

# 養殖アユから分離された細菌の病原性

堀江 康 浩 ， 見奈美 輝 彦

養殖アユの細菌性疾病には，ビブリオ病・細菌性鰓病・連鎖球菌症などがあるが，日常の検査では他に種々の細菌が分離される。これらの菌と病害との関連については現在のところ十分に明らかでないので，アユに対する病原性を検討し，魚病対策の一助とする。

## 材料および方法

**供試菌株** 供試菌株は昭和60年3月から9月にかけて養殖アユの腎臓より分離された15株で，その由来を表1に示した。このうちA-4とP-1，またA-6とE-2はそれぞれ同一個体より分離されたものである。

表1 供試菌株の由来

菌 株	分離月日	場 所	魚 種	体 重 (g)
A-1	4・24	那賀郡桃山町	人工産アユ	3
A-2	6・7	和歌山市	湖産アユ	5
A-3	6・14	〃	〃	5
A-4	7・3	〃	〃	9
A-5	7・14	那賀郡岩出町	〃	10
A-6	7・22	〃	〃	55
A-7	8・12	〃	〃	65
A-8	8・19	〃	〃	65
A-9	9・19	〃	〃	60
A-10	6・14	西牟婁郡日置川町	〃	7
P-1	7・3	和歌山市	〃	9
E-1	6・14	西牟婁郡白浜町	〃	2
E-2	7・22	那賀郡岩出町	〃	55
C-1	3・1	和歌山市	海産アユ	1
C-2	6・14	西牟婁郡白浜町	湖産アユ	4

**性状試験** 魚類等防疫指針3（水産庁）<sup>1)</sup> に従って行い，また腸内細菌同定用キットAPI

20 E も併用した。

**病原性試験** 1) 腹腔内接種による病原性 供試菌15株について、各菌株をハートインキュベーション寒天培地で25°C 24時間培養し、0.85%滅菌生理食塩水に懸濁させ、魚体重10g 当たり湿菌重量で0.01 mg ( $10^6$  CFU) となるように平均体重 10.1g のアユ (1群10尾、以下同様) の腹腔内に接種した。魚は実験感染後70ℓ のアクリル水槽に収容し、7日間経過を観察した。また、A-6 と E-2 については、4段階の菌液を調整し平均体重 12.5g のアユを用い同様に行った。

2) 筋肉内接種による病原性 A-6 と E-2 について、1) と同様にして4段階の菌液を調整し、平均体重 17.2g のアユの筋肉用に接種し7日間経過を観察した。

3) 菌浴による病原性 A-6 と E-2 について、1) と同様の方法で菌を培養し、3又は5段階の菌液各1ℓ を調整した。これに平均体重 14.1g のアユを30分間通気しながら菌浴させ、10日間経過を観察した。なお、*Vibrio anguillarum* (V-1, 血清型A型) も参考に供した。

### 結果および考察

**供試菌株の性状** 表2に示したとおりで、供試菌株は全てグラム陰性の桿菌で、運動性を有し、グルコースを醗酵的に利用し、カタラーゼが陽性で、硝酸塩を亜硝酸塩に還元した。A-1~10とP-1はチトクロームオキシダーゼ陽性であるのでビブリオ様菌群に、またE-1・2とC-1・2は陰性であるので腸内細菌群に属する。A-1~10は0/129に感受性がなく、37°Cで発育し、A-1~9は2, 3-ブタンジオール脱水素が陽性であるので *Aeromonas hydrophila* に、またA-10は陰性であるので *A. punctata* と同定される。P-1はグルコースからガスを産生せず、イノシットを利用するが、マンニットを利用せず、ゼラチンを液化しないことから *Plesiomonas shigelloides* と思われる。また、API 20Eによれば、E-1は *Escherichia coli*, E-2は *Edwardsiella tarda* C-1は *Citrobacter* spp. およびC-2は *Citrobacter freundii* とされた。

**病原性** 供試15株について腹腔内接種した結果は表3に示すとおりである。斃死率は *A. hydrophila* (A-1~9) ではA-3, 6, 8, 9が100%, A-5, 7が90%, A-4が30%, A-1, 2が0%で、菌株により差異がみられた。また、斃死率は *E. tarda* (E-2) では90%であったが、*A. punctata* (A-10), *P. shigelloides* (P-1), *E. coli* (E-1), *Citrobacter* spp. (C-1) および *C. freundii* (C-2) では0%であった。

次に、A-6 と E-2 について4段階の菌液を腹腔内接種した結果は表4に示すとおりで、斃死率はA-6では $10^6$ ,  $10^5$ で100%,  $10^4$ で90%,  $10^3$ で70%であり、またE-2では $10^6$ で90%,  $10^5$ で40%,  $10^4$ で10%,  $10^3$ で0%であった。斃死魚には眼球と腹腔壁の出血が両株で、背鰭と尾鰭基部の出血がA-6で、また肛門の発赤と拡張がE-2でそれぞれみられた。

表2 供試菌株の性状

性 状	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6	A-7	A-8	A-9	A-10	P-1	E-1	E-2	C-1	C-2
形	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
運動性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
グラム	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37℃における発育	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7.5%食塩加培地での発育	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0/129感受性	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
カタラーゼ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
チトクローム・オキシダーゼ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
O-F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
VP	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MR	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
インドール	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
グルコースからのガス産出	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
グリセロールからのガス産出	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
H <sub>2</sub> S (SIM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
2, 3-ブタンジオール脱水素	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
クエン酸塩(シモンズ)	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+
〃 (クリステンセン)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
リシン脱炭酸	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
アルギニン脱炭酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
オルニチン脱炭酸	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
アルギニン加水分解	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
ゼラチンの液化	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
硝酸塩還元	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
マロン酸塩	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
ウレアーゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
炭水化物の利用：グルコース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ガラクトース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
アラビノース	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
ラムノース	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
シュクロース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
トレハロース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ラクトース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
メルビオース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
ラフィノース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
イヌリン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
サリシン	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
エスクリン	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
アミグダリン	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
グリセロール	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
マンニット	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
ソルビット	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
イノシット	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

R：桿菌， F：醗酵

表3 0.01 mg / 10 g b. w. を腹腔内接種したときの病原性

菌 株	経 過 日 数							斃 死 率 (%)
	1	2	3	4	5	6	7	
A - 1								0
A - 2								0
A - 3	9*	1						100
A - 4		1	2					30
A - 5	9							90
A - 6	10							100
A - 7	9							90
A - 8	9	1						100
A - 9	10							100
A - 10								0
P - 1								0
E - 1								0
E - 2	1	5	3					90
C - 1								0
C - 2								0

\* 斃死尾数, 水温: 18.3 ~ 19.6 °C

表4 A-6およびE-2の腹腔内接種による病原性

菌 株	接種菌数 (CFU/10g b.w.)	経 過 日 数							斃死率 (%)
		1	2	3	4	5	6	7	
A - 6	$6.3 \times 10^6$	10*							100
"	" $\times 10^5$	10							100
"	" $\times 10^4$	2	6	1					90
"	" $\times 10^3$		6	1					70
E - 2	$7.0 \times 10^6$		2	7		1			100
"	" $\times 10^5$		2	2					40
"	" $\times 10^4$		1						10
"	" $\times 10^3$								0

\* 斃死尾数, 水温: 17.6 ~ 19.1 °C

LD<sub>50</sub>はA-6では10<sup>3</sup> CFU/10g b.w.以下, E-2では10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup> CFU/10g b.w.と推定される。

A-6とE-2の筋肉内接種の結果は表5に示すとおりで, 斃死率はA-6では10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>で100%, 10<sup>3</sup>で90%, またE-2では10<sup>6</sup>で100%, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>で0%であった。斃死魚には両株とも, 腹腔内接種と同様の症状がみられた。また, LD<sub>50</sub>についてもA-6では10<sup>3</sup> CFU/10g b.w.以下, E-2では10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup> CFU/10g b.w.と腹腔内接種と同様の範囲にあった。なお, A-6については10<sup>3</sup>の斃死率が90%であるので, それ以下の菌数での検討が, E-2については試験水温(16.2~19.1℃)が養殖池の水温(26℃)や*E. trada*の発育適温(30~35℃)と比べ低かったことから, 高水温での検討が必要と思われる。

表5 A-6およびE-2の筋肉内接種による病原性

菌 株	接種菌数 (CFU/10g b.w.)	経 過 日 数							斃死率 (%)
		1	2	3	4	5	6	7	
A-6	5.3 × 10 <sup>6</sup>	10*							100
"	" × 10 <sup>5</sup>	1	9						100
"	" × 10 <sup>4</sup>		8	2					100
"	" × 10 <sup>3</sup>		3	5	1				90
E-2	6.2 × 10 <sup>6</sup>			3	6	1			100
"	" × 10 <sup>5</sup>								0
"	" × 10 <sup>4</sup>								0
"	" × 10 <sup>3</sup>								0

\* 斃死尾数, 水温: 16.2~17.1℃

A-6, E-2およびV-1の菌浴の結果は表6に示すとおりで, 斃死率はA-6では10<sup>9</sup>で70%, 10<sup>8</sup>, 10<sup>7</sup>で10%, E-2では10<sup>8</sup>で10%, 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>で0%, V-1では10<sup>8</sup>で100%, 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>で90%, 10<sup>5</sup>で10%, 10<sup>4</sup>で0%であった。斃死魚の症状は, A-6では肛門の発赤と拡張, 背鰭・尾鰭基部の発赤と出血, 頭部の内出血, 眼球の突出, 鰓蓋の出血, 腹腔壁の出血がみられ, E-2では胸鰭基部の発赤と腹腔壁の出血が, またV-1では各鰭部の発赤・出血と体側の出血・潰瘍がみられた。LD<sub>50</sub>はA-6では10<sup>8</sup>~10<sup>9</sup> CFU/ml, V-1では10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup> CFU/mlと推定され, *A. hydrophila*の菌浴による病原性は, *V. anguillarum*の10<sup>-3</sup>~10<sup>-4</sup>と推測される。

*V. anguillarum*と*Streptococcus* sp.の Ayuに対するLD<sub>50</sub>について, 楠田<sup>2)</sup>らは, *V. anguillarum*は筋肉内接種では10<sup>0</sup> cels / fish以下, 菌浴では10<sup>4</sup> cells / ml, また *Strep* -

*tococcus* sp. は同様に $10^2$  cells/fish 以下,  $10^6$  cells /ml と報告している。今回の実験では *A. hydrophila* については同様に $10^3$  CFU/10 g b. w. 以下,  $10^8 \sim 10^9$  CFU/ml であったので, *A. hydrophila* の病原性は *V. anguillarum* や *Streptococcus* sp. と比べると弱

表6 A-6, E-2 および V-1 の菌浴による病原性

菌 株	菌 数 (CFU/ml)	経 過 日 数										斃死率 (%)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
A-6	$8.0 \times 10^9$		5*	2									70
"	" $\times 10^8$		1										10
"	" $\times 10^7$				1								10
E-2	$5.2 \times 10^8$							1					10
"	" $\times 10^7$												0
"	" $\times 10^6$												0
V-1	$2.0 \times 10^8$			7	3								100
"	" $\times 10^7$			2	5	1	1						90
"	" $\times 10^6$				5	3	1						90
"	" $\times 10^5$					1							10
"	" $\times 10^4$												0

\* 斃死尾数, 水温: A-6 ; 20.3 ~ 22.3°C, E-2 ; 24.8 ~ 25.8°C, V-1 ; 15.2 ~ 16.2°C

いものと考えられる。アユの *Aeromonas* 感染症は天然アユと養殖アユで報告され, その主な発生条件として高水温が上げられているが, *Aeromonas* は給餌過多の養殖アユから分離される場合が多い。また, ウナギやコイでは *Aeromonas* の感染は菌液では認められず経口投与することによって成立することを明らかにしている。このことから, *Aeromonas* の病原性の検討には, 今後, 経口感染実験も必要であると考えられる。

## 文 献

- 1) 水産庁: 魚類等防疫指針 2, 31-35 (1978).
- 2) 楠田理一他: 日水誌, 47, 993-997 (1981).