

Branhamella catarrhalis における Penicillinase 産生因子および Tetracycline 耐性因子の接合伝達について

高橋 綾子・四方田幸恵・田波 洋
群馬大学医学部付属病院・中央検査部

(昭和 61 年 7 月 15 日受付)

当検査室において過去 2 年間に、喀痰、咽頭粘液、耳漏などから分離された 30 株の *Moraxella* subgenus *B. catarrhalis* のうち 28 株 (93%) は penicillinase 産生株であり、4 株 (13%) は tetracycline (TC) 耐性、うち 3 株は penicillinase 陽性、AP, TC に対しともに感受性株はただ 1 株のみであった。

任意に選んだ penicillinase 陽性 18 株を供与菌とし TY 101 (AP^r, TC^r) 株の変異株を受容菌として penicillinase 産生因子 (AP^r 因子) に関する接合伝達実験を行なったところ、すべての供与菌から、供与菌当り 10^{-3} ~ 10^{-7} の頻度で AP^r 因子の一次、二次伝達が認められた。また、4 株の TC^r 耐性株を供与菌として TC^r 因子の接合伝達を行なったところ、すべての供与菌株について約 10^{-4} の頻度で TC^r 因子の伝達が認められた。

AP, TC 両剤耐性株を供与菌として行なった実験では AP^r, TC^r 両因子が互いに分離して伝達されることが認められた。上記の薬剤耐性因子の伝達が plasmid によるものか否か現在検討中である。

Moraxella 属の亜属である *Branhamella catarrhalis* は以前はヒトの上部気道に常在する非病原菌と考えられていたが、松本ら(1981¹⁾, 1982²⁾)の指摘以後、本菌はヒトの気管支炎、髄膜炎、中耳炎まれに敗血症などさまざまな感染症の起原菌であることが確認されている¹⁻⁷⁾。また、近年、*B. catarrhalis* 臨床分離株の多くは β -lactamase 産生株であり^{2,3,5-7)}、本菌の保持する β -lactamase が本菌特有の penicillinase 型であるという酵素学的特徴も明らかにされている^{8,9)}。しかし、本菌における薬剤耐性因子の接合伝達についての報告は極めて乏しい。

B. catarrhalis における β -lactamase 産生の接合伝達については、KAMME et al. (1983¹⁰⁾, 1984¹¹⁾)によって初めて報告されたが、私どもの知る範囲では、その後の報告はないようである。

私どもの検査室で過去 2 年間に 30 株の *B. catarrhalis* が分離され、そのうち 28 株 (93%) は penicillinase 陽性であった。それらのうちから任意に選んだ 18 株を供与菌として、penicillinase 産生因子の接合伝達実験を行なったところ、すべての供与菌から他の *B. catarrhalis* 株へ本因子が一次、二次伝達されることが確認された。また、分離株のうち 4 株 (13%) は tetracycline (TC) 耐性であったが、これらの TC 耐性因子も一次、二次接合伝達することが確認された。*B. catarrhalis* における TC 耐性因子の接合伝達については、私ども

の知る限りでは、これまで報告がない。

上記の薬剤耐性因子を媒介する可能性のある plasmid の分離実験は現在進行中でまだ発表の段階に至っていないが、これまでに得られた接合伝達実験成績について報告する。

I. 材料と方法

1. 供与菌株

Penicillinase 産生因子の接合伝達では任意に選んだ 18 株の penicillinase 陽性株を、TC 耐性因子の伝達実験では 4 株の TC 耐性株を供与菌として用いた。

2. 受容菌株

耳漏から分離された TY 101 株および本菌に由来する各種の変異株 (Table 1) を受容菌として用いた。

3. 受容菌の薬剤耐性マーカー

一次伝達では rifampicin (RIF) 耐性株 (MIC > 500 μ g/ml) を、二次伝達では nalidixic acid (NA) 耐性株 (MIC 100 μ g/ml) を用いた。

TC^r 因子の伝達実験における供与菌と受容菌との組合せは後でその都度示す。

4. 接合伝達実験法

i) 混合培養法: 供与菌 (約 10^9 /ml) と受容菌 (約 10^9 /ml) を各 1 ml ずつ混合 37°C で 2 時間培養後、適宜希釈し適当な選択薬剤 (AP, 0.025 μ g/ml; TC, 3.1 μ g/ml; RIF, 25 μ g/ml; NA, 25 μ g/ml の組合せ) を含む

Table 1 Derivative strains obtained from a clinical isolate of *B. catarrhalis*, strain TY101, isolated from an otorrhea of a patient with acute otitis media

Designation	Drug resistance patterns	Derivation
TY101	AP ^s TC ^r RIF ^s NA ^s	Original clinical isolate from an otorrhea.
TY102	AP ^s TC ^r RIF ^r NA ^s	RIF resistant mutant obtained from TY101.
TY103	AP ^s TC ^r RIF ^s NA ^r	NA resistant mutant obtained from TY101.
TY104	AP ^s TC ^s RIF ^s NA ^s	TC ^r determinant was eliminated from TY101 by means of penicillin-screening method.
TY105	AP ^s TC ^s RIF ^r NA ^s	RIF resistant mutant of TY104.
TY106	AP ^s TC ^s RIF ^s NA ^r	NA resistant mutant of TY104.
TY102-7	AP ^r TC ^r RIF ^r NA ^s	Transconjugant of TY102, to which AP ^r determinant harbored in a penicillinase positive isolate, TY7, was transferred.
TY102-8	AP ^r TC ^r RIF ^r NA ^s	Transconjugant of TY102, to which AP ^r determinant harbored in a penicillinase positive isolate, TY8, was transferred.

Note. Abbreviations used: AP, ampicillin; TC, tetracycline; RIF, rifampicin; NA, nalidixic acid.

Table 2 Transfer frequencies of the penicillinase production in *B. catarrhalis* (Mixed culture method)

Recipient: TY101 AP^s TC^r

Donor strain	Transfer frequency per donor	
	Primary	Secondary §
TY 1	4×10^{-5}	2×10^{-5}
2	6×10^{-7}	N.T.*
3	2×10^{-6}	2×10^{-3}
4	9×10^{-5}	10^{-3}
5	5×10^{-4}	3×10^{-3}
6	10^{-5}	9×10^{-4}
7	2×10^{-6}	7×10^{-4}
8	10^{-6}	5×10^{-4}
9	5×10^{-5}	N.T.
10	6×10^{-7}	9×10^{-4}
11	3×10^{-5}	8×10^{-5}
12	10^{-5}	5×10^{-4}
14	3×10^{-5}	3×10^{-5}
15	2×10^{-5}	7×10^{-4}

§ In the secondary transfer, the transconjugants obtained in the primary experiment were used as the donors.

* Not tested.

イズ 0.3 μm) で濾過し、フィルター・メンブランを血液寒天培地上に置き 37°C で 16 時間培養する。培養時間後メンブラン上の培養菌を 5 ml のブイヨン中に再浮遊させ、適宜希釈し、適当な選択薬剤を含む寒天培地を用いて接合伝達菌の定量検定を行なった。伝達頻度は供与菌当りの接合伝達菌の比率で示した。

5. 最小抑制濃度 (MIC) 測定法は化学療法学会の標準法 (寒天希釈法) によった。

6. AP^r, TC^r 両因子に関する接合伝達実験における、接合伝達菌の薬剤耐性型の判別は以下のように行なった。TC (3.1 μg/ml) を含む選択培地上に発育した接合伝達菌についてはヨード澱粉法で各集落の penicillinase 産生の有無をしらべた。一方、AP (0.025 μg/ml) を含む選択培地上に発育した集落については、集落の一部を TC (3.1 μg/ml) を含む培地上に塗抹して TC 耐性の有無を確認した。

7. 本論文においては、例えば、AP 感受性、TC 耐性株の薬剤耐性型を AP^s, TC^r というように表す。また、penicillinase 産生因子を AP^r 因子、TC 耐性因子を TC^r 因子と呼ぶことにする。

II. 成 績

1. 臨床分離 *B. catarrhalis* 株の MIC 分布

患者検体から分離された 30 株の *B. catarrhalis* の AP, TC および cefoxitin (CFX) に対する MIC 分布を Fig. 1 に示す。30 株中 28 株 (93%) はヨード澱粉試験で penicillinase 陽性を示し AP 耐性を示した。

HI 寒天培地を用い接合伝達菌数を定量検定した。

ii) メンブラン・フィルター法: 供与菌と受容菌を混合後直ちにミリポア・フィルター (直径 2 cm, ポアサ

Table 3 Comparison of the transfer frequencies of AP^r determinants from penicillinase positive clinical isolates of *B. catarrhalis* either to TY102 or to TY105 (Membrane-filter method)

Donor strain	Transfer frequency per donor in the primary conjugation	
	Recipient : TY102 AP ^s TC ^r *	TY104 AP ^s TC ^s *
TY 1	3×10^{-4}	N.T. §
2	8×10^{-4}	10^{-5}
3	3×10^{-4}	N.T.
4	10^{-4}	6×10^{-6}
5	3×10^{-4}	10^{-5}
6	10^{-3}	9×10^{-5}
7	2×10^{-5}	10^{-5}
8	3×10^{-5}	8×10^{-6}
9	4×10^{-4}	3×10^{-5}
10	6×10^{-5}	4×10^{-5}
11	2×10^{-4}	4×10^{-5}
12	2×10^{-4}	N.T.
14	2×10^{-4}	10^{-5}
15	2×10^{-4}	10^{-5}
16	N.T.	2×10^{-5}
17	N.T.	2×10^{-5}
18	N.T.	2×10^{-5}
23	N.T.	5×10^{-5}

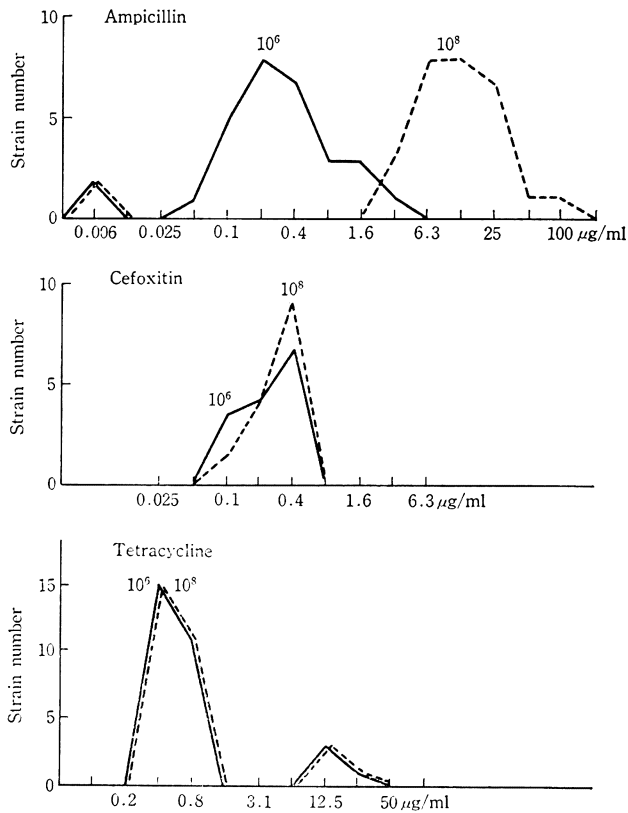
* See Table 1.

§ Not tested.

Table 4 Transfer frequencies of AP^r determinant from the transconjugants obtained in the primary transfer (Table 3) to either TY102 or TY105 (Membrane-filter method)

Original donor strain	Transfer frequencies per donor in the secondary transfer	
	Recipient : TY102 AP ^s TC ^r	TY105 AP ^s TC ^s
TY 2	2×10^{-4}	N.T. §
4	7×10^{-4}	3×10^{-5}
5	10^{-3}	10^{-4}
6	6×10^{-4}	10^{-4}
7	6×10^{-4}	N.T.
8	4×10^{-4}	6×10^{-5}
9	N.T.	10^{-4}
10	N.T.	3×10^{-5}
11	5×10^{-4}	10^{-5}
14	4×10^{-4}	5×10^{-5}
15	3×10^{-4}	10^{-5}
16	N.T.	10^{-5}
17	N.T.	10^{-4}
18	N.T.	2×10^{-4}
23	N.T.	10^{-5}

§ Not tested.

Fig. 1 MIC distributions of clinical isolates of *B. catarrhalis*

Broken lines indicate MICs assayed with bacterial suspensions of 10^8 cells per ml, and solid lines those with lower bacterial suspensions of 10^6 per ml. Note that MICs of penicillinase positive *B. catarrhalis* against to ampicillin (upper right) were affected by the inoculum doses.

Penicillinase 陽性株の対 AP MIC は、試験菌濃度 $10^6/\text{ml}$ では $0.05\sim 3.1\ \mu\text{g/ml}$ 、菌濃度 $10^8/\text{ml}$ では $3.1\sim 50\ \mu\text{g/ml}$ の範囲に分布し、試験菌濃度により数十倍の差を示した。これに対し、CFX に対しては試験菌濃度差による影響は認められず、MIC は $0.2\sim 0.4\ \mu\text{g/ml}$ であった。これらの成績は本菌の保持する β -lactamase が penicillinase 型であるという ELIASSON & KAMME (1985)⁹⁾ および YOKOTA et al. (1986)⁹⁾ の成績にほぼ符合する。

分離株のうち 4 株は TC 耐性を示し、MIC は $12.5\sim 25\ \mu\text{g/ml}$ 、そのうち 3 株は penicillinase 陽性であった。TC 耐性株のうち 1 株、TY 101 株は penicillinase 陰性で AP に対する感受性が高く (MIC $0.006\ \mu\text{g/ml}$) AP^r 因子の受容菌として高い感受性を示した。

2. Penicillinase 産生因子の接合伝達

供与菌：臨床分離株のうちから任意に選んだ 18 株の

penicillinase 陽性株を供与菌とした。

受容菌：TY 102 株～TY 105 株 (RIF あるいは NA 耐性変異株) (Table 1) を用いた。

成績を Table 2, 3, 4 にまとめて示す。ここにみられるように、受容菌として TY 102 株、TY 103 株を用いた場合、混合培養法では一次伝達では供与菌当り $10^{-3}\sim 10^{-7}$ 、二次伝達では $10^{-3}\sim 10^{-5}$ の頻度で penicillinase 産生因子が接合伝達されることが確認された (Table 2)。

一方、メンブラン・フィルター法では伝達頻度は、一次、二次共やや高く供与菌当り $10^{-3}\sim 10^{-5}$ であった (Table 3 左欄)。

受容菌として (TC^r 因子を欠く) TY 104 株、TY 105 株を用い、メンブラン・フィルター法で行なった伝達実験では、伝達頻度は一次、二次とも $10^{-4}\sim 10^{-5}$ のオーダー (Table 3 右欄) で、(TC^r 因子を持つ) TY 102 株、

Table 5 Transfer frequency of TC^r determinant in *B. catarrhalis* in the primary and secondary conjugations (Membrane-filter method)

Transfer	Donor cells/ml	Transconjugant cells/ml	Transfer frequency per donor
Primary §	1.7×10^8	1.5×10^4	9×10^{-5}
Secondary *	7.3×10^8	1.8×10^5	2.5×10^{-4}

§ Donor : TY 101 AP^s. TC^r. RIF^s. NA^s; Recipient : TY 105 AP^s. TC^r. RIF^r. NA^s.

* Donor : Transconjugant obtained in the primary transfer whose drug resistance type was AP^s. TC^r. RIF^r. NA^s.
Recipient : TY 106 AP^s. TC^r. RIF^s. NA^r. (see Table 1)

Table 6 Segregation of AP^r and TC^r determinants in double drug resistant strains of *B. catarrhalis* during conjugal transfer

Donor	Donor cells per ml.	Number of the transconjugant colonies carrying the drug resistance markers cited below.(An aliquot of 0.1ml of 10 ⁻¹ dilution was plated on each selective agar plate).		
		AP ^r TC ^s	AP ^r TC ^r	AP ^s TC ^r
TY 101-7 §	7×10^8	78 (6%)	274 (20%)	890 (74%)
TY 101-8 §	3×10^8	428 (20%)	243 (12%)	1430 (68%)
TY 15 *	2×10^8	139 (31%)	311 (69%)	0 (0%)
TY 24 *	6×10^8	0 (0%)	182 (100%)	0 (0%)
TY 36 *	3×10^8	58 (32%)	182 (68%)	0 (0%)

Note : § Artificially prepared double drug resistant strains(see Table 1).

* Double drug resistant clinical isolates.

TY 103 株を受容菌として用いた場合の頻度 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ (Table 3 左欄) に比べやや低い結果が得られた。このことは受容菌が TC^r 因子を保持している場合には AP^r 因子の伝達頻度が高くなることを示唆する。ただし、AP^r 因子の二次伝達では受容菌が TC^r 因子を持つか否かは伝達頻度にほとんど影響を与えなかった (Table 4)。

3. 接合伝達菌の対 AP MIC について

上記の実験で AP (0.025 μg/ml) を含む選択培地上に発育した接合伝達菌集落はすべてヨード澱粉試験陽性を示し、それらの AP に対する MIC は 0.05~0.4 μg/ml の範囲に分布していた。また、数個の接合伝達菌について集落分離を繰り返した後、延べ約 2,000 個についてヨード澱粉法で検査した結果、すべて陽性であり、penicillinase 産生能の脱落は認められなかった。このことは本酵素産生因子は接合伝達菌内で安定して存在すること

を示している。

受容菌としてそれぞれ TY 104 および TY 105 株を用いた場合の一次、二次接合伝達菌の AP に対する MIC の変化をみたところ、接合伝達菌の AP に対する耐性は原株に比べ 1/2~1/4 に低下していることが認められた。しかし、上に述べたように、すべての接合菌は penicillinase 陽性を示した。

4. TC 耐性因子の接合伝達

供与菌として TC 耐性の臨床分離株 TY 101 株 (Table 1) を用い、受容菌として TY 104 株、TY 105 株 (Table 1) を用いた接合伝達実験成績を Table 5 に示す。一次、二次伝達とも、供与菌当り約 10^{-4} の頻度で TC^r 因子の伝達が認められた。得られた接合伝達菌の TC に対する MIC は供与菌 (12.5 μg/ml) に比べ 1/2 に低下し、一次、二次とも 6.25 μg/ml であった。

5. AP^r・TC^r 両耐性因子を保持する *B. catarrhalis*

株からの両因子の接合伝達

供与菌：臨床分離株 TY 15, TY 24, TY 36 株のほか誘導株, TY 102-7, TY 102-8 株 (Table 1) の計 5 株を用いた。

受容菌：TY 104 株 (Table 1) を用いた。

成績をまとめて Table 6 に示す。ここにみられるように, AP^r 因子および TC^r 因子は, 各因子を単独で伝達させた場合と同レベルの, それぞれ供与菌当り 10⁻⁵ および 10⁻⁴ の頻度で伝達されたが, TY 24 株を供与菌とした場合を除き, 他のすべての供与菌と受容菌の組合せで両因子の分離伝達がみられた。接合伝達菌間における耐性因子の分離の程度は供与菌ごとに異なるが, これらの成績は AP^r 因子と TC^r 因子は (TY 24 株を除き) 互いに異なる伝達性因子によって媒介されることを示唆している。

III. 考 察

B. catarrhalis における β -lactamase 産生因子の接合による伝達については KAMME et al. (1983¹⁰, 1984¹¹) により最初に報告された。彼らは寒天ゲル電気泳動法により伝達性因子と推定される 2 本の extra-chromosomal DNA バンド (分子量はそれぞれ 2×10⁶ および 30×10⁶ daltons) が得られたと述べている¹¹。しかし, 奇妙なことに彼ら¹¹の記載によれば, それらの DNA 分画は供与菌からは分離されず, かえって受容菌から得られており, また, これらの DNA 分画が耐性因子を伝達するかどうかの実験はなされていない。したがって, *B. catarrhalis* における β -lactamase の伝達が plasmid によるものか否かは今後に残されていると考えられる。

B. catarrhalis 株から抽出された β -lactamase は等電点電気泳動法により淋菌あるいは *Haemophilus influenzae* の β -lactamase とは異なり⁹, また, それが penicillinase 型であることが明らかにされている⁹。Fig. 1 に示した成績も本菌の β -lactamase が penicillinase 型であることを示唆している。

任意に選んだ 18 株の penicillinase 産生株を供与菌として行なった接合伝達実験では, すべての試験株から AP^r 因子の一次, 二次伝達が起ることが確認された (Table 2~4)。このことは本菌における penicillinase 産生因子は, そのすべてではないにしても, 大部分は伝達性因子によって感受性菌に伝達され得ることを示している。当検査室で分離された *B. catarrhalis* 株の 93% は penicillinase 陽性であったが, これらの penicillin 耐性菌は *in vivo* において耐性因子が伝達されて生じた可能性がある。

B. catarrhalis における TC^r 因子の接合伝達については, 私どもの知る限りでは, これまで報告がない。当

検査室で分離された 30 株の本菌のうち 4 株 (13%, すべて異なる患者から分離) は TC 耐性であり, MIC も 12.5~25 μ g/ml とかなり高い値を示した。また, それらのうち 3 株は penicillinase 陽性であった。

上記のように, 本菌においては AP^r および TC^r 獲得が伝達性因子によると考えられることから, 今後 AP, TC 両剤耐性株が臨床分離株間に増加することが予想される。

私どもが用いた *B. catarrhalis* 株における上記の薬剤耐性因子の伝達が plasmid によるものか否か現在追求中である。

本研究のうち *B. catarrhalis* の penicillinase 産生因子の接合伝達については昭和 60 年 10 月, 第 32 回日本臨床病理学会総会 (松本) において, また TC 耐性因子の伝達については昭和 61 年 3 月, 第 59 回日本細菌学会総会 (名古屋) においてそれぞれ発表した。

<謝辞> 本研究にあたり群馬大学医学部微生物学教室 橋本一教授, 同薬剤耐性菌実験施設 井上松久助教授, 並びに教室の方々の御指導御助言を受けました。また, 長崎大学熱帯医学研究所内科 松本慶蔵教授より貴重な御教示を受けました。録して深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) 松本慶蔵, 永武 毅, 渡辺貴和雄: *Branhamella catarrhalis* 慢性呼吸器感染症。日本医事新報 No. 2961 : 31~40, 1981
- 2) 松本慶蔵, 永武 毅, 宇塚良夫, 力富直人, 野口行雄: *Branhamella catarrhalis* 性呼吸器感染症。日内会誌 71 : 44~50, 1982
- 3) 永武 毅, 松本慶蔵, 渡辺貴和雄, 河野俊之: 喀痰から分離された *B. catarrhalis* と非病原性 *Neisseria catarrhalis* の薬剤感受性—*Branhamella catarrhalis* の病原的意義。Chemotherapy 30 : 1425~1431, 1982
- 4) 沢木政好, 三上理一郎, 三笠桂一他: 経気管吸引法で確認できた *Branhamella catarrhalis* による慢性気道感染症の 6 症例。感染症学会誌。58 : 477~481, 1984
- 5) 永武 毅: ブランハメラ。臨床病理 33 : 884~891, 1985
- 6) NAGATAKE, T.: Clinical significance of respiratory infection caused by *Branhamella catarrhalis* with special reference to β -lactamase producing strains. Tohoku J. Exp. Med. 147 : 1~13, 1985
- 7) DOERN, G. V.: *Branhamella catarrhalis*: An emerging human pathogen. Clin. Microbiol. Newsletter 7 : 75~79, 1985
- 8) ELIASSON, I. & C. KAMME: Characterization of the plasmid-mediated β -lactamase in *Branhamella catarrhalis*, with special reference

- to substrate affinity. J. Antimicrobial Chemotherapy 15 : 139~149, 1985
- 9) YOKOTA, E.; T. FUJII, M. INOUE & S. MITSUHASHI : Purification and properties of β -lactamase produced by *Branhamella catarrhalis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 29 : 696~698, 1986
- 10) KAMME, C.; M. VANG & S. STÄHL : Transfer of β -lactamase production in *Branhamella catarrhalis*. Scand. J. Infect. Dis. 15 : 225~226, 1983
- 11) KAMME, C.; M. VANG & S. STÄHL : Intrageneric and intergeneric transfer of *Branhamella catarrhalis* β -lactamase production. Scand. J. Infect. Dis. 16 : 153~155, 1984

CONJUGAL TRANSFER OF PENICILLINASE PRODUCTION AND TETRACYCLINE RESISTANCE DETERMINANTS IN *BRANHAMELLA CATARRHALIS*

AYAKO TAKAHASHI, SACHIE YOMODA and YOH TANAMI

Clinical Laboratory, Gunma University Hospital
School of Medicine, Gunma University

The present paper describes conjugal transfer experiments where the transfer of penicillinase production (AP^r) and tetracycline resistance (TC^r) determinants have been demonstrated with clinical isolates of *Branhamella catarrhalis*.

Transfer of AP^r determinant from arbitrarily chosen 18 penicillinase positive *B. catarrhalis* strains to a susceptible strain of the same genus has been demonstrated, with all strains tested, in both primary and secondary conjugations at a frequency between 10^{-3} and 10^{-7} per donor.

Transfer of TC^r determinant from 4 TC^r resistant strains to a susceptible *B. catarrhalis* was also demonstrated at a frequency of 10^{-4} to 10^{-5} per donor.

In conjugation where some double resistant strains carrying both AP^r and TC^r determinants were used as the donors, segregation of these determinants among the transconjugant cells was observed, suggesting that these two may be mediated by different transferable factors, each other.