

学 位 論 文 要 旨

氏 名 嶋原 佳子

題 目

魚病細菌 *Nocardia seriolae* に対する魚類の抗体検出および細菌学的性状に関する研究
(Detection of antibody response in fish against the fish bacterial pathogen, *Nocardia seriolae* and its bacteriological characterization)

由来の異なる魚類ノカルジア感染症原因菌 *Nocardia seriolae* 菌株 64 株を供試し、酵素活性を調査した。API ZYM (BioMerieux, France) および RapID Yeast Plus System (Remel, USA) を用いて酵素活性を調査した結果、 α -glucosidase 活性において、明瞭に陽性を示す菌株と陰性の菌株に分けられた。日本国内の養殖ブリ、カンパチ、ヒラメ、マサバより分離された 58 菌株のうち、ノカルジア症が急増した 2000 年以降に分離された菌株 (n=50) は 3 株を除き、 α -glucosidase 陰性で、ノカルジア症急増以前の 1970 年から 90 年の菌株 (n=8) とは異なる反応を示した。ノカルジア症は 1997 年以降、台湾のスズキ、ボラおよび中国のフウセイにおいても報告されている。台湾由来の 5 菌株および中国由来の 1 菌株を供試した結果、いずれも近年日本国内で分離された菌株のうち 47 株と異なる α -glucosidase 活性を示した。パルスフィールド電気泳動の一種であるバイアス正弦電場電気泳動 (BSFGE) により分子疫学調査を行った。制限酵素 *Xba* I および *Ase* I で各菌株の染色体 DNA を切断後、BSFGE 解析を行い、UPGMA analysis に基づいた系統樹を作成した。その結果、2000 年以降に日本国内で分離された菌株の多くは、菌株間で高い関連性が示された。しかし、1970 年代から 90 年代に日本国内で分離された菌株、および台湾、中国由来の菌株とは関連性が低いと考えられた。2002 年に鹿児島県のカンパチより分離された 1 菌株は、台湾で分離された 5 菌株と強い関連性を示した。 α -glucosidase 活性および遺伝型の異なる 5 菌株を供試し、16S rRNA シークエンスを行った結果、標準菌株である *N. seriolae* ATCC43993 株と高い相同性を示した。Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法による血清学的診断法について検討した。*N. seriolae* OTTS 株で攻撃したブリ・カンパチの血清中の抗体を ELISA 法により測定した結果、感染魚において抗体の上昇が確認された。*N. seriolae* OTTS 株ホルマリン不活化菌体で免疫したブリにおいても、血清中の抗体の上昇が確認されたが、*N. seriolae* OTTS 株で浸漬攻撃した結果、ワクチンの有効性は確認されなかった。*N. seriolae* OTTS 株を 6 年にわたり継代培養し、病原性の低下が確認された菌株を用いて弱毒生ワクチンの有効性を検討した。その結果、カンパチを弱毒株で免疫後、腹腔内接種法で攻撃した結果、対照区より死亡率は少なかったものの、防御効果は確認できなかった。

学 位 論 文 要 旨

氏 名 Yoshiko Shimahara

題 目 Detection of antibody response in fish against the fish bacterial pathogen, *Nocardia seriolae* and its bacteriological characterization.
(魚病細菌 *Nocardia seriolae* に対する魚類の抗体検出および細菌学的性状に関する研究)

The enzymatic and genetic characterizations of 64 isolates of the fish pathogen *Nocardia seriolae* were examined. These isolates were obtained from amberjack, yellowtail, Japanese flounder, and chub mackerel in Japan during 1970–2005; from sea bass, grey mullet, and largemouth bass in Taiwan during 1997–2005; and from large yellow croaker in China in 2003. In the enzymatic characterization investigated by the API ZYM (BioMerieux, France) and the RapID Yeast Plus System (Remel, USA), *N. seriolae* strains were divided into α -glucosidase positive and negative strains. The genetic characterization was investigated by the biased sinusoidal field gel electrophoresis (BSFGE) analysis, a modified pulsed field gel electrophoresis (PFGE). In the BSFGE analysis, enzymatic digestions of chromosomal DNA with *Xba* I and *Ase* I produced 16 and 18 patterns, respectively. Since no common patterns were observed in strains isolated in Japan between 2000–2005 and 1970–1990, it was suggested that a current outbreak of nocardiosis in Japan was not epidemiologically related to the outbreaks of 1970–1990 in Japan. Although a low genetic relationship was observed in the restriction pattern between recent and previous isolates in Japan, identity was confirmed between recent and previous isolates because 5 representative strains showed a high similarity with each other and 99.9% homology with *N. seriolae* ATCC43993^T in the 16S rRNA sequence. An epidemiological relationship was indicated between one of the strains isolated in Japan during 2000–2005 and strains isolated in Taiwan since one strain isolated in Japan showed a restriction pattern and α -glucosidase activity identical to the strains isolated in Taiwan. Serum samples obtained from fish experimentally challenged or immunized with *N. seriolae* were analyzed in order to evaluate the antibody response against *N. seriolae*. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied for antibody quantification with whole cell sonicated antigens (WCA) prepared from *N. seriolae* OTTS. The antibody responses were observed in yellowtail and amberjack that were immersed in a suspension of live *N. seriolae* cells. Although yellowtail immunized with formalin-killed cells (FKC) of *N. seriolae* or FKC with Freund's Incomplete Adjuvant (FKC-FIA) showed humoral responses against WCA, no protective effects resulting from the immunization with FKC or FKC-FIA were observed. The attenuated *N. seriolae* OTTS strain was obtained from the parent strain (*N. seriolae* OTTS) by subculturing on agar plates for 6 years. Amberjack were immunized with the attenuated cells and subsequently challenged with *N. seriolae* OTTS strain by the intraperitoneal injection. However no protective effects against *N. seriolae* infection were observed in fish immunized with the attenuated *N. seriolae* OTTS cells.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	鳴原 佳子
審査委員	主査 宮崎大学 教授 伊丹利明
	副査 鹿児島大学 教授 山本 淳
	副査 宮崎大学 助教授 吉田照豊
	副査 宮崎大学 教授 香川浩彦
	副査 鹿児島大学 助教授 大富 潤
審査協力者	
題 目	魚病細菌 <i>Nocardia seriolae</i> に対する魚類の抗体検出および細菌学的性状に関する研究 (Detection of antibody response in fish against the fish bacterial pathogen, <i>Nocardia seriolae</i> and its bacteriological characterization)
<p>由来の異なる魚類ノカルジア感染症原因菌 <i>Nocardia seriolae</i> 菌株64株を供試し、酵素活性を調査した。API ZYM (BioMerieux, France) および Rapid Yeast Plus System (Remel, USA) を用いて酵素活性を調査した結果、α-glucosidase活性において、明瞭に陽性を示す菌株と陰性の菌株に分けられた。日本国内の養殖ブリ、カンパチ、ヒラメ、マサバより分離された58菌株のうち、ノカルジア症が急増した2000年以降に分離された菌株 (n=50) は3株を除き、α-glucosidase 陰性で、ノカルジア症急増以前の1970年から90年の菌株 (n=8)とは異なる反応を示した。ノカルジア症は1997年以降、台湾のスズキ、ボラおよび中国のフウセイにおいても報告されている。台湾由来の5菌株および中国由来の1菌株を供試した結果、全て α-glucosidase 陽性で、近年日本国内で分離された菌株のうち47株と異なる α-glucosidase活性を示した。</p>	

パルスフィールド電気泳動の一種であるバイアス正弦電場電気泳動 (BSFGE) により分子疫学調査を行った。制限酵素 *Xba* I および *Ase* I で各菌株の染色体DNAを切断後、BSFGE解析を行った結果、それぞれ16種類 (*Xba* I) および 18種類 (*Ase* I) の泳動パターンが得られた。泳動パターンを、UPGMA analysisに基づき系統樹を作成した。その結果、2000年以降に日本国内で分離された50菌株のうち α -glucosidase陰性であった47菌株は、類似した泳動パターンを示し、菌株間で高い関連性が示された。しかし、2000年以降に日本国内で分離され、 α -glucosidase陰性であった菌株は、1970年代から90年代に日本国内で分離された菌株および台湾、中国由来の菌株とは類似度は低く、 α -glucosidase活性も異なることから、関連性は低いと考えられた。2002年に鹿児島県のカンパチより分離された1菌株は、BSFGE解析の結果、台湾で分離された5菌株と同一、または類似した泳動パターンを示し、 α -glucosidase活性も陽性であった。 α -glucosidase活性および遺伝型の異なる5菌株を供試し、16S rRNAシーケンスを行った結果、標準菌株である *N. seriolae* ATCC43993株と高い相同性を示し、16S rRNAにおける変異は確認されなかった。

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法による血清学的診断法を検討した。*N. seriolae* OTTS株で攻撃したブリ・カンパチの血清中の抗体をELISA法により測定した結果、感染魚において抗体の上昇が確認された。*N. seriolae* OTTS株ホルマリン不活化菌体で免疫したブリにおいても、血清中の抗体の上昇が確認されたが、*N. seriolae* OTTS株で浸漬攻撃した結果、ワクチンの有効性は確認されなかった。*N. seriolae* OTTS株を6年にわたり継代培養し、病原性の低下が確認された菌株を用いて弱毒生ワクチンの有効性を検討した。カンパチを弱毒株で免疫後、腹腔内接種法で攻撃した結果、対照区より死亡率は少なかったものの、防御効果は確認できなかった。

最終試験結果の要旨

学位申請者 氏名	嶋原 佳子		
審査委員	主査	宮崎大学	教授 伊丹利明
	副査	鹿児島大学	教授 山本 淳
	副査	宮崎大学	助教授 吉田照豊
	副査	宮崎大学	教授 香川浩彦
	副査	鹿児島大学	助教授 大富 潤
審査協力者			
実施年月日	平成18年 12月 22日		
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)			<input checked="" type="radio"/> 口答・筆答
<p>主査及び副査は、平成 18年12月22日の公開審査会において学位申請に対して、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大学院博士課程修了者と同等以上の学力ならびに識見を有するものと認め、博士（水産学）の学位を与えるに十分な資格を有するものと認めた。</p>			

学位申請者
氏 名

嶋原 佳子

[質問 1] ELISA 法による抗体測定は血清学的診断に応用できるとのことだが、感染の確認として菌の存在を証明する必要はないのか？

[回答 1] *N. seriolae* 菌体の存在を確認する方法として PCR 法、菌分離がある。血清学的診断と並行し、菌の存在を菌分離と PCR でも確認するべきであると考える。

[質問 2] 論文中に防疫対策の確立が必要とあるが、具体的にはどのような対策なのか？

[回答 2] 現在カンパチの多くは輸入種苗に頼っている。本研究では輸入種苗によるノカルジア症の伝播が示唆された。種苗の輸入に伴う感染症の伝播を防ぐため、人口種苗の開発が必要であると考える。

[質問 3] 養殖魚は宿主の生育場所、養殖環境域のどちらでノカルジア症に感染しているのか。

[回答 3] 原因菌である *N. seriolae* は外洋よりも養殖環境域の海水中において生存性が高いと報告されている。そのため、生育場所ではなく、養殖環境域で感染していると考える。

[質問 4] ならば何故伝播に気をつける必要があるのか？

[回答 4] 日本国内で養殖されているカンパチの多くは台湾に近い中国南部で採捕され、中間育成を経て日本国内に輸入される。中国において感染を受けた個体が日本に輸入され中国や台湾で流行している菌株が伝播する可能性もあるので、気をつけた方が良いと考える。

[質問 5] 中国での中間育成は危険なのか？

[質問 5] 日本で流行していない菌株の伝播の可能性があるので、危険であると考える。

学位申請者 氏 名	嶋原 佳子
<p>[質問 6] 天然魚を介した伝播は起きるのか？資源学的なコメントを望む。</p> <p>[回答 6] 天然魚を介した伝播はおそらくない。ヒラメにおいて、海外からの種苗に伴って伝播した寄生虫が天然魚にも感染し、資源量が低下しているという報告がある。現時点ではカンパチやブリでは天然魚への感染の報告はなく、問題はないと考える。</p> <p>[質問 7] フウセイとはどのような魚なのか。</p> <p>[回答 7] スズキ目ニベ科の魚。</p> <p>[質問 8] 標準和名はフウセイで正しいのか。</p> <p>[解答 8] 論文では large yellow croaker と表記されていた。学名 <i>Larimichthys crocea</i> より標準和名を検索したので、正しいかどうか分からない。</p> <p>[質問 9] 分類学的位置を詳しく表記したほうが良い。</p> <p>[回答 9] 学位論文もそのように修正したい。</p> <p>[質問 10] ELISA 法による抗体測定において個体によりばらつきがあるが、その原因は。</p> <p>[回答 10] ELISA 法による抗体測定に関しては、現時点では抗原を精製するなど、検出感度を向上させる必要があると考える。同じ条件で攻撃しても、症状が現れるもの、現れないもの、死亡するもの、と個体差がある。今回の結果でみられたばらつきは個体差によるものであると考える。</p> <p>[質問 11] 弱毒生ワクチンがうまくいかなかった原因と対策について。</p> <p>[回答 11] 今回の試験はカンパチを供試し、腹腔内接種法で攻撃した。腹腔内接種と比較し、浸漬法で攻撃した方が養殖場に近い症状を再現でき、ワクチン評価には適している。しかし、カンパチはブリと比較し、感受性が低く、浸漬法では死亡が少ないため、腹腔内接種法で攻撃した。ブリを用いて浸漬法で攻撃し、再度ワクチンを検討する必要があると考える。</p>	

学位申請者
氏名

嶋原 佳子

[質問 12] 現在養殖場でノカルジア症による被害が起きており、養殖業者から相談を受けたと仮定する。養殖業者に対してどういった対策を提案するか。

[回答 12] 感染症には飼育密度などストレスが影響する。飼育密度を下げ飼育環境を改善するといった、ストレスの軽減を提案する。

[質問 13] 経済的に無理では？

[回答 13] 経済的には難しいが、現時点でノカルジア症に対して認可されている薬剤がない。ストレスを軽減し、感染が広がらないようにするべきである。