

アユのビブリオ病に関する研究 — I

昭和48年に県内のアユ養殖場で流行した

ビブリオ病について

里 井 晋 一

昭和48年7月上旬から9月下旬にかけて県内のアユ養殖場及び天然河川で流行したビブリオ病はその発生規模や被害量が近年になく大きくアユ養殖業者に非常に大きな打撃を与えた。従来のビブリオ病であれば、サルファ剤・抗生物質・フラン剤で対処出来たのであるが、今年のビブリオ病はこれらの薬剤で効かない例が多くなり、特に種苗放養後に大被害をもたらした。

著者は、県内のアユ養殖場及び天然河川で多数の病死魚を採集し細菌分離を行なった。いづれの病死魚からも多数のビブリオ菌 (*Vibrio anguillarum*) を分離することができ、これらの菌を用いて復元試験を行ない病原性を確認することが出来た。又、これらの菌の生化学的性状や薬剤感受性等を調べた。その結果室賀¹⁾らが昭和43年から45年にかけて県内の養殖場或は天然河川の病アユから分離したビブリオ菌、又、川村²⁾らが昭和42年に天然河川の病アユから分離したビブリオ菌とは生化学的性状や薬剤感受性の点でいくらか違いが見られたので、これらもあわせて報告する。

材料および方法

昭和48年7月上旬から9月下旬にかけて県内の14養殖場及び3河川で多数の病死魚を採取した。これらの病死魚の症状は初期のものでは体側部に背部から腹部にかけて帯状或は斑紋状の褪色部分が認められ、さらに症状が進んだものでは出血及び潰瘍が認められた。その他、眼に出血が認められたり、鰭及びその基部、鰓蓋、肛門周辺に出血の認められるものもあり、外観症状は様々であったが、従来のビブリオ病として特徴づけられていた腸管の充血したものは認められず、又内臓にはこれといった病変が認められない状態で死んで行くものがほとんどであった。しかし2養殖場及び1河川で採集した病死魚の中には従来のビブリオ病の典型的な症状即ち、体表に出血潰瘍、眼球の突出、腸管の充血などを示すものが多数認められた。

このようになさまざまな外観症状を示す病死魚の腎臓から2% NaCl加普通寒天培地を用いて細菌分離を行なったところ、いづれもほぼ純粋な形で一種類と思われる細菌を分離することが出来た。そこで病死魚の採取時期、場所の違いに応じて各養殖場及び天然河川からの代表株1菌株を選び合計18菌株について、常法に従って各種の細菌学的検査、薬剤感受性検査、復元試験等を行なった。分離菌の由来等は表1に示した。

表1. アユ病魚より分離した *V. anguillarum* 菌株の由来

菌株 NO	養魚場名又は河川名	分離月日 (1973年)	体長 (cm)	症 状	病原性
No 6	Ki 養魚場	7/9	17.1	体側潰瘍出血・下顎部出血	+
No 23	Mi "	7/18	13.8	体側潰瘍出血	+
No 24	Ha "	7/20	14.5	体側潰瘍出血	+
No 31	I "	7/21	13.1	体側潰瘍出血	+
No 36	Hi "	7/23	8.2	体側潰瘍出血	+
No 37	愛知川	7/25	7.7	肛門部出血	+
No 54	天野川	8/13	7.0	体側潰瘍出血	+

菌株 NO	養魚場名又は河川名	分離月日 (1973年)	体長 (cm)	症 状	病原性
No 61	Na 養魚場	8/14	13.3	体側潰瘍出血	+
No 69	Ko "	8/14	15.1	下顎部、鰓蓋出血	+
No 75	Shu "	8/15	10.7	体側潰瘍出血	+
No 78	Ma "	8/15	14.8	腹鰭基部出血	+
No 80	Ka "	8/15	10.7	体側潰瘍出血	+
No 84	O "	8/16	8.9	腹部、尾柄部出血	+
No 92	I "	8/31	14.1	体側潰瘍出血	+
No 95	Wa "	9/ 3	18.2	体側潰瘍出血	+
No 114	Ya "	9/ 4	11.7	眼球突出出血	+
No 123	U "	9/17	17.9	体側潰瘍出血・腸管出血	+
No 128	安曇川	9/18	7.1	体側潰瘍出血・胸鰭基部出血	+

結果および考察

1. 細菌学的検査

1) 分離菌の培養形態

分離菌18菌株について培養形態を調べた。25℃、48時間培養で2% NaCl加普通寒天培地上に出現したコロニーは直径1~2mmの大きさで、大部分淡黄色で湿潤光沢のある比較的透明な正円形であった。中には灰白色或は無色に近いコロニーも見られた。いずれの菌株もSwarmingは認められなかった。

2) 分離菌の形態学的生化学的性状

分離菌18菌株について、常法に従って形態学的生化学的性状を調べた。その結果を表2に示した。又糖分解能についても同様に調べた。その結果は表3に示した。

これらの分離菌は表2に見られるようにグラム陰性の短桿菌で運動性があり、チトクロームオキシターゼ⁺、カタラーゼ⁺、グルコースを酵素的に分解し酸を産生し、Vibrio static agent o/129に感受性を示すことからVibrio属の細菌である。このVibrio属の細菌のうちで、海産・淡水産の魚類から分離されすでに性状が明らかにされたものにV. anguillarum V. parahaemolyticus, V. alginolyticusがある。これらの細菌の性状と今回分離したVibrio菌の性状(表2)を比較すると、18株菌ともV. anguillarumに同定出来るものである。V. anguillarumをさらにインドール産生シュクロース、マニトール分解能の有無によってNybelinやSmithはA, B, Cの3typeに分類している。これに従うなら、昭和43年から45年に室賀らが又、昭和42年に川村らが病アユから分離したV. anguillatumはいずれもA typeに属する。

表2. アユ病魚より分離したV. anguillarumの形態学的生化学的性状

菌株 検査項目	分離菌		V. anguillarum				V. parahaemolyticus	V. alginolyticus
	No 6 ~95	No 114 ~128	* A	* B	* C	室賀ら ²⁾ の株	***	***
大 き さ (μ)	0.5~ 2×0.5	0.5~ 2×0.5	15×0.5	15×0.5	15×0.5	0.5~ 2.0		
運 動 性	+	+	+	+	+	+	+	+
グ ラ ム 染 色	-	-	-	-	-	-	-	-

菌株 検査項目	分離菌		V. anguillarum				V. parahae- molyticus	V. alginoly- ticus
	No 6 ~95	No114 ~128	A*	B*	C*	室賀ら の株	***	***
好塩性 (O)	0.5~5	0.5~5	0.07 ~8.5	0.07 ~8.5	0.6 ~6.0	0~7	1.0~10.0	1.0~10.0
色素産生	-	-	-	-	-	-		
流化水素産生	-	-	-	-	-	-		
ヒューレイフソン培地 O-Ftest	発酵	発酵			発酵	発酵	発酵	発酵
ガス酸生	-	-			-	-	-	-
尿素利用性	-	-			-		-	-
シモンズクエン酸利用性	+	+			+	+	+	+
チトクローム酸化性	+	+			+	+	+	+
インドール産生	-	+	+	-	-	+	+	+
硝酸塩還元性	+	+			+	+	+	+
カタラーゼ反応	+	+			+	+	+	+
マロン酸塩利用性	-	**** +W				+W	-	-
D-酒石酸塩利用性	+	+				+	+	+
コレラ赤反応	-	-				-		
V P 反応	+	+			+	+	+W	+
M R 反応	-	-			-	+or-	+	+or-
アルギニンジヒドロラーゼ	+	+			+	+	-	-
リジンデカルボキシラーゼ	-	+				-	+	+
O/129 感受性	+	+				+	+	+
ノボピオシン感受性	+	+				+	+	
ペニシリン感受性	-	-				-	-	

* 江草が魚病研究 4 (1)に記載

** 室賀らが魚病研究 5 (1)に記載

*** 室賀らが魚病研究 8 (1)に記載

**** Weakly positive.

表 3. アユ病魚より分離した V. anguillarum の糖分解能

菌株 糖	分離菌		v. anguillarum				V. parahae- molyticus	v. alginoly- ticus.
	No6~95	No114~128	A	B	C	室賀ら の株		
グルコース	+	+	+	+	+	+	+	+
ラクトース	-	-	-	-	-	-	-	-
シュクロース	+	+	+	-	+	+	+	+
アラビノース	-	+			-	+	+W*	+W
セロピオース	(-13,+2)	+			+	+	+W	+W
マニトール	+	+	+	-	+	+	+	+

菌株 糖	分離菌		V. anguillarum				V. parahae molyticus	V. alginoly ticus.
	No6~95	No114~128	A	B	C	室賀ら の株		
ズルシット	-	-						
アドニット	-	-			-		-	-
ラフィノース	⁺ (+14, -1)	-			-	-	-	-
イノシット	-	-			-	-	-	-
キシロース	-	-			-	-	-	-
マルトース	+	+	+	+	+	+	+	+
ガラクトース	⁺ (+13, -2)				+	-	+	+
マンノース	+	+			+	+	+	+
ラムノース	-	-			-	-	-	-
デキストリン	+	+	+	+	+	+	+	+
デンプン	+	+			+	+	+	+
ソルビット	⁺ (+14, -1)	-			-	-	-	-
グリコーゲン	+	+			+		+	+

セロビオース(+2), ガラクトース(-2)はNo 75, No 80の2菌株

ラフィトース(-1), ソルビット(-1)はNo 78の1菌株

*: Weakly positive

ものであったが、今回分離した菌株の大部分(18株中15株)はC typeのものであり、A typeのものはわずかに3菌株であった。従って今回流行したビブリオ菌は従来のビブリオ菌とは明らかに type の異なるものと思われる。なおC typeの株のうち、糖分解能において若干性状を異にする菌株が3株見られた。

3) 塩分濃度と発育

A typeとC typeの代表株No.123とNo.6株の至適塩分濃度を調べるために、Difco nutrient brothを用い、培養温度25℃, pH7.0で24時間振盪培養して菌の発育状態を調べた結果を表4に示した。発育可能塩分濃度はA type 0~5%, C type 0.5~5%で、至適塩分濃度は1~3%であった。A typeの株は淡水に適応していてNaCl 0%で十分発育出来るが、C typeの株は全く発育出来ないか、ごく弱くしか発育出来ないようである。

表4. アユ病魚より分離したV. anguillarumの発育と食塩濃度

菌株	NaCl濃度(%)	0	0.5	1	2	3	4	5	6	7	10	型
No 6		-or+	+	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	Ctype
No 123		+	+	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	Atype

培養温度25℃ pH 7.0 24時間振盪培養

4) pHと発育

培養温度25℃, 食塩濃度2%で24時間振盪培養してpHの変化による発育状態を調べた結果を表5に示した。発育可能pHはA, C両typeとも6~10で、至適pHは7~9である

が、A typeの株はC typeの株より若干酸性域でも発育出来るようである。

表5. アユ病魚より分離した *V. anguillarum* の発育と p^H

菌株	PH	5	6	7	8	9	10	11	型
No 6		-	±	+++	+++	+++	++	-	Ctype
No 123		-	++	+++	+++	+++	+	-	Atype

培養温度 25℃, 食塩濃度 2%, 24時間振盪培養

5) 温度と発育

食塩濃度 2%, p^H 7.0 で 24時間振盪培養して温度の変化による発育状態を調べた結果を表6に示した。発育可能温度はA, C両typeとも 10~37℃, 至適温度は 15~37℃の範囲であった。

表6. アユ病魚より分離した *V. anguillarum* の発育と温度

菌株	培養温度 ℃	10	15	20	25	30	37	型
No 6		+	+++	+++	+++	+++	+++	Ctype
No 123		+	+++	+++	+++	+++	+++	Atype

食塩濃度 2%, p^H 7.0, 24時間振盪培養

2. 復元試験

アユ病死魚より分離した *V. anguillarum* 18株菌の病原性を調べるために健康な養成アユを用いて復元試験を行なった。2% NaCl加普通寒天平板培地で 25℃, 24時間培養した菌を滅菌生理食塩水に懸濁し, 1尾当り $2.8 \sim 6.3 \times 10^5$ 個の生菌を供試魚 (15~30g) 10尾の体側筋肉部に接種して, ガラス水槽に放養し, その後の発病および斃死状況を観察した。18菌株とも生菌接種 48時間以内に 100% の斃死が見られた。症状はほとんどの斃死魚が接種部位の発赤腫張, 出血および潰瘍であった。これらの斃死魚より接種菌の回収を試み, いづれも腎臓から純粋に接種菌を再分離することが出来た。又A typeとC typeの代表株No 123とNo 6株の生菌を用いて, 健康な稚アユに大量に経口投与した。(1日10尾の生菌をクランブルに添加して10日間連続投与)

供試魚は各区60尾, 平均体重 1.03g で流水式にしてコンテナ水槽で3週間飼育した。飼育期間中における斃死状況は, A typeの生菌投与区では投与5日目から発病斃死が見られ15日目までに全数斃死した。症状は腸管のびらん出血, 肝臓・幽門垂に点状の出血, 眼球の突出出血, 体表に点状の出血などが見られた。C typeの生菌投与区では生菌投与3週間目までに9尾が斃死したのみで残りは全く異状が見られなかった。斃死魚の症状は鰭基部の出血, 体表にびらん出血, 眼球の突出, 肝臓・幽門垂に点状の出血等であった。又, 生残魚の内臓を剖見しても肉眼的には全く異状が認められなかった。この9尾の斃死については取扱い時に体表或は鰭に損傷を受け, その部位より水中の生菌が感染し発病斃死したものと考えられる。

3. 薬剤感受性検査

分離菌の薬剤に対する感受性はハートインヒュージョン寒天培地, 或はミュラーヒントン寒天培地を用い, 常法に従ってディスク法によって調べた。結果を表7に示した。

表7. アユ病魚より分離した *V. anguillarum* の薬剤感受性

薬剤 \ 菌株	15株 * (Ctype)	3株** (Atype)
クロラムフェニコール	+++*** 1 ++ 11 + 3	+++ 3
テトラサイクリン	+++ 1 ++ 12 + 2	+++ 3
カナマイシン	+++ 10 ++ 5	+++ 3
ストレプトマイシン	+++ 2 ++ 10 + 3	+++ 2 ++ 1
エリスロマイシン	+++ 2 ++ 13	++ 3
オキシレニン酸	+++ 15	+++ 3
ナリジック酸	+++ 15	+++ 3
スルファジメトキシシン	- 15	- 3
スルファモノメトキシシン	- 15	- 3
フラゾリゾン	+ 13 - 2	++ 1 - 2

感受性 +: Weekly ++: Mediatly +++: Strongly

25℃, 24時間培養後の阻止円の大きさにより判定

* 15株はNo 6~95の菌株 ***: 株数

** 3株はNo 114~128の菌株

分離菌18菌株中A typeの3株はクロラムフェニコール, テトラサイクリン, カナマイシン, ナリジック酸, オキシレニン酸には強い感受性を示し, ストレプトマイシン, エリスロマイシン, フラゾリゾンにはやや低い感受性を示したが, スルファモノメトキシシン, スルファジメトキシシンには全く感受性を示さなかった。又, Ctype の15株はナリジック酸, オキシレニン酸, カナマイシンには強い感受性を示したが, クロラムフェニコール, テトラサイクリン, エリスロマイシン, フラゾリゾンには感受性が弱く, スルファモノメトキシシン, スルファジメトキシシンには全く感受性を示さなかった。特に, 従来のピブリオ病に対して特効薬のように用いられていたクロラムフェニコールに感受性の弱い株が多いことが注目された。

4. 薬剤耐性菌の出現について

昭和47年まではアユ養殖場においてピブリオ病が発生すれば, 多くの養殖業者はサルファ剤(スルファモノメトキシシン, スルファジメトキシシン等)・抗生物質(クロラムフェニコール, テトラサイクリン等)・フラン剤(ニフルブラジン, ニフルピリノール等)を使用し本病の予防治療に効果をあげて来たのであるが, 昭和48年からは, 従来有効であったこれらの薬剤が効かないという事例が多くなり, 著者がin vitro で調べた結果, 表7からもスルファモノメトキシシン, スルファジメトキシシンには全く感受性がなく, 又, クロラムフェニコール, テトラサイクリンには感受性の弱い菌株が多く見られて, これらの薬剤にすでに耐性を獲得していることが確認された。この耐性菌の出現については, 再発と治療を何度もくり返している間に感受性菌が駆逐され, これらの薬剤に耐性を獲得した菌がはびこって来たものと考えられるが, この点についてはさらに詳細に検討する必要がある。

又, 今回流行したピブリオ病に対しては, 従来有効であったサルファ剤や抗生物質にかわって, 養殖業者の間で, ナリジック酸が多用され, ようやく本病をおさえることが出来たが, この薬剤にしても, 治療薬として十分なものではなく, 本剤使用後に菌交代症的な現象が見られて問題になっている。このような現象がなぜ起こるのか, 今後明らかにして行く必要がある。

5. まとめ

1) 昭和48年7月上旬から9月下旬にかけて県内のアユ養殖場及び天然河川で流行したピブリオ

病の原因菌は細菌学的検査の結果 *Vibrio anguillarum* であることが確認出来た。

- 2) この菌はインドール産生能や糖分解能の差異によって A, B, C の 3 type に分類出来るが、今回流行したビブリオ病の原因菌は、従来のビブリオ菌 (A type) とは型の異なる C type のものであった。
- 3) 分離菌の塩分耐性については、A type の菌は淡水に適応していて NaCl 0% でも十分発育可能であったが、C type の菌は全く発育出来ないか、ごく弱くしか発育出来ず、海産由来の菌のように思われた。
- 4) 又、pH については、A type の菌は C type の菌より若干酸性域でも発育出来るようであった。
- 5) 今回流行した C type のビブリオ菌の特徴として、腸管が充血した病魚がほとんど認められなかったこと。又、従来から使用されていた薬剤 (スルファモノメトキシシ、クロラムフェニコール等) では治療することが困難であったこと。又、大量の生菌を経口投与しても経口感染は成立し難いようであったこと等があげられる。
- 6) 薬剤感受性については、C type の菌はナリジック酸、オキシレニン酸、カナマイシンに強い感受性を示したが、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、エリスロマイシンには感受性が弱く、スルファモノメトキシシ、スルファジメトキシシには全く感受性が認められなかった。
- 7) C type の菌の多くは、サルファ剤、クロラムフェニコール、テトラサイクリンに対して耐性を獲得していた。
- 8) 分離菌の病原性については、菌接種 48 時間以内に全供試魚が斃死し、高い致死能力を保持していることが認められた。

6. 文献

- 1) 室賀清邦・江草周三
1970: 淡水養殖アユ病魚より分離した *Vibrio anguillarum* について、
魚病研究 5(1) 16~20
- 2) 川村正純・赤沢一三・他
1968: 細菌によるビワ湖産アユの伝染病疾患 (第1報)
滋賀県立短期大学学術雑誌 No 9 60~64
- 3) Smith, I.W.
1961: A disease of finnock due to *Vibrio anguillarum*.
J. gen. Microbiol., 24, 247~252
- 4) 室賀清邦・江草周三
1973: *Vibrio anguillarum* の性状に関する考察
魚病研究 8(1) 10~25
- 5) 江草周三
1969: 魚病菌 *Vibrio anguillarum* について (総説)
魚病研究 4(1) 31~44
- 6) 室賀清邦・属博夫・他
1974: 1973 年春から夏にかけて徳島および岡山県下に流行したアユのビブリオ病の原因菌について、
魚病研究 8(2) 147~151
- 7) Muroga, K. and S. Egusa
1967: *Vibrio anguillarum* from an endemic disease of Ayu in Lake Hamana.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 33, 636~640
- 8) 伝染病研究所学友会編
1958: 細菌学実習提要, 丸善, 東京