

DE-3936 の *Treponema hyodysenteriae* に対する *in vitro*, *in vivo* での抗菌活性

菊池直哉*・斎藤 純**・川上善三*
村瀬信雄*・高島俊弘***

The Preventive Effect of DE-3936 Against *Treponema hyodysenteriae* *in vitro* and *in vivo*

Naoya KIKUCHI*, Jun SAITO**, Yoshimi KAWAKAMI*,
Nobuo MURASE* and Toshihiro TAKAHATA***

(May, 1983)

緒 言

豚赤痢は、*Treponema hyodysenteriae* (以下 *T. hyodysenteriae*) の感染による粘血下痢便の排泄を主徴とする急性または慢性の疾病である^{6),23)}。わが国では、宮前ら¹²⁾が北海道で初めて本症を確認したが、現在では全国各地での発生が知られている。本症は15~70 kgの育成豚に多く発生し、発育遅延や飼料効率の低下などのため、肥育養豚場にとって大きな問題となっている。

したがって、本症に対して高い治療および予防効果のある抗生物質の開発が強く望まれている。これまでの研究から、原因菌である *T. hyodysenteriae* に対して *in vitro* で抗菌活性を示す薬剤^{10,14,25)}は、野外応用あるいは感染実験の結果からも本症に対して予防および治療効果のあることが報告されている^{2,5,7,8,11,19,20,22,26)}。したがって、豚赤痢の予防および治療には、*T. hyodysenteriae* に対して強い抗菌活性を持つ薬剤を使用する必要がある。

DE-3936^{16,27)} (Lonomycin¹⁸⁾ あるいは Emericid¹⁵⁾ 同一物質) は *Streptomyces hygroscopicus* あるいは *S. ribosidificus* により産生される Polyether 系抗生物質で、グラム陽性菌に抗菌活性を示すこと、また鶏のコクシウム症に有効なことなどが報告されてい

* 獣医学科、家畜微生物学教室

Laboratory of Veterinary Microbiology, Department of Veterinary Medicine, The College of Dairying, Ebetsu, Hokkaido 069-01, Japan

** 獣医学科、獣医公衆衛生学教室

Laboratory of Veterinary Public Health, Department of Veterinary Medicine, The College of Dairying, Ebetsu, Hokkaido 069-01, Japan

*** 第一製薬株式会社中央研究所、東京都江戸川区北葛西1-16-13

Research Institute, Daiichi Seiyaku Co., Ltd., Edogawa-ku, Tokyo 134, Japan

る^{1,24)}。また高島ら²¹⁾は本剤の豚赤痢に対する予防効果を示唆している。

今回、著者らは本抗生物質の *T. hyodysenteriae* に対する抗菌活性を *in vitro* で測定するとともに、豚赤痢への予防効果について実験感染により詳細に検討したので、以下得られた成績について報告する。

材料および方法

1. 薬剤感受性試験

供試菌株および培養法：19株の *T. hyodysenteriae* を供試した。うち18株は柏崎らの方法⁹⁾により野外の豚赤痢発症豚の糞便から分離したもの、また1株(S72/2)は英国 Glasgow 大学の D. J. Taylor 博士より分与されたものである。培地には5%馬脱線血加トリブチケースソイ寒天培地(BBL)を用い、37°C 3日間 Gas Pack 法(BBL)による嫌気培養を行なった。

供試薬剤：DE-3936、タイロシン(動物医薬品検査所分与)およびリファンピシン(第一製薬)を供試した。これらの薬剤はまず1,000 $\mu\text{g/ml}$ の溶液に調整し、2倍階段希釈して試験を行なった。

最小発育阻止濃度の測定：100~0.05 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に薬剤を添加した血液寒天培地平板に各供試菌液を接種し、37°C 3日間嫌氣的に培養した。接種菌の発育は、接種部における溶血斑形成の有無で判定し、溶血斑形成を完全に阻止した最も低い薬剤濃度をその菌の最小発育阻止濃度(MIC)とした。なお、接種菌液は約 10^6 colony forming unit (CFU)/ml に調製し、その約0.01 ml をマイクロプランター(佐久間製作所)を用いて接種した。

2. 豚赤痢に対する予防試験

供試豚：8週齢のSPF豚18頭を1週間の予備飼育を行なったのち、そのうちの15頭を体重差がほぼ等しくなるように5頭ずつ3群に分けて厳重に隔離して飼育し、抗菌剤無添加の実験用子豚期飼料(日本クリア)を不断給飼した。残りの3頭は別の隔離豚舎で飼育し、これら3群への接種材料を作製するため *T. hyodysenteriae* の感染試験に供した。

接種材料の調製および接種方法：血液寒天培地に十分発育した *T. hyodysenteriae* を培地とともにホモジナイズし、カテーテルを用いて3頭のSPF豚の胃内に強制投与した。赤痢の発症極期に殺処分し、摘出した大腸部分を-80°Cに保存して接種材料とした。接種時にこの材料を溶解、腸内容物とともに粘膜面をかきとり、等量の5%ムチン(東京化成工業)加希釈液⁹⁾を加えて十分ホモジナイズし、その約10gをあらかじめ約18時間絶食させた各供試豚にカテーテルを用いて投与した。なお、この接種材料1g中に、約 10^8 CFU の *T. hyodysenteriae* が含まれていることを確認した。

投薬方法：1群5頭ずつの3群に分けたうちの第1群を接種・無投薬の対照群、また第

2群と第3群を試験群として DE-3936 をそれぞれ 50 および 75 ppm の濃度に添加した飼料を接種5日前から接種後30日目まで給飼した。

臨床観察： 試験開始時から5日ごとに各個体別に体重を測定した。毎日臨床観察を行ない、とくに便の性状を4段階(0: 正常便, 1: 軟便, 2: 水様性下痢便, 4: 粘血下痢便)に区分して記録した。なお死亡豚のスコアを8として記録し、各群の毎日の下痢スコアの和を供試頭数で除したものを平均下痢指数とした。

***T. hyodysenteriae* 検索：** 感染材料接種後3日ごとに供試豚の新鮮糞便を採取し、*T. hyodysenteriae* の培養に供した。これらの糞便の10倍階段希釈を作製し、その0.1 ml をポリミキシンB(台糖ファイザー) 200単位/mlとリファンピシン20 µg/mlを含む血液寒天培地に接種、嫌氣的に培養し、菌数を測定した。

試験終了時の検査： 材料接種後30日目に供試豚のすべてを殺処分し、大腸の肉眼病変の有無ならびに程度を観察するとともに *T. hyodysenteriae* を検索した。なお、死亡例についても死後直ちに同様の観察と検索を行なった。

結 果

1. *T. hyodysenteriae* の薬剤感受性試験

供試薬剤 DE-3936, タイロシンおよびリファンピシンの MIC 値は Table 1 に示した通

Table 1. Susceptibility of *T. hyodysenteriae* to antimicrobial agent

Strain	DE-3936	Tylosin	Rifampicin
D J 70	0.1*	100	>100
D J 183	0.2	100	>100
S 776	0.1	3.13	>100
DK762	0.1	100	—
DK765	0.1	100	—
YD 2	0.1	1.6	—
YD 3	0.2	1.6	—
YD 4	0.2	1.6	—
TD 6	0.1	1.6	—
Pr 775	0.1	100	—
CD 1	0.1	100	—
CD 3	0.1	>100	—
62	0.2	>100	—
93	0.1	>100	—
RD291	0.2	3.13	—
RD292	0.4	3.13	—
MA	0.1	100	—
MC	0.1	100	—
S 72/1	0.2	6.25	>100

Remark *: minimal inhibitory concentration (MIC, µg/ml).

りて、DE-3936 の MIC 値は供試菌株 19 株に対して 0.1~0.4 $\mu\text{g/ml}$ ときわめて高い活性を示した。一方、タイロシンのそれは 1.6~6.25 $\mu\text{g/ml}$ と 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の 2 峰性の分布を示し、リファンピシンの MIC 値は用いた 4 株のすべてが 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上で、強い耐性を示した。

2. DE-3936 の投与試験

供試豚の糞便性状からみた豚赤痢の発生状況を Fig. 1 に示した。接種・無投薬対照豚

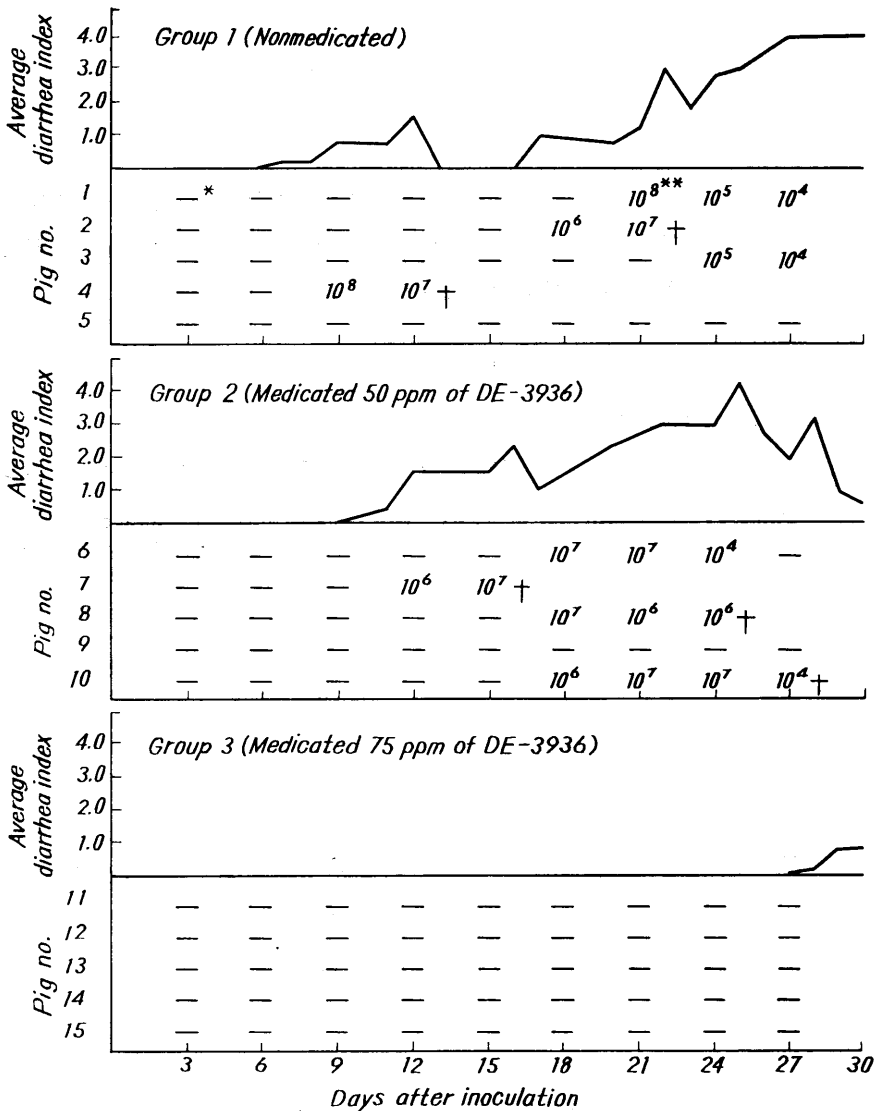


Fig. 1. Daily feces condition and isolation *T. hyodysenteriae* from feces. Remarks *: not isolated, **: CFU/g, †: dead

(第1群)では、1頭が接種7日目に発症、12日目に死亡した。他の4頭は接種17~25日目に全頭が発症し、下痢症状が試験終了時まで続き、うち1頭が死亡した。発症豚はいずれも典型的な赤痢便を排泄し、被毛は光沢を失ない、元気消失および消瘦が認められた。一方、DE-3936を50 ppm投与した第2群では、接種10日目から発症、うち3頭が死亡し、豚赤痢症状は試験終了時まで持続した。DE-3936を75 ppm投与した第3群では、1頭の供試豚に接種28日目から粘血下痢便の排出が認められたのみで、他の4頭は正常に経過した。

試験期間中の糞便の *T. hyodysenteriae* 検索成績は Fig. 1 にみられるとうり、発症豚の下痢便には、 $10^4 \sim 10^8$ CFU/g の菌数が検出された。第1群の供試豚のうち No. 5 は、接種25日目から30日目まで、第2群の No. 9 は22日目から30日目まで、それぞれ赤痢症状を呈したにもかかわらず、*T. hyodysenteriae* を分離できなかった。なお、第3群の供試豚の糞便からは試験期間中 *T. hyodysenteriae* が分離されなかった。

3. 豚赤痢に対する DE-3936 の子防効果

Table 2 に示したように、対照の第1群における発症までの平均潜伏期間は17.8日、また平均下痢持続期間は7.2日であった。DE-3936を50 ppm投与した第2群の平均潜伏期間と平均下痢持続期間はいずれも対照群との間に有意差がなく、予防効果は認められなかった。しかし、75 ppmを投与した第3群では、潜伏期の平均が28.0日、下痢持続期間も0.6日と短かく、死亡するものもなく、豚赤痢の発症を抑えることができた。

Fig. 2 に各群の試験期間中における増体成績を示した。第1および第2群では、材料接種後20日以降本症の発生により体重の増加が顕著に抑制されたが、第3群では順調に増加した。

試験期間中における増体重、死亡時あるいは殺時における大腸の肉眼病変および *T. hyodysenteriae* の分離成績を Table 3 に示した。大腸の肉眼病変としては、おもに粘膜面のび慢性充血および水腫が認められた。下痢が慢性に経過した例では、明らかに腸管壁の

Table 2. Preventive effect of DE-3936, a polyether antibiotic, against swine dysentery

Group	Number of pigs	Medication	Concentration in feed (ppm)	Average duration of latency (day)	Average duration of diarrhea (day)	Mortality (%)
1	5	—	0	17.8	>7.2	40
2	5	+	50	15.6	>9.2	60
3	5	+	75	28.0	>0.6	0

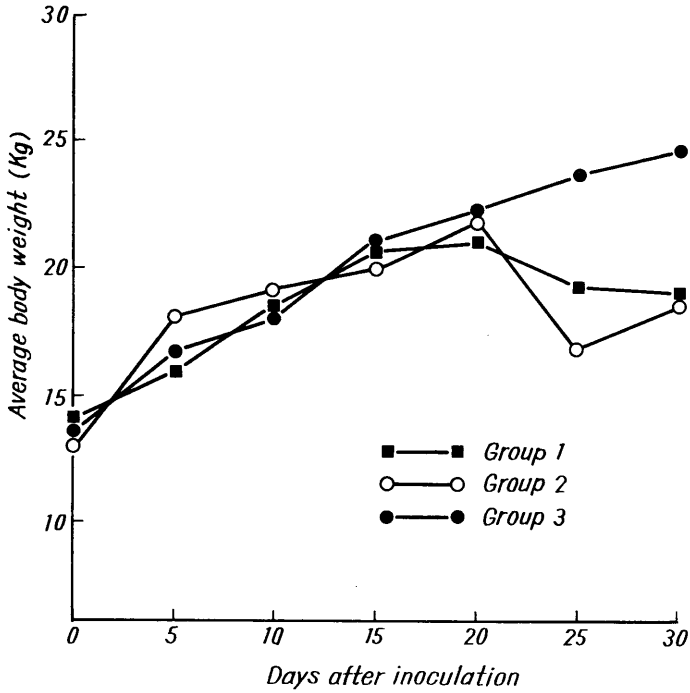


Fig. 2. Growth curves of pigs throughout the experiment.

Table 3. Gross lesions and isolation of *T. hyodysenteriae* at the end of experiment

Group	Medication	Pig number	Body weight (kg)		Average weight gains (kg)	Gross lesions			Isolation of <i>T. hyodysenteriae</i> (CFU)		
			Initial	Final		Cecum	Colon	Rectum	Cecum	Colon	Rectum
1	-	1	12	17	6.7	+	+	+	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁸
		2	16	-		+	+	+	-	10 ⁶	10 ⁷
		3	11	19		-	+	+	-	10 ⁸	10 ⁷
		4	15	-		+	+	+	-	-	10 ⁵
		5	15	22		-	+	+	-	-	10 ⁷
2	+	6	11	18	6.5	-	+	+	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
		7	12	-		-	+	+	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁷
		8	12	-		+	+	+	10 ³	10 ⁵	10 ⁶
		9	14	20		-	+	-	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵
		10	16	-		+	+	+	10 ⁶	10 ⁷	-
3	+	11	13	24	10.6	-	-	-	-	-	-
		12	14	26		-	-	-	-	-	-
		13	16	28		-	-	-	-	-	-
		14	14	22		-	-	-	-	-	-
		15	12	22		+	+	+	-	10 ⁷	10 ⁷

菲薄化がみられた。第1, 第2群のすべての供試豚および第3群で発症がみられ、生前に糞便から *T. hyodysenteriae* が分離されなかった No. 15 においても殺処分後の大腸内容物から本菌が分離された。

考 察

T. hyodysenteriae の経口投与による発症豚の大腸内容物とその粘膜の搔爬材料を供試豚に経口的に投与することにより、SPF 豚に豚赤痢を再現することができた。このような実験感染は、野外での感染が糞便の経口摂取によって成立するという事実を裏付けるものである。また、この方法により、発症を確実に成立させ得ることが明らかになったので、この方法を発症予備試験に応用した。

生体外での DE-3936 の *T. hyodysenteriae* に対する抗菌活性は非常に高く、MIC の最頻値は 0.1 $\mu\text{g/ml}$ であった。一方、タイロシンの MIC 値は 2 峰性に分布しており、この成績は他の報告^{10), 14), 25)} とほぼ一致した。タイロシンはこれまで養豚産業において豚赤痢の防除に応用されてきた主要薬剤の 1 つ⁴⁾ であるが、本病の予防および治療効果に関しては必ずしも一致した成績が得られていなかった^{3, 13, 17)}。この成績の不一致は関与した *T. hyodysenteriae* のタイロシンに対する感受性の差に原因しているものと推察される。したがって、本病の薬剤による予防・治療に際しては、*T. hyodysenteriae* に対し抗菌活性の高い薬剤を適切な濃度で使用することが肝要と思われる。すなわち、今回の試験で、DE-3936 を 50 ppm の濃度に添加した飼料を投与した感染実験群では、全頭に赤痢症状がみられ予防効果は認められなかったが、75 ppm を添加した群では供試豚の 1 頭に発症が認められたのみで、他の 4 頭は赤痢症状を示すことなく正常に経過し、糞便からの *T. hyodysenteriae* の分離も陰性で、しかも試験期間中の発育も順調であった。さらにこれらの 4 頭では剖検時大腸からの菌分離も陰性で、肉眼的病変も認められず、予防の効果は完全であった。

以上の成績から、野外における DE-3936 投与における豚赤痢の予防には、飼料への 75 ppm 以上の添加が必要であることが明らかになった。

要 約

Polyether 系抗生物質 DE-3936 の *T. hyodysenteriae* に対する *in vitro* での抗菌活性と豚赤痢の実験感染に対する予防効果について検討した。

DE-3936 の *T. hyodysenteriae* に対する最小発育阻止濃度は寒天平板希釈法で 0.1~0.4 $\mu\text{g/ml}$ であり、優れた抗菌活性を有することが確かめられた。

実験的に本菌を感染させた豚に、DE-3936 を飼料に混合して投与し、本菌に対する予防効果を検討したところ、50 ppm 濃度の飼料添加群では全頭が赤痢症状を呈し、予防効果は認められなかったが、75 ppm 添加群では1頭に発症が認められたのみで、残りの4頭は下痢することもなく、体重が順調に増加し、糞便中からの *T. hyodysenteriae* の回収も試験期間を通じて陰性であった。以上の結果から、DE-3936 は75 ppm 以上の濃度で豚赤痢に対して優れた予防効果のあることが明らかになった。

文 献

- 1) Cruthers, L. R., J. Szanto, W. H. Linkenheimer, D. C. Maplesden and W. E. Brown, 1978. Anticoccidial activity of lonomycin (SQ 12525) in chicks. *Poultry Sci.*, **57**: 1227-1233.
- 2) DeGeeter, M. J., L. W. Davis and S. Geng, 1976. Effect of lincomycin on swine dysentery. *J. Anim. Sci.*, **42**: 1381-1388.
- 3) Doornenbal, H., 1965. Clinical evaluation of tylosin as a treatment of vibronic dysentery in swine. *Can. J. Com. Med. Vet. Sci.*, **29**: 179-182.
- 4) Gossett, F. O. and J. A. Miyat, 1964. A new antibiotic in treatment of swine dysentery. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, **59**: 169-215.
- 5) 浜名克己・吉田 均・津田知幸・南正覚耕平・田浦保穂, 1979. リンコマイシンによる豚赤痢の予防治療試験. *獣畜新報*, No. 692: 151-153.
- 6) Harris, D. L., R. D. Glock, C. R. Christensen and J. M. Kinyon, 1972. Inoculation of pigs with *Treponema hyodysenteriae* (new species) and reproduction of the disease. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, **67**: 61-64.
- 7) 伊藤富美雄・利部征夫・平塚長生・佐藤清孝, 1977. 豚赤痢による生産性低下防止に対する Nithiamide の効果. *日獣会誌*, **30**: 496-499.
- 8) 柏崎 守・久米常夫・多田融右・西村 豊, 1980. ロニダゾール：豚赤痢トレホネーマに対する *in vitro* での抗菌活性および実験的豚赤痢に対する治療効果について. *日豚研誌*, **17**: 173-177.
- 9) Kashiwazaki, M., T. Takahata and T. Kume, 1977. Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from feces of pigs affected with swine dysentery by use of a medicated medium. *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.*, **17**: 29-30.
- 10) Kitai, K., M. Kashiwazaki, Y. Adachi, T. Kume and A. Arakawa, 1979. *In vitro* activity of 39 antimicrobial agents against *Treponema hyodysenteriae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **15**: 392-395.
- 11) Layton, H. W., K. L. Simkins and R. G. Eggert, 1977. Efficacy of nithiamide in preventing and treating swine dysentery in experimentally inoculated pigs. *Am. J. Vet. Res.*, **38**: 627-631.
- 12) 宮前武雄・東海林昌夫・水戸利秋, 1965. 仔豚の *Vibrio coli* について. *北獣会誌*, **9**: 26-29.
- 13) Miyat, J. A. and F. O. Gossett, 1964. A new antibiotic in treatment of swine dysentery (Treatment of experimentally induced infections). *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, **59**: 295-300.
- 14) Molnár, L. and T. Szent-Iványi, 1981. Sensitivity to different chemotherapeutics of *Treponema hyodysenteriae* strains isolated in Hungary. *Acta. Vet. Acad. Sci. Hung.*, **29**: 111-118.
- 15) Ninet, L., F. Benazet, H. Depaire, J. Florent, J. Lunel, D. Mancy, A. Abraham, J. R. Cartier, N. DeChezelles, C. Godard, M. Moreau, R. Tissies and J. Y. Lallemand, 1976.

- Emericid, a new polyether antibiotic from *Streptomyces hygroscopicus* (DS 24367). *Experientia*, **15**: 319-321.
- 16) Ohima, M. N. Ishizaki, K. Abe, M. Ukawa, Y. Marumoto, K. Nakatsuka, T. Horiuchi, Y. Tonooka, S. Yoshino and N. Kanda, 1976. Antibiotic DE-3936, a polyether antibiotic identical with lonomycin. *J. Antibiotics*, **29**: 354-365.
 - 17) Olson, L. D. and D. E. Rodabaugh, 1976. Prevention of swine dysentery with a combination of lincomycin and spectinomycin and resistance of swine dysentery to tylosin and sodium arsanilate. *Am. J. Vet. Res.*, **37**: 769-773.
 - 18) Omura, S., M. Shibata, S. Machida, J. Sawada and N. Otake, 1976. Isolation of a new polyether antibiotic, lonomycin. *J. Antibiotics*, **29**: 15-20.
 - 19) Rainier, R. H., R. R. Chalquest, W. E. Babcock and G. W. Thrasher, 1973. Efficacy of carbadox in prevention of field outbreaks of swine dysentery. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, **68**: 171-175.
 - 20) 関口雅夫・三谷節生・石川一成・内野富弥・本好茂一・柏崎 守, 1980. 豚赤痢の予防治療に関する研究. 1. リンコマイシンによる予防治療試験. *獣畜新報*, **709**: 457-461.
 - 21) 高島俊弘・加藤正博・柏崎 守・久米常夫, 1977. ポリエーテル系抗生物質 DE-3936 の *Treponema hyodysenteriae* に対する抗菌活性. *日獣会誌 (学会号)*, No. 84: 129.
 - 22) Taylor, D. J., 1974. Ronidazole in the treatment of experimental swine dysentery. *Vet. Rec.*, **95**: 215-216.
 - 23) Taylor, D. J. and T. J. L. Alexander, 1971. The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. *Br. Vet. J.* **127**: lviii-lxi.
 - 24) Westley, J. W., 1977. Polyether antibiotics: Versatile carboxylic acid ionophores produced by *Streptomyces*. *Adv. in Appl. Microbiol.*, **22**: 177-221.
 - 25) Williams, B. J. and W. E. Babcock, 1976. *In vitro* susceptibility of *Treponema hyodysenteriae* to carbadox, virginiamycin, and tylosin. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, **71**: 957-959.
 - 26) Wilson, M. R. and C. K. Roe, 1971. Swine dysentery control: The effect of carbadox on the experimentally produced disease. *Can. Vet. J.*, **12**: 143-146.
 - 27) Yamazaki, K., K. Abe and M. Sano, 1976. Structure of Antibiotic DE-3936. *J. Antibiotics*, **29**: 91-92.

Summary

The capacity of the polyether antibiotic, DE-3936, to prevent *Treponema hyodysenteriae* was evaluated both *in vitro* and *in vivo*.

DE-3936 showed a high inhibitory activity *in vitro* against *T. hyodysenteriae* with minimal inhibitory concentrations of 0.1 to 0.4 $\mu\text{g/ml}$ by the agar dilution procedure.

DE-3936 at concentrations of 50 or 75 ppm was added to the feed of swine infected with *T. hyodysenteriae*. Pigs given 50 ppm of DE-3936 showed mucohemorrhagic diarrhea as severely as the infected but non-medicated control group. In the group given 75 ppm, one pig showed symptoms. Furthermore, *T. hyodysenteriae* was not found in feces of these healthy pigs during the experiment. Therefore the medication of more than 75 ppm of DE-3936 in feed was found to be effective in preventing swine dysentery.