

17 *Salmonella* Dublin の効率的な培養法の検討

網走家畜保健衛生所

○山田 真喜子 久保 翠
稲原 一幸

はじめに

Salmonella enterica serovar Dublin (SD) は、牛の糞便中に排菌されにくく、菌血症を起こしやすいという特徴がある。そのため、通常の増菌培養法では検出率が低く保菌牛の摘発が困難である。そこで、網走家畜保健衛生所（当所）では SD による牛サルモネラ症の発生農場における同居牛検査は、糞便及び血液を検査材料とし、通常の増菌培養法に加え、遅延二次増菌培養法（二次培養法）[1]を併用している。今回、培養日数の短縮を目的に、SD の効率的な二次培養法について検討を行った。

I 従来の検査法とその課題

1 通常の増菌培養法

(1) 糞便材料

選択増菌（増菌）培地を用いて 37°C で一晩培養後、選択分離（分離）培地に塗布し 37°C で一晩培養後、判定する（図 1）。

(2) 血液材料

ブレインハートインフュージョン培地（Becton, Dickinson and Company）(BHI) を増菌培地とし、全血を培地の 1/10 量となるよう添加・混和し、37°C で一晩培養後、分離培地に塗布し 37°C で一晩培養、判定する（図 1）。

2 従来の二次培養法（従来法）

従来法では、糞便は増菌培地としてハーナ・テトラチオン塩基礎培地（栄研化学株式会社）(HTT) をオートクレーブ処理した培地（AC-HTT）を用い、血液は増菌培養法で培養した BHI から継代し 37°C で一晩培養した AC-HTT を用いる。AC-HTT で 25°C または室温で 5～7 日間静置培養後、新しい AC-HTT に継代し、37°C で一晩培養、ES サルモネラ寒天培地 II（栄研化学株式会社）(ES II) に塗布し 37°C で一晩

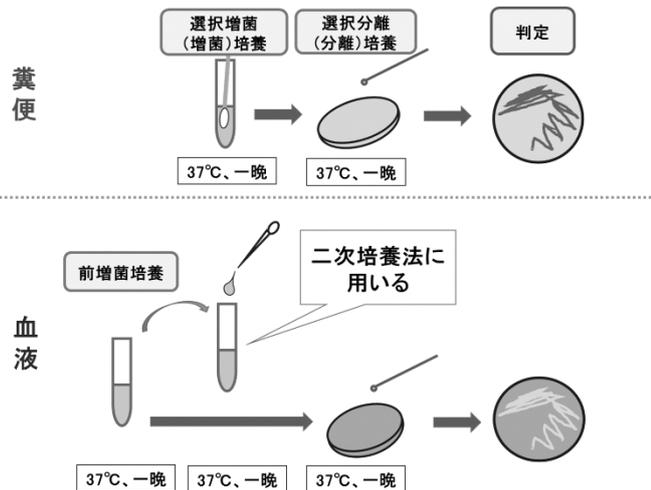


図 1 通常の増菌培養法

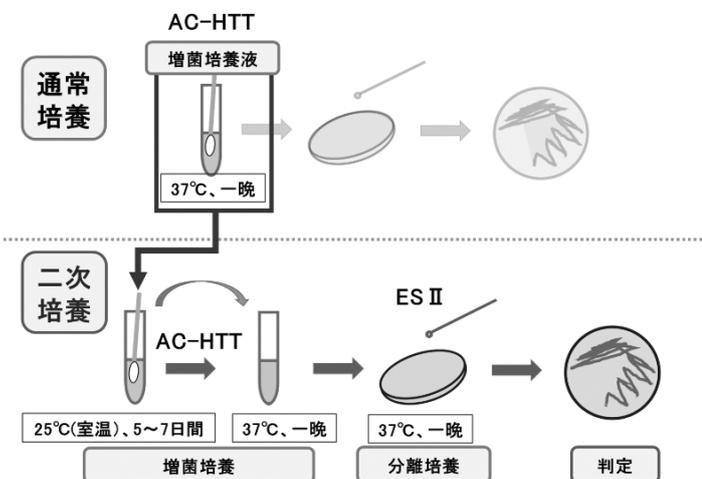


図 2 従来法

培養、増殖したコロニーを判定する（図2）。

3 SD 発生農場における成績

令和2年、オホーツク管内のSD発生農場の同居牛検査は、通常の増菌培養と従来法を併用して実施した。同居牛全頭を対象とした2戸の検査結果は、従来法のみ陽性の検体がそれぞれ81.8%、46.6%であった（図3）。このことから、従来法はSDの保菌牛の摘発に有効な培養法であることを確認した。なお、通常の培養法で陽性、従来法で陰性の検体が両農場で確認されたことから、保菌牛の摘発には、通常の培養法と従来法の併用が必要である。

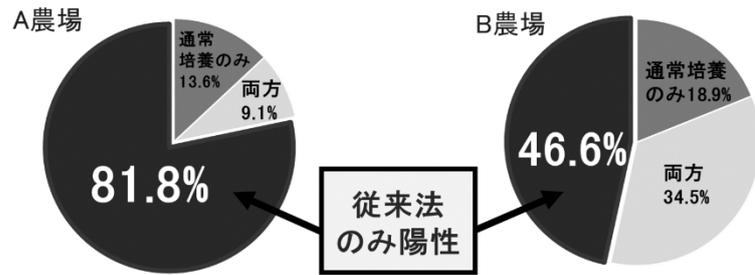


図3 SD 発生農場における培養法別陽性割合

従来法はSDの保菌牛の摘発に有効な培養法であることを確認した。なお、通常の培養法で陽性、従来法で陰性の検体が両農場で確認されたことから、保菌牛の摘発には、通常の培養法と従来法の併用が必要である。

4 課題

従来法は、判定までに9~12日と長い日数を要する。その間、保菌牛の隔離や治療等を実施出来ないことから、SDのまん延が危惧される。また、抗生剤治療を行った場合、通常は休薬期間を空けた2週間間隔で同居牛検査を実施するが、SD発生農場では、同居牛検査の間隔が概ね3週間となり対策日数の長期化が懸念される。これら課題の克服には、従来法の培養日数の短縮が不可欠であったことから、今回、当所で分離されたSDを用いて培地や培養条件の検討を行った。

II 供試材料の検討

1 供試菌株の選定

(1) パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE)

平成17年から令和2年にオホーツク管内で分離されたSD13株について、制限酵素BlnIを用いてPFGEを実施した。結果、分離年毎に大きく4種類の型に分類された（図4）。

(2) 薬剤感受性試験成績

同じくSD13株を用い、一濃度ディスク拡散法により、アンピシリン (ABPC)、セファゾリン (CEZ)、ストレプトマイシン (SM)、カナマイシン (KM)、ゲンタマイシン (GM)、オキシテトラサイクリン (OTC)、エンロフロキサシン (ERFX)、マルボフロキサシン (MBFX)、ナリジクス酸 (NA)、ST合剤 (SXT)、コリスチン (CL)、ホスホマイシン (FOM) の12薬剤を供試した。結果、NAは全ての株で耐性だったが、I型では、SM及びKMに耐性、II型では、KM及びOTCに耐性、III型ではOTCに耐性、IV型ではABPC、CEZ、SM、OTCに耐性だった（図5）。

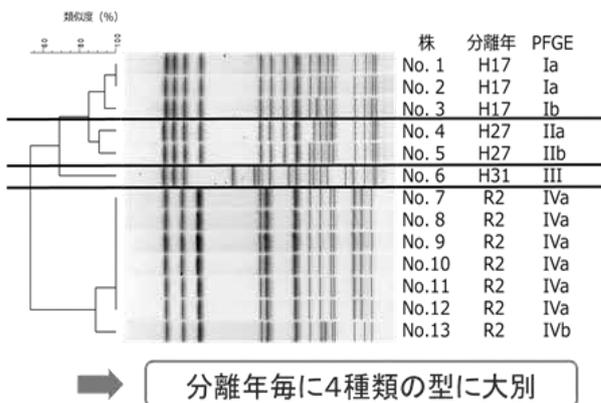


図4 PFGEの結果

No.	ABPC	CEZ	SM	KM	GM	OTC	ERFX	MBFX	NA	SXT	CL	FOM	PFGE
1	S	S	R	R	S	S	I	S	R	S	S	S	I
2	S	S	R	R	S	S	I	S	R	S	S	S	
3	S	S	R	R	S	S	I	S	R	S	S	S	
4	S	S	I	R	S	R	I	S	R	S	S	S	II
5	S	S	I	R	S	S	I	S	R	S	S	S	
6	S	S	I	I	S	R	I	S	R	S	S	S	III
7	R	R	R	I	S	R	I	S	R	S	S	S	
8	R	R	I	S	S	R	I	S	R	S	S	S	IV
9	R	R	I	S	S	R	I	S	R	S	S	S	
10	R	R	I	S	S	R	I	S	R	S	S	S	
11	R	R	I	S	S	R	I	S	R	S	S	S	
12	R	R	I	S	S	R	I	S	R	S	S	S	
13	R	R	I	S	S	R	I	S	R	S	S	S	

S:感受性 I:中間 R:耐性

図5 薬剤感受性試験の結果

(3) 分離培地上での発育の違い

同じサルモネラ属菌でも一般的な生化学的性状を示さない株も存在する[2]ことから、MLCB 寒天培地（日水製薬株式会社）（MLCB）、ノボビオシン（20µg/mL）添加 DHL 寒天培地（日水製薬株式会社）（N-DHL）、XLD 寒天培地（OXOID,UK）（XLD）、ES II の 4 種類の分離培地上における 13 株の発育を確認したところ、1 株が MLCB 上での発育が弱く硫化水素の産生遅延も認められた。他の 12 株は全ての培地上で同様の発育を示した。

以上の結果から、由来や性状が異なる 4 株を選定し供試した（表 1）。

表 1 供試菌株

No.	株No.	分離年	PFGE	分離材料	耐性薬剤	培地上での発育の違い
1	No.2	H17	I	流産胎子	SM・KM・NA	MLCBでH ₂ S産生が非常に遅い
2	No.4	H27	II	肺(子牛)	KM・OTC・NA	-
3	No.6	H31	III	糞便(成牛)	OTC・NA	-
4	No.13	R2	IV	流産胎子	ABPC・CEZ・OTC・NA	-

2 糞便及び血液中の菌数の検討

培地上で発育を確認できる最少菌数で検討を行うため、予備試験を実施した。SD の低排菌牛は糞便中に 10¹~10⁴CFU/g 排菌するとの既報[6]をもとに、サルモネラ陰性を確認した糞便に供試菌株 4 株を 10²~10⁴CFU/g となるよう調整し、従来法を実施した。結果、10²CFU/g では発育が確認されなかったことから、糞便中の菌数を 10³CFU/g、同様に血液中の菌数も 10³CFU/ml とした。

III 培地の検討

1 前増菌培地と実施の必要性

従来法では、血液を材料とする場合のみ、BHI を用いて、前増菌培養を行う。

今回は、BHI と 10%Tween80 添加緩衝ペプトン水（OXOID,UK）（BPW）[7,8]を検討培地とした。

また、糞便は、前増菌培養しない場合も検討した。血液については保菌牛の血中菌数が少ないと想定し、全て前増菌培養から実施した（図 6）。

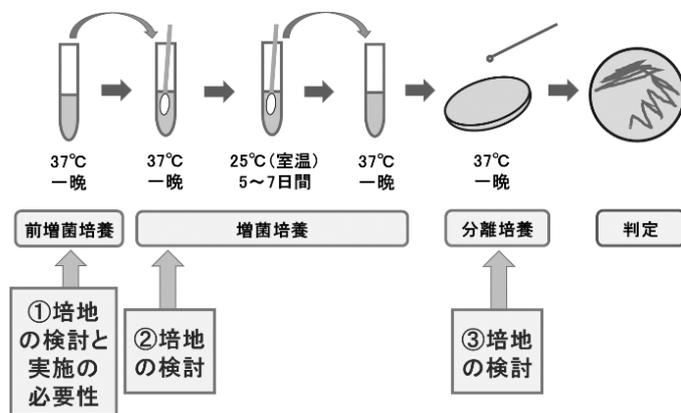


図 6 培地の検討と前増菌培養の実施の必要性

2 増菌培地

従来法では、AC-HTT を用いる。

今回は、HTT、AC-HTT、テトラチオネート液体培地（栄研化学株式会社）（TT）、ブリリアントグリーン未添加 TT（TTBG（-））、ラパポート・バシリアディス培地（栄研化学株式会社）（RV）の 5 種類を検討培地とした（図 6）。

3 分離培地

従来法では、ES II を用いる。

今回は、MLCB、N-DHL、XLD、ES II の 4 種類を検討培地とした（図 6）。

4 結果

(1) 前増菌培地と実施の必要性

ア 糞便材料

前増菌培養しない場合が最もSDの検出率が高く、58.3%だった。次いで、BHIで47.5%、BPWで31.0%だった(図7)。

イ 血液材料

BPWを用いた場合のSDの検出率が高く、45.0%だった。BHIでは40.8%だった(図7)。

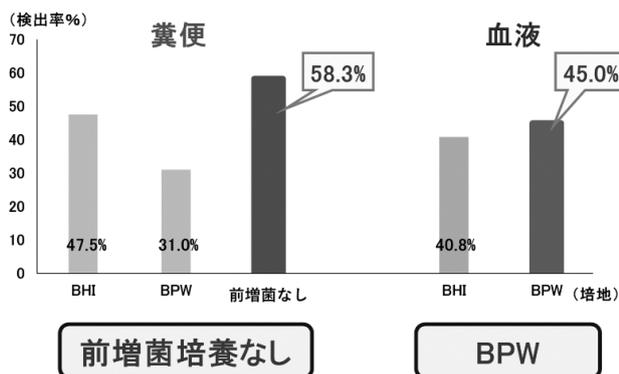


図7 前増菌培地と実施の必要性

(2) 増菌培地

ア 糞便材料

TTが最もSDの検出率が高く、62.1%だった。次いで、TTBG(-)で57.5%、HTTで48.8%、AC-HTTで41.3%、RVで18.8%だった(図8)。

イ 血液材料

AC-HTTが最もSDの検出率が高く、50.6%だった。次いで、TTで45.6%、RVで41.9%、HTT及びTTBG(-)で38.1%だった(図8)。

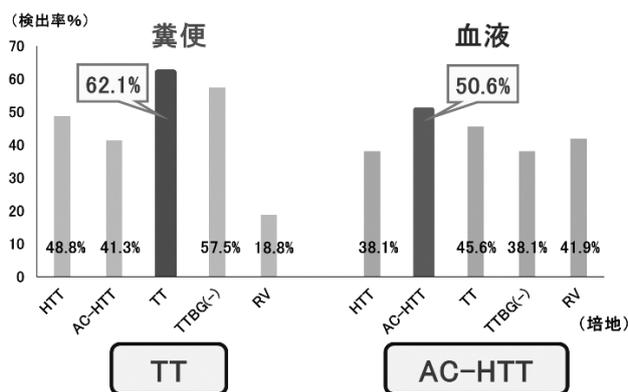


図8 増菌培地

(3) 分離培地

ア 糞便材料

XLDが最もSDの検出率が高く、52.0%だった。次いで、MLCBで48.0%、ES IIで45.3%、N-DHLで37.0%だった(図9)。

イ 血液材料

N-DHLが最もSDの検出率が高く、46.5%だった。次いで、XLDで43.5%、MLCB及びES IIで42.5%だった(図9)。

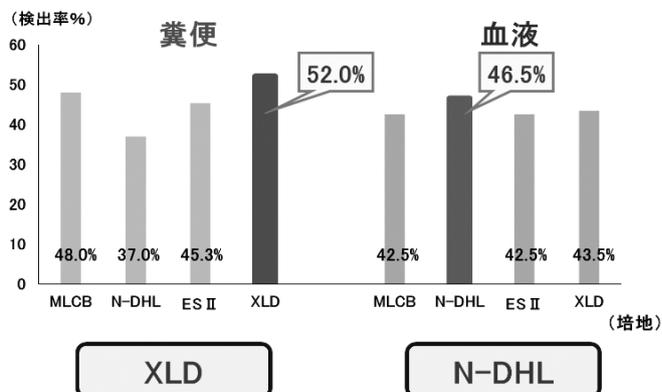


図9 分離培地

IV 培養条件の検討

培地の検討において、最もSDの検出率の高かった培地を用い、以下の培養条件について検討した。

1 25°Cにおける増菌培養日数

従来法では、37°Cで一晩増菌培養した後、25°Cで5~7日間増菌培養を行う。

今回は25°Cでの増菌培養日数について、糞便は一晩~2日間の短期間と5~6日間の長期間、血液は一晩の短期間と5日間の長期間で検討した(図10)。

2 新しい同一種の増菌培地への継代の必要性

糞便は、TT で増菌培養後、新しい TT へ継代、血液は AC-HTT で増菌培養後、新しい AC-HTT へ継代し 37℃で一晩増菌培養する場合としない場合を検討した。

3 結果

(1) 25℃における増菌培養日数

糞便及び血液ともに、一晩～2 日間の短期間の培養と 5～6 日間の長期間の培養で、SD の検出率に差は認められず、糞便での検出率は 75.0%、血液での検出率は 50.0%であった。

(2) 新しい同一種の増菌培地への継代の必要性

糞便では新しい TT、血液では新しい AC-HTT へ継代し 37℃一晩増菌培養するか否かで SD の検出率に差は認められず、糞便での検出率は 75.0%、血液での検出率は 50.0%であった。

(3) 従来法との比較

同一材料を用いて従来法と今回検討した培養法（改良法）を比較した。糞便では、改良法の SD 検出率は 75.0%、従来法の検出率は 50.0%、血液では、改良法及び従来法ともに検出率は 50.0%で、改良法の SD 検出率は従来法と同等以上であった。

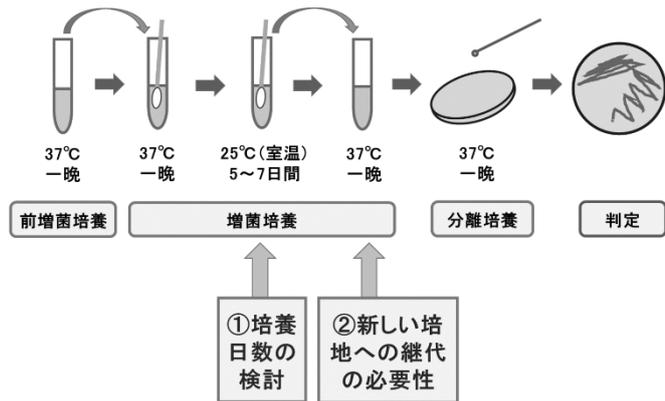


図 10 培養条件の検討

V まとめ及び考察

SD は保菌牛の摘発が困難な血清型であり、検出率の向上には二次培養法の併用が有効である [1、6、7]。しかし、従来法は、結果の判明までに長い日数を要することが課題であった。そこで今回、培養日数の短縮を目的に、効率的な二次培養法を検討した。

検討を行うにあたり、供試菌株を選定するため分子疫学解析や薬剤感受性試験を実施し、さらに、複数種のサルモネラ属菌分離培地を用いて菌株の発育状況を確認し、由来や性状が異なる株を供試した。糞便では、前増菌を実施した場合、検出率が低くなったのは夾雑菌が急速に増殖することで SD の増殖が抑制された可能性が考えられた。一方、血液は、本来無菌であるため、SD が増殖しやすい環境を整えることで、増殖性が向上すると考えられた。このことにより、糞便では比較的選択性の高い増菌培地でふるいをかけた後に分離培養、血液では選択性が低く増殖しやすい増菌・分離培地で培養を進めることが望ましいと考え、家畜保健衛生所で検査に用いる頻度の高い培地の中から、最も SD の検出率が高い組合せを選定した。結果、糞便では、増菌培地は TT、分離培地は XLD の組合せが、血液では前増菌培地は BPW、増菌培地は AC-HTT、分離培地は N-DHL の組合せが最も SD の検出率が高かった。これらの培地を用いて、培養条件を検討したところ、25℃での増菌培養日数は、一晩～2 日間の短期間でも、5～6 日間の長期間でも SD の検出率に差はなかったため、増菌培養の日数短縮が可能と考えられた。また、25℃での増菌培養後、新しい増菌培地へ継代する作業について、検討した結果、継代の有無で SD の検出率に差はなかったため、この作業は省略可能と考えられた。

VI 改良法の提案

本検討結果より、改良法を以下のとおり提案する。糞便を検査材料とした場合は、増菌培地として TT を使用、37℃で一晩増菌培養、25℃で 2 日間増菌培養、分離培地として XLD を使用し、37℃で一晩分離培養し、増殖したコロニーを判定する（図 11）。血液を検査材料とした場合は、前増菌培地として BPW を使用、37℃で一晩前増菌培養、増菌

培地として AC-HTT を使用し、37℃で一晩増菌培養、25℃で一晩増菌培養、分離培地として N-DHL を使用し、37℃で一晩分離培養し、増殖したコロニーを判定する（図 12）。これら改良法は、従来法より判定までの日数を 4～7 日間短縮することが可能となる。

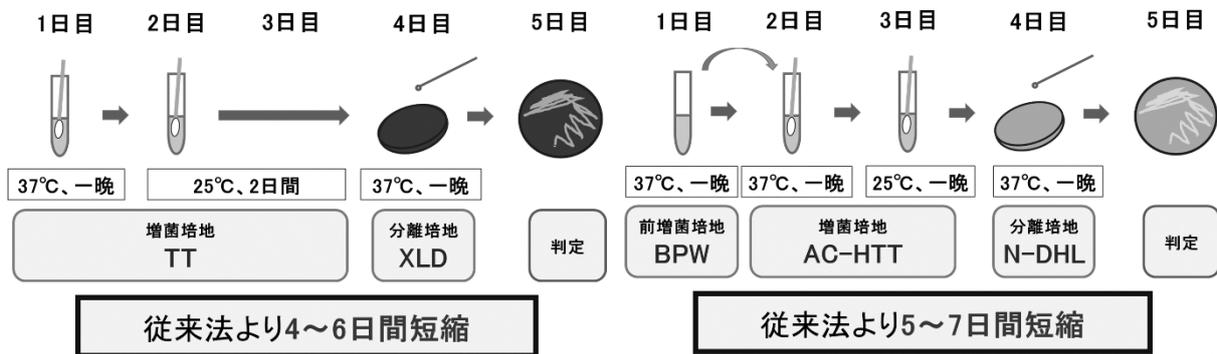


図 11 糞便の改良法

図 12 血液の改良法

今回提案した改良法は、増菌培養日数の短縮と新しい増菌培地へ継代する作業が省略されることから、作業の簡便化につながり、当初の目的であった培養日数の短縮が可能となった。このことにより、通常の培養法との併用で、SD の保菌牛を早期に摘発でき、SD のまん延防止及び早期清浄化に寄与すると考える。

今後は野外の同居牛検査でのデータを積み重ね、さらなる検証を行う予定である。また、今回供試した菌株の中に、培地上での発育が弱い株が確認されたため、このような株における SD の検出率を向上させる培養法を引き続き模索していく必要がある。

稿を終えるにあたり、分子疫学解析を実施していただき、本発表に御助言いただいた国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 新井暢夫先生に深謝いたします。

引用文献

- [1] 岡本絵梨佳、山本敦子、榊原伸一、手塚聡、高橋弘康、中岡祐司、信本聖子、立花智：第 65 回家畜保健衛生業績発表会集録(2017)
- [2] 東出正人、五十嵐瑞穂、佐々木照美、石川悦夫、石崎栄光：硫化水素非産生サルモネラにおける各種選択培地の基礎的検討、日本食品微生物学会雑誌、17(2)、135-141(2000)
- [3] Liza Rosenbaum Nielsen:Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of *Salmonella* Dublin in Cattle,Vet.Med.162,1-9(2013)
- [4] 盛田隆行、北澤秀基、村山靖之：飼料および食品製造施設で用いるサルモネラ属菌分離のための遅延二次増菌培養法の評価、日本食品微生物学会雑誌、27,21-26(2010)
- [5] 千原哲夫、田中里美、八木寿治：飼料中のサルモネラ検査に用いる選択増菌培地の検討、日本食品微生物学会雑誌、28(3)、175-185(2011)
- [6] 玉村雪乃:サルモネラ保菌牛の検査法、家畜診療、66(8)、507-508(2019)
- [7] 中村政幸、矢島佳世、永田知史、竹原一明：鶏糞便からのサルモネラ培養法の検討、鶏病研究会報、36(4)、201-206(2000)