

養殖アユに発生した *Pseudomonas anguilliseptica* 感染症

中井敏博*¹・花田 博*²・室賀清邦*¹

(昭和 60 年 4 月 24 日受理)

First records of *Pseudomonas anguilliseptica* infection in cultured ayu, *Plecoglossus altivelis*

Toshihiro NAKAI*¹, Hiroshi HANADA*², and Kiyokuni MUROGA*¹

*¹Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University,
Fukuyama 720, Japan

*²Hamana-ko Branch, Shizuoka Prefectural Fisheries Experimental Station,
Maisaka 431-02, Japan

(Received April 24, 1985)

In 1982 to 1984, 3 cases of *Pseudomonas anguilliseptica* infection occurred in pond-cultured ayu, *Plecoglossus altivelis*, in Shizuoka Prefecture. The outbreaks of the disease have been reported exclusively in eels, thus this is the first record of the infection in ayu fish.

Biochemically, the isolates from diseased ayu were identical to *P. anguilliseptica* isolates from eels (*Anguilla japonica* and *A. anguilla*). However, the ayu-isolates were proved different from eel-isolates in the pathogenicity to ayu and Japanese eel, resistance to bactericidal action of normal fish sera, and a surface antigen.

1982 年から 1984 年にかけて、静岡県下の養殖場および静岡県水産試験場浜名湖分場で飼育されていたアユ (*Plecoglossus altivelis*) に、一見真菌性肉芽腫症あるいはビブリオ病を思わせるような軀幹の潰瘍・出血を主徴とする疾病が発生し、少なからぬ被害をもたらした。細菌学的検査の結果、本病は *Pseudomonas anguilliseptica* 感染症であると判断された。以下に、養殖アユにおける本菌感染症の初発例につき、その発生状況ならびに分離菌の性状を報告する。

材料および方法

発生状況

発症例 1: 1982 年 6 月 28 日から 7 月 8 日にかけて、浜松市古人見町の A 養殖場において本病が発生し (海産種苗, 17~28 g, 水温 17~18°C, 塩分 71 ppm, pH 6.9), 約 300 kg (死亡率約 20%) の魚が死亡した。

発症例 2: 1983 年 6 月 23 日から 6 月 28 日にかけて、浜松市入野町の B 養殖場で本病が発生した (海産種苗, 49~56 g, 水温 20~22°C, 塩分 160~170 ppm, pH 7.0~

7.1)。この間約 300 尾 (約 1%) が死亡した。

発症例 3: 1984 年 4 月 23 日から 5 月 5 日にかけて、静岡水試浜名湖分場 (舞阪町) の試験池に本病が発生した (海産種苗, 2~3 g, 水温 23~24°C, 塩分 800~860 ppm, pH 7.4~7.6)。本例では、4 月 13 日に天竜川河口産種苗約 20 kg (平均体重 1.6 g) を試験場内の飼育池に搬入した翌日から 4 月 19 日にかけてビブリオ病 (*Vibrio anguillarum*, J-O-3 血清型) が発生し、その後 4 月 23 日から *P. anguilliseptica* による死亡が続いていった。この間の *V. anguillarum* および *P. anguilliseptica* による死亡率はそれぞれ 24.5% および 4.2% であった。

治療: 3 例ともオキシソリン酸の経口投与により 1 週間程度で終息した。

病魚の症状: 遊泳時に魚の軀幹に灰白色を呈する患部が観察され、症状が進行したものでは潰瘍形成が認められた。個体によっては眼球およびその周辺、鰓蓋、鰭基部、体側、腹部等に出血点や帯状の出血斑が認められ、また血液を混えた腹水が貯留しているものもあった。

供試菌株

いずれの症例においても病魚の肝臓、腎臓、あるいは

*¹ 広島大学生物生産学部

*² 静岡県水産試験場浜名湖分場

体表の潰瘍患部から、ハート・インフュージョン寒天やトリプトソイ寒天培地 (20°C) に純培養状に細菌が分離された。各例の代表株、すなわち SH-82424 (発生例 1), SH-83454 (発生例 2) および SH-84110 (発生例 3) の 3 株に加え、既報 (NAKAI *et al.*, 1981) のウナギ由来の *P. anguilliseptica* ET-7601 株 (病原株: K⁺ 血清型) と ET-2 株 (非病原株: K⁻ 血清型) を以下の試験に供した。いずれの株も普通寒天培地で 20°C, 3 日間培養したものを用いた。

生化学的性状

生化学的性状試験は HENDRIE and SHEWAN (1979) の記載に従って行った。なお、塩分および温度耐性試験には、MgCl₂·6H₂O を 0.1% 含む 1% ペプトン (Difco) 水を用いた。培養はすべて 20°C で行った。

病原性試験

健康なアユ (平均体重 10 g) およびニホンウナギ *Anguilla japonica* (85 g) を供試し、SH-82424, SH-83454 および ET-7601 株の病原性を調べた。1 区 10 尾の魚を用いてそれぞれ 5 段階の異なる量 (10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ CFU/100 g) を腹腔内接種した。水温約 20°C で 2 週間観察し、各株の LD₅₀ を求めた。

血清に対する抵抗性

健康魚の背大動脈 (アユ) または動脈球 (ニホンウナギ) から採取した血液を遠心分離 (3000 g・10 分) して血清を得た。この新鮮血清またはあらかじめ 50°C・30 分間加熱処理した血清 1.0 ml と約 10⁸ CFU/ml (PBS, pH 7.2) に調整した SH-82424, SH-83454 および ET-7601 株の生菌懸濁液 0.1 ml をそれぞれ混合し、20°C で振盪しながら 1, 3, 6 時間後に平板培養法により生細菌数を求めた。

血清学的性状

ET-7601 株の加熱死菌 (121°C・30 分) で作製した家兎抗血清 (抗-O 血清) および ET-7601, SH-828424 および SH-83454 株のそれぞれのホルマリン死菌で作製した抗-OK 血清を用いて、マイクロ・タイター法により交差凝集試験を行った。

結 果

アユ分離株の生化学的・生理学的性状を Table 1 に示した。供試 3 株は同一の性状を有し、またペニシリン感受性およびゼラチン液化を除くそれらの性状は過去にウナギから分離された *P. anguilliseptica* の性状 (中井・室賀, 1982) と一致した。

3 株のアユおよびウナギに対する LD₅₀/100 g 体重を

Table 1. Biochemical characteristics of 3 strains of *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from diseased ayu

Character	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	
	Present strains from ayu	Strains from eels* ¹
Gram stain	—	—
Motility	+	+
Flagellation	sp* ²	sp
Oxidase (kovacs)	+	+
Catalase	+	+
O-F test (glucose)	—	—
Pigment	—	—
DNase	—	—
Arginine dihydrolase	—	—
H ₂ S production	—	—
Sensitivity to		
penicillin	+	—
chloramphenicol	+	+
novobiocin	+	+
polymyxin B	+	+
Gelatin liquefaction	—	+
Casein hydrolysis	—	+ or —
Starch hydrolysis	—	—
Tween 80 hydrolysis	+	+
Levan from sucrose	—	—
ONPG	—	—
Indole production	—	—
Acid from sugars	—	—
Growth at 10°C	+	+
25	+	+
30	+	+
37	—	—
Growth in NaCl 0%	+	+
3	+	+
4	—	+ or —
5	—	—

*¹ NAKAI and MUROGA (1982).

*² single polar.

Table 2. LD₅₀ of 3 strains of *P. anguilliseptica* to ayu and Japanese eel

<i>P. anguilliseptica</i> strain	Source	log ₁₀ LD ₅₀ (CFU/100 g b.w.)*	
		ayu	Japanese eel
SH-82424	ayu	6.25	8.65
SH-83454	ayu	6.06	>9.36
ET-7601	eel	9.23	6.38

* Fish were injected intraperitoneally and kept at 20°C.

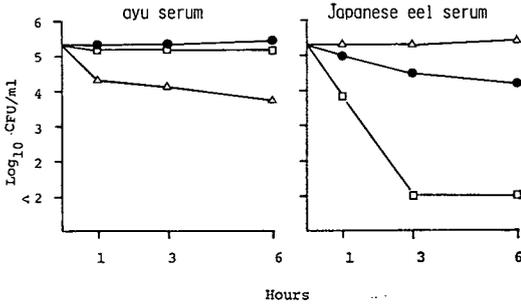


Fig. 1. Survival of *P. anguilliseptica* (●—●: SH-82424 □—□: SH-83454 △—△: ET-7601) in normal ayu serum and normal Japanese eel serum after incubation at 20°C.

Table 3. Agglutinin titers of rabbit anti-O serum*

Strain	Formalinized antigen	Heated (121°C-30 min) antigen
ET-7601	0	128
ET-2	128	128
SH-82424	0	128
SH-83454	0	128
SH-84110	0	128

* Prepared with heated (121°C-30 min) antigen of ET-7601 strain.

Table 4. Cross agglutination test with rabbit anti-OK sera*1

Agglutinogens*2	Agglutinin titers of		
	anti-ET-7601 serum	anti-SH-82424 serum	anti-SH-83454 serum
ET-7601	256	0	0
ET-2	1024	512	512
SH-82424	0	1024	512
SH-83454	0	1024	1024
SH-84110	0	256	256

*1 Prepared with each formalinized antigen.

*2 Formalinized antigen.

Table 2 に示す。SH-82424 および SH-83454 株はアユに対して強い毒性を示し、LD₅₀ はそれぞれ 10^{6.25} および 10^{6.06} CFU/100 g であった。死亡魚は眼球や軀幹部等の出血または出血性の腹水の貯留が顕著であったが、前述の自然感染魚のような潰瘍形成は認められなかった。一方、ウナギに対する毒性は低く、SH-82424 株が最高接種量 (2.8 × 10⁹ CFU/100 g) でのみ致死病的病原性

を示した。ただし、死亡したウナギには赤点病に特有の点状出血が認められた。これに比べウナギ由来の ET-7601 株では、ウナギに対しては強い毒性 (LD₅₀ = 10^{6.33} CFU/100 g) を示したが、アユに対しては低い毒性しか示さなかった。

新鮮血清の殺菌作用に対する抵抗性試験の結果を Fig. 1 に示す。アユ血清中では、SH-82424 および SH-83454 株の菌数は減少しなかったが、ET-7601 株は 6 時間後には 7 × 10³ CFU/ml に減少した。ウナギ血清に対しては、逆に ET-7601 株は抵抗性を示したが、SH-82424 および SH-83454 株は感受性を示し、特に SH-83454 株は 3 時間後に 1 × 10² CFU/ml 以下となった。なお、あらかじめ 50°C・30 分間加熱処理した血清では 3 株とも菌数の減少は認められなかった。

Table 3 および 4 に抗血清との凝集反応の結果を示す。抗-O 血清に対し、供試した 5 株の加熱死菌抗原は同一の抗体価 (128) で凝集したが、ホルマリン死菌抗原では ET-2 株を除きいずれの株も凝集しなかった (Table 3)。一方、抗-OK 血清では、アユ株の各ホルマリン抗原は抗 SH-82424 血清および抗 SH-83454 血清と凝集したが (抗体価: 256~1024)、抗 ET-7601 血清とは凝集せず、逆に ET-7601 株のホルマリン抗原は抗 SH-82424 血清および抗 SH-83454 血清とは凝集しなかった (Table 4)。ET-2 株はすべての抗血清と 512~1024 の抗体価で凝集した。なお、抗 SH-82424 血清および抗 SH-83454 血清を用いた相互吸収試験の結果、アユ株 3 株間の抗原性は同一であることが確かめられた。

考 察

赤点病は 1971 年に初めてその発生が確認 (WAKA-BAYASHI and EGUSA, 1972) されて以来現在に至るまで、ウナギについてのみ報告されている (城ら, 1975; 郭・郭, 1978; STEWART *et al.*, 1983)。本報告は養殖アユにおける *P. anguilliseptica* 感染症の初確認例と考えられるが、病魚の症状が一見ビブリオ病や真菌性肉芽腫症のそれと区別し難いことから、これまでにビブリオ病や真菌性肉芽腫症と判断された症例の中に本菌感染症が含まれていた可能性はある。本例では 3 例とも病気の発生は一過性のものであり、また池水の塩分濃度は 71~860 ppm と低く、更には本分離株がウナギ由来株と同様塩分 1000 ppm 以下では速やかに死滅することから、ウナギの赤点病の場合と異なり塩分を含む池水に常在する菌による感染 (室賀, 1978) とは考え難い。ここで報告した症例のいずれの場合も海産種苗を用いていたことか

文 献

ら、それらの海産種苗の中に存在した保菌魚により持ち込まれたのではないかという疑いが強い。現在のところ、オキシリン酸などの薬剤により比較的容易に治療できるが、アユ養殖上注意すべき疾病のひとつであろう。

アユから分離された株の性状を従来のウナギ由来株と比較した結果、2, 3 興味のある知見が得られた。第 1 に、アユ株とウナギ株には宿主特異性がみられ、それぞれの分離魚種に対して特異的に強い病原性を示すことが確かめられた (Table 2)。また、この特異性は血清の殺菌作用に対する抵抗性にも認められた (Fig. 1)。第 2 に、両者の耐熱性抗原 (O 抗原) は共通していたが、易熱性 (121°C・30 分) の表在抗原に相違が認められた。すなわち、抗-O 血清に対して非加熱死菌抗原が凝集性を示さないことは (Table 3)、アユ株にもウナギ株で知られている K 抗原様の表在抗原 (NAKAI *et al.*, 1981) が存在することを意味すると考えられる。しかしながらその表在抗原の抗原性はウナギ株のそれとは異なっており、交差凝集性は認められなかった (Table 4)。著者らはすでに、ウナギ由来の *P. anguilliseptica* 株について K 抗原を有する株 (K⁺) は K⁻ 株に比べてウナギ血清の殺菌作用に対して強い抵抗性を示し、また菌の病原性と血清抵抗性とはよく一致することを確認している (NAKAI, 1985)。従って、アユ株とウナギ株でみられた病原性あるいは血清に対する抵抗性の相違は、K 抗原の性質に基づくと考えられる。

謝 辞

アユ血清の入手に関し御助力いただきました広島県水産試験場淡水魚支場の職員各位に感謝致します。

HENDRIE, M. S. and J. M. SHEWAN (1979): The identification of pseudomonads, in "Identification Methods For Microbiologists" 2nd. ed., F. A. SKINNER and D. W. LOVELOCK ed., 1-14, 315 pp., Academic Press, London.

城 泰彦・室賀清邦・大西圭二 (1975): 養殖ウナギの赤点病に関する研究—III. ヨーロッパウナギ (*Anguilla anguilla*) における発病例. 魚病研究, 9, 115-118.

郭 上卿・郭 光雄 (1978): 養殖鰻赤点病病原菌 *Pseudomonas anguilliseptica* 之分離, 經濟部・国立台湾大学合併漁業生物試験所研究報告, 3, 19-23.

室賀清邦 (1978): ウナギの赤点病, 魚病研究, 13, 35-39.

NAKAI, T. (1985): Resistance of *Pseudomonas anguilliseptica* to bactericidal action of fish serum. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 51, 1431-1436.

中井敏博・室賀清邦 (1982): スコットランドのヨーロッパウナギ (*Anguilla anguilla*) から分離された *Pseudomonas anguilliseptica*. 魚病研究, 17, 147-150.

NAKAI, T., K. MUROGA and H. WAKABAYASHI (1981): Serological properties of *Pseudomonas anguilliseptica* in agglutination. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 47, 699-703.

STEWART, D. J., K. WOLDEMARIAM, G. DEAR, and F. M. MOCHABA (1983): An outbreak of 'Sekitenbyo' among cultured European eels, *Anguilla anguilla* L., in Scotland. *J. Fish Dis.*, 6, 75-76.

WAKABAYASHI, H. and S. EGUSA (1972): Characteristics of a *Pseudomonas* sp. from an epizootic of pond-cultured eels (*Anguilla japonica*). *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 38, 577-588.