

内閣府食品安全委員会
平成 29 年度食品安全確保総合調査

畜水産食品における薬剤耐性菌の
出現実態調査(水産関連プロトコルの試行)
報告書

平成 30 年 2 月

一般財団法人 東京顕微鏡院

目 次

I. 調査の概要	1
II. 調査背景および目的	2
III. ビブリオ属菌の検出試験と成績	3
1. 試料(検体)のサンプリング	3
1) 施設の要件	3
2) 検体の種類	3
3) 検体のサンプリング、輸送および保管方法	3
4) 検体数	4
2. 試料(検体)からのビブリオ属菌の分離および同定の概略	6
1) 対象菌	6
2) 分離および同定	6
3. 試験方法	6
1) 試料液(乳剤)の調製(前処理)	6
2) 検出方法および同定方法	9
3) 試験に使用した培地・試薬	10
4. 結果	11
1) ビブリオ属菌の検出成績	11
① 養殖魚およびいけす付着物からの検出状況	11
IV. 分離菌株の薬剤感受性試験(MICの測定)	12
1. 分離菌株の選定	12
1) 供試菌株数	12
① <i>V. alginolyticus</i>	12
② <i>V. parahaemolyticus</i>	12
2. 測定方法	13
1) 対象薬剤	13
2) MIC 測定試験方法	14
① 微量液体希釈培養法	14
② 寒天平板希釈培養法	16
3) 試験に使用した機器・培地	18
3. 結果	19
1) 養殖魚およびいけす付着物由来株の MIC と耐性株出現頻度	19
① <i>V. alginolyticus</i>	19
② <i>V. parahaemolyticus</i>	31
2) 微量液体希釈培養法と寒天平板希釈培養法での結果の比較	35

① <i>V. alginolyticus</i>	35
② <i>V. parahaemolyticus</i>	35
V. 分離菌株の性状解析 (腸炎ビブリオ病原因子遺伝子の検出)	36
1. 菌株の選定	36
2. 試験方法	36
1) 腸炎ビブリオ病原因子遺伝子 (<i>tdh</i> 、 <i>trh1</i> 、 <i>trh1&2</i>) の検出	36
2) 試験に使用した機器および試薬	36
3. 結果	37
1) 腸炎ビブリオ病原因子遺伝子 (<i>tdh</i> 、 <i>trh1</i> 、 <i>trh1&2</i>) の検出状況	37
VI. 分離菌株の保存	37
VII. プロトコルの改善点など	38

I. 調査の概要

本調査では国内で養殖される魚への抗菌性物質の使用に起因する薬剤耐性菌の食品健康影響評価をより科学的に実施するため、養殖魚等における薬剤耐性菌の調査を実施した。

平成 29 年 7 月から 9 月にかけて、国内の代表的な養殖地域(九州)の複数の養殖場(2 箇所)から養殖魚(ぶり)48 検体およびいけす付着物 12 検体の合計 60 検体入手し、ビブリオ属菌(*Vibrio alginolyticus*、*V. anguillarum*、*V. parahaemolyticus*、*V. vulnificus*)を分離した。養殖魚およびいけす付着物からの対象菌の分離状況は、*Vibrio alginolyticus* が養殖魚 48 検体(陽性率 100%)、いけす付着物 12 検体(100%)、*V. anguillarum* が養殖魚 12 検体(25.0%)、いけす付着物 1 検体(8.3%)、*V. parahaemolyticus* が養殖魚 4 検体(8.3%)、いけす付着物 3 検体(25.0%)、*V. vulnificus* が養殖魚 21 検体(43.8%)、いけす付着物 8 検体(66.7%)で陽性であった。

次に分離されたビブリオ属菌のうち *V. alginolyticus* と *V. parahaemolyticus* について、微量液体希釈培養法と寒天平板希釈培養法により薬剤感受性試験を行った。対象とした薬剤は、オキシテトラサイクリン(OTC)、アンピシリン(ABPC)、エリスロマイシン(EM)、リンコマイシン(LCM)、ビコザマイシン(BCM)、ホスホマイシン(FOM)、オキシリン酸(OA)、スルファモノメトキシシン(SMMX)、フロルフェニコール(FF)の 9 薬剤とした。*V. alginolyticus* について見ると、微量液体希釈培養法の結果からは薬剤耐性株が供試した 9 薬剤のうち 2 薬剤に認められ、耐性率は OTC が 12.5%、SMMX が 6.7%であった。寒天平板希釈培養法では 3 薬剤に耐性株が認められ、耐性率は OTC が 13.3%、EM が 5.0%、SMMX が 8.3%であった。一方、*V. parahaemolyticus* について見ると、微量液体希釈培養法と寒天平板希釈培養法ともに供試した 9 薬剤全てにおいて一峰性の分布を示し、薬剤耐性株は認められなかった。なお分離された *V. parahaemolyticus* 8 株は、腸炎ビブリオの病原因子遺伝子である *tdh*、*trh1* および *trh2* は全て陰性であった。

Ⅱ．調査背景および目的

畜水産食品における薬剤耐性菌の出現実態調査について、平成 17 年度にプロトコルが作成され、平成 18～20 年度及び平成 25～27 年度において、国産の牛、豚及び鶏由来食品のサルモネラ、カンピロバクター、大腸菌及び腸球菌について薬剤耐性菌の調査が実施された。これらの調査により得られたデータは、薬剤耐性菌に関する食品健康影響評価のばく露評価において、薬剤耐性菌による食品の汚染状況についての懸念を評価する際に使用されている。

一方、水産食品については平成 28 年度に養殖魚等における薬剤耐性菌の出現実態を把握するための対象菌種の設定等に関する基礎的な調査を実施し、プロトコル¹（以下、「プロトコル」という）が作成された。国内で養殖される魚への抗菌性物質の使用に起因する薬剤耐性菌の食品健康影響評価をより科学的に実施するため、養殖魚等における薬剤耐性菌の出現状況を把握することが必要である。このため、平成 29 年度においては、本プロトコルに基づき養殖魚等の調査を行いながらその実効性を確認し、必要に応じて改善を図ることとした。

¹ 平成 28 年度「畜水産食品における薬剤耐性菌の出現実態調査（水産関連プロトコル作成）」報告書
<http://www.fsc.go.jp/fsciis/survey/show/cho20170010001>

Ⅲ. ビブリオ属菌の検出試験と成績

1. 試料(検体)のサンプリング

1) 施設の要件

市場等への輸送時の交差汚染の影響を避けるため、養殖場での試料採取が原則とされたことから、国内の代表的な養殖地域(九州)の複数の養殖場(2箇所)において試料(検体)を採取した。

2) 検体の種類

国内で養殖される海水魚(ぶり)及びその生産環境試料を対象とした。なお、生産環境試料はいけす付着物とした。

3) 検体のサンプリング、輸送および保管方法

微生物検査用検体の取扱いに関して知識を有する者の管理下でサンプリングした。また検体採取時には交差汚染や環境からの汚染が起きないように取扱い、輸送時には交差汚染が起きないように1検体ずつ梱包して輸送した。なお、本調査ではビブリオ属菌が分離対象菌種であることから、養殖魚を直接氷詰めにせず、ビニール袋に入れた上で氷詰めした(図1)。サンプリングした検体は凍結しないように保冷して運搬し、速やかに試験に供試した。



図1 試料(検体)輸送時の梱包状況

4) 検体数

調査仕様書²に従い養殖魚及びいけす付着物を合わせて 60 検体以上とした。

養殖魚及びいけす付着物の養殖場別採取数を表 1、検体採取時の養殖環境(海水)の状況を表 2 および表 3 に示した。

なお、養殖場 A でいけすが設置してある場所の水深は約 45 m、養殖場 B は約 50 m である。また養殖場 A ではアンピシリン(ABPC)、オキシテトラサイクリン(OTC)およびフロルフェニコール(FF)、養殖場 B では OTC、スルファモノメトキシシ(SMMX) およびエリスロマイシン(EM)の投与履歴があった。

実際の採取数は 2 養殖場共に養殖魚が 24 検体、いけす付着物が 6 検体であった。

表1 養殖魚及びいけす付着物の養殖場別採取数

養殖場	養殖魚	いけす付着物
A	24	6
B	24	6
合計	48	12

(検体)

² 平成 29 年度「畜水産食品における薬剤耐性菌の出現実態調査(水産関連プロトコルの試行)」仕様書
http://www.fsc.go.jp/chousa/sougouchousa/chousa_kadai.data/chousa29keikaku_1.pdf

表2 養殖場Aにおける養殖環境(海水)の状況

採取日	天候	水温 (°C)		Dissolved Oxygen;DO (mg/L)		透明度 (m)	塩分濃度 (g/kg)
		5 m	10 m	表層	5 m		
2018年7月22日	晴れ	23.5	23.5	-	5.7	9.0	-
2018年9月9日	晴れ	23.3	23.2	-	5.0	7.0	33.79
2018年9月16日	雨	23.0	23.0	-	5.3	10.5	-

7/22および9/16の採取当日のデータが無かったため、7/26および9/15のデータを記載した。

表3 養殖場Bにおける養殖環境(海水)の状況

採取日	天候	水温 (°C)		Dissolved Oxygen;DO (mg/L)		透明度 (m)	比重
		表層	5 m	表層	5 m		
2018年8月19日	晴れ	26.6	25.4	5.8	5.5	9.0	1.024
2018年8月26日	晴れ	27.5	27.3	6.1	6.3	12.0	1.022
2018年9月9日	晴れ	27.2	27.3	6.7	6.8	10.0	1.026

2. 試料(検体)からのビブリオ属菌の分離および同定の概略

1) 対象菌

ビブリオ属菌

プロトコルで指定された *V. alginolyticus*、*V. anguillarum*、*V. parahaemolyticus*、*V. vulnificus* を対象とした。

2) 分離および同定

試験方法は原則として、プロトコルに準拠して、分離および同定を行った。

3. 試験方法

1) 試料液(乳剤)の調製(前処理)

養殖魚はエラ、体表および腸管を1尾分採取(図2)し、混合したものを1検体とした。

いけす付着物は海藻、貝類等を採取(図3)し、混合したものを1検体とした。

それぞれ 25 g を秤量し、2% NaCl 含有アルカリペプトン水 (Alkaline Peptone Water, APW) 225 mL を加えた後、1 分間ストマッカー処理したものを乳剤とした(図4)。



検査対象部位
エラ 体表 腸管

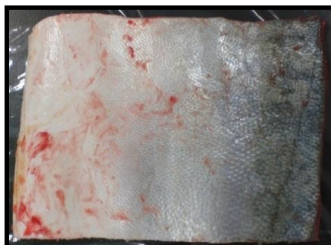


図2 養殖魚(ぶり)の前処理



図3 いけす付着物の前処理

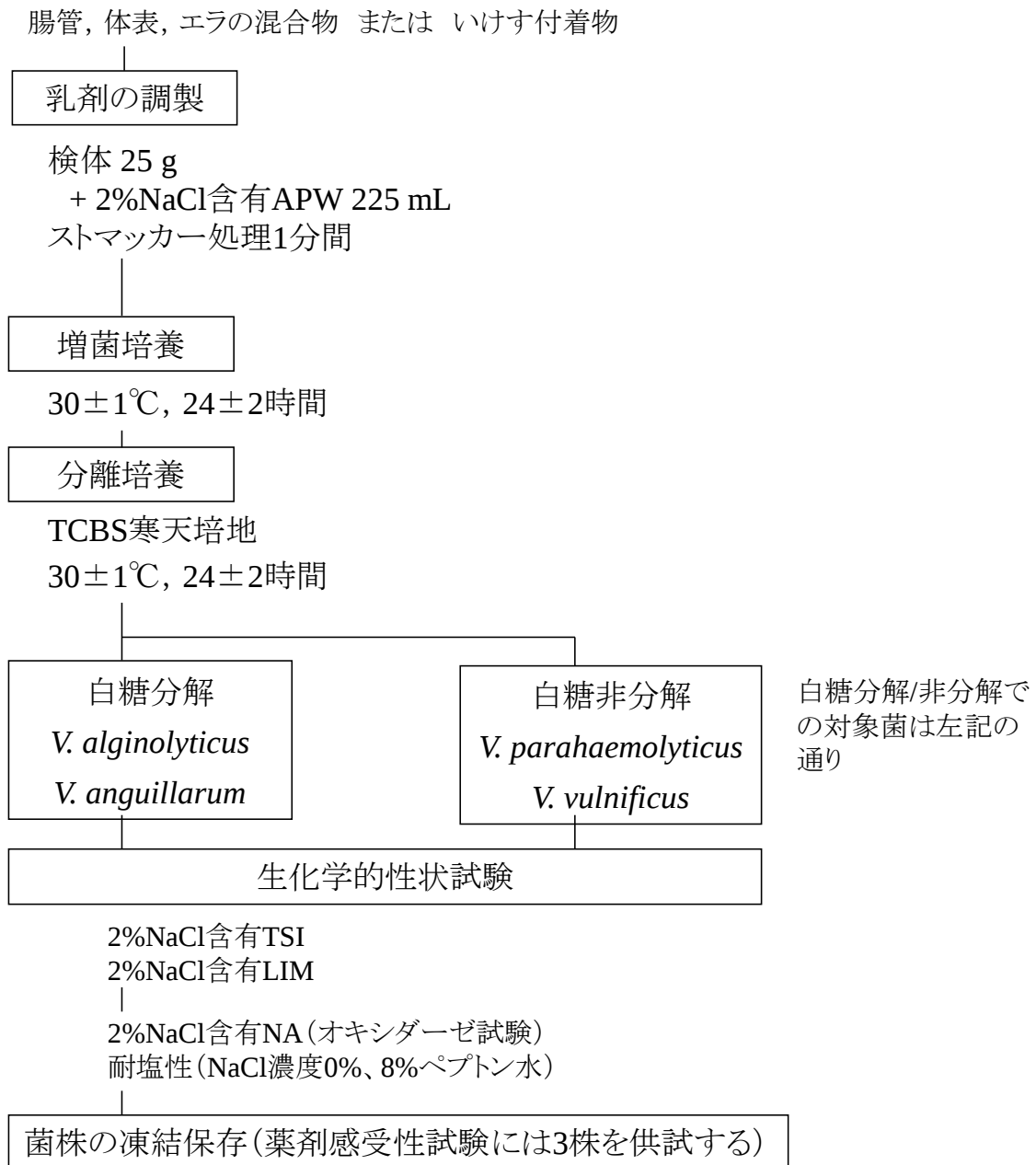


図4 ビブリオ属菌の分離方法

2) 検出方法および同定方法

a) 増菌培養法

乳剤を $30 \pm 1^\circ\text{C}$ で 24 ± 2 時間増菌培養後、培養液の 1 白金耳量を TCBS 寒天培地に画線分離し、 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養した(図 4)。

b) 生化学的性状試験

培養終了後、TCBS 寒天培地上で白糖分解を疑う集落と、白糖非分解を疑う集落について図 4 に示す各種生化学的性状試験を実施し、表 4 に示した性状に従い、*V. alginolyticus*、*V. anguillarum*、*V. parahaemolyticus*、*V. vulnificus* の 4 種類に区分した。

表4 ビブリオ属菌の生化学的性状

	2%NaCl含有 TSI寒天培地				2%NaCl含有 LIM培地			2%NaCl含有 NA培地	耐塩性試験 (発育)	
	乳糖・白糖分解 (斜面)	ブドウ糖分解 (高層)	ガス産生	硫化水素産生	リジン脱炭酸	インドール産生	運動性	オキシダーゼ	塩化ナトリウム 0 %	塩化ナトリウム 8 %
<i>V. alginolyticus</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
<i>V. anguillarum</i>	+	+	-	-	-	+/-	+		-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	+	-	-	+	+	+		-	+
<i>V. vulnificus</i>	-	+	-	-	+	+	+		-	-

3) 試験に使用した培地・試薬

ビブリオ属菌の検出および同定に使用した培地、試薬を表 5 に示した。

表5 使用培地、試薬一覧

対象菌	名称	メーカー名	ロットNo.
ビブリオ属菌	アルカリペプトン水	栄研化学	1872395
	TCBS寒天培地	極東製薬	CRAI6R01 CRAI7O01 CRAIA201 CRAIBR01
	2%NaCl含有TSI寒天培地	関東化学	7F0506 8F2222
	2%NaCl含有LIM培地	関東化学	7F0507 8F2223
	2%NaCl含有NA培地	関東化学	7F0508 8F2224
	無塩ペプトン水	関東化学	7F0509 8F2225
	8%NaCl含有ペプトン水	関東化学	7F0511 8F2227
	オキシダーゼ試験紙	日水製薬	240701

4.結果

1)ビブリオ属菌の検出成績

①養殖魚およびいけす付着物からの検出状況

養殖魚およびいけす付着物からの対象菌の検出状況を表 6 に示した。

V. alginolyticus は養殖魚 48 検体といけす付着物 12 検体の合計 60 検体全てから検出され、陽性率 100%であった。*V. anguillarum* は養殖魚 12 検体といけす付着物 1 検体の合計 13 検体から検出され、陽性率 21.7%であった。*V. parahaemolyticus* は養殖魚 4 検体といけす付着物 3 検体の合計 7 検体から検出され、陽性率 11.7%であった。*V. vulnificus* は養殖魚 21 検体といけす付着物 8 検体の合計 29 検体から検出され、陽性率 48.3%であった。

次に養殖場毎に見ると、*V. alginolyticus* は養殖場 A、B 共に、養殖魚といけす付着物の全検体から検出された。*V. anguillarum* は養殖場 A では、養殖魚 10 検体のみ(陽性率 33.3%)から検出され、養殖場 B では、養殖魚 2 検体といけす付着物 1 検体の計 3 検体(陽性率 10.0%)から検出された。*V. parahaemolyticus* は養殖場 A では養殖魚 2 検体といけす付着物 1 検体の計 3 検体(陽性率 10.0%)から検出され、養殖場 B では養殖魚 2 検体といけす付着物 2 検体の計 4 検体(陽性率 13.3%)から検出された。*V. vulnificus* は養殖場 A では養殖魚 7 検体といけす付着物 3 検体の計 10 検体(陽性率 33.3%)から検出され、養殖場 B では養殖魚 14 検体といけす付着物 5 検体の計 19 検体(陽性率 63.3%)から検出された。

なお、上記ビブリオ属菌の検出において、表 4 に示した生化学的性状試験により区分したものの、*V. alginolyticus* でガス産生(+)という例外が認められた。また *V. vulnificus* と区分された菌株には、複数の菌種が含まれていると考えられた。

表6 養殖魚およびいけす付着物からの検出状況(養殖場別)

養殖場	検体	検体数	<i>V. alginolyticus</i>		<i>V. anguillarum</i>		<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>V. vulnificus</i>	
			陽性検体数	陽性率(%)	陽性検体数	陽性率(%)	陽性検体数	陽性率(%)	陽性検体数	陽性率(%)
A	養殖魚	24	24	100	10	41.7	2	8.3	7	29.2
	いけす付着物	6	6	100	0	0	1	16.7	3	50.0
	計	30	30	100	10	33.3	3	10.0	10	33.3
B	養殖魚	24	24	100	2	8.3	2	8.3	14	58.3
	いけす付着物	6	6	100	1	16.7	2	33.3	5	83.3
	計	30	30	100	3	10.0	4	13.3	19	63.3
合計	養殖魚	48	48	100	12	25.0	4	8.3	21	43.8
	いけす付着物	12	12	100	1	8.3	3	25.0	8	66.7
	計	60	60	100	13	21.7	7	11.7	29	48.3

IV. 分離菌株の薬剤感受性試験(MIC の測定)

1. 分離菌株の選定

分離された菌株の中から、最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration ; MIC) 測定に供試する菌株数が 100 株を超えるように選定した。すなわち、全ての検体から分離された *V. alginolyticus* 120 株と食中毒起因菌として重要と考えられる *V. parahaemolyticus* 8 株の 2 菌種 128 株を選定した。

1) 供試菌株数

養殖魚およびいけす付着物から分離された菌株のうち、薬剤感受性試験に供試した菌株数を表 7 に示した。

表7 薬剤感受性試験供試菌株数

菌種	由来	養殖魚分離株	いけす付着物分離株	薬剤感受性試験に供試する菌株数	
				微量液体希釈培養法	寒天平板希釈培養法
<i>V. alginolyticus</i>	養殖場A	48	12	60	30
	養殖場B	48	12	60	30
	合計			120	60
<i>V. parahaemolyticus</i>	養殖場A	2	1	3	3
	養殖場B	3	2	5	5
	合計			8	8

① *V. alginolyticus*

V. alginolyticus は 1 検体から複数株が分離されたことから、1 検体から 2 株ずつ選定し、養殖魚およびいけす付着物から分離された 120 株 (養殖場 A 由来 ; 60 株、養殖場 B 由来 ; 60 株) を試験用菌株とした。

② *V. parahaemolyticus*

養殖魚およびいけす付着物から分離された 8 株 (養殖場 A 由来 ; 3 株、養殖場 B 由来 ; 5 株) 全てを試験用菌株とした。

2.測定方法

MIC の測定は微量液体希釈培養法と寒天平板希釈培養法で行った。すなわち微量液体希釈培養法は米国臨床検査標準委員会 (Clinical and Laboratory Standards Institute ; CLSI) の試験法³(以下、CLSI 試験法)に準拠し、MIC を測定した。また、寒天平板希釈培養法は動物用抗菌剤研究会 2003 年改定標準法⁴(以下、改訂標準法)に準拠し測定した。なお対象薬剤はプロトコルで指定された薬剤とした。

1)対象薬剤

対象とした薬剤および濃度範囲を表 8 に示した。

表8 調査対象薬剤

薬剤名	略号	系統	濃度範囲 (μg/mL)
オキシテトラサイクリン	OTC	テトラサイクリン系	0.125－256
アンピシリン	ABPC	ペニシリン系	0.125－256
エリスロマイシン	EM	マクロライド系	0.125－256
リンコマイシン	LCM	リンコマイシン系	0.125－256
ピコザマイシン	BCM	その他	0.125－256
ホスホマイシン	FOM	その他	0.125－256
オキシリン酸	OA	キノロン系	0.125－64
スルファモノメキシム	SMMX	サルファ剤	0.125－256
フロルフェニコール	FF	フェニコール系	0.125－16

³ CLSI: Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Approved Guideline-Second Edition. CLSI document VET04-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014

⁴ 動物用抗菌剤研究会: 動物由来細菌に対する抗菌性物質の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法.
<http://jantianim.org/article-628.html>

2) MIC 測定試験方法

微量液体希釈培養法には、栄研化学株式会社製のフローズンプレートを用いた。また *V. alginolyticus* は一部の菌株 (1 検体 1 株)、*V. parahaemolyticus* は 8 株全てについて寒天平板希釈培養法も併用して試験し、微量液体希釈培養法と比較した。

なお、微量液体希釈培養法に供試するプレートの作成にあたっては薬剤の溶解度を考慮し、OTC および SMMX は 64 µg/mL、EM は 128 µg/mL を上限とした。

①微量液体希釈培養法

i 接種用菌液の調製

供試菌株を 2%NaCl 含有ミューラーヒントン寒天培地で 25℃で 18～24 時間培養した。生育した集落を滅菌生理食塩水に McFarland 標準濁度 No.1 と同じ濁度となるように調製した。調製した菌液 1 mL を、滅菌生理食塩水 9 mL で 10 倍に希釈し、接種用菌液とした。

ii 菌液の接種および培養

接種用菌液を 0.0025 mL (2.5 µL) ずつフローズンプレートの各ウェルに接種し、28℃で 24～28 時間培養した。

iii 判定方法

マイクロプレートリーディングミラーの上に培養後のプレートを置き、判定を行った。肉眼的に混濁または沈殿が認められない場合、沈殿物があっても直径 1 mm 未満で 1 個の場合には発育陰性と判定した。これ以外の場合には、発育陽性と判定した。

iv 精度管理

CLSI 試験法で示された下記の菌株を用いて精度管理を行った。

Escherichia coli ATCC 25922

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida* ATCC 33658

なお、MIC の精度管理限界値 (MIC 範囲) については、CLSI 試験法に従った (表 9)。

表9 CLSIが規定する対象薬剤におけるMIC (μg/mL) の精度管理限界値 (28±2℃, 24-28時間)

薬剤名	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC 33658
オキシテトラサイクリン	0.5-2	0.12-1
アンピシリン	2-16	0.12-1
エリスロマイシン	-	4-32
リンコマイシン	-	-
ピコザマイシン	-	-
ホスホマイシン	-	-
オキシリン酸	0.06-0.25	0.008-0.03
スルファモノメトキシ	-	-
フロルフェニコール	4-16	0.5-2

- : 規定なし

②寒天平板希釈培養法

i 薬剤の調製方法

各薬剤の溶解に使用した溶媒と希釈液を表 10 に示した。なお各薬剤については 2,560～1.25 µg/mL までの 2 段階希釈液を調製した。ただし、オキシリン酸については 640～1.25 µg/mL、フロルフエニコールについては 160～1.25 µg/mL までの 2 段階希釈液を調製した。

表10 薬剤の溶解に使用する溶媒と希釈液

薬剤名	溶媒	希釈液
オキシテトラサイクリン	少量の0.1 N HCl+ 蒸留水	蒸留水
アンピシリン	緩衝液2	緩衝液1
エリスロマイシン	95%エタノール	蒸留水
リンコマイシン	蒸留水	蒸留水
ピコザマイシン	蒸留水	蒸留水
ホスホマイシン	蒸留水	蒸留水
オキシリン酸	下記 ¹⁾ 参照	蒸留水
スルファモノメキシシ	下記 ²⁾ 参照	蒸留水
フロルフエニコール	95%エタノール	蒸留水

1) 蒸留水1/2容量を加えた後、1N NaOHを溶解するまで滴下し、蒸留水でメスアップした。

2) 熱い蒸留水1/2容量を加えた後、2.5N NaOHを溶解するまで滴下し、蒸留水でメスアップした。

緩衝液1:0.1Mリン酸塩緩衝液(pH6.0)

リン酸二水素カリウム(KH_2PO_4) 7.0 g、リン酸一水素ナトリウム($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 6.0 gに蒸留水約750 mLを加え、1分間以上煮沸して溶解した。必要があれば1N NaOHまたはリン酸を用いてpHを5.9-6.1に調製した後、更に蒸留水を加えて1,000 mLとした。

緩衝液2:0.1Mリン酸塩緩衝液(pH8.0)

リン酸一水素カリウム(16.73g)、リン酸二水素カリウム(0.523g)に蒸留水約750 mLを加えて溶解し、必要があれば、リン酸を用いてpHを7.9-8.1に調整した後、さらに蒸留水を加えて1,000 mLとした。

ii 薬剤含有寒天培地の調製方法

シャーレ(直径 90 mm)に各薬剤希釈液を 2 mL 分注し、2%NaCl 含有ミューラーヒント寒天培地(Oxoid) 18 mL を添加して混合、固化させた後、フラン器内で寒天表面を乾燥させた。薬剤無添加の寒天培地についても同様に作成し、対照とした。

iii 接種用菌液の調製

供試菌株を2%NaCl 含有ミューラーヒントン液体培地で 25℃で 18～24 時間培養後、 $1 \sim 2 \times 10^8$ CFU/mL となるように濃度を調整し、これをさらに 10 倍希釈して接種用菌液とした。

iv 菌液の接種および培養

マイクロプランターを用いて、薬剤を含まない対照培地、次いで低濃度の薬剤含有寒天培地から順に菌液を接種し、培地上の菌液が乾燥した後、28℃で28時間培養した。

v 判定方法

薬剤含有寒天培地で被検菌の発育が完全に阻止された薬剤の最小濃度をエンドポイントとして判定し、その値を MIC 値とした。なお、単一集落のみの発育あるいは微少な発育は発育阻止とみなした。また、薬剤を含まない対照培地で被検菌の発育を確認した。

vi 精度管理

改定標準法で示された下記の菌株を用いて精度管理を行った。

Staphylococcus aureus ATCC 29213

Enterococcus faecalis ATCC 29212

Escherichia coli ATCC 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida* ATCC 33658

なお、MIC の精度管理限界値 (MIC 範囲) については、改定標準法で示された値 (参考値) を参照した (表 11)。

表11 動物用抗菌剤研究会が規定する対象薬剤におけるMIC (μg/mL) の精度管理限界値 (参考値)

薬剤名	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC 33658
オキシテトラサイクリン	≤0.5	4-16	0.5-2	1-4	≤0.5
アンピシリン	0.25-1	0.25-1	1-4	>512	<0.125
エリスロマイシン	-	-	-	-	-
リンコマイシン	-	-	-	-	-
ピコザマイシン	>512	>512	16-64	>512	8-32
ホスホマイシン	2-8	16-64	1-4	4-16	0.5-2
オキシリン酸	0.25-1	8-32	<0.125	4-16	<0.125
スルファモノメキシシ	8-32	>512	64-256	≥512	128-512
フロルフェニコール	1-4	1-4	2-8	64-256	0.25-1

-: 規定なし

3) 試験に使用した機器・培地

MIC 測定に使用した機器、培地類を表 12 に示した。

表12 MIC測定に使用した機器、試薬一覧

名称	メーカー名	ロットNo.
フローズンプレート‘栄研’ XB0C	栄研化学株式会社	82001
フローズンプレート‘栄研’ XB0D	栄研化学株式会社	82001
ミューラーヒントンブイヨン	Oxoid	1460487
ミューラーヒントン寒天培地	Oxoid	1807616
マイクロプランター	佐久間製作所	-

3.結果

1) 養殖魚およびいけす付着物由来株の MIC と耐性株出現頻度

① *V. alginolyticus*

微量液体希釈培養法

○養殖場 A+養殖場 B(合計 120 株)

養殖場 A と B を合わせた養殖魚およびいけす付着物から分離された *V. alginolyticus* の Range、MIC₅₀、MIC₉₀、耐性菌株数および耐性率を表 13、MIC 分布を表 14、薬剤耐性パターンを表 15 に示した。OTC では 0.5 µg/mL および >64 µg/mL、SMMX では 4 µg/mL および 64 µg/mL を MIC のピークとする二峰性が認められたことから、それぞれの中間値 (OTC は 4 µg/mL、SMMX は 32 µg/mL) を暫定的なブレイクポイントに設定した。この暫定的なブレイクポイントを基に耐性状況を判断すると、薬剤耐性株は供試した 9 薬剤のうち 2 薬剤に認められ、耐性率は OTC が 12.5%、SMMX が 6.7%であった。また薬剤耐性パターンについては、3 パターンに分類され、2 薬剤耐性が 8 株、1 薬剤耐性が 7 株、感受性株が 105 株であった。耐性株の内訳については、OTC-SMMX の 2 薬剤耐性が 8 株 (6.7%)、次いで OTC の 1 薬剤耐性が 7 株 (5.8%)であった。

表13 養殖場A, B由来*V.alginolyticus*の薬剤感受性試験(合計120株, 微量液体希釈培養法)

薬剤名	菌株数	Range ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	耐性株数	耐性率	ブレイクポイント ($\mu\text{g/mL}$)
OTC	120	0.25->64	0.5	32	15	12.5	4
ABPC	120	64->256	>256	>256	-	-	-
EM	120	2->128	8	16	-	-	-
LCM	120	64->256	128	256	-	-	-
BCM	120	32->256	>256	>256	-	-	-
FOM	120	2-128	16	32	-	-	-
OA	120	≤ 0.12 -0.5	0.25	0.5	-	-	-
SMMX	120	1-64	4	16	8	6.7	32
FF	120	0.5-2	1	1	-	-	-

表14 養殖場A, B由来*V.alginolyticus*のMIC分布(合計120株, 微量液体希釈培養法)

薬剤名	菌株数	No. of strains with MIC ($\mu\text{g/mL}$)												
		≤ 0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
OTC	120		35	69	1				1	4	2	8 (>64)	-	-
ABPC	120										1		1	118
EM	120					1	33	73	10	1	1		1 (>128)	-
LCM	120										9	55	55	1
BCM	120									1	2	5	8	104
FOM	120					1	13	44	41	14	6	1		
OA	120	45	61	14								-	-	-
SMMX	120				2	13	56	36	5		8	-	-	-
FF	120			51	68	1					-	-	-	-

表15 養殖場A, B由来*V.alginolyticus*の薬剤耐性パターン(合計120株, 微量液体希釈培養法)

耐性薬剤数	菌株数	耐性パターン								
		OTC	ABPC	EM	LCM	BCM	FOM	OA	SMMX	FF
2	8	OTC							SMMX	
1	7	OTC								
感受性株	105									
合計	120									

○養殖場 A (60 株)

養殖場 A の養殖魚およびいけす付着物から分離された *V. alginolyticus* の Range、MIC₅₀、MIC₉₀、耐性菌株数および耐性率を表 16、MIC 分布を表 17、薬剤耐性パターンを表 18 に示した。OTC では 0.5 µg/mL および >64 µg/mL を MIC のピークとする二峰性が認められた。薬剤耐性株は供試した 9 薬剤のうち 1 薬剤 (OTC) にのみ認められ、耐性率は 6.7%であった。また薬剤耐性パターンについては、2 パターンに分類され、1 薬剤耐性 (OTC 耐性) が 4 株 (6.7%)、感受性株が 56 株であった。

表16 養殖場A由来*V.alginolyticus* の薬剤感受性試験 (60株, 微量液体希釈培養法)

薬剤名	菌株数	Range ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	耐性株数	耐性率	ブレイクポイント ($\mu\text{g/mL}$)
OTC	60	0.25->64	0.5	0.5	4	6.7	4
ABPC	60	>256	>256	>256	-	-	-
EM	60	4-16	8	8	-	-	-
LCM	60	64->256	128	256	-	-	-
BCM	60	128->256	>256	>256	-	-	-
FOM	60	2-64	8	16	-	-	-
OA	60	≤ 0.12 -0.5	0.25	0.5	-	-	-
SMMX	60	1-16	4	8	0	0	32
FF	60	0.5-1	0.5	1	-	-	-

表17 養殖場A由来*V.alginolyticus* のMIC分布 (60株, 微量液体希釈培養法)

薬剤名	菌株数	No. of strains with MIC ($\mu\text{g/mL}$)												
		≤ 0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
OTC	60		17	39							1	3 (>64)	-	-
ABPC	60													60
EM	60						16	38	6				-	-
LCM	60										4	27	28	1
BCM	60											2	4	54
FOM	60					1	3	26	24	4	2			
OA	60	23	29	8								-	-	-
SMMX	60				1	7	27	23	2			-	-	-
FF	60			30	30						-	-	-	-

表18 養殖場A由来*V.alginolyticus* の薬剤耐性パターン (60株, 微量液体希釈培養法)

耐性薬剤数	菌株数	耐性パターン								
		OTC	ABPC	EM	LCM	BCM	FOM	OA	SMMX	FF
1	4	OTC								
感受性株	56									
合計	60									

○養殖場 B (60 株)

養殖場 B の養殖魚およびいけす付着物から分離された *V. alginolyticus* の Range、MIC₅₀、MIC₉₀、耐性菌株数および耐性率を表 19、MIC 分布を表 20、薬剤耐性パターンを表 21 に示した。OTC では 0.5 µg/mL および >64 µg/mL、SMMX では 4 µg/mL および 64 µg/mL を MIC のピークとする二峰性が認められた。薬剤耐性株は供試した 9 薬剤のうち 2 薬剤に認められ、耐性率は OTC が 18.3%、SMMX が 13.3%であった。また薬剤耐性パターンについては、3 パターンに分類され、2 薬剤耐性が 8 株、1 薬剤耐性が 3 株、感受性株が 49 株であった。耐性株の内訳については、OTC-SMMX の 2 薬剤耐性が 8 株 (13.3%)、OTC の 1 薬剤耐性が 3 株 (5%)であった。

表19 養殖場B由来*V.alginolyticus* の薬剤感受性試験 (60株, 微量液体希釈培養法)

薬剤名	菌株数	Range ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	耐性株数	耐性率	ブレイクポイント ($\mu\text{g/mL}$)
OTC	60	0.25->64	0.5	32	11	18.3	4
ABPC	60	64->256	>256	>256	-	-	-
EM	60	2->128	8	16	-	-	-
LCM	60	64-256	128	256	-	-	-
BCM	60	32->256	>256	>256	-	-	-
FOM	60	4-128	16	32	-	-	-
OA	60	≤ 0.12 -0.5	0.25	0.25	-	-	-
SMMX	60	1->64	4	>64	8	13.3	32
FF	60	0.5-2	1	1	-	-	-

表20 養殖場B由来*V.alginolyticus* のMIC分布 (60株, 微量液体希釈培養法)

薬剤名	菌株数	No. of strains with MIC ($\mu\text{g/mL}$)												
		≤ 0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
OTC	60		18	30	1				1	4	1	5 (>64)	-	-
ABPC	60										1		1	58
EM	60					1	17	35	4	1	1		1 (>128)	-
LCM	60										5	28	27	
BCM	60									1	2	3	4	50
FOM	60						10	18	17	10	4	1		
OA	60	22	32	6								-	-	-
SMMX	60				1	6	29	13	3			8 (>64)	-	-
FF	60			21	38	1					-	-	-	-

表21 養殖場B由来*V.alginolyticus* の薬剤耐性パターン (60株, 微量液体希釈培養法)

耐性薬剤数	菌株数	耐性パターン								
		OTC	ABPC	EM	LCM	BCM	FOM	OA	SMMX	FF
2	8	OTC							SMMX	
1	3	OTC								
感受性株	49									
合計	60									

寒天平板希釈培養法

○養殖場 A+養殖場 B(合計 60 株)

養殖場 A と B を合わせた養殖魚およびいけす付着物から分離された *V. alginolyticus* の Range、MIC₅₀、MIC₉₀、耐性菌株数および耐性率を表 22、MIC 分布を表 23、薬剤耐性パターンを表 24 に示した。

OTC では 0.25 µg/mL および 32 µg/mL、EM では 4 µg/mL および 128 µg/mL、SMMX では 4 µg/mL および >256 µg/mL を MIC のピークとする二峰性が認められたことから、それぞれの中間値 (OTC は 4 µg/mL、EM と SMMX は 32 µg/mL) を暫定的なブレイクポイントに設定した。この暫定的なブレイクポイントを基に耐性状況を判断すると、薬剤耐性株は供試した 9 薬剤のうち 3 薬剤に認められ、耐性率は OTC が 13.3%、EM が 5.0%、SMMX が 8.3%であった。また薬剤耐性パターンについては、5 パターンに分類され、3 薬剤耐性が 3 株、2 薬剤耐性が 1 株、1 薬剤耐性が 5 株、感受性株が 51 株であった。耐性株の内訳については、OTC の 1 薬剤耐性が 4 株 (6.7%) で最も多く、次いで OTC-EM-SMMX の 3 薬剤耐性が 3 株 (5.0%)、OTC-SMMX の 2 薬剤耐性と SMMX の 1 薬剤耐性が各 1 株 (1.7%) であった。

表22 養殖場A, B由来*V.alginolyticus*の薬剤感受性試験(合計60株, 寒天平板希釈培養法)

薬剤名	菌株数	Range ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	耐性株数	耐性率	ブレイクポイント ($\mu\text{g/mL}$)
OTC	60	0.25-256	0.25	32	8	13.3	4
ABPC	60	16->256	128	>256	-	-	-
EM	60	2-128	4	16	3	5.0	32
LCM	60	256->256	>256	>256	-	-	-
BCM	60	64->256	>256	>256	-	-	-
FOM	60	8->256	32	64	-	-	-
OA	60	0.25-0.5	0.25	0.5	-	-	-
SMMX	60	2->256	4	8	5	8.3	32
FF	60	1-4	1	2	-	-	-

表23 養殖場A, B由来*V.alginolyticus*のMIC分布(合計60株, 寒天平板希釈培養法)

薬剤名	菌株数	No. of strains with MIC (μg/mL)												
		≤0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
OTC	60		42	10						4	1	2	1	
ABPC	60								1		11	21	14	13
EM	60					1	31	18	7			3		
LCM	60												19	41
BCM	60										1	3	2	54
FOM	60							5	4	37	13			1
OA	60		49	11								-	-	-
SMMX	60					8	35	11	1		1			4
FF	60				44	15	1			-	-	-	-	-

表24 養殖場A, B由来*V.alginolyticus*の薬剤耐性パターン(合計60株, 寒天平板希釈培養法)

耐性薬剤数	菌株数	耐性パターン									
		OTC	ABPC	EM	LCM	BCM	FOM	OA	SMMX	FF	
3	3	OTC		EM					SMMX		
2	1	OTC							SMMX		
1	1								SMMX		
	4	OTC									
感受性株	51										
合計	60										

○養殖場 A (30 株)

養殖場 A の養殖魚およびいけす付着物から分離された *V. alginolyticus* の Range、MIC₅₀、MIC₉₀、耐性菌株数および耐性率を表 25、MIC 分布を表 26、薬剤耐性パターンを表 27 に示した。

OTC では 0.25 µg/mL および 128 µg/mL、SMMX では 4 µg/mL および 64 µg/mL を MIC のピークとする二峰性が認められた。薬剤耐性株は供試した 9 薬剤のうち 2 薬剤に認められ、耐性率は OTC が 6.7%、SMMX が 3.3%であった。また薬剤耐性パターンについては、3 パターンに分類され、1 薬剤耐性が 3 株、感受性株が 27 株であった。耐性株の内訳については、OTC と SMMX の 1 薬剤耐性がそれぞれ 2 株 (6.7%) と 1 株 (3.3%) であった。

表25 養殖場A由来*V.alginolyticus* の薬剤感受性試験 (30株, 寒天平板希釈培養法)

薬剤名	菌株数	Range ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	耐性株数	耐性率	ブレイクポイント ($\mu\text{g/mL}$)
OTC	30	0.25-128	0.25	0.5	2	6.7	4
ABPC	30	16->256	128	>256	-	-	-
EM	30	2-16	8	16	0	0	32
LCM	30	256->256	>256	>256	-	-	-
BCM	30	64->256	>256	>256	-	-	-
FOM	30	8-64	32	64	-	-	-
OA	30	0.25-0.5	0.25	0.5	-	-	-
SMMX	30	2-64	4	8	1	3.3	32
FF	30	1-2	1	1	-	-	-

表26 養殖場A由来*V.alginolyticus* のMIC分布 (30株, 寒天平板希釈培養法)

薬剤名	菌株数	No. of strains with MIC ($\mu\text{g/mL}$)												
		≤ 0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
OTC	30		18	10								2		
ABPC	30								1		8	11	4	6
EM	30					1	11	12	6					
LCM	30												6	24
BCM	30										1	3	2	24
FOM	30							1	2	22	5			
OA	30		22	8								-	-	-
SMMX	30					5	19	5			1			
FF	30				28	2				-	-	-	-	-

表27 養殖場A由来*V.alginolyticus* の薬剤耐性パターン (30株, 寒天平板希釈培養法)

耐性薬剤数	菌株数	耐性パターン								
		OTC	ABPC	EM	LCM	BCM	FOM	OA	SMMX	FF
1	1	SMMX								
	2	OTC								
感受性株	27									
合計	30									

○養殖場 B (30 株)

養殖場 B の養殖魚およびいけす付着物から分離された *V. alginolyticus* の Range、MIC₅₀、MIC₉₀、耐性菌株数および耐性率を表 28、MIC 分布を表 29、薬剤耐性パターンを表 30 に示した。

OTC では 0.25 µg/mL および 32 µg/mL、EM では 4 µg/mL および 128 µg/mL、SMMX では 4 µg/mL および >256 µg/mL を MIC のピークとする二峰性が認められた。薬剤耐性株は供試した 9 薬剤のうち 3 薬剤に認められ、耐性率は OTC が 20.0%、EM が 10.0%、SMMX が 13.3%であった。また薬剤耐性パターンについては、4 パターンに分類され、3 薬剤耐性が 3 株、2 薬剤耐性が 1 株、1 薬剤耐性が 2 株、感受性株が 24 株であった。耐性株の内訳については、OTC-EM-SMMX の 3 薬剤耐性が 3 株 (10.0%) で最も多く、次いで OTC の 1 薬剤耐性が 2 株 (6.7%)、OTC-SMMX の 2 薬剤耐性が 1 株 (3.3%) であった。

表28 養殖場B由来*V.alginolyticus* の薬剤感受性試験 (30株, 寒天平板希釈培養法)

薬剤名	菌株数	Range ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	耐性株数	耐性率	ブレイクポイント ($\mu\text{g/mL}$)
OTC	30	0.25-256	0.25	32	6	20.0	4
ABPC	30	64->256	256	>256	-	-	-
EM	30	4-128	4	16	3	10.0	32
LCM	30	256->256	>256	>256	-	-	-
BCM	30	>256	>256	>256	-	-	-
FOM	30	8->256	32	64	-	-	-
OA	30	0.25-0.5	0.25	0.25	-	-	-
SMMX	30	2->256	4	>256	4	13.3	32
FF	30	1-4	1	2	-	-	-

表29 養殖場B由来*V.alginolyticus* のMIC分布 (30株, 寒天平板希釈培養法)

薬剤名	菌株数	No. of strains with MIC ($\mu\text{g/mL}$)												
		≤ 0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
OTC	30	24									4	1	1	
ABPC	30										3	10	10	7
EM	30	20									6	1	3	
LCM	30												13	17
BCM	30													30
FOM	30										4	2	15	8
OA	30	27									3		-	-
SMMX	30	3									16	6	1	4
FF	30	16									13	1	-	-

表30 養殖場B由来*V.alginolyticus* の薬剤耐性パターン (30株, 寒天平板希釈培養法)

耐性薬剤数	菌株数	耐性パターン									
		OTC	ABPC	EM	LCM	BCM	FOM	OA	SMMX	FF	
3	3	OTC		EM					SMMX		
2	1	OTC							SMMX		
1	2	OTC									
感受性株	24										
合計	30										

② *V. parahaemolyticus*

微量液体希釈培養法

○養殖場 A+養殖場 B(合計 8 株)

養殖場 A と B を合わせた養殖魚およびいけす付着物から分離された *V. parahaemolyticus* の Range、MIC₅₀、MIC₉₀、耐性菌株数および耐性率を表 31、MIC 分布を表 32 に示した。

供試した 9 種類の薬剤において 8 株全てが一峰性の分布を示し、ブレイクポイントの設定は出来なかった。

表31 養殖場A, B由来*V.parahaemolyticus*の薬剤感受性試験(合計8株, 微量液体希釈培養法)

薬剤名	菌株数	Range ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	耐性株数	耐性率	ブレイクポイント ($\mu\text{g/mL}$)
OTC	8	0.5-1	0.5	1	-	-	-
ABPC	8	>256	>256	>256	-	-	-
EM	8	4-16	8	16	-	-	-
LCM	8	256->256	256	>256	-	-	-
BCM	8	>256	>256	>256	-	-	-
FOM	8	8-64	32	64	-	-	-
OA	8	0.25-1	0.5	1	-	-	-
SMMX	8	8-16	16	16	-	-	-
FF	8	1-2	1	2	-	-	-

表32 養殖場A, B由来*V.parahaemolyticus*のMIC分布(合計8株, 微量液体希釈培養法)

薬剤名	菌株数	No. of strains with MIC ($\mu\text{g/mL}$)												
		≤ 0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
OTC	8			5	3							-	-	-
ABPC	8													8
EM	8						1	5	2			-	-	
LCM	8												7	1
BCM	8													8
FOM	8							1	2	4	1			
OA	8		1	6	1							-	-	-
SMMX	8							1	7			-	-	-
FF	8				7	1					-	-	-	-

寒天平板希釈培養法

○養殖場 A+養殖場 B(合計 8 株)

養殖場 A と B を合わせた養殖魚およびいけす付着物から分離された *V. parahaemolyticus* の Range、MIC₅₀、MIC₉₀、耐性菌株数および耐性率を表 33、MIC 分布を表 34 に示した。

供試した 9 種類の薬剤において 8 株全てが一峰性の分布を示し、ブレイクポイントの設定は出来なかった。

表33 養殖場A, B由来*V.parahaemolyticus*の薬剤感受性試験(合計8株, 寒天平板希釈培養法)

薬剤名	菌株数	Range ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	耐性株数	耐性率	ブレイクポイント ($\mu\text{g/mL}$)
OTC	8	0.5-1	1	1	-	-	-
ABPC	8	16-32	16	32	-	-	-
EM	8	8-16	8	16	-	-	-
LCM	8	>256	>256	>256	-	-	-
BCM	8	>256	>256	>256	-	-	-
FOM	8	128-256	256	256	-	-	-
OA	8	0.25-0.5	0.5	0.5	-	-	-
SMMX	8	16	16	16	-	-	-
FF	8	1	1	1	-	-	-

表34 養殖場A, B由来*V.parahaemolyticus*のMIC分布(合計8株, 寒天平板希釈培養法)

薬剤名	菌株数	No. of strains with MIC ($\mu\text{g/mL}$)												
		≤ 0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
OTC	8			1	7									
ABPC	8								4	4				
EM	8							7	1					
LCM	8													8
BCM	8													8
FOM	8											3	5	
OA	8		3	5								-	-	-
SMMX	8								8					
FF	8				8							-	-	-

2) 微量液体希釈培養法と寒天平板希釈培養法での結果の比較

本調査の薬剤感受性試験では、微量液体希釈培養法と寒天平板希釈培養法を併用し、得られた結果について比較した。

① *V. alginolyticus*

試験方法が異なるため得られた結果を直接比較することは難しいが、供試した 9 薬剤については概ね同様の傾向を示した。この中で、ABPC と FOM の傾向がやや異なっていた。

ABPC について見ると、微量液体希釈培養法では Range が 64->256 µg/mL であり、ほぼ全ての菌株 (118 株) が MIC 値 >256 µg/mL を示したのに対し、寒天平板希釈培養法では Range が 16->256 µg/mL と微量液体希釈培養法と比較して広く分布しており、128 µg/mL が MIC のピークであった。

また FOM については、微量液体希釈培養法では Range が 2-128 µg/mL であり 8 µg/mL が MIC のピークであったのに対し、寒天平板希釈培養法では Range が 8->256 µg/mL で 32 µg/mL が MIC のピークであった。

FOM の抗菌力に関しては、glucose-6-phosphate (G6P) をミューラーヒントン寒天培地 (MHA) 培地に添加することで MHA に比べて 2~128 倍増強されること⁵、*E. coli* では、MHA に G6P を添加した培地を用いて好気培養条件下で測定することにより、得られる MIC 値が感受性側にシフトすること⁶が報告されている。ビブリオ属菌に関しては、FOM 抗菌力の G6P 添加の影響を検討した報告は見当たらないものの、本調査で実施した微量液体希釈培養法では FOM に 25 µg/mL の G6P が添加されているものの、寒天平板希釈培養法では未添加の条件で実施したことから G6P 添加での抗菌力への影響が考えられた。

② *V. parahaemolyticus*

上記 *V. alginolyticus* と同様に概ね同様の傾向を示したものの、ABPC と FOM の傾向が異なっていた。

ABPC について見ると、微量液体希釈培養法では Range が >256 µg/mL であったのに対し、寒天平板希釈培養法では Range が 16-32 µg/mL であり 3 管差 (8 倍) の差が認められ、上記 *V. alginolyticus* での FOM 同様に抗菌力に差が生じたものの詳細は明らかにできなかった。

また *V. parahaemolyticus* については、農林水産省が水産養殖環境由来腸炎ビブリ

⁵ 三國谷雄ら: Fosfomycin の各種感受性測定法における抗菌スペクトルと β-ラクタマーゼ産生株、薬剤排出ポンプ変異株に対する抗菌活性. The Japanese Journal of Antibiotics, **58**, 105-122, 2005.

⁶ 村松英彰ら: 種々の方法で測定した 2003 年-2004 年の臨床分離株のホスホマイシンに対する感受性成績の比較. The Japanese Journal of Antibiotics, **60**, 107-124, 2007

オの薬剤感受性結果を公表⁷しており、寒天平板希釈培養法を用いた OTC、EM、LCM、OA、FF に関して調査がなされている。本調査の寒天平板希釈培養法で得られた結果と比較すると、EM と LCM で本調査の MIC 値がやや高い傾向にあったものの、これ以外の薬剤では同様の傾向であった。

V. 分離菌株の性状解析（腸炎ビブリオ病原因子遺伝子の検出）

1. 菌株の選定

分離された *V. parahaemolyticus* 8 株全てを対象とした。

2. 試験方法

1) 腸炎ビブリオ病原因子遺伝子 (*tdh*、*trh1*、*trh1&2*) の検出

PCR 法により腸炎ビブリオ病原因子遺伝子（耐熱性溶血毒遺伝子 *tdh*、耐熱性溶血毒類似毒素遺伝子 *trh1*、*trh1&2*）の検出を行った。なお陽性コントロール菌株として、*V. parahaemolyticus* RIMD 2210050 (O4:K12、*tdh*+, *trh*+) を用いた。

2) 試験に使用した機器および試薬

腸炎ビブリオ病原因子遺伝子の検出に使用した機器および試薬を表 35 に示した。

⁷ 農林水産省：ブリ類由来連鎖球菌症及び類結節症原因菌並びに水産養殖環境由来腸炎ビブリオの薬剤感受性；2015.

表35 *tdh*、*trh1*、*trh2* の遺伝子検出に使用した機器および試薬一覧

名称	メーカー名	機種番号or ロットNo.
サーマルサイクラー	Applied Biosystem	Veriti 96 well Thermal Cycler
DNeasy Blood & Tissue Kit	QIAGEN	157050849
10× Ex Taq Buffer	TaKaRa	NA7501BA
2.5mM dNTP Mixture		
TaKaRa Ex Taq HS		
耐熱性溶血毒遺伝子検出用Primer Set VPD-1&2		A1301A
耐熱性溶血毒類似毒素遺伝子検出用Primer Set VPS-1&2		AH97076A
耐熱性溶血毒類似毒素遺伝子検出用Primer Set VPR-1&2		A1201A
Agarose LO3「TaKaRa」		AH4P020
1× TAE(Tris-Acetate-EDTA)		803G1661

3. 結果

1) 腸炎ビブリオ病原因子遺伝子 (*tdh*、*trh1*、*trh1&2*) の検出状況

供試した *V. parahaemolyticus* 8 株は全て病原因子遺伝子 (*tdh*、*trh1*、*trh1&2*) について陰性であった。

VI. 分離菌株の保存

本調査で分離され、薬剤感受性試験に供試した菌株を-80℃で凍結保存した。凍結保存した菌株数を表 36 に示した。

表36 凍結保存に供した分離菌株数

菌種	由来	菌株数		
		養殖魚分離株	いけす付着物分離株	計
<i>V. alginolyticus</i>	養殖場A	48	12	60
	養殖場B	48	12	60
<i>V. parahaemolyticus</i>	養殖場A	2	1	3
	養殖場B	3	2	5

VII. プロトコルの改善点など

本調査は、平成 28 年度に作成されたプロトコルに基づき養殖魚等の調査を行いながらその実効性を確認し、必要に応じて改善を図ることを目的に実施した。

調査の結果、以下のようなプロトコルで改善すべき点および今後の調査で考慮すべき点を得た。

1 点目：

ビブリオ属菌の生化学的性状試験として TSI 寒天培地で糖分解、ガス産生、硫化水素産生を判定するが、ガス産生の項を削除すること。

理由；本プロトコルの生化学的性状試験において *V. alginolyticus* と同定される菌にガス産生が認められた。但し、一度保存した株ではガス産生は弱かった。なお *V. parahaemolyticus* と同定された菌は、全てガス非産生であった。

2 点目：

本調査の生化学的性状試験で *V. vulnificus* と同定されるものには、複数の菌種が入っていることが考えられる。

3 点目：

本調査の分離結果から、*Photobacterium* 属菌も多数 (60 検体中 37 検体) 分離されたことから、対象菌種として利用可能と考えられる。

以 上