

呼吸器感染症起因菌の同定法および薬剤感受性試験の定法

田邊太志

北里大学 獣医学部 獣医学科 獣医微生物学研究室
〒034-8628 青森県十和田市東二十三番町 35-1
Tel 0176-23-4371、Fax 0176-23-8703
e-mail: tanabe@vmas.kitasato-u.ac.jp

【要約】

近年薬剤耐性菌の増加が世界規模で問題され、その1つの原因として抗菌薬の不適切な使用方法が指摘されている。それは人医療だけの問題ではなく、動物医療においても治療効果の減弱、抗菌性物質または耐性菌の環境汚染、畜産物を介して人への拡散などが懸念されている。その対策として、獣医医療では、「適正使用」と「慎重使用」の考えのもと適切な抗菌薬の使用が求められている。ウシの呼吸器病症状候群 (Bovine Respiratory Disease Complex: BRDC) は、細菌・ウイルス・ストレスなどの複数の要因による混合感染であり、畜産業において大きな損失をもたらす疾病の1つでもある。その主要な病原細菌としては、*Mannheimia haemolytica*、*Pasteurella multocida*、*Histophilus somni*、*Trueperella pyogenes*、*Mycoplasma bovis* などがあり、治療の1つとして抗菌薬が汎用される。そこで本稿では、適切な抗菌薬の選択に必要な呼吸器感染症起因菌の同定法について一般的方法と簡易的な方法を、また分離された菌を使っての薬剤感受性試験法について概説する。

キーワード：ウシ呼吸器病症状候群、菌の分離同定、薬剤感受性試験、薬剤耐性菌

【はじめに】

感染症の治療として抗菌薬を使用する場合、常に耐性菌の問題を考えなければならない。抗菌薬の使用により薬剤耐性菌を増加させないためには、「慎重使用」の考えのもと、使用すべきかどうか検討した上で、使用するのであれば有効な抗菌薬を選び必要最小限の使用量とする必要がある [7]。そのためには、正しく薬剤感受性試験を行い有効な抗菌薬を選ぶ必要がある。薬剤感受性試験に供する菌は、分離同定されたものを使用する必要があるが、菌の分離同定にはある程度の技術が必要なこと、また菌を同定するまでに時間がかかることもあり臨床現場で実際に行うことが難しいか、もしくは外部

機関に依頼することが多いのではないだろうか。また感染症の治療を考えると、緊急を要する場合は、薬剤感受性試験の結果を待ってからということは難しく経験的な治療を行わざるを得ない場面も多い。そこで本稿では、ウシの呼吸器病症状候群 (Bovine Respiratory Disease Complex: BRDC) を例に、日常的な診療でも可能な簡易的な同定法を紹介し、さらに再確認の意味も含め正しい薬剤感受性試験法について解説する。

【ウシの呼吸器病症状候群 (Bovine Respiratory Disease Complex: BRDC) の原因菌の分離同定法】

BRDC は、輸送や環境の変化等によるストレスに加え、ウイルス (ウシヘルペスウイルス-1、ウシパラインフルエンザウイルス 3 型、ウシ RS ウイルス、ウシアデノウイルス、ウシウ

ウイルス性下痢ウイルス)、細菌 (*Mannheimia haemolytica*、*Pasteurella multocida*、*Histophilus somni*、*Trueperella pyogenes*、*Mycoplasma bovis*) などによる単独あるいは混合感染により起こり、その結果、病態は複雑化し重篤な呼吸器症状を引き起こす [2, 4-6, 10, 12, 16-19]。

一般的な菌の分離同定法は、採材→(増菌培養)→分離培養→純培養→同定試験(生物学的、生化学的性状試験など)の順に行ない菌種を同定することになる [8]。手順の進め方、同定のための様々な試験などはその検査室などにより

若干の違いがあるかとは思われるが、ここでは我々の研究室で普段行っている呼吸器病が疑われるウシからの分離同定法を紹介する(図1)。BRDCの原因菌には上述の *M. haemolytica*、*P. multocida*、*H. somni* および *T. pyogenes* が主な原因菌と考えられるため、これら菌の分離を想定しつつ、他の菌の可能性も考え分離培養を行う必要がある(マイコプラズマは同定法、薬剤感受性試験法が若干異なるため今回は省略する)。上述の4菌種の一般的な性状の違いは表1に示したので参考にしていただきたい [13-

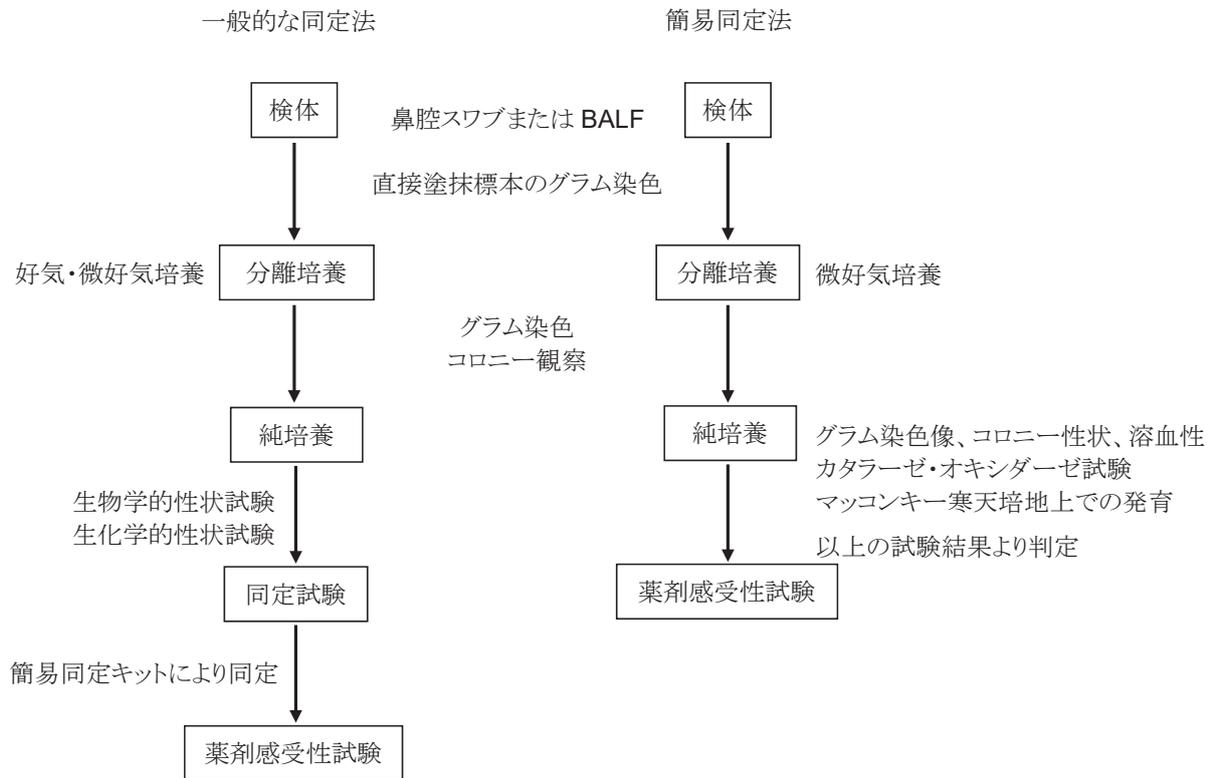


図1 BRDC罹患牛からの菌の分離同定法

表1 主なBRDC原因菌の性状比較

	グラム染色像	コロニー性状		培養	溶血性	カタラーゼ 産生	オキシターゼ 産生	マッコンキー寒天培地上 での発育
		色	大きさ					
<i>P. multocida</i>	陰性短桿菌 両端染色	灰白	大	37°C、好気 24~48時間	-	+	+	-
<i>M. haemolytica</i>	陰性短桿菌 両端染色	灰白	中~大	37°C、好気 24~48時間	+	+	+	d (11~89%陽性) 赤色コロニー
<i>H. somni</i>	陰性短桿菌	黄色	小	37°C、 5~10%CO ₂ 48~72時間	-	-	+	-
<i>T. pyogenes</i>	陽性小桿菌 松葉状	灰白	微小	37°C、 5~10%CO ₂ 48~72時間	+	-	-	-

16]。

ウシの呼吸器病の場合、鼻腔スワブもしくは気管支肺胞洗浄液 (BALF) が出発材料となる。鼻腔スワブはそのまま用い、BALFは、遠心後の沈渣を使用する。スワブまたはBALFの沈渣から直接塗抹標本を作製し、グラム染色を行ない菌の有無などを確認する。グラム染色は一度覚えてしまえば、それほど手間ではなく、そこから得られる情報はとても有益であるので、グラム染色は面倒がらずにぜひ行っていただきたい。分離培養は、1つの検体を2枚の5% ヒツジ血液加寒天培地にそれぞれ接種し37℃、好気および微好気 (5~10%CO₂ 存在下) 下で分離培養を行う。血液寒天培地は、普通寒天培地に比べ栄養価も高く、特定の栄養素や因子などを要求するような特殊な菌でなければ幅広く菌を発育させることができる非選択性の培地であり、BRDCでよく分離される表1に示した様な菌は問題なく生えるため分離培地として使用している。また培養条件は *H. somni* または *T. pyogenes* の可能性も想定し、好気的な培養に加えCO₂ 存在下での分離培養も行う。分離培養時間は24~72時間を目安に行う。*H. somni* や *T. pyogenes* 以外の通常の菌であれば24時間もあればコロニーの発育が認められる。しかし *H. somni* は48~72時間の培養を必要

とし、*T. pyogenes* もコロニーが小さいため48時間の培養が必要なこともある。そのため例えば分離培養24時間後に菌の発育が認められたとしても、混合感染ということも考え少なくとも72時間までは分離培養を続けたほうが良いであろう。コロニーの発育が確認されたら、グラム染色を行いグラム染色性、菌の形態を確認する (図3)。呼吸器疾患だけでなく一般的な感染症においても、分離された菌がグラム陰性菌なのか陽性菌なのか、球菌なのか桿菌なのかわかるだけでもかなり菌種を絞ることができ、その結果この後の培養方法 (使用する培地の種類など) や同定試験も決まってくる。次に目的の菌の純培養を行う。純培養とは分離培地から1つのコロニーを釣菌し、培養することで遺伝的に同一の菌を得ることである。純培養ができていないということは、複数の菌が混じった状態であるため、そのまま同定試験を行うと正しい結果を得ることができない。そのため純培養することは菌を同定する上で必須である。純培養菌を得ることができたら、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験を行う。図2に示したようなフローチャートに沿って、グラム染色像とカタラーゼ試験、オキシダーゼ試験の結果から、菌の属やある程度のグループに絞ることができる。我々の研究室では、これらの結果からおお

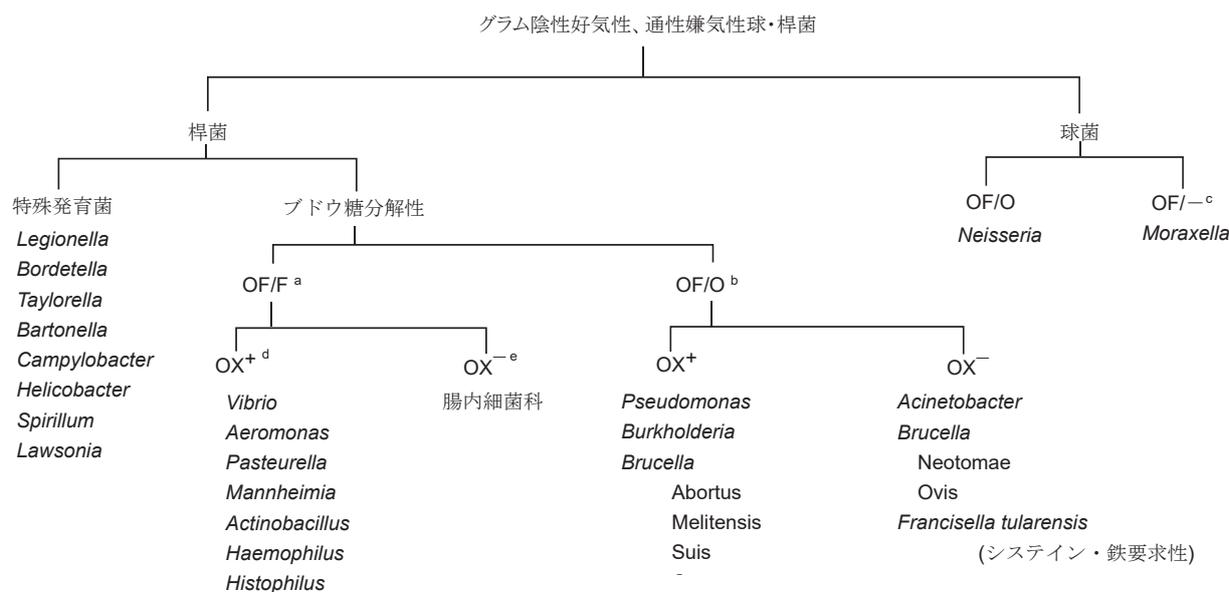
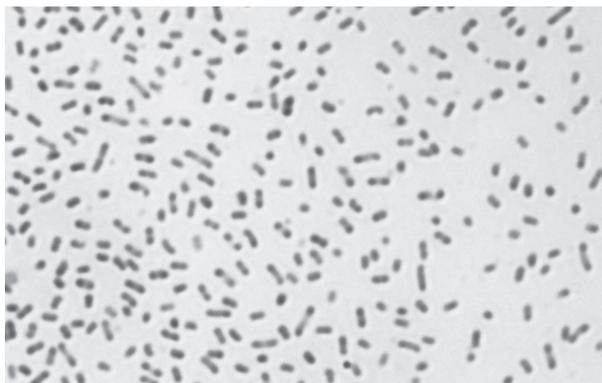


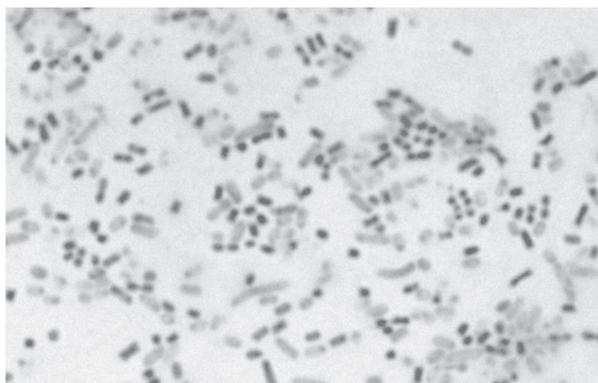
図2 グラム陰性菌分離同定フローチャート

a:ブドウ糖の発酵的分解、b:ブドウ糖の酸化的分解、c:ブドウ糖非分解、d:オキシダーゼ産生陽性、e:オキシダーゼ産生陰性

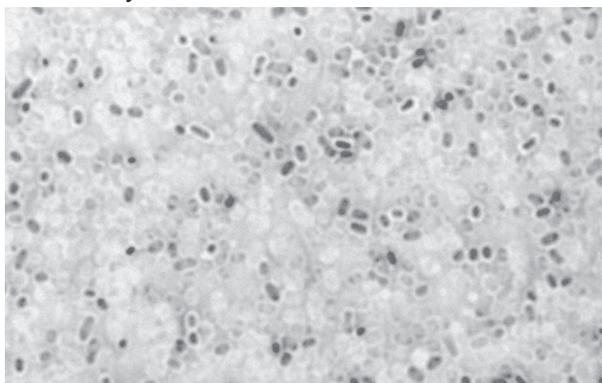
P. multocida



H. somni



M. haemolytica



T. pyogenes



図3 グラム染色像

よその属を推定し、使用すべき簡易同定キットを選び菌種同定を行っている。この方法だと通常、分離培養から同定まで順調に進んで5日程度はかかり、*H. somni* や *T. pyogenes* では培養時間が長いのもっと時間がかかることもある。

【ウシ BRDC 原因菌の簡易分離同定法】

通常の方法で順調に行ったとしても同定までに5日間はかかってしまい、薬剤感受性試験を行えばさらに判定までの時間がかかってしまう。そこで我々は宮城県農業共済組合家畜診療研修所の松田敬一先生とともに、より簡単でできるだけ短い時間で薬剤感受性試験に供するに十分な菌を得るための簡易同定法を作成した。この簡易法は、表1に示したBRDCの代表的な4菌種を性状の違いをもとに最終的な同定試験を行わずに推定する方法である。薬剤感受性試験には、原因菌が純培養された状態でなければ試験に使用することはできない。ここで述べ

る簡易法は、きちんとした菌種の同定までは行わないが、原因菌であろう菌を推定し純培養し薬剤感受性試験に供している。その手順としては以下ようになる(図1)。

1日目: 鼻腔スワブまたはBALFの遠心後の沈渣を5%ヒツジ血液加寒天培地に接種し微好気(5%CO₂存在下)で分離培養を行う。*M. haemolytica* も *P. multocida* も通性嫌気性菌であることから微好気下でも発育は可能であるため、培地も1つのサンプルに対して1枚としCO₂存在下でのみの培養とする。サンプルの直接塗抹標本を用いたグラム染色については、できれば行っていただきたい。

2日目: 発育した菌のコロニー性状(色、大きさ、形状、光沢、溶血性、コロニー数)を確認し、また菌のグラム染色も行う。その結果分離数も多く表1の性状に当てはまる菌を選び、5%ヒツジ血液加寒天培地に接種し純培養を行うとともに、同一の菌をマッコンキー寒天培地にも接種し培養を行う。また *H. somni* や *T. pyogenes*

のように発育が遅い菌もあるため、分離培地は更に培養を続ける。

3日目：純培養菌の性状確認

純培養菌について、溶血性の有無、マッコンキー寒天培地上での発育、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験を行う。その結果と今まで得たコロニー性状、グラム染色像の試験結果をもとに表1に照らし合わせ総合的に推定する。分離される菌によって様々なパターンが考えられるが、いくつか例をあげると、例えばマッコンキー寒天培地上で発育が観察された菌の中で、白色コロニーを呈したものは乳糖非分解の腸内細菌科の菌として除外する。赤色コロニーを示した菌は、オキシダーゼ試験を行いオキシダーゼ陰性の場合、乳糖分解性腸内細菌科の菌として除外し、オキシダーゼ陽性であれば *M. haemolytica* の可能性を考える。また *M. haemolytica* でもマッコンキー寒天培地での発育が弱いまたは発育しないこともあることから、その場合グラム染色像が陰性桿菌で両端染色性を示し、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験がともに陽性であり、溶血性を示す菌であれば *M. haemolytica*、溶血性がなければ *P.*

multocida と推定する。グラム陰性の多型を示す桿菌でコロニーが黄色く、カタラーゼ試験陰性、オキシダーゼ試験陽性、非溶血性の菌であれば *H. somni* と推定し、グラム陽性菌の場合は、特徴的なグラム染色像（多型V字型）、微小コロニー、カタラーゼ試験陰性、オキシダーゼ試験陰性であれば *T. pyogenes* と推定する（表1、図3）。

この方法であれば早くて3日間で菌を推定でき、さらに薬剤感受性試験を行ったとしても全体で4日間あれば結果を得ることができる。ただし、*H. somni* と *T. pyogenes* に関してはどうしても培養時間が48～72時間は必要となるため時間はかかってしまうが、通常の方法に比べれば数日は短縮可能である。まだまだ検証例が足りないところもあり、改善の余地があるかと思われるが、ぜひこの簡易同定法をもとに独自に改良していただければと思う。

【ディスク拡散法による薬剤感受性試験】

薬剤感受性試験には、最小発育阻止濃度（MIC）を求める希釈法とディスク拡散法があるが、臨床現場を考えると迅速性、経済性や簡

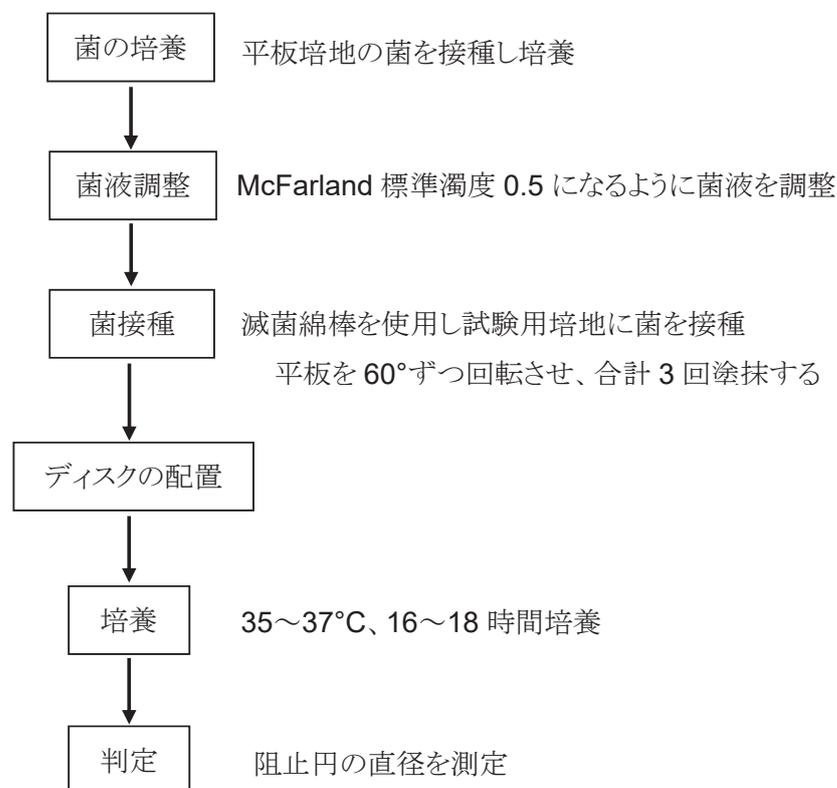


図4 薬剤感受性試験ディスク拡散法フローチャート

便性に優れるディスク拡散法が利用されることが多いと思う。ここではその手順について述べる。

ディスク拡散法は、CLSI に準拠した Kirby-Bauer 法が一般的であるが、抗菌薬を含んでいる一定の大きさのろ紙を菌を塗抹した培地上に置き培養後に、そのろ紙の周囲に菌が発育していない領域、すなわち阻止円の直径を測る。個々の抗菌薬の阻止円の直径に基づき抗菌薬への感受性を定性的に判定するものである [3, 11]。繰り返しになるが薬剤感受性試験に供する菌は、純培養菌を用いることが原則である。さまざまな菌が混在しているサンプルを使用した場合、抗菌薬に影響を一番受けない菌の阻止円を測定することになる。それが本来の原因菌であるかどうかはわからないため正確な結果を求めることができない。そのためにも上述した方法で得た純培養菌を使用すべきである。薬剤感受性試験のディスク拡散法の手順は以下の通りとなる (図 4)。

- ①菌液調整：目的の菌を寒天培地上で発育させる。4ml 程度の滅菌生理食塩水に McFarland 標準濁度液 0.5 と同じ濃度になるように菌浮遊液を調整する。菌液は濃くても薄くても結果に影響するため、簡易的ではあるが McFarland 標準濁度液に合わせる必要がある。McFarland 標準濁度液は、購入することもでき、また自分で調整することも可能なので、検査室に 1 つは用意しておくとも良いだろう。
- ②菌接種：調整された菌液に滅菌綿棒を浸し、試験管内壁で軽く押し付け過剰な菌液を取り除く。菌の接種は寒天培地に隙間なく全面に塗抹する。その後シャーレを 60° 回転させ、菌液に再度浸すことなく同じ綿棒で最初と同様に菌を全面に塗抹する。もう一度シャーレを 60° 回転させ同様に菌を接種する。なお菌接種は、菌液調整後 15 分以内に行わなければならない。
- ③ディスクの配置：ディスクは滅菌ピンセットまたはディスペンサー等を使い、菌を塗抹した培地上にディスクを配置する。ピンセット等を使う場合、ディスク間は、ディスクの中心から 24mm 以上隣のディスクから離れるように置く。
- ④培養：特殊な細菌でなければ 35 ~ 37°C で 16 ~ 18 時間好氣的に培養を行う。ただし *H.*

somni の場合は 5 ~ 10%CO₂ 下で培養する。

⑤判定：阻止円の直径を測定しディスク添付文書の判定基準、CLSI または EUCAST の判定基準に照らし合わせ、感性 (S)、中間 (I)、耐性 (R) として表す [3, 9]。

ディスク拡散法での注意点として、使用する培地は、一般的にミューラーヒントン寒天培地またはミューラーヒントン寒天培地に血液を添加した培地を用いる。これは培地成分によっては抗菌薬の作用に影響し正確な試験結果が得られないことがあり、ミューラーヒントン寒天培地はそれらを考慮して作られている。そのため薬剤感受性試験に使用する培地は、CLSI 等に準拠した薬剤感受性試験用の培地を使用しなければならない。得られた結果から、ついつい阻止円の直径が大きいと効果が高いと勘違いしがちだが、あくまでもディスク拡散法は定性法であるため、同じ抗菌薬でも菌種によって判定基準が異なる場合があること、異なった抗菌薬同士での阻止円の比較は意味がない点に注意が必要である。またこのディスク拡散法は、嫌気性菌やマイコプラズマなどには適用外であり、これら菌の感受性は希釈法で行うことが推奨される。

【おわりに】

薬剤耐性菌の問題は、動物や人だけでなく環境とも密接に影響しあっており、この 3 分野の垣根を超えた対策が必要とされる。その対策として、「適正使用・慎重使用」が求められている。そのためには、経験的または推測での抗菌薬の投与に頼るのではなく、病原菌を突き詰め、薬剤感受性試験を行い、その結果に基づいて抗菌薬を選択することが重要である。しかし、感染症が疑われる動物から原因菌を分離、同定し、薬剤感受性試験を行う一連の手順は煩雑かつ時間がかかり、理想と現実のジレンマとなる。本稿では、そのジレンマを少しでも解消するため、一般的な同定法に加え簡易法も紹介した。簡易的な同定法では菌の属種はあくまでも推定となってしまうが、原因菌と思われる菌を単離することができれば、その純培養菌を使って薬剤感受性試験を行うことができ臨床的にも活用できる結果を得ることができると考える。またとりあえず先行して薬剤感受性試験を行いなが

ら、純培養菌の同定を行っても良いかもしれない。今後はさらに抗菌薬の「適正使用・慎重使用」を求められるだろう。そのため、少しでも臨床獣医師の先生方の労力を増やすことなく、正しい抗菌薬を選ぶための1つのアイデアとなれば幸いである。

【引用文献】

- [1] Angen, Ø. 2015. *Histophilus Angen et. al 2003*^{VP}. Christense, H.(ed) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, Bergey's Manual Trust.
- [2] Caswell, J. L. and Archambault, M. 2007. *Mycoplasma bovis pneumonia in cattle*. *Anim. Heal. Res. Rev.* 8:161-186.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 30th ed. CLSI supplement M100*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2020.
- [4] Confer, A. W. 2009. *Update on bacterial pathogenesis in BRD*. *Anim. Health. Res. Rev.* 10:145-148.
- [5] Corbeil, L. B., Widders, PR, Gogolewski, R., Arthur, J., Inzana, T. J, Ward ACS. 1986. *Haemophilus somnus: bovine reproductive and respiratory disease*. *Can. Vet. J.* 27:90-93.
- [6] Dabo, S. M., Taylor, J. D. and Confer, A. W. 2007. *Pasteurella multocida and bovine respiratory disease*. *Anim. Heal. Res. Rev.* 8:129-150.
- [7] 動物医薬品検査所：動物様抗菌性物質製剤の慎重使用の考え
www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p5.html
- [8] 動物衛生研究部門：病性鑑定マニュアル 第4版
www.naro.affrc.go.jp/org/niah/disease_byoseikantei2016/index.html
- [9] EUCAST Disk Diffusion Test Methodology. https://eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/
- [10] Gershwin, L. J. 2007. *Bovine respiratory syncytial virus infection: immunopathogenic mechanisms*. *Anim. Heal. Res. Rev.* 8:207-213.
- [11] 実験法—抗菌剤の試験法を理解するために . 2004. *動物用抗菌剤マニュアル*. (動物様抗菌剤研究会編). InterZoo, 東京 . pp 155-173.
- [12] Jones, C. and Chowdhury, S. 2007. *A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines*. *Anim. Heal. Res. Rev.* 8:187-205.
- [13] Lammler, C., Sammra, O, Glaeser, S. and Kampfer, P. 2015. *Trueperella Yassin et al. 2011*^{VP}. Trujillo, M. E. (ed.) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, Bergey's Manual Trust.
- [14] Mutters, R., Angen, Ø. and Bisgaard, M. 2015. *Mannheimia Mutters, A., Olesen, C. and Bisgaard 199a, 82*^{VP}. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, Bergey's Manual Trust.
- [15] Mutters, R., Christensen, H. And Bisgaard, M. 2015. *Pasteurella Trevisan 1887, 94*^{AL}. *Nom. Cons. Opin.* 13, *Jud. Comm.* 1954b, 153. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, Bergey's Manual Trust.
- [16] Muylkens, B., Thiry, J., Kirten, P., Schynts, F. and Thiry, E. 2007. *Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis*. *Vet. Res.* 38:181-209.
- [17] Panciera, R.J. and Confer, A.W. 2010. *Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia*. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 26:191-214.
- [18] Singh, K., Ritchey, J.W. and Confer, A. W. 2011. *Mannheimia haemolytica: bacterial–host interactions in bovine pneumonia*. *Vet. Pathol.* 48:338-348.
- [19] Valarcher, J-F. and Taylor, G. 2007. *Bovine respiratory syncytial virus infection*. *Vet Res.* 38:153-180.

Bacterial identification method for respiratory infections and standard method of drug susceptibility test

Taishi Tanabe

Laboratory of Veterinary Microbiology, School of Veterinary Medicine, Kitasato University
35-1, Higashi 23, Towada, Aomori, 034-8628, Japan
Tel: +81 0176 23 4371, Fax: +81 0176 23 8703
e-mail: tanabe@vmas.kitasato-u.ac.jp

[Abstract]

The recent increase in drug-resistant bacteria due to improper use of antimicrobial agents has become a global issue. In both human and veterinary medicine, they pose problems, such as reduced therapeutic effects, environmental pollution of antimicrobial substances or drug-resistant bacteria, and their passage to humans through livestock products. In veterinary medicine, the appropriate use of antimicrobial agents is required under the concept of “proper” and “careful” usage to prevent the spread of drug-resistant bacteria. Bovine Respiratory Disease Complex (BRDC), a combined infection due to multiple factors, such as bacteria, viruses, and stress, is a disease that causes significant losses in the livestock industry. Its major causative bacteria include *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Trueperella pyogenes*, and *Mycoplasma bovis*, for which antimicrobial agents are routinely administered. This paper reviews the general and simple methods for identifying the causative bacteria of respiratory infection required to select an appropriate antimicrobial agents and drug susceptibility tests with isolated bacteria.

Keywords: Antimicrobial resistant bacteria, Bacterial identification, Bovine respiratory disease complex, Drug susceptibility test