

# 1. 1989年～91年に分離された *Actinobacillus pleuropneumoniae* の血清型と薬剤感受性

福安 嗣 昭 (麻布大学獣医学部)\*

豚胸膜肺炎の起因菌である *Actinobacillus pleuropneumoniae* の血清型は、1型から12型までに型別されている<sup>14)</sup>。わが国における *A. pleuropneumoniae* は2型菌が主流であった<sup>7,9,16,17)</sup>が、ここ数年1型菌や5型菌による集団発生例<sup>4,5,10,15,20)</sup>やその他血清型菌の分離報告<sup>1,8,18)</sup>がみられるようになった。

今回、1989年から1991年に国内の豚の胸膜肺炎材料から分離された *A. pleuropneumoniae* の血清型と薬剤感受性について検討したので報告する。

## 材料と方法

### 1. 供試菌株

1989年から1991年の3年間に北海道から鹿児島(17県)の養豚場において胸膜肺炎発症豚の肺炎材料から *A. pleuropneumoniae* を分離した。分離 *A. pleuropneumoniae* は、1989年343株、1990年153株、1991年99株の合計595株であった。

### 2. 血清型別

血清型別試験は、*A. pleuropneumoniae* の血清型基準株1型(Shope 4074)、2型(1536)、3型(1421)、4型(M 62)、5型(K 17)、6型(Femφ)、7型(WF 83)、8型(CCM 3803)、9型(CVJ 13261)、10型(D 13039)、11型(56153)および12型(8329)のウサギ抗血清を用いて、急速スライド凝集反応<sup>12)</sup>、試験管凝集反応<sup>2)</sup>、間接赤血球凝集反応<sup>11)</sup>および免疫拡散法<sup>9)</sup>により実施した。

### 3. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、家畜の耐性菌研究会法<sup>9)</sup>に準じた寒天平板希釈法により実施した。供試薬剤は penicillin G (PCG\*\*), ampicillin (ABPC), cephalothin (CET), streptomycin (SM), fradiomycin (FM), kanamycin (KM), tetracycline (TC), oxytetracycline (OTC), chlortetracycline (CTC), erythromycin (EM), spiramycin (SP), kitasamycin (LM), lincomycin (LCM), colistin (CL), novobiocin (NB), thiamphenicol (TP), chloramphenicol (CP), sulfadimethoxine (SDMX) および sulfisoxazole (SIX) の19薬剤を用いた。供試菌株の培養には  $\beta$ -NAD (10  $\mu$ g/ml) 加 brain heart infusion broth (Difco) を、薬剤感受性試験用培地には  $\beta$ -NAD (10  $\mu$ g/ml) 加 muller-hinton agar (Difco) を用いた。1夜培養菌の100倍希釈菌液をマイクロプランターで接種後、37°C、18時間、5%炭酸ガス培養し、最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。

## 成績

### 1. *A. pleuropneumoniae* の血清型

1989年から1991年に豚胸膜肺炎材料から分離された *A. pleuropneumoniae* 595株の血清型は、2型が336株(56.5%)と高率で、次いで1型205株(34.5%)、5型45株(7.6%)であった(表1)。さらに、7型菌、3型菌および12型菌も1~7株分離された。年次別の分離状況をみると、1989年には2型菌が76.7%と高率であったが、翌年には約30%に低下した。しかし、1型菌および5型菌は'89年にはそれぞれ16.3%および5.8%で

\* 共同研究者: Thavajchai SAKPUARAM (現: カセサート大学), 斎藤慶子 (現: 筑波大学大学院), 芦田淨美 (麻布大学獣医学部)

\*\* 薬剤名の略号は本会制定の略号表によった。

表 1 *A. pleuropneumoniae* 血清型菌の年次別分離状況

血清型	分離年次と菌株数 (%)			菌株数 (%)
	'89	'90	'91	
1	56(16.3)	100(65.3)	49(49.5)	205(24.5)
2	263(76.7)	46(30.1)	27(27.3)	336(56.5)
3	1(0.3)			1(0.1)
5	20(5.8)	7(4.6)	18(18.2)	45(7.6)
7	2(0.6)		5(5.0)	7(1.2)
12	1(0.3)			1(0.1)
計	343	153	99	595

あったが、翌年以降増加し、1991年にはそれぞれ49.5% および 18.2% であった。

また、2型菌および1型菌はほとんどの県から分離されたが、他の血清型菌は少数の県からのみ分離された。すなわち、7型菌は北海道、秋田および群馬、5型菌は秋田と鹿児島、3型菌および12型菌はそれぞれ北海道および秋田であった。

## 2. *A. pleuropneumoniae* の薬剤感受性

*A. pleuropneumoniae* 595株の薬剤感受性試験の結果を表2に示した。ペニシリン系(PCG, ABPC), アミノ配糖体系(SM, FM, KM), テトラサイクリン系(TC, OTC: 一括して TC と表

示。以下同様)をはじめ TP, CP, サルファ剤(SDMX, SIX: SA) など多くの薬剤に対する薬剤感受性分布は2峰性以上を示し、これら薬剤に対する耐性菌も認められた。しかし、マクロライド系(SP, LM, EM), LCM, NB, CLの感受性分布はいずれも1峰性であった。

2峰性以上の感受性分布を示した薬剤について耐性限界値(表2)以上を示した菌株、いわゆる耐性菌の割合は、SA, SM および TC がそれぞれ45.2%, 39.8% と 36.2% と比較的高率であり、次いで、TP, CP, ABPC, KM, PCG, FM, CETの順であった。さらに、血清型別では菌分離率が高率であった2型菌の耐性菌の割合が41.4% と最も低率であり、次いで、1型菌の81.0% であった(表3)。しかし、菌分離率が低率であった5型菌(45株), 7型菌(7株) および12型菌(1株)は、全て薬剤耐性であった。

これら耐性菌の薬剤耐性型は血清型により異なり、1型菌(166株)ではSA, TC, SMの単剤耐性が5.5%(合計9株), SA TC耐性, SA SM耐性の2剤耐性が9.0%(合計15株)と、2剤耐性型以下の割合が14.5%であり、85.5%の菌株は3剤以上の耐性型であった(表4)。3剤以上

表 2 *A. pleuropneumoniae* 分離株 595 株の薬剤感受性

薬 剤	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )											感受性 ピーク ( $\mu\text{g/ml}$ )	耐 性 限界値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	耐 性 株 数 (%)
	$\leq 0.09$	0.19	0.39	0.78	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50	$\geq 100$			
PCG		9	142	329	28		19	21	15	23	9	0.78	3.12	87(14.6)
ABPC	29	348	70	55	15	26	21	21	2	2	6	0.19	1.56	93(15.6)
CET	16	162	340	66	5	2	4					0.39	1.56	11(1.8)
SM					13	18	108	184	27	8	237	12.5	100	237(39.8)
FM					1	53	231	232	1		77	12.5	50	77(12.9)
KM					17	170	310	8		5	85	6.25	25	90(15.1)
TC	26	15	234	85	34	7	163	16	7	8		0.39	6.25	194(36.2)
OTC			96	155	86	57	7	90	89	6	9	0.78	12.5	194(36.2)
CTC		13	194	96	100	104	55	27	2	4		0.39		
TP		13	275	168	4		12	3	3	7	110	0.39	2.12	135(22.7)
CP		70	244	149	2	1	31	45	13	28	12	0.39	3.12	130(21.8)
SDMX				24	22	47	85	84	37	27	269	6.25	100	269(45.2)
SIX			22	26	44	132	59	17	13	13	269	3.12	100	269(45.2)
SP						1	18	51	184	331	10	50		
LM			10	3	31	134	396	21				6.25		
EM				32	50	270	229	14				3.12		
LCM							75	157	342	20	1	25		
NB					1	50	147	339	56	2		12.5		
CL	2	39	172	216	136	30						0.78		

表 3 A. pleuropneumoniae 血清型別の薬剤耐性菌の割合

血清型	供試菌株数	薬剤耐性菌株数 (%)	感受性菌株数 (%)
1	205	166 ( 81.0)	39 ( 19.0)
2	336	136 ( 41.4)	197 ( 58.5)
3	1		1 (100 )
5	45	45 (100 )	
7	7	7 (100 )	
12	1	1 (100 )	
	595	358 ( 60.2)	237 ( 39.8)

の耐性型のなかで SA TC SM FM KM TP CP PCG ABPC 耐性および SA TC SM TP CP 耐性の 2 つの多剤耐性型が 1 型菌の耐性株中の約 42% を占めた。2 型菌 (139 株) の耐性型は、1 型菌のそれと著しく異なり、単剤耐性と 2 剤耐性型で 85.6% (合計 119 株) を占め、3 剤以上の耐性型は 14.4% (合計 20 株) であった。2 型耐性菌のなかで、SA SM 耐性の 2 剤耐性型が約 54% を占めていた。さらに、5 型菌は TC 耐性が高率で、7 型菌および 12 型菌は、いずれも 4 剤ある

表 4 薬剤耐性 A. pleuropneumoniae の耐性型

血清型	菌株数	薬 剤 耐 性 型	菌株数
1	166	SA TC SM FM KM TP CP PCG ABPC CET	10
		SA TC SM FM KM TP CP PCG ABPC	37
		SA SM FM KM TP CP PCG ABPC	3
		SA TC SM FM KM TP CP	15
		SA TC SM PCG ABPC CET	1
		TC FM TP CP PCG ABPC	5
		SA TC SM FM KM	2
		SA TC SM TP CP	32
		SA SM KM TP ABPC	9
		SA SM PCG ABPC	14
		SA SM TP CP	8
		SA TC TP CP	1
		TC FM TP CP	2
		TC TP CP	3
		SA TC	4
		SA SM	11
		SA	5
2	139	SM	3
		TC	1
		SA TC SM FM KM TP	3
		SA TC SM TP CP	1
		SA TC SM PCG ABPC	7
		SA TC TP CP	3
		SA SM KM TP CP	2
		SA TC SM	3
		SA SM KM	1
		SA TC	1
5	45	SA SM	75
		SA	13
		TC	19
		KM	8
		PCG	3
7	7	TC	38
		TC CP	7
12	1	SA SM PCG ABPC	2
		SA TC SM PCG ABPC	5

いは5剤耐性型であった。

## 考 察

わが国で分離される *A. pleuropneumoniae* の血清型は従来2型であった<sup>7,9,16)</sup>。1986年以降5型による胸膜肺炎の発生病例が報告<sup>5,10)</sup>され、近年では1型による胸膜肺炎の発生病例<sup>4,15)</sup>も多く見られるようになった。著者ら<sup>1)</sup>は1991年 *A. pleuropneumoniae* 血清型について、胸膜肺炎由来では2型, 1型, 5型, 7型, 3型, 12型, また、と場搬入豚の肺炎由来では2型, 1型, 8型, 9型があることを報告した。今回、1989年から1991年に胸膜肺炎から分離した *A. pleuropneumoniae* の血清型は、1989年には2型菌が最も高率であり、これまでの多くの報告と同様な傾向にあった。しかし、1990年以降1型菌や5型菌の割合が著しく増加した。特に、1型菌の増加は、1型菌による胸膜肺炎発生病例の報告<sup>4,15)</sup>が見られるようになったことと一致していた。また、少数ではあるが3型, 7型, 12型などの血清型菌も分離された。このようなことから、今後、これら血清型菌による胸膜肺炎の多発も危惧される。

一方、薬剤耐性 *A. pleuropneumoniae* は、従来非常に低率であったが、近年、SA剤, PC(ペニシリン系), TC, AG(アミノ配糖体), TPなど多くの薬剤に対する耐性菌が報告されるようになった<sup>1,15,18,20)</sup>。今回1989年~'91年の3年間に分離された *A. pleuropneumoniae* のうち60.2%が供試薬剤のいずれかに耐性であった。さらに、血清型別の薬剤耐性菌は2型菌では41.4%, 1型菌は81.0%であったが、3型, 5型, 7型, 12型菌は全て薬剤耐性菌であった。このように2型菌と他の血清型菌では、薬剤耐性率や薬剤耐性型が著しく異なっていた。薬剤耐性菌の出現は血清型に関係なく、抗菌剤の使用と密接に関連しているものと考えられるが、わが国で非常に分離率の少ない血清型菌、しかも特定の地域(養豚場)に限定された由来菌がほとんど薬剤耐性であったことから、輸入豚から6型菌が検出された例<sup>10)</sup>のように、豚の生体輸入と同時に、国内での分離頻度が低い血清型菌でしかも薬剤耐性の *A. pleuropneu-*

*moniae* 保有豚の国内への持ち込みの可能性も考えられる。

いずれにしても、近年、野外胸膜肺炎の起因菌である *A. pleuropneumoniae* は、血清型の多様化、さらには、薬剤耐性化の傾向にあり、予防、治療のための薬剤やワクチンの選択に当たっては、その農場の流行している菌株の血清型あるいは薬剤感受性を把握することが重要である。

## 要 約

1989年~'91年に豚の胸膜肺炎材料から分離された *A. pleuropneumoniae* 595菌株の血清型別と19薬剤に対する感受性試験を実施した。血清型別の分離頻度は、2型56.3% (336菌株), 1型34.5% (205菌株), 5型7.6% (45菌株), 7型1.2% (7菌株), 3型および12型各0.2% (各1菌株)であった。3年間における分離菌の血清型別の変化では、2型は減少し、反対に1型と5型は増加した。

一方、*A. pleuropneumoniae* に対するABPC, CET, PCG, TC, TP, CPおよびCLのMICピーク値はいずれも0.78  $\mu\text{g/ml}$ 以下で強い抗菌活性を示した。しかし、SM, FM, KM, SA, LM, EM, およびNBのそれは、3.12~12.5  $\mu\text{g/ml}$ の範囲にあり、比較的弱い抗菌活性であった。さらに、SP, LM, EM, LCM, NBおよびCLは1峰性のMIC分布を示したが、他の薬剤では2峰性以上のMIC分布を示した。595菌株中358菌株(60.2%)は数薬剤に対して耐性であった。血清型別の薬剤耐性菌の割合は、1型81.0% (166菌株/205菌株)および2型41.4% (139菌株/336菌株)であったが、5型, 7型および12型では全株(45菌株, 7菌株および1菌株)が耐性であった。また、それらの薬剤耐性型において、1型および2型は多剤耐性型が高率であったが、反対に5型, 7型および12型では低率の傾向にあった。

本試験の実施にあたり、野外での胸膜肺炎材料の採取あるいは菌株の分離に協力頂いた、明治製菓(株)生物産業事業部、日清製粉(株)中央研究所、SMC(株)およびジーピーラボラトリーズ(株)

の関係各位に感謝する。

## 文 献

- 1) 福安嗣昭, Thavajchai Sakpuaramu, 斎藤慶子ほか. 1991. 豚肺炎由来 *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* の血清型と薬剤感受性. 日獣会誌, 44, 11-16.
- 2) Gunnarsson, A., Biberstein, E. L., and Hurvell, B. 1977. Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus parahaemolyticus (pleuropneumoniae)*: Agglutination reactions. Am. J. Vet. Res., 38, 1111-1114.
- 3) Gunnarsson, A., Hurvell, B., and Biberstein, E. L. 1978. Serologic studies of porcine strains of *Haemophilus parahaemolyticus (pleuropneumoniae)*: Antigenic specificity and relationship between serotypes. Am. J. Vet. Res., 39, 1286-1292.
- 4) 伊藤裕和, 岡田正二, 杉山弘行ほか. 1988. 哺乳豚にみられた *Actinobacillus pleuropneumoniae* 1 型菌による胸膜肺炎. 第 106 回日獣学会講演要旨集, 167.
- 5) 岩松 茂, 森尾 篤, 毛利 卓ほか. 1986. *Haemophilus pleuropneumoniae* 5 型菌による豚の線維索性胸膜肺炎の発生. 日獣会誌, 39, 374-377.
- 6) 家畜の耐性菌研究会. 1976. 家畜由来の細菌に対する抗生物質等の薬剤の最小発育阻止濃度測定法について. 日獣会誌, 29, 90-92.
- 7) Kawahara, K., Asano, M., Nakai, T., et al. 1989. Antibiotic susceptibility of serotype 2 and 5 strains of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* isolated from swaine from 1974 to 1986. Jpn. J. Vet. Sci., 51, 359-363.
- 8) 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.
- 9) Kume, K., Nakai, T., and Sawada, A. 1984. Isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae* from the nasal cavities of healthy pigs. Jpn. J. Vet. Sci., 46, 641-647.
- 10) 黒川 知, 福安嗣昭, 斎藤慶子ほか. 1990. *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* 血液型 5 subtype b による子豚の線維索性漿膜肺炎. 第 109 回日獣学会講演要旨集, 137.
- 11) Mittal, K. R., Higgins, R., and Lariviere, S. 1983. Determination of antigenic specificity and relationship among *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes by an indirect hemagglutination test. J. Clin. Microbiol., 17, 787-790.
- 12) 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.
- 13) Nakai, T. and Kume, K. 1987. Serological and bacteriological survey of *Haemophilus pleuropneumoniae* serovar 5. Jpn. J. Vet. Sci., 49, 1141-1144.
- 14) Nielsen, R. 1986. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. Acta Vet. Scand., 27, 453-455.
- 15) 岡崎好子, 稲毛幹雄, 村上覚史ほか. 1991. 千葉県において発生した豚の *Actinobacillus pleuropneumoniae* 感染症と分離菌の薬剤感受性. 日獣会誌, 44, 581-586.
- 16) Sakpuaram, T., Fukuyasu, T., and Ashida, K. 1989. Isolation of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* from pneumonic lungs of slaughtered pigs. Jpn. J. Vet. Sci., 51, 1279-1281.
- 17) Suzuki, S., Takahashi, T., Muramatsu, M., et al. 1988. Serotype of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* isolates from pigs in slaughterhouse. Jpn. J. Vet. Sci., 50, 1264-1267.
- 18) Suzuki, S., Ohmae, K., Ohishi, K., et al. 1989. Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* isolated from pigs with pleuropneumonia. Jpn. J. Vet. Sci., 51, 450-452.
- 19) 山本和枝, 滝 俊博, 浅香俊男ほか. 1987. *Haemophilus pleuropneumoniae* 6 型によるカナダ産輸入豚の死亡例. 第 103 回日獣学会講演要旨, 118.
- 20) 山本孝史. 1989. 最近分離された *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* の薬剤感受性. 家畜抗菌剤研究会報, 10, 16-20.

## Serotype and Antimicrobial Susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Isolated from Pigs During 1989 to 1991

Tsuguaki FUKUYASU

(School of Veterinary Medicine, Azabu University)

A total of 595 strains of *A. pleuropneumoniae* isolated from pneumonic lungs during the period of 1989 to 1991 were serotyped and examined for their susceptibility to 19 antimicrobial agents. Of these 595 isolates, 336 isolates (56.5%) were serotype 2, 205 isolates (34.5%) were serotype 1, 45 isolates (7.6%) were serotype 5, 7 isolates (1.2%) were serotype 7, and the remaining 2 isolates were serotype 3 and 12, respectively. On a secular change of each serotype strain for the isolates, the isolation ratio of serotype 2 decreased and conversely that of serotype 1 and 5 increased.

Most of these isolates were highly susceptible to ampicillin, cephalothin, benzylpenicillin, tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline, thiamphenicol, chloramphenicol, and colistin. Streptomycin, fradiomycin, kanamycin, sulfa drugs (sulfadimethoxine and sulfisoxazole), kitasamycin, erythromycin, and novobiocin showed relatively low antimicrobial activity against the isolates. All the isolates formed a single peak distribution of MIC for the 6 drugs (spiramycin, kitasamycin, erythromycin, lincomycin, novobiocin and colistin). On the other hand, 358 of 595 isolates (60.2%) were resistant to some drugs. One hundred and sixty-six of 205 isolates (81.0%) of serotype 1 were resistant to drugs, and about 85% of them were multiple resistance more than three drugs. But, 136 of 366 isolates (41.4%) of serotype 2 were resistant to drugs, and about 15% of them were the multiple resistance. All isolates of serotype 3, 5, 7 and 12 were resistant to some drugs.

### 討 論 (座長: 中村政幸)

質問 (井上 勇, 日大)

本年の養豚場別の成績についてお教え下さい。

答 (福安嗣昭)

年次により異なる血清型が分離されるケースが数例ある。例えば、従来2型であったが、1型に変わっていた例もあり、このようなケースでは発症月齢が若齢化の傾向にあった。

質問 (佐藤静夫, 全農家衛研)

1型菌は従来、薬剤耐性傾向が強いといわれて来たが、今回の報告では、耐性菌の比率はむしろ2型の方が高くなっており、とくにTC耐性に関しては1型は減少傾向を示している。これらの点から1型菌が薬剤耐性に関

して特殊性をもつか疑問である。この点に関して御意見を。

答 (福安嗣昭)

耐性菌の出現は薬剤との接触が基本である。血清型とは関連していないものと考えられる。1型菌のTC耐性の減少は今回の結果のみでは結論づけられないが、菌株の由来(農場)の違いによるものと考えられる。

質問 (中村政幸, 動葉検)

1991年にTC耐性菌(1型菌)が減少した理由は。

答 (福安嗣昭)

分離地域(養豚場)の違いが大きな要因であると考えられる。