情 報

Iodometric method を応用した Slide test による Ampicillin 耐性 *Pasteurella piscicida* の迅速判定法の検討*

北尾 忠利**・青木 宙**

(昭和 58 年 7 月 25 日受理)

Evaluation of a Rapid Slide β -lactamase Test, a Modified Iodometric Method, for Detecting Ampicillin Resistance Strains of *Pasteurella piscicida*

Tadatoshi KITAO and Takashi AOKI

Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Miyazaki University,
Miyazaki 880, Japan

(Received July 25, 1983)

In 1982 infections of cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) with ampicillin (ABPC) resistant strains of *Pasteurella piscicida* were observed in the southwest of Japan. Determining whether current strains of *P. piscicida* are resistant or sensitive to ABPC is very important in the selection of initial antibiotics therapy for this infection. The detection of β -lactamase in ABPC resistant strains was attempted by using the rapid β -lactamase test of ROSENBLATT and NEUMANN (1978). The production of β -lactamase was found first in ABPC resistant strains of *P. piscicida*. The test was useful to determine whether the strain was resistant or not.

The rapid slide test can be, therefore, easily utilized as a rapid detection method for ABPC resistant *P. piscicida* in routine work.

Pasteurella piscicida に起因するハマチ類結節症は、1969 年に九州、四国および瀬戸内海の沿岸養殖場で大流行し(窪田ら, 1970), それ以来、毎年その流行の規模に大小の差はみられるものの、養殖ハマチの特に稚魚期において莫大な経済的被害を与えている。本症の原因菌 *P. piscicida* は、発見の初期よりペニシリン系の薬剤に対して強い感受性を示すことが知られており(木村・北尾, 1971), 最近までアンピシリン(以下 ABPC と略す)製剤が本症の治療薬として広く使用され、すぐれた治療効果を示してきた。しかしながら、1982 年になって四国地方および九州地方の一部の養殖場において ABPC

耐性の *P. piscicida* の検出が報告され***, ABPC 耐性の *P. piscicida* による類結節症の発生が充分に予想される。すなわち、今後は本症の罹病魚から分離される *P. piscicida* について ABPC に対して耐性であるか感受性であるかを迅速に判定することが、初期の治療対策決定上きわめて重要なことである。一般にペニシリン系抗生物質(ABPC も含まれる)に対する薬剤耐性菌は、 β -ラクタマーゼ(ペニシリナーゼ)を産生することが知られている(田中ら, 1982)が、ABPC 耐性 *P. piscicida* についてその産生の有無を検討した報告はみあた

* 本研究の一部は昭和 58 年度日本魚病学会において発表した。

** 宮崎大学農学部水産増殖学科

*** 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、楠田理一・川合研一・安部知智, 昭和 58 年度日本魚病学会発表。

らない。そこで、ROSENBLATT および NEUMANN (1978) によって開発された Iodometric method を応用した rapid slide test 法により ABPC 耐性 *P. piscicida* 株が β -ラクタマーゼを産生するかどうかを調べた。さらにこの方法が ABPC 耐性株の迅速判定法として利用できるか否かについても検討したので報告する。

材料および方法

1. 供試菌株

1980 年から 1982 年の間に、鹿児島、長崎、佐賀および愛媛の各県下の養殖場で、本症の病魚から分離した菌株で、形態学的、培養学的、生化学的および血清学的諸性状試験によって、*P. piscicida* と同定された当教室保存の 12 株を用いた。

2. ABPC 感受性試験

1) ディスク法

(i) 使用培地

感受性測定には、2% 食塩加 MUELLER-HINTON agar (Difco) を用い、増菌には 2% 食塩加 MUELLER-HINTON broth (Difco) を使用した。

(ii) 使用感受性ディスク

感受性測定用ディスクは、1 濃度アンピシリン (Pb) ディスク (昭和ディスク) を使用した。

(iii) 感受性測定

常法に従い、25°C で 36 時間培養後に阻止円の直径を測定した。

2) MIC (Minimal Inhibitory Concentration) 測定法

日本化学療法学会の定める標準法に従って ABPC に対する MIC 値を測定した。前培養には、2% 食塩加 MUELLER-HINTON broth (Difco) を用い、測定用培地には 2% 食塩加 MUELLER-HINTON agar (Difco) を使用し、25°C で 36 時間培養後に判定した。

3. Rapid slide test (iodometric method)

ROSENBLATT and NEUMANN (1978) の方法に準じて行った。

1) ペニシリン溶液

結晶ペニシリン G カリウム (注射用) 100 万単位を含むバイアル瓶に滅菌蒸留水 1 ml を加えて完全に溶解させ、その溶解液を 0.15 ml ずつ小試験管に分注し、ゴム栓にて密封 (ビニールテープで更にシールしておく) 後、使用時まで -20°C 以下に保存する。

2) ヨウ素液

ヨードカリ 1.5 g とヨウ素 0.3 g を 0.1 M リン酸緩衝

Fig. 1. A rapid slide test for β -lactamase production. White color on left shows β -lactamase positive reaction, whereas dark (purple) color on right indicates a negative reaction.

液 (0.2 M Na_2HPO_4 26.5 ml, 0.2 M NaH_2PO_4 73.5 ml, 蒸留水 100 ml; pH 6.4) 100 ml で溶解し、遮光の目的で褐色瓶に入れ使用時まで 4°C に保存する。

3) ペニシリン・ヨウ素混合液

前述の凍結保存中のペニシリン溶液 0.15 ml を含む小試験管を取出し、流水にて溶解させたのち、その小試験管に既成のヨウ素液 1.1 ml を加えてよく混合し、ペニシリン・ヨウ素混合液を作成する。この混合液は、試験に供試する直前に作成する。

4) 0.4% デンブレン液

可溶性デンプン (Difco) 0.4 g に 100 ml の蒸留水を加え、加温溶解させたのち、試薬瓶に入れ使用時まで 4°C に保存する。カビが発生した場合は、再度新たに調製する。

5) Slide test の術式

固型培地上に発育した *P. piscicida* のコロニーを 1 白金耳かきとり、ペニシリン・ヨウ素混合液 1 滴を滴下したスライドグラス (ホールグラスでもよい) 上で十分に混和したのち、ただちにその混和液の中心に 0.4% デンプン液を 1 滴滴下する。 β -ラクタマーゼ非産生菌 ABPC 感受性菌) であれば濃紫色に変色し、 β -ラクタマーゼ産生菌 (ABPC 耐性菌) であれば着色せず白色のままである。 β -ラクタマーゼ陰性の場合には直ちに判定できるが、最終判定は 5 分後に行う。

結 果

Table 1 に示すように、本実験に供試した *P. piscicida* 菌株中、Pb 感受性ディスクに対して 3.9 mm 以上の著明な阻止円の形成が観察された ABPC 感受性株は、ABPC に対する MIC 値も 0.0125~0.025 $\mu\text{g/ml}$ と低い値を示し、rapid slide test (iodometric method) でもすべて β -ラクタマーゼ非産生 (濃紫色を呈す) の成績

Table 1. Correlation between sensitivity test for ampicillin and a rapid slide test for β -lactamase (penicillinase)

Strains used	Sensitivity test		β -lac- tamase test (Iodo- metric method)
	Disk test (cm)	MIC (μ g/ml)	
<i>P. piscicida</i> KGS 8002	6.0	0.0125	—
" KGS 8101	6.3	0.0125	—
" KGS 8113	4.1	0.025	—
" NGS 8108	4.1	0.025	—
" NGS 8111	3.9	0.025	—
" SAG 8102	6.1	0.025	—
" NGC 8201	6.0	0.025	—
" NGC 8204	3.9	0.025	—
" H 82084	1.2	25	+
" EH 8203	1.2	25	+
" H 82088	0.8	50	+
" H 82089	0.8	100	+

+ indicates a positive reaction, — indicates a negative reaction

であった。これに対して、Pb 感受性ディスクに対して阻止円の形成がほとんど認められなかったもの、あるいは全く認められなかった ABPC 耐性株は、ABPC に対する MIC 値も 25~100 μ g/ml と高い値を示し、これら ABPC 耐性株は、rapid slide test においてもすべて β -ラクタマーゼ産生（白色）の反応を示した (Fig. 1)。

考 察

1982 年になって、ハマチ類結節症の病魚由来の ABPC 耐性 *P. piscicida* が検出されはじめ、今後 ABPC 製剤による本症の治療効果を期待するためには、*P. piscicida* の新鮮分離菌株について ABPC に対する耐性の有無を迅速に判定する必要がある。

ヒトにおける数種の病原細菌のペニシリン系薬剤に対する耐性菌は、 β -ラクタマーゼを産生することが知られており、その検出法として、iodometric method (NOVICK, 1962; LINDSTRÖM ら, 1972; ROSENBLATT ら, 1978), hydroxylamine method (DALE ら, 1971), chemical manometric method (HENRY ら, 1947), pH-stat alkalimetric method (HOU ら, 1972), spectrophotometric method (O'CALLAGHAN ら, 1972; WALEY ら, 1974) など種々の検出方法が報告されている。

著者らは、これらの検出方法の中から比較的簡便と思われる iodometric method を改良した ROSENBLATT

ら (1978) の rapid slide test を用い、魚病細菌としてのはじめて ABPC 耐性 *P. piscicida* が β -ラクタマーゼを産生することを証明し、この β -ラクタマーゼ産生能は、従来の感受性ディスク試験および MIC 試験の成績と一致することを明らかにした (Table 1)。

Iodometric method の原理は、 β -ラクタマーゼが存在すると基質として用いるペニシリンの β -ラクタム環が開裂し、penicilloic acid となり、この penicilloic acid はヨウ素と結合しやすく、容易に penicilloic acid-iodine complexes ができ、free のヨウ素が消失するため、その後にデンプンを作用させても呈色反応があらわれず、白色のままに推移するのである。

この rapid slide test (iodometric method) は、固形培地上に発育した *P. piscicida* さえあれば、スライドグラス上で短時間のうちに多数の菌株について、ディスク試験の成績よりも早く呈色反応の結果から ABPC に対して感受性菌であるか耐性菌であるかを簡単にかつ容易に判別することができる。

この rapid slide test を実施するに当たって留意すべき事項は、反応に用いる菌量が少ないときは β -ラクタマーゼ産生株でも false-negative になることがあるので、充分な菌量（1 白金耳）を用いることが必要である。また、ペニシリン溶液とヨウ素液の混合液は、検査直前に作成し、作成後 1 時間以上を経過したものは使用しない方がよい。

要 約

1. Iodometric method を改良した ROSENBLATT および NEUMANN (1978) の rapid slide test により、ABPC 耐性 *P. piscicida* は β -ラクタマーゼを産生することを証明した。

2. ABPC 耐性 *P. piscicida* の β -ラクタマーゼ産生能は、ディスク試験および MIC 試験の成績と完全に一致し、rapid slide test は ABPC 耐性 *P. piscicida* の迅速検出法として、容易に日常検査に活用できることを明らかにした。

文 献

DALE, J. W. and J. T. SMITH (1971): The purification and properties of the β -lactamase specified by the resistance factor R-1818 in *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Biochem. J.*, **123**, 493-500.

HENRY, R. J. and R. D. HOUSEWRIGHT (1947): Studies on penicillinase: II. Manometric

- methods of assaying penicillinase and penicillin, kinetics of penicillin-penicillinase reaction, and effects of inhibitors on penicillinase. *J. Biol. Chem.*, **167**, 559-571.
- HOU, J. P. and J. W. POOLE (1972): Measurement of β -lactamase activity and rate of inactivation of penicillins by a pH-stat alkalimetric titration method. *J. Pharm. Sci.*, **61**, 1594-1598.
- 木村正雄・北尾忠利 (1971): 類結節症の原因菌について. 魚病研究, **6**, 8-14.
- 窪田三朗・木村正雄・江草周三 (1970): 養殖ブリ稚魚の細菌性類結節症の研究—I. 病徴及び病理組織学—1. 魚病研究, **4**, 111-116.
- LINDSTRÖM, E. B. and K. NORDSTRÖM (1972): Automated method for determination of penicillins, cephalosporins and penicillinase. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **1**, 100-106.
- NOVICK, R. P. (1962): Micro-iodometric assay for penicillinase. *Biochem. J.*, **83**, 236-240.
- O'CALLAGHAN, C. H., A. MORRIS, S. M. KIRBY and A. H. SHINGLER (1972): Novel method for detection of β -lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **1**, 283-288.
- ROSENBLATT, J. E. and A. M. NEUMANN (1978): Laboratory suggestion A rapid slide test for penicillinase. *Amer. Soc. Clin. Path.*, **69**, 351-354.
- SARGENT, M. G. (1968): Rapid fixed time assay for penicillinase. *J. Bacteriol.*, **95**, 1493-1494.
- 田中信男・中村昭四郎 (1982): 抗生物質大要・化学と生物活性 第3版, 東京大学出版会, 東京, pp. 310-311.
- WALEY, S. G. (1974): A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. *Biochem. J.*, **139**, 789-790.
- WORKMAN, R. G. and W. E. FARRAR, JR. (1970): Activity of penicillinase in *Staphylococcus aureus* as studied by the iodometric method. *J. Infect. Dis.*, **121**, 433-437.