

ウナギの養殖池水および腸管より分離された薬剤耐性菌の研究

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	青木, 宙 渡辺, カ
巻/号	39巻2号
掲載ページ	p. 121-130
発行年月	1973年2月

ウナギの養殖池水および腸管より分離された 薬剤耐性菌の研究*

青木 宙・渡辺 力

(1972年9月8日受理)

Studies of Drug-resistant Bacteria isolated from Eel-pond Water and Intestinal Tracts of the Eel (*Anguilla japonica* and *Anguilla anguilla*)

Takashi AOKI** and Tsutomu WATANABE***

A rather wide variety of drug resistant gram-negative bacteria were isolated from the eel-pond water as well as from the intestinal tracts of cultured and wild eels (*Anguilla japonica* and *Anguilla anguilla*) in various districts. A fairly high proportion of the drug resistant bacteria isolated were found to carry R factors. Occurrence rate of R factor-carrying bacteria varied in different districts, being high in the Yaizu and Yoshida areas and low in the Hamana-Lake area and in wild eels. R factors were found in *Aeromonas liquefaciens*, *Vibrio* and *Enterobacteriaceae* strains but not in *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* strains. The drug-resistance markers of the R factors were almost exclusively sulfonamides and tetracycline. This tendency was apparent particularly in *A. liquefaciens*.

さきに著者らは、淡水養殖場の魚体および池水から分離された *Aeromonas liquefaciens* の菌株中には薬剤耐性とくに多剤耐性株が多く存在すること、それらの多くは R 因子による耐性であることを報告した^{1,2)}。この耐性菌の出現率の高い事実は細菌性疾病の治療や予防のために薬剤が多用されつつあることに関連すると思われるが、それならば *Aeromonas* 菌のみならず各種の細菌にも耐性菌が存在してもよいと思われる。いつぼう、*Aeromonas* 菌の R 因子の由来に関連して *Aeromonas* 菌以外の菌種にも R 因子による耐性菌が存在するかは興味ある課題である。

そこで著者らは 1969 年 8 月から 1970 年 8 月にかけて養殖ウナギの腸管および養殖池水、さらに天然ウナギの腸管について耐性菌の出現頻度、それらのうち R 因子による耐性菌の出現頻度およびその R 因子の耐性パターンを調べた。本報告はその結果をまとめたものである。なお結果の一部要旨は内外のシンポジウム^{3,4)†}で公表したものである。

実験方法

養殖池水ならびにウナギの腸管よりの細菌の分離方法と分離菌の薬剤感受性試験 1969年8月および11月、静岡県焼津市および吉田町の12の養殖池の池水(但し、Yaizu5は8月には調査しなかつた。)(Table 1)、また、1969年11月および1970年8月、浜名湖周辺の8カ所の養殖池の池水を採取し、普通寒天平板培

* この研究の一部は昭和 45 年 4 月日本水産学会で発表した。

** 東京大学農学部水産学科 (Laboratory of Aquaculture Biology, Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Tokyo, Japan).

*** 慶応義塾大学医学部微生物学教室 (Department of Microbiology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan).

† 日本薬学会講演 (1971), 第 27 回日本細菌学会関東支部総会講演 (1972).

Table 1. Resistant bacteria isolated from the water of eel-ponds in Yaizu City and Yoshida town, Shizuoka Prefecture.

Date of isolation	Ponds	Selected by		
		CM*	TC**	No drug
Aug. 1969	Yaizu 1	0/4***	3/8	0/20 (5.6×10^5)****
"	Yaizu 2	0	3/4	
"	Yaizu 3	0	1/4	
"	Yaizu 4	1/4	2/4	1/20 (6.4×10^4)
"	Yoshida 1	3/9	1/2	4/19 (3.5×10^4)
"	Yoshida 2	0	2/4	
"	Yoshida 3	1/2	1/4	
"	Yoshida 4	2/2	1/4	
"	Yoshida 5	0	2/4	
"	Yoshida 6	5/5	3/4	
"	Yoshida 7	0/1	1/4	
Total		12/27	20/46	5/59
Nov. 1969	Yaizu 1	0/3 (3.5×10^2)	2/4 (7.0×10^2)	1/4 (5.0×10^3)
"	Yaizu 2	0/1	1/4	0/4
"	Yaizu 3	0/3	1/4	1/4
"	Yaizu 4	0/2 (1.9×10^2)	1/4 (8.6×10^2)	0/4 (3.3×10^3)
"	Yaizu 5	0/3	0/3	0/4
"	Yoshida 1	1/4 (5.9×10^3)	2/4 (1.1×10^4)	2/4 (1.8×10^4)
"	Yoshida 2	0/4	1/4	0/4
"	Yoshida 3	0/4	0/4	1/4
"	Yoshida 4	0/4	2/4	2/4
"	Yoshida 5	0/4	2/4	1/4
"	Yoshida 6	0/4	1/4	3/4
"	Yoshida 7	0/4	2/4	1/4
Total		1/40	15/47	12/48

* CM: chloramphenicol, ** TC: tetracycline, *** R⁺ strains/strains studied, **** Viable cells/ml.
The mean of Water temperature: 14.8°C, pH: 8.0 and Transparency: 23.1 cm in November 1969.

地と chloramphenicol (CM) (三共) または tetracycline hydrochloride (TC) (Lederle) 25 µg/ml を加えた培地に 1 白金耳ずつ塗抹した (Table 2)。焼津市および吉田町地域の 12 カ所の池のうち 3 カ所、また浜名湖周辺の 1970 年 8 月調査した全池については、池水を生理食塩水 (pH 7.2) で稀釈し、0.1 ml ずつを上記の平板培地に塗抹培養して、菌数を定量的に求めた。薬剤を使用した経歴のない養殖池として、1969 年 12 月、愛知県伊川津の元東大水産実験所の池水についてしらべた (Table 2)。

腸管からの細菌の分離は Table 3 に示した材料について行なつた。浜名湖周辺地域の養殖ウナギおよび千葉県印旛沼から得た天然ウナギについては、腸管 (腸内容物を含む) を無菌的に摘出して秤量し当量の生

理食塩水を加えた後、ホモジナイザー（日本精機）にて、2000回転で3分間ホモジナイズした。ホモジナイズされた腸管浮遊液を生理食塩水で稀釈した後、池水の時に使用したのと同様の寒天平板に塗抹し、定量的に細菌数を求めた。焼津市および吉田町地域の養殖ウナギおよび渥美湾、木曾川で採捕された天然ウナギの腸管については定量的には行なわず1白金耳培地に塗抹した。池水、腸管から分離塗抹した各平板は、28°Cで24時間ないし48時間培養し、各平板上に生じたコロニーを3-4個無作為に鈎菌して高層寒天に保存し、以後の検査に使用した。

それぞれの分離菌株はグラム染色をほどこした後、BERGEY⁵⁾ および COWAN と STEEL⁶⁾ の分類に従って同定した。但し、*Aeromonas liquefaciens* については、BULLOCK⁷⁾ の分類方法に従った。

薬剤感受性試験は、ディスク法により、sulfisoxazole (SA), streptomycin (SM), CM, TC, aminobenzyl penicillin (ABP), fradiomycin (neomycin と同じ) (FRM), kanamycin (KM), nitrofurantoin (NF) について実施した。使用したのは昭和ディスクで、昭和ディスク数値判定表に従い阻止円の大きさにより感受性、

Table 2. Resistant bacteria isolated from the water of eel-ponds in Hamana-Lake area, Shizuoka Prefecture and Ikawazu, Aichi Prefecture.

Date of isolation	Ponds	Selected by		
		CM	TC	No drug
Nov. 1969	Hamana 1	0/4** (3.3×10^8)	0/4 (3.0×10^8)	0/4 (1.5×10^4)***
"	Hamana 2	0/4	0/4	0/4
"	Hamana 3	0/4	0/4	0/4
"	Hamana 4	0/1	0/1	0/3
"	Hamana 5	0/3	1/4	2/4
"	Hamana 6	0/4	0/4	0/4
"	Hamana 7	0	0/1	0/2
"	Hamana 8	0/4	0	0/3
Total		0/24	1/22	2/28
Aug. 1970	Hamana 1*	0/4 (2.6×10^8)	0/4 (6.4×10^8)	0/4 (9.9×10^8)
"	Hamana 2	0/4 (1.5×10^8)	0/4 (6.0×10)	0/4 (5.5×10^8)
"	Hamana 3*	0 ($< 1.0 \times 10$)	0/4 (1.1×10^8)	0/4 (9.0×10^4)
"	Hamana 4	0/4 (2.4×10^8)	0/4 (1.8×10^8)	0/4 (7.8×10^4)
"	Hamana 5	0/4 ($< 1.0 \times 10^8$)	1/4 (2.8×10^8)	0/4 (6.6×10^8)
"	Hamana 6	0/4 (1.7×10^8)	0/4 (5.9×10^8)	0/4 (2.9×10^4)
Total		0/20	1/24	0/24
Dec. 1969	Ikawazu 1	0/4	0/3	0/3

* Ponds contiguous to those studied in November, 1969.

** R⁺ strains/strains studied.

*** Viable cells/ml.

The mean of Water temperature: 12.0°C, pH: 8.7 and Transparency: 20.6 cm in November, 1969

The mean of Water temperature: 28.0°C, pH: 8.7 and Transparency: 23.0 cm in August in 1970.

耐性を区別した。なお、この方法は、R 因子を受けとつた耐性菌と R 因子をもたない感受性菌とにおいても明確な差を与えた。感受性試験用培地として、SA にはミューラーヒントン寒天培地（栄研）を使用し、他の薬剤については普通寒天平板培地を使用した。

R 因子の伝達の手順 受容菌 (recipient) として *Escherichia coli* K-12 の substrain である CSH-2 (*met⁻*, *pro⁻*, *F⁻*) および W 677/PTS (*thr⁻*, *leu⁻*, *thi⁻*, *pro⁻*, *man⁻*, *xyl⁻*, *mal⁻*, *gal⁻*, *lac⁻*, *str^r*, *tsx^r*, *F⁻*) の 2 株を使用した。分離した耐性菌株 (供与菌) を、Penassay broth (Difco) 中で 28°C で吸光度 0.4 (約 5.0×10^8 cells/ml) になるまで振盪培養し、CSH-2, W 677/PTS についても同様に (但し培養温度は 37°C) 培養して、おのおの菌液を 1 ml ずつ試験管内で混合し、37°C で一昼夜培養した。受容菌 W 677/PTS は供与菌が乳糖分解菌のとき、また CSH-2 は乳糖非分解菌のときに使用した。混合培養液を 1 白金耳ずつ、各薬剤を含んだ BTB 乳糖加寒天平板培地に塗抹し、37°C で一昼夜培養した。各平板が含む薬剤濃度は、sulfathiazole (武田) 500 µg/ml; dihydrostreptomycin sulfate (三共) 10 µg/ml; CM 25 µg/ml; TC 25 µg/ml; ABP (万有) 50 µg/ml; fradiomycin sulfate (明治) 50 µg/ml; kanamycin sulfate (明治) 50 µg/ml; furazolidone (武田) 12.5 µg/ml とした。但し、W 677/PTS については、SM: 1000 µg/ml を各薬剤以外にあらかじめ加え、R 因子を受けとつた W 677/PTS のみを選択できるようにした。R 因子を受けとつた受容菌のコロニーは、分離した時と同じ薬剤平板で再分離を繰返した後、ディスク法により薬剤感受性パターンをしらべた。

結 果

1) **耐性菌の出現頻度** 調査したすべてのウナギの養殖池水、また養殖魚、天然魚を問わずすべてのウナギの腸管から、CM または TC 25 µg/ml を含む培地に増殖可能な耐性菌が検出された。養殖池水の細菌数は、薬剤を含まない普通寒天平板で、 3.3×10^3 - 5.6×10^5 /ml, CM および TC 耐性菌はそれぞれ $<1.0 \times 10$ - 5.9×10^3 /ml および 6.0×10 - 1.1×10^4 /ml であつた (Table 1, 2)。耐性菌の出現頻度は池によつて著しく異なり、非常に高い値を示したのもあつた。例えば Hamana 5, Yoshida 1 では TC 耐性菌は、全細菌数の 42-61% にも及んだ。しかし一般的には 1/10-1/100 の範囲にあつたと言える。CM 耐性菌もほぼ同様の傾向であつたが、池によつてははなはだ低い出現率もみられた。Hamana 3 ($<1.0 \times 10$ /ml) がその例である (Table 1, 2)。

浜名湖周辺の 6 つの池からのウナギの腸管 (内容物を含む) の細菌数の平均は 2.4×10^7 /g であつた。耐性菌の出現率は池水と同様に池によつて異なり、Hamana 5 にみられるように高い比率を示すものがあつた (Table 3)。いつぼう天然ウナギの腸管の細菌数は養殖魚よりやや低い傾向にあつたが、予想に反して耐性菌の比率は高かつた。なお腸管においても池水同様、CM 耐性菌は TC 耐性菌よりも出現頻度は低い傾向が認められた (Table 1, 2, 3)。

養殖池水より検出された耐性菌は、*Pseudomonas* 株がもつとも多く、どの地域にも分布していた。ついで *Aeromonas liquefaciens* が伊川津を除くすべての地域から多数検出された。以下 *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Citrobacter*, *Vibrio* の順であつた。その他 *Escherichia coli*, *Achromobacter*, 未同定の *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella*, *Hafnia* および未同定株も、多くはないが検出された (Table 4)。腸内細菌群は、11 月より 8 月のほうが種類、菌類、菌数とも多く検出され、また焼津市および吉田町地域のほうが、浜名湖周辺地域に比較して多く検出された。とくに浜名湖周辺地域の 11 月の材料では、腸内細菌はまったく検出されなかつた (Table 4)。腸管においても、養殖池水とほぼ同様の種類の耐性菌が検出された。なお *Aeromonas liquefaciens* は、養殖魚のみならず天然魚の腸管からも多数検出された (Table 5)。

2) **地域的にみた R⁺ 耐性菌の出現頻度** 焼津市および吉田町地域における 1969 年 8 月および 11 月の 2 回の調査で、11 月の Yaizu 5 を除くすべての養殖池水から、R 因子による耐性菌が検出された。いつぼう、浜名湖周辺の地域では、2 回の調査を通じて Hamana 5 のみより R 因子による耐性菌が検出されたにとどまり、他の池水からはまったく検出されなかつた。伊川津においても R 因子による耐性菌は検出

Table 3. Resistant bacteria isolated from the intestinal tracts of eels (*Anguilla japonica* and *Anguilla anguilla*).

Date of isolation	Location	Selected by			Mean body weight (g)	Mean body length (cm)	Number of eel
		CM	TC	No drug			
Aug. 1969	Yaizu 1	0	4/4*		202.0		1
"	Yoshida 8**	4/4	3/4	3/4	127.0		1
Nov. 1969	Yaizu 1	0/3	5/15	3/28	150.1	44.8	10
Dec. 1969	Atsumi Bay	0/3	0/1	0/2	331.5	61.1	6***
"	Kiso River	0/18	0/15	0/27	132.5	45.8	10
Aug. 1970	Hamana 1	0/4 (1.0×10^4)	0/4 (9.0×10^5)	0/4 (5.1×10^7)**	192.5	49.7	3
"	Hamana 2	0 ($< 1.0 \times 10^2$)	0/4 (4.8×10^4)	0/4 (6.2×10^6)	34.7	29.9	3
"	Hamana 3	0/1 (2.0×10^5)	0/4 (2.2×10^5)	0/4 (1.9×10^6)	32.7	32.0	3
"	Hamana 4	0/4 (2.0×10^5)	0/4 (9.4×10^6)	0/4 (4.0×10^7)	138.7	43.3	3****
"	Hamana 5	0/4 (1.8×10^5)	1/4 (2.6×10^7)	0/4 (3.9×10^7)	205.5	52.0	3
"	Hamana 8	0/4 (1.4×10^4)	0/4 (1.7×10^5)	0/4 (4.4×10^6)	45.3	33.5	3
Sep. 1970	Innbanuma 1	0/3 (3.0×10^5)	0/4 (9.7×10^4)	0/4 (1.2×10^6)	113.6	43.3	5
"	Innbanuma 2	1/2 (2.0×10^2)	0/4 (1.6×10^4)	0/4 (6.0×10^5)	119.4	43.4	5
"	Innbanuma 3	0/4 (4.5×10^4)	0/4 (1.7×10^6)	1/4 (5.8×10^6)	144.6	44.6	5

* R⁺ strains/strains studied. ** Isolated from eels with red-fin disease. *** Silver eel. **** Viable cells/ml.
 ***** *Anguilla anguilla*.

Table 4. Gram-negative bacilli isolated from the water of eel-ponds.

Location of ponds	Yaizu City and Yoshida Town			Hamana-Lake area			Ikwazu			
	Aug. 1969		Nov. 1969		Nov. 1969		Aug. 1970		Dec. 1969	
Date of isolation	CM	TC	No drug	CM	TC	No drug	CM	TC	No drug	Total
<i>Achromobacter</i>			0/3(1)*			0/1	0/3	0/1	0/1	0/9
<i>Aeromonas liquefaciens</i>	8/13**	0/5	10/30	15/25	10/30		1/2	2/10	0/3 0/8	36/96
<i>Alcaligenes</i>	0/3	0/20	0/2	0/2	0/2		0/2	0/2		0/31
<i>Citrobacter</i>	1/5	4/8	2/4	1/6	0/1	2/5			0/2	10/31
<i>Enterobacter</i>	11/12	5/7	1/2	0/21	0/15	0/4	0/3	0/3		17/67
<i>Escherichia coli</i>	1/6	1/5								2/11
<i>Hafnia</i>	0/1			0/2	0/1					0/4
<i>Klebsiella</i>	0/4	1/1								1/5
<i>Pseudomonas</i>	0/3	0/11(2)	0/4	0/11	0/4	0/4	0/19	0/17	0/17(1) 0/11	0/124
<i>Vibrio</i>	1/10	1/8							0/1 0/13(5)	2/32
Unidentified <i>Enterobacteriaceae</i>			0/1						1/4 0/2	1/7
Unidentified strains			0/1						0/1(1)	0/2

() * Sensitive strain

** R⁺ strains/strains studied

Table 5. Gram-negative bacilli isolated from the intestinal tracts of eels (*Anguilla japonica* and *Anguilla anguilla*).

Location	Yaizu City and Yoshida Town		Hamana-Lake area		Atsumi Bay and Kiso River		Innbanuma		Total
	Nov. 1969		Aug. 1970		Dec. 1969		Sep. 1970		
Date of isolation	CM	TC	No drug	CM	TC	No drug	CM	TC	No drug
<i>Aeromonas liquefaciens</i>	1/2*	3/3		1/5	0/5		0/12	1/9	
<i>Alcaligenes</i>									
<i>Citrobacter</i>	3/3			0/2	0/1	0/5(1)**			
<i>Enterobacter</i>	4/4	3/3		0/4	0/3		1/1		
<i>Escherichia coli</i>									
<i>Hafnia</i>			0/1	0/1	0/2				
<i>Proteus</i>				0/6	0/4	0/7			
<i>Pseudomonas</i>				0/2			0/8	0/3(1)	0/43
<i>Vibrio</i>			0/3		0/4(1)				0/16
Unidentified <i>Enterobacteriaceae</i>			0/5	0/6	0/5				0/6
Unidentified strains				0/3	0/3		0/4	0/3	0/4

* R⁺ strains/strains studied. ()** Sensitive strain.

されなかつた (Table 1, 2)。

腸管においては, Yaizu 1 および Yoshida 8 のヒレ赤病のウナギの腸管より R 因子による耐性菌が多数検出された。浜名湖周辺の地域では, 養殖池水と同様に Hamana 5 の池の魚からのみ R 因子による耐性菌が検出された (Table 3)。いつぼう天然ウナギについては, 渥美湾および木曾川で採捕された魚の腸管からは, R 因子による耐性菌はまったく検出されなかつたが, 印旛沼で採捕されたものの腸管からは R 因子による耐性菌が2株分離された (Table 3)。

3) R⁺ 耐性菌の種類と耐性パターン 菌の種類別に見ると養殖池水から検出された耐性菌のうち, *A. liquefaciens* 96 株中 36 株, *Enterobacter* 67 株中 17 株, *Citrobacter* 31 株中 10 株, *Escherichia coli* 11 株中 2 株, *Vibrio* 32 株中 2 株, *Klebsiella* 5 株中 1 株および未同定の腸内細菌 7 株中 1 株より R 因子が検出された。いつぼう *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Hafnia*, *Pseudomonas* からはまったく R 因子が検出されなかつた (Table 4)。焼津市および吉田町地域においては, 11 月より 8 月のほうが, 腸内細菌群の耐性株から多くの R 因子が検出され, *Enterobacter* においては 11 月にはまったく R 因子は検出されず, *A. liquefaciens* と *Citrobacter* のみから検出された (Table 4)。

ウナギの腸管においても, 同様に *A. liquefaciens*, *Citrobacter* および *Enterobacter* より R 因子が検出されたが, 他の菌株からはまったく検出されなかつた (Table 5)。

各菌種から検出された R 因子の耐性パターンは, *A. liquefaciens* においては 50 株中 SA・TC が 49 株ともつとも多く, SA・SM・CM 耐性が 1 株のみであつた。腸内細菌および *Vibrio* の耐性菌より検出された R 因子の耐性パターンは Table 6 に示した。どの菌種の耐性株からも SA・TC 耐性パターンの R 因子がもつとも多く検出された。

考 察

ウナギの養殖池水, 養殖および天然ウナギの腸管から CM または TC 25 µg/ml を含む普通寒天平板培地

Table 6. Drug-resistance patterns of R factors detected from the water of eel-ponds and the intestinal tracts of eel.

Species or genus	Resistance patterns of R factors from			
	Water	Intestinal tracts		
<i>Aeromonas liquefaciens</i> (50)	SA TC*	35	SA TC	14
	SA SM CM	1		
<i>Citrobacter</i> (14)	TC	5	TC	1
	SA CM	1	SA SM TC	2
	SA TC	2	SA SM CM TC	1
	SM TC	1		
	SA SM TC	1		
<i>Enterobacter</i> (26)	TC	3	SA TC	6
	SA TC	13(1)**	SA SM CM TC	1
	SA CM TC	1(1)**		
	SA SM CM TC	2		
<i>Escherichia coli</i> (2)	SA TC	1		
	SA SM CM	1		
<i>Klebsiella</i> (1)	SA SM CM TC	1		
<i>Vibrio</i> (2)	SA TC	1		
	SA SM TC FRM KM	1		
Unidentified <i>Enterobacteriaceae</i> (1)	SA TC	1		

* Abbreviations—SA: sulfoamides, SM: streptomycin, TC: tetracycline, CM: chloramphenicol, FRM: fradiomycin (identical to neomycin), KM: kanamycin.

** Carrying two R factors.

で耐性菌の分離を試みた結果、養殖魚、天然魚を問わずほとんどすべての魚体から、また養殖池水から CM または TC 耐性マーカーをもつ種々の多剤耐性菌が分離された。耐性菌の出現率は調査を行なった地域相互間に大差はなかつた。例えば養殖池水の耐性菌数は、焼津市および吉田町地域と浜名湖周辺の地域間で、また腸管の耐性菌数は浜名湖周辺の養殖ウナギと印旛沼で採捕された天然ウナギの間で、ともにほとんど差は認められなかつた (Table 1, 2, 3)。なお、渥美湾で採捕された下りウナギの腸管からはほとんど菌が分離されなかつたが、これはおそらく絶食の影響によるものと考えられた。それでもなおかつ耐性菌が分離された (Table 3)。

冒頭に述べたように薬剤多用の結果として耐性菌が増加しているとすれば腸管はもとより池水中でも種々の細菌に耐性株があつてしかるべきであり、事実検出された菌種すべてに耐性株が見出された。しかし上述したように天然魚にも養殖池に劣らず耐性菌が多いことは、それらの菌種では自然耐性株が多く存在し、薬剤選択の影響はほとんどないことを示している。

出現菌種は池水、腸管とも *Pseudomonas*, *A. liquefaciens* 腸内細菌群が多かつたが養殖池水からは *Pseudomonas* 菌がもつとも多く分離され、ついで *A. liquefaciens* の順になるのに対して腸管では *A. liquefaciens* がもつとも多く、次に *Pseudomonas* 菌の順であつた (Table 4, 5)。地域的に出現菌種の組成には多少の相違があることは言うまでもないが、とくに腸内細菌の出現の地域差が目された。すなわち焼津市および吉田町地域では、8 月よりもより水温が低下した 11 月においても養殖池水中に腸内細菌が多く検出されたが、浜名湖周辺の地域では腸内細菌は 8 月のみに検出され、検出された菌数も少なかつた。いつぼう、*A. liquefaciens* の出現にも地域的な差はあり、浜名湖周辺の地域においては、焼津市および吉田町地域に比較して比較的少なく、また、伊川津においてはまったく分離されなかつた (Table 4, 5)。この細菌相の地域的な差は何らかの水質因子の影響によるものと思われた。

R 因子による耐性菌の出現頻度は地域的に異なり、焼津市および吉田町地域からは多く検出されたが、浜名湖周辺の地域では少なかつた。伊川津の養殖池水、および渥美湾、木曾川で採捕された天然ウナギの腸管からは、R 因子による耐性菌はまったく検出されなかつた。しかし印旛沼で採捕された天然ウナギからは R 因子をもつ *A. liquefaciens* が検出された (Table 4, 5)。このことは、自然界において、R 因子による耐性菌が分布していることを示している。池水中でも腸管内でも R 因子をもつ菌は大部分が *A. liquefaciens* であり、ついで *Enterobacter*, *Citrobacter* が多かつた。大腸菌はごく少数であつた (Table 4, 5)。

A. liquefaciens について著者らは、各種の養殖池からの分離株について調べ、耐性菌が多いこと¹⁾、それらから R 因子を検出したこと²⁾をすでに報告したが、本研究の結果においても *A. liquefaciens* は耐性菌株中もつとも多く、かつそのうち養殖池水、養殖魚の腸管から得られたものの 125 株中 49 株は R 因子による耐性であることが示された (Table 4, 5)。すでに知られているように、また本結果からも推察されるように、*A. liquefaciens* は淡水魚の腸管内に通常存在する細菌であり^{6,9)}、また摂餌後盛んに増殖を起こす菌であること¹⁰⁾も知られている。したがって抗菌剤を投与した場合、それと接触する機会の多い菌種と思われる。本種の耐性出現が多いのはおそらく化学療法剤を使用することによつて選択され、耐性株が増加して来たものと考えられる。いつぼう天然魚では R 因子によるものはきわめて少なく、47 株中 1 株にすぎなかつた (Table 5)。この理由はまだよくわからないが、薬剤との接触がまれであるためと思われる。

A. liquefaciens から検出された R 因子の耐性パターンは 1 株を除きすべて、SA・TC であつた (Table 6)。SA・TC 耐性パターンは、*A. liquefaciens* のみならず水中由来菌の代表的な耐性パターンとみられるが、その由来に関して、例えば焼津市および吉田町地域においては SA・TC 耐性パターンの R 因子による腸内細菌が多く検出されたことにより (Table 4, 5)、それらからの R 因子の伝播の可能性も考えられる。しかし、いつぼう R 因子をもつ腸内細菌の少ない地域、例えば浜名湖周辺の地域からも SA・TC 耐性パターンの R 因子をもつ *A. liquefaciens* が検出されていることと (Table 4, 5)、また後に報告するが全国各地の隔離されたアユ (*Plecoglossus altivelis*)、コイ (*Cyprinus carpio*) の養殖場からも SA・TC 耐性パターンの R 因子をもつ *A. liquefaciens* が多数検出されていることから *A. liquefaciens* に特異的な R 因子が

水域に広く存在すると考えられ、必ずしも他から伝達されたものと考えられることはないように思われる。

本研究の結果、薬剤多用により R 因子による耐性菌が多数増加していることが注目された。R 因子による耐性菌特に *A. liquefaciens* の増加は、魚病の薬剤による治療効果を少なくする可能性のあることが考えられ、今後、耐性のできにくい薬剤の開発、使用が必要だと思われた。

要 約

1969 年夏から 1970 年夏にかけて、静岡県焼津市、吉田町、浜名湖周辺、さらに愛知県伊川津の養鰻池水より、また静岡県下の養殖ウナギおよび木曾川、渥美湾、印旛沼で採捕されたウナギの腸管より耐性菌を分離し、それらの薬剤感受性、R 因子による耐性菌かどうか、さらに検出された R 因子の耐性パターン等について検討した。

(1) 薬剤耐性グラム陰性桿菌は、すべての養殖池水、養殖および天然のウナギの腸管から検出された。

(2) R 因子による耐性菌の出現頻度は地域的に異なり、吉田、焼津地区では、養殖池水およびウナギの腸管より多数の R 因子が検出されたが、浜名湖周辺の地域では、一カ所のみから検出された。渥美湾および木曾川で採捕されたウナギの腸管からは、R 因子による耐性菌はまったく検出されなかつたが、印旛沼で採捕されたウナギの腸管からは少数の R⁺ 菌が検出された。

(3) ウナギの養殖池水および腸管から検出された耐性菌のうち、*Aeromonas liquefaciens*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Vibrio* および未同定の腸内細菌から多数の R 因子が検出されたが、*Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Hafnia*, *Proteus*, *Pseudomonas* 等からまったく検出されなかつた。

(4) これらの耐性菌のうち、*Pseudomonas* はどの地域からも、*A. liquefaciens* は伊川津を除くすべての地域の養殖池水およびウナギの腸管から分離されたが、腸内細菌は地域的にも出現率が異なり、また季節的に変動が認められた。

(5) ウナギの養殖池水より分離された耐性菌から検出された R 因子の耐性パターンは、SA・TC がもつとも多く、とくに *A. liquefaciens* ではこの傾向が顕著であつた。

終りにのぞみ懇切なるご指導、ご助言をいただいた東京大学農学部江草周三教授に深く感謝の意を表する。調査の際にご援助いただいた静岡県水産試験場浜名湖分場大上皓久氏、千葉県内水面試験場場長石井俊雄氏、吉田町養鰻研究所西尾和民氏の各位に深く感謝の意を表する。

なお、本研究の一部は NIH 研究費 (AI-08078) によつた。

文 献

- 1) T. AOKI, and S. EGUSA: This Bull., **37**, 176-185 (1971).
- 2) T. AOKI, S. EGUSA, Y. OGATA, and T. WATANABE: *J. Gen. Microbiol.*, **65**, 343-349 (1971).
- 3) T. WATANABE, T. AOKI, Y. OGATA, and S. EGUSA: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **182**, 383-410 (1971).
- 4) T. WATANABE, T. AOKI, C. YADA, K. SUGAWARA, T. SAITO, and S. EGUSA: Proc. 1st Internal. Symp. on Infectious Antibiotics Resistance (Smolenice, Czechoslovakia), 131-141 (1971).
- 5) BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY (7th edit.), Waverly Press, Baltimore, Md. (1957).
- 6) S. T. COWAN, and K. J. STEEL: Manual for the Identification of Medical Bacteria. 1-217. Cambridge Univ. Press, London and N. Y. (1966).
- 7) G. L. BULLOCK: *Develop. Appl. Microbiol.*, **5**, 101-108 (1964).
- 8) T. MATTHEIS: *Z. Fish.*, **12**, 537-559 (1964).
- 9) 反町 稔・江草周三: 魚病研究, **6**, 1-7 (1971).
- 10) 南 善明・梶田稚尚・日比野進: 本誌, **38**, 1013-1019 (1972).