原 著

Trichophyton verrucosum の発育および生存に及ぼす 尿素, アンモニアおよび硝酸塩の影響

小 菅 旬 子¹ 後 藤 義 孝¹ 新 城 敏 晴¹

李 憲 俊² 高 鳥 浩 介³

¹ 宮崎大学農学部家畜微生物学講座

² 衛生・微生物試験研究センター

³ 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部

〔受付 10 月 23 日, 2001 年. 受理 2 月 1 日, 2002 年〕

要 旨

牛の皮膚病巣部および牛飼育環境より分離した *Trichophyton verrucosum* 6 株は, いずれもウレアーゼ試験陽性であったが, 尿素および硝酸塩を利用して発育することはできなかった. さらに, 多量の尿素, アンモニアおよび硝酸塩を添加した培地では, 全ての菌株が死滅した. これらの窒素化合物を多量に含むウシ飼育環境の土壌は, *T. verrucosum* の発育および生存に適しておらず, 土壌が本菌のレゼルボアとなる可能性は低いと思われた.

Key words: ウシ皮膚糸状菌症 (bovine dermatophytosis), *Trichophyton verrucosum*, 尿素 (urea), アンモニア (ammonia), 硝酸塩 (nitrate)

序 文

T. verrucosum による皮膚糸状菌症は, わが国で最も一般的にみられるウシの皮膚疾患の一つであるが, 人獣共通感染症としても問題となっている¹⁾. ウシ飼育環境における *T. verrucosum* の生態には未知な点が多いが, Takatori ら²⁾ は皮膚糸状菌症発生農場の土壌から本菌種を分離し, 感染源としての土壌の意義を指摘した. *T. verrucosum* は好獣性菌とされている^{3,4)} が, ウシ飼育環境の土壌に感染牛の病巣部から菌体が多量に落下することを考えると, 土壌が感染源となる可能性も否定できない. 我々は以前, ウマ喉嚢炎原因菌である *Emericella nidulans* の発育が, 実験的に尿素を添加した敷料において促進されることを見出し, 排泄物由来の窒素化合物が家畜の病原性糸状菌の発育に関与する可能性を指摘した⁵⁾. 同様に, 皮膚病巣部から感染被毛や落屑とともに落下した *T. verrucosum* が, ウシ飼育環境の土壌に大量に存在する硝酸塩や尿素などを窒素源として利用することが可能であれば, 土壌は本菌種のレゼルボアとしても非常に重要な意味をもつことになる. そこで, ウシ飼育環境における *T. verrucosum* の生態解明への一助として, 本菌の発育に対する窒素化合物の影響をしらべ, ウシ飼育環境の土壌における本菌種の発育および生存性について *in vitro* で検討した.

材料および方法

供試菌株

皮膚糸状菌症罹患牛の皮膚病巣部から分離した *T. verrucosum* 4 株およびウシ飼育環境から分離した 2 株の計 6 株 (Table 1) を使用した. 各菌株は 0.02 % チアミンを添加したブレイン・ハートインヒュージョン寒天培地 (日水製薬) (以下 BHIA) にて 37℃, 14 日間前培養した^{3,4)}. また, 前培養した集落から菌体をかき取って 0.05 % Tween 80 加生理食塩水に懸濁させ, 血球計算板で菌数を計測して 1.0×10^5 /ml に調整した⁶⁾.

方 法

1. *T. verrucosum* による尿素の加水分解

一般的なウレアーゼ試験として, 以下の二法を用いた.

1) 寒天培地法: クリステンセン尿素寒天平板 (0.1 % 尿素量)³⁾ に供試菌を接種し, 37℃ で 14 日間培養した. 尿素の加水分解は培地の赤変をもって陽性と判定した.

2) 液体培地法: 尿素培地 (栄研化学) (3 % 尿素量) に供試菌を接種し, 37℃ で 14 日間培養した. 尿素の加水分解は培地の赤変をもって陽性と判定した.

また, これらの尿素培地の組成からそれぞれ尿素を省いた培地を作製し, 対照として用いた.

2. *T. verrucosum* による尿素の利用

Yeast carbon base (Difco) (以下 YCB) に 1.5 % 寒天, 0.02 % チアミンおよび 0.3 % 尿素 (ナカライテスク) を添加した培地平板上に供試菌を接種して, 37℃ で 21 日間培養し, 集落の発育を観察した.

別刷請求先: 小菅 旬子

〒889-2192 宮崎市学園木花台西 1-1
宮崎大学農学部家畜微生物学講座

Table 1. Test strains of *Trichophyton verrucosum* isolated from lesions of infected cattle and cattle breeding environments

Strain No.		Source
MKC 0201	Farm A	Lesion of cattle
MKC 0208	Farm B	Lesion of cattle
MKC 0212	Farm B	Lesion of cattle
MKC 0218	Farm B	Lesion of cattle
MKC 0232	Farm B	Air dust in stable ^a
MKC 0235	Farm B	Surface of stall fence ^b

^aIsolated by settle plated method in 10 minutes^bIsolated by swab method3. *T. verrucosum* の発育に影響を及ぼす尿素濃度

0.02%チアミンを添加したブレイン・ハートインフュージョン液体培地（日水製薬）（以下 BHIB）に 50,000, 25,000, 12,500 および 6,250 $\mu\text{g/ml}$ の濃度になるように尿素を加えた。各濃度の培地 2.0 ml に菌液 0.1 ml を滴下して 37℃ で 14 日間培養し、肉眼的に供試菌の発育の有無を観察した⁶⁾。対照には尿素を加えない BHIB を用いた。また、培養前後の培地 pH を測定した。さらに、各濃度の培地における供試菌の生存性を確認するために、培養後の培地から一白金耳を新たに BHIA に塗布し、37℃ で 14 日間培養し菌の発育の有無を観察した⁶⁾。

4. *T. verrucosum* の生存性に影響を及ぼす pH 域

1) 生理食塩水における生存: 1N NaOH を用いて滅菌生理食塩水を pH 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 および 11.0 に調整した。各 pH 液 2 ml に菌液 0.1 ml を滴下して室温で 21 日間静置した。7, 14 および 21 日目に各 pH 液から一白金耳を BHIA に塗布し、37℃ で 14 日間培養した。判定は BHIA における菌の発育の有無によった。

2) 液体培地における生存: 1N NaOH を用いて BHIB を pH 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 および 11.0 に調整した。各培地 2 ml に菌液 0.1 ml を滴下して、室温で 21 日間静置した。7, 14 および 21 日目に各培地から一白金耳を BHIA に塗布し、37℃ で 14 日間で培養した。判定は BHIA における菌の発育の有無によった。

5. *T. verrucosum* の発育に影響を及ぼすアンモニア濃度

アンモニア水（ナカライテスク）を 0.02%チアミン添加 BHIB で 2 倍希釈し、2,188, 1,094, 547 および 274 $\mu\text{g/ml}$ の濃度にアンモニアを含む培地を作成した。各濃度の培地 2.0 ml に菌液 0.1 ml を滴下して 37℃ で 14 日間培養した。3 と同様に培養前後の培地の pH を測定し、各培地における菌の発育および生存を観察した。

6. *T. verrucosum* による硝酸塩の利用および *T. verrucosum* の発育に影響を及ぼす硝酸塩濃度

YCB に 1.5%寒天、0.02%チアミンおよび 0.3%硝酸ナトリウム（ナカライテスク）を添加した培地平板上にそれぞれ供試菌を接種して、37℃ で 21 日間培養し、集落の

Table 2. Effect of urea and medium pH on the growth of *Trichophyton verrucosum*

Urea concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Growth of <i>T. verrucosum</i> ^a	Viability of <i>T. verrucosum</i> ^b	pH of brain heart infusion broth	
			Before incubation	After incubation
50,000	—	—	6.9 ^c	7.8
25,000	+	+	6.8	8.1
12,500	++	+	6.8	8.1
6,250	+++	+	6.6	8.1
BHIB(control)	+++	+	6.8	7.0

^aGrowth of test strains in brain heart infusion broth added with urea for 14 days at 37℃.^bAfter incubation in the broth added with urea, one loop of the broth was inoculated to brain heart infusion agar and cultured for 14 days at 37℃.^cData represent average pH of all test strains.Table 3. Effect of ammonia and medium pH on the growth of *Trichophyton verrucosum*

Ammonia concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Growth of <i>T. verrucosum</i> ^a	Viability of <i>T. verrucosum</i> ^b	pH of brain heart infusion broth	
			Before incubation	After incubation
2,188	—	—	9.6 ^c	8.6
1,094	—	—	9.2	8.3
547	+	+	8.5	7.7
274	++	+	7.8	7.3
BHIB(control)	+++	+	6.8	7.0

^aGrowth of test strains in brain heart infusion broth added with ammonia for 14 days at 37℃.^bAfter incubation in the broth added with ammonia, one loop of the broth was inoculated to brain heart infusion agar and cultured for 14 days at 37℃.^cData represent average pH of all test strains.

発育を観察した。また、0.02%チアミン添加 BHIB に 100,000, 50,000, 25,000, 12,500 および 6,250 $\mu\text{g/ml}$ の濃度になるように硝酸ナトリウムを加えた培地を作成した。各濃度の培地 2.0 ml に菌液 0.1 ml を滴下して、37 $^{\circ}\text{C}$ で 14日間培養した。3と同様に、培養前後の培地の pH を測定し、各培地における菌の発育および生存を観察した。

結 果

1. *T. verrucosum* による尿素の加水分解

寒天培地法、液体培地法のいずれの方法でも、全ての菌株で肉眼的な発育と培地の赤変が観察されウレアーゼ陽性と判定された。一方、尿素のみを省いた対照の培地では、いずれの方法においても全ての菌株で肉眼的な発育が認められたが、培地の赤変は認められなかった。

2. *T. verrucosum* による尿素の利用

YCB に唯一の窒素源として尿素のみを添加した培地では、全ての菌株で発育は認められなかった。

3. *T. verrucosum* の発育に影響を及ぼす尿素濃度

尿素を 50,000 $\mu\text{g/ml}$ 以上添加した BHIB では全ての菌株で発育が認められなかった (Table 2)。また、培養後の BHIB の pH は対照を除き顕著に上昇した (Table 2)。BHIB から BHIA に接種し直したところ、尿素濃度 50,000 $\mu\text{g/ml}$ 以上では菌の発育は認められなかった。

4. *T. verrucosum* の生存性に影響を及ぼす pH 域

1) 生理食塩水における生存: いずれの pH 条件でも全ての菌株が 21 日目まで生存した。

2) 液体培地における生存: pH 7.0, 8.0 および 9.0 の BHIB では全ての菌株が 21 日目まで生存した。しかし、pH 10.0 および 11.0 の BHIB では、7 日目までは生存したが 14 日目には死滅した。なお、肉眼的には pH 7.0, 8.0 および 9.0 の BHIB において 7 日目で発育が確認されたが、pH 10.0 および 11.0 の BHIB では 21 日目まで発育は認められなかった。

5. *T. verrucosum* の発育に影響を及ぼすアンモニア濃度

アンモニア濃度 1,094 $\mu\text{g/ml}$ 以上の BHIB では全ての菌株で発育が認められなかった (Table 3)。また、培養後の BHIB の pH は対照を除き全て低下した (Table 3)。BHIA に接種し直したところアンモニア濃度 1,094 $\mu\text{g/ml}$ 以上では菌の発育は認められなかった。

6. *T. verrucosum* による硝酸塩の利用および *T. verrucosum* の発育に影響を及ぼす硝酸塩濃度

唯一の窒素源として硝酸塩のみを添加した YCB では全ての菌株でわずかに菌糸が伸長するのみで顕著な発育は認められなかった。また硝酸塩濃度 100,000 $\mu\text{g/ml}$ 以上の BHIB では全ての菌株が発育せず、培養後の BHIB の pH は全て変化しなかった。BHIA に接種し直したところ硝酸塩濃度 100,000 $\mu\text{g/ml}$ 以上では菌の発育は認められなかった。

考 察

T. verrucosum の尿素分解性に関しては陰性⁷⁾、陽性⁸⁾

および不定⁹⁾ など様々な報告があるが、今回用いた全ての菌株は陽性と判定された。しかしながら、YCB に唯一の窒素源として尿素のみを添加した培地で供試菌を培養したところ、全く発育しないことが明らかとなった。過去に Philpot⁸⁾ も同様の報告をしているが、唯一の窒素源として尿素を添加した培地において本菌種が発育不能な理由が、尿素を窒素源として利用できないためか、それとも尿素によって発育抑制を受けているためかを確認するために、本菌種の発育が影響される尿素濃度を検討した。その結果、低濃度の尿素では菌の発育も生存も認められたが、50,000 $\mu\text{g/ml}$ 以上の高濃度域では殺菌的に働くこと、尿素を添加した液体培地では、培養後に pH が上昇することがわかった。培地の pH が上昇する現象は、菌が尿素を分解しアンモニアが生成されるためと思われた。そこでアルカリ環境における *T. verrucosum* の生存性とアンモニアの発育への影響を検討したところ、供試菌は pH 10 以上で 2 週間以上培養すると死滅し、1,094 $\mu\text{g/ml}$ 以上のアンモニアによって殺菌作用を受けることが明らかとなった。しかし、供試菌が殺菌された尿素およびアンモニア濃度における培地 pH はいずれも pH 10 以下であったこと、pH 10 以上であっても生理食塩水中では死滅しなかったことから、供試菌は pH の上昇に伴う物理的な作用よりむしろ、培地中のアンモニア量が増加するとともにその細胞毒性が作用することで死滅したと考えられる。なお、アンモニアを添加した液体培地では培養後に pH の低下が見られたが、これはアンモニアの揮発によるものと思われ、実際に殺菌効果を示すアンモニア濃度は算定量よりも低かったと思われる。以上から、*T. verrucosum* は尿素を窒素源として利用しない上、一定濃度以上の尿素を添加した培地では、菌自身の尿素加水分解作用によって生じたアンモニアを同化できず、培地中のアンモニアが有毒濃度に達し死滅したと推察された。しかし、アンモニア同化作用が働かなかった理由が本菌種の特性によるものなのか、*in vitro* 試験の条件が適さなかったためかは明らかでない。本菌種の窒素化合物の代謝機構に関しては、今後さらに検討する必要があると思われる。なお、Mahmoud ら¹⁰⁾ はアンモニアの毒性と pH 上昇によって *Trichophyton mentagrophytes*, *T. simii* および *T. soudanense* の発育およびウレアーゼ活性が尿素濃度依存的に抑制されると述べているが、今回の実験から *T. verrucosum* にも同様の特性が確認されたといえる。さらに硝酸塩も、本菌種では窒素源として利用され難く、高濃度ではむしろ殺菌的に作用することが判明した。

以上の結果から、*T. verrucosum* はウシ飼育環境の土壌において排泄物由来の硝酸塩や尿素を窒素源として増殖することはできず、むしろこれらの窒素化合物が高濃度に存在する環境下では発育および生存すら難しいため、土壌が本菌種のレゼルボアとなる可能性は低いと思われる。しかし、農場によって土壌の性質は異なることから、土壌中の *T. verrucosum* の生存期間には大きなバラツキがあると推察される。ウシ皮膚糸状菌症の拡大、蔓延を

防除するためには、本菌種の代謝、生理や病原因子の解明のみならず、ウシ飼育環境と本菌種の生態との関係を明らかにする必要がある。

謝 辞

供試菌株の分離にご協力いただいた NOSAI 都城の古川英幸獣医師および後藤篤志獣医師に感謝いたします。また、本研究は日本学術振興会特別研究員制度の助成(2894)を受けて行いました。記して深謝いたします。

引用文献

- 1) 楠原正洋, 蜂須賀裕志: *Trichophyton verrucosum* による tinea circinata の1例. 真菌誌 33: 533-539, 1992.
- 2) Takatori K, Kawai S, Takahashi A, Ichijo S: Isolation of *Trichophyton verrucosum* from soil in cattle breeding environments. Jpn J Vet Sci 52: 823-825, 1990.
- 3) 宮治 誠, 西村和子編: Christensen's urea agar, *Trichophyton verrucosum* Bodin 1902, Urease test. 医真菌学辞典, 第2版, p. 69, 269, 273, 協和企画通信, 1993.
- 4) 田淵 清: 皮膚糸状菌群. 獣医真菌学, p.134-147, 啓明出版, 2000.

- 5) 小菅旬子, 後藤義孝, 新城敏晴, 安齊 了, 高鳥浩介: ウマ飼育環境における敷料からの喉嚢炎原因真菌 *Emmericella nidulans* の検出とその意義. 真菌誌 41: 251-256, 2000.
- 6) 高鳥浩介: 胞子液作製, 最小発育阻止濃度測定試験, 最小殺かび濃度測定試験. 一目でわかる図説かび検査・操作マニュアル, p.346-347, 354-357, テクノシステム, 1991.
- 7) Shadomy HJ, Philpot CM: Utilization of standard laboratory methods in the laboratory diagnosis of problem dermatophytes. Am J Clin Pathol 74: 197-201, 1980.
- 8) Philpot CM: The use of nutritional tests for the differentiation of dermatophytes, Sabouraudia 15: 141-150, 1977.
- 9) 渡辺昌平: *Trichophyton verrucosum* Bodin. 菌類図鑑, (宇田川俊一, 椿 啓介, 堀江義一, 三浦宏一郎, 箕浦久兵衛, 山崎幹夫, 横山竜夫, 渡辺昌平著), p.994-995, 講談社サイエンティフィク, 1978.
- 10) Mahmoud A-LE, El-Shanawany AA, Omar SA: Factors affecting growth and urease production by *Trichophyton* spp. Mycopathologia 135: 109-113, 1996.

The Influence of Urea, Ammonia and Nitrate as they Affect Growth and Viability of *Trichophyton verrucosum*

Junko Kosuge¹, Yoshitaka Goto¹, Toshiharu Shinjo¹, Noritoshi Ri², Kosuke Takatori³

¹Department of Veterinary Microbiology, Miyazaki University

1-1 Gakuen-kibanadai-nishi, Miyazaki 889-2192

²Hygiene & Microbiology Research Center

7-9-4 Asakusa, Taito-ku, Tokyo 111-0032

³Laboratory of mycology, National Institute of Health Sciences

1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501

Six strains of *Trichophyton verrucosum* were used in a test to determine effects of urea and sodium nitrate on their growth. Despite having urease activity, the strains failed to utilize the urea and sodium nitrate for their growth. Moreover, the organisms were killed if large amounts of these nitrogen compounds and ammonia were added to the medium. These nitrogen compounds, distributed in cattle breeding soil, inhibited the growth of *T. verrucosum*. Thus, soil in cattle breeding environments does not seem to be a reservoir of this pathogen.