

本邦で分離された Ampicillin 耐性 *Haemophilus influenzae* の性状について

生方公子・高橋洋子・紺野昌俊

帝京大学医学部小児科

(昭和53年4月3日受付)

## 緒 言

Ampicillin (ABPC) は, *Haemophilus influenzae* (以下 *H. influenzae* と略) 感染症に対し, 最もよく使用されている抗菌薬であるが, 1972 年頃から欧州や米国では, ABPC 耐性の *H. influenzae* が髄膜炎の患児から分離され始め, その治療上に重要な問題を提起し始めた<sup>1-7)</sup>。このような ABPC 耐性発現の機序を解明するため, 欧米の多くの研究者によって研究がなされ, 現在では *H. influenzae* の ABPC 耐性は plasmid 性であること, またそれらの耐性菌から産生される  $\beta$ -lactamase は, *E. coli* の ABPC 耐性菌から産生される  $\beta$ -lactamase の一部と非常に類似していること等が判明してきている。さらに最近では, *H. influenzae* の Chloramphenicol (CP), Tetracycline (TC) および Kanamycin (KM) に対する耐性菌の出現も問題になり始めている<sup>8-9)</sup>。

一方, 本邦においては, ABPC 耐性の *H. influenzae* は存在しないと極言する研究者もいる反面, ABPC 耐性と思われる *H. influenzae* が分離されたという学会報告も散見される。この真偽はともかくとして, 本邦では ABPC 耐性の *H. influenzae* は欧米ほどに分離頻度が高くなく, 且つ临床上重要な問題となっていないことは事実のようであり, 私たちも *H. influenzae* 感染症の患児に対して, ABPC の作用機序の上から生ずる使用上の隘路を除いては, ABPC 耐性の *H. influenzae* 感染症に関する治療上の困難というような経験は有していなかつ

た。

このように, 本邦で何故 ABPC 耐性の *H. influenzae* が少ないのかという疑問は極めて興味ある問題で, この疑問への第1の手掛りとして, 私たちも 1976 年から私たちが扱っている検体から分離された *H. influenzae* 菌<sup>10)</sup> 株に対する各種抗生物質の抗菌力や, 薬物の作用機序等について検討してきた。それらについては, 別に原著として発表する予定であるが, 収集した菌株の中から, ABPC 耐性の *H. influenzae* 1株を見出し, その菌の産生する  $\beta$ -lactamase の性状や plasmid についても調べ, 欧米でのそれらについての報告との比較を行なった。本邦で分離された ABPC 耐性の *H. influenzae* について, このような性質を調べた成績の報告は, 手許の文献を見る限りにおいては見当たらない。おそらく本邦における最初の成績と思われるので, 報告をしたい。

## 材 料 と 方 法

## 1. 使用菌株

ABPC 耐性の *H. influenzae* TK156 株は, 1977 年初期に小児の急性気道感染症の咽頭から分離されたもので, Difco 社製の *H. influenzae* 用型別抗血清を用いた成績では, 型別不能株であった。この株の ABPC に対する最小発育阻止濃度は, 原液接種, 100 倍希釈のいずれでも Table 1 に示したように 100  $\mu$ g/ml 以上であった。薬剤耐性の伝達実験の受容菌には, 手持の *H. influenzae* の中から, ABPC に感性の株を 5 株無作意に選び, それ

Table 1 Susceptibility of test cultures of *Haemophilus influenzae* to several antibiotics

Used strain		Type	Minimum Inhibitory Concentration* ( $\mu$ g/ml : inoculum about $10^8$ cells/ml)									
			ABPC	Mezlocillin	Pipera-cillin	Ticar-cillin	CBPC	SBPC	Cefat-rizine	CP	TC	KM
Donor	TK 156	U. T.	$\geq 100$	12.5	6.25	3.13	12.5	6.25	3.13	0.39	0.39	3.13
Recipi-ent	TK 007	U. T.	0.39	0.1	0.05	0.2	0.39	0.78	3.13	0.39	0.39	3.13
	TK 117	b	0.39	0.05	0.05	0.2	0.2	0.2	1.56	0.39	0.39	3.13
	TK 133	b	0.78	0.02	0.01	0.2	0.2	0.2	3.13	0.39	0.39	3.13
	TK 147	U. T.	0.78	0.1	0.05	0.39	0.2	0.2	1.56	0.39	0.78	1.56
	TK 151	U. T.	0.78	0.05	0.02	0.2	0.2	0.39	3.13	0.78	0.39	3.13

\* Tests were performed by agar dilution method using Heart infusion agar (plus 5% Fildes enrichment).

らの Nalidixic acid (NA) 耐性菌を試験管内継代培養により人工的に作製して用いた。なお、使用菌株の型別と各種抗菌薬に対する感受性は、Table 1 に示すとおりである。

## 2. 培地

増菌、薬剤耐性の脱落、および耐性伝達実験には、Bacto Tryptic Soy Broth (Difco) に Fildes enrichment (Difco) を 5% の割合に加えて使用した (以下この培地は TSBF 培地と略)。固型培地として使用する際は、TSBF 培地に 1.5% の割合に寒天を加えて用いた。plasmid DNA 解析のための合成培地は、以下に述べる CY medium を作製した後に Fildes enrichment を 5% の割合に加えて使用した。

### CY medium

A : $K_2HPO_4$	7.0 g	} 1,000 ml の蒸留水に 溶解して pH 7.2 に調 整した後、121°C で 15 分間高圧滅菌する。
$KH_2PO_4$	3.0 g	
$(NH_4)_2SO_4$	1.0 g	
$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$	0.5 g	
yeast extract	1.0 g	
カザミノ酸	2.0 g	

### B : $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g

10 ml の蒸留水に溶解後、ミリポアフィルター (GELMAN, GA-6, pore size 0.45  $\mu$ m) で濾過滅菌する。

### C : グルコース 4.0 g

10 ml の蒸留水に溶解した後 B と同様に濾過滅菌する。

使用直前に A 液 9.4 ml, B 液 0.1 ml および C 液 0.5 ml を無菌条件のもとに混合する。37°C に 18 時間静置し、無菌であることを確認した後に使用した。

## 3. $\beta$ -lactamase の分離および酵素活性の測定

TSBF 培地にて培養した TK 156 株を、対数増殖の初期に ABPC 50  $\mu$ g/ml の濃度で induce し、対数増殖の後期に遠心集菌した。同菌は 0.01M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で 1 度洗浄した後、同緩衝液に浮遊し、水冷しながら超音波破碎した。次いで 12,000 r. p. m. 30 分遠心した後、その上清を粗酵素として使用した。

酵素活性は PERRET<sup>10)</sup> の方法を modify した Macroiodometry 法により測定した。酵素活性 1 unit は、0.05 M のリン酸緩衝液 (pH 6.8) 中で、30°C、1 時間に Penicillin G (PCG) の 1  $\mu$  mole を水解する酵素量として表わした。なお、Kinetics は Microiodometry 法により測定した。

## 4. 薬剤耐性の除去

TSBF 培地で 37°C、18 時間培養した菌 1 ml を、acridine orange (Sigma) を 1/2 MIC の 25  $\mu$ g/ml 含む

TSBF 培地 10 ml に接種し、37°C で 1 昼夜培養後、その 1 ml をとり、同じ濃度の acridine orange を含む TSBF 培地に接種し、同様な操作をくり返して連続 1 週間培養した。その後、これらの菌を 10<sup>8</sup>/ml になるように希釈して TSBF 寒天培地に接種した。1 夜培養した後発育した colony を ABPC 10  $\mu$ g/ml 含有の TSBF 寒天培地と薬剤無含有培地に同時に画線塗抹し、耐性の脱落の有無を調べた。耐性が脱落したと思われる colony については、再度 TSBF 培地で培養後、寒天平板希釈法により正確に ABPC の MIC を測定した。

## 5. plasmid DNA の分離と電子顕微鏡による観察

TK 156 株および 4) の方法により ABPC 耐性を脱落させた TK/56E 株について、CY medium で 1 夜培養後、10 ml の CY medium にこれらの菌をそれぞれ 0.5 ml 接種し、37°C で 2 時間振盪培養した。次いで、DNA ラベルのために [<sup>3</sup>H]-thymidine (35 Ci/m mol; Amersham) を 10  $\mu$ Ci/ml と decyadenosine を 250  $\mu$ g/ml になるように加え、さらに 2 時間振盪培養した。終了後、冷却遠心によりただちに集菌し、TES buffer {0.05 M tris (hydroxymethyl) aminomethane, 0.05 M NaCl, 0.005 M ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), pH 8.0} で 3 回洗浄した。その後菌は 0.5 ml の TES buffer 中に懸濁し、0.5M と EDTA (pH 8.0) 0.2 ml と lysozyme (10 mg/ml) 0.1 ml を加えて、37°C に 10 分間保ち、次いで Briz 58 (70 mg/ml) 0.1 ml を添加して 37°C に 10 分間保ち、最後に Sarkosyl (250 mg/ml) を 0.1 ml 加えて完全に溶菌させ、粘稠な透明液とした。この溶菌液は、cesium chloride 6.9 g, ethidium bromide 700  $\mu$ g/ml : 2.0 ml, 蒸留水 : 4.0 ml, 溶菌液 : 1.0 ml となるようにして、日立 65P 超遠心機により、40,000 rpm, 20°C, 40 時間遠心した。超遠心後この試料は、0.1 ml ずつの分画として採取した。各分画の放射活性は、Aloka LSC-653 形液体シンチレーションにより測定した。電子顕微鏡用試料作製は、上記の方法によって、satellite DNA のピークが認められたものについて実施した。まず 10 倍に希釈した SSC 液 (0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate, pH 7.0) にて satellite DNA 分画を 24 時間透析する。次いで山岸<sup>11)</sup>の方法に準じて、パラジウム膜を張った grid 上に DNA を広げ、白金パラジウムのシャドーイングを施した後、日立 11E 型電子顕微鏡により観察および撮影を行なった。DNA の長さは、撮影したフィルムを 5 倍の大きさに引き伸ばし、map measure にて測定した。なお、plasmid DNA の分子量は、DNA の 1  $\mu$ m が 2.07  $\times$  10<sup>6</sup> dalton として計算した。

## 6. 薬剤耐性の伝達

まず donor としての ABPC 耐性 TK156 株と NA 耐性を付加された recipient 菌株は、それぞれ TSBF 培地 10 ml 中に 0.5 ml ずつ単独に接種され、37°C で 4 時間振盪培養された。次に、donor と recipient を 1 : 1 になるようによく混合し、millipore filter を通して菌を filter 上に固定するようにした。この filter は、TSBF 寒天培地上に背面を培地上に密着するようにしておき、6 時間あるいは 18 時間 37°C 中で保存した。その後この filter は TSBF 培地 5 ml の中に入れ、ミキサーで強く攪拌して菌を遊離させた。そして、遠心の後もう 1 度 TSBF 培地で洗浄した後 ABPC 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と NA 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を同時に含む選択培地に接種した。37°C、48 時間培養後、生じた colony をさらに耐性を確認するために、ABPC と NA を含有する培地上に replicate した。

### 結 果

#### 1. TK 156 株から分離した $\beta$ -lactamase について

TK 156 株から分離された  $\beta$ -lactamase による各種 Penicillin (PC) 系および Cephalosporin 系抗菌薬の基質特異性は Fig. 1 に、また一部の抗菌薬についての  $V_{\max}$  および  $K_m$  値は Table 2 に示した。PCG の加水分解率を 100 として表わすと、PC 系抗菌薬の中では ABPC (128), Mezlocillin (119), Piperacillin (118), Amoxycillin (AMPC; 110) の順で PCG 以上に水解されるが、Carbencillin (CBPC; 17.5) や Sulbenicillin (SBPC; 6.6) はやや低い被水解率を示した。penicillinase (PCase) 耐性半合成 PC の Cloxacillin (MCIPC) や Oxacillin (MPIPC) はほとんど水解されず極めて安定であった。Cephalosporin 系抗菌薬の中では Cephazolidine (CER), Cefazolin (CEZ) および Cephalexin (CEX) に

Fig. 1 Relative rates of hydrolysis of various  $\beta$ -lactam antibiotics by penicillinase isolated from *H. influenzae* TK 156

\* The rate of hydrolysis was determined at 30°C in 0.05 M phosphate buffer (pH 6.8) with a substrate concentration of 8 mM.

\*\* Not detected

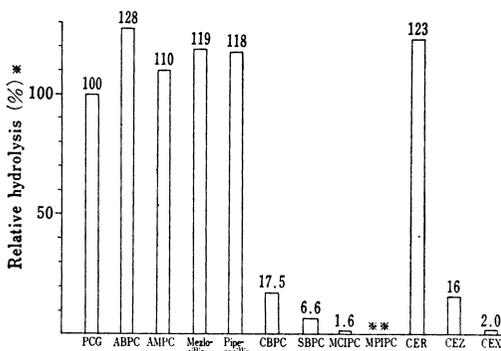


Table 2 Kinetics for hydrolysis of several  $\beta$ -lactam antibiotics by penicillinase isolated from *H. influenzae* TK 156

Substrate	$V_{\max}$	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )
PCG	1.00	41.6
ABPC	1.87	47.6
CER	0.59	526

$K_m$  values were measured by Micro-iodometric method.

Table 3 Elimination of ABPC resistance from *H. influenzae* TK 156

Acridine orange	No. of colonies tested	ABPC susceptible colonies
without treatment	1,200	0
with treatment for a week*	1,120	716 (63.9%)

\* Elimination test was undertaken to cure the cells bearing the resistance markers by daily transfers for a week in Tryptic Soy Broth (plus 5% Fildes enrichment) supplemented with 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  acridine orange.

ついて検討したが、その中では CER が ABPC と同程度に水解された。CEZ と CEX は比較的安定であった。上記の基質特異性の点から、TK 156 株から分離された  $\beta$ -lactamase は、L 型 PCase に属する TEM 型であろうと推測された。

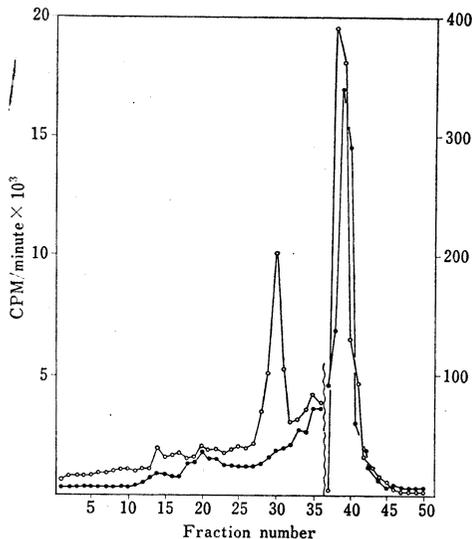
#### 2. TK 156 株からの ABPC 耐性の脱落

TK 156 株について acridine orange 処理による薬剤耐性の脱落を調べた成績は、Table 3 に示した。なお、この実験には、当初 ethidium bromide で処理することにより、耐性の脱落の有無を検討したが、耐性の脱落は全く認められず、次に acridine orange で 1 回処理したが、耐性の脱落は認められないので、このような長期間処理の方法を採用したものである。acridine orange 無処理で 1 週間植え継いだ場合には、耐性の脱落は認められなかったが、1/2 MIC 濃度の acridine orange 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を加えた培地で 1 週間にわたって毎日植え継ぐと、表の下端に示したように、約半数の colony で ABPC 耐性の脱落が認められた。耐性脱落後の colony に対する ABPC の MIC は、感性菌と全く同じく、 $10^6/\text{ml}$  の菌接種で 0.39  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。

#### 3. plasmid DNA の分離

TK 156 株および TK 156 株から ABPC 耐性を脱落させた TK 156 E 株の 2 株について、実験方法の項に述べた順序に従って plasmid DNA を抽出した。得られた成績は Fig. 2 に示したが、ABPC 耐性の TK 156 株では、

Fig.2 Ethidium bromide-CsCl density gradient centrifugation of DNA from strains of *H. influenzae*. Cells were grown into logarithmic phase in defined medium (CY medium) in the presence of [ $^3\text{H}$ ] thymidine. Radioactive cultures were lysed and analyzed separately on ethidium bromide-cell gradients. Symbols: (○) DNA from strain TK 156 (ABPC resistant); (●) DNA from strain TK 156 E (ABPC-susceptible variant of TK 156). Note the change of scale between fractions 36 and 37 in each case.



核 DNA とは別に明瞭な satellite peak が認められ、plasmid DNA の存在が示唆された。耐性脱落の TK 156 E 株ではそれに匹敵する satellite peak は認められなかった。また対照とした TK 117 株でもこのような satellite peak は認められなかった。

さらに、TK 156 株で見られた satellite peak 部分の DNA を電子顕微鏡により観察し、代表的な plasmid DNA 分子を Fig.3 に示した。また観察した DNA 分子のうちから無作為に 20 個を選び、環状分子としての大きさを測定した。結果は Table 4 に示したが、DNA 分子の長さは  $14.8 \pm 0.58 \mu\text{m}$  であり、この DNA の長さから推測される分子量は、 $1 \mu\text{m}$  を  $2.07 \times 10^6$  dalton とすると、 $30.6 \times 10^6$  dalton と換算された。

この実験は 3 回繰返しているが、この 3 回の実験において、核 DNA に対する satellite DNA の割合はほぼ同じで、平均 2.6% であり、このことから GILLIS 等<sup>12)</sup>の成績による *H. influenzae* の核 DNA  $1.66 \times 10^9$  dalton を基に、細胞あたりの plasmid DNA の数を計算すると 1.4 個となった。なお、この ABPC 耐性を有する pla-

Table 4 Contour length and estimated molecular weight of plasmid from ABPC-resistant *H. influenzae* TK 156

No. of measured	Mean length ( $\mu\text{m}$ ) SD*	Estimated molecular weights**
20	$14.8 \pm 0.58$	$30.6 \times 10^6$

\* SD, Standard deviation

\*\* Molecular weights of the plasmids were calculated by assuming  $1 \mu\text{m}$  of DNA to be equivalent to  $2.07 \times 10^6$  daltons.

smid は、pTK 156 と名付けた。

#### 4. ABPC 耐性の伝達

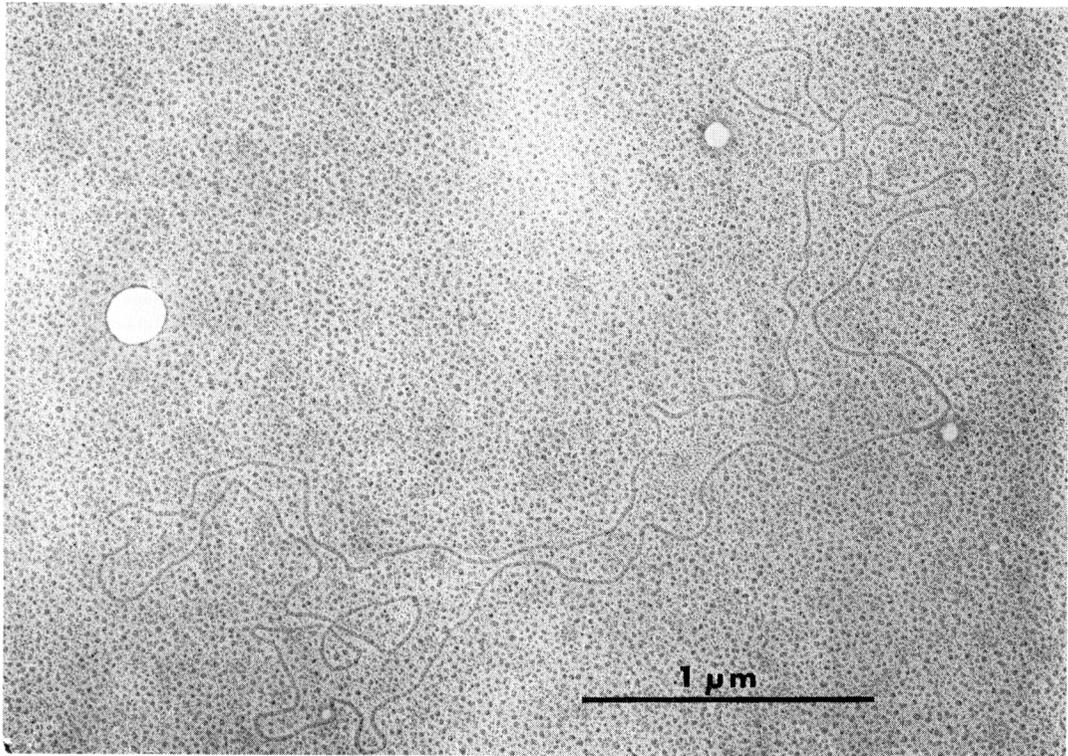
TK 156 株を donor とし、Table 1 に示した感性菌に NA 耐性を付加した菌を recipient として、混合培養により ABPC 耐性の伝達の有無を検討したが、耐性の伝達は成功しなかった。すなわち、filter 上での混合培養後に、1 度菌を洗浄して選択培地に塗布し、 $37^\circ\text{C}$  にて 48 時間培養した時点では、確かに  $10^{-5}$  程度に菌の発育は認めるのであるが、その菌を pick up し、さらに抗菌薬含有の選択培地に replicate すると、それらの菌はまったく発育が認められなくなってしまった。このような現象は、recipient に *E. coli* W 3104 (Rifampicin 耐性)、J 56 (NA 耐性) および *Pseudomonas aeruginosa* ML 4262 を用いた際も同様で、一見  $10^{-5} \sim 10^{-6}$  の頻度で伝達したようにも見えたが、colony の出現が一樣ではなく、replicate すると、ABPC 耐性を獲得したと思われる株は 1 株も認められなかった。

なお、この実験の初期には、recipient として *H. parainfluenzae* をも用いたが、*H. parainfluenzae* は液体培地中で菌塊を形成しやすく、また conjugation 後、*H. parainfluenzae* だけが生えるように培地を調整しても、donor の菌が培地上に発育の悪い極めて微細な colony として残っているため、完全に *H. parainfluenzae* だけを単離することは不可能であり、一見耐性が伝達されたようにも見えるが、実は donor の産生する  $\beta$ -lactamase による影響と考えられた。本実験に filter を用いたのは、何回か実験を繰返しても耐性の伝達を確認できなかったため、donor と recipient の接触頻度をより高めたかったからである。

#### 考 察

*H. influenzae* 感染症に対する治療としては、各種抗菌薬の抗菌力の点から、あるいは薬物の毒性の面から、ABPC が第 1 選択の薬物として使用されてきた。しかし、欧米で ABPC に耐性を示す *H. influenzae* が分離されるようになり、とくに小児科領域で、化膿性髄膜炎から分離される type b の *H. influenzae* に ABPC 耐性菌が

Fig. 3 Electron micrograph of extrachromosomal DNA from *H. influenzae* TK156. Bar represents 1  $\mu$ m.



見出されたことにより、にわかに注目を集め始めた<sup>1-7)</sup>。THORNSBERRY 等<sup>13)</sup>によれば、髄液や血液から分離される ABPC 耐性菌は、圧倒的に type b が多く、呼吸器や耳漏からは untypable の耐性菌が多いとも報告されている。

一方、本邦においては、ABPC 耐性の *H. influenzae* は 1977 年まではほとんど問題となっておらず、一部に耐性菌が見出されたという学会報告もあったが、その菌が確実に耐性菌であるという証明はまったくなされていなかった。事実、私たちは 1977 年に数例の *H. influenzae* による化膿性髄膜炎を経験したが、起炎菌は幸いにもすべて type b の ABPC 感性菌であった。しかし、1973 年から 1974 年にかけての ABPC 消費量の急速な伸びから推測しても<sup>14)</sup>、本邦に ABPC 耐性の *H. influenzae* がまったく存在しないとは考え難い。そこで私たちは、それらを明らかにする目的で、1976 年の後半から 1977 年にかけて、臨床材料から分離される *H. influenzae* の収集を開始した。収集した菌数の抗菌薬感受性やその他の基礎的検討に関しては、別に原著として発表の予定であるので、ここでは省略するが、それらの株の中には、新鮮分離当初は ABPC に耐性を示すと思われる株も数% 以内の頻度で存在したが、確認のための 2~3 代の継代で耐性は脱落し、明らかに ABPC に安定した耐性を示す

菌株は 1 株であった。この株は、小児の急性気道感染症の患児の咽頭から分離された菌であり、型別では untypable であった。

分離当初 ABPC 耐性であっても、2~3 代の継代で耐性を脱落する菌株についての問題は、いずれ改めて報告したいと考えているが、それはさておき、私たちが分離した安定な ABPC 耐性菌の耐性機作が、今まで欧米の多くの研究者によって報告されてきたものと、同一の機構によるものなのか否かという点について、先づ解明したいと考えたのである。欧米で分離された耐性菌は、分離当初から  $\beta$ -lactamase 産生能を有することが指摘されていたが<sup>7)13)15)</sup>、その後の研究により、この不活化酵素の型は、PCase III 型に属する TEM 型であることが明らかになっている<sup>16)17)</sup>。私たちが分離した ABPC 耐性菌 TK 156 株についての成績でも、この菌の産生する  $\beta$ -lactamase は、欧米のそれらと同じように、基質特異性の点から、PCase III 型に属する TEM 型の不活化酵素であることが明らかにされた。

さらに、この ABPC 耐性は、acridine orange 処理により脱落することが判明し、またこの ABPC 耐性菌と ABPC を脱落させた菌株等を用いての plasmid DNA の分離および解析によって、ABPC 耐性因子は分子量  $30.6 \times 10^6$  dalton の環状 DNA 中に存在していることがほぼ

証明されたと考える。欧米での今までの報告によれば、ABPC 耐性の *H. influenzae* には ABPC 耐性遺伝子がのった plasmid DNA は 2 種類あることが判っている。ひとつは  $30 \times 10^6$  dalton 前後の環状 DNA であり<sup>18-20</sup>、もうひとつは  $3 \times 10^6$  dalton 程度の小さい環状 DNA である<sup>18)19)21)</sup>。大きいほうの DNA には、腸内細菌の R 因子上に存在する ABPC 耐性遺伝子 (TnA) 部位<sup>22)23)</sup>が完全に含まれていることが明らかになっているが、小さいほうの DNA には TnA 部位の 1/3 だけしか含まれていないといわれている<sup>18)19)</sup>。私たちが ABPC 耐性の TK 156 株から見出した環状 DNA の pTK 156 は、分子量からして前者の大きい plasmid DNA に属するものであろうと推測されるのである。

ただ、彼等の報告にある  $30 \times 10^6$  dalton の DNA と、私たちが見出したほぼ同じ大きさの環状 DNA との相違は、彼等のそれは腸内細菌の場合と同様に、conjugation によって *H. parainfluenzae* や *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* 等へ ABPC 耐性の伝達が可能であると報告していることであり<sup>16)20)21)24)25)</sup>、私たちの実験では、conjugation による ABPC 耐性の伝達は成功しなかったことである。彼等の報告によれば、conjugation による耐性の伝達頻度は  $10^{-5} \sim 10^{-6}$  程度で、必ずしも低い頻度ではないということであるが、一面非常に不安定であるらしく、薬剤存在下でないとも耐性が脱落し易いと報告している。そして、それらの報告を詳細に検討すると、conjugation によって得られた ABPC 耐性株を用いては、不活化酵素を証明している報告があるだけで<sup>16)21)</sup>、DNA の解析等はほとんどの場合 transformation によって ABPC 耐性を獲得した菌を用いて行なっている。腸内細菌のように、conjugation によって耐性が容易に伝達するとなれば、临床上においても耐性菌が急速に増加することも予想され、この点については、私たちは繰返し何回も検討を重ねた。recipient には *H. parainfluenzae*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, さらには NA 耐性を付加した *H. influenzae* をも作製して種々の検討を試みたが、結果の項で述べたとおり、実験は常に一見、 $10^{-5} \sim 10^{-6}$  の頻度で ABPC 耐性を伝達し得るように見えるのであるが、replicate した colony からは、conjugation によって ABPC 耐性を確実に伝達するという実証を得ることはできなかった。

私たちの用いた TK 156 株の ABPC 耐性遺伝子が、 $30 \times 10^6$  dalton 前後の plasmid DNA に存在すると考えられるにもかかわらず、conjugation による伝達が不可能であった点については、いくつかの推測が可能である。ひとつには耐性伝達に関与している遺伝子の一部が欠損している可能性が考えられ、もうひとつには、recipient

が適当でなかったということもあるが、少なくとも、recipient に関しては十分な検討を加えたつもりである。一方、今までに欧米での報告にあった conjugation に関する data について考察すると、彼等は conjugation により ABPC 耐性は伝達するとしながらも、その incompatibility に関する報告は手許の文献からは見出すことができず、この点については多少の疑問がある。conjugation による ABPC 耐性の伝達の有無については、できればさらに耐性菌分離株を加えて再検討したいと考えている。

以上、私たちが本邦において分離した、ABPC 耐性の安定な *H. influenzae* について、その耐性の性状について、不活化酵素や plasmid DNA の面などからその特徴を述べてきたが、これはおそらく本邦において分離された ABPC 耐性 *H. influenzae* について、詳しく性状を調べた第 1 報と思われるので、とくに注意を喚起する意味もあって報告した次第である。私たちが分離した ABPC 耐性の plasmid DNA pTK 156 について残された検査は、transformation による耐性遺伝子の伝達についての検討であるが、これは前述した conjugation による耐性の伝達の有無とあわせて検討したいと考えている。

#### 要 約

1977 年に帝京大学医学部付属病院小児科外来を訪れた急性気道感染症の患児の咽頭から分離された ABPC 耐性の *H. influenzae* TK 156 株について、 $\beta$ -lactamase 産生性、plasmid DNA の存在の有無、耐性の伝達等を検討し、考察を行なった。

1. TK 156 株は、Ⅲ型 penicillinase に属する TEM 型の  $\beta$ -lactamase を産生する。

2. TK 156 株の ABPC 耐性は、 $25 \mu\text{g/ml}$  の acridine orange で 1 週間処理することにより 63.9% が脱落した。

3. TK 156 株とこの株から耐性を除去した TK 156 E 株について、plasmid DNA の解析を行なったが、耐性菌だけに satellite DNA が認められ、電子顕微鏡により長さ  $14.8 \pm 0.58 \mu\text{m}$ 、分子量  $30.6 \times 10^6$  dalton の環状 DNA (pTK 156) が確認された。従って TK 156 株の ABPC 耐性はプラスミド性のものであることが推測された。

4. TK 156 株を donor とし、*H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* を recipient にした場合の conjugation による耐性伝達実験は陰性結果に終わった。

5. これらの ABPC 耐性の性状について、欧米での *H. influenzae* の ABPC 耐性のそれとの比較を文献的な考察の上から行なった。

## 引用文献

- 1) THOMAS, W. J. ; J. W. MCREYNOLDS, C. R. MOCK & D. W. BAILEY: Ampicillin resistant *Haemophilus influenzae* meningitis. Lancet 1 : 313, 1974
- 2) TURK, D. C. : Ampicillin resistant *Haemophilus influenzae* meningitis. Lancet 1 : 453, 1974
- 3) PRICE, E. & P. A. BOSWELL : Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Lancet 1 : 936~937, 1974
- 4) WILLIAMS, J. D. & P. CAVANAGH : Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* meningitis. Lancet 1 : 864, 1974
- 5) GUNN, B. A. ; J. B. WOODALL, J. F. JONES & C. THORNSBERRY : Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Lancet 2 : 845, 1974
- 6) TOMEH, M. O. ; S. E. STARR, J. E. MCGOWAN, P. M. TERRY & A. J. NAHMAS : Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b infection. J. Am. Med. Assoc. 229 : 295~297, 1974
- 7) KHAN, W. ; S. ROSS, W. RODRIGUEZ, G. CONTRONI & A. K. SAZ : *Haemophilus influenzae* type b resistant to ampicillin. A report of two cases. J. Am. Med. Assoc. 229 : 298~301, 1974
- 8) KLINGEREN, VAN B. ; J. D. A. VAN EMBDEN & M. DESSENS-KROON: Plasmid mediated chloramphenicol resistance in *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents & Chemoth. 11 : 383~387, 1977
- 9) DANG, VAN A. ; F. GOLDSTEIN, J. F. ACAR & D. H. BOUANCHAUD : A transferable kanamycin resistance plasmid isolated from *Haemophilus influenzae*. Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, Ser. A 126 : 397~399, 1975
- 10) PERRET, C. J. : Iodometric assay of penicillinase. Nature 174 : 1012~1013, 1954
- 11) 山岸秀夫 : 電子顕微鏡による核酸分子の構造解析とその進歩, 生化学実験講座 2, 核酸の化学 I, 東京化学同人
- 12) GILLIS, M. ; J. DE LEY & M. DE CLEENE : The determination of molecular weight of bacterial genome DNA from renaturation rates. Eur. J. Biochem. 12 : 143~153, 1970
- 13) THORNSBERRY, C. ; C. N. BAKER, L. A. KIRVEN & J. M. SWENSON: Susceptibility of ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* to seven penicillins. Antimicrob. Agents & Chemoth. 9 : 70~73, 1976
- 14) 藤井良知 : 日本における各種抗生物質の使用現況とその問題点. Chemotherapy 25 : 418~423, 1977
- 15) FARRAR, W. E. & N. M. O'DELL: Beta-lactamase activity in ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents & Chemoth. 6 : 625~629, 1974
- 16) SYKES, R. B. ; M. MATTHEW & C. H. O'CALLAGHAN : R-factor mediated  $\beta$ -lactamase production by *Haemophilus influenzae*. J. Med. Microbiol. 8 : 437~441, 1975
- 17) MEDEIROS, A. A. & T. F. O'BRIEN : Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b possessing a TEM-type lactamase but little permeability barrier to ampicillin. Lancet 1 : 716~718, 1975
- 18) ELWELL, L. P. ; J. D. GRAAFF, D. SEIBERT & S. FALKOW: Plasmid-linked ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* type b. Infect. Immun. 12 : 404~410, 1975
- 19) GRAAFF, J. D. ; L. P. ELWELL & S. FALKOW : Molecular nature of two beta-lactamase-specifying plasmids isolated from *Haemophilus influenzae* type b. J. Bact. 126 : 439~446, 1976
- 20) RAUFS, R. & P. M. KAULFERS : Molecular characterization of a plasmid specifying ampicillin resistance and its relationship to other R factors from *Haemophilus influenzae*. J. Gen. Microbiol. 103 : 277~286, 1977
- 21) SAUNDERS, J. R. & R. S. SYKES : Transfer of a plasmid-specified beta-lactamase gene from *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents & Chemoth. 11 : 339~344, 1977
- 22) HEFFRON, F. ; C. RUBENS & S. FALKOW: Translocation of a plasmid DNA sequence which mediates ampicillin resistance : Molecular nature and specificity of insertion. Proc. Nat. Acad. Sci. 72 : 3623~3627, 1975
- 23) HEFFRON, F. ; R. SUBLETT, R. W. HEDGES, A. JACOB & S. FALKOW: Origin of the TEM beta-lactamase gene found plasmids. J. Bact. 122 : 250~256, 1975
- 24) THORNE, G. M. & W. E. FARRAR : Transfer of ampicillin resistance between strains of *Haemophilus influenzae* type b. J. Infect. Dis. 132 : 276~281, 1975
- 25) EICKHOFF, T. C. ; J. M. EHRET & R. D. BAINES : Characterization of an ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b. Antimicrob. Agents & Chemoth. 9 : 889~892, 1976

## CHARACTERIZATION OF AN AMPICILLIN-RESISTANT STRAIN OF *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* ISOLATED IN JAPAN

KIMIKO UBUKATA, HIROKO TAKAHASHI and MASATOSHI KONNO

Department of Pediatrics, School of Medicine, Teikyo University

An ampicillin-resistant strain TK 156 of *Haemophilus influenzae*, isolated from pharynx of a patient with acute respiratory infection at Teikyo University Medical School Hospital in 1977, was examined for the  $\beta$ -lactamase production, plasmid DNA and the transferability of drug resistance, and attempted some discussion on these subjects.

1. The strain TK 156 produces TEM type  $\beta$ -lactamase of the group of Type III penicillinase.
2. Ampicillin resistance of the strain TK 156 was eliminated for 63.9% of the total cells when treated with 25  $\mu$ g/ml acridine orange for 1 week.
3. TK 156 and TK 156 E (ampicillin-susceptible variant of TK 156) strains were examined for the presence or absence of plasmid DNA. The strain TK 156 contained  $30.6 \times 10^6$  dalton plasmid DNA, but TK 156 E did not contain satellite DNA. From this finding, it was strongly suggested that the ampicillin-resistant gene of TK 156 strain was located on plasmid.
4. In the transfer experiment of drug resistance by conjugation with TK 156 strain as a donor and ampicillin-sensitive strains of *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* as recipients, resistance transfer failed to take place.
5. The aforesaid characteristics of ampicillin resistance of the strain TK 156 were compared with those of ampicillin resistance of *H. influenzae* reported in Western countries.