

農学部門長 殿

代 表 者 今城 雅之
助言・評価者 大島 俊一郎

令和 4 年度農学部門個人・グループ研究プロジェクト
成 果 報 告 書

標記について、下記のとおり報告いたします。

記

1. プロジェクト名称 高知県野見湾の養殖カンパチにおける未確認連鎖球菌症の積極的疫学調査

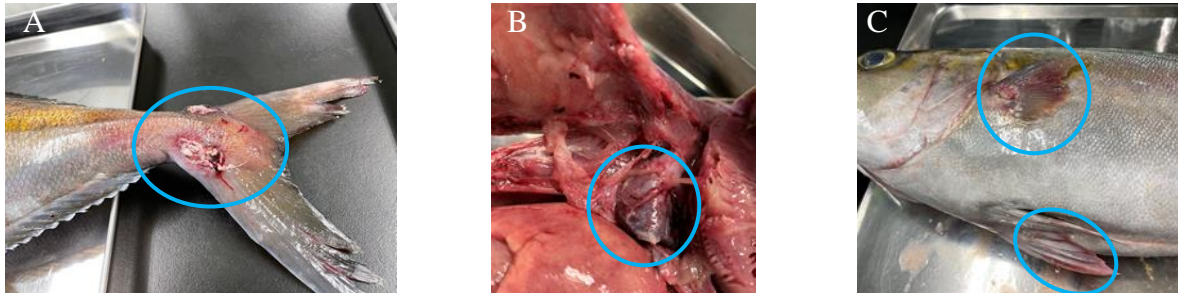
2. 研究成果（2 ページ程度）

高知県須崎市野見湾は、本県の主要養殖漁場のひとつで、リアス式地形を有して外洋の影響を受けにくいと、海面養殖に適した場所とされる。本湾では現在、カンパチ養殖発祥地としての全国的な知名度を活用した海外輸出やネット通販などの販路開拓が積極的に行われており、良質かつ安定的なカンパチ生産体制の維持・向上が求められる。

連鎖球菌症は *Lactococcus garvieae* を原因とし、ブリ類養殖の中で最も高い被害割合を示すゆえ、野見湾カンパチの本疾病対策として、ワクチン予防と投薬治療が図られる。先行研究において、1) 少なくとも 2016 年までの被害は血清型の I 型が主流であり、2019 年には II 型へと変遷していたこと、2) 第一選択剤として用いられるエリスロマイシン（EM）の耐性菌出現を 2020 年に初確認し、翌年に同耐性菌の被害が急拡大したこと、3) 注射ワクチンによる II 型の予防効果は 1 年以上期待できないことなどを明らかにした。よって、今後投薬効果を低下させないためには、EM 耐性菌の出現頻度や多剤耐性化などの監視を強化していかなければならない。そこで本研究では、現場での適正な投薬治療を推奨する取り組みに資する目的で、野見湾カンパチから分離される *L. garvieae* の血清型判別、薬剤感受性検査、最近報告されたリンコマイシン（LCM）耐性関連遺伝子の変異の有無の検討を行い、さらには連鎖球菌症罹患魚、他疾病罹患魚、および未罹患魚での本菌の体内分布も解析した。

今年度は調査期間中、連鎖球菌症の被害がほとんどなく、日本水産資源保護協会によるカンパチの診断マニュアルに従って、各検体を 26 尾の未罹患魚グループ、3 尾の連鎖球菌症罹患魚グループ、43

尾の他疾病罹患魚グループからなる3グループに分けて供した。連鎖球菌症罹患魚グループは、魚体重3.1 kgと4.0 kgの成魚で尾柄部潰瘍（下写真A）、心外膜炎（下写真B）、鰭発赤（下写真C）などの外観症状が見られたのに対し、200 gの稚魚では目立った症状がなかった。



他疾病罹患魚グループは140~600 gの当歳魚で、うち20尾で顕著な肝臓退色と鰓貧血（下写真A）が観察され、一部の鰓にエラムシ寄生（下写真B）も確認されたため、駆虫のための長時間の過酸化水素処理による赤血球破壊で重度の貧血に陥ったものと推察された。9尾は眼球炎症様の症状（下写真C）を呈し、4尾の体表で軽度の発赤（下写真D）が見られた。



連鎖球菌症罹患魚グループの脳、腎臓、および患部、他疾病罹患魚グループの腎臓から1.5% NaCl添加BHI寒天培地を用いて菌分離し、前者グループの成魚検体から6株、同稚魚検体から1株の連鎖球菌が分離され、後者グループの眼球炎症様検体の腎臓からビブリオ様菌が分離された。連鎖球菌分離株の血清型は既知PCR法で判定し、薬剤感受性は寒天平板希釈法で検査した。成魚由来6株はII型と、稚魚由来1株はIII型とそれぞれ判別された。このIII型は2021年に初報告された新たな血清型であり、今回の野見湾での初確認になったとともに、分離検体が中国から搬入されたばかりのものであったため、国外からの持ち込みが疑われた。連鎖球菌分離株の薬剤感受性は、成魚由来II型6株と稚魚由来III型1株ともに、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（AP）に感受性を示した一方で、LCMには耐性であった。さらに、II型2株とIII型1株がEMに対して $<0.125 \mu\text{g/mL}$ のMIC値を示したのに対して、残りのII型4株は $>512 \mu\text{g/mL}$ となり、依然と

して II 型で高い EM 耐性率の傾向が明らかとなった。

3 グループの各検体 7 臓器の抽出 DNA から既報 qPCR 法で菌を検出・定量した結果、未罹患魚グループと他疾病罹患魚グループは、全ての検体ではないものの 7 臓器のいずれかで 10^3 オーダーの総じたコピー数で検出され、時期や魚の状態に関わらず、一定の割合で保菌していることが確認された。また同時に、両グループ検体はワクチン接種していたため、高いワクチン効果による増殖抑制とも考えられた。連鎖球菌症罹患魚グループは、脳で最大 10^6 オーダー、心臓で 10^5 オーダーと本疾病特有の症状が観察される臓器で高値となり、菌分離が行われる腎臓でも 10^4 オーダーと他グループにはなかったコピー数が示され、この辺りのコピー数の菌量が、菌分離できるか否かの境界線と示唆された。

既報 LCM 耐性関連遺伝子 *Lsa* (D) について、先行研究の LCM と EM 両耐性 II 型 1 株をシークエンス解析した結果、既知配列と全く相違がなく、よって遺伝子変異は確認されなかった。また、先行研究の I 型 1 株と II 型 3 株、本研究の II 型と III 型 1 株ずつを供し、同遺伝子発現パターンを既報 RT-PCR 法で確認した結果、II 型のみで 3 つのプライマーセットいずれも増幅産物が得られた。これらの結果より、野見湾分離 II 型の LCM 耐性メカニズムは既報と同様であると推定された。

今後も野見湾カンパチに流行する II 型が EM・LCM 耐性菌なのかを監視して、それを蔓延させない投薬治療の取り組みが必要であるとともに、今回初確認された III 型が II 型に代わって流行する可能性があるのか、調査を継続させなければならない。

3. 研究助言・評価者のコメント（300字程度）

日本で最も養殖生産されるブリ類において、最も魚病被害が大きいとされる連鎖球菌症に対する感染症対策は、海面養殖産業にとってきわめて重要である。本研究では、高知県野見湾の養殖カンパチについて、連鎖球菌症の対策に資する大きな成果が得られたものとする。特に、今回初めて見つかった III 型タイプの連鎖球菌はまだ知見がほとんどなく、ワクチン接種による予防が行えない現状にある。その一方で、薬剤感受性検査によりエリスロマイシンの投薬治療は可能であるとのデータから、今後野見湾内で本タイプを流行・蔓延させないための監視が必要になると考える。

4. 研究成果の公開実績・予定

令和 5 年度日本魚病学会秋季大会で口頭発表予定