情 報

アユから分離された Vibriostatic agent 非感受性の *Vibrio anguillarum*

室賀清邦*・米山 昇*・城 泰彦**

(昭和 53 年 4 月 30 日受理)

Vibriostatic Agent-nonsensitive *Vibrio anguillarum* Isolated from Ayu

Kiyokuni MUROGA*, Noboru YONEYAMA* and Yasuhiko Jo**

*Dept. Fish., Fac. Fish. & Animal Husband., Hiroshima Univ., Fukuyama

**Fish. Experimental Station of Tokushima Pref., Hiwasa, Tokushima

(Received April 30, 1978)

Vibrio anguillarum is well known as the causative agent of vibriosis in ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Japan.

During the diagnostic works on the vibriosis in cultured ayu in Tokushima Prefecture from 1976 to 1977, many strains were obtained. Among them, 52 strains were submitted to characterization tests, and these strains were found to be identified as *Vibrio anguillarum*. The problem is, however, that 27 strains out of 52 strains were not sensitive to the vibriostatic agent O/129 (VSA).

In ayu culture, many therapeutic agents such as chloramphenicol, oxolinic acid, and nalidixic acid have been used, and recently, trimethoprim mixed with sulfadoxine (TS) has been used. Among those drugs, the new one, TS, was suspected of producing VSA-nonsensitive strains.

Then, the relationship between the sensitivity of the isolates to VSA and that to TS was examined. As a result, minimal inhibitory concentration of TS for the four VSA-sensitive strains and the four VSA-nonsensitive strains were found to be 1.2 $\mu\text{g/ml}$ and 24.0 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Furthermore, it was confirmed that the VSA-sensitive strains lost their sensitivity to VSA when they became resistant to TS by passing through TS containing media.

In consequence, it was concluded that some strains of *V. anguillarum* lost their sensitivity to VSA by obtaining resistance to TS administered to diseased ayu in ponds.

最近、アユのビブリオ病の原因菌として分離された *Vibrio anguillarum* の中に Vibriostatic agent O/129 に対し感受性を示さない株が少なからず存在することがわかった。そして、2, 3 の実験を行なったところ、現場で使用されている治療薬のトリメトプリム・スルファドキシシン合剤に対し *V. anguillarum* が耐性化したため、このような株が出現したものと考えられた。以下、それらの実験結果を紹介する。

材料および方法

1976 年 9 月から 1977 年 10 月にかけて、徳島県下の

* 広島大学水畜産学部

** 徳島県水産試験場

いくつかの養魚場において、ビブリオ病にかかっていると思われるアユについて細菌検査を行なった。その結果、コロニーの形態などから経験的に *V. anguillarum* と判断される菌株を数百株得た。この中から適当に 52 株を選び、それらの一般性状、糖分解能、塩分耐性、およびニホンウナギ (*Anguilla japonica*) に対する病原性を調べた。Vibriostatic agent O/129 (以下 VSA と略す) に対する感受性は、坂崎 (1963) の記載に従って作製したディスクを用い、常法通り発育阻止帯の形成の有無をもって判定した。なお、病原性の確認には接種量を 1 mg (湿菌重量)/100 g (魚体重) とした筋肉内接種による供試魚の生死で判定した。

その結果、後述するように検査した 52 株は VSA に対する感受性の有無に基づき 2 つのグループに分けられた。そこで、VSA 感受性株から 4 株 (PT-7691, 77020, 77122 および PB-15。PB-15 は供試 52 株には含まれず、1966 年に浜名湖の稚アユから分離された株) と VSA 非感受性株から 4 株 (PT-7680, 77437, 77439, 77442) を代表株として選び、これらのトリメトプリム・スルファドキシシン合剤 (混合比 1:5, 以下 TS と略す) に対する感受性を次の方法で調べた。すなわち滅菌後のミューラーヒントン寒天培地 (栄研) にいろいろな濃度に稀釈した TS 液を加えて作製した検査培地 (TS 濃度: 0.06, 0.12,

0.24, 0.6, 1.2, 2.4, 6, 12, 24, 60, ... $\mu\text{g/ml}$) に、上記代表菌株を接種し、25°C, 1 日培養後の発育の有無を調べ、発育を阻止した最低 TS 濃度を最小発育阻止濃度 (MIC) とした。

次に、前記の VSA 感受性代表株 4 株を TS を含むミューラーヒントン寒天培地で 1 日おきに継代培養することによりに TS に対する感受性を低下せしめ、それらの VSA に対する感受性の変化について調べた。すなわち、結果の項で示すように当初の VSA 感受性 4 株に対する TS の MIC が 1.2 $\mu\text{g/ml}$ であり、VSA 非感受性 4 株に対するそれが 24.0 $\mu\text{g/ml}$ であったことから、VSA 感受

Table 1. Characteristics of the isolates (*Vibrio anguillarum*)

<i>Vibrio anguillarum</i>				<i>Vibrio anguillarum</i>			
Test	Present strains		MUROGA (1975)	Test	Present strains		MUROGA (1975)
	VSA- sensitive 25 strains	VSA-non- sensitive 27 strains			VSA- sensitive 25 strains	VSA-non- sensitive 27 strains	
Single polar flagellum	+	+	+	Acid from			
Motility	+	+(96)	+	Dextrin	+	+	+
Gram stain	—	—	—	Fructose	+	+	+
Swarming	—	—	—	Glucose	+	+	+
Fermentation of glucose	+	+	+	Maltose	+	+	+
Gas from glucose	—	—	—	Mannose	+	+	+
Oxidase (cytochrome)	+	+	+	Starch	+	+	+
Sensitivity to 0/129 (VSA)	+	—	+	Sucrose	+	+	+
novobiocin	+	+	+	Adonitol	— (96)	— (96)	—
penicillin	—	—	— (96)	Dulcitol	—	—	—
Catalase	+	+	+	Lactose	—	—	—
Litmus milk peptonization	+	+	+	Xylose	— (96)	— (52)	—
Nitrate reduction	+(96)	+(93)	+	Trehalose	+	+	+(97)
Gelatin liquefaction	+	+	+	Rhamnose	—	—	— (97)
Voges-Proskauer test	+	+	+	Inulin	—	— (96)	— (95)
2, 3-butanediol production	+(84)	+	+	Salicin	—	—	— (95)
H ₂ S production	—	—	—	Mannitol	+(68)	+(93)	+(92)
Arginine decomposition	+	+	+	Inositol	—	—	— (90)
Lysine decarboxylation	—	—	—	Raffinose	—	—	— (72)
Ornithine	—	—	—	Glycogen	+(92)	+(96)	+(68)
Phenylalanine deamination	—	—	—	Sorbitol	+	+	+(66)
Urease production	—	—	—	Arabinose	+(64)	— (74)	— (58)
Tartrate (Jordan)	+w	+w	+w	Galactose	+(76)	+(63)	+(56)
Starch hydrolysis	+(96)	+	+	Glycerin	— (84)	—	— (55)
Citrate (Simmons)	+	+	+(98)	Cellobiose	— (52)	— (96)	+(52)
Cholera red test	— (96)	—	— (97)	NaCl 0%	— (64)	—	— (72)
Methyl red test	— (84)	—	— (93)	0.5	+	+	+
Malonate	—	—	+(82)	1	+	+	+
Chitin decomposition	— (76)	—	— (75)	3	+	+	+
Indole production	+(92)	+	+(57)	5	+(76)	— (63)	+
Pathogenicity for eel	+6/6	+8/9	+(98)	7	—	—	— (61)

(): % having reactions as given. VSA: Vibriostatic agent 0/129. +w: weakly positive.

性株に対する TS の MIC が $24.0 \mu\text{g/ml}$ になるまで、発育可能な最高 TS 濃度培地で順次継代することにより耐性化を計った。

また、VSA 感受性株 10 株および非感受性株 10 株について、宮崎大学より分与された抗 *V. anguillarum* 家兎血清 (A, B, C タイプ) を用いてスライド凝集反応を試みた。なお、反応抗原としては生菌をそのまま用い、抗血清は 30 倍稀釈のものを用いた。

結果および考察

検査した供試菌 52 株の性状は、いくつかの項目を除けば、従来アユのビブリオ病の原因菌として分離されてきた *V. anguillarum* の性状によく一致した。しかしながら、約半数の株にあたる 27 株が VSA に対し感受性を示さないという点が特異的であった。そこで供試菌を VSA に対し感受性を有する菌株群と感受性を示さない菌株群に分け、それぞれの性状をまとめて Table 1 に示した。なお、同表には過去に室賀 (1975) が数種の魚から分離した *V. anguillarum* 62 株の性状を比較のため併記した。

Table 1 に示されたように、供試菌 52 株の中には VSA に対する感受性の有無とは別に、非運動性株 1 株、硝酸塩非還元株 3 株、2, 3-ブタンジオール非産生株 4 株、澱粉非加水分解株 1 株といった、従来わが国で分離されている *V. anguillarum* にはみられなかった性状を示すものがわずかながら認められた。ただし、非運動性株については若林ら (1975) の報告が既にある。上記のような例外的な性状を示すものはありながらも、VSA に対する感受性の点を除けば、供試 52 株の性状はアルギニン、リジンに対する反応など重要な性状は勿論、全般的に従来わが国で分離されてきた *V. anguillarum* の性状とよく一致した。

また、一部の供試菌株と抗 *V. anguillarum* 血清とのスライド凝集反応を調べた結果を Table 2 に示した。同表に示されたように、VSA 感受性 10 株のうち 6 株が A タイプ抗血清と凝集し、3 株が B および C タイプ抗血清と凝集し、1 株はいずれの抗血清とも凝集しなかった。一方 VSA 非感受性 10 株のうち 9 株は A タイプ抗血清に凝集し、1 株はいずれとも凝集しなかった。従って少なくともこの実験結果からは、VSA 感受性株と非感受性株との間に血清型の上で違いがあるとは思われなかった。

更に、VSA 感受性株と非感受性株の間には普通培地における発育状態に特に差は認められず、また Table

Table 2. Result of slide agglutinating test between the isolates (*V. anguillarum*) and anti-*V. anguillarum* sera

Antigens	Anti- <i>V. anguillarum</i> sera* ($\times 30$)		
	A	B	C
VSA-sensitive strains	PT-7679	+	—
	PT-7691	+	—
	PT-7698	+	—
	PT-77002	+	—
	PT-77032	+	—
	PT-77050	—	—
	PT-77122	—	+
	PT-77129	+	—
	PT-77161	—	+
	PT-77171	—	+
VSA-nonsensitive strains	PT-7680	+	—
	PT-7681	—	—
	PT-77420	+	—
	PT-77425	+	—
	PT-77427	+	—
	PT-77430	+	—
	PT-77435	+	—
	PT-77439	+	—
	PT-77443	+	—
	PT-77480	+	—

* presented by Dr. T. AOKI.

Table 3. Minimal inhibitory concentration of TS for VSA-sensitive and VSA-nonsensitive strains of *Vibrio anguillarum*

Strain	Sensitivity to VSA	MIC($\mu\text{g/ml}$) of TS
PT-7691	Sensitive	1.2
PT-77020		1.2
PT-77122		1.2
PB-15		1.2
PT-7680	Nonsensitive	24.0
PT-77437		24.0
PT-77439		24.0
PT-77442		24.0

TS: Trimethoprim+Sulfadoxine (1:5), VSA: Vibriostatic agent 0/129, PB-15: A strain isolated from ayu in Lake Hamana in 1966.

1 に示したようにウナギに対する病原性においても特に違いがあるとは思われなかった。

これらのことから、VSA に対する感受性の点を別にすれば、52 株はすべて *V. anguillarum* に同定しうると判断された。

ところでアユ養殖場では、従来クロラムフェニコール、テトラサイクリン、オキシリン酸、ナリジクス酸などが予防、治療薬として使用され、最近ではこれらに加えてTS (トメトプリム・スルファドキシシン合剤) が使用されている。1973年に各地の養殖場で発生したアユのビブリオ病は、それまでは本病の有効治療薬であったクロラムフェニコールの効果がしばしば認められないということで問題になった。その年に著者らが徳島県および岡山県下のアユから分離した *V. anguillarum* の菌株の中にはクロラムフェニコールに対し感受性を示さない、あるいはごく弱い感受性しか示さない株が存在することが確かめられているが、その時点ではVSA非感受性株の出現は認められなかった(室賀ら, 1974)。その後クロラムフェニコールにかわる治療薬としてTSがしばしば使用されていたが、一昨年(1976)年の末頃からそのTSにも効果が認められないという事例が出てきており、この頃からVSA非感受性株が出現してきている。このことから、TSに対する耐性化がVSAに対する感受性の喪失をもたらしたのではないかと考えられた。

前述のVSA感受性代表株4株と非感受性代表株4株、それぞれに対するTSの最小発育阻止濃度を調べた結果をTable 3に示した。同表に示されたように、VSA感受性4株に対するTSのMICはいずれも $1.2 \mu\text{g/ml}$ であったのに対し、VSA非感受性4株に対するそれはいずれも $24.0 \mu\text{g/ml}$ であり、VSA感受性株と非感受性株のTSに対する感受性には著しい差が認められた。このことから、TSに対する感受性とVSAに対する感受性の間には相関関係があるものと推定された。

そこで、VSA感受性4株をTSを含む培地で継代培養したところ、わずか8継代で4株とも $12 \mu\text{g/ml}$ のTSを含む培地に発育するようになった。人為的にTS感受

性を低下せしめたそれらの株のVSA感受性を調べたところ、発育阻止帯の形成は認められず、VSA感受性株がVSA非感受性株に変化していることが確認された。

以上の実験結果から、ビブリオ病罹病中のアユから分離された *V. anguillarum* の中にはVSA (Vibriostatic agent O/129) に対する感受性を失ってしまっている株が存在することが確かめられた。そして、それらの株は治療薬として使用されていたTS (トリメトプリム・スルファドキシシン合剤) に対し耐性化したためVSAに対する感受性も喪失したものと推定された。従って今後、TSが使用されている養魚場の魚から分離された菌の簡易同定においては、VSAに対する感受性の有無は必ずしも *Vibrio* 属あるいは *V. anguillarum* の同定の鍵とはなり得ないものと考えられるが、これは *Vibrio* 属細菌の分類上きわめて重大な問題であり今後更に詳細な検討が必要と考えられる。

最後に、*V. anguillarum* の抗血清を分与して下さった宮崎大学の青木宙博士に謝意を表します。

文 献

- 室賀清邦・属 博夫・杉山瑛之・田原恒男・城 泰彦 (1974): 1973年春から夏にかけて徳島県および岡山県下に流行したアユのビブリオ病の原因菌について。魚病研究, 8, 147-151.
- 室賀清邦 (1975): *Vibrio anguillarum* およびその感染症に関する研究。広大水畜産学部紀要, 14, 101-215.
- 坂崎利一 (1963): 細菌学的諸性状と分類学上の位置, 藤野・福見編, 「腸炎ビブリオ」69-107. 一成堂, 東京, 422+33 pp.
- 若林久嗣・塩瀬淳也・江草周三・富永正雄 (1975): アユに発生した非運動性ビブリオ菌による流行病について。魚病研究, 9, 199-203.