可能性が示唆された。

また、ゲンタカナ培地と 6 種混合培地では他の菌のコンタミネーションは認められなかったが、抗生物質フリー培地では関節液：0 例、絨毛：30 例、内腸骨リンパ節：26 例で他の菌のコンタミネーションが見られた。抗生物質を添加した培地（ゲンタカナ培地あるいは 6 種混合培地）のみで豚丹毒菌を検出し、抗生物質フリー培地で検出されなかった事例は 7 例あり、これらはいずれも他の菌のコンタミネーションが原因で、豚丹毒菌を検出できなかったと考えられる。

(2) 薬剤感受性試験

表 2 のとおり、ゲンタカナ培地、6 種混合培地で用いられている 6 薬剤(ゲンタマイシン,カナマイシン,

バシトラシン,バンコマイシン,ネオマイシン,ノボピオシン)ではいずれも MIC<sub>50</sub> が >128 μg/ml と薬剤耐性が認められた。オキシテトラサイクリンの MIC<sub>50</sub> は 4 μg/ml,アンピシリンの MIC<sub>50</sub> は ≤0.125 μg/ml であり、従来の報告<sup>3)</sup> とほぼ同等であった。

(3) 抗生物質が増菌に与える影響の検討

ゲンタカナ培地、6 種混合培地及び抗生物質濃度を 1/10 となるよう調整した液体培地を用い、豚丹毒菌を 1cfu/ml となるように加え、6 時間培養後、生菌数を測定した。

図 1 のとおり、抗生物質フリー培地と比較して、ゲンタカナ培地と 6 種混合培地では、有意に増菌が抑制された (p<0.05)。抗生物質濃度が 1/10 のものでは、有意ではなかったが、減少傾向が認められた。

4 結論

ゲンタカナ培地及び 6 種混合培地は、抗生物質が他の菌のコンタミネーションを防ぐ役割を果たすものの、豚丹毒菌自体の発育も有意に抑制していた。また、これらの培地を用い、増菌後の生菌数を測定すると、抗生物質の効果は同程度であった。抗生物質フリー培地は、豚丹毒菌の発育に問題ないものの、他の菌のコンタミネーションが原因で豚丹毒菌が発育できないと考えられる事例があった。

以上のことから、抗生物質を添加した培地と添加していない培地の両方を用いて豚丹毒の検査を行うべきであると考えられる。

5 文献

- (1) 赤瀬悟, 宮尾陽子他: 日獣会誌 60, p221-225
- (2) Takeshi K et al.: Journal of Clinical Microbiology 37, p. 4093-4098
- (3) 宮尾陽子, 船越康之他: 日獣会誌 59, p. 409-415

表 1 液体培地に添加する抗生物質

	添加する抗生物質
A: ゲンタカナ培地	ゲンタマイシン (50 μg/ml), カナマイシン (500 μg/ml)
B: 6 種混合培地	ゲンタマイシン (40 μg/ml), カナマイシン (400 μg/ml), バシトラシン (0.4U/ml) バンコマイシン (25 μg/ml), ネオマイシン (25 μg/ml), ノボピオシン (50 μg/ml)
C: 抗生物質フリー培地	なし

表2 薬剤感受性試験結果 (表中の数字は薬剤感受性を示した株数)

濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	GM	KM	BC	VCM	NM	NB	OTC	ABPC
$\leq 0.125$								20
0.25								
0.5								
1								
2	1						8	
4							12	
8								
16								
32								
64	1			1				
128	7	1	5	5		6		
>128	11	19	15	14	20	14		
MIC <sub>50</sub>	>128	>128	>128	>128	>128	>128	4	$\leq 0.125$

GM : ゲンタマイシン KM : カナマイシン BC : バシトラシン VCM : パンコマイシン

NM : ネオマイシン NB : ノボビオシン OTC : オキシテトラサイクリン ABPC : アンピシリン

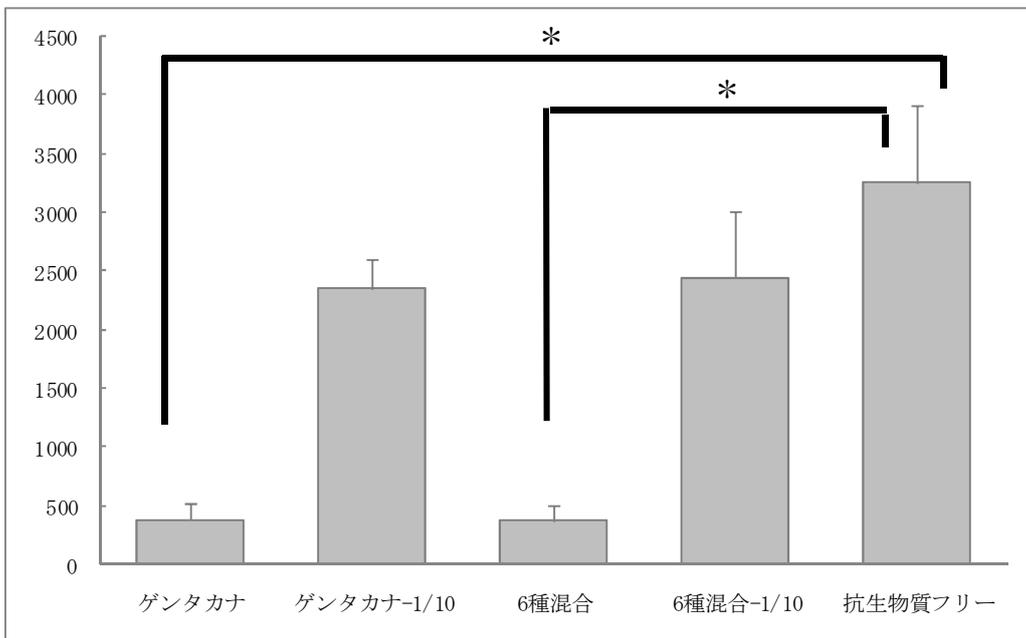


図1 6時間培養後の生菌数 (単位は cfu/ml) (n=5) \*  $p < 0.05$