アモキシシリンの魚病細菌に対する試験管内抗菌活性^{*1}

北尾忠利^{*2}・中内良介^{*3}・斉藤雷太^{*3}・田中一郎^{*3}

(1988 年 9 月 28 日受付)

In vitro Studies of Amoxicillin on Antibacterial Activity for Some Fish Pathogens

Tadatoshi KITAO^{*2}, Ryosuke NAKAUCHI^{*3}, Raita SAITO^{*3} and Ichiro TANAKA^{*3}

^{*2} Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Gakuen-Kibanadai Nishi 1-1, Miyazaki 889-21, Japan

^{*3} Animal health products division, Eisai Co., Ltd., Koishikawa, Tokyo 112-88, Japan

(Received September 28, 1988)

Minimal inhibitory concentration (MIC) of amoxicillin (AMPC) against *Pasteurella piscicida*, *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, and *Streptococcus* sp. were investigated. AMPC showed the highest antibacterial activity to *P. piscicida*. MICs of AMPC against 30 strains of *P. piscicida* isolated from cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) in 1985 were almost as high as that of ampicillin (ABPC), ranging from 0.025 to 0.1 µg/ml. Furthermore, bactericidal activity of AMPC to *P. piscicida* was higher than that of ABPC. Sensitivity of *P. piscicida*, *Streptococcus* sp. or *E. tarda* to AMPC was kept almost the same level during the culture of 20 times transfer. These results suggest that AMPC can be applied for therapy of bacterial pseudotuberculosis of cultured yellowtail.

アモキシシリン (AMPC) はペニシリン系の半合成抗生物質で、Fig. 1 に示すようにアンピシリン (ABPC) のベンゼン核のパラ位に -OH 基を導入した構造をしている。AMPC は試験管内抗菌活性および β ラクタマーゼによって不活化されるなどの基本的性質は ABPC とよく似ているが、大腸菌に対する試験管内での殺菌作用は ABPC より強く、マウスでは経口投与によって ABPC の約 2 倍の吸収効率を示すことが報告されている (中沢

ら, 1973)。

今回、数種の魚病細菌に対する AMPC の抗菌活性を調べ、養殖魚の細菌性疾病の治療薬としての応用の可能性について検討したので報告する。

材料および方法

供試菌株：宮崎大学農学部水産衛生学教室保存の *Pasteurella piscicida* (33 株), *Edwardsiella tarda* (30 株), *Aeromonas salmonicida* (30 株), *Aeromonas hydrophila* (30 株), *Vibrio anguillarum* (アユ由来 30 株, 海産魚由来 30 株) および *Streptococcus* sp. (30 株) を使用した。

供試薬剤：AMPC, ABPC, オキシリン酸 (OA), ナリジクス酸 (NA), オキシテトラサイクリン (OTC), フラゾリドン (FZ) およびチアンフェニコール (TP) の 7 薬剤を使用した。

最小発育阻止濃度の測定 AMPC の供試菌株に対する最小発育阻止濃度 (MIC) は、日本化学療法学会の方法に準じて測定した^{*4}。すなわち、前培養培地には Mueller Hinton Broth (MH ブイヨン; Difco), 測定用培地には Mueller Hinton agar (MH 寒天培地; Difco) を使用した。*P. piscicida* の前培養培地、測定用培地にはいず

Fig. 1. Chemical structure of amoxicillin.

^{*1} 本研究の一部は 1987 年 4 月の日本魚病学会春季大会において発表した。

^{*2} 宮崎大学農学部水産増殖学科

^{*3} エーザイ株式会社動薬事業部

^{*4} 日本化学療法学会 (1981): *Chemotherapy*, 29(1), 76-79.

れも 2% の割合に食塩を添加したものを用いた。前培養は MH ブイヨン (Difco) に供試菌株を接種して、*P. piscicida* は 25°C、*A. salmonicida* は 20°C、その他の菌種は 30°C で 1 夜静置培養した。前培養した各菌液を約 10^8 CFU/ml に調整したのち、薬剤含有培地に接種した。MIC 判定のための培養温度および培養時間は、*P. piscicida* は 25°C で 36 時間、*A. salmonicida* は 20°C で 48 時間とし、その他の菌種は 30°C で 24 時間とした。

また、1985 年に発生した類結節症から分離した *P. piscicida* の中から無作為に 30 株を抽出し、上記と同じ方法で MIC を測定した。

殺菌試験：AMPC および ABPC に対して、それぞれ 0.1 と 0.05 $\mu\text{g/ml}$ の MIC 値を示す *P. piscicida* PP47 を供試菌株として用いた。供試菌を 2% 食塩加 Heart Infusion broth (HI ブイヨン；ニッスイ) に接種後、25°C で 24 時間培養した菌液を、2% 食塩加 HI ブイヨンで 1.1×10^5 CFU/ml の濃度に調整した。この菌液に終末濃度が 0.2 $\mu\text{g/ml}$ または 0.4 $\mu\text{g/ml}$ になるように、AMPC または ABPC を添加した区および薬剤無添加の対照区を設定した。薬剤添加後直ちに 25°C で振盪培養を開始し、0, 1, 2, 3, 5 および 7 時間後の菌数の推移を平板塗抹培養法により測定した。菌数測定培地は 2% 食塩加 Heart Infusion agar (HI 寒天培地；ニッスイ) を用い、25°C で 36 時間培養後のコロニー数を算定した。測定は各時点で 3 回実施した。

耐性獲得試験：ブリ類結節症病魚より分離した *P. piscicida* TKP 7901 と NGC 8201、ブリ連鎖球菌症病魚より分離した *Streptococcus* sp. NGT 7834 と KGS 8115 およびバラコ病罹病ウナギより分離した *E. tarda* SY 7901 と AIC 8211 を供試した。供試菌株は、それぞれ至適の保存培地に継代保存中のものを使用した。試験培地としては、*P. piscicida* については 2% 食塩加 HI ブイヨン (ニッスイ)、*Streptococcus* sp. については Todd Hewitt broth (Difco) そして *E. tarda* については HI ブイヨン (ニッスイ) を使用した。これらはいずれも発育に最適なものとして選んだ。各液体培地 9.5 ml に AMPC 溶液 0.5 ml を添加し、終末薬剤濃度が 100 $\mu\text{g/ml}$ から 0.05 $\mu\text{g/ml}$ までの試験培地を作製した。なお、対照培地には滅菌蒸留水 0.5 ml を添加した。各供試菌の新鮮培養液を 1000 倍に希釈したものを 0.1 ml ずつ試験培地に接種した。各供試菌とも至適温度で 48 時間培養後、薬剤非含有の対照培地と同程度の発育を示したもののについては、次に 2 倍濃度の薬剤含有試験培地に接種し、同様の操作を 20 回継続した。なお、試験開始時の

AMPC に対する MIC 値は、*P. piscicida* では 2 株とも 0.2 $\mu\text{g/ml}$ で、*Streptococcus* sp. では 2 株とも 0.78 $\mu\text{g/ml}$ で、*E. tarda* では 2 株とも 1.56 $\mu\text{g/ml}$ であった。

Fig. 2. Minimal inhibitory concentration of amoxicillin for several fish pathogens.

結 果

抗菌活性: 各種魚病細菌の AMPC に対する感受性 (MIC) は Fig. 2 に示すとおりであった。*P. piscicida* は一部の感受性低下株を除いて 0.2 µg/ml 以下, *Streptococcus* sp. は 0.39~0.78 µg/ml, 海産魚由来の *V. anguillarum* は 12.5~25 µg/ml, アユ由来の *V. anguillarum* は 25~50 µg/ml と 100 µg/ml 以上, *E. tarda* は 0.39~1.56 µg/ml, *A. salmonicida* は 0.78 µg/ml 以下, *A. hydrophila* は 0.2 µg/ml と 6.25 µg/ml 以上であった。

1985 年に分離された *P. piscicida* 30 株の各種薬剤に対する感受性 (MIC) は Table 1 に示すとおりである。AMPC に対しては, 30 株すべてが 0.1 µg/ml 以下, ABPC に対しては 0.025 µg/ml 以下であった。OA に対

しては 30 株中 21 株が 0.39 µg/ml 以下, 9 株が 3.13~12.5 µg/ml であった。NA に対しては 21 株が, 1.56~6.25 µg/ml, 9 株が 100~400 µg/ml であった。OTC に対しては 5 株が 0.2~0.78 µg/ml, 25 株が 12.5~50 µg/ml であった。FZ に対しては 1 株が 12.5 µg/ml, その他はすべて 3.13 µg/ml 以下であった。TP に対しては 4 株が 1.56~6.25 µg/ml, その他はすべて 400 µg/ml 以上であった。

殺菌作用: 試験管内において *P. piscicida* に AMPC および ABPC を作用させた場合の生菌数の変化を, Fig. 3 に示した。すなわち, AMPC 0.4 µg/ml 添加区では, 薬剤添加後 2 時間後から急激に生菌数が減少しはじめ, 開始時 1.1×10^5 CFU/ml の菌数が, 7 時間後には 7.8×10^2 CFU/ml となった。ABPC 0.4 µg/ml 添加区でも薬

Table 1. MICs of some drugs against *P. piscicida* isolated from cultured yellowtail in 1985 (µg/ml)

Organism	AMPC	ABPC	OA	NA	OTC	FZ	TP
MZ 8557	0.025	0.025	0.39	3.13	0.20	1.56	6.25
MZ 8558	0.05	0.025	3.13	100	50	1.56	800
MZ 8559	0.05	0.025	0.20	1.56	50	3.13	800
MZ 8560	0.05	0.025	0.20	1.56	0.78	3.13	800
MZ 8561	0.05	0.025	6.25	400	50	3.13	800
SA 8514	0.05	0.025	0.20	1.56	50	3.13	800
SA 8516	0.05	0.025	0.20	3.13	50	3.13	400
SA 8528	0.05	0.025	0.20	3.13	0.78	3.13	6.25
HT 8557	0.10	0.025	0.20	3.13	50	3.13	400
HT 8559	0.05	0.025	0.10	1.56	50	1.56	400
HT 8562	0.05	0.025	3.13	100	50	3.13	800
HT 8573	0.05	0.025	0.20	3.13	50	3.13	400
KGP 85420	0.05	0.025	0.20	1.56	50	1.56	400
KGP 85421	0.05	0.025	0.20	1.56	50	3.13	400
KGP 85422	0.05	0.025	0.20	6.25	12.5	3.13	400
KGP 85423	0.05	0.025	0.20	3.13	50	3.13	400
KGP 85424	0.05	0.025	0.20	3.13	50	3.13	400
NG 8515	0.05	0.025	0.20	3.13	50	3.13	400
NG 8522	0.05	0.025	0.20	3.13	50	3.13	400
WKY 8571	0.05	0.025	0.20	3.13	0.78	12.5	3.13
WKY 8575	0.05	0.025	0.39	3.13	0.39	3.13	1.56
WKY 8576	0.05	0.025	0.20	3.13	25	3.13	400
WKY 8578	0.05	0.025	0.20	1.56	50	3.13	400
WKY 8579	0.05	0.025	0.20	3.13	50	3.13	400
EHP 85440	0.05	0.025	12.5	100	50	3.13	400
EHP 85441	0.05	0.025	3.13	100	50	3.13	400
EHP 85442	0.05	0.025	12.5	100	50	3.13	400
EHP 85449	0.05	0.025	6.25	100	50	3.13	400
EHP 85454	0.05	0.025	6.25	100	50	3.13	400
EHP 85458	0.05	0.025	3.13	100	50	3.13	400

AMPC: amoxicillin, ABPC: ampicillin, OA: oxolinic acid, NA: nalidixic acid, OTC: oxytetracycline, FZ: furazolidone, TP: thiamphenicol.

Fig. 3. Bactericidal activity of amoxicillin and ampicillin against *Pasteurella piscicida* PP 47. □—□ amoxicillin 0.2 µg/ml, ■—■ amoxicillin 0.4 µg/ml, △—△ ampicillin 0.2 µg/ml, ▲—▲ ampicillin 0.4 µg/ml, ●—● control.

剤添加 2 時間後から菌数が減少しはじめたが、7 時間後に 2.9×10^8 CFU/ml であった。AMPC 0.2 µg/ml 添加区では、薬剤添加後 3 時間後から徐々に菌数の減少がはじまり、5 時間後から急激に減少し、7 時間後には 4.9×10^8 CFU/ml となった。いっぽう、ABPC を 0.2 µg/ml 添加した区では、菌数の減少は緩慢であり、7 時間後には 2.4×10^4 CFU/ml であった。

耐性獲得試験：試験管内において 20 回継代後の AMPC に対する耐性獲得状況を Fig. 4 に示した。すなわち、*P. piscicida* NGC 8201 および TKP 7901 の両株とも試験開始時の 0.2 µg/ml の MIC 値を保ち、耐性獲得は認められなかった。*Streptococcus* sp. KGS 8115 では 20 回継代中に MIC 値が 4 倍上昇したが、NGT 7834 では変化が認められなかった。*E. tarda* SY 7901 では 20 回継代中に MIC 値が 8 倍上昇し、AIC 8211 では MIC 値が 4 倍上昇した。

Fig. 4. Changes of *in vitro* drug resistance of fish pathogens to amoxicillin.

考 察

P. piscicida は一部の感受性低下株を除いて AMPC に対して強い感受性を示すことが判明したので、ブリ類結節症の治療薬として有効である可能性が示唆された。また、AMPC は *A. salmonicida*, *Streptococcus* sp. および *E. tarda* に対しても抗菌性を示した。*V. anguillarum* および *A. hydrophila* の AMPC に対する感受性は低かった。

1985 年に分離された *P. piscicida* 30 株について AMPC, ABPC, OA, NA, OTC, FZ および TP の MIC 値を比較したところ、OA, NA, OTC, FZ, および TP に対して耐性を示した菌株においても、AMPC に対しては、MIC 値は 0.1 µg/ml 以下と、強い感受性を示した。このことから、AMPC はこれら薬剤との交差耐性を示すことはないと考えられる。ただし、AMPC は

ABPC と同様に β ラクターマーゼによって不活化されることが知られており (中沢ら, 1973), 両薬剤間では交差耐性を示すことが予想される。AMPC は *P. piscicida* に対する MIC 値ではほぼ $0.05 \mu\text{g/ml}$ と ABPC の $0.025 \mu\text{g/ml}$ に比べてやや高い値を示した。しかし, 殺菌作用は逆に ABPC より強い傾向がみられたのは, AMPC が ABPC に比べ細菌細胞壁の合成に関与している penicillin binding protein (PBP) の内, PBP 1Bs との親和性が高いことにより, 強い溶菌活性を示すためと考えられる (CURTIS *et al.*, 1979)。また, 大腸菌に対する殺菌効力を比較した試験で, FUKUI and NAKAZAWA (1973) は AMPC は ABPC の $1/2$ 濃度で同程度の殺菌作用を示すとしている。*P. piscicida* を用いた殺菌作用試験においても, Fig. 3 に示すように AMPC の方が ABPC よりも強い殺菌作用を示す成績が得られた。

いっぽう, 楠田ら (1976; 1985) は試験管内における 10 回継代後の薬剤耐性獲得状況は, *P. piscicida* を用いた実験ではクロラムフェニコールで 4 倍, ABPC では 4~8 倍にそれぞれ MIC 値が上昇し, また, *Streptococcus* sp. に対しては, マクロライド系薬剤で, 32~500 倍に MIC 値が上昇したとしている。試験方法が異なるため同一レベルで倍率を比較することはできないが, 本試験の結果では, 20 回継代後においても *P. piscicida* の AMPC に対する耐性獲得は認められず, また *Streptococcus* sp. についても MIC 値の上昇は 0 と 4 倍の低い値で推移したことから, AMPC は耐性を誘導しにくい薬剤であると考えられた。

AMPC は医療用医薬品として人体用に広く利用されてきた抗生物質であり, 広範囲抗生物質として知られている ABPC と類似構造を有するので, 抗菌スペクトル

も ABPC とよく似ているが, 殺菌作用は AMPC のほうが強力であることが確認されている (FUKUI and NAKAZAWA, 1973)。本研究の結果においても, AMPC は数種の魚病細菌に対して強い抗菌力を示し, なかでも *P. piscicida* に対しては ABPC より強い殺菌作用を示したこと, さらに, 耐性獲得率が低いことからブリの類結節症の治療剤として応用できる抗生物質であると考えられた。

文 献

- FUKUI, M. and S. NAKAZAWA (1974): Study on mechanism of antibacterial action of amoxycillin. I. *Chemotherapy*, **22**(6), 1111-1114.
- 楠田理一・井上喜久治 (1976): 養殖ハマチの類結節症に対するアンピシリンの水産薬としての応用に関する研究—I. 日本水産学会誌, **42**(9), 969-973.
- 楠田理一・鬼崎 忍 (1985): ブリ連鎖球菌 *Streptococcus* sp. に対するマクロライド系抗生物質およびリンコマイシンの試験管内作用. 魚病研究, **20**(4), 453-457.
- CURTIS, N. A. C., D. ORR., G. W. ROSS and M. G. BOULTON (1979): Affinities of penicillins and cephalosporins for the penicillin binding proteins of *Escherichia coli* K-12 and their antibacterial activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **16**(5), 533-539.
- 中沢昭三・北中英良・大槻雅子・福井正憲 (1973): 合成ペニシリン Amoxycillin にかんする細菌学的研究. *Chemotherapy*, **21**(8), 1375-1382.
- 佐藤 清・福井正憲・荒木義孝・高橋正博・田村繁昭・高平汎志 (1973): Amoxycillin にかんする細菌学的検討および生体内動態について. 同誌, **21**(8), 1383-1390.