

鹿児島県の養殖ブリおよび高知県の養殖カンパチから
分離された *Nocardia seriolae* における薬剤感受性の動向

今城雅之¹・志水将人²・難波悠介¹・大嶋俊一郎¹

(¹高知大学教育研究部自然科学系農学部門・²高知大学大学院総合人間自然科学研究科農学専攻)

Drug Susceptibility Patterns of *Nocardia seriolae* Isolated from Cultured Yellowtail *Seriola quinqueradiata* in Kagoshima Prefecture and
Cultured Amberjack *Seriola dumerili* in Kochi Prefecture

Masayuki Imajoh¹, Masato Shimizu², Yusuke Nanba¹ and Syun-ichirou Oshima¹

¹Agriculture Unit, Natural Sciences Cluster, Research and Education Faculty, Kochi University; ²Faculty of Agriculture and Agricultural Science Program,
Graduate School of Integrated Arts and Science, Kochi University

Abstract: *Nocardia* spp. are aerobic, non-motile, Gram-positive, bacillary, branching bacteria that belong to the *Actinomycetes* and more than 50 species have been identified to date. Some of these species cause nocardiosis in aquatic organisms. The occurrence of nocardiosis in marine fish was first reported in 1967 in yellowtail *Seriola quinqueradiata* and amberjack *Seriola dumerili* cultured in Owase, which is located in the southeastern part of Kii Peninsula in Japan. The causative agent was named *Nocardia seriolae*. Nocardiosis caused by *N. seriolae* is a major disease in cultured fishes of the genus *Seriola*. In Japan, although there is no commercial vaccine against nocardiosis to date, sulfamonomethoxine (SMM) has been approved by the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan for the control of the disease in cultured fishes of the order *Perciformes*. The aim of this study was to determine the drug susceptibility patterns of 16 isolates of *N. seriolae* from cultured yellowtail in Kagoshima Prefecture and six isolates from cultured amberjack in Kochi Prefecture. The drugs tested were ampicillin (AP), erythromycin (EM), fosfomycin (FOM), lincomycin (LM), oxytetracycline (OTC), SMM and thiamphenicol (TP). A total of 22 isolates showed the MIC values of 0.78 to 3.13 µg/ml for SMM, 1.56 to 6.25 µg/ml for TP and 0.2 to 6.25 µg/ml for LM, indicating that all isolates were sensitive to the three drugs. On the other hand, they showed the MIC value of 100< µg/ml for FOM. The distribution of the MIC of EM was divided into two groups, one of which was resistant and included 10 Kagoshima isolates with MIC values of 50 to 100< µg/ml and three Kochi isolates with those of 100 to 100< µg/ml. In addition, another Kochi isolate was resistant to OTC. No multi-drug resistant isolates were detected.

キーワード：魚類ノカルジア症，ブリ，カンパチ，薬剤感受性試験，スルファモノメトキシン。

Keyword: Fish nocardiosis, Yellowtail, Amberjack, Drug sensitivity assay, Sulfamonomethoxine.

はじめに

魚類のノカルジア症は1967年8月に三重県尾鷲の養殖ブリおよびカンパチで最初に確認された細菌性疾病であり(狩谷ほか¹⁾、翌年には、高知県と愛媛県、さらに、1971年には、広島県と宮崎県でも発生するようになり、主として活魚の移動により各地の養殖場に伝播していったとされる(松里²⁾。原因菌の*Nocardia seriolae*はグラム陽性の糸状菌で、弱抗酸性を有する(Kudoほか³⁾。

ノカルジア症は、現在、日本の海面養殖生産量の約6割を占めるブリ属養殖魚類において最も被害の大きい感染症である(高橋ほか⁴⁾。本症は水温の上昇する7月から翌年の2月にかけて流行し、9月から10月が最大の流行期間である(若林と室賀⁵⁾。また、症状の違いから、軀幹部の皮下脂肪組織や筋肉に膿瘍や結節が出現し、内臓、特に脾臓と腎臓に無数の粟状結節が形成される軀幹結節型と、鰓に特異的に結節が形成される鰓結節型に分かれ、後者は低水温期の冬季に多く現れるのが特徴である(楠田と中川⁶⁾。

現在、国内で市販されている水産用ワクチンはいずれもホルマリン不活化ワクチンであるが、ノカルジア症の場合、本ワクチンでは十分な感染防御効果が認められないことから(楠田と中川⁶、Shimaharaほか⁷⁾など)、まだ実用化には至っていないのが現状である。一方で、すずき目魚類のノカルジア症に対する水産用医薬品として、サルファ剤のスルファモノメトキシ(SMM)が承認されており、経口投与による投薬治療を行うことができる(http://www.maff.go.jp/j/syouan/suisan/suisan_yobo/)。しかし、本症の特徴である結節内部には*N. seriolae*が生きた状態で包囊されることから、病理学的には、結節中の本菌を抗菌薬で完全に殺菌することは困難であることが示唆されており(窪田ほか⁸⁾、投薬した薬剤に耐性化しやすい性質があると考えられる。さらに、単一薬剤の連用は薬剤感受性を低下させるため、SMMが頻りに投薬されている養殖漁場では、今後、SMM耐性菌が出現する恐れがあり、薬剤感受性の動向を把握しておく必要がある。実際に、養殖現場で長年使用されている他の細菌感染症の抗菌薬に耐性を獲得した*N. seriolae*が既に出現していることも報告されており(板野と川上⁹、Ismailほか^{10,11)}など)、多剤耐性化する懸念もある。そこで、本稿では、2008年から2014年にかけて、ノカルジア症と診断された鹿児島県の養殖ブリおよび高知県の養殖カンパチから分離された*N. seriolae*について、水産用医薬品として承認されている7薬剤に対する感受性を調べたので報告する。

材料と方法

供試菌株

供試菌株の詳細は表1に示した。それぞれの菌株を20 mlのブレインハートインヒュージョン液体培地(BHI液体培地、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)にて27°Cで3日間振とう培養し、薬剤感受性試験に供した。

供試薬剤

供試薬剤には、水産用ダイメトソンダ(Meiji Seika ファルマ株式会社)として市販されているSMM、エリスロマイシン(EM、和光純薬工業株式会社)、チアンフェニコール(TP、和光純薬工業株式会社)、リンコマイシン塩酸塩(LM、和光純薬工業株式会社)、オキシテトラサイクリン塩酸塩(OTC、和光純薬工業株式会社)、アンピシリンナトリウム塩(AP、ナカライテスク株式会社)、ホスホマイシンカルシウム(FOM、シグマアルドリッチジャパン株式会社)を用いた。

薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は以前に報告された方法(板野と川上⁹⁾)に準じて行った。すなわち、まず、各薬剤を1 mg/mlの濃度になるように滅菌蒸留水に溶かし、0.5 µg/mlになるまで二倍希釈系列を作製した。希釈した薬剤溶液1.5 mlとオートクレーブ済の感受性テスト用寒天培地(DST寒天培地、関東化学株式会社)13.5 mlを混合して、最終薬剤濃度がそれぞれ、0.05 µg/ml、0.1 µg/ml、0.2 µg/ml、0.39 µg/ml、0.78 µg/ml、1.56 µg/ml、3.13 µg/ml、6.25 µg/ml、12.5 µg/ml、25 µg/ml、50 µg/mlおよび100 µg/mlとなる薬剤平板培地を作製した。上記の培養菌液は400×gで10分間の遠心分離により菌体を回収し、湿菌量1 mgに対して滅菌蒸留水1 mlを加え、30秒間の超音波処理により菌体

表1 実験で供試した *N. seriolae* 菌株リスト

分離株	分離日	分離箇所	分離魚種	魚齢	魚体重	分離臓器
KaU 1198	2011.9.8	鹿児島県出水郡長島町諸浦薄井	ブリ	当歳魚	534g	腎臓
KaS 1199	2011.9.9	鹿児島県出水郡長島町諸浦白瀬	ブリ	当歳魚	200g	腎臓
KaW 111017	2011.10.17	鹿児島県出水郡長島町川床脇崎	ブリ	2歳魚	2700g	腎臓
KaU 11103	2011.10.3	鹿児島県出水郡長島町諸浦薄井	ブリ	当歳魚	420g	腎臓
KaH 11104	2011.10.4	鹿児島県出水郡長島町獅子島濬串	ブリ	当歳魚	506g	腎臓
KaU 111014	2011.10.14	鹿児島県出水郡長島町諸浦薄井	ブリ	当歳魚	591g	腎臓
KAS 11929	2011.9.29	鹿児島県出水郡長島町諸浦白瀬	ブリ	当歳魚	522g	腎臓
KaH 13910	2013.9.10	鹿児島県出水郡長島町獅子島濬串	ブリ	当歳魚	395g	腎臓
KaH 131031	2013.10.31	鹿児島県出水郡長島町獅子島濬串	ブリ	2歳魚	1872g	腎臓
KaH 13118	2013.11.8	鹿児島県出水郡長島町獅子島濬串	ブリ	当歳魚	591g	腎臓
KaU 131213	2013.12.13	鹿児島県出水郡長島町諸浦薄井	ブリ	2歳魚	2876g	腎臓
KaW 14109	2014.10.9	鹿児島県出水郡長島町川床脇崎	ブリ	2歳魚	3047g	腎臓
KaI 141010	2014.10.10	鹿児島県出水郡長島町鷹巣伊唐	ブリ	2歳魚	2797g	腎臓
KaK 141016	2014.10.16	鹿児島県出水郡長島町諸浦葛輪	ブリ	当歳魚	680g	腎臓
KaH 141016	2014.10.16	鹿児島県出水郡長島町獅子島濬串	ブリ	当歳魚	624g	腎臓
KaW 141030	2014.10.30	鹿児島県出水郡長島町川床脇崎	ブリ	2歳魚	3080g	鰓
KoN 81015	2008.10.15	高知県須崎市大谷	カンパチ	不明	不明	不明
KoN 91213	2009.12.13	高知県須崎市大谷	カンパチ	不明	不明	不明
KoN 11922	2011.9.22	高知県須崎市大谷	カンパチ	不明	不明	腎臓
KoN 11102	2011.10.2	高知県須崎市大谷	カンパチ	不明	不明	腎臓
KoN 111013	2011.10.13	高知県須崎市大谷	カンパチ	不明	不明	腎臓
KoN 141021	2014.10.21	高知県須崎市大谷	カンパチ	当歳魚	650g	鰓

を撈拌した。この菌液 5 μ l を薬剤平板培地にスポットして 27 $^{\circ}$ C で 5 日間静置培養し、肉眼で菌の発育が認められない最低薬剤濃度を最少発育阻止濃度 (MIC) と判定した。

結果と考察

鹿児島県分離 16 株と高知県分離 6 株に対する各薬剤の MIC の測定結果を表 2 と表 3 にそれぞれ示した。SMM の MIC 値の分布は、鹿児島県分離株で 0.78~3.13 μ g/ml、高知県分離株で 1.56~3.13 μ g/ml の範囲となり、高い感受性を示したことから、今回、最も危惧された SMM 耐性株の出現は認められなかった。

EM はマクロライド系抗生物質で、ブリを用いた実験感染により、ノカルジア症に対して経口投与で有効であることが示されている (畑井ほか¹²⁾)。本実験の結果から、EM の MIC 値は、鹿児島県分離株で <0.05~6.25 μ g/ml および 50~100 μ g/ml、高知県分離株で <0.05~0.78 μ g/ml および 100~100 μ g/ml と 2 峰性を示し、耐性株の存在が明らかとなった。さらに、高知県分離株においては、OTC の MIC 値も 1.56~3.13 μ g/ml および 25 μ g/ml と 2 峰性を示した。EM と OTC 耐性株の出現は以前に報告されており (板野と川上⁹⁾, Ismail ほか^{10, 11)} など)、今回、供試菌株の中でもその存在が確認された。EM はスズキ目魚類の連鎖球菌症、OTC はスズキ目魚類のピブリオ病やカレイ目の連鎖球菌症などに対して使用が承認された経口治療薬であり、養殖現場で長年広く使用されてきた経緯がある。このことから、魚体内に不顕性感染した、あるいは養殖環境中に存在する *N. seriolae* が他の細菌性疾病に対する投薬治療によって、耐性を獲得したことが示唆された。

謝辞

本実験を行うにあたり、鹿児島県分離株を分与いただいた鹿児島県東町漁業協同組合の山本剛氏、ノカルジア症のカンパチを分与いただいた高知県須崎市大谷の久保栄作氏と森光一幸氏にこの場を借りて深い感謝の意を表します。

文献

1. 狩谷貞二・窪田三朗・中村恵江・吉良桂子, 養殖ハマチ・カンパチにおけるノカルジア症について-I. 魚病研究, 3, 16-23. (1968)
2. 松里寿彦, 養殖ハマチのノカルディア病. 魚病研究, 13, 33-34. (1978)
3. Kudo, K., Hatai, K., Seino, A., *Nocardia seriolae* sp. nov. causing nocardiosis of cultured fish. International Journal of Systematic Bacteriology, 38, 173-178. (1988)
4. 高橋幸則・福田耕平・近藤昌和・安本信哉・廣野育生・青木宙, 日本における海水魚の細菌性疾病とワクチン開発の現状. 水産大学校研究報告, 60, 51-56. (2011)
5. 若林久嗣・室賀清邦, 魚介類の感染症・寄生虫症. 恒星社厚生閣, 東京, pp.211-214. (2004)
6. 楠田理一・中川敦史, ブリのノカルジア症. 魚病研究, 13, 25-31. (1978)
7. Shimahara, Y., Yasuda, H., Nakamura, A., Itami, T., Yoshida, T., Detection of antibody response against *Nocardia seriolae* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a preliminary vaccine trial in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Bulletin of the European Association Fish Pathologists, 25, 270-275. (2005)
8. 窪田三朗・狩谷貞二・中村恵江・吉村桂子, 養殖ハマチ・カンパチにおけるノカルジア症について-II. 魚病研究, 3, 24-33. (1968)
9. 板野公一・川上秀昌, 最近分離された *Nocardia seriolae* の薬剤感受性. 魚病研究, 37, 152-153. (2002)
10. Ismail, T.F., Takeshita, A., Umeda, N., Itami, T., Yoshida, T., Application of α -glucosidase activity and drug susceptibility tests to epidemiological studies on the fish pathogen *Nocardia seriolae*. Fisheries Science, 77, 113-118. (2011)
11. Ismail, T.F., Takeshita, A., Umeda, N., Itami, T., Yoshida, T., The use of chromogenic media for α -glucosidase determination and presumptive drug susceptibility profiles in the fish pathogen *Nocardia seriolae*. Fish Pathology, 46, 62-64. (2011)
12. 畑井喜司雄・安元進・安永統男, 養殖ブリのノカルジア症に対するエリスロマイシンの効果. 長崎県水産試験場研究報告, 10, 85-93. (1984)
13. 青木宙, 魚介類の微生物感染症の治療と予防. 恒星社厚生閣, 東京, pp.215-219. (2013)
14. Itano, T., Kawakami, H., Sakashita, M., Kona, T., Sakai M., Efficacy of oral streptomycin administration for the treatment of nocardiosis in the yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Bulletin the European Association of Fish Pathologists, 27, 83-87. (2007)

平成27年（2015）10月9日受理

平成27年（2015）12月31日発行