

公募型試験研究事業－Ⅲ

養殖ブリ類の再興感染症（ノカルジア症）に関する研究

柳宗悦，村瀬拓也

【目 的】

ノカルジア症は国内では1967年8月に，三重県尾鷲において養殖ブリ及びカンパチで初めて報告された疾病で^{1,2)}，現在ではブリ属養殖魚類において最も被害が大きい感染症となっている。本疾病への対策として，これまでさまざまなワクチンによる予防方法が検討されてきたが，実用化には至らず^{3,4)}，養殖現場における治療方法は，スルファモノメトキシナトリウム（SMM-Na）を主成分とするサルファ剤の投薬があるにすぎない。また，本症はブリ類ではこれまで主に秋季に発生していた疾病であるが，近年，春先に海外から輸入されたカンパチ種苗からも確認されている。

一方，本症の分離株のほとんどは，従来の寒天培養法では低感受性であり効果の判定が非常に困難なことから水産試験場等で感受性を現場評価できる手法が確立されていない状況にある。

本研究では，ノカルジア菌に対しサルファ剤の薬効を現場評価できる標準法の確立と野外分離株の評価，感染試験によるSMM-Naの治療試験を実施し，薬剤耐性菌の存在について調査した。併せて最適治療方法の確立に向け，SMM-Naの治療投薬方法の検討とエリスロマイシン（EM）による治療の可能性について調査した。

【方 法】

1. 疫学調査

鹿児島県水産技術開発センターが，2004～2011年度の8年間に検査依頼を受けたものを対象とし，県内養殖場におけるノカルジア症の発生状況（魚種，場所，時期等）について整理を行った。なお，診断件数として示す“件”は，1回の検査依頼につき通常，複数の検体（複数の生簀を含む）が持ち込まれるが，その診断結果が全て同一の疾病だった場合は1件として，複数の疾病が確認された場合は複数件として集計したものである。また，検査個体数として示す“尾”は，持ち込みのあった全ての検体について検査した個々の個体数を集計したものである。

2. サルファ剤の効果を評価する標準法の確立

(1) リサズリンを添加したマイクロダイリューション法(REMA法)による客観的なMIC測定法の開発と菌株の薬剤感受性評価

サルファ剤の効果を評価する標準法を確立するため，サルファ剤4種類（スルファモノメトキシ（SMM），スルファダイメトキシ（SDM），サルファメソキサゾール（SMX），スルフィソゾール（SIZ）），培地2種類（ミューラーヒントン液体培地cation-adjusted Mueller-Hinton broth(CAMHB;Difco,MI,USA)及びその1/2濃度の1/2×CAMHB），接種菌数（ $10^5\sim 10^2$ CFU/well）を変えて，マイクロダイリューション法によりノカルジア菌のMIC値測定を行った。併せて，上記培地にリサズリン（Resazurin sodium salt;Sigma-Aldrich,USA）を添加し，細菌の増殖を色により視覚判定が容易にできないかを調べた。なお，供試株には， α -グルコシダーゼ陽性株及び陰性株をそれぞれ10株ずつ，計20株を使用した。

また、2008～2011年にかけて国内4県（宮崎県、鹿児島県、高知県、三重県）で分離されたノカルジア菌の野外分離株190株（ブリ由来136株、カンパチ由来44株、シマアジ由来1株、ヒラメ由来9株）について、SMMに対するMIC値を測定し、当該菌株の薬剤感受性評価を行った。併せて、API ZYM市販キットを使用し α -グルコシダーゼ活性を調べた。

(2)ブリ類魚類を用いた感染試験による耐性菌の存在調査

供試魚はカンパチ当歳魚（平均体重110 g）を用いた。供試菌株はスルファモノメトキシシナトリウム（SMM-Na）に対してMIC値の低い菌株（4 μ g/mL、2008年に宮崎県内の養殖ブリから分離されたUT10株、 α -グルコシダーゼ陰性株）と高い菌株（32 μ g/mL、2008年に鹿児島県内の養殖カンパチから分離されたAM802株、 α -グルコシダーゼ陽性株）の2株を使用し、BHI寒天培地で25℃で5日間培養後、滅菌生理食塩水に 10^7 CFU/mLになるよう懸濁し、供試魚の腹腔内に0.1mL（接種菌量 10^6 CFU/fish）接種した。なお、対照区は滅菌生理食塩水を同様に接種した。接種後、各区16尾を200 L水槽5基（5回転/日の濾過海水をかけ流し）に収容し、1日1回、E P飼料を魚体重の2%給餌し、32日間飼育観察を行った。なお、SMM-Na（水産用ダイメトン散；明治製菓(株)）の投薬は菌接種の8時間後から開始し、以後、供試魚が餌を食べなくなるまで毎日給餌した。投薬量は50mg/kg魚体重・日を基準とした。試験終了後、生残魚の外部（体表の潰瘍）及び内部（腎臓、脾臓の結節）所見により、ノカルジア症の発症の有無を観察し、併せて7H11寒天培地(Mycobacteria 7H11 Agar;Difco, USA)に臓器片を接種後25℃で2週間以上培養し、黄白色のコロニーの発育の有無を観察した。

3. 最適治療方法の調査（治療指針の確立）

(1)養殖現場に即したサルファ剤（SMM-Na）の治療投薬方法の整理

すずき目魚類のノカルジア症の治療薬として承認されているSMM-Naについて、1週間毎に投薬パターンの異なる試験区を3つ設定し（試験区1：投薬→休薬→投薬→休薬，試験区2：投薬→休薬→休薬→投薬，試験区3：投薬→休薬→休薬→休薬），カンパチ当歳魚を用いて感染試験を行った。供試菌株はAM802株を使用し、BHI寒天培地で25℃で5日間培養後、滅菌生理食塩水に 10^7 CFU/mLになるよう懸濁し、供試魚の腹腔内に0.1mL（接種菌量 10^6 CFU/fish）接種した。なお、対照区は他の試験区と同様に菌接種を行った。1回目の試験では平均体重約330 gのカンパチ当歳魚を攻撃後、各区8尾を100 L水槽（20回転/日の濾過海水をかけ流し）に収容し、1日1回、E P飼料を魚体重の2%給餌し、28日間飼育観察を行った。なお、SMM-Naの投薬は菌接種の18時間後から開始し、投薬量は50mg/kg魚体重・日を基準とした。2回目の試験では平均体重約470 gのカンパチ当歳魚を、1回目の試験と同様に各区8尾収容し28日間飼育観察を行った。試験終了後、生残魚の外部（体表の潰瘍）及び内部（腎臓、脾臓の結節）所見により、ノカルジア症の発症の有無を観察し、併せて7H11寒天培地(Mycobacteria 7H11 Agar;Difco, USA)に臓器片を接種後25℃で2週間以上培養し、黄白色のコロニーの発育の有無を観察した。試験期間中の水温及び溶存酸素(DO)は、ポータブル水質測定器（YSI社製 Model85）で測定した。

(2)既存魚病薬剤（EM）の治療効果の調査・検討

(1)のSMM-Na試験と並行して、すずき目魚類の既存魚病薬剤であるエリスロマイシン（EM）についても、試験区1と同様の投薬パターン、菌接種量で試験区4として設定し、同一時期に同一方法で計2回試験を行い、当該薬剤のノカルジア感染症に対する治療の可能性について調べた。

【結 果】

1. 疫学調査

2004～2011年度の8年間の魚病診断結果（n=3,369）を分析した結果、ノカルジア症の診断割合は全診断件数の7.2%（n=243）で（図1）、そのうちブリ類（ブリ、カンパチ、ヒラマサ）の診断件数に占める割合は9.4%（n=215）であった（図2）。

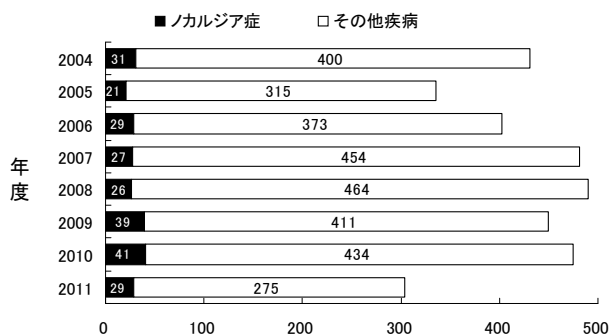


図1. 全魚病診断に占めるノカルジア症の件数(鹿児島県)

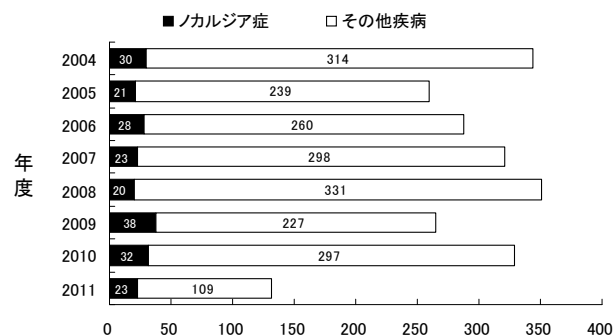


図2. ブリ類の診断件数に占めるノカルジア症の件数(鹿児島県)

ノカルジア症は、県内のほぼ全域で発生が確認され、夏季から秋季にピークは見られたが、カンパチでは近年、春先から初夏の種苗導入時期（4～7月）にも発生が確認される傾向があった（表1）。また、当センターにおいて2004～2011年度の過去8年間に、春先から初夏にかけてノカルジア症と診断されたカンパチの検査個体数の年齢分析では、4～7月にかけて診断された多くは当歳魚であることが分かった（図3）。なお、本年度は春先から初夏の発症は見られず、夏季から秋季にかけての発症傾向が見られ、水温が低下した12月においても、ノカルジアの感染が継続する状況にあった。

表1. カンパチにおけるノカルジア症の年度別・月別診断件数の推移（単位:件）

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計
2004年		1		3	4	10	6	1					25
2005年					3	3	4	2		1			13
2006年			1	1		5	5	4		1			17
2007年		1	1	1	2	4	2	1					12
2008年			1	2		2	5	3	1				14
2009年				4	6	6	7		4	1		2	30
2010年	4		1	3	3	4	2	4					21
2011年					3	5	3	1	2				14
合計	4	2	4	14	21	39	34	16	7	3	0	2	146

（注）診断件数として示す“件”は、1回の検査依頼につき通常、複数の検体（複数の生質を含む）が持ち込まれるが、その診断結果が全て同一の疾病だった場合は1件として、複数の疾病が確認された場合は複数件として集計した。

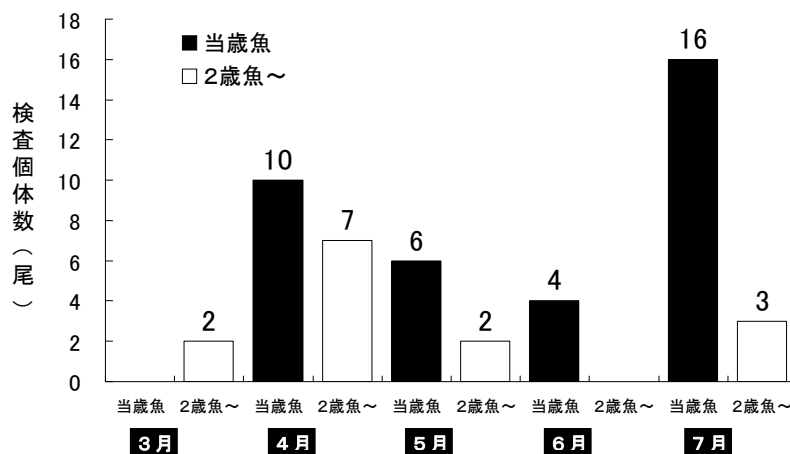


図3. 春先から初夏にかけてノカルジア症と診断されたカンパチ検査個体の年齢分析

2. サルファ剤の効果を評価する標準法の確立

(1) リサズリンを添加したマイクロダイリューション法(REMA法)による客観的なMIC測定法の開発と菌株の薬剤感受性評価

表2にREMA法による客観的なMIC測定法の調査結果を示した。

MIC値は接種菌数によりその値が変化した。接種菌数が $10^5 \sim 10^4$ CFU/wellでは、MIC値は512 μ g/mL以上を示し、値が大きすぎて判定が困難であった。 10^3 CFU/wellでは、MIC値は64 μ g/mLで、分布は16~128 μ g/mLとやや大きく、再現性という点で判定がやや困難であった。 10^2 CFU/wellでは、MIC値はSMM, SDM, SIZで16 μ g/mL, SMXで32 μ g/mLを示し、分布は4~32 μ g/mLで、測定には最も優れていた。また、Ca, Mgイオンを調整した1/2×CAMHB培地が、測定には最も優れていた。図4に示すとおり、リサズリンを添加することにより、色による視覚判定が容易にできることが判明した。

上記の結果を踏まえて、2008~2011年に現場から分離された190株について、REMA法によりSMMのMIC値を測定したところ、その分布は4~32 μ g/mLであった(図5)。なお、MIC値が高い32 μ g/mLの株は α -グルコシダーゼ陽性株の比率が高く(15/38 \approx 40%)、MIC値が低い16 μ g/mL以下の株は全てが α -グルコシダーゼ陰性株(152/152)であることが判明した。

表2. REMA法によるノカルジア菌のMIC測定結果(サルファ剤の種類, 培地の種類, 菌接種量の比較測定)

サルファ剤(種類)	培地(種類)	接種菌数におけるMIC値(μ g/mL)							
		10^5 (CFU/well)		10^4 (CFU/well)		10^3 (CFU/well)		10^2 (CFU/well)	
		MIC値	分布	MIC値	分布	MIC値	分布	MIC値	分布
SMM	1×CAMHB	>512	>512	>512	>512	64	16-128	16	4-32
	1/2×CAMHB	>512	>512	>512	>512	64	16-128	16	4-32
SDM	1×CAMHB	>512	>512	>512	>512	64	16-128	16	4-32
	1/2×CAMHB	>512	>512	>512	>512	64	16-128	16	4-32
SMX	1×CAMHB	>512	>512	>512	>512	64	16-128	32	4-32
	1/2×CAMHB	>512	>512	>512	>512	64	16-128	32	4-32
SIZ	1×CAMHB	>512	>512	>512	>512	64	16-128	16	4-32
	1/2×CAMHB	>512	>512	>512	>512	64	16-128	16	4-32

(注) ①SMM スルファモノメトキシシ、SDM スルファダイメトキシシ、SMX サルファメソキサゾール、SIZ スルフィソゾール
CAMHB ミューラー-ヒントン液体培地

②REMA法:リサズリンを添加したマイクロダイリューション法

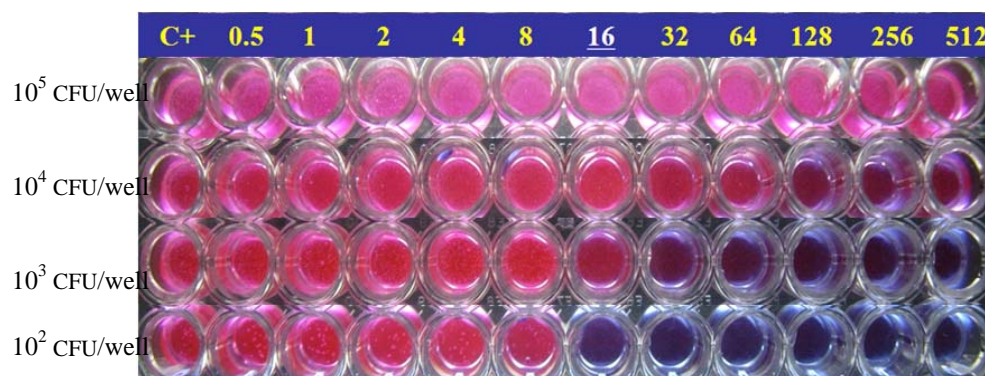


図4. リサズリンを添加したマイクロダイリューション法(REMA法)によるSMMのMIC測定(色による視覚判定)

※ ピンク色: 菌が増殖している
紫色: 菌の増殖が認められない
やや赤み: わずかに菌の増殖が認められる

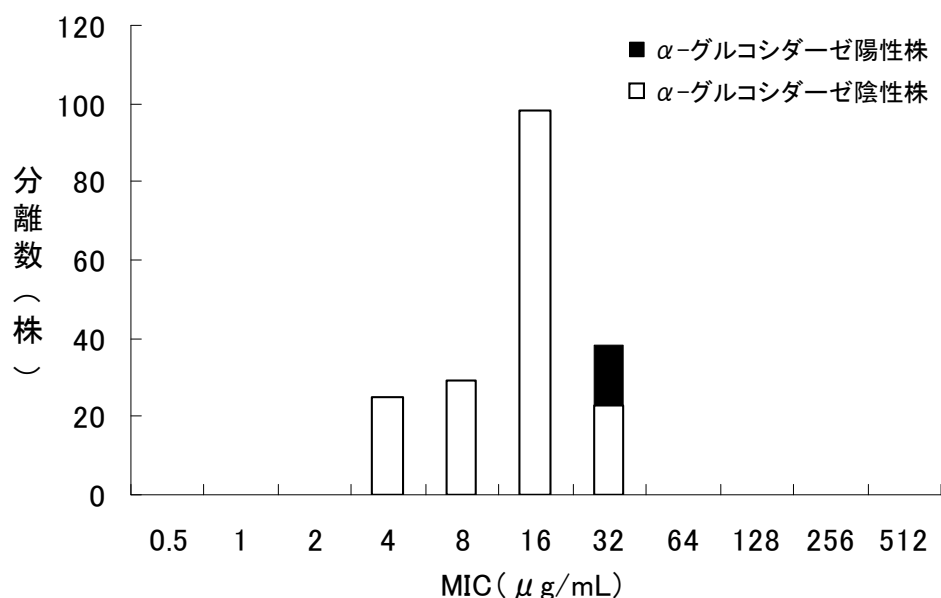


図5. マイクロダイリューション法(リサズリン)を用いたサルファ剤(SMM)のMIC分布

(2) ブリ類魚類を用いた感染試験による耐性菌の存在調査

表3にカンパチを用いたノカルジア菌感染試験によるSMM-Naの治療効果の結果を、図6に感染試験における生残尾数の推移を示した。

表3、図6に示すとおり、試験区3(MIC値:32 μg/mL, 投薬)、試験区4(MIC値:32 μg/mL, 投薬)では菌接種7日後から、試験区2(MIC値:4 μg/mL, 無投薬)では8日後から死亡が始まり、試験区4は25日後で全て死亡した。対して、試験区1(MIC値:4 μg/mL, 投薬)、試験区5(対照区)では死亡は発生しなかった。

一方、菌接種32日後の生残率は、SMM-Naを投薬した試験区1、3はそれぞれ100%、87.5%で、無投薬の試験区2、4はそれぞれ25.0%、0%であった。対照区の試験区5は100%であった。また、生残魚におけるノカルジア菌分離率は、試験区1、2、3がそれぞれ25.0%、100%、14.3%であった。なお、試験期間中の水温及び溶存酸素(DO)は概ね25℃と6 mg/Lで推移した。

表3. カンパチを用いたノカルジア菌感染試験によるスルファモノメトキシナトリウム(SMM-Na)の治療効果試験結果

	試験区 No				
	1	2	3	4	5
飼育尾数(尾/水槽)	16	16	16	16	16
平均体重(g/尾)	110	110	110	110	110
接種菌液(菌株由来)	UT10	UT10	AM802	AM802	0.85% NaCl
α-グルコシダーゼ活性	-	-	+	+	
MIC(μg/mL)	4	4	32	32	
SMM-Na投与量(mg/kg・日)	50	-	50	-	-
投薬開始時間(時間後)	8	-	8	-	-
死亡初発日(日後)	-	8日後	7日後	7日後	-
生残率(%)	100 (16/16)	25.0 (4/16)	87.5 (14/16)	0	100 (16/16)
生残魚におけるノカルジア症の外部症状発生率(%) ^{※1}	31.3 (5/16)	100 (4/4)	14.3 (2/14)		
生残魚におけるノカルジア症の内部症状発生率(%) ^{※2}	81.3 (13/16)	100 (4/4)	85.7 (12/14)		
生残魚におけるノカルジア菌分離率(%) ^{※3}	25.0 (4/16)	100 (4/4)	14.3 (2/14)		

(注) ※1 外部症状発生率は、体表潰瘍の有無を確認した尾数の割合。

※2 内部症状発生率は、腎臓及び脾臓の結節の有無を確認した尾数の割合。

※3 菌分離率は、7H11寒天培地に臓器片を接種後25℃で2週間以上培養し、黄白色のコロニーの発育の有無を観察した尾数の割合。

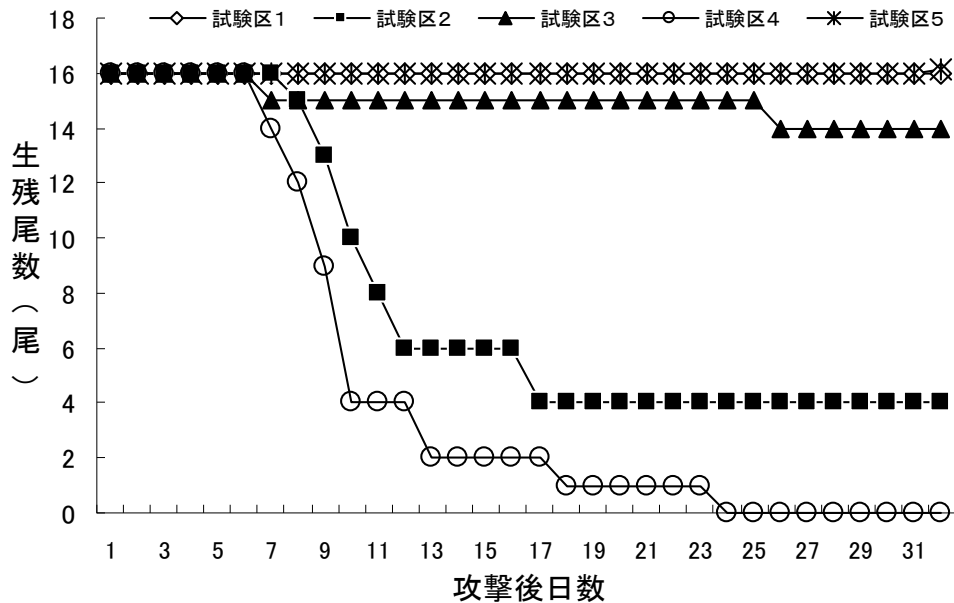


図6. ノカルジア菌感染試験における生残尾数の推移

3. 最適治療方法の調査（治療指針の確立）

(1) 養殖現場に即したサルファ剤（SMM-Na）の治療投薬方法の整理

第1回目の試験結果を表4に、試験期間中の生残率の推移を図7に、第2回目の試験結果を表5に、試験期間中の生残率の推移を図8にそれぞれ示した。

菌接種28日後の生残率は、試験区1（1回目100%、2回目100%）、試験区2（1回目87.5%、2回目100%）、試験区3（1回目75.0%、2回目87.5%）の順に高かった。なお、第1回目の試験では各区とも対照区（37.5%）に比べ明らかに高い生残率を示したが、第2回目の試験では各区と対照区（87.5%）との間には明確な差は見られなかった。

生残魚におけるノカルジア菌分離率は、第1回目の試験では対照区が33.3%であったのに対し、3試験区とも保菌魚は確認されなかった。第2回目の試験では試験区3（57.1%）、試験区1（25.0%）、試験区2（12.5%）の順に高かった。なお、対照区は試験区3と同じ57.1%であった。試験期間中の水温は1回目が28～25℃、2回目が25～23℃で推移し、溶存酸素(DO)は1回目、2回目とも概ね6 mg/Lで推移した。

(2) 既存魚病薬剤（EM）の治療効果の調査・検討

SMM-Naと同様、第1回目の試験結果を表4に、試験期間中の生残率の推移を図7に、第2回目の試験結果を表5に、試験期間中の生残率の推移を図8にそれぞれ示した。

菌接種28日後の生残率は、第1回目の試験が87.5%で、対照区（37.5%）に比べ明らかに高い生残率を示したが、第2回目の試験（100%）では、対照区（87.5%）との間に明確な差は見られなかった。なお、これらの値はSMM-Naの試験区1、2とほぼ同等であった。

生残魚におけるノカルジア菌分離率は、1回目が0%、2回目が25.0%で、対照区（1回目33.3%、2回目57.1%）に比べ明らかに低い分離率を示した。なお、これらの値はSMM-Naの試験区1、2とほぼ同等であった。

表4. 第1回治療効果試験の結果

	ダイムトン(SMM-Na)投与区			エリスロマイシン(EM)投与区	対照区
	試験区1 (投薬→休薬→投薬→休薬)	試験区2 (投薬→休薬→休薬→投薬)	試験区3 (投薬→休薬→休薬→休薬)	試験区4 (投薬→休薬→投薬→休薬)	試験区5 (無投薬)
	飼育尾数(尾/水槽)	8	8	8	8
平均体重(g/尾)	275.6	332.9	321.9	387.1	320.3
投薬開始時間(時間後)	18	18	18	18	—
死亡初発日(日後)	—	28日後	当日(菌接種)	10日後	4日後
生残率(%)	100 (8/8)	87.5 (7/8)	75.0 (6/8)	87.5 (7/8)	37.5 (3/8)
生残魚におけるノカルジア症の外部症状発生率(%) ^{※1}	12.5 (1/8)	0	0	42.9 (3/7)	33.3 (1/3)
生残魚におけるノカルジア症の内部症状発生率(%) ^{※2}	12.5 (1/8)	14.3 (1/7)	33.3 (2/6)	0	100 (3/3)
生残魚におけるノカルジア菌分離率(%) ^{※3}	0	0	0	0	33.3 (1/3)

(注) ①用量はダイムトン(SMM-Na), エリスロマイシン(EM)とも50mg/kg・日を基準に, 1週間当たり5日間連続投与とした。

②AM802株の由来(2008年鹿児島由来, カンパチ, α -グルコシダーゼ陽性株)

※1 外部症状発生率は, 体表潰瘍の有無を確認した尾数の割合。

※2 内部症状発生率は, 腎臓及び脾臓の結節の有無を確認した尾数の割合。

※3 菌分離率は, 7H11寒天培地に臓器片を接種後25℃で2週間以上培養し, 黄白色のコロニーの発育の有無を観察した尾数の割合。

表5. 第2回治療効果試験の結果

	ダイムトン(SMM-Na)投与区			エリスロマイシン(EM)投与区	対照区
	試験区1 (投薬→休薬→投薬→休薬)	試験区2 (投薬→休薬→休薬→投薬)	試験区3 (投薬→休薬→休薬→休薬)	試験区4 (投薬→休薬→投薬→休薬)	試験区5 (無投薬)
	飼育尾数(尾/水槽)	8	8	8	8
平均体重(g/尾)	462.1	471.1	531.9	455.5	431.3
投薬開始時間(時間後)	18	18	18	18	—
死亡初発日(日後)	—	—	9日後	—	13日後
生残率(%)	100 (8/8)	100 (8/8)	87.5 (7/8)	100 (8/8)	87.5 (7/8)
生残魚におけるノカルジア症の外部症状発生率(%) ^{※1}	37.5 (3/8)	25.0 (2/8)	42.9 (3/7)	50.0 (4/8)	85.7 (6/7)
生残魚におけるノカルジア症の内部症状発生率(%) ^{※2}	37.5 (3/8)	62.5 (5/8)	42.9 (3/7)	37.5 (3/8)	100 (7/7)
生残魚におけるノカルジア菌分離率(%) ^{※3}	25.0 (2/8)	12.5 (1/8)	57.1 (4/7)	25.0 (2/8)	57.1 (4/7)

(注) ①用量はダイムトン(SMM-Na), エリスロマイシン(EM)とも50mg/kg・日を基準に, 1週間当たり5日間連続投与とした。

②AM802株の由来(2008年鹿児島由来, カンパチ, α -グルコシダーゼ陽性株)

※1 外部症状発生率は, 体表潰瘍の有無を確認した尾数の割合。

※2 内部症状発生率は, 腎臓及び脾臓の結節の有無を確認した尾数の割合。

※3 菌分離率は, 7H11寒天培地に臓器片を接種後25℃で2週間以上培養し, 黄白色のコロニーの発育の有無を観察した尾数の割合。

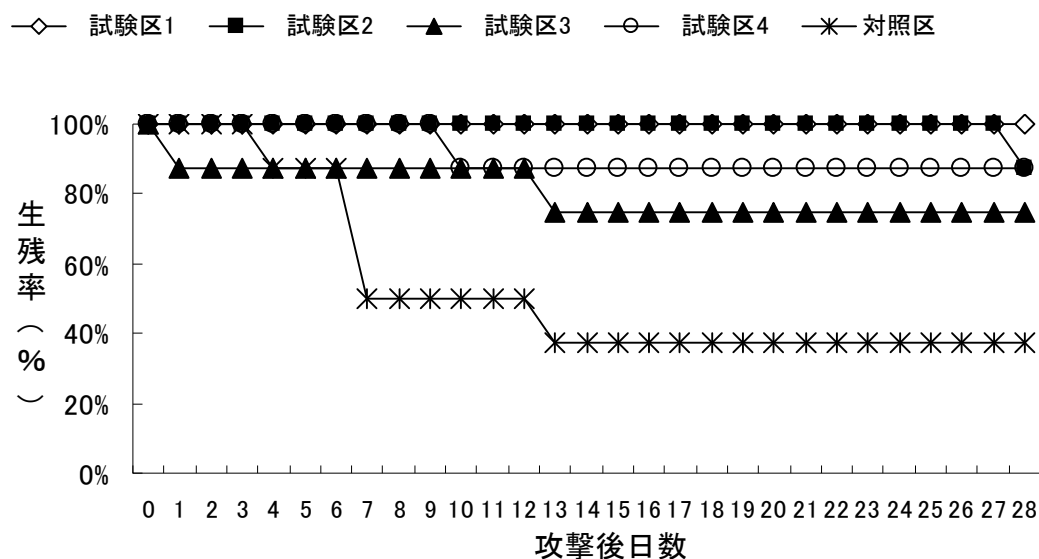


図7. 第1回治療効果試験(SMM-Na, EM)の生残率の推移

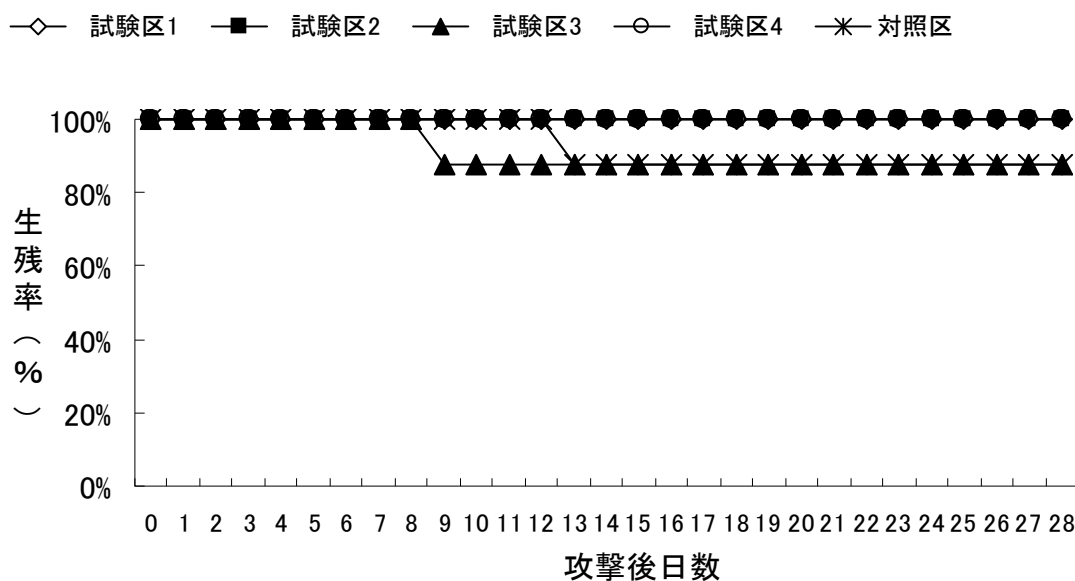


図8. 第2回治療効果試験(SMM-Na, EM)の生残率の推移

【考 察】

1. 疫学調査

ノカルジア症はこれまで水温の高い夏季から水温が徐々に低下し始める秋季（8月下旬～11月）に多発する疾病であったが、近年、カンパチで春先から発症する傾向があることから、その発生動向には注意が必要である。山本ら⁵⁾は4月のカンパチ当歳魚において、血清中の抗 *Nocardia seriolae* 抗体価が確認されたことを受けて、種苗導入時にすでに感染している可能性があることを報告しているが、今回、図3で示すように、当センターにおいて4～7月にかけてノカルジア症として診断された多くの個体が当歳魚であったという事実は、それらを裏付ける結果と言える。さらに、山本ら⁶⁾はパルスフィールド電気泳動（PFGE）の一種であるバイアス正弦電場ゲル電気泳動により、*N. seriolae* の菌株間の遺伝的多様性（遺伝型）について調査し、分離された地域、魚種によって類似性は見られなかったものの、1970～1990年の分離株と1997～2003年の分離株との間には大きく異なるパターンが確認され、さらには台湾のスズキ由来株は国内分離株と同じ泳動パターンを示し、海外から新しいタイプの菌株が持ち込まれた可能性も否定できないと報告している。一方、類似の報告として、嶋原⁷⁾は *N. seriolae* 菌株を表現型（酵素活性, API ZYM市販キット使用）及び遺伝型（パルスフィールド電気泳動）により型別を行い、2000～2005年に分離された菌株の多くは、1970～1990年の菌株とは異なる表現型を示し（1970～1990年は全て α -グルコシダーゼ陽性株、2000～2005年はカンパチ由来菌株の一部を除き、 α -グルコシダーゼ陰性株）、遺伝的な相関性も低く、近年流行している菌株の多くは、過去に流行していた菌株の再現ではなく異なるタイプの菌株によるものであると推察している。

これらのことから、今後、春先から発症が確認されている菌株と従来の秋季に発生する菌株との間には、遺伝タイプが異なる可能性も推察されることから、今後、両者についての表現型（ α -グルコシダーゼ活性）や遺伝子型を調査する必要があるものと思われた。

2. サルファ剤の効果を評価する標準法の確立

(1) リサズリンを添加したマイクロダイリューション法(REMA法)による客観的なMIC測定法の開発と菌株の薬剤感受性評価

サルファ剤のMIC値測定は、これまで判定が非常に困難で再現性に乏しかった。今回の試験結果から、リサズリンを添加し、Ca, Mgイオンを調整した1/2×CAMHB培地を使用したREMA法により、接種菌数を 10^2 CFU/wellに調整することで、色の識別により容易に判定することが可能となった。正確かつ客観的にMIC値を測定する方法が確立されたことは、試験研究の推進や養殖現場の対応において重要であり、これによりノカルジア症に対するSMM-Naの薬効を正しく評価することが可能となったと思われる。

なお、今回測定された $32\mu\text{g/mL}$ よりも高いMIC値を有する細菌が出てきた場合は、薬剤耐性菌である可能性が高いことから注意する必要がある。また、今回のMIC測定結果から、薬剤感受性との関連性が高い α -グルコシダーゼ活性については注目すべき項目であり、当該活性のモニタリングは薬剤耐性菌発生の有無を確認する有益な指標になり得るものと思われ、今後も継続していくことが望ましいと考えられる。

(2) ブリ類魚類を用いた感染試験による耐性菌の存在調査

感染試験の結果、MIC値の低い菌株($4\mu\text{g/mL}$, α -グルコシダーゼ陰性株)、高い菌株($32\mu\text{g/mL}$, α -グルコシダーゼ陽性株)共に、SMM-Naで治療効果があることが確認された。また、今回の野外分離株190株のMIC値の測定結果から、サルファ剤の耐性菌は最大 $32\mu\text{g/mL}$ であることから、現時点では耐性菌は存在しないものと推察された。しかし、両区とも保菌魚が確認されていることから(菌分離率はMIC値の低い菌株接種区で25.0%、高い菌株接種区で14.3%)、この濃度の投薬では、完全に除菌はできていないことが推察された。

3. 最適治療方法の調査(治療指針の確立)

(1) 養殖現場に即したサルファ剤(SMM-Na)の治療投薬方法の整理

今回、最も治療効果が得られたのは試験区1の投薬→休薬→投薬→休薬のパターンで、最も治療効果が低かったのは、試験区3の投薬→休薬→休薬→休薬のパターンであった。これらの試験結果から、ノカルジア症は体表や鰓、内臓諸器官に結節を呈する病気であるため、感染初期の体内への薬剤投与が菌の増殖阻止に効果的であり、時間の経過と共に治癒が困難な状況になることが示唆された。この結果は、ノカルジア症が魚体に結節が形成される感染後期では投薬による治療が困難であるという楠田、中川らの報告²⁾と一致する内容であった。養殖現場においては、ノカルジア症の早期発見に努め、感染初期の段階でSMM-Naを一定の間隔で繰り返し投薬治療することにより、当該疾病のまん延を防止することが可能であると思われた。

なお、今回、第1回目の試験結果に比べて第2回目の試験結果が生残率、菌分離率とも、試験区1, 2, 3と対照区との間で有意な差が見られなかった理由については、飼育水温が1回目の $28\sim 25^\circ\text{C}$ に対し2回目は $25\sim 23^\circ\text{C}$ で、ノカルジア原因菌である *N. seriolae* の至適温度($25\sim 30^\circ\text{C}$)²⁾よりやや低く推移したこと、供試魚の平均体重が1回目約330gに対し2回目は約470gとやや大きく、菌接種量が魚体重に対しやや少なかったのではないかということの2点が考えられた。

(2) 既存魚病薬剤(EM)の治療効果の調査・検討

すずき目魚類の既存魚病薬剤であるEMを使用し、投薬→休薬→投薬→休薬のパターンで薬剤の治療試験を実施したところ、SMM-Naとほぼ同等の治療効果を確認することができた。この結果は、感染初期であればエリスロマイシンの投与でノカルジア症の治療が可能であると

いう畑井らの報告⁸⁾と一致する内容であった。今回、すずき目魚類のノカルジア症の既承認以外の薬剤の治療効果が確認できたことは、将来の薬剤耐性菌対策として新たな承認薬の可能性を見いだす基礎資料となり得るものと思われた。

なお、今回、第1回目の試験結果に比べて第2回目の試験結果が生残率、菌分離率とも、試験区と対照区との間で有意な差が見られなかった理由については、上記のSMM-Naの治療効果試験と同じ理由が考えられた。

これら研究結果の一部は、*Fisheries Science* に投稿した⁹⁾。

なお、本研究は農林水産省委託事業「平成23年度養殖衛生対策推進事業」の一環として実施し、結果は別途、「平成23年度養殖衛生管理問題への調査・研究（養殖ブリ類の再興感染症（ノカルジア症）に関する研究）成果報告書」として、養殖衛生対策推進協議会へ提出した。

【謝 辞】

本研究を実施するに当たり、宮崎大学農学部の吉田照豊准教授並びにターマー ファウンデーションイスマイルには、各試験実施に関して多大なるご指導とご協力を頂いた。記して深謝する。

【参考文献】

- 1) 室賀清邦. ブリのノカルジア症. 「魚介類の感染症・寄生虫症」(若林久嗣・室賀清邦編) 恒星社厚生閣, 東京. 2004;211-214.
- 2) 楠田理一, 中川敦史. ブリのノカルディア症. 魚病研究, 1978;13:25-31.
- 3) 福田穰. ワクチン普及に伴うブリ養殖の再興疾病対策に関する研究. 平成15年度養殖衛生対策技術開発研究成果報告書, 社団法人日本水産資源保護協会, 2004;35-43.
- 4) 板野公一, 川上秀昌. 養殖ブリの再興疾病に関する研究. 平成15年度養殖衛生対策技術開発研究成果報告書, 社団法人日本水産資源保護協会, 2004;46-60.
- 5) 山本淳. 養殖ブリの再興疾病(ノカルジア症)に関する研究. 平成16年度養殖衛生対策技術開発研究成果報告書, 社団法人日本水産資源保護協会, 2005;131-146.
- 6) 山本淳. 養殖ブリの再興疾病(ノカルジア症)に関する研究. 平成17年度養殖衛生対策技術開発研究成果報告書, 社団法人日本水産資源保護協会, 2006;115-132.
- 7) 嶋原佳子. 防疫 ノカルジア症の研究結果と今後の展望～感染時期, 病原菌の由来, ワクチン開発への課題など～. 月刊アクアネット, 2009. 1月号;54-57.
- 8) 畑井喜司雄, 安元 進, 安永統男. 養殖ブリのノカルジア症に対するエリスロマイシンの効果. 長崎水試研報, 1984;10:85-93.
- 9) T. F. Ismail, A. Nakamura, K. Nakanishi, T. Minami, T. Murase, S. Yanagi, T. Itami and T. Yoshida: Modified resazurin microtiter assay for in vitro and in vivo assessment of sulfamonomethoxine activity against the fish pathogen *Nocardia seriolae*. *Fisheries Science*. 2012.