

ハギ類に病原性を示す  
非結核性抗酸菌 *Mycobacterium* sp. に関する研究

Studies on nontuberculous mycobacterium ;  
*Mycobacterium* sp. pathogenic for filefish

深野 華子

ハギ類に病原性を示す  
非結核性抗酸菌 *Mycobacterium* sp. に関する研究

(Studies on nontuberculous mycobacterium ;  
*Mycobacterium* sp. pathogenic for filefish)

深野 華子

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 25 年入学

(指導教授：和田 新平)

平成 29 年 3 月

## 目次

第1章	: 諸言	1
第2章	: 2種のハギ類から分離されたNTMについての性状試験	6
第1節	生物学および生化学的性状試験	8
第1項	供試菌	8
第2項	各項目の試験方法	9
第3項	生物学および生化学性状試験の結果と考察	14
第2節	薬剤感受性試験	28
第1項	供試菌株	28
第2項	試験方法	28
第3項	結果	30
第3節	小括	34
第3章	人為感染試験による疫学的検討	36
第1節	カワハギを用いたNTM侵入門戸の検討	38
第1項	材料および方法	38
第2項	結果	39
第3項	考察	39
第2節	カワハギ由来菌株のウマヅラハギに対する病原性評価と病理組織学的検討	44
第1項	材料および方法	44
第2項	結果	45
第3項	考察	48
第3節	小括	58
第4章	分子生物学的解析	59

第1節	マルチローカスシーケンスタイピング(MLST)解析.....	61
第1項	材料および方法.....	61
第2項	結果.....	64
第3項	考察.....	66
第2節	<i>hsp65</i> 遺伝子を用いた PRA pattern 解析.....	72
第1項	材料および方法.....	72
第2項	結果.....	73
第3項	考察.....	74
第3節	パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)によるジェノタイピング解析	
	77	
第1項	材料および方法.....	77
第2項	結果.....	78
第3項	考察.....	78
第4節	小括.....	80
第5章	: MALDI-TOF MS によるタンパク質および脂質分析.....	81
第1節	MALDI Biotyper によるタンパク質解析.....	83
第1項	材料と方法.....	83
第2項	結果.....	84
第3項	考察.....	85
第2節	MALDI TOF MS による総脂質解析.....	91
第1項	材料および方法 1.....	91
第2項	結果 1.....	91
第3項	材料および方法 2.....	92
第4項	結果 2.....	92
第5項	考察.....	93

第3節	小括 .....	97
第6章	: 迅速診断法の開発 .....	98
第1節	特異的 PCR プライマーの設計 .....	99
第1項	材料および方法 .....	99
第2項	結果 .....	100
第2節	設計した PCR プライマーの特異性評価 .....	103
第1項	材料および方法 .....	103
第2項	結果 .....	104
第3項	考察 .....	105
第3節	特異的 PCR プライマーの検出感度評価 .....	107
第1項	材料および方法 .....	107
第2項	結果 .....	108
第3項	考察 .....	110
第4節	小括 .....	112
第7章	総括 .....	113

## 第 1 章 : 諸言

非結核性抗酸菌(Nontuberculous Mycobacteria,以下 NTM と略する)とは結核菌 *M. tuberculosis* を代表とする *M. tuberculosis* complex (*M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. orygis*, *M. pinnipedii*) とハンセン病の原因菌である *Mycobacterium leprae* を除く抗酸菌群を指す(Hoshino & Suzuki, 2015)。その中でも NTM は大きく 7 日以内にコロニーを形成する迅速発育型 (Rapidly Growing)とコロニー形成に 7 日以上の日数を要する遅発育型 (Slowly Growing)に類別され、Runyon による分類法によれば、表 1-1 に示すようにコロニーの光発色性の有無により更に I ~IV群に分類される(Runyon, 1959)。多くの NTM は土壌や水中などの環境中に普遍的に存在することが知られているとともに、公共の給水システムやシャワーヘッド、公衆浴場や風呂桶など人の生活環境中にも生息することが明らかとなってきた(Falkinham III, 2016; Nakanaga *et al.*, 2014)。

ATS(米国胸部疾患学会)が出版した 2007 年版の NTM ガイドラインによれば、NTM の菌種は 125 菌種以上とされており、分子生物学的分類方法が広く用いられるようになったことからその菌種は細分化し続けている(Griffith *et al.*, 2007)。日本においては、*Mycobacterium avium* complex による呼吸器疾患がその 90%以上を占めており、続いて *M.kansasii*, *M.gordonae*, *M.fortuitum*, *M.szulgai*, *M.chelonae*, *M.scrofulaceum*, *M.xenopi*, *M.marinum*, *M.nonchromogenicum*, *M.abscessus* などを原因菌とする疾患が認められる(四元・倉島, 2010)。

これらの菌種のうちほとんどは、他の哺乳類、鳥類、両生類、爬虫類、魚類、無脊椎動物および原虫に至るまで多種多様な生物から分離されている(Dvorska *et al.*, 2007; Izumi *et al.*, 2010; Reavill & Schmidt, 2012)。

NTM は結核の病原菌(*M.tuberculosis*) やハンセン病の原因菌(*M.leprae*) とは異なり、ヒトからヒトへの感染あるいは、動物からヒトへの感染も成立しないとされてい

たが、近年になって *M.abscessus* や *M.kansasii* ではヒトからヒトへの感染が強く示唆されるケースが報告されている(Bryant *et al.*, 2013, 2016; William M *et al.*, 2014)。

Kušar *et al.*, (2016) によればヒトに感染し得る *M.marinum*, *M.chelonae*, *M.fortuitum*, *M.gordonae*, *M.pregrinum* などは、ペットショップで売られている魚に高確率に存在しており、水棲生物由来 NTM の同定は人獣共通感染症の観点から重要であろうと結論付けている。

実際に、*M.marinum* による感染事例は漁業従事者や魚の飼育水槽に接触する人、ボートや釣りをする人に多いとされ、中でも水槽管理者が罹患する場合は "Fish Tank Granuloma" と呼ばれる(Johnson & Stout, 2015; Wu *et al.*, 2012)。加えて、*M.marinum* だけでなく *M.chelonae* による水槽管理者に対する感染例も報告されている(Li *et al.*, 2014)。

魚類の NTM 症は 165 以上の魚種で報告されており、観賞魚、養殖魚、野生魚を問わず多くの海水魚・汽水魚・淡水魚が罹患することが明らかとなっている。原因菌としては *M. marinum* が最も多く報告されており、次いで *M. chelonae* および *M. fortuitum* が多く分離され、さらに *M. abscessus*, *M. shottsii*, *M. pseudoshottsii* などによる症例も報告されている(Jacobs *et al.*, 2009)。

*M.marinum*, *M.pseudoshottsii* を原因とする魚類 NTM 症の症状は、一般的に慢性から亜急性であるとされ、外観的な病徴は観察しにくい。また、内部肉眼所見は粟粒大白色結節が諸臓器、特に体腎、脾臓、肝臓、心臓において散在するのが一般的であり、病理組織学的には乾酪壊死性の類上皮細胞性肉芽腫を形成する(Lewis & Chinabut, 2011)。日本の養殖魚に発症する NTM 症としては西日本を中心に生産が盛んなブリ、カンパチに削瘦や肉芽腫病変を形成する *M.marinum* および *M.pseudoshottsii* 感染症(通称ミコバクテリア症)が最も多いと考えられるが、抗生剤での治療は困難であるため未だ解決策は見いだされていない。

一方で、近年は「マイナー魚種」と呼ばれる新しい養殖魚種の生産に力を入れる業者が増加しており、そのひとつがハギ類である。日本で養殖されている主なハギ類はカワハギ(*Stephanolepis cirrhifer*)、ウマヅラハギ(*Thamnaconus modestus*)の2種であり、フグ目カワハギ科に分類され、日本では北海道以南から東シナ海に分布し、浅い砂底と岩礁が混じるような環境に生息する。食性は肉食性で、ゴカイやクラゲ、貝類、ウニ、甲殻類などを捕食し、フグ目に共通して見られる歯板で貝の殻や甲殻類の殻も噛み砕いて食べる。天然魚は一年を通して漁獲されるが、日本では西日本を中心に近縁種のウマヅラハギとともに養殖が行なわれている。身はフグに似ており、養殖魚は天然魚よりも肝臓(キモ)が冬に大きくなり美味であることから、魚価の高い新たな養殖魚種として期待を集めており、種苗生産および単独養殖が試みられている(Mizuno *et al.*, 2012)。

2009年以降、愛媛県水産研究センターにおいて養殖されているカワハギに高い死亡率を伴う疾病が発生しており、小川培地上でのコロニーの発育、ZN染色などの予備的な検討の結果、本事例はNTMによる感染症である疑いが高いと判断された。本事例における自然発症魚を病理組織学的に精査し、発症魚の患部より原因菌の分離・培養を試み、DNA-DNAハイブリダイゼーション試験による同定を実施した結果、本事例がカワハギで初めてのNTM感染症の症例であることが明らかとなった。また、小川培地上に分離された原因菌を使用して健常なカワハギに対して病原性試験を実施したところ、原因菌はカワハギに対して高い病原性を示すことを明らかにした(Fukano *et al.*, 2015)。

2011年以降には日本の他の海域で、それまでには事例のなかったカワハギの‘天然魚’にも近縁種である‘ウマヅラハギ’においても類似したNTMの感染が疑われる事象が相次いで発生しており、感染地域や感染魚種の拡大が懸念された。

そこで、本論文では、カワハギおよびウマヅラハギから分離されたハギ類由来NTMの生物学的・生化学的な性状と薬剤感受性、カワハギを使用した侵入門戸の検



討試験、カワハギ由来 NTM のウマヅラハギに対する病原性とその病理組織学的な検討、ハギ類由来 NTM の分子生物学解析およびタンパク質および脂質解析、ハギ類由来 NTM に対する特異的 PCR プライマーの設計とその検出感度評価を実施した。

第 1 章は緒言、第 2 章ではハギ類由来 NTM の生物学的小および生化学性状と薬剤感受性について、第 3 章ではカワハギおよびウマヅラハギを使用した人為感染試験による疫学的検討について、第 4 章ではハギ類由来 NTM の分子生物学的検討について、第 5 章では MALDI-TOF MS によるハギ類由来 NTM のタンパク質および脂質分析について、第 6 章ではハギ類由来 NTM に対する特異プライマーの設計とその有効性に関する検討について述べ、第 7 章を総括とした。

表 1-1. 抗酸菌の Runyon 分類

斎藤肇：「結核菌検査指針 2007」による抗酸菌検査より一部改変

群別	分類	菌種	魚類における感染報告の有無	
	培養不能菌	<i>M. leprae</i>		
遅発育菌	結核菌群	<i>M. tuberculosis</i>		
		<i>M. africanum</i>		
		<i>M. bovis</i>		
		<i>M. canettii</i>		
		<i>M. caprae</i>		
		<i>M. microti</i>		
		<i>M. pinnipedii</i>		
	非結核性抗酸菌	I 群	<i>M. asiaticum</i>	
			<i>M. kansasii</i>	
			<i>M. marinum</i>	○
			<i>M. pseudoshottsii</i>	○
			<i>M. simiae</i>	
		II 群	<i>M. gordonae</i>	
			<i>M. heckeshornense</i>	
			<i>M. interjectum</i>	
			<i>M. intermedium</i>	
			<i>M. lentiflavum</i>	
			<i>M. scrofulaceum</i>	
			<i>M. szulgai</i>	
		III 群	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	
			<i>M. angelicum</i>	○
			<i>M. branderi</i>	
			<i>M. celatum</i>	
			<i>M. haemophilum</i>	○
			<i>M. intracellulare</i>	
			<i>M. lepraemurium</i>	
	<i>M. montefiorensis</i>		○	
<i>M. nonchromogenicum</i>				
<i>M. shimoidei</i>				
<i>M. shottsii</i>	○			
<i>M. terrae</i>				
<i>M. triplex</i>				
<i>M. triviale</i>				
迅速発育菌	IV 群	<i>M. abscessus</i>	○	
		<i>M. chelonae</i>	○	
		<i>M. fortuitum</i>	○	
		<i>M. goodii</i>		
		<i>M. mageritense</i>		
		<i>M. massiliense</i>		
		<i>M. peregrinum</i>	○	
		<i>M. salmoniphilum</i>	○	
		<i>M. smegmatis</i>		
<i>M. saopaulense</i>	○			

## 第 2 章 : 2 種のはぎ類から分離された NTM についての性状試験

近年、1 章でも述べたようにカワハギ(*Stephanolepis cirrhifer*)、ウマヅラハギ(*Thamnaconus modestus*)についての種苗生産や養殖技術についての研究が進み、これらの魚種の生産をおこなう業者が西日本を中心に増加傾向にある(Mizuno *et al.*, 2012)。

南ら(2012)によれば、2005 年から 2009 年度の間に愛媛県、大分県、宮崎県で発生したカワハギに対する疾病診断数は 287 件であった。それら疾病診断数のうち全体の 42.2%に当たる 121 件を *Streptococcus iniae* の感染を含むレンサ球菌症が占めており、次にビブリオ病(13 件、4.5%)、*Peniculus minuticaudae* 感染症(12 件、4.2%)、ウイルス性神経壊死症(10 件、3.5%)が続いた。そのうち抗酸菌症は 5 月に 1 件、10 月に 1 件、2 月に 2 件と計 4 件診断されているが原因菌の同定はなされていない。

2009 年および 2010 年に愛媛県水産研究センター内の生簀で抗酸菌を原因とする養殖カワハギの大量死が発生した。種苗は他県の生産業者より購入し、沖出し(コンクリート生簀内から海面生簀へ移動すること)後しばらくすると散発的に死亡する個体が認められ、その後生簀内の 40%が死亡する大きな問題となった。

2009 年から 2010 年にかけて同センターより依頼を受け、死亡魚の調査を行ったところいずれの病魚からも同様の形態を示すコロニーが小川培地上に分離された。分離された菌株に対し、抗酸菌染色である ZN 染色を実施したところ、抗酸菌特有の赤色を呈し長桿菌の形状が観察された。また、簡易的な生化学的性状試験を実施したところ 25~30℃を至適発育温度とする迅速発育抗酸菌であり、光発色性を持たないグループに分類されると判定された。また、それらの分離菌から DNA 抽出を行い‘DDH 極東’キット(極東製薬工業株式会社)を用いて DNA-DNA ハイブリダイゼーション試験を実施したところ、ヒトに対する感染性を有することが知られており NTM に類似される *M.chelonae* あるいは *M.abscessus* に近縁な菌種であることを明らかとなった(Fukano *et al.*, 2015)。また、分離菌を用いて行った健常カワハギに対する腹腔内

接種感染試験では、分離された NTM がカワハギに対して非常に高い病原性を有すること、および感染魚は腹腔内に大型膿瘍を形成することを特徴とし、病理組織学的にはヒトのネコひっかき病のリンパ節炎において認められるような膿瘍形成性肉芽腫を形成する病態を示すことが明らかとなった。これらの病態は、これまでにブリやカンパチで報告のあったミコバクテリア症とは全く異なる病態を示しており、その原因菌も全く異なる種類のものであることが示唆されたが、分離された NTM の詳細な同定には至らなかった(Fukano *et al.*, 2015)。

2010 年以降、他県あるいは他魚種でも同様の疾病が発生し問題となっていることが明らかとなってきた。そこで、2010 年から 2013 年までに複数の研究機関また検査機関で分離された NTM5 菌株の分与を受け、これまでに愛媛県の養殖カワハギから分離された NTM 菌株も含めて詳細な生化学性状試験の検討を行うこととした。加えて、2009 年および 2010 年に分離された菌株に対する DDH 試験ではヒトに対して感染性のある *M.chelonae* に近縁であることが示唆されたことから、供試した菌株に対する各種抗生剤の薬剤感受性試験を実施することとした。

本章ではハギ類から分離された NTM について、第 1 節では生物学的および生化学性状試験、第 2 節では薬剤感受性試験、第 3 節では小括を記載した。

## 第 1 節 生物学的および生化学的性状試験

### 第 1 項 供試菌

2009 年～2013 年にかけて愛媛県、高知県、長崎県で天然および養殖ハギ類から分離された計 26 菌株を供試した。それぞれの分離日、分離魚種、分離部位、分離場所を表 2-1-1 および図 2-1-1 に示す。また、各試験には近縁種であると考えられる *M. chelonae* JCM 6388<sup>T</sup> および *M. salmoniphilum* ATCC 13758<sup>T</sup> を供試し各試験を実施した。なお、ZN 染色には以上に加えて *M. marinum* JCM17638<sup>T</sup>、*M. pseudoshottsii* JCM15466<sup>T</sup> を標準菌株として供試した。

ZN 染色による観察、至適発育温度試験、コロニー性状の観察、光発色性試験についてはハギ類由来 26 菌株全てに対して行った。一方、以下に記載する個々の生化学性状試験は、結核菌検査指針 2007(日本結核病学会 抗酸菌検査法検討委員会, 2007)および Public Health Mycobacteriology ; A Guide for the Level III Laboratory(Kent & Kubica, 1985; 日本結核病学会 抗酸菌検査法検討委員会, 2007)に記載されている定法に従って実施し、分離年、分離場所、分離魚種、種苗由来の異なる NJB0901、NJB1001 (以上、愛媛県のカワハギ由来)、NFUMC11 (=NJB1101 高知県のカワハギ由来)、Ns11sousui68 (=NJB1201)、Ns12sousuiL-3 (=NJB1202) (以上、長崎県のカワハギ由来)、NJB1301、NJB1302 (以上、愛媛県のウマズラハギ由来)、*M. chelonae* JCM 6388<sup>T</sup> および *M. salmoniphilum* ATCC 13758<sup>T</sup> の計 9 株を供試した。

各菌株は 0.05% Tween80 を添加した Middlebrook7H9 液体培地 3mL 中あるいは Middlebrook7H11 寒天培地 20mL 上にて前培養を行った。いずれの試験にも、前培養を行った対数増殖期にあたる菌を使用し、それらは 15mL チューブ内に分注した 3mL の Middlebrook7H9 液体培地とガラスビーズと共にボルテックスすることにより菌塊を分散させた。分散後、上清を Middlebrook7H9 液体培地中に 630nm の吸光度で 0.08～0.10 の濁度に調整し、これを調整菌液として各試験に供試した。

## 第 2 項 各項目の試験方法

### 1. ZN 染色による菌の形態観察

Middlebrook7H9 液体培地で培養した菌株を、シランコートされたスライドガラス上に塗抹し火炎固定した。固定したスライドガラスは藤木(2011)の手法に従って ZN 染色を施した。作成した塗抹標本は光学顕微鏡下で観察し、標準株 (*M.cheloniae* JCM6388<sup>T</sup>, *M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup>, *M.marinum* JCM17638<sup>T</sup>, *M.pseudoshottsii* JCM15466<sup>T</sup>)との比較を行った。

### 2. 至適発育温度試験

ハギ類由来菌株および *M. cheloniae* JCM 6388<sup>T</sup>、*M. salmoniphilum* ATCC 13758<sup>T</sup> 各標準株の調整菌液を白金耳で約 10  $\mu$ l ずつ Middlebrook 7H11 寒天培地上に接種し 4,10,15,20,25,30,35,37,40 $^{\circ}$ C の各温度で 7 日間培養し発育の様子を観察した。なお、7 日目に発育が認められなかったものは 30 日目に再度観察を行い記録した。

### 3. コロニー形態の観察

ハギ類由来菌株および *M.cheloniae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> 各標準株の調整菌液を白金耳で約 10  $\mu$ l ずつ Middlebrook 7H11 寒天培地上に接種後 30 $^{\circ}$ C にて培養し、3 日目、5 日目、7 日目のコロニー形態を観察した。観察した性状はスムーズ型コロニーを S 型、多くはラフ型でしばしばスムーズ型が出現するものを R/(S)型、初期はスムーズ型だがやがてラフ型に移行するものを S/R 型と表現した。

### 4. 色素産生と光発色性試験

ハギ類由来菌株および *M.cheloniae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmoniphilum*

ATCC13758<sup>T</sup>の調整菌液 50 μl を、1 菌株に対し 2 本の 2%小川培地上に接種した。一方を暗所用培地、もう一方を光照射用培地とし、個別にアルミホイルで包み、十分に発育するまで培養した。

十分な発育を確認したのち、光照射用培地のアルミホイルを外し、60W 蛍光灯で 30cm の距離から約 1 時間光を照射し、再度アルミホイルで包んで 24 時間培養した。培養後、暗所用培地のアルミホイルを外し、両コロニーの色調を比較・観察した。

暗所培養では灰白色ないしクリーム色を呈していたコロニーが光照射後にレモン黄色を示す場合は光発色菌(Runyon I : photochromogens)、暗所培養で、コロニーが既に黄色ないしオレンジ色を呈しているものは暗発色菌(Runyon II : scotochromogens)、暗所培養で灰白色ないしクリーム色のコロニーが光照射によっても変化しないものを非光発色菌(Runyon III : nonphotochromogens)、色素産生性に関わらず培養 1 週間以内に成熟コロニーを形成するものを迅速発育抗酸菌(Runyon IV)として記録した。

なお、この試験では Photochromogenicity を有する *M.marinum* JCM17638<sup>T</sup> を比較対象として供試した。

## 5. PNB(パラニトロ安息香酸)培地発育能

PNB 添加小川培地 (極東製薬工業株式会社) 上にハギ類由来菌株および *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> 各標準株の調整菌液を 50 μL 接種しその発育の有無を観察した。

## 6. 硝酸塩還元試験

硝酸ナトリウム 0.085g を M/45 リン酸緩衝液(pH7.0)100mL に溶解・滅菌し基質液とした。小試験管中に蒸留水 200 μL を分注しこれに 1 白金耳のハギ類由来菌

株、*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> の菌塊を浮遊基質液 2mL 中に加え、軽く振ったのち 30℃の温浴中に 2 時間保持した。

菌塊を懸濁した基質液に、2 倍希釈塩酸(蒸留水/濃塩酸: v/v)100μL、0.2%スルファニルアミド水溶液 200μL、0.1% N-ナフチルエチレンジアミン水溶液 200mL を加え軽く振り、反応液が直ちに赤色～赤紫色に変化したものを陽性、全く変化しないあるいは微桃色に変化したものを陰性とした。

#### 7. カタラーゼ試験

Middlebrook7H11 寒天培地 3mL を大試験管に垂直位で凝固滅菌し、ハギ類由来菌株、*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> 調整菌液を 100μL 接種し 25℃にて培養した。培養後、10%Tween80 と 30%過酸化水素水の等量混合液を 1mL 添加し、5 分後の泡沫の高さを計測した。45mm 以上の泡沫を産生するものを高カタラーゼ産生菌、45mm 以下のものを低カタラーゼ産生菌として記録した。

#### 8. 耐熱性(68℃)カタラーゼ試験

1.5mL チューブに 1/15M リン酸緩衝液(pH7.0)を 0.5mL 加え、これに数白金耳のハギ類由来菌株、*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> の菌塊を分散させ、68℃の加熱ブロック内に 20 分間静置した。水冷後、10%Tween80 と 30%過酸化水素の等量混合液を 500μL 加え、発泡の有無を観察・記録した。

#### 9. アリルスルファターゼ試験(Wayne 3 日法)

Middlebrook7H11 寒天培地 100mL にグリセリン 1mL、トリポタシウムフェノールフタレイン二硫酸塩を 65mg 加え、2mL ずつスクリーバイアルに分注し、直立位にて凝固させた。



ハギ類由来菌株、*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup>の調整菌液 1 滴(約 20 $\mu$ L)を培地表面に接種し 30 $^{\circ}$ Cで 3 日間培養後、2N 炭酸ナトリウム 300 $\mu$ L を加え 30 分後の色調の変化を観察した。

培地表層が赤色になったものを陽性、色調変化のないものを陰性とした。

#### 10. ウレアーゼ試験

滅菌した 1/100M リン酸緩衝液(pH6.8)100mL に尿素 3.0g、0.1%フェノールレッド水溶液 1mL を加えたものを基質液とし、小試験管に 2mL ずつ分注した。

ハギ類由来菌株、*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup>それぞれ一白金耳の菌塊を基質液中に浮遊させ、30 $^{\circ}$ Cにて 3 日間保ったのち、基質液が赤色になったものを陽性とした。

#### 11. ピクリン酸培地発育能試験

変法 Sauton 寒天培地\*1 20mL に、ハギ類由来菌株、*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> をそれぞれ一白金耳分塗抹し、25 $^{\circ}$ Cで 2 週間培養し、発育の有無を観察した。

\*1 【変法 Sauton 寒天培地】

グルタミン酸ナトリウム	4g
クエン酸	2g
リン酸二水素カリウム	0.5g
硫酸マグネシウム	0.5g
クエン酸鉄アンモニウム	0.05g
グリセリン	30mL
ピクリン酸	2g

蒸留水

970mL

#### 12. 鉄取り込み能試験

2%のクエン酸鉄アンモニウムを加えた Middlebrook7H11 寒天培地上に、ハギ類由来菌株、*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> の調整菌液 10 $\mu$ L を塗抹しコロニーが褐色に変化する場合を陽性、コロニー周囲の培地が緑色から褐色へと変化する場合を中間型、褐色化したコロニーを生じないあるいは周囲の培地の色調に変化をきたさないものを陰性とした。

#### 13. 5%食塩耐性試験

5%の食塩(NaCl)を加えた Middlebrook7H11 寒天培地 20mL および塩分非含有対照培地 20mL に、ハギ類由来菌株、*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> の調整菌液 100 $\mu$ L を接種し 25 $^{\circ}$ Cにて 2 週間培養した。対照培地に多数のコロニーが出現し、食塩含有培地上に 50 個以上のコロニーが見られた場合を陽性とした。

#### 14. Tween80 水解試験

1/15M リン酸緩衝液(pH7.0)100mL に Tween80 0.5mL および、0.1%ニュートラルレッド水溶液 2mL を加え混和したのち、小試験管に 2mL ずつ分注し滅菌したものを基質液とした。

基質液中にハギ類由来菌株、*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> 1 白金耳の菌塊を分散させ、琥珀色の基質液が薄赤色～赤色に変化したものを陽性とした。なお、観察は 5 日目と 10 日目に行い、14 日間が経過しても変化の見られないもの、また、試験管底に沈殿した菌体が赤色に着色し、基質液が琥珀色をしている場合および基質液の褪色が見られたものは全て陰性と判

定した。

### 第 3 項 生物学的および生化学性状試験の結果と考察

#### 1. ZN 染色による菌の形態観察

供試した 5 菌株の ZN 染色像を図 2-1-2 A~E に示す。カワハギ由来菌株は図 1-1-2 A (代表として NJB0901<sup>T</sup>) で示すように強い凝集性が観察された。*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> も NJB0901<sup>T</sup> と同様に凝集性を示していたが、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> には凝集性は認められなかった。また、*M.marinum* JCM17638<sup>T</sup> と *M.pseudoshottsii* JCM15466<sup>T</sup> は NJB0901<sup>T</sup> や *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup>、に比べてやや大型の長桿菌の形態を示していた。

#### 2. 至適発育温度試験

7 日間までの観察で、26 株の分離菌および 2 株の標準株は 15~35℃の間で発育が見られ、26 株の分離株および *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> は 30℃で最も良好な発育が認められた。また *M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> は 25℃で最も良好に発育した。

7 日目までに発育の認められなかった温度帯のうち、37℃、40℃では 30 日目まで培養日数を延長しても発育は全く認められなかった。しかしながら、4℃、10℃では 30 日目まで培養日数を延長したところ、全ての供試菌株において発育が認められた。

#### 3. コロニー形態の観察

観察されたコロニーを図 2-1-3 A~C に示す。3 日目にはすべての供試菌株にお

いてコロニー形成が観察された。26株のハギ類由来株は、5日目には大多数がR型のコロニーを形成し、僅かにS型のコロニーが観察されたのでR/(S)型と判定され、その後もコロニーの形態は変化しなかった。*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>は5日目にはほとんどがスムーズ型コロニーを形成していたが、7日目を過ぎると徐々にラフ型コロニーへの移行が観察された(S/R型)。また、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup>は観察日数を通じてスムーズ型コロニーを形成し、コロニー形態の変化は認めなかった(S型)。

#### 4. 色素産生と光発色性試験

供試したすべての菌株は、暗所培養で白色～クリーム色のコロニーを呈し、光照射後の変化は認められなかった。

#### 5. PNB(パラニトロ安息香酸)培地発育能

供試したすべての菌株は、PNB培地上で良好に発育した。

#### 6. 硝酸塩還元試験

供試したすべての菌株は、硝酸塩還元試験に対して陰性を示した。

#### 7. カタラーゼ試験

供試したすべての菌株で発泡が認められたが、いずれも45mm以下であった。このことから供試菌株は低カタラーゼ産生菌であると判断された。

#### 8. 耐熱性(68℃)カタラーゼ試験

7分離菌株および*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>はチューブの底部より発泡を生じ耐熱性カタラーゼ産生性を示した。一方、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup>において

発泡は認められなかった。

#### 9. アリルスルファターゼ試験(Wayne 3 日法)

供試したすべての菌株は、アリルスルファターゼ試験に陰性を示した。

#### 10. ウレアーゼ試験

供試したすべての菌株は、ウレアーゼ試験に陽性を示した。

#### 11. ピクリン酸培地発育能試験

7 分離菌株および *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> は、ピクリン酸培地では発育不能であった。しかしながら、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> はピクリン酸培地上で良好な発育を示した。

#### 12. 鉄取り込み能試験

供試したすべての菌株は、一部で褐色の色調を呈するコロニーを生じるとともに周囲の培地を緑色から褐色へと変化させた。このことから、全ての菌株の鉄取り込み能は中間型を示すと判断した。また、本試験では分離菌株、*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> の間でコロニー性状に顕著な違いが認められた(図 2-1-4 D~F)。

#### 13. 5%食塩耐性試験

7 分離菌株は 5%食塩に対して感受性を示し、2 週間の観察ではコロニー数は 50 個に満たなかった。しかしながら、*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> は 5%食塩添加培地中においても 50 以上のコロニー数を生じていた。また、コロニーの大きさも分離菌株と比較すると大きいことが観察された。

#### 14. Tween80 水解試験

Tween80 水解試験ではすべての供試菌株が 5 日目、10 日目の観察においても陰性の結果を示した。

以上の生物学的および生化学性状試験結果を表 2-1-2 にまとめた。

供試した全てのハギ類由来菌株は同様のコロニー形態と生化学的性状を有することが明らかとなった。このことからハギ類由来分離菌株は同一種である可能性が示唆された。また、これらは非色素産生性の迅速発育菌であることから RunyonIV 群菌であることが示された。至適発育温度試験では、供試しハギ類由来菌株と *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> は 30℃で最も良好に発育したのに対し、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> の至適発育温度は 25℃とやや低かった。

コロニー性状においては、ハギ類由来菌株は培養直後から強い R 型を示し、その中に僅かながら S 型コロニーを生じていた。それに対し、*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> は、培養後 3~5 日目は S 型コロニーを生じていたが、培養日数が長くなるにつれて S 型から R 型への変化が認められた。*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> に関しては培養日数が経過しても S 型コロニーを維持していた。ハギ類由来菌株が示す R 型の特性は、ZN 染色では強い凝集性として認められた。

コロニーの発育速度の結果からハギ類由来菌株は光発色性も色素産生性も持たない迅速発育抗酸菌(Runyon IV)に分類された。

*M.salmoniphilum* は、これまでにマスノスケ(*Oncorhynchus tshawytscha*)、大西洋サケ(*Salmo salar*)やニジマス(*Oncorhynchus mykiss*)、大西洋ダラ(*Gadus morhua*)などの低水温性の魚類に対して病原性を示すことが知られている(Dalsgaard *et al.*, 1992; Ross, 1960; Zerihun *et al.*, 2011)。Zerihun *et al.*,(2011) によれば、大西洋サケでの発症例では飼育温度が 5~11℃と低いにもかかわらず感染が成立する。このこ

とから、病原菌の至適温度と宿主の生活水温は密接に関連していることが示唆されている。

一方でハギ類の大量死は水温が 25℃を上回る高水温期である。本試験で、原因菌の至適発育温度が 30℃であることが明らかとなったことから、夏の高水温期が病原菌に対して有利に働いたことが伺える。このことは高水温が本症発生のリスクファクターとなり得ることを示唆した。また、耐熱性(68℃)カタラーゼ試験、ピクリン酸培地発育能試験および 5%食塩耐性試験、鉄取り込み試験はハギ類由来菌株と近縁種である *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> との鑑別に有効であることが示された。

なお、ハギ類由来菌株は同一の生物学および生化学的性状を呈したことから、同一菌種である可能性が示唆され、供試した標準菌株の中では *M.chelonae* に最も近いと判断された。

表 2-1-1. ハギ類病魚由来供試菌株

分離個体	分離魚種	菌株番号	分離日	分離部位	分離場所	天然/養殖
#1	カワハギ	NJB 0901 (MF47) JCM31611=KCTC39843	2009/6/15	腎臓	愛媛県宇和島市	養殖(天然種苗)
#2	カワハギ	NJB 0902 (MF48)	2009/7/8	腎臓	愛媛県宇和島市	養殖(天然種苗)
#3	カワハギ	NJB 1001 (MF51)	2010/6/19	白色結節	愛媛県宇和島市	養殖(天然種苗)
#3	カワハギ	NJB 1002 (MF52)	2010/6/19	白色結節	愛媛県宇和島市	養殖(天然種苗)
#4	カワハギ	NJB 1003 (MF53)	2010/6/19	白色結節	愛媛県宇和島市	養殖(天然種苗)
#4	カワハギ	NJB 1004 (MF54)	2010/6/19	腎臓	愛媛県宇和島市	養殖(天然種苗)
#5	カワハギ	NJB 1006 (MF56)	2010/6/21	腎臓	愛媛県宇和島市	養殖(天然種苗)
#6	カワハギ	NJB 1007 (MF57)	2010/6/21	白色結節	愛媛県宇和島市	養殖(天然種苗)
#6	カワハギ	NJB 1008 (MF58)	2010/6/21	腎臓	愛媛県宇和島市	養殖(天然種苗)
#7	カワハギ	NJB 1009 (MF59)	2010/6/29	腎臓	愛媛県宇和島市	養殖(天然種苗)
#8	カワハギ	NJB 1010 (MF60)	2010/6/29	腎臓	愛媛県宇和島市	養殖(天然種苗)
#9	カワハギ	NJB 1011 (MF61)	2010/8/6	白色結節	愛媛県宇和島市	養殖(天然種苗)
#10	カワハギ	NJB 1012 (MF62)	2010/8/6	白色結節	愛媛県宇和島市	養殖(天然種苗)
#11	カワハギ	NJB 1013 (MF63)	2010/8/6	白色結節	愛媛県宇和島市	養殖(天然種苗)
#12	カワハギ	NJB 1014 (MF64)	2010/8/6	白色結節	愛媛県宇和島市	養殖(天然種苗)
#13	カワハギ	NJB 1015 (MF65)	2010/8/6	白色結節	愛媛県宇和島市	養殖(天然種苗)
#14	カワハギ	NJB 1016 (MF66)	2010/8/6	白色結節	愛媛県宇和島市	養殖(天然種苗)
#15	カワハギ	NJB 1017 (MF67)	2010/8/6	白色結節	愛媛県宇和島市	養殖(天然種苗)
#16	カワハギ	NJB 1018 (MF68)	2010/8/6	卵巣	愛媛県宇和島市	養殖(天然種苗)
#17	カワハギ	NJB 1019 (MF69)	2010/8/6	白色結節	愛媛県宇和島市	養殖(天然種苗)
#18	カワハギ	NJB 1020 (MF70)	2010/8/25	白色結節	愛媛県宇和島市	養殖(天然種苗)
#19	カワハギ	NJB1101 (NFUMC11)	2011/7/21	白色結節	高知県宿毛市	養殖(天然種苗)
#20	カワハギ	NJB1201(Ns 11sousui68)	2012/2/17	白色結節	長崎県平戸市	養殖
#21	カワハギ	NJB1202(Ns 12sousuiL-3)	2012/7/4	白色結節	長崎県平戸市	天然
#22	ウマヅラハギ	NJB1301	2013/8/	腎臓	愛媛県八幡浜市	養殖(人工種苗)
#23	ウマヅラハギ	NJB1302	2013/8/	腎臓	愛媛県八幡浜市	養殖(人工種苗)



表 2-1-2. 供試菌株に対する生化学性状試験結果

	NJB 0901 (MF47) JCM31611= KCTC39843	NJB 0902 (MF48)	NJB 1001 (MF51)	NJB 1002 (MF52)	NJB 1003 (MF53)	NJB 1004 (MF54)	NJB 1006 (MF56)	NJB 1007 (MF57)	NJB 1008 (MF58)	NJB 1009 (MF59)	NJB 1010 (MF60)
30℃における7日以内での培養の有無	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
発育可能温度											
4℃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10℃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37℃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40℃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
コロニー性状	R(S)	R(S)	R(S)	R(S)	R(S)	R(S)	R(S)	R(S)	R(S)	R(S)	R(S)
色素産生および光発色性	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PNB培地発育試験	+	N.E.	+	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
硝酸塩還元試験	-	N.E.	-	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
カタラーゼ試験	<45mm	N.E.	<45mm	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
耐熱性(68℃)カタラーゼ試験	+	N.E.	+	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
アリスルファターゼ(Wayne3日法)	-	N.E.	-	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
ウレアーゼ試験	+	N.E.	+	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
ピクリン酸培地発育能試験	-	N.E.	-	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
鉄取り込み能試験	±	N.E.	±	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
5%食塩耐性試験	-	N.E.	-	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
Tween80水解試験(5.10日)	-/-	N.E.	-/-	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.

	NJB 1011 (MF61)	NJB 1012 (MF62)	NJB 1013 (MF63)	NJB 1014 (MF64)	NJB 1015 (MF65)	NJB 1016 (MF66)	NJB 1017 (MF67)	NJB 1018 (MF68)	NJB 1019 (MF69)	NJB 1020 (MF70)
30℃における7日以内での培養の有無	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
発育可能温度										
4℃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10℃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37℃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40℃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
コロニー性状	R(S)	R(S)	R(S)	R(S)	R(S)	R(S)	R(S)	R(S)	R(S)	R(S)
色素産生および光発色性	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PNB培地発育試験	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
硝酸塩還元試験	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
カタラーゼ試験	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
耐熱性(68℃)カタラーゼ試験	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
アリスルファターゼ(Wayne3日法)	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
ウレアーゼ試験	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
ピクリン酸培地発育能試験	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
鉄取り込み能試験	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
5%食塩耐性試験	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
Tween80水解試験(5.10日)	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.

	NJB1101 (NFUMC11)	NJB1201 (Ns11sousui68)	NJB1202 (Ns12sousuiL-3)	NJB1301	NJB1302	<i>M.chelonae</i> JCM6388 <sup>T</sup>	<i>M.salmoniphilum</i> ATCC13758 <sup>T</sup>
30℃における7日以内での培養の有無	+	+	+	+	+	+	+
発育可能温度							
4℃	-	-	-	-	-	-	-
10℃	-	-	-	-	-	-	-
15℃	+	+	+	+	+	+	+
20℃	+	+	+	+	+	+	+
25℃	+	+	+	+	+	+	+
30℃	+	+	+	+	+	+	+
35℃	+	+	+	+	+	+	+
37℃	-	-	-	-	-	-	-
40℃	-	-	-	-	-	-	-
コロニー性状	R(S)	R(S)	R(S)	R(S)	R(S)	S/R	S
色素産生および光発色性	-	-	-	-	-	-	-
PNB培地発育試験	+	+	+	+	+	+	+
硝酸塩還元試験	-	-	-	-	-	-	-
カタラーゼ試験	<45mm	<45mm	<45mm	<45mm	<45mm	<45mm	<45mm
耐熱性(68℃)カタラーゼ試験	+	+	+	+	+	+	+
アリスルファターゼ(Wayne3日法)	-	-	-	-	-	-	-
ウレアーゼ試験	+	+	+	+	+	+	+
ピクリン酸培地発育能試験	-	-	-	-	-	-	+
鉄取り込み能試験	±	±	±	±	±	±	±
5%食塩耐性試験	-	-	-	-	-	+	-
Tween80水解試験(5.10日)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

N.E; Not Examined



「国土地理院」 (<http://maps.gsi.go.jp/development/ichiran.html>)

図 2-1-1. 供試菌株の分離場所の地理的位置

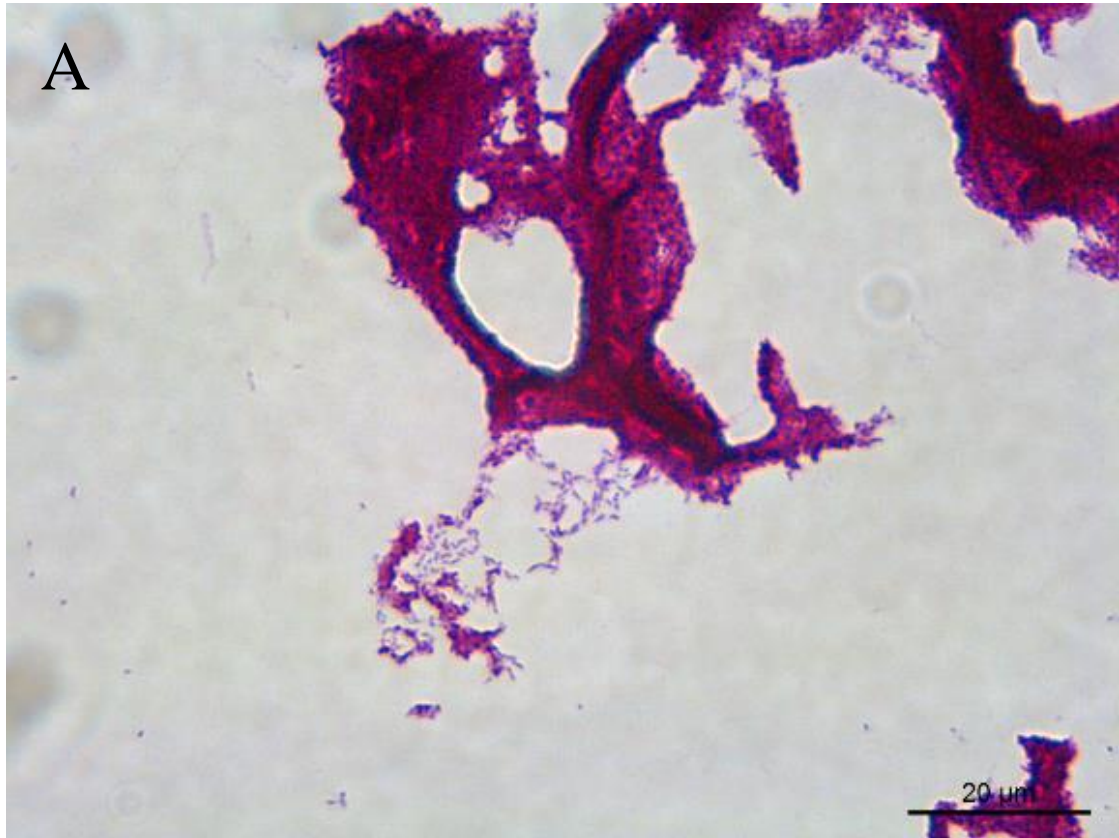


図 2-1-2. ZN 染色による形態観察

A, NJB0901; ZN 陽性を示し、強い凝集性を認める。

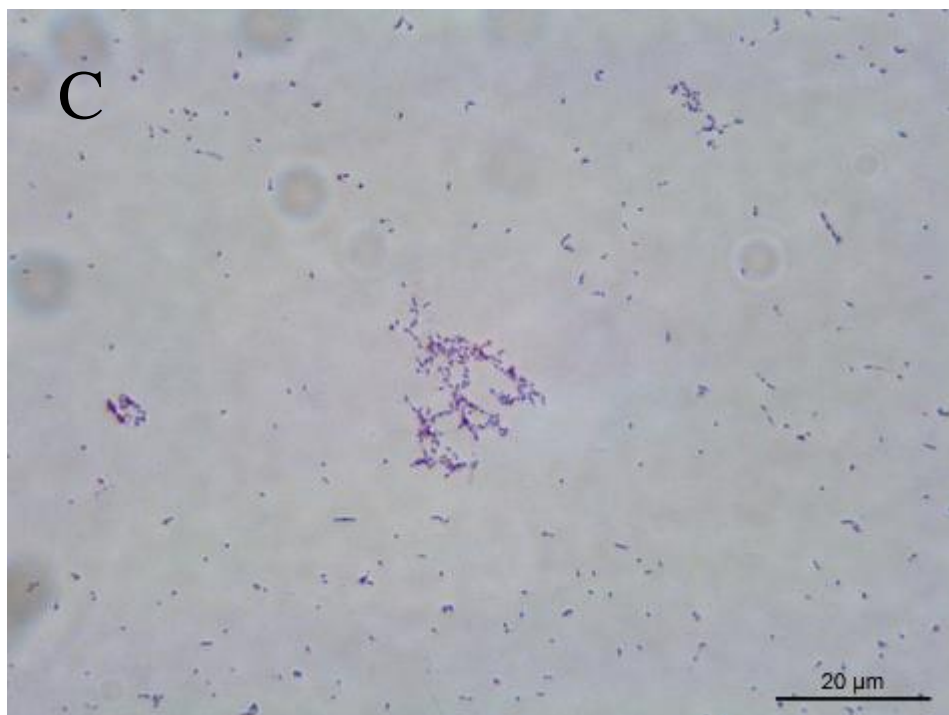
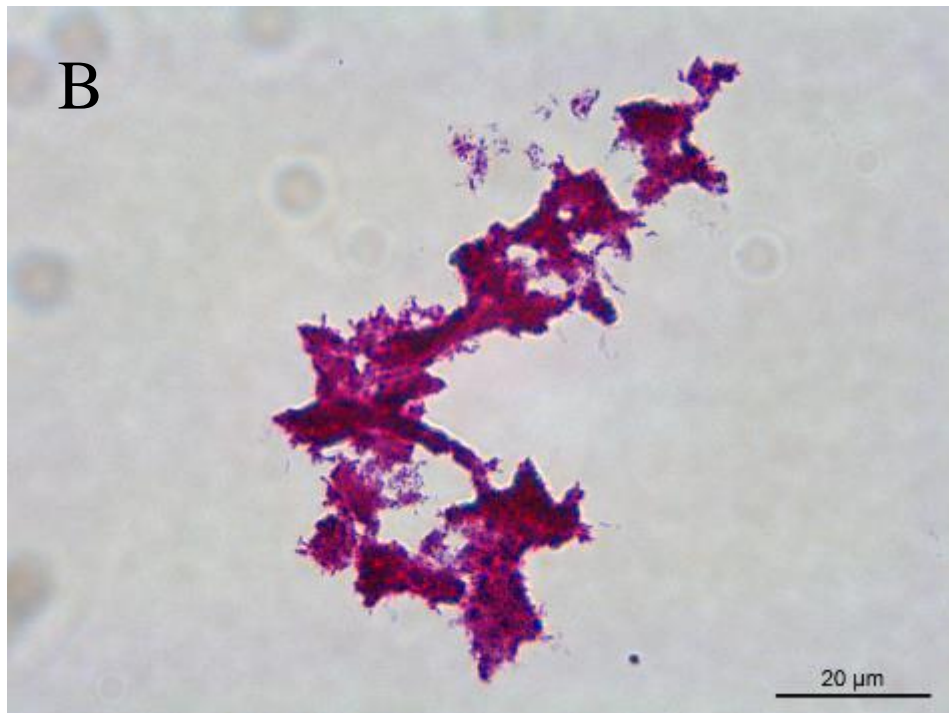


図 2-1-2. ZN 染色による形態観察 (cont.)

B, *M. chelonae* JCM6388<sup>T</sup>; ZN 陽性を示し、NJB0901 と同様に強い凝集性を認める。

C, *M. salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup>; ZN 陽性を示すが凝集性はほとんどない。

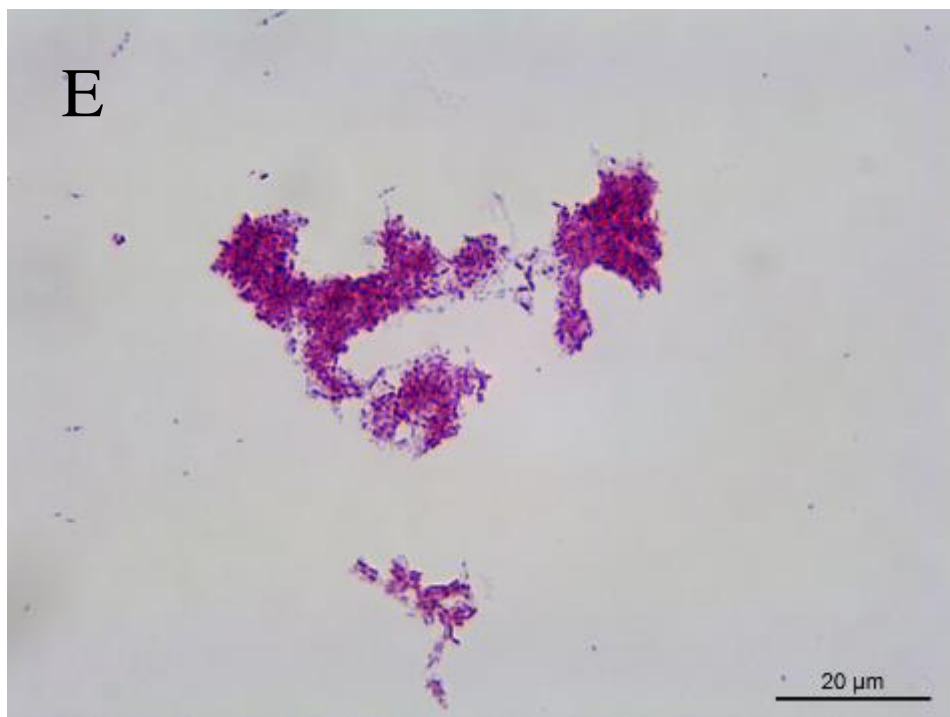
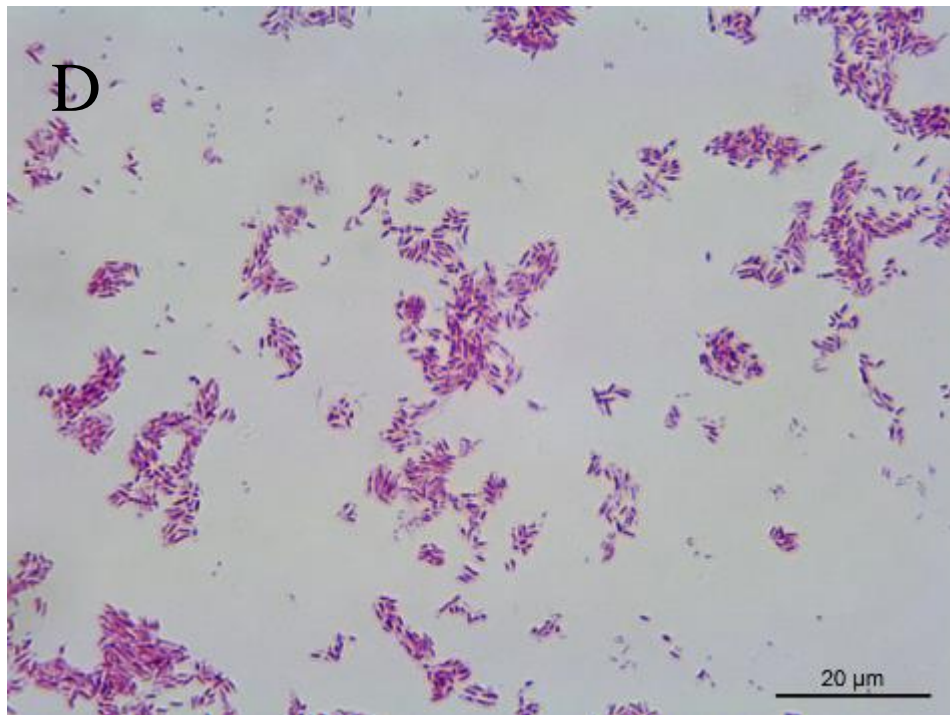


図 2-1-2. ZN 染色による形態観察 (cont.)

D; *M. marinum* JCM17638<sup>T</sup>, NJB0901 に対しやや大型の長桿菌の形態を示す。

E; *M. pseudoshottsii* JCM15466<sup>T</sup>, NJB0901 に対しやや大型で、長桿菌の形態を示す。



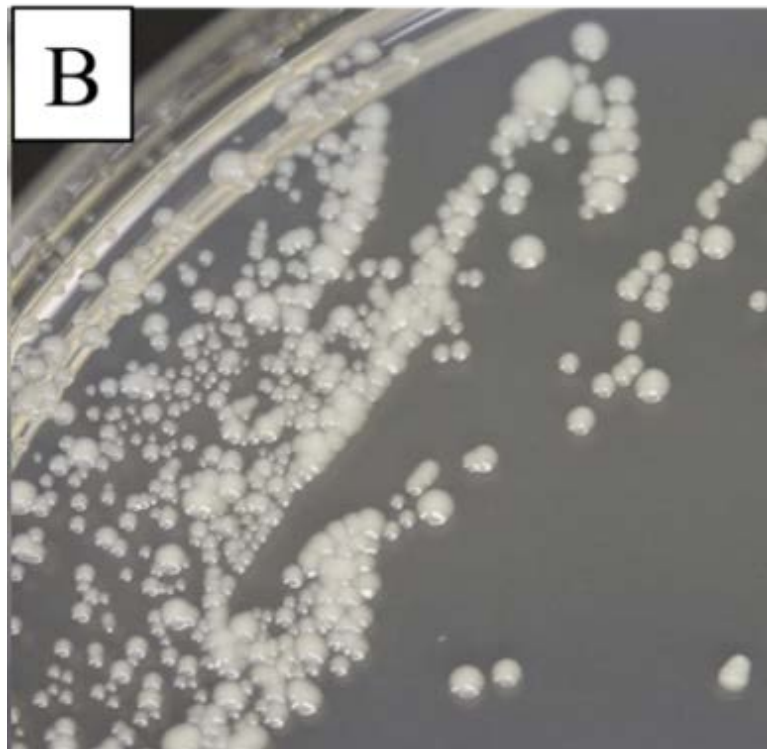
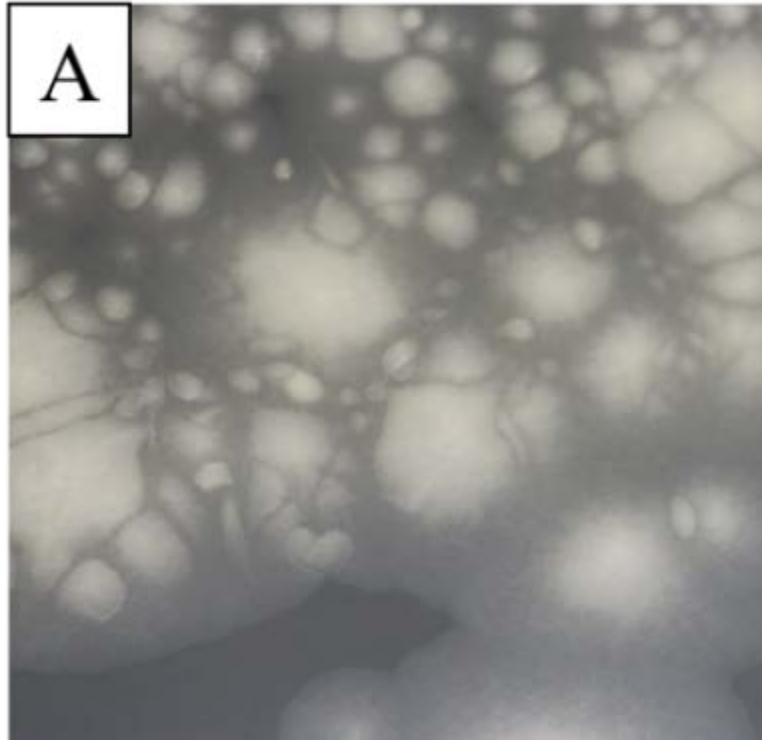


図 2-1-3. Middlebrook7H11 上に形成したコロニーの形態的特徴

A; NJB0901, 強い Rough 型を示す大小不同のコロニーを生じている。

B; *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>, 白色 Smooth 型のコロニーを生じている。

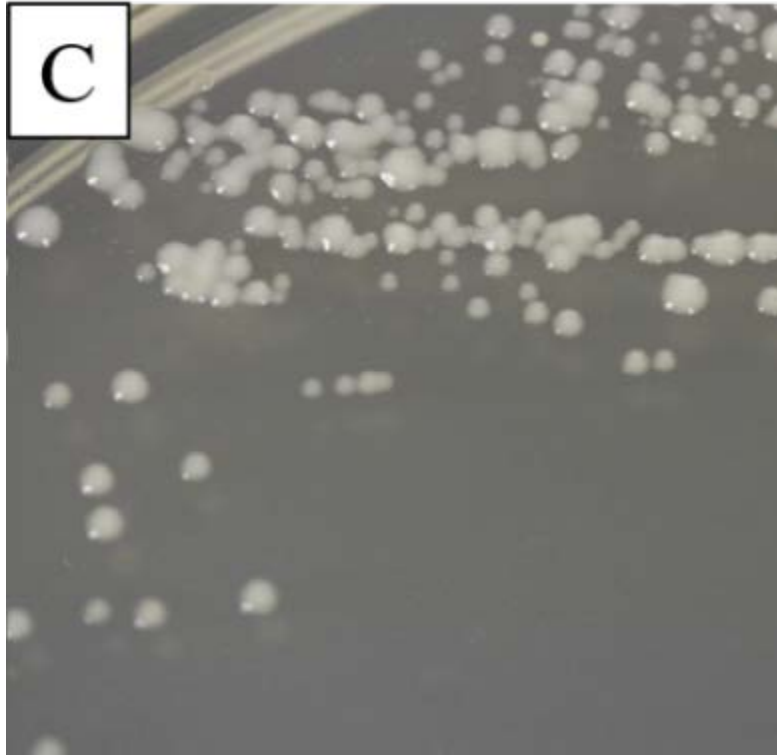


図 2-1-3. Middlebrook7H11 上に形成したコロニーの形態的特徴 (cont.)

C; *M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup>, 白色 Smooth 型のコロニーを生じている。

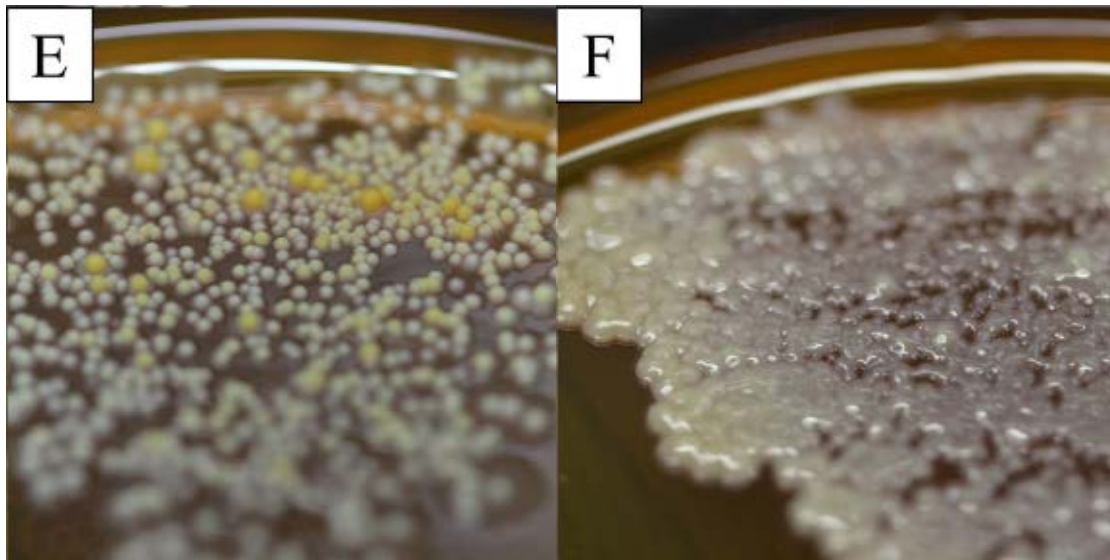


図 2-1-4. 鉄取り込み試験で認められた形態的特徴

D; NJB0901, ほとんどのコロニーは白色を保っているが僅かな数のコロニーは黄色へと変化している。また、周囲の培地は褐色へと変化している。

E; *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>, 少数のコロニーが黄色へと変化しており周囲の培地は褐色へと変化している。

F; *M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup>, コロニーが糊状に変化し、それらの辺縁は淡黄色に変化している。また、周囲の培地は褐色へと変化している



## 第 2 節 薬剤感受性試験

本疾病はハギ類の養殖産業に多大な影響を与え得るが、養殖ハギ類に対しては使用可能な水産用医薬品の種類、およびそれらの適応感染症は限られており、現時点で養殖ハギ類の NTM 症に適用可能な水産用医薬品は存在しない(農林水産省 消費・安全局 畜水産安全管理課, 2016)。そこで、将来的に養殖ハギ類の NTM 症に適用可能な抗生物質ないし抗菌剤を検討することは有用であろうと思われる。また、ハギ類由来菌株の抗菌性薬剤に対する感受性の違いを、近縁種と考えられる標準菌株のそれと比較検討することは、各菌種の生物学的特徴を検討する上で有用な手法であると考えられる。このことから、本節では現在水産用医薬品として認可されている 7 薬剤、およびヒトの抗酸菌治療に使用される 8 薬剤を用いて薬剤感受性試験を実施し、有効な水産用医薬品の検討および各菌株の薬剤感受性の検討を行うことを目的とした。

### 第 1 項 供試菌株

水産用医薬品の検討にはカワハギ由来の 19 菌株(NJB0901~NJB1019)、近縁種である *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmonihphilum* ATCC13758<sup>T</sup> を供試した。

また、ヒト抗酸菌治療に使われる薬剤を使用した検討にはカワハギ、ウマヅラハギ由来の 7 菌株(NJB0901, NJB1001, NFUMC11=NJB1101, Ns11sousui68=NJB1201, Ns12sousuiL-3=NJB1202, NJB1301, NJB1302)および *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmonihphilum* ATCC13758<sup>T</sup> を供試した。

### 第 2 項 試験方法

試験は Clinical and Laboratory Standards Institute (以後 CLSI) が発行する Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes ; Approved Standard - Second Edition に記載されている手法に準拠

し、滅菌した平底 96 ウェルプレートを用いた微量液体希釈法(Micro dilution 法)にて実施した(Clinical & Laboratory Standard Institute, 2011)。希釈培地には Cation Adjusted Mueller Hinton Broth を使用し、7 薬剤、11 段階希釈系列の薬剤プレートを作製した。

供試薬剤は、Kawakami & Kusuda (1989)および Weerakhun *et al.*, (2008)を参照して選択した。2016 年現在水産用医薬品として認可されている 6 薬剤(エリスロマイシン:EM, アンピシリン:ABPC, スルファモノメトキシシン:SMMX,チアンフェニコール:TP,リンコマイシン:LCM,オキシテトラサイクリン:OTC)にクロラムフェニコール(CP)を加えた 7 薬剤および、ヒトの抗酸菌治療に使用される 7 薬剤(クラリスロマイシン:CAM,リファンピシン:RFP,ストレプトマイシン:SM,カナマイシン:KM,アミカシン:AMK,ドキシサイクリン:DOXY,シプロフロキサシン:CPFX)を使用し、それぞれの薬剤の終濃度を、水産用医薬品 7 薬剤は 0.25~256 $\mu$ g/mL(Kawakami & Kusuda, 1989; Weerakhun *et al.*, 2008)、ヒト治療用医薬品 7 薬剤は 0.125 ~ 128 $\mu$ g/mL(Clinical & Laboratory Standard Institute, 2011)になるよう段階希釈を行った。希釈した各薬剤は 100 $\mu$ L ずつ各ウェルに分注した。

各薬剤を分注したウェルに、第 1 節で述べたのと同様の手法で作成し 630nm 吸光度で 0.08~0.10 に濃度調整した菌液を Cation adjusted Muller Hinton Broth (Muller Hinton II Broth)にて 100 倍に希釈し、各ウェルに 100 $\mu$ L ずつ接種した。接種した 96 ウェルプレートは滅菌したプレートシールで密閉し、一定期間培養を行った。

観察日数は CLSI のガイドラインに基づいて実施し、ハギ類由来 19 菌株、*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup>は対照区のウェル内の供試菌株の発育を確認しながら水産用医薬品については 25 $^{\circ}$ C、ヒトの抗酸菌治療薬については 30 $^{\circ}$ Cにて 3~5 日間培養し判定を行ない、それぞれの最小発育阻止濃度(MIC)を決定した。ヒト治療用医薬品 7 薬剤に関して、感受性および耐性の判定は CLSI (2011)の判定基準に従った。

### 第3項 結果

水産用医薬品に対して実施した薬剤感受性試験結果を表 2-2-1 に示す。同一供試薬剤に対するカワハギ由来 19 菌株の感受性の差異をみると、そのほとんどが希釈段階で 1~2 段階内であり、同一供試薬剤に対する感受性に顕著な差は認められなかった。これら 19 菌株は ABPC および SMMX に対して殊に高い MIC (64~256  $\mu$ g/mL ないし >256  $\mu$ g/mL) を示し、その他の供試薬剤 (EM, TP, LCM, OTC, CP) に対しても高い MIC を示した。ブリ (*Seriola quinqueradiata*) 由来の *Mycobacterium* sp. に対する各種抗菌性薬剤の MIC を測定した結果 (川上・楠田, 1989) と比較すると、カワハギ由来 19 菌株の EM、ABPC、LCM、OTC および CP に対する MIC は顕著に高く、ブリ由来 *M. marinum* に対する MIC (Weerakhun *et al.*, 2008) と比較すると、カワハギ由来菌株の MIC は EM では低かったが SMMX と同じサルファ剤のスルファメトキシゾールに対する MIC は高い値を示した (Kawakami & Kusuda, 1989; Weerakhun *et al.*, 2008)。 *M. chelonae* JCM6388<sup>T</sup> は ABPC および SMMX に対して、また *M. salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> は ABPC、TP、CP および OTC に対して殊に高い MIC 値 (>256  $\mu$ g/mL) を示し、EM および LCM を除いた供試薬剤に対しても比較的高い MIC 値 (32~256  $\mu$ g/mL) を示した。

ヒトに対する抗酸菌治療薬を使用して実施した薬剤感受性試験結果を表 2-2-2 に示す。供試したハギ類由来菌株 7 菌株はそれぞれ同一の供試薬剤に対し、同様の感受性を示した。特に CAM、DOXY および CPFYX に対しては高い感受性を示していた。

一方で、近縁種である *M. chelonae* JCM6388<sup>T</sup> と *M. salmoniphilum* ATCC13748<sup>T</sup> は DOXY に対しては強い耐性を示していた。また、ハギ類由来株と *M. chelonae* JCM6388<sup>T</sup> は SM に対して  $\geq 128\mu\text{g/mL}$  と強い耐性を示していたが、*M. salmoniphilum* ATCC13748<sup>T</sup> は 16 $\mu\text{g/mL}$  で発育阻止が認められた。

水産用医薬品に対する薬剤感受性試験の結果から、本試験で使用した 7 薬剤の中では EM が比較的低い MIC を示したが、残りの 6 薬剤にはハギ類由来分離菌株に対する有効性を見出せなかった。

ヒトの抗酸菌治療薬を使用した薬剤感受性試験では、*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> と *M.salmoniphilum* ATCC13748<sup>T</sup> は DOXY に対して耐性を示していたが、ハギ類由来菌株は  $\leq 1\mu\text{g/mL}$  と低い MIC を示していた。また、ハギ類由来株と *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> はストレプトマイシンに対して  $\geq 128\mu\text{g/mL}$  と強い耐性を示していたが、ストレプトマイシンに対する *M.salmoniphilum* ATCC13748<sup>T</sup> の MIC は  $16\mu\text{g/mL}$  であった。

CLSI が定めるドキシサイクリンに関する最小発育阻止濃度の解釈基準は  $\leq 1\mu\text{g/mL}$  が感受性 (Susceptible)、 $2\sim 4\mu\text{g/mL}$  が中間型 (Intermediate)、 $\geq 8\mu\text{g/mL}$  が耐性 (Resistant) であることから、ハギ類由来株は DOXY に対して感受性を示すことが明らかとなった。

現在、水産用医薬品の中で塩酸ドキシサイクリンはスズキ目魚類のレンサ球菌症に対してのみ経口投与が認められている (農林水産省 消費・安全局 畜水産安全管理課, 2016)。今後、DOXY の養殖ハギ類に対する毒性、魚体内での代謝速度、躯幹筋および内臓における残留性を検討する必要がある。また、DOXY の感作によってハギ類由来菌株が耐性能を獲得する可能性が得るか否か等、慎重な検討が必要であると考えられる。

表 2-2-1. 水産用医薬品に対する薬剤感受性試験の結果

Strains	EM	ABPC	SMMX	TP	CP	LCM	OTC
NJB0901	16	>256	128~256	32	128~256	16~32	8~32
NJB0902	16	>256	>256	32~128	64~256	16~32	16~32
NJB1001	4~16	>256	>256	32	64~256	16~128	8~16
NJB1002	4~16	>256	>256	32	128~256	16~128	16~32
NJB1003	16	>256	>256	64~256	128~256	>256	16~256
NJB1004	16~32	>256	256	32	128	16~32	16
NJB1007	16	>256	64~256	32~64	128	16~32	16
NJB1008	16	>256	>256	32	64~128	16~32	16
NJB1009	8~16	>256	128	32~64	64	16~32	16
NJB1010	16	>256	256	32	256	32	16~32
NJB1011	16	>256	256	32~128	64~128	16~32	16~32
NJB1012	16	>256	>256	32	64~256	16~64	16~32
NJB1013	16~32	>256	>256	32	128	16~32	16
NJB1014	8~16	>256	256	16~64	128~256	16~64	16~32
NJB1015	16	>256	>256	32	128~256	32	16~32
NJB1016	16~32	>256	>256	32~64	128~256	16~64	16~32
NJB1017	16	>256	128~256	32~64	128~256	16~32	16
NJB1018	16	>256	>256	64	128~256	16~64	16~32
NJB1019	32	>256	>256	32~128	128~256	16~64	16~32
<i>M. chelonae</i> JCM6388 <sup>T</sup>	2~128	>256	>256	32~64	16~32	8~16	64~128
<i>M. salmoniphilum</i> ATCC13758 <sup>T</sup>	4~8	>256	32~256	>256	>256	16~64	>256

単位:µg/mL

表 2-2-2. 抗酸菌治療薬に対する薬剤感受性試験結果

Antibiotic drugs	MIC( $\mu\text{g/ml}$ )								
	Strains								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Clarithromycin	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$	2
Rifampicin	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32
Streptomycin	128	>128	>128	128	>128	128	>128	128	16
Kanamycin	16	16	16	16	32	16	8	16	32
Amikacin	16	32	16	16	16	32	32	16	16
Doxycycline	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	8	>128
Ciprofloxacin	1	1	0.5	1	0.5	0.5	1	$\leq 0.25$	1

1, NJB0901<sup>T</sup>; 2, NJB1001; 3, NJB1101(NFUMC11); 4, NJB1201 (Ns11sousui68); 5, NJB1202 (Ns12sousuiL-3); 6, NJB1301; 7, NJB1302; 8, *Mycobacterium chelonae* JCM 6388<sup>T</sup>; 9, *Mycobacterium salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup>.

### 第3節 小括

カワハギ由来菌株は ZN 染色で抗酸性を示し、強い凝集性が観察された。また、26 株のハギ類由来株のコロニーは、すべて R(S)型と判定され、その後もコロニーの形態は変化しなかった。

7 日間の培養の結果、供試した 26 株のハギ類由来菌株は 15~35℃の間で発育が見られ、30℃で最も良好な発育が認められた。また、近縁種である可能性が示唆される *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> もハギ類由来菌株と同様に 30℃で最も良好な発育が認められたが、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> は 25℃で最も良好に発育した。

26 株のハギ類由来菌株はいずれも、7 日以内にコロニーを生じ、光発色性を持たない Runyon IV 群の菌種であることが明らかとなった。

PNB 培地発育試験、硝酸塩還元試験、カタラーゼ試験、耐熱性(68℃)カタラーゼ試験、アリルスファターゼ(Wayne 3 日法)、ウレアーゼ試験、ピクリン酸培地発育能試験、鉄取り込み能試験、5%食塩耐性試験、Tween80 水解試験(5,10 日)の試験結果は供試したハギ類由来菌株は全く同一であった。また、ピクリン酸培地発育能試験、5%食塩耐性試験、鉄取り込み試験はハギ類由来菌株と *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> との鑑別に有効であることが示された。

ハギ類由来菌株は同一の生物学的および生化学的性状を呈したことから、同一菌種である可能性が示唆され、供試した標準菌株の中では *M.chelonae* に最も近いと判断された。

水産用医薬品に対する薬剤感受性試験の結果から、本試験で使用した 7 薬剤の中では EM が比較的低い MIC を示したが、残りの 6 薬剤にはハギ類由来分離菌株に対する有効性を見出せなかった。

ヒトの抗酸菌治療薬を使用した薬剤感受性試験では、*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> と *M.salmoniphilum* ATCC13748<sup>T</sup> は DOXY に対して耐性を示していたが、ハギ類由来菌株は  $\leq 1\mu\text{g/mL}$  と低い MIC を示していた。

CLSIが定めるドキシサイクリンに関する最小発育阻止濃度の解釈基準は $\leq 1\mu\text{g/mL}$ が感受性(Susceptible)、 $2\sim 4\mu\text{g/mL}$ が中間型(Intermediate)、 $\geq 8\mu\text{g/mL}$ が耐性(Resistant)であることから、ハギ類由来株は DOXY に対して感受性を示すことが明らかとなった。

現在、水産用医薬品の中で塩酸ドキシサイクリンはスズキ目魚類のレンサ球菌症に対してのみ経口投与が認められている(農林水産省 消費・安全局 畜水産安全管理課, 2016)。今後、DOXY の養殖ハギ類に対する毒性、魚体内での代謝速度、躯幹筋および内臓における残留性を検討する必要がある。また、DOXY の感作によってハギ類由来菌株が耐性能を獲得する可能性が得るか否か等、慎重な検討が必要であると考えられる。



### 第3章 人為感染試験による疫学的検討

カワハギ由来菌株 NJB0901 のカワハギに対する病原性を検討する目的で、健常カワハギの腹腔内に供試菌を接種した結果、菌液接種後2日目に死亡する個体が認められ、試験終了時には累積死亡率は95%に至った。肉眼的に、死亡魚の消化管漿膜面上には白色結節が観察され(図 3-1-1)、それらは病理組織学的に、ZN 陽性の長桿菌の増殖像を伴い、核の破砕物が散在する大規模な融解壊死部を類上皮細胞が複数層にわたって取り囲む肉芽腫性病変であった。これら肉芽腫性病変の周囲を被包する結合織は非常に乏しかった(図 3-1-2)。すなわち、感染により生じた白色結節は内部が膿瘍状を呈する類上皮細胞性肉芽腫、すなわち膿瘍形成性肉芽腫(pyogranuloma)であると判断された。これらの病変部からは接種菌と同一性状を示す NTM が分離された。以上の所見はカワハギの自然発生性 NTM 症に類似していたことより、カワハギ由来菌株 NJB0901 はカワハギに対して非常に高い病原性を示すことが明らかとなった(Fukano *et al.*, 2015)。

魚類 NTM 症の感染経路の1つは、感染魚や汚染された餌を経口的に摂取することによると考えられている(Harriff *et al.*, 2007)。細胞内寄生性を有する魚類病原性細菌の一つである *Edwasiela tarda* は腸管や鼻腔を主な侵入経路としており、主病巣は腎臓や肝臓などに限局的に形成されること、および原因菌を用いて浸漬法による人為感染が成立することが知られている(Iida *et al.*, 2016; Miyazaki & Kaige, 1985)。ハギ類由来 NTM も *E. tarda* と同様に細胞内寄生細菌であると考えられ、消化管漿膜面や腸間膜、肝臓を中心に限局的な病変が形成される点も類似している。以上より、カワハギ NTM 症においても消化管粘膜あるいは鼻腔粘膜から病原菌が侵入し、細胞内寄生性により初期感染が成立した後に腹腔内病変が形成されるか否かを検討する目的で、健常カワハギを用いた浸漬および経口接種法による人為感染試験を行った。

2章で述べたように、2013年に初めてウマヅラハギから分離された NTM は、2009年～2012年までカワハギから分離されていた NTM と、その生物学的大体および生化学的

性状が非常に類似していることから、今後の感染魚種あるいは感染地域の拡大が懸念される。そこで、カワハギで流行していた NTM 症が、近縁魚種であるウマヅラハギに波及した可能性を検討するため、カワハギ由来 NTM NJB0901 株がウマヅラハギに対して病原性を示すか否か、人為感染試験によって評価することとした。また、得られた病魚の病理組織学的所見を、上述のカワハギ人為感染 NTM 症のものと比較検討を行った。

本章は、第 1 節ではカワハギを用いた NTM 侵入門戸の検討、第 2 節ではカワハギ由来菌株のウマヅラハギに対する病原性試験と病理組織学的所見の比較検討、第 3 節を小括とした。

## 第 1 節 カワハギを用いた NTM 侵入門戸の検討

### 第 1 項 材料および方法

試験には宮崎県内で生産された人工種苗由来カワハギの 0 才魚(平均体重：2.83g)を供試した。

感染試験は腹腔内接種区、浸漬接種区、経口接種区の 3 区に分け、各区 2 尾ずつを供試した。腹腔内接種区は試験対照区とし、接種菌がカワハギに対し病原性を示すかどうか確認した。なお、各試験区は 30L のガラス水槽とし、通気を施した人工海水中で水温を 25°C に調整した。

供試菌 NJB0901 は 0.05% Tween80 を添加した Middlebrook7H9 液体培地 3mL 中にて 5 日間前培養を行い、ガラスビーズと共にボルテックスすることにより菌塊を分散させた。分散させた対数増殖期の菌液を滅菌生理食塩水に懸濁し接種菌液を作製した(以下調整菌液と呼称)。調整菌液は Middlebrook7H10 寒天培地を使用した 10 倍希釈系列にて菌数測定を実施し、Colony Forming Unit (CFU) を算定した。

浸漬接種区では、調整菌液を用いて一定の菌量( $3.4 \times 10^5$  CFU/mL)に調整した人工海水内に室温で 10 分間浸漬し、感染を試みた。経口接種区では、マウス用ゾンデを胃まで挿入し調整菌液を用いて PBS 中に  $3.4 \times 10^5$  CFU/mL に調整した菌液 50 $\mu$ L を接種した。腹腔内接種区では調整菌液を用いて PBS 中に懸濁した  $3.4 \times 10^5$  CFU/mL の菌液を、25G 注射針を用いて 50 $\mu$ L を腹腔内に接種した。以上の接種を行う際には、供試魚に 250ppm の 2-phenoxyethanol を用いて鎮静を施した。

接種後は 2 日に 1 度、配合飼料の給餌を行い 21 日間飼育した。試験期間中に死亡した個体は剖検を行なったのち、10%リン酸緩衝ホルマリン液にて固定し、s 生残魚は試験最終日に 2-phenoxyethanol の過麻酔により安楽殺処理を行ない、

その後、10%リン酸緩衝ホルマリン液にて固定した。これら固定材料を用いて、浸漬接種区の供試魚に関しては口腔および鼻腔粘膜周囲、体壁、鰓、腹腔内臓器について、経口接種区の供試魚に関しては口腔から咽頭部、胃、腸管、その他腹腔内臓器について、腹腔内接種区の供試魚に関しては腹膜および腹腔内臓器についてそれぞれパラフィン切片を作製しヘマトキシリン・エオジン（以下 H&E）染色および ZN 染色を施したのち、光学顕微鏡観察に供した。

## 第 2 項 結果

腹腔内接種区および経口接種区では 13 日目、14 日目にそれぞれ 1 尾ずつの死亡が認められた。また、浸漬接種区では 13 日目に 1 尾が死亡した。

病理組織学的検査の結果、浸漬による接種区では検査したいずれの組織においても、抗酸菌の増殖像あるいは炎症像などの病理組織学的変化は認められず、感染は成立しなかったと結論付けられた。

また、経口による接種区においても、検査したいずれの組織にも抗酸菌の増殖像や炎症像は認められず、感染は成立しなかったと結論付けられた。

腹腔内接種区の病理組織学的検査では、H&E 染色にて腸間膜や消化管漿膜面上に膿瘍形成性の肉芽腫病変を多数認めた(図 3-1-3)。それらの肉芽腫内には ZN 染色に陽性を示す抗酸菌の増殖像が認められるとともに、単核細胞やそれらの壊死物質、核の破砕物を多量に含んでいた(図 3-1-4,5)。これらの所見はカワハギにおける NTM 症の自然発症例と類似していた。

なお、病理組織学的な病変がないにもかかわらず試験中に死亡した経口接種区の 2 尾と浸漬接種区の 1 尾の死亡原因は、拒食に伴う消瘦であると推察された。

## 第 3 項 考察

カワハギ NTM 症自然発症例では、消化管漿膜面や腸間膜、肝臓を中心に病変

形成が認められるため、鼻腔粘膜上皮および消化管粘膜上皮を侵入門戸として感染が成立する可能性を検討する目的で、腹腔内接種より自然な感染経路を再現しうる接種法と考えられる、浸漬接種および経口接種による人為感染試験を実施したが、どちらの接種法においても感染は成立しなかったと判定された。このことから、本症の発生機序には他に異なる因子が関与している可能性が推測された。

Miyazaki *et al.*,(1992)はウナギにおける *E.tarda* の自然発症病理像の再現に關し、微量の過酸化水素で腸管の絨毛粘膜を傷害し感染門戸を人為的に作成すれば、自然発症時の病理像と同様の結果が得られると述べている。ハギ類は貝類や甲殻類などの硬い餌を歯板で破碎し摂餌する習性がある。これらの食性は消化管粘膜に物理的な傷害を与える可能性があり、侵入門戸を作るきっかけになる可能性が考えられた。

また、Peterson *et al.*, (2013)によれば、自由生活性のアメーバ(*Paramecium caudatum*)に貪食させた *M.chelonae* や *M.marinum* を経口的にゼブラフィッシュ (*Danio rerio*)に接種すると感染率が上昇することを示している。

これらの知見は、カワハギ NTM 症病理発生には、病原体が魚体内に侵入するための補助的要因が存在する可能性を示唆するものと考えられる。それらが粘膜面の機械的損傷なのか、あるいは他の微生物の介在であるのかは今後の検討課題であろう。

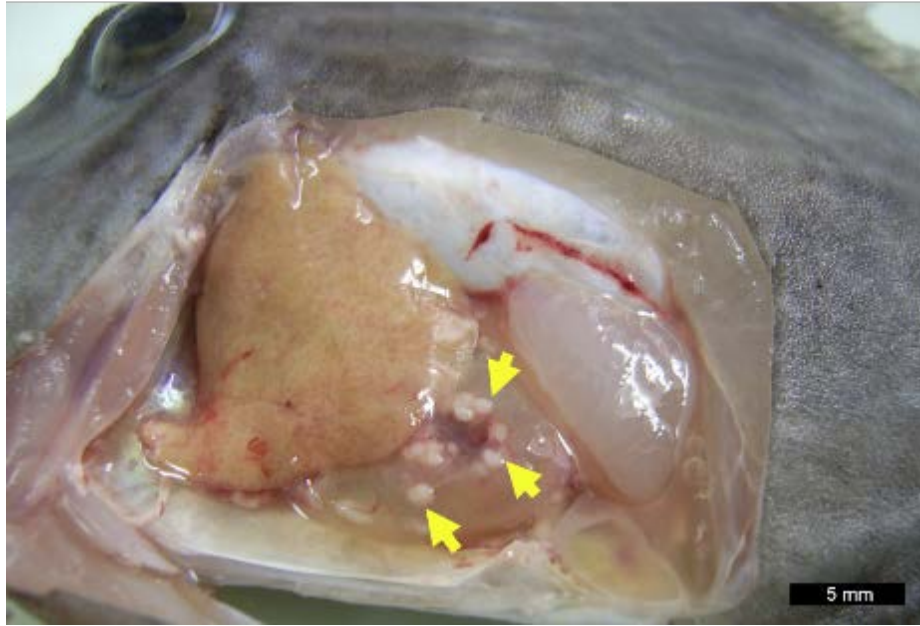


図 3-1-1. 菌液接種後 7 日目のカワハギ腹腔内に形成された白色結節(矢印)。

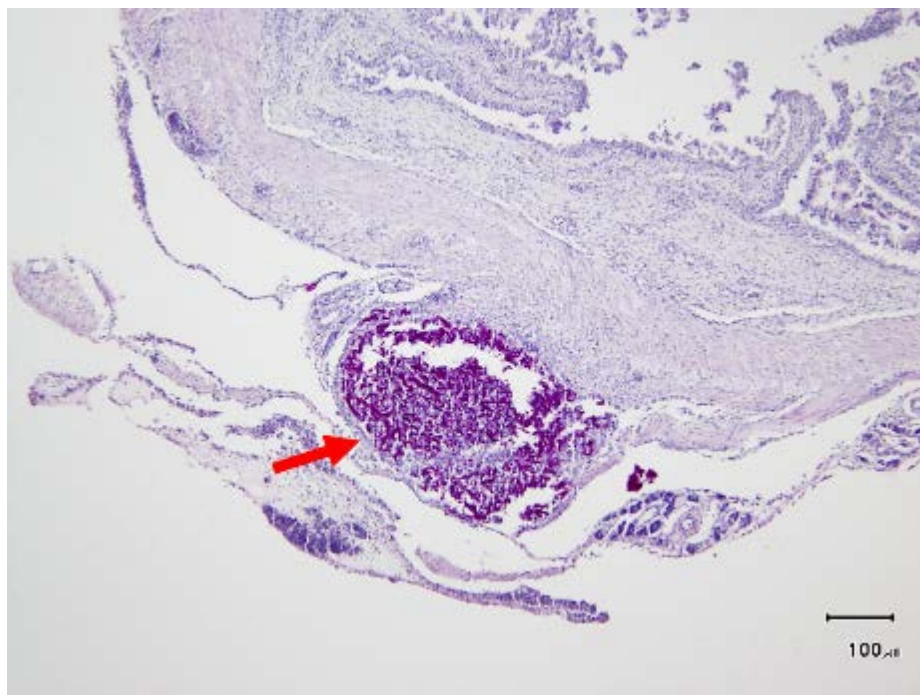


図 3-1-2. 腸管漿膜上に形成された膿瘍形成性肉芽腫の ZN 染色像。肉芽腫内部には ZN に陽性を示す抗酸菌の顕著な増殖像が認められる(矢印)。

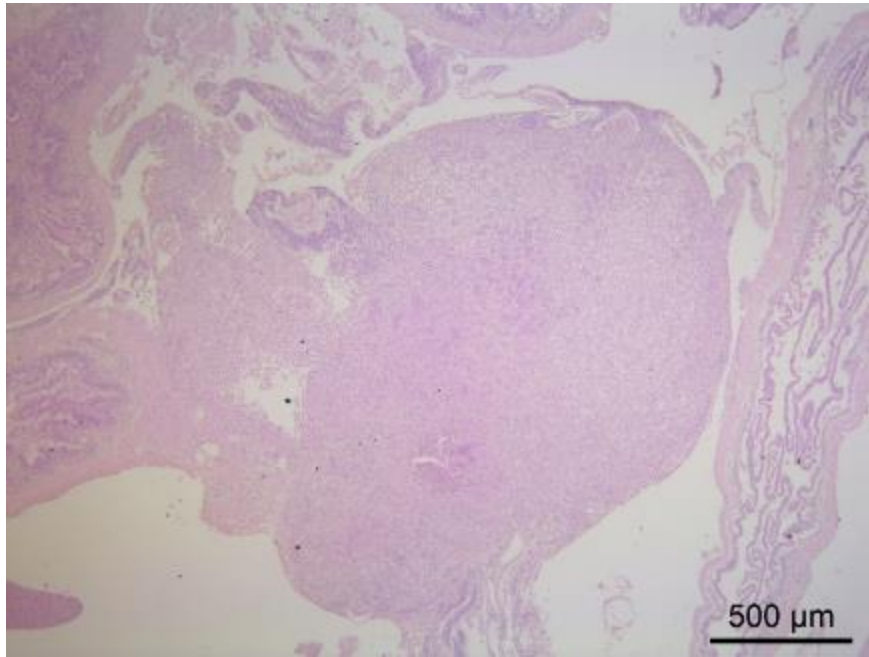


図 3-1-3. 腹腔内接種区の病魚の腸間膜に形成された大型の膿瘍性肉芽腫(H&E 低倍)。

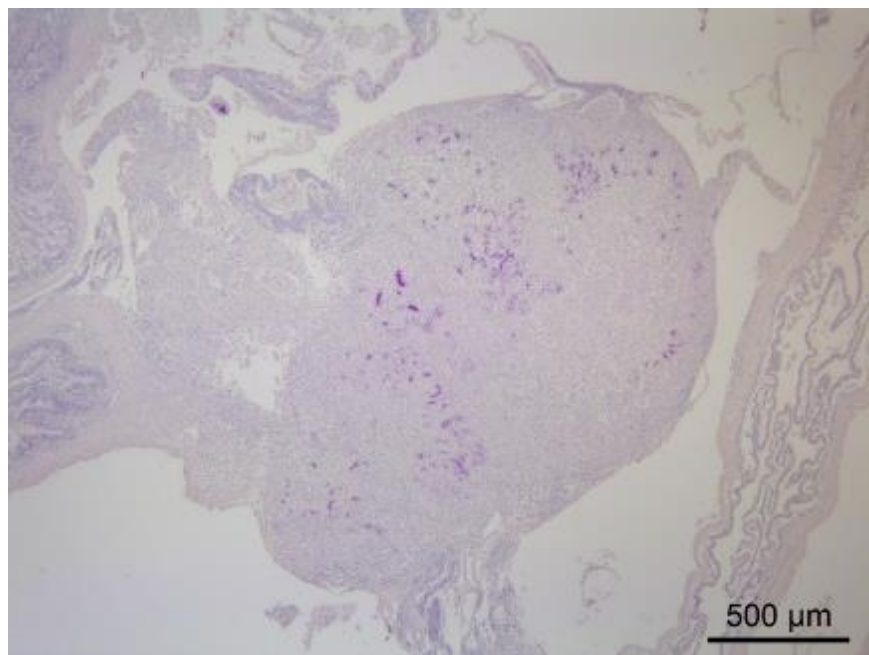


図 3-1-4. 腹腔内接種区の病魚の腸間膜に形成された大型の膿瘍性肉芽腫の ZN 染色像(低倍)。肉芽腫内部には ZN 染色に陽性を示す抗酸菌が認められる。



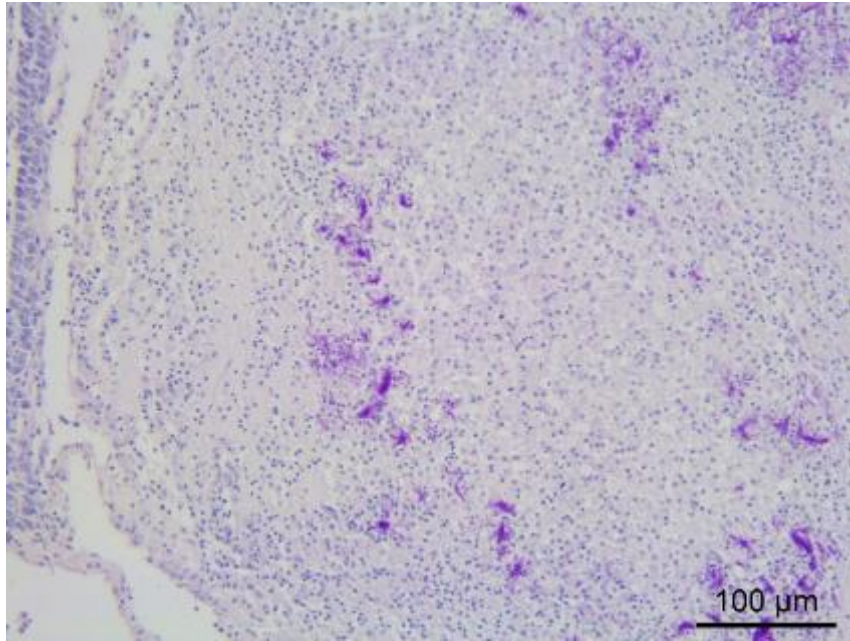


図 3-1-5. 腹腔内接種区の病魚の腸間膜に形成された大型の膿瘍性肉芽腫の中等倍像 (ZN 染色)。肉芽腫内部には抗酸菌の増殖像及び、炎症性細胞と思われる細胞の壊死残渣が認められ、肉芽腫を取り囲む最外層は繊維性結合織に乏しい。



## 第 2 節 カワハギ由来菌株のウマヅラハギに対する病原性評価と病理組織学的検討

第 2 章で述べたように、2013 年に初めてウマヅラハギから分離された NTM は、2009 年～2012 年までカワハギから分離されていた NTM と、その生物学のおよび生化学的性状が非常に類似していることから、カワハギに感染する NTM がウマヅラハギに対しても病原性を示す可能性が示唆された。

そこで、カワハギに病原性を示すことが既に明らかとなっているカワハギ由来 NTM NJB0901 株がウマヅラハギに対して病原性を示すかどうか人為感染試験によって評価することとした。病原性の評価は累積死亡率によって行い、死亡魚は病理組織学的にその病態を検討した。また、得られた累積死亡率の結果、肉眼的所見および病理組織学的所見は、カワハギに対して同一菌株を腹腔内接種した人為感染試験結果 (Fukano *et al.*, 2015) と比較検討した。

### 第 1 項 材料および方法

#### 1. 供試魚

株式会社マリンテックにて生産されたウマヅラハギ (*Thamnaconus modestus*) 人工種苗、平均体重 5.37g、平均体長 7.39cm の個体を 16 尾供試し、1 試験区当たり各 8 尾ずつ 2 区に分けて試験を行った。

#### 2. 飼育環境

1 区は菌液接種区、もう 1 区は陰性コントロールとして PBS 接種区とした。それぞれ 150L のアクリル水槽を使用し、人工海水中の止水飼育環境で通気飼育した。飼育温度は 25℃、接種後は 1 日 1 回の給餌を行い 15 日間観察した。

### 3. 菌液調整

供試菌には 2009 年に養殖カワハギから分離された NJB0901 株を Middlebrook7H9 液体培地中で 25℃、1 週間培養し、対数増殖期にあたる菌液を作製した。菌液は吸光度計で菌液の濁度を測定したのち滅菌 PBS で希釈し、菌液調整を行った。

調整した菌液は 10 段階希釈倍率系を作製し、Middlebrook 7H11 寒天培地に塗抹、25℃で培養し CFU を算出し、 $9.8 \times 10^4$  CFU/100 $\mu$ L であることを確認した。

### 4. 人為感染試験および採材

供試魚は 250ppm の 2-phenoxyethanol で鎮静化し、25G の注射針で腹腔内に菌液および滅菌 PBS をそれぞれ 100 $\mu$ L ずつ接種した。

死亡個体は剖検を行ない、接種部位の腹膜を 1 $\mu$ L 白金耳で擦過して微量の組織を採取し、それらを Middlebrook7H11 上に塗抹し接種菌の再分離を試みた。また、剖検後の個体は 10%リン酸緩衝ホルマリン液にて固定した。これらの固定材料より消化管、肝臓、体腎、脾臓、体壁、鰓および心臓について 4-5  $\mu$  m のパラフィン切片を作製し、H&E および ZN 染色を施し光学顕微鏡観察に供した。

## 第 2 項 結果

### 1. 累積死亡率

本試験で得られた累積死亡率の結果をグラフに示す(図 3-2-1)。

本試験では接種後 1 日目に死亡する個体が認められ、4 日目には半数にあたる 4 尾が死亡した。その後、累積死亡率は 6 日目に 60%を超え、15 日目には全ての供試魚が死亡に至った。

また、PBS 接種区で 11 日目と 13 日目に死亡する個体が認められた。

## 2. 肉眼所見

菌液接種後 6 日目までに死亡した 5 尾は少量の腹水貯留が認められるものの、肉眼での明らかな病変形成は認められなかった。6 日目以降に死亡した個体は多量の腹水の貯留が認められ、また 14 日目、15 日目に死亡した個体では体腎の僅かな腫大と、腹腔内に形成された直径約 1 mm の白色結節を認めた(図 3-2-2,3)。PBS 接種区で死亡した個体はやや消瘦が認められるものの、著変は認められなかった。

## 3. 再分離

菌液接種区の 8 尾全てから、Middlebrook7H11 寒天培地上に接種菌と同様のコロニー形態を示す菌が再分離された。なお、PBS 接種区で死亡した 2 尾の腹腔からは接種菌は再分離されなかった(表 3-2-1)。

## 4. 病理組織学的所見

病理組織学的検査の結果を表 3-2-1 に示す。病理組織学的検査に供した臓器のうち、鰓と心臓では接種区の 8 尾すべての供試魚で著変および抗酸菌の増殖像は認められなかった。

4 日目に死亡した病魚の腹膜の ZN 染色像を図 3-2-4 に示す。炎症反応性の線維増生による腹膜の肥厚および好中球あるいはリンパ球と考えられる炎症性細胞の集簇が認められた。

14 日目に死亡した病魚の体腎内のマクロファージセンター内には ZN 染色に陽性を示す抗酸菌が僅かながら観察されたが、それらは増殖像を伴わなかった(図 3-2-5,6)。

15 日目に死亡した病魚の肝臓漿膜上に複数の膿瘍形成性肉芽腫が認められ、それらを ZN 染色で観察すると抗酸菌の増殖像が認められた(図 3-2-7)。また、肝

臓実質内にも境界不明瞭な肉芽腫が形成されており、その内部に抗酸菌の顕著な増殖像を認めた(図 3-2-8)。脾臓周囲組織の ZN 染色低倍像では、腸間膜上あるいは脾臓漿膜上に肉芽腫が多数形成されており、その内部には顕著な抗酸菌の増殖像が認められた(図 3-2-9,10)。脾臓実質内のマクロファージセンター内には ZN 染色に陽性を示す抗酸菌が僅かに観察されたが、体腎のマクロファージセンター内の病理組織像と同じく、それらは増殖像を示さなかった(図 3-2-11)。

### 第3項 考察

カワハギ由来菌株のウマヅラハギに対する人為感染試験を実施した結果、菌液接種日翌日に死亡する個体が認められ、4日目には半数にあたる4尾が死亡した。そのうち、累積死亡率は6日目に60%を超え、15日目には全ての供試魚が死亡に至った。このことから、カワハギ由来菌株 NJB0901 株がウマヅラハギに対して高い病原性を示すことが明らかとなった。

NJB0901 株を用いたカワハギに対する病原性評価試験では、1尾あたり  $9 \times 10^5$ CFU の菌液を接種したところ2日目に最初の死亡魚が認められ、7日目に60%を超え、15日目には85%の供試魚が死亡している(Fukano *et al.*, 2015)。このことから NJB0901 株はカワハギに対してもウマヅラハギに対しても同等の病原性を示すことが明らかとなった。

ウマヅラハギ死亡魚は肉眼的に、腹腔内の腹水貯留と腸間膜周囲に形成される白色結節の形成が特徴として認められた。

2009年にカワハギに同一菌株を接種した人為感染試験(Fukano *et al.*, 2015)の接種後7日目の病魚の腹腔内には多量の腹水が貯留しており、腸管周囲には直径1~2mm 大の白色結節の散在が認められた(図 3-1-1)。これらを比較してみると腹水の顕著な貯留と腸管周囲の白色結節の形成は、同一菌株接種によって引き起こされる、これら2魚種の共通所見であると考えられた。白色結節の形成程度はカワハギを使用した実験の方がやや高度であるように見受けられたが、カワハギを用いた試験時の菌液接種量は  $9 \times 10^5$ CFU であること、飼育環境が流水飼育であったこと、両者の肝臓を比較すると栄養状態に差があることなど実施条件に差があるため、それらが白色結節の形成程度を左右していることも考えられた。

ウマヅラハギ腹腔内の腸間膜周囲で認められた白色結節を病理組織学的に観察すると、それらは薄い繊維細胞層に囲まれた類上皮細胞性肉芽腫であり、内部が炎症細胞の壊死残渣と抗酸菌で満たされた膿瘍形成性肉芽腫像を呈していた。形

成された肉芽腫のほとんどは腸間膜および腸管漿膜面上、腹腔内臓器の漿膜上に形成されており、魚類で一般的に感染性病変が認められる腎臓や脾臓にはほとんど肉芽腫は認められなかった。これらの基本的な肉芽腫の構造および限局的な形成様式はカワハギで観察された所見 (Fukano *et al.*, 2015) とウマヅラハギにおけるそれらとは非常に類似していた(図 3-1-2)。

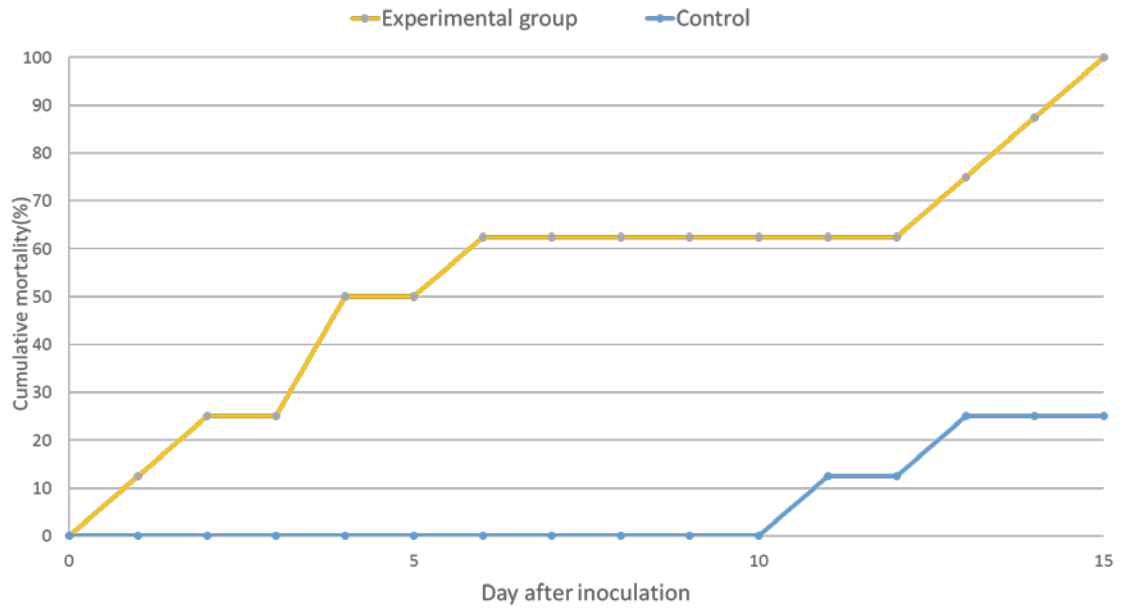
*M. marinum* や *M. pseudoshottsii* 感染症を代表とする魚類 NTM 症は腎臓や脾臓に抗酸菌を含む粟粒大結節を形成することが知られており、病理組織学的にはそれらは内部に乾酪化を伴う肉芽腫性病変として観察される (Lewis & Chinabut, 2011)。一方、上述のカワハギおよびウマヅラハギを使用して実施した NJB0901 株を用いた病原性評価試験では、脾臓や腎臓に炎症像は殆ど見受けられず、抗酸菌の増殖像も全く認められていない。このことから、ハギ類における本症の診断法に使用する分離組織として脾臓や腎臓の選択は必ずしも適切でないことが示された。

表 3-2-1. カワハギ由来 NTM NJB0901 株のウマズラハギに対する人為感染試験結果:

再分離結果と剖検所見および病理組織学的観察所見のまとめ

供試魚			消化管	肝臓	腎臓	脾臓	体壁	鰓	心臓
死亡日	再分離	剖検所見	抗菌増殖像の有無 病理組織学的所見						
No.1 day1	+	著変なし	-	-	-	-	-	-	-
No.2 day2	+	死後変化強	+	-	-	-	-	-	-
			腸間膜に抗菌菌の増殖像						
No.3 day4	+	死後変化強	-	-	-	-	-	-	-
No.4 day4	+	腹水貯留	-	-	-	-	+	-	-
			腹膜に抗菌菌の増殖像、好中球と思われる炎症性細胞が腹膜に集簇						
No.5 day6	+	腹水貯留	+	+	-	-	-	-	-
			腸間膜あるいは、漿膜面上に直径200μLの肉芽腫、肝臓漿膜付近に僅かな菌の集塊						
No.6 day13	+	腹水貯留	+	-	-	-	+	-	-
			腸間膜あるいは、漿膜面上に直径100μLの肉芽腫、菌の増殖像あり、腐敗臭						
No.7 day14	+	腎臓やや腫大 消化管漿膜上に直径1~2mmの白色結節	+	+	+	-	+	-	-
			腸間膜あるいは、漿膜面上に直径200~400μLの肉芽腫 多数の腎臓MMC内に少量の抗菌菌が存在 腹膜、筋肉内に僅かな抗菌菌の集塊有り						
No.8 day15	+	消化管漿膜上に微細な白色結節	+	+	+	+	-	-	-
			肝臓漿膜に複数の肉芽腫が存在 肝実質内に多量の抗菌菌を含む肉芽腫 腸間膜に抗菌菌を含む肉芽腫 脾臓MMC内に少量の抗菌菌が存在						

図 3-2-1. ウマヅラハギに対するカワハギ由来菌株 NJB0901 接種後の累積死亡率。





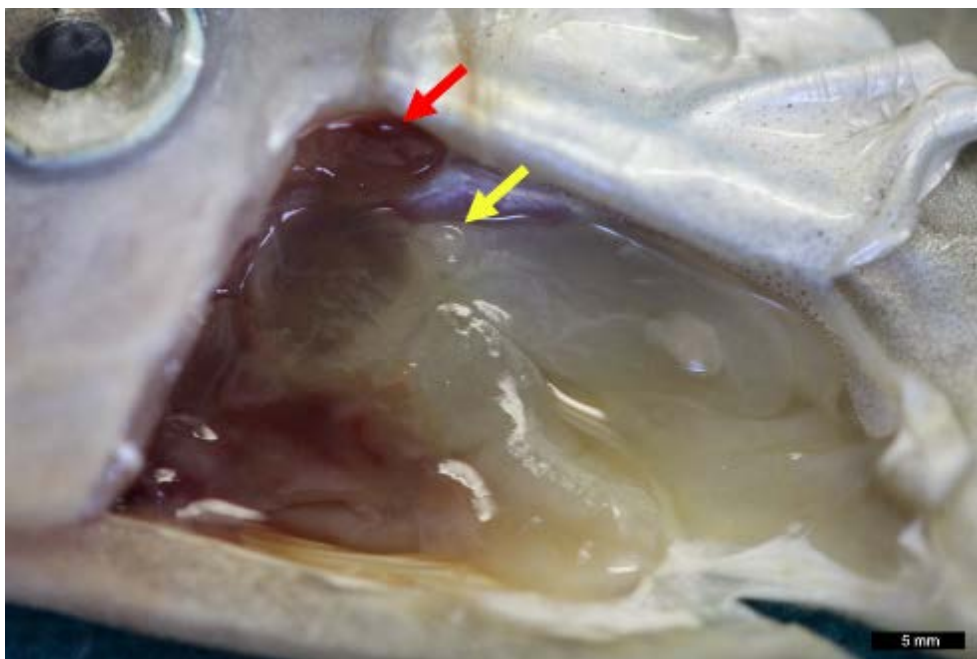


図 3-2-2

菌液接種後 14 日目の病魚の腹腔内臓器。体腎に僅かながら腫大が認められ(赤矢印)、腹腔内には直径約 1mm の白色結節が認められる(黄矢印)。



図 3-2-3

菌液接種後 15 日目に死亡した病魚の腹腔内臓器。消化管付近に直径 0.5~1mm の白色結節が認められる(黄矢印)。

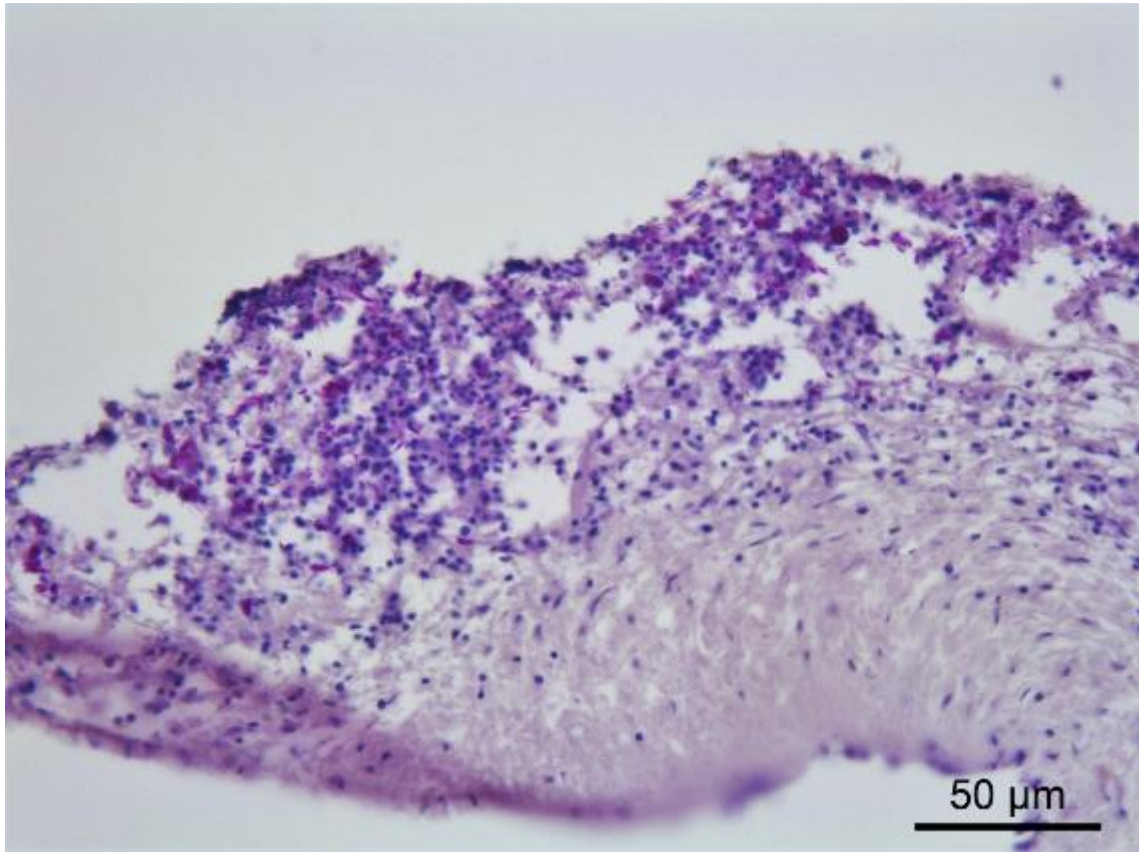


図 3-2-4. 菌液接種後 4 日目に死亡した病魚の腹膜の ZN 染色による中等倍像。炎症反応性の過形成による腹膜の肥厚および炎症性細胞の集簇が認められ、炎症細胞の集簇部には ZN に陽性を示す抗酸菌が散在している。

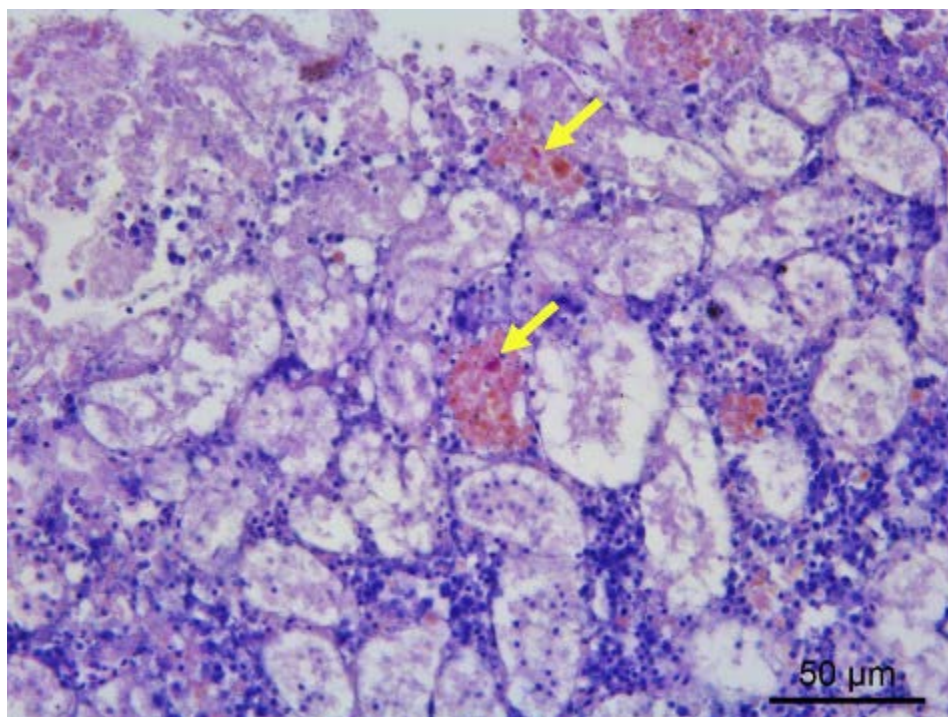


図 3-2-5. 菌液接種後 14 日目に死亡した病魚の体腎の ZN 染色による中等倍像。マクロファージセンター内に ZN 染色に陽性を示す抗酸菌が僅かに認められる(矢印)。

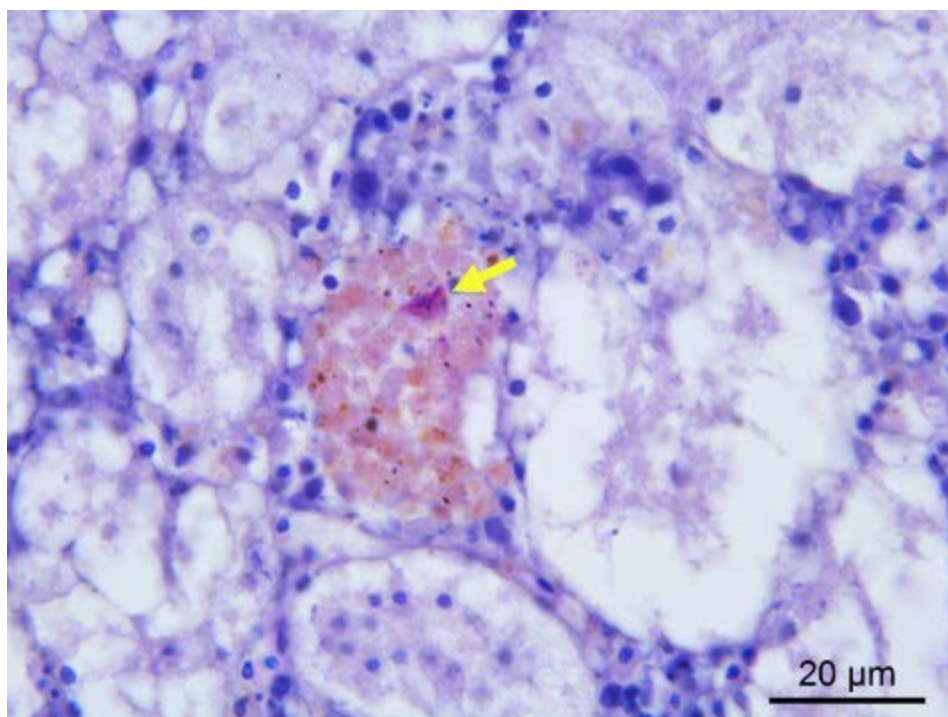


図 3-2-6. 菌液接種後 14 日目に死亡した病魚の体腎の ZN 染色高倍像。マクロファージセンター内に ZN 染色に陽性を示す抗酸菌(矢印)。



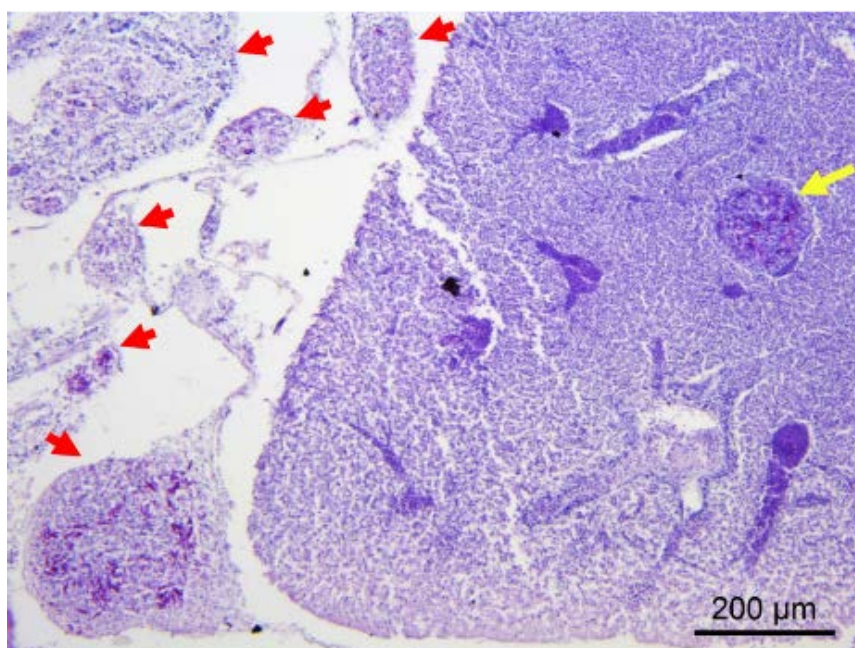


図 3-2-7. 接種後 15 日目に死亡した病魚の肝臓の ZN 染色中等倍像。肝臓漿膜面および肝実質内に認められた膿瘍形成性肉芽腫の ZN 染色像(低倍)。肝臓漿膜には複数の肉芽腫が形成されている(赤矢印)。また、肝実質内においても抗酸菌を含む肉芽腫の形成が認められる(黄矢印)。

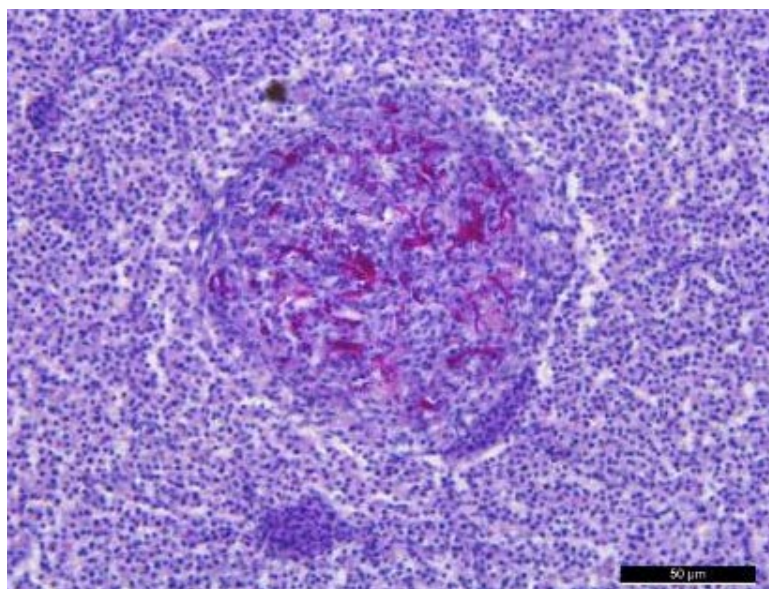


図 3-2-8. 肝実質内に形成された肉芽腫の ZN 染色高倍像。肉芽腫は境界不明瞭であり、その内部では抗酸菌の顕著な増殖像が認められる。

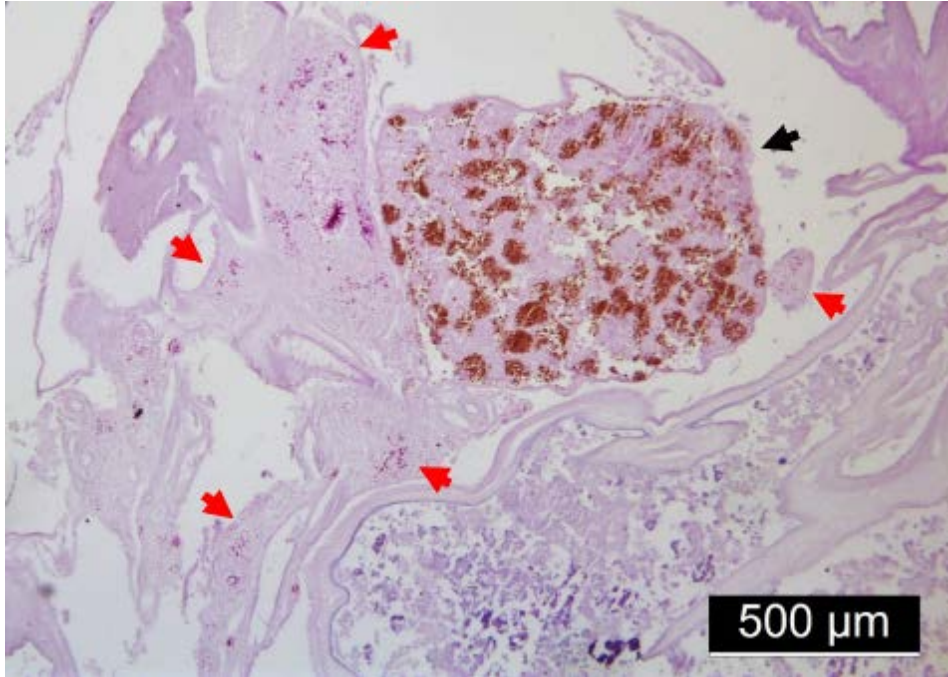


図 3-2-9. 菌液接種後 15 日目の病魚の脾臓周囲組織の ZN 染色低倍像。腸間膜上あるいは脾臓漿膜上に肉芽腫が多数形成されており、その内部には顕著な抗酸菌の増殖像が認められた(赤矢印)。黒矢印は脾臓を示す。

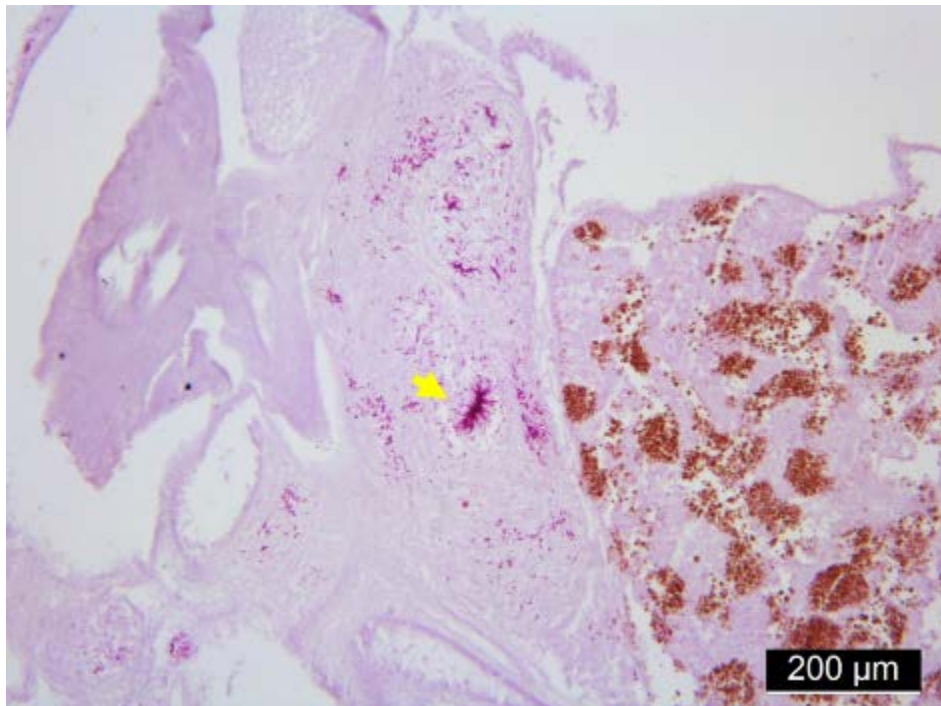


図 3-2-10. 脾臓に隣接して形成された肉芽腫(ZN 染色 中等倍)。肉芽腫内部には非常に顕著な抗酸菌の増殖像を認める(黄矢印)。



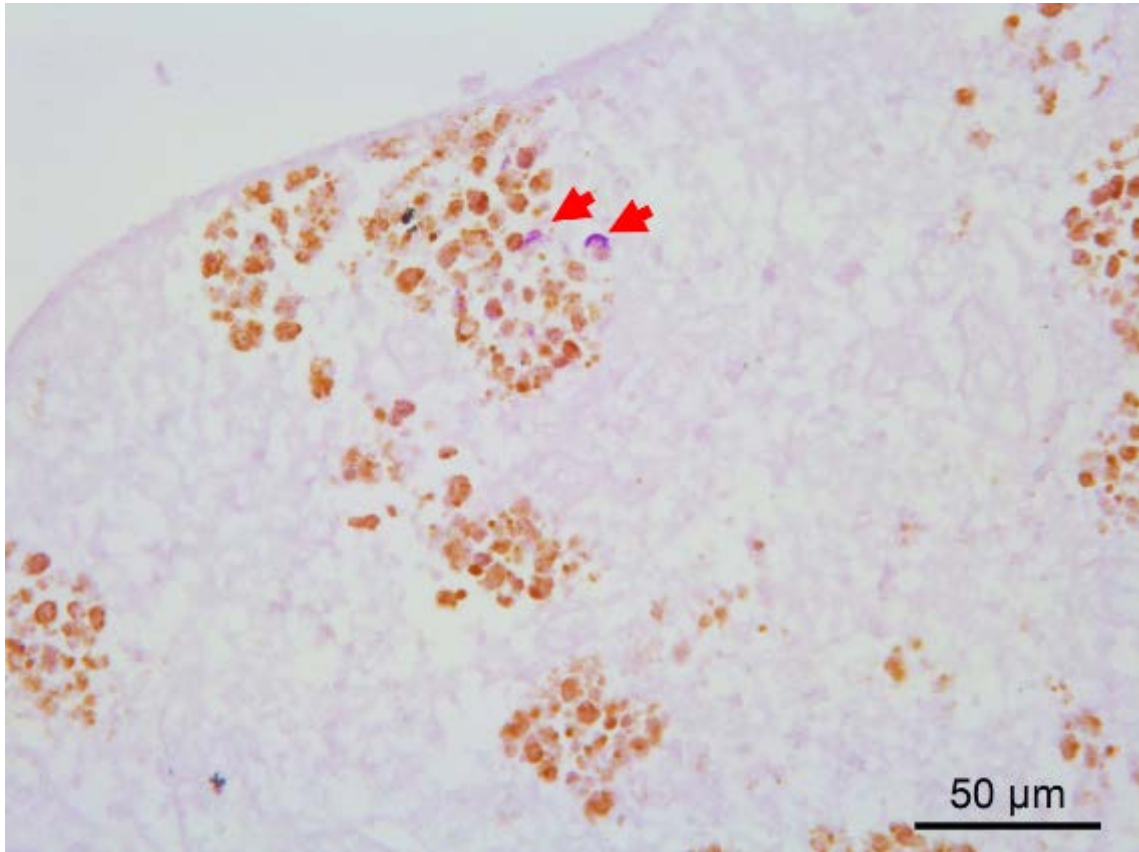


図 3-2-11. 脾臓内のマクロファージセンター(ZN 染色 高倍)。マクロファージセンター内に僅かながら抗酸菌の存在を認める(赤矢印)。

### 第3節 小括

カワハギ NTM 症自然発症例では、消化管漿膜面や腸間膜、肝臓を中心に病変形成が認められるため、鼻腔粘膜上皮および消化管粘膜上皮を侵入門戸として感染が成立する可能性を検討する目的で、腹腔内接種より自然な感染経路を再現しうる接種法と考えられる、浸漬接種および経口接種による人為感染試験を実施したが、どちらの接種法においても感染は成立しなかったと判定された。このことから、本症の発生機序には他に異なる因子が関与している可能性が推測された。

カワハギで発生している NTM 症の原因菌がウマヅラハギにも感染することが示され、本原因菌が双方のハギ類に同等のかつ高い病原性を有していることが明らかとなった。肉眼所見も腹腔内貯留する多量の腹水と、腹腔内に白色結節を形成する点で類似した所見を呈していた。

病理組織学的所見では、いずれの場合も腹腔内の腸管漿膜上、腸間膜、肝臓漿膜上に抗酸菌を含んだ膿瘍形成性肉芽腫を形成し、腎臓および脾臓にはほとんど著変が認められなかった。このことから、*M.marinum* や *M.pseudoshottsii* などの魚類ミコバクテリア症で分離に適するとされる脾臓、腎臓からの分離は、本症においては適切ではないことが明らかとなり、誤診を招く可能性をも示唆した。

#### 第 4 章 分子生物学的解析

NTM の分子生物学的解析手法は飛躍的に進歩しており、それに伴って種の種類も益々細分化が進んでいる。16S rRNA(SSU rRNA)遺伝子を用いた解析により、迅速発育型抗酸菌(Rapid Growing Mycobacteria; RGM)は以下の 3 つのグループに分類することが可能であるとされている。すなわち、*M.fortuitum*, *M.peregrinum*, *M.houstonense*, *M.neworleanense*, *M.septicum*, *M.mageeritense*, *M.mucogenicum*, *M.senegalense* を含む *M.fortuitum* group、*M.abscessus*, *M.chelonae*, *M.immunogenum* を含む *M.chelonae* – *M.abscessus* group、および *M.smegmatis*, *M.wolinskyi*, *M.goodii* を含む *M.smegmatis* group である(Brown-Elliott & Wallace, 2002)。しかしながら、それら迅速発育型抗酸菌の 16S rRNA 遺伝子の相同性は 99% 以上であり、16S rRNA 遺伝子のみに基づく明確な分類・同定は極めて困難であると述べている報告も存在する(Drancourt *et al.*, 2000)。

そこで、Adékambi & Drancourt, 2004 は、19 種の RGM を対象に 16S rRNA 遺伝子、65-kDa heat-shock protein - encoding (以下 *hsp65*)遺伝子、RNA polymerase  $\beta$  subunit (以下 *rpoB*) 遺伝子、16S – 23S internal transcribed spacer (以下 ITS)領域、recombinase A(以下 *recA*)遺伝子、superoxide dismutase A (以下 *sodA*)遺伝子を解析し、それらの結果を組み合わせることにより、最適な分子生物学的分類方法を検討している。また、彼らは RGM のグループごとにその組み合わせを検討する必要があることも提唱している。

HPLC によるミコール酸のパターン解析やシーケンス解析、および生化学性状試験には多大なコストと時間を要することから、Telenti *et al.*, 1993 は 65-kDa *hsp65* 遺伝子内の部分塩基配列(441bp) の PCR 産物を 2 種類 (*BstE* II、*Hae*III)の制限酵素で酵素処理し電気泳動のパターンを解析する同定方法を提案している。この手法は簡便かつ短時間で同定を行うことが可能であることから広く使用されており、現在ではインターネット上で 121 菌種の情報が公開されている。



(<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>)

パルスフィールドゲル電気泳動法(pulsed-field gel electrophoresis; 以下 PFGE)は、分子疫学的解析法の一つとして現在でも広く用いられる手法であり、RGM の同種であっても環境分離菌株や臨床分離株に対して高い識別能力を発揮するとされている(Cooksey *et al.*, 2008)。PFGE に使用されるいくつかの制限酵素のうち RGM には *Ase* I あるいは、*Dra* I、*Xba* I などがこれまでに使用されてきており、その有効性が示されている(Luo *et al.*, 2016; Vanitha *et al.*, 2003)。

本章 1 節では、ハギ類から分離された 7 菌株 NJB0901、NJB1001、NJB1101、NJB1201、NJB1202、NJB1301、NJB1302 から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子、ITS 領域、*hsp65* 遺伝子、*rpoB* 遺伝子、*recA* 遺伝子、*sodA* 遺伝子についてダイレクトシーケンスを行い各遺伝子領域の部分塩基配列を決定し、マルチローカスシーケンスタイピング(MLST)解析を行った。また、決定した部分塩基配列は BLAST 検索を行い近縁種の特定を行うとともに、NJB0901 について得られた部分塩基配列は Gen Bank に登録しアクセッションナンバーを取得した。得られた部分塩基配列を元に遺伝子毎に分子系統解析を行うとともに、複数の部分塩基配列を連結した配列を使用して連結分子系統樹(concatenated tree)を作製した。

本章第 2 節では、*hsp65* 遺伝子の制限酵素パターン解析である hsp-PRA pattern analysis を実施し 2 種の近縁種およびインターネット上に公開されているデータベースとハギ由来菌株との比較を行った。

本章第 3 節では、カワハギ由来菌株およびウマヅラハギ由来菌株について制限酵素 *Ase* I および *Xba* I を使用した PFGE によるジェノタイピング解析を実施し、第 4 節は小括とした。

## 第 1 節 マルチローカスシーケンスタイピング(MLST)解析

### 第 1 項 材料および方法

#### 1. 供試菌株

2009 年から 2013 年までにカワハギおよびウマヅラハギから分離された分離年、分離場所の異なる NJB0901 (愛媛県のカワハギ由来)、NFUMC11 (=NJB1101 高知県のカワハギ由来)、Ns12sousui68(=NJB1201)、Ns12sousuiL-3(=NJB1202) (以上、長崎県のカワハギ由来)、NJB1301、NJB1302 (以上、愛媛県のウマヅラハギ由来) の計 6 菌株を使用した。

また、NCBI のデータベース上で 2 遺伝子(*recA* 遺伝子、*sodA* 遺伝子)の塩基配列情報が得られなかった *M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> も供試した。

#### 2. DNA 抽出

各菌株は Middlebrook7H9 液体培地中で 25℃にて十分に培養したのち集菌し、煮沸・凍結融解を使用して DNA 抽出を行った。すなわち、300μL の培養菌液を 1.5mL チューブに分注し 70℃で 15 分加熱殺菌した。それらは 3,000 rpm で 10 分間遠心を行ったのち上清を捨て H<sub>2</sub>O 300μL を加えボルテックスミキサーにて攪拌し、攪拌した菌液は-20℃にて約 12 時間凍結させたのち 95℃で 15 分間加熱した。加熱後 3,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を PCR 反応のテンプレートとして使用した。

#### 3. MLST に使用した遺伝子領域

Adékambi & Drancourt, 2004 の手法に従い 16S rRNA 遺伝子、65-kDa heat-shock protein - encoding (以下 *hsp65*)遺伝子、RNA polymerase β subunit (以下 *rpoB*) 遺伝子、16S - 23S internal transcribed spacer (以下 ITS)領域、recombinase A (以下 *recA*)遺伝子、superoxide dismutase A (以下 *sodA*)遺伝子の

6 遺伝子を使用した。PCR に使用したプライマーのプライマー配列情報を表 4-1-1 に示す。

#### 4. PCR 反応と PCR 産物の精製

PCR 反応は Go Taq(Promega)を使用した。いずれのプライマーセットに対しても同一の PCR 反応条件を適用したが *recA* 遺伝子の A 領域については Blackwood *et al.*, (2000)の手法に従い semi-nested PCR を行った。

1 サンプルあたり、5×Colorless Buffer 12μL、2.5mM dNTP mix 4.8μL、H<sub>2</sub>O 33.9μL、Forward Primer (10μM) 3μL、Reverse Primer (10μM) 3μL、Go Taq 0.3μL を混合し、抽出 DNA 3μL をテンプレート DNA として添加した。

95°C 10 分間の熱変性の後、95°C 40 秒間の熱変性、55°C 40 秒間のアニーリング反応、72°C 90 秒間の伸長反応を 40 サイクル繰り返し、その後 72°C の伸長反応を 10 分間行った。

得られた PCR 産物のうち 2μL はエチジウムブロマイドを添加した 2% アガロースゲル (1×TBE buffer) 中で 100V 30 分間電気泳動を行った。泳動後、アガロースゲルは UV トランスイルミネーターで PCR 産物を確認するとともに非特異的な PCR 産物の存在の有無を確認した。

特異的な PCR 産物のみが確認された場合は、PCR 産物 58μL をスピнкаラム DNA 精製キット QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) により精製した。

また、非特異的な PCR 産物が確認された場合は、PCR 産物 58μL をエチジウムブロマイド添加した 2% アガロースゲルにて 40 分間 電気泳動し、特異的 PCR 産物のみをメスで切り取った。切り取ったゲルは同様に QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)にて精製を行った。

## 5. ダイレクトシーケンスによる部分塩基配列の決定

精製した PCR 産物は BigDye Terminator v1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) によりラベル化され DNA シークエンサー (ABI PRISM 3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems) で解析を行った。

なお、ラベル化およびシーケンス解析は Hokkaido System Science Co. (Hokkaido, Japan) あるいは FASMAC Co. (Kanagawa, Japan) によって実施された。

得られた部分塩基配列は、遺伝子情報処理ソフトウェア GENETYX ver 11.0 (GENETYX) を用いてアセンブルし配列情報を決定した。

ハギ類由来菌株についてはそれぞれの遺伝子についてアライメントを行い相同性の確認を行った。また、NJB0901 株の塩基配列は近縁種であると考えられる *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>, *M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> の塩基配列との相同性を比較した。

## 6. 分子系統学的解析

分子系統樹はそれぞれの遺伝子ごとに構築するとともに、さらに明確な分子系統樹を得るため Adékambi & Drancourt (2004) の方法に従い、16S rRNA 遺伝子、*rpoB* 遺伝子、*hsp65* 遺伝子、*recA* 遺伝子、*sodA* 遺伝子のシーケンスを結合させた連結分子系統樹(concatenated tree)を構築した。

ダイレクトシーケンスの結果により得られた NJB0901 の 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列は *M. tuberculosis* H37Rv および *M.smegmatis* グループ、*M. fortuitum* グループ、*M.chelonae* – *M.abscessus* グループに含まれる全 18 菌株を用いてアライメントを行い、部分塩基配列 1405 bp について、分子系統樹を作製した。

また、同様に *hsp65* 遺伝子、*rpoB* 遺伝子、*recA* 遺伝子、*sodA* 遺伝子に関してダイレクトシーケンスにより得られたそれぞれの部分塩基配列(*hsp65*;361bp、*rpoB*;550bp、*recA*;918bp、*sodA*;391bp)は *M. tuberculosis* H37Rv および *M.chelonae* –

*M. abscessus* グループに含まれる全 10 菌株を用いてアライメントを行い、それぞれ分子系統樹を作製した。

連結分子系統樹の作製には、*M. tuberculosis* H37Rv および *M. chelonae* – *M. abscessus* グループに含まれる全 10 菌株の 16S rRNA 遺伝子、*hsp65* 遺伝子、*rpoB* 遺伝子、*recA* 遺伝子、*sodA* 遺伝子の部分塩基配列を結合し、3625(1405+361+550+918+391) bp をもとにアライメントを行ない、その結果から分子系統樹を作製した。

いずれの過程においても、アライメントには Clustal W を使用し、それぞれの遺伝子について得られたアライメントはフリーソフトウェア MEGA ver 6.0 にて、分子系統樹を作製した。系統樹の作製には近隣接合法を使用し Kimura の two-parameter distance correction model で 1,000 回のブートストラップ検定を行った。

## 7. 決定した塩基配列の登録

決定した部分塩基配列のうち NJB0901 の 6 遺伝子(16S rRNA 遺伝子、ITS 領域、*rpoB* 遺伝子、*hsp65* 遺伝子、*recA* 遺伝子、*sodA* 遺伝子)および *M. salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> の 2 遺伝子(*recA* 遺伝子、*sodA* 遺伝子)については DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録し、各配列のアクセッションナンバーを得た。

## 第 2 項 結果

それぞれの供試菌株について決定した塩基配列数を表 4-1-2 に示す。

ハギ類から 2009~2013 年に分離された NJB0901、NFUMC11、Ns11sousui68、Ns12sousuiL-3、NJB1301、NJB1302 の 6 菌株の 16S rRNA 遺伝子、*rpoB* 遺伝子、*hsp65* 遺伝子、*recA* 遺伝子、*sodA* 遺伝子についてアライメントを行ったところ、すべての供試菌株は全く同一の塩基配列を持つことが明らかとなった。

NJB0901 株と近縁であると考えられる *M. chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M. salmoniphilum*

ATCC13758<sup>T</sup>の部分塩基配列の相同性を比較したものを表 4-1-3 に示す。16S rRNA 遺伝子に関する NJB0901 株の 2 菌種に対する相同性はそれぞれ 99.7% と 99.8% でありその差は 1~2 塩基であった。ITS 領域についてはそれぞれ、98.8%と 94.2% であり、NJB0901 株は *M.salmoniphilum* に対してより高い相同性を示した。*hsp65* 遺伝子については 96.2%と 97.5%、*rpoB* 遺伝子については 96.3%と 98.2%、*sodA* 遺伝子については 93.2%と 98.3%、*recA* 遺伝子については 93.6%と 97.4%であり、いずれも NJB0901 株は *M.chelonae* に対してより高い相同性を示した。

16S rRNA 遺伝子のアラインメントに基づいて作成した分子系統樹を図 4-1-1 に示す。NJB0901 株は迅速発育抗酸菌の 3 つのグループ (*M.fortuitum* グループ、*M.smegmatis* グループ、*M.chelonae* – *M.abscessus* グループ)のうち *M.chelonae* – *M.abscessus* グループに含まれることが示された。また、*M.chelonae* – *M. abscessus* グループの中では *M.salmoniphilum*、*M.franklinii*、*M.chelonae*、*M.saupaulense* を含むクラスターの中に分類され、更には *M.salmoniphilum* に最も近縁であり、そのブートストラップ値は 90%であった。

*M.chlonae* – *M. abscessus* グループについての *hsp65*、*rpoB*、*recA*、*sodA* 遺伝子それぞれの分子系統樹および、16S rRNA 遺伝子との連結分子系統樹を図 4-1-2, 3, 4, 5, 6 に示す。*hsp65* 遺伝子、*rpoB* 遺伝子、*recA* 遺伝子、*sodA* 遺伝子のすべてにおいて、NJB0901 は *M.chelonae* と同じクラスター内に分類され、それらはそれぞれ 70%、74%、100%および 99%のブートストラップ値で分岐した。殊に、*recA* 遺伝子および *sodA* 遺伝子では高値を示した。

16S rRNA、*hsp65*、*rpoB*、*recA*、*sodA* 遺伝子の連結分子系統樹では、NJB0901 は *M.chelonae* と同じクラスターに分類されるとともに、そのブートストラップ値は 100%であった。また、*Mycobacterium* sp. NJB0901 から *M. abscessus* subsp. *bolletii* を含むクラスターではすべてのブートストラップ値が 90%以上であった。

なお、本試験中において取得した GenBank のアクセッションナンバーは以下の

とおりである。

NJB0901;16S rRNA (AB971866)、ITS region (LC008144)、*rpoB* (LC008146)、*hsp65* (LC008145)、*recA* (LC008147)、*sodA* (LC008148)

*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup>; *recA* (LC174942)、*sodA* (LC174941)

### 第3項 考察

ハギ類より分離された6菌株は、16S rRNA、*hsp65*、*rpoB*、*recA*、*sodA*の5つの遺伝子の部分塩基配列について全く同一の配列を持つことが明らかとなったことから、ハギ類より分離されたすべての菌株は同一種であることが示唆された。

Adékambi & Drancourt (2004)は90%以上のブートストラップ値には分岐として意味があるとしているが、本節において検査した16S rRNA遺伝子のみの分子系統解析結果では、NJB0901は*M.chelonae*よりも*M.salmoniphilum*に近いという結果であり、そのブートストラップ値は90%であった。しかしながら、*hsp65*遺伝子、*rpoB*遺伝子、*recA*遺伝子、*sodA*遺伝子のそれぞれを用いた分子系統解析では*M.salmoniphilum*よりも*M.chelonae*により近縁であるという結果が得られた上に、連結分子系統樹では90%以上のブートストラップ値を以ってNJB0901は*M.salmoniphilum*よりも*M.chelone*に近縁であり、且つ*M.chelonae*とも独立した菌種であることが強く示唆されている。

これらの結果から、ハギ類由来菌株は16S rRNA遺伝子のみのシーケンス解析あるいはそれを用いたBLAST検索では*M.salmoniphilum*に同定されてしまう可能性があり、注意が必要であることが明らかとなった。

また、連結分子系統樹において100%のブートストラップ値をもって*M.chelonae*と分離されたことから、ハギ類由来 *Mycobacterium* sp.は*M.chelonae*-*M.abscessus*グループに属する新規の菌種であることが強く示唆された。

表 4-1-1. 本試験中で使用した PCR プライマーの配列情報。

Genes	Primers	Sequences (5'-3')
16S rRNA	8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
	1047R	TGCACACAGGCCACAAGGGA
	830F	GTGTGGGTTTCCTTCCTTGG
	1542R	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA
<i>rpoB</i>	MycoF	GGCAAGGTCACCCCGAAGGG
	MycoR	AGCGGCTGCTGGGTGATCATC
<i>hsp65</i>	Tb11	ACCAACGATGGTGTGTCCAT
	Tb12	CTTGTCGAACCGCATACCCT
<i>recA</i>	RecF1	GGTGTTTCGNCTANTGTGGTG
	RecF2b	GCGTCTGCCTCAACCGATCGG
	RecF3	GGCAARGGYTCGGTSATGC
	RecR1	AGCTGGTTGATGAAGATYGC
	RecR2	TTGATCTTCTTCTCGATCTC
<i>sodA</i>	SodF	ACATCTCGGGTCAGATCAACGAGC
	SodR	GACGTTCTTGIACTGCAGGTA
ITS	ITSF	TTGTACACACCGCCCGTC
	ITSR	TCTCGATGCCAAGGCATCCACC



表 4-1-2. 6 つの遺伝子領域について決定した塩基配列数。

Genes	Strains					
	NJB0901	NFUMC11	Ns11sousui68	Ns12sousuiL-3	NJB1301	NJB1302
16S rRNA	1467	1401	1400	1412	1408	1393
<i>rpoB</i>	677	683	674	674	679	667
<i>hsp65</i>	444	442	444	444	442	432
<i>recA</i>	935	936	972	935	950	882
<i>sodA</i>	432	337	379	379	462	467
ITS	348	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.

単位: bp  
N.E.; Not Examined

表 4-1-3. NJB0901 に対する *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>, *M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> の部分塩基配列の相同性。

Species	Genes					
	NJB 0901		(Accession No.)			
	16S rRNA 1467bp (AB971866)	ITS 348bp (LC008144)	<i>hsp65</i> 400bp (LC008145)	<i>rpoB</i> 348bp (LC008146)	<i>sodA</i> 432bp (LC008148)	<i>recA</i> 744bp (LCC008147)
Nucleotide sequence homology (%)						
<i>M. salmoniphilum</i> ATCC13758 <sup>T</sup>	99.7	98.8	96.2	96.3	93.2	93.6
<i>M. chelonae</i> JCM6388 <sup>T</sup>	99.8	94.2	97.5	98.2	98.3	97.4

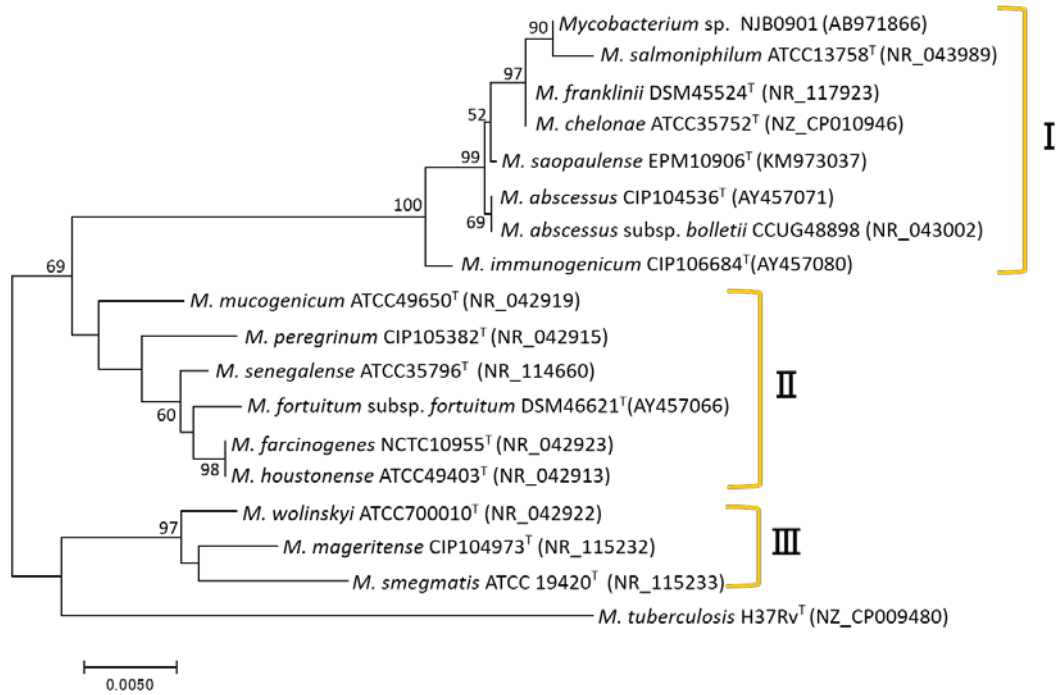


図 4-1-1. 16S rRNA 遺伝子に基づいた分子系統樹

I ; *M.chelonae* – *M.abscessus* group, II ; *M.fortuitum* group, III ; *M.smegmatis* group

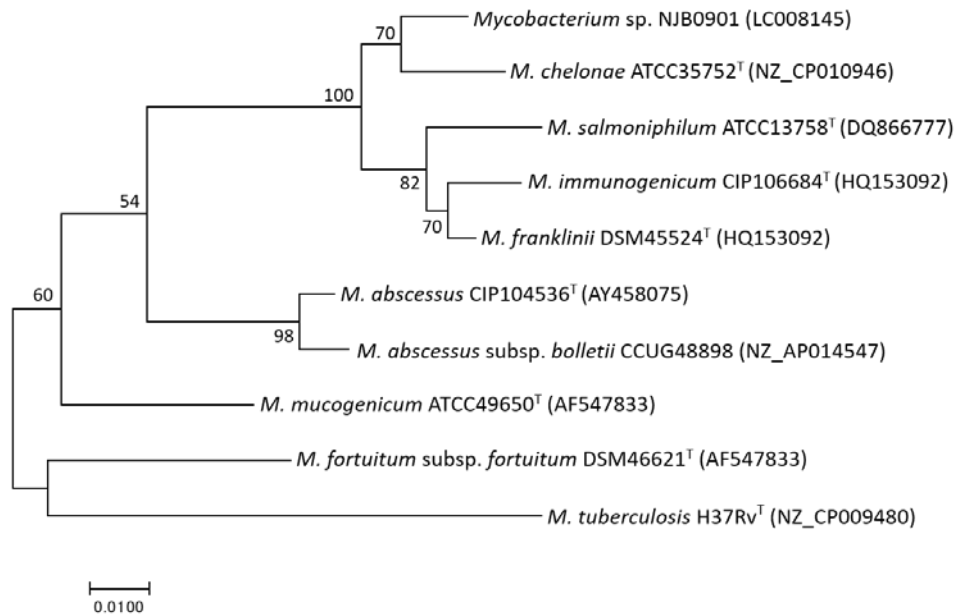


図 4-1-2. *hsp65* 遺伝子に基づいた分子系統樹

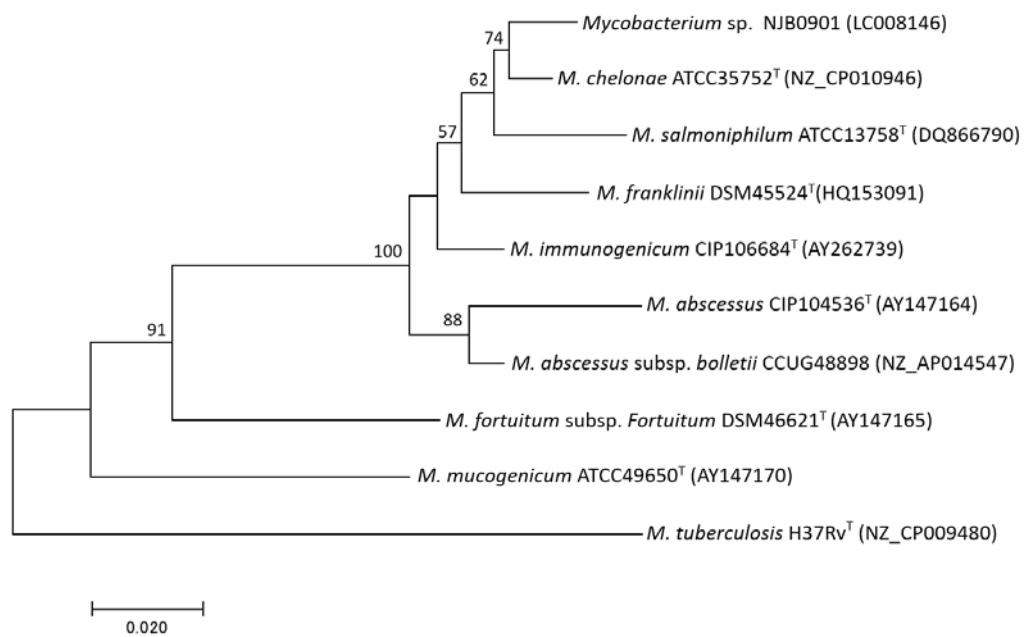


図 4-1-3. *rpoB* 遺伝子に基づいた分子系統樹

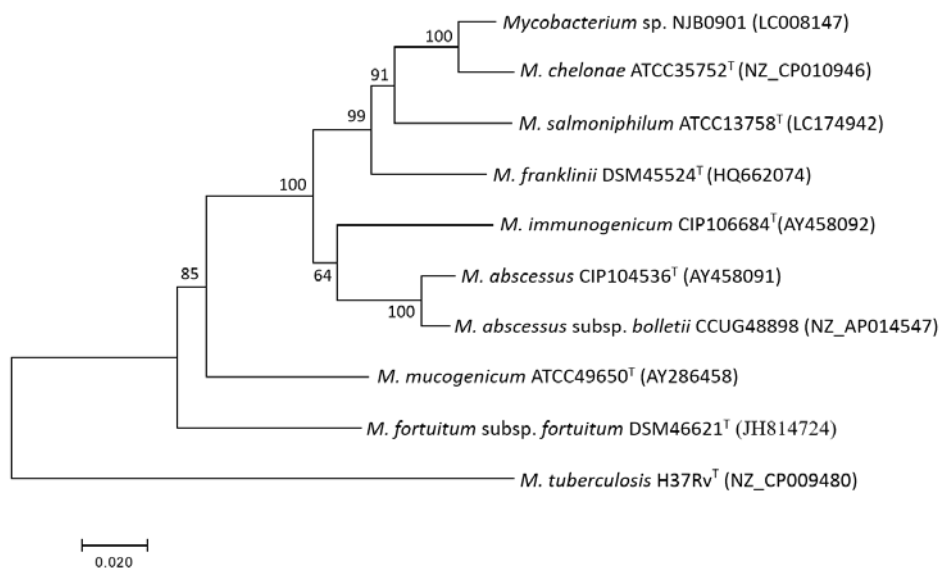


図 4-1-4. *recA* 遺伝子に基づいた分子系統

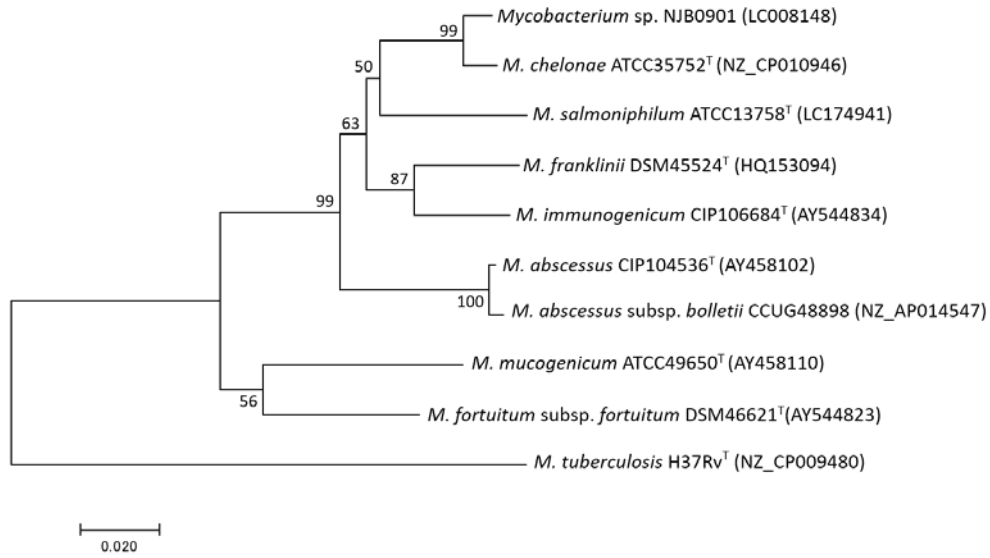


図 4-1-5. *sodA* 遺伝子に基づいた分子系統樹

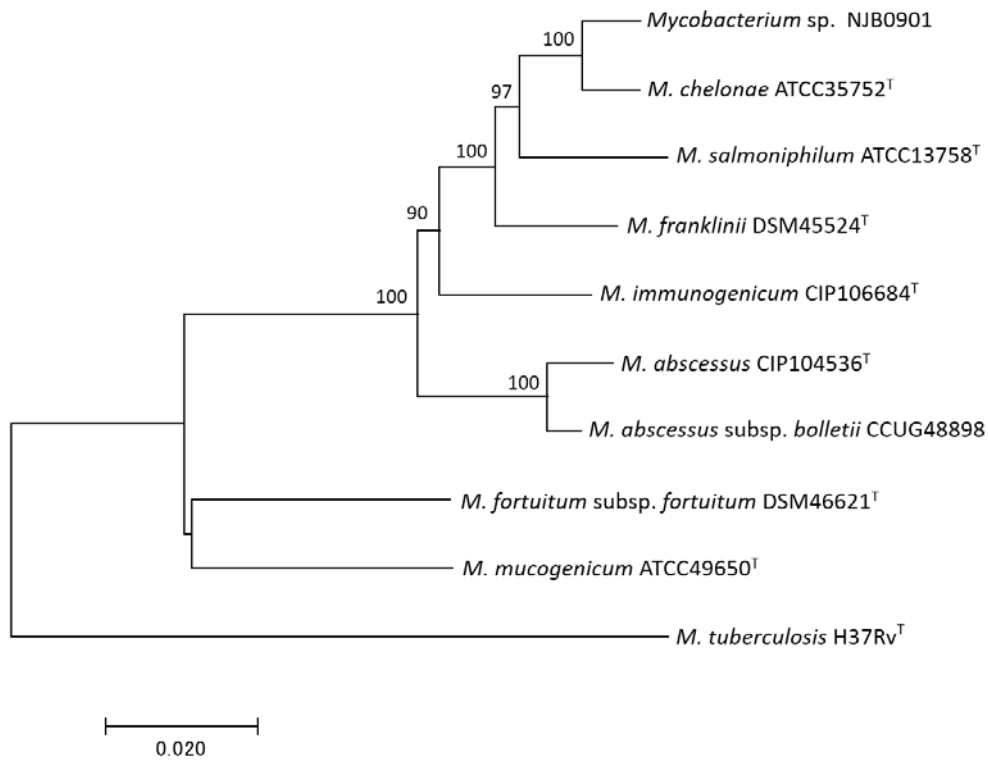


図 4-1-6. 16S rRNA 遺伝子、*rpoB* 遺伝子、*hsp65* 遺伝子、*recA* 遺伝子、*sodA* 遺伝子の部分塩基配列を結合して作成した concatenated tree

## 第 2 節 *hsp65* 遺伝子を用いた PRA pattern 解析

### 第 1 項 材料および方法

PRA pattern 解析にはカワハギ由来菌株である NJB0901、近縁であると考えられる *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> と *M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> を使用し、Telenti *et al.* (1993) の方法に従って実施した。PCR による *hsp65* 遺伝子の増幅には TB11、TB12 のプライマーを使用し、441bp の部分塩基配列を増幅した。PCR は 1 サンプルあたり、5×Colorless Buffer 4.0μL、2.5mM dNTP mix 1.6μL、H<sub>2</sub>O 11.3μL、Forward Primer (10μM) 1.0μL、Reverse Primer (10μM) 1.0μL、Go Taq 0.1μL を混合し、各菌株の抽出 DNA 1μL をテンプレート DNA として添加した。

95°C 10 分間の熱変性の後、95°C 40 秒間の熱変性、55°C 40 秒間のアニーリング反応、72°C 90 秒間の伸長反応を 50 サイクル繰り返し、その後 72°C の伸長反応を 10 分間行った。

得られた PCR 産物は 2 種類の制限酵素 *Bst*EII (Takara) と *Hae*III (Takara) を使用し消化を行った(図 4-2-1)。*Bst*EII では、PCR 産物 10μL に *Bst*EII 0.5μL(5 U)、10×H Buffer 2.4μL、0.1% BSA 2.4μL、H<sub>2</sub>O 8.7μL を添加し、*Hae*III においては PCR 産物 10μL に *Hae*III 0.5μL、10×M Buffer 2.4μL、H<sub>2</sub>O 11.1μL 添加して混合液を調整した。調整した混合液は 37°C の恒温ブロックで 1 時間保ち、PCR 産物の制限酵素による消化処理を行った。

消化した PCR 産物は、3% の CTG agarose (Nuesive) で、2 時間泳動を行い、その後エチジウムブロマイドでゲルの染色を行った。染色したゲルは UV トランスイルミネーターにてバンドパターンを確認した。

また、4 章 1 節にて決定した NJB0901 の *hsp65* 遺伝子の部分塩基配列および *M.chelonae* (Acc. No. CP010946) *M.salmoniphilum* (Acc. No. DQ866777) の

*hsp65* 遺伝子の部分塩基配列を GENETYX ver.11 のプログラムを使用して *BstEII* と *HaeIII* の制限酵素サイトで切断し、消化断片の塩基配列数を比較した。

## 第 2 項 結果

*BstEII* による消化処理では、NJB0901, *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>, *M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> はいずれも、約 320bp と約 130bp 付近にバンドが認められ、供試菌株間での差は認められなかった。

*HaeIII* による消化処理では、NJB0901 株では 220bp 付近にバンドが認められたが、*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> と *M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> では 200bp 付近にバンドが認められ異なるパターンを示すことが明らかとなった(図 4-2-2)。

GENETYX ver.11 による制限酵素認識配列による切断結果(50bp 以上のみ)を表 4-2-1 に示す。*BstEII* では 3 菌株は同一部位に認識配列を有することが明らかとなった。しかしながら、*HaeIII* ではハギ類由来 1 菌株は同一部位で認識配列を有するが、*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> と *M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> はハギ類とは異なる部位に認識配列を持つことが確認された。そのうち最も大きなフラグメントはハギ類由来 2 菌株では 220bp、標準株 2 菌株では 197bp であり 23bp のフラグメントサイズの違いが認められた。

この結果は電気泳動の比較で認められた相違と合致していた。また、<http://app.chuv.ch/prasite/index.html> のホームページ上でハギ類由来菌株の *HaeIII* の認識パターンに該当するものは存在しなかった。

### 第3項 考察

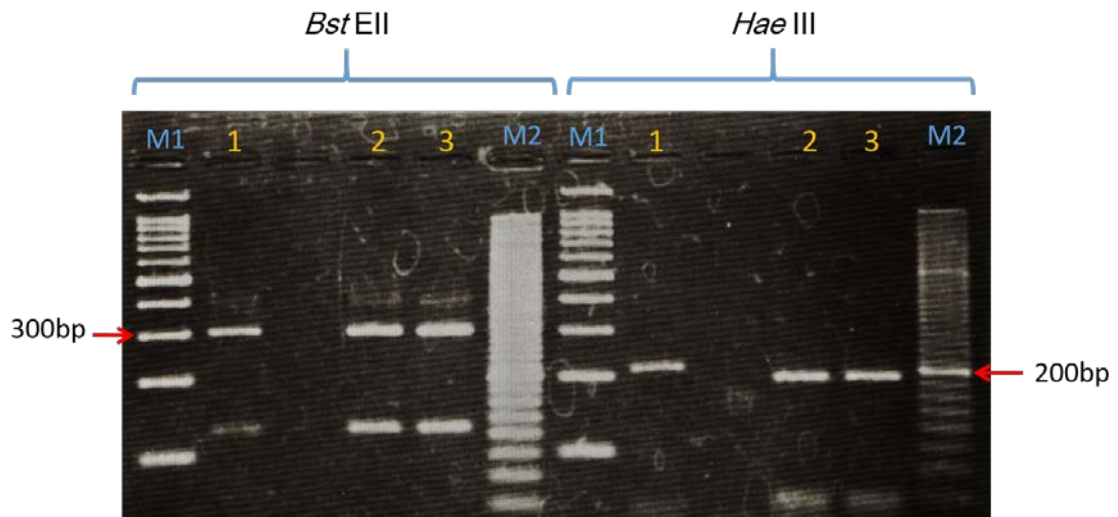
本章1節で述べたように、16S rRNA 遺伝子のみのシーケンス解析では、塩基配列の相違が少なく *M.salmoniphilum* 近縁種という同定に至りかねず、また *hsp65* 遺伝子のシーケンス解析のみでは、ブートストラップ値が 90%以下であるため分子系統解析上は *M.chelonae* との分離が困難である。

しかしながら、本試験の結果より、*hsp65* 遺伝子の *HaeIII* によるパターン解析がハギ類由来 *Mycobacterium* sp. と近縁種である *M.chelonae* および *M.salmoniphilum* との鑑別に有効であることが示された。

図 4-2-1. 各制限酵素の認識配列.



図 4-2-2. アガロースゲル電気泳動により得られたバンドパターンを示す.



M1; 100bp Ladder Marker, M2; 20bp Ladder Marker

1; NJB0901, 2; *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>, 3; *M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup>



表 4-2-1. GENETYX ver.11 による制限酵素認識配列による切断結果(50bp 以上を表示).

Strains	Restriction Enzyme	
	<i>Bst</i> EI	<i>Hae</i> III
	Restriction Patterns	
NJB0901	310/132	220/54/58
<i>M. chelonae</i> (CP010946)	310/132	197/60/54/58
<i>M. salmoniphilum</i> (DQ866777)	310/132	197/60/54/58

### 第3節 パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE)によるジェノタイプング解析

#### 第1項 材料および方法

NJB0901 (愛媛県のカワハギ由来)、NFUMC11 (=NJB1101 高知県のカワハギ由来)、Nsiiisousui68 (=NJB1201)、Ns12sousuiL-3 (=NJB1202) (以上、長崎県のカワハギ由来)、NJB1301、NJB1302 (以上、愛媛県のウマズラハギ由来) の計6菌株を供試した。

Middlebrook7H10 寒天培地上で培養した菌体を PBS にて懸濁し、520nm 吸光度で 2.0 の菌液濃度に調整した。調整菌液は 1.5mL チューブに 120 $\mu$ L 分注し 10,000G で 5 分間遠心したのち、TE buffer にてバッファー交換を行った。

TE buffer 中に懸濁した菌液に低融点アガロース(Bio-Rad)を等量入れ、プラグモールド(Bio-Rad)内で固相化したのち、5mg/mL のリゾチーム溶液 50 $\mu$ L を添加した 1mL の EC buffer に固相化したプラグを入れ、37 $^{\circ}$ Cの恒温ブロックにて 12 時間溶菌処理を行った。

リゾチーム液を廃液しプラグを H<sub>2</sub>O で数回洗浄したのち、5mg/mL proteinase K 50 $\mu$ L を添加した ESC buffer 1mL を加え 50 $^{\circ}$ Cのヒートブロックで 8 時間酵素処理を行った。8 時間後、再度新調した proteinase K 添加 ESC buffer 1mL にバッファー交換し、更に 12 時間酵素処理を継続した。

酵素処理後、プラグを取り出し 10mL TE buffer 中に入れ、振盪させながら酵素液の洗浄を行った。1 時間毎に TE buffer を交換し、計 4 時間洗浄した。

洗浄したプラグは 50 Unit に調整した制限酵素 *Xba* I (Takara)、*Ase* I (Takara) バッファー200 $\mu$ L 内に入れ 37 $^{\circ}$ Cにて 12 時間制限酵素処理を行った。

制限酵素処理を行ったプラグは 1%の BIO-RAD Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad) 150mL ( $\times$ 0.5 TBE Buffer) 内に包埋し、2mL のチオ尿素(50mM) を添

加した 2L の×0.5 TBE Buffer で、CHEF-DR IIIシステム(Bio-Rad)を使用し電気泳動を行った。

電気泳動の条件は、電圧 6V/cm、Included angle; 120°、Initial Switching Time; 1 秒、Final Switching Time; 50 秒とし、14°Cにて 20 時間泳動を行なった。電気泳動終了後、ゲルはエチジウムブロマイドで染色しそれぞれのバンドパターンを比較した。

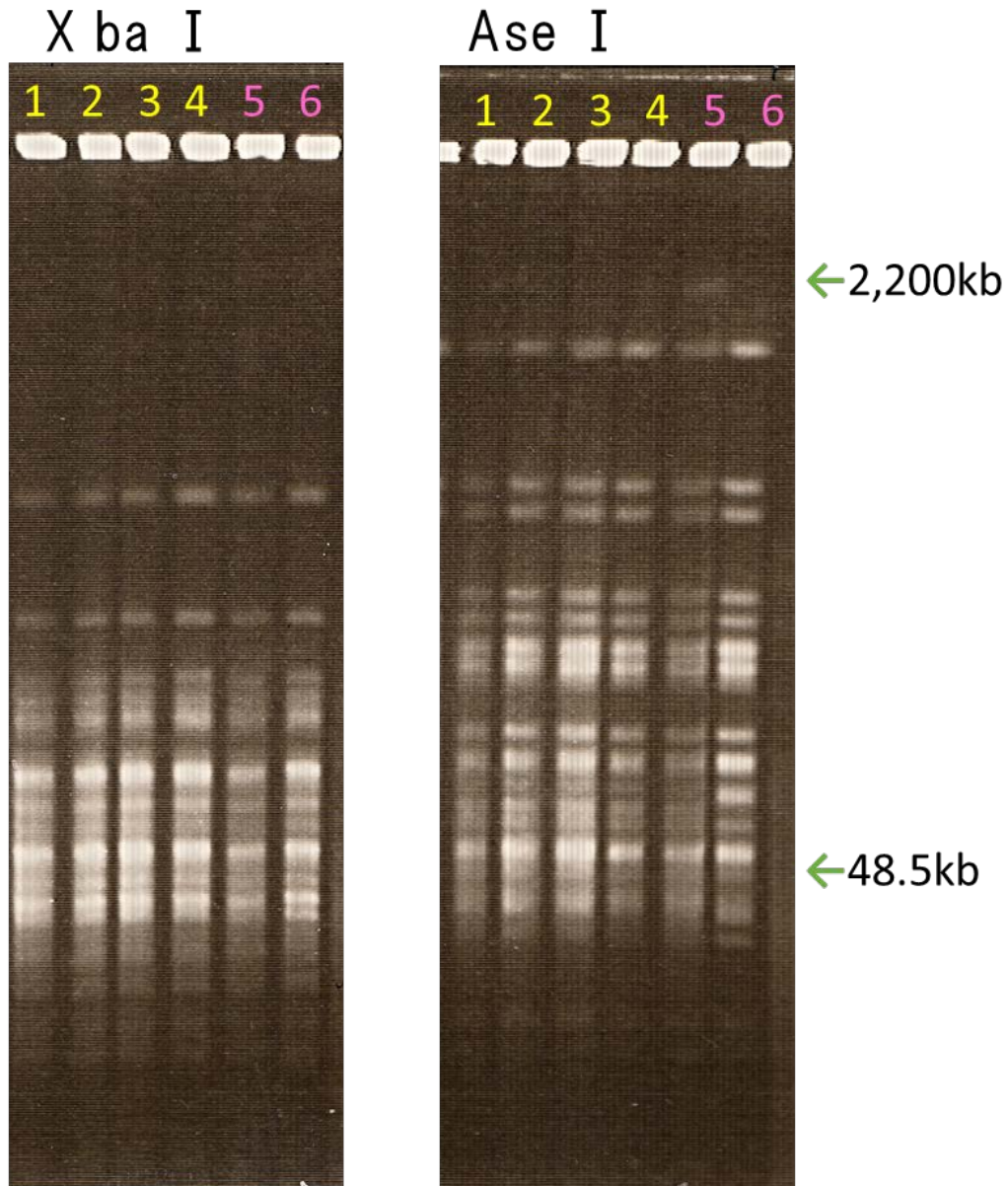
## 第 2 項 結果

PFGE により得られたバンドパターンを図 4-3-1 に示す。*Xba* I の制限酵素処理によってハギ類由来 6 菌株は全く同一のバンドパターンを示すことが明らかとなった。また、*Ase* I の制限酵素処理によってもハギ類由来は全く同一のバンドパターンを示すことが明らかとなった。

## 第 3 項 考察

以上のことから異なる年、異なる海域でカワハギおよびウマヅラハギより分離された菌株は全て同じジェノタイプを持つことが明らかとなった。愛媛県、高知県は西日本有数の養殖漁場であり、それらから同一のジェノタイプを持つ菌種が分離されたことは、それらの地域が地理的に近接している事が要因となっていると考えられた。しかしながら、地理的、海域的に全く異なる長崎県で分離された菌株も同一のジェノタイプを持っていたこと、また、長崎県で分離された菌株の一つは天然魚由来のものであることから、この菌種が既に日本の南西海域に広く定着しつつある可能性を示唆していた。

図 4-3-1. PFGE によって得られた電気泳動のバンドパターン。



1; NJB0901、 2; NFUMC11、 3; Ns11sousui68、 4; Ns12sousuiL-3、 5; NJB1301、  
6; NJB1302

#### 第 4 節 小括

異なる年、異なる海域で 2 種のハギ類より分離された 6 菌株は、16S rRNA、*hsp65*、*rpoB*、*recA*、*sodA* の 5 つの遺伝子の部分塩基配列について全く同一の配列を持つことが明らかとなった。このことから、ハギ類より分離されたすべての菌株は同一種であることが示唆された。

また、複数の遺伝子領域を使用した分子系統解析の結果 *Mycobacterium* sp. NJB0901 株は、*M.chelonae* に近縁な新規の *Mycobacterium* 属であることが強く示唆された。

それと共に、16S rRNA 遺伝子のみのシーケンス解析あるいはそれを用いた BLAST 検索では *M.salmoniphilum* に同定されてしまう可能性があり、注意が必要であることが明らかとなった。

その点で、*hsp65* 遺伝子の *HaeIII* によるパターン解析がハギ類由来 *Mycobacterium* sp. と近縁種である *M.chelonae* および *M.salmoniphilum* との鑑別に有効であることが示された。

また、制限酵素 *Xba* I、*Ase* I を使用して実施した PFGE によるジェノタイプ解析の結果、異なる年、異なる海域で 2 種のハギ類より分離された *Mycobacterium* sp. 6 菌株は全く同一のジェノタイプを持つ種であることが明らかとなった。このことは、ハギ類に病原性を示す *Mycobacterium* sp. が日本の南西海域で既に広く定着しつつあるということを示唆するものであった。

## 第5章：MALDI-TOF MS によるタンパク質および脂質分析

NTM の同定は Runyon 分類や生化学的な特徴づけ、遺伝子のシーケンス解析の他に、抗酸菌の細胞壁の構成成分の一つであるミコール酸の高速液体クロマトグラフィー(以下、HPLC)によって、更に詳細な分類がなされてきた(Buchan *et al.*, 2014; Butler & Guthertz, 2001)。しかしながら、HPLC では *M.chelonae* と *M.abscessus*、*M.avium* と *M.intracellulare* などミコール酸のパターンが非常に近い菌種の分類には限界があると言われている上に、解析課程には多大な労力を必要とし、且つ本解析は限られた研究機関でしか実施できない(Balada-Llasat *et al.*, 2013; Butler & Kilburn, 1990; Koh *et al.*, 2012; Lotz *et al.*, 2010; Yakrus *et al.*, 2001)。

そこで近年、質量分析法の一つである Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (マトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析; 以下、MALDI-TOF MS) を使用した幅広い微生物の同定法が確立されつつある(Clark *et al.*, 2013)。この方法は菌種間の違いによって分子量が異なるリボゾームタンパク質を主体とした菌体内タンパク質のマスマスペクトルをデータベース化し、被検株のマスマスペクトルをマッチングさせることで菌種同定を行う方法で、従来の微生物同定方法に比べコストの削減の点や同定までの時間短縮という点で優れているとされている(小松, 2016)。

*Mycobacterium* 属に関しても既に臨床検査の一環として普及が進みつつあり、2016年の時点で Bruker Daltonics 社の *Mycobacterium* 属のライブラリには 159 菌種のマスマスペクトルデータが登録されている(Bruker Daltonics, 2016; Saleeb *et al.*, 2011)。しかし一方で、Balážová ら(2014)は、培養に使用する培地や培養条件によって同定結果に影響することを示しており、また、Buckwalter ら(2016)は、臨床分離株を Bruker Daltonics による *Mycobacterium* 属ライブラリとマッチングさせたところ、全ての菌株について必ずしも正しい同定結果が得られないことから、今後ライブ

ラリーデータの拡張の必要性和、検査機関が独自のライブラリを構築する必要性を論じている(Balážová *et al.*, 2014; Buckwalter *et al.*, 2016)。

また、抗酸菌は細胞壁に糖脂質を豊富に含むことが知られている。そのうち Glycopeptidolipids (以下、GPLs)は、遅発育菌(*M.avium* complex)や迅速発育菌の *M.megmatis*, *M.abscessus*, *M.chelonae*, *M.fortuitum* など幾つかの NTM が有する細胞表層脂質であり、コロニー性状やバイオフィルムの形成に深く関与しているとされる(Fujiwara, 2012; Ripoll *et al.*, 2007)。

GPLs として *M.chelonae* には diglycosylated GPL (以下 DG)と triglycosylated GPL (以下 TG)の 2 種類が存在することが知られており、Kim ら(2012)は RGM の一種である *M.massiliense* から抽出した総脂質を使用した MALDI-TOF MS による解析からコロニー性状とそれら 2 種の GPL との関係を示している。(Kim *et al.*, 2012)。

本章 1 節では、MALDI Biotyper を使用したタンパク質のプロファイリング解析、第 2 節では MALDI-TOF MS を使用した菌体総脂質の解析について述べ、第 3 節は小括とした。

## 第 1 節 MALDI Biotyper によるタンパク質解析

### 第 1 項 材料と方法

*M.chelonae*、*M.salmoniphilum* は共に Bruker Daltonics 社によるライブラリーに登録されているが、その際の培養培地、培養条件、使用した株の情報は不明確である。そこで、本試験では *M.chelonae*、*M.salmoniphilum* それぞれのスペクトルパターンを独自に解析することとした。

供試菌としてカワハギ由来 NJB0901 株、*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> を使用した。

増菌培養には Middlebrook7H11 培地を使用し、30℃で 5 日間培養しタンパク質抽出に供試した。タンパク質抽出は Bruker Daltonics 社の抗酸菌からの抽出プロトコルに従って実施した。

1.5mL のエッペンドルフチューブに 300μL の H<sub>2</sub>O を加え、寒天培地上に発育した菌体を 10μL 白金耳にて釣菌し懸濁した。懸濁した菌液は 95℃のブロックヒーターで 30 分間加熱し、殺菌処理を行った。室温に戻したのち 900μL のエタノールを加えボルテックスミキサーで 10 分間攪拌した。攪拌した菌液は 13,500 rpm で 2 分間遠心し上清をマイクロピペットで除去し、得られたペレットを安全キャビネット内で約 2 分間風乾させた風乾させたペレットに少量の径 0.5mm のジルコニア シリカビーズ(Bio Spec Products)と 30μL のアセトニトリルを加え、5 分間パルスボルテックスを行い攪拌した。攪拌後、30μL のギ酸を加え、10 秒程度ボルテックスしたのち 13,500rpm で 2 分間遠心した。得られた上清 1μL をターゲットプレート(MTP polished steel; Bruker Daltonics)上に乗せて乾燥させた。

マトリックスは OS 溶液(アセトニトリル 50%、H<sub>2</sub>O 47.5%、トリフルオロ酢酸 2.5%)中に 10μg/μL に溶解した alpha-cyano-4-hydroxy cinnamic acid (HCCA;Bruker Daltonics) を使用し、ターゲットプレート上に乾燥させたサンプル上に 1μL を滴下



し、結晶化させた。なお、キャリブレーションスタンダードには OS 溶液中に溶解した Bruker Bacterial Test Standard (Bruker Daltonics)を使用した。

それぞれのマスペクトルは autoflex speed (Bruker Daltonics)を使用し取得した。また、取得したマスペクトルは MALDI Biotyper 3.1 ソフトウェアを使用し、NJB0901 株に対する *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> と *M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> のマッチングを行い、Score Value を算出した。Score Value の解釈については、2.000 以上を種レベルの同定、1.700~1.999 までを属レベルの同定、1.7 以下を同定不能とする Bruker Daltonics 社の基準に従った。

## 第 2 項 結果

それぞれの菌株で得られたマスペクトルを図 5-1-1,2,3,4 に示す。

供試した 3 菌株はそれぞれ独自のスペクトルパターンを持っていることが明らかとなった。NJB0901 と 2 種の標準株を比較すると、*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> に対する方が共通パターンを数多く認めたが、4476.483(m/z)や 6094.656(m/z)は NJB0901 のみが持つ独自のピークであると考えられた。

また、NJB0901 株に対する標準株 2 菌株間の Score Value を表 5-1 に示す。NJB0901 に対する *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> と *M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> の Score Value はそれぞれ 1.893 と 1.301 であり、いずれも種としての同定基準である 2.000 を下回っていた。

Bruker Daltonics 社による Score Value の解釈基準に従えば、NJB0901 株は *M.chelonae* と *M.salmoniphilum* と異なる種であるということが明らかとなった。また、得られた Score Value から *M.salmoniphilum* よりも *M.chelonae* の方がより近縁であることが示唆された。

### 第 3 項 考察

タンパク質解析により、NJB0901 株は *M.chelonae* と *M.salmoniphilum* と異なる独自のスペクトルパターンを持つことが明らかとなった。また、2 つの標準株に対して得られた Score Value から、NJB0901 株は *M.chelonae* と *M.salmoniphilum* と異なる種である可能性が考えられた。

また、NJB0901 は *M.salmoniphilum* よりも *M.chelonae* に近縁であることが示唆され、このことは 4 章で述べた複数遺伝子のシーケンス配列を使用した連結分子系統解析の結果に準ずるものであった。

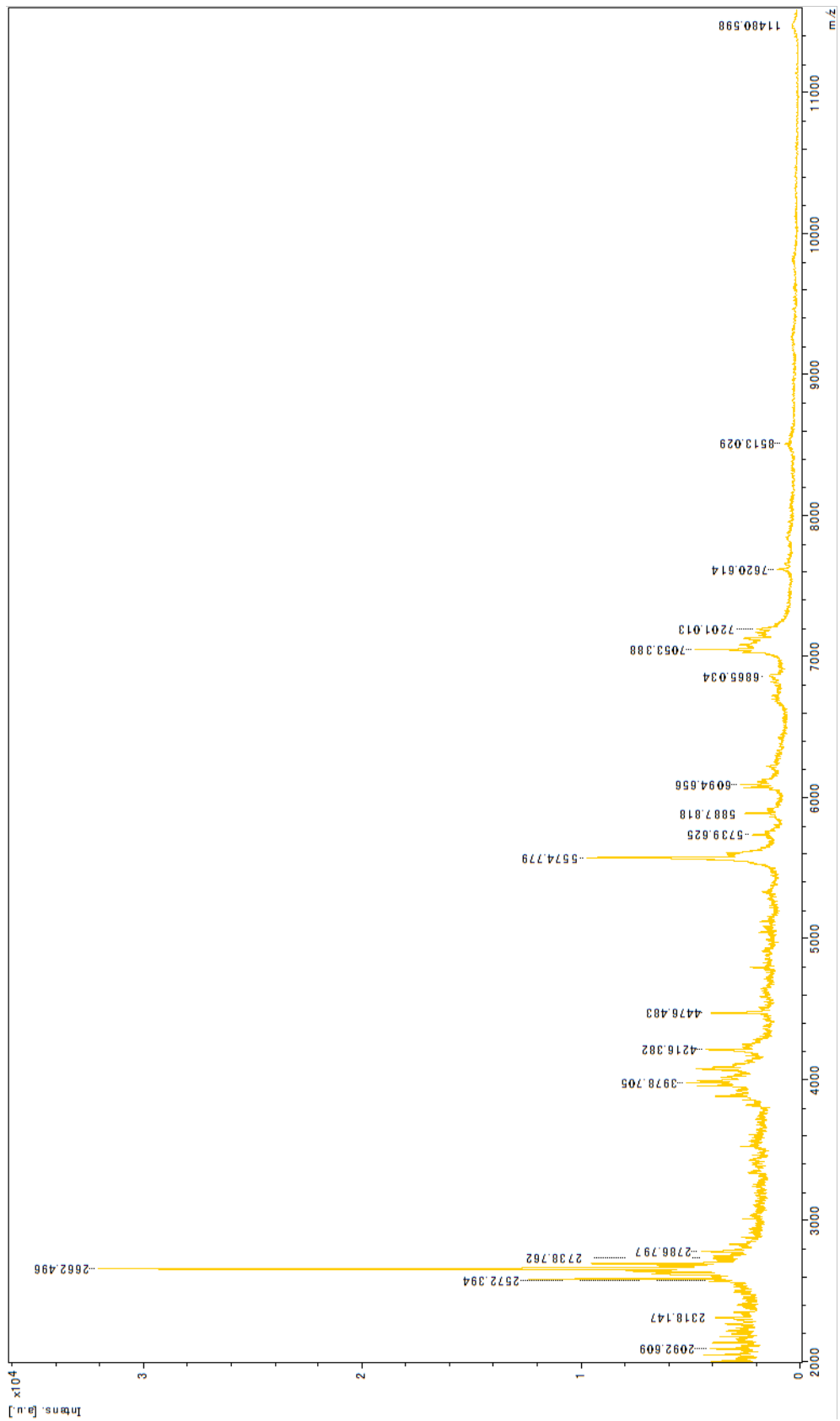


図 5-1-1. *Mycobacterium* sp. NJB0901 の抽出タンパク質によるマスペクトル.

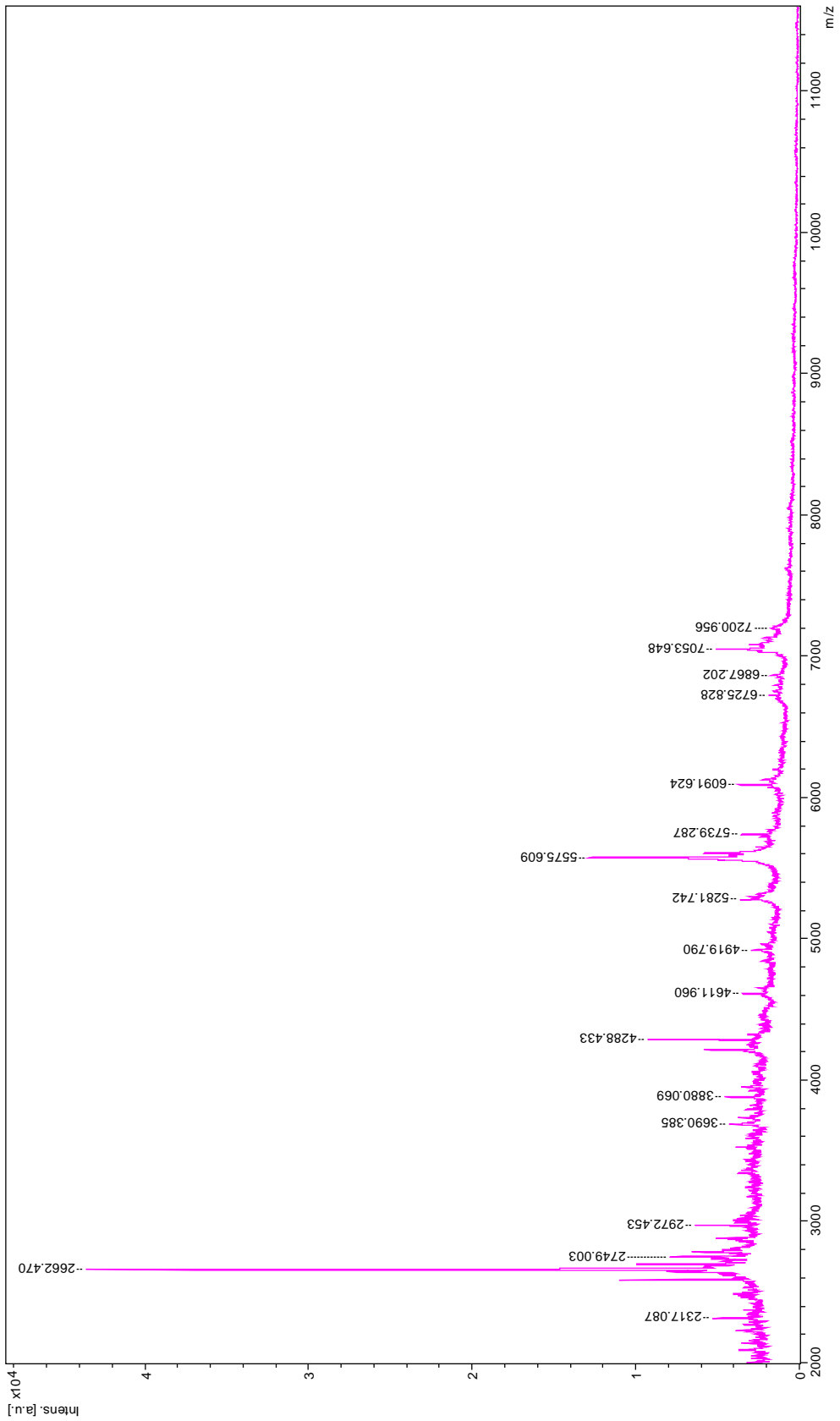


図 5-1-2. *M. chelonae* JCM6388<sup>T</sup> の抽出タンパク質によるマスペクトル.

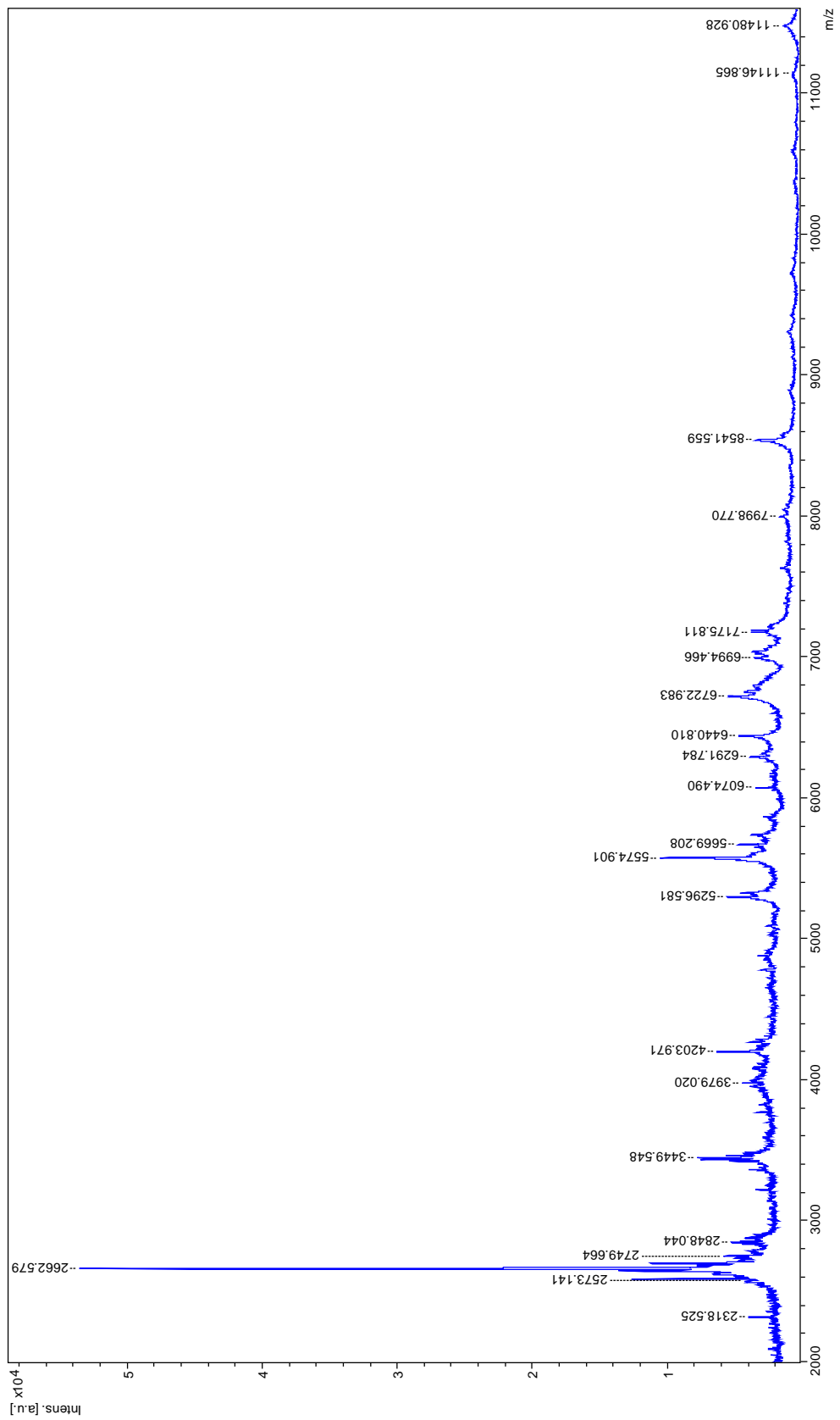


図 5-1-3. *M. salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> の抽出タンパク質によるマスペクトル.

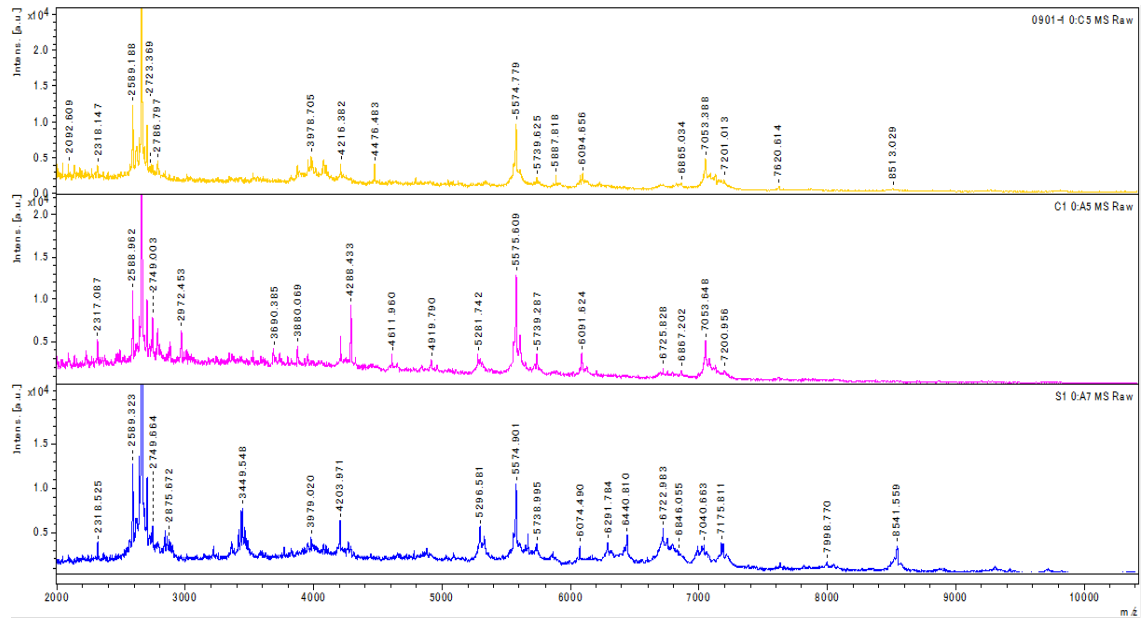


図 5-1-4. 供試菌 3 菌種の抽出タンパク質によるマスペクトルの比較.

上から NJB0901(黄)、*M. chelonae* JCM6388<sup>T</sup>(ピンク)、*M. salmoniphilum*

ATCC13758<sup>T</sup> (青).

	NJB0901	<i>M.chelonae</i>	<i>M.salmoniphilum</i>
NJB0901	2.845	1.893	1.301

Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

表 5-1. Bruker Daltonics によるマッチングスコアが示す意味および、NJB0901 の各供試菌株に対するマッチング Score Value を示す。

## 第 2 節 MALDI TOF MS による総脂質解析

### 第 1 項 材料および方法 1

供試菌としてカワハギ由来 NJB0901 株、*M. chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M. salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> を使用し、Kim ら(2014)の方法を一部改変し、実施した(Kim *et al.*, 2014)。

供試菌は 0.05% の Tween 80 を添加した Middlebrook7H11 培地(以下、Tween80+7H11)にて 30°C で 5 日間培養した。

培養後、それぞれの培地上のコロニーを使用し、Bligh-Dyer 法により総脂質の抽出を行った(Bligh & Dyer, 1959)。500 $\mu$ L の H<sub>2</sub>O に 10 $\mu$ L の白金耳で掻き取った菌体を入れ攪拌し、500 $\mu$ L のクロロホルムと 1,000 $\mu$ L のメタノールを入れさらに攪拌する。更に、500 $\mu$ L のクロロホルムと 500 $\mu$ L の H<sub>2</sub>O を加えよく攪拌し、1,500 rpm で 20 分間遠心したのち底層のクロロホルム層を回収した。また、比較対照として Tween 80 も同様の抽出過程を経て、クロロホルム層を回収した。

マトリックスには TA 30 溶液(アセトニトリル : 0.1%TFA 水溶液=30 : 70)中に 20mg/mL に溶解した 2,5-dihydroxy benzoic acid (2,5-DHB)を使用した。サンプル 1 $\mu$ L に対し、マトリックス溶液 5 $\mu$ L を加えて混和し、そのうち 1 $\mu$ L をターゲットプレート(MTP 384 ground steal; Bruker Daltonics)上に滴下し、結晶化させた。

なお、キャリブレーションスタンダードには Peptide calibration standard (Bruker Daltonics)を使用し、測定モードは Reflector Positive に設定し測定を実施した。

### 第 2 項 結果 1

Tween 80+7H11 にて培養後、抽出した総脂質のマスペクトルをまとめたものを図 5-2-1 示す。

NJB0901 は A~D の 4 つのクラスターが検出された。クラスター A(1,000-1,400 m/z) および D(1,700-2,250 m/z)には 44 の atomic mass unit (以下、amu)間隔を特徴とす



るスペクトルパターンを示していた。

*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> には 3 つのクラスター(B,C,E)が検出され、クラスターE(1,100-1,700 m/z)も 44 amu の間隔を特徴とするスペクトルパターンであった。

*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> にはクラスターF、G の 2 つが検出されたが、それらは 44 amu の間隔を特徴とするパターンは有さなかった。

対照区として置いた Tween 80 の解析においても、1,100-1,800 m/z の間に 44 (amu) の間隔を特徴とするスペクトルパターンが観察された。

この結果から、NJB0901 と *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> において認められた 44 (amu) の間隔を特徴とするスペクトルパターンは Tween 80 の混入によるものである可能性が考えられ、Tween 80 を使用せずに培養した菌株を用いて同様の解析を試みることにした。

### 第 3 項 材料および方法 2

供試菌としてカワハギ由来 NJB0901 株、*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> を使用し、それらの菌株は Tween80 を添加していない Middlebrook7H11 培地上 (以下、Tween80-7H11) で、30℃ で 2 代継代培養を行ったものを用意した。

培養後の脂質抽出および測定は本節第 1 項と同一の方法で実施した。

### 第 4 項 結果 2

Tween80-7H11 にて培養後、抽出した総脂質のマススペクトルをまとめたものを 図 5-2-2 に示す。

全ての菌株で 44(amu)間隔を特徴としたスペクトルパターンは観察されなかった。

NJB0901 では、Tween80+7H11 培地での培養で検出されたのと同じのクラスター B および C が検出された。また、それら 2 つのクラスターは *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> にも共通して検出された。

*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> については、Tween 80 の添加の有無に関わらず、同じピークパターンを持つマススペクトルを示していた。

## 第 5 項 考察

界面活性剤の一種である Tween 80 (polyoxyethylene sorbitan monooleate) は *Mycobacterium* 属の脂肪酸の供給源として、また菌体を分散させ均一な菌液を得るために培地中に添加されてきており、Tween 80 の添加はコロニー性状や *in vitro* における薬剤感受性試験の結果にも影響を及ぼすことが知られている (Van Boxtel *et al.*, 1990)。Wang ら(2011 年)は *M.smegmatis* を Tween 80 を含有する培地で培養し、クロロホルム/メタノールによる脂質抽出を行ったところ、”trehalose dimycolate(TDM)-様の”脂質合成を確認し、それらが 44 amu 間隔のピークを持つ polyoxyethylene を含んだ新しい種類の糖脂質であること、また Tween 80 を含有しない培地で培養したものからは検出されないことを示している。

本解析において、NJB0901 と *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> を Tween 80 含有培地で培養したところ、特徴的な 44 amu 間隔のピーク群を有していたが、それらが検出される質量範囲は Tween 80 のものとは異なっていた。また、それら 44 amu 間隔を持つピークパターンは Tween 80 非含有培地で培養したものからは検出されなかった。

これらのことから、NJB0901 と *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> は Tween 80 を代謝し糖脂質として取り込んでいると考えられた。また、それらのスペクトルパターンおよびピークトップは異なっていたことからこれら 2 菌株が持つ Tween 80 の代謝あるいは糖脂質合成のメカニズムは異なるものであることが示唆されるとともに、菌種としての特

徴の違いであると判断された。

*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup>に関しては、Tween 80 の含有の有無に関わらずスペクトルパターンに変化がなかったことから、本菌種は Tween 80 の代謝能を持たないことが想定された。

Kim ら(2012)は、迅速発育菌の一種である *M.massiliense* の Smooth 型を示す菌株群と Rough 型のコロニー性状を持つ菌株群について、2 種の GPL (DG,TG)の比較を行っている。この報告によれば、Smooth 型のコロニーを持つ菌株は 2 種類の GPL を有しており、Rough 型のコロニーを持つ菌株はそれらを持たないとしている。

Kim ら(2012)あるいは Ripoll ら(2007)が報告しているスペクトルパターンと本試験で得られたパターンとを比較するとスペクトルパターン F および H は DG、スペクトルパターン B および G は TG である可能性が考えられた。第 2 章におけるコロニー性状試験で得られた結果を照らし合わせれば、Smooth 型コロニーを生じる *M.salmoniphilum* と *M.chelonae* は 2 種の GPL と思われるピークが検出されているのに対し、Smooth 型のコロニーがほとんど出現しない NJB0901 には DG に当たるとと思われるピークパターンが観察されないことから、本試験においても GPL の存在とコロニー性状との関連性が伺えた。Kim ら(2012)あるいは Ripoll ら(2007)の報告から、diglycosylated GPL あるいは triglycosylated GPL である可能性が考えられたが、これらの同定には今後さらなる検討が必要であろう (Fujiwara, 2012; Kim *et al.*, 2012; Ripoll *et al.*, 2007)。

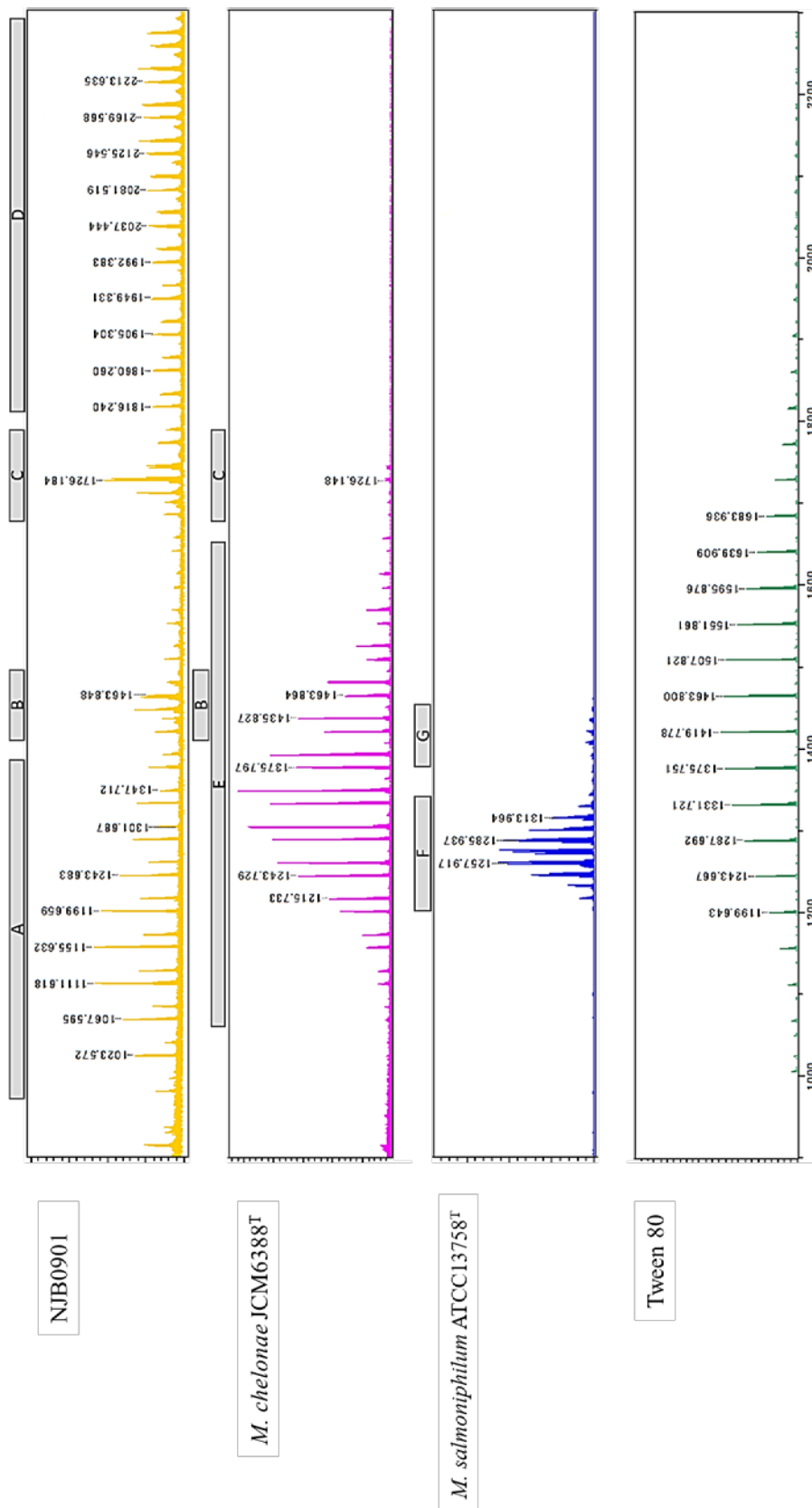
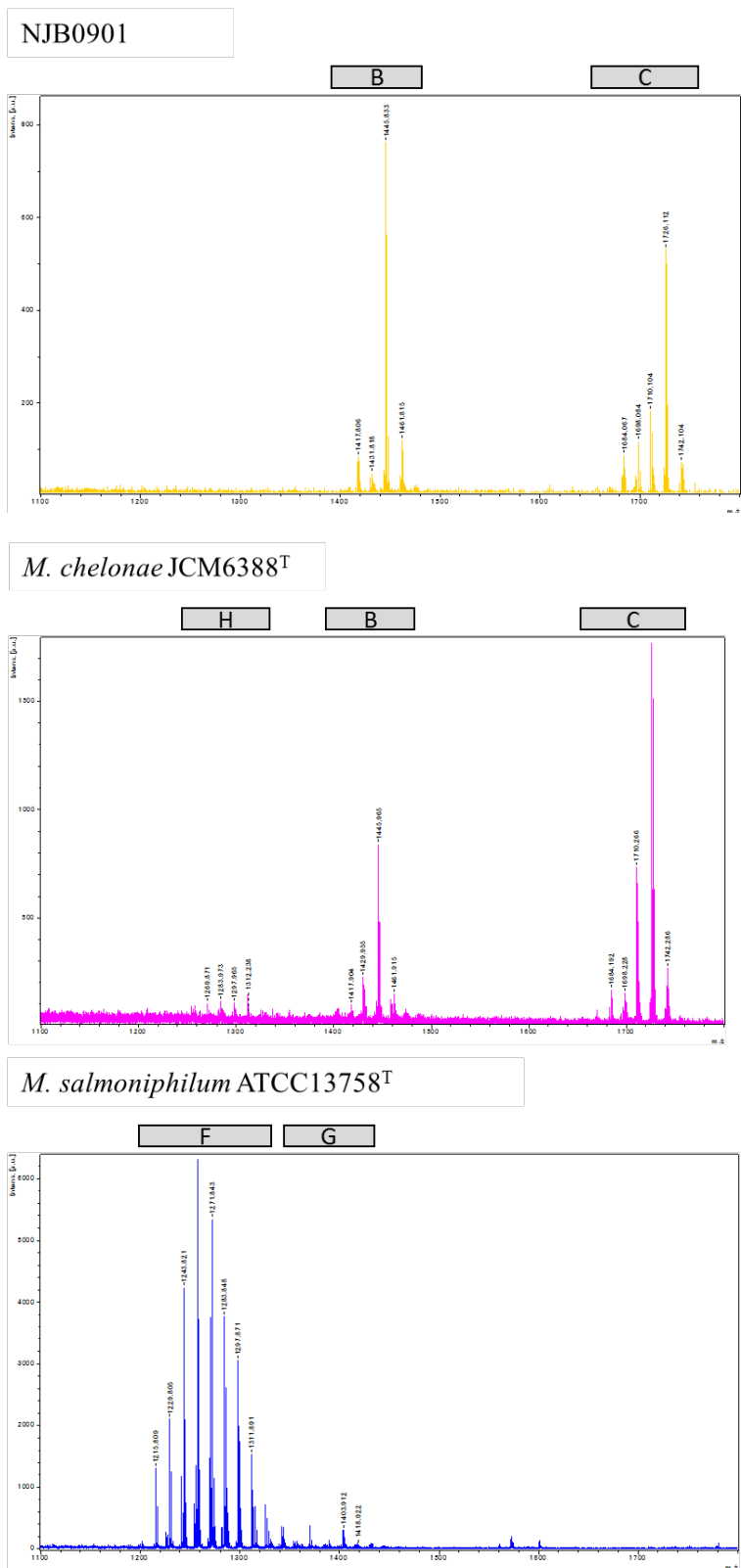


図 5-2-1 Tween 80+7H11 にて培養後、抽出した総脂質および Tween80 のマススペクトル。

図 5-2-2 Tween 80-7H11 にて培養後、抽出した総脂質のマススペクトル。



小括

菌体から抽出したタンパク質を使用した MALDI Biotyper による解析から、NJB0901 株は *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> と *M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> と異なる独自のスペクトルパターンを持つことが明らかとなった。

また、NJB0901 株の 2 つの標準株に対する Score Value の結果は、NJB0901 株が種レベルでそれら 2 菌種と異なることを示していた。

MALDI-TOF MS による総脂質解析の結果からは、NJB0901 と *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> が Tween 80 を代謝し、糖脂質合成を行っていることが示唆されるとともに、その代謝、合成のメカニズムが 2 菌種間で異なる可能性が考えられた。

## 第 6 章 : 迅速診断法の開発

魚類 NTM の対策の一つとして、感染症発生時の早期診断と迅速な菌種同定が必要であると考えられる。早期診断・同定には原因菌の分離培養や、シーケンス解析による菌種の同定作業が含まれるが、抗酸菌は培養速度が遅い上に第 4 章で述べているように遺伝的な差異が少なく、詳細な同定には MLST が必要である。これらの工程は、時間とコストがかかることから迅速な診断法とは言えないであろう。

また、抗酸菌は他の一般細菌と比較しても発育が遅くコンタミネーションに弱いこと、培養には選択培地を用意する必要があり、塩酸による酸処理や水酸化ナトリウムによるアルカリ処理を使用した雑菌処理も必要である。また、環境中には様々な種類の NTM は普遍的に存在しているため、コンタミネーションのリスクが常に伴う。以上のように、抗酸菌の早期診断・同定には様々な壁が存在している (Hoshino & Suzuki, 2015)。

これらのことから、ハギ類に病原性を持つ NTM 症の迅速診断および菌種同定には原因菌の分離培養に頼らない検出法の開発が必要であると考えた。

また、第 2 章、4 章、5 章で述べたように NJB0901 を含むハギ類由来 NTM は、生物学的・生化学的にも、分子生物学的にも、タンパク質のプロファイリングからも既知の菌種とは異なった新規の NTM であることが強く示唆されている。また、これらの検討の結果、ハギ類由来 NTM は *M.chelonae* に最も近縁であることが示唆されている。*M.chelonae* はヒトに対する感染性を有する菌種であるため、ヒトの臨床分離株との鑑別が可能かどうか検討する必要があると考えられた。そこで、本章ではハギ類由来 *Mycobacterium* sp. に対する特異的 PCR プライマーの設計を試みた。

第 1 節では特異的 PCR プライマーの設計、第 2 節では設計したプライマーを使用した特異性の評価、第 3 節では検出感度の評価について述べ、第 4 節を小括とした。

## 第 1 節 特異的 PCR プライマーの設計

### 第 1 項 材料および方法

第 4 章で論じたように、NTM は菌種間での遺伝的差異が少なく、同章で決定した 16S rRNA 遺伝子、ITS 領域、*hsp65* 遺伝子、*rpoB* 遺伝子、*recA* 遺伝子、*sodA* 遺伝子の塩基配列では、ハギ類由来 *Mycobacterium* sp. に対する特異的なプライマーの設計は難しいと判断された。

そこで、次世代シーケンサー MiSeq (Illumina)によるディープシーケンスを行いハギ類由来 *Mycobacterium* sp. のドラフトゲノム配列を得ることによって、特異的な配列を検索し、そこからプライマー設計を行うこととした。

カワハギ分離菌株 NJB0901 を Middlebrook7H9 液体培地内で増菌したのち、QIAamp DNA Mini Kit(Qiagen)を使用し、DNA 抽出を行った。ディープシーケンスに必要なライブラリ調整には Nextera XT DNA ライブラリ調整キット(Illumina)を使用し、次世代シーケンサーMiSeq (Illumina)によりシーケンスを行った。得られたリード配列は、ソフトウェア CLC Genomics Workbench 6.5.1 (CLC bio)を使用し、近縁種であると考えられる *M.chelonae* ATCC35752 (Accession number : NZ\_CP010946)の配列上にマッピングし、コンティグ配列を得た。

得られたドラフトゲノム配列は、フリーソフトウェア Mauve を使用し *M.chelonae* ATCC35752 (Accession number : NZ\_CP010946)とのアライメントを行なったのち、Forward Primer は双方の共通配列上、Reverse Primer は NJB0901 株の特異配列上にそれぞれ設計した。

特異配列上に設計した Reverse Primer の配列は BLAST 検索を行い、NCBI のデータベース上に一致する登録配列の有無を確認した。



## 第 2 項 結果

次世代シーケンサーMiSeq (Illumina)によるシーケンスを行ない、*M.chelonae* ATCC35752 (Accession number : NZ\_CP010946)の配列上へマッピングした結果、合計 215 のコンティグ配列が得られた。

Mauve を使用した PCR プライマーの設計の様子を図 6-1-1 に示す。*M.chelonae* ATCC35752 とのアライメントの結果、表 6-1-1 に示す特異的プライマーM ste-F、M ste-R を設計した。

特異配列上に設計した Reverse Primer : M ste-R の配列を BLAST 検索にかけたところ、この配列に 100%該当する情報は NCBI のデータ上には存在しないことが確認された。

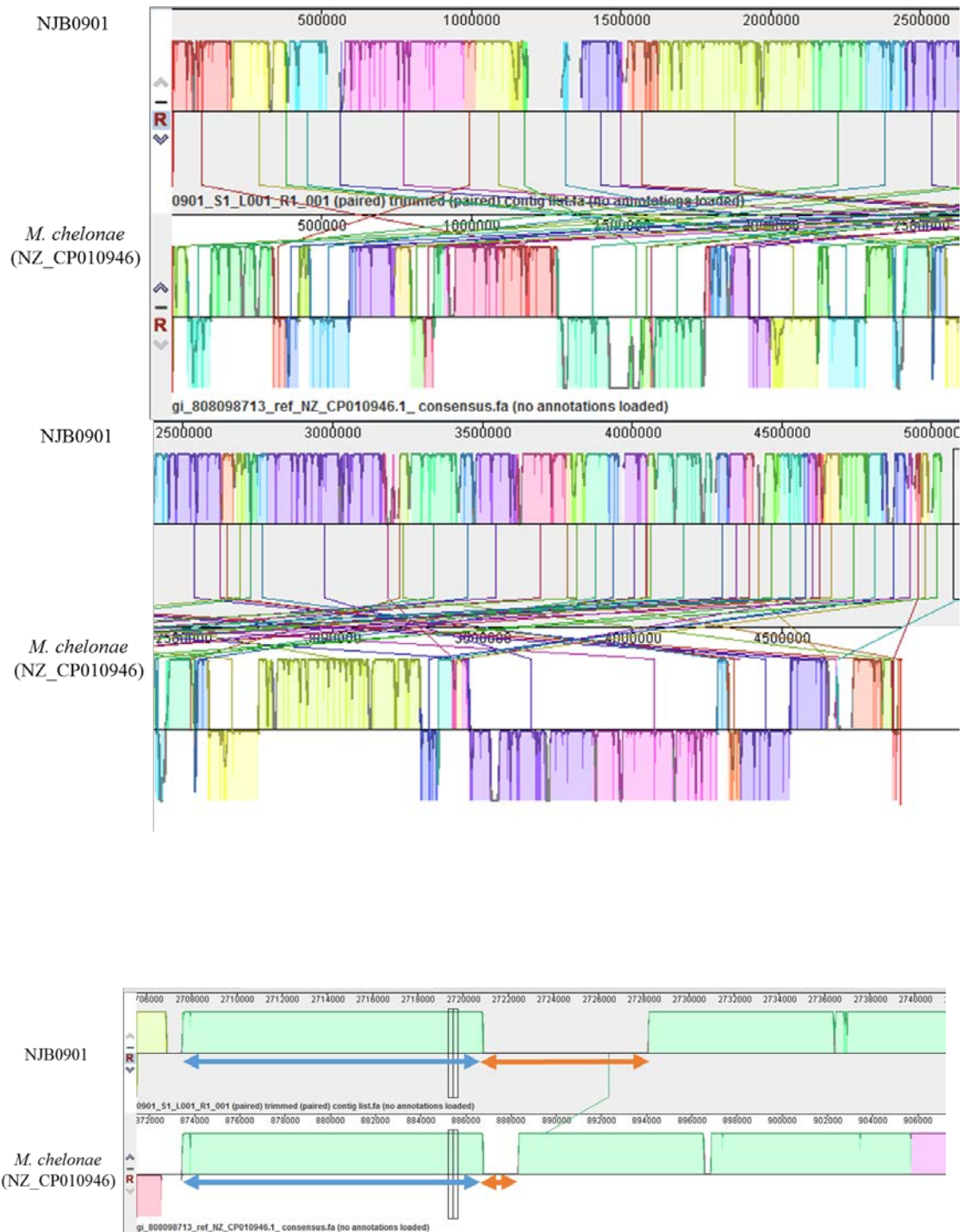


図 6-1-1 Mauve を使用したアライメントの様子。

青矢印は 2 菌株の共通配列部分を、橙矢印は非共通配列部分を示す。

Primers	Sequence 5'-3'	Length (bp)	Target size (bp)
M ste - F	gat cga tga gtc cgt cac cat cct g	25	445
M ste - R	g atc gct gca cca cgt gga gat gtt	25	

表 6-1-1 設計した特異的プライマー M ste-F, M ste-R のプライマー情報.

## 第 2 節 設計した PCR プライマーの特異性評価

### 第 1 項 材料および方法

本章第 1 節にて設計した特異的 PCR プライマー M ste-F, M ste-R を使用し実際に PCR 反応を行い、その特異性を評価した。

#### 1. 供試菌株

供試菌株 2009 年から 2013 年までにカワハギおよびウマヅラハギから分離された分離年、分離場所の異なる NJB0901、NJB1001 (愛媛県のカワハギ由来)、NFUMC11 (=NJB1101 高知県のカワハギ由来)、Nsiiisousui68 (=NJB1201)、Ns12sousuiL-3(=NJB1202) (以上、長崎県のカワハギ由来)、NJB1301、NJB1302 (愛媛県のウマヅラハギ由来) の計 6 菌株を使用した。

また、標準株である *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup>、*M.marinum* JCM17638<sup>T</sup>、*M.pseudoshottsii* JCM15466<sup>T</sup> と水族館飼育魚(キンメモドキ)から分離され *M.marinum* と同定された 1 菌株、養殖マサバから分離され *M.pseudoshottsii* と同定された 1 菌株、*M.chelonae* と同定されたヒトの臨床分離株 3 菌株も供試した(表 6-2-1)。

#### 2. DNA 抽出

各菌株は Middlebrook7H9 液体培地あるいは Middlebrook7H11 寒天培地上で十分に培養したのち集菌し、DNA 抽出を行った。菌株の DNA 抽出は、第 4 章 1 節で述べた方法と同じ煮沸・凍結融解による抽出方法で行った。

また、特異的 PCR プライマーがハギ類に由来するゲノム DNA に反応しないことを確認するため、ウマヅラハギの筋肉から QIAamp DNA Mini Kit(Qiagen)を使用し DNA を抽出した。

全ての DNA サンプルは、Nano drop Lite (Leica)により DNA 濃度を測定し、50ng/ $\mu$ L になるよう濃度調整を行った。

### 3. PCR 反応と PCR 産物の精製

PCR 反応は Go Taq(Promega)を使用した。1 サンプルあたり、5×Green Buffer 4 $\mu$ L、2.5mM dNTP mix 1.6 $\mu$ L、H<sub>2</sub>O 11.3 $\mu$ L、Forward Primer (10 $\mu$ M) 1 $\mu$ L、Reverse Primer (10 $\mu$ M) 1 $\mu$ L、Go Taq 0.1 $\mu$ L を混合し、抽出 DNA 1 $\mu$ L をテンプレート DNA として添加した。95°C 10 分間の熱変性の後、95°C 30 秒間の熱変性、60°C 30 秒間のアニーリング反応、72°C 60 秒間の伸長反応を 40 サイクル繰り返し、その後 72°C の伸長反応を 5 分間行った。

得られた PCR 産物 5 $\mu$ L を、エチジウムブロマイドを添加した 2% アガロースゲル (1×TBE buffer) 中で 100V 30 分間泳動した。泳動後、アガロースゲルは UV トランスイルミネーターで PCR 産物を確認した。

また、特異的な PCR 産物が確認されたサンプルのうち NJB0901 株を使用したものについては、本論第 4 章 1 節と同様の方法で PCR 産物を作製およびスピニングによる精製を行い、ダイレクトシーケンスによる部分塩基配列の決定を行った。シーケンス解析は FASMAC Co. (Kanagawa, Japan) によって実施され、得られた部分塩基配列については BLAST 検索を行った。

## 第 2 項 結果

電気泳動写真による検出結果を図 6-2-1 に示す。ハギ類由来 *Mycobacterium* sp. に対して設計した特異的 PCR プライマー M ste-F, M ste-R を使用して PCR を行ったところ、供試した 16 菌株のうちハギ類由来菌株に対してのみ PCR 産物を増幅し非特異的な増幅も認められなかった。

また、M ste-F, M ste-R がウマヅラハギの筋肉に対して反応することもなかった。

NJB0901 株鋳型にして合成された PCR 産物のシーケンス解析を行った結果、プライマー設計時に予想された 445bp が増幅されていることが明らかとなった。

### 第 3 項 考察

ハギ類由来 *Mycobacterium* sp. に最も近いと考えられる *M.chelonae* やその臨床分離株、*M.salmonihpilum* に対しても設計した特異的 PCR プライマーは反応しなかった。

また、日本で報告の多い魚類 NTM 症原因菌である *M.marinum* と *M.pseudoshottsii* にも特異的 PCR プライマーは反応しなかった。さらに、本プライマーで増幅される PCR 産物のシーケンスデータについて BLAST 検索を実施したが、データベース上に該当する配列情報との一致率は 10% 以下であった。

以上のことから、設計した PCR プライマーはハギ類由来 *Mycobacterium* sp. へのみ特異的に反応すると結論付けられた。

Lane	Samples	Origin	Lane	Samples	Origin
M	Size Marker		9	<i>M.chelonae</i> JCM6388 <sup>T</sup>	
1	<i>M.stephanolepiae</i> NJB0901	養殖カワハギ	10	<i>M.chelonae</i> strain	ヒト臨床分離株
2	<i>M.stephanolepiae</i> NJB1001	養殖カワハギ	11	<i>M.chelonae</i> strain	ヒト臨床分離株
3	<i>M.stephanolepiae</i> NFUMC11	養殖カワハギ	12	<i>M.chelonae</i> strain	ヒト臨床分離株
4	<i>M.stephanolepiae</i> Ns11sousui68	養殖カワハギ	13	<i>M.marinum</i> JCM17638 <sup>T</sup>	
5	<i>M.stephanolepiae</i> Ns12sousuiL-3	天然カワハギ	14	<i>M.marinum</i> strain	キンメドキ
6	<i>M.stephanolepiae</i> NJB1501	養殖ウマヅラハギ	15	<i>M.pseudoshottsii</i> JCM15466 <sup>T</sup>	
7	<i>M.stephanolepiae</i> NJB1502	養殖ウマヅラハギ	16	<i>M.pseudoshottsii</i> strain	マサバ
8	<i>M.salmoniphilum</i> ATCC13758 <sup>T</sup>		17	ウマヅラハギ抽出DNA	

表 6-2-1. 使用した供試菌株とその由来および、電気泳動時のレーン番号.



図 6-2-1 設計した PCR プライマーを使用して得られたそれぞれの PCR 産物の電気泳動結果を示す.

### 第3節 特異的 PCR プライマーの検出感度評価

設計した特異的 PCR プライマーの検出限界を評価するとともに、実際の診断方法を想定しウマヅラハギの組織サンプルを使用した検出感度の評価を実施した。

#### 第1項 材料および方法

##### 1. 菌体抽出 DNA に対する検出感度

設計した特異的 PCR プライマー M ste-F、M ste-R の検出感度を検討するため、NJB0901 株から抽出した DNA を 0.1pg~50ng/μL の濃度に調整し、各 1μL を総量 20μL の PCR mix 中に Template DNA として PCR 反応を行った。なお、菌株の DNA 抽出は、第4章1節で述べた方法と同じ煮沸・凍結融解による抽出方法で行った。

PCR 反応は、95℃ 10 分間の熱変性の後、95℃ 30 秒間の熱変性、60℃ 30 秒間のアニーリング反応、72℃ 60 秒間の伸長反応を 40 サイクル繰り返し、その後 72℃ の伸長反応を 5 分間行った。

得られた PCR プロダクト 5μL を、エチジウムブロマイドを添加した 2% アガロースゲル (1×TBE buffer) 中で 100V 30 分間泳動し、泳動後のアガロースゲルは UV トランスイルミネーターで PCR 産物を確認した。

##### 2. ウマヅラハギ組織を使用した検出感度

実際の診断方法を想定するため、健常ウマヅラハギの脾臓および腎臓組織と菌体を混合し、市販の抽出キットである QIAamp DNA mini kit(Qiagen)を使用し DNA 抽出を行い、特異的 PCR プライマーによる検出を試みた。

健常ウマヅラハギの腎臓および脾臓をそれぞれ 5mg 摘出し、それぞれを 1.5mL チューブ内でペッスルにてホモジェナイズした。ホモジェナイズした組織は



Buffer ATL(Qiagen) 60 $\mu$ L 中に懸濁して組織磨砕液とし、更に 20 $\mu$ L ずつ 1.5mL チューブ内に分注した。

そこへ Middlebrook7H9 液体培地中で培養した NJB0901 を 630nm 吸光度にて 0.10 の濁度に調整し、その調整菌液を滅菌水にて  $10^{-1}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-5}$  に希釈したものを 10 $\mu$ L ずつ添加した。

組織磨砕液と 3 段階の希釈菌液の混合液をボルテックスミキサーによりよく混和し、組織・菌体抽出サンプルとして供試した。

その後の DNA 抽出は、Qiagen による組織細胞からの DNA 抽出プロトコルに従って実施した。

抽出した DNA を使用し本項 1 と同様に PCR による増幅、電気泳動を実施し、トランスイルミネーターで検出の有無を確認した。

なお、 $10^{-1}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-5}$  に希釈した希釈菌液は Middlebrook7H11 寒天培地上に塗布し、CFU を算出した。

## 第 2 項 結果

### 1. 菌体抽出 DNA に対する検出感度

特異的 PCR プライマーによる菌体抽出 DNA に対する検出感度の結果を図 6-3-1 に示す。40 サイクルの PCR 反応により、設計した特異的プライマー (Mste-F、Mste-R) の菌体抽出 DNA に対する検出感度は 1pg/ $\mu$ L であった。

### 2. ウマヅラハギ組織を使用した検出感度

ウマヅラハギ組織・菌体抽出液を使用し実施した PCR 反応の検出結果を図 6-3-2 に示す。

腎臓、脾臓の両サンプルにおいても  $10^{-1}$ 、 $10^{-3}$  希釈菌液まで特異プライマーでの検出が可能であったが、 $10^{-5}$  希釈菌液では検出されなかった。また腎

臓、脾臓間での菌体 DNA の抽出効率に顕著な差は認められなかった。

なお、CFU の算出により、組織磨砕液に添加した  $10^{-1}$  希釈菌液 10 $\mu$ L 中には  $0.93 \times 10^5$  CFU の菌数が入っていたことが明らかとなった。

### 第3項 考察

菌体抽出DNAに対する検出感度の検討によれば、設計した特異的プライマー(Mste-F、Mste-R)の菌体抽出DNAに対する検出感度の限界は40サイクルのPCR反応で1pg/μLであり、病原体の検出用プライマーとしての有用性が示された。このから、病理組織像において菌体の著しい増殖が認められている腹腔内大型膿瘍を使用すれば、実際の病魚検査が可能であると推察された。

また、ウマヅラハギ組織を用いた実際の検出・診断を想定した検討では、設計した特異的プライマー(Mste-F、Mste-R)は、 $0.93 \times 10^3$  CFUの菌数までを検出した。

第3章で述べたように、ハギ類のNTM症では脾臓や腎臓にはほとんど病変を形成しないことが病理組織学的に示されている。このことから、本症の自然発症の初期段階において、脾臓や腎臓で $0.9 \times 10^3$  CFUの菌数が集簇することは考えにくく、これらの臓器を使用した早期診断は難しいと判断される。

今後、原因菌の分離培養に頼らない早期診断方法の確立を目指すには、菌体DNAの抽出効率あるいは、腎臓・脾臓以外の検査対象として適切な臓器の選択について更なる検討が必要であろう。



図 6-3-1 特異的 PCR プライマーの菌体抽出 DNA に対する検出結果。

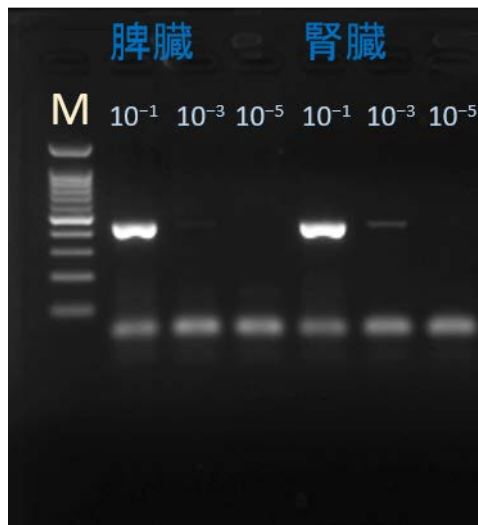


図 6-3-2 ウマヅラハギ組織・菌体抽出液を使用し実施した PCR 反応の検出結果。

#### 第 4 節 小括

次世代シーケンサーMiSeq (Illumina)によるディープシーケンスにより、ハギ類由来 *Mycobacterium* sp. に対して特異的に反応する PCR プライマー(M ste-F、M ste-R)を設計した。

設計した特異的 PCR プライマーは、ハギ類由来 *Mycobacterium* sp.に最も近いと考えられる *M.chelonae* やその臨床分離株には反応しなかった。また、次いで近縁であると考えられる *M.salmonihpilum*、日本で報告の多い魚類抗酸菌症原因菌である *M.marinum* と *M.pseudoshottsii* にも反応しなかった。

また、M ste-F, M ste-R がウマヅラハギの組織抽出 DNA に対して反応することもなかった。

これらのことから、設計した PCR プライマー(M ste-F, M ste-R)はハギ類由来 *Mycobacterium* sp. にのみ特異的に反応すると結論付けられるとともに、近縁種である *M.chelonae* との鑑別にも有効であると結論付けられた。

菌体抽出 DNA に対する検出感度の検討によれば、Mste-F、Mste-R の菌体抽出 DNA に対する検出感度の限界は 40 サイクルの PCR 反応で 1pg/μL であり、病原体の検出用プライマーとしての有用性が示された。

しかしながら、実際の検査手順を想定した脾臓および腎臓組織を使用し行った検出感度の検討では Mste-F、Mste-R が検出可能であった菌数は、 $0.93 \times 10^3$  CFU と比較的多かった。

今後、原因菌の分離培養に頼らない診断方法の確立を目指すには、菌体 DNA の抽出効率あるいは、検査対象とすべき臓器の選択について更なる検討が必要であると結論付けた。

## 第7章 総括

非結核性抗酸菌(Nontuberculous Mycobacteria,以下 NTM と略する)とは結核菌 *M. tuberculosis* を代表とする *M. tuberculosis* complex (*M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. orygis*, *M. pinnipedii*) とハンセン病の原因菌である *Mycobacterium leprae* を除く抗酸菌群を指す(Hoshino & Suzuki, 2015)。その中でも NTM は7日以内にコロニーを生じる迅速発育型 (Rapidly Growing)とコロニー形成に7日以上の日数を要する遅発育型 (Slowly Growing)に大きく類別され、Runyon による分類法によれば、コロニーの光発色性の有無によりさらに I~IV 群に分類される(Runyon, 1959)。多くの NTM は土壌や水中などの環境中に普遍的に存在することが知られているとともに、公共の給水システムやシャワーヘッド、公衆浴場や風呂桶など人の生活環境中にも生息することが明らかとなってきた (Falkinham III, 2016; Nakanaga *et al.*, 2014)。

魚類の NTM 症は 165 以上の魚種で報告されており、観賞魚、養殖魚、野生魚を問わず多くの海水魚・汽水魚・淡水魚が罹患することが明らかとなっている。原因菌としては *M. marinum* が最も多く報告されており、次いで *M. chelonae* および *M. fortuitum* が多く分離され、さらに *M. abscessus*, *M. shottsii*, *M. pseudoshottsii* などによる症例も報告されている(Jacobs *et al.*, 2009)。

近年、魚価の高いマイナー魚種としてハギ類の養殖が西日本を中心に行われている。身はフグに似ており、養殖魚は天然魚よりも肝臓(キモ)が冬に大きくなり美味であることから魚価が高く、新たな養殖魚種として期待を集めており、種苗生産および単独養殖が試みられている(Mizuno *et al.*, 2012)。

2009年以降、愛媛県水産研究センターにおいて養殖されているカワハギに高い死亡率を伴う疾病が発生しており、小川培地上でのコロニーの発育、ZN染色などの予備的な検討の結果、本事例は NTM による感染症である疑いが高いと判断された。本事例における自然発症魚を病理組織学的に精査し、発症魚の患部より原因菌の分離・

培養を試み、DNA-DNA ハイブリダイゼーション試験による同定を試みた結果、本事例がカワハギで初めての NTM 感染症の症例であることが明らかとなった。また、小川培地上に分離された原因菌を使用して健常なカワハギに対して病原性試験を実施したところ、原因菌はカワハギに対して高い病原性を示すことを明らかにした。

2011 年以降には日本の他の海域で、それまでには事例のなかったカワハギの‘天然魚’および近縁種である‘ウマヅラハギ’においても類似した NTM の感染が疑われる事例が相次いで発生しており、感染地域や感染魚種の拡大が懸念された。

第 2 章では、2009 年～2013 年にかけて愛媛県、高知県、長崎県で天然および養殖ハギ類から相次いで分離された NTM 26 菌株を使用し、生物学的および生化学的な検討と、薬剤感受性について検討した。

それらハギ由来菌株は Ziehl-Neelsen (ZN) 染色で抗酸性を示し、強い凝集性を有していた。また、コロニー形態は、すべて R/(S)型と判定された。7 日間の培養の結果、ハギ類由来菌株は 15～35℃の間で発育が見られ、30℃で最も良好な発育が認められた。また、近縁種である可能性が示唆される *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> もハギ類由来菌株と同様に 30℃で最も良好な発育が認められたが、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> は 25℃で最も良好に発育した。ハギ類由来菌株はいずれも、7 日以内にコロニーを生じ、光発色性を持たないことから、Runyon IV 群の菌種であることが明らかとなった。

PNB 培地発育試験、硝酸塩還元試験、カタラーゼ試験、耐熱性(68℃)カタラーゼ試験、アリルスファターゼ(Wayne 3 日法)、ウレアーゼ試験、ピクリン酸培地発育能試験、鉄取り込み能試験、5%食塩耐性試験、Tween80 水解試験(5,10 日)の試験結果は供試したハギ類由来菌株は全く同一であった。また、ピクリン酸培地発育能試験、5%食塩耐性試験、鉄取り込み試験はハギ類由来菌株と *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup>、*M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> との鑑別に有効であることが示された。ハギ類由来菌株は同一の生物学的および生化学的性状を呈したことから、それらはいずれも同一菌種である可能性が示唆され、供試した標準菌株の中では *M.chelonae* に最も近いと

判断された。

水産用医薬品に対する薬剤感受性試験の結果からは、本試験で使用した 7 薬剤の中ではエリスロマイシンが比較的低い MIC を示したが、残りの 6 薬剤にはハギ類由来分離菌株に対する有効性を見出せなかった。ヒトの抗酸菌治療薬を使用した薬剤感受性試験では、*M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> と *M.salmoniphilum* ATCC13748<sup>T</sup> はドキシサイクリンに対して耐性を示していたが、ハギ類由来菌株は  $\leq 1\mu\text{g/mL}$  と低い MIC を示していた。CLSI が定めるドキシサイクリンに関する最小発育阻止濃度の解釈基準は  $\leq 1\mu\text{g/mL}$  が感受性(Susceptible)、 $2\sim 4\mu\text{g/mL}$  が中間型(Intermediate)、 $\geq 8\mu\text{g/mL}$  が耐性(Resistant)であることから、ハギ類由来株はドキシサイクリンに対して感受性を示すことが明らかとなった。現在、水産用医薬品の中で塩酸ドキシサイクリンはスズキ目魚類のレンサ球菌症に対してのみ経口投与が認められている(農林水産省 消費・安全局 畜水産安全管理課, 2016)。今後、ドキシサイクリンの養殖ハギ類に対する毒性、魚体内での代謝速度、躯幹筋および内臓における残留性を検討する必要がある。また、ドキシサイクリンの感作によってハギ類由来菌株が耐性能を獲得する可能性が得るか否か等、慎重な検討が必要であると考えられた。

第 3 章では、カワハギを使用した侵入門戸の検討およびカワハギ由来菌株を使用したウマヅラハギに対する病原性の検討を、人為感染試験により行った。カワハギ NTM 症自然発症例では、消化管漿膜面や腸間膜、肝臓を中心に病変形成が認められるため、鼻腔粘膜上皮および消化管粘膜上皮を侵入門戸として感染が成立する可能性が考えられる。それを検討する目的で、腹腔内接種より自然な感染経路を再現しうる浸漬接種および経口接種による人為感染試験を実施したが、どちらの接種法においても感染は成立しなかったと判定された。このことから、本症の発生機序には何らかの補助的な因子が関与している可能性が推測された。

また、カワハギで発生している NTM 症の原因菌がウマヅラハギにも感染することが示され、腹腔内に多量の腹水および白色結節が観察される点で自然発症例に類似し



た所見を呈していた。以上より、本原因菌が双方のハギ類に同等の高い病原性を有していることが明らかとなった。

病理組織学的に、いずれの魚種においても腹腔内の腸管漿膜上、腸間膜、肝臓漿膜上に抗酸菌を含んだ膿瘍形成性肉芽腫が観察され、腎臓および脾臓にはほとんど著変が認められなかった。このことから、*M.marinum* や *M.pseudoshottsii* などの一般的な魚類 NTM 症で分離に適するとされる脾臓、腎臓からの分離は、本症においては適切ではないことが明らかとなり、誤診を招く可能性をも示唆した。

第 4 章では、ハギ類由来 NTM を用いて分子生物学的な検討を行った。シーケンス解析の結果からは、異なる年、異なる海域で 2 種のハギ類より分離された 6 菌株は、16S rRNA、*hsp65*、*rpoB*、*recA*、*sodA* の 5 つの遺伝子の部分塩基配列について全く同一の配列を持つことが明らかとなった。このことから、ハギ類より分離されたすべての菌株は同一種であることが示唆された。また、複数の遺伝子領域を使用した分子系統解析の結果、ハギ類由来 *Mycobacterium* sp. は、*M.chelonae* に近縁な新規の *Mycobacterium* 属であることが強く示唆された。

それと共に、16S rRNA 遺伝子のみのシーケンス解析あるいはそれを用いた BLAST 検索では *M.salmoniphilum* に同定されてしまう可能性があり、注意が必要であることが明らかとなった。

その点で、*hsp65* 遺伝子の部分塩基配列の PCR 産物を使用した制限酵素 *Hae*III によるパターン解析が、ハギ類由来 *Mycobacterium* sp. と近縁種である *M.chelonae* および *M.salmoniphilum* との鑑別に有効であることが示された。

また、制限酵素 *Xba* I、*Ase* I を使用して実施した PFGE によるジェノタイプ解析の結果、異なる年、異なる海域で 2 種のハギ類より分離された *Mycobacterium* sp. 6 菌株は全く同一のジェノタイプを持つ種であることが明らかとなった。このことは、ハギ類に病原性を示す *Mycobacterium* sp. が日本の南西海域で既に広く定着しつつあるということを示唆するものであった。

第 5 章では、MALDI-TOF MS を使用したハギ類由来 NTM の菌体に含まれるタンパク質および総脂質の解析を実施した。菌体から抽出したタンパク質を使用した MALDI Biotyper による解析から、NJB0901 株は *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> と *M.salmoniphilum* ATCC13758<sup>T</sup> と異なる独自のスペクトルパターンを持つことが明らかとなった。また、NJB0901 株の 2 つの標準株に対する Score Value の結果は、NJB0901 株が種レベルでそれら 2 菌種と異なることを示していた。

MALDI-TOF MS による総脂質解析の結果からは、NJB0901 と *M.chelonae* JCM6388<sup>T</sup> が Tween 80 を代謝し、糖脂質合成を行っていることが示唆されるとともに、その代謝、合成のメカニズムが 2 菌種間で異なる可能性が考えられた。

第 6 章では、次世代シーケンサー MiSeq (Illumina) により得たドラフトゲノム配列により、ハギ類由来 *Mycobacterium* sp. に対して特異的に反応する PCR プライマー (M ste-F、M ste-R) を設計した。

またハギ類由来 *Mycobacterium* sp. に最も近いと考えられる *M.chelonae* やその臨床分離株、次いで近縁であると考えられる *M.salmoniphilum*、日本で報告の多い魚類抗酸菌症原因菌である *M.marinum* と *M.pseudoshottsii* にも、今回設計した特異的 PCR プライマーは反応しなかった。また、M ste-F、M ste-R がウマヅラハギの組織抽出 DNA に対して反応することもなかった。これらのことから、設計した PCR プライマー (M ste-F、M ste-R) はハギ類由来 *Mycobacterium* sp. にのみ特異的に反応すると結論付けられた。

菌体抽出 DNA に対する検出感度の検討によれば、Mste-F、Mste-R の菌体抽出 DNA に対する検出感度の限界は 40 サイクルの PCR 反応で 1pg/μL であり、病原体の検出用プライマーとしての有用性が示された。しかしながら、実際の検査手順を想定した脾臓および腎臓組織を使用し行った検出感度の検討では Mste-F、Mste-R が検出可能であった菌数は、 $0.93 \times 10^3$  CFU と比較的多かった。今後、原因菌の分離培養に頼らない診断方法の確立を目指すには、菌体 DNA の抽出効率あるいは、検査対象とすべ

き臓器の選択について更なる検討が必要であると結論付けた。

## 謝辞

本研究を実施するにあたり、ご指導とご鞭撻を賜り、且つ本論文のご高閲を頂きました日本獣医生命科学大学 水族医学教室の和田新平教授に深く感謝の意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり数々の研究手法のご指導ならびにデータ解析のご指導を賜りました、日本獣医生命科学大学 水族医学教室の倉田修教授に深謝の意を表します。

本研究を実施するにあたり、快く菌株の分与を賜りました長崎県水産試験場の杉原志貴先生、愛媛県八幡浜漁業協同組合の福岡利広先生、国立研究開発法人 水産研究・教育機構、水産大学校の安本信哉先生、鹿児島県水産技術センターの柳宗悦先生に謹んで御礼申し上げます。

本研究での PFGE の実施にあたり、多大なるご援助を賜りました国立研究開発法人 水産研究・教育機構、増養殖研究所の湯浅啓先生、嶋原佳子先生に厚く御礼申し上げます。

本研究のタンパク質および脂質分析を実施するにあたり、多大なるご援助を賜りました日本獣医生命科学大学 生体分子化学教室の片山欣哉准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の次世代シーケンサーによるドラフトゲノム配列解析を実施するにあたりご協力を賜りました東京農工大学 国際家畜感染症防疫研究教育センターの水谷哲也先生、大松勉先生、片山幸江先生に厚く御礼申し上げます。

また、特異的 PCR プライマーの設計にあたりご協力を賜りました国立感染症研究所 ハンセン病研究センターの星野仁彦先生、吉田光範先生に謹んで御礼申し上げます。

最後に、本研究の遂行に協力を惜しまなかった日本獣医生命科学大学 水族医学教室の室員諸氏に対しまして心より御礼申し上げます。

## 参考文献

- Adékambi, T. & Drancourt, M. (2004).** Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 2095–2105.
- Balada-Llasat, J. M., Kamboj, K. & Pancholi, P. (2013).** Identification of mycobacteria from solid and liquid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in the clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology* **51**, 2875–2879.
- Balážová, T., Makovcová, J., Šedo, O., Slaný, M., Faldyna, M. & Zdráhal, Z. (2014).** The influence of culture conditions on the identification of *Mycobacterium* species by MALDI-TOF MS profiling. *FEMS Microbiology Letters* **353**.
- Blackwood, K. S., He, C., Gunton, J., Turenne, C. Y., Wolfe, J. & Kabani, A. M. (2000).** Evaluation of recA sequences for identification of *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol* **38**, 2846–2852.
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959).** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* **37**, 911–917.
- Van Boxtel, R. M., Lambrecht, R. S. & Collins, M. T. (1990).** Effects of colonial morphology and tween 80 on antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **34**, 2300–2303.
- Brown-Elliott, B. A. & Wallace, R. J. (2002).** Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clinical microbiology reviews* **15**, 716–46. American Society for Microbiology.
- Bruker Daltonics. (2016).** *MALDI-TOF MS Innovation with Integrity. Bruker Daltonics.*

- Bryant, J. M., Grogono, D. M., Greaves, D., Foweraker, J., Roddick, I., Inns, T., Reacher, M., Haworth, C. S., Curran, M. D. & other authors. (2013).** Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *The Lancet* **381**, 1551–1560.
- Bryant, J. M., Grogono, D. M., Rodriguez-Rincon, D., Everall, I., Brown, K. P., Moreno, P., Verma, D., Hill, E., Drijkoningen, J. & other authors. (2016).** Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. *Science* **354**.
- Buchan, B. W., Riebe, K. M., Timke, M., Kostrzewa, M. & Ledebøer, N. A. (2014).** Comparison of MALDI-TOF MS With HPLC and Nucleic Acid Sequencing for the Identification of *Mycobacterium* Species in Cultures Using Solid Medium and Broth. *Am J Clin Pathol* **141**, 25–34.
- Buckwalter, S. P., Olson, S. L., Connelly, B. J., Lucas, B. C., Rodning, A. A., Walchak, R. C., Deml, S. M., Wohlfiel, S. L. & Wengenack, N. L. (2016).** Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of *Mycobacterium* species, *Nocardia* species, and Other Aerobic Actinomycetes. *Journal of Clinical Microbiology* **54**, 376–384.
- Butler, W. R. & Guthertz, L. S. (2001).** Mycolic Acid Analysis by High-Performance Liquid Chromatography for Identification of *Mycobacterium* Species. *Clinical Microbiology Reviews* **14**, 704–726.
- Butler, W. R. & Kilburn, J. O. (1990).** High-performance liquid chromatography patterns of mycolic acids as criteria for identification of *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, and *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of clinical microbiology* **28**, 2094–2098.

- Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A. & Wolk, D. M. (2013).** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews* **26**, 547–603. American Society for Microbiology.
- Clinical & Laboratory Standard Institute. (2011).** Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard, 2nd edn, M24-A2.
- Cooksey, R. C., Jung, M. A., Yakrus, M. A., Butler, W. R., Adékambi, T., Morlock, G. P., Williams, M., Shams, A. M., Jensen, B. J. & other authors. (2008).** Multiphasic approach reveals genetic diversity of environmental and patient isolates of *Mycobacterium mucogenicum* and *Mycobacterium phocaicum* associated with an outbreak of bacteremias at a Texas hospital. *Applied and environmental microbiology* **74**, 2480–2487.
- Dalsgaard, I., Møllgaard, S. & Larsen, J. L. (1992).** Mycobacteriosis in cod (*Gadus morhua* L.) in Danish coastal waters. *Aquaculture* **107**, 211–219.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlouz, A., Martelin, R., Gayral, J. P. & Raoult, D. (2000).** 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of clinical microbiology* **38**, 3623–30.
- Dvorska, L., Matlova, L., Ayele, W. Y., Fischer, O. A., Amemori, T., Weston, R. T., Alvarez, J., Beran, V., Moravkova, M. & Pavlik, I. (2007).** Avian tuberculosis in naturally infected captive water birds of the Ardeideae and Threskiornithidae families studied by serotyping, IS901 RFLP typing, and virulence for poultry. *Veterinary Microbiology* **119**, 366–374.
- Falkinham III, J. O. . (2016).** Current Epidemiologic Trends of the Nontuberculous

- Mycobacteria (NTM). *Current Environmental Health Reports* **3**, 161–167.
- Fujiwara, N. (2012).** Distribution, Characterization of Mycobacterial Glycolipids and Host Responses. In *Glycosylation*. Edited by T. Petrescu. InTech.
- Fukano, H., Wada, S., Kurata, O., Mizuno, K., Nakanaga, K. & Hoshino, Y. (2015).** Nontuberculous Mycobacteriosis in Farmed Thread-sail Filefish *Stephanolepis cirrhifer*. *Fish Pathol* **50**, 68–74.
- Griffith, D. E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B. A., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., Holland, S. M., Horsburgh, R., Huitt, G. & other authors. (2007).** An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **175**, 367–416. American Thoracic Society.
- Harriff, M. J., Bermudez, L. E. & Kent, M. L. (2007).** Experimental exposure of zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton), to *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium peregrinum* reveals the gastrointestinal tract as the primary route of infection: a potential model for environmental mycobacterial infection. *Journal of Fish Diseases* **30**, 587–600. Blackwell Publishing Ltd.
- Hoshino, Y. & Suzuki, K. (2015).** Differential diagnostic assays for discriminating mycobacteria, especially for nontuberculous mycobacteria: what does the future hold? *Future Microbiol* **10**, 205–216.
- Iida, T., Sakai, T. & Takano, T. (2016).** Edwardsiellosis in Fish. *Fish Pathology* **51**, 87–91.
- Izumi, H., Gauthier, M. E. A., Degnan, B. M., Ng, Y. K., Hewavitharana, A. K., Shaw, P. N. & Fuerst, J. A. (2010).** Diversity of *Mycobacterium* species from marine sponges and their sensitivity to antagonism by sponge-derived rifamycin-synthesizing actinobacterium in the genus *Salinispora*. *FEMS Microbiology*



*Letters* 313.

- Jacobs, J. M., Stine, C. B., Baya, A. M. & Kent, M. L. (2009).** A review of mycobacteriosis in marine fish. *Journal of Fish Diseases* **32**, 119–130.
- Johnson, M. G. & Stout, J. E. (2015).** Twenty-eight cases of *Mycobacterium marinum* infection: retrospective case series and literature review. *Infection* **43**, 655–662.
- Kawakami, K. & Kusuda, R. (1989).** In vitro effect of some chemotherapeutic on the causative of *Mycobacterium* infection in yellowtail. *Niipon Suisan Gakkaishi* **55**, 2111–2114.
- Kent, P. T. & Kubica, G. P. (1985).** Public health mycobacteriology. *A guide for the level 3 laboratory*.
- Kim, B.-J., Yi, S.-Y., Shim, T.-S., Do, S. Y., Yu, H.-K., Park, Y.-G., Kook, Y.-H. & Kim, B.-J. (2012).** Discovery of a novel hsp65 genotype within *Mycobacterium massiliense* associated with the rough colony morphology. *PLoS one* **7**, e38420.
- Kim, B.-J., Hong, S.-H., Kook, Y.-H. & Kim, B.-J. (2014).** *Mycobacterium paragordoniae* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species closely related to *Mycobacterium gordonae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **64**, 39–45.
- Koh, W.-J., Jeong, B.-H., Jeon, K., Lee, N. Y., Lee, K. S., Woo, S. Y., Shin, S. J. & Kwon, O. J. (2012).** Clinical Significance of the Differentiation Between *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* in *M. avium* Complex Lung Disease. *Chest* **142**, 1482–1488.
- Kušar, D., Zajc, U., Jenčič, V., Očepek, M., Higgins, J., Žolnir-Dovč, M. & Pate, M. (2016).** Mycobacteria in aquarium fish: results of a 3-year survey indicate caution required in handling pet-shop fish. *Journal of Fish Diseases*.
- Lewis, S. & Chinabut, S. (2011).** Mycobacteriosis and nocardiosis. In *Fish diseases*

*and disorders Volume 3: viral, bacterial and fungal infections*, pp. 397–423.

Wallingford: CABI.

**Li, J., Chong, A. H., O’Keefe, R. & Johnson, P. D. (2014).** The fish tank strikes again:

Metachronous nontuberculous mycobacterial skin infection in an

immunosuppressed host. *Australasian Journal of Dermatology* **55**, e77–e79.

**Lotz, A., Ferroni, A., Beretti, J.-L., Dauphin, B., Carbonnelle, E., Guet-Revillet, H.,**

**Vezeris, N., Heym, B., Jarlier, V. & other authors. (2010).** Rapid Identification of

Mycobacterial Whole Cells in Solid and Liquid Culture Media by Matrix-

Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal*

*of Clinical Microbiology* **48**, 4481–4486.

**Luo, L., Li, B., Chu, H., Huang, D., Zhang, Z., Zhang, J., Gui, T., Xu, L., Zhao, L. &**

**other authors. (2016).** Characterization of Mycobacterium Abscessus Subtypes in

Shanghai of China: Drug Sensitivity and Bacterial Epidemicity as well as

Clinical Manifestations. *Medicine* **95**, e2338.

**Miyazaki, T. & Kaige, N. (1985).** Comparative Histopathology of Edwardsiellosis in

Fishes. *Fish Pathology* **20**, 219–227.

**Miyazaki, T., Gutierrez, M. A. & Tanaka, S. (1992).** Experimental infection of

Edwardsiellosis in the Japanese eel. *Fish Pathology* **27**, 39–47.

**Mizuno, K., Shimizu-Yamaguchi, S., Miura, C. & Miura, T. (2012).** Method for

efficiently obtaining fertilized eggs from the black scraper *Thamnaconus*

*modestus* by natural spawning in captivity. *Fisheries Science* **78**, 1059–1064.

**Nakanaga, K., Sekizuka, T., Fukano, H., Sakakibara, Y., Takeuchi, F., Wada, S.,**

**Ishii, N., Makino, M., Kuroda, M. & Hoshino, Y. (2014).** Discrimination of

*Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* from *Mycobacterium abscessus*

subsp. *abscessus* in clinical isolates by multiplex PCR. *Journal of clinical*

*microbiology* **52**, 251–9.

- Peterson, T., Ferguson, J., Watral, V., Mutoji, K., Ennis, D. & Kent, M. (2013).** Paramecium caudatum enhances transmission and infectivity of Mycobacterium marinum and M. chelonae in zebrafish Danio rerio. *Diseases of Aquatic Organisms* **106**, 229–239.
- Reavill, D. R. & Schmidt, R. E. (2012).** Mycobacterial Lesions in Fish, Amphibians, Reptiles, Rodents, Lagomorphs, and Ferrets with Reference to Animal Models. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* **15**, 25–40.
- Ripoll, F., Deshayes, C., Pasek, S., Laval, F., Beretti, J.-L., Biet, F., Risler, J.-L., Daffé, M., Etienne, G. & other authors. (2007).** Genomics of glycopeptidolipid biosynthesis in Mycobacterium abscessus and M. chelonae. *BMC genomics* **8**, 114.
- Ross, A. J. (1960).** Mycobacterium salmoniphilum sp. nov. from salmonid fishes. *American Review of Respiratory Disease* **81**, 241–250.
- Runyon, E. H. (1959).** Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *The Medical clinics of North America* **43**, 273–90.
- Saleeb, P. G., Drake, S. K., Murray, P. R. & Zelazny, A. M. (2011).** Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology* **49**, 1790–1794.
- Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Botrger, E. C. & Bodmer, T. (1993).** Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. *J Clin Microbiol* **175**–178.
- Vanitha, J. D., Venkatasubramani, R., Dharmalingam, K. & Paramasivan, C. N. (2003).** Large-restriction-fragment polymorphism analysis of Mycobacterium

- chelonae and Mycobacterium terrae isolates. *Applied and environmental microbiology* **69**, 4337–4341.
- Wang, C., Mahrous, E. A., Lee, R. E., Vestling, M. M. & Takayama, K. (2011).** Novel Polyoxyethylene-Containing Glycolipids Are Synthesized in *Corynebacterium matruchotii* and *Mycobacterium smegmatis* Cultured in the Presence of Tween 80. *Journal of lipids* **2011**, 676535.
- Weerakhun, S., Hatai, K., Murase, T. & Hirae, T. (2008).** In Vitro and In Vivo Activities of Drugs against *Mycobacterium marinum* in Yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Fish Pathology* **43**, 106–111.
- William M, R., O’Shaughnessy, T. C. & Jakko van, I. (2014).** Human-to-human transmission of or victims of a shared source? *The European respiratory journal* **44**, 1085–1087.
- Wu, T.-S., Chiu, C.-H., Yang, C.-H., Leu, H.-S., Huang, C.-T., Chen, Y.-C., Wu, T.-L., Chang, P.-Y., Su, L.-H. & other authors. (2012).** Fish Tank Granuloma Caused by *Mycobacterium marinum*. *PloS One* **7**, e41296.
- Yakrus, M. A., Hernandez, S. M., Floyd, M. M., Sikes, D., Butler, W. R. & Metchock, B. (2001).** Comparison of methods for Identification of *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae* isolates. *Journal of clinical microbiology* **39**, 4103–10. American Society for Microbiology.
- Zerihun, M. A., Nilsen, H., Hodneland, S. & Colquhoun, D. J. (2011).** *Mycobacterium salmoniphilum* infection in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* **34**, 769–781.
- 四元秀毅 & 倉島篤行. (2010). *結核Up to Date (改訂第3版)*. 南江堂.
- 小松方. (2016). MALDI-TOF MS を用いた臨床微生物学的検査の新しい潮流 原理から応用まで. 日本臨床微生物学会 **26**, 79–89.

藤木明子. (2011). 「Medical Technology」別冊 最新 染色法のすべて. In 「*Medical Technology*」別冊 最新 染色法のすべて, pp. 348–349. Edited by 水口國雄. 東京: 医歯薬出版株式会社.

南隆之, 金丸昌慎, 岩田一夫, 中西健二, 山下亜純, 三吉泰之, 福田穰 & 吉田照豊.

(2012). 西日本における養殖カワハギの疾病発生状況. *Fish Pathology* **47**, 111–113.

日本結核病学会 抗酸菌検査法検討委員会 (Ed.). (2007). 結核菌検査指針2007. 公益財団法人結核予防会.

農林水産省 消費・安全局 畜水産安全管理課. (2016). 水産用医薬品の使用について 第29報.