

長崎県内で分離された類結節症の原因菌 *Pasteurella piscicida* の薬剤感受性の変化

塚原淳一郎・平川 榮一・安永 統男

Drug Sensitivity of *Pasteurella piscicida* Isolated from
Yellowtail in Nagasaki Prefecture in 1983—1986

Jun-ichiro TSUKAHARA, Eiichi HIRAKAWA, and Norio YASUNAGA

We determined the minimal inhibitory concentrations (MIC) of selected chemotherapeutics to *Pasteurella piscicida* isolated from cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) in Nagasaki prefecture in 1983—1986.

The chemotherapeutics tested were : Spiramycin embonate (SPE), Erythromycin (EM), Doxycyclin (DOTC), Oxytetracyclin (OTC), Chloramphenicol (CP), Ampicilin (ABPC), Tianphenicol (TP), Oxolinic acid (OA), Sodium nifurstyrenate (NFS-Na), and Sulfamonomethoxine (SMM). The MIC's were determined by the serial dilution method using agar media.

Some bacteria isolated in 1983—1984 were resistant to DOTC, OTC, ABPC, TP and SMM, while others in 1985—1986 were resistant to DOTC, OTC, ABPC, TP, SMM and OA. Increasing numbers of bacterial strains have become resistant to these chemotherapeutics, about 60% of the bacteria isolated in 1986 being resistant to ABPC and OA.

養殖業の発展に伴ない、養殖現場では細菌性疾病の治療を目的とした種々の化学療法剤が使用されており、ブリの類結節症においても、急性的なへい死をもたらす、経済的被害が甚大であることから、治療薬の投与による対策とその効果は被害の軽減に資すること多大である。しかしながら近年、従来投薬効果のみられた治療薬に対して耐性を示す原因菌 *Pasteurella piscicida* の検出が報告されており¹⁾、長崎県内においても、耐性菌による被害が増大する傾向にある。そこで著者らは長崎県内で分離された *P. piscicida* について種々の薬剤に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を測定し、感受性の経年変化について検討したので、その概要を述べる。

材料および方法

供試株 1983年から1986年にかけて県内各地の

養殖現場において病魚から分離された *P. piscicida* を供試株とし、分離株数は1983年が30株、1984年が26株、1985年が160株、1986年が257株で、各分離年の月別分離株数は表1に示した。*P. piscicida* の同定は、抗血清によるスライド凝集試験および病原細菌鑑別法²⁾に従って行なった。

供試薬剤 エンボン酸スピラマイシン (SPE)、エリスロマイシン (EM)、塩酸ドキシサイクリン (DOTC)、塩酸オキシテトラサイクリン (OTC)、クロラムフェニコール (CP)、アンピシリン (ABPC)、チアンフェニコール (TP)、オキシリン酸 (OA)、ニフルスチレン酸ナトリウム (NFS-Na)、スルファモノメトキン (SMM) の10剤を供試薬剤とし、各薬剤の力価が1,000 μ g/mlになるよう常法によって調整したものを原液として用いた。

最小発育阻止濃度の測定 最小発育阻止濃度

表1 1983～1986年に分離された *Pasteurella piscicida* の月別分離株数

分離年(年間分離株数)	月別分離株数											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12(月)
1983年 (30株)							22	6		2		
1984年 (26株)							9	12		5		
1985年 (160株)							131	29				
1986年 (257株)							174	81		2		

(Minimal Inhibitory Concentration ; MIC と略称)は日本化学療法学会の測定法³⁾に準じ、以下に述べる寒天平板希釈法によって測定した。*P. piscicida* の各菌株を 2%NaCl 加バクトペプトン水に接種し、25°C、24時培養後の菌液を接種菌とし、感受性測定培地には 2%NaCl 加 Heart Infusion Agar (栄研)を用いた。ただし、SMM のみ Muller Hinton Agar (Difco) を用いた。感受性測定培地は、各薬剤ごとに100～0.0125 $\mu\text{g/ml}$ までの2倍希釈で14段階の濃度になるように調整した薬剤平板とした。菌液の接種は cathia 社製の Replicator System を使用して各薬剤平板へ一定量接種する方法で実施し、接種後25°Cにて48時間培養した後、MIC 値を測定した。

結果および考察

1983年から1986年までの耐性菌の株数および MIC 値の測定結果は以下に述べるとおりである。1983年に分離された30株における MIC 値の分布は表2に示すとおりであり、DOTC、OTC、CP、TP、SMM で17株、ABPC で6株が耐性を示し、耐性菌の MIC 値 ($\mu\text{g/ml}$) は DOTC が3.2、OTC が100、CP が25～50、ABPC、TP、SMM が>100であった。1984年に分離された26株における MIC 値の分布は表3に示すとおりであり、DOTC、OTC、CP、TP で25株、ABPC で8株、SMM で26株が耐性を示し、耐性菌の MIC 値 ($\mu\text{g/ml}$) は DOTC が1.6～25、OTC が12.5～25、CP が25～50、ABPC、SMM が>100、TP が ≥ 100 であった。1985年に分離された160株における MIC 値の分布は表4に示すとおりであり、DOTC、OTC、CP、TP で140株、ABPC、SMM で88株、OA で19株が耐性を示し、耐性菌の MIC 値

($\mu\text{g/ml}$) は DOTC、OTC、CP、TP で140株、ABPC、SMM で88株、OA で19株が耐性を示し、耐性菌の MIC 値 ($\mu\text{g/ml}$) は DOTC が3.2～12.5、OTC、CP が25～100、ABPC、SMM が>100、TP が ≥ 100 であった。1986年に分離された257株における MIC 値の分布は表5に示すとおりであり、DOTC、OTC、CP、TP で247株、ABPC、SMM で160株、OA で73株が耐性を示し、耐性菌の MIC 値 ($\mu\text{g/ml}$) は DOTC が3.2～25、OTC が25～50、CP が25～100、ABPC、SMM が25または ≥ 100 、TP が ≥ 100 であった。

MIC 値の測定結果から、1983年から1986年においては、SPE、EM、NFS-Na に対する耐性菌は検出されなかったが、DOTC、OTC、CP、ABPC、TP、SMM では1983年から1986年、OA では1985年および1986年において耐性菌が検出され、各薬剤に対する耐性菌の MIC 値 ($\mu\text{g/ml}$) は、DOTC が1.6～25、OTC が12.5～100、CP が25～100、ABPC が50～>100、TP が ≥ 100 、OA が0.8～3.2、SMM が50～>100であった。各分離年における耐性菌の出現頻度は表6に示すとおりであり、DOTC、OTC、CP、ABPC、TP においては1983年以降高くなる傾向にあり、OA においても1986年は1985年に比較し高くなっている。また、SMM においては分離年において増減がみられるが、1983年から1986年まで分離菌の半数以上が耐性であった。

これらの結果から、長崎県内における類結節症の原因菌 *P. piscicida* においては、DOTC、OTC、CP、ABPC、TP、OA、SMM に対する耐性菌が出現、増大する傾向にあり、特に *P. piscicida* に対して高い感受性を有し、速効的な治療効果から現場において広く使用されている ABPC および

表2 1983年における分離菌（30株）の薬剤に対する MIC 値の分布

M. I. C. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	菌 株 数									
	SPE	EM	DOTC	OTC	CP	ABPC	TP	OA	NFS-Na	SMM
<0.0125										
0.0125										
0.025						2				
0.05						13		3		
0.1						7		27		
0.2						2				
0.4			11	2						
0.8			2	10	9				2	
1.6				1	4				17	3
3.2			17*				11		11	10
6.3										
12.5		16					2			
25		14			5*					
50					12*					
100	27			17*						
>100	3					6*	17*			17*

* 薬剤耐性菌

表3 1984年における分離菌（26株）の薬剤に対する MIC 値の分布

M. I. C. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	菌 株 数									
	SPE	EM	DOTC	OTC	CP	ABPC	TP	OA	NFS-Na	SMM
<0.0125										
0.0125										
0.025										
0.05						11		10		
0.1						7		16	1	
0.2										
0.4			1	1						
0.8					1				6	
1.6			4*						18	
3.2							1		1	
6.3										
12.5		10	11*	15*						
25		16	10*	10*	14*					
50	14				11					
100							4*			
>100	12					8*	21*			26*

* 薬剤耐性菌

表4 1985年における分離菌(160株)の薬剤に対するMIC値の分布

M. I. C. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	菌 株 数									
	SPE	EM	DOTC	OTC	CP	ABPC	TP	OA	NFS-Na	SMM
<0.0125										
0.0125										
0.025						7				7
0.05						24		76		24
0.1						25		65		25
0.2			2			16				16
0.4			17							
0.8			1	2	6			2*	8	
1.6				18	14			17*	67	
3.2		3	16*				20		65	
6.3		76	111*						16	
12.5		81	13*						4	
25				1*	38*					
50	1			30*	100*					
100				109*	2*		5*			
>100	159					88*	135*			88*

*薬剤耐性菌

表5 1986年における分離菌(257株)の薬剤に対するMIC値の分布

M. I. C. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	菌 株 数									
	SPE	EM	DOTC	OTC	CP	ABPC	TP	OA	NFS-Na	SMM
<0.0125										
0.0125										
0.025						45				45
0.05						25		51		25
0.1						27		90	4	27
0.2								43	2	
0.4			9	1	5				3	
0.8			1	3	5			56	27	
1.6				6			10	11	106	
3.2		2	31*					6	74	
6.3		97	151*						39	
12.5		157	64*						2	
25		1	1*	110*	119*					
50				137*	126*	1*				1*
100					2*		1*			
>100						159*	246*			159*

*薬剤耐性菌

表6 1983～1986年における薬剤別耐性株出現頻度

年	分離株数	薬剤	耐性株数	出現頻度(%)
1983	30	DOTC	17	56.7
		OTC	〃	〃
		CP	〃	〃
		ABPC	6	20.0
		TP	17	56.7
		OA	0	0.0
		SMM	17	56.7
1984	26	DOTC	25	96.2
		OTC	〃	〃
		CP	〃	〃
		ABPC	8	30.8
		TP	25	96.2
		OA	0	0.0
		SMM	26	100.0
1985	160	DOTC	140	87.5
		OTC	〃	〃
		CP	〃	〃
		ABPC	88	55.0
		TP	140	87.5
		OA	19	11.9
		SMM	88	55.0
1986	257	DOTC	247	96.1
		OTC	〃	〃
		CP	〃	〃
		ABPC	160	62.3
		TP	247	96.1
		OA	73	28.4
		SMM	160	62.3

※耐性レベル DOTC: ≥ 1.6 ($\mu\text{g}/\text{ml}$), OTC: ≥ 12.5 , CP: ≥ 25 , ABPC: ≥ 50 , TP: ≥ 100 , OA: ≥ 0.8 , SMM: ≥ 50

OA に対する耐性菌が出現していることから、今後の薬剤の選択に際しては、あらかじめ十分な薬剤感受性試験を実施することが望ましいと思われる。ABPC については北尾らによる Iodometric 法⁹⁾および、安永らによる Acidmetric 法⁹⁾により病魚の臓器または分離菌を用いた耐性菌の迅速判定法により容易に診断が可能となったが、OA については従来のディスク試験法による結果を待つ以外にない。SPE, EM, NFS-Na における耐性菌の出現はみられなかったが、MIC 値の測定結果から SPE で $50 \sim > 100 \mu\text{g}/\text{ml}$, EM で $3.2 \sim 25 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、感受性が本来低いために治療薬として

は好ましくなく、NFS-Na においては MIC 値が $0.1 \sim 12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、広範な MIC 値を示し、ABPC, OA の非耐性菌に比較し感受性が低いことから、速効性において劣るものと思われる。

本試験に用いた菌株は現場における魚病対策指導等において分離されたものであり、県内全域の類結節症の発生時における原因菌の全てについて試験したものではないので、県内の正確な耐性菌の発生状況は明らかではないが、現場における聞きとり、および本報告の結果から、*P. piscicida* の薬剤耐性菌が蔓延しつつあることは容易に推察され、ABPC および OA に対して両剤耐性を示す *P. piscicida* においては、現在まで特効薬的薬剤がないことから、被害の増大が懸念される。従って、ABPC および OA に対する耐性菌の蔓延防止に努めるとともに、速効性のある薬剤の開発が急務と思われる。

おわりに *P. piscicida* の分離収集に御協力いただいた水産業改良普及所の方々にお礼申し上げます。

要 約

- 1983年から1986年において長崎県内で分離された *P. piscicida* の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定し、感受性の変化について検討した。
- MIC 値の測定結果から、1983～1986年に DOTC, OTC, CP, ABPC, TP, SMM に対する耐性菌が、また、1985～1986年に OA に対する耐性菌が確認された。
- 耐性菌の MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) は DOTC が $1.6 \sim 25$, OTC が $12.5 \sim 100$, CP が $25 \sim 100$, ABPC が $50 \sim > 100$, TP が ≥ 100 , OA が $0.8 \sim 3.2$, SMM が $50 \sim > 100$ であった。
- 1983年から1986年における耐性菌の出現頻度は年々高くなる傾向にあり、長崎県内で蔓延しつつあることが推察された。

文 献

- 1) 楠田理一・川合研児・安部知智, 1983: 1978年から1982年に流行した類結節症の原因菌 *Pasteurella piscicida* の薬剤感受性について, 昭和58年度日本魚病学会講演要旨集, 17.

- 2) 魚類等防疫指針3, ウイルス・真菌症, 1979 :
病原細菌鑑別法, 69—100, 水産庁編, 120PP.
- 3) 日本化学療法学会, 1975 : 最小発育阻止濃度
(MIC) 測定法, *Chemotherapy*, **23** (8), 1
—2.
- 4) 北尾忠利・青木 宙, 1983 : Iodometric 法を
応用した Slide test による Ampicillin 耐性
Pasteurella piscicida の迅速判定法の検討, 魚病
研究, **18** (2), 103—106.
- 5) 安永統男・平川榮一・塚原淳一郎, 1985 :
Acidometric 法によるアンピシリン耐性 *Pas-
teurella piscicida* の迅速検出について, 魚病研
究, **20** (4), 501—502.