

学 位 論 文 要 旨

氏 名	野本 竜平
題 目	ブリおよびカンパチにおける <i>Streptococcus dysgalactiae</i> 感染症に関する疫学的研究 (The epidemiological studies on <i>Streptococcus dysgalactiae</i> infection in yellowtail, <i>Seriola quinqueradiata</i> and amberjack, <i>Seriola dumerili</i>)
<p>日本の海面魚類養殖において、細菌感染症は大きな問題となっている。2002 年より西日本のブリ属魚類養殖場にて、尾柄部に著しい炎症を伴って養殖魚が死亡する事例が多発するようになった。死亡魚より分離された細菌は、それまで魚病細菌としての報告例がないランスフィールドの血清型別で C 群に属するレンサ球菌であった。分離した細菌株でカンパチに対する感染試験を行ったところ、感染魚は自然感染魚と同様の症状を示し死亡した。分離細菌の一般細菌学的性状および形態学的特徴を調査したところ、分離細菌はグラム陽性のレンサ球菌で細菌学的性状から <i>Streptococcus dysgalactiae</i> であると類推された。透過型電子顕微鏡の観察では、菌体表面に線毛様構造物が確認された。16Sr DNA の塩基配列では、<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> の ATCC 標準株と 99.9% の相同性が認められた。以上から、本疾病の原因細菌を <i>S. dysgalactiae</i> であると特定した。</p> <p><i>S. dysgalactiae</i> は畜産動物において分離報告例がある細菌であり、養殖魚類において流行している菌株と畜産動物より分離される菌株の関連性が危惧された。両者の関連性を調査する目的で、市販の簡易同定キットを用いた酵素学的性状とバイアス正弦電場ゲル電気泳動法による分子遺伝学的性状および 16S-23Sr DNA の IGS 領域の部分塩基配列を比較した。酵素学的性状に関しては畜産由来菌株と魚類由来菌株間に差異は認められなかった。一方、バイアス正弦電場ゲル電気泳動による遺伝子型別では、畜産由来菌株において多様な遺伝型の出現が確認されたのに対し、魚類由来菌株の遺伝型は多様性に乏しく、そのいずれの遺伝型も畜産由来菌株と同一のものは確認されなかった。また、16S-23Sr DNA の IGS 領域の部分塩基配列においても魚類由来菌株と畜産由来菌株間で共通の塩基置換が認められた。</p> <p>魚類由来菌株と畜産由来菌株の相違をより詳細に検討するために、ハウスキーピング遺伝子の一つである <i>soda</i> の部分塩基配列を決定し、それぞれの菌株間で比較した。その結果、魚類由来菌株の <i>soda</i> は全て一つのクラスターに分類されたが、畜産由来菌株のものは多様性が認められた。畜産由来菌株と魚類由来菌株間の塩基配列の相同性は 97.2~98.2% であり、畜産由来菌株の中に魚類由来菌株の <i>soda</i> に完全に一致するものは確認されなかった。また両者の <i>soda</i> の差異をマーカーとして、魚類由来菌株を畜産由来菌株と識別できるプライマーを設計することができた。これらの結果は、現在養殖魚類で流行している <i>S. dysgalactiae</i> は、畜産動物より分離されるものとは遺伝的に区別できることを示した。</p>	

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Ryohei Nomoto
題 目	The epidemiological studies on <i>Streptococcus dysgalactiae</i> infection in yellowtail, <i>Seriola quinqueradiata</i> and amberjack, <i>Seriola dumerili</i> (ブリおよびカンパチにおける <i>Streptococcus dysgalactiae</i> 感染症に関する疫学的研究)

A Lancefield serological group C *Streptococcus* sp. (GCS) was isolated from cultured amberjack, *Seriola dumerili* Risso and yellowtail, *Seriola quinqueradiata* Temminck and Schlegel, immunized with *Lactococcus garvieae* commercial vaccines in Japan. The isolated bacteria were Gram-positive cocci, auto-aggregated in saline, morphologically long chains in growth medium, catalase negative and α -haemolysis on blood agar. An almost complete gene sequence of the 16S rDNA of two isolates was determined and compared to that of bacterial strains in the data base. The isolates were identified as Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* (GCSD) based on the results of the 16S rDNA sequence, the bacteriological properties and the Lancefield serological grouping. Oligonucleotide primers specifically designed for the 16S-23S rDNA intergenic spacer region of GCSD amplified a gene from all the fish isolates as well as the type strains α -haemolytic *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* ATCC430738 and β -haemolytic *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* ATCC35666, but not those of *S. equi* ATCC33398, *Lactococcus garvieae* ATCC43921 and *L. garvieae* KG9408. The severe necrotic lesions of the caudal peduncle seen in experimentally infected fish were similar to those seen in naturally infected fish.

Enzymatic profiles of GCSD strains from fish and mammals were investigated by using the API ZYM system, and genotypic characterization of GCSD strains was performed using biased sinusoidal field gel electrophoresis (BSFGE). Moreover, the partial sequence of the 16S-23S rDNA intergenic spacer region of the GCSD strain isolates from fish and mammals was also compared. The API ZYM test indicated that it is difficult to differentiate isolates of *S. dysgalactiae* from fish and animals based on enzymological variations. In the BSFGE analysis, the macrorestriction profiles, which were obtained using *Sma* I or *Apa* I as a restriction enzyme, revealed variations between the fish and animal isolates. The partial sequence of 16S-23S rDNA intergenic spacer region of all the tested fish isolates differed from the all mammals isolates in one or two nucleotides. The possibility of a clonal expansion of *S. dysgalactiae* strains was also suggested in fish farms by result of BSFGE profiles of fish isolates.

To investigate the difference between Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* (GCSD) strains isolated from diseased fish and animals by sequencing and phylogenetic analysis of the *sodA* gene. The *sodA* gene of *S. dysgalactiae* strains isolated from fish and animals were amplified and its nucleotide sequences were determined. Although 100% sequence identity was observed among fish GCSD strains, the determined sequences from animal isolates showed variations against fish isolate sequences. Thus, all fish GCSD strains were clearly separated from the GCSD strains of other origin by using phylogenetic tree analysis. In addition, the original primer set was designed based on the determined sequences for specifically amplify the *sodA* gene of fish GCSD strains. The primer set yield amplification products from only fish GCSD strains. By sequencing analysis of the *sodA* gene, the genetic divergence between *S. dysgalactiae* strains isolated from fish and mammals was demonstrated. Moreover, an original oligonucleotide primer set, which could simply detect the genotype of fish GCSD strains was also designed.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	野本竜平
審査委員	主査 宮崎大学 准教授 吉田照豊
	副査 宮崎大学 教授 香川浩彦
	副査 鹿児島大学 教授 山本 淳
	副査 鹿児島大学 教授 越塩俊介
	副査 鹿児島大学 准教授 大富 潤
審査協力者	
題 目	The epidemiological studies on <i>Streptococcus dysgalactiae</i> infection in yellowtail, <i>Seriola quinqueradiata</i> and amberjack, <i>Seriola dumerili</i> (ブリおよびカンパチにおける <i>Streptococcus dysgalactiae</i> 感染症に関する疫学的研究)
<p>日本の海面魚類養殖において、細菌感染症は大きな問題となっている。2002 年より西日本のブリ属魚類養殖場にて、尾柄部に著しい炎症を伴って養殖魚が死亡する事例が多発するようになった。死亡魚より分離された細菌は、それまで魚病細菌としての報告例がないランスフィールドの血清型別で C 群に属するレンサ球菌であった。分離した細菌株でカンパチに対する感染試験を行ったところ、感染魚は自然感染魚と同様の症状を示し死亡した。分離細菌の一般細菌学的性状および形態学的特徴を調査したところ、分離細菌はグラム陽性のレンサ球菌で細菌学的性状から <i>Streptococcus dysgalactiae</i> であると類推された。透過型電子顕微鏡の観察では、菌体表面に線毛様構造物が確認された。16Sr DNA の塩基配列では、<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> の ATCC 標準株と 99.9% の相同性が認められた。以</p>	

上から、本疾病の原因細菌を *S. dysgalactiae* であると特定した。

S. dysgalactiae は畜産動物において分離報告例がある細菌であり、養殖魚類において流行している菌株と畜産動物より分離される菌株の関連性が危惧された。両者の関連性を調査する目的で、市販の簡易同定キットを用いた酵素学的性状とバイアス正弦電場ゲル電気泳動法による分子遺伝学的性状および 16S-23Sr DNA の IGS 領域の部分塩基配列を比較した。酵素学的性状に関しては畜産由来菌株と魚類由来菌株間に差異は認められなかった。一方、バイアス正弦電場ゲル電気泳動による遺伝子型別では、畜産由来菌株において多様な遺伝型の出現が確認されたのに対し、魚類由来菌株の遺伝型は多様性に乏しく、そのいずれの遺伝型も畜産由来菌株と同一のものは確認されなかった。また、16S-23Sr DNA の IGS 領域の部分塩基配列においても魚類由来菌株と畜産由来菌株間で共通の塩基置換が認められた。

魚類由来菌株と畜産由来菌株の相違をより詳細に検討するために、ハウスキーピング遺伝子の一つである *sodA* の部分塩基配列を決定し、それぞれの菌株間で比較した。その結果、魚類由来菌株の *sodA* は全て一つのクラスターに分類されたが、畜産由来菌株のものは多様性が認められた。畜産由来菌株と魚類由来菌株間の塩基配列の相同性は 97.2~98.2% であり、畜産由来菌株の中に魚類由来菌株の *sodA* に完全に一致するものは確認されなかった。また両者の *sodA* の差異をマーカーとして、魚類由来菌株を畜産由来菌株と識別できるプライマーを設計することができた。これらの結果は、現在養殖魚類で流行している *S. dysgalactiae* は、畜産動物より分離されるものとは遺伝的に区別できることを示した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	野本竜平
審査委員	主査 宮崎大学 准教授 吉田 照豊
	副査 宮崎大学 教授 香川 浩彦
	副査 鹿児島大学 教授 山本 淳
	副査 鹿児島大学 教授 越塩 俊介
	副査 鹿児島大学 准教授 大富 潤
審査協力者	
実施年月日	平成19年12月28日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、平成19年12月28日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者
氏名

野本竜平

〔質問 1〕 新型レンサは 2002 年頃に存在が確認されたということですが、それ以前は旧レンサ球菌症 (LG) のために発見されなかっただけなのか、それとも新たに発生したのでしょうか？

〔回答 1〕 以前から存在していたと思います。ワクチンが開発される前は症状が類似していたため誤認していたのではないかと思います。ワクチンができてからも病気が発生するというで調査を開始した結果、新たな疾病として認識しました。

〔質問 2〕 LG は脳から分離できないのかあるいは分離しにくいのですか？

〔回答 2〕 効率は悪いです。LG は 25℃ で、新型は 37℃ で早く生長します。

〔質問 3〕 台湾の病原体の流入が起きている可能性があるとおっしゃいましたが、現在の日本の種苗は台湾からののではないのですか？

〔回答 3〕 台湾からの種苗であっても、1~2 年経ってから日本で感染したものは区別しています。

〔質問 4〕 ブリ、カンパチは本来生息域がことなる魚ですが、その生息域の違いから菌に対する耐性の違いとかはあるのですか？

〔回答 4〕 ブリよりもカンパチのほうが多く病気が発生しています。だいたい水温が 25℃ 以上になると発生が増えます。GCSF は低温では増殖しにくいと思います。

〔質問 5〕 地図を見ると鹿児島での発生が多いですが実際どのくらいの地域でこの病気は発生しているのですか？

〔回答 5〕 錦江湾のほとんどの地域で発生しています。

〔質問 6〕 先ほど BSFGE の結果、魚類由来株と畜産由来株とでは遺伝子型が同一なものがないとおっしゃいましたが、畜産由来の菌株数は十分だとお考えですか？

〔回答 6〕 十分だとは思っていません。細菌が手に入りにくいのでできる範囲で行った結果です。

〔質問 7〕 畜産業と病気発生との関連は？

〔回答 7〕 いまのところ明確なデータがない。

〔質問 8〕 この病気は同時多発で起きたとお考えですか？

〔回答 8〕 同時多発だと思います。2002 年に鹿児島のある漁場で、翌年 2003 年に高知などで発生しました。

〔質問 9〕 非病原性の細菌から病原病原体となった可能性は？あるいは要因はなんであるとお考えですか？

〔回答 9〕 偶然に海水に適した細菌がいて、そこから広まったのではないかと考えられます。また、養殖場における過密養殖などによる魚体へのストレスも要因の一つであると思います。

〔質問 10〕 東町で発生していない要因はなんだとお考えですか？

〔回答 10〕 東町はほとんどがブリで、他の地域が他から種苗を導入しているのに対し、それがいないので病原体の流入が少ないのではないかと思います。

〔質問 11〕 野本さんの本研究の一番の売りはなんですか？

〔回答 11〕 畜産由来の株と魚類由来の株とでは遺伝型のパターンが違うということです。

〔質問 12〕 感染試験では比較的小さな魚を使っておられますが、養殖の現場では出荷前の大きな魚での被害が深刻なのですよね？発症の時期はいつごろでしょうか？

〔回答 12〕 今回発表しませんでした。大型の魚でも感染試験をしたところ、1 キロを超えると感受性が高い傾向が見られました。

〔質問 13〕 海外から種苗を持ってこなければ病気は起こらないと思われませんか？

〔回答 13〕 病気が発生して既に 5 年以上が経過しておりますので、日本に定着していると考えます。ゆえに病気はなくならないと思います。

〔質問 14〕 感染後 30 日は無給餌ですか？ 餌の詳細な成分は？

〔回答 14〕 餌は投与しております。詳細な成分等は把握しておりません。

〔質問 15〕 畜産由来株は魚類に病原性がありますか？

〔回答 15〕 ありませんでした。

〔質問 16〕 投薬歴はありますか？ (OTC について)

〔回答 16〕 あると思います。

〔質問 17〕 この疾病に対する今後の処置をどうお考えですか？

〔回答 17〕 レンサ球菌症はワクチンで抑えなければ、被害が新型レンサによるものとは比較にならないほど深刻です。ですからワクチンを接種し、投薬で抑えるべきだと思います。あとは、現実的には厳しいですが、過密養殖を避けることなどと思います。