

## 4. 豚の鼻腔由来 *Pasteurella multocida* の 薬剤感受性とプラスミド

牛島 稔 大 (化学及血清療法研究所)

*Pasteurella multocida* には皮膚壊死毒素 (DNT) を産生し、豚の萎縮性鼻炎 (AR) の発症に関与する株があることはよく知られている。AR は養豚業において経済的損失の大きい豚の感染症のひとつである。本病の対策として *Bordetella bronchiseptica* ワクチンの応用および抗菌剤投与がなされている。わが国では *P. multocida* ワクチンの実用化がなされていないため、抗菌剤の応用は临床上重要な意義を有している。

今回著者らは、AR 発生農場の豚の鼻腔から分離した *P. multocida* D 型菌について、薬剤感受性および薬剤耐性プラスミドさらにその伝達性について検討した。

### 材料および方法

#### 1) 供試株

材料は 1988 年に、国内 16 県下 38 農場で飼育されていた豚の鼻腔から分離した 100 株の *P. multocida* D 型菌を用いた。供試株の DNT 産生性は、モルモット皮内接種試験<sup>10)</sup>によって確認した。

#### 2) 薬剤感受性試験

ハートインフュージョン (HI) 寒天培地 (Difco) を用い動物用抗菌剤研究会標準法に従って、寒天培地希釈法によって **Table 1** に示した 12 種の薬剤について最少発育阻止濃度 (MIC) を測定した。なお、SDMX および TMP の感受性試験は 7.5% に馬溶血液を上記寒天培地に加えて行った。供試菌は、HI ブイヨン (Difco) で 37°C、1 夜培養し、PBS で希釈 (約 10<sup>6</sup> CFU/ml) 後その 0.005 ml を感受性測定用培地に接種した。判定は 37°C で 18 時間培養後に行った。

#### 3) 薬剤耐性プラスミドの検出

供試した菌株は、SM SA 耐性 3 株 (R040, R113, R124), KM CP SA 耐性 1 株 (R221), KM SM SA 耐性 1 株 (R783), OTC 耐性 1 株 (S832) および CP 耐性 1 株 (R304) の計 7 株を用いた (**Table 2**)。Birnboim and Doly<sup>2)</sup> 法によりプラスミド試料を抽出し、大腸菌を形質転換して *P. multocida* 由来薬剤耐性プラスミドの検出を行った。コンピテントセルは Kushner<sup>9)</sup> の方法で大腸菌 C600 株より調製した。形質転換はコンピテントセル 0.2 ml に薬剤耐性株より抽出したプラスミド DNA 10 ml を加え 30 分間氷冷し、さらに 43.5°C で 30 秒間熱処理を行った後、L プロス 2 ml を加え、37°C で 1~2 時間培養して行った。形質転換体 (トランスフォーマント) の選択は検出を目的とする耐性プラスミドの薬剤を添加した L 寒天培地に培養液を接種し、37°C、1 夜培養して行った。なおトランスフォーマントの選択のため、培地に添加した薬剤の濃度は CP および OTC を 25 µg/ml また KM, SM を 50 µg/ml とした。

#### 4) プラスミドの分子量測定

菌株の保有するプラスミドの分子量測定には、*P. multocida* および大腸菌のいずれについても Kado and Liu<sup>7)</sup> 法によって抽出したプラスミド試料を用いた。電気泳動は 0.8% アガロースゲルで行い、常法に従ってエチジウムブロマイドで染色後、紫外線下でプラスミドを観察した。なお分子量マーカーは、Supercoiled DNA Ladder (Bethesda Research Laboratories · Life Technologies, Inc.) を使用した。

#### 5) 接合伝達試験

接合伝達試験は、ドナーとして *P. multocida* のプラスミド DNA で形質転換された大腸菌 8 株

(Table 4), 薬剤耐性 *P. multocida* 6 株 (Table 2 および 5), およびその接合伝達試験によって得られた *P. multocida* 接合伝達体 (トランスコンジュガント) 4 株 (Table 7) を用い, これらのドナーに対するレシピエントとして, それぞれナリジクス酸 (NA) 耐性を人為的に付与した大腸菌 C600<sup>NA</sup> 株, 薬剤感受性 *P. multocida* R187 株にリファンプシン (RFP) 耐性を人為的に付与した R187-1 株または大腸菌 C600 株, および KM CP SA 耐性 *P. multocida* R221 株を用いた。

ドナーとレシピエントの交雑は, Bradley ら<sup>1)</sup>の述べている寒天平板交雑法を以下のように変更して行った。供試菌は 5% 馬脱線維血液加 HI 寒天培地で 37°C, 1 夜前培養し, 発育した菌苔を HI ブイヨンに接種し, さらに 37°C で 3 時間培養した。菌数約 10<sup>9</sup> CFU/ml に到達したドナーおよびレシピエントの菌液を等量に混合し, その 0.3 ml を直径約 9 cm の 5% 馬脱線維血液加 HI 寒天平板に接種した。寒天平板は 37°C で約 2 時間培養した後, 2 ml の PBS に菌を回収した。回収菌液から接合伝達体 (トランスコンジュガント) の選択はドナーおよびレシピエントの耐性保有薬剤の両者を添加した HI 寒天培地で行ったが, *P. multocida* と大腸菌 (C600) の交雑試験では *P.*

*multocida* の耐性保有薬剤を添加した DHL 寒天培地 (日水) でおこなった。接合伝達頻度はドナーの耐性保有薬剤のみを添加した HI 寒天培地で, 回収した菌液中のドナーの菌数を計測し, トランスコンジュガントの菌数/ドナーの菌数で表現した。なお培地に添加した薬剤の濃度は SM と KM が 50 µg, CP と OTC が 25 µg, また RFP と NA が 40 µg/ml とした。

## 成績

### 1) 薬剤感受性および DNT 産生性

MIC 値の分布において SM, SDMX, CP, OTC および KM で 2 峰性が観察され, 各々 29, 37, 16, 3 および 5% の株が耐性であった。その他の薬剤ではいずれも 1 峰性の MIC 値の分布を示した (Table 1)。

供試 100 株の内訳を薬剤耐性, DNT 産生性, プラスミド保有状況及び分離農場別に Table 2 に示した。薬剤耐性株は供試株全体の 44% に達し, 耐性パターン別に内訳を見ると, 単剤から 3 剤耐性まで認められ, 3 剤耐性として SM CP SA (6%), KM CP SA (3%), KM SM SA (2%) および OTC SM SA (1%) が, 2 剤耐性は SM

Table 1. Distribution of drug susceptibility in 100 strains of type D *P. multocida* from the nasal cavities of swine

Drug <sup>1)</sup>	Minimum inhibitory concentration (µg/ml)										
	0.2	0.4	0.78	1.56	3.1	6.25	12.5	25	50	100	>100
SM					3 <sup>2)</sup>	6	41	16	5		29
SDMX							9	30	9	15	37
CP	6	63	14	1	11	5					
OTC		30	59	4	4		1		2		
ABPC	89	9	2								
KM					5	54	32	3	1		5
NA		5	88	7							
SPM								3	13	38	46
EM			3	10	68	19					
TS							20	49	30	1	
RFP	15	59	26								
TMP	100										

<sup>1)</sup> SM; streptomycin, SDMX; sulfadimetoxin, CP; chloramphenicol, OTC; oxytetracyclin, ABPC; ampicillin, KM; kanamycin, NA; nalidixic acid, SPM; spiramycin, EM; erythromycin, TS; tylosin, RFP; rifampicin, TMP; trimethoprim.

<sup>2)</sup> Number of strains.

**Table 2.** Investigation results of drug resistance, DNT production, and plasmids patterns of 100 strains of *P. multocida*

Farm	Prefecture	Number of strains	Drug-resistance	DNT	Plasmids pattern <sup>1)</sup>	Strain used for further studies <sup>2)</sup>
1	Hokkaido	1	SM SA OTC	+	b	
2	Aomori	1	—	+	a	
3	Akita	2	—	+	a	
4	Akita	1	SM SA	+	b	R040
4	Akita	1	SM SA	+	c	R041
5	Iwate	2	KM SA CP	+	c	R221
6	Iwate	1	—	+	c	
7	Iwate	1	—	+	c	
8	Iwate	1	SM SA	—	b	
8	Iwate	2	—	—	—	
9	Ishikawa	1	—	+	—	
10	Ishikawa	3	—	+	a	
10	Ishikawa	2	—	—	—	
11	Chiba	1	—	+	a	
12	Gifu	2	CP	+	c	R304
13	Osaka	1	—	+	a	
14	Mie	1	—	+	c	
15	Mie	1	SA OTC	+	c	
15	Mie	1	CP	+	c	
16	Ehime	1	—	+	b	
16	Ehime	2	—	—	—	
17	Ehime	1	—	+	a	
17	Ehime	1	—	—	—	
18	Fukuoka	1	OTC	+	b	S832
19	Fukuoka	1	KM SA CP	+	c	
20	Oita	2	—	+	a	
21	Oita	2	—	+	a	
22	Saga	2	SM SA	+	c	R113
22	Saga	5	—	+	c	
22	Saga	1	SA	—	b	
23	Saga	1	—	+	b	
24	Saga	1	SM SA	—	b	
25	Saga	1	—	—	—	
26	Saga	1	SM SA CP	+	c	
27	Saga	2	SM SA	+	c	
28	Kumamoto	3	SM SA	+	c	R124
29	Kumamoto	4	SM SA CP	+	c	
29	Kumamoto	3	SM SA	+	c	
30	Kumamoto	1	SM SA	—	b	
31	Kumamoto	1	SA	—	b	
32	Kumamoto	2	—	+	a	
32	Kumamoto	1	SM SA	—	b	
33	Miyazaki	2	SM SA	+	c	
34	Miyazaki	1	—	+	—	
35	Miyazaki	1	SA	+	a	
35	Miyazaki	1	CP	+	c	
35	Miyazaki	1	CP	+	b	
35	Miyazaki	5	—	+	c	
35	Miyazaki	1	CP	—	b	
35	Miyazaki	10	—	—	—	R187

Table 2 (つづき)

36	Miyazaki	2	SM SA	+	c	
36	Miyazaki	1	—	+	a	
36	Miyazaki	5	—	+	c	
37	Kagoshima	1	SM SA CP	+	c	
38	Kagoshima	1	SA CP	—	b	
38	Kagoshima	2	KM SA SM	—	b	R783

<sup>1)</sup> a; 1.8 megadalton plasmid only, b; one or more plasmids except for a 1.8 megadalton plasmid, c; 1.8 megadalton plasmid and other plasmid(s), —; none.

<sup>2)</sup> See Materials and Methods.

SA (20%), SM CP (1%) および OTC SA (1%), また単剤耐性は CP (6%), SA (3%) および OTC (1%) が認められ, このうち SM SA 2 剤耐性が最も多かった。

DNT の産生は供試株の 72% に認められ, DNT 産生株 72 のうち 34 株が薬剤耐性株であった。DNT 産生株と非産生株の薬剤耐性化率には有意差 ( $\chi^2$  乗検定) はなかった。供試株の 80% が, 分子量約 1~30 megadalton (Md) の範囲で 1~数本のプラスミドバンドを保有し, このうち 1.8 Md のプラスミドが最も普遍的 (供試株の 65%) に認められた。しかしながら本プラスミドと薬剤耐性

または DNT 産生性との間には直接的関連は認められなかった。

薬剤耐性および DNT 産生株の浸潤は, 今回供試した *P. multocida* 分離農場 (合計 38 農場) 中各々 20 農場 (52.6%) および 32 農場 (84.2%) に認められた。また同一農場から薬剤耐性, DNT 産生性あるいはプラスミドプロファイルの異なる株が分離される例も見られた (Table 2)。

## 2) 形質転換法による薬剤耐性プラスミドの検出

大腸菌で検出された R-プラスミドは, 秋田, 佐賀および熊本県由来の 3 株から 5.1, 5.1 および 3.9 Md の SM 耐性プラスミド, 岩手および鹿

Table 3. Drug resistance and plasmids patterns

Strain	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )							Molecular weight (megadalton)
	SM	SDMX	KM	CP	OTC	ABPC	RFP	
<i>P. multocida</i>								
R040	400	1600	6.25	0.4	0.4	0.2	0.4	28.5, 2.7, 2.3
R113	400	800	6.25	0.4	0.8	0.2	0.4	28.5, 5.1, 3.2, 2.7, 1.8, 1.0
R124	400	800	6.25	0.4	0.8	0.2	0.4	3.9, 2.3, 1.8
R221	12.5	1600	>100	3.1	0.4	0.8	0.4	4.7, 3.3, 2.2, 1.8
R783	400	1600	>100	0.4	0.8	0.8	0.4	28.5, 4.7, 3.6, 0.8
S832	12.5	25	6.25	0.4	50	0.2	0.4	3.0, 2.8
R304	12.5	25	1.56	3.1	0.4	0.2	0.4	3.3, 1.8
<i>E. coli</i>								
C600	1.56	200	1.56	3.13	6.25	3.13	>100	None
Transformant <sup>1)</sup>								
C600 (R040)a <sup>2)</sup>	1600	>3200	3.13	3.13	6.25	3.13	>100	5.1
C600 (R113)a	1600	>3200	3.13	3.13	6.25	3.13	>100	5.1
C600 (R124)a	1600	>3200	3.13	3.13	6.25	3.13	>100	3.9
C600 (R221)b	1.56	200	>100	3.13	6.25	>100	>100	4.7
C600 (R783)b	1.56	200	>100	3.13	6.25	>100	>100	4.7
C600 (S832)c	1.56	200	1.56	3.13	>100	3.13	>100	3.2
C600 (R304)d	1.56	200	1.56	>100	6.25	3.13	>100	3.3
C600 (R221)d	1.56	200	1.56	>100	6.25	3.13	>100	3.3

<sup>1)</sup> *E. coli* C600 transformed with plasmid DNAs from *P. multocida* strains indicated in a parenthesis.

<sup>2)</sup> a; SM-selected transformant, b; KM-selected transformant, c; OTC-selected transformant, d; CP-selected transformant.

児島県由来の2株から4.7MdのKM耐性プラスミド、岩手および岐阜県由来の2株から3.3MdのCP耐性プラスミド、福岡県由来の1株から3.2MdのOTC耐性プラスミドであった (Table 2 および 3)。トランスフォーマントの薬剤耐性スペクトラムを、プラスミドを供与した *P. multocida* と比較したところ、5.1及び3.9MdのSM耐性プラスミドはいずれもSM耐性のほかにSA耐性を、また4.7MdのKM耐性プラスミドはいずれもABPC耐性をコードしていた。しかし3.2MdのOTC耐性プラスミドおよび3.3MdのCP耐性プラスミドは他の薬剤耐性のコードはみられなかった。なおKM耐性プラスミドにコードされていたABPC耐性は *P. multocida* では発現が低度 ( $0.8 \mu\text{g/ml}$ ) で、大腸菌では高度 ( $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ ) であった (Table 3)。

### 3) 接合伝達試験

大腸菌トランスフォーマントをドナーとした接合伝達試験ではいずれも接合伝達は成立しなかった (Table 4)。

薬剤耐性 *P. multocida* 6株をドナーとした接合伝達試験では、R187-1株に対して、SM耐性伝達能を有する2株 (R041とR113) が認められ、その伝達頻度は  $4.0 \times 10^{-7}$  および  $6.7 \times 10^{-9}$  であったが (Table 5)、大腸菌に対してはいずれの株も耐性伝達を示さなかった。ドナー株のプラスミドプロフィールを調べたところ、R041株、R113株、R040株、およびR783株の4株に、分子量約28.5Mdのプラスミドが認められたが (Table 5)、耐性伝達能との関連はみられなかった。伝達頻度が高

**Table 4.** Transfer of drug resistance from C600 to *E. coli* C600<sup>NA</sup> by mixed cultivation

Donor	Drugs of selection	Transfer frequency <sup>1)</sup>
C600 (R040)	SM+NA	$<9.1 \times 10^{-8}$
C600 (R113)	SM+NA	$<4.3 \times 10^{-8}$
C600 (R124)	SM+NA	$<1.4 \times 10^{-8}$
C600 (R221) <sup>a2)</sup>	KM+NA	$<6.7 \times 10^{-8}$
C600 (R783)	KM+NA	$<5.0 \times 10^{-8}$
C600 (S832)	CTC+NA	$<6.7 \times 10^{-8}$
C600 (R304)	CP+NA	$<5.6 \times 10^{-8}$
C600 (R221) <sup>b2)</sup>	CP+NA	$<1.2 \times 10^{-8}$

<sup>1)</sup> Transconjugants per donor cell.

<sup>2)</sup> a; KM-selected transformant, b; CP-selected transformant.

かったR041株とR187-1株の交雑によって得られた接合伝達体 (トランスコンジュガント) 13株について薬剤耐性スペクトラとプラスミドプロフィールを調べたところ、いずれもSM SA耐性で3.9または5.9Mdプラスミドのいずれかもしくは両者を保有していた。またそれ以外に28.5、2.3あるいは1.8Mdプラスミドの一部を保有する株もみられた (Table 6)。次に、R041株の接合伝達性とプラスミドの関連を検討するため、これらのトランスコンジュガントの中から、28.5Mdプラスミドを保有するT1およびT16株、3.9、2.3および1.8Mdプラスミドを保有するT2株、5.9Mdプラスミドのみを保有するT8株の4株を選択してドナーとした。レシピエントとしてKM耐性 *P. multocida* R221株をもちいSM耐性の伝達を試みた。その成績では、T1およびT16株にのみ耐性伝達能が観察され、R041株の保有している

**Table 5.** Transfer of drug resistance from *P. multocida* to *P. multocida* R187-1 by mixed cultivation.

Donor ( <i>P. multocida</i> )	Plasmid patterns	Drugs of selection	Transfer frequency <sup>1)</sup>	Spontaneous RFP-resistance reversion of donor
R040	28.5 <sup>2)</sup> 2.7, 2.3	SM+REF	$<5.0 \times 10^{-8}$	$2.0 \times 10^{-7}$
R041	28.5, 3.9, 2.3, 1.8	SM+REF	$4.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-8}$
R113	28.5, 5.1, 3.2, 2.7, 1.8, 1.0	SM+REF	$6.7 \times 10^{-9}$	$5.6 \times 10^{-8}$
R124	3.9, 2.3, 1.8	SM+REF	$<1.0 \times 10^{-8}$	$3.1 \times 10^{-8}$
R783	28.5, 4.7, 3.6, 0.8	SM+REF	$<1.6 \times 10^{-8}$	$1.4 \times 10^{-8}$
R221	4.7, 3.3, 2.2, 1.8	KM+REF	$<1.5 \times 10^{-8}$	not tested
R783	28.5, 4.7, 3.6, 0.8	KM+REF	$<1.4 \times 10^{-8}$	$1.4 \times 10^{-8}$

<sup>1)</sup> Transconjugants per donor cell.

<sup>2)</sup> Molecular weight (megadalton).

Table 6. Drug resistance and plasmids patterns

Strain	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )							Molecular weight (Megadalton)	
	SM	SDMX	KM	CP	OTC	ABPC	RFP		
(Parents)									
R041	200	800	6.25	0.4	0.4	0.2	0.4	28.5,	3.9, 2.3, 1.8
R187-1	12.5	25	6.25	0.4	0.8	0.2	>100	None	
(Transconjugants)									
T1	400	1600	6.25	0.4	0.8	0.2	>100	28.5, 5.9	
T2	400	1600	6.25	0.4	0.8	0.2	>100		3.9, 2.3, 1.8
T3	400	1600	6.25	0.4	0.8	0.4	>100		3.9 1.8
T4	400	1600	6.25	0.4	0.8	0.4	>100		3.9
T5	400	1600	6.25	0.4	0.8	0.2	>100		3.9
T7	400	1600	6.25	0.4	0.8	0.2	>100	28.5,	3.9, 2.3, 1.8
T8	400	1600	6.25	0.4	0.8	0.2	>100		5.9
T9	400	1600	6.25	0.4	0.8	0.2	>100	28.5, 5.9,	3.9, 1.8
T11	400	1600	6.25	0.4	0.8	0.2	>100		3.9 1.8
T12	400	1600	6.25	0.4	0.8	0.2	>100		3.9 1.8
T16	400	1600	6.25	0.4	0.8	0.2	>100	28.5, 5.9,	3.9, 1.8
T17	400	1600	6.25	0.4	0.8	0.2	>100		3.9 1.8
T18	400	1600	6.25	0.4	0.8	0.2	>100		5.9

Table 7. Effects of 28.5 megadalton plasmid originated from *P. multocida* strain R041 on R-transfer

Strain <sup>1)</sup>	28.5 Mdal plasmid	Recipient	Drugs of selection	Transfer frequency <sup>2)</sup>
T1	+	R221	SM+KM	$5.5 \times 10^{-5}$
T2	-			$<9.1 \times 10^{-10}$
T8	-			$<6.7 \times 10^{-9}$
T16	+			$8.3 \times 10^{-6}$

<sup>1)</sup> Transconjugants were obtained from the mating strain R041 of *P. multocida* with strain R187-1 of *P. multocida*.

<sup>2)</sup> Transconjugants per donor cell.

28.5 Md プラスミドは伝達性に関与するプラスミドであることが確認された (Table 7)。

## 考 察

*P. multocida* の薬剤耐性プラスミドとして, SM SA 耐性<sup>3,5,8,11,12)</sup>, TC 耐性<sup>11)</sup>, TC SM SA 耐性<sup>6)</sup>および SM SA CP KM 耐性<sup>12)</sup>プラスミドなどが報告されており, いずれも 10 Md 以下の小型のプラスミドである。これらの分子量は同じ表現型プラスミドにおいてもかなり多様である。

今回, 4 株の SM SA 耐性株から, 形質転換法

または接合伝達によって該耐性をコードするプラスミドとして 5 つのものが検出されたが, それらの分子量は 5.1 (R040 および R113 株由来), 3.9 (R124 および R041 株由来), および 5.9 Md (R041 株由来) であった。また大腸菌 C600 株を形質転換して得られたトランスフォーマント内に認められた R-プラスミドのうち, OTC 耐性ならびに SM SA 耐性プラスミドの一部は, その分子量がプラスミドを供与した *P. multocida* の保有するプラスミドの分子量と異なっていた。これと類似の現象は接合伝達においてもみられた。トランスコンジュガントはいずれも 5.9 あるいは 3.9 Md の SM SA 耐性プラスミドを保有していたが, ドナーである R041 株はこのうち 5.9 Md のプラスミドを保有していなかった。このことは, 形質転換あるいは接合伝達の過程で薬剤耐性プラスミドの自己複製機構になんらかの修飾が加えられるのか, あるいは薬剤耐性遺伝子がトランスポゾンや IS (Insertion Sequence) のような遺伝子エレメントに連動してプラスミド上に存在し, 宿主菌内で容易に共存するプラスミドと融合組換えを起こす結果, 分子量を大きく変化させるなどが考えられる。特に後者は *P. multocida* 由来薬剤耐性プラスミドの分子量の多様性についてもよく説明できるもの

と思われる。

接合により薬剤耐性の伝達が *P. multocida* でも起こることは、既に Hirshら<sup>4,9)</sup>によって七面鳥由来株で報告されている。今回著者は豚由来株で、比較的接合伝達頻度の高かった R041 株について、その接合伝達性とプラスミドとの関連を検討したところ、該株の保有する 28.5 Md プラスミドとの関連が認められた。しかしながら同じ分子量のプラスミドを保有しているにも関わらず、伝達頻度が著しく低い株 (R113)、および伝達が観察されなかった株 (R040, R783) も存在した。今後これらのプラスミドの詳細な解析あるいは伝達性の発現に影響を及ぼす宿主菌側の機構などが検討されるべきである。

## 要 約

1988年に国内16県下の養豚場より分離した *P. multocida* D型菌100株について12の薬剤に対する薬剤感受性試験ならびに薬剤耐性プラスミドとその伝達性について検討を行った。

供試株のうち44株(44%)がサルファ剤(SA)、ストレプトマイシン(SM)、クロラムフェニコール(CP)、カナマイシン(KM)、オキシテトラサイクリン(OTC)などの薬剤に耐性であった。大腸菌C600株を用い形質転換法で薬剤耐性プラスミドの検出を試みたところ、SM SA耐性に5.3および3.9, KM AMPC耐性に4.7, OTC耐性に3.2, およびCP耐性に3.3メガダルトン(Md)の各プラスミドが検出されたが、いずれも非伝達性であった。

七面鳥由来 *P. multocida* の非伝達性 R-プラスミドを可動化するプラスミド(28.5 Md)の存在が知られているが、今回供試した豚由来株の中にも、ほぼ同じ分子量のクリプチックプラスミドを保有する SM SA 耐性株 (R041) が認められた。そこでこの株をドナーとし、薬剤感受性でプラスミド保有しない分離株にリファムピシン耐性を人為的に賦与した R187-1 株をレシピエントとし、接合伝達試験を試みた。その結果、対数値 -6.4 の頻度でトランスコンジュガントが得られ、またその約 30% に SM SA 耐性プラスミドとともにクリ

プチックプラスミドも伝達された。次に、得られたトランスコンジュガントの接合伝達性を KM CP SA 耐性株 (R221) をレシピエントとして検討したところ、クリプチックプラスミドを保有するトランスコンジュガントにのみ伝達性が認められた。

以上の成績から、豚由来 *P. multocida* の中には、薬剤耐性プラスミドを他の株へと伝達する株があり、その伝達能は該株の保有する 28.5 Md のクリプチックプラスミドと関連していることが確認された。

## 文 献

- 1) Bradley, D. E., Taylor, D. E., and Cohen, D. R. 1980. Specification of surface mating systems among conjugative drug resistance plasmids in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 143: 1466-1470.
- 2) Brinboim, H. C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- 3) Cote, S., Harel, J., Higgins, R., and Jacques, M. 1991. Resistance to antimicrobial agents and prevalence of R plasmid in *Pasteurella multocida* from swine. *Am. J. Vet. Res.* 52: 1653-1657.
- 4) Hirsh, D. C., Hansen, L. M., Dorfman, L. C. et al. 1989. Resistance to antimicrobial agents and prevalence of R plasmids in *Pasteurella multocida* from turkeys. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 670-673.
- 5) Hirsh, D. C., Martin, L. D., and Rhoades, K. R. 1981. Conjugal transfer of an R-plasmid in *Pasteurella multocida*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20: 415-417.
- 6) Hirsh, D. C., Martin, L. D., and Rhoades, K. R. 1985. Resistance plasmids of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys. *Am. J. Vet. Res.* 46: 1490-1493.
- 7) Kado, C. I. and Liu, S. T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145: 1365-1373.
- 8) 川添公伸, 中井豊次, 久米勝巳, 寺門誠致. 1984. 豚由来 *Pasteurella multocida* の薬剤耐性と非伝達

- 性Rプラスミドについて. 第98回日本獣医学会講演要旨集, 154.
- 9) Kushner, S. R. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids. In: Boyer, H. B. and Nicosia, S. eds. Genetic engineering. Amsterdam: Elsevier North-Holland, 1978; 17.
- 10) Lugtenberg, B., van Boxtel, R., and de Jong, M. 1984. Atrophic rhinitis in swine: Correlation of *Pasteurella multocida* pathogenicity with membrane protein and Lipopolysaccharide patterns. Infect. Immun. 46. 48-54.
- 11) Silver, R. P., Leming, B., Garon, C. F. et al. R-Plasmids in *Pasteurella multocida*. Plasmid. 1979. 2. 493-497.
- 12) Yamamoto, J., Sakano, T., and Shimizu, M. 1990. Drug resistance and R plasmids in *Pasteurella multocida* isolates from swine. Microbiol. Immunol. 34. 715-721.

## Drug Susceptibility and R Plasmids of *Pasteurella multocida* Isolated from Nasal Cavities of Swine

Toshihiro USHIJIMA

(The Chemo-sero-therapeutic Research Institute)

A total of 100 strains of capsular type D *Pasteurella multocida* isolated from the nasal cavities of pigs reared on farms in 16 prefectures of Japan in 1988 were examined for drug resistance and R plasmids.

Minimum inhibitory concentration of 12 antimicrobial drugs against these isolates were determined. Fourty-four isolates (44%) were resistant to multiple antimicrobial drugs such as sulfadimetoxin (SDMX), streptomycin (SM), chrolamphenicol (CP), kanamycin (KM) and oxytetracycline (OTC).

*Escherichia coli* K12 strain C600 was transformed with plasmid DNAs isolated from some of drug-resistant *P. multocida* isolates. Plasmids of molecular weight 5.1, 3.9, 4.7, 3.2, and 3.3 megadaltons (Md) were identified to be encoding resistance to SM SA, SM SA, KM ABPC, OTC, and CP, respectively. All of these plasmids were nonconjugative.

The transconjugation was performed by using the R041 strain of SM resistant *P. multocida* as a donor and the strain R187-1 of spontaneous rifampicin-resistance *P. multocida* as a recipient. A transfer of SM resistance was observed at a frequency of  $4.0 \times 10^{-7}$ . All transconjugants possessed 5.9 or 3.9 Md plasmid, thus these plasmids were suggested to be responsible for SM resistance. About 30% of the transconjugants accepted a cryptic plasmid of molecular weight 28.5 Md along with SM resistance plasmid(s). When the second transconjugations were performed by using the transconjugants as donors and the strain R221 of KM resistant *P. multocida* as a recipient, only the transconjugants accepted a 28.5 Md plasmid showed the SM resistance transfer. The results suggest that SM resistance plasmids themselves were non-conjugative and the genes necessary for the transfer of the resistance genes appeared to be associated with a 28.5 Md plasmid harboured by the R041 strain.



討 論（座長：沢田拓士）

質問（福安嗣昭，麻布大）

SDMX と TMP の感剤感受性試験用培地に 7.5% 溶血血液を添加する理由は？

答（牛島稔大）

常法通り行ったが，理由については“ST 合剤研究会，Chemotherapy, 21. 67-76, 1973”を参照されたい。