

# 学位論文要旨

氏名 板野 公一

題目

ブリノカルジア症の防疫に関する研究

(Detection and Prevention of Nocardiosis in Yellowtail *Seriola quinqueradiata*)

*Nocardia seriolae*によって引き起こされるノカルジア症は、1967年に三重県で初めてブリおよびカンパチで発生が報告されて以来、ブリ養殖業に大きな被害を与えている。本症は、出荷を控えた秋口に発生率が高く、産業的に大きな被害が生じていることから、養殖ブリの重要な疾病の一つとされている。現在、このノカルジア症は、有効な薬剤やワクチンがなく、防疫的処置が本病を防ぐ上で最も重要な手段である。本研究では、養殖ブリのノカルジア症の防疫技術を確立するために種々の研究を行った。

1981年から2004年までの24年間における愛媛県のノカルジア症の発生状況と本症流行の原因について検討した。その結果、本症は1998年以降急激に増加傾向を示した。その要因として、夏期の水温変化が本症の流行に影響を受けることが示唆された。また、感染期を特定する目的で、ブリ血清中の*N. seriolae*に対する抗体価の推移について調査した。その結果、抗体価は死亡魚が見られる1~2か月前に上昇し、この時期にブリは*N. seriolae*の曝露を受けていることが認められた。

迅速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。本法により*N. seriolae*を検出するための最適温度は65°C、反応時間は60分であり、ブリ由来の他の魚病細菌との交差反応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法はPCR法よりも10倍感度が高く、無症状の感染魚からも本菌を検出することが可能であった。

*N. seriolae*の感受性をブリとマダイで比較した結果、ブリはマダイより感受性が高いことが確認された。両魚種の血清は、*N. seriolae*を殺菌することは出来なかったが、マダイの白血球は本菌に対して高い殺菌能を有した。従って、*N. seriolae*に対するブリとマダイの感受性の相違は、本菌に対する白血球の殺菌能による可能性が示唆された。次に、腹腔内接種法、浸漬法、経皮感染法、経口投与方法および同居感染法の5つの方法で、ブリを用いて*N. seriolae*の感染実験を試みた。その結果、LD<sub>50</sub>や供試魚の病状、飼育期間等から考察して、浸漬法が自然感染に最も近い感染方法であると考えられた。従って、本法を利用して薬剤による治療試験とワクチンの試験を行った。

11種類の薬剤を用いて*N. seriolae*に対する感受性試験を行った結果、エリスロマイシン、スピラマイシンおよびキタサマイシンに対する耐性株が初めて確認された。一方で、フロルフエニコール、カナマイシン、ストレプトマイシンは本菌に対して安定して高い感受性を示した。

感受性が高かったストレプトマイシンとフロルフエニコールを用いて治療試験を行った。その結果、全ての試験区で対照区に対し治療効果が認められた。しかし、試験期間中の生残魚から*N. seriolae*が分離されたことから、本症に対する薬剤を用いた治療は、本菌の感染を完全に阻止することは困難であると考えられた。

最後に、*N. seriolae*に対して共通抗原を持つ環境由来の*Nocardia*属の細菌2株(*N. soli*, *N. fluminea*)の生菌をブリに接種して、*N. seriolae*に対する防御免疫に関する検討を行った。その結果、若干の防御能の増加が認められたが、*N. seriolae*の感染を予防することは出来なかった。次に、*N. seriolae*感染から回復したブリを用いて本症に対する再感染実験を行った。その結果、感染耐過魚は、まったく死亡が確認されず、本症に対する生ワクチンの可能性が示唆された。

# 学位論文要旨

氏名

Itano Tomokazu

題目

Detection and Prevention of Nocardiosis in Yellowtail *Seriola quinqueradiata*

(プリノカルジア症の防疫に関する研究)

*Nocardia seriolae* is the causative agent of Nocardiosis in farmed marine fish in Japan. The first incidence of Nocardiosis was seen in cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata* in Mie Prefecture in 1967. Nocardiosis is the one of major diseases affecting cultured yellowtail. However, an effective antibiotic and vaccine against Nocardiosis has not yet been developed. This study has been carried out to establish an effective chemotherapeutic agents and a suitable vaccine against Nocardiosis in the cultured yellowtail.

In this study, the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method, a protocol for detecting *N. seriolae* was designed. The optimized temperature and reaction time of LAMP method were 65 degrees and 60 minutes, respectively. 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 *N. seriolae* DNA from carrier fish. Therefore, LAMP is a very useful diagnostic method to detect *N. seriolae* at an early stage of infection.

During the analysis of the pathogenicity of *N. seriolae* to fish, the susceptibility of yellowtail to *N. seriolae* was higher than against red sea bream. Serum bactericidal activity against *N. seriolae* was not observed in both fish species. Production of superoxide anion in kidney phagocytes isolated from red sea bream significantly increased in response to addition of live *N. seriolae*. However, such increase of superoxide anion production was not detected in yellowtail kidney phagocytes. This suggests that superoxide anion from phagocytes is one of important factors in protection against nocardiosis.

The methods of challenge were evaluated using yellowtail. The methods were intraperitoneal injection, immersion, intradermal injection, and oral administration. Immersion challenge is most recommended experimental infection in the best method for nocardiosis. This method will be useful for the development of vaccine, immunostimulants and chemotherapeutics agents against nocardiosis.

*In vitro* antibacterial activities of 11 chemotherapeutic agents against *N. seriolae* isolates were determined as minimum inhibitory concentrations. All the 88 isolates examined showed susceptibility to streptomycin(SM), kanamycin(KM) and florfenicol(FF). Some of the isolates showed resistance to erythromycin(EM), spiramycin(SPM) and kitasamycin(LM).

Furthermore, the effects of SM and FF treatment, against nocardiosis were examined by artificial infection studies. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were recorded between control and SM or FF treated groups. However, numbers of bacterial cells were gradually increased of surviving fish at days post administration. It is difficult to prevent completely the invasion of *N. seriolae* by chemotherapeutic agents in early infection stage. Therefore, study related to the frequency of administration will be required for the prevention of nocardiosis.

To develop a suitable vaccine against yellowtail nocardiosis, this study has examined the effectiveness of live vaccine. The vaccine against *N. seriolae* attempted using the live bacteria of related species in yellowtail. Furthermore, the fish survived from nocardial infection was also used for the model of live vaccine. The fish injected by live *N. soli* and *N. fluminea* cells showed slight resistance against artificial challenge of *N. seriolae*. On the other hand, the survived fish from *N. seriolae* infection resulted the excellent protection after *N. seriolae* challenge. These results suggest that yellowtail possess the protective immune responses against *N. seriolae*.

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	板野 公一
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 鹿児島 大学 教授 坂田泰造
	副査 宮崎 大学 助教授 吉田照豊
	副査 鹿児島 大学 教授 越塩俊介
審査協力者	
題 目	ブリノカルジア症の防疫に関する研究 (Detection and Prevention of Nocardiosis in Yellowtail <i>Seriola quinqueradiata</i> )
<p><i>Nocardia seriolae</i>によって引き起こされるノカルジア症は、1967年に三重県で初めてブリおよびカンパチで発生が報告されて以来、ブリ養殖業に大きな被害を与えている。本症は、出荷を控えた秋口に発生率が高く、産業的に大きな被害が生じていることから、養殖ブリの重要な疾病の一つとされている。現在、このノカルジア症は、有効な薬剤やワクチンがなく、防疫的処置が本病を防ぐ上で最も重要な手段である。本研究は、養殖ブリのノカルジア症の防疫技術を確立するために種々の研究を行ったものである。</p> <p>研究成果の概要は以下のとおりである。</p> <p>1981年から2004年までの24年間における愛媛県のノカルジア症の発生状況と本症流行の原因について検討した。その結果、本症は1998年以降急激に増加傾向を示した。その要因として、夏期の水温変化が本症の流行に影響を受けることが示唆された。また、感染期を特定する目的で、ブリ血清中の<i>N. seriolae</i>に対する抗体価の推移について調査した。その結果、抗体価は死亡魚が見られる1~2ヵ月前に上昇し、この時期にブリは<i>N. seriolae</i>の曝露を受けていることが認められた。</p>	

迅速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。本法により *N. seriolae* を検出するための最適温度は65℃、反応時間は60分であり、ブリ由来の他の魚病細菌との交差反応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法はPCR法よりも10倍感度が高く、無症状の感染魚からも本菌を検出することが可能であった。

*N. seriolae* の感受性をブリとマダイで比較した結果、ブリはマダイより感受性が高いことが確認された。両魚種の血清は、*N. seriolae* を殺菌することは出来なかったが、マダイの白血球は本菌に対して高い殺菌能を有した。従って、*N. seriolae* に対するブリとマダイの感受性の相違は、本菌に対する白血球の殺菌能による可能性が示唆された。次に、腹腔内接種法、浸漬法、経皮感染法、経口投与方法および同居感染法の5つの方法で、ブリを用いて *N. seriolae* の感染実験を試みた。その結果、LD<sub>50</sub> や供試魚の病状、飼育期間等から考察して、浸漬法が自然感染に最も近い感染方法であると考えられた。従って、本法を利用して薬剤による治療試験とワクチンの試験を行った。

11種類の薬剤を用いて *N. seriolae* に対する感受性試験を行った結果、エリスロマイシン、スピラマイシンおよびキタサマイシンに対する耐性株が初めて確認された。一方で、フロルフェニコール、カナマイシン、ストレプトマイシンは本菌に対して安定して高い感受性を示した。

感受性が高かったストレプトマイシンとフロルフェニコールを用いて治療試験を行った。その結果、全ての試験区で対照区に対し治療効果が認められた。しかし、試験期間中の生残魚から *N. seriolae* が分離されたことから、本症に対する薬剤を用いた治療は、本菌の感染を完全に阻止することは困難であると考えられた。

最後に、*N. seriolae* に対して共通抗原を持つ環境由来の *Nocardia* 属の細菌2株 (*N. soli*, *N. fluminea*) の生菌をブリに接種して、*N. seriolae* に対する防御免疫に関する検討を行った。その結果、若干の防御能の増加が認められたが、*N. seriolae* の感染を予防することは出来なかった。次に、*N. seriolae* 感染から回復したブリを用いて本症に対する再感染実験を行った。その結果、感染耐過魚は、まったく死亡が確認されず、本症に対する生ワクチンの可能性が示唆された。

以上のように、本研究は、ブリ等で発生するノカルジア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	板野 公一			
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	鹿児島大学	教授	坂田泰造
	副査	宮崎大学	助教授	吉田照豊
	副査	鹿児島大学	教授	越塩俊介
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 type="radio"/> 口答 <input checked="" type="radio"/> 筆答
<p>主査および副査の5名は、平成18年12月22日（金曜日）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	板野 公一
<p>[質問 1] 近年のノカルジア症の流行が、夏季の水温変動によるものだという愛媛県における結果を示したが、愛媛よりも水温が高い南九州の他県との比較は行ったか？また、同様の傾向が見られたなら、ノカルジア症は 98 年以降、他県でも流行したのか？</p> <p>[回答 1] 他県(南九州)における水温と発生状況との関係については調査を行っていない。しかし、西日本を中心とした他県においても同様に 98 年頃から増加傾向であることが報告されている。</p> <p>[質問 2] ストレプトマイシンの経口投与は有効である結果が得られているが、ストレプトマイシンを経口投与しても血中濃度は上がらないことが今まで報告されている。投薬後のストレプトマイシンの血中濃度を測定したか？もし血中濃度が上がっているのであれば、ブリのストレプトマイシンに対する代謝は他魚種とは違うのか？</p> <p>[回答 2] 160mg の倍量の 320mg 投与で吸収排泄を確認した結果、短期間で <math>9.2 \mu\text{g/ml}</math> の吸収が確認された。御指摘のとおり原則としてストレプトマイシンは経口投与では行わないが、対象動物によってはその吸収が異なることも報告されており、本研究の結果からもブリに関しては吸収されるものと考えている。</p> <p>[質問 3] MIC の測定について、スルフィソゾールを使用しているが、スルフィソゾールはサルファ剤の一種である。現場ではサルファ剤の効果があるとされていますが、なぜ MIC が高いのか？</p> <p>[回答 3] 感受性を測定する方法に問題があると考え、サルファ剤も測定可能な DST 培地を選択して測定を行ったが、それでも MIC が高い値を示した。この点については現段階では不明である。しかし培地上と生体内での感受性は薬剤種や環境によって異なることから、今後サルファ剤についても生体内での効果を明らかにしていく必要がある。</p> <p>[質問 4] 現在、ノカルジア症に対して治療法および予防法は確立されていないが、一番効果的な治療あるいは予防策についてはどのように考えているか？</p> <p>[回答 4] 現段階で有効な対策法はない。本症は一度発症した場合、治療が困難なため、これ以上キャリアーとなる魚を導入しないことが重要だと考える。本研究の調査では中国からの輸入カンパチ、イサキといった魚種で導入直後に保菌している状態を確認しており、キャリ</p>	

学位申請者 氏名	板野 公一
<p>アーとなる魚を漁場内に侵入させないことが現段階で最も重要だと考える。</p> <p>[質問 5] 養殖場では当歳魚でノカルジア症に感染しても、二年魚、三年魚で同じ生け簀で出るのか？</p> <p>[回答 5] 調査地点において当歳魚で発生が確認された養殖場で、越年魚でも発生を確認している。当歳魚では抗体価の上昇が見られており、越年魚ではさらに応答が速いあるいは高くなるものと考えられる。しかし、全ての魚が当歳時に感染しているかどうかは確認できないため、正確な把握は困難である。</p> <p>[質問 6] ワクチン試験で <i>M. seriolae</i> SN02-05 株を腹腔内接種した場合、累積死亡率が 50% となっているが、生き残ったものを感染耐過魚として使ったのか？また、累積死亡率が 50% で止まるというのはどのような意味があるのか？</p> <p>[回答 6] <i>M. seriolae</i> SN02-05 株で攻撃した生残魚を感染耐過魚（免疫魚）としてワクチン試験に用いた。累積死亡率が 50% で止まる理由として、攻撃株として使用した <i>M. seriolae</i> 024013 株を接種した場合の LD<sub>50</sub> は 10<sup>2</sup> cfu/fish である。感染耐過魚作製に使用した SN02-05 株の攻撃菌量は 10<sup>4</sup>~<sup>5</sup> cfu/fish で、024013 株に対し 100 倍~1000 倍の菌量を接種している。SN02-05 株は 3 年前に分離されたものであり、継代培養あるいは凍結保存中に病原性が落ちた結果ではないかと考えている。</p> <p>[質問 7] ワクチンを考える場合、感染耐過魚というものは特殊な例にあたり、コントロールワクチン(どの魚にも効果があるもの)が最終的に必要となる。この点についてはどのように考えるか？</p> <p>[回答 7] 本症は FKC で予防効果が得られていないことから、本研究ではワクチン開発の糸口として感染耐過魚（生菌免疫魚）を使用した。今後は病原性をもつ特異抗原の探索を行い、最終的にはこれに対するワクチン評価を行う必要があると考えている。</p> <p>[質問 8] 排菌というのは外側(環境中)に菌を出すことだが、どの経路を通過して外へ出すのか？やはり排泄物として外に出るのか？</p> <p>[回答 8] 他の疾病と同様に糞からも排出されるものと思われるが、本症の特徴として、病状</p>	

学位申請者  
氏名

板野 公一

が進行すると体表隆起が見られ、隆起部が膿瘍を形成して排菌することが知られている。実際の養殖場において肉眼で膿瘍部から排菌されている状況が確認でき、膿瘍部からの排菌の方が量として多いものと推察される。

[質問 9] ブリとマダイで自然免疫の比較を行う際、飼育に用いた市販の配合飼料に免疫活性を高める物質が含まれている可能性があるが、その点について免疫系の測定値に影響はないのか？

[回答 9] 両魚種ともに同社の飼料を同様に使用していることから、その影響は相殺しているものと思われる。また、対照区も同様の飼料を使用していることから、対照区に対する反応値として問題ないものと考えている。

[質問 10] 攻撃試験する前の状態の情報がよく分からない。市販飼料(丸紅)を使っているが、市販飼料の危険な点として、何が入っているかがわからない点がある。飼料中の免疫賦活剤や免疫増強剤、ビタミン類、酵素などが様々なものが免疫活性を上げている場合がある。そういうもとでの攻撃試験なので、前歴のところのデータを示した方がより分かりやすい。例えば、ブリとタイでは感受性が違うと言っているが、餌によるブリとマダイの免疫状態の違いがあるのではないか？

[回答 10] 試験をする前の状況は、統一してブリ用の市販飼料(丸紅)を使用し続けています。魚種による比較は難しいが(検討してみないとわからないが)、常に同じ条件で行っていることも一つの重要な要素だと考えています。しかし、餌による影響は今後検討しなければならないと考えます。

[質問 11] 抗菌剤、抗生物質を入れたとき(配合飼料に添加した場合)、添加方法によって実際にどのくらい吸収されたか分からないのではないか？溶失などのデータがあり、実際に吸収されている量が分かると現実的なデータになるのではないか。その点についてどのように考えるか？

[回答 11] 餌に染み込ませた薬剤がどれくらい残っているかについては測定していないが、ブリは瞬間的に餌を食べる魚種であり、摂食状況を見ている限り、大きな損失はないのではないかと考えます。



学位申請者  
氏名

板野 公一

[質問 12] 抗生物質は投与方法の改善などがあるが、結局対症療法でしかない。世界的な推薦としては将来的に制限されたり、禁止されたりする可能性がある。そのようになったら使えなくなってしまう、非常に難しい状況になってくる。その時、何が一番有効なのか？

[回答 12] 免疫賦活剤やプロバイオテクスについては今回の研究では行っていないが、現場ではそういったものが使用されています。しかし、現場でどれだけノカルジア症を抑えられているかを評価することは難しく、これも我々がしなければならない仕事だと考えています。

[質問 13] 生ワクチンというのは承認される可能性はかなり低いと考えますが？

[回答 13] 現在においても、今後においてもおそらく難しいのではないかと考えます。しかし、生ワクチンそのものを与えるのではなく、今後の展開としては、抗原となる(病原性を示すものもの)を見つけて、その成分でワクチネーションする方向で考えなければならないと思っています。

[質問 14] LAMP 法を行っているが、天然魚からのノカルジアの検出は行いましたか？

[回答14] 行っていません。