

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 2 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580229

研究課題名（和文）海水温上昇に伴いリスク管理が必要となる魚類の新興感染症の診断・治療方法の検討

研究課題名（英文）Risk assessments of the emerging fish pathogen in the environmental condition of rising water temperature.

研究代表者

吉田 照豊 (YOSHIDA TERUTOYO)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：20240294

研究成果の概要（和文）：魚類のC群レンサ球菌感染症の原因細菌の分離・選択培地として、コンゴレッド色素を用いた特殊培地を開発した。魚類由来株は、高水温に特に注意を払うべき細菌であることが判明した。魚類株は非常に均一な細菌集団であることが判明した。また、薬剤感受性調査の結果、耐性菌の存在が明らかとなった。魚類株にもSOF因子があり、その遺伝子構造を明らかにした。この遺伝子配列より、診断に応用できることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

TH-CR (Todd-Hewitt Congo red) agar was developed to detect and presumptively identify the GCSD (Group C *Streptococcus dysgalactiae*) obtained from artificially or naturally infected fish. Typical symptoms were observed in artificially infected fish at higher temperature (28°C), thus need an attention at the high water temperature season. The genetic analysis revealed that the fish isolates were genetically very similar to each other with high DNA-DNA relatedness and sequence homology. Seventeen isolates in GCSD collected Asian countries were found to be resistant to oxytetracycline and carried the tet(M) gene, except for the strains collected in Taiwan and the PP1564 strain collected in China. The amino acid sequence of SOF was identical among fish isolates. A primer set targeting the sof-FD gene was designed and applied to a PCR assay for discriminating fish isolates from mammalian isolates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：水産学一般

科研費の分科・細目：魚病

キーワード：C群レンサ球菌、*Streptococcus dysgalactiae*、高水温、ブリ、カンパチ、魚病

1. 研究開始当初の背景

『学術的背景』日本の海産養殖、特にブリ属

魚類養殖は水産養殖業における重要な産業である。ブリ属養殖魚類における感染症は、ブ

り類の養殖産業が確立して以来、その対策に莫大な労力がはらわれてきた。近年、注射ワクチンが開発され、予防対策が確立された感染症も一部には存在する。その一方で、新興感染症と言われる新しい感染症が問題視されるようになった。ブリ属魚類の新型レンサ球菌は、魚類の新興細菌症として近年報告された感染症である(Nomoto et al, 2004)。原因細菌が畜産動物などから分離される *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* に分類される。*S. dysgalactiae*は、畜産動物であるウシ、ブタからの分離報告例が多くあり、ウシの乳房炎およびヒト心膜炎との因果関係が指摘されている。ブリ属魚類から分離される *S. dysgalactiae*は哺乳動物の体温と同じ37度が最適増殖温度であり、通常魚病細菌とは最適生育温度が異なると同時に、マウスに毒性が認められる。魚類由来細菌は、哺乳動物に対して病原性が強く疑われる細菌である。

2. 研究の目的

近年、地球温暖化に伴い海水温上昇による生態系への影響が懸念されている。海産養殖業においても、海水温の上昇に伴う感染症増加の問題も無視できない状況となっている。南九州では、夏場の高水温期において水深3mにおける海水温が28℃を超える期間が1ヶ月継続するような養殖場が多く認められる。また、冬季においても水温が15℃を下らない養殖場も認められるようになっており、ブリ・カンパチ養殖場では特に、ランスフィールドC群レンサ球菌感染症(GCS; *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*)が新興細菌感染症として増加している。また、この疾病は海水温度依存的に病状が悪化することにより、其の病理を把握することは、感染予防の観点からも重要と考える。この細菌は平成16年度に改正された感染症法における病原体の分類においてバイオセーフティーレベル2(BSL2)に分類され、取り扱いに注意を必要とする。ブリ・カンパチを刺身として生食する習慣のある日本人にとっては、公衆衛生上特に注意を必要とする病原体の一つであると考えられる。また同時に、水産食品の安全性を担保する上でも早急な診断・治療の確立が望まれる。近年、生育適温が37℃であ

り、海水温の上昇と共に病勢を増す、養殖魚類の新興感染症(ランスフィールドC群レンサ球菌症)がブリ属魚類養殖場において増加している。この感染症の原因細菌は、*Streptococcus dysgalactiae*に分類され、畜産動物特にウシ、ブタに病原性を示す病原細菌と同属・同種であることが判明した。この病原細菌は、改正された感染症法の分類においてバイオセーフティーレベル2に分類され、公衆衛生上注意を必要とする細菌感染症である。このように、食品衛生上注意を必要とする細菌が養殖場において新興感染症として増加している。この疾病の診断・治療方法を確立することか目的である。

3. 研究の方法

水温の違いによる毒性の評価

魚類由来 *S. dysgalactiae*によるレンサ球菌症は、高水温の時期(7~9月;平均水温28度)に多発し、病勢が非常に強くなる疾病である。近年指摘されている海水温の高水温化により、今後さらに被害が拡大する疾病と考えられる。そこで、海水温の違いにより病原性に違いが認められるのか検討する。南九州(鹿児島、宮崎)の夏季(8~9月)の平均水温は28度前後であり、この夏場の28度と4~5月の平均水温23度に設定し、その感染力の違いを明らかにする。これらの研究結果を基に、この疾病の危険予報を科学的に出すことが可能となる。

日本株および海外養殖魚類由来株との遺伝疫学調査

アジアの養殖魚類においても日本のブリ、カンパチに病原性を示し、同様の症状を示す細菌が分離されている。特に、中国、台湾、シンガポール、マレーシアの養殖魚類で近年分離され問題視されている。日本のカンパチ養殖において、種苗の大半は中国において採捕された種苗を一時的に飼育した後、日本に輸入し養殖しているのが現状である。カンパチの養殖体系から、種苗と同時に病原細菌の移動が考えられる。新型レンサ球菌感染症は、海外から持ち込まれた懸念がある新興感染症である。そこで、日本株と中国、台湾、シンガポール、マレーシアで分離した養殖魚由来株との遺伝型をゲノムレベルで比較する。

新型レンサ球菌の再分類

魚類由来菌株は、現在のところわれわれが発表した *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* に分類されているが、畜産動物由来の *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* と *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* とは、遺伝子レベルおよび抗原性で異なっている。よって、魚類由来株の亜種レベルでの再分類を行う。具体的には、DNA-DNA 相同試験により、亜種レベルでの違いを明確にする。ハウスキーピング遺伝子である 16SrRNA, 23SrRNA, *sodA*, *hsp*, *gryA* の違いが判明しているためにこれら遺伝子を基に再分類の補足データとする。これらの結果、魚類由来菌株と畜産由来菌株との違いを明らかにする。

魚類由来レンサ球菌の毒性因子の探索

魚類由来レンサ球菌の毒性因子を遺伝子レベルで探索する。特に、ストレプトリジンあるいはスーパー抗原といったレンサ球菌に特有の毒性因子をコードする遺伝子を

4. 研究成果

魚類の C 群レンサ球菌感染症の早期診断法(PCR)を確立した。この技術は研究室レベルでは有効に機能するが、各県あるいは漁協における日常の魚病検査においては、手間および特殊機器・技術を必要とする。そこで、日常診断に耐える診断指針の確立を行った。すでに、新興感染症の原因細菌である *S. dysgalactiae* の分離・選択培地として、コンゴレッド色素を用いた特殊培地を開発した。この分離・選択培地を用いることで、迅速・簡便な魚病診断の確立ができた。この感染症は、従来の魚病細菌とは生育温度が異なる上に、増殖速度が違い、分離培養にある程度の技術を必要とする。よって、我々が開発した選択培地に基づく診断技術を確立することができた。

魚類由来 C 群レンサ球菌感染症原因菌である *S. dysgalactiae* の疫学調査および分類学的研究を行った。その結果、魚類由来菌株は、非常に均一な細菌集団であり、ランスフィールド群の抗原性を持った遺伝的に均一な細菌集団であることが判明した。また、哺乳動物由来の同種細菌とは、性状試験(ストレプトキナーゼ産生)や DNA-DNA 相同試験で、異なるグループ集団に属することが明らか

となった。

魚類の C 群レンサ球菌感染症原因細菌の病原因子について調査した。その結果、いわゆるレンサ球菌が保有しているストレプトリジン S をコードする遺伝子を保有していることが判明した。また、ヒト由来レンサ球菌の *S. pyogenes* が保有する毒性因子であるスーパー抗原(*speG*)を魚類由来 C 群レンサ球菌感染症原因菌は保有していることが判明した。またこの遺伝子には IS が挿入されているが、挿入されている IS は ORF には存在しておらず、発現していることが推察され、魚類の病原性に関与する可能性を示唆した。

魚類由来 C 群レンサ球菌感染症原因菌の疫学調査を海外分離株と比較した。その結果、日本で分離される菌株は、非常に均一な細菌集団であり、台湾由来株と遺伝的に近い菌株を見出した。しかしながら、中国、マレーシア由来の株とは遺伝的に異なる集団であることを示した。

魚類由来菌株の病原因子探索の研究の一環として、血清白濁因子について研究した。血清白濁因子とは、血清と細菌を混合し培養することで、血清を白濁させる細菌が保有するタンパクを意味する。この血清白濁因子(Serum opacity factor)は、ヒトレンサ球菌では病原因子の一つとして考えられている。魚類株にもこの SOF 因子があり、その遺伝子構造を明らかにした。また、この遺伝子配列より、魚類株と哺乳動物由来株を識別できるプライマーを設計し、診断に応用できることを明らかにした。

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 9 件)

1; Y. Watanabe, T. Naito, K. Kikuchi, Y. Amari, Y. Uehara, H. Isonuma, H. Hisaoka, T. Yoshida, K. Yaginuma, N. Takaya, H. Daida and K. Hiramatsu(2011); Infective endocarditis with *Lactococcus garvieae* in Japan: a case report Journal of Medical Case Reports, 5, 356-359 査読有り

2; I. Nishiki, Y. Horikiri, T. Itami and T. Yoshida(2011); Cloning and expression of serum opacity factor in fish pathogenic *Streptococcus*

dysgalactiae and its application to discriminate between fish and mammalian isolates. FEMS Microbiology Letter,323, 68-74 査読有り

3;I. Nishiki, M. Furukawa, S. Matsui, T. Itami, T. Nakai and T. Yoshida(2011) Epidemiological study on *Lactococcus garvieae* isolates from fish in Japan Fisheries Science, 査読有り

4;M. Abdelsalam, S.C.Chen and T. Yoshida (2010)Dissemination of streptococcal pyrogenetic exotoxin G (spepg) with an IS-like element in fish isolates of *Streptococcus dysgalactiae*. FEMS Microbiology Letters 309, 105-113 査読有り

5;I. Nishiki, M. Noda, T. Itami and T. Yoshida(2010) Homogeneity of *Streptococcus dysgalactiae* isolated from amberjack, *Seriola dumerili*, in Japan. Fisheries Science 76, 661-668 査読有り

6;M. Abdelsalam, S.C.Chen and T. Yoshida (2010)Phenotypic and genetic characterizations of *Streptococcus dysgalactiae* strains from fish collected in Japan and other Asian countries FEMS Microbiology Letters, 302,32-38 査読有り

7;M. Abdelsalam, S.C. Chen and T. Yoshida; Surface properties of *Streptococcus dysgalactiae* strains isolated from marine fish Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., (2009), 29 (1) 16-24 査読有り

8;西木一生、野本竜平、米村輝一郎、中西健二、平江多績、村瀬拓也、伊丹利明、吉田照豊(2009) ; プリ属魚類由来 *Streptococcus dysgalactiae* の薬剤感受性 日本水産学会誌 75(3)、451-452 査読有り

9;M. Abdelsalam, K. Nakanishi, K. Yonemura., T. Itami, S.C. Chen and T. Yoshida; (2009)Application of Congo red agar to detect *Streptococcus dysgalactiae* from diseased fish. Journal of Applied Ichthyology,25,442-446 査読有り

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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 (YOSHIDA TERUTOYO)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号 : 20240294

(2) 研究分担者

伊丹 利明 (ITAMI TOSHIAKI)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号 : 00363573