

高知県野見湾の養殖カンパチにおけるエリスロマイシン耐性連鎖球菌の 初確認について

今城雅之¹・服部汐音²・加藤佑亮³・福西晃育³・
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)

First Detection of Erythromycin-resistant Strains in *Lactococcus garviae* Isolates from Greater Amberjack (*Seriola dumerili*)
Cultured in Nomi Bay, Kochi Prefecture

Masayuki Imajoh¹, Shion Hattori², Yusuke Kato³, Kosuke Fukunishi³,
Katsumichi Nakayama⁴, Kei Nishiyama⁵, Eisaku Kubo⁶ and Kazuyuki Morimitsu⁶

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 garviae* 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 80 *L. garviae* isolates from diseased greater amberjack with typical symptoms of lactococcosis in the bay for PCR serotyping assay and antimicrobial susceptibility test. It was found that all isolates were serotype II, and three of these isolates were resistant to erythromycin.

キーワード：野見湾，カンパチ，ラクトコッカス・ガルビエ，II型，薬剤耐性菌。

Keyword: Nomi Bay, Greater amberjack, *Lactococcus garviae*, Serotype II, Drug resistant strain.

はじめに

ブリ属養殖魚類の α 溶血性連鎖球菌症(以下,連鎖球菌症)は,通性嫌気性のグラム陽性球菌 *Lactococcus garvieae* を原因とし,1974年に高知県土佐清水市の養殖ブリ (*Seriola quinqueradiata*) で発生したことに始まる(楠田ほか¹⁾). 本疾病は1970~1990年代に甚大な被害をもたらしたが,その後,ワクチンの普及により予防可能な疾病となった(高橋ほか²⁾). しかし,近年,ワクチン株と抗原性の異なる変異株の出現から,西日本各地の養殖場において,連鎖球菌症の被害が再拡大しており,これまで最も被害が多かったノカルジア症に取って代わるなど,深刻な事態になっている(農林水産省³⁾). この抗原性の違いは,診断に汎用される抗血清凝集試験で容易に確認でき,2012年の大分県と2013年の愛媛県の養殖ブリから,初めて凝集反応しない *L. garvieae* が分離され(Oinaka et al.⁴⁾), それ以降,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⁵⁾).

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,海面養殖場として高密度に利用され(山本ほか⁶⁾),カンパチ (*Seriola dumerili*) とマダイ (*Pagrus major*) 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,ブランド化や海外輸出などの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・拡大を図る上で,感染症対策の周知徹底が重要な課題となる.そのひとつが連鎖球菌症対策で,多くの養殖業者が,毎年中国から輸入するカンパチ種苗にワクチン接種を実施している.そうした状況にも関わらず,野見湾も他漁場と例外なく,II型による被害が増加しており,近年,積極的な投薬治療も行われていることから,早急に,薬剤耐性株出現の有無と,耐性程度を検証していかなければならないことを昨年提言した(今城ほか⁷⁾).

そこで,本研究では,昨年に引き続き,野見湾で流行する *L. garvieae* の血清型と,薬剤感受性の動向を明らかにすることを目的とした.

Table 1. 本研究の分離株リスト.

材料と方法

供試魚

野見湾の養殖業者から,2020年3月~12月に連鎖球菌症の罹患カンパチ38尾,対照として,手結沖の養殖業者から,同年9月~12月に同罹患ブリ23尾を入手した.各検体の入手日,魚体重,全長について,Table 1に示した.

尚,菌株番号は,昨年報告した内容(今城ほか⁷⁾)を引き継いで振った.

菌分離と凍結保存菌株の調製

各検体の外部症状を観察・記録し,魚体重と魚体長(全長)を測定した後,腎臓,脳,および病変患部をディスポーザブルループで突き,1.5%NaCl添加ブレインハートインヒュージョン(BHI,バクton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%

菌株番号	入手日	魚体重 (kg)	魚体長 (cm)	菌分離部位
野見湾カンパチ				
43・44	3/9	2.98	56.8	脳・腎臓
45・46	同上	3.85	64.9	脳・腎臓
47・48	3/13	2.10	59.2	脳・腎臓
49・50	同上	2.94	61.4	脳・腎臓
51・52	3/14	3.80	66.1	脳・腎臓
53	3/17	3.79	70.9	腎臓
54・55	3/21	4.23	67.9	脳・腎臓
56・57	4/1	3.51	67.5	脳・腎臓
58・59	同上	4.46	73.3	脳・腎臓
60	同上	3.88	69.4	腎臓
61・62	4/2	2.27	61.5	脳・腎臓
63・64	同上	3.14	66.6	脳・腎臓
65・66	5/2	1.14	50.9	脳・腎臓
67	5/28	3.39	67.8	腎臓
68・69	5/29	1.36	51.5	脳・腎臓
70・71	同上	1.37	47.5	脳・腎臓
72・73・74	6/13	1.98	55.4	脳・腎臓・尾柄部潰瘍
75・76・77	6/15	4.03	71.9	脳・腎臓・尾柄部潰瘍
78・79	7/6	1.22	48.5	腎臓・尾柄部潰瘍
80・81	同上	1.05	46.0	脳・尾柄部潰瘍
82	同上	1.31	47.5	脳
83	7/16	2.36	60.5	脳
84・85・86	同上	2.89	64.1	脳・腎臓・尾柄部潰瘍
87・88・89	同上	2.01	59.4	脳・腎臓・尾柄部潰瘍
90・91・92	同上	1.35	52.4	脳・腎臓・尾柄部潰瘍
93・94	同上	1.11	49.8	脳・腎臓
95・96・97	8/21	1.67	53.2	脳・腎臓・尾柄部潰瘍
98・99	同上	2.07	54.0	脳・腎臓
100・101	同上	2.16	55.5	脳・腎臓
102・103	8/22	3.03	66.5	脳・腎臓
104・105・106	8/27	2.03	56.5	脳・腎臓・尾柄部潰瘍
107	同上	1.64	55.4	脳
108・109・110	9/18	2.41	59.9	脳・腎臓・尾柄部潰瘍
111・112・113	同上	2.22	61.2	脳・腎臓・尾柄部潰瘍
114・115	10/28	2.52	62.4	脳・尾柄部潰瘍
116・117	同上	2.27	60.2	脳・尾柄部潰瘍
118・119	同上	2.60	63.0	脳・尾柄部潰瘍
120・121・122	11/3	2.62	59.9	脳・腎臓・尾柄部潰瘍
手結沖ブリ				
123	9/23	0.41	34.5	腎臓
124・125	同上	0.51	35.9	脳・腎臓
126・127	同上	0.56	35.2	脳・腎臓
128・129	10/1	0.80	40.9	脳・腎臓
130・131	同上	0.78	40.8	脳・腎臓
132・133	同上	0.71	40.5	脳・腎臓
134・135	同上	0.63	39.0	脳・腎臓
136・137	同上	0.73	40.7	脳・腎臓
138・139	同上	0.76	41.5	脳・腎臓
140・141	同上	0.91	43.5	脳・腎臓
142・143	同上	0.66	39.9	脳・腎臓
144・145・146	10/27	0.75	41.1	脳・腎臓・尾柄部出血
147・148	同上	2.68	64.8	脳・尾柄部出血
149・150	10/31	0.84	41.9	脳・腎臓
151・152	同上	0.94	43.5	脳・腎臓
153・154	同上	0.79	42.4	脳・腎臓
155	同上	0.87	42.1	脳
156・157	同上	1.16	45.3	脳・腎臓
158	同上	1.04	45.0	脳
159・160	12/2	1.13	46.5	脳・腎臓
161・162	同上	1.45	49.9	脳・腎臓
163・164	同上	1.13	45.9	脳・腎臓
165・166	同上	1.19	45.2	脳・腎臓

グリセルロール溶液200 µLを加えて混合し、各実験に供するまで-80°Cで保存した。野見湾カンパチ検体から分離した菌株数は、菌株番号43から122までの合計80株、手結沖のブリ検体から分離された菌株数は、菌株番号123から166までの合計44株であった。

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、同菌液から菌体ペレットを1.5 mLエッペンチューブに集めた。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、定法のフェノール・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。

菌株番号108, 109, 111, 112, 124, および125の菌株を分離した寒天平板培地上から、保存菌株とは別に各30個のコロニーをランダムに釣菌し、シカジーニクスDNA抽出試薬 (関東化学社製) に供し、マニュアルに従いDNA抽出した。

薬剤感受性試験

古下ほか⁸⁾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 (MIC) 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, ベクトン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, ベクトン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。MIC判定は、25°Cで48時間の培養後に行った。

PCR法

PCRは、Ohbayashi *et al.*⁹⁾に従って、*glxR-argS*遺伝子間を標的に行い、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 µL (5 units/µL, ニューイングランドバイオラボ社製)、5 × OneTaqバッファー5 µL、10 mM dNTPsミクスチャー0.5 µL、および0.5 µM各プライマー溶液0.1 µLを含む反応系に、菌体抽出ゲノムDNA溶液0.1 µLを加え、滅菌水で全量25 µLとした。得られたPCR増幅産物6 µLを、1.5%アガロースゲル電気泳動に供した。同アガロースゲルを、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はI型、1,285 bpはII型と

Kawanishi *et al.*¹⁰⁾は、2002年6～11月の西日本9県のブリ属魚類由来分離株の4割以上が、EM、LCM、およびOTCの多剤耐性株で、それらが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⁸⁾は、現場でのワクチン普及による投薬機会の減少から、EMとOTCの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。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II型の約4割が、LCMとCM（LCMの交差耐性の確認薬剤）の耐性株であったとする興味深い報告がなされ（Shi *et al.*¹¹⁾）、今回、野見湾カンパチの方でも、多くのLCM耐性株が見つかった。

以上、野見湾カンパチにおいて、最も危惧されたEM耐性株が、本研究から初めて確認された。今後も引き続き、高い頻度での投薬機会が見込まれ、さらに多剤耐性化することも強く懸念されるため、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。

謝辞

本研究の一部は、一般財団法人高銀地域経済振興財団の令和2年度研究課題等に関する助成事業の支援を受けて行われたものである。

参考文献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 農林水産省（2021）参照先: https://www.maff.go.jp/j/syouan/suisan/suisan_yobo/disease/gyobyou_higai_jyoukyou.html.
- 4) 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 Pathology*, 50, 37–43.
- 5) 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. 魚病研究, 50, 200–206.
- 6) 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.
- 7) 今城雅之・池田拓司・加藤佑亮・服部汐音・中山勝道・西山慶・久保栄作・森光一幸（2020）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. 高知大学学術研究報告, 69, 221–229.
- 8) 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.
- 9) 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 Pathology.*, 52, 46–49.
- 10) 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. *Letters in Applied Microbiology*, 40, 322–328.
- 11) 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 Pathology*, 54, 51–57.

令和3年(2021)10月22日受理

令和3年(2021)12月31日発行