

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07554

研究課題名(和文) ワクチン効果が低下した非定型レンサ球菌の出現と新規ワクチン開発に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the new emerging *Laccococcus garvieae* serotype II infection and its vaccine development

研究代表者

吉田 照豊 (Terutoyo, Yoshida)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：20240294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：レンサ球菌症の症状を呈する養殖ブリより抗*Laccococcus garvieae* KG-血清に凝集しない細菌が分離された。この菌株を従来の菌株と区別するために血清型II型と提唱した。DNA-DNAハイブリダイゼーション試験では従来の*L. garvieae*との相同性が70%以上であったことから、*L. garvieae*であると考えられた。BSFGE解析の結果、異なる地域で分離された非凝集性株間で類似の電気泳動パターンを示した。血清型I型で免疫した場合、II型の菌株の感染には効果が低いことが判明した。I型およびII型を識別することのできるプライマーを設計した。

研究成果の概要(英文)：We propose that the non-agglutinating strains belong to a new serotype II of *L. garvieae* as the pathogen of *Seriola* spp., which did not agglutinate with an antiserum against serotype I. The DNA-DNA hybridization between the both strains were higher than 70%. The 16S rRNA gene of the serotype II revealed high similarity with serotype I. The serotype II strains showed the same bacteriological characteristics as serotype I strains. The biased sinusoidal field gel electrophoretic patterns of serotype II strains were similar. The result of cross-protection tests suggested the serotype I FKC might confer the insufficient protection to the fish against the serotype II, however, the immunization with the serotype II FKC was quite ineffective for the serotype I infection. To distinguish the two serotypes, a primer set was developed to target the *glxR-argS* intergenic region. As a result of PCR, different-sized fragments were amplified from the serotype II and serotype I strains.

研究分野：魚類病原微生物学

キーワード：*Laccococcus garvieae* serotype I serotype II vaccine *Seriola* emerging pathogen

1. 研究開始当初の背景

魚類の溶血性レンサ球菌の原因細菌である *Lactococcus garvieae*(LG)は、ブリ類養殖魚の疾病であり、最悪の被害のあった感染症の原因細菌である。治療のため使用していた抗菌剤に対する多剤耐性菌の出現により大きな被害のあった細菌感染症である。しかしながら、長年にわたる研究の成果から経口ワクチンや注射ワクチンが開発・認可市販され、その効果も優れていることから、その被害は年々減少してきた。現在では、ブリ、カンパチを含めブリ属魚類の養殖魚は、単味ワクチンのみならず LG を主体とする他の感染症との混合ワクチンが使用されており、ブリ類養殖魚類のレンサ球菌対策において不可欠なワクチンとなっている。近年、LG はブリ類魚類から分離されるだけでなく、ニジマスの病原細菌としても海外でも大きな問題となっている。さらに近年では、人の心内膜炎やウシの乳房炎に罹患している患者・患畜からも分離されるとの報告が増えている。さらには、乳製品や人の糞便からも LG の分離の報告が増加しており、我々はその疫学研究と由来に関して一部報告した。また、我々の研究で、ブリ属魚類から分離される LG は、マウスに対して病原性は低いもののブリ属魚類に対して非常に強い病原性を示すことを報告した。また、ブリ属魚類以外から分離される LG(ヒト、ウシ、ネコ、食品由来、ニジマス)は、ブリに対して病原性が低いがあるいは全く無いことを明らかにしており、その遺伝型においても異なることを示した。しかしながら 2012 年、LG に対するワクチンを接種したにも関わらずワクチン効果が認められず、九州の複数のブリ属養殖場において、遺伝学的および細菌学的性状から LG に分類される細菌が分離される症例が頻発した。また、2013 年においてはさらに、複数の県においてブリ養殖場において拡大した。2014 年度においても、その非定型 LG 感染の報告があり、今まで報告のなかった養殖場で感染が拡大している。

LG を主体として、日本の魚類養殖に定着したワクチンの基本を脅かす新たな抗原性の異なる非定型 LG の出現であり、ブリ類養殖

業に脅威を与えるものである。緊急性を持って、新たな細菌感染症に対応する必要がある。本研究は、ワクチン効果の無い非定型 LG 菌株の細菌学的性状および抗原解析を行うと主に、従来のワクチン効果のある菌株と効果が低下した菌株とのゲノム情報を比較して、その相違を基に、PCR で識別を可能にするものである。また、従来の株との抗原性を比較するとともにその病原性をブリ、カンパチを用いて証明する。2012、2013 および 2014 年に分離された菌株の由来を明らかにするために疫学調査を実施した。

2. 研究の目的

ブリ類のレンサ球菌症に対する予防法として非常に効果のあるワクチンが開発されて以来その被害は激減し、現在ではブリ類養殖産業において不可欠なワクチンとなった。しかしながら 2012 年、従来のレンサ球菌ワクチンを接種したにもかかわらずワクチン効果が認められず、養殖魚類(ブリ)から従来のレンサ球菌に類似した細菌が分離される事例が頻発した。病魚の症状も従来のレンサ球菌感染症に酷似していた。また、分離された細菌はワクチン効果のある従来のレンサ球菌と細菌学的性状が類似していたが、抗原性が異なっていた。このような事例は、複数の県におけるブリ養殖場にまたがり発生した。さらに 2013 年度および 2014 年度においても発生が認められ感染の拡大が進行している。ワクチン効果が低下した非定型 *Lactococcus garvieae*(LG)が出現すると共に養殖場においてその被害が拡大している。この非定型 LG はブリやカンパチに対しても毒性が認められ、既にブリ類の養殖場において大きな問題となっている。この非定型 LG の細菌学的性状を詳しく調査する。

3. 研究の方法

1) ワクチン効果低下の証明

ブリおよびカンパチに従来の市販のワクチンを用いて免疫し、従来の定型株と今回新たに出現した非定型 LG 菌株を用いて攻撃することにより、今回問題となっている非定型 LG 菌株に対するワクチン効果の低下を証明す

るとともに、そのワクチン効果低下の程度を明らかにする。その際、死亡率だけではなく臓器における菌数測定など、死亡率だけでは明らかにされないワクチン効果低下を明確にする情報を収集する。

2) ワクチン効果減弱非定型株と従来型の菌株の性状比較と疫学調査

ワクチン効果低下非定型株と従来型の菌株の細菌学的性状を検討する。さらに、既に養殖魚類において非定型細菌の感染が確認されている（愛媛、大分、宮崎、香川）各県の養殖場からの菌株を収集し、溶菌ファージによるファージ型別や薬剤感受性を検討し、従来型の細菌との違いを明確にする。また、これら非定型菌株がブリ類の養殖場においてにどれほど拡大しているかを、各県（鹿児島県、宮崎県、大分県、愛媛県等）の水産試験場との連携より疫学調査の実施により被害の程度を明らかにする。さらにこれら各県で分離した非定型菌株間の同一性をパルスフィールド電気泳動解析し、日本のブリ類養殖場における感染拡大の程度を明らかにすることで、各県試験場に情報を伝える。

3) 従来 *Lactococcus garvieae* とワクチン効果が低下した LG とのゲノム情報の比較と診断技術の開発 次世代シーケンサーによりゲノム解読：既に解読が終了している従来のブリ由来菌株をレファレンス株 (LG2) とし、ワクチン効果が低下した非定型菌株のゲノムの塩基配列を次世代シーケンサーで解析する（一部終了している）。その際、ヒトおよび畜産由来の *L. garvieae* 株において、登録されている病原性に関わる遺伝子の探索を行う。特に、莢膜遺伝子、M-like タンパク、フィブロネクチン結合タンパク、溶血性遺伝子（ストレプトリジン S）およびスーパー抗原遺伝子等のヒトあるいは畜産動物に対して病気を起こさせる因子をターゲットに探索する。また、従来の株にない配列を探索するとともに、従来の株とは異なる配列部分をターゲットにした PCR 系で両者を識別できるようにすることで、一度の PCR で非定型あるいは定型菌株を同定できるマルチプレックス PCR 系を開発し迅速診断法を確立する。

4. 研究成果

1) 従来の診断用抗血清 KG に凝集しない細菌を非凝集株としていたが、血清学的に II 型菌株と提唱した。それに伴い、従来の菌株を血清型 I 型株とした。また、I 型を Ia (KG⁻ タイプ) と Ib (KG⁺) とそれぞれ命名した。

2) 水産試験場との共同研究により、血清型 II 型の菌株は、I 型の菌株のワクチンに対して防御効果が低いことが判明した、また、ブリに対する病原性は、I 型より II 型は低いことが判明した。

3) 血清型 I 型と II 型の菌株の性状は、非常に類似しており、一般性状において識別することが不可能であった。また、血清学的には、一部共通抗原が認められた。また、ファージに対する感受性は、I 型と II 型に大きな違いがあり、I 型のファージには感受性を示さなかった。

4) II 型の完全ゲノム解析より、I 型と II 型の特徴のある遺伝子の探索を行った。魚類の病気を起こさせる遺伝子は、I 型と類似していたが、莢膜産生に関わる遺伝子群が異なるあるいは欠失していると考えられた。

5) ゲノム解析から I 型と II 型を認識できるプライマーを設計した。その結果、I 型と II 型を識別できる PCR 系を確立した。この方法で、養殖場から分離できる *L. garvieae* を明確に診断できることを示した。

6) II 型菌は、既にリンコマイシン系薬剤に耐性化していた。また、この耐性は、ABC 輸送体遺伝子の変異に関与している可能性を示した。また、II 型菌は、BSFGE の解析の結果、非常に均一な最近集団であることが判明した。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1) D. Oinaka, N. Yoshimura, Y. Fukuda, A. Yamashita, S. Urasaki, Y. Wada and T. Yoshida (2015): Isolation of *Lactococcus garvieae* showing no agglutination with anti-KG phenotype rabbit serum. *Fish Pathology*, 50 (2), 37-43 (査読あり).

2) K. Ohbayashi, D. Oinaka, T. D. Hoai, T. Yoshida and I. Nishiki (2017); PCR-mediated identification of the newly emerging pathogen *Lactococcus garvieae* serotype II from *Seriola quinqueradiata* and *S. dumerili*. *Fish Pathology*, 52 (1), 46-49 (査読あり).

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 照豊 (Terutoyo Yoshida)
宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：20240294

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

福田 穰 (Fukuda Yutaka)
大分県農林水産研究指導センター水産研究部