

富山県内でサケ科魚類から分離された  
オキソリン酸耐性 *Aeromonas salmonicida*

宮崎 統五  
(1989年11月24日受理)

Oxolinic Acid Resistant *Aeromonas salmonicida* Isolated from Cultured  
Salmonids in Toyama Prefecture

Tougo MIYAZAKI\*

The sensitivity of *Aeromonas salmonicida* to oxolinic acid (OA), which is employed for treatment of furunculosis by fish farmers, was studied. Sixty-four strains of the bacteria were collected from cultured salmonids in Toyama Prefecture during the period of 1977-1982 and examined for minimal inhibitory concentration (MIC) against OA. The MIC of OA for *A. salmonicida* isolated from 1977 to 1980 was below  $0.78 \mu\text{g}/\text{ml}$  and OA administration was effective in the treatment for furunculosis in this period. However, 33 of 48 strains collected in 1981 and 1982 showed high MIC values such as  $1.56 \mu\text{g}/\text{ml}$  to  $25.00 \mu\text{g}/\text{ml}$ . The effectiveness of OA administration (10mg OA/kg BW/day) decreased in the case of fish farms where resistant *A. salmonicida* was detected. In 1983, 49 specimens of char *Salvelinus leucomaenis* from 12 farms which were found to be contaminated with furunculosis were examined to clarify the distribution of OA resistant *A. salmonicida*. Thirty-seven fishes from 11 farms were found to carry OA resistant *A. salmonicida*.

Key words: *Aeromonas salmonicida*, drug - resistance, furunculosis, oxolinic acid, Salmonids.

富山県内のサケ科魚類の養殖場は24経営体があり、イワナ *Salvelinus leucomaenis*、ヤマメ *Oncorhynchus masou* およびニジマス *Salmo gairdneri* が養殖されている。一方、内水面漁業協同組合においては、河川増殖事業のためにサケ *O. keta* やサクラマス *O. masou* の飼育が行われている。せっそう病はサケ科魚類に病原細菌 *Aeromonas salmonicida* が感染することによって発生する伝染性疾病であり、1936年頃に本県に侵入して(江草 1984)以来、サケ科魚類の増養殖に大きな被害を与えている。

---

\* 富山県水産試験場 (Toyama Prefectural Fisheries Experiment Station, Namerikawa, Toyama 936, Japan)  
富山県水産試験場業績A第2号

本疾病の治療には、サルファ剤の経口投与が有効であるとされており (Snieszko et al 1950)、本県でもスルファモノトキシンの経口投与が一般的に行われていたが、遠藤 (1973) がせっそう病治療薬として有効であると報告したオキシリン酸 (OA) が、ほとんどの増養殖場で、1976年頃から、使用されるようになった。しかし、せっそう病に対するOAの治療効果が、1981年頃から以前ほど顕著でなくなったという情報を、養殖業者数人から得たので、1977年から1982年までの間に病魚から分離し、保存してあった *A. salmonicida* のOAに対する感受性を調べたところ、投薬効果の低下はOA耐性菌の出現が原因であることが分った。さらに、1983年に県内の養殖場のせっそう病魚を調査したところ、高い頻度でOA耐性菌感染魚がみられたので報告する。

## 材料及び方法

***A. salmonicida* の保存株のMIC値及びOAの投薬効果の聞き取り** 富山県水産試験場においては、増養殖業者の飼育魚多数が急速に斃死した場合には病原体の検査を行っているが、このうち1977年に1業者で1件、1978年に1業者で1件、1980年に2業者で3件、1981年に2業者で4件、1982年に4業者で6件、計15件がせっそう病による斃死であると確認された。これらの疾病の検査を行った際に、検査魚各1尾について *A. salmonicida* 1株ずつを分離し、CTA培地中で年1回継代しながら保存した。今回のOA感受性検査では、各件について3株から5株の計64株を用いた。

OAに対する感受性は平板希釈法によって調べた。すなわち、供試菌株をTSA培地に接種して25°Cで24時間の前培養を行い、発育した集落を滅菌生理食塩水中に浮遊した後希釈し、 $10^6$ CFU/mlになるように菌液を調整した。OAは滅菌した0.1モルのNaOH溶液を用いて2,000  $\mu$ g/mlの濃度に調整した後、滅菌蒸留水で2倍系列希釈し、各1mlとミュラーヒントン寒天培地19mlを加えて100  $\mu$ g/mlから0.05  $\mu$ g/mlのOA濃度の平板とし、菌液を画線塗抹した。その後25°Cで24時間培養して集落発育の有無を肉眼的に観察し、細菌の発育が完全に阻止された培地の含有薬剤の最低濃度をもって最小発育阻止濃度 (MIC) とした。

これらせっそう病の発生が確認された増養殖業者については、OAの使用開始年及び投薬効果が低下 (OA 10mg/kg体重/日の経口投与を5日間継続してもせっそう病による斃死が顕著に減少しない場合を示す) した年を聞き取った。

**1983年のOA耐性菌の分布調査** 富山県内の12のサケ科魚類養殖場において、1尾から10尾のイワナ衰弱魚計78尾を採集して検査魚とした。これらの検査魚の腎臓中央部をTSA平板培地に塗抹して25°Cで24時間培養し、褐色色素産生がみられた培地について集落の肉眼観察を行い、形状によって *A. salmonicida* と判断された集落を混合して釣菌し、滅菌生理食塩水に懸濁して $10^6$ CFU/mlの菌液を調整した。菌液をOA 1  $\mu$ g/mlになるように加えたミュラーヒントン寒天培地上に塗抹し、25°Cで24時間培養後、集落発育の有無を観察した。薬剤無添加のTSA培地及びOA加ミュラーヒントン培地上で発育した数集落については普通寒天培地で再び培養し、グラム染色、運動性、菌形、褐色色素産生、オキシダーゼ活性、カタラーゼ活性の検査を行うことによって、*A. salmonicida* であることを確認した。

## 結 果

1977年から1982年までの間にせつそう病魚から分離された *A. salmonicida* の、O A に対する感受性測定結果を Fig. 1 に示した。1977年から1980年の間に分離された *A. salmonicida* 16株の M I C 値は、いずれも  $0.05 \mu\text{g/ml}$  以下から  $0.78 \mu\text{g/ml}$  の範囲であったが、1981年以降では48株中33株が  $3.13 \mu\text{g/ml}$  から  $25.00 \mu\text{g/ml}$  と高い M I C 値を示し、 $0.39 \mu\text{g/ml}$  以下のグループと  $1.56 \mu\text{g/ml}$  以上のグループの2群に分かれる傾向がみられた。一方、O A の使用開始年と投薬効果についてみると (Table 1)、1981年以降に  $13 \mu\text{g/ml}$  以上の M I C 値の *A. salmonicida* が分離された養殖業者 A 及び C では1981年頃、F では1982年頃から投薬効果が低下したと回答した。1982年でも投薬効果が認められると回答したのは D 及び E であるが、このうち E は1981年から事業を開始した養殖業者であり、O A の投薬期間は短かった。D はサケ科魚類のふ化場であり、全ての池が種苗放流と採卵の間の約1ヶ月間乾燥されるため、飼育用水及び器具等に付着した *A. salmonicida* の、世代間における伝播は稀で、ふ化場内の感染環境はほぼ遮断されていると思われる業者であった。また B 養殖場は調査時点まで O A の使用歴のない業者であった。

Table 1. Relation between minimal inhibitory concentration (M I C) of oxolinic acid (O A) for *Aeromonas salmonicida* strains and the result of hearing questionnaire about O A - effectiveness for treatment of furunculosis.

Name of farmers	Date of isolation	Species of fish sampled	Number of strains MIC examined※1	Result of MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) examination	Year of the effectiveness decreased
A	1977 Jun.	Char	3	$\leq 0.05 \times 3$	1981
	1981 Jun.	Char	5	$3.13 \times 5$	
	Jul.	Char	5	$3.13 \times 4 + 12.50 \times 1$	
	1982 Aug.	Char	4	$3.13 \times 2 + 6.25 \times 1 + 25.00 \times 1$	
	Aug.	Masu salmon	5	$3.13 \times 2 + 6.25 \times 3$	
B	1978 Jun.	Char	3	$\leq 0.05 \times 3$	— ※2
C	1980 Jul.	Char	3	$0.10 \times 2 + 0.19 \times 1$	1981
	1981 Jun.	Char	5	$\leq 0.05 \times 5$	
	Jul.	Char	4	$3.13 \times 3 + 12.50 \times 1$	
	1982 Jun.	Char	5	$1.56 \times 1 + 3.13 \times 3 + 12.50 \times 1$	
D	1980 Jul.	Chum salmon	3	$\leq 0.05 \times 3$	Effective in 1982
	Oct.	Masu salmon	4	$0.39 \times 3 + 0.78 \times 1$	
E	1982 Jun.	Char	5	$0.10 \times 4 + 0.19 \times 1$	Effective in 1982
	Jul.	Char	5	$\leq 0.05 \times 5$	
F	Jul.	Char	5	$0.39 \times 1 + 3.13 \times 4$	1982
ATCC14174			1	$\leq 0.05$	

※ 1 Each *A. salmonicida* strains were isolated from specimens of char *Salvelinus leucomaenis*, chum salmon *Oncorhynchus keta* and masu salmon *O. masou* individually.

※ 2 O A was not used until 1982.

県内の養殖場のイワナを対象に、1983年に O A 耐性菌の分布調査を行った結果を Table 2 に示した。調査対象とした12養殖業者全てから、計49尾のせつそう病罹病魚が発見され、このうち11業者の計34尾は  $1 \mu\text{g/ml}$  の O A 加平板培地上で発育する *A. salmonicida* を保有していた。

**Table 2. Results of examinations of char *Salvelinus leucomaenis* infected with oxolinic acid resistant (growing in concentration of OA  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) *Aeromonas salmonicida* in 1983.**

No. of fish farms	Numbers of fish sampled	Numbers of fish <i>A. salmonicida</i> isolated	Numbers of fish infected with resistant <i>A. salmonicida</i>
1(A) *	7	2	2
2(C)	6	4	3
3(F)	7	2	1
4	1	1	1
5	10	10	10
6	3	2	0
7	6	4	4
8	7	6	5
9	8	3	2
10	8	1	1
11	9	9	7
12	6	5	1
Total	78	49	37

\* Names of farmers are the same as those shown in table 1.

## 考 察

Aoki et al. (1983) は養殖サケ科魚類から分離された *A. salmonicida* 129株の各種薬剤に対する感受性を調べ、OAに対する耐性菌はみられなかったものの、OAと同じキノリン骨格を有するナルジクス酸で、二峰性のMIC値の分布が認められ、ナルジクス酸耐性菌が増加していると報告している。今回検査した64株のMIC値の分布は、 $0.78 \mu\text{g}/\text{ml}$ から $1.56 \mu\text{g}/\text{ml}$ を境とする二峰性を示し (Fig. 1), またtable 1 に示したように、1981年以降に分離した株のなかには対照として用いたATCC14174株のMIC値 $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下に較べて、30倍から500倍のMIC値を示すものがみられた。これらのことにより、今回の検査でOAに対して $0.78 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のMIC値を示した株は、薬剤耐性菌 (三橋 1980) であると考えられた。

森川ら (1975) は、ヤマメ1年魚に、通常の使用量である体重1kg当り10mgのOAを連日経口投与したところ、48時間後及び120時間後で、血清中に $0.24 \mu\text{g}/\text{ml}$ から $1.90 \mu\text{g}/\text{ml}$ のOAの濃度が認められたと報告している。Table 1 に示したように、本県では1981年以降、養殖業者A, C及びFのせっそう病魚から $3.13 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のMIC値を示す株が分離され、この頃からOAの投与効果の低下がみられている。このことは、イワナに通常量のOAを投与を行った場合、イワナの組織内はヤマメと同程度のOA濃度となり、MIC値が $3.13 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の *A. salmonicida* は増殖が可能であることを示していると考えられた。

1983年に12養殖業者のせっそう病魚のOA耐性菌保有状況を調べた結果、11養殖業者から $1 \mu\text{g}/$

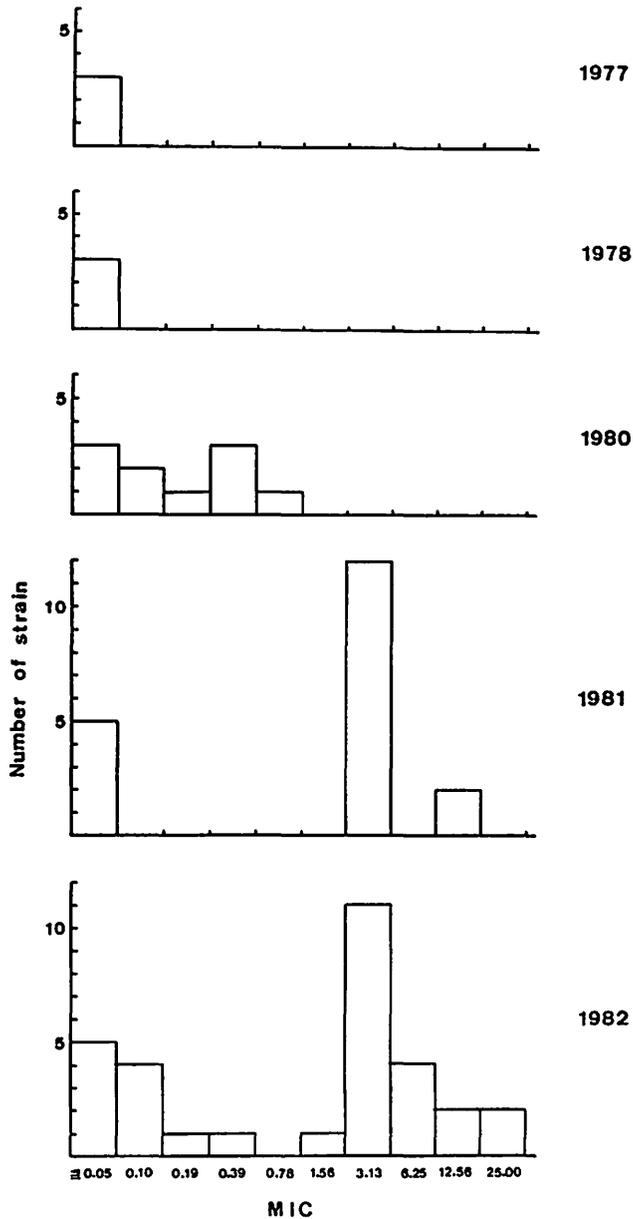


Fig.1 Histograms of minimal inhibitory concentration (MIC) of oxolinic acid (OA) for *Aeromonas salmonicida* strains isolated in Toyama prefecture during 1977 to 1982 show increase of OA resistant strains.

ml以上のOA濃度でも増殖する*A. salmonicida*が分離されたことは、本県内の多くのサケ科魚類及び飼育環境にOA耐性菌が存在していることを示唆していると考えられた。

本県内のほとんどの増養殖業者は、1984年以後OAの使用を中止し、サルファ剤を再び用いるようになって現在に至っており、サルファ剤の投与はせっそう病の治療に有効であると筆者に報告し

ている。しかし、サルファ剤の投与方法が適正に行われなかった場合には、耐性菌が急速に増加することが予想される他、*A. salmonicida* のサルファ剤耐性因子は伝達性Rプラスミド上に存在することが知られている(Aoki et al 1983)ため、他種の細菌からの遺伝子伝達によって感受性菌が耐性化する可能性もある。従って、将来のせっそう病対策には、薬剤の投与方法を検討することによって、耐性菌の増加を抑制するとともに、免疫反応を利用した予防方法も開発することが必要であろう。

## 謝 辞

本稿をまとめるのにあたり、貴重な御教示を賜った養殖研究所原武史病理部長及び御校閲をいただいた北海道大学水産学部微生物学講座助手吉水守先生に深謝申し上げます。

## 文 献

- Aoki T., T. Kitao, N. Iemura, Y. Mitoma and T. Nomura 1983. The susceptibility of *Aeromonas salmonicida* strains isolated in cultured and wild salmonids to various chemotherapeutics. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 49 :17-22.
- 江草周三 1984. サケ科魚のせっそう病. pp128-146, 魚の感染症(改訂版). 恒星社厚生閣, 東京.
- 遠藤俊夫・荻島健次・早坂治男・金子修司・大島慧 1973. Oxolinic Acid の魚類感染症治療剤としての応用に関する研究-I. 日水誌 39 :165-171.
- 三橋 進 1980. 薬剤耐性菌. pp1-21, 薬剤感受性測定法. 講談社サイエンティフィック, 東京.
- 森川 進・田代文男・谷口朝臣 1975. せっそう病に関する研究-VI. 岐水試研報, 20 :67-98.
- Snieszko S. F., J. S. Gutsell and S. B. Friddle 1984. Various sulfonamide treatment of furunculosis in brook trout, *Salvelinus fontinalis*. Trans. Am. Fish. Soc. 78 :181-188.