

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

石井佑治¹・山田敏之²・杉原志貴²・高見生雄³・菅 向志郎¹・金井欣也^{1*}

(2012年12月27日受付)

Protective Efficacy of a Commercial β -hemolytic *Streptococcus* Vaccine for Japanese Flounder against *Streptococcus iniae* Infection of Threadsail Filefish

Yuji Ishii¹, Toshiyuki Yamada², Yukitaka Sugihara², Ikuo Takami³, Koushirou Suga¹ and Kinya Kanai^{1*}

¹Graduate School of Fisheries Science and Environmental Studies, Nagasaki University, Nagasaki 852-8521, Japan

²Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries, Nagasaki 851-2213, Japan

³Tsushima Fisheries Expansion Advisory Center, Nagasaki 817-0324, Japan

(Received December 27, 2012)

ABSTRACT—A commercial β -hemolytic *Streptococcus* vaccine for Japanese flounder was examined for the protective efficacy against *Streptococcus iniae* infection of threadsail filefish *Stephanolepis cirrhifer*. In the artificial infection test a high mortality rate (90%) was obtained by intramuscular inoculation with *S. iniae* as low as 10^2 CFU/100 g body weight. In the vaccination test intraperitoneal inoculation with the vaccine at the usual and 1/10 dosages resulted in a high protective effect (RPS \geq 85%), and the high protective efficacy was kept for at least 7 months.

Key words: *Stephanolepis cirrhifer*, threadsail filefish, *Streptococcus iniae*, vaccine, efficacy

カワハギ *Stephanolepis cirrhifer* は淡白色の白身魚であり、一般家庭でも消費されやすい魚である。また、肝臓

¹ 長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科

² 長崎県総合水産試験場

³ 長崎県対馬水産普及指導センター

* Corresponding author

E-mail: kanai@nagasaki-u.ac.jp

は美味で珍重されており、養殖魚は天然魚より肝臓が大きいことから高値で取引されている。現在、新たな養殖対象魚種として長崎県¹、大分県²、宮崎県などで種苗生産および養殖に関する技術開発が進められている。一方、カワハギ養殖においても他の魚種と同様に種々の疾病が発生し、宮崎県、愛媛県および大分県ではとくに *Streptococcus iniae* を原因とするレンサ球菌症の診断件数が多い³。しかし、カワハギに使用できる治療薬は少なく⁴、疾病予防のために給餌量の制限などが行われているが、出荷サイズに達するまでの飼育期間が長くなるなどのデメリットもある。そこで今回、水産用医薬品として承認されているヒラメ用 β 溶血性レンサ球菌症ワクチンがカワハギの *S. iniae* 感染症に対して有効か否かを検討した。

材料および方法

供試菌株および供試魚

長崎県総合水産試験場地先海面いけすで飼育されていたカワハギから2010年9月に分離され、10%グリセリンを保護剤として -80°C で凍結保存されていた *S. iniae* NSL10 を攻撃用菌株として用いた。使用時に、本菌株をトッドヒューイット（以下 TH; Difco）寒天培地で 27°C 、24時間培養した。供試魚には、2010年に長崎県総合水産試験場種苗量産技術開発センター魚類科で種苗生産され、紫外線照射海水を用いて陸上水槽でEPを給餌して飼育されたカワハギ0歳魚および1歳魚を用いた。

供試ワクチン

水産用医薬品として市販されているヒラメ β 溶血性レンサ球菌症不活化ワクチン“Mバックイニエ（松研薬品工業株式会社）”（ロット番号6-1；以下、ワクチンと省略）を使用した。

人為感染試験

筋肉接種法と浸漬法により人為感染法を検討した。筋肉接種法では、攻撃用菌株を TH 寒天培地で 27°C 、24時間培養後、菌体を滅菌 0.01 M リン酸緩衝生理食塩水 pH 7.2 (PBS) に 2 mg 湿重量/mL の濃度で懸濁し、PBS で 10 倍階段希釈系列を調製した。供試魚 10 尾（平均体重 30.3 ± 6.7 g）の背部筋肉に各希釈段階の菌液を 0.1 mL/100 g 魚体重 (BW) 注射した。接種菌数は $9.4 \times 10^{-1-2}$ CFU/100 g BW であった。対照区には滅菌 PBS を 0.1 mL 注射した。浸漬法では、攻撃用菌株を TH 液体培地で 27°C 、24時間振盪培養後遠心分離（ $1,750 \times g$ 、15分）し、集めた菌体を所定の濃度になるように海水に懸濁して供試魚 20 尾（平均体重は同上）を 30 分間浸漬した。浸漬菌濃度は $7.3 \times 10^{4-7}$ CFU/mL であった。対照区は菌を添加していない海水に浸漬した。攻撃後は両攻撃

法とも攻撃菌濃度ごとに 100 L 容の円形水槽に収容し、魚体重の 1 % の EP を毎日給餌して流水飼育しながら 3 週間死亡経過を観察した。試験期間中の水温は 25.3 ~ 25.6°C であった。死亡魚および試験終了時の生残魚の脳と腎臓から TH 寒天培地を用いて攻撃菌の再分離を試みた。培地上に発育したコロニーについて、抗 *S. iniae* NUF631 ウサギ血清⁵⁾を用いたスライド凝集試験により *S. iniae* であることを確認した。

ワクチンの有効性試験

ワクチンを滅菌 PBS で 10 倍および 100 倍に希釈し、ワクチン原液と希釈液をそれぞれ供試魚 20 尾 (平均体重 88.5 ± 26.9 g) の腹腔内に 0.1 mL 接種し、100 L 容円形水槽で給餌流水飼育を行った。対照区には PBS を注射して同様に飼育した。ワクチン接種 2 週間後、攻撃用菌株の TH 寒天培養菌を 6.9×10^2 CFU/100 g BW 筋肉接種し、その後人為感染試験と同様の方法で飼育しながら 3 週間死亡経過を観察した。試験期間中の水温は 25.0 ~ 27.7°C であった。死亡魚および試験終了時の生残魚からの攻撃菌の再分離と分離菌の同定は上記と同様の方法で行った。ワクチンの有効率 (Relative percent survival: RPS) を以下の式により算出した。

$$RPS = (1 - \text{ワクチン投与区の死亡率} / \text{対照区の死亡率}) \times 100$$

免疫効果の持続性試験

ワクチン原液を供試魚 (体重 77.1 ± 32.8 g) 100 尾の腹腔内に 0.1 mL 接種し、2 kL 容円形水槽で給餌流水飼育を行った。対照区の 100 尾には PBS を注射して同様に飼育した。ワクチン接種は 8 月下旬に行い、飼育期間中

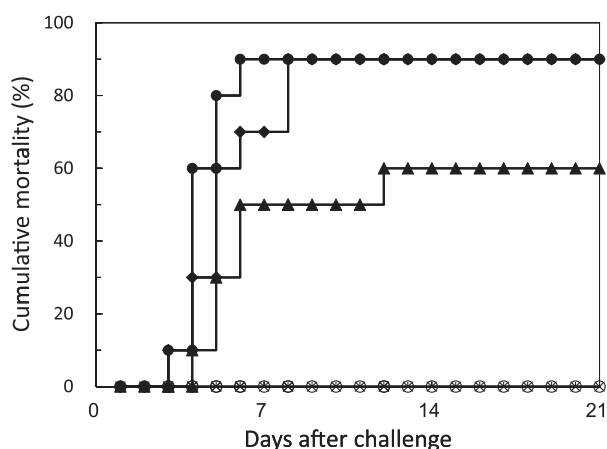


Fig. 1. Change in cumulative mortality of filefish artificially infected with *S. iniae* NSL10 (Intramuscular inoculation). Dose: 9.4×10^2 (●), 9.4×10^1 (◆), 9.4×10^0 (▲), 9.4×10^{-1} (×) CFU/100 g body weight, control (○).

の水温は 11.2 ~ 26.1°C であった。ワクチン接種 2 週間、1 か月および 3 か月後にワクチン投与区と対照区から 20 尾ずつ、7 か月後に 10 尾ずつ取り上げてそれぞれ 100 L 容円形水槽に収容し、ワクチンの有効性試験と同様の方法で攻撃試験を行った。7 か月後の攻撃試験は、供試魚

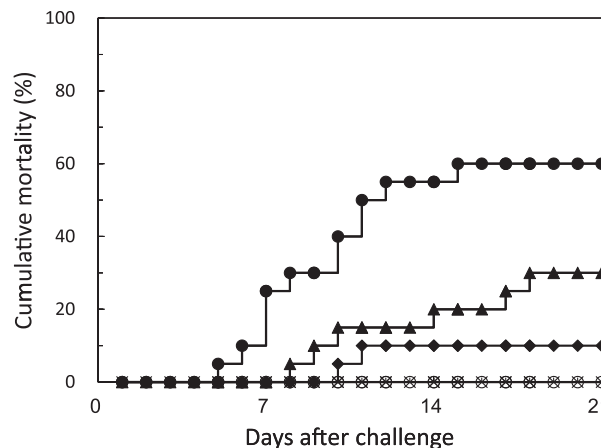


Fig. 2. Change in cumulative mortality of filefish artificially infected with *S. iniae* NSL10 (Immersion challenge). Dose: 7.3×10^7 (●), 7.3×10^6 (◆), 7.3×10^5 (▲), 7.3×10^4 (×) CFU/mL, control (○).

Table 1. Survival and carrier rate of filefish in the artificial infection test

Challenge method	Challenge dose (CFU/100 g BW or mL)	Cumulative mortality* ¹	Carrier rate* ²	
			Brain	Kidney
Intramuscular inoculation	9.4×10^2	9/10	0/1	0/1
	9.4×10^1	9/10	0/1	1/1
	9.4×10^0	6/10	0/4	0/4
	9.4×10^{-1}	0/10	0/10	0/10
	Control	0/10	0/10	0/10
Immersion	7.3×10^7	12/20	0/8	0/8
	7.3×10^6	2/20	0/18	0/18
	7.3×10^5	6/20	0/14	0/14
	7.3×10^4	0/20	0/20	0/20
	Control	0/20	0/20	0/20

*¹ No. of fish died/no. of fish challenged.

*² No. of fish carried *S. iniae*/no. of fish survived.

Table 2. Survival and carrier rate of filefish in the vaccine efficacy test*¹

Vaccination dose	Survival rate* ²	RPS (%)	Carrier rate* ³	
			Brain	Kidney
1 dose	20/20	100	0/20	0/20
1/10 dose	17/20	85	0/17	1/17
1/100 dose	8/20	40	0/8	0/8
Control	0/20	—	—	—

*¹ Challenge dose: 6.9×10^2 CFU/100 g BW.

*² No. of fish survived/no. of fish challenged.

*³ No. of fish carried *S. iniae*/no. of fish survived.

Table 3. Survival and carrier rate of filefish in the protective immunity duration test

Time after vaccination	Experimental group	Mean body weight ^{*1} ± SD (g)	Challenge dose (CFU/100 g BW)	Temperature ^{*2} (°C)	Survival rate ^{*3}	RPS (%)	Carrier rate ^{*4}	
							Brain	Kidney
2 wk	Vaccinated	91.7 ± 31.2	6.9 × 10 ²	25.0~26.0	16/20	80	0/16	0/16
	Control						0/20	0/16
1 mo	Vaccinated	91.4 ± 36.1	6.5 × 10 ²	24.7~25.2	18/20	90	0/18	0/18
	Control						0/20	0/18
3 mo	Vaccinated	136.1 ± 55.2	1.5 × 10 ²	22.7~25.2	18/20	90	0/18	2/18
	Control						0/20	0/18
7 mo	Vaccinated	163.0 ± 42.9	5.6 × 10 ²	24.0~25.8	10/10	100	0/10	0/10
	Control						0/10	0/10

*1 Mean body weight of fish used in the challenge test.

*2 Water temperature during the period of challenge test.

*3 No. of fish survived/no. of fish challenged.

*4 No. of fish carried *S. iniae*/no. of fish survived.

を約 25°C に 2 週間順化させた後に実施した。死亡魚および試験終了時の生残魚からの攻撃菌の再分離と分離菌の同定は上記と同様の方法で行った。

有意差検定

ワクチン投与区と対照区の生残率の有意差検定には χ^2 検定を用いた。

結果および考察

人為感染試験における死亡経過を Fig. 1 および 2 に、試験終了時の生残魚の保菌状況を Table 1 に示す。筋肉接種法では、10² 区および 10¹ 区で 90%、10⁰ 区で 60% の累積死亡率となり、10⁻¹ 区および対照区では死亡はみられなかった。浸漬法では、10⁷ 区で 60%、10⁶ 区で 10%、10⁵ 区で 30% の累積死亡率となり、10⁴ 区および対照区では死亡はみられなかった。筋肉接種法では攻撃 3 日後から死亡し始め、死亡のピークは 4~6 日後であった。浸漬法では 5 日後から死亡し始め、18 日後まで死亡が続いた。死亡魚には、眼球の白濁、体表の褪色、接種部付近の膨隆、腎臓および脾臓の腫大などがみられ、全ての死亡魚から *S. iniae* が分離された。生残魚の保菌率は低かった。注射攻撃法と比較した場合、ブリやマダイは *S. iniae* に対して比較的感受性が低く、アユやヒラメは感受性が高い⁵⁻⁸⁾。今回の実験結果からカワハギも感受性の高い魚種であると考えられた。しかし、浸漬法ではアユやヒラメに比べると死亡率が低かった^{6,9)}。カワハギの皮膚は厚く丈夫なため、直接皮膚から細菌が感染することが少ないことも考えられる。

ワクチンの有効性試験の結果を Table 2 に示す。ワクチン原液および 10 倍希釈液で免疫した区の RPS は 100% および 85% であり、両区の生残率は対照区に対して有意に高かった ($p < 0.01$)。また、生残魚の保菌率は低かった。免疫効果の持続性試験の結果を Table 3 に示す。免疫 2 週間後から 7 か月後までのすべての攻撃試験におい

て RPS は 80% 以上であり、免疫効果が長期間持続することが分かった。生残魚の保菌率も低かった。*S. iniae* においては莢膜抗原が主要な感染防御抗原であることが解明されており¹⁰⁾、我が国の各種魚種から分離される *S. iniae* は莢膜抗原によって単一の血清型に分類されると考えられることから⁵⁾、カワハギ由来の *S. iniae* に対してもヒラメ用ワクチンが有効であったと思われる。

本研究から水産用医薬品として承認されているヒラメ β 溶血性レンサ球菌症不活化ワクチンがカワハギの *S. iniae* 感染症にも有効であることが確認された。しかし、ブリでは α 溶血性レンサ球菌症ワクチンが使われ始めてからノカルジア症や他の疾病の発生が増え¹¹⁾、ヒラメでは β 溶血性レンサ球菌症ワクチンが使われ始めてから *S. parauberis* 感染症の診断件数が増加したことから¹²⁾、カワハギにおいても今後は他の疾病のワクチンについても研究を進める必要があると思われる。

文 献

- 1) 山田敏之・杉原志貴・松倉一樹・山本純弘 (2012) : 平成 23 年度長崎県総合水産試験場事業報告, 88-89.
- 2) 中里礼大・景平真明・金澤 健・井本有治 (2012) : 平成 23 年度大分県農林水産研究指導センター水産研究部事業報告, 5-12.
- 3) 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) : 魚病研究, **47**, 111-113.
- 4) 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課 (2012) : 水産用医薬品の使用について, 第 25 報, 13.
- 5) Kanai, K., M. Notohara, T. Kato, K. Shutou and K. Yoshikoshi (2006) : *Fish Pathol.*, **41**, 57-66.
- 6) 楠田理一・杉山昭博・川合研児・稲田義和・米田実 (1981) : 日水誌, **47**, 993-997.
- 7) 大西圭二・城 泰彦 (1986) : 魚病研究, **21**, 9-13.
- 8) 佐古 浩 (1993) : 水産増殖, **41**, 387-395.
- 9) Nguyen, H. T., K. Kanai and K. Yoshikoshi (2001) : *Fish Pathol.*, **36**, 40-41.
- 10) Shutou, K., K. Kanai and K. Yoshikoshi (2007) : *Fish Pathol.*, **42**, 101-106.
- 11) 板野公一・川上秀昌・河野智哉・酒井正博 (2008) : 魚病研究, **43**, 86-88.
- 12) 福田 穰 (2009) : 「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, 84-86.