

1. 豚ヘモフィルス感染症の最近の動向と分離菌株の薬剤感受性

久米勝巳 (北里研究所附属家畜衛生研究所)

豚のヘモフィルス性胸膜肺炎は *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* (Hpn) の感染によって起こる疾病として知られている。本病は世界各地でその発生が確認されており、近年、わが国においても主要な豚病の一つとみなされている。Hpn は感染豚の鼻腔または肺病巣部から容易に分離される。本菌は、現在血清型1~12の計12型に型別される。しかし、わが国における血清型の分布状況や分離菌の薬剤感受性に関する報告は少ない。

そこで、著者らは主として1980年以降に、わが国で分離された Hpn 菌株について、血清型別と薬剤感受性試験を試みたので、その成績について報告する。

材料と方法

1. 供試菌株および検査方法

血清型別に用いた菌株は1980年以降に著者らが主として健康豚の鼻腔より分離した Hpn 約2,000株である。このうち計106株(検査A)については Mueller-Hinton 培地に 20 µg/ml の割合で NADH を添加した培地を用い、寒天平板希釈法により最少発育阻止濃度 (MIC) を求めた。菌の接種はレプリカ法で行い、MIC 値は 5% CO₂ 条件下 37°C で48時間培養後判定した。また、53株(検査B)については上記基礎培地に 5 µg/ml の割合で NADH と 5% の割合で鶏血清とを添加した培地を用い、MIC 値は日本化学療法学会標準法に準じてマイクロプランターを用いた寒天平板希釈法で実施した。

血清型別は1~10型の標準菌株で調製された家兔免疫血清を用い、急速平板凝集反応で行なった¹⁾。

2. 供試薬剤*

検査Aについては、ABPC, PCG, KM, SM, LCM, FRM, CP, TC, OTC, TS, TML, および CDX の計12薬剤を、また検査Bについては、ABPC, KM, SM, LCM, FRM, TP, OTC, TS, OL, TML, および DOXY の計11薬剤を用いた。

成績

1. わが国で確認された Hpn の血清型

著者らの成績によると、1984年以前の分離菌株は全て2型菌に型別された^{2,3)}。1985年以降、2型菌に加え5型菌が、わが国での流行の主体となった(表1および2)⁴⁾。さらに1986年以降、1, 6, および7型菌の流行が確認されるに至った(表2)⁵⁾。血清型の分布は地域あるいは農場によって異なった。なお、上記血清型以外にも屠場の肺病巣から3型菌が分離されたと報告されている⁶⁾。

2. 薬剤感受性試験供試菌株の血清型

供試菌株の血清型は表3に示した。総菌株数は計159株であり、うち1型が9株、2型が109株、5型が27株、6型が7株、7型が7株である。

* 供試薬剤の略称は本会制定の略号表によった。

表 1 健康豚鼻腔からの Hpn の分離と血清型別 (1985年)

地域	農場	供試豚数	供試月齢	菌分離陽性頭数		
				2型	5型	計
九州	A	20	3	6	6	12
	B	14	5	5	6	12
	C	10	4	4	2	6
関東	D	4	5	1	3	4
	E	10	4	6	3	9
東北	F	6	5	2	3	5
計		64		24	23	47

表 2 健康豚鼻腔からの Hpn の分離と血清型別 (1986~87年)

地域	農場	供試豚数	菌分離陽性頭数					計
			1型	2型	5型	6型	7型	
九州	A	20	0	7	3	1	0	11
	B	20	0	6	3	0	1	10
関東	C	15	1	6	4	0	1	12
	D	20	3	6	4	0	1	14
	E	10	1	4	1	0	1	7
東北	F	20	0	5	2	1	4	12
	G	10	1	3	2	0	1	7
	H	20	0	4	4	0	1	9
	I	10	1	2	1	0	1	5
計		145	7	43	24	2	11	87

表 4 1980~86年分離 Hpn 106 菌株の各種薬剤に対する感受性 (検査A)

供試薬剤	MIC ($\mu\text{g/ml}$)									
	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	≥ 200
ABPC	98	7	0	0	0	0	0	0	0	1
PCG	98	1	2	4	0	0	0	0	0	1
KM	0	2	9	4	42	12	2	2	8	25
SM	13	7	7	7	14	18	6	3	1	30
LCM	6	3	5	9	1	2	12	7	0	61
FRM	11	2	4	20	19	37	6	2	2	3
CP	30	2	31	27	13	0	1	2	0	0
TC	9	11	2	0	15	10	12	44	3	0
OTC	4	5	13	1	2	9	28	42	2	0
TS	3	2	5	5	2	3	31	7	3	47
TML	38	25	15	8	18	1	1	0	0	0
CDX	3	2	6	9	6	27	23	15	5	10

表 3 供試菌株の血清型

検査区分	供試菌株	血清型	菌株数	分離年
A	106	2型	93	1980-84年 1985-86年
		5型	13	
		1型	9	
B	53	2型	16	1986-88年
		5型	14	
		6型	7	
		7型	7	

3. 薬剤感受性試験

(1) 検査Aの成績

各種薬剤に対する感受性は表4に示したとおりである。耐性菌株は全て1985~86年に分離された2型菌であり、1984年以前に分離された2型菌計13株ならびに供試5型菌計13株はいずれも全ての供試薬剤に対して感受性を呈した。

MIC値の分布をみると、KM, SM, LCM, TC, ならびに TS では二峰性が認められた。耐性菌株の一部からプラスミドの分離を試みたところ、計2株でプラスミドDNAバンドが確認された。うち1株は SM, CM, および TC に耐性であり、2.2Kbのプラスミドを保有していた。この菌株をノボビオシンで処理すると、上記3薬剤に感受性で、プラスミドDNAを欠く菌株が分離された。本感受性菌株にプラスミドを再導入し

てみると、再導入菌株は SM および CM に耐性であったことから、2.2 Kb プラスミドは SM および CM 耐性に関与していると推測される。また、ABPC, KM, SM, および SA に耐性の1株は 4.1 Kb および 3.1 Kb プラスミドを保有していた。本菌株をノボビオシンで処理したところ、ABPC 感受性菌株が分離されたが、本感受性菌株のプラスミドパターンは変化しなかった。そこで、本菌株のプラスミド DNA で大腸菌を形質転換したところ、4.1 Kb プラスミドを有する SM および SA 耐性菌株が得られたため、4.1 Kb プラスミドは SM および SA 耐性に関与すると考えられる。

(2) 検査 B の成績

検査 A とは異なる農場の豚から分離された菌株を用いた検査 B の成績を表 5 および表 6 に示した。供試菌株は TML, TP, KM, FRM, OTC, DOXY, ならびに ABPC に対して高感受性を呈した。しかし、7 型の 3 菌株のみは ABPC に対して耐性であった (表 5)。

供試菌株は TS, SM, および LCM に対して低感受性を呈し、TS で 3 株 (2 型菌), SM で 5 株 (2 型と 7 型菌), そして LCM で 1 株 (2 型菌) が MIC 値 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を呈した。また、大部分の供試菌株 (75.7%) は OL に対して MIC 値 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であった (表 6)。なお、ABPC ならびに SM に耐性を呈した 7 型の 3 株は同一の菌株であった。

表 5 1986~88 年分離 Hpn 53 菌株の各種薬剤に対する感受性 (検査 B)

供試薬剤	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	分布	耐性菌株数*
TML	3.13~12.5	0
TP	0.78~1.56	0
KM	3.13~12.5	0
FRM	6.25~12.5	0
OTC	0.2 ~25	0
DOXY	≤ 0.1 ~1.56	0
ABPC	≤ 0.1 ~>100	3**

* ≥ 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

** >100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (いずれも 7 型菌)

表 6 1986~88 年分離 Hpn 53 菌株の各種薬剤に対する感受性 (検査 B)

供試薬剤	血清型	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
		6.25	12.5	25	50	≥ 100
OL	1	0	0	0	9	0
	2	2	3	0	9	2
	5	0	0	3	11	0
	6	0	0	1	6	0
	7	0	0	4	3	0
	計	2	3	8	38	2
TS	1	0	0	9	0	0
	2	2	3	8	3	0
	5	0	5	9	0	0
	6	0	0	7	0	0
	7	0	1	6	0	0
	計	2	9	39	3	0
SM	1	0	9	0	0	0
	2	4	5	5	0	2
	5	0	9	5	0	0
	6	5	1	1	0	0
	7	0	3	1	0	3
	計	9	27	12	0	5
LCM	1	0	8	1	0	0
	2	2	5	8	1	0
	5	0	14	0	0	0
	6	0	1	6	0	0
	7	1	3	3	0	0
	計	3	31	18	1	0

考 察

わが国で分離された Hpn 菌株の血清型と薬剤感受性を調べてみた。著者らの成績によると、1984 年以前の分離菌株は全て 2 型菌であった^{2,3)}。本期間中に分離された菌株は各種薬剤に対して感受性であり (検査 A), 本成績は Inoue *et al.*⁷⁾ の成績と一致する。

5 型菌は 2 型菌とともに 1985 年以降しばしば分離されるようになり、現在ではほぼ全国で本血清型菌の感染に起因する Hpn 感染症の発生が認められるようになった⁴⁾。その後、わが国では 1, 6, および 7 型菌が各地で飼育中の豚から分離されるようになった⁵⁾。本期間中に分離された Hpn 菌株では各種薬剤に対して低感受性を呈する菌株

や耐性菌株が認められるようになり、これら耐性菌株は多剤耐性を呈するものが多かった。比較的多数の菌株が耐性を呈した薬剤としては KM, TC, ならびに SM などが認められている。本成績では今の所、血清型による薬剤耐性パターンの差は認められていない。なお、検査 A と検査 B との間で得られた成績に大差が認められるが、これは供試培地ならびに検査方法の差によるものか、あるいは菌株の由来に起因するものかはっきりしない。しかし、1985 年以降の分離菌株は全体的に各種薬剤に対して低感受性化の傾向を呈していることは明らかである。これら低感受性菌株ならびに耐性菌株の増加に加えて、血清型の多様化は同時期に野外で観察されている Hpn 感染症の顕著な発病例の増加と関連するものと思われる。なお、MIC 値の分布が明瞭な二峰性を呈した耐性菌株のうちから薬剤耐性に関与するプラスミドが分離されている。今後、Hpn 感染症の予防ならびに治療用薬剤の選定には注意を要するものと思われる。

参考文献

1. Mittal, K. R., Higgins, R., and Lariviere, S. 1982. Evaluation of slide agglutination and ring precipitation tests for capsular serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*. J. Clin. Microbiol. 15: 1019-1023.
2. Kume, K., Nakai, T., and Sawata, A. 1984. Isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae* from the nasal cavities of healthy pigs. Jpn. J. Vet. Sci. 46: 641-647.
3. Kume, K., Nagano, I., and Nakai, T. 1986. Bacteriological, serological, and pathological examinations of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in 200 slaughtered pigs. Jpn. J. Vet. Sci. 48: 965-970.
4. Nakai, T., and Kume, K. 1987. Serological and bacteriological survey of *Haemophilus pleuropneumoniae* serovar 5. Jpn. J. Vet. Sci. 49: 1141-1144.
5. Kume, K., and Nakai, T. 1988. Isolation of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serovar 1, 6, or 7 from pigs. Jpn. J. Vet. Sci. 50: 589-591.
6. Chan, C., Yamamoto, K., Konishi, S., and Ogata, M. 1978. Isolation and antigenic characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* from porcine pneumonia. Jpn. J. Vet. Sci. 40: 103-107.
7. Inoue, A., Yamamoto, K., Hirano, N., and Murakami, T. 1984. Drug susceptibility of *Haemophilus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs. Jpn. J. Vet. Sci. 46: 175-180.

Serological Typing and Antibiotic Susceptibility of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* Isolated from the Nasal Cavities of Healthy Pigs in Japan during 1980 to 1988

Katsumi KUME

(Research Center for Veterinary Science, The Kitasato Institute)

Isolation of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* was achieved from the nasal cavities of healthy pigs housed on different farms in varying geographical areas of Japan from 1980 to 1988. All the isolates were serotyped using a rapid plate agglutination method, and some of them were tested for their antibiotic susceptibilities to 15 antibiotics. About 2,000 isolates were obtained during this period. All the strains isolated before 1984 belonged to serotype 2, and no resistance was noted in all the tested strains for the antibiotics employed. Serotype 2 strains are still predominant type in Japan, although

serotype 1, 5, 6, and 7 have also been frequently isolated from pigs since 1985. Small numbers of the serotype 2 strains isolated from 1985 to 1988 were relatively resistant to ABPC, AMPC, FRM, CP, TC, TP, OTC, or TML, while a high proportion of them were relatively resistant to KM and/or SM. Only 3 serotype 7 strains were resistant to both ABPC and SM among the 38 strains belonging to serotype 1, 5, 6, or 7. However, majority of them (>85%) were relatively resistant to SM.