

37) リファンピシンの冷水病菌に対する抗菌作用について

金辻宏明

【目的】 *Flavobacterium psychrophilum* を原因菌とするアユ冷水病は近年非常に問題となっており、早急に対策を講じる必要がある。その手段としては抗菌剤の投薬治療が非常に簡便である。そこで本研究では冷水病をほぼ完全に除菌できる抗菌剤を検索・開発する一環として、水溶性で消化管からの吸収がよく、経口投与が可能と推察されるリファンピシン(RP)およびリファマイシンSV(RM)の冷水病菌に対する抗菌性について検討した。

【方法】 供試菌には*F. psychrophilum* SG990302株を用いた。培養は供試菌を改変サイトファーガ寒天培地(MCYA)を用いて4°Cで継代したものを50mlの改変サイトファーガ液体培地(MCY)に接種して15°Cで振盪しながら24h行った。抗菌作用は供試薬剤としてRP【Sigma R-3501】、RM【Sigma R-8626】、フロルフェニコール【FF, 武田薬品：アクアフェン®L】およびスルフィソゾールナトリウム【SIZ, 武田薬品：イスラン®ソーダ】を用いて調べた。RPおよびRMは25mg/mlになるようにメタノールに溶解後、MCY10mlに0.05、0.1、0.5、1、5および10 μ g/mlになるように無菌的に加えて調製した。FFおよびSIZはMCYに溶解して濾過滅菌後、MCY10mlに0.05、0.1、0.5、1、5および10 μ g/mlになるように無菌的に加えて調製した。抗菌性は次のようにして調べた。MCYで100倍希釈した供試菌液100 μ lと供試薬剤液10mlとを混合し、1、5、10、20、30、60、120および240min後に混合液100 μ lをサンプリングしてMCYで100倍希釈し、希釈液20 μ lをMCYA上に滴下した。その後、15°Cで培養してコロニー形成の有無を観察して抗菌性を判断し、その効果をコロニーがシート状(◎)、10個以上のコロニーを形成(○)、1~10個のコロニーを形成(△)およびコロニー形成なし(-)の4段階に区分した。次に、4種類の抗菌剤の最小阻止濃度(MIC)をマイクロタイター法で調べた。開始濃度を500ng/mlとしてタイタープレートに2倍段階希釈系列を100 μ l/wellの量で作製し、MCYで10,000倍希釈した供試菌液5 μ lを加え、15°Cで4dayの間培養して判定した。

【結果】 短時間条件下でのRPおよびRMの抗菌作用を調べた結果は表1に、FFおよびSIZの結果を表2に示した。すなわち、RPは1 μ g/mlでは1min以内に、0.1 μ g/mlでも10min以内にすべての冷水病菌を除菌した。同様に、RMは0.5 μ g/ml以下では240min以内に完全な除菌は認められなかったが、1 μ g/mlで30min以内に、5 μ g/mlで20min以内の除菌が認められた。一方、FFでは5 μ g/mlで240min以内に除菌され、SFでは100 μ g/mlで240minでは完全な除菌はできず、RPNと比較して非常に効果は低かった。次に、MICを調べた結果を表3に示した。RP、RM、FFおよびSFのMICはそれぞれ0.016、0.016、12.5および0.78 μ g/mlと測定され、表1、2と同様にRP、RMの効果はFFおよびSFより高い傾向を示した。

ゆえに冷水病菌に対するRPとRMの抗菌性は現在使用されているFFおよびSIより非常に高いため、RPおよびRMの欠点である耐性菌の早期出現がなければFFやSIZに加えて新たな抗菌剤として承認申請できる可能性がある。なお、耐性菌の出現は次報で言及している。

【注意】 RP、RMは人間用医薬品であり、水産用途には薬事法に基づく承認が必要であり、FFは水産用医薬品であるがアユの冷水病治療薬ではないため、治療目的で使用することはできない。

表1 リファンピシンおよびリファマイシンSVの冷水病菌に対する抗菌作用

暴露時間	リファンピシン($\mu\text{g/ml}$)						リファマイシンSV($\mu\text{g/ml}$)					
	0.05	0.1	0.5	1	5	10	0.05	0.1	0.5	1	5	10
1min	△	△	△	—	—	—	△	△	△	△	—	—
5min	△	△	—	—	—	—	△	△	△	△	△	—
10min	—	—	—	—	—	—	△	△	△	△	△	—
20min	—	—	—	—	—	—	△	△	△	△	—	—
30min	△	—	—	—	—	—	△	△	△	—	—	—
60min	—	—	—	—	—	—	△	△	—	—	—	—
120min	—	—	—	—	—	—	△	△	△	—	—	—
240min	—	—	—	—	—	—	△	△	△	—	—	—

◎:コロニーがシート状(20個以上のコロニー), ○:10個以上のコロニー, △:1~10個のコロニー, —:コロニーなし.

表2 フロルフェニコールおよびスルフィゾールの冷水病菌に対する抗菌作用

暴露時間	フロルフェニコール($\mu\text{g/ml}$)								スルフィゾール($\mu\text{g/ml}$)							
	0.05	0.1	0.5	1	5	10	100	0.05	0.1	0.5	1	5	10	100		
1min	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎		
5min	◎	◎	◎	◎	◎	◎	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎		
10min	◎	◎	◎	◎	◎	○	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎		
20min	◎	◎	◎	◎	◎	○	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎		
30min	◎	◎	◎	◎	◎	○	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎		
60min	◎	◎	◎	◎	◎	○	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎		
120min	◎	◎	◎	○	△	△	△	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎		
240min	◎	◎	◎	○	—	—	—	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎		

◎:コロニーがシート状(20個以上のコロニー), ○:10個以上のコロニー, △:1~10個のコロニー, —:コロニーなし.

表3 リファンピシン、リファマイシンSV、フロルフェニコール、スルフィゾールに対する
Flavobacterium psychrophilum SG990302株のMIC

	抗菌剤名			
	リファンピシン	リファマイシンSV	フロルフェニコール	スルフィゾール
MIC (ng/ml)	15.6	15.6	12,500	780

※ マイクロタイター法