総説

レッドマウス病

坂井貴光*

(2021年1月5日受付)

Redmouth Disease

Takamitsu Sakai*

Fisheries Technology Institute, National Research and Development Agency,
Japan Fisheries Research and Education Agency,
Nagasaki 851-2213, Japan

(Received January 5, 2021)

ABSTRACT—Redmouth disease is caused by the infection of the enteric bacterium *Yersinia ruckeri*. The disease was first noticed in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in the USA in 1950s and has since been observed in salmonids and some other fishes in many countries. *Y. ruckeri* can be classified into different biotypes, serotypes, or genotypes, according to biological properties such as motility or enzyme activity, antigenicity, or gene sequences. In particular, O-antigen, which is one of the markers for serotyping, is an important antigen for the vaccination for of *Y. ruckeri*. In Japan, redmouth disease is listed as one of the notifiable diseases of aquatic animals by the government to prevent occurrences or spreading of the disease. This review describes topics necessary important for the diagnosis and control of the disease.

Key words: *Yersinia ruckeri*, redmouth disease

レッドマウス病は、*Yersinia ruckeri* を原因とする細菌感染症である。本病名は、1950年代にアメリカ合衆国で発生したニジマスの口周辺の発赤を伴う細菌感染症に由来する (Rucker, 1966)。近年では、多くの国々で発生するようになり、ニジマス以外のサケ科魚類やその他の魚種でも *Y. ruckeri* の感染による被害が確認されている。以下、原因菌 *Y. ruckeri* 及び本病の特徴について解説する。

原因菌の性状

Y. ruckeri は、腸内細菌科に属するグラム陰性短桿菌である。菌体のサイズは、直径 0.5~0.75 μm × 長さ 1~6 μm であり、菌株によって菌体の長さが異なる (Austin *et al.*, 1982)。基準株 (Type strain) は、アメリカ合衆国アイダホ州でニジマスから分離された CDC2396-61株であり (Ewing *et al.*, 1978), American Type Culture Collec-

tion (ATCC) には ATCC29473として、National Collection of Industrial Food and Marine Bacteria (NCIMB) には NCIMB2194として寄託登録されている。本菌のゲノムは全長 3.7~3.8 Mbp の環状二本鎖 DNA で (Kumer *et al.*, 2015), G+C 含量は47.5~48.5%であり、他のエルシニア属細菌と同様の含量である (Austin *et al.*, 1982)。本菌は、トリプチケースソイ寒天培地、普通寒天培地、コロンビア血液寒天培地、マッコンキー寒天培地やサルモネラシゲラ寒天培地上で発育し、至適増殖温度は 22°C~25°Cである (Ross *et al.*, 1966; Wrobel *et al.*, 2019)。トリプチケースソイ寒天培地では、2~3日以内にコロニー (乳白色、半透明、表面や辺縁は平滑) が見られる (Fig. 1)。*Yersinia* 属細菌の選択培地として知られる CIN 寒天培地では発育しない (坂井ら, 2006)。*Y. ruckeri* の選択・鑑別培地として、Shotts-Waltman 寒天培地 (SW 培地) と ROD 寒天培地が報告されている。但し、これらの培地では *Vibrio anguillarum* 等の *Y. ruckeri* 以外の魚病細菌も発育する可能性がある。加えて、鑑別の指標と

なるコロニー及びその周辺の変化が見られない菌株があり、*Y. ruckeri* の種同定では他の検査法も併用した方がよい。生化学的性状試験で示す特徴的な性状については、 β -ガラクトシダーゼ試験及びオルニチンデカルボキシラーゼ試験で陽性を示し、ウレアーゼ、硫化水素及びインドールの産生は見られない。糖分解については、D-マンニトール及びマルトースが陽性、イノシトール、L-ラムノース、サッカロース、D-メリビオース、D-アミグダリンやL-アラビノースが陰性である (Ewing *et al.*, 1978)。これらの性状は、生化学的性状反応に基づく迅速・簡易同定キットによる本菌の同定にも有用である。

1950年代から近年まで多くの菌株が分離されており、その型別として、運動性及びホスホリパーゼの産生の有無に基づくバイオタイプ、血清型、複数のハウスキーピング遺伝子やパルスフィールド電気泳動法による遺伝子型が調べられている (Tobback *et al.*, 2007)。バイオタイプについては、運動性及びホスホリパーゼ活性の両性状を有するタイプ (バイオタイプ1) とこれらの性状を示さないタイプ (バイオタイプ2) がある。バイオタイプ2では、鞭毛の形成に関わる遺伝子に変異或いは欠損が生じており、運動性に関わる鞭毛が形成されない (Welch *et al.*, 2011)。血清型については、主にLPSのO抗原に基づく型別が行われている。当初、血清型は1種類と考えられていたが、他の血清型も見つかり (Bullock *et al.*, 1978)、5種類の血清型 (O-1, O-2, O-5, O-6, O-7) が提唱された (Davies, 1990)。その後、新たな血清型 (O-8) の *Y. ruckeri* がスコットランドのアトランティックサーモンから分離されている。O-1 及び O-2 については、それぞれサブタイプ (O-1a, O-1b, O-2a, O-2b, O-2c) が報告されている (Romalde *et al.*, 1993)。その報告の中で O-3 と O-4 が提唱されているが、これら

は Davies (1990) の提唱における O-5 と O-6 に該当する。O 抗原は、血清による本菌の殺菌において、補体活性化の古典経路に關与する抗原と考えられており (Haig *et al.*, 2011)、不活化菌体ワクチンの重要な抗原の一つと言える。当初、血清型 O1・バイオタイプ1による被害の報告が多かったが、その後、血清型 O1・バイオタイプ2による被害が報告されるようになった (Davies and Frerichs, 1989; Austin *et al.*, 2003)。近年スコットランドでは、アトランティックサーモンの罹病魚から血清型 O-8 の *Y. ruckeri* が分離される頻度が高くなってきている。遺伝子による型別については、複数のハウスキーピング遺伝子を用いたタイピングである MLST 法 (Multilocus sequence typing 法) のデータが充実しており、そのデータベースが Web で公開されている (PubMLST, <https://pubmlst.org/>)。MLST 法に基づく系統解析によって、これまで世界各地で分離されている菌株間の遺伝的関係が分かっている (Bastardo *et al.*, 2015)。

症状および感染経路

殆どのサケ科魚類がレッドマウス病に感受性を有すると考えられているが (Furones *et al.*, 1993)、その感受性の程度は魚種によって異なる。国内のアマゴ、ヤマメ及びイワナについては、感染試験でニジマスと同様の症状を呈し (Fig. 2 and 3)、本病に感受性を示すが、各魚種の累積死亡率はニジマスより低い (Sakai *et al.*, 2012)。

Fig. 1. トリプチケースソイ寒天培地上の *Yersinia ruckeri* のコロニー

Fig. 2. *Y. ruckeri* の感染試験で見られたニジマス (アルビノ) の死亡魚

Fig. 3. *Y. ruckeri* の感染試験で見られたイワナの死亡魚

尚、国内では、アマゴ、ヤマメ及びイワナにおける本病の発生例は無い。ニジマス罹病魚では、体色黒化が見られ、口吻部、口腔内、下顎及び鰭基部が赤変（皮下出血）する（Furones *et al.*, 1993）。剖検所見としては、脾臓の腫大が認められる他、肝臓、脂肪組織、腸管膜、腸後部等に出血が見られる場合がある。また、胃腸管後部又は排泄物に黄色粘液物が観察されることがある。病状の経過は、急性型、亜急性型と慢性型に分けられる。急性型の場合は、春から夏にかけての水温上昇期に当歳魚で主に発生し、30～60日間で累積死亡率は50～70%に達する。亜急性型は、秋から冬にかけての水温下降期に流行し、死亡率は急性型より低いものの、2～6ヶ月で10～50%に達する。慢性型は、死亡率は約10%と低い、出荷サイズの魚や親魚で発生しやすい点が問題になる。

魚体への *Y. ruckeri* の侵入経路については、ニジマスに対する感染試験で詳細に調べられており、鰓、消化管及び側線が主な侵入門戸と考えられている（Tobback *et al.*, 2009; Ohtani *et al.*, 2014）。また、血清型 O1・バイオタイプ 2 の *Y. ruckeri* においては、鼻腔の嗅上皮から脳内に侵入する可能性が示唆されている（Strøm *et al.*, 2017）。鰓では、*Y. ruckeri* の感作から約 1 時間以内に二次鰓弁組織内で菌体が観察され、その後、鰓の血管内でも菌体が見られるようになる。血管内に侵入した *Y. ruckeri* は、血流を介して、腎臓、脾臓や肝臓等の様々な器官へ感染を拡げる。病理組織観察においては、脾臓、肝臓及び腎臓に局所的な壊死が多数見られる。腎臓では、尿細管の変

性やメラノマクロファージの増加も観察されることがある。

親魚からの垂直感染に関しては、アメリカ合衆国コロンビア川沿いの孵化場で行われた調査において、マスノスケの雌親魚の体腔液、未授精卵、発眼卵や仔魚から *Y. ruckeri* が検出された報告があり、その可能性が示唆されている（Glenn *et al.*, 2015）。

Y. ruckeri の宿主範囲は広く、サケ科魚類以外の魚種にも感染する可能性がある。ナイルティラピア、コクレン、ハクレンやチョウザメ等（Eissa *et al.*, 2008; Shaow *et al.*, 2014; Wrobel *et al.*, 2019）での発症が報告されており、レッドマウス病の典型的な症状である口や顎周辺の発赤が、ナイルティラピア、アムールチョウザメとシベリアチョウザメの罹病魚で確認されている。また、コクレンやハクレンでは、腹部、鰭基部や眼球に発赤が見られる。

病勢には水温やハンドリング等が影響を及ぼす。ニジマスにおいては、10℃以下では病勢が著しく低く、13℃付近ではハンドリング等のストレスが発症の要因になりやすく、18℃以上では著しく病勢が強くなると考えられている。上述のナイルティラピアの発生時は、16～24℃の水温上昇期であった。

病 原 因 子

宿主の細胞や組織に影響を及ぼす菌体外産生物や宿主内での生存に関わるⅢ型分泌装置等が、本菌の病原因子と考えられており（Wrobel *et al.*, 2019）、菌体外産生物質のプロテアーゼ Yrp1、ペプチダーゼ YrpA 及び溶血素 YhlA については、病原性との関連性が報告されている。Yrp1 はセラリシン型のメタロプロテアーゼであり（Secades and Guijarr, 1999）、ABC トランスポーターから菌体外へ分泌される（Fernández *et al.*, 2002）。Yrp1 の遺伝子が鰓や腸管の組織内で発現することに加え、本遺伝子を変異株させた株がニジマスに対する病原性の低下を示すことから（Fernandez *et al.*, 2003）、Yrp1 は重要な病原因子の一つとして考えられているが、Yrp1 の遺伝子を持たない病原性株もある。また、加熱処理で不活化した Yrp1 を接種したニジマスは、感染試験において顕著な死亡率の低下が見られることから、感染防御抗原の一つとして知られる。YrpA は、U32 ファミリーのペプチダーゼである（Navais *et al.*, 2014）。U32 ファミリーのペプチダーゼは、*Proteus mirabilis*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella enterica* や *Aeromonas veronii* においても、感染に関与する因子と考えられている。*Y. ruckeri* でも、その欠損株で病原性の低下が見られることから重要な病原因子の一つと考えられている。溶血素 YhlA は、5b 型分泌装置から分泌される溶血素である。これらの産生には *yhIA* と *yhIB* の 2 つの遺伝子が関わり、各遺伝子

は *Serratia marcescens* の 5b 型分泌装置の構成遺伝子に相動性を示す (Fernández, 2007)。YhlA は, *Y. ruckeri* の至適増殖温度より低い温度 (18°C) で発現しやすく, 鉄制限環境も発現の要因になる。各遺伝子の変異株には, 魚に対する病原性の低下及び魚類培養細胞に対する細胞毒性の低下が見られることから, 本菌の病原性に関わる溶血素と考えられている。

診断および防除対策

本邦では, レッドマウス病は持続的養殖生産確保法に指定されており, その診断は病勢鑑定指針に基づいて行われる。臨床検査後の細菌検査において, チトクロームオキシダーゼ陰性のグラム陰性菌が分離された場合, *Y. ruckeri* に対する PCR 検査が分離菌に対して実施される。発生時のまん延防止においては, 施設, 器具類や手指等の消毒が重要である。本菌が30秒以内に死滅する有効塩素濃度は 1.25 mg/L 以上であり, 有効ヨウ素濃度については 4 mg/L 以上である (Yamasaki *et al.*, 2017)。エタノールやイソプロパノールを有効成分とする消毒剤や逆性石けん消毒剤も本菌に対する消毒効果が確認されている。

残された課題

本邦では, 2015年3月にシロサケ孵化場でレッドマウス病が発生した。その後の発生は無いが, 今後も本菌の国内侵入に対して注意が必要である。

国外のサケ科魚類養殖では, 本病に対する市販ワクチンが使用されており, 発生の予防に役立っている。一方, ワクチンの効果を適用できない新たな抗原型の *Y. ruckeri* 感染が発生する可能性は今後もあり, 血清型等の抗原や病原因子に関する研究は今後必要である。防疫においても, 流行株に対する疫学情報の注視が引き続き重要である。

文 献

- Austin, B., M. Green and C. J. Rodgers (1982): Morphological diversity among strains of *Yersinia ruckeri*. *Aquaculture*, **27**, 73–78.
- Austin, D. A., P. A. W. Robertson and B. Austin (2003): Recovery of a new biogroup of *Yersinia ruckeri* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Syst. Appl. Microbiol.*, **26**, 127–131.
- Bastardo, A., C. Ravelo and J. L. Romalde (2015): Phylogeography of *Yersinia ruckeri* reveals effects of past evolutionary events on the current strain distribution and explains variations in the global transmission of enteric redmouth (ERM) disease. *Front. Microbiol.*, **6**, 1198.
- Bullock, G. L., H. M. Stuckey and E. B. Shotts, Jr (1978): Enteric redmouth bacterium: comparison of isolates from different geographic areas. *J. Fish Dis.*, **1**, 351–356.
- Davies, R. L. (1990): O-serotyping of *Yersinia ruckeri* with special emphasis on European isolates. *Vet. Microbiol.*, **22**, 299–307.
- Davies, R. L. (1991): Virulence and serum-resistance in different clonal groups and serotypes of *Yersinia ruckeri*. *Vet. Microbiol.*, **29**, 289–297.
- Davies, R. L. and G. N. Frerichs (1989): Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. *J. Fish Dis.*, **12**, 357–365.
- Eissa, A. E., M. Moustafa, M. Abdelaziz and N. A. Ezzeldeen (2008): *Yersinia ruckeri* infection in cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, at a semi-intensive fish farm in lower Egypt. *Afr. J. Aquat. Sci.*, **33**, 283–286.
- Ewing, W. H., A. J. Ross, Don J. Brenner and G. R. Fanning (1978): *Yersinia ruckeri* sp. Nov., the Redmouth (RM) Bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **28**, 37–44.
- Fernandez, L., J. R. Lopez, P. Secades, A. Menendez, I. Marquez and J. A. Guijarro (2003): In vitro and in vivo studies of the Yrp1 protease from *Yersinia ruckeri* and its role in protective immunity against enteric red mouth disease of salmonids. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 7328–7335.
- Fernández, L., P. Secades, J. R. Lopez, I. Márquez and J. A. Guijarro (2002): Isolation and analysis of a protease gene with an ABC transport system in the fish pathogen *Yersinia ruckeri*: insertional mutagenesis and involvement in virulence. *Microbiology*, **148**, 2233–2243.
- Fernández, L., M. Prieto and J. A. Guijarro (2007): The iron- and temperature-regulated haemolysin YhlA is a virulence factor of *Yersinia ruckeri*. *Microbiology*, **153**, 483–489.
- Furones, M. D., C. J. Rodgers and C. B. Munn (1993): *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. *Annual. Rev. Fish Dis.*, **3**, 105–125.
- Glenn, R. A., P. W. Taylor, E. H. Pelton, S. K. Gutenberger, M. A. Ahrens, L. M. Marchant and K. C. Hanson (2015): Genetic evidence of vertical transmission and cycling of *Yersinia ruckeri* in hatchery-origin fall Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *J. Fish Wildlife Manag.*, **6**, 44–54.
- Haig, S. J., R. L. Davies, T. J. Welch, R. A. Reese and D. W. Verner-Jeffreys (2011): Comparative susceptibility of Atlantic salmon and rainbow trout to *Yersinia ruckeri*: relationship to O antigen serotype and resistance to serum killing. *Vet. Microbiol.*, **147**, 155–161.
- Kumer, G., S. Menanteau-Ledouble, M. Saleh and M. El-Matbouli (2015): *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Vet. Res.*, **46**, 103.
- Navais, R., J. Méndez, D. Pérez-Pascual, D. Cascales and J. A. Guijarro (2014): The *yrpAB* operon of *Yersinia ruckeri* encoding two putative U32 peptidases is involved in virulence and induced under microaerobic conditions. *Virulence*, **5**, 619–624.
- Ohtani, M., K. R. Villumsen, H. K. Strøm and M. K. Raida (2014): 3D visualization of the initial *Yersinia ruckeri* infection route in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by optical projection tomography. *PLOS One*, **9**, e89672.
- Romalde, J. L., B. Magariños, J. L. Barja and A. E. Toranzo (1993): Antigenic and molecular characterization of *Yersinia ruckeri* proposal for a new intraspecies classification. *System. Appl. Microbiol.*, **16**, 411–419.
- Ross, A. J., R. R. Rucker and W. H. Ewing (1966): Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Microbiol.*, **12**,

763–770.

- Rucker, R. R. (1966): Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bull. Off. Int. Epiz.*, **65**, 5–6.
- 坂井貴光・大迫典久・飯田貴次 (2006): レッドマウス病原菌の簡易迅速検出法について. *魚病研究*, **41**, 127–130.
- Sakai, T., C. Nakayasu, T. Ito, S. Miwa, N. Oseko and T. Iida (2012): Virulence of *Yersinia ruckeri* for four indigenous fish species in Japan. *Fish Pathol.*, **47**, 74–79.
- Secades, P. and J. A. Guijarro (1999): Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3969–3975.
- Shaow, L., W. Di, L. Hongbai and L. Tongyan (2013): Isolation of *Yersinia ruckeri* strain H01 from farm-raised Amur Sturgeon *Acipenser schrencki* in China. *J. Aquat. Anim. Health*, **25**, 9–14.
- Strøm, H. K., M. Ohtani, B. Nowak, T. S. Boutrup, B. Jones and M. K. Raida (2018): Experimental infection by *Yersinia ruckeri* O1 biotype 2 induces brain lesions and neurological signs in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Fish Dis.*, **41**, 529–537.
- Tobback, E., A. Decostere, K. Hermans, F. Haesebrouck and K. Chiers (2007): *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *J. Fish Dis.*, **30**, 257–268.
- Tobback, E., A. Decostere, K. Hermans, J. Ryckaert, L. Duchateau, F. Haesebrouck and K. Chiers (2009): Route of entry and tissue distribution of *Yersinia ruckeri* in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.*, **84**, 219–228.
- Welch, T. J., D. W. Verner-Jeffreys, I. Dalsgaard, T. Wiklund, J. P. Evenhuis, J. A. G. Cabrera, J. M. Hinshaw, J. D. Drennan and S. E. LaPatra (2011): Independent emergence of *Yersinia ruckeri* biotype 2 in the United States and Europe. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 3493–3499.
- Wrobel, A., J. C. Leo and D. Linke (2019): Overcoming Fish Defences: The Virulence Factors of *Yersinia ruckeri*. *Genes (Basel)*, **10**, 700.
- Yamasaki, M., T. Sakai, T. Ito and K. Mori (2017): Bactericidal effects of disinfectants on *Yersinia ruckeri*. *Fish Pathol.*, **52**, 198–201.