

高知県野見湾の養殖カンパチで新たに発生する連鎖球菌症に関する研究

今城雅之¹・池田拓司²・加藤佑亮³・服部汐音²・中山勝道⁴・西山慶⁵・久保栄作⁶・森光一幸⁶

(¹高知大学教育研究部自然科学系農学部門・²高知大学農林海洋科学部海洋資源学科海洋生物生産学コース・

³高知大学大学院総合人間自然科学研究科・⁴高知県漁業協同組合・⁵野見漁業協同組合・⁶大谷漁業協同組合)

A Study of Lactococcosis Newly Occurring in Cultured Greater Amberjack (*Seriola dumerili*) in Nomi Bay, Kochi Prefecture

Masayuki Imajoh¹, Takuji Ikeda², Yusuke Kato², Shion Hattori³, Katsumichi Nakayama⁴, Kei Nishiyama⁵, Eisaku Kubo⁶ and Kazuyuki Morimitu⁶

¹ Agriculture Unit, Natural Sciences Cluster, Research and Education Faculty, Kochi University; ² Aquaculture Course, Department of Marine Resource Science, Faculty of Agriculture and Marine Science, Kochi University; ³ Graduate School of Integrated Arts and Science, Kochi University; ⁴ Kochi-Ken Fisheries Cooperative Association; ⁵ Nomi Fisheries Cooperative Association; ⁶ Otani Fisheries Cooperative Association.

Abstract: *Lactococcus garvieae* is the etiological agent of lactococcosis which is a well-known disease in fish farms in western Japan. Nomi Bay is an enclosed bay located in the south of Shikoku Island, Japan. Extensive mariculture of greater amberjack (*Seriola dumerili*) is carried out in the bay. In this study, we isolated 42 *L. garvieae* isolates from diseased greater amberjack (*Seriola dumerili*) with typical symptoms of lactococcosis in the bay for PCR serotyping assay and antimicrobial susceptibility test, and collected seawater samples at three stations at depths of 1 m and 10 m within the greater amberjack farm area for real-time PCR assay.

キーワード：高知県，野見湾，カンパチ，連鎖球菌症，ラクトコッカス・ガルビエ，血清型，薬剤感受性試験

Keyword: Kochi Prefecture, Nomi Bay, Greater amberjack, Lactococcosis, *Lactococcus garvieae*, Serotype, Antimicrobial susceptibility test.

はじめに

本邦の基幹産業として確立されている海面養殖業は、幾度となく各種感染症の問題に直面してきており、その中で生産量の多いブリ (*Seriola quinqueradiata*), マダイ (*Pagrus major*), ギンザケ (*Oncorhynchus kisutch*), ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) の細菌性疾病による被害が甚大である (高橋ほか, 2011). その代表例が4種類の原因菌により引き起こされる連鎖球菌症で、通性嫌気性のグラム陽性球菌ラクトコッカス・ガルビエを原因とするブリ属魚類の α 溶血性連鎖球菌症 (以下、連鎖球菌症) は、1974年に高知県土佐清水市の養殖ブリで発生したことに始まる (楠田ほか, 1976). 本疾病は1970~1990年代に甚大な被害をもたらしたが、その後、ワクチンの普及で効果的に予防可能な疾病となった (高橋ほか, 2011). しかし、近年、ワクチン株と抗原性の異なる変異株の出現により、西日本各地のブリ属魚類養殖場で連鎖球菌症の被害が拡大して、再び深刻な事態となっている (Shi *et al.*, 2019). この抗原性の違いは、本疾病の診断に汎用される抗血清凝集試験で容易に確認することができ、2012年の大分県と2013年の愛媛県の養殖ブリから凝集反応を示さないラクトコッカス・ガルビエが初めて分離され (Oinaka *et al.*, 2015), 以降、新しい変異株をII型、従来株をI型と血清型呼称が区分されている (福田ほか, 2015).

高知県須崎市野見湾は海域面積約4 km², 平均水深18 mの閉鎖的内湾で、湾全体が海面養殖場として高密度に利用され (山本ほか, 2007), カンパチ (*Seriola dumerili*) とマダイの養殖生産が主力である. カンパチは養殖発祥地の知名度を活かして、ブランド化や海外輸出など新しい取り組みが展開され、この先、安定的かつ良質な生産体制の維持・拡大を図るためには、感染症対策を周知徹底することが重要となる. これまで野見湾では、連鎖球菌症の予防を目的に、多くの養殖業者が毎年中国から輸入されるカンパチ種苗にワクチン接種を行っている. しかし、本疾病の被害が再び深刻化するようになり、他県で問題となっているII型出現が強く懸念される. また、そうした連鎖球菌症に対して投薬治療も積極的に行われるため、薬剤耐性菌の出現の有無と耐性程度を早急に検討する必要もある. そこで本研究では、野見湾カンパチの連鎖球菌症による被害顕在化の原因解明とその対策に資する知見を得る目的から、現在流行中のラクトコッカス・ガルビエの血清型とそれらの薬剤感受性、および過去4年のカンパチ漁場での本菌分布を明らかにしたので、ここに報告する.

材料と方法

供試魚

2019年7~12月に野見湾の養殖業者から連鎖球菌症に罹患したカンパチ21尾を直接入手した. 各検体の分離日、魚体重、全長についてTable 1に示した.

菌分離と凍結保存菌株の調製

検体21尾の外部症状の観察・記録、魚体重と全長の測定後、腎臓、脳、および病変患部をディスプレイブルーで突き、1.5%NaCl添加ブレインハートインヒュージョン (BHI, バクトンディッキンソン社製) 寒天培地に画線塗布した. 25°Cで一晩培養後、1.5%NaCl添加BHI液体培地20 mLに1コロニーを接種し、さらに25°Cで一晩振とう培養した. 同培養菌液800 μ Lに80%グリセルロール溶液200 μ Lを加えて混合し、各実験に供するまで-80°Cで保

Table 1. ラクトコッカス・ガルビエの供試菌株リスト. 番号1~14は対照菌14株, 番号15~56は被検菌42株.

番号	分離日	場所	魚種	魚体重 (kg)	全長 (cm)	分離部位
対照菌株						
鹿児島県						
1	2011/9/21	薄井竹島	ブリ	0.54	未測定	脳
2	2011/10/4	幣串前島	ブリ	3.5	未測定	脳
3	2011/10/10	薄井竹島	ブリ	2.6	未測定	脳
4	2013/4/25	本浦	ブリ	3.28	未測定	脳
5	2013/6/12	福ノ浦	ブリ	2.97	未測定	脳
高知県						
6	2016/10/25	野見湾	カンパチ	0.72	38.3	腎臓
7・8	2019/12/4	手結沖	ブリ	4.58	69.7	脳・腎臓
9・10	同上	同上	同上	4.58	72.2	脳・腎臓
11・12	同上	同上	同上	4.17	71.8	脳・腎臓
13・14	同上	同上	同上	4.48	74.5	脳・腎臓
被検菌株						
高知県						
15	2019/7/11	野見湾	カンパチ	2.02	53.5	腎臓
16	同上	同上	同上	2.45	56.4	腎臓
17・18・19	2019/8/30	野見湾	カンパチ	2.81	61.5	脳・腎臓・尾柄部潰瘍
20・21・22	2019/10/16	野見湾	カンパチ	2.81	62.4	脳・腎臓・尾髄発赤
23・24・25	同上	同上	同上	2.98	63.5	脳・腎臓・尾髄発赤
26・27	2019/10/22	野見湾	カンパチ	0.76	38.7	脳・腎臓
28・29	同上	同上	同上	0.62	38.0	脳・腎臓
30	2019/10/25	野見湾	カンパチ	0.57	36.8	尾柄部潰瘍
31・32	同上	同上	同上	0.63	38.7	脳・尾柄部潰瘍
33・34・35	同上	同上	同上	0.47	36.2	脳・腎臓・尾柄部潰瘍
36・37	2019/11/6	野見湾	カンパチ	2.86	65.2	脳・腎臓
38・39	同上	同上	同上	2.11	61.8	脳・腎臓
40・41	2019/11/10	野見湾	カンパチ	2.93	66.5	脳・腎臓
42・43	同上	同上	同上	2.56	62.3	脳・腎臓
44・45	2019/11/13	野見湾	カンパチ	3.02	63.8	脳・腎臓
46・47	2019/11/16	野見湾	カンパチ	3.38	66.6	脳・腎臓
48・49	2019/11/17	野見湾	カンパチ	3.29	67.7	脳・腎臓
50・51	同上	同上	同上	2.15	60.8	脳・腎臓
52・53	2019/12/2	野見湾	カンパチ	2.06	58.2	脳・腎臓
54・55	同上	同上	同上	1.56	56.8	脳
56	同上	同上	同上	1.56	56.8	脳

存した。検体21尾のうち、18尾の脳と腎臓、4尾の尾柄部潰瘍患部、および2尾の尾鰭発赤患部から菌分離され、それら42株(番号15~56)を被検菌、鹿児島県ブリ由来と高知県ブリ・カンパチ由来14株(番号1~14)を対照菌とした(Table 1)。

菌体からのDNA抽出

凍結保存菌株を1.5%NaCl添加BHI液体培地20 mLで25°C一晩振とう培養し、室温、20,400 × g、1分間の遠心分離により、同菌液から1.5 mLエッペンチューブに菌体ペレットを集めた。同ペレットにSTEバッファー 300 μL (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA ; pH 8.0) と鶏卵白由来リゾチーム10 μL (100 mg/mL, シグマアルドリッチジャパン社製)を加えて、37°Cで30分間消化し、リコンビナントプロテイナーゼK溶液3 μL (活性>600 U/mL, ナカライテスク社製)を加えて、さらに56°Cで1時間消化した。次に、定法に従ってフェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行い、DNAペレットを100 μLのTEバッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA ; pH 8.0) に懸濁した。得られたDNA溶液のDNA純度と収量をQ5000微量紫外可視分光光度計 (トミー精工社製) で確認した。

海水の採水とDNA抽出

カンパチ漁場内にSt.1, St.2, およびSt.3を設けた (Fig. 1)。採水は8~11月とし、各月毎に8~11回の頻度で実施した。採水時間は午前4~5時の間とし、各地点の水深1 mと10 mから船上で北原式B号採水器により海水1 Lを採水して、直ちに研究室に持ち帰った。海水試料1 Lを孔径0.2 μmのセルロース混合エステルタイプメンブレンフィルター (アドバンテック社製) でろ過濃縮して、フィルター上の集積物からDNeasy Plant Miniキット (キアゲン社製) によりマニュアルに従ってDNA抽出を行った。得られたDNA溶液のDNA純度と収量をQ5000微量紫外可視分光光度計で確認した。

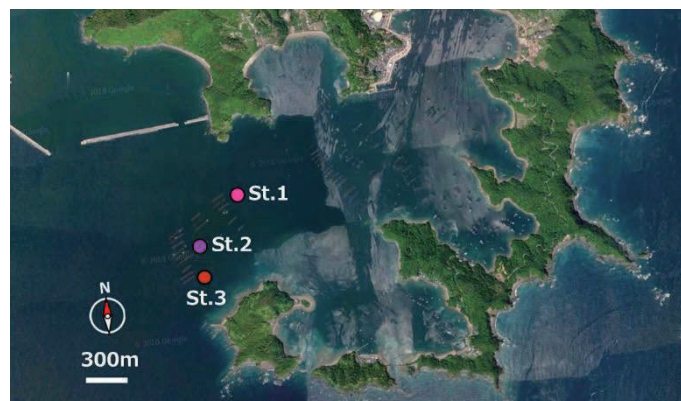


Fig. 1. 野見湾の全体地図。カンパチ漁場の採水3地点を地図上に示した。

薬剤感受性試験

古下ほか (2015) で報告された臨床・検査標準委員会 (CLSI) 提唱の標準試験法を基本にして、寒天平板希釈法による最小発育阻止濃度測定法を行った。凍結保存菌株を1.5%NaCl添加BHI液体培地20 mLで25°C一晩振とう培養し、同培養菌液をトリプトソイ (TSB, バクtonディッキンソン社製) 寒天培地に画線塗布して、さらに25°C一晩培養した。次に、寒天上のコロニーをMcFarland標準液No.5相当にまで滅菌生理食塩水に懸濁して、同懸濁液2 μLをピペットマンでMIC測定用寒天培地上にのせた。このMIC測定用培地はミューラーヒントン (MH, バクtonディッキンソン社製) 寒天培地に各種薬剤を混合したもので、エリスロマイシン (EM), リンコマイシン (LCM), オキシテトラサイクリン (OTC), フロルフェニコール (FF), アンピシリン (ABPC), およびスルファモノメトキシシン (SMMX) の6薬剤を用いた。判定は

25°Cで48時間の培養後に行った。

PCR法

PCRは、Ohbayashi *et al.* (2017) に従って *glxR-argS* 遺伝子間を標的にを行い、用いた各プライマーの塩基配列は次のとおりである。

LGD-Fフォワードプライマー：5'-GGATTGAACTTCCTGCCACA-3'

LGD-Rリバープライマー：5'-ATCCTTGAGGACAACGAAGG-3'

PCR反応はT100サーマルサイクラー (バイオラッド社製) で行った。反応条件は、まず、94°Cで30秒の初期熱変性、次に、94°Cで30秒、55°Cで30秒、および68°Cで90秒の30サイクルの繰り返し、最後に、68°Cで5分の付加伸長とした。PCR反応液の組成はOneTaq HS DNA ポリメラーゼ0.125 μ L (5 units/ μ L, ニューイングランドバイオラボ社製)、5 \times OneTaqバッファー5 μ L、10 mM dNTPsミクスチャー0.5 μ L、および0.5 μ M各プライマー溶液0.1 μ Lを含む反応系に、菌体抽出ゲノムDNA溶液0.1 μ Lを加え、滅菌水で全量を25 μ Lとした。得られたPCR増幅産物6 μ Lを1.5%アガロースゲルにロードして、電気泳動後、アガロースゲルはエチレンブロマイド溶液 (0.625 mg/mL, アムレスコ社製) で15分間染色し、254 nm波長の紫外線照射下でPCR増幅産物のサイズ、すなわち、285 bpでI型、1,285 bpでII型と判別した。

リアルタイムPCR法

リアルタイムPCRは、16S *rRNA* 遺伝子を標的にしたJung *et al.* (2010) によるSYBR Green法を改変して行った。用いた各プライマーは次のとおりである。

ITSLg30Fフォワードプライマー：5'-ACTTTATTCAGTTTTGAGGGGTCT-3'

ITSLg319Rリバープライマー：5'-TTTAAAAGAATTCGCAGCTTACA-3'

PCR反応はQuantStudio5リアルタイムPCRシステム (アプライドバイオシステムズ社製) で行った。PCR反応液の組成は、2 \times KAPA SYBR Fastマスターミックス (カパバイオシステムズ社製) 10 μ L、10 μ M各プライマー溶液0.4 μ L、および50 \times Low ROX溶液0.4 μ Lを含む反応系に、海水試料由来DNA溶液0.2 μ Lまたは10倍階段希釈した下記で述べるコントロールプラスミドDNA溶液1 μ L ($7.7 \times 10^4 \sim 7.7 \times 10^9$ コピー/ μ L) を加え、滅菌水で全量を20 μ Lとした。尚、この海水試料由来DNA溶液について、冷凍保存していた2016~2018年の海水試料由来DNA溶液 (今城ほか, 2016; 門野ほか, 2017; 池田ほか, 2019) も供した。反応条件は、95°Cで3分の初期熱変性後、95°Cで3秒の熱変性、60°Cで20秒のアニーリング、72°Cで1秒の伸長のサイクルを45回繰り返した。その後、QuantStudio Design and Analysisソフトウェア v1.4.3 (アプライドバイオシステムズ社製) により次の解析を行った。まず、各階段希釈のコントロールプラスミドDNA溶液で得られたCt値から検量線を作成した (data not shown)。次に、各海水試料由来DNA溶液で得られたCt値から同検量線を用いて、標的遺伝子のコピー数に換算した。

コントロールプラスミドの作製

上記のリアルタイムPCRプライマーで得たPCR増幅産物をTarget Cloneキット (東洋紡ライフサイエンス社製) によりpTA2ベクターにクローニングし、ECOSコンピテント*E.coli* JM109株 (ニッポンジーン社製) を形質転換させた。ABPC混合 (終濃度50 μ g/mL) ルリアブロス (LB, ベクトンディッキンソン社製) 寒天培地で37°C一晩培養した。次に1コロニー

を釣菌して、同終濃度ABPC混合LB液体培地100 mLに接種して、37°Cで一晩振とう培養した。その後、50 mL遠沈管に移して、4°C、5,800 × g、3分間の遠心分離により菌体ペレットを得て、Plasmid Maxiキット（キアゲン社製）を用いてマニュアルに従い、組換えプラスミドDNAを精製した。得られた組換えプラスミドDNA溶液の純度と濃度をQ5000微量紫外線分光光度計で測定し、その濃度と分子量からアボガドロ定数によりコピー数を算出して、TEバッファーで 7.7×10^9 コピー/ μ Lに希釈調整したものをコントロールプラスミドDNA原液とした。

結果と考察

ラクトコッカス・ガルビエによる連鎖球菌症の被害は、2001年に承認された注射ワクチンの普及により激減した経緯があり（福田ほか、2015）、この流れは野見湾も例外になく、多くの業者が連鎖球菌症を含んだ多価ワクチンを使用している。被害が見られた場合には積極的に投薬も行われ、EM、OTC、FFの3薬剤が主流である。本研究では、現場の声からワクチン効果の薄いII型の出現が危惧されたため、ラクトコッカス・ガルビエの血清型を明らかにした。まず、野見湾の連鎖球菌症罹患カンパチの外観症状をFig. 2に示した。検体21尾に共通して尾鰭の発赤が見られ、尾柄部に潰瘍が認められた検体もかなり多く、一方で、眼球突出と心外膜炎を呈した検体は少なかった。また、それらの外観症状は既知の特徴と一致するものであった（吉田、2016）。次に、PCR法による血清型判別の結果をFig. 3に示した。2011年と2013年鹿児島県ブリ由来5株（番号1～5）と2016年野見湾カンパチ由来1株（番号6）はI型、本研究で分離した2019年野見湾カンパチ由来42株（番号15～56）と手結沖ブリ由来8株（番号7～14）はII型とそれぞれ判別された。このことから、検査株数が1株と少なく断定は難しいが、2016年の連鎖球菌症発生はII型でなくI型によったものとされ、その後、ラクトコッカス・ガルビエの流行に変遷があり、2019年は間違いなくII型が台頭していたことが明らかになった。また野見湾以外で手結沖の養殖ブリからもII型が分離され、高知県で既に蔓延状態の可能性がある。

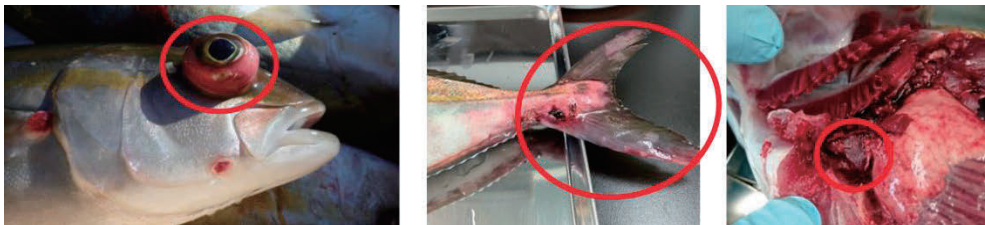


Fig. 2. 野見湾の連鎖球菌症罹患カンパチの外観症状の写真。眼球突出（左）、尾柄部と尾鰭の発赤・潰瘍（中央）、心外膜炎（右）。

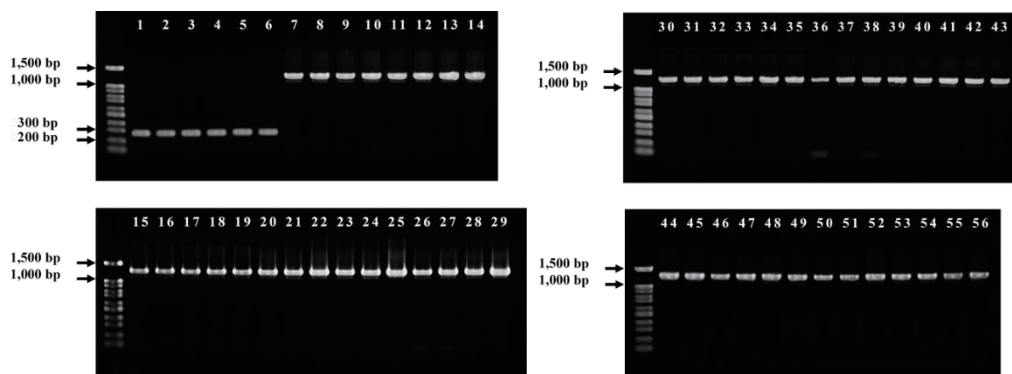


Fig. 3. LGD-FプライマーとLGD-Rプライマーを用いたPCRによる血清型判別の結果。I型では285 bp、II型では1,285 bpのPCR増幅産物が得られる。番号はTable 1の番号に対応。

2019年野見湾カンパチ由来42株の6薬剤に対する薬剤感受性試験の結果をTable 3に示した. 4薬剤のMIC値について, EMで42株全てが0.125 µg/mL以下, OTCで37株が0.25 µg/mL, 3株が0.5 µg/mL, 2株が1 µg/mL, FFで23株が2 µg/mL, 19株が4 µg/mL, ABPCで2株が0.25 µg/mL, 39株が0.5 µg/mL, 1株が1 µg/mLとなり, いずれも感受性株と判断された. 一方で, 2薬剤では違った傾向が認められ, すなわち, LCMで42株が4~64 µg/mLと広範囲に分布し, SMMXで42株全てが512 µg/mL以上となり, このSMMXの結果はKawanishi *et al.* (2005) と古下ほか (2015) と同じであった. よって, 連鎖球菌症の承認4薬剤の中で, LCMが最も高値のMIC値を示した薬剤となり, 野見湾のカンパチで投薬治療の中心となっているEMは最も低値を示し, またOTCとFFも低値であったことから, 3薬剤は引き続き高い効果が期待できると言える. Kawanishi *et al.* (2005) は, 2002年6~11月の西日本9県のブリ属魚類由来分離株170株のうち75株がEM, LCM, およびOTC耐性株であったことを報告し, 全て *ermB* 遺伝子と *tet(S)* 遺伝子を保有していたことから, これらの耐性菌が15年間にわたり本邦の広域に分布していたとする仮説を提唱している. その後, 古下ほか (2015) は, 2004~2009年の西日本6県のブリ属魚類由来分離株221株について, EM, LCM, およびOTCを含む全3薬剤の感受性株は2004年の4.0%から2009年の23.1%まで回復している一方で, LCM耐性株は72.0~85.1%と減少傾向になかったことを受け, ワクチン普及による投薬機会の減少で薬剤感受性化にある中, LCM単剤耐性を生み出す新たな薬剤耐性遺伝子獲得メカニズムの存在を示唆している. 別の可能性として, もしかするとLCM耐性はそもそもII型特有の特徴であり, LCMはII型の治療に不向きな薬剤かもしれない. 実際に, 2012~2017年の西日本8県のブリ属魚類とシマアジから分離された161株のII型について, ABPC, EM, FF, LCM, clindamycin (CM, LCMの交差耐性の確認薬剤), およびOTCを含む6薬剤のうち, 62株がCMとLCM耐性であったとする興味深い報告がなされている (Shi *et al.*, 2019). また, その中で既知16種類のLCM耐性関連遺伝子は全て検出されず, LCM耐性メカニズムを明らかにできなかったとして, さらなる研究の進展が待たれるところである.

Table 3. 寒天平板希釈法による野見湾カンパチ由来42株に対する5薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC).

Antibiotics	MIC (µg/mL)													MIC ₅₀ [*] (µg/mL)	MIC ₉₀ ^{**} (µg/mL)	No. resistant of isolates (%)		
	<0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512				>512	
EM	42															<0.125	<0.125	0
OTC		37	3	2												0.25	0.5	0
FF					23	19										2	4	0
LCM						1	2	5	22	12						32	64	0
ABPC		2	39	1												0.5	0.5	0
SMMX													42			>512	>512	0

*50%の菌株の発育を阻止したMIC

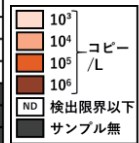
**90%の菌株の発育を阻止したMIC

カンパチ漁場3地点におけるリアルタイムPCRによる海水1 Lあたりのラクトコッカス・ガルビエ *16S rRNA* 遺伝子の検出・定量の結果をTable 4に示した. 2016年と2017年は 10^3 ~ 10^5 オーダーのレンジで検出され, 明瞭な地点間差の傾向が見られず, 最も高い 10^5 オーダーでの検出頻度は8~11月に高かった. 加えて2018年と2019年は 10^6 オーダーの検出も見られ, 2018年について, 9月にSt.2で2回, 12月にSt.3で1回, 2019年について, 8月にSt.1で1回, 9月にSt.1とSt.3で1回ずつの計2回, 10月にSt.1とSt.2で1回ずつとSt.3で4回の計6回, 11月にSt.1で4回とSt.3で2回の計6回となった. このリアルタイムPCRで把握した海水中のラクトコッカス・ガルビエの血清型の区別はできないため, I・II型のいずれか, あるいは混在して検出されたものか不明であるが, *16S rRNA* 遺伝子の推移レンジが 10^6 オーダーまで上がったのは, I型とII型の流行規模の違いを反映したものと仮説を立てることができる. これを支持する2つの理由が次に挙げられる. 1つ目は, 2016年は1株のみしか調べることができなかったが, PCRの結果で当時の連鎖球菌症はまだI型を原因としたと考えられること, 2つ目は, 統計的データはないものの, 2018年以降, 以前よりも被害が目立つようになったという現場での聞き取り調査である.

PCRから分離菌は全てII型であったため、一見すると本タイプのみが流行している印象を受けるが、本研究の検査検体数だけではまだ十分になく、今後増やすことでI型も分離される可能性はまだある。尚、2020年7月時点で94株を調べたが、全てII型と判別され、引き続き調査中である（data not shown）。連鎖球菌症は通年見られるため、早急にI型とII型の流行状況の詳細を検討しなければならない。

Table 4. 野見湾カンパチ漁場の3地点2水深の海水からリアルタイムPCRによるラクトコッカス・ガルビエ*16S rRNA*遺伝子の検出・定量。

		4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
2016	St.1 1m	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	St.1 10m	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	St.2 1m	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	St.2 10m	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	St.3 10m	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2017	St.1 1m	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	St.1 10m	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	St.2 1m	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	St.2 10m	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	St.3 10m	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2018	St.1 1m	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	St.1 10m	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	St.2 1m	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	St.2 10m	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	St.3 10m	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2019	St.1 1m	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	St.1 10m	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	St.2 1m	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	St.2 10m	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	St.3 10m	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND



これまでにラクトコッカス・ガルビエ感染ブリから大量排菌される現象が見つかったことから（松岡，1992），海水中の菌は養殖生け簀内の感染カンパチから排菌されたものと想定され，海水中の菌数と生け簀内の罹病魚数は比例関係にあると考える。4年間の調査期間を通して 10^6 オーダーでの検出頻度が特に高かった2019年10月と11月に，現場では白点病が流行しており，対策として行われた餌止めで投薬の困難な状況から，実際に連鎖球菌症とノカルジア症による被害も目立っていた。また，ラクトコッカス・ガルビエの水平感染は高酸素環境下に比べて低酸素環境下で起こりやすいとの報告がある（福田ほか，1997）。野見湾では，夏には内部潮汐による外海水が底層に流入することから，湾口部から湾奥部の底層では貧酸素水塊の発生はほとんど見られないのに対し，秋には湾内水の停滞する現象として知られる通称「秋の水止まり」が起こり，湾内底層で貧酸素化が生じるようになる（山本ほか，2007）。もしかすると，この秋の貧酸素化がラクトコッカス・ガルビエ感染拡大助長の要因になっているのかもしれない。

本研究のリアルタイムPCRの結果から，カンパチ漁場内にラクトコッカス・ガルビエが常在していることが分かり，本菌は栄養分の多いブリ養殖場の小割付近の表層水において， 15°C と 25°C で42日間， 37°C で14日間生存できることや（楠田と川合，1982），低水温でも適当な栄養分を含む養殖場内の底泥で生存できることから（楠田と川合，1982），カンパチは恒常的に水平感染を受けるリスク下にあると推察される。本菌は腸内細菌の一種で，病原株と非病原株の比較ゲノム解析から莢膜が病原性に関与すると示唆され，ヘモリジン等の候補病原因子も報告されている（Morita *et al.*, 2011）。三重県の養殖ブリにおいて，連鎖球菌症の発症・流行には一定の法則があり，餌過剰投与による過度の肥満，単一餌料の長期間投与，過密養殖が原因に挙げられている（柴原，1982）。ラクトコッカス・ガルビエは条件性病原菌のため，上記に述べた菌の病原遺伝子発現や魚の体調不良が発病に大きく影響することは間違いないが，次に述べる点が特に興味深い。本菌の起病力は比較的弱く，餌料中や環境中の菌が解凍処理過程を通じて餌料魚上で増菌することによる経口感染の可能性が

最も高く (谷口, 1982a), 発病に必要な菌数は, 魚肉汁に混じてゾンデを用いた場合は300~500 gのブリ1尾あたり10万個, 餌料魚の皮下に注射して投与した場合は10億個以上とされる (谷口, 1982b). この考えを強く支持する報告もあり, 絶食により胃のpHを変化させることで完治したり, 病気の進行が止まる現象が見出されている (柴原, 1982). また本菌は腸管に対する親和力が強くて増殖率が大きく, そこでの除菌作用が弱いことから保菌部位とされ, 夏季に猛威をふるうのは, 高水温による摂餌量の増加で, 腸管内における本菌の増殖が促進されるためとしている (楠田と川合, 1982). 松岡 (1992) は, 死亡ブリから死亡267時間後でも10分間で 10^9 オーダーCFU/尾という大量の菌が排出されていた現象を報告し, 浮上した死亡ブリを健常ブリが摂餌したり, 接触したりすることで感染拡大につながると指摘した. また, 谷口 (1982b) は, 飼料魚の外側に菌を付着させて摂餌させただけでは発病させることが困難で, 飼料魚の皮下に菌を注入して摂餌させることで, 現場で見られる病魚と同様の症状を呈して発病することを明らかにしている. 本研究から海水中の菌数は正確に分からないが, おそらく野見湾のカンパチは海水を介してそれ程大量でない菌の経口感染の危険に常時さらされている. しかし, 楠田と川合 (1982) が見出したように, それら少数菌だと発病まで至らずに体内消失している可能性があり, やはり発病リスクを高めるのは現場で使用されている生餌や, 同じ生簀内の罹病魚や死亡魚から短期で受ける大量菌の経口感染であり, そのリスクはあくまで限定的に留まると示唆された. 加えて, 連鎖球菌症流行後のブリ血清中にはラクトコッカス・ガルビエに対する血中抗体価の上昇が認められ, 実験的な再感染が成立しにくいことも (飯田ほか, 1982), 被害が容易には拡大しない要因との特筆すべき点も考慮しなければならない.

最後に, 野見湾ではII型のラクトコッカス・ガルビエが定着したものと考えられ, 今後I型の時よりも高い頻度での投薬機会が見込まれる. そのため, 行政指導の元で耐性菌出現リスクを回避する薬剤の適正使用を心がけねばならない.

参考文献

- 高橋幸則・福田耕平・近藤昌和・安本信哉・廣野育生・青木宙 (2011) 日本における海水魚の細菌性疾病とワクチン開発の現状. 水産大学校研究報告, 60, 51-56.
- 楠田理一・川合研児・豊嶋利雄・小松功 (1976) 養殖ハマチから分離された *Streptococcus* 属の新魚病細菌について. 日本水産学会誌, 42, 1345-1355.
- Shi, Y.-Z., I. Nishiki, S. Yanagi and T. Yoshida (2019) Epidemiological study on newly emerging *Lactococcus garvieae* serotype II isolated from marine fish species in Japan. *Fish Pathol.*, 54, 51-57.
- Oinaka, D., N. Yoshimurzu, Y. Fukuda, A. Yamashita, S. Urasaki, Y. Wada and T. Yoshida (2015) Isolation of *Lactococcus garvieae* showing no agglutination with anti-KG⁻ phenotype rabbit serum. *Fish Pathol.*, 50, 37-43.
- 福田穰・津江佑哉・追中大作・和田善信・山下亜純・浦崎慎太郎・吉岡宗祐・木本圭輔・吉田照 (2015) 抗KG型血清非凝集性 *Lactococcus garvieae* のブリ類に対する病原性と免疫原性. 50, 200-206.
- 山本潤・田中仁・佐伯信哉 (2007) 野見湾の内部潮汐による海水交換と水止まりによる貧酸素水塊発生に関する研究. 土木学会論文集 B, 63, 39-50.
- 古下学・福田翼・福田穰・山下亜純・柳宗悦・今岡慶明・田中真二・杉原志貴・安部昌明・長野泰三・青野怜史・宮澤英将・芝恒男 (2015) 2004~2009年にブリ類から分離された α 溶血性レンサ球菌症原因菌 *Lactococcus garvieae* の薬剤感受性. 水産増殖, 63, 59-64.
- Ohbayashi, K., D. Oinaka, T. D. Hoai, T. Yoshida and I. Nishiki (2017) PCR-mediated identification of the newly emerging pathogen *Lactococcus garvieae* serotype II from *Seriola quinqueradiata* and *S. dumerili*. *Fish Pathol.*, 52, 46-49.
- Jung, M. Y., Y. H. Chang and W. Kim (2010) A real-time PCR assay for detection and quantification of *Lactococcus garvieae*. *J. App. Microbiol.*, 108, 1694-1701.
- 今城雅之・森光一幸・助田将樹・梅崎拓也・門野真弥・合田暉・久保栄作・大嶋俊一郎 (2016) 高知県野見湾における

Cryptocaryon irritans の TaqMan リアルタイム PCR 検出と分子系統解析. 魚病研究, 51, 103–111.

門野真弥・森光一幸・合田輝・梅崎拓也・内海愛優理・久保栄作・今城雅之（2017）高知県須崎市野見湾におけるリアルタイム PCR 法を用いた海産白点虫 *Cryptocaryon irritans* の分布動態の解析. 平成 28 年度日本水産学会中国・四国支部例会. 口頭発表.

池田拓司・加藤佑亮・門野真弥・山下はづき・森光一幸・久保栄作・西山慶・今城雅之（2019）検出頻度を高めたリアルタイム PCR 法による高知県野見湾での *Cryptocaryon irritans* の検出. 令和元年度日本魚病学会秋季大会. 口頭発表.

吉田照豊（2016）レンサ球菌症およびラクトコッカス感染症. 魚病研究, 51, 44–48.

Kawanishi, M., A. Kojima, K. Ishihara, H. Esaki, M. Kijima, T. Takahashi, S. Suzuki and Y. Tamura (2005) Drug resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Lactococcus garvieae* isolates from cultured *Seriola* (yellowtail, amberjack and kingfish) in Japan. Lett. Appl. Microbiol., 40, 322–328.

松岡学（1992）ブリ連鎖球菌症実験感染魚からの排菌量. 愛媛県水産試験場研究報告, 5, 39–41.

福田穰・舞田正志・佐藤公一・山本浩・岡本信明・池田彌生（1997）ブリの腸球菌症実験感染における *Enterococcus seriolicida* 水平感染に及ぼす溶存酸素の影響. 魚病研究, 32, 43–49.

楠田理一・川合研児（1982）ブリ連鎖球菌の特性. 魚病研究, 17, 11–16.

Morita, H., H. Toh, K. Oshima, M. Yoshizaki, M. Kawanishi, K. Nakaya, T. Suzuki, E. Miyauchi, Y. Ishii, S. Tanabe, M. Murakami and M. Hattori (2011) Complete genome sequence and comparative analysis of the fish pathogen *Lactococcus garvieae*. PLoS One, 6, e23184.

柴原敬生（1982）三重県下における連鎖球菌症による被害の現状. 魚病研究, 17, 49–53.

谷口道子（1982a）高知県下における養殖ブリの連鎖球菌症の発病要因とその予防対策. 魚病研究, 17, 55–59.

谷口道子（1982b）ハマチのレンサ球菌症における餌料経由の人為経口感染について. 日本水産学会誌, 48, 1717–1720.

飯田貴次・若林久嗣・江草周三（1982）ハマチの連鎖球菌症ワクチンについて. 魚病研究, 16, 201–206.

令和 2 年（2020）10月14日受理

令和 2 年（2020）12月31日発行