アユ養殖場における薬剤耐性菌増加について

青木 宙*・城 泰彦**・江草周三***

(昭和 54 年 11 月 28 日受理)

Frequent Occurrence of Drug Resistant Bacteria in Ayu (*Plecoglossus altivelis*) Culture

Takashi AOKI*, Yasuhiko JO** and Syuzo EGUSA***

*Dept. of Fish., Fac. of Agr., Miyazaki Univ., Miyazaki, Japan

**Fish. Exp. Stn. of Tokushima Pref. Tokushima, Japan

***Dept. of Fish., Fac. of Agr., Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan

(Received November 28, 1979)

Chloramphenicol (CM)- and tetracycline (TC)-resistant bacteria which could grow on Heart Infusion agar containing 6.2 mcg/ml of CM or TC, respectively, were isolated with high frequencies from the intestinal tracts of cultured Ayu (*Plecoglossus altivelis*) and the water of Ayu culturing ponds in Tokushima Pref. CM- and TC-resistant bacteria were not isolated from the intestinal tracts of wild Ayu collected from the river Nakagawa in Tokushima Pref. The principal drug resistant bacteria isolated from the intestinal tracts were *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio anguillarum*. Drug resistant *Pseudomonas*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Escherichia coli*, *Hafnia*, *Salmonella arizonae* and other unidentified *Enterobacteriaceae* were occasionally found. Drug resistant bacteria isolated from the water of ponds were common to those from the intestinal tracts. However, drug resistant *E. coli*, *Pseudomonas* and *V. anguillarum* were not isolated from the water. All drug resistant *V. anguillarum* strains carried R plasmids. R plasmids were detected in a part of the *Hafnia*, *E. cloacae*, *A. hydrophila*, unidentified *Enterobacteriaceae* and *E. aerogenes* strains. The drug resistance markers present in the R plasmid bearing strains were in most cases sulfonamides streptomycin CM and TC.

1973 年以来、毎年全国各地のアユ養殖場でビブリオ病が多発し、少なかなぬ被害を出している。その被害が大きい要因の一つとして、原因菌の *Vibrio anguillarum* が、養殖場で広く使用されているサルファ剤、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ニトロフラン誘導体あるいはナリジキシン酸誘導体等の化学療法剤に対し耐性を有することが多く、治療を困難にしていることが挙げられる。しかもそれら耐性は多くの場合伝達性薬剤耐性因子 (R プラスミド) によるものであり、多剤耐性を示す (Aoki *et al.*, 1974)。そして治療困難であることがかえって多種多用の化学療法剤の使用を促している。このことから *V. anguillarum* のみならず養殖池水やアユの腸管に生息する種々の細菌でも耐性株は増加しているものと推察される。この推察を裏付けるために我々は

徳島県下のアユ養殖場における耐性菌の出現状況について調査を行なった。

本報告はその調査結果をまとめたものである。なお、この結果の一部はさきの魚病研究談話会主催で行なわれた「魚類の感染症の予防に関する」シンポジウムで公表した (青木ら, 1978)。

材料および方法

1974 年 4 月、徳島県下の 14 の養殖場の各 1 池より各 5 尾のアユを採集した。調査時点で 14 池のうち 11 池のアユにビブリオ病の発生が観察され、さらに別の 1 池のアユでは真菌性肉芽腫症が認められた。採集した魚はアイスボックスに収容し、その日のうちに実験室に持帰り、体長および体重を測定後、腸管を無菌的に摘出し、等量の滅菌生理食塩水を加えて 2,000 rpm で、3 分間ホモジナイズした。ホモジナイズしたものを 5 尾プールし、滅菌生理食塩水で 10^{-1} ~ 10^{-3} まで 10 段階希釈し

* 宮崎大学農学部水産増殖学科

** 徳島県水産試験場

*** 東京大学農学部水産学科

た。各稀釈液の 0.1 ml を chloramphenicol (三共) (CM) または tetracycline (レダリー) (TC) を 6.2 mcg/ml を含むハートインフュージョン (HI) 寒天平板培地 (栄研) と、それらを含まない同じ培地上に塗抹・培養し、定量的に菌数を求めた。また、14 池のうちの 4 池 (いずれもビブリオ病の発生が認められた) について、池水中の細菌を同様の方法で定量した。

一方、薬剤にまったく触れていないと思われる徳島県那賀川の野生 Ayu を 5 尾、1974 年 4 月に採捕し、上記の養殖 Ayu と同様に処理して腸管の細菌数を定量した。

培養は 28°C で 48 時間行なった。池別に、上記 3 種類の HI 寒天平板培地に増殖した形態を異にする 4 (ときに 3, または 8) コロニーを釣菌し、それぞれの分離平板培地と同じ平板培地に再分離した。再分離した菌は Bergey's Manual 第 8 版 (BUCHANAN *et al.*, 1974) および COWAN (1974) の分類に従って同定した。CM または TC を含む平板培地に増殖可能であった菌について

は、大腸菌 K-12 の Substrain である RC 85 *nal* (nalidixic acid 耐性) と混合培養し、RC 85 *nal* へ耐性の伝達の有無を調べた。さらに、検出された伝達性 R プラスミドの耐性マーカーをディスク法を用いて求めた (AOKI *et al.*, 1974)。

結 果

1) 耐性菌の出現頻度

14 池の養殖 Ayu 腸管 1 g 当りの細菌数 (全細菌数) は $9.9 \times 10^6 \sim 1.1 \times 10^8$ で、それらの平均は 3.3×10^7 であった。同じ材料から CM 6.2 mcg/ml を含む HI 寒天平板培地に増殖可能であった細菌 (以下 CM 耐性菌と呼ぶ) の全細菌数に対する比率 (以下出現率と呼ぶ) は 33.3~100%, 平均で 75.9% と非常に高く、14 池のうちの 5 池では 100% の値を示した (Table 1)。TC 6.2 mcg/ml を含む HI 寒天平板培地に増殖可能であった細菌 (以下 TC 耐性菌と呼ぶ) の出現率は、4.2~100%,

Table 1. Incidence of chloramphenicol- and tetracycline-resistant bacteria* in the intestinal tracts of Ayu (*Plecoglossus altivelis*)

No. of ponds	Number of cells/g of intestine (including intestinal contents)						Fish examined		
	Unselected** bacteria	CM-resistant bacteria			TC-resistant bacteria		Mean Body length (cm)	Mean Body Weight (g)	
1	5.4×10^7	3.6×10^7	(66.7%)	3/4***	9.0×10^6	(16.7%)	0/4	8.8	11.1
2	7.2×10^7	8.3×10^7	(100%)	2/4	1.5×10^7	(20.8%)	3/4	12.3	28.3
3	3.2×10^7	2.8×10^7	(87.5%)	0/4	1.8×10^7	(56.3%)	0/4	7.7	8.6
4	2.0×10^7	2.1×10^7	(100%)	0/4	1.0×10^6	(5.0%)	0/4	9.3	13.5
5	9.9×10^6	3.3×10^6	(33.3%)	1/4	1.5×10^6	(15.2%)	2/4	8.7	9.8
6	4.5×10^7	3.4×10^7	(75.6%)	0/4	5.6×10^6	(12.4%)	2/4	14.5	46.1
7	1.0×10^7	5.4×10^6	(54%)	0/4	4.2×10^5	(4.2%)	1/4	13.3	36.3
8	4.7×10^7	6.7×10^7	(100%)	0/4	2.7×10^7	(57.4%)	2/4	7.8	7.1
9	7.8×10^7	5.5×10^7	(70.5%)	0/4	5.8×10^7	(74.4%)	0/4	14.4	46.7
10	1.3×10^7	6.0×10^6	(46.2%)	0/4	7.5×10^6	(57.7%)	3/4	9.7	12.4
11	7.9×10^7	3.9×10^7	(49.4%)	1/4	4.5×10^7	(57.0%)	1/4	7.7	4.9
12	1.1×10^8	8.8×10^7	(80%)	0/4	6.2×10^7	(56.4%)	0/4	10.4	17.4
13	3.0×10^7	3.0×10^7	(100%)	1/4	2.5×10^7	(83.3%)	2/4	11.7	23.6
14	1.2×10^7	2.9×10^7	(100%)	3/4	1.7×10^7	(100%)	3/4	10.4	13.8
Total				11/56			22/56		
Mean	3.3×10^7	2.6×10^7	(75.9%)		1.0×10^7	(44.1%)		10.6	20.8
Wild Ayu (Nakagawa River)									
	2.6×10^4	$< 2.0 \times 10^2$	(<0.8%)		$< 2.0 \times 10^2$	(<0.8%)		7.8	3.9

* Bacteria grown on Heart Infusion agar containing 6.2 mcg/ml of CM or TC were taken as CM- and TC-resistant bacteria, respectively.

** Bacteria grown on drug free Heart Infusion agar.

*** R⁺ strains/strains studied.

平均で 44.1% とやはり高かった (Table 1)。

那賀川で採捕されたアユの腸管 1 g 当りの細菌数は 2.6×10^4 と養殖魚の腸管の菌数に比較して少なかった。また、CM 耐性菌、TC 耐性菌はともにまったく検出されなかった (Table 1)。

養殖池水 1 ml 当りの細菌数は 1 池を除き 10^3 台であった (Table 2)。CM および TC 耐性菌の出現率は池によって異なったが、3 池において TC 耐性菌が 30% を越えた (Table 2)。

2) 伝達性 R プラスミドによる耐性菌の検出

伝達性 R プラスミドによる耐性菌は 10 池の魚より分離された。伝達性 R プラスミドは調べた CM 耐性 56 株中 11 株 (19.6%)、同じく TC 耐性 56 株中 22 株 (39.3%) より検出された (Table 1)。

伝達性 R プラスミドによる耐性菌は池水中からも検出

され、調べた CM 耐性 16 株中 8 株、同じく TC 耐性 19 株中 1 株が伝達性 R プラスミドによるものであった。伝達性 R プラスミドは腸管とは逆に CM 耐性菌により多く検出された (Table 2)。

3) 伝達性 R プラスミドと耐性菌の種類

アユの腸管から薬剤無添加培地で分離された 60 株および CM 耐性および TC 耐性株各 56 株、および同様に池水から分離されたそれぞれ 18 株、16 株および 19 株の種類を Table 3 に示した。池別の種類は示さないが、池間で菌種の差は少なかった。本表にみられるように薬剤無添加培地で分離された菌種と耐性菌種との間に大差はない。一方、アユ腸管内と池水中の菌種を比較すると *Aeromonas hydrophila* が前者で遙かに多く、本種が腸内に棲みつき易い種類であることを示している。それに対して *Vibrio anguillarum* は池水からは分離されな

Table 2. Incidence of chloramphenicol- and tetracycline-resistant bacteria* in the water of Ayu (*Plecoglossus altivelis*) culturing ponds

No. of ponds	Number of cells/ml of pond water						
	Unselected bacteria**	CM-resistant bacteria			TC-resistant bacteria		
6	2.4×10^3	1.2×10^3	(50%)	0/4***	1.6×10^2	(6.7%)	0/4
11	4.1×10^3	1.4×10^2	(3.4%)	6/8	1.3×10^3	(31.7%)	0/8
12	5.6×10^3	1.3×10^3	(23.2%)	2/4	2.2×10^3	(39.3%)	1/4
13	2.0×10	$<1.0 \times 10$	(<50%)	0	3.0×10	(100%)	0/3
Total				8/16			1/19
Mean	1.0×10^3	1.2×10^2	(19.2%)		3.4×10^2	(44.4%)	

* Bacteria grown on Heart Infusion agar containing 6.2 mcg/ml of CM or TC were taken as CM- and TC-resistant bacteria, respectively.

** Bacteria grown on drug free Heart Infusion agar.

*** R⁺ strains/strains studied.

Table 3. Identification of bacteria isolated from the intestinal tracts of Ayu (*Plecoglossus altivelis*) and the water of Ayu culturing ponds

Species or genus	Intestinal tracts			Pond water		
	CM-resistant strains	TC-resistant strains	Unselected strains	CM-resistant strains	TC-resistant strains	Unselected strains
<i>Aeromonas hydrophila</i>	30	21	31	5	2	4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	2	0	0	1	0
<i>E. cloacae</i>	3	1	2	2	0	1
<i>Escherichia coli</i>	0	1	0	0	0	0
<i>Hafnia</i>	4	6	1	9	11	6
<i>Pseudomonas</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Salmonella arizonae</i>	6	6	2	0	1	0
<i>Vibrio anguillarum</i>	8	14	20	0	0	0
Unidentified						
<i>Enterobacteriaceae</i>	4	5	0	0	4	7

Table 4. Drug resistance markers of R plasmids detected in CM- and TC-resistant bacteria isolated from the intestinal tracts of Ayu (*Plecoglossus altivelis*)

Species or genus	CM-resistant bacteria		TC-resistant bacteria	
	No. of R ⁺ strains/ No. of strains studied	Resistance markers of R plasmids	No. of R ⁺ strains/ No. of strains studied	Resistance markers of R plasmids
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0/30		1/21	SA SM CM TC*
<i>Enterobacter aerogenes</i>			1/2	SA SM CM TC
<i>E. cloacae</i>	3/3	SA SM CM	1/1	SA SM CM TC
<i>Escherichia coli</i>			0/1	
<i>Hafnia</i>	0/4		0/6	
<i>Pseudomonas</i>	0/1			
<i>Salmonella arizonae</i>	0/6		0/6	
<i>Vibrio anguillarum</i>	8/8	SA SM CM TC	14/14	SA SM CM TC
Unidentified				
<i>Enterobacteriaceae</i>	0/4		2/5	SA SM CM TC

* Abbreviations—SA: sulfonamides; SM: streptomycin; CM: chloramphenicol; TC: tetracycline.

Table 5. Drug resistance markers of R plasmids detected in CM- and TC-resistant bacteria isolated from the water of cultured Ayu (*Plecoglossus altivelis*) ponds

Species or genus	CM-resistant bacteria		TC-resistant bacteria	
	No. of R ⁺ strains/ No. of strains studied	Resistance markers of R plasmids	No. of R ⁺ strains/ No. of strains studied	Resistance markers of R plasmids
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1/5	SA CM TC	0/2	
<i>Enterobacter aerogenes</i>			0/1	
<i>E. cloacae</i>	0/2			
<i>Hafnia</i>	7/9	SA SM CM (5) SA SM CM TC (2)	1/11	SA SM CM TC
<i>Salmonella arizonae</i>			0/1	
Unidentified				
<i>Enterobacteriaceae</i>			0/4	

かった。これは池水中での生存性が弱いためかと思われる。なお那賀川産アユの腸内から薬剤無添加培地で分離された4株はすべて *V. anguillarum* であった。

アユの腸管より分離された耐性菌112株のうち51株(45.5%)は *A. hydrophila* でもっとも多く、次いで *V. anguillarum* が22株(19.6%)と多かった。前者は14池中の13池から、後者は10池より分離された。他に腸内細菌群と *Pseudomonas* が分離された。それに対して池水から分離された耐性菌は *Hafnia* が最も多く、*A. hydrophila* がそれに次いだ。

V. anguillarum のCM耐性8株およびTC耐性14株はすべて伝達性Rプラスミドによるものであった(Table 4)。他に伝達性Rプラスミドが検出されたのは *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae* 腸内細菌群の未同定株、および *A. hydrophila* であったが、*A. hydrophila*

からの検出率は非常に低かった(Table 4)。

これら検出された伝達性Rプラスミドの耐性マーカーはTable 4に示したとおりであるが、*E. cloacae* 由来のものを除き、全て4剤耐性であった。

池水より分離されたCM耐性菌およびTC耐性菌のうち *Hafnia* および *A. hydrophila* からのみ伝達性Rプラスミドが検出された。その耐性マーカーはTable 5に示したとおりである。

考 察

今回調査を行なった徳島県下の養殖場のアユの腸管内のCM耐性菌およびTC耐性菌の出現率は非常に高かった。すでに著者らが報告した他の養殖魚(コイ、ウナギ、ニジマス、アマゴ、ヤマメおよびブリ)の腸管のCM耐性菌およびTC耐性菌出現率(AOKI *et al.*, 1977)

よりも遙かに高い値を示した。さきに著者 (AOKI, 1975) はアユ養殖場における化学療法剤の使用頻度と、アユの腸管内の CM 耐性菌および TC 耐性菌の出現率を比較し、化学療法剤の使用頻度の高い養殖場ほどこれら薬剤耐性菌の出現率が高いことを示唆した。今回も調査した養殖地のほとんどすべてで多種多様の化学療法剤が使用されていた。一方、河川で採捕された化学療法剤に触れていないと思われるアユの腸管から耐性菌は検出されなかった (Table 1)。これらの事実より、養殖場で薬剤が使用されることによりアユの腸管内で耐性菌が選択され、増加したものと思われる。

また、養殖池水中の耐性菌出現率も、腸管における耐性菌出現率に比べれば低かったが、やはり高い値を示した (Table 2)。さらに、他の養殖魚種の養殖池水中の CM 耐性菌および TC 耐性菌出現率 (AOKI *et al.*, 1977) よりも高かった。

養殖アユの腸管から分離された細菌の種類としては *A. hydrophila* がもっとも多く、次いで *V. anguillarum* であった (Table 3)。その他は *Pseudomonas* および腸内細菌群であった。特に、*A. hydrophila* は 14 池中の 13 池の魚から検出された CM 耐性菌、TC 耐性菌ともこの 2 種が多かった。しかし *A. hydrophila* 耐性株は伝達性 R プラスミドによるものは極めて少なかった (Table 4)。一方、コイ (青木, 1973) およびウナギ (青木ら, 1973; AOKI *et al.*, 1971) から分離された *A. hydrophila* の耐性株の多くは伝達性 R プラスミドによるものであった。*A. hydrophila* はこれら魚種のよく知られた病原菌であるが、アユに対する病原性はあまり強いものとは思われない。しかし R プラスミド耐性菌の出現をこの点に結びつけて考えることは適当とは思われない。この問題は今後の研究課題としたい。

V. anguillarum の耐性株は 14 の養殖池のうちの 10 池の魚より分離された。各養殖池から分離された 22 株のすべてから 4 剤耐性 SA, SM, CM, TC の伝達性 R プラスミドが検出された (Table 4)。このことは養殖場において *V. anguillarum* の耐性菌感染症が起こっていることを示唆しているものと思われる。*V. anguillarum* がアユ養殖場へ導入されるルートは明らかではない。しかし、その耐性菌から検出された伝達性 R プラスミドの性状がすべて一致したこと (AOKI *et al.*, 1975)、さらに、多くの養殖場から分離された菌株の血清型が一致すること (青木ら, 1978) から、*V. anguillarum* 耐性株はアユの移動とともに養殖場へ導入された可能性が充分に考えられる。今後、この点を考慮した防疫体制の確立が望

まれる。

要 旨

1974 年 4 月、徳島県下の 14 の養殖場のアユの腸管および池水中の chloramphenicol (CM) 耐性菌および tetracycline (TC) 耐性菌を定量的に分離した。那賀川で採捕された野生アユの腸管についても同様に行なった。その結果養殖アユの腸管あるいは池水より CM 耐性菌および TC 耐性菌が高頻度に検出された。一方、野生アユからはまったく耐性菌は検出されなかった。分離耐性菌種は *Aeromonas hydrophila* がもっとも多く、次いで *Vibrio anguillarum* であった。他に腸内細菌群および *Pseudomonas* であった。伝達性 R プラスミドは *V. anguillarum* の耐性株からもっとも多く検出され、腸内細菌群および *A. hydrophila* 耐性株の一部からも検出された。検出された伝達性 R プラスミドの耐性マーカーのほとんどは sulfonamides, streptomycin, CM, TC の 4 剤耐性であった。

謝 辞

調査の際にご援助をいただいた徳島県水産試験場元場長小竹子之助氏、同試験場田原恒夫氏、元同試験場研修生故芦田穆氏に深く感謝の意を表する。

なお、本研究の一部は文部省科学研究費補助金によって行なわれた。

文 献

- 青木 宙 (1973): コイの養殖池水および腸管より分離された薬剤耐性菌の研究. 日水誌, **40**, 247-254.
- AOKI, T. (1975): Effects of chemotherapeutics on bacterial ecology in the water of ponds and the intestinal tracts of cultured fish. Ayu (*Plecoglossus altivelis*). Japan. J. Microbiol., **19**, 7-12.
- AOKI, T., T. ARAI and S. EGUSA (1975): R factors detected from *Vibrio anguillarum* and marine *Vibrio*. Microbial Drug Resistance. pp. 223-228. Edit. by S. Mitsuhashi and H. Hashimoto. University of Tokyo Press, Tokyo.
- AOKI, T., S. EGUSA and T. ARAI (1974): Detection of R factors in naturally occurring *Vibrio anguillarum* strains. Antimicrob. Ag. Chemother., **6**, 534-538.
- 青木 宙・北尾忠利 (1978): アユのビブリオ病. 魚病研究, **13**, 19-24.
- AOKI, T., T. KITAO, and T. ARAI (1977): R plasmids in fish pathogens. Plasmids Medical and Theoretical Aspects. pp. 39-45. Edit. by S.

- Mitsubishi *et al.* Avicenum, Czechoslovak Medical Press, Prague.
- AOKI, T., S. EGUSA, Y. OGATA and T. WATANABE (1971): Detection of resistance factors in fish pathogens *Aeromonas liquefaciens*. *J. Gen. Microbiol.*, **65**, 343-349.
- 青木 宙・渡辺 力 (1973): ウナギの養殖池水および腸管より分離された薬剤耐性菌の研究. 日本誌, **39**, 121-130.
- BUCHANAN, R. E. *et al.* Editors (1974): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th Edn., Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- COWAN, S. T. (1974): Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria 2nd Edn., Cambridge Univ. Press, London.