

平成 25 年 3 月 13 日

財団法人富山第一銀行奨学財団
理事長 金岡 純二 殿

助成研究成果概要報告書

教育機関名 : 国立大学法人 富山大学	助成金額:	900 千円
研究代表者: 安川 洋生	所属: 大学院理工学研究部	職位: 准教授
研究題目: 富山県におけるアユ冷水病菌の分布状況と抗菌剤耐性の解析		

【研究概要】

冷水病菌（フラボバクテリウム サイクロフィラム）はアユやニジマス等に感染する致死性の病原体であり、1980 年代に北米から侵入したと考えられている。現在では富山県を含む国内の多くの河川等から検出されており、養殖魚の感染予防と漁業事業振興の観点から、本病原体の棲息状況や抗菌剤耐性度の把握が急務である。

そこで本研究の代表者らは、富山県内の河川水を採水し、その中に含まれる細菌を分離、培養し、冷水病菌及びその近縁種がどの程度検出されるか解析した。また、検出された菌種について電子顕微鏡による形態観察と分子生物学的手法による遺伝子解析を行うとともに、様々な抗菌剤の感受性（耐性度）を解析した。

【成果要約】

本研究実施期間のうち春と夏の河川水採水にて 15 株のフラボバクテリウム属細菌を分離した。微生物学的所見、及び遺伝子解析の結果、これらはすべて冷水病菌の近縁種であることが分かった。これらの菌株はカナマイシンに耐性を示し、うち 1 株は試験中に耐性度の上昇がみとめられた。この株は同時に複数の抗菌剤に対しても耐性度が上昇し、抗菌剤に対して耐性を獲得しやすい性質を有していると判断された。この株の病原性については未確認であるが、養魚場での抗菌剤使用には十分な注意が必要であると思われる。

本研究の過程で、培養法では冷水病菌の検出が困難であると思われたため、本菌種特異的な遺伝子を増幅することによるリアルタイム高感度検出法を検討した。その結果、別種の菌が多数混入した条件でも 1 菌体の冷水病菌が存在すれば検出可能な鋭敏な検出系を開発することができた。今後、この検出系を用いて、富山県内の河川水中に冷水病菌がどの程度棲息しているのか解析することが可能となると思われる。

本研究成果の一部は第 47 回日本水環境学会(平成 25 年 3 月)にて報告した。
学会発表ポスターを別紙 1 に示す(謝辞は別葉として学会会場のポスター横に掲
示)。

Flavobacterium属河川分離株の抗菌薬感受性の解析

Antibiotic resistance of *Flavobacterium* strains isolated from rivers in Toyama prefecture

○羽根田ゆかり、佐藤彩、今野法子、田中大祐、中村省吾、安川洋生
富山大・院・理工



研究背景

Flavobacterium属細菌
グラム陰性桿菌であり、冷水病の原因菌でもある*F. psychrophilum*や、細菌性鰓病を引き起こす*F. branchiophilum*が含まれる。河川環境中の生態系を構成する生物種であると考えられるが、分布状況や抗菌薬感受性等について必ずしも詳細に調べられてはいない。

富山県内の河川における
*Flavobacterium*属細菌について詳細を調べた。

菌種の把握 抗菌薬感受性の把握

菌種の同定

菌株名	採取地点	採取日	最近親種	Accession No.
FTP1	氷見市万尾川	2010.7.20	<i>Flavobacterium</i> sp. WG2	FN547416
FTP2	氷見市中谷内川	2012.1.17	<i>Flavobacterium</i> sp. CI.1.100	AM934694
FTP3	氷見市万尾川	2012.4.25	<i>Flavobacterium</i> sp. JD6	IF922309
FTP4	氷見市万尾川	2012.4.25	<i>Flavobacterium</i> sp. OI2	HQ836451
FTP5	氷見市万尾川	2012.4.25	<i>Flavobacterium</i> sp. TP-Snow-C24	HQ327133
FTP6	氷見市万尾川	2012.4.25	<i>Flavobacterium</i> sp. TP-Snow-C24	HQ327133
FTP7	氷見市中谷内川	2012.4.25	<i>Flavobacterium</i> sp. ARSA-108	GU295968
FTP8	氷見市中谷内川	2012.4.25	<i>Flavobacterium</i> sp. WB2.3-63	AM934649
FTP9	氷見市中谷内川	2012.4.25	<i>Flavobacterium</i> sp. TP-Snow-C24	HQ327133
FTP10	氷見市中谷内川	2012.4.25	<i>Flavobacterium</i> sp. ARSA-15	GU295972
FTP11	氷見市万尾川	2012.7.17	<i>Flavobacterium</i> sp. HME7818	JN622006
FTP12	氷見市万尾川	2012.7.17	<i>Flavobacterium terrigena</i>	DQ889724
FTP13	氷見市万尾川	2012.7.17	<i>Flavobacterium</i> sp. SF 2	JQ390510
FTP14	氷見市万尾川	2012.7.17	<i>Flavobacterium</i> sp. SF 2	JQ390510
FTP15	氷見市中谷内川	2012.7.17	<i>Flavobacterium</i> sp. THWCSN34	AM888191
FTP16	氷見市中谷内川	2012.7.17	<i>Flavobacterium</i> sp. WG2	FN547416

16S rDNA塩基配列を基に菌種を同定
16株の*Flavobacterium*属細菌を得た。

PCRによる冷水病菌の判定

使用プライマー
Name Sequence (5'-3')
FPS-BF 5'-CTTCGATGGTTCCTGCTGC
FPS-BR 5'-ATTGCTGCACGGGAATT
※*ppiC*: peptidyl prolyl cis-trans isomerase C

電気泳動結果
*Flavobacterium*属河川分離株

M: 100 bp DNA ladder (Dye plus) NT: no template C: *F. psychrophilum*
冷水病菌は検出されなかった。

形態観察

Flavobacterium属細菌の形態観察結果

全株桿菌であり、多くは*F. psychrophilum*より明らかに短い形態であった。

抗菌薬感受性試験

使用抗菌薬

薬剤群	抗菌薬名	略語
テトラサイクリン系	Oxytetracycline	OTC
アミノグリコシド系	Streptomycin	SM
	Kanamycin	KM
キノロン系	Nalidixic acid	NA
β-ラクタム系	Ampicillin	ABPC
クロラムフェニコール系	Chloramphenicol	CP
リファマイシン系	Rifampicin	RFP

抗菌薬感受性試験結果

菌株名	MIC (μg/ml)						
	OTC	SM	KM	NA	ABPC	CP	RFP
FTP1	<1	<1	16	8	4	4	<1
FTP2	<1	8	128	4	16	8	<1
FTP3	<1	<1	16	2	<1	4	<1
FTP4	<1	<1	8	32	<1	<1	<1
FTP5	<1	8	128	8	<1	4	<1
FTP6	<1	8	128	8	<1	4	<1
FTP7	<1	4	128	8	<1	4	<1
FTP8	<1	4	64	8	<1	4	<1
FTP9	<1	8	128	8	<1	4	<1
FTP10	<1	<1	32	4	<1	4	<1
FTP11	<1	32	128	16	<1	8	<1
FTP12	<1	<1	32	2	<1	4	<1
FTP13	<1	16	128	4	<1	4	<1
FTP14	<1	32	>128	16	<1	8	<1
FTP15							
FTP16	<1	16	>128	<1	<1	4	<1

ほとんどの株がKMに対して耐性を示した。

試験期間中、FTP2において、
抗菌薬濃度の高い培地でコロニー形成が見られた。

コロニーの形成例

CP濃度 (μg/ml)	菌株名	抗菌薬濃度 (μg/ml)
0:1	FTP2KM1	KM 128
1:1	FTP2NA1	NA 8
2:1	FTP2ABPC1	ABPC 32
4:1	FTP2CP1	CP 4

FTP2由来株のコロニーが形成された抗菌薬濃度

これらのコロニーを同濃度のプレートで培養したところ、コロニーではなく安定して全体に生育することが分かった。

耐性度允進試験

抗菌薬感受性試験結果

菌株名	MIC (μg/ml)						
	OTC	SM	KM	NA	ABPC	CP	RFP
FTP2	<1	8	128	4	16	8	<1
FTP2KM1			>256				
FTP2NA1	<1	64	>128	32	4	16	2
FTP2ABPC1	<1	32	>128	<1	32	8	<1
FTP2CP1	<1	64	>128	4	4	32	2

複数の抗菌薬に対して同時に耐性度の允進が見られた。

耐性允進株の形態観察結果

FTP2ABPC1について、菌体の伸長と膨張が見られた。

まとめ
富山県内河川から採水し、培養、同定を行い、様々な*Flavobacterium*属細菌が得られた。これらの多くは、KMに対して耐性を示した。また、1株について、抗菌薬耐性度の允進がみられた。これは、耐性獲得機構の解析を行うモデル系となるかもしれない。

(別添資料)

研究成果 発表状況	【雑誌論文, 学会発表, 図書, 新聞掲載, 研究に関連して作成した Web ページ, 産業財産権 (特許権等) の出願・取得状況について記入】 学会発表 1 件 「 <i>Flavobacterium</i> 属河川分離株の抗菌薬感受性の解析」 羽根田ゆかり、佐藤彩、今野法子、田中大祐、中村省吾、安川洋生 第 47 回日本水環境学会 平成 25 年 3 月 11~13 日		
経費の 執行状況	区分	執行額 (円)	備考
	培地用試薬	97508	
	抗菌剤感受性試験試薬	20793	
	DNA 解析用試薬	400388	
	電子顕微鏡用導電試薬	200224	
	合成 DNA	110853	
	プラスチック実験器具	46,156	
	ガラス実験器具	24078	
	計	900000	