

国内水族館の閉鎖飼育環境における
Mycobacterium marinum の感染環に関する研究

(Studies on transmission cycles of *Mycobacterium marinum*
in closed-rearing environment of aquaria in Japan)

学位論文の内容の要約

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科
獣医学専攻博士課程平成30年入学

小 峰 壮 史

(指導教授：和田 新平)

Mycobacterium marinum は結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* を代表とする *M. tuberculosis complex* とハンセン病の原因菌である *Mycobacterium leprae* を除く抗酸菌群である非結核性抗酸菌の一種である。ヒトの *M. marinum* 感染症では手指や腕などに肉芽腫性皮膚病変を生じ、特にプール利用者や魚類飼育者に好発する。ヒト以外の動物における *M. marinum* 感染症は哺乳類、魚類、爬虫類、両生類、鳥類、節足動物で報告がある。さらに *M. marinum* は環境常在菌であり、特に水圏に分布している。現在までに、上記動物群に加え、巻貝、二枚貝、ウニ、アメーバといった水生生物からの分離例がある。また、湖や海などの自然環境、並びに個人飼育水槽や水族館、養殖場などの水生生物飼育環境におけるバイオフィームや付着藻類、水、砂、植物などからも本菌が分離されている。これらの事から *M. marinum* は多様な動物・環境要素の間で感染環を形成していると推察されるが、このことは明確には証明されていない。

本研究では、閉鎖飼育環境における *M. marinum* の感染環を分子疫学的に証明することを目的とし、国内 2 水族館における *M. marinum* 感染症の診断と網羅的な病原体分離（第 2 章・第 3 章）および分離された *M. marinum* 株群の系統解析（第 4 章）を実施した。

第 2 章：水族館における *M. marinum* 感染症例 –A 水族館–

本章では、まず 2017 年から 2020 年にかけて国内 A 水族館のトビウオ類展示水槽（A 水槽）において発生した連続死亡事例の診断のために、病魚（ホソアオトビ *Hirundichthys oxycephalus*: n=53）の剖検・病理組織学的検査、病原体の分離培養、分子生物学的検査を実施した。病魚の剖検の結果、腹腔内臓器に白色微小結節が認められ、病理組織学的検査においては検査魚 50 個体中 48 個体で抗酸菌を伴う肉芽腫病変が認められた。分離培養検査では検査魚 50 個体中 47 個体から抗酸菌が分離され、そのほとんどは Runyon 分類の I 群菌に分類された。分子生物学的検査における連結分子系統樹で病魚の組織サンプルと I 群菌群は *M. marinum* と同クラスターを形成した。さらに挿入配列検出試験において、挿入配列のパターン（IS2404 +/IS2606 -）が報告されている当該病原体の挿入配列のパターンと一致した。これらのことから、多くの検査魚から分離され、分離細菌株の大部分を占めていた I 群菌は *M. marinum* と同定された。以上より、本症例は *M. marinum* が主要因と考えられる抗酸菌症と結論付けられた。なお、検査魚 53 個体中 13 個体では *M. marinum* と黒色真菌の一種である *Exophiala aquamarina* の混合感染が認められた。

次いで、A水槽ホソアオトビ群の *M. marinum* 感染症を診断後、A水族館における *M. marinum* の浸潤状況および感染環を検討するため、同館の13水槽（A–K水槽）における環境要素（バイオフィーム、飼育水、注水、底砂、ろ過砂、餌：n=41）や飼育個体および導入前の野生個体（トビウオ類5種、イトベラ：n=50）からの当該病原体の検出を実施した。分離培養の結果、*M. marinum* はトビウオ水槽（A, B水槽）のトビウオ類4種とろ過砂に加え、アマモ水槽（G水槽）のイトベラおよび底砂からも分離された。このことから本水族館における魚類や、底砂やろ過砂といった環境要素が感染環の構成要素となる可能性が示唆され、さらに複数の水槽に当該病原体が浸潤している可能性が疑われた。

第3章：水族館における *M. marinum* 感染症例 –B水族館–

本章では、まず2018年から2020年にかけて、B水族館のアマモ場を再現した水槽（M水槽）の複数魚種において発生した死亡事例の診断のため、病魚（アミメハギ *Rudarius ercodes*、ゴンズイ *Plotosus japonicus*、ハオコゼ *Hypodytes rubripinnis*: n=4）の剖検・病理組織学的検査、病原体の分離培養、分子生物学的検査を実施した。病理組織学的検査の結果、アミメハギ1個体において抗酸菌を伴う肉芽腫病変が認められた。分離培養では、2個体から抗酸菌が得られ、これらはI群菌に分類された。分子生物学的検査における連結分子系統樹で病魚の組織サンプルとI群菌群は *M. marinum* と同クラスターを形成した。また、挿入配列検出試験において、分離細菌株の挿入配列のパターン（IS2404 +/IS2606 -）が報告されている当該病原体の挿入配列のパターンと一致した。したがって、この分離細菌株は *M. marinum* と同定された。以上より、少なくともアミメハギ1個体は *M. marinum* による抗酸菌症に罹患していたと診断された。

M水槽のアミメハギにおける *M. marinum* 感染症を診断後、B水族館の当該病原体の浸潤状況および感染環を検討するため、同園館のM水槽を含む合計5水槽（L–O水槽）および自然環境（アマモ採集地点）の動物（魚類：n=66、無脊椎動物：n=20）や環境要素（n=152）からの当該病原体の検出を実施した。M水槽の飼育魚類8種、無脊椎動物9種（イソメ、巻貝、二枚貝、ウニ、エビ、ヤドカリ、ナマコなど）、環境要素（飼育水、ろ過砂や底砂、バイオフィーム、付着藻類、アマモ）から *M. marinum* が分離された。本症例において、多様な魚類や無脊椎動物、環境要素の間で本菌の感染環が成立している可能性が考えられた。

第4章：分子疫学的解析による感染環の検討

本章では A 水族館および B 水族館における *M. marinum* の感染環を明らかにするため、第2章・第3章で分離された *M. marinum* 株において core single nucleotide polymorphism (SNP) 解析による分子疫学的解析を実施した。さらに、迅速遺伝子型鑑別法としての Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) 解析の有用性を評価するため、VNTR 解析も合わせて実施し、core SNP 解析結果との比較を行った。

M. marinum 25 株（研究室保存株 4 株、A 水族館由来株 9 株、B 水族館由来株 12 株）を NGS を用いた core SNP 解析に供試した。その結果、A 水族館および B 水族館に関する細菌株は 4 つのクラスター（Genotype i-iv）を形成した。A 水族館においてはアマモ水槽（G 水槽）由来株の属する Genotype i と トビウオ水槽（A, B 水槽）由来株の属する Genotype iii の 2 つの遺伝子型に分類されたことから、A 水族館には少なくとも 2 つの遺伝系統が存在し、トビウオ水槽およびアマモ水槽でそれぞれ独立した *M. marinum* の感染環が成立している可能性が示唆された。また、それぞれの水槽における魚類由来株と環境要素由来株が同遺伝子型に分類された。したがって魚類と環境間で感染環が形成されていたことが強く示唆された。B 水族館のアマモ水槽（M 水槽）においては、ボラ由来株のみ Genotype ii に分類され、その他のすべての魚類・無脊椎動物・環境要素由来株は Genotype iv に分類された。このことから、B 水族館 M 水槽には 2 つの遺伝系統が存在し、その内 Genotype iv に属する *M. marinum* が空間的・時間的にニッチを占めていたと推察された。また、魚類、無脊椎動物、環境要素から分類された *M. marinum* が同クラスターを形成したことから、これらの幅広い要素が当該病原体の感染環の構成要素となることが分子疫学的に証明された。

コストや迅速性に優れ、現場に広く導入されることが期待される VNTR 解析には A 水族館由来株、B 水族館由来株、研究室保存株から選抜した 44 株（core SNP 解析に供試した 25 株を含む）および Type strain 2 株の合計 46 株が供試された。11 領域における VNTR 解析の結果、VNTR 解析に供した A 水族館由来株および B 水族館由来株は 3 群に分けられた。core SNP 解析において Genotype i に分類された A 水族館 G 水槽由来株は Genotype 1 に、Genotype ii に分類された B 水族館 M 水槽ボラ由来株は Genotype 2 に、Genotype iii に属した株群を含む A 水族館 トビウオ水槽由来株および Genotype iv に属した株群を含む B 水族館 M 水槽由来株（前述のマボラ由来株を除く）は両群とも Genotype 3 に分類された。また、VNTR プロファイルに基づく系統分類結果と SNP 解析に基づく系統分類結果も完全には一致しなかった。次いで、この 2 群を区別するため VNTR 解析の分解能の向上を試みた。しかしながら、

既存 6 領域および新たに作製した 14 領域 (V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V-2-7, V-2-12, V-2-31, V-2-36, V-2-39, V-2-41) では当該 2 群を区別するには至らなかった。したがって、迅速遺伝子型鑑別法として VNTR 解析を活用するには更なる検討を要すると結論付けた。

本研究では、閉鎖飼育環境における *M. marinum* の感染環を明らかにするために、国内 2 水族館から分離された *M. marinum* 株群の系統解析を実施した。さらに、迅速遺伝子型鑑別法としての VNTR 解析の有用性を評価するため、VNTR 解析結果と core SNP 解析結果の比較を行った。本研究により、閉鎖飼育環境における魚類・無脊椎動物・環境要素が *M. marinum* の感染環の構成要素となることが分子疫学的に証明された。また、VNTR 解析に関してはさらなる検討を要すると結論付けられた。