

38) リファンピシンに耐性の冷水病菌が出現する可能性と耐性の長期維持について

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。その手段として抗菌剤の投薬治療が非常に簡便であるため、有効剤を検索したところ、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(RM)にその有効性があることを見いだした。しかし、本剤の使用によって他菌では簡単に耐性菌が出現することが知られている。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、RPおよびRMに対する耐性菌の出現の可能性とその維持・継続の時間について検討した。

【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。供試菌の耐性化はリファンピシンRP【Sigma R-3501】で20ng/mlに耐性のものを選択し、順次濃度を上昇させ、200 μg/mlのRP濃度で生育するようにして行い、耐性を示す8菌株を供試耐性菌(R-200株)とした。また、RPの耐性濃度が200 μg/mlになる最短時間を調べた。なお、供試耐性菌の継代を200 μg/mlのRPを含むMCYAで1weekに1回または10mlのMCYで毎日行い、MCYで継代している8菌株を耐性消失誘導株(RD-200株)として以後の実験に用いた。つぎに、供試耐性株と耐性消失誘導株のRP、RM【Sigma R-8626】に対する最小阻止濃度(MIC)をおよそ1week間隔で8weekの間の経時的変化についてマイクロタイター法で測定した。すなわち、開始濃度を500ng/mlとして2倍段階希釈系列を100 μl/wellで作製し、MCYで10,000倍希釈した供試耐性菌および耐性消失誘導菌液5 μlを加え、15°Cで4dayの間培養して判定した。

【結果】 冷水病菌のRPに対する耐性化にかかる最短日数を調べた結果は図1に示すとおりで、24h間隔で20、50、10,000ng/mlとRP濃度を上昇させると耐性菌が出現し、この菌を分離培養してさらに24h間隔で50 μg/ml、200 μg/mlのRPを含むMCYに継代培養すると目的の濃度に耐性を示した。分離培養の時間を除くと耐性化日数はほぼ5日間と測定された。また、RR-200株のMICは表1に示すように2.5mg/mlと通常の12,800,000倍の濃度に耐性を示した。つぎに、耐性化菌のMICの変化について調べた結果を図1に示した。すなわち、耐性菌のRPに対する1、2日後のMICは2.5mg/ml(表1)でその後100日間は115~370 μg/mlで推移した。RMでは105~286 μg/mlで推移し、耐性の脱落は認められなかった。

以上のことから、冷水病菌のRPに対する抗菌作用はFFやSFと比較して非常に高いが、耐性菌は非常に早い段階で出現し、さらに一度獲得した耐性は容易には脱落しないことが明らかとなり、有効性の面で期待されるRPは耐性菌の出現の点で現場での使用には明らかに不向きであると判断された。

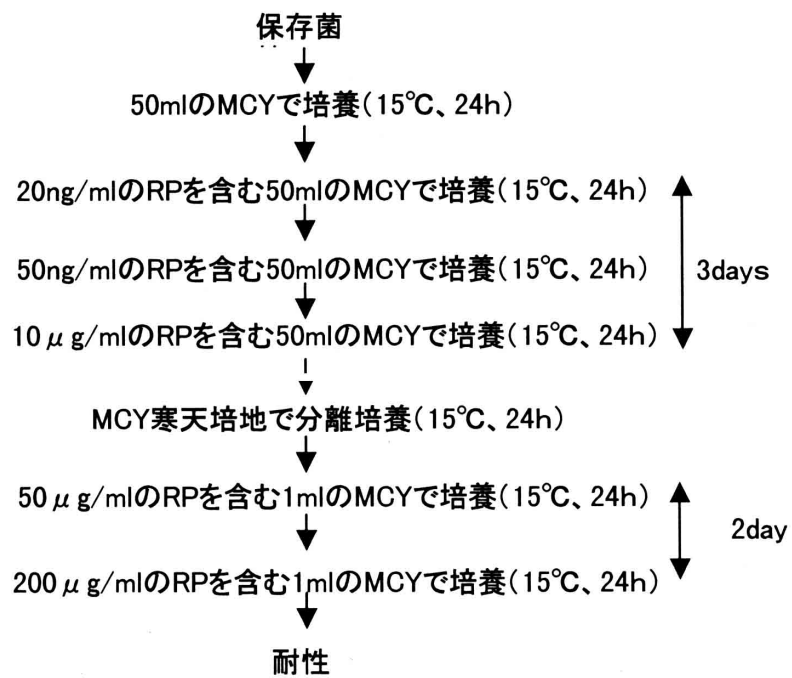


図1. 冷水病菌の最短時間でのリファンピシンの耐性化におけるタイムスケジュール.

表1 リファンピシン(RP)耐性および非耐性冷水病菌株のRPおよびリファマイシンSVに対するMIC

	MIC(ng/ml)	
	リファンピシン	リファマイシンSV
継代耐性株	>2500000	>2500000
通常株	15.6	15.6

※ マイクロタイター法で測定

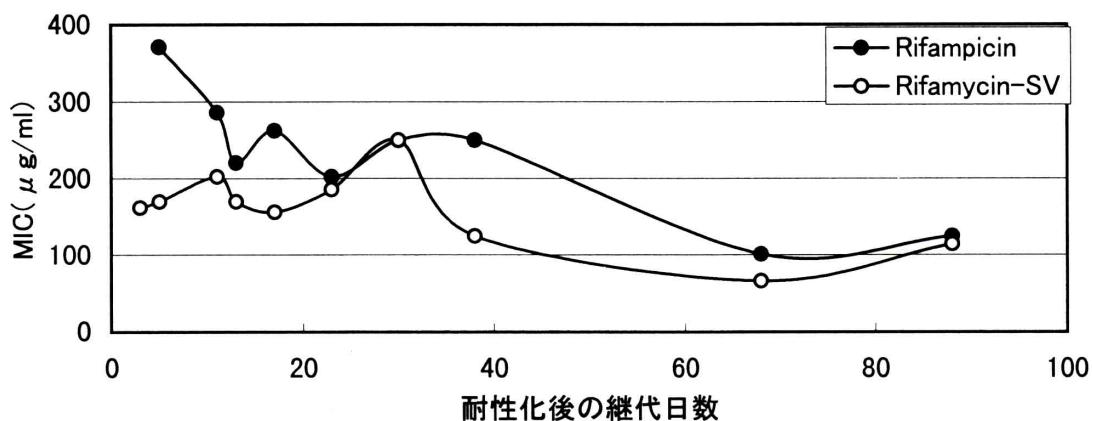


図2 リファンピシン、リファマイシンSVに耐性の冷水病菌における耐性の変化