

# ブリ属魚類由来Streptococcus dysgalactiaeの薬剤感受性

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者名	西木, 一生 野本, 竜平 米村, 輝一郎 中西, 健二 平江, 多績 村瀬, 拓也 伊丹, 利明 吉田, 照豊
発行元	日本水産學會
巻/号	75巻3号
掲載ページ	p. 451-452
発行年月	2009年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 短 報

ブリ属魚類由来 *Streptococcus dysgalactiae*  
の薬剤感受性

西木 一生,<sup>1</sup> 野本 竜平,<sup>2</sup> 米村輝一郎,<sup>3</sup>  
中西 健二,<sup>3</sup> 平江 多績,<sup>4</sup> 村瀬 拓也,<sup>4</sup>  
伊丹 利明,<sup>1</sup> 吉田 照豊<sup>1\*</sup>

(2008年9月17日受付, 2008年12月10日受理)

<sup>1</sup>宮崎大学農学部生物環境科学科,

<sup>2</sup>東京大学大学院農学生命科学研究科,

<sup>3</sup>宮崎県水産試験場, <sup>4</sup>鹿児島県水産技術開発センター

Antimicrobial sensitivity of *Streptococcus dysgalactiae*  
isolated from cultured genus *Seriola*

ISSEI NISHIKI,<sup>1</sup> RYOHEI NOMOTO,<sup>2</sup>

KOICHIRO YONEMURA,<sup>3</sup> KENJI NAKANISHI,<sup>3</sup>

TATSUMU HIRAE,<sup>4</sup> TAKUYA MURASE,<sup>4</sup>

TOSHIAKI ITAMI<sup>1</sup> AND TERUTOYO YOSHIDA<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Production and Environmental Science, Faculty of Agriculture, The University of Miyazaki, Miyazaki, Miyazaki 889-2192, <sup>2</sup>Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113-8657, <sup>3</sup>Miyazaki Fisheries Station, Miyazaki, Miyazaki 889-2162, <sup>4</sup>Kagoshima Prefectural Fisheries Technology and Development Center, Ibusuki, Kagoshima 891-0315, Japan

キーワード: *Streptococcus dysgalactiae*, 耐性遺伝子, 薬剤感受性

養殖ブリ *Seriola quinqueradiata*, カンパチ *S. dumerili* にランスフィールド C 群の *Streptococcus dysgalactiae* を, 原因細菌とするレンサ球菌感染症 (C 群レンサ球菌感染症) が確認されたのは 2002 年である。<sup>1,2)</sup> この疾病が養殖場で確認され既に数年が経過し, 養殖場では重要な細菌感染症となっている。C 群レンサ球菌に感染した病魚の症状は, 尾柄部の壊死を特徴とし, *Lactococcus garvieae* を原因細菌とするレンサ球菌症 (ラクトコッカス症) に罹患した病魚の症状に類似している。また, C 群レンサ球菌感染症の診断には, 病魚からの細菌の分離と共に PCR 法が開発されている。<sup>1)</sup>

ブリ, カンパチにおいて, ラクトコッカス症の予防に関しては, 経口および注射ワクチンが開発されている。<sup>3)</sup> また, 治療においては数種類の抗生剤が認可されており治療に使用されている。<sup>4)</sup> しかしながら, 養殖魚類の C 群レンサ球菌感染症の予防および治療に関する基礎情報は報告されていない。そこで本研究では C 群

レンサ球菌の基礎情報を得るために, ブリ, カンパチの重要疾病であるラクトコッカス症および類結節症の治療に用いられている薬剤に対する, *S. dysgalactiae* の感受性調査を行った。

供試菌株は 2002 年から 2007 年にかけて宮崎県および鹿児島県の養殖場のブリ, カンパチ, ヒラマサ *S. lalandi* から分離し, 野本らの方法に従い *S. dysgalactiae* と同定した計 285 株を用いた。<sup>1,2)</sup> 薬剤感受性試験に使用した薬剤は, ラクトコッカス症の治療に使用されている, エリスロマイシン (EM), リンコマイシン (LCM), フロルフェニコール (FF) およびオキシテトラサイクリン (OTC) と類結節症の治療に使用されているアンピシリン (ABPC) の計 5 薬剤を用いた。最小発育阻止濃度 (MIC) は日本化学療法学会の定めた方法を一部修正して寒天平板希釈法により測定し, 希釈系列の最大値を 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に設定した。<sup>5)</sup> 培地にはミューラーヒントン寒天培地 (Difco) を用いた。MIC 値の判定は, 寒天培地に菌を接種し, 37°C で 24 時間培養後に測定した。OTC においては, テトラサイクリン系抗生物質の耐性遺伝子として知られている *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)* および *tet(S)* の検出を, Aarestrup *et al* (2000) らの方法に従いそれぞれのプライマーを用いて PCR 法で検出を試みた。<sup>6)</sup> OTC 感受性株として MIC 値が 3.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下の菌株を 8 株, OTC 耐性株として MIC 値 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の菌株を 7 株用いた。DNA の抽出は InstaGene Matrix (BIO-RAD) を用い, 付属のユーザーズマニュアルに従って行った。PCR 反応には, TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ) を用いた。反応条件は前熱変性 93°C 3 分の後, 熱変性 93°C 1 分, アニーリング (*tet(L)*: 52°C, *tet(M)*: 50°C, *tet(O)*: 57°C, *tet(S)*: 56°C) 1 分, 伸長反応 72°C 1 分を 35 サイクル行い, 最終伸長反応を 72°C で 5 分間行った。反応終了後, 1% アガロースゲル (Agarose-I: 和光純薬) を作製し電気泳動を行い PCR 産物の増幅を確認した。増幅産物は, pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA) にライゲーションしたのち *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  に導入した。シークエンス反応は, GenomeLab DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) を使用し, プロトコールに従い反応させた後, CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter) を用いて配列を決定した。

各薬剤に対する分離菌株の MIC 値はそれぞれ, EM が 0.025~0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , LCM は 0.1~0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , FF は

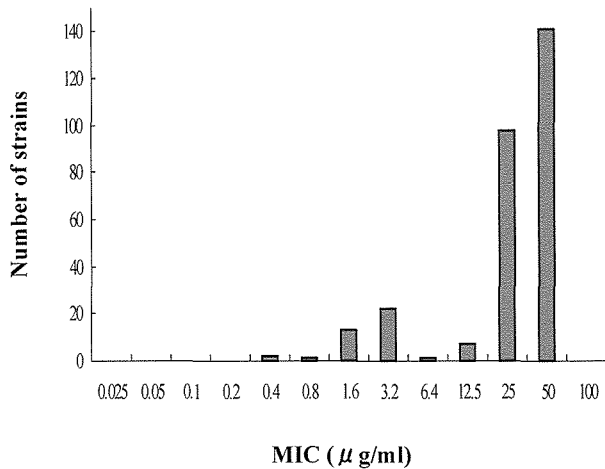


Fig. 1 MIC distributions of oxytetracycline in *Streptococcus dysgalactiae* isolates.

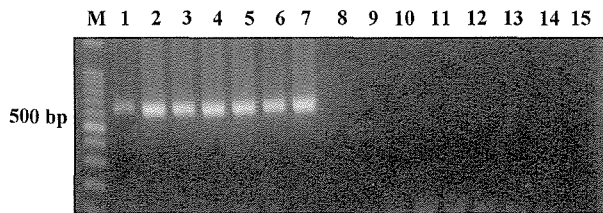


Fig. 2 Detection of *tet(M)* gene in *Streptococcus dysgalactiae*. Lane M: a 100-bp ladder, Lane 1-7: resistant strains (MIC=50 μg/mL), Lane 8-15: sensitive strains (MIC ≤ 3.2 μg/mL).

1.6~3.2 μg/mL, ABPCは0.025 μg/mLの値であった。OTCについてはMIC値の菌株の分布に2峰性が確認され、調査を行った多くの菌株が25 μg/mL以上のMIC値を示した (Fig. 1)。*tet(L)*, *tet(O)*, *tet(S)*の3つの遺伝子に関しては感受性菌株, 耐性菌株ともにPCRによる増幅産物は確認できなかった。*tet(M)*については, 50 μg/mLのMIC値を示す菌株において推定されるPCR産物の増幅が確認された (Fig. 2)。増幅産物657 bpの塩基配列は, *Enterococcus faecalis* LMG20647株の*tet(M)* (AJ585078) 遺伝子と100%の相同値を示した。<sup>7)</sup>

薬剤感受性試験の結果から, 現在養殖魚類で流行している *S. dysgalactiae* の多くは OTC に耐性化しているものと考えられる。テトラサイクリン系抗生物質の耐性遺伝子のうち, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)* について, PCR法を用いて検出を試みたところ, *tet(M)* 遺伝子のみ耐性菌株において増幅産物が確認された。*tet(M)* 遺伝子はトランスポゾン上に存在することが多く報告されており,<sup>8)</sup> 魚類由来 *S. dysgalactiae* の同遺伝子も非耐性

株へ伝達することが十分に予想されるため, 伝達試験などさらなる検討が必要であると考えられる。本研究では, *S. dysgalactiae* は OTC に耐性化していることが明らかとなったが, 今後 *L. garvieae* のようにマクロライド系抗生物質やリンコマイシンに対して耐性化する可能性も考えられる。<sup>9)</sup> そのため, *S. dysgalactiae* の薬剤感受性に関する調査を続けていくことが重要であると考えられる。

## 謝 辞

本研究の一部は, 科学研究費補助金基盤 (C) (課題番号; 19580212) により行われた。

## 文 献

- 1) Nomoto R, Munasinghe LI, Jin DH, Shimahara Y, Yasuda H, Nakamura A, Misawa N, Itami T, Yoshida T. Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. *J. Fish Dis.* 2004; **27**: 679-686.
- 2) Nomoto R, Unose N, Shimahara Y, Nakamura A, Hirae T, Maebuchi K, Harada S, Misawa N, Itami T, Kagawa H, Yoshida T. Characterization of Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* isolated from farmed fish. *J. Fish Dis.* 2006; **29**: 673-682.
- 3) Ooyama T, Shimahara Y, Nomoto R, Yasuda H, Iwata K, Nakamura A, Itami T, Yoshida T. Application of attenuated *Lactococcus garvieae* strain lacking a virulence-associated capsule on its cell surface as a live vaccine in yellowtail *Seriola quinqueradiata* Temminck and Schlegel. *J. Appl. Ichthyol.* 2006; **22**: 149-152.
- 4) Kawanishi M, Kojima A, Ishihara K, Esaki H, Kijima M, Takahashi T, Suzuki S, Tamura Y. Drug resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Lactococcus garvieae* isolates from cultured *Seriola* (yellowtail, amberjack and kingfish) in Japan. *Lett. Appl. Microbiol.* 2005; **40**: 322-328.
- 5) Committee for Revision of MIC Determination Method. Revision of minimal inhibitory concentration (MIC) determination method. *Chemotherapy (Tokyo)* 1981; **29**: 76-79.
- 6) Aarestrup FM, Agero Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2000; **37**: 127-137.
- 7) Huys G, D'Haene K, Collard J-M, Swings J. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; **70**(3): 1555-1562.
- 8) Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P. New variants of the *tet(M)* gene in *Clostridium difficile* clinical isolates harbouring Tn916-like elements. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; **57**: 1205-1209.
- 9) Maki T, Hirono I, Kondo H, Aoki T. Drug resistance mechanism of the fish-pathogenic bacterium *Lactococcus garvieae*. *J. Fish Dis.* 2008; **31**: 461-468.