

Study on Appearance and Mechanism of Drug Resistance
in Pathogenic Strains of *Streptococcus parauberis* from
Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*
(ヒラメ由来 *Streptococcus parauberis* における薬剤耐性菌の出現と
耐性化機構に関する研究)

長崎大学大学院生産科学研究科

孟 飛

Streptococcus parauberis はウシの乳房炎の原因菌として知られ、魚類ではターボット *Scophthalmus maximus* のレンサ球菌症の原因菌としてヨーロッパではじめて報告された。ヨーロッパ以外では、韓国において眼球突出と鰓の壊死を病徴とするヒラメ *Paralichthys olivaceus* の *S. parauberis* 感染症が報告されている。わが国では 2000 年代に入ってヒラメの *S. parauberis* 感染症の発生が確認され、その後発生地域が拡大して発生率および被害率が高い傾向が各地で見られている。

現在、ヒラメのレンサ球菌症の治療薬としてはテトラサイクリン系の抗生物質のみが承認されているが、*S. parauberis* の薬剤感受性および耐性菌の出現についての報告はない。本研究では、日本各地で分離された *S. parauberis* 株について、代表株で作製したウサギ抗血清との凝集性およびテトラサイクリンを含む主要な抗菌剤に対する感受性を調べた。そして薬剤耐性株については、耐性化機構について分子生物学的検討を行った。

(第一章) 2002 年から 2007 年にかけて西日本各地のヒラメ養殖場で分離された *S. parauberis* 64 株は、すべて I 型 (44 株) あるいは II 型 (20 株) に分類された。血清型別した 64 株を供試菌株として、アンピシリン (ABPC)、カナマイシン (KM)、エリスロマイシン (EM)、リンコマイシン (LCM)、塩酸オキシテトラサイクリン (OTC)、クロラムフェニコール (CP)、オキシリン酸 (OA)、スルファモノメトキシシン (SMMX)、トリメトプリム (TMP) の 9 種類の抗菌剤の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。その結果、OA および SMMX については高い MIC 値を示したことから、*S. parauberis* が本来両薬剤に耐性であると考えられた。また、血清型が I 型の 44 株中 5 株が OTC と EM に高度耐性で、II 型は 20 株すべてが OTC 中等度耐性を示した。

(第二章) 見つかった OTC および EM 耐性株から、耐性遺伝子および耐性遺伝子をコードするトランスポゾンに関連する遺伝子の検出を試みた。その結果、I 型耐性株 5 株からは OTC 耐性遺伝子 *tet(S)* と EM 耐性遺伝子 *erm(B)* が検出され、II 型 20 株からは OTC 耐性遺伝子 *tet(M)* およびトランスポゾン 916 (Tn916) の挿入酵素遺伝子 *int* と切出し酵素遺伝子 *xis* が検出された。このことから、II 型株には Tn916 様の配列の存在が示唆された。

(第三章) 血清型 I 型株から検出された耐性遺伝子のゲノム上の位置をサザンハイブリダイゼーションで調べた。OTC/EM 耐性株からは約 11 kbp のプラスミドが検出され、各耐性遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションの結果、*tet(S)*はプラスミド上に、*erm(B)*は染色体 DNA 上にコードされていることが判明した。I 型耐性株 5 株に検出されたプラスミドはすべて受容菌 *Enterococcus faecalis* FA2-2 に伝達され、*Hind*III による切断パターンは同じであった。このことから、プラスミドは伝達性であり、同じプラスミドであると考えられた。染色体 DNA 上の *erm(B)* を含む *Hind*III 断片をクローニングし、塩基配列を調べたところ、この断片は *erm(B)* の上流と下流に 331 bp のリピート配列を有し、4 つの ORF からなる断片であり、その塩基配列は他の球菌のプラスミドの配列と 92%以上の相同性を示した。したがって、この *erm(B)* を含む配列はプラスミド由来と推察された。

(第四章) 血清型 II 型株に Tn916 様のトランスポゾンの存在が示唆されたことから、GenBank から取得した Tn916 の塩基配列に基づいて設計したプライマーを用いて、II 型株の染色体 DNA を鋳型に Tn916 の 4 つの部分に相当する配列の PCR を試みた。その結果、予想される長さの増幅産物がすべての II 型株から得られ、本 Tn916 様配列が Tn916 と極めて類似する遺伝子構造を有することが推察された。代表株について得られた PCR 産物の塩基配列を調べたところ、他の細菌の Tn916 とほぼ同じ配列であった。なお、Tn916 様配列をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、*Sau*3AI および *Hind*III の切断ハイブリダイゼーションパターンは II 型株すべて同一であったが、*Hinc* II の切断パターンは 2 種類認められた。したがって、*S. parauberis* II 型株由来の Tn916 様配列には配列に多様性があると考えられた。また、Tn916 様配列に隣接する塩基配列を調べたところ、Tn916 様配列の挿入部位は A/T リッチな場所であり、Tn916 様配列を持たない I 型株の同じ部位の塩基配列との比較から、Tn916 様配列には ATCATA の配列が付加されていることが判明した。

本研究から、*S. parauberis* 血清型 I 型株には伝達性プラスミドにコードされた OTC 耐性遺伝子が、II 型株にはトランスポゾンに保持された OTC 耐性遺伝子があることが明らかになった。ヒラメのレンサ球菌症ではオキシテトラサイクリン系薬剤が唯一使用できる治療薬であることから、耐性株の存在は *S. parauberis* 感染症の防除対策を考える上で重要な問題である。I 型株ではプラスミドによって耐性が広まる懸念があり、II 型株ではすべての株が耐性である可能性があることから治療は困難である。今後はテトラサイクリンに代わる治療薬の開発あるいはワクチン等の予防法の確立を目指すことが必要と思われるが、耐性化を助長しないよう、ヒラメ養殖におけるテトラサイクリン系薬剤の使用は慎重に行わなければならない。