

ヒラメ稚魚の *Vibrio anguillarum*(J-O-1(A) 型) 感染症

安信秀樹・中本幸一

(1997年12月1日受付)

Vibrio anguillarum (serotype J-O-1(A)) Infection in Cultured Japanese Flounder

Hideki YASUNOBU* and Ko-ichi NAKAMOTO*

Mass mortalities have occurred in Japanese flounder juveniles *Paralichthys olivaceus* reared in Hyogo Prefecture. Diseased fish showed a dark body color and abnormal swimming behavior such as disorientated whirling. The diseased fish died with its their mouths open. A bacterium isolated from the diseased fish was found to be pathogenic to Japanese flounder juveniles by intraperitoneal injection. The isolate was identified as *Vibrio anguillarum* by its morphological and biochemical characteristics and belonged to the serotype J-O-1.

キーワード: ヒラメ, *Vibrio anguillarum*, 血清型 J-O-1(A)

Vibrio anguillarum は淡水魚の病原菌として広く知られているが、種々の海産魚の疾病の原因菌としても報告されている。¹⁻³⁾ 種苗生産期以降の稚魚にみられることも多く、マダイ、⁴⁾ トラフグ、⁵⁾ ヒラメ⁶⁾ で報告されている。これら海産魚の稚魚から分離されたものは、血清学的には J-O-2(B) および J-O-3(C) 型に属することが明らかになっている。

兵庫県栽培漁業協会ではヒラメの種苗生産を行っており、全長 20mm 程度に達すると各漁業協同組合に配布している。1990 年以降、配布先の各漁業協同組合における中間育成過程で、大量斃死がしばしば発生し、問題となっていた。今回、大量斃死時にヒラメ稚魚の病魚から分離された菌株の性状試験を行った結果、分離された菌株は *V. anguillarum* に同定され、抗 *V. anguillarum* J-O-1(A) 型血清に凝集した。また、ヒラメ稚魚に対する病原性も確認されたので、その結果を報告する。

材料および方法

材料魚および分離菌株 1993 年 6 月に明石浦漁業協同組合の屋内コンクリート水槽で飼育されていたヒラメ稚魚(平均全長 47.4mm, 平均体重 0.87g) に大量斃死が発生した。発生状況の聞き取りと病魚の観察を行うととも

に、病魚の脳より BHI 寒天培地 (BBL) を用いて細菌分離を試みた。いずれの個体からも純培養状に 1 種の細菌が分離され、そのうちの 1 株 (FA-930610) を性状試験と病原性試験に供した。

性状試験 供試菌株を BHI 寒天培地 (BBL) で 25℃ で 1 日培養し、性状試験に供した。また、抗 *V. anguillarum* J-O-1 ~ J-O-3 型血清に対する反応をスライド凝集反応で調べた。

病原性試験 病原性試験は腹腔内攻撃と浸漬攻撃により行った。供試魚には兵庫県栽培漁業協会にて飼育されていた平均全長 73mm, 平均体重 3.4g のヒラメ稚魚を使用した。腹腔内攻撃の接種量は 1.7×10^4 , 1.7×10^5 および 1.7×10^6 CFU/g 魚体重とし、1 尾につき 0.1ml 接種した。また対照区の魚には同量の生理食塩水を接種した。浸漬攻撃は 5.8×10^7 CFU/ml の菌液懸濁海水 2l に 10 分間浸漬した。いずれの試験区も供試魚 10 尾を 30l ポリカーボネイト水槽に放養し、無給餌で、流水にて 10 日間飼育した。なお実験期間中の水温は 20.3 ~ 21.2℃ であった。

結果

* 兵庫県立水産試験場 (Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station, Minami-Futami, Akashi 674-0093)

発生状況および症状 当試験場では魚病診断により分離された細菌は通常、性状検査には供しないが、コロニー形態、Gram染色、運動性など確認後、抗 *V. anguillarum* 血清で凝集したものを既知のビブリオ病と診断している。それによると、本病は毎年発生しており、1993年以降ヒラメ稚魚のビブリオ病から分離された菌株は、すべて J-O-1 型に凝集していた。

1993年から1997年までの発生状況を見ると、ヒラメの全長 37～63mm、飼育水温 15.7～18.5℃の時に本病が発生していた。病魚はいずれも異常遊泳(きりきり舞い)、体色黒化、脳の発赤および口を開けての斃死 (Fig. 1) といった症状を示したが、内臓にはほとんど異常は認められなかった。斃死率は投薬が遅れた場合、90%に至る場合があったが、適切な投薬が行われた場合は30%程度であった。

性状試験 常法による性状試験の結果を Table 1 に示した。供試菌株はグラム陰性運動性単桿菌で、各性状から *V. anguillarum* に同定された。なお、本菌は抗 *V. anguillarum* J-O-1 型血清に凝集した。

病原性試験 病原性試験の結果を Table 2 に示した。1.3x10⁴ CFU/g 魚体重腹腔内攻撃区では2日以内にすべ

てが死亡し、1.3x10⁴ および 1.3x10⁶ CFU/g 魚体重腹腔内攻撃区ではそれぞれ 40%および 10%の死亡率となった。浸漬攻撃区の魚には死亡はみられなかった。また、対照区では死亡個体はなかった。なお、感染死亡魚は自然発病魚とほぼ同様の症状を示し、それらの脳からは純粋に接種菌が分離された。

考察

今回分離された菌株は各性状から *V. anguillarum* に同定されたが、これまでに海産稚魚から分離されている *V. anguillarum* の性状と比較すると、^{4,5)} arabinose, cellobiose および galactose からの酸の産生で一部違いがみられる他は一致した。*V. anguillarum* は少なくとも西日本の沿岸海水中に常在することが明らかになっているが、

¹⁾ 中間育成段階の海産稚魚に発生するビブリオ病は、注射攻撃でのみ疾病を再現し得ることが報告されている。

^{4,5)} 今回行った感染試験においては、供試魚のサイズが自然発病魚のサイズとは若干異なるものの、これまでの報告と同じく浸漬攻撃では死亡はみられず、高濃度の菌液の注射攻撃でのみ死亡が認められた。これは本菌がヒラメ稚魚に対し条件性の病原体であることを意味する。

⁶⁾ したがって、本病はヒラメ稚魚が何らかの原因により

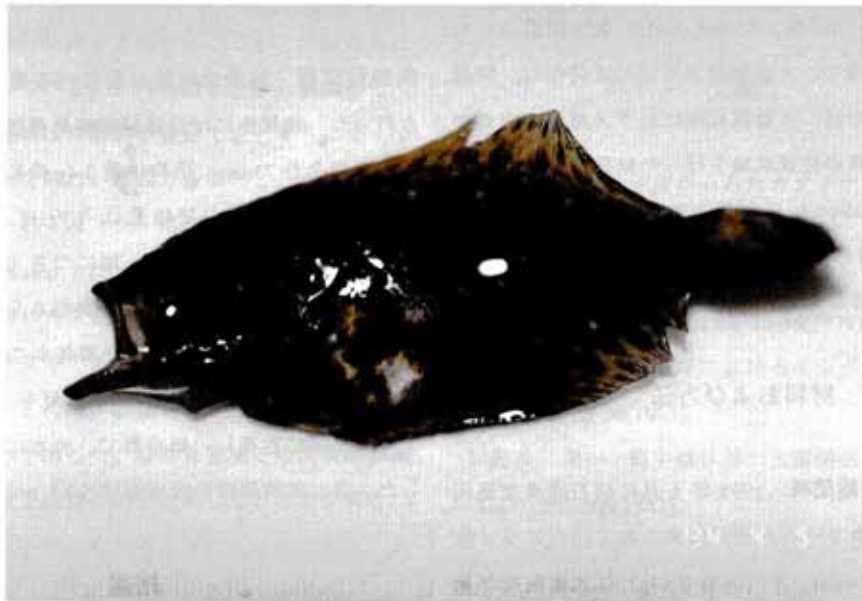


Fig. 1. Diseased Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) caused by *Vibrio anguillarum* (serotype J-O-1) infection.

感染を受けやすい状況が生じた場合に発生すると考えられる。本県のヒラメ稚魚に発生するビブリオ病からは、抗 *V. anguillarum* の J-O-1 型血清に凝集する株が分離されるが、先にも述べたように、これまでヒラメ稚魚のビブリオ病からは J-O-2 および J-O-3 型の株が分離されている。これらの病魚には体色黒化および体表あるいは鰭の出血、びらんなどの外部症状が顕著に認められているが、本県における J-O-1 型のビブリオ病には、体色黒化以外は目立った症状は認められず、きりきり舞い等の異常遊泳と口を開けての斃死が特徴的にみられる。脳および神経組織に病原体が認められる疾病には、しばしばきりきり舞い、狂奔などの異常遊泳がみられる。^{9,10)} 本病の場合も菌が脳から大量に検出されることは、きりきり舞いの

Table 1. Comparison of the characteristics of the isolate from Japanese flounder juveniles with previously published data of *Vibrio anguillarum* infected red seabream juveniles, Japanese flounder juveniles and tiger puffer juveniles.

Character	Present strain		V. anguillarum from		
	(FA-930610)	red sea-bream* ¹ (RH-8101)	tiger puffer* ² (TY-1)	Japanese flounder* ³ (HOS-8601)	Japanese flounder* ³ (FY-8701)
Form	Short rod	Short rod		Short rod	Short rod
Gram stain	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+
Flagella		Single polar flagellum			
Cytochrome oxidase	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
OF test		Fermentative			
Gas from glucose	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+	+
Gelatine liquefaction	+	+	+	+	+
NaCl tolerance					
0 %	-	-	-	-	-
0.5	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
5		+		+	+
6	+w* ⁴		+	-	+
7		-		-	-
8	-		-		
Growth at					
4°C	-				
40	-	-	-		
Arginine decomposition	+	+	+	+	+
Lysine decarboxylation	-	-	-	-	-
Ornithine	-	-	-	-	-
Indole production	+	+	+w	+	+
H ₂ S production	-	-	-	-	-
MR test	-	-	-	-	-
VP test	+	+	+	+	+
Citrate (Simmons)	+	+	+	+	+
β-galactosidase	+	+	+		
O/129 sensitivity	+			+	+
Acid from					
Glucose	+	+	+	+	+
Arabinose	-	+	+		
Cellobiose	-	-	+w or -	+	-
Galactose	-	+	+	+	+
Mannitol	+w	+	+		+
Mannose	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+
Sero type	J-O-1	J-O-3	J-O-3	J-O-2	J-O-3

*1 Muroga and Tatani (1982)*⁴⁾.

*2 Muroga and Varin (1987)*⁵⁾.

*3 Yamanoi *et al.* (1988)*⁶⁾.

*4 Weakly positive.

Table 2. Percentage mortality in Japanese flounder juveniles challenged by intraperitoneal injection and immersion methods with *V. anguillarum*(FA-930610).

Method	Challenge dose	Mortality (%) ^{*1} (dead/tested)
Intraperitoneal injection ^{*1}	1.3 x 10 ⁴ (CFU/g)	100 (10/10)
	1.3 x 10 ⁵	40 (4/10)
	1.3 x 10 ⁴	10 (1/10)
	Control	0 (0/10)
Immersion ^{*1}	5.8 x 10 ⁷ (CFU/ml)	0 (0/10)

^{*1} Mortalities were observed 10 days after inoculation.

^{*1} Fish were intraperitoneally injected with 0.1ml of the inoculum.

^{*1} Fish were immersed for 10 min. in 2 L sea water containing 10ml of the inoculum.

Water temperature: 20.3~21.2°C

Mean body weight of fish : 3.4g.

症状と関係があることが示唆された。また、これらの血清型の違いによる毒力の差について、ヒラメ稚魚で報告されている J-O-2 および J-O-3 型菌株を用いた感染試験の結果と比較したが、供試魚のサイズ等が異なることから明らかにすることはできなかった。

本病発生時の対策としては OTC 等の投薬が行われているが、現在のところこれらの薬剤に対する耐性は認められていない。本県では毎年本病が発生しており、頻繁に薬剤投与を行えば今後耐性菌が出現する可能性がある。対策としては本菌が条件性病原体であることを念頭に置き、良好な飼育環境を維持し、発生を防止することを心がけるとともに、発生時には早期の適切な投薬を行うことが必要と考えられる。

謝辞

本論文をまとめるにあたり、疾病の発生状況等の資料を提供して下さった明石浦漁業協同組合の職員各位に感謝します。

文献

- 1) 城 泰彦・大西圭二・室賀清邦：養殖ハマチから分離された *Vibrio anguillarum*. 魚病研究, 14, 43-47(1979).
- 2) 楠田理一・佐古 浩・川合研見：病魚から分離された *Vibrio* 属細菌の分類学的研究 - 1. 魚病研究, 13, 123-137(1979).
- 3) 鈴木博也：1971, 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(1974).
- 4) 室賀清邦・田谷全康：マダイ稚魚からの *Vibrio anguillarum* の分離. 魚病研究, 16, 211-214(1982).
- 5) 室賀清邦・V. Tanasomwang：トラフグ稚魚に発生した *Vibrio anguillarum* 感染症. 魚病研究, 22, 29-31(1987).
- 6) 山野井英夫・桃山和夫・安信秀樹・室賀清邦：ヒラメ稚魚に発生した *Vibrio anguillarum* 感染症. 魚病研究, 23, 69-70(1988).
- 7) K. Muroga, M. Iida, H. Matsumoto, and T. Nakai: Detection of *Vibrio anguillarum* from waters. Nippon Suisan Gakkaishi, 52, 641-647(1986).
- 8) 室賀清邦・江草周三：魚病学概論, 恒星社厚生閣, 東京, 1996, pp.47-50.
- 9) Nguyen, H. D., T. Mekuchi, K. Imura, T. Nakai, T. Nishizawa, and K. Muroga: Occurrence of viral nervous necrosis(VNN) in hatchery-reared juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish. Sci., 60, 551-554 (1994).
- 10) 塩満捷夫：養殖ブリの脳からの連鎖球菌の検出について. 魚病研究, 17, 27-31(1982).