

リアルタイム PCR 法を用いたブリ体内における *Nocardia seriolae* 感染動態の 解析およびスルファモノメトキシン経口投与効果の評価

今城雅之¹・福本陽一²

(¹高知大学教育研究部自然科学系農学部門・²高知大学大学院黒潮圏総合科学専攻)

Use of Quantitative Real-time PCR for the Analysis of Infection Dynamics and for the Effect Evaluation of Oral
Sulfamonomethoxine Administration in Yellowtail Experimentally Infected with *Nocardia seriolae*

Masayuki Imajoh¹ and Yoichi Fukumoto²

¹*Agriculture Unit, Natural Sciences Cluster, Research and Education Faculty, Kochi University;*

²*Graduate School of Kuroshio Science, Kochi University*

Abstract: *Nocardia* are aerobic, nonmotile, gram-positive, bacillary, branching bacteria, and over 100 species have been identified. In Japan, *Nocardia seriolae* causes nocardiosis mainly in cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) and greater amberjack (*Seriola dumerili*). This disease can be treated with two antibacterial drugs, sulfamonomethoxine (available for fishes of the order *Perciformes*) and sulfisozole sodium (available only for yellowtail). On the other hand, currently there is no licensed vaccine available. Recently, we developed quantitative real-time PCR (qPCR) based on the 16S rRNA gene of *N. seriolae*, and applied it for *in vivo* evaluation of vaccine candidate against nocardiosis. Further studies focused on the development of vaccines and the screening of antibacterial drugs are needed, however the effect evaluation method is not established yet. In this study, using our Q-PCR assay, we examined the dynamics of *N. seriolae* infection in yellowtail and the protective effect of oral sulfamonomethoxine administration against the infection. Bath challenge was selected because it closely mimics natural exposure. This infection caused a mortality of 100%, while the infected and dead fish showed typical clinical signs of nocardiosis, i.e., ulceration on the body surface, and white nodules in the kidney, spleen, gills, and heart. Q-PCR assay showed that the copy numbers of the 16S rRNA gene in the kidney and spleen tissues of infected fish increased, followed by increasing numbers of white nodules, and reached values of 7,455,611 copies/50ng and 8,585,415 copies/50ng at 9 days post-infection, which were higher than those in other tissues and blood. There was not a significant difference in mortality among all six oral sulfamonomethoxine administration groups (high-dose (200mg/kg) or low-dose (20mg/kg) administration at 1, 3, or 5 days post-infection), which were lower than that in no administration group (66.7%). On the other hand, a clear difference in the copy numbers of the 16S rRNA gene was detected in the spleen and heart tissue samples between two high-dose administration groups and the other four groups, indicating that higher-dose and earlier administration is more effective than lower-dose and later. It must be clear whether the remaining bacteria become drug-resistant and cause nocardiosis again because antibacterial drugs including sulfamonomethoxine do not kill all bacteria. Therefore, we propose a novel approach by using our Q-PCR assay for *in vivo* screening antibacterial drugs against nocardiosis.

キーワード：魚類ノカルジア症，ノカルジア・セリオレ，リアルタイム PCR 法，スルファモノメトキシン。

Keyword: Fish nocardiosis, *Nocardia seriolae*, Real-time PCR assay, Sulfamonomethoxine.

はじめに

Nocardia 属細菌はグラム陽性好気性放線菌であり (Wilson¹⁾), List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN, Euzéby²⁾) によると, 現在までに 100 種以上の菌種が報告されている. そのうち, 魚類にノカルジア症を引き起こす原因種として *Nocardia asteroides*, *Nocardia seriolae*, および *Nocardia salmonicida* の 3 種が知られており (Elkesh ほか³⁾), 日本では, 海面養殖生産量の約 6 割を占めるブリ属魚類養殖において *N. seriolae* による被害が大きくなっている (高橋ほか⁴⁾). その背景として, 従来の主要感染症であった連鎖球菌症, 類結節症, およびマダイイリドウイルス病のワクチンが普及したことで, これらの疾病の発生が減少したためと考えられている (柳と前野⁵⁾).

現在, 国内ではノカルジア症の経口投与剤として承認されている水産用医薬品があり, スズキ目魚類を対象にスルファモノメトキシシ (SMM) またはそのナトリウム塩 (SMM-Na), およびブリのみを対象にスルフィソゾールナトリウム (SIZ) を使用することができる (農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課⁶⁾). また, 近年の耐性菌問題から, 水産増養殖における感染症対策はワクチン予防を重要視する傾向にあり, これまでワクチン開発に関する研究は報告されているが (楠田と中川⁷⁾, 楠田ほか⁸⁾, Shimahara ほか⁹⁾, Itano ほか¹⁰⁾, Kato ほか^{11,12)}, Imajoh ほか¹³⁾ など), まだ実用化されたものはない.

ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) 法は, 魚類病原体を正確で高感度に検出できることから, 多くの魚病診断に用いられる分子生物学的手法である (Cunningham¹⁴⁾). *N. seriolae* の特異的検出のために開発された PCR 法は, 10^2 コロニー形成単位 (colony-forming units, CFU) を検出限界とし, 生きた魚の体表粘液から本菌を検出する簡易診断法として応用できる可能性が示された (Miyoshi と Suzuki¹⁵⁾). さらに, その後開発されたループ介在等温増幅

(loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 法は感染魚から PCR 法よりも迅速かつ高感度で *N. seriolae* を検出できるとし, 養殖現場での早期診断への活用が期待されている (Itano ほか¹⁶⁾). 細菌の定量手法としては, 従来からの手法である CFU 法がよく用いられるが, 培養によって行われることから, 結果判定までの時間を各細菌の増殖能に依存しており, *N. seriolae* の場合には 2 週間を要する (Itano ほか¹⁷⁾). 定量リアルタイム PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 法による検出は高感度で, かつ迅速性と定量性で優れていることから, せつそう病の原因菌 *Aeromonas salmonicida* (Balcázar ほか¹⁸⁾, Keeling ほか¹⁹⁾ など), エドワジエラ症の原因菌 *Edwardsiella tarda* (Xie ほか²⁰⁾), 細菌性冷水病の原因菌 *Flavobacterium psychrophilum* (del Cerro ほか²¹⁾, Orieux ほか²²⁾, Marancic と Wiens²³⁾ など), 連鎖球菌症の原因菌 *Lactococcus garvieae* (Jung ほか²⁴⁾, Thanh ほか²⁵⁾ など), ビブリオ病の原因菌 *Vibrio anguillarum* (Crisafi ほか²⁶⁾), 抗酸菌症の原因菌 *Mycobacterium* sp. (Zerihun ほか²⁷⁾), 細菌性腎臓病の原因菌 *Renibacterium salmoninarum* (Chase ほか²⁸⁾, Jansson ほか²⁹⁾ など), 滑走細菌症の原因菌 *Tenacibaculum maritimum* (Fringuelli ほか³⁰⁾) 等, 多くの魚病細菌で qPCR 法による検出例が報告されている. 我々は最近, *N. seriolae* の 16S rRNA 遺伝子を標的として特異検出する qPCR 法を開発し, ノカルジア症に対する新規ワクチン効果の評価に応用した (Imajoh ほか¹²⁾).

N. seriolae によるノカルジア症は水温の上昇する 7 月から翌年の 2 月にかけて流行し, 最大の流行期間は 9 月と 10 月とされる (若林と室賀³¹⁾). 本症の特徴として, 軀幹部の皮下脂肪組織や筋肉に膿瘍や結節が出現し, 内臓, 特に脾臓と腎臓に無数の粟状結節が形成される軀幹結節型と, 鰓に特異的に結節が形成される鰓結節型に分かれ, 後者は低水温期の冬季に多く現れる (楠田と中川⁷⁾). 結節の内部では *N. seriolae* が生きた状態で包囊されるため, 結節中の本菌を抗菌薬で完全に殺菌することは困難であり, 結節病変が進行してからの投薬ではあまり効果がなく, 長期間の投与が必要となる (窪田ほか³²⁾). このことは耐性菌の出現にも影響を及ぼす懸念があり, 実際, 養殖現場で長年広く使用されてきたエリスロマイシン (EM) とオキシテトラサイクリン (OTC) に耐性を有する *N. seriolae* の出現が複数報告され (板野と川上³³⁾, Ismail ほか^{34,35)} など), 連鎖球菌症やビブリオ病等, 他の細菌感染症の治療目的に使用される薬剤への耐性化問題が顕在化している. 以前の我々の研究でも, 2011 年から 2014 年に分離された鹿児島県養殖ブリ由来株から EM 耐性株, 2008 年から 2014 年に分離された高知県の養殖カンパチ由来株から EM 耐性株と OTC 耐性株がそれぞれ確認され

た（今城ほか³⁶⁾）。よって、生残菌の問題の観点から、今後、既存魚病薬剤からノカルジア症に有効な薬剤の探索を行う上で、感染実験の生残率の結果だけでは評価基準として不十分であり、評価精度を高める必要があると考える。そこで、本研究では、我々の開発した qPCR 法を用いてブリ体内における *N. seriolae* の感染動態を明らかにするとともに、ノカルジア症の治療薬 SMM-Na の投与効果を評価した。

材料と方法

供試菌株と培養

供試菌株には NBRC 株に登録・保存されている N-2927 株（NBRC 110360, Imajoh ほか³⁷⁾）を用いた。本菌株の 1 コロニーを 20mL の Tryptic Soy Broth (TSB) 液体培地に接種し、28.0°C、96 時間、140rpm の振とうで前培養を行った。前培養菌液 100μL を TSB 液体培地 300mL に接種し、28.0°C、96 時間、160rpm の振とうで得られた本培養菌液を海水で 10 倍希釈して感染実験に供した。

供試魚

供試魚には土佐湾で採捕されたブリ当歳魚を用い、2,000LのFRP水槽に収容して、市販のドライペレット（日清丸紅飼料社製）を3%の給餌率で1日1回給餌した。飼育期間中の水温は26.5～28.0°Cであった。平均体重48.8gのブリを2日間絶食させ、以下の感染実験に用いた。

感染実験

実験1では、 3.1×10^5 CFU/mL濃度の*N. seriolae*菌液に供試魚を10分間浸漬させ、46尾および39尾を200L水槽2基にそれぞれ収容して感染群Aと感染群Bを設け、流水で飼育した。対照群（n=19）には菌液に代わりTSB培地を用いた。感染期間を14日間とし、1日1回の飽食給餌を行い、期間中の水温は25.0～27.0°Cであった。感染群Aから感染10日後まで1日毎に3尾、感染11日後に1尾を無作為に取り上げた。また、感染期間中の瀕死と死亡直後の感染魚も取り上げ、その尾数は感染7日後に1尾、感染8日後に2尾、感染9日後に1尾、および感染11日後に1尾となった。累積死亡率は感染群Bと対照群における死亡尾数から算出し、感染14日後に対照群から3尾を取り上げた。

実験2では、 1.0×10^6 CFU/mL濃度の*N. seriolae*菌液に供試魚を10分間浸漬させ、15尾ずつ200L水槽6基に収容して流水で飼育した。感染1日後、3日後、または5日後にSMM-Na主成分の水産用ダイメトンソーダ（Meiji Seikaファルマ社製）を魚体重1kg当たり20mgまたは200mgの濃度になるようにドライペレットに均一に混ぜ、1日1回の頻度で3日間経口投与した。投薬終了7日後に各投薬群から3尾ずつ取り上げた。この間、全投薬群で死亡魚はなく、さらに21日間観察を継続して累積死亡率を求めた。

DNA抽出

上記の回収魚は直ちに尾柄部から採血を行い、外観症状と剖検症状を観察して記録した。その後、鰓、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、胃、腸管、左体側の筋肉、および脳を摘出し、それぞれを数個の組織片に切り分け、そのうちの3片と上記の血液検体に200μLの溶解バッファー（50mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 0.2% Nonidet-40, 1.0% Tween 20, 0.5% (w/v) sodium dodecyl sulfate）と5μLのプロテイナーゼK溶液（20mg/mL, タカラバイオ社製）を加え、50°Cで一晩インキュベートした。

その後、98°Cで10分間の不活化処理を行い、鶏卵自由来リゾチーム（シグマアルドリッチ社製）を最終濃度1mg/mLになるように加え、37°Cで1時間インキュベートした。再び2μLのプロテイナーゼK溶液を加え、50°Cで2時間インキュベートし、定法に従いフェノール・クロロホルム法とエタノール沈殿を行い、DNAペレットを100μLのTEバッファー（10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0）に懸濁した。得られたDNA溶液の純度と量をQ5000微量紫外可視分光光度計（トミー精工社製）で測定した。

SYBR Green 法による qPCR

qPCR は Imajoh ほか¹²⁾ の方法を改変して行った。すなわち、PCR 反応は SYBR Green PCR Master Mix（ライフテクノロジー社製）と最終濃度 200nM のプライマー、組織及び血液から抽出した 50ng の DNA 溶液を加えて滅菌 MQ 水で全量 20μL とし、StepOne Plus リアルタイム PCR システム（ライフテクノロジー社製）を用いて 3 本立てで行った。反応条件は、95°C で 10 分の初期変性を行い、その後、95°C で 15 秒の熱変性と 60°C で 1 分のアニーリングを 40 サイクル繰り返す。60°C から 95°C までの昇温により融点曲線解析を行った。既知濃度のコントロールプラスミドを用いて作成した検量線（Imajoh ほか¹³⁾）により得られた Ct 値からコピー数を算出し、抽出 DNA 50ng あたりのコピー数とした。

結果と考察

実験1の感染群Bおよび対照群におけるブリの累積死亡率をFig. 1に示した。感染群Bでは、感染7日後に最初の死亡魚（累積死亡率2.9%）が見られた。さらに、感染8日後には3尾の死亡魚（累積死亡率11.4%）が確認され、その後、累積死亡率は急激に上昇し、感染13日後には100%に達した。一方、対照群では、14日間の感染期間を通して死亡魚は観察されなかった。Itanoほか¹⁷⁾ は4つの感染様式、すなわち、経口感染、浸漬感染、注射感染、および同居感染により*N. seriolae*のブリに対する50% lethal dose (LD₅₀) を求め、浸漬感染では1魚体あたり 1.5×10^4 CFUとし、感染23日後の累積死亡率はそれぞれ、菌濃度 5.1×10^3 CFU/mLで20%、 5.1×10^4 CFU/mLで80%、 5.1×10^5 CFU/mLで100%となることを示した。浸漬感染は自然感染に近いとされるが、多くの魚病細菌において高い致死率が得られなくなる場合が多い（Itanoほか¹⁷⁾）。本研究では、浸漬感染による菌濃度と累積死亡率との関係について高い再現性が認められたことから、浸漬法は*N. seriolae*の実験感染手法として適していると判断された。

実験1の感染群Aのブリの初期病変として、感染3日後の回収魚の胸鰭に出血 (Fig. 2A)、腹鰭の基部に発赤 (Fig. 2B)、及び尻鰭に出血 (Fig. 2C) 等の外観症状が観察された。感染4日後の回収魚の尾柄部では糜爛と潰瘍が生じており

(Fig. 2D)、さらに、感染6日後には体側部でも潰瘍病変が

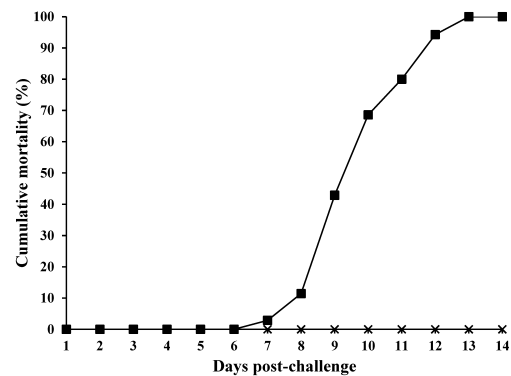


Fig. 1. Cumulative mortality of yellowtail after bath challenge with *N. seriolae* strain N-2927 (■) and TSB medium (×).

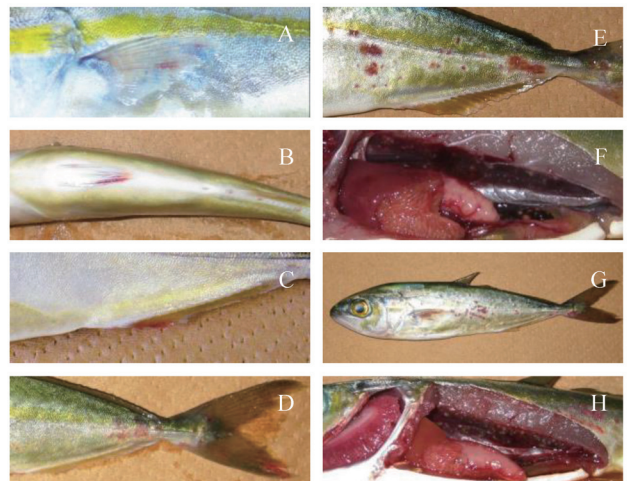


Fig. 2. Clinical signs of yellowtail after bath challenge with *N. seriolae* strain N-2927

認められるようになった (Fig. 2E) . 感染5日後の回収魚の腎臓と脾臓には粟粒状の結節が観察され (Fig. 2F) , その数は感染日数の経過とともに多くなった. 潰瘍・結節形成病変はノカルジア症の特徴的な症状であり (窪田ほか³²⁾) , 死亡魚では重度に進行しており, 特に, 結節は腎臓と脾臓で多発し, 加えて鰓と心臓でも観察された (Fig. 2GとH) .

実験1の感染群Aのブリ各臓器における*N. seriolae*の16S rRNA遺伝子量の推移をFig. 3に示した. 感染3日後の感染魚において, 16S rRNA遺伝子量は腎臓で3,178~74,256 copies/50ng DNA, 脾臓で3,862~43,380 copies/50ng DNAと他臓器と比較して相対的に高くなり, さらに, 感染9日後まで増加傾向が継続して, その増加には他臓器と明らかな差が認められた. ノカルジア症の結節のほとんどは大型化したマクロファージである類上皮細胞で占められ, 中心部の乾酪化は*N. seriolae*による類上皮細胞の凝固壊死に起因しており, 乾酪巣を有する場合には, そこで本菌が多数観察される (窪田ほか³²⁾) . よって, 上記で述べた剖検所見も含めて考慮すると, 腎臓と脾臓における16S rRNA遺伝子量の増加は結節形成の進行程度に大きな影響を受けていたと考えられる. また, 自然感染の病魚における結節は腎臓, 脾臓, および心臓で多く, 次の鰓でも見られるが, 肝臓は他臓器と比べて非常に少ない (窪田ほか³²⁾) . 瀕死魚または死亡魚において, 16S rRNA遺伝子量の最大値は腎臓で5,622,469 copies/50ng DNAと最も高くなり, 次の順に脾臓で2,079,996 copies/50ng DNA, 心臓で663,746 copies/50ng DNAとなり, この結果は自然感染時の結節形成の頻度と一致しており, 肝臓で結節は見られなかったものの, 浸漬感染による*N. seriolae*のブリへの病原性は自然発症に近い形で発現していたと思われた. また, 腎臓, 脾臓, 心臓, および肝臓での16S rRNA遺伝子量は1オーダーのばらつきがあったのに対し, 腸管では70~11,0381 copies/50 ng DNA, 胃では3,136~153,418 copies/50 ng DNAとばらつきがかなり大きく, Itanoほか¹⁶⁾ によると胃腸管で結節形成が認められたという報告はないことから, 両臓器が*N. seriolae*の主な増殖部位でないことを反映しているのかもしれない. 尚, 感染14日後に取り上げた対照魚3尾の全ての臓器から16S rRNA遺伝子は検出されなかった.

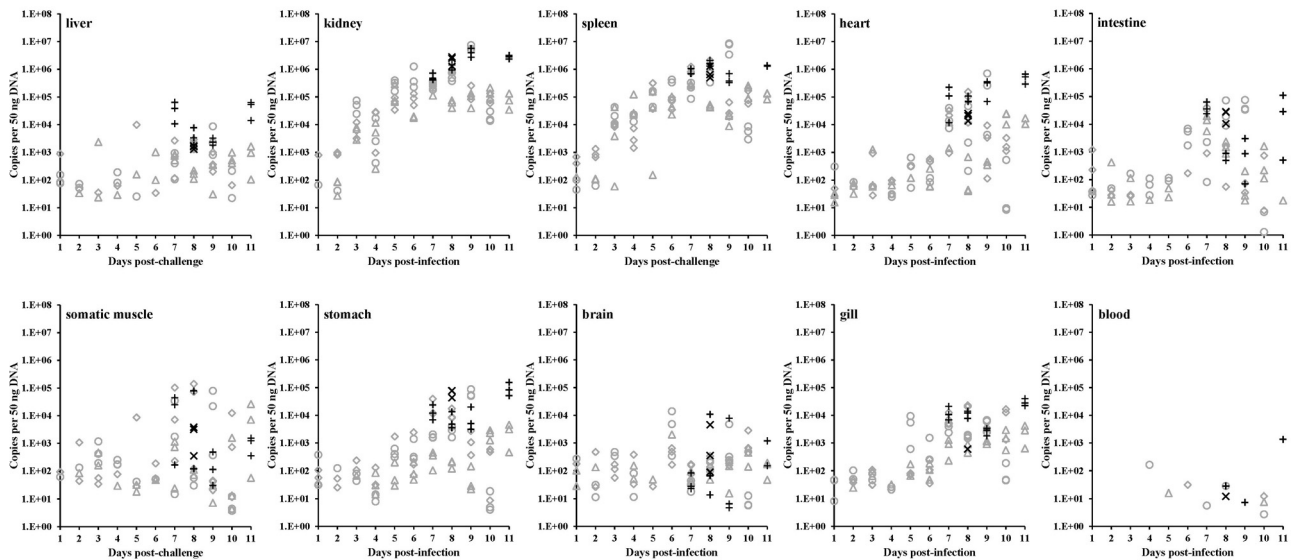


Fig. 3. Quantification of 16S rRNA gene of *N. seriolae* strain N-2927 by qPCR in 9 different tissues and blood of sampled (gray symbols) and dead (black symbols) yellowtail after bath challenge.

実験2の各SMM-Na投薬群のブリ各臓器における投薬終了7日後の*N. seriolae*の16S rRNA遺伝子量をFig. 4に示した. 感染1日後の200mg投薬群では脳, 鰓, 心臓, および肝臓, 感染3日後の同投薬群では脳で16S rRNA遺伝子は全く検出されず, また, その遺伝子量は感染1日後および3日後の200mg投与群の脾臓と心臓で20mg投与群よりも有意に低くなり, 感染の早期かつ高濃度の投与でより効果的に*N. seriolae*の増殖を抑制する傾向を示した. しかし, 300mg/kg濃度以上のSMMの連続投与では摂餌低下や貧血が見られることがあるとの報告に加えて (青木³⁸⁾) , 実際に養殖現場での使用を想定すると,

SMMの使用基準は1日あたり50mg/kgと用量が定められていることから(農林水産省消費・安全局畜産安全管理課⁶⁾), その以上の濃度での投与による薬剤効果はそもそも期待できない. 投薬終了21日後の累積死亡率は無投薬群で66.7%となり, 実験1よりも低い結果となった. この理由として, 実験2は実験1とは異なり12月に行われ, 各水槽に25°Cに設定したヒーターを入れたものの, 全体で水温が思ったように上がらず, *N. seriolae*の発育至適水温とされる25~28°C(若林と室賀³¹⁾)を下回ったことが原因と考えられた. 感染1日後, 3日後, および5日後の20mg投薬群での累積死亡率は6.7%, 20.0%, および0%, 感染1日後, 3日後, および5日後の200mg投薬群では0%, 6.7%, および6.7%となり, 死亡率は全ての投薬群とともに大幅に減少した(data not shown). 以上の結果から, 投与日および投与量間の薬剤効果の差は生残率の結果では認められなかったが, 16S rRNA遺伝子の定量結果から明確にすることができ, 薬剤効果の評価においてqPCR法の有用性が実証された. 柳と前野⁵⁾によると, 5日間のSMM-Na投薬と2日間の休薬を3週間繰り返して行い, その後4週間飼育して生残したブリでの菌分離率は75%と高率になることが報告されており, 今後, 投薬治療後にどれだけの生残菌が存在すると薬剤耐性や再発症のリスクに繋がるのかを評価できる仕組みが求められ, 今回のqPCR法の応用が大いに期待できる. 興味深いことに, 結核の原因菌*Mycobacterium tuberculosis*の場合, 結核結節の乾酪巣では内容物の硬化に伴って菌は弱毒化する傾向があるとの報告があり(池田³⁹⁾), *N. seriolae*ではまだ知見がなく, 今後の研究で明らかにしなければならない.

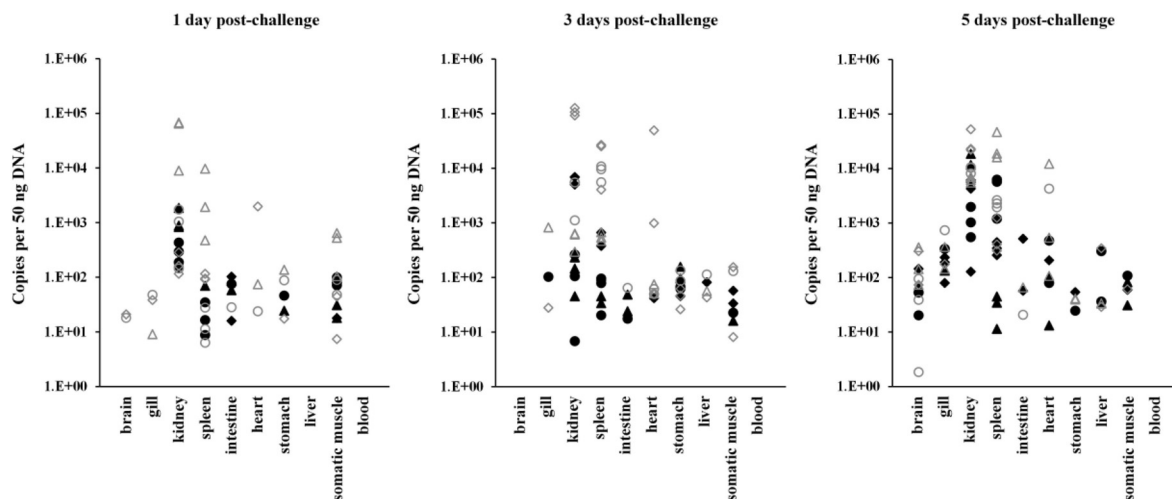


Fig. 4. Quantification of 16S rRNA gene of *N. seriolae* strain N-2927 by qPCR in 9 different tissues and blood in yellowtail orally administered a high-dose (200mg/kg of body weight, black symbols) and a low-dose (20mg/kg of body weight, gray symbols) sulfamonomethoxine after bath challenge.

文献

1. Wilson, J.W., Nocardiosis: updates and clinical overview. *Mayo Clinic Proceedings*, 87, 403–407. (2012)
2. Euzéby, J.P., List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 590–592. (1997)
3. Elkesh, A., Kantham, K.P., Shinn, A.P., Crumlish, M., Richards, R.H., Systemic nocardiosis in a Mediterranean population of cultured meagre, *Argyrosomus regius* Asso (Perciformes: Sciaenidae). *Journal of Fish Diseases*, 36, 141–149. (2013)
4. 高橋幸則・福田耕平・近藤昌和・安本信哉・廣野育生・青木宙, 日本における海水魚の細菌性疾患とワクチン開発の現状. *水産大学校研究報告*, 60, 51–56. (2011)
5. 柳宗悦・前野幸二, 公募型試験研究事業－Ⅲ 養殖ブリ類の再興感染症(ノカルジア症)の薬剤治療に関する研究.

- 平成24年度鹿児島県水産技術開発センター事業報告書, 209–218. (2013)
6. 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課, 水産用医薬品の使用について 第29報, 9–10. (2016)
 7. 楠田理一・中川敦史, ブリのノカルディア病. 魚病研究, 13, 25–31. (1978)
 8. 楠田理一・木村喜洋・浜口 昌巳, *Nocardia kampachi*で免疫したブリの血液中および腹腔内の白血球の動態. 日本水産学会誌, 55, 1183–1188. (1989)
 9. Shimahara, Y., Yasuda, H., Nakamura, A., Itami, T., Yoshida, T., Detection of antibody response against *Nocardia seriolae* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a preliminary vaccine trial in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 25, 270–275. (2005)
 10. Itano, T., Kawakami, H., Kono, T., Sakai, M., Live vaccine trials against nocardiosis in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Aquaculture, 261, 1175–1180. (2006)
 11. Kato, G., Kondo, H., Aoki, T., Hirono, I., *Mycobacterium bovis* BCG vaccine induces non-specific immune responses in Japan flounder against *Nocardia seriolae*. Fish & Shellfish Immunology, 33, 243–250. (2012)
 12. Kato, G., Kato, K., Jirapongpairaj, W., Kondo, H., Hirono, I., Development of DNA vaccines against *Nocardia seriolae* infection in fish. Fish Pathology, 49, 165–172. (2014)
 13. Imajoh, M., Tamura, K., Oguro, K., Kurihara, S., Yamane, J., Shimizu, M., Oshima, S., Kawai, K., Failure to protect yellowtail *Seriola quinqueradiata* against nocardiosis by vaccination with a recombinant protein and pcDNA4 expression vector of *Edwardsiella tarda* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Fish Pathology, 49, 151–158. (2014)
 14. Cunningham, C.O., Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control. Aquaculture, 206, 19–55. (2002)
 15. Miyoshi, Y., Suzuki, S., A PCR method to detect *Nocardia seriolae* in fish samples. Fish Pathology, 38, 93–97. (2003)
 16. Itano, T., Kawakami, H., Kono, T., Sakai, M., Detection of fish nocardiosis by loop-mediated isothermal amplification. Journal Applied Microbiology, 100, 1381–1387. (2006)
 17. Itano, T., Kawakami, H., Kono, T., Sakai, M., Experimental induction of nocardiosis in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* Temminck and Schlegel by artificial challenge. Journal of Fish Diseases, 29, 529–534. (2006)
 18. Balcázar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Gironés, O., Múzquiz, J.L., Quantitative detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue by real-time PCR using self-quenched, fluorogenic primers. Journal of Medical Microbiology, 56, 323–328. (2007)
 19. Keeling, S.E., Brosnahan, C.L., Johnston, C., Wallis, R., Gudkovs, N., McDonald, W.L., Development and validation of a real-time PCR assay for the detection of *Aeromonas salmonicida*. Journal of Fish Diseases, 36, 495–503. (2013)
 20. Xie, G., Huang, J., Zhang, Q., Han, N., Shi, C., Wang, X., Liu, Q., A real-time PCR targeted to the upstream regions of HlyB for specific detection of *Edwardsiella tarda*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 30, 731–737. (2012)
 21. del Cerro, A., Mendoza, M.C., Guijarro, J.A., Usefulness of a TaqMan-based polymerase chain reaction assay for the detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. Journal of Applied Microbiology, 93, 149–156. (2002)
 22. Orieux, N., Bourdineaud, J.P., Douet, D.G., Daniel, P., Le Hénaff, M., Quantification of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), tissues by qPCR. Journal of Fish Diseases, 34, 811–821. (2011)
 23. Marancik, D.P., Wiens, G.D., A real-time polymerase chain reaction assay for identification and quantification of *Flavobacterium psychrophilum* and application to disease resistance studies in selectively bred rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. FEMS Microbiology Letters, 339, 122–129. (2013)
 24. Jung, M.Y., Chang, Y.H., Kim, W., A real-time PCR assay for detection and quantification of *Lactococcus garvieae*. Journal of Applied Microbiology, 108, 1694–1701. (2010)

25. Thanh, H.D., Park, H.K., Kim, W., Shin, H.S., Development of a 16S-23S rRNA intergenic spacer-based quantitative PCR assay for improved detection and enumeration of *Lactococcus garvieae*. FEMS Microbiology Letters, 339, 10–16. (2012)
26. Crisafi, F., Denaro, R., Genovese, M., Cappello, S., Mancuso, M., Genovese, L., Comparison of *16SrDNA* and *toxR* genes as targets for detection of *Vibrio anguillarum* in *Dicentrarchus labrax* kidney and liver. Research in Microbiology, 162, 223–230. (2011)
27. Zerihun, M.A., Hjortaa, M.J., Falk, K., Colquhoun, D.J., Immunohistochemical and Taqman real-time PCR detection of mycobacterial infections in fish. Journal of Fish Diseases, 34, 235–246. (2011)
28. Chase, D.M., Elliott, D.G., Pascho, R.J., Detection and quantification of *Renibacterium salmoninarum* DNA in salmonid tissues by real-time quantitative polymerase chain reaction analysis. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 18, 375–380. (2006)
29. Jansson, E., Lindberg, L., Säker, E., Aspán, A., Diagnosis of bacterial kidney disease by detection of *Renibacterium salmoninarum* by real-time PCR. Journal of Fish Diseases, 31, 755–763. (2008)
30. Fringuelli, E., Savage, P.D., Gordon, A., Baxter, E.J., Rodger, H.D., Graham, D.A., Development of a quantitative real-time PCR for the detection of *Tenacibaculum maritimum* and its application to field samples. Journal of Fish Diseases, 35, 579–590. (2012)
31. 若林久嗣・室賀清邦, 魚介類の感染症・寄生虫症. 恒星社厚生閣, 東京, pp. 211–214. (2004)
32. 窪田三朗・狩谷貞二・中村恵江・吉村桂子, 養殖ハマチ・カンパチにおけるノカルジア症について－II. 魚病研究, 3, 24–33. (1968)
33. 板野公一・川上秀昌, 最近分離された *Nocardia seriolae* の薬剤感受性. 魚病研究, 37, 152–153. (2002)
34. Ismail, T.F., Takeshita, A., Umeda, N., Itami, T., Yoshida, T., The use of chromogenic media for α -glucosidase determination and presumptive drug susceptibility profiles in the fish pathogen *Nocardia seriolae*. Fish Pathology, 46, 62–64. (2011)
35. Ismail, T.F., Takeshita, A., Umeda, N., Itami, T., Yoshida, T., Application of α -glucosidase activity and drug susceptibility tests to epidemiological studies on the fish pathogen *Nocardia seriolae*. Fisheries Science, 77, 113–118. (2011)
36. 今城雅之・志水将人・難波悠介・大嶋俊一郎, 鹿児島県の養殖ブリおよび高知県の養殖カンパチから分離された *Nocardia seriolae* における薬剤感受性の動向. 高知大学学術研究報告, 64, 201–206. (2015)
37. Imajoh, M., Fukumoto, Y., Yamane, J., Sukeda, M., Shimizu, M., Ohnishi, K., Oshima, S., Draft genome sequence of *Nocardia seriolae* strain N-2927 (NBRC 110360), isolated as the causal agent of nocardiosis of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) in Kochi Prefecture, Japan. Genome Announcements, 3(2), e00082–15. (2015)
38. 青木宙, 魚介類の微生物感染症の治療と予防. 恒星社厚生閣, 東京, pp 222. (2013)
39. 池田宏, 切除肺病巣内結核菌の生物学的, 細菌学的性状に関する研究 第2編 切除肺病巣内結核菌と毒力について. 岡山医学会雑誌, 71, 3783–3798. (1959)

平成28年 (2016) 10月12日受理

平成28年 (2016) 12月31日発行