

魚病原細菌 *Edwardsiella tarda* の薬剤耐性とその伝達性森井 秀昭¹, 大場 崇徳¹, 孟 飛², 金井 欣也¹Conjugative Transferability of Drug Resistances
in the Fish Pathogen *Edwardsiella tarda*Hideaki MORII¹, Takanori OBA¹, Fei MENG², Kinya KANAI¹

Conjugative transferability of various drug resistances was investigated in the fish pathogen *Edwardsiella tarda* isolated from freshwater fishes (mainly Japanese eel) and marine fishes (mainly Japanese flounder). The *E. tarda* isolates were resistant to ampicillin (Ap), chloramphenicol (Cm), kanamycin (Km), nalidixic acid (Na), furazolidone (Nf), oxolinic acid (Oa), sulfamonomethoxine (Su), tetracycline (Tc, including doxycycline and oxytetracycline), and trimethoprim (Tmp) and susceptible to cephalixin, erythromycin, and streptomycin. The most of the 185 isolates was resistant in the isolates from the eel and susceptible in those from the flounder. Resistances to Ap, Km, and Tmp were harbored only in the isolates from the flounder and resistances to the other drugs were possessed mostly in those from the eel. Resistances to Cm, Km, Su, and Tc were transferred at transfer frequencies of 10^{-4} to 10^{-6} but the other resistances were not transferred to the recipient *Escherichia coli* k-12 1037 strain. Additionally, the isolates harboring the transferable resistances were mostly collected from the eel. A single plasmid was harbored in the isolates with Cm, Km, Su, and/or Tc resistances and transferred to the recipient. Restriction enzyme *Pst* and *Hind* digestion patterns of plasmid in *E. tarda* were different between plasmids from the eel and the flounder, suggesting that the origin of R plasmids in *E. tarda* is different between the eel and the flounder. The molecular weight of the transferred R plasmid was estimated as 81 kb from the length (25.5 μ m) in electron micrograph of a transferable plasmid.

Key Words: 淡水および海水魚類 freshwater and marine fishes,
魚病原菌 fish pathogen *Edwardsiella tarda*, 薬剤耐性 drug resistance,
接合伝達性 conjugative transferability

緒 言

近年, ウナギ *Anguilla japonica* 養殖ではハウス養殖が盛んになり, 常に高水温で飼育されるようになったため, *Edwardsiella tarda* によるパラコ口病¹⁾ が成長段階や季節を問わず²⁻⁴⁾ 単独感染症として発生している。*E. tarda* は, 淡水魚ではウナギのほかナマズ *Ictalurus punctatus* (1973)⁵⁾, テラピア *Tilapia mossambica* (1981)⁶⁾, ニジマス *Salmo gairdneri f. irideus* (1982)⁷⁾, ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* (1983)⁴⁾ およびコイ *Cyprinus carpio* (1984)⁸⁾ など, 海産魚ではボラ *Mugil cephalus* (1976)⁹⁾, チダイ *Evinnis japonica* (1977)¹⁰⁾, マダイ *Pagrus major* (1982)¹¹⁾, マスノスケ *Oncorhynchus tshawytscha* (1982)⁷⁾, ヒラメ *Paralichthys olivaceus* (1983)¹²⁾, ブリ *Seriola quinqueradiata* (1983)¹²⁾ およびアイナメ *Hexagrammos otakii* (1999)¹³⁾ など各種の

魚類でもエドワジエラ症として知られる疾病を引き起こし, 水産業に甚大な被害を与え, 大きな社会問題となっている。

ところで, 細菌性疾病はウイルス病とは異なり予防や治療が可能のため, その予防と治療のために様々な化学療法剤が養殖漁場に大量に長期的に投与されてきた。その結果, 魚病細菌の薬剤耐性化が進み, 耐性化の範囲も日本全域に拡大し, 日本における魚養殖に新たな問題を引き起こしている^{14,15)}。とくに *E. tarda* は, 疾病ウナギの菌株で薬剤耐性化が進み, 様々な多剤耐性株の出現を見ている¹⁶⁻²⁰⁾。この薬剤耐性化は薬剤耐性 (R) プラスミドが伝達することで引き起こされる¹⁶⁾。*E. tarda* の薬剤耐性化および薬剤耐性の伝達性に関する研究はウナギから分離された菌株で詳細な研究がなされている¹⁶⁻²⁰⁾。しかし, 海水養殖魚から分離された *E. tarda* では, 薬剤感受性に関する研究は多く見られるが²¹⁻²⁴⁾, 薬剤耐性の伝達性に関する研究は見られない。

1 長崎大学水産学部

2 長崎大学大学院生産科学研究科

本研究は、淡水養殖のウナギなどおよび海水養殖のヒラメなどのエドワジラ症（パラコ口病）の疾病魚から分離された *E. tarda* の薬剤耐性化および薬剤耐性の伝達性を検討するため、分離 *E. tarda* の各種薬剤に対する感受性、プラスミドと薬剤耐性との関連性、Rプラスミド（または薬剤耐性）の伝達性、伝達性Rプラスミドの薬剤耐性因子のコード化、伝達性および非伝達性Rプラスミドの制限酵素での消化パターンを調べた。また、伝達性Rプラスミドの分子量を電子顕微鏡写真で測定した。

材料および方法

供試菌株

1979～1995年に日本各地（Table 2 参照）の淡水および海水養殖漁場のエドワジエラ症（パラコ口病）の魚類（Table 2 参照）から分離された *Edwardsiella tarda* 185菌株を、薬剤感受性試験および接合伝達実験に用いた。また、接合伝達実験の受容菌としては *Escherichia coli* k-12 1037 Rp^r 変異体 [1037 (*galK2 galT22 hsdR lacY1 metB1 relA supE44*) のリファンピシン耐性変異体] を用いた。

供試培地および培養方法

E. tarda の培養には2% 塩化ナトリウム添加ブレイン・ハートインヒュージョン（BHI）培地（Difco製）および *E. coli* の培養にはLuria-Bertani（LB）培地 [1% パクト・トリプトン（Difco製）、0.5% パクト・酵母エキス（Difco製）、1% NaCl, pH 7.5] を用いた。薬剤感受性試験には1% 塩化ナトリウム添加Muller-Hinton培地（Difco製）を、また接合伝達実験での接合伝達体の選択には各種薬剤添加BTB-ラクトース平板培地 [1% パクト・ペプトン（Difco製）、1% パクト・酵母エキス、1% ラクトース、0.004% BTB、1.5% 寒天, pH 7.5] を用いた。培養温度は *E. tarda* および *E. coli* とともに37℃ とした。

薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は日本化学療法学会標準法²⁵⁾ に従い、下記の各薬剤を添加したMuller-Hinton寒天培地を用い、添加薬剤濃度は2倍段階希釈とした。まず、Muller-Hinton培地で12時間振とう培養した培養液（10⁸/mL）をBSG緩衝液（0.85% NaCl, 0.03% KH₂PO₄, 0.06% Na₂HPO₄, 0.01% ゼラチン）で10⁶/mLに希釈した。この希釈液をマイクロプランター（1プランターの直径は3mmで4μLを摂取：東洋測器株式会社製）を用い、Muller-Hinton寒天平板上に摂取した。最小発育阻止濃度は24～48時間培養後に、また薬剤耐性は最小発育阻止濃度から決定された。

供試薬剤はペニシリン系抗生剤のアンピシリン（Ap）、セフェム系抗生剤のセファレキシム（Cex）、クロラムフェニコール系抗生剤のクロラムフェニコール（Cm）、マクロライド系抗生剤のエリスロマイシン（Em）[Sigma製]、アミノグリコシド系抗生剤でデオキシストレプトアミンを含むカナマイシン（Km）およびストレプトチジンを含むストレプトマ

イシン（Sm）[和光純薬工業製]、テトラサイクリン系抗生剤のテトラサイクリン（Tc）、オキシテトラサイクリン（Otc）およびドキシサイクリン（Dc）[Sigma製]、合成抗生剤のピリドンカルボン酸系のサルファモノメトキシ（Su）[和光純薬工業製]、ナリジクス酸（Na）およびトリメトプリム（Tmp）、フラン系のフラゾリドン（Nf）、キノリン系のオキソリン酸（Oa）[Sigma製] の計14薬剤を用いた。

接合伝達実験

供与菌の *E. tarda* を10時間および受容菌の *E. coli* k-12 1037 Rp^r を8時間振とう培養した。供与菌と受容菌の培養液を等量混合（各2.5mL）し、50mL容三角フラスコに入れ、37℃ で3時間静置培養した。混合培養液の10倍段階希釈液の0.1mLをリファンピシン（Rp）と各種選択薬剤を添加したBTB-ラクトース寒天平板培地で24時間培養した。薬剤濃度はRp（50μg/mL）、Ap（6.25μg/mL）、Cm（25μg/mL）、Em（100μg/mL）、Km（25μg/mL）、Na（100μg/mL）、Su（3200μg/mL）、Tc（25μg/mL）およびTmp（400μg/mL）とした。なお、受容菌の最小発育阻止濃度はAp（3.13mg/mL）、Cm（12.5mg/mL）、Em（50μg/mL）、Km（12.5μg/mL）、Na（50μg/mL）、Su（1600μg/mL）およびTmp（12.5μg/mL）であった。37℃ で24～48時間培養後のコロニーが接合伝達体として計数され、供与菌数当たりの接合伝達体の値として接合伝達頻度を求めた。

また、10あるいはそれ以上の接合伝達体を分離し、薬剤耐性を調べた。

プラスミドの分析

粗プラスミドの分離はアルカリ界面活性剤法²⁶⁾ で、またプラスミド分析は分離したプラスミドを0.7%アガロースゲルで電気泳動分析した。精製プラスミドは粗プラスミドをさらに塩化セシウム密度勾配遠心法で分離して得た。精製プラスミドは制限酵素によるRプラスミドの消化実験および電子顕微鏡観察に用いた。

消化断片の分子量は DNAの Sty I 消化断片（ニックンジーン）を用いて測定した。

制限酵素によるRプラスミドDNAの消化実験

供試 *E. tarda* の伝達性RプラスミドDNAの起原および魚種、地域、年代の違いを検討するために行った。制限酵素として *Pst* と *Hind*（宝酒造）を用いた。

プラスミドDNAの電子顕微鏡観察実験

電子顕微鏡観察のためのDNAの拡散には微量拡散法（滴下法）を用いた。まず、プラスミドDNAを0.15M 酢酸アンモニウム・0.15mM EDTA溶液（pH 7.0）で20μg/mLに希釈し、その希釈液の35μLをパラフィルム上に滴下した。この希釈液にチトクロームC溶液（13μg/mL）の4μLを注意深く加え、混合した。この混合液の上にペトリー皿をかぶせ、30分間静置した。変性したチトクロームCと開環したDNAの液

面上フィルムを、グリッド膜側面と接触させ、グリッド上に移動した。このグリッドを5秒蒸留水で洗浄し、0.01 μM酢酸ウラニウム-90% エタノール溶液で染色し、90% エタノールで30秒およびイソペンタンで10秒脱水した。Pt/Pd (80:20:直径0.1mm, 長さ4.5cm) を回転蒸着 (距離は15cm, 角度は20°) 後に電子顕微鏡で観察した。なお、プラスミドDNAの長さ1 μmは3200塩基対 (bp) として算出した。

結 果

供試 *E. tarda* の薬剤感受性

供試 *E. tarda* 185菌株の各薬剤に対する最小発育阻止濃度の分布をFig. 1に、また各薬剤に対する耐性菌の割合をTable 1に示す。同濃度分布はAp, Cm, Dc, Km, Na, Nf, Oa, Otc, Su, TcおよびTmplについては2つのピークを有し、

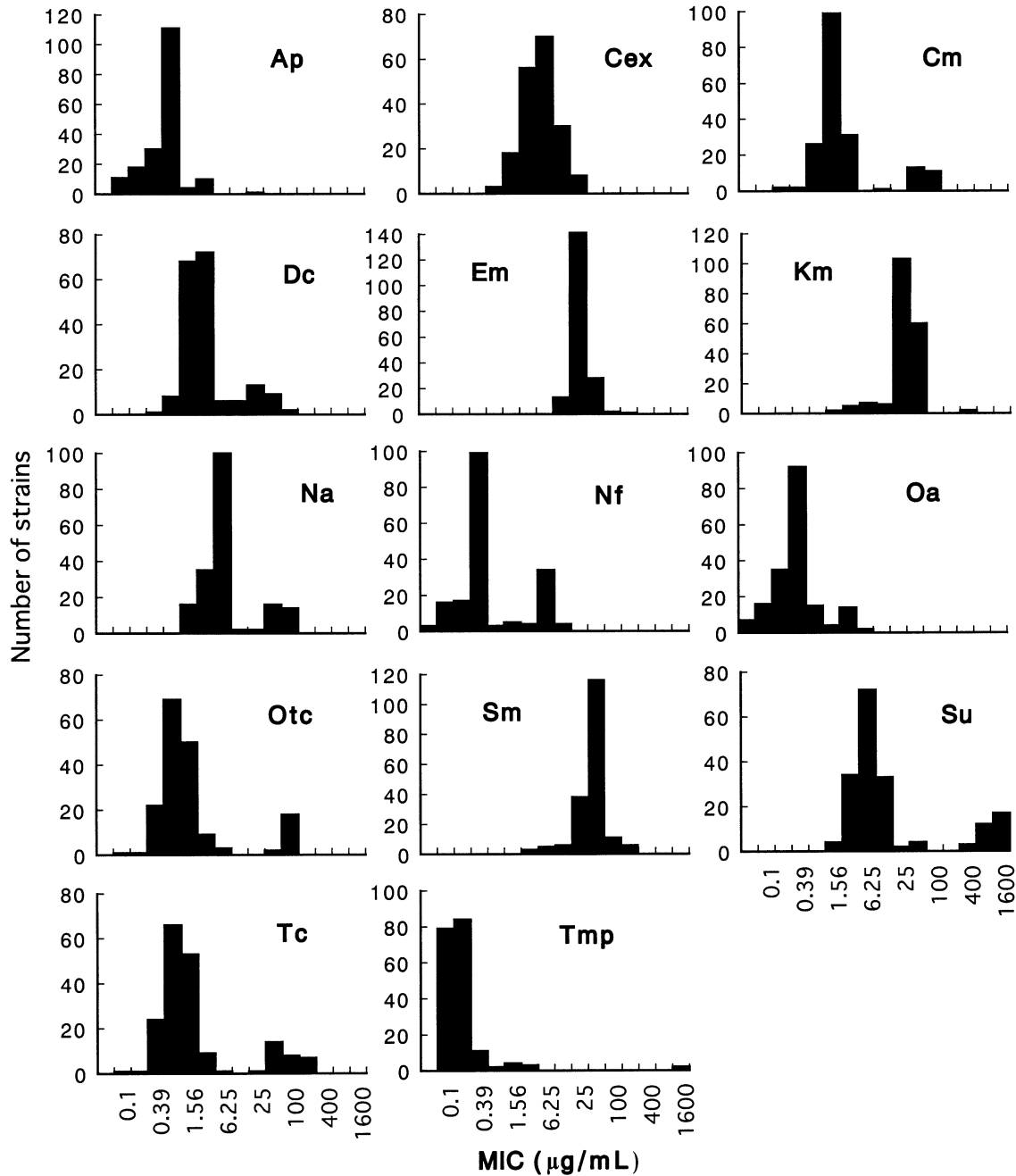


Fig. 1 Distributions of the minimum inhibitory concentrations (MIC) of 14 chemotherapeutics in 185 strains of *Edwardsiella tarda* isolated from various marine and freshwater fishes of edwardsiellosis in geographically dispersed area between 1979 and 1995. Compound abbreviations are as follows: Ap, ampicillin; Cex, cephalexin; Cm, chloramphenicol; Dc, doxycycline; Em, erythromycin; Km, kanamycin; Na, nalidixic acid; Nf, furazolidone; Oa, oxolinic acid; Otc, oxytetracycline; Sm, streptomycin; Su, sulfamonomethoxine; Tc, tetracycline; and Tmp, trimethoprim.

Table 1. Fishes isolated *Edwardsiella tarda* strains harboring various drug resistances and percentages of the resistant strains

Drug used for drug susceptibility test	Fishes isolated the resistant strains (number of the resistant strains/ number of the test strains)	Percentages of the resistant strains ^{*3}
Ampicillin (Ap) ^{*1}	PO ^{*2} (1/104)	0.5
Cephalexin (Cex)	not isolated the resistant strains	0.0
Chloramphenicol (Cm)	AJ(22/53), PO(3/104)	13.5
Doxycycline (Dc)	AJ(26/53), PO(4/104)	16.2
Erythromycin (Em)	not isolated the resistant strains	0.0
Kanamycin (Km)	PO(2/104)	1.1
Nalidixic acid (Na)	AJ(21/53), HO(5/7), PM(3/15), PO(2/104), EJ(1/2)	17.3
Furazolidone (Nf)	AJ(40/53), PO(1/104), TM(1/4)	22.7
Oxolinic acid (Oa)	AJ(18/53), PO(3/104)	11.4
Oxytetracycline (Otc)	AJ(26/53), PO(4/104)	16.2
Sulfamonomethoxine (Su)	AJ(26/53), PO(4/104), PM(1/15)	16.8
Streptomycin (Sm)	not isolated the resistant strains	0.0
Tetracycline (Tc)	AJ(26/53), PO(4/104)	16.2
Trimethoprim (Tmp)	PO(2/104)	1.1

^{*1} Abbreviations of drugs are shown in parentheses.

^{*2} Abbreviations of the name of fishes: AJ, Japanese eel; EJ, crimson sea bream; HO, greenling; PM, red sea bream; PO, Japanese flounder; and TM, mozambique mouthbreeder (also see Table 2).

^{*3} 185 strains of *Edwardsiella tarda* were used for this experiment.

低い濃度分布の感受性菌と高い濃度分布の耐性菌が存在した。他方Cex, EmおよびSmは1つのピークだけを有し, これらの薬剤に対しては供試 *E. tarda* のすべてが感受性であった。

各薬剤に対する耐性菌の割合はAp, KmおよびTmpについては1%またはそれ以下で, これらの耐性はヒラメ由来菌だけに認められた。またCm, Dc, Na, Nf, Oa, Otc, SuおよびTcについては約11~23%の範囲で耐性菌が存在し, これらの耐性菌の大半がウナギ由来菌で認められた。なお, 同じ化学的基本構造を有するDc, OtcおよびTcの耐性はいずれも16.2%であった。それ故今後, これら3薬剤耐性は同一のものとして扱う。

供試 *E. tarda* の薬剤耐性と同菌の分離魚種および分離地域との関連性

様々な魚種および地域から分離した *E. tarda* の薬剤耐性化の程度をTable 2に示す。ウナギから分離した菌株では, いずれの地域から分離した菌株ともその大半が耐性菌で, 他方ヒラメから分離した菌株ではその大半が感受性菌であった。また, マダイ, アイナメ, チダイおよびテラピアからの分離菌では, 供試菌数が少なく耐性化の程度は判断できなかったが, いずれの供試魚由来菌株とも耐性菌が確認された。また, 供試185菌株のうちの61株(約30%)が耐性菌であった。なお, 薬剤耐性化の程度と分離年代との関連性は明らかでなかった。

供試 *E. tarda* の薬剤耐性の接合伝達

薬剤耐性を保持した供試 *E. tarda* の薬剤耐性マーカーと

Table 2. Isolation of the resistant *Edwardsiella tarda* strains from marine and freshwater fishes of edwardsiellosis in geographically dispersed area between 1979 and 1995

Fishes	Area	Number of the resistant strains/ number of the test strains
Freshwater fish		(45/57)
Japanese eel		(44/53)
(<i>Anguilla japonica</i> , AJ)	AICHI (AC)	8/12
	KAGOSHIMA (KG)	4/4
	MIYAZAKI (MZ)	2/6
	NAGASAKI (NG)	15/15
	SHIZUOKA (SZ)	5/5
	TOKUSHIMA (TK)	10/11
Mozambique mouthbreeder		(1/4)
(<i>Tilapia mossambica</i> , TM)	KAGOSHIMA	1/4
Marine fish		(16/128)
Japanese flounder		(7/104)
(<i>Psrlichthys olivaceus</i> , PO)	EHIME (EH)	1/17
	FUKUOKA (FK)	0/1
	KAGOSHIMA	1/17
	KUMAMOTO (KM)	1/15
	NAGASAKI	2/46
	OITA (OT)	1/6
	SAGA (SG)	1/2
Red sea bream		(3/15)
(<i>Pagrus major</i> , PM)	KAGOSHIMA	1/3
	NAGASAKI	2/12
Greenling		(5/7)
(<i>Hexagrammos otakii</i> , HO)	OITA	5/7
Crimson sea bream		(1/2)
(<i>Evinnis japonica</i> , EJ)	NAGASAKI	1/2
Total		61/185

Abbreviations of the names of fishes and area are shown in parentheses.

Table 3. Drug resistance markers and transferable resistances in the resistant *Edwardsiella tarda* strains isolated from various fishes of edwardsiellosis in geographically dispersed area between 1979 and 1995

Pattern	Resistance marker of the resistant strains	Drug-resistance transferred	Number of strains harbored R plasmid/ number of strains studied	Number of strains harbored transferable R plasmid/ number of strains studied
1	Na		0/9 [HO (5); PM (3); EJ (1)]*	0/9
2	Nf		0/6 [AJ (5); TM (1)]	0/6
3	Na Oa		0/4 [AJ (2); PO (2)]	0/4
4	Nf Oa		0/1 [AJ (1)]	0/1
5	Ap Cm Tc		1/1 [PO (1)]	0/1
6	Cm Nf Su	Cm	2/2 [AJ (2)]	2/2
7	Cm Su Tc	Cm Su Tc	1/1 [AJ (1)]	1/1
8	Na Nf Oa		0/9 [AJ (8); PO (1)]	0/9
9	Na Su Tc		1/1 [AJ (1)]	0/1
10	Nf Su Tc	Su Tc	2/2 [AJ (2)]	1/2
11	Su Tc Tmp		1/1 [PO (1)]	0/1
12	Cm Nf Su Tc		13/13 [AJ (13)]	0/13
13	Cm Km Su Tc		2/2 [PO (2)]	0/2
14	Na Nf Su Tc	Su Tc	1/1 [AJ (1)]	1/1
15	Cm Na Nf Su Tc		2/2 [AJ (2)]	0/2
16	Na Nf Oa Su Tc		2/2 [AJ (2)]	0/2
17	Cm Km Su Tc Tmp	Cm Km Tc	1/1 [PO (1)]	1/1
18	Cm Na Nf Oa Su Tc	Cm Su Tc	4/4 [AJ (4)]	4/4
Total			33/61	10/61

Abbreviations of drugs: Ap, ampicillin; Cm, chloramphenicol; Km, kanamycin; Na, nalidixic acid; Nf, furazolidone; Oa, oxolinic acid; Su, sulfamonomethoxine; Tc tetracycline; and Tmp, trimethoprim.

*Abbreviations of the name of fishes are shown in parentheses.: AJ, Japanese eel; EJ, crimson sea bream; HO, greenling; PM, red sea bream; PO, Japanese flounder; and TM, mozambique mouthbreeder (also see Table 2).

伝達性薬剤耐性マーカーをTable 3に示す。供試 *E. tarda* の薬剤耐性は1薬剤だけに耐性を示す菌株 (パターン1と2) から6薬剤に対し耐性を示す菌株 (パターン18。DC, Otc およびTc耐性は同一と考える。以下同様とする) まで、18の薬剤耐性パターンがあった。薬剤耐性菌はその多くが多剤耐性を示し、このうちNa/Nf/Oa耐性 (パターン8) および Cm/Nf/Su/Tc耐性 (パターン12) を示す菌株を多く認めた。

薬剤のうちCm, Km, SuおよびTcの4薬剤の耐性が伝達され、その他の耐性は伝達されなかった。しかし、これらの伝達性薬剤耐性は菌株により伝達される場合とされない場合があり、また同じ薬剤耐性パターン (パターン10) を示す菌株でもこの両者を認めた。また薬剤耐性が伝達される場合には、伝達性耐性のすべてが伝達される場合と、その一部が伝達されない場合 (Su耐性因子については伝達されない場合があった) があった。なお、薬剤耐性菌61株の中の10菌株で耐性が伝達された。この10菌株中の9菌株がウナギから分離されたが、分離した地域および年代ともに様々であった (Table 4参照)。

供試 *E. tarda* の各薬剤耐性の接合伝達頻度

供試 *E. tarda* から *E. coli* k-12 1037 R_p^r への薬剤耐性の接合伝達頻度をTable 4に示す。薬剤耐性の伝達頻度は菌株により 10^{-4} ~ 10^{-6} と異なったが、個々の菌株における各薬剤耐性の伝達頻度には違いを認めなかった。なお、供試菌は

分離した魚種、地域および年代が異なるが、このような来源の違いによる伝達頻度の違いは見られなかった。

供試 *E. tarda* の薬剤耐性とプラスミドとの関連性

供試したすべての薬剤に感受性を示した124菌株、およびNa, NfおよびOaのいずれか1つまたは複数に耐性を示したがCmおよび/またはTcに耐性を示さない29菌株 (Table 3参照) はいずれもプラスミドを保持しなかった。なお、Su耐性はCmおよび/またはTc耐性と常に共存し、したがってCmおよび/またはTc耐性を示さない菌株は全てがプラスミドを持たず、つまりCmおよび/またはTc耐性を示さない菌株は、伝達性Rプラスミドを持たない菌株であった。

Cmおよび/またはTc耐性を示した菌株のプラスミドのAgaroseゲル電気泳動図をFig. 2に示す。Cmおよび/またはTc耐性を示した菌株では、伝達性 (グループ) および非伝達性 (グループ) に関わらず、その全てでプラスミドのバンド1本が確認された (なお、プラスミドよりも低分子側に認められるバンドは染色体DNAである)。なお、Rプラスミドはほぼ同じ分子量 [後述するように、電子顕微鏡観察の結果、伝達性Rプラスミドの分子質は約81kbであった] であった。前述のようにCmおよび/またはTc耐性を示さない菌株ではRプラスミドを保持しないことから、このプラスミドはCm, Km, Suおよび/またはTc耐性をコードするRプラスミドと判断された。

Table 4. The transfer frequencies of drug resistances transferred from the donor *Edwardsiella tarda* strains to the recipient *Escherichia coli* K-12 1037 Rp-r strain

Pattern	Strain	Resistance marker	Transfer frequency of individual R factors			
			Cm	Km	Su	Tc
6	ETAJTK8604*	Cm Nf Su	6.9×10^{-6}	nd	nt	nd
6	ETAJTK8607	Cm Nf Su	1.5×10^{-5}	nd	nt	nd
7	ETAJAC8705	Cm Su Tc	3.2×10^{-4}	nd	1.5×10^{-4}	2.6×10^{-4}
10	ETAJTK8605	Nf Su Tc	nd	nd	2.6×10^{-6}	1.1×10^{-6}
14	ETAJTK8704	Na Nf Su Tc	nd	nd	1.3×10^{-5}	1.0×10^{-5}
17	ETPOOT9139	Cm Km Su Tc Tmp	1.3×10^{-5}	1.4×10^{-5}	nt	1.2×10^{-5}
18	ETAJTK8603	Cm Na Nf Oa Su Tc	2.7×10^{-4}	nd	2.7×10^{-4}	2.4×10^{-4}
18	ETAJTK8701	Cm Na Nf Oa Su Tc	1.9×10^{-4}	nd	1.2×10^{-4}	1.3×10^{-4}
18	ETAJSZ8807	Cm Na Nf Oa Su Tc	3.7×10^{-6}	nd	2.5×10^{-6}	3.7×10^{-6}
18	ETAJSZ8808	Cm Na Nf Oa Su Tc	3.5×10^{-5}	nd	4.5×10^{-5}	4.3×10^{-5}

* The *Edwardsiella tarda* (ET) strain was isolated from an eel (AJ, see Table 2) in Tokushima (TK, see Table 2) in 1986 (8604). The others also are the same.

Abbreviations of drugs: Cm, chloramphenicol; Km, kanamycin; Na, nalidixic acid; Nf, furazolidone; Oa, oxolinic acid; Su, sulfamonomethoxine; Tc, tetracycline; and Tmp, trimethoprim.

Symbols: nd, not determined; and nt, not transferred.

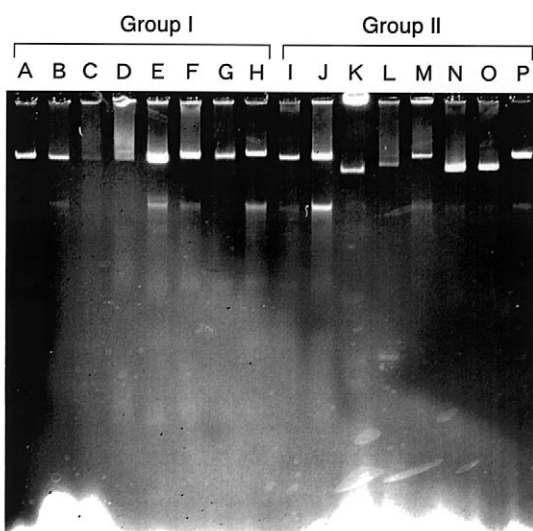


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of plasmid DNAs in *Edwardsiella tarda* strains harboring Cm, Km, Su, and/or Tc (Dc or Otc) resistances. Plasmids of group I (lanes A to H) and II (lanes I to P) were transferred and not transferred from the donor *Edwardsiella tarda* strains to the recipient *Escherichia coli* K-12 1037 Rp-r strain, respectively. Lanes: A, plasmid pETAJSZ8807 [detected in *Edwardsiella tarda* (ET) from an eel (AJ, see Table 2) in Shizuoka (SZ, see Table 2) in 1988 (8807), and so forth]; B, plasmid pETAJAC8705; C, plasmid pETAJTK8701; D, plasmid pETAJTK8603; E, plasmid pETAJSZ8808; F, plasmid pETAJTK8605; G, plasmid pETAJTK8704; H, plasmid pETPOOT9139; I, plasmid pETAJTK8601; J, plasmid pETPOKM9102; K, plasmid pETAJJKG8404; L, plasmid pETAJJKG8403; M, plasmid pETPOEH9132; N, plasmid pETAJNG8412; O, plasmid pETAJTK8602; and P, plasmid pETPOSG8910.

接合伝達体のプラスミド

各薬剤で選択された接合伝達体のプラスミドのアガロースゲル電気泳動図をFig. 3 (A)および3 (B)に示す。伝達性薬剤耐性を保持したいずれの供試菌株とも、供与菌のプラスミド (レーンA) と各薬剤で選択した各接合伝達体のプラスミド (レーンAを除く他のレーン) は分子量が同じで、つまり供与菌のRプラスミドはコードする薬剤耐性を変えることなく伝達された。

供試 *E. tarda* から分離したプラスミドの制限酵素による消化パターン

E. tarda から分離したRプラスミドの *Pst* 消化断片のアガロースゲル電気泳動図をFig. 4 (A)に示す。図に見られるように、非伝達性Rプラスミド (グループ) と伝達性Rプラスミド (グループ) の *Pst* による消化パターンに、

意味ある違いを見出すことができなかった。むしろ、この両者に共通する5.19, 3.53および2.38kbの大きさのバンドが認められ、とくに3.53kbのバンドはレーンBのプラスミドを除くすべてのプラスミドに、また2.38kbのバンドはレーンK (レーンMも2.38kbのバンドの存在が再実験で確認) を除くすべてのプラスミドに認められた。また、レーンGとHおよびレーンMとN (再確認実験からの結果を含む) は同一のパターンを示し、前者は分離した魚種、地域および薬剤耐性が同じであるが、後者は分離地が異なった。

E. tarda から分離したRプラスミドの *Hind* 消化断片のアガロースゲル電気泳動図をFig. 4 (B)に示す。図に見られるように、非伝達性Rプラスミド (グループ) および伝達性Rプラスミド (グループ) の *Hind* による消化パターンに、意味ある違いを見出すことができなかった。一方、ヒラメ由来菌のRプラスミド (レーンB, RおよびJ) の消

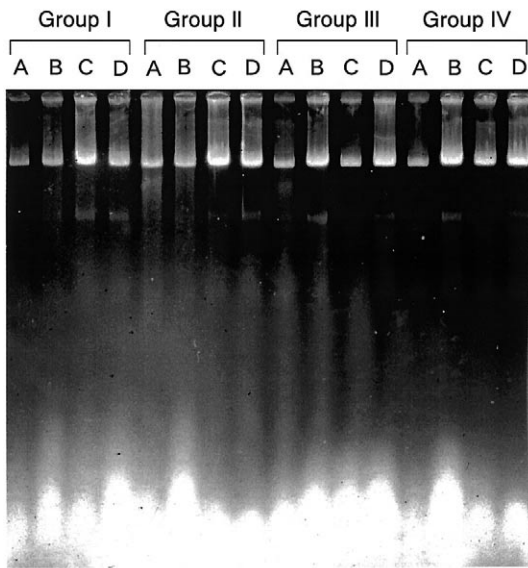


Fig. 3(A) Agarose gel electrophoresis of plasmids in donor *Edwardsiella tarda* strains and R plasmids in transconjugants selected with articular drugs in mating with the recipient *Escherichia coli* K-12 1037 Rp-r strain. Groups I, II, III, and IV show the donor *E. tarda* strains ETAJTK8603 [isolated from an eel (AJ, see Table 2) in Tokushima (TK, see Table 2) in 1986 (8603), and so forth], ETAJTK8701, ETAJAC8705, and ETAJSZ8807. Lane A involves plasmids in the donor strains; lane B involves R plasmids in transconjugants selected with tetracycline; lane C involves R plasmids in transconjugants selected with chloramphenicol; and lane D involves R plasmids in transconjugants selected with sulfamonomethoxine.

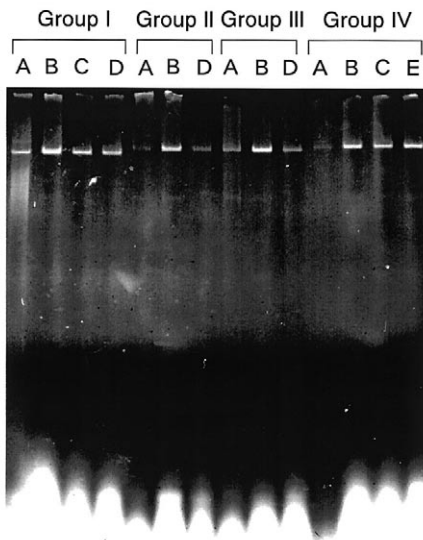


Fig. 3(B) Agarose gel electrophoresis of plasmids in donor *Edwardsiella tarda* strains and R plasmids in transconjugants selected with articular drugs in mating with the recipient *Escherichia coli* K-12 1037 Rp-r strain. Groups I, II, III, and IV show the donor *E. tarda* strains ETAJSZ8808 [isolated from an eel (AJ, see Table 2) in Shizuoka (SZ, see Table 2) in 1988 (8808), and so forth], ETAJTK8605, ETAJTK8704, and ETPOOT9139. Lane A involves plasmids in the donor strains; lane B involves R plasmids in transconjugants selected with tetracycline; lane C involves R plasmids in transconjugants selected with chloramphenicol; lane D involves R plasmids in transconjugants selected with sulfamonomethoxine; lane E involves R plasmid in a transconjugant selected with kanamycin.

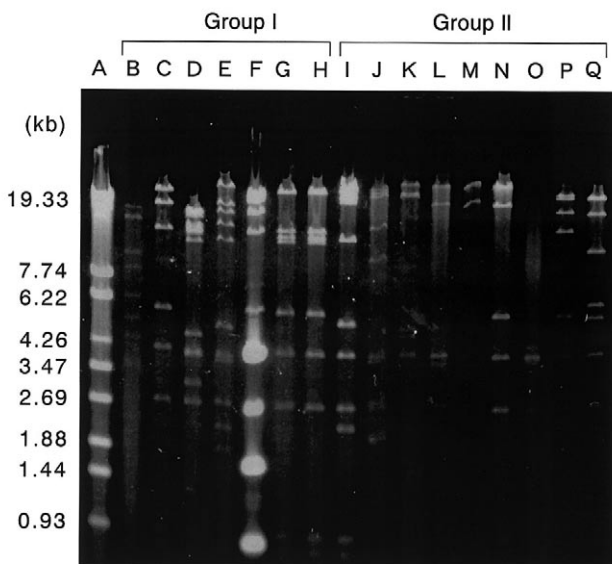


Fig. 4(A) Agarose gel electrophoresis of *Pst*I-digested plasmid DNAs from the *E. tarda* isolates. Group I (lanes B to H) and II (lanes I to Q) involve plasmids that were not transferred and transferred from donor *Edwardsiella tarda* strains to the recipient *Escherichia coli* K-12 1037 Rp-r strain, respectively. Lanes: A, DNA digested with *Sty*I; B, plasmid pETPOSG8910 [detected in *E. tarda* (ET) from a flounder (PO, see Table 2) in Saga (SG, see Table 2) in 1989 (8910), and so forth]; C, plasmid pETAJNG8412; D, plasmid pETAJTK8601; E, plasmid pETPOKM9102; F, plasmid pETAJJKG8401; G, plasmid pETAJNG8504; H, plasmid pETAJNG8409; I, plasmid pETAJTK8604; J, plasmid pETPOOT9139; K, plasmid pETAJTK8605; L, plasmid pETAJTK8704; M, plasmid pETAJAC8705; N, plasmid pETAJSZ8808; O, plasmid pETAJSZ8807; P, plasmid pETAJTK8701; and Q, plasmid pETAJTK8603.

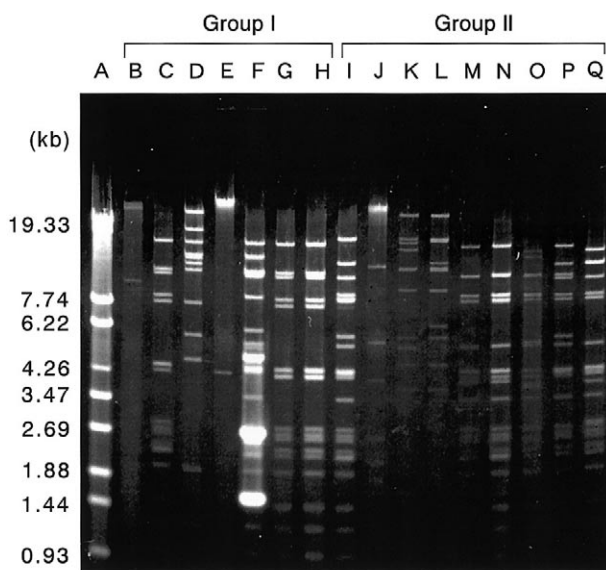


Fig. 4(B) Agarose gel electrophoresis of *Hind*III-digested plasmid DNAs from the *E. tarda* isolates. Groups (I and II) and lanes (A to Q) are the same as Fig. 4(A)

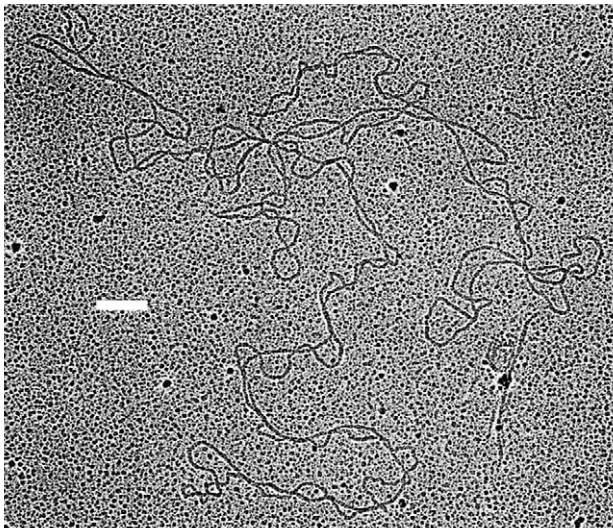


Fig. 5 Electronmicrograph of transferable plasmid DNA of *E. tarda* strain ETAJSZ8807 (x 20,000). The length of a bar is 200 nm.

化断片はウナギ由来菌 (レーン B, E および J 以外のレーン) のそれに比べその数が極めて少なかった (しかし, *Pst* での消化パターンではこのような違いは見られなかった)。またレーン C, G および H は同じ消化パターンを示し (しかし, *Pst* での消化パターンはレーン C とレーン G および H とでは異なった), これら 3 者は分離された魚種, 地域および薬剤耐性が同じであった。ところがレーン M と N は同じ消化パターンを示したが (*Pst* での消化パターンと同様), 分離した地域が異なった。他方, レーン N と O およびレーン P と Q は分離魚, 分離地域, 薬剤耐性およびプラスミドの分子質量が同じ (とくにレーン N と O は分離年も同じ) であるにも関わらず消化パターンは異なった (*Pst* での消化パターンでも同様)。

供試 *E. tarda* から分離した R プラスミドの電子顕微鏡的観察
E. tarda ETAJSZ8807 株から分離した R プラスミド (Cm, Su および Tc 耐性因子がコード) の電子顕微鏡写真を Fig. 5

に示す。本菌のプラスミドの長さは 25.3 μ m, 分子量は 81kb であった。

考 察

供試 *E. tarda* は分離した魚種, 地域および年代に関わりなく Cex, Em および Sm に対してはすべてが感受性で, また Ap, Km および Tmp に対してもほぼすべてが感受性であった。他方 Cm, Na, Nf, Oa, Su および Tc (Otc および Tc を含む, 以下同様) に対しては 11 ~ 23% の範囲で耐性であった。しかしながら淡水養殖のウナギ由来菌ではその大半がこれらの薬剤に対して耐性であったのに対し, 海水養殖のヒラメやタイ由来菌では大半が感受性であった。ウナギ由来菌株で薬剤耐性の割合が高かったことについては, 養鰻池が閉鎖的で用いた抗生剤および抗菌剤の残留性が高いことに関連すると考えられる。ところで現在, 海産魚類のエドワジエラ症の治療薬として承認されている薬剤はない。しかしながら, 沿岸養殖場では各種の疾病の予防と治療のために多種多用の薬剤

が大量に投与されている。それ故今回、薬剤耐性菌の割合が低かったヒラメやタイ由来菌株についても、今後薬剤耐性化が進むことが予測される。事実、Otcに対する耐性が愛媛では1990年以降で²³⁾、大分では1998年以降で増加傾向を示している²⁴⁾。加えてAp, KmおよびTnpについてはヒラメ由来株だけに耐性を認めたこと、またウナギ由来株では様々な薬剤に対する耐性株が感受性株に比べて優占していることを考え合わせると、海水養殖魚類では様々な薬剤に対する耐性化が今後増加すると思われる。

ところで今回、Cm, Km, Suおよび/またはTc耐性をもつ供試 *E. tarda* ではプラスミドを保有し、このプラスミドは接合伝達され、各薬剤耐性の伝達頻度は同じ菌株では違いが見られず、また接合伝達されたプラスミドの分子量は供与菌のそれと同じであり、さらにこの接合伝達体の薬剤耐性は供与菌と同じ薬剤耐性を示した。これらの結果から、*E. tarda* ではCm, Km, Suおよび/またはTc耐性は1つのRプラスミドにコードされていること、そしてこの多剤耐性プラスミドが感受性菌を耐性化していることが明らかとなった。ところで、これらRプラスミドは伝達される場合とそうでない場合があり、伝達されたプラスミドの大部分がウナギ由来株であった。またウナギ由来株とヒラメ由来株とでは *Hind* での消化パターンが異なった。それ故、ウナギ由来株とヒラメ由来株では薬剤耐性化の機構が異なることも考えられ、今後これらRプラスミドの構造と機能を調べる必要がある。

耐性を示した薬剤のうち、Cm, Km, SuおよびTc耐性を持たないNa, NfおよびOa耐性株ではプラスミドを保持せず、したがってこれらNa, NfおよびOa耐性は染色体DNAにコードされていると考えられる。また薬剤耐性が伝達されなかったAp耐性株やCm, Km, Suおよび/またはTc耐性株ではRプラスミドを保持しており、したがってこれについてはRプラスミドが伝達性因子を持たないことあるいはこれを欠落していることなどが考えられ、今後塩基配列の研究を通してこれらのことを明らかにする必要がある。

Hind によるRプラスミドの消化パターンについて見ると、ヒラメ由来株から得られたRプラスミドとウナギ由来株から得られたそれとは消化パターンに有意な違いが見られ、前述したヒラメ由来株とウナギ由来株の薬剤耐性化の違いとの関連性も考えられる。一方、ウナギ由来株からのRプラスミドの消化パターンは様々であった。この中であって同じ消化パターンを示したレーンC, GおよびHのうちのレーンGとHは *Pst* でも同じ消化パターンを示し(レーンCはレーンGおよびHとは *Pst* での消化パターンを異にした)、この両レーンのプラスミドは薬剤耐性、分離魚種および分離地域が同じであり、したがってこれらプラスミドの起源も共通すると考えられる。他方、宿主菌の分離地域が異なるにも関わらず同一の消化パターンを示したプラスミド(レーンMとN: この両レーンのプラスミドは *Pst* での消化パターンも同一であった)についてもRプラスミドの起源の共通性が考えられ、薬剤耐性化の機序を研究する上で興味深い。また宿主菌の薬剤耐性、分離地域、分離魚種、分離年およびプラス

ミドの分子量が同じであるにも関わらず消化パターンを異にする(レーンNとO)場合があり、ウナギ由来株のRプラスミドは様々な起源をもつことが推察される。

これまで、ある魚種のある特定の疾病にも、様々な薬剤を選択的に利用することで治療がなされている。しかし、そのときどきの病原体にどの薬剤が有効であるかを調べた上での選択がなされていない。とりわけ、個々の細菌の様々な薬剤に対する耐性化やその機構が明らかになされていないことがその選択を一層困難にし、治療効果のないまま無駄な投与がなされていると考えられる。今回の研究で *E. tarda* の様々な薬剤に対する耐性化やその機構に関し、ある程度の知見を得ることができた。ところで現在、エドワジエラ症の治療薬として承認されているものがないが、今回の結果は、今後治療薬として使用する場合の参考になると考える。

謝 辞

供試菌の一部は愛知県水産試験場内水面漁業研究所、愛媛県魚病指導センター、大分県農林水産研究センター水産試験場、鹿児島県水産技術開発センター、静岡県水産試験場浜名湖分場、東京海洋大学(教授青木宙博士)、徳島県立農林水産総合技術支援センター水産研究所並びに長崎県総合水産試験場から譲渡された。ここに謝意を申し上げる。

文 献

- 1) H. Wakabayashi, and S. Egusa: *Edwardsiella tarda* (*Paracolobactrum anguillimortiferum*) associated with pound-cultured eel disease. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **39**, 931-936 (1973).
- 2) T. Miyazaki and S. Egusa: Histopathological studies of *Edwardsiella tarda* of the Japanese eel (*Anguilla japonica*)-III. Elvers and anguillettes. *Fish Pathol.*, **11**, 127-131 (1976).
- 3) 皆川武夫, 中井敏博, 室賀清邦: 養鰻環境中における *Edwardsiella tarda*. *魚病研究*, **17**, 243-250 (1983).
- 4) 朴 守一, 若林久嗣, 渡辺佳一郎: 養鰻池に分布する *Edwardsiella tarda* の血清型と病原性. *魚病研究*, **18**, 85-89 (1983).
- 5) F. P. Meyer, and G. L. Bullock: *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Appl. Microbiol.*, **25**, 155-156 (1973).
- 6) 窪田三朗, 界外 昇, 宮崎照雄, 宮下敏夫: テラピアのエドワジエラ症の病理組織学的研究 - I 自然感染例. *三重水産研報*, **9**, 155-165 (1982).
- 7) A. Amandi, S. F. Hiu, J. S. Rohovec, and J. L. Fryer: Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1380-1384 (1982).
- 8) D. Sae-Qui, K. Muroga, and T. Nakai: A case of *Edwardsiella tarda* infection in cultured colored carp

- Cyprinus carpio*. *Fish Pathol.*, **19**, 197-199 (1984).
- 9) 楠田理一, 豊嶋利雄, 岩村善利, 佐古 浩: 高知県興津湾のボラ病魚から分離された *Edwardsiella tarda* について. *日水誌*, **42**, 271-275 (1976).
 - 10) 楠田理一, 伊丹利明, 宗清正広, 中島博司: 養殖チダイから分離された病原性 *Edwardsiella tarda* の性状について. *日水誌*, **43**, 129-134 (1977).
 - 11) 安永統男, 小川七朗, 畑井喜司雄: 数種の海産養殖魚から分離された病原性 *Edwardsiella tarda* の性状について. *長崎水試研報*, **8**, 57-65 (1982).
 - 12) 中津川俊雄: ヒラメ幼魚から分離された *Edwardsiella tarda*. *魚病研究*, **18**, 99-101 (1983).
 - 13) 福田 穰: 1980年から1997年に大分県で発生した養殖海産魚介類の疾病. *大分海水研調研報*, **2**, 41-73 (1999).
 - 14) 江草周三: 魚の感染症. 恒星社厚生閣, 東京, pp.1-554 (1984).
 - 15) B. Austin, and D. A. Austin: Bacterial fish pathogens. Disease in farmed and wild fish. Ellis Horwood Limited, New York · Chichester · Brisbane · Toronto, pp.1-364 (1987).
 - 16) T. Aoki, T. Arai, and S. Egusa: Detection of R plasmids in naturally occurring fish-pathogenic bacteria, *Edwardsiella tarda*. *Microbiol. Immunol.*, **21**, 77-83 (1977).
 - 17) T. Aoki, and T. Kitao: Drug resistance and transferable R plasmids in *Edwardsiella tarda* from fish culture ponds. *Fish pathol.*, **15**, 277-28 (1981).
 - 18) T. Aoki, A. Akashi, and T. Sakaguchi: Phylogenetic relationships of transferable R plasmids from *Edwardsiella tarda*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **52**, 1173-1179 (1986).
 - 19) T. Aoki, T. Sakaguchi, and T. Kitao: Multiple drug-resistant plasmids from *Edwardsiella tarda* in eel culture ponds. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 1821-1825 (1987).
 - 20) T. Aoki, T. Kitao, and M. Fukudome. Chemotherapy agent infection with multiple drug resistant strains of *Edwardsiella tarda* in cultured eels. *Fish Pathol.*, **24**, 161-168 (1989).
 - 21) 小川七朗, 畑井喜司雄, 安本 進, 平井栄一, 安永統男, 市来忠彦: 近年長崎県内の養殖魚から分離された各種魚病細菌の薬剤感受性. *長崎水試研報*, **8**, 91-100 (1982).
 - 22) 畑井喜司雄, 安本 進, 塚原淳一郎, 平井栄一, 安永統男, 市来忠彦: 1982年に長崎県内の養殖魚から分離された各種魚病細菌の薬剤感受性. *長崎水試研報*, **9**, 13-23 (1983).
 - 23) 松岡 学, 和田有二: 1986年から1995年にヒラメ病魚から分離された *Edwardsiella tarda* および *Streptococcus iniae* の薬剤感受性. *水産増殖*, **44**, 445-449 (1996).
 - 24) 福田 穰: 1990年から2001年に大分県の養殖海産魚類から分離された主要魚病細菌の薬剤耐性. *大分海水研調研報*, **4**, 25-50 (2003).
 - 25) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定法. *Chemotherapy*, **29**, 76-79 (1981).
 - 26) C. I. Kado, and S. T. Liu: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bact.*, **145**, 1365-1373 (1981).