

学 位 論 文 題 名

Studies on the distribution, virulence properties
and detection of a newly identified species
Aeromonas sp. T8 group

（エロモナス属新菌種 T 8 グループの分布，病原性ならびに
検出法に関する研究）

学位論文内容の要旨

エロモナス属細菌は水圏に広く分布している菌種で、1971 年以降東南アジア諸国において養殖魚ならびに野生魚に大量死をもたらしている流行性潰瘍病（EUS）の原因菌種とも考えられている。また、本属菌種は、魚類のほか両生類やヒトをはじめとする哺乳動物の各種の疾病の原因菌でもある。現在、本属には 14 の遺伝子型種（HG）が公表されているが、数種の追加菌種が考えられている。その中の一つに、Iqbal (1999) がタイの EUS 感染魚から分離・同定した *Aeromonas* sp. T8 株があるが、本菌種については、金魚に対する病原性が調べられているのみである。そこで本研究では、本菌の分布、EUS 発症魚種及び哺乳動物に対する病原性ならびに検出法を検討した。

まず第一章では、養殖並びに野生の健康魚および EUS 感染魚、カエルおよびカメから分離した 106 株のエロモナス属細菌を供試して *Aeromonas* sp. T8 の分布を調べた。分離菌株の内訳は、バングラデシュ分離株 49 株、タイ分離株 33 株、マレーシア分離株 18 株、フィリピン分離株 2 株および日本分離株 4 株である。第一節では、各国分離株 106 株および対照株として、14 の HG 代表菌株および *Aeromonas* sp. T8 株の計 121 株を供試して、44 項目の生理学的小および生化学的性状を調べて表現形質による分類を試みた。その結果、供試した 106 株は、4 株が *Aeromonas* sp. T8 株に、37 株が *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* に、22 株が *A. hydrophila* subsp. *ranae* に、1 株が *A. media* に、24 株が *A. veronii* biotype *sobria* に、10 株が *A. veronii* biotype *veronii* に、8 株が *A. jandaei* に同定された。第二節では、表現形質での分類結果を確認するために 16S rDNA の塩基配列に基づく系統解析を行った。供試菌株は、第一節で *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila*、*A. hydrophila* subsp. *ranae*、*A. veronii* biotype *sobria*、*A. veronii* biotype *veronii*、*A. jandaei* に同定された菌株を 2 株ずつ、*A. media* に同定された 1 株および *Aeromonas* sp. T8 に同定された 4 株（T4, T27, P2, B30）である。対照株として *Aeromonas* sp. T8 株および各分類菌群の標準株 19 株（DNA データベー

スから)を供試した。その結果、*Aeromonas* sp. T8に分類された4株をはじめ、各分類群に同定された菌株はそれぞれ高い相同値で独立したクラスを形成し、第一節の分類結果が概ね妥当なものであったことが確認された。*Aeromonas* sp. T8株に同定されたグループ(T4, T27, P2, B30)について、T8株DNAをフォトビオチン標識してDNA-DNA相同値を測定した結果、T4、T27およびP2株はT8株と70%以上の相同性を示しT8株と同種と判断されたが、B30株は36%の相同性しか示さずT8株とは同定されなかった。なお、T4、T27およびP2株の3株はいずれもEUS感染魚分離株であった。T4株とT24株はタイ分離株で、P2株はフィリピン分離株であったことから、T8グループは広く東南アジアに分布していることが予想された。

第二章では、新規エロモナス属菌種T8グループの病原性を検討した。第一節ではT8株のsilver barb、striped snakehead、tilapiaの3熱帯魚種に対する病原性を筋肉内接種法により調べた。また、T8グループのすべての株を用いてマウス(10~12週令)に対する病原性を腹腔内注射、静脈内注射および乳のみマウス試験により調べた。第二節では、培養上清のプロテアーゼ活性、また魚類・哺乳動物の赤血球を用いた菌体外産生物質(ECP)の溶血活性、PCR(Polymerase Chain Reaction)によるエロモナス属細菌に確認されているaerolysinおよびcytolytic enterotoxin等の病原性遺伝子を調べた。まず、T8株の3魚種silver barb、striped snakehead、tilapiaに対するLD₅₀はそれぞれ 1.5×10^5 、 3.2×10^5 、 2.9×10^5 CFU/fishと比較的高い値であった。なお、それぞれの実験魚にはEUS自然発症魚で見られる症状と類似の症状が観察され、死亡魚からは接種菌が再分離された。マウスに対する腹腔内注射、静脈内注射および乳のみマウス試験ではいずれも病原性は認められなかった。T8グループの菌株が産生するプロテアーゼは、タイ分離株(T4、T8、T27)は主にセリンプロテアーゼ、フィリピン分離株(P2)は主に金属プロテアーゼであることが推察された。また、T8グループの菌株のECPの溶血活性は哺乳動物の赤血球に対してよりも魚類赤血球に対してより強い溶血活性を示した。さらに、ECPの魚類細胞(RTG-2、FHM、EPC、BF-2、SNN-1)およびヒトのHeLa細胞に対する細胞毒性は、フィリピン分離株に若干認められたが、他の株にはみられなかった。aerolysinおよびcytolytic enterotoxin遺伝子はT8グループの菌株には認められなかった。第二章で得られた結果から、T8グループの菌株の病原性は、ヒトを含めた哺乳動物に対しては極めて低く、魚類に対してのみ強いことが示唆された。

第三章では、T8グループ菌株の防除対策を考える上で欠かすことのできない迅速で正確な本菌群の検出法を検討した。まず、第一節ではエロモナス属細菌のみを特異的に検出するためのPCRのプライマーを作出するために、エロモナス属細菌の16S rDNAの塩基配列の比較からAerom-Fa(5'-AGCGGCAGCGGAAAGTAGCTTGC-3')とAerm-Ra(5'-GCTAGCTTGCAGCCCTCTGTACGC-3')からなるプライマーセットを作成した。本プライマーセットは、供試したT8株および分離菌106株とは所定の1206bpのバンドを形成したが、近縁菌であるビブリオ属細菌やフォトバクテリウム属細菌からはこのサイズのバンドが増幅されず、エロモナス属細菌のみを特異的に検出し得ること

が分かった。第二節では、エロモナス属の 14 の HG の代表菌株、T8 株および分離菌 106 株の、第一節での PCR で得られた 1206 bp DNA を用いて RFLP 解析を行った。まず、14HG のうち、*A. sobria* (HG7), *A. veronii* (HG8 and 10), *A. jandaei* (HG9), *A. schubertii* (HG12), *A. trota* (HG13) および *Aeromonas* sp. Group 501 の 6HG は制限酵素 *Alu* I で特異的切断片を作り、他の遺伝型種とは区別された。*A. caviae* (HG4), *A. media* (HG5), *A. eucrenophila* と *Aeromonas* sp.T8 は *Alu* I では同じ切断パターンを示したが、このうち *A. eucrenophila* は *Mbo* I で他遺伝型種と、さらに *A. media* は *Pvu* II で *A. caviae* と *Aeromonas* sp.T8 と区別できたが、*A. caviae* と *Aeromonas* sp.T8 とを区別し得る制限酵素は見出せなかった（両者は 1、2 の性状で区別し得る）。残りの *A. hydrophila* (HG1), *A. bestiarum* (HG2), *A. salmonicida* (HG3) および HG11 は *Mbo* I, *Pst* I および *Nar* I で識別できた。以上の 14HG の結果を基に、分離エロモナス属菌 106 株の RFLP タイプを調べた結果、HG1 に 53 株、HG5 に 1 株、HG8/10 に 35 株、HG9 に 8 株、HG4/T8 に 7 株および HG13 に 5 株と分類された。この結果は第一章での分類結果とほぼ一致したことから、本章での PCR-RFLP による同定が T8 株並びにエロモナス属細菌の迅速検出法として利用可能なことが分かった。

以上、1999 年にタイの EUS 感染魚から分離された新菌種 *Aeromonas* sp. T8 株は、分布調査の結果、タイ分離株の他、フィリピン分離株にも見出されたことから、T8 グループは広く東南アジアに分布していることが予想された。また、T8 グループの菌株の病原性は、ヒトを含めた哺乳動物に対しては極めて低く、魚類に対してのみ強いことが示唆された。さらに、若干の性状検査を加えた PCR-RFLP により T8 株を迅速に検出し得ることを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 島 研 一

副 査 教 授 吉 水 守

副 査 助 教 授 澤 辺 智 雄

学 位 論 文 題 名

Studies on the distribution, virulence properties and detection of a newly identified species *Aeromonas* sp. T8 group

(エロモナス属新菌種 T8 グループの分布, 病原性ならびに
検出法に関する研究)

エロモナス属細菌は水圏に広く分布している菌種で、1971 年以降東南アジア諸国において養殖魚ならびに野生魚に大量死をもたらしている流行性潰瘍病 (EUS) の原因菌とも考えられている。また、本属菌種は、魚類のほか両生類やヒトをはじめとする哺乳動物の各種の疾病の原因菌でもある。現在、本属には 14 の遺伝子型種 (HG) が公表されているが、数種の追加菌種が考えられている。その中の一つに、1999 年にタイの EUS 感染魚から分離・同定された *Aeromonas* sp. T8 株があるが、本菌種については、金魚に対する病原性が調べられているのみである。本論文は、本菌の分布、EUS 発症魚種及び哺乳動物に対する病原性ならびに検出法を検討したものである。特に評価される成果は以下の通りである。

1. バングラデシュ、タイ、マレーシア、フィリピン、日本の養殖並びに野生の EUS 感染魚および健康魚、カエルおよびカメから分離・収集したエロモナス属細菌 106 株を供試して、生理学的小および生化学的性状を調べて表現形質による分類、16S rDNA の塩基配列に基づく系統解析並びに分子生物学的手法による分類を行い、*Aeromonas* sp. T8 の分布を調べた。その結果、3 株 (T4, T24, P2) が *Aeromonas* sp. T8 に同定された。3 株はいずれも EUS 感染魚分離株で、T4 株と T24 株タイ分離株で、P2 株はフィリピン分離株であったことから、T8 グループは広く東南アジアに分布している可能性を示唆した。
2. T8 グループの菌株の病原性を調べた。その結果、T8 株の 3 熱帯魚種 silver barb, striped snakehead, tilapia に対する LD₅₀ は、それぞれ 1.5×10^5 , 3.2×10^5 , 2.9×10^5 CFU/fish と比較的高い値であった。マウスに対する腹腔内注射、

尾静脈内注射および乳のみマウス試験では、T8 グループの菌株はいずれも病原性を示さなかった。また、T8 グループ菌株の ECP の溶血活性は哺乳動物の赤血球に対してよりも魚類赤血球に対してより強い溶血活性を示した。これらの結果から、T8 グループの菌株の病原性は、哺乳動物に対しては極めて低く、魚類に対して強いことを示唆した。

3. T8 グループの菌株の迅速な検出法を検討した。その結果、まずエロモナス属細菌のみを特異的に検出するための PCR のプライマーを作出するために、エロモナス属細菌の 16S rDNA の塩基配列の比較から *Aerom-Fa*(5'-AGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGC-3') と *Aerm-Ra*(5'-GCTAGCTTGCAGCCCTCTGTACGC-3')からなるプライマーセットを作成した。本プライマーセットは供試した T8 株および収集したエロモナス属細菌 106 株とは所定の 1206bp のバンドを形成したが、近縁菌属の細菌ではこのバンドは増幅されなかった。次いで、PCR で得られた 1206bp DNA を用いて RFLP 解析を行った。その結果、若干の性状検査を加えた PCR-RFLP により T8 株を迅速に検出し得ることを明らかにした。

以上の成果は、今後東南アジア諸国において発生が予想される T8 グループの菌株による EUS を正確・迅速に診断し、本病の防除対策を講じる上で大きく貢献するものと考えられることから、審査員一同は本論文が博士（水産科学）の学位を論文として十分な内容を有するものと判定した。