表6 品種と病型

	リンパ肉腫	細網肉腫	計
黒毛和種	7	2	9
ホルスタイン種	2	5	7
褐毛和種	1	0	1
日本短角種	0	1	1
計	10	8	18

れ表5, 表6のとおりで, 年齢的には4才から9才までの成牛が18例中16例と大部分を示した. 品種別発生は, 黒毛和種とホルスタイン種に多かった.

性別では雌が17例で, 雄が1例であった.

IV. 考察および要約

牛白血病をリンパ肉腫と細網肉腫に分類し, これらについて臨床病理的立場から比較したところ, 臨床症状および剖検所見に特別な差異は見られなかった. ただし脾臓と肝臓の腫大が, 細網肉腫にやや多く見られた. 両型の地区別, 月別発生状況にはとくに差異は認められなかったが, 年齢別発生頭数は両型とも4才から9才が大

部分をしめた. このことは DUNGWORTH ら¹⁾および THEILEN ら²⁾の分類による成牛型の発生頻度の高いことを示しており, これらの成牛が多くと畜場に搬入されたものと思われる.

当検査所における昭和49年度の牛の総と殺頭数は5,548頭で, 本症の発生比率は0.32%である. しかしながら, これら牛白血病の18例は全て病畜として搬入されたものであり, 牛の病畜と殺頭数877頭に対し, その比率は2.1%と高い値を示した. このことは牛の白血病はと畜検査にあたり一層重視すべき疾病であることを示す.

[本論文は昭和50年度日本獣医公衆衛生学会(東北)において発表された褒賞論文である]

文 献

- 1) DUNGWORTH, D. L., THEILEN, G.H. and LENOXYEL, J.: *Path. Vet.*, 1, 323~350 (1964).
- 2) THEILEN, G. H. and DUNGWORTH, D. L.: *Am. J. Vet. Res.*, 26, 696~709 (1965).
- 3) YOSHIKAWA, T. and YOSHIKAWA, H.: *Kitasato Arch. Exp. Med.*, XIV, 193~204 (1972).

家畜衛生

炭疽菌のチオグリコレート培地における発育集落について

池上敬之* 西岡 修* 佐藤 弘* 小山順之* 古賀利治* 金子 宏*

(昭和50年4月10日受付)

Colonies of *Bacillus anthracis* Grown on Thioglycolate Medium

TAKAYUKI IKEGAMI, O. NISHIOKA, H. SATO, Y. KOYAMA, T. KOGA and H. KANEKO

(Chikugo Livestock Hygiene Service Center, Prefecture of Fukuoka)

SUMMARY

When *Bacillus anthracis* (BA) was allowed to grow on thioglycolate (TGC) medium, soft, beautiful stellate or ellipsoidal characteristic colonies appeared. Any other *Bacillus* species failed to form such colonies.

Materials were collected from mice and guinea pigs inoculated with BA and feed contaminated with BA.

When TGC medium inoculated with these materials was heated, those characteristic colonies appeared. This appearance was found to be influenced by the agar content of the medium and the bacterial count of BA.

炭疽は畜産および公衆衛生上重要な急性伝染病の一つであるため, その診断にあたっては, 迅速性と確実性が同時に満たされねばならない.

現在周知のように, 血清診断法^{1,2,5,7)}としてアスコリ-反応⁴⁾, 細菌学的診断法^{1,2,5,7)}として莢膜および運動性の検査, バールテスト³⁾およびファージテスト, また蛍光抗体直接法⁸⁾などが利用されている.

* 福岡県筑後家畜保健衛生所(福岡県筑後市大字泉九郎地山)

最近, 平田ら⁶⁾は, 無菌検査用チオグリコレート培地における炭疽菌集落の特徴的形態に注目し, 炭疽診断上有効な補助的意義があることを指摘した.

今回, 著者らは平田らの成績を追試するとともに, 炭疽菌の特徴的集落発現機構の一端を明らかにしたので, それらの成績を報告する.

実験材料および方法

1. 培地: 栄研の無菌および臨床検査用チオグリコレ

ート培地（以下TGC培地）、SIM培地、CTA培地、TSI半流動培地、ブレインハートインフュージョン寒天培地、INペプトン培地、ヒューレイフソン培地、および糖分解用半流動培地を用いた。

2. 供試菌株：次の菌株を用いた。

Bacillus anthracis：4株（福岡・肺炎・細菌および弱毒株）。前記3株は京都第二赤病院平田博士より、弱毒株は化血研（熊本）より、それぞれ分譲された。

対照菌株：*B. cereus* 1株（化血研より分譲）、*B. subtilis* 3株、*B. mesentericus* 6株、*B. megaterium* 1株、*B. mycoides* 1株、および土壌あるいは牛糞便から分離された好気性芽胞桿菌（以下芽胞桿菌）30株を用いた。

Bacillus 以外に *Clostridium chauvoei* 2株、*Cl. septicum* 1株、*Corynebacterium pyogenes* 6株、*Escherichia coli* 2株および *Pseudomonas aeruginosa* 2株も供試した。

3. 実験方法：普通寒天またはブイヨン培地に1晩培養した菌、または人工感染動物材料をそれぞれ1白金耳TGC培地（7 ml）に接種しよく振盪後、その1白金耳を次のTGC培地に接種し、再度上記の操作後次のTGC培地に接種した。これら接種TGC培地（通常3本）を37℃で1晩培養し発育状況（培地の混濁、集落形態等）を観察した。

また、TGC 培地における炭疽菌の発育におよぼす血液の影響をしらべるため、次の方法を用いた。すなわち、チトラート加牛血液 1 ml または同山羊血液 2 ml に、炭疽菌（福岡株）を1白金耳加えて良く振盪し 37℃ 30 分間静置後、上記の連続希釈培養を実施した。

人工感染動物からの培養試験として、*B. anthracis*（福岡株）、*B. subtilis* および *E. coli* のそれぞれ 24 時間培養菌の1白金耳を、生理食塩液 2 ml にそれぞれ均等に混合浮游し、その 0.5 ml をマウスおよびモルモットの腹腔内に注射し、斃死動物の心血と腹腔液を TGC 培地に連続希釈培養し、70℃ 30 分間熱処理後 37℃ 1 晩培養した。

4. 汚染飼料：生理食塩液 10 ml に *B. anthracis*（福岡株）の 24 時間培養菌1白金耳を均等浮游し、これに養鶏用完全配合飼料 2 g を加え良く混和した。この試料を3等分し、それぞれ 65℃ 30分、70℃ 30 分、および 80℃ 15 分の熱処理を行ない、連続希釈培養を実施した。

実験成績

1. *B. anthracis* の TGC 培地における発育所見

無菌、および臨床検査用 TGC 培地に *B. anthracis* 4 株を培養しその発育状況を調べた。

接種菌量が多い時には培地は平等に混濁するが、接種菌数の減少に伴い培地は透明度を増し、柔かみのある美麗な星状またはマリモ状集落がみられ、菌数が最小の時

写真1の模写図

写真1 *B. anthracis* の TGC 培地における発育所見

には全部マリモ状集落を呈した。弱毒株もほぼ同一所見を示したが、集落は柔かみのある顆粒状、ぶどう房状、あるいはくさび状を呈した(写真1)。

なお、無菌と臨床検査用培地との間の *B. anthracis* の発育および集落形態上に差違はみられなかった。以下の実験には臨床検査用 TGC 培地を用いた。

2. 他の *Bacillus* の TGC 培地における発育所見

B. subtilis 2株では、培地上層部が混濁し下層部は透明を呈した。*B. mesentericus* 6株では、僅かに菌膜を認め、培地上層部は混濁し、下層部は透明となった。*B. cereus* 1株では、培地上層部は吹き流し状の集落が密集し白濁帯を呈し、透明な下層部にも同様の集落が散発した。*B. mycoides* 1株では、管壁に菌膜様発育を示し全液は半透明か、または透明を呈した。*B. megaterium* 1株は、液面下に薄い白輪を認め、以下の全液は透明を示した。

なお、芽胞桿菌では 30 株中8株は *B. subtilis* の発育に、4株は *B. mesentericus* に、2株は *B. cereus* に、5株は *B. mycoides* に、また5株は *B. megaterium* に、その発育所見がそれぞれ類似した。また、芽胞桿菌の1株では培地上層部が半透明で下層部は透明を呈し、2株では培地全体が混濁または半混濁を呈し、他の3株では培地液面下が透明で中間層は半混濁を呈し下層部は混濁が著明であった(写真2)。

炭疽菌の試験と同じく最小菌数になるよう連続希釈培養を行なった上記の発育所見は、*B. anthracis* のそれと明瞭に異なった。

3. その他の細菌の TGC 培地における発育所見

Cl. chauvoei (2株) ではガス産生を認め、培地底部で発育白濁を示し培地面向かい次第に透明となった。*Cl. septicum* (1株) では培地上層部が透明となり、下層部は混濁を示しガスの発生を認めた。*Corynebacterium pyogenes* (6株) では培地が全面透明を呈し、その中にくさび型、吹流型、または長糸状の集落が垂直に認められた。*Escherichia coli* (2株) では培地全体が半透明か、または培

1. *B. mesentericus* 2. *B. cereus*
 3. *B. mycoides* 4. *B. subtilis*
 5. *B. megaterium* 6~12. 芽胞桿菌

同上模写図

写真2 他の *Bacillus* の TGC 培地における
 発育所見

地面が混濁し下層するに従い次第に透明となった。

4. TGC 培地における集落出現時間

生理食塩液 3 ml に *B. anthracis* の 24 時間培養の 1 白金耳を混じたもの(A液), A液 1 ml に山羊血液 2 滴を混じて 70℃ 30 分加熱したもの(B液), またA液 1 ml に *B. subtilis* と *E. coli* 24 時間培養の 1 白金耳をそれぞれ溶解混合し 70℃ 30 分加熱処理したもの (C液) の 3 例について TGC 培地を用いて培養を行ない *B. anth-*

racis の特徴的な集落の出現を検討した。

その成績を表 1 にまとめた。集落の発現に, A, B 両液では 6 時間を, C 液では発育遅延して 7~8 時間を要した(表 1)。

表 1 鑑別可能所要時間調査成績

炭疽菌株 処理区分 観察経 過時間	A 液				B 液				C 液			
	福岡株	肺炎株	細菌株	弱毒株	福岡株	肺炎株	細菌株	弱毒株	福岡株	肺炎株	細菌株	弱毒株
培養 3 時間	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
“ 4 時間	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
“ 5 時間	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
“ 6 時間	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
“ 7 時間	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
“ 8 時間	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
“ 24 時間	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

備考 A 液: 各炭疽菌の 1 白金耳を生理的食塩水 3 ml に溶解したもの。

B 液: A 液 1 ml に山羊血液 2 滴を滴下し, 70℃ 30 分熱処理したもの。

C 液: A 液 1 ml に枯草菌および普通大腸菌をおおの 1 白金耳溶かし, 70℃ 30 分熱処理したもの。

— 土 + 土 ++ 土 +++ ……鑑別可能程度を示す。

5. 動物血液添加の影響

方法の項に記載した試験方法を用い, 牛および山羊血液の炭疽菌の発育におよぼす影響を調べた。血液の添加によって炭疽菌の特徴的な集落形成は助長された。

6. 人工感染動物からの培養試験成績

E. coli, *B. subtilis* そして *B. anthracis* の混合浮游液を注射して斃死したマウスの心血と腹腔液を培養した TGC 培地では, 培地の上面部約 1/3 が半透明でその下層部は平等に混濁し, その境界域に不明瞭な星状とマリモ状の集落を認めた。他方斃死モルモットの心血と腹腔液では培地全面が混濁し, その中にマリモ状の集落が点々とかすかに見られた。しかしこれらを加熱処理した培養ではいずれの培地も透明で, 特徴的な星状, またはマリモ状の集落が明瞭に出現した。

7. 汚染飼料の培養試験成績

方法の項に記述した試験方法を用い汚染飼料の培養試験を行なったが, いずれの場合にも *B. anthracis* の特徴的

表 2 寒天とゼラチンの含有培地における特徴的集落の発現状況

培地区分	寒 天 培 地										ゼ ラ チ ン 培 地						
試験管 No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	対	1	2	3	4	5	6	対
%	2	1	0.5	0.25	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.00625	照	40	20	10	5	2.5	1.25	照
判定	成	績	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—

備考: +++ 土 +++ は集落の発現程度を示す。(++) は培地着色のため, みにくい状態を示す。

な集落が出現した。

3. TGC 培地における *B. anthracis* の集落および ぼす寒天とゼラチン濃度の影響と各種培地における *B. anthracis* の発育状況

普通ブイオン培地に各種濃度に寒天を添加し *B. anthracis* の発育をしらべると、0.006%以上の濃度に寒天を含有すると *B. anthracis* の特徴的な集落が出現するが、濃度が 0.25% 以上になると集落を識別する事が難しくなった。この成績から寒天含有最適濃度はほぼ 0.1~0.02% の範囲が適当とされた(表 2)。

なおさらに市販の培地について再度試みるに、寒天含有濃度が 0.1~0.02% 以内にある無菌検査用 TGC 培地(寒天含有濃度 0.07%, 以下同じ)、臨床検査用 TGC 培地(0.08%), IN ペプトン培地(0.1%) では最も鮮明な *B. anthracis* の特徴的な集落を現わしたが、寒天含有量の 0.1% 以上の CTA 培地(0.25%), ヒューレイフソン培地(0.3%), 糖分解用半流動培地(0.3%), SIM 培地(0.5%), ならびにブレインハートインフュージョン寒天培地(1.5%) では集落が不鮮明であって寒天含有濃度が高い培地ほどその識別が難しくなった。この結果から寒天含有最適濃度範囲(0.1~0.02%)の確実性がより一層立証された。

しかしまた、この試験を実施中にたまたま培地表面にできたいわゆる縮毛状集落を立体的に側面からみたところ培地深部ではマリモ状の集落となっていた。

ゼラチンではいずれの濃度の培地でも紙屑様集落か、または全液混濁して、星状やマリモ状の集落は出現しなかった。

考 察 と 総 括

著者らは 1 昨年平田らが発表した炭疽菌の簡易鑑別培養法について追試験検討を行なった。

実験成績の範囲内では、平田らの成績と一致した。なお、より一層の確実性をますため、今後より多数例について検討したい。

今回の実験成績では、TGC 培地における炭疽菌の集落形成は特徴的であり、その出現所要時間は 7~8 時間で、かつその手技も至って簡単容易である点などから現行の細菌学的診断法に加えて実施されることを要望する。

なお、本培養法を実際に応用する場合には、まず、検査材料を 70℃ 30 分~80℃ 15 分間加熱処理し、TGC 培地に連続希釈培養(3 本以上)を行ない、菌数を可能なかぎり少数にすることが最も肝要と思考する。

以上成績をまとめると

1) 炭疽菌を TGC 培地に培養すると、柔かみのある美麗な星状またはマリモ状の特徴的な集落が出現した。

2) *B. anthracis* 以外の *Bacillus* を調べたが、上記の

ような集落は認められなかった。

3) *B. anthracis* 接種マウス、モルモット材料および *B. anthracis* 汚染飼料の場合、材料接種 TGC 培地を加熱処理して、上記の特徴的集落の出現が認められた。

4) この原因としては、培地の寒天含有量と *B. anthracis* の菌数が影響することを知り得た。

5) なお、*B. anthracis* の特徴の一つである縮毛状集落を立体的に観察したところ、培地深部ではマリモ状の集落となっていた事例に遭遇した。

脱稿に臨み、熊本市・化学及血清療法研究所所長 六反田藤吉博士のご厚志に感謝申しあげ、京都市・京都女子大学教授兼京都第二赤病院 平田一士博士のご指導に深謝申しあげます。

参 考 文 献

- 1) 安藤敬太郎：日獣会誌，24，113~120 (1971)。
- 2) 石井 進，ほか：家畜伝染病診断学各論，30~34，文永堂 (1953)。
- 3) 金田義宏，吉田 勲，安藤敬太郎：農林省家畜衛生試験場研究報告，48，35 (1964)。
- 4) 高木静雄：日本細菌学誌，9，10，885~890 (1954)。
- 5) 農林省家畜衛生試験場技術者集談会：家畜伝染病の診断，585~593，文永堂 (1967)。
- 6) 平田一士，竹内素子，奥野晶三：第 17 回日本臨床病理学会近畿支部総会発表 (京都) (1974)。
- 7) 平戸勝七：獣医微生物学，375，養賢堂発行 (1968)。
- 8) 山岡弘二，松本 勝：日獣会誌，24，10，534~537 (1971)。

//////日 獣 の 新 刊 図 書//////

増補改訂

技術の手引き 12

家畜衛生に必要な――

臨 床 生 化 学 的 検 査 法

農林省家畜衛生試験場 飯塚・伊出・新林・元井・山本共著

定 価 1,800 円 (送料 160 円)

A 5 版 232 頁 図表真写多数挿入

(主なる増補改訂内容)

第 3 章 一般血液検査法・電子血球計算装置に 1) 自動血球計算器による測定方法を加える。

第 4 章 血液定量的検査の VII. 血清カルシウムの定量に [2. 比色法] を加え，XX. 臨床化学分析の精度管理 [1. 外部精度管理法―1) プール血清による精度管理図 2) 管理血清による精度管理図―2. 内部精度管理法 3. 管理図のみかた 4. 正確度の管理]

発 行 日 本 獣 医 師 会

東京都港区南青山 7-2-10 (〒107)

電話 (03) 406-5271 郵便振替東京 6-68304 番