

# 博士學位論文

論文内容の要旨  
及び  
論文審査結果の要旨

平成24年9月授与

宮崎大学大学院  
農学工学総合研究科

学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条の規定に基づき、平成24年9月に博士の学位を授与した論文内容の要旨及び論文審査結果の要旨を公表する。

学位記番号	学位の種類	(ふりがな) 氏名	本籍	専攻 教育コース	授与 年月日	博士論文名	主指導教員
農工総博甲第50号	博士 (学術)	<small>ターメル ファウジイ</small> Tamer Fawzy <small>イブラヒム</small> Ibrahim <small>モハメド</small> Mohammed <small>イスマイル</small> Ismail	エジプト	生物機能応用科学専攻 水域生物科学教育コース	H24. 9. 14	Epidemiological studies on the fish pathogen, <i>Nocardia seriolae</i> in relation to $\alpha$ -glucosidase activity and antimicrobial susceptibility ( $\alpha$ -グルコシダーゼ活性と薬剤感受性に関連した魚病細菌 <i>Nocardia seriolae</i> の疫学的研究)	吉田 照豊

氏 名 Tamer Fawzy Ibrahim Mohammed Ismail

本 籍 エジプト

学位記番号 農工総博甲第50号

学位の種類 博士(学術)

学位授与年月日 平成24年9月14日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

研究科 農学工学総合研究科

専 攻 生物機能応用科学専攻

教育コース 水域生物学教育コース

学位論文題目 Epidemiological studies on the fish pathogen, *Nocardia seriolae*  
in relation to  $\alpha$ -glucosidase activity and antimicrobial susceptibility  
( $\alpha$ -グルコシダーゼ活性と薬剤感受性に関連した魚病細菌  
*Nocardia seriolae* の疫学的研究)

学位論文審査委員	主査	教授	吉田照豊
	副査	教授	伊丹利明
	副査	教授	香川浩彦
	副査	教授	酒井正博
	副査	准教授	鈴木祥広

主指導教官 教授 吉田照豊

## 学位論文の要旨

フリガナ 氏名	タメル ファウジイ イブラヒム モハメド イスマイル Tamer Fawzy Ibrahim Mohammed Ismail 
専攻 入学年度	宮崎大学大学院農学工学総合研究科博士後期課程 生物機能応用科学 専攻 平成 20 年度 ( 10 月 ) 入学
学位論文 題目	Epidemiological studies on the fish pathogen, <i>Nocardia seriolae</i> in relation to $\alpha$ -glucosidase activity and antimicrobial susceptibility ( $\alpha$ -グルコシダーゼ活性と薬剤感受性に関連した魚病細菌 <i>Nocardia seriolae</i> の疫学的研究)
<p>Fish nocardiosis caused by <i>Nocardia seriolae</i> has become a major cause of mortality in farmed yellowtail <i>Seriola quinqueradiata</i> and amberjack <i>S. dumerili</i>, which are the most intensively cultured fish species in Japan. The <math>\alpha</math>-glucosidase (<math>\alpha</math>-glu) activity test is useful to indicate the epidemiological aspects of <i>N. seriolae</i>, because positive <math>\alpha</math>-glu activity was common in the Taiwanese strains, while negative <math>\alpha</math>-glu activity was common in the Japanese strains. Furthermore, genetic diversities were observed between the <math>\alpha</math>-glu-positive and <math>\alpha</math>-negative strains.</p> <p>In the first study, the minimum inhibitory concentrations (MICs) for oxytetracycline hydrochloride (OTC) and erythromycin (Em) were determined along with the <math>\alpha</math>-glu activities in 110 <i>Nocardia seriolae</i> strains isolated in Miyazaki and Kagoshima prefectures in 2008–2009. The strains were examined for the presence of <i>tet(K)</i>, <i>tet(L)</i>, <i>tet(M)</i>, <i>tet(O)</i>, <i>tet(S)</i>, <i>erm(A)</i>, <i>erm(B)</i>, <i>mph(A)</i>, <i>mef(A)</i>, and <i>msr(D)</i> genes. All the <math>\alpha</math>-glu-positive strains (<math>n = 15</math>) were OTC resistant and Em sensitive with MICs of 32–64 and <math>&lt;0.125 \mu\text{g/ml}</math>, respectively. All the <math>\alpha</math>-glu-negative strains (<math>n = 95</math>) were OTC sensitive with an MIC of 2–4 <math>\mu\text{g/ml}</math>, and most of them (93 of 95) were Em resistant with an MIC of <math>&gt;128 \mu\text{g/ml}</math>. The MIC for Em in the remaining 2 <math>\alpha</math>-glu-negative strains was <math>&lt;0.125 \mu\text{g/ml}</math>. The 15 OTC-resistant strains possessed the <i>tet(K)</i> and/or <i>tet(L)</i> gene(s), and all the 93 Em-resistant strains possessed both the <i>mef(A)</i> and <i>msr(D)</i> genes. The relationship between <math>\alpha</math>-glu activity and drug sensitivity of <i>N. seriolae</i> strains may explain the difference in prevalence of each phenotype. Nevertheless, the relationship should be further explored using <i>N. seriolae</i> isolates collected from more prefectures and farms.</p> <p>In the second study, the utility of chromogenic media for determination of <math>\alpha</math>-glu activity and presumptive drug susceptibility profiles in 116 <i>N. seriolae</i> isolates was investigated. In all isolates, the results obtained using chromogenic media were identical to those of the API ZYM test. All the <math>\alpha</math>-glu-positive isolates (<math>n=27</math>) were erythromycin (Em)-sensitive, and more than half of them (<math>n=18</math>) were oxytetracycline (OTC)-resistant. On the other hand, all the <math>\alpha</math>-glu-negative isolates (<math>n=89</math>) were OTC-sensitive, and most of them (<math>n=81</math>) were Em-resistant. These results support the relationship between the <math>\alpha</math>-glu activity and drug susceptibility profiles in <i>N. seriolae</i>. Therefore, chromogenic media could be used as simple and reproducible one-step tests to determine the <math>\alpha</math>-glu activity for presumptive drug susceptibility profiles in <i>N. seriolae</i>.</p> <p>In the third study, Biased sinusoidal field gel electrophoresis (BSFGE), DNA-DNA hybridization, and sequence analysis of <i>secA1</i> and <i>gyrB</i> genes were performed to investigate the possible transmission of the <math>\alpha</math>-glucosidase (<math>\alpha</math>-glu)-positive phenotype of <i>N. seriolae</i> between amberjack and yellowtail, and to conduct a study for a possible genetic differences at the species level in <i>N. seriolae</i> isolates with phenotypically different <math>\alpha</math>-glu and drug susceptibility profiles. The BSFGE profiles of the <math>\alpha</math>-glu-positive and <math>\alpha</math>-glu-negative isolates</p>	

were epidemiologically unrelated. The restriction patterns of  $\alpha$ -glu-positive isolates from yellowtail and amberjack were identical, and these strains belonged to the same epidemiological cluster. DNA relatedness values of the  $\alpha$ -glu-positive and -negative phenotypes to that of *N. seriolae* ATCC43993 were greater than or equal to 77.6% and 78.8%, respectively. The sequences of *secA1* and *gyrB* genes in the two *N. seriolae*  $\alpha$ -glu phenotypes were identical to reference *N. seriolae* strains. In this study, we have supported the possible transmission of the two  $\alpha$ -glu phenotypes of the *N. seriolae* between amberjack and yellowtail. In addition, we have also confirmed that the intra-species differences in BSFGE and drug susceptibility profiles between the two  $\alpha$ -glu phenotypes do not affect the extent of DNA relatedness and the similarity in *secA1* and *gyrB* gene sequences among *N. seriolae* isolates.

In the last study, resazurin microtiter assay (REMA) was carried out using four sulfonamides, three culture media, and four inoculum sizes as a first screening step to establish an easy-to-interpret sulfonamides susceptibility testing method for *N. seriolae*. The *in vitro* activity of sulfamonomethoxine (SMM) against 190 clinical *N. seriolae* isolates was then examined, and *in vivo* experimental treatment was performed. When the culture medium and the inoculum size were considered in tandem, a 0.5 $\times$  the original concentration of cation-adjusted Mueller-Hinton broth and an inoculum size of 10<sup>2</sup> CFU/well showed the clearest endpoint reading for all tested drugs, and the REMA generated data was in excellent agreement with those generated by the reference Etest method. SMM activity showed minimum inhibitory concentration (MIC) values of 4–32  $\mu$ g/ml against all tested *N. seriolae* isolates. Treatment of fish groups, experimentally infected with *N. seriolae* isolates having SMM MICs of 4 and 32  $\mu$ g/ml, resulted in survival rates of 100% and 87.5% in the two groups, respectively. In this study, we developed a simple visual method to test SMM activity against *N. seriolae*. We found that an MIC of 32  $\mu$ g/ml can be considered the preliminary breakpoint in monitoring the sensitivity of *N. seriolae* in fish farms.

- (注1) 論文博士の場合は、「専攻、入学年度」の欄には審査を受ける専攻を記入すること。
- (注2) フォントは和文の場合、10.5ポイントの明朝系、英文の場合12ポイントのtimes系とする。
- (注3) 学位論文題目が外国語の場合は日本語を併記すること。
- (注4) 和文又は英文とする。

平成24年7月31日

## 論文審査結果の要旨

専攻 入学年度	生物機能応用科学 平成20年度(10月)入学	専攻 氏名	Tamer Fawzy Ibrahim Mohammed Ismail
論文題目	Epidemiological studies on the fish pathogen, <i>Nocardia seriolae</i> in relation to $\alpha$ -glucosidase activity and antimicrobial susceptibility ( $\alpha$ -グルコシダーゼ活性と薬剤感受性に関連した魚病細菌 <i>Nocardia seriolae</i> の疫学的研究)		
審査委員 職名及び氏名	主査	教授 吉田 照豊	
	副査	教授 伊丹 利明	
	副査	教授 香川 浩彦	
	副査	教授 酒井 正博	
	副査	准教授 鈴木 祥広	
審査結果の要旨(800字以内)			
<p><i>Nocardia seriolae</i>は、ブリ属魚類養殖産業において最大の被害のあるノカルジア症の原因細菌である。この疾病の治療および予防法の確立には、薬剤感受性や疫学的知見を蓄積することは非常に重要である。本論文では、病魚から分離された本細菌の疫学研究を、<math>\alpha</math>-グルコシダーゼ活性(<math>\alpha</math>-glu)と薬剤感受性を中心に研究した。病魚から分離された細菌は、<math>\alpha</math>-glu活性を有する株と活性のない株に大別され、活性の異なる細菌群は遺伝的にそれぞれ異なる集団であることを示した。また、養殖場において使用されるエリスロマイシン(EM)およびオキシテトラサイクリン(OTC)に、既に耐性菌が存在し、<math>\alpha</math>-glu活性の違いにより薬剤耐性プロファイルが異なることを示し、EM耐性は<i>mefA</i>および<i>msrD</i>遺伝子にコードされ、OTC耐性は<i>tetK</i>および<i>tetL</i>にコードされていることを明らかにした。また、<math>\alpha</math>-glu活性の有無を評価できる発色酵素基質培地を作成し、養殖現場で<math>\alpha</math>-glu活性を評価できることを示した。現在、主に治療薬としてサルファ剤(SA)が用いられているが、これまでの評価法では最少発育阻止濃度が高い値を示し、耐性菌の存在を示唆する結果となっていた。しかし、養殖現場では治療効果が認められており混乱を招いていた。本論文では、SAの薬剤感受性を評価するため、再現性のある測定条件を明らかにし、測定法を標準化した。その結果、分離菌には耐性菌は存在せず治療効果があることを示した。</p> <p>以上の結果は、国際誌に発表されており、科学的知見のみならず養殖現場にも還元できる成果である。</p> <p>本審査委員は、以上の論文内容ならびに平成24年7月31日に開催された公聴会での発表内容および質疑に対する応答を総合的に判断し、本論文が博士(学術)として適格であり、最終試験に合格したものと判定した。</p>			

(注) 論文題目が外国語の場合は日本語を併記すること。