

ブリの *Streptococcus iniae* 感染症に関する研究

佐 古 浩

Studies on *Streptococcus iniae* Infection in Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*

Hiroshi Sako

Streptococcosis caused by β -hemolytic *Streptococcus* (BHS) is one of the serious invasive diseases in cultured yellowtail, *Seriola quinqueradiata* in Japan. BHS is distributed not only in cultured yellowtail but also in many other marine and freshwater fishes. Prevention of this disease is important for the successful culture of yellowtail. The present study was performed on BHS infection in cultured yellowtail to investigate the occurrence, etiology, and taxonomy and pathogenicity of the causative bacterium. For the purpose of establishing control measures against this disease, prophylaxis and treatment of the disease were also studied.

A BHS was frequently isolated from the brain of cultured yellowtail juveniles showing vertebral deformity. Morbidities were 10 to 20% in the case examined. A BHS was also isolated from deformed wild yellowtail and common mackerel, *Scomber japonicus*. Results of these surveys suggested that BHS is related to vertebral deformity of yellowtail and distributed also in other cultured and wild fishes.

Comparative taxonomical studies were performed over a total of 14 BHS strains isolated from diseased cultured yellowtail, Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, ayu, *Plecoglossus altivelis*, and wild common mackerel, with strains of *Streptococcus iniae* ATCC 29178, ATCC 29177 and *S. equisimilis* IID 681. The phenotypic properties of the fish isolates well agreed with each other, and were identical to those of *S. iniae* ATCC 29178, which was isolated from Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. The surface antigens of the *S. iniae* isolates from different sources of fish were shown to be serologically homologous, whereas the serotype of the fish isolates was different from that of *S. iniae* ATCC 29178.

Occasional death was observed with *S. iniae* isolates although it frequently caused vertebral deformity to yellowtail by artificial infection through various challenge routes. Clinical symptoms such as exophthalmos, corneal opacity, epicarditis, and congestion on the inside of the opercula and upper jaw were observed in artificially infected yellowtail. Sensitivity to *S. iniae* infection decreased with the increase of body weight. All the strains isolated from cultured marine and freshwater fish, and wild fish possessed the same pathogenicity to yellowtail and ayu. These results indicate that the distribution of BHS in marine and freshwater environment is ubiquitous and they are the same strains as *S. iniae*. Considering the salt tolerance of *S. iniae*, reported, *S. iniae* might have originated from terrestrial animals. Viable counts of *S. iniae* in the brain of yellowtail inoculated with the bacteria increased faster and period required for the occurrence of vertebral deformity after the inoculation of bacteria became shorter as the water temperature increased at 18-30°C. The fate of *S. iniae* in various organs of yellowtail after experimental infection indicates that the growth of the bacteria and subsequent infection in the brain is the cause of the occurrence of vertebral deformity. *S. iniae* isolated from yellowtail have been confirmed to be pathogenic to mice by intraperitoneal injection.

Immunity of yellowtail recovered from experimental infection with *S. iniae* was examined to know the efficacy of vaccination as a possible way of prevention. The agglutinating antibody titers in the

sera isolated from recovered fish against the *S. iniae* were 1:4–1:16. After re-infecting the recovered fish, no clear symptom was observed, furthermore number of viable bacteria in the blood, spleen, and kidney were decreased faster than those of the control fish. Moreover, increase in viable bacterial cell number was not observed in the brain of the recovered fish. Results of this experiment indicate that fish recovered from *S. iniae* infection acquired resistance to subsequent re-infection. To know the efficacy of vaccination, formalin killed cells (FKC) of *S. iniae* were administered to yellowtail fingerling by immersion, oral, and intraperitoneal injection methods. Twenty and 35 days after vaccination, each group was challenged by intraperitoneal inoculation of the bacteria. At this time, agglutinating antibody titers were undetectable (< 1:2) in the sera of fishes vaccinated by immersion and oral methods, whereas in those vaccinated by injection the titers were barely detectable (< 1:2–1:8). After the challenge, fishes vaccinated by injection showed neither clinical signs of the disease nor they died. Furthermore, bacterial cell numbers decreased rapidly in the blood, spleen, and kidney whereas the numbers remained static in the brain. On the other hand immersion and oral vaccination were ineffective, showing typical clinical signs of the disease. Results of this experiment indicate that vaccination by injection method is the best among three different administration routes in preventing *S. iniae* infection in cultured yellowtail. Passive immunization using the sera isolated from the fish recovered from *S. iniae* infection and the fish immunized with FKC of *S. iniae* were also effective in preventing to *S. iniae* infection.

The *in vitro* activities of 36 antimicrobial agents were tested against 15 strains of *S. iniae* isolated from diseased fishes by the standard agar plate dilution method. Penicillins, cephalosporines, macrolides, tetracyclines, rifampicin, lincomycin, sodium nifurstyrenate, and diaminopyrimidines were highly effective (MIC, 0.00313–0.78 µg/ml) against all the strains tested. Chloramphenicols and bacitracin were also effective (MIC, 0.78–3.13 µg/ml). Susceptibility of *S. iniae* to penicillins, cephalosporines, rifampicin, bacitracin, sodium nifurstyrenate, and diaminopyrimidines was higher than that of *Enterococcus seriolicida*. *In vivo* therapeutic effects of selected 12 drugs, to which *S. iniae* is highly susceptible, were also observed in experimentally infected yellowtail. Among the 12 selected drugs, penicillins, macrolides, tetracyclines, rifampicin, lincomycin and sodium nifurstyrenate were found to be effective against *S. iniae* infection.

Key words: streptococciosis, *Streptococcus iniae*, yellowtail, vertebral deformity, pathogenicity, vaccination, chemotherapy

目 次			
緒 言	65	第 3 節 本菌接種後の推移と症状の発現	92
第 1 章 発生および被害状況	67	第 4 節 マウスに対する病原性	97
第 1 節 発生例	67	第 4 章 ワクチンに関する研究	99
第 2 節 被害状況	73	第 1 節 感染耐過魚の獲得免疫に関する検討	99
第 2 章 原因菌の分類学的研究	74	第 2 節 不活化ワクチンの有効性	101
第 3 章 原因菌の病原性に関する研究	82	第 3 節 受動免疫による有効性	105
第 1 節 各種感染法による病原性の比較	83	第 5 章 化学療法に関する研究	107
第 2 節 飼育水温による病原性の比較	91	第 1 節 原因菌の薬剤感受性	107
		第 2 節 薬剤による治療効果	113
		第 6 章 総 括	115

謝	辞	117
文	献	117

緒 言

ブリ *Seriola quinqueradiata* の養殖が開始された当初はいくつかの細菌性疾病 (楠田 1965), 寄生虫症 (保科 1966), 餌料性疾病 (岡 1967) が知られる程度であった。しかし, ブリ養殖の発展に伴って各種の疾病が多発, 多様化するようになり, 養殖業の健全な振興を図るうえでの大きな障害となってきた (Matsusato 1984, 楠田 1990, Kusuda and Salati 1993)。1992年のブリ養殖における疾病による推定被害額は89億円にのぼり, 生産額の6.8%に達している (水産庁研究部研究課 1994)。養殖ブリの主な疾病としては, ウイルス性疾病では腹水症, イリドウイルス感染症, 細菌性疾病では連鎖球菌症, 類結節症, ビブリオ病, ノカルジア症, 細菌性溶血性黄疸, 寄生虫症ではベネデニア症, ヘテラキシネ症などが知られている。これらのうち, 連鎖球菌症の被害額は, わが国の養殖魚のなかで最も大きく, 1992年にはブリの推定被害額の59%を占める53億円にのぼる被害が発生している。

養殖ブリの連鎖球菌症の原因菌としては, わが国ではこれまでに *Enterococcus seriolicida* (楠田他 1976, Kusuda *et al.* 1991), β 溶血性の連鎖球菌 (見奈美他 1979, 界外他 1984), 非溶血性の連鎖球菌 (飯田他 1986) の3種類の菌が報告されている。*E. seriolicida* による感染症については, 楠田他 (1976) によって最初に記載された。楠田らは, 1974年に高知県の養殖場の2年魚および1年魚に初めて発生した眼球の突出と鰓蓋の内側の発赤を主徴とする病魚から, 原因菌を分離した。そして, この分離菌は *Streptococcus faecalis* および *S. faecium* に類似しているが, いずれとも異なる新種であるとして報告された。その後は種名が提案されないまま, *Streptococcus sp.* とされるにとどまった。のちに, *S. faecalis* および *S. faecium* を *Streptococcus* 属から独立させ, 新属の *Enterococcus* (腸球菌) 属に移す提案がなされた (Schleifer and Kilpper-

Balz 1984)。この *Enterococcus* 属の新設にともない, ブリの病原性 *Streptococcus sp.* は *Enterococcus* 属のほかのどの菌種とも異なっていることから, Kusuda *et al.* (1991) によって新種名 *E. seriolicida* が提案され, *E. seriolicida* の感染症を腸球菌症 (enterococcal infection) と呼ぶことが提起された。しかし, 歴史的経緯から連鎖球菌症の呼称も引き続き使われている。さらに, 最近では *E. seriolicida* は *Lactococcus garvieae* のジュニア・シノニムであることが報告されている (Eldar *et al.* 1996, Teixeira *et al.* 1996)。なお, 本研究においては, 楠田他 (1976) の報告したブリの連鎖球菌症原因菌 *Streptococcus sp.* は *E. seriolicida* と, その感染症は腸球菌症と呼ぶこととした。いっぽう, β 型の溶血性を示す連鎖球菌による感染症については, 見奈美他 (1979) によって最初に報告された。見奈美他は, 1976年に和歌山県の養殖場のブリ稚魚の眼球の白濁と心外膜炎を主徴とする病魚から, β 溶血性連鎖球菌を初めて分離した。その後, 界外他 (1984) によって, 三重県において発生したブリ稚魚の変形症の原因が, β 溶血性連鎖球菌の感染によることが報告されている。また, 飯田他 (1986) は, 静岡県浜名湖内で養殖されていたブリの脊椎変形魚の脳から, 非溶血性の連鎖球菌を分離している。

本研究は養殖ブリの β 溶血性連鎖球菌による感染症の防除を目的として行ったものである。 β 溶血性連鎖球菌による養殖魚類の感染症は, ブリのほかにも, 海水魚ではイシダイ *Oplegnathus fasciatus*, アイゴ *Siganus fuscescens*, メジナ *Girella punctata*, ヒラメ *Paralichthys olivaceus*, ウスバハギ *Aluterus monoceros* (小川他 1982b), クロソイ *Sebastes schlegeli* (酒井他 1986), ギンザケ *Oncorhynchus kisutch* (厚田他 1990) など, 淡水魚ではテラピア *Tilapia nilotica*, ニジマス *O. mykiss*, アユ *Plecoglossus altivelis* (Kitao *et al.* 1981, 大西・城 1981, 宇賀神 1981), アマゴ *O. rhodurus* (大西・城 1981) などの多くの魚種で発生し, 少なからぬ被害を与えている。また, 養殖魚のみならず, マイワシ, タイなどの野生魚においても, 本症による被害が発生することが報告されている (楠田他 1982, 松岡・室賀

1993)。これらの報告のように、本症はブリをはじめとする多くの魚種に被害を与え、安定的な養殖生産をおびやかすだけでなく、天然資源や栽培漁業などへの影響も心配されることから、本症の防除対策の確立が強く望まれている。

これまでに、ブリにおける本症に関する研究には、発生状況および症状（見奈美他 1979, 界外他 1984, 大西・城 1986）、原因菌の分類学的位置および病原性（見奈美他 1979）、蛍光抗体法による診断（河原・楠田 1987）、溶血毒素（Kawahara *et al.* 1989, 1991）、薬剤感受性（畑井他 1983, 関屋他 1987）および罹病魚の病理組織学的検討（界外他 1984）などがある。

ブリにおける本症の発生は、養成初期の稚魚で認められており、発生時期としては7月から9月までの間に発生するとされている（見奈美他 1979, 界外他 1984, 大西・城 1986）。罹病魚の症状については、眼球の白濁と心外膜炎（見奈美他 1979）、脊椎変形症（界外他 1984）などが観察されている。

本症原因菌の分類学的位置については、見奈美他（1979）は溶血性、発育性、加水分解反応および炭水化物の分解性などの主要性状が *S. equisimilis* と一致するとしている。いっぽう、各種の海水魚と淡水魚から分離される β 溶血性連鎖球菌は性状がほぼ一致していること（Kitao *et al.* 1981, 大西・城 1981, 宇賀神 1981, 小川他 1982b, 中津川 1983, 酒井他 1986, 厚田他 1990）、アマゾン淡水イルカ *Inia geoffrensis* の皮膚の膿瘍から分離された *S. iniae* の性状に類似していること（大西・城 1981, 北尾他 1982）、が報告されている。これらのように、わが国において病魚から分離される β 溶血性連鎖球菌の分類学的位置については、*S. equisimilis* に同定するのが妥当であるとするものと、*S. iniae* に類似するとするもののがあって、十分な検討が行われているとはいえない。このために、本症原因菌とブリ以外の養殖魚や野生魚から分離される β 溶血性連鎖球菌の性状の比較ならびに種の同定の検討が必要と考えられる。

本菌の病原性については、見奈美他（1979）がブリに対する分離菌の復元実験によって、自然発症魚にみられる症状を再現し、致死菌数を

求めている。いっぽう、界外他（1984）はブリ脊椎変形魚の脳から本菌を分離するとともに、組織学的研究によって本菌の感染が脊椎変形の原因と推定している。しかし、復元実験が行われていないために本菌と脊椎変形との関係は明らかとはいえない。このように、病原性についての検討も十分でなく、水温の影響や各種病魚から分離される β 溶血性連鎖球菌との病原性の比較などを含めて、さらに検討する必要があると思われる。なお、Kawahara *et al.*（1989, 1991）は、本菌が *in vitro* において産生する溶血毒素の性状について報告している。さらに、 β 溶血性を示す連鎖球菌群（ β -hemolytic streptococci, BHS）のなかには、*S. pyogenes* や *S. agalactiae* などのヒトの重要な病原菌が含まれている。本菌の性状は、分類学的にはこれらの菌種とは異なるが、30~35°C の高い温度でよく増殖することから、温血動物に対する病原性についても検討する必要があると思われる。

本症の防除法に関連する研究としては、畑井他（1983）および関屋他（1987）が本菌の薬剤感受性を調べ、ドキシサイクリン、オキシテトラサイクリン、アンピシリン、エリスロマイシン、ニフルスチレン酸ナトリウム、オルメトプリムなどに高い感受性を示すとしているのみで、極めて知見に乏しい。なお、淡水養殖魚の β 溶血性連鎖球菌症においては、ニジマスに対するワクチンの有効性（Sakai *et al.* 1987, 酒井他 1988）や、アユおよびニジマスに対する薬剤の治療効果（楠田他 1981a, 城 1982, 北尾他 1987）が明らかにされていることから、本症においても、これらの検討が期待されている。

このように、本症の効果的な防除対策を立案するためには解明すべき研究課題が多い。

そこで、本研究においては、まず第1章において、本症の発生および被害状況を調べた。つぎに、第2章において、ブリから分離された本菌と、野生魚、ブリ以外の海水養殖魚および淡水養殖魚から分離された β 溶血性連鎖球菌株との各種性状の比較を行うとともに、本菌の水域における生態や感染環を検討した。さらに、本菌の分類学的位置を明らかにするために、*S. iniae* および *S. equisimilis* を対照菌株として、種

の同定を試みた。また、第3章においては、本菌の病原性を明らかにするために、ブリに対する病原性、飼育水温が感染・発病に及ぼす影響、本菌接種後のブリ体内における消長と症状の発現との関係ならびにマウスに対する病原性について調べた。さらに、第4章においては、ワクチンによる効果的な予防法をみいだすために、本症感染耐過魚の再感染実験による免疫獲得状況、ホルマリン不活化菌体ワクチンの有効性ならびにブリおよびウサギ免疫血清を用いた受動免疫の効果について調べた。第5章においては、各種の化学療法剤に対する本菌の感受性を調べるとともに、感受性が高かった薬剤を用いて実験的感染魚の治療試験を行った。

第1章 発生および被害状況

本症の発生および被害状況については、見奈美他(1979)の発生時期および発病魚サイズについての、界外他(1984)の発生時期、発病魚サイズおよび被害状況についての、大西・城(1986)の発生時期についての報告がある。見奈美他(1979)は、1976年7月に和歌山県下のブリ養殖場で、眼球の白濁と心外膜炎を呈して死亡した体重15~30gの稚魚の眼球などから、それまでに報告されていた楠田他(1976)のブリの連鎖球菌症原因菌とは、性状が異なる β 溶血性を示す連鎖球菌を分離している。また、界外他(1984)は、1982年7月に三重県下のブリ養殖場の脊椎変形症を呈する体長11~15cmの稚魚から細菌分離を試み、すべての病魚の脳から β 溶血性の連鎖球菌を分離している。なお、検査した6例の内の1例からは、楠田他(1976)が報告したブリの連鎖球菌症原因菌が同時に分離されている。この脊椎変形症は7月から9月まで発生し、その期間中に捕獲処分された変形魚は2.1% (1小割63,000尾中1,302尾)であったとしている。さらに、大西・城(1986)は、ブリ稚魚から1977年以降ほぼ毎年 β 溶血性の連鎖球菌を分離しているが、これらの病死魚は類結節症などの病魚に混じってわずかに認められるだけで、まとまった死亡はみられていないとしている。

このようにブリ養殖において、 β 溶血性連鎖球菌は、稚魚期における死亡あるいは脊椎変形症の原因となるとされている。本症の被害量や被害額に関する統計的な資料は見当たらないが、本症の症状とされる眼球の白濁や心外膜炎などは、楠田他(1976)の報告した連鎖球菌症の症状と類似していることから、*E. seriolicida*が原因の腸球菌症に含めて取扱われてきたものも少なくないのではないと思われる。さらに、野生のマイワシ、タイなどの病魚からも β 溶血性連鎖球菌が分離されており(楠田他1982)、野生のブリにおける β 溶血性連鎖球菌の感染状況の検討も必要であると思われる。

そこで、本章では養殖および野生のブリにおける本症の発生および被害状況を調べた。

第1節 発生例

本症の発生状況を把握することは、本症の発生要因を解明し、防除対策を立案するうえで重要である。

そこで、本節では三重県内のブリ養殖場において、本症の発生状況を調べるとともに、その周辺で漁獲される野生のブリなどでの罹病状況を検討した。

材料および方法

養殖ブリにおける発生例の検討

症例1：三重県度会郡南勢町五ヶ所湾内のAブリ養殖場において、1985年6月中旬から稚魚に体の側湾を主徴とする変形症が流行した。そのうちの病魚5尾(体重20.0~25.3g、尾叉長12.4~13.6cm)について、80ppmのm-アミノ安息香酸エチルメタンスルホネートで麻酔後、症状の観察を行うとともに、腎臓中央部および脳(小脳部)に白金耳を穿刺してブレインハートインヒュージョン(BHI)寒天培地(日水)に塗抹し、25°Cで培養した。また、脳における粘液胞子虫*Myxobolus buri*寄生の有無を調べるために、脳全体を摘出して9倍量の生理食塩水を加えたのち、ガラスホモジナイザーで磨砕し、スライドグラスに塗抹、エタノール固定後ギム

ザ染色を施して検鏡した。

症例 2：三重県度会郡南勢町五ヶ所湾湾口部に位置する B プリ養殖場において、1987年 6 月下旬から稚魚に変形症の発生がみられた。7 月 21 日に採集した変形魚 3 尾（体重 43.4~48.9 g, 尾叉長 14.2~16.3 cm）について、症状の観察を行うとともに、臓器から細菌の定量的分離を行うために筋肉、脾臓、腎臓、心臓および脳を摘出し 9 倍量の生理食塩水を加えてガラスホモジナイザーで磨砕後、生理食塩水で 10 倍希釈系列をつくり、それらの 0.1 ml を BHI 寒天培地に塗抹し、30°C で 3 日間培養した。また、脳における *M. buri* 寄生の有無を同様にして調べた。なお、病魚は生簀内では生存していたが、取り上げ後に氷冷して研究室に搬入したため、検査時には死亡していた。

野生ブリにおける発生例の検討

三重県度会郡南勢町五ヶ所湾湾口部の前記症例 2 を検討した B プリ養殖場の近くに設置されている定置網で漁獲された当歳の野生ブリのなかから、1988年 10 月 4 日に 9 尾（体重 283~600 g, 尾叉長 28.0~33.4 cm）、同年 10 月 28 日に 25 尾（体重 564~805 g, 尾叉長 34.0~38.2 cm）の合計 34 尾を供試した。まず、尾柄部血管から採血したのちに症状の観察を行い、ついで筋肉、脾臓、腎臓、心臓および脳から前と同様の方法で細菌の定量的分離培養を行った。採取した血液からは血清を分離し、本症原因菌に対する凝集抗体価を、U 型マイクロプレート（ヌンク）を用いたマイクロタイター法により測定した。すなわち、血液を 2 時間室温に置いてから、5°C に一晚静置したのち、3,000 rpm で 20 分間遠心して血清を分離した。抗原としては前出の養殖ブリの症例 1 の病魚の脳から分離した β 溶血性の連鎖球菌 No. 1 株を BHI ブイヨン（日水）で 25°C、24 時間培養した菌を 0.3% のホルマリンで不活化後、7,000 rpm で 10 分間の遠心分離で集菌した菌体を用いた。添加する抗原濃度は 1 mg/ml とし、抗原を加えてから 25°C で 2 時間インキュベートし、さらに 5°C に一晚静置したのちに、凝集塊の有無で判定した。

ブリ以外の野生魚における発生例の検討

マサバ：三重県沿岸で変形を呈するマサバ

Scomber japonicus が漁獲された。そこで、本症との関連性を調べるために、1985年 7 月 30 日に三重県度会郡南勢町五ヶ所湾湾口の定置網で漁獲された変形魚を 4 尾（体重 29~46 g, 尾叉長 14.1~16.2 cm）、三重県志摩郡志摩町御座沖の定置網で 1986年 6 月 2 日に漁獲された体形に異常のない 30 尾（体重 6.9~74.4 g, 尾叉長 9.6~18.6 cm）、1986年 8 月 22 日に漁獲された変形魚 1 尾およびヤセ 1 尾を含む 12 尾（体重 31.2~65.4 g, 尾叉長 15.2~18.5 cm）、1986年 6 月 13 日および 14 日に三重県志摩郡浜島町沖の定置網で漁獲された体形に異常のない 40 尾（体重 15.8~75.3 g, 尾叉長 12.2 cm~19.3 cm）、1987年 7 月 31 日三重県尾鷲市の定置網で漁獲された変形魚を 5 尾（体重 39.2~123.8 g, 尾叉長 16.4~22.3 cm）の合計 91 尾を供試して、症状の観察と腎臓および脳から細菌の分離培養を行った。

その他の魚類：養殖場の近くで漁獲される野生魚の β 溶血性連鎖球菌の保菌状況を調べるために、1987年 4 月 23 日に三重県度会郡南勢町五ヶ所湾湾口部の前記症例 2 を検討した B プリ養殖場の近くに設置された定置網で漁獲された魚類のなかからコノシロ *Konosirus punctatus* 2 尾、ゴンズイ *Plotosus lineatus* 7 尾（体重 37~93 g）、メバル *Sebastes inermis* 2 尾（47, 53 g）、ウミタナゴ *Ditrema temmincki* 1 尾（45 g）、ネンブツダイ *Apogon semilineatus* 49 尾（1.0~7.6 g）、ウルメイワシ *Etrumeus microps* 40 尾（0.9~7.6 g）、カタクチイワシ *Engraulis japonica* 60 尾（3.4~14.2 g）、シロギス *Sillago japonica* 3 尾（10.5~13.2 g）、キビナゴ *Spratelloides gracilis* 20 尾（3.0~6.4 g）、シマイサキ *Rhyncopelates oxyrhynchus* 6 尾（10.5~16.3 g）、マアジ *Trachurus japonicus* 10 尾（0.6~2.2 g）、オキヒイラギ *Leiognathus rivulatus* 7 尾（0.8~4.6 g）の脾臓、腎臓および脳から前述の方法によって、細菌の定量的分離培養を行った。なお、小型魚は大きさに応じて、適宜数尾~10 尾をプールして検査した。

結 果

養殖ブリにおける発生例の検討

症例 1 の病魚 5 尾の症状および腎臓、脳から

Table 1. Clinical signs and isolation of bacteria from organs of diseased cultured yellowtail (case 1)

Date of isolation	Fish No.	BW (g)	FL (cm)	Clinical sign	Isolation of bacteria	
					Kidney	Brain
1985.6.17	1	20.0	12.4	Slim body, blackening of body color, swelling of spleen	-	++ (BHS)
	2	25.2	13.1	Slim body, blackening of body color, scoliosis, swelling of spleen	-	++ (BHS)
	3	23.4	13.0	〃	-	++ (BHS)
	4	25.3	13.6	〃	-	++ (BHS)
	5	23.0	13.2	〃	-	++ (BHS)

-, bacteria were not isolated; ++, abundant growth of bacteria; BHS, β -hemolytic *Streptococcus*.

の菌の分離状況は Table 1 に示すとおりである。病魚はいずれもやせて体色が黒化し、5尾中の4尾は体の側湾を呈していた。体の側湾症状を呈する病魚の写真を Fig. 1 に示した。解剖所見としては、脾臓がやや腫大していたほかは、とくに異常が認められなかった。なお、X線撮影により脊椎骨の状況を調べたが、骨折はみられなかった。細菌は腎臓からは何も分離されなかったが、脳からは Fig. 2 に示すように BHI 寒天上に純培養状に多数の細菌が分離された。分離菌のコロニーは、いずれも 25°C、24時間の培養では 0.2~0.3 mm 以下の小さなものであった。分離菌はいずれもグラム染色性陽性の連鎖した球菌で、カタラーゼおよびオキシダーゼ産生性はともに陰性、OF 試験は発酵的であった。また、Fig. 3 に示すようにヒツジ血液寒天上で β 型の溶血性を示したことから、 β 溶血性の連鎖球菌に分類された。なお、いずれの病魚の脳から

も、*Myxobolus buri* の胞子は検出されなかった。

症例 2 の病魚 3 尾の症状および各臓器からの細菌の分離状況は Table 2 に示すとおりである。病魚はいずれも体の側湾あるいは前側湾を呈していた。また、体表には単生虫 *Benedenia seriola* が多数寄生して体表には損傷がみられた。この

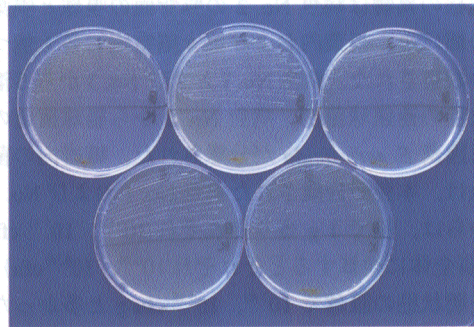


Fig. 2. Colonies isolated from the brain and kidney of deformed yellowtail. B, brain; K, kidney.



Fig. 1. Vertebral deformity found in cultured yellowtail.

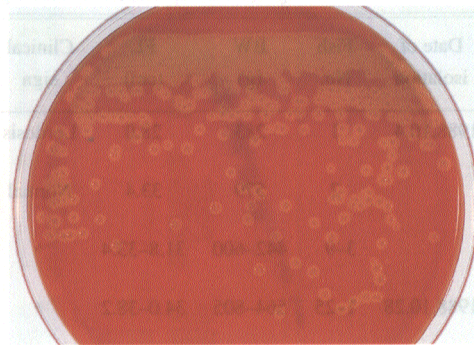


Fig. 3. Hemolytic reaction of an isolate from deformed yellowtail on sheep blood agar plate.

Table 2. Clinical signs and isolation of bacteria from organs of diseased cultured yellowtail (case 2)

Date of isolation	Fish No.	BW (g)	FL (cm)	Clinical sign	Isolation of bacteria (\log_{10} cfu/g)					
					Muscle	Spleen	Kidney	Heart	Eye	Brain
1987.7.21	1	48.9	14.2	Lordoscoliosis, lost of left eye, congestion of the brain and inside of the opercula, benedeniosis	<2	<2	<2	<2	7.40 (BHS)	7.08 (BHS)
	2	43.4	15.2	Slim body, scoliosis, adhesion of the internal organs, benedeniosis	2.70 (ES)	5.18 (ES)	4.66 (ES)	5.76 (ES)	NT	7.30 (ES)
	3	45.6	16.3	Slim body, scoliosis, lost of left eye, congestion of inside of the opercula, benedeniosis	<2	<2	<2	4.41 (BHS)	8.18 (BHS)	7.11 (BHS)

BHS, β -hemolytic *Streptococcus*; ES, *Enterococcus seriolicida*; NT, not tested.

ほかに、病魚 No. 1 および No. 3 では片方の眼球の失明、鰓蓋の内側や脳の発赤などが観察された。なお、病魚 No. 1 および No. 3 の脳背面の嗅球と嗅葉の間げきに、白色の微小な乾酪様の異物が各3個ずつあるのが観察された。また、同様の異物は病魚 No. 2 の脳背面の嗅球と嗅葉の間げき、視葉内および第4脳室内に各1個ずつ観察された。病魚 No. 1 および No. 3 から β 溶血性の連鎖球菌が、病魚 No. 2 から腸球菌症の原因菌 *E. seriolicida* が分離された。臓器内の菌数は、本菌が分離された病魚 No. 1 および No. 3 からは、脳で1g 当りそれぞれ $10^{7.08}$ 、 $10^{7.11}$ cfu (脳全体に換算するとそれぞれ $10^{6.26}$ 、 $10^{6.30}$ cfu)、失明状態の眼球で $10^{7.40}$ 、 $10^{8.18}$ cfu/g と多かったが、筋肉、脾臓、腎臓および心臓では病魚 No. 3 の心臓で $10^{4.41}$ cfu/g が検出されたほかは、検出

限界 (10^2 cfu/g) 以下であった。*E. seriolicida* が分離された病魚 No. 2 の臓器1g 当りの菌数は、脳において $10^{7.30}$ cfu と最も多く、筋肉、脾臓、腎臓および心臓では $10^{2.70} \sim 10^{5.76}$ cfu/g であった。なお、脳内の異物から細菌の分離培養を行ったところ、病魚 No. 1 および No. 3 からは本菌が、病魚 No. 2 からは *E. seriolicida* がそれぞれ純培養で分離された。*M. buri* の胞子はいずれの病魚からも検出されなかった。

野生ブリにおける発生例の検討

1988年10月4日に定置網で漁獲された9尾および同年10月28日に漁獲された25尾の野生ブリの症状および細菌分離結果ならびに分離菌に対する抗体の保有状況については Table 3 に示すとおりである。10月4日に漁獲された1尾(魚体 No. 1) に Fig. 4 に示すような体後部の前湾症

Table 3. Clinical signs, isolation of bacteria from organs, and serum titers against BHS of yellowtail captured by set net

Date of isolation	Fish No.	BW (g)	FL (cm)	Clinical sign	Isolation of bacteria (\log_{10} cfu/g)					Serum titer against BHS (1:)
					Muscle	Kidney	Spleen	Heart	Brain	
1988.10.4	1	283	28.0	Lordosis	<2	<2	<2	4.90 (BHS)	5.11 (BHS)	16
	2	579	33.4	Normal	<2	<2	<2	<2	2.00 (BHS)	<2
	3-9	442-600	31.8-33.4	〃	<2 (7/7)	<2 (7/7)	<2 (7/7)	<2 (7/7)	<2 (7/7)	<2 (7/7)
1988.10.28	1-25	564-805	34.0-38.2	〃	<2 (25/25)	<2 (25/25)	<2 (25/25)	<2 (25/25)	<2 (25/25)	<2 (25/25)

BHS, β -hemolytic *Streptococcus*.

The values in parentheses indicate number of fish showed represented value/number of fish tested.



Fig. 4. Vertebral deformity found in a wild yellowtail.

状がみられた。この個体はほかの個体よりもやや小型であったが、内臓にはとくに異常は認められなかった。このほかの個体については、外観および内臓ともに異常はみられなかった。細菌の分離状況については、10月4日の前湾の認められた魚体 No. 1 の脳からは $10^{5.11}$ cfu/g、心臓からは $10^{4.90}$ cfu/g、またとくに異常のみられなかった魚体 No. 2 の脳からは 10^2 cfu/g の β 溶血性を示す連鎖球菌が分離された。本菌に対する抗体の保有状況は、体の前湾を示し、 β 溶血性連鎖球菌が分離された No. 1 の個体が 1:16 の抗体価を有していたが、そのほかの個体では抗体は検出限界 (1:2) 以下であった。

ブリ以外の魚種における発生例の検討

マサバ：1985～1987年の6～8月の間に定置網で漁獲された個体の検査結果は Table 4 に示すとおりである。Fig. 5 に1985年7月に五ヶ所湾湾口部の定置網で漁獲された前側湾を呈した4尾の変形魚の外観写真を示したが、これらの

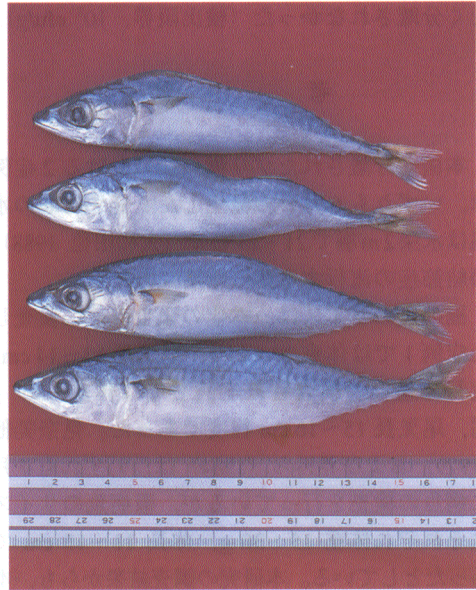


Fig. 5. Vertebral deformity found in common mackerel.

4尾中3尾の脳および1尾の腎臓から β 溶血性連鎖球菌が分離された。また、1986、1987年に調べた合計6尾の前湾を呈した変形魚については、すべての個体の脳から β 溶血性連鎖球菌が分離された。このほかに、脊椎の変形は認められないがやせている1個体の腎臓と脳から β 溶血性連鎖球菌が分離された。また、外観上とくに異常が認められなかった個体の腎臓と脳からも β 溶血性連鎖球菌が分離されることがあった。

その他の魚類：検査した12種207尾の内臓および脳からは、いずれも β 溶血性連鎖球菌はまっ

Table 4. Isolation of β -hemolytic *Streptococcus* sp. from common mackerel captured by set net

Date of isolation	Location of capture	Clinical sign	No. of fish examined	BW (g)	FL (cm)	Isolation of bacterium*	
						Kidney	Brain
1985.7.30	Gokasho	Lordoscoliosis	4	29~46	14.1~16.2	1/4	3/4
1986.6. 2	Goza	Normal	30	6.9~74.4	9.6~18.6	7/30	4/30
1986.8.22	〃	〃	10	37.0~65.4	15.2~18.5	0/10	1/10
		Lordosis	1	49.5	17.0	1/1	1/1
		Slim	1	31.2	16.8	1/1	1/1
1986.6.13	Hamajima	Normal	10	32.6~75.3	15.0~19.3	3/10	2/10
1986.6.14	〃	〃	30	15.8~68.0	12.2~18.1	3/30	3/30
1987.7.31	Owase	Lordosis	5	39.2~123.8	16.4~22.3	1/5	5/5

* Number of fish β -hemolytic *Streptococcus* was isolated/number of fish tested.

たく分離されなかった（検出限界， 10^2 cfu/g）。

考 察

本菌が分離されたブリ稚魚期における2症例は、いずれも6月から発生した。発生時期の水温は水深2m層で21~23°Cで（大和田他 1988）、類結節症の流行する前の時期にあたる。

罹病魚のサイズは、本症の発生直後に検査した症例1では体重20~25g、尾叉長12~14cm、流行の途中で検査した症例2では体重50g弱、尾叉長15~16cm程度であった。見奈美他（1979）および界外ら（1984）は、いずれも7月に病魚の検査を行っているが、罹病魚のサイズはそれぞれ体重15~30g、体長11~15cmであったとしている。本研究の調査結果からも、本症はブリの稚魚期に感染、発症する疾病であると考えられる。

症状は、症例1ではやせて体色が黒化し、体の側湾がみられ、内臓では脾臓の腫大が観察された。症例2では体の側湾あるいは前側湾、失明、鰓蓋の内側や脳の発赤が観察された。本症の症状については、見奈美他（1979）は眼球の白濁や心外膜炎が、界外他（1984）は脊椎の側湾および上下湾（前湾）の変形が認められるとしている。本研究における症例と比較すると、体が側湾あるいは前湾する変形症状が界外他（1984）の報告と共通していた。本研究における症例1では体の変形の状況は側湾であったが、症例2では前側湾の症状を示すものもみられた。症例2の病魚は発症後しばらく経過したものであったと思われる、発症直後の変形症状は側湾であるが、やがてこれに前湾が加わることがあるのではないと思われる。また、本研究では症例2においては眼球が失明状態となっている個体が観察された。このような眼球からは本菌が多数分離されたことから、眼球の失明は見奈美他（1979）が報告している本菌の感染による眼球の白濁後の治癒痕ではないと思われる。

細菌の分離部位については、症例1および症例2の合計8尾中7尾の脳から、本菌が多数分離された。いっぽう、脳以外の主要臓器からは、

1例の心臓から本菌が分離されたのを除いて、分離されなかった。これらのことから、脳が本菌の好適な増殖部位の一つではないと思われる。

界外他（1984）は本菌の脳への感染が脊椎変形の原因ではないかと推察している。しかし、本菌とともに *E. seriolicida* が同一個体から分離される例もあったことから、*E. seriolicida* も脊椎変形の原因の一つとして疑われるとしている。本調査例においても、変形魚の1例からは *E. seriolicida* が分離された。宮崎（1982）はブリの腸球菌症の脳感染型では、躯幹の変形を主病徴とするとしている。したがって、本菌および *E. seriolicida* の感染とブリ変形症との関連性を再現実験によって証明するとともに、両者の病原性を比較検討する必要があると思われる。なお、症例2の病魚の脳には、本菌あるいは *E. seriolicida* を内蔵した微小な乾酪様の異物が観察された。養殖ブリの *M. buri* 寄生による側湾症では、第4脳室内での *M. buri* のシストの集塊形成が、神経障害とそれに基因する体側筋の萎縮を起し、その結果として体形の異常が表れると考えられている（阪口他 1987）。したがって、本菌を内蔵する脳内の異物が変形と関連していることも考えられる。

野生ブリでは検査した34尾中2尾から本菌が分離された。したがって、野生魚においても本菌の感染が起こっていることが確認された。また、そのうちの1尾は変形魚であったことから、本菌の感染がその原因である可能性も考えられる。養殖場からの逃亡の可能性は否定できないが、マイワシ、タイなどの野生魚におけるβ溶血性連鎖球菌感染による被害例が報告されており（楠田他 1982）、野生ブリにおいても本菌の感染が確認されたものとするのが妥当であると思われる。なお、本菌が分離された野生ブリは本菌に対する抗体を有しており、感染してから少なくとも抗体価の上昇に必要な期間を経過していたものと思われる。

熊野灘や伊勢湾で漁獲されるマサバに変形魚が混獲されることが知られている。そこで、体の変形したマサバおよび体形に異常のないマサバについて、脳および内臓から細菌の分離を

行ったところ、体の変形したマサバの脳から高率に β 溶血性の連鎖球菌が分離された。また、体形に異常のないマサバからも、かなりの頻度で β 溶血性の連鎖球菌が分離された。

マサバは養殖魚の餌料に使われることがあり、症例 1 では変形したマサバが餌料に用いられていたことや、養殖場近くに回遊してきていたことを考えると、マサバのような β 溶血性の連鎖球菌を保菌した個体は、餌料あるいは環境水を通じて養殖魚への感染源となる可能性があると思われる。したがって、マサバのような餌料に用いられる魚から分離される β 溶血性の連鎖球菌とブリの本症原因菌の関係を明らかにするために、双方の菌株の性状や病原性の比較検討などが必要と考えられる。なお、マサバの変形症の原因については、これまでに中枢神経系中にみられるグラム陽性の未知の微生物（窪田他 1982）や、神経組織内にみられた粘液胞子虫（松里・阪口 1981）が検討されているが、今回分離された β 溶血性の連鎖球菌感染の関与の可能性も考えられる。

第 2 節 被害状況

本症は *E. seriolicida* が原因の腸球菌症と必ずしも区別して取扱われていないことなどもあり、被害の実態はあまり把握されていない。

そこで、本節では第 1 節における発生例をもとに、被害状況を調べた。

材料および方法

第 1 節において検討した養殖ブリおよび野生ブリでの発生例、ならびに漁業者および水産試験場の魚病担当者からの聞き取りなどをもとに被害状況を調べた。

結 果

1985年に五ヶ所湾内の 4 か所のブリ養殖場に放養されたブリ種苗は合計約 115 万尾であった。前節における養殖ブリの症例 1 の病魚を採集した A 養殖場は、4 か所のうちで最多数の推定約

70 万尾を放養した規模の大きなブリ稚魚育成場である。その A 養殖場では、5 月から一辺 4.5 m、水深 7.5 m の 8 角化繊生簀 47 台に 1 小割あたり約 18,000 尾のモジャコが飼育されていた。そして、6 月 15 日ごろから、体の側湾を呈する変形魚がみられるようになった。生簀 47 台のほとんどすべてに発病がみられたが、とくに変形魚が多く目立つものが 2 小割、平均以上に目立つものが 10 小割で、発生率は小割により異なるが、およそ 10~20% 程度であった。変形魚は食欲がなく、やせて体色の黒化がみられたが、大量に死亡した形跡はみられなかった。やがて、7 月中旬以降になると変形魚は目立たなくなり、自然に治癒した。その年の 12 月における 1 小割あたりの残存尾数は、平均約 15,500 尾（最低約 15,000 尾、最高約 16,500 尾）で、各小割には 1 小割あたり 200 尾程度の変形魚が観察された。それらの変形魚は、健常なものにくらべて魚体が小さかった。発病当時の餌にはマサバが使われており、そのなかには体の変形した熊野灘産のマサバも混じっていた。投薬に関しては 6 月 7 日~6 月 14 日の間はスレによるビブリオ病予防のためにオキシテトラサイクリン、6 月 21 日~6 月 28 日は本症治療のためにスピラマイシン、7 月 9 日~7 月 21 日は類結節症治療のためにアミノベンジルペニシリンなどが投与された。漁業者はオキシテトラサイクリン投与後に変形魚の発生がみられたと言い、オキシテトラサイクリンの投与が遅れた区では変形魚の発生が少なかったという。また、この養殖場の極く近い所に設置された定置網に入網するマサバに、6 月 18 日ごろから体の変形したものが混じり始めていた。

症例 2 の B 養殖場においては、5 月から約 8 万尾の稚魚を飼育していた。本症の病魚がみられたのは一辺約 10 m の角型化繊生簀に 24,000 尾が飼育されていた小割で、6 月下旬から変形魚が散見されるようになった。その後群から離れるなどのために取り上げられた変形魚は 7 月下旬までに約 200 尾に達した。

野生ブリの本症の罹病状況については、沿岸の定置網で漁獲される当歳魚について調べたところ、検査した 34 尾中 2 尾から本菌の分離され、

そのうちの1尾は体の変形がみられた。定置網で漁獲された当歳ブリはほとんどが活魚で出荷されるが、変形魚は廃棄されていた。

考 察

本研究における養殖ブリ稚魚の本症の被害調査例からは、本菌感染による大量死亡はみられなかった。しかし、発症すると摂餌不良となるので、殺処分されるものも多かった。発症して体の変形を呈した魚の飼育を継続すると、やがて自然に体形の異常がわからなくなり治癒するものもいたが、体の変形が残る場合も多く、症例1では発症してから約6か月後の時点で1小割あたり飼育尾数の約1.3%（約15,500尾中200尾）の変形魚がみられた。これらは体が小さいだけでなく、体の変形のために商品価値は期待できないものと思われる。

野生ブリにおいても、本菌の感染が起きていることが明らかになり、本菌の感染が野生ブリの変形症の原因の一つではないかと思われる。前野（私信）によると、定置網に入網する野生ブリに変形魚がしばしばみられるとのことであり、相当数が本症に罹病しているのではないかと思われる。

なお、このほか、調査した三重県以外においても、長崎県（畑井他 1983）、徳島県（大西・城 1986）、宮崎県（関屋他 1987）などにおいても、養殖ブリから本菌が分離されており、各地のブリ養殖場で本症が発生していることがうかがわれる。

第2章 原因菌の分類学的研究

β 溶血性の連鎖球菌による感染症は、わが国では見奈美他（1979）によって養殖ブリ稚魚で報告されて以来、イシダイ、アイゴ、メジナ、ウスバハギ（小川他 1982b）、ヒラメ（小川他 1982b、中津川 1983）、クロソイ（酒井他 1986）、ギンザケ（厚田他 1990）など多くの海水養殖魚やマイワシ、マダイなどの野生魚（楠田他 1982）、テラピア、ニジマス（Kitao *et al.* 1981）、アユ（Kitao *et al.* 1981、大西・城 1981、宇賀神

1981）、アマゴ（大西・城 1981）などの淡水養殖魚で報告されている。養殖ブリからの分離菌は、見奈美他（1979）によって *S. equisimilis* に同定されている。いっぽう、海水魚由来株と淡水魚由来株の性状がほぼ一致し、*S. iniae* の性状に類似することも指摘されている（大西・城 1981、北尾他 1982）。このように、本菌の分類学的位置については、*S. equisimilis* に同定するのが妥当であるとするものと、*S. iniae* に類似するものとのがあり、十分な検討が行われているとはいえない。

第1章において、本症は養殖ブリにおいてだけでなく、野生ブリにおいても発生しており、また、餌料に用いられるマサバにおいても感染がみられることが明らかとなった。したがって、本症の防除対策を考えるうえで、養殖魚や野生魚から分離される β 溶血性連鎖球菌の性状を詳細に比較検討し、それらの異同を明らかにして本菌の分類学的位置を検討するとともに、本菌の水界における生態や感染環を明らかにする必要があると思われる。

そこで、養殖ブリから分離された菌株と野生マサバ、養殖ヒラメならびに淡水養殖アユ各病魚から分離された菌株の性状の比較検討を行うとともに、*S. equisimilis* および *S. iniae* を対照菌株とし、種の同定を試みた（佐古 1993a）。

材料および方法

供試菌株：由来は Table 5 に示すとおりである。すなわち、第1章第1節の症例1の養殖ブリ病魚から分離した5菌株、野生マサバ病魚から分離した4菌株のほか、養殖ヒラメから分離した2菌株、徳島県水産試験場の城 泰彦博士から分与された養殖アユ由来の3菌株の計14菌株を用いた。また、対照菌株として、ATCC から購入したアマゾン淡水イルカ由来の *S. iniae* ATCC 29178株および ATCC 29177株ならびに東京大学医科学研究所から分与された *S. equisimilis* IID 681株を用いた。

細菌学的性状検査：各供試菌株を BHI ブイヨン（日水）あるいは BHI 寒天（日水）で 25°C、18～24時間前培養して、各種の性状検査に供し

Table 5. Strains of β -hemolytic *Streptococcus* sp. isolated from diseased marine and freshwater fishes and reference strains used for taxonomical study

Strain No.	Source	Organ of isolation	Location	Date	Remarks
No. 1	Yellowtail	Brain	Mie	1985. 6.17	Cultured
No. 2	〃	〃	〃	〃	〃
No. 3	〃	〃	〃	〃	〃
No. 4	〃	〃	〃	〃	〃
No. 5	〃	〃	〃	〃	〃
1 BL	Common mackerel	〃	〃	1985. 7.30	Wild
2 BL	〃	〃	〃	〃	〃
3 BL	〃	〃	〃	〃	〃
3 K	〃	Kidney	〃	〃	〃
F-1	Japanese flounder	Brain	〃	1985. 8.20	Cultured
F-2	〃	〃	〃	〃	〃
PT 78061* ¹	Ayu	Spleen	Tokushima	1978. 9.19	〃
PT 85106* ¹	〃	〃	〃	1985.11.12	〃
PT 85107* ¹	〃	〃	〃	〃	〃
Reference strains					
ATCC 29178* ²	<i>Streptococcus iniae</i> PW			1972. 3	
ATCC 29177* ²	<i>Streptococcus iniae</i> BU				
IID 681* ³	<i>Streptococcus equisimilis</i>				

*¹ Supplied by Dr. Yasuhiko Jo of Tokushima Prefectural Fisheries Experimental Station, Hiwasa, Tokushima, Japan.

*² Supplied by American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA.

*³ Supplied by the Institute for Infectious Disease, Tokyo, Japan.

た。形態学的、生物学的ならびに生化学的性状検査は細菌学実習提要（医科学研究所学友会1976）、培地学各論（1）（坂崎利一1970）および医学細菌同定の手引き第2版（Cowan 1974）に従い、以下に示す方法で行った。培地の食塩濃度は特記しない限り0.5%とした。培養温度は通常25°Cとしたが⁸、必要に応じて37°Cにおいても試験した。

1. 形態学的性状検査

BHI ブイヨン18~24時間培養菌について検査した。形態および大きさは、Pfeiffer氏液による単染色を行ったのちに顕微鏡によって観察した。運動性は懸滴標本および半流動寒天培地を用いて観察した。グラム染色性はHuckerの変法およびRyuの方法によって検討した。

2. 生物学的性状検査

各種培地における発育性：1白金耳量のブイヨン培養菌をPEAアザイド培地（栄研）、Bile

esculin agar（Difco）、EF寒天培地（日水）、マッコンキー寒天培地（日水）、SS寒天培地（日水）、遠藤培地（日水）、BTBティポール寒天培地（日水）、ビプリオ寒天培地（日水）、1%小川培地（日水）、SFブイヨン（日水）に塗抹あるいは接種して5日間培養し、発育の有無を観察して調べた。

0.1%メチレンブルーミルクにおける発育性：1白金耳量のブイヨン培養菌を0.1%メチレンブルー加10% Skim milk（Difco）に接種して7日間培養し、菌の発育およびメチレンブルーの還元性を検査して調べた。

発育温度：あらかじめ各試験温度に設定したBHIブイヨンに1白金耳量のブイヨン培養菌を接種し、5~42°Cで2日間培養して発育の有無を観察して調べた。

発育塩分濃度：1% Tryptone（Difco）水を基礎培地とし、これに0~6.5%（W/V）の食塩を

加えた培地に、1白金耳量のブイヨン培養菌を接種して2日間培養し、発育の有無を観察して調べた。

pH9.6での発育性：ブドウ糖フェノールフタレインブイヨンに1白金耳量のブイヨン培養菌を接種して2日間培養し、発育の有無を観察して調べた。

温度抵抗性：ブイヨン培養菌の1mlを小試験管にとり、ウォーターバス中で60°C 30分加温後、それから1白金耳量をBHIブイヨンに接種して2日間培養し、生残菌の有無を調べて検討した。

溶血性：5%ヒツジ、ウマおよびウサギ脱線維素血液加トリプトソーヤ寒天(日水)平板に画線および穿刺して2日間培養し、溶血環形成の有無を観察して調べた。

3. 生化学的性状検査

カタラーゼ産生性：培養菌に3%過酸化水素水を注いで、発泡の有無を観察して検査した。

チトクロームオキシダーゼ産生性：蒸留水で湿らしたチトクロームオキシダーゼ試験用ろ紙(日水)に、寒天培養菌の1白金耳量を取り、その直後および1分後の試験紙の色の变化を観察して検査した。

O-F試験：糖分解用半流動培地(栄研)に1%のブドウ糖を加えた培地を用いて、好氣的ならびに嫌氣的条件化で7日間培養し、酸およびガス産生の有無を観察して行った。

インドール産生性：SIM確認培地(日水)で3日間培養後、Kovacsの方法によって検査した。

メチルレッド試験：ブドウ糖リン酸塩ペプトン水(日水)で3日および5日間培養後、メチルレッド試薬を加えて検査した。

VP反応：ブドウ糖リン酸塩ペプトン水(日水)で3日間培養後、6%アルファナフトール・エタノール溶液と40% KOH 溶液を加えて検査した。

クエン酸塩の利用性：シモンズ・サイトレート培地(日水)で7日間培養し、菌の発育と培地の色の变化を観察して検査した。

硫化水素の産生性：SIM確認培地(日水)で3日間培養して検査した。

尿素の分解性：Christensenの尿素寒天で4日間培養して検査した。

硝酸塩の還元性：硫酸塩半流動培地で3日間培養後、Tittslerの方法によって検査した。

リトマスミルク：Litmus milk (Difco)で10日間培養して、色の变化と凝固の有無を観察して調べた。

ピロリドニルアリルアミダーゼ産生性：アピストレップ20 (bio Mérieux)を用いて調べた。

α -ガラクトシダーゼ産生性：アピストレップ20 (bio Mérieux)を用いて調べた。

β -ガラクトシダーゼ産生性：ONPG ディスク(日水)およびアピストレップ20 (bio Mérieux)を用いて調べた。

β -グルクロニダーゼ産生性：アピストレップ20 (bio Mérieux)を用いて調べた。

アルカリフォスファターゼ産生性：アピストレップ20 (bio Mérieux)を用いて調べた。

ロイシンアリルアミダーゼ産生性：アピストレップ20 (bio Mérieux)を用いて調べた。

胆汁酸塩の溶解性：Todd-Hewitt broth (Difco) 10 mlで24時間培養した菌を遠心分離し、上清を捨てたのちにpH 7.0の0.067Mリン酸緩衝液0.5 mlと10%デオキシコール酸ナトリウム0.5 mlを加え、37°Cで30分後に液の透明化の有無を観察して調べた。

アルギニン加水分解性：Nivenらのアルギニンブイヨンで2日間培養後、Nesslerの試薬を加えて検査した。

エスクリン加水分解性：0.1%エスクリンおよび0.025%クエン酸鉄加ハートインヒュージョンブイヨン(日水)で2日間培養して検査した。

でん粉加水分解性：0.2%可溶性でん粉加トリプトソーヤ寒天(日水)平板で5日間培養後、ルゴール液を注いで検査した。

馬尿酸塩加水分解性：Thirstの馬尿酸塩寒天で7日間培養して、発育と培地の色の变化の有無を観察して検査した。

ゼラチン加水分解性：0.4%ゼラチン(Difco)加トリプトソーヤ寒天平板で4日間培養後、塩化第2水銀溶液を注いで、発育した菌の周囲の透明帯の形成の有無を観察して検査した。

Tween 80 加水分解性：Sierra の Tween 80 培地で14日間培養して、発育した菌の周囲の混濁帯の形成の有無を観察して調べた。

アミノ酸脱炭酸試験：Möller の方法に従い、L-リジン，L-アルギニンおよび L-オルニチンに対する脱炭酸性を，4日間培養して検査した。

DNase 産生性：DNase test agar (Difco) で2日間培養後，1N-HCl を注いで，発育した菌の周囲の透明帯の形成の有無を観察して調べた。

CAMP 試験：トリプチケースソイ II 5% ヒツジ血液寒天培地 (BBL) に供試菌と *Staphylococcus aureus* IAM 12082株を交差して接種して2日間培養し，溶血帯の形成の有無を観察して検査した。

バシトラシンおよびオプトヒン感受性：トリプチケースソイ II 5% ヒツジ血液寒天培地 (BBL) の1/4区画にブイヨン培養菌 25 μ l を塗抹し，鑑別試験用バシトラシンおよびオプトヒンディスク (Difco) を置いて18時間培養し，阻止円の有無を観察して検査した。

スルファメトキサゾール・トリメトプリム (SXT) 合剤感受性：トリプチケースソイ II 5% ヒツジ血液寒天培地 (BBL) の1/4区画にブイヨン培養菌 25 μ l を塗抹し，SXT 合剤ディスク (BBL) を置いて18時間培養し，阻止円の有無を観察して検査した。

炭水化物の分解性：糖分解用半流動培地 (栄研) に33種の炭水化物を1%加えた培地で14日間培養し，酸およびガス産生の有無を観察して検査した。

血清学的性状検査：ブリ由来の No. 1 株，マサバ由来の 3K 株，ヒラメ由来の F-2 株，アユ由来の PT 85107 株ならびにアマゾン淡水イルカ由来の *S. iniae* ATCC 29178 株のホルマリン死菌で作製したウサギ免疫血清および市販の A, B, C, G 溶血レンサ球菌群別用免疫血清 (デンカ生研) を用いて，各供試菌株の臍エキス処理菌体に対するスライド凝集反応を行った。なお，ウサギ免疫血清は，BHI 寒天で 25°C，20時間培養した菌を0.3%ホルマリンで不活化後，生理食塩水に 10 mg/ml の濃度に懸濁し，これとフロイントのインコンプリートアジュバント (Difco) の等量混合液の 1.5~2 ml を体重 2~3 kg のウサ

ギ背中皮下に接種して作製した。得られた免疫血清の抗体価は 1:256~1:1,024 であった。これらの免疫血清を，生理食塩水で10~20倍に希釈してスライド凝集反応に用いた。

結 果

形態および生物学的性状：Table 6 に示すとおりである。養殖ブリ病魚から分離された5菌株は同一の性状を示し，直径 0.6~0.8 μ m の，連鎖状または双球状に配列した運動性のないグラム陽性球菌であった。Fig. 6 に No. 1 株の走査電子顕微鏡写真を示した。これらの菌株は PEA アザイド培地上で発育したが，Bile esculin agar, EF 寒天培地，マッコンキー寒天培地，SS 寒天培地，遠藤培地，BTB ティポール寒天培地およびビブリオ寒天培地ならびに1%小川培地上では発育しなかった。また，SFブイヨン，0.1%メチレンブルー加 10%ミルク中では発育しなかった。10°C においては緩慢に発育し，37°C においては発育したが，42°C では発育しなかった。0~4%の食塩濃度下においては発育したが，6.5%においては発育しなかった。pH 9.6 における発育性および 60°C で30分間の加熱による生残性は陰性であった。ヒツジ，ウマおよびウサギ血液寒天では，いずれも β 型の溶血性を示した。

また，養殖ブリ病魚から分離された菌株と，マサバから分離された4菌株，養殖ヒラメから分離された2菌株，養殖アユから分離された3菌株，*S. iniae* ATCC 29178 株および ATCC 29177 株ならびに *S. equisimilis* IID 681株の形態および生物学的性状には，とくに差異はみられなかった。

生化学的性状：Table 7 に示すとおりである。養殖ブリ病魚から分離された5菌株は同一の性状を示し，カタラーゼ産生性，オキシダーゼ産生性，インドール産生性，VP 反応，クエン酸塩の利用性，硫化水素の産生性，尿素の分解性，硝酸塩の還元性， α -ガラクトシダーゼ産生性，胆汁酸塩の溶解性，馬尿酸塩，ゼラチンおよび Tween80 の加水分解性，リジンおよびオルニチンの脱炭酸性，オプトヒン感受性試験は陰性であった。また，ブドウ糖を発酵的に利用し，リ

Table 6. Morphological and biological characteristics of β -hemolytic *Streptococcus* sp. isolated from diseased marine and freshwater fishes and reference strains

Character	Yellowtail	Common mackerel	Japanese flounder	Ayu	<i>Streptococcus iniae</i>		<i>Streptococcus equisimilis</i>
	(5*)	(4)	(2)	(3)	ATCC 29178	ATCC 29177	IID 681
Form	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci
Size (μm)	0.6–0.8	0.7–0.8	0.7–0.9	0.6–0.9	0.7–0.9	0.7–0.9	0.8–0.9
Motility	–	–	–	–	–	–	–
Gram stain	+	+	+	+	+	+	+
Growth on:							
PEA azide agar	+	+	+	+	+	+	+
Bile esculin agar (bile40%)	–	–	–	–	–	–	–
EF agar	–	–	–	–	–	–	–
MacConkey agar	–	–	–	–	–	–	–
SS agar	–	–	–	–	–	–	–
Endo agar	–	–	–	–	–	–	–
BTB teepol agar	–	–	–	–	–	–	–
Vibrio agar	–	–	–	–	–	–	–
1% Ogawa medium	–	–	–	–	–	–	–
Growth in:							
SF broth	–	–	–	–	–	–	–
0.1% Methylene blue milk	–	–	–	–	–	–	–
Growth at:							
5°C	–	–	–	–	–	–	–
10°C	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
15°C	+	+	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+	+	+	+
42°C	–	–	–	–	–	–	–
0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
2% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
4% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
6.5% NaCl	–	–	–	–	–	–	–
pH 9.6	–	–	–	–	–	–	–
60°C 30 min.	–	–	–	–	–	–	–
Hemolysis of:							
sheep blood	β	β	β	β	β	β	β
horse blood	β	β	β	β	β	β	β
rabbit blood	β	β	β	β	β	β	β

* Number in parentheses represent number of strains tested.

–, negative; +, positive; (+), delayed positive.



トマスミルク中で酸を産生し、メチルレッド試験、ピロリドニルアリルアミダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、アルカリフォスファターゼおよびロイシンアリルアミダーゼ産生性、アルギニン、エスクリンおよびデンプン加水分解性、アルギニン脱水素酵素の

Fig. 6. Scanning electron micrograph of cells of β -hemolytic *Streptococcus* strain No. 1.

Table 7. Biochemical characteristics of β -hemolytic *Streptococcus* sp. isolated from diseased marine and freshwater fishes and reference strains

Character	Yellowtail	Common mackerel	Japanese flounder	Ayu	<i>Streptococcus iniae</i>		<i>Streptococcus equisimilis</i>
	(5*)	(4)	(2)	(3)	ATCC 29178	ATCC 29177	IID 681
Catalase	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-
Fermentation of glucose	+	+	+	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-	-	-	-
Methyl red	+	+	+	+	(+)	+	(+)
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-
Citrate (Simmons's)	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-
KNO ₃ reduction	-	-	-	-	-	-	-
Litmus milk	A	A	A	A	A	A	A
Production of:							
Pyrrolidonylarylamidase	+	+	+	+	+	+	-
α -Galactosidase	-	-	-	-	-	-	-
β -Galactosidase	+	+	+	+	+	-	+
β -Glucuronidase	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+
Alkaline phosphatase	+	+	+	+	+	+	+
Leucine arylamidase	+	+	+	+	+	+	+
Bile dissolution	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolysis of:							
Arginine	+	+	+	+	+	+	+
Esculin	+	+	+	+	+	-	+
Starch	+	+	+	+	+	+	(+)
Hippurate	-	-	-	-	-	-	-
Gelatine	-	-	-	-	-	-	-
Tween80	-	-	-	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-
Arginine dehydrolase	+	+	+	+	+	+	+
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-
DNase	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	(+)
CAMP test	+	+	+	+	+	(+)	-
Sensitivity to bacitracin	+	+	+	+	+	(+)	(+)
Sensitivity to optochin	-	-	-	-	-	-	-
Sensitivity to SXT	+	+	+	+	+	+	+

* Number in parentheses represent number of strains tested.

-, negative; +, positive; (+), delayed or weakly positive; A, acid production.

産生性, DNase 産生性, CAMP 試験, バシトラシンおよび SXT 合剤に対する感受性試験は陽性であった。

養殖ブリ病魚から分離された菌株の生化学的性状は, マサバ, 養殖ヒラメおよび養殖アユから分離された菌株と同じ性状を示した。また, 対

照菌株の *S. iniae* ATCC 29178 株の性状とも一致した。しかし, *S. iniae* ATCC 29177 株とは β -ガラクトシダーゼ産生性およびエスクリン加水分解性, また, *S. equisimilis* IID 681 株とはピロリドニルアリルアミダーゼ産生性および CAMP 試験の結果が異なっていた。

炭水化物の分解性は、Table 8 に示すとおりである。養殖ブリ病魚から分離された 5 菌株は同一の性状を示し、リボース、グルコース、マンノース、ガラクトース、レブロース、マルトース、セロビオース、サッカロース、トレハロース、

メレジトース、でん粉、グリコーゲン、デキストリン、マンニット、サリシン、エスクリン、アルブチンおよびアミグダリンからの酸産生性は陽性であった。また、アラビノース、キシロース、ラムノース、ソルボース、ラクトー

Table 8. Acid production from carbohydrates by β -hemolytic *Streptococcus* sp. isolated from diseased marine and freshwater fishes and reference strains

Character	Yellowtail	Common mackerel	Japanese flounder	Ayu	<i>Streptococcus iniae</i>		<i>Streptococcus equisimilis</i>
	(5*)	(4)	(2)	(3)	ATCC 29178	ATCC 29177	IID 681
Acid from:							
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+
Levulose	+	+	+	+	+	+	+
Sorbose	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	+	-
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	(+)	-
Melezitose	+	+	+	+	+	+	-
Starch	+	+	+	+	+	+	+
Glycogen	+	+	+	+	+	+	(+)
Inulin	-	-	-	-	-	-	-
Dextran	-	-	-	-	-	-	-
Dextrin	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	-
Glycerol	-	-	-	-	-	-	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	+	+	+	+	+	-	+
Esculin	+	+	+	+	+	-	+
Arbutin	+	+	+	+	+	-	+
Amygdalin	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-
Gas from carbohydrates	-	-	-	-	-	-	-

* Number in parentheses represent number of strains tested.

-, negative; +, positive; (+), delayed or weakly positive.

(1986) の分類に従って *Pyogenic streptococci* (化膿性連鎖球菌) の範疇に分類すべきであると思われる。

病魚由来株と対照の *S. iniae* および *S. equisimilis* の性状を比較すると、病魚由来株の性状は *S. iniae* ATCC 29178 株の性状と一致した。しかし、*S. iniae* ATCC 29177 株の性状とは β -ガラクトシダーゼ産生性、エスクリン加水分解性、ラクトース、ラフィノース、サリシン、エスクリン、アルブチンおよびアミグダリンからの酸産生性において異なっていた。また、*S. equisimilis* IID 681 株とはピロリドニルアリアルアミダーゼ産生性、CAMP 試験、メレジトース、マンニット、グリセリンおよびアミグダリンからの酸産生性に相違がみられた。Pier and Madin (1976) および Pier *et al.* (1978) がアマゾン淡水イルカから分離した *S. iniae* の 2 菌株の性状は互いに異なる部分があるとされているが、本研究においても同様の結果が得られた。本症病魚由来株の性状は Rotta (1986) の *S. iniae* の Type strain である ATCC 29178 株の性状と一致したことから、ブリから分離された菌株は、マサバ、ヒラメおよびアユから分離された菌株とともに *S. iniae* に同定するのが妥当であると思われる。

血清学的性状については、病魚由来株は互いに共通抗原をもつことが示され、Kitao *et al.* (1981)、楠田他 (1982)、小川他 (1982b) および河原・楠田 (1987) の報告と一致した。しかし、病魚由来株は *S. iniae* ATCC 29178 株および ATCC 29177 株のいずれとも異なる血清学的性状を示した。このことは北尾他 (1982) がすでに報告しているが、河原・楠田 (1987) はアユ由来の β 溶血性連鎖球菌に対する抗血清から作製した標識抗体は、*S. iniae* ATCC 29178 株および ATCC 29177 株に対して病魚由来株と同様に反応するとしており、さらに詳細な血清学的検討が必要と思われる。

本研究で、ブリ、マサバおよびヒラメから分離された菌株と、アユから分離された菌株が同じ性状と共通抗原を有していたことから、海水域と淡水域の魚類病原性 β 溶血性連鎖球菌は同一のものであると考えられる。魚類由来の β 溶血性連鎖球菌は、食塩を加えなくてもよく発育

し、塩分耐容性も低いことから (小川他 1982b, 酒井他 1986, 大西・城 1986)、もともと淡水起源であるが、なんらかのルートを経て、海域の魚類に感染するようになったのではないと思われる。また、養殖ブリ病魚とマサバから分離された β 溶血性連鎖球菌は同じ性状と共通抗原を有していたことから、原因菌を保菌する餌料魚からの養殖魚への感染の可能性が考えられる。これらの点を明らかにするためには、さらに病原性などの比較検討が必要と思われる。

なお、海外においては、イスラエルにおいてニジマス (Eldar *et al.* 1994, 1995)、アメリカにおいてテラピア (Perera *et al.* 1994) の *S. iniae* 感染症が報告されている。各国で分離された菌株の比較検討も今後の研究課題の一つと思われる。

第 3 章 原因菌の病原性に関する研究

本菌の自然感染魚には、眼球の白濁や心外膜炎などの症状がみられ、また、実験的感染によっても、これらの症状が再現されることが知られている (見奈美他 1979)。いっぽう、界外他 (1984) はブリ稚魚の脊椎変形症について、細菌学および病理組織学的に検討し、調査した全例の脳から本菌が分離されること、全例の脳内に本菌を貪食したマクロファージの集簇および肉芽腫形成がみられることから、ブリ稚魚にみられる変形症は本菌の脳内感染で生じたこれらの病変が脳組織を圧迫して運動障害を起こして生じると推察している。第 1 章において、養殖および野生ブリにおける本症の自然発症例では、目立った症状としては体の側湾あるいは前側湾症状を示す変形が観察された。これらのことから、本菌はブリなどの変形症の原因となることが示唆される。しかし、本菌がブリ変形症の原因となるかどうかについては、実験的感染によって再現性を確かめる必要がある。また、本症の発症時期は、既報 (見奈美他 1979, 界外他 1984, 大西・城 1986) ならびに第 1 章第 1 節の症例から明らかのように、6 月と 7 月の稚魚期に集中している。この理由としては、ブリにお

いては稚魚期に本菌に対する感受性が高くなること、稚魚期の水温あるいは飼育環境が本菌の感染に好適であることなどが考えられるが、明らかにされていない。さらに、第2章においては、本菌は *S. iniae* に同定されること、野生のマサバ、養殖ヒラメおよび淡水養殖アユなどの他魚種由来株と同じ生化学的性状と共通抗原をもつことが明らかとなった。しかし、本菌と他魚種から分離される菌株との病原性の異同については検討されていない。

また、本菌は第2章において、ヒトに病原性のある菌種を含む化膿性連鎖球菌のグループに分類されることを述べた。アメリカでは、養殖セラピアの *S. iniae* 感染症が報告されている (Perera *et al.*, 1994) が、Weinstein *et al.* (1996) は、カナダにおいてアメリカから輸入したセラピアを調理したヒトの *S. iniae* 感染例を報告している。これらのことから、本菌は温血動物に対する病原性を有しているのではないかと心配される。しかし、本菌の温血動物に対する病原性については検討されていない。

そこで、本菌のブリに対する各種の感染方法による病原性、各種病魚由来株のブリおよびアユに対する病原性、発病に及ぼす飼育水温の影響、本菌接種後の臓器内における消長と症状の発現との関係を調べるとともに、マウスに対する病原性についても検討した。

第1節 各種感染法による病原性の比較

本菌のブリに対する病原性を、腹腔内接種法、菌浴法および経口投与方法により調べた。また、腹腔内接種による実験的感染によって、体重の異なるブリに対する病原性を調べた。さらに、各種病魚から分離された菌株をブリおよびアユに腹腔内接種して実験的感染による病原性の差異を比較した (佐古 1993a)。

材料および方法

各種感染法による病原性

供試魚：ハマチ用モイストペレットを給与し

て養成した平均体重 20 g, 24.4 g および 29.4 g の3群のブリを用いた。

供試菌株：第2章の分類学的研究によって、*S. iniae* に同定された養殖ブリ由来のNo. 1株を用いた。供試菌株をBHI寒天で25°C、20時間培養後に集菌して、生理食塩水に懸濁した。そして、5,000 rpmで10分間の遠心分離によって1回洗浄したのちに、再度生理食塩水に懸濁させて実験的感染に用いた。

腹腔内実験的感染：平均体重 24.4 g のブリ各20尾ずつの腹腔内に、供試菌株をそれぞれ1尾当たり 5.3×10^8 , 5.3×10^6 , 5.3×10^4 および 5.3×10^2 cfu あて接種したのち、60 l の流水式角型アクリル水槽に收容し、モイストペレットを1日2回給与して2週間飼育し、死亡ならびに症状の発現を観察した。なお、飼育期間中の水温は20.6~22.5°Cであった。死亡魚および発病して体の変形を呈した個体は直ちにに取り上げて、第1章第1節と同様の方法によって、各種臓器における接種菌の数を測定した。なお、発病して変形を呈したブリは、80 ppm の *m*-アミノ安息香酸エチルメタンスルホネートで麻酔後に、尾柄部からヘパリン処理した注射器を用いて採血したのち、血液および各種臓器中の菌数を測定した。

菌浴による実験的感染：100 l パンライト水槽に22°Cの20 l の海水を入れ、あらかじめ用意した供試菌株の生理食塩水懸濁菌液を加えて作製した 5.3×10^6 および 5.3×10^4 cfu/ml 海水希釈菌液に、それぞれ平均体重 20 g のブリ15尾を入れた。エアレーションをしながら20分間浸漬したのち、60 l の流水式角型アクリル水槽に收容し、モイストペレットを1日2回給与して2週間飼育し、死亡ならびに症状の発現を観察した。なお、飼育期間中の水温は21.8~22.9°Cであった。死亡魚および発病して体の変形を呈したブリは直ちにに取り上げて、第1章第1節と同様の方法によって、各種臓器における接種菌の数を測定した。

経口投与方法による実験的感染：供試菌株を 2.5×10^9 および 2.5×10^6 cfu/ml 含む生理食塩水懸濁液 10 ml を、それぞれ 15 g のヒラメ用配合飼料 (ヒガシマル P-1) に、5°C において1時間かけて吸着させた。これを、200 l の流水式角型

アクリル水槽 2 個に収容したそれぞれ平均体重 29.4 g のブリ 25 尾に対して、自由摂餌によって 1 回あるいは 1 日 1 回 5 日間連続投与した。なお、1 回の投与による 1 尾当りの菌の摂取量は、 10^9 および 10^6 cfu の 2 段階となるように設定し、前者には菌数の多く含まれた飼料を、後者には菌数の少ない飼料を投与した。菌の初回投与から、いずれもモイストペレットを 1 日 2 回給与して 2 週間飼育し、死亡ならびに症状の発現を観察した。なお、飼育期間中の水温は 22.7~23.5°C であった。発病して変形を呈したブリは直ちにに取り上げて、第 1 章第 1 節と同様の方法によって、各種臓器における接種菌の数を測定した。

種々の体重のブリに対する感染実験

供試魚：ハマチ用モイストペレットを給与して養成した大きさの異なる 6 群のブリを用いた。

供試菌株：養殖ブリ由来の *S. iniae* No. 1 株を用いた。供試菌株を BHI 寒天で 25°C、20 時間培養後に集菌して、生理食塩水に懸濁した。そして、5,000 rpm で 10 分間の遠心分離によって 1 回洗浄したのちに、再度生理食塩水に懸濁させて実験的感染に用いた。

実験的感染：平均体重が 13.9 g, 33.6 g, 52.0 g, 123 g, 445 g および 1,840 g のブリを用いて、魚体重による感受性の差異を検討した。供試菌株をそれぞれ魚体重 100 g 当り 0.025 mg (1 尾当り $5.5 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^8$ cfu) 腹腔内接種したのちに、13.9 g および 33.6 g のブリは 60 l の、52.0 g および 123 g のブリは 200 l の流水式角型アクリル水槽に、445 g および 1,840 g のブリは 1 kl の流水式パンライト水槽に収容して、モイストペレットを 1 日 2 回給与して 2 週間飼育し、死亡ならびに症状の発現を観察した。なお、飼育期間中の水温は 21~23°C であった。

各種病魚由来 *S. iniae* 菌株の病原性の比較

供試魚：ハマチ用モイストペレットを給与して養成した平均体重 20.5 g のブリおよびアユ用クランブルで養成した平均体重 45.2 g の琵琶湖産アユを用いた。

供試菌株：第 2 章の分類学的研究において、*S. iniae* に同定された菌株のなかから、ブリ由来

の No. 1 株、マサバ由来の 3K 株、ヒラメ由来の F-2 株、アユ由来の PT 85107 株およびアマゾン淡水イルカ由来の *S. iniae* ATCC 29178 株の 5 菌株を供試した。供試菌株をそれぞれ BHI 寒天で 25°C、20 時間培養後に集菌して、生理食塩水に懸濁した。そして、5,000 rpm で 10 分間の遠心分離によって 1 回洗浄したのちに、再度生理食塩水に懸濁させて実験的感染に用いた。

実験的感染：ブリに対する病原性の比較は、供試したすべての 5 菌株について行った。それぞれ 10 尾のブリに、魚体重 100 g 当り 1 および 0.01 mg を腹腔内に接種したのち、60 l の流水式角型アクリル水槽に収容し、モイストペレットを 1 日 2 回給与して 20 日間飼育し、死亡ならびに症状の発現を観察した。なお、飼育期間中の水温は 21.0~22.0°C であった。死亡魚および発病して体の変形を呈した魚は直ちにに取り上げ、第 1 章第 1 節と同様の方法によって、脳および腎臓における接種菌の数を測定した。

また、アユに対する病原性の比較は、No. 1 株および PT 85107 株の 2 株について行った。それぞれ 10 尾のアユに、魚体重 100 g 当り 10^2 、 10^4 および 10^6 mg を腹腔内に接種したのち、50 l の流水式丸型塩ビ水槽に収容し、無給餌で 15 日間飼育して観察した。なお、飼育期間中の水温は 19~20°C であった。死亡魚の脳と腎臓からは、白菌耳を用いて BHI 寒天に塗抹して菌分離を行った。

結 果

腹腔内実験的感染：腹腔内接種による感染実験の結果は、Table 10 に示すとおりである。すなわち、1 尾当り 5.3×10^8 cfu を接種した場合、菌を接種してから 2 日後に 20 尾中 2 尾、3 日後に 1 尾が死亡し、菌接種 3~8 日後にかけて、合計 17 尾の変形症が出現した。また、1 尾当り 5.3×10^6 cfu、 5.3×10^4 cfu および 5.3×10^2 cfu を接種した場合、それぞれ 20 尾中変形 16 尾、死亡 1 尾と変形 12 尾および変形 13 尾がみられた。ブリ由来の *S. iniae* No. 1 株接種によりみられた変形魚を Fig. 7 に、鰓蓋内側の発赤を Fig. 8 に、上顎内側の出血を Fig. 9 に、眼球の白濁と出血を

Table 10. Pathogenicity of *Streptococcus iniae* No. 1 to yellowtail in intraperitoneal administration infection

Challenge dose (cfu/fish)	No. of fish challenged	No. of fish died (No. of fish deformed)										Total no. of fish died	Total no. of fish deformed
		Days after inoculation											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
5.3×10^8	20	2	1	(2)	(3)	(4)	(4)	(3)				3	17
			(1)										
5.3×10^6	20				(2)	(4)	(6)	(3)	(1)			0	16
5.3×10^4	20					(1)	(6)	(4)	(1)			1	12
							1						
5.3×10^2	20						(5)	(3)	(3)	(2)		0	13

Fig. 10 に、心外膜炎を Fig. 11 に示した。

死亡魚および変形症を呈した個体の臓器内における *S. iniae* 生菌数の分布は、Table 11 に示すとおりである。すなわち、死亡魚では調べたいいずれの臓器においても 10^8 cfu/g 以上の高い生菌数を示した。これに対して、変形魚では、どの検査個体からも菌が検出された臓器は脳、脊髄、脾臓、腎臓、心臓および鰓であった。これらのうち、比較的高い菌数が検出されたのは脳、脊髄および心臓で、それぞれ 10^{5-8} 、 10^{5-7} および 10^{4-9} cfu/g であった。いっぽう、個体によっては血液、肝臓、胃、腸、糞、筋肉あるいは眼球中の菌数が検出限界以下の場合もみられた。なお、検出限界は血液では 10 cfu/ml、その他の臓器では 10^2 cfu/g であった。

菌浴による実験的感染：菌浴による感染実験の結果は、Table 12 に示すとおりである。すなわち、 5.3×10^6 cfu/ml の菌液に20分間浸漬した場合には、菌浴してから6～9日後にかけて15尾中合計3尾が変形症を発現し、12日後に1尾が死亡した。 5.3×10^4 cfu/ml 20分間の菌浴感染では、菌浴から8日後に15尾中の1尾が変形症を発現した。変形症を呈した個体の臓器内の *S. iniae* 生菌数の分布は、Table 13 に示すとおりである。脳および心臓で 10^6 cfu/g 以上、腸で 10^5 cfu/g 以上と比較的高い値を示したが、そのほかの臓器ではこれらより低く、脊髄、肝臓および筋肉中では検出限界以下の個体もみられた。

経口投与による実験的感染：経口投与による感染実験の結果は、Table 14 に示すとおりである。すなわち、1回当たりの投与菌量が1尾当たり

10^9 cfu の場合には、1回の投与では25尾中1尾が7日後に変形症を発現したが、5日間連続で5回投与の場合には、初回投与から8～12日後にかけて25尾中合計6尾が変形症を発現した。1回当たりの投与菌量が1尾当たり 10^6 cfu の場合には、1回の投与では変形症は発現しなかったが、5日間連続投与の場合には12日後に25尾中1尾が変形症を発現した。変形症を呈した個体の臓器内の *S. iniae* 生菌数の分布は Table 15 に示すとおりである。例外なく多くの菌が検出されたのは脳においてのみで、菌数は 10^{6-8} cfu/g であった。また、例外なく菌が分離されなかったのは筋肉中からのみであった。そのほかの臓器からの菌の分離状況には、一定の傾向はみられなかった。

種々の体重のブリに対する感染実験：種々の大きさのブリに対する感染実験の結果は、Table 16 に示すとおりである。平均体重 13.9 g のブリでは、菌接種から4～6日後に21尾中19尾中が死亡し、生残した2尾が変形症を呈した。これより体重が重い供試魚群では、死亡はほとんどみられず、変形症の発現率は体重が重いほど低くなる傾向がみられた。

各種病魚由来 *S. iniae* 菌株の病原性：各供試菌株のブリに対する感染実験の結果は、Table 17 に示すとおりである。ブリ由来の No. 1 株を接種したときには、魚体重 100 g 当たり 1 mg 接種区では菌を接種してから2～3日後にかけて10尾中8尾が死亡し、その後生残した2尾が体の側湾を主病徴とする変形症を呈した。0.01 mg 接種区では死亡魚はなく、10尾とも変形症が発



Fig. 7. Vertebral deformity found in yellowtail experimentally infected with *Streptococcus iniae* No. 1.



Fig. 8. Congestion in the inside of the operculum found in a yellowtail experimentally infected with *Streptococcus iniae* No. 1.

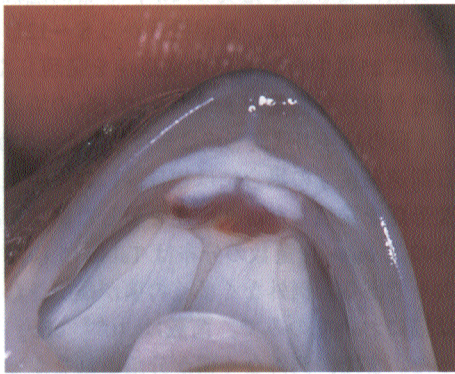


Fig. 9. Congestion in the inside of the upper jaw found in a yellowtail experimentally infected with *Streptococcus iniae* No. 1.

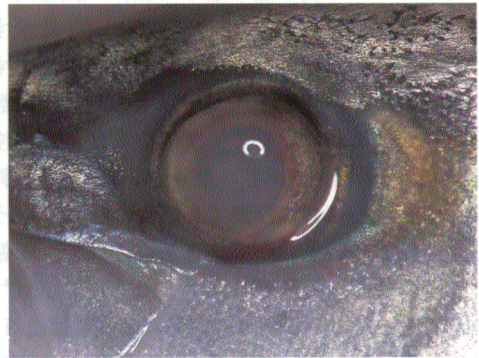


Fig. 10. Corneal opacity and hemorrhage of the eye found in a yellowtail experimentally infected with *Streptococcus iniae* No. 1.

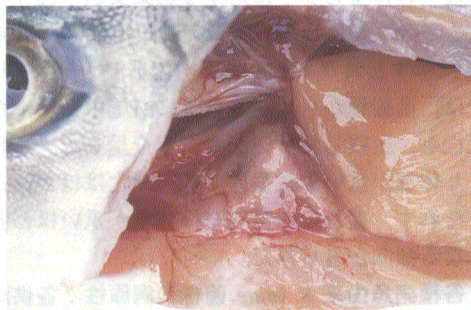


Fig. 11. Epicarditis found in a yellowtail experimentally infected with *Streptococcus iniae* No. 1.

現した。

これに対して、他魚種由来の菌株においては、

野生マサバ由来の3K株接種魚では、1 mg 接種区で7尾が死亡し、3尾に変形症が発現した。0.01 mg 接種区では1尾が死亡し、6尾に変形症が発現した。養殖ヒラメ由来のF-2株接種魚では、1 mg 接種区で4尾が死亡し、5尾に変形症が発現した。0.01 mg 接種区で1尾が死亡し、4尾に変形症が発現した。淡水養殖アユ由来のPT 85107株接種魚では、1 mg 接種区で5尾が死亡し、5尾に変形症が発現した。0.01 mg 接種区では死亡魚はみられなかったが、10尾ともに変形症が発現した。いっぽう、アマゾン淡水イルカ由来の*S. iniae* ATCC 29178株接種魚では死亡、変形症のいずれもみられなかった。

死亡魚の症状としては、各接種菌株に共通して胸鰭基部、尾鰭基部、鰓蓋内側および外側や

Table 11. Viable counts of *Streptococcus iniae* in various organs of died and deformed fish after intraperitoneal inoculation

Fish No.	Viable count (\log_{10} cfu/ml or g)												
	Blood	Brain	Spinal cord	Spleen	Kidney	Heart	Liver	Stomach	Intestine	Feces	Muscle	Gill	Eye
Died fish													
1	NT	9.52	9.28	8.61	10.30	10.28	10.04	9.52	9.54	NT	8.79	9.56	9.65
2	NT	9.79	9.61	9.11	10.45	10.54	10.23	9.81	9.71	NT	8.53	9.76	9.74
3	NT	8.89	8.80	9.52	10.43	10.28	9.95	9.61	9.61	NT	8.85	9.99	9.61
Deformed fish													
1	<1	5.28	5.72	2.90	2.30	3.85	2.60	2.70	<2	<2	<2	2.00	2.60
2	2.69	7.62	6.66	4.76	3.97	9.34	NT	4.18	6.85	5.45	3.11	3.46	8.79
3	1.60	7.57	5.23	4.63	3.93	7.88	5.23	3.26	5.88	<2	<2	5.98	9.32
4	2.61	7.26	6.68	3.08	3.91	4.45	<2	2.95	6.00	<2	<2	3.08	4.18
5	1.00	6.96	5.94	2.48	2.48	5.70	<2	<2	2.30	<2	2.30	3.49	3.15
6	1.30	5.98	4.89	4.32	6.90	4.26	3.59	7.48	7.18	7.00	<2	3.26	<2
7	1.00	7.41	6.34	3.15	3.43	4.89	2.70	<2	5.48	<2	<2	3.60	2.78
8	1.60	7.08	6.95	5.28	3.54	5.74	2.60	2.78	7.04	4.04	<2	7.70	7.41

NT, not tested.

Table 12. Pathogenicity of *Streptococcus iniae* No.1 to yellowtail in seawater borne infection

Challenge dose	No. of fish challenged	No. of fish died (No. of fish deformed)										Total no. of fish died	Total no. of fish deformed	
		Days after challenge												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			11-14
5.3×10^6 cfu/ml for 20 min.	15					(1)	(1)	(1)				1	1	3
5.3×10^4 cfu/ml for 20 min.	15									(1)			0	1

Table 13. Viable counts of *Streptococcus iniae* in various organs of deformed fish after seawater borne infection

Fish No.	Viable count (\log_{10} cfu/ml or g)								
	Blood	Brain	Spinal cord	Spleen	Kidney	Heart	Liver	Intestine	Muscle
1	3.26	7.64	5.54	3.75	3.56	6.45	2.78	8.84	2.00
2	2.08	6.04	<2	2.85	3.36	6.40	2.00	6.40	<2
3	1.85	7.53	2.00	3.73	3.36	6.30	<2	5.28	<2
4	1.78	7.04	4.95	3.28	3.32	7.36	2.30	4.48	<2

NT, not tested.

脳などの発赤，消化管の充血などが観察された。変形魚では体の側湾のほか，鰓蓋内側の発赤，上顎内側の出血などが多くの個体でみられた。また，小数ではあるが眼球の白濁，出血，突出も観察された。

死亡あるいは変形症を起こしたブリの脳および腎臓中の接種菌の菌数は，ブリ由来の No. 1 株接種による死亡魚の脳では 10^{9-10} cfu/g，腎臓では 10^{10} cfu/g，変形魚の脳では 10^{7-8} cfu/g，腎臓では 10^{2-6} cfu/g であった。また，養殖ヒラメ由

Table 14. Pathogenicity of *Streptococcus iniae* No. 1 to yellowtail in oral administration infection

Challenge dose (cfu/fish/day)	Times	No. of fish challenged	No. of fish deformed												Total no. of fish died	Total no. of fish deformed	
			Days after first administration														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			13
10 ⁹	1	25						1								0	1
10 ⁹	5	25							1		3	1	1			0	6
10 ⁶	1	25														0	0
10 ⁶	5	25											1			0	1
Control		25														0	0

Table 15. Viable counts of *Streptococcus iniae* in various organs of deformed fish after oral administration

Fish No.	Viable count (log ₁₀ cfu/ml or g)									
	Blood	Brain	Spinal cord	Spleen	Kidney	Heart	Liver	Intestine	Muscle	Eye
1	2.81	7.20	3.23	4.45	4.62	3.36	2.60	2.00	<2	9.28
2	<1	7.34	<2	2.85	<2	6.40	<2	2.00	<2	NT
3	<1	6.91	<2	2.30	<2	2.00	<2	5.84	<2	NT
4	<1	8.76	3.52	<2	<2	<2	<2	<2	<2	NT
5	3.59	6.96	3.83	4.18	4.43	8.04	3.56	5.53	<2	NT

NT, not tested.

Table 16. Pathogenicity of *Streptococcus iniae* No.1 to yellowtail of various body weight in intraperitoneal administration infection

BW of fish (g)	Challenge dose (mg/100 g · BW, cfu/fish)	No. of fish challenged	No. of fish died (No. of fish deformed)										Total no. of fish died	Total no. of fish deformed	
			Days after inoculation												
			1-3	4	5	6	7	8	9	10	11-14				
13.9	0.025	5.5 × 10 ⁵	21	4	11	4	(1)	(1)						19	2
33.6	0.025	1.3 × 10 ⁶	21		(1)	(5)	(4)	(3)	(3)		(1)			1	17
52.0	0.025	2.1 × 10 ⁶	21		(1)	(4)	(1)	(4)	(2)	(4)				0	16
123	0.025	3.2 × 10 ⁶	20		(3)	(4)	(1)	(3)	(1)		(1)			0	13
445	0.025	1.6 × 10 ⁷	20		(1)									0	1
1,840	0.025	1.0 × 10 ⁸	5							(1)				0	1

来の F-2 株接種による死亡魚の脳では 10⁹⁻¹⁰ cfu/g, 腎臓では 10⁹⁻¹⁰ cfu/g, 変形魚の脳では 10⁶⁻⁸ cfu/g, 腎臓では 10³⁻⁷ cfu/g であった。野生マサバ由来の 3K 株接種による死亡魚の脳では 10⁹⁻¹⁰ cfu/g, 腎臓では 10¹⁰ cfu/g, 変形魚の脳では 10⁷⁻⁸ cfu/g, 腎臓では 10³⁻⁵ cfu/g であった。淡水養殖アユ由来の PT 85107 株接種による死亡魚の脳では 10⁹⁻¹⁰ cfu/g, 腎臓では 10¹⁰ cfu/g, 変形魚の脳では 10⁷⁻⁸ cfu/g, 腎臓では 10²⁻⁶ cfu/g であった。

これに対して, アマゾン淡水イルカ由来の *S. iniae* ATCC 29178 株接種魚の試験終了時の脳および腎臓の菌数は, 1 mg 接種区で 10 尾中 1 尾の腎臓から 10⁴ cfu/g が回収された以外は, すべて検出限界 (10² cfu/g) 以下であった。

アユに対する病原性は, Table 18 に示すとおりである。アユ由来の PT 85107 株を接種したときは, 魚体重 100 g 当り 10⁻² および 10⁻⁴ mg 接種区では, それぞれ 10 尾中 10 尾, 10⁻⁶ mg 接種区で

Table 17. Pathogenicity of *Streptococcus iniae* isolated from diseased marine and freshwater fishes and *S. iniae* ATCC 29178 to yellowtail in intraperitoneal administration infection

Strain No.	Source	Challenge dose (mg/100 g · BW, cfu/fish)		No. of fish challenged	No. of fish died) (No. of fish deformed)													Total no. of fish died	Total no. of fish deformed/ survived
					Days after inoculation														
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13-20		
No. 1	Yellowtail	1	1.7×10^8	10	6	2	(1)	(1)										8	2/2
		0.01	1.7×10^6	10				(4)	(3)	(1)	(1)	(1)							0
3K	Common mackerel	1	6.8×10^7	10	6	1		(1)	(2)									7	3/3
		0.01	6.8×10^5	10				1	(1)	(1)	(3)	(1)						1	6/9
F-2	Japanese flounder	1	8.2×10^7	10	3	1		(1)	(1)	(2)				(1)				4	5/6
		0.01	8.2×10^5	10				(1)	1	(1)	(1)	(1)						1	4/9
PT-85107	Ayu	1	1.1×10^8	10	3	2	(1)	(2)	(1)	(1)								5	5/5
		0.01	1.1×10^6	10				(1)	(4)	(1)	(2)	(2)						0	10/10
<i>S. iniae</i> ATCC 29178		1	1.0×10^8	10														0	0/10
		0.01	1.0×10^6	10														0	0/10
Control	Physiological saline			10														0	0/10

Table 18. Pathogenicity of *Streptococcus iniae* isolated from yellowtail and ayu to ayu in intraperitoneal administration infection

Strain No.	Source	Challenge dose (mg/100 g · BW, cfu/fish)		No. of fish challenged	No. of fish died	Mean days to death
No. 1	Yellowtail	10^{-2}	3.8×10^5	10	10	5.6
		10^{-4}	3.8×10^3	10	10	6.0
		10^{-6}	3.8×10^1	10	10	5.7
PT 85107	Ayu	10^{-2}	2.6×10^5	10	10	5.1
		10^{-4}	2.6×10^3	10	10	5.7
		10^{-6}	2.6×10^1	10	9	7.8
Control	Physiological saline			10	0	—

は10尾中9尾が死亡した。ブリ由来の No. 1 株を接種したときは、いずれの接種菌量においても10尾とも死亡した。なお、変形症の発現は観察されなかった。死亡魚の症状はいずれの接種菌株の場合においても、肛門の拡張、発赤、各鰭基部の発赤あるいは出血、尾柄部の充血、腹腔壁の出血などが顕著であった。また、死亡魚の脳および腎臓からは例外なく接種菌が多数再分離された。

考 察

本研究における接種菌量を数段階に変えた腹腔内接種実験の結果から、多量の菌を接種する

と死亡に至る個体があるが、少量の菌の接種では側湾を主病徴とする変形症を発現することが多いことがわかった。また、本菌の接種によって、本症の自然感染魚の症状として報告されている眼球の充出血や白濁、突出、鰓蓋内側の充出血、心外膜炎（見奈美他 1979）、脊椎変形症（界外他 1984）などのすべての症状が発現することがわかった。これらの感染実験における臓器内の菌数は、死亡魚では各臓器ともに高い値を示したが、変形魚では脳内の菌数のみが他の臓器よりも高いことが特徴であった。また、菌浴および経口感染実験においても、発病率は低かったが変形症が発現し、脳における本菌の特異的な増殖がより顕著に認められた。これらの

ことから、ブリは本菌の急性的な全身感染を受けた場合は死亡するが、主に脳内における感染、増殖にとどまった場合は変形症を呈するものと思われる。

ブリに対する本菌の実験的な病原性については、見奈美他 (1979) はブリから分離した β 溶血性連鎖球菌は腹腔内接種によって体重 10~65 g のブリ稚魚を 1 尾当り 10^4 細胞の接種菌量で 100% 死亡させたとしている。いっぽう、大西・城 (1986) はアユ由来株について体重約 60 g のブリ稚魚に対する病原性を検討し、魚体重 100 g 当り 2.7×10^8 cfu の腹腔内接種で 60% の死亡率となり病原性は弱いとしている。感染実験の結果は、用いる菌株やその保存状況だけでなく、供試魚の状況や環境条件によっても異なると思われる。したがって、これらの結果と今回の結果とを単純には比較できないと思われるが、本研究における、体重の異なるブリに対する感染実験の結果から、小さなブリほど全身感染になりやすく、死亡に至る場合が多いのではないかと思われる。また、魚体重が増えるに従って、変形症の発病率が低下したこと、ならびに自然発生例はいずれも体重 50 g 以下の魚において報告されていることなどから、本症は稚魚期に罹病しやすい疾病であると考えられる。

ブリ、マサバ、ヒラメおよびアユ由来菌株のブリに対する病原性の比較実験において、体重 100 g 当り 1 mg ($6.8 \times 10^7 \sim 1.7 \times 10^8$ cfu) の多量の菌を接種した場合には、脳および腎臓中の菌数が顕著に増加し致死性が高くなったが、接種菌数を減らすと腎臓中よりも脳においてよく増殖して変形症を発現することが明らかになり、各魚種由来菌株はほぼ同様の病原性を有するものと考えられた。

なお、*S. iniae* ATCC 29178 株はブリに対して病原性を示さなかった。第 2 章で明らかとなった血清型だけでなく、病原性においても病魚由来株とは異なるタイプであると考えられる。*S. iniae* ATCC 29178 株の病原性が保存の過程で喪失した可能性も考えられるので、今後は魚類由来株とアマゾン淡水イルカ由来株の遺伝的關係を調べるとともに、魚体通過による病原性の回復をはかったうえで、再度病原性を比較する必要

があると思われる。

ブリおよびアユ由来の *S. iniae* をアユに接種した場合、いずれにおいてもきわめて少ない菌数で高い死亡率が観察された。アユに対するアユ由来の本菌の病原性について、楠田他 (1981b) は平均体重 16.9 g のアユに対して 1 尾当り 6.2×10^2 細胞の筋肉内接種で、大西・城 (1986) は体重約 35 g のアユに対して魚体重 100 g 当り 2.2×10^2 cfu の腹腔内接種で、100% 死亡させることのできる強い病原性を有するとしている。今回の感染実験の結果から、アユに対してブリ由来株はアユの連鎖球菌症に特有の症状 (大西・城 1981, 宇賀神 1981) である肛門の拡張、発赤、各鰭基部の発赤あるいは出血、腹腔壁の出血などを引き起こし、アユ由来株と同様の病原性を示すことが明らかになった。

第 2 章において *S. iniae* に同定されたブリ、マサバ、ヒラメおよびアユ由来の β 溶血性連鎖球菌は同一の性状と共通抗原をもつこと、また、本章本節の実験的感染における、ブリとアユを用いたブリおよびアユ由来株の交差感染実験において、相互に同様の症状を発現させたことから、海水域と淡水域に分布する菌は同一のものであると考えられる。さらに、本研究において野生のマサバ由来株は、ブリに対してブリ由来株と同様の病原性を有し、また、本菌は菌浴および経口感染しうることが明らかとなった。したがって、本菌を保菌する野生魚は、餌あるいは環境水を介して養殖魚への感染源となりうると考えられる。これまでの結果から、第 1 章において検討した養殖ブリ稚魚の症例 1 の本症発生例は、本菌を保有するマサバが餌料の原料として使われ、これが感染源となった可能性が高い。本菌は魚肉ミンチ中において温度が高いと増殖することが知られており (Sako 1992a)、本症の予防に当たっては、生魚を用いた餌料の管理には注意が必要である。また、ブリの稚魚期の餌料へのドライペレットの導入の一層の推進が望まれる。

今後、海水養殖魚、野生魚ならびに淡水養殖魚に広く分布する本菌の生態をさらに明確にするとともに、遺伝学的手法による本菌の検出が必要であると思われる。

第2節 飼育水温による病原性の比較

感染症は宿主，病原体および環境との相互関係のもとに成立するとされている (Snieszko 1974, Wedemeyer *et al.* 1976)。とくに，変温動物である魚類の病原体の宿主内における増殖は，宿主および環境の条件によって著しく左右されると思われる。本章第1節において，本菌の感染はブリの稚魚期に起こりやすいことが明らかになったが，変温動物である魚類では水温の影響が大きいと考えられる。

そこで，本節では飼育水温が発病に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

供試魚：ハマチ用モイストペレットを給与し，22°Cの水温で飼育されていた平均体重25.0gのブリを用いた。

供試菌株：養殖ブリ由来の *S. iniae* No. 1 株を用いた。実験的感染には供試菌株をBHI寒天で25°C，24時間培養後に集菌し，生理食塩水に懸濁して5,000 rpmで10分間の遠心分離によって1回洗浄したものを，接種菌として用いた。

飼育水温：15，18，21，24，27および30°Cの6段階の飼育水温を設定した。すなわち，各飼

育水温ごとに流水式の60l角型アクリル水槽を用意し，それぞれの水槽に供試魚を10尾ずつ収容したのち，各飼育水温への馴致を3日間かけて行った。

実験的感染：各飼育水温での飼育魚の腹腔内に，供試菌株を1尾当り 6.8×10^5 cfuあて接種したのち，モイストペレットを1日2回給与して，症状の発現状況を2週間観察した。変形症を発現した魚は直ちにとりあげ，第1章第1節と同様の方法によって，脳における接種菌の数を測定した。

結 果

それぞれの水温における死亡および変形魚の出現状況は，Table 19に示すとおりである。15°Cの飼育水温下では供試魚に変化はみられなかったが，18°C以上では脊椎変形魚がみられた。18°Cでは脊椎変形魚の出現率は10%であったが，21°Cから30°Cの範囲では80%以上の出現率であった。変形症が発現するまでの菌接種後の平均経過時間は，18°Cで9日，21°Cで7.9日，24°Cで6.7日，27°Cで6.0日，30°Cで5.6日であり，水温が高いほど短かった。

各水温で飼育した実験的感染ブリにみられた変形魚の脳における菌数は，Table 20に示すとおりである。すなわち，水温18°Cでは 10^7 cfu/g，21°Cでは 10^{6-7} cfu/g，24°Cでは 10^7 cfu/g，

Table 19. Pathogenicity of *Streptococcus iniae* No. 1 administered by intraperitoneal inoculation to yellowtail at various water temperatures

Water temperature (°C)	(Range)	No. of fish challenged*	No. of fish deformed (No. of fish died)										Total no. of fish died	Total no. of fish deformed	Mean days to deform		
			Days after inoculation														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				11	12-20
15	(15.4-15.9)	10													0	0	—
18	(17.8-18.6)	10							1						0	1	9
21	(20.8-21.5)	10						2	1	3	1		1		0	8	7.9
24	(23.8-24.2)	10						3	2	3	1	1			0	10	6.7
27	(25.8-27.0)	10						1	2	2	2	1			1	8	6.0
											(1)						
30	(29.3-29.9)	10						1	2	4	2		1		0	10	5.6

* Challenge dose was 6.8×10^5 cfu per fish.

Table 20. Viable counts of *Streptococcus iniae* in the brain of deformed fish reared at various water temperatures after intraperitoneal inoculation

Fish No.	Viable count (\log_{10} cfu/g)					
	15°C	18°C	21°C	24°C	27°C	30°C
1		7.52(9)	7.57(6)	7.23(5)	7.56(4)	7.45(3)
2			7.11(6)	7.43(5)	7.00(5)	7.36(4)
3			6.48(7)	7.41(5)	6.95(5)	7.45(4)
4				7.54(6)	6.91(6)	3.86(5)
5				7.45(6)	7.36(6)	6.95(5)

Number in parentheses represent days after infection.

27°C では $10^{6.7}$ cfu/g, 30°C では $10^{4.7}$ cfu/g であり, 飼育水温による差異はみられなかった。

考 察

S. iniae No. 1 株の *in vitro* における増殖至適温度は 35°C 付近であり, 35°C までの増殖速度は培養温度に比例している。

各飼育水温における本菌接種魚の症状の発現状況から, 病原性は水温 18°C 以上で発現するのではないと思われる。また, 水温 21~30°C で高い発病率が観察されたことから, 水温が高いほど発病に至るまでの期間が短いのではないと思われる。

本菌接種魚の脳における接種菌数の推移は, 飼育水温に強く影響されており, 水温が高いほどピークに達するまでの期間が短く, 変形症状の発現とよく対応していた。飼育水温にかかわらず, 変形魚の脳内の生菌数はほとんどの個体で 10^7 cfu/g 以上であることから, 菌の脳内での増殖と変形との関係が示唆される。

変温動物である魚類では, 一般的に水温によって成長, 代謝, 呼吸, 免疫応答などに影響を受けることから, 至適水温以上で飼育された場合には, 生理機能が低下する一方, 病原菌の増殖は活発になるために, 感染, 発病の機会が増加することも, 容易に考えられる。

本章第 1 節において, プリは成長にしたがって本菌に対する感受性が低くなることを明らかにしており, 感受性の高い稚魚期を低水温下で飼育することが, 本症の予防に有効であると思

われる。

第 3 節 本菌接種後の推移と症状の発現

第 1 章の自然発生例および本章第 1 節, 第 2 節の実験的感染の結果から, 本菌感染による外観症状としては変形が最も頻度が高くみられる症状であり, 本菌の脳への感染と変形症の発現が関係していることが示唆された。

そこで, 本節では本菌感染後の臓器内における本菌の推移と, 症状の発現との関係を詳細に検討した。

材料および方法

供試魚: ハマチ用モイストペレットを給与して養成した平均体重 25.0 g のブリ 180 尾を用いた。

供試菌株: 養殖ブリ由来の *S. iniae* No. 1 株を用いた。供試菌株を BHI 寒天で 25°C, 24 時間培養後に集菌して, 生理食塩水に懸濁した。そして, 5,000 rpm で 10 分間の遠心分離によって 1 回洗浄したものを, 実験的感染に用いた。

接種菌の推移と症状の発現の関係の検討: 供試ブリ 120 尾に対し, 1 尾当たり 3.0×10^4 cfu を腹腔内に接種したのち, 2 個の流水式角型 2001 アクリル水槽に 60 尾ずつ収容してモイストペレットを 1 日 2 回給与し, 22.8~24.3°C の水温で 15 日間飼育した。一水槽については 24 時間あるいは 2~3 日ごとに 4 ないし 7 尾ずつ取り上げ,

症状を観察したのち、80 ppm の *m*-アミノ安息香酸エチルメタンスルホネートで麻酔し、尾柄部からヘパリン処理した注射器を用いて採血した。ついで、体表および内臓の症状を肉眼的に観察したのち、脳、脾臓、腎臓、心臓、肝臓、腸管および皮膚を含む体側部の筋肉を採取し、第1章第1節と同様の方法によって接種菌の数を調べた。もう一つの水槽については、変形症状の発現に注目して観察した。対照としては、生理食塩水を腹腔内に接種したブリ60尾を同様に飼育して観察した。なお、変形症を発現した個体は毎日取り上げて別の水槽に移し、合計41尾について変形症発現後50日間ハマチ用モイストペレットを給与して飼育し予後を観察した。

結 果

経時的に取り上げた菌接種魚に観察された症状および各臓器内の菌数は Table 21 に示すとおりである。菌を接種して2日後から摂餌が不活発となり、菌接種から4～8日後に取り上げた魚の多くで、上顎および鰓蓋の内側の発赤、眼球の突出、出血、白濁が観察された。上顎および鰓蓋の内側の発赤については、菌の接種から10日後以降の魚にはほとんど観察されなくなった。内臓に関しては、菌接種から2～4日後の魚の多くに脾臓の腫張が観察されたが、これは菌の接種から5日後以降の魚ではみられなくなり、代わって心外膜炎がみられる個体が散見された。変形魚は菌を接種して6日後から取り上げたが、前述の外観症状の有無と変形症状との間には、とくに関係がみられなかった。

菌接種後の臓器内の菌数については、腹腔内に菌を接種したために、各臓器における菌数は1日後に 10^{3-6} cfu/ml あるいは g となり、全臓器に分散したが、脳では2日後以降に顕著な増加がみられた。すなわち、菌接種から1日後に 10^{3-4} cfu/g であったものが、5日後には 10^{7-8} cfu/g となった。そして、8日後までは 10^{7-8} cfu/g の菌数を保ったが、それ以降は減少に転じた。変形後6～8日間経過した魚の脳からは、接種菌が培養されない場合が多かった。脳以外の臓器については、心臓などでは個体によって高い菌数

を示すものがみられたが、全体的にみると脳におけるような明瞭な増加はみられなかった。これらの菌数の推移の傾向を Fig. 12 (A) に示した。

菌接種後のブリの変形症状の発現は Fig. 12 (B) に示すとおりである。魚体の変形は5日後に1尾で観察され、その後は次第に変形魚数が増加し、11日目までに累計51尾に変形がみられ、変形症の発病率は85%となった。なお、生理食塩水を接種した対照区のブリでは変形などの症状はまったくみられなかった。

変形魚を変形が起こってから50日間継続飼育し、変形症状の回復状況を観察した結果は Fig. 13 に示すとおりである。変形症を発現してから数日～1週間後には次第に餌を食べようになり、供試した41尾の変形魚中、変形症の発現から10日後で2尾(5%)、20日後で21尾(51%)、50日後で33尾(80%)の変形症状が消失した。しかし、8尾に観察された眼球の白濁は治癒することなく、失明状態のまま推移した。なお、この間の死亡魚は3尾(7%)であった。

考 察

ブリ変形症の原因については、薬剤の副作用(窪田他 1970)、農薬(馬場他 1974)、ビタミン欠乏(坂口他 1969)、寄生虫の寄生(古川他 1981, Egusa 1985, 阪口他 1987, Maeno and Sorimachi 1992)、細菌の感染(宮崎 1982, 界外他 1984)およびウイルスの感染(中島他 1993)などが報告されているが、未だに明らかでない部分も多い。

本菌接種後の臓器内における菌の推移および症状の観察から、脳における生菌数がピークに達したところから変形魚が出現している。本節における実験的感染魚および第1章第1節で明らかにした自然発病した変形魚においては、脳以外の臓器からは本菌がほとんど分離されないことから、本菌の脳への感染が変形症の原因であると思われる。

また、体の変形を呈した直後の脳における生菌数は多いが、その後の脳の生菌数は次第に減少し、側湾症を発現して1週間程度経過すると、

Table 21. Clinical signs in yellowtail observed after intraperitoneal injection with *Streptococcus iniae* No. 1

Days after infection	Fish No.	External symptoms				Anatomical symptoms	Viable count of inoculated bacteria (log ₁₀ cfu/ml, g)							
		Vertebral* deformity	Congestion in inside of upper jaw	Congestion and/or swelling in inside of operculum	Exophthalmos, hemorrhage, or cloudiness of eye		Blood	Brain	Spleen	Kidney	Heart	Liver	Intestine	Muscle
1	1	-	-	-	-	-	4.89	2.78	6.46	5.81	4.82	5.71	5.20	3.04
	2	-	-	-	-	-	5.38	3.96	7.58	5.60	5.54	5.86	6.41	3.52
	3	-	-	-	-	-	4.95	3.26	7.0	5.83	5.18	5.46	5.41	3.11
	4	-	-	-	-	-	5.61	4.18	7.28	5.60	5.80	6.15	6.26	3.86
2	5	-	-	-	-	Hypertrophy of spleen	5.20	5.34	6.60	6.04	5.90	4.74	6.49	3.79
	6	-	-	-	-	〃	4.84	4.82	6.20	5.79	6.04	4.83	5.72	4.26
	7	-	-	-	-	〃	5.11	4.04	6.76	5.36	6.04	4.78	6.00	4.00
	8	-	-	-	-	〃	4.90	6.52	6.83	5.62	6.00	5.15	6.00	3.65
3	9	-	-	-	-	-	5.51	6.95	6.46	6.08	6.30	4.63	5.94	3.88
	10	-	-	-	-	Hypertrophy of spleen	4.78	6.72	6.34	6.36	6.28	4.51	6.04	3.30
	11	-	-	-	-	〃	5.30	6.11	6.61	5.63	5.85	4.65	5.63	3.76
	12	-	-	-	-	-	5.32	6.51	6.94	6.11	6.23	6.11	6.99	6.15
4	13	-	+	+	-	Hypertrophy of spleen, congestion of liver, epicarditis	4.08	7.00	5.38	4.86	6.48	3.73	3.52	3.18
	14	-	+	+	-	Hypertrophy of spleen, epicarditis	6.18	7.79	7.98	6.70	8.15	6.11	7.30	6.11
	15	-	+	-	-	Ascitic fluid	4.66	6.30	5.85	5.32	6.51	3.67	4.18	4.04
	16	-	-	-	+	-	4.76	5.79	5.86	4.56	5.59	4.04	5.65	2.78
5	17	-	+	+	+	-	3.72	7.46	4.96	5.30	6.11	4.08	4.38	2.85
	18	-	+	+	-	-	4.49	7.90	5.58	5.04	6.54	3.99	4.65	3.32
	19	-	+	-	-	Adhesion	1.70	7.73	3.53	3.76	4.72	2.60	4.04	2.00
	20	-	+	+	-	-	5.15	7.52	6.04	5.23	5.60	3.95	4.40	2.60
6	21	+	-	-	-	Epicarditis	3.43	7.18	2.90	2.30	6.56	3.53	2.60	<2
	22	-	-	-	-	-	1.48	7.77	5.32	4.32	4.30	2.95	3.26	4.40
	23	-	+	+	-	-	<1	7.49	2.70	2.00	3.96	3.65	2.70	2.00
	24	-	+	+	+	-	5.28	6.94	5.58	5.99	5.99	4.92	4.64	4.74

7	25	+	+	+	+	+	<1	7.20	3.00	2.70	7.23	<2	<2	<2
	26	+	+	+	+	+	2.67	7.48	3.08	3.67	6.77	2.30	3.11	4.48
	27	-	-	-	-	-	2.56	NT	4.67	2.00	6.65	2.00	3.65	<2
	28	-	+	+	+	+	5.81	7.08	6.86	6.92	6.18	5.28	5.88	4.08
8	29	+	+	+	+	+	1.95	7.04	2.85	2.70	7.18	2.30	2.00	<2
	30	+	+	+	+	+	2.43	7.65	3.49	3.82	7.64	3.30	2.60	2.90
	31	-	-	-	-	-	2.48	7.08	3.04	3.52	7.53	2.30	<2	2.90
	32	-	-	-	-	-	<1	7.08	2.95	<2	2.48	<2	<2	<2
9	33	+	+	+	+	+	2.11	7.69	3.84	4.15	2.30	2.70	<2	<2
	34	+	+	+	+	+	1.30	6.26	4.78	3.08	7.57	2.60	2.00	3.15
	35	-	-	-	-	-	<1	5.82	2.00	2.48	6.81	3.34	4.18	<2
	36	-	-	-	-	-	<1	5.67	<2	2.48	4.36	2.60	2.30	3.90
10	37	+	+	+	+	+	<1	3.60	<2	2.00	5.79	<2	4.30	<2
	38	-	-	-	-	-	<1	<2	2.00	3.18	7.30	<2	6.45	<2
	39	+(4)	-	-	-	+	1.95	8.23	2.00	2.90	2.30	<2	2.00	<2
	40	+(3)	-	-	-	+	<1	6.46	4.62	2.30	6.20	2.30	<2	<2
12	41	+(6)	-	-	-	-	<1	3.18	<2	<2	5.23	<2	5.23	<2
	42	+(5)	-	-	-	-	<1	2.48	<2	<2	6.83	<2	5.32	<2
	43	+(4)	-	-	-	+	1.48	4.30	2.00	<2	3.00	2.00	<2	<2
	44	+(3)	-	-	-	-	<1	7.78	<2	<2	<2	<2	5.45	<2
	45	-	-	-	-	-	<1	<2	<2	4.57	<2	<2	<2	<2
	46	-	-	-	-	-	<1	2.60	2.00	<2	4.18	<2	<2	<2
	47	-	-	-	-	-	1.60	<2	2.95	3.43	3.89	2.00	2.30	2.00
15	48	+(6)	-	-	-	+	<1	6.04	<2	<2	6.15	<2	<2	<2
	49	+(6)	-	-	-	-	<1	<2	<2	<2	<2	<2	NT	2.00
	50	+(8)	-	-	-	+	<1	<2	2.60	2.00	9.26	4.82	NT	<2
	51	+(8)	-	-	-	+	<1	<2	<2	<2	6.96	<2	<2	<2
	52	-	-	-	-	-	<1	<2	<2	<2	5.15	<2	4.00	<2
	53	-	-	-	-	+	<1	<2	2.48	2.30	5.85	4.74	<2	<2
	54	-	-	-	-	-	<1	<2	2.30	<2	5.80	<2	<2	<2

* Numbers in parentheses indicate days after the fish showed vertebral deformity.
NT, not tested.

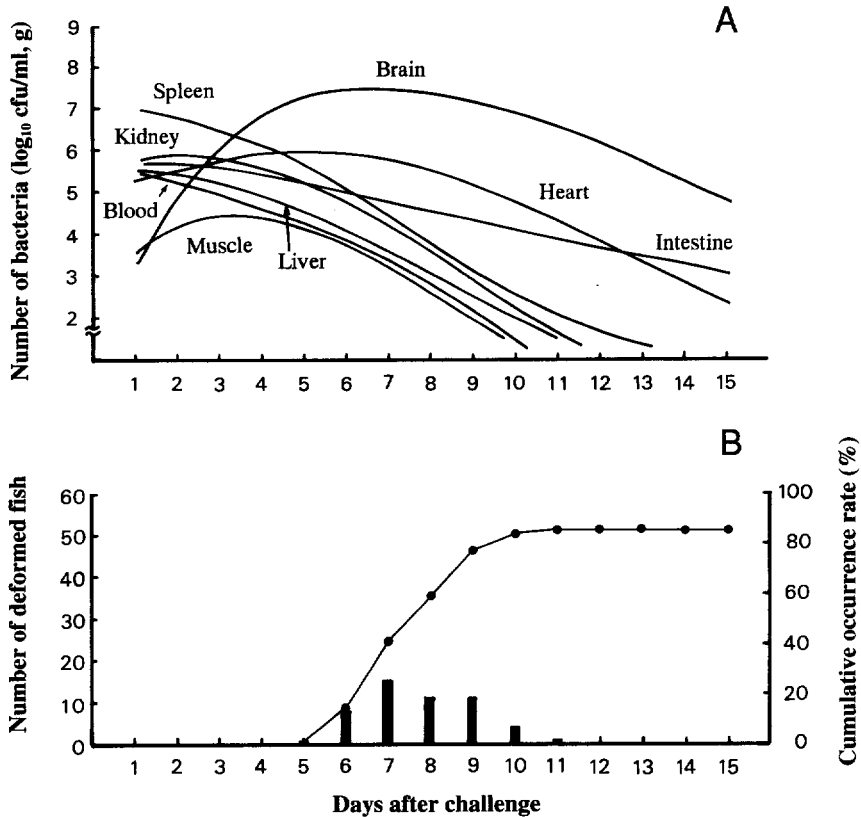


Fig. 12. Changes in viable cell numbers of *Streptococcus iniae* No. 1 in various organs of yellowtail after challenged with intraperitoneal inoculation (Fig. A). Occurrence of vertebral deformity in yellowtail after intraperitoneal inoculation with *Streptococcus iniae* No. 1 (Fig. B) ■, number of deformed fish; ●, cumulative occurrence rate.

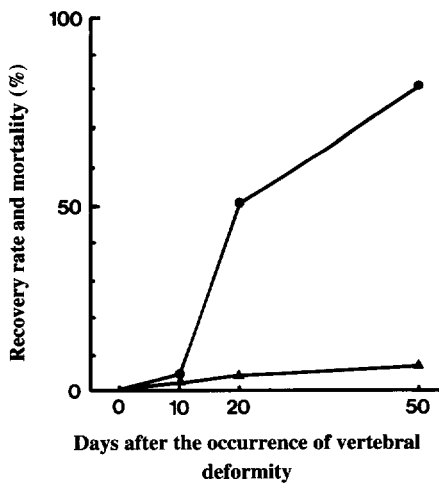


Fig. 13. Recovery from vertebral deformity during continuous rearing of experimentally deformed fish with inoculation of *Streptococcus iniae* No. 1. ●, recovery rate; ▲, mortality.

体は側湾していても脳からは菌が培養されることがあることがわかった。

さらに、変形魚を継続飼育すると、多くのものは脳の生菌数が減少に転じる頃から次第に餌を食べるようになり、やがて変形症状は次第に消失し、治癒したと考えられる個体も多くみられる。

本菌の感染による発症および症状の消失の機構を明らかにするためには、さらに脳を中心とした組織学的検討が必要であると思われる。

第4節 マウスに対する病原性

連鎖球菌には、ヒトや家畜などの病原菌となるものが知られている。第2章における分類学

的研究の結果、本菌は Pier and Madin (1976) がアマゾン淡水イルカから分離し、*S. iniae* と命名した菌に同定された。Pier and Madin の報告では、アマゾン淡水イルカから分離された *S. iniae* ATCC 29178 株の温血動物に対する病原性はあまり強くないとされている。いっぽう、最近、カナダでは Weinstein *et al.* (1996) によって、テラピアを調理したヒトの *S. iniae* 感染例が報告されている。

そこで、魚類由来の *S. iniae* の温血動物に対する病原性を検討するために、本菌のマウスに対する接種実験を行った。

材料および方法

供試菌：魚類由来の *S. iniae* 菌株として、ブリ由来の No. 1 株、マサバ由来の 3K 株、ヒラメ由来の F-2 株およびアユ由来の PT 85107 株を、対照として、*S. iniae* ATCC29178 株を用いた。また、1985年9月3日に三重県の養殖ブリ病魚から分離された腸球菌症原因菌の *E. seriolicida* MK1B 株および MK3K 株を用いた。実験的感染には、各供試菌株を BHI 寒天で 25°C、24時間培養後に集菌し、生理食塩水に懸濁して 5,000 rpm で10分間の遠心分離によって1回洗浄したものを、接種菌として用いた。

供試マウス：ICR ♂ 5 週令（日本エス エルシー）を用いた。平均体重は 28.7 g であった。

実験的感染：各供試菌株をそれぞれ5匹のマ

ウスの腹腔内に、体重 100 g 当り湿菌重量で 1 mg（マウス 1 匹当り約 10^8 cfu）の菌を注射したのち、配合飼料を与えて、23°C の室温で飼育し、10日間観察した。また、ブリ由来の No. 1 株については、さらに少ない菌量での病原性を調べるために、体重 100 g 当り $1 \sim 10^4$ mg（マウス 1 匹当り $1.4 \times 10^8 \sim 1.4 \times 10^4$ cfu）の5段階の菌を腹腔内接種したのち、同様に飼育して観察した。死亡したマウスの肝臓、腎臓、心臓、脾臓、肺および脳からは菌の再分離を行い、接種菌による死亡であることを確認した。また、生存したマウスについても同様に菌の再分離を行った。

結 果

各供試菌株をマウスに体重 100 g 当り 1 mg 接種したときの病原性は、Table 22 に示すとおりである。すなわち、ブリ由来の No. 1 株を接種したマウスは48時間後までに、マサバ由来の 3K 株では14時間後までに、ヒラメ由来の F-2 株では16時間後までに、アユ由来の PT 85107 株では60時間後までに、すべてが死亡した。マウスの症状としては、短時間内に死亡した 3K 株および F-2 株を接種したマウスでは、食欲不振と不動状態の症状がみられたが、そのほかの顕著な症状は認められなかった。No. 1 株および PT 85107 株を接種したマウスでは死亡するまでの時間が長かったものには、眼を半分閉じた状態

Table 22. Pathogenicity of *Streptococcus iniae* isolated from diseased fish and *S. iniae* ATCC 29178 and *Enterococcus seriolicida* isolated from yellowtail to mice after intraperitoneal inoculation

Species	Strain No.	Source	Challenge dose (mg/100g · BW, cfu/indiv.)		No. of mice died/tested (Time to death)
<i>S. iniae</i>	No. 1	Yellowtail	1	1.9×10^8	5/5 (25–48 h)
	3K	Common mackerel	1	1.2×10^8	5/5 (within 14 h)
	F-2	Japanese flounder	1	1.5×10^8	5/5 (within 16 h)
	PT-85107	Ayu	1	2.2×10^8	5/5 (25–60 h)
<i>S. iniae</i>	ATCC 29178	Amazon freshwater dolphin	1	8.4×10^7	0/5
<i>E. seriolicida</i>	MK1B	Yellowtail	1	1.1×10^8	0/5
	MK3K	〃	1	1.0×10^8	0/5
Control			Physiological saline		0/5

や目脂、数珠便が観察される個体のみられた。なお、死亡したマウスの肝臓、腎臓、心臓、脾臓、肺および脳からは、極めて多数の接種菌が純培養状に再分離された。

いっぽう、*S. iniae* ATCC 29178 株および *E. seriolicida* の 2 菌株を接種したマウスに死亡はみられなかった。なお、食欲は *S. iniae* ATCC 29178 株を接種したマウスでは、翌日はやや不振であったが、2 日後から良好となり、*E. seriolicida* の 2 菌株を接種したマウスでは、翌日から良好であった。このほかに外観的な症状はなく、10 日間の観察期間終了後に接種菌の再分離を行ったが、*E. seriolicida* MK1B 株接種マウスの 1 匹の脾臓と肝臓から、 $10^{2.00}$ および $10^{2.90}$ cfu/g の接種菌が再分離されたが、そのほかのマウスでは検出限界 (10^2 cfu/g) 以下であった。

ブリ由来の No. 1 株をマウスに体重 100 g 当り $1 \sim 10^{-4}$ mg 接種したときの病原性は、Table 23 に示すとおりである。すなわち、体重 100 g 当り 10^{-3} mg (1 匹当り 1.4×10^5 cfu) の接種では死亡はみられなかったが、 10^{-1} mg (1 匹当り 1.4×10^7 cfu) および 10^{-2} mg (1 匹当り 1.4×10^6 cfu) の接種では 5 匹中 4 匹が死亡した。マウスの症状としては、短時間内に死亡したマウスでは、食欲不振と不動状態の症状のみられた。また、死亡するまでの時間が長かったものには、眼を半分閉じた状態や目脂、数珠便が観察される個体のみられた。なお、死亡したマウスの肝臓、腎臓、心臓、脾臓、肺および脳からは、極めて多数の接種菌が純培養状に再分離された。

Table 23. Dose related pathogenicity of *Streptococcus iniae* No.1 isolated from yellowtail to mice after intraperitoneal inoculation

Challenge dose (mg/100g · BW, cfu/indiv.)		No. of mice died/tested (Time to death)	
1	1.4×10^8	5/5	(16–38 h)
10^{-1}	1.4×10^7	4/5	(24–63 h)
10^{-2}	1.4×10^6	4/5	(39–140 h)
10^{-3}	1.4×10^5	0/5	
10^{-4}	1.4×10^4	0/5	
Control (Physiological saline)		0/5	

考 察

アマゾン淡水イルカから分離された *S. iniae* ATCC 29178 株の温血動物に対する病原性については、Pier and Madin (1976) はマウスに対しては 1 匹当り 10^7 cfu の、モルモットに対しては 1 匹当り 10^8 cfu の菌数の腹腔内あるいは皮下注射で、異常はみられなかったとしている。本実験においても、ATCC 29178 株をマウスに 1 匹当り 8.4×10^7 cfu (体重 100 g 当り 1 mg) の腹腔内接種では死亡しなかったことから、温血動物に対する病原性は低いと考えられる。

いっぽう、各種病魚由来の *S. iniae* 4 菌株は、マウスを 1 匹当り $1.2 \sim 2.2 \times 10^8$ cfu (体重 100 g 当り 1 mg) の腹腔内接種で死亡させたことから、アマゾン淡水イルカ由来の *S. iniae* ATCC 29178 株よりも、マウスに対して強い病原性を有するものと思われる。ブリ由来の No. 1 株をマウスにさらに少量接種した場合には、1 匹当り 1.4×10^6 cfu (体重 100 g 当り 10^{-2} mg) の腹腔内接種で 80% が死亡したことから、温血動物に対して病原性を有するものと判断される。カナダでは、セラピアを調理したことのあるヒトの蜂巣炎患者らから *S. iniae* が分離されている (Weinstein *et al.* 1996) が、患者およびセラピアから分離された *S. iniae* のパルスフィールド電気泳動結果が一致しておらず、セラピアからヒトへの感染が証明されているわけではない。しかし、わが国では多くの魚種から本菌が分離されており、魚肉を生食する習慣もあることから、温血動物に対する病原性をさらに詳しく検討する必要があると思われる。本菌は Kawahara *et al.* (1989) によって、溶血毒を産生することが報告されているが、本菌およびヒトの病原性連鎖球菌のもつ病原因子との関連性を比較研究することが望まれる。

第 4 章 ワクチンに関する研究

本症の予防に関しては、ほかの感染症に対するのと同様に、餌料や飼育環境などの管理に留意し、適切な健康管理を行って発病要因を取り

除くことが基本であると思われる。第1章第1節において、野生のブリやマサバから本菌が分離されたことから、感染源の完全な遮断は困難であると考えられる。また、養殖環境下では絶えずなんらかのストレスを受け、罹病の危険性にさらされているものと考えられる。これらのことから、ブリにワクチンなどを投与して、感染に対する抵抗性を賦与することができれば、予防に有効な一つの手段となると思われる。

第1章第1節においては、本症の自然発症魚に本菌に対する抗体が産生されていることを明らかにした。また、第3章第3節においては、本菌の致死菌数以下の接種によって脊椎変形症を起こした実験的発病ブリを飼育し続けると、変形症状が次第に消失し、正常な体形に回復する個体が多くなることを明らかにした。これらのことから、感染を耐過したブリが免疫を獲得しておれば、ワクチンによる免疫が賦与される可能性があるのではないかと考えられる。

本菌のワクチンに関しては、ニジマスの連鎖球菌症でその有効性が報告されている (Sakai et al. 1987, 酒井他 1988)。しかし、ブリをはじめとする海産魚の本症に対するワクチンの予防効果については検討されていない。

そこで、本章ではワクチンによる本症の予防の可能性を検討するために、まず感染耐過魚の免疫の獲得状況を調べ、ついでワクチンによる能動免疫ならびに免疫血清による受動免疫の予防効果について検討した。

第1節 感染耐過魚の獲得免疫に関する検討

ブリの類結節症や腸球菌症では感染後に抗体が産生され、感染防御に重要な役割を果すのではないかとされている (楠田 1974, 福田・楠田 1980, 楠田・高木 1983)。本症の実験的感染魚の治癒個体においても、免疫を獲得しているのではないかと考えられる。このような治癒魚の感染防御能を調べることは、ブリの免疫機構の解明やワクチンの研究に役立つものと思われる。

そこで、本節では本菌を接種して、変形症状

が確認されたブリを継続飼育し、変形症状が治癒した個体に対して、再度実験的感染を行い、再感染に対する防御能の獲得の状況を調べた (佐古 1992b)。

材料および方法

供試魚：ハマチ用モイストペレットを給与して養成した平均体重 31.5 g のブリを用いた。

供試菌株：養殖ブリ由来の *S. iniae* No. 1 株を、BHI 寒天で 25°C、24 時間培養後に集菌して、生理食塩水に懸濁した。そして、5,000 rpm で 10 分間の遠心分離によって 1 回洗浄したのちに、再度生理食塩水に懸濁させて実験的感染に用いた。

感染方法と発病魚の症状回復までの飼育：供試魚 60 尾の腹腔内に、供試菌株を 1 尾当たり 3.4×10^6 cfu 接種したのち、200 l 角型アクリル水槽に収容した。これらのうち、体の変形症状が確認されたブリを、モイストペレットを 1 日 2 回給与して菌接種後 75 日間飼育し、変形症状が完全に消失したものを感染耐過魚として実験に供した。対照魚には、生理食塩水のみを接種して同様に飼育したブリを用いた。なお、飼育期間中の水温は、23.5~26.6°C であった。

感染耐過魚の血中凝集抗体価の測定：感染耐過魚および対照魚の各 5 尾の尾柄部から血液を採取し、常法により血清を分離した。そして、第 1 章第 1 節と同様の方法によって、供試菌株のホルマリン死菌に対する凝集抗体価を測定した。

感染耐過魚に対する再実験的感染：感染耐過魚および対照魚の各 30 尾の腹腔内に、供試菌株を魚体重 100 g 当たり 1.1×10^7 cfu 接種した。そして、それぞれを 15 尾ずつ二群に分け、一群はモイストペレットを 1 日 2 回給与して 2 週間飼育し、死亡ならびに症状の発現を観察した。また、ほかの一群は 1, 3, 5, 7 日後に 3~4 尾ずつ取り上げ、80 ppm の *m*-アミノ安息香酸エチルメタンサルホネートで麻酔後に尾柄部から血液を採取したのち、脳、脾臓および腎臓を摘出して、第 1 章第 1 節と同様の方法によって、血液および各臓器における接種菌の菌数を測定した。な

お、本実験中の飼育水温は、22.5~23.4°Cであった。

結 果

発病魚の症状の回復状況：菌接種から5~11日後に、60尾中51尾が脊椎変形症を呈した。これら変形魚のうち、眼球の白濁を呈した4尾を除く47尾を分養して飼育を続けたところ、菌接種2週間後頃から次第に餌を食べるようになり、75日後までに37尾の変形症が回復治癒した。このときの魚体重は116~175gであった。なお、死亡魚は菌接種8日後に1尾と、変形魚の飼育中の衰弱死2尾であった。

感染耐過魚の血中凝集抗体価：菌接種から75日後の感染耐過魚の血中凝集抗体価は、Table 24に示すとおりである。感染耐過魚の抗体価は1:4~1:16に上昇していたが、対照魚では検出限界(1:2)以下であった。

感染耐過魚の再感染に対する防御能：感染耐過魚に対する再感染実験の結果は、Table 25に示すとおりである。すなわち、対照魚では15尾中11尾が変形症を呈し、1尾が死亡したが、感染耐過魚では変形症ならびに死亡魚ともにまったくみられず、発病は認められなかった。

再感染後の血液、脳、脾臓および腎臓における接種菌の消長は、Fig. 14に示すとおりであ

Table 24. Agglutinating antibody titers in the sera of recovered fish after infected with *Streptococcus iniae* No. 1

Experimental group	Fish No.	Agglutinating antibody titer (1:)
Recovered fish*	1	16
	2	16
	3	16
	4	16
	5	4
Control	1	<2
	2	<2
	3	<2
	4	<2
	5	<2

* 75 days after experimental infection.

Table 25. Number of fish deformed and died after re-challenging the fish, which had been recovered from experimental infection with *Streptococcus iniae* No. 1, to the same bacterium.

Experimental group	No. of fish challenged	No. of fish died	No. of fish deformed
Recovered fish*	15	0	0
Control	15	1	11

* 75 days after experimental infection. Challenge dose, 1.1×10^7 cfu/100 g · BW.

る。すなわち、感染耐過魚では血液、脾臓および腎臓における菌数が対照魚に比べて常に少なく推移した。また、対照魚では体の変形の原因と考えられる脳における菌の増殖がみられたのに対して、感染耐過魚では脳における菌の増殖はみられなかった。なお、再感染前に感染耐過魚および対照魚各3尾について、血液、脳、脾臓および腎臓中の生菌数を調べた結果は、いずれも検出限界以下であった。

考 察

ブリの類結節症や腸球菌症では、流行後に産生された抗体が感染防御に重要な役割を果たすとされている(楠田 1974, 福田・楠田 1980, 楠田・高木 1983)。寄生虫症(Hines and Spira 1974)やウイルス病(Piacentini *et al.* 1989, Okamoto *et al.* 1992)などにおいても、感染を耐過した魚が再感染に対する抵抗性を獲得することが知られている。したがって、ブリの免疫機構の解明や、本症に対するワクチンの開発研究を行うためには、感染魚や感染耐過した魚の免疫応答を解明することによって、有用な知見が得られるのではないと思われる。しかし、自然感染、実験的感染のいずれにおいても、感染経歴のある魚群としてとらえることができて、個体ごとに罹病歴を特定することは難しいと思われる。また、感染がどの程度まで進んでいたかを調べることも容易でない。

しかしながら、本症では体の変形症状から実験的感染や症状の発現が個体ごとに確認でき、

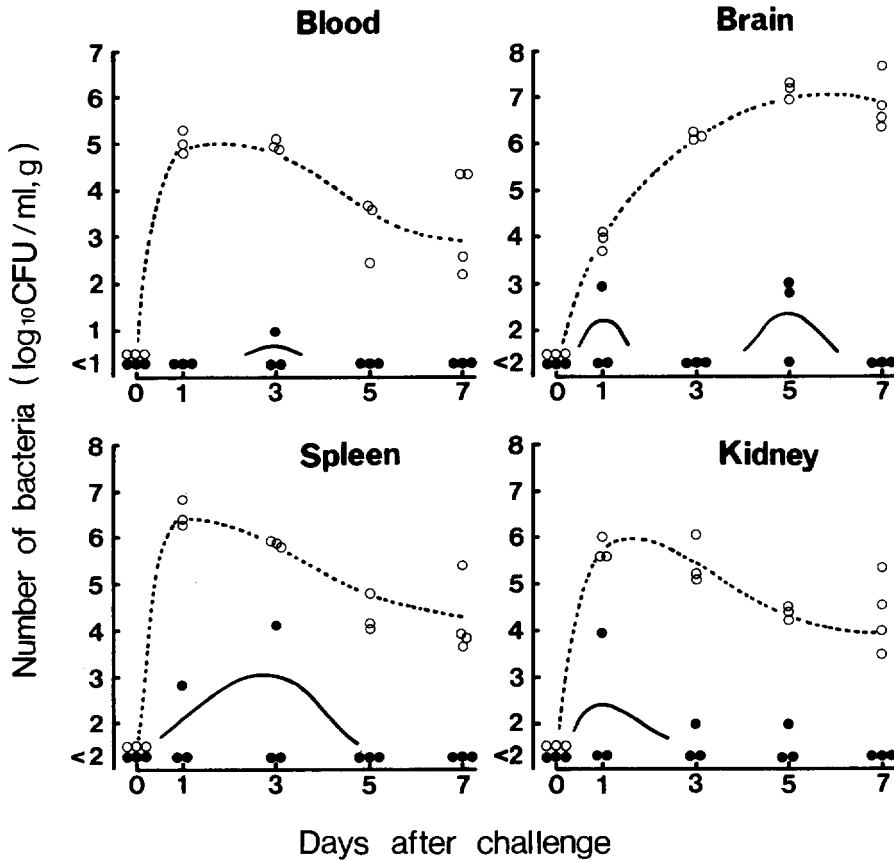


Fig. 14. Changes in viable cell numbers of *Streptococcus iniae* No. 1 in various organs of the yellowtail which had been recovered from the experimental infection and control fish after the second challenge with intraperitoneal inoculation. ●, fish recovered from vertebral deformity by experimental infection; ○, control fish.

これらの実験的感染魚の生存率ならびに回復治癒率も高いことから、病後免疫の確認が可能であると考えられた。そこで、本研究では症状が回復治癒した個体の免疫獲得状況を調べた。その結果、感染耐過魚では血液中に凝集抗体が産生されること、再実験的感染によって再度の変形症が発現しないこと、体内における除菌能が上昇して脳への感染や増殖が起らないことが明らかとなり、実験的感染耐過魚は本症に対する免疫能を獲得することが確認された。感染防御機構については明らかにできなかったが、今回確認された抗体のほかに、今後は細胞性免疫などについても検討する必要があると思われる。

以上のように、本症の感染耐過魚は免疫を獲

得することが明らかとなり、本症のワクチンによる予防の可能性が考えられた。また、本症は変形の発現の確認が確実かつ容易で、回復治癒率が高いことから、ブリの免疫機構に関する研究の実験材料としても有用であると思われる。

第2節 不活化ワクチンの有効性

前節において、本症の回復治癒魚は再感染に対する防御能を獲得することを明らかにし、ワクチンによる予防効果が期待できることを述べた。

そこで、本節ではホルマリン不活化ワクチンを試作して、各種投与方法によって投与し、本症の予防効果が得られるかどうかを検討した（佐

古 1992c)。

材料および方法

供試魚：ハマチ用モイストペレットを給与して養成した平均体重 10.1 g のブリを用いた。

供試菌株：養殖ブリ由来の *S. iniae* No. 1 株を、ワクチンの種株および攻撃試験における接種菌として用いた。

ワクチンの作製：供試菌株を BHI ブイヨンに接種し、25°C で 24 時間静置培養した。なお、この培養液 1 ml 当りの生菌数は 6.8×10^8 cfu であった。この培養液にホルマリンを 0.3% 添加し、25°C で 2 日間静置して不活化したのち、生菌がないことを確かめ、浸漬用ワクチンの原液として用いた。浸漬用ワクチンの原液の一部を、7,000 rpm で 10 分間遠心分離して回収した菌体を、生理食塩水で 2 回洗浄して、経口および注射投与用ワクチンとして用いた。

ワクチンの投与方法：浸漬、経口および注射の 3 種の投与方法で、それぞれ 100 尾の供試魚を用いて実験を行った。浸漬投与法は浸漬ワクチンの原液を海水で 10 倍に希釈して調製したワクチン液 50 l に、供試魚をエアレーションをしながら 5 分間浸漬した。なお、浸漬時の水温は 23.8°C であった。経口投与法は魚体重 1 kg 当たり 1 日に湿菌量で 4 g のワクチンをモイストペレットに混合し、1 日 1 回の頻度で 7 日間連続投与した。給餌率は 4% とした。注射投与法は 1 尾当たり湿菌量で 0.2 mg のワクチンを腹腔内に 1 回接種した。対照には無処理の供試魚 100 尾を用いた。いずれも、200 l の流水式角型アクリル水槽に収容し、モイストペレットを朝夕の 2 回飽食量与えて飼育後、実験に供した。なお、飼育期間中の水温は、21.5~23.7°C であった。

攻撃試験：ワクチンを投与して 20 日後および 35 日後の 2 回、供試菌株の BHI 寒天 25°C、24 時間培養菌を、3 種の方法によるワクチン投与魚および対照魚の腹腔内に接種して攻撃した。接種菌量は、ワクチン投与 20 日後の攻撃試験においては、1 尾当たり 1.9×10^6 および 1.9×10^5 cfu の 2 段階、ワクチン投与 35 日後の攻撃試験においては 20 日後の 10 倍の菌量の 1 尾当たり 2.4×10^7 cfu

とし、各区 20 尾の魚を用いた。菌接種後はいずれもモイストペレットを 1 日 2 回給与して、ワクチン投与から 20 日後の攻撃試験は 20.5~23.4°C、ワクチン投与から 35 日後の攻撃試験は 22.5~23.4°C の水温下で 2 週間飼育し、死亡ならびに症状の発現を観察した。

血中凝集抗体価の測定：ワクチン投与前と 2 回の攻撃試験時に、各区 5 尾の尾柄部から血液を採取し、常法により血清を分離した。そして、第 1 章第 1 節と同様の方法によって、供試菌体ワクチンに対する凝集抗体価を測定した。

注射法によるワクチン投与魚の攻撃菌クリアランスの測定：ワクチンを注射法で投与してから 35 日後の魚および対照魚各 20 尾の腹腔内に、供試菌株の BHI 寒天 25°C、24 時間培養菌を 1 尾当たり 5.2×10^7 cfu 接種し、1, 3, 5, 7 日後に 4 尾ずつ取り上げ、80 ppm の *m*-アミノ安息香酸エチルメタンスルホネートで麻酔後に尾柄部から血液を採取したのち、脳、脾臓および腎臓を摘出し、第 1 章第 1 節と同様の方法によって、血液および各臓器の菌数を測定した。なお、本実験中の飼育水温は、22.5~24.1°C であった。

結 果

ワクチンの各投与方法による発病予防効果の差異：ワクチン投与から 20 日後の攻撃試験結果は、Table 26 に示すとおりである。すなわち、1 尾当たり 1.9×10^6 cfu を接種した場合は、それぞれ 20 尾中、対照魚では 1 尾が死亡し 10 尾に変形症が発現したのに対し、注射投与魚では変形症、死亡ともまったくみられなかった。いっぽう、浸漬投与魚および経口投与魚ではいずれにおいても 20 尾中 12 尾が変形症を発現した。また、1 尾当たり 1.9×10^5 cfu を接種した場合は、それぞれ 20 尾中、対照魚では 9 尾に変形症が発現したのに対し、注射投与魚では変形症、死亡ともまったくみられなかった。いっぽう、浸漬投与魚では 20 尾中 1 尾が死亡、11 尾に変形症が発現し、経口投与魚では 20 尾中 10 尾に変形症が発現した。

ワクチン投与から 35 日後の攻撃試験結果は、Table 27 に示すとおりである。すなわち、それぞれ 20 尾中、対照魚では 1 尾が死亡し、16 尾に

Table 26. Number of fish deformed and died after challenging the vaccinated fish to bacteria 20 days after vaccination

Routes of vaccination	Challenge dose(cfu/fish)	No. of fish challenged	No. of fish died	No. of fish deformed
Immersion	1.9×10^6	20	0	12
	1.9×10^5	20	1	11
Oral	1.9×10^6	20	0	12
	1.9×10^5	20	0	10
Intraperitoneal injection	1.9×10^6	20	0	0
	1.9×10^5	20	0	0
Control	1.9×10^6	20	1	10
	1.9×10^5	20	0	9

Table 27. Number of fish deformed and died after challenging the vaccinated fish to bacteria 35 days after vaccination

Routes of vaccination	Challenge dose(cfu/fish)	No. of fish challenged	No. of fish died	No. of fish deformed
Immersion	2.4×10^7	20	2	18
Oral	2.4×10^7	20	1	15
Intraperitoneal injection	2.4×10^7	20	0	0
Control	2.4×10^7	20	1	16

変形症が発現したのに対し、注射投与魚では死亡、変形症ともまったくみられなかった。いっぽう、浸漬投与魚では20尾中2尾が死亡、18尾に変形症が発現し、経口投与魚では20尾中1尾が死亡し、15尾に変形症が発現した。

ワクチン投与魚の血中凝集抗体価：ワクチン投与前の供試魚血清の供試菌に対する抗体価は、検出限界（1：2）以下であった。ワクチン投与20日後および35日後の攻撃試験時におけるブリ血清中の抗体価は、Table 28 に示すとおりである。すなわち、ワクチンを浸漬あるいは経口投与した供試魚の抗体価は、いずれも検出限界以下であった。いっぽう、注射投与魚では検出限界以下の個体もみられたが、20日後では1：4～1：8、35日後では1：2～1：8に上昇している個体のみみられた。

注射法によるワクチン投与魚の攻撃菌クリアランス：ワクチンを注射法で投与後35日経過したブリを攻撃したときの血液、脳、脾臓および腎臓における接種菌の消長は、Fig. 15 に示すとおりである。すなわち、ワクチン注射魚ではいずれの臓器においても、対照魚に比べて生菌数

Table 28. Agglutinating antibody titers of yellowtail sera vaccinated by various routes of administration 20 and 35 days after vaccination

Routes of vaccination	Fish No.	Agglutinating antibody titer(1:)	
		Days after vaccination 20 days	35 days
Immersion	1	<2	<2
	2	<2	<2
	3	<2	<2
	4	<2	<2
	5	<2	<2
Oral	1	<2	<2
	2	<2	<2
	3	<2	<2
	4	<2	<2
	5	<2	<2
Intraperitoneal injection	1	4	8
	2	<2	<2
	3	<2	<2
	4	8	2
	5	<2	4
Control	1	<2	<2
	2	<2	<2
	3	<2	<2
	4	<2	<2
	5	<2	<2

が常に少なく推移した。また、脳内において、対照魚では体の変形の原因と考えられる菌の顕著な増殖がみられたのに対して、ワクチン注射魚では菌の増殖はみられなかった。

考 察

わが国では、アユとニジマスのピブリオ病のワクチンが市販されているが、海水養殖魚においても、有効なワクチンが開発されれば、今後の各種感染症の被害を軽減させる一つの手段となると思われる。

また、本菌は脳が主増殖部位の一つであると考えられるところから、薬剤による治療も容易でないと思われる。このために、予防が大切で

あり、有効なワクチンの開発が期待される。

本研究では、本菌のホルマリン不活化ワクチンを作製し、浸漬、経口あるいは注射投与方法によって投与後、生菌による攻撃試験を行い、その有効性について検討した。その結果、注射投与魚ではまったく症状の発現はみられず、注射ワクチンの本症に対する顕著な発病予防効果が明らかとなった。いっぽう、本研究では攻撃試験の結果からみる限り、浸漬および経口投与方法では発病予防効果は認められなかった。Sakai *et al.* (1987) はニジマスの連鎖球菌症について、ホルマリン不活化ワクチンの浸漬および注射投与の効果を確認し、とくに注射ワクチンが顕著な予防効果を示すとしている。本研究の結果からも、本菌ワクチンの投与方法としては注射法

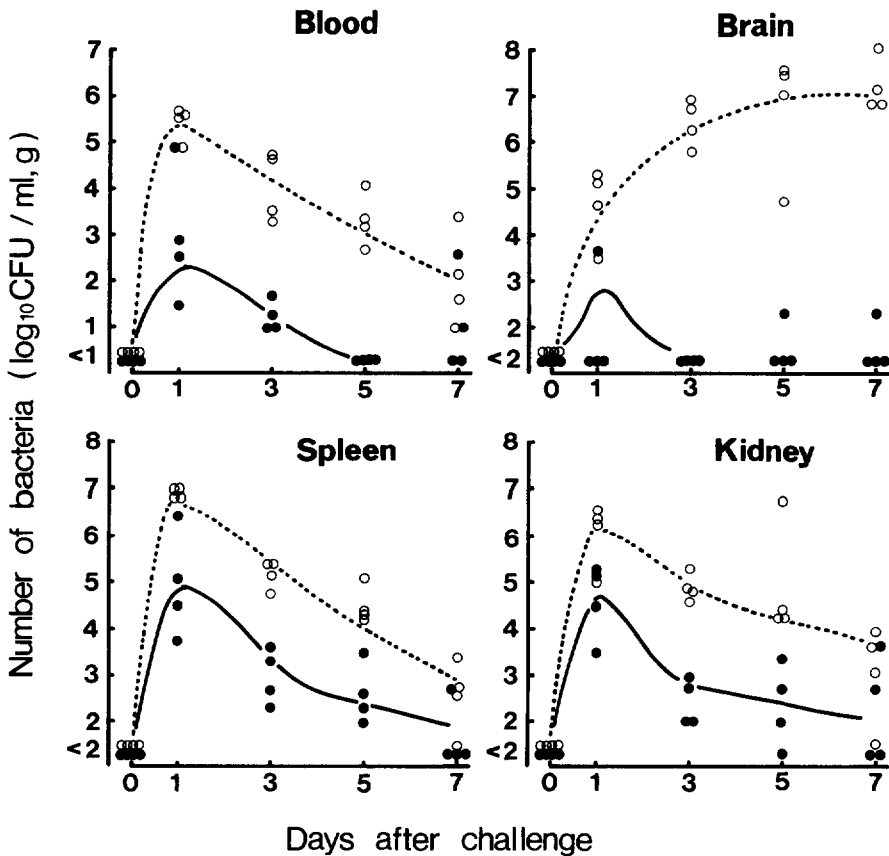


Fig. 15. Changes in viable cell numbers of *Streptococcus iniae* No. 1 in various organs of intraperitoneally vaccinated yellowtail and control fish after challenged with intraperitoneal inoculation. ●, vaccinated fish; ○, control fish.

が最も高い効果を示すと思われる。ブリで浸漬投与方法による効果が認められなかったことの一因として、ブリはニジマスに比べて抗原の取り込みが低い (Ototake *et al.* 1992) ことが考えられ、取り込みがよい浸漬投与方法を開発する必要があると思われる。また、ニジマスの連鎖球菌症ワクチンでは抗原の種類により効果に差異がみられることが報告されており (酒井他 1988)、種々のワクチン抗原ならびに投与プログラムの検討が必要であると思われる。

なお、ブリの腸球菌症のワクチンについては、その有効性が報告されている (飯田他 1982, 小川・小松 1995, 楠田他 1996)。飯田他 (1982) は腸球菌症について、ホルマリン不活化ワクチンを浸漬、経口および注射法により投与し、攻撃試験の結果からいずれの投与方法によっても有効であるが、それらのうちでは注射法が最も顕著な防御効果を有するとしている。また、小川・小松 (1995) も腸球菌症のホルマリン不活化ワクチンは腹腔内接種の有効性が高いが、経口投与方法においても、投与量によって異なるが数週間有効性が持続するとしている。

浸漬あるいは経口投与した魚では血中抗体価の上昇はみられなかったが、注射投与魚ではわずかに上昇が認められ、抗体が感染防御に関与するのではないかとと思われる。

ワクチンを注射法で投与した魚は、生菌による攻撃を受けた場合、血液、脳、脾臓および腎臓中における生菌数は対照の非免疫魚に比べて低く推移し、脳における菌の増殖が起ころなかった。ブリが本菌に感染した時の主病徴である変形症は、第3章の結果からも明らかなように、原因菌の脳への感染、増殖に起因した結果であると考えられる。したがって、ワクチンの注射投与魚は、免疫により体内に侵入した原因菌を認識し、除菌する機構が備わり、脳への感染、増殖を防ぐので発病しないものと思われる。

以上のように、ワクチンの注射投与魚は、前項の回復治癒魚と同様の感染防御能を獲得することが明らかとなり、本症の予防に注射ワクチンがきわめて有効であることがわかった。ワクチンなどの利用によって、ブリの備えている生体防御能をうまく引出して発病予防ができれば、

薬剤使用量の軽減にもつながるものと思われる。今後は、さらにワクチンのより簡便で実用的な投与方法を開発するためにも、ワクチンの有効抗原の探索および投与方法の開発、ならびに免疫魚の感染防御機構の解明が必要であろう。

第3節 受動免疫による有効性

本章第1節および第2節において、本菌の感染耐過魚および不活化ワクチン投与魚は感染防御能を獲得することが明らかになった。これらの魚の血中には抗体が産生されており、この抗体が感染防御に関与する可能性があると考えられる。

いっぽう、ワクチンによる能動免疫の効果が現れるのは、抗原に対する免疫応答を経てからなので、防御能が発現するまでに一定期間が必要であることが知られている。これに対して、受動免疫は迅速に防御能の賦与ができることが知られている。

そこで、本節では本菌の免疫血清投与による受動免疫が成立するかどうかを調べた。

材料および方法

供試魚：ハマチ用モイストペレットを給与して養成した平均体重 27.8 g および 30.0 g の2群のブリを用いた。

供試菌株：養殖ブリ由来の *S. iniae* No.1 株を、供試血清の作製および実験的感染における接種菌として用いた。

供試血清：受動免疫試験に用いる免疫血清としては、前節で注射用ワクチンとして用いた供試菌株のホルマリン不活化菌体を、平均体重 30.0 g の供試魚50尾の腹腔内に、1尾当たり 0.3 mg 接種して 22.5~23.5°C の水温下で3週間飼育後、尾柄部血管から採取した血液から常法に従って分離した凝集抗体価 1:2 の血清、供試菌株の実験的感染で変形症を呈したのちに105日間継続飼育した感染耐過魚から同様に採取した凝集抗体価 1:8 の血清、ウサギに供試菌株のホルマリン不活化菌体を接種して得た 56°C で30

分の加熱によって非働化した凝集抗体価1:256の血清の3種類を用いた。対照には、ブリおよびウサギの凝集抗体価1:2未満の正常血清を用いた。

受動免疫の有効性の判定：それぞれの供試血清を平均体重27.8gの供試ブリ、各10尾の腹腔内に、1尾当り0.1mlあるいは0.01mlあて注射し、その1日後に供試菌株のBHI寒天25°C、24時間培養菌を、1尾当り 1.7×10^7 cfu腹腔内接種した。菌接種後はモイストペレットを1日2回給与して22.6~23.5°Cの水温下で10日間飼育し、症状の発現の有無を観察した。なお、受動免疫と能動免疫の有効性を比較するために、前節で供試した供試菌株の注射用ワクチンを腹腔内に1尾当り0.3mg接種し、3週間を経過した能動免疫ブリに対する攻撃試験についても行った。

結 果

ブリ免疫血清、感染耐過ブリから採取した血清ならびにウサギ免疫血清の受動免疫効果は、Table 29に示すとおりである。すなわち、生理食塩水およびブリの正常血清の0.1ml注射魚で

は、攻撃試験によりそれぞれ10尾中10尾に変形症が発現、1尾が死亡し8尾に変形症が発現したが、ブリ免疫血清および感染耐過魚血清の0.1ml注射魚では、それぞれ10尾中1尾が死亡し、1尾に変形症が発現したのみであった。接種する血清を0.01mlとした場合は、ブリ免疫血清では7尾、感染耐過魚血清では1尾に変形症が発現した。なお、不活化ワクチン接種魚は、まったく発病しなかった。いっぽう、ウサギ免疫血清では、0.1ml接種においても、半数の5尾に変形症が発現した。

考 察

ブリ免疫血清あるいは本症の感染耐過ブリから得た血清を注射したブリは、攻撃試験後の発病率がブリの正常血清注射魚にくらべて明らかに低かったことから、免疫血清移入による受動免疫が成立することが明らかになった。

注射する血清の量を少なくしたときの防御能には、ブリ免疫血清と感染耐過魚血清とは差異がみられた。この原因としては、感染耐過魚血清のほうが凝集抗体価が高く、供試菌株に対する特異抗体の含有量の違いによるものではな

Table 29. Efficacy of passive immunization by sera from vaccinated yellowtail against *Streptococcus iniae* infection

Serum injected		Dose (ml/fish)	No. of fish challenged	No. of fish died	No. of fish deformed
source	titer (1:)				
Yellowtail vaccinated by I. P. injection	2	0.1 0.01	10 10	1 1	0 7
Yellowtail recovered from infection	8	0.1 0.01	10 10	0 0	1 1
Normal yellowtail	<2	0.1 0.01	10 10	1 0	8 10
Rabbit vaccinated (56°C, 30 min.)	256	0.1 0.01	10 10	0 0	5 9
Normal rabbit	<2	0.1 0.01	10 10	1 0	9 10
Physiological saline	—	0.1	10	0	10
Vaccinated fish by I. P. injection	—	—	10	0	0

Challenge dose, intraperitoneal injection of 1.7×10^6 cfu/fish.

Average body weight used for passive immunization, 27.8 g.

いかと思われる。いっぽう、ウサギの免疫血清は凝集抗体価が1:256とブリの血清に較べてかなり高いにもかかわらず、発病の予防が不完全であった。この理由としては、異種血清であることによるブリからの排除、あるいは免疫発現における食細胞との不適合などが考えられる。

これらのことから、本菌に対するブリ特異抗体は、本菌の感染防御に強く関与しており、ブリ免疫血清の受動免疫による、迅速な感染防御能の賦与が可能であると考えられる。

第5章 化学療法に関する研究

本症の防除対策に関しては、前章においてワクチンによる予防の可能性あることを述べた。しかし、ワクチンの実用化については検討されていない。このために、病気が発生した場合には化学療法に頼らざるを得ないのが現状である。しかし、本菌感染症の化学療法に関する知見は乏しく、薬剤感受性については Kitao *et al.* (1981)、楠田他 (1981a)、城 (1982)、小川他 (1982a)、畑井他 (1983)、北尾他 (1987)、関屋他 (1987)、竹丸・楠田 (1988)、Palmer *et al.* (1992) などの、治療については、アユに対するエリスロマイシン (楠田他 1981a) およびオキシテトラサイクリン (城 1982)、ニジマスに対するエリスロマイシン (北尾他 1987) についての報告があるのみである。とくに、海水魚の本症に対する治療に関してはほとんど検討されておらず、ブリなどの腸球菌症 (Kusuda *et al.* 1991) の化学療法を参考にしているのが現状である。

そこで、本症に対する化学療法の基礎的知見を得るための一環として、本症原因菌の各種化学療法剤に対する感受性の測定、ならびにブリの実験的感染魚に対する各種化学療法剤の有効性について検討を行った (佐古 1993b)。

第1節 原因菌の薬剤感受性

本症原因菌の各種化学療法剤に対する感受性を明らかにして、治療に有効な薬剤を選択する

ために、病魚から分離された本症原因菌の化学療法剤に対する感受性を調べた。

材料および方法

供試菌株：養殖ブリ由来の3菌株のほかに野生のマサバ、養殖ヒラメ、アユおよびアマゴから分離された12菌株の合計15菌株を用いた。なお、対照菌株としては *S. iniae* ATCC 29178 株および ATCC 29177 株、*S. equisimilis* IID 681 株およびブリの腸球菌症原因菌 *E. seriolicida* の5菌株を用いた。それらの由来は、Table 30 に示すとおりである。

供試薬剤：ペニシリン G カリウム (PCG)、オキサシリンナトリウム (MPIPC)、アンピシリン (ABPC)、カルペニシリン 2 ナトリウム (CBPC)、セファレキシン (CEX)、セファゾリンナトリウム (CEZ)、ラクトビオン酸エリスロマイシン (EM)、リン酸オレアンドマイシン (OL)、キタサマイシン (LM)、エンボン酸スピラマイシン (SPM)、ジョサマイシン (JM)、ミデカマイシン (MDM)、クロラムフェニコール (CP)、チアンフェニコール (TP)、塩酸テトラサイクリン (TC)、塩酸オキシテトラサイクリン (OTC)、塩酸ドキシサイクリン (DOXY)、硫酸カナマイシン (KM)、硫酸ストレプトマイシン (SM)、硫酸フラジオマイシン (FRM)、硫酸ゲンタマイシン (GM)、リファンピシン (RFP)、硫酸リンコマイシン (LCM)、バシトラシン (BC)、硫酸コリスチン (CL)、硫酸ポリミキシン B (PLB)、スルファモノメトキシ (SMMX)、スルファジメトキシ (SDMX)、スルフィンゾール (SIZ)、フラゾリドン (FZ)、ニフルスチレン酸ナトリウム (NFS)、トリメトプリム (TMP)、オルメトプリム (OMP)、オキシリン酸 (OA)、ナリジクス酸 (NA) およびピロミド酸 (PA) の36種を用いた。これらの薬剤のうち、LM, SPM, JM, MDM および CP はエタノールで、TP, RFP, FZ, TMP および OMP はジメチルスルホキシドで、SMMX, SDMX および SIZ は 1N-NaOH で、OA, NA および PA は 1/4N-NaOH で溶解した。その他の薬剤の溶解には蒸留水を用いた。

Table 30. Strains of *Streptococcus iniae* isolated from diseased marine and freshwater fishes and reference strains used for pharmaceutical study

Strain No.	Source	Organ of isolation	Location	Date
No. 1	Yellowtail	Brain	Mie	1985. 6.17
No. 4	〃	〃	〃	〃
No. 5	〃	〃	〃	〃
1BL	Common mackerel	Brain	Mie	1985. 7.30
2BL	〃	〃	〃	〃
3BL	〃	〃	〃	〃
3K	〃	Kidney	〃	〃
F-1	Japanese flounder	Brain	〃	1985. 8.20
F-2	〃	〃	〃	〃
FT-8513* ¹	〃	〃	Tokushima	〃
FT-8514* ¹	〃	〃	〃	〃
PT 78061* ¹	Ayu	Spleen	〃	1978. 9.19
PT 85106* ¹	〃	〃	〃	1985.11.12
PT 85107* ¹	〃	〃	〃	〃
OT 7804* ¹	Amago salmon	Liver	〃	1978. 8. 9
Reference strains				
ATCC 29178* ²	<i>Streptococcus iniae</i> PW			1972. 3.
ATCC 29177* ²	<i>Streptococcus iniae</i> BU			
IID 681* ³	<i>Streptococcus equisimilis</i>			
<i>Enterococcus seriolicida</i>				
SK-3* ⁴	Yellowtail	Kidney	Kochi	1974. 8. 1
MK1B	〃	Brain	Mie	1985. 9. 3
MK4B	〃	〃	〃	〃
SM2-11	〃	Kidney	〃	1982. 9.14
MK3K	〃	〃	〃	1985. 9. 3

*¹ Supplied by Dr. Yasuhiko Jo of Tokushima Prefectural Fisheries Experimental Station, Hiwasa, Tokushima, Japan.

*² Supplied by American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA.

*³ Supplied by the Institute for Infectious Disease, Tokyo, Japan.

*⁴ Supplied by Prof. Riichi Kusuda of Kochi University, Nankoku, Kochi, Japan.

最小発育阻止濃度 (MIC) の測定：日本化学療法学会の最小発育阻止濃度測定法 (日本化学療法学会 1981) に準じて、供試36薬剤の供試23菌株に対する MIC を測定した。すなわち、感受性測定用培地には感受性測定用寒天 (日水) を、接種菌の前培養用培地には感受性測定用ブイヨン (日水) を使用した。そして、感受性測定用寒天に、供試菌株の 25°C で24時間培養菌液をゼラチンを含む生理食塩液 (BSG) で100倍に希釈した接種菌液を、内径 1 mm の白金耳で約 2 cm 画線塗抹した。これを 25°C で24時間培養

後に観察し、接種菌の発育が完全に阻止された最低濃度をもって MIC ($\mu\text{g/ml}$) とした。

結 果

供試36薬剤の供試菌株に対する MIC は、Table 31a, b, c に示すとおりである。すなわち、本実験に供試したブリ、マサバ、ヒラメ、アユおよびアマゴから分離された *S. iniae* 15株の感受性は、分離された魚種あるいは菌株の違いによる差異は小さかった。供試薬剤の MIC は、PCG が

0.00313~0.0125 $\mu\text{g/ml}$, MPIPC が^s 0.0125~0.05 $\mu\text{g/ml}$, ABPC が^s 0.00625~0.025 $\mu\text{g/ml}$, CBPC が^s 0.39~0.78 $\mu\text{g/ml}$, CEX が^s 0.20~0.39 $\mu\text{g/ml}$, CEZ が^s 0.025~0.05 $\mu\text{g/ml}$, EM が^s 0.05 $\mu\text{g/ml}$, OL が^s 0.39 $\mu\text{g/ml}$, LM が^s 0.10~0.39 $\mu\text{g/ml}$, SPM が^s 0.39~0.78 $\mu\text{g/ml}$, JM および MDM が^s 0.20~0.39 $\mu\text{g/ml}$, CP が^s 1.56 $\mu\text{g/ml}$, TP が^s 1.56~3.13 $\mu\text{g/ml}$, TC が^s 0.39~0.78 $\mu\text{g/ml}$, OTC が^s 0.39 $\mu\text{g/ml}$, DOXY が^s 0.05~0.10 $\mu\text{g/ml}$, KM が^s 25~50 $\mu\text{g/ml}$, SM が^s 50 $\mu\text{g/ml}$, FRM が^s 25~50 $\mu\text{g/ml}$, GM が^s 6.25~12.5 $\mu\text{g/ml}$, RFP が^s 0.025~0.05 $\mu\text{g/ml}$, LCM が^s 0.10~0.20 $\mu\text{g/ml}$, BC が^s 0.78~3.13 $\mu\text{g/ml}$, CL, PLB および SMMX が^s 100~ \geq 200 $\mu\text{g/ml}$, SDMX および SIZ が^s \geq 200 $\mu\text{g/ml}$, FZ が^s 12.5 $\mu\text{g/ml}$, NFS が^s 0.0125~0.05 $\mu\text{g/ml}$, TMP が^s 0.20

~0.39 $\mu\text{g/ml}$, OMP が^s 0.39~0.78 $\mu\text{g/ml}$, OA, NA および PA が^s \geq 200 $\mu\text{g/ml}$ であった。対照菌株として用いたアマゾン淡水イルカ由来の *S. iniae* ATCC 29178 株および ATCC 29177 株に対する MIC は、BC が魚類由来の *S. iniae* に対する MIC よりも高い値を示したほかは、魚類由来の *S. iniae* に対する MIC に近似していた。しかし、*S. equisimilis* IID 681 株に対する MIC は、魚類由来の *S. iniae* に対する MIC よりも全体的にやや低い値を示す傾向がみられた。また、ブリ由来の *E. seriolocida* 5 菌株の感受性は、菌株の違いによる差異は小さく、供試薬剤の MIC は、PCG が 0.78 $\mu\text{g/ml}$, MPIPC が^s 12.5 $\mu\text{g/ml}$, ABPC が^s 0.78 $\mu\text{g/ml}$, CBPC が^s 50~100 $\mu\text{g/ml}$, CEX が^s 12.5~25 $\mu\text{g/ml}$, CEZ が^s 1.56~3.13 $\mu\text{g/ml}$, EM が^s 0.05

Table 31a. Susceptibility of *Streptococcus iniae* isolated from diseased fish and reference strains to antimicrobial agents

Strain No.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)											
	PCG	MPIPC	ABPC	CBPC	CEX	CEZ	EM	OL	LM	SPM	JM	MDM
No. 1	0.00625	0.05	0.025	0.78	0.39	0.05	0.05	0.39	0.20	0.39	0.20	0.20
No. 4	0.00625	0.05	0.0125	0.78	0.39	0.05	0.05	0.39	0.20	0.39	0.20	0.20
No. 5	0.00625	0.05	0.0125	0.78	0.39	0.05	0.05	0.39	0.20	0.78	0.20	0.20
1BL	0.00625	0.025	0.0125	0.78	0.20	0.05	0.05	0.39	0.10	0.39	0.20	0.20
2BL	0.00625	0.025	0.0125	0.78	0.20	0.05	0.05	0.39	0.20	0.39	0.20	0.20
3BL	0.00625	0.05	0.025	0.78	0.39	0.05	0.05	0.39	0.20	0.39	0.20	0.20
3K	0.00625	0.05	0.0125	0.78	0.39	0.05	0.05	0.39	0.20	0.39	0.20	0.20
F-1	0.00625	0.05	0.0125	0.78	0.20	0.05	0.05	0.39	0.20	0.78	0.20	0.20
F-2	0.00625	0.05	0.0125	0.78	0.20	0.05	0.05	0.39	0.20	0.78	0.20	0.20
FT 8513	0.00313	0.025	0.0125	0.39	0.20	0.025	0.05	0.39	0.39	0.78	0.39	0.39
FT 8514	0.00625	0.05	0.0125	0.78	0.20	0.05	0.05	0.39	0.20	0.39	0.20	0.20
PT 78061	0.00313	0.0125	0.00625	0.39	0.20	0.025	0.05	0.39	0.10	0.78	0.20	0.20
PT 85106	0.00625	0.05	0.025	0.78	0.39	0.05	0.05	0.39	0.20	0.39	0.20	0.20
PT 85107	0.00625	0.05	0.025	0.78	0.39	0.05	0.05	0.39	0.20	0.39	0.20	0.20
OT 7804	0.0125	0.05	0.025	0.78	0.39	0.05	0.05	0.39	0.10	0.39	0.20	0.20
<i>S. iniae</i> ATCC 29178	0.00625	0.025	0.0125	0.39	0.20	0.025	0.05	0.39	0.20	0.39	0.20	0.20
<i>S. iniae</i> ATCC 29177	0.00625	0.025	0.0125	0.39	0.20	0.05	0.05	0.39	0.20	0.39	0.39	0.39
<i>S. equisimilis</i> IID 681	0.00313	0.025	0.0125	0.39	0.20	0.025	0.025	0.39	0.10	0.39	0.20	0.20
<i>E. seriolocida</i>												
SK-3	0.78	12.5	0.78	50	12.5	1.56	0.05	0.39	0.78	1.56	0.78	1.56
MK1B	0.78	12.5	0.78	100	25	3.13	0.05	0.39	0.39	1.56	0.78	0.78
MK4B	0.78	12.5	0.78	100	25	3.13	0.05	0.39	0.78	1.56	0.78	0.78
SM2-11	0.78	12.5	0.78	100	25	3.13	0.05	0.39	0.78	1.56	0.78	0.78
MK3K	0.78	12.5	0.78	100	25	3.13	0.05	0.39	0.78	1.56	0.78	0.78

PCG, penicillin G; MPIPC, oxacillin; ABPC, ampicillin; CBPC, carbenicillin; CEX, cefalexin; CEZ, cefazolin; EM, erythromycin; OL, oleandomycin; LM, kitasamycin; SPM, spiramycin; JM, josamycin; MDM, midecamycin.

Table 31b. Susceptibility of *Streptococcus iniae* isolated from diseased fish and reference strains to antimicrobial agents

Strain No.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)											
	CP	TP	TC	OTC	DOXY	KM	SM	FRM	GM	RFP	LCM	BC
No. 1	1.56	3.13	0.78	0.39	0.10	50	50	50	12.5	0.05	0.20	0.78
No. 4	1.56	1.56	0.78	0.39	0.10	50	50	50	12.5	0.05	0.20	0.78
No. 5	1.56	1.56	0.78	0.39	0.10	50	50	50	12.5	0.05	0.20	0.78
1BL	1.56	3.13	0.78	0.39	0.10	50	50	50	12.5	0.05	0.20	0.78
2BL	1.56	3.13	0.78	0.39	0.10	50	50	50	12.5	0.05	0.20	1.56
3BL	1.56	3.13	0.78	0.39	0.10	50	50	50	12.5	0.05	0.20	1.56
3K	1.56	3.13	0.78	0.39	0.10	50	50	50	12.5	0.05	0.20	0.78
F-1	1.56	1.56	0.78	0.39	0.10	50	50	50	12.5	0.05	0.20	0.78
F-2	1.56	1.56	0.39	0.39	0.10	50	50	50	12.5	0.05	0.20	0.78
FT 8513	1.56	1.56	0.39	0.39	0.10	50	50	50	6.25	0.05	0.20	3.13
FT 8514	1.56	1.56	0.39	0.39	0.05	25	50	25	6.25	0.05	0.20	0.78
PT 78061	1.56	1.56	0.39	0.39	0.05	25	50	25	6.25	0.025	0.10	3.13
PT 85106	1.56	3.13	0.78	0.39	0.10	50	50	50	12.5	0.05	0.20	0.78
PT 85107	1.56	3.13	0.78	0.39	0.10	50	50	50	12.5	0.05	0.20	0.78
OT 7804	1.56	1.56	0.39	0.39	0.05	25	50	50	12.5	0.025	0.10	3.13
<i>S. iniae</i> ATCC 29178	0.78	3.13	0.20	0.20	0.05	50	50	100	12.5	0.025	0.20	12.5
<i>S. iniae</i> ATCC 29177	1.56	3.13	0.20	0.20	0.05	50	50	100	12.5	0.05	0.78	12.5
<i>S. equisimilis</i> IID 681	0.78	1.56	0.20	0.20	0.025	50	12.5	6.25	3.13	0.0125	0.10	12.5
<i>E. seriolicida</i>												
SK-3	3.13	6.25	0.78	0.78	0.10	50	100	25	12.5	25	0.20	≥ 200
MK1B	3.13	6.25	0.39	0.78	0.10	25	50	6.25	3.13	25	0.20	≥ 200
MK4B	3.13	6.25	0.39	0.78	0.10	25	50	6.25	3.13	25	0.20	≥ 200
SM2-11	3.13	6.25	0.78	0.78	0.10	25	50	12.5	6.25	25	0.20	≥ 200
MK3K	3.13	6.25	0.78	0.78	0.10	25	50	12.5	6.25	25	0.20	≥ 200

CP, chloramphenicol; TP, thiamphenicol; TC, tetracycline; OTC, oxytetracycline; DOXY, doxycycline; KM, kanamycin; SM, streptomycin; FRM, fradiomycin; GM, gentamicin; RFP, rifampicin; LCM, lincomycin; BC, bacitracin.

$\mu\text{g/ml}$, OL が s 0.39 $\mu\text{g/ml}$, LM が s 0.39~0.78 $\mu\text{g/ml}$, SPM が s 1.56 $\mu\text{g/ml}$, JM が s 0.78 $\mu\text{g/ml}$, MDM が s 0.78~1.56 $\mu\text{g/ml}$, CP が s 3.13 $\mu\text{g/ml}$, TP が s 6.25 $\mu\text{g/ml}$, TC が s 0.39~0.78 $\mu\text{g/ml}$, OTC が s 0.78 $\mu\text{g/ml}$, DOXY が s 0.10 $\mu\text{g/ml}$, KM が s 25~50 $\mu\text{g/ml}$, SM が s 50~100 $\mu\text{g/ml}$, FRM が s 6.25~25 $\mu\text{g/ml}$, GM が s 3.13~12.5 $\mu\text{g/ml}$, RFP が s 25 $\mu\text{g/ml}$, LCM が s 0.20 $\mu\text{g/ml}$, BC, CL, PLB, SMMX, SDMX および SIZ が s ≥ 200 $\mu\text{g/ml}$, FZ が s 6.25~12.5 $\mu\text{g/ml}$, NFS が s 1.56 $\mu\text{g/ml}$, TMP が s 50~100 $\mu\text{g/ml}$, OMP が s 12.5~50 $\mu\text{g/ml}$, OA, NA および PA が s ≥ 200 $\mu\text{g/ml}$ であった。

本実験における各供試薬剤の魚類由来 *S. iniae* ならびに *E. seriolicida* に対する MIC の分布範囲

は Fig. 16 に示すとおりである。すなわち, EM, OL, LM, SPM, JM, MDM, CP, TP, TC, OTC, DOXY, KM, SM, FRM, GM, LCM, CL, PLB, SMMX, SDMX, SIZ, FZ, OA, NA および PA の MIC は, ほぼ同じ値であった。これに対して, PCG, MIPIC, ABPC, CBPC, CEX, CEZ, RFP, BC, NFS, TMP および OMP の *S. iniae* に対する MIC は, *E. seriolicida* に対する MIC の 1/16 から 1/500 の値であった。

考 察

病魚から分離される *S. iniae* の薬剤感受性については, Kitao *et al.* (1981), 楠田 (1981a), 城

Table 31c. Susceptibility of *Streptococcus iniae* isolated from diseased fish and reference strains to antimicrobial agents

Strain No.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)											
	CL	PLB	SMMX	SDMX	SIZ	FZ	NFS	TMP	OMP	OA	NA	PA
No. 1	≥ 200	100	≥ 200	≥ 200	≥ 200	12.5	0.025	0.20	0.78	≥ 200	≥ 200	≥ 200
No. 4	≥ 200	100	≥ 200	≥ 200	≥ 200	12.5	0.025	0.39	0.78	≥ 200	≥ 200	≥ 200
No. 5	≥ 200	100	≥ 200	≥ 200	≥ 200	12.5	0.025	0.39	0.78	≥ 200	≥ 200	≥ 200
1BL	≥ 200	100	≥ 200	≥ 200	≥ 200	12.5	0.025	0.20	0.78	≥ 200	≥ 200	≥ 200
2BL	≥ 200	100	≥ 200	≥ 200	≥ 200	12.5	0.025	0.39	0.78	≥ 200	≥ 200	≥ 200
3BL	≥ 200	100	≥ 200	≥ 200	≥ 200	12.5	0.025	0.39	0.78	≥ 200	≥ 200	≥ 200
3K	≥ 200	100	≥ 200	≥ 200	≥ 200	12.5	0.025	0.39	0.78	≥ 200	≥ 200	≥ 200
F-1	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	12.5	0.025	0.39	0.78	≥ 200	≥ 200	≥ 200
F-2	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	12.5	0.025	0.39	0.78	≥ 200	≥ 200	≥ 200
FT 8513	≥ 200	100	≥ 200	≥ 200	≥ 200	12.5	0.0125	0.39	0.78	≥ 200	≥ 200	≥ 200
FT 8514	≥ 200	100	≥ 200	≥ 200	≥ 200	12.5	0.0125	0.20	0.39	≥ 200	≥ 200	≥ 200
PT 78061	≥ 200	100	100	≥ 200	≥ 200	12.5	0.05	0.20	0.78	≥ 200	≥ 200	≥ 200
PT 85106	≥ 200	100	≥ 200	≥ 200	≥ 200	12.5	0.025	0.20	0.78	≥ 200	≥ 200	≥ 200
PT 85107	≥ 200	100	≥ 200	≥ 200	≥ 200	12.5	0.025	0.20	0.78	≥ 200	≥ 200	≥ 200
OT 7804	100	100	≥ 200	≥ 200	≥ 200	12.5	0.025	0.20	0.78	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>S. iniae</i> ATCC 29178	100	100	≥ 200	50	50	12.5	0.025	0.20	0.78	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>S. iniae</i> ATCC 29177	≥ 200	≥ 200	≥ 200	50	50	12.5	0.025	0.20	0.78	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>S. equisimilis</i> IID 681	50	25	50	25	12.5	6.25	0.05	0.20	0.78	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>E. seriolicida</i>												
SK-3	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	6.25	1.56	50	12.5	≥ 200	≥ 200	≥ 200
MK1B	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	12.5	1.56	100	50	≥ 200	≥ 200	≥ 200
MK4B	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	12.5	1.56	100	25	≥ 200	≥ 200	≥ 200
SM2-11	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	12.5	1.56	100	50	≥ 200	≥ 200	≥ 200
MK3K	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	12.5	1.56	100	50	≥ 200	≥ 200	≥ 200

CL, colistin; PLB, polymixin B; SMMX, sulfamonomethoxine; SDMX, sulfadimethoxine; SIZ, sulfisozole; FZ, furazolidone; NFS, sodium nifurstyrenate; TMP, trimethoprim; OMP, ormethoprim; OA, oxolinic acid; NA, nalidixic acid; PA, piromidic acid.

(1982), 小川他 (1982a), 畑井他 (1983), 北尾他 (1987), 関屋他 (1987), 竹丸・楠田(1988), Palmer *et al.* (1992) らの報告があり, 淡水魚由来株は ABPC, DOXY, CEZ, JM, EM, SPM, CP, TC, TMP および OMP に高い感受性を示すこと, 海水魚由来株は ABPC, DOXY, OTC, EM および NFS などに高い感受性を示すことが知られている。

また, *E. seriolicida* の薬剤感受性については, 主にブリ由来の菌株について, 柏木他 (1977), 中村 (1982), 片江 (1982), 菅 (1982), 小川他 (1982a), 畑井他 (1983), Aoki *et al.* (1983, 1990), 楠田・鬼崎 (1985) および竹丸・楠田 (1988) らの報告があり, ABPC, TC, DOXY,

EM, JM, LM, OL, SPM, タイロシン, LCM, NFS などに対して高い感受性を示すことが知られている。

本研究では, 淡水魚および海水魚から分離された *S. iniae* 15 菌株の 36 種の化学療法剤に対する感受性を調べた結果, 分離魚種や菌株による感受性の差は小さく, ペニシリン系, セファロスポリン系, マクロライド系, クロラムフェニコール系およびテトラサイクリン系抗生物質や RFP, LCM, BC, NFS ならびにジアミノピリミジン誘導体に高い感受性を示す一方, アミノグリコシド系抗生物質および FZ に低い感受性を, ポリミキシン, サルファ剤およびキノロンカルボン酸系誘導体に耐性を示した。対照菌株に用

Antimicrobial agents	MIC ($\mu\text{g/ml}$)																
	0.00313	0.00625	0.0125	0.025	0.05	0.10	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	≥ 200
Penicillin G	●	●	●						○								
Oxacillin			●	●	●								○				
Ampicillin		●	●	●					○								
Carbenicillin								●	●						○	○	
Cefalexin							●	●					○	○			
Cefazolin				●	●					○	○						
Erythromycin					●	○											
Oleandomycin								●	○								
Kitasamycin						●	●	●	○	○							
Spiramycin								●	●	○							
Josamycin								●	●	○							
Midecamycin								●	●	○	○						
Chloramphenicol										●	○						
Thiamphenicol										●	●	○					
Tetracycline								●	○	●	○						
Oxytetracycline								●	○								
Doxycycline					●	●	○										
Kanamycin															●	○	○
Streptomycin															●	○	○
Fradiomycin												○	○	●	○	●	
Gentamicin											●	●	○	●	○		
Rifampicin				●	●										○		
Lincomycin						●	●	○									
Bacitracin									●	●	●						○
Colistin																●	●
Polymixin B																●	●
Sulfamonomethoxine																●	●
Sulfadimethoxine																●	○
Sulfisozole																●	○
Furazolidone												○	●	○			
Sodium nifurstyrenate			●	●	●					○							
Trimethoprim							●	●							○	○	
Ormethoprim								●	●				○	○	○		
Oxolinic acid																	●
Nalidixic acid																	●
Piromidic acid																	●

Fig. 16. Sensitivities of *Streptococcus iniae* and *Enterococcus seriolicida* isolated from diseased fish against various antimicrobial agents. ●, *Streptococcus iniae*; ○, *Enterococcus seriolicida*.

いた *E. seriolicida* は、ペニシリン系抗生物質のうちの PCG および ABPC や、マクロライド系ならびにテトラサイクリン系抗生物質に高い感受性を示した。また、魚類から分離される *S. iniae* と *E. seriolicida* のマクロライド系、クロラムフェニコール系、テトラサイクリン系およびアミノグリコシド系抗生物質、LCM、ポリミキシン、サルファ剤、FZ およびキノロンカルボン酸系誘導体に対する感受性はほぼ同じであると考えられた。これに対して、ペニシリン系およびセファロsporin系抗生物質、RFP、BC、NFS、ジアミノピリミジン誘導体の *S. iniae* に対する MIC は *E. seriolicida* に対する MIC の 1/16 から 1/500 の値であり、これらの薬剤に対しては *S. iniae* のほうが *E. seriolicida* よりも、はるかに感受性が高いことが明らかになった。したがって、腸球菌症の治療に用いられる薬剤だけでなく、これらの薬剤の治療効果も検討する必要があると思われる。

なお、第3章で魚類から分離される β 溶血性連鎖球菌の性状は、*S. iniae* ATCC 29178 株の性状に一致することを述べたが、薬剤感受性の点でも BC に対する感受性を除いて、ほぼ一致することが明らかとなった。

ところで、微生物の薬剤感受性は耐性プラスミドが関与している場合もあるが、各微生物に固有の性状である場合も多いことから、薬剤感受性が菌種の種類や鑑別に応用されることがある。連鎖球菌の菌群や種の種類、鑑別にも、BC、オプトヒン、あるいは TMP とサルファ剤の合剤に対する感受性が用いられている。*S. iniae* および *E. seriolicida* の感受性が明らかに異なる MIPIC (250倍)、RFP (500倍)、BC (64倍)、TMP (128倍) などに対する感受性は、両菌種を鑑別する性状に応用できる可能性があると思われる。また、連鎖球菌は一般的にポリミキシンやキノロンカルボン酸系誘導体に耐性を示すことが知られている。これらの薬剤は、連鎖球菌の選択培地にグラム陰性菌の抑制剤として広く用いられているが、魚類由来の *S. iniae* ならびに *E. seriolicida* はいずれもこれらの薬剤に対して耐性であり、選択培地に用いる選択剤として用いることができるのではないと思われる。

第2節 薬剤による治療効果

前節において明らかにされた本菌の感受性が高い薬剤を用いて、本症に対する化学療法剤としての有効性が期待できるかどうかを検討するために、実験的感染魚による治療試験を行った。

材料および方法

供試魚：ハマチ用モイストペレットを給与して養成した平均体重 20.0 g のブリを用いた。

供試菌株：養殖ブリ由来の *S. iniae* No. 1 株を用いた。供試菌株を BHI 寒天で 25°C、24時間培養後に集菌して、生理食塩水に懸濁した。そして、5,000 rpm で10分間の遠心分離によって1回洗浄したものを、実験的感染に用いた。

供試薬剤：前節において、*S. iniae* に対する MIC 値の低かった供試薬剤の中から PCG (ブリ由来株に対する MIC : 0.00625 $\mu\text{g/ml}$)、ABPC (0.0125~0.025 $\mu\text{g/ml}$)、EM (0.05 $\mu\text{g/ml}$)、LM (0.20 $\mu\text{g/ml}$)、SPM (0.39~0.78 $\mu\text{g/ml}$)、JM (0.20 $\mu\text{g/ml}$)、OTC (0.39 $\mu\text{g/ml}$)、DOXY (0.10 $\mu\text{g/ml}$)、RFP (0.05 $\mu\text{g/ml}$)、LCM (0.20 $\mu\text{g/ml}$)、NFS (0.025 $\mu\text{g/ml}$) および TMP (0.20~0.39 $\mu\text{g/ml}$) の12薬剤を用いた。

治療試験：各供試薬剤ごとに20尾の供試魚を用いた。供試魚の腹腔内に、供試菌株を1尾当たり 2.0×10^6 cfu 接種し、実験的感染を行った。そして、それぞれ 60 l の流水式角型アクリル水槽に収容した。菌接種から 3, 24, 48, 72 および 96 時間後の 5 回にわたり、各供試薬剤をモイストペレットに混合して、1回当たり魚体重 1 kg 当たり 50 mg の投薬量となるように自由摂餌によって投与した。対照区には、薬剤を混合しないモイストペレットのみを同様にして給与した。なお、給餌率は 5 % とした。菌接種後 14 日間飼育して死亡ならびに症状の発現を観察した。飼育水温は 21.5~23.7°C、平均 22.8°C であった。

結 果

本菌によって実験的感染させたブリに対する

投薬試験の結果は、Table 32 に示すとおりである。すなわち、対照区では20尾中3尾が死亡し、17尾に変形症が発現した。これに対し、薬剤投与区では、LCM投与区で1尾が餌ばなれして死亡したのみで、変形症はまったく発現しなかった。なお、TMPを混合したモイストペレットに対してブリは忌避性を示し、実験終了時にやせた魚が散見されたが、このほかの薬剤に対しては忌避性はみられなかった。

考 察

本菌感染症の化学療法については、アユおよびニジマスで報告されており、アユでは楠田他(1981a)がEMで、城(1982)がOTCで、ニジマスでは北尾他(1987)がEMで投与効果が認められるとしている。海水魚の本症の化学療法についての知見はみあたらない。本研究においては、前節において病魚由来の*S. iniae*が^a高い感受性を示した薬剤のなかから、PCG, ABPC, EM, LM, SPM, JM, OTC, DOXY, RFP, LCM, NFS および TMP の12薬剤を選び、ブリの実験的感染魚に対して菌接種3時間後から、これら

の薬剤を経口投与したところ、すべての薬剤に発病阻止効果が認められた。これらのことから、本症の感染初期においては、これらの薬剤による化学療法が有効であると思われる。

以上の結果から、腸球菌症の治療に用いられているEM, LM, SPM, JMなどのマクロライド系、OTC, DOXYなどのテトラサイクリン系の抗生物質ならびにLCMなどは、本菌感染症の治療に対しても有効ではないかと思われる。また、このほかにも、前節において本菌に対して高い感受性を示したペニシリン系の抗生物質などの有効性がうかがえる。

今後は、さらに感染が進んだ時期における治療試験や、安全性などを検討し、最も有効な薬剤を選定する必要があると思われる。

第6章 総 括

ブリ養殖で大きな被害を出している連鎖球菌症の原因菌としては*Enterococcus seriolicida*のほかに、この菌とは溶血性が異なる β 溶血性の連鎖球菌が知られている。しかし、この β 溶血性の菌による連鎖球菌症については、発生の実態

Table 32. Efficacy of various oral administered drugs in yellowtail against experimental infection with *Streptococcus iniae* No. 1

Drugs	Dose (mg/kg · BW/day)	No. of fish employed	No. of fish died	No. of fish deformed
Penicillin G	50	20	0	0
Ampicillin	50	20	0	0
Erythromycin	50	20	0	0
Kitasamycin	50	20	0	0
Josamycin	50	20	0	0
Spiramycin	50	20	0	0
Oxytetracycline	50	20	0	0
Doxycycline	50	20	0	0
Rifampicin	50	20	0	0
Lincomycin	50	20	1	0
Sodium nifurstyrenate	50	20	0	0
Trimethoprim	50	20	0	0
Control	—	20	3	17

Challenge dose, intraperitoneal injection of 2.0×10^6 cfu/fish.

Average body weight of fish, 20.0 g.

Each drug was administered orally 50 mg/kg · body weight per day for five days.

や原因菌の分類および病原性などの検討が乏しく、予防・治療法もほとんど研究されていない。

そこで、本研究では本症の発生、被害状況を調べるとともに、原因菌の性状および病原性を明らかにし、さらにワクチンによる予防および薬剤による治療法を確立することを目的とした。

ブリにおける β 溶血性連鎖球菌による感染症の発生および被害状況を明らかにするために、三重県下における養殖および野生ブリについて、罹病魚の症状の観察と体各部からの菌分離、ならびに聞き取り調査を行った。養殖ブリにおいては本症は6～7月の稚魚期に発病し、病魚は体の側湾あるいは前側湾を主病徴としていた。このような変形魚の脳からは、 β 溶血性の連鎖球菌が分離された。ブリの側湾症の原因とされる *Myxobolus buri* などの粘液胞子虫は検出されず、本菌の脳への感染と変形との関連性が疑われた。養殖ブリにおける発病率は、高い場合では1小割の20%にのぼった。発症魚の多くは摂餌不良となり成長が止るので、多くは殺処分される。なお、そのまま飼育を続けると、一部の魚では変形症状が消失し、自然治癒したものもいたと思われた。しかし、体の変形が残る個体も多く、変形症状が残ったものでは商品価値がない。また、沿岸で漁獲された変形を呈した野生の当歳ブリからも本菌が分離され、本菌の感染は養殖ブリだけでなく野生ブリにもみられることが明らかになった。定置網で漁獲された当歳ブリのほとんどは活魚で出荷されるが、変形魚は出荷できないために、廃棄されていた。全国的にみても、三重県のほかに長崎県、宮崎県、徳島県などの養殖ブリで本症による被害がみられている。なお、沿岸に回遊するマサバにも変形魚がみられ、変形マサバからは高頻度に、また外観上正常なものからもかなりの頻度で本菌が分離された。

ブリからの分離菌と、野生のマサバ、養殖ヒラメおよび淡水養殖アユの各病魚から分離された β 溶血性の連鎖球菌との形態学的、生物学的、生化学的ならびに血清学的性状の比較を行うとともに、*Streptococcus iniae* および *S. equisimilis* を対照菌株とし、種の同定を試みた。

その結果、病魚由来の菌株は相互に同じ性状を示したことから、これらの菌株は同一種であることが明らかとなった。また、その性状は対照菌株に用いた *S. iniae* の標準株である ATCC 29178 株の性状と一致したので *S. iniae* に同定された。血清学的には病魚由来株は互いに共通抗原を有していたが、*S. iniae* ATCC 29178 株とは異なる血清タイプであり、また、A, B, C, G 群抗原は有していなかった。

次に、本菌の病原性について検討した。まず、本菌の腹腔、菌浴および経口感染による病原性、野生のマサバ、養殖アユなどの他魚種からの分離菌株との病原性の差異について調べた。ついで、飼育水温が感染・発病に及ぼす影響、致死量以下の菌量を腹腔内接種したときの各種臓器内における菌の推移と変形症状の発現との関係、およびマウスに対する病原性について調べた。その結果、菌量を変えた腹腔内接種実験結果から、本症の自然感染魚の症状として報告されている眼球の充出血や白濁、突出、鰓蓋内側の充出血、心外膜炎、脊椎変形症のいずれもが本菌の感染によって起こる症状であり、ブリにおいては一時に多量の菌の感染を受けると死亡に至るが、少量の菌の感染では側湾を主徴とする変形症を呈する症例が多いことがわかった。実験的感染魚における臓器内の生菌数は、死亡魚は各臓器とも高い値を示したが、変形魚では脳内の生菌数がほかの臓器よりも高いことが特徴的であった。

また、ブリおよびアユからの分離菌株を用いたブリおよびアユに対する交差感染実験の結果、いずれの菌株とも、ブリでは変形あるいは死亡、アユでは死亡させ、海水魚と淡水魚から分離される菌株は病原性の点でも、同じ性質をもつことが明らかになった。本菌は、塩分耐容性から考えると元来は淡水起源であると考えられる。経口および菌浴感染実験においても、発症率は低かったが変形症が起り感染が成立した。野生のマサバ由来株はブリに対してブリ由来株と同様の病原性を有していたことから、このような本菌を保菌する野生魚は餌あるいは環境水を介して養殖魚への感染源となり得ることが示唆された。

飼育水温と病原性の関係については、15°Cでは発症は認められなかったが、18~30°Cの範囲では発症した。この間の水温では水温が高いほど発症までの時間が短かく、本菌の増殖速度と関係するものと考えられた。

臓器内における生菌数の推移と症状の発現との関係を調べた結果、とくに脳において生菌数の顕著な増加がみられ、脳内の生菌数がピークに達した頃から変形症が起り始めることから、本菌の脳感染が変形症の発病の原因であると思われる。やがて、脳における生菌数は次第に減少していく。また、変形魚の飼育を続けたところ、変形症の発病から50日後には80%の魚で変形症状が消失し、治癒する個体も多くみられた。

なお、本菌をマウスの腹腔内に体重100g当り0.01mg(1匹当り 1.4×10^6 cfu)接種したところ、80%が死亡したことから、本菌はマウスに対して病原性を有すると判断された。このため、本菌の病原因子については魚類だけでなく、温血動物に対しても検討する必要があると思われる。

本症の防除方法に関しては、まず、本症の感染耐過魚の感染実験による免疫の獲得状況を検討したのち、ホルマリン不活化菌体ワクチンを浸漬法、経口投与方法および腹腔内注射法で投与したときの能動免疫、ならびに免疫血清を用いた受動免疫の有効性を調べた。その結果、実験的感染させて、変形症が発現したブリの変形症状が消失治癒するまで飼育した感染耐過魚の血中の抗体価は1:4~1:16に上昇しており、再度実験的感染を行っても発病しないことが明らかになった。また、感染耐過魚は接種された本菌を速やかに除菌し、脳における増殖が起らなかった。

感染耐過魚は感染防御能が向上し免疫を獲得していたことから、ワクチンによる本症の予防の可能性が考えられた。そこで、ホルマリン不活化ワクチンを作製し、ブリ稚魚に浸漬、経口投与および注射法で投与して、20日後および35日後に攻撃試験を行った。その結果、ホルマリン不活化ワクチンは、浸漬あるいは経口投与では予防効果はみられなかったが、注射投与では

顕著な発病予防効果が認められ、注射ワクチンによる予防の可能性が示された。ワクチン投与魚の血中の抗体価は、注射投与魚にのみ1:2~1:8に上昇したものがみられたが、浸漬および経口投与魚では検出限界(1:2)以下であった。さらに、ワクチンの注射投与魚は体内に侵入した原因菌を速やかに除菌したことから、本症原因菌の感染を防ぐ機構を獲得するものと思われる。今後は、実用化に向けて有効抗原の探索、簡便でコストのかからない投与法の開発などが望まれる。

実験的感染に対する感染防御能を有していた、感染耐過魚およびワクチンの注射免疫魚は、いずれにおいても血清中の抗体価が上昇していた。そこで、本菌の感染防御に対する抗体の関与ならびに免疫血清を用いた迅速な免疫賦与方法を検討するために、免疫魚および感染耐過魚から採取した血清、ならびにウサギ免疫血清を用い、ブリ稚魚に腹腔内接種したのちに攻撃試験を行い、受動免疫の有効性を調べた。その結果、免疫魚および感染耐過魚から採取した血清を接種されたブリは、感染防御能を獲得していることが明らかになった。ウサギ免疫血清は高い抗体価の割には、防御効果は低かった。これらのことから、本菌に対する特異抗体が本菌の感染防御に重要な役割をになうことがわかり、本菌に対する特異抗体の注射による受動免疫は迅速な免疫賦与方法として有効であった。

つぎに、化学療法剤による本症の治療効果を検討するため、まず36種の化学療法剤について本菌に対する最小発育阻止濃度を求めた。その結果、本菌はペニシリン系、セファロスポリン系、マクロライド系、クロラムフェニコール系およびテトラサイクリン系抗生物質、リファンピシン、リンコマイシン、バシトラシン、ニフルスチレン酸ナトリウムならびにジアミノピリミジン誘導体に高い感受性を示した。また、アミノグリコシド系抗生物質およびフラゾリドンには低い感受性を示し、ポリミキシン、サルファ剤およびキノロンカルボン酸系誘導体に耐性を示した。なお、*E. seriolocida*の感受性との比較から、オキサシリン、リファンピシン、バシトラシンおよびトリメトプリムなどに対する感受性

は両菌種の鑑別性状になり得ると思われた。

ついで、本菌に対する発育阻止濃度の値が小さかった薬剤の中からペニシリン G, アンピシリン, エリスロマイシン, リンコマイシン, スピラマイシン, ジョサマイシン, オキシテトラサイクリン, ドキシサイクリン, リファンピシリン, リンコマイシン, ニフルスチレン酸ナトリウムおよびトリメトプリムの12薬剤を用い、実験的感染魚に対して魚体重 1 kg 当り 1日に 50 mg の経口投与治療試験を行ったところ、いずれの薬剤においても発病を予防でき、治療薬としての有効性が示唆された。

謝 辞

本研究にあたり、終始御懇篤な御指導を賜った恩師高知大学農学部教授楠田理一先生に謹んで深謝の意を表します。

本論文の御校閲をいただいた、高知大学農学部の野貞夫教授と谷口順彦教授、愛媛大学農学部の熊井清雄教授ならびに香川大学農学部の山内高円教授に厚くお礼申し上げます。

本研究の当初から御指導、さらには暖かい激励を賜った養殖研究所阪口清次元病理部長（現日本水産資源保護協会）、研究をすすめるうえで適切な御助言をいただいた同研究所病理部反町稔前病原生物研究室長（現富山県水産試験場長）に厚くお礼を申し上げます。三重県水産技術センター山形陽一尾鷲分場長、同センター故柴原敬生氏ならびに林 政博氏には、疾病の情報や病魚材料を提供していただいた。徳島県水産試験場城 泰彦次長には、菌株の分与ならびに情報の提供をしていただいた。養殖研究所病理部前野幸男主任研究官には、変形魚に関する情報をいただくとともに、菌の走査電子顕微鏡撮影の労をとっていただいた。三重県度会郡南勢町五ヶ所湾内のブリ養殖業者の方々には、野外調査に御協力をいただきました。ここに記して厚くお礼を申し上げます。

藤本 實前所長、會澤安志所長、森岡泰啓資源増殖部長はじめ南海区水産研究所職員の方々には、本稿をとりまとめるにあたり種々の御助力と多大なる御便宜を賜りました。深く感

謝いたします。

最後に、本稿作成にあたり絶えず暖かい励ましをいただいた養殖研究所浮 永久前繁殖生理部長（現日本海区水産研究所資源増殖部長）、同研究所本城凡夫前企画連絡室長（現九州大学農学部教授）、国際農林水産業研究センター福所邦彦前水産部長（現養殖研究所繁殖生理部長）に感謝の意を表します。

文 献

- Aoki, T., T. Takami, and T. Kitao, 1990: Drug resistance in a non-hemolytic *Streptococcus* sp. isolated from cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Dis. aquat. Org.*, **8**, 171-177.
- Aoki, T., S. Takeshita, and T. Kitao, 1983: Anti bacterial action of chemotherapeutic agents against non-hemolytic *Streptococcus* sp. isolated from cultured marine fish, yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, **49**(1), 1673-1677.
- 厚田 静男・吉本二郎・酒井正博・小林正典, 1990: 養殖ギンザケに発生した連鎖球菌症について。水産増殖. **38**(3), 215-219.
- 馬場啓輔・奈良正人・岩橋義人・松島又十郎・佐々木正, 1974: 農薬の海水魚に対する毒性-II. ブリ稚魚の TLm 値測定中に見られた脊椎骨の変形について。静岡水試研報. **9**, 43-52.
- Cowan, S. T., 1974: Cowan & Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge. [坂崎利一訳, 1974: 医学細菌同定の手びき, 第2版, 近代出版, 東京, 183-261.]
- Egusa, S., 1985: *Myxobolus buri* sp. n. (Myxosporea: Bivalvulida) parasitic in the brain of *Seriola quinqueradiata* Temminck et Schlegel. *Fish Pathol.*, **19**(4), 239-244.
- Eldar, A., Y. Bejerano, and H. Bercovier, 1994: *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. *Curr. Microbiol.*, **28**, 139-143.
- Eldar, A., P. F. Frelier, L. Assenta, P. W. Varner, S. Lawhon, and H. Bercovier, 1995: *Streptococcus shiloi*, the name for an agent causing septicemic infection in fish, is a junior synonym of *Streptococcus iniae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**(4), 840-842.
- Eldar, A., Ghittino, C., Asanta, L., Bozzetta, E., Gorla M., Prearo, M., and H. Bercovier, 1996: *Enterococcus seriolida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*,

- a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. *Curr. Microbiol.*, **32**, 85–88.
- 福田 穰・楠田理一, 1980: 養殖ハマチにおける類結節症流行後の抗体産生と血清タンパクの変化. 日水誌, **46**(11), 1301–1305.
- 古川 清・日比谷 京・羽生 功, 1981: 養殖ハマチの脊椎弯曲症に関する研究—I. ハマチの脳に寄生する粘液胞子虫について. 昭和56年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 99.
- Hardie, J. M., 1986: Genus *Streptococcus*. In “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (ed. by Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt), Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, 1043–1047.
- 畑井喜司雄・安元 進・塚原淳一郎・平川栄一・安永統男・市来忠彦, 1983: 1982年に長崎県内の養殖魚から分離された各種魚病細菌の薬剤感受性. 長崎県水産試験場研究報告, **9**, 13–23.
- Hines, R. S. and D. T. Spira, 1974: Ichthyophthiriasis in the mirror carp *Cyprinus carpio* (L.) V. Acquired immunity. *J. Fish Biol.*, **6**, 373–378.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams, 1994: Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed., Williams and Wilkins, Baltimore. 527–558.
- 保科利一, 1966: 単世代吸虫類について. 魚病研究, **1**(1), 47–57.
- 飯田貴次・古川 清・酒井正博・若林久嗣, 1986: 脊椎変形プリの脳から分離された非溶血性連鎖球菌. 魚病研究, **21**(1), 33–38.
- 飯田貴次・若林久嗣・江草周三, 1982: ハマチの連鎖球菌症ワクチンについて. 魚病研究, **16**(4), 201–206.
- 医科学研究所学友会, 1976: 細菌学実習提要, 改訂5版 (医科学研究所学友会編), 丸善, 東京, 43–158.
- 城 泰彦, 1982: 淡水養殖魚の連鎖球菌症症例. 魚病研究, **17**(1), 33–37.
- 界外 昇・宮崎照雄・窪田三朗, 1984: プリ稚魚変形症の原因菌および病理組織. 魚病研究, **19**(3), 173–179.
- 柏木 哲・杉本 昇・渡辺和子・大田外之・楠田理一, 1977: 養殖ハマチの連鎖球菌症に対するニフルスチレン酸ナトリウムの化学療法的研究—I. 連鎖球菌症に対する試験管内作用. 魚病研究, **12**(1), 11–14.
- 片江宏巳, 1982: エリスロマイシンのすべて—プリ連鎖球菌症への応用に関する研究. 魚病研究, **17**(1), 77–85.
- 河原栄二郎・楠田理一, 1987: 直接蛍光抗体法による α および β 型溶血性 *Streptococcus* spp. の識別. 魚病研究, **22**(2), 77–82.
- Kawahara, E., H. Sako, S. Nomura, and R. Kusuda, 1989: Hemolysin production by beta-hemolytic *Streptococcus* sp. isolated from yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Fish Pathol.*, **24**(4), 219–223.
- Kawahara, E., H. Sako, S. Nomura, and R. Kusuda, 1991: Properties of hemolysin produced by β -hemolytic *Streptococcus* sp. isolated from yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Fish Pathol.*, **26**(4), 177–181.
- 北尾忠利・青木 宙・板橋敏郎, 1982: 魚類から分離した β -溶血性連鎖球菌の血清学的性状に関する研究. 昭和57年度日本水産学会春季大会講演要旨集. P. 127.
- Kitao, T., T. Aoki, and R. Sakoh, 1981: Epizootic caused by β -haemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. *Fish Pathol.*, **15**(3/4), 301–307.
- 北尾忠利・岩田一夫・太田開之, 1987: 水産用エリスロマイシン製剤による養殖ニジマスの連鎖球菌症の治療試験. 魚病研究, **22**(1), 25–28.
- 窪田三朗・小島清一・石田昭夫, 1970: サルファ剤の副作用. 魚病研究, **4**(2), 98–102.
- 窪田三朗・宮崎照雄・神谷憲一, 1982: マサバの変形症に関する研究. 三重大水産研報, **9**, 167–177.
- 楠田理一, 1965: 海産魚の潰瘍病に関する研究. 京都府水試業績, **25**, 1–116.
- 楠田理一, 1974: 養殖ハマチの類結節症に関する研究. 昭和48年度農林省水産業特別試験研究費補助金による研究報告書 (楠田理一編), 高知大学農学部, 南国市, 59–72.
- 楠田理一, 1990: プリ養殖における魚病の変遷と最近の話題. 水産増殖, **38**(3), 312–313.
- 楠田理一・川合研児・北村憲一, 1982: 1981年秋に三崎半島伊予灘海域で大量死した病魚から分離した連鎖球菌の性状. 昭和57年度日本魚病学会大会講演要旨. 5.
- Kusuda, R., K. Kawai, F. Salati, C.R. Banner, and J. L. Fryer, 1991: *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **41**(3), 406–409.
- 楠田理一・川合研児・豊嶋利雄・小松 功, 1976: 養殖ハマチから分離された *Streptococcus* 属の新魚病細菌について. 日水誌, **42**(12), 1345–1352.
- 楠田理一・鬼崎 忍, 1985: プリ連鎖球菌 *Streptococcus* sp. に対するマクロライド系抗生物質およびリンコマイシンの試験管内作用. 魚病研究, **20**(4), 453–457.
- Kusuda, R. and F. Salati, 1993: Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. *Annu. Rev. Fish Dis.*, **69**–85.
- 楠田理一・佐藤洋大・川合研二・二宮 学, 1996: *Enterococcus seriolicida* ホルマリン不活化菌体の投与がプリの生体防御系に与える影響. 日水誌,

- 62(5), 780-784.
- 楠田理一・杉山昭博・川合研児, 1981a: 養殖アユの連鎖球菌症とビブリオ病に対する投薬の影響. 日本誌, 47(10), 1309-1315.
- 楠田理一・杉山昭博・川合研児・稲田善和・米田 実, 1981b: アユに対する *Streptococcus* sp. ならびに *Vibrio anguillarum* の病原性について. 日本誌, 47(8), 993-997.
- 楠田理一・高木修作, 1983: 養殖ハマチの連鎖球菌感染魚の抗体産生能. 高知大海洋生物研報, 5, 21-28.
- Maeno, Y. and M. Sorimachi, 1992: Skeletal abnormalities of fishes caused by parasitism by myxosporea. *NOAA Tech. Rep. NMFS*, 111, 113-118.
- 松岡 学・室賀清邦, 1993: 愛媛県下の養殖海産魚における細菌性疾病発生の歴史 (1966-1992年). 広島大学生物生産学部紀要, 32(2), 109-118.
- Matsusato, T., 1984: Present status and future potential of yellowtail culture in Japan. *NOAA Tech. Rep. NMFS*, 10, 11-16.
- 松里寿彦・阪口清次, 1981: 伊勢湾産マサバの神経組織内にみられた *Kudoa* sp. について. 昭和56年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 100.
- 見奈美輝彦・中村正夫・池田弥生・尾崎久雄, 1979: 養殖ハマチから分離された β 溶血レンサ球菌. 魚病研究, 14(1), 33-38.
- 宮崎照雄, 1982: 連鎖球菌症の病理学的研究—病魚の病理組織像. 魚病研究, 17(1), 39-48.
- 中島員洋・前野幸男・有元 操・井上 潔・反町稔, 1993: ブリ稚魚の“ウイルス性変形症”. 魚病研究, 28(3), 125-129.
- 中村吉成, 1982: ドキシサイクリンのすべて. 魚病研究, 17(1), 67-76.
- 中津川俊雄, 1983: 養殖ヒラメの連鎖球菌症について. 魚病研究, 17(4), 281-285.
- 日本化学療法学会, 1981: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改定について. *Chomotherapy*, 29(1), 76-79.
- 小川 健・小松 功, 1995: ブリ連鎖球菌症経口ワクチンの安全性および有効性試験. 和歌山県水産増殖試験場報告, 27, 15-22.
- 小川七朗・畑井喜司雄・安元 進・平川栄一・安永統男, 1982a: 近年長崎県内の養殖魚から分離された各種魚病細菌の薬剤感受性. 長崎県水産試験場研究報告, 8, 91-100.
- 小川七朗・安永統男・畑井喜司雄・平川栄一, 1982b: 海面養殖場の各種病魚から分離された β 溶血連鎖球菌について. 長崎県水産試験場研究報告, 8, 81-90.
- 大西圭二・城 泰彦, 1981: 淡水養殖魚の連鎖球菌症に関する研究—I, 1977年および1978年に養殖アユおよびアマゴから分離された β 溶血連鎖球菌の性状. 魚病研究, 16(2), 63-67.
- 大西圭二・城 泰彦, 1986: 養殖アユから分離された β 溶血連鎖球菌の生理学的性状および病原性. 魚病研究, 21(1), 9-13.
- 大和田紘一・本城凡夫・杜多 哲・田中信彦・浅川明彦・佐古 浩・山本茂也・植本東彦, 1988: 五ヶ所湾における海洋観測記録 (1984年-1985年). 養殖研資料 No. 5, 108 pp.
- 岡 正雄, 1967: 養殖ハマチの食餌性疾病に関する研究. 魚病研究, 1(2), 1-19.
- Okamoto, N., K. Takahashi, A. Kumagai, M. Maita, J. S. Rohovec, and Y. Ikeda, 1992: Erythrocytic inclusion body syndrome: resistance to reinfection. *Fish Pathol.*, 27(4), 213-216.
- Ototake, M., K. Ikeda, and T. Nakanishi, 1992: Comparison of uptake of bovine serum albumin by marine and freshwater fish after hyperosmotic infiltration treatment. *Aquaculture*, 103(2), 1373-1376.
- Palmer, R., K. Kawai, and R. Kusuda, 1992: In vitro activity of quinolone antibacterials against selected fish pathogens. *Fish Pathol.*, 27(3), 131-142.
- Perera, R. P., S. K. Johnson, M. D. Collins, and D. H. Lewis, 1994: *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* \times *T. aurea* hybrids. *J. Aquat. Anim. Health*, 6(4), 335-340.
- Piacentini, S. C., J. S. Rohovec, and J. L. Fryer, 1989: Epizootiology of erythrocytic inclusion body syndrome. *J. Aquat. Anim. Health*, 1(3), 173-179.
- Pier, G. B., and S. H. Madin, 1976: *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic *Streptococcus* isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 26(4), 545-553.
- Pier, G. B., S. H. Madin, and S. Al-Nakeeb, 1978: Isolation and characterization of a second isolate of *Streptococcus iniae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 28(2), 311-314.
- Rotta, J., 1986: Pyogenic hemolytic streptococci. In “Bergey's Manual of Systematic Bacteriology” (ed. by Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt), Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, 1047-1054.
- 阪口清次・原 武史・松里寿彦・柴原敬生・山形陽一・河合 博・前野幸男, 1987: 養殖ハマチの粘液胞子虫による側弯症. 養殖研報, 12, 79-86.
- 坂口宏海・竹田文弥・丹下勝義, 1969: ハマチのビタミン要求に関する研究—I. B₆ および C 欠乏症について. 日本誌, 35(12), 1201-1206.
- 酒井正博・厚田静男・小林正典, 1986: クロソイの連鎖球菌症について. 水産増殖, 34(3), 171-177.

- 酒井正博・厚田静男・小林正典, 1988: ニジマスのβ溶血性連鎖球菌症に対する浸漬ワクチンの有効性. 魚病研究, **23**(4), 269-270.
- Sakai, M., R. Kubota, S. Atsuta, and M. Kobayashi, 1987: Vaccination of rainbow trout *Salmo gairdneri* against β-haemolytic streptococcal disease. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**(8), 1373-1376.
- 坂崎利一, 1970: 培地学各論(1), 第2版, 近代医学社, 東京, 232 pp.
- Sako, H., 1992a: Streptococcal infection in cultured yellow tail. *NOAA Tech. Rep. NMFS*, **111**, 125-130.
- 佐古 浩, 1992b: プリの実験的β溶血性連鎖球菌症回復魚における免疫の獲得. 水産増殖, **40**(4), 389-392.
- 佐古 浩, 1992c: プリのβ溶血性連鎖球菌症予防ワクチンの有効性. 水産増殖, **40**(4), 393-397.
- 佐古 浩, 1993a: 海水魚および淡水魚から分離されたβ溶血性連鎖球菌の性状ならびに病原性. 水産増殖, **41**(3), 387-395.
- 佐古 浩, 1993b: 各種化学療法剤に対するβ溶血性連鎖球菌症原因菌の感受性. 水産増殖, **41**(3), 397-404.
- Schleifer, K. H. and R. Kilpper-Balz, 1984: Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**, 31-34.
- 関屋朝裕・岩田一夫・井上進一, 1987: 各種養殖魚から分離された連鎖球菌症原因菌の薬剤感受性について. 昭和60年度宮崎県水産試験場事業報告書. 247-251.
- Snieszko, S. F., 1974: The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J. Fish Biol.*, **6**, 197-208.
- 菅 善人, 1982: スピラマイシンのすべて. 魚病研究, **17**(1), 87-99.
- 水産庁研究部研究課, 1994: 平成4年魚病被害の実態調査結果. 水産庁研究部研究課, 東京, 15 pp.
- 竹丸 巖・楠田理一, 1988: *Streptococcus* sp. および各種魚病細菌に対するジョサマイシンの試験管内抗菌作用. 日水試, **54**(9), 1527-1531.
- Teixeira, L. M., Merquior, V. L. C., Vianni, M. C. E., Carvalho, M. G. S., Fracalanza, S. E. L., Steigerwalt, A. G., Brenner, D. J., and R. R. Facklam, 1996: Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**(3), 664-668.
- 宇賀神光夫, 1981: 1980年栃木県下の養殖アユの流行病の原因である連鎖球菌に関する研究. 魚病研究, **16**(3), 119-127.
- Wedemeyer, G. A., F. P. Meyer, and L. Smith, 1976: Environmental Stress and Fish Diseases. In "Disease of Fishes" (ed. by Snieszko, S. F., and H.R. Axelrod), Book 5, T. F. H. Publications, Neptune, N. J., 192 pp.
- Weinstein, M., D. E. Low, A. McGeer, B. Willey, D. Rose, M. Coulter, P. Wyper, A. Borczyk, and M. Lovgren, 1996: Invasive infection with *Streptococcus iniae*-Ontario, 1995-1996. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **45**(30), 650-653.

1997年12月15日受理 (Accepted on December 15, 1997)

本報告は, 1997年1月愛媛大学に提出, 受理された学位審査論文を一部改筆したものである。

南西海区水産研究所業績A第71号 (Contribution No. A 71 from the Nansei National Fisheries Research Institute)

佐古 浩: 南西海区水産研究所 〒739-0452 広島県佐伯郡大野町丸石2-17-5 (H. Sako: Nansei National Fisheries Research Institute, 2-17-5 Maruishi, Ohno, Saeki, Hiroshima 739-0452, Japan)