

水産分野における薬剤耐性に関する技術研修会テキスト

水産分野における

薬剤感受性試験マニュアル



目次

1 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験とは	1
水産動物由来細菌の薬剤感受性試験のこれまでと現状	1
水産動物由来細菌の薬剤感受性試験条件	2
薬剤感受性試験の精度管理	2

2 ディスク拡散法

ディスク拡散法の実際	6
1) ディスク拡散法に必要な試薬・器具	6
2) 感受性試験用培地	8
3) 薬剤感受性ディスクの用意	8
4) 菌液の調整	10
5) 菌液の接種法とディスクの配置	11
6) 培養条件と温度	11
7) 阻止円直径の測定	12
8) 判定	14
9) 精度管理	14
10) 危険防止または取り扱い上の注意	15

3 微量液体希釈法

微量液体希釈法の実際	17
1) フローズンプレートを使用した微量液体希釈法に必要な試薬・器具	17
2) 感受性試験用培地	18
3) フローズンプレートの発注	19
4) 菌液の調整	20
5) 菌液の接種と培養	21
6) 菌の増殖判定と記録	22
7) 判定	24
8) 精度管理	24
9) 危険防止または取り扱い上の注意	25

参考文献	26
------	----

Appendix

水産用医薬品の薬剤感受性ディスク入手先（令和7年12月時点）	27
講習会の記録用紙	28
ディスク拡散法記録用紙	28
微量液体希釈法記録用紙	29-30
ディスク配置図	31

ここでは、薬剤感受性試験についての基本を学ぶ。

薬剤感受性試験とは

薬剤感受性試験とは、抗菌剤に対する細菌の感受性を調べるために行われる試験である。これにより、感染症の治療に有効な抗菌剤を選択することが可能となる。

薬剤感受性試験法には、拡散法と希釈法の2種類がある（図 1-1）。拡散法は、薬剤感受性ディスクという円形の濾紙を用いるディスク拡散法とストリップと呼ばれる薬剤の濃度勾配を持たせた短冊状の濾紙を用いる E-test 方がある。菌液を塗布した培地上に薬剤を含有した濾紙を置くことにより、培地中の水分をディスクが吸収し、抗菌剤が培地中に拡散する。拡散した薬剤濃度と細菌の増殖能との関係により細菌の増殖が見られない阻止円または阻止帯が形成される。阻止円においては、小さければ、その薬剤に対する感受性が低いということになる。阻止帯は阻止帯が生じはじめた目盛りから最小発育阻止濃度（minimum inhibitory concentration: MIC）を測定する。

希釈法は、液体培地を用いる液体希釈法と寒天培地を用いる寒天希釈法がある。また、液体希釈法のうちマイクロプレートを使用し、微量の液体培地（100 μ l）で希釈法を行うことを微量液体希釈法と言う。希釈法は、抗菌剤を溶解させた培地から段階希釈系列を作成し、そこに一定濃度の菌液を接種し培養を行う。これにより、細菌の発育が阻止される抗菌剤の濃度から定量的な MIC 値を測定することが出来る。しかしながら、希釈法は煩雑かつ、作業者の習熟度も要求されることから、水産試験場の多くは、ディスク拡散法を採用している。

水産動物由来細菌の薬剤感受性試験のこれまでと現状

養殖魚に代表される水産動物由来細菌の薬剤感受性試験は、2003 年に動物由来細菌に対する抗菌性物質の最小発育阻止濃度（MIC）測定法が発表された¹⁾。本法は、NCCLS（National Committee for Clinical Laboratory Standards、米国臨床検査標準委員会）が定めた薬剤感受性試験法に準拠している。

2005年にNCCLSがCLSI（Clinical and Laboratory Standards Institute、臨床検査標準協会）と改名後、水産動物由来細菌の液体培地希釈法とディスク拡散法による薬剤感受性試験法が発表された。その後、数回にわたり改訂され、2020年に改定された「VET03 Methods for antimicrobial broth dilution and disk diffusion susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals, 2nd Edition」²⁾と「VET04 (VET03 Supplement) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals, 3rd Edition」³⁾が最新版となっている。

本 CLSI 法は、世界で唯一の水産動物由来細菌の薬剤感受性試験法となっていることから、ここでは本法に準拠したマニュアルを示す。

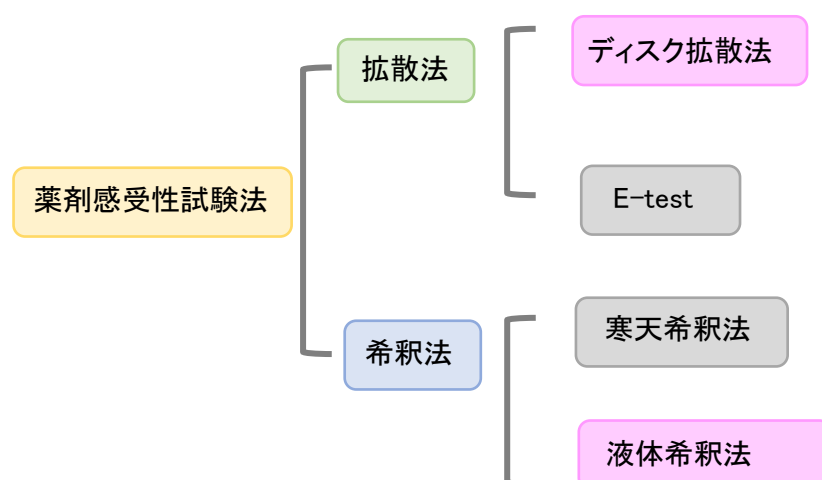


図 1-1 薬剤感受性試験の種類

水産動物由来細菌の薬剤感受性試験条件

2021年改定 CLSI 法に含まれる対象菌種は、5 グループに分類される。菌種ごとに培地・培養条件が異なるため、被検菌株の菌種を把握した上で薬剤感受性試験を行う必要がある。また、ディスク拡散法と液体希釈法でも試験条件が異なる（表 1-1、表 1-2）。講習会では、連鎖球菌症原因菌として知られる *Lactococcus garvieae* と *Vibrio* spp. を被検菌株とする。

薬剤感受性試験の精度管理

薬剤感受性試験の精度管理（QC: Quality control）は、薬剤感受性試験の正確性および再現性を確認するため重要。試薬や実験器具の性能や試験従事者の能力についてもモニターする。

水産動物由来細菌の培養条件はヒトや畜産と異なるため、精度管理株として以下の2株が認められている。この精度管理株で薬剤感受性試験を行い、精度管理値限界値の範囲内であることを確認する。

Escherichia coli ATCC 25922

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida* ATCC 33658

なお、上記2株の精度管理株は、ATCC (American Type Culture Collection) より細菌分与を受けることが可能であり、住商ファーマインターナショナルが輸入代行をおこなっている。しかし、ATCC 以外の機関から分与を受けることも可能である (表 1-3)。特に JCM (理化学研究所バイオリソース研究センター微生物材料開発室) は、日本にある機関ため金額も安価で入手し易い。表の NCIMB (The National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria Ltd.) は、英国の微生物株保存機関であり株式会社テクノスルガ・ラボが輸入代行を行っている。どこの微生物株保存機関から分与を受けても同じ株であるが、ATCC 以外の機関から分与を受けた際は、精度管理値を確認する必要があると思われる。

精度管理は、試験毎および試薬や培地ロット等が変わる毎に行う必要がある。しかしながら、現在 CLSI が提案している精度管理値限界値は一部の条件のみである。特に、*Lactococcus garvieae* の培養条件に対する精度管理値は提供されていない。

表 1-3 精度管理株の微生物株保存機関別カタログ番号

微生物名	微生物株保存機関		
	ATCC	JCM	NCIMB
<i>Escherichia coli</i>	25922	5491	12210
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	33658	7874	1102

表 1-1 CLSI によるディスク拡散法プロトコル

Group	Organism	Medium	Incubation	Incubation Time
1 Nonfastidious bacteria	<i>Enterobacteriales</i>	MHA	22 ± 2 °C	24-28 h and/or 44-48 h
			28 ± 2 °C	24-28 h
			35 ± 2 °C	16-20 h
	<i>Vibrionaceae</i> (including facultative halophilic species)	MHA	28 ± 2 °C	24-28 h
			35 ± 2 °C	16-20 h
			22 ± 2 °C	24-28 h
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	MHA	28 ± 2 °C	24-28 h
			28 ± 2 °C	24-28 h
			35 ± 2 °C	16-20 h
2 Strictly halophilic <i>Vibrionaceae</i>	Unknown	MHA+1% NaCl	28 ± 2 °C	24-28 h and/or 44-48 h
			22 ± 2 °C	24-28 h
			28 ± 2 °C	24-28 h
	<i>Aeromonas hydrophila</i> and other mesophilic Aeromonads	MHA	28 ± 2 °C	24-28 h
			35 ± 2 °C	16-20 h
			28 ± 2 °C	24-28 h
	<i>Pseudomonas</i> spp.	MHA	35 ± 2 °C	16-20 h
			35 ± 2 °C	16-20 h
			35 ± 2 °C	16-20 h
3 Gliding bacteria	<i>Flavobacterium columnare</i>	Diluted MHA (4 g/L)+ 5% fetal calf serum+agar (17 g/L)	28 ± 2 °C	24-28 h and/or 44-48 h
			28 ± 2 °C	24-28 h
			28 ± 2 °C	24-28 h
	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	Diluted MHA (4 g/L)+ cation-adjusted MHA+agar (17 g/L)	15 ± 2 °C	72-96 h
			15 ± 2 °C	72-96 h
			15 ± 2 °C	72-96 h
	<i>Flavobacterium branchiophilum</i>	No recommendations at this time		
4 Streptococci	<i>Lactococcus</i> spp.	MHA+5% defibrinated sheep blood	22 ± 2 °C	44-48 h
			28 ± 2 °C	24-28 h and/or 44-48 h
			28 ± 2 °C	24-28 h and/or 44-48 h
	<i>Vagococcus salmoninarum</i>	MHA	15 ± 2 °C	44-48 h
			15 ± 2 °C	44-48 h
			15 ± 2 °C	44-48 h
	<i>Psychrophilic Aeromonas salmonicida</i>	No recommendations at this time		
5 Nonfastidious bacteria	<i>Aliivibrio salmonicida</i>	Diluted MHA (3 g/L) +inorganic ion supplementation	25 ± 2 °C	44-48 h
			25 ± 2 °C	44-48 h
			25 ± 2 °C	44-48 h
	<i>Tenacibaculum maritimum</i>	No recommendations at this time		
	<i>Tenacibaculum dicentrarchi</i>	No recommendations at this time		
6 Fastidious bacteria	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	No recommendations at this time		
	<i>Mycobacterium</i> spp.	CLSI document M24		
	<i>Nocardia</i> spp.	No recommendations at this time		

表 1-2 CLSI による液体希釈法プロトコル

Group	Organism	Medium	Incubation	Incubation Time
1 Nonfastidious bacteria	<i>Enterobacteriales</i>	CAMHB	22 ± 2 °C	24-28 h and/or 44-48 h
			28 ± 2 °C	24-28 h
			35 ± 2 °C	16-20 h
	<i>Vibrionaceae</i> (including facultative halophilic species)	CAMHB	22 ± 2 °C	24-28 h and/or 44-48 h
			28 ± 2 °C	24-28 h
			35 ± 2 °C	16-20 h
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	CAMHB	22 ± 2 °C	44-48 h
			28 ± 2 °C	24-28 h
	<i>Aeromonas hydrophila</i> and other mesophilic Aeromonds <i>Pseudomonas</i> spp. Nonfastidious gram-positive cocci	CAMHB	28 ± 2 °C	24-28 h
			35 ± 2 °C	16-20 h
			35 ± 2 °C	16-20 h
2 Strictly halophilic <i>Vibrionaceae</i>	Unknown	CAMHB+1% NaCl	22 ± 2 °C	24-28 h and/or 44-48 h
			28 ± 2 °C	44-48 h
3 Gliding bacteria	<i>Flavobacterium columnare</i>	Diluted CAMHB (4 g/L)	28 ± 2 °C	44-48 h
	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	Diluted CAMHB (4 g/L)	18 ± 2 °C	92-96 h
4 Streptococci	<i>Lactococcus</i> spp.	MHA+LHB	22 ± 2 °C	44-48 h
	<i>Vagococcus salmoninarum</i>	(2.5% to 5% v/v)	28 ± 2 °C	44-48 h
5 Nonfastidious bacteria	Psychrophilic <i>Aeromonas salmonicida</i>	CAMHB	15 ± 2 °C	44-48 h
	<i>Aliivibrio salmonicida</i>	Unknown	4 °C 15 °C	6 days
	<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Diluted MHA (1:7) +inorganic ion supplementation	25 ± 2 °C	44-48 h
	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	KDM-2	15 °C	96 h with agitation
	<i>Mycobacterium</i> spp. <i>Nocardia</i> spp.	CLSI document M24		

ディスク拡散法

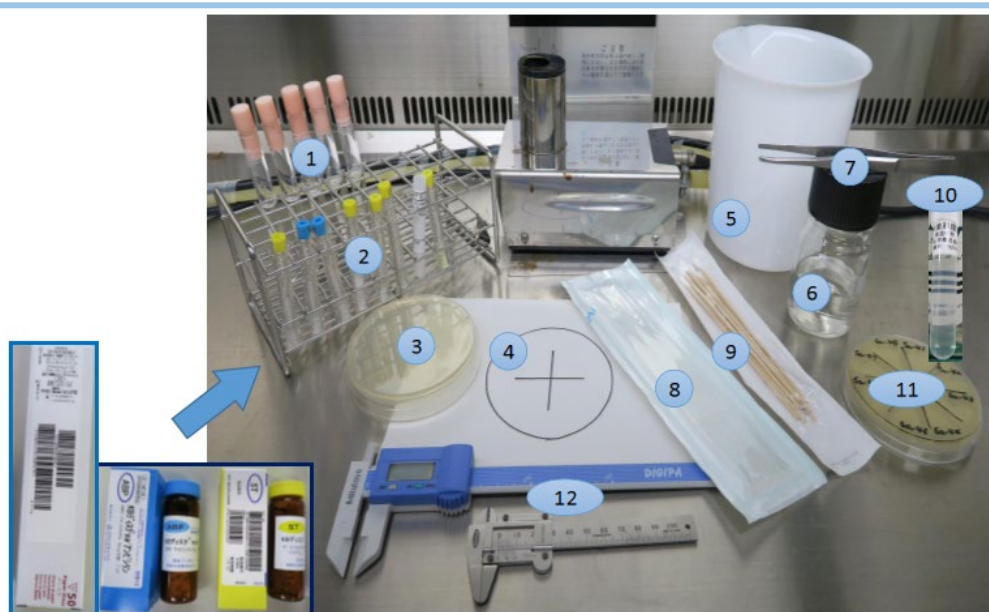
毛細管現象により、寒天中の水分がディスクの濾紙に吸収され、ディスク中の薬剤が溶解する。溶解した薬剤は直下の培地に移行し、培地上の細菌に作用しながら拡散していく。拡散した薬剤濃度と細菌の増殖能との関係により阻止円が形成される。すなわち阻止円が小さければ、その薬剤に対する感受性が低いということになる。本法は、Kirby-Bauer 法による拡散法を測定原理とし、CLSI 法に準拠した方法で実施している。

ディスク拡散法の実際

Kirby-Bauer 法を測定原理とし CLSI 法に準拠した薬剤感受性ディスクを用いたディスク拡散法のフローチャートを図 2-1 に示す。

1) ディスク拡散法に必要な試薬・器具

ディスク拡散法に必要な試薬・器具を以下に示す（図 2-2）。



- | | |
|----------------|-----------------|
| ① 3 ml 滅菌生理食塩水 | ⑦ ピンセット |
| ② 薬剤感受性ディスク | ⑧ 滅菌白金耳（エーゼ） |
| ③ 薬剤感受性試験用平板 | ⑨ 滅菌綿棒（綿径 5mm） |
| ④ ディスク型紙 | ⑩ McFarland 標準液 |
| ⑤ 消毒容器 | ⑪ 被検菌株 |
| ⑥ 火炎滅菌用アルコール | ⑫ ノギス |

図 2-2 ディスク拡散法に必要な試薬・器具

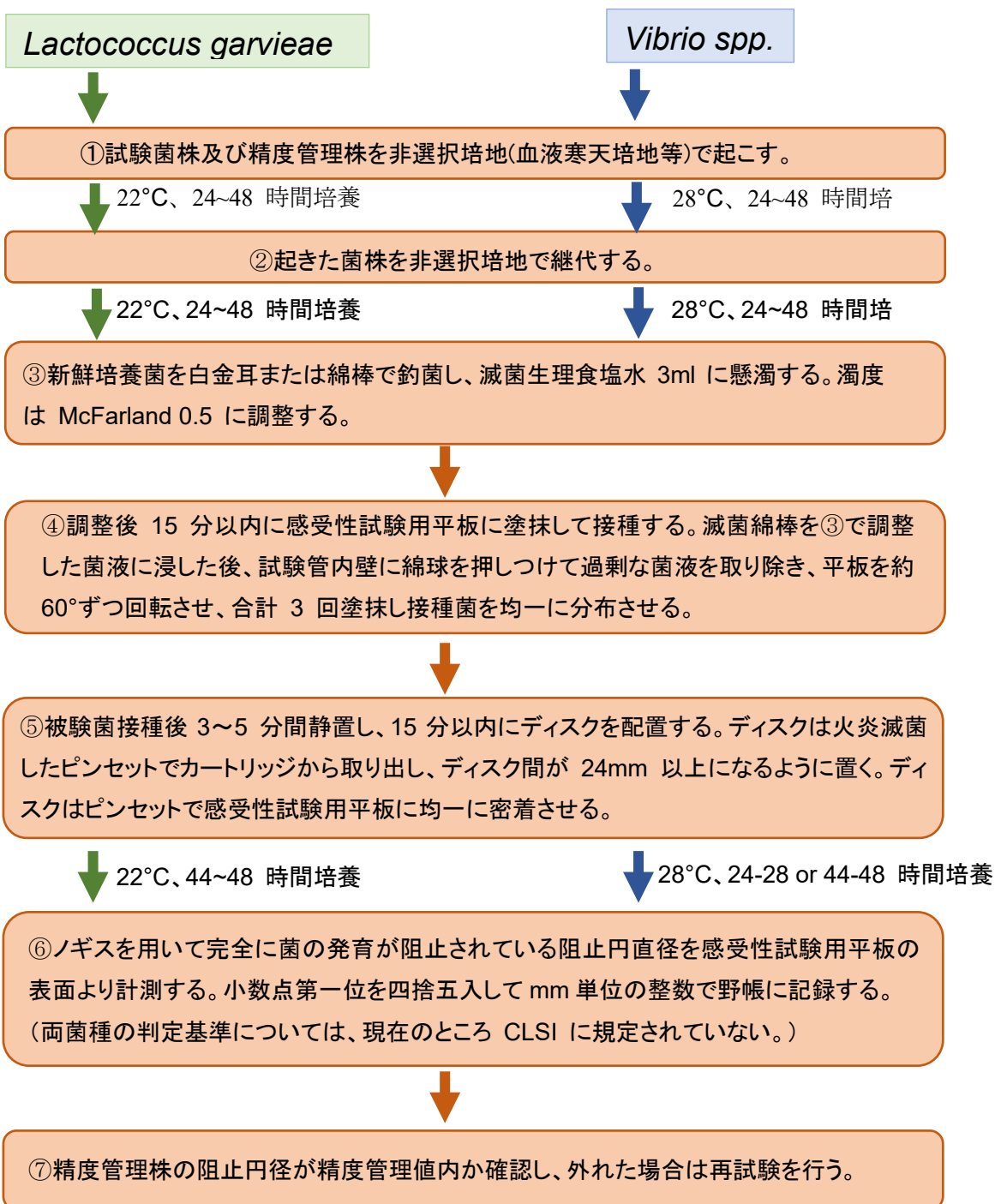


図 2-1 ディスク拡散法のフローチャート

2) 感受性試験用培地

Lactococcus garvieae

表面を乾燥した 5% sheep blood 添加ミューラーヒントン寒天培地（培地の厚み 4 mm、直径 90 mm 丸シャーレに培地 20 ml 分注、目視で厚みを確認すること）を用いる。培地の厚みが足りないと、薬剤感受性を過小評価することがある。5% sheep blood 添加ミューラーヒントン寒天培地は、日本ベクトンデキンソン社製 BD BBL (TM) ミューラーヒントン 5% ヒツジ血液寒天培地（商品型番：251176、20 枚入り）を購入可能。

自作の場合は、羊脱繊維血液を購入しミューラーヒントン寒天培地に加えて作成する。羊脱繊維血液は、使用期限が短くかつ生産スケジュールが決まっているため、実験スケジュールの調整が必要となる。なお、株式会社ジャパン・バイオシーラム等で購入可能。

Vibrio spp.

表面を乾かしたミューラーヒントン寒天培地（(培地の厚み 4 mm、直径 90 mm 丸シャーレに培地 20 ml 分注、目視で厚みを確認すること）を用いる。

他菌種を行う際は、表 1-1 を確認

3) 薬剤感受性ディスクの用意

CLSI 法に準拠した薬剤感受性ディスクは、栄研化学株式会社または日本ベクトンデキンソン社から購入可能。ただし、水産用医薬品として使用される薬剤は一部しか取り扱いが無い。現在販売されていない薬剤感受性ディスクの一部は、Appendix 水産用医薬品の薬剤感受性ディスク入手先（令和 7 年 12 月時点）に示す様に入手可能である。推奨はしないが、自作の薬剤感受性ディスクを作成する場合の手順を下記に示す。

薬剤感受性ディスクの作成法（参考例）

養殖研究所が公開している、CLSI 法に準じた研究用薬剤感受性検査ディスクの作成法を紹介する。（<http://nria.fra.affrc.go.jp/sindan/kenkyu/pdf/yakuzai.pdf>）

ここでは、参考例としてフロルフェニコール (FF) のディスク作成法を紹介するが、FF の薬剤感受性ディスクは、Appendix に示す様入手可能である。

1. 試薬類

- ・ 滅菌・乾燥済みのペーパーディスク（円形濾紙）
（ADVANTEC 製抗生物質検定用濾紙，薄手，直径6 mmなどを使用）
- ・ 薬剤原末
- ・ 溶媒および滅菌蒸留水
- ・ 0.22 μ m フィルター

2. フロルフェニコール (FF) 30 μg (力価) 含有薬剤感受性ディスク作成法

- ① 精密天秤で薬剤30 mg (力価) を計り取る。
- ② 計り取った薬剤に95%エタノールを滴下して溶解する。このとき95%エタノールはなるべく少量になるように注意する。
- ③ 滅菌蒸留水で20 mLにメスアップする (1.5 mg/mL)。
- ④ 0.22 μm フィルターでろ過滅菌する。
- ⑤ クリーンベンチで滅菌・乾燥済みのディスクに薬剤を20 μL ずつ染み込ませる (30 $\mu\text{g}/\text{disc}$)。できれば滅菌した金網の上で行うとよい。
- ⑥ そのままクリーンベンチ内で2～3時間乾燥させる。紫外線を当てないようにする。
- ⑦ 滅菌済みの容器に収容し、冷蔵庫で保管する。

注) エタノール溶媒の場合ディスクが20 μL をそのまま添加するとディスクから流出する場合がある。その際は、10 μL ずつ2回に分けて添加するか、薬剤濃度を3.0 mg/mL (2倍) とし、10 μL をディスクに添加する。

4. 力価について

- ・ 薬剤の種類やロットにより力価は異なるため、上記のプロトコルで力価 X mgの薬剤を秤量する際には次の計算式で秤量すべき薬剤の量を算出する。

$$\text{秤量 (mg)} = (1000 X) \div \{\text{薬剤の重量当たりの力価 (}\mu\text{g/mg)}\}$$

- ・ 通常は薬剤の力価は、薬剤の機能性部分の重量で示す。例えばホスホマイシンカルシウムであれば、カルシウムを除いたホスホマイシン ($\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_4\text{P}$) 部分のみの重量を力価とする。塩酸オキシテトラサイクリンであれば、オキシテトラサイクリンのみの重量を力価とする。一部の抗生物質については「動物用抗生物質医薬品基準 (平成24年9月農水省)」 (下記URL) を参照のこと。

http://www.maff.go.jp/nval/kentei_kensa/kousei/pdf/241226iyakuhinkijyun.pdf

5. 備考

薬剤は原則として滅菌蒸留水で溶解するが、水に溶解しない薬剤や難容性の薬剤はなるべく少量のエタノールや水酸化ナトリウムなどの溶媒で溶解した後、滅菌蒸留水でメスアップする。代表的な薬剤と溶媒を次ページの表1に示す。

表 1 代表的な水産用医薬品とその溶解に用いる溶媒

薬剤	略号	溶媒
アモキシシリン	AMPC	0.1M PBS
アンピシリン	ABPC	DW
エリスロマイシン	EM	95%エタノール
ジョサマイシン	JM	95%エタノール
スピラマイシン	SP	95%エタノール
リンコマイシン	LCM	DW
オキシテトラサイクリン	OTC	DW
ドキシサイクリン	DOXY	DW
チアンフェニコール	TP	95%エタノール
フロルフェニコール	FF	95%エタノール
ホスホマイシンカルシウム	FOM	DW
ビコザマイシン	BCM	DW
スルファモノメトキシ	SMMX	0.5N NaOH
オキシリン酸	OA	0.5N NaOH
スルフィソゾールナトリウム	SIZ	DW

4) 菌液の調整

培養した寒天培地上の被検菌を釣菌して滅菌生理食塩水に懸濁する方法（直接法）により調整する。菌液濃度は、McFarland 0.5 ($1.0 \sim 2.0 \times 10^8$ CFU/ml) と同じ濁度に合わせる。

McFarland 標準液は、菌液濃度を確認するための標準液として使用される（図 2-3）。McFarland 標準液の組成および対応する菌数濃度を表 2-1 に示す。なお、McFarland 標準液の代わりに栄研化学社製の標準菌濁度液 A を使用することが出来る。調整に当たっては、ストライプカードと呼ばれるストライプ柄のカードとともに濁度を確認すると調整しやすい（図 2-4）。

3 ml の生理食塩水に滅菌白金耳で菌体を懸濁し、標準菌濁度液 A と同じ濁度になる様ストライプカードをかざしながら目視で調整する（図 2-4）。

調整した菌液は、調整後 15 分以内に培地に塗抹する。



図 2-3 栄研化学社製の標準菌濁度液 A



図 2-4 ストライプカードと菌液調整

表 2-1 McFarland 標準液の組成および菌数濃度

McFarland 標準液	McFarland 標準液組成		菌液濃度 (CFU/ml)
	1% BaCl ₂ (ml)	1% H ₂ SO ₄ (ml)	
0.5	0.05	9.95	1.5×10 ⁸
1.0	0.1	9.9	3.0×10 ⁸
2.0	0.2	9.8	6.0×10 ⁸
3.0	0.3	9.7	9.0×10 ⁸
4.0	0.4	9.6	1.2×10 ⁹
5.0	0.5	9.5	1.5×10 ⁹

5) 菌液の接種法とディスクの配置

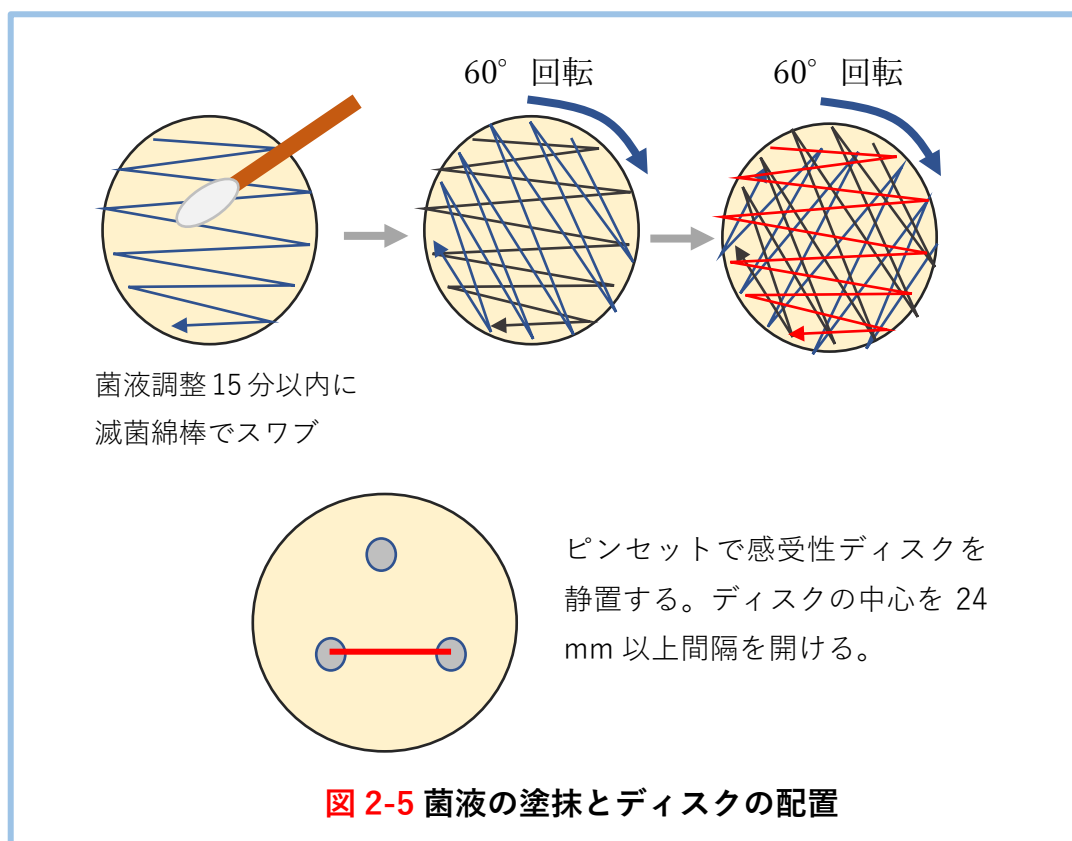
調整後 15 分以内の菌液を、滅菌綿棒で寒天培地に画線する (図 2-5)。綿棒は、綿径 5 mm 程度の綿棒 (日水製薬等) が使い易い。ディスクは密栓したままの状態室温に戻した後に、開封し使用する。ディスクは、お互いが 24 mm 以上の間隔が空く様に配置する。均一に薬剤を拡散させるため、ディスクは感受性試験用培地上に密着させる。

6) 培養条件と温度

Lactococcus garvieae : 22°C、44~48 時間

Vibrio spp. : 28°C、24 時間

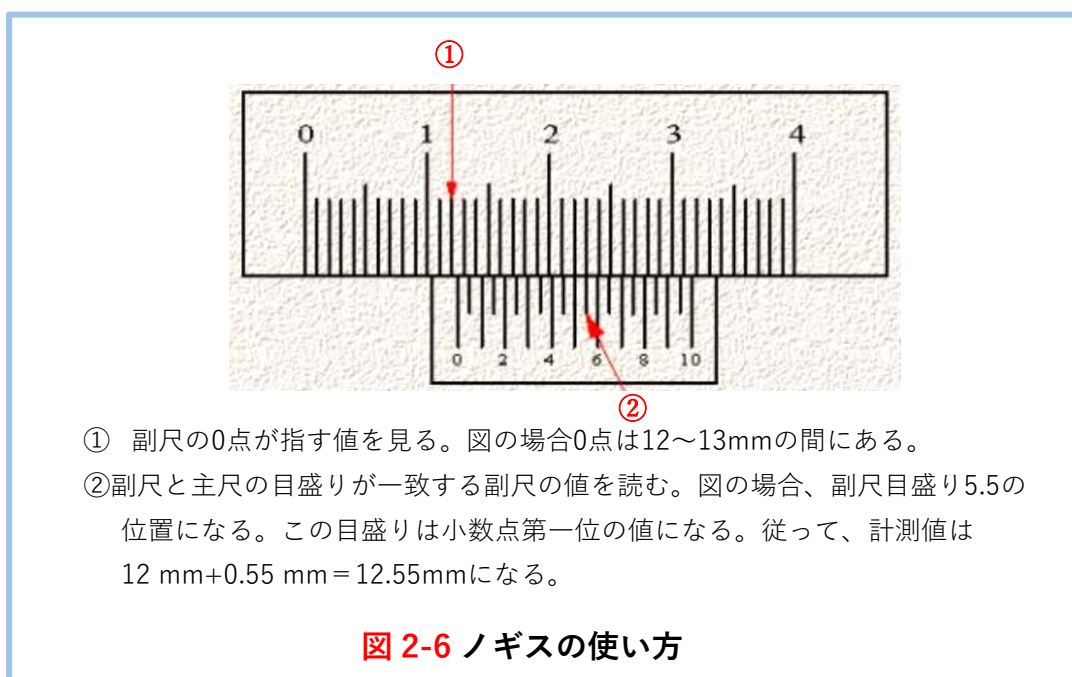
他菌種を行う際は、表 1-1 を確認

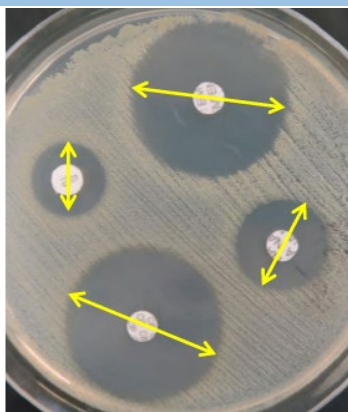


7) 阻止円直径の測定

完全に菌の発育が阻止されている阻止円の直径を平板の表側から測定する。小数点以下は四捨五入し、mm 整数で記録用紙に記録する。測定には、ノギスを使用する。ノギスの使用法は、図 2-6 示す。

ミューラーヒントン寒天培地を用いた際の測定例を図 2-7 に、5% sheep blood 添加ミューラーヒントン寒天培地を用いた際の測定例を図 2-8 示す。

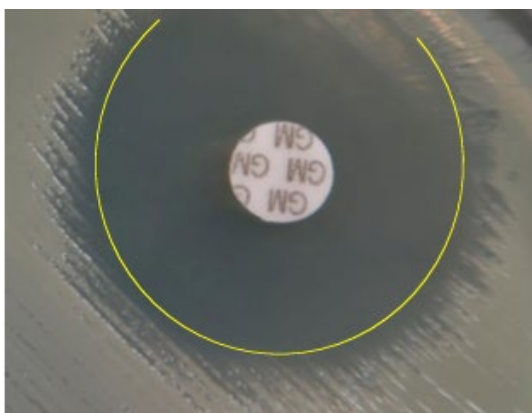




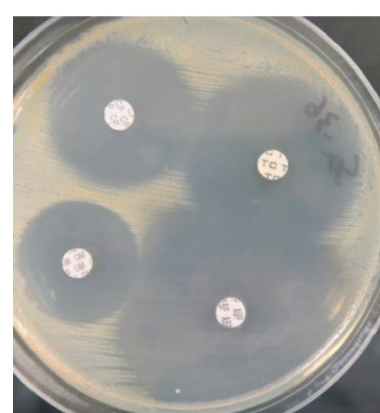
阻止円がしっかりと確認出来る例
阻止円直径を測定する



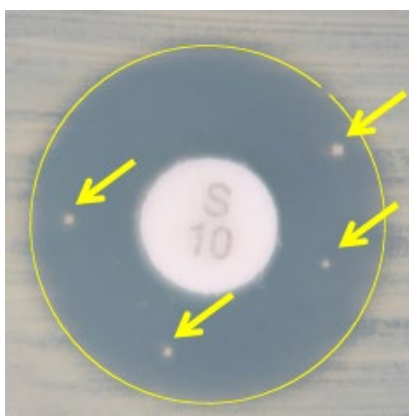
阻止円が確認出来ない例
ディスクの直径(6 mm)を記録する。



上記の様な阻止円の場合、完全阻止円（肉眼的に判別可能な菌の発育と発育が阻止されている境界）を測定する。



阻止円が重複、いびつな例
ディスクの配置を変更し、再試験。



阻止円の内側にコロニーが見られる例
菌のコンタミネーションを疑い、再単離。
それでも同じ結果の場合は、その内側を阻止円とする。

図 2-7 ミューラーヒントン寒天培地の阻止円直径の測定例

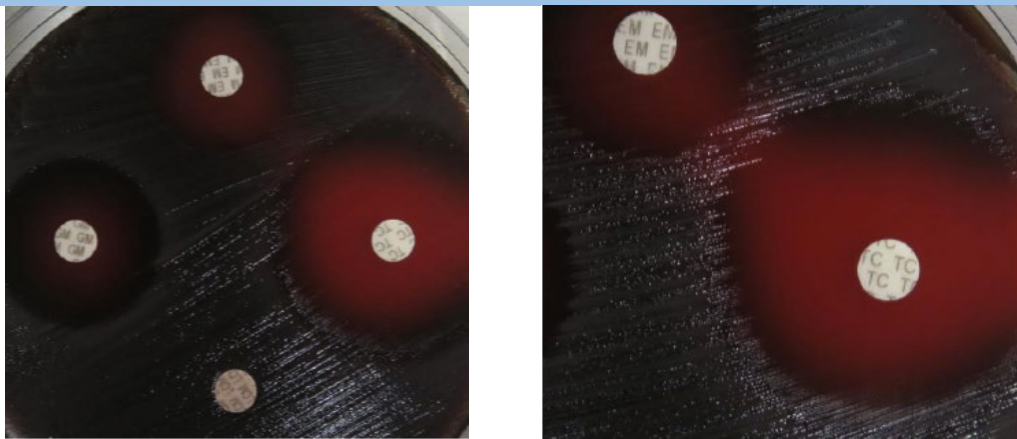


図 2-8 5% sheep blood 添加ミューラーヒントン寒天培地の阻止円直径の測定例

8) 判定

薬剤感受性試験の判定は、CLSI が提供している判定基準を用いる。しかし、現在 CLSI が提供している判定基準は、*Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila* の 2 菌種のみである。

現在、判定基準として Ecological cut-off value (CO_{wt}) が推奨されている⁴⁾。これは、感受性株である wild-type (WT) と薬剤感受性が低下した株 (NWT) を分ける手法である。ここでは、我々が 100 株の *L. garvieae* で行ったディスク拡散法試験結果による暫定的な判定基準を示す(表 2-2)。この判定基準に従った場合、判定の表記は野生型 (WT) または、非野生型 (NWT) と表記する。耐性および感受性という言葉を用いない。

表 2-2 *Lactococcus garvieae* (MHA + 5% sheep blood、22°C、44～48 時間) のディスク拡散法における判定基準 (Cut-off 値) 参考値

薬剤	ディスク薬剤 含有量	CO_{wt} (mm)	
		<i>L. garvieae</i> I 型	<i>L. garvieae</i> II 型
Erythromycin	15 μ g	≥ 21	≥ 26
Lincomycin	2 μ g	-	-
Tetracycline	30 μ g	≥ 23	≥ 24
Florfenicol	30 μ g	≥ 24	≥ 25

9) 精度管理

CLSI 法に準拠した薬剤感受性試験は、精度管理が必要である。しかしながら、*L. garvieae* の培養条件の精度管理基準は CLSI から示されていない。ここでは、我々が行った試験結果

を基準に暫定的な精度管理の参考値を示す（表 2-3）。

一方、*Vibrio* spp.の薬剤感受性試験条件（ミューラーヒントン寒天培地、28℃、24 時間または 48 時間）の精度管理基準は、CLSI から示されている（一部薬剤除く）（表 2-4）。

表 2-3 *Lactococcus garvieae* のディスク拡散法における精度管理暫定値

薬剤	ディスク 薬剤 含有量	阻止円直径（mm）			
		22 °C for 48 hr on Muller-Hinton Agar supplemented with 5% sheep blood (本マニュアルの暫定値)		22 °C for 48 hr on Muller-Hinton Agar (CLSI VET04, 3 rd Edition 参照)	
		<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC33658	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC33658
Erythromycin	15 µg	13-20	20-23	13-20	19-31
Tetracycline (Oxytetracycline)	30 µg	32-35	38-40	25-35*	28-38*
Florfenicol	30 µg	23-25	40-45	20-32	34-47
Lincomycin	2 µg	6	6	-	-

*, Quality control ranges for Oxytetracycline

表 2-4 *Vibrio* spp.（MHA、28℃、24～28 時間）のディスク拡散法における精度管理値

薬剤	ディスク薬剤 含有量	阻止円直径（mm）	
		<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC33658
Oxytetracycline	30 µg	23-29	28-34
Oxolinic acid	2 µg	25-32	32-41
Florfenicol	30 µg	20-30	33-41

10) 危険防止または取り扱い上の注意

(1)危険防止の注意

- ① 操作は全て微生物の取り扱いに習熟した人の指導の下に、バイオハザード対策を実施した上で行うこと。
- ② 検体(被検菌)及び培養後の菌類は全て感染の危険があるものとして十分に注意して取り

扱うこと。

- ③ 感染を避けるため、検査時は使い捨て手袋を着用すること。
- ④ 口によるピペッティングはしないこと。

(2) ディスク使用上の注意

- ① 試薬は指定の貯蔵方法で保存すること。
- ② 使用期限を過ぎたディスクは使わないこと。
- ③ ディスクは汚染しないように無菌的に取り扱うこと。
- ④ 開封後のディスクは乾燥剤を入れた密閉容器内で保管し、15°C以下に保存すること。開封後はなるべく早く（約 2 か月以内）使用すること。
- ⑤ ディスクは輸送上及び保管上で乾燥剤を入れた密閉容器内で保管し、15°C以下の状態を維持すること。
- ⑥ 使用中のカートリッジは、カートリッジの入っているビンに戻さないこと。

(3) 廃棄上の注意

- ① 使用後の平板は、オートクレーブ等で滅菌処理した後、廃棄すること。オートクレーブを使用する場合は蒸気を吸い込まないように注意すること。
- ② 検体に接触した器具や廃液等は、次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度 1,000ppm 以上、1 時間以上浸漬）又はグルタールアルデヒド（2%、1 時間以上浸漬）による消毒処理、あるいはオートクレーブ（121°C、20 分間以上）による滅菌処理を行うこと。
- ③ 滅菌後のシャーレや器具等は、医療廃棄物等に関する規定及び、水質汚濁防止法等の各種規制に従い、各施設の責任において処理すること。

3

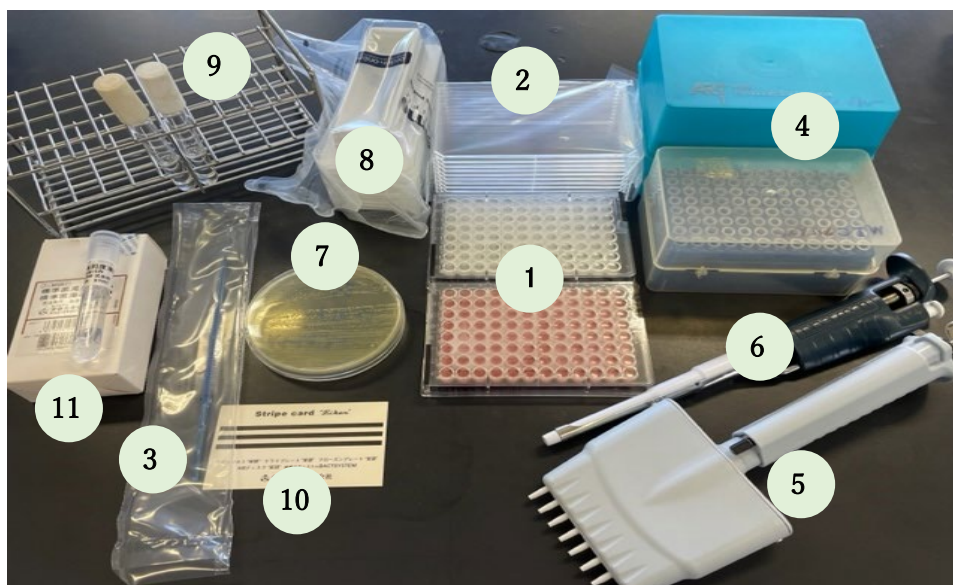
微量液体希釈法

微量希釈法は、液体希釈法でもマイクロプレートを使用し微量の液体培地(100 μ l)で希釈法を行う方法である。細菌の発育が阻止される抗菌剤の濃度から定量的な MIC 値を測定することが出来る。ここでは、CLSI 法に準拠したフローズンプレート(栄研化学)を用いた微量希釈法を紹介する。

微量液体希釈法の実際

CLSI 法に準拠したフローズンプレート(栄研化学)を使用した微量液体希釈法のフローチャートを図 3-1 に示す。

- 1) フローズンプレートを使用した微量液体希釈法に必要な試薬・器具
フローズンプレートを使用した微量液体希釈法に必要な試薬・器具を以下に示す(図 3-2)。



- | | |
|--------------------------|-----------------------|
| ① フローズンプレート | ⑦ 菌株 |
| ② フローズンプレート用フタ | ⑧ リザーバー |
| ③ 滅菌白金耳(エーゼ) | ⑨ 3ml, 2.7 ml 滅菌生理食塩水 |
| ④ 滅菌フィルターチップ | ⑩ ストライプカード |
| ⑤ 8連ピペット | ⑪ McFarland 標準液 |
| ⑥ マイクロピペット(1000 μ l) | |

図 3-2 微量液体希釈法に必要な試薬・器具

これ以外にも可能であればリーディングミラー（栄研、60,000 円）を用意する。

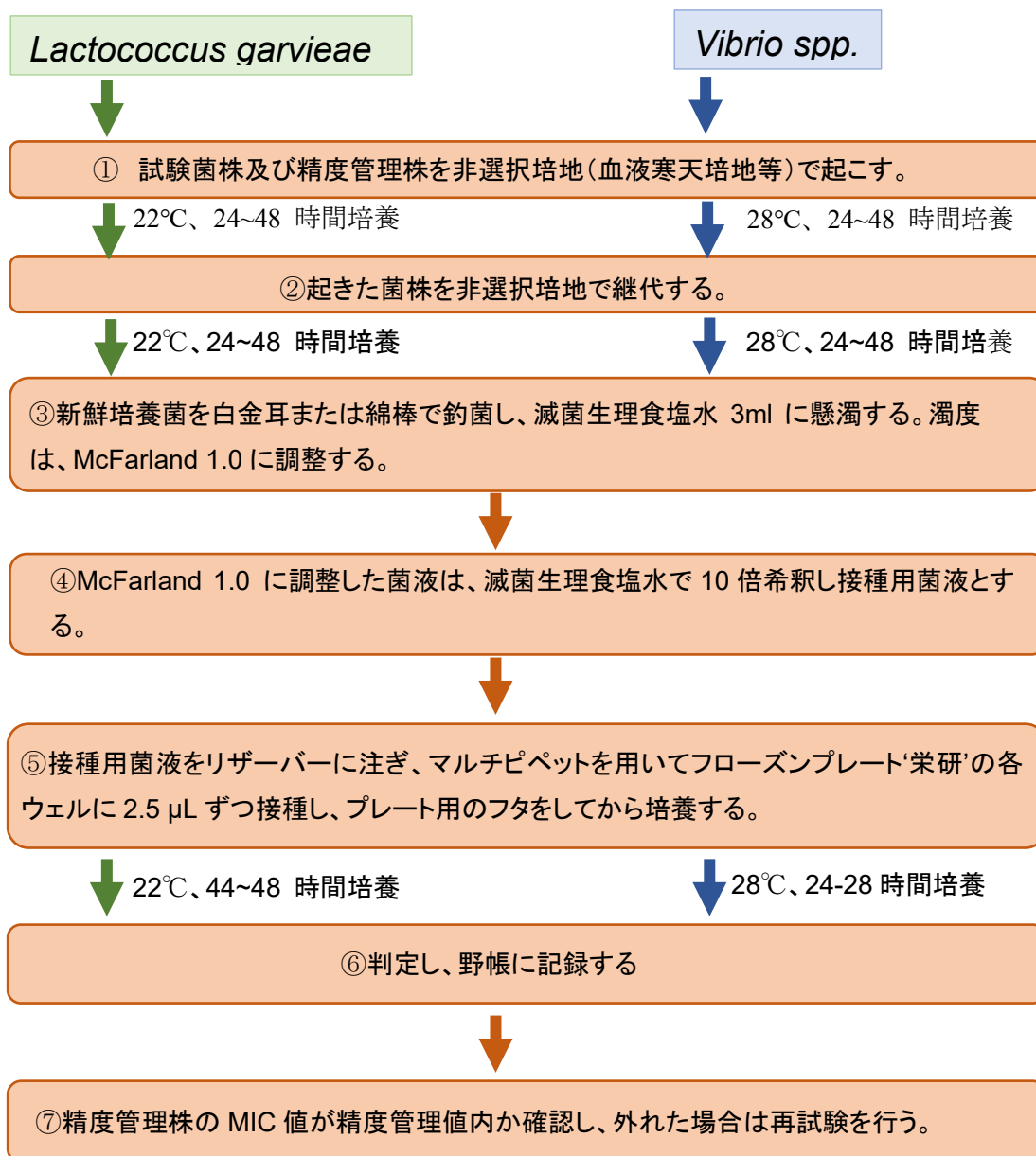


図 3-1 フローズンプレートを使用した微量液体希釈法のフローチャート

2) 感受性試験用培地

液体希釈法で用いる培地は、Muller-Hinton 液体培地の Ca^{++} , Mg^{++} 濃度をそれぞれ 1 mg/L に調整した CAMHB (cation-adjusted Muller-Hinton broth) を用いる。

Lactococcus garvieae

表 1-2 に示す様に、*L. garvieae* の液体希釈法は CAMHB に 2.5% LHB（ウマ溶血液）を加えたものを薬剤感受性試験に用いる。

Vibrio spp.

表 1-2 に示す様に、*Vibrio* spp. の液体希釈法は CAMHB（通常 NaCl は加えない）を用いる。

他菌種の薬剤感受性試験を行う際は、表 1-2 を確認すること。

CAMHB（cation-adjusted Muller-Hinton broth）調整の実際

Mg stock solution

MgCl₂ · 6H₂O 8.36g を 100ml の DW に溶解

0.2 μm シリンジフィルター（ADVANTEC DIMIC-25CS 等）による滅菌

Ca stock solution

CaCl₂ · 2H₂O 3.68g を 100ml の DW に溶解

0.2 μm シリンジフィルターによる滅菌

CAMHB

21 g の Muller-Hinton Broth (Beckton Dickinson) を蒸留水 1 ℓ に溶解し、オートクレーブで 121℃・15 分滅菌する。冷却後、0.1ml の Mg および Ca stock solution をそれぞれ加え CAMHB とする。

3) フロースンプレートの発注

CLSI 法に準拠したフロースンプレートは、栄研化学株式会社に発注可能（以降、栄研と略す）。ただし、発注から納品までに時間を要する場合があることから時間的な余裕を考慮すること。

フロースンプレートの発注にあたっては、プレートのデザイン（使用薬剤、薬剤濃度範囲、Ca²⁺、Mg²⁺および血液等の添加）が必要となる。また、薬剤により栄研に用意が無い場合がある。その場合、自分で薬剤を用意（購入または原末請求）し、それを栄研に送付する。講習会用のフロースンプレートのデザインを図 3-3 に示す。*L. garvieae* の薬剤感受性試験に、EM（エリスロマイシン）、OTC（オキシテオラサイクリン）、FFC（フロルフエニコール）を、*Vibrio* spp. に OTC と OXA（オキシリン酸）を用いる。

フロースンプレートの保存はディープフリーザー（-70℃以下）が必要となる。試験場やラボに施設整備されているか確認または整備を行う。

Lactococcus garvieae 用フローズンプレート (濃度は $\mu\text{g/ml}$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EM 128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	Control
B	Control	OTC 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	Control
C	Control	Control	FFC 32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	Control

1 株あ
たり

培地	添加物
Mueller Hinton broth	Ca^{++} , Mg^{++} , 馬溶血 (2.5%)

Vibrio spp.用フローズンプレート (濃度は $\mu\text{g/ml}$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control	OTC 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	Control
B	Control	OXA 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	Control

1 株あ
たり

培地	添加物
Mueller Hinton broth	Ca^{++} , Mg^{++}

図 3-3 本講習会で用いるフローズンプレートのデザイン

4) 菌液の調整

培養した寒天培地上の被検菌を釣菌して滅菌生理食塩水に懸濁する方法（直接法）により調整する。菌液濃度は McFarland 1.0 (3.0×10^8 CFU/ml) と同じ濁度に合わせる。

McFarland 標準液は、菌懸濁液の濃度を確認するための標準液として使用される（図 3-4）。McFarland 標準液の組成および対応する菌数濃度を表 3-1 に示す。なお、McFarland 標準液の代わりに栄研化学社製の標準菌濁度液 B を使用することが出来る（図 3-4）。調整に当たっては、ストライプカードと呼ばれるストライプ柄のカードとともに濁度を確認すると調整しやすい（図 3-5）。

3 ml の生理食塩水に滅菌白金耳で菌体を懸濁し、標準菌濁度液 B と同じ濁度になる様ストライプカードをかざしながら調整する（図 3-5）。濁度を調整した菌液 300 μl を 2.7 ml の滅菌生理食塩水に加え 10 倍希釈したものを接種用菌液とする。接種用菌液は、調整後 15 分以内にフローズンプレートに接種する。



図 3-4 栄研化学社製の標準菌濁度液



図 3-5 ストライプカードと菌液調整

表 3-1 McFarland 標準液の組成および菌数濃度

McFarland 標準液	McFarland 標準液組成		菌液濃度 (CFU/ml)
	1% BaCl ₂ (ml)	1% H ₂ SO ₄ (ml)	
0.5	0.05	9.95	1.5×10 ⁸
1.0	0.1	9.9	3.0 ×10 ⁸
2.0	0.2	9.8	6.0×10 ⁸
3.0	0.3	9.7	9.0×10 ⁸
4.0	0.4	9.6	1.2×10 ⁹
5.0	0.5	9.5	1.5×10 ⁹

5) 菌液の接種と培養

フローズンプレートは、使用約 1 時間前に冷凍庫から取り出し、室内温度に十分戻してから使用する。凍結融解の繰り返しは避けること。

接種用菌液は、滅菌リザーバーに移し 8 連マルチチャンネルピペット等で 2.5 μl ずつフローズンプレートに接種する。これにより最終接種菌量は約 5 ×10⁴ CFU/ウェルとなる。菌液接種後、フローズンプレート用のフタ（型番：M-C314）で覆う。

菌液を接種したフローズンプレートは、表 1-2、図 3-1 に示す様に、*L. garvieae* は、22℃・44~48 時間培養、*Vibrio* spp. は 28℃・24~28 時間培養を行う。

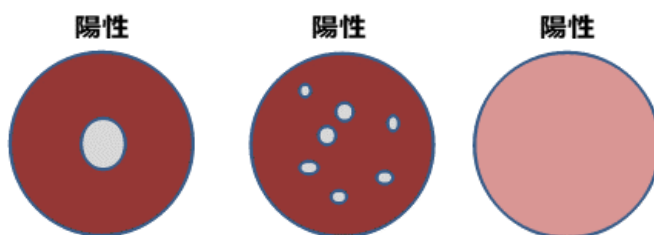
プレートを重ねて培養する場合は、各ウェルの培養温度を均一にするため、3 枚以上重ねるのは避けること。

6) 菌の増殖判定と記録

下記の判定基準に従い、明らかに菌の発育を認めたものを発育陽性、菌の発育が認められないものを発育陰性とする。菌の増殖が確認されない抗菌剤の最小濃度を確認し、その濃度を最小発育阻止濃度（minimum inhibitory concentration: MIC）とする。

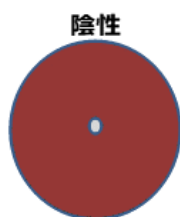
【発育陽性の判定基準】

- ①肉眼的に混濁又は直径 1 mm 以上の沈殿が認められた場合
- ②沈殿物の直径が 1 mm 未満であっても沈殿塊が 2 個以上認められた場合



【発育陰性の判定基準】

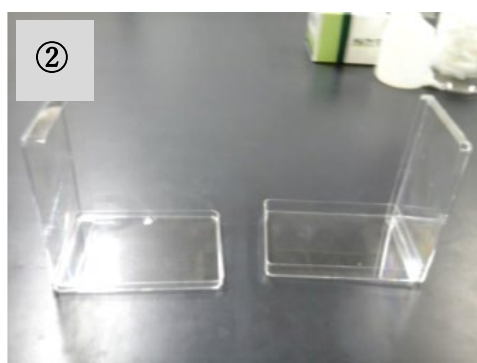
- ①肉眼的に混濁又は沈殿が認められない場合
- ②沈殿物があっても直径が 1 mm 未満で 1 個の場合



なお、菌の増殖確認時にリーディングミラーを用いると判定がしやすいが、価格の問題や資産管理のため準備するのが難しい場合がある。その場合、以下の様に簡易的かつ安価にリーディングミラーを用意することができるので紹介する（図 3-6）。



① の様にスタンドの鏡（100 円ショップで購入）と角シャーレ 2 セットを用意する。



②～④の様に角シャーレと鏡を組み立てる。



⑤の様に、プレートを上に乗せ、鏡の角度を変えて菌の発育状態を判定する。

図 3-6 簡易リーディングミラーの作り方

7) 判定

薬剤感受性試験の判定は、CLSI マニュアルが判定基準を提供している場合はそれを用いる。しかし、現在 CLSI が提供している判定基準は、*Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *Flavobacterium columnare*, *F. psychrophilum* の 4 菌種のみである。

L. garvieae および *Vibrio* spp. は、CLSI の判定基準が提供されていない。現在、病魚由来細菌の薬剤感受性調査では、細菌学ブレイクポイントが採用されている。

8) 精度管理

CLSI 法に準拠した薬剤感受性試験は、精度管理が必要である。しかしながら、*L. garvieae* の培養条件の精度管理基準は CLSI から示されていない。ここでは、我々が行った試験結果を基準に暫定的な精度管理の参考値を示す（表 2-2）。

一方、*Vibrio* spp. の薬剤感受性試験条件（ミューラーヒントン寒天培地、28℃、24 時間または 48 時間）の精度管理基準は、CLSI から示されている（一部薬剤除く）（表 3-1、表 3-2）。

表 3-1 *Lactococcus garvieae* (CAMHB+2.5% LHB) の液体希釈法における精度管理用参考値

薬剤	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922		<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC33658	
	Modal 1 ± log2 (μg/ml)	% of MIC results within QC range	Modal 1 ± log2 (μg/ml)	% of MIC results within QC range
EM	16-32	100	4-16	100
FF	8-16	100	0.25-1	100
OTC	1-2	100	0.25-0.5	100

表 3-2 *Vibrio* spp. の液体希釈法における精度管理値

薬剤	MIC QC Ranges (μg/ml)	
	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC33658
OTC	0.5-2	0.12-1
OA	0.06-0.25	0.008-0.03

CLSI VET04, 3rd Edition 参照

9) 危険防止または取り扱い上の注意

(1) 危険防止の注意

- ①操作は全て微生物の取り扱いに習熟した人の指導の下に、バイオハザード対策を実施した上で行うこと。
- ② 検体被験菌及び培養後の菌類は全て感染の危険があるものとして十分に注意して取り扱うこと。
- ③ 感染を避けるため、検査時は使い捨て手袋を着用すること。
- ④ 口によるピペティングはしないこと。
- ⑤プレートは輸送上及び保管上-70℃の状態を維持すること。

(2) 使用上の注意

- ①試薬は指定の貯蔵方法で保存すること。
- ②使用期限を過ぎた試薬は使わないこと。
- ③プレートは汚染しないように無菌的に取り扱うこと。
- ④プレートの直射日光への暴露は抗菌剤の力価低下の原因となるため、注意すること。

(3) 廃棄上の注意

- ①使用後のプレートは、オートクレーブ等で滅菌処理した後、廃棄すること。オートクレーブを使用する場合は、蒸気を吸い込まないように注意すること。
- ②検体に接触した器具や廃液等は、次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度 1,000ppm 以上、1 時間以上浸漬）又はグルタルアルデヒド（2%, 1 時間以上浸漬）による消毒処理、あるいはオートクレーブ（121℃, 20 分間以上）による滅菌処理を行うこと。ただし接種機及び判定機の付属機器についてはその取扱説明書に従うこと。
- ③プレートはポリスチレン（PS）、プレートシールはポリエチレンテレフタレート（PET）、ケースは紙を主な材質としている。
- ④滅菌後のプレートや器具等は、医療廃棄物等に関する規定及び、水質汚濁防止法等の各種規制に従い、各施設の責任において処理すること。

参考文献

- 1) 動物用抗菌剤研究会 MIC 測定法標準化委員会 (2004); 動物由来細菌に対する抗菌性物質の最小発育阻止濃度(MIC)測定法の改定について. *Fish Pathol.*, **39**, 47-67.
- 2) Clinical and laboratory standards institute (2020); Methods for antimicrobial broth dilution and disk diffusion susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals, 2nd Edition, VET03. Wayne, PA: Clinical and laboratory standards institute.
- 3) Clinical and laboratory standards institute (2020); Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals, 3rd Edition. VET03. Wayne, PA: Clinical and laboratory standards institute.
- 4) Kronvall G, Smith P. (2016); Normalized resistance interpretation, the NRI method: Review of NRI disc test applications and guide to calculations. *APMIS.*, **124**, 1023-1030.

Appendix 水産用医薬品の薬剤感受性ディスク入手先（令和7年12月時点）

抗生物質/ 合成抗菌剤	系統名	抗菌剤名	供給元 (製造販売業者/輸入業者/製造者)	製品名	関連会社 問い合わせ先	入手方法
抗生物質	β-ラクタム系	アンピシリン(ABPC)	栄研化学(株)	KBディスク®‘栄研’アンピシリン(10μg)		医薬品等販売店を通じて販売されています。
	テトラサイクリン系	塩酸オキシテトラサイクリン (OTC)*	栄研化学(株)	KBディスク®‘栄研’テトラサイクリン (30μg)		医薬品等販売店を通じて販売されています。
		アルキルトリメチルアンモニウムカルシウム オキシテトラサイクリン(QTC)*		*OTC及びQTCはテトラサイクリンで代用可能		
		塩酸ドキシサイクリン(DOX)		KBディスク®‘栄研’ドキシサイクリン(30μg)		
	マクロライド系	エリスロマイシン (EM)	栄研化学(株)	KBディスク®‘栄研’エリスロマイシン(15μg)		医薬品等販売店を通じて販売されています。
	リンコマイシン系	塩酸リンコマイシン (LCM)	栄研化学(株)	KBディスク®‘栄研’リンコマイシン (2μg)		医薬品等販売店を通じて販売されています。
	その他	ホスホマイシン (FOM)	栄研化学(株)	KBディスク®‘栄研’ ホスホマイシン (50μg)		医薬品等販売店を通じて販売されています。
合成抗菌剤	キノロン系	オキシリン酸	栄研化学(株)	オキシリン酸ディスク (パラザン製品群用)	物産アニマルヘルス株式会社畜水産事業部 事業プロモーションG 〒541-0053 大阪市中央区本町2-5-7 Tel: 06-4705-8067 https://www.bussan-ah.com	左記連絡先へ お問い合わせください。
	サルファ剤	スルファモノメトキシシ又は そのナトリウム塩 (SMMX)	—	—	—	—
		スルファモノメトキシシ及び オルメトプリムの合剤	栄研化学 (株)	KBディスク®‘栄研’スルファメトキサゾール・ トリメトプリム (23.75μg/1.25μg)		医薬品等販売店を通じて販売されています。
		スルフィソゾールナトリウム	—	—	—	—
	チアンフェニコール系	フロルフエニコール (FF)	栄研化学(株)	VKBディスク®‘栄研’フロルフエニコール (30 μg)	MSD アニマルヘルス株式会社 〒102-8667 東京都千代田区九段北1-13-12 Tel : 03-6272-0770 mail : susumu.matsukura@merck.com	左記連絡先へ お問い合わせください。
		チアンフェニコール (TP)	栄研化学(株)	チアンフェニコール	共立製薬株式会社 学術 〒102-0073 東京都千代田区九段北1-11-5 Tel : 03-3264-7559	
					共立製薬株式会社 学術 〒102-0073 東京都千代田区九段北1-11-5 Tel : 03-3264-7559	動物薬販売店を通じて販売されています。

ディスク拡散法記録用紙

_____年 AMR 講習会

都道府県：

実施者：

実施日：

Lactococcus garvieae

菌株	阻止円直径(mm)		
	OTC (30μg)	EM (15μg)	FF (30μg)
<i>E. coli</i> ATCC25922			
<i>A. salmonicida</i> ATCC33658			

Vibrio spp.

菌株	阻止円直径(mm)		
	OTC (30μg)	OA (30μg)	
<i>E. coli</i> ATCC25922			
<i>A. salmonicida</i> ATCC33658			

微量液体希釈法記録用紙

_____年 AMR 講習会

都道府県： _____ 実施者： _____ 実施日： _____

Lactococcus garvieae

E. coli ATCC25922

($\mu\text{g/ml}$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EM 128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control
B	Control	OTC 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control
C	Control	Control	FFC 32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control

A. salmonicida ATCC33658

($\mu\text{g/ml}$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EM 128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control
B	Control	OTC 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control
C	Control	Control	FFC 32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control

L. garvieae _____

($\mu\text{g/ml}$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EM 128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control
B	Control	OTC 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control
C	Control	Control	FFC 32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control

微量液体希釈法記録用紙

_____年 AMR 講習会

都道府県：

実施者：

実施日：

Vibrio spp.

E. coli ATCC25922

($\mu\text{g/ml}$)

.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control	OTC 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control
B	Control	OXA 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control

A. salmonicida ATCC33658

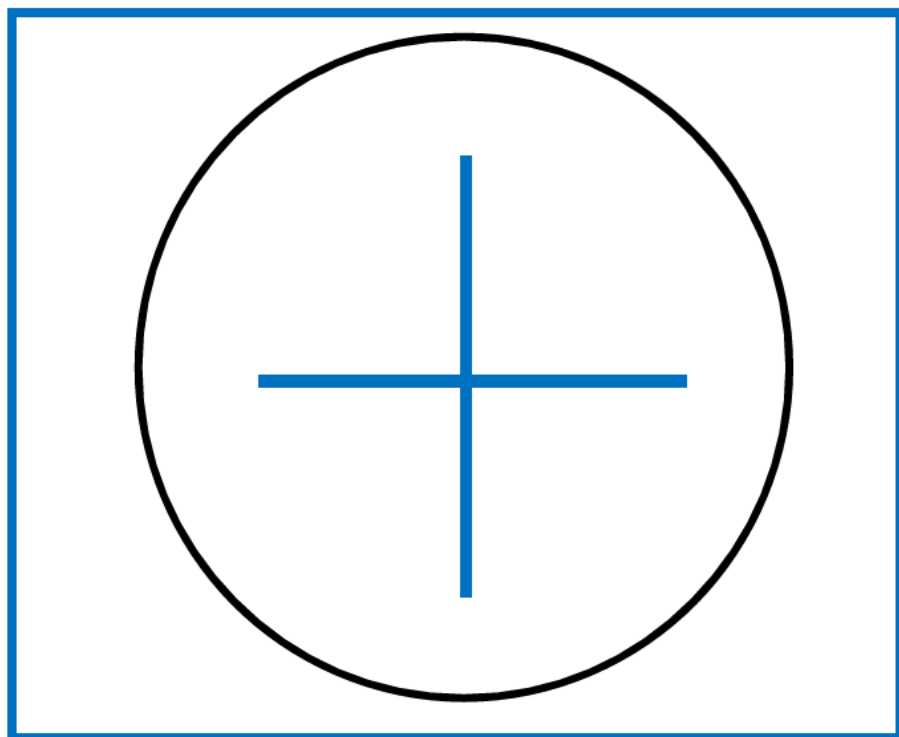
($\mu\text{g/ml}$)

.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control	OTC 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control
B	Control	OXA 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control

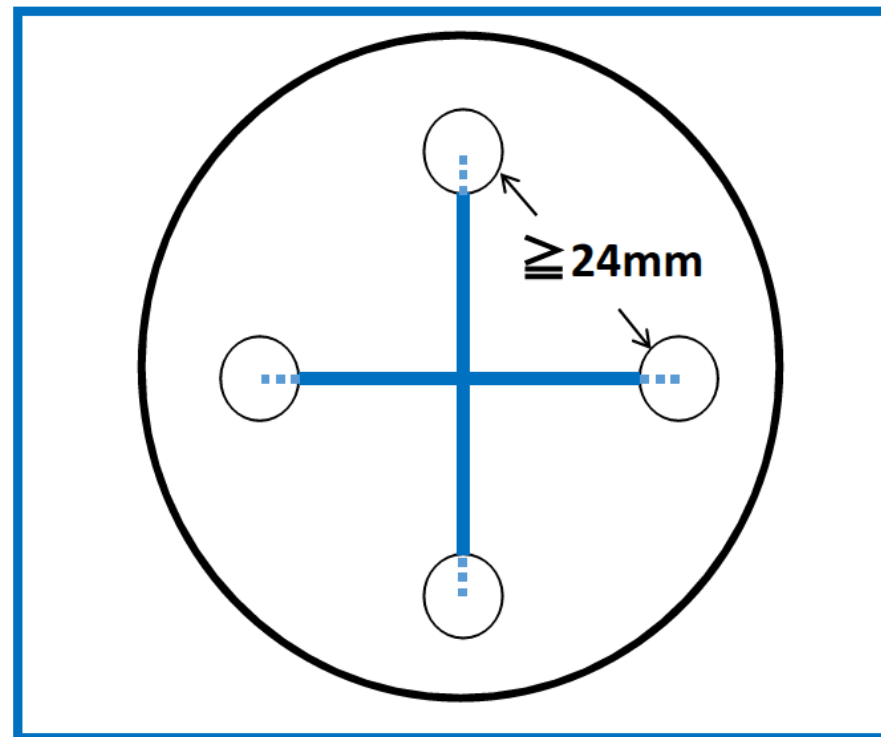
Vibrio spp. _____

($\mu\text{g/ml}$)

.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control	OTC 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control
B	Control	OXA 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control



被検菌を接種し3～5分静置した平板
をディスク型紙に合わせて置く。



火炎滅菌したピンセットで型紙に合わせて
ディスクを置く。
ディスクはピンセットで平板に均一に密着
させる。

水産分野における薬剤耐性に関する技術研修会テキスト
水産分野における薬剤感受性試験マニュアル

2023 年 3 月 初版

2023 年 12 月 訂正版 (Rev.1)

2025 年 12 月 訂正版 (Rev.2)

著、編集 水産大学校 古下 学

発行 農林水産省 消費・安全局