

# マツカワで発生した*Pseudomonas anguilliseptica*の病原性

伊藤慎悟<sup>\*1</sup>, 松田泰平<sup>2</sup>, 勝又義友<sup>1</sup>, 西川翔太郎<sup>1</sup>, 水野伸也<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北海道立総合研究機構さけます・内水面水産試験場, <sup>2</sup>北海道立総合研究機構栽培水産試験場

Pathogenicity of *Pseudomonas anguilliseptica* to barfin flounder *Verasper moseri*

SHINGO ITO<sup>\*1</sup>, TAIHEI MATUDA<sup>2</sup>, YOSHITOMO KATUMATA<sup>1</sup>, SHOUTAROU NISHIKAWA<sup>1</sup> and SHINYA MIZUNO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Salmon and Freshwater Fisheries Institute, Hokkaido Research Organization, *Eniwa, Hokkaido 061-1433*,

<sup>2</sup> Mariculture Fisheries Institute, Hokkaido Research Organization, *Muroran, Hokkaido 051-0013, Japan*

Rod bacteria were observed in the brains, kidneys, and spleens of barfin flounder, following a mass mortality event. Biochemical properties and genetic analysis of bacteria from the kidney identified the bacterial species as *Pseudomonas anguilliseptica*. We examined the pathogenicity of the isolated *P. anguilliseptica* in barfin flounder using immersion tests. Mortality rates (within 35 days from the start of the test) were 74% at  $2.1 \times 10^5$  CFU/ml, 86% at  $2.1 \times 10^6$  CFU/ml, and 73% at  $2.1 \times 10^7$  CFU/ml. The onset of mortality occurred earlier when the number of bacterial counts was higher.

*P. anguilliseptica* was reisolated from the brains of all the dead fish. Since Koch's postulates were satisfied, we conclude that *P. anguilliseptica* is pathogenic to barfin flounder.

キーワード：病原性, マツカワ, *Pseudomonas anguilliseptica*, 生化学的性状

2019年に北海道内のマツカワの飼育施設で大量死が発生した。瀕死魚の腎臓から細菌が分離されたため、同定したところ*Pseudomonas anguilliseptica*であった。

マツカワ*Verasper moseri*はカレイ目カレイ科マツカワ属のカレイである(坂本 1986)。えりも以西太平洋海域には全長8 cmのマツカワ種苗が100万尾放流されており(川下・今 2007)、現在、天然魚も漁獲されるものの、漁獲物のほとんどが放流種苗由来である(吉村 2020)。

*P. anguilliseptica*はWakabayashi and Egusa (1972)によってニホンウナギの赤点病として命名された報告が最初であり、その後、国内ではアユ(中井ら 1985, Shimahara *et al.* 2018)、シマアジ(Kusuda *et al.* 1985)など、海外ではニジマス、ターボット、ヒラメなど広範囲の魚種の病原体として報告されている(Wiklund and Bylund 1990, Berthe *et al.* 1995, Kang *et al.* 2015)。

マツカワからの*P. anguilliseptica*の分離は今回が初めてであり、分離した菌株の同定の詳細、薬剤感受性試験、マツカワに対する病原性について報告する。

## 材料と方法

**供試魚** 2019年8月8日に北海道内の施設で瀕死のマツカワ(平均全長69 mm)を取り上げ、宅急便で冷蔵輸送されてきた魚を検体とした。なお、輸送には1日を要した。この魚体の外観と解剖による症状の観察を行った。

**細菌の分離** 腎臓、脾臓、脳の塗抹標本を作製し、グラムサフラニン溶液(BD)で染色し、生物顕微鏡で菌の有無を検鏡した。また、Marine Agar 2216培地(Difco)、パールコアTCBS寒天培地(栄研)、SS寒天培地(顆粒)「ニッスイ」(日水製薬)に腎臓と脾臓を塗抹し、15℃で7日間培養した。腎臓から単離した菌を*P. anguilliseptica* Kd-1株とし、以下の試験に供した。

**細菌の同定** 細菌の性状検査はAPI20E(ジオメリュー)で調べた。なお、グラム染色はグラム染色キット(日本ベクトン・ディッキンソン)で、運動性とOF試験は絵面・清水(1990)の簡易同定法で調べた。鞭毛染色はKodaka *et al.* (1982)の方法を使用した。チトクローム・オキシダーゼ試験はチトクローム・オキシダーゼ試験用ろ紙「ニ

ッスイ」(日水製薬)で判定した。カタラーゼ試験は1%塩化ナトリウム(富士フィルム和光純薬)となるように調整したトリプチケースソイ寒天培地(以下1%塩化ナトリウム含有TSA, 日水製薬)で培養した新鮮培養菌体に3%過酸化水素水を滴下し判定した。DNA分解性試験はDNA寒天培地「ニッスイ」(日水製薬)で行った。塩分耐性および温度耐性試験は中井ら(1985)の方法で調べた。16SrDNA領域の解析はBacterial 16S rDNA PCR Kit(タカラバイオ)を用い,キットのマニュアルに従いPCR法で増幅させた。得られたPCR産物のシーケンスは株式会社ファスマックに委託し,解析した。また,得られたシーケンスデータはアメリカ国立生物工学情報センターのオンライン([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome))を利用し,ホモロジー検索した。

**ディスク拡散法による薬剤感受性試験** 今回分離した*P. anguilliseptica* Kd-1株を終濃度が1%塩化ナトリウム含有TSAで15℃,10日間培養後,100 mlの終濃度が1%塩化ナトリウムとなるように調整したトリプチケースソイ液体培地(以下,1%塩化ナトリウム含有TSB,日水製薬)に1白金耳懸濁し,15℃で5日間振盪培養した。菌液を1白金時採取し,1%塩化ナトリウム含有TSAに塗抹後,BDセンシ・ディスク オキシテトラサイクリン30(日本ベクトン・ディッキンソン)を載せ,15℃で10日間培養後,ディスクの周りにできた阻止円の直径を測定し,添付資料から結果を判定した。

**抗*P. anguilliseptica* Kd-1株ウサギ血清の作製** 今回分離した*P. anguilli-septica* Kd-1株を1%塩化ナトリウム含有TSAで15℃,10日間培養後,100 mlの1%塩化ナトリウム含有TSBに1白金耳懸濁し,15℃で5日間振盪培養した。次に,50 mlの培養液を4℃下で3,000×gで15分間遠心分離し,上清を捨てた。沈殿した菌体を25 mlの0.85%塩化ナトリウム溶液に懸濁し,4℃下で3,000×gで15分間の遠心分離を行った。この作業を3回繰り返し,洗浄した菌体1 mgを採取し,1 mlの0.85%塩化ナトリウムに懸濁した液を11本作製後,0,3,7,10,14,17,21,24,28,31,35日後にウサギ(日本白色種)へ1回あたり1本を静注した。42日後に全採血し,スライド凝集法で凝集価を測定した。なお,ウサギの飼育・抗原接種・全採血はユーロフィンジェノミクス株式会社に委託した。

**感染試験の供試魚** 栽培水産試験場で飼育した全長50~60 mmのマツカワ種苗を使用した。感染試験開始前に全長を測定した。

**マツカワに対する病原性** 感染試験は中央水産試験場の隔離飼育施設で実施した。60 L水槽で流水飼育し,流水量は毎時1換水とした。配合餌料を1日1回飽食量給餌し

た。菌液の調整には継代数6の菌を使用した。1%塩化ナトリウム含有TSAに菌を塗抹し,15℃で10日間培養した。菌を1白金耳とり,100 mlの1%塩化ナトリウム含有TSBに懸濁し,15℃で5日間振盪培養した。この菌液を抗*P. anguilliseptica* Kd-1株ウサギ血清の作製と同様に洗浄後,0.85%塩化ナトリウム溶液でMacFarland No.3の濁度に調整した。生菌数は1%塩化ナトリウム含有TSAで測定した。 $2.1 \times 10^5$ ,  $2.1 \times 10^6$ ,  $2.1 \times 10^7$  CFU/mlの菌数の海水を調整し,室温で1時間浸漬攻撃した。死亡魚の脳からは菌の再分離を実施し,抗*P. anguilliseptica* Kd-1株ウサギ血清で分離菌の凝集試験を行った。感染試験中の水温はペンダント温度データロガー(HOBO)で1時間に1度水温を測定した。

## 結果

**供試魚** マツカワは平均全長68.7 mm,平均体重は4.3 g(n=32)であり,外観的な症状として鱗基部や頭部の発赤が観察された。解剖したところ,肝臓出血,腎臓や脾臓の肥大が観察された。

**細菌の分離** サフラニン溶液染色した腎臓,脾臓,脳の塗抹標本中には桿菌が多数観察された。Marine Agar 2216培地では腎臓と脾臓からほぼ単一の菌が増殖したが,TCBS寒天培地とSS寒天培地では増殖しなかった。

**細菌の同定** 供試菌の生化学的性状を調べた結果を表1に示した。グラム陰性桿菌でOF試験は糖を発酵せず,運動性があり,鞭毛は極毛であった。また,チトクロームオキシダーゼ試験とカタラーゼ試験は陽性であり,糖分解性を調べたところ,供した糖はすべて分解しなかった。DNA分解性は陰性であり,ゼラチン分解性は陽性であった。塩分耐性を調べたところ,今回の試験で上限とした5%まで菌は発育した。生育温度は4~30℃まで発育したが,37℃では発育しなかった。なお,これらの生化学的性状はKang *et al.*(2015)で報告されている*P. anguillisepti-*

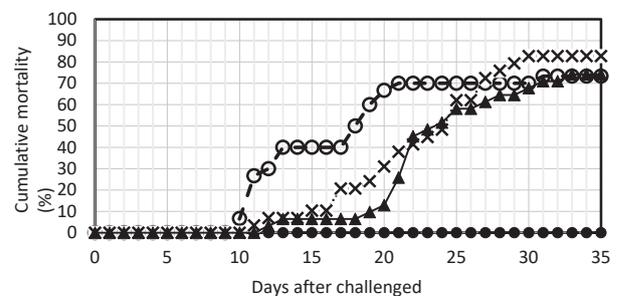


Fig.1 Cumulative mortality of barfin flounder after *P. anguilliseptica* immersion exposure.

● : Control(n=29), ○ :  $2.1 \times 10^7$  CFU/ml(n=30),  
× :  $2.1 \times 10^6$  CFU/ml(n=29), ▲ :  $2.1 \times 10^5$  CFU/ml(n=31)

caの性状とすべて一致した。シーケンス結果から16SrDNA(34-1,325番)は既知の*P. anguilliseptica*の配列(LC194236)と100%一致した。

**薬剤感受性試験** 添付資料にあるオキシテトラサイクリンでは感性があるという判断基準が阻止円直径19 mmに対して、供試菌では阻止円直径が44.6 mmであり、感性があると判断された。

**抗 *P. anguilliseptica* Kd-1株ウサギ血清の作製** 血清は約50 ml採取でき、*P. anguilliseptica* Kd-1株に対するスライド凝集価は1:16であった。

**感染試験の供試魚** 平均全長53.7 mm ± 3.8 (n=30)であった。

**マツカワに対する病原性** 感染試験の結果を図1に示した。2.1 × 10<sup>7</sup> CFU/mlの菌液に浸漬した場合、10日目から死亡が開始し、14日目までに30尾中12尾が死亡し、21日目までに21尾が死亡し、試験終了時の35日目までに22尾が死亡した。2.1 × 10<sup>6</sup> CFU/mlの菌液に浸漬した場合、11日目から死亡が開始し、14日目までに29尾中2尾が死亡し、21日目までに11尾が、試験終了時の35日目までに24尾が死亡した。2.1 × 10<sup>5</sup> CFU/mlの菌液に浸漬した場合、12日目から死亡が開始し、14日目までに31尾中2尾が死亡し、21日目までに8尾が死亡し、試験終了時の35日目までに23尾が死亡した。また、死亡魚には発症時と同様に鰭基部の発赤などが観察され、死亡魚の脳からは抗*P. anguilliseptica* Kd-1株ウサギ血清により凝集反応を示す菌が全個体で確認された。一方、対照区での死亡はなく、生残魚からは同ウサギ血清に凝集反応を示す菌は分離されなかった。なお、感染試験時の水温は18.0~20.4 °C、平均水温は19.1 °Cであった。

## 考 察

Table 1に示したとおり、今回分離された*P. anguilliseptica* Kd-1株はKang *et al.* (2015) がヒラメから分離した*P.*

*anguilliseptica*と性状が一致し、かつShimahara *et al.* (2018) で報告されているアユの*P. anguilliseptica*の16SrDNAの配列と今回分離された菌の部分配列(1,292塩基)が100%一致したことから、*P. anguilliseptica*と同定した。現在、マツカワの細菌病としてはエドワジェラ病、ビブリオ病等が知られているが、*P. anguilliseptica*の分離事例は北海道内の過去の事業報告書や診断記録、論文などにも記載がなく、マツカワでは初めての事例となる。今回分離した*P. anguilliseptica*の生化学的性状を中井・室賀(1982)と中井ら(1985)によって報告されているアユとウナギの*P. anguilliseptica*の性状と比較すると、ゼラチン分解性があること、塩分耐性が高いことから本菌はアユから分離された株よりもウナギから分離された株に近い性状を持っていると推察される。

本研究で菌濃度が2.1 × 10<sup>5</sup>~10<sup>7</sup> CFU/mlの1時間の浸漬攻撃後、35日間飼育したところ、供試魚の73~86%が死亡した。死亡魚では鰭基部の発赤など症状が再現された。死亡魚の脳からはほぼ単一のコロニーが分離され、これらの菌は抗*P. anguilliseptica* Kd-1株ウサギ血清で凝集反応を示した。以上のことから、コッホの原則が満たされ、この菌はマツカワに対して病原性を示すものと考えられた。また、室賀(2008)によると偏性病原体の特徴として浸漬攻撃が成立するということが挙げられているから、この菌は偏性病原体の可能性が高いと考えられる。

マツカワで発生する細菌病の治療方法は水産用医薬品としてカレイ目への投与が認可されている塩酸オキシテトラサイクリンもしくはアルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリンの投与が考えられる。今回の試験では*P. anguilliseptica* Kd-1株に対して、塩酸オキシテトラサイクリンに感性があると判断された。治療には有効であると考えられた。しかし、平均体重約50 gのマツカワには水産用医薬品として認可されている塩酸オキシテトラサイクリンやアルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリンを規定量投

Table 1 Comparison of the biochemical properties of the bacteria isolated in this study and *P. anguilliseptica* isolated from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), Ayu (*Plecoglossus altivelis*), and European eel (*Anguilla anguilla*).

	Kang <i>et al.</i> (2015)	Nakai <i>et al.</i> (1985)	Shimahara <i>et al.</i> (2018)	Nakai&Muroga (1982)	This study
	Japanese flounder	Ayu	Ayu	European eel	Barfin flounder
Gram stain	-	-	-	-	-
Shape	rod	No record	rod	No record	rod
pigment	No record	-	-	-	-
O/F	-	-	-	-	-
Growth temperature (°C)	5~30	10~30	No record	10~30	4~30
Mobility	+	+	+	+	+
Flagellation	Single polar	Single polar	+	Single polar	Single polar
Cytochrome oxidase	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Gelatin degradation	No record	-	-	+	+
Sugar examined	-	-	-	-	-
Growth in TSA with NaCl(%)	0-3 (4-5:Not detectede)	0-3	No record	0-4(4%:+ or-)	0-5

与しても、治療に十分な体内濃度に達しないことがわかっている(西原ら2004)。今回発症した個体の大きさは平均体重4.3 gであったが、4 g前後のマツカワへの規定量の塩酸オキシテトラサイクリンの投与についても同様に治療に十分な体内濃度に達しないことがわかっている(未公表データ)。マツカワに発症する*P. anguilliseptica*の化学的治療方法に関しては、今後、最小阻止濃度の検証や治療試験を行う必要があると考えられる。

## 謝 辞

試験を実施するにあたり、マツカワ受精卵を分与していただいた北海道栽培漁業振興公社伊達事業所今満人所長に感謝申し上げます。

## 引用文献

- Berthe, F.C.J., C.Michel and J.F.Bernardet. Identification of *Pseudomonas anguilliseptica* isolated several fish species in France. *Dis. Aqua.Org.*, 1995 ; 21(2) : 151-155.
- 絵面良男・清水潮：“水質・微生物篇”，日本海洋学会(編)，沿岸環境調査マニュアルⅡ。東京，恒星社厚生閣，東京，1990；9-20.
- Kang, B.J.,D.Subramanian, Y.H.Jang, S.H.Won and M.S.Heo. Detection of *Pseudomonas anguilliseptica* from olive flounder *Paralichthys olivaceus* using real-time with TaqMan fluorescent probe. *Fish Pathology*. 2015 ; 50(1) : 1-7
- 川下正己, 今満人：マツカワ種苗生産事業。平成18年度種苗生産事業報告書。社団法人 北海道栽培漁業振興公社。札幌。2007；77-87.
- Kodaka, H., A.Y.Armfield, G.L. Lombard and V.R.Dowell. Practical procedure for demonstrating bacterial flagella. *J.clin. Microbiol.* 1982 ; 16 : 948.
- Kusuda, R., N.Dohata, Y.Fukuda and K.Kawai. *Pseudomonas anguilliseptica* infection of striped jack. *Fish Pathology*. 1985 ; 30(2) : 121-122
- 室賀清邦. 第4章細菌病. §2. 魚類病原細菌. 「改訂・魚病学概論(小川和夫・室賀清邦編)」恒星社厚生閣, 東京. 2008 ; 56-59
- 中井敏博・室賀清邦. スコットランドのヨーロッパウナギ(*Anguilla Anguilla*)から分離された*Pseudomonas anguilliseptica*. 魚病研究 1982 ; 17(2) : 147-156
- 中井敏博, 花田 博, 室賀清邦. 養殖アユに発生した*Pseudomonas anguilliseptica*感染症. 魚病研究 1985 ; 20 (4) : 481-484
- 西原豊, 三浦宏紀, 伊藤慎悟:1.8 海産魚介類の魚病診断及び防疫対策事業(一般試験研究費:国費補助).平成14年度北海道立中央水産試験場事業報告書.北海道立中央水産試験場. 余市. 2004 ; 92-98.
- 坂本一男：マツカワ。日本産魚類大図鑑(益田一・尼岡邦夫・荒賀忠一・上野輝弥・吉野哲夫編)，東海出版，東京，1986；P. 337.
- Shimahara, Y, Y.Kawamoto, I.Kiryu, T.Nishioka, T.Kamaishi, K.Yuasa, S.Miwa, M.Hosaka R.Matsumoto, T.Nakai and N.Oseko. Mass mortality caused by *Pseudomonas anguilliseptica* in the pond-cultured Ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathology*, 2018 ; 53(3) : 101-104
- Wakabayashi, H and S. Egusa. Characteristic of a *Pseudomonas* sp.from an epizootic of pond-cultured eel(*Anguilla japonica*). *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 1972 ; 38 : 577-588
- Wiklund, T.andG.Bylund. *Pseudomonas anguilliseptica* as a pathogen of salmonid fish in Finland. *Dis.Aqua.Org.* 1990 ; 8 : 13-19.
- 吉村圭三. 資源管理・海洋環境シリーズ 人工種苗放流により構築されたマツカワ資源の現在. 北水試だより 2020 ; 101 : 11-13