

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)

学位論文内容の要約

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科
獣医学専攻博士課程平成 25 年入学

深野 華子

(指導教授：和田 新平)

非結核性抗酸菌(Nontuberculous Mycobacteria,以下 NTM)とは結核菌 *Mycobacterium 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 *M. leprae* を除く *Mycobacterium* 属抗酸菌群を指し、Runyon 分類によれば、その中でも NTM は発育速度(遅発育型 ;slowly growing mycobacteria と迅速発育型;rapidly growing mycobacteria)と光発色性によって 4 つのグループに分類される。

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*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. shottsii*, *M. pseudoshottsii*, *M. salmoniphilum* が多く報告されている。

2009 年、愛媛県の養殖生簀内のカワハギ (*Stephanolepis cirrhifer*) に高い死亡率を伴う疾病が発生した。死亡魚からは抗酸性で非光発色性の迅速発育型 NTM が分離され、培養菌を用いた DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる試験の結果、これらは *M. chelonae* に近縁である可能性が示された。2009 年から 2013 年までには日本の他の海域で、カワハギの‘天然魚’や近縁種であるウマヅラハギ (*Thamnaconus modestus*) においても類似した NTM が分離される事例が発生している。

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生物学的および生化学的に同一の特徴を持っており、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、5 日間 30℃で培養すると、ほとんどのコロニーは Rough 型でそれらは光発色性を伴わなかった。

試験した生化学試験のうち、ハギ類由来菌株と *M. chelonae* JCM 6388^T は、耐熱性(68℃)カタラーゼ試験に陽性、ピクリン酸培地発育能試験に陰性を示したが、*M. salmoniphilum* ATCC13758^T はこれらの試験に対してそれぞれ陰性、陽性の結果を示した。一方で、ハギ類由来菌株と *M. salmoniphilum* ATCC13758^T は、5% 食塩添加培地上でほとんど発育が認められなかったが、*M. chelonae* JCM6388^T は発育が認められた。このことから、これらの試験はハギ類由来菌株と *M. chelonae* JCM6388^T、*M. salmoniphilum* ATCC13758^T との鑑別に有効であることが示された。

薬剤感受性試験の結果から、ハギ類由来菌株はエリスロマイシンに対して比較的低い最小発育阻止濃度を示し、クラリスロマイシン、ドキシサイクリン、シプロフロキサシンには感受性を示した。

第 3 章では、人為感染試験による感染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行った。

本試験では、浸漬接種、経口接種、腹腔内接種による人為感染試験を実施したが、感染が成立したのは腹腔内投与のものだけであった。このことから、本症の自然発症の成立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。

ウマヅラハギに対する病原性試験では、試験区の供試魚は 4 日目に 50% が死亡に至り、試験最終日には死亡率は 100% に達した。このことから、カワハギから分離された菌株がウマヅラハギにも病原性を持つことが示された。また、死亡魚は病理組織学的に、腸管漿膜上および腸管膜に抗酸菌を含んだ膿瘍形成性肉芽腫を形成する点で、カワハギで認められる所見と類似していた。

一般的な魚類の NTM 症では、脾臓、腎臓の腫大やそれらの臓器に形成される白色結節が主だった特徴であるとされている。しかし、本症においては脾臓や腎臓に白色結節や肉芽腫形成はほとんど観察されない。このことから、

一般的な魚類 NTM 症で菌分離部位とされる脾臓や腎臓は、カワハギ NTM 症では適切な分離部位ではないことが示唆された。

第 4 章では、マルチローカスシーケンスタイピングと分子生物学的解析、*hsp65* 遺伝子による PRA パターン解析、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)による解析を実施した。

シーケンス解析は 16S rRNA 遺伝子, RNA polymerase β -subunit (*rpoB*) 遺伝子, 65-kDa heat shock protein (*hsp65*) 遺伝子, recombinase A (*recA*) 遺伝子, superoxide dismutase A (*sodA*) 遺伝子を使用して実施した。

これら 5 つの部分塩基配列は、試験したすべてのハギ類由来菌株において 100%の一致が見られた。代表株として NJB0901 のこれらの配列を Gen Bank データベースに登録した(16S rRNA: AB971866; *rpoB*: LC008146; *hsp65*: LC008145; *recA*: LC008147; and *sodA*: LC008148)。

16S rRNA 遺伝子に基づいた分子系統解析の結果、NJB0901 は *M. chelonae*-*M. abscessus* group に属することが示された。また、16S rRNA, *hsp65*, *rpoB*, *recA*, *sodA* の部分塩基配列の連結分子系統樹を作製したところ、NJB0901 は *M. chelonae* と *M. salmoniphilum* とも高いブートストラップ値を伴って明瞭な分岐が認められた。

PRA パターン解析は、NJB0901, *M. chelonae* JCM6388^T, and *M. salmoniphilum* ATCC13758^T を使用して実施した。*hsp65* 遺伝子の PCR 産物を *BstEII* と *HaeIII* の制限酵素で消化し、切断された PCR 産物を電気泳動し、UV トランスイルミネーターでバンドを確認した。また、シーケンスにより得られた配列情報を *BstEII* と *HaeIII* の制限酵素認識部位でソフトウェア(GENETYX ver 11.0)上で切断し、消化断片の塩基配列数を比較した。また、それらの消化断片の塩基配列数は PRASITE 上で他菌種と比較した。

試験したすべての供試菌は *BstEII* に対しては同じフラグメントパターン

を示し、その結果は GENETYX で得られた結果と一致していた。

一方で、*Hae*III では NJB0901 が 220,54,58bp のフラグメントに切断されるのに対し、*M. chelonae* および *M. salmoniphilum* は 197, 60, 54, あるいは 197, 60, 58 bp に切断されていた。このことから、制限酵素 *Hae*III によるパターン解析が、ハギ類由来 NJB0901 と他菌種との鑑別に有効であることが示された。

PFGE 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 菌株を使用して実施した。その結果、それらすべての菌株は 2 種類の制限酵素 (*Xba* I、*Ase* I) に対して全く同じ切断パターンを示すことが明らかとなった。このことから、異なる状況で分離された供試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り、この NTM が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 を使用しタンパク質および脂質解析を実施した。タンパク質分析は、MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, Inc.) によって実施し、NJB0901 株、*M. chelonae* JCM6388^T、*M. salmoniphilum* ATCC13758^T を供試した。マススペクトルの解析には autoflex speed (Bruker Daltonics, Inc.) を使用し、NJB0901 株と他の 2 種の標準株との相性は Biotyper の Score Value によって評価した。

NJB0901 に対する *M. chelonae* JCM6388^T、*M. salmoniphilum* ATCC13758^T それぞれの Score Value は 1.893 と 1.301 であった。Bruker Daltonics 社による仕様書に従えば、この結果は NJB0901 が独自のタンパク質プロファイルを持っていることを示唆していた。

総脂質分析には、NJB0901 株、*M. chelonae* JCM6388^T、*M. salmoniphilum* ATCC13758^T を供試し、総脂質は Middlebrook7H11 寒天培地に Tween80 を含む培地と Tween80 を含まない培地双方で培養した菌体から抽出した。

Tween80 を含む培地と Tween80 を含まない培地双方で培養した NJB0901 および *M. cheloane* のスペクトルパターンを比較すると、Tween80 を含む培地で培養したものだけに 44amu 間隔を特徴とするスペクトルパターンが認められた。また、それら 2 菌種のパターンは異なる質量範囲に検出された。MALDI-TOF MS による総脂質解析の結果からは、NJB0901 が独自の Tween 80 の代謝機構を持っていることが示唆された。

第 6 章では、ハギ類由来 *Mycobacterium* sp. に対する特異的 PCR プライマーを設計し、迅速診断法としての有用性について検討した。

PCR プライマーは、次世代シーケンサーによって得られたドラフトゲノム配列を元に設計した。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ことが示され、NJB0901 の菌体抽出 DNA に対する検出感度は 1pg/ μ L であった。この結果から、特異的 PCR プライマーの迅速同定に対する高い有用性が示された。

このプライマーを使用し、実際の検査手順を想定した組織磨砕液中での検出感度の検討を行ったところ、 10^3 CFU の菌数までを検出した。

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、検査対象とする適切な検査サンプルの選択について更なる検討の余地があると結論付けた。