

平成 21 年 4 月 7 日現在

研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19580212
 研究課題名（和文）：
 ブリ属魚類養殖場における新型および旧型レンサ球菌感染症の疫学的研究
 研究課題名（英文）：
 Epidemiological studies on *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus dysgalactiae*
 infection in fish farms
 研究代表者：吉田照豊
 宮崎大学・農学部・准教授
 研究者番号：20240294

研究成果の概要：

ブリ属魚類養殖場における新型および旧型レンサ球菌感染症の疫学的研究を行った。旧型レンサ球菌 (*Lactococcus garvieae*) の薬剤感受性を調査すると共にファージ型を明らかにし、近年の旧型レンサ球菌に新しい遺伝型が増加していること明らかにした。また、*L. garvieae* は、養殖魚以外に多くの宿主から分離されており、それらの細菌と遺伝型、ファージ型、ブリに対する病原性が異なることを示した。ブリ属養殖魚類由来の新型レンサ球菌 (*Streptococcus dysgalactiae*) は、畜産動物由来の *S. dysgalactiae* とその遺伝型が異なると共に、*SodA* 遺伝子に違いが認められ、その違いを基に両者を識別できるプライマーを設計した。このプライマーで、PCR で容易に両者を識別できることが可能となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学、水産学一般

キーワード：魚病、新興感染症

1. 研究開始当初の背景

日本の海産養殖魚類、特にブリ属魚類養殖のレンサ球菌感染症の病原体は、 α 溶血性レンサ球菌感染症 (旧型レンサ球菌感染症) の原因細菌である *Lactococcus garvieae* およ

びランスフィールド C 群レンサ球菌感染症 (新型レンサ球菌感染症) の原因細菌である *Streptococcus dysgalactiae* がある。特に *S. dysgalactiae* は、哺乳動物の体温と同じ 37 度が増殖最適温度であり、通常の魚病細菌と

は最適生育温度が異なると同時に、マウスに対しても毒性があり、公衆衛生上注意が必要な魚病細菌である。最近では *L. garvieae* 感染症（旧型レンサ球菌）を予防する注射ワクチン・経口ワクチンが開発され、*L. garvieae* 感染症そのものの被害は減少傾向にあるが、未だにブリ属魚類の養殖場ではその被害が散発的に認められる。さらには、ワクチンを投与したにもかかわらず、*L. garvieae* 感染症の被害報告があり、ワクチンの効果に疑問を抱く養殖業者が増加している。その原因のひとつには、これら両レンサ球菌感染症を明確に診断せず、レンサ球菌感染症をひとくくりにして診断するケースが多くあり、間違った診断を下すケースが報告されている。特に、*L. garvieae* 感染症のワクチンが市販されて以来、確定診断をしないケースが多々ある。原因の2つ目には、*L. garvieae* 細菌自体の変異によるワクチン効果の減弱の可能性も疑われる。

2. 研究の目的

日本の海産養殖魚類、特にブリ属魚類養殖のレンサ球菌感染症の病原体は、 α 溶血性レンサ球菌感染症（旧型レンサ球菌感染症）の原因細菌である *Lactococcus garvieae* およびランスフィールドC群レンサ球菌感染症（新型レンサ球菌感染症）の原因細菌である *Streptococcus dysgalactiae* である。特に *S. dysgalactiae* は、哺乳動物の体温と同じ37度が増殖最適温度であり、通常の魚病細菌とは最適生育温度が異なると同時に、マウスに対しても毒性があり、公衆衛生上注意が必要な魚病細菌である。ゆえに、この2種類の新旧レンサ球菌の疫学研究をおこなう。

3. 研究の方法

1) データベースの充実化

研究代表者および研究協力者が、養殖魚から現在まで収集保存してきた *L. garvieae* および *S. dysgalactiae* 細菌株のデータベース化を、分離年別、養殖場別、宿主別に行っており、これらの菌株のデータベース化の充実を図る。また、海外からの養殖魚、乳製品、畜産動物、ヒト由来 *L. garvieae* 菌株と畜産動物由来 *S. dysgalactiae* の譲渡を世界の研究者から受けている。これら菌株も含めたデータベース化を充実させる。

2) 疫学調査の実施（遺伝疫学・ファージ疫学・薬剤感受性調査）上記のすべての細菌の遺伝疫学調査を細菌のゲノムを分離した後、制限酵素である *SmaI* および *ApaI* で切断後、パルスフィールド電気泳動により断片を分離し、遺伝子型を決定する (Nomoto et al., 2004 and 2006; Kawanishi et al., 2006)。この遺伝子型別は平成20年度も含め継続調査する。この遺伝子型別から系統樹を作成し、レンサ球菌の出現傾向と遺伝子型の関係について調査する。さらに、これら細菌のバクテリオファージ型を当研究室保存 (Kawanishi et al., 2006) のバクテリオファージ4種を用いて明確に型別化する (Ooyama et al., 2006; Kawanishi et al., 2006)。また、これらレンサ球菌感染症の治療に用いている薬剤の感受性測定を、アンピシリン (ABPC)、エリスロマイシン (EM)、リンコマシン (LM)、テトラサイクリン (TC)、フロルフェニコール (FF) 等のMIC値を測定する。

3) 異なる遺伝型・ファージ型細菌に対するワクチン評価

L. garvieae 感染症は、2002年よりワクチンが開発され市場で用いられるようになっているが、19年度、20年度のデータと現在までのデータから、ワクチンが市販される前の細菌株と市販後の細菌株では遺伝子型、ファージ型、莢膜抗原型が異なることが明

らかになっている。これら、市場にワクチンが用いられるようになった後の分離菌株で、遺伝子型、ファージ型異なる菌株に対して、現在使用されているワクチンの効果があるのかを評価する。

4. 研究成果

1) データベース化

2002 年度よりブリ属魚類の養殖場で問題となっている新型・旧型レンサ球菌の疫学調査を行った。遺伝型、ファージ型および薬剤感受性調査を行い、データベース化を行った。その結果、両株合わせて計600株の菌株をデータベース化すると共に保存した。

2) 旧型レンサ球菌の疫学調査

遺伝型、薬剤感受性、ファージ型で新しいタイプの分離菌が増加していた。これらの菌株は、ブリ以外の養殖魚であると共に、ワクチン投与したブリから分離されたものであった。これらの菌株で、市販のワクチンを免疫した魚に対して攻撃試験を行った結果、ワクチンは有効であることが判明した。

3) 新型レンサ球菌の疫学調査

新型レンサ球菌は、ほとんどの薬剤に感受性を示したが、オキシテトラサイクリンには多くの菌株が耐性を示し、tetM の耐性遺伝子を保有していることが判明した。これらの耐性と遺伝型を調べることにより、日本の養殖魚において分離される新型レンサ球菌は、遺伝型が類似して菌株の集団が養殖場で拡大していることが判明した。

4) 選択培地の開発

新型レンサ球菌に対して新しい選択培地を開発した。これは、コンゴレッドを加えた培地であり、新型レンサ球菌はこの培地上で赤色のコロニーを形成し、容易に他の細菌との識別が可能であった。この培地を利用し、病魚からの新型レンサ球菌の分離・同定を試みたところ、十分に利用できることが判明し

た。

5) 魚類由来菌株と畜産動物由来菌株のPCR反応を利用した識別

SodA 遺伝子配列を基に魚類由来株と畜産動物由来株を識別することを目的にプライマーを設計してPCR反応を試みた。その結果、十分識別可能なプライマーであることが判明し、応用可能となった。

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 5 件)

1)R. Nomoto, H. Kagawa and T. Yoshida Partial sequencing of *sodA* gene and its application to identification of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* isolated from farmed fish. *Letters in Applied Microbiology* (2008);46, 95-100

2)M. Kawanishi, T. Yoshida (et al): Characterization of *Lactococcus garvieae* isolated from radish and broccoli sprouts that exhibited a KG+ phenotype, lack of virulence and absence of a capsule. *Letters in Applied Microbiology*(2007)44,481-488

3)内山成人、上野友美、只野健太郎、古川三記子、西木一生、野本竜平、長宗秀明、中井敏博、吉田照豊 ヒト糞便由来 *Lactococcus garvieae* の魚類由来菌株との比較研究 日本水産学会誌(2008);74(6),1085-1087

4)西木一生、野本竜平、米村輝一朗、中西健二、平江多績、村瀬拓也、伊丹利明、吉田照豊 ブリ属魚類由来*Streptococcus dysgalactiae* の薬剤感受性 日本水産学会誌 (2009)(印刷中)

5) M.Abdelsalam, K. nakanishi, K. Yonemura, T. Itami ,S.C. Chen and T. Yoshida: Application of Congo red agar to detect *Streptococcusdysgalactiae* from diseased fish.

Journal of Applied Ichthyology(2009) (accepted for publication 査読あり 印刷中)

〔学会発表〕 (計 12 件)

- 1) 古川三記子、米村輝一郎、中西健二、福田稔、平江多績、村瀬拓也、伊丹利明、吉田照豊 : 日本の養殖海産魚から分離された *Lactococcus garvieae* の疫学解析 日本水産学会九州支部大会講演要旨 A-13 平成 20 年 1 月 26 日 (宮崎大学) (口頭発表)
- 2) 古川三記子、米村輝一郎、中西健二、福田稔、平江多績、村瀬拓也、中井敏博、伊丹利明、吉田照豊 近年増加傾向にある *Lactococcus garvieae* の遺伝子解析とカンパチに対する免疫反応 平成 20 年日本水産学会春季大会 1425 (p 2 4 4) (ポスター発表)
- 3) 西木一生、内山成人、上野友美、只野健太郎、長宗秀明、吉田照豊 sodA, gray, hsp の部分塩基配列を用いた由来の異なる *Lactococcus garvieae* の比較 平成 20 年日本水産学会春季大会 1427 (p 2 4 4) (ポスター発表)
- 4) 吉田照豊 魚類のレンサ球菌感染症 ランチョンセミナー 第 17 回 Lancefield レンサ球菌研究会 2008、7 月 26 日 (口頭発表)
- 5) 西木一生、平江多績、村瀬拓也、吉田照豊 魚類病原性 *Streptococcus dysgalactiae* の分子疫学解析および感染実験 第 17 回 Lancefield レンサ球菌研究会 徳島大学 2008 年 7 月 26 日 (口頭発表)
- 6) Yoshida T, Furukawa M, Nishiki I, Hirae T, Murase T, Fukuda Y, Yonemura K, Nakanishi K, Itami T: Epidemiological studies of *Lactococcus garvieae* isolated from diseased fish in Japan. 5th World Fisheries Congress October 24th 2008 (oral

presentation)

- 7) T. Yoshida: *Lactococcus garvieae* infection and vaccine development in cultured fish
2008 International Animal Vaccine Seminar at Pingtung Agricultural Biotechnology Park
2008 Nov. 11st (Invited speech)
- 8) I. Nishiki, T. Hirae, T. Murase, and T. Yoshida: Epidemiological study of *Streptococcus dysgalactiae* and artificially infection induced by this fish pathogen. Fifth International Symposium of The Japanese Society for Fish Pathology
October 18-19 2008 (poster presentation)
- 9) 野本竜平、鵜瀬直樹、中村充志、平江多績、伊丹利明、吉田照豊 : ブリ属魚類由来 *Streptococcus dysgalactiae* の薬剤感受性調査および台湾養殖魚由来菌株との比較魚類病原性 *Streptococcus dysgalactiae* の分子疫学解析および感染実験 (口頭発表)
- 10) T. Yoshida : A lancefield serological group C *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* from farmed fish in Japan. The 7th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. 2008 June 26th (Taiwan, Taipei, oral presentation)
- 11) M Abdelsalam, M Furukawa, N Unose, R Nomoto, Y Shimahara, T Yoshida:
A presumptive identification and isolation of lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (GCSD) from farmed fish
The 7th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. 2008 June 22nd-25th (Poster

presentation)

12) 鶴瀬直樹、野本竜平、米村輝一朗、中西健二、平江多績、村瀬拓也、伊丹利明、吉田照豊：魚類病原性 *Streptococcus dysgalactiae* の分子疫学および薬剤感受性調査：日本水産学会九州支部大会講演要旨 A-10 平成 20 年 1 月 26 日（宮崎大学）（口頭発表）

13) 西木一生、野田真広、吉田照豊：海産魚類由来 *Streptococcus dysgalactiae* の分類学的再検討 日本水産学会九州支部大会 平成 21 年 1 月 23 日（長崎大学）（口頭発表）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田照豊（YOSHIDA TERUTOYO）
宮崎大学・農学部・准教授
20240294

(2) 研究分担者

伊丹利明（ITAMI TOSHIAKI）
宮崎大学・農学部・教授
00363573

(3) 連携研究者