

サルファ剤による *Bordetella bronchiseptica* の莢膜合成阻止作用

桑野 昭

ハムリー株式会社 筑波研究センター (〒 306-0101 茨城県古河市尾崎 2654-3)

1. はじめに

豚萎縮性鼻炎 (AR) の原因菌である *Bordetella bronchiseptica* は I 相菌, I から III 相菌への移行型である II 相菌, I 相菌の形態学的変異型である III 相菌およびラフ型菌の四つに分類される。I 相菌は莢膜抗原 (K 抗原), 線毛性赤血球凝集抗原 (HA 抗原), 鞭毛抗原 (H 抗原) および外膜の多糖抗原 (O 抗原) を有するが, III 相菌は K および HA 抗原を欠損する [5]。I 相菌は病原性と密接な関係があり, 赤血球凝集性, 溶血性, 壊死毒素 (DNT) 産生および感染防御活性などを持つが, III 相菌はこれらの活性をすべて欠いている。特に, I 相菌の莢膜は鼻粘膜上皮細胞への付着因子として, また, 感染防御抗原として極めて重要であることが報告されている [7]。AR の予防対策として I 相菌不活化ワクチン, I 相菌不活化ワクチンと抗菌薬の併用などが行われている。抗菌薬としては主にサルファ剤とテトラサイクリン系が用いられているが, 最近, 長年の使用によりサルファ剤に対する耐性菌が多く分離されるようになった。しかし, サルファ剤耐性の *B. bronchiseptica* が分離されるにもかかわらず, 臨床的あるいは病理学的にサルファ剤の効果が認められる現象が多く見受けられる。著者は, サルファ剤の一つであるスルファモノメトキシシン (SMMX) の存在下で培養したサルファ剤耐性 *B. bronchiseptica* が, 莢膜抗血清 (K 因子血清) との反応性が消失し, 莢膜が欠如する現象を偶然発見した。このことは *B. bronchiseptica* の I 相菌を病原性のない III 相菌に変異させる作用, すなわち, 豚の鼻粘膜上皮細

胞への付着因子として重要な莢膜の合成を阻止する作用を SMMX が有することが示唆され, 一連の検討を加えた。なお, 本研究は著者が第一製薬 (株) に所属していた時に実施したものであり, 本研究で実施した豚を用いた動物実験は, 第一製薬 (株) 動物実験倫理委員会の承認条件である供試頭数の削減および安楽死における全身麻酔薬の使用 (苦痛の軽減) を遵守して実施した。

2. *B. bronchiseptica* の莢膜合成に及ぼす SMMX の影響 — *in vitro* での検討 —

(1) 目的

SMMX の存在下で培養したサルファ剤耐性 *B. bronchiseptica* が, 莢膜抗血清 (K 因子血清) との反応性が消失する現象, すなわち, 豚の鼻粘膜上皮細胞への付着因子として重要な莢膜の合成を阻止する作用を *in vitro* で調べた [2]。

(2) 材料および方法

ア. 供試菌株

野外において AR の症状を示す 2~3 カ月齢の子豚の鼻腔から分離された SMMX 耐性の *B. bronchiseptica* の I 相菌 (SM2-4, NS-1, S-11) および SMMX 感受性の 3 株 (S1, FB2301, BB-18) を供試した。I 相菌の参照株として S1 株を用いた。また, III 相菌の参照株とした SM2-4-CV 株は, クリスタルバイレットを用いる Ishikawa と Isayama の方法 [1] に準じて作製した。各供試菌株の分離年, 分離地およびサルファ剤に対する薬剤感受性を表 1 に示した。

表1 *B. bronchiseptica* 供試菌株のサルファ剤に対する感受性

菌相	菌株名	分離年	分離地	MIC (mg/L)	
				SMMX ^{a)}	SDMX ^{b)}
I	SM2-4	1984	千葉県	> 400	> 400
I	NS-1	1987	群馬県	> 400	> 400
I	S-11	1985	新潟県	> 400	> 400
I	S1	・	・	0.4	0.8
I	FB2301	1984	北海道	0.1	0.2
I	BB-18	1985	千葉県	0.1	0.4
III	SM2-4-CV (SM2-4 の III 相菌)			> 400	> 400

a) スルファモノメトキシン b) スルファジメトキシン

S1 株：農水省家畜衛生試験場より分与

SM2-4-CV 株：クリスタルバイオレットを用いて作製

MIC 測定培地：Mueller-Hinton 寒天培地

イ. 使用培地と I 相菌の選定

B. bronchiseptica の I 相菌の性状を保持するため、7% 馬脱線維素血液加 Bordet-Gengou 寒天 (BGA) 培地を用いた。各菌株を BGA 培地に接種し、コンラージ棒で広げ、37°C、36 時間好気培養した。β 溶血を示す正円、灰白色の直径 1mm 以下の集落を形成し、かつ、これらの菌が K 因子血清と凝集することを確認して I 相菌とした。

ウ. K 因子血清の作製

ホルマリン不活化 I 相菌で作製した抗血清を、同じくホルマリン不活化 III 相菌の菌体で吸収して作製した。この K 因子血清に対して I 相菌の参照株である S1 株は凝集するが、III 相菌の参照株である SM2-4-CV 株は凝集を示さなかった。

エ. SMMX の最小莢膜合成阻止濃度の測定

2 倍希釈系列の SMMX を含む BGA 培地に各試験用菌液を菌接種機で接種し、37°C、36 時間培養した。培養後、発育菌の K 因子血清に対する凝集性をスライド凝集反応法で検査し、K 因子血清に対する凝集性が消失した SMMX の最小濃度を最小莢膜合成阻止濃度とした。

オ. K 因子血清に対する凝集性の復帰

K 因子血清に対する凝集性が消失した SMMX の各濃度の発育菌を SMMX を含まない BGA 培地に接種し、37°C、36 時間培養した。培養後、発育した菌の K 因子血清に対する凝集性を検査した。

(3) 成績

ア. SMMX 含有ディスクの周囲に発育した集落の観察

SMMX のディスク (400 μg) 存在下で SMMX 耐性 *B. bronchiseptica* の I 相菌を培養した結果、ディスクを中心とした半径 15mm の円内では、莢膜を欠く III 相菌の集落に極めて類似した集落が、また、ディスクの中心から 15mm 以上離れた部分では、I 相菌に類似した集落が観察された。

イ. SMMX の最小莢膜合成阻止濃度

2 倍希釈系列で 0.1 ~ 100 mg/L の SMMX を含む BGA 培地に発育した各菌株の全集落について K 因子血清に対する凝集性を検査した。その結果、SMMX 耐性の SM2-4、NS-1 および S-11 株では、SMMX の 1.56 mg/L 以上の濃度で K 因子血清に対する凝集性が消失した。一方、SMMX 感受性の S1、FB2301 および BB-18 株の各菌株では、0.4 あるいは 0.8 mg/L 以下の濃度で集落が形成されたが、これらの集落は K 因子血清に対して凝集した (表 2)。

ウ. K 因子血清に対する凝集性の復帰

SMMX の 1.56 mg/L 以上の濃度で K 因子血清に対する凝集性が消失した SMMX 耐性の SM2-4、NS-1 および S-11 の各菌株の発育集落を SMMX を含まない BGA 培地に接種し、37°C、36 時間培養した。培養後、発育した各菌株の全集落について K 因子血清に対する凝集性を検査したところ、凝集性の復帰がすべてに認められた (表 2)。

表 2 *B. bronchiseptica* の K 因子血清に対する凝集性

菌株名	SMMX の濃度 (mg/L)										
	0.1	0.2	0.4	0.8	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100
SM2-4 ^{a)}	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
NS-1 ^{a)}	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
S-11 ^{a)}	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
S1 ^{b)}	+	+	+	+	·	·	·	·	·	·	·
FB2301 ^{b)}	+	+	+	·	·	·	·	·	·	·	·
BB-18 ^{b)}	+	+	+	·	·	·	·	·	·	·	·
SM2-4-CV ^{c)}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ 陽性, - 陰性, · 菌の発育なし
 a) サルファ剤耐性株 b) サルファ剤感受性株 c) III 相菌
 使用培地: Bordet-Gengou 寒天培地

(4) 考 察

BGA 培地中の SMMX 濃度が 1.56 mg/L 以上の存在下で、供試した SMMX 耐性の 3 株を培養した場合、いずれも K 因子血清に対する凝集性が消失した。一方、発育阻止濃度 (0.4 あるいは 0.8 mg/L) 以下で発育した SMMX 感受性菌は K 因子血清に対して凝集し、K 因子血清に対する凝集性の消失は、選択的に SMMX 耐性菌のみに認められることが明らかとなった。莢膜が欠損した菌は III 相菌として定義され、鼻粘膜上皮細胞への付着能および病原性を欠くことが知られている。したがって、*in vivo* においても SMMX は、サルファ剤耐性の *B. bronchiseptica* の莢膜合成を阻止し、鼻甲介組織における本菌の定着を抑制する可能性が示唆された。また、SMMX によって莢膜が欠損した菌は、SMMX を含まない BGA 培地に継代して培養すると莢膜を有する I 相菌の性状に復帰することも明らかとなった。この成績から、SMMX による本菌の莢膜合成阻止作用は、SMMX の存在下で生じる一時的なものであることが推察された。

3. *B. bronchiseptica* の莢膜合成に及ぼす SMMX の影響 - *in vivo* での検討 -

(1) 目 的

in vitro で認められた SMMX による本菌の莢膜合成阻止作用が *in vivo* でも生じるか否かを検証

する目的で SMMX 耐性 *B. bronchiseptica* の人工感染豚を用いて検討した [4]。

(2) 材料および方法

ア. 供試豚

16 日齢のランドレース系の SPF 豚 (雄) を 4 日間の予備飼育後、20 日齢から試験に供した。SMMX 投薬群および無投薬対照群の 2 群を設定し、各群 4 頭の計 8 頭を用いた。各群は別々の動物室 (室温: 23 ± 2°C, 湿度: 55 ± 10%) で飼育した。飼料および水は自由に摂取させた。飼料は抗菌性飼料添加物無添加の後期用人工乳 (日本クレア, SDS No.2) を用いた。

イ. 供試菌株

B. bronchiseptica SM2-4 株を供試した。

ウ. I 相菌の確認

BGA 培地で 37°C, 36 時間培養後、明瞭な β 溶血を示す粘稠な小集落で、K 因子血清に対して凝集し、莢膜を有する I 相菌であることを確認して供試した。

エ. *B. bronchiseptica* の接種

BGA 培地で明瞭な β 溶血を示す粘稠な I 相菌集落を釣菌し、これを PBS (pH 7.0) にマクファールランド No.5 の濁度に浮遊させた菌液 (3.0 × 10⁸ CFU/mL) の 3mL を各供試豚の鼻腔内 (左右それぞれ 1.5mL) に注射器で注入した。

オ. SMMX の投薬

抗菌性飼料添加物無添加の後期用人工乳 (SDS No.2) に SMMX が 500ppm の割合になるよう添

表3 SMMXによりK因子血清に対する凝集性が消失した *B. bronchiseptica* を SMMX を含まない培地に培養後の K 因子血清に対する凝集性

菌株名	SMMX の濃度 ^{a)} (mg/L)						
	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100
SM2-4	+	+	+	+	+	+	+
NS-1	+	+	+	+	+	+	+
S-11	+	+	+	+	+	+	+

+ 陽性

a) SMMXによりK因子血清に対する凝集性が消失した濃度
使用培地：Bordet-Gengou 寒天培地

加した飼料を菌接種1日前から剖検日（菌接種後11日目または25日目）まで連続給与した。SMMXの500ppmは25mg/kgに相当し、これは臨床での投与量である。

カ. 鼻甲介の病理学的検査

菌接種後11日目または25日目に各群それぞれ2頭ずつペントバルビタール麻酔下で安楽死させた後、AR病変を肉眼的に観察した。

キ. 鼻甲介粘膜の走査型電子顕微鏡学的観察

と殺後、鼻甲介をPBS (pH 7.4) で洗浄し、3%グルタルアルデヒド液で前固定した。この組織を標本用に細切した後、常法に従って標本を処理し、走査型電子顕微鏡(日立S-800型)で観察した。

ク. 鼻甲介の細菌検査

鼻甲介を無菌的に採取し、これをPBS (pH 7.0) で軽く洗浄した後、それぞれ0.5gをガラスホモジナイザー管に秤量、分取した。これに4.5mLのPBSを加えた後、氷冷下でよくホモジナイズして、 10^1 の組織乳剤を作製した。更に、PBSで $10^2 \sim 10^8$ の希釈系列を作製した後、それぞれの希釈液0.1mLをBGA培地にコンラージ棒で広げた。37°C、36時間培養し、生菌数を測定した。

ケ. 抗体検査

菌接種1日前および剖検日に頸静脈から採血し、試験管凝集反応により血清抗体価を測定した。

(3) 成績

ア. 肉眼的AR病変

SMMX投薬群では、菌接種後11日目に剖検した1/2頭に軽度のAR病変が認められたが、残りの1頭および菌接種後25日目に剖検した2頭で

はAR病変は認められなかった。これに対し、対照群では菌接種後11日目に剖検した2/2頭および菌接種後25日目に剖検した1/2頭の計3頭が中程度のAR病変を示し、また、残りの1頭が軽度のAR病変を示した(表4)。

イ. 走査型電子顕微鏡による鼻甲介粘膜表面の観察

SMMX投薬群では、肉眼的に軽度のAR病変を示した1頭のみ、粘膜上皮細胞の変性、剥離および粘膜線毛に少数の菌体付着が観察された。AR病変を認めなかった残りの3頭では粘膜上皮細胞の異常は認められず、粘膜上皮線毛に付着した菌体も観察されなかった。対照群では、粘膜上皮細胞の変性と剥離が全頭に観察された。また、小塊状に残存している粘膜上皮線毛に菌体が多数付着している像も観察された。

ウ. 鼻甲介からの *B. bronchiseptica* の検出

菌接種後11日目における検出菌数は、SMMX投薬群の2頭では 10^4 および 10^6 CFU/g、対照群の2頭では 10^6 および 10^8 CFU/gであった。また、菌接種後25日目におけるそれは、SMMX投薬群の2頭はいずれも 10^4 CFU/g、対照群の2頭では 10^7 および 10^9 CFU/gであった(表5)。

エ. 検出された *B. bronchiseptica* の菌相

SMMX投薬群および対照群から分離された菌はすべてI相菌であった。

オ. 凝集抗体価の推移

菌接種前1日目における全供試豚の抗体価は、10倍以下で抗体は陰性であった。SMMX投薬群では、菌接種後11日目または25日目に剖検したそれぞれ2頭が、いずれも10および20倍の抗体価

表 4 鼻甲介骨萎縮病変の検査成績

群	豚 No.	A R 病変の程度	
		菌接種後 11 日	菌接種後 25 日
SMMX 投薬群	1	—	・
	2	+	・
	3	・	—
	4	・	—
対照群	5	++	・
	6	++	・
	7	・	++
	8	・	+

— 正常, ± 疑似, + 軽度, ++ 中程度

表 5 鼻甲介からの *B. bronchiseptica* の検出成績

群	豚 No.	菌 数 (CFU/g)	
		菌接種後 11 日	菌接種後 25 日
SMMX 投薬群	1	5.0×10^4	・ (未検査)
	2	1.7×10^6	・
	3	・	1.4×10^4
	4	・	1.0×10^4
対照群	5	3.3×10^6	・
	6	5.6×10^8	・
	7	・	2.7×10^7
	8	・	1.6×10^9

使用培地：Bordet-Gengou 寒天培地

を示し、経過に伴う抗体価の上昇は認められず、低値で推移した。これに対し対照群では、菌接種後 11 日目に剖検した 2 頭が 20 および 40 倍を、また、25 日目に剖検した 2 頭は 80 および 160 倍の抗体価を示し、経過とともに抗体価の上昇が認められた (表 6)。

(4) 考 察

SMMX による SMMX 耐性 *B. bronchiseptica* の莢膜合成阻止作用が、*in vivo* においても生じるか否かを人工感染豚を用いて検討した結果、*in vivo* においても SMMX の存在下で SMMX 耐性 *B. bronchiseptica* の莢膜合成が阻止され、本菌の鼻甲介への付着が抑制されることを示唆する成績が得られた。また、SMMX 投薬群および対照群から分離された菌はすべて I 相菌であったことから、*in vivo* における本菌の莢膜合成阻止は *in*

vitro と同様に SMMX の存在下においてのみ生じる一時的な作用と推察された。

4. *B. bronchiseptica* の莢膜合成に及ぼす各種サルファ剤の作用

(1) 目 的

豚に使用される 9 種のサルファ剤について *B. bronchiseptica* の莢膜合成に及ぼす影響について比較検討した [3]。

(2) 材料および方法

ア. 供試菌株

北海道、岩手県、千葉県、山梨県、新潟県および長崎県下の計 10 カ所の AR 発生養豚場から分離された *B. bronchiseptica* 計 10 株 (1 養豚場当たり 1 株) を供試した。これらの菌株に対する供試

表6 *B. bronchiseptica* の I 相菌に対する凝集抗体価の推移

群	豚 No.	菌 接 種		
		1 日 前	11 日 後	25 日 後
SMMX 投薬群	1	< 10 (倍)	10	・
	2	< 10	20	・
	3	< 10	・	10
	4	< 10	・	20
対照群	5	< 10	40	・
	6	< 10	20	・
	7	< 10	・	80
	8	< 10	・	160

・未検査

サルファ剤の MIC は 400 mg/L 以上であった。

イ. 供試サルファ剤

SMMX については、ピリミジン環の 6 位の位置に 1 個の -OCH₃ 基 (MeO 基) を有する 6-MeO-SMMX (SMMX) および 2 位の位置に 1 個の MeO 基を有する 2-MeO-SMMX の 2 剤を用いた。1 および 2 の試験で用いた SMMX は前者に属する。SMMX 以外のサルファ剤として豚で使用されるスルファジメトキシシン (SDMX), スルファドキシシン (SDX), スルファメトキサゾール (SMXZ), スルファチアゾール (STAZ), スルファメトキシピリダジン (SMPD), スルファメサジン (SMTZ) およびスルフイソキサゾール (SIXA) の 7 薬剤を供試した。

ウ. 供試サルファ剤の最小莢膜合成阻止濃度

2 倍希釈系列の供試サルファ剤を含む BGA 培地に各試験用菌液を菌接種機で接種し、37°C、36 時間培養した。培養後、発育菌の K 因子血清に対する凝集性をスライド凝集反応法で検査し、K 因子血清に対する凝集性が消失した供試サルファ剤の最小濃度を最小莢膜合成阻止濃度とした。

(3) 成 績

ア. 供試サルファ剤の最小莢膜合成阻止濃度

化学構造的にピリミジン環およびピリダジン環に MeO 基を有するサルファ剤が 1.56 ~ 3.13 mg/L の濃度で *B. bronchiseptica* の莢膜合成を強く阻止するとともに、SMMX のように MeO 基を 1 個有するサルファ剤が最も強い活性を示した。

一方、MeO 基を有しない SMXZ, STAZ, SMTZ および SIXA の最小莢膜合成阻止濃度は 100 あるいは 100 mg/L 以下であり、莢膜合成阻止活性は極めて弱いことが明らかとなった (表 7)。

イ. 供試サルファ剤の抗菌活性と莢膜合成阻止活性との相関性

供試サルファ剤のサルファ剤感受性 *B. bronchiseptica* に対する 6-MeO-SMMX, 2-MeO-SMMX, SMXZ および STAZ の MIC は、いずれも $\leq 0.1 \sim 0.4$ mg/L であり、ほぼ同等の強い抗菌活性を示したが、これらの 4 薬剤のなかで MeO 基を有する 6-MeO-SMMX および 2-MeO-SMMX の 2 薬剤のみが強い莢膜合成阻止活性を示し、抗菌活性と莢膜合成阻止活性との相関性は認められなかった (表 8)。

(4) 考 察

莢膜合成阻止活性が認められたサルファ剤は、化学構造的に MeO 基を有する化合物であり、MeO 基が莢膜合成阻止活性に深く関与していることが示唆された。また、MeO 基を有するピリミジン系サルファ剤のなかで SMMX および 2-MeO-SMMX の 2 剤は最も強い莢膜合成阻止活性を示した。一方、2 位と 5 位に MeO 基を有する SDX は、SMMX および 2-MeO-SMMX と同様な位置に MeO 基を有するにもかかわらず、それらの莢膜合成阻止活性は SMMX および 2-MeO-SMMX に比べやや劣ることも明らかとなった。これらの成績は、サルファ剤が *B. bronchiseptica* の莢膜合成を阻止するには、ピリダジン環に付く

表 7 サルファ剤耐性 *B. bronchiseptica* に対する各種サルファ剤の莢膜合成阻止活性

菌株名	最小莢膜合成阻止濃度 (mg/L)								
	6-MeO-SMMX	2-MeO-SMMX	SDMX	SDX	SMXZ	STAZ	SMPD	SMTZ	SIXA
BB113	3.13	3.13	25	25	> 100	> 100	50	> 100	> 100
SM2-4	1.56	1.56	25	12.5	> 100	> 100	50	> 100	> 100
K-5	3.13	3.13	12.5	25	> 100	> 100	50	> 100	> 100
MS-5	1.56	3.13	12.5	12.5	100	> 100	12.5	> 100	> 100
MY-931	1.56	1.56	12.5	12.5	100	> 100	12.5	> 100	> 100
YM-4	3.13	3.13	12.5	25	> 100	> 100	50	> 100	> 100
OKM-5	3.13	3.13	50	50	> 100	> 100	100	> 100	> 100
I-11	1.56	3.13	25	25	100	> 100	25	> 100	> 100
S-11	1.56	3.13	12.5	25	> 100	> 100	25	> 100	> 100
SM24-3	1.56	3.13	12.5	12.5	> 100	> 100	50	> 100	> 100

6-MeO-SMMX: 6-MeO-スルファモノメトキシシ、2-MeO-SMMX: 2-MeO-スルファモノメトキシシ、SDMX: スルファジメトキシシ、SDX: スルファドキシシ、SMXZ: スルファメトキサゾール、STAZ: スルファチアゾール、SMPD: スルファメトキシピリダジン、SMTZ: スルファメサジン、SIXA: スルフィソキサゾール

表 8 サルファ剤感受性 *B. bronchiseptica* に対する各種サルファ剤の抗菌活性

菌株名	最小莢膜合成阻止濃度 (mg/L)								
	6-MeO-SMMX	2-MeO-SMMX	SDMX	SDX	SMXZ	STAZ	SMPD	SMTZ	SIXA
S 1	0.4	0.4	0.8	0.8	0.4	0.4	0.8	3.2	0.8
SP-89	0.2	0.4	0.8	0.4	0.4	0.4	0.8	1.6	0.8
IWA9-2	≤ 0.1	≤ 0.1	0.2	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1	0.2	0.8	0.4

参考) 最小莢膜合成阻止濃度

・ 6-MeO-SMMX, 2-MeO-SMMX: 1.56 ~ 3.13mg/L

・ SMXZ, STAZ; 100 ~ > 100mg/L

MeO 基の数が重要であることを示唆している。この場合、MeO 基の数が 1 個であるサルファ剤が、2 個であるサルファ剤に比べ、より強い莢膜合成阻止活性を示すことが明らかとなった (図 1)。また、宇田ら [6] は莢膜と同様に鼻甲介粘膜上皮細胞の付着因子として推定されているシアル酸特異的赤血球凝集素 (HA) の活性発現に対しても、SMMX は 3.13 mg/L 以上の濃度でその活性を消失させること、さらに、その HA 活性の消失作用は MeO 基の数が 1 個である SMMX が最も強い作用を示すことを報告している。*in vitro* と *in vivo* が一致しない原因として SMMX の HA 活性の消失作用も関与しているものと考察された。

5. 豚における SMMX の体内分布

—特に鼻甲介の組織内濃度について—

(1) 目的

SMMX がサルファ剤耐性本菌の莢膜合成を阻止するには 1.56 ~ 3.13 mg/L 以上の濃度が必要である。豚に SMMX を投与した場合の体内分布については全く明らかにされていない。SMMX による *B. bronchiseptica* の莢膜合成阻止作用が、豚の鼻甲介組織で生じるか否かを体内分布の面から明らかにする目的で、SMMX 投与後の血清中濃度および組織内濃度を検討した。

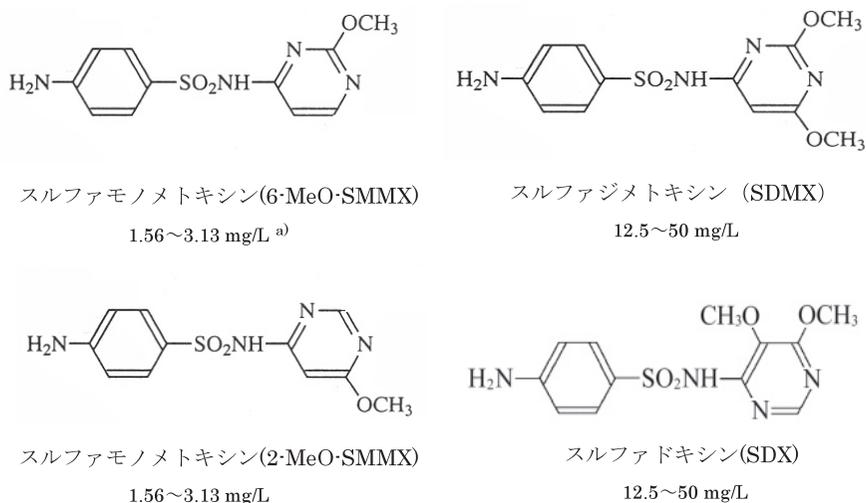


図1 供試ピリミジン系サルファ剤の化学構造
a) 最小莢膜合成阻止濃度

(2) 材料および方法

ア. 供試動物

血清中濃度の測定には SPF 豚の 5 頭 (ランドレース系, 雄, 46 日齢, 体重 12.5 ~ 16.1kg) を使用した。また, 組織内濃度の測定には SPF 豚の 5 頭 (ランドレース系, 雄, 40 日齢, 体重 9.6 ~ 10.8kg) を使用した。

イ. SMMX の投薬量および投薬方法

0.5% のカルボキシメチルセルローズナトリウム (CMC) 溶液に SMMX を懸濁 (50mg/mL) し, 経口カテーテルを用いて 25mg/kg を単回経口投薬した。

ウ. 採材

血清中濃度の測定では, SMMX 投与後, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 および 24 時間後に頸静脈から採血し, 4℃, 3,000rpm で 10 分間遠心して血清を分離し, 測定時まで -20℃ に凍結保存した。組織内濃度では, SMMX の血清中濃度が最高値を示す投与後 4 時間にペントバルビタール麻酔下で安楽死させ, 鼻甲介, 気管, 肺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 小腸, 筋肉および脳を採取した。これらの組織は測定時まで -20℃ に凍結保存した。

エ. 定量法

高速液体クロマトグラフィー法で SMMX の未

変化体 (SMMX) とその代謝物であるアセチル体 (Ac-SMMX) を分別定量した。本法による血清中濃度の定量限界は SMMX が 0.05, Ac-SMMX が 0.1 mg/L である。また, 組織内濃度の定量限界は SMMX が 0.1, Ac-SMMX が 0.1 mg/L である。

オ. 薬物動態パラメーターの算出

血清中の SMMX と Ac-SMMX の最高濃度 (Cmax), 最高濃度到達時間 (Tmax), 生物半減期 ($t_{1/2}$) および時間曲線下面積 (AUC) を算出した。

(3) 成績

ア. 血清中濃度の推移

SMMX の濃度は, 投与後 1 時間で著明に上昇し, 投与後 3.8 時間に Cmax の 23.1 μ g/g を示した。その後, SMMX の濃度は 2.2 時間の $t_{1/2}$ で速やかに減衰し, 投与後 24 時間には 0.05 μ g/g 以下となった。一方, Ac-SMMX の濃度は, 投与後 5.6 時間に Cmax の 8.3 μ g/g を示した。その後, Ac-SMMX の濃度は 2.8 時間の $t_{1/2}$ で減衰し, 投与後 24 時間には 0.1 μ g/g 以下となった (表 9)。

イ. 組織内濃度

SMMX の血清中濃度が最高値を示す投与後 4 時間における SMMX の組織内濃度の順位は, 腎臓 > 気管, 心臓 > 筋肉 > 小腸, 肝臓 > 鼻甲介骨

表 9 豚における SMMX の経口投与後の血清中未変化体 SMMX とそのアセチル体である Ac-SMMX のファーマコカインेटィック・パラメーター (25mg/kg, n=5)

	Tmax ^{a)} (時)	Cmax ^{b)} ($\mu\text{g/g}$)	t _{1/2} ^{c)} (時)	AUC ₀₋₂₄ ^{d)} ($\mu\text{g} \cdot \text{時/mL}$)
SMMX	3.8 ± 1.1 ^{e)}	23.1 ± 4.7	2.2 ± 0.0	144.7 ± 6.4
Ac-SMMX	5.6 ± 1.0	8.3 ± 0.4	2.8 ± 0.3	72.6 ± 12.9

a) 最高濃度到達時間, b) 最高濃度, c) 生物学的半減期, d) 時間曲線下面積
e) 平均値±標準偏差

表 10 豚における SMMX の経口投与後 4 時間における組織内濃度 (25mg/kg, n=5) 単位: $\mu\text{g/g}$

組 織	SMMX ^{a)}	Ac-SMMX ^{b)}	アセチル化率 (%)
鼻甲介骨	7.09 ± 2.89 ^{c)}	6.98 ± 3.11	49.6
気 管	10.40 ± 4.39	6.57 ± 2.09	39.9
肺	6.25 ± 1.99	7.62 ± 3.69	54.9
心 臓	10.04 ± 3.51	1.93 ± 0.90	16.1
肝 臓	7.44 ± 3.11	4.89 ± 1.78	39.7
腎 臓	26.10 ± 5.75	17.61 ± 6.34	40.3
小 腸	7.82 ± 3.52	4.83 ± 1.89	38.2
筋 肉	8.01 ± 2.84	1.01 ± 0.58	11.2
脳	6.55 ± 2.34	1.21 ± 0.49	15.6

a) SMMX の未変化体, b) SMMX のアセチル体, c) 平均値±標準偏差

> 脳, 肺であった。特に, *B. bronchiseptica* の感染部位である鼻甲介における SMMX および Ac-SMMX の濃度は, それぞれ 7.09 および 6.98 $\mu\text{g/g}$ であった (表 10)。

(4) 考 察

本試験の結果から, 鼻甲介における SMMX は 7.09 $\mu\text{g/g}$ が分布することが明らかとなった。サルファ剤耐性 *B. bronchiseptica* の莢膜合成を阻止するには SMMX が 1.56 ~ 3.13 mg/L 以上の濃度が必要であるが, それ以上の濃度の SMMX が鼻甲介に分布することが示唆され, 薬物動態学的にも SMMX による莢膜合成阻止作用が *in vivo* でも十分生じることが推察された。

6. 謝 辞

本研究は, 著者が第一製薬(株)開発研究所特薬研究センターに所属していた時に実施したものである。本研究の遂行にあたり御指導と論文の御校閲

をいただいた当時の酪農学園大学大学院獣医学研究科平棟孝志教授, 梁川 良教授, 阿部光雄教授, 種池哲朗教授に深甚の謝意を表します。また, 御指導をいただいた当時の第一製薬(株)開発研究所特薬研究センター 館 裕センター長, 第一製薬(株)特薬開発部加藤正博部長, 傍士和彦博士に感謝の意を表します。さらに, 実験遂行上御協力をいただいた当時の第一製薬(株)開発研究所坂下昭夫氏をはじめ関係各位の皆様へ感謝の意を表します。

要 約

豚萎縮性鼻炎 (AR) 対策として主にサルファ剤とテトラサイクリン系が長年にわたり用いられており, サルファ剤に対する耐性菌が多く分離されるようになった。しかし, サルファ剤耐性の *B. bronchiseptica* が分離されるにもかかわらず, 臨床的あるいは病理的にサルファ剤の効果が認められる現象が多く見受けられる。著者は, スルファモノメトキシシ (SMMX) の存在下で培養したサ

ルファ剤耐性 *B. bronchiseptica* の莢膜が欠損する現象を偶然発見した。このことから、SMMX は *B. bronchiseptica* の I 相菌が豚の鼻粘膜上皮細胞への付着因子として重要な莢膜の合成を阻止する作用を有することが示唆され、一連の検討を加えたところ、次のことが明らかとなった。*in vitro* において SMMX の莢膜合成阻止作用は SMMX 耐性菌のみで生じ、その最小作用濃度は 1.56 ~ 3.13 mg/L であった。また、SMMX 耐性菌 (I 相菌) の人工感染豚において、SMMX 投薬群で AR 病変の抑制がみられ、かつ、鼻甲介粘膜上皮細胞における付着菌数の低下をきたしたことから、*in vivo* においても SMMX による莢膜合成阻止が示唆された。

また、豚に使用される 9 種のサルファ剤のなかで、化学構造的にピリミジン環およびピリダジン環に -OCH₃ 基 (MeO 基) を有するサルファ剤が *B. bronchiseptica* の莢膜合成を強く阻止するとともに、SMMX のように MeO 基を 1 個有するサルファ剤が最も強い活性を示すことが明らかとなった。さらに、薬物動態学的な面から SMMX の分布状況を調べた結果、豚の鼻甲介には 3.13 μg/g 以上の濃度で分布し、*in vivo* でも本剤による莢膜合成阻止作用が十分惹起されることを示唆する成績を得た。

引用文献

- 1) Ishikawa H, Isayama Y: *Bordetella bronchiseptica* phase variation induced by crystal violet. J Clin Microbiol, 23, 235-239 (1986)
- 2) Kuwano A: Inhibitory effect of sulfamonomethoxine on capsule antigen formation of *Bordetella bronchiseptica*. Zentralbl Veterinarmed B, 38, 685-688 (1991)
- 3) Kuwano A, Ito T, Tachi H: Comparison of the inhibitory effect of sulfamonomethoxine and other sulfonamides on the capsule formation of *Bordetella bronchiseptica*. J Vet Med Sci, 54, 1057-1059 (1992)
- 4) 桑野 昭, 舘 裕, 石井良和, 加藤正博: *Bordetella bronchiseptica* の莢膜抗原形成に及ぼすスルファモノメトキシンの影響. 日本獣医師会雑誌, 46, 463-468 (1993)
- 5) 尾形学監修: 豚の萎縮性鼻炎, 32-34, 文永堂, 東京 (1979)
- 6) 宇田庸子, 石川 整: サルファ剤の *Bordetella bronchiseptica* 菌体シアル酸特異的赤血球凝集素に対する影響. 滋賀県家畜保健衛生所業績発表収録集, 21-23 (1994)
- 7) Yokomizo Y, Shimizu T: Adherence of *Bordetella bronchiseptica* to swine nasal epithelial cells and its possible role in virulence. Res Vet Sci, 27, 15-21 (1976)

Inhibitory Effect of Sulfamonomethoxine on Capsule Antigen Formation of *Bordetella bronchiseptica*

Akira KUWANO

Tukuba Research Center, Hamri Co., Ltd., 2654-3, Osaki, Koga-shi, Ibaraki 306-0101, Japan

Bordetella bronchiseptica phase I organism possesses a capsule and has the ability to agglutinate with K antiserum, although phase III organism lacks both. The present study examined the effect of sulfamonomethoxine (SMMX) on capsule formation of *B. bronchiseptica*. The result are summarized as follows.

1. Three SMMX-resistant strains of *B. bronchiseptica* phase I organisms showed loss of agglutinability with K antiserum by culturing them at a higher concentration of 1.56 mg/L of SMMX. These results indicated that capsule formation of SMMX-resistant *B. bronchiseptica* is inhibited by SMMX.

2. SMMX in form of a feed added at the level of 500 ppm was administered consecutively from one day before bacterial inoculation to the day of autopsy, which was performed 11 and 25 days after bacterial inoculation. The SMMX-administered group showed distinct inhibition of bone atrophy of the concha nasalis (AR lesion) both macroscopically and electron microscopically, in contrast to the control group. Decrease in viable cell count of *B. bronchiseptica* in the concha nasalis was noted in the former group. The serum agglutination titer in the former group decreased to a low value. The capsule formation of SMMX-resistant *B. bronchiseptica* would thus appear to be inhibited in the presence of SMMX on the pigs concha nasalis, leading to inhibition of AR lesions.
3. The inhibitory effect of SMMX and other sulfonamides on the capsule formation of sulfonamide-resistant *B. bronchiseptica* was investigated. All the sulfonamides having MeO (-OCH₃) groups inhibited the capsule formation of *B. bronchiseptica*. Strong inhibition was obtained with SMMX. Inhibition was not seen with sulfonamides having no MeO groups.
4. The turbinate bone concentration of SMMX was about 7 μ g/g at Tmax of serum (4 hours after oral administration of 25mg/kg). On the other hand, the concentration of SMMX in serum continued high level until 6 hours after oral administration of SMMX. These results show that the concentration of SMMX in turbinate bone of pigs is higher than minimum inhibition capsule formation on SMMX-resistant *B. bronchiseptica*.

討 論 (座長：澤田拓士 日獣大)

質問 (原田和記, 日獣大)

B. bronchiseptica についてサルファ剤が莢膜合成阻止作用を有するというご発表内容であるが、莢膜を有する他の菌種でも同様の現象が起こりうる可能性があるかどうか、お考えがあれば聞きたい。

答 (桑野 昭)

まず薬剤については、サルファ剤以外の数種の系統の抗菌性物質でも試したが、特に効果は認められなかった。また、他の菌種についても検討する予定であったが、途中で断念した経緯がある。

質問 (澤田拓士, 日獣大)

①サルファ剤で莢膜形成が阻止された菌の毒素 (DNT) 産生性は、②他の菌で同様の現象 (作用) が認められたといった報告があるか、③本現象の遺伝

子解析などが行われたという報告等がありますか。

答 (桑野 昭)

他の菌で同様の現象 (作用) が認められたといった報告は見当たりません。また、本現象の遺伝子解析についても報告はありません。

もし、多剤耐性菌などが増えてきて、抗菌薬がほとんど効かない時代がきたとき、病原菌の病原性や毒素をなくす方法も対応策の一つとして考えるのがよいと思われる。

発言 (藤倉孝夫, 動物衛生研究所 OB)

莢膜を欠如した菌種としては *B. bronchiseptica* が知られており、現在でも弱毒ワクチン株としてアフリカ各地などで広く使われている。