

魚病細菌の薬剤感受性の迅速判定による投薬指導技術の高度化

湯浅明彦

近年アユ養殖業に甚大な被害をもたらしている冷水病には、抗菌性物質を餌に添加して投与する治療（化学療法）が行われている。化学療法は「効果の高い薬剤を早期に投与」することが必要だが、そのためにはアユ用に承認された医薬品の中から効果の高い薬剤を選択する必要がある。現在、魚病細菌に対する薬剤の効果を明らかにするために、ディスク拡散法による薬剤感受性検査を実施している。しかし、冷水病原菌の場合は結果が判明するまで約96時間を要するとともに、検査の結果と投薬の効果が必ずしも一致しない場合がある。こうした問題点を解決するために、新たな薬剤感受性検査法について検討した。今回検討した魚病細菌に対する薬剤の最少発育阻止濃度（MIC）を測定する方法は、魚介類病原細菌を含めた動物由来細菌に対する抗菌性物質の最少発育阻止濃度（MIC）測定法（動物用抗菌剤研究会2003年改定標準法）に基づいている。同測定法には、「寒天平板希釈法」とともに「微量液体希釈法」の手技等が示されているので、両手法について比較検討した。

材料と方法

2003年1月から2006年4月までの間に県下のアユ養殖場及び中間育成場の病魚から分離された冷水病原菌50株、及び冷水病の発病が見られた河川の河床の転石から分離した冷水病類似菌3株を試験に供した。

動物用抗菌剤研究会2003年改訂標準法に準じて、表1の手順でMICの測定を実施した。検査は10種類の薬剤について実施し、薬剤に適した溶媒に溶解して薬剤原液を作成した（表2）。寒天平板希釈法で6種類の薬剤に対して30株のMICを測定し、微量液体希釈法では10種類の薬剤に対して23株のMICを測定した（表3）。検査は薬剤の濃度範囲が0.12～128 µg/mL、2倍段階希釈の11濃度で実施した。使用した培養容器数は寒天平板希釈法の場合はシャーレ134枚、微量液体希釈法では96穴マイクロプレート30枚であった。

結果と考察

寒天平板希釈法で測定した30菌株のMICを表4に示した。FFに対しては全ての菌株が感受性を示したが、SIZに対しては耐性（MIC値64）を示すものが存在した。SMMXに対してはほとんどの株が耐性（MIC値128以上）を示し、OAに対しては耐性（MIC値64以上）を示す菌株が半

数以上をしめた。LCMとAMPCに対してはほとんどの株が感受性を示した。微量液体希釈法で測定した23株についても、6種類の薬剤に対する感受性は同様の傾向を示した。その他4種の薬剤については、OTCとFRMでは耐性を示す菌株が存在し、TOBとPM-Bでは多くの菌株が耐性を示した（表5）。アユの養殖場から分離されたSIZに対して耐性を示す菌株は、SIZを用いた化学療法の結果耐性を獲得したものと考えられる。また、LCMに対しては2005年3月まで高い感受性を示すが、それ以降ではMICが高くなる傾向を示している。河川から採取した菌株（表5、菌株番号21～23）の2株はSIZとFRMに対して耐性を示した。

寒天平板希釈法では、寒天培地上に菌体の増殖が肉眼で確認できるまでの時間は96時間であったが、接種菌濃度を1オーダー高い 10^8 CFU/mLにすれば72時間で判定が可能で

表1 MIC測定の手順

No	項目
1	薬剤原液の調整
2	薬剤の2倍段階希釈列の調整
3	薬剤含有感受性測定用寒天培地の調整 ¹⁾ 薬剤含有感受性測定用液体培地の調整 ²⁾
4	接種用菌液の調整
5	薬剤含有寒天培地へ菌液を接種 ¹⁾ 感受性測定用液体培地への接種 ²⁾
	1) 寒天平板希釈法
	2) 微量液体希釈法

表2 使用薬剤と溶解に用いた溶媒

薬剤名	略号	溶媒
スルフィンゾール	SIZ	蒸留水
リンコマイシン	LCM	蒸留水
フロルフエニコール	FF	95%エタノール
アモキシシリン	AMPC	0.1M リン酸塩緩衝液
オキシリン酸	OA	蒸留水と1N水酸化ナトリウム
オキシテトラサイクリン	OTC	蒸留水と0.1N塩酸
スルファモノメトキシシン	SMMX	蒸留水と2.5N水酸化ナトリウム
トブラマイシン	TOB	蒸留水
フラジオマイシン	FRM	蒸留水
ポリミキシンB	PM-B	蒸留水

表3 MICの測定条件

条件	寒天平板希釈法	微量液体希釈法
試験薬剤数	6	10
検査対象菌数	30	23
薬剤濃度範囲 µg/mL	0.12～128	0.12～128
薬剤含有培地量	20mL	100 µL
培養容器	85mmシャーレ	96穴マイクロプレート
容器当たりの接種菌株数	24株	8株
試験に必要な容器数	薬剤1濃度当たり1個	薬剤11濃度まで1個

あった。一方微量液体希釈法の場合、改訂標準法で定められた接種後の菌数が 10^4 CFU/mLでは、明瞭な判定が可能になるまでに96時間が必要であった。接種菌濃度を濃くすれば判定時間を短くすることが可能だが、判定結果に及ぼす影響について検討する必要がある。

表4 寒天平板希釈法で測定した冷水病原菌のMIC

菌株番号	分離日	菌株に対する各薬剤の最少発育阻止濃度(μg/mL)					
		FF	SIZ	SMMX	OA	LCM	AMPC
1	2003年1月20日	1	4	128	>128	<0.125	2
2	2003年1月20日	1	1	>128	8	<0.125	1
3	2003年1月20日	1	2	>128	8	<0.125	2
4	2003年1月20日	1	1	>128	8	<0.125	2
5	2003年1月27日	1	2	128	8	<0.125	1
6	2003年5月6日	1	4	>128	>128	<0.125	8
7	2003年5月7日	1	4	>128	32	<0.125	8
8	2004年1月14日	1	2	128	>128	<0.125	2
9	2004年1月16日	1	64	>128	16	<0.125	4
10	2004年1月20日	1	64	>128	8	<0.125	4
11	2004年1月23日	1	2	128	8	<0.125	2
12	2004年1月23日	1	1	>128	>128	<0.125	8
13	2004年1月30日	1	64	>128	64	<0.125	2
14	2004年1月30日	1	64	>128	>128	<0.125	2
15	2004年1月30日	1	8	>128	>128	<0.125	4
16	2004年1月30日	1	1	>128	16	<0.125	8
17	2004年3月4日	1	1	>128	32	<0.125	2
18	2004年3月4日	1	8	>128	>128	<0.125	2
19	2004年4月27日	2	8	>128	>128	<0.125	2
20	2004年7月9日	1	64	>128	64	<0.125	2
21	2004年7月19日	1	1	>128	128	<0.125	2
22	2004年8月2日	1	1	>128	>128	<0.125	4
23	2004年8月2日	1	32	>128	64	<0.125	4
24	2005年3月16日	8	32	>128	128	<0.125	2
25	2005年4月1日	1	1	128	>128	<0.125	2
26	2005年4月1日	1	1	64	8	<0.125	2
27	2005年4月21日	1	1	>128	8	8	2
28	2005年4月21日	1	1	>128	128	0.5	2
29	2005年8月2日	2	32	>128	>128	<0.125	2
30	2005年8月2日	1	64	>128	>128	<0.125	2

表5 微量液体希釈法で測定した冷水病原菌のMIC

菌株番号	分離日	菌株に対する各薬剤の最少発育阻止濃度(μg/mL)									
		SIZ	LCM	FF	AMPC	OA	OTC	SMMX	TOB	FRM	PM-B
1	2005年2月16日	2	0.25	2	4	>128	4	128	16	8	128
2	2005年3月16日	2	ND	4	4	>128	ND	>128	16	4	>128
3	2005年7月6日	8	0.25	2	1	8	0.5	>128	32	8	>128
4	2005年1月28日	8	ND	1	4	128	ND	>128	16	8	>128
5	2005年2月10日	4	ND	1	1	8	ND	128	32	8	128
6	2005年4月1日	16	0.25	1	0.25	64	32	>128	8	8	>128
7	2005年3月16日	2	0.25	2	1	32	32	128	32	4	>128
8	2005年4月21日	16	0.5	4	0.5	>128	32	>128	16	4	>128
9	2005年5月6日	8	0.12	1	1	2	16	>128	32	8	>128
10	2005年4月22日	4	0.25	2	4	>128	8	>128	16	8	>128
11	2005年5月6日	4	0.5	4	0.12	>128	16	>128	16	8	>128
12	2005年2月16日	2	0.12	1	1	2	32	>128	32	16	>128
13	2005年3月1日	4	0.25	1	1	64	2	>128	16	4	>128
14	2005年8月29日	16	0.25	1	1	8	32	>128	8	4	128
15	2005年8月7日	8	0.5	1	1	2	32	>128	32	16	>128
16	2005年8月7日	8	0.12	1	1	2	16	>128	64	16	>128
17	2005年8月29日	16	0.25	1	0.12	8	2	>128	32	4	>128
18	2006年3月7日	4	0.25	1	0.12	>128	16	>128	8	4	>128
19	2006年3月14日	4	0.12	0.5	1	2	16	>128	16	8	>128
20	2006年3月6日	4	128	1	1	8	32	>128	16	4	>128
21	2006年4月4日	8	1	8	ND	2	0.5	>128	32	8	64
22	2006年4月4日	64	4	4	8	0.5	2	>128	128	16	16
23	2006年4月4日	128	1	4	4	1	1	>128	>128	128	>128