

ヒト糞便由来Lactococcus garvieaeと魚類由来菌株との比較研究

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者名	内山,成人 上野,友美 只野,健太郎
発行元	日本水産學會
巻/号	74巻6号
掲載ページ	p. 1085-1087
発行年月	2008年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



短 報

ヒト糞便由来 *Lactococcus garvieae* と
魚類由来菌株との比較研究

内山 成人,¹ 上野 友美,¹ 只野健太郎,¹
古川三記子,² 西木 一生,² 野本 竜平,²
長宗 秀明,³ 中井 敏博,⁴ 吉田 照豊^{2*}

(2008年3月5日受付, 2008年5月7日受理)

¹大塚製薬株式会社佐賀栄養製品研究所,

²宮崎大学農学部生物環境科学科,

³徳島大学大学院工学研究科,

⁴広島大学大学院生物圏科学研究科

Comparative studies on *Lactococcus garvieae*
between human feces isolates and fish isolates

SHIGETO UCHIYAMA,¹ TOMOMI UENO,¹
KENTARO TADANO,¹ MIKIKO FURUKAWA,²
ISSEI NISHIKI,² RYOHEI NOMOTO,²
HIDEAKI NAGAMUNE,³ TOSHIHIRO NAKAI⁴
AND TERUTOYO YOSHIDA^{2*}

¹Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Saga Nutraceuticals
Research Institute, Saga 842-0195, ²Department of Biological
Production and Environmental Science, Faculty of
Agriculture, The University of Miyazaki, Miyazaki
889-2192, ³Graduate School of Advanced Technology and
Science, The University of Tokushima, Tokushima
770-8501, ⁴Graduate School of Applied Biological Science,
Hiroshima University, Higashi-hiroshima 739-8528,
Japan

キーワード: *Lactococcus garvieae*, 魚類, ヒト糞便, 病
原性

Lactococcus garvieae は、海産養殖魚類のレンサ球菌感
染症の原因菌である。¹⁾ *L. garvieae* の分離報告例は海産
養殖魚類だけではなく、国外においてニジマス *On-*
*chorynchus mykiss*²⁾ や淡水エビ *Macrobranchum rosen-*
*berigii*³⁾ からの報告例もある。最近ではチーズ,⁴⁾ 野
菜,⁵⁾ ヒトの血液⁶⁾ および糞便^{7,8)} からの分離・報告例が
ある。これら *L. garvieae* 菌株が養殖環境中に流入した
際、ブリ *Seriola quinqueradiata* やカンパチ *S. dumerili*
など *L. garvieae* に感受性を有する養殖魚類に対する影
響が危惧される。今回、ヒト糞便から *L. garvieae* を分
離した。このヒト糞便由来株の性状及びカンパチに対す
る病原性について検討した。

ヒト糞便由来 *L. garvieae* 株は、内山ら^{7,8)} の方法で分
離・同定した菌株を用いた。すなわち健康な成人男性数

名の糞便を分取し、BHI 液体培地で希釈液列を作成し
た後、一部を BHI 寒天培地で培養し菌株を単離した。
グラム陽性を示し、乳酸生成を認めた数株を乳酸菌と判
定した。一般性状は、API STREP (bioMereux; Maecy
l'Etoil, France) を用い 37°C, 24 時間反応後、*L. gar-*
vieae と判定された菌株を保存すると共に 16Sr-DNA を
標的にした PCR 反応を行った。⁹⁾ PCR 反応陽性 4 株の
うち、1236 および 20-92 株の 16Sr-DNA の部分遺伝子
配列を決定した。その結果、データベースに登録されて
いる *L. garvieae* (AY699289, AF352116 および
AF352165) と一致したので、糞便由来株を *L. garvieae*
と同定し、PCR 反応で陽性を示した 20-92, 1236, 881
および 337 株を試験に供した。

糞便由来 4 株と魚類由来の 14 株は、抗血清によるス
ライド凝集反応¹⁰⁾ を行った。遺伝型別は、バイアス正
弦電場電気泳動 (BSFGE) で解析した。¹¹⁾ 試験に供し
た魚類由来株の同定は、PCR 反応で行った。⁹⁾ 使用した
魚類由来菌株は、2006 年のメバル *Sebastes inermis* 由来
の EH06M1 株、シマアジ *Pseudocaranx dentex* 由来の
KGLA0631 株、ヒラマサ *S. lalandi* 由来の KN6121~
KN6128 株の 7 株、ブリ由来の DKG6806 および
DKG6808 株を使用した。また、1987 年のブリ由来の
KG8712 株 および 1993 年にヒラメ *Paralichthys*
olivaceus より分離した KG9301 株の計 14 菌株を用いた。
BSFGE に用いた試料の作成は、Nomoto *et al.*¹¹⁾ の方法
に準じて行った。BSFGE は、制限酵素 *Sma*I で染色体
DNA を消化後、ジェノフィールド® (アトー社) で行
った。泳動条件は、定常バイアス電場電圧: 288 V, 正
弦電場電圧: 48 V, 周波数を開始が 10 mHz, 終了を
300 mHz にセットし、15°C で 24 時間泳動した。遺伝
子断片の解析は、Gene Profiler 4.05® (アトー社) を用
いデンドログラムを作成した。

L. garvieae のバクテリオファージに対する感受性
を、糞便由来株と魚類由来株と比較した。用いたファ
ージは、PLgW-1, PLgY-16 および PLgY-30 を使用し
た。¹²⁾ 対照菌株としてブリ由来の KG9408¹⁾ および
ATCC49156 を用いた。ファージに対する感受性の評価
は、Kawanishi *et al.*¹²⁾ の方法に準じて行った。

糞便由来 2 株 (1236 および 20-92) のカンパチ (平
均体重 70 g; n=10) に対する病原性を調査した。150
L の循環式水槽を使用し、1 時間あたり 2 回転の換水率
で 23°C の水温で感染試験を行った。それぞれの感染菌
数は 1.5×10^6 cfu および 2.3×10^6 cfu の濃度を、カンパ

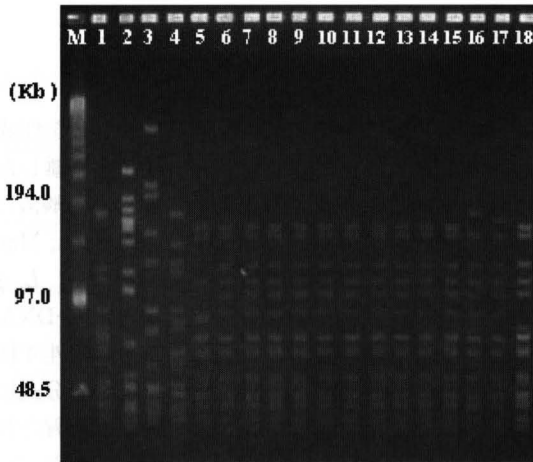


Fig. 1 Biased sinusoidal field gel electrophoresis (BSFGE) *Sma*I macrorestriction profiles of *Lactococcus garvieae* isolates from human feces (Lanes 1~4) and fish (Lanes 5~18). M: molecular marker, Lanes 1: 20-92, 2: 881, 3: 337, 4: 1236, 5: EH06M1, 6: KN6121, 7: KN6122, 8: KN6123, 9: KN6124, 10: KN6125, 11: KN6126, 12: KN6127, 13: KN6128, 14: DKG6806, 15: DKG6808, 16: KG8712, 17: KGLA0631, and 18: KG9301.

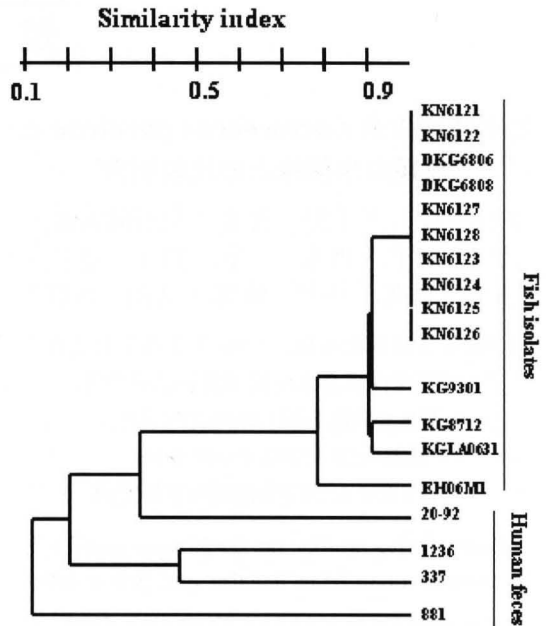


Fig. 2 Dendrogram showing cluster analysis based on BSFGE profiles.

チ1個体あたり腹腔内にそれぞれ注射し14日間観察した。感染14日後、生残魚の腎臓より細菌分離を試みた。感染対照としてKG9408を同様に調整し(1.8×10^6 cfu)感染させた。

糞便由来株の実験感染において、試験期間中カンパチの死亡は認められなかった。また、感染後14日目の生残魚の腎臓から細菌分離を試みたが、再分離もされなかった。しかしながらブリ由来KG9408は、感染5日以内にすべてのカンパチを死亡させると共に、すべての死亡魚の腎臓より細菌が再分離された。魚類由来株は診断用抗血清に強い凝集を示したが、糞便由来4菌株では凝集反応が認められなかった。また、用いたファージ3株に対する感受性はまったく認められなかった。KG9408は、PLgW-1に感受性が認められなかったが、他のファージ(PLgY-16, PLgY-30)に対しては感受性が認められた。ATCC49156は、すべてのファージに対して感受性が認められた。BSFGEの結果、糞便由来株と同一の泳動パターンを示すものは、魚類由来株においては認められなかった(Fig. 1)。また、BSFGEを基に系統樹を作成したところ、ヒト糞便由来株は海産魚由来株と大きく異なるグループに分類されることが判明した(Fig. 2)。

*L. garvieae*は海産養殖魚類のみでなく、他宿主からの分離報告例がある。²⁻⁶⁾今回、ヒト糞便由来*L. garvieae*の菌株と魚類由来株を比較した。また、日本の海産養殖対象魚であるカンパチに対する病原性についても

検討した。内山ら⁸⁾は、日本人女性135名の糞便を調査した結果、*L. garvieae*が糞便1gあたり 10^7 程度検出される検体があることを報告した。本研究において調査した糞便由来の2株は、カンパチに病原性は認められず、海産養殖魚類に対して脅威になる可能性は低いと考えられた。BSFGEによる解析の結果からも、現在海産魚養殖場で問題視されている菌株とは、泳動パターンも異なっていた。また、ファージに対する感受性も明らかに魚類由来株とは異なっていた。以上の性状から、ヒト糞便由来の*L. garvieae*は現在海産養殖魚で問題となっている菌株とは、遺伝型、ファージ型、血清型ともに異なる可能性が考えられた。*L. garvieae*の食品からの分離報告例があるが、⁴⁻⁵⁾野菜から分離された菌株もブリに対して病原性が認められず、ファージに対する感受性も魚類由来株と異なることが報告されている。⁵⁾今後も食品や多様な宿主からの*L. garvieae*の分離報告があると思われる。これら分離株の海産養殖魚に与える影響を継続して検討する必要があると考える。*L. garvieae*を検出するPCR法は開発されているが、^{9,13)}現在日本で問題となっている海産魚由来株と他宿主由来菌株を識別できるPCR法は開発されていない。日本の海産養殖魚類で問題となる菌株との識別を容易にするべく新しいPCR法の開発が望まれる。

謝 辞

本研究は、科学研究費補助金基盤(C)(課題番号; 19580212)および先端技術を活用した農林水産研究高

度化事業（課題番号；18075）「バクテリオファージを用いた魚類細菌感染症の防除技術の開発」の一部として行われた。

文 献

- 1) Ooyama T, Shimahara Y, Nomoto R, Yasuda H, Iwata K, Nakamura A, Itami T, Yoshida T. Application of attenuated *Lactococcus garvieae* strain lacking a virulence-associated capsule on its cell surface as a live vaccine in yellowtail *Seriola quinqueradiata* Temminck and Schlegel. *J. Appl. Ichthyol.* 2006; **22**: 149-152.
- 2) Barnes AC, Guyot C, Hansen BG, Mackenzie K, Horne MT, Ellis AE. Resistance to serum killing may contribute to differences in the abilities of capsulate and non-capsulated isolates of *Lactococcus garvieae* to cause disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L). *Fish Shellfish Immunol.* 2002; **12**: 155-168.
- 3) Chen SC, Lin YD, Liaw LL, Wang PC. *Lactococcus garvieae* infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* confirmed by polymerase chain reaction and 16S r DNA sequencing. *Dis. Aquat. Org.* 2001; **45**: 1005-1008.
- 4) El-Baradei G, Delacroix-Buchet A, Ogier J-C. Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian Domiat cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; **73**: 1248-1255.
- 5) Kawanishi K, Yoshida T, Kijima M, Yagyu K, Nakai T, Okada S, Endo A, Murakami M, Suzuki S, Morita H. Characterization of *Lactococcus garvieae* isolated from radish and broccoli sprouts that exhibited a KG+ phenotype, lack of virulence and absence of a capsule. *Lett. Appl. Microbiol.* 2007; **44**: 481-487.
- 6) Aguire M, Collins MD. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.* 1993; **75**: 95-107.
- 7) 内山成人, 上野友美, 鈴木淑水. 新規エクオール産生乳酸菌のヒト糞便からの単離・同定. 腸内細菌学雑誌 2007; **21**: 217-220.
- 8) 内山成人, 木村弘之, 上野友美, 鈴木淑水, 只野健太郎, 石見圭子. *Lactococcus garvieae* の食品中からの検出およびヒト腸内常在性. 腸内細菌学雑誌 2007; **21**: 221-225.
- 9) Zlotkin A, Eldar A, Ghittino C, Bercovier H. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1998; **36**: 983-985.
- 10) Ooyama T, Hirokawa Y, Minami T, Yasuda H, Nakai T, Endo M, Ruangpan L, Yoshida T. Cell-surface properties of *Lactococcus garvieae* strains and their immunogenicity in the yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Dis. Aquat. Org.* 2002; **51**: 169-177.
- 11) Nomoto R, Unose N, Shimahara Y, Nakamura A, Hirae T, Maebuchi K, Harada S, Misawa N, Itami T, Kagawa H, Yoshida T. Characterization of Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* isolated from farmed fish. *J. Fish Dis.* 2006; **29**: 673-682.
- 12) Kawanishi M, Yoshida T, Yagashiro S, Kijima M, Yagyu K, Nakai T, Murakami M, Morita H, Suzuki S. Differences between *Lactococcus garvieae* isolated from the genus *Seriola* in Japan and those isolated from the other animals (trout, terrestrial animals from Europe) with regard to pathogenicity, phage susceptibility, and genetic characterization. *J. Appl. Microbiol.* 2006; **101**: 496-504.
- 13) Aoki T, Park C-I, Yamashita H, Hirono I. Species-specific polymerase chain reactions primers for *Lactococcus garvieae*. *J. Fish Dis.* 2000; **23**: 1-6.