

## 養殖ブリ・カンパチの新型レンサ球菌症 (*Streptococcus dysgalactiae* 感染症)

平江 多績・村瀬 拓也・仁部 玄通<sup>1)</sup>・吉田 照豊<sup>2)</sup>

1)大隅地域振興局, 2)宮崎大学農学部

## A new type *Streptococcus* infection in Cultured amberjack *Seriola dumerili* and yellowtail *Seriola quinqueradiata* (*Streptococcus dysgalactiae* Infection)

Tatumu Hirae, Takuya Murase, Harunao Nibe and Terutoyo Yoshida

**Abstract :** In 2002, mortalities due to infection with an unknown *Streptococcus* sp. occurred in cultured amberjack *Seriola dumerili* and yellowtail *S. quinqueradiata*. This infection had high clinical similarity to *Lactococcus garvieae* infection. Using Lancefield grouping and genetic investigation, the unknown *Streptococcus* sp. was identified as Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* (GCS). For diseased fish, bacteria should be isolated from the necrosis site of the caudal peduncle since bacterial isolation from the brain is difficult. GCS infection in fish is characterized by severe necrosis of the caudal peduncle with little exophthalmos. Genetic characterization by biased sinusoidal field gel electrophoresis (BSFGE) revealed different genotypes between fish and animal GCS isolates. The partial sequence of the 16S-23S rDNA intergenic spacer region of all the tested fish isolates differed from mammalian isolates in one or two nucleotides. Although GCS was resistant to drugs such as oxytetracycline (OTC), resistance to erythromycin (EM), lincomycin (LCM), and aminobenzylpenicillin (ABPC) was not observed. Until 2002, the use of drugs in fish farms in Kagoshima Prefecture had decreased because of the prevalent practice of *L. garvieae* vaccination. However, drug use has been increasing since 2003 due to the fish mortality caused by GCS infection.

南日本において2002年の夏季以降発生した通称「新型レンサ球菌症」は、本県の養殖ブリ、カンパチに甚大な魚病被害をもたらしている。本症の原因細菌は、LancefieldのC型血清に反応を示す連鎖球菌であることが明らかにされ、*Streptococcus dysgalactiae*に分類された。<sup>1)</sup> これまでに、本症の概要について報告があり<sup>2)3)</sup>、さらに病原菌株の遺伝子解析結果や性状についても報告されている<sup>4)5)</sup>。本症は、その症状の類似性から従来型の $\alpha$ 溶血性レンサ球菌症(*Lactococcus garvieae*感染症:以下、従来型レンサ球菌症と記載)と誤認されやすく、診断に際しては細心の注意が必要である。<sup>6)7)</sup> なお、従来型レンサ球菌症はワクチンが販売され、一定の効果が得られているが、本症についてはワクチンが販売されていない。これらのことから、本センターでは、2003年以降、本症の全容を明らかにするため、調査研究を行った。

今回は、疫学調査結果を中心にとりまとめ、本症と従

来型レンサ球菌症と症状の違いによる簡易判別法の検討、養殖場での薬剤使用量の推移、分離菌株の薬剤感受性試験を行うとともに、魚類由来菌株の遺伝子型の比較検討を行った。なお、本研究は社団法人日本水産資源保護協会の養殖衛生管理技術開発研究事業で行った。

### 材料及び方法

#### 1 確定診断と簡易判別法の検証

本センターにおいて魚病検査を行ったブリとカンパチを供試魚とした。病魚の外観症状は、病変の著しい尾柄部周辺及び眼球、体表、鰭等を、内部症状は、心臓、脾臓、腎臓、肝臓、脳について肉眼で観察した。

細菌の観察は、病魚の脳、腎臓、病変部の組織をスライドガラスに塗抹し、火炎固定した後、メチレンブルー染色し、生物顕微鏡1,000倍で検鏡し、連鎖状の球菌を確

認した。また、数検体については、走査型電子顕微鏡により形態を観察した。

細菌培養は、病魚の脳、腎臓、病変部の組織を、NaCl 1.25%に調整したハートインフュージョン寒天培地上に塗抹し、ニクロム耳で画線または、滅菌生理食塩水で組織をコンラージし、37℃で約24時間培養し、発育状況を確認した。発育したコロニーはバイオラッド社PASTOR EX STREPを用い、ランスフィールド血清型でC型の凝集反応がみられたものを本症とし、C型の凝集がみられず *L. garviae* 抗血清に凝集したものを、従来型レンサ球菌症と確定した。

簡易判別法については、上記によって確定した類似2種の疾病に対し、主な特徴である、眼球症状、尾柄部の異常、心外膜炎の出現率、腎臓・脳の細菌検出率について、それぞれの項目を比較し、フィッシャーの直接確率計算法により有意差を求めて評価した。

## 2 発生状況とワクチン投与尾数

本センターの魚病診断件数から発生状況を把握した。また、ワクチンの投与尾数については、本センターが発行したワクチン使用指導書を集計した。

## 3 薬剤感受性試験と投薬量

2002年から2006年に分離された、*S. dysgalactiae*196菌株を供試菌株とした。抗生物質はエリスロマイシン(EM;SIGMA)・リンコマイシン(LCM;住友製薬)・アンピシリン(ABPC;Wako)・フロルフェニコール(FF;Wako)・オキシテトラサイクリン(OTC;Wako)・カナマイシン(KM;Wako)の6薬剤を使用し、最小発育阻止濃度(MIC)測定した。MICの測定は日本化学療法学会(1981)に準じ、寒天平板希釈法によって行なった。

また、本県の推定投薬量については、県水産振興課がアンケートを実施し、社団法人日本水産資源保護協会がとりまとめた魚病被害・水産用医薬品使用状況調査結果を集計した。

## 4 病原菌株の遺伝子多型比較

### (パルスフィールド電気泳動法改変版試験)

供試菌株は、本センター保有菌株と国内の水産研究機関から入手した菌株を含めて供試した。本試験においてはATTO社のGENOFIELDを用いてバイアス正弦電場ゲル電気泳動を行った。制限酵素による処理条件は、*Sma* Iが30℃、*Apa* Iが37℃で、両方とも8時間処理を行い、共に12℃、19時間の条件で泳動した。*Sma*I処理時の泳動条件は、電圧DC48V、AC300VでAC周波数設定値

はSTART:5mHz、END: 160mHzであり、*Apa*I処理時の泳動条件は、電圧DC48V、AC300VでAC周波数設定値はSTART:5mHz、END: 260mHzであった。

## 結果

### 1 確定診断と簡易判別法の検証

ブリ、カンパチともに病魚は尾鰭の発赤と尾柄部の潰瘍が顕著で、その部位を解剖すると容易に病巣を確認できた。また、希に胸鰭や背鰭の基部に潰瘍を形成するものもみられた。その他の部位については外観上目立った症状はみられなかった。なお、カンパチ病魚を図1～3に示した。また、病変部から分離培養した本症原因細菌(*S. dysgalactiae*)を図4に、対照の従来型レンサ球菌原因菌(*L. garviae*)を図5に示した。*S. dysgalactiae*は、直径約4μmのほぼ真円形であったが、*L. garviae*は長径が約6μm、短径が約4μmの紡錘形で、長径側に連鎖し、高倍率では両者の違いを顕著に観察できた。

生物顕微鏡1,000倍の検鏡では、単体において両者の違いを明確にはできなかったが、*L. garviae*が、2連鎖の菌体で散在しているのに対し、*S. dysgalactiae*は10個以上が連なる菌体が多く見られた。

なお、本症原因細菌は図6に示したようにランスフィールド血清型の判別試験でC型に凝集反応を示した。これに対し、従来型レンサ球菌原因細菌はC型の凝集反応はみられなかった。

類似2種の疾病を迅速で簡易に判別する方法を見出すために、本症と確定したブリ、カンパチ病魚171尾と、従来型レンサ球菌症と確定したブリ、カンパチ病魚107尾について症状、組織内の細菌観察結果について比較検討した。病魚の特徴である、眼球異常、尾柄部潰瘍、脳内細菌の出現率に対して、それぞれ1%未満の危険率で、本症と従来型レンサ球菌症の両者に有意差がみられた(図7)。つまり、本症は従来型レンサ球菌症と比較して、眼球と脳の病変の出現率が低い反面、尾柄部の病変の出現率が高かった。



図1 カンパチ病魚



図2カンパチ病魚尾柄部拡大 図3 同左解剖

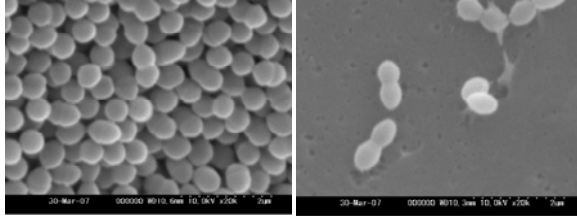


図4 *S. dysgalactiae* 図5 *L. garviae*  
(走査型電子顕微鏡20,000倍)

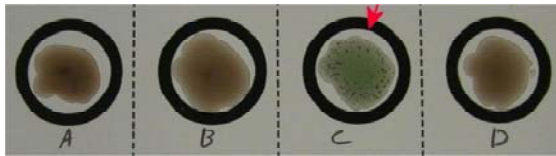


図6 ランスフィールド血清型試験

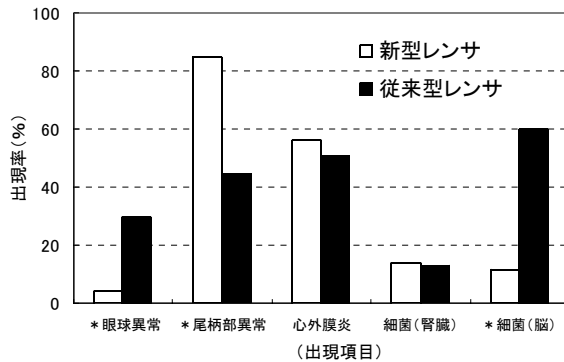


図7 症状と組織観察による細菌の出現率 (\*P<0.01)

## 2 発生状況とワクチン投与尾数

### 1) 発生地区

2009年12月末までに、鹿児島県周辺で本症を確認した場所は図8のとおりであった。

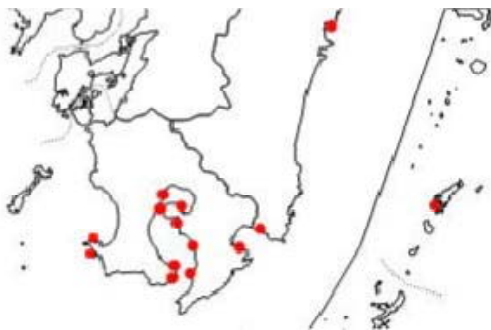


図8 新型レンサ球菌症発生確認場所

### 2) 診断件数とワクチン投与尾数

本症の診断件数は、高水温期の夏場に集中した。また、対照の従来型レンサ球菌症の診断件数は本症と比較すると、通年みられ、季節による変化は少なかった(図9, 図10)。

従来型レンサ球菌症の診断件数は1995年~1998年にかけて激減し、1998年~2001年まではほぼ横ばいから微増傾向であったが、ワクチンの投与尾数が大幅に増加した2002年以降はさらに減少した。ただし、2003年以降は本症の診断件数が加算されたため、レンサ球菌症全体としては2003年に比べ微増し、2003年以降は横ばい状態で推移した。(図11)

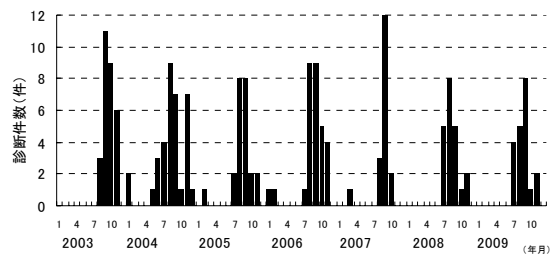


図9 新型レンサ球菌症診断件数

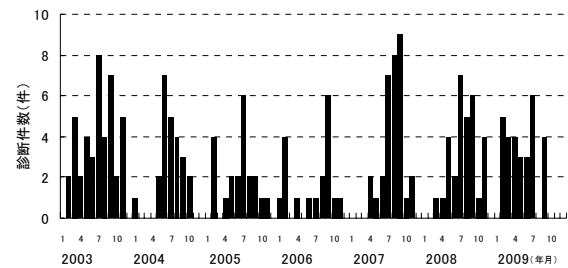


図10 従来型レンサ球菌症診断件数

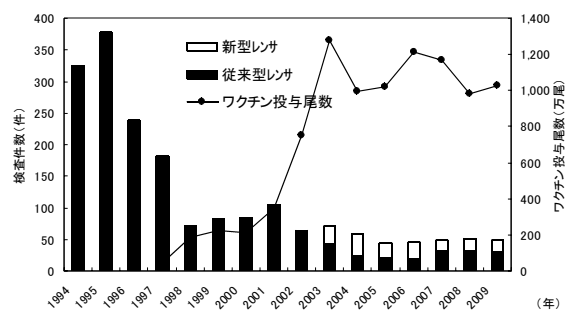


図11 レンサ球菌症診断件数とワクチン投与尾数

### 3 薬剤感受性試験と投薬量

2002年から2006年に分離された、*S. dysgalactiae* 196菌株を供試菌株とした薬剤感受性試験結果(MIC測定結果)を年度ごとに示した。(表1~3)

EMは全ての菌株が0.025~0.4 μg/mlで、ABPCは全

菌株が0.025  $\mu\text{g/ml}$ 以下であった。LCMは多くの菌株が0.025~0.4  $\mu\text{g/ml}$ であったが、06年に分離された2菌株においては、25  $\mu\text{g/ml}$ という高い値を示した。OTCは多くの菌株が25  $\mu\text{g/ml}$ か50  $\mu\text{g/ml}$ という高い値を示し、FFは、1.6~6.4  $\mu\text{g/ml}$ であった。またKMは、12.5  $\mu\text{g/ml}$ 付近であった。

なお、本症原因細菌に対し感受性が高い、エリスロマイシン製剤(EM)、アンピシリン製剤(ABPC)、リンコマイシン製剤(LCM)の投薬量は、2000年~2002年にかけて減少していたが、本症の発症が確認されはじめた2003年以降に増加に転じていた。(図12)

表1 02年~04年分離 *S. dysgalactiae* 株のMIC値

2002~2004年	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )												
	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	12.5	25	50	100
EM		15	56	12									
LCM			17	64	2								
OTC				2	1			8			17	55	
ABPC	83												
FF							42	41					
KM								6	5	62	8	2	

表2 05年分離 *S. dysgalactiae* 株のMIC値

2005年	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )												
	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	12.5	25	50	100
EM	5	15	39	17									
LCM			14	62									
OTC							4	1		3	48	2	
ABPC	76												
FF							4	36					
KM								5	11	59	1		

表3 06年分離 *S. dysgalactiae* 株のMIC値

2006年	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )												
	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	12.5	25	50	100
EM	1	12	19	3	2								
LCM			1	29	5							2	
OTC							5	4	1	4	3	2	
ABPC	37												
FF							14	21	2				
KM								3	5	28	1		

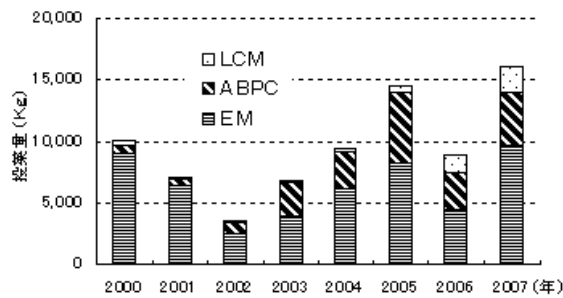


図12 県内養殖ブリ類への抗生物質使用量

#### 4 病原菌株の遺伝子解析

##### (パルスフィールド電気泳動法改変版試験)

図13に *Sma*I制限酵素処理後の一部の電気泳動画像を示した。レーンNo1~13は国内カンパチ由来、No14は国内ブリ由来、No15~18は台湾のボラ由来で、魚種ごとにそれぞれバンドパターンが異なった。95菌株について解析を行うと、S1型~S8型の8種類に分類された。

図14に *Apa*I制限酵素処理後の一部の電気泳動画像を示した。 *Sma*I制限酵素処理後の電気泳動画像と同様で、レーンNo1~13は国内カンパチ由来、No14は国内ブリ由来、No15~18は台湾のボラ由来で、魚種ごとにそれぞれバンドパターンが異なった。 *Sma*Iでは95菌株が8種類に分類されたが、 *Apa*Iで122菌株について解析を行うと、A1型~A20型の20種類に分類され、 *Sma*Iでは分類できない遺伝型を *Apa*Iでは分類できた。

表4に *Sma*I制限酵素処理後の結果を地域別で示した。S1型が95株中82株で多く存在したが、本県奄美地区は3株全てがS7型で、台湾の菌株は4株全てがS8型に分類され、両者とも他の地域に存在しない型であった。

表5に *Apa*I制限酵素処理後の結果を地域別で示した。本県大隅地区ではA1型が29株中に20株と多いのに対し、A県ではA4型が21株中20株と多く、地域により傾向が異なった。また、本県薩摩地区でもA1型が多いが、A2型~A8型まで多くの型が存在した。さらに、台湾の菌株はA17型~A20型に分類され、国内に存在しない型であった。

- 1; 12-06
- 2; KN05701
- 3; KN05702
- 4; KN060101
- 5; KN060102
- 6; KU06201
- 7; KU06601
- 8; KN06701
- 9; KN06702
- 10; KN06703
- 11; Kdys0603
- 12; Kdys0604
- 13; Kdys0605
- 14; Kdys0606
- 15; 94377
- 16; 94414
- 17; 94455
- 18; 94485

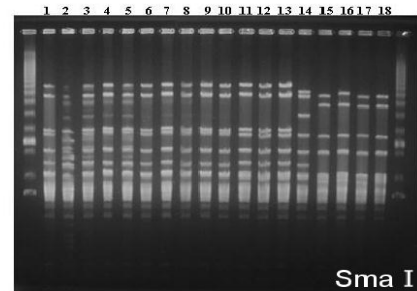


図13 *Sma*I制限酵素処理後の電気泳動画像

- 1; 12-06
- 2; KN05701
- 3; KN05702
- 4; KN060101
- 5; KN060102
- 6; KU06201
- 7; KU06601
- 8; KN06701
- 9; KN06702
- 10; KN06703
- 11; Kdys0603
- 12; Kdys0604
- 13; Kdys0605
- 14; Kdys0606
- 15; 94377
- 16; 94414
- 17; 94455
- 18; 94485

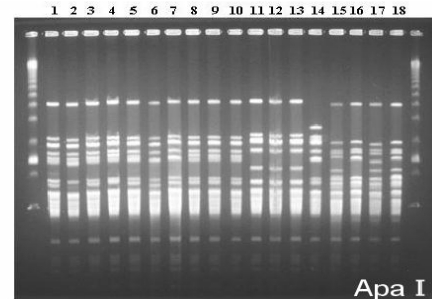


図14 *Apa*I制限酵素処理後の電気泳動画像

表4 Sma Iの地域別遺伝子多型パターン

	大隅	薩摩	奄美	A県	B県	C県	D県	台湾	合計
S1	21	25		22	7	6	1		82
S2					1				1
S3					2				2
S4				1					1
S5					1				1
S6	1								1
S7			3						3
S8								4	4
合計	22	25	3	23	11	6	1	4	95

表5 Apa Iの地域別遺伝子多型パターン

	大隅	薩摩	奄美	A県	B県	C県	D県	台湾	合計
A1	20	18	1		3	5			47
A2		8		1		1	1		11
A3		7							7
A4		1		20	2				23
A5	2	2			1				5
A6		7							7
A7		1	3						4
A8		1							1
A9	1								1
A10	3								3
A11	1								1
A12					1				1
A13					2				2
A14					2				2
A15	2								2
A16					1				1
A17								1	1
A18								1	1
A19								1	1
A20								1	1
合計	29	45	4	21	12	6	1	4	122

## 考 察

### 1 診断と診断方法の検証

養殖現場における魚病診断は外観症状に頼るところが多いため、養殖業者は本症と従来型レンサ球菌症を混同し、従来型レンサ球菌症用のワクチン効果や投薬効果について誤解が生ずる危険性があることを指摘されてきたが、今回の結果から、病魚に眼球の異常がなく、尾柄部の潰瘍が顕著で、脳組織から原因細菌の確認が困難な個体が多くみられる場合は本症の可能性が高く、この基準は養殖現場での一次診断として応用できるものと思われる。ただし、診断精度を担保するには、検査機関等において、病魚から分離培養された細菌がランスフィールドのC型抗血清に凝集すること等で本症であることを定期的に確認する必要があると思われる。

### 2 発生状況とワクチン投与尾数

2004年度以降、鹿児島県内において本症が新たに確認された地区はみられなかったが、診断件数は減少していないことから、養殖現場での被害は現在も続いている

と考えられる。

従来型レンサ球菌症の診断件数は、ワクチンの普及と同時に減少していることから、これについてのワクチンは有効であり、今後も再興を妨ぐことや、本症との判別のためにもワクチンの投与は継続すべきと思われる。

### 3 薬剤感受性試験と投薬量

薬剤感受性試験において、本症原因細菌には、EM, LCM, ABPCが有効であることが分かり、現場では投薬治療によって一定の効果が得られている。しかし、投薬量の増加は薬剤耐性菌を誘発する可能性がある。2006年にはLCM耐性菌株が2例確認されていたことから、今後、本症の発生が長期化し、投薬が恒常化すれば、さらなる耐性菌の出現も考えられる。薬剤感受性や使用量については今後もモニタリングを続ける必要があろう。

### 4 病原菌株の遺伝子解析

現在、養殖場で流行している*S. dysgalactiae*魚類由来菌株間の遺伝型は多様性に富んでおり、地域的な分化の可能性も示唆されたことから、それぞれの地域に定着した菌株による感染が広がっている可能性がある。ただし、本症の病原菌の由来について考察するためには、さらなる菌株収集と遺伝子解析が必要であろう。

### 5 最後に

本症は2002年の初発から既に8年を経過したが、現在でも終息する気配はなく、養殖ブリ類に対し夏季を中心に大きな被害を出している。養殖現場では本症に対して投薬が行われ、一定の効果が得られているが、地域によっては、定着、長期化し、対策に苦慮する事例も多い。

現在、発生場所は限定的であるが、国内では、数年来、活魚移動が盛んに行われており、それに伴い病原体も伝搬される危険性も高いことから、新たな場所での発生を抑制するためには、未発生地区への病魚持ち込みを避けることが最も重要であると思われる。

本研究では、養殖ブリ・カンパチの新型レンサ球菌症(*S. dysgalactiae*感染症)の全容を明らかにし、簡易診断の方法について検証し、薬剤感受性試験により有効薬剤の検討を行う事で被害軽減に寄与したと考える。しかし、投薬量の増加や薬剤耐性菌の問題など、本症については疫学を中心としたさらなる研究と、ワクチン開発が望まれるなど、課題が残されている。

## 謝 辞

本研究を行うにあたりご協力をいただきました，  
宮崎大学農学部生物環境科学科の野本竜平さん，鵜  
之瀬直樹さんに深く感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1)宮崎大学農学部. 養殖カンパチの新興感染症(仮称:  
新型レンサ球菌症)に関する研究. 平成16年度養殖衛  
生対策技術開発研究成果報告書. 2004;169-185
- 2)野本竜平・吉田照豊. ブリ・カンパチの新しい連鎖球菌  
感染症. 月刊養殖. 2003. 12月号41
- 3)野本竜平・吉田照豊. ブリ属魚類の新型連鎖球菌症に  
ついて. 月刊アクアネット. 2004. 6月号52-55
- 4)R Nomoto, L I Munasinghe, D-H Jin, Y Shimahara,  
H Yasuda, A Nakamura, N Misawa, T Itami and T  
Yoshida. Lancefield group C *Streptococcus dysgalact-*  
*iae* infection responsible for fish mortalities in Japan.  
Journal of Fish Diseases. 2004. 27,679-686
- 5)R Nomoto, N Unose, Y Shimahara, A Nakamura, T  
Hirae, K Maebuchi, S Harada, N Misawa, T Itami, H  
Kagawa, T Yoshida. Characterization of Lancefield  
group C *Streptococcus dysgalactiae* isolated from  
farmed fish. Journal of Fish Diseases. 2006. 29, 673-  
682
- 6)鹿児島県水産技術開発センター. 養殖カンパチの新  
興感染症(仮称:新型レンサ球菌症)に関する研究. 平  
成16年度養殖衛生対策技術開発研究成果報告書.  
2004;189-198
- 7)鹿児島県水産技術開発センター. 養殖カンパチの新  
興感染症(仮称:新型レンサ球菌症)に関する研究. 平  
成17年度養殖衛生対策技術開発研究成果報告書.  
2005;145-154