

ニシキゴイの“新穴あき病”病魚から新たに分離された 非定型 *Aeromonas salmonicida* の薬剤感受性

中嶋一恵・吉澤良輔・兵藤則行

The drug sensitive of atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from the nishikigoi
Cyprinus carpio suffering from ulcer disease

Kazue NAKAJIMA, Ryosuke YOSHIZAWA and Noriyuki HYODO

キーワード：ニシキゴイ，新穴あき病，抗菌剤

1996年から、ニシキゴイ (*Cyprinus carpio*) において、体表に潰瘍患部を形成する致死性の高い疾病が発生している。従来の穴あき病と異なる病状を示し、また、多くの水産用医薬品で効果が示されないことから、ニシキゴイ業界では本疾病を“新穴あき病”と称している。加来ら¹⁾によって、本疾病の病魚から分離された細菌が、非定型 *Aeromonas salmonicida* と同定され、コイに対して病原性があることが示された。また、的山ら²⁾は、7養殖場から分離した9株の非定型 *A. salmonicida* がコイに対して致死性の高い病原性を持つことを示し、この細菌がニシキゴイにおいて流行する“新穴あき病”の原因菌であることを示唆した。

本疾病はその後も収束することなく、発生が継続しており、ニシキゴイ養殖に大きな被害をもたらしている。また、唐木沢ら³⁾は2004年に分離された株について、それまでの株に比して薬剤感受性が低下している旨を報告している。本研究では、“新穴あき病”の防疫対策の確立に必要な知見を得るため、ニシキゴイから新たに分離した非定型 *A. salmonicida* の性状および薬剤感受性を調査し、過去に分離された株と比較した。

材 料 と 方 法

細菌分離

2013年10月に新潟県内水面水産試験場へ持ち込まれ、外観から症状が認められた“新穴あき

病”罹患ニシキゴイを用いて、体表に生じた潰瘍患部から定法に従い分離した細菌株B13131を試験に供した。分離用培地は綿羊無菌脱繊維血（日本生物材料センター）を含むトリプトソイ寒天培地（栄研 以下羊血 TSA）を用いた。分離された細菌は同様の培地で継代培養を行い、分離培養および継代培養は20℃に設定したインキュベーター内で行った。非定型 *A. salmonicida* の確認は的山⁴⁾の方法に従い、PCR法により行った。

性状試験

性状試験は API20E SYSTEM を用いて行い、性状の判定は的山ら²⁾に準じた方法で行い、的山ら²⁾および唐木沢ら³⁾が分離した株と性状を比較した。

病原性試験

B13131株のニシキゴイに対する病原性を確認するために、感染試験を行った。供試魚には当场で飼育していた体重6~49gのニシキゴイを使用した。供試魚への感染は注射法および浸漬法によって行い、病原性試験に使用した細菌は羊血TSA培地を用いて、20℃で72時間から120時間培養したものを無菌的に調整した。注射法ではPBSで 4.9×10^8 cfu/mlに濃度調整し、0.1mlずつ皮下注射し、対照区として、PBSのみを0.1mlずつ皮下注射した区を設けた。浸漬法ではオートクレーブにより滅菌した飼育水で 1.0×10^8 cfu/mlに濃度調整した菌液5mlを60L容量のガラス水槽（水量50L）に投入し、20℃で1時間暴露した後、ろ過槽を稼働した。感染処理を行わ

なかった群を浸漬法での対照区とした。感染処理後は水温20℃で無給餌で飼育した。

感受性試験

過去に分離された株と薬剤に対する感受性を比較するため、感受性試験を行った。感受性試験は羊血TSA培地で培養した非定型 *A.salmonicida* を生理食塩水に懸濁し、ミューラーヒントン S 寒天培地（栄研化学）を用い、ディスク拡散法にて行った。

結果

今回分離された非定型 *A. salmonicida* B13131株および的山ら²⁾の報告による株(T112)、唐木沢ら³⁾の報告による株(T1602)の性状を表1に示した。過去に分離された株では、β-Galactosidase が陰性を示したのに対し、B13131株では陽性を示した。また、過去の株では D-Glucose が陽性を示したのに対し、B13131株では陰性を示した。T1602株で陽性だった Arginine dihydrolase は、それ以前の菌株と同様に陰性を示し、他の性状については一致した。また、羊血TSA培地での培養における溶血性は、すべての株で認められなかった。

表1 非定形 *Aeromonas salmonicida* の性状比較

試験項目	B13131	T112	T1602
β-Galactosidase	+	-	-
Arginine dihydrolase	-	+	-
Lysine decarboxylase	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-
Citrate	-	-	-
H ₂ S production	-	-	-
Urease	-	-	-
Tryptophan deaminase	-	-	-
Indole production	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-
Gelatinase	-	-	-
D-Glucose	-	+	+
D-Mannitol	-	-	-
Inositol	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-
Sucrose	+	+	+
D-Melibiose	-	-	-
D-Amygdalin	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-

+は陽性、-は陰性を示す

B13131株のニシキゴイに対する病原性を確認するために、注射法および浸漬法による感染試験を行った。その結果、対照区では注射法、浸漬法ともに死亡個体が観察されなかった。菌液を注射した区では2日目に全滅したが、浸漬区では攻撃後20日を経過しても症状が現れなかった。

抗菌剤に対する薬剤感受性を表2に示した。B13131株では用いた15種類の抗菌剤のうち、アンピシリン、エリスロマイシン、ホスホマイシン、スルフィソゾールナトリウム（以下スルフィソゾール Na）、ニフルスチレン酸ナトリウム（以下ニフルスチレン酸 Na）で高い感受性が認められた。その一方、これまで継続して高い感受性が認められていたフロルフェニコールでは、感受性の低下が認められた。

表2 抗菌剤に対する薬剤感受性の比較

抗生物質	薬剤感受性*		
	B13131	T112	T1602
ABPC アンピシリン	+++	++	-
EM エリスロマイシン	+++	++	-
TP チアンフェニコール	-	-	+
CP クロラムフェニコール	+	+	+
FF フロルフェニコール	+	+++	+++
KM カナマイシン	-	+++	-
GM ゲンタマイシン	-	-	-
AMK アミカシン	-	+++	-
OA オキシリン酸	-	-	-
NA ナリジスク酸	-	-	-
LCM リンコマイシン	-	-	-
FOM ホスホマイシン	+++	-	-
SIZ スルフィソゾールNa	+++	++	++
SO スルファモノメトキシ シン・オルメトプリム	-	-	++
NFSA ニフルスチレン酸Na	+++	+++	+++

* : + (低) ~+++ (高) は感受性、-は耐性を表す。

考察

今回新たに分離された株の性状を見ると、これまで陽性を示したことのなかった β-Galactosidase で陽性が示され、また、薬剤感受性においては、5種類の薬剤について高い感受性が得られたが、

過去に分離された菌とは感受性を示した薬剤がニフルスチレン酸 Na 以外異なり、菌の生物学的性状が今までになかったものに変化していることがうかがえた。

新穴あき病が発生した場合、生産者は抗菌剤による治療で対処しており、当场でも、主にフロルフェニコールを経口投与を指導している。薬剤の効用に関しては *in vitro* で感受性が示されても、現場では実際に投与すると効き目がみられない場合もあり、今回感受性が高かった薬剤の効用については *in vivo* で試験を行い、効用を確認する必要がある。今回の株では今まで本病が発症した際の有効な治療薬であったフロルフェニコールにおいて感受性の低下が確認され、抗菌剤を用いた治療が難しくなっていることが示唆された。また、和田ら⁵⁾は薬剤の投与に関して魚類では体重測定が正確に実施できない事情があるため、耐性菌が出現しやすいと述べている。耐性菌や、今回の結果からみられた性状の変化を防ぐためにも、薬剤に頼った対策は見直されるべきである。

特定疾病であるコイヘルペスウイルス病では、自家魚と他家魚を極力接触させないという対策がとられており、それに伴い新穴あき病も減少している。このことから新穴あき病においても、病原菌を持ち込まない、隔離するといった対策は有効であると考えられる。

要 約

“新穴あき病”病魚から2013年に分離された非定型 *A. salmonicida* は、1997年から1998年の分離株および2004年の分離株と生物学的性状の変化がみられ、攻撃試験により魚体内に侵入すると致死性の病原性があることも確認された。しかし、2013年に分離されたB13131株では、これ

まで高い感受性が示されていたフロルフェニコールに対する感受性が低下し、抗菌剤による治療効果が難しくなっている可能性があり、病原体の侵入の防除が最善の対策であると考えられる。

謝 辞

本研究の一部は農林水産省消費安全局 消費・安全対策交付金によって実施された。

文 献

- 1) 加来佳子, 山田義行, 若林久嗣: 最近流行している穴あき病様疾病のコイから分離された非定型 *Aeromonas salmonicida* の性状. 魚病研究. 1999; **34**(3): 155-162.
- 2) 的山央人, 星野正邦, 細谷久信: ニシキゴイの“新穴あき病”病魚から分離された非定型 *Aeromonas salmonicida* の病原性. 魚病研究. 1999; **34**(4): 189-193.
- 3) 唐木沢秀之, 星野正邦, 的山央人: ニシキゴイの“新穴あき病”病魚から新たに分離された非定型 *Aeromonas salmonicida* の薬剤感受性(短報). 新潟県内水面水産試験場調査研究報告. 2006; **30**: 1-3.
- 4) 的山央人: 2種類のプライマーによる PCR を利用した錦鯉の穴あき病病原体 非定型 *Aeromonas salmonicida* の検出. 新潟県内水面水産試験場調査研究報告. 2013; **37**: 4-13.
- 5) 和田新平, 小熊俊寿: 観賞魚由来細菌の薬剤感受性について 特に、ニシキゴイの「新穴あき病」病例由来細菌の抗菌剤感受性. 動物用抗菌剤研究会報. 2001; **23**: 25-28.