

総 説

類結節症

金井欣也*

(2017年4月25日受付)

Pseudotuberculosis

Kinya Kanai*

Graduate School of Fisheries and Environmental Sciences,
Nagasaki University, Nagasaki 852-8521, Japan

(Received April 25, 2017)

ABSTRACT—Pseudotuberculosis caused by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (= *Pasteurella piscicida*) is a bacterial disease of cultured fish belonged to genus *Seriola*. The disease frequently occurs among juveniles at a water temperature ranging from 20 to 25°C with a high mortality rate. A characteristic disease sign is occurrence of a lot of small, white spots in the spleen and kidney, which consist of bacterial colonies and focal tissue necrosis. The disease can be cured by administering antibiotics, but *P. damsela* subsp. *piscicida* possessing multiple drug resistance has been found. In Japan, several adjuvant vaccines are commercially available.

歴 史

類結節症は1969年、あるいはその数年前に西日本のブリ稚魚に初めて発生し、その後各地に広まって発生頻度ならびに死亡率の高いブリ類の細菌病として知られるようになった。原因菌は *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* である。本菌が当初 *Pasteurella piscicida* に同定されたことから、ブリ類以外の魚種ではパスツレラ症 *pasteurellosis* と呼ばれる。外国では *photobacteriosis* が用いられている。ブリ養殖は5～6月に天然採捕されたモジャコを養殖場に搬入して飼育が始まるが、九州・四国地方では、搬入後間もなく *Vibrio anguillarum* を原因とするビブリオ病が発生し、水温が20°Cを超えると類結節症、さらに25°Cを超えると *Lactococcus garvieae* を原因とするレンサ球菌症が発生する。この流行パターンはレンサ球菌症ワクチンが使用されレンサ球菌症の発生が著しく減少するまで続いた。これら3疾病には抗菌剤が良く効いたが、投薬が繰り返行われたために耐性菌が出現して問題となった。当初、類結節症にはサルファ

剤、テトラサイクリン系薬剤、チアンフェニコールなどが使われたが、いずれも耐性化のために使えなくなった。その後、アンピシリンやオキシリン酸が治療薬として承認されたが、やはり耐性化が進み、現在はフロルフェニコール、安息香酸ビコザマイシン、ホスホマイシンカルシウムの使用に移行している。なお、近年アンピシリンに対する感受性が回復する傾向が見られている。2008年には油性アジュバント添加ワクチンが承認された。また、最近ではワクチンの使用とは関係なく類結節症の発生が減少したと言われている。

流 行 期

本症が最も流行しやすい時季は、6～8月の水温が20°C～25°Cの稚魚期である。とくに、梅雨期で降雨のあとに発生しやすいと言われている。25°Cを超える夏季に病勢は弱まり、秋季に再び発生が増える。しかし、秋季や1歳魚の春季の流行は稚魚期より少ない。これは、春季に流行のあった飼育群が *P. damsela* subsp. *piscicida* に対する免疫を獲得するためと言われている(福田・楠田, 1980)。また、ウサギ抗 *P. damsela* subsp. *piscicida* 抗体を接種した正常ブリ稚魚は人為感染試験で感染抵抗性を示す。すなわち受動免疫が成立する

長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科

* Corresponding author

E-mail: kanai@nagasaki-u.ac.jp

(福田・楠田, 1981)。このことから、本菌に対する特異抗体が感染防御に関わると考えられる。

症 状・病 理

罹病魚は外観症状に乏しく、わずかに体色黒化を呈する程度である。重症魚は生簀網底に沈み、そのまま死亡する。網底で横臥して白く見える死亡魚を発見して初めて病気の発生に気付くことが多い。病勢が強い場合は、死亡魚を発見した翌日には数十尾、さらにその翌日には数百尾死亡するという、死亡経過は急性であり、投薬せずに放置すれば、短期間で飼育魚の数十%が死亡することも珍しくない。網底から取り上げた死亡魚は口を大きく開けているものが多い。開腹すると、内臓、とくに脾臓と腎臓に小白点が観察される (Fig. 1)。この小白点は、

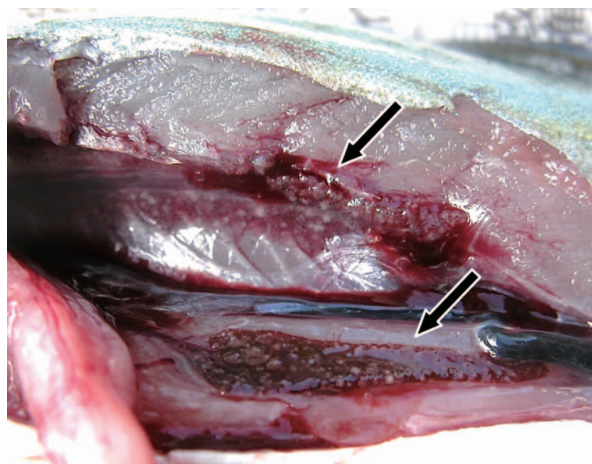


Fig. 1. Appearance of internal organs of yellowtail artificially infected with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. White spots are observed in the spleen and kidney (arrows).

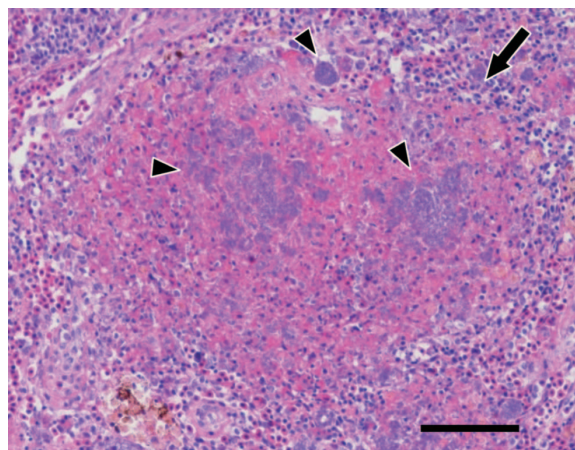


Fig. 2. Histopathology of the spleen of yellowtail artificially infected with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Focal coagulative necrosis (arrow) adjacent to bacterial colonies (arrow heads) is observed. H-E stain. Bar = 100 μ m.

多くの場合、臓器内に生じた細菌集落と其の近傍に形成される凝固壊死巣である (Fig. 2)。回復期あるいは経過が慢性的であると、次第に細菌集落および壊死巣の周囲を類上皮細胞が包み、肉芽腫形成へと進む。*P. damsela* subsp. *piscicida* は通性細胞内寄生菌である。本菌は、魚体に侵入後、血流に入り脾臓や腎臓の常在性マクロファージに食食されるが、マクロファージによる殺菌に抵抗性を示し、マクロファージの食胞内で増殖する。マクロファージは菌体が充満した菌球となり、最終的に細胞膜が壊れて内部の菌が流出し、マクロファージの外でさらに増殖し続け大きな菌集落となる。菌集落近傍の組織は凝固壊死している。

病 原 体

P. damsela subsp. *piscicida* は、グラム陰性、通性嫌気性、非運動性短桿菌である。加えて、菌体が両極染色性を示すことから、当初 *Pasteurella* 属細菌と考えられた。本菌は、1963年に米国チェサピーク湾で発生した野生の white perch *Morone americana* および striped bass *Morone saxatilis* の大量死から分離され、*Pasteurella piscicida* と命名された細菌と性状が酷似した (Janssen and Sargalla, 1968)。そこで、米国から菌株を取り寄せてブリからの分離株とともに性状試験を行ったところ、両者の性状が完全に一致したことから、類結節症の原因菌は *P. piscicida* に同定された (楠田・山岡, 1972)。しかし、本菌の16S rRNA 遺伝子の塩基配列を調べた結果、他の *Pasteurella* 属細菌との相同性は低く、*Photobacterium damsela* と高い相同性を示したことから、*P. damsela* を *P. damsela* subsp. *damsela* (今日では *P. damsela* subsp. *damsela*) に、*P. piscicida* を *P. damsela* subsp. *piscicida* (今日では *P. damsela* subsp. *piscicida*) にすることが提案され、今日に至っている (Gauthier et al., 1995)。

本菌の至適培養温度は22.5°C~30°C、至適食塩濃度は1%~3%で0%では発育しない。食塩濃度を1.5%~3%に調整したブレインハートインヒュージョン寒天やトリプトソーヤ寒天など、栄養価が高い培地によく発育する。普通寒天を用いる場合は酵母エキスを添加するとよく発育するようになる。発育に適した培地で25°C~30°C、2~3日間培養すると、1~2 mmの大きさの培地と同じ色合いで透明感のある円形コロニーが出現する。病魚から分離した直後はやや硬い粘稠なコロニーであるが、継代を繰り返すと次第に粘稠性が失われ、それとともに病原性が低下する。

粘稠性に関する菌体表面の粘性物質 (莢膜様物質) が本菌の病原性に関係すると考えられている (Magariños et al., 1996a)。我々が新鮮株と粘稠性を失った継代株を使って行った実験では、ブリ血清に対して新鮮株が殺菌

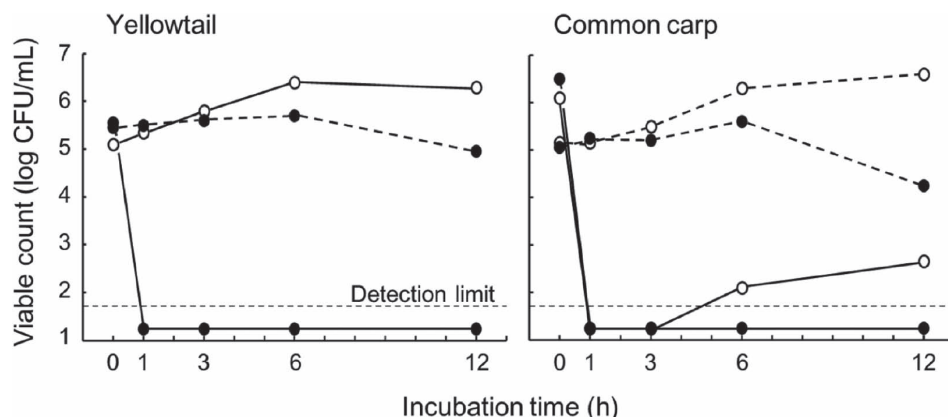


Fig. 3. Bactericidal effect of yellowtail and common carp sera against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* NUF89 (○, virulent strain) and NUF244 (●, avirulent strain). NUF244 is a strain produced from NUF89 by subculturing it 50 times. —, normal serum; ---, heat-inactivated serum (50°C, 30 min).

抵抗性を示したが、継代株は殺菌された (Fig. 3)。本菌が病原性を示さないコイの血清では、新鮮株・継代株ともに殺菌された。この殺菌作用は加熱処理した血清では見られないことから、補体による殺菌と推察される。粘性物質以外に、細胞付着性、溶血性、ホスホリパーゼ活性、アポトーシス誘導因子 (AIP56)、致死因子、など病原性に関わると推察される性状・因子が報告されている (Magariños *et al.*, 1996b)。

ヨーロッパ株および日本株を比較した研究から、本菌の血清型は単一と考えられている。遺伝子型については、ヨーロッパ株と日本株が異なるとの報告がある (Magariños *et al.*, 1992)。

宿主範囲

類結節症という病名はブリ、カンパチなどのブリ類に限定して使用されるが、*P. damsela* subsp. *piscicida* による疾病はブリ類以外の魚種でも知られており、宿主範囲はかなり広い。養殖 (飼育) 魚では、マダイ、クロダイ、シマアジ、キジハタ、ヒラメ、イソギンボ、海水飼育アユ、sea bass, gilthead sea bream など、天然魚では、ウマズラハギ、メジナ、white perch, striped bass など報告されている (Magariños *et al.*, 1996b)。筆者は、ブリ稚魚飼育生簀に入り込んだカワハギやメジナの稚魚が、類結節症発生時にパスツレラ症に罹って死亡しているのを目にしたことがある。*P. damsela* subsp. *piscicida* が偏性病原体であることから、流行を耐過したブリや比較的感受性の低いブリ以外の天然魚が保菌して感染源となっている可能性がある。

診断法

本症が流行しやすい時期であって、検査魚に外観症状が乏しく、脾臓・腎臓に小白点が認められると、類結節症の可能性が高まる。稚魚期以外で発生した場合は、類

結節症のように内臓に白点を形成するノカルジア症や非結核性抗酸菌症 (ミコバクテリウム症) と判別しにくいことがある。そのような場合は、スライドグラスに脾臓や腎臓のスタンプ標本を作り、抗酸菌染色を施す。赤く染まる (抗酸性) 短桿菌が観察されればミコバクテリウム症と診断される。ノカルジア症の白点は臓器から盛り上がる様な硬い結節であり、同時に鰓結節や皮下膿瘍も認められるケースが多く、患部のスタンプ標本には分枝した菌体が観察される。類結節症であることを確定するには、本菌の発育に適した培地で脾臓あるいは腎臓から原因菌を分離培養し、発育したコロニーについて診断用ウサギ抗血清を用いたスライド凝集試験を実施する。この場合、若い培養菌ほど大きな凝集塊を作る傾向がある。

また、日本の分離株に特有のプラスミド pZP1 (5.1 kbp) の部分配列を増幅する PCR (Aoki *et al.*, 1997) や 16S rRNA 遺伝子および *ureC* 遺伝子をターゲットとしたマルチプレックス PCR が報告されている (Osorio *et al.*, 2000)。

防除対策 (治療・予防)

本症は抗菌剤の経口投与により治療が可能である。しかし、前述のように耐性菌による流行も多いことから、投薬前に薬剤感受性試験を実施して分離菌が感受性を示す抗菌剤を選ぶ必要がある。また、本症は病勢が一般に急性であることから、早期投薬が望ましい。

予防対策としては、*P. damsela* subsp. *piscicida* のホルマリン不活化菌体を含む油性アジュバント加ワクチンが2008年に製造承認された。これは魚用としては日本初となるアジュバント添加ワクチンである。現在販売されている類結節症ワクチンには、その後承認されたものを含めると、油性アジュバント加ワクチンとして、 α 溶血性レンサ球菌症との2種混合ワクチン、 α 溶血性レンサ球菌症およびビブリオ病との3種混合ワクチン、 α 溶血

性レンサ球菌症、ビブリオ病およびイリドウイルス病との4種混合ワクチン、多糖アジュバント加ワクチンとして、 α 溶血性レンサ球菌症、ビブリオ病およびイリドウイルス病との4種混合ワクチンがある。

最近の研究動向

P. damsela subsp. *piscicida* の病原性に関与する因子の中で、近年注目されているのが前述の AIP56 (apoptosis inducing protein of 56 kDa) である (do Vale *et al.*, 2016)。AIP56 はプラスミド pPHDP10 (9,631 bp) にコードされた菌体外毒素であり、マクロファージおよび好中球のアポトーシスを誘導する。本毒素は、魚体内で *P. damsela* subsp. *piscicida* を処理しようと集まってきた食細胞をアポトーシスに至らしめる。本菌は貪食されることなく組織中で増殖することが可能となり、さらに、アポトーシスを起こしたマクロファージおよび好中球から流出した細胞傷害性物質が周囲の組織を壊死させると推察されている。また、ウサギ抗毒素血清による受動免疫に感染防御効果が認められる (do Vale *et al.*, 2005)。これらのことから、本毒素は本菌の宿主体内における速やかな増殖と組織壊死に中心的に働く病原因子と考えられている。

文 献

- Aoki, T., D. Ikeda, T. Katagiri and I. Hirono (1997): Rapid detection of the fish-pathogenic bacterium *Pasteurella piscicida* by polymerase chain reaction targeting nucleotide sequences of the species-specific plasmid pZP1. *Fish Pathol.*, **32**, 143–151.
- do Vale, A., M. T. Silva, N. M. S. dos Santos, D. S. Nascimento, P. Reis-Rodrigues, C. Costa-Ramos, A. E. Ellis and J. E. Azevedo (2005): AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. *Mol. Microbiol.*, **58**, 1025–1038.
- do Vale, A., D. Cabanes and S. Sousa (2016): Bacterial toxins as pathogen weapons against phagocytes. *Front. Microbiol.*, **7**, 42 (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00042>).
- 福田 穰・楠田理一 (1980): 養殖ハマチにおける類結節症流行後の抗体産生と血清タンパクの変化. 日水誌, **46**, 1301–1305.
- 福田 穰・楠田理一 (1981): 養殖ハマチの類結節症に対する受動免疫について. 魚病研究, **16**, 85–89.
- Gauthier, G., B. Lafay, R. Ruimy, V. Breittmayer, J. L. Nicolas, M. Gauthier and R. Christen (1995): Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko *et al.*) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**, 139–144.
- Janssen, W. A. and M. J. Surgalla (1968): Morphology, physiology, and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch (*Roccus americanus*). *J. Bacteriol.*, **96**, 1606–1610.
- 楠田理一・山岡政興 (1972): 養殖ハマチの細菌性類結節症の原因菌に関する研究—I. 形態学的ならびに生化学的性状による種の同定. 日水誌, **38**, 1325–1332.
- Magariños, B., J. L. Romalde, I. Bandín, B. Fouz and A. E. Toranzo (1992): Phenotypic, antigenic, and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3316–3322.
- Magariños, B., R. Bonet, J. L. Romalde, M. J. Martínez, F. Congregado and A. E. Toranzo (1996a): Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. *Microb. Pathog.*, **21**, 289–297.
- Magariños, B., A. E. Toranzo and J. L. Romalde (1996b): Phenotypic and pathological characteristics of *Pasteurella piscicida*. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **6**, 41–64.
- Osorio, C. R., A. E. Toranzo, J. L. Romalde and J. L. Barja (2000): Multiplex PCR assay for *ureC* and 16S rRNA genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*. *Dis. Aquat. Org.*, **40**, 177–183.