

日本における海水魚の細菌性疾病とワクチン開発の現状

高橋幸則^{1†}, 福田耕平², 近藤昌和¹, 安本信哉¹, 廣野育生³, 青木 宙³

Bacterial Diseases of Marine Fish and Development of Vaccine in Japan

Yukinori Takahashi^{1†}, Kohei Fukuda², Masakazu Kondo¹, Shinya Yasumoto¹, Ikuo Hirono³ and Takashi Aoki³

Abstract : In Japan, mass mortalities of cultured marine fish due to bacterial diseases have been often reported. Among diseases caused by Gram-positive bacteria, *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail, amberjack, jack mackerel and striped jack, *Streptococcus iniae* infection in yellowtail, Japanese flounder and filefish, *S. parauberis* infection in Japanese flounder, *Nocardia seriolae* infection in yellowtail. Among diseases caused by Gram-negative bacteria, *Edwardsiella tarda* infection in Japanese flounder and red sea bream, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* infection in yellowtail, red sea bream, striped jack and Japanese flounder, *Tenacibaculum maritimum* infection in Japanese flounder, red sea bream and striped jack, *Vibrio* spp. infection in various marine fishes cause serious damages every year. A commercially available *L. garvieae* and *V. anguillarum* vaccine is used in yellowtail and amberjack by oral administration or injection. *S. iniae* vaccine is used in Japanese flounder by injection. Recently, oil-based bivalent vaccine against *P. damsela* and *L. garvieae* infection was developed in yellowtail and amberjack. We have developed pentavalent vaccine against streptococciosis and edwardsiellosis in Japanese flounder. Efficacy of pentavalent vaccine with formalin-killed *S. parauberis* (serotype I and II strain), *S. iniae* and *E. tarda* (motile and non-motile strain) were tested by vaccination followed by intramuscular challenge with the each pathogen. The Japanese flounder vaccinated with pentavalent vaccine showed higher resistance against the each pathogen on two weeks post-vaccination. These results revealed that pentavalent vaccine was effective in prevention against streptococciosis and edwardsiellosis in cultured Japanese flounder.

Key words : bacterial diseases, marine fish, vaccine, *Streptococcus parauberis*, *Edwardsiella tarda*

緒 言

日本における海水魚の養殖漁業は、1954年頃に開発された生簀網によるブリ (*Seriola quinqueradiata*) の養殖技術の普及とともに著しく発展した¹⁾。しかし、養殖漁業の発展に伴ってウイルス、細菌および寄生虫による疾病が発生し、大きな経済的被害をもたらしてきた^{2,3)}。とくに、ラクトコッカス症 (α 溶血性レンサ球菌症) をはじめとす

る細菌性疾病の被害が甚大であったことから、これらの疾病に対するワクチンの開発研究が急速に進展するに至った。

ここでは、日本の養殖海水魚に大量死をもたらした主要な細菌性疾病と、ワクチン開発の現状について述べるとともに、最近多発して問題となっているヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) のレンサ球菌症およびエドワジエラ症に対する5価ワクチンの開発の現状について解説する。

2011年7月15日受付. Received July 15, 2011.

¹水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University)

²水産大学校生物生産学科研究生 (Research student, Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University)

³東京海洋大学大学院 (Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, Minato, Tokyo 108-8477)

[†]別刷り請求先 (corresponding author) : takahasy@fish-u.ac.jp

海水魚の主要な細菌性疾病

最近における海水魚の養殖生産量をTable 1に示した。ブリ類（ブリ，カンパチ：*Seriola dumerili*，ヒラマサ：*Seriola lalandi*）がおよそ16万トンと，もっとも多く，次いでマダイ（*Pagrus major*）が7万トン，ギンザケ（*Oncorhynchus kisutch*）が1.3万トンおよびヒラメが4千トンであり，海水魚の合計生産量は，およそ26万トンである⁴⁾。このうち，マダイとヒラメは，1990年代になってから生産量が増加し，近年においてはブリ類のなかでもカンパチの生産量が著しく増大している⁵⁾。

海水魚の主要な細菌性疾病をTable 2に示した。海水魚

の細菌性疾病は，海面養殖漁業の発展とともに，その種類と発生頻度が増加し，長年にわたって大きな経済的被害をもたらしている。1970年代から90年代に甚大な被害をもたらした*Lactococcus garvieae*によるブリのラクトコッカス症（ α 溶血性レンサ球菌症³⁾）は，ワクチン未接種の魚には依然として発生しているものの，後述するワクチンの普及によって被害が減少しつつある。本症に代って問題となっているブリ類の疾病は，*Streptococcus dysgalactiae*による新型レンサ球菌症⁶⁾，ノカルジア症，ミコバクテリウム症および類結節症である³⁾。また，ギンザケには*Renibacterium salmoninarum*による細菌性腎臓病が発生し，大きな被害をもたらしている³⁾。一方，マダイにおいては，養殖が本

Table 1. Production of cultured marine fish in Japan in 2008

Fish	Scientific name	Production (ton)
Yellowtail	<i>Seriola quinqueradiata</i>	155,108
Red sea bream	<i>Pagrus major</i>	71,588
Coho salmon	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	12,809
Japanese flounder	<i>Paralichthys olivaceus</i>	4,164
Others		17,331
Total		261,000

Table 2. Bacterial diseases of cultured marine fish in Japan

Diseases	Causative bacteria	Host fish
Lactococciosis	<i>Lactococcus garvieae</i>	Yellowtail, Amberjack, Jack mackerel, Striped jack
Streptococciosis	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Yellowtail, Amberjack
Streptococciosis	<i>S. iniae</i>	Yellowtail, Japanese flounder, Filefish
Streptococciosis	<i>S. parauberis</i>	Japanese flounder
Nocardiosis	<i>Nocardia seriolae</i>	Yellowtail, Amberjack, Striped jack, Japanese flounder
Mycobacterium infection	<i>Mycobacterium</i> sp.	Yellowtail
Bacterial kidney disease	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	Coho salmon
Vibriosis	<i>Vibrio</i> spp.	Yellowtail, Amberjack, Jack mackerel, Red sea bream
Pseudotuberculosis (Pasteurellosis)	<i>Photobacterium damsella</i> subsp. <i>piscicida</i>	Yellowtail, Striped jack, Red sea bream, Japanese flounder, Filefish
Edwardsiellosis	<i>Edwardsiella tarda</i>	Red sea bream, Japanese flounder
Glinding bacterial disease	<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Striped jack, Red sea bream, Black sea bream, Japanese flounder, Filefish

格化しはじめた70年代からのピブリオ病と、80年代からのエドワジエラ症が現在においても発生しているほか、最近ではこれらの疾病に加えて、滑走細菌症の発生が比較的多い³⁾。80年代以降に急激に発展したヒラメ養殖においては、*Edwardsiella tarda*によるエドワジエラ症と*S. iniae*によるレンサ球菌症による被害が大きかったが、レンサ球菌症に対して後述のワクチンが開発されたことによって、最近では*S. parauberis*による新型のレンサ球菌症とエドワジエラ症および滑走細菌症が多発している^{3,7-9)}。

認可された細菌病ワクチン

国の承認を受け、市販されている海水魚の細菌病ワクチンの種類と使用方法をTable 3に示した¹⁰⁾。70年代から大きな経済的被害をもたらしてきたブリ類のラクトコッカス症（ α 溶血性レンサ球菌症）に対するワクチンが最も普及している。このワクチンは、本症の原因菌である*L. garvieae*のホルマリン不活化菌体であり、飼料に混合して経口投与するタイプと腹腔内に注射するワクチンの2種類がある。ブリのピブリオ病に対するワクチンは、*Vibrio anguillarum*

J-0-3型のホルマリン不活化菌体であり、ワクチンを混合した海水中にブリの稚魚を浸漬する方法によって用いる。また、この*V. anguillarum* J-0-3型と*L. garvieae*のホルマリン不活化菌体を混合した腹腔内注射法による2種混合ワクチンも存在する。最近、ブリのラクトコッカス症と類結節症に対する2種混合のオイルアジュバントを含む注射法ワクチンが、わが国では初めて認可された。そのほか、ブリ類のワクチンとしては、ラクトコッカス症、ピブリオ病およびイリドウイルス病に対する3種混合の注射法ワクチンやラクトコッカス症とイリドウイルス病に対する2種混合注射法ワクチンが用いられている。また、2005年にヒラメでは初めてのレンサ球菌症に対するワクチンが認可された。このワクチンは原因菌である*S. iniae*のホルマリン不活化菌体であり、腹腔内注射法によって用いる。

ヒラメの細菌病に対する5価ワクチンの開発

前項で述べたように、ブリ類の細菌性疾病に対しては、いくつかのワクチンが開発され、普及していることから、被害が減少しつつある。しかし、ヒラメ養殖においては、

Table 3. Trade vaccine for bacterial diseases of cultured marine fish in Japan

Target diseases	Target fish	Antigen	Use
Lactococcosis	Yellowtail, Amberjack	<i>Lactococcus garvieae</i>	Oral
Lactococcosis	Yellowtail, Amberjack	<i>L. garvieae</i>	Intraabdominal injection
Vibriosis	Yellowtail	<i>Vibrio anguillarum</i>	Immersion
Lactococcosis and Vibriosis	Yellowtail, Amberjack	<i>L. garvieae</i> and <i>V. anguillarum</i> (bivalence)	Intraabdominal injection
Lactococcosis and Pseudotuberculosis	Yellowtail	<i>L. garvieae</i> and <i>Photobacterium damsella</i> subsp. <i>piscicida</i> (bivalence) with oil adjuvant	Intraabdominal injection
Streptococcosis	Japanese flounder	<i>Streptococcus iniae</i>	Intraabdominal injection
Lactococcosis, Vibriosis and Iridovirus disease	Yellowtail, Amberjack	<i>L. garvieae</i> , <i>V. anguillarum</i> and <i>iridovirus</i> (trivalence)	Intraabdominal injection
Lactococcosis, Vibriosis and Iridovirus disease	Yellowtail, Amberjack	<i>L. garvieae</i> and <i>iridovirus</i> (bivalence)	Intraabdominal injection

S. parauberis, *S. iniae*によるレンサ球菌症および*E. tarda*によるエドワジエラ症が発生し, 問題となっている。このうち, *S. iniae*感染症に対しては, ワクチンが認可されたのちに発生が少なくなっているが, *S. parauberis*と*E. tarda*感染症については, ワクチンなどの予防法および使用可能な抗菌性物質がなく, 大きな経済的被害をもたらしている⁷⁾。

そこで, 著者らは*S. parauberis*の血清 I・II型株⁹⁾, *E. tarda*の定型・非定型株および*S. iniae*のホルマリン不活化菌体を混合した5価ワクチンを作製し, その有効性とヒラメの免疫機能に及ぼす作用を抗原(供試菌株)別に調べた。

ヒラメ病魚由来の*S. parauberis* SP-1(血清 I型), TK-1(血清 II型), *S. iniae* FI-1および*E. tarda* UH-6(定型)とマダイ病魚由来の*E. tarda* UT-1(非定型)の各菌株をトリプトソーヤブイオン培地で培養後, ホルマリンで不活化したのち, 各株の菌数が $1.0\sim 3.0\times 10^{10}$ cfu/mlとなるように調整後混合し, 5価ワクチンとした。平均体重30gのヒラメに本ワクチンの0.1 mlずつを筋肉内接種したのち, その14日後にワクチン供試株とは異なる*S. parauberis* AK-1(血清 I型), SA-1(血清 II型), *S.*

iniae BS-1および*E. tarda* ME-2(定型)などの菌株によって攻撃し, 攻撃21日後の生残率を調べ, 有効性を評価した。また, 上記のワクチン株の単独および混合のワクチンを接種した14日後のヒラメについて, 攻撃菌株に対する血清中の凝集抗体価, 好中球と単球の貪食および殺菌活性を調べた。

5価ワクチンを接種したヒラメにおける攻撃後の生残率および有効率をTable 4に示した。*S. parauberis* I, II型, *S. iniae*および*E. tarda*定型株の生菌接種21日後の生残率は, 対照区がそれぞれ20, 35, 0, 0%であったのに対し, ワクチン区が90, 100, 95, 85%と高く, 対照区との間に有意な差がみられた。また, それらの有効率は, それぞれ87.5, 100, 95, 85%であり, 高い有効性が認められた。

ワクチンを接種したヒラメの免疫機能を調べたところ, *S. parauberis* I, II型および*S. iniae*に対しては凝集抗体価は低いものの, 好中球と単球の貪食・殺菌活性が高いことが明らかとなった。

また, *E. tarda*の定型または非定型株の単独ワクチン区および混合ワクチン区におけるヒラメの免疫機能をTable 5に示した。定型(UH-6)または非定型株(UT-1)単独

Table 4. Survival rates of inoculated Japanese flounder with pentavalent vaccine against *S. parauberis*, *S. iniae* and *E. tarda* infection 3 weeks after challenge with the causative bacteria

Challenge strains	<i>S. parauberis</i> AK-1 (serotype I)		<i>S. parauberis</i> SA-1 (serotype II)		<i>S. iniae</i> BS-1		<i>E. tarda</i> ME-2 (motile)	
	Exam.	Control	Exam.	Control	Exam.	Control	Exam.	Control
Survival ratio (%)	90**	20	100**	35	95**	0	85**	0
RSP*	87.5	—	100	—	95	—	85	—

*RSP: Relative percentage survival (%)=[1-(mortality rate of examination group/control group)] \times 100.

**Significantly higher than the control group ($p<0.01$).

Table 5. Immune defense activity of Japanese flounder 2 weeks after vaccination against edwardsiellosis

Immune defense functions against challenge strain	Used antigens in vaccines			
	UH6+UT-1*	UH-6	UT-1	Control
Agglutinin antibody titre (1:GM)**	4,096***	1,176	776	0.1
Neutrophil				
Phagocytic index	168.0 \pm 21.43**	45.7 \pm 11.52	47.0 \pm 15.43	25.1 \pm 5.52
Phagocytic ratio (%)	52.5 \pm 2.40**	38.1 \pm 4.25	39.2 \pm 2.38	31.4 \pm 4.81
Number of the phagocytized bacteria per cell	3.2 \pm 0.33**	1.2 \pm 0.40	1.2 \pm 0.38	0.8 \pm 0.27
Bactericidal ratio (%)	26.5 \pm 1.82**	8.2 \pm 2.91	9.0 \pm 2.05	6.5 \pm 2.02
Monocyte				
Phagocytic index	75.2 \pm 8.46	58.2 \pm 12.85	47.7 \pm 8.52	41.3 \pm 2.70
Phagocytic ratio (%)	50.1 \pm 2.07	48.5 \pm 5.13	43.4 \pm 3.56	41.3 \pm 3.11
Number of the phagocytized bacteria per cell	1.5 \pm 0.17	1.2 \pm 0.13	1.1 \pm 0.10	1.0 \pm 0.03
Bactericidal ratio (%)	10.5 \pm 1.34	9.1 \pm 1.40	7.0 \pm 0.68	7.8 \pm 0.72

*UH-6+UT-1: motile (UH-6) and non-motile (UT-1) *E. tarda*.

**GM: Geometric mean.

***Significantly higher than the other groups ($p<0.01$ or 0.05).

および混合 (UH-6+UT-1) ワクチンを接種したヒラメの血清について、攻撃菌ME-2に対する凝集抗体価を測定した結果、単独区にくらべて混合ワクチン区のそれが有意に高かった。さらに、このヒラメ血清を用いて、UH-6, UT-1, UH-6+UT-1およびME-2による交差吸収試験を行ったところ、UH-6, UT-1およびME-2は共通の抗原を有するものの、同一の血清型ではないことが明らかとなった。

ヒラメおよびウナギ (*Anguilla japonica*) に病原性を有する定型 *E. tarda* の血清型は1種類であることが知られており¹¹⁾、マダイ由来の非定型 *E. tarda* の血清型についても、定型株と一致することが報告されている¹²⁾。抗原として同じホルマリン死菌を用いたにも関わらず、異なる結果が得られた原因としては、既往の研究が吸収試験の抗血清をウサギから得ているのに対し、著者らのそれはヒラメから得たことが挙げられる。このことは、哺乳類と魚類ではリンパ球の抗原認識部位が異なることを示唆しており、興味深い。

また、このヒラメ血清を用いて、野外株に対する凝集抗体価を調べた結果、UH-6, UT-1およびUH-6+UT-1ワクチン区の幾何平均値が、それぞれ338, 194, 6208であり、全ての野外株に対して混合ワクチン区の抗体価が他区にくらべて有意に高かった。これらの結果から、攻撃株と野外株に対する凝集抗体価が混合ワクチン区において有意に高かった要因は、両株を混合することによって抗原性が広がり、かつ高まることが示唆された。

一方、白血球の活性は、UH-6+UT-1混合ワクチン区の血清でオプソニン化した場合に、混合ワクチン区の好中球における貪食率、1血球細胞あたりの取込み細菌数、貪食指数および殺菌率が著しく高く、対照区のみならず単独ワクチン区との間にも有意な差がみられた。

これまで、*E. tarda* の強毒株は白血球がもつ活性酸素産生システムを阻害して細胞内で生存しつづけるために、エドワジエラ症に対してはワクチンが無効とされてきた¹³⁻¹⁷⁾。

本研究において、混合ワクチンを接種したヒラメの人為感染症に対する生残率が高かった要因としては、定型および非定型株との混合によって抗原性が広く、かつ高まり、血清型の異なる攻撃菌にも対応可能な多量の抗体が産生され、その血清によってオプソニン化された菌を、とくに好中球が効率よく貪食、殺菌したことが考えられる。

今後、ヒラメの養殖場において臨床試験を実施し、この5価ワクチンの野外における有効性を評価する必要がある。

文 献

- 1) 村田 修：1. プリ・プリヒラ. 熊井英水 (編), 水産増養殖システム1 海水魚. 恒星社厚生閣, 東京, 1-29 (2005)
- 2) Nakajima K, Inouye K, Sorimach M : Viral diseases in cultured marine fish in Japan. *Fish Pathol*, 33, 181-188 (1998)
- 3) Kusuda R, Kawai K : Bacterial diseases of cultured marine fish in Japan. *Fish Pathol*, 33, 221-227 (1998)
- 4) 農林水産省大臣官房統計部 : 第85次農林水産省統計表 (平成21年-22年). 460-465 (2011)
- 5) 高岡 治：2. カンパチ. 熊井英水 (編), 水産増養殖システム1 海水魚. 恒星社厚生閣, 東京, 31-43 (2005)
- 6) Nomoto R, Munasinghe LI, Jin D-H, Shimahara Y, Yasuda H, Nakamura A, Misawa N, Itami T, Yoshida T : Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. *J Fish Dis*, 27, 679-686 (2004)
- 7) 金井欣也：ヒラメ レンサ球菌症. 畑井喜司雄, 小川和夫 (監), 新魚病図鑑. 緑書房, 東京, 206 (2006)
- 8) Baeck GW, Kim JH, Gomez DK, Park SC : Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju island. *J Vet Sci*, 7, 53-58 (2006)
- 9) 金井欣也, 山田美幸, 孟 飛, 高橋一郎, 長野泰三, 川上秀昌, 山下亜純, 松岡 学, 福田 穰, 三吉泰之, 高見生雄, 中野平二, 平江多積, 首藤公宏, 本間利雄：わが国の養殖ヒラメから分離された *Streptococcus parauberis* の血清型. 魚病研究, 44, 33-39 (2009)
- 10) 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課 : 水産用医薬品の使用について. 1-29 (2008)
- 11) Rasihd MM, Mekuchi T, Nakai T, Muroga K : A serological study on *Edwardsiella tarda* strains isolated from diseased Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Pathol*, 29, 277 (1994)
- 12) Andrea BC, Kanai K, Yoshikoshi K : Serological characterization of atypical strains of *Edwardsiella tarda* isolated from sea bream. *Fish Pathol*, 33, 265-274 (1998)

- 13) Ishibe K, Osatomi K, Hara K, Kanai K, Yamaguchi K, Oda T : Comparison of the responses of peritoneal macrophages from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against high virulent and low virulent strains of *Edwardsiella tarda*. *Fish Shellfish Immunol*, 24, 243-251 (2008)
- 14) Iida T, Wakabayashi H : Resistance of *Edwardsiella tarda* to opsonophagocytosis of eel neutrophils. *Fish Pathol*, 28, 191-192 (1993)
- 15) 馬久地隆幸, 清川智之, 本多数充, 中井敏博, 室賀清邦 : ヒラメにおける *Edwardsiella tarda* の感染実験. *魚病研究*, 30, 247-250 (1995)
- 16) 馬久地隆幸, 清川智之, 本多数充, 中井敏博, 室賀清邦 : ヒラメのエドワジエラ症に対する予防免疫の試み. *魚病研究*, 30, 251-256 (1995)
- 17) 金井欣也, 金丸素久, 塚原淳一郎, 一ノ瀬弘幸, 佐々木英治 : ヒラメエドワジエラ症に対する予防免疫の試み. *長崎大学水産学部研究報告*, 85, 31-34 (2004)