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
類結節症菌に対する *in vitro* での抗菌力、
耐性獲得および耐性消失

楠田 理一・井上喜久治

(1976 年 4 月 19 日受理)

Studies on the Application of Ampicillin for Pseudotuberculosis
of Cultured Yellowtails—I

In vitro Studies on Sensitivity, Development of Drug-resistance
and Reversion of Acquired Drug-resistance Characteristics
of *Pasteurella piscicida*

Riichi KUSUDA*¹ and Kikuzi INOUE*²

Studies are being made to apply ampicillin for pseudotuberculosis of cultured yellowtails. *In vitro* sensitivity and development of drug-resistance characteristics of *Pasteurella piscicida* were examined. Chloramphenicol was used for comparison. The minimum inhibitory concentration of ampicillin to *P. piscicida* was 0.04 to 0.08 mcg/ml and the MIC of chloramphenicol was 0.63 mcg/ml. Antibacterial activity of ampicillin was 8 to 16 times greater than the activity of chloramphenicol. After 10 serial passages *in vitro* under the presence of drug, MIC values to ampicillin and to chloramphenicol were 4 to 8 times greater than the initial values. Reversion of acquired drug-resistance features to ampicillin also was studied. After 5 serial passages *in vitro* in BHI agar under the absence of the drug, the acquired drug-resistance characteristics of *P. piscicida* disappeared, i. e., MIC changing from 0.32 mcg/ml to 0.04~0.08 mcg/ml. Results of the study suggest that ampicillin is an useful antibacterial drug for pseudotuberculosis of cultured yellowtails.

類結節症は 1969 年に四国、九州、瀬戸内海沿岸の養殖ハマチに大発生して以来、毎年ハマチ養殖業に大きな経済的損失を与えている。

発生時期は地域により異なるが、一般に 6 月の梅雨期である。これは降雨による海水の塩分濃度の低下、および水温が 20°C 以上に上昇することに原因している。本病の感染魚の脾臓、腎臓には白点が形成されるのが特長¹⁾で、原因菌についても検討されている。²⁻⁶⁾ 楠田ら^{2,3)}は病魚から分離された原因菌を形態学的、生化学的、生物学的ならびに血清学的に検討し、*Pasteurella piscicida* と同定している。

一般に魚類の細菌性疾病の予防および治療を目的として、各種の化学療法剤が使用されている。しかし、薬剤の多用による耐性菌の増加によつて魚病対策をいちじるしく困難にしている。また、魚体内への薬剤の残留など、公衆衛生上重要な問題をはらんでおり、⁷⁾ 魚病薬としてすぐれた薬剤の探索が必要である。

*¹ 高知大学農学部栽培漁業学科 (Department of Cultural Fisheries, Faculty of Agriculture, Kochi University, Nangoku-shi, Kochi, 783 Japan.)

*² 藤沢薬品工業中央研究所 (Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., 2-1-6, Kashima, Yodogawa-ku, Osaka, 532 Japan.)

供試薬剤 供試薬剤にはアンピシリンを用いた。また、対照薬剤としてハマチ類結節症の治療薬として
 繁用されているクロラムフェニコールを使用した。

供試菌株 養殖ハマチの類結節症魚から分離した *P. piscicida* のうちから代表的な K-1, M, HK および I 株を選んで使用した。なお、菌株の由来は Table 1 に示すとおりである。

試験方法 抗菌力の測定は滅菌水にアンピシリンを溶解し、滅菌した 2% 食塩ならびに 0.3% 寒天加ブレイン・ハート・インフュージョン・ブイヨン（栄研）培地で希釈し、40 mcg/ml~0.01 mcg/ml までの 2 倍希釈系列を作成した。この培地を検定培地とし、2% 食塩加ブレイン・ハート・インフュージョン・ブ

Strain	Date	Source	Organ
K-1	June 1970	Kochi Prefecture	spleen
M	June 1971	Miyazaki Prefecture	kidney
HK	October 1971	Kochi Prefecture	kidney
I	July 1972	Kochi Prefecture	kidney

Generation	1	2	3	4	5	6	7	8	Rate of development
Strain									
K-1	0.04	0.04	0.04	0.08	0.08	0.08	0.32	0.32(mcg/ml)	8
M	0.08	0.08	0.08	0.16	0.16	0.32	0.32	0.32(mcg/ml)	4
I	0.04	0.04	0.04	0.08	0.08	0.16	0.16	0.32(mcg/ml)	8

[illegible][illegible]

Table 5. Development of drug-resistance of *P. piscicida* to ampicillin

Generation	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Rate of Development
Strain											
K-1	0.04	0.04	0.04	0.04	0.08	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32(mcg/ml)	8
M	0.08	0.08	0.08	0.16	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32(mcg/ml)	4
I	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16(mcg/ml)	4

Table 6. Development of drug-resistance of *P. piscicida* to chloramphenicol

Generation	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Rate of Development
Strain											
K-1	0.63	0.63	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	2.50(mcg/ml)	4
I	0.63	0.63	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	2.50(mcg/ml)	4
M	0.63	0.63	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	2.50(mcg/ml)	4

Fig. 1. Development of drug-resistance of *P. piscicida* to ampicillin.

イオンで 25°C, 20 時間前培養した *P. piscicida* を白金線で検定培地に移殖し, 25°C, 40 時間培養した。そして, 菌の発育の有無を肉眼的に観察して最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。耐性獲得は抗菌力の測定と同じく, 0.3% の寒天を加えた 2% 食塩加ブレイン・ハート・インフュージョン・ブイヨンで 40 mcg/ml~0.01 mcg/ml までの 2 倍稀釈系列を作成し, 白金線で前培養菌を移殖して測定した。そして, 25°C, 24 時間培養した菌を 1 世代とし, 菌が発育できる最高濃度のアンピシリンを含む培地から菌を殖え 継ぎ, 10 代継代後の耐性獲得率を測定した。耐性消失試験は K-1, M および I 株を, 耐性消失試験と同じ方法で, アンピシリンに対して MIC が 0.32 mcg/ml まで耐性を獲得させて使用した。なお, 耐性獲得の状況は Table 2 に示すとおりである。

供試菌をアンピシリンを含まない 2% 食塩加ブレイン・ハート・インフュージョン寒天に穿刺して保存し, 20 日間隔で菌の殖え継ぎをおこなった。そして, 菌を殖え継ぐたびに, 2% 食塩加ブレイン・ハート・インフュージョン寒天で, アンピシリンの 0.64 mcg/ml~0.02 mcg/ml までの 2 倍稀釈系列を作成し, 白金線で保存培地から菌を移殖した。そして, 25°C, 20 時間後の肉眼的な MIC を測定し, 耐性消失の状況を観察した。

Fig. 2. Development of drug-resistance of *P. piscicida* to chloramphenicol.

Table 7. Reversion of acquired drug-resistance of *P. piscicida* to ampicillin

Strain	K-1	M	I
Date			
December 17, 1974	0.32	0.32	0.32 (mcg/ml)
January 7, 1975	0.16	0.32	0.32 (mcg/ml)
January 27, 1975	0.16	0.16	0.08 (mcg/ml)
February 18, 1975	0.08	0.08	0.08 (mcg/ml)
March 8, 1975	0.04	0.08	0.04 (mcg/ml)

結 果

抗菌力試験 試験成績は Table 3 および Table 4 に示すとおりである。ハマチ類結節症の原因菌 *P. piscicida* に対する MIC はアンピシリンが 0.04 mcg/ml から 0.08 mcg/ml であるのに対し、対照薬剤のクロラムフェニコールは 0.63 mcg/ml であった。

耐性獲得試験 試験成績は Table 5, 6 および Fig. 1, 2 に示すとおりである。対照のクロラムフェニコールは原株の MIC が 0.63 mcg/ml に対して、10 代継代後には 2.5 mcg/ml となり 4 倍の耐性を獲得した。これに対して、アンピシリンの 10 代継代後の耐性増大値は、0.16~0.32 mcg/ml となり、原株の MIC 0.04~0.08 mcg/ml に比べて、耐性獲得率は 4~8 倍となった。

耐性消失試験 試験成績は Table 7 に示すとおりで、あらかじめ耐性獲得させた菌の MIC は、20 日間隔で 5 回継代すると、もとの MIC にもどった。

考 察

アンピシリンは養殖ハマチの類結節症菌に対して、極めて高い抗菌活性を示し、0.04~0.08 mcg/ml の低濃度で発育を阻止する。現在、水産薬として認可されている薬剤で、類結節症に繁用されているクロラムフェニコールの MIC は 0.63 mcg/ml であるから、アンピシリンの *in vitro* 抗菌力はクロラムフェニコールの約 8~16 倍に相当する。10 代継代後の薬剤耐性獲得率はアンピシリンとクロラムフェニコールはほぼ等しく、約 4 倍という値が示された。

また、20 日間隔、5 回の継代培養で、*P. piscicida* がアンピシリンに対して獲得した耐性は 0.32 mcg/ml から 0.04 と 0.08 mcg/ml に減少し、*P. piscicida* の耐性獲得以前の MIC にもどった。

以上のことから、試験管内での実験結果が、そのまま生体内にも適用できるとは考えられないが、アンピシリンはハマチ類結節症のすぐれた魚病薬となりうる可能性があると考えられる。

要 約

アンピシリンのハマチ類結節症への治療薬としての応用を目的として、*in vitro* での抗菌力、薬剤耐性獲得率および耐性消失を測定し、つぎの結果を得た。

1. 類結節症原因菌 *P. piscicida* に対するアンピシリンの MIC は、0.04~0.08 mcg/ml であった。これに対して、クロラムフェニコールの MIC は 0.63 mcg/ml であった。
2. *P. piscicida* のアンピシリンとクロラムフェニコールに対する 10 代継代後の耐性獲得率は、ともに 4~8 倍であった。
3. アンピシリンに対して、あらかじめ MIC が 0.32 mcg/ml まで耐性を獲得させた *P. piscicida* を 20 日間隔で 5 回継代培養すると、MIC は 0.04~0.08 mcg/ml となり、原株の MIC の値に下がった。
4. 以上のことから、アンピシリンはハマチ類結節症のすぐれた魚病薬となりうる可能性のあることが判明した。

文 献

- 1) 窪田三朗・木村正雄・江草周三：魚病研究，**4**，111-118 (1970)。
- 2) 楠田理一：昭和 48 年度農林水産業特別試験研究費補助金による研究報告書，養殖ハマチの類結節症に関する研究，1-100 (1974)。
- 3) 楠田理一・山岡政典：本誌，**38**，1325-1332 (1972)。
- 4) 木村正雄・北尾忠利：魚病研究，**6**，8-14 (1971)。
- 5) U. SIMIZU and S. EGUSA: This Bull., **38**, 803-812 (1972)。
- 6) Y. KOIKE, A. KUWAHARA, and H. FUJIWARA: Japan. J. Microbiol., **19**, 241-247 (1975)。
- 7) 渡辺 力：モダンメディア，**17**，46-56 (1971)。