

# ディスク法による薬剤感受性試験に及ぼす 測定用培地の種類、接種菌液の調整法及び 接種方法の比較検討\*

照 屋 忠 敬

## I 目的及び内容

魚介類養殖業が増々盛になるにしたがって、疾病も多発するようになってきた。それに伴い、水産用医薬品の適切な選択及び使用法の迅速的判断が要求される。

水産用医薬品の使用に当っては、数種の薬剤の感受性を測定する必要がある。感受性測定法は、寒天平板希釈法とディスク法に大別できる。一般的な感受性測定法としては寒天平板希釈法である。しかし現場では、迅速さ及び簡便さにおいてディスク法の方が利用度が高いと思われる。

今回、ディスク法における供試薬剤と測定用培地による感受性の差異の有無について比較検討を行い、現場的対応の一助とするための試験を行った。

試験は代表的な魚病細菌を供試し、予め寒天平板希釈法でMICを測定した後、各菌種から数種を選び出し、ディスク法によって測定した。結果は、*V. anguillarum*、*E. tarda*、*A. hydrophila*のディスク試験用培地としては「感受性ディスク用培地“栄研”」、「感受性用培地“ニッスイ”」が良かった。*Streptococcus* sp.についてはトッド・ヘビット寒天培地、プレイン・ハート・インフュージョン寒天培地が良かった。又、海産由来の*V. anguillarum*に対しては、1～2% NaClを培地に添加した方が阻止円の形状が明瞭であった。

御指導をいただいた宮崎大学農学部北尾忠利教授に御礼申し上げます。

## II 使用菌株の寒天平板希釈法によるMICの測定

### 1. 方 法

#### (1) 使用菌株

宮崎大学農学部水産衛生学教室に保存中の魚病由来菌*Vibrio anguillarum*、*Streptococcus* sp.、*Edwardsiella tarda*、*Aeromonas hydrophila*を用いた。使用菌株の由来は表-1～5に示した。

#### 2) 使用薬剤

使用菌株によって表6に示すような薬剤を使用した。

#### 3) MICの測定

日本化学療法学会(1981)で定められた方法に準じて行った。

感受性測定用培地はミュラー・ヒントン寒天培地 Diffco (MHAと略す)を用いた。

\* 昭和57年度日本水産資源保護協会魚病研修B<sub>1</sub>コース報告の一部

表-1 V. anguillarum (K.S. type) の分離由来

No.	スタム	No.	分離場所	分離年月日	魚種	分離部位
1	YMS	8201	山口県久津	82. 7. 12	モジャコ	腎臓
2	"	8202	" "	"	"	"
3	"	8203	" "	"	"	"
4	"	8204	" "	"	"	"
5	"	8205	" "	"	"	"
6	KMS	8201	熊本県牛深町	82. 5. 30	ハマチ	
7	"	8202	熊本県			
8	"	8203	"			
9	"	8204	"			
10	MZK	8201	宮崎県串間	82.	ハマチ	
11	"	8202	" "	"	"	
12	"	8203	宮崎県	"	カンパチ	
13	OTK	8201	大分県津久見	82. 6. 21	モジャコ	腎臓
14	"	8202	" 水試	"	"	"

表-2 V. anguillarum (A. type) の分離由来

No.	スタム	No.	分離場所	月	日	魚種
1	PT	82031	徳島県徳島	82.	2. 23	アユ
2	"	82032	" "		3. 5	"
3	"	82038	" 阿南		3. 31	"
4	"	82042	" "		5. 17	"
5	"	82043	" "		5. 26	"
6	"	82044	" 徳島		6. 15	"
7	"	82045	" 羽の浦		6. 21	"
8	"	82046	" "		" "	"
9	"	82047	" 徳島		6. 26	"
10	"	82048	" "		6. 27	"
11	"	82049	" "		"	"
12	"	82050	" 羽の浦		7. 21	"
13	"	82051	" 阿南		7. 29	"
14	"	82052	" "		8. 12	"
15	"	82053	" "		8. 13	"
16	"	82054	" "		8. 16	"
17	"	82055	" 羽の浦		8. 23	"
18	"	82056	" 徳島		8. 25	"
19	"	82057	" 阿南		8. 30	"
20	"	82058	" 鴨島		9. 6	"
21	"	82059	" 阿南		9. 8	"
22	"	82060	" 徳島		9. 9	"
23	"	82061	" "		"	"
24	"	82062	" "		"	"
25	"	82063	" "		"	"
26	"	82064	" "		"	"
27	"	82065	" "		"	"
28	"	82066	" "		"	"
29	"	82067	" 阿南		9. 27	"

表-3 Streptococcus sp. の分離由来

No	スタム No.	分離場所	年 月 日	魚 種
1	KGS8208	鹿児島県桜島	82. 1. 9	ハマチ
2	" 8212	" 海潟	1. 29	"
3	" 8213	" 山川	2. 2	"
4	" 8217	" 鹿屋	2. 4	"
5	" 8218	" 牛根	2. 10	"
6	" 8222	" 隼人	3. 29	"
7	" 8230	" 桜島	4. 15	"
8	" 8240	" 鹿児島	4. 6	"
9	" 8250	" 桜島	4. 14	"

表-4 E. tarda の分離由来

No	スタム No.	分離場所	年月日	魚 種	部 位
1	AIC8201	愛知県一色町	82. 1. 6	ウナギ	腎 蔵
2	" 8202	"	"	"	"
3	" 8203	"	"	"	"
4	" 8204	"	1. 4	"	"
5	" 8205	"	"	"	"
6	" 8206	"	1. 16	"	"
7	" 8207	"	"	"	"
8	" 8208	"	1. 23	"	"
9	" 8209	" 豊橋	1. 26	"	"
10	" 8210	" "	2. 2	シラスウナギ	"
11	KGE8201	鹿児島県根占	2. 28	ヒラメ	"
12	" 8202	"	"	"	"
13	" 8203	" 東串良	3. 8	ウナギ	脳
14	" 8204	"	"	"	心 蔵
15	MZN8201	宮崎県日南	5. 14	シラスウナギ	"
16	" 8202	"	"	"	"
17	NG8201	長崎県	9. 14	チコダイ	"
18	MZ佐2	宮崎県佐土原	11. 10	ウナギ	腎 蔵
19	" 佐5	"	"	"	"

表-5 A. hydrophila の分離由来

No	スタム No.	由 来
1	SK 1	USA 株
2	SK 4	"
3	SK 12	"
4	SK 14	"
5	TSK 2	台湾 株
6	TSK 14	"
7	KGS8105	鹿児島 株
8	KGS8106	"
9	KGS8108	"
10	226	不明

表-6 使用薬剤

菌名	薬剤名	略号	溶媒
Vibrio anguillarum	クロラムフェニコール	C M	水、加熱
	オキシテトラサイクリン	O T C	水
	サルファモノメトキシ	S M M	1/10 N NaoH
	オキノリン酸	O A	"
	ナリジクス酸	N A	"
	トリメトプリム	T M P	N. N. D
Streptococcus sp	エリスロマイシン	E M	エタノール
	スピラマイシン	S P	"
	ドキシテトラサイクリン	D o T C	水
Edwardsiella tarda	クロラムフェニコール	C M	水、加熱
	オキシテトラサイクリン	O T C	水
	ナリジクス酸	N A	1/10 N NaoH
	オキノリン酸	O A	"
	プロミデイク酸	P A	"
Aeromonas hydrophila	クロラムフェニコール	C M	水、加熱
	オキシテトラサイクリン	O T C	水
	サルファモノメトキシ	S M M	1/10 N NaoH
	ナリジクス酸	N A	"
	オキノリン酸	O A	"
	フラゾリドン	N F	N. N. D. (1:1) 加熱

9 cmシャーレにMHAを18mlと各濃度の抗菌剤を2 ml入、十分に混和した後に平板とした。抗菌剤の濃度は100 $\mu$ g/mlより2倍段階希釈法により0.025 $\mu$ g/ml濃度まで希釈した。

接種菌液は、ミューラー・ヒントン液体培地(MHBと略す)で18~20時間振温前培養し、10<sup>8</sup>~10<sup>9</sup>cells/mlに増殖したものを10<sup>6</sup>cell/mlまで滅菌生理食塩水(生食水と略す)で希釈した。接種は接種器を用いた。接種量は0.025mlである。

それらを30°Cで18~20時間培養し、完全に発育が阻止された濃度をもってMICとした。

ただし、感受性測定用培地はVibrioに対してはNaCl 2%を加え、Streptococcus sp.に対しては感受性測定用培地「ニッスイ」(変法ミューラー・ヒントン)(SDNと略す)を用いた。

## 2. 結果

表-7~11に示した。

なお、Streptococcus sp. はグルコース要求が強いので前培養にグルコース0.2%添加のMHB及びトッド・ヘビット液体培地、Diffco(THBと略す)を用いてMICをもとめてみたが、表-12に示す通り有意な差はみられなかった。

表-7 *Vibrio anguillarum* (KS type) のMIC

No.	スタム No.	Drug					
		C M	O T C	S M M	N . A	D A	T M P
1	YMS 8201	0.78	0.2	1.56	0.39	0.05	0.39
2	" 8202	"	"	"	"	"	"
3	" 8203	"	"	3.13	"	"	"
4	" 8204	"	"	1.56	"	"	"
5	" 8205	"	"	3.13	"	"	0.78
6	KMS 8201	"	"	"	"	"	"
7	" 8202	"	"	"	"	"	"
8	" 8203	"	"	1.56	"	"	"
9	" 8204	"	"	"	"	"	0.39
10	MZK 8201	"	"	3.13	0.78	"	"
11	" 8202	"	"	"	0.39	"	"
12	" 8203	"	"	1.56	"	"	"
13	OTK 8201	"	"	"	"	"	"
14	" 8202	"	"	"	"	"	"

測定培地 2% NaCl 加MHA (Diffco)

前培養培地 MHB

表-8 *Vibrio anguillarum* (A type) のMIC

No.	スタム No.	C M	O T C	S M M	N A	O A	T M P
1	PT 82031	0.39	0.39	0.78	12.5	0.78	0.39
2	" 80032	0.78	"	100	"	"	0.78
3	" 80038	25.0	6.25	100以上	25.0	"	0.78
4	" 80042	25.0	1.56	"	12.5	"	100以上
5	" 80043	6.25	6.25	"	"	"	"
6	" 80044	25.0	1.56	"	"	"	0.78
7	" 80045	6.25	"	"	"	"	0.2
8	" 80046	12.5	"	"	6.25	0.39	0.39
9	" 80047	0.39	0.39	100	12.5	0.78	0.78
10	" 80048	6.25	1.56	100以上	"	"	0.78
11	" 80049	6.25	0.39	"	100以上	12.5	25.0
12	" 80050	0.78	6.25	100	25	0.78	0.78
13	" 80051	12.5	"	100以上	6.25	0.39	0.2
14	" 80052	0.78	"	100	12.5	0.78	0.78
15	" 80053	6.25	1.56	100以上	25.0	"	0.39
16	" 80054	25.0	"	"	12.5	"	0.78
17	" 80055	25.0	6.25	"	"	"	100以上
18	" 80056	6.25	1.56	"	"	"	"
19	" 80057	6.25	0.39	"	100以上	12.5	"
20	" 80058	12.5	6.25	"	12.5	0.78	"
21	" 80059	12.5	"	"	100以上	12.5	"
22	" 80060	0.78	3.13	3.13	12.5	0.78	0.78
23	" 80061	6.25	6.25	100以上	"	"	"
24	" 80062	"	"	"	"	"	"
25	" 80063	"	3.13	"	"	"	100以上
26	" 80064	"	6.25	"	"	"	0.78
27	" 80065	"	"	"	"	"	"
28	" 80066	"	"	"	"	"	"
29	" 80067	"	"	"	100以上	12.5	100以上

測定培地 2% NaCl 加MHA、前培養培地MHB

表-9 Streptococcus sp. のMIC

No	スタム No	E M	S M	D O T C
1	K B S 8 2 0 8	0.05	1.56	0.2
2	" 8 2 1 2	"	"	"
3	" 8 2 1 3	"	"	"
4	" 8 2 1 7	"	"	0.1
5	" 8 2 1 8	"	"	0.2
6	" 8 2 2 2	"	"	"
7	" 8 2 3 0	"	3.13	"
8	" 8 2 4 0	"	1.56	"
9	" 8 2 5 0	"	"	"

測定培地MHA、前培養培地MHB

表-10 Edwardsiella tarda のMIC

No	スタム No	C M	O T C	N A	O A	P A
1	A I C 8 2 0 1	0.39	100	0.78	0.05	3.13
2	" 8 2 0 2	"	0.2	50	1.56	100以上
3	" 8 2 0 3	"	"	50	0.78	"
4	" 8 2 0 4	"	"	12.5	0.39	50
5	" 8 2 0 5	0.78	0.39	"	"	100
6	" 8 2 0 6	0.39	"	50	1.56	100以上
7	" 8 2 0 7	0.78	0.2	"	0.78	"
8	" 8 2 0 8	0.39	100	0.78	0.05	3.13
9	" 8 2 0 9	100	50	"	"	6.25
10	" 8 2 1 0	0.39	0.39	"	"	0.78
11	K G E 8 2 0 1	"	"	"	"	3.13
12	" 8 2 0 2	"	"	"	"	"
13	" 8 2 0 3	"	0.2	"	"	"
14	" 8 2 0 4	"	"	"	"	"
15	M Z N 8 2 0 1	"	"	"	"	"
16	" 8 2 0 2	"	0.39	"	"	"
17	N G 8 2 0 1	"	"	"	0.1	"
18	M Z 佐 2	"	"	"	"	6.25
19	" 佐 5	"	"	"	"	"

測定培地 SDN (ニッスイ) 前培養培地 THB

表-11 Aeromonas hydrophila のMIC

No	スタム No	C M	O T C	S M M	N A	O A	N F
1	S K 1	0.78	0.78	12.5	0.1	0.025	1.56
2	S K 4	0.39	0.39	"	"	"	"
3	S K 1 2	"	0.2	"	"	"	0.78
4	S K 1 4	"	"	0.78	"	"	12.5
5	T S K 2	50	50	100以上	0.2	"	"
6	T S K 1 4	0.78	100	"	0.1	"	"
7	K G S 8 1 0 5	0.39	0.39	"	"	"	25
8	K G S 8 1 0 6	"	"	"	0.2	"	0.78
9	K G S 8 1 0 8	"	"	6.25	0.1	"	12.5
10	2 2 6	3.13	0.78	100以上	0.39	0.05	50

測定培地MHA、前培養培地MHB

表-12 Streptococcus sp. 前培養培地の差によるMIC

スタム No.	前培養	E M	S P	D O T C
K G S 8 2 0 8	M H	0.05	1.56	0.1
	M H g	0.05	1.56	0.2
	T H	0.05	1.56	0.2
K G S 8 2 1 2	M H	0.05	0.78	0.2
	M H g	"	1.56	"
	T H	"	"	"
K G S 8 2 1 3	M H	0.05	1.56	0.2
	M H g	"	"	"
	T H	"	"	"
K G S 8 2 1 7	M H	0.05	1.56	0.1
	M H g	"	3.13	"
	T H	"	1.56	"
K G S 8 2 1 8	M H	0.05	0.78	0.2
	M H g	"	1.56	"
	T H	"	"	"
K G S 8 2 2 0	M H	100以上	100以上	1.56
	M H g	100	"	"
	T H	100以上	"	"
K G S 8 2 2 2	M H	0.05	1.56	0.2
	M H g	"	"	"
	T H	"	"	"
K G S 8 2 3 0	M H	0.05	1.56	0.2
	M H g	"	3.13	"
	T H	"	"	"
K G S 8 2 4 0	M H	0.05	1.56	0.2
	M H g	"	"	0.39
	T H	"	"	0.2
K G S 8 2 5 0	M H	0.05	1.56	0.2
	M H g	"	"	"
	T H	"	"	"

測定培地SDN

### III ディスク法の菌液調製と接種法の検討

菌液の調製法は、液体培地で前培養する方法と、直接平板上の培養菌より懸濁して調製する方法がある。それらの両方で調製した菌液を用いてディスク試験を行い、両者の差異の有無について検討した。

又、菌液接種法は、コンラージ棒を用いる方法、綿棒を用いる方法、ガラス玉による接種法、流加法、菌接種カンテン重層法、カンテンフィルム接種法（金沢1974）があるが、今回はコンラージ棒を用いる方法と流加法の二方法について比較検討した。

#### 1. 方法

##### (1) 使用菌株

*Vibro anguillarum* (KS-type) YMS 8201

##### (2) 感受性測定培地

普通寒天培地 (NAと略す) を 9 cmシャーレに 20ml 分注し使用。

(3) 使用ディスク

オキソリン酸 (OA) を 6 mm 1 A : 10  $\mu$ g、2 A : 2  $\mu$ g、3 A : 0.5  $\mu$ g

(4) 試験方法

接種菌液の調製は使用菌株を、一方は MHB に接種し一夜培養したものを用い、他方は NA 平板培地より直接コロニーを生食水に懸濁したのものを用いた。その時の菌数は前者が  $1.6 \times 10^{10}$  cells/ml、後者が  $2.4 \times 10^{10}$  cells/ml であった。

それらを生食水で  $10^{10}$  -  $10^7$  cells/ml まで希釈し、コンラージ法と流加法で測定培地に接種した。コンラージ法においては接種菌液の量を 0.1ml と 0.2ml の二つの方法をとった。流加法は菌液を 2 ml 測定培地に注加し、よく広げた後、余分な菌液を滅菌ピペットで取り除いた。30°C のふ卵器中で 30 分間乾燥した後ディスクをおいた。

のせたディスクをピンセットで軽くおし 30°C で 18~20 時間培養し、阻止円をノギスで測定した。

2. 結果及び考察

結果は表-13 に示した。

表-13 にみられるように、液体前培養法と直接平板上のコロニーより懸濁させた菌液を使用する方法とでは、阻止円の大きさに差はみられなかった。すなわち、直接平板上の発育菌より菌液を調製した方が判定日数を一日短縮できると考えられた。

又、接種菌量の少ない程、阻止円が大きくなった。コンラージ法は流加法より菌液量が少なく、又、0.1ml の菌液で十分に測定培地に拡げることができた。つまり、コンラージ法で接種菌液を 0.1 ml 接種するのが良いと思われた。

表-13 *Vibrio anguillarum* を用いた接種菌量及び  
接種方法別による OA ディスクに対する阻止円の大きさ (mm) の相違

接種菌液	接種菌量 OAディスクの濃度	$10^{10}$			$10^9$			$10^8$			$10^7$		
		1 A	2 A	3 A	1 A	2 A	3 A	1 A	2 A	3 A	1 A	2 A	3 A
液体前培養	コンラージ 0.1 cc	33	28	22	38	32	24	41	34.5	28	44	37	30
	0.2 cc	32	26	21.5	36	31	24	41	35	27.5	42	36	29
	流加法	29	24	19	35	26.5	21.5	39	31	25	43	36	29
平板より直接	コンラージ 0.1 cc	34	28	22	38.5	30.5	24	40.5	34	28	45	36	29.5
	0.2 cc	31.5	25.5	21	36	29.5	22	37.5	34	27	41	35.5	29
	流加法	30	23	18	34	28	21	38	31	25	42	34	28

※ 細菌数

液体  $1.6 \times 10^{10}$  cells/ml

平板  $2.4 \times 10^{10}$  cells/ml



#### IV 感受性測定用培地の差によるディスク試験

IIの試験の結果から各菌属より数株ずつ選び出し、数種のディスク測定用培地を用いてディスク試験を行い、それら数種のディスク測定用培地の比較を行った。

##### 1. 方法

###### (1) 使用菌株

表14に示すように *V. anguillarum* 3株、*Streptococcus* sp. 2株、*E. tarda* 4株、*A. hydrophila* 3株を使用した。なお、これらの菌株の各種薬剤に対するMIC値も併記した。

###### (2) 使用ディスク

表15に示す薬剤のディスクを使用した。

###### (3) 使用培地及び組成

使用培地は表-16に示した通りである。各培地の組成は表17~23に掲げた。なお、*V. anguillarum* はNaClを1及び2%添加したものをを使用した。

###### (4) 平板培養の作製

9cmガラスシャーレに、滅菌後冷却し60°Cに保った各培地を20mlずつ分注し、固化した平板を恒温器中で50°C15分間乾燥させたものを用いた。

###### (5) 菌液の調製

一夜培養した平板培地より直接平板上のコロニーを生食水に懸濁し、硫酸バリウム標準液(1.175% (W/V) BaCl<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O 0.5mlと1% (V/V) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 99.5mlとを混合したもの)と同一濃度になるように菌液濃度を調製した。なお、硫酸バリウム標準液の菌量は *V. anguillarum* を用いた2回の菌数計算の結果 0.7~1.78×10<sup>8</sup> cells/mlの範囲内であった。

表-14 使用菌株とMIC

① <i>V. anguillarum</i>							② <i>Streptococcus</i> sp.				
スタムNo.	C	M	OTC	SMM	NA	OA	TMP	スタムNo.	EM	SP	OOTC
YMS8201	0.78	0.2	1.56	0.39	0.05	0.39		KGS8217	0.05	1.56	0.1
MZK8203	"	"	"	"	"	"		" 8222	"	"	0.2
PT82067	6.25	6.25	100以上	100以上	125	100以上					

###### ③ *E. tarda*

スタムNo.	C	M	OTC	NA	OA	PA
KGS8203		0.39	0.2	0.78	0.05	3.13
MZN8201		"	"	"	"	"
AIC8206		"	0.39	5.0	1.56	100以上
" 8209	1.00		5.0	0.78	0.05	"

###### ④ *A. hydrophila*

スタムNo.	C	M	OTC	SMM	NA	OA	NF
SK 4		0.39	0.39	1.25	0.1	0.025	1.56
SK 12		"	0.2	"	"	"	0.78
TSK 2	5.0		5.0	100以上	0.2	"	1.25

表-15 使用ディスク

薬名	略名	DISC略名	濃度/DISC	DISC径
クロラムフェニコール	C M	C	100 $\mu$ g	8 mm
オキシテトラサイクリン	O T C	O	200 "	"
サルファモノメトキシ	S M M	m p	400 "	"
ナリジクス酸	N A	N a	50 "	"
フラゾリドン	N F	f	20 "	"
エリスロマイシン	E M	E	50 "	"
スピラマイシン	S P	S P	30 "	"
ドキシテトラサイクリン	D o T C	D O T	200 "	"
オキソリン酸	O A		2 "	6 mm

表-16 使用培地一覧

使用培地	略号	Lot No
ミューラー・ヒントン培地 (Dif f c o)	M H A	0 2 5 2 - 0 1 - 4
感受性ディスク用培地 (栄研)	S T E	0 0 8 2 0 7
感性ディスク用培地 (ニッスイ)	S D N	2 9 0 1 2
ブレイン・ハート・イン・フュージョン培地 (栄研)	B H I	2 9 0 0 5
ハート・イン・フュージョン培地 (ニッスイ)	H I	1 8 5 2 0 7
普通培地 (ニッスイ)	N A	2 1 6 2 0 8
トッド・ヘビット培地 (Dif f c o)	T H A	0 4 9 2 - 0 1

表-17 ミューラー・ヒントン培地の組成 (水1ℓ当り)

牛心臓浸出液	300 g
カザミノ酸	17.5 g
デンプン	1.5 g
寒天	17 g
P H 7.3 $\pm$ 0.1 at 25°C	

表-18 感受性ディスク用培地 (栄研) の組成 (水1ℓ当り)

牛心臓浸出液	250 g
カザミノ酸	15 g
L-トリプトファン	0.05 g
ブドウ糖	2 g
寒天	15 g
P H 7.4	

表-19 感性ディスク用培地 N (ニッスイ) の組成 (水1ℓ当り)

牛 心 臓 浸 出 液	2 0 0 g
カザミノ酸 (ニッスイ)	1.6 5 g
デ ン プ ン ( 溶 性 )	1.5 g
ブ ド ウ 糖	2 g
L ト リ プ ト フ ェ ン	0.0 5 g
L シ ス チ ン	5 μg
ビ オ チ ン	1 5 g
寒 天	
P H 7.4 ± 0.1 塩濃度0.8%に調製	

表-20 ブレイン・ハート・イン・フュージョン培地の組成 (水1ℓ当り)

コ ウ シ 脳 浸 出 液	2 0 0 g
牛 心 臓 浸 出 液	2 5 0 g
ペ プ ト ン	1 0 g
ブ ド ウ 糖	2 g
塩 化 ナ ト リ ウ ム	5 g
寒 天	1 5 g
P H 7.4	

表-21 ハート・イン・フュージョン培地の組成 (水1ℓ当り)

牛 心 臓 浸 出 液	5 0 0 ml
ペ プ ト ン	1 0 g
塩 化 ナ ト リ ウ ム	5 g
寒 天	1 5 g
P H 7.2 ± 0.1	

表-22 普通培地の組成 (水1ℓ当り)

肉 エ キ ス	5 g
ペ プ ト ン	1 0 g
塩 化 ナ ト リ ウ ム	5 g
寒 天	1 5 g
P H 7.2	

表-23 トッド・ヘビット培地の組成 (水1ℓ当り)

牛 心 臓 浸 出 液	5 0 0 g
ペ プ ト ン	2 0 g
デ キ ス ト ロ ー ス	2 g
塩 化 ナ ト リ ウ ム	2 g
リン酸二ナトリウム	0.4 g
炭 酸 ナ ト リ ウ ム	2.5 g

## (6) 菌液の接種

硫酸バリウム標準液と同一濃度になるように調製した菌液を 0.2 ml ディスク測定用平板培地に注加し、コンラージ棒を用いて拡げた。15～30分以内に各ディスクをのせ、軽くピンセットでおさえた。

## (7) 判定

24時間培養後、阻止円の長径、短径をノギスで測定し、その平均 (mm) を阻止円の直径とした。

## 2. 結果及び考察

結果は表24～29、及び図1～15に示した。

### (1) *V. anguillarum* (表24～26、図1～6)

H I、NAはCM、OTC、SMMに対し阻止円の径が小さく不明瞭であった。

MHA、STE、SDN、BHIは菌の発育は良好であった。阻止円の大きさからみるとSTE、SDNがディスク用培地として良いと思われる。

塩分添加量の差による阻止円の影響については、塩分添加したものが無添加より阻止円の大きさが少し小さくなる傾向がみられた。しかし、阻止円の形状は整円であった。

### (2) *Streptococcus* sp. (表27、図7)

MHA、SDN、H I、NAはいずれも *Streptococcus* sp. の発育が不良で判定は困難であった。

BHI、THA、STEの培地では良い結果が得られた。

BHI、THAにおいて、EMとSPに対してはTHAの方が阻止円が大きく、DoTCに対してはBHIの方が大きく現われた。

### (3) *E. tarda* (表28、図9～11)

H I、NAは阻止円が不明瞭であった。

阻止円の大きさからSTE、SDNが良好と思われる。

### (4) *A. hydrophila* (表29、図12～15)

阻止円の大きさからSTE、SDN、MHA、BHI、H I、NAの順であった。

以上の結果から、*V. anguillarum*、*E. tarda*、*A. hydrophila* のディスク試験用培地としては、感受性ディスク用培地「栄研」、感性ディスク用培地「ニッスイ」が良好な結果が得られた。

ミューラー・ヒントン寒天培地も次いで良かった。

*Streptococcus* sp. についてはトッド・ヘビット寒天培地、ブレイン・ハート・インフュージョン寒天培地を用いた場合に良い結果が得られた。

海産由来の *V. anguillarum* に対してはNaClを1～2%添加した方が阻止円の形状が整円となり、明瞭な阻止円が形成されることが判明した。

SMMに対しては、いずれも阻止円中に菌の再発育がみられ、明確な判定が困難であった。

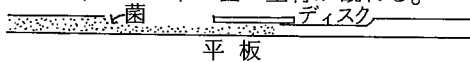
表-24 V. ang (ks-type)  
YMS8201のDisc Test

	C M	OTC	SMM	N A	O A
M H A	39	32	36(-)*3	33	31
S T E	44	40	(-)*4	34.5	33.5
S D N	37	38	(-)	40	36
B H I	37	31	25(-)	36	32.5
H I	33	26	(-)	38.5	34.5
N A	28	18	(-)	34	31
1MHA*1	38	30	38(-)	30	28
1STE	40	36	37(-)	37	33.5
1SDN	39	36	37(-)	38	35
1BHI	35.5	30.5	24(-)	34.5	31
1HI	24	24	(-)	34.5	31
1NA	28	18	(-)	30	27
2MHA*2	39	32	35(-)	33	28
2STE	40	35	38(-)	37	35.5
2SDN	40	36	(-)	37.5	32.5
2BHI	36	29.5	20(-)	33	30.5
2HI	22	(-)	(-)	33	27
2NA	28	16	(-)	32	28.5
(MIC)	0.78	0.2	1.56	0.39	0.05

\*1 1MHA: 1%NaCl加MHA

\*2 2MHA: 2%NaCl加MHA

\*3 36(-) : みかけの阻止円が36mmであるが、  
その中 その中に菌の生育が観れる。



平板

\*4 (-): 不明瞭で判定不可

表-26 V. anguillarum  
PT82067のディスク試験結果

	C M	OTC	SMM	N A	O A
M H A	28	26.5	8	8	6
S T E	30	31	8	8	6
S D N	30.5	30.5	8	8	6
B H I	28	26	8	8	6
H I	27.5	20	8	8	6
N A	22	16	8	8	6
1MHA*1	26	27	8	8	6
1STE	27	30.5	8	8	6
1SDN	30	30	8	8	6
1BHI	27.5	28	8	8	6
1HI	26	25	8	8	6
1NA	23	16	8	8	6
2MHA*2	29	29	8	8	6
2STE	29	31	8	8	6
2SDN	30	30.5	8	8	6
2BHI	25.5	27.5	8	8	6
2HI	25	25	8	8	6
2NA	25	18.5	8	8	6
(MIC)	6.25	6.25	100	100	12.5

\*1 1MHA: 1%NaCl加MHA

\*2 2MHA: 2%NaCl加MHA

表-25 V. ang (ks-type)  
MZS8203のDisc Test

	C M	OTC	SMM	N A	O A
M H A	39	32	39(-)	33	28.5
S T E	42	36.5	41.5(-)	39	36.5
S D N	37.5	35	(-)	37	33.5
B H I	35.5	31	28(-)	36.5	31.5
H I	(-)	(-)	(-)	36	31
N A	(-)	(-)	(-)	36	30.5
1MHA*1	38	31.5	39.5(-)	32.5	30.5
1STE	39	34	37	37.5	32.5
1SDN	39	36.5	36	38.5	33.5
1BHI	35.5	29	24.5(-)	33	29
1HI	(-)	(-)	(-)	35	29.5
1NA	(-)	(-)	(-)	32.5	28.5
2MHA*2	38	31	40(-)	33	30.5
2STE	41.5	38	43(-)	35.5	34
2SDN	41	33.5	37.5(-)	38	33.5
2BHI	36	29.5	21.5(-)	33.5	30
2HI	(-)	30	(-)	38	31
2NA	(-)	28	(-)	32.5	27
(MIC)	0.78	0.2	1.56	0.39	0.05

\*1 1MHA: 1%NaCl加MHA

\*2 2MHA: 2%NaCl加MHA

表-27 Streptococcus sp.  
のディスク試験結果

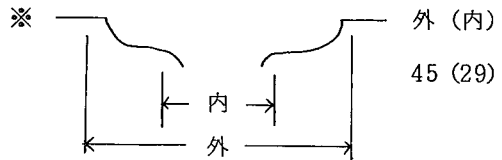
スタムNo.	産地	E M	S P	DOTC
K G S 8217	M H A	29	20.5	30
	S T E	32.5	17.5	36.5
	S D N	31	19	36
	B H I	34.5	20	35.5
	H I	30	20	29
	N A	(-)	17	22
	T A	42	28.5	32
(MIC)		0.05	1.56	0.1
K G S 8222	M H A	38.5	19	26.5
	S T E	30	17.5	32
	S D N	(-)	(-)	(-)
	B H I	32.5	18	31
	H I	(-)	(-)	(-)
	N A	(-)	(-)	(-)
	T A	34	24	24
(MIC)		0.05	1.56	0.2

表-28 E. tardaの  
ディスク試験結果

スタムNo	培地	CM	OTC	SMM	NA	OA
MZN 8201	MHA	34	30	33(-)	35	30
	STE	38	41.5	(-)	41	36
	SDN	40	38	31(-)	38.5	37
	BHI	37	34	29(-)	35.5	33.5
	HI	32	29	(-)	35	32
	NA	29	21	(-)	31	28
(MIC)	0.39	0.2		0.78	0.05	
KGE 8203	MHA	40	36.5	(-)	36.5	32.5
	STE	40	40	(-)	44	39.5
	SDN	40	40	(-)	42	37.5
	BHI	38	34.5	27(-)	38	34.5
	HI	37	32	(-)	35.5	33
	NA	(-)	22	(-)	33.5	29
(MIC)	0.39	0.2		0.78	0.05	
AIC 8206	MHA	42	33		8	14
	STE	39	41.5		9	17.5
	SDN	39	40		8	17.5
	BHI	38	32		8	15
	HI	(-)	27.5		8	20
	NA	(-)	20		8	14.5
(MIC)	0.39	0.39		50	1.56	
AIC 8209	MHA	10	11	(-)	33	29
	STE	12	15.5	(-)	40	37
	SDN	12	12.5	(-)	40	37.5
	BHI	10	12	(-)	36.5	33.5
	HI	15.5	11.5	(-)	32	32
	NA	15	10	(-)	32.5	29
(MIC)	100	50		0.78	0.05	

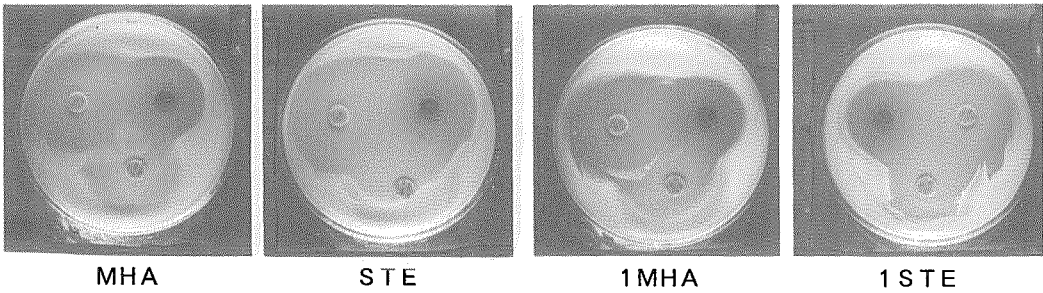
表-29 A. hydrophilaの  
ディスク試験結果

スタムNo	培地	CM	OTC	SMM	NA	OA	NF
SK4	MHA	42.5	32	41(-)	39	36	27
	STE	48	43.5	44(-)	43	40	29
	SDN	42.5	39	30(-)	41.5	37	25.5
	BHI	41.5	32	26.5(-)	41	36	24.5
	HI	45(29)*	31.5	39(-)	39	35.5	25.5
	NA	44(29.5)	25	40(-)	35.5	30.5	22
(MIC)	0.39	0.39	12.5	0.1	0.025	1.56	
SK12	MHA	42	33.5	45(-)	37	34.5	29
	STE	42.5	47.5	25(-)	50	46	31.5
	SDN	36.5	36	31.5(-)	37	34	27
	BHI	42	36	22.5(-)	41	35	24
	HI	45(32.5)	31.5	36.5(-)	40	35.5	27
	NA	41.5(31.5)	24	(-)	35.5	31	24.5
(MIC)	0.39	0.2	12.5	0.1	0.025	0.78	
TSK 2	MHA	14.5	12	35.5(-)	37	31.5	20
	STE	14	15.5	29(-)	41.5	36.5	15.5
	SDN	16	15	30(-)	38	34	15.5
	BHI	14.5	13.5	24(-)	36	31	13
	HI	16	13	33(-)	33	30	16
	NA	15	9	36(-)	31.5	28.5	15
(MIC)	50	50	100以上	0.2	0.025	1.25	



## V 成果の要約

1. 病魚由来菌 *Vibrio anguillarum*、*Edwardsiella tarda*、*Aeromonas hydrophila*、*Streptococcus* sp. についてMIC測定を行なった。
2. ディスク法の菌液調製と接種法を検討した結果、コンラージ棒を用いて0.1 mlの接種菌液を拡げる方法が良いと思われた。
3. 1の試験結果より、それぞれの菌を数株ずつ選び出し、2の試験の結果を応用して数種の感受性ディスク用培地の比較を行なった所、*V. anguillarum*、*E. tarda*、*A. hydrophila* に対しては感受性ディスク用培地「ニッスイ」が良かった。*Streptococcus* sp. に対してはトッド・ヘビット寒天培地、ブレイン・ハート・インフュージョン寒天培地が良かった。又、海産由来の *V. anguillarum* に対しては1~2%のNaClを添加した方が良い結果が得られた。

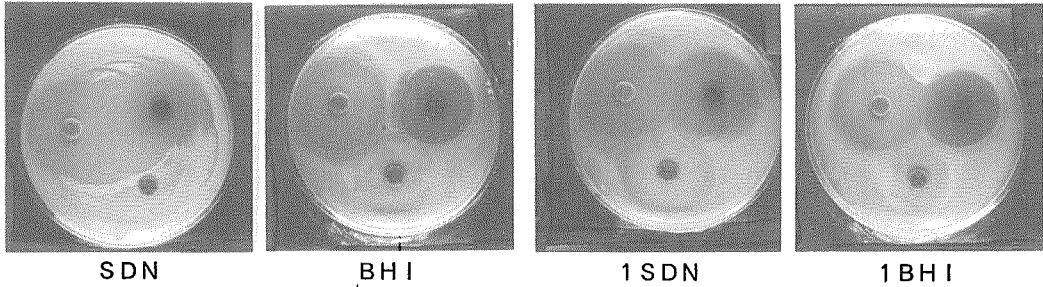


MHA

STE

1MHA

1STE

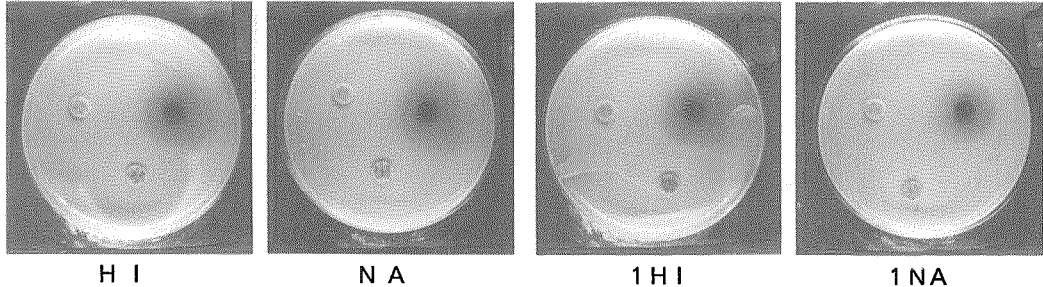


SDN

BHI

1SDN

1BHI



HI

NA

1HI

1NA

図-1 感受性測定用培地の差によるディスク試験

使用菌株 : *V. anguillarum* YMS8201  
 使用ディスク: クロラムフェニコール C  
 オキシテトラサイクリン O  
 サルファモメトキシン mp  
 NaCl : 無添加

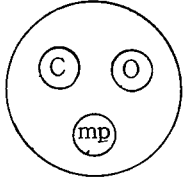
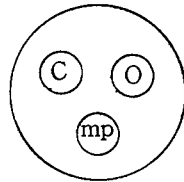


図-2 感受性測定用培地の差によるディスク試験

使用菌株 : *V. anguillarum* YMS8201  
 使用ディスク: クロラムフェニコール C  
 オキシテトラサイクリン O  
 サルファモメトキシン mp  
 NaCl : 1% 添加



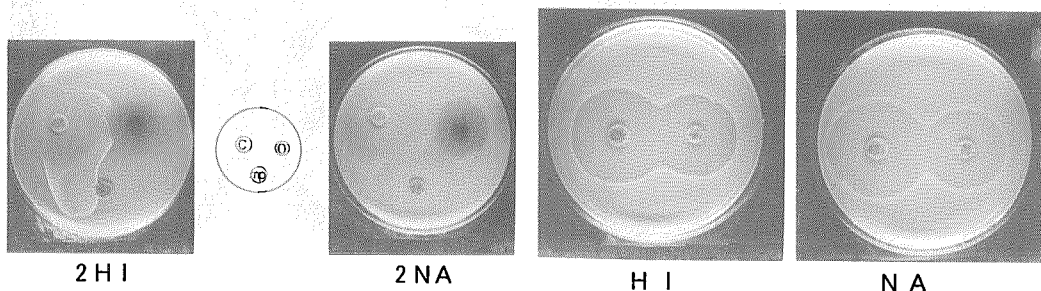
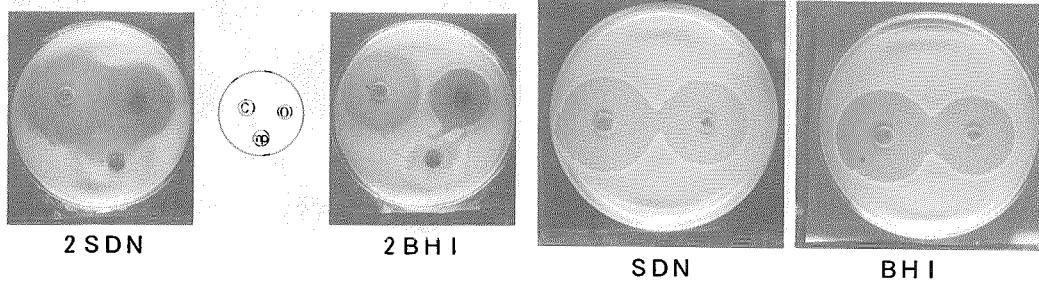
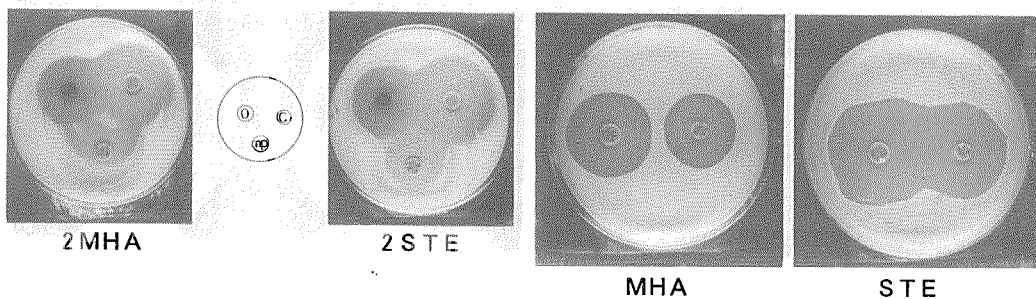


図-3 感受性測定用培地の差によるディスク試験

使用菌株 : *V. anguillarum* YMS 8201

使用ディスク: クロラムフェニコール C

オキシテトラサイクリン O

サルファモノメトキシン mp

NaCl : 2% 添加

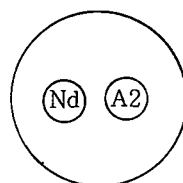
図-4 感受性測定用培地の差によるディスク試験

使用菌株 : *V. anguillarum* MZS 8203

使用ディスク: ナリジクス酸 Nd

オキシリン酸 A2

NaCl : 無添加





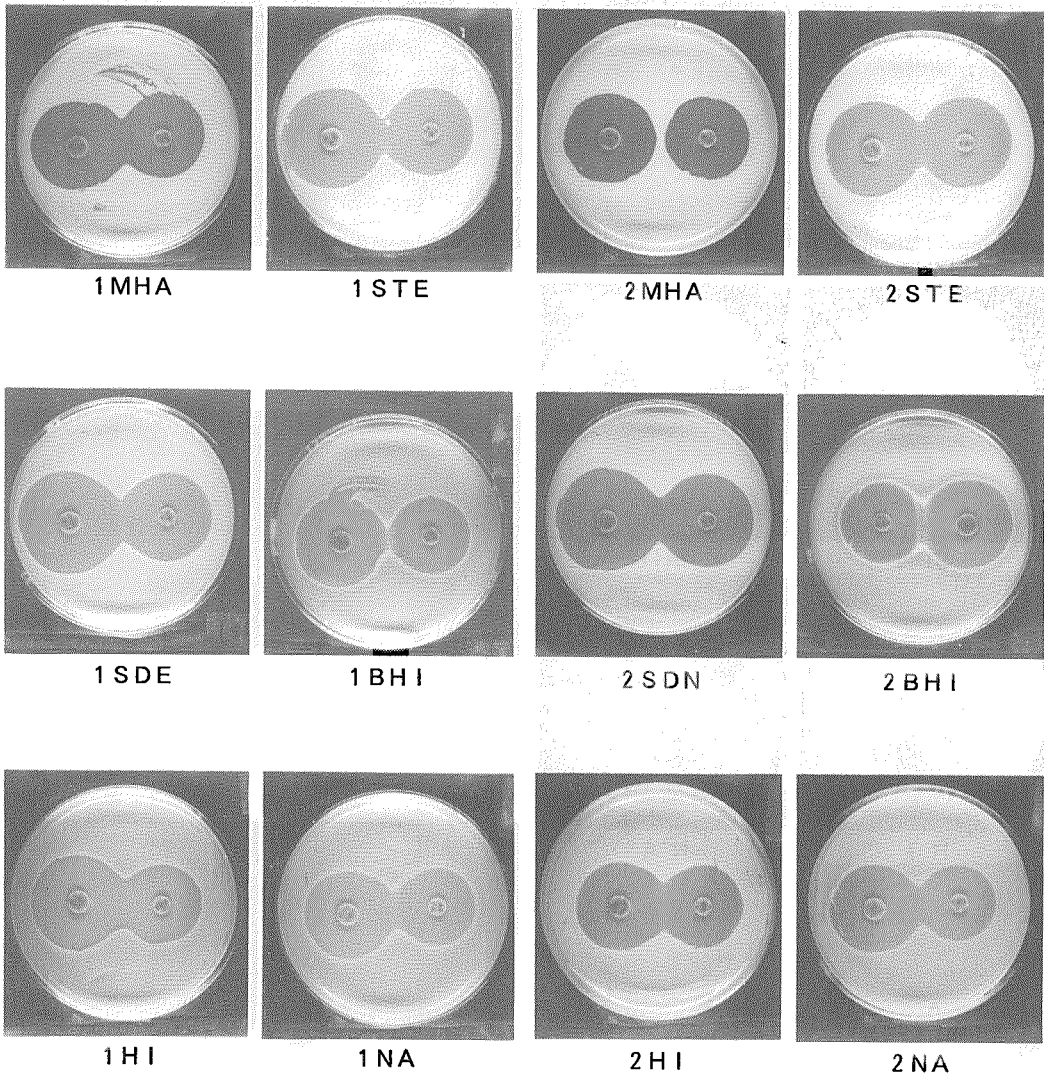


図-5 感受性測定用培地の差によるディスク試験

使用菌株 : *V. anguillarum* MZS 8203

使用ディスク: ナリジクス酸 Nd

オキシリン酸 A2

NaCl : 1% 添加

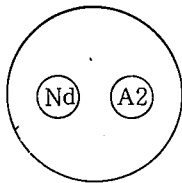


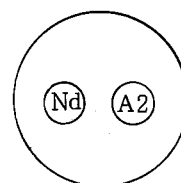
図-6 感受性測定用培地の差によるディスク試験

使用菌株 : *V. anguillarum* MZS 8203

使用ディスク: ナリジクス酸 Nd

オキシリン酸 A2

NaCl : 2% 添加



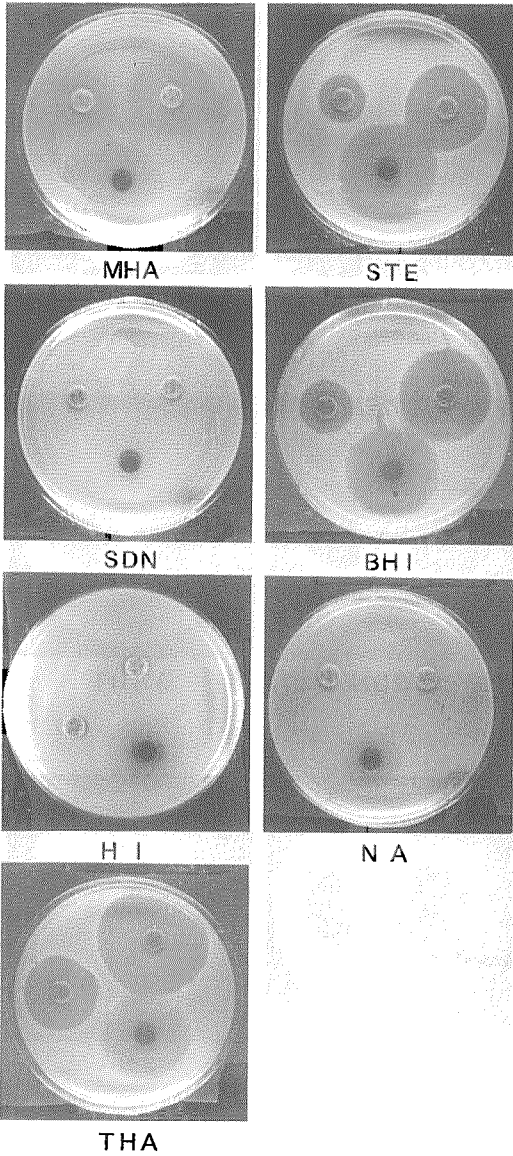


図-7 感受性測定用培地の差によるディスク試験

使用菌株 : *Sfreptococcus* sp KGS 8217  
 使用ディスク: エリスロマイシン E  
 スピラマイシン SP  
 ドキシテトラサイクリン Dot

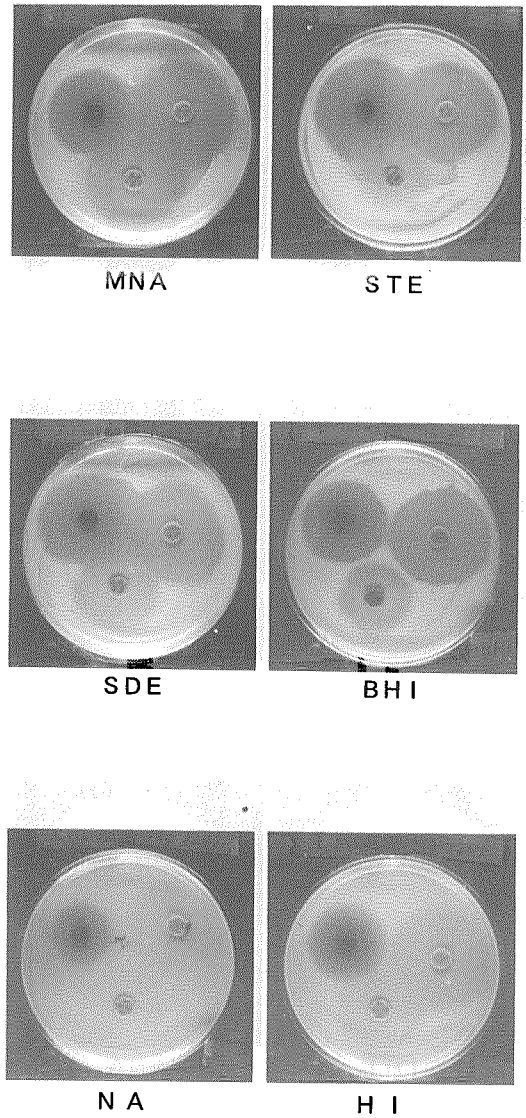
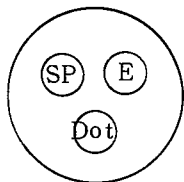
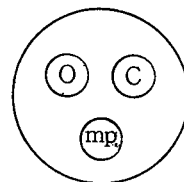


図-8 感受性測定用培地の差によるディスク試験

使用菌株 : *E. tarda* MZN 8201  
 使用ディスク: クロラムフェニコール C  
 オキシテトラサイクリン O  
 サルファモノメトキシン mp



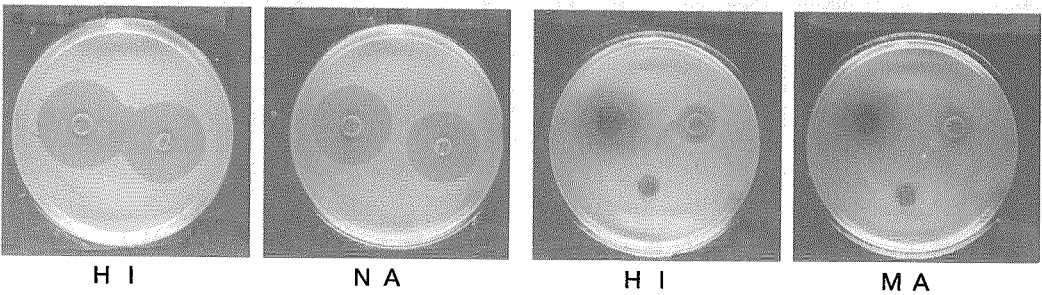
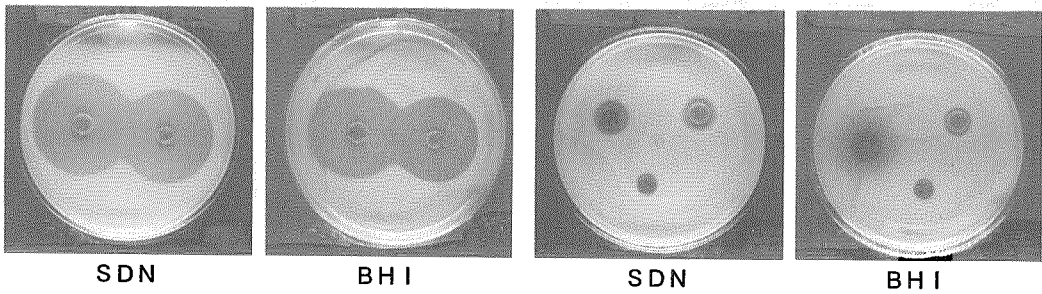
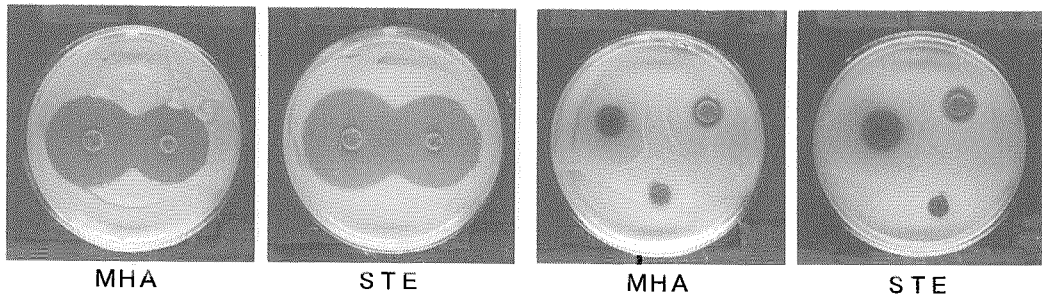


図-9 感受性測定用培地の差によるディスク試験

使用菌株 : *E. tarda* MZN8201

使用ディスク: ナリジクス酸 Nd

オキソリン酸 A2

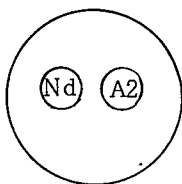


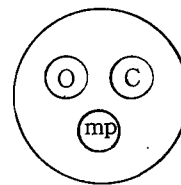
図-10 感受性測定用培地の差によるディスク試験

使用菌株 : *E. tarda* AIC8209

使用ディスク: クロラムフェニコール C

オキシテトラサイクリン O

サルファモノメトキシン mp



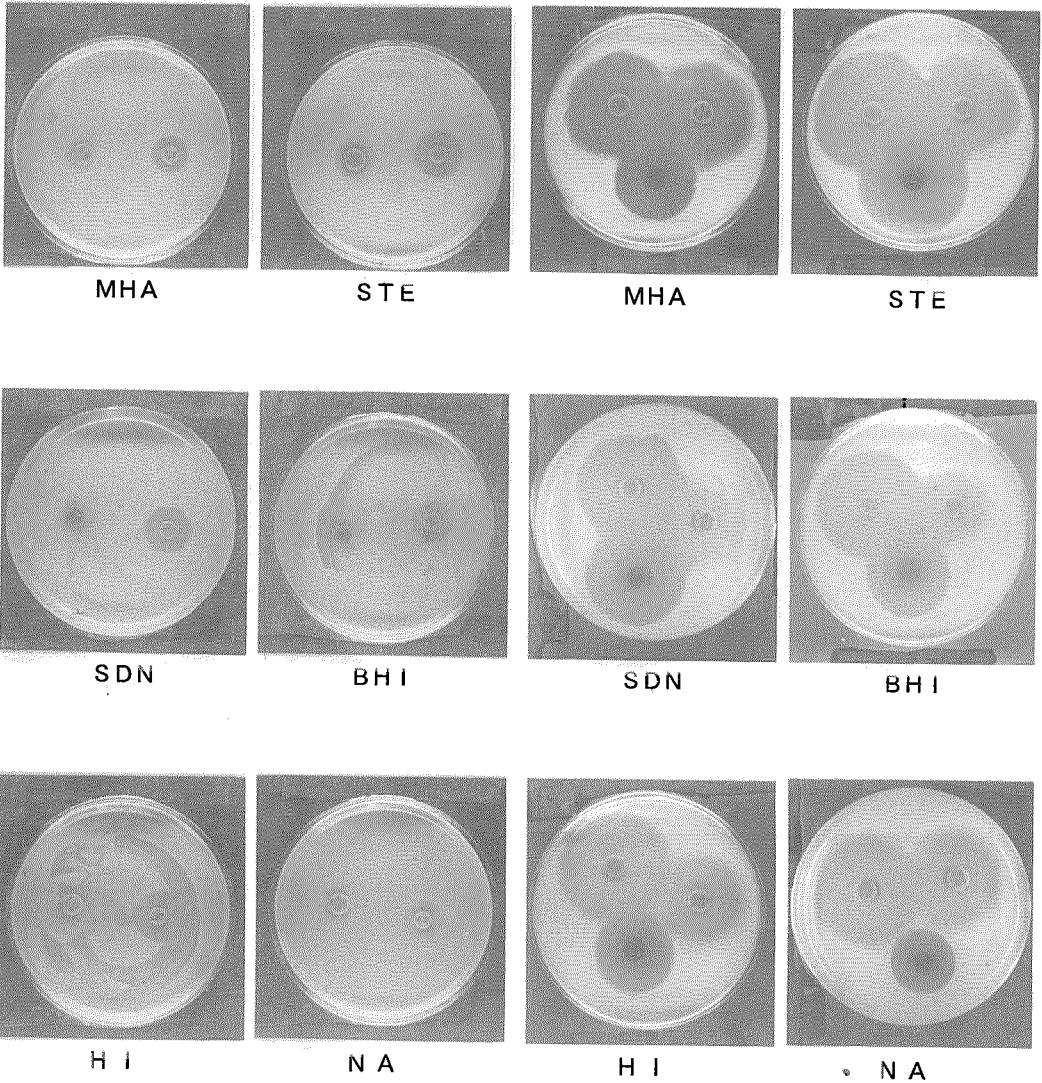


図-11感受性測定用培地の差によるディスク試験

使用菌株 : *E. tarda* A1C8206  
 使用ディスク: ナリジクス酸 Nd  
 オキシリン酸 A2

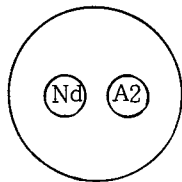
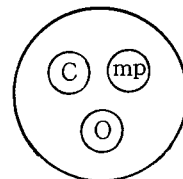


図-12感受性測定用培地の差によるディスク試験

使用菌株 : *A. hydrophila* SK4  
 使用ディスク: クロラムフェニコール C  
 オキシテトラサイクリン O  
 サルファモノメトキシン mp



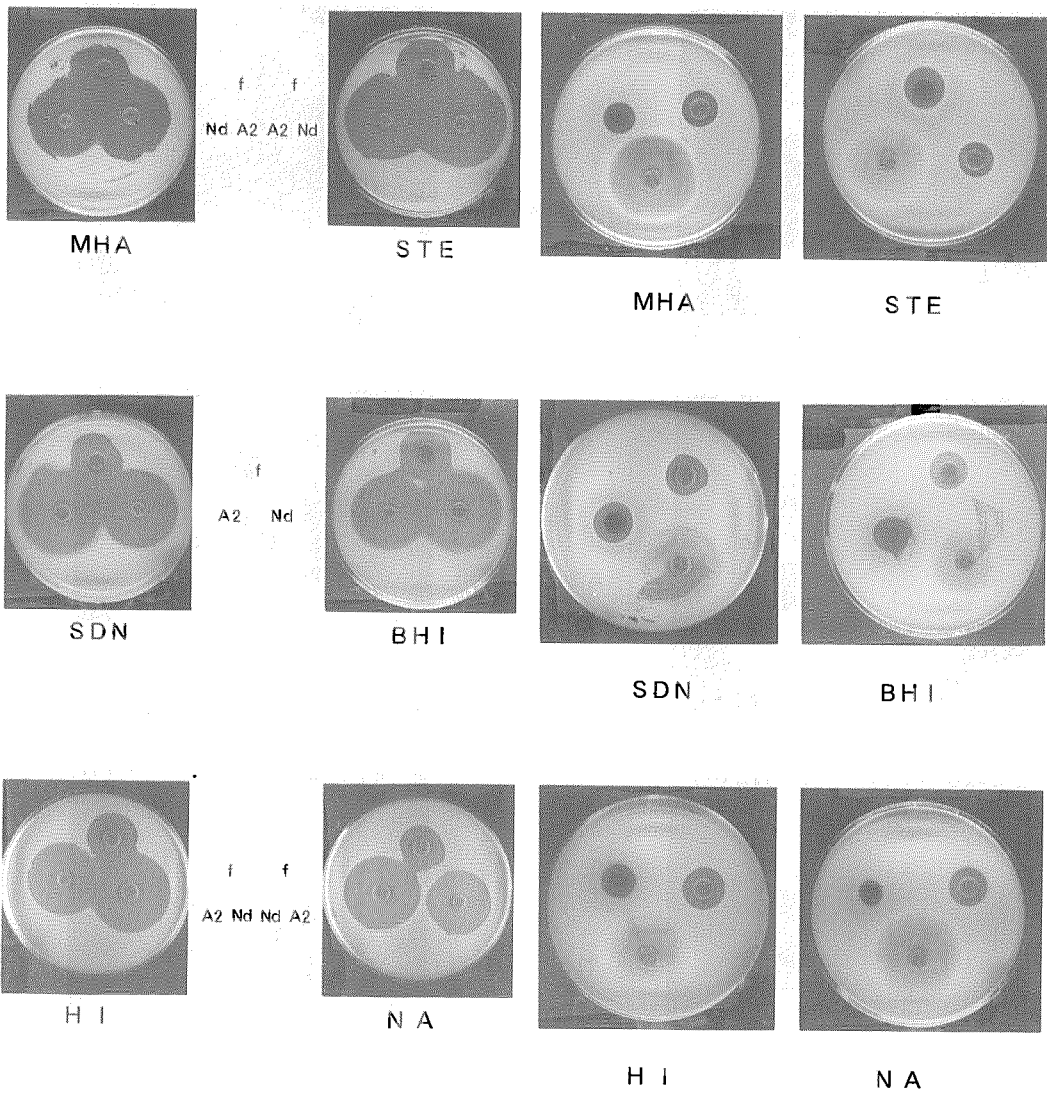
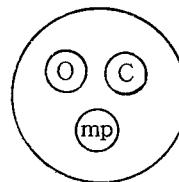


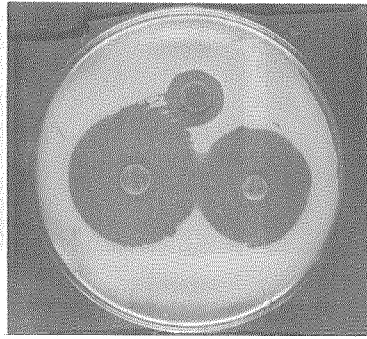
図-13感受性測定用培地の差によるディスク試験

使用菌株 : *A. hydrophila* SK4  
 使用ディスク: フラゾリドン f  
 ナリジクス酸 Nd  
 オキシソリン酸 A2

図-14感受性測定用培地の差によるディスク試験

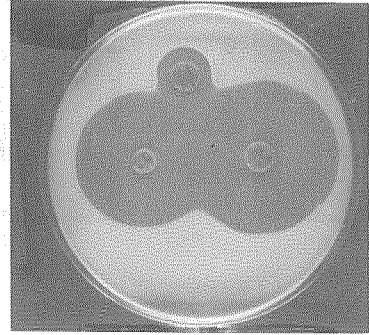
使用菌株 : *A. hydrophila* TSK2  
 使用ディスク: クロラムフェニコール C  
 オキシテトラサイクリン O  
 サルファモノメトキシン mp



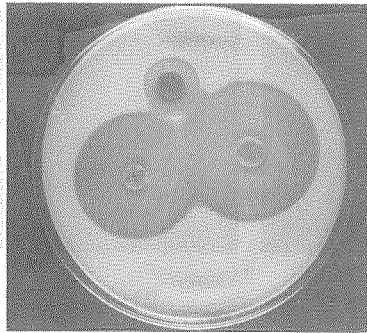


MHA

f		f
Nd	A2	A2

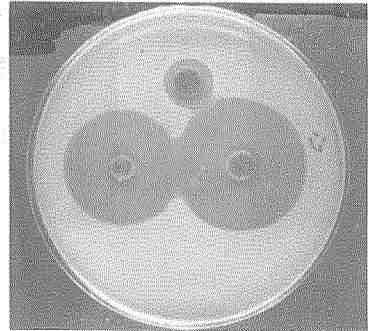


STE

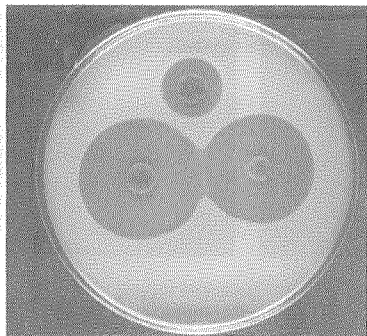


SDN

	f	
A2		Nd

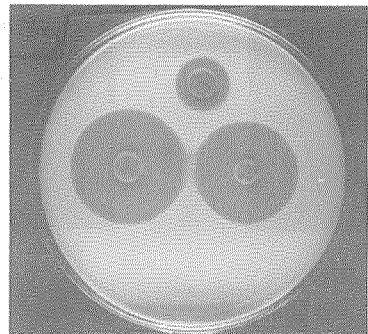


BHI



HI

	f	
Nd		A2



NA

図-15感受性測定用培地の差によるディスク試験

使用菌株 : *A. hydrophila* TSK2

使用ディスク: フラツリドン f

ナリジクス酸 Nd

オキシソリン酸 A2

## 文 献

- 日本化学療法学会（1981）最小発育阻止濃度（MIC）測定法再改訂についてCHEMOTHERAPY Vol. 29 No.1 P 76～79
- 金沢 裕（1974）感受性ディスク法の基礎と臨床（一濃度法を中心として）（6）メディアサークルVol. 19 No.6 P 161～167
- 三橋進編（1980）薬剤感受性測定法—薬剤耐性菌の理論と実際—講談社 東京
- 医科学研究所学友会編（1976）細菌学実習提要（改訂5版）丸善 東京