総説

細菌性溶血性黄疸

高野倫一*・松山知正

(2020年3月23日受付)

Bacterial Hemolytic Jaundice

Tomokazu Takano* and Tomomasa Matsuyama

Nansei Main Station, National Research Institute of Aquaculture,
Japan Fisheries Research and Education Agency,
Mie 519-0193, Japan

(Received March 23, 2020)

ABSTRACT—Bacterial hemolytic jaundice (BHJ) was first described in populations of cultured yellowtail, *Seriola quinqueradiata* in 1980 in Japan. BHJ is now one of the most important diseases of farmed yellowtail. The taxonomic position of the causative agent, *Ichthyobacterium seriolicida*, was recently determined as a single clade within the order *Flavobacteriales* and was distinct from the known clades of the family *Flavobacteriaceae*, *Blattabacteriaceae* and *Cryomorphaceae*. Whole genome analysis of the type strain JBKA-6^T revealed that this bacterium harbors a single circular chromosome. Polymorphic analyses of *I. seriolicida* identified four major clusters among *I. seriolicida* isolates, and all belonged to clonal complexes; thus, this bacterium is considered to be recently introduced in Japan. In passive immunization tests, significantly lower mortality was observed in fish that received the serum from a convalescent fish, indicating *I. seriolicida* is neutralized by the humoral component of the immune system. However, since this bacterium does not grow vigorously *in vitro*, control measures such as the production of an inactivated vaccine is under development.

Key words: Bacterial hemolytic jaundice, *Ichthyobacteriaceae*, *Ichthyobacterium seriolicida*, *Flavobacteriales*, *Seriola quinqueradiata*

歴 史

1980年代はじめから体色が黄色化する病気が養殖ブリに発生し、1990年ごろまでには九州、四国、紀伊半島沿岸などの西日本各地のブリ養殖場において“黄疸症”が知られるようになった。2年魚以上の大型魚でも発症し、当時の死亡率は5～20%であったことが報告されている(反町ら, 1993a)。本症の原因は長らく不明であり、餌料や飼育条件など様々な原因が考えられていた。発生域が徐々に伝播・拡大していくこと、マクロライド系抗生物質に効果が認められることなどから伝染性疾患の可能性も強く疑われていた(反町ら, 1993a)。一方, Sakai

ら(1989)は、チオバルビツール酸(TBA)価が病魚の肝臓や筋肉で高くなることを見つけ、本症への脂質過酸化の関与を指摘した。和田ら(1989)が実施した病理組織学的検査ではいくつかの特徴的な病変を観察したものの、原因の特定には至らなかった。1990年代に入って反町ら(1993a)が、黄疸を発症したブリの血液中に存在する長桿菌の分離培養、および培養菌を使った感染試験による黄疸の再現に成功し、本菌が病原体であることを報告した。このため現在、本症には“細菌性溶血性黄疸：Bacterial Hemolytic Jaundice (BHJ)”が魚病名として選定されている(前野ら, 1995)。原因病原体の分類については、未だに近縁な細菌が見つかっていないことに加え、本菌が難培養性であることから解析が難航していたが、最近になり *Ichthyobacterium seriolicida* の学名が付された(Takano et al., 2016)。

国立研究開発法人水産研究・教育機構増養殖研究所

* Corresponding author

E-mail: takanoto@fra.affrc.go.jp

病原体

病原体は、フラボバクテリウム目 (*Flavobacteriales*), イクチオバクテリウム科 (*Ichthyobacteriaceae*) に属する好気性菌の *I. seriolicida* である。鞭毛を持たないグラム陰性の長桿菌 ($0.3 \times 4 \sim 6 \mu\text{m}$) (Fig. 1) で特徴的な滑走運動をする (反町ら, 1993a; Takano et al., 2016)。カタラーゼ産生能は無く、オキシダーゼは陽性である (Takano et al., 2016)。化学分類指標となる菌体の主なキノン組成はメナキノン-6 (MK-6) (95.1~97.9%) および MK-7 (2.1~4.9%) であり, 主な菌体脂肪酸組成は $\text{C}_{14:0}$ (13.4~20.5%) および iso- $\text{C}_{15:0}$ (56.5~68.7%) である (Takano et al., 2016)。

本菌は他の魚病細菌の *Flavobacterium branchiophilum*, *F. columnare*, *F. hydatidis*, *F. psychrophilum*, *F. succinicans*, *Tenacibaculum discolor*, *T. gallaicum*, *T. maritimum* および *T. soleae* と目レベルで近縁と言えるが, これらの細菌はいずれもフラボバクテリウム科 (*Flavobacteriaceae*) に属する。一方, イクチオバクテリウム科の細菌は, 現在までに *I. seriolicida* の一属一種しか見つかっておらず, 本菌は分類学的に珍しい。*Ichthyobacterium seriolicida* の Type strain (基準株) は, 1991年10月に香川県下の養殖ブリから反町氏が分離した JBKA-6^T であり, American Type Culture Collection (ATCC) には ATCC BAA-2465^T として, Japan Collection of Microorganisms (JCM) には JCM 18228^T として寄託登録されている。JBKA-6^T のゲノム (GenBank accession no. NZ_AP014564) は, 全

Fig. 1. Cell morphology of *Ichthyobacterium seriolicida* strain JBKA-6^T observed under transmission electron micrograph (TEM). Ultrathin section shows both lateral (arrow) and vertical (triangle) sections of the bacterial cells. Scale bar = 2.0 μm .

長が 1,921,407 bp の環状二本鎖 DNA で, G+C 含量は 32.8% であり, 32 個の tRNA 領域と 1 つの rRNA オペロンが存在する。タンパク質をコードした遺伝子は 1,474 個が予測されている。その中には, 本菌の病原性に関わると考えられる遺伝子が含まれ, Type IX 分泌装置の遺伝子群や, 2 種類のヘモリジン遺伝子が見つかっている (Takano et al., 2017)。本菌には宿主の血球に積極的に付着する様子が観察できることから (Fig. 2), 宿主細胞への付着に関わる遺伝子も病原性を発揮する上で重要であると考えられる。

Ichthyobacterium seriolicida の培養には, Leibovitz's L-15 液体培地 (L-15) にウシ胎児血清 (FBS) を 10% (v/v) 添加したものを標準的に用いる。寒天を添加した培地では全く増殖しない。NaCl の至適濃度は 1.6% (w/v) であるため, 培養に用いる L-15 培地の NaCl 終濃度を 1.6% に調節することが望ましい。至適 pH は 7.0~7.5 である (Iida and Sorimachi, 1994)。FBS の濃度を 0~20% まで変化させた場合には, 20% で最も増殖が良くなることが報告されている (Iida and Sorimachi, 1994)。増殖は L-15 に劣るものの, Eagle's MEM, 0.85% 食塩水または 1/3 海水に 10% の FBS を添加することで本菌を培養することができる。しかし, 0.85% 食塩水または 1/3 海水を使用した場合には連続して継代することは困難である (Iida and Sorimachi, 1994)。BHI 寒天培地, 変法バツラー寒天培地, ブリ血清またはウシ胎児血清 (FCS) を添加したフレッチャー培地およびコルトフ培地では発育しない (反町ら, 1993a)。*Ichthyobacterium seriolicida* の増殖は 18~28°C の間で認められ, 至適温度は 26°C である (Iida and Sorimachi, 1994; Takano et al., 2016)。培養条件下での増殖は遅くかつ菌体密度もかなり低い。至適温度下で振盪培養しても, 最大の濁度は 0.1~0.2 程度 (OD_{660}) であり, 培養時間も静止期に達するまでに 70 時間以上を要する (Takano et al., 2016)。*Tenacibaculum*

Fig. 2. Microscopy of fluorescently-labeled live cells of JBKA-6^T inoculated with the blood cells of yellowtail. Intense adherence of bacterial cells to the blood cells was observed.

Fig. 3. Minimum spanning tree based on multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) allelic profiles. The phylogenetic relationship among 31 *Ichthyobacterium seriolicida* isolates is shown. Each node represents a unique sequence type (ST). The size of the circle is proportional to the number of strains belonging to the STs. The collection locations are indicated in each node. Collection years are indicated by colors.

maritimum での報告（増村・若林，1977）と同様に，静止期に入った本菌を長時間放置すると菌体の球形化が観察される（未発表）。培養菌液の遠心分離から得られる菌体ペレットは乳白色を呈するため，フラボバクテリウム科の細菌のようにカロテノイドやフレキシルビン等の黄色ないしは橙色の色素を産生しないものと考えられる。

国内の異なる年代や場所から分離した *I. seriolicida* で実施した amplified fragment length polymorphism (AFLP) 解析や，8 種類のハウスキーピング遺伝子を利用した multilocus sequence typing (MLST) からは，分離株の間に多型性を検出できなかったことが報告されている（Matsuyama *et al.*, 2017）。ゲノム中の繰り返し配列を利用した multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) では，31 分離株が 16 種類の sequence type (ST) に分類されたが，いずれの ST も 1 つの clonal complex（クローン集合体）に属することが明らかになっている（Matsuyama *et al.*, 2017）（Fig. 3）。分離株間で遺伝的多型性が乏しいことは，何らかの原因で国内に持ち込まれた菌株が拡散した。あるいは非病原性細菌が，何らかの理由で病原性を獲得し本症の原因となった可能性を示唆する。ブリ養殖が本格的に産業化したのは 1950 年代であり，その後 30 年も経過してから BHJ は顕在化したことから，本菌がもともと国内のブリ養殖環境中に存在したとは考えにくい。1980 年代には東シナ海産および南シナ海産のブリ種苗を輸入した記録が残されており，海外から本菌が持ち込まれた可能性も考えられる（Matsuyama *et al.*, 2017）。ただし，海外にお

ける BHJ 症発症例はこれまでのところ無い。

発 症 魚

BHJ は養殖ブリおよび養殖ヒラマサで発生が確認されているが（柳ら，2016），養殖カンパチや天然魚での発生報告はない。

発症魚には緩慢な遊泳と体色黒化が認められ，摂餌が不活発になる。ヘマトクリット値は 20% 前後まで低下するため，鰓の褪色や変色を伴う貧血症状が認められる（反町ら，1993a）。*Ichthyobacterium seriolicida* に感染した魚は，溶血性貧血を起こし血漿中の総ビリルビン量が急激に上昇する（反町ら，1993a）。これは，溶血物中のヘモグロビンに起因する連鎖的な酸化ストレスがヘムオキシゲナーゼを誘導しビリルビンの過剰合成が生じるため，その結果として黄疸を発症すると考えられている（Sakai *et al.*, 1998；伊東ら，2000）。健康魚では白色であるはずの腹部が発症魚では顕著に黄色化することから，本症は容易に確認することができる（Fig. 4）。吻部や眼窩にも黄色化が認められる（和田ら，1989；反町ら，1993a）。肝臓および脾臓は，健康魚のそれと比較してそれぞれ約 3 倍および約 6 倍程度に著しく腫大する（反町ら，1993a）。前野ら（1995）が実施した実験感染魚における病理組織学的検査からは，肝臓のうっ血，肝細胞および肝静脈血管内皮細胞の変性，細尿管上皮細胞および糸球体の壊死，脾内血管のうっ血，脾臓髄質部の核濃縮を伴う広範囲な壊死，溶血像などが報告されている。

Fig. 4. External symptoms and necropsy of yellowtail experimentally infected with *Ichthyobacterium seriolicida*. A) Yellow coloration of the skin was observed in infected fish (left), but not in healthy fish (right). B) Necropsy of infected fish (lower) and healthy fish (upper). Intra-abdominal surfaces and lateral muscle of the infected fish showed yellowish-brown color. Spleen was obviously enlarged in infected fish. The stomach was removed from both fish to observe the spleen. C) Size comparison of the excised spleen tissues between *I. seriolicida*-infected fish (left) and healthy fish (right).

診 断

養殖ブリにおいて黄疸症状を呈する感染症は少なく、先に述べた外部所見はBHJ発症の推定に役立つ。血液塗抹標本をギムザ染色（反町ら，1993a）やディフ・クイック染色（Fig. 5）することで血球の周辺に多数の長桿菌を認めることができる。*Tenacibaculum maritimum*等の長桿菌との混同を避けるため、*I. seriolicida*の16S rDNAに対して特異的なPCRプライマー（三井ら，2004）で分離菌を確認することが望ましい。本菌を分離する場合には、瀕死魚から無菌的に採取した血液を先に述べたL-15培地に接種し25℃で2週間程度培養する（反町ら，1993a）。本菌は非常に細く観察しづらいため、市販の蛍光試薬のLIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit（Molecular Probes）で染色し蛍光顕微鏡下で観察することで細胞の形態や運動性を鮮明に観察することができる（Fig. 6）。

Fig. 5. Light micrograph of blood smear from an artificially infected fish at 7 days post-infection. The smear was fixed and stained with Dif-Quick stain. Long rod-shaped bacterial cells were faintly stained (arrow). Scale bar = 10.0 μm .

Fig. 6. Morphology of fluorescently-labeled cells of JBKA-6^T on a glass slide.

防 除 対 策

本菌については、尾静脈注射および腹腔内注射のみならず浸漬法でも感染試験が成立することが報告されていることから（反町ら，1993a），病魚を頻繁に取り上げることは感染の拡大を防ぐために有効であると考えられる。各種抗菌性物質に対する *I. seriolicida* の最小発育阻止濃度（minimum inhibitory concentration, MIC）はそれぞれ、アンピシリン（0.125～0.2 μg/mL），エリスロマイシン（0.2 μg/mL），エンボン酸スピラマイシン（0.78 μg/mL），オキシテトラサイクリン（<0.063～0.2 μg/mL），オキシソリン酸（0.39～1.0 μg/mL），カナマイシン（>128 μg/mL），クロラムフェニコール（1.0～2.0 μg/mL），スルファモノメトキシシン（128 μg/mL），トリメトプリム（32～64 μg/mL），ホスホマイシン（>128 μg/mL），およびニフルスチレン酸ナトリウム（3.12 μg/mL）である（反町・前野，1993b；Takano *et al.*, 2016）。*Ichthyobacterium seriolicida* で攻撃したブリ幼魚の経口投与試験では、アンピシリン，エリスロマイシン，エンボン酸スピラマイシン，オキシテトラサイクリン，およびオキシソリン酸に死亡率を低下させる効果が認められている。また，スルファモノメトキシシンは MIC が高いものの，経口投与した場合には死亡率を顕著に低下させる（反町・前野，1993b）。したがって，これらの抗菌性物質は BHJ の治療薬として利用できると考えられるが，現在までにいずれの薬剤も承認は受けていない。実際の養殖現場では，レンサ球菌症に対してエリスロマイシンが投与されていることから，これにより BHJ の発症が抑えられ顕在化していないケースもあると考えられる（反町・前野，1993b）。

残された課題

BHJ から回復した魚は *I. seriolicida* の再感染に対して強い抵抗性を持つ。また，耐過魚の血清を移入した naïve 群では *I. seriolicida* 攻撃後の死亡率が有意に低下する。さらに，耐過魚の血清から精製した抗体を naïve 個体の血清と混合し *I. seriolicida* 菌体に作用させると古典的補体活性化経路によって殺菌が生じる（Matsuyama *et al.*, 2018）。すなわち，本菌は特異抗体の誘導によって容易に防除できるものと考えられる。しかしながら，本菌は FBS を添加した L-15 液体培地であってもわずかにしか増殖せず，未だ実用的な不活化ワクチンが開発されていない。今後，安価で効率の良い培養法を開発することが課題として残されている。一方で，著者らは，遺伝子組換え技術を利用した抗原の大量調製技術の確立を目指し，新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業「遺伝子情報を利用した難培養性病原体に対するワクチン技術の開発」において，*I. seriolicida* の全ゲノム配列から感染防御抗原遺伝子を予測し，組換えサブユニットワクチンの開発を行った。これまでに，感染防御抗原遺伝子を元に調製した数種類の組換え抗原で有効性を確認している。こちらのワクチンについても今後の改良と実用化が待たれる。

文 献

- Iida, T. and M. Sorimachi (1994): Cultural characteristics of the bacterium causing jaundice of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Fish Pathol.*, **29**, 25–28.
- 伊東尚史・毛良明夫・村田 寿・吉田照豊・境 正・山内清・山崎義弘・山口登喜夫・宇川正治（2000）：ブリにおける実験的細菌性溶血性黄疸と酸化ストレス。日本水産学

- 会誌, **66**, 50–54.
- 前野幸男・中島員洋・反町 稔・乾 靖夫 (1995): 養殖ブリ黄疸の病態生理. 魚病研究, **30**, 7–14.
- 増村和彦・若林久嗣 (1977): 人工生産マダイ, クロダイ稚魚の滑走細菌感染症. 魚病研究, **12**, 171–177.
- Matsuyama, T., Y. Fukuda, T. Sakai, N. Tanimoto, M. Nakanishi, T. Takano and C. Nakayasu (2017): Clonal structure in *Ichthyobacterium seriolicida*, the causative agent of bacterial haemolytic jaundice in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, inferred from molecular epidemiological analysis. *J. Fish Dis.*, **40**, 1065–1075.
- Matsuyama, T., Y. Fukuda, T. Takano, T. Sakai and C. Nakayasu (2018): Antibody-mediated bacterial killing of *Ichthyobacterium seriolicida* in Japanese amberjack. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **203**, 73–77.
- 三井清加・飯田貴次・吉田照豊・廣野育生・青木 宙 (2004): PCR によるブリ細菌性溶血性黄疸原因菌の検出. 魚病研究, **39**, 43–45.
- Sakai, T., H. Murata, M. Endo, K. Yamauchi, N. Tabata and M. Fukudome (1989): 2-Thiobarbituric acid values and contents of α -tocopherol and bile pigments in the liver and muscle of jaundiced yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1739–1740.
- Sakai, T., H. Murata, M. Endo, T. Shimomura, K. Yamauchi, T. Ito, T. Yamaguchi, H. Nakajima and M. Fukudome (1998): Severe oxidative stress is thought to be a principal cause of jaundice of yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture*, **160**, 205–214.
- 反町 稔・前野幸男・中島員洋・井上 潔・乾 靖夫 (1993a): 養殖ブリ“黄疸症”の原因. 魚病研究, **28**, 119–124.
- 反町 稔・前野幸男 (1993b): ブリ“黄疸症”原因菌の各種薬剤に対する感受性. 魚病研究, **28**, 141–142.
- Takano, T., T. Matsuyama, T. Sakai, Y. Nakamura, T. Kamaishi, C. Nakayasu, H. Kondo, I. Hirono, Y. Fukuda, M. Sorimachi and T. Iida (2016): *Ichthyobacterium seriolicida* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum ‘Bacteroidetes’, isolated from yellowtail fish (*Seriola quinqueradiata*) affected by bacterial haemolytic jaundice, and proposal of a new family, *Ichthyobacteriaceae* fam. nov.. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.*, **66**, 580–586.
- Takano, T., Y. Nakamura, T. Matsuyama, T. Sakai, Y. Shigenobu, T. Sugaya, M. Yasuike, A. Fujiwara, H. Kondo, I. Hirono, Y. Fukuda and C. Nakayasu (2017): Complete genome sequence of *Ichthyobacterium seriolicida* JBKA-6^T, isolated from yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) affected by bacterial hemolytic jaundice. *Genome Announc.*, **5**, e01574–16.
- 柳 宗悦・福留 慶・和田和彦 (2016): 魚病総合対策事業 (養殖衛生管理体制整備事業). 平成28年度 鹿児島県水産技術開発センター事業報告書, pp. 206–213.
- 和田新平・畑井喜司雄・窪田三郎 (1989): 体色黄化を特徴とする養殖ブリの光学顕微鏡所見. 魚病研究, **24**, 211–218.