

マガレイから分離された *Aeromonas salmonicida* 様細菌の異体類への病原性について

伊藤慎悟*¹, 三浦宏紀*², 佐藤敦一*³

Study of pathogenicity of *Aeromonas salmonicida* like bacteria from brown sole (*Pleuronectes herzensteini*) to other flatfish species

Shingo ITO*¹, Kouki MIURA*² and Nobukazu SATOH*³

Isolated bacteria from kidneys of dead brown soles in a tank were similar to *A. salmonicida* sub. *salmonicida*. Intraperitoneal injection with 10^{5-7} CFU per fish of isolated bacteria killed all of 5 injected fish, injection with 10^{2-4} CFU per fish killed four fish, and injection with 10^1 CFU per fish killed one fish; immersion with 10^7 CFU per L for 1 hour killed all tested fries. Therefore, the strain of this study was obligate pathogen for brown sole. Injection with 10^7 CFU per fish to Japanese flounders killed 10 out of 10 fish and with 10^5 CFU per fish killed four fish, but injection with 10^3 CFU per fish killed no fish.

Intraperitoneal injection with 10^7 CFU per fish also killed 8 out of 10 barfin flounder, but did not kill with under 10^5 CFU per fish of bacteria. The strain used in this study has the capability to kill not only brown sole but also Japanese flounder and barfin flounder.

キーワード : *Aeromonas*, マガレイ, マツカワ, ヒラメ, 病原性

まえがき

Aeromonas salmonicida は19世紀にサケ科魚類のせつそう病の原因菌として発見されて¹⁾以来多くの研究が行われ、淡水魚ではサケ科魚類以外にもウナギの頭部潰瘍病²⁾などの原因菌としても報告されている。

また、海産魚ではニシン³⁾, turbot⁴⁾, Atlantic cod⁵⁾, flounder⁶⁾などから分離例が多数報告されている。国内の海産魚では栽培漁業が振興するに伴い、イシガレイ⁷⁾, ハタハタ⁸⁾, マコガレイ⁹⁾, ムシガレイ¹⁰⁾, アイナメ¹¹⁾, ヒラメ¹¹⁾, クロソイ^{11,12)}から *A. salmonicida* が分離され、病原性が確認されている。対策としては早期に発見できた場合、抗生物質による治療が有効と考えられる

が、発見が遅れると大きな被害が発生する。また、ノルウェーではサケ科魚類に対してアジュバンド添加ワクチンが効果をあげている¹³⁾が、日本国内でまだワクチンは認可されていない。

北海道の海産魚では、過去に道南で飼育していたマコガレイの病魚から褐色色素を産生し、抗せつそう病血清と凝集する菌が分離された例があるが、病原性などの検討はされていない。2002年6月に道南で飼育していた産卵期のマガレイが死亡し続けたため、原因を検討したところ、腎臓から褐色色素を産生する菌がほぼ単一のクローニとして分離された。その菌の性状を検討したところ、*A. salmonicida sub. salmonicida* に極めて近い性状を示した。また病原性をマガレイ稚魚で確認するとともに、

報文番号 A373 (2004年1月19日受理)

*¹北海道立稚内水産試験場 (Hokkaido Wakkanai Fisheries Experimental Station, Wakkanai, Hokkaido 097-0001, Japan)

*²北海道立中央水産試験場 (Hokkaido Central Fisheries Experimental Station, Yoichi, Hokkaido, 046-8555, Japan)

*³北海道立栽培漁業総合センター (Hokkaido Institute of Mariculture, Shikabe, Hokkaido, 041-1401, Japan)

同じ異体類であるヒラメ, マツカワについても病原性を検討したので報告する。

材料および方法

1. 供試魚

2002年6月28日に死亡したマガレイ2尾(全長32cm, 28cm)を実験室に持ち込むまで氷冷し, 検体とした。外観及び解剖により症状を観察した。

2. 細菌検査

腎臓の一部をスライドガラスに塗抹・風乾し, サフラニンで単染色後, 1,000倍で検鏡した。また, 腎臓をBHI培地, *Vibrio* 選択培地, SS培地, marine broth2216培地に塗抹し, 15°Cで5日間培養して, 生じたコロニーを観察した。次に代表的なコロニーをそれぞれ5株ずつ釣菌し, 清水・絵面の簡易同定法¹⁰⁾を用い, 分離菌の属レベルを決定した。さらに, Cowan and Steel's 医学細菌同定の手引き(第3版)¹⁵⁾による方法で生化学的性状を検討し, 菌の同定を行った。また, 日本で発見された非定型 *A.salmonicida* と性状を比較するために糖の分解性試験なども加えて行った。

3. ウイルス検査

腎臓を9倍量のPBS(-)でホモジナイズし, 0.45µm フィルターで濾過後, CHSE-214細胞, RTG-2細胞に接種して15°Cで14日間細胞変性の有無を観察した。

4. 薬剤感受性試験

分離した菌のうち1株を代表株とし, BHI ブイヨンに接種し, 20°Cで培養後, MacFarlandNo. 2に菌濃度を調整し, 感受性培地に1白金耳のせ, コンラージ棒で塗抹した後, 市販のオキシテトラサイクリン, ニフルスチレン酸ディスク(日水)をのせ, 20°Cで24時間培養後, 阻止円の大きさから各薬剤への感受性を検討した。

5. 耐塩性試験

普通ブイヨンに終濃度で0, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0%となるように塩化ナトリウムを加えた培地に菌を接種して, 15°Cで1週間培養し, 菌の発育の有無を調べた。

6. マガレイに対する病原性の検討

腹腔内接種試験としてマガレイ0歳魚5尾(全長60±4mm)に対しそれぞれ 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^7 CFU/尾となるよう滅菌PBS(-)で希釈した菌液を腹腔内接種し, また浸漬試験として 10^7 CFU/Lの菌液に1時間

浸漬し, いずれも15°Cで14日間飼育観察した。死亡魚については腎臓から分離された細菌のコロニーの形状, 色, 褐色色素産生の有無から接種菌による死亡かどうかを判定した。また, 対照としてPBS(-)を接種した。

7. マツカワ, ヒラメに対する病原性の検討

マツカワ1歳魚(全長196±15mm), ヒラメ稚魚(全長71±3mm), でマガレイに準じて腹腔内接種による感染試験を行った。なお, 接種した菌量をそれぞれ 10^3 , 10^5 , 10^7 CFU/尾とした。

結果と考察

1. マガレイの症状

外観では供試魚では観察されなかったが, その後に死亡したマガレイで腫瘍様のものが観察された。解剖したところ, 腎臓肥大と卵巣に出血が観察された。

2. 分離菌の性状

腎臓の塗抹標本を観察したところ, 多数の桿菌が観察された。BHI培地で単一のコロニーが, marine broth 2216培地でもほぼ単一なコロニーが形成されたため, 両培地からコロニーを釣菌し, 性状を調べた。調べた性状の一部をTable 1に示した。

分離菌はグラム陰性で運動性がなく, OF試験は発酵的であり, 塩類要求性はなく, カタラーゼ試験及びオキシダーゼ試験は陽性で褐色色素を産生したことから *Aeromonas* 属細菌であると同定した。属の同定後, Cowan and Steel's 医学細菌同定の手引き(第3版)に基づいてさらに詳しく同定を行った。なお, D-ガラクトウロン酸塩は現在販売されていないため, 試験を行わなかった。Cowan and Steel's 医学細菌同定の手引き(第3版)に記載されている *Aeromonas* 属細菌の性状と比較したところ, *A.salmonicida sub. salmonicida* と類似した結果が得られ近縁種であると考えられた。しかし, Cowan and Steel's 医学細菌同定の手引き(第3版)には記載されておらず, 他の論文^{9~11)}で記載されている糖分解性試験を比較したところ, 一部で *A.salmonicida sub. salmonicida* とは異なる結果が出たことやGCmol%を調べていないことからこの菌が *A.salmonicida sub. salmonicida* であると断定はできなかった。

3. ウイルス検査

供試した細胞で細胞変性は起こらなかった。

Table 1 Characteristics of the strains used in this study and *Aeromonas* genus

	1	2	3	4	5
sharpe	rod	rod	rod	rod	rod
mobility	d	-	+	+	+
Gram stain	-	-	-	-	-
growth in aerobic environment	+	+	+	+	+
growth in anaerobic environment	+	+	+	+	+
catalase	+	+	+	+	+
oxidase	+	+	+	+	+
acid from glucose	+	+	+	+	+
O/F test	F	F	F	F	F
growth in 37°C	-	-	NR	NR	NR
reduction of nitrate	+	+	NR	NR	NR
Møller's decarboxylate:					
arginine	+	+	+	+	d
lysine	d	+	+	-	+
ornithine	-	-	-	-	-
Gas from glucose	W/-	-	d	d	d
resistance in O/129 10 µg	+	+	+	+	+
150 µg	d	NT	+	+	d
growth in 0%NaCl	+	+	+	+	+
growth in 6%NaCl	-	-	-	-	-
gluconic acid oxidative	-	-	d	-	-
indole production	d	-	d	-	d
Vogel-Proskauer	-	-	d	-	d
Esculin hydrolysis	d	+	-	d	-
Lecithin hydrolysis	+	+	+	d	-
acid:					
L-arabinose	?	+	-	+	d
arbutin	+	d	-	d	-
inosit	-	-	-	-	-
salicin	d	-	d	d	d
saccharose	d	+	+	+	+
Availability:					
ethanol	-	-	-	-	-
propanol	-	-	-	-	-
D-galacturonic acid salt	-	NT	-	-	-
D-glucosamine	-	-	+	+	-
Brown, diffusible pigment	NR	+	NR	NR	NR
Auto-aggulutination	NR	+	NR	NR	NR

1: *Aeromonas salmonicida*
 2: Strains used in this study
 3: *A. sobria*
 4: *A. caviae*
 5: *A. salmonicida* subspecies *masoucida* and *achromogenes*
 Source of characteristics of 1, 3~5
 : Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria (Third Edition) (1993)
 +: 85-100%positive, d: 16-84%positive, -: 0-15%positive
 NT: Not tested, NR: Not recorded, ?: unknown or incomplete information
 w/-: weak or no reaction

4. 薬剤感受性試験

オキシテトラサイクリンとニフルスチレン酸ナトリウムの最小阻止濃度は0.05µg/ml以下と1.56µg/mlで、両薬剤ともに有効と考えられた。

5. 耐塩性試験

分離菌は0から5.0%の塩分濃度で発育したことから海水中でも充分発育できることが判明した(Table 2)。

6. マガレイに対する病原性

感染試験の結果を Table 3 に示した。10⁵CFU/尾接種区, 10⁷CFU/尾接種区ですべての個体が, 10², 10³CFU/尾接種区で4尾が死亡し, 10¹CFU/尾接種区で1尾死亡した。また, 菌濃度を10⁷CFU/Lとし, 1時間浸漬した試験区でも供試したすべての個体が死亡した。

Table 2 Influence to growth of isolated bacteria with each NaCl concentration

NaCl concentration	growth
0 % NaCl	+
0.5%NaCl	+
1 % NaCl	+
2 % NaCl	+
3 % NaCl	+
3.5%NaCl	+
4 % NaCl	+
4.5%NaCl	+
5 % NaCl	+
5.5%NaCl	-
6 % NaCl	-
7 % NaCl	-
1/6 ASW	+

+:growth
 -:negative

Table 3 Mortality of brown sole infected with *Aeromonas salmonicida* like bacteria separated from brown sole

CFU/fish	inject to peritoneum	CFU/L	immersion
0	0/5*	0	0/5
×10 ⁷	5/5	×10 ⁷	5/5
×10 ⁵	5/5		
×10 ³	4/5		
×10 ²	4/5		
×10 ¹	1/5		

*:dead fish number/tested fish number

以上の感染試験の結果からこの菌はマガレイ稚魚に対する病原性が大変強いことが明らかになった。

7. マツカワ, ヒラメに対する病原性

マツカワとヒラメに対する病原性試験の結果を Table 4 に示した。マツカワ1歳魚では10⁷CFU/尾腹腔内接種区で8尾死亡したが, 10⁵CFU/尾以下の濃度の菌液を腹腔内に接種しても死亡しなかった。

ヒラメでは10⁷CFU/尾腹腔内接種区で10尾が, 10⁵CFU/尾腹腔内接種区で6尾が, 10³CFU/尾腹腔内接種区で3尾が死亡した。

以上の結果からマツカワやヒラメも条件次第で発症する可能性が示唆された。

病原体がマガレイへ進入した経路としては, 1) ねずみなどの陸上小動物や人間など哺乳類から進入した可能性, 2) 給餌していた餌料から進入した可能性, 3) 天

Table 4 Mortality of barfin flounder and Japanese flounder infected with *Aeromonas salmonicida* like bacteria

CFU/fish	barfin flounder	Japanese flounder
0	0/10*	0/10
$\times 10^7$	8/10	10/10
$\times 10^5$	0/10	6/10
$\times 10^3$	0/10	3/10

*dead fish number/tested fish number

然海域から移入する際にすでに感染していた可能性が考えられた。

この菌は37°Cで発育しない性状や、強い耐塩性を有することから、ねずみなど陸上哺乳動物から進入した可能性は低い。また、餌料についても冷蔵保存した市販の餌料を給餌していることから感染原因とは考えにくい。

そのため、病原体を持っていたマガレイを天然海域から導入し、人為飼育環境下におかれたことによるストレスや産卵期により免疫力がおちたことから発症した可能性が高いと考えられた。もともと *A. salmonicida* はサケ科魚類のせつそう病¹⁾やウナギの頭部潰瘍病¹⁾など淡水魚の疾病の原因となる菌であり、塩類要求性もなかったことから、マガレイが河川由来生物などを汽水域で摂餌し、感染したのではないかと考えられたが確証はない。そのため、河川由来のプランクトン、小型魚類や河口周辺で生息するマガレイなどの異体類のこの菌の保有状況調査をし、感染源や保菌している可能性の高い魚の分布状況を絞り込み、種苗生産施設に病魚を持ち込まないようにすることが今後の防疫対策の一つとして重要である。

現在、発症後に塩酸オキシテトラサイクリンを投薬する以外講じる手段がなく、また、発症後に投薬するため効果がでるまで時間がかかり、被害が大きくなることが考えられる。そのため、防疫対策の確立や早期診断・早期治療法の開発、ワクチン開発等予防法の研究・実用化を行っていく必要がある。

参考文献

- 1) 若林久嗣：“第4章3. サケ科魚類および淡水魚の細菌病”. 魚病学概論. 東京, 恒星社厚生閣, 1996, 51-58
- 2) Kitao T., T. Yoshida, T. Aoki, and M. Fukudome: Atypical *Aeromonas salmonicida*, the causative agent of an ulcer disease of eel occurred in Kagoshima prefecture. *Fish Path.* 19(2), 113-117 (1984)
- 3) Traxler G.S. and G.R. bell: Pathogens associated with impounded Pacific herring *Clupea harengus pallasii*, with emphasis on viral erythrocytic necrosis (VEN) and atypical *Aeromonas salmonicida*. *Dis. Aquatic. Org.* 5, 93-100 (1988)
- 4) Pedersen K., H. kofod, I. Dalsgaard and J.L. Larsen : Isolation of oxidative-negative *Aeromonas salmonicida* from diseased turbot *Scophthalmus maximus*. *Dis. Aquatic. Org.* 18, 149-154 (1994)
- 5) Cornic J.W., C.M. Morrison, B. Zwicker and G. Shum : Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in Atlantic cod. *Gadus morhua* L., *J. Fish. Disease.* 7, 495-499 (1984)
- 6) Wiklund T. and G. Bylund: Skin ulcer disease of flounder *Platichthys flesus* in the northern Baltic Sea. *Dis. Aquatic. Org.* 17, 165-174 (1993)
- 7) 大滝勝久: イシガレイ稚魚より検出した非定型 *Aeromonas salmonicida*. 福島種苗研報, 43-52 (1986)
- 8) 反町 稔, 堀田和夫, 大津 順: ハタハタに発生した非定型 *Aeromonas salmonicida*. 富山県水産試験場研究報告. 5, 1-8 (1999)
- 9) 馬久地隆幸: マコガレイに発生した非定型 *Aeromonas salmonicida* 感染症. 広島県水産試験場研究報告. 20, 1-3 (1999)
- 10) 中津川俊雄: ムシガレイから分離された非定型 *Aeromonas salmonicida*. 魚病研究. 39(3), 193-198 (1994)
- 11) 飯田貴次, 坂田千夏, 川津浩嗣, 福田 譲: 海産魚の非定型 *Aeromonas salmonicida* 感染症. 魚病研究. 32(1), 65-66 (1997)
- 12) 泉川晃一, 植木範行: クロソイに発生した非定型 *Aeromonas salmonicida* 感染症. 魚病研究. 32(1). 67-68 (1997)
- 13) 小松 功: 魚病ワクチン開発の現状とワクチンデリバリー法の特性. *JVM.* 52(6), 491-497 (1999)
- 14) 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.
- 15) G.I. Barrow and R.K.A. Feltham: Cowan and Steel's 医学細菌同定の手引き(第3版) 坂崎利一監訳, 東京, 近代出版, 1993, pp386.