

## ヒラメにおける *Edwardsiella tarda* の感染実験

馬久地隆幸\*<sup>1</sup>・清川智之\*<sup>2</sup>・本多数充\*<sup>3</sup>  
中井敏博\*<sup>3</sup>・室賀清邦\*<sup>3</sup>

(1995年6月28日受付)

### Infection Experiments with *Edwardsiella tarda* in the Japanese Flounder

Takayuki Mekuchi\*<sup>1</sup>, Tomoyuki Kiyokawa\*<sup>2</sup>, Kazumitsu Honda\*<sup>3</sup>  
Toshihiro Nakai\*<sup>3</sup> and Kiyokuni Muroga\*<sup>3</sup>

\*<sup>1</sup>Hiroshima Prefectural Fisheries Experiment Station, Ondo, Hiroshima 737-12, Japan

\*<sup>2</sup>Shimane Prefectural Fish Farming Center, Nishinoshimacho, Shimane 648-02, Japan

\*<sup>3</sup>Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University,  
Higashihiroshima 739, Japan

(Received June 28, 1995)

Infection experiments in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) with *Edwardsiella tarda* were conducted by intramuscular injection, intraperitoneal injection, immersion, and oral administration methods. Mortalities were produced by all the methods tested, LD<sub>50</sub> being determined as  $7.1 \times 10^1$  CFU/fish by intramuscular injection,  $1.7 \times 10^2$  CFU/fish by intraperitoneal injection,  $3.6 \times 10^6$  CFU/ml by immersion, and  $1.3 \times 10^6$  CFU/fish by oral administration. These results show that the Japanese flounder has high susceptibility to *E. tarda*. Mortalities continuously occurred during the observation period of 15 or 20 days showing a chronic nature of the disease.

**Key words:** Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, *Edwardsiella tarda*, edwardsiellosis, infection experiment, medium lethal dose, LD<sub>50</sub>

ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) 養殖が普及するに当たって、*Edwardsiella tarda* を原因とするエドワジエラ症が各地で発生するようになった (安永ら, 1982; 中津川, 1983)。病魚の多くは腹部の膨満や肛門からの脱腸などの特徴的な症状を示す。病状の進行は緩慢で短期間に大量の死亡が生じることは少ない。しかし、稚魚から出荷サイズの魚 (500 g~2 kg) にまで発生が認められ、高水温期を中心に長期間にわたって死亡が継続することから累積死亡率は高く (金井ら, 1988)、本病はヒラメ養殖において最も重要な疾病の一つとなっている (松岡・室賀, 1993)。

*E. tarda* は養殖池の海水や外見的に健康と思われるヒ

ラメからも分離されている (Mamnur Rashid *et al.*, 1994)。また、ヒラメ由来の *E. tarda* は多くの抗菌剤に感受性を示すものの、養殖現場では投薬によって完治させることは困難であるといわれている (塩満ら, 1989) \*\*。飼育環境の改善によって本病の被害をある程度軽減し得ると考えられているが、より積極的な防除方法、すなわち予防免疫の可能性についても検討する必要があると考えられる。ここではエドワジエラ症の予防免疫に関する研究の第一歩として、ヒラメにおける *E. tarda* の人為感染方法について検討した。

#### 材料および方法

##### 供試菌株および材料魚

ヒラメ病魚由来の *E. tarda* NUF251 株を予めヒラメに筋肉内接種し、再分離することにより病原性を高めた後、凍結乾燥保存 (-20°C) した。それぞれの実験に際し保存菌株を普通寒天培地 (栄研もしくは日水) で

\*<sup>1</sup> 広島県水産試験場

\*<sup>2</sup> 島根県栽培漁業センター

\*<sup>3</sup> 広島大学生物生産学部

\*\* 塩満捷夫・松岡 学・増村和彦・反町 稔・木島利通・小関良二・江草周三 (1989): エドワジエラ症, 「ヒラメの魚病, 日本資源保護協会, 東京」, 24-26.

25°C・48時間培養した後に、滅菌生理食塩水に懸濁し、10倍希釈系列を作り、3～5段階の濃度の接種菌液を調製した。

実験は広島県水産試験場（以下広島と略す）および島根県栽培漁業センター（以下島根と略す）の2か所で行った。前者では広島県栽培漁業センター、後者では同センターで種苗生産し陸上水槽で配合飼料を与えて飼育したヒラメ稚魚を実験に供した。供試魚の平均体重は広島では16.0g、島根では2.2gであったが、後者での経口感染実験には平均体重14.5gの魚を用いた。広島では15尾、島根では20尾（ただし、経口投与方法では15尾）を1区とし、それぞれ30lパンライト水槽に収容し、十分なエアレーションを行い流水飼育した。試験期間中は市販のヒラメ用配合飼料を投与した。

人為感染後、広島では20日間、島根では15日間（ただし、経口投与方法では20日間）毎日、実験魚の観察と飼育水温の測定を行った。

#### 感染実験

攻撃方法として筋肉内注射法、腹腔内注射法、浸漬法および経口投与方法の4つの方法を用いた。

**筋肉内注射法および腹腔内注射法：**調製した菌液を供試魚1尾あたり0.05ml接種した。接種菌量は島根では $1.8 \times 10^1 \sim 10^5$  CFU/fishの5段階、広島では $4.6 \times 10^0 \sim 10^2$  CFU/fishの3段階とした。対照区の魚には同量の滅菌生理食塩水を注射した。

**浸漬法：**調製した菌液を海水10lに添加して、この中にエアレーションを施しながら魚を10分間浸漬した。浸漬液の菌の濃度は島根では $2.7 \times 10^4 \sim 10^7$  CFU/mlの4段階、広島では $9.2 \times 10^4 \sim 10^6$  CFU/mlの3段階とした。対照区では菌液を含まない同量の海水に魚を浸漬した。

**経口投与方法：**菌液と粉末にした配合飼料を重量比で3:1になるように混合したペーストを注射針の代わりにチューブを装着した1mlシリンジを用いて強制的に胃内に注入した。1尾当りの接種菌量は $6.3 \times 10^3$ ,  $6.3 \times 10^5$  および  $6.3 \times 10^7$  CFU/fishの3段階とした。対照区には菌液の代わりに滅菌生理食塩水を用いて作ったペースト状の餌を注入した。なお、経口投与方法は島根のみで実施した。

試験期間中は毎日死亡魚を取り上げ、死亡魚の腎臓から普通寒天培地を用いて *E. tarda* の再分離を試みた。なお、抗 *E. tarda* NUF251 ウサギ血清を用いたスライド凝集テストにより分離菌が *E. tarda* であることを確認した。それぞれの攻撃法による半数致死量（濃度）を Reed

and Muench (1938) の方法に従い計算した。

## 結 果

#### 筋肉内注射法

以下の3つの攻撃試験を含め、試験期間中の水温は、広島では20.9～23.5°C、島根では19.5～25.7°Cであった。

島根では5段階濃度（ $1.8 \times 10^1 \sim 10^5$  CFU/fish）で攻撃を行った結果、いずれの攻撃区でもすべての魚が死亡し、また、接種菌量が多いほど死亡魚が早く出現した。

広島では $4.6 \times 10^2 \sim 10^0$  CFU/fishの3段階で攻撃を行ったが、実験終了時（20日目）のそれぞれの区の累積死亡率は93%、40% および 33% であった（Fig. 1）。すべての死亡魚から *E. tarda* が再分離され、注射した部位に潰瘍の形成が認められたが、腹部膨満や脱腸等の症状は顕著ではなかった。

#### 腹腔内注射法

島根では、 $1.8 \times 10^1$  区の累積死亡率は95%であり、 $1.8 \times 10^2$  CFU/fish以上の接種量区ではすべての供試魚が死亡した。

広島では実験終了時の累積死亡率は $4.6 \times 10^2$ ,  $10^1$ , および  $10^0$  CFU/fish区でそれぞれ67%、27%、および13%であった（Fig. 2）。死亡した魚の多くにはエドワジエラ症特有の腹部膨満などの症状が認められ、死亡魚からは例外なく *E. tarda* が再分離された。

#### 浸漬法

島根では $2.7 \times 10^7$  CFU/ml 攻撃区で90%が死亡し、いずれの死亡魚からも *E. tarda* が再分離された。 $2.7 \times 10^6$  CFU/ml 区では10尾（50%）が死亡したが、そのうち4

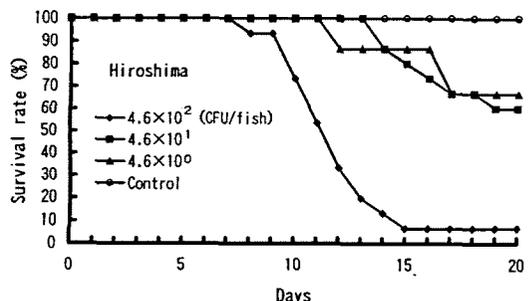


Fig. 1. Survival rate of the Japanese flounder challenged with *E. tarda* (NUF251) by intramuscular injection.

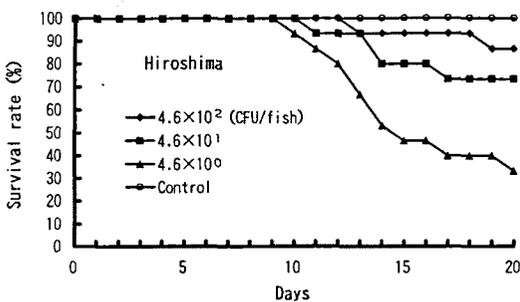


Fig. 2. Survival rate of the Japanese flounder challenged with *E. tarda* (NUF251) by intraperitoneal injection.

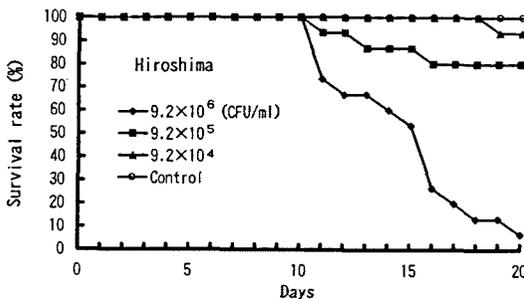


Fig. 3. Survival rate of the Japanese flounder challenged with *E. tarda* (NUF251) by immersion.

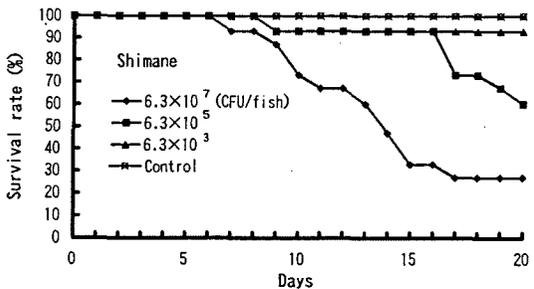


Fig. 4. Survival rate of the Japanese flounder challenged with *E. tarda* (NUF251) by oral administration.

尾からは *E. tarda* が再分離されなかった。

広島では  $9.2 \times 10^6$ ,  $10^5$ , および  $10^4$  CFU/ml 攻撃区の死亡率はそれぞれ 93%, 20% および 7% となり (Fig. 3), いずれの死亡魚からも *E. tarda* が再分離された。それらの死亡魚のほぼすべてに腹部膨満が、そして一部の魚に脱腸の症状が認められた。

### 経口投与法

最高接種菌量の  $6.3 \times 10^7$  CFU/fish 区では死亡率は 73% に達したが,  $10^5$  および  $10^3$  CFU/fish の攻撃区の累積死亡率はそれぞれ 40%, 7% と低かった (Fig. 4)。死亡魚からは例外なく接種菌が再分離され, 10 日目以降の死亡魚の多くには腹水貯留等のエドワジェラ症特有の症状が認められた。

### 考 察

ワクチンの有効性判定や薬剤の効力判定のためには再現性の高い感染手法の開発が求められる。本研究で筋肉内注射, 腹腔内注射, 浸漬, および経口投与の 4 つの方法でヒラメにおける *E. tarda* の感染試験を試みたところ, いずれの方法によっても 50% 以上の死亡率が得られることが判明した。すなわち, 半数致死量 (あるいは濃度) は, 筋肉内注射法で  $7.1 \times 10^4$  CFU/fish (広島, 材料魚平均体重 16g), 腹腔内注射法で  $1.7 \times 10^2$  CFU/fish (広島, 平均体重 16g), 浸漬法で  $4.8 \times 10^6$  CFU/ml (広島, 平均体重 16g) および経口投与法で  $1.3 \times 10^6$  CFU/fish (島根, 平均体重 14.5g) と計算された。金井 (1993) は平均体重 17g のヒラメを用い同様の実験を行い, 浸漬法では  $7.4 \times 10^5$  CFU/ml で 100%, 経口投与法では  $7.5 \times 10^4$  CFU/10g (魚体重) で 50% の死亡率を得ている。今回の実験結果は彼の実験結果と比べて大きな差はない。更に, いずれの人為感染方法においても, 攻撃量が増すほど死亡率が高くなり, また死亡に至る期間が短くなっており, 再現性も高いように思われる。従っていずれの方法もワクチン効果判定法として用いることができると考えられる。ヒラメにおける *E. tarda* の感染経路は明らかにされていないが, もし腸管からの感染が主要な感染経路だとすれば, ワクチンの判定には経口攻撃法を用いることが適しているとも考えられる。しかし, 少量の接種量で高い死亡率をもたらす注射攻撃法は最も確実な感染方法として広く使用し得ると考えられる。

なお, 経口攻撃試験以外の島根の試験では, いくつかの実験区において *E. tarda* が再分離されない死亡魚が認められたため, それらの結果は図示しなかった。島根ではそれらの実験に平均体重 2.2g の小型魚を用いたが, そのような小型魚には注射や浸漬攻撃のための取り扱いの影響がでたものと考えられる。

*E. tarda* はウナギ (*Anguilla japonica*) のパラコロ病の原因菌として知られるが, *E. tarda* をウナギに  $10^{6.8}$  CFU/fish 筋肉内接種した場合は死亡したが,  $10^{5.7}$  CFU/fish では死亡しなかったとされている (楠田・石原,

1981)。また、健康なウナギでは  $4.2 \times 10^8$  CFU/ml の *E. tarda* に浸漬しても死亡魚はまったく認められなかったとの報告もある (Mushiake *et al.*, 1984)。一方、*E. tarda* 菌液に浸漬したイトミミズ ( $10^{7.6}$  CFU/g) を自由摂餌させたところ、シラスウナギでは 50% 近い死亡率が得られたものの、クロコ (平均体重 3.5 g) では感染は成立しなかったという (石原・楠田, 1981)。本研究で得られたヒラメでの実験結果をウナギでのこれらの結果と比較すると、ヒラメは *E. tarda* に対し、ウナギよりかなり高い感受性を有することがわかる。

ヒラメにおける *E. tarda* の感染実験における一つの問題点は試験期間 (攻撃後の観察期間) の設定にある。例えばアユにおける *Vibrio anguillarum* の感染実験では、攻撃方法によって死亡の生じる時間に多少の差はあるものの、通常 1 週間程度の試験期間で十分とされている (楠田ら, 1981; Kanno *et al.*, 1989)。これに対して本研究では試験期間を 15 日もしくは 20 日間としたが、試験期間の末期にも死亡する魚があり、一部の実験区においては試験終了後にも死亡魚が出現した。*E. tarda* はウナギ補体のオプソニン化および好中球の食作用に対する抵抗性を有することが示されている (Iida and Wakabayashi, 1993; 飯田ら, 1993)。また、ヒラメにおいても好中球内における *E. tarda* の増殖像が観察されていることから (Miyazaki and Kaige, 1985), *E. tarda* はヒラメの食細胞に対しても抵抗性を有すると考えられる。攻撃後長期間にわたってヒラメの死亡が認められたのは、接種された *E. tarda* が食細胞中などに残存し、その後再び増殖してくるためではないかと考えられる。

#### 謝 辞

本研究は日本水産資源保護協会の委託研究「魚類免疫の研究 (ヒラメのエドワジエラ症の予防免疫に関する研究) (平成 4, 5 年度) により広島県水産試験場, 島根県栽培漁業センターおよび広島大学生物生産学部の共同研究として実施されたものである。菌株を分与された長崎大学の金井欣也助教授に謝意を表す。

#### 文 献

- Iida, T. and H. Wakabayashi (1993): Resistance of *Edwardsiella tarda* to opsonophagocytosis of eel neutrophils. *Fish Pathol.*, **28**, 191-192.
- 飯田貴次・三浦 薫・若林久嗣・小林正典 (1993): アクリジン・オレンジ染色によるウナギ好中球内殺菌活性の測定. 魚病研究, **28**, 49-50.
- 石原秀平・楠田理一 (1981): シラスウナギおよびクロコに対する *Edwardsiella tarda* の実験感染について. 日水誌, **47**, 999-1002.
- Kanno, T., T. Nakai and K. Muroga (1989): Mode of transmission of vibriosis among ayu *Plecoglossus altivelis*. *J. Aquat. Anim. Health*, **1**, 2-6.
- 金井欣也 (1993): ヒラメの細菌性疾病. 韓国魚病学会誌, **6**, 197-204.
- 金井欣也・田協誠一・内田洋祐 (1988): ヒラメ養殖場における *Edwardsiella tarda* の分布. 魚病研究, **23**, 41-47.
- 楠田理一・石原秀平 (1981): ウナギの筋肉内に接種した *Edwardsiella tarda* の消長について. 日水誌, **47**, 475-479.
- 楠田理一・杉山昭博・川合研児・稲田善和・米田 実 (1981): アユに対する *Streptococcus* sp. ならびに *Vibrio anguillarum* の病原性について. 日水誌, **47**, 993-997.
- Mamnur Rashid, M., K. Honda, T. Nakai and K. Muroga (1994): An ecological study on *Edwardsiella tarda* in flounder farms. *Fish Pathol.*, **29**, 221-227.
- 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). 広大生物生産学部紀要, **32**, 109-118.
- Miyazaki, T. and N. Kaige (1985): Comparative histopathology of edwardsiellosis in fishes. *Fish Pathol.*, **20**, 219-227.
- Mushiake, K., K. Muroga and T. Nakai (1984): Increased susceptibility of Japanese eel (*Anguilla japonica*) to *Edwardsiella tarda* and *Pseudomonas anguilliseptica* following exposure to copper. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**, 1797-1801.
- 中津川俊雄 (1983): ヒラメ幼魚から分離された *Edwardsiella tarda*. 魚病研究, **18**, 99-101.
- Reed, L. J. and H. Muench (1938): A simple method estimating fifty per cent endpoint. *American J. Hygiene*, **27**, 493-497.
- 安永統男・小川七朗・畑井喜司雄 (1982): 数種の海産魚類から分離された病原性 *Edwardsiella tarda* の性状について. 長崎水試研報, No. 8, 57-65.