論文

養殖カンパチで発生している *Vibrio harveyi* 感染症

南 隆之^{1*}・岩田一夫¹・嶋原佳子²・湯浅 啓²

(2015年5月14日受付)

Vibrio harveyi Infection in Farmed Greater Amberjack *Seriola dumerili*

Takayuki Minami^{1*}, Kazuo Iwata¹, Yoshiko Shimahara² and Kei Yuasa²

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

²Diagnosis and Training Center for Fish Disease, National Research Institute of Aquaculture,
Fisheries Research Agency, Mie 516-0193, Japan

(Received May 14, 2015)

ABSTRACT—Mortalities accompanied with symptoms similar to vibriosis were observed in farmed greater amberjack *Seriola dumerili* immunized with a commercial *Vibrio anguillarum* vaccine (serotype J-O-3). The symptoms of infection included exfoliation of the head epithelium, ragged caudal fin, accumulated ascites, and ophthalmitis. Bacteria isolated from infected fish were positive in species-specific PCR assays for *V. harveyi*. A phylogenetic analysis based on *topA* (DNA topoisomerase I) and *mreB* (rod shape-determining protein mreB) concatenated gene sequence provided further confirmation of the isolated bacteria as *V. harveyi*. Experimental infection revealed that the isolate was pathogenic to greater amberjack. In a vaccine trial, mortality of fish immunized with formalin-killed cells (FKC) of the isolate was significantly lower than that of control fish, suggesting that FKC of the isolate prevents greater amberjack from *V. harveyi* infection.

Key words: *Seriola dumerili*, amberjack, *Vibrio harveyi*, vibriosis, vaccine

カンパチ *Seriola dumerili* は国内で主要な養殖魚種の一つであり、西日本沿岸で海面養殖が盛んに行われている。宮崎県においても県北部と県南部でカンパチ養殖が行われ、本県の主要な養殖魚種の一つとされる。一方、海産魚のビブリオ病は *Vibrio anguillarum* を始めとした複数の原因細菌により発生するが、ブリ *S. quinqueradiata* の稚魚や幼魚で発生するビブリオ病の原因となる株のほとんどが *V. anguillarum* J-O-3 型であることや (高橋, 2013)、既にカンパチを含めたブリ類の J-O-3 型感染症に対して他の感染症との混合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, 2015) ことから、ワクチン普及前にはカンパチでも J-O-3 型が流行していたと予想さ

れる。またブリ属で市販される J-O-3 型ビブリオ病に対する市販ワクチンはワクチン使用後のアンケート調査で概ね有効との評価 (高木, 2009) であったことから、カンパチ養殖現場においても有効であったと考えられ、現に宮崎県のカンパチ養殖において2010年頃までビブリオ病は大きな問題とならなかった。しかしながら2011年頃から、宮崎県内で市販ビブリオ病ワクチンを接種した養殖カンパチにビブリオ病に似た症状を呈する疾病が確認されるようになり、2013年10月には市販ビブリオ病ワクチン接種済のカンパチで日間0.4–0.8%程度の死亡が約1ヶ月継続した。このため本研究では、死亡したカンパチの魚病検査で分離された菌株の同定とカンパチに対する病原性を評価して、死亡原因の特定を試みた。さらに分離菌株からワクチンを試作して予防効果を検討した。

¹ 宮崎県水産試験場

² 増養殖研究所南勢庁舎

* Corresponding author

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

材料および方法

魚病診断

供試魚は2013年10月に宮崎県内の養殖場で採取したカンパチ死亡魚5尾（魚体重 47.0 ± 10.3 g）を用いた。養殖業者からの聴取によると、採取したカンパチの由来は人工種苗（当歳魚）であり、当カンパチ飼育群は2013年8月にJ-O-3型ビブリオ病を含む3種混合ワクチンを用法用量どおり接種されていた。供試魚は養殖カンパチの魚病診断マニュアル（村瀬，2012；大迫ら，2012）に準じて、外観症状の観察および鰓の生標本観察を行った後、解剖し内臓諸器官の観察を行うと共に、1.5% NaCl 添加ブレインハートインヒュージョン（BHI）寒天培地（日水製薬）および TCBS 寒天培地（日水製薬）を用いて、頭部上皮組織剥離部位および腎臓から細菌分離を試みた。分離された全ての細菌は常法によりグラム染色し、光学顕微鏡で観察を行った。

分離細菌の同定

魚病診断において、TCBS 寒天培地で純培養状に分離された黄色コロニーを形成する細菌のうち、最も症状が重かった1個体（体重 45.0 g）の頭部上皮組織剥離部位および腎臓から分離された細菌を代表株とし、それぞれ MS13101A 株および MS13102A 株として保存し、以下の調査に供した。また標準株として、*V. harveyi* ATCC14126 株（端脚類 *Talorchestia* sp. 由来）を用いた。分離株の性状は API20E（シスメックス・バイオメリユー）を用いて Buller（2004）に従い調べた。すなわち、分離菌株を滅菌生理食塩水でマクファーランド濁度 No. 1 に調製して API20E に接種し、25°C で2日間培養した。結果の判定は取扱説明書に従って行った。凝集反応は公益社団法人日本水産資源保護協会から配布された抗 *V. anguillarum* (A) ウサギ血清（免疫原 ATCC19264 株，タイセイヨウマダラ *Gadus morhua* 由来），抗 *V. anguillarum* (C) ウサギ血清（免疫原 PT-213 株，アユ *Plecoglossus altivelis* 由来）および抗 *V. harveyi* ウサギ血清（免疫原 Ns12sousui21 株，トラフグ *Takifugu rubripes* 由来）を用いて定法により調べた。

PCR 用 DNA サンプルは、MS13101A 株、MS13102A 株および *V. harveyi* ATCC14126 株を1.5% NaCl 添加 BHI 寒天培地で27°C にて24時間培養後に、1コロニーを無菌的に採取し、滅菌超純水 100 μ L に懸濁し、加熱（100°C，10分），遠心（10,000 rpm，10分）処理することで調製した。PCR は Pang *et al.*（2006）および Kim *et al.*（2014）の方法を参考にして行った。PCR 反応におけるプライマーセットは、Pang *et al.*（2006）の方法では toxRF1 および toxRR1 を、Kim *et al.*（2014）の方法では VH-F および VH-R を用いた。PCR の反応溶

液の組成は、Pang *et al.*（2006）の方法では TaKaRa Ex Taq Hot Start Version（タカラバイオ；5 U/ μ L）を 0.1 μ L，10 $\times$ Ex taq Buffer（タカラバイオ；20 mM Mg²⁺ plus）を 2.0 μ L，dNTP Mixture（タカラバイオ；dATP，dCTP，dGTP および dTTP は各 2.5 mM）を 1.6 μ L，プライマーセット（100 μ M）を各 0.1 μ L，DNA サンプルを 2.0 μ L，滅菌超純水を 14.1 μ L の計 20 μ L とし、Kim *et al.*（2014）の方法では TaKaRa Ex Taq Hot Start Version を 0.1 μ L，10 $\times$ Ex taq Buffer を 2.0 μ L，dNTP Mixture を 1.6 μ L，プライマーセット（100 μ M）を各 1.0 μ L，DNA サンプルを 2.0 μ L，滅菌超純水を 12.3 μ L の計 20 μ L とした。PCR の反応条件は以下のとおりとした。Pang *et al.*（2006）の方法は94°C・1分，55°C・1分，72°C・1分を30 サイクル行った。Kim *et al.*（2014）の方法は94°C・5分間の反応の後に，94°C・30秒，66.4°C・30秒，72°C・30秒を30 サイクル行い，最後に72°C・7分間行った。アガロース電気泳動は1.5% アガロース（ニッポンジーン，アガロース S）をゲル材料に用いた電気泳動（ミュービッド，Mupid-exU）を行い，PCR 増副産物を確認した。バンドの塩基長の対照物としてはサイズマーカーの100 bp ラダー（ニッポンジーン，Gene Ladder 100）を用いた。さらに，Cano-Gomez *et al.*（2011）に従い，2 遺伝子（*topA*；DNA topoisomerase I および *mreB*；rod shape-determining protein *mreB*）を対象とした分析を行った。2 遺伝子を含む領域は PCR 法によりプライマーセット VtopA400F および VtopA1200R（*topA* 遺伝子），VmreB12F および VmreB999R（*mreB* 遺伝子）を用いて増幅させ（Cano-Gomez *et al.*，2011），反応液は PrimeSTAR GXL DNA Polymerase（タカラバイオ）を用いた。アガロースゲル電気泳動により目的のバンドを確認してゲルを切り出し，Wizard SV Gel and PCR Clean-up System（Promega）を用いて精製した。ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し，DNASTAR Lasergene software の SeqMan を用いて塩基配列の解析を行った。その後，*topA* および *mreB* 遺伝子の塩基配列を結合させて MEGA6（Tamura *et al.*，2013）に取り込みアライメントを行い，Kimura 2-parameter モデルおよび近隣結合法により系統樹を作成した。

筋肉内接種法による分離株の病原性評価

供試魚は民間機関で種苗生産されたカンパチ当歳魚（魚体重 263.3 ± 43.4 g）を用い，2 kL FRP 水槽で予備飼育を行った。攻撃7日前に各区10尾ずつ120 L アクリル水槽（急速ろ過海水流水飼育）に移槽し，徐々に加温して，攻撃当日から実験終了まで25°C で飼育した。120 L アクリル水槽収容後から攻撃前日までは給餌飼育，攻撃開始日から終了までは無給餌飼育とした。攻撃株と

して腎臓由来の MS13102A 株を用いた。攻撃菌液は 1.5% NaCl 添加 BHI 液体培地（日水製薬）を用いて 27°C にて 24 時間培養し、培養液を滅菌生理食塩水で希釈することで調製した。攻撃菌液の濃度は、1.5% NaCl 添加 BHI 寒天培地を用いて菌数測定した。攻撃実験は 6.0×10^6 CFU/FISH, 6.0×10^5 CFU/FISH および 6.0×10^4 CFU/FISH の 3 段階の攻撃菌濃度区を設定し、調製した菌液を 0.2 mL ずつ躯幹部背側体側筋に接種した。対照区には滅菌生理食塩水 0.2 mL を接種した。攻撃後 14 日間観察すると共に、死亡魚は外部症状を観察し、剖検した後、TCBS 寒天培地を用いて腎臓から細菌分離を行った。分離された細菌の同定は Pang (2006) らの方法に準じて PCR 法で行った。攻撃実験終了後、全ての生残魚の腎臓から TCBS 寒天培地を用いて細菌分離を行った。

供試ワクチン

供試ワクチンは市販ワクチンおよび試作ワクチンを用いた。市販ワクチンはマリンジェンナービブレン（バイオ科学、製造番号 1WC401E）を用いた。試作ワクチンは、以下のとおり調製した。攻撃実験にも供した MS13102A 株を用いて 1.5% NaCl 添加 BHI 液体培地で 27°C にて 24 時間培養した。培養後、 1.9×10^7 CFU/mL となるよう滅菌生理食塩水に懸濁し、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し、4°C で保存した。

ワクチン接種および攻撃実験

供試魚は民間機関で種苗生産されたカンパチ当歳魚（魚体重 81.1 ± 19.2 g）を用い、2 kL FRP 水槽で予備飼育を行った。ワクチン接種 7 日前に 120 L アクリル水槽（急速ろ過海水流水飼育）に移槽し、徐々に加温して、ワクチン接種当日から攻撃実験終了まで 25°C で飼育した。各ワクチン接種区では供試魚 20 尾に供試ワクチンを 0.1 mL/FISH、腹腔内に接種した。対照区では供試魚 20 尾に滅菌生理食塩水を 0.1 mL/FISH、腹腔内に接種した。ワクチン接種後 14 日間給餌飼育を行い、死亡がないことを確認し、攻撃実験に供した。供試魚の攻撃後の飼育、観察、死亡魚および生残魚の処理は、病原性評価と同じ方法で実施した。攻撃菌量は 2.3×10^5 CFU/FISH であった。

統計処理

攻撃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。LD₅₀ の計算は Reed and Muench 法（Reed and Muench, 1938）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有効率（RPS）を求めた（Croy and Amend, 1977）。

結 果

魚病診断

病魚の症状を Fig. 1 に示した。供試魚 5 尾のうち、頭部上皮組織の剥離（Fig. 1A）は 5 尾、尾鰭欠損（Fig.

Fig. 1. The symptoms of diseased greater amberjacks collected from a farm. A: Exfoliation of head epithelium. B: Ragged fin. C: Visceral dropsy. D: Ophthalmitis.

1B) は 4 尾, 腹水症 (Fig. 1C) は 4 尾, 眼球炎 (Fig. 1D) は 3 尾確認された。菌分離を試みた結果, 全ての魚の頭部上皮組織剥離部位および腎臓から, 1.5% NaCl 添加 BHI 寒天培地で透明感かつ光沢のある灰白状コロニーを, TCBS 寒天培地で黄色のコロニーを形成する細菌が純培養状に分離された。各培地で分離された細菌のコロニー形状は類似しており, グラム染色を施した分離株を光学顕微鏡で観察したところ, 全ての菌株がグラム陰性短桿菌であることを確認した。なお, 鰓の生標本観察では, 全ての個体で鰓の褪色が確認されたものの, 鰓腐れの症状や寄生虫は確認されなかった。

分離細菌の同定

分離菌株の性状と凝集反応の結果を Table 1 に, PCR の結果を Fig. 2 示した。API20E に基づく MS13101A 株および MS13102A 株の性状は, TDA および SOR を除き *V. harveyi* ATCC14126 株と同じ性状を示した (Table 1)。これら 3 菌株は抗 *V. anguillarum* (A) 血清, 抗 *V.*

anguillarum (C) 血清および抗 *V. harveyi* 血清には凝集を示さなかった (Table 1)。Pang et al. (2006) および Kim et al. (2014) の方法により PCR 法を行った結果, それぞれ予定されたサイズにあたる増幅産物が得られた (Fig. 2)。ダイレクトシーケンスにより 740 bp (*topA* 遺伝子) および 1,008 bp (*mreB* 遺伝子) の塩基配列を決定した。得られた配列は GenBank に登録した (Accession no. は LC071932-LC071935)。カンパチから分離された 2 菌株の相同性は *topA* 遺伝子では 99.1%, *mreB* 遺伝子では 99.5% であった。また *V. harveyi* LMG4044 との相同性は, *topA* 遺伝子では MS13101A 株が 99.3%, MS13101A 株が 99.5% であり, *mreB* 遺伝子では MS13101A 株が 98.8%, MS13101A 株が 99.8% であり, 2 遺伝子を結合させた塩基配列に基づく系統樹において, 同じ分岐群に属するも異なる遺伝子型を示した (Fig. 3)。

筋肉接種法による病原性評価

攻撃実験の結果を Fig. 4 に示した。攻撃区は, 全ての

Table 1. The results of API 20E and agglutination test with anti *Vibrio* spp. serums in two isolates in this study

Examinations	Isolates		<i>V. harveyi</i>
	MS13101A	MS13102A	ATCC14126
API20E			
β -galactosidase (ONPG)	—	—	—
Arginine dihydrolase (ADH)	—	—	—
Lysine decarboxylase (LDC)	+	+	+
Ornithine decarboxylase (ODC)	+	+	+
Citrate utilization (CIT)	+	+	+
H ₂ S production (H ₂ S)	—	—	—
Urease production (URE)	—	—	—
Tryptophan deaminase (TDA)	—	—	+
Indole production (IND)	+	+	+
Voges-Proskauer reaction (VP)	—	—	—
Gelatin hydrolysis (GEL)	+	+	+
Utilization of:			
Glucose (GLU)	+	+	+
Mannitol (MAN)	+	+	+
Inositol (INO)	—	—	—
Sorbitol (SOR)	+	+	—
Rhamnose (RHA)	—	—	—
Sucrose (SAC)	+	+	+
Melibiose (MEL)	—	—	—
Amygdalin (AMY)	+	+	+
Arabinose (ARA)	—	—	—
Oxidase production (OX)	+	+	+
Agglutination test with anti- <i>V. anguillarum</i> and anti- <i>V. harveyi</i> serums*			
anti <i>V. anguillarum</i> (A) ATCC19264	—	—	—
anti <i>V. anguillarum</i> (C) PT-213	—	—	—
anti <i>V. harveyi</i> Ns12sousui21	—	—	—

*: All of the antisera used were supplied by Japan fisheries resource conservation association (JFRCA).

Fig. 2. PCR results with primer set toxRF1 and toxRR1 (Lane 1 to 4), and VH-F and VH-R (Lane 5 to 8). Lane M, 100 bp DNA ladder. Lane 1 and 5, negative control. Lane 2 and 6, MS13101A strain. Lane 3 and 7, MS13102A strain. Lane 4 and 8, *V. harveyi* ATCC14126 strain.

Fig. 3. Phylogenetic relationships of *Vibrio harveyi* isolated from amberjack to other *Vibrio* spp. based on partial 2 protein-coding loci concatenated gene sequences (*topA* and *mreB*). The neighbor-joining tree was constructed using the Kimura 2-parameter model used on aligned sequences by MEGA6. Numbers at nodes represent bootstrap values (1,000 repetitions). *Photobacterium phosphoreum* LMG4233^T is used as the outgroup. GenBank accession numbers for sequences used to construct the trees are shown in parentheses.

Fig. 4. Cumulative mortalities of greater amberjack challenged with three doses of MS13102A isolate. Fish ($n = 10$) were intramuscularly injected with the isolate at a dose of 6.0×10^4 CFU/FISH (○), 6.0×10^5 CFU/FISH (△) and 6.0×10^6 CFU/FISH (□). ●: control without challenge. Cumulative mortalities of fish with the injection at doses of 6.0×10^5 CFU/FISH (△) and 6.0×10^6 CFU/FISH (□) are significantly different from those of fish in control (** $p < 0.01$).

Table 2. Efficacy of commercial combined vaccine (*V. anguillarum* serotype J-O-3 and *Lactococcus garvieae*) and formalin killed MS13102A cells in greater amberjack challenged with MS13102A isolate

Source of vaccine	Mortality (Number of dead fish/number of fish injected with the isolate)	Cumulative percent mortality (%)	RPS (%)	Re-isolation of bacteria from kidney of survivor
Formalin killed cells of MS13102A isolate	5/20**	25	74	1/15
Commercial combined vaccine (<i>V. anguillarum</i> serotype J-O-3 and <i>Lactococcus garvieae</i>)	20/20	100	-5	-
Control (sterile physiological saline)	19/20	95	-	0/1

Mortality of vaccinated fish was significantly different from those of control (** $p < 0.01$).

濃度で攻撃 1 から 2 日後に死亡が認められ、実験期間中の累積死亡率は、 6.0×10^6 CFU/FISH 攻撃では 100%， 6.0×10^5 CFU/FISH 攻撃では 80%， 6.0×10^4 CFU/FISH 攻撃では 10%であった (Fig. 4)。一方、対照区は実験期間中、死亡が認められなかった (Fig. 4)。また実験期間中に死亡した全ての個体の腎臓から *V. harveyi* が分離されたが、生残魚の腎臓から細菌は分離されなかった。累積死亡率から LD_{50} を計算した結果、 $6.0 \times 10^{4.6}$ CFU/FISH となった。全ての実験区の死亡魚において、攻撃菌液接種部位を中心に上皮組織の剥離が確認された。

ワクチン接種および攻撃実験

ワクチン接種後の実験魚は、異常は確認されず、摂餌も良好であった。攻撃結果を Table 2 に示した。攻撃後の死亡率は、対照区が 95% であるのに対し、市販ワクチン接種区は 100%，試作ワクチン接種区は 25% であり (Table 2)，対照区と比べ試作ワクチン接種区の死亡率が有意に低かった ($p < 0.01$)。また RPS は市販ワクチン接種区は -5%，試作ワクチン接種区は 74% であった。実験期間中に死亡した全ての個体の腎臓から、*V. harveyi* が分離された。また、試作ワクチン接種区の生残魚 1 尾から *V. harveyi* が分離された。全ての実験区の死亡魚および試作ワクチン接種区の生残魚 3 尾において、攻撃菌液接種部位を中心に上皮組織の剥離が確認された。

考 察

これまで国内養殖ブリのビブリオ病の原因となる細菌は、*V. anguillarum*、*V. parahaemolyticus*、*V. alginolyticus*、*Vibrio* sp. (海産魚の潰瘍病病原菌) が報告されている (高橋, 2013)。一方、*V. harveyi* は海外の養殖魚に被害を与えているとされ (Austin et al., 2006; Ishimaru et al., 1997)，国内でもマアジ (Iwamoto et al., 1995; Thompson et al., 2002) やトラフグ (Mohi et al., 2010) で報告されており、養殖カンパチにおける *V. harveyi* 感染症のまん延が懸念された。このため、まず、今回報告するカンパチ検体について魚病診断を行うと共に分離細菌の同定を行った。魚病診断時における死亡魚の目視観

察の結果、頭部上皮組織の剥離、尾鰭欠損、腹水貯留や眼球炎が高い頻度で観察され、TCBS 寒天培地を用いた腎臓および頭部上皮剥離部からの菌分離で黄色コロニーを形成する細菌が純培養的に分離された。症状および分離細菌のコロニー形状は海産魚で発生する *V. anguillarum* と類似していたが (高橋, 2013)，分離細菌の性状は *V. harveyi* ATCC14126 株とほぼ一致しており、既報の PCR (Pang et al., 2006; Kim et al., 2014) で陽性となったことから、*V. harveyi* もしくは、その近縁種であると考えられた。ビブリオ属細菌では、種間の遺伝子相違度が高い遺伝子座位を利用して分析される Multilocus sequence analysis (MLSA) が同定ツールとなっている (澤辺, 2010)。一方、Cano-Gomez et al. (2011) は *V. harveyi* とその近縁種では、2 遺伝子 (*topA-mreB*) の塩基配列を連結した系統解析により、同定可能と報告している。このため本研究では、この 2 遺伝子の塩基配列を連結した系統解析を行った。その結果、いずれの分離菌株も既知の *V. harveyi* 遺伝子配列と高い相同性を示し、分離菌株は *V. harveyi* と同定して問題ないとの結論に至った。しかし、同一個体から分離された株であるにもかかわらず、一部塩基配列に違いが認められた。頭部上皮組織剥離部位は外部環境と接しており、本部位より分離された MS13101A 株は疾病とは無関係な環境性の細菌の可能性も考えられるため、攻撃試験とワクチン試験には腎臓由来の分離株 MS13102A 株を用いた。*V. harveyi* の遺伝的多様性ならびに魚体内の分布については今後の研究進展が望まれる。

また、既存の抗血清および既報の PCR (Pang et al., 2006; Kim et al., 2014) で同定を試みたところ、PCR のみ陽性となった。同属の *V. anguillarum* には複数の血清型が存在することが知られている (高橋, 2013)。本報のカンパチ由来 *V. harveyi* 株や ATCC14126 株は、トラフグ由来の *V. harveyi* に対する抗血清に凝集が認められなかったことから、海産動物由来 *V. harveyi* に複数の血清型が存在する可能性が高く、分離細菌の同定には PCR 法の方が良いと考えられる。ただ、抗血清を用いた同定法の方が簡便であることから、*V. harveyi* に係る血清型研究

の進展と診断法の開発が望まれる。

続いて分離株を用いて攻撃実験を行い、病原性評価を行った。その結果、筋肉注射法による LD_{50} が $6.0 \times 10^{4.6}$ CFU/FISH であることが明らかとなった。一般的に偏性病原菌は $10^1 \sim 10^4$ CFU/FISH の注射攻撃により感受性宿主を殺すのに対し、条件性病原菌は 10^7 CFU/FISH の菌量を注射して初めて宿主を殺しうるとされる（室賀, 2012）。このため、*V. harveyi* MS13102A 株はカンパチ人工種苗にとって偏性病原菌に近いと考えられ、魚病診断した養殖カンパチの死亡原因は *V. harveyi* の感染と考えられる。また、ワクチン実験を含め攻撃実験で上皮組織の剥離が死亡魚を中心に確認されたことから、自然感染に近い症状が再現できたと考えられる。一方、本研究では攻撃後の *V. harveyi* の体内動態は検討されていない。*V. harveyi* の病原性を評価する上で重要と考えられることから、今後の研究進展が望まれる。

さらに、カンパチにおける *V. harveyi* 感染症について、ワクチンを用いた予防対策を検討するため、ワクチン実験を実施した結果、市販ワクチンでは予防効果が確認されなかった一方、試作ワクチンでは予防効果が確認された。カンパチにおけるビブリオ病に対する市販ワクチンは、*Vibrio anguillarum* J-O-3 型を含む混合ワクチンのみ（消費・安全局畜産安全管理課, 2015）であり、養殖現場においてワクチン接種しているにも関わらず *V. harveyi* 感染症の発生事例があること、また本報において市販ワクチン接種区は予防効果が得られなかったことから、本症に対して既存のビブリオ病市販ワクチンでは予防効果が期待できないと示唆され、被害の拡大が懸念される。このため *V. harveyi* 感染症に対するワクチンの早期実用化が望ましいが、国内に流行する *V. harveyi* には複数の血清型が予想されることから、効果的なワクチンを開発するためには国内で流行する血清型の把握が必要であると考えられる。

謝 辞

実験補助およびカンパチの飼育管理をしていただいた栗田壽男氏、池端直生子氏および田中さおり氏に深謝する。

文 献

Austin, B. and X.-H. Zhang (2006): *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol.*, **43**, 119–124.

Buller, N. B. (2004): Bacteriological culture techniques: Microscopy, Culture and Identification. In "Bacteria from Fish and other aquatic animals" (ed. by N. B. Buller). CABI publishing, pp. 83–116.

Cano-Gomez, A., L. Høj, L. Owens and N. Andreakis (2011): Multilocus sequence analysis provides basis for fast and reliable identification of *Vibrio harveyi*-related species and reveals previous misidentification of important marine pathogens. *Syst. Appl. Microbiol.*, **34**, 561–565.

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.

Ishimaru, K. and K. Muroga (1997): Taxonomical re-examination of two pathogenic *Vibrio* species isolated from milkfish and swimming crab. *Fish Pathol.*, **32**, 59–64.

Iwamoto, Y., Y. Suzuki, A. Kurita, Y. Watanabe, T. Shimizu, H. Ohgami and Y. Yanagihara (1995): *Vibrio trachuri* sp. nov., a new species isolated from diseased Japanese horse mackerel. *Microbiol. Immunol.*, **39**, 831–837.

Kim, M. S., J. Y. Cho and H. S. Choi (2014): Identification of *Vibrio harveyi*, *Vibrio ichthyenteri* and *Photobacterium damsela* isolated from olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea by multiplex PCR developed using the *rpoB* gene. *Fisheries Sci.*, **80**, 333–339.

Mohi, M. M., M. Kuratani, T. Miyazaki and T. Yoshida (2010): Histopathological studies on *Vibrio harveyi* - infected tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Temminck et Schlegel), cultured in Japan. *J. Fish Dis.*, **33**, 833–840.

村瀬拓也 (2012): 魚病診断 概説, 「魚類防疫技術書シリーズ XXVIII 養殖カンパチの魚病診断マニュアル」, 養殖衛生対策推進協議会, 東京, pp. 9–27.

室賀清邦 (2012): 細菌病, 「改訂・魚病学概論第二版, 小川和夫・室賀清邦編」, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 55–60.

大迫典久・湯浅 啓・西岡豊弘・栗田 潤・桐生郁也・嶋原佳子・村瀬拓也 (2012): 魚病診断 各論, 「魚類防疫技術書シリーズ XXVIII 養殖カンパチの魚病診断マニュアル」, 養殖衛生対策推進協議会, 東京, pp. 29–54.

Pang, L., X.-H. Zhang, Y. Zhong, J. Chen, Y. Li and B. Austin (2006): Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of *toxR* gene. *Lett. Appl. Microbiol.*, **43**, 249–255.

Reed, L. J. and H. Muench (1938): A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.*, **27**, 493–497.

澤辺智雄 (2010): ビブリオ病の多様性と進化. 日本細菌学会誌, **65**, 333–342.

消費・安全局畜産安全管理課 (2015): 水産用医薬品の使用について, **28**, 16–20.

高橋幸則 (2013): 海産魚の細菌感染症と診断法, 「魚介類の微生物感染症の治療と予防, 青木宙編」, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 29–61.

高木修作 (2009): 現場における使用状況, 現場からの要望, 「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.

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar (2013): MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, **30**, 2725–2729.

Thompson, F. L., B. Hoste, K. Vandemeulebroecke, K. Engelbeen, R. Denys and J. Swings (2002): *Vibrio trachuri* Iwamoto et al. 1995 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann et al. 1981. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 973–976.