

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小峰壮史

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

本研究では、閉鎖飼育環境における *M. marinum* の感染環を分子疫学的に証明することを目的とし、国内 2 水族館における *M. marinum* 感染症の診断と網羅的な病原体分離（第 2 章・第 3 章）および分離された *M. marinum* 株群の系統解析（第 4 章）を実施した。得られた知見は本症の診断、制御および疫学を検討する上で大きく貢献する事が期待される。なお、本論文の第 1 章は諸言、第 5 章は総括となっている。

第 2 章では、まず 2017 年から 2020 年にかけて国内 A 水族館のトビウオ類展示水槽（A 水槽）において発生した連続死亡事例の診断のために、病魚（ホソアオトビ *Hirundichthys oxycephalus*: n = 53）の剖検・病理組織学的検査、病原体の分離培養、分子生物学的検査を実施した。病魚の剖検の結果、腹腔内臓器に白色微小結節が認められ、病理組織学的検査においては検査魚 50 個体中 48

個体で抗酸菌を伴う肉芽腫病変が認められた。分離培養検査では検査魚 50 個体中 47 個体から抗酸菌が分離され、そのほとんどは Runyon 分類の I 群菌に分類された。分子生物学的検査における連結分子系統樹で病魚の組織サンプルと I 群菌群は *M. marinum* と同クラスターを形成した。さらに挿入配列検出試験において、挿入配列のパターン (IS2404 +/IS2606 -) が報告されている当該病原体の挿入配列のパターンと一致した。これらのことから、多くの検査魚から分離され、分離細菌株の大部分を占めていた I 群菌は *M. marinum* と同定された。以上より、本症例は *M. marinum* が主要因と考えられる抗酸菌症と結論付けられた。

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

第 3 章では、まず 2019 年から 2020 年にかけて、B 水族館のアマモ場を再現した水槽 (M 水槽) の複数魚種において発生した死亡事例の診断のため、病魚 (アミメハギ *Rudarius ercodes*、ゴンズイ *Plotosus japonicus*、ハオコゼ *Hypodytes rubripinnis*: n=4) の剖検・病理組織学的検査、病原体の分離培養、分子生物学的検査を実施した。病理組織学的検査の結果、アミメハギ 1 個体において抗酸菌を伴う肉芽腫病変が認められた。分離培養では、2 個体から抗酸菌が得られ、これらは I 群に分類された。分子生物学的検査における連結分子系統樹で病魚の組織サンプルと I 群菌群は *M. marinum* と同クラスターを形成した。また、挿入配列検出試験において、分離細菌株の挿入配列のパターン (IS2404 +/IS2606 -) が報告されている当該病原体の挿入配列のパターンと一致した。したがって、この分離細菌株は *M. marinum* と同定された。以上より、少

なくともアミメハギ 1 個体は *M. marinum* による抗酸菌症に罹患していたと診断された。

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

第 4 章では A 水族館および B 水族館における *M. marinum* の感染環を明らかにするため、第 2 章・第 3 章で分離された *M. marinum* 株において core single nucleotide polymorphism (SNP) 解析による分子疫学的解析を実施した。さらに、迅速遺伝子型鑑別法としての Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) 解析の有用性を評価するため、VNTR 解析も合わせて実施し、core SNP 解析結果との比較を行った。

*M. marinum* 25 株 (研究室保存株 4 株、A 水族館由来株 9 株、B 水族館由来株 12 株) を NGS を用いた core SNP 解析に供試した。その結果、A 水族館および B 水族館に関する細菌株は 4 つのクラスター (Genotype i-iv) を形成した。A 水族館においてはアマモ水槽 (G 水槽) 由来株の属する Genotype i とトビウオ水槽 (A, B 水槽) 由来株の属する Genotype iii の 2 つの遺伝子型に分類されたことから、A 水族館には少なくとも 2 つの遺伝系統が存在し、トビウオ水槽およびアマモ水槽でそれぞれ独立した *M. marinum* の感染環が成立している可能性が示唆された。また、それぞれの水槽における魚類由来株と環境要素由来株が同遺伝子型に分類された。したがって魚類と環境間で感染環が形成されていたことが強く示唆された。B 水族館のアマモ水槽 (M 水槽) においては、ボラ由来株のみ Genotype ii に分類され、その他のすべての魚類・無脊椎動物・環境要素由来株は Genotype iv に分類された。このことから、B 水族館 M 水槽に

は2つの遺伝系統が存在し、その内 Genotype ivに属する *M. marinum* が空間的・時間的にニッチを占めていたと推察された。また、魚類、無脊椎動物、環境要素から分類された *M. marinum* が同クラスターを形成したことから、これらの幅広い要素が当該病原体の感染環の構成要素となることが分子疫学的に証明された。

コストや迅速性に優れ、現場に広く導入されることが期待される VNTR 解析には A 水族館由来株、B 水族館由来株、研究室保存株から選抜した 44 株（core SNP 解析に供試した 25 株を含む）および Type strain 2 株の合計 46 株が供試された。11 領域における VNTR 解析の結果、VNTR 解析に供した A 水族館由来株および B 水族館由来株は 3 群に分けられた。core SNP 解析において Genotype i に分類された A 水族館 G 水槽由来株は Genotype 1 に、Genotype ii に分類された B 水族館 M 水槽ボラ由来株は Genotype 2 に、Genotype iii に属した株群を含む A 水族館トビウオ水槽由来株および Genotype iv に属した株群を含む B 水族館 M 水槽由来株（前述のマボラ由来株を除く）は両群とも Genotype 3 に分類された。また、VNTR プロファイルに基づく系統分類結果と SNP 解析に基づく系統分類結果も完全には一致しなかった。次いで、この 2 群を区別するため VNTR 解析の分解能の向上を試みた。しかしながら、既存 6 領域および新たに作製した 14 領域では当該 2 群を区別するには至らなかった。したがって、迅速遺伝子型鑑別法として VNTR 解析を活用するには更なる検討を要すると結論付けた。

以上のように、本論文は水圏由来ヒト感染症の有力候補であり、飼育展示水生生物の QOL を脅かす重要疾患である *M. marinum* 感染症に関して、その原因菌を飼育生物・飼育環境から網羅的に検出・分析する事によって、本症の分子疫学を解明する端緒を見出し、詳細な分子生物学的検討により同一菌種内に遺伝的小集団が形成されている事を見出した。この事は本症の制御手段を検討する上で学術上、応用上貢献するところが少なくない。

よって審査員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。