ブルセラ属菌の型別に関する研究

第 I 報 輸入牛及び日本産乳牛由来菌株の性状の比較

柴田 重孝 伊佐山 康郎 村田 昌芳

家畜衛生試験場 (場長 小林正芳)

〔受付: 11月6日, 1956年〕

まえがき

本邦乳牛からの所謂バング氏菌の分離については既に古くから奥田等(1915)二村(1928)等によつて報告されているが分離菌の生物学的性状検査に硫化水素産生能, 色素感受性等を吟味するようになったのはその後のことに属する。渡横(1937)は過去拾数年の間に本邦内で分離されて研究室に保存されていた94株の *Br. abortus* の人工変異実験を報告したが, 同論文中にはチオニン(1:20,000)添加培地に発育を認めた6株, メチルバイオレット(1:30,000)及びピロニン(1:4,000)添加培地にほとんど発育しない菌株夫々8株の記載がある。最近安藤・川島(1954)もブルセラ属菌の変異の研究を行い, 1926年から1949年の間に分離された12株の *Br. abortus* のうち2株はチオニン(1:50,000)に感受性低く, 他の2株はフクシン(1:25,000)添加培地に全く発育しない結果を示しているが, このような性質が分離頭初からのものか, 継代中の変異によるものか, いまのところ充分な資料が見当たらない。

乳牛以外の家畜では能美等(1936)が英国からの輸入豚から, 橋爪等(1940)は畜産試験場繋養中の豚から夫々 *Br. suis* を分離し, 板橋等(1936)は旧満州国において羊の伝染性流産を調査し, 分離菌の硫化水素産生能及びチオニン添加培地上の発育性状から *Br. melitensis* と断定した。

人からのブルセラ属菌の分離例としては, 敷波等(1935)が *Br. suis* の1例を報告し, 広木等(1937)は旧満州国白城子種羊場従業員の血液から *Br. melitensis* を近藤等(1940)は波状熱型を呈する患者の血液から *Br. abortus* を, 堀(1941)は *Br. suis* を夫々分離報告し, 大林(1941)はブルセロージスの2例報告で分離菌が概ね *Br. melitensis* に一致すると述べ, 最近青木等(1955)はホヂキン氏病患者の脾から *Br. suis* を分離したと報告している。

従来内外の研究者によつて採用されているブルセラ属菌型別の拠点は培養時の炭酸ガス要求性, 色素感受性, 硫化水素産生能, ウレアーゼ, ペトラニヤニー培地上の発育性状, 病原性, 吸収血清による凝集反応等々夥しい数に達している。最近 F. Huddleson (1954) はペニシリン感受性の差により *Br. abortus* をさらに2種に分け感受性菌に *Type II (Wilson)* の名を与えている。型別方法就中色素感受性検査法については, M. J. Pickett (1952, 1953) J. C. Cruickshank (1954) 等によつて改善され *filter paper strip method* として一般の注目するところとなった。

私どもは本邦における人畜ブルセロージス調査の一部を分担しているものであるが, 1954年以降毎年輸入されているジャージー種乳牛及び日本産ホルスタイン種乳牛からブルセラ菌を分離し, これらの生物学的性状を検査したところ, 興味ある成績をえたのでそのあらましを報告したい。

実験材料及び方法

1. 供試菌株。検索の対象となつた牛は, 1955年内にニュージーランド及びオーストラリアから輸入され, 凝集反応上陽性と決定された計8頭のジャージー種乳牛から分離された8株と, 1955年1月石川県の2頭, 同年4月長野県の1頭, 1956年9月愛知県の2頭及び同年6~8月千葉県4頭計9頭のホルスタイン種乳牛からの分離菌9株でその詳細は第1表のとおりである。なお同一牛の各臓器から数系を分離したが, 同一個体からの菌株の

SHIBATA Shigetaka, ISAYAMA Yasuro and MURATA Masayoshi: Studies on the classification of *Brucella*, I. Biological comparison between the strains isolated from the cattle from abroad and of Japan. National Institute of Animal Health. —Jap. J. of Bact., 12(1), 41-45, 1957. 東京都北多摩郡小平町家畜衛生試験場内。

第1表 供試菌株の由来

区 分	菌 株 名	分離臓器	分 離 年 月 日	性状検査年月日	殺前の血清凝集反応（国際法）									
					10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	
輸入 ジャ ー ジ ー 牛 由 来 菌 株	1（ニュージーランド）	腸骨リンパ	昭和30年12月9日	昭和31年2月27日	3	3	2	0						
	2（オーストラリア）	乳房リンパ	31. 2. 3	31. 2. 27	4	4	4	3	2	0				
	3（オーストラリア）	乳房リンパ	31. 2. 6	31. 2. 27	4	4	4	3	1	0				
	4（ニュージーランド）	乳房リンパ	31. 2. 20	31. 2. 27	4	4	4	4	1	0				
	5（ニュージーランド）	腸骨リンパ	31. 2. 22	31. 2. 27	4	4	4	3	1	0				
	6（オーストラリア）	肩前リンパ	31. 2. 27	31. 2. 27	4	4	3	3	2	0				
	7（ニュージーランド）	咽背リンパ	31. 2. 14	31. 10. 15	4	4	4	4	3	2	1	0		
	8（オーストラリア）	乳房リンパ	31. 8. 16	31. 10. 15	4	4	4	4	1	0				
日本 産 ホ ル ス タ イ ン 牛 由 来 菌 株	1（石 川 県）	乳 汁	30. 1. 19	31. 2. 27	4	4	4	4	4	4	2	0		
	2（石 川 県）	乳 汁	30. 1. 19	31. 2. 27	1	2	3	4	4	4	4	4	4	2
	3（長 野 県）	乳 汁	30. 4. 11	31. 2. 27	4	4	4	4	4	4	3	0		
	4（愛 知 県）	乳房リンパ	31. 9. 26	31. 10. 15	4	4	4	3	0					
	5（愛 知 県）	乳房リンパ	31. 9. 26	31. 10. 15	4	4	4	3	1	0				
	6（千 葉 県）	腸骨リンパ	31. 8. 15	31. 10. 15	4	4	4	4	4	4	3	1	0	
	7（千 葉 県）	乳房リンパ	31. 6. 25	31. 10. 15	4	4	4	4	4	3	1	0		
	8（千 葉 県）	腸骨リンパ	31. 8. 9	31. 10. 15	4	4	4	4	4	4	4	3	2	
	9（千 葉 県）	腸骨リンパ	31. 8. 9	31. 10. 15	4	4	4	4	4	2	0			

註: 1. 菌株名のカッコ内は供試牛の輸入先又は繋留県を示す。

2. 血清凝集反応の数字は 4 : 完全凝集, 3 : 75%凝集, 2 : 50%凝集,

1 : 25%凝集, 0 : 凝集なし を示す。

間に特に差異を認めなかつたので各個体1系のみの成績に止めた。

2. 性状検査法のあらまし

a. 変異検査。1 : 500 アクリフラビン水溶液 1 cc に等量の菌液 (McFarland No. 1) を加え 37°C 18~24 時間後の凝集の有無を観察する。熱凝集は菌液を沸騰水中で 30 分作用させて凝集の有無を検し、酸凝集は pH 2.2~5.4 の緩衝液 1 cc 宛を用意しておいてこれに等量の菌液を加え 37°C に 18~24 時間おいて凝集の有無を検する。以上の 3 者の外に W. Braun (1953) の唱導する DL アラニン加寒天上の発育状況を観察したが未だ満足すべき域に達していない。

b. 炭酸ガス要求。10%炭酸ガス培養と好気性培養を併行し出現集落数の比較を行い好気性に全く発育しないものを卅とし、両者の間に差の認められないものを一とする。

c. 硫化水素産生。醋酸鉛 10 g を蒸留水 50 cc に煮沸して溶解し、これに長さ 8 cm 巾 0.7 cm の濾紙を浸して鉛糖紙を調製しこれを血清加寒天斜面培養に綿栓で固定して 4 日間観察する。

d. 尿素分解。Pickett の方法に従い A 液 (Na₂HPO₄ · 12 H₂O : 4.8 g, KH₂PO₄ : 1.8 g, Yeast Extract : 2 cc 水 : 98 cc 0.2% Phenol Red : 1 cc) 100 cc に B 液 (20%ウレア) 20 cc を添加した液の 0.5 cc に等量の菌液を加えて着色状態を観察する。20 分以内に着色するものを卅とし、24 時間を経過しても分解しないものを陰性とする。

e. 色素感受性。チオニン 600 倍、フクシン 200 倍、メチルバイオレット 400 倍、ピロニン 600 倍の夫々の溶液に短冊濾紙を浸漬し、これを乾燥する。このようにしてえられた色素濾紙を、寒天 10 cc を分注して固めた平板上におきこれにさらに 10 cc の寒天を注入して、4°C に一夜保存し、一定菌量を劃線培養し 48 時間後に色素による発育抑制の巾を測定する。

f. ペニシリン感受性。前項の色素濾紙法に準じてペニシリン濾紙法を考案中であるが、今回は寒天 1 cc に夫々ペニシリン 50, 5 及び 0.5 単位となるように寒天平板を調製して一定菌量を培養し 48 時間後の発育阻止の有無をしらべる方法を採用した。

g. 吸収血清による検査。最近 Pickett より分譲を受

けた *Br. abortus* 3a-2 及び *Br. melitensis* 4 M-27を以て単相血清を調製した。ウサギの免疫には生菌 2 mgを静脈内に接種したが 2 週後の凝集価は血清稀釈で 12.800倍であつた。

実験成績

輸入ジャージー種乳牛及び日本産ホルスタイン種乳牛から分離された各菌株は第 2 表にみられるようにいずれ

第 2 表 分離菌の生物学的性状 (その 1)

区 分	菌 株 名	変異検査	炭酸ガス 要 求	硫化水素 産 生	尿素分解	血 清 学 的 検 査		
						アボルタス	メリテ ンジス	
新 分 離 菌 株	輸入 ジャージー牛由来	1	S 型	++	++	++	++	—
		2		++	++	++		
		3		++	++	++		
		4		++	++~++	++~++		
		5		++~++	++~++	++		
		6		++	++~++	++		
		7		++	++~++	+		
		8		++	++~++	+		
	日本産 ホルスタイン牛由来	1	S 型	++	++	+	++	—
		2		++	++	+		
		3		++	++	+		
		4		++	++~++	+		
		5		++~++	++	+		
		6		++	+	++		
		7		++	+	+		
		8		++	+	+		
		9		++~++	+	+		
	対 照 菌 株	ア ボ ル タ ス	544 (イ ギ リ ス)	S 型	+	—	—	++
3a-33 (ア メ リ カ)			+		+	++		
99 (イ ギ リ ス)			—		++	++		
St. 19 (ア メ リ カ)			—		—	++		
125 (ニ ッ ポ ン)			—		++	++		
3a-2 (ア メ リ カ)			++		++	+		
メ リ テ ン ジ ス		M 4 (ド イ ツ)	S 型	—	++	+	++	++
		M 13 (イ ギ リ ス)		—	++	+	++	++
		16 M (イ ギ リ ス)	R 型	—	—	+	±	++
		4 M-30 (ア メ リ カ)		—	—	+	—	++
		M 7 (ホ ー テ ン)	S 型	—	++	+	++	++
		4 M-27 (ア メ リ カ)		—	—	+	—	++
ス イ ス		S 13 (ニ ッ ポ ン)	S 型	—	++	++	++	—
		S 14 (イ ギ リ ス)		—	++	++		
		1330 (イ ギ リ ス)	S 型	±	++	++		
		3S-81 (ア メ リ カ)		—	++	++		
		S 2 (ド イ ツ)		—	++	++		
		3S-11 (ア メ リ カ)		—	++	++		

註: 対照菌株のカッコ内は菌株分離を受けた国名を示す。

第3表 分離菌の生物学的性状(その2)

区分	菌株名	色素感受性				ペニシリン感受性		
		チオニン	フクシン	メチルパイオレット	ピロニン	50単位	5単位	0.5単位
新分離株	輸入ジャージー牛由来	1	11	0	4	0	—	++
	2	11	0	3	0	+	++	++
	3	10	0	2	0	±	+	++
	4	11	0	2	0	—	++	++
	5	11	3	4	0	—	++	++
	6	11	0	1	0	—	++	++
	7	12	0	6	0	—	++	++
	8	10	0	3	0	—	+	++
菌株	日本産ホルスタイン牛由来	1	12	15	15	—	—	++
	2	12	10	15	16	—	—	++
	3	13	15	9	15	—	±	+
	4	8	8	7	17	—	—	±
	5	10	9	8	15	—	—	—
	6	7	11	9	15	—	—	—
	7	10	14	7	14	—	—	±
	8	12	9	7	11	—	—	—
	9	12	8	12	13	—	—	—
対照株	アボルタス	544	12	0	1	0	+	++
	3a-33	10	0	1	0	+	++	++
	99	13	0	1	0	—	++	++
	St. 19	13	0	1	0	—	++	++
	125	12	0	0	0	—	—	++
	3a-2	10	0	1	0	—	++	++
菌株	マリテンジス	M 4	0	0	1	0	—	++
	M 13	0	0	0	0	++	++	++
	16 M	0	0	2	0	++	++	++
	4 M-30	0	0	1	0	++	++	++
	M 7	0	0	0	0	—	++	++
	4M-27	0	0	0	0	++	++	++
株	ス	S 13	0	10	5	0	—	++
	S 14	0	8	5	0	—	++	++
	1330	0	10	5	0	—	++	++
	3S-81	0	8	4	0	—	++	++
	S 2	0	15	6	0	—	—	+
	3S-11	0	15	6	0	—	—	—

註: (1) 色素感受性の数字は発育阻止の幅を示す(単位mm)

(2) ペニシリン感受性の +~++ は発育の程度を示す。

(3) 色素はメルク製(但しピロニンはグリュブラー製) ペニシリンは万有製薬会社のものを使用。

もS型で、培養時炭酸ガスを要求し、*abortus* 血清に強く凝集し、*melitensis* 血清に凝集しないことから *Br. abortus* と考えられる。硫化水素産生は対照株の *Br. suis* の諸株について、分離菌はいずれも中等度の硫化水素産生がみられたが、対照の *Br. melitensis* に強い硫化水素産生株の認められたことは、本法がブルセラ属菌の型別に広く利用されているだけにさらに吟味する必要がある。尿素分解の結果は分離菌株、対照 *Br. abortus* 及び *suis* ともにいろいろの段階に分解したが、対照 *Br. melitensis* は少々これらに劣る傾向を示した。

つぎに色素及びペニシリンに対する感受性検査の結果は、第3表にみるように輸入牛由来菌株と日本産乳牛由来菌株との間で明瞭な差異がみられた。即ち前者はチオニンに強く抑制されるがフクシン、メチルパイオレット、ピロニンにはほとんど感受性を示さず、またペニシリン5単位の寒天に発育を認めたのに対して、後者はすべての色素に高い感受性を示し、ペニシリン0.5単位の低濃度においてもほとんど発育しなかつた。

考 察

Br. abortus が培養時に炭酸ガスを要求することにより、*Br. suis* 及び *melitensis* から区別され、硫化水素産生では *Br. suis* とともに旺盛で *melitensis* はほとんど硫化水素を産生せず、尿素分解では、*Br. suis* と *melitensis* との中間にあることなどは諸家の等しく是認するところである。しかしながら対照菌株にみられるように、継代によつてこれらの性状が変化しうことは日常我々の経験するところである。A. G. Marr (1950) によると炭酸ガスを要求する *Br. abortus* からの非依存菌の出現頻度即ち *mutation rate* は 3×10^{-10} と云われているが、継代による変異の問題は *mutagenic agent* としてのメチウムの条件を考慮に入れて細菌の遺伝学的立場から再出発すべきものと考えている。

ブルセラ属菌の色素感受性については、チオニンに感受性なくフクシンに感受性の高いものを定型的 *Br. abortus*、その逆を *suis*、いずれにも感受性を示さないものを *melitensis* とすることには異論はないが、諸家の報告を通覧するのに、相当数の異型株が見受けられる。例えば Pickett (1953) は米国内外から集めた92株のうち各種色素に対して感受性の高い5株の *Br. abortus* を異型株として記載しているが如きである。他方これとは別に Huddleson (1954) は米国ミシガン州の乳牛から、寒天平板上で微細の集落を形成し、色素培地及び低濃度(0.5単位以下)のペニシリン加培地に発育しえない異

型株のあることを認め, *Br. abortus* Type II (Wilson) と記載している。

ひるがえって今回の分離菌株性状検査の成績をみるのに, 輸入牛由来菌株は諸家の云う定型的 *Br. abortus* と断定して間違いないと思われるが, 日本産ホルスタイン牛から分離された菌株は, いずれもすべての色素に感受性高く, またペニシリン感受性も顕著である。前述したように別の目的で行われた渡楨 (1937) 安藤等 (1954) の報告中にも私どものえた菌株とほぼ同様の性状を示す菌株が散見されることから, この種の異型菌が本邦乳牛間に存在することはたしかで, 人畜に対する病原性, 凝集反応上の差異等今後追究さるべき多くのものがある。他方日本産牛由来菌がペニシリン感受性をもつ点から *Type II* (Wilson) を疑われるが, 感染牛の生前の凝集価が比較的高いこと, 分離時の集落が少々大きいことなど, Huddleson の云うところと異った点もありさらに吟味を要する。

む す び

輸入ジャージー種乳牛から8株, 日本産ホルスタイン種乳牛から9株計17株の, *Br. abortus* を分離し由来を異にする両群菌株間に生物学的性状特に色素及びペニシリン感受性の点で顕著な差のあることを発見した。即ち前者が定型的 *Br. abortus* であつたのに対して, 日本産牛由来菌株は, いずれも著明な色素感受性を有し, さらにペニシリンに高い感受性を示すことから Huddleson の *Br. abortus* Type II (Wilson) との関係について若干の考察を加えた。

文 献

- 1) 青木, 高山: 慶応医学, 32, 415-431, 1955.
- 2) 安藤, 川島: 家畜衛生試験場研究報告, 28, 55-71, 1954.
- 3) Braun, W.: Bacterial Genetics, 1953.
- 4) Cruickshank, J. C.: J. Path. Bact., 60, 328-329, 1948.
- 5) Cruickshank, J. C.: J. Hyg., 52, 106-118, 1954.
- 6) 橋爪, 加本, 桐沢: 畜産試験場報告, 42, 1-113, 1940.
- 7) Huddleson, I. F.: Michigan State College Agri. Exptl. Stat., Memoir 6, 7-62, 1952.
- 8) Huddleson, I. F.: Veterinarian, 14, 120-121, 1954.
- 9) 二村: 獣疫調査所研究報告, 12, 1-34, 1928.
- 10) 堀: 日本伝染病学会雑誌, 15, 596-604, 1941.
- 11) 広木, 新井, 孫本, 本多: 東京医事新誌, 61, 320, 324, 1937.
- 12) 板橋, 渡辺: 東京医事新誌, 60, 2580-2581, 1936.
- 13) 近藤, 谷口: 日本微誌, 34, 480-502, 1939.
- 14) Marr, A. G.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 75, 438-440, 1950.
- 15) 能美, 加藤, 唐沢: 家畜衛生協会報, 4, 425-465, 1936.
- 16) 奥田, 福田: 第8次獣疫調査報告, 421-544, 1915.
- 17) 大林: 日本細菌学雑誌, 548, 633-651, 1941.
- 18) Pickett, M. J. et al: J. Lab. & Clin. Med., 40, 2-7, 1952.
- 19) Pickett, M. J. et al: J. Bact., 66, 210-219, 1953.
- 20) 敷波, 細川: 日内会誌, 27, 358-363, 1939.
- 21) 渡楨: 獣疫調査所研究報告, 17, 31-66, 1937.
- 22) Wilson, G. S.: J. Hyg., 4, 516-541, 1933.
- 23) 岡: 日本細菌学雑誌, 11, 341-349, 351-354, 1956.