

Bacteroides fragilis の clindamycin および tetracycline 耐性の伝達に関する研究

渡辺邦友・梅村厚志・上野一恵
岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設

(昭和 59 年 5 月 16 日受付)

臨床由来の clindamycin (CLDM), tetracycline (TC) 耐性の *Bacteroides fragilis* 4 株から CLDM, TC 感受性の *B. fragilis* への CLDM, TC 耐性伝達実験を行ない、さらにその耐性伝達における plasmid の関与の有無およびその耐性伝達様式について検討し次の結果を得た。

1) 供与菌 4 株は、CLDM, TC 耐性の両方またはいずれか一方をフィルター交配法で受容菌に伝達した。4 株中 3 株では、CLDM, TC 耐性の解離伝達が認められたが、1 株では認められず、両薬剤耐性は常に連関して伝達された。また TC による供与菌の前処理は、TC 耐性伝達頻度を上昇させた。

2) 供与菌 4 株には、1.8 Mdalton から 35.8 Mdalton 程度の複数の plasmid bands が認められたが、それら供与菌と、plasmid を保有しない受容菌との交配で得られた耐性伝達株の plasmid 分析では、CLDM 耐性伝達と関連する plasmid の存在を証明できなかった。また plasmid をもたない耐性伝達株が、別の受容菌にその耐性を伝達する現象を認めた。

3) これら *B. fragilis* 間における CLDM, TC 耐性の伝達は、その伝達に cell to cell contact が必要であることから conjugation like process でおこっていることが強く示唆された。

著者らは、すでに、我が国で分離され当施設に保存されている clindamycin (CLDM), erythromycin (EM), josamycin (JM) と tetracycline (TC) のすべてに耐性を示す臨床材料由来の *Bacteroides fragilis* 24 株のうち 15 株は CLDM と TC 耐性の両方またはいずれか一方を *B. fragilis* と近縁の *B. thetaiotaomicron* へ伝達できることを報告した¹⁾。この伝達はフィルター交配法によって行なわれた。また 15 株中 2 株を用いて行なったエチジウムブロマイドによる耐性の脱落の試みは不成功に終わった。1981 年頃 PRIVITERA ら²⁾と WELCH ら³⁾はそれぞれ別個にフランスで分離された CLDM, TC 耐性の *B. fragilis* から pIP 410, pBF 4 と名付けられた CLDM 耐性を暗号した 27.2 Mdal. の同一の plasmid を分離した。また TALLY ら⁴⁾はアメリカで分離された CLDM, TC 耐性の *B. fragilis* から pBFTM 10 と名付けられた同じく CLDM 耐性を暗号した 10.3 Mdal. の plasmid を分離した。これら 2 つの plasmid はいずれも伝達性である。また MALAMY ら⁵⁾と MACRINA ら⁶⁾は、それぞれ別個に plasmid が関連しないと考えられる CLDM, TC 耐性の接合性の伝達があることを報告した。

著者らは、本邦で分離された CLDM, TC 耐性の *B. fragilis* の耐性伝達がどのような機構で行なわれるか

を明らかにするため CLDM, TC 耐性の *B. fragilis* 4 株の耐性伝達を TALLY から分与された plasmid のない *B. fragilis* を受容菌として再検討した。同時に供与菌およびそのトランシビエントの plasmid の分析を行なった。

I. 実験材料および方法

1) 使用菌株：使用菌株とその表現型および由来を Table 1 に示した。これらはスキムミルクを保護剤として -70°C に凍結保存された。

2) 使用培地：嫌気性菌培養用の液体培地には 0.5% Yeast extract, 0.005% Hemin 添加の Brain heart infusion (BHI) (以下 BHIS と略す)、または GAM broth (ニッスイ) を用いた。固形培地には BHIS に 1.5% になるように寒天末を加えた BHISA または GAM agar (ニッスイ) を用いた。*B. fragilis* 用の最小培地 (Anaerobic minimal medium, AMM と略す) は VAREL らの方法⁷⁾に準じて作製した。BHIS, BHISA および GAM agar には必要に応じて各種化学療法剤が、AMM には各種化学療法剤、Histidine, Arginine が添加された。

3) 供試薬剤：TC, CLDM, rifampicin (RFP) が用いられた。使用した濃度は固形培地でそれぞれ 10 µg/ml, 10 µg/ml および 50 µg/ml であった。TC は induction のために 1/10~1/25 MIC に相当する 1 µg/ml

Table 1 *Bacteroides fragilis* strains used and relevant properties

Strains	Phenotype	Source/Comment
Donor		
GAI-0605	Cln ⁺ Tet ⁺ Rif ⁺	Clinical isolate
GAI-2385	Cln ⁺ Tet ⁺ Rif ⁺	Clinical isolate
GAI-1213	Cln ⁺ Tet ⁺ Rif ⁺ AMM ⁻	Clinical isolate
GAI-6069	Cln ⁺ Tet ⁺ Rif ⁺	Clinical isolate
Recipient		
GAI-7001	Cln ⁺ Tet ⁺ Rif ⁺ His ⁻ Arg ⁻	JC-101 (From Dr.F.P.Tally)
GAI-7000	Cln ⁺ Tet ⁺ Rif ⁺	TAL-4000 (From Dr.F.P.Tally)
Reference		
GAI-6068	Cln ⁺ Tet ⁺ Rif ⁺	Clinical isolate (TMP-10)
GAI-6064	Cln ⁺ Tet ⁺ Rif ⁺	PBF TM-10 (TMP-10×TAL-4000)

Cln⁺: 100 µg/ml or more, Tet⁺: 12.5 µg/ml~25 µg/ml,

Cln⁻: 0.20 µg/ml or less, Tet⁻: 0.39 µg/ml or less,

Rif⁺: 100 µg/ml or more, His: Histidine, Arg: Arginine

AMM: Anaerobic minimal media

が液体培地中に加えられた。

4) 耐性伝達法: 主に TALLY らにより行なわれたフィルター法⁹⁾を用いたが、液体培地法および軟寒天培地法も用いられた。フィルター法は以下の如く行なわれた。BHIS での一夜培養菌を BHIS で約 50 倍に希釈後、さらに 3~4 時間培養を続けて得た対数増殖期の供与菌と受容菌を 1:10 の混合比でミリポアフィルター (Diameter 40 mm, Pore size 0.45 µm) 上に密着させた。フィルターを BHISA 上に置き 20~24 時間培養した。1 ml の BHIS または GAM broth 中にフィルターを投じ、サーモミキサーで激しく混合し濃厚菌液を作製した。0.85% NaCl 加 0.066 M リン酸緩衝液で適当に希釈し、その 0.1 ml を各種選択培地に塗抹培養した。供与菌の一夜培養菌を TC 1 µg/ml 含有 BHIS で希釈して得たものについても同様に行なった。選択培地としては供与菌、受容菌数の算出のためにそれぞれ CLDM 加 BHISA, RFP 加 BHISA を用い、トランシピエント数の算出のために CLDM, RFP 加 BHISA, TC, RFP 加 BHISA および CLDM, TC, RFP 加 BHISA を用いた。耐性を獲得した受容菌であることは、これらの Histidine, Arginine 要求性を確認することにより証明した。なお、伝達頻度は CLDM 加 BHISA 上の集落数を分母とし、CLDM, RFP 加 BHISA または TC, RFP 加 BHISA 上の集落数を分子として表わした。

軟寒天培地法は、50°C に保温した BHIS 軟寒天 (寒天含有量 0.7%) 4 ml にフィルター法の場合と同様に調整した供与菌液 0.1 ml と受容菌液 1 ml を加えよく混合した後 BHISA 上に重層し、培養した。20~24 時間培養後、軟寒天部をコンラージ棒でかきとり滅菌試験管に移し、その後の操作を行なった。供与菌液・受容菌液と同

時に DNase を 100 µg/ml に加えた実験も行なった。

また供与菌を密着させたフィルター (Diameter 25 mm, Pore size 0.45 µm) を菌液をのせた状態で BHISA 上に置き、さらにその上に受容菌を密着させたフィルター (Diameter 40 mm, Pore size 0.45 µm) を同様に菌液をのせた状態で 25 mm のフィルターをすっかりおおうように重ねて培養した場合に、耐性の伝達がおこるか否かも検討した。

5) plasmid の分析: MARSH らによる Triton X-100 を用いる minilysis 法により行なった⁹⁾。

II. 実験成績

1) CLDM および TC 耐性の伝達実験

CLDM および TC に耐性を示す供与菌 *B. fragilis* 4 株から受容菌 *B. fragilis* GAI-7000 または 7001 へのフィルター法による CLDM および、または TC 耐性の伝達頻度と解離伝達の有無を Table 2 に示した。

B. fragilis GAI-0605 では、TC で供与菌を前処理した場合にのみ、TC 耐性の伝達のみが 10^{-4} の頻度で認められた。*B. fragilis* GAI-2385, 1213 および 6069 では、供与菌の TC による前処理の有無にかかわらず CLDM, TC の耐性伝達が認められた。GAI-2385 は、TC で前処理された時、前処理されない時の 1,000 倍の伝達頻度を示した。GAI-1213 および GAI-6069 は、TC の前処理による影響をほとんど受けなかった。

また CLDM 耐性と TC 耐性の解離伝達は、GAI-2385 および GAI-1213 で認められたが、GAI-6069 では確認できなかった。

2) 供与菌、受容菌およびそのトランシピエントの plasmid 分析

供与菌 4 株とそれらのトランシピエントの Triton X-

Table 2 Transfer of resistance to tetracycline and clindamycin among *Bacteroides fragilis* strains

Donor × Recipient	Induction	Selective marker	Transfer freq.*	Cotransfer **	
				Cln ^r	Tet ^r
0605 7001	0	Cln ^r Rif ^r Tet ^r Rif ^r	<10 ⁻⁹ <10 ⁻⁹	0	
	tet	Cln ^r Rif ^r Tet ^r Rif ^r	<10 ⁻⁹ 10 ⁻⁴		
2385 7001	0	Cln ^r Rif ^r Tet ^r Rif ^r	10 ⁻⁶ 10 ⁻⁶	90	90
	tet	Tln ^r Rif ^r Tet ^r Rif ^r	10 ⁻² 10 ⁻²		
1213 7000	0	Cln ^r Rif ^r Tet ^r Rif ^r	10 ⁻¹ 10 ⁻¹	42	100
	tet	Cln ^r Rif ^r Tet ^r Rif ^r	10 ⁻¹ 10 ⁻²		
6069 7001	0	Cln ^r Rif ^r Tet ^r Rif ^r	10 ⁻¹ 10 ⁻⁴	100	100
	tet	Cln ^r Rif ^r Tet ^r Rif ^r	10 ⁻³ 10 ⁻³		

Cln : Clindamycin, Tet : Tetracycline, r : resistance

* No. of transcript input donor cells

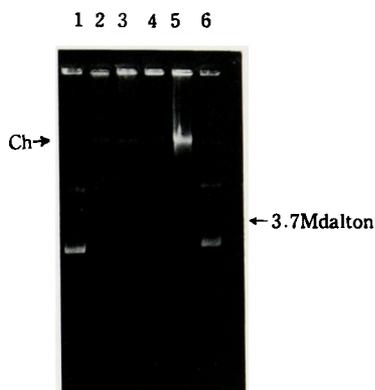
**No. of Cln^r or Tet^r progeny / 100 selected progenies

100 minilysis 法による plasmid 分析の結果は, Fig. 1, 2, 3 に示した。

(1) *B. fragilis* GAI-0605 と GAI-7001 の交配 :
Fig. 1 に示すように, GAI-0605 には 3.7 Mdalton の plasmid が認められた。耐性伝達株 4 株中 1 株に供与菌の plasmid が認められたが, 残りの 3 株には plasmid は認められなかった。

(2) *B. fragilis* GAI-2385 と GAI-7000 の交配 :

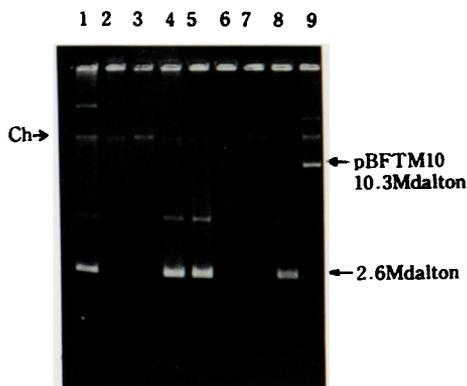
Fig. 1



1 : donor ; GAI-0605
2 : recipient ; GAI-7001
3, 4, 5, 6 : cln^r tet^r progeny ; KW-113, KW-114,
KW-115, KW-116

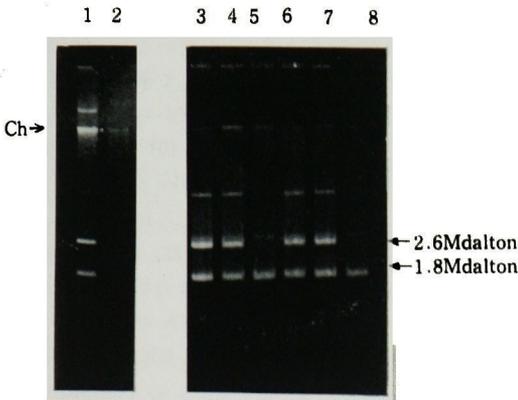
Fig. 2 に示すように, GAI-2385 には 2.6 Mdalton の plasmid と pBFTM 10 (10.3 Mdalton) より大きな plasmid が認められた。CLDM 耐性, TC 耐性伝達株の 3 株中 2 株に, TC 耐性伝達株の 3 株中 1 株に 2.6 M dalton の plasmid が認められた。

Fig. 2



1 : donor ; GAI-2385
2 : recipient ; GAI-7000
3, 4, 5 : cln^r tet^r progeny ; KW-101, KW-102,
KW-103
6, 7, 8 : cln^s tet^r progeny ; KW-104, KW-105,
KW-106
9 : control ; GAI-6064
Ch : chromosomal band

Fig. 3

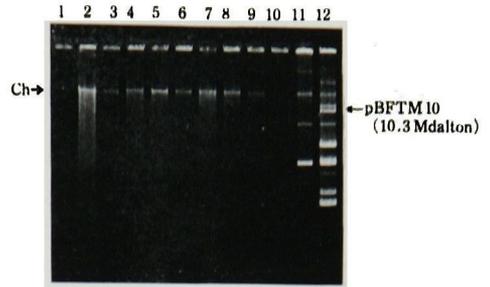


1 : donor ; GAI-1213
 2 : recipient ; GAI-7001
 3, 4, 5 : *cln^r tet^r* progeny ; KW-136, 137, 138
 6, 7, 8 : *cln^s tet^r* progeny ; KW-139, 140, 141
 Ch : chromosomal band

(3) *B. fragilis* GAI-1213 と GAI-7001 の交配 :
 Fig. 3 に示すように、GAI-1213 には 2.6 Mdalton と 1.8 Mdalton の plasmid と pBFTM 10 より大きい plasmid が認められた。CLDM 耐性 TC 耐性伝達株 3 株のすべてに 1.8 Mdalton の plasmid が、またそのうち 2 株に 2.6 Mdalton の plasmid も認められた。TC 耐性伝達株 3 株のすべてに 1.8 Mdalton の plasmid が、そのうち 2 株に 2.6 Mdalton の plasmid も認められた。

(4) *B. fragilis* GAI-6069 と GAI-7001 の交配 :
 図には示さなかったが、GAI-6069 には、3.7 Mdalton の plasmid と pBFTM 10 より大きな plasmid が認められた。CLDM 耐性・TC 耐性伝達株には、時に 3.7 Mdalton の plasmid のみが認められるのみであった。

Fig. 4



1 : donor ; KW-118
 2 : recipient ; GAI-7001
 3, 4, 5 : *cln^r tet^r* progeny from KW-118 × GAI-7001 mating
 6 : donor ; KW-119
 7, 8, 9, 10 : *cln^r tet^r* progeny from KW-119 × GAI-7001 mating
 11 : original donor ; GAI-6069
 12 : control ; GAI-6068
 KW-118, KW-119 : *cln^r tet^r* progeny from GAI-6069 × GAI-7001 mating
 Ch : chromosomal band

3) *B. fragilis* GAI-6069 の CLDM および TC 耐性の伝達について

CLDM と TC の耐性を常に連関して受容菌に伝達した GAI-6069 について二次伝達の有無およびその伝達の kinetics を検討した。また伝達様式についても検討した。

GAI-6069 と GAI-7001 の交配で得られた耐性伝達株 KW-118, 119, 122, 123 および 124 の 5 株は Table 3 に示すように、いずれもそれらの CLDM, TC 耐性を GAI-7000 に伝達することができた。また Fig. 4 に示し

Table 3 Transfer of resistance to tetracycline and clindamycin secondary transfer

Donor × Recipient	Induction	Selective marker	Transfer freq.	Cotransfer Tet ^r (%)
KW-118 GAI-7000	0	His ⁺ Arg ⁺ Cln ^r	<10 ⁻⁹	—
	tet	His ⁺ Arg ⁺ Cln ^r	10 ⁻⁶	—
	cln	His ⁺ Arg ⁺ Cln ^r	10 ⁻⁶	100
KW-119 GAI-7000	0	His ⁺ Arg ⁺ Cln ^r	10 ⁻⁸	—
	tet	His ⁺ Arg ⁺ Cln ^r	10 ⁻⁵	—
	cln	His ⁺ Arg ⁺ Cln ^r	10 ⁻⁴	100
KW-122 GAI-7000	tet	His ⁺ Arg ⁺ Cln ^r	10 ⁻⁵	100
KW-123 GAI-7000	tet	His ⁺ Arg ⁺ Cln ^r	10 ⁻⁵	100
KW-124 GAI-7000	tet	His ⁺ Arg ⁺ Cln ^r	10 ⁻⁵	100

KW-118, 119, 122, 123 and 124 : Transconjugant from GAI-6069 × GAI-7001 mating

たように plasmid が認められない CLDM・TC 耐性の KW-118 と 119 と GAI-7000 株との交配で得られた CLDM, TC 耐性伝達株には plasmid は認められなかった。

GAI-6069 と GAI-7001 との交配における耐性伝達様式を検討するために以下の実験を行なった。供与菌の培養液(対数増殖期)をミリポアフィルター(Pore size 0.45 μm)で濾過し、その濾液と受容菌を混合した場合には CLDM および TC の耐性伝達はおこらなかった。供与菌体をクロロホルムで処理した後、受容菌と混合した場合には耐性の伝達はおこらなかった。液体培地中で供与菌と受容菌を混合培養しても耐性の伝達はおこらなかった。秋寒天(寒天 0.75%)中で供与菌と受容菌を混合培養した場合、 10^{-7} と頻度は低かったが TC・CLDM の耐性伝達を認めた。この交配で秋寒天中に DNase (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を加えても、加えない場合と異ならない伝達頻度であった。供与菌と受容菌を寒天培地上でミリポアフィルター(Pore size 0.45 μm)で濾して培養した場合には耐性の伝達は認められなかった。

III. 考 按

著者らは、*B. fragilis* の CLDM・TC 耐性の両方またはいずれか一方が、その近縁の菌種である *B. thetaiotaomicron* にフィルター交配法によって伝達することを報告した¹⁾。その時、*B. fragilis* GAI-0605 および GAI-1213 を用いて耐性の脱落試験が試みられたが不成功であったことから、この耐性伝達に plasmid が関与しているか否か不明のままであった。

そこで今回は、前回著者らが使用した菌株の中から供与菌として *B. fragilis* GAI-0605, GAI-1213 および GAI-2385 を選び、新規に *B. fragilis* GAI-6069 を加え CLDM・TC の耐性伝達における plasmid の関与の有無を検索した。GAI-0605 と GAI-1213 は、前回、耐性脱落試験が行なわれた株であること、また GAI-2385 と GAI-6069 は、予備実験において大きめの plasmid を有していることが確かめられていたことが、今回これらの4株を選択した理由である。

GAI-0605, GAI-1213 および GAI-2385 は、*B. fragilis* を受容菌とした場合にも、前報の如く *B. thetaiotaomicron* を受容菌とした場合と同様に CLDM・TC 耐性の両方または一方を伝達できた。新規に加えた GAI-6069 も CLDM・TC 耐性を *B. fragilis* に伝達可能であった。またこれら供与菌と受容菌との交配(一次伝達)により、耐性を獲得した株は、それらの耐性を適当な受容菌に再伝達(二次伝達)することができた。

これらの交配における耐性伝達様式を GAI-6069 と GAI-7001 との交配を対象として検討したところ、供与

菌と受容菌の混合液を DNase で処理しても伝達頻度が不変であること、供与菌をクロロホルム処理後受容菌と接触させても耐性伝達は認められないこと、供与菌と受容菌をメンブランフィルターで境して平板上で培養しても耐性伝達は認められないことなどから、TALLY 氏により報告されている TM 2300 と JC 101 との交配における耐性伝達と同様に conjugation like process により耐性伝達が行なわれているものと考えられた。

供試した CLDM・TC 耐性株4株は、Triton X-100 を用いる minilysis 法による plasmid 分析の結果、いずれも *E. coli* (V-517) の plasmid DNA をマーカーとした場合、1.8 Mdal. から 35.8 Mdal. あるいはそれ以上(正確には大きさを決定していない)の plasmid を有していることが示された。しかし、これら供与菌と plasmid free の受容菌との間の交配で得られた耐性伝達株の plasmid 分析の結果、現時点では GAI-1213 のもつ 1.8 Mdal. の plasmid と TC 耐性の関連性を否定できないものの、それ以外のいずれの plasmid も CLDM 耐性の伝達とは無関係であることが示唆された。また GAI-1213 の 1.8 Mdal. の plasmid は TC に耐性を示さない *B. fragilis* に多く分布しており(未発表)、これらと TC 耐性との関連性はうすいものと考えられる。

また plasmid 保有株 GAI-6069 と GAI-7001 との交配で得た plasmid の証明されない CLDM・TC 耐性株がその CLDM・TC 耐性を GAI-7001 の isogenic strain である GAI-7000 に伝達することが知られた。

これらの結果は、わが国の感染症病巣から分離された *B. fragilis* の CLDM・TC 耐性の伝達は、既に MALAMY²⁾ および MACRINA³⁾ が報告したように、plasmid の関連しない形式で行なわれることを強く示唆した。

文 献

- 1) 梅村厚志, 渡辺邦友, 上野一恵: *Bacteroides fragilis* から *Bacteroides thetaiotaomicron* への clindamycin, erythromycin, josamycin および tetracycline 耐性の伝達に関する研究. *Chemotherapy* 31: 963-967, 1983
- 2) PRIVITERA, G.; G. BOTTA & M. SEBALD: Macrolide, lincosamide, streptogramin and tetracycline transferable resistance in the *Bacteroides fragilis* group. *J. Antimicrobial Chemotherapy* 8: 87-94, 1981
- 3) WELCH, R. A.; F. L. MACRINA: Physical Characterization of *Bacteroides fragilis* R plasmid pBF 4. *J. Bacteriology* 145: 867-872, 1981
- 4) TALLY, F. P.; D. R. SNYDMAN, M. J. SHIMMEL & M. H. MALAMY: Characterization of pBFTM 10, a Clindamycin-Erythromycin Resistance Transfer Factor from *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriology* 151: 686-691, 1982

- 5) MALAMY, M. H.; F. P. TALLY : Mechanisms of drug resistance transfer in *Bacteroides fragilis*. J. Antimicrobial Chemotherapy 8 : 59~75, 1981
- 6) MACRINA, F. L.; T. D. MAYS, G. J. SMITH & R. A. WELCH : Non-plasmid associated transfer of antibiotic resistance in *Bacteroides*. J. Antimicrobial Chemotherapy 8 : 77~86, 1981
- 7) VAREL, V. H.; M. P. BRYANT : Nutritional features of *Bacteroides fragilis* subsp. *fragilis*. Appl. Microbiology 18 : 251~257, 1974
- 8) TALLY, F. P.; D. R. SNYDMAN, S. L. GORBACH & M. H. MALAMY : Plasmid-mediated, Transferable Resistance to Clindamycin and Erythromycin in *Bacteroides fragilis*. J. Infectious Diseases 139 : 83~88, 1979
- 9) MARSH, P. K.; M. H. MALAMY, M. J. SHIMELL & F. P. TALLY : Sequence Homology of Clindamycin Resistance Determinants in Clinical Isolates of *Bacteroides* spp. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 23 : 726~730, 1983

TRANSFERABLE RESISTANCE TO CLINDAMYCIN AND TETRACYCLINE IN *BACTEROIDES FRAGILIS*

KUNITOMO WATANABE, ATSUSHI UMEMURA and KAZUE UENO

Institute of Anaerobic Bacteriology, Gifu University School of Medicine

Transferability of resistance to clindamycin (CLDM) and tetracycline (TC) was studied in four clinical isolates of *Bacteroides fragilis*. Plasmids of donors and transconjugants were also analysed using the modified Triton X-100 cleared lysate procedure.

Resistance to TC and/or CLDM was transferred from four donor strains (GAI-0605, GAI-1213, GAI-2375 and GAI-6069) which were resistant to both CLDM and TC to a recipient strain of *B. fragilis* (GAI-7001) by the filter mating procedure. Its transfer frequency was significantly elevated in two strains (GAI-0605 and GAI-2385) and slightly elevated in the remaining strains by TC induction. Resistance to both drugs was always transferred en bloc in one donor strain (GAI-6069). The secondary transfer of resistance was also successful. Four donor strains contained several plasmids ranging ~1.8 Mdalton to ~36 Mdalton or more. But there found no involvement of particular plasmid in transfer of CLDM resistance. One plasmid-less transconjugant was shown to transfer its resistance to an isogenic strain of GAI-7001. This transfer seemed to occur by conjugation since it required the cell to cell contact of filter mating, was insensitive to DNase and was not mediated by chloroform-treated donor cells and culture-filtrate of donor cells.