

博士（水産学） モハメド・マハブブ・イクバル

学位論文題名

Taxonomical and pathological studies
on motile *Aeromonas* species isolated
from fish with epizootic ulcerative
syndrome in Southeast Asian countries

(東南アジア諸国の流行性潰瘍病病魚から分離された運動性
エロモナス属細菌の分類および病原性に関する研究)

学位論文内容の要旨

1970年以降東南アジア諸国において流行性潰瘍病 (EUS) による養殖魚並びに野生魚の大量斃死が発生して問題になっている。病魚からは真菌類の *Aphanomyces* sp. および運動性 *Aeromonas* spp. が高頻度に分離されているが、未だに原因菌が特定されていない。さらに分離された *Aeromonas* 属細菌も表現形質による同定で *A. hydrophila*, *A. caviae* および *A. sobria* とされているが、分類学的に混乱した状態にある。そこで本研究では、マレーシア、タイおよびバングラデシュの EUS 病魚から分離された *Aeromonas* 属細菌について、従来の表現形質による分類に加え、DNA-DNA 相同性および 16S rDNA の塩基配列に基づく系統解析などの分子生物学的手法による分類を試み、さらに同定した菌群代表菌株の病原性について検討した。

まず第一章では、EUS に感染した養殖魚から分離されたマレーシア 18 株、タイ 15 株およびバングラデッシュ 11 株の計 44 株と対照菌株として *Aeromonas* 属の 13 DNA ハイブリダイゼーション グループ (HG) 代表株 14 株の総計 58 株を供試した。常法に従い形態学的、生理学的および生化学的性状 41 項目の表現形質を検査し、その結果に基づいて対照菌株との比較により分離菌株の同定を行った。その結果、分離菌株はすべてグルコースを嫌気的に分解する単極毛を有するグラム陰性桿菌で、vibriostatic agent O/129 抵抗性であることから *Aeromonas* 属細菌に属する細

菌であると考えられた。分離菌 44 株は、26 株が *A. hydrophila* 類縁菌に、12 株が *A. veronii* biotype *sobria* に、5 株が *A. jandaei* に同定された。残りのタイ分離菌株 1 株 (T8) はいずれの種にも属さなかった。

第二章では、分離菌株および HG 対照菌株 DNA の G+C mol% を測定するとともに前章において分離菌株が同定されたそれぞれの種の対照株、*A. hydrophila* (HG1)、*A. hydrophila* 類縁種 (HG2)、*A. veronii* biotype *sobria* (HG8Y) および *A. jandaei* (HG9) DNA をフォトビオチン標識して各分離菌株に対する DNA-DNA 相同値を求め、前章での表現形質による分類結果と比較検討した。まず、分離菌株の DNA の G+C mol% は 55~64% の範囲であり、ほぼ *Aeromonas* 属細菌の G+C mol% の範囲に入る値を示し、前章の表現形質による分類結果が再確認された。DNA-DNA 相同性の測定結果、前章で *A. veronii* biotype *sobria* に同定された 12 株と *A. jandaei* に同定された 5 株はそれぞれ当該の種に同定されたが、*A. hydrophila* に同定された 26 株中、19 株が *A. hydrophila* に、5 株が *A. veronii* biotype *sobria* に、2 株が *A. jandaei* に同定され、前章での分類結果と異なり、表現形質のみでは正確に分類し得ないことが判明した。また、HG2 (*A. hydrophila* 類縁種) に同定される菌株はなかった。なお、前章でいずれの種にも同定されなかった 1 株 (T8) は DNA-DNA 相同性からもいずれの種にも同定し得ず新種の可能性が示唆された。3 菌種の国別分布をみると、マレーシア分離菌株 18 株は、9 株が HG1 (*A. hydrophila*) に、7 株が HG8Y (*A. veronii* biotype *sobria*) に、2 株が HG9 (*A. jandaei*) に同定された。タイ分離菌株 15 株は、10 株が HG1 (*A. hydrophila*) に、4 株が HG8Y (*A. veronii* biotype *sobria*) に同定されたが、前記の 1 株 (*Aeromonas* sp.) はいずれにも同定されなかった。また、バングラデッシュ分離菌株 11 株は、6 株が HG8Y (*A. veronii* biotype *sobria*) に、5 株が HG9 (*A. jandaei*) に同定された。なお、タイ分離菌株には HG9 (*A. jandaei*) が、バングラデッシュ分離菌株には HG1 (*A. hydrophila*) がみられず、国により 3 菌種の分布に特徴が見られた。同定されなかった 1 株を除いて、*A. hydrophila*、*A. veronii* biotype *sobria* および *A. jandaei* の 3 菌種は、エスクリン分解性、酢酸塩利用性およびショクロース・サリシンの分解性の 4 つの性状でほぼ識別し得ることが判明した。

第三章では、前章で同定された3菌種、*A. hydrophila*のM29株とT20株、*A. veronii* biotype *sobria*のM16株とB1株、*A. jandaei*のM34株とB10株の6株および未同定の*Aeromonas* sp. T8株を供試して、16S rDNAの塩基配列に基づく系統解析を行った。その結果、3菌種の各2菌株間の16S rDNA遺伝子の相同性は、それぞれ100%で完全に一致した。さらに、供試菌株の16S rDNAの塩基配列とデータベースに登録されている既知の*Aeromonas*属各菌種49菌株の塩基配列を用いて系統解析を行った結果、分離菌3菌種はそれぞれの標準株と99.9%の相同性を示し同じクラスターを形成した。なお、各クラスター間は有意に異なるものであった。T8株は*A. caviae*, *A. trota*および*A. enteropelogenes*とそれぞれ99.9%, 99.8%, 99.9%の相同値を以って同じクラスターを形成した。なお、T8株は前章のDNA-DNA相同性の結果から*A. caviae*, *A. trota*とは異なる菌種であることが判明しているが、今後、*A. enteropelogenes*標準株とのDNA-DNA相同性を調べ、新種であるか否かの検討を行う必要がある。

第四章では、前章で供試した菌株のうち*A. jandaei*の1株B10株をB2株に替えた3菌種6株および*Aeromonas* sp. T8株の計7株を供試し、水温20°Cと25°Cにおける金魚に対する病原性を筋肉内接種法および浸漬法により検討した。筋肉内接種法でのLD₅₀は、20°Cでは $2 \times 10^{6.8} \sim 6 \times 10^8$ 、25°Cでは $2.6 \times 10^{4.5} \sim 1.2 \times 10^8$ の範囲にあり、*A. jandaei*の1株M34株を除いては25°CでのLD₅₀が20°Cでのそれよりも1~2オーダー低かった。菌を接種した実験魚は、接種翌日には接種部位の膨隆、立鱗が、2~3日後には脱鱗が見られた。また、死亡魚は接種部位付近の筋肉の融解、筋肉内出血等の症状が見られた。これらの症状はEUS自然発症魚に認められる症状に酷似するものであった。浸漬法では同一菌種のうち筋肉内接種実験で病原性の強かった*A. hydrophila* T20株, *A. veronii* biotype *sobria* M16株, *A. jandaei* B2株および*Aeromonas* sp. T8株を供試して行った。供試魚は数枚の鱗を剥がしひとすじの傷をつけ、攻撃菌量は筋肉内接種実験でのLD₅₀値とほぼ同じ量で、20分間行った。その結果、25°CではT20株, M16株, B2株で1~2尾の死亡が見られたが、T8株では死亡魚はみられず、20°Cではいずれの菌株にも死亡魚は見られなかった。しかし、鱗を

剥がした部位は筋肉内接種したものと同様に膨隆、筋肉の融解、筋肉内出血等の症状が見られた。なお、両法における死亡魚、瀕死状態の魚および観察終了時の生残魚の腎臓から菌の再分離を行い、コロニーハイブリダイゼーション法により攻撃に用いた菌であることを確認した。

以上、EUS感染魚から分離された*Aeromonas*属細菌の遺伝子レベルでの種決定を初めて行うと共に、人工感染実験によりそれら分離菌の病原性を確認し、*A. hydrophila*, *A. veronii* biotype *sobria*, *A. jandaei*および*Aeromonas* sp. T8株がEUSの原因菌である可能性を示唆し得た。

学位論文審査の要旨

主査 教授 絵面 良男
副査 教授 猪上 徳雄
副査 教授 吉水 守
副査 助教授 田島 研一

学位論文題名

Taxonomical and pathological studies on motile *Aeromonas* species isolated from fish with epizootic ulcerative syndrome in Southeast Asian countries

(東南アジア諸国の流行性潰瘍病病魚から分離された運動性
エロモナス属細菌の分類および病原性に関する研究)

1970年以降東南アジア諸国で問題になっている流行性潰瘍病(ESU)の原因菌は未だ特定されていない。病魚からは運動性 *Aeromonas* spp. が高頻度に分離され、表現形質による同定で *A. hydrophila*, *A. caviae* および *A. sobria* とされているが、分類学的に混乱した状態にある。そこで本研究では、東南アジア三国の ESU 病魚から分離された *Aeromonas* 属細菌について、従来の表現形質による分類に加え、DNA-DNA 相同性および 16S rDNA の塩基配列に基づく系統解析などの分子生物学的手法による分類を試み、さらに同定した菌種代表菌株の病原性について検討したものである。特に評価される成果は以下のとおりである。

1. EUS 感染魚から分離されたマレーシア 18 株、タイ 15 株およびバンガラデッシュ 11 株の計 44 株と対照菌株として *Aeromonas* 属 13 菌種代表株 14 株の総計 58 株を供試して 41 項目の表現形質を検査し、対照菌株との比較により分離菌 44 株の同定を行った。その結果、タイ分離菌株 1 株 (T8) を除いて、26 株を *A. hydrophila* 類縁菌に、12 株を *A. veronii* biotype *sobria* に、5 株を *A. jandaei* に同定した。
2. 前記の同定菌種の対照株、*A. hydrophila* (ハイブリダイゼーショングループ HG 1)、*A. hydrophila* 類縁種 (HG2)、*A. veronii* biotype *sobria* (HG8Y) および *A. jandaei* (HG9) のフォトビオチン標識 DNA と各分離菌株 DNA 間の DNA-DNA 相同値を求め、表現形質による同定結果と比較検討した。DNA-DNA 相同性の結果から、先に *A. veronii* biotype *sobria* に同定した 12 株と *A. jandaei* に同定した 5 株はそれ

それ当該の種に同定されたが、表現形質で *A. hydrophila* に同定された 26 株中、19 株が *A. hydrophila* に、5 株が *A. veronii* biotype *sobria* に、2 株が *A. jandaei* に同定され、表現形質のみでは正確に分類し得ないことを明らかにした。なお、表現形質でいずれの種にも同定し得なかった *Aeromonas* sp. T8 株は DNA-DNA 相同性からもいずれの種にも同定し得ず新種の可能性を示唆した。

3. 3 菌種の国別分布では、タイ分離菌株には *A. jandaei* が、バングラデッシュ分離菌株には *A. hydrophila* がみられず、国により 3 菌種の分布に特徴が見られた。
4. *A. hydrophila*, *A. veronii* biotype *sobria*, *A. jandaei* および *Aeromonas* sp. (T8) の 4 菌種は、エスクリン分解性、酢酸塩利用性およびシュクロース・サリシンの分解性の 4 つの性状でほぼ識別し得ることを明らかにした。
5. 同定した 4 菌種、*A. hydrophila*、*A. veronii* biotype *sobria* および *A. jandaei* から各 2 株ずつと *Aeromonas* sp. T8 株を供試して、16S rDNA の塩基配列に基づく系統解析を行った。その結果、3 菌種の各 2 菌株間の 16S rDNA の塩基配列は、それぞれ完全に一致した。さらに、供試菌株の 16S rDNA の塩基配列と既知の *Aeromonas* 属各菌種 49 菌株の塩基配列を用いて系統解析を行った結果、分離菌 3 菌種はそれぞれの標準株と 99.9% の相同性を示し同じクラスターを形成することおよび各クラスター間では有意に異なるものであることを明らかにした。さらに T8 株は *A. caviae*, *A. trota* および *A. enteropelogenes* とそれぞれ 99.9%, 99.8%, 99.9% の相同値を以って同じクラスターに入るが、DNA-DNA 相同性の結果から *A. caviae*, *A. trota* とは異なる菌種であることが判明している。今後、*A. enteropelogenes* 標準株との類縁性について詳細な検討が必要であることを示した。
7. 供試菌株の病原性を知る目的で、3 菌種 6 株および *Aeromonas* sp. T8 株の計 7 株を供試し、水温 20°C と 25°C における金魚に対する感染実験を筋肉内接種法および浸漬法により行った。筋肉内接種法での LD₅₀ は、20°C では $2 \times 10^{6.8} \sim 6 \times 10^8$ 、25°C では $2.6 \times 10^{4.5} \sim 1.2 \times 10^8$ の範囲にあり、*A. jandaei* の 1 株 M34 株を除いては 25°C での LD₅₀ が 20°C でのそれよりも 1~2 オーダー低かった。死亡魚は接種部位付近の筋肉の融解、筋肉内出血等の症状が見られ、これらの症状は EUS 自然発症魚の症状に酷似するものであった。
8. 筋肉内接種実験で病原性の強かった *A. hydrophila* T20 株, *A. veronii* biotype *sobria* M16 株, *A. jandaei* B2 株および *Aeromonas* sp. T8 株を供試し、数枚の鱗を剥がしひとすじの傷をつけた供試魚について浸漬法による感染実験を実施した。その結果、25°C では T20 株, M16 株, B2 株で 1~2 尾の死亡が見られたが、T8 株では死亡魚はみられず、20°C ではいずれの菌株にも死亡魚は見られなかった。しかし、鱗を剥がした部位は筋肉内接種したものと同様に膨隆、筋肉の融解、筋肉内出血等の症状が見られた。なお、新たに開発したコロニーハイブリダイゼーション法により両法における死亡魚、瀕死魚および観察終了時の生残魚の腎臓からの再分離菌が攻撃に用いた菌株であることを確認し、感染実験の結果は供試菌株が病原性を有することを示唆するものであった。

以上の成果は、EUS感染魚から分離された*Aeromonas*属細菌の遺伝子レベルでの種決定を初めて行い、それら分離菌がEUSの原因菌である可能性を示唆し、本病の原因解明並びに予防対策に有益な知見を加えるのみならず、水産学に貢献するところ大であることから、審査員一同は本研究の申請者が博士(水産学)の学位を授与される十分な資格を有すると判定した。