

スルファモノメキシン・オルメトプリム合剤のヒラメエドワジエラ症に対する治療効果

金井 欣也

Therapeutic Effect of a Combination of Sulfamonomethoxine and Ormetoprim against Edwardsiellosis in Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*

Kinya KANAI

Therapeutic effect of a 3:1 combination of sulfamonomethoxine and ormetoprim (SMM-OMP) against edwardsiellosis was studied in two experiments with artificially infected Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Flounder, average weight of 25.8 ± 4.8 g in experiment 1 and 38.4 ± 7.2 g in experiment 2, were challenged by immersing for 15 min in sea water containing about 10^8 colony forming unit (CFU)/ml of *Edwardsiella tarda* NUF251. Slurry made up of ground commercial pellet feed and water containing SMM-OMP was administered orally into the stomach of experimental fish with a plastic catheter for 7 days in experiment 1 or 5 days in experiment 2 from the following day of challenge. Dosages of the drug containing 30 mg of SMM and 10 mg of OMP per 100 mg were 0, 25, 50, 100, 200 and 400 mg/kg/day in experiment 1 and 0, 12.5, 25 and 50 mg/kg/day in experiment 2. Therapeutic effect of oxytetracycline (OTC) was also studied at a dose of 50 mg/kg/day in experiment 2.

As a result high therapeutic effects of SMM-OMP were achieved even at the lowest dosage (12.5 mg/kg). In experiment 1, however, the fish at higher dosages were died more than those at lower dosages. Such fish did not show the disease signs of edwardsiellosis, and also *E. tarda* was not reisolated from the fish. From the results such deaths may be due to a harmful effect of the drug. OTC was proved to be ineffective though *E. tarda* NUF251 was sensitive to OTC in vitro.

Key words : スルファモノメキシン sulfamonomethoxine, オルメトプリム ormetoprim, エドワジエラ症 edwardsiellosis, 治療効果 therapeutic effect, ヒラメ Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, *Edwardsiella tarda*.

ヒラメのエドワジエラ症は腸内細菌科の細菌 *Edwardsiella tarda* を原因菌とする，現在ヒラメ養殖に最も被害を与えている疾病である。¹⁾主に高水温期に流行し，日間死亡率は低いものの，流行が長期化することが多く，被害を大きくしている。本症は化膿性炎を特徴とし，肝臓や腎臓などに膿瘍が形成される。重症魚では腹水の貯留により腹部が著しく膨満し，腸の一部が肛門から脱出する。病巣では好中球やマクロファージに貪食された *E. tarda* がその細胞内で殺菌作用に抵抗して増殖する様子が観察されている。²⁾

ヒラメの細菌病の治療薬として承認された薬剤はレンサ球菌症を対象としたオキシテトラサイクリン (OTC) および滑走細菌症を対象としたニフルスチレン酸ナトリウムのみであり，最も被害の大きいエドワジエラ症には治療薬が存在しないのが現状である。³⁾わが国のヒラメの年間養殖生産量はわずかに約8,000tであり，薬の消費量が少ないと見積もられていることが製薬会社の治療薬開発を遅らせている一因と思われる。しかし，抗菌剤の投与以外にこれといった有効な防除法がない上に，安全性が確認されていない薬剤や魚体内における残留期間が明らかにされていない薬が養殖業者自身の判断で使用されている現状からすると，早急に治療薬を開発する必要があると考えられる。

ヒラメのエドワジエラ症と同じく *E. tarda* を原因菌とするウナギのパラコ口病にはオキシソリン酸やOTCを始めいくつかの抗菌剤が治療薬として承認されている。³⁾スルファモノメキシン・オルメトプリム (SMM - OMP) 合剤はその一つであり，臨床試験において優れた治療効果が認められている。⁴⁾SMMおよびOMPはいずれも葉酸の合成阻害剤であるが，それぞれ作用点が異なり，合剤とすることで相乗的な抗菌作用を示す。⁵⁾本研究では人為感染したヒラメを用いてエドワジエラ症に対するSMM - OMP合剤の治療効果を調べた。

材料および方法

供試菌株

1986年に長崎県下の養殖場においてヒラメの腸から分離された *E. tarda* NUF251 を攻撃用菌株として用いた。また，1983年から1992年の間に西日本各地の養殖場のヒラメから分離された，NUF251を含む *E. tarda* 54株を薬剤感受性試験に用いた (Table 1)。

Table1. Minimum inhibitory concentration (MIC) of sulfamonomethoxine (SMM), ormetoprim (OMP), a 3:1 combination of SMM and OMP (SMM-OMP), and oxytetracycline (OTC) against *Edwardsiella tarda* strains isolated from Japanese flounder

Strain	Year	Location	MIC (μ g/ml)			
			SMM	OMP	SMM-OMP	OTC
NUF28	1983	Nagasaki pref.	6.25	25	3.13	0.2
NUF37	1983	Nagasaki pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF82	1984	Nagasaki pref.	6.25	50	3.13	0.39
NUF83	1984	Nagasaki pref.	6.25	50	3.13	0.39
NUF84	1984	Nagasaki pref.	6.25	50	3.13	0.39
NUF85	1984	Nagasaki pref.	6.25	50	3.13	0.39
NUF119	1985	Nagasaki pref.	6.25	12.5	1.56	0.39
NUF134	1985	Nagasaki pref.	6.25	12.5	1.56	0.39
NUF135	1985	Nagasaki pref.	6.25	12.5	3.13	0.39
NUF175	1985	Nagasaki pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF176	1985	Nagasaki pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF177	1985	Nagasaki pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF178	1985	Nagasaki pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF179	1985	Nagasaki pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF245	1985	Nagasaki pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF246	1985	Nagasaki pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF247	1985	Nagasaki pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF250	1986	Nagasaki pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF251	1986	Nagasaki pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF252	1986	Nagasaki pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF284	1986	Nagasaki pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF334	1987	Nagasaki pref.	6.25	50	6.25	0.39
NUF335	1987	Nagasaki pref.	6.25	50	3.13	0.39
NUF336	1987	Nagasaki pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF337	1987	Nagasaki pref.	6.25	25	1.56	0.39
NUF444	1987	Nagasaki pref.	6.25	25	1.56	0.39
NUF445	1989	Saga pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF446	1989	Saga pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF447	1989	Saga pref.	6.25	50	3.13	0.39
NUF448	1989	Saga pref.	>100	25	12.5	100
NUF502	1991	Nagasaki pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF511	1991	Nagasaki pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF521	1991	Nagasaki pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF566	1991	Ehime pref.	6.25	50	3.13	0.39
NUF568	1991	Ehime pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF569	1991	Ehime pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF570	1991	Ehime pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF571	1991	Ehime pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF586	1989	Kagoshima pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF587	1989	Kagoshima pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF588	1989	Kagoshima pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF589	1989	Kagoshima pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF590	1990	Kagoshima pref.	6.25	12.5	1.56	0.39
NUF602	1991	Oita pref.	6.25	50	3.13	0.39
NUF603	1991	Oita pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF604	1991	Oita pref.	>100	>100	>100	>100
NUF605	1991	Oita pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF606	1992	Oita pref.	6.25	50	3.13	0.39
NUF620	1992	Kumamoto pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF626	1992	Kumamoto pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF628	1992	Nagasaki pref.	6.25	12.5	1.56	0.39
NUF634	1992	Kumamoto pref.	6.25	25	3.13	0.39
NUF638	1992	Fukuoka pref.	6.25	50	3.13	0.39
NUF640	1992	Kumamoto pref.	6.25	50	3.13	0.39

供試薬剤

SMM - OMP合剤は、100g中SMMを30gおよびOMPを10g含む成剤である水産用エクトシン（第一製薬）を用いた。対照薬として、レンサ球菌症の治療薬としてヒラメへの使用が認められているOTC（Sigma）を用いた。

薬剤感受性試験

供試菌株に対する各種抗菌剤の最小発育阻止濃度（MIC）を日本化学療法学会の標準法⁶⁾に準じて測定した。基礎培地には0.5%食塩加Nutrient Agar（Difco）を用い、抗菌剤添加培地に被検菌を接種して25℃で24時間培養後にMICを測定した。

治療試験

実験1： *E. tarda* NUF251を普通ブイヨン（ポリペプトン1%、酵母エキス0.5%、食塩0.5%、pH7.2）で25℃、40時間振とう培養した。試験区ごとに1個ずつの200 L円形水槽を用意し、体重 25.8 ± 4.8 （平均 \pm 標準偏差）gのヒラメをそれぞれ10尾ずつ収容した。供試魚を収容した水槽の海水を10Lに減少させ、遠心分離で集めた培養菌を海水1mlあたり約 10^8 colony forming unit（CFU）となるよう添加し、供試魚を15分間浸漬して攻撃した。攻撃翌日から7日間、MS222で麻酔した供試魚の胃内にゾンデを用いて各濃度の薬剤添加飼料を投与した。薬剤添加飼料としては、粉末にしたヒラメ用配合飼料（ヒガシマル）と薬剤を混合し、水を加えて流動状にしたものを用いた。SMM - OMP合剤の投薬量は、魚体重1kgあたり25, 50, 100, 200および400mg/dayとした。無投薬対照区には薬剤無添加飼料を胃内投与した。実験中の水温は26.8~29.4℃であった。

実験2： 攻撃および投薬は実験1と同様に行った。ただし、供試尾数を各試験区20尾とし、SMM - OMP合剤の投薬量を魚体重1kgあたり12.5, 25および50mg/dayとし、投薬期間を攻撃翌日から5日間とした。また、OTC投薬区（50mg/day）を設けた。供試魚の体重は 38.4 ± 7.2 g、水温は17.0~22.3℃であった。

攻撃後に死亡したヒラメから普通寒天を用いて攻撃菌の再分離を行った。また、実験1では攻撃後17日、実験2では28日目で実験を終了し、生残魚からの細菌分離を行い、*E. tarda*の保菌の有無を調べた。

結果

薬剤感受性試験

供試 *E. tarda* 菌株の薬剤感受性試験の結果をTable 1に示した。使用した54株のうち、NUF448はSMMおよびOTCに対して、NUF604はSMM, OMP, SMM - OMP合剤およびOTCに対して耐性であった。その他の菌株に対するSMM, OMP, SMM - OMP合剤およびOTCのMICはそれぞれ6.25 μ g/ml, 12.5~50 μ g/ml, 1.56~6.25 μ g/mlおよび0.2~0.39 μ g/mlを示し、SMMおよびOMPのMICと比べて合剤のMICは低く、両薬剤の相乗的な抗菌作用が認められた。治療試験に用いたNUF251はいずれの薬剤に対しても感受性であった。

治療試験

実験1： *E. tarda*を人為感染させたヒラメのSMM - OMP合剤投与後の死亡経過をFig. 1に示した。無投薬対照区では攻撃後3日目から死に始め、6日目までにすべて死亡した。投薬区では対照区と異なる死亡経過を示し、400mg/kg区が12日目、200mg/kg区が13日目、100mg/kg区が12日目、50mg/kg区が9日目、25mg/kg区が16日目から死に始め、実験終了時の生残率は、それぞれ、40%、70%、70%、80%、90%となった。なお、対照区ではすべての死亡魚から *E. tarda* が再分離されたのに対し、400, 200, 100mg/kg区のすべての死亡魚および50mg/kg区の死亡魚のうち1尾からは分離されず、それらにはエドワジエラ症の症状も認められなかった。生残魚のうち100mg/kg

以上の投与試験区の多くに有眼側体表の潰瘍や発赤および鰓の褪色がみられたが、細菌分離の結果、細菌の発育は認められなかった (Table 2)。

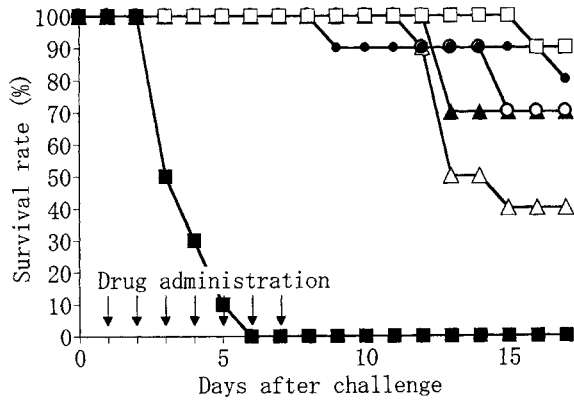


Fig. 1. Therapeutic effect of SMM-OMP at doses of 400 (), 200 (), 100 (), 50 (), 25 () and 0 (control;) mg/kg/day against artificial infection of *E. tarda* NUF251 (Experiment 1). The drug was orally administrated for 7 days from the following day of immersion challenge. The water temperature during the experiment ranged from 26.8 to 29.4 .

Table 2. Reisolation of *E. tarda* from dead and survived fish (Experiment 1)

Dose	n ^{*1}	Dead fish ^{*2}	Survived fish ^{*3}
25 mg/kg	10	1/1	2/9
50 mg/kg	10	1/2	3/8
100 mg/kg	10	0/3	0/7
200 mg/kg	10	0/3	0/7
400 mg/kg	10	0/6	0/4
Control	10	10/10	—

^{*1}No. of fish used, ^{*2}No. of fish positive in reisolation/no. of dead fish, ^{*3}No. of fish positive in reisolation/no. of survived fish.

実験2: *E. tarda*を人為感染させたヒラメのSMM - OMP合剤およびOTC投与後の死亡経過をFig. 2に示した。対照区では攻撃後3日目から死に始め、17日目までにすべて死亡した。実験1と比べて死亡速度は緩やかであった。OTC投薬区も対照区に類似した死亡経過を示し、24日目までにすべて死亡した。SMM - OMP合剤投薬区では50mg/kg区が6日目、25mg/kg区が2日目、12.5mg/kg区が7日目にそれぞれ1尾死亡したが、その後は、50mg/kg区で24日目に降若干死亡が増加したほかはほとんど死亡しなかった。実験終了時の生残率は、それぞれ80%、95%、90%であった。死亡魚にはエドワジエラ症特有の肉眼的症状がみられ、すべての死亡魚から*E. tarda*が再分離された。また、生残魚からも*E. tarda*が高率に分離された (Table 3)。

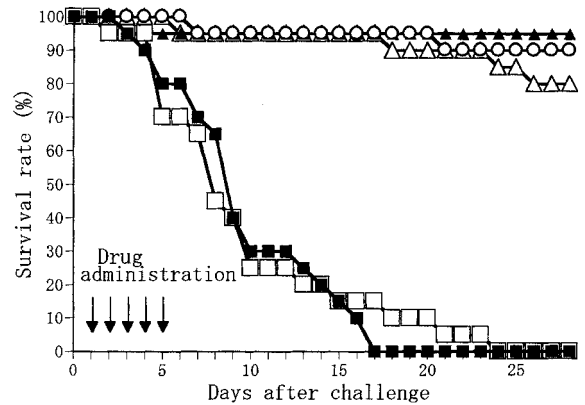


Fig. 2. Therapeutic effect of SMM-OMP at doses of 50 (), 25 (), 12.5 () and 0 (control;) mg/kg/day and OTC at a dose of 50 () mg/kg/day against artificial infection of *E. tarda* NUF251 (Experiment 2). The drug was orally administrated for 5 days from the following day of immersion challenge. The water temperature during the experiment ranged from 17.0 to 22.3 .

Table 3. Reisolation of *E. tarda* from dead and survived fish (Experiment 2)

Dose	n ^{*1}	Dead fish ^{*2}	Survived fish ^{*3}
SMM-OMP			
12.5 mg/kg	20	2/2	6/18
25 mg/kg	20	1/1	10/19
50 mg/kg	20	4/4	13/16
OTC			
50 mg/kg	20	20/20	—
Control	20	20/20	—

^{*1}No. of fish used, ^{*2}No. of fish positive in reisolation/no. of dead fish, ^{*3}No. of fish positive in reisolation/no. of survived fish.

考 察

田中⁷⁾は静岡県下のウナギ養殖場で1989年に分離されたパラコ口由来の*E. tarda* 52株の薬剤感受性を調べ、SMMに対して54%、SMM - OMPに対して18%、OTCに対して12%が耐性であったと述べている。本研究でヒラメ由来*E. tarda* 54株について調べた結果では、SMMに対して2株 (3.7%)、SMM - OMPに対して1株 (1.9%)、OTCに対して2株 (3.7%)が耐性であり、ウナギ由来株に比べて耐性菌の出現率がかなり低かった。その理由としては、ヒラメのエドワジエラ症には使用できる治療薬がなく本研究で調べた薬剤があまり使用されていないこと、ウナギに比べてヒラメ養殖の歴史が浅いこと、などが考えられる。なお、Table 1にあるように今

回見つかった耐性菌は多剤耐性であり、ヒラメ養殖場で発生したというよりは、むしろ陸上で耐性化したものがヒラメ養殖場に侵入したのではないと思われる。

本研究では、人為感染魚を用いた治療試験において、最低の投薬量である12.5mg/kg/dayの5日間連続投与でもSMM - OMP合剤の優れた治療効果が認められた。サルファ剤耐性菌を人為感染させたウナギを用いた実験においても25 mg/kg/day、5日間投与での有効性が報告されている。⁸⁾なお、パラコ口病が流行している養鰻場での臨床試験においては、50 mg/kg/day、7日間投与で顕著な死亡率の減少が認められている。⁴⁾ヒラメに対してもSMM - OMP合剤は有効であり、治療薬としての実用化が期待される。

しかし、実験1では100mg/kg以上の投薬区で投薬終了6日目からエドワジエラ症とは異なる症状を呈して死亡する魚がみられた。死亡魚から*E. tarda*は分離されず、投薬量が多い試験区ほど死亡数が多かったことから、薬の副作用の可能性が考えられる。ウナギの治療試験では200mg/kg/day、5日間投与でも異常が現れたとは述べられていない。⁸⁾ウナギに比べてヒラメの方が本薬剤の毒性に対して感受性が高い、消化管からの吸収率が高い、あるいは魚体内での残留時間が長いことが可能性として考えられ、開発に際しては安全性および吸収と排泄に関して十分に検討する必要がある。また、実験2の終了時には生残魚の多くが*E. tarda*を保菌していた。このように、SMM - OMP合剤には優れた治療効果があるものの、病原菌は魚体内から完全に排除されておらず、流行が再燃する可能性があることも念頭においておく必要がある。

薬剤感受性試験で攻撃菌株に対して比較的低いMIC値を示したOTCに治療効果は全く認められなかった。水野⁹⁾は自然感染魚群についてOTCを添加した飼料を与えて治療試験を行い、高水温期(25以上)や死亡率が高い時に投薬しても治

療効果があまり期待できないと述べている。今回の実験では水温はさほど高くなかった。また、対照区では最終的にかなり高い死亡率になったが、死亡し始める前から投薬しているので自然感染魚群を用いた治療試験とは異なる。自然感染と人為感染の違いもあるが、今回の実験では投薬期間中毎日取り上げたことがストレスとなってヒラメの生体防御能を低下させ、治療効果に影響したとも考えられる。

文 献

- 1) 中津川俊雄：ヒラメ病魚から分離された*Edwardsiella tarda*. 魚病研究, 18, 99-101 (1983).
- 2) Miyazaki, T. and Kaige, N.: Comparative histopathology of edwardsiellosis in fishes. *Fish Pathol.*, 20, 219-227 (1985).
- 3) 水産庁：水産用医薬品の使用について、第15報. 水産庁、東京、2001、17p.
- 4) 田中 真：DG - 5459のウナギパラコ口病における臨床試験．昭和60年度静岡県水産試験場事業報告, 258 - 262 (1986).
- 5) 横田 健：新しい抗生物質の使い方. ライフ・サイエンス、東京、1983、153p.
- 6) 日本化学療法学会：最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改訂について. *Chemotherapy*, 29, 76-89 (1981).
- 7) 田中 真：ウナギパラコ口病原菌の薬剤感受性．平成元年度静岡県水産試験場事業報告, 268 (1990).
- 8) Aoki, T., Kitao, T., and Fukudome, M.: Chemotherapy against infection with multiple drug resistant strains of *Edwardsiella tarda* in cultured eels. *Fish Pathol.*, 24, 161-168 (1989).
- 9) 水野芳嗣：現場における養殖ヒラメの疾病対策．韓国魚病学会誌, 6, 219-231 (1993).