

### 3. *Haemophilus parasuis* の薬剤感受性と プラスミドについて

森 腰 俊 亨 (伊藤忠飼料株式会社研究所)\*

*Haemophilus parasuis* は豚のいわゆるグレースー病の原因菌である。グレースー病は欧米では特に SPF 豚群に多発し、いったん発生すると甚急性の症状と高い死亡淘汰率を示す経済的被害の大きい疾病として知られている。しかし SPF 豚の普及率の低いわが国においては、コンベンショナル豚群における散発例の報告はあるものの、SPF 豚群の本病についてはあまり知られておらず、またわが国で分離される *H. parasuis* の詳細な性状も検討されていなかった。

先にわれわれは、わが国の SPF 豚群におけるグレースー病の発生例に遭遇し、発症再現試験と投薬による予防試験、そして分離された *H. parasuis* の性状について報告した<sup>9,10)</sup>。

本病の予防には不活化ワクチンが有効である<sup>13,14,15)</sup>。不活化ワクチンは欧米ではすでに市販されているが、わが国では 1992 年 8 月に製造が承認された段階にある。したがって、現状ではその予防は投薬に頼る部分が大きく本菌の薬剤感受性を知ることは重要である。一般的に本菌は多くの薬剤に感受性が高いといわれている。しかし、わが国で分離される *H. parasuis* の多数株について薬剤感受性を検討したのは加藤ら<sup>9)</sup>の、またプラスミドについては両角ら<sup>11)</sup>の報告以外に見当たらない。近年、数種の豚病原菌について薬剤耐性菌の存在や増加が報告されており、*H. parasuis* についても同様の現象が起きていることが懸念される。

そこでわれわれは、1987 年から 1989 年の間に

分離した多数の *H. parasuis* 分離株についてその薬剤感受性とプラスミドを検討し、いくつかの知見を得たので報告する。

#### 材料と方法

##### 1. 供試菌株

1987 年 10 月から 1989 年 11 月の間に、東北、関東および九州地方の 16 農場で飼育されていた発症豚、健康豚および輸入豚から分離した *H. parasuis* 計 174 株を供試した。分離部位別では鼻腔由来株が 111 株、病巣由来株が 63 株、PAGE 型別では PAGE-I 型菌が 74 株、PAGE-II 型菌が 100 株、血清型別では 1 型菌 4 株、2 型菌 9 株、4 型菌 24 株、5 型菌 15 株であり、残り 122 株は 1 から 5 型の抗血清と反応しなかった型別不能株であった。また、今回供試した株の中で 3 型に型別された株は無かった。

##### 2. 薬剤感受性試験

供試した薬剤は Table 1 に示した計 13 薬剤である。各分離株の薬剤感受性はおおむね家畜抗菌剤研究会標準法に準じ、寒天平板希釈法により最少発育阻止濃度 (MIC) を測定し決定した。しかし、 $\beta$ -NADH や血清を添加しても、感受性試験測定用培地上の *H. parasuis* の発育が非常に悪く判定が困難であったので、今回の測定では S 寒天培地<sup>7)</sup>を用いた。なお、同培地を用いるに先だって大腸菌 ML-1410 株とブドウ球菌 FDA-209P 株を用い、これらの菌で両培地の MIC 値に差が無いことを確認した。

菌の接種はマイクロプランター (佐久間製作所) でおこない、今回はカルバドックス (CBD) を含

\* 共同研究者: 園田昭浩, 林 哲, 増村忠宏, 平野 進 (伊藤忠飼料株式会社研究所), 小林一彦 (株式会社ミック), 神野太一, 大脇正治 (伊藤忠飼料株式会社防疫センター)

**Table 1** Drug susceptibility in 174 *H. parasuis* isolates to 13 kinds of antimicrobial drug.

Drug	Minimum inhibitory concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )												Break point of MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )
	$\leq 0.10$	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	$200 \leq$	
PCG	21 <sup>a</sup>	14	1	46	63	5	4	6			1	13	50
ABPC	21	13	8	40	60	10	4	1		1		16	50
SM						24	78	51	2		1	18	100
KM					2	52	88	25				7	50
GM				41	65	48	18	2					50
FM					7	28	79	46	7		1	6	100
TC				20	69	50	25	6	3			1	100
OTC					21	52	21	36	34	7	3	1	200
LCM				6			19	85	51	8		5	200
CBD				9	1	31	41	59	29	2	2		200
CP			95	70	5		1	2			1		6.25
CL		1	11	39	28	60	26	5	2	1		1	200
NA					78	64	17	10			2	3	50

<sup>a</sup> Number of strains.

むすべての薬剤について 37°C 24 時間好気培養後に判定し、Table 1 に示した break point 以上の MIC 値を示した菌株を当該薬剤に対する耐性菌と判定した。

電気泳動法により検出した。

## 成績

### 3. プラスミドの検出

S ブロース<sup>7)</sup>で 37°C 一夜培養し、集菌したものを出発材料とした。プラスミドは Kado and Liu<sup>8)</sup>の方法にしたがって抽出し、1% アガロースゲル

### 1. *H. parasuis* 分離株の薬剤感受性

*H. parasuis* 分離株 174 株の薬剤感受性試験成績を Table 1 に示した。MIC 分布曲線のピークはクロラムフェニコール (CP) では 0.39  $\mu\text{g/ml}$ 、ペニシリン (PCG)、アンピシリン (ABPC)、ゲン

**Table 2** Drug resistant patterns of 174 *H. parasuis* isolates.

Multiplicity of resistance	Drug											No. of strain
	PCG	ABPC	KM	FM	SM	LCM	OTC	TC	CL	CP	NA	
Quadruple	R <sup>a</sup>	R	R	R								2
			R	R	R	R						1
Triple	R					R	R					1
	R	R								R		1
Double					R	R					R	2
	R	R										10
Single			R	R								1
						R					R	1
									R		R	1
			R									3
					R							16
								R				1
										R		2
											R	1
	14	16	7	7	19	5	1	1	1	3	5	46

<sup>a</sup> Resistant to the drug.

タマイシン (GM), テトラサイクリン (TC) およびナリジクス酸 (NA) では  $1.56 \mu\text{g/ml}$ , オキシテトラサイクリン (OTC) およびコリスチン (CL) では  $3.13 \mu\text{g/ml}$ , ストレプトマイシン (SM), カナマイシン (KM) およびフラジオマイシン (FM) では  $6.25 \mu\text{g/ml}$ , リンコマイシン (LCM) および CBD では  $12.5 \mu\text{g/ml}$  を示した。OTC および CL に対する MIC 値は比較的広い範囲に分布した。 $\beta$ -ラクタム系の全 2 薬剤とアミノグリコシド系の 3 薬剤 (KM, FM および SM) の分布曲線は不完全ながら二峰性を示した。

分離株の薬剤耐性パターンを Table 2 に示した。合計 46 株 (26.4%) が何らかの薬剤に耐性と判定され, 4 剤耐性が 3 株, 3 剤耐性が 4 株, 2 剤耐性が 16 株に認められ, 残り 23 株は単剤耐性であった。また,  $\beta$ -ラクタム系 2 薬剤に対する耐性菌のうち 13 株とアミノグリコシド系の 2 薬剤 (KM および FM) に対する耐性菌のすべてがそれぞれの両薬剤に耐性であった。

## 2. *H. parasuis* 分離株のプラスミドについて

Table 3 に *H. parasuis* 分離株のプラスミド検出成績を, 既知の性状と比較して示した。少なくとも 5 農場由来の 9 株 (5.2%) が少なくとも 6 種類の比較的分子量の小さなプラスミドを保有していた。これら 9 株はすべて鼻腔由来の PAGE-I 型菌で, 血清型別不能株であった。また, 6 株は薬剤耐性菌であった。

## 考 察

*H. parasuis* は比較的多くの薬剤に感受性が高いといわれていた。しかし, 国内外を問わず多数の *H. parasuis* 菌株の薬剤感受性について検討した文献は見当たらない。阿部ら<sup>1)</sup>はグレーサー病豚から分離した 4 株についてディスク法で薬剤感受性試験を行い, これらの株は 10 薬剤に対して高度に感受性であったがスピラマイシンとバントラシンに耐性であり, また 1 株は SM に耐性であったと報告した。平澤ら<sup>3,4)</sup>は別々の症例から分離した計 5 株について薬剤感受性を調べ, これらは今回われわれが供試した 8 薬剤を含む 13 薬剤に高度に感受性であったと報告した。一方 Hannan ら<sup>2)</sup>は 2 株の *H. parasuis* についてキノロン系 6 薬剤と GM および OTC を含む 4 抗生物質に対する MIC を調べた。その結果キノロン系薬剤に対する MIC 値は  $0.25 \mu\text{g/ml}$  かそれ以下であり, また GM に対して  $1.0 \mu\text{g/ml}$ , OTC に対して  $2.0 \mu\text{g/ml}$  であったと報告した。

これらの報告と今回のわれわれの成績は方法が異なっており, 直接の比較はできないが今回の成績では予想以上に多剤耐性菌を含む多数の耐性菌が見いだされ, 耐性菌の増加が推察される成績となった。また, 野外で汎用されている  $\beta$ -ラクタム系およびアミノグリコシド系薬剤に対する耐性菌が多く交差耐性も認められたことから, 本病予防

Table 3 Properties of plasmid-mediated 9 strains in 174 *H. parasuis* isolates.<sup>1)</sup>

Farm	Strain no.	Mol wt of plasmid (Mdal)	Drug						
			PCG	ABPC	KM	FM	SM	LCM	NA
A	50	1.3	R <sup>a</sup>	R	R	R			
	60	4.3							
B	36	4.3			R	R			
	38	1.7, 4.3	E	R	R	R			
C	120	1.5, 1.9							
D	142	2.5					R	R	R
	143	2.5					R	R	R
E	182	1.9					R		
	183	4.3							

<sup>a</sup> Resistant to the drug.

<sup>1)</sup> All the 9 strains were derived from the nasal cavities of pigs, and belonged to PAGE type I and unknown serotypes other than 1 to 5.

のためには慎重な薬剤の選択が必要と考えられた。

われわれは先に、テトラサイクリン系薬剤で本病が良好に予防されることを報告した<sup>9)</sup>。今回の実験では TC および OTC に対する MIC 分布曲線のピークは比較的 low、また耐性菌も少なかった。この結果は、野外におけるテトラサイクリン系薬剤の効果を説明するひとつの理由になるものと考えられる。

つぎに両角ら<sup>11)</sup>は、*H. parasuis* 供試菌株の 27% に 7 および 10 Mdal のプラスミドが検出され、プラスミド保有株はすべて PAGE-I 型菌で血清型は 3 または型別不能株であったと述べた。この報告と比べ、今回のわれわれの成績ではプラスミドの検出率が低く、またプラスミドの分子量も小さいものであった。また、今回のわれわれの供試菌株には血清型 3 型菌は含まれていなかったの、3 型菌におけるプラスミドの有無については不明であった。しかし、今回の成績ではプラスミド保有株はすべて PAGE-I 型菌で血清型別不能株であり、この点については先の両角ら<sup>11)</sup>の報告と一致する成績であった。

病巣から分離される *H. parasuis* はほとんどが PAGE-II 型であり<sup>8,9,12)</sup>、また実験的にも PAGE-I 型菌より PAGE-II 型菌の方が病原性が強いといわれている。これまでプラスミドが検出されているのは PAGE-I 型菌のみであるので、したがって本菌の場合プラスミドは病原性と関係がないとする両角らの意見をわれわれも支持するものである。

一方、薬剤菌性の機序を知る目的でプラスミド保有株のプラスミド・プロフィールと薬剤耐性の関連を調べたが、明瞭な相関は認められなかった。よって、現在のところ本菌の薬剤耐性にプラスミドが関与している可能性は少ないものと考えられた。

最後に、本研究の実施にあたり貴重なご助言を頂いた農林水産省家畜衛生試験場の両角徹雄博士に深謝します。

## 文 献

1) 阿部民也, 岩崎正幸, 吉川恵郷ほか. 1982. *Hae-*

*mophilus parasuis* による豚 Glasser 病の発生例. 家畜衛生試験報告, 84: 13-17.

- 2) Hannan, P. C. T., O'Hanlon, P. J., and Rogers, N. H. 1989. *In vitro* evaluation of various quinolone antibacterial agents against veterinary mycoplasmas and respiratory bacterial pathogens. Res. Vet. Sci., 46: 202-211.
- 3) 平澤博一, 佐藤良彦, 両角吉三ほか. 1987. 化膿性線維索性髄膜炎を主徴とした豚の *Haemophilus parasuis* 感染症例. 日獣会誌, 40: 519-522.
- 4) 平澤博一, 佐藤良彦, 太田俊明ほか. 1985. 豚の *Haemophilus parasuis* 感染症の 1 例. 日獣会誌, 38: 802-805.
- 5) Kado, C. I., and Liu, S-T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bacteriol., 145: 1365-1375.
- 6) 加藤和好, 両角徹雄. 1977. *Haemophilus parasuis* および *Haemophilus parahaemolyticus* の抗生物質に対する試験管内感受性. 第 83 回日本獣医学会講演要旨, 42.
- 7) Kume, K., Sawata, A., and Nakase, Y. 1978. *Haemophilus* infections in chickens. 1. Characterization of *Haemophilus paragalinarum* isolated from chickens affected with coryza. Jpn. J. Vet. Sci., 40: 65-73.
- 8) Morikoshi, T., Kobayashi, K., Kamino, T., et al. 1990. Characterization of *Haemophilus parasuis* isolated in Japan. Jpn. J. Vet. Sci., 52: 667-669.
- 9) 森腰俊亨, 小林一彦, 神野太一ほか. 1988. SPF 豚のグレーサー病に関する研究 I—再現試験及び投薬による予防試験. 第 106 回日本獣医学会講演要旨, 168.
- 10) 森腰俊亨, 小林一彦, 神野太一ほか. 1988. SPF 豚のグレーサー病に関する研究 II—分離菌株の性状. 第 106 回日本獣医学会講演要旨, 169.
- 11) 両角徹雄, 竹内正太郎, 小林良則. 1987. *Haemophilus parasuis* の plasmid DNA について. 第 103 回日本獣医学会講演要旨, 115.
- 12) Nicolet, J., and Krawinkler, M. 1981. Polyacrylamide gel electrophoresis, a possible taxonomical tool for *Haemophilus*, pp. 205-212. In: *Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus* (Kilian, M., Frederiksen, W., and Biberstein, E. L., eds.), Academic Press, London.

- 13) Nielsen, R., and Danielsen, V. 1975. An outbreak of Glasser's disease, studies on etiology, serology and the effect of vaccination. Nord. Vet. Med., 27: 20-25.
- 14) Riising, H. J. 1981. Prevention of Glasser's disease through immunity to *Haemophilus parasuis*. Zbl. Vet. Med. B., 28: 630-638.
- 15) Smart, N. L., and Miniats, O. P. 1989. Preliminary assesment of a *Haemophilus parasuis* bacterin for use in specific pathogen free swine. Can. J. Vet. Res., 53: 390-393.

## Drug Susceptibility and Plasmid Profiles of *Haemophilus parasuis*

Toshimichi MORIKOSHI

(Research Laboratory of C. Itoh Feed Mill Co., Ltd.)

In vitro susceptibility to 13 antimicrobial drugs and plasmid profiles of 174 isolates of *Haemophilus parasuis* were examined. These strains were isolated from 1987 to 1989 from pigs reared at 16 farms in Tohoku, Kantoh and Kyushu districts in Japan. Of them, 46 (26.4%) strains were judged to be resistant to one or more kinds of drugs. In the drug resistant strains, 3 were quadruple resistant, 4 were triple, 16 were double and 23 were single. A typical cross resistance was observed in  $\beta$ -lactams (penicillin and ampicillin) and aminoglycosides (kanamycin and radiomycin). In 174 strains, 9 strains carried at least 6 kinds of small plasmid. All the plasmid-mediated strains were derived from nasal cavities of pigs, belonged to PAGE type I and unknown serotype.

From these results, it was suggested that the number of the drug resistant strains of *H. parasuis* tended to increase. And it is also suggested that the plasmids of *H. parasuis* did not control PAGE types and pathogenicity of the strains. On the other hand, a clear correlation between drug resistance and plasmid profiles was not recognized, so the mechanisms of the resistance were not elucidated in this study.

### 討 論 (座長: 沢田拓士)

質問 (阪野哲也, 全農家畜研)

2週間程度の抗菌剤投与で、以後の発症をも抑制しているがその機序は、投薬期間中に軽度な菌の感染をうけ、それにより産生される抗体により以後の発症が防御されていると考えてよいか。

答 (森腰俊亨)

投薬しても感染を防御できない。また、導入豚は CF 抗体 (-)→(+)になることによって質問の通りと考えられるが、導入豚の農場は Hps PAGE-I 型菌で汚染されている。よって CF では検出されない量の抗体を持っている可能性があり、抗体の量とともに質 (抗 PAGE-II 型抗体?) も大事ではないかと推察している。

質問 (沢田拓士, 日獣畜大)

- 1) 農場別で薬剤毎の MIC に差があるということで、きめ細かい対策をたてられておりますが、これは現在も続けられていますか。その効果は如何ですか。
- 2) PAGE-II 型菌は耐性株がありますか。II 型菌はプラスミドを持たないということですので、もし耐性であればこれはプラスミドによらないということですか。

答 (森腰俊亨)

- 1) 続けており、有効であります。
- 2) PAGE-II 型にも I 型菌と同様に耐性菌は有りますが、プラスミドを持っていないのでプラスミド性ではないと思います。