

# *Vibrio anguillarum* およびその 感染症に関する研究

室 賀 清 邦

(広島大学水産産学部 水産学科)

Studies on *Vibrio anguillarum* and  
*V. anguillarum* infection  
Kiyokuni MUROGA

Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and  
Animal Husbandry, Hiroshima University, Fukuyama

(Figs. 1-18 ; Tables 1-50 ; Plates I-III)

## 目 次

緒 論 .....	102
第 I 章 各種養殖魚の <i>Vibrio anguillarum</i> 感染症について .....	104
第 1 節 浜名湖産稚アユのビブリオ病 .....	105
(1) 病気発生の時期と病魚の症状 .....	105
(2) 歩減りの原因としての細菌感染症 .....	106
(3) 原因菌の分離 .....	108
(4) 原因菌の同定 .....	111
(5) 利根川河口における稚アユのビブリオ病 .....	117
第 2 節 淡水養殖中のアユのビブリオ病 .....	118
(1) 滋賀県下および長野県下の養殖場に発生したアユのビブリオ病 .....	118
(2) 徳島県下, 岡山県下および愛知県下の養殖場に流行したアユのビブリオ病 .....	121
第 3 節 養殖ウナギのビブリオ病 .....	126
第 4 節 その他の魚における本菌感染症 .....	129
(1) 海水順化中に発生したニジマスのビブリオ病 .....	129
(2) 沼津の養殖ハマチおよびカンパチにおけるビブリオ病 .....	131
(3) 神西湖のボラなどにおけるビブリオ病 .....	131
(4) 海水中での種苗生産の過程におけるアユのビブリオ病 .....	131
第 5 節 まとめ .....	131
第 II 章 <i>Vibrio anguillarum</i> の性状および分類学的考察 .....	133
第 1 節 各種病魚より分離した <i>V. anguillarum</i> の性状 .....	134
第 2 節 分類学的考察 .....	144

第3節	我が国で報告された他の魚類病原性 vibrios との比較	149
第4節	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> および <i>Vibrio alginolyticus</i> との比較	153
第5節	まとめ	157
第Ⅱ章	<i>Vibrio anguillarum</i> の病原性	158
第1節	数種魚類の本菌に対する感受性の比較	158
第2節	ニホンウナギを用いての実験的感染	161
(1)	感染方法	161
(2)	接種菌量, 水温および魚体重と死亡率の関係	162
(3)	接種菌の魚体内における消長	165
(4)	接種魚の血液性状の変化	172
(5)	接種魚の病理組織学的検討	180
第3節	毒素について	183
第4節	マウスに対する病原性	185
第5節	まとめ	185
補	免疫学的検討	187
第1節	ニホンウナギの本菌に対する抗体産生と防禦作用	187
第2節	抗体産生に及ぼす水温の影響	190
第3節	経口免疫の試み	195
第4節	まとめ	199
謝 辞		200
要 約		200
引用文献		203
SUMMARY		209

## 緒 論

*Vibrio anguillarum* は多くの魚類病原細菌の中でも最も古くから知られる代表的なものの一つである。本菌は最初ヨーロッパの沿岸や汽水域のウナギ (*Anguilla anguilla*\*) の red disease の原因菌として報告されたが、その後ウナギ以外の海産魚およびサケ科魚類などの回游魚の疾病因となることが、ヨーロッパのみならず、アメリカ合衆国 (CISAR and FRYER 1969<sup>3)</sup>, LEVIN et al. 1972<sup>4)</sup>) およびカナダ (EVELYN 1971)<sup>5)</sup> においても報告されている。また最近ではアメリカ合衆国におけるニジマス (*Salmo gairdneri*) の例 (ROSS et al. 1968)<sup>6)</sup> およびカナダにおける熱帯魚の例 (HACKING and BUDD 1971)<sup>7)</sup> に見られるように、淡水魚ないしは淡水中の魚においても本菌感染症の存在が確認されている。

このように *V. anguillarum* は海水中、淡水中を問わず、魚類に病気を起こすものとして世界中で注目されながらも、古い報告ではその性状記載が十分でなかったこともあり、Bergey's manual of determinative

\*ヨーロッパにおける多くの報告および最近の ANDERSON and CONROY 1970<sup>1)</sup> によるビブリオ病に関する総説などではヨーロッパウナギの学名は *A. vulgaris* とされているが、本論文では松井 1972<sup>2)</sup> に従い *A. anguilla* とした。

bacteriology の第7版(1957)<sup>8)</sup>には記載されていなかった。しかし最近になり本菌の性状に関するかなり詳しい報告が世界各地でなされるようになり、特に EVELYN (1971)<sup>5)</sup> および HENDRIE et al. (1971)<sup>9)</sup> などにより過去の報告が整理され、その結果として最近出版された Bergey's Manual 第8版 (1974)<sup>10)</sup> には本菌が記載されるに至っている。

ところで従来 *V. anguillarum* 以外の魚類病原性 vibriosとしてはオーストリアのコイ (*Cyprinus carpio*) からの *V. piscium* (DAVID 1927)<sup>11)</sup>, plaice (*Pleuronectes platessa*) などの潰瘍病の原因菌である *V. ichthyodermis* (本菌は最初 WELLS and ZOBELL 1934<sup>12)</sup> により *Achromobacter ichthyodermis*\* として報告されたが、その後 HODGKISS and SHEWAN 1950<sup>14)</sup> により *Pseudomonas ichthyodermis* として報告され、さらに SHEWAN, HOBBS and HODGKISS 1960<sup>15)</sup> により *Vibrio ichthyodermis* と分類された)、および我が国のニジマスのピブリオ病の原因菌である *V. piscium* var. *japonicus* (HOSHINA 1957)<sup>16)</sup> の3種があげられていた。ところが第8版の Bergey's Manual では単に従来からの *V. anguillarum* が掲載されただけでなく、HENDRIE et al. が提案していたように、*V. piscium*, *V. piscium* var. *japonicus* および *V. ichthyodermis* が *V. anguillarum* の synonym とされ一つにまとめられている。従ってこの Manual に従うならば、今まで種名の明らかにされてきた fish-pathogenic vibrios はすべて *V. anguillarum* となるわけである。

我が国ではニジマスのピブリオ病が1953年から1955年にかけて新潟、群馬、静岡および鳥取県下で流行し、HOSHINA (1956)<sup>17)</sup> および斎藤ら (1956)<sup>18)</sup> により研究が始められ、原因菌は *V. piscium* var. *japonicus* (HOSHINA 1957)<sup>16)</sup> と命名された。同じ頃、あるいはそれ以後、数人の研究者によりニジマスのピブリオ病に関する報告がなされている (岸ら 1958<sup>19)</sup>、村江ら 1959<sup>20)</sup>、SAITO et al. 1964<sup>21)</sup>、林ら 1964 a<sup>22)</sup>, b<sup>23)</sup>、1965<sup>24)</sup>)。それらの報告ではかならずしも原因菌は *V. piscium* var. *japonicus* と同定されていないが、その後もそれらの分離菌については整理されることなく、一般的に我が国のニジマスのピブリオ病の原因菌は *V. piscium* var. *japonicus* とされてき (保科 1963<sup>25)</sup>、1968<sup>26)</sup>、江草 1972<sup>27)</sup>) 新しい Bergey's Manual に従えば、それは *V. anguillarum* となるわけである。

1960年頃から海産魚の養殖および蓄養が瀬戸内海などを中心に盛んに行なわれるようになり、アユ (*Plecoglossus altivelis*)、ブリ (ハマチ, *Seriola quinqueradiata*)、トラフグ (*Fugu rubripes*)、イシダイ (*Oplegnathus fasciatus*) およびキュウセンベラ (*Halichoerus poecilopterus*) などに潰瘍病と呼ばれる細菌性疾病が多発し、楠田・赤沢 (1963)<sup>28)</sup> および楠田 (1965)<sup>29)</sup> により原因菌は *V. anguillarum* に類似した *Vibrio* sp. であることが報告された。また一方では赤沢ら (1966)<sup>30)</sup> は種々の海産魚の病魚から腸炎ピブリオ *V. parahaemolyticus* を分離している。木村 (1964<sup>31)</sup>、1968<sup>32)</sup>) は養殖ハマチの細菌性疾病について検討し、原因菌として楠田の分離菌 (*Vibrio* sp.) と同じものを報告している。またマダイ (*Chrysophrys major*) の細菌感染症を研究した平野・米 (1971 a<sup>33)</sup>, b<sup>34)</sup>、1972<sup>35)</sup>) および安永 (1972)<sup>36)</sup> は原因菌として楠田の報告した *Vibrio* sp. および他の vibrios (いずれも種名の同定はなされていない) を報告している。以上のように養殖海産魚にはピブリオ病が多発し、研究も多くなされていながら、その原因菌の種名については未だに結論をみていない。

このような状況の中で著者は1965年から浜名湖において海産稚アユの細菌性疾病に関する研究に着手し、その原因菌を *V. anguillarum* と同定した (MUROGA and EGUSA 1967)<sup>37)</sup>。その後、利根川河口 (室賀・元信 1967)<sup>38)</sup> および伊豆の海産稚アユにおいても本菌感染症を確認した。また1968年から1970年にかけて滋賀県下および長野県下で淡水養殖中のアユからも本菌を分離し、淡水中での本菌感染症の存在を確認した (室賀・江草 1970)<sup>39)</sup>。

本論文では第I章でアユおよびその他の養殖魚における *V. anguillarum* 感染症について述べ、第II章で

\* 後に ZOBELL (1946)<sup>13)</sup> 自身、本菌は *Pseudomonas ichthyodermis* とすべきであるとしている。

著者が分離してきた菌株の性状を整理するとともに *V. anguillarum* に関する分類学的考察を加え、第Ⅲ章では本菌をウナギ (*A. japonica*) に接種して行なった病原性実験の結果について述べる。また最後に免疫学的な面から行なった実験結果についてつけ加えた。

## 第Ⅰ章 各種養殖魚の *Vibrio anguillarum* 感染症について

冒頭に述べた如く *V. anguillarum* はそもそもヨーロッパにおいてウナギの red disease (red pest) の病原体として分離同定されたものである。ヨーロッパにおけるウナギの発病例は養殖魚の病気とは呼び難い面もあるが、一部では粗放的養殖あるいは蕃養といった状況下で発病している例もあるようなので、一応ウナギでの本菌感染症について触れてみる。

SINDERMAN (1966<sup>40</sup>, 1970<sup>41</sup>) によれば、オランダ、ドイツ、イタリアおよびスウェーデンの各国およびバルト海、北海の沿岸において red disease と呼ばれるウナギの疾病が古くから知られていたという。最も古くはイタリアで1718年という記録があり、その後も1825年、1850年、1864年、1884年、1885年、1889年、および1892年に発生したとあり、病魚の症状は鱗および皮膚における発赤および内臓における出血により特徴づけられ、しばしば大量斃死をひき起こしたとされている。Red disease (ウナギの鱗赤病) という病名はスカンディナビアでの発病例を報告した FEDDERSEN が1896年につけたとされている。原因菌については CANESTRINI (1893), INGHILLERI (1909) の研究があり、1909年に BERGMANN が *Vibrio anguillarum* なる種名を命名したが、その性状に関する記載は不十分なものであったといわれる。1930年頃になりドイツの SCHÄPERCLAUS (1934)<sup>42</sup> およびスウェーデンの NYBELIN (1935a)<sup>43</sup> により比較的詳しい研究報告がなされ、*V. anguillarum* なる種名は一般的に認められるようになった。本病は比較的最近でも発生しているようで、ドイツから WOLTER (1960)<sup>44</sup> および MATTHEIS (1964)<sup>45</sup> の報告があり、フランスからも LAGARDE and CHAKROUN (1965)<sup>46</sup> の報告が出されている。

以上のようにヨーロッパにおいては *V. anguillarum* によるウナギの red disease はかなり昔から最近に至るまで広く発生がみられているが、アメリカではウナギに関する報告はなく、我が国でもウナギ (*A. japonica*) を淡水中で養殖するためか、本病はごく最近まで認められなかった (城, 室賀 1972)<sup>47</sup>。

ヨーロッパにおいてはウナギを除く天然海産魚での症例も多いようであるが、サケ科魚類に関してはヨーロッパのみならずアメリカでも報告されている。アメリカ合衆国では RUCKER ら、(RUCKER et al. 1953<sup>48</sup>, RUCKER 1959<sup>49</sup>) によりニジマスなどの養殖マス類にピブリオ病が発生することがかなり前から指摘されていたが、最近になり ROSS et al. (1968)<sup>5</sup> によりアリゾナ州のコロラド川の水を使用している

Willow Beach National Fish Hatchery で発生したニジマスのピブリオ病から *V. anguillarum* が確認されているし、CISAR and FRYER (1969)<sup>3</sup> によりオレゴン州で汽水中で飼育されていたマスノスケ (*Onchorhynchus tshawytscha*) に発生した疾病の原因菌として *V. anguillarum* が報告されている。またカナダからも飼育中の4種の Pacific salmon (サケ *Onchorhynchus keta*, ベニマス *O. nerka*, カラフトマス *O. gorbuscha*, マスノスケ) から *V. anguillarum* が報告されている (EVELYN 1971)<sup>5</sup>。もちろん最近のヨーロッパにおいても、ノルウェーにおけるニジマスでの症例 (HOLT 1970<sup>50</sup>), HAASTEIN and HOLT 1972<sup>51</sup>), およびイギリスにおける同じくニジマスでの症例 (McCARTHY et al. 1974)<sup>52</sup> が報告されている。

このようにサケ科魚類においては海水中はもちろん淡水中でも本菌感染症の存在することが世界的に確認されている。前述したように我が国におけるニジマスのピブリオ病の原因菌は *V. piscium* var. *japonicus* とされ独特なものと思われていた面もあるが、これも *V. anguillarum* の synonym とされた現在では、諸外国におけるニジマスのピブリオ病と同じと考えてよいわけである。なお日本のニジマスのピブリオ病の原因菌には *V. anguillarum* と同定し難いものも存在する疑いがあるが、この点については後に述べる。

また養殖魚という範疇からは少し外れるが、淡水熱帯魚の tiger burb (*Puntius* sp.) およびドジョウ (

*Acanthrophthalmus* sp.) にピブリオ病が発生し、原因菌として *V. anguillarum* が分離された例もカナダから報告されている (HACKING and BUDD 1971)<sup>7)</sup>。

著者は主としてアユ (*Plecoglossus altivelis*) のピブリオ病について研究を行ってきたが、本魚種はニシン目 Clupeida, サケ亜目 Salmonina, アユ科 Plecoglossidae に属し、日本およびその周辺にのみ分布する魚である。以下アユにおける本菌感染症を中心に、ウナギなど少数例ではあるが他魚種における症例についても述べていく。

## 第1節 浜名湖産稚アユのピブリオ病

浜名湖の稚アユは池中養殖用あるいは河川放流用の種苗として古くから利用されていたが、採捕後淡水に順致する過程における歩留りの悪さが利用上の大きな障害となっていた。浜名湖の稚アユの種苗化の歴史は明確ではないが、1931年(昭和6年)頃より始まり、1936~1938年頃には3月から5月にかけて60~80万尾の稚アユを採捕し、静岡県下の河川および養殖業者に配給したという記録がある。しかしその後歩留りが悪いためほとんど利用されなくなったものようである。1960年より同湖の稚アユの利用があらためて検討され始め、11月~3月に採捕するという方法にかえることにより1963年からはどうか種苗化が軌道に乗り始めた(大上・山崎 1965)<sup>53)</sup>。しかしながら依然として歩留りは10~50%と悪く、大きな問題を残したままであった。海産稚アユは養殖用種苗の3割以上を占めるものでありながら、一般的に採捕後の歩留りは悪く、中でも浜名湖産のものは特に歩留りが悪いものようであった。

大上・山崎(1965, 1967<sup>54)</sup>)は同湖の稚アユの歩留りの悪さは、1. 魚体が小型であること、2. 蓄養が海域で行なわれていること、3. 細菌感染による病害が著しいこと、に起因すると指摘し、海水蓄養をやめ陸上で半流水式の水槽に収容し淡水に順化していくと歩留りを高めることができたと報告している。しかしながらこのように淡水順化を比較的好いに行なっても、海水蓄養した場合と同様に細菌感染症が発生し、特に3月以降の種苗では投棄しなければ全滅するといった状態であった。

著者は1965年からこの問題の究明に着手し、まず細菌感染症が起きることを確認し、次にその原因菌が *V. anguillarum* であることを確認した。

### (1) 病気発生の時期と病魚の症状

淡水順化の過程で起こる死亡は必ずしも単一の原因によるものとは考えられないが、採捕後陸上水槽に収容して3~5日目頃に起こる大量斃死が古くから関心を集めていた。この病態は原因の確認がないままピブリオ病と呼ばれたり、あるいはその発生が採捕後4日目頃を中心とすることから4日目病と呼ばれたりしていた。ピブリオ病と呼ばれるようになったのは、HOSHINA (1957)<sup>16)</sup>の報告中にニジマスの病原体である *V. piscium* var. *japonicus* (*V. anguillarum*) はアユをも冒すとあることや、本病が楠田・赤沢(1963)<sup>28)</sup>により報告された舞鶴湾などでの海水蓄養中のアユに発生したピブリオ病(原因菌 *Vibrio* sp.) に症状的に似ているところからきたものと想像される。

外観的に見られる特徴的症状は、シラスアユにおいては躯幹局所の透明な体側筋肉に混濁部分が現われることである(巻末に示した Plate I-1 参照)。この病徴を示す魚は時に水面を狂奔することもあるが、多くの場合は水面をふらふら泳いでおり、10~20時間以内に水底に沈んで死亡する。やや成長し鱗が吹き始めたいわゆる背黒アユ(体重2g以上)では躯幹局所筋肉に白濁ないし発赤斑が現われる。そして一見したところ正常に泳いでいたものが突然水底に横転したり狂奔するといったことを2, 3回繰返して死に至る。これら白濁あるいは発赤斑の現われる部位は多くの場合1カ所であり、主として肛門から尾柄部の間の部分に多いが(Plate I-2 参照)、体前部の躯幹に現われる個体も稀ではない。開腹してみると、腸管に炎症が認められたり肝臓にうっ血が認められることもあるが、一般に内臓器官にこのような肉眼的異常が認められないことが多い。

これらの症状は最近の小寺ら(1974, a<sup>55)</sup>, b<sup>56)</sup>)の報告しているアユのピブリオ病の症状とまったく一

致しているし、後述する淡水養殖中のアユのビブリオ病の症状ともほとんど一致するものである。

病魚の組織を Bouin 氏液で固定し常法により作製したパラフィン切片標本 (Hematoxylin-Eosin 染色) を観察した結果を以下に簡単に述べる。

**皮膚および筋肉病変部：**初期病変とみられる白濁を呈する筋肉組織では、皮下に出血が認められ、ごく一部の筋肉繊維には融解などの病変が認められ、病原菌 (*V. anguillarum*) と考えられる細菌が多数認められる部分もある。やや症状が進んだ個体では出血域が拡がり、特に真皮表層部における出血が顕著である。筋繊維には配列の乱れ、膨化および融解などの変性が起きている。一部の筋繊維束は完全に融解し、その部分には血球と組織崩壊物が充満しており、細菌の集落らしきものも認めることができる。

**腸管：**筋肉に白濁病変が認められる初期病魚の腸管では、正常魚と異なり絨毛上皮がやや薄くなっており、粘液細胞の増加が認められる。症状が進むと輪走筋層の内側に出血が認められ、一部の絨毛構造がこわれ始める。

さらに重症のものでは絨毛組織はほとんど崩壊し、腸管内にその崩壊物および血球が充満している。

**脾臓：**筋肉の白濁病変が認められる魚では脾柱および脾小節などの構造が不明瞭になり、赤血球が赤脾髄に充満している。外観的症狀の進んだものでは出血性脾炎の程度が進行しているが、実質組織の壊死などは認められず、細菌は散在する程度で集落らしきものはあまり認められない。

**肝臓：**筋肉に白濁が認められる比較的初期の病魚の肝臓組織では、うっ血が認められるがその他の変化は認められない。やや症状が進行し体表および筋肉に出血が認められる個体においても多くの場合うっ血が認められる程度であり、重症魚と思われるもののみ肝細胞の壊死および細菌の集落が認められる。

以上をまとめてみると、真皮および筋繊維間の結合組織における出血、筋繊維の融解、腸管絨毛組織の崩壊、脾臓の出血性炎症、肝臓のうっ血、出血および壊死などが罹病魚の特徴的病変となっている。

これらの病変は、淡水中で養殖開始直後に発生したアユのビブリオ病について病理組織学的に検討した舟橋ら (1974)<sup>57)</sup> が報告しているものとはほぼ一致する。ただ彼等の観察例では腸管には充血や出血が認められていない点が相違している。

また潰瘍病 (原因菌 *Vibrio* sp.) にかかったアユにおいては、腸などの消化管を含めて内臓諸器官に潰瘍などの顕著な病変が観察されており (楠田・赤沢1963, 窪田・高桑 1963,<sup>58)</sup> 楠田1965), 浜名湖におけるアユの病変はそれらに比べると軽度であるといえよう。このような症状の違いは原因菌の病原性の違いによるものもあろうが、初期感染病巣の位置の違い、および魚の抵抗力あるいは水温などに影響される病気の進行速度の違いによるものもあると思われる。

## (2) 歩減りの原因としての細菌感染症

前述した症状は特徴的なものであり細菌感染によるものであることを示唆しているが、採捕後の死亡魚がすべてこの症状を呈するわけではなく、他の原因によって死亡するものもあると考えられた。そこで全体の斃死原因の中で細菌感染症の占める大きさを知るための実験を行なった。

### ( 材料および方法 )

1967年3月に浜名湖の湖口部において採捕 (採捕水域水温約9℃) された稚アユから健康と思われる背黒アユ (体重2~5g) を選び、4つのコンクリート実験水槽 (縦90cm, 横50cm, 深さ60cm, 水量約60ℓ) に各々30尾ずつ収容し、9日後までの死亡状況を追跡し、あわせて死亡魚の症状の観察と細菌の分離を行なった。

4つの水槽には、それぞれ浜名湖の海水 (比重 $\sigma = 25$ ,  $chl \neq 18.5\%$ ), 稀釈海水 ( $\sigma = 17$ ), 煮沸滅菌海水 ( $\sigma = 26$ ), および chlortetracycline (以下 CTC と略) 10ppm添加の海水が入っていた。実験を開始してから、3, 6, 8日後に CTC 薬浴区の薬液を更新し、同時に対照区である海水区の水を換えた。稀釈海水区では実験開始直後から淡水を少量ずつ連続的に注入し、1時間後には比重 $\sigma = 10$ , 7時間後には $\sigma$

= 6, 24時間後には完全に淡水にした。この淡水順化の過程および換水時を除けば、すべての区において実験は止水で行なわれた。水温は淡水順化区の17~18°Cを別にすれば他のすべての区で13~15°Cであった。また実験期間中を通じて餌は与えなかった。

(結果および考察)

図1に対照区ともいべき海水区の日間死亡率を示し、図2に各区の累積死亡率を示した。図1に示されたように、海水に收容したアユの50%が最初の1日の間に死亡したが2日後、3日後には死亡するものはかなり減少した。4日後に至り再び死亡率は上昇し、最終的には6日後に全滅した。死亡魚の肉眼的観察によ

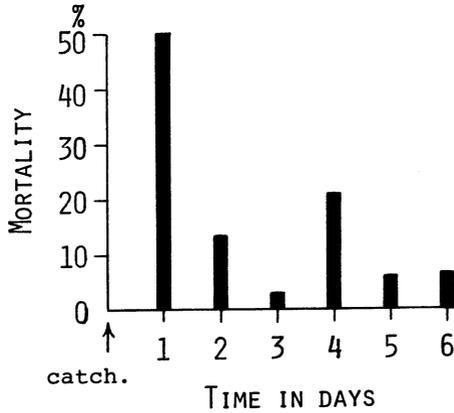


Fig.1. Daily mortality of Ayu stocked in sea water.

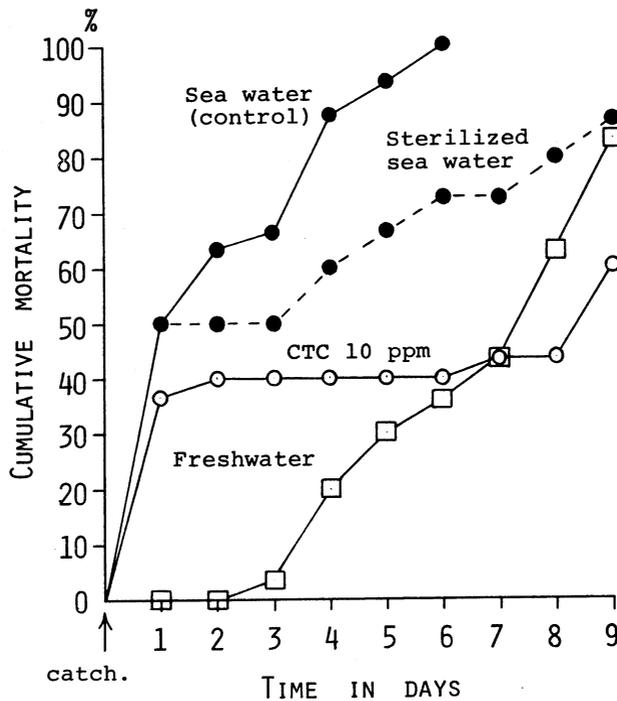


Fig.2. Cumulative mortalities of Ayu stocked in various waters. (CTC: chlortetracycline)

れば、2日後までの死亡魚には前述したような細菌感染によると思われる病徴は認められず、3日後ないし4日後からの死亡魚にのみ病徴が認められた。また細菌分離の結果においても、採捕してから1日後までの死亡魚からは病原菌と考えられるものはまったく分離されなかったのに対し、2日後および3日後の死亡魚の一部からは病原菌と思われる細菌が分離され、4日後およびそれ以降の死亡魚からは例外なく病原菌と思われるものが分離された。以上のことから海水に収容した対照区のアユの死亡は2つの部分に分けられることがわかった。すなわち、一つは採捕直後から2日後までの細菌感染以外の原因による死亡で、他は3日後ないし4日後から始まる細菌感染による死亡である。ここでは前者を前期死亡と呼び、後者を後期死亡と呼ぶことにする。

次に図2に示された各実験区における累積死亡率の変化をみると、CTC 薬浴区における前期死亡は対照区のそれと比較してほとんど差がないが、後期死亡には顕著な差が見られ、特に3日後から6日後までの間では1尾も死亡しなかった。前年(1966年)の同湖の稚アユからの分離株(*V. anguillarum*)がCTCに対し高い感受性を示したことからCTCを用いてみたわけであるが、この薬浴区での実験結果は対照区での観察結果から得られた結論、すなわち前期死亡は細菌感染によるものではないが、後期死亡は細菌感染によるものであるという結論を裏付けるものと思われる。

また煮沸滅菌海水区では対照区に比べて若干死亡率が低くなっているが、対照区と同様に細菌感染症が発生したことが、症状の観察および細菌の分離結果から確認された。飼育水中には病原菌は存在していなかったと考えられるので、この実験区のアユは実験水槽に収容した後に飼育水中に存在する病原菌の感染を受けたのではなく、すでに感染が成立していたか否かはともかく、魚自体が病原菌を持ち込んだと判断された。

次に淡水順化区をみると、ここでは2日後までまったく死亡魚は認められず、3日後から死亡魚が出始め、9日後までには80%以上が死亡した。この区においても4日後ないし5日後から死亡魚には細菌感染症の病徴が認められ、病原菌(*V. anguillarum*)も分離された。本病原菌は後述する実験結果に示されたように淡水中には存在しえないと考えられるので、この区の場合も魚は採捕前か採捕時に病原菌を保持しており、淡水中で発病したものと判断された。

非常に興味あることは、本実験の淡水区にみられたように、海水中で採捕したアユを稀釈海水に収容し、1日以内に淡水に順化してしまうことにより前期死亡をなくすることができたということである。これは大上・山崎(1965)<sup>53</sup>の実験結果とも一致するわけであるが、その理由を説明しうだけのものは現在はない。小寺ら(1974b)<sup>56</sup>は最近愛知県下の海産稚アユのピブリオ病について報告しており、淡水順化を遅らせることにより発病率を下げることを試み、失敗に終わっているが、本実験結果から考えればそれはむしろ当然のことと思われる。彼等は海水中のアユと淡水中のアユに対する*V. anguillarum*の病原性に差があるのではないかと推論しているが、著者はそのような差はほとんどないものと考えている。むしろ環境変化とそれに対応する魚側の生理的な状態が感染ないし発病を左右する一番大きな要因になっているものと考えられる。

以上をまとめてみると、浜名湖産海産稚アユの採捕後の死亡は2種類、あるいは2つの部分に分けられることがわかった。すなわち一つは採捕直後から2日後までの比較的早い時期に起こるもので、その原因は採捕による物理的な影響および環境変化から生じるアユの生理的な障害に起因するものと想像される。そしてこの死亡はその時期に淡水順化させることにより抑えることができることが確認された。もう一つの死亡は採捕してから3日後ないし4日後から起こるもので、その原因は細菌感染であることが確認された。そしてこの死亡はCTC薬浴により抑えることができることがわかった。

### (3) 原因菌の分離

1965年および1966年の調査により浜名湖の稚アユの細菌性疾病は*V. anguillarum*によるものであろうということが一応把握されていた。そこで1967年3月に、病原菌が魚に感染する時期および症状の進行と感染との関係などを知るために以下の実験を行なった。

### (材料および方法)

採捕直後の稚アユを海水水槽に收容し、日を追って魚から細菌分離を行なった。分離方法は、材料魚の組織小片(腸管、肝臓、および筋肉を含む皮膚—皮膚の表面はアルコール綿でよく消毒した)を切り取り、普通ブイヨン(NaCl 3%)に入れ28°Cで24時間培養した。増菌したものを BTB teepol 寒天培地に拡げ、発育してきたコロニーの形状(本節(4)に示す)から *V. anguillarum* を確認した。なお *V. anguillarum* 以外で BTB teepol 寒天培地上に発育してきた菌は3種類ほどあったが、それらはいずれもコロニーの形や色で *V. anguillarum* とは区別でき、また念のためそれらの菌についてもアユおよびウナギに接種してみたが病原性は認められなかった。

実験は採捕日時の異なる4つの魚群について行ない、それぞれ海水水槽に收容し6日後まで検査を行なった。材料魚の平均体重および体長は表中に記した。

### (結果および考察)

検査した魚を、健康魚(外観的に異常が認められないもの)、病魚(筋肉に白濁もしくは発赤部分が認められるもの)、および瀕死魚(症状のあるなしにかかわらず瀕死状態のもの、もしくは死亡直後のもの)の3つに分け、それぞれの肝臓、腸管および皮膚のいずれかから *V. anguillarum* が分離された個体数の検査個体数に対する比を、採捕魚群および経過日数別に表1に示した。この表に示されたように、採捕したその日に調べた個体からは問題の vibrio は分離されず、翌日(1日後)でもBグループのものを除けば瀕死魚からも *V. anguillarum* は分離されなかった。2日後になると健康魚以外の魚からはすべて *V. anguillarum* が分離され、3日後になると健康魚でも5尾中4尾から分離され、4日後からはすべての魚から *V. anguillarum* が分離された。なおここには臓器別の出現状況についての結果は示さなかったが、臓器別にみても特にどの臓器/組織から分離されるということではなく、検査した3つの臓器/組織ではほぼ同時に *V. anguillarum* が出現した。また *V. anguillarum* が分離されなかった25個体のうち、22個体の腸管からは何らかの菌が分離されたが、半数以上の個体の皮膚および肝臓からは菌は培養されなかった。

この実験から、採捕してから2日後ないし3日後からのアユの死亡には1種類の細菌が関与していることがあらためて確認された。しかしながら一方では、先の発病状況の観察実験から得られた推論、すなわち蓄養を開始した時点で病原菌がすでに魚体中に存在するということを実証するという点ではあまり明確な結果が得られなかった。この点に関しては二つのことが考えられる。一つは、もし感染(あるいは保菌)しているとしても全部の魚がということではなく、むしろごく一部の魚が感染しており、その魚が蓄養開始後に発病し病原菌を排出し、他の魚が短時間のうちに排出菌に感染するという pattern が考えられる。もしそうだとすれば採捕当日ないし翌日に原因菌が確認できる魚はごく一部であってよく、本実験結果にみられたように当日および翌日の検査個体21尾中2尾から原因菌が分離されたことがある程度その証明になると解釈できる。

もう一つの考え方としては、採捕直後にすでに多くの魚が原因菌の感染を受けているが、実験の方法に問題がありそれを証明することができなかったという可能性がある。実験方法上の問題点としては、初感染部位がこの実験で検査した組織とは違うところであったことがまず考えられる。また検査した腸管などに感染していたとしても、菌数が非常に少なかったりあるいは増菌過程における他の菌種との競争のためうまく分離できなかったという可能性もある。

いずれにしても採捕時において一部の魚かあるいは大部分の魚が原因菌を保持していたことは間違いないと考えられ、どの程度の魚が、どこに保菌していたのか、あるいはどこに感染を受けていたのかについては、今後分離方法を検討するなり、個別別蓄養をするなどして究明しなければならないであろう。

Table 1. Incidence of *Vibrio anguillarum* from young Ayu (*Plecoglossus altivelis*) during the course of stoking.

(Number of fish from which the bacterium was isolated/Number of fish tested)

Days after catching	0		1		2			3			4			5		6			Number of fish tested	Length and weight of fish tested	
	Healthy	Moribund	Healthy	Moribund	Healthy	Diseased	Moribund	Healthy	Diseased	Moribund	Healthy	Diseased	Moribund	Diseased	Moribund	Healthy	Diseased	Moribund		Mean and Range	
Experimental group																					
A (6, Mar., 1967)	0 2		0 2				1 1													5	5.2 cm 1.3 g (3.8-7.2) (0.2-2.5)
B (8, Mar., 1967)	0 2		1 1	1 1	2 2			0 1	1 1		1 1	3 3	1 1				1 1	2 2	1 1	17	6.6 2.3 (4.8-9.2) (0.7-7.2)
C (16, Mar., 1967)	0 3	0 1	0 1	0 2	1 2			1 1	0 1	2 3		1 1	9 9		5 5			2 2	31	7.1 3.4 (6.1-8.8) (2.0-5.5)	
D (17, Mar., 1967)			0 3	0 3	0 2			3 3				1 1	1 1	1 1	2 2			1 1	1 1	18	6.7 2.6 (5.2-9.2) (1.0-6.8)
Total	0 7	0 1	1 7	1 6	1 4	2 2	1 1	4 5	0 1	3 4		2 5	5 5	11 11	2 2	5 5	1 1	3 3	4 4	71	6.7 cm 2.8 g (3.8-9.2) (0.2-7.2)
		0/8		2/13		4/7			7/10			18/18			7/7			8/8			

#### (4) 原因菌の同定

1965年、1966年および1967年の3年間にわたり稚アユ病魚から pure もしくは dominant な形で分離されたいくつかの菌株について、アユおよびウナギに接種することにより病原性を検討した。その結果、病原性を有する株として、PB-1 (1965年分離)、PB-3, PB-5, PB-6, PB-7, PB-15 (1966年分離)、PB-26, PB-27, PB-28, PB-29, PB-37 (1967年分離)の11株を検査の対象に取り上げた。

この11株について、常法に従い生物学および生化学的性状を検査する一方、アユおよびウナギ、さらにマウスに対する病原性を検討し、分類学上の位置を決定した。

#### (材料および方法)

上記の分離菌11株の分離、培養、および1カ月程度の短期間の保存などには、polypepton 15g, beef extract 7.5g, NaCl 30g, 蒸留水 1 ℓ, pH 7.0~7.2, (agar powder 15g) の組成の普通栄養培地(普通栄養寒天培地)を用いた。生化学的性状検査は常法に準拠し、通常25~28°C下で2日間培養して判定した。特別な項目の検査方法については第II章で説明するのでここでは省略する。適正培地塩分量、pHおよび培養温度に関する実験ではDifco nutrient brothを用い、振盪培養を行ない光学的に増殖量を測定した。

病原性実験では普通栄養寒天培地で24時間培養した菌を滅菌した0.85% NaCl溶液に懸濁させ、アユおよびニホンウナギ(*A. japonica*)の体側筋肉部に接種した。接種量は魚体重100g当り湿菌重量で0.01~5.0mgとした。なお湿重量にして1mgの菌量は細胞数(生菌数)にすると $7.2 \sim 8.8 \times 10^8$ 個であった。マウスに対する病原性実験は、上記のように食塩水に懸濁させた材料のほかにはブイオン培養液をそのまま材料とし腹腔内接種を行なった。

#### (結 果)

**生物学的性状：**検査した11菌株は実験結果からすべて同一種と断定されたので、必要な箇所以外では特に菌株を断わることなく結果を述べる。

本菌はグラム陰性で、長さ1~2 $\mu$ 、幅0.5 $\mu$ のやや弯曲した短桿菌で、1本の極鞭毛を有し活発に運動する。普通寒天培地上および普通ブイオン中でよく発育し、培地上に色素を産生することはない。ただし分離後数年を経た株では培地の色をごくわずかに茶褐色に変ずる場合がある。普通培地上でのコロニーは正円形で、湿潤性光沢のある灰白色を呈し、比較的透明であるが発育が進むと中央部がわずかに混濁してくる。培地だけで長期継代したものでは病原性の低下がみられるが、それとともにコロニーの透明度も低下する。そのような状態の菌を魚体を2回程度通過させることにより病原性を回復させることができるが、それと同時にコロニーの透明度も回復する。拡散運動(swarming)は認められない。BTB teepol 寒天培地上では鮮黄色のよく発達したコロニーを形成し、WA 寒天培地では青色の微小コロニーを形成する。MacConkey 寒天培地(NaCl 3%)ではほとんど発育せず、SS 寒天培地(NaCl 3%)ではまったく発育しない。胞子は形成せず莢膜も持たない。

塩分、温度およびpHが本菌の発育に及ぼす影響についての実験結果を図3および図4に示した。まず温度と塩分の影響であるが、図3の左側に示した28°C、pH 7.0の場合は6菌株いずれもNaCl 1~3%のところでもよく増殖していることがわかる。右側に示したPB-1株を使つての温度と塩分の組み合わせ実験では、温度により至適塩分濃度が多少違ってくることが示された。すなわち15°Cの場合は至適塩分濃度が1%に近いところにあり、20°Cおよび28°Cの場合は1~2%にあり、35°Cおよび37°Cの場合は3%に近いところに至適塩分濃度がある。

また塩分濃度2%のところに着目してみると、28°Cの時に最もよく増殖し、以下35°C、20°C、37°C、15°Cの順になっている。なお発育温度についてPB-1株の場合を例にあげると、分離直後には10°C

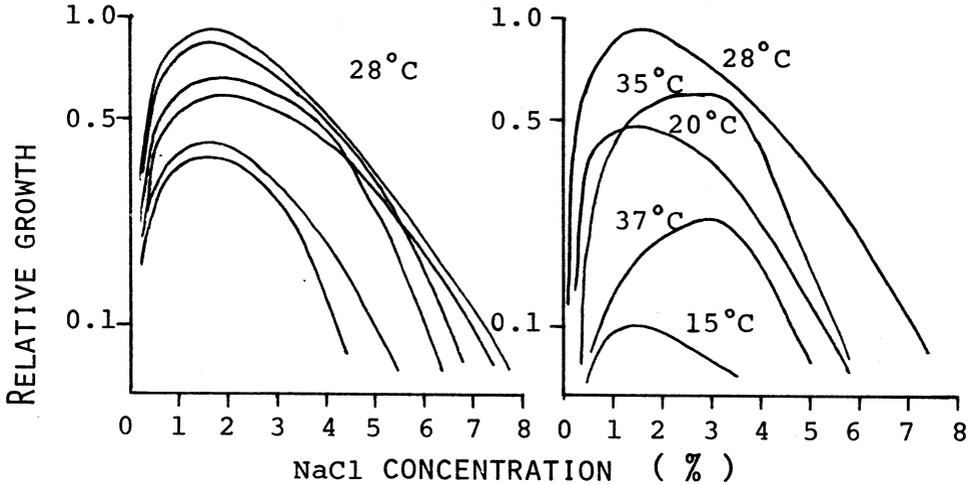


Fig.3. Effects of NaCl concentration and temperature on the growth of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased young Ayu.  
 Left : experiments on the 6 strains including PB-1  
 Right : experiments on strain PB-1

でも発育可能であり、37°Cでは非常に発育が悪かった。しかし普通斜面培地を用いて2、3ヶ月間隔で植え継ぎながら約1年間維持しているうちに、この実験結果に示されたように15°Cではかなり発育が悪くなり、逆に37°Cでは十分発育するようになっていた。

また培養温度を28°Cにし塩分濃度を2%とした時のpHによる増殖度の違いは、図4に示したように、pH 7および8で最もよく発育し、以下pH 9、pH 6、pH 10の順になり、pH 10ではわずかではあったが増殖したのに対しpH 5ではまったく増殖しなかった。

本菌は滅菌した海水中では2週間以上生存したが、滅菌した井戸水(淡水)中では6時間は生存しえたが

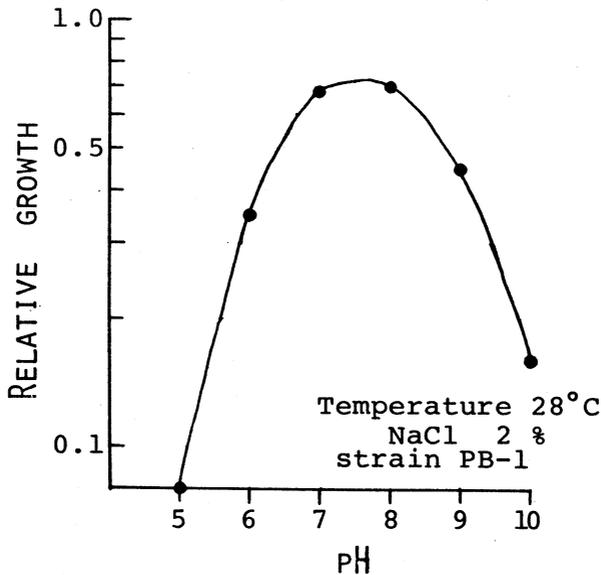


Fig.4. Effect of pH on the growth of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased young Ayu.

Table 2. Characteristics of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased young Ayu in Lake Hamana

Test	Strain	PB-1	PB-3	PB-5	PB-6	PB-7	PB-15	PB-26	PB-27	PB-28	PB-29	PB-37
		1965	1966					1967				
Gas from carbohydrates		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hugh-Leifson test		F		Ferment.						Ferment.		
Cytochrome oxidase		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase reaction		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S production		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole production		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methyl red test		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer test		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2, 3-butanediol production		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin liquefaction		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cholera red test		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch hydrolysis		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urease		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Milk coagulation		+*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chitin decomposition		+w	-	+w	-	-	-	+w	+w	-	+w	+w
Hemolysis of horse blood		+**	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Utilization of d-tartrate		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
malonate		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
citrate		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

\* lab ferment      \*\* β-type      +w : weakly positive

Table 3. Carbohydrate utilization of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased young Ayu in Lake Hamana

Carbohydrate	Strain	PB-1	PB-3	PB-5	PB-6	PB-7	PB-15	PB-26	PB-27	PB-28	PB-29	PB-37
	Glucose		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose		+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Xylose		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructose		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose		+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol		-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Sucrose		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellobiose		+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
Dextrin		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycogen		+	+	-	-	-	+	-	-	+w	-	-
Starch		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerin		-	+w	+	+	-	+w	-	-	+w	-	-

24時間後には死滅した。また食塩を含めぬ1%ペプトン水中で静置培養(28°C)すると多くの株はまったく増殖しなかったが、培養3日後にわずかに増殖が認められる株もあった。

**保存:** 本菌は普通斜面培地ないし半流動寒天培地に接種し5~10°C位の温度の下におけば2~3カ月は保存可能である。また仔牛の血清または脱脂粉乳を分散媒として常法に従い凍結乾燥すれば2年間は保存可能であり、中には5年間も保存できた株もある。

なお FLOODGATE and HAYES (1961)<sup>59)</sup> は *V. anguillarum* (NCMB 6) をブイオン:牛の血清=1:3の混合液(glucose 7.5% 添加)を分散媒として凍結乾燥し2年間は保存可能であったと報告している。

**生化学的性状:** 分離菌11株の生化学的性状を一般性状および糖分解性に分けて表2および表3に示した。それらの結果をみると数種の糖利用性において株間に若干の相違点があるが、主要な性状では完全に一致し、この11株は同一種であると判断された。

**薬剤に対する感受性:** 栄研の感受性 disc を用い Heart infusion 寒天培地にて試験した結果、本菌は chloramphenicol, tetracycline, colistin および novobiocin に対し高い感受性を有することがわかった。特に TC (tetracycline) 系抗生物質の本菌に対する発育阻止力は強く、CTC および OTC (oxytetracycline) の50%発育阻止濃度(27°C, 6時間振盪培養)は0.005~0.01 ppmであった(室賀・江草 1968)<sup>60)</sup>。また vibrio static agent (O/129, 2:4-diamino 6:7-diisopropyl pteridine) に感受性が認められた。

**病原性:** 各菌株をアユおよびウナギに接種した実験結果を表4に示した。PB-1 および PB-3 株を接

Table 4. Pathogenicity for fishes of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased young Ayu in Lake Hamana

<i>V. anguillarum</i> strain	Fish	Body weight	Experimental water temperature	Time in days to death						
				5.0	Dose (mg/100 g fish body weight)		0.1	0.05	0.01	
PB-1	Ayu*	8-10g	15-17°C	1	1	2	2			
	Ayu	5-12	13-14		1	2	2	3		
	Eel	30-40	20-25		3		S**			
PB-3	Ayu	1-5	13-15	1		2		3		3
	Eel	60-100	20-25	2	2	1	3	3	5	3
	Eel*	75-130	17-20		2	2		3		
PB-5	Eel	60-100	20-25	3	2	2	3	S		
PB-6	"	"	"	2	1	2	S			
PB-7	"	"	"	2	2	2	S			
PB-15	"	"	"	1	1	2	3	3	3	S
PB-26	"	"	"			4		2		
PB-27	"	"	"			4		S		
PB-28	"	"	"			3		4		
PB-29	"	"	"			3		4		
PB-37	"	"	"			3		4		

Fishes (Ayu, *Plecoglossus altivelis*, and the eel, *Anguilla japonica*) were injected intramuscularly.

\* Experiments were carried out in sea water, and the others were in freshwater.

\*\* S: survived for one week.

種したアユは接種後10数時間で接種部位に発赤および膨隆が認められ(Plate I-3 参照)、多くの接種魚は1日ないし2日後に死亡した。3日後に死亡した個体の中には接種部位に潰瘍が形成されていたものも1尾あった。ウナギの場合も株により、また接種量によって死亡するまでの日数は異なるが、魚体重100g 当り1 mg を接種した場合はすべて1~4日後に死亡した。アユにおいてもウナギにおいても、死亡魚の肝臓、脾臓、腎臓および血液から純粹に接種菌が再分離された。PB-1 株の接種実験結果にみられるように、海

水中のアユと淡水順化させた後のアユの間には、接種してから死亡するまでの時間および症状には明らかな差はなかった。

接種後のアユにおける変化を病理組織学的にみると、接種部近くの筋肉繊維束間には著しい出血が起きており、菌が多数認められる部分も多い。また筋繊維が融解しその跡に細菌が多数認められる部分もある。脾臓は自然病魚の場合と同様出血性炎症を起こしているが、自然病魚の場合と異なり細菌が多数認められる部分も認められる。肝臓においても出血を伴う病変が顕著で、大小の壊死域および類壊死域が目立ち、そこには細菌が集中していることが多い。肝細胞索が原形を保っている部分でも肝細胞の核の拡大や萎縮などの変化がみられる。接種アユにおけるこれらの各組織における病変は自然病魚のそれと比べて本質的には差がないが、自然病魚の場合より急激に病状が進行していると考えられた。

ウナギに接種した場合は接種部位の発赤および膨隆はアユにおける場合程顕著ではなく、むしろ体表全面にわたる点状出血や特に各鱗におけるうっ血、出血が目立った (Plate I-5)。しかし時によっては接種部位の膨隆が目立ったり、そこに潰瘍が形成される場合もあった (Plate I-6)。PB-3 株の実験結果が示しているように、ウナギの場合においても淡水と海水による病原性発現の差はみられなかった。菌接種したウナギにおける病理組織学的変化については第 III 章で詳しく述べる。

なお注射によらない感染方法として、水中へ培養した菌を添加することにより、採捕後数日を経た海水中の稚アユを発病させることはできた。しかしながらそれらのアユはもともと保菌していた可能性がないわけではなく、はたして本当に添加した菌の感染により発病したかどうかは疑わしかった。一方、完全に淡水順化しさらに数日を経、もはや自然発病はしないと思われる健康魚を材料とした場合は、水中に培養菌を添加しても発病させることはできなかった。飼育水中に菌を懸濁させることによってアユを感染、発病させるのは、材料魚の問題あるいは再現性の点などでかなり問題があるものと思われた。

注射法には筋肉注射と腹腔内注射とが考えられ、その比較実験を試みた。ここにはその実験結果を示さなかったが、アユの場合にはどちらの方法によっても死亡率および死亡時間にはほとんど差がなかった。またウナギの場合については第 III 章に結果を示すが、筋肉注射の方がより確実に病原性が発揮されることがわかった。また腹腔内注射ではあやまって臓器に注射してしまうような危険性もあるので、筋肉注射を主たる接種方法とした。

表 4 に示したように、PB-1 および PB-3 株の実験で、アユに接種することにより自然病魚によく似た症状をひき起こして死亡させることが確められ、またすべての株がウナギを 1 mg/100 g 魚体重の接種量で 4 日以内に致死させることが確められた。

Table 5. Pathogenicity for mouse of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased young Ayu in Lake Hamana

Exp. No.	<i>V. anguillarum</i> strain	Incubation	Dose (per one animal)	Number of animals died/tested
1.	PB-1	on nutrient agar 28°C, 48 hrs	0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 mg	0/5
2.	PB-1, 3, 5, 6, 7, 15	on nutrient agar 28°C, 24 hrs	0.3 - 0.4 mg	2*/6
3.	PB-5, 6	on nutrient agar 28°C, 24 hrs	0.1 mg	0/5
4.	PB-1	in nutrient broth 28°C, 50 hrs	0.1, 0.25, 0.5 ml	0/6
5.	PB-1	in nutrient broth 28°C, 70 hrs	0.05, 0.1, 0.25, 0.5 ml	0/4
Control	<i>V. parahaemolyticus</i> (Okayama BO-18)	on nutrient agar 28°C, 48 hrs	0.5 mg	4/4

In Exp. No. 1, 2, 3, and Control, saline suspended cells were injected intraperitoneally

In Exp. No.4 and 5, incubated broth were injected intraperitoneally

\* The mouse received PB-5 and PB-6, respectively, died.

マウスに対する腹腔内接種実験の結果を表5に示した。実験に用いたマウスは体重 15~30 g のものであり、菌接種後は餌を与えながら7日ないし10日間観察した。また比較のため京都府衛生研究所の赤沢一博士より分与された *Vibrio parahaemolyticus* (Okayama BO-18 海産ウナギ由来) を用いて実験を行なった。なお表の下に説明したように、実験1, 2, 3および *V. parahaemolyticus* を用いた対照実験では寒天培地上で培養したものを滅菌食塩水に懸濁し接種し、実験4および5では培養したブイオンをそのまま接種した。

実験1, 2および3の結果をみると、実験2で PB-5 および PB-6 株を接種したマウスがそれぞれ1匹ずつ死亡した以外は、PB-1 株をはじめ他の株でもマウスを死亡させることはなかった。また実験4および5に示したように、PB-1 株を50時間ないし70時間培養したブイオンをそのまま接種した場合でも死亡するマウスはなかった。これに対し、対照区の *V. parahaemolyticus* を接種したマウスは4匹とも20時間以内に死亡した。

以上の実験結果から稚アユ病魚から分離した本菌はマウスに対しほとんど病原性をもたないものと判断された。むろん本実験でも一部のマウスが死亡しており、マウスに対する病原性について問題がないわけではないが、この点については第II章で *V. parahaemolyticus* との比較という面からあらためて検討を加えることとする。

### ( 考 察 )

本菌はグラム陰性で、端在単鞭毛を有し、活発に運動するやや弯曲した短桿菌である。Glucose を醗酵的に分解し、gas を産生せず酸のみを産生する。Cytochrome oxidase を産し、酒石酸を利用する。硝酸塩を還元し亜硝酸とし、urease は産生しない。また pH 9 で発育し、好塩性である。さらに novobiocin および vibrio static agent (O/129) に感受性を有する。これらの形態学および生化学的性状から本菌は *Vibrio* 属に分類された (DAVIS and PARK 1962<sup>61</sup>, 坂崎 1963<sup>62</sup>, 1967<sup>63</sup>, BUCHANAN and GIBBONS 1974<sup>10</sup>)。

なお著者が本分離菌を *V. anguillarum* と同定した頃 (MUROGA and EGUSA 1967)<sup>37</sup>、坂崎 (1967)<sup>63</sup> は *V. anguillarum*, *V. ichthyodermis* および *V. piscium* var. *japonicus*, すなわち現在 *V. anguillarum* とされているものは、lysine の脱炭酸酵素を持たず arginine 脱水素酵素を持つことを重要視し、*V. anguillarum* は *vibrio* 属からははずすべきであると述べ、*V. anguillarum* に対し *Oceanomonas anguillarum* なる名称を提案したいと述べている。これに対し BAIN and SHEWAN (1968)<sup>64</sup> は *Vibrio* 属に lysine 脱炭酸陰性、arginine 脱水素陽性なるものを記載しており、それが一般的に認められたようで、その後坂崎 (1972)<sup>65</sup> も *V. anguillarum* を認めるようになっていく。

ところで最初にも述べたように新しい Bergey's Manual<sup>10</sup> では *V. anguillarum* BERGMAN 1909, *V. piscium* DAVID 1927, *V. piscium* var. *japonicus* HOSHINA 1957, *V. ichthyodermis* (WELLS and ZOBELL) SHEWAN, HOBBS and HODGKISS 1960 の4種が一つにまとめられ *V. anguillarum* となっているわけであるが、浜名湖産稚アユからの分離菌を同定した当時は、そのような意見も一部にはあったが (SMITH 1961)<sup>66</sup> まだ一般的に認められていなかった。従って本分離菌を *V. anguillarum* と同定するための比較の対象には最初から *V. anguillarum* として報告されたものを取り上げた。

*V. anguillarum* についてはかなり古くから研究されてはいたが、その性状に関する記載は不十分で、例えば SCHÄPERCLAUS (1934)<sup>42</sup> および NYBELIN (1935)<sup>43</sup> の論文にある性状記載と比較検討するだけで本分離菌を *V. anguillarum* と同定するにはいささか無理があった。SMITH (1961) はスコットランドの河口部におけるマス (*finnock*, *Salmo trutta*) のヒブリオ病を研究しその原因菌を *V. anguillarum* と同定した。これが *V. anguillarum* の性状について詳しく報告した最初のものと思われる。彼女は BAGGE and BAGGE (1956)<sup>67</sup> の分離した *V. anguillarum* (NCMB 6) の性状を調べ、彼女の分離株の性状をそ

れと比較し *V. anguillarum* と同定している。そこで著者の分離株の性状を彼女の示している NCMB 6 株の性状と比較したところ starch 利用性の点で異なるほかはすべての項目で一致した。そこで本分離株を *V. anguillarum* と同定した。なお SMITH の分離株は本分離株と starch 利用性の点では一致し陽性であった。もちろん新しい Bergey's Manual (1974) における *V. anguillarum* の性状記載と比較しても特に問題となるような点はないが、その後の分類に関する問題については第 II で詳しく述べることにする。

**(5) 利根川河口における稚アユのピブリオ病**

海産稚アユの歩留りの悪さは浜名湖産のものに限られたものではなく、他の地域の子産稚アユあるいは河川産稚アユにおいても、程度の差はあれやはり一般的に歩留りは悪いようであった。そしていずれの場合にも細菌感染症が関与していることもまた共通していることようであった。

1967年、著者は利根川河口で採捕された稚アユ病魚について細菌検査をする機会を得、*V. anguillarum* が関与していることを確認した(室賀・元信 1967)<sup>38)</sup>。

利根川の稚アユは従来よりシラスウナギ掛袋網漁、シラウオ漁などの混獲物としては知られていたが、養殖種苗としては全く注目されていなかった。それが1964年に一部で試験的に採捕が行なわれ、1967年にはかなり本格的に養殖種苗としての稚アユの採捕が行なわれるようになっていた。採捕には旋網が使われ2月初めから4月一杯にかけて行なわれていた。河口付近の茨城県波崎における海水の chlorinity は17~18‰であり、水温は9℃(2月上旬)~15℃(4月下旬)であった。この波崎において採捕したアユを長方形水槽に収容し、淡水順化を行っていたが、1966年および1967年いずれの年にも、収容後3~4日目頃に細菌感染によるものと思われる大量斃死が発生した。採捕収容後3~4日目に発生するという点や病魚の症状は浜名湖におけるピブリオ病のそれとまったく一致していた。

1967年4月下旬、波崎において採捕したアユ(体重1.5~2.6g, 体長55~65mm)を東京大学の研究室に運び、病変筋肉部、肝臓および腸などから細菌の分離を試みた。なお供試魚は輸送中に死亡した2尾とまだ

Table 6. Characteristics of *Vibrio anguillarum* isolated from young Ayu taken from the River Tone

Character	Strain			Strain	Strain			
	PH-1	PH-2	PH-4		Carbohydrate	PH-1	PH-2	PH-4
Gas from carbohydrates	-	-	-	Acid from	Glucose	+	+	+
Hugh-Leifson test		Ferment.		Arabinose	+	+	+	
Cytochrome oxidase	+	+	+	Xylose	-	-	-	
Catalase reaction	+	+	+	Fructose	+	+	+	
H <sub>2</sub> S production	-	-	-	Mannose	+	+	+	
Indole production	+	+	+	Galactose	+	+	+	
Methyl red test	-	-	-	Rhamnose	-	-	-	
Voges-Proskauer test	+	+	+	Mannitol	+	+	+	
2, 3-butanediol production	+	+	+	Inositol	-	-	-	
Gelatin liquefaction	+	+	+	Sucrose	+	+	+	
Cholera red test	-	-	-	Maltose	+	+	+	
Starch hydrolysis	+	+	+	Raffinose	-	-	-	
Nitrate reduction	+	+	+	Lactose	-	-	-	
Urease	-	-	-	Cellobiose	+	+	+	
Milk coagulation	+	+	+	Dextrin	+	+	+	
Hemolysis of horse blood	+	+	+	Glycogen	-	-	+	
Chitin decomposition	-	-	-	Starch	+	+	+	
Utilization of d-tartrate	+	+	+	Glycerin	-	-	-	
malonate	+	+	+					
citrate	+	+	+					

生きていた3尾であり、死魚および生魚それぞれ1尾に体側部筋肉の白濁もしくは軽度の出血病変が認められ、他の3尾には外観的異常は認められなかった。

分離材料を培養したところ、5尾中4尾の魚の筋肉、肝臓および血液から種類の菌が pure もしくは dominant に出現し、コロニーの形状および表6に示した生化学性状、さらにはウナギに対する病原性から *V. anguillarum* と同定された。表6には別々の個体から分離された3菌株 (PH-1, PH-2, PH-4) の性状を示したが、それら3菌株の間では glycogen 利用性にのみ差がみられたが、他のすべての点で完全に一致していた。

また1970年に静岡県伊豆で採捕された海産稚アユ病魚より分離された菌の同定を依頼され検査したところ、やはり *V. anguillarum* と同定された。本菌株 (PI-6) の性状についてはここでは省略したが、第Ⅱ章の表18および表19に示した。

なお本章第2節で示すように、愛知県、徳島県および岡山県におけるアユ養殖場に発生したピブリオ病の原因菌も *V. anguillarum* であり、それらの場合の種苗は愛知県、徳島県、高知県および宮崎県で採捕された海産稚アユであった。これらのことから全国的に海産稚アユに発生する細菌性疾病は *V. anguillarum* によるものであると考えられた。

## 第2節 淡水養殖中のアユのピブリオ病

1967年浜名湖産稚アユで *V. anguillarum* 感染症を確認した後、淡水養殖中におけるアユの本菌感染症の存在の有無について検討を始めた。その当時すでに淡水養殖中のアユにもピブリオ病と呼ばれる細菌感染症が存在するといわれていたが、それに関する報告例はなく、ニジマスの病原菌である *V. piscium* var. *japonicus* (*V. anguillarum*) がアユをも冒すとの記載がある程度であった (HOSHINA 1957, 保科・四籠・江草 1965<sup>68</sup>)。また一部のアユ養殖に関する成書を見ると、疾病の項ではいずれも第一にピブリオ病を取り上げてはいるが、その原因菌は *V. anguillarum* としているもの (大上 1966)<sup>69</sup> と、*V. piscium* var. *japonicus* としているもの (石田 1968)<sup>70</sup> があり、原因菌の種名についてはあいまいな点がみられた。現在では *V. piscium* var. *japonicus* は *V. anguillarum* の synonym とされているが、当時は別種と考えられていたので、淡水養殖アユのピブリオ病の原因菌を明らかにすることを目的として調査を始めた。

1967年5月、浜名湖周辺の養殖場、および同年8月愛知県赤羽根の養殖場のアユにピブリオ病と思われる疾病が発生したとの連絡を受け調査した。それらの養殖場では共に海産稚アユを種苗としていた。しかしながら *V. anguillarum* はいずれの養殖場の病魚からも分離されず、*Aeromonas* spp. が分離され、*Aeromonas* 感染と診断された。

その後1968年、1969年に至り、滋賀県下および長野県下の養殖場で初めて本菌感染症を確認することができた (室賀・江草 1970)<sup>39</sup>。さらに最近では全国的にアユのピブリオ病が大流行し、徳島、岡山および愛知県下の養殖場で *V. anguillarum* が確認されている。

### (I) 滋賀県下および長野県下の養殖場に発生したアユのピブリオ病

#### (材料および方法)

**滋賀県:** 1969年夏、養殖場のアユおよび琵琶湖に流入する河川の天然アユに流行病が発生した。現地では本病を一応ピブリオ病と呼んでいた。病魚の症状は体表、鰭およびその基部、吻および口腔、肛門周辺の発赤によって特徴づけられた。病状が進んだものでは体表および筋肉組織に潰瘍が認められ、一部の病魚には腹水症状も認められた。内臓所見では点状出血が肝臓、腸および筋肉組織に認められた。いくつかの養殖場の病魚および芹川の天然アユ病魚を材料魚とした。

**長野県:** 1969年の初夏に県下東部の18のアユ養殖場のうち11の養殖場において流行病が発生した。病魚の

症状としては腹水と先に述べた滋賀県での場合と同様、魚体各部分における発赤が目立った。8月の末になると腹水症状を呈する魚は少なくなり、9月初めには病気はほぼ治まった。被害の程度は養殖場によって異なるが、平均すると尾数にして18%位であった。佐久地区のいくつかの養殖場から集めて蓄養池に収容されていた病魚を検査材料魚とした。

なお調査した両県の養殖場では琵琶湖産の稚アユを種苗としていた。

これらの病魚の病変筋肉部、肝臓および腎臓より3% NaCl 加普通寒天培地を用いて細菌分離を行なったところ、滋賀県下の6養殖場と1河川および長野県下の蓄養池のいずれの病魚からも、コロニーの形状から vibrio と思われる細菌が pure もしくは dominant な形で分離された。そこで各地域から1ないし数株を残して研究材料とした。

またこの前年の1968年、および翌年の1970年に滋賀県下の養殖場のアユ病魚を調べた際、いくつかの菌に混って1969年の分離株と同一種と思われる菌が分離されたので、それらも合わせて性状検査に供した。以下に材料菌株の分離年月および場所を示す。

PSh-1 ……滋賀県, 養殖場, 1968年9月分離, PSh-2 ……滋賀県, 養殖場, 1969年8月, PSh-3 ……滋賀県, 芹川(天然アユ), 1969年8月, PSh-8, 9, 10 ……滋賀県, 養殖場, 1970年7月, PNa-1 ……長野県, 蓄養池, 1969年8月。

(結果および考察)

分離株はいずれも3% NaCl 加普通寒天地上でよく発育し、正円形、湿潤性光沢のある灰白色ないし淡黄色の比較的透明なコロニーを形成した。コロニーの特徴は浜名湖産稚アユ病魚から分離した *V. anguillarum* とよく似ており、透明感のある点で先に述べた浜名湖周辺あるいは赤羽根の病気アユから分離された

Table 7. Characteristics of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased Ayu in freshwater ponds in Shiga and Nagano prefectures

Character	<i>Vibrio anguillarum</i>						
	PSh-1	PSh-2	PSh-3*	PSh-8	PSh-9	PSh-10	PNa-1
Form, Flagella and Motility	Short	rod,	Single	polar	flagellum,	Active	motility
Length	1 μ	0.5-2	1	1-1.5	1-1.5	1-1.5	1-3
Gram stain	Negative						
Cytochrome oxidase	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Indole production	+	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S production	-	-	-	-	-	-	-
Gas from carbohydrates	-	-	-	-	-	-	-
Hugh-Leifson test	Fermentative						
Methyl red test	-	-	+	+	+	+	-
Voges-Proskauer test	+	+	+	+	+	+	+
Cholera red test	-	-	+	-	+	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin liquefaction	NT**	NT	NT	+	+	+	NT
Utilization of d-tartrate	+	+	+	+	+	+	+
malonate	+w	+w	+w	+w	+w	+w	+w
citrate	+	+	+	+	+	+	+
Decarboxylation of arginine	NT	+	-	+	+	+	+
lysine	NT	-	+	-	-	-	-
Sensitivity to 0/129	+	+	+	+	+	+	+

\* PSh-3 was finally removed from *V. anguillarum*

\*\* Not tested

*Aeromonas* spp.とは容易に判別できた。分離菌の形態学および生化学的性状を表7に、糖分解能を表8に、塩分耐性およびウナギに対する病原性を表9にそれぞれ示した。表7に見られるように、淡水アユからの分離菌7株のうち PSh-3 株を除く6株の性状は、PSh-9 株の cholera red 反応(+)を除けばすべての点で一致していた。そしてこれらの性状は先に示した浜名湖産稚アユから分離された *V. anguillarum* の性状とまったく一致するものであった。表8に示した糖分解能においても、PSh-3 株を除く6株はすべて同じ反応を示し、galactose の点を除けば浜名湖株の性状とも一致した。さらに表9に示した塩分耐性の実験結果、およびウナギに対する病原性実験の結果を総合し、PSh-3 株を除く6株は *V. anguillarum* と同定された。

Table 8. Carbohydrate utilization of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased Ayu in freshwater ponds in Shiga and Nagano prefectures

Carbohydrate	<i>Vibrio anguillarum</i>							
	PSh-1	PSh-2	PSh-3*	PSh-8	PSh-9	PSh-10	PNa-1	
Acid from								
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	NT	-	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	NT	+	-	+	+	+	+	+
Dextrin	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	NT	+	-	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	-	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	NT	NT	NT	-	-
Mannose	NT	+	-	NT	NT	NT	+	+
Rhamnose	NT	-	-	-	-	-	-	-
Starch	NT	+	+	+	+	+	+	+
Glycerin	NT	-	-	NT	NT	NT	-	-
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	NT	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	NT	-	-	-	-	-	-	-

\* PSh-3 was finally removed from *V. anguillarum*

Table 9. NaCl-tolerance and pathogenicity for eels of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased Ayu in freshwater ponds in Shiga and Nagano prefectures

NaCl 0 %	<i>Vibrio anguillarum</i>						
	PSh-1	PSh-2	PSh-3*	PSh-8	PSh-9	PSh-10	PNa-1
	Growth in peptone water containing NaCl in various concentrations						
+w	+	+	-	-	+	+	+
0.5	+	+	+	+	+	+	+
1		+	+	+	+	+	+
2		+	+				+
3	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+
7	-	-	-	+w	+w	+w	-
Pathogenicity for eel**	+	+	+	+	+	+	+

\* PSh-3 was finally removed from *V. anguillarum*

\*\* The Japanese eels were injected intramuscularly with viable cells  
Injection doses : 1 mg/100 g of fish body weight

芹川の天然アユから分離された PSh-3 株は arginine decarboxylase -, lysine decarboxylase + となっており他の 6 株および浜名湖株と異なっている。先にも述べたように坂崎 (1967)<sup>63</sup> もこの項目を重要視していたし、BAIN and SHEWAN (1968)<sup>64</sup> によれば vibrios pathogenic for poikilothermic animals の lysine decarboxylase は陰性と記していることもあり、本菌株を *V. anguillarum* とすることは無理と思われる。なお本研究では arginine, lysine および ornithine の decarboxylase 試験には Falkow medium (SKERMAN 1967)<sup>71</sup> を用いて行なった。また本菌株は表 8 に示した糖分解能においても cellobiose, arabinose および fructose などの点で他の 6 株とは異なった反応を示しており、この点からやはり別種であると考えられる。しかしながら表 9 に示したようにウナギには実験的には病原性を示したこともあり、今後再びこのような株が出現するようなことがあれば更に検討を加える必要がある。

表 9 に示した塩分耐性においては、PSh-3 株を除く 6 株中、4 株が食塩を含ませペプトン水中で発育し、2 株はまったく発育しなかった。高塩分においては 5% で全株発育し、7% ではごくわずかに発育するものが 3 株あった。高塩分に対する抵抗性は浜名湖株と比べてあまり差はないが、0% に対する抵抗性には若干違いがあり、浜名湖株に比較してやや淡水に適應していると見ることができる。

なおこれらの分離株を普通斜面培地を用いて保存 (5℃下) しておいたところ、2 カ月後にはすべての株が死滅してしまい、海産稚アユからの分離株に比べて保存に対してはかなり弱いことがわかった。

*V. anguillarum* は本来海水細菌であると考えられているので (SINDERMAN 1970)<sup>41</sup>、この菌がどこで淡水養殖アユに感染したかということが問題となる。海産稚アユを淡水で養殖している時に発病した場合は、アユが長期間にわたり保菌していたと考えることができるが、この滋賀県および長野県下の例ではいずれも琵琶湖産のアユを種苗としており、伝染経路が重要な問題となる。一部の養殖場では海産魚を餌として用いていた事実があるので、餌が感染源とも考えられるが、かならずしも海産魚を投与していない池でも発生しているので単に餌が原因とは考えられない。同じ琵琶湖の種苗を養殖していて滋賀県と長野県という遠隔の地で同時に発病したことから考えれば、むしろ種苗の時期にすでに感染していた可能性が強く、もしそうだとすれば本菌はすでに何等かの形で琵琶湖に存在しているのではないかと考えられる。

## (2) 徳島県、岡山県および愛知県の実験場に流行したアユのピブリオ病

養殖アユのピブリオ病は原因菌の種名に関する混乱などはあるながらも、いくつかの県の水産試験場における研究成果や養殖業者自身の経験に基づき一応の対策が立てられ、1965年頃から1972年にかけては、さほど恐い病気とは考えられていなかったようである。例えば大上 (1966)<sup>69</sup> によれば、数種のサルファ剤 (sulfisoxazole, sulfathiazole, sulfadimethoxine, sulfamonomethoxine), furazolidone, および抗生物質 (tetracycline など) が速効的に効き、経口投与をすれば 3 日～4 日で斃死魚がきわめて少なくなり、5 日～6 日で全治するのが普通であるとされている。事実、1965年および1966年に浜名湖産稚アユから分離された株および1968年に滋賀県の養殖アユから分離された株は sulfisoxazole に対してもかなり感受性を有していたし、tetracycline および chloramphenicol に対してはすべての株が高い感受性を有していた (後出する表 13 参照)。従ってその当時の *V. anguillarum* には薬剤耐性株と呼べるようなものはほとんどなく、実際的にもサルファ剤および抗生物質がかなり有効であったものと考えられる。

ところが1973年春に発生したアユのピブリオ病はその発生規模もほぼ全国的であり、また従来使用されていたサルファ剤あるいは chloramphenicol などの治療薬の効果がほとんど認められないことから大きな問題となった。

1973年春から夏にかけて、著者は各水試の職員の協力の下に、徳島県下のいくつかのアユ養殖場および岡山県下の一養殖場を調査し、また愛知県水試の宇野将義氏の分離した菌株を同技師と共同して検査する機会を得、いずれの場合も原因菌は *V. anguillarum* であることを確認した (室賀ら 1974<sup>72</sup>、宇野・室賀 1974<sup>73</sup>)。

## ( 材料および方法 )

徳島県下および岡山県下で観察した病魚は各鱗、口吻および体表における出血あるいは潰瘍、さらに肛門部の発赤および拡張など、ビブリオ病の典型的な症状を呈していた (Plate I-4 参照)。そのような症状を示す病魚の主として肝臓から 0.5% NaCl 加普通寒天培地を用いて細菌の分離を行なった。培養の結果、ほとんどの病魚の肝臓材料からはほぼ純粋な形で一種類と思われる菌が得られ、場所、池あるいは個体の違いに応じて、徳島県下の病魚から18菌株、岡山県下の病魚から1菌株を選び性状検査に供した。また愛知県における病魚の症状もこれら両県における場合とまったく同じで、同じような方法で分離した4株を性状検査に供した。それぞれの菌株の由来を表10に示した。

Table 10. Sources of strains of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased Ayu in 1973

Strain	Location	Date (1973)	Seed
<i>V. anguillarum</i>			
PT-3	Anan, Tokushima Pref.	4, May	Caught in sea (Tokushima)
PT-4	"	"	"
PT-5	"	"	"
PT-8	"	29, May	(Kochi)
PT-9	"	"	"
PT-10	"	"	(Miyazaki)
PT-11	"	"	(Kochi)
PT-12	"	"	(Tokushima)
PT-14	"	30, May	"
PT-15	"	"	(Miyazaki)
PT-16	"	"	Caught in freshwater (Lake Biwa)
PT-17	"	"	Caught in sea (Miyazaki)
PT-18	"	"	(Miyazaki & Tokushima)
PT-19	Hiwasa, Tokushima Pref.	22, May	(Tokushima)
PT-22	Anan, Tokushima Pref.	25, May	(Kochi)
PT-23	"	"	(Tokushima)
PT-24	"	"	Caught in freshwater (Lake Biwa)
PT-25	"	"	Caught in sea (Miyazaki)
PH-5	Sōja, Okayama Pref.	21, Mar.	Caught in sea
PA-1	Aichi Pref.	4-5, Jun.	Caught in sea
PA-2	"	"	"
PA-8	"	"	"
PA-9	"	"	"

この23株について常法に従い形態学および生化学的性状を検査するとともに、栄研の3濃度 disc を用いて薬剤感受性を調べ、また1%ペプトン水に食塩を加えた培地を用いて28°C、48時間培養し塩分耐性を調べた。

さらに病原性試験として、徳島県養殖アユからの10株と愛知県養殖アユからの1株、あわせて11株につき、ニホンウナギに湿菌量1mg/100-g 魚体重の割合で筋肉内注射し、マウスには愛知株をさらに3株加えた計14株につき、0.6mg/1匹の割合で腹腔内注射し、それぞれに対する影響をみた。

(結果および考察)

検査した23株の一般性状を表11に、糖分解能を表12にそれぞれ示した。(なお宇野・室賀 1974<sup>73)</sup>の報告中にある愛知株4株の glucose および dulcitol の分解性、および PA-8 株の glycerin および glycogen の分解性に関する記載は間違いであり、本論文中の記載が正しい)

これらの結果および後述するウナギに対する病原性などから、検査したすべての菌株は *V. anguillarum* と同定された。表11に見られるようにこの23株の indole 産生能がすべて陰性となっており、この点で浜名湖あるいは滋賀株と異なっている。これは浜名湖株の検査に用いたと同じ方法、すなわち SIM 培地で25~

Table 11. Characteristics of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased Ayu in 1973

Character	Strain			Strains having reaction as given
	Tokushima 18 strains (PT-3~PT-25)	Okayama (PH-5)	Aichi 4 strains (PA-1~PA-9)	
Form	Short rod			
Length	0.5-2 μ	0.6-2	0.5-2.5	
Flagella	Single polar flagellum			
Motility	+	+	+	
Swarming	-	-	-	
Gram stain	-	-	-	
Hugh-Leifson test	Fermentative			
Gas from glucose	-	-	-	
Cytochrome oxidase	+	+	+	
Catalase	+	+	+	
Litmus milk	+	+	+	
Nitrate reduction	+	+	+	
Gelatin liquefaction	+	+	+	
Indole	-	-	-	
Voges-Proskauer test	+	+	+	
Methyl red test	+1, -17*	-	-	+PT-22
H <sub>2</sub> S production	-	-	-	
2, 3-butanediol	+	+	+	
Arginine decarboxylation	+	+	+	
Lysine	-	-	-	
Ornithine	-	-	-	
Phenylalanine deamination	-	-	-	
Urease	-	-	-	
Cholera red test	-	-	-	
Citrate	+	+	+	
Malonate	+15, -3	+	+1, -3	-:PT-4,5,19,PA-2,8,9
Tartrate	+	+	+	
Starch hydrolysis	+	+	+	
Sensitivity to 0/129	+	+	+	
Novobiocin	+	+	+	
Penicillin	-	-	NT	
Pathogenicity for eel	+9, -1	NT	+1	-:PT-15
for mouse	-10	NT	-4	

\* Number of strains having reaction as given

28℃, 2日間培養して判定した結果であり, 試みに5日間培養して検査すると弱陽性を示す株が多かった。NYBELIN (1935a)<sup>43)</sup> の分類に従えば, 浜名湖株および滋賀, 長野株, すなわち1965年から1970年にかけて

Table 12. Carbohydrate utilization of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased Ayu in 1973

		Tokushima 18 strains (PT-3~PT-25)	Okayama 1 strain (PH-5)	Aichi 4 strains (PA-1~PA-9)	Strains having reaction as given (Exept PH-5)
Acid from	Glucose	+	+	+	
	Fructose	+	+	+	
	Xylose	-	-	-	
	Arabinose	-	-	-	
	Rhamnose	-	-	-	
	Galactose	+2, -16	+	-	+ :PT-22, 23
	Mannose	+	+	+	
	Sucrose	+	+	+	
	Lactose	-	-	-	
	Trehalose	+	+	+	
	Raffinose	+17, -1	-	-	- :PT-9, PA strains
	Dextrin	+	+	+	
	Maltose	+	+	+	
	Glycogen	+	-	-	
	Inulin	+2, -16	-	-	+ :PT-22, 23
	Glycerin	+	-	+1, -3	- :PA-1, 2, 9
	Mannitol	+	-	+1, -3	- :PA-1, 2, 9
	Sorbitol	+15, -3	+	+	- :PT-9, 17, 25
	Inositol	-	-	-	
	Adonitol	-	-	-	
	Dulcitol	-	-	-	
	Salicin	+2, -16	-	-	+ :PT-22, 23
	Cellobiose	+2, -16	-	-	+ :PT-22, 23

て分離された株はすべて indole +, sucrose +, mannitol + で *V. anguillarum* の A type に属するものであったのに対し, 1973年に分離したこれら23菌株のうち19株は indole -, sucrose +, mannitol + で SMITH (1961)<sup>66)</sup> の提案した C type に属することになる。残りの4株(岡山株および愛知株3株)は indole -, sucrose +, mannitol - となっており, A, B, C, いずれの type にも該当しないことになる。最近までは *V. anguillarum* に関する多くの報告の中で, この NYBELIN の type 分けについて言及されてきたが, 他の3種を合わせたものとしての新しい *V. anguillarum* においては彼の type 分けはあまり意味を持たなくなったものと考えられる。

糖分解においても, 上記の mannitol のほかに, inulin + (2株), raffinose + (17株), および salicin + (2株) など1965年から1970年までの分離株には見られなかったような性状を示すものがあった。

表11に示したようにニホンウナギに対しては PT-15 株を除くすべての検査株は 1 mg を接種することにより数日以内に死亡せしめ, 病原性を有することが確認された。なお PT-15 株を接種したウナギは接種部位の組織の崩壊などの病変は認められたが死亡しなかった。またマウスに対しては検査した14株すべてが病原性を示さなかった。

次に薬剤感受性の実験結果を表13に示し, 比較のため浜名湖株および滋賀株 (PSh-1) の薬剤感受性を併記した。これらの実験方法はすべて同じで, sulfisoxazole については Mueller Hinton 寒天培地を用い, 抗生物質については Heart infusion 寒天培地を用い, 28℃で24時間培養し判定した。Disc は栄研の3濃

Table 13. Drug sensitivity of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased Ayu in 1973, comparing with the strains isolated in 1965~1968

Drug	Year Strain	1973					1965~1968		
		Tokushima 18 strains		Okayama PH-5	Aichi 4 strains		Lake Hamana 6 strains	Shiga PSH-1	
Chloramphenicol		##3*	##10	+5	-	+3	-1	##6	##
Colistin		##13	##4	+1	##	##4		##4	##1
Dihydrostreptomycin		##3	##13	+2	-		+3	-1	##4
Erythromycin		##2	##16		+	##4			##4
Kanamycin		##13	##5		+	##4			##2
Leucomycin		##7	##10	+1	##	##4			##6
Oleandomycin				+18	-		+4		##1
Tetracycline		##4	##11	+3	+	##3	+1		##6
Sulfisoxazole				-18	-			-4	##2

\* Number of strains having sensitivity as given

度 disc を用いた。

表13に示した結果をみると、1965年から1968年にかけて分離された浜名湖株および滋賀株は chloramphenicol (CM) および tetracycline (TC) に対しすべての株が高い感受性を示しているのに対し、1973年の分離株ではそれらの薬剤に対し高い感受性を示すものもあるが、かなり感受性が低い株もあり、中には岡山株のようにまったく感受性を示さないものもあった。Sulfisoxazole (SI) に対しても1968年以前の株の多くのは高い感受性を有していたのに対し、1973年の株はすべて感受性を示さなかった。この変化を解り易

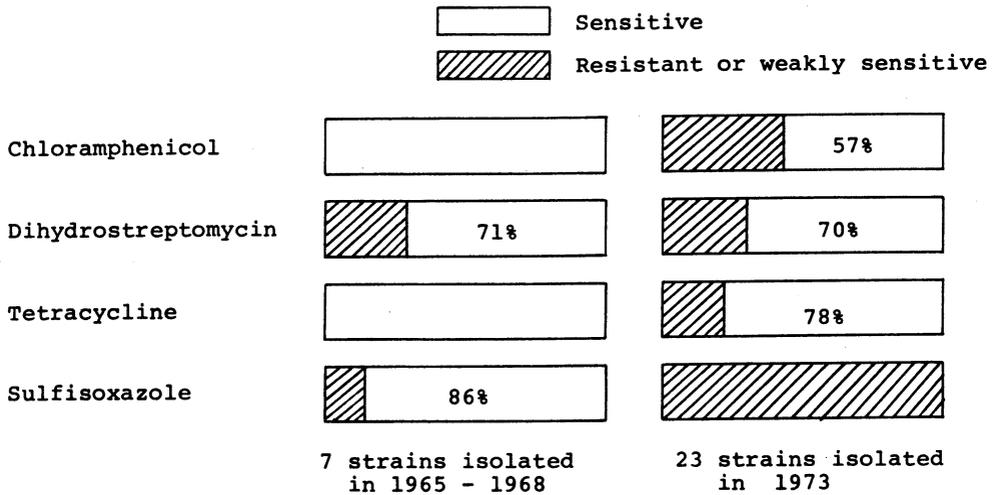


Fig.5. Comparison in drug sensitivities between the strains of *Vibrio anguillarum* isolated in 1973 and those isolated in 1965 ~ 1968.

くするために、CM, SM (dihydrostreptomycin), TC および SI の4つの薬剤に対する感受性の違いを図5に示した。これは表13に示した実験結果において、## および ## であったものを感受性を有するものとし、

+もしくは一であったものを抵抗性を有するものとし、1968年以前に分離された7株と1973年に分離された23株の中で感受性株と耐性株の占める割合を図示したものである。これを見ると、前述の繰り返しになるが、SI に対する感受性の変化が最も顕著で、CM および TC に対する感受性の変化も明らかに認められる。SM に対しては1968年以前に分離株にも抵抗性を示すものがある程度存在したが、1973年になっても抵抗性を示すものがふえているということはない。このことは養殖場においてサルファ剤、CM および TC が最も頻繁に使用されてきた事実と結びつくものと思われる。1973年に分離されたこれらの薬剤耐性株は青木ら(1972)<sup>74)</sup> のいう4剤耐性株 (SA...sulfonamides, SM, CM, TC) にあたると考えられる。青木ら(1973)<sup>75)</sup> は1973年にアユから分離した *V. anguillarum* の薬剤耐性について検討し、多くの株は SA・SM・CM・TC 耐性を示すとし、それらはR因子 (resistant factor) によるものであると報告している。

このように1973年に分離された *V. anguillarum* は SA, CM, TC などに対する耐性株が多く、養殖場でそれらの薬剤が従来と違って効果を示さなかった事実を裏付けている。

なお1973年の徳島県下の養殖場においては、nalidixic acid (NA) を試験的に用いたところ、かなり有効であったようであるが、1973年の後半にはすでに NA に対し耐性を示す株が出現し、1974年には NA が実際的にも効力を示さなくなった例が多いようである。このような SA, CM, TC あるいは NA に対する耐性菌の出現は、著者が調査した県だけではなく、滋賀県、岐阜県および静岡県などでも同様に見られているといわれる。

一時は抗菌剤により予防あるいは治療が効を奏し、あまり重要視されていなかったアユのピブリオ病は1973年に至り、無秩序な薬剤の使用が原因して全国的に耐性菌が出現し、新しい有効治療薬の選択に追われるような状況に立ち至っている。

### 第3節 養殖ウナギのピブリオ病

繰り返し述べてきたように *V. anguillarum* はヨーロッパにおいて海水あるいは汽水中のウナギの鱈赤病 (red disease, red pest, Salzwasseraalrotseuche) の病原菌として世に知られるようになったわけである。一方アメリカ合衆国ではサケ科魚類を始めとする他の海産魚にピブリオ病の存在することが報告されているが、ウナギに関する症例は未だない。ヨーロッパのウナギが *Anguilla anguilla* であるのに対しアメリカのウナギが *A. rostrata* であるという魚種の違いによることも考えられるが、一つにはアメリカにおいてはウナギがあまり重要視されずほとんど観察されていないことからきている可能性がある。

我が国においてもウナギ (*A. japonica*) のピブリオ感染症の事例はほとんどないといってよい。これは我が国ではウナギはほとんど淡水池で養殖されていることによるものと思われる。SCHÄPERCLAUS (1934)<sup>42)</sup> がドイツにおけるウナギの鱈赤病について報告しているが、それによれば淡水域のウナギの病原体は *Aeromonas punctata* (*Pseudomonas punctata sacrowiensis*) であり、海水ないし汽水域のウナギの病原体は *V. anguillarum* であるとしている。我が国における養殖ウナギにおいても鱈赤病は最も重要な疾病の一つとなっており、これに関しては保科の詳細な研究があり、病原菌は *A. punctata* および *Paracolo-bactrum anguillimortiferum* (*Edwardsiella tarda*) とされている (保科 1962)<sup>76)</sup>。

著者は海産稚アユで *V. anguillarum* 感染症の存在を確認した後、ニホンウナギにおける本菌感染症の存在の有無を調べるために機会あるごとに調査を行なってみた。例えば1965年から1966年にかけて、愛知県伊川津において海水中で蓄養されていたウナギのうちの病魚数尾、また1966年3月浜名湖内の角建網 (樹網) で採捕されたウナギのうち皮膚に潰瘍病変が認められた個体2尾、あるいは同年3月浜名湖周辺のやや塩分を含む養鰻池で認められた病気のウナギ5尾、などについて細菌検査を行なってみた。しかしながら伊川津での実験的蓄養魚の例を除けば、天然および養殖ウナギから *V. anguillarum* を分離することはできなかった。伊川津での例は特別なケースとも考えられるので別に述べるものとする。

1971年5月徳島県松茂町の養鰻池において、鱈赤病症状を呈する病魚が認められ、徳島県水試の城泰彦技

Table 14. Characteristics of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased eels (*Anguilla japonica*)  
(ET strains from Tokushima, EI strains from Ikawazu, Aichi)

Character	Strain					Carbohydrate	Strain				
	ET-1	ET-23	ET-24	EI-5	EI-6		ET-1	ET-23	ET-24	EI-5	EI-6
Single polar flagellum	+	+	+	+	+	Acid from					
Motility	+	+	+	+	+	Fructose	+	+	+	+	+
Gram stain	-	-	-	-	-	Galactose	+	+	+	+	+
Swarming	-	-	-	-	-	Glucose	+	+	+	+	+
Fermentation of glucose	+	+	+	+	+	Mannose	+	+	+	+	+
Gas from glucose	-	-	-	-	-	Maltose	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	Trehalose	+	+	+	+	+
Cytochrome	+	+	+	+	+	Dextrin	+	+	+	+	+
Kovacs	+	+	+	+	+	Mannitol	+	+	+	+	+
Sensitivity to 0/129	+	+	+	+	+	Starch	+	+	+	+	+
Novobiocin	+	+	+	+	+	Sucrose	+	+	+	+	+
Penicillin	-	-	-	-	-	Glycogen	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	Glycerin	+w	-	-	-	-
Litmus milk peptonization	+	+	+	+	+	Cellobiose	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	Arabinose	-	-	-	-	-
Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	Inositol	-	+	+	+	+
Indole	+	+	+	+	+	Sorbitol	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer test	+	+	+	+	+	Lactose	-	-	-	-	-
2, 3-butanediol production	+	+	+	+	+	Inulin	-	-	-	-	-
Methyl red test	-	-	-	-	-	Rhamnose	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S production	-	-	-	-	-	Xylose	-	-	-	-	-
Arginine decarboxylation	+	+	+	+	+	Raffinose	-	-	-	-	-
Lysine	-	-	-	-	-	Adonitol	-	-	-	-	-
Ornithine	-	-	-	-	-	Salicin	-	-	-	-	-
Phenylalanine deamination	-	-	-	-	-	NaCl					
Urease	-	-	-	-	-	0	+	+	+	+	+
Cholera red test	-	-	-	-	-	0.5					
Citrate (Simmons)	+	+	+	+	+	1					
Tartrate (Jordan)	+w	+	+	+	+	3	+	+	+	+	
Malonate	+w	+	+	+	+	5	+w	+w	+w	+w	
Chitin decomposition	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	10					
Hemolysis of horse blood	+	+	+	+	+						
human blood	+	+	+	+	+						
Pathogenicity for eel	+	+	+	+	+						

師が普通寒天培地 (NaCl 0.5%) を用いて細菌分離を行ない、*A. liquefaciens* (Bergey's Manual 8th ed. には *A. liquefaciens* なる種名は記載されておらず、これに従うとすれば *A. hydrophila* となるものと思われる) とともに *V. anguillarum* を分離した (城・室賀 1972)<sup>47)</sup>。

その年の4月下旬から7月上旬にかけて徳島県松茂町を中心に、隣接する大津町および川内町の養鰻池に大量発死を伴う疾病が発生した。これらの病魚の症状は様々で単一の原因で死亡したものは思われなかった。

WAKabayashi and Egusa (1972)<sup>77)</sup> はこれらの病魚の一部から新しい病原体 *Pseudomonas anguilliseptica* を分離し、これによる感染症を赤点病と名付けた。城はこれらの体表における点状出血を特徴的

病変とする赤点病病魚とは別に、従来から知られていた鱧赤病の病魚と思われるものについて細菌分離を行ない、6菌株を得た。彼はその分離株を東京大学の研究室に持ち込み、著者と共同して形態学および生化学的性状を調べた。その結果、6株のうち1株(ET-1)が表14に示したような性状を有し、*V. anguillarum* と同定された。表14には *V. anguillarum* と同定されたこの ET-1 株の形態および生化学的性状を示すとともに、後述するウナギからの他の分離株(ET-23, 24, 松茂町養殖ウナギ由来, EI-5, 6, 伊川津養殖ウナギ由来)の性状をまとめて示した。

なお ET-1 株を除く残る 5 株中 4 株は *Aeromonas* 属に分類され、1 株は分類学的位置を明らかにするには至らなかった。

ET-1 株の至適塩分および pH を知るために Difco nutrient broth を用い25°Cで6時間振盪培養し、いろいろな条件における増殖度の違いを比較してみた。その結果、発育可能塩分は0.5~4.5%(1%ペプトン水中で48時間静置培養するとNaCl 0%および5%でもわずかに発育は認められた)、至適塩分は1~2%、発育可能 pH は6~10、至適 pH は7~9であった。これらの結果は浜名湖株のものと比較すると発育可能塩分の上限がやや低くだけであとはよく一致していた。またいろいろな環境水での本菌の生存状態を知るために、滅菌した海水、淡水(池水)、および蒸留水それぞれ100 ml中に10 mg ( $10^9 \sim 10^{10}$  cells) の培養菌を懸濁させ室温(8~18°C)に放置した。その後適宜釣菌し普通寒天培地で培養することにより懸濁させた菌の生存状態を調べたところ、蒸留水中では6時間後に、淡水中では24時間後にすでに生菌が認められなくなっていたが、海水中では4週間以上生存した。例えば *Aeromonas salmonicida* は滅菌した淡水中(井戸水)で7日以上生存するとされており(木村 1970)<sup>78)</sup>、これと比較すると本菌はやはり海水性のものであると考えられる。

薬剤感受性の点では CM, TC などに感受性を示したが SI には感受性を示さなかった。

またウナギに 1 mg/100 g 魚体重、筋肉内接種したところ、水温15~18°Cの下で3日以内に死亡させた。

翌1972年、松茂町および那賀川町などの養鰻池において、赤点病の発生状況を把握することを主目的として調査を行なった際、やはりいくつかの池の病魚から *V. anguillarum* が分離された(室賀・城・矢野 1973)<sup>79)</sup>。その時の分離株 ET-23, ET-24 の性状を先の表14に示した。

この1972年の春の調査結果を例にとれば、検査した77尾(外見的に発赤などの異常が認められたものは約60%で、他は外見的には異常が認められなかった)のうち17尾(22%) (すべて体表もしくは鱧に発赤が認められた)のウナギから本菌が分離されており、すでにこの松茂町あるいは那賀川町の養鰻池には *V. anguillarum* が常在しているものと考えられた。現在までのところ、同地区の養鰻池には *Pseudomonas anguilliseptica* による赤点病、*A. liquefaciens* および *Paracolobactrum anguillimortiferum* (*Edwardsiella tarda*) による鱧赤病などいくつかの細菌性病害が存在しており、*V. anguillarum* による鱧赤病は単独で大きな被害をもたらしているわけではなく、産業的にはあまり重要視されていない。

本菌が分離された養鰻池の水の塩分についてみると、1971年に最初に分離された池の水にはほとんど塩分が含まれていなかったが(城・室賀1972)、1972年の春に調査した時には、 $Cl^-$ にして1.1~4.0%といずれも多少の塩分を含んでおり、まったく塩分を含まない池の魚から本菌は分離されなかった。従ってウナギにおける本菌感染症は赤点病の場合(室賀・城・矢野1973)と同様、多少とも塩分を含む池に発生する病気とみることができよう。

なお静岡県吉田地区の養殖ウナギの細菌性病害を調査した若林・江草(1973)<sup>80)</sup>は同地区のウナギからは *V. anguillarum* はまったく分離されなかったと報告しているが、これはその地区の養殖池の水にはほとんど塩分が含まれていないことと関係するのではないかと思われる。また1973年愛知県水試の宇野将義氏が豊橋市内の養鰻池の病魚から分離した細菌の中にも *V. anguillarum* と同定しうるのが確認されているが(宇野・室賀 1974)<sup>73)</sup>、残念ながらその池の塩分については調べられていない。

以上のように現在のところ養殖ウナギの本菌感染症は地域的にある限られた所のみ発生しているが、塩分を多少とも含むような池では今後新たに発生する可能性は十分あるものと思われる。しかしウナギはアユ

に比べると本菌に対する抵抗性が強いと思われるので、魚の健康管理に十分注意を払えば、ウナギ養殖池で本菌感染症が蔓延し大量斃死を招くようなことはあまりないものと考えられる。ヨーロッパにおけるウナギの red disease の流行の状況を見ても、多くの場合高水温時など魚にとって環境条件が悪化した時に発生しているようである。徳島県下で観察したある池では、アユにピブリオ病が発生し、かなりの死亡魚が出ている池の水をそのままヨーロッパウナギを飼育している池に注水していたが、その池のウナギには何等異常は認められなかった。これらのことから考えると（ニホンウナギとヨーロッパウナギの本菌に対する感受性はあまり差がないことが第Ⅲ章に示す実験結果からわかっている）、ウナギのピブリオ病はアユの場合程恐れる必要はないものと考えられる。

次に伊川津での海水蓄養中のニホンウナギに発生した本菌感染症の事例について簡単に説明する。愛知県渥美半島の伊川津にあった東大農学部付属水産実験所（現在は浜名湖に移転）において1961年頃からウナギの成熟促進に関する実験が行なわれ、著者が観察する機会を得た1965年にも、秋に浜名湖などで漁獲された下りウナギである大きな天然ウナギを海水中に蓄養し、ホルモン投与などがなされていた。それらのウナギにしばしば細菌性疾患と思われるものが発生し、実験上困難を生じていた。著者は1965年12月および1966年1月に数尾の病魚から細菌分離を試みた。

病魚の症状は、鰭および体表における出血を特徴とし、なかには採捕した時すでに尾部先端が欠損しているものもある。また一部の病魚には *Saprolegnia* sp. と思われるカビの着生も認められた。蓄養池の海水の  $Cl^-$  は約14%、水温は14~15°Cであった。検査したウナギの大きさは様々で、体長39.8 cm~72.6 cm、体重66 g~540 gであった。

内臓諸器官から分離・培養を行なった結果、いくつかの細菌とともに *vibrio* と思われる2株 (EI-5, EI-6) が得られ、前出の表14に示したような性状を有していたことから、*V. anguillarum* と同定された。

我が国では海水中でのウナギの養殖はほとんど行なわれていないが、一部では試験的に海水中での生養殖が行なわれ、鰭赤病のような症状を呈する病魚も出るといわれている（田中 1967）<sup>81)</sup>。このような場合には *V. anguillarum* が関与している可能性があるので今後検討する必要がある。

#### 第4節 その他の魚における本菌感染症

##### (1) 海水順化中に発生したニジマスのピブリオ病

1966年3月、静岡県水試浜名湖分場の海水流水池2面に収容されていたニジマスに細菌性疾患と思われる病気が発生し、1池（約300尾）は全滅し、もう一つの池でもかなりの斃死魚が認められた。これらのニジマスは同年2月まで淡水中で養殖されていたものを実験的に海水に順致させたものであった。同池の海水の温度は12~13°Cで  $Cl^-$  は約15%であり、魚の大きさは50~90 gであった。

病魚の症状としては、外観的には体表の一部が白っぽく変色したり、やや膨隆している程度で、発赤などはあまり認められなかった。そのように皮膚が白っぽくなった部分を切開してみると、筋肉組織には著しい出血が起きており、中には血腫がたまり筋肉組織の一部が完全に壊死している個体もあった。

水面をふらふら泳いでいた病魚の病変筋肉部、肝臓、脾臓、腎臓、および腸管から、3% NaCl 加普通寒天培地を用いて細菌分離を試みたところ、腸管以外のすべての組織から pure に1種類の菌が得られた。この分離菌 (RB-1 株) をニジマスの筋肉に接種したところ、10数時間後にその魚は死亡し、接種部位の筋肉には自然病魚と同じように著しい出血が認められた。本菌は表15に示したような形態および生化学的性状を有し、*V. anguillarum* と同定された。なお表15には本分離株 (RB-1) のほかに、後出する沼津の養殖ハマチおよびカンパチからの分離株 (YN-8, KN-11)、神西湖のボラからの分離株 (MSh-8, MSh-23)、および岡山県水試で育成した稚アユからの分離株 (PO-14~PO-58) の性状をあわせて示してある。

これらのニジマスは海水順致によりかなり stress (SNIESZKO 1974)<sup>82)</sup> を受け、抵抗力が低下していたために容易に感染が成立し大量斃死をみたものと思われる。これとまったく同じようなケースが最近イギリスでも



観察されており、海水順化過程に発生したニジマスのビブリオ病から原因菌として *V. anguillarum* が確認されている (McCARTHY et al. 1974)<sup>52)</sup>。

## (2) 沼津の養殖ハマチおよびカンパチにおけるビブリオ病

1966年3月、静岡県沼津において網生簀で養殖されていたハマチ (*Seriola quinqueradiata*) およびカンパチ (*S. purpurascens*) に体表の潰瘍病変を特徴とする細菌性疾病と思われる病気が発生し、病魚の腎臓および肝臓などから6菌株を分離した。当時の同水域の水温は12~14℃であった。分離菌の性状を調べた結果、2株 (ハマチからの YN-8, カンパチからの KN-11) が先の表15に示したような性状を有し、*V. anguillarum* と同定された。他の4株は *Vibrio* 属のものではあったが、gelatin 分解性、indole 産生能、および sucrose 利用性が陰性であり、また lactose を利用し、さらにウナギに対する病原性が認められなかったことから別種と判断した。

検査個体数が少なかったこともあるが、いろいろな菌が分離されたことから、それらのハマチあるいはカンパチの斃死が本菌感染によるものであったかどうかは疑わしかった。なおこの時検査した病魚の肝臓にはいわゆる脂肪肝のような変性が認められ、また網生簀には付着物が多く水の交流が阻害されていたことから考えると、冬期の投餌および環境悪化が斃死を招いた主要原因と思われた。

このほか養殖ハマチについては、1967年7月に香川県下において、また同年8月に三重県下においていくつかの養殖場において多数の病魚の細菌検査を行なったが、*V. anguillarum* が確認された例はまったくなかった。

## (3) 神西湖のボラなどにおけるビブリオ病

1972年7月頃から翌年3月頃にかけて島根県北西部にある神西湖 (やや汽水性) において、ナマズ (*Parasilurus asotus*)、タイワンドジョウ (ライギョ *Channa maculata*) およびボラ (*Mugil cephalus*) に体表における潰瘍病変を特徴とする細菌性疾病が発生し、1972年秋に島根県水試の鈴木博也氏が細菌分離を行ない、多数の菌株を得た。著者はそれらの分離菌を検査する機会を得、性状検査を行なったところ、ボラから分離された2株 (MSh-8 および MSh-23) は先の表15に示したような性状を有し、*V. anguillarum* と同定された (鈴木 1974)<sup>83)</sup>。

しかしこの場合も先の沼津のハマチなどの場合と同様、多数の菌種に混って本菌が分離されており、本菌感染症と呼べるようなものが存在したかどうかは疑問である。

## (4) 海水中での種苗生産の過程におけるアユのビブリオ病

岡山県水産試験場では数年前からアユの種苗生産を行なっているが、海水中で育成している稚アユに毎年4月頃になると、海産稚アユのビブリオ病と同じ症状を呈する病気が発生し、種苗生産における大きな問題点の一つになっている。その原因については同水試の調査で *V. anguillarum* 感染によるものであろうということのはほぼ確かめられていたが、著者は1973年5月および6月にそれらの病魚から7菌株 (PO-14, 15, 16, 18, 19, 20, 21) を分離し、翌1974年に同水試の杉山瑛之氏が分離した4株 (PO-54, 55, 56, 58) を合わせて検査に供した。その結果、それらの分離株は先の表15に示したような性状を有し、*V. anguillarum* と同定された。なお1973年の分離株7株はいずれも indole 産生能陰性であり、その点では同年徳島あるいは岡山県などの養殖アユ病魚から得られた株と同じであったが、1974年の分離株はすべて indole 産生能陽性であった。

この種苗生産の過程におけるアユのビブリオ病は発生する時期がかなりはっきりしており、また環境の面でも天然水域に比べればかなりいろいろな要素を把握しやすいので、ビブリオ病の発生機序の研究には絶好の材料になると思われる。

## 第5節 ま と め

以上述べてきたように、*V. anguillarum* はアユをはじめ、ウナギ、ニジマス、ハマチ、カンパチおよび

ボラから分離された。しかし養殖対象魚として特に問題になるのはアユにおけるピブリオ病ということになる。養殖ウナギにおけるピブリオ病は今のところその発生が一部の地区に限られており、あまり重要ではない。また著者がニジマスにおける本菌感染症を確認したのは1例にすぎないが、*V. piscium* var. *japonicus* が *V. anguillarum* の synonym とされた現在では、ニジマスにおける本菌感染症も重要なものとなるわけである。著者はニジマスのピブリオ病の原因菌には *V. anguillarum* のほかにこれとはいささか性状を異にするものもあると考えている。この点については次章の分類のところであらためて述べることにし、ここではアユのピブリオ病を中心にまとめてみる。

*V. anguillarum* はすべての魚を冒すわけではなく、あるいくつかの種類魚を選択的に冒すものと考えられる。このことは今までの自然感染例を見てもある程度推測しうるし、また第Ⅲ章で示す感受性の比較実験結果からも裏付けられる。本菌による流行病が認められたという点からいえば、本菌に対し高い感受性を持つものとしてはまず第一にアユ、それに次いでニジマスを挙げることができる。そしてこの2種に比べるとやや感受性は低いと考えられるが、一応ある地域で継続して本菌感染症が存在していることから、ニホンウナギを感受性を有する魚種として付け加えることができる。

次には感染体である本菌は先に述べたように淡水中では生存しえないことから考えれば、本菌感染症は海水ないし汽水中の魚、もしくはそのような水域で生活した経歴をもつ魚にのみ発生することになる。もちろん先に実験結果を示したように6時間程度の短時間であれば淡水中でも生存可能であるから、養殖場のような魚の密度の高いところでは容易に伝染しうると考えられるが、その場合でも最初に発病する個体はやはり別のところで感染を受けたものと考えられる。このような海水とのつながりという面からみれば、海産稚アユおよびシラスウナギはともに十分感染の機会を持っているし、徳島県松茂町付近の養殖池のウナギの場合は継続的にある程度塩分があるような環境におかれており常に感染の可能な状態下におかれており見ることができると見られる。しかし琵琶湖産アユの場合は海水とのつながりという面からはまったく説明ができない。餌としての海産魚からという経路も考えられるが、すべての池の場合をそれで説明することはできない。この琵琶湖産アユのピブリオ病、あるいはニジマスにおけるピブリオ病を考えると、*V. anguillarum* が何等かの形で淡水域に定着している可能性が考えられるが、この点については別に検討されねばならない。

もう一つ考慮しなくてはならないのは、本菌は obligate pathogen ではなく facultative pathogen (条件性病原体) であるということである (EVELYN, 1971)<sup>5)</sup>。すなわち本菌と本菌に対し感受性を有する魚が接触すれば必ず感染が成立し発病に至るといったものではないということである。魚側の状態が悪く、抵抗力が低下するとか、環境が変化し菌が増殖するとかの条件があってはじめて発病が起こるのである。魚側の状態が悪くなるような条件としては、水温あるいは塩分などの環境要因が急激に変化するとか、物理的なショックを与えられるとか、水質が悪化するなどが最も典型的なものとして考えられる。この点において海産稚アユあるいはシラスウナギは採捕および運搬という物理的ショックを受け、淡水順化という環境変化による生理的ショックを受ける要素を有していることで問題となるわけである。特に稚アユはウナギに比べるとそのような物理的あるいは環境的影響に対して著しく敏感であり弱い魚といえよう。

以上の要因をまとめてみると、本菌感染症に最もかかり易い魚とは、本菌に対し高い感受性を有すること、海水中で生活する時期があること、採捕および淡水順化あるいは運搬というような物理的影響および環境の急変という悪条件にさらされ、かつそのような影響を強く受ける弱い魚であること、などの諸要因を備えているものということになる。そしてそれらの要因をすべて備えているものといえば海産稚アユが挙げられる。

また浜名湖においてみられた海水順化過程に発生したニジマスのピブリオ病の場合、あるいは伊川津の実験所での海水蓄養ウナギに発生したピブリオ病の場合も、ほぼこれらの条件を満たしていた例とみることができよう。これらに対し、沼津の養殖ハマチの例や神西湖の天然ボラの例は、上記の条件のうちいくつかの条件がたまたま重なったために、本来あまり本菌に対し感受性を有していない魚種に発生した例とみることができよう。

このように見てくると、浜名湖などの海産稚アユに本病が多発するのはむしろ必然的とさえ言えよう。も

もちろん自然減耗についても検討しなくては断言できないが、現在のような状況では多少技術的な改良を加えても、海産稚アユを種苗化することはかなりの減耗を伴ない、資源の有効利用という点からみて大いに問題があると思われる。

また養殖過程におけるアユのピブリオ病についてみても、海産稚アユにおける問題の延長とみることができ。すなわち淡水順化の過程を薬剤などの助けを借り、なんとか乗り切って養殖池に移したものが、再び魚が抵抗力を失うような条件を与えることにより、一部の保菌魚を発病させ、短期間のうちに池全体に病気を広げてしまうと考えられる。従って保菌している可能性のない種苗を用いることが望ましいわけであるが、たとえ保菌していても他の条件を成立させないようにすれば、すなわち魚の健康状態を良く保っておけば、本病の発生はかなり防げるものと思われる。薬に依存した予防あるいは治療対策には様々な問題があることはすでに一部で実証されているし、今後は魚の健康状態を維持しうる養殖方法というものを検討し直すことが最大の課題と考えられる。

なお世界的にみても、本菌感染症が多発する魚種が、ウナギおよびサケ科魚類に限られていることをみれば、高い感受性を有するとともに先にあげた条件がととのい易い魚種に発生しているとみることができ。

## 第Ⅱ章 *Vibrio anguillarum* の性状および分類学的考察

1907年 BERGMAN はスウェーデンの西海岸におけるウナギの疾病を研究し、病魚の軀幹部に発赤腫脹性の患部が観察されたことからこの疾病を rote Beulenkrankheit と呼び、病因は一種の *Vibrio* であることを明らかにし、それを *Vibrio anguillarum* と命名した (NYBELIN 1935a)<sup>43)</sup>。なおこれより以前にイタリアにおけるウナギの red disease を研究した CANESTRINI (1892) は病原菌を *Bacillus anguillarum* として記載しているとのことである (保科 1962)<sup>76)</sup>。

その後 BRUON and HEIBERG (1932) がデンマークのウナギの Rotseuche を研究し、病原菌を *V. anguillcida* n. sp. と名付けたが、SCHÄPERCLAUS (1934)<sup>42)</sup> はそれを *V. anguillarum* と同一種であると見、以後 *V. anguillcida* なる種名は使われることがなかったようである。

*V. anguillarum* に関する知見はまず BERGMAN (1909) により与えられ、その後 SCHÄPERCLAUS (1934) および NYBELIN (1935a) らによって付け加えられはしたが、生化学的性状の記載が十分でなかったためか Bergey's manual of determinative bacteriology 第7版 (1957)<sup>8)</sup> には記載されなかった。本種について最初に最も詳しい性状記載をしたのは SMITH (1961)<sup>66)</sup> であろう。

SMITH (1959<sup>84)</sup>, 1961) は英国スコットランドの Dee 川河口の *Salmo trutta* の病魚からはほとんど pure な形で一種の vibrio を分離し、Torry Research Station より取り寄せた *V. anguillarum* NCMB 6 (BAGGE and BAGGE 1956 がデンマーク沿岸のタラから分離した株) の性状と比較検討した結果、彼女自身の分離菌を *V. anguillarum* と同定した。彼女はその分離株が NYBELIN (1935a) の示した A, B いずれの type にもあてはまらないことから、新たに C type を提案した。また彼女はこの時、保科がニジマスから分離した *V. piscium* var. *japonicus* および HODGKISS and SHEWAN (1950)<sup>14)</sup> がカレイ (*Pleuronectes platessa*) から分離した *V. ichthyodermis* (これは最初 *Pseudomonas ichthyodermis* として報告され、後に *Vibrio* 属に移されたことはすでに述べた) についても比較検討し、*V. piscium* var. *japonicus* は *V. anguillarum* に含めうると述べている。前章で述べたように著者が浜名湖産稚アユから分離した菌を *V. anguillarum* と同定した拠り所もこの SMITH の報告にあった。

その後 ROSS et al. (1968)<sup>6)</sup> がアメリカ合衆国アリゾナ州の淡水養殖ニジマスから *V. anguillarum* を分離し、本菌種が Bergey's Manual に登載されるべきであると主張した。1969年には我が国からも江草<sup>85)</sup> により本菌に関する総説が出され、さらに1971年にはカナダの EVELYN<sup>5)</sup> およびスコットランドの HENDRIE et al.<sup>9)</sup> により本菌の定義に関するかなり具体的な提案がなされた。その結果、新しい Bergey's Manual 第8版 (1974)<sup>10)</sup> に本菌種が収められ、細菌分類学上ようやく認められるに至ったわけである。

ただ新しい点として注目しなければならないのは、HENDRIE et al. が提案していたように、Bergey's Manual 第8版に記載された *V. anguillarum* は従来から *V. anguillarum* と呼ばれていたものはもとより、*V. ichthyodermis*, *V. piscium* および *V. piscium* var. *japonicus* を合わせたものとして記載されているということである。

さらに *V. anguillarum* は人間の病原菌でありまた魚からも分離される *V. parahaemolyticus* (腸炎ビブリオ) およびその近縁種である *V. alginolyticus* との関係が問題にされ、比較検討がなされてきている。

このような状況のもとに、現在まで著者が種々の病魚から分離してきた *V. anguillarum* 61株 (他の研究者が分離し著者が同定したものも一部含む) の性状を整理するとともに (このうちの31株についてまとめたものを過去に報告した、室賀・江草 1973<sup>86)</sup>、坂崎 (1967)<sup>63)</sup> の検査した *V. anguillarum* 7株 (彼の報告中では *V. anguillarum* 3株、*V. piscium* var. *japonicus* 2株、*V. ichthyodermis* 2株となっている) の性状および比較的最近出された外国からの報告にある分離株の性状を比較しながら、Bergey's Manual 第8版に記載された *V. anguillarum* の type description について検討を行なってみた。

また今まで我が国で報告された魚類病原性 vibrios との比較をするとともに、最後に *V. parahaemolyticus* および *V. alginolyticus* との比較検討を試みた。

## 第1節 各種病魚より分離した *V. anguillarum* の性状

### (材料および方法)

性状検査に供した *V. anguillarum* 61株を海水中の病魚から分離したもの (以下海水株という) 31株と、淡水もしくはわずかに塩分を含む汽水中の病魚から分離した株 (以下淡水株という) 30株とに分け、それぞれの由来を表16および表17に示した。

表16に示したように、海水株は1965年から1974年にかけて、浜名湖 (弁天島)、利根川河口 (波崎) および伊豆の海産稚アユから分離したもの、岡山県水試の人工孵化育成アユから分離したもの、愛知県伊川津にあった東大水産実験所の海水蓄養ウナギから分離したもの、静岡県水試浜名湖分場の海水蓄養ニジマスから分離したもの、および沼津の養殖ハマチとカンパチから分離したもの、計31株である。また淡水株は表17に示したように、1968年から1973年にかけて、滋賀県彦根、長野県佐久、徳島県阿南および日和佐、および岡山県総社の養殖アユから分離したもの、徳島県松茂の養殖ウナギから分離したもの、および島根県神西湖 (汽水) のボラから分離したもの、計30株である。

多くの項目についての性状検査は各株分離後、1~2カ月以内に行なわれたが、いくつかの項目については後に追加的に行なわれた。なお本章第3節に示す *V. parahaemolyticus* との性状比較のために PB-3 (1966年分離) など5株について1971年に再検査したが、その結果は分離直後に行なわれた実験結果とまったく一致していた。

性状検査は、多くの項目について市販の検査培地を用い、細菌学実習提要 (伝染病研究所学会編 1958)<sup>87)</sup>、臨床細菌検査の実際 (SCHAUB, 坂崎・波岡訳 1964)<sup>88)</sup>、腸炎ビブリオ (坂崎 1964)<sup>62)</sup>、その第II集 (坂崎 1967)<sup>63)</sup>、Identification methods for microbiologists, part A (HAYWARD 1966)<sup>89)</sup>、A guide to the identification of the genera of bacteria (SKERMAN 1967)<sup>71)</sup> などにある方法に従って行なった。いくつかの項目についての検査方法を以下に示す。

Sensitivity to O/129 (vibrio static agent): 坂崎 (1964) の記載に従い、2, 4-diamino-6-7-diisopropyl pteridine 150 mg を ethyl alcohol・ethyl ether 等量混合液 10ml に溶解し、これを直径 6.5 mm の円形濾紙にしみ込ませた後、37°C で乾燥して freezer 中に保存したものを disc として使用した。

Sensitivity to novobiocin and penicillin: novobiocin の場合は 2 mcg disc (栄研) を使用し、peni-

Table 16. Strains of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased fishes in sea water

Strain	Host fish	Location	Year
PB-1	Ayu	Bentenjima, Shizuoka	1965
PB-3	"	"	1966
PB-5	"	"	"
PB-6	"	"	"
PB-7	"	"	"
PB-15	"	"	"
PB-26	"	"	1967
PB-27	"	"	"
PB-28	"	"	"
PB-29	"	"	"
PB-37	"	"	"
PH-1	"	Hazaki, Ibaragi	"
PH-2	"	"	"
PH-4	"	"	"
PI-6	"	Izu, Shizuoka	1970
PO-14	"	Ushimado, Okayama	1973
PO-15	"	"	"
PO-16	"	"	"
PO-18	"	"	"
PO-19	"	"	"
PO-20	"	"	"
PO-21	"	"	"
PO-54	"	"	1974
PO-55	"	"	"
PO-56	"	"	"
PO-58	"	"	"
EI-5	Eel	Ikawazu, Aichi	1966
EI-6	"	"	"
RB-1	Rainbow trout	Bentenjima, Shizuoka	"
YN-8	Yellow tail	Numazu, Shizuoka	"
KN-11	Kampachi	"	"

Ayu (*Plecoglossus altivelis*), Eel (*Anguilla japonica*), Rainbow trout (*Salmo gairdneri*), Yellow tail (*Seriola quinqueradiata*), Kampachi (*S. purpurascens*).

cillin の場合は 10 u disc (栄研) を使用して判定した。

2, 3-butanediol production : BULLOCK (1961)<sup>90)</sup> の記載に従い,  $K_2HPO_4$  を 0.5% 含む nutrient broth 4.5 ml に滅菌した glucose 溶液 (15%) を 0.5 ml 加えたものを培地とし, 48 時間培養後に 2.3% 過沃素酸溶液を 1 ml 加え, よく振ってから 30 分間室温に放置し, さらに piperazine 溶液 (蒸留水 99 ml に piperazine hexahydrate 25g を溶かし, 87% ギ酸を 1.3 ml 加えたもの) を 1.5 ml 加え, 最後に 4% sodium nitroprusside 溶液を 0.5 ml 加え, 直後にみられる青色の発色で判定した。

Decarboxylase for arginine, lysine and ornithine : A guide to the identification of the genera of bacteria に記されている Falkow method に従い, Bacto-peptone 5g, 酵母エキス 3g, glucose 1g および brom cresol purple (1.6% 溶液) 1ml を 1 l の蒸留水に溶かしたものを基礎培地とし, arginine, lysine および ornithine をそれぞれ 0.5% になるように加えた培地で培養し検査を行なった。なお arginine の検査の際, 培養後に ammonia の有無を調べたところ ammonia が検出されたので, decarboxylase

Table 17. Strains of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased fishes in freshwater

Strain	Host fish	Location	Year
PSh-1	Ayu	Hikone, Shiga	1968
PSh-2	"	"	1969
PSh-8	"	"	1970
PSh-9	"	"	"
PSh-10	"	"	"
PNa-1	"	Saku, Nagano	1969
PT-3	"	Anan, Tokushima	1973
PT-4	"	"	"
PT-5	"	"	"
PT-8	"	"	"
PT-9	"	"	"
PT-10	"	"	"
PT-11	"	"	"
PT-12	"	"	"
PT-14	"	"	"
PT-15	"	"	"
PT-16	"	"	"
PT-17	"	"	"
PT-18	"	"	"
PT-19	"	Hiwasa, Tokushima	"
PT-22	"	Anan, Tokushima	"
PT-23	"	"	"
PT-24	"	"	"
PT-25	"	"	"
PH-5	"	Soja, Okayama	"
ET-1	Eel	Matsushige, Tokushima	1971
ET-23	"	"	1972
ET-24	"	"	"
MSh-8	Grey mullet	Jinzaiko, Shimane	"
MSh-23	"	"	"

Ayu (*Plecoglossus altivelis*), Eel (*Anguilla japonica*), Grey mullet (*Mugil cephalus*)

より dihydrolase の方が作用していると考えられたが、準拠した text では decarboxylase test となっていたのでここでは一応 arginine の場合も decarboxylase という表現をとった。

Chitin decomposition: 「腸炎ヒブリオ」中の柳沢 (1964)<sup>91)</sup> の記載に従い、Campbell の基礎培地 ( $K_2HPO_4$  1 g,  $MgSO_4$  0.5 g,  $CaCl_2$  0.1 g, 蒸留水 1 l) に chitin を加えた培地で 2 週間培養し判定した。

Hemolysis of horse and human blood (TS): 5% 血液加 Trypto-Soy 寒天培地を用い、2 日間培養し判定した。

Hemolysis of human blood (Azuma): 5% ヒト血液加吾妻変法培地 (神奈川現象検査培地) を用いて判定した (LECLAIR et al. 1970)<sup>92)</sup>。

なお海水株を検査する場合には NaCl 濃度を 3% にした培地を用い、淡水株を検査する場合には NaCl を特に加えないか、または 0.5% の濃度になるように加えた培地を使用し、培養温度はいずれの場合も 25~28℃ とした。

塩分耐性: 1% ペプトン水 (pH 7.0~7.2) に所定の濃度になるように NaCl を加えた培地で 48 時間静置

培養し、発育を肉眼的に観察し判定した。

病原性試験：普通栄養寒天培地にて25~28℃、48時間培養したものを滅菌食塩水 (NaCl 0.85%) に懸濁させ、所定の菌量をニホンウナギの体側筋肉部へ接種した。接種量は1 mg (湿菌重量) / 100 g (魚体重) とし、水温15~25℃の下で1週間以内にウナギを死亡させた場合、病原性を有すると判定した。

### (結果および考察)

この61菌株は海水中および淡水中の病魚から分離されたわけであるが、その魚種をみると、ハマチおよびカンパチという海産魚を除けば、アユ、ウナギ、ニジマスおよびボラという海水および淡水いずれの水域にも生活している、あるいは生活しうる魚種に限られていることが興味を引く。本研究ではアユが主たる対象魚となっているが、ここではその由来する魚種に関係なく分離菌を海水株と淡水株に分けてその性状を検討してみた。海水株31株の一般性状を表18に、糖分解能を表19に示し、淡水株30株の一般性状を表20に、糖分解能を表21にそれぞれ示した。更にそれらの結果を表22にまとめてみたが、ここでは各試験の結果を海水株および淡水株、更にはすべての株を合わせたものとして+もしくは-に表示し、括弧内にはそれぞれの表示にあるような反応を示した株数の検査株数に対する割合 (percentage) を示した。ここではこの表22にまとめた結果を中心に論議を進めることにする。

一般性状において、すべての株に共通している性状をまとめてみると以下ようになる。本菌は短桿菌 (長さ1~3 μ) で1本の極鞭毛を有し活発に運動し、グラム陰性で、普通栄養寒天培地上で正円形の比較的透明なコロニーを形成し、游走 (swarming) することはない。

Glucose を酵素的に利用し gas は産生しない。Oxidase (GABY and HADLEY および KOVACS の方法による) を産生し、vibrio static agent (O/129) および novobiocin に感受性を有し、penicillin には感受性を示さない。ただし沼津のハマチから分離された YN-8 株およびカンパチから分離された KN-11 株は penicillin に対しごく弱い感受性を示した。また表22には示されていないが、他の抗生物質やサルファ剤に対しては前章第2節で示したように、1968年以前の分離株は chloramphenicol と tetracycline に高い感受性を示し、sulfisoxazole に対しても多くの株が感受性を有していたが、1973年の分離株は chloramphenicol および tetracycline に対しても感受性を示さないものが認められ、sulfisoxazole に対してはすべての株が感受性を示さなかった。

Catalase を有し、litmus milk をペプトン化もしくは凝固し、硝酸塩を亜硝酸に還元し、gelatin を層状もしくは漏斗状に液化する。Voges-Proskauer 試験 (acetyl-methylcarbinol = acetoin 産生) 陽性で、2, 3-butanediol を産生し、SIM 培地で硫化水素を産生しない。

Arginine 脱炭酸酵素 (脱水素酵素) を有し、lysine および ornithine 脱炭酸酵素は有しない。多くの研究者は arginine 脱水素酵素として結果を記載しており、本研究においても一部の株を THORNLEY 1960<sup>93)</sup> の方法によって検査したところ脱水素酵素を有することが確かめられたので、他の研究報告との比較の際には arginine 分解という表現をとった (表23参照)。Phenylalanine 脱アミノ酸反応は陰性で、尿素を分解しない。

酒石酸塩 (Jordan 培地) を利用し、澱粉を加水分解する。ウマおよびヒトの血液に対し溶血性が認められ神奈川現象 (吾妻変法培地におけるヒト血液溶血性) についてはごく少数の株について調べたところ陽性の株と陰性の株とがあった。

また大多数の株はクエン酸塩 (Simmons) を利用し、cholera red 反応および methyl red 反応は陰性で、マロン酸塩を利用し、chitin を分解しない。Indole 産生については全体的には陽性株が多いが、陰性株もかなり存在する。

ニホンウナギに対しては、検査した45株中44株が病原性を示し、1株 (PT-15 株) のみが、接種したウナギに接種部位の膨隆などの変化を引き起こしたが死亡させることなく、病原性陰性と判定された。

次に糖分解能についてみると、11の糖に対してはすべての株で反応が一致している。すなわち、dextrin, fructose, glucose, maltose, mannose, starch および sucrose を分解し、 adonitol, dulcitol, lactose および xylose を分解しない。それ以外の13の糖に対しては株によって反応が異なるが、90%以上の株は、 trehalose および mannitol を分解し、 rhamnose, inulin, salicin および inositol を分解しない。 Raffinose, glycogen, sorbitol, arabinose, galactose, cellobiose および glycerin に対しては株により反応はまちまちである。

Table 18. Characteristics of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased fishes in sea water

Character	Strain
	PB-1
	PB-3
	PB-5
	PB-6
	PB-7
	PB-15
	PB-26
	PB-27
	PB-28
	PB-29
	PB-37
	PH-1
	PH-2
	PH-4
	PH-6
	PO-14
	PO-15
	PO-16
	PO-18
	PO-19
	PO-20
	PO-21
	PO-54
	PO-55
	PO-56
	PO-58
	EI-5
	EI-9
	RB-1
	YN-8
	KN-11
Single polar flagellum	+
Motility	+
Gram stain	+
Swarming	+
Fermentation of glucose	+
Gas from glucose	+
Oxidase	+
Cytochrome	+
Kovacs	+
Sensitivity to 0/129	+
Novobiocin	+
Penicillin	+
Catalase	+
Litmus milk peptonization	+
Nitrate reduction	+
Gelatin liquefaction	+
Voges-Proskauer test	+
2, 3-butanediol production	+
H <sub>2</sub> S production	+
Arginine decarboxylation	+
Lysine	+
Ornithine	+
Phenylalanine deamination	+
Urease production	+
Tartrate (Jordan)	+
Starch hydrolysis	+
Hemolysis of horse blood	+
human blood	+
human blood in Azuma's medium	+
Citrate (Simmons)	+
Cholera red test	+
Methyl red test	+
Malonate	+
Chitin decomposition	+
Indole production	+
Pathogenicity for eel	+





Table 21. Carbohydrate utilization and NaCl-tolerance of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased fishes in freshwater

Test	Strain	PSh-1	PSh-2	PSh-8	PSh-9	PSh-10	PNa-1	PT-3	PT-4	PT-5	PT-8	PT-9	PT-10	PT-11	PT-12	PT-14	PT-15	PT-16	PT-17	PT-18	PT-19	PT-22	PT-23	PT-24	PT-25	PH-5	ET-1	ET-23	ET-24	MSH-8	MSH-23					
		Acid from	Dextrin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	Mannose		+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	Starch		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	Sucrose	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	Adonitol																																			
	Dulcitol																																			
	Lactose																																			
	Xylose	-	-																																	
	Trehalose							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	Rhamnose			-	-																															
	Inulin																																			
	Salicin																																			
	Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	Inositol		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Raffinose		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Glycogen							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Sorbitol		-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Arabinose			+	+	+	+																													
	Galactose	-	-	-	-	-	-																													
	Glycerin		-					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Cellobiose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
NaCl	0 %	+w	+	-	-	+	+w	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	1		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	7	-	-	+w	+w	+w	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Table 22. Characteristics of *Vibrio anguillarum* studied

General character	31	30	61	Carbohydrate utilization & NaCl-tolerance	31	30	61
	strains (sea water)	strains (freshwater)	strains		strains (sea water)	strains (freshwater)	strains
Single polar flagellum	+ (100)*	+ (100)	+ (100)	Dextrin	+ (100)	+ (100)	+ (100)
Motility	+ (100)	+ (100)	+ (100)	Fructose	+ (100)	+ (100)	+ (100)
Gram stain	- (100)	- (100)	- (100)	Glucose	+ (100)	+ (100)	+ (100)
Swarming	- (100)	- (100)	- (100)	Maltose	+ (100)	+ (100)	+ (100)
Fermentation of glucose	+ (100)	+ (100)	+ (100)	Mannose	+ (100)	+ (100)	+ (100)
Gas from glucose	- (100)	- (100)	- (100)	Starch	+ (100)	+ (100)	+ (100)
Oxidase Cytochrome .	+ (100)	+ (100)	+ (100)	Sucrose	+ (100)	+ (100)	+ (100)
Kovacs	+ (100)	+ (100)	+ (100)	Adonitol	- (100)	- (100)	- (100)
Sensitivity to 0/129	+ (100)	+ (100)	+ (100)	Dulcitol	- (100)	- (100)	- (100)
Novobiocin	+ (100)	+ (100)	+ (100)	Lactose	- (100)	- (100)	- (100)
Penicillin	- ( 92)	- (100)	- ( 96)	Xylose	- (100)	- (100)	- (100)
Catalase	+ (100)	+ (100)	+ (100)	Trehalose	+ ( 93)	+ (100)	+ ( 97)
Litmus milk peptonization	+ (100)	+ (100)	+ (100)	Rhamnose	- ( 94)	- (100)	- ( 97)
Nitrate reduction	+ (100)	+ (100)	+ (100)	Inulin	- (100)	- ( 91)	- ( 95)
Gelatin liquefaction	+ (100)	+ (100)	+ (100)	Salicin	- (100)	- ( 91)	- ( 95)
Voges-Proskauer test	+ (100)	+ (100)	+ (100)	Mannitol	+ ( 87)	+ ( 97)	+ ( 92)
2, 3-butanediol production	+ (100)	+ (100)	+ (100)	Inositol	- ( 87)	- ( 93)	- ( 90)
H <sub>2</sub> S production	- (100)	- (100)	- (100)	Raffinose	- (100)	+ ( 59)	- ( 72)
Arginine decarboxylation	+ (100)	+ (100)	+ (100)	Glycogen	- ( 52)	+ ( 95)	+ ( 68)
Lysine	- (100)	- (100)	- (100)	Sorbitol	+ ( 73)	+ ( 62)	+ ( 66)
Ornithine	- (100)	- (100)	- (100)	Arabinose	+ ( 61)	- ( 79)	- ( 58)
Phenylalanine deamination	- (100)	- (100)	- (100)	Galactose	+ ( 87)	- ( 77)	+ ( 56)
Urease production	- (100)	- (100)	- (100)	Glycerin	- ( 81)	+ ( 79)	- ( 55)
Tartrate (Jordan)	+ (100)	+ (100)	+ (100)	Cellobiose	+ ( 68)	- ( 66)	+ ( 52)
Starch hydrolysis	+ (100)	+ (100)	+ (100)				
Hemolysis of horse blood	+ (100)	+ (100)	+ (100)	NaCl			
human blood	+ (100)	+ (100)	+ (100)	0 %	- ( 74)	- ( 69)	- ( 72)
human blood in Azuma	+ ( 50)	+ (100)	+ ( 60)	0.5	+ (100)	+ (100)	+ (100)
Citrate (Simmons)	+ ( 97)	+ (100)	+ ( 98)	1	+ (100)	+ (100)	+ (100)
Cholera red test	- ( 97)	- ( 97)	- ( 97)	3	+ (100)	+ (100)	+ (100)
Methyl red test	- (100)	- ( 87)	- ( 93)	5	+ (100)	+ (100)	+ (100)
Malonate	+ ( 74)	+ ( 90)	+ ( 82)	7	+ ( 61)	- ( 80)	- ( 61)
Chitin decomposition	- ( 74)	- (100)	- ( 75)	10	- (100)		- (100)
Indole production	+ ( 77)	- ( 63)	+ ( 57)				
Pathogenicity for eel	+ (100)	+ ( 95)	+ ( 98)				

\* ( ) = % having reactions as given

塩分耐性の点では、NaCl 0% (ペプトン水そのもののNaCl濃度は測定していないので、正確に言えば、NaClを加えないペプトン水ということになる)では約4分の3の株が発育せず、0.5%から5%までの範囲ですべての株が発育し、特に1~3%において最もよく発育する。NaCl 7%になると海水株では比較的多くの株が発育し、淡水株では逆に発育しない株が多く、全体を合わせると発育するものとしめないものとが半々程度になる。表にはNaCl 10%の結果を示したが、8%以上ですべての株が発育不可能と思われた。

第1章でPB-1株(浜名湖産稚アユより分離)などを用いての実験結果に示されたように、発育可能pHは6~10で、発育至適pHは7~8である。発育可能温度は15~37℃で、発育至適温度は30℃前後にある。

以上が著者が分離してきた*V. anguillarum*の性状であるが、他の研究者の報告との比較は次節に回すとし、ここでは海水株と淡水株の違いについて検討してみる。

すでに述べてきたように、一般性状の多くの項目において海水株と淡水株の性状は一致している。やや詳しくみるならば、クエン酸塩利用では海水株にのみ陰性株(1株)があり、methyl red反応においては淡水株にのみ陽性株(4株)があり、さらにindole産生能では海水株に陽性株が多く淡水株に陰性株が多い点の違いとして挙げる。しかしながら、クエン酸およびmethyl redの点では上記のような反応を示す株はむしろ例外的なものであり、海水株と淡水株の違いとみることはできない。またindoleの点については海水株と淡水株の違いではなく、1973年の分離株のみが陰性であったための違いである。Chitin分解においては海水株にのみ陽性株(微陽性株6株)があるが、その数は少なく、また淡水株についてはほとんど調べられていないこともあり、やはりこの点も海水株と淡水株の違いとすることはできない。さらにウナギに対する病原性の点でも差はなく、一般性状においては海水株と淡水株の差はないものとみることができる。

次に糖分解能についてみると、dextrinからxyloseまでの11の糖に対する反応は前述の如くすべて一致しており、それ以外のいくつかの糖の分解において海水株と淡水株の間にわずかな違いがみられる。例えば、海水株にのみtrehalose陰性株(1株)およびrhamnose陽性株(2株)があり、淡水株にのみinulin陽性株(2株)およびsalicin陽性株(2株)がある。また海水株の多くはraffinose陰性(100%)、glycogen陰性(52%)、arabinose陽性(61%)、galactose陽性(87%)、glycerin陰性(81%)、cellobiose陽性(68%)であるのに対し、淡水株の多くはこれと逆に、raffinose陽性(59%)、glycogen陽性(95%)、arabinose陰性(79%)、galactose陰性(77%)、glycerin陽性(79%)、cellobiose陰性(66%)となっている。特にgalactose(海水株+87%、淡水株-77%)およびglycerin(海水株-81%、淡水株+79%)に対する反応が比較的高い割合で相反するとみることができ、いずれの場合も90%以上の株が相反する反応を示すわけではないので、糖分解能においても海水株と淡水株とを区別しようような違いはないと判断した。

塩分耐性においては7%における発育にわずかな違いが認められ、海水株の多く(61%)のものは発育可能であるのに対し、淡水株の多く(80%)は発育不可能となっている。

なお、海水株の場合は通常NaClを3%含んだ培地を分離および維持に使用していたのに対し、淡水株の場合はNaCl 0.5%の培地を用いていたので、それによる影響もあるかもしれないと考え、異なる塩分濃度の培地で継代培養することにより、塩分耐性が変化するかどうかを調べてみた。その結果、継代培養により塩分耐性が大きく変化するようなことはなく、海水株と淡水株の塩分耐性の差は維持されることがわかった(室賀・属1974)<sup>94</sup>)。従ってやはりNaCl 7%における塩分耐性に関しては、海水株と淡水株との間に若干の差があるものと考えられた。

以上を総合すると、海水株と淡水株の間にはNaCl 7%における塩分耐性、galactoseおよびglycerin分解性などにわずかな違いが認められるが、全体的にみればこの両者を特に区別する必要はないものと判断された。

## 第2節 分類学的考察

前節で示してきた著者の分離した *V. anguillarum* の性状を Bergey's manual of determinative bacteriology 8th ed. (1974) における本菌の type description と比較するとともに、本菌の代表的な株についての坂崎 (1967) の検査結果および比較的最近外国から報告されたものの性状を比較することにより、*V. anguillarum* に関する考察を行なった。

## (材料および方法)

性状比較のために引用した報告中の菌株由来を以下に説明する。

坂崎(1967)<sup>63</sup> : NCMB 6 = ATCC 19264... BAGGE and BAGGE (1956)<sup>67</sup> がデンマークのタラ *Gadus callarias* 病魚より分離, NCMB 828 = ATCC 14181, NCMB 829... SMITH (1961)<sup>66</sup> がスコットランドの *Salmo trutta* 病魚より分離, NCMB 571, NCMB 572... (*V. piscium* var. *japonicus*), HOSHINA (1957)<sup>16</sup> がニジマス *Salmo gairdneri* 病魚より分離, NCMB 407, NCMB 1291... (*V. ichthyodermis*), NCMB 407 は HODGKISS and SHEWAN (1950)<sup>14</sup> がスコットランドのカレイ *Pleuronectes platessa* 病魚より分離。

ROSS et al. (1968)<sup>6</sup> : アメリカ合衆国アリゾナ州の淡水養殖ニジマス病魚より分離。

CISAR and FRYER (1969)<sup>3</sup> : アメリカ合衆国オレゴン州の海水飼育マスノスケ *Oncorhynchus tshawytscha* 病魚より分離。

EVELYN (1971)<sup>5</sup> : カナダ Nanaimo Biological Station で海水飼育していたサケ *Oncorhynchus keta* とベニマス *O. nerka*, および West Vancouver の Pacific Environmental Institute で海水飼育していたカラフトマス *O. gorbuscha* とマスノスケ, それぞれの病魚より分離。

HACKING and BUDD (1971)<sup>7</sup> : カナダの Ontario Veterinary College の研究室へ持ち込まれた淡水熱帯魚 (タイガーバルブ *Puntius* sp. およびドジョウ *Acanthopthalmus* sp.) の病魚より分離。

LEVIN et al. (1972)<sup>4</sup> : アメリカ合衆国 Rhode Island の Narragansett Bay で漁獲された winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) の病魚より分離 (12株)。

HAASTEIN and HOLT (1972)<sup>51</sup> : ノルウェーの Bergen 近くの海で捕獲された coal-fish (*Gadus virens*), タラ (*G. morhua*), カレイ (*Pleuronectes platessa*, *P. flesus*), dab (*Limanda limanda*) およびマス (*Salmo salar*), それぞれの病魚より分離 (20株)。

MCCARTHY et al. (1974)<sup>52</sup> : イギリスの Weymouth にある研究所において、淡水で飼育されたニジマスを海水に順致させた時に発病した病魚より分離。

## (結果および考察)

表23に一般性状についてまとめ、表24には糖分解能ならびに塩分耐性についてまとめてみた。なお引用した著者の記載に結果の示されていない項目については、その株に関する他の研究者の記載を引用し、asterisk を付けて示した。また著者の分離株、LEVIN et al. および HAASTEIN and HOLT の分離株の性状記載の一部に括弧をつけた数字を示したが、これは先の著者の分離株の性状をまとめた表22に用いたと同じように、表示した反応を示した株数の割合 (%) を示したものである。

なお Bergey's Manual の type description には記載されていない性状がいくつかあり、特に糖分解についての記載が少ないので、HENDRIE et al. (1971)<sup>9</sup> の提案した type description を表中の該当欄に括弧を付けて併記し、比較の対象に含めた。

まず著者の分離株と Bergey's Manual における性状記載を比較する。表23および表24に示されたほとん

Table 23. Comparison in general characteristics of *Vibrio anguillarum* reported by several workers

Character	Strain or Worker	Present strains	Type description in Bergey's Manual & (HENDRIE et al)	SAKAZAKI (1967)						ROSS et al. (1968)	CISAR & FRYER (1969)	EVELYN (1971)	HACKING & BUDD(1971)	LEVIN et al. (1972)	HAASTEIN & HOLT (1972)	McCARTHY et al. (1974)
				NCMB 6	NCMB 828	NCMB 829	NCMB 571	NCMB 572	NCMB 407							
Single polar flagellum		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Motility		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Gram stain		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Swarming		-	(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Fermentation of glucose		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Gas from glucose		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Oxidase		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Cytochrome		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Kovacs		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Sensitivity to 0/129		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Novobiocin		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Penicillin	- (96)	(-)	(-)	-*	-**	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	
Catalase		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Litmus milk peptonization		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Nitrate reduction		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Gelatin liquefaction		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Voges-Proskauer test		+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
2, 3-butanediol production		+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
H <sub>2</sub> S production		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Arginine decomposition		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lysine decarboxylation		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ornithine		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Phenylalanine deamination		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Urease production		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tartrate (Jordan)		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Starch hydrolysis		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Hemolysis of horse blood		+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
human blood		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Citrate (Simmons)	+ (98)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Cholera red test	- (97)	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Methyl red test	- (93)	±	±	±*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	
Malonate	+ (82)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Chitin decomposition	- (75)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Indole production	+ (57)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

\* from EVELYN (1971), \*\* from HACKING and BUDD (1971), s : sheep blood, g : goat blood

Table 24. Comparison in carbohydrate utilization and NaCl-tolerance of *Vibrio anguillarum* reported by several workers

Test	Strain or Worker	Present strains	Type description in Bergey's Manual & (HENDRIE et al)	SAKAZAKI (1967)						ROSS et al. (1968)	CISAR & FRYER (1969)	EVELYN (1971)	HACKING & BUDD (1971)	LEVIN et al. (1972)	HAASTEIN & HOLT (1972)	McCARTHY et al. (1974)		
				NCMB 6	NCMB 828	NCMB 829	NCMB 571	NCMB 572	NCMB 407								NCMB 1291	
Acid from	Dextrin	+	(+)	++	++	++	++	++			+					+		
	Fructose	+	(+)	++	++	++	++	++	+		+		+			+	+	
	Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+		+	+	+	
	Maltose	+	(+)	+	+	+	+	+	+		+		+		+	+	+	
	Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+		+		-		+	+	+	
	Starch	+	(+)	-*	++	++	++	++	-*			+						
	Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+		+(58)	+	+	
	Adonitol	-		-	-	-	-	-	-			-			-(75)	-	-	-
	Dulcitol	-	(-)	-	-	-	-	-	-			-				-	-	-
	Lactose	-	(-)	-	-	-	-	-	-			-		+L		-	-	-
	Xylose	-	(-)	-	-	-	-	-	-			-		-		-	-	-
	Trehalose	+(97)	(+)	+	+	+	+	+	+	+		+		+		+(65)	-	-
	Rhamnose	-(97)	(±)	-	-	-	-	-	-			-		-		-	-	-
	Inulin	-(95)		-*	**	*	*	*	*	*		+w		-		-	-	-
	Salicin	-(95)		-	-	-	-	-	-			-		-		-	-	-
	Mannitol	+(92)	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+		+	+	+
	Inositol	-(90)	-	-	-	-	-	-	-	-**		-		+		-	-	-
	Raffinose	-(72)	(-)	-	-	-	-	-	-	-		-		-		-	-	-
	Glycogen	+(68)	(+)	++	++	++	++	++	++			+		+		-	-	-
	Sorbitol	+(66)	(+)	+w	+w	-	+	+	+	+w				-		+	+	+
	Arabinose	-(58)	-	-	-	+	+	+	-	+				-		+(60)	+	+
	Galactose	+(56)	(+)	++	**	++	++	++	++	+		+		+		+	+	+
	Glycerin	-(55)	(±)	++	±*	*	-*	++	++	+w		+w		+			+	+
Cellobiose	+(52)	(±)	-	-	-	+	+	-			+			+	+(60)	+	+	
NaCl	0 %	-(72)	+	-	-	-	-	-	-**				+w		-(91)			
	0.5	+		++	++	++	++	++	+++				+					
	1	+		+	+	+	+	+										
	3	+																
	5	+	(+)															
	6					+	+	+										
	7	-(61)			-**	-**	-	-	-	+w**		+						
10	-			-	-	-	-	-										

\* from EVELYN (1971)    \*\* from HACKING and BUDD (1971)    +L : positive after 14 days

どの項目において、著者の分離株の性状は *Bergey's Manual* の記載に一致し、本分離株は *V. anguillarum* と同定しうることがあらためて確認された。ただクエン酸塩利用、indole 産生および塩分耐性などの点においてある程度食い違いがみられるが、それらについては後で他の研究者の報告結果を総合して論議する。

次に坂崎の検査した *V. anguillarum* 7 株（先にも述べたように坂崎は 3 菌種 7 株の性状として報告している）の性状をみると、cholera red, methyl red, indole および starch などいくつかの糖分解性において相互に食い違う点は認められるが、全体的にはほとんど一致しており、HENDRIE et al. (1971) が提案し、清水 (1972)<sup>95)</sup> および坂崎 (1972)<sup>65)</sup> 自身も認めているように *V. piscium* var. *japonicus* および *V. ichthyodermis* は *V. anguillarum* に含めうることが示されている。

以下個々の問題点について他の研究報告を合わせて論議を進めてみる。

まず鞭毛については、*Bergey's Manual* の type description では一応端在単鞭毛とし、*Achromobacter ichthyodermis* の WELLS and ZOBELL (1934)<sup>12)</sup> の最初の記載では lophotrichous (叢毛性) となっていることを付記している。しかしながらその後 ZOBELL (1946)<sup>13)</sup> 自身、その分離菌は 1 本の極鞭毛を有するとし *Pseudomonas* 属に移すべきであると述べているし、HODGKISS and SHEWAN (1950)<sup>14)</sup> が分離した *Ps. ichthyodermis* も端在単鞭毛を有するとなっている。また ROSS et al. (1968)<sup>6)</sup> はニジマスから分離した *V. anguillarum* について、多くの細胞は端在単鞭毛を有するがなかには周毛と呼ぶような鞭毛を有する細胞が少数ながら存在したと報告している。

著者はかなり長くなった細胞で両極に 1 本ずつの鞭毛を持った分裂寸前のものと思われるものは見ているが、tuft polar (= lophotrichous) あるいは peritrichous (周毛) といったような鞭毛は観察していない。いずれにしても *V. anguillarum* の基本的な形は single polar flagellum と考えてよいであろう。

*Vibrio static agent* に対する感受性は比較的重要な項目と思われる。本薬剤に対する感受性は現在のところ genus *Vibrio* の鑑別の key point になっているので、LEVIN et al. (1972)<sup>4)</sup> の報告中にある 0/129 に対する感受性陰性の 1 株は *V. anguillarum* とするにはいささか問題があるものと思われる。Penicillin に対しては著者の分離株中に弱い感受性を示すものが 2 株存在するが、一般的に本菌は penicillin に感受性がなく novobiocin には感受性を有するとしてよいであろう。他の抗生物質などに対する感受性は薬剤の使用などにより変化することは、すでに第 1 章第 2 節において述べたように、我が国における 1973 年の分離株により実証されている。

Voges-Proskauer (以下 VP と略) test も比較的重要な項目と思われる。HENDRIE et al. (1971) の提案では usually positive となっていたが *Bergey's Manual* では variable となっている。VP 陰性株は plaice から分離された NCMB 407 株と LEVIN et al. が winter flounder から分離した株だけであり、それらの株が分離された plaice および winter flounder の症状は dermatitis と表現されている。また最初に *V. ichthyodermis* (*Achromobacter ichthyodermis*) を分離した WELLS and ZOBELL (1934)<sup>12)</sup> によれば、*Fundulus parvipinnis* にみられた病巣は皮膚および筋肉に局限されており、内臓および血液からは病原菌が分離されなかったと報告されている。このような症状は著者が観察したアユのピブリオ病、あるいは第 III 章で示すウナギでの実験的感染症に特徴的にみられる全身感染症とはかなり異なるものである。魚種の違いは無視できないが、やはり VP 陰性である株 (*V. ichthyodermis* group) と他の *V. anguillarum* とは病原性の点において異なった性質をもっている可能性がある。

硫化水素産生およびクエン酸塩利用については研究者により結果が異なっており、特にクエン酸塩利用における著者の分離株の結果は *Bergey's Manual* の記載に相反するものとなっているが、これらの項目においては検査方法の違いが含まれているので、そのまま結果の違いを問題にすることはできないと思われる。

Cholera red および methyl red test における反応は、株により陽性、陰性いずれも存在するものと思われる。Malonate に関しては著者の分離株のみが陽性となっている。この検査は栄研のマロン酸培地を用い、48 時間培養後に、培地の色がやや青緑色に変化したものを陽性と判定したが、この判定基準に問題があるか

もしれない。

Chitin 分解については著者の分離株についてしか検討されていない。著者の分離株の中には陽性と判定されたものもあるが、その分解の程度は *V. parahaemolyticus* に比べると弱く、*V. anguillarum* の chitin 分解性は著者の採用した方法による限りは陰性とみてよい。

Indole 産生能は Bergey's Manual では陽性としているが、著者の株および他の研究者の報告をみてもやはり陽性陰性両方あるとすべきである。

次に表24に示した糖分解能についてみると、dextrin から xylose までの11の糖については、mannose における HACKING and BUDD の分離株、starch における NCMB 6 および MCMB 407 などの例外的なものもあるが、一応 Bergey's Manual および HENDRIE et al. の記載通り、それぞれ陽性もしくは陰性とすることができる。

なお LEVIN et al. の分離株には sucrose 陰性、adonitol 陽性といった他の株とは違った反応を示す株が含まれており、先の vibrio static agent に感受性を示さない株の存在を合わせ考えると、彼等の分離株(12株)をすべて *V. anguillarum* とするのはやはり問題があるものと思われる。

Trehalose, salicin, mannitol, inositol, raffinose および glycerin の6つの糖については、各研究者の結果がほぼ一致しており、これらについても Bergey's Manual および HENDRIE et al. の記載通りでよいものと思われる。なお rhamnose について HENDRIE et al. は陽性もしくは陰性としているがこれは陰性とすべきであろうし、inulin については記載がないが、これは陰性と規定できるであろう。また sorbitol, arabinose および galactose の3つの糖については陽性もしくは陰性(variable) とすべきであろうし、glycerin および cellobiose は HENDRIE et al. の提案通り陽性もしくは陰性(variable) としてよいであろう。

塩分耐性の点では、NaCl 0.5% から5%の範囲ではすべての株が発育可能と考えられる。Bergey's Manual では0%において発育可能としているが、これは HENDRIE et al. が述べているように特に食塩を加えぬ nutrient broth 中で発育可能ということの意味しているものと思われ、著者が試験したペプトン水中とはいささか条件が異なるわけである。厳しくいえば nutrient broth あるいはペプトン水そのものに含まれる NaCl 濃度を調べる必要はあるが、一応 NaCl 0%および7%においては発育可能な株とそうでない株があるとすることができよう。

そのほか、結果は示さなかったがいくつかの重要な点について簡単に触れたい。

本菌の血清 type については従来あまり触れられていないが、著者の断片的な検査結果によれば、著者の分離株だけでもいくつかの type にまとめることは困難なように思われる。例えば、1965年に分離した浜名湖株 PB-1 の抗血清と1966年および1967年の浜名湖株とを反応させてみても凝集反応は認められなかったし、1966年の浜名湖株 PB-15 の抗血清は1967年の浜名湖株とも反応しなかった。また1971年の徳島株 ET-1 の抗血清と1972年の徳島株 ET-23,24 との間にも凝集反応は認められなかった。

HACKING and BUDD (1971)<sup>7)</sup> も彼等の分離株の抗血清を用いて NCMB 6 および NCMB 828 と凝集反応を試みているが、いずれも陰性であったと述べている。このような現象は NYBELIN (1935a) がすでに認めていることであり、ANDERSON and CONROY (1970)<sup>1)</sup> が述べているように、*V. anguillarum* と同定された菌株間でも凝集反応が認められることは稀なようである。従って本菌をいくつかの血清 type に部類分けするのはかなり困難なことと思われる。

最近、本菌の DNA の guanine および cytosine 含量(GC値)について検討がなされており、Bergey's Manual でも本菌の GC 値を44~45 (HENDRIE et al. は43~46としていた)としているが、この点についても今後更に検討される必要がある。なお著者の分離株 PB-1, PB-15 株などについて ANDERSON and ORDAL (1972)<sup>9)</sup> が検討し、その GC 値を44と報告している。

以上を総合してみると、Bergey's Manual における本菌の性状記載は多くの研究者の報告を包含しうるものであり、本菌の性状をかなり明確に定義付けたものとして評価しうる。また従来の fish-pathogenic vibrios を *V. anguillarum* 1種にまとめた点も現段階では一応妥当なものと考えられる。

しかしながら一方では、従来の fish-pathogenic vibrios を一つにしてしまうことにより、病原性の違うものが単純に *V. anguillarum* として扱われてしまう不安も感じられる。本菌はもともと obligate pathogen ではなく facultative pathogen であるにしても、同じような性状を持っていても魚に病気を起すものとそうでないものが存在するのかどうかといった問題や、アユを冒すものと海産魚を冒すものがたとえ生化学的性状では一致していても病原性という点でも同じものであるとみてよいのかどうかといった問題については、更に検討されなくてはならない。そのような問題を検討していくためには、本菌を単純に一種として包括的にだけ扱うのではなく、病原性およびそれに関連するような生化学的性状にある基準をみつけて類別していく必要が出てくるであろう。病原性そのものは不安定な特性で、分類の重要な基準にはなりえないともいわれるが、魚病学の立場からは病原性は最も重要な性質と考えられ、本菌に関して病原性の評価ということが重要な研究課題となる。病原性のとらえ方という点に関しては、まず分離された株がその魚の病気の原因体と認定できるかどうかということ、次いで実験的にはその病原性をどのようにして評価するのかという問題がある。前の点について、少なくとも現在のところ性的にある範疇に入っていれば、それが流行病の原因体として分離されたものも、単に異常魚から分離されたというだけのものも同等に *V. anguillarum* として扱っているわけである。この点をもう少し整理していけば *V. anguillarum* の性質も整理されてくるのではないかと考えられる。もう一つの問題点、すなわち実験的に確認しうる病原性についてはまずその実験方法を検討する必要がある。この点については第 III 章において著者の検討結果を示すものとする。

### 第 3 節 我が国で報告された他の魚類病原性 vibrios との比較

前節で示したように *V. piscium* var. *japonicus* が *V. anguillarum* の synonym とされた現在、我が国のニジマスのピブリオ病の原因菌も *V. anguillarum* ということになるが、すべての研究者が必ずしも原因菌を *V. piscium* var. *japonicus* と同定しているわけではない。また海産魚の潰瘍病の原因菌も *V. anguillarum* に近いものであるとはいわれながら、単に *Vibrio* sp. とされている。著者がアユなどから分離してきた *V. anguillarum* とこれらの菌の相違点を明確にするために以下のような比較を行ってみた。

#### (材料および方法)

著者の分離してきた *V. anguillarum* と比較するために、ニジマスのピブリオ病の原因菌に関するものとして、HOSHINA (1957)<sup>16)</sup>、岸ら (1958)<sup>19)</sup>、村江ら (1959)<sup>20)</sup>、林ら (1964a)<sup>22)</sup>、SAITO et al. (1964)<sup>21)</sup> の報告および坂崎 (1967)<sup>63)</sup> の検査結果を取り上げ、海産魚の潰瘍病の原因菌に関するものとして楠田 (1965)<sup>29)</sup>、木村 (1968)<sup>32)</sup> および安永 (1972)<sup>36)</sup> の報告を取り上げた。

ニジマスのピブリオ病の原因菌について、HOSHINA は *V. piscium* var. *japonicus* と命名し、岸らおよび SAITO et al. は *V. piscium* var. *japonicus* なる種名そのものについてはあまり触れず、単に分離株を保科の分離株と同じものであるとしている。それに対し、村江らは彼等の分離株は保科の分離株とはいささか異なるとのみ述べ、林らは彼等の分離株を保科のものと同一種であると認めた上で、*V. ichthyocholerae* という名前を提案している。坂崎の報告は保科の分離株 NCMB 571, 572 の性状を再検査したものである。

一方海産魚の潰瘍病の原因菌について、楠田 (1965) は、彼の分離菌を *V. parahaemolyticus* および *V. anguillarum* に近いものであるが、そのいずれとも異なる種であると結論している。その後しばしばこの楠田分離株が *V. anguillarum* と呼ばれることがあるが、当分離株の種名については未だ結論をみていない。また宮崎県におけるハマチの細菌性疾病について研究した木村 (1968) はその分離株13株の性状を記載し、1株を *V. alginolyticus* とし、残りの12株を楠田の分離した *Vibrio* sp. と同一種であるとしている。ここでは *V. alginolyticus* と同定された1株を除く12株についての性状を引用し比較の対象とした。またマダイ (*Chrysophrys major*) の細菌性疾病について検討した安永 (1972) はいくつかの細菌とともに一種

の *Vibrio* を分離し、マダイに対する病原性を確認している。彼はその分離株の性状を坂崎 (1967) が marine vibrio として記載しているものの性状に似ていると述べている。

なおここに引用したものの他に魚の病原性 vibrios を報告したものとしては、内田 (1961)<sup>97)</sup> のニジマスのピブリオ病の原因菌があるが、その記載には分離株の由来が明記されておらず、示された性状もあまり多くはなく、また保科の報告を引用した部分が原著と著しく違っていることなどもあり、ここでは採り上げなかった。また比較的最近、輸送中のマダイの斃死原因としての *Vibrio* spp. が平野・米によって報告されている (米・平野 1971<sup>98)</sup> , 平野・米 1971a<sup>33)</sup> , b<sup>34)</sup> , 1972<sup>35)</sup> )。彼等は分離した多数の菌株を13のグループに分け、そのうちの2つのグループを病原性を有するものとし、1つ (V群) は楠田の報告した *Vibrio* sp. と同じものであるとし、もう一つ (X群) は *V. anguillarum* の B type (NYBELIN) に似ているとしている。彼等はX群とした細菌を細く分けることなく1種類の菌、しかも病原菌としてとらえているようであるが、X群の性状としてあげられている結果をみると、VP (Voges-Proskauer test) および MR (methyl red test) が陽性のものと陰性のものが混っているだけでなく、中には硝酸塩還元陰性の株、urease陽性の株、さらには cytochrome oxidase 陰性の株まで含まれており、とうてい1種類の菌とは考え難く、従ってどの性状のものをさして *V. anguillarum* と似ているというのか理解できない。以上の理由で彼等の分離株も比較の対象には採り上げなかった。

また魚から病原菌として *V. parahaemolyticus* あるいは *V. alginolyticus* が分離されたという報告もあるが、これは次節で採り上げるものとする。

### ( 結果および考察 )

一般性状を表25に、糖分解能および塩分耐性を表26にそれぞれ示した。

保科の分離株を検査した坂崎の結果をみると、その性状はほとんどの点で著者の分離した *V. anguillarum* の性状と一致しており、*V. piscium* var. *japonicus* は *V. anguillarum* の synonym としてさしつかえないことがわかる。しかし村江らの分離菌はコロニーが小型で透明度が劣る点や、ヒトおよび家兎血液に対して溶血性が認められず、さらに VP が陰性、lactose 分解および xylose 分解が陽性である点などで著者の分離してきた *V. anguillarum* とは異なっている。林らの分離株もやはり VP 陰性、lactose 陽性となっており、村江らの分離菌に近いものと思われる。それらを *V. anguillarum* に含めるにしても、また別種とするにしても、vibrio static agent に対する感受性、arginine 分解、lysine 脱炭酸反応、および塩分耐性などいくつかの重要な項目について検討されねばならないであろう。

著者は1969年8月、長野県明科の養殖ニジマスから病原菌として一種の vibrio を分離しているが (室賀未発表)、その性状も VP 陰性、lactose 陽性であったばかりでなく、普通栄養寒天培地に発育しにくく、*V. anguillarum* とは別種のものであると判断した。さらに最近 (1974年)、静岡県富士養鱒場で分離されたピブリオ病の原因菌も *Vibrio* 属には分類されるが、明科の株と同様に普通寒天培地には発育しにくく、VP が陰性であり、更に arginine dihydrolase (decarboxylase) も陰性であり、*V. anguillarum* とは一応別種であると判断された。これらのニジマスからの分離株の性状については更に検討を重ねた上で報告するつもりである。

以上のことを合わせてみると、現時点では我が国のニジマスのピブリオ病の原因菌には *V. anguillarum* と、それとはいささか性状を異にするものが存在するとしておくべきであろう。

次にハマチ (*Seriola quinqueradiata*) などの養殖あるいは蓄養海産魚の潰瘍病の原因菌 *Vibrio* spp. と *V. anguillarum* を比較してみる。楠田 (1965) は彼の分離菌の性状と *V. anguillarum* の性状を比較し、lactose, sucrose 分解性、塩分耐性および血清学的な違いをもって *V. anguillarum* とは別種であるとしている。彼の挙げている血清学的な違いおよび lactose 利用の点は別種とする根拠にはなり得ないと考えられるが、塩分耐性の点および sucrose 利用の点はたしかに重要な違いといえよう。彼の分離株は NaCl 0.5%

Table 25. Comparison in general characteristics among fish-pathogenic vibrios isolated in Japan

Character	Species and Worker		<i>Vibrio anguillarum</i>				<i>Vibrio</i> spp.				
			Present strains Bergey's Manual & (HENDRIE et al.)	<i>(V. p. v. j.)</i>			MURAE et al. (1959)	HAYASHI et al. (1964)	KUSUDA (1965)	KIMURA (1968)	YASUNAGA (1972)
	(1957)	(1967)		(1958)	(1964)						
	HOSHINA	SAKAZAKI		KISHI et al.	SAITO et al.	from rainbow trout			from marine fishes		
Single polar flagellum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram stain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Swarming	-	(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentation of glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cytochrome oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sensitivity to 0/129	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Novobiocin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Penicillin	-(96)	(-)	-	*	-	-	-	±	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Litmus milk peptonization	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer test	+	±	-	+	+	-	-	-	-	-	-
2, 3-butanediol production	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S production	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine decomposition	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lysine decarboxylation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ornithine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phenylalanine deamination	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Tartrate (Jordan)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hemolysis of horse blood	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+
human blood	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate (Simmons)	+	(98)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cholera red test	-	(97)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl red test	-	(93)	±	-	+	-	-	-	+	-	+
Malonate	+	(82)	+	-	-	-	-	-	+	-	+
Chitin decomposition	-	(75)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole production	+	(57)	+	±	+	+	+	-	+	+	+
Pathogenicity for eel	+	(98)	+	+	+	+	-	+	-	-	-

\* from EVELYN (1971), (*V.p.v.j.*) : *Vibrio piscium* var. *japonicus*

Table 26. Comparison in carbohydrate utilization and NaCl-tolerance among fish-pathogenic vibrios isolated in Japan

Test	Species and Worker	<i>Vibrio anguillarum</i>						<i>Vibrio</i> spp.			
		Present strains	<i>(V. p. v. j.)</i>				MURAE et al (1959)	HAYASHI et al (1964)	KUSUDA (1965)	KIMURA (1968)	YASUNAGA (1972)
			(1957)	(1967)	(1958)	(1964)					
			Bergey's Manual & (HENDRIE et al)	HOSHINA	SAKAZAKI	KISHI et al	SAITO et al	from rainbow trout	from marine fishes		
Acid from	Dextrin	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	
	Fructose	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	
	Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Maltose	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	
	Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Starch	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	
	Sucrose	+	+	-	+	+	+	+	-	±	
	Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Dulcitol	-	(-)	-	-	-	-	-	-	-	
	Lactose	-	(-)	-	-	+L	+	+	-	-	
	Xylose	-	(-)	-	-	-	+	-	-	-	
	Trehalose	+	(97)	(+)	+	+	+	+	-	+	
	Rhamnose	-	(97)	(±)	-	-	-	-	-	-	
	Inulin	-	(95)	-	-	-*	-	-	-	-	
	Salicin	-	(95)	-	-	-	-	-	-	-	
	Mannitol	+	(92)	+	+	+	+	+	±	±	
	Inositol	-	(90)	-	-	-	-	-	-	-	
	Raffinose	-	(72)	(-)	-	-	-	-	-	-	
	Glycerin	+	(68)	(+)	+	+	+	+	+	+	
	Sorbitol	+	(66)	(+)	-	±	+	-	-	+	
	Arabinose	-	(58)	-	+	+	+	+	-	-	
	Galactose	+	(56)	(+)	+	+	+	+	+	+	
	Glycerin	-	(55)	(±)	-	-*	+	-	-	-	
	Cellobiose	+	(52)	(±)	-	+	-	-	+	±	
NaCl	0 %	-	(72)	+	-	-	-	-	-	-	
	0.5	+	-	-	-	-	+	-	-	-	
	1	+	-	-	+	-	+	+	-	-	
	3	+	-	-	+	-	+	+	+	+	
	5	+	+	(+)	+	-	-	+	+	+	
	7	-	(61)	-	-	-	-	-	-	-	
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

\* from EVELYN (1971), +L : positive after 4 days.

で増殖しないとなっており、そのような株は *V. anguillarum* には知られていない。また彼の分離株は sucrose 陰性となっているが、*V. anguillarum* における sucrose 陰性株は最近ではごくわずかにしか報告されていない (MATTHEIS 1960<sup>45</sup>), LAGARDE and CHAKROUN 1965<sup>46</sup>). EVELYN (1971)<sup>5</sup>) および HENDRIE et al. (1971)<sup>9</sup>) が *V. anguillarum* の sucrose 分解性は陽性と提案し、Bergey's Manual でもそれは陽性と定義付けされている。これらに従い sucrose 陽性を *V. anguillarum* の重要な性質とみなすならば、楠田の分離株はこの点と塩分耐性の点をもって *V. anguillarum* とは別種としうるわけであるが、これだけではいささか問題があるように思われる。

木村の分離株は VP -, sucrose - (+ の株も含まれている), NaCl 0.5% の培地で发育しないなどの点で楠田の分離株と一致している。また安永の分離株も VP -, sucrose -, NaCl 0.5% で发育しない点などで前2者の分離株と一致している。更に安永の分離株は arginine dihydrolase -, lysine decarboxylase + となっており、この点で決定的に *V. anguillarum* とは異なることがわかる。楠田および木村の分離株については arginine および lysine についての結果が出されていないが、もし安永の結果と一致するならば、その点をもって潰瘍病の原因菌は *V. anguillarum* と別種であると断定できよう。

またもし、楠田および木村の分離株が arginine +, lysine - であり、その点では *V. anguillarum* と区別できないとしても、それらの潰瘍病の病原菌はウナギに病原性を示さない (楠田1965) 点で著者の分離してきた *V. anguillarum* とは違うと思われるので、VP -, sucrose - などの性状の違いを重要視し、仮に *V. anguillarum* に含めるにしても著者がアユなどから分離した *V. anguillarum* とは何らかの形で区別しておく必要があろう。

#### 第4節 *Vibrio parahaemolyticus* および *V. alginolyticus* との比較

最近アメリカ合衆国などで、貝類などから *V. parahaemolyticus* あるいは *V. alginolyticus* が分離されているし (BAROSS and LISTON 1970<sup>99</sup>), TUBIASH et al. 1970<sup>100</sup>), 同じくアメリカ合衆国の LEVIN et al. (1972)<sup>4</sup>) によれば *V. parahaemolyticus* および *V. alginolyticus* は human and fish pathogen と書かれており、その当否はともかく、その言葉が示すように、*V. parahaemolyticus* および *V. alginolyticus* が魚の病原菌となっていることがかなりの研究者により認められているようである。

我が国においては赤沢ら (1966)<sup>30</sup>) の報告にあるように、潰瘍病にかかった海産魚から *V. parahaemolyticus* および *V. alginolyticus* が分離されているし、また他の研究者によっても、*V. alginolyticus* が他の細菌とともに病魚から分離されている (木村 1968)<sup>32</sup>) 。

このようなことから、*V. anguillarum* と *V. parahaemolyticus* あるいは *V. alginolyticus* との比較検討が重要な研究課題とされ、LEVIN et al. はそれらの鑑別の基準を提案している。

著者は東京都衛生研究所から分与された *V. parahaemolyticus* および *V. alginolyticus* の性状を *V. anguillarum* と比較しながら検査し、いくつかの相違点を明らかにした (室賀・江草 1973)<sup>86</sup>) 。

#### (材料および方法)

検査した *V. parahaemolyticus* は中津川株 (ヒト死体より分離, 抗原型 O : 2, K : 3), および T-5455 株 (海水由来, O : 4, K : 34) の2株であり、*V. alginolyticus* は魚由来の C-20 株である。

一般性状検査の方法はすでに述べてきた通りである。一部の色素に対する抵抗性を比較するために、NaCl 3% とした Trypto-Soy 寒天培地に brilliant green あるいは methyl violet を 0.005% ないし 0.01% に加えた培地での发育を調べた。

また3菌種のニホンウナギおよびマウスに対する病原性を比較するために、普通栄養培地を用いて同一条件下 (28°C) で培養したそれぞれの菌を、ウナギ体重 100 g 当り湿菌重量にして 1 mg および 5 mg 量を筋肉内

Table 27. Comparison in characteristics among *Vibrio anguillarum*, *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*

Test	Species and Strain	<i>Vibrio anguillarum</i>		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>			<i>Vibrio alginolyticus</i>	
		Present strains	Nakatsugawa	T-5455	SAKAZAKI (1967)	Bergey's Manual	C-20	SAKAZAKI (1967)
Single polar flagellum		+	+	+	+	+	+	+
Motility		+	+	+	+	+	+	+
Gram stain		-	-	-	-	-	-	-
Swarming		-	-	-	-	-	+	+
Fermentation of glucose		+	+	+	+	+	+	+
Gas from glucose		-	-	-	-	-	-	-
Cytochrome oxidase		+	+	+	+	+	+	+
Sensitivity to 0/129		+	+	+	+	+w	+	+
Novobiocin		+	+	+	+	+w	+	+
Penicillin		-(96)	-	-	-*	-	-	-*
Catalase		+	+	+	+		+	+
Litmus milk peptonization		+	+	+	+*		+	+
Nitrate reduction		+	+	+	+	+	+	+
Gelatin liquefaction		+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer test		+	+w	+w	-	-	+	+
2, 3-butanediol production		+	-	-	-	-	+	+
H <sub>2</sub> S production		-	-	-	-	-	-	-
Arginine decomposition		+	-	-	-	-	-	-
Lysine decarboxylation		-	+	+	+	+	+	+
Ornithine		-	+	+	±	+	+	±
Phenylalanine deamination		-	-	-	-	-	-	-
Urease production		-	-	-	-	-	-	-
Tartrate (Jordan)		+	+	+			+	
Starch hydrolysis		+	+	+	+	+	+	+
Hemolysis of human blood		+	+	+			+	
human blood in Azuma		+(60)	+	-			-	
Citrate (Simmons)		+(98)	+	+	±*	+	+	
Cholera red test		-(97)	-	-	+		-	+
Methyl red test		-(93)	+	+	+	+	-	+
Malonate		+(82)	-	-	-	-	-	-
Chitin decomposition		-(75)	+	+	+		+	+
Indole production		+(57)	+	+	+	+	+	+
Acid from	Dextrin	+	+	+	++		+	-*
	Fructose	+	+	+	++		+	
	Glucose	+	+	+	+	+	+	+
	Maltose	+	+	+	+	+	+	+
	Mannose	+	+	+	+	+	+	+
	Starch	+	+	+			+	
	Sucrose	+	-	-	-	-	+	+
	Adonitol	-	-	-	-	-	-	-
	Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-
	Lactose	-	-	-	-	-	-	-
	Xylose	-	-	-	-	-	-	-
	Trehalose	+(97)	+	+	+		+	+
	Rhamnose	-(97)	-	-	-	-	-	-
	Inulin	-(95)	-	-	-*		-	-
	Salicin	-(95)	-	-	-	-	-	-
	Mannitol	+(92)	+	+	+	+	+	+
	Inositol	-(90)	-	-	-	-	-	-
	Raffinose	-(72)	-	-	-	-	-	-
	Glycogen	+(68)	+	+			-	-
	Sorbitol	+(66)	-	-	-	-	-	-
	Arabinose	-(58)	-	+	±	±	+w	±
	Galactose	+(56)	+	+	++		+	
	Glycerin	-(55)	+w	+	++		+	
	Cellobiose	+(52)	+w	+	-	-	+w	-
NaCl	0 %	-(72)	-	-	-	-	-	-
	0.5	+						
	1	+			+			+
	3	+	+	+			+	
	5	+	+	+			+	
	7	-(61)	+	+	++	+	+	++
	10	-	+	+	-	-	+	+

\* from COLWELL (1970).

接種し、マウスに1匹当たり0.2 mg, 0.5 mgおよび1 mg腹腔内接種し、それぞれに対する病原性の違いを検討した。

なお性状比較を示した表27には坂崎(1967)の検査した *V. parahaemolyticus* (32株) および *V. alginolyticus* (10株) の性状、ならびに Bergey's Manual 8th ed. 中の *V. parahaemolyticus* についての記載を引用し参考にした。Bergey's Manual では *V. alginolyticus* を1つの種として認めておらず、*V. parahaemolyticus* に biotype 1 におよび biotype 2 を設け、biotype 2 が *V. alginolyticus* に相当するものとなっている。従ってここで引用したのは *V. parahaemolyticus* の biotype 1 の性状である。

### (結果および考察)

まず表27に示した一般性状、糖分解能および塩分耐性における *V. anguillarum* と *V. parahaemolyticus* の違いを拾ってみると、VP, 2, 3-butanediol production, arginine decomposition, lysine and ornithine decarboxylase, MR, sucrose および塩分耐性の諸点を挙げる事ができる。VP については先に述べたように *V. anguillarum* と同定されるものの中にも陰性株があることや、著者が検査した *V. parahaemolyticus* 2株が微陽性を示したことなど多少まぎらわしい点もあるが、一応違いとしうる。MR については *V. parahaemolyticus* が十であるのに対し、*V. anguillarum* の多くの株が一となっておりこれも一応違いとみることが出来る。Sucrose についてはかなり明確な差があることになるが、前節で述べたように過去に sucrose 陰性なる *V. anguillarum* が報告されていることや、*V. parahaemolyticus* の sucrose 分解性についても BIANCHI (1971)<sup>101)</sup> は陽性とし、COLWELL (1970)<sup>102)</sup> も陽性株 (2/32) を記載しており、まったく例外が無いわけではない。また 2, 3-butanediol production, arginine 分解, lysine および ornithine 脱炭酸反応における違いは特に重要な違いとみることができよう。更に NaCl 7% および10%における増殖の差も一応違いとみることができよう。

次に *V. anguillarum* と *V. alginolyticus* の相違点を拾ってみると、swarming (寒天培地上での游走発育), arginine, lysine, ornithine および塩分耐性の諸点が挙げられる。

LEVIN et al. はこの3菌種の鑑別のための図式を示しており、そこには今著者が挙げてきた項目の他に galactose, sorbitol および cellobiose の分解性を鑑別の鍵として挙げている。しかしこれらの糖に対しては著者の分離した *V. anguillarum* の中に陽性のものおよび陰性のもの共にかかなりの率で存在しており、鑑別の鍵とはなり得ないと考えられる。また彼等は37°Cにおける増殖の有無を違いとして挙げているが、著者の分離した *V. anguillarum* も37°Cで増殖するし、HACKING and BUDD (1971)<sup>7)</sup> によれば彼等自身の分離株および NCMB 6, NCMB 828 株も37°Cにおいて増殖可能となっている。従って *V. anguillarum* と *V. parahaemolyticus* および *V. alginolyticus* との間には増殖至適温度の違いはあるにしても、単純に37°Cにおける増殖の有無から3菌種を判別することはできないと考えられる。また Bergey's Manual 8th ed. では *V. parahaemolyticus* は5°Cで発育しないが *V. anguillarum* は5°Cで発育可能としているが、著者の分離した *V. anguillarum* は5°Cでは発育せず、5°Cにおける増殖能力を両菌種の違いとすることはできない。更に LEVIN et al は H<sub>2</sub>S 産生能を取り上げ、*V. anguillarum* は陰性であるが *V. parahaemolyticus* は陽性なので両者の鑑別に使えるとしている。これは彼等が *V. parahaemolyticus* の性状を COLWELL (1970) の報告から引用しているためと思われる。COLWELL の用いた方法は他とは違っており、同一方法 (SIM 培地使用) にて調べた本実験結果では両菌種とも陰性であり、この項目も鑑別には使えないと思われる。

表中に吾妻変法培地におけるヒト血球に対する溶血性の検査を示したが、これは LECLAIR et al. (1970)<sup>92)</sup> が *V. parahaemolyticus* の溶血性を調べる方法として記載したのに従ったわけであるが、この方法でも検査した *V. anguillarum* の中には溶血性を示す株 (3/5) があり、この点でも *V. parahaemo-*

*lyticus* と *V. anguillarum* を区別することはできなかった。

また表には結果を示さなかったが、いくつかの色素に対する抵抗性の違いを調べたところ、methyl violet に対する抵抗性には差がなかったが、brilliant green を0.01%含む Trypto-Soy 寒天培地には *V. anguillarum* は発育しなかったが、*V. parahaemolyticus* および *V. alginolyticus* は発育し、差が認められた。

病原性についての3菌種の比較実験結果を表28に示した。1966年から1968年にかけての実験では、著者の分離した *V. anguillarum* は一部の例外的な結果はありながらも、一応マウスに対しては病原性はないものと判断された。ところが、ここに示したように1971年に行なった実験では病原性ありと認めざるを得ない結果が得られた。この違いは1971年の実験に用いた菌株の activity が高かったためとも考えられるが、特に長期の保存がもたらした菌株の高温への適応が影響したのではないかと考えられる。いずれにしても表28に示した実験結果により、*V. anguillarum* のある株はマウスを死亡させることが明らかになった。しかしそ

Table 28. Comparison in pathogenicity among *Vibrio anguillarum*, *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*

Animal and Dose	Species and Strain	<i>Vibrio anguillarum</i>					<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		<i>Vibrio alginolyticus</i>
		PB-3	PB-15	PB-28	PI-6	ET-1	Nakatsugawa	T-5455	C-20
Eel	1 mg/100 g	+D	+D	+D	+D	+	-	-	-
	5 mg	+D	+D	+D	+D	+D	+	+	+
Mouse	0.2 mg/animal	2/2*	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2
	0.5 mg	1/2	0/2	0/2	1/2	0/2	2/2	2/2	0/2
	1 mg	2/2	0/2	1/2	1/2	2/2	2/2	2/2	0/2
	(total)			(10/30)			(10/12)		(0/6)

Eels (the Japanese eels, *Anguilla japonica*, body weight 97 - 137 g, water temperature 15.0 - 18.5°C) were injected intramuscularly.

Mice (average body weight 20 g) were injected intraperitoneally.

Key: +D injected fish showed pathological changes and died within a week.

+ injected fish showed pathological changes but survived.

- injected fish showed no changes.

\* number of the animals died per tested.

の場合でも、接種したマウスは *V. parahaemolyticus* 接種により死亡したマウスより時間的にかなり遅れて死亡した。これら全体的なことから、本菌のマウスに対する病原性は *V. parahemolyticus* のマウスに対する病原性よりはかなり弱いものであると判断した。

ニホンウナギに対しては、*V. anguillarum* は1mgの接種量で死亡させうる(1株例外)だけの病原性を示したのに対し、*V. parahaemolyticus* および *V. alginolyticus* は1mgの接種量では何等の影響を与えず、5mgの場合でも接種部位の筋肉組織にはほとんど出血を伴わない壊死病変を引き起こした程度で、死亡させることはなかった。

以上の病原性実験の結果をまとめてみると、ウナギに対しては *V. anguillarum* のみが致死的な病原性を示し、マウスに対しては、*V. parahaemolyticus* が強い、そして *V. anguillarum* がそれに比べると弱い

病原性をそれぞれ示したが、*V. alginolyticus* はいずれの動物にもほとんど病原性を示さなかった。

赤沢ら (1966) の実験によれば *V. parahaemolyticus* はキュウセンベラ (*Halichoeres poecilopterus*) およびササノハベラ (*Pseudolabrus japonicus*) には致死的な病原性を発揮したが、淡水中のウナギ、フナ およびドジョウには接種部位における膨隆などは認められたが死亡させることはなかったとされている。このことから *V. anguillarum* と *V. parahaemolyticus* のウナギに対する病原性の違いはかなり明確であり、両菌種の重要な性質の違いの一つとみることができる。

## 第5節 ま と め

著者が分離してきた *V. anguillarum* 61株の性状をまとめてみたところ、海水株、淡水株別にみても、それらの間には大きな違いはなくほとんどの項目で一致していた。それらの性状を *Bergey's Manual 8th ed.* の type description と比較した結果、本分離株は *V. anguillarum* と同定しうることが再確認された。

他の研究者の報告をも考察しながら *Bergey's Manual* の type description を見ていくと、必ずしもそれに問題が無いわけではないことがわかった。すなわち、indole 産生能陽性となっているがこれは陰性株もかなりあるので陽性もしくは陰性 (variable) とすべきであるし、arabinose 陰性となっている点も陽性株がかなりあることから variable とすべきと考えられた。5℃で発育可能とされているが、少なくとも著者の分離株は5℃では増殖しないので、陰性もしくは variable とすべきである。更に、これは当然のことかもしれないが、catalase 陽性、litmus milk peptonization 陽性、phenylalanine deamination 陰性を付け加えることができよう。

また *Bergey's Manual* に掲載された *V. anguillarum* は従来の *V. anguillarum* のほかに *V. piscium*, *V. piscium* var. *japonicus*, および *V. ichthyodermis* をまとめて1種にしたものであるが、これは fish-pathogenic vibrios を整理するというところで現段階では一応妥当なことと考えられた。しかしながら、いくつかの種類を *V. anguillarum* 1種にまとめたことにより、本菌の性状の規定がゆるやかになり、今後海水中、淡水中を問わず病魚から分離されてくる vibrios はすべて *V. anguillarum* とされてしまう可能性が強くなり、更には単に生化学的性状が近似しているといったことから健康魚あるいは水中からも本菌に分類される菌が報告されてくることも考えられる。そのような事態になれば病原菌としての *V. anguillarum* の性質はますます不明確になってくる恐れがある。そのような事態をさけるためには、病原菌として分離されたものかどうか、また実験的に病原性が認められるか否か、といった観点から整理していく必要がある。そして将来は病原性およびそれに関連するような生化学的性状に基づき、本菌を type 分けする、あるいはあるものは別種とするなどして病原菌としての本菌の性質を明確にしていく必要がある。

我が国でニジマスおよびハマチなどの海産魚から分離された種名の明らかにされていない fish-pathogenic vibrios は、今述べた *V. anguillarum* 以外に種を設けるか、種内に type を設けるべきかという問題を検討する上で重要な材料となるものである。現時点では、ニジマスからは *V. anguillarum* とはいささか異なるものが病原菌として存在しているものと思われるし、ハマチなどの潰瘍病の原因菌についても、type 分けをせずそのまま単に *V. anguillarum* としてしまうことはできないものと思われる。

最後に *V. anguillarum* と *V. parahaemolyticus* および *V. alginolyticus* との比較を行ってみたところ、最前種と後2種との間には arginine 分解, lysine, ornithine 脱炭酸の点で明確な違いがあり、また NaCl 7~10%の範囲での増殖にも差があることが確認された。更に前2種の間には, sucrose 利用に違いがあり, methyl red reaction, Voges-Proskauer reaction, 2, 3-butanediol production の点でも例外的な株はあるにしても一応違いがあることがわかった。

またこの3菌種につき、ウナギおよびマウスに対する病原性を比較したところ、*V. anguillarum* はウナギに対し他の2種と異なり致死的な病原性を示し、*V. parahaemolyticus* はマウスに対し強い病原性を示し、*V. anguillarum* はそれよりやや弱い病原性を示したが、*V. alginolyticus* はマウスに対しても病原性を示

さなかつた。なお、この *V. anguillarum* と *V. parahaemolyticus* のマウスおよびウナギに対する病原性の違いは、両菌種の増殖至適ないし増殖可能最高温度の違いに帰せられる可能性があるが、この点については更に検討する必要がある。

## 第Ⅱ章 *Vibrio anguillarum* の病原性

前章で述べたように、魚類病原菌である *V. anguillarum* については非常に古くから研究がなされてきたが、種名の確立が主要な問題であったためか、その形態学的あるいは生化学的性状を主として扱っている研究報告が多かつたようである。しかしながら本菌の病原性あるいは罹病魚の症状について検討を加えている報告も少なくはない(SCHÄPERCLAUS 1934<sup>42)</sup>, NYBELIN 1935a<sup>43)</sup>, HODGKISS and SHEWAN 1950<sup>14)</sup>, SAITO et al. 1964<sup>21)</sup>, HACKING and BUDD 1971<sup>7)</sup>, LEVIN et al. 1972<sup>41)</sup>)。それらの報告を総合してみると、本菌感染病魚の症状に関する記載はおおまかにはほぼ一致しており、体表および筋肉組織などにおける出血および壊死、さらには潰瘍、また内臓諸器官におけるうっ血などが特徴とされている。しかしながら詳細に検討すれば、それらの報告の内容にはいくつかの点で違いが認められる。その違いは菌株のもつ病原性の違いによるものと、魚種の違いによるものがあるわけである。また実験的に感染させた場合の病魚における症状の違いはこの2つの要素に加えて実験方法の違いによる差も含まれてくるので、それらの報告から分離株の病原性を比較することは困難なことと思われる。

多くの研究では自然病魚と同じ魚種に分離菌を接種することにより、その魚に自然病魚と同じような症状を起こし、死亡させることを確認し、分離菌を原因菌と認定している。これは当然なされなければならない実験であるが、それとは別に *V. anguillarum* の株間における病原性の違いについて検討するためには、やはりある特定の魚種に対する病原性というものを比較検討しなければならない。著者は前章で *V. anguillarum* を type 分けする際の、あるいは本菌と他種の鑑別の際の一つの鍵に病原性の項目を採り上げるべきであると述べた。病原性を問題にするとすれば、病原性確認の方法およびその再現性ということが問題になってくる。そして病原性確認の方法については標準動物あるいは実験魚の選択が第一の検討課題となる。

本章ではまず最初にいくつかの魚種に対する本菌の病原性を比較し、それから得られた結果およびいくつかの現実的な状況から、ニホンウナギを本菌の病原性検査の標準動物として選んだ過程を説明し、次いでニホンウナギを実験材料魚とした場合の接種方法について検討し、病原性確認の方法を提案する。後半においては、その実験的感染における本菌とニホンウナギの host-parasite relationship について検討を加えてみた。

### 第Ⅰ節 数種魚類の本菌に対する感受性の比較

浜名湖産稚アユ病魚より分離した *V. anguillarum* をアユの筋肉内に接種すれば、数時間あるいは数日でアユに自然病魚と同じような症状をひき起こし、死亡させることはすでに第Ⅰ章で示した。第Ⅰ章で示した本菌の分離された状況およびこの再現実験の結果から本菌がアユの疾病の原因体であることが確認されたわけである。この浜名湖の例だけでなく、我が国における本菌感染症は主としてアユに発生するという事実を考えると、本菌の病原性確認のための標準動物としてはアユがまず考えられる。しかしながらアユの飼育は通常きれいな水を多量に必要とすることから、どこでも容易に飼えるというわけではないことや、年間自由に任意の大きさの魚を入手し得ないこと、さらには非常に弱い魚であるため運搬あるいは実験の操作上種々不都合な点があることが考えられる。更に重要なこととして、海産稚アユはもちろん、淡水池でかなりの期間養殖されたアユでも本菌を保菌しているか、もしくは過去に本菌の感染を受けている可能性が高いわけである。これらの理由から、本菌に対する実験動物としてはアユは不適當であると判断した。

そこでアユにかわる適当な魚種をさがすことを目的として、いくつかの入手可能であった魚に *V. anguillarum* を接種し、それらの魚の本菌に対する感受性を調べてみた。

(材料および方法)

実験材料魚としてはニホンウナギ (*Anguilla japonica*), ヨーロッパウナギ (*A. anguilla*), キンギョ (*Carassius auratus*), コイ (*Cyprinus carpio*), フナ (*Carassius carassius*), ドジョウ (*Misgurnus anguillicaudatus*), ニジマス (*Salmo gairdneri*), クロダイ (*Mylio macrocephalus*) およびハマチ (ブリ, *Seriola quinqueradiata*) を採り上げた。原則として各魚種10尾をそろえ、筋肉内接種を行ない、*V. anguillarum* のそれらの魚種に対する病原性を調べた。使用した魚の体重、接種菌量 (原則として体重 100 g 当り 1 mg) および実験水温 (原則として 20°C 前後) は表中に示した。クロダイおよびハマチについては海水中で実験を行ない、他はすべて淡水中で実験を行なった。使用した菌株は1966年に浜名湖産稚アユ病魚より分離した PB-15 株であり、実験は1969年から1974年にかけて行なわれた。

(結果および考察)

実験結果を表29に示した。ニホンウナギに 1 mg を接種した 2 回の実験結果を平均してみると接種後 2 日間で 80% の魚が死亡しており、ヨーロッパウナギに 1 mg を接種した場合も死亡日数は若干異なるが死亡率は 90

Table 29. Pathogenicity of *Vibrio anguillarum* for some freshwater and marine fishes by intramuscular injection

Fish	Body weight		Water temperature		Dose mg/100g	Number of fish died/tested	Mean time to death (days)
	mean	(range)	mean	(range)			
The Japanese eel	17g	(10-33)	18.0°C	(17.0-19.0)	1	6/10	2.0
"	32	(12-52)	19.2	(18.5-20.7)	1	10/10	1.9
The European eel	74	(48-100)	20.0	(19.0-20.5)	1	9/10	3.1
"	59	(32-80)	20.0	(19.0-20.5)	0.1	0/10	-
Loach	12	(6-20)	17.8	(17.5-18.0)	1	10/10	1.3
"	13	(8-26)	25.6	(24.0-26.0)	0.5	9/10	2.2
Rainbow trout	8		18.1	(16.8-19.4)	1	10/10	2.9
"	98		18.1	(16.8-19.4)	1	4/10	6.0
Carp	4	(3-6)	18.0	(17.0-19.0)	1	0/10	-
Goldfish	10	(3-22)	18.0	(17.0-19.0)	1	1/10	3.0
Crucian carp	3	(2-4)	18.0	(17.0-19.0)	1	3/10	2.7
Black sea bream	1.0	(0.7-1.5)	19.3	(18.8-20.6)	10	6/10	1.0
"	1.1	(0.5-1.7)	19.2	(18.3-20.5)	1	6/10	1.2
Yellow tail	300-400		20.2	(20.0-20.5)	3-4	4/4	2.5

The Japanese eel (*Anguilla japonica*), The European eel (*A. anguilla*), Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*), Rainbow trout (*Salmo gairdneri*), Carp (*Cyprinus carpio*), Goldfish (*Carassius auratus*), Crucian carp (*C. carassius*), Black sea bream (*Mylio macrocephalus*), Yellow tail (*Seriola quinqueradiata*)

Black sea bream and yellow tail were kept in sea water (Cl<sup>-</sup> 14.0 ~ 15.5 ‰)

％とはほぼ同じ結果が得られている。ヨーロッパウナギに 0.1 mg を接種した場合は 1 尾も死亡しなかったが、これは後に示すようにニホンウナギに 0.1 mg を接種した場合でもやはり死亡魚はみられず、この点でも同じ結果を示した。ドジョウもニホンウナギと同様短時間でほとんどのものが死亡しており、ウナギに劣らぬ高い感受性を有することがわかった。ニジマスは平均体重 8 g という当才魚（孵化後約半年）の場合は約 3 日間ですべてが死亡したが、平均体重 98 g という 1 年魚（孵化後約 1 年半）では 40% の魚が死亡したにとどまり、平均死亡日数も 6.0 日とかなり長くなっている。このようにニジマスでは当才魚と 1 年魚との間には本菌に対する感受性にやや差があるが、1 年魚ではウナギに比べてやや感受性が低いということがいえる。

SAITO et al. (1964)<sup>21)</sup> はニジマスから分離した *V. anguillarum* (*V. piscium* var. *japonicus*) の病原性について実験を行ない、ニジマスには  $10^{-8}$  mg の菌量を接種するだけで死亡させえたのに対し、ウナギ（ニホンウナギ）には 0.1 mg 接種しても死亡させることはできなかったと報告している。従って著者の分離株のウナギおよびニジマスに対する病原性と彼等の分離株のそれとはかなり違っていることがわかる。

コイ、キンギョおよびフナに対しては、死亡率がいずれの場合も 30% 以下であり、本菌株はこれらの魚に対してあまり強い病原性を持っていないものと判断された。HOSHINA (1956)<sup>17)</sup> はニジマスからの *V. anguillarum* (*V. piscium* var. *japonicus*) はコイにも病原性があると記しているし、SAITO et al もコイ、フナおよびキンギョを  $10^{-4} \sim 10^{-5}$  mg の菌量で致死させたとしている。従ってこれらコイ科の魚類に対する病原性の点でも著者の分離株とニジマスからの分離株とはいささか性質を異にするものと思われる。

クロダイは孵化後 4 カ月の小さなものを実験材料としたわけであるが、死亡率は 1 mg 接種の場合も 10 mg 接種の場合も共に 60% とそれ程高くはなかった。接種された魚には接種部位の皮膚および筋肉組織に潰瘍が形成され、著しい場合は脊椎骨が露出しても死亡しなかった個体もあった。

ハマチは 4 尾しか実験に供していないので他とは比較できないが、本菌に対する感受性を有していることが確認された。

なおこれらの実験は、接種する菌が魚体重 100 g 当り 1 mg の接種量でニホンウナギを死亡させることを確認した上で行なったもので、ある魚種に対する実験の時に接種菌の病原性が特に低下していたという心配はない。

以上をまとめてみると、本菌はニホンウナギ、ヨーロッパウナギ、およびドジョウに最も強い病原性を示し、ニジマスおよびクロダイにもそれに次いで比較的強い病原性を示したが、コイ、キンギョおよびフナにはあまり強い病原性を示さないことがわかった。もちろん第 1 章の表 4 に示したように、本菌はアユに対してはウナギに対する以上に強い病原性を有しているわけである。

この実験から本菌の病原性確認のための実験魚としてはウナギもしくはドジョウが適しているものと考えられた。ヨーロッパウナギはこの実験を行なった当時、我が国ではまだ一般的ではなかったので一応除外した。ニホンウナギおよびドジョウはアユあるいはニジマスに比べて飼育が容易であるという点でも実験魚として適している。そして以下に述べる 3 つの理由から、最終的にニホンウナギを実験材料魚とすることにした。第一の理由は、*V. anguillarum* はそもそもヨーロッパウナギの red disease の病原体として報告され、我が国でもニホンウナギにおける本菌感染症が少例ながら存在し、ウナギを材料魚とすることは単に実験動物というだけでなく実際の意味を持ちうるという利点がある。ドジョウでは HACKING and BUDD (1971)<sup>7)</sup> の報告例 (loach, *Acanthopthalmus* sp.) はあるにしても一般的には本菌感染症は知られていない。

第二に、これは第一の理由とやや矛盾することであるが、ニホンウナギに本菌感染症が存在するにしてもそれはごく限られた地域においてみられるだけであり、飼育池を吟味すれば本菌の感染を受けたことのないウナギを入手することは容易であり、この点でアユにおいて問題となった点の心配がない。

第三に、ウナギは、海水、淡水いずれにおいても比較的容易に飼育するという点で、単に病原性検査だけでなくいろいろな実験の材料魚として好都合な面があると考えられた。また血液などを材料とする場合、ドジョウに比べればウナギは大きく、採血しうる血液の量が多いといったことなども利点と考えられた。

もちろんドジョウの方が有利だと考えられる点もある。例えば現段階ではウナギにおいて人工孵化などにより種苗を作るとは非常に困難であるのに対し、ドジョウでは比較的容易に種苗を作ることができ、場合によっては無菌魚を作ること也有可能と考えられる。また少数の魚を飼育する場合、ウナギはわずかな刺激などによってもほとんど摂餌しなくなるといった現象が一般的にみられ、実験の目的によっては非常に扱いが難しいのに対し、ドジョウは比較的容易に摂餌させるといった違いがある。しかし、この2つの点はさしあたっては大きな障害にはならないと判断し、ニホンウナギを実験動物に選んだ。

## 第2節 ニホンウナギを用いての実験的感染

### (I) 感染方法

#### (材料および方法)

感染方法として、ニホンウナギを飼育している水槽中へ培養菌を懸濁させる方法(水中懸濁法)、培養菌を配合飼料に混ぜて投与する方法(経口投与法)、および注射法の3つの方法を検討してみた。水中懸濁法では、水量4ℓの水槽にニホンウナギ(体長8~12cm)を10尾収容し、培養菌を400~600mg懸濁させ(生菌濃度 $8 \sim 12 \times 10^7$  cells/ml)、7日ないし10日間観察した。飼育水は淡水の場合と海水の場合の両方を設け、それぞれにつき2回実験を行なった。水温は18~23℃であった。

経口投与実験では50尾のニホンウナギ(実験開始時の体重10~20g)を水量約300ℓのコンクリート水槽に収容し、毎日培養した菌を0.85%の食塩水に懸濁し、その液で粉末配合飼料をねり、投与した。実験は4カ月続けられ、その間の水温は15.0~21.0℃であり、投与した培養菌の総量は約800mgであった。実験に使用したウナギはシラスの時から大学の実験水槽で飼育したもので、飼料によく慣れており実験中もほとんどの個体が摂餌し、かなりの成長も認められた。なお市販の配合飼料には何等かの抗菌剤が含まれている可能性があると考え、某飼料会社に発注して抗菌剤を含まない実験用の飼料を作り、それを使用した。

注射法としては、背鰭前端部近くの筋肉に注射する筋肉内注射、腹腔内注射、および胸部を切開し動脈球に直接注射する血管内注射を行なった。接種量および実験水温は表30に示す通りである。

なお水中懸濁法に供した菌株は1965年に浜名湖産稚アユ病魚より分離したPB-1株であり、経口および注射法に供した菌株は1966年に同湖産のアユ病魚より分離したPB-15株である。

#### (結果および考察)

水中懸濁法によってウナギを発病させることはできなかった。また経口投与法によってもやはり発病させることはできなかった。なおこの経口投与実験は抗体産生実験を兼ねて行なったものであるが、これらのウナギには実験開始後約3カ月目に凝集素価にして25ないし50という抗体が形成されていた(後出の補章、第

Table 30. Comparison in mortalities among the Japanese eels injected with *Vibrio anguillarum* intramuscularly, intraperitoneally and intravascularly

Injection route	Dose mg/100 g	Mean body weight	Water temperature	Mortality	Mean time to death
Intramuscular	0.5	71 g	24.4-26.0°C	20 %	2.0 days
Intraperitoneal	"	61	"	10	2.0
Intravascular	"	66	"	10	2.0
Intramuscular	1	44	23.0-25.5	90	1.3
Intraperitoneal	"	42	"	20	1.5
Intravascular	"	42	"	10	2.0

Ten eels were used for each test.

3節参照)。

注射法による実験結果を表30に示した。接種菌量が0.5 mgの場合はいずれの場合も死亡率は10~20%とあまり差がなかったが、接種量を1 mgとした場合は筋肉内接種による死亡率が90%であったのに対し、腹腔内接種では20%、血管内接種では10%と差が認められた。

以上のことから病原性を確認する方法としては、注射による接種、それも筋肉内接種が最も確実な方法であることがわかった。もちろん感染の mechanism を研究するような場合には自然感染に近いような方法で実験的にも感染を成立させる必要がでてくるが、そのような目的の実験にはウナギはあまり適していないものと思われた。

*V. anguillarum* の病原性について検討している他の研究者の報告をみると、多くの場合は筋肉内あるいは腹腔内接種法が採られている (NYBELIN 1935a, SMITH 1961, SAITO et al. 1964, HACKING and BUDD 1971, HAASTEIN and HOLT 1972<sup>51</sup>), LEVIN et al. 1972)。例えば LEVIN et al. は winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) を用いて腹腔内接種と皮下注射を行ない、皮下注射の方が病原性が若干強くでるという結果を得ている。

また注射以外の接種、あるいは感染方法についてもいろいろ検討されている。ZOBELL and WELLS (1934)<sup>103</sup> は killifish (*Fundulus parvipinnis*) の鱗をはいだ部分に培養菌を塗布することにより感染させているし、SAITO et al. はニジマスの眼球、傷ついた、あるいは傷つけた鱗および皮膚などに培養菌を塗布することにより何割かの魚を発病致死せしめている。また HACKING and BUDD は自然病魚の tiger burb (*Puntius* sp.) が入っている小水槽に guppy を3尾入れ、2日後に tiger burb が死亡し、その4日後に1尾の guppy が死亡し、その魚の肝臓からは *V. anguillarum* が純粋に分離されたが、残る2尾の guppy は発病しなかったと報告している。また小寺ら (1974b)<sup>56</sup> はアユの皮膚に培養菌を塗布することにより発病、致死せしめている。このように魚種によっては注射以外の方法で感染、発病させることも十分可能であることが報告されている。

## (2) 接種菌量、水温、および魚体重と死亡率の関係

材料魚としてニホンウナギを用い、筋肉内注射するとしても、その場合の接種菌量、水温および魚の大きさが問題になる。なお飼育水が海水の場合と淡水の場合の違いについては、すでに第1章の表4に実験結果を示したように、海水中のウナギと淡水中のウナギは同量の培養菌を注射されれば、ほぼ同じような時間を経て死亡することが確かめられている。

### (材料および方法)

水温約10℃あるいは20℃の水槽に収容したいろいろな大きさのニホンウナギに、魚体重100 g 当り0.1, 0.5, 1, ないし5 mg (湿菌重量) 量の培養菌を筋肉内に接種した。なお湿菌重量にして1 mgの菌量は細胞数(生菌数)にすると約 $8 \times 10^8$  cellsであった。実験は1968年から1970年にかけて20回行ない、1回の実験にウナギを10尾ずつ用い、同一実験にはなるべく大きさの揃ったウナギを材料魚に選んだ。用いた菌株はPB-15で、普通栄養寒天培地にて25~28℃, 48時間培養したものを0.85%食塩水に懸濁させ、接種材料とした。なお前述したように本菌は魚体を通すことなく長期間培地で継代していると病原性の低下が起こるので、多くの場合は1回ウナギに接種しそれから再分離することにより病原性をある程度高めてから実験に供した。

### (結果および考察)

20回の接種実験の結果を表31に示した。魚の大きさによる死亡率の違い、水温による死亡率の違い、および接種菌量による死亡率の違いをみるために、表31に示したこれらの結果を以下のように整理した。まず使用した魚の平均体重が100 g 以上の場合の実験結果と、平均体重が10~20 g の場合の実験結果を比べてみたのが表32である。ここでは水温が10℃前後の実験結果 (No.19, 20) および供試魚の平均体重が30~100 g の

Table 31. Mortalities of the Japanese eels injected with *Vibrio anguillarum* (PB-15) intramuscularly

Exp. No.	Body weight of fish mean $\pm$ S.D.	Water temp. mean $\pm$ S.D.	Dose mg/100 g	Mortality	Mean time to death
1	110 $\pm$ 13 g	19.4 $\pm$ 0.7°C	1	80 %	2.8 days
2	14 $\pm$ 3	20.9 $\pm$ 0.3	1	100	1.9
3	19 $\pm$ 5	20.9 $\pm$ 0.3	1	90	2.1
4	10 $\pm$ 4	21.1 $\pm$ 0.3	0.1	0	—
5	133 $\pm$ 10	21.3 $\pm$ 0.3	0.1	0	—
6	146 $\pm$ 22	21.8 $\pm$ 0.5	5	100	2.7
7	17 $\pm$ 5	21.5	5	100	1.0
8	133 $\pm$ 9	21.8 $\pm$ 0.5	0.5	80	3.3
9	17 $\pm$ 9	21.3	0.5	100	1.1
10	168 $\pm$ 37	22.6 $\pm$ 0.6	5	80	2.6
11	22 $\pm$ 15	22.1	5	100	1.1
12	167 $\pm$ 17	22.6 $\pm$ 0.6	0.5	90	2.1
13	22 $\pm$ 13	22.6 $\pm$ 0.6	0.5	90	1.8
14	182 $\pm$ 10	19.9 $\pm$ 1.6	0.1	0	—
15	18 $\pm$ 7	19.9 $\pm$ 1.6	0.1	0	—
16	32	19.2	1	100	1.9
17	17 $\pm$ 6	18.0 $\pm$ 0.8	1	60	2.0
18	57 $\pm$ 17	18.7 $\pm$ 1.1	1	100	2.5
19	131 $\pm$ 20	10.9 $\pm$ 0.2	1	90	5.4
20	157 $\pm$ 33	10.2 $\pm$ 0.6	1	60	6.0

Ten eels were used for each test, S.D. standard deviation

Table 32. Effect of fish size on the mortalities in pathogenicity experiments

Size	Body weight of fish	Dose mg/100 g	Water temperature	Mortality	Mean time to death	Exp. No.
Large	146 - 168 g	5	21.8 - 22.6°C	90 %	2.7 days	6, 10
	110	1	19.4	80	2.8	1
	133 - 167	0.5	21.8 - 22.6	85	2.6	8, 12
	133 - 182	0.1	19.9 - 21.3	0	—	5, 14
Small	17 - 22	5	21.5 - 22.1	100	1.1	7, 11
	14 - 22	1	18.0 - 20.9	83	2.0	2, 3, 17
	17 - 22	0.5	21.3 - 22.6	95	1.4	9, 13
	10 - 18	0.1	19.9 - 21.1	0	—	4, 5

Table 33. Effect of water temperature on the mortalities in pathogenicity experiments

Water temperature	Dose mg/100 g	Body weight of fish	Mortality	Mean time to death	Exp. No.
10.2 - 10.9°C	1	131 - 157 g	75 %	5.7 days	19, 20
19.2 - 20.9	1	14 - 110	93	2.1	1, 2, 3, 16

実験結果 (No.16, 18) を除いてある。この表にまとめられた結果をみると、0.1 mg を接種した場合は大きいもの (100 g 以上) も小さいもの (10~20 g) も 1 尾も死亡していないことを別にすれば、他のいずれの接種量においても、小さいウナギの方が大きいウナギに比べて高い死亡率を示しており、また死亡するまでの平均日数も短くなっている。しかしながらその差はわずかであり、実験材料魚としては体重 10~20 g の小さなウナギも 100 g 以上の大きなものもいずれも使用できることがわかった。

次に水温の影響であるが、10°C 前後での実験結果 (No.19, 20) と、同じ接種量 (1 mg) の水温 20°C 前後での実験結果 (No. 1, 2, 3, 16) を表 33 にまとめてみた。これをみると、水温 10°C の場合は水温 20°C の場合に比べて死亡率もやや低く、死亡するまでの日数がかなり長くなっていることがわかる。なお水温 20°C の実験結果には小型のウナギを用いた実験結果が含まれており、その影響も多少はあるかもしれないが、100 g 以上のウナギを用いた実験結果 (No. 1) だけを取り出して比べてみても、やはり水温 20°C の方が死亡率が高く死亡するまでの日数が 10°C の場合の約半分になっていることには変わりがない。このことから、水温は 10°C でも一応病原性の検査は可能であるが 20°C の方がより早く確実な結果が得られることがわかった。

なおこのような病原性発現に及ぼす水温の影響は他の研究者によっても認められており、例えば ZoBELL and WELLS によれば *V. anguillarum* (*Achromobacter ichthyodermis*) を killifish (*Fundulus parvipinnis*) に接種した場合、水温が 15°C 以下の場合は水温が 15~25°C の場合に比べて死亡率も低くなりまた死亡が遅れると報告されている。

Table 34. Effect of injection dose on the mortalities in pathogenicity experiments

Dose mg/100 g	Body weight of fish	Water temperature	Mortality	Mean time to death	Exp. No.
5	17 - 168 g	21.5-22.6°C	95 %	1.8 days	6, 7, 10, 11
1	14 - 110	19.2-20.9	93	2.2	1, 2, 3, 16
0.5	17 - 167	21.3-22.6	90	2.0	8, 9, 12, 13
0.1	10 - 182	19.9-21.3	0	-	4, 5, 14, 15

次に接種菌量別にまとめた実験結果を表 34 に示した。ここでは実験水温が 19°C 以下のもの (No.17, 18, 19, 20) を除き、供試魚体重に関係なく各接種量ごとに実験結果をまとめた。これをみると、接種量が 5 mg, 1 mg および 0.5 mg の場合の死亡率はそれぞれ 95%, 93%, 90% となっており、これらの間では一応接種量に比例した死亡率が出ているが、むしろこの 3 つの接種量の間には死亡率の差はなく、いずれの場合も高い死亡率が得られているとみることができる。死亡日数においても、いずれの接種量の場合も約 2 日となっておりこの点でも差は認められない。

これに対し、0.1 mg を接種した実験では接種した 40 尾中 1 尾も死亡せず、接種量 0.5 mg 以上の場合と際立った違いをみせている。

これら 20 回の実験は 1968 年から 1970 年にかけて同一の株を用いて行なわれたものであり、その意味ではかなり再現性があるものと判断できる。また前章で示したように、ほとんどの分離株 (44/45) は 1 mg 量をウナギに接種することにより致死の病原性が確認されており、この点からも病原性確認のためには 1 mg という接種量が適切な量であると考えられる。

なお本実験に用いた PB-15 株は 1966 年に浜名湖産稚アユ病魚から分離されたものであるが、同年に行なった実験によれば、第 1 章の表 4 に結果を示したように、0.05 mg の接種量でウナギを 3 日目に死亡させている。従って魚体を通すことによってある程度病原性を維持しうるが、その病原性の程度は最初に分離された時のそれよりやはり低いものでしかないことがわかる。

以上をまとめてみると、ニホンウナギを実験魚として *V. anguillarum* の病原性を検査する場合は、実験水温を 20°C 前後にし、魚体重 100 g 当り 1 mg の菌量を筋肉内に接種すればよいという結論が得られた。なお

供試魚は小さいものの方が死亡率がやや高くなる傾向があるが10 g以上のものであれば一応大きさに関係なく材料魚としてうるということがわかった。また水温が10℃前後の場合には水温20℃前後の場合に比べ死亡がかなり遅れ、また死亡率もやや低くなるが、病原性の検査は一応可能であると考えられた。

なお分離株の病原性の検査は、分離後1カ月以内位に行なった方が確実であるが、それ以上長く保存し病原性が低下したものでも1回ないし2回魚体を通してることにより病原性をある程度回復させることができるので、その上で実験を行なえば、病原性の確認は可能である。

### (3) 接種菌の魚体内における消長

以上で本章の第一の目的、すなわち病原性確認の方法については一応の結論が得られたわけである。そしてこの実験中に、接種量のわずかな違いにより90%以上の魚が死亡する場合とまったく死亡魚が出ない場合があることがわかった。そこでこの現象に着目し、感染後発病し死に至る場合と、感染後も症状が進行せず回復に向う場合の違いを検討することにより host-parasite relationship の一つの局面をとらえてみた。

まず最初に感染後死亡する場合と回復する場合の、それぞれの魚における接種菌の消長を知るための実験を行なった。

#### (材料および方法)

前述した方法と同じように、培養した *V. anguillarum* (PB-15 株) をニホンウナギに魚体重 100 g 当り 1 mg および 0.1 mg 筋肉内接種し、水温20℃あるいは10℃の水槽に収容した。菌接種してから一定時間後(30分, 1時間, 3時間, ……72時間)にウナギを取り上げ、1.5% urethan 溶液中で麻酔し、胸部を切開し動脈球より採血した。採取した血液は少量の tween 80 (0.5%程度)を含む0.85%食塩水を用いて適宜稀釈し、一定量を寒天培地上に滴下し conradi 棒を用いて拡げ、培養した。24~48時間培養後に発育してきたコロニーの数から血液1 ml中の *V. anguillarum* の数を求めた。結果を示した表にはその値を対数に直して示した。

一部の実験では肝臓、脾臓および腎臓における生菌数を測定したが、その場合には採血後に各組織を切り取り、重量を測定した後、tween 80 を含む0.85%食塩水を稀釈液として加え glass homogenizer ですりつぶした。得られた homogenate を必要に応じて更に稀釈し培養に供した。

なお健康魚と思われるものを材料魚とした限りでは、操作中に混入したと考えられる雑菌が発育してきた場合を別にすれば、多くの場合接種した *V. anguillarum* 以外の菌が発育してくることはなかった。実験は1969年から1972年にかけて数回行ない、用いた材料魚の多くは何等の病気も発生していない養殖業者の池から直接購入したものである。

#### (結果および考察)

まず水温約20℃の下で行なった実験から得られた血液中の菌数変化についての結果を表35, 36および図6に示した。表35には接種菌量を1 mgとした5回の実験結果を示し、表36には0.1 mgを接種した6回の実験結果を示し、それらの結果を図6にまとめた。

この図をみると、個体差はかなりありながらも1 mg接種した場合は血液中の菌数は徐々に増加し、36時間後には平均して約  $10^7$  cells/ml に達していることがわかる。これに対して0.1 mg接種した場合は、比較的速みやかに菌数は減少し48時間後には約  $10^2$  cells/ml になっていることがわかる。

先に示したように、水温約20℃で1 mgを接種したウナギは接種後2日、すなわち36~48時間で死亡するわけであるが、この実験結果をみると、死亡寸前のウナギの血液中における *V. anguillarum* は  $10^7$  cells/ml になっていることがわかった。なお48時間後にはやや菌数が減少しているが、これは血中菌数が36時間後に  $10^7$  に達した魚が死亡してしまい、48時間後に生き残っていたものは、死亡がやや遅れる個体もしくは回復に向う個体であったためと考えられる。

一方0.1 mgを接種したウナギは先の実験結果からみてすべて生き残ると考えられるが、この実験結果をみ

Table 35. Changes with time in log number of viable cells in the blood of the Japanese eels intramuscularly injected with 1 mg of cells of *Vibrio anguillarum* under about 20°C of water temperature

Experiment (Date)	Experimental water temperature Mean and (range)	Body weight of fish tested (range)	Number of fish tested	Log number of cells of <i>V. anguillarum</i> /ml of blood										
				Time after injection (hours)										
				0.5	1	2	3	6	9	12	24	36	48	
1 (Jul. 1969)	18.6°C (17.8-19.2)	36 g (26-74)	8								6.26	6.60	>7	4.86
											6.00	6.08	>7	6.15
2 (Oct. 1969)	18.9 (18.0-19.8)	112 (71-162)	8				5.52	6.36	5.95	5.34				
							5.58	5.67	6.93	8.00				
3 (Oct. 1969)	19.7 (19.5-20.0)	104 (64-189)	8	5.20	5.23	5.20	5.76							
				5.43	3.95	5.08	4.48							
4 (May, 1971)	18.7 (18.5-19.0)	130	8					5.70	5.70		6.70	<5		
								5.78	5.70		<5	7.48		
5 (Nov. 1972)	17.5 (17.0-18.0)	127 (94-155)	30					5.20			6.00	4.60		
								6.26			5.41	6.34		
								5.43			5.78	6.97		
								6.32			5.53	7.81		
								5.88			5.72	5.83		
								5.94			6.40	5.23		
								6.28			6.90	6.57		
								6.26			6.23	8.23		
				5.30			6.54	7.59						
				5.65				5.62	6.20					
Mean	18.7°C	111 g		5.32	4.59	5.14	5.36	5.86	6.07	6.40	6.12	6.62	5.51	

Table 36. Changes with time in log number of viable cells in the blood of the Japanese eels intramuscularly injected with 0.1 mg of cells of *Vibrio anguillarum* under about 20°C of water temperature

Experiment (Date)	Experimental water temperature  mean and (range)	Body weight of fish tested  (range)	Number of fish tested	Log number of cells of <i>V. anguillarum</i> /ml of blood										
				Time after injection (hours)										
				1	3	6	9	12	18	24	36	48	72	96
1 (Jul. 1969)	18.7°C (17.8-19.5)	32 g (20- 51)	8								3.00	<2	<2	<2
											3.77	<2	<2	<2
2 (Oct. 1969)	20.6 (20.5-20.8)	90 (46-166)	8		3.43 4.08	3.18 3.40	4.53 3.95	5.36 2.30						
3 (Nov. 1969)	18.5 (18.0-19.0)	67 (55- 79)	8				3.40 5.15	4.74 5.04	2.40 2.48	1.70 2.54				
4 (Jun. 1970)	18.6 (18.2-20.0)	112 (65-148)	12	4.48 6.11 6.18					4.15 3.18 5.18	3.93 <2 5.76		3.08 <2 1.70		
5 (May, 1971)	18.7 (18.5-19.0)	131	8			2.48 2.78	2.70 2.00			<2 1.70	<2 <2			
6 (Nov. 1972)	17.5 (17.0-18.0)	118 (100-140)	8			5.32 4.86				2.78 3.00		1.48 1.00	<1 <1	
Mean	18.8°C	93 g		5.59	3.76	3.67	3.62	4.36	3.48	3.12	<2	1.82	<1	<2

*V. anguillarum*

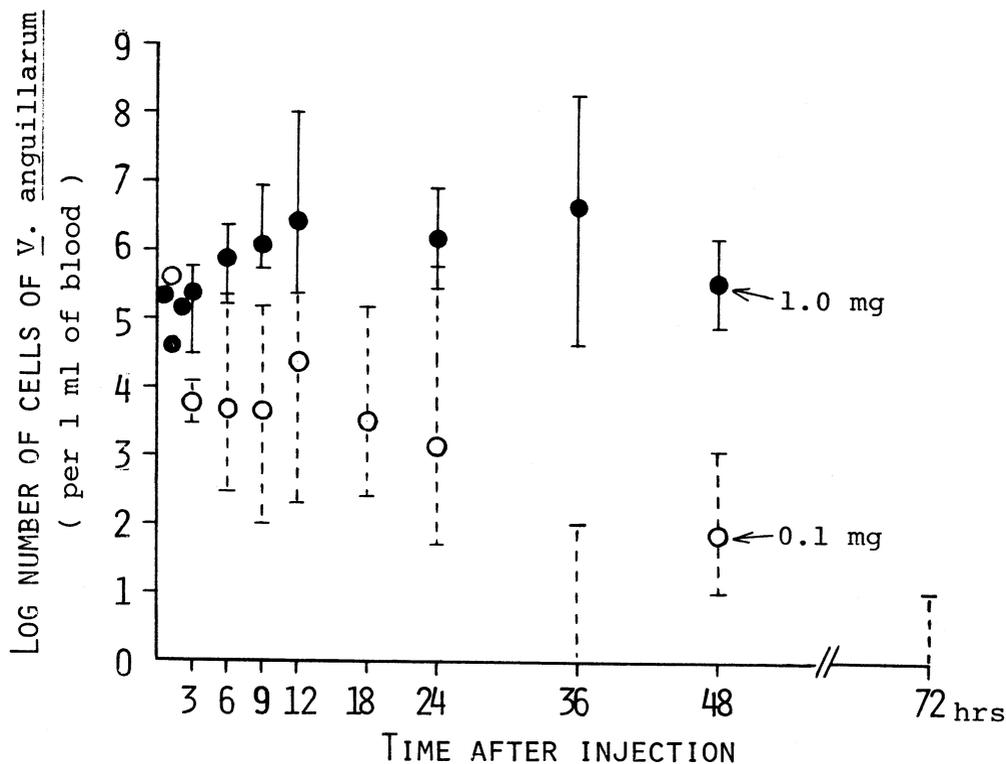


Fig.6. Changes with time in log number of viable cells in the blood of the Japanese eels intramuscularly injected with 1.0 mg and 0.1 mg of cells of *Vibrio anguillarum* under about 20°C of water temperature.

Table 37. Changes with time in log number of viable cells in the blood of the Japanese eels intramuscularly injected with 1 mg of cells of *Vibrio anguillarum* under about 10°C of water temperature

Experiment (Date)	Experimental water temperature mean and (range)	Body weight of fish tested (range)	Number of fish tested	Log number of cells of <i>V. anguillarum</i> per ml of blood				
				Time after injection (hours)				
1 (Jan. ~ Feb. 1970)	12.2°C (11.8-12.5)	161 g (88-274)	16	48	4.56	<2	7.49	6.26
				96	6.18	5.89	6.91	7.92
				48	5.79	5.60	5.41	8.11
				96	6.26	5.88	6.89	4.78
2 (Feb. 1970)	10.4 ( 9.5-11.0)	155 (123-234)	20	48	6.54	5.20	8.18	5.18
				96	6.40	5.20	8.04	7.71
				48	5.65	5.90	6.69	8.11
				96	5.96	4.81	7.08	8.08
				48	6.15	5.78	8.91	6.23
Mean	11.3°C	158 g		5.78		7.11		

ると48時間後にすでに菌数は $10^2$ 位になり、96時間後にはほぼ消失してしまっていることが確認された。1 mgと0.1 mgの接種量はわずかに1オーダー違うだけであり、接種してから3時間後までの菌数の違いは測定値が少なく個体差が大きく出ているためもあってかあまり大きな差は出ていないが、それ以後の菌の消長はまったく対照的であり非常に興味ある現象と思われた。

次に水温 $10^{\circ}\text{C}$ 下で行なった1 mg接種実験の結果を表37に示した。この場合は48時間後と96時間後の値のみを測定しているが、ここでも時間経過とともに菌数が増加していることがわかる。先に示したように水温 $10^{\circ}\text{C}$ 下で1 mg接種するとウナギは5日ないし6日で死亡するわけであるが、4日後(96時間)にしてすでに血中の菌数は $10^7$ に達していることが確認された。

Table 38. Changes with time in log number of viable cells in the tissues of the Japanese eels intramuscularly injected with 1 mg of cells of *Vibrio anguillarum* under  $17.5^{\circ}\text{C}$  of water temperature

Fish	Log number of cells of <i>V. anguillarum</i> /g (ml) of tissue											
	Time after injection (hours)											
	6				24				36			
	Blood	Spleen	Liver	Kidney	Blood	Spleen	Liver	Kidney	Blood	Spleen	Liver	Kidney
1	5.20	6.11	4.70	5.00	6.00	6.89	5.70	6.40	4.60	6.38	4.70	5.00
2	6.26	6.66	5.40	5.40	5.41	6.00	4.00	5.78	6.34	5.00	4.70	5.54
3	5.43	6.72	5.11	5.63	5.78	6.28	4.00	5.18	6.97	7.36	5.00	6.51
4	6.32	6.92	5.26	5.57	5.53	6.81	4.48	5.30	7.81	7.73	7.83	7.93
5	5.88	6.43	4.00	5.00	5.72	7.26	4.88	5.40	5.83	6.51	5.30	5.00
6	5.94	6.94	4.48	5.56	6.40	6.04	5.20	5.74	5.23	6.32	4.00	5.00
7	6.24	7.23	5.34	5.71	6.90	7.20	5.70	6.28	6.57	7.15	6.23	6.15
8	6.26	7.34	5.45	5.86	6.23	7.04	4.88	5.60	8.23	7.73	7.58	7.54
9	5.30	6.83	4.00	5.65	6.54	7.11	5.54	6.18	7.59	7.76	7.04	7.53
10	5.65	6.70	4.90	6.04	5.62	6.40	4.40	5.40	6.20	7.18	5.00	6.11
Mean	5.85	6.79	4.86	5.54	6.01	6.70	4.88	5.73	6.54	6.91	5.74	6.23
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
S.D.	0.43	0.36	0.55	0.33	0.49	0.48	0.65	0.43	1.15	0.87	1.34	1.13
Experimental water temperature					17.5°C (17.0–18.0)							
Body weight of material fish					127 g (94–155)							

以上が血液における生菌数変化であるが、血液以外の内臓器官における菌数変化についても合わせて調べた実験結果を表38, 39および図7, 8に示した。表38に示したのは30尾のニホンウナギに1 mgを接種して6時間、24時間および36時間後に魚を10尾ずつ取り上げ、血液、脾臓、肝臓および腎臓における菌数を測定した結果である。更にこの結果を図7に示したが、これを見ると菌数は各組織においてほぼ同じ様に増加していることがわかる。臓器別に菌数をみると、測定時間に関係なく常に脾臓で最も高く、以下血液、腎臓、肝臓の順になっている。

なお本実験では血液および上記の3つの臓器における菌の存在量についてしか測定していないが、予備実験で接種魚のいろいろな組織を stamp することにより大まかな菌の存在量を調べてみた。その結果、血液および上記の3つの臓器からは多量の菌が分離されたのに対し、腸および胃からはわずかな菌しか分離されなかった。また接種部位近くの筋肉組織にはかなり多量の菌が存在することが確かめられ、また生き残るようなウナギにおいても一番最後まで菌が検出する部位でもあったが、採取する筋肉組織のわずかな位置の違いにより菌数に大きな差が出ることから定量の対象とはしなかった。

0.1 mgを接種した場合の結果を表39および図8に示した。この場合も3つの臓器における菌数変化の傾向

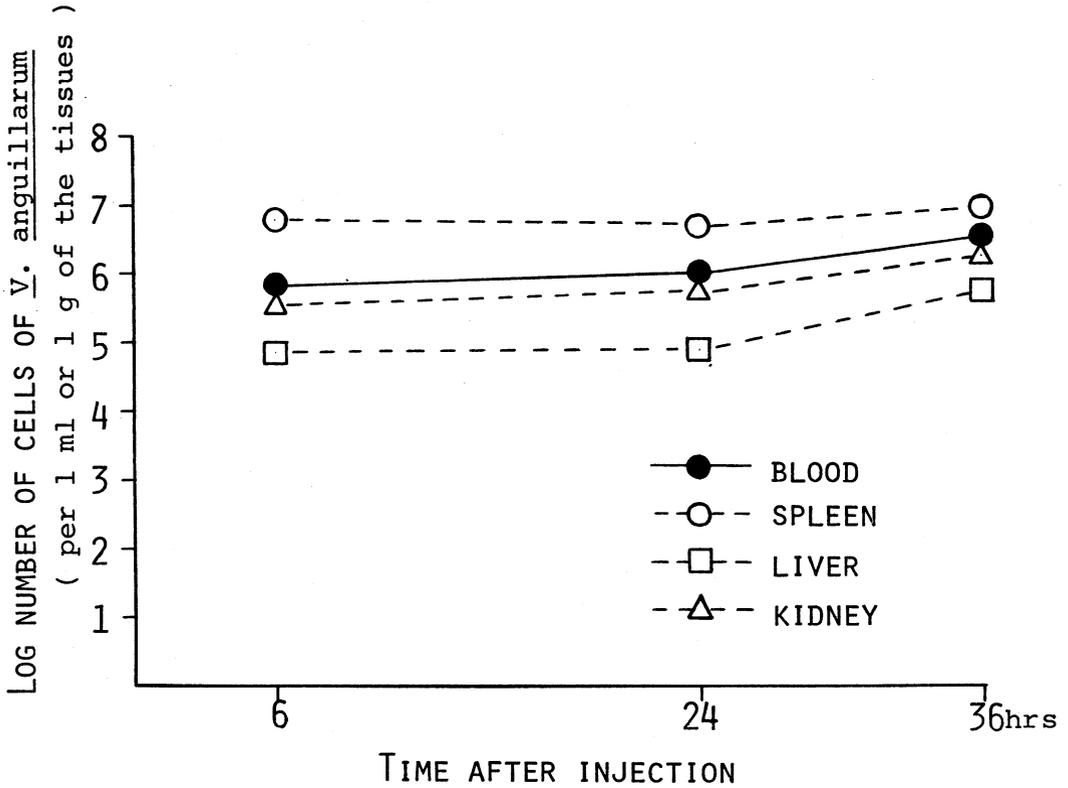


Fig.7. Changes with time in log number of viable cells in the tissues of the Japanese eels intramuscularly injected with 1.0 mg of cells of *Vibrio anguillarum* under 17.5°C of water temperature.

Table 39. Changes with time in log number of viable cells in the tissues of the Japanese eels intramuscularly injected with 0.1 mg of cells of *Vibrio anguillarum* under 17.5°C of water temperature

Tissue	Log number of cells of <i>V. anguillarum</i> / g (ml) of tissue			
	Time after injection (hours)			
	6	24	48	72
Blood	5.32	2.78	1.48	<1
	4.86	3.00	1.00	<1
Spleen	5.16	3.40	2.30	<1
	5.36	4.68	2.30	<1
Liver	3.90	3.18	<1	<1
	3.18	<2	<1	<1
Kidney	4.64	3.00	<1	<1
	4.00	3.30	1.70	<1

Experimental water temperature 17.5°C (17.0–18.0)

Body weight of material fish, 8 eels, 118 g (100–140)

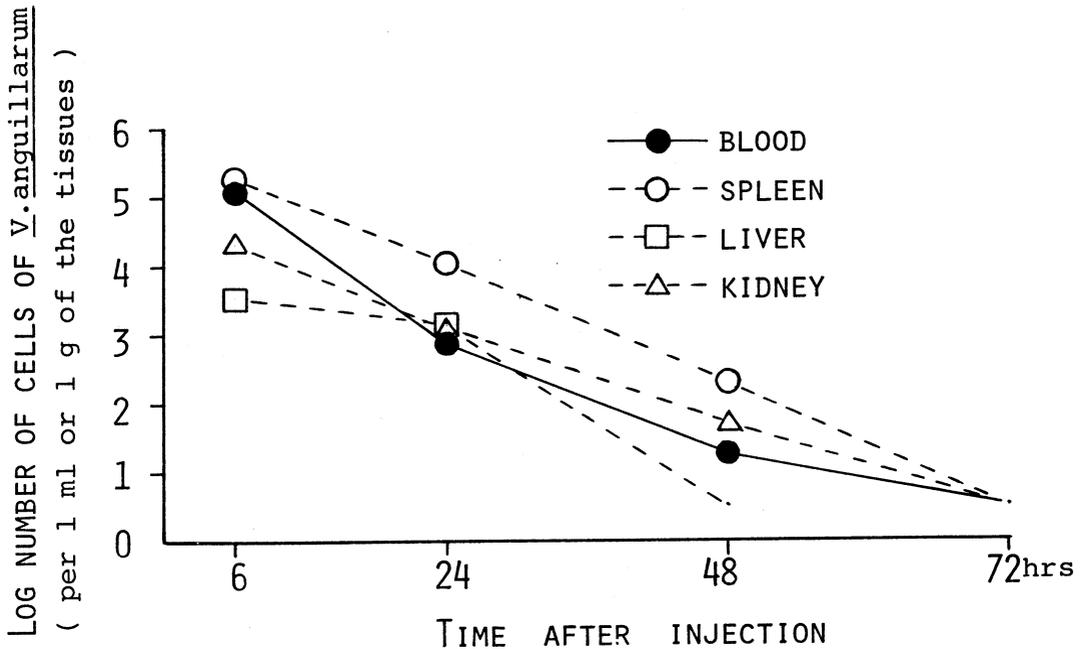


Fig.8. Changes with time in log number of viable cells in the tissues of the Japanese eels intramuscularly injected with 0.1 mg of cells of *Vibrio anguillarum* under 17.5°C of water temperature.

は血液中における菌数変化の傾向とほぼ同じであり、72時間後にはいずれの組織からも接種菌は消失してしまっていた。臓器別にみるとやはり脾臓に最も多く、他はあまり差がないが、肝臓では他におけるより早く48時間後にすでに10以下となっていた。

以上の結果をまとめてみると、1 mgの *V. anguillarum* をニホンウナギに筋肉内接種した場合、血液、肝臓、脾臓および腎臓において菌数は $10^4 \sim 10^5$  から $10^6$  へと徐々に増加し、死亡する寸前には $10^6$  ないし $10^7$  の level に達していた。一方、0.1 mgを接種した場合、菌数は各組織において $10^4$  位から次第に減少し48時間後には $10^2$  以下になり、72時間後には10以下となりほぼ消失してしまった。この1 mgと0.1 mg接種の場合の対照的な菌の消長が、前者の場合の90%以上、後者の場合の0%という極端な死亡率の違いをもたらすと考えられた。

*V. anguillarum* を接種した場合の魚体内における菌の消長に関する報告は見当たらないが、畑井(1972a)<sup>104)</sup> は *Aeromonas liquefaciens* をニホンウナギに血管内接種し、接種菌の消長について観察している。本実験結果と彼の実験結果を比べてみると、菌種の違いおよび接種方法の違いがあるにもかかわらず、菌数の変化の全体的な傾向はよく似ている。すなわち、死亡寸前と思われるウナギの血液中の菌数は、 $10^6$  もしくは $10^7$  の level であること、および肝臓と腎臓における菌数(彼は脾臓については調べていない)の変化は血液中におけるそれとほぼ平行している点などで一致している。しかし細部においては一致しない点も認められる。例えば彼の実験では致死量以下の菌量を接種した場合、最初の24時間では速みやかな菌数の減少がみられるが、その後はあまり減少せず7日後でも $10^3 \sim 10^4$  の菌が血液中に残っていたという点は本実験結果と異なっている。

本実験結果から判断すると、体内に入った *V. anguillarum* を処理するウナギの能力はかなり安定しており、その能力は接種菌量が0.1 mgの場合は処理できるが、1 mgの場合は処理しきれないものであることがわ

かった。そこでその処理能力を決定しているものは何か、どの組織あるいはどの細胞が処理能力を有しているのかということが問題となってくる。

畑井はこの問題に関し、腎臓における菌数が最も多いことから腎臓が除菌をする重要な組織ではないかと推論しているが、その論法でいけば本実験結果からは、脾臓の方がより重要ということになる。しかしながら菌が多いということがその組織が菌を処理しているということの説明には必ずしもならないと考えられ、この実験から菌を処理している組織を推定することはできないものと思われる。

#### (4) 接種魚の血液性状の変化

接種実験により死亡するウナギあるいは回復するウナギの内的変化を調べるために、まず血液性状における変化に着目してみた。先の実験結果から、接種された *V. anguillarum* は血液中および血液につながるの深い組織において多く認められたことから、血液に何等かの病変が生じているかもしれないと考えた。またもし血液に何等かの顕著な変化が起きているとすれば、本病の診断の上でも利用できると考えられた。

検討した項目は、第一に貧血が起きているかどうかを知るために hematocrit 値、赤血球数および血色素量を測定し、第二に防禦反応の状態を知るために各種白血球の量的変化を調べてみた。

##### (材料および方法)

本節(2)および(3)の実験で用いたと同じ方法により、ニホンウナギに *V. anguillarum* を接種し、一定時間後に魚を取り上げ麻酔した後、胸部を切開し動脈球より heparin を coating した滅菌注射器を用いて採血をした。採血量は魚体重の約 1% (V/W) とした。

得た血液の一部は菌数測定のために、先に示した方法で 1ml 中の菌数を求めた。Hematocrit 値は micro-hematocrit 管を用い 12,000 回転で 5 分間遠心分離を行ない測定した。赤血球数は Hayem 氏液を稀釈固定液に用い Thoma の血球算定盤を用いて算出した。血色素量 (hemoglobin 量) は Sahli 血色素計を用い肉眼にて測定するという最も簡単な方法を採用した。

白血球数の計測は May-Giemsa 染色 (結城 1963)<sup>105)</sup> を施した塗抹標本を観察することにより、成熟赤血球 10,000 に対する相対的な数を求めた。血球の分類は結城 (1960)<sup>106)</sup>、(1963) の分類などを参考にして、成熟赤血球、幼若赤血球、崩壊赤血球、リンパ球、好中球、単核球などのその他の白血球、栓球および核影に分類したが、そのいずれにも分類することができなかった血球もある。実験は 1970 年から 1973 年にかけて 15 回行ない、1 回の実験にニホンウナギを少ない時で 8 尾、多い時で 40 尾、合計 312 尾を用いた。

##### (結果および考察)

表 40 に水温約 10°C 下で 1 mg を接種した実験結果 (No 1, 2) および水温約 20°C 下で 1 mg を接種した実験結果 (No 3, 4, 6, 7, 12, 15) を示し、表 41 に水温約 20°C 下で 0.1 mg を接種した実験結果 (No 5, 8, 10, 11, 13, 14) および 1 mg を血管内接種した実験結果 (No 9) を示した。

まず赤血球における変化をみるために、水温約 20°C 下で 1 mg および 0.1 mg を接種した時の、hematocrit 値、hemoglobin 量および赤血球数の変化をそれぞれ図 9 および図 10 に示した。これらの図には合わせて血液中の *V. anguillarum* の細胞数の変化も示したが、これは変動はあるものの全体的には前の実験結果と同様に、1 mg 接種の場合は徐々に増加し、0.1 mg 接種の場合は徐々に減少している。このいずれの場合においても、hematocrit 値、hemoglobin 量および赤血球数にはある程度のふれはありながら、それらの値が時間経過とともに減少していく、あるいは増加していくといったような変化は認められなかった。図には示さなかったが、水温 10°C 下で 1 mg を接種したウナギにおいても同じように貧血の徴候は認められなかった。ただ実験 No. 9 の血管内接種の場合には、それらの値がある程度減少していく傾向が認められた。しかしこの血管内接種実験に供した魚の数は少ないので論議の対象にはしなかった。少なくとも筋肉内接種した場合は、その接種量が致死量の場合にも致死量以下の場合でも、実験期間中には hematocrit 値、hemoglobin 量および赤血球数にはほとんど変化が起こらないと判断された。

Table 40. Changes with time in blood characteristics of the Japanese eels intramuscularly injected with *Vibrio anguillarum*. (Part 1)

Item	Exp. No.	1, 2			3, 4, 6, 7, 12, 15						
Date		Jan. - Feb., 1970			1971, 1972, 1973						
Water temperature		10.4 - 12.2°C			17.5 - 25.0°C						
Dose		1 mg/100 g			1 mg/100 g						
Time after injection		Cont.	48 hrs	96 hrs	Cont.	6 hrs	9 hrs	24 hrs	30 hrs	36 hrs	48 hrs
Number of fish tested		18	18	18	38	28	2	36	11	15	9
Body weight of fish		152 g	158	174	123	114	132	116	97	136	110
Log number of cells of <i>V. anguillarum</i> (per ml of blood)			5.95	7.98		5.63	5.70	5.82	5.00	6.26	
Hematocrit value		34	32	34	27	28		24	30	26	29
Hemoglobin (g/dl)		6.6	6.0	6.5	5.4	5.6		4.8	6.6	5.5	4.9
Number of blood cells											
Mature erythrocyte ( $\times 10^4$ /cu.mm)		242	214	221	230	244		212	240	233	222
Relative number of blood cells (to 10000 mature erythrocytes)											
Immature erythrocyte		36	24	28	13	4	1	16	45	5	5
Disintegrated erythrocyte		94	108	81	49	32	24	65	93	18	129
Lymphocyte		93 (100)	47 (54)*	26 (31)	166 (100)	105 (80)	63	80 (57)	31 (43)	74 (36)	95
Neutrophil		59 (100)	30 (54)	13 (21)	20 (100)	46 (304)	66	35 (168)	7 (84)	28 (78)	51
Other leucocytes		32 (100)	15 (50)	13 (47)	43 (100)	23 (73)	20	26 (61)	10 (42)	17 (43)	49
Unidentified		107	126	106	210	160	55	143	92	129	200
Spindle cell		116	92	61	115	138	36	88	145	19	81
Nuclear shadow		132	113	71	101	66		104	100	31	239

\* relative number to the control

Table 41. Changes with time in blood characteristics of the Japanese eels intramuscularly injected with *Vibrio anguillarum*. (Part 2)

Item	Exp. No.	5, 8, 10, 11, 13, 14					9 (Intravascular injection)			
		Date		1971, 1972, 1973					Apr., 1970	
Water temperature		17.5 - 20.8°C					16.0°C			
Dose		0.1 mg/100 g					1 mg/100 g			
Time after injection	Cont.	6 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs	
Number of fish tested	28	23	22	16	16	4	4	4	2	
Body weight of fish	135 g	119	135	135	131	100	103	96	95	
Log number of cells of <i>V. anguillarum</i> (per ml of blood)		4.55	4.26	3.32	1.88					
Hematocrit value (%)	29	28	28	27	27	24	20	20	18	
Hemoglobin (g/dl)	5.8	6.4	5.9	5.6	5.8	4.6	3.1	3.4	3.5	
Number of blood cells										
Mature erythrocyte ( $\times 10^4$ /cu.mm)	237	229	225	228	218	205	145	172	153	
Relative number of blood cells (to 10000 mature erythrocytes)										
Immature erythrocyte	3	1	1	0	3	15	52	222	50	
Disintegrated erythrocyte	13	14	17	11	13	202	79	337	69	
Lymphocyte	120 (100)	49 (71)*	70 (66)	68 (83)	97 (160)	130	112	52	216	
Neutrophil	16 (100)	33 (380)	38 (202)	34 (302)	59 (572)	207	141	297	198	
Other leucocytes	25 (100)	14 (78)	14 (50)	14 (71)	30 (230)	40	42	91	80	
Unidentified	157	67	67	86	76	117	239	155	160	
Spindle cell	98	99	102	160	127	17	59	88	126	
Nuclear shadow	50	41	36	48	42	49	124	93	94	

\* relative number to the control

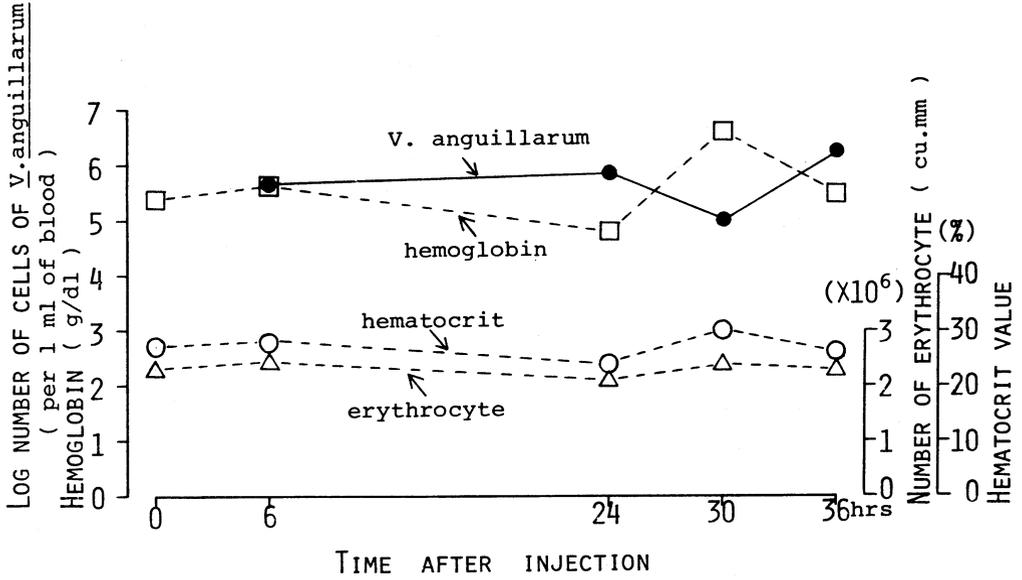


Fig.9. Changes with time in blood characteristics of the Japanese eels intramuscularly injected with 1.0 mg of cells of *Vibrio anguillarum* under about 20°C of water temperature.

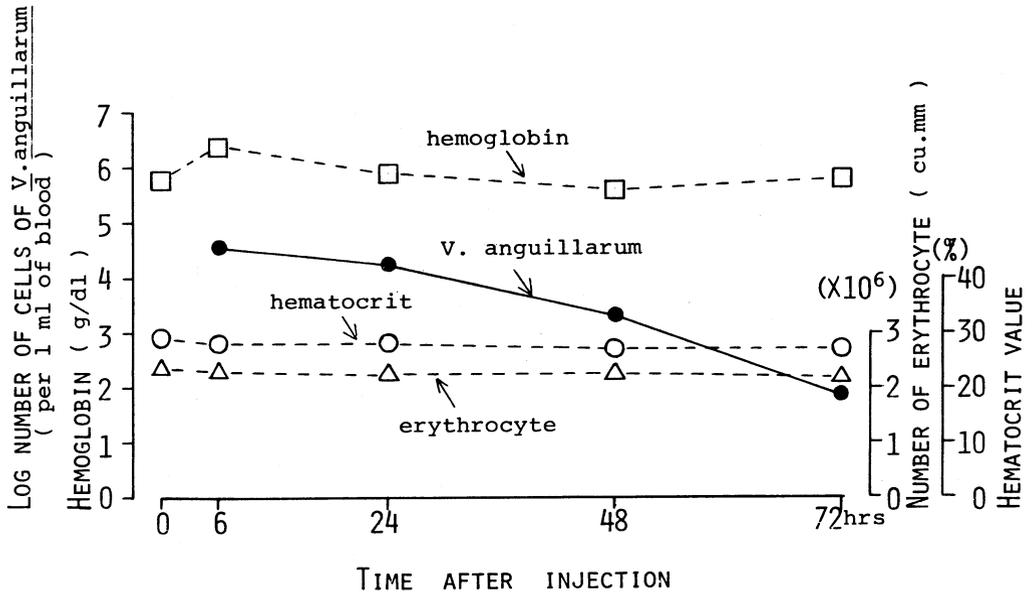


Fig.10. Changes with time in blood characteristics of the Japanese eels intramuscularly injected with 0.1 mg of cells of *Vibrio anguillarum* under about 20°C of water temperature.

*V. anguillarum*を用いてのこのような実験例は他にないが、ANDERSON and CONROY (1970)<sup>1)</sup> がスコットランドの天然タラおよびカレイなど (*Gadus morhua*, *Pleuronectes microcephalus*, *P. platessa*, *Rhombus maximus*) のピブリオ罹病魚の血液を調べている。それによれば病魚の hematocrit 値, hemoglobin 量および赤血球数は健康魚のものに比べて一様に低く、例えば hematocrit 値では健康魚の値の70~84%になっている。このような自然病魚における貧血症状はウナギの鱭赤病 (*Aeromonas punctata* 感染) においても認められているが (保科 1962)<sup>76)</sup>, ピブリオ病の場合も自然病魚の場合も慢性的に病状が進行しその結果として貧血症状を呈するものと推測される。もちろん貧血症状を呈するようなものが感染を受け易いとみることも可能であろう。

いずれにしても、本実験によればウナギにおける実験的急性 *V. anguillarum* 感染症においては貧血の徴候は認められないことがわかった。なお幼若赤血球および赤血球の崩壊形の数はいずれも大きく、実験に供した魚群ごとにもかなり差があることもあってか、菌接種後の時間経過に伴う増加あるいは減少の傾向は認められなかった。

次に白血球の量的変化についてであるが、各実験に供した魚群ごとにはじめからかなり白血球数の差があったので、各魚群ごとに对照魚でのそれぞれの白血球数を100とし、それに対する実験魚のリンパ球, 好中球, および単核球などのその他の白血球 (以下単に「その他の白血球」と呼ぶ) の値を求め、それを平均した。そのようにして求めた相対値の変化を図11および図12に示した。図11には水温約20°C下で1mgを接種した実験結果を、図12には水温約20°C下で0.1mgを接種した実験結果を示してある。

まず図11の致死量接種の場合をみると、リンパ球および「その他の白血球」は時間経過とともに徐々に減少しているのに対し、好中球は菌接種してから6時間後には对照魚の3倍もの値に増加している。好中球もその後は減少し、24時間後には对照魚の1.7倍程度になり、30時間後および36時間後には对照魚の値より低くなっている。

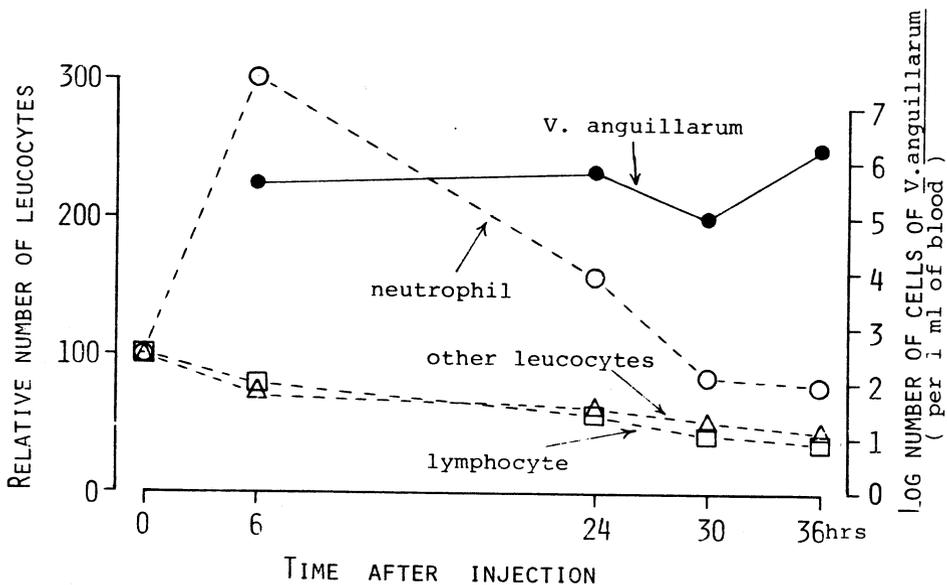


Fig.11. Changes with time in relative number of leucocytes of the Japanese eels intramuscularly injected with 1 mg of cells of *Vibrio anguillarum* under about 20°C of water temperature.

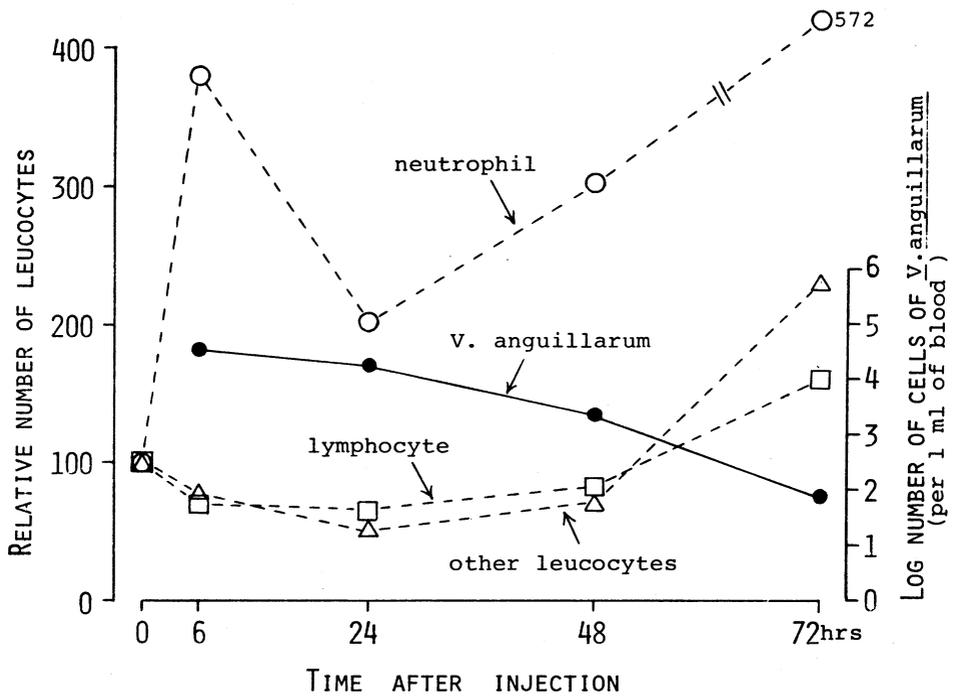


Fig.12. Changes with time in relative number of leucocytes of the Japanese eels intramuscularly injected with 0.1 mg of cells of *Vibrio anguillarum* under about 20°C of water temperature.

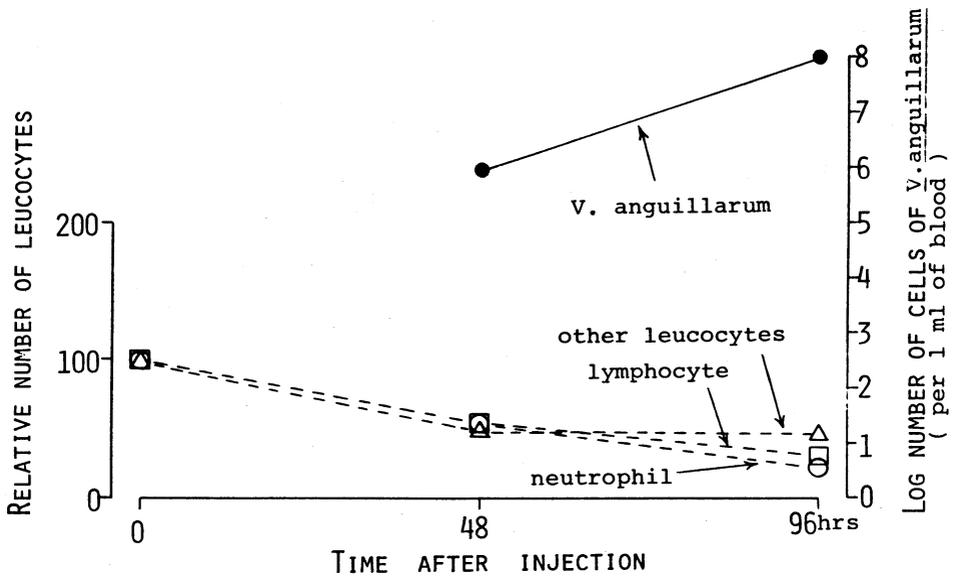


Fig.13. Changes with time in relative number of leucocytes of the Japanese eels intramuscularly injected with 1 mg of cells of *Vibrio anguillarum* under about 10°C of water temperature.

Table 42. Changes with time in leucocyte constituent of the Japanese eels intramuscularly injected with *Vibrio anguillarum*.  
Water temperature : 17.5–25.0°C

Leucocyte	Dose		1 mg/100 g					0.1 mg/100 g				
	Time after injection		0	6	24	30	36 hrs	0	6	24	48	72 hrs
Lymphocyte	166*	105	80	31	74	120	49	70	68	97		
	(72)**	(55)	(61)	(65)	(58)	(73)	(51)	(60)	(58)	(56)		
Neutrophil	20	46	35	7	28	16	33	38	34	59		
	(9)	(31)	(24)	(15)	(30)	(11)	(36)	(29)	(28)	(28)		
Other leucocytes	43	23	26	10	17	25	14	14	14	30		
	(19)	(14)	(15)	(20)	(12)	(16)	(13)	(11)	(14)	(16)		
Total	229	174	141	48	119	161	96	122	116	186		

\* Relative number to 10,000 of mature erythrocyte

\*\* percentage in total leucocytes

これに対し、図12に示した致死量以下の菌量を接種した場合をみると、24時間後までの白血球の変化は致死量接種の場合とはほぼ同じになっている。すなわちリンパ球および「その他の白血球」は徐々に減少し、好中球は6時間後に対照魚の4倍近くに増加し、その後24時間後にはやや減少し対照魚の2倍程度になっている。24時間後からの変化は致死量接種の場合とは著しく異なり、すべての白血球は増加の一途をたどり、特に72時間後における好中球の量は対照魚のその5倍以上になっている。

また水温10°Cの下で1mgを接種した場合の白血球の量的変化を図13に示した。この場合は接種してから48時間後までの間では測定していないのでその間の変化は不明であるが、48時間後および96時間後にはいずれの白血球も減少しており、水温20°Cで致死量接種した場合と基本的に同じ現象が見られている。

次に白血球の組成変化の面から検討を加えてみた。この場合も各実験魚群ごとに白血球の組成（各白血球が全白血球の中で占める割合、%）を求め、それを平均した値を表42および図14に示した。図14の左側に示した致死量接種の場合をみると、好中球の占める割合が対照魚の9%から6時間後に31%と急激に増加しており、その後もある程度の変動はありながら36時間後でも30%前後と高い割合を示している。リンパ球の占める割合がその分だけ低くなっており、「その他の白血球」の占める割合は終始14~20%とあまり変化していない。

図14の右側に示した致死量以下の0.1mgを接種した場合においても、好中球の占める割合が6時間後に36%と増大しており、その後も多少は下がるが30%近い値で維持され、その分だけリンパ球の占める割合が対照魚と比べて低くなっている。この白血球の組成変化の点では致死量接種の場合も、致死量以下接種の場合も同じ現象が見られているといえよう。

以上の白血球の量的変化をまとめてみると、致死量接種した場合、接種してから6時間後に好中球が異常に多くなり、その後好中球は減少し、死亡寸前と思われる36時間後には接種前（対照魚）より減少してしまっていた。ただ好中球が全白血球中で占める割合は6時間後から36時間後まで常に対照魚より高い値を示した。リンパ球および「その他の白血球」は接種後減少の一途をたどり、組成の点では「その他の白血球」の占める割合には変化がなく、リンパ球は常に対照魚より低い値を示した。

これに対し、致死量以下の菌量を接種した場合は24時間後までのそれぞれの白血球数の変化は致死量接種の場合と同じ pattern を示したが、24時間後以降はすべての白血球が増加した。白血球の組成の点では致死量接種の場合とまったく同様に好中球が対照魚と比べて高い割合を維持し続けた。

なお本実験の対照魚における白血球の組成は、好中球が約10%、リンパ球が約70%、「その他の白血球」が約20%となっているが、この割合は SANO (1957)<sup>107)</sup> の示したニホンウナギの値と比べると、特に好中

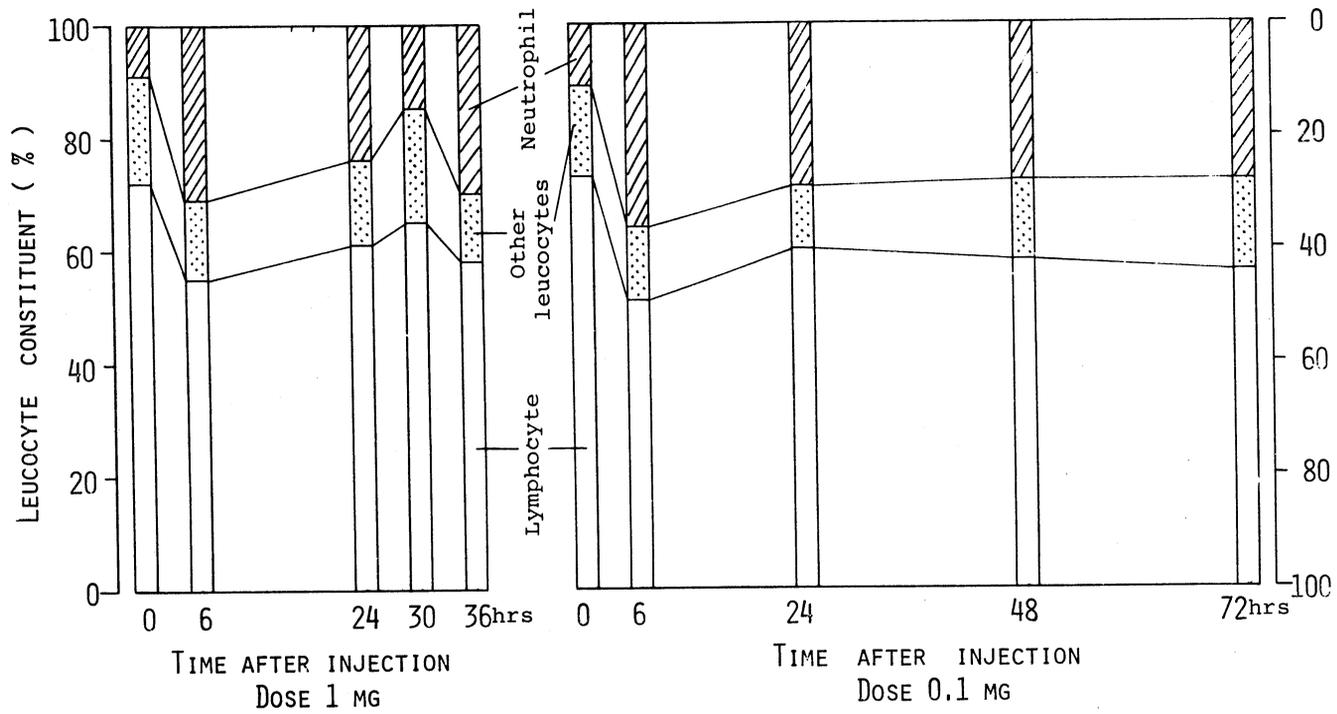


Fig.14. Changes with time in leucocyte constituent of the Japanese eels injected intramuscularly with *Vibrio anguillarum* under about 20°C of water temperature.

球の占める割合が低いように思われる。本実験で用いたウナギと彼が調べたウナギの血液状態がかなり違っていたと考えられるが、一つには白血球分類の基準の違いによるものもあるのではないかと考えられる。

本実験結果で確認された白血球の変動について多少推論を混えて論議してみたい。

疾病時における白血球の数およびその形態上の変化は、その動物自身の造血機能と病原体の毒力との相対的關係でまってくる。つまり一般に造血機能が高い場合には作用する毒力に対し積極的に反応を示し、白血球数の増加として現われ、毒力が造血機能を制圧する状態になると退行所見が示されるといわれる(日比谷 1963)<sup>108)</sup>。

本実験結果でも *V. anguillarum* を筋肉内に接種すると、すみやかに白血球造血機能が働き始め、接種6時間後には特に好中球が血液中に多量に認められるようになる。24時間後になると6時間後に比べると好中球も半減し、リンパ球および「その他の白血球」も減少しているが、これはおもにそれらの白血球が初感染部位である筋肉組織に集中したためと考えられる。定量的には測定していないが、接種部位の筋肉組織の塗抹標本を観察すると、好中球およびリンパ球などの白血球が顕著に増加していることが確認されたし、後出する組織切片の観察からも同様の現象が確認されている。

24時間後以降の変化は接種菌量によって違ってくるが、致死量接種の場合は生産される好中球などの白血球の喰菌作用を上回るだけの菌の増殖があり、逆に白血球を破壊し、血中の白血球は減少し、死に至るものと考えられる。血液塗抹標本を観察していると、2, 3個程度の *V. anguillarum* を取り込んで溶解している好中球の存在とともに、5個程度の菌体を取り込み逆に好中球が崩壊しかかっている像が認められた(Plate II-1, 2参照)。しかし好中球がかなり減少してきている個体の血液標本においても、このような好中球の崩壊像はそれ程多いとは思われなかったことから考えれば、単に好中球が細菌に破壊されることだけで数が減少するとは思えず、やはり造血機能にも何等かの障害が生じているものと推測された。

これに対し、接種菌量が致死量以下であった場合は、24時間後以降白血球は増加してくる。これは接種部位に集中した好中球などの白血球が菌の増殖を抑えたために、その後補給された白血球が血液中に多量に存在したためと考えられる。

このようにみえてくると、接種された菌を処理するウナギの能力を決定しているのは喰菌作用をもつ白血球の量(本実験結果からは好中球が主たる働きをすると考えられた)ということになる。この場合の白血球の量というのは、菌が接種された時点における血液中の存在量もさることながら、それ以上にその後生産される量、すなわち造血機能が問題となる。

畑井(1972b)<sup>109)</sup>は *A. liquefaciens* をウナギに血管内接種した時の白血球の量的および組成の変化を調べている。本実験の結果と彼の実験結果を比較してみると、菌接種後にリンパ球などにはほとんど量的な変化はなく、好中球のみが顕著に増加している点で一致している。しかしながら彼は死亡寸前のウナギにおいても好中球の数が依然として多いと述べている点が若干問題となる。彼の実験結果をみると、たしかに好中球が全白血球の中で占める割合という点では死亡寸前のウナギにおいても高い level が維持されているが、絶対値、すなわち好中球の数そのものの値は必ずしも最後まで高い値で維持されているとはいえないように思われる。

また全体的に彼の実験結果では、好中球の数および割合が本実験結果より高くなっている傾向がある。この差は先にも触れたように、材料魚の血液性状の違いあるいは血球の分類の基準の違いに基づく部分もあるが、一つには菌の接種方法の違いからきているものもあると考えられる。すなわち本実験では筋肉内に接種したため、いったん血流中に出された好中球などの白血球が接種部位に集中したのに対し、彼の実験では血管内に直接接種したためそのような他の組織への白血球の移動がほとんどなかったことによる差と考えられる。

##### (5) 接種魚の病理組織学的検討

致死量および致死量以下の *V. anguillarum* を筋肉内に接種したニホンウナギの各組織における病変と接

種された菌の存在状態を知るために病理組織学的検討を行なった。

### (材料および方法)

組織中の生菌数および血液性状の変化をみた先の実験と同じように、*V. anguillarum* (PB-15株)を魚体重 100 g 当り 1 mg もしくは 0.1 mg の割合でニホンウナギに筋肉内接種し、水温 18.0～20.8℃ の水槽中に収

Table 43. Number of the Japanese eels sampled for histopathological observation

Dose	Time after injection					
	0 (Control)	6	24	30	48	72 hrs
1 mg/100 g	3 eels	2	3	3	—	—
0.1 mg/100 g	2	3	3	—	3	3

容した。接種後一定時間にウナギを取り上げ、採血した後、各組織を切り取り Bouin 氏固定液にて固定した。約24時間固定の後、通常の方法によりパラフィン切片標本を作製した。染色は Hematoxylin-Eosin 染色と、主として細菌の存在を見るために May-Giemsa 染色を施した。観察に供した組織は、接種部位近くの皮膚および筋肉（以下単に筋肉と呼ぶ）、肝臓、脾臓、腎臓、心臓（主として心室）、胃、腸（ほぼ中央部）、および鰓である。標本材料としたウナギの尾数を接種後の経過時間別に表43に示した。

### (結果および考察)

#### 0.1 mg 接種の場合

**筋肉組織：**菌を接種してから6時間後の標本を観察すると、筋繊維束間の結合組織中に接種した vibrio と考えられる細菌が存在している。その数は比較的少ない場合とかなり多い場合とがあるが、これは主として採取した組織の位置の違いによるものと思われた。病変としては皮膚に近い脂肪組織に隣接する筋肉組織において、筋繊維の軽度の融解が認められた。菌を接種してから24時間後の標本では、筋繊維の融解は進行し、筋繊維束間の結合組織において vibrio がかなり増殖し、多いところでは1,000倍1視野(0.03mm<sup>2</sup>, 厚さ5μ)に100個以上の菌体が確認された。なお菌体の長さは2～4μとなっており、培養したもの(通常1～2μ)よりかなり長くなっていた。結合組織および筋繊維束間における各種血球の浸潤が顕著であった(Plate II-4参照)。48時間後の標本では、白血球などの浸潤は依然として目立つが、vibrio は減少し、筋繊維における融解などの病変も24時間後からは進行せず、72時間後には白血球の浸潤は目立つが vibrio は発見が困難な程度減少していた。

**肝臓：**接種してから6時間後の標本では肝臓内の血管中にわずかながら vibrio が認められ、白血球も多く認められた。24時間後のものにおいても vibrio は血管中にかろうじて確認でき、白血球はやや減少していた。その後 vibrio は血管中を含めて肝臓組織中ではまったく認められなくなり、白血球も減少していた。肝臓の実質組織には終始目立った変化は認められず、部分的にうっ血が認められた程度である。

**脾臓：**Vibrio は接種6時間後および24時間後の標本には血管中にわずかに認められるが、その後は消失した。全体的に赤血球を主体とする各種血球の増加が認められ、そのため赤脾髄と白脾髄(対照魚の標本で赤血球が比較的集中している部分を赤脾髄 red pulp とし、他の部分を白脾髄 white pulp とした)の区分が不明瞭となり、脾柱も消失したようにみえる。これらの変化は48時間後のものではやや軽度になり、72時間後のものでは赤脾髄と白脾髄の区分もかなりはっきりし、回復していることが確認された。

**腎臓：**Vibrio は6時間後の標本でも非常に少なく、24時間後のものではまったく認められない個体もあり、以後はすべての個体で完全に消失してしまった。血管を取りまく筋肉組織にごく軽度の変化が認められた場合もあるが、細尿管および糸球体には終始変化は認められなかった。腎臓のリンパ様組織中に菌体を取り込んでいる大型白血球が認められる標本もあった。

**心臓：**Vibrio は終始認められず、心室の筋肉組織にもほとんど変化は認められなかった。血液中における

る白血球の増加が目立ち、中には vibrio を取り込んだ大型白血球がわずかに観察された。

**胃：** Vibrio はまったく認められなかった。血管中に白血球の増加が認められる点と、24時間後および72時間後の標本に絨毛上皮における粘液細胞の発達が認められたほかには特に変化は認められなかった。

**腸：** Vibrio はまったく認められなかった。粘膜下組織中の血管がややうっ血を呈しているほかには変化はなかった。

**膵：** Vibrio は終始認められず、組織にも特記すべき変化は認められなかった。

### 1 mg 接種の場合

**筋肉組織：** Vibrio は6時間後から24時間後にかけて、主として結合組織において繁殖し、30時間後にはかなり深部の筋肉組織間の結合組織を中心に繁殖し、融解してしまった筋繊維束内、脂肪組織、表皮に隣接する結合組織、あるいは基底膜下の間隙などあらゆる部分で繁殖している。筋繊維の融解はすでに6時間後に比較的表皮に近い部分で認められ、時間経過とともに融解の程度が進行し、また病変がみられる部分も次第に深部へ広がっている。24時間後には表皮基底膜下における血管がうっ血を呈し、血管外でも各種血球の浸潤が顕著であり、個体によっては表皮組織において細胞の増生あるいは逆に崩壊などの変化が認められた (Plate II-5 参照, 表皮増生を示す)。

筋肉組織における変化は、最初に筋繊維の不明瞭化、すなわち硝子様変性が起こり、次いで部分的融解が起こる。これらの変化は通常近くに vibrio の存在がないままに進行し、かなり融解が進んだ段階で vibrio がその部分に認められるようになる (Plate II-6, 7, 8 参照, 8の写真の右側の部分が筋肉が完全に融解してしまった部分を示し、各種血球とともに小さな点として見える菌体が多数認められる)。すなわち、筋繊維の変性あるいは融解は vibrio の侵入に先行して起こるものと判断され、本菌は筋繊維を融解するような物質を菌体外に産出しているものと考えられた。

**肝臓：** 血管中には終始 vibrio が観察されるが、その量は少なく、比較的大きな血管でも1断面にせいぜい2~3個の菌体が認められる程度である。実質組織には菌体はまったく認められず、病変も認められなかった (Plate III-1 参照)。

**脾臓：** Vibrio は時間経過とともに増加し、30時間後には組織全面に多数認められるようになるが、せいぜい5~6個の菌体が集まっている程度で、集落を形成しているとは思われなかった (Plate III-2, 3 参照, 3は散在する菌体を示す)。血管周辺を中心に全体的に各種血球の増加が認められた。また24時間後には脾柱の筋繊維に軽度の変性が認められたがその後進行する様子はなかった。

**腎臓：** Vibrio は6時間後から認められるが、その後あまり増加することはなく、30時間後においてもリンパ様組織中に散在する程度である。全体的にリンパ様組織において赤血球を主体とする血球の増加が認められるが、細尿管、糸球体などにはほとんど変化は認められなかった (Plate III-4 参照)。

**心臓：** Vibrio は標本によっては6時間後からわずかに認められるが、30時間後でも心室筋肉組織の繊維束間に血球に混ってわずかに認められる程度である。6時間後から血液中の白血球の増加が認められ、vibrio を取り込んでいる大型白血球 (喰細胞) も認められた。24時間後から心室の一部の筋繊維に軽度の変性が認められたが、30時間後になってもあまり進行した様子はなかった (Plate III-5 参照)。

**胃：** Vibrio は粘膜下筋層の主として血管中に24時間後から観察されたが、30時間後になっても血管外に認められることはなかった。粘膜下組織に6時間後から白血球および赤血球の浸出が認められ、粘膜下筋板 muscularia mucosa の筋繊維に軽度の融解が認められ、時間経過とともにその程度は進行した。外側の輪走筋層および縦走筋層にも部分的に筋繊維の変性が認められるが、その程度は粘膜下筋板における変化に比べると軽度であった。絨毛上皮には多少粘液細胞の発達が認められた程度でそれ以上の変化は認められなかった。

**腸：** Vibrio は30時間後の標本において初めて認められ、その存在は粘膜下組織の血管中に限られていた。

24時間後に輪走筋層に接する部分の縦走筋層の筋繊維の一部に融解が起こり、コーンハイム野 Cohnheim's field が消失していた。30時間後にはそれらの変化は更に進行し輪走筋層にも病変が起きていた。粘膜下組織においても細胞区分が不明瞭となり核だけが逆に明瞭化（濃染）し、一部では出血も起こり白血球も広範囲に浸潤していた (Plate III-6 参照)。絨毛組織には特に変化は認められなかった。

鰓: *Vibrio* は終始認められず、鰓弓軟骨近くの筋肉層に軽度の変性が認められたが、鰓薄板などにはまったく変化が認められなかった。

以上を総合してみると、接種された *V. anguillarum* は接種部位である筋肉組織あるいは結合組織において増殖しているのみで、その他に増殖していると判断される組織は認められなかった。死亡寸前の個体の脾臓においてかなりの菌が認められ、脾臓においてはあるいは増殖しているかもしれないと思われる程度である。従って接種部位で増殖した菌が血流に乗り各組織へ運ばれたと考えられる。また接種部位における結合組織あるいは筋肉組織を別にすれば、各組織で実質細胞が壊死するといったような変化は認められなかった。これらのことから、この実験的感染魚の病状は典型的な敗血症であるとみることができる。この場合の敗血症病果は接種部位の筋肉組織および結合組織ということになり、この原発病果から絶えず *vibrio* が血流中に侵入し、各組織に運ばれ全身感染症をひき起こし、死に至らしめたとみることができる。致死量以下を接種した場合は、原発病果における炎症により血流中に送られる菌がある段階で減少し、敗血症に至らずに回復に向ったと判断される。

*V. anguillarum* に感染した自然病魚の組織病変を検討した報告は数多くあるが (ZOBELL and WELLS 1934, HODGKISS and SHEWAN 1950, SAITO et al. 1964, HACKING and BUDD 1971, LEVIN et al. 1972, MCCARTHY et al. 1974, 舟橋ら 1974), いずれも自然病魚であることと魚種が違うという点で比較はできないと思われる。

舟橋ら (1974)<sup>57)</sup> は自然病魚のほか *V. anguillarum* を筋肉内接種あるいは皮膚塗抹し感染させたアユの病変について検討しており、筋肉内注射によりひき起こした病変を一次性敗血症と呼んでいる。魚種の違いはありながらも本実験でウナギにみられた変化は基本的には彼等の示したアユにおける病変とよく似ている。すなわち、接種部位の筋肉組織および結合組織において菌が増殖し、血流によって各組織へ運ばれていること、筋繊維の融解が菌体の侵入に先行していることから菌が何等かの分解酵素的なもの（彼等はそれを外毒素と呼んでいる）を産出していると考えられること、および肝臓、心臓、あるいは鰓などの実質組織には病変が認められないなどの諸点で一致している。もちろん魚種の違いによるためか、検査した魚の状態（彼等は死亡魚ないし瀕死魚のみを材料としている）の違いによるためか、彼等の観察では脾臓および腎臓に変性壊死が認められている点など、本実験結果とは相違する点もある。

### 第3節 毒素について

*V. anguillarum* が毒素を産生するか否かは本菌の病原性を検討する上でも、また vaccine について検討する上でも重要な問題点になると考えられる。しかしながら現在まで *V. anguillarum* が毒素を産生するか否かについてはほとんど検討されていない。ここでは本菌の毒素産生に関する予察的な実験を試みた。

#### (材料および方法)

*V. anguillarum* PB-15 株を普通寒天培地にて 28°C, 48 時間培養したものを滅菌食塩水に懸濁させた。濃度は 10mg/ml, 20mg/ml および 200mg/ml の 3 種類用意した。10mg/ml および 200mg/ml の 2 つのものは超音波発生装置 (Tominaga, UR-150P, 20KC) を冷却しながら 30 分間作用させた後、10,000 回転 15 分間高速遠心分離を行なった。その上澄み液をとり、培養により生菌が残存しないことを確認し (場合によっては更に bacterial filter を通した)、接種材料とした。また 20mg/ml の懸濁液には 0.01% になるように merzonin (merthiolate, ethyl mercuri-thiosalicylate) を加え、18 時間室温に放置し、生菌のないことを確かめた上で接種材料とした。また比較のために同一培養の本菌を 10mg/ml 食塩水に懸濁させ、生菌接種の材料とした。

これらの接種材料を魚体重30～202 gのニホンウナギの体側筋肉部に接種し、水温17.5～30.3℃の下で1週間観察した。

### (結果および考察)

結果を表44に示した。これを見ると、超音波処理をしたものの上澄み液を接種したウナギは、生菌量に換算して200 mgを接種したものでも死亡していないことがわかる。また単に死亡しただけでなく外観的な病変もほとんど認めることはできなかった。これに対し merzonin 処理死菌を接種した場合は生菌量に換算して10mgの接種量で29尾中8尾(約28%)が死亡している。Merzonin 死菌の接種実験は数回に分けて行なわれたものであるが、その実験毎に結果は異なり、2尾接種し2尾とも死亡したり、6尾接種し1尾も死亡しなかったり、更には同じ実験で10mg(生菌換算量)を接種したウナギが死亡したのに25mgを接種したウナギ

Table 44. Toxicity of sonicated supernatant and merzonin-killed cells of *Vibrio anguillarum* (PB-15) for the Japanese eels.

Injection materials	Dose (/100 g)	Body weight of fish tested	Water temperature	Number of fish died/tested	Mean time to death
A Supernatant of sonicated cell suspension (10 mg/ml)	1 ml	30 - 64 g	17.5-20.0°C	0/10	-
B Supernatant of sonicated cell suspension (200 mg/ml)	0.5	65 - 89	19.0-20.5	0/5	-
C Supernatant of sonicated cell suspension (200 mg/ml)	1	64 - 122	19.0-20.5	0/5	-
D Merzonin-killed cell suspension (20 mg/ml)	0.5	70 - 202	19.0-31.5	8/29	3.9 days
E (Control) Viable cell suspension (10 mg/ml)	0.1	40 - 74	17.5-20.0	10/10	2.5
F (Control) Merzonin saline (merzonin 0.01%)	0.5	117 - 196	22.8-30.3	0/6	-

#### Preparation of materials

Supernatant of sonicated cell suspension—— Cultured cells were suspended into saline and sonicated by an oscillator

(Tominaga UR-150P, 20KC, 30 min), and supernatant fluids obtained by centrifugation were injected.

Merzonin-killed cell suspension—— Cultured cells were suspended into saline containing 0.01 % merzonin.

が死亡しなかったりといった具合に結果の変動が著しく大きかった。同一条件下で培養したにもかかわらず菌の状態 (virulence) は必ずしも同じではなかったとも考えられるが、原因は主としてこの実験が冬期に水温を上昇させた条件下で行なわれたため魚の状態があまりよくなかったことにあると思われる。このように merzonin 処理をした菌を用いての実験結果からは本菌の産生する毒素の存在をはっきりと肯定する、あるいは否定するだけのものは得られなかった。

超音波処理をしてその上澄み液を接種するという方法は清水 (1969)<sup>110)</sup> が *Aeromonas liquefaciens* に用いた方法に準拠したものであるが、この方法では *V. anguillarum* にはウナギに対する致死的作用をもつ毒素は検出されなかったわけである。清水は *A. liquefaciens* の産生する毒素に関する一連の研究を行なっているが (SHIMIZU 1968 a~d)<sup>111)~114)</sup>、それによれば *A. liquefaciens* (Y-62 株, ウナギ由来) は生菌換算量で3~4 mg 相当の接種量で、ウナギの接種部位の組織の崩壊および体表全面での出血斑が観察されたとしている。菌種が違うため同一方法を用いても同じように毒素が得られない場合もあるので、*V. angui-*

llarum については更に別の方法で検討してみる余地はあるが、一応本菌には *A. liquefaciens* が産生するような毒素は産生しないと考えられた。

村江ら (1959)<sup>20)</sup> はニジマスより分離した *Vibrio* sp. (*V. piscium* var. *japonicus* とはいささか異なるとのみ報告している) の液体培地での培養濾液をマウスに接種し、毒物質の存在を確認している。彼等はその毒性成分の1つは histamine であろうとしているが、魚に対する毒素については検討していない。

いずれにしても本菌の産生する毒素に関しては本実験では一応否定的な結果が得られたが、培地成分、菌の virulence, 更には毒素の分離方法について再検討の必要があるものと思われる。

#### 第4節 マウスに対する病原性

従来一般的に *V. anguillarum* は温血動物に対する病原性を持たないものとされてきた。これは CANESTRINI (1893) が *V. anguillarum* (*Bacillus anguillarum*) はウナギ、トゲウオ (sticklebacks), キンギョ, カエルおよびイモリには病原性を示すが、ウサギ、テンジクネズミおよびマウスには病原性を示さないと報告していることや (RUCKER 1959)<sup>49)</sup>、本菌は一般的に37°C以上の温度の下では増殖しないとされていることなどからきていると思われる。実際にはあまり実験されることなく一般的に温血動物には病原性を示さないとされてきたようである。

著者が分離した *V. anguillarum* については第I章および第II章で示してきたように、マウスに対し病原性が認められた場合があったわけである。しかしその病原性は *V. parahaemolyticus* のマウスに対する病原性と比較するとやや弱いものであった。著者の実験では、分離直後の株がマウスに病原性を示した例はなく、分離後ある程度の年月が経過した株にのみ病原性が認められている傾向がある。従って前章でも述べたように培養を重ねることにより発育可能温度が多少高くなってきたことがマウスに対し病原性を発揮するようになった原因とも考えられる。この発育可能温度と温血動物に対する病原性の関連については今後の研究課題の一つであろう。

ニジマスから分離された *V. anguillarum* (*V. piscium* var. *japonicus*) の温血動物に対する病原性については SAITO et al. (1964)<sup>21)</sup> がマウス、ラット、テンジクネズミ、ウサギ、ネコおよびイヌには病原性は認められなかったと報告している。また熱帯魚 (水温23~24°C) から分離した *V. anguillarum* の病原性について検討した HACKING and BUDD (1972)<sup>7)</sup> はテンジクネズミ、マウスおよびウサギには病原性を示さなかったと報告している。ただ妊娠したテンジクネズミの腹腔内に接種すると死産するケースが認められ、何等かの悪影響を与えていたことを示している。

以上を合わせて考えると、*V. anguillarum* は温血動物に対しほとんど病原性を示さないとみることができると。著者の実験結果にみられたように菌の状態によっては病原性が発揮される場合もあるが、その病原性は *V. parahaemolyticus* のそれと比べれば弱いものであった。

なお *V. anguillarum* と同定されていない魚類病原性 vibrios にはしばしばマウスに対する病原性が認められている。例えばニジマスから村江らによって分離された *Vibrio* sp. および海産魚の潰瘍病の原因菌はマウスに対しかなり強い病原性を示すことが報告されている (楠田 1965<sup>29)</sup>, 木村 1968<sup>32)</sup>)。もちろんこれらの実験結果を比較する際、接種量が問題になるわけであるが、その点を加味しても、一応 *V. anguillarum* はマウスにはほとんど病原性を示さず、他の fish-pathogenic vibrios はマウスに病原性を示すものが多いということができよう。従ってこのマウスに対する病原性の点も分類上の一つの鍵になるのではないかと考えられる。

#### 第5節 ま と め

*V. anguillarum* を数種の淡水魚および海産魚に接種した結果、ニホンウナギ、ヨーロッパウナギおよび

ドジョウは本菌に対し高い感受性を有し、ニジマス、クロダイおよびハマチも比較的高い感受性を有するが、コイ、フナおよびキンギョは低い感受性しか持っていないことがわかった。

感受性の高いことや飼育しやすいことなどの理由からニホンウナギを本菌の病原性確認の材料魚に選び、病原性検査の方法について検討してみた。まず感染方法についていくつかの方法を実験してみたが、筋肉内注射による接種が最も確実な結果をもたらすことがわかった。更に、筋肉内注射により病原性を調べる場合、接種菌量は魚体重 100 g 当り 1 mg (湿菌重量) とするのが適当であること、魚は体重 10 g 以上のものであれば大きさにあまり関係なく材料魚とすること、水温は 10°C でも実験可能であるが 20°C の方がより早く確実な結果が得られることなどがわかった。

前章において、病原性は見落すことのできない本菌の重要な性質の一つであると述べたが、ここでは以上のようにその具体的な検査方法が示されたわけである。そしてこの方法で検査したところ、著者が現在まで分離してきた *V. anguillarum* のほとんどすべての株がウナギに病原性を示すことが確認された。しかし他の研究者の分離株にはウナギにはほとんど病原性を示さずニジマスなどの別の魚種に強い病原性を示すものがあるので、実際にはウナギに対する病原性だけでその菌のもつ魚類への病原性を推し測ることは無理なようである。従って、ウナギだけでなくニジマス、アユ、コイあるいはハマチなどの海産魚など数種の魚類に対する病原性を調べることができれば、その菌のもつ病原性の特性が更に明確になり、また他菌株あるいは他菌種との比較もより意味のあるものになる。

なおここでいう病原性陽性とは、その菌が自然状態において魚に病気を起こすということまでを意味するものではなく、病気を起こす能力を有するという病原菌としての必要条件を満足していることを意味するに過ぎないことは言うまでもないことである。

ニホンウナギにおける接種実験において、接種菌量の違いによる死亡率の違いを検討した際、魚体重 100 g 当り 1 mg の菌量を接種すると 90% 以上の魚が死亡するのに、0.1 mg の菌量を接種するとまったく死亡魚が出ないという興味ある現象が見られたので、この致死量接種の場合と致死量以下の接種の場合の菌の動向およびウナギの反応の違いについて検討を進めた。

まず本菌を接種したニホンウナギの各組織における接種菌の消長を調べたところ、致死量接種の場合は、血液、肝臓、脾臓および腎臓においてはほぼ同様の傾向で菌数は増加し、死亡寸前と思われる接種 36 時間後には血液中で 10%/ml の level に達していた。これに対し、致死量以下を接種した場合、各組織における菌数はそれぞれ同じような傾向で減少し、72 時間後にはほぼ消失してしまっていた。

また接種魚の血液性状を調べたところ、致死量を接種したウナギおよび致死量以下を接種したウナギのいずれにおいても、hematocrit 値、hemoglobin 量あるいは赤血球数には変化は見られなかった。

一方、白血球の動態にはそれら死亡するウナギと回復するウナギとの間には顕著な差が見られた。すなわち、致死量を接種されたウナギでは接種してから 6 時間後に好中球の顕著な増加が見られたが以後は減少し続け、その他の白血球も一様に減少し続けた。これに対し致死量以下を接種したウナギにおいては、一時的な減少はありながらもすべての白血球が 72 時間後まで顕著に増加した。特に好中球が死亡するウナギと回復するウナギにおいて対照的な変化を示し、好中球が本菌の処理に大きく関与していることが示された。

また病理組織学的に検討を加えた結果、接種された菌は接種部位である筋肉組織および結合組織において増殖し、それが血流に乗り各組織に運ばれ、ウナギに全身感染症をひき起こし、死に至らしめるという典型的な敗血症をひき起こしていることが確かめられた。

次に本菌の毒素産生に関する基礎的な実験を行なったが、少なくとも超音波処理による上澄み液にはウナギを死亡させるような毒性成分は認められず、*A. liquefaciens* とはこの点で異なるものと考えられた。

最後に第 1 章および第 2 章で示したマウスに対する病原性実験の結果をふまえて、本菌の温血動物に対する病原性について考察を加えてみた。その結果、本菌はマウスなどの温血動物に対し病原性を示す場合もあるが、多くの場合は病原性を示さないものと判断された。このマウスに対する病原性の点において、我が国で報告されている *V. anguillarum* 以外の fish-pathogenic vibrios と *V. anguillarum* との間には違いが

みられるので、今後分類学的な面でも着目すべき事項と考えられた。

## 補 免疫学的検討

養殖魚および天然魚における *V. anguillarum* 感染症は、海産魚および淡水魚において最も重要な疾病の一つに挙げることができる。我が国においては第 I 章で述べたように、アユ、ニジマスおよびウナギという淡水養殖魚において本菌感染症が大きな被害をもたらしており、その対策は産業上緊急の研究課題とされている。すでに述べたように、これらの養殖魚における本病の対策としてはまず第一に予防が大切であり、そのためには種苗の選択や養殖方法の改善などの面で根本的な検討がなされなくてはならない。

しかしながらそれと平行して、現実の問題としてはもう少し直接的な予防法あるいは治療法に関する検討も必要とされている。

ヨーロッパにおける最近の *V. anguillarum* 感染症に関する報告は天然魚を扱ったものが多いためか、治療という点ではほとんど検討がなされていない。ただ興味あることとして、ノルウェーにおいてマス(*Salmo salar*)における本病の被害を少なくするために耐病性の系統の選択について検討されていることを挙げることができる(GJEDREM and AUSTAD 1974)<sup>115)</sup>。アメリカ合衆国では魚類の細菌性疾病の対策として、サルファ剤、抗生物質あるいはニトロフラン誘導体の使用に関する一般的な研究は多いが、特に *V. anguillarum* 感染症についての研究といったようなものは見当たらない。

我が国では集約的養殖が行なわれているためと、薬剤の使用制限がゆるやかなためか、予防あるいは治療のために種々の薬剤が頻繁に使われており、*V. anguillarum* 感染症においても例外ではない。本病に対する予防ないし治療薬として、malachite green (保科・千葉 1957,<sup>116)</sup> SAITO et al. 1964<sup>21)</sup>、フラン剤 (林ら 1964a<sup>22)</sup>, 1965<sup>24)</sup>)、サルファ剤 (保科ら 1957<sup>117)</sup>, SAITO et al. 1964<sup>21)</sup>、大上 1969<sup>118)</sup>) および oxytetracycline や chloramphenicol などの抗生物質 (保科ら 1957<sup>117)</sup>, 林ら 1965<sup>24)</sup>, ALMEIDA et al. [インド] 1967<sup>119)</sup>) とひととおりの薬について検討がなされており、適確に使用すれば十分予防ないし治療効果が期待できるとされている。著者も chlortetracycline が in vitro 試験においても現場における治療効果の点でも非常にすぐれた力を発揮することを確めている (室賀・江草 1968)<sup>60)</sup>。

しかしながら第 I 章で示した徳島県下などのアユ養殖場での例に見られたように、*V. anguillarum* の薬剤に対する抵抗性が増し、従来使用されていた抗菌剤の効果がまったく認められなくなるという現象が起きている。現場での状況を観察するとやはり薬剤の過度の使用が本菌の耐性を招いたものと思われる。また単に *V. anguillarum* が薬剤に対し耐性化し治療が困難になるというだけでなく、人体および環境に及ぼす影響の面からみても、薬剤の過度の使用は問題があると思われる。従って今後は薬剤に依存しない養殖方法、あるいは病害対策について検討されねばならないと考えられる。

そのための基礎的な研究として、*V. anguillarum* に関する免疫学的な検討を行なった。なおこの実験は病原性実験に関連して行なわれたために材料魚がニホンウナギとなっており、その点では我が国で問題となっているアユあるいはニジマスのピブリオ病からはいささか離れてしまっている。

### 第 1 節 ニホンウナギの本菌に対する抗体産生と防禦作用

まずニホンウナギに *V. anguillarum* の merzonin (ethyl mercuri-thiosalicylate) 処理死菌を接種することにより、凝集素抗体が産生されるか否かを検討し、更に抗体を産生したウナギが本菌に対する防禦作用を示すかどうかを検討してみた。

#### (材料および方法)

実験は 2 回行ない、1 回目は 1968 年 10 月から 11 月にかけて、48 尾のニホンウナギを用いて実験し、2 回目は

1969年5月から6月にかけて48尾のニホンウナギを用いて実験を行なった。この実験に限らず、免疫に関する実験に用いたウナギはほとんど静岡県吉田地区で養殖されたものである。1968年5月から12月にかけて同地区から入手した約100尾のウナギの血漿を材料にし *V. anguillarum* PB-15 株の死菌を抗原として凝集反応を試みたが、反応はすべて陰性であった。また当時の同地区における調査によっても病気のウナギから *V. anguillarum* が分離されたことはなかった。これらのことから本実験の材料魚とした同地区からのウナギは *V. anguillarum* に感染した経歴はないものと判断した。

1回目の実験では、魚を12尾ずつの4つのグループ(A~D)に分け、A群のウナギには1週間間隔で2回死菌接種による免疫を行ない、2回目の免疫接種の1週間後に生菌による攻撃試験を行なった。B群のウナギには1週間間隔で4回免疫し、最後の免疫の1週間後に生菌攻撃試験を行なった。C群およびD群は対照区とし、それぞれ2回ないし4回の merzonin を含む滅菌食塩水の注射後に生菌攻撃試験を行なった。また攻撃試験時にそれぞれの魚群から2尾ずつ魚を取り上げ、凝集素価を測定した。実験水温は16.0~24.0°Cであった。

免疫接種に用いた死菌液は、48時間培養した *V. anguillarum* PB-15を0.01% merzonin食塩水(NaCl 0.85%)に懸濁させ1晩以上室温ないし冷蔵庫に保存したものを、1回の接種量は1 mg(湿菌重量)/100 g(魚体重)とした。対照区の魚に接種したのは菌を含まない merzonin 食塩水である。

凝集素価の測定は、動脈球より採血した血液を3,000回転10分の遠心分離を行ない得た血漿を材料として行なった。滅菌食塩水を用いて倍数稀釈した血漿の稀釈系列に merzonin 処理死菌を抗原として同量加え、37°Cに2時間置き、その後15~20°Cの下に15~20時間放置した後に凝集反応を肉眼的に観察して凝集素価を決定した。なお遠心分離して得られた血漿を56°Cないし48°Cで30分間非働化処理をすると、前者の場合は非働化前のものと比べて62%の血漿 sample (54/87) が1段階低い凝集価を示すようになり、後者の場合は非働化前のものに比べて24%の血漿 sample (17/71) が1段階低い凝集価を示すようになった。ここでは非働化する前の血漿を用いて測定した凝集価を示した。

生菌による攻撃試験は各群10尾ずつのウナギを材料にし、前章で述べた方法により培養菌を筋肉内に接種し、1週間観察し死亡率を求めた。

2回目の実験は1回だけ免疫を行ない、抗体が産生されるまでの日数を知ることが目的として行なわれた。ここでは対照区の魚はそのまま生菌攻撃試験に供し、免疫区の3群(A, B, C)には1回死菌接種(接種菌量10mg/100g魚体重)を行ない、その後3日目にA群、7日目にB群、14日目にC群をそれぞれ生菌攻撃試験に供した。攻撃試験には各群10尾ずつを用い、各群残る2尾ずつを凝集価測定に用いた。攻撃試験および凝集価測定の方法は1回目の実験と同じである。なお2回目の実験水温は18.0~21.8°Cであった。

### (結果および考察)

1回目の実験結果を表45に、2回目の実験結果を表46にそれぞれ示した。1回目の実験結果をみると、2回ないし4回免疫したウナギは生菌攻撃試験時にそれぞれ200, 800という抗体価を示した。攻撃試験の結果においても、対照群が100%(C)、70%(D)という死亡率を示したのに対し、免疫したものの死亡率は0%(A)、10%(B)となっており、確実に防禦能力を有していたことが確かめられた。

次に表46に示した2回目の実験結果をみると、1回だけ免疫されたウナギは2週間後に抗体を産生していたことが、凝集価の点でも防禦作用の点でも確認された。

なお、免疫時の接種抗原量は魚体重100g当り0.01~10mgの範囲では抗体産生の結果には差がみられなかった。また超音波処理死菌を接種抗原とした他の実験においても同じように抗体が産生されることが確かめられた。

以上の実験から、死菌接種をすることにより、ウナギは2週間後には抗体を産生し防禦能力をも獲得することがわかった。

Table 45. Challenge of immunized and control eels with *Vibrio anguillarum* (1968)

Group	Immunization and Challenge					Agglutinin titer at Challenge	Mortality	
	1, Oct.	8, Oct.	15, Oct.	22, Oct.	29, Oct.			
Immunized*	A	1 st Immuniz.	2 nd Immuniz.	Challenge			200	0 %
	B	1 st Immuniz.	2 nd Immuniz.	3 rd Immuniz.	4 th Immuniz.	Challenge	800	10
Control**	C	1 st Inject.	2 nd Inject.	Challenge			<25	100
	D	1 st Inject.	2 nd Inject.	3 rd Inject.	4 th Inject	Challenge	<25	70

\* immunized with merzonin-killed cells by intramuscular injection (1 mg/100 g)

\*\* injected with merzonin saline (0.1 ml/100 g)

Challenge: Ten eels (*A. japonica*, 64–130 g) were injected intramuscularly with 1 mg of viable cells in each group.

Experimental water temperature: 18.9°C (16.0–24.0).

Table 46. Challenge of immunized and untreated control eels with *Vibrio anguillarum* (1969)

Group	Immunization and Challenge					Agglutinin titer at Challenge	Mortality
	22, May	23, May	26, May	30, May	6, Jun.		
Control	Challenge					<4	80 %
Immunized*	A		Immunization	Challenge		<4	70
	B		Immunization		Challenge	<4	70
	C		Immunization			Challenge	32

\* immunized with merzonin-killed cells by intramuscular injection (10 mg/100 g)

Challenge : Ten eels (*A. japonica*, 97–128 g) were injected intramuscularly with 1 mg of viable cells in each group.

Experimental water temperature : 20.1°C (18.0–21.8).

## 第 2 節 抗体産生に及ぼす水温の影響

魚類の抗体産生に及ぼす水温の影響の重要性については古くから知られている (CUSHING 1942,<sup>120)</sup> HILDEMAN 1962)<sup>121)</sup> 先に示したように水温16~24Cの下ではニホンウナギは容易に抗体を産生することが確かめられたが、ここでは水温がウナギの抗体産生に及ぼす影響について検討してみた (MUROGA and EGUSA 1969<sup>122)</sup>)。

### (材料および方法)

実験は1968年から1969年にかけて、静岡県吉田地区で養殖されたニホンウナギ(体重70~140 g)を材料魚として行なった。接種死菌は先と同じ merzonin 処理死菌を用い、1回の接種量は魚体重100 g 当り1 mg (湿菌重量)とした。また一部の実験では adjuvant の効果をみるために、Freund's incomplete adjuvant (流動パラフィン1 : tween 80 1) に死菌を等量混合させたものを接種する方法と、死菌液9 : 1%クロムミョウバン1の割合に混合したものを接種する方法とを検討してみた。

実験は3つの部分からなり、最初に供試尾数を決定するために凝集価の個体差の大きさを知るための実験を行なった。ここでは29尾のウナギを用い1週間間隔で4回死菌接種を行なう一方、2週間目からは同じく1週間間隔で5尾ずつ魚を取り上げ抗体価を測定した。

次いで水温別の抗体産生を明らかにするために、いろいろな水温の下においたウナギに1週間間隔で4回死菌接種による免疫を行ない、第2回目の免疫から平行して凝集価の測定を行なった。実験水温および実験期間は下記の通りである。

実験区	設定水温 (平均水温±標準偏差)	実験期間
A	11°C (10.6 ± 0.9°C)	1968年 12月 5日~1969年 1月 30日
B	15°C (14.9 ± 0.2°C)	1968年 10月 10日~ 11月 28日
C	19°C (18.9 ± 0.9°C)	6月 12日~ 7月 17日
D	23°C (23.4 ± 1.2°C)	6月 20日~ 7月 25日
E	27°C (27.4 ± 0.9°C)	6月 23日~ 9月 17日

上記のように水温は11Cから27Cまで4C間隔で5段階設定し、水温調節はアクアトロンによった。

最後に、adjuvant の効果をみるために、先の水温実験におけるB区(15C)およびE区(27C)に平行して Freund's incomplete adjuvant vaccine を接種する実験を行ない、C区(19C)およびD区(23C)に平行して chrome vaccine の接種実験を行なった。またこの比較試験終了後、水温15Cの下で Freund's incomplete adjuvant を用いて免疫したウナギを温度調節をしない室内水槽に移し、最初の免疫から約4か月間無投餌で飼育し、その間の凝集価の変化を調べ、抗体の維持について検討してみた。

なお、抗体の維持実験に用いたウナギだけでなく実験中すべてのウナギにはまったく餌を与えなかった。

### (結果および考察)

**凝集価の個体差**：実験結果を表47に示した。この表をみると、最初に取り上げて調べた5個体、すなわち1回だけ免疫された個体の間には25から100という3段階の凝集価の開きが認められるが、2回目以降の検査魚、すなわち2回以上免疫された個体の間にはせいぜい1段階の凝集価の開きしかなくわかった。従って1つの測定値を得るためには2尾程度の魚を調べるだけで十分であると判断し、以下の実験では2尾ないし3尾の魚の凝集価の平均値をもって1つの値とした。

なお抗体価の変化を調べるためには、1個体の動物について連続的に追跡する方が正確な変化を把握しうると考えられるが、本実験では1尾のウナギから最低0.5 mlの血液を採血したので、連続採血は不可能であった。そのため1つの値を得るためには1尾の魚を殺さねばならず、個体差を検討する必要があったわけである。

Table 47. Differences in agglutinin titer among individual immunized eels.  
(1968)

Test and Immunization (Number of fish tested or immunized)		Agglutinin titer				
		1	2	Fish 3	4	5
	27, Aug.	1 st immunization (29 eels)				
1 (5)	3, Sept.	25	25	50	50	100
		2 nd immunization (24)				
2 (5)	10, Sept.	400	400	800	800	800
		3 rd immunization (19)				
3 (5)	17, Sept.	800	800	800	800	1600
		4 th immunization (14)				
4 (5)	24, Sept.	800	800	800	800	1600
5 (5)	1, Oct.	800	800	1600	1600	1600
6 (4)	8, Oct.	800	800	800	1600	

Experimental water temperature: 23.0 (mean) ± 2.9 (S.D.)°C.

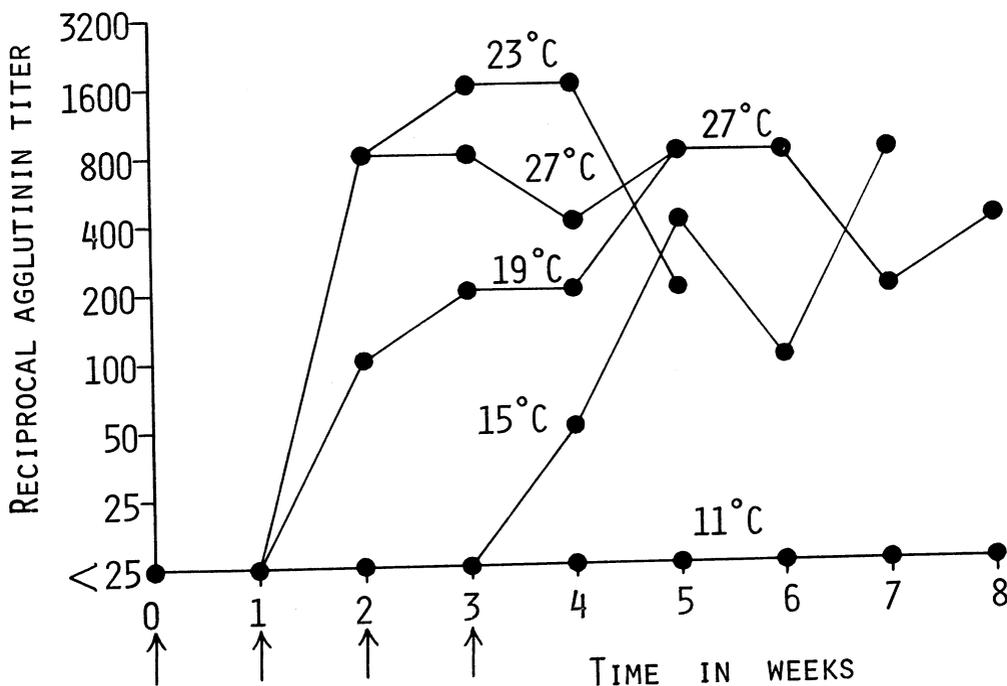


Fig.15. Effects of water temperature on the production of agglutinins against *Vibrio anguillarum* in the Japanese eels.

Fish were injected with 1 mg of the merzonin-killed cells per 100 g of body weight four times at one week intervals. Arrows show antigen injection.

**抗体産生に及ぼす水温の影響：**実験結果を図15に示した。免疫は図中に矢印で示したように4回行なったわけであるが、水温11℃の場合は最初の免疫から8週間後まで抗体は産生されなかった。15℃の場合は4週間後に初めて50という凝集価が測定され、以後変動はありながらも7週間後に800という値に達した。19℃の場合は2週間後にすでに100という凝集価が測定され、5週間後には800に達した。23℃と27℃の場合はともに2週間後に800というほぼ最高値に達した。

以上をまとめてみると、水温11℃ではウナギは抗体を産生せず、15℃から23℃までの間では抗体産生速度は水温が高くなる程早くなるが、27℃では23℃の場合とほとんど差がなかった。なおこの実験では水温23℃および27℃の場合には最初の免疫接種から2週間後に初めて抗体が確認され、その抗体価は800であった。しかし先に示した個体差を調べた実験結果(表47)においては、水温23℃において最初の免疫から1週間後に25~100という抗体価が測定されている。この差は何によるものであるかはわからないが、水温23℃というニホンウナギの抗体産生に最も好適な温度と思われる条件下では、抗体は免疫後1週間目から2週間目の間に産生されることが明らかになった。

NYBELIN (1935 b)<sup>123)</sup>は *V. anguillarum* をヨーロッパウナギに接種し抗体産生をみているが、水温7~10℃では抗体産生はみられず、水温18~20℃では10240~40960という高い凝集価が得られたと報告している。本実験結果は凝集価の点では彼の結果と著しく違っているが、10℃以下では抗体が産生されないという点では、ニホンウナギとヨーロッパウナギという魚種の違いはありながらも一致している。保科(1962)<sup>76)</sup>は低水温時におけるニホンウナギの抗体産生について調べており、*A. punctata* (生菌)を接種したところ、10℃以下でも抗体産生が認められたと報告している。

PLISZKA (1939 a)<sup>124)</sup>, b<sup>125)</sup>によれば、コイに *A. punctata* (*Pseudomonas punctata*)を接種したところ、水温19~20℃の場合は1週間後に抗体産生が認められ、3週間後には最高値に達したが、水温9~11℃では抗体は産生されなかったと報告している。一方SMITH (1940)<sup>126)</sup>はコイおよびジマスなどに *A. salmonicida* (*Bacterium salmonicida*)を接種したところ、水温10℃下でも抗体の産生が認められたと報告している。このように抗体産生の限界水温は魚種によって異なるものと考えられるし、また接種する抗原によっても若干の違いはでてくるようである。

ニホンウナギの抗体産生に対する好適水温は本実験結果から23~27℃と考えられた。MANN (1939)<sup>127)</sup>はコイに *A. punctata* の死菌を接種し、水温17℃の場合と水温27℃の場合の抗体産生を比較しているが、それらの結果にはあまり差がなく、水温を20℃以上に上げて抗体産生を更に促進することはできないと述べている。

一方SPENCE et al. (1965)<sup>128)</sup>は冷水魚の抗体産生速度は、その魚の適応可能最高水温に水温を近づける程、速くなると述べている。これと比較すると、ウナギやコイのような温水魚の場合は、温度が高ければ高い程抗体産生は速くなるというのではなく、やはり適温というものがあると考えられる。

**Adjuvant の効果および抗体の維持：**Adjuvant の効果をみた実験結果を図16に示した。この図をみると、水温27℃および15℃の場合の Freund's incomplete adjuvant 実験においても、水温23℃および19℃の chrome adjuvant 実験においても、5~8週間という実験期間中には adjuvant を添加した効果はほとんどあらわれていないと見ることができる。KRANTZ et al. (1963<sup>129)</sup>, 1964 a<sup>130)</sup>の brown trout (*Salmo trutta*) に *A. salmonicida* の死菌を抗原として接種した実験において、adjuvant vaccine (Freund's complete adjuvant) を用いると死菌単独の場合に比べて、抗体の維持がより長期にわたるばかりでなく、抗体価も数倍高くなり、またより早く抗体が産生されることが認められている。本実験では実験期間が5~8週間と短いため維持の点は論議できないが、抗体価の高さ、あるいは抗体産生の速さの点における adjuvant の効果はほとんど認められなかった。

次に抗体の維持に関する実験結果について述べる。 Freund's incomplete adjuvant を用いて水温15℃の下で免疫されたウナギを材料とし、最初の免疫(1968年10月10日)から17週間後(1969年2月6日)までの期間における凝集価の変化について調べた結果とその間の水温変化を図17に示した。水温は7週間目まで15

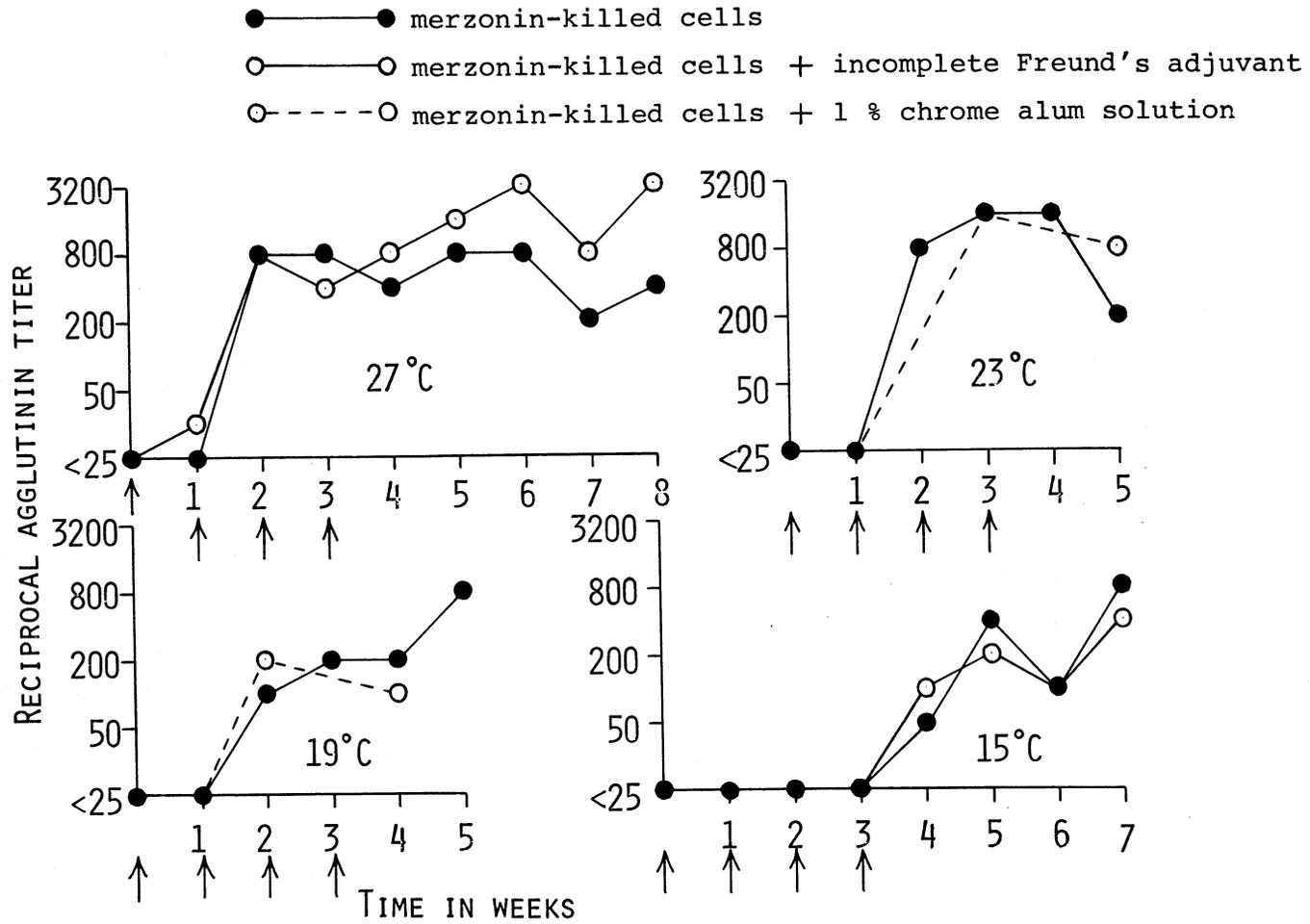


Fig.16. Effects of adjuvants on the production of agglutinins against *Vibrio anguillarum* in the Japanese eels. Arrows show antigen injection.

Vibrio anguillarum

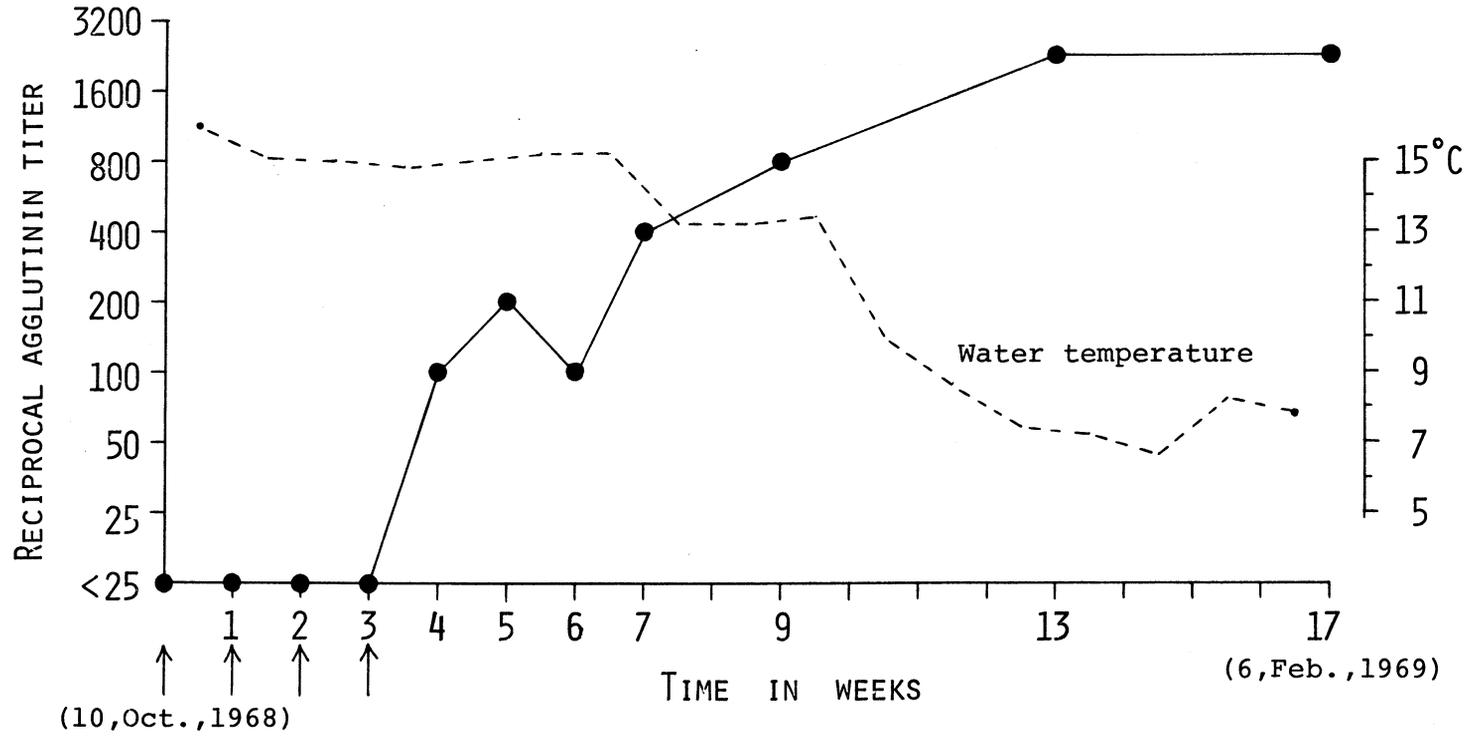


Fig.17. Change in agglutinin titer against *Vibrio anguillarum* in the Japanese eels under low temperature.

Fish were injected with the killed cells plus incomplete Freund's adjuvant four times. Arrows show antigen injection.

℃に保たれ、以後温度調節を中止したため水温は下降し、1月末の14週間目から15週間目にかけては7℃にまで下っている。一方抗体価は7週間後に400であったのがその後も下降することなく、むしろ上昇し実験終了時の17週間後には1600～3200となっていた。このようにいったん免疫を獲得すれば、7～15℃といった低水温に2、3カ月おかれても、抗体は維持されることが確かめられた。従ってもし晩秋に免疫して抗体を産生させれば、その抗体は翌春まで維持することは十分可能であることが示唆された。

MANN は *A. punctata* の死菌をコイに接種し、水温11～13℃の下においた場合、2カ月間抗体の維持が認められ、生菌を接種した場合は約1年半も維持されたと報告している。前出の KRANTZ et al. によれば、水温11℃の池で飼育中の brown trout に *A. salmonicida* のホルマリン死菌を接種したところ、3カ月後に抗体価は最高値(160)に達し、6カ月後にはかなり低下(10)したが adjuvant vaccine を接種した場合は2年間も高い抗体価(640～10240)が維持されたと報告している。

このように魚種や実験方法の違いによって結果はまちまちであるが、死菌を単独で接種するよりもやはり adjuvant vaccine として接種した方が抗体はより長期にわたって維持されるものと考えられる。本実験においても、ウナギが比較的長期間抗体を維持していたのは、第一に adjuvant の効果があったものと推測されるし、また水温が低かったことや無投餌で飼育していたことも影響しているものと思われる。

### 第3節 経口免疫の試み

第1節において、死菌を筋肉内に接種すれば、ウナギは抗体を産生し、同一株の攻撃に対してかなりの防禦作用を発揮することが確認された。しかしながら産業的応用ということを考えて、注射による養殖魚の個体免疫は非常に困難であり、経口免疫の検討が必要であると考えられた。そこで先の実験に用いた *V. anguillarum* PB-15 株を用いてニホンウナギに対する経口免疫を試みた(室賀・江草1969)<sup>131)</sup>。

#### (材料および方法)

普通寒天培地で28℃、48時間培養した菌を滅菌食塩水に1mg(湿重量)/1mlの割合に懸濁させ生菌抗原液とした。この生菌抗原液は毎日投餌の直前に用意した。死菌抗原液は生菌抗原液に用いたと同じ培養の菌を0.01% merzonin 溶液に10mg/mlの割合に懸濁させ、冷蔵庫中に保存した。毎日の餌の準備に際し、このようにして調製した死菌抗原液の少量をとり滅菌食塩水で10倍に希釈して用いた。

上記の生菌抗原液、死菌抗原液、さらに merzonin 溶液および水道水(脱塩素処理をしたもの)を用いてウナギ用配合飼料をねり合わせ、4種類の餌を毎日用意した。飼料をねり合わせる際には、粉餌1に対し各溶液1.5(重量:容量)の割合に混ぜたので、実験区用の餌2.5g(湿重量)には1.5mgの生菌もしくは死菌が含まれていたことになる。なお配合飼料としては抗生物質あるいはフラン剤などの抗菌剤が含まれていないものを用いた。

実験に使用したウナギは1967年冬から1968年初春にかけてシラスウナギとして採捕されたものを、生餌および配合飼料を用いて約9カ月間飼育したものであり、飼料によく慣れていた。実験は1969年1月31日に開始したが、実験開始時のウナギの体重は5～50gとかなりバラツキがあった。なお、実験開始時および実験中においても、摂餌活動が低下するのをさけるため、抗体価測定の方法魚以外の魚の体重は測定しなかった。これらの材料魚を2m×1m×15cm(水深)(水量300ℓ)のコシクリート水槽4つにそれぞれ50尾ずつ収容し、A～D区とした。A区は死菌投与区、B区は生菌投与区とし、C区(merzonin区)およびD区(水道水区)は対照区とし、それぞれの区に前述のようにして準備した餌を原則として毎日1回投与した。投餌量としては、投与を開始してから30分間以内に完全に食べてしまうような量を与え、食べ残しのないよう注意した。実験は1969年1月31日から6月3日まで約4カ月続けられ、実験を開始してから最初は1週間後、その後は1カ月間隔で各区より2尾ずつ魚を取り上げ抗体価を測定した。実験終了後、各区より10尾ずつ魚を取り上げ、生菌攻撃試験に供した。攻撃試験は先に述べた病原性実験の方法に従い筋肉内接種を行ない、水温約20℃の下で1週間観察した。

Table 48. Amounts of organisms (*V. anguillarum*) and food administered and water temperature in oral immunization of the Japanese eels.

Period	A		B		C	D
	merzonin-killed cells feeding		viable cells feeding		control (merzonin)	control (city water)
31, Jan. - 5, Feb. 1969	33mg* 14.6 ±	55g** 1.8°C	47mg 15.3 ±	78g 1.0°C	73g 14.8 ±	73g 1.0°C
7, Feb. - 5, Mar.	115mg 13.7 ±	192g 2.1°C	149mg 14.9 ±	248g 1.5°C	273g 14.3 ±	290g 1.7°C
8, Mar. - 7, Apr.	122mg 16.4 ±	203g 2.1°C	158mg 16.4 ±	263g 1.7°C	270g 16.9 ±	300g 2.5°C
9, Apr. - 6, May	204mg 21.1 ±	340g 1.7°C	210mg 18.9 ±	350g 2.4°C	360g 19.7 ±	375g 2.9°C
8, May - 3, Jun.	254mg 21.1 ±	423g 0.8°C	213mg 21.4 ±	355g 1.8°C	340g 19.5 ±	308g 1.7°C
Total	728mg	1213g	777mg	1294g	1316g	1346g
Mean		17.4°C		17.4°C	17.0°C	18.0°C

\* organisms (viable or killed), \*\* food, both in wet weight.

### ( 結 果 )

各区における投与菌量, 投餌量 (ともに湿重量) および各期間の水温 (平均水温±標準偏差) を表48に示した。この表に示されているように, 各区の水温にはあまり差がなく, そのためか投餌量 (投餌量) にもほとんど差がない。

表49に各区から定期的に2尾ずつ魚を取り上げ測定した凝集価, および検査に供した魚の体重を示した。なお, 凝集価測定のための材料魚としてはよく餌を食べていると思われるなるべく大きいものを選んだ。この表に示されているように, 死菌区 (A区) および2つの対照区 (C, D区) の魚には4カ月の実験期間を

Table 49. Agglutinin titer by oral immunization of the Japanese eels.

Date	A Killed cells feeding	B Viable cells feeding	C control (merzonin)	D control (city water)
6, Feb. 1969	-* (56,54 g)**	- (13,11 g)	- (16,13 g)	- (14,11 g)
7, Mar.	- (32,23 g)	- (19,14 g)	- (24,20 g)	- (27,20 g)
8, Apr.	- (25,23 g)	- (21,18 g)	- (19,19 g)	- (27,19 g)
7, May	- (86,32 g)	25,50 (34,17 g)	- (28,18 g)	- (25,23 g)
6, Jun.	- (65,41 g)	-12.5 (34,27 g)	- (34,21 g)	- (47,25 g)

\* -: < 12.5 or < 25

\*\* body weight of fish tested

通じて、凝集素抗体は検出されなかった。なお、実験に供した血漿の最小稀釈倍数は12.5ないし25であったので、凝集価一となっているのは正確には<12.5あるいは<25ということになる。

生菌投与区 (B区) においては、菌体投与開始後約3カ月目に凝集価25, 50を得た。しかし更に1カ月間菌体を投与し続けても凝集価の上昇はみられず、むしろ12.5, <12.5と下ってしまっていた。実験期間を通じて生菌投与区においても他の区と同様、発病あるいは死亡する個体はまったく認められなかった。

次に、実験終了時 (実験を開始してから4カ月後) に行なった生菌攻撃試験の結果を、菌接種後1週間目

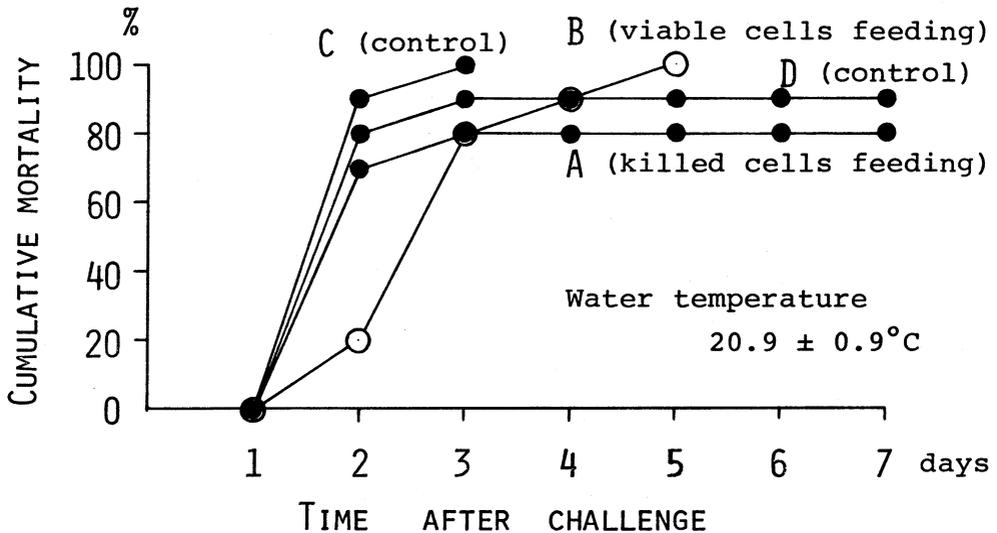


Fig. 18. Challenge of orally immunized and control eels with *Vibrio anguillarum* by intramuscular injection.

までの各区における累積死亡率として図18に示した。第Ⅲ章で示してきたように、本菌株を水温約20°Cの下でニホンウナギに筋肉内接種すると、2日後までに70%近くが死亡し、1週間後の累積死亡率は80~100%になるのが普通である。本実験のA, C, およびD区いずれの区の死亡率変化もそれと同じ pattern を示しており、これらの区のウナギには何等特別な防禦作用は働いていないと判断できる。B区の生菌投与区の場合は、最終的には死亡率100%となっているが、2日後における累積死亡率は他の区と比べて著しく低く、20%となっている。この死亡の遅れを重要視すれば、生菌投与区の魚はある程度防禦能力を有していたと考えることができるが、その能力はごく低いものであったと判断される。

#### (考 察)

魚類における経口免疫に関する研究はいくつかあるが、川津(1969<sup>132</sup>, 1972<sup>133</sup>)および SNIESZKO (1970)<sup>134</sup> が魚類の免疫反応に関する総説の中で述べているごとく、その結果はまちまちである。多くの研究はサケ、マス類について *A. salmonicida* を材料としてなされているが (KLONTZ and ANDERSON 1970)<sup>135</sup> 最近になり *V. anguillarum* を用いての研究がアメリカ合衆国 (FRYER et al. 1972)<sup>136</sup> およびイギリス (FLETCHER and WHITE 1973)<sup>137</sup> から報告されている。

現在までなされた魚類の経口免疫に関する実験報告例を表50にまとめてみた。これら11例の結果をみると、一応防禦という面でも効果があったものは4例あり (DUFF 1942<sup>138</sup>, 林ら1964b<sup>23</sup>), ROSS and KLONTZ 1965<sup>139</sup>, FRYER et al. 1972<sup>136</sup>), 多少免疫効果があったと思われるものが2例あり (POST 1966,<sup>140</sup> FLETCHER and WHITE 1973<sup>137</sup>), あとの5例はまったく抗体が産生された形跡が認められなかったもの

Table 50. Oral immunizations in fishes

Investigator	Organism	Fish	Methods	Results		
				Agglutinin titer	Mortality	
Duff	1942	<i>Aeromonas salmonicida</i> ( <i>Bacterium salmonicida</i> )	Cutthroat trout	CP-chloroform-killed cells, 64-70 feedings in 2 weeks	higher than control	immunized 24% control 75%
Snieszko & Friddle	1949	<i>A. salmonicida</i>	Brook trout	heat and merzonin-killed cells, fed for 8 days		no effect
Hoshina	1962	<i>A. punctata</i>	Eel	heat killed cells, fed for 2 weeks	same level as control	no effect
Hayashi et al	1964	<i>Vibrio</i> sp.	Rainbow trout	formalin-killed cells, fed for 5 weeks	64 (3 weeks) 128 (4 weeks)	immunized 70% control 100%
Saito et al	1964	<i>Vibrio anguillarum</i> ( <i>V. piscium</i> var <i>japonicus</i> )	Rainbow trout	heat killed cells	negative	no effect
Krantz et al	1964	<i>A. salmonicida</i>	Brown trout	viable and chloroform-killed cells, 65 feedings	same level as control	
Spence et al	1965	<i>A. salmonicida</i>	Coho salmon	formalin-killed cells, fed for 98 days	negative	no effect
Ross & Klontz	1965	pathogen of "red mouth disease"	Rainbow trout	phenol-killed cells, 18 feedings in 10 weeks	positive	immunized 10% control 90%
Post	1966	<i>A. hydrophila</i>	Rainbow trout	heat killed cells, fed for 9 months	higher than control	immunized 60-90% control 80-100%
Fryer et al	1972	<i>V. anguillarum</i>	Chinook salmon	sonicated cells, fed for 14 days		immunized 45% control 98%
Fletcher & White	1973	<i>V. anguillarum</i>	Plaice	heat killed and freeze-dried cells, fed for 1 year	16 (serum) 64 (intestinal mucus)	

Cutthroat trout (*Salmo clarki*), Brook trout (*Salvelinus fontinalis*), Eel (*Anguilla japonica*), Rainbow trout (*Salmo gairdneri*), Brown trout (*Salmo trutta*), Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), Chinook salmon (*O. tshawytscha*), Plaice (*Pleuronectes platessa*).

である。21), 76), 128), 141), 142) これらの報告を比較検討しても、効果が見られた例と見られなかった例の違いを単純に魚種、菌種あるいは方法の違いによって説明することは難しいと思われる。抗原の作製方法についての比較検討は重要と思われるが、多くの報告中ではあまり十分に検討されておらず、Ross and KLONTZ による“red mouth disease”の病原菌についての検討がある程度である。いずれにしても、これらの研究成果を総合してみると、魚類における経口免疫は十分可能であると考えられるが、抗原などについての検討が十分になされていないためか、現時点ではやや再現性に乏しいものとなっている。

本実験の結果では、生菌投与区には凝集素抗体の産生が認められたが、生菌攻撃試験ではわずかに死亡の遅れが認められた程度で、防禦作用はあまり顕著に認められなかった。しかし一応ニホンウナギに対し *V. anguillarum* を用いて経口免疫することは可能であると結論することはできよう。問題は死菌投与区では抗体が産生されなかったという点であり、今後抗原の作製方法について検討を進める必要がある。

なお最近 ROHOVEC et al.<sup>143)</sup> はマスノスケ (*O. tschawytscha*) などのサケにおける *V. anguillarum* 感染症に対する経口免疫の効果について詳細な検討を進めており *V. anguillarum* のホルマリン処理死菌を凍結乾燥して15日間経口投与することにより、自然感染に対し顕著な防禦効果が認められたとしている。彼によれば、免疫した魚に生菌を接種すると防禦作用はほとんど発揮されず、自然状態で感染させた時のみ対照区よりはるかに低い死亡率を示すという。従って著者の実験の場合でも、生菌接種をしたために防禦作用があまり認められなかったとも考えられ、自然状態に近い形で攻撃試験を行えば、もっと顕著な防禦効果が期待できたものと思われる。このように攻撃試験の方法も重要な研究課題の一つであろう。

#### 第4節 ま と め

ニホンウナギに *V. anguillarum* の死菌を接種することにより、凝集素抗体が産生され、また生菌攻撃に対する防禦力も獲得することが確認された。このような死菌接種による抗体産生に及ぼす水温の影響を調べたところ、水温11℃の場合は抗体が産生されないのに対し、水温が15℃から23℃の間ではいずれの場合も抗体が産生され、その間では水温が高い程抗体の産生はすみやかに行なわれることがわかった。また水温を27℃に上げた場合の抗体産生速度は23℃の場合とほぼ同じであり、水温23~27℃がウナギの抗体産生にとって好適水温と考えられた。このような好適水温の下で、最も早く抗体が確認される時期は多くの実験では免疫してから2週間後であったが、一部の実験では1週間後という例もあった。

また adjuvant を用いて免疫されたウナギは7~15℃という比較的低温のもとにおかれた場合、最初の免疫接種から4カ月間以上抗体を維持することが認められた。

次に経口免疫について検討したところ、本実験では生菌投与区にのみ抗体の産生が認められたが、ウナギにおける経口免疫は可能であると考えられ、投与する抗原についての検討が今後の研究課題として残された。

このようにみえてくると、実験的には免疫による本病の予防が可能であるという結論が導き出されてくるが、応用ということを見ると、それぞれの魚種、特に我が国でいえばアユにおける基礎的な実験が必要であるし、本病の感染経路および本菌の血清タイプという大きな問題点も残されている。

本菌の血清タイプは非常に variety に豊んでおり、年により、地域により、あるいは池により、それぞれ抗原構造が異なる株が出現してくる可能性が強いと考えられている。とすればあらかじめ予防的に vaccine を経口投与し免疫を獲得させたととしても、同一血清タイプの菌株の感染があるような場合には十分効果が期待できるが、そうでない場合にはあまり効果は期待できないということになる。従って vaccine による本菌感染症の防除という問題に関しては、アユなどにおいても今ウナギを材料に示してきたような基礎的な実験がなされるとともに、投与する抗原の作製方法についての検討とともに本菌の血清タイプに関する知見の集積がなされなければならないものと考えられる。

## 謝 辞

稿を終るに当り、本研究の端緒を与えられ、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜った恩師東京大学農学部教授江草周三先生に謹んで深謝の意を表します。

また本研究のとりまとめに際し、種々の御助言を賜わるとともに多大の御配慮をいただいた広島大学水畜産学部教授中村中六先生に厚く御礼申し上げます。

東京大学名誉教授大島泰雄先生ならびに村地四郎教授をはじめとする広島大学水畜産学部水産学科の諸先生方には研究遂行上、あるいは論文のとりまとめに際し種々有益な御助言ならびに御便宜を賜わった。これらの御厚情に対してそれぞれ深謝の意を表します。

国立予防衛生研究所河端俊治博士には細菌学の基礎的技術の御指導をいただき、同研究所坂崎利一博士および東京大学海洋研究所清水潮助教授には江草教授を通じて細菌の分類に関する御助言を賜わった。また京都府衛生研究所赤沢一三博士、東京都衛生研究所善養寺浩博士、日清製粉株式会社中央研究所青江弘博士には、菌株の分与あるいは実験用飼料の提供を受け、更には有益な御助言を賜わった。ここに厚く御礼申し上げます。

さらに現場での調査・実験あるいは分離菌株の分与などの面で各地の水産試験場の職員各位の御援助と御助言をいただいた。特に、静岡県水産試験場の大上皓久氏には浜名湖における調査・実験において終始暖かい御指導と御援助をいただき、厚く感謝する次第である。

また1970年以降一部の実験に御協力下さった広島大学水畜産学部水産学科増殖学研究室の学生諸君にもお礼申し上げます。

なお、本研究の一部は、昭和46年度および昭和47年度文部省科学研究費補助金（奨励研究A）によって行なわれたことを付記して謝意を表する。

## 要 約

（本論文はすでに発表した実験結果に未発表の実験結果を付け加えてまとめたものである。）

## 第 I 章

アユおよびその他の養殖魚の病魚から *Vibrio anguillarum* を分離し、我が国における本菌感染症を確認した。

1) 浜名湖産稚アユは採捕後の蓄養期間中における歩留りが著しく悪いが、その斃死原因には、主として蓄養初期の死亡をもたらす物理・化学的要因と、主として蓄養開始後3日目頃からの死亡をもたらす細菌感染症の2つのものがあることが確認された。

2) 前者の死亡は淡水順化を短時間に実施することにより、後者の死亡は chlortetracycline 薬浴を行なうことにより、それぞれかなり抑えることができた。

3) 後者の細菌感染症には1種類の細菌が関与していることがわかり、また稚アユは蓄養水槽に収容した時点ですでにその病原菌の感染を受けていると考えられたが、感染している個体の比率、あるいは感染を受けている組織（初感染部位）を明らかにすることはできなかった。

4) 1965年、1966年および1967年に浜名湖産稚アユ病魚から分離された病原菌（11株）は、その形態学および生化学的性状からいずれも *Vibrio anguillarum* と同定された。

5) 利根川河口産稚アユ（1967年）および静岡県伊豆の海産稚アユ病魚（1970年）から *V. anguillarum* が分離され、各地の海産稚アユの歩留りの不良には多くの場合本菌感染症が関与しているものと考えられた。

6) 1969年夏、滋賀県彦根周辺および長野県佐久地区の淡水養殖アユ（琵琶湖産種苗）にピブリオ病が発生し、いずれの病魚からも *V. anguillarum* が分離され、完全なる淡水域にも本菌感染症が存在することが確認された。

7) 1973年、全国的に養殖アユのピブリオ病が流行し、徳島県、岡山県および愛知県下の病魚から *V. anguillarum* が原因菌として分離された。この年の流行は、従来は本病に対し有効であった治療薬（サルフ

剤ならびに chloramphenicol などの抗生物質) の効果がほとんど認められないことから大きな被害をもたらした。同年の分離菌株は in vitro 試験によってもこれらの薬剤にかなり耐性化していることが示された。

8) このような *V. anguillarum* の薬剤耐性化は薬剤の過度の使用がもたらしたものと考えられ、抗菌剤による本病の予防・治療対策には大きな問題のあることが指摘された。

9) 1971年、徳島県松茂町の養鰻池においてニホンウナギの本菌感染症が確認され、以後同地区の塩分を含む養鰻池には継続して本病が存在した。

10) 1965年および1966年、愛知県伊川津において実験を目的として海水に蓄養されていたニホンウナギから本菌が分離された。

11) 1966年、浜名湖において海水順化試験を行なったニジマスに本菌感染症が発生した。

12) 1966年、静岡県沼津の養殖ハマチおよびカンパチ、1972年島根県神西湖の天然ボラなどの病魚から本菌が分離された。

13) 岡山県水産試験場で行なっているアユの種苗生産においてピブリオ病による著しい減耗が大きな問題となっており、その原因菌は *V. anguillarum* であることが確認された。(1973年, 1974年)。

14) 魚の本菌に対する感受性、魚の一般的な抵抗力、および種苗の取り扱い方などを総合してみると、アユ特に海産稚アユに本菌感染症が多発するのはかなり必然的なことであると考えられ、アユのピブリオ病を抑えるためには根本的な養殖方式の再検討が必要と考えられた。

## 第Ⅱ章

著者がこれまでに分離した *V. anguillarum* について、その性状を整理し、それらと外国から分離・報告された本菌の性状を比較するとともに初めて Bergey's manual of determinative bacteriology (8th ed. 1974) に記載された本菌の type description について考察を加えた。また我が国で報告された他の fish-pathogenic vibrios, 更には *Vibrio parahaemolyticus* あるいは *Vibrio alginolyticus* と本菌の性状との比較を試みた。

15) 1965年から1974年にかけて、アユ、ニホンウナギ、ニジマス、ハマチ、カンパチおよびボラから分離した *V. anguillarum* 61菌株の性状を整理したところ、糖分解能その他でいくつかの相違点はあるにしても主要な項目およびウナギに対する病原性などの点で完全に一致した。それらの性状を新しい Bergey's Manual の type description と比較した結果、すべての分離株は *V. anguillarum* と同定しうることが再確認された。

16) 著者の分離株の性状および外国から報告された *V. anguillarum* の性状を総合して検討した結果、Bergey's Manual の type description には indole 産生能についての記載など、若干訂正されるべき点があると考えられた。

17) Bergey's Manual に記載されたように、*Vibrio piscium*, *V. piscium* var. *japonicus* および *V. ichthyodermis* を *V. anguillarum* の synonym とすることは現段階では一応妥当なことと考えられたが、今後特に本菌の病原性についての検討を行ない、将来は生化学的性状だけでなく病原性の違いをも考慮して本菌をいくつかの type に分ける必要があると考えられた。

18) 我が国で他の研究者により報告された種名の明らかにされていない fish-pathogenic vibrios の性状を検討したところ、ニジマスには *V. anguillarum* とは別種の病原菌も存在していると考えられ、また海産魚の潰瘍病の原因菌をそのまま *V. anguillarum* とすることには問題があると考えられた。

19) *V. anguillarum* と *V. parahaemolyticus* を比較検討したところ、arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, sucrose 利用, Voges-Proskauer reaction, 塩分耐性などの生化学的性状、およびウナギに対する病原性に違いのあることが確認された。

20) *V. anguillarum* と *V. alginolyticus* を比較したところ arginine dihydrolase, lysine decarboxylase 塩分耐性およびウナギに対する病原性などに違いのあることがわかった。

## 第Ⅲ章

*V. anguillarum* (PB-15 株, アユ由来) に対する数種淡水魚および海産魚の感受性を検討したのち, ニホンウナギを実験材料魚に選び, 病原性確認の実験方法について検討した。この接種実験の過程において, 接種菌量のわずかな違いによって90%以上のウナギが死亡する場合とまったく死亡魚が出ない場合があったので, その現象に着目し, 接種菌の動態および接種した魚の内的変化を明らかにすることにより host-parasite relationship の一局面をとらえてみた。

21) *V. anguillarum* を数種の淡水魚および海産魚に接種したところ, ニホンウナギ, ヨーロッパウナギおよびドジョウは本菌に対し高い感受性を示し, ニジマス, クロダイおよびハマチも比較的高い感受性を示したが, コイ, フナおよびキンギョは極めて低い感受性しか示さなかった。

22) 感受性が高い点や飼育が比較的容易であることなどからニホンウナギを本菌の病原性確認の材料魚として選び, 感染方法を検討したところ, 接触法(培養菌水中懸濁法)あるいは経口投与方法によっては発病させることができず, 注射法, それも筋肉内注射が最も確実に発病させる接種方法であることがわかった。

23) 発病を目的として筋肉内注射を行なう場合, 接種菌量は魚体重 100 g 当り 1 mg (湿菌重量, 生菌数  $8 \times 10^8$  cells) が適当であること, 魚は体重 10 g 以上であれば大きさにあまり関係なく材料魚として使用しうること, 水温は 10°C でも実験可能であるが 20°C が適当であることがわかった。

24) ニホンウナギに本菌 (PB-15 株) を魚体重 100 g 当り 1 mg を接種すると 90% 以上のウナギが死亡したが, 接種量を 0.1 mg とすると死亡魚は 1 尾もでなかった。

25) 1 mg を接種されたウナギの血液, 肝臓, 脾臓および腎臓において接種菌は徐々に増加し, 死亡寸前(接種 36 時間後)の菌数は  $10^6$ /ml or g の level に達していた。これに対し 0.1 mg を接種されたウナギの各組織中の接種菌の数は時間経過とともにすみやかに減少し, 72 時間後にはほぼ消失していた。

26) 1 mg を接種されたウナギおよび 0.1 mg を接種されたウナギのいずれにおいても, hematocrit 値, hemoglobin 量あるいは赤血球数における変化は認められなかった。

27) 白血球の変動においては, 1 mg を接種されたウナギと 0.1 mg を接種されたウナギの間には大きな違いが認められた。特に菌接種 6 時間後に急激に増加した好中球は, 前者のウナギ (1 mg 接種) ではその後減少し続けたのに対し, 後者のウナギ (0.1 mg 接種) では更に増加し, 好中球が本菌の処理に大きく関与していることが示唆された。

28) 病理組織学的に検討を加えた結果, 接種された菌は接種部位の筋肉組織および結合組織において増殖し, それが血流に乗り各組織に運ばれ全身感染をひき起こし, 典型的な敗血症をひき起こしていることが確められた。

29) 本菌を超音波処理した上澄み液にはウナギに対する毒性成分は認められなかった。

30) 本菌は多くの場合マウスに対する病原性を示さなかった。実験によっては病原性を示す菌株もあったが, その程度は *V. parahaemolyticus* のマウスに対する病原性に比べると弱く, 本菌は一般的にはマウスにほとんど病原性を示さないと考えられた。

## 補

ニホンウナギを材料魚に用い, 本菌感染症の予防法の検討を目的として免疫学的基礎実験を試みた。

31) 本菌の死菌をウナギに筋肉内接種すると, 凝集素抗体が産生され, 生菌接種攻撃に対しても顕著な防禦作用を発揮した。

32) 死菌接種免疫によるウナギの抗体産生には水温が大きく関与することが確められた。すなわち水温 11°C ではウナギは抗体を産生せず, 水温 15°C 以上で抗体を産生しその速度は水温が高い程増した。しかし水温を 27°C にまで上げて抗体産生の速度は水温 23°C の場合と変わらず, 水温 23~27°C 位がニホンウナギの抗体産生のための好適水温であると考えられた。

33) 水温 23~27°C の場合, 通常最初の免疫から 2 週間後に凝集素抗体が初めて確認されたが, 最も早い例

では1週間後に確認された。また維持の点では、 Freund's incomplete adjuvant vaccine を接種し水温7～15℃の下においた場合、最初の免疫から約4カ月後でも抗体が確認された。

34) 経口免疫実験を試みたところ、 merzonin 死菌投与区においては抗体は産生されなかったが、生菌投与区においては低い titer ながら凝集素抗体の産生が認められた。なおそれらの抗体を産生した生菌投与区の魚に生菌攻撃を試みたが、あまり顕著な防禦作用は認められなかった。

## 引用文献

- 1) ANDERSON, J.I.W. and D. A. CONROY (1970): Vibrio disease in marine fishes. in A symposium of the American Fisheries Society on diseases of fishes and shellfishes (1969, S. F. SNIESZKO ed.), *Trans. Amer. Fish. Soc. spec. pub. No. 5*, 266–272.
- 2) 松井魁 (1972): 種類と分類「鰻学—生物学的研究篇—」1～47, 恒星社厚生閣, 東京, 283 pp.
- 3) CISAR, J. O. and J. L. FRYER (1969): An epizootic of vibriosis in chinook salmon. *Bull. Wildlife Disease Assoc.*, **5**, 73–76.
- 4) LEVIN, M. A., R. E. WOLKE and V. J. CABELLI (1972): *Vibrio anguillarum* as a cause of disease in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Can. J. Microbiol.*, **18**, 1585–1592.
- 5) EVELYN, T. P. T. (1971): First records of vibriosis in pacific salmon cultured in Canada, and taxonomic status of the responsible bacterium, *Vibrio anguillarum*. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **28**, 517–525.
- 6) ROSS, A. J., J. E. MARTIN and V. BRESSLER (1968): *Vibrio anguillarum* from an epizootic in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in the U. S. A.. *Bull. Off. Int. Epiz.*, **69**, 1139–1148.
- 7) HACKING, M. A. and J. BUDD (1971): Vibrio infection in tropical fish in a freshwater aquarium. *J. Wildlife Dis.*, **7**, 273–280.
- 8) BREED, R. S., E. G. D. MURRAY and N. R. SMITH (1957): Bergey's manual of determinative bacteriology. 7th ed. Williams & Wilkins Co. Baltimore, 1094 pp.
- 9) HENDRIE, M. S., W. HODGKISS and J. M. SHEWAN (1971): Proposal that the species *Vibrio anguillarum* BERGMAN 1909, *Vibrio piscium* DAVID 1927, and *Vibrio ichthyodermis* (WELLS and ZOBELL) SHEWAN, HOBBS and HODGKISS 1960 be combined as a single species, *Vibrio anguillarum*. *Int. J. Syst. Bact.*, **21**, 64–68.
- 10) BUCHANAN, R. E. and N. E. GIBBONS (1974): Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed., Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1246 pp.
- 11) DAVIS, H. (1927): Über eine durch choleraähnliche Vibrionen hervorgerufene Fischseuche. *Zentrbl. Bakteriol. Parasitenk. Abt. I. Orig.*, **102**, 46–60.
- 12) WELLS, N. A. and C. E. ZOBELL (1934): *Achromobacter ichthyodermis*, n. sp., the etiological agent of an infectious dermatitis of certain marine fishes. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **20**, 123–126.
- 13) ZOBELL, C. E. (1946): Relation of marine bacteria to flora and fauna (Chap. 14) in Marine microbiology, 170–176, Waltham, U.S.A., 230 pp.
- 14) HODGKISS, W. and J. M. SHEWAN (1950): *Pseudomonas* infection in a plaice. *J. Path. Bact.*, **62**, 655–657.
- 15) SHEWAN, J. M., G. HOBBS and W. HODGKISS (1960): A determinative schema for the identification of certain genera of gram-negative bacteria, with special reference to the Pseudomonadaceae. *J. Appl. Bact.*, **23**, 379–390.

- 16) HOSHINA, T. (1957): Further observations on the causative bacteria of the epidemic disease like furunculosis of rainbow-trout. *J. Tokyo Univ. Fish.*, **43**, 59-66.
- 17) HOSHINA, T. (1956): An epidemic disease affecting rainbow-trout in Japan. *ibid.*, **42**, 15-16.
- 18) 斉藤豊・佐野昭子・大鶴正満・神田一男(1956): 1955年夏期新潟県に発生した養殖ニジマスの伝染性疾患について, 衛生動物 **7**. 109-110.
- 19) 岸久吉・原田賢治・三橋進・山本郁夫(1958): 鱒より分離した病原性Vibrioに関する研究, 第1報, 分離菌の性状と病原性について, 日本細菌学雑誌, **13**. 256-258.
- 20) 村江通之・岩村昇・高野正明・亀家朗介・木下干城・星野暉・日野淑美・内田守雄・松田正雄(1959): 公衆衛生外来相談臨場経験その3, 養殖虹鱒より分離したビブリオ病菌の衛生細菌学的研究, 米子医雑, **10**. 1371-1379.
- 21) SAITO, Y., M. OTSURU, T. FURUKAWA, K. KANDA and A. SATO (1964): Studies on an infectious disease of rainbow-trouts. *Acta Medica et Biologica*, **11**, 267-295.
- 22) 林孝市郎・小林茂雄・鎌田淡紅郎・尾崎久雄(1964a): ニジマスのビブリオ病に関する研究-I, ニトロフラン誘導体の治療効果, 三重県大水産学部紀要, **6**. 171-180.
- 23) 林孝市郎・小林茂雄・鎌田淡紅郎・尾崎久雄(1964b): — II. ワクチンの予防効果, 同誌, **6**. 181-191.
- 24) 林孝市郎・西岡信夫・西出一彦・鎌田淡紅郎(1965): — III. TM-5及びパナゾンの治療効果, 同誌 **6**. 287-289.
- 25) 保科利一(1963): 水生菌病を中心とした最近の魚病研究, 水産増殖, 臨時号 **3**. 「養魚の疾病に関する最近の問題」, 1-16.
- 26) 保科利一(1968): 淡水魚類の細菌性疾病, 「魚類の細菌性疾病に関するシンポジウム1967」, 日本水産学会誌, **34**. 226-237.
- 27) 江草周三(1972): 魚病細菌と魚病, シンポジウム「魚病細菌をめぐって」日本細菌学雑誌, **27**. 739-744.
- 28) 楠田理一・赤沢一三(1963): 細菌による海産蓄養魚類の伝染性疾病について, 水産増殖, 臨時号 **3**. 「養魚の疾病に関する最近の問題」, 31-66.
- 29) 楠田理一(1965): 海産魚の潰瘍病に関する研究, 京都府水産試験場業績, 第 **25** 号, 1-116.
- 30) 赤沢一三・一浦与一・伊吹彦三(1966): 腸炎ビブリオと魚病の関連について, 京都府衛生研究所, パンフレット, 1-19.
- 31) 木村正雄(1964): 養殖魚類の疾病に関する研究-II. ハマチの細菌性疾病について(その1), 日本水産学会誌, **30**. 114-121.
- 32) 木村正雄(1968): 海産養殖魚とくにブリの疾病に関する基礎的研究, 宮崎大学農学部研究時報, **15**. 81-175.
- 33) 平野克己・米康夫(1971a): 輸送後飼育中に起きる魚の死亡の一原因および病原性分離菌の性状, *Rept. Fish. Res. Lab. Kyushu Univ.*, **1**. 15-27.
- 34) 平野克己・米康夫(1971b): 輸送中あるいは輸送後飼育中に起きる魚の斃死に関する細菌学的研究 — II. 斃死魚から分離した病原性V群菌の性状, 日本水産学会誌, **37**. 1084-1087.
- 35) 平野克己・米康夫(1972): — III. 斃死魚から分離した病原菌の性状および薬剤に対する感受性, 同誌, **38**. 64-68.
- 36) 安永統男(1972): スレに起因する種苗用マダイの細菌性疾病の一原因菌と薬浴の効果, 魚病研究, **7**. 67-71.
- 37) 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.

- 38) 室賀清邦・元信堯(1967): 利根川河口における稚アユのビブリオ病について, 魚病研究, 2. 74~76.
- 39) 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, 同誌, 5. 16~20.
- 40) SINDERMAN, C. J. (1966): Diseases of marine fishes. *Adv. Mar. Biol.*, 4, 1-89.
- 41) SINDERMAN, C. J. (1970): Bacteria, in Principle disease of marine fish and shellfish. 16-22, Academic Press, New York and London, 369 pp.
- 42) SCHÄPERCLAUS, W. (1934): Untersuchungen über die Aalseuchen in deutschen Binnen- und Küsten-gewässern 1930-1933. *Zeit. für Fisch.* 32, 191-217.
- 43) NYBELIN, O. (1935 a): Untersuchungen über den bei Fischen Krankheitsserregenden Spaltpilz *Vibrio anguillarum*. *Medd. Statens Unders. Forsogsanst. Sotvattenfisket.* Nr. 8, 5-62.
- 44) WOLTER, R. (1960): Die Vibrio-anguillarum-Seuche im Strelasund und Greifswalder Bodden. *Zeit. für Fisch.*, 9, 763-769.
- 45) MATTHEIS, T. (1964): Das Vorkommen von *Vibrio anguillarum* in Ostsee Fischen. *Zeit. für Fisch.*, 12 (NF), 259-263.
- 46) LAGARDE, E. et F. CHAKROUN (1965): Une épizootie a *Vibrio anguillarum* chez les anguilles de létang du Canet (Pyrenees Orientales). *Ann. Inst. Pasteur*, 108, 135-140.
- 47) 城泰彦・室賀清邦(1972): 淡水養殖ウナギから分離された *Vibrio anguillarum* について, 魚病研究 6. 117~119.
- 48) RUCKER, R. R., B. J. EARP and E. J. ORDAL (1953): Infectious disease of pacific salmon. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 83, 297-312.
- 49) RUCKER, R. R. (1959): Vibrio infections among marine and freshwater fish. *Prog. Fish-Cult.*, 21, 22-25.
- 50) HOLT, G. (1970): Vibriosis (*Vibrio anguillarum*) as an epizootic disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Acta. Vet. Scand.*, 11, 600-603.
- 51) HAASTEIN, T. and G. HOLT (1972): The occurrence of vibrio disease in wild Norwegian fish. *J. Fish. Biol.*, 4, 33-37.
- 52) MCCARTHY, D. H., J. P. STEVENSON and M. S. ROBERTS (1974): Vibriosis in rainbow trout. *J. Wildlife Dis.*, 10, 2-7.
- 53) 大上皓久・山崎浩(1965): 海産稚アユの移殖方法について(I)浜名湖産稚アユの蓄養歩留りについて, 木曾三川河口資源調査報告, No.2. 695~706.
- 54) 大上皓久・山崎浩(1967): 海産稚アユの移殖方法について(II)浜名湖産シラスアユの蓄養歩留りと塩分濃度との関係, 同誌, No.3. 21~29.
- 55) 小寺和郎・舟橋紀男・宮崎照雄・窪田三朗(1974 a): アユのビブリオ病-I, 淡水馴致を遅延した場合の発生状況について, 魚病研究, 8. 183~184.
- 56) 小寺和郎・舟橋紀男・宮崎照雄・窪田三朗(1974 b): — II. 病魚からの分離菌による復元実験, 同誌, 8. 185~189.
- 57) 舟橋紀男・宮崎照雄・小寺和郎・窪田三朗(1974): アユのビブリオ病の病理組織学的研究, 同誌, 8. 136~143.
- 58) 窪田三朗・高桑三明(1963): 海産養殖魚の疾病に関する研究— I. 三重県下に発生している魚病の概要と予備的考察, 三重県大産学部紀要, 6. 107~124.
- 59) FLOODGATE, G. D. and P. R. HAYES (1961): The preservation of marine bacteria. *J. Appl. Bact.*, 24, 87-93.
- 60) 室賀清邦・江草周三(1968): 魚の細菌感染症治療法としての chlortetracycline 薬浴について, - I. 魚病治療効力, 魚病研究, 2. 141~147.

- 61) DAVIS, G. H. G. and R. W. H. PARK (1962): A taxonomic study of certain bacteria currently classified as *Vibrio* species. *J. Gen. Microbiol.*, 27, 101-119.
- 62) 坂崎利一(1963): 細菌学的諸性状と分類学上の位置, 藤野・福見編, 「腸炎ビブリオ」69~107. 一成堂, 東京, 422 + 33 pp.
- 63) 坂崎利一(1967): 腸炎ビブリオとその類似細菌, 藤野・福見編, 「腸炎ビブリオ第Ⅱ集」83~115. 納谷書店, 東京, 806 pp.
- 64) BAIN, N. and J. M. SHEWAN (1968): Identification of *Aeromonas*, *Vibrio* and related organisms. in Identification methods for microbiologists, part B(GIBBS and SHAPTON ed.), 79-84. Academic Press, London and New York, 212 pp.
- 65) 坂崎利一(1972): 魚病細菌についての問題点, シンポジウム「魚病細菌をめぐって」日本細菌学雑誌, 27. 788~789.
- 66) SMITH, I. W. (1961): A disease of finnock due to *Vibrio anguillarum*. *J. Gen. Microbiol.*, 24, 247-252.
- 67) BAGGE, J. and O. BAGGE (1956): *Vibrio anguillarum* som or sog til ulcussygdom hos torsk (*Gadus callarias* L.). *Nord. Vet. Med.*, 8, 481-492.
- 68) 保科利一・四竈安正・江草周三(1965): ビブリオ菌病「養魚学」, 231~243. 恒星社厚生閣, 東京, 642 pp.
- 69) 大上皓久(1966): ビブリオ病, 「アユ」65~68. 農山漁村文化協会, 東京, 115 pp.
- 70) 石田力三(1968): ビブリオ病, 大島泰雄・稲葉伝三郎監修「鮎」養魚講座第3巻, 110~111. 緑書房, 東京, 154 pp.
- 71) SKERMAN, V. B. D. (1967): Methods, in A guide to the identification of the genera of bacteria (2nd ed.), 213-286, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 303 pp.
- 72) 室賀清邦・属博夫・杉山瑛之・田原恒男・城泰彦(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. 147~151.
- 73) 宇野将義・室賀清邦(1974): 愛知県下の養殖アユ, ウナギおよびコイ(錦ゴイ)病魚から分離したいくつかの魚類病原細菌について, 同誌, 8. 165~170.
- 74) 青木宙・江草周三・渡辺力(1972): 水産養殖における薬剤耐性とR因子, シンポジウム「魚病細菌をめぐって」日本細菌学雑誌, 27. 762~767.
- 75) 青木宙・江草周三・新井俊彦・室賀清邦・城泰彦(1973): アユから分離された *Vibrio anguillarum* の薬剤耐性の研究, 昭和48年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p. 84.
- 76) 保科利一(1962): ウナギの鱗赤病に関する研究, 東水大特別研究報告 6. 1~104.
- 77) WAKABAYASHI, H. and S. EGUSA (1972): Characteristics of a *Pseudomonas* sp. from an epizootic of pond-cultured eels (*Anguilla japonica*). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 38, 577-587.
- 78) 木村喬久(1970): 催熟蓄養中のサクラマスならびにカラフトマス親魚に発生した細菌性疾病に関する研究, 北海道さけ・ますふ化場研究報告 24. 9~100.
- 79) 室賀清邦・城泰彦・矢野雅行(1973): 養殖ウナギの赤点病に関する研究-I. 1972年徳島県下の養鰻池における赤点病発生状況, 魚病研究, 8. 1~9.
- 80) 若林久嗣・江草周三(1973): 静岡県吉田地区における養殖ウナギの細菌感染症について, 同誌, 8. 91~97.
- 81) 田中義興(1967): 網生簀による海水養鰻, 福岡県福岡水産試験場調査研究報告, 13. 31~38.
- 82) SNIESZKO, S. F. (1974): The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J. Fish. Biol.*, 6, 197-208.

- 83) 鈴木博也 (1974): 1971年, 1972年, 宍道湖, 神西湖の天然魚に発生した疾病について, 魚病研究, 9, 91~94.
- 84) SMITH, I. W. (1959): *Vibrio* spp. in finnock from the Aberdeen-shire Dee., *Nature*, 183, 1409.
- 85) 江草周三 (1969): (総説) 魚病菌 *Vibrio anguillarum* について, 魚病研究, 4, 31~44.
- 86) 室賀清邦・江草周三 (1973): *Vibrio anguillarum* の性状に関する考察, 同誌, 8, 10~25.
- 87) 伝染病研究所学友会編 (1958): 顕微鏡による検査法, 鑑別に利用される細菌の生物学的性状の検査法「細菌学実習提要」119~146. 丸善, 東京, 478 pp.
- 88) 坂崎利一・波岡茂郎訳 (I. G. SCHAUB) (1964): 試験のやり方, 「臨床細菌検査の実際」, 139~165. 納谷書店, 東京, 214 pp.
- 89) HAYWARD, A. C. (1966): Methods of identification in the genus *Xanthomonas*. in Identification methods for microbiologists, part A (GIBBS and SKINNER ed.), 9-14, Academic Press, London and New York, 145 pp.
- 90) BULLOCK, G. L. (1961): A schematic outline for the presumptive identification of bacterial disease of fish. *Prog. Fish-Cult.*, 23, 147-151.
- 91) 柳沢文徳 (1964): キチナーゼについて, 藤野・福見編「腸炎ビブリオ」215~221. 一成堂, 東京, 422 + 33 pp.
- 92) LECLAIR, R. H., H. ZEN-YOJI and S. SAKAI (1970): Isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* from clinical specimens. *J. Conf. Public Health Lab. Dir.*, 28, 82-92.
- 93) THORNLEY, M. J. (1960): The differentiation of *Pseudomonas* from other gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *J. Appl. Bact.*, 23, 37-52.
- 94) 室賀清邦・属博夫 (1974): *Vibrio anguillarum* の塩分耐性に及ぼす培地塩分濃度の影響について, 魚病研究, 9, 28~30.
- 95) 清水潮 (1972): 魚病細菌と分類, シンポジウム「魚病細菌をめぐって」日本細菌学雑誌, 27, 780~785.
- 96) ANDERSON, R. S. and E. J. ORDAL (1972): Deoxyribonucleic acid relationships among marine vibrios. *J. Bact.*, 109, 696-706.
- 97) 内田達次 (1961): 鱒のビブリオ病に関する実験的研究, *Kōnan's Technical Bulletin* 上, 甲南工業株式会社, 1~43.
- 98) 米康夫・平野克己 (1971): 輸送中あるいは輸送後飼育中に起きる魚の斃死に関する細菌学的研究 - I. 斃死の一原因について, 日本水産学会誌, 37, 140~144.
- 99) BAROSS, J. and J. LISTON (1970): Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and related hemolytic vibrios in marine environments of Washington State. *Appl. Microbiol.*, 20, 179-186.
- 100) TUBIASH, H. S., R. R. COLWELL and R. SAKAZAKI (1970): Marine vibrios associated with bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *J. Bact.*, 103, 272-273.
- 101) BIANCHI, M. A. G. (1971): Étude comparée de vibrios de haute mer de leurs homologues non marins: Biochimie, nutrition et taxonomic numérique. *Arch. Mikrobiol.*, 77, 127-139.
- 102) COLWELL, R. R. (1970): Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: Numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J. Bact.*, 104, 410-433.
- 103) ZOBELL, C. E. and N. A. WELLS (1934): An infectious dermatitis of certain marine fishes. *J. Infect. Diseases*, 55, 299-305.
- 104) 畑井喜司雄 (1972a): 魚における血流中接種細菌の動態に関する研究 - I. ウナギ血流中に接種された *Aeromonas* 菌の消長, 魚病研究, 7, 26~33.
- 105) 結城了伍 (1963): 魚類の血液細胞に関する諸問題, 特にその顕微鏡的検査の吟味, シンポジウム「魚類

- 血液学の水産への応用」,日本水産学会誌, **29**, 1098～1103.
- 106) 結城了伍 (1960): 魚類の血球組成 - IV. 血液塗抹標本にみられる「核影」について, 同誌, **26**, 490～495.
- 107) SANO, T. (1957): Haematological studies on the culture fishes in Japan. I. On the blood of eel. *J. Tokyo Univ. Fish.*, **43**, 75-79.
- 108) 日比谷京 (1963): 疾病魚における血液性状の変動, シンポジウム「魚類血液学の水産への応用」,日本水産学会誌, **29**, 1119～1124.
- 109) 畑井喜司雄 (1972b): 魚における血流中接種細菌の動態に関する研究 - II. ウナギ血流中における *Aeromonas* 菌の消長に伴う白血球の変動, 魚病研究, **7**, 34～43.
- 110) 清水朋子 (1969): エロモナス感染症における菌の病原性と産生する毒素について (総説), 同誌, **4**, 19～30.
- 111) SHIMIZU, T. (1968 a): Studies on pathogenic properties of *Aeromonas liquefaciens*. -I. Production of toxic substance to eel. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **35**, 55-66.
- 112) SHIMIZU, T. (1968 b): —II. Separation of toxic factors by gel filtration. *ibid.*, **35**, 163-172.
- 113) SHIMIZU, T. (1968 c): —III. Some chemical and antigenic properties of toxic factors. *ibid.* **35**, 423-429.
- 114) SHIMIZU, T. (1968 d): —IV. Necrotic factor for eel and guinea pig. *ibid.*, **35**, 613-618.
- 115) GJEDREM, T. and D. AUSTAD (1974): Selection experiments with salmon I. Differences in resistance to vibrio disease of salmon parr (*Salmo salar*). *Aquaculture*, **3**, 51-59.
- 116) 保科利一・千葉胤和 (1957): マラカイトグリーンのビブリオ病菌に対する発育阻止力に就て, 日本水産学会誌, **23**, 199～201.
- 117) 保科利一・国峯一声・高橋猛 (1957): ニジマスのビブリオ病菌の被害防除に関する研究予報, 同誌, **23**, 241～244
- 118) 大上皓久 (1969): 海産稚アユのビブリオ病に対するスルファモノメトキシシ菌浴の効果, 魚病研究, **3**(2), 30～33.
- 119) ALMEIDA, L. J., E. J. DA SILVA and Y. M. FREITAS (1967): Effect of antibiotics on some bacterial pathogens of fish. *Indian J. Microbiol.*, **7**, 51-56.
- 120) CUSHING, Jr. J. E. (1942): An effect of temperature upon antibody-production in fish. *J. Immunol.*, **45**, 123-126.
- 121) HILDEMAN, W. H. (1962): Immunogenetic studies of poikilothermic animals. *Am. Naturalist*, **96**, 195-204.
- 122) MUROGA, K. and S. EGUSA (1969): Immune response of the Japanese eel to *Vibrio anguillarum* —I. Effects of temperature on agglutinating antibody production in starved eels. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **35**, 868-874.
- 123) NYBELIN, O. (1935 b): Über Agglutininbildung bei Fischen. *Ztschr. Immunit. Forsch.*, **84**, 74-79.
- 124) PLISZKA, F. (1939 a): Untersuchungen über die Agglutinine bei Karpfen. *Zentralb. Bakt. Parasit. und Infekt.*, **143**, 262-264.
- 125) PLISZKA, F. (1939 b): Weitere Untersuchungen über Immunitätsreaktionen und über Phagozytose bei Karpfen. *ibid.*, **143**, 451-460
- 126) SMITH, W. W. (1940): Production of anti-bacterial agglutinins by carp and trout at 10°C. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **45**, 726-729.
- 127) MANN, H. (1939): Serologischen Untersuchungen an mit asteckender Bauchwassersucht be-

- fallenen Karpfen. *Zeit. für Fisch.*, **37**, 101–126.
- 128) SPENCE, K. D., J. L. FRYER and K. S. PILCHER (1965): Active and passive immunization of certain salmonid fishes against *Aeromonas salmonicida*. *Can. J. Microbiol.*, **11**, 397–405.
- 129) KRANTZ, G. E., J. M. REDDECLIFF and C. E. HEIST (1963): Development of antibodies against *Aeromonas salmonicida* in trout. *J. Immunol.*, **91**, 757–760.
- 130) KRANTZ, G. E., J. M. REDDECLIFF and C. E. HEIST (1964 a): Immune response of trout to *Aeromonas salmonicida*. part I. Development of agglutinating antibodies and protective immunity. *Prog. Fish-Cult.*, **26**, 3–10.
- 131) 室賀清邦・江草周三 (1969): *Vibrio anguillarum* に対するウナギの免疫反応 - II. 経口免疫の可能性について, 魚病研究, **4**, 6~10.
- 132) 川津浩嗣 (1969): 魚類の免疫反応, 同誌, **3**(2). 57~72.
- 133) 川津浩嗣 (1972): 魚病と免疫, シンポジウム「魚病細菌をめぐって」日本細菌学雑誌, **27**, 746~751.
- 134) SNIESZKO, S. F. (1970): Immunization of fishes: a review. *J. Wildlife Dis.*, **6**, 24–30.
- 135) KLONTZ, G. W. and D. P. ANDERSON (1970): Oral immunization of salmonids: a review. in A symposium of the Amer. Fish. Soc. on diseases of fishes and shellfishes (1969), *Trans. Amer. Fish. Soc. spec. pub.*, No.5, 16–22.
- 136) FRYER, J. L., J. S. NELSON and R. L. GARRISON (1972): Vibriosis in fish. *Prog. Fish. Food Sci.*, **5**, 129–133.
- 137) FLETCHER, T. C. and A. WHITE (1973): Antibody production in the plaice (*Pleuronectes platessa*) after oral and parenteral immunization with *Vibrio anguillarum* antigens. *Aquaculture*, **1**, 417–428.
- 138) DUFF, D. C. B. (1942): The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida*. *J. Immunol.*, **44**, 87–94.
- 139) ROSS, A. J. and G. W. KLONTZ (1965): Oral immunization of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) against an etiologic agent of “Red mouth disease”. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **22**, 713–719.
- 140) POST, G. (1966): Response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to antigens of *Aeromonas hydrophila*. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **23**, 1489–1494.
- 141) SNIESZKO, S. F. and S. B. FRIDDLE (1949): Prophylaxis of furunculosis in brook trout by oral immunization and sulfamerazine. *Prog. Fish-Cult.*, **11**, 161–168.
- 142) KRANTZ, G. E., J. M. REDDECLIFF and C. E. HEIST (1964 b): Immune response of trout to *Aeromonas salmonicida*. part II. Evaluation of feeding techniques. *ibid.*, **26**, 65–69.
- 143) ROHOVEC, J. S., R. L. GARRISON and J. L. FRYER: Immunization of fish for the control of vibriosis (personal communication).

### Summary

#### Part I

*Vibrio anguillarum* was identified as the causative organism of epizootics of vibriosis in Ayu (*Plecoglossus altivelis*) and in some other fishes cultured in Japan.

1) In every spring from 1965 to 1967, young Ayu, which were caught in Lake Hamana, a salt lake, as seed fish for pond-culture, showed heavy mortalities during the period of acclimatization to freshwater. A considerable part of the mortalities was caused by an infectious disease. The causative

bacterium of this infection has been identified as *Vibrio anguillarum*.

2) In 1967 and 1970, similar disease occurred in stocked young Ayu caught in an estuary of the River Tone and along the sea-shore of some other districts, respectively. *V. anguillarum* was isolated from these diseased fish in each case.

3) In the summer of 1969, an epizootic occurred in Ayu in freshwater ponds in Shiga and Nagano prefectures. The causative organism was identified as *V. anguillarum*. Since these fish were caught as seed in Lake Biwa, a freshwater lake, this was the first time for the bacterium to be isolated as the etiological agent from Ayu which had exclusively inhabited freshwater environments.

4) In 1973, *Vibrio anguillarum* infection was prevalent in Ayu in freshwater ponds in various parts of Japan, and led to heavy losses due to the ineffectiveness of sulfa drugs and antibiotics, which had been frequently used before in controlling efficiently.

5) In 1971, *V. anguillarum* was isolated from the diseased eel (*Anguilla japonica*) cultured in freshwater ponds in Tokushima prefecture. The water of these ponds contained a slight amount of sea-water. Ever since then, this infection of cultured eel has repeatedly occurred in that district. In contrast, such infection has never been observed so far in eel ponds in other districts of Japan.

6) From 1966 to 1974, *V. anguillarum* was isolated occasionally also from diseased specimens of such fishes in sea- or brackish waters, as cultured rainbow trout (*Salmo gairdneri*), yellow tail (*Seriola quinqueradiata*) and Kampachi (*S. purpurascens*), and wild grey mullet (*Mugil cephalus*).

7) As described above, vibriosis has recently become a serious problem in fish culture, especially in Ayu culture in Japan. It is wished that the actual method of Ayu culture should be examined radically anew, in view of controlling the occurrence of this infectious disease.

## Part II

The microbiological characteristics of *V. anguillarum* isolated by the present author were studied comparatively and comprehensively. The type description of *V. anguillarum* listed in Bergey's manual of determinative bacteriology (8th ed. 1974) was discussed on the basis of the characteristics of the strains isolated by the present author and some other strains reported by foreign workers. Furthermore, some comparative studies of the present strains of *V. anguillarum* with other fish-pathogenic vibrios reported in Japan, and also with *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* were carried out.

8) The characteristics of *V. anguillarum* isolated from various fishes as described in the previous part proved to be identical with each other (not serologically), and these isolates were reaffirmed to be classified as *V. anguillarum* in reference to Bergey's new Manual.

9) From investigations of the present isolates, it seems necessary to revise the type description of *V. anguillarum* in the Manual for some items such as indole production, growth at 5°C and some sugar utilizations.

10) It seems reasonable to combine *V. anguillarum*, *Vibrio piscium*, *V. piscium* var. *japonicus* and *Vibrio ichthyodermis* as a single species, under the name of *V. anguillarum*. At the same time, however, it is suggested that *V. anguillarum* should be divided into separate types on the basis of the differences in pathogenicity and in some biochemical characteristics.

11) It was indicated that some vibrios from rainbow trout and marine fishes in Japan, as reported by other authors, can be differentiated from *V. anguillarum* by certain biochemical characteristics

and by their pathogenicity.

12) From comparative experiments, it was demonstrated that *V. anguillarum* differs from *V. parahaemolyticus* in the following points; arginine dihydrolation, lysine decarboxylation, sucrose fermentation, Voges-Proskauer reaction, NaCl-tolerance and pathogenicity for the eel. Likewise, *V. anguillarum* differs from *V. alginolyticus* by arginine dihydrolation, lysine decarboxylation, NaCl-tolerance and pathogenicity for the eel.

### Part III

The Japanese eel (*A. japonica*) was selected as test-material for the evaluation of pathogenicity of *V. anguillarum*, and a method to confirm the pathogenicity was sought for. In the latter section of this part, some host-parasite relationships in experimental infection were investigated.

13) Susceptibilities of several freshwater and marine fishes against *V. anguillarum* (strain PB-15, from Ayu) were tested by means of intramuscular injection. As a result, it appeared that the Japanese eel, the European eel (*A. anguilla*) and loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) possess a remarkable susceptibility; that rainbow trout, black sea bream (*Mylio macrocephalus*) and yellow tail have a relatively high susceptibility too, but that carp (*Cyprinus carpio*), goldfish (*Carassius auratus*) and crucian carp (*C. carassius*) have a low susceptibility.

14) On account of this high susceptibility and for practical convenience, the Japanese eel was chosen as the test-material fish, and a method for the evaluation of pathogenicity was sought. The conclusions were as follows: intramuscular injection proves to be the most reliable method and 1 mg of the bacterium in wet weight ( $8 \times 10^8$  cells) per 100 g of fish body weight is the adequate dose for inoculation. Even small eels (more than 10 g in body weight) can be used as materials. The experimental results can be obtained by a water temperature of 10°C, but show up more rapidly at 20°C.

15) Under the above mentioned experimental conditions, more than 90 % of the Japanese eels that received a dose of 1 mg of cells of the bacterium died within a week, while none of the eels that received only 0.1 mg died. It was confirmed that the number of the bacterium in the blood and in some other tissues of the former eels augmented slowly up to  $10^6$  cells/ml or g; and that on the contrary, the bacterium in the latter eels diminished in number and at 72 hours after the inoculation the bacterium disappeared in every tissue.

16) From hematological studies of the inoculated eels, it was proved that no change had occurred in the hematocrit value, the hemoglobin content and the number of erythrocyte, even for the eels that had received a lethal dose (1 mg). But changes in number of leucocytes, especially of neutrophil, were markedly contrasted between the eels that received 1 mg and those received 0.1 mg.

17) From the histological studies, it could be shown that the eels which had received a lethal dose fell into a systemic septicemia.

18) A supernatant fluid of the sonicated cell suspension of the strain PB-15 was proved to have no toxic effect on the eel.

19) Most of the strains of *V. anguillarum* showed no pathogenicity for mouse, but in a few experiments some strains exhibited pathogenicity, though weaker than that of *V. parahaemolyticus*.

**Supplementary part**

Some immunological laboratory experiments were carried out, using the eels as test-material.

20) The eels produced agglutinins and protective immunity by receiving the merzonin-killed cells intramuscularly.

21) Water temperature played an important role on the formation of antibodies in the eel; within a temperature range from 15°C to 23°C, the maximum titer, viz. 800 ~ 1,600, were attained more rapidly at higher temperature, but no difference was found between 23°C and 27°C. No measurable antibody was produced at 11°C.

22) The agglutinating antibody induced by Freund's incomplete adjuvant vaccine were maintained for about 4 months at a low temperature of 7 to 15°C.

23) An attempt was made on oral immunization of the eel against *V. anguillarum*. The group fed on merzonin-killed cells did not produce antibodies, but the group fed on viable cells produced circulating agglutinating antibodies after three month's feeding. It was shown that the protective immunity of the eel fed on viable cells was very weak however, even after four month's feeding.

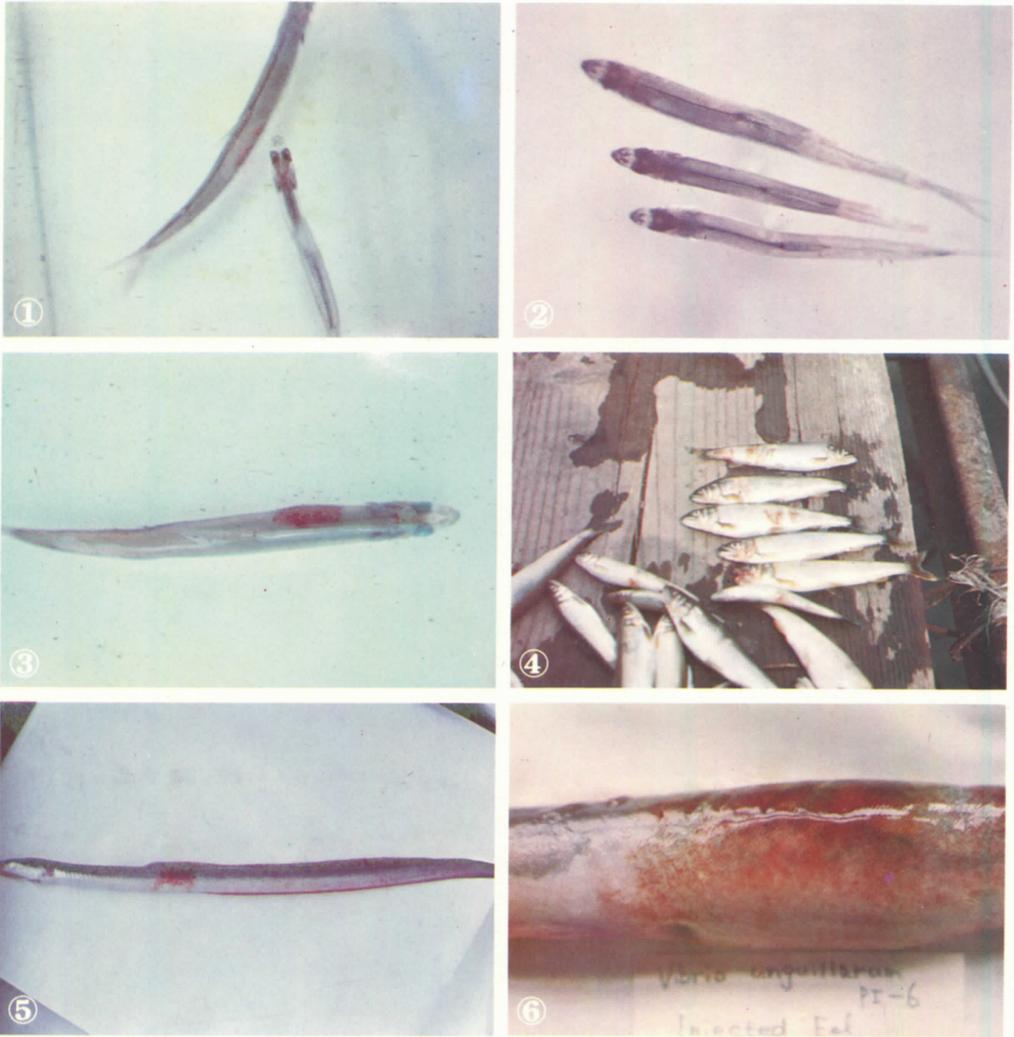


Plate I

- 1 Vibriosis in young Ayu caught in Lake Hamana.
- 2 Vibriosis in young Ayu caught in Lake Hamana.
- 3 Induced vibriosis in young Ayu by intramuscular injection.
- 4 Vibriosis in Ayu cultured in freshwater ponds.
- 5 Induced vibriosis in the Japanese eel by intramuscular injection.
- 6 Induced vibriosis in the Japanese eel (Inoculation site).

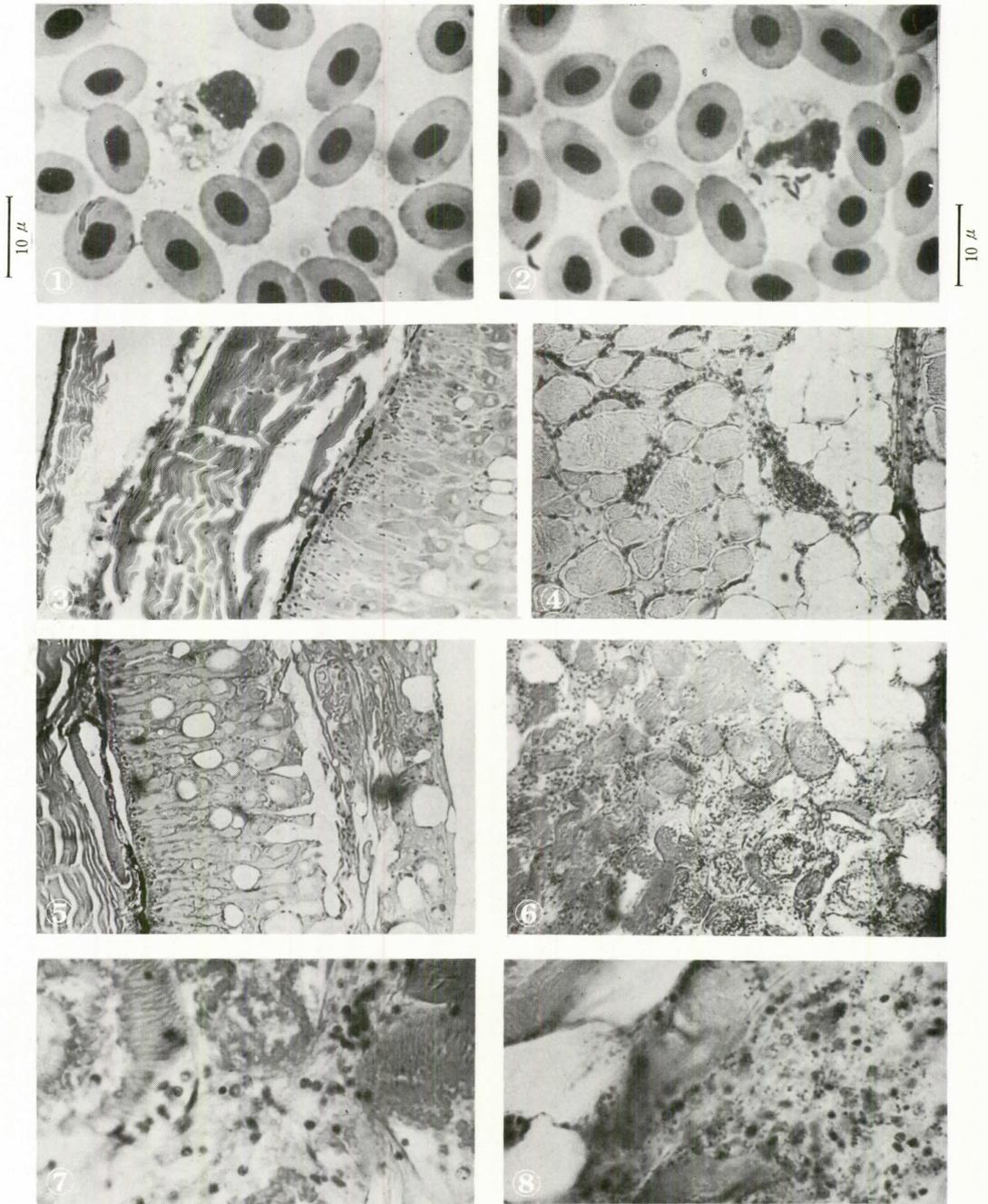


Plate II Induced vibriosis in the Japanese eel.

- 1 *Vibrio anguillarum* phagocytized by a neutrophil in the blood.  
(after 30 hours since inoculation with 1 mg)
- 2 *V. anguillarum* in a neutrophil in the blood. (1 mg, 30 hrs.) MG
- 3 Skin of a control (healthy) eel.
- 4 Muscle of a injected eel. (0.1 mg, 24 hrs.) MG ×100
- 5 Skin (1 mg, 24 hrs.) HE ×100
- 6 Muscle (1 mg, 30 hrs.) HE ×100
- 7 ( " ) HE ×400
- 8 Muscle ( " ) MG ×400

MG --- May-Giemsa stain, HE --- Hematoxylin-Eosin stain

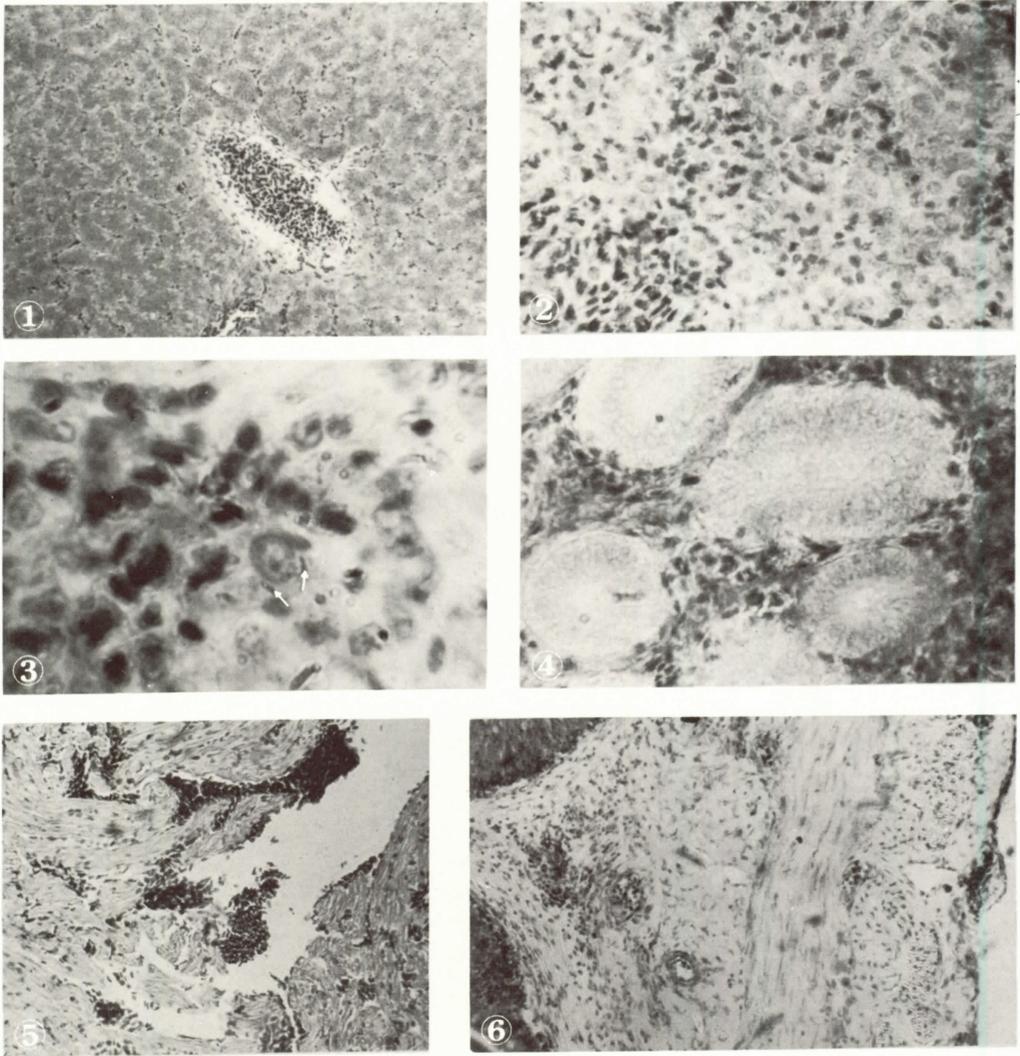


Plate III Induced vibriosis in the Japanese eel.

1	Liver	( 1 mg, 30 hrs.)	MG	×100
2	Spleen	( " )	MG	×400
3	Spleen	( " )	MG	×1000
4	Kidney	( " )	MG	×400
5	Heart [Ventricle]	( " )	MG	×100
6	Intestine	( " )	MG	×100

→ *Vibrio anguillarum*