

安心・安全な養殖魚生産技術開発事業－V (養殖ブリの抗酸症に関する研究)

平江多績, 村瀬拓也

【背景・目的】

近年、西日本の養殖場においてブリ (*Seriola quinqueradiata*) の抗酸菌症による被害が増加傾向にある。ブリの抗酸菌症は1986年に高知県宿毛湾で初めて報告された疾病である。本症の外観症状は腹部が著しく膨満し、体色の黄色化が認められ、剖検すると腎・脾臓の肥大や多数の粟粒結節を形成し、各臓器は広範囲に癒着しており、原因細菌は *Mycobacterium* sp. とされた。¹⁾その後、2004年に南日本で本症例に類似したブリから分離された細菌が *M. marinum* に同定され、国内初の養殖ブリの *Mycobacterium marinum* 感染症として記載された。²⁾また、昨年度の本研究では、カンパチ (*Seriola dumerili*)、ヒラマサ (*Seriola lalandi*)、シマアジ (*Pseudocaranx dentex*) についても抗酸菌症を確認し、生化学的性状試験結果から全ての分離菌株は *M. marinum* であると同定された。³⁾しかし、*M. marinum* は人の皮膚病などの原因となる人畜共通病原体として報告がある。⁴⁾このことは食品である養殖魚の安全性を著しく脅かすことから、原因細菌の同定についてはより慎重な検証が求められた。今年度は、西日本の養殖場から収集した菌株の生化学的性状について再検討し、培養温度による菌株の毒性についても調べた。また、分子遺伝学的性状についても詳しく調べ、*Mycobacterium* 属細菌の報告に照らして検証した。なお、今年度も引き続き本県での本症発生状況について把握し、昨年度に得られた養殖ブリの抗酸菌症原因細菌の抗体価の推移と本症による死亡との関連については、屋内水槽で感染試験を行い検証した。なお、本研究については、農林水産省の平成21年度養殖衛生対策推進事業（養殖衛生管理問題への調査・研究）委託事業にて行った。

【方 法】

1. 実態調査

鹿児島県水産技術開発センターが検査依頼を受けたものについて調べた。また県内 2 カ所をモニタリング地点として発生動向を調査し、その他については聞き取り調査を行った。

2. 魚類由来菌株と *Mycobacterium* 属細菌標準株との性状比較

供試菌株は、ブリ、カンパチ、ヒラマサ、シマアジ、マダイ、マハタ、トラフグ由来の菌株を西日本の水産研究機関から入手し、*M. marinum* 標準株 ATCC927 は住商ファーマインターナショナルから購入した。各菌株は 1% 小川培地でコロニーの形成を確認後、Middlebrook OADC Enrichment 添加 *Mycobacteria* 7H11 Agar(DIFCO) で培養後集菌し、菌株保存用バイアル(マイクロバンクアスカ純薬)または 10% スキムミルクを用いて -80℃ で保存した。

生物学的及び生化学的性状検査

収集した 41 菌株を極東製薬製の抗酸菌同定キットを用い、プロトコールに従って生化学的性状試験を実施したが、1% 小川培地による発育試験では 25℃ と 37℃ で 14 日間以上培養した。その他の項目はコロニーの形状の観察、光発色試験（暗所、光照射後）、PAS 分解試験、ピクリン酸培地上の発育試験、アリスルファーゼ試験、Tween80 水分解試験、ウレアーゼ試験、硝酸塩還元試験の 10 項目について調べた。

増殖特性試験

ブリ由来 2 株，トラフグ由来 1 株，マハタ由来 1 株，*M. marinum* 標準株 ATCC927 の計 5 株を使用した。Middlebrook 7H9(DIFCO)を 10m L 分注した L 字型試験管に、5 μ L 菌液を接種し、15 ~ 37 $^{\circ}$ C の温度勾配になるように設定した Toyo temperature gradient incubater12 に設置し、14 ~ 20 日間培養を行った。培養終了後、各試験管内の培養液を遠沈管に移し、10,000rpm で 10 分間遠心分離して菌を収集した。試験管ガラスビーズと Tween80 を加えて攪拌したものを再び元の培養液に懸濁させ、波長 600nm における吸光度を測定した。結果は、吸光度が最も高かった温度で吸光度の値を 100 とし、それぞれの温度の増殖量を相対値として表した。

16SrDNA シークエンス解析

供試菌株の分子遺伝学的性状を調査するため、5 菌株について 16SrDNA 塩基配列の決定と系統解析を行った。PCR 反応産物を精製後、ABI3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)にて塩基配列の決定を行った。なお、塩基配列の決定は鹿児島大学フロンティアサイエンス研究推進センター(FSRC)遺伝子実験施設で行った。16SrDNA に基づく近縁種の相同性検索は National Center for Biotechnology Information (NCBI)の塩基配列検索ソフト Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)を用いた。

3. 培養温度の違いによる菌株毒性比較試験

供試魚はブリ 0 才魚を用いた。供試菌株は 2004 年に鹿児島県内の養殖ブリから分離された NJB0419 株を攻撃直前に魚体内通過させたものを用いた。1 %小川培地で 25 $^{\circ}$ C・30 $^{\circ}$ C でそれぞれ 30 日間培養した菌体を、滅菌生理食塩水に 5.0×10^4 CFU / m L になるように懸濁し、供試魚の腹腔内に 0.2m L 接種した。なお、対照区には滅菌生理食塩水を同様に接種した。夏の試験（平成 21 年 8 月 5 日～平成 21 年 9 月 30 日）では平均体重 108g のブリ 0 才魚を攻撃後、各区 15 尾収容し、182 L 水槽 3 基（2 回転 / 1 時間の濾過海水をかけ流し）に EP を週 2 回給餌して 56 日間観察を行った。冬の試験（平成 21 年 10 月 29 日～平成 22 年 1 月 31 日）では平均体重 392g のブリ 0 才魚を上記水槽に各区 10 尾収容し、EP を週 2 回給餌して 94 日間観察を行った。飼育水温は Onset 社 データロガーで測定した。

4. 抗体価と死亡の関連

抗体価の推移と死亡との関連を調べるために、本疾病の感染歴がない平均体重 1,172 g のブリ 1 才魚（以後通常魚と呼ぶ）と感染歴がある平均体重 928 g の生き残り群ブリ 1 才魚（以後感染耐過魚と呼ぶ）を感染試験に供試した。供試菌は NJB0419 株を魚体内通過させたものを用いた。1 %小川培地で 25 $^{\circ}$ C で 20 日間培養した菌体を、滅菌生理食塩水に 2.0×10^5 CFU / m L になるように懸濁し、供試魚の腹腔内に 0.2m L 接種した。なお、対照区には滅菌生理食塩水を同様に接種した。攻撃後、各区 10 尾を 1.5 t 角形水槽 4 基（1 回転 / 1 時間の濾過海水をかけ流し）に収容し、EP を週 2 回給餌して 105 日間観察を行った。飼育水温は Onset 社 データロガーで測定した。開始時および接種 1 週間後から 6 週間後まで毎週 1 回、各区 5 尾から採血し、ブリ血清中の抗 *Mycobacterium* sp.抗体を酵素抗体法 (ELISA) ³⁾ を用いて検出した。

【結 果】

1. 実態調査

2009年度の鹿児島県内における抗酸菌症は3カ所で確認された。1カ所は県北部のブリ1才魚で、8月下旬～10月上旬に発生がみられ、11月にはブリ0才魚においても若干の発生を確認した。2カ所目も県北部のブリ1才魚で、9月下旬から10月上旬に発生がみられた。県北部2カ所は、ともに昨年度に発生を確認した水深30～40mの漁場で、抗酸菌症による被害は昨年度より少なかったが、同時期にノカルジア症の発生が多かった。また、今年度は7月、10月、11月に鹿児島湾内養殖場（水深10～20m）のカンパチ1才魚で抗酸菌症を確認した。

2. 魚類由来菌株と *Mycobacterium* 属細菌標準株との性状比較

表1に示した菌株を下記の試験にそれぞれ供試した。

表1 供試菌株一覧

No.	菌株	菌株の由来			試験項目		
		分離年	分離魚	分離場所	性状	増殖温度	16SrDNA
1	KGM0401	2004	ブリ	鹿児島県	○		
2	KGM0406	2004	カンパチ	鹿児島県	○		
3	KGM0407	2004	トラフグ	鹿児島県	○	○	○
4	NJB0419	2004	ブリ	鹿児島県	○	○	
5	KGM0501	2005	ブリ	鹿児島県	○		
6	KGM0502	2005	ブリ	鹿児島県	○		
7	KGM0503	2005	シマアジ	鹿児島県	○		
8	KGM0504	2005	カンパチ	鹿児島県	○		
9	KGM0602	2006	カンパチ	鹿児島県	○		
10	KGM0603	2006	カンパチ	鹿児島県	○		○
11	KGM0701	2007	マダイ*	鹿児島県	○		
12	KGM0702	2007	マダイ*	鹿児島県	○		
13	KGM0704	2007	ブリ	鹿児島県	○		
14	KGM0705	2007	ブリ	鹿児島県	○		
15	KGM0801	2008	ブリ	鹿児島県	○	○	
16	KGM0802	2008	ブリ	鹿児島県	○		○
17	KGM0803	2008	ブリ	鹿児島県	○		
18	KGM0804	2008	ブリ	鹿児島県	○		
19	KGM0805	2008	ブリ	鹿児島県	○		
20	KGM0806	2008	ブリ	鹿児島県	○		
21	KGM0807	2008	ブリ	鹿児島県	○		
22	①-2	2006	カンパチ	大分県	○		
23	①-3	2006	カンパチ	大分県	○		
24	①-4	2006	カンパチ	大分県	○		
25	①-5	2006	カンパチ	大分県	○		
26	①-6	2006	カンパチ	大分県	○		
27	92391	1999	シマアジ	大分県	○		
28	93062	1999	シマアジ	大分県	○		○
29	SMY0107197	2001	ブリ	大分県	○		
30	13663	2001	ブリ	大分県	○		
31	13763	2001	ブリ	大分県	○		
32	Myco071952	2007	ヒラマサ	大分県	○		
33	Myco083356	2008	ブリ	大分県	○		
34	MY08-1	2008	ブリ	愛媛県	○		
35	MY08-2	2008	マハタ	愛媛県	○	○	○
36	MY08-3	2008	ブリ	愛媛県	○		
37	No.1	2008	ブリ	愛媛県	○		
39	No.3	2009	ブリ	愛媛県	○		
40	No.4	2009	マハタ	愛媛県	○		
41	<i>M. marinum</i> ATCC927		魚類	USA	○	○	

* NJB0419株でマダイに攻撃後、筋肉部から再度分離した菌株

生物学および生化学的性状

表 2 に供試菌の形態学的，生物学および生化学的性状の結果を示した。供試菌株はすべて，グラム陽性，抗酸性の運動しない S 型の短桿菌で，光照射後，光発色性の集落を形成し，PAS 分解，ピクリン酸培地上の発育，アリスルファターゼ，硝酸塩還元試験では供試菌はすべて陰性を示し，Tween80 水解，ウレアーゼ試験では供試菌はすべて陽性を示した。供試菌株によって q 異なる項目は，37 °C・14 日間での発育試験結果で，供試菌株のうちトラフグ由来菌株は発育がみられたのに対し，ブリ類由来，シマアジ由来，マハタ由来菌株は，すべて発育がみられなかった。なお，表 2 の *M. marinum*** では発育が確認されている。

表2 生物学及び生化学的性状試験結果

供試菌株	ブリ類 由来 (32)*	シマアジ 由来(4)*	トラフグ 由来 (1)*	マハタ 由来 (2)*	<i>M. marinum</i> **	<i>M. pseudoshottsii</i> ***
グラム染色	+	+	+	+	+	+
抗酸性	+	+	+	+	+	+
運動性	N	N	N	N	N	N
集落(S・R)	S	S	S	S	S	S
37°C 7日間での発育	—	—	—	—	—	—
37°C 14日間での発育	—	—	+	—	+	—
着色(暗所)	—	—	—	—	—	—
着色(光照射後)	黄	黄	黄	黄	黄	黄
PAS分解	—	—	—	—	—	—
ピクリン酸	—	—	—	—	—	ND
アリスルファターゼ	—	—	—	—	—	—
Tween80水解	+	+	+	+	+	—
ウレアーゼ	+	+	+	+	+	+
硝酸塩還元	—	—	—	—	—	ND

*()内は供試株数；** Herbert and Robert(1985), Sneath *et al.*(1986) and Barrow and Feltham(1993)；***Rhodes *et al.*(2005)；+，positive；—，negative；+/-，variable up on subspecies；N，non-motile；S，Smooth；R，Rough；ND，not determined.

増殖特性試験

図 1 に海産養殖魚由来 *Mycobacterium* spp.の増殖に及ぼす温度の影響の結果を示した。ATCC927 は 17.5 °C～ 40 °Cで発育を確認し，27.5 °Cで最大増殖値を示し，32.5 °Cで約 30 %，35 °Cで約 20 %の増殖を確認した。これに対し，ブリ由来の NJB0419 は，20 °Cで最大増殖の約 25 %で，22.5 °Cで最大増殖を示したが，25 °Cでは増殖は急激に低下し，これ以上の温度帯ではほとんど増殖しなかった。また，ブリ由来の KGM0801 株は，20 °Cで最大の増殖を示した後，温度の上昇とともに増殖の程度は低下し，22.5 °Cでは最大増殖の約 80 %，25 °Cでは約 25 %の増殖を示したが，27 °C以上ではほとんど増殖しなかった。一方，トラフグ由来株 KGM0407 は，22.5 °Cでは最大増殖の約 20 %であったが，その後は温度の上昇とともに徐々に増殖も増加し，27.5 °Cで最大増殖を示し，30 °Cで 80 %，35 °Cでもわずかな発育がみられた。マハタ由来株は 22.5 °Cで最大増殖を示し，30 °Cでも最大増殖の 50 %以上の発育がみられたが，35 °C以上では発育はみられなかった。また，増殖時の特性として，ブリ由来株では液体培地での培養中に強い菌の凝集性がみられたが，トラフグ，マハタ由来株では液体培地での培養中に菌の凝集性はみられなかった。

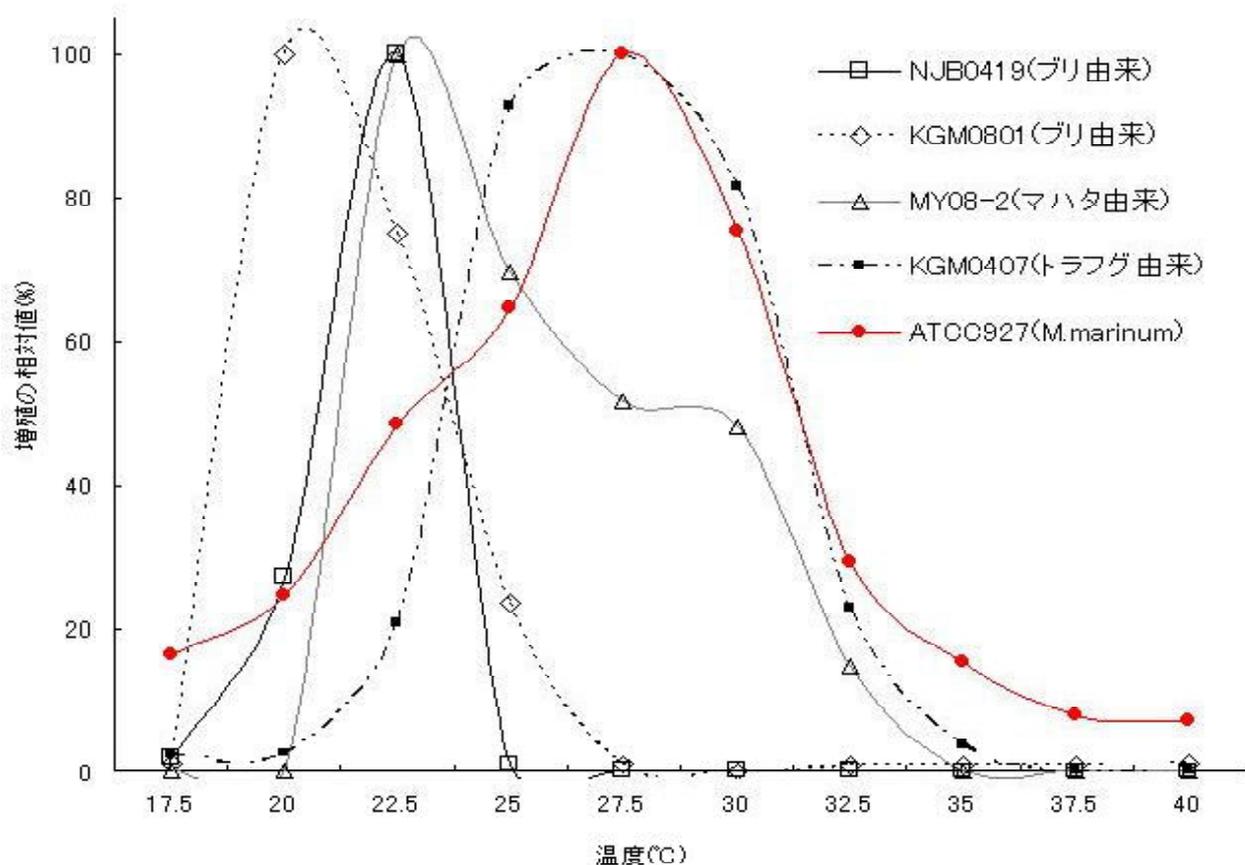


図1 海産養殖魚由来 *Mycobacterium* spp. の増殖に及ぼす温度の影響

16SrDNA 塩基配列の決定および系統解析

16SrDNA シークエンスの結果、ブリ由来 0802 株、カンパチ由来 0603 株、シマアジ由来 93062 株、マハタ由来 MY08-2 株で有効な 16SrDNA 塩基配列を得ることができ、これらの塩基配列は、*Mycobacterium pseudoshottsii* 16S ribosomal RNA gene (accession No. AY570988) と 100% もしくは 99% の相同性が得られた。なお、トラフグ由来 KGM0407 株は *M. marinum* strain SCCSHT3 16S ribosomal RNA gene (AY509248) と 100% の高い相同性が得られた。

3. 培養温度の違いによる菌株毒性比較試験

図 2, 3 に攻撃後の死亡率を示した。図 2 のとおり、夏季の試験では、25°C 培養菌液接種区では攻撃後 19 日目から死亡が始まり、28 日目には全て死亡した。30°C 培養菌液接種区では 40 日目から死亡が始まり、50 日目に全て死亡した。なお、試験期間中の水温は 27°C ~ 29°C で平均 28.2°C であった。また、図 3 のとおり、冬季の試験では、25°C 培養菌液接種区では攻撃後 48 日から死亡が始まり、75 日目には全て死亡した。30°C 培養菌液接種区では 85 日目に 1 尾死亡したが、その後、試験期間中の死亡はみられなかった。なお、試験期間中の水温は 14.6°C ~ 23.2°C で平均 19.2°C であった。

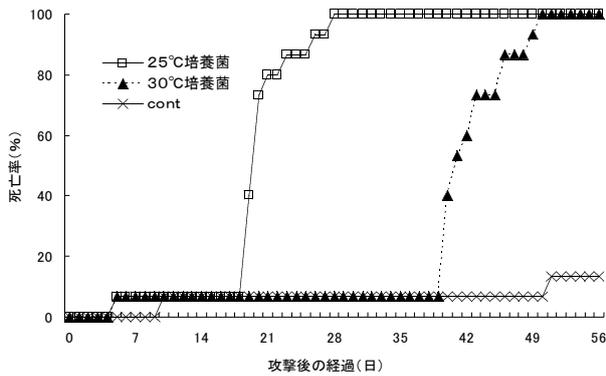


図2 攻撃後のブリ死亡率の推移（夏季）

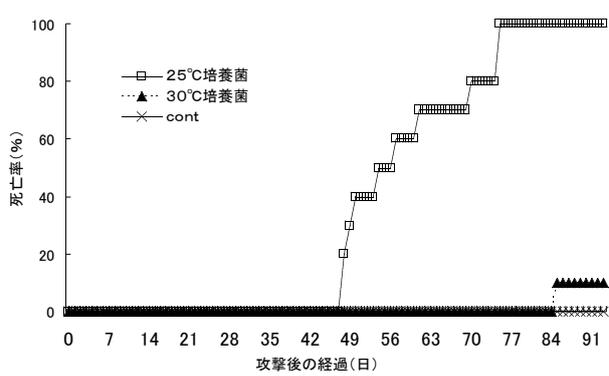


図3 同左（冬季）

4. 抗体価と死亡の関連

図4に攻撃後の死亡率を示した。通常魚の攻撃区では4週間後から抗酸菌症による死亡が始まり、10週目には全て死亡した。感染耐過魚の攻撃区では8週目以降に2尾が抗酸菌症で死亡したが、その後は死亡はみられなかった。それぞれの対照区では抗酸菌症による死亡はみられず、試験期間中の水温は22.4℃～29℃、平均26.9℃であった。

図5にブリ血清中の抗 *Mycobacterium* sp. 抗体価の推移を示した。通常魚の抗体価は攻撃区、対照区ともに開始時には0.6であったが、その後は攻撃区のみ上昇傾向がみられ、3週間後をピークに0.8まで上昇し、5週間後を除いて対照区より常に高い値を示し、期間中の抗体価は攻撃区の方が対照区より有意に高かった。感染耐過魚の抗体価は対照区、攻撃区ともに開始時には0.8以上であった。対照区は3週間後に、攻撃区も4週間後に下降したが、期間中は攻撃区の方が対照区よりも有意に高かった。また、感染耐過魚両区の抗体価は通常魚両区の抗体価と比較して有意に高かった。

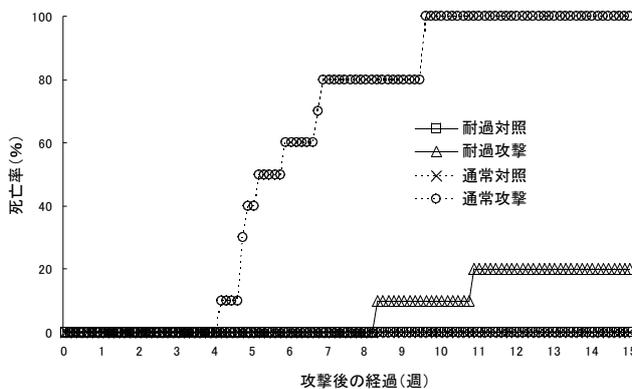


図4 攻撃後のブリの死亡率の推移

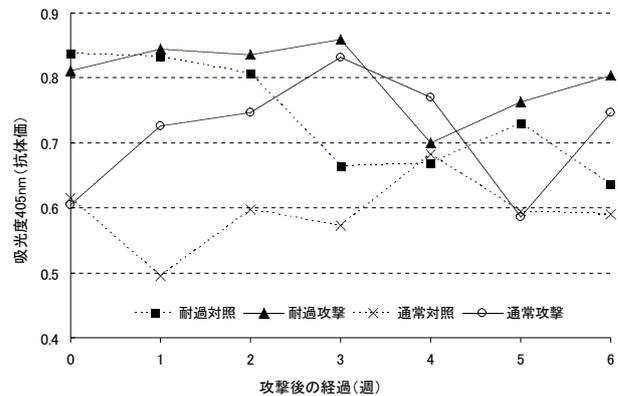


図5 ブリの *Mycobacterium* sp. 抗体価の推移

考察

1. 実態調査

抗酸菌症は水深の浅い海域で発生が多かったことから、地形的な背景が本疾病の発生に深く関わっていると思われる。また、水温が比較的低い県北部海域で発生がみられたことは、原因細菌の至適発育温度が25℃以下であることに起因すると思われる。養殖ブリ、カンパチともに1才魚以上の発生が多いことから、感染から発病までの期間が長いと考えられ、こ

れは感染試験の結果からも容易に推測できる。今後、発病を防ぐためには稚魚期での感染を避けることが重要である。また、抗酸菌症の発生はノカルジア症の発生時期と前後又は同時期であるため、これらの疾病の増減は互いに影響を及ぼしていると思われ、今後は双方の発生動向を正確に把握することも重要であると考えられる。

2. 魚類由来菌株と *Mycobacterium* 属細菌標準株との性状比較

M. marinum 標準株は 37℃ で発育し、至適増殖温度は 27℃ であったのに対し、ブリ類、シマアジ由来菌株では 30℃ 以上では発育せず、至適増殖温度は 20℃～22℃ で明らかに異なっていた。また、16SrDNA 塩基配列の解析の結果では、ブリ、カンパチ、シマアジ、マハタ由来株の 16rDNA 塩基配列は、*M. pseudoshottsii* と 100% もしくは 99% 一致したことから、これらの菌株は *M. marinum* とは別種の *M. pseudoshottsii* であると判断すべきである。なお、*M. pseudoshottsii* は 2005 年チェサピーク湾の striped bass (*Morone saxatilis*) から分離・命名された、class1 細菌⁹⁾であり、日本国内の魚類からの最初の報告である。本症の原因細菌が人畜共通感染菌 *M. marinum* とは別種の細菌であることが判明したことは、食品の安全性の観点からも意義深い。ただし、トラフグ由来株は 1 株の解析結果ではあるが *M. marinum* に近く位置付けられたことから、今後は菌株数を増やして分類学的地位や増殖温度帯などの検討を行い、哺乳類への感染の可能性についての検討が必要と思われる。

3. 培養温度の違いによる菌株毒性比較試験

NJB0419 株の 25℃ 培養菌株を接種した群は、30℃ 培養菌株を接種した群よりも早く死亡が始まったことから、同一菌株でも 25℃ 培養菌株の方が 30℃ 培養菌株よりも魚毒性が強いと思われる。このことは、ブリ由来株の至適増殖温度が 22℃ であったことや、水温が比較的低い東シナ海側の県北部海域で抗酸菌症の発生が多いこととも合致する。つまり、本疾病は夏～秋の水温が比較的低温で、20℃～25℃ の温度帯が長く継続する海域で本疾病の発生が多いことと密接な関係があると思われる。

4. 抗体価と死亡の関連

昨年度の試験において、県北部養殖場のブリ 1 才魚は 10 月前後に抗酸菌症を確認したが、この群の抗体価は発生時の 10 月前後より、むしろ未発生時である 6、7 月の方が高かった。このことについて室内感染試験で抗体価の推移と死亡との関連をみたところ、同様の結果が得られた。すなわち、抗体価の下降と死亡の開始が連動していることが実証できた。また、感染耐過魚は攻撃前から通常魚より抗体価が有意に高く、逆に死亡率は有意に低かったことから、感染耐過魚は抗酸菌症に対して免疫を獲得していたことが示唆される。

5. 最後に

2 年間におよぶ研究において、抗酸菌症の発生動向を把握し、発生場所については水温や地形的な背景との関連について考察することができた。また、原因菌株の多くはヒトに感染報告がない *M. pseudoshottsii* と位置付けられたことは大変意義深い。しかし、菌株の数が少ない魚種もあることから、今後もモニタリングを継続し、さらなる菌株の収集と解析を継続

するべきと考える。なお、昨年度の研究で薬剤感受性試験においては有効薬剤の検索を行い、ストレプトマイシンの有効性を確認し、³⁾治療試験においても有効性が確認されているが、⁶⁾この薬品が水産用医薬品として承認されるには安全性や残留性の問題を残している。しかし、本年度の試験で感染耐過魚は再攻撃に対して死亡率が有意に低いことから、ブリは抗酸菌に対して免疫が成立すると思われ、今後のワクチン開発に向けた取り組みが望まれる。

参考文献

- 1) 楠田理一, 川上宏一, 川合研児. 養殖ブリから分離された魚類病原性*Mycobacterium* sp. について. 日水誌1987;53:1797-1804.
- 2) SompothWeerakhun, NaoAoki, OsamuKurata, KishioHatai, HarunaoNibe, TatsumuHirae. *Mycobacterium marinum* Infection in Cultured Yellowtail *Seriola quinqueradiata* in Japan. 魚病研究, 2007;42(2):79-84
- 3) 平江多績. 養殖ブリの抗酸菌症に関する研究. 平成20年度養殖衛生管理問題への調査研究成果報告書, 2008;143-156
- 4) 光戸 勇. *Mycobacterium marinum*の研究—生理学的性状, 薬剤感受性並びに動物病原性について—金沢大学十全医学会雑誌 第89巻 第1号1980;119-132
- 5) Martha W. Rhodes, Howard Kator, Alan McNabb, Caroline Deshayes: *Mycobacterium pseudoshottsii* sp. nov., a slowly growing chromogenic species isolated from Chesapeake Bay striped bass (*Morone saxatilis*) International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology ; 2005 : 55 ; 1139-1147.
- 6) SompothWeerakhun, KishioHatai, TakuyaMurase, TatsumuHirae . *In Vitro and In Vivo* Activities of Drugs against *Mycobacterium marinum* in Yellowtail *Seriola quinqueradiata*. 魚病研究, 2008;43(3):106-111