論文

養殖カワハギにおける *Streptococcus iniae* および *Lactococcus garvieae* の病原性ならびにこれら細菌に対する不活化ワクチンの有効性

南 隆之^{1*}・金丸昌慎¹・岩田一夫¹・桑原正和²・天野健一²・水田 篤³
前田修大⁴・西木一生⁵・津江佑哉⁵・吉田照豊⁵

(2013年3月19日受付)

Pathogenicity of *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae* in Farmed Thread-sail Filefish and Efficacy of the Formalin-killed Vaccines against These Bacteria

Takayuki Minami^{1*}, Masanori Kanemaru¹, Kazuo Iwata¹, Masakazu Kuwahara², Kenichi Amano²,
Atushi Mizuta³, Nobuhiro Maeda⁴, Issei Nishiki⁵, Yuya Tue⁵ and Terutoyo Yoshida⁵

¹Miyazaki Prefectural Fisheries Research Institute, Miyazaki 889-2162, Japan

²Matsuoka Research Institute for Science, Tokyo 184-0003, Japan

³Miyazaki Prefectural Fisheries Promotion Association, Miyazaki 819-0322, Japan

⁴Miyazaki Prefectural Miyazaki Marine High School, Miyazaki 880-0856, Japan

⁵Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, Miyazaki 889-2192, Japan

(Received March 19, 2013)

ABSTRACT—The virulence of *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae* strains was evaluated in farmed thread-sail filefish *Stephanolepis cirrhifer* by intraperitoneally injecting live bacterial cells. These two pathogens were highly pathogenic to thread-sail filefish. The efficacy of each commercial vaccine, namely, *S. iniae* vaccine, *L. garvieae* vaccine, and a combined vaccine of *S. iniae* and *L. garvieae* was evaluated in the fish. The mortality was significantly lowered in both *S. iniae*- and *L. garvieae*-vaccinated groups compared to the control group, and both vaccines showed strong protection against the respective pathogens. Moreover, the combined vaccine showed strong protection against these two pathogens. These results suggest that these commercial vaccines are applicable in filefish aquaculture.

Key words: *Stephanolepis cirrhifer*, *Streptococcus iniae*, *Lactococcus garvieae*, thread-sail filefish, streptococcosis, pathogenicity, aquaculture, vaccine

西日本の海面養殖生産の主体をなすブリ類養殖は、近年の魚価の低迷や飼料価格の高騰で、厳しい経営状況にある。このような中、養殖カワハギは天然産に比べて価

格が高く、飼育期間がブリ類と比べ短いことなどから、現行の主力魚種と組み合わせた複合養殖に有用な魚種として注目されており、カワハギ養殖振興を目的に複数の県で種苗量産化技術開発が行われている。宮崎県でも種苗量産化に取り組み種苗生産に成功したことから、試験的に宮崎県内の養殖業者に出荷したところ、高水温期を中心に死亡が発生した。そこでカワハギ養殖の盛んな愛媛および大分県と宮崎県のカワハギの魚病診断状況を整理集計したところ、*Streptococcus iniae* や *Lactococcus*

¹ 宮崎県水産試験場

² 一般財団法人松岡科学研究所

³ 財団法人宮崎県水産振興協会

⁴ 宮崎県立宮崎海洋高等学校

⁵ 宮崎大学農学部

* Corresponding author

E-mail: minami-takayuki@pref.miyazaki.lg.jp

garvieae を原因細菌とするレンサ球菌症が発生していることが明らかとなった（南ら，2012）。*S. iniae* や *L. garvieae* を原因細菌とするレンサ球菌症は，日本をはじめ海外でも報告があり，ブリ類，マス類など様々な養殖対象魚種で報告されている（室賀，2004a，2004b；Elder *et. al*, 1995）。しかしながら，カワハギに対する *L. garvieae* の病原性は明らかにされておらず，*S. iniae* の病原性に関する情報もごく限られている（石井ら，2013）。これら2種類のレンサ球菌のカワハギに対する病原性を解明することは，有効な防除法を確立する上で必要な研究と考えられる。また，これらレンサ球菌症に対して他魚種では，ヒラメで *S. iniae* 感染症ワクチンが，ブリ類で *L. garvieae* 感染症ワクチンが市販されている（消費・安全局畜水産安全管理課，2013a）。これらワクチンをカワハギに対し接種することで，レンサ球菌症の予防が期待される。そこで本研究では，カワハギに対するこれら細菌の病原性解明およびカワハギにおけるワクチンの有効性評価を行った。

材料および方法

実験魚

財団法人宮崎県水産振興協会で種苗生産されたカワハギを用いた。実験魚は宮崎県水産試験場に搬入後，2 kL 角形 FRP 水槽でトラフグ用配合飼料（トラフグ EP，日清丸紅飼料）を与えて自然水温で予備飼育を行った後，実験7日前に120 L 角形アクリル水槽に移槽し，自然水温から徐々に加温し，最終的に25°Cになるよう加温・流水飼育を行った。実験魚は実験期間中，25°Cで加温・流水飼育を行った。

Streptococcus iniae 感染実験

供試菌株は，2010年に宮崎県内の養殖カワハギから分離され，凍結保存していた *S. iniae* MS1007株を用いた。感染実験に用いた菌液は，凍結保存していた菌株を Todd-Hewitt Broth（THB: Difco）を用いて25°Cにて24時間培養し，培養液を無菌的に撹拌した上で，滅菌した0.85% NaCl 生理食塩水（PS）によって目的の菌濃度に希釈することで調製した。実験魚は各区10尾ずつ用い（平均体重 123.6±32.2 g），飼育水温を25°Cに設定し，2段階の攻撃菌濃度区を設定した。すなわち10² 攻撃区（1.0×10² CFU/FISH）および10³ 攻撃区（1.0×10³ CFU/FISH）とした。調製した菌液を0.1 mLずつ腹腔内接種し攻撃した。また対照区にはPSを0.1 mLずつ腹腔内接種した。攻撃後，飼育水槽に収容し，急速ろ過海水を注水しながら，無給餌飼育を14日間行った。死亡魚は外部症状観察と剖検の後，Mitis Salivarius Agar（MSA: 日本 BD）を用いて腎臓および脳から細菌分離を行った。分離された細菌の同定は Mata *et al.*（2004）の方法に準

じて PCR 法で行うと共に，抗 *S. iniae* ウサギ血清によるスライド凝集反応を併用した。各感染実験ともに飼育期間終了後，全ての生残魚について腎臓および脳から細菌分離を行った。

Lactococcus garvieae 感染実験

供試菌株は，2011年に宮崎県内の養殖カワハギから分離され，凍結保存されていた *L. garvieae* SM07K1 株を用いた。感染実験に用いた菌液は，*S. iniae* による感染実験と同じ方法で調製した。実験魚は各区10尾ずつ用い（平均魚体重 97.6±14.3 g），飼育水温を25°Cに設定し，2段階の攻撃菌濃度区を設定した。すなわち10² 攻撃区（1.0×10² CFU/FISH）および10³ 攻撃区（1.0×10³ CFU/FISH）とした。調製した菌液を0.1 mLずつ腹腔内接種し攻撃した。また対照区にはPSを0.1 mLずつ腹腔内接種した。攻撃後，飼育水槽に収容し，急速ろ過海水を注水しながら，無給餌飼育を21日間行った。死亡魚は外部症状観察と剖検の後，MSAを用いて腎臓および脳から細菌分離を行った。分離された細菌の同定は抗 *L. garvieae* KG- ウサギ血清によるスライド凝集反応を用いて行った。各感染実験ともに飼育期間終了後，全ての生残魚について腎臓および脳から細菌分離を行った。

異なるサイズの魚体を用いた *Streptococcus iniae* ワクチン実験

供試ワクチンは市販ワクチンおよび *S. iniae* 試作ワクチンを用いた。市販ワクチンは，ヒラメのβ溶血性レンサ球菌症で承認されている M バックイニエ（松研薬品工業製；製造番号9-1，不活化前菌数 1.8×10⁹ CFU/mL）を用いた。また *S. iniae* 試作ワクチンは，MS1007株を THB を用いて25°Cにて24時間培養し，遠心分離（3,500 rpm，15 min）を行い，培養上清を除去した上で1.0×10⁸ CFU/mL となるよう PS に懸濁し，ホルマリン（和光純薬）を0.1%（v/v）加えて，室温で48時間静置して培養菌を不活化することで調製した。供試ワクチンは実験に用いるまで4°Cで保存した。実験魚は実験1では各区12尾ずつ用い（平均魚体重 28.5±5.9 g），実験2では各区20尾ずつ用い（平均魚体重 6.9±1.1 g），飼育水温はワクチン接種以降，25°Cに設定して飼育した。実験1では市販ワクチンおよび *S. iniae* 試作ワクチンを実験魚に0.1 mL/FISH ずつ腹腔内接種した。実験2では市販ワクチンを実験魚に0.1 mL/FISH ずつ腹腔内接種した。対照区には両実験ともPSを0.1 mL/FISH ずつ腹腔内接種した。ワクチン接種後，14日間給餌飼育を行い，ワクチン接種魚の死亡がないことを確認した上で，ワクチン接種魚に，*S. iniae* 感染実験と同じ方法で調製した菌液を実験1では6.0×10² CFU/FISH となるよう，実験2では8.0×10² CFU/FISH となるよう PS に懸濁し，その0.1

mLを腹腔内接種し攻撃した。攻撃後は、*S. iniae* 感染実験と同様に死亡魚の剖検や攻撃菌の再分離を行った。

Lactococcus garvieae ワクチン実験

供試ワクチンは市販ワクチンおよび *L. garvieae* 試作ワクチンを用いた。市販ワクチンはブリ属魚類の α 溶血性レンサ球菌症で承認されている M バックレンサ注（松研薬品工業製；製造番号7-1，不活化前菌数 3.2×10^9 CFU/mL）を用いた。また *L. garvieae* 試作ワクチンは、SM07K1株を THB を用いて 25°C にて24時間培養し、遠心分離（3,500 rpm, 15 min）を行い、培養上清を除去した上で 3.2×10^9 CFU/mL となるよう PS に懸濁し、ホルマリン（和光純薬）を0.1%（v/v）加えて、室温で48時間静置して培養菌を不活化することで調製した。供試ワクチンは実験に用いるまで 4°C で保存した。実験魚は各区10尾ずつ用い（平均魚体重 77.2 ± 11.5 g）、*S. iniae* ワクチン実験と同じ方法でワクチン接種および飼育管理を行い、*L. garvieae* 感染実験と同じ方法で調製した菌液を 1.1×10^4 CFU/FISH となるよう PS に懸濁し、その0.1 mLを腹腔内接種し攻撃した。攻撃後は、*L. garvieae* 感染実験と同様に死亡魚の剖検や攻撃菌の再分離を行った。

2 種混合試作ワクチン実験

供試ワクチンは、M バックイニエおよび M バックレン

サ注を等量混合することで調製した（以下、2 種混合試作ワクチンとする）。実験魚は各区20尾ずつ用い（ 8.0 ± 1.5 g）、*S. iniae* ワクチン実験と同じ方法で2 種混合試作ワクチンの接種および飼育管理を行った。感染実験は、*S. iniae* および *L. garvieae* による感染実験と同じ方法で調製した菌液 0.1 mL を腹腔内接種し攻撃した。攻撃菌量は *S. iniae* では 8.0×10^2 CFU/FISH、*L. garvieae* では 3.0×10^5 CFU/FISH であった。攻撃後は、*S. iniae* および *L. garvieae* 感染実験と同様に死亡魚の剖検や攻撃菌の再分離を行った。

統計処理

感染実験結果の統計学的処理には、フィッシャーの直接確率法を用い、 $p < 0.05$ を有意と判定した。また LD_{50} の計算はプロビット図解法（東京大学医科学研究所学友会，1958）を用いて行った。またワクチン実験においては、各実験の累積死亡率から Croy and Amend（1977）に従って有効率（RPS）を求めた。

結 果

Streptococcus iniae 感染実験

感染実験の結果を Fig. 1a に示した。死亡状況は、攻撃1日後に 10^3 攻撃区で死亡が認められ、攻撃2日後には全ての攻撃区で死亡率が100%となった（Fig. 1a）。一方、

Fig. 1. Cumulative mortality of thread-sail filefish challenged with MS1007 strain of *S. iniae* (a.) and with SM07K1 strain of *L. garvieae* (b.). Fish ($n = 10$) were intraperitoneally injected with the bacterium at a dose of 1.0×10^2 CFU/FISH (Δ) and 1.0×10^3 CFU/FISH ($\square$). $\circ$: control without challenge. Results were significantly different from those of control without challenge (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

対照区は実験期間中、死亡が認められなかった (Fig. 1a)。また実験期間中に死亡した全ての個体の脳および腎臓から攻撃菌が分離されたが、対照区の生残魚から細菌は分離されなかった。

***Lactococcus garvieae* 感染実験**

感染実験の結果を Fig. 1b に示した。攻撃3日後から死亡が始まり、攻撃18日後まで死亡が認められた。累積死亡率は 10^2 攻撃区で50%、 10^3 攻撃区で80%となり、対照区と 10^2 攻撃区 ($p < 0.05$) および 10^3 攻撃区 ($p < 0.01$) との間には有意な差が認められた (Fig. 1b)。一方、対照区は実験期間中、死亡が認められなかった (Fig. 1b)。累積死亡率から LD_{50} を計算した結果、 1.0×10^{16} CFU/FISH となった。実験期間中に死亡した全ての個体の脳および腎臓より、攻撃菌が分離された。また、対照区および 10^2 攻撃区の生残魚の脳および腎臓からは攻撃菌が再分離されなかったが、 10^3 攻撃区生残魚のうち1尾の脳および腎臓からは攻撃菌が再分離された。

異なるサイズの魚体を用いた *Streptococcus iniae* ワクチン実験

ワクチン接種後の実験魚は、実験1及び実験2共に緩慢遊泳等の行動の異常は確認されず、摂餌も良好であっ

た。*S. iniae* に対するワクチン実験の結果を Table 1 に示した。実験1における攻撃後の死亡率は、対照区が100%であるのに対し、市販ワクチン区は17%、試作ワクチン区は0%であり (Table 1)、対照区と比べ両ワクチン区の死亡率が有意に低かった ($p < 0.01$)。実験期間中に死亡した全ての個体の脳および腎臓より、攻撃菌が再分離された。市販ワクチン区および試作ワクチン区の生残魚から攻撃菌は分離されなかった。RPS は市販ワクチン区が83%、試作ワクチン区が100%であった。

一方、実験2における攻撃後の死亡率は、対照区が100%であるのに対し市販ワクチン区は10%であり (Table 1)、対照区と比べ市販ワクチン区の死亡率が有意に低かった ($p < 0.01$)。実験期間中に死亡した全ての個体の脳および腎臓より、攻撃菌が再分離された。RPS は90%であった。また、市販ワクチン区の生残魚から攻撃菌は分離されなかった。

***Lactococcus garvieae* ワクチン実験**

ワクチン接種後の実験魚は、緩慢遊泳等の行動の異常は確認されず、摂餌も良好であった。*L. garvieae* に対するワクチン実験の結果を Table 2 に示した。攻撃後の死亡率は、対照区が60%であるのに対し、市販ワクチン区および試作ワクチン区は0%であり (Table 2)、対照区と

Table 1. Efficacy of *S. iniae* vaccines in thread-sail filefish of different fish sizes against *S. iniae* MS1007 strain infection

Vaccine	Fish mortality	Cumulative percent mortality (%)	RPS (%)	Carrier rate	
				Brain	Kidney
Experiment 1 (Body weight 28.5 ± 5.9g)					
Commercial <i>S. iniae</i> vaccine	2/12**	17	83	0/10	0/10
Formalin killed <i>S. iniae</i> MS1007 cells	0/12**	0	100	0/12	0/12
Control	12/12	100	—	0/0	0/0
Experiment 2 (Body weight 6.9 ± 1.1g)					
Commercial <i>S. iniae</i> vaccine	2/20**	10	90	0/18	0/18
Control	20/20	100	—	0/0	0/0

Fish mortality: numbers of dead fish/numbers of infected fish

Cumulative percent mortality (%): numbers of dead fish/numbers of infected fish $\times$ 100

Carrier rate: numbers of fish carried *S. iniae*/numbers of fish survived

Control: The fishes were injected intraperitoneally with 0.1 mL of sterile physiological saline on vaccination.

Results were significantly different from those of control (** $p < 0.01$).

Table 2. Efficacy of *L. garvieae* vaccines in thread-sail filefish against *L. garvieae* SM07K1 strain infection

Vaccine	Fish mortality	Cumulative percent mortality (%)	RPS(%)	Carrier rate	
				Brain	Kidney
Commercial <i>L. garvieae</i> vaccine	0/10*	0	100	0/10	0/10
Formalin killed <i>L. garvieae</i> SM07K1 cells	0/10*	0	100	0/10	0/10
Control	6/10*	60	—	1/4	1/4

Fish mortality: numbers of dead fish/numbers of infected fish

Cumulative percent mortality (%): numbers of dead fish/numbers of infected fish $\times$ 100

Carrier rate: numbers of fish carried *L. garvieae*/numbers of fish survived

Control: The fishes were injected intraperitoneally with 0.1 mL of sterile physiological saline on vaccination.

Results were significantly different from those of control (* $p < 0.05$).

Table 3. Efficacy of the combined vaccine (*S. iniae* and *L. garvieae*) in thread-sail filefish against *S. iniae* or *L. garvieae* strain infections

Vaccine	Fish mortality	Cumulative percent mortality (%)	RPS (%)	Carrier rate	
				Brain	Kidney
<i>S. iniae</i> MS1007 strain infection experiment					
<i>S. iniae</i> – <i>L. garvieae</i> vaccine	2/20**	10	90	0/18	0/18
Control	20/20	100	–	0/0	0/0
<i>L. garvieae</i> SM07K1 strain infection experiment					
<i>S. iniae</i> – <i>L. garvieae</i> vaccine	1/20**	5	94	0/19	1/19
Control	18/20	90	–	0/2	2/2

Fish mortality: numbers of dead fish/numbers of infected fish

Cumulative percent mortality (%) : numbers of dead fish/numbers of infected fish × 100

Carrier rate: numbers of fish carried *S. iniae* or *L. garvieae*/numbers of fish survived

Control: The fishes were injected intraperitoneally with 0.1 mL of sterile physiological saline on vaccination.

Results were significantly different from those of control (** $p < 0.01$).

比べ両ワクチン区の死亡率が有意に低かった ($p < 0.05$)。実験期間中に死亡した全ての個体の脳および腎臓より、攻撃菌が再分離された。また、対照区の生残魚の一部から攻撃菌が再分離されたが、市販ワクチン区および試作ワクチン区の生残魚から攻撃菌は分離されなかった (Table 2)。RPS は市販ワクチン区および試作ワクチン区共に100%であった。

2 種混合試作ワクチン実験

ワクチン接種後の実験魚は、緩慢遊泳等の行動の異常は確認されず、摂餌も良好であった。2 種混合ワクチンを接種し、*S. iniae* および *L. garvieae* で攻撃した結果を Table 3 に示した。*S. iniae* 攻撃後の死亡率は、対照区が100%であるのに対し、2 種混合ワクチン区は10%であり (Table 3)、対照区と比べ2 種混合ワクチン区の死亡率が有意に低かった ($p < 0.01$)。RPS は90%であった。また、2 種混合ワクチン区の生残魚から攻撃菌は分離されなかった。

一方、*L. garvieae* 攻撃後の死亡率は、対照区が90%であるのに対し、市販ワクチン区は5%であり (Table 3)、対照区と比べ2 種混合ワクチン区の死亡率が有意に低かった ($p < 0.01$)。RPS は94%であった。また、対照区の生残魚では2 尾中2 尾、2 種混合ワクチン区の生残魚では19尾中1 尾から攻撃菌が再分離された。

考 察

カワハギにおいて、*S. iniae* 感染症および *L. garvieae* 感染症の発症例は報告があるものの (南ら, 2012)、*L. garvieae* の病原性は明らかにされておらず、*S. iniae* の病原性に関する情報も限られていた (石井ら, 2013)。今回、これら細菌を用いて腹腔内接種による感染実験を行った結果、LD₅₀が *S. iniae* では 1.0×10^2 CFU/FISH 未満であり、*L. garvieae* では 1.0×10^{16} CFU/FISH だった

ことから、これら細菌は共にカワハギに対し強い病原性をもつことが明らかとなり、カワハギ養殖において重要な感染症であると考えられた。カワハギに対する *S. iniae* の病原性については石井ら (2013) の結果と一致した。同程度の攻撃菌量で比較した場合、*S. iniae* による感染実験と *L. garvieae* による感染実験との死亡状況には違いが認められ、死亡率の上昇は、*S. iniae* による感染実験の方が速かった。石井ら (2013) は *S. iniae* の攻撃菌量を 9.4×10^2 CFU/100gBW から 9.4×10^{-1} /100gBW に設定して、筋肉接種法を用いて人為感染試験を行ったところ、攻撃後3日目から死亡し始め、死亡のピークは攻撃後4～6日目であったと報告している。このため、*S. iniae* による感染実験において、攻撃後2日目に急激に死亡率が上昇し全数が死亡したのは、*L. garvieae* より *S. iniae* の病原性が強いこと、攻撃方法が異なるものの石井らの方法よりも多く攻撃菌量を設定したことが原因と考えられる。ただし、*L. garvieae* による感染実験は、死亡のピークが攻撃後8～11日目であり死亡が攻撃後18日目まで続いたこと、生残魚に保菌魚が確認されたことから、石井らの人為感染試験と比べても病状が慢性的に進行しているものと考えられる。このような *S. iniae* と *L. garvieae* の病原性の違いはニジマスにおいても報告されている (Elder and Ghittino, 1999)。すなわち、注射感染による LD₅₀は *S. iniae* では 2.5×10^5 CFU/FISH であったのに対し、*L. garvieae* では 1.25×10^1 CFU/FISH と大きく異なること、前種の感染を受けたニジマスは髄膜炎および全眼球炎を呈しているのに対し、後種の感染魚は急性全身感染に陥り症状が異なったことが報告されている。このためニジマス同様、カワハギにおいても、レンサ球菌の種類により病原性に違いがある可能性が高いと考えられる。

続いて、レンサ球菌感染実験の結果を参考にしながらワクチン実験を行った。魚類のワクチンは、ブリ類を初

め様々な魚種で市販されている（消費・安全局畜水産安全管理課, 2013a）。しかしながら、魚種により免疫システムの発達に違いがあること（中西, 2012）、カワハギでは *L. garvieae* に対するワクチン効果が明らかでなく、*S. iniae* に対するワクチン効果に関する情報も限られていること（石井ら, 2013）、ワクチンを作製する抗原（菌株）の由来によりワクチン効果に差異が生じる可能性が考えられたことから、カワハギにおけるレンサ球菌症ワクチンの効果を検証する必要がある。まず由来の異なる2種類の *S. iniae* ワクチンを用いてワクチン試験を実施した。その結果、ヒラメ由来株抗原である *S. iniae* 市販ワクチン、およびカワハギ由来株抗原である *S. iniae* 試作ワクチンに共にワクチン効果が認められ、石井ら（2013）が報告した *S. iniae* 市販ワクチンの有効性を再確認できた。これらの結果から、抗原の由来によりワクチン効果が発現しないといった可能性は少ないと考えられる。さらにカワハギにおいて *S. iniae* 市販ワクチンの持続性が報告されていることから（石井ら, 2013）、*S. iniae* 市販ワクチンが養殖現場で活用できる可能性は高いと考えられる。なお、今回の *S. iniae* に対するワクチン実験では、*S. iniae* 試作ワクチンおよび *S. iniae* 市販ワクチンの抗原量が異なり、カワハギに対してどちらのワクチンが効果的か正確に評価することはできなかった。

ワクチン接種にあたっては、魚種の特性和生産形態に適した魚体サイズを選択することが重要であると考えられる。稚魚期におけるワクチン接種には、高いレベルで防疫体制を図れる種苗生産機関で接種可能となることや接種作業の作業性向上といったメリットが期待できる。一方、稚魚期でのワクチン接種には、免疫寛容の可能性（中西, 2012）やワクチン接種作業時の死亡といったようなデメリットも考えられる。そこで *S. iniae* 市販ワクチンと平均魚体重 6.9 g のカワハギを用いてワクチン実験を行い、カワハギ稚魚におけるワクチン接種の可能性について検討した。その結果、ワクチン効果が認められ、ワクチン接種後に死亡や行動の異常は認められず、摂餌も良好であった。これらのことから、約 7 g 以上のカワハギにワクチン接種すれば、その効果が期待できると考えられ、ワクチン接種後の摂餌等への影響も少ないと考えられる。カワハギ人工種苗は概ね 5–10 g 程度で出荷されていることから、種苗生産機関によるワクチン接種が可能であると考えられる。

このようにカワハギにおいて *S. iniae* ワクチンの有効性が示され、*L. garvieae* でもワクチン効果が期待できると予想されたことから、*L. garvieae* に対するワクチン実験を行った。その結果、ブリ由来株抗原である *L. garvieae* 市販ワクチンおよびカワハギ由来株抗原である *L. garvieae* 試作ワクチン共にワクチン効果が認められたことから、カワハギにおける *L. garvieae* 市販ワクチンの有

効性が示された。抗原因とワクチン効果の強さとの関係については、*L. garvieae* 試作ワクチンと *L. garvieae* 市販ワクチンの抗原量は同程度であることや、感染実験において両ワクチン区で死亡が認められなかったことから、抗原因の違によりワクチン効果の強さに差異は少ないと予想され、カワハギ養殖現場における *L. garvieae* 市販ワクチンの活用が期待された。

国内の魚類ワクチンについては、特にブリ類養殖で接種回数の削減による省力化と魚のストレス軽減の観点から、2 種以上の混合ワクチンの普及が進んでいる（高木, 2009）。2 種類以上の病原体を含む混合ワクチンについては、国内で11種市販され、うち2種は2種類のレンサ球菌症を含む混合ワクチンである（消費・安全局畜水産安全管理課, 2013a）。また、実験レベルではヒラメにおいて *S. iniae* を含む混合ワクチンの有効性について報告されている（Han et al., 2011）。さらに今回カワハギにおいて *S. iniae* および *L. garvieae* ワクチンの有効性がそれぞれ示されたことから、これら感染症を予防するため2種混合ワクチンの可能性が期待された。一方、複数のワクチンを混合した場合、抗原の競合・干渉により、どちらか一方の有効性が低下して効かなくなる可能性がある（乙竹, 2009）。そこでカワハギにおいて2種混合ワクチンの可能性について検討した結果、両レンサ球菌症に対し2種混合試作ワクチンの有効性が示された。このことから、レンサ球菌症を含め、2 種以上の混合ワクチンによる予防免疫の可能性が示されると共に、今回用いた *S. iniae* および *L. garvieae* 市販ワクチンを混合しても抗原の競合・干渉による弊害は発生しないと考えられる。また、今回の2種混合試作ワクチンは各市販ワクチンを等量混合し試作したことから、抗原投与量は通常の市販ワクチンの2分の1となったが、ワクチン効果が認められた。このことから、今回の投与方法について問題は無いと考えられる。

今回の一連の研究において、カワハギにおける *S. iniae* および *L. garvieae* 市販ワクチンの有効性が示され、2種混合ワクチンの可能性が示された。今後はレンサ球菌症ワクチンの実用化に向けて、養殖現場におけるワクチン効果やワクチン効果の持続性に関する知見が必要と考えられる。カワハギにおいて、レンサ球菌症に対する治療薬とワクチンがない（消費・安全局畜水産安全管理課, 2013b）現状を考えると、カワハギ養殖の振興を図るため、これら知見を収集し、早期にワクチンが実用化されることが望まれる。

謝 辞

本研究は、宮崎県「地球温暖化対応「みやざきモデル」確立推進事業」により実施された。また、実験補助およびカワハギの飼育管理をしていただいた栗田壽男氏およ

び岩切安子氏に深謝する。

文 献

- Croy, T. R. and D. F. Amend (1977): Immunization of sockeye salmon (*Oncorhynchus Nerka*) against vibriosis using the hyperosmotic infiltration technique. *Aquaculture*, **12**, 317–325.
- Elder, A., P. F. Frelie, L. Assenta, W. P. Varner, S. Lawhon and H. Bercovier (1995): *Streptococcus shiloi*, the name for an agent causing septicemic infection in fish, is a junior synonym of *Streptococcus iniae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**, 840–842.
- Elder, A. and C. Ghittino (1999): *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. *Dis. Aquat. Org.*, **36**, 227–231.
- Han, S. Y., B. K. Kang, B. J. Kang, J. M. Kim, J. E. Han, J. H. Kim, C. Choresca Jr., S. P. Shin, J. W. Jun and S. C. Park (2011): Protective efficacy of combined vaccine against *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* in farmed Olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathol.*, **46**, 108–111.
- 石井佑治・山田敏之・杉原志貴・高見生雄・菅向志郎・金井欣也 (2013): カワハギの β 溶血性レンサ球菌症に対する市販ヒラメ用ワクチンの有効性. 魚病研究, **48**, 29–31.
- Mata A. I., M. M. Blanco, L. Domínguez, J. F. Fernández-Garayzábal, A. Gibello (2004): Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactate oxidase (*lctO*) gene with potential diagnostic value. *Vet. Microbiol.*, **101**, 109–116.
- 南 隆之・金丸昌慎・岩田一夫・中西健二・山下亜純・三吉泰之・福田 穰・吉田照豊 (2012): 西日本における養殖カワハギのレンサ球菌症発生状況. 魚病研究, **47**, 111–113.
- 室賀清邦 (2004a): プリの連鎖球菌症 (*Lactococcus garvieae* infection) 「魚介類の感染症・寄生虫病, 若林久嗣・室賀清邦編」, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 198–203.
- 室賀清邦 (2004b): アユ等淡水魚の連鎖球菌症 (*Streptococcus iniae* infection) 「魚介類の感染症・寄生虫病, 若林久嗣・室賀清邦編」, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 203–206.
- 中西照幸 (2012): 魚類の生体防御 「改訂・魚病学概論第二版, 小川一夫・室賀清邦編」, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 9–26.
- 消費・安全局畜水産安全管理課 (2013a): 水産用医薬品の使用について, **26**, 17–21.
- 消費・安全局畜水産安全管理課 (2013b): 水産用医薬品の使用について, **26**, 13.
- 乙竹 充 (2009): ワクチンの投与方法 「水産用ワクチンハンドブック, 中西照幸・乙竹 充編」, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 19–32.
- 高木修作 (2009): 現場における使用状況, 現場からの要望 プリ 「水産用ワクチンハンドブック, 中西照幸・乙竹 充編」, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 78–84.
- 東京大学医科学研究所学友会 (1958): 細菌学実習提要, 丸善株式会社, 東京, pp. 470–471.