

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）の薬剤治療に関する研究

柳宗悦，前野幸二

【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、ノカルジア症について、①疫学情報の収集（近年の発生状況）、②サルファ剤の効果を評価する標準法の確立、③最適治療方法の検討（サルファ剤の治療投薬方法の整理、既存魚病薬剤（エリスロマイシン（EM）、塩酸オキシテトラサイクリン（OTC））の治療効果の調査・検討）を研究課題として掲げ、取り組むこととした。

平成23年度はまず、疫学調査で、近年、春先から発生が確認されているノカルジア症の多くが当歳魚であることを明らかにした。次に、Ca、Mgイオンを調整した1/2濃度のミューラーヒントン液体培地にレサズリンを添加することで、視覚により正確かつ客観的に判定できるMIC値測定法（REMA法）を開発し、同手法によりSMMに対する野外分離株のMIC値は4～32 μ g/mLであること、更には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いことを明らかにした。また、*Nocardia seriolae* に対するSMM-Naの効果的な投薬方法として、投薬→休薬→投薬→休薬のパターンが最も効果的であったこと、同投薬パターンでEMはSMM-Naとほぼ同等の治療効果があることを確認した。

本年度は昨年度に引き続き、①疫学調査（魚病診断データの分析、野外分離菌株の α -グルコシダーゼ活性とMIC測定値の関連性に関する調査、養殖カンパチのノカルジア症感染時期の推定調査）、②既存病魚薬剤（OTC）の治療効果の検討を行うとともに、昨年度報告したREMA法について、水産試験場等で使用する際に参考となるようなマニュアルを作成した。

【方法】

1. 疫学調査

(1) 魚病診断データの分析

鹿児島県水産技術開発センターが、2004～2012年度の9年間にブリ類について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) 野外分離菌株の α -グルコシダーゼ活性と MIC 測定値の関連性に関する調査

2008～2012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214株（ブリ由来145株、カンパチ由来50株、シマアジ由来1株、ヒラメ由来18株）について、REMA法により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市販キットまたはchromID™ MRSA（シスメックス・ビオメリュー(株)）を使用し α -グルコシダーゼ活性を調べた。同様に、2011～2012年に鹿児島県で分離したノカルジア菌の野外分離株24株（ブリ由来9株、カンパチ由来6株、ヒラメ由来9株）について、OTCとEMに対するMIC値測定と α -グルコシダーゼ活性を調べた。

(3) 養殖カンパチのノカルジア症感染時期の推定調査

鹿児島県内の養殖場2か所（A漁場：当歳魚、B漁場：2歳魚）において、カンパチ種苗導入期の2012年5月から8月まで計4回、毎月10尾ずつ尾柄部から採血した。血液は、約24時間冷暗所に保管した後、マイクロ・マルチ遠心分離機（SIGMA Laborzentrifugen 型式2-16, 3,000rpm, 5分間）で血清を分離した。得られた血清は、実験に供するまで -80°C で凍結保存した。

なお、*N. seriolae*に対する抗体価の測定は、Shimahara *et al.*⁵⁾の方法に準じて、間接ELISA法を用いて行った。測定時の陰性対照（コントロール血清、当歳魚0.112、2歳魚0.101）は、*N. seriolae*に感染していないと思われる群の血清を使用した。

2. 既存魚病薬剤の中から本症に治療効果を示す薬剤の検討

すずき目魚類の既存魚病薬剤であるOTC（水産用OTC散20%「SP」；(株)インターベツト）と既承認薬であるSMM-Na（水産用ダイメトンソーダ；明治製菓(株)）について、平均体重500gのカンパチ当歳魚を用いて感染、治療試験を行った。供試菌株はOTCに対するMIC値の低い菌株（ $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2011年に鹿児島県内の養殖カンパチから分離されたKGN1136株、 α -グルコシダーゼ陰性株）を使用し、BHI寒天培地で 25°C で5日間培養後、滅菌生理食塩水に 10^8 CFU/mLになるよう懸濁し、供試魚の腹腔内に0.1mL（接種菌量 10^7 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。接種後、各区10尾を100L水槽（20回転/日の濾過海水をかけ流し）に収容し、1日1回、エクストルーデッド飼料（extruded pellet：EP）を魚体重の1～2%を目安に給餌し、OTC及びSMM-Naの投薬は菌接種の8時間後から開始し、投薬量は $50\text{mg}/\text{kg}$ 魚体重・日を基準とした。投薬は1週目から3週目まで月曜から金曜までの5日間連続投与後、2日間休薬とし、以後4週間後まで飼育観察を行い、治療効果について調べた。試験終了後、生残魚の外部（体表、鰓の潰瘍の有無）及び内部（腎臓、脾臓等の結節の有無）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）と1%小川培地（日水製薬(株)）に臓器片を接種後 25°C 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。

【結 果】

1. 疫学調査

(1) 魚病診断データの分析

2004～2012年度の9年間の魚病診断結果（n=2,448）を分析した結果、ブリ類におけるノカルジア症の診断割合は全診断件数の9.8%（n=241）で、2009年度からノカルジア症の診断割合が急激に増加する傾向にあった（図1，2）。

ノカルジア症は、県内のほぼ全域で発生が確認され、ブリ類全体では夏季から秋季にピークが見られたが、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）。なお、本年度はカンパチで春先から初夏に発生が確認され、また、従来の夏季から秋季にかけての発生も比較的多く見られ、さらに、水温が低下した12月においても、ノカルジア症の感染が継続する状況にあった。

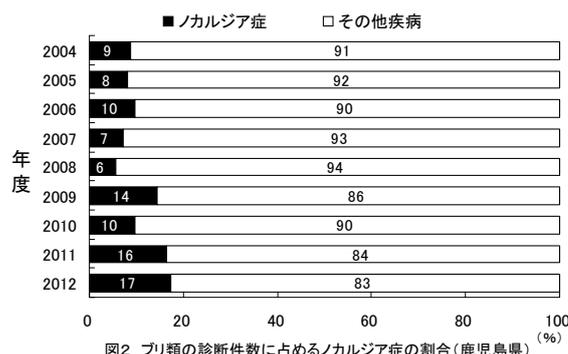
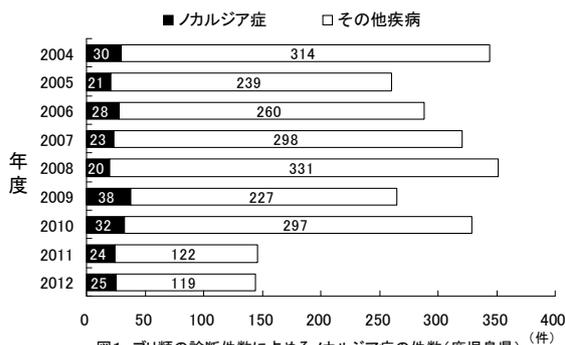


表1 カンパチにおけるノカルジア症の年度別・月別診断件数の推移(単位:件)

	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
2012年	1	1	2	2		4	2	2	2				16
合計	5	3	6	16	21	43	36	18	9	3	0	2	162

(2) 野外分離菌株のα-グルコシダーゼ活性とMIC測定値の関連性に関する調査

2008～2012年度の野外分離株214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4～32μg/mLで、そのうちα-グルコシダーゼ陽性株は大半がMIC値が高い32μg/mL付近で確認され(15/38≒40%)、逆に16μg/mL以下の株は、その大半がα-グルコシダーゼ陰性株(175/176≒99.4%)であった(図3)。2011～2012年の野外分離株24株のうち、α-グルコシダーゼ陽性株は1株のみであった。

2011～2012年の野外分離株24株のOTCとEMに対するMIC値測定の結果、両者のMIC値は逆相関を示し、OTCに対するMIC値の大半が1μg/mL(22/24≒91.7%、全て陰性株)であったのに対し、EMは大半が128μg/mL(23/24≒95.8%、全て陰性株)であった。そのうち、α-グルコシダーゼ陽性株はOTCでは16μg/mLで、EMでは<0.125μg/mLであった(図4，5)。

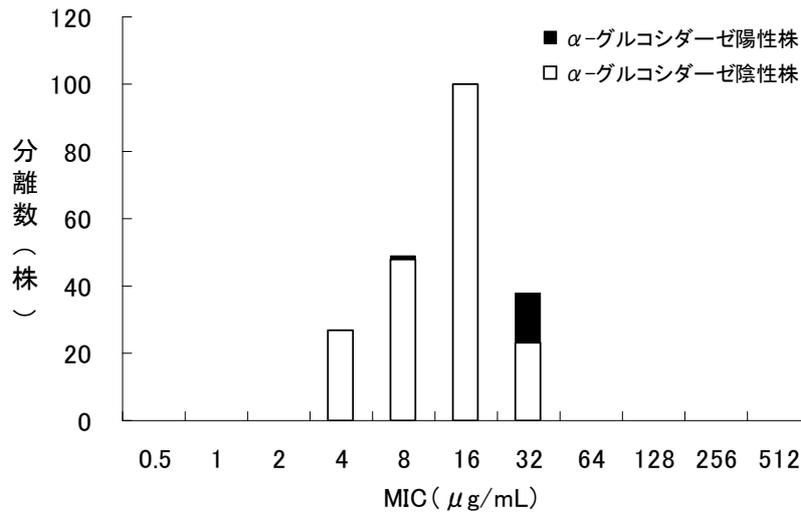


図3 REMA法を用いたSMMのMIC分布

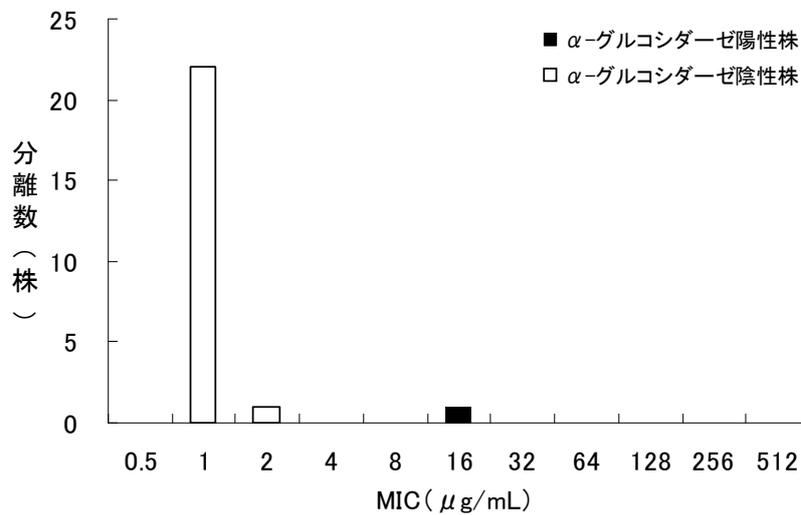


図4 REMA法を用いたOTCのMIC分布

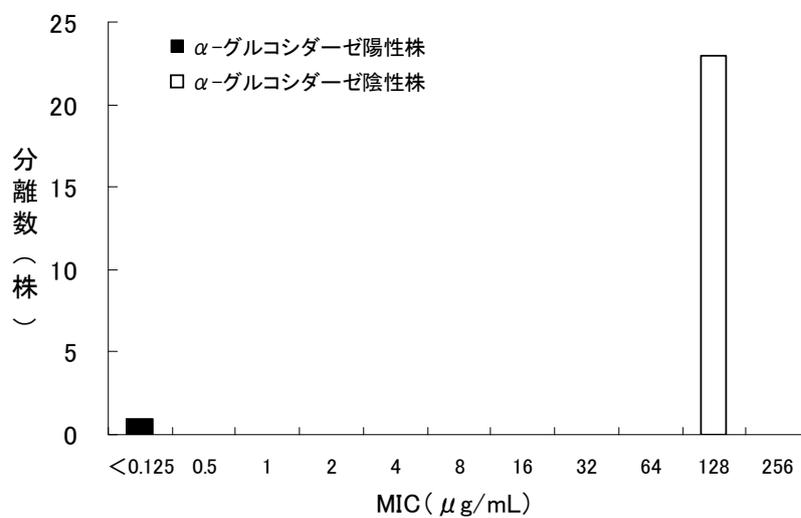


図5 REMA法を用いたEMのMIC分布

(3) 養殖カンパチのノカルジア症感染時期の推定調査

表2, 図6に養殖カンパチ(当歳魚, 2歳魚)のELISA値(抗体価)の推移を示した。

表2, 図6に示すとおり, 当歳魚では5月には既に抗体価の上昇が確認され(コントロール0.112, 測定値0.195±0.06), 6~7月にかけて徐々に上昇し, 8月には低下傾向を示した。一方, 2歳魚では6月から抗体価の高い個体が確認され始め(コントロール0.101, 測定値0.176±0.06), その後, 7~8月で急激に上昇した。

また, 当センターにおいて2004~2012年の過去9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約7割(41/58≒70.7%)は当歳魚であった(図7)。

表2 養殖カンパチ(当歳魚, 2歳魚)のELISA値(抗体価)の推移

	漁場	年齢	月			
			5月	6月	7月	8月
ELISA値(抗体価)	A漁場	当歳	0.195±0.06	0.200±0.06	0.267±0.05	0.229±0.07
	B漁場	2歳	0.129±0.03	0.176±0.06	0.210±0.08	0.238±0.08
水温(°C)	A漁場	当歳	21.1	23.2	26.3	27.2
	B漁場	2歳	21.6	22.9	25.1	28.8
体重(g)	A漁場	当歳	177	250	418	572
	B漁場	2歳	1,524	1,924	2,021	2,192
尾叉長(cm)	A漁場	当歳	22	25	29	32
	B漁場	2歳	44	47	49	51
ノカルジア症の検査件数(件)	鹿児島県内(2012年)	当歳	1	4	0	0
		2歳	0	0	1	2

(注) ノカルジア症の感染が認められていない個体の血清をコントロールとして供試した(当歳魚0.112, 2歳魚0.101)。

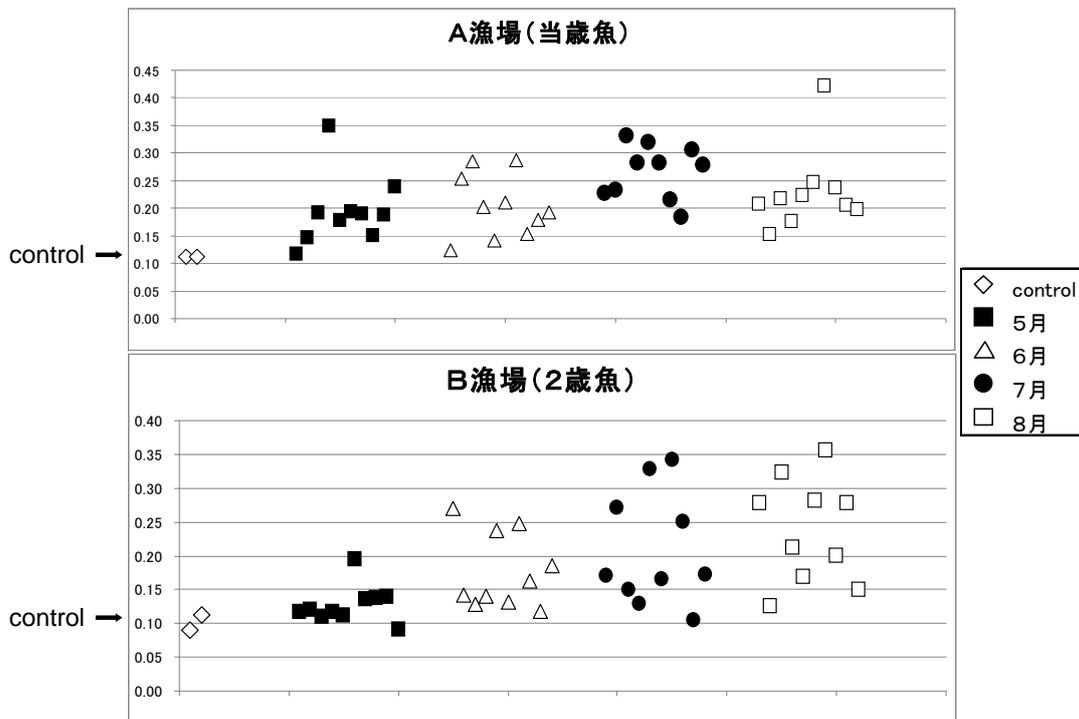


図6 養殖カンパチ(当歳魚, 2歳魚)のELISA値(抗体価)の推移

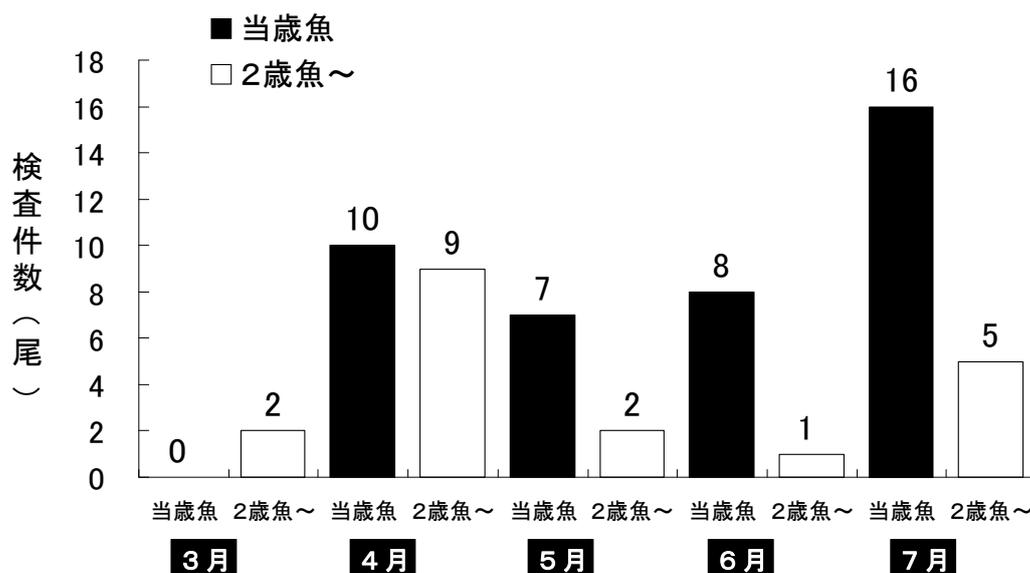


図7 春先から初夏にかけてノカルジア症と診断されたカンパチ検査個体の年齢分析

2. 既存魚病薬剤の中から本症に治療効果を示す薬剤の検討

試験結果を表3に、試験期間中の生残率の推移を図8に、生残魚におけるノカルジア症の外部症状及び内部症状発生率を図9に、試験期間中の供試魚の状況写真を図10に、試験終了時の生残魚の症状写真を図11にそれぞれ示した。

菌接種 28 日後の生残率は、SMM-Na 投与区(40 %), OTC 投与区(20 %)で共に低かったものの、対照区は菌接種 9 日後には 0 %となり、薬剤投与区 2 つとは明らかな差が確認された。

生残魚におけるノカルジア菌分離率は、SMM-Na 投与区が 75.0 %に対し OTC 投与区は 100 %であった。生残魚におけるノカルジア症の外部症状及び内部症状発生率は、共に SMM-Na 投与区(外部 25 %, 内部 50 %)より OTC 投与区(外部 100 %, 内部 100 %)の方が高かった。試験期間中の水温は 25 ~ 23 °Cで推移し、溶存酸素(DO)は概ね 6 mg/Lで推移した。

表3 治療効果試験の結果

	ダイメトン(SMM-Na)投与区	オキシテトラサイクリン(OTC)投与区	対照区
	試験区 1 (投薬→投薬→投薬→休薬)	試験区 2 (投薬→投薬→投薬→休薬)	試験区 3 (無投薬)
飼育尾数(尾/水槽)	10	10	10
平均体重(g/尾)	521.2	487.2	485.1
投薬開始時間(時間後)	8	8	—
死亡初発日(日後)	4	4	5
生残率(%)	40.0 (4/10)	20.0 (2/10)	0
生残魚におけるノカルジア症の外部症状発生率(%) ^{※1}	25.0 (1/4)	100 (2/2)	—
生残魚におけるノカルジア症の内部症状発生率(%) ^{※2}	50.0 (2/4)	100 (2/2)	—
生残魚におけるノカルジア菌分離率(%) ^{※3}	75.0 (3/4)	100 (2/2)	—

(注) ①用量はダイメトン(SMM-Na), オキシテトラサイクリン(OTC)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。

②KGN1136株の由来(2011年鹿児島由来, カンパチ, α-グルコシダーゼ陰性株, OTCのMIC2 μg/mL, SMMのMIC16 μg/mL)

③OTCは「水産用OTC散20%」, SMMは「水産用ダイメトンソーダ」を使用。

※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又は1%小川培地に臓器片を接種後25°C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。

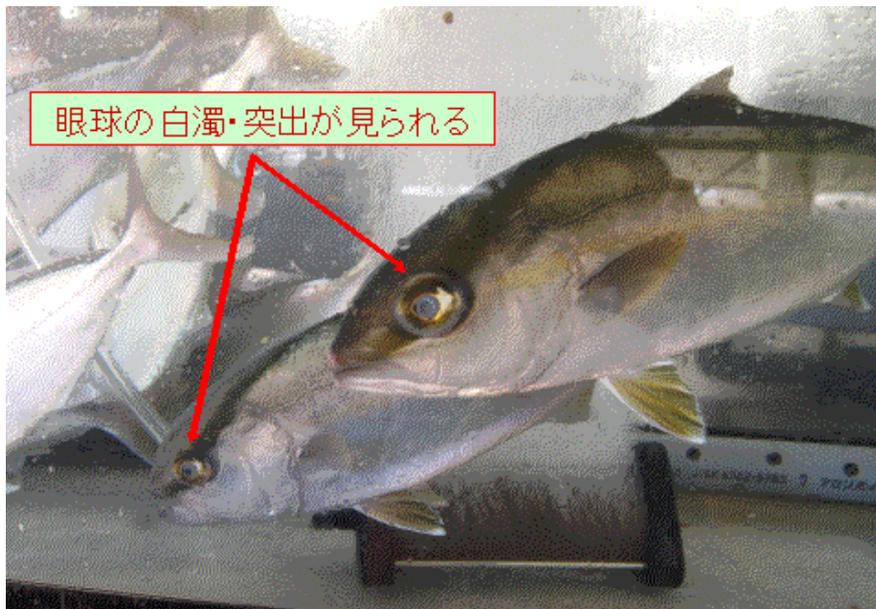
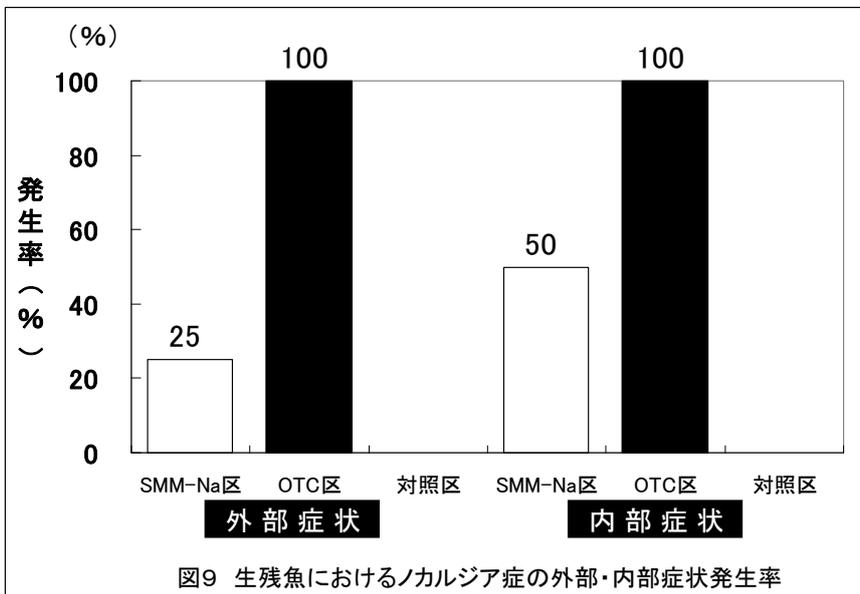
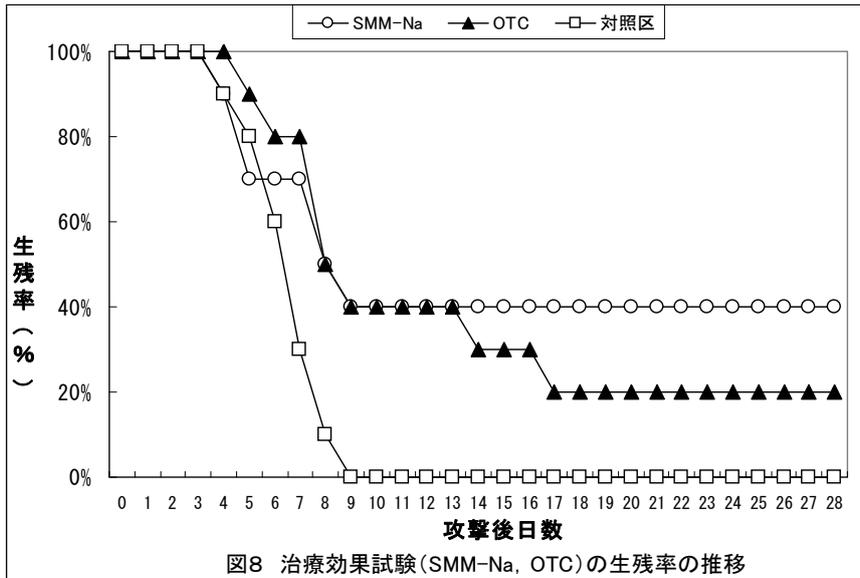


図10 試験期間中の供試魚の状況(菌接種2日後のSMM-Na区)

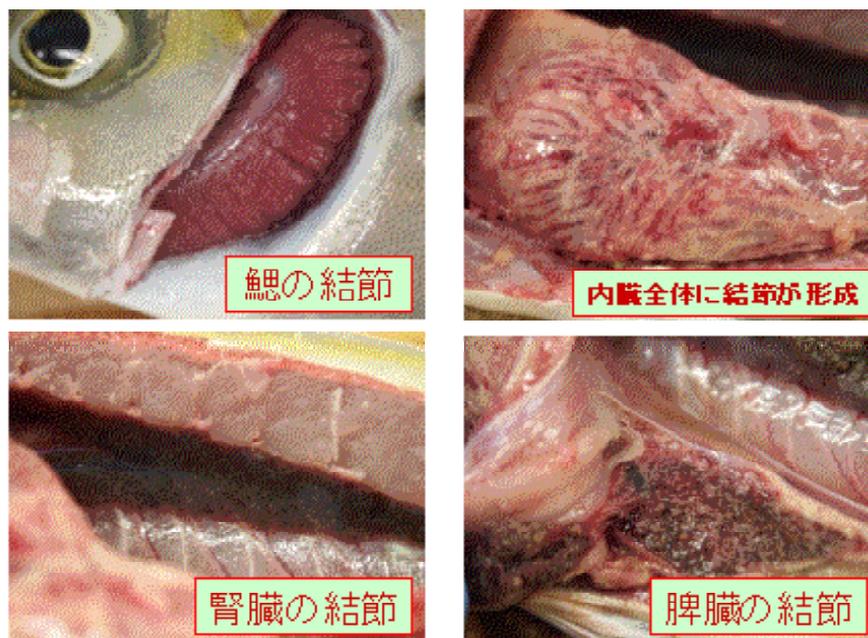


図11 OTC区試験終了時の生残魚に見られた症状

【考 察】

1. 疫学調査

(1) 魚病診断データの分析

2012年度のブリ類のノカルジア症の診断件数(25件)は、平年値(2004～2011年度の平均値、27件)と大きな違いはなかったが、4～12月の全ての月で確認された。本症の診断割合が2009年度から増加する傾向にある背景には、ワクチン普及による連鎖球菌症、類結節症、マダイイリドウイルス病等の主要感染症の減少が大きな要因と考えられ、ノカルジア症に対する早急なワクチン開発、新薬開発が望まれるとともに、その発生動向には引き続き注意が必要である。

(2) 野外分離菌株の α -グルコシダーゼ活性とMIC測定値の関連性に関する調査

2012年度に新たに24株が分離できたが、そのうち、 α -グルコシダーゼ陽性株は1株のみであった。調査に使用した2008～2012年にかけて分離された全214株では、陽性株は16株であり、その大半がSMMに対するMIC値が $32\mu\text{g/mL}$ 付近に集中している(15/16 \approx 93.8%)。現時点の野外分離株のMICの最大値は $32\mu\text{g/mL}$ であることから、 α -グルコシダーゼ陽性株はSMMに対しては低感受性、陰性株は感受性を示す傾向が伺われ、当該活性のモニタリングは、既承認薬耐性菌の出現の有無を評価する上で、有益な指標に成り得るものと推察され、引き続き注視する必要がある。

2012年度に新たに分離された野外分離株24株のOTCとEMに対するMIC値が、逆相関を示す分布結果であったことは非常に興味深い。すなわち、2012年度に分離された菌株の大半はOTCに対しては感受性、EMに対しては低感受性を示した。また、 α -グルコシダーゼ活性との関連性は、2012年度に得られた陽性株(1株)はOTCに対してSMMと同様に低感受性を、一方、EMに対しては高い感受性を示す傾向が伺われた。これらのことから、SMMと併せてOTC、EMのMIC値をモニタリングすることは、ノカルジア症に対するブリ類の既存薬剤による治療の可能性と選択肢を見出す資料に成り得るものと思われた。

(3) 養殖カンパチのノカルジア症感染時期の推定調査

当歳魚では5月の測定開始時には抗体価の上昇が確認されたことから(コントロール0.112と比較し、高い個体が多い)、5月以前に感染を受けているものと推察された。一方、2歳魚では、5月はコントロールと同程度の抗体価の個体が多く、6月から高い個体が多く確認されていることから、6月以降に感染したものと推測された。山本ら⁶⁾は4月のカンパチ当歳魚において、血清中の抗*N. 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として報告しており、今回の当歳魚の抗体価推移はこれに類似する結果となった。また、板野ら⁷⁾は愛媛県の2つの養殖場におけるブリの感染動向を調査して、養殖現場で死亡が見られる1~2か月前から抗体価の上昇を確認し、それらの時期を感染時期と推察している。当センターで2004~2012年の過去9年間に、4~7月にかけてノカルジア症と診断した検査個体の約7割が当歳魚であったことも含めて考えると、近年の春先から発生しているノカルジア症は、種苗導入時(中国から国内漁場に入れた時)に感染を受けた当歳魚による流行の可能性が高いと推察される。

2. 既存魚病薬剤の中から本症に治療効果を示す薬剤の検討

今回、試験開始が10月1日となり、*N. seriolae*の至適水温帯(25~28℃)での感染試験が困難であったため、昨年度の同時期に実施した第2回の試験結果を踏まえ(試験期間中の水温が25~23℃で、対照区及び治療区ともほとんど斃死が発生しなかった)⁸⁾、接種菌量を 10^6 CFU/fishから 10^7 CFU/fishに増やして実施した。その結果、今回の接種菌量では魚体に与えるダメージが強かったものと思われ、OTC投与区、SMM-Na投与区とも最終生残率が著しく低く、全ての区で菌接種2日後から供試魚に眼球白濁や突出が確認され、摂餌も極端に低下した。菌接種4日後から斃死が発生し、対照区は9日後には全滅した。最終の生残率はOTC投与区が20%、SMM-Na投与区が40%と共に低かったものの試験終了時までで生残し、9日後に全滅した対照区とは明らかな差が確認され、OTCによる治療効果の可能性が示唆された。

山本と森実ら⁹⁾は、ノカルジア症の治療に関し、テトラサイクリン(TC)に対するMIC値を測定し、感受性があることを報告しているが、楠田、中川²⁾は、ノカルジア症が一旦発症すると膿瘍や多数の結節を形成することから、生体内では薬剤効果が得られにくく、発症から終息までに長い期間を要するとしている。また、窪田ら¹⁰⁾は、結節内部には*N. seriolae*が生存した状態で包囊されるため、病的には結節中の病原菌を化学療法剤で完全に阻止することは困難であることを示唆している。今回の結果では、感染試験時の菌接種量が多く、短時間で魚体内に結節が形成されたことで、菌接種8時間後に投薬を開始したものの、SMM-Na、OTC共に本来の治療効果が十分に発揮されず、結果として低い生残率となってしまったものと推察している。OTCの治療効果については、再度、*N. seriolae*の至適水温帯かつ、接種菌量は 10^6 CFU/fishの条件で再確認する必要がある。しかしながら、昨年度のEMに引き続き、OTCでノカルジア症の治療効果の可能性が確認できたことは、将来の薬剤耐性菌対策としてブリ類を含むすずき目の既存薬剤の中から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、本研究は農林水産省委託事業「平成24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24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)の薬剤治療に関する研究)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、宮崎大学農学部生物環境科学科の吉田照豊教授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。また、感染時期の推定調査の抗体価測定に関しては独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所の嶋原佳子氏に多大なるご指導とご協力を頂いた。両者に対し、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) Y. Shimahara, H. Yasuda, A. Nakamura, T. Itami and T. Yoshida. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 2005 ; 25, 270-275
- 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.
- 7) 板野公一, 川上秀昌, 河野智哉, 酒井正博. 血清抗体価測定による養殖ブリの *Nocardia seriolae* 感染時期の推定. 魚病研究, 2008 ; 43, 86-88.
- 8) 柳宗悦, 村瀬拓也, 吉田照豊, Tamer Fawzy Ismail. 養殖ブリの再興感染症(ノカルジア症)に関する研究. 平成23年度養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書, 養殖衛生対策推進協議会, 2012 ; 81-94.
- 9) 山本賢治, 森実庸男. 魚病研究・指定調査研究総合助成事業. 愛媛県水産試験場報告書, 1971 ; 177-178
- 10) 窪田三朗, 狩谷貞二, 中村恵江, 吉良桂子. 養殖ハマチ・カンパチにおけるノカルジア症について－Ⅱ病理組織学的研究, 魚病研究, 1968 ; 3, 24-31.