

学 位 論 文 要 旨

氏 名

上田 秀昌

題 目

ブリ類結節症の疫学および予防に関する研究

(Detection and prevention of pasteurellosis in yellowtail

Seriola quinqueradiata)

類結節症は、1960年代後半に豊後水道の養殖ブリに発生して以来、ブリ養殖業に大きな被害を与えている重要な疾病である。本症はグラム陰性桿菌である *Pasteurella piscicida* により引き起こされ、現在対策としては主に化学療法剤による治療が行われている。しかし、多剤耐性菌の出現や化学療法剤の多用による公衆衛生上の問題が本症の治療をより困難にしている。そこで本研究では、化学療法剤に依存しない養殖ブリの類結節症対策技術の確立を目指して以下の研究を行った。

1981年から2003年までの23年間で、愛媛県で発生したブリの疾病の中で類結節症の平均診断率は43.9%であり、本症が養殖ブリにおける重要な疾病であることが確認された。23年間で類結節症の大きな流行は1985年から1994年であると推察された。また、類結節症の発生は5月から翌年の1月の間に認められ、発生のピークは7月であった。1985年以降は、本症の発生期間が長くなる傾向が認められた。本菌の薬剤感受性は、1997年にフォスホマイシンカルシウム(FOM)に対する耐性株が確認された。さらに、その後、3剤(ABPC, BCM, FOM等)、4剤(ABPC, OA, BCM, FOM)といった多剤耐性株の出現が認められたことから、本症の治療をより困難にしていると考えられた。

次に、本症の迅速な診断法を確立するために、等温でDNAの増幅が可能なLAMP法の導入を試みた。本法による *P. piscicida* を検出するための最適温度および反応時間は65°C、60分であり、さらにブリ由来の魚病細菌との交差性は認められなかった。LAMP法とPCR法の検出感度の比較では、LAMP法がPCR法よりも10倍感度が高く、感染耐過魚からもLAMP法では *P. piscicida* 遺伝子を検出することが可能であった。従って、本手法は、*P. piscicida* の漁場環境中での動態や感染経路解明するための疫学調査手法として有用であることが示された。

P. piscicida の各魚種に対する病原性はブリが最も高いことが示された。さらに、同じブリ属であるブリとヒラマサとを比較した場合、ブリがヒラマサに比べて本菌に高い感受性を有していることが明らかとなり、その違いは、血清中での本菌に対する殺菌活性、白血球のNBT反応の違いによるものであると推察された。

最後にブリ類結節症に対するワクチンの検討を行った。*P. piscicida* から粗LPSを抽出し、これにクロロホルムで不活化した菌体を混合させたLPS-CKCワクチンを作製してその有効性の検討を行った。その結果、本ワクチンは *P. piscicida* 感染に対して高い有効性が認められ、その効果は少なくとも35日間確認された。さらに本ワクチンは、実験感染のみならず自然感染に対しても防御効果が認められた。LPS-CKCワクチンを投与したブリは、血清中の凝集抗体価の上昇が認められ、さらに本菌に対する白血球の貪食作用の上昇が認められた。従ってLPS-CKCワクチンは、これらの免疫機能を活性化することによって *P. piscicida* 感染に対する防御効果を示していると推察された。

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	Ueda Hidemasa
題 目	Detection and prevention of pasteurellosis in yellowtail <i>Seriola quinqueradiata</i> (ブリ類結節症の疫学および予防に関する研究)

Pasteurella piscicida is the causative agent of pasteurellosis in wild and farmed marine fish worldwide. In Japan, the first incidence of pasteurellosis was seen in cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata* in Bungo channel during 1960. Now, every year huge economic loss is incurred by aquaculture industry due to pasteurellosis. This disease is the one of major diseases affecting cultured yellowtail. To date, chemotherapy has been widely used control measure for pasteurellosis. However, emergence of antibiotic-resistant bacteria and problems with environment by the over-use of chemotherapeutic agents are well known. Therefore, this study has been carried out to establish an effective control measure against pasteurellosis, in the cultured yellowtail, that does not depend on chemotherapeutic agents.

The epizootiology of pasteurellosis, in Ehime prefecture, for 23 years from 1981 to 2003 has been investigated by diagnosis in Ehime Prefectural Fish Diseases Control Center. The results indicate a 43.9% of infection occurred were due to *P. piscicida*. This confirmed that pasteurellosis was one of the serious diseases in cultured yellowtail. The out-break has occurred from 1985 to 1994.

For establishment of rapid diagnosis method by LAMP for *P. piscicida*, optimized temperature and reaction time were 65 degrees and 60 minutes, respectively. LAMP based detection was very high because the primers did not amplify the any other micro-organism. In comparison of the sensitivity of LAMP and PCR methods, LAMP-sensitivity was 10 times higher than that of PCR. Moreover, LAMP could also detect the *P. piscicida* DNA from carrier fish. Therefore, LAMP is a very useful diagnostic method to detect *P. piscicida* at an early stage of infection.

The drug sensitivity of *P. piscicida* shows resistance to FOM during 1997. *P. piscicida* with multi-drug resistance profiles for ABPC, BCM, FOM and OA oxophosphoric acid were also observed during this study. This might be the major cause for chemotherapy becoming ineffective for pasteurellosis treatment.

During the analysis of the pathogenicity of *P. piscicida* to fish, the susceptibility of yellowtail to *P. piscicida* was higher than against other fish species. The differences of susceptibility to goldstriped amberjack *Seriola aureovittata*, belonging to the same genus as yellowtail, depended on the differences of the anti-bacterial activity against *P. piscicida* and the quantity of superoxide anion produced in the whole serum. These results suggested that the complement or macrophages might play an important role in the resistance against *P. piscicida* infection.

Finally, to develop a suitable vaccine against yellowtail pasteurellosis, we have examined the effectiveness of LPS-CKC vaccine. LPS-CKC vaccine is composed of LPS and chloroform-killed *P. piscicida* and then administered to yellowtail by i.p. (intra-peritoneal) injection. By infection experiments we determined the efficacy of the vaccine by infecting vaccinated yellowtail by *P. piscicida* in in-door tanks. LPS-CKC vaccinated yellowtail showed resistance to the *P. piscicida* (various strains) infection compared to control groups. In addition, the effect of vaccination lasted for 35 days post injection in vaccinated groups. Moreover, LPS-CKC vaccine also significantly increased the resistance against *P. piscicida* infection in yellowtail in the cage culture. The results suggested that LPS-CKC vaccine increased the antibody titer in the serum and phagocytic activity was increased in the leucocytes of yellowtail. Therefore, it was suggested that LPS-CKC vaccine could increase the innate and adaptive immune responses against the *P. piscicida* infection. We are of the opinion that LPS-CKC vaccine is very useful in order to control the *P. piscicida* infection in yellowtail farm.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	上田秀昌
審査委員	主査 宮崎大学 教授 酒井正博
	副査 宮崎大学 教授 伊丹利明
	副査 宮崎大学 助教授 吉田照豊
	副査 鹿児島大学 教授 坂田泰造
	副査 鹿児島大学 教授 山本 淳
審査協力者	
題 目	ブリ類結節症の疫学および予防に関する研究 (Detection and prevention of pasteurellosis in yellowtail <i>Seriola quiqueradiata</i>)
<p>類結節症は、1960年代後半に豊後水道の養殖ブリに発生して以来、ブリ養殖業に大きな被害を与えている重要な疾病である。本症はグラム陰性桿菌である <i>Pasteurella piscicida</i> により引き起こされ、現在対策としては主に化学療法剤による治療が行われている。しかし、多剤耐性菌の出現や化学療法剤の多用による公衆衛生上の問題が本症の治療をより困難にしている。そこで本研究では、化学療法剤に依存しない養殖ブリの類結節症対策技術の確立を目指して以下の研究を行った。</p> <p>1981年から2003年までの23年間で、愛媛県で発生したブリの疾病の中で類結節症の平均診断率は43.9%であり、本症が養殖ブリにおける重要な疾病であることが確認された。23年間で類結節症の大きな流行は1985年から1994年であると推察された。また、類結節症の発生は5月から翌年の1月の間に認められ、発生のピークは7月であった。1985年以降は、本症の発生期間が長くなる傾向が認められた。本菌の薬剤感受性は、3剤 (ABPC, BCM, FOM等)、4剤 (ABPC, OA, BCM, FOM) といった多</p>	

剤耐性株の出現が認められたことから、本症の治療をより困難にしていると考えられた。

次に、本症の迅速な診断法を確立するために、等温で DNA の増幅が可能な LAMP 法の導入を試みた。本法による *P. piscicida* を検出するための最適温度および反応時間は 65°C、60 分であり、さらにブリ由来の魚病細菌との交差性は認められなかった。LAMP 法と PCR 法の検出感度の比較では、LAMP 法が PCR 法よりも 10 倍感度が高く、感染耐過魚からも LAMP 法では *P. piscicida* 遺伝子を検出することが可能であった。従って、本手法は、*P. piscicida* の漁場環境中での動態や感染経路解明するための疫学調査手法として有用であることが示された。

P. piscicida の各魚種に対する病原性はブリが最も高いことが示された。さらに、同じブリ属であるブリとヒラマサとを比較した場合、ブリがヒラマサに比べて本菌に高い感受性を有している明らかとなり、その違いは、血清中での本菌に対する殺菌活性、白血球の NBT 反応の違いによるものであると推察された。

最後にブリ類結節症に対するワクチンの検討を行った。*P. piscicida* から LPS を抽出し、これにクロロホルムで不活化した菌体を混合させた LPS-CKC ワクチンを製してその有効性の検討を行った。その結果、本ワクチンは *P. piscicida* 感染に対して高い有効性が認められ、その効果は少なくとも 35 日間確認された。さらに本ワクチンは、実験感染のみならず自然感染に対しても防御効果が認められた。LPS-CKC ワクチンを投与したブリは、血清中の凝集抗体価の上昇が認められ、さらに本菌に対する白血球の貪食作用の上昇が認められた。従って LPS-CKC ワクチンは、これらの免疫機能を活性化することによって *P. piscicida* 感染に対する防御効果を示していると推察された。

以上のように、本研究は、ブリ等で発生する類結節症の疫学について明らかにし、さらにワクチンの可能性について新たな知見を加えた。

したがって、審査員一同は、本論文は博士（農学）の学位論文として十分に価値あるものと判定した。

学力確認結果の要旨				
学位申請者 氏名	上田秀昌			
審査委員	主査	宮崎大学	教授	酒井正博
	副査	宮崎大学	教授	伊丹利明
	副査	宮崎大学	助教授	吉田照豊
	副査	鹿児島大学	教授	坂田泰造
	副査	鹿児島大学	教授	山本 淳
審査協力者				
実施年月日	平成 17 年 12 月 26 日			
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)				<input type="radio"/> 口答 <input checked="" type="radio"/> 筆答
<p>主査および副査の 5 名は、平成 17 年 12 月 26 日 (月曜日) の公開審査会において、学位申請者にたいし学位申請論文について説明を求め、その内容および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>また、筆記により、外国語 (英語) の学力を確認した。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が大学院博士課程修了者と同等以上の学力ならびに見識を有し、博士 (農学) の学位を与えるに足る十分な資格をもつものと認めた。</p>				

学位申請者
氏 名

上田秀昌

〔質問 1〕 **LAMP** 法で *P. piscicida* の検出について検討を行っているが、どこの遺伝子を用いてプライマーの設計を行ったのか？

〔回答 1〕 仲らがジーンバンクに登録している *P. piscicida* の染色体遺伝子から栄研化学（株）**LAMP** 設計ソフトを用いて設計を行った。

〔質問 2〕 **PCR** 法で用いているプライマーの設計は、同じ遺伝子から設計を行ったのか？

〔回答 2〕 今回用いた **PCR** のプライマーは、既に報告されている *P. piscicida* のプラスミドから作製された青木らのプライマーを用いて行った。

〔質問 3〕 プライマーを設計する遺伝子の種類によっては、**PCR** 法の方が検出感度は高くなるのではないか？

〔回答 3〕 本研究では、同じ遺伝子から **PCR**、**LAMP** のプライマーを作製していないのでその結果はわからない。しかし、これまでに報告されている **LAMP** 法と **PCR** 法における検出感度の比較では、いずれの報告でも **LAMP** 法は **PCR** 法より検出感度が優れているので、**LAMP** 法の方が検出感度は高いと考えている。

〔質問 4〕 ワクチンの有効性の検討を行っているが、有効性を判断する上で **RPS** と統計的な有意な差どちらが重要であると考えているのか？

〔回答 4〕 無論どちらも高い値の方がよいと思うが、対照区の死亡率が **50%** 以上の場合には **RPS** を重視している。

〔質問 5〕 ワクチンの有効性試験で **RPS** が **32** を示している試験例を有効と判断しているが、ワクチン試験の場合、通常 **RPS** が **70** 以下の場合には、養殖現場では、有効性を示さないと言われている。アユのビブリオ病ワクチンなどでは、**RPS** が **75** ぐらいで、それに比べて低いことについてどのように考えるか？

〔回答 5〕 ご指摘のように養殖現場では、この程度の **RPS** では有効性を示さない

と考えられる。この試験例は 1 例のみで対照区の死亡率が 92% でオーバードーズの攻撃試験であったと考えている。検定を行った結果、有意な差が認められたので有効であると判断した。本ワクチンは野外実験でも有効性を示している。

〔質問 6〕 ワクチン成分として **LPS** と **CKC** を用いて行って試験を行っているが、どちらの成分が免疫を高めていると考えているのか？

〔回答 6〕 一般に **LPS** は非特異的免疫機能を高めると考えられている。**LPS**、**CKC** 単独投与においてもそれぞれ **P.piscicida** 感染に対して防御効果を示しており、これらを混合することによってより効果を高めていると考えている。**P.piscicida** に関するワクチンの研究では、不活化菌体、**EPC** のみ投与でも有効性が報告されている。**CKC** ワクチンには、不活化菌体、**ECP** も含まれていることから、本ワクチンには種々の感染防御抗原が含まれていると考えている。

〔質問 7〕 近年の類結節症の発生状況を見ると発生件数が減少しているが、この要因としては **P.piscicida** が以前の **P.piscicida** と違いがあるのか？

〔回答 7〕 **P.piscicida** を長期間保存すると病原性が低下すると報告されていることから、以前の菌株と近年の菌株を用いて同時に実験することはできないが、本研究で 1991 年に分離された **P.piscicida** をもちいて感染実験を行った結果は **LD₅₀** が数 10cfu/尾であったが、2004、2005 年に分離された菌を用いて感染実験を行った結果では、 10^3 cfu/尾ぐらいで、近年の **P.piscicida** の病原性は弱くなっていると思う。

〔質問 8〕 現在分離される菌株を魚体通過することで病原性の回復は可能であると考えるか？

〔回答 8〕 魚体通過を繰り返すことで、病原性の回復は可能であると思われる。