

## 2. *Actinobacillus pleuropneumoniae* 2 型菌の 薬剤耐性とプラスミド

川 原 一 芳 (北里研究所・細菌部)

*Actinobacillus pleuropneumoniae* は豚の線維素性胸膜炎の起因菌として知られている。本菌による胸膜炎は世界各地で発生しており、養豚経営に経済的被害を与える主要な豚病の一つとなっている。

国外では1980年代初期においてすでに本菌の薬剤耐性株の発生が報告されていた<sup>2,13)</sup>が日本国内ではこの時期、耐性株の分離は稀であった<sup>4,15)</sup>。ところが1984年を境にして国内においても耐性株が高頻度に分離されるようになってきた。現在では以前は見られなかった5型菌、1型菌の分離例が多く、これらの血清型菌から薬剤耐性株が高頻度に見つかっているが、1985~1986年においてはそれまでわが国の流行の主体となっていた2型菌に耐性株の出現がみられた。我々はこの時期に分離された *A. pleuropneumoniae* 2 型菌株についてその薬剤耐性を調べ、これらの多くがアミノグリコシド系抗生物質、テトラサイクリン (TC)、タイロシン、カルバドックス等に耐性を示す事、またこれらの薬剤に対する最小発育阻止濃度の分布が2峰性を示す事を見出した<sup>8,11)</sup>。これらの結果から我々はこれらの薬剤耐性が薬剤耐性プラスミドによるのではないかと考え、耐性株からのプラスミドの分離を試みた<sup>9)</sup>。

### 材料と方法

#### 1. 供試菌株と培養法

健康豚の鼻腔より分離した *A. pleuropneumoniae* 2 型菌のうち多剤耐性を示した12株を用いた。培養にはS培地<sup>10)</sup>を用い、液体培地は37°Cでの振盪培養、寒天培地の場合は37°C、5% CO<sub>2</sub>

存在下で培養した。

#### 2. プラスミドの分離

比較的温和な条件下でプラスミドを分離する目的で Kupersztoch-Portnoy らの方法<sup>12)</sup>を用いた。2lの培養液から集菌した後24mlの25% Sucrose 溶液に懸濁し、8本の遠心チューブに分注した。1本当たり1mlの0.25M EDTAと0.5mlのリゾチーム溶液を加えた後室温で5分間保持し、続いて0.2% TritonX-100, 4mlを加えることにより溶菌した。溶菌が起らない場合には20% TritonX-100, 1mlを追加し、60°C, 15分間加温した。なおこの条件ではすでにDNAの損傷が起るのでこの範囲内でなるべく温和に溶菌できるように菌株により加温温度と時間を調節した。溶菌液から菌体成分を除き、上清をポリエチレングリコール沈殿により濃縮し、常法に従って塩化セシウム-臭化エチジウム密度勾配超遠心分離を行ないプラスミドDNAを分取した。プラスミドバンドが検出されていない場合もプラスミドDNAがあると思われる画分を分取し、アガロースゲル電気泳動により確認した。

*E. coli* 形質転換体からのプラスミドの分離は Kado and Liu 法<sup>7)</sup>により行なった。

#### 3. 形質転換

形質転換実験は *A. pleuropneumoniae* についても *E. coli* などに広く用いられている通常法<sup>14)</sup>を適用した。0.03MのCaCl<sub>2</sub>で菌を処理し作成した受容菌に0.5μgのプラスミドDNAを加え、30分冷却した後に42°C, 3分間加温した。次にL-broth中で37°C, 90分間保温し、各薬剤プレ

ートにまいた。

#### 4. プラスミド脱落実験

プラスミド保有株を生育最大許容量のノボピオン (NB) を含む液体培地中で一晚培養し、プレートに移した。出現したコロニーをレプリカ法で薬剤プレートに移植し、感受性株を選択した。

### 結果

#### 1. プラスミド DNA の検出

実験に供した *A. pleuropneumoniae* 12 株のうち 2 株にプラスミド DNA が検出された。

そのうちの 1 つ、Hpn25 株は 3.7 kb と 4.1 kb の 2 種のプラスミド、およびその 2 量体と思われる 7.0 kb と 8.2 kb のプラスミドを保有していた (図 1, レーン 2)。

もう 1 つのプラスミド保有株 Hpn18 は 2.2 kb, 12 kb, 35 kb の 3 種のプラスミドを保有していた (図 1, レーン 4)。Hpn18 株のプラスミドは Hpn25 と比べて収量が悪かったが、これがプラスミドの不安定性によるものか、あるいはコピー数の違いによるものかは今のところ明らかではない。

#### 2. Hpn25 株のプラスミドと薬剤耐性

Hpn25 株はアンピシリン (ABPC), カナマイシン (KM), ストレプトマイシン (SM) およびスルホンアミド (SA) に対して耐性を示すので、これらの薬剤耐性とプラスミドとの関連性について調べた。

Hpn25 株のプラスミド DNA を用いて *E. coli* C600 株と *E. coli* JA221 株を形質転換したところ両株共に SM, SA 耐性の形質転換体が得られた。これらの形質転換体のプラスミド DNA を分

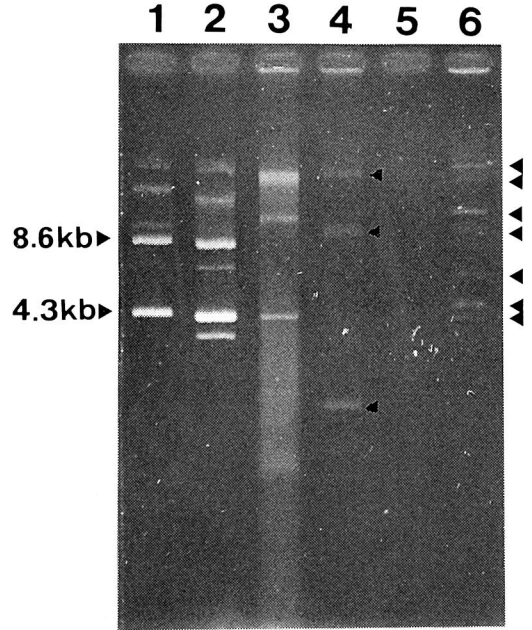


図 1 *A. pleuropneumoniae* Hpn25, Hpn18, およびその派生株のプラスミドパターン。

0.8% アガロースゲル電気泳動で分析。レーン 1, 分子サイズマーカー (pBR322); レーン 2, Hpn25, レーン 3, *E. coli* C600 Transformant; レーン 4, Hpn18; レーン 5, KD1; レーン 6, KD2。

析したところ、4.1 kb プラスミドが検出された (図 1, レーン 3 および表 1)。従って Hpn25 株の 4.1 kb プラスミドが本菌株の SM, SA 耐性に関与している事が明らかになった。

ABPC あるいは KM 耐性の形質転換体は得られなかったので、Hpn25 株を NB 処理し薬剤感受性株を選択した。その結果、ABPC 感受性株が 3 株得られ、これらのうちの 1 株を KD3 株とした。感受性株のプラスミド DNA を分析したところ、親株である Hpn25 株と全く同一のプラスミドパターンを示した (表 1)。これにより本菌株の

表 1 *A. pleuropneumoniae* Hpn25 株のプラスミドと薬剤耐性の関連性

菌 株	プラスミド (kb)	薬 剤 耐 性			
		ABPC	KM	SM	SA
<i>A. pleuropneumoniae</i> Hpn25	3.7, 4.1	r	r	r	r
<i>E. coli</i> C600	—	s	s	s	s
<i>E. coli</i> C600 Transformant	4.1	s	s	r	r
<i>A. pleuropneumoniae</i> KD3	3.7, 4.1	s	r	r	r

r: 耐性, s: 感受性

ABPC 耐性にはプラスミドが関与していないことが示された。

### 3. Hpn18 株のプラスミドと薬剤耐性

Hpn18 株は SM, テトラサイクリン (TC) およびクロラムフェニコール (CP) に対して耐性を示した。

Hpn18 株のプラスミド DNA を用いて *E. coli* の形質転換を試みたが, SM, TC, CP のいずれかに耐性となった形質転換体は得られなかった。

次に, Hpn18 株を NB 処理し上記薬剤に感受性を示す株を選択したところ, 3 剤に同時に感受性になった株が 10 株得られた。これらの感受性株はプラスミドを全くもたない株であった (図 1, レーン 5)。このうちの 1 株, KD1 を受容菌株として使用し, Hpn18 株のプラスミドを用いて形質転換 (プラスミドの再導入) を行なったところ SM と CP に対して耐性で TC に対しては感受性を示す株, KD2 が得られた。KD2 株のプラスミドを分析したところ, 元株である Hpn18 よりも高収量でプラスミド DNA が得られ, アガロース電気泳動では Hpn18 株のパターンとは異なる多くのプラスミドが検出された (図 1, レーン 6 および表 2)。これらのプラスミドのうち 12 kb と 35 kb のプラスミドに関しては Hpn18 株にみられるプラスミドと類似の分子量なので, 恐らくこれらのうちのいずれかが SM, CP 耐性に関与していると思われるがこれに関しては今後更に検討が必要であろう。

## 考 察

*A. pleuropneumoniae* の薬剤耐性株が高頻度で分離されるようになったのはわが国においては

1985 年以降であるが, 諸外国ではそれ以前から耐性株についての報告があり, 薬剤耐性プラスミドについてもすでに 1982 年に Hirsh らにより報告されている<sup>9)</sup>。彼らは ABPC と SA 耐性をコードする 3.6 Mdal のプラスミドと SM と SA 耐性をコードする 2.3 Mdal のプラスミドを見出ししており, 後者は分子量と耐性パターンの点で我々が Hpn25 株から分離した 4.1 kb プラスミドと類似している。これについては, 最近石井らにより両者の比較が行なわれた。それによると, 分子量, および制限酵素による切断パターンにおいて両者は全く一致した<sup>9)</sup>。一方, 井上らのグループにより台湾の分離菌株から見出されたプラスミド<sup>10)</sup>もこれらと同一のプラスミドであることが示された<sup>9)</sup>。これらの結果からこの SM, SA 耐性に関与する 4.1 Mdal のプラスミドは世界的に広く分布しており, それが 1985 年前後に日本に持込まれたものと推定された。

井上らのグループ<sup>10)</sup>, および石井ら<sup>9)</sup>はこれ以外にもいくつかの薬剤耐性プラスミドを見出しているがいずれも 10 kb 以下の比較的コピー数の高いものである。ところが我々が Hpn18 株に見出したプラスミドはコピー数も低く, またその分子機構は不明であるが形質転換により分子量の変化が観察された。もしも, *A. pleuropneumoniae* のプラスミドにこの種のプラスミドが多く存在するのであれば, 本菌のプラスミドの分離法およびその研究法を再検討する必要があるのではないだろうか。我々の研究以降 5 型菌および 1 型菌の分離頻度が高くなり, これらから高率で薬剤耐性株が見つかり, また新しい耐性プラスミドが分離されつつある (石井, 私信)。こうした点からも本菌のプラスミドを扱うための新しい実験系の開発が望まれるところである。

表 2 *A. pleuropneumoniae* Hpn18 株のプラスミドと薬剤耐性の関連性

菌 株	プラスミド (kb)	薬 剤 耐 性		
		SM	TC	CP
<i>A. pleuropneumoniae</i> Hpn18	2.2, 12, 35	r	r	r
<i>A. pleuropneumoniae</i> KD1	—	s	s	s
<i>A. pleuropneumoniae</i> KD2	4.1, 4.4, 6.5, 12, 15, 35, 40	r	s	r

r: 耐性, s: 感受性

## 要 約

1985年から1986年にかけてわが国で分離された多剤耐性を示す *Actinobacillus pleuropneumoniae* 2型菌のうち、2株からプラスミドが分離された。

そのうちの1株、Hpn25はアンピシリン (ABPC)、カナマイシン (KM)、ストレプトマイシン (SM)、およびスルホンアミド (SA) に耐性で3.7 kbと4.1 kbのプラスミドを保有していた。大腸菌を受容株に用いた形質転換実験で4.1 kbプラスミドがSMとSA耐性に関与していることが証明された。一方ノボビオン (NB) 処理により得られたABPC感受性株のプラスミドパターンには変化がなかったためABPC耐性はプラスミド支配ではないと推定された。

他の1株、Hpn18はSM、テトラサイクリン (TC)、およびクロラムフェニコール (CP) 耐性で2.2 kb, 12 kb, および35 kbのプラスミドを保有していた。NB処理によりプラスミドを除去した後、形質転換により再導入してやるとSMとCPに耐性で4.1 kb, 4.4 kb, 6.5 kb, 12 kb, 15 kb, 35 kb, および40 kbのプラスミドをもつ株が得られた。この結果より、SMとCP耐性はこれらのいずれかのプラスミドと関連していると思われるが、不明な点も多く再検討が必要である。

本菌のプラスミドには不安定で分子サイズの変化するものが時々みられるので、これらのプラスミドの研究には新しい実験系が必要であると思われる。

## 文 献

- 1) 阿保多佳子, 井上 玲, 野平紀夫ほか. 1984. *Haemophilus pleuropneumoniae* で見出された薬剤耐性プラスミドの大腸菌への形質転換について. 第98回日本獣医学会講演要旨: 154.
- 2) Gilbride, K. A. and Rosendal, S. 1984. Antimicrobial susceptibility of 51 strains of *Haemophilus pleuropneumoniae*. Can. J. Comp. Med. 48: 47-50.
- 3) Hirsh, D. C., Martin, L. D. and Libal, M. C. 1982. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Haemophilus pleuropneumoniae*. Am. J. Vet. Res. 43: 269-272.
- 4) Inoue, A., Yamamoto, K. and Hirano, N. et al. 1984. Drug susceptibility of *Haemophilus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs. Jpn. J. Vet. Sci. 46: 175-180.
- 5) Ishii, H., Nakasone, Y. and Shigehara, S. et al. 1990. Drug-susceptibility and isolation of a plasmid in *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. Jpn. J. Vet. Sci. 52: 1-9.
- 6) Ishii, H., Hayashi, F. and Iyobe, S. et al. 1991. Characterization and classification of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* plasmids. Am. J. Vet. Res. 52: 1816-1820.
- 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) Kawahara, K., Asano, A. and Nakai, T. et al. 1989. Antibiotic susceptibility of serotype 2 and 5 strains of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* isolated from swine from 1974 to 1986. Jpn. J. Vet. Sci. 51: 359-363.
- 9) Kawahara, K., Kawase, H. and Nakai, T. et al. 1990. Drug resistance plasmids of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 2 strains isolated from swine. Kitasato Arch. Exp. Med. 63: 131-136.
- 10) Kume, K., Sawata, A. and Nakase, Y. 1978. *Haemophilus* infection in chickens. 1. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolated from chickens affected with coryza. Jpn. J. Vet. Sci. 40: 65-73.
- 11) 久米勝巳. 1989. 豚へ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. 家畜抗菌剤研究会報 10: 7-11.
- 12) Kupersztoch-Portnoy, Y. M., Lovett, M. A. and Helinski, D. R. 1974. Strand and site specificity of the relaxation event for the relaxation complex of the antibiotic resistance plasmid R6K. Biochemistry 13: 5484-5489.
- 13) Libal, M. C. and Gates, C. E. 1982. Antimicrobial sensitivity patterns of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolated from pigs with pneumonia. J. Am. Vet. Med. Assoc. 180: 399.

- 14) Mandel, M. and Higa, A. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53: 159-162.
- 15) Shimizu, M., Kuninori, K. and Sakano, T. et al. 1982. Antibiotic susceptibility of *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* isolated from swine. *Jpn. J. Vet. Sci.* 44: 359-363.

## Drug Resistance and the Plasmids of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 2 strains

Kazuyoshi KAWAHARA

(Department of Bacteriology, The Kitasato Institute)

Plasmids were found in two of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 strains, which were isolated from 1985 to 1986 in Japan and showed multiple drug resistance.

One of them, Hpn25 was resistant to ampicillin (ABPC), kanamycin (KM), streptomycin (SM), and sulfonamides (SA), and harbored 3.7 and 4.1 kb plasmids. Transformation experiments using drug susceptible *E. coli* as a recipient strain proved that 4.1 kb plasmid was responsible for the resistance to SM and SA. ABPC susceptible strains were isolated by novobiocin (NB) treatment without changing the plasmid profile, suggesting that ABPC resistance was not plasmid-mediated.

Another strain, Hpn18, resistant to SM, tetracycline (TC), and chloramphenicol (CP), harbored 2.2, 12, and 35 kb plasmids. Hpn18 was cured of all these plasmids by NB treatment and the strains obtained were susceptible to all three drugs. Transformation of cured strain by using plasmid DNA of Hpn18 produced transformants, resistant to SM and CP, and harboring 4.1, 4.4, 6.5, 12, 15, 35, and 40 kb plasmids. These results suggested that SM and CP resistance was mediated by one or some of these plasmids, but further investigations are necessary to confirm the relation between drug resistance and plasmids of Hpn18 strain.

Since the plasmids of *A. pleuropneumoniae* were relatively unstable, and the alteration of molecular sizes sometimes occurred, more suitable tools and techniques are required for the study of these plasmids.

### 討 論 (座長: 中村政幸)

質問 (中村政幸, 動薬検)

本菌のプラスミドの分離が困難な理由は。

答 (川原一芳)

コピー数が少ないのも理由の1つだと思われるが、そ

れに加え、プラスミド自体が熱や薬剤処理に不安定なこと、菌体が溶けにくいこと、また、大腸菌内で安定な複製がされないものがある。すなわち、Host range がせいまい等の理由によると思われる。