

コイ科魚類のエロモナス病に関する研究*

高橋幸則

Studies on the Aeromonas Disease of Cyprinids

By

Yukinori TAKAHASHI

目 次

第1章 序 論	40
第2章 病魚の病理学的ならびに血液学的所見	41
材料および方法	41
結 果	42
第1節 病魚の外観ならびに臨床症状	42
第2節 病魚の解剖学的所見	42
(1) 鰓	43
(2) 肝臓	43
(3) 腎臓	43
(4) 脾臓	43
(5) 腸管	43
(6) 腹腔内	44
(7) 腹壁	44
第3節 病魚の病理組織学的所見	44
(1) 鱗囊	44
(2) 筋肉	44
(3) 肝臓	44
(4) 腎臓	44
(5) 脾臓	44
(6) 腸管	44
第4節 病魚の血液学的所見	44
第5節 病魚の病理学的ならびに血液学的所見に関する考察	45
第6節 要 約	45

*業績番号

水産大学校研究業績 第1032号, 1984年7月27日受理.

Contribution from Shimonoseki University of Fisheries, No.1032. Received, July 27, 1984.

第3章	原因菌に関する研究	46
第1節	原因菌の分離ならびに分離菌の再現性試験	46
材料および方法		46
結果および考察		46
第2節	原因菌の性状	46
材料および方法		46
結果		51
(1)	原因菌の形態学的ならびに生物学的性状	51
(2)	原因菌の生化学的性状	51
(3)	原因菌の血清学的性状	53
第3節	原因菌の分類学的位置に関する考察	55
第4節	健康魚の腸管内ならびに飼育水中における原因菌の分布	59
材料および方法		59
結果		60
考察		60
第5節	原因菌の生化学的性状と病原性との関係	61
材料および方法		61
結果		62
考察		63
第6節	要約	64
第4章	感染機構に関する研究	66
第1節	ストレス負荷条件下のコイの各組織における <i>Aeromonas</i> の動態	66
材料および方法		66
結果		67
考察		72
第2節	病原性 <i>Aeromonas</i> によるストレス負荷条件下のコイの感染試験	74
材料および方法		74
結果		74
考察		74
第3節	要約	76
第5章	発病機構に関する研究	77
第1節	病理学的変化の発現機構	77
材料および方法		77
結果		77
(1)	生菌の筋肉内注射による病理学的経時変化	77
(1-1)	外観的所見	77
(1-2)	解剖学的所見	78
(1-3)	病理組織学的所見	78
(2)	生菌の経口投与および菌体抽出液の背大動脈注射による病変の比較	78
(2-1)	外観的比較所見	78
(2-2)	解剖学的比較所見	79

(2-3) 病理組織学的比較所見	79
考 察	79
第2節 血液学的変化の発現機構	81
材料および方法	81
結 果	81
(1) 赤血球数の経時的変化	81
(2) 赤血球と核の形態および大きさの経時的変化	81
(3) ヘマトクリット値の経時的変化	82
(4) 血液比重の経時的変化	82
(5) 血色素量の経時的変化	85
(6) 血漿比重の経時的変化	85
(7) 血液水分量の経時的変化	85
(8) 血清タンパク量の経時的変化	85
考 察	87
第3節 要 約	89
第6章 予防免疫に関する研究	90
材料および方法	90
結 果	90
(1) 免疫形成の有無ならびに消長	90
(2) ワクチンの感染防御効果	91
考 察	91
要 約	93
第7章 薬剤による治療に関する研究	93
第1節 原因菌の薬剤に対する感受性	94
材料および方法	94
結 果	94
考 察	95
第2節 ニシキゴイに対する薬剤の毒性	96
材料および方法	96
結 果	96
(1) 薬浴毒性	96
(2) 経口毒性	96
考 察	96
第3節 実験的感染魚および自然感染魚に対する薬剤の治療効果	98
材料および方法	98
結 果	99
(1) 実験的感染魚に対する薬剤の治療効果	99
(2) 自然感染魚に対する薬剤の治療効果	100
考 察	100
第4節 要 約	100

第8章 総括	101
謝辞	103
文献	103
Summary	107

第1章 序論

エロモナス病はコイ科の魚類では、主としてコイ (*Cyprinus carpio*), キンギョ (*Carassius auratus*), フナ (*Carassius carassius*) ならびにカマツカ (*Pseudogobio esocinus*) などに発生する, 運動性の *Aeromonas* 属細菌による疾病である。その特徴的な症状は, 表皮ならびに鱗の充・出血および立鱗である。

本病に類似した症状を示すコイ科魚類の疾病には, ヨーロッパ諸国で多発している伝染性腹水症 (Infectious Dropsy of Carp) がある。本疾病については, 最初に SCHÄPERCLAUS (1930) が *Pseudomonas punctata f. ascitae* [本種名は, のちに SNIESZKO (1957) によって, *Aeromonas punctata* に訂正された] に起因する感染症であることを報告している。伝染性腹水症は, WUNDER (1949) および WUNDER and DOMBROWSKI (1953) が述べているように, 主としてドイツに発生する急性型と, ポーランドを中心に発生する慢性型とに分けられる。前者は, 表皮・筋肉の出血ならびに腹水の貯留などの症状を呈して急性の経過をたどり, 斃死率はきわめて高い。後者は, 皮膚に潰瘍を形成するのが特徴で, 斃死率は低いといわれている。TOMASEC (1965, 1966) および FIJAN ら (1971) は, 急性型の病魚からウイルスを分離し, 同じ急性型症状を再現したことを報告している。また, 分離ウイルスの性状を調べ, *Rhabdovirus carpio* と命名し, 急性型を春ウイルス血症 (Spring Viremia of Carp) と呼称することを提案した (FIJAN ら, 1971)。現在では, 伝染性腹水症のうち, 主として春季に発生する急性型の主因については, ウイルス説が有力であり, FIJAN らが提唱した春ウイルス血症の病名が一般化しつつある。

一方, 慢性型について FIJAN (1972) は, 病魚からウイルスの分離ができないことから, 急性型とは異なる疾病として, 紅斑性皮膚炎 (Carp Erythrodermatitis) と呼ぶことを提唱した。その後, BOOTSMA and BLOMMAERT (1976) および BOOTSMA ら (1977) は, 本病のコイから *Aeromonas salmonicida* の変種と同一する細菌を分離し, 再現試験にも成功したことを明らかにしている。したがって, 慢性

型についても当初の *A. punctata* (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第8版によれば *A. hydrophila*) 原因説は否定的になりつつある。

わが国においては, 紅斑性皮膚炎に類似の疾病として, キンギョならびにフナに発生する穴あき病がある。本病の特徴的症狀は, 表皮および筋肉の充血ならびに潰瘍である。高橋ら (1975) は, 病魚から *A. hydrophila*, *Pseudomonas* 属および *Moraxella* 属などの細菌を分離し, このうち, *A. hydrophilla* のみが再現試験で潰瘍を起こさせたものの, 本菌を一次的原因とするには問題があると述べている。その後, わが国から入手した本病と類似の症状を示すキンギョから, 再現性を有する *A. salmonicida* の変種が分離されたことが報じられている (ANONYMOUS, 1977)。

一方, コイ科以外の魚類における, 運動性 *Aeromonas* に基づく疾病については, いくつかの報告がある。

DUIJN (1938) は, 熱帯魚の Labyrinth (*Betta splendens*) や Paradise fish (*Macropodus opercularis*) などに発生する, 体表の出血と立鱗症状を伴う疾病について, 細菌が原因であるとし, その原因菌を *Bacterium lepidorthosae* と命名した。本菌はグラム陰性の桿菌で, 運動性があり, 糖を分解して酸とガスを産生するほか, 硝酸塩還元性, MR 反応, インドール産生性およびゼラチン液化性がいずれも陽性で, VP 反応陰性などの性質を示すことから, 現在の分類では *Aeromonas* に入れるべき細菌と思われる。

また, 保科 (1962) はウナギの鱗赤病について, 病因・組織ならびに血液所見などの詳細な研究を行い, 病原菌は *A. punctata* (現在の分類では *A. hydrophila*) と *Paracolobactrum anguillimortiferum* (現在の分類では *Edwardsiella tarda*) であることを明らかにした。その後, 宮崎・江草 (1976) によって, *A. hydrophila* と *E. tarda* のウナギに対する病因作用は異なることが明らかにされ, 江草 (1978) によって, 2つの細菌に基づく疾病は別の病名で呼ばれるべきであることが指摘された。現在では, *A. hydrophila* 感染症を鱗赤病, *E. tarda* 感染症をバラコ口病と呼称することが一般化している。

そのほか, 天然河川のアユに *A. liquefaciens* (*A. hydrophila*) に基づく疾病が流行したし (川津, 1970),

養殖アユにも *A. hydrophila* 感染症が確認されている (蕭・陳, 1977; 城・大西, 1980)。

このように、コイ科魚類のエロモナス病に類似した症状を示すが病因の異なる疾病、ならびにコイ科以外の魚類における、運動性 *Aeromonas* 感染症についての記載は比較的多い。

しかし、本病に関する報告はきわめて少なく、わずかに大島・江草 (1966) の報告があるにすぎない。本報告によれば、長野県下の養殖ゴイに体表の出血と糜爛ならびに立鱗症状を呈する疾病が発生し、瀬死魚からは1種または数種の細菌が分離されている。その中でも、グラム陰性の桿菌で運動性があり、VP 反応陽性で糖を分解し酸とガスを産生する菌は、純培養状に分離されることが多く、再現性も確認された。そして、大島・江草は、本分離菌は *Aeromonas* 属に分類すべきであると述べている。

以上のように、コイ科魚類のエロモナス病に関する報告は、前述の大島・江草の記載以外にはみうけられず、本病の原因菌の詳細や感染のメカニズムならびに対策などについては、確実な知見が得られていない。

上記のような背景から、本論文では全国各地で発生した本病罹患魚から、細菌を分離し、再現性が認められた菌株を用いて、その性状を調べ、分類学的位置を明確にしようとした。また、条件性の病原体である *Aeromonas* が、感染症をひきおこすに到るメカニズムについて、種々のストレスを負荷させたコイを用いて、その解明を試みるとともに、本病の特徴的の発現機構を調べた。さらに、免疫による予防策の可能性ならびに適切な治療方法など、コイ

科魚類のエロモナス病について、総合的に明らかにしようとした。

なお、エロモナス病 (*Aeromonas* Disease) なる病名は、運動性の *Aeromonas* 属細菌に基づく魚類の感染症に対して、EGUSA and NISHIKAWA (1965), BULLOCK ら (1971) および江草 (1978) がすでに用いていることから、本研究ではそれらに準じて本呼称を使用することにした。

第2章 病魚の病理学的ならびに血液学的所見

全国各地で発生したエロモナス病の病魚について、その外観的、解剖学的、病理組織学的ならびに血液学的特徴を調べ、本病を診断する上での基準を明確にすることを試みた。

材料および方法

供試魚 1都8県で発生したマゴイ、ニシキゴイ、キンギョ、フナならびにカマツカの病魚、合計203尾を供試した (Table 1)。

肉眼的検索 203尾の病魚について、外観的ならびに解剖学的症状を観察した。

病理組織学的検索 病魚の各組織を摘出し、ブアン液で固定したのち、パラフィンによる包埋を行った。そして、ヘマトキシリン・エオシン二重染色標本を作成し、検鏡した。

血液学的検査 上記病魚のうち、マゴイ24尾、ニシキゴイ21尾、キンギョ10尾、フナ12尾、合計67尾を用い、赤

Table 1. Sources of diseased fishes used in this study

Name of fish	Number of fish examined	Body weight of fish examined (g)	Source (Location)
Common carp, <i>Cyprinus carpio</i> (LINNÉ)	71	85— 900	Nagano, Yamanashi, Yamaguchi
Fancy red carp, <i>Cyprinus carpio</i> (LINNÉ)	52	22—1350	Saitama, Tokyo, Kohchi
Goldfish, <i>Carassius auratus</i> (LINNÉ & NILSON)	28	10— 250	Kanagawa, Nara, Kohchi, Yamaguchi
Crucian carp, <i>Carassius carassius</i> (LINNÉ)	47	26— 160	Ibaraki, Yamaguchi
River dodger, <i>Pseudogobio esocinus</i> (TEMMINCK & SCHLEGEL)	5	15— 21	Yamaguchi
Total	203	—	—

血球数ならびにヘマトクリット値を調べた。

病魚を tricaine methanesulfonate (MS222) で麻酔させたのち、ヘパリンで処理した注射筒を用いて、背大動脈(1部は尾柄切断によった)から採血した。赤血球数は THOMA の血球算定盤を用いる常法により、ヘマトクリット値は毛細管法によって測定した。

結 果

第1節 病魚の外観ならびに臨床症状

病魚の症状別発現頻度を Table 2 に示した。いずれの魚種にも、体表の充・出血が最も多く観察され、平均出現頻度は 92.6% であった。ついで、尾鰭 (83.7%)、腹鰭 (63.5%) および背鰭 (62.6%) の充・出血が多くみられた。そのほか、腹部 (47.8%) や肛門 (43.3%) の発赤や立鱗 (31.0%) などの症状も比較的多く観察された (Plate I, A~D)。また、魚種別には、キンギョに臀鰭の充・出血が、キンギョとフナに立鱗が、いずれも他種より

やや多くみられたほかは、症状別発現頻度に大きな差は認められなかった。

一方、病魚の臨床症状はいずれの魚種にも共通して、二つの発生型に大別された。その一つは、体表のほぼ全面における充・出血と鰭の充・出血とが、ほとんど同時期に発現し、肛門周囲の発赤を伴い、発症後 1~2 週間以内に斃死する急性型である。他方は尾鰭を中心とした各鰭に充血がみられ、数日後に体表の数ヵ所に充・出血斑が現われ、数週間を経て食欲がなくなり、動きが緩慢になって斃死する慢性型である。慢性型では、充・出血の程度が急性型ほど広範囲でない場合が多い。また、急性ならびに慢性型ともに、全身または部分的に鱗が突起することがある。これらの病魚について、鱗の上から魚体を押すと無色透明、または淡黄色の液体が流出する。

第2節 病魚の解剖学的所見

病魚の解剖学的所見別の頻度を Table 3 に示した。魚種によって多少の差がみられるものの、腸管の充血が最も

Table 2. Revealed frequency of external symptoms of the diseased fishes used in this study

Symptoms	Name of fish		Goldfish	Crucian carp	River dodger	Total
	No. of fish					
	Common carp	Fancy red carp				
	71	52	28	47	5	203
Congestion and hemorrhage;	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Surface of body	93.0*	90.4	85.7	97.9	100	92.6
Caudal fin	94.4	92.3	71.4	66.0	90.0	83.7
Basal part of caudal fin	50.7	65.4	53.6	34.0	20.0	50.2
Dorsal fin	74.6	42.3	71.4	63.8	40.0	62.6
Basal part of dorsal fin	46.5	46.2	32.1	19.1	20.0	37.4
Pelvic fin	67.6	53.8	50.0	74.5	80.0	63.5
Basal part of pelvic fin	35.2	59.6	35.7	10.6	80.0	36.9
Pectoral fin	43.7	44.2	53.6	25.5	20.0	40.4
Basal part of pectoral fin	49.3	32.7	25.0	8.5	0	31.0
Anal fin	45.1	46.2	75.0	40.4	40.0	48.3
Basal part of anal fin	38.0	26.9	35.7	12.8	0	28.1
Abdomen	49.3	51.9	46.4	42.6	40.0	47.8
Anus	43.7	44.2	46.4	38.3	60.0	43.3
Eyelid	22.5	17.3	32.1	23.4	0	22.2
Protrusion of scale	19.7	32.7	42.9	42.6	0	31.0
Exophthalmos	8.5	7.7	10.7	4.3	0	7.4
Ulcer of skin	4.2	5.8	10.7	4.3	20.0	5.9
Abdominal inflation	0	1.9	7.1	0	0	1.5

*Revealed frequency of external symptoms (%).

Table 3. Revealed frequency of anatomical symptoms of the diseased fishes used in this study

Symptoms	Name of fish		Common carp	Fancy red carp	Goldfish	Crucian carp	River dodger	Total
	No. of fish							
			32	26	18	21	5	102
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Gill;								
Fading		46.9*	57.7	72.2	28.6	20.0	49.0	
Liver (Hepatopancreas);								
Congestion		34.4	42.3	38.9	42.9	40.0	39.2	
Fading		21.9	26.9	33.3	19.0	20.0	24.5	
Dissolution		12.5	19.2	27.8	4.8	0	14.7	
Spleen;								
Congestion		34.4	30.8	16.7	42.9	80.0	34.3	
Swelling		25.0	11.5	16.7	33.3	20.0	21.6	
Kindney;								
Congestion		28.1	38.5	27.8	33.3	20.0	31.4	
Swelling		18.8	23.1	11.1	19.0	0	17.6	
Fading		12.5	19.2	22.2	19.0	0	16.7	
Dissolution		9.4	11.5	11.1	9.5	0	9.8	
Intestine;								
Congestion		71.9	53.8	44.4	76.2	100.0	64.7	
Standing mucus		46.9	30.8	33.3	47.6	60.0	41.2	
Dissolution		31.3	23.1	50.0	28.6	20.0	31.4	
Intraperitoneum;								
Standing fluid		9.4	11.5	16.7	4.8	0	9.8	
Accumulation of fat		15.6	26.9	33.3	19.0	0	21.6	
Abdominal wall;								
Congestion and hemorrhage		43.8	23.1	11.1	19.0	20.0	26.5	

*Revealed frequency of anatomical symptoms (%).

著しく、平均出現頻度は64.7%であった。ついで、鰓の褪色(49.0%)、腸管内の粘液貯留(41.2%)および肝臓のうっ血(39.2%)が多く観察された。そのほか、脾臓のうっ血(34.3%)、腎臓のうっ血(31.4%)ならびに腸管の軟化融解(31.4%)などの所見も比較的多くの個体で認められた。また、魚種別には、マゴイの腹壁内部の充・出血、キンギョの腸管における融解およびフナの脾臓の腫脹が、いずれも他種よりやや多くみられた。

一方、病魚の症状の進行に伴う各臓器の変化については、下記に示すとおりである。

(1) 鰓 病魚の感染初期における鰓葉には、ほとんど変化が認められないが、急性型病魚の斃死直前、および慢性型病魚の末期には、鰓葉が褪色して、淡紅色を呈していることが多い。

(2) 肝臓(肝臓) 感染初期の病魚には、暗赤色の点状または比較的広範囲なうっ血がみられ、症状の進行に伴って黄疽色から白色化していく。この傾向は慢性型の病魚に顕著であり、急性型のものではうっ血斑がみられるまま斃死することが多い。

(3) 腎臓 感染初期の病魚の腎臓には、暗赤色のうっ血斑が認められ、急性型の個体の中には腫脹が観察されることも少なくない。また、慢性型の病魚の末期には、褪色および軟化融解も散見される。

(4) 脾臓 急性型の病魚には、うっ血および腫大が観察されることが多いが、慢性型には健康魚とくらべて、有意な差異を認めがたく、症状の進行に伴う変化にも乏しい。

(5) 腸管 感染初期の腸管はみずみずしく、やや充血している程度であるが、やがて充血が著しくなる。このよ

うな腸管の内部には血液を含む粘液が多量に貯留していることが多い。症状の進行した病魚の腸管は、白色化して光沢がなく軟化してくる。このような腸管の内部には、白色の粘液物質が充満している。

(6) 腹腔内 カマツカを除く、その他の魚種の、症状が進行したものの腹腔内には、無色透明または淡黄色の液体が貯留しているものが散見される。また、急性型では血液を含んでいることもある。この腹水の量は、まれに腹腔内に充満するほど多量の場合もあるが、少量であることが多い。また、キンギョには、多量の脂肪を蓄積している病魚が比較的多く観察された。

(7) 腹壁 急性型の症状の進行した病魚には、内部腹壁の充血ならびに出血がみられることが比較的多かった。

第3節 病魚の病理組織学的所見

病魚を病理組織学的に検索した結果、すべての魚種に共通した次の変化が観察された。

(1) 鱗囊 病魚の鱗囊には、各細胞の肥大および萎縮が認められ、その大きさが一様でなく、配列も乱れている。細胞内には、核の膨潤、濃縮ならびに融解など、核崩壊像が観察される。また、細胞間の間隙が広く、著明な水腫像が認められた (Plate I, E)。

(2) 筋肉 体表の出血が少ない病魚の筋肉は、筋繊維の配列が整然とし、大きな変化はみられない。出血が著しい病魚には、筋繊維の膨化と配列の乱れが観察されるほか、筋繊維の部分的壊死がみられた。また、筋繊維間の結合組織に円形細胞ならびに菌集落が認められた。

(3) 肝臓 (肝脾臓) 感染初期の肝臓には、血管の拡張がみられる程度で、肝細胞索の配列に異常は認められない。やがて、細胞間の間隙が拡張して、その部分にリンパ系細胞が浸潤し、さらに赤血球が各所で観察されるように

なり、顕著な滲出性ならびに出血性の炎症像が認められる。重症魚には、洞様血管のうっ血、肝細胞索の配列の乱れ、核濃縮および核崩壊が観察され、肝細胞の壊死像が認められた。

(4) 腎臓 感染初期の腎臓には、間質の希薄化と円形細胞の浸潤がみられる。症状の進行に伴って、尿細管の拡張と萎縮、さらには尿細管上皮細胞の核濃縮ならびに核崩壊が認められ、壊死像が観察された (Plate I, F)。

(5) 脾臓 感染初期の脾臓には、莢動脈の充血がみられる。しだいに、髄質部にリンパ系細胞および赤血球が充ち、髄索と髄洞との区別が不明瞭になって、感染脾の像を呈してくる。重症魚の髄質部には、ヘモジデリンが沈着しているほか、細胞の壊死が認められた (Plate I, G)。

(6) 腸管 感染初期の腸管には、粘膜の部分的剝離、固有層における毛細血管の拡張ならびに円形細胞の浸潤がみられる。重症魚には、筋層に浮腫が生じているほか、円柱上皮細胞の崩壊および組織全層の壊死が観察された (Plate I, H)。

第4節 病魚の血液学的所見

病魚の血液学的検査の結果を Table 4 に示した。発病後4日のマゴイでは、平均赤血球数が 163 ± 10.9 ($\times 10^4/\text{mm}^3$ ・以下、単位省略) であり、平均ヘマトクリット値は 32.2 ± 3.41 (%・以下、単位省略) であった。発病後9~13日のマゴイでは、赤血球数が 141 ± 8.6 であり、ヘマトクリット値は 28.2 ± 3.03 であった。発病後3日のニシキゴイでは、赤血球数が 172 ± 13.5 であり、ヘマトクリット値は 32.5 ± 3.57 であったのに対し、発病後7~9日では、それぞれ 136 ± 6.9 、 25.8 ± 2.06 であった。発病後11~15日のキンギョでは、赤血球数が 108 ± 6.6 であり、ヘマトクリット値は 20.9 ± 1.81 であった。発病後の経過日数が不明

Table 4. Haematological characters of the diseased fishes used in this study

Name of fish	Number of fish	Body weight (g) (mean)	Days after attack	Erythrocyte counts ($\times 10^4/\text{mm}^3$) (mean \pm S.D.)	Hematocrit value (%) (mean \pm S.D.)
Common carp	8	340	4	163 ± 22.9	32.2 ± 5.41
Common carp	16	550	9-13	141 ± 18.6	28.2 ± 3.03
Fancy red carp	8	750	3	172 ± 23.5	32.5 ± 5.57
Fancy red carp	13	620	7-9	136 ± 16.9	25.8 ± 2.06
Goldfish	10	80	11-15	108 ± 16.6	20.9 ± 4.21
Crucian carp	12	76	Unknown	127 ± 13.2	22.4 ± 2.47

のフナでは、赤血球数が 127 ± 11.2 であり、ヘマトクリット値は 22.4 ± 2.47 であった。いずれの魚種にも、発病後の日数が経過したものほど、赤血球数の減少ならびにヘマトクリット値の低下などの傾向が顕著であった。

第5節 病魚の病理学的ならびに血液学的所見に関する考察

本病と類似の症状を示すコイ科魚類の疾病に、コイの春ウイルス血症がある。この疾病は水温の上昇はじめる春に多く（水温 17°C 前後に多発）、腹部の膨満、眼球突出、肛門の充血と腫脹、鰓の出血点、腹膜炎、内臓諸器官の浮腫、腸炎、表皮・鰓の出血などの症状を呈する（FIJAN, 1976）。これらの発生時期および症状をエロモナス病のそれと比較すると、体表の出血、肛門の充血ならびに腸炎などの症状は一致する。しかし、エロモナス病は、春と秋にやや多く発生するものの、季節や水温にはほとんど無関係に発生し、腹部の膨満、鰓の出血点および鰓の出血症状が発現することは、きわめてまれであることなどが春ウイルス血症と異なる。

また、キンギョやフナにみられる穴あき病も、本病と比較的類似の症状を示す。しかし、穴あき病は表皮の白濁壊死にはじまり、真皮の壊死と脱鱗がおきたのちに、潰瘍が生じ、末期には筋肉が露出するに到る（高橋ら, 1975）。エロモナス病は、表皮の出血および鰓の充血が主で、表皮の白濁壊死や筋肉が露出するほどの潰瘍が生じることはない。穴あき病と同一原因による疾病とは考え難い。

大島・江草（1966）は冬期の養鯉コイに、表皮の出血とうっ血、立鱗ならびに肛門の充血と腫脹などの症状を示す疾病が発生したことを明らかにしている。また、この病魚から *Aeromonas* 属と考えられる再現性を有する細菌が分離できたと述べている。エロモナス病の外観症状ならびに解剖学的所見は、上記の大島・江草が報告した疾病にみられた病変とよく一致する。

一方、*Aeromonas hydrophila* に基づく、ウナギの鰓赤病の外観症状は、軀幹、頭部腹側の皮膚ならびに腎鰭・胸鰭の発赤であり、解剖学的には肝臓のうっ血ならびに腸管の赤変などである。病理組織学的には、脾臓のうっ血が著しく、脾臓全体が血海状を呈し、腎臓には糸球体毛細血管のうっ血や出血および尿細管上皮細胞の壊死が見られ、腸管では上皮細胞の剝離や固有層にリンパ球や食細胞が浸潤しているほか、出血がみられる（江草, 1978）。また、保科（1962）は鰓赤病のウナギの血液病理変化について、症状が進むと赤血球は減少し、ヘマトクリット値は低下するこ

とを明らかにしている。

また、アユの *A. hydrophila* 感染症では、眼球の突出、背部と尾柄後端部の皮下出血および肛門の発赤と拡張を伴う（城・大西, 1980）。

上記の鰓赤病の病理学的ならびに血液学的病変と、本病のそれとを比較すると、外観症状、剖検所見、病理組織学的所見ならびに血液学的所見のいずれにも一致する点が多く、また、アユの *A. hydrophila* 感染症の外観症状とも類似点が多い。

さらに、本病の病理組織学的検索の結果から、病魚の肝臓、腎臓、脾臓ならびに腸管に、円形細胞の浸潤像が観察されたのをはじめ、脾臓の髄質部にリンパ系細胞および赤血球が一樣に充たされていることなどから、本病は病原微生物に基づく感染症であると推定される。

本病の診断上の指標としては、症状の発現頻度から考えて、外観的には体表、尾鰭とその基部、背鰭、腹鰭、腹部および肛門の充出血があげられる。解剖学的には、腸管の発赤、腸管内における粘液の貯留、肝臓のうっ血および症状の進行した病魚での鰓の褪色があげられる。病理組織学的には、肝臓・腎臓、脾臓および腸管における滲出性ならびに出血性の炎症と鱗囊における水腫があげられる。また、血液学的には、症状の進行した病魚における赤血球数の減少ならびにヘマトクリット値の低下に象徴される貧血が、診断上の指標になりうると考える。

第6節 要 約

(1) コイ科魚類のエロモナス病は、マゴイ、ニシキゴイ、キンギョ、フナならびにカマツカに発生することが確認された。

本病の特徴的な外観症状は、体表、尾鰭とその基部、背鰭、腹鰭、腹部および肛門の充・出血である。また、立鱗も比較的多くの個体に観察された。

(2) 解剖学的には、肝臓のうっ血、腸管の発赤、腸管内における粘液の貯留および症状の進行した病魚での鰓の褪色が、高頻度で認められた。

(3) 病理組織学的には、鱗囊に水腫が生じているほか、肝臓・腎臓・脾臓および腸管に滲出性ならびに出血性の炎症像が認められ、症状の進行した病魚には、これらの組織に壊死が観察された。また、上記所見ならびに脾臓髄質部における、リンパ球および赤血球の充満などの所見から考えて、本病は病原微生物に基づく感染症であると推察された。

(4) 血液学的には、症状の進んだ病魚における、赤血球

数の減少ならびにヘマトクリット値の低下が特徴的であった。

第3章 原因菌に関する研究

第1節 原因菌の分離ならびに分離菌の再現性試験

前章において述べたように、病魚の外観症状、剖検所見ならびに病理組織学的所見などから、本病は細菌感染症であると推定されたので、まず下記の方法によって推定原因菌の分離を試みた。次に、分離された細菌の、コイ科魚類に対する病原性ならびに再現性の有無を調べた。

材料および方法

分離材料 細菌検査に供した病魚は、1968年10月から1982年4月にかけて、1都8県で発病したマゴイ、ニシキゴイ、キンギョ、フナならびにカマツカ、合計203尾である(第2章, Table 1参照)。

細菌の分離培養 病魚の心臓および腎臓へ白金耳を穿刺したのち、普通寒天培地(日水)ならびにBHI寒天培地(栄研)平板上に塗抹して、25℃で24時間培養した。

分離菌の再現性試験 細菌検査によって出現したコロニーから、合計72株を選び、再現性試験に供した。すなわち、分離菌を普通寒天培地斜面に25℃で、18~20時間培養したのち、滅菌生理食塩水に懸濁させた。そして、健康なニシキゴイ(平均体重33g)、キンギョ(平均体重12g)およびカマツカ(平均体重20g)に、体重10gあたり 10^8 (1部は 10^{10})細胞の生菌数となるように、腹腔内または筋肉内接種した。生菌接種後、アクリル樹脂水槽〔40×22×25(深さ)cm〕に収容し、水温 20 ± 1 ℃または 25 ± 1 ℃で、20日間飼育し、斃死の有無ならびに外観症状を毎日確認した。なお、症状発現および斃死魚については、解剖学的病変を観察するとともに、心臓ならびに腎臓から接種菌の再分離を試みた。

結果および考察

細菌検査の結果、いずれの病魚からも無色透明、湿潤性の光沢ある円形コロニーが、純培養状に分離された。

次に、分離菌72株のそれぞれについて、再現性試験を行った結果をTable 5に示した。

分離菌のうち、GA-1株の病原性が最も弱く、その 10^8 細胞/10g(魚体重)を接種したキンギョでは、接種部位

の膨隆およびその周囲の出血が生じたが、時間の経過とともに全検体が治癒した。しかし、生菌を 10^{10} 細胞接種した群では192~312時間(8~13日)後に41.7%が斃死した。

また、CI-1, CP-1, CJ-1, CK-1, CM-1, SC-2, GS-1, GT-1, OK-1ならびにOK-3株の計10株の病原性は比較的弱く、 10^8 細胞を接種した群の20~50%が生存し、斃死した魚の平均致死時間は、菌接種後165~197時間(7~8日)であった。一方、他の27株の病原性はいずれも強く、生菌の 10^8 細胞を接種した魚の全数が斃死した。その平均致死時間は、菌接種後71~97時間(3~4日)であった。斃死魚の外観症状は、体表および腹部の充・出血ならびに鱗の充血などであり、自然発病魚と同様の症状を呈した(Plate II, I) なお、GA-1株を含む弱毒の11株を接種した魚の症状は、強毒株のそれにくらべて、充・出血の程度が軽微であった。解剖学的には、肝臓のうっ血ならびに腸の充血など、自然発病魚と同様の病変が観察された。また、斃死魚の心臓ならびに腎臓からは、接種菌と同一性状を示す細菌が再分離された。以上の結果から、これらの分離菌はいずれも本病の原因菌と考えてさしつかえないものと思われる。

なお、同一個体または同一時期の同一場所で発生した病魚からの分離菌は、その病原性がほぼ同様であることが確認されたので、Table 5では代表株の結果についてのみ表示した。

第2節 原因菌の性状

前節において、再現性が確認された分離菌について、その形態学的、生物学的、生化学的ならびに血清学的性状を調べ、分類学的位置を検討した。

材料および方法

供試菌株 再現性が確認された病魚からの分離菌株72株と、対照菌株4株の合計76株を用いた。各菌株の由来をTable 6に示した。

形態学的性状検査 普通寒天培地斜面で、25℃、18~20時間培養した菌について、形態、大きさ(PFEIFFER液による単染色)、運動性(懸滴標本および半流動寒天法)、鞭毛の有無および位置(LOFFLERの法)、グラム染色性(HUCKERの変法)ならびに抗酸性(ZIEHL-NEELSENの法)を調べた。固形培地における培養性状としては、普通寒天培地平板に25℃で、24~48時間培養し、生じたコロニーの形態と色素産生の有無を観察した。また、液体培地における培養性状としては、ブイオンに25℃で24~48時間培養し、

Table 5. Pathogenicity of the isolated strains to carp fishes
(Dose 10^8 or 10^{10} viable cells/10g fish body weight, intraperitoneal or intramuscular injection)

Strains	Name of fish examined	Number of fish died/lested	Mortality (%)	Average time to death (hr)
CA 1	Fancy red carp	12/12	100	75
CB 1	"	12/12	100	71
CF 1	"	6/6	100	83
CG 1	"	6/6	100	86
CH 1	"	6/6	100	92
CI 1	"	4/5	80	168<
CE 1	"	5/5	100	82
CD 1	"	5/5	100	79
CO 1	"	6/6	100	90
CP 1	"	3/6	50	197<
CJ 1	"	3/5	60	173<
CK 1	"	4/5	80	162<
CL 1	"	5/5	100	78
CM 1	"	6/10	60	183<
CN 1	"	6/6	100	89
SC 1	"	5/5	100	72
SC 2	"	6/10	60	186<
SC 3	"	6/6	100	84
GA 1*	Goldfish	5/12	41.7	216<
GB 1	"	5/5	100	97
GC 1	"	5/5	100	88
GS 1	"	3/5	60	179<
GT 1	"	4/5	80	165<
CRA 1	Fancy red carp	5/5	100	95
SF 1	"	5/5	100	86
OK 1	River dodger	3/5	60	172<
OK 2	"	5/5	100	78
OK 3	"	4/5	80	190<

*Challenge dose was 10^{10} viable cells/10g fish body weight.

菌膜形成の有無と混濁の程度を観察した。

生物学的性状検査 各種培地上の発育： 1白金耳の培養菌を滅菌生理食塩水2mlに懸濁し、その1白金耳をSS寒天(日水)、マッコンキー寒天(日水)、BTBティール寒天(日水)、ARONSONのフクシン寒天およびブリリアントグリーン寒天(日水)培地上に塗抹し、25℃で5日間培養して発育の有無を観察した。

発育温度： 上記と同様に培養菌液の1白金耳を普通寒

天培地平板上に塗抹し、5～42℃における発育の有無と程度を観察した。

発育塩分濃度： 1%ポリペプトン(大五)水に1.5%の寒天を加えたものを基礎培地とし、これに0～5.0%(W/V)の食塩を加えた培地上に、培養菌液の1白金耳を塗抹し、25℃で5日間培養して発育の有無と程度を観察した。

発育pH： pHを5.0～10.0に変えた普通寒天培地上に、

Table 6. Strains isolated from diseased fishes used in this study

Strains	Host fish	Location	Date
CA 1, 2, 3	Fancy red carp	Nangoku, KOHCHI	Nov., 1968
CB 1, 2, 3	"	"	Jan., 1969
CF 1, 2, 3	"	Kodaira TOKYO	Nov., 1971
CG 1, 2, 3	"	"	"
CH 1, 2, 3	"	"	"
CI 1, 2, 3	"	Tokorozawa, SAITAMA	Aug., 1971
CE 1, 2, 3	"	Fuchu, TOKYO	Apr., 1976
CD 1, 2, 3	"	"	May, 1977
CO 1, 2, 3	"	Shimonoseki, YAMAGUCHI	Jun., 1981
CP 1, 2, 3	"	"	Nov., 1981
CJ 1, 2, 3	Common carp	Kofu, YAMANASHI	Oct., 1971
CK 1, 2, 3	"	"	"
CL 1, 2, 3	"	Saku, NAGANO	Mar., 1978
CM 1, 2, 3	"	"	Oct., 1978
CN 1, 2, 3	"	"	Feb., 1979
SC 1	"	Shimonoseki, YAMAGUCHI	May, 1981
SC 2	"	"	"
SC 3	"	"	Apr., 1982
GA 1, 2, 3	Goldfish	Nangoku, KOHCHI	Oct., 1968
GB 1, 2, 3	"	Yokohama, KANAGAWA	Aug., 1971
GC 1, 2, 3	"	Yamatotakada, NARA	Feb., 1972
GS 1, 2, 3	"	Shimonoseki, YAMAGUCHI	Oct., 1981
GT 1, 2, 3	"	"	Mar., 1982
CRA 1, 2, 3	Crucian carp	Namekata, IBARAKI	Jun., 1971
SF 1, 2, 3	"	Shimonoseki, YAMAGUCHI	Apr., 1982
OK 1	River dodger	Ube, YAMAGUCHI	Oct., 1981
OK 2	"	"	Nov., 1981
OK 3	"	"	Dec., 1981
Reference strains			
A 62	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> UT 62		
V 1	<i>Vibrio anguillarum</i> NCMB 6		
V 2	<i>Vibrio piscium</i> var. <i>japonicus</i> TUF		
V 3	<i>Vibrio ichthyoderms</i> NCMB 407		

培養菌液の1白金耳を塗抹し、25℃で5日間培養して発育の有無と程度を観察した。

0/129に対する感受性：感受性ディスク用培地（日水）上に培養菌液〔 10^8 細胞/ml（滅菌生理食塩水）〕の0.1mlを塗抹し、Vibriostatic agent 0/129の1濃度ディスクを置いて、25℃で24時間培養後、阻止円の有無を観察した。

生化学的性状検査 カタラーゼ産生性：培養菌に3%過酸化水素水を注いで、発泡の有無で検査した。

チトクロームオキシダーゼ産生性：培養菌の1白金耳を蒸留水でしめらせたチトクロームオキシダーゼ試験紙（日水）に塗抹し、1分以内の試験紙の色調変化で検査した。

O-F 試験： ヒュー・レイフソン培地（栄研）を用い、好氣的ならびに嫌氣条件下で7日間培養し、酸産生の有無を観察した。

VP 反応： VP 半流動培地（栄研）を用い、1, 3および5日間培養後、5%アルファナフトール・エタノール溶液 1 ml と0.3%クレアチン加40%水酸化カリウム溶液 0.4 ml の混合液を数滴滴下して検査した。

MR 試験： ブドウ糖リン酸塩ペプトン水に3日および5日間培養後、メチルレッド試薬を滴下して検査した。

インドール産生性： SIM 培地（日水）で3日間培養して、KOVACSの方法により検査した。

硫化水素の産生性： SIM 培地（日水）ならびにシステイン鉄寒天培地（VERON and GASSER, 1963）を用い、4日間培養して検査した。

KCN 試験： KCN 基礎培地（日水）に0.5% KCN 水溶液を加えた培地を用い、24時間培養して検査した。

グルコン酸の酸化性： SHAW and CLARKE 法によるグルコン酸塩培地で2日間培養後、BENEDICTの試薬を加えて検査した。

クエン酸塩の利用性： SIMMONS のクエン酸塩培地（栄研）で7日間培養し、菌の発育と培地の色調変化で検査した。

2, 3-アブタンジオールからのアセトイン産生性： SCHUBERT and KEXEL の方法に準じて2日間培養後、BARRITTの方法により検査した。

KAUFFMANN-PETERSEN の試験： ELLIS らの培地でクエン酸塩の利用性を14日間培養して検査した。

デカルボキシラーゼ産生性： MÖLLER の方法にしたがい、L-リジン、L-アルギニンおよびL-オルニチンに対するデカルボキシラーゼ産生の有無を、4日間培養して検査した。

アルギニン加水分解性： NIVEN らのアルギニンブイオンで24時間培養後、NESSLER の試薬を加えて検査した。

エスクリン加水分解性：エスクリン・ブイオンに4日間培養したのち、7%塩化第二鉄溶液 1 ml を加えて検査した。

でん粉加水分解性：0.2%可溶性でん粉加普通寒天培地で5日間培養後、ヨウ素ヨウ化カリウム液を注いで検査した。

ゼラチン液化性：ゼラチン培地高層に穿刺して20日間培養し、液化の有無を観察した。

エラスターゼ産生性： エラスチン寒天培地（SCHARMANN, 1972）平板で14日間培養し、透明帯の形成

の有無を観察した。

カゼイン消化性： 50%脱脂乳加普通寒天培地で14日間培養し、透明帯の形成の有無を観察した。

チロシンおよびキサンチンの溶解性： 0.5%のチロシンまたは0.4%のキサンチンを加えた普通寒天培地平板で20日間培養し、透明帯形成の有無を観察した。

皮粉の消化性： 1%皮粉加普通寒天培地平板で20日間培養し、透明帯の形成の有無を観察した。

キチンの分解性： 1%キチン加普通寒天培地平板で20日間培養し、透明帯の形成の有無を観察した。

トリブチリン消化性： HUGO and REVERIDGE の寒天培地で10日間培養し、透明帯の形成の有無を観察した。

溶血性： 1%ウサギ脱線維素血液加普通寒天培地平板で3日間培養し、溶血環の形成の有無を観察した。

β-ガラクトシダーゼ産生性： LOWE の ONPG ブイオンで24時間培養して検査した。

硝酸塩の還元性： 硝酸塩半流動培地 3, 5, 7 および10日間培養後、TITTLER の方法により検査した。

メチレンブルーの還元性：ブイオンで2日間培養後、1%メチレンブルー水溶液を滴下し、1時間後の脱色の有無で検査した。

コレラ赤試験： 藤野らの方法にしたがい、24~48時間培養後、濃硫酸を1滴滴下して検査した。

フェニルピルビン酸試験： EWING らのフェニルアラニン寒天培地で24時間培養後、10%塩化第2鉄水溶液を滴下して検査した。

マロン酸塩の利用性： EWING らのマロン酸塩培地で7日間培養して検査した。

ウレアーゼ産生性： CHRISTENSEN の尿素寒天培地に4日間培養して検査した。

凝乳酵素産生性： リトマス加脱脂乳で20日間培養して、凝固の有無を観察した。

炭水化物の分解性： 糖分解試験用半合成基礎培地（日水）に26種の炭水化物を1%加えた培地にDurhan管を入れ、14日間培養して酸およびガスの産生を検査した。

炭水化物の発酵的分解性： HUGH-LEIFSON の基礎培地に14種の炭水化物を1%加え、嫌氣条件下で5日間培養して検査した。

有機化合物の炭素源としての利用性試験： SIMMONS のアンモニウム寒天培地に17種の有機化合物を0.05~0.5%の割合に加えた培地で7日間培養し、菌の発育と培地の色の変化で検査した。

数値分類法： 検査した125項目の性状をもとにして、

SOKAL and MICHENER (1958) の式により、全菌株間の S-value を求めた。

血清学的性状検査 供試菌株： 本病の病魚から分離した12株と、対照菌株8株の合計20株を用いた (Table 7)。
ウサギ免疫抗原： 病魚から分離した CA-1 ならびに CB-1 株を普通寒天培地平板で25℃、24時間培養後、0.5%の割合でホルマリンを加え死菌としたのち、滅菌生理食塩水に湿菌量で1 mg/mlの濃度に懸濁させたものを免疫抗原として用いた。

ウサギの免疫方法： ウサギ (平均体重3.5kg) の大腿部に免疫抗原液の合計10mlを、5日間隔で5回に分けて筋肉内注射した。注射量は初回に0.5ml、ついで1, 2, 3, 3.5mlとした。

ウサギ抗血清の作製： 免疫抗原の最終接種日から9日後に、ウサギの心臓から採血し、試験管に入れ室温下に3時間置いたのち、4℃で15時間放置し、血清を分離させた。

凝集素価の測定： 抗血清を56℃で30分間放置し、非働化を行ったのち、生理食塩水で倍数段階希釈した。希釈液の0.5mlを凝集用試験管にとり、各供試菌株の懸濁液を等量加えて振盪し、37℃に2時間放置後4℃に20時間置き、凝集の有無を観察して凝集価を求めた。

凝集素吸収試験： CA-1 および CB-1 株のウサギ抗血清を生理食塩水で20倍希釈し、希釈血清を10mlずつ12等分した。それぞれの希釈血清に、供試菌株の25℃、24時間培養菌を多量に懸濁した。懸濁液を37℃に2時間置いたのち、4,000rpmで15分間遠心分離した。得られた上清液に

Table 7. *Aeromonas* strains used in this study

Strains	Organisms	Matter sampled
CA-1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Carp
CA-2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Carp
CA-3	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Carp
CB-1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Carp
CB-2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Carp
CB-3	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Carp
GA-1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Goldfish
GA-2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Goldfish
GA-3	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Goldfish
CG-1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Carp
CE-1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Carp
CI-1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Carp
Ar-1	<i>Aeromonas hydrophila</i> NRRL-B-909	(unknown)
Ar-2	<i>Aeromonas punctata</i> ATCC-11163	(unknown)
Ar-3	<i>Aeromonas liquefaciens</i> EFDL	Eel
Ar-4	<i>Aeromonas liquefaciens</i> UT-62	Eel
Ar-5	<i>Aeromonas salmonicida</i> ATCC-14174	Trout
Ar-6	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Salmon
Ar-7	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	Trout
KA	<i>Aeromonas</i> sp.	Killi fish

Table 9. Biochemical characteristics of all strains used in this study

Characteristics	Strains																																		
	CA	CB	CF	CG	CH	CI	CE	CD	CO	CP	CJ	CK	CL	CM	CN	SC1	SC2	SC3	GA1,2,3	GB1,2,3	GC1,2,3	GS1,2,3	GT1,2,3	CRA1,2,3	SF1,2,3	OK1	OK2	OK3	A62	V1	V2	V3			
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Cytochrome oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
O-F test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
V P reaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
M R test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Indole	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Gas from glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Gas from glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
H ₂ S (SIM)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
H ₂ S (G. C. F)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
KCN test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,3-butandiol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gluconate oxidized	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Simmons' citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K P-citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lysine decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Elastase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Casein digestion	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tyrosine dissolution	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xantine dissolution	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hide powderlysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chitin decomposition	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tributylin digestion	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Haemolysis rabbit	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-galactosidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M B reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chorela red test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P P A test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Malonate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urease	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rennet production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

〜3株を除くすべての株が陽性、MR試験はCA1〜3、CI1〜3、CP1〜3、CJ1〜3、CK1〜3、CM1〜3、GA1〜3、GT1〜3、OK1およびOK3株は陽性であったが、他の菌株は陰性であった。また、すべての菌株はインドール産生性、2, 3-ブタンジオールからのアセトイン産生性、アルギニン脱炭酸性、アルギニンおよびでん粉の加水分解性、ゼラチン液化性、カゼインおよびトリブチリンの消化性は陽性であったが、KPクエン酸塩利用性、リジンおよびオルニチン脱炭酸性は陰性であった。ブドウ糖からのガス産生性はCA1〜3、CP1〜3、CM1〜3、GA1〜3株が陰性であり、グリセリンからのガス産生性はCA1〜3、CP1〜3、CM1〜3株が陰性であった。硫化水素産生性はSIM培地で、CM1〜3株を除く全株が陽性、システイン鉄寒天培地ではCA1〜3、CI1〜3、CP1〜3、CM1〜3、SC2、GA1〜3株が陰性であった。KCN試験はSC2株を除く全株が陽

性であり、グルコン酸の酸化性はCP1〜3、GA1〜3、GS1〜3、OK3株を除く全株が、またSIMMONSのクエン酸塩利用性はCH1〜3、CP1〜3、OK1株を除くすべての菌株が陽性であった。エスクリン加水分解性はOK1株のみが陰性であり、エラスターゼ産生性はCA1〜3、CI1〜3、CP1〜3、CJ1〜3、CK1〜3、CM1〜3、SC2、GA1〜3、GS1〜3、GT1〜3、OK1、OK3株が陰性であった。また、すべての菌株はチロシン溶解性、皮粉の消化性、溶血性、β-ガラクトシダーゼおよび凝乳酵素産生性、硝酸塩およびメチレンブルーの還元性は陽性であったが、キチン分解性、コレラ赤試験、PPA試験、マロン酸塩利用性、ウレアーゼ産生性はいずれも陰性であった。

原因菌の炭水化物分解性試験の結果をTable 10に示した。すべての菌株はブドウ糖、フラクトース、マンノース、ガラクトース、白糖、麦芽糖、でん粉、デキストリン、グ

Table 10. Utilization of carbohydrates all strains used in this study

Carbohydrates	Strains																																						
	CA 1,2,3	CB 1,2,3	CF 1,2,3	CG 1,2,3	CH 1,2,3	CI 1,2,3	CE 1,2,3	CD 1,2,3	CO 1,2,3	CP 1,2,3	CJ 1,2,3	CK 1,2,3	CL 1,2,3	CM 1,2,3	CN 1,2,3	SC 1	SC 2	SC 3	GA 1,2,3	GB 1,2,3	GC 1,2,3	GS 1,2,3	GT 1,2,3	CRA 1,2,3	SF 1,2,3	OK 1	OK 2	OK 3	62	1	2	3							
Arabinose	-	+	-	-	-	g	+	+	g	-	-	g	+	g	+	-	g	+	g	g	g	g	+	+	-	+	g	+	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Glucose	+	g	g	g	g	g	g	g	g	g	+	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	
Fructose	+	g	g	g	g	g	g	g	g	g	+	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	
Mannose	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	
Galactose	+	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	
Saccharose	+	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Maltose	+	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	
Trehalose	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	
Cellobiose	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Starch	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	
Dextrin	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	
Glycogen	+	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	
Glycerol	+	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Mannitol	+	g	g	g	g	g	g	+	g	+	g	g	g	g	g	g	+	g	+	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Salicin	+	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	
Esculin	+	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

g: gas production, (+) : weakly positive.

リコーゲン、グリセリン、マンニットを分解するが、キシロース、アドニット、ズルシット、イヌリン、イノシットを分解しない。また、ほとんどの菌株は炭水化物を分解して、酸とともにガスを産生するが、CA1~3, CP1~3, CM1~3, SC2株などは糖の種類によって、ガスを産生しない場合があり、GA1~3株はどの糖からもガスを産生しない。

原因菌の炭水化物の発酵的分解性ならびに唯一の炭素源としての有機化合物の利用性試験の結果を Table 11 に示した。すべての菌株はマンノース、白糖、麦芽糖、トレハロース、グリセリン、マンニットを発酵的に分解するが、キシロース、ラフィノース、アドニット、イノシットを分解しない。また、すべての菌株は唯一の炭素源として、L-ヒスチジン、L-グルタミン酸、L-アラビノース、ブドウ糖、白糖、サリシン、ビルビン酸を利用するが、ギ酸、酢酸、乳酸、修酸を利用しない。

(3) 原因菌の血清学的性状

本病の原因菌 CA1 株のホルマリン死菌を接種して得られた、ウサギ抗血清の凝集素の特異性を Table 12 に示し

た。本抗血清は免疫抗原として用いた CA1 株および同一の病魚から分離した CA2, CA3 株に対して、いずれも 1 : 2560 (以下倍として表示) の凝集素価を示した。他の病魚から分離した CB1~3 株に対しては 160 倍、GA1~3 株には 640 倍、CI1 株には 80 倍の凝集素価を示したが、CG1 および CE1 株に対しては凝集素を形成しなかった。対照菌株としての Ar2 株に対しては 640 倍の比較的高い凝集素価を示し、Ar3 および Ar4 株には 40~80 倍の凝集素価を示したが、Ar1, Ar5, Ar6, Ar7 株に対しては凝集素の形成は認められなかった。

原因菌 CB1 株のウサギ抗血清における、凝集素の特異性を Table 13 に示した。本抗血清は免疫抗原として用いた CB1 株および同一の病魚から分離した CB2 および CB3 株に対して、いずれも 1280 倍の凝集素価を示した。他の病魚から分離した CA1~3 株に対しては 160 倍、GA1~3 株には 320 倍の凝集素価を示したが、CG1, CE1, CI1 株に対しては凝集素を形成しなかった。対照菌株としての Ar2 株に対しては 1280 倍の高い凝集素価が認められたほか、Ar4 株に対しても 320 倍の比較的高い凝集素価を示した。しかし、Ar1, Ar5, Ar6, Ar7 株に対しては凝集素が形

Table 11. Fermentation of carbohydrates and utilization of organic compounds by all strains used in this study

Characteristics	Strains																A	V 1	V 2	V 3																		
	CA 1,2,3	CB 1,2,3	CF 1,2,3	CG 1,2,3	CH 1,2,3	CI 1,2,3	CE 1,2,3	CD 1,2,3	CO 1,2,3	CP 1,2,3	CJ 1,2,3	CK 1,2,3	CL 1,2,3	CM 1,2,3	CN 1,2,3	SC 1					SC 2	SC 3	GA 1,2,3	GB 1,2,3	GC 1,2,3	GS 1,2,3	GT 1,2,3	CRA 1,2,3	SF 1,2,3	OK 1	OK 2	OK 3						
Fermentation of :																																						
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Adonitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Utilization of :																																						
L-Arginine	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L-Asparagine	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Histidine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Glutamic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Serine	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Formate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lactate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Oxalate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Succinate	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Malate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Pyruvate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alginate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

/: not tested.

Table 12. Specificity of agglutinin in the rabbit antisera against formalin-killed cell of *A. hydrophila* strain CA-1

Agglutigen	Dilution of antiserum (1:)							
	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120
CA-1	+	*	+	+	+	+	+	-**
CA-2	+	+	+	+	+	+	+	-
CA-3	+	+	+	+	+	+	+	-
CB-1	+	+	+	-	-	-	-	-
CB-2	+	+	+	-	-	-	-	-
CB-3	+	+	+	-	-	-	-	-
GA-1	+	+	+	+	+	-	-	-
GA-2	+	+	+	+	+	-	-	-
GA-3	+	+	+	+	+	-	-	-
Ar-1	-	-	-	-	-	-	-	-
Ar-2	+	+	+	+	+	-	-	-
Ar-3	+	-	-	-	-	-	-	-
Ar-4	+	+	-	-	-	-	-	-
Ar-5	-	-	-	-	-	-	-	-
Ar-6	-	-	-	-	-	-	-	-
Ar-7	-	-	-	-	-	-	-	-
CG-1	-	-	-	-	-	-	-	-
CE-1	-	-	-	-	-	-	-	-
CI-1	+	+	-	-	-	-	-	-
KA	+	+	-	-	-	-	-	-

* + : agglutinate, ** - : no agglutinate.

Table 13. Specificity of agglutinin in the rabbit antisera against formalin-killed cell of *A. hydrophila* strain CB-1

Agglutigen	Dilution of antiserum (1:)							
	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120
CA-1	+*	+	+	-**	-	-	-	-
CA-2	+	+	+	-	-	-	-	-
CA-3	+	+	+	-	-	-	-	-
CB-1	+	+	+	+	+	+	-	-
CB-2	+	+	+	+	+	+	-	-
CB-3	+	+	+	+	+	+	-	-
GA-1	+	+	+	+	-	-	-	-
GA-2	+	+	+	+	-	-	-	-
GA-3	+	+	+	+	-	-	-	-
Ar-1	-	-	-	-	-	-	-	-
Ar-2	+	+	+	+	+	+	-	-
Ar-3	+	-	-	-	-	-	-	-
Ar-4	+	+	+	+	-	-	-	-
Ar-5	-	-	-	-	-	-	-	-
Ar-6	-	-	-	-	-	-	-	-
Ar-7	-	-	-	-	-	-	-	-
CG-1	-	-	-	-	-	-	-	-
CE-1	-	-	-	-	-	-	-	-
CI-1	-	-	-	-	-	-	-	-
KA	+	+	+	+	-	-	-	-

* +: agglutinate, ** -: no agglutinate.

成されなかった。

次に、エロモナス病の病魚由来のCA1およびCB1株のホルマリン死菌抗血清に対して、凝集性を示した菌株について、凝集素吸収試験を行い、抗原構造の相似性を分析した。その結果、Table 14に示すように、CA1株のウサギ抗血清をCA1, CA2, CA3株で吸収した血清は、CA1, CA2, CA3, CB1~3, GA1~3およびAr2株の生菌抗原に対して、凝集性を示さなかった。しかし、同じ抗血清をCB1~3株で吸収した血清は、いずれもCA1~3株の生菌抗原に対して320倍の凝集素価を示し、Ar2株に対しては640倍の価を示した。CB1~3およびGA1~3株の生菌抗原に対しては、凝集性が認められなかった。

また、CB1株のウサギ抗血清をCB1~3株で吸収した血清は、CB1, CB2, CB3, CA1~3, GA1~3, Ar2およびAr4株の生菌抗原に対して凝集性を示さなかった。しかし、同じ抗血清をCA1~3株で吸収した血清は、い

ずれもCB1~3, GA1~3およびAr2株の生菌抗原に対して80~320倍の凝集素価を示した。GA1~3株で吸収した血清はCA1~3, CB1~3およびAr2株に対して凝集性を示した。Ar2株で吸収した血清はCA1~3株とは凝集しなかったが、CB1~3, GA1~3およびAr4株に対しては、凝集性が認められた。

第3節 原因菌の分類学的位置に関する考察

原因菌の形態学的、生物学的ならびに生化学的性状をBergey's Manual of Determinative Bacteriology, 第8版(1974)およびCOWAN and STEEL's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 第2版(1981)などの記載と比較した結果、分類学上の位置としては、いずれの原因菌も *Aeromonas* 属に同定するのが最も妥当であると思われる。すなわち、Bergey's manual 第8版では、*Aeromonas* 属を次のように定義している。グラム陰性の先端がまるい

Table 14. Absorption test of agglutinin in the antiserum against the formalin-killed cells of *A. hydrophila* strains CA-1 and CB-1

Antiserum	Absorbing strain	Agglutinin										
		CA-1	CA-2	CA-3	CB-1	CB-2	CB-3	GA-1	GA-2	GA-3	Ar-2	Ar-4
CA-1	CA-1	—	**	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	CA-2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	CA-3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	CB-1	320	*	320	320	—	—	—	—	—	—	640
	CB-2	320	320	320	—	—	—	—	—	—	—	640
	CB-3	320	320	320	—	—	—	—	—	—	—	640
	GA-1	320	320	320	160	160	160	—	—	—	—	640
	GA-2	320	320	320	160	160	160	—	—	—	—	640
	GA-3	320	320	320	160	160	160	—	—	—	—	640
	Ar-2	320	320	320	—	—	—	—	—	—	—	—
	non	2,560	2,560	2,560	160	160	160	640	640	640	640	640
CB-1	CA-1	—	—	—	160	160	160	80	80	80	320	—
	CA-2	—	—	—	160	160	160	80	80	80	320	—
	CA-3	—	—	—	160	160	160	80	80	80	320	—
	CB-1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	CB-2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	CB-3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	GA-1	80	80	80	640	640	640	—	—	—	160	—
	GA-2	80	80	80	640	640	640	—	—	—	160	—
	GA-3	80	80	80	640	640	640	—	—	—	160	—
	Ar-2	—	—	—	640	640	640	40	40	40	—	320
	Ar-4	—	—	—	640	640	640	—	—	—	320	—
non	160	160	160	1,280	1,280	1,280	320	320	320	1,280	320	

* agglutinin titer (1:), ** no agglutinate.

桿菌で、通常端在性の単鞭毛をもち運動性を有するが、運動性のないものもある。炭水化物を分解し、酸または酸とガスとを産生する。本属の数種の菌はブドウ糖からアセトインを産生し、窒素源としてのアンモニアと、炭素源としてのブドウ糖、アルギニン、アスパラギンまたはヒスチジンを含む培地に発育する。炭水化物のうち、ブドウ糖、果糖、麦芽糖、トレハロースを分解し、アドニット、ズルシット、イノシット、イヌリン、メレジトース、ソルボース、キシロースを発酵的に分解しない。でん粉、デキストリン、グリセリン、カゼインを加水分解し、ゼラチンを液化する。チトクロムオキシダーゼ、オキシダーゼおよびカタラーゼを産生する。

また、COWAN and STEEL's manual 第2版では、*Aeromo-*

nas 属を次のように定義している。グラム陰性の桿菌で運動性がある。好気性および通性嫌気性で、カタラーゼおよびオキシダーゼを産生する。糖を発酵的に分解し、ガスを産生するものがある。アルギニンを分解する。本病の原因菌は、上記の Bergey's manual 第8版および COWAN and STEEL's manual 第2版に記載された *Aeromonas* 属の定義を完全に満足した。

Aeromonas 属の種の分け方については、過去に多くの論議がなされた。EDDY (1960) は *Aeromonas* 属のうち、運動性を有する菌を2つに分け、VP反応陽性、炭水化物からガスを産生するものを *A. liquefaciens* とし、両方の性状が陰性の菌を *A. formicans* にすることを提案した。そして、*A. liquefaciens* に同定すべき菌はグルコン酸塩を酸化

し、溶血性をもつものが多いが、*A. formicans* はこれらの性質をもたないと述べている。これに対して EWING ら (1961) は、VP 反応と炭水化物からのガス産生性の性状の違いだけで種を分けるのは適当でないとし、*A. formicans* を *A. hydrophila* の生物型の一つにすべきであると主張した。その後 EDDY ら (1964) も、数値分類を試みた結果からの判断として、EWING らの見解に同意している。

また、SCHUBERT (1960~1968) は *Aeromonas* 属に関する一連の報告の中で、次に示す提案をしている。すなわち、

菌のもつ 2, 3-ブタンジオール脱水素酵素を重視し、本酵素をもつ菌を *A. hydrophila* とし、その中でブドウ糖からガスを産生しないものを、その variety として *A. hydrophila* var. *anaerogenes* とした。そして、2, 3-ブタンジオール脱水素酵素をもたないものを *A. punctata* とし、その中でブドウ糖からガスを産生しないものを、その variety として *A. punctata* var. *caviae* とした。さらに SCHUBERT は、*A. liquefaciens* は名称の適用に疑問があり、承認しえない菌種であるとし、その分類群と名称は除くべ

Table 15. Comparison in general characteristics of genus *Aeromonas* described by Bergey's manual, 8th ed.

Characteristics	Present strains	<i>A. hydrophila</i> subsp.			<i>A. punctata</i> subsp.		<i>A. salmonicida</i> subsp.		
		<i>hydrophila</i>	<i>anaerogenes</i>	<i>proteolytica</i>	<i>punctata</i>	<i>caviae</i>	<i>salmonicida</i>	<i>achromogenes</i>	<i>masoucida</i>
Growth in nutrient broth at 37 °C (water bath)	+	+ ^a	+	+	+	+	-	-	-
Brown pigment (water-soluble) on trypticase-yeast agar	-	-	-	-	-	-	+	- ^b	- ^b
Ammonium ion and glucose as sole source of nitrogen and carbon	+	+ ^c	+ ^c	+	+	+ ^c	-	-	-
Amino acids as sole source of carbon	%								
L - Arginine	+(95.8)	+	+	+	+	+	-	-	-
L - Asparagine	+(95.8)	+	+	+	+	+	-	-	-
L - Histidine	+	+	+	+	+	+	-	-	-
L - Glutamic acid	+	+	+ ^c	+	+	+	-	-	-
L - Serine	+(83.3)	+ ^c	d	+	+	+	-	-	-
L - Alanine	N. T.	d	d	+	d	+	-	-	-
Growth in nutrient broth containing 7.5 % NaCl	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Butanediol dehydrogenase	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Production of Gas from glycerol	+(81.9)	+	-	-	-	-	+	-	+
Gas from glucose	+(83.3)	+	-	-	+	-	+	-	+
Indole in tryptone broth containing 0.1 % tryptophan	+	SIM	+ ^c	+ ^c	+	+	+	-	+
Hydrogen sulfide from 2.5 % peptone water	+(95.8)	SIM	+	+	-	+	+	-	-
KCN broth (Møller technique)	+(95.8)	+	+	+	+	+	-	- ^b	-
Lysine decarboxylase reaction (Møller technique)	-	-	-	+	-	-	-	-	+
		biotypes							
		1	2						
Voges-Proskauer reaction	+(95.8)	+ -	+ -	+	-	-	-	-	+
Gluconate oxidase test	+(86.1)	+ -	+ -		-	-	-	-	+
Breakdown of Galactose	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Sucrose	+	d	+	-	d	+	-	+	+
Mannitol	+	+	+	+	d	+	+	-	+
Arabinose	+(73.6)	d	+	-	d	+	+	-	+
Esculin	+(76.4)	d	d	-	d	+	+	-	+

a + = positive; - = negative; d = some strains positive, some negative.

b May be a delayed positive reaction.

c Aberrant strains occur. N. T. = Not tested.

きであると述べて、*A. hydrophila*がこの菌属の type speciesとして認められるべきであるとした。SCHUBERTのこれらの提案は、Bergey's manual 第8版に活かされている。

本病の原因菌72株の性状をSCHUBERTの提案、すなわちBergey's manual 第8版に記載されている *Aeromonas* 属の各種と比較した結果を Table 15 に示した。すべての原因

菌は37°Cで発育し、褐色色素産生性および7.5%食塩含有培地発育性がいずれも陰性で、2, 3-ブタンジオール脱水素酵素を産生する。したがって、Bergey's manual 第8版の定義にしたがえば、唯一の炭素源としてのアミノ酸利用性などに多少の疑問が残る株も存在するが、原因菌は *A. hydrophila* に同定するのが妥当と思われる。

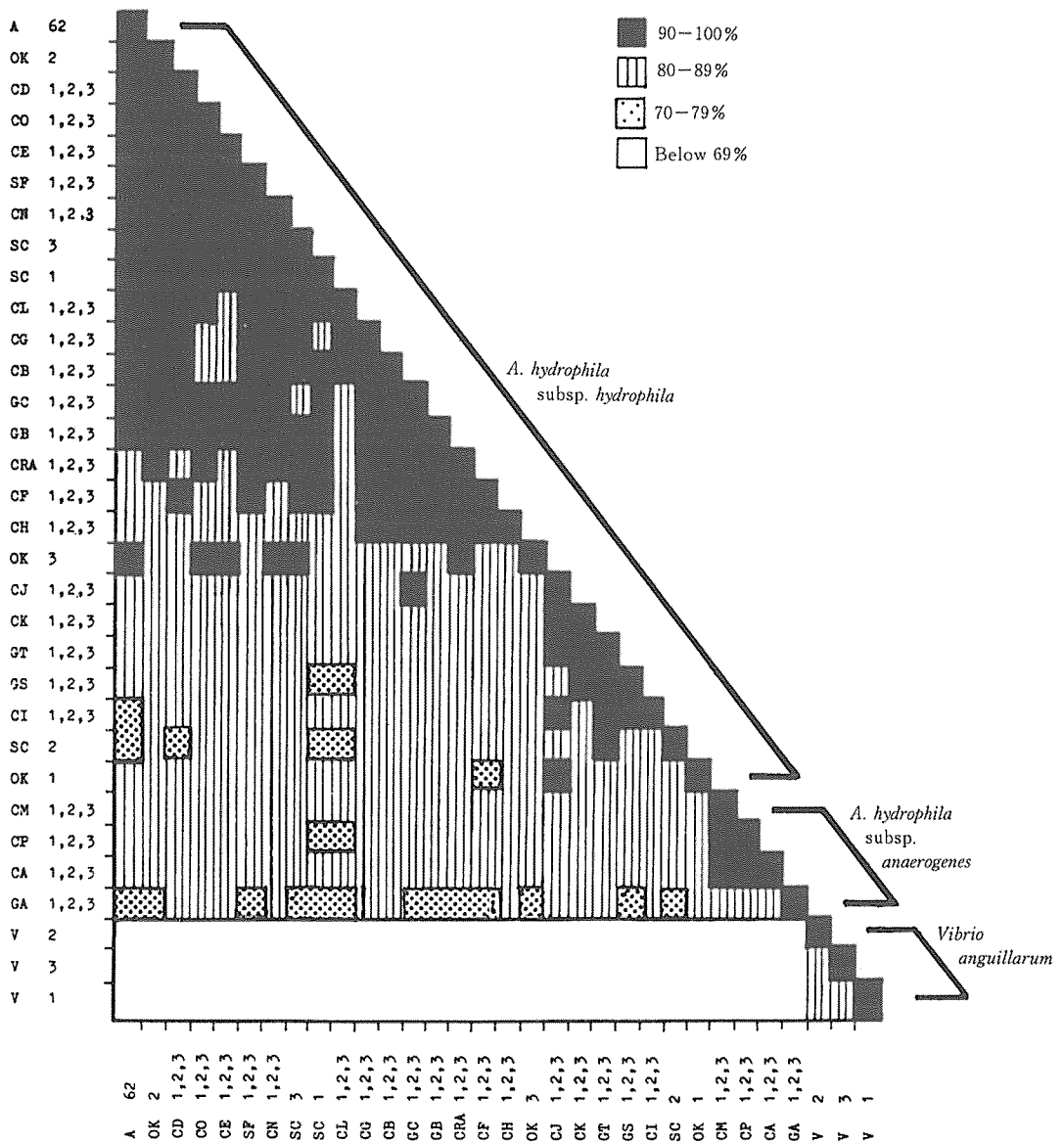


Fig. 1. Shaded S-value matrix of 76 strains studied.

次に、原因菌の亜種の論議に先立ち、病魚からの分離菌72株について、数値分類法に基づく分析の結果を Fig. 1 に示した。原因菌はその性状の相似度によって、大きく三つに分けられた。すなわち、EGUSA and NISHIKAWA (1965) が鱈赤病のウナギから分離した *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* UT62 (本菌は当初、*A. liquefaciens* として報告された) と最も類似性の高い、OK 2 から CH 1~3 株までの42株 (グループ I と仮称) と、これらのグループと比較的類似の性質をもつ OK 3 から OK 1 株までの18株 (グループ II)、さらにグループ I と類似性の低い残りの12株 (グループ III) とである。グループ I および II は、いずれもブドウ糖ならびにグリセリンからガスを産生し、VP 反応が陽性であることから、Bergey's manual 第8版の定義にしたがえば、*A. hydrophila* subsp. *hydrophila* に同定すべきであると考えられる。グループ III は、ブドウ糖ならびにグリセリンからガスを産生しないことから、*A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* に包括するのが妥当と思われる。

一方、POPOFF and VÉRON (1976) は数値分類法によって、運動性 *Aeromonas* を *A. hydrophila* と *A. sobria* の2種に分類し、さらに前者の性状のうち、エラスターゼ産生性、ブドウ糖からのアセトインならびにガス産生性、および硫化水素産生性 (Gélose G.C.F.) がいずれも陽性のものを生物型 *hydrophila* に、陰性の菌を生物型 *anaerogenes* に分けた。

原因菌の性状を POPOFF and VÉRON の報告と比較した結果、グループ I は彼らの述べた生物型 *hydrophila* と完全に一致し、グループ III は生物型 *anaerogenes* に極めて近く、グループ II は生物型 *hydrophila* に近似の中間型に位置した。したがって、POPOFF and VÉRON の分類基準にしたがうと、原因菌のうちグループ I および II が *A. hydrophila* biovar. (生物型) *hydrophila* に、グループ III が *A. hydrophila* biovar. *anaerogenes* に同定されうると考える。しかし、運動性 *Aeromonas* の分類に関しては、上記の種々の説に対して異論を唱えた報告もある。McCARTHY (1975) は、*punctata* が最も古くに公表された種名であることから、本種名が *hydrophila* に優先するとしている。

運動性 *Aeromonas* の種名については、必ずしも結論が得られているとはいえないが、現段階における、本病の原因菌の分類学的位置としては、Bergey's manual 第8版の基準にしたがって、数値分類に基づくグループ I および II (83.3%) を *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* に、またグループ III (16.7%) を *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* に同定するのが妥当と思われる。

次に、本病の原因菌の血清学的特異性について考察する。本病の原因菌 CA 1 および CB 1 株のホルマリン死菌ウサギ抗血清は、本病由来の CA 1~3、CB 1~3 および GA 1~3 株に対して凝集素を形成したほか、現在の分類 (Bergey's manual 第8版) では *A. hydrophila* に同定すべき Ar 2 および Ar 4 株に対しても比較的高い凝集価を示した。しかし、本病の病魚由来の CG 1、CE1 株に対して凝集しなかったのははじめ、Ar 1 株 (*A. hydrophila*) に対しても凝集しなかった。また、Ar 5 (*A. salmonicida*)、Ar 6 (*A. salmonicida* および Ar 7 株 (*A. salmonicida* subsp. *masoucida*) に対する凝集性は認められなかった。さらに、凝集素吸収試験によって、抗原構造を分析した結果、本病の同一病魚から分離した菌株は血清学的に同型であることが明らかになった。しかし、異なった病魚からの菌株間および Ar 2、Ar 4 株とは抗原構造が異なることが判明した。

A. hydrophila (*A. punctata*, *A. liquefaciens*) が血清学的に多様であることは、清水・江草 (1968) がウナギ、川津 (1970) がアユからの分離菌株で確認しているほか、EDDY (1960) および SCHÄPERCLAUS (1930) も認めている。コイ科魚類のエロモナス病から分離される *A. hydrophila* は、本病以外からの分離株と同様に、血清学的に多型であることが明らかになった。したがって、清水・江草 (1968) がウナギのワタカブリ病について述べているように、本病においても血清学的診断ならびに菌の同定は容易ではないと思われる。今後、多くの菌株について、易熱性抗原ならびに耐熱性抗原の構造をしらべるとともに、沈降素の特異性についても検討する必要があると考える。

第4節 健康魚の腸管内ならびに飼育水中における原因菌の分布

運動性の *Aeromonas* が淡水魚の腸管内および飼育水中に常在することは、すでに知られている。しかし、コイ科魚類に病原性を示す菌、すなわち本病の原因菌となりうる細菌が、どの程度それらに常在しているのかについては明らかにされていない。

そこで、健康なマゴイの腸管内ならびに養鯉池水における、病原性 *Aeromonas* の分布について、季節的に調査した。

材料および方法

調査は1981年6月から翌年10月まで、2カ月ごとに9回、水産大学校内の養鯉池〔2×1×1 (深さ) m; 4池、7×

7×1.5(深さ)m;1池]と同校小野実習場の養鯉池[6×8×0.8(深さ)m;5池,1981年6月および10月の2回調査]の計10池を対象にして行った。

供試飼育水は、各池の表層水を滅菌コルベンに採水し、生理食塩水で10倍稀釈系列を作製し、その0.1mlを普通寒天培地(日水)平板上に塗抹した。

供試魚は水産大学校内の上記養鯉池のうち、二つで飼育されているマゴイ(平均体重210g)を対象にした。毎回、1池3尾ずつ計6尾の腸管(上部と下部)各1gを採材し、9mlの滅菌生理食塩水中でホモジナイズしたのち、10倍稀釈系列を作製し、その0.1mlを普通寒天培地平板上に塗抹した。

飼育水および腸管ともに、25℃、3日間培養後、出現したコロニー数を計測し菌数を求めた。また、コロニーを釣菌し常法によってその性状を調べ、Bergey's manual 第8版(1974)およびCowan and Steel's manual 第2版(1974)に基づいて属を決定した。そして、総菌数と*Aeromonas*属細菌数および総菌数に対する*Aeromonas*属細菌数の出現頻度を求めた。また、飼育水については、水温とpH(ガラス電極pHメーター、東海電子工業)を調べた。

分離された*Aeromonas*属細菌の病原性については、二つの養鯉池の飼育水および、そのマゴイからの分離菌を、調査日ごとにそれぞれ3~4株無作為に選び、飼育水からの54株、マゴイからの53株、合計107株を対象にした。各分離菌は普通寒天培地斜面に25℃で、20時間培養したのち、滅菌生理食塩水に懸濁させた。そして、健康なニシキゴイ(平均体重23g)の体重10gあたり約 10^8 細胞の生菌数となるように腹腔内接種した。病原性の有無の判定は、各群5尾の供試魚が菌接種後1週間以内に全数斃死した場合を強毒株(十)、10日以内に一部が斃死するか、または何らかの症状が発現した場合を弱毒株(十)、10日以内にまったく異常が認められない場合を無毒株(一)とした。

結 果

養鯉池水および健康なマゴイの腸管内における、総菌数と*Aeromonas*の菌数および総菌数に対する*Aeromonas*菌数の出現比率をFig. 2に示した。池水中および腸管内の総菌数は、いずれも夏季に多く、冬季に少ない傾向がみられた。*Aeromonas*の菌数は池水および腸管ともに、総菌数とはほぼ同様の季節的消長を示したが、夏季から秋季にかけて多く、この傾向は腸管内で特に顕著であった。一方、総菌数に対する*Aeromonas*菌数の比率は、池水中では冬季

に高く、腸管内では秋季と春季に高い傾向が認められた。

次に、池水中および腸管内から分離した*Aeromonas*属細菌の、ニシキゴイに対する病原性確認試験の結果をTable 16に示した。分離菌はニシキゴイに対する病原性の強弱によって、強毒、弱毒および無毒株に大別されたが、病原性を有する株が特定の季節に特に多く出現する傾向は、池水ならびに腸管ともに認められなかった。病原性の強弱別の出現頻度は、池水中において強毒株が5.6%、弱毒株が35.2%、無毒株が59.3%であったのに対し、腸管内では強毒株から順に9.4%、45.3%、45.3%で、病原性を有する株の出現頻度が池水中よりも、やや高い傾向が認められた。

考 察

若林ら(1976)は養鯉池水中における、一般細菌の菌数を調べ、腸内細菌群は高水温期に優勢で、低水温期に少なく、*Aeromonas*菌群は逆に低水温期に優勢で、高水温期には少なく、両者の間に相補的な関係が認められたとしている。著者の本調査においても冬季(12~2月)には、総菌数に対する*Aeromonas*の出現頻度が明らかに高い傾向が認められ、若林らの結果と一致した。したがって、運動性の*Aeromonas*は飼育されている魚種と、それに係る餌料残渣や排泄物などの環境要因に対して、さほど影響をうけずに、通常の淡水中ならば、同様の季節的消長を示すものと推察される。

一方、腸内細菌叢としての*Aeromonas*の動態について反町・江草(1971)は、ウナギの腸管内における季節的変化を調べ、春先に多く冬には認められなかったと述べている。また、金井ら(1977)は健康なウナギの腸内細菌叢のうち、*Aeromonas*は冬に多く、夏と秋に少ないとし、反町・江草の報告と逆の結果を得ている。著者のマゴイにおける調査では、春(4月)と秋(10月)に*Aeromonas*が多い傾向が認められた。この結果は、本病が春と秋に比較的多く発生する事実と併せ考えると興味深い。

また、養鯉池水に存在する*Aeromonas*の中で、魚類に対して病原性を示す株が少ないことは、若林ら(1976)が養鯉池水からの分離株について明らかにしている。金井ら(1977)は、鱈赤病のウナギが存在する池の健康ウナギからは、病原性の強い菌株が比較的多く分離されるが、そうでない池の健康ウナギでは強毒株は少ないことを明らかにしている。著者の調査結果においても、養鯉池水および健康なマゴイからは、少数の強毒株が分離されたにすぎなかった。しかし、池水中の*Aeromonas*のうち、強毒株が

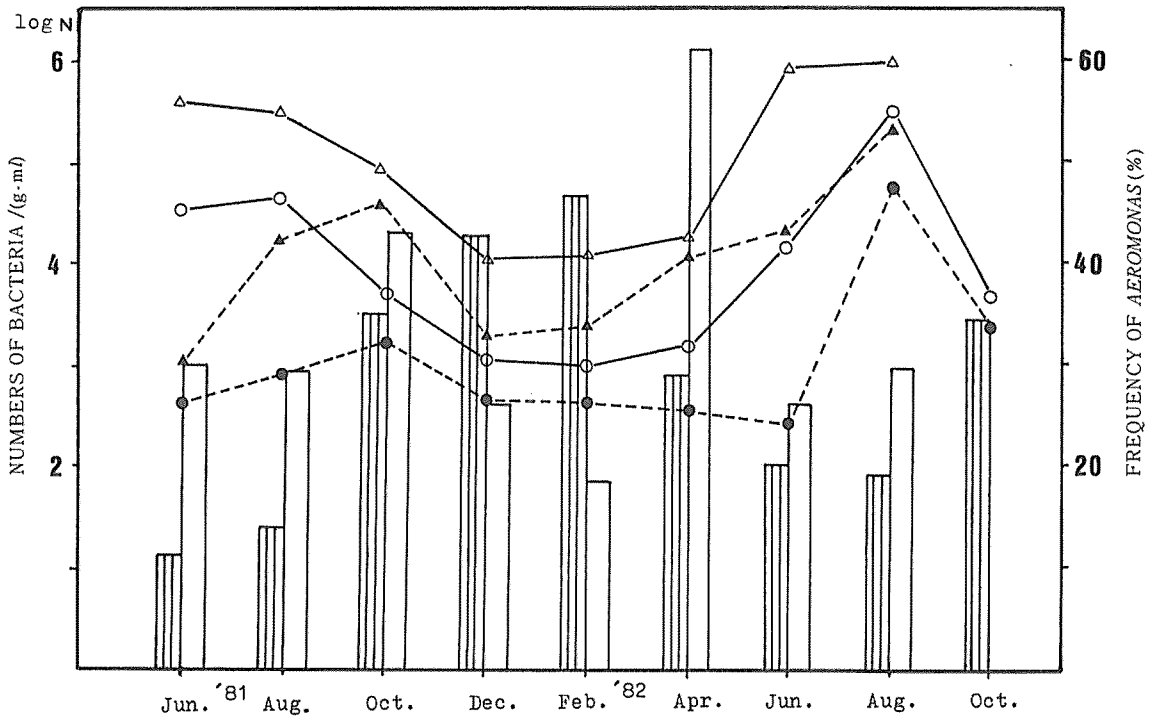


Fig. 2. Seasonal change in numbers of *Aeromonas* in the carp culturing pond water and intestines of healthy carp. ○—○ The total number of bacteria in the pond water, ●··● Number of *Aeromonas* in the pond water, △—△ The total number of the intestinal bacteria, ▲··▲ Number of *Aeromonas* in the intestines of carp, ▤ Frequency of *Aeromonas* in the total bacteria of the pond water, □ Frequency of *Aeromonas* in the intestinal microflora of carp.

5.6%, 弱毒株が35.2%, また健康マゴイの腸管内 *Aeromonas* のうち, 強毒株が9.4%, 弱毒株が45.3%存在した事実と, これらの株を接種したニシキゴイに, 本病の典型的症状が発現する事実とから, これらの病原性保有株が本病の原因になりうる細菌であることは, 疑いないと思われる。

第5節 原因菌の生化学的性状と病原性との関係

前節で述べたように, 養鯉池水およびマゴイの腸管内に存在する運動性 *Aeromonas* のうち, 約50%はコイ科魚類に対して病原性をもたない株である。また, すでに明らかにしたごとく, 本病の原因菌自体も血清学的に多様であり, 病魚からの分離株が本病の原因菌であるか否かの判断に, 血清学的診断法を用いることは困難である。

そこで, 分離菌のもつ多くの性質を調べたり, 再現性試験を実施することなく, 比較的迅速に菌種と病原性の有無とを推定することを目的に, 病魚, 健康魚および養鯉池水から分離された運動性 *Aeromonas* について, その生化学的性状と病原性ならびに菌種との関連性を検討した。

材料および方法

供試菌株 病魚からの菌株は, 本章第2節で用いた72株を, 健康魚および養鯉池水からの菌株として, 本章第4節で用いたそれぞれ53株, 54株の計179株を供試した。

生化学的性状検査 本章第2節に記載した方法にしたがって, チトクロムオキシダーゼおよびカタラーゼ産生性, OF試験, 2, 3-ブタンジオールからのアセトイン産生性, VP反応, ブドウ糖からのガス産生性およびリジ

Table 16. Pathogenicity of *Aeromonas* strains isolated from intestine of fish or pond water

Date of isolation	Pond	No. of isolates	Pathogenicity			No. of carp	No. of isolates	Pathogenicity		
			†	+	-			†	+	-
Jun. '81	B	3	0*	1	2	3	3	0	2	1
	C	3	1	1	1	4	4	0	2	2
Aug. '81	B	3	0	2	1	4	4	0	1	3
	C	3	0	0	3	3	3	0	1	2
Oct. '81	B	3	0	1	2	3	3	1	2	0
	C	3	0	2	1	4	4	0	2	2
Dec. '81	B	3	0	2	1	4	4	1	1	2
	C	3	0	1	2	3	3	0	1	2
Feb. '82	B	3	0	0	3	3	3	0	2	1
	C	3	1	0	2	3	3	1	1	1
Apr. '82	B	3	1	2	0	4	4	1	2	1
	C	3	0	1	2	3	3	0	2	1
Jan. '82	B	3	0	1	2	3	3	0	2	1
	C	3	0	1	2	3	3	0	1	2
Aug. '82	B	3	0	1	2	3	3	0	1	2
	C	3	0	1	2	3	3	1	1	1
Oct. '82	B	3	0	1	2					
	C	3	0	1	2					
Total	B	27	1	11	15	27	27	3	13	11
		(100%)	(3.7)	(40.7)	(55.6)		(100%)	(11.1)	(48.2)	(40.7)
Total	C	27	2	8	17	26	26	2	11	13
		(100%)	(7.4)	(29.6)	(63.0)		(100%)	(7.7)	(42.3)	(50.0)
Total	B,C	54	3	19	32	53	53	5	24	24
		(100%)	(5.6)	(35.2)	(59.3)		(100%)	(9.4)	(45.3)	(45.3)

†: All fishes were died within a week after inoculation.

+: All or partial fishes were attacked with a disease within 10 days.

-: All fishes were not attacked with a disease within 10 days.

*: Numbers of isolates.

ン脱炭酸性を調べた。また、皮粉の消化能については、1%の皮粉と1.5%の寒天を加えた溶液を滅菌後、その7mlをシャーレに入れ、固まったのちに直径8mmのステンレス円筒を置いて、さらに溶液13mlを流し込み、固まったのちに円筒を取りさった。平板中の小穴に各菌株のブイヨン、25℃、48時間培養の濾液(10,000rpm、30分の遠心分離後の上清を0.45μmのミリポアフィルターで濾過)、0.1mlを注いだ。25℃で、48時間放置後、平板中にできた透明帯の直径を計測した。

菌株の病原性 本章第4節に記載した方法によって、菌株の病原性の有無および強弱を調べた。

結 果

本病の病魚、健康魚(マゴイ)および養鯉池水からの分離菌の生化学的性状と病原性の関係をTable 17に示した。分離菌株のうち、2、3-ブタンジオール脱水素酵素を産生しない株は、すべて病原性を有さなかった。しかし、健康魚の腸管から分離された株の中には、上記酵素を産生するにもかかわらず、病原性がないものが19.4%存在した。皮粉の消化能の高い株、すなわち48時間以内に15mm以上の透明帯を形成する菌は、すべて病原性を有し、透明帯の大きいものほど病原性が強い傾向が認められた。ブドウ糖か

Table 17. Characteristics and pathogenicity of motile strains of *Aeromonas* isolated from diseased carp, healthy carp and pond water

Source of strains	Characteristics					Numbers of strains	Pathogenicity		
	2.3 -butandiol	High digestive ability to hide powder	VP reaction	Gas from glucose	Elastase		+	+	-
							[pertinent numbers (%)]		
Diseased carp	+	+	+	+	+	42	42(100%)	0	0
	+	+	+	+	-	18	15(83.3)	3(16.7)	0
	+	+	+	-	-	9	3(33.3)	6(66.7)	0
	+	+	-	-	-	3	0	3(100)	0
	Total						72	60(83.3)	12(16.7)
Healthy carp	+	+	+	+	+	5	5(100)	0	0
	+	+	+	+	-	12	0	12(100)	0
	+	+	+	-	-	7	0	7(100)	0
	+	+	-	+	-	5	0	5(100)	0
	+	-	-	-	-	7	0	0	7(100)
	-	-	-	-	-	17	0	0	17(100)
Total						53	5(9.4)	24(45.3)	24(45.3)
Pond water	+	+	+	+	+	3	3(100)	0	0
	+	+	+	+	-	10	0	10(100)	0
	+	+	+	-	-	4	0	4(100)	0
	+	+	-	+	-	5	0	5(100)	0
	-	-	-	+	-	12	0	0	12(100)
	-	-	-	-	-	20	0	0	20(100)
Total						54	3(5.6)	19(35.2)	32(59.3)

卍: All fishes were died within a week after inoculation.
 +: All or partial fishes were attacked with a disease within 10 days.
 -: All fishes were not attacked with a disease within 10 days.

らアセトインを産生する株 (VP反応陽性株) は、病原性を有するものが多いが、健康魚からの VP 反応陰性株の 17.2%には病原性が認められた。ブドウ糖を分解し、ガスを産生する株には病原性を有するものが多いが、健康魚および養鯉池水から分離された株の中には、ガス非産生にもかかわらず、病原性を有するものが20%存在した。また、病魚から分離された CA1~3株は、ガスを産生しないが、極めて強い病原性を有した。また、エラスターゼ産生株はすべて強毒株であった。しかし、病魚からの分離株の中には、エラスターゼ非産生にもかかわらず、強い病原性を有する株が60%存在した。

また、再現性を有する病魚からの分離株および健康魚と養鯉池水からの分離菌のうち病原性をもつ株、すなわち本病の原因菌になりうると思われる菌株の共通性状は下記に示すとおりである。オキシダーゼならびにカタラーゼを

産生し、ブドウ糖を発酵的に分解し、Vibriostatic agent 0/129に感受性をもたない。2, 3-ブタンジオール脱水素酵素を産生し、リジンを脱炭酸しない。また、皮粉消化能が高い。すなわち、48時間以内に幅15mm以上の透明環を形成する。

考 察

運動性 *Aeromonas* の生化学的性状と病原性との関連性についてはいくつかの報告がある。EDDY (1960) は、ブドウ糖からガスおよびアセトインを産生しないものは、病原性がないか、非常に弱いことを指摘している。SCHUBERT (1964) はブドウ糖からガスを産生しないものは、マウスおよびカエルに病原性がなく、ガスを産生してもアセトイン非産生の株には、病原性のないものが多いとしている。著者の成績では、上記の2性質が陰性であった47株のうち、

ニシキゴイに対して病原性を示したものは3株(6.4%)にすぎず、しかもその3株の病原性は比較的弱かった。しかし、ブドウ糖からガスを産生しないもの67株のうち、20株(29.9%)はニシキゴイに対して病原性を示しSCHUBERTの結果と異なった成績が得られた。ただし、病原性を示した20株はすべて、ブドウ糖からアセトインを産生する株であった。また、郭(1972)は淡水魚の病魚、健康魚および養殖池水から分離した運動性 *Aeromonas* 339株について、培養菌をウナギに対して、湿菌量1 mg/100g(魚体重)を筋注し、1週間以内に致死せしめたものを病原性株、接種点に大きな病患部をつくるが、致死せしめることのなかったものを亜病原性株、それらの異常を起こさなかったものを非病原性株として、生化学的性状との関連性を調べている。その結果、2, 3-ブタンジオール脱水素酵素、VP反応およびブドウ糖からのガス産生性の3性状がいずれも陰性の株は、すべて非病原性であり、3性状のうち、2, 3-ブタンジオール脱水素酵素とVP反応が陰性の株の75%が非病原性株であったとしている。また、上記3性状のうち、ブドウ糖からガスを産生しないもの88.9%が非病原性株であり、3性状がすべて陽性の株の66.8%が非病原性株であったことを報告している。著者の成績では、上記の3性状がいずれも陰性の株は、すべて病原性を示さなかった点およびブドウ糖からガスを産生しない株の中にも病原性を有する株が若干存在する点は郭の報告と一致したが、ブドウ糖からガスを産生しても、2, 3-ブタンジオール脱水素酵素およびVP反応がいずれも陰性の株には、すべて病原性がなかった点が異なっていた。

一方、若林(1981)はPOPOFF and VÉRON(1976)の分類基準による *A. hydrophila* biovar. *hydrophila* すなわち、ブドウ糖からガスとアセトインを、システインから硫化水素を産生し、またエラスターゼをも産生するなどの性質を有するものは、ドジョウに対してすべて強病原性株であり、これらの性質をもたない菌のうち、強い病原性を示したものは31.0%であったことを明らかにしている。また、若林は運動性 *Aeromonas* のうち、エラスターゼおよびブドウ球菌溶解酵素を産生するものは、病原性において明らかに他のものとは異なっており、魚病菌として特に注目されると述べている。著者が病魚、健康魚および養殖池水から分離した179株のうち、エラスターゼを産生したものは50株(27.9%)であったが、これらの株はすべて、ニシキゴイに対して強い病原性を有し、若林の報告と一致した結果が得られた。しかし、若林も明らかにしているように、エラスターゼ非産生株の中にも強い病原性を示す株が存在する

一方、エラスターゼ非産生の弱毒株も、本病の原因となりうることから、本性状のみで病原性の有無ならびに原因菌の推定を行うことは危険であると思われる。本試験の結果から、分離菌のコイ科魚類に対する病原性の有無を判定する上で、培養濾液の皮粉消化能が有用であることが明らかになった。すなわち、病原性を有する株はすべて、一定時間内に広範囲の皮粉を消化し、病原性が強い株ほど、その範囲が広いことが認められた。細菌の皮粉消化性を調べた報告はあるが、消化能力について検討した論文はみあたらない。

若林(1981)はエラスターゼを産生する *A. hydrophila* biovar. *hydrophila* について、その培養濾液のタンパク分解能を測定し、本菌がその他の運動性 *Aeromonas* よりも分解能が高いことを明らかにしている。皮粉はケラチン・コラーゲン・エラスチンおよびアルブミンなどで構成される硬タンパク質であることから、著者の皮粉消化能試験は、若林の報告とタンパクの種類は異なるが、同様に、タンパク分解能を調べたことにはかならない。タンパク分解能の高い菌株が、病原性も高いこれらの事実は、おそらく菌の産生するタンパク分解酵素によって、血管壁や各種の組織に損傷がおきるためと推察される。

また、本病から分離される細菌の病原性の推定ならびに種の同定に必要な検査としては、Fig. 3に示す方法が妥当と思われる。

第6節 要約

(1) 1968年10月から1982年4月にかけて、1都8県で発病したマゴイ、ニシキゴイ、キンギョ、フナならびにコマツカについて、細菌検査を行ったところ、いずれの個体からも細菌が純培養状に分離された。分離菌72株を用いて再現性試験を実施した結果、分離菌を接種した魚は自然発病魚と同様の症状を呈して斃死した。また、斃死魚の心臓ならびに腎臓からは、接種菌と同一性状を示す細菌が再分離された。したがって、これらの分離菌はいずれも、本病の原因菌と考えてさしつかえないものと思われた。

(2) 原因菌72株について、その形態学的、生物学的ならびに生化学的性状を調べ、Bergey's manual 第8版、Cowan and STEEL's manual 第2版、EDDY およびSCHUBERTの記載などと比較した結果、原因菌の83.3%を *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* に、残りの株を *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* に同定するのが妥当と考えられた。

また、原因菌の血清学的性状を調べた結果、血清学的に多様であることが判明したので、本病の血清学的手法に基

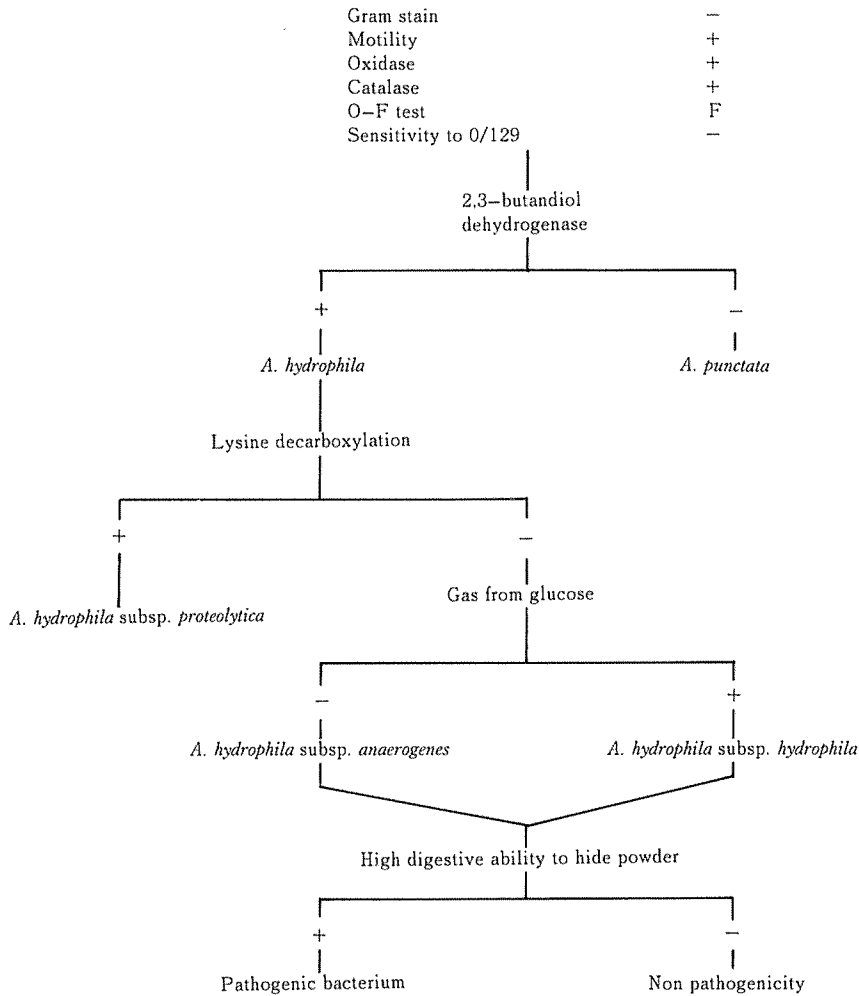


Fig. 3. Diagnostic scheme for rapid identification of organisms isolated from Aeromonas disease of cyprinids.

づく診断は困難であると思われた。

(3) 健康魚の腸管内ならびに飼育水中における、本病の原因となりうる細菌の分布について調査した結果、コイ科魚類にきわめて強い病原性を示す菌株は、腸管内の *Aeromonas* 属菌株の9.4%、飼育水中の株の5.6%であり、やや弱い病原性を示す菌株は腸管内に45.3%、飼育水中で35.2%を占めることが明らかになった。

(4) 本病からの分離株の、菌種と病原性の有無とを迅速に推定する方法を知るために、病魚、健康魚および養鯉池

水から分離された運動性 *Aeromonas* を用い、その生化学的性状と病原性との関連性を調べた。その結果、グラム陰性で運動性があり、オキシダーゼおよびカタラーゼを産生し、ブドウ糖を発酵的に分解する菌で、Vibriostatic agent O/129に感受性をもたず、2, 3-ブタンジオール脱水素酵素を産生するが、リジンを脱炭酸しないものうち、皮粉の消化能の高い株が本病の原因菌である可能性が高いと考えられた。

第4章 感染機構に関する研究

第1節 ストレス負荷条件下のコイの各組織における *Aeromonas* の動態

前章において、本病の原因になりうる病原性 *Aeromonas* は、健康魚の腸管内や飼育水中に常在していることが明らかになった。しかし、条件性の病原体である *Aeromonas* が、コイ科魚類の生体内外にいかなる変化が生じた時に、感染を引き起こすのかについては不明である。

一方、魚類の細菌感染における感染門戸部位については、皮膚、鰓ならびに腸管などが知られており（舟橋ら：1974, RUCKERら：1954, 松里：1980, KUSUDA and KIMURA：1978）、感染・発病誘因としては、水温ならびに過密ストレスなどが明らかにされている（FUJIHARAら：1971, HOLTら：1975, HUNTER and FRYER：1980, MAHONEYら：1973, BULLOCK：1972）。

そこで、本病の感染成立前の感染門戸部位には種々の誘因によって、*Aeromonas* が付着・増殖しやすい状態が生じるのではないかと考え、その可能性の有無を検討した。すなわち、給餌または絶食条件下のコイに、水温上昇および下降を刺激として与え、飼育水と腸管内に存在する *Aeromonas* およびその他の細菌の、感染門戸となりうると考えられる部位への付着・増殖菌数を調べた。

材料および方法

実験Ⅰは給餌条件下で水温変化させた系であり、実験Ⅱは絶食条件下で水温変化させた系である。

供試魚 実験Ⅰではマゴイ（平均体重220g）24尾を隣接する屋内コンクリート水槽〔2×1×1（深さ）m〕3個に分けて収容し、各区とも水量を600lとして、毎分350～450mlの注・排水を行った。実験Ⅱではマゴイ（平均体重185g）20尾を上記水槽2個に分けて収容し、水量および注・排水量は実験Ⅰに準じた。なお、実験Ⅰ、Ⅱともに、コイを2週間馴致飼育したのち供試した。

水温変化の操作 実験ⅠのA、B区には、500Wのチタン製ヒーター2本と200Wの石英管ヒーター2本を用い、1日のうち12時間かけて水温を25.5±1℃から31.5±1℃へ、平均6℃上昇させた。その後12時間は冷却装置（東洋製作所、LABCOOL、LC-250E）を用いて冷却槽の水を冷却し、水槽内に設置したビニールホース内を冷却水が流れることによって、水温を平均6℃下降させた。上記の操作を

3週間継続した。対照群（C区）は常時24±1℃で飼育した。実験Ⅱの試験群（D区）は同様に、12時間かけて20±0.5℃から28±0.5℃へ、平均8℃上昇させたのち、12時間で8℃下降させる操作を2週間継続した。対照群（E区）は常時20±0.5℃で飼育した。

供試飼料と給餌方法 実験ⅠのA、C区には、1日に魚体重の1%の割合で市販のマゴイ成魚用飼料（林兼産業）を、B区には本飼料に100mg/kg（魚体重）/日相当のバンテチン〔(C₂₂H₄₂N₄O₈S₂), 第一製薬〕を添加し、各区とも採材当日を除き毎日投与した。実験Ⅱは試験開始前3週間と試験期間中の2週間は絶食させた。

飼育水の諸検査 実験Ⅰ、Ⅱともに、試験開始前後の回数にわたり、飼育水の溶存酸素量（Winkler法）、pH（ガラス電極pHメーター、東海電子工業）および水中細菌数を1日4回経時的に調べた。

血液性状検査 実験Ⅰについては、供試魚の生理状態を把握する意味で、その指標としての血液諸性状を調べた。供試魚は滅菌蒸留水中に溶解した tricaine methanesulfonate で麻酔したのち、背大動脈から採血した。赤血球数はTHOMAの血球算定盤を用いる常法により、ヘマトクリット値は毛細管法、ヘモグロビン量はヘモメーター（A.O.社）を用いて測定した。

付着・増殖細菌数の測定 実験Ⅰでは試験開始後2および3週間、実験Ⅱは開始前および2週間後に、布製の袋でコイを静かに捕獲し、上記と同様にして麻酔した。その後、ウロコ（5.5×2.5cm²）と皮膚（7.0×2.5cm²）の同部位、同面積および鰓と腸管の同部位をいずれも1g採材した。各組織片を9mlの滅菌生理食塩水中でホモジナイズしたのち、10倍希釈系列を作製し、その0.1mlを普通寒天培地平板上に塗抹して、25℃、72時間培養後、出現したコロニー数を計測し菌数を求めた。また、コロニーを釣菌し常法によってその性状を調べ、Bergey's manual, 第8版およびCOWAN and STEEL's manual, 第2版に基づいて属を決定した。

統計学的検討 血液性状検査および菌数測定の結果については、F検定ならびにt検定によって有意差検定を行った。

バンテチン（パントテン酸）の定量 実験Ⅰの3週間後の供試魚については、実際にバンテチンが摂取されているか否かを確認するために、その血液中濃度をパントテン酸含量として調べた。すなわち、血液をハト肝抽出液およびアルカリホスファターゼで処理したのち、Microbioassay法で定量した。

結 果

血液性状 実験 I における血液性状の変化を Table 18 および Fig. 4 に、その有意差検定の結果を Table 19 に示した。試験開始後 2 週間における赤血球数の平均値は C, B, A 区の順で高く、A-C 区間には有意の差 ($P < 0.05$) が認められた。ヘマトクリット値およびヘモグロビン量の平均値は、いずれも C 区が最も高く、A, B 区はほぼ同等であった。ヘモグロビン量においては、A-C 区間に有意の差 ($P < 0.05$) が認められた。3 週間後には、B 区における全性状に好転の傾向がみられ、いずれも C 区とほぼ同等の値を示したのに対し、A 区では 2 週間後よりもやや悪化した。赤血球数においては、A-B 区間に有意の差 ($P < 0.05$) が認められた。

付着・増殖細菌数 実験 I におけるウロコ (体表)、

皮膚、鰓および腸管に付着または増殖した総細菌数を Table 20 および Fig. 5 に、その有意差検定の結果を Table 21 に示した。2 週間後における各部位の付着・増殖総細菌数は A, B 区にくらべて C 区が少ない傾向がみられ、中でも皮膚の付着総細菌数は有意に少なかった ($P < 0.1$)。3 週間後には B 区における付着・増殖総細菌数が、すべての部位で減少する傾向がみられ、C 区とほぼ同等の値を示したのに対し、A 区では増加した部位が多かった。特に B 区の皮膚および鰓における付着総細菌数の減少傾向は著しく、A-B 区間にはいずれも有意の差 ($P < 0.05$) が認められた。また、2, 3 週間後ともに、各区間のウロコおよび腸管の付着・増殖総細菌数には有意の差は認められなかった。

一方、出現した細菌は各部位に共通して、*Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* 属が多く、*Pasteurella*, *Enterobacter*, *Flavobacterium* 属などがわずかに存在した。菌群

Table 18. Change with the passage of time in haematological characters of carp exposed to the variations in water temperature

Time elapsed	Group	Number of fish	Erythrocyte counts ($\times 10^4/\text{mm}^3$) (mean \pm S.E.)	Hematocrit value (%) (mean \pm S.E.)	Hemoglobin content (g/100ml) (mean \pm S.E.)
After 2 weeks	A	3	155 \pm 10.7	34.2 \pm 1.02	8.2 \pm 0.09
	B	3	181 \pm 15.0	34.7 \pm 2.85	8.2 \pm 0.44
	C	3	192 \pm 7.7	41.6 \pm 3.37	9.7 \pm 0.45
After 3 weeks	A	5	153 \pm 14.4	32.2 \pm 2.95	7.5 \pm 0.70
	B	5	196 \pm 7.5	39.1 \pm 3.61	9.7 \pm 0.78
	C	5	189 \pm 6.9	40.3 \pm 3.54	9.5 \pm 0.93

Group A; Exposed to the variations in water temperature, B; Exposed to the variations in water temperature and administered pantethine at 100mg/Kg (B.W.) / day, C; control.

Table 19. Test of significance of haematological characters of carp exposed to the variations in water temperature

Haematological characters	After 2 weeks			Group	After 3 weeks		
	A-B	A-C	B-C		A-B	A-C	B-C
Erythrocyte counts	—	0.05 *	—		0.05	0.10	—
Hematocrit value	—	—	—		—	—	—
Hemoglobin content	—	0.05	0.10		0.10	—	—

* Significant $P < 0.05$, $P < 0.10$ (T-Test).

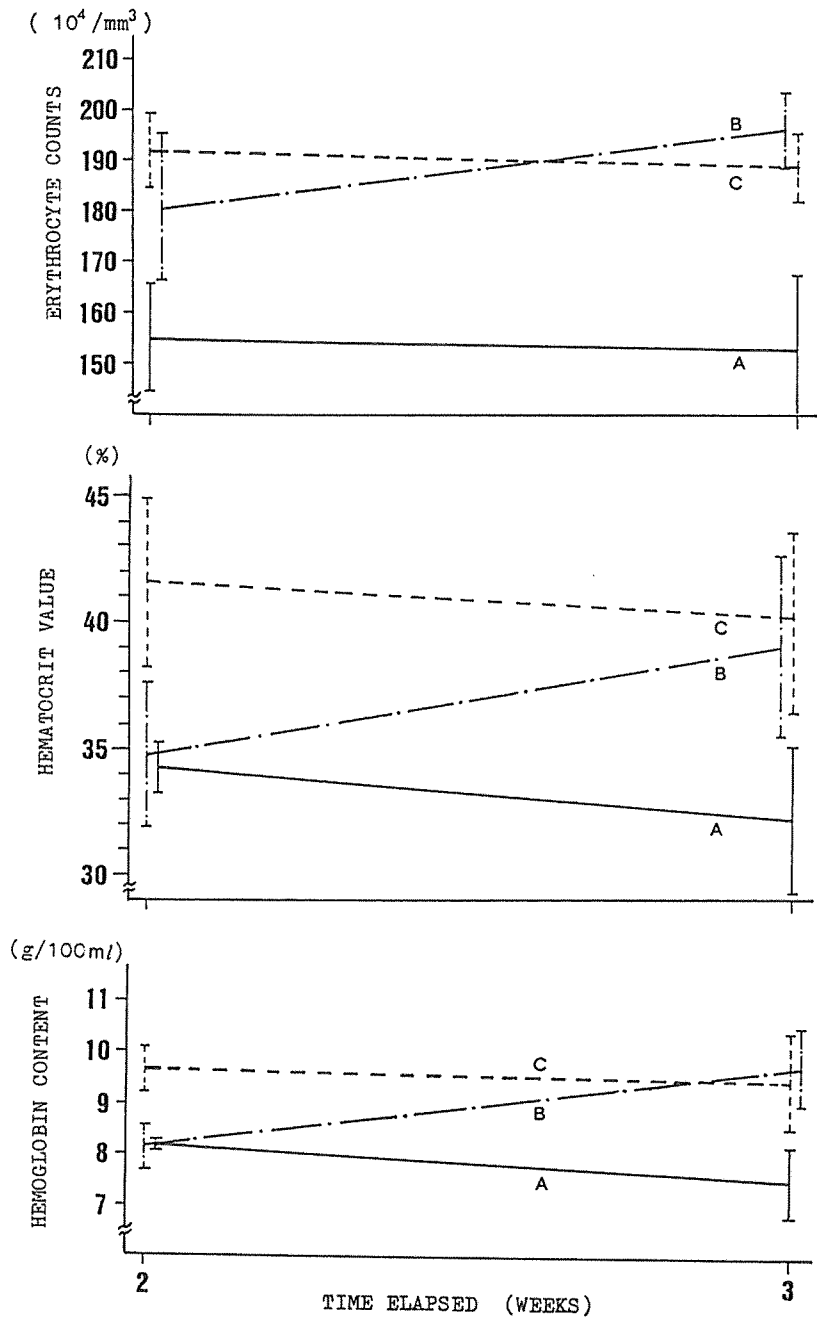


Fig. 4. Change with the passage of time of haematological characters of carp exposed to the variations in water temperature. A ; Exposed to the variations in water temperature, B ; Exposed to the variations in water temperature and administered pantethine at 100mg/kg(B.W.)/day, C ; Control.

Table 20. Numbers of epiphytic bacteria at tissues of carp exposed to the variations in water temperature

(log N/g)

Time elapsed	Group	Number of fish	Scale	Tissues		
				Skin	Gill	Intestine
				(mean ± S.E.)		
After 2 weeks	A	3	4.89 ± 0.35	3.97 ± 0.20	6.23 ± 0.06	6.01 ± 0.01
	B	3	4.43 ± 0.57	4.26 ± 0.14	6.26 ± 0.14	6.19 ± 0.50
	C	3	4.36 ± 0.15	2.93 ± 0.34	6.24 ± 0.17	5.23 ± 0.62
After 3 weeks	A	5	4.38 ± 0.18	3.74 ± 0.32	6.97 ± 0.18	6.33 ± 0.19
	B	5	4.05 ± 0.32	2.59 ± 0.32	5.94 ± 0.27	6.16 ± 0.29
	C	5	4.32 ± 0.30	3.71 ± 0.42	6.22 ± 0.28	6.19 ± 0.44

Group A; Exposed to the variations in water temperature, B; Exposed to the variations in water temperature and administered pantethine at 100mg/Kg(B.W)/day, C; Control.

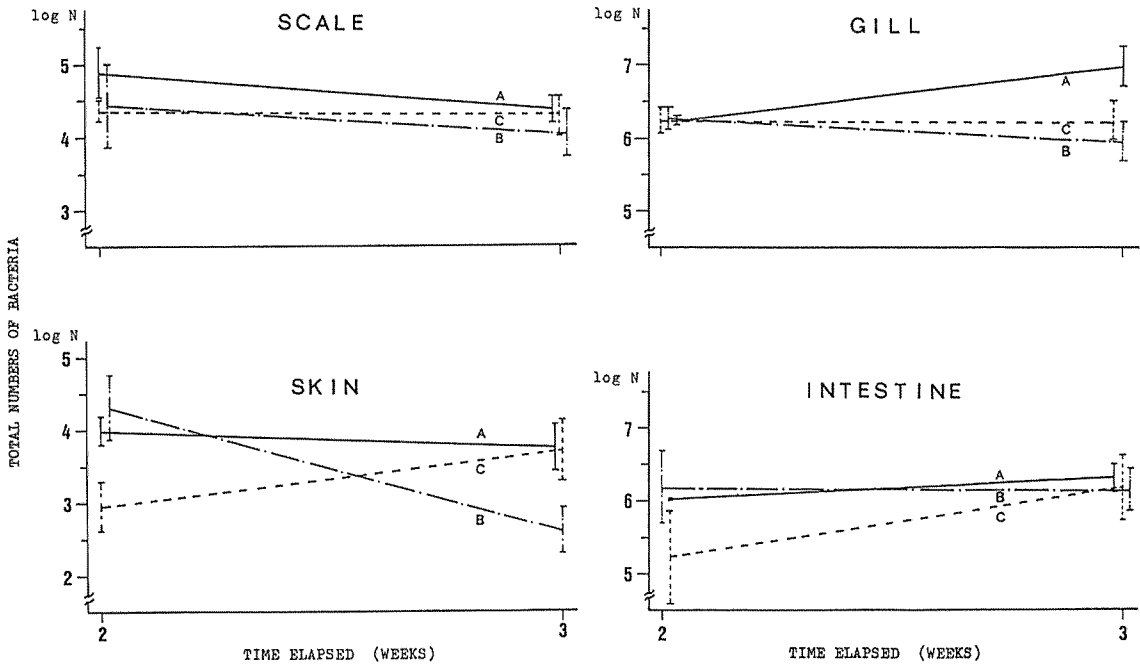


Fig. 5. Change with the passage of time in number of epiphytic bacteria at tissues of carp exposed to the variations in water temperature.

A ; Exposed to the variations in water temperature, B ; Exposed to the variations in water temperature and administered pantethine at 100mg/kg(B.W.)/day, C ; Control.

Table 21. Test of significance of numbers of epiphytic bacteria at tissues of carp exposed to the variations in water temperature

Tissues	After 2 weeks			After 3 weeks			2-3 weeks		
	Group						A	B	C
	A - B	A - C	B - C	A - B	A - C	B - C			
Scale	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Skin	-	0.10*	0.10	0.05	-	0.10	-	0.05	-
Gill	-	-	-	0.05	0.10	-	0.05	-	-
Intestine	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Significant $P < 0.05$, $P < 0.10$ (T - Test).

(属) 別にみると、3週間後のA, B区の鰓における *Aeromonas* 属細菌の動態が特徴的であった (Fig. 6)。すなわち、A区は増加、B区は減少傾向を示し、2区間の付着細菌数には有意の差 ($P < 0.05$) が認められた。

また、血液性状と付着・増殖細菌数との相関について検討した結果、ヘモグロビン量と鰓における *Aeromonas* 属細菌の付着菌数との間に $|r_0| = 0.3428 (> r(22, 0.05))$ で有意の負相関が認められた。

実験IIにおける各部位の付着・増殖総細菌数については、Table 22 および Fig. 7 に、その有意差検定の結果を

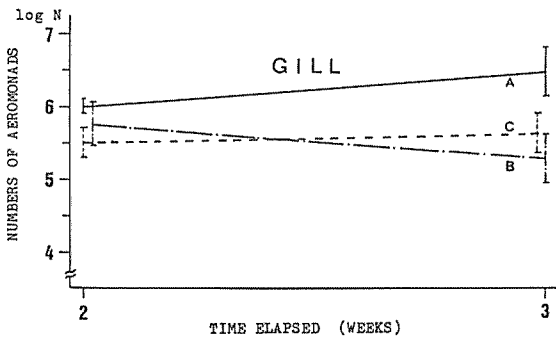


Fig. 6. Change with the passage of time in numbers of epiphytic *Aeromonads* at gill of carp exposed to the variations in water temperature.

A; Exposed to the variations in water temperature, B; Exposed to the variations in water temperature and administered pantethine at 100 mg/kg(B.W.)/day, C; Control.

Table 23 に示した。試験区 (D) では試験開始前 (D1) に比較し、2週間後 (D2) の皮膚、鰓および腸管における付着・増殖細菌数が有意に増加した ($P < 0.01$ または $P < 0.05$)。増加した菌群 (属) は皮膚の *Aeromonas*, *Alcaligenes*, 鰓の *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* ならびに腸管の *Aeromonas* であった。2週間後の試験区 (D2) と対照区 (E2) を比較すると、前者の鰓および腸管の総菌数が有意に多かった ($P < 0.01$ または $P < 0.05$)。特に増加した菌群 (属) は鰓の *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* ならびに腸管の *Aeromonas* であった。

飼育水の状態 飼育水の溶存酸素量は、実験Iにおいて各区とも4.29~5.94mg/l、実験IIでは各区とも5.01~5.90mg/lの範囲内であった。pHは実験Iで7.12~7.55、実験IIは7.20~7.40であった。これらの値には、各区間の差はほとんど認められなかった。水中の細菌数については、実験IのA, B区が $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^6$ 細胞/ml、C区は $1.8 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^6$ 細胞/mlの範囲内にあり、C区が他区にくらべて、わずかに多い日があった。実験IIの水中細菌数は、試験開始前でD区が 1.1×10^2 細胞/ml、E区は 3.7×10^2 細胞/mlであり、2週間後にはD区が 4.6×10^3 細胞/ml、E区は 5.3×10^3 細胞/mlとなった。また、水中に存在した菌群 (属) は、実験I, IIともに *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* が多いほか、検査日によってばらつきがあるものの、*Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pasteurella* および未同定菌群がわずかに認められた。

血液中のパンテテン酸含量 実験Iの3週間後におけるコイの血液中パンテテン酸含量を定量した結果、パンテチンを投与したB区の濃度が最も高く、平均 $5.54 \pm$

Table 22. Numbers of epiphytic bacteria at tissues of carp exposed to the variations in water temperature and fast condition
(log N/g)

Group	Number of fish	Scale	Tissues		
			Skin	Gill	Intestine
Examination group					
D1	5	4.17 ± 0.14	3.00 ± 0.17	6.06 ± 0.22	4.96 ± 0.31
D2	5	4.57 ± 0.26	3.76 ± 0.22	7.28 ± 0.22	6.19 ± 0.18
Control group					
E1	5	4.20 ± 0.17	3.06 ± 0.17	5.94 ± 0.22	5.01 ± 0.18
E2	5	4.37 ± 0.24	3.48 ± 0.18	6.07 ± 0.22	5.24 ± 0.27

D1, E1; Before the experiment, D2, E2: After 2 weeks.

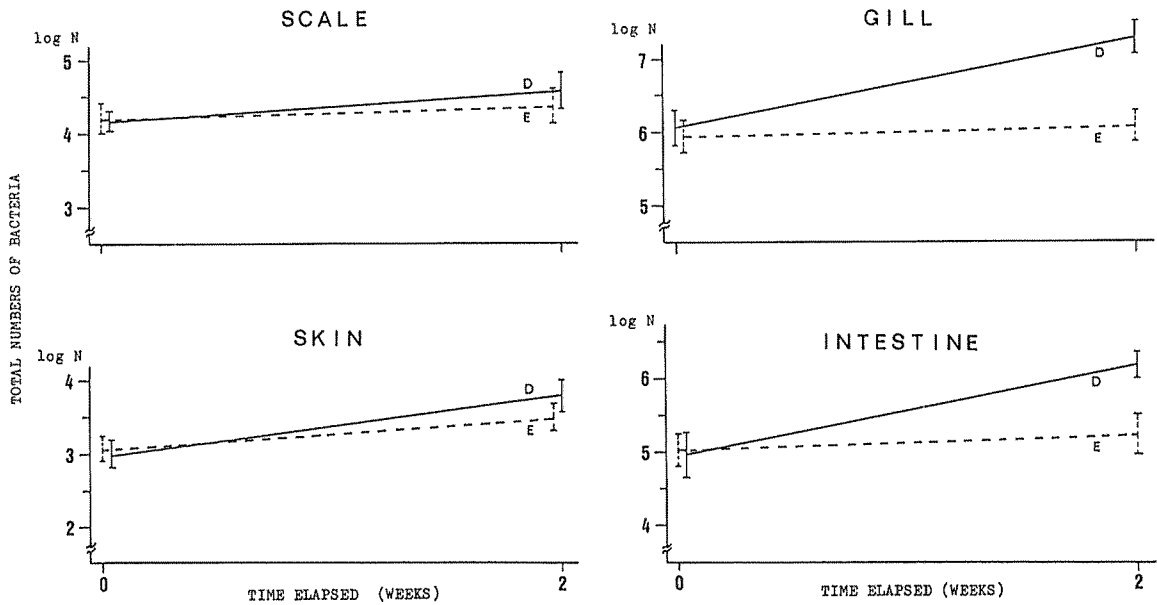


Fig. 7. Change with the passage of time in numbers of epiphytic bacteria at tissues of carp exposed to the variations in water temperature and fast condition.
D ; Examination group, E ; Control group.

Table 23. Test of significance of numbers of epiphytic bacteria at tissues of carp exposed to the variations in water temperature and fast condition

Tissues	Group			
	D1 - D2	E1 - E2	D1 - E1	D2 - E2
Significant level				
Total numbers of epiphytic bacteria				
Scale	—	—	—	—
Skin	0.05	—	—	—
Gill	0.01	—	—	0.01
Intestine	0.01	—	—	0.05
Significant level				
Classified by bacterial group				
Scale	<i>Aeromonas</i>	—	—	—
	<i>Alcaligenes</i>	—	—	—
	<i>Pseudomonas</i>	—	—	—
Skin	<i>Aeromonas</i>	0.05	—	—
	<i>Alcaligenes</i>	0.05	—	—
	<i>Pseudomonas</i>	—	—	—
Gill	<i>Aeromonas</i>	0.01	—	0.01
	<i>Alcaligenes</i>	0.05	—	0.01
	<i>Pseudomonas</i>	0.05	—	0.05
Intestine	<i>Aeromonas</i>	0.01	—	0.05
	<i>Alcaligenes</i>	—	—	—
	<i>Pseudomonas</i>	—	—	—

D; Examination group, E; Control group.
D1, E1; Before the experiment, D2, E2; After 2 weeks.

0.479(S.E) $\mu\text{g/ml}$ であったのに対し、C区が $1.36 \pm 0.053 \mu\text{g/ml}$ 、A区は $1.27 \pm 0.042 \mu\text{g/ml}$ といずれも低かった。

供試魚の状態 試験期間中の供試魚には、実験IおよびIIの水温変化群に過敏な動きを示すものがみられたが、斃死する個体はなかった。

考 察

魚類の血液性状に対する水温変化の影響についての報告例は比較的多い。(BALL and SLICHER: 1962, SLICHER: 1962, PICKFORDら: 1974, NEALEら: 1977, WEDEMEYER: 1973, 石岡: 1980)。WEDEMEYER (1973) は Steelhead trout などに対して、短時間(3分以内)に水温を 10°C 上昇させるとヘモ

グロビン量が増加すると述べている。石岡(1980)はマダイに対して、比較的短時間(2~4時間)内に水温変化($6\sim 11^\circ\text{C}$)させたところ、水温上昇刺激はヘモグロビン量およびヘマトクリット値を一過性に上昇させ、水温下降刺激は低下の方向へ働くことを明らかにしている。これらの結果は、酸素運搬のための魚類の一対応現象と考えられるが、著者らの実験では、毎日12時間かけて 6°C 水温上昇後、12時間で 6°C 下降を3週間継続し、水温上昇過程に採材したにもかかわらず、3週間後の水温変化群のうちA区は、赤血球数、ヘマトクリット値およびヘモグロビン量がそれぞれ $153 \pm 14.4 (\times 10^4/\text{mm}^3)$ 、 $32.2 \pm 2.95 (\%)$ 、 $7.5 \pm 0.7 (\text{g}/100\text{ml})$ に減少した。

田村ら(1962)は健康なコイの赤血球数およびヘマトクリット値は、それぞれ 209 ± 36 ($\times 10^4/\text{mm}^3$), 39.8 ± 2.7 (%)であることを報告している。TAKAHASHI and KUSUDA (1979) および高橋(1984b)は健康なコイの赤血球数、ヘマトクリット値およびヘモグロビン量は、それぞれ 201 ± 24.85 ($\times 10^4/\text{mm}^3$), 41.5 ± 3.52 (%), 10.2 ± 1.86 (g/dl)であったのに対して、*Aeromonas liquefaciens* (*A. hydrophila*)を接種後96時間の瀕死状態のコイでは、各々 148 ± 15.84 ($\times 10^4/\text{mm}^3$), 27.4 ± 3.25 (%), 7.1 ± 1.16 (g/dl)に低下したことを明らかにしている。これらのことから、本実験に供した水温変化群は、環境への順応が不可能なまでに、生理学的恒常性を失っていたものと推察される。

このような生理学的恒常性を乱した魚類の感染門戸部位において、環境水中および腸管内に存在する細菌が、いかなる動態を示すかについての報告はみあたらない。本実験では給餌条件下であっても、水温変化させると皮膚および鰓に細菌が有意に付着し、中でも鰓における*Aeromonas*属細菌の付着数は特異的に増加した。また、血液性状と付着菌数間、特にヘモグロビン量と鰓の*Aeromonas*菌数との間には、有意の負相関がみられたことは、水温変化群の付着菌数増加が偶発的現象ではなかったことを意味すると同時に、血液性状の悪化にともなって、細菌付着防御能が失墜したものと推察され興味深い。さらに絶食条件下で水温変化させた群には、皮膚および鰓のみならず、腸管内の*Aeromonas*が有意に増加した事実は、本病が越冬(絶食)あけの水温上昇期に比較的多く発生することと併せ考えると注目すべき現象と思われる。

一方、給餌ならびに絶食条件ともに、体表(ウロコ)の付着菌数には有意な変化は認められなかった。この原因については不明であるが、著者は本実験において、水温変化群の体表粘液中に、対照群よりも強い抗菌活性を示す物質の存在を確認している(高橋・藤野, 1984)。体表のみに、細菌の有意な付着がみられなかった原因の1つは、この物質の影響ではないかと考えられる。魚類の体表粘液中には、抗原によって誘発された特異的な抗体が産生され(川合・楠田, 1981)、また粘液および各組織には非特異抗体や自然抗体とよばれる物質が存在することが知られている(INGRAM: 1980, BALDO and FLETCHER: 1973, RAMOS and SMITH: 1978, HARRELLら: 1976)。

MURRAY and FLETCHER (1976)はPlaice (*Pleuronectes platessa* L.)について、鰓弁の軟骨性桿状体、鰓薄板上皮細胞、脾臓、腎臓、皮膚および体表粘液中にリゾチームが

分泌されることを確認している。そして、表皮と体表粘液中のそれは、頭部強打によるストレスの負荷によって、より多く分泌されることを明らかにしている。また、FLETCHERら(1976, 1977)は、PlaiceおよびLumpsucker (*Cyclopterus lumpus* L.)における血清中のリゾチーム濃度は、4~6月に高くなることを明らかにし、本酵素が温度、餌ならびに生殖などに影響されることを示唆する結果を得ている。今回、著者が体表粘液中で確認した物質は、本病の病魚および飼育水中からの*Aeromonas*をはじめ、数種の細菌に対して抗菌活性を示したこと、ストレス負荷魚の活性が高かったこと、および4~7月中旬までの活性が高かったことなどから考えて、リゾチームかそれに類似した非特異な生体防御物質の可能性が高いと思われる。

一方、水温変化群の皮膚、鰓および絶食時における腸管に、*Aeromonas*をはじめとする細菌が有意に付着・増殖した原因については、水温変化によって細菌の付着・増殖を抑制する物質が、体表粘液中よりも早く産生されなくなるのか、または体表粘液とこれらの部位とは細菌の付着・増殖に対する抑制機構が異なるのか、そのメカニズムは不明である。しかし、実験Iのパンテチンを与えた水温変化群には、3週間後に血液性状の好転とともに、皮膚および鰓の付着細菌数が有意に減少した。この結果は、皮膚および鰓における細菌の付着抑制機構を解明する上で、その手掛りになると考えられ、興味深い。パンテチンはパントチン酸の誘導体で、ヒトおよび哺乳動物における、副腎皮質のコルチコステロイドの産生と分泌に関与し、寒冷や低酸素などに対して、抗ストレス作用があることが知られている(田中ら: 1958, 木村ら: 1980)。

一方、魚類のリゾチームは好中球や単球で、主として産生されることが明らかにされている(HANSEN, 1974)。そして、これらの白血球は、温度などのストレス刺激によって、その数が変動することは、ヒトだけでなく魚類においても知られており(SCHLICHER: 1927, ROBERTS: 1980)、この反応は脳下垂体-副腎系を通して伝達されるのではないかと考えられている(ROBERTS, 1980)。したがって、水温変化群に*Aeromonas*などの細菌が多く付着した原因は、長期間にわたる水温の上昇ならびに下降刺激によって、副腎機能が低下し、白血球由来リゾチームの活性が衰えたためではないかと考えられる。また、パンテチン投与群は、副腎機能が維持された結果として、付着細菌数が少なかったのではないかと推察される。

そのほか、パンテチンはワクチンとの同時投与によって、抗体価をより上昇させることが知られている(田中ら:

1958, 木村ら:1980)。赤崎ら(1982)は、マウスにパンテチンを投与し、液性ならびに細胞性免疫応答が増強することを明らかにしている。魚類における細胞性免疫応答については、必ずしも明確にされているとはいえないが、その一形態が存在することは、HILDEMANN(1970)がキンギョのウロコの移殖実験で明らかにしている。また、魚類の免疫応答は、水温や過密ストレスなどに強く影響されることが知られている(BISSET:1948, AVTALIONら:1973, PERLMUTTERら:1973)。

以上のことから、水温変化群の各種の組織に、*Aeromonas*などの細菌が多く付着・増殖したのは、前述の非特異な生体防御物質のほかに、付着または常在細菌に対する液性ならびに細胞性免疫反応の減少に起因することなどが考えられる。

一方、本病の感染経路については不明であるが、ウナギの*Aeromonas*感染症(鱧赤病)では、腸管内に存在する病原性*Aeromonas*の異常増殖によると考えられている(金井ら, 1977)。本実験において、水温変化群には皮膚および鰓に*Aeromonas*が有意に付着し、絶食条件下で水温変化させたコイの腸管には*Aeromonas*が有意に増加することが明らかになった。この結果は、本病の感染門戸として、皮膚、鰓ならびに腸管の可能性を示唆するものと推察される。

第2節 病原性*Aeromonas*によるストレス負荷条件下のコイの感染試験

前節において、種々のストレスを負荷させたコイの皮膚、鰓ならびに腸管には、*Aeromonas*属の細菌が有意に付着または増殖することから、これらの部位が門戸となって感染が成立するのではないかと考えられた。

そこで本節では、病魚から分離した*A. hydrophila*を用い、前節と同様のストレスを負荷させたコイに対して、感染門戸と考えられる部位からの感染を試みた。

材料および方法

供試魚 平均体重205 gのマゴイを合計100尾用いた。

経皮・経鰓感染 3週間絶食させたマゴイを1群10尾ずつ4群に分け、4つの循環式アクリル樹脂水槽[75×45×45(深さ)cm]に収容した。石英管ヒーターを用いて、飼育水の水温を1日のうち12時間かけて20±0.5℃から8℃上昇させ、さらに12時間で8℃下降させる操作を2週間継続した。試験区の2群には*A. hydrophila* SC 1株の25℃、20時間培養菌を飼育水中に2.5×10⁸細胞/ml(飼育

水)実験当初から浮遊させた。経皮感染群はウロコをはがし、メスを用いて表皮に5 mmの傷を加えた。対照区のうち、1群には上記の水温変化を負荷し、他群は常時20±0.5℃で飼育した。

腸管感染 絶食条件下で水温変化させた系、給餌条件下で水温変化させた系、絶食条件下で水温を一定にした系および対照区からなる4つの系を設定した。飼育水槽、絶食条件下ならびに水温変化操作は上記に準じて行った。1つの系に接種菌量の異なる3群を設け、1群につき5尾を用いた。すべてのマゴイに、*A. hydrophila* SCI株の25℃、20時間培養菌を1尾あたり1.5×10⁸~1.5×10¹¹細胞となるように微量の粉末餌料に吸着させ、ゼラチン製カプセルにつめて実験当初に経口投与した。

検査項目 実験開始後2週間、症状発現と斃死の有無とを確認し、LD₅₀(半数致死菌数)および平均致死日数を求めた。斃死魚および生存魚ともに、心臓ならびに腎臓から接種菌の再分離を試みた。

結果

絶食と水温変化とを負荷させたマゴイに対する経皮ならびに経鰓感染試験の結果をTable 24に示した。すべての供試魚は2週間の実験期間中、何の異常も認められず、2週間後に心臓ならびに腎臓から菌分離を試みたが当該菌は検出されなかった。

次に、各種のストレスを負荷させたマゴイに対する腸管感染試験の結果をTable 25に示した。水温を一定にし、給餌した対照区のLD₅₀値は1.2×10¹⁰細胞/尾であったのに対し、絶食と水温変化とを負荷させた群のそれは、7.5×10⁸細胞/尾であった。また、給餌条件下で水温変化させた群のLD₅₀値は3.0×10⁹細胞/尾であり、水温一定で絶食させた群では7.5×10⁹細胞/尾であった。平均致死時間について、絶食水温変化群が最も短く、1.5×10¹⁰細胞/尾投与で3.8日(斃死率100%)、ついで給餌水温変化群の4.8日(斃死率100%)、絶食水温一定群の5.8日(斃死率80%)、対照群の6.7日<(斃死率60%)の順であった。斃死魚の外観症状は、腹部、肛門、体表および各鱗の充・出血が特徴的であり、解剖学的には腸管の充血と肝臓のうっ血が著しく、腸管内には血液を含む粘液が貯留していた。また、斃死魚の心臓ならびに腎臓からは、接種菌と同一性状を示す細菌が再分離された。

考察

前節において、本病の感染門戸としての可能性が考えら

Table 24. Results of skin and gill-borne infection for carp exposed to the variations in water temperature and fast conditions by *Aeromonas hydrophila*

Route of infection	Dose	Number of fish	Mortality
	viable cells/ml (breeding water)	died/tested	(%)
Skin-borne infection*	2.5×10^8	0 / 10	0
Gill-borne infection*	2.5×10^8	0 / 10	0
Infectious control**	2.5×10^8	0 / 10	0
Non-infectious** control	--	0 / 10	0

* The variations in water temperature: $20 \pm 0.5 \rightleftharpoons 28 \pm 0.5^\circ\text{C}$.** Water temperature: $20.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$.**Table 25.** Effect of various breeding conditions on the pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* for the common carp
(Oral inoculation dose, $1.5 \times 10^8 \sim 1.5 \times 10^{11}$ viable cells/fish)

Breeding condition	Inoculation dose (viable cells/fish)	Number of fish (died/tested)	Mortality (%)	Average time to death (days)	Median lethal dose (viable cells/fish)
Exposed to the variations in water temperature and fast condition*	1.5×10^{10}	5 / 5	100	3.8	7.5×10^8
	1.5×10^9	4 / 5	80	5.3 <	
	1.5×10^8	0 / 5	0	14.0 <	
Exposed to the variations in water temperature*	1.5×10^{10}	5 / 5	100	4.8	3.0×10^9
	1.5×10^9	1 / 5	20	7.0 <	
	1.5×10^8	0 / 5	0	14.0 <	
Exposed to the fast condition**	1.5×10^{11}	5 / 5	100	5.2	3.0×10^9
	1.5×10^{10}	4 / 5	80	5.8 <	
	1.5×10^9	0 / 5	0	14.0 <	
Control**	1.5×10^{11}	5 / 5	100	5.6	1.2×10^{10}
	1.5×10^{10}	3 / 5	60	6.7 <	
	1.5×10^9	0 / 5	0	14.0 <	

* The variations in water temperature: $20.0 \pm 0.5^\circ\text{C} \rightleftharpoons 28.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$.** Water temperature: $20.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

れた皮膚、鰓および腸管のうち、前2者については感染がまったく成立しなかった。しかし、腸管については、種々のストレスを負荷させた群は対照群にくらべて、はるかに少ない菌量でマゴイを致死させることが明らかになった。マゴイに対する菌のLD₅₀ならびに平均致死時間から考えて、発病および致死に特に大きな影響をおよぼしたのは、絶食と水温変化ストレスとを併加した系であった。また、絶食と水温変化との影響度を比較すると、後者のそれがやや大きい傾向がみられた。

水温ストレスが魚類の細菌感染に対して影響をおよぼすことは、すでに知られている。HUNTER and FRYER(1980)は、Steelheadの*Yersinia ruckeri*感染症について、保菌魚の飼育水温を上げると発病し、下流の健康魚へも伝播したことを報告している。また、HOLTら(1975)は、人為感染によるSteelheadのカラムナリス病について、25日間の死亡率は、水温9.4℃以下で0%、15℃で56%、20.5℃および23.3℃で100%であり、高水温ほど死亡率が高いことを明らかにしている。若林ら(1970)も同様の傾向をウナギのカラムナリス病で確認している。これらの報告とは逆に、COVERT and REYNOLDS(1977)は菌接種に基づく魚類の発熱反応の試験の中で、キンギョに対して*A. hydrophila*の生菌を腹腔内に注射し、異なる4つの水温で飼育した結果、72時間の生存率は25.5℃で24%、28℃で64%、30.5℃で84%、32.7℃では100%であったことを明らかにし、この原因は魚種の通常の適温よりも高い温度上昇で、免疫反応が高まったためであるとしている。しかし、一般に魚類は種ごとの適温と、生存の可能な最低ならびに最高温度とをもっており、水温がこれらの限界温度、特に高温限界に近づくと病原体の侵襲がおこる(ROBERTS, 1980)。水温の変化は微生物の増殖率、水中溶存酸素量および代謝産物の排出率に影響を与えらると思われるが、さらに重要なことは魚体の防御機構と抗体産生能への影響であろう。ROBERTS(1980)は貪食作用、炎症、創傷の治癒および毒素産生の細菌性疾患ならびに敗血症性細菌疾患におよぼす水温の影響に関する研究からの一般原理として、宿主の防御的反応の度合は、容認できる適温域であれば、水温がより高い方が各々の反応がより速やかに起こるとしている。

本実験で用いたコイは、適温域であったが、長期間にわたって水温を上下させたために、前節で明らかにしたように血液性状が悪化するほどに生理学的恒常性を乱していたものと推察される。したがって、水温変化群において、少ない菌量で腸管感染が立成した原因は、前節の付着・増殖

菌数の項で述べたように、脳下垂体-副腎系-白血球産生とその貪食作用ならびにリゾチーム産生、および免疫反応などの生体防御反応がスムーズに行われなかった結果と考えられる。

一方、飢餓魚は感染症や寄生虫の寄生を受けやすいことが知られている(ROBERTS, 1980)。本実験における絶食条件下のコイは、給餌条件下のそれよりも少ない菌量で腸管感染が成立した。これらの原因については、おそらく生体防御に関与するγ-グロブリンやリゾチームなどの物質を産生するための栄養素が欠乏したためではないかと思われる。

以上のことから、自然界における本病の少なくとも1つの感染機構として、水温変化や絶食(飢餓)などの誘因によって、宿主の生体防御反応が劣った結果、腸管内に存在した病原性*Aeromonas*が異常増殖するのではないかと推察される。

第3節 要約

(1) コイ科魚類のエロモナス病の感染機構を解明するための第一段階として、給餌ならびに絶食条件下のコイに水温変化ストレスを負荷させ、体表(ウロコ)、皮膚、鰓および腸管における運動性*Aeromonas*の付着・増殖菌数を調べた。また、給餌条件下のコイについては、生理状態を把握する目的で、血液性状をも調べた。

(2) 給餌条件下のコイでは水温変化させると、実験開始後2週間目に赤血球数およびヘモグロビン量が有意に減少し、皮膚に*Aeromonas*ならびにその他の細菌が多く付着した。3週間後には、水温変化群のうちバンテチン投与群(100 mg/kg b.w./day)は、血液性状の好転とともに皮膚および鰓の付着細菌数が減少したのに対し、通常市販飼料群はさらに増加した。すべての期間ならびに群のヘモグロビン量と、鰓の*Aeromonas*菌数との間には、有意の負相関が認められた(|r₀|=0.3428 [>r(22,0.05)])。

(3) 絶食条件下のコイに2週間の水温変化ストレスを負荷させると、皮膚および鰓の付着細菌数が有意に増え、腸管内の菌数が増加した。有意に増加した菌群(属)は、皮膚の*Aeromonas*, *Alcaligenes*, 鰓の*Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*および腸管の*Aeromonas*であった。

(4) 上記において、種々のストレスを負荷させたコイの皮膚、鰓ならびに腸管には、運動性*Aeromonas*が有意に付着または増殖することから、これらの部位が門戸となって感染が成立するのではないかと推察されたので、病原性

Aeromonas を用い、同様のストレス負荷魚に対して、感染門戸と考えられる部位からの感染を試みた。

(5) 絶食と水温変化とを負荷させたコイに対して、経皮・経鰓感染を試みた結果、いずれの経路とも感染は成立しなかった。しかし、腸管感染では対照群のコイに対する *A. hydrophila* の LD₅₀ 値が 1.2×10^{10} 細胞/尾であったのに対し、絶食・水温変化群、給餌・水温変化群、絶食・水温一定群の LD₅₀ 値は、それぞれ 7.5×10^8 , 3.0×10^9 , 7.5×10^9 細胞であり、ストレス負荷群はいずれも少ない菌量で腸管感染が成立した。

(6) 以上のことから、自然界における本病の少なくとも 1 つの感染機構として、水温変化や絶食（飢餓）などの誘因によって、宿主の生体防御応答が劣えた結果、腸管内に存在した病原性 *Aeromonas* が異常増殖するのではないかと考えられた。

第 5 章 発病機構に関する研究

第 1 節 病理学的変化の発現機構

第 2 章で述べたように、本病の特徴的な肉眼的症状は、体表と各鰭の充・出血、肝臓のうっ血ならびに腸管の充血などである。また、病理組織学的には肝臓、腎臓、脾臓および腸管に、滲出性ならびに出血性の炎症が著しい。

これらの症状は、病原菌のいかなる作用に基づく変化であるのか、すなわち本病の発病のメカニズムを知るために、病原菌の生菌と菌体破壊抽出液を接種して発現した実験感染魚の病変を、肉眼的ならびに病理組織学的に比較検討した。

材料および方法

生菌の筋肉内注射による感染 ニシキゴイ（平均体重 30g）を 4 個の亚克力樹脂水槽 [40×60×35（深さ）cm] に 20 尾ずつ収容し、水温 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ で 2 週間予備飼育したのち実験に供した。本病の病魚から分離した *A. hydrophila* CA1 株および CB1 株を、普通寒天培地斜面に 25°C 、20 時間培養後、滅菌生理食塩水に懸濁した。そして、魚体重 10g あたり約 10^8 細胞宛、背部筋肉内に接種した。

生菌の経口投与による感染 マゴイ（平均体重 205g）12 尾を亚克力樹脂水槽 [75×45×45（深さ）cm] に収容し、水温 $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で 2 週間予備飼育したのち実験に供した。病魚から分離した *A. hydrophila* SC1 株を、普通寒天

培地斜面に 25°C 、20 時間培養後、生菌数にして約 10^{10} 細胞を微量の粉末飼料に吸着させ、ゼラチン製カプセルにつめて経口投与した。経口投与後 24 時間目に、半数の供試魚の背大動脈から市販の墨汁 0.1 ml を注入した。

超音波破壊抽出液の背大動脈注射による攻撃 マゴイ（平均体重 200g）を 2 個の亚克力樹脂水槽 [75×45×45（深さ）cm] に 9 尾ずつ収容し、水温 $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で 2 週間予備飼育したのち実験に供した。病魚から分離した *A. hydrophila* SC1 株を、普通寒天培地平板に 25°C 、20 時間培養後、滅菌生理食塩水で 5 回洗浄し、同食塩水に 10% の割合で懸濁した。そして、氷冷下で細胞が破壊されるまで超音波処理を行い、 4°C で 10,000rpm、30 分間遠心分離し、得られた上清を $0.45 \mu\text{m}$ のミリポアフィルターで濾過した。この超音波破壊抽出液の 0.1 ml を、コイの背大動脈に注射した。注射後 24 時間に、市販の墨汁 0.1 ml を同部位に注入した。対照群には、背大動脈に生理食塩水の 0.1 ml を注射後 24 時間に墨汁 0.1 ml を同部位に注入した。

病理学的検索 筋肉内注射群は菌接種後、12、24、35、48、72、96 および 120 時間ごとに、それぞれ 5 尾を、経口投与群ならびに抽出液の背大動脈注射群は、24～28、48 および 72 時間ごとに、それぞれ 3 尾ずつ取りあげて、外観的ならびに解剖学的観察を行った。その後、鱗囊、筋肉、肝臓、腎臓、脾臓および腸管を摘出し、ブアン液で固定した。固定後、パラフィン包埋を行い、常法に従ってヘマトキシリン・エオシン二重染色法により組織標本を作製し、病理組織学的変化を観察した。

結 果

(1) 生菌の筋肉内注射による病理学的経時変化

(1-1) 外観的所見：本病の原因菌 CA1 ならびに CB1 株を筋肉内接種したニシキゴイは、接種後 5 時間に接種部位の出血と、その直径 1～2 cm 周囲内に充血が認められるほか、尾鰭、背鰭、胸鰭などに充血がみられた。12 時間後には、接種部位の周囲（直径 1.0～1.5 cm）の表皮が黄変し、やや隆起する。24 時間後には、接種部位周辺（直径 2～3 cm）の立鱗が明確になり、各鰭の充血が著しい。35～48 時間後には、接種部位側の表皮のほぼ全体に充・出血が認められ、接種部位周辺（直径 1.0～1.5 cm）に膿瘍が形成されるとともに、斃死する個体が見られた。72～96 時間後には接種部位側面だけでなく、体表全体および腹部の充・出血と肛門周囲の充血が認められた。120 時間後には、体表および各鰭の充・出血が著しく、膿瘍部位が空洞化したものもみられ、ほとんどの個体が斃死した。

(1-2) 解剖学的所見： 菌接種後5～12時間に接種部位付近を切断すると、筋肉の軟化が認められる。内臓諸器官には、特記すべき変化はみられない。24時間後には腸管の毛細血管がうきだし、充血が認められた。35～48時間後には肝臓のうっ血斑、腹壁の充血が認められるほか、接種部位側の表皮および筋肉を切断すると滲出液が流出する。72時間後には腸管の上部から肛門付近まで著しく充血し、それを縦断すると血液を含む粘液が貯留している。96～120時間後には鰓および肝臓がやや褪色し、脾臓は肥大する。腸管には壁が薄くなっているものや、透明感を失い、白く混濁しているものがみられ、縦断すると白色の粘液が充満している。

(1-3) 病理組織学的所見

(a) 鱗囊： 菌接種後5～12時間には、接種部位の周辺に限局して、細胞間の間隙が広がり薄くなっている。24～48時間後には、その細胞間間隙の広がりが接種部位側のほぼ全面に認められ、72時間後には反対側の鱗囊にもおよぶ。96～120時間後には、細胞の大きさが一様でなくなり、肥大および萎縮したものなどがみられ、その配列も乱れている。細胞間の間隙は著しく広く、顕著な水腫像が観察された。

(b) 筋肉： 菌接種後5～12時間には、接種部位周辺の筋繊維に膨化が生じ、筋束間に細胞浸潤が認められる。24～48時間後には、接種部位周辺に円形細胞の浸潤と壊死が観察された。72時間後には、接種部位周辺の筋繊維が融解し、かなり広範囲にわたって繊維に配列の乱れが生じた。96～120時間後には、接種部位周辺に膿瘍が形成され、その周囲に出血性炎症像が観察された。

(c) 肝臓(肝脾臓)： 菌接種後5～12時間には、細胞の配列に乱れは生じていないが、洞様血管が拡張し、うっ血像が観察される。24時間後には、うっ血像がさらに明確になり、間質に赤血球ならびにリンパ系細胞が広範囲に浸潤している。48時間後には間質にリンパ系細胞が広範囲に浸潤しているほか、その周囲が薄くなる。72時間後には、肝実質および間質に赤血球やリンパ系細胞が充ち、出血性ならびに滲出性の炎症像が著しい。96～120時間後には、肝細胞索の配列に乱れが生じ、核崩壊ならびに肝細胞の壊死が認められる。また、一部には菌集落が観察された。

(d) 腎臓： 菌接種後5～12時間には、間質の毛細血管が拡張する。24時間後には糸球体に赤血球が、また間質に赤血球とリンパ系細胞が浸潤している。48～72時間後には、尿管上皮細胞に肥大と萎縮とが観察される。96～120時間後には、腎組織全体に出血性ならびに滲出性の炎症像が

著しく、間質および尿管上皮細胞に壊死している部分がみられた。

(e) 脾臓： 菌接種後5～12時間には、英動脈および髓質部の毛細血管が拡張している。24時間後には、髓質部にリンパ系細胞が浸潤する。48時間後には、髓質部に広範囲にわたる赤血球およびリンパ系細胞の浸潤がみられ、ヘモジデリンが沈着している部分がある。72時間後には、髓質部に萎縮と壊死とが部分的に認められる。96～120時間後には、髓質部にかなり進行した壊死と、他方には赤血球浸潤と菌集落が認められ、いわゆる感染脾の像が観察された。

(f) 腸管： 菌接種後5～12時間には、縦走筋および輪走筋がやや膨化している。24時間後には、固有層の毛細血管の拡張が観察された。48時間後には、筋層に近い固有層部分が薄くなっているほか、漿膜と縦走筋間または縦走筋と輪走筋間に赤血球およびリンパ系細胞の浸潤が認められる。72時間後には、固有層に赤血球およびリンパ系細胞の浸潤が著しく、粘膜は剝離している。96～120時間後には、固有層に出血性ならびに滲出性の炎症が著しく、円柱上皮細胞の壊死が観察された。

(2) 生菌の経口投与および菌体抽出液の背大動脈注射による病変の比較

(2-1) 外観的比較所見： 生菌を経口投与後24時間には、肛門の周囲ならびに各鰭が多少充血している程度であるが、48時間後にはこれらの部位の充血が顕著になるほか、眼球突出と立鱗が観察された。72時間後には、立鱗がより明確になり、体表に著しい充・出血が認められた。一方、背大動脈から菌体抽出液を注入した群では、24時間後にはすでに、各鰭および体表の充・出血が著しいほか、眼球突出と立鱗が観察された。しかし、肛門周囲の充血は認められなかった。生菌投与後24時間に背大動脈から墨汁を注入した群では、24時間後にはすでに、各鰭および体表の充・出血が著しいほか、眼球突出と立鱗が観察された。しかし、肛門周囲の充血は認められなかった。生菌投与後24時間に背大動脈から墨汁を注入した群では、注入後30分以内に胸鰭基部がわずかに黒化したのち、約24時間後に頭部の皮膚、各鰭および肛門が著しく黒化したのに対して(Plate II, K), 菌体抽出液群では墨汁注入後4時間に、体表全体および各鰭の顕著な黒化が観察された。対照群には、胸鰭および腹鰭の基部にわずかな黒化がみられたのみであった。生菌経口投与群と菌体抽出液注入群との外観的所見を比較した結果、前者の48～72時間後の所見と後者の24～28時間後のそれとが、よく一致した。

(2-2) 解剖学的比較所見： 生菌を経口投与後24時間には、腸管のみはすでに発赤しており、48時間後には腸管の発赤がさらに顕著になり、腸管内に血液を含む粘液が貯留していた。72時間後には肝臓にうっ血がみられるほか、肝臓および腎臓の軟化が認められた。一方、背大動脈から菌体抽出液を注入した群では、24時間後にはすでに、肝臓のうっ血と肝臓および腎臓の軟化が認められたほか、腸管上部の発赤が観察された。生菌投与後24時間に背大動脈から墨汁を注入した群では、注入後24時間に、腹腔内に黒色の腹水が貯留し、肝臓、腎臓、および脾臓が黒化していた。腸管内には、黒赤色の粘液の貯留が認められた。菌体抽出液群では墨汁注入後4時間にはすでに、腹腔内に黒色の腹水が貯留し、肝臓、腎臓および脾臓の黒化が観察されるほか、腸管の上部が黒化し、その内部には黒赤色の粘液が貯留していた (Plate II, L)。対照群には、脾臓がやや黒化した以外に特記すべき変化は認められなかった。生菌経口投与群と菌体抽出液注入群との解剖学的所見を比較した結果、腸管を除き、前者の48~72時間後の所見と後者の24~28時間後のそれとがよく一致した。

(2-3) 病理組織学的比較所見： 生菌を経口投与後48時間の鱗囊は、細胞の配列が乱れ、細胞間の間隙が著しく広がっていた。(Plate II, M)。菌体抽出液群の鱗囊には、注入後24時間に上記と同じ所見が得られ、墨汁を注入した個体には鱗囊組織の各所に、墨汁の沈着が観察された (Plate II, N)。生菌を経口投与後24時間の肝臓には、洞様血管が拡張し、うっ血像が観察された。生菌経口投与群の48時間後および菌体抽出液群の24時間後の肝臓には、間質に出血性ならびに滲出性の炎症像が観察された。生菌を経口投与後48時間および菌体抽出液注入後24時間の腎臓には、間質に赤血球が浸潤しているほか、尿細管上皮細胞の一部に壊死が認められた。(Plate II, O)。また、これらの墨汁注入群には、主として間質に墨汁の沈着がみられた (Plate II, P)。生菌を経口投与後24時間の脾臓には、英動脈および髄質部の毛細血管の拡張が認められた。生菌経口投与群の48時間後および菌体抽出液群の24時間後の脾臓には、髄質部に赤血球が充満していた。これらの墨汁注入群には、英動脈およびその周囲の間質に墨汁の沈着が観察された (Plate III, Q・R) 対照の墨汁注入群にも、その沈着がみられたが、範囲がせまく、英動脈にそって痕跡程度に認められた。生菌経口投与群の24時間以降および菌体抽出液群の48時間以降の腸管には、粘膜の剝離、固有層における顕著な出血性ならびに滲出性炎症像が観察された (Plate III, S) これらの墨汁注入群には、縦走筋と輪走筋

間および固有層に、赤血球の浸潤にともなって、墨汁の沈着が認められた。(Plate III, T)。

考 察

Aeromonas hydrophila による魚類の感染症の外観的症状は、ウナギでは鱗、皮膚および肛門の発赤であり (保科：1962, 江草：1978), アユでは、皮下出血および肛門の発赤などである (城・大西, 1980)。また、ウナギの場合の解剖学的特徴は、肝臓のうっ血、腸管の発赤および腸管内の粘液の貯留であり、病理組織学的には、肝臓、腎臓および腸管などに、リンパ球様細胞の浸潤と出血が認められる (江草, 1978)。本実験において、*A. hydrophila* の生菌を筋注または経口投与したニシキゴイおよびマゴイの特徴的な肉眼的所見は、体表と鱗の充・出血、立鱗、肛門の充血、肝臓のうっ血ならびに腸管の充血であった。また、病理組織学的には肝臓、腎臓、腸管に、出血性ならびに滲出性の炎症像が認められるなど、上記のウナギおよびアユの *Aeromonas* 感染症の病変と同様の所見が得られた。さらに、本菌の超音波破壊によって得られた菌体内抽出物を、背大動脈から注入したマゴイには、生菌接種の場合とほとんど同じ病変が発現した。

清水 (1969) は、ワタカブリ病 (鰯赤病) のウナギから分離した *A. liquefaciens* (*A. hydrophila*) について、菌体の超音波破壊によって得た抽出物を、ウナギに筋肉内注射すると、接種部位およびその周囲に出血と壊死が起こり、大量に接種すると斃死すること、またその抽出物はマウスに対しても致死性をもつことを明らかにした。さらに、その抽出物をゲル濾過によって分けたところ、Sephadex G-100のカラムを素通りする分画と、ゲル内に拡散する分画とに分かれたとし、前者の成分およびウナギに対する作用は明らかにされなかったが、後者はタンパク質と考えられる物質で、ウナギに対して出血ならびに壊死を起こさせることを報告している。また、若林 (1981) は Popoff and Véron (1976) の分類に基づく、*A. hydrophila* biovar. *hydrophila* について、その培養濾液を接種したコイの36%が斃死し、菌体破壊抽出液を接種したコイの94%に顕著な眼球突出と立鱗が生じたことを明らかにしている。

以上のことから、本病の病魚に見られる出血性ならびに滲出性の炎症、壊死、立鱗および眼球突出などの主要病変は、*A. hydrophila* の菌体内物質の作用に起因するものと推察される。

動物に種々の病変を起こさせる細菌の毒素は、菌体外毒素と菌体内毒素とに大別される (PILLEMER and ROBBINS,

1949)。前者は細菌の産生するタンパク性の物質で、菌体から容易に遊離し、動物に対して出血、溶血および壊死などの作用を示すことが知られている（小山：1964，加藤：1964，八木：1951）。後者はリポ多糖体よりなる物質で、自己消化または細胞破壊によってのみ細胞外へ遊離し、動物に対して発熱，白血球減少，浮腫，出血および下痢などを起こさせることが知られている（WESTPHAL：1960，LUDERITZら：1966，植竹：1967，二階堂：1967）。本実験において，マゴイに出血，壊死，立鱗および眼球突出を起こさせた物質の本体は不明であるが，前述の清水（1969）ならびに若林（1981）と同一の手法に基づき，超音波破壊によって菌体内から得ていることから，清水が明らかにしたタンパク質と考えられる毒性物質を含んでいることは疑いないものと思われる。しかし，清水も述べているように，タンパク性で出血および壊死作用を示すなどの性状は，菌体外毒素のもつ性質に近いことから，今後，定温動物と魚類とでは細菌の毒素作用が異なって現われるのか，あるいは，*Aeromonas* 属細菌に特有の物質であるのか，などについて検討する必要がある。

一方，*A. hydrophila* 感染症の感染メカニズムについては，ウナギの鱗赤病の場合，腸内に存在した強毒株が何らかの原因で異常増殖するのではないかと考えられている（金井ら：1977，江草：1978）。保科（1962）はウナギの鱗赤病について，飼育水中に培養菌を加え，魚体との接触による感染を試みたが発病せず，生菌を胃内および直腸内に注入するか，餌と共に経口投与することによって，初めて感染が成立したことを明らかにしている。本病の感染メカニズムについては前章において，水温変化や絶食（飢餓）などの誘因によって，宿主の生体防御反応が衰えた結果，腸管内に存在した病原性 *Aeromonas* が異常増殖するのではないかと推論した。

前述の感染メカニズム，肉眼的ならびに病理組織学的所見およびマゴイに対する生菌と菌体内抽出物との毒素作用の一致などから，本病における発病のメカニズムについて，次のとおり考察する。すなわち，(1) 腸管内において，病原性 *Aeromonas* が異常増殖したのち，腸管内の血管へ侵入する。(2) 血管内で細菌はさらに増殖し，血液を介して全身の組織に分布する。その一方で，細菌の自己消化に

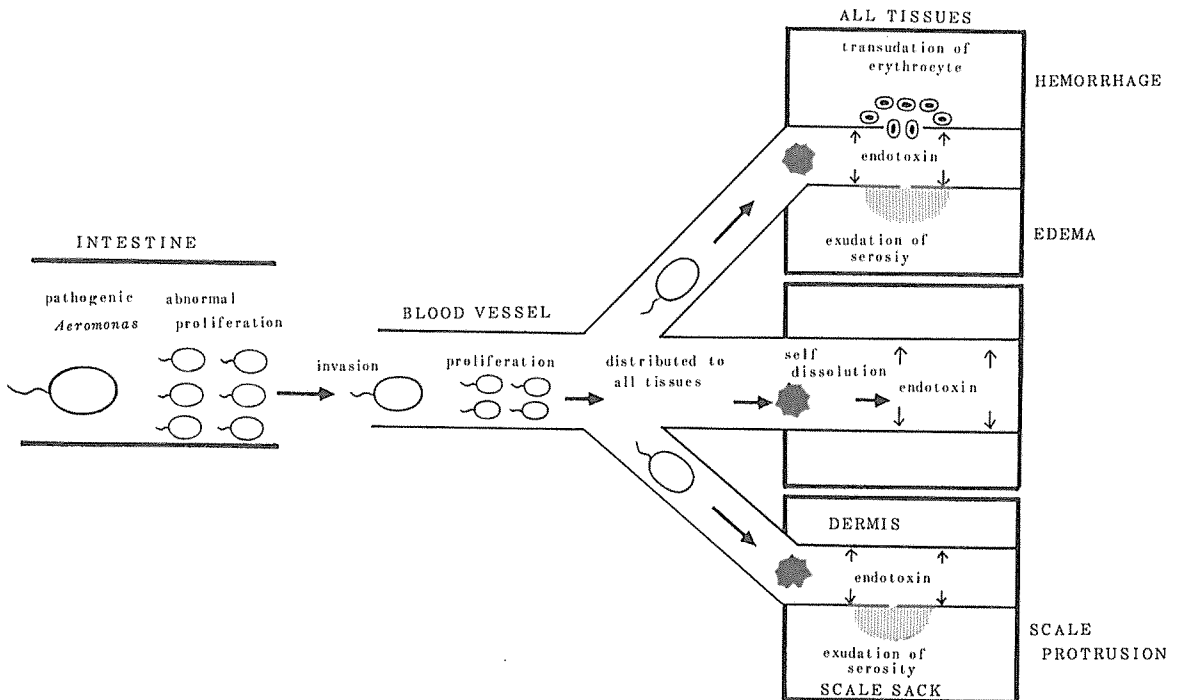


Fig. 8. Proposed mechanisms of symptoms of the *Aeromonas* disease in carp.

よって放出された菌体内毒素により、血管の透過性が亢進する。(3) 血管壁の損傷が大きい部分には、赤血球が漏出するために出血が生じ、損傷の小さい部分には漿液のみが滲出し、浮腫が起こる。(4) 真皮の血管壁から滲出した漿液が鱗囊の細胞間隙に貯留した結果、組織が膨張し、鱗が上方へ押し上げられて立鱗が起こる (Fig. 8)。

第2節 血液学的変化の発現機構

第2章において明らかにしたように、本病の血液学的変化の特徴は、症状の進行した病魚における赤血球数の減少と、ヘマトクリット値の低下である。

そこで、本節ではこれらの血液学的異常の発現メカニズム、ならびに上記以外の性状における病的変化の把握と、その発現機構について検討を試みた。

材料および方法

供試魚： 平均体重44.5 g のニシキゴイを、4個のアクリル樹脂水槽 [40×60×40 (深さ) cm] に20尾ずつ収容し、水温20±1℃で2週間予備飼育したのち実験に供した。

人為的感染： 病魚から分離した *Aeromonas hydrophila* CA 1株を普通寒天培地斜面に25℃、20時間培養後、滅菌生理食塩水に懸濁させ、供試魚の体重10 g あたり約10⁷細胞の生菌数となるように筋肉内接種した。

採血： 菌接種後24, 48, 72, 96時間ごとに7尾ずつとりあげ、tricaine methanesulfonate (MS 222) で麻酔したのち、尾柄部を切断して、ヘパリン処理の小試験管に採血した。

赤血球数の算定： 赤血球用メランジュールを用い、HAYEM 液で血液を200倍に希釈し、THOMA の血球算定盤により、血液 1 m³中の赤血球数を算定した。

赤血球と核の形態： 血液をスライドグラスに塗抹し、ギムザ液で染色したのち、1個体につき100個を無作為に選び、赤血球および核の長径と短径を測定した。

ヘマトクリット値の測定： プレイン毛細管に血液を採取したのち、8,000 rpm, 30分間の遠心分離を行い、血球容積比を測定した。

血液比重の測定： 硫酸銅法に基づいて行った。

色素量の定量： Acuglobin (Orth Corp. 製) を用いて検量線を求め、シアンメトヘモグロビン法によって定量した。

血漿比重の測定： 硫酸銅法によって行った。

血液水分量の測定： 血液0.2mlを秤量瓶にとり、105℃、1時間放置したのちに秤量をくり返し、重量が一定した時点で、その減量をもって水分量とした。

血清タンパク量の定量： ヘパリン無処理の血液を4℃、20時間放置して得られた上澄の血清について、屈折タンパク計 (Erma 社製) を用いて定量した。

結 果

(1) 赤血球数の経時的変化： 本病の原因菌を接種したニシキゴイにおける赤血球数の経時的変化を Table 26 および Fig. 9 に示した。菌接種前のニシキゴイの赤血球数は、201±24.9(×10⁴/m³・以下、単位省略)であったのに対して、菌接種後24時間には184±34.0となり、以後は時間の経過に伴って漸減し、96時間後には148±15.9となった。

(2) 赤血球と核の形態および大きさの経時的変化： 菌接種前の赤血球の多くは、楕円形であったが (Plate III, U), 菌接種後24時間には、類円形の赤血球が多数出現し (Plate III, V), 48時間後には、この種の赤血球のほか

Table 26. Changes in erythrocyte counts on experimental infection in fancy red carp inoculated with *A. hydrophila*

Hours after inoculation	Number of fish	Body weight(g)		Erythrocyte counts (×10 ⁴ /mm ³)		
		Range	Mean	Range	Mean	Standard deviation
0	7	33-57	43.6	174-249	201	24.85
24	7	36-55	45.1	141-221	184	34.03
48	7	30-59	43.3	90-229	166	42.95
72	7	38-51	46.0	108-203	155	30.14
96	7	30-53	45.3	128-171	148	15.84

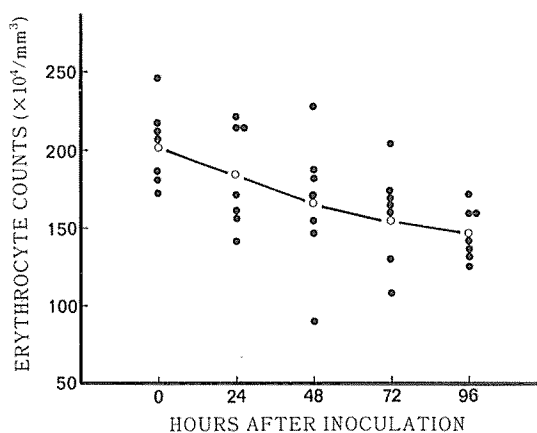


Fig. 9. Changes in erythrocyte counts on experimental infection in fancy red carp inoculated with *A. hydrophila*.

崩壊過程にある膨潤化した赤血球が出現しはじめた。72時間後には、崩壊寸前の膨潤化した赤血球が増加していわゆる大小不同症を呈するほか、赤紫色に染まった無構造物が多数観察された。96時間後には膨潤化した赤血球が減少し、多くは正常に近い楕円形の赤血球と無構造物とで占められた (Plate III, W)。

赤血球と核の大きさの経時的变化を Table 27 および Fig. 10~13 に示した。菌接種前の赤血球の長径は、 $14.3 \pm 1.09 \mu\text{m}$ (以下、単位省略) であったのに対して、菌接種後では短くなる傾向がみられ、とくに24時間後には 13.3 ± 1.41 と著しく小さくなった。菌接種前の赤血球の短径は、 9.8 ± 0.69 であったのに対して、72時間後に長いものが多

くなり、 10.3 ± 0.81 となった。しかし、96時間後には再び短くなる傾向がみられた。また、菌接種前における長径と短径の比は、1.46であったのに対して、接種後にはその比が小さくなる傾向が認められた (Table 27)。

一方、菌接種前の核の長径は 5.9 ± 0.43 であったのに対して、24および48時間後には一旦短くなり、72時間後には 6.0 ± 0.60 と長くなった。しかし、96時間後には再び短くなる傾向がみられた。菌接種前の核の短径は 3.5 ± 0.34 であったのに対して、接種後にはそれより長くなる傾向が認められた。とくに、72時間後においてその傾向が強くなり、 4.2 ± 0.51 であった。また、菌接種前における長径と短径の比は、1.69であったのに対して、接種後には $1.36 \sim 1.47$ となり、その比が小さくなる傾向を示した (Table 27)。

(3) ヘマトクリット値の経時的变化：ヘマトクリット値の経時的变化を Table 28 および Fig. 14 に示した。菌接種前のヘマトクリット値は、 $41.5 \pm 3.52\%$ (以下、単位省略) であったのに対して、菌接種後24時間には 32.5 ± 5.16 となり、以後は時間の経過に伴って漸減し、96時間後には 27.4 ± 3.25 となった。

(4) 血液比重の経時的变化：血液比重の経時的变化を Table 29 および Fig. 15 に示した。菌接種前の血液比重は、 1.046 ± 0.0020 であったのに対して、菌接種後24時間には 1.040 ± 0.0028 となり、以後は時間の経過に伴って漸減し、96時間後には 1.035 ± 0.0014 となった。

前項のヘマトクリット値と血液比重との相関関係について調べた結果を Table 30 および Fig. 16 に示した。菌接種前の両者の相関係数は、0.732であったのに対して、接種後のそれは $0.664 \sim 0.981$ の範囲内にあり、各経過時間共

Table 27. Microcytosis on experimental infection in fancy red carp inoculated with *A. hydrophila*

Hours after inoculation	Erythrocyte			Nucleus of erythrocyte		
	Long diameter (μm)	Short diameter (μm)	Ratio of long to short	Long diameter (μm)	Short diameter (μm)	Ratio of long to short
0	$14.3 \pm 1.09^*$	9.8 ± 0.69	1.46	5.9 ± 0.43	3.5 ± 0.34	1.69
24	13.3 ± 1.41	9.8 ± 0.76	1.36	5.6 ± 0.47	3.8 ± 0.46	1.47
48	14.0 ± 1.38	9.8 ± 0.72	1.43	5.3 ± 0.53	3.9 ± 0.41	1.36
72	13.9 ± 1.53	10.3 ± 0.81	1.35	6.0 ± 0.60	4.2 ± 0.51	1.43
96	13.9 ± 1.23	9.7 ± 0.71	1.43	5.5 ± 0.56	3.8 ± 0.37	1.45
Ratio of 0 to 96 hours	0.97	0.99	—	0.93	1.09	—

* Standard deviation.

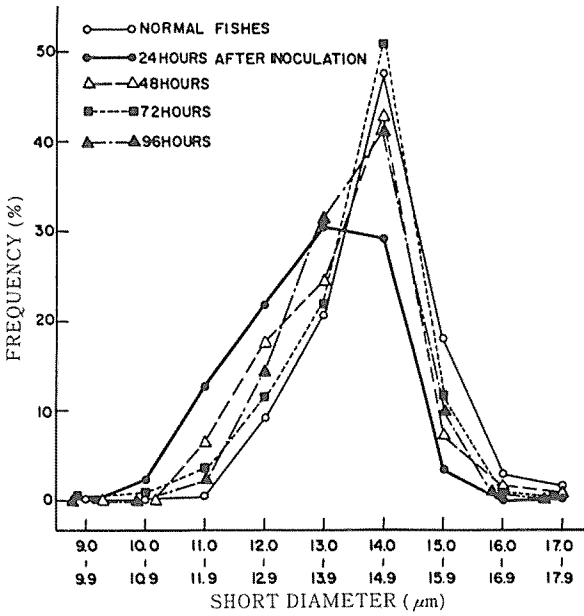


Fig. 10. Frequency distribution of long diameter of erythrocytes on experimental infection in fancy red carp inoculated with *A. hydrophila*.

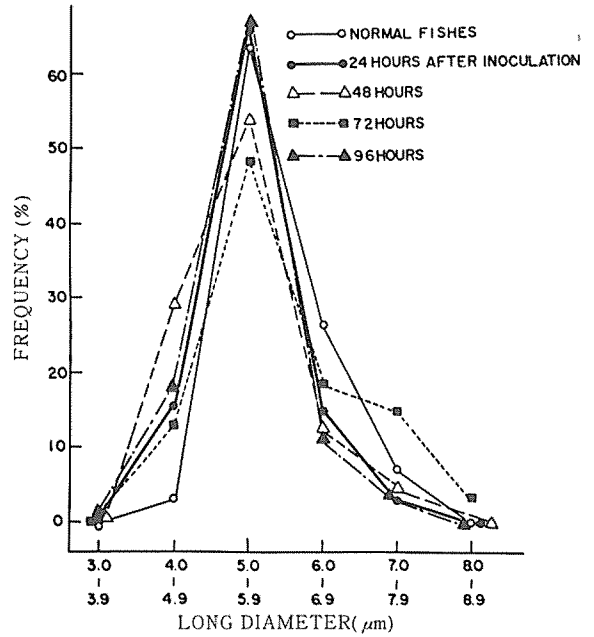


Fig. 12. Frequency distribution of long diameter of nuclei on experimental infection in fancy red carp inoculated with *A. hydrophila*.

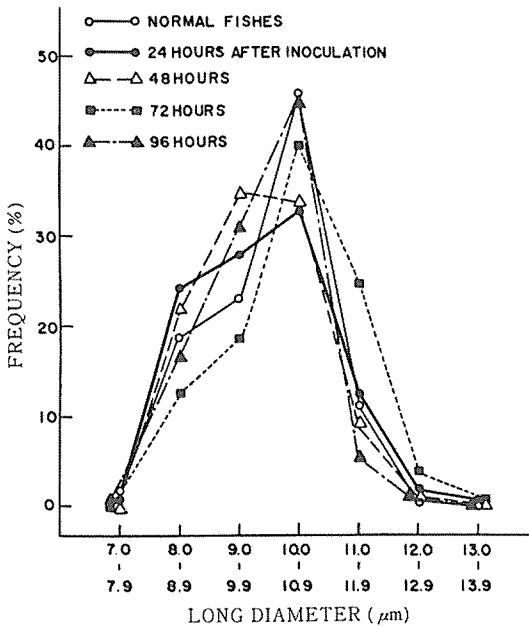


Fig. 11. Frequency distribution of short diameter of erythrocytes on experimental infection in fancy red carp inoculated with *A. hydrophila*.

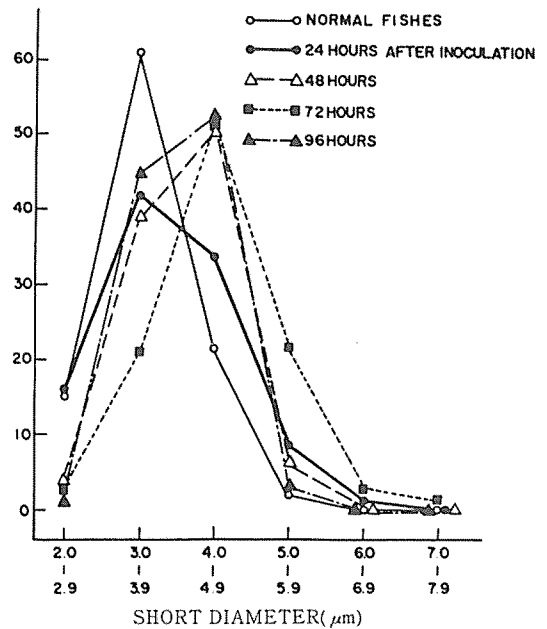


Fig. 13. Frequency distribution of short diameter of nuclei on experimental infection in fancy red carp inoculated with *A. hydrophila*.

Table 28. Changes in haematocrit value experimental infection in fancy red carp inoculated with *A. hydrophila*

Hours after inoculation	Number of fish	Body weight(g)		Haematocrit value(%)		
		Range	Mean	Range	Mean	Standard deviation
0	7	35-57	49	34.5-44.7	41.5	3.52
24	7	33-54	48	26.3-40.9	32.5	5.16
48	7	32-56	47	25.7-42.2	32.1	5.95
72	7	31-58	50	22.0-38.6	28.4	6.91
96	7	30-56	48	23.4-33.4	27.4	3.25

Table 29. Changes in specific gravity of blood on experimental infection in fancy red carp inoculated with *A. hydrophila*

Hours after inoculation	Number of fish	Body weight(g)		Specific gravity of blood		
		Range	Mean	Range	Mean	Standard deviation
0	7	35-57	49	1.044-1.049	1.046	0.0020
24	7	33-54	48	1.036-1.043	1.040	0.0028
48	7	32-56	47	1.034-1.046	1.039	0.0043
72	7	31-58	50	1.028-1.044	1.036	0.0053
96	7	30-56	48	1.033-1.037	1.035	0.0014

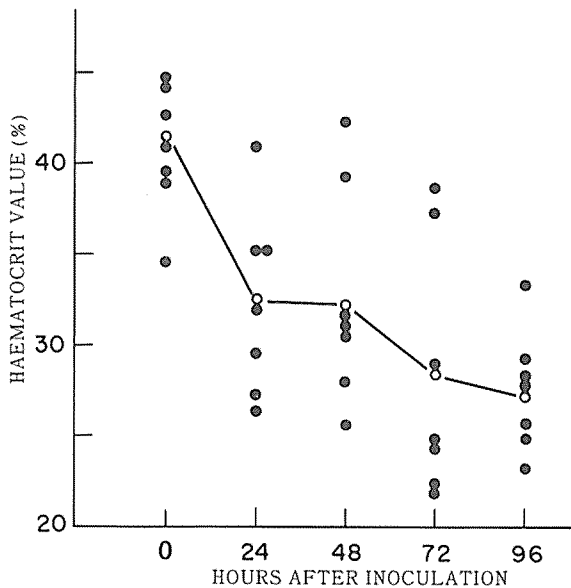


Fig. 14. Changes in haematocrit value in fancy red carp infected with *A. hydrophila*.

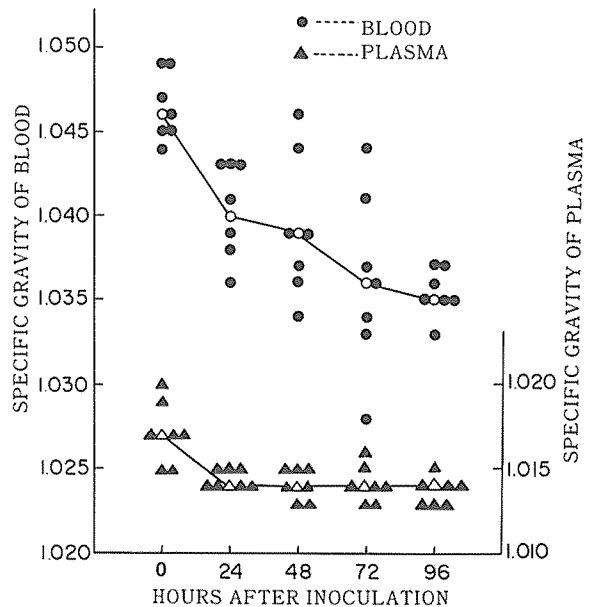


Fig. 15. Changes in specific gravity of blood and plasma on experimental infection in fancy red carp inoculated with *A. hydrophila*.

Table 30. Correlation coefficients between haematocrit value and specific gravity of blood on experimental in fancy red carp inoculated with *A. hydrophila*

Hours after inoculation	Number of fish	Body weight(g)		Correlation coefficient
		Range	Mean	
0	7	35-57	49	0.732
24	7	33-54	48	0.664
48	7	32-56	47	0.981
72	7	31-58	50	0.909
96	7	30-56	48	0.829

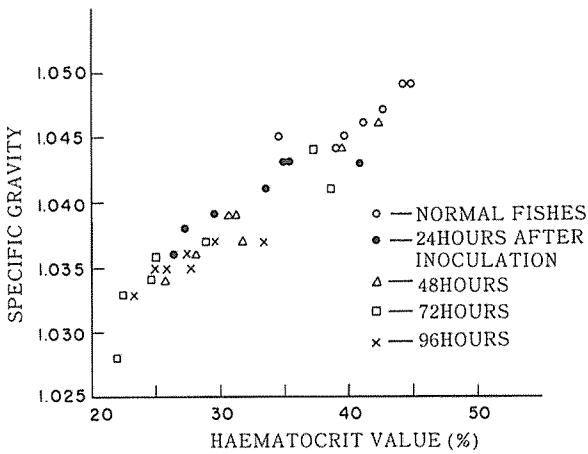


Fig. 16. Relation between the haematocrit value and the specific gravity of blood.

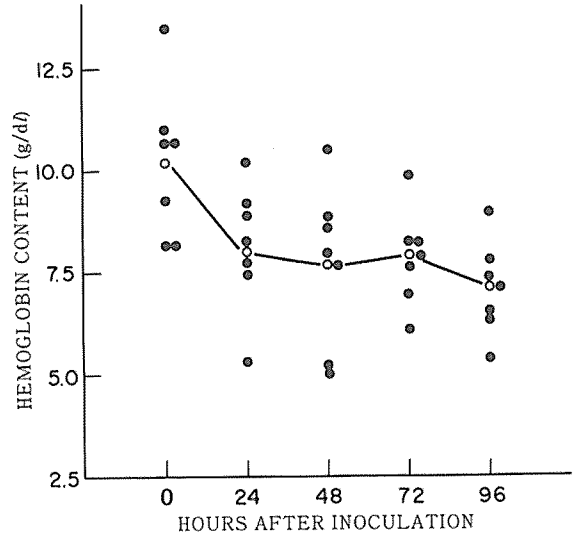


Fig. 17. Changes in hemoglobin content on experimental infection in fancy red carp inoculated with *A. hydrophila*.

に高い正の相関が認められた。

(5) 血色素量の経時的変化： 血色素量の経時的変化を Table 31 および Fig. 17 に示した。菌接種前の血色素量は、 10.2 ± 1.86 g/dl (以下、単位省略)であったのに対して、菌接種後24時間には、 8.0 ± 1.54 となり、96時間後には 7.1 ± 1.16 まで減少した。

(6) 血漿比重の経時的変化： 血漿比重の経時的変化を Table 32 および Fig. 15 に示した。菌接種前の血漿比重は、 1.017 ± 0.0019 であったのに対して、菌接種後24時間には 1.014 ± 0.0005 まで低下した。48~96時間後にはほとんど変動がみられず、各経過時間における比重は、いずれも 1.014 であった。

(7) 血液水分量の経時的変化： 血液水分量の経時的変

化を Table 33 および Fig. 18 に示した。菌接種前の血液水分量は、 $85.3 \pm 1.51\%$ (以下、単位省略)であったのに対して、菌接種後24時間には 86.5 ± 1.59 となった。その後、経過時間によって多少の変動がみられるが、接種前の水分量に比較して、いずれも増加する傾向が認められた。

(8) 血清タンパク量の経時的変化： 血清タンパク量の経時的変化を Table 34 および Fig. 19 に示した。菌接種前の血清タンパク量は、 2.6 ± 0.46 g/dl (以下、単位省略)であったのに対して、菌接種後24および48時間には、それぞれ 1.5 、 1.4 まで減少した。しかし、72時間後からは再び増加の傾向がみられ、96時間後には 2.1 ± 0.54 となった。

Table 31. Changes in hemoglobin content on experimental infection in fancy red carp inoculated with *A. hydrophila*

Hours after inoculation	Number of fish	Body weight(g)		Hemoglobin content (g/dl)		
		Range	Mean	Range	Mean	Standard deviation
0	7	37-60	51	8.2-13.5	10.2	1.86
24	7	34-57	49	5.3-10.2	8.0	1.54
48	7	31-58	49	5.0-10.6	7.7	2.03
72	7	36-56	47	6.1-9.9	7.9	1.17
96	7	34-54	47	5.4-9.0	7.1	1.16

Table 32. Changes in specific gravity of plasma on experimental infection in fancy red carp inoculated with *A. hydrophila*

Hours after inoculation	Number of fish	Body weight(g)		Specific gravity of plasma		
		Range	Mean	Range	Mean	Standard deviation
0	7	35-57	49	1.015-1.020	1.017	0.0019
24	7	33-54	48	1.014-1.015	1.014	0.0005
48	7	32-56	47	1.013-1.015	1.014	0.0009
72	7	31-58	50	1.013-1.016	1.014	0.0011
96	7	30-56	48	1.013-1.015	1.014	0.0006

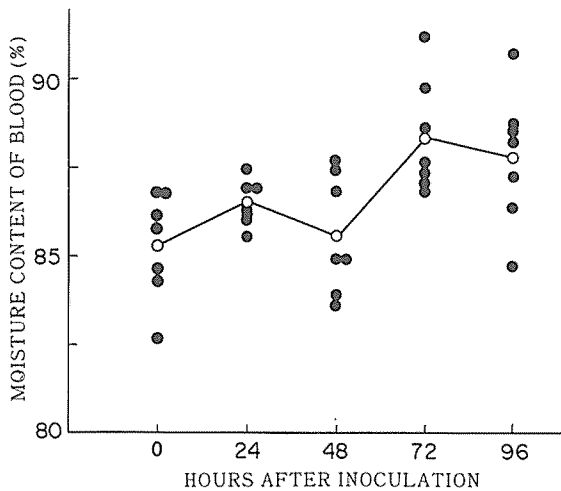


Fig. 18. Changes in moisture content of blood on experimental infection in fancy red carp inoculated with *A. hydrophila*.

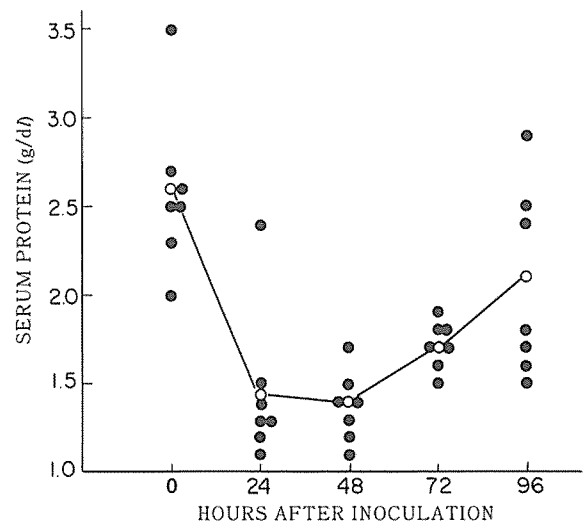


Fig. 19. Changes in amount of serum protein on experimental infection in fancy red carp inoculated with *A. hydrophila*.

Table 33. Changes in moisture content of blood on experimental infection in fancy red carp inoculated with *A. hydrophila*

Hours after inoculation	Number of fish	Body weight(g)		Moisture content of blood(g)		
		Range	Mean	Range	Mean	Standard deviation
0	7	36-60	47	82.7-86.8	85.3	1.51
24	7	32-50	41	85.6-87.4	86.5	1.59
48	7	34-60	44	83.6-87.6	85.6	1.63
72	7	34-51	43	86.9-91.2	87.6	1.61
96	7	32-58	44	84.7-90.7	87.8	1.91

Table 34. Changes in amounts of serum protein on experimental infection in fancy red carp inoculated with *A. hydrophila*

Hours after inoculation	Number of fish	Body weight(g)		Amounts of serum protein(g/dl)		
		Range	Mean	Range	Mean	Standard deviation
0	7	34-52	42	2.0-3.5	2.6	0.46
24	7	36-50	45	1.1-2.4	1.5	0.44
48	7	34-56	47	1.1-1.7	1.4	0.48
72	7	32-53	44	1.5-1.9	1.7	0.13
96	7	33-51	42	1.5-2.9	2.1	0.54

考 察

保科 (1962) は鱈赤病のウナギの血液性状について、感染初期の諸測定値には個体間の変異の幅が大きいが、病状の進行した病魚では、赤血球数ならびにヘモグロビン量が減少し、ヘマトクリット値は低下することを明らかにしている。

本病の原因菌を接種したニシキゴイの血液性状の測定値には、個体間に多少のばらつきがみられるものの、時間の経過に伴って、赤血球数ならびにヘモグロビン量の減少およびヘマトクリット値の低下が認められ、保科が報告した鱈赤病のウナギと同様の貧血の所見が得られた。

KATO (1938) は、ヒトにおける貧血を色素指数、容積指数および飽和指数によって解析している。本実験における人為的感染魚に生じた貧血の内容について、KATOの方法に基づいて、以下に解析する。すなわち、赤血球数を R ($\times 10^6$)、ヘモグロビン量を Hb (g/dl)、ヘマトクリット

値を V (%) で表すと、3つの指数はそれぞれ次式によって計算される。

$$\text{色素指数} = Hb/R \times a \quad (a \text{ は色素指数の常数})$$

$$\text{容積指数} = V/R \times b \quad (b \text{ は容積指数の常数})$$

$$\text{飽和指数} = (Hb/R \times a) / (V/R \times b)$$

ニシキゴイにおける R , Hb , V の正常値を仮に、 R_n , Hb_n , V_n とすると、色素指数の常数は

$$a = Hb_n/R_n \quad \text{により}$$

容積指数の常数 b は

$$b = V_n/R_n \quad \text{により求められる。ここで、各性状の正常値として、本実験における菌接種前の健康魚の平均値を採用すると、常数 } a \text{ および } b \text{ は次式によって求められる。}$$

$a = Hb_n/R_n = 10.20/2.01 \approx 5$
 $b = V_n/R_n = 41.50/2.01 \approx 20$

したがって、3指数は次式によって得られる。
 色素指数 = $Hb/5R$

容積指数 = $V/20R$

飽和指数 = $4 \text{ Hb}/V$

上式によって求めた菌接種後の経過時間別の色素指数、容積指数および飽和指数を Table 35 に示した。すなわち、菌接種後24時間には、個々の赤血球内のヘモグロビン飽和度はさほど低くないが、小さい赤血球が多いために、ヘモグロビン量がやや少ない傾向を示し、いわゆる小赤血球性低色素性貧血をきたしているものと推察される。これは、プライス・ジョーンズ曲線および血液塗抹標本によって明らかにしたように、菌接種後24時間に小型の幼若赤血球が、多数出現したことを意味するものと思われる。魚類の感染症において、幼若赤血球が多く出現することは、SCHÄPERCLAUS and MANN (1939) が伝染性腹水症のコイで、尾崎 (1959) が X 病 (IPN) のニジマスで、また保科 (1962) が鱒赤病のウナギで明らかにしている。これらは、病原体の感染をうけた魚類に貧血が生じたために、未成熟な赤血球まで放出して、これに対応しようとする生体の防衛反応の一つと考えられる。

また、菌接種後48時間には、プライス・ジョーンズ曲線で示したように、赤血球の大きさが正常に近づくために、色素指数も健康魚のそれとほとんど変わらない。72~96時間後には、ヘモグロビン飽和度も高く、正色素性貧血であるといえる。したがって、本病の人為的感染魚に発現した貧血は、感染初期 (菌接種後24時間) には、やや小赤血球性低色素性貧血の傾向がみられるものの、病状の進行した個体は正赤血球性正色素性貧血であると考えてさしつかえないと思われる。

ヒトの、正赤血球性正色素性貧血の原因として、次の事項が明らかにされている (日野, 1969)。すなわち、(1)

造血機能の低下に基づく再生不良性貧血。(2) 急性大量出血。(3) 溶血性貧血。(4) 慢性腎臓病、肝臓病、悪性腫瘍および慢性感染症などに基づく二次性貧血。(5) 遺伝性球形赤血球症などである。

魚類において、腎臓や脾臓などの造血器が冒される感染症では、著しい貧血が生じることが明らかにされている。AMEND and SMITH (1974) は、IHN ウイルスを腹腔内注射したニジマス幼魚は、ヘマトクリット値が低下し、ヘモグロビン量および赤血球数が減少すると述べている。HUNN (1964) は、カワマスの細菌性腎臓病について、健康魚のヘマトクリット値は 39 ± 1 であったのに対して、病魚のそれは 22 ± 1 であったことを報告し、木村・粟倉 (1977) はマスの同疾病について、健康魚のヘマトクリット値は 44.4 であったのに対して、病魚のそれは 22.6 であったと述べている。第2章および前節で明らかにしたように、本病の自然感染魚ならびに人為的感染魚の病状の進行したものには、腎臓ならびに脾臓などの造血器官に壊死が生じていた。したがって、本病での貧血の原因の一つとして、腎臓および脾臓に損傷をうけた結果、造血機能が衰えたことが考えられる。また、本実験の人為的感染魚には、菌接種後72時間以降の血液塗抹標本に、赤紫色の無構造物が多数観察された。これは、保科 (1962) が鱒赤病のウナギで明らかにした赤血球が崩壊したあとの核であり、結城 (1960) が報告した核影と思われる。結城はその報告の中で、核影異常増多現象の原因の一つとして、造血器官の障害あるいは環境要因によってうけた魚体の生理的障害に基づく、老化赤血球の異常増加をあげている。本実験の人為的感染魚に認められた核影増加現象は、結城の述べた造血器官の障害に起因するものと推察される。

Table 35. Haematological indices of experimentally infected fancy red carp inoculated with *A. hydrophila*

Hours after inoculation	Color index	Volume index	Saturation index
0	1.00	1.00	1.00
24	0.87	0.88	0.98
48	0.93	0.97	0.96
72	1.02	0.92	1.11
96	0.96	0.93	1.04

一方、魚類において、出血を伴う感染症では、著しい貧血が生じることが明らかにされている。FODA (1973) は、せっそう病の大西洋産サケについて、正常魚のヘマトクリット値は 44.5 ± 3.5 、ヘモグロビン量は 9.5 ± 0.86 であったのに対して、病魚ではそれぞれ 18.8 ± 2.89 、 4.3 ± 0.39 であったとし、この低下は出血によるものであることを推論している。第2章および前節で明らかにしたように、本病の病魚には出血が著しい。したがって、本病に生じる貧血の二つめの原因として、各組織における出血が考えられる。

また、種々の細菌が溶血毒素を産生することが知られている（小山：1964，加藤：1964）。清水（1969）は、ウナギから分離された *Aeromonas liquefaciens* (*A. hydrophila*) の超音波破壊によって得られた菌体内物質の、ゲル濾過による素通り分画の中に、溶血因子が存在したことを明らかにしている。また、若林（1981）は、POPOFF and VÉRON (1976) の分類に基づく *A. hydrophila* biovar. *hydrophila* 6株と、その他の運動性 *Aeromonas* の29株中25株が、ウサギ、ヒツジおよびウマの血液を溶血したことを報告している。第3章で明らかにしたように、本病の原因菌はすべて、溶血性を有することから、貧血の第三の原因として、病原菌の毒素に起因する溶血が考えられる。したがって、本病に見られる貧血の発現メカニズムは、血液中に侵入した菌の産生する毒素によって赤血球が溶血し、一方では血管壁から赤血球が漏出し、さらには腎臓および脾臓組織に壊死などの退行性病変が生じて、造血機能が低下することなどが考えられる。

一方、山下（1967）は、潰瘍が生じたカサゴの血液性状を調べ、ヘマトクリット値と共に血液比重が低下することを報告している。本実験における血液比重の変化は、ヘマトクリット値の変動傾向と一致しており、両者の経過時間別測定値には相関係数 $0.66 \sim 0.98$ の高い正相関が得られた。血液比重は血球数、血球容積およびヘモグロビン含量などに強く影響されることから、血液比重がヘマトクリット値と正相関を示したことは、当然の結果と思われる。

また、血漿比重は菌接種後24時間に低下したのち、96時間後まで大きな変動はみられなかった。この原因について以下に考察する。血漿比重と関係の深い血液水分量と血清タンパク量は、前者が経過時間によって多少の変動はあるにしても、平均的に増加するのに対して、後者は48時間後までは減少し、その後増加した。保科（1962）は鱈赤病のウナギの血液水分量について、初期症状のものでは減少する個体のみがみられたが、末期には増加することを明らかにし

ている。また、保科は同報告の中で、鱈赤病のウナギの血清タンパク量は、一般に健康魚より低いが、組織の崩壊が強おきている個体では高まる傾向にあると述べている。その理由としては、血球の崩壊や患部からのタンパク吸収によって、血清中のタンパク量が一時的に増加するのではないかと推論している。前節で述べたように、本実験における人為的感染魚には、菌接種部位に膿瘍が形成されるのをはじめ、各組織が崩壊していることから、72時間後から血清タンパク量が増加した原因は、保科が述べているように、組織崩壊部位からのタンパク吸収に基づく一時的な現象ではないかと考えられる。以上のことから、菌接種後48時間以降に、血液水分量が増加するにもかかわらず、血漿比重が変動しなかった原因は、血清タンパク量の増加によるものであると推察される。

第3節 要 約

(1) コイ科魚類のエロモナス病の発病機構を明らかにするために、ニシキゴイとマゴイを用いて、本病の病魚から分離した *A. hydrophila* の生菌を、筋肉内および経口接種した系と、同一株の菌体破壊抽出液を背大動脈注射した系とを設定し、それぞれの群に発現した病理学的変化を比較検討した。

(2) 接種部位を除く生菌筋注群および生菌経口投与群と、菌体破壊抽出液注射群との外観的、解剖学的ならびに病理組織学的所見がよく一致したことから、本病の発病メカニズムを次のように推論した。すなわち、(a) 腸管内において、病原性 *Aeromonas* が異常増殖したのち、腸管内の血管へ侵入する。(b) 血管内の細菌はさらに増殖し、血液を介して全身の組織に分布する。その一方では、細菌の自己消化によって放出された菌体内毒素により、血管の透過性が亢進する。(c) 血管壁の損傷が大きな部分には、赤血球が漏出するために出血が生じ、損傷の小さな部分には漿液のみが滲出して浮腫が起こる。(d) 真皮の血管壁から滲出した漿液が、鱗囊の細胞間隙に貯留した結果、組織が膨脹し、鱗が上方へ押し上げられて立鱗が起こる。

(3) 次に、本病の血液学的変化の特徴である貧血の発現メカニズムを明らかにするために、実験的感染魚の血液性状を調べ、血液学的ならびに病理組織学的解析を試みた。

(4) 血液性状検査の結果、本病の実験的感染魚に発現した貧血は、正赤血球性正色素性貧血であることが明らかになった。また、実験的感染魚に生じた病理組織学的変化などと併せて、本病の血液学的変化の発現メカニズムを、

次のように推論した。すなわち、(a) 血液中に侵入した病原菌の産生する毒素によって赤血球が溶血する。(b) 一方では、毒素によって血管壁の透過性が亢進し、出血が起こる。(c) 腎臓および脾臓組織に壊死などの退行性病変が生じて、造血機能が低下する。

第6章 予防免疫に関する研究

動物における特異的な免疫反応は、系統発生的に、メクラウナギおよびヤツメウナギなどの円口類を含む脊椎動物から認められることが知られている (MANNING and TURNER, 1979)。

また、NYBELIN (1935) および MANN (1935) は、コイについて、抗原に誘発された特異的な抗体が産生されることを明らかにしている。

本章では、本病に対する予防免疫の可能性の有無を明らかにするために、原因菌の各種の死菌を接種したマゴイについて、抗体産生の有無、その持続性ならびに感染防御能の有無を検討した。

材料および方法

(1) 免疫形成の有無ならびに消長

供試魚： 室内のコンクリート水槽〔76×160×57 (深さ) cm〕4つに、マゴイ (平均体重970 g) 9尾ずつを収容し、1ヵ月間予備飼育したのち、免疫獲得の有無を確認後実験に供した。4区とも同一水源の地下水を用い、毎日体重の0.2%の割合で市販の配合飼料を与えた。実験期間中 (6月1日～12月25日) の水温は、4区とも16.2～21.8℃であった。

免疫抗原： 本病の病魚から分離した *A. hydrophila* CA 1株を、あらかじめ魚体通過したのち、普通寒天培地斜面に25℃、24時間培養し、滅菌生理食塩水に湿菌量で1 mg/mlと、2 mg/mlの割合に懸濁させた。1 mg/ml菌懸濁液を2分して、一方には100℃、30分間の加熱を行って加熱死菌抗原とし、他方には0.5%の割合にホルマリンを加えて、37℃、48時間放置して、生菌の残存しないことを確かめたのち、滅菌生理食塩水で3回洗浄後、ホルマリン死菌抗原とした。2 mg/ml菌懸濁液には0.5%の割合にホルマリンを加え、同様にしてホルマリン死菌としたのち、Freund's incomplete adjuvant (paraffin liquid : tween 80 = 9 : 1) を等量加え、十分混合したのちにアジュバント加ホルマリン死菌抗原とした。このようにして調製した3種の免疫抗原を、各区9尾のコイに対して、1尾あたり

0.4 mlを筋肉内接種し、さらに1週間後に0.6 mlを追加接種した。

採血： ヘパリン処理した注射器を用いて、コイのキューバー管から魚体重の0.1～0.15%量を採血した。第1回の採血は抗原の最終接種日から1週間後に行い、それ以降は2週間おきに19週間後までと、さらに27週間後に、いずれも同一個体から反復採血した。採血後、3,000rpm、10分間の遠心分離で得た血清を、凝集素価の測定用に供した。

凝集素価の測定： 遠心分離によって得られた血清を、生理食塩水で倍数段階に希釈し、それぞれに一定量の抗原を加えて、37℃で2時間反応させたのち、4℃に20時間放置して、凝集の有無を肉眼的に観察した。なお、血清を56℃、30分間加熱して非働化を行ったところ、反応が不明瞭になることが判明したので、本実験では非働化を行わなかった。

(2) ワクチンの感染防御効果

供試魚： 前述の室内コンクリート水槽を3つ使用して、ニシキゴイ (平均体重205 g) 30尾ずつを収容し、1ヵ月間予備飼育したのち供試した。実験期間中 (7月1日～10月25日) の水温は17.0～20.5℃であった。

ワクチンの調製： 前述の方法によって、加熱死菌とホルマリン死菌の2種のワクチンを調製し、供試魚1尾あたり0.2 ml宛筋肉内接種し、さらに1週間後に0.3 mlを追加接種した。

生菌による攻撃試験： ワクチンの最終接種日から1週間、5週間および14週間後に、*A. hydrophila* CA-1株の25℃、24時間培養菌を滅菌生理食塩水に0.02 mg/mlの割合に懸濁して、懸濁液の0.2 mlを供試魚の筋肉内に接種した。菌接種後10日間、斃死の有無を確認し、斃死率を求めた。

結 果

(1) 免疫形成の有無ならびに消長

免疫抗原の最終接種日から1週間後以降の平均凝集価をTable 36およびFig. 20に示した。1週間後においては、加熱死菌接種区 (以下H区とする) で最高1 : 256 (以下倍数のみを表示)、最低64、幾何平均値 (以下平均と表示) 142の凝集価が得られた。ホルマリン死菌接種区 (以下F区とする) は最高256、最低128、平均213であった。アジュバント加ホルマリン死菌接種区 (以下AF区とする) は最高512、最低128、平均327であった。3週間後の凝集価はH区において平均1,024、F区において平均1,920、

Table 36. Changes in agglutinin titer against heat and formalin-killed cells of *A. hydrophila* in the carp

Immunized antigen	Number of fish	Mean of body weight	Geometric mean of agglutinin titer (1 :)										
			Weeks after immunization										
			1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	27
Heat-killed cells	9	896 (g)	142	1,024	1,664	585	402	87	75	31	31	20	19
Formalin-killed cells	9	1,051	213	1,920	6,875	878	533	197	501	64	149	85	53
Adjuvant formalin-killed cells	9	969	327	1,317	1,638	614	512	160	400	52	144	82	60
Control	5	855	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean of water temperature (°C)			16.6	17.2	18.1	19.2	19.7	20.3	20.6	20.5	20.0	19.5	18.2

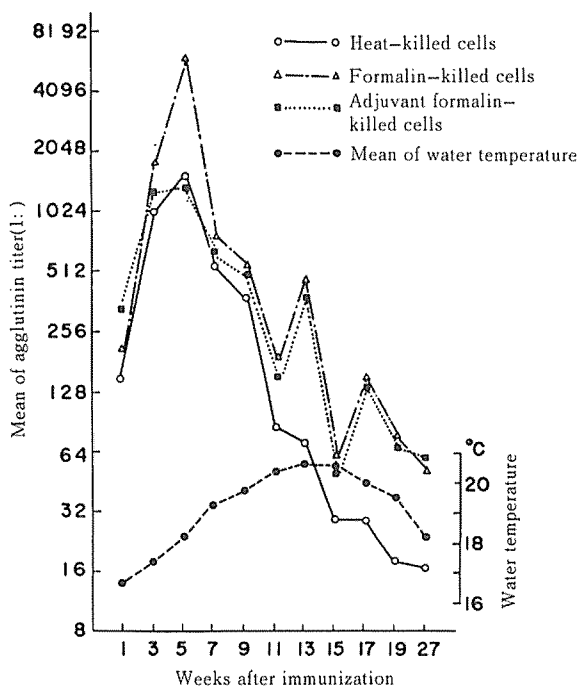


Fig. 20. Changes in agglutinin titer against killed cells of *A. hydrophila* in the carp.

AF区では平均1,317となり、3区とも凝集価の上昇がみられた。5週間後の凝集価はH区において最高4,096、最低1,024、平均1,664となり、F区では最高16,384、最低1,024、平均6,875となった。また、AF区では最高2,048、最低1,024、平均1,638となり、3区とも5週間後の凝集価が最も高かった。しかし、7週間後の凝集価は3区とも低

下の傾向を示し、H区においては平均585、F区で平均878、AF区では平均614となった。9～11週間後までの凝集価は、3区とも漸次低下する傾向がみられた。13週間後にはH区では平均75に低下したが、F区とAF区に凝集価の上昇した個体があらわれ、それぞれ平均501と400になった。15週間後には3区とも凝集価の低下がみられ、17週間後のFおよびAF区には、多少上昇した個体が存在した。27週間後においてはH区で最高32、最低8、平均19となり、F区では最高128、最低16、平均53となった。AF区では最高128、最低16、平均60となった。

(2) ワクチンの感染防御効果

生菌の攻撃試験によるワクチンの感染防御成績を Table 37 に示した。ワクチンの最終接種日から1週間後に生菌による攻撃試験を行った結果、加熱死菌ワクチン接種区（以下H区とする）では、10日間の累積死亡率は50%であった。ホルマリン死菌接種区（以下F区とする）では、累積死亡率は20%となった。これに対して、対照区では生菌攻撃後7日までに全数が斃死した。

ワクチン接種後5週間に生菌による攻撃試験を行った結果、H区では10日間の累積死亡率が30%、F区では10%であったのに対して、対照区は攻撃後6日以内に全数が斃死した。ワクチン接種後14週間に生菌による攻撃試験を行った結果、H区では10日間の累積死亡率が40%、F区では同様に40%となったのに対して、対照区では攻撃後9日以内に全数が斃死した。

考 察

コイの免疫反応については、いくつかの報告がある。NYBELIN (1935) は、コイに *Vibrio anguillarum* および *Bacillus (Pseudomonas) fluorescens* の生菌または死菌を

Table 37. Challenge of immunized and untreated control carp against *A. hydrophila*

Weeks after immunization	Immunized antigen	Number of deaths Days after challenge										Mortality (%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	Heat-killed cells	0	0	0	0	0	1	2	2	0	0	50
	Formalin-killed cells	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	20
	Untreated control	0	0	2	0	2	2	4	-	-	-	100
5	Heat-killed cells	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	30
	Formalin-killed cells	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	10
	Untreated control	0	0	2	3	2	3	-	-	-	-	100
14	Heat-killed cells	0	0	0	0	0	2	1	0	0	1	40
	Formalin-killed cells	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1	40
	Untreated control	0	0	1	1	0	3	2	1	2	-	100

接種したところ、凝集素が形成され、しかも1回だけの抗原接種によって高い凝集価が得られたことを明らかにしている。また、PLISZKA (1939) および MANN (1935) は、当時伝染性腹水症の原因とされていた *Pseudomonas punctata* (*Aeromonas hydrophila*) をコイに接種して凝集価を測定した。PLISZKAによると、凝集価は抗原接種後1週間で20、2週間後で1,280、3週間後で20,480となり、きわめて高い価になることを報告している。一方、MANNによると、凝集価は抗原接種後1日に80~160となり、4日後にはさらに上昇して640~2,560となるが、70日後には20~80に低下したと述べている。本実験においても、加熱死菌、ホルマリン死菌およびアジュバント加ホルマリン死菌の3種の免疫抗原を接種したコイの凝集素の形成は比較的早く、接種後1週間にはすでに全個体に認められ、いずれの抗原に対しても5週間後の凝集価が最も高かった。これらのことから、コイは *Aeromonas* や *Vibrio* などの細菌抗原に対して、比較的短期間に高い抗体を産生する能力をもつものと思われる。

一方、変温動物における抗体産生能は一般に、温度に強く影響されることが知られている。NYBELIN (1935) および PLISZKA (1939) は、魚類の抗体産生能は10℃以下の低水温下においては十分でないとし、MANN (1935) は、コイでは18~20℃で最高の凝集価が得られることを明らかにしている。しかし、DUFF (1942) は冷水族のマス類について調べ、10℃でも抗体が産生されると述べている。また、保科 (1962) はウナギに *A. punctata* (*A. hydrophila*) を

接種して、水温5.9~10.5℃で56日間飼育し、凝集価320~640が得られたことを報告している。AVTALION ら (1973) は、水温25℃に保たれているコイは、抗原刺激に対して9日以内に抗体を産生するが、12℃では抗原接種後数カ月を経ても抗体は検出されなかったとしている。しかし、25℃で免疫し、その後8日目に12℃に移しても正常な免疫応答が現れたとの興味ある結果を明らかにしている。このことは、魚類の免疫反応が水温に影響をうけるのは、一次免疫応答の誘発時であることを意味するものと考えられる。本実験におけるコイの飼育水温は16.2~21.8℃であり、MANNの述べた抗体産生の適温範囲内の成績であって、低水温時や高水温時における抗体産生については明らかでない。しかし、実用に際してはAVTALION らの明らかにしたように、一次免疫応答時の短期間だけ、人為的に調節した高水温の環境下で飼育する方法も十分考えられる。

次に、本実験においては短期間に高い凝集価が得られたが、持続性が比較的とほしく、免疫抗原接種後5週間で最高にして、27週間後の各区における平均凝集価は、19~60であった。この結果はKRANTZ ら (1964) がマス類に *A. salmonicida* のアジュバントワクチンを接種して、10ヵ月後に平均1,280を超える高い凝集価を得たという報告や木村 (1970) がニジマスに *A. salmonicida* の加熱死菌を接種して、18週間後に平均2,048の凝集価を得たとの報告と異なる。この原因については不明であるが、佐野 (1970) はキューベーター管から反復採血する場合には、採血時に採取量程度のコイの血清を輸血すれば、抗体価の持続は可能であ

るとしている。凝集素形成の持続性については、今後採血法や輸血の問題を含めて、抗原量やその調製法および水温などとの関連を検討する必要がある。

一方、免疫抗原の種類別の抗体産生能は、ホルマリン死菌、アジュバント加ホルマリン死菌、加熱死菌の順にすぐれていた。KRANTZら(1964)は、マス類に *A. salmonicida* のホルマリン死菌ならびにアジュバントワクチンを接種した結果、後者に高い凝集素が形成されたことを明らかにしている。本実験ではアジュバント加ホルマリン死菌接種区の抗体価は、ホルマリン死菌のそれよりも、やや低い価しか得られなかった。この点についても、アジュバントの種類や抗原の接種法などとの関連を検討する必要がある。

次にワクチンの感染防御効果については、免疫抗原接種後1, 5および14週間の3回にわたって、生菌攻撃試験により確かめた結果、対照群はいずれの場合にも10日以内に100%斃死したのに対して、加熱死菌およびホルマリン死菌ワクチン区の斃死率は10~40%であり、顕著な防御効果が認められた。特に、高い抗体価が得られたホルマリン死菌抗原の接種後5週間では、攻撃試験においても斃死率が10%と著しく低く、抗体価と感染防御効果に関連性があることを示唆する結果が得られた。KRANTZら(1964)は *A. salmonicida* のアジュバントワクチンを接種したのち、生菌攻撃試験を行ったところ、予防効果が認められたことを報告している。保科(1962)は *A. punctata* (*A. hydrophila*) と *Paracolobactrum anguillimortiferum* (*Edwardsiella tarda*) を等量ずつ加えたホルマリン死菌・クロームワクチンを筋肉内接種したのち、生菌攻撃試験を行い、ワクチンの有効性を確認している。しかし、保科は同報告の中で、ワクチンの経口投与を試みているが、免疫効果を示す結果は得られなかったと述べている。一方、HARAら(1976)はヤマメおよびアマゴのせっそう病を対象に、*A. salmonicida* の経口ワクチンの効果について調べ、自然感染による死亡率が対照にくらべて低い結果を得ている。また、KAWAIら(1981)はアユのピブリオ病経口ワクチンの有効性を確認し、その効果は体表粘液中に分泌される凝集素によるものであると述べている。そのほか、KUSUDAら(1980)はアユのピブリオ病に対して、浸漬法ワクチンが有効であることを、また伊丹・楠田(1980)は同疾病に対して、噴霧ワクチンが有効であることを、それぞれ明らかにしている。本実験において、*A. hydrophila* の加熱死菌ならびにホルマリン死菌ワクチンを筋肉内接種した個体には、実験感染に対して明らかな防御効果が認められたことから、これらのワクチンを養殖魚にあらかじめ

接種しておけば、予防できる可能性があるものと推察される。しかし、実用化に際しては、浸漬法および噴霧法など、簡便なワクチン投与方法の検討をする必要があると思われる。また、本病の原因菌 *A. hydrophila* は血清学的に多様であることが明らかにされているので、(清水・江草：1968, 高橋・楠田：1977), 単一血清型の菌株を用いたワクチンでは、本病の予防は困難であると考えられることから、今後は多価ワクチンについても検討する必要がある。

要 約

(1) コイ科魚類のエロモナス病に対する、免疫による予防の可能性を知るために、*A. hydrophila* の加熱死菌、ホルマリン死菌ならびにアジュバント加ホルマリン死菌を筋肉内接種したマゴイについて、凝集素形成の有無および消長を調べた。死菌抗原接種後1週間目の平均凝集価は、加熱死菌区で1:142, ホルマリン死菌区で213, アジュバント加ホルマリン死菌区で327となった。5週間後には加熱死菌区で1,664, ホルマリン死菌区で6,875, アジュバント加ホルマリン死菌区で1638となり、3区とも5週間後に最も高い凝集価が得られた。その後、凝集価は、いずれの区とも漸時低下し、2週間後には加熱死菌区で19, ホルマリン死菌区で53, アジュバント加ホルマリン死菌区で60となった。このように、マゴイは *A. hydrophila* の死菌抗原に対して、短期間に高い凝集素を形成するが、持続性に比較的乏しいことが明らかになった。

(2) 加熱死菌ならびにホルマリン死菌ワクチンをあらかじめ接種しておいたニシキゴイに対して、生菌による攻撃試験を行って、ワクチンの感染防御効果を調べた。対照区では生菌攻撃後10日以内に、いずれも100%斃死したのに対して、ワクチン接種後1週間目の斃死率は、加熱死菌区で50%, ホルマリン死菌区で20%となった。5週間後の斃死率は、加熱死菌区で30%, ホルマリン死菌区は10%であり、14週間後の斃死率は2区ともに40%となって、明らかな感染防御効果が認められた。

以上のことから、本病に対してワクチンによる防除の可能性があることが示唆された。

第7章 薬剤による治療に関する研究

魚類の細菌性疾病の治療には、抗生物質、サルファ剤ならびにニトロフラン剤など、多くの薬剤が使用されているが、コイ科魚類のエロモナス病に対する治療方法は確立されていない。

そこで、本病の適切な治療方法を明らかにするために、まず原因菌に対する種々の薬剤の抗菌力を調べ、抗菌活性の高い薬剤について、コイ科魚類に対する毒性ならびに治療効果を検討した。

第1節 原因菌の薬剤に対する感受性

材料および方法

感受性ディスク法：本病の病魚から分離した *A. hydrophila* GA1, CA1 および CB1 株を、それぞれ普通ブイオン培地（日水）で、25℃、20時間培養後、培養液の0.1mlを感受性ディスク用培地（日水）平板上に塗抹して、各種薬剤の感受性ディスク（昭和薬化工）を置いたのち、5℃、4時間放置後、25℃、20時間培養して発育阻止円の直径を計測した。

寒天平板希釈法：日本化学療法学会標準法に基づいて行った。供試菌株は病魚から分離した CA1, CB1, GA1, CF1, CG1, CH1, CI1, CJ1, CK1, GB1, GC1 および

CRA1 株を用いた。各菌株を普通寒天培地斜面で25℃、20時間培養したのち、滅菌生理食塩水に 2×10^5 細胞/ml 濃度に懸濁し、その1白金耳を各種薬剤含有培地に塗抹した。なお、サルファ剤については、下記の組成よりなる半合成培地を使用した。判定は25℃、24時間培養後、菌の発育の有無を観察して行った。

半合成培地の組成

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.5g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1g
KH ₂ PO ₄	0.4g	DL-Tryptophan	10mg
NaCl	5.0g	Thiamin	10mg
Casamino Acid	2.0g	Nicotinic Acid	10mg
Glucose	1.0g	Aq. dest.	1000ml

液体希釈法：一部の薬剤について、その溶解液を普通ブイオンで倍数段階希釈した。各種希釈系列に、*A. hydrophila* CA1 株の25℃、20時間ブイオン培養菌の1/10⁴ 希釈液

Table 38. Sensitivity of the isolates to antibacterial agents

Drugs(mcg/ml)	Strains		
	GA	GA	CB
Chloramphenicol	0.2*	0.04	0.1
Colistin	10	0.9	4
Streptomycin	8	4	6
Kanamycin	18	2	2
Tetracycline	40	0.04	0.04
Erythromycin	9	4	6.5
Novobiocin	6.2	4.5	6.2
Leucomycin	28	6	17
Oleandomycin	40	0.04	0.04
Sulfadimethoxine	16	60	40
Sulfamonomethoxine	8.5	90	290
Sulfamethomidine	26	150	70
Sulfaphenazole	31	160	210
Sulfamethoxypyridazine	21	285	165
Sulfisomidine	50	170	170
Sulfisoxazole	170	130	93
Sulfamethizole	160	160	200
Sulfisomezole	150	230	330
Nalidixicacid	0.5	0.1	0.8

* Minimum inhibitory concentration (mcg/ml).

0.1mlを加え、25℃、18時間培養後、培養液の混濁の有無によって判定した。

供試薬剤： クロラムフェニコール (CP), コリスチン (CL), ストレプトマイシン (SM), カナマイシン (KM), テトラサイクリン (TC), エリスロマイシン (EM), ノボビオシン (NB), オキシテトラサイクリン (OTC), ロイコマイシン (LM), オレアンドマイシン (OM), スルファジメトキシシン (SD), スルファモノメトキシシン (SMM), スルファメトミジン (SMD), スルファフェナゾール (SPZ), スルファメトキシピリダジン (SMP), スルフィソミジン (SIM), スルフィソキサゾール (SIX), スルファメチゾール (SMZ), スルフィソメゾール (SMZ), スルフィソゾール (SIZ), ナリジクス酸 (NA), オキサリン酸 (OA) およびニトロフラン誘導体の NF-1800, NF-1802, P-7138 を用いた。

結 果

原因菌の各種薬剤に対する感受性試験については、ディスク法による成績を Table 38 に、寒天平板希釈法による

成績を Table 39 に、液体希釈法による成績を Table 40 にそれぞれ示した。

ディスク法では、菌株によって感受性に多少の差異が認められたが、CP および NA に対しては、いずれの株も高い感受性を示した。

寒天平板希釈法では CP, NA および TC に対する感受性が高く、その最小発育阻止濃度 (MIC) は、それぞれ $0.1 \sim 0.8$, $\leq 0.1 \sim 0.4$, $0.2 \sim 1.6 \text{mcg/ml}$ であった。また、サルファ剤では、SMM および SIZ に対して感受性が高く、その MIC はいずれも $3.2 \sim 12.5 \text{mcg/ml}$ であった。

また、液体希釈法では、いずれの薬剤に対しても高い感受性がみられ、MIC は NF-1800 および NF 1802 で 0.002, P-7138 では 0.03, OTC では 0.62, OA では 0.005mcg/ml であった。

考 察

AOKI and EGUSA (1971) はウナギ, アユ, キンギョ およびコイなどから分離した *A. liquefaciens* (*A. hydrophila*) について、薬剤に対する感受性をしらべ、CP, TC およ

Table 39. Sensitivity of the isolates to antibacterial agents

Drugs(mcg/ml)	Strains												
	GA1	GB1	GA1	GF1	CG1	CH1	CI1	GJ1	GK1	GB1	GC1	CRA1	
Chloramphenicol	0.2*	0.4	0.8	0.2	0.1	0.1	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	
Colistin	6.3	6.3	12.5	3.2	6.3	6.3	12.5	12.5	12.5	6.3	6.3	12.5	
Streptomycin	6.3	12.5	12.5	6.3	6.3	12.5	6.3	3.2	6.3	6.3	3.2	12.5	
Kanamycin	25	25	25	12.5	25	3.2	25	25	12.5	12.5	6.3	6.3	
Tetracycline	0.2	0.4	3.2	0.4	0.4	0.4	0.8	1.6	0.8	1.6	0.4	0.2	
Erythromycin	6.3	12.5	12.5	6.3	12.5	6.3	6.3	12.5	12.5	12.5	12.5	6.3	
Novobiocin	6.3	6.3	6.3	3.2	6.3	6.3	6.3	3.2	3.2	6.3	6.3	12.5	
Nalidixic acid	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	
Sulfisozole	6.3	12.5	12.5	6.3	6.3	6.3	3.2	6.3	12.5	3.2	6.3	6.3	
Sulfadimethoxine	12.5	25	25	12.5	12.5	6.3	12.5	6.3	6.3	3.2	6.3	6.3	
Sulfamonomethoxine	3.2	12.5	6.3	3.2	3.2	6.3	3.2	6.3	6.3	6.3	3.2	3.2	
Sulfamethomidine	50	50	50	12.5	25	25	12.5	6.3	12.5	12.5	12.5	25	
Sulfaphenazole	100	50	50	50	50	25	50	50	50	100	50	50	
Sulfamethoxy pyridazine	25	50	25	25	12.5	25	25	50	50	25	25	50	
Sulfisomidine	100	50	100	100	50	50	50	50	100	50	25	50	
Sulfisoxazole	50	25	50	50	50	50	50	100	200	100	100	50	
Sulfamethizole	50	100	100	50	100	100	50	50	50	50	25	50	
Sulfisomezole	12.5	25	25	25	12.5	12.5	6.3	25	12.5	25	12.5	25	

* Minimum inhibitory concentration (mcg/ml).

Table 40. Sensitivity of *A. hydrophila* CA 1 to antibacterial agents

Drugs	Concentration of drugs(mcg/ml)												
	2.50	1.25	0.62	0.31	0.15	0.07	0.03	0.01	0.005	0.002	0.001	0.0005	
Nitrofurantoin													
NF-1800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
NF-1802	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	
P-7138	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+	
Oxytetracycline	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	
Oxolinic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	

び SMM に対して高い感受性を示すことを明らかにしている。また、大島ら (1970) は *A. liquefaciens* (*A. hydrophila*) の DS-677K (NF-1802 と同一薬剤) および TC に対する感受性を調べ、前者の MIC は 0.0125~0.05 であり、後者のそれは 0.8~1.6mcg/ml であったと述べている。本実験においても、上記の報告とはほぼ同様の成績が得られた。すなわち、抗生物質では CP, TC, OTC に、サルファ剤では SMM, SIZ に、ニトロフラン剤では NF-1800, NF-1802 に、またその他合成抗菌剤では NA および OA に対して、いずれも高い感受性を有することが認められた。

したがって、これらの薬剤が本病に対して有効であると考えられるが、次節以降において、コイ科魚類に対する安全性ならびに *in vivo* における効果などを確認したのち、結論づけることにしたい。

第2節 ニシキゴイに対する薬剤の毒性

材料および方法

(1) 薬浴毒性 薬剤のうち、CP, OTC, NA は pH7.0 に調整したプロピレングリコールを用いて、また SMM と OA は 1N カセイソーダで溶解し、アクリル樹脂水槽 [22×17×15(深さ) cm] に所定の濃度となるように加えた。

薬剤の各種濃度液に、ニシキゴイ (平均体重 10g) を 5 尾ずつ収容し、水温 15±1℃ で飼育して、24, 48, 72 および 96 時間後における斃死尾数を確認した。

(2) 経口毒性

ニシキゴイ (平均体重 25g) をアクリル樹脂水槽 [40×60×35(深さ) cm] 9 個に 5 尾ずつ収容し、水温 15±0.5℃ で飼育した。

各群には、供試魚の体重 kg あたり、SMM を 0.5, 1, 5, 10g, また OA を 0.1, 0.2, 0.5, 1g 宛、5% アラビアゴム水溶液に懸濁してゾンデによって 1 回経口投与した。投薬後 96 時間飼育して、斃死尾数を調べた。

結 果

(1) 薬浴毒性

ニシキゴイに対する薬浴毒性については、CP および OTC の成績を Table 41 に、SMM および NA の成績を Table 42 に、また OA の成績を Table 43 に示した。CP の 1,000ppm, 96 時間薬浴における累積斃死率は 20%, OTC の 500ppm, 96 時間薬浴では 20%, 1,000ppm では 40% が斃死した。SMM の 10,000ppm, 96 時間薬浴における累積斃死率は 60%, NA の 30ppm では 40%, 50ppm では 100% が斃死した。OA の 500ppm, 48 時間薬浴における累積斃死率は 40% であった。いずれの薬剤も、上記以下の濃度においてはニシキゴイの斃死はみられなかった。

(2) 経口毒性

ニシキゴイに対する SMM および OA の経口毒性の結果を Table 44 に示した。SMM は 10g/kg (魚体重) の最高用量群の 96 時間後においても、全数が生存した。また、OA は 1g/kg (魚体重) の最高用量群でも、すべての供試魚が生存した。

考 察

各種薬剤の薬浴毒性については、CP のヒメダカに対する 48 時間の TL_m が 1,400ppm であったとの報告や (日本水産資源保護協会, 1981), OTC のウナギ成魚に対する毒性は、500ppm, 48 時間薬浴で斃死はみられず、1,000ppm において 75% が斃死したとの報告などがある (楠田ら,

Table 41. Bathing toxicity of chloramphenicol and oxytetracycline solution to fancy red carp

Hours after bathing	Concentration of drugs(ppm)								Control
	Chloramphenicol				Oxytetracycline				
	50	100	500	1000	50	100	500	1000	
24	0*	0	0	0	0	0	20	40	0
48	0	0	0	20	0	0	20	40	0
72	0	0	0	20	0	0	20	40	0
96	0	0	0	20	0	0	20	40	0

* Cumulative mortality(%).

Table 42. Bathing toxicity of sulfamonomethoxine and nalidixic acid solution to fancy red carp

Hours after bathing	Concentration of drugs(ppm)								Control
	Sulfamonomethoxine				Nalidixic acid				
	500	1000	5000	10000	10	30	50	100	
24	0*	0	0	0	0	0	0	100	0
48	0	0	0	40	0	0	80	100	0
72	0	0	0	40	0	20	80	100	0
96	0	0	0	60	0	40	100	100	0

* Cumulative mortality(%).

Table 43. Bathing toxicity of oxolinic acid solution to fancy red carp

Hours after bathing	Concentration of oxolinic acid(ppm)			Control
	100	250	500	
24	0*	0	40	0
48	0	0	40	0

* Cumulative mortality (%).

Table 44. Oral toxicity of sulfamonomethoxine and oxolinic acid to fancy red carp

Hours after administration	Concentration of drugs(mg/kg B.W.)								
	Sulfamonomethoxine				Oxolinic acid			Control	
	500	1000	5000	10000	100	200	500	1000	
24	0*	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0	0	0	0	0
96	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* Cumulative mortality (%)

1969)。また、井上ら(1966)は、SMMのキンギョに対する半数致死濃度を調べ、24時間薬浴では12,500ppm、48時間薬浴では9,600ppmであったと述べている。NAについては、コイに対する安全域が3~5ppm、3日間薬浴であること、またOAのニシキゴイに対する薬浴毒性は、250ppm、48時間で斃死はみられず、500ppm、24時間では40%が斃死することが明らかにされている(日本水産資源保護協会, 1981)。本実験においても、上記の報告とはほぼ同様の成績が得られた。すなわち、ニシキゴイに対する各種薬剤の薬浴における、安全濃度と時間は、CPの場合500ppm、96時間または1,000ppm、24時間であり、OTCでは100ppm、96時間、SMMは5,000ppm、96時間または10,000ppm、24時間、NAでは10ppm、96時間または30ppm、48時間、OAは250ppm、48時間であった。したがって、本病の薬浴による治療を目的に、これらの薬剤を用いる場合は、上記の各濃度および時間以下の範囲を一応の安全域と考えてさしつかえないものと思われる。

次に、魚類に対する薬剤の経口毒性については、SMMをコイの体重kgあたり15g1回投与で100%が生じたとの報告や(東京都水試, 1965)、OAをアユの体重kgあたり20, 100, 200mg/日、5日間投与したところ、20mg投与では何ら異常は認められなかったが、100mg以上の投与群では肝臓と腎臓に病的変化が観察されている(日本水産資源保護協会, 1981)。本実験における、ニシキゴイに対する薬剤の経口毒性は、SMMで10g/kg(魚体重)、OAで1g/kg(魚体重)、1回投与によって100%の供試魚が生じた。したがって、経口投与による治療を目的に、これらの薬剤を用いる場合は、上記投与量以下の量が一応の安全域と考えられるが、本実験では1回投与による急性毒性について調べていることから、さらに数日投与による安全

量を把握する必要があると考える。また、魚類に対する薬剤の毒性は薬浴および経口投与ともに、水温に影響されることが知られているので、数段階の水温条件下における毒性試験が必要と思われる。しかし、上記の薬剤の安全量は、かなり高濃度であることから、これらの薬剤のコイ科魚類に対する安全性は高いと考えられる。実際使用量については、次節において有効量を確認した上で論じることにした。

第3節 実験的感染魚および自然感染魚に対する薬剤の治療効果

材料および方法

(1) 実験的感染魚に対する薬剤の治療効果

(1-1) 薬浴による治療

ニシキゴイ(平均体重25g)を10個のアクリル樹脂水槽[40×60×35(深さ)cm]に10尾ずつ収容し、水温15±1℃で1週間予備飼育したのち実験に供した。病魚から分離した*A. hydrophila* CA 1株を、普通寒天培地斜面に25℃、18時間培養後、滅菌生理食塩水に懸濁した。そして、魚体重10gあたり約10⁸細胞宛、背部筋肉内に接種した。菌接種後1および4時間に、CPならびにOTCの2, 8, 20ppmとNAの5, 20, 50ppm濃度液中に、それぞれ30分間薬浴させた。薬浴後、上記の水槽に再びもどして、十分なエアレーションを行って10日間飼育し、斃死の有無を観察した。

(1-2) 経口投与による治療

ニシキゴイ(平均体重25g)を5個の上記と同一水槽に10尾ずつ収容し、水温20±0.5℃で1週間予備飼育したのち実験に供した。上記と同様にして感染させた供試魚に対

して、5%アラビアゴム液に懸濁させたOAを、体重kgあたり2, 10, 20, 40mg宛、菌接種後30分と3時間の2回に分け、ゾンデを用いて経口投与した。投薬後、上記の水槽に再びもどして、十分なエアレーションを行って10日間飼育し、斃死の有無を観察した。

(2) 自然感染魚に対する薬剤の治療効果

(2-1) 薬浴による治療

1971年11月、東京都小平市において、ニシキゴイ(平均体重650g)13尾に、体表および鱗の充・出血が著しい病気が発生した。細菌の分離と同定を試みたところ、*A. hydrophila*が純培養状に分離されたため本病と診断し、NAによる薬浴治療を行った。

病魚13尾のうち、5尾ずつをNAの3または5ppm薬液中に1日1回、30分間浸漬し、これを3日間継続したのち、臨床症状と斃死の有無とを2週間観察した。なお、3尾の病魚については無処置の対照区とした。

(2-2) 経口投与による治療

1971年8月、埼玉県所沢市において、ニシキゴイ(平均体重215g)26尾に、眼縁、体表および鱗の充・出血と一部の個体に立鱗を伴う疾病が発生した。細菌の分離と同定

を行ったところ、*A. hydrophila*が純培養状に分離されたため本病と診断し、SMMを用いた下記の治療を行った。病魚26尾のうち、17尾にはSMMの100mg/kg(魚体重) / 日量を養魚油に懸濁し、クランブル飼料に吸着させて5日間経口投与した。投薬期間中ならびに投薬終了後10日まで、臨床症状と斃死の有無とを観察した。

結 果

(1) 実験的感染魚に対する薬剤の治療効果

CP, OTCおよびNAによる薬浴治療の成績をTable 45に示した。対照区では、菌接種後7日目までに100%が斃死したのに対して、CPおよびOTCの8ppm区では、10日後までの累積斃死率が前者で20%、後者は60%であった。また、CPおよびOTCの20ppm区では、いずれも100%が生じた。しかし、両薬剤の2ppm区には、薬浴による治療効果は認められなかった。一方、NAの5, 20, 50ppm区では、いずれも100%が生じた。

次に、OAの経口投与による治療の成績をTable 46に示した。対照区では、菌接種後7日目までに100%が斃死したのに対して、OAを2mg/kg(魚体重)投与した区

Table 45. Therapeutic effect of drugs against experimental infection in fancy red carp inoculated with *A. hydrophila*

Drugs and concentration	Number of dead fish										Mortality (%)
	Days after challenge										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Chloramphenicol											
2 ppm	0	0	0	2	0	2	2	2	0	0	80
8 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	20
20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oxytetracycline											
2 ppm	0	0	0	0	4	2	2	2	0	0	100
8 ppm	0	0	0	0	1	1	2	0	0	2	60
20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nalidixic acid											
5 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control											
-	0	0	0	1	3	4	2	0	0	0	100

Table 46. Effect of oral-administered oxolinic acid against experimental infection in fancy red carp inoculated with *A. hydrophila*

Administered dose (mg/kg B.W.)	Number of dead fish Days after challenge										Mortality (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
2	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	40
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control	0	0	0	0	5	0	5	—	—	—	100

における10日後までの累積死亡率は40%であった。また、10, 20および40mg/kg 投与区では、いずれも100%が生じた。

(2) 自然感染魚に対する薬剤の治療効果

NAによる薬浴治療の成績をTable 47に示した。無処置の3尾は、発病後4～8日目に斃死したのに対して、NAの3 ppm 薬浴区では20%が斃死し、5 ppm 区では全魚が生じた。

一方、SMMの経口投与による治療成績をTable 48に示した。15日間の観察期間中に、対照区では88.9%が斃死したのに対して、SMMを100mg/kg (魚体重)/日、5日間投与した群では1尾が斃死したのみであった(死亡率5.9%)。また、上記の投薬区と対照区との死亡率には、有意差($P < 0.01$)が認められた。

なお、実験的感染魚の治療試験において斃死した個体の腎臓からは、接種菌と同一性状を示す細菌が再分離された。自然感染魚のそれからは、再現性を有する *A. hydrophila* が分離された。

考 察

大島ら(1970)は、キンギョの実験的 *A. hydrophila* 感染症に対して、DS-677 K (NF-1802) および TC による薬浴治療の効果を検討し、感染対照群では感染後2日までに100%が斃死したのに対して、治療群では7日後までに、DS-677 K の20ppm 薬浴区で40%が、TC の20ppm 薬浴区では80%が斃死したことを明らかにしている。稲葉(1978)は、野外におけるニシキゴイのエロモナス病に対して、NAの5 ppm, 4～5回(数日の間隔をおく)の薬浴が有効であったと述べている。また、コイの立鱗病(エ

ロモナス病)に対する OTC の効果については、10および50ppm, 30分間の2回薬浴によって、それぞれ50, 75%が治癒し、10および100mg/kg (魚体重), 1日間経口投与によって、それぞれ50, 75%が治癒したとの報告がある(日本水産資源保護協会, 1980)。本実験において、病魚を100%治癒させた薬剤とその最小濃度は、薬浴の場合 CP と OTC のいずれも20ppm, NA の5 ppm, 各30分間2回薬浴であった。経口投与では、OA の10mg および SMM の100mg/kg (魚体重)であった。

以上のことから、各薬剤の魚類に対する最大無作用量を治療における最小有効量で除して安全係数を求めると、24時間以内の薬浴では CP で50, OTC で5, NA では10となる。また、経口投与では、SMM および OA ともに安全係数100以下となった。したがって、本病の治療剤とその用量を魚類に対する安全性と効果の両面から考えた場合、薬浴では CP および OTC の各20ppm と NA の5 ppm が、また経口投与では OA の10mg/kg (魚体重)/日および SMM の100mg/kg (魚体重)/日をいずれも5日間投与する方法が適当であると思われる。

しかし、*A. hydrophila* には薬剤耐性株が出現していることから(AOKI and EGUSA, 1971), 薬剤を使用する場合は、事前に感受性試験を実施することが望ましいと考える。

第4節 要 約

(1) 本病に対する適切な治療方を明らかにするために、病魚から分離した *A. hydrophila* の薬剤感受性を調べ、感受性の高い薬剤を対象に、魚類に対する安全性ならびに治療効果を検討した。

(2) 本病の病魚から分離した *A. hydrophila* について、

Table 47. Effect of bathing therapy of nalidixic acid against *Aeromonas* infection in fancy red carp

Group	Concentration of drug(ppm)	Number of fish	Days after beginning of bathing therapy														Mortality (%)		
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14	
Therapeutic group	3	5	0*	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control	—	3	0	0	0	0	1	0	0	1	1	—	—	—	—	—	—	—	100

* : Number of dead fish. ↓ : Bathing therapy.

Table 48. Effect of oral-administered sulfamonomethoxine against *Aeromonas* infection in fancy red earp (oral-administered dose: 100 mg/kg/day, for 5 days)

Group	Number of fish	Days after beginning of medication												Number of fish (died/tested)	Mortality (%)	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			12
Medicated group	17	0*	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1 / 17**	5.9
Control	9	0	0	2	1	3	1	0	1	0	0	0	0	0	8 / 9**	88.9

* : Number of dead fish. ↓ : Medication.
** : Significant P < 0.01.

各種の薬剤に対する感受性を調べた結果、分離菌は CP, TC, OTC, SMM, SIZ, NF-1800, NF-1802, NA および OA などに高い感受性を示すことが明らかになった。

(3) 本病の原因菌に対して高い抗菌活性を示した薬剤のうち数剤について、ニシキゴイに対する安全性を調べた結果、薬浴における最大無作用量（濃度）とその最高時間は、CP で500ppm, 96時間および1,000ppm, 24時間であった。また、OTC では100ppm, 96時間, SMMは5,000ppm, 96時間および10,000ppm, 24時間, NA では30ppm, 48時間および50ppm, 24時間であり, OA では250ppm, 48時間であった。1回の経口投与による急性毒性は、SMMで魚体重 kgあたり10g <, OA では1g <となった。

(4) 本病の実験的感染魚および自然感染魚に対する薬剤の治療効果を検討した結果、薬浴ではCPおよびOTCの各20ppmとNAの5ppm, いずれも30分間を数回実施する方法が適当であると思われた。また、経口の場合はOAの10mg/kg（魚体重）/日およびSMMの100mg/kg（魚体重）/日を5日間投与する方法が妥当であると考えられた。

第8章 総括

本研究はコイ科魚類のうち、主としてコイ、キンギョ、フナおよびカマツカに発生するエロモナス病について、その病因を明らかにし、感染と発病のメカニズムを解明するとともに、診断上の基準とすべき特徴を明確にし、効果的な予防ならびに治療対策などを総合的に究明したものである。

まず第1章において、本病と関連のある疾病の既往の研究について論述し、コイの春ウイルス血症、紅斑性皮膚炎およびウナギの鱗赤病など、本病と類似の症状を呈する疾病に関する報告は多いが、コイ科魚類のエロモナス病についての、見るべき研究は皆無に等しい本研究着手の背景と経緯について述べた。

第2章では、全国各地で発生した4魚種（コイ、キンギョ、フナ、カマツカ）、203尾の病魚について、その外観症状、剖検所見、病理組織学的所見ならびに血液学的所見など、本病を診断する上での基準とすべき特徴を明確にし

た。すなわち、本病は体表と鱗の充・出血、立鱗、肝臓のうっ血および腸管の充血などの症状が特徴的である。また、病理組織学的には、各組織に滲出性ならびに出血性の炎症が著しく、症状の進行した病魚の各組織には壊死などの退行性病変が生じている。血液学的には、症状の進行した病魚における、赤血球数の減少およびヘマトクリット値の低下が特徴的であった。

第3章では、上記の病魚について細菌検査を行った結果、いずれの個体からも再現性を有する細菌が純培養状に分離されたので、これらの分離菌を本病の原因菌と考えた経緯について述べた。そして、原因菌72株について、その形態学的、生物学的ならびに生化学的性状を調べ、Bergey's manual of Determinative Bacteriology, 第8版の記載などと比較して、原因菌のうち83.3%を *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* に、残りの株を *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* に同定した。また、原因菌は血清学的に多様であることを明らかにし、血清学的手法に基づく本病の診断は困難であることを指摘した。さらに、健康魚の腸管内ならびに飼育水中における、本病の原因になりうる細菌の分布について調査し、コイ科魚類に強い病原性を示す菌株は、腸管内の運動性 *Aeromonas* の9.4%、飼育水中のその5.6%であり、やや弱い病原性を示す菌株は腸管内に45.3%、飼育水中では35.2%を占めることを明らかにした。また、病魚、健康魚および飼育水から分離した運動性 *Aeromonas* について、その生化学的性状とコイ科魚類に対する病原性との関連性を調べ、2, 3-ブタンジオール脱水素酵素を産生し、リジンを脱炭酸しないものの中で、皮粉の消化能力の高い株が病原性を有することを明らかにした。

第4章では、本病の感染機構を解明するために、まず給餌ならびに絶食条件下のコイに水温変化ストレスを負荷させ、体表（ウロコ）、皮膚、鰓および腸管内における運動性 *Aeromonas* の付着・増殖菌数を調べた。その結果、給餌条件下で水温を変化させると、血液性状の悪化とともに、皮膚および鰓における付着細菌数が有意に増加し、鰓の *Aeromonas* の菌数と、ヘモグロビン量との間には、有意の負相関が認められた。さらに、絶食条件下で水温変化ストレスを負荷させると、皮膚、鰓および腸管内において、*Aeromonas* をはじめとする数種の細菌が、有意に付着・増殖することを明らかにした。次に、本病の原因菌を用いて、水温変化と絶食条件下のコイを対象に、経皮、経鰓および経口（腸管）感染を試みた結果、皮膚と鰓からは感染しなかったが、腸管からの感染が成立し、絶食と水温変化に

よって接種菌の LD₅₀ 値が著しく低下した。これらの結果から、本病の少なくとも一つの感染機構として、水温の変化や絶食（飢餓）などの誘因によって、宿主の生体防御反応が劣えた結果、腸管内に存在した病原性 *Aeromonas* が異常増殖するのではないかと考えられた。

第5章では、本病の発病機構を明らかにするために、ニシキゴイとマゴイを用いて、病魚から分離した *A. hydrophila* の生菌を、筋肉内および経口接種した系と、同一株の菌体破壊抽出液を背大動脈注射した系とを設定し、それぞれの群に発現した病理学的変化を比較検討した。その結果、生菌接種群と菌体破壊抽出液注射群との外観的、解剖学的ならびに病理組織学的所見がよく一致したことから、本病の発病メカニズムを次のように推論した。すなわち、

(1) 腸管内において、病原性 *Aeromonas* が異常増殖したのち、腸管内の血管へ侵入する。(2) 血管内の細菌はさらに増殖し、血液を介して全身の組織に分布する。その一方では、細菌の自己消化によって放出された菌体内毒素により、血管の透過性が亢進する。(3) 血管壁の損傷が大きな部分には、赤血球が漏出するために出血が生じ、損傷の小さな部分には漿液のみが滲出して浮腫が起こる。(4) 真皮の血管壁から滲出した漿液が鱗囊の細胞間隙に貯留した結果、組織が膨脹し、鱗が上方へ押し上げられて立鱗が起こるなどである。さらに、本病の血液学的変化の特徴である貧血の発現機構を明らかにするために、実験的感染魚の血液性状を調べ、血液学的ならびに病理組織学的解析を試みた。その結果、本病の実験的感染魚に発現した貧血は、正赤血球性正色素性貧血であったことから、血液学的変化の発現メカニズムを次のように考察した。すなわち、(1) 血液中に侵入した病原菌の産生する毒素によって赤血球が溶血する。(2) その一方では、毒素によって血管壁の透過性が亢進し、出血が起こる。(3) 腎臓および脾臓組織に壊死などの退行性病変が生じ、造血機能が劣えるなどである。

第6章では、本病の免疫による予防の可能性を知るために、*A. hydrophila* の加熱死菌およびホルマリン死菌を筋肉内接種したコイについて、抗体産生の有無とその消長ならびに感染防御能の有無を調べた。その結果、コイの血清中にはいずれの抗原に対しても凝集素が形成され、その凝集素は少なくとも抗原接種後27週間検出された。また、上記の死菌抗原をあらかじめ接種しておいたコイに、原因菌による生菌攻撃を行ったところ、本凝集素は感染防御能を有することが明らかになり、本病に対してワクチンによる防除の可能性があると示唆された。

第7章では、本病の適切な治療方法を明らかにするために

に、まず原因菌に対する種々の薬剤の抗菌力を調べ、抗菌活性の高い薬剤について、コイ科魚類に対する毒性ならびに治療効果を検討した。その結果、魚類に対する安全性と効果の両面から考えて、クロラムフェニコールとオキシテトラサイクリンの各20ppm およびナリジクスの5 ppm、いずれも30分間の薬浴による治療と、スルファモノメトキシンの100mg/kg (魚体重)/日またはオキシリン酸10mg/kg (魚体重)/日、いずれも5日間の経口投与による治療方法などがすぐれていることを明らかにした。

謝 辞

本研究をまとめるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った京都大学農学部教授門田元先生に謹んで深謝の意を表すると共に、研究の端緒を賜り、永年にわたって御懇篤なる御指導と御鞭撻をいただいた恩師高知大学農学部教授楠田理一先生に衷心から感謝申し上げる。

また、有益なる御助言と御指導を賜った京都大学農学部教授岩井保先生、同教授池田静徳先生ならびに水産大学校教授小林博先生に謹んで謝意を表すると共に、研究遂行上、種々の御便宜と御助言をいただいた水産大学校増殖学科の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

文 献

赤崎盛昭・小沢誠一・山口文恵・塚田恒 (1982) : パンテチンの免疫調節作用. 炎症, 2, 445-446.
 AMEND, D. F. and L. SMITH (1974) : Pathophysiology of infectious hematopoietic necrosis virus disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) : Early changes in blood and aspects of immune response after injection of IHN virus. *Jour. Fish Res. Board Can.*, **31**, 1371-1378.
 ANONYMOUS (1977) : Goldfish ulcer disease studies. *Amer. Fish. Soc., Fish Health Section Newsletter*, 5 (3), 1.
 AOKI, T. and S. EGUSA (1971) : Drug Sensitivity of *Aeromonas liquefaciens* Isolated from Freshwater Fishes. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **37**, 176-185.
 AVTALION, R. R., A. WOJDANI, Z. MALIK, R. SHAHRABANI and M. DUCZYMINER (1973) : Influence of environmental temperature on the immune response in fish. *Curr. Topics Microbiol. Immun.*, **61**, 1-35.
 BALDO, B. A. and T. C. FLETCHER (1973) : C-reactive protein-like precipitins in plaice. *Nature, Lond.*, **246**, 145-146.

BALL, J. N. and A. M. SLICHER (1962) : Influence of hypophysectomy and an adrenocortical inhibitor (SU-4885) on the stress-response of the white blood cells in the teleost fish, *Mollie nesia latipinna le sueur*. *Nature*, **196**, 1331-1332.
 BOOTSMA, R. and J. BLOMMAERT (1976) : Zur Aetiologie der erythrodermatitis beim karpfen *Cyprinus carpio* L. P.20-27 in H. H. REIHENBACH-KLINKE (ed.) *Fisch und Umwelt*, 5. *Neuere Erkenntnisse über Fischinfektionen*. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, New York.
 BOOTSMA, R., N. FIJAN and J. BLOMMAERT (1977) : Isolation and preliminary identification of the causative agent of carp erythrodermatitis. *Vet. Archiv.*, **47**, 291-302.
 BUCHANAN, R. E. and N. E. GIBBONS (1974) : *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th ed. Williams and Wilkins, Co., Baltimore, 1246pp.
 BULLOCK, G. L., D. A. CONROY and S. F. SNIESZKO (1971) : *Bacterial diseases of fishes*. 151pp. in S. F. SNIESZKO and H. R. AXELROD (eds.) *Diseases of fishes*. Book 2A. T. F. H. Publications, Inc., Neptune City.
 BULLOCK, G. L. (1972) : Studies on selected myxobacteria pathogenic for fishes and on bacterial gill disease in hatchery-reared salmonids. *U. S. Fish, Wildl. Serv. Tech. Paper*, **60**, 30pp.
 COVERT, J. B. and W. W. REYNOLDS (1977) : Survival value of fever in fish. *Nature*, **267**, 43-45.
 COWAN, S. T. (1974) : *Manual for the identification of medical bacteria*. 2nd ed. Cambridge University Press, London, 238pp.
 DUFF, D. (1942) : The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida*. *Jour. Immunol.*, **44**, 87-94.
 DUIJN, C. v. (1938) : Beitrag zur kenntnis der schuppensträu bei fischen. *Wachen. Aquar. Terrar.*, **35**, 68-70.
 EDDY, B. P. (1960) : Cephalotrichous, fermentative gram-negative bacteria: the genus *Aeromonas*. *Jour. Appl. Bacteriol.*, **23**, 216-249.
 EDDY, B. P. and K. P. CARPENTER (1964) : Further studies on *Aeromonas*. II. Taxonomy of *Aeromonas* and C27 strains. *Jour. Appl. Bacteriol.*, **27**, 96-109.
 EGUSA, S. and T. NISHIKAWA (1965) : Studies of a primary infectious disease in the so-called fungus disease

- of eels. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **31**, 804-813.
- 江草周三 (1978) : 細菌症, p147-168. 魚の感染症. 第1版. 恒星社厚生閣, 東京, 554pp.
- EWING, W. H., R. HUGH and J. G. JOHNSON (1961) : Studies on the *Aeromonas* group. *Publ. Health Serv. Comm. Disease Center, Atlanta*, 37pp.
- FIJAN, N., Z. PETRINEC, D. SULIMANOVIC and L. O. ZWILLENBERG (1971) : Isolation of the viral causative agent from the acute form of infectious dropsy of carp. *Vet. Archiv.*, **41**, 125-138.
- FIJAN, N. (1972) : Infectious dropsy in carp—A disease complex. P. 39-51 in L. E. MAWDESLEY-THOMAS (ed.) *Diseases of fish*. Symp. Zool. Soc. London. No. 30. Academic Press, London, 380pp.
- FIJAN, N. (1976) : Disease of cyprinids in Europe. *Fish Pathol.*, **10**, 129-134.
- FLETCHER, T. C. and A. WHITE (1976) : The lysozyme of the plaice *Pleuronectes platessa* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, **55**, 207-210.
- FLETCHER, T. C. A. WHITE and B. A. BALDO (1977) : C-reactive protein-like precipitin and lysozyme in the lumpsucker *Cyclopterus lumpus* L. during the breeding season. *Comp. Biochem. Physiol.*, **57**, 353-357.
- FODA, A. (1973) : Changes in hematocrit and hemoglobin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) as a result of furunculosis disease. *Jour. Fish. Res. Board Can.*, **30**, 463-467.
- FUJIHARA, M. P., P. A. OLSON and R. E. NAKATANI (1971) : Some factors in susceptibility of juvenile rainbow trout and chinook salmon to *Chondrococcus columnaris*. *Jour. Fish. Res. Board Can.*, **28**, 1739-1743.
- 舟橋紀男・宮崎照雄・小寺和郎・窪田三郎 (1974) : アユのピプリオ病の病理組織学的研究. 魚病研究, **8**, 136-143.
- HANSEN, N. E. (1974) : Plasma lysozyme—a measure of neutrophil turnover. *An analytical review. Acta Haematol.*, **7**, 7-87.
- HARA, T., K. INOUE, S. MORIKAWA and F. TASHIRO (1976) : Vaccination trials for control of furunculosis of salmonids in Japan. *Fish pathol.*, **10**, 227-235.
- HARRELL, L. W., H. M. ETLINGER and H. O. HODGINS : Humoral factors important in resistance of salmonid fish to bacterial disease. I. Serum antibody protection of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) against vibriosis. *Aquaculture*, **6**, 211-219.
- HILDEMAN, W. H. (1970) : Transplantation immunity in fishes: Agnatha, Chondrichthyes and Osteichthyes. *Transplant. proc.*, **2**, 9-253.
- 日野志郎 (1969) : 血液疾患, P. 57-63. 衛生検査技術講座 3, 血液学. 第4版. 医歯薬出版, 東京, 227pp, (1969).
- HOLT, R. A., J. E. SANDERS, J. L. ZINN, J. L. FRYER and K. S. PILCHER (1975) : Relation of water temperature to *Flexibacter columnaris* infection in steelhead trout (*Salmo gairdneri*), coho (*Oncorhynchus kisutch*) and chinook (*O. tshawytscha*) salmon. *Jour. Fish. Res. Board Can.*, **32**, 1553-1559.
- 保科利一 (1964) : ウナギの鱗赤病に関する研究. 東京水産大学特別研報, **6**, 1-104.
- HUNN, J. B. (1964) : Some patho-physiologic effects of bacterial kidney disease in brook trout. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **117**, 383-385.
- HUNTER, V. A. and J. L. FRYER (1980) : Stress-induced transmission of *Yersinia ruckeri* infection from carriers to recipient steelhead trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Jour. Fish. Diseases*, **3**, 372-467.
- 稲葉伝三郎 (1978) : 錦ゴイの穴あき病に対する水産用ナイスレート薬浴治療, p.12-19. 水産用ナイスレート文献集, 25pp.
- INGRAM, G. A. (1980) : Substances involved in the natural resistance of fish to infection—A review. *J. Fish. Biol.*, **16**, 23-60.
- 井上進一・吉田文三・今井重之 (1966) : サルファ剤魚体内濃度に関する研究—I. サルファ剤水溶液中での金魚体内への吸収およびその毒性について. 日水誌, **32**, 573-578.
- 石岡宏子 (1980) : 海産魚のストレス反応に関する研究—I. 温度変化によるストレス反応. 日水誌, **46**, 523-531.
- 伊丹利明・楠田理一 (1980) : 養殖アユのピプリオ病に対する噴霧ワクチンの研究—I. ワクチンのベントナイト添加と pH 調整の必要性. 日水誌, **46**, 533-536. (1980)
- 城泰彦・大西圭二 (1980) : 養殖アユから分離された *Aeromonas hydrophila*. 魚病研究, **15**, 85-89.
- 金井欣也・若林久嗣・江草周三 (1977) : 養殖ウナギにお

- ける健康魚と病魚の腸内細菌叢の比較, 相違について. 魚病研究, **12**, 199-204.
- 加藤敏 (1964) : 菌体外毒素の化学構造と機能. 蛋白質・核酸・酵素, **9**, 697-707.
- KATO, K. (1938) : Triaxial correlation of hematologic indices: Its significance in classification and treatment of anemias. *J. Lab. and Clin. Med.*, **24**, 191-197.
- 川合研児・楠田理一 (1981) : ビブリオ病経口ワクチンによるアユの免疫機構の研究—I. 体表における感染防御作用. 魚病研究, **16**, 1-8.
- KAWAI, K., R. KUSUDA and T. ITAMI (1981) : Mechanisms of protection in ayu orally vaccinated for vibriosis. *Fish Pathol.*, **15** (3/4), 257-262.
- 川津浩嗣 (1970) : 水産生物の病害防除に関する研究. 農林水産技術会議事務局, 12-16.
- 木村修一・長瀬修・安孫子雍史 (1980) : パントテン酸, P305-340. ビタミン学Ⅱ, 第1版 (日本ビタミン学会編). 東京化学同人, 東京, 649pp.
- 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・ますふ化場研報, **24**, 9-100.
- 木村喬久・粟倉輝彦 (1977) : わが国で初めて見出された養殖サケ科魚類の細菌性腎臓病 (Bacterial kidney disease) について. 日水誌, **43**, 143-150.
- 小山次郎 (1964) : 溶血性レンサ球菌とブドウ球菌の毒素. 蛋白質・核酸・酵素, **9**, 708-715.
- KRANTZ, G. E., J. M. REDDECLIFF and C. H. HEIST (1964) : Immune response of trout to *Aeromonas salmonicida*. Part I. Development of agglutinating antibodies and protective immunity. *Prog. Fish Cult.*, **26**, 3-10.
- 楠田理一・高橋幸則 (1970) : コイ科魚類の立鱗病に関する研究—I. 病魚から分離した *Aeromonas* 菌について. 魚病研究, **4**, 87-97.
- KUSUDA, R. and H. KIMURA (1978) : Studies on the pathogenesis of streptococcal infection in cultured yellowtails *Seriola* spp. the fate of *Streptococcus* sp. bacteria after inoculation. *Jour. Fish. Diseases*, **1**, 109-114.
- KUSUDA, R., K. KAWAI and T. ITAMI (1980) : Efficacy of bath-immunization against vibriosis in cultured ayu. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **46**, 1053.
- LUDERITZ, O., A. M. STAUB and O. WESTPHAL (1966) : Immunochemistry of O and R antigens of *Salmonella* and related enterobacteriaceae. *Bact. Rev.*, **30**, 192-255.
- MAHONEY, J. B., F. H. MIDLIGE and D. G. DEUEL (1973) : A fin rot disease of marine and euryhaline fishes in the New York Bight. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **102**, 596-605.
- MANN, O. (1935) : Serologische Untersuchungen mit an steckender Bauchwassersucht befallen Karpfen. *Zeit. Fisch.*, **37**, 101-126.
- MANNING, M. J. and R. J. TURNER (1979) : 比較免疫生物学 (村松繁・大西耕二訳). 共立出版, 東京, 217 pp.
- 松里寿彦 (1980) : 養殖魚における病害の予防に関する研究. 農林水産技術会議事務局研究成果, **128**, 144-157.
- MCCARTHY, D. H. (1975) : The bacteriology and taxonomy of *Aeromonas liquefaciens*. *Tech. Rep. Ser. No. 2*, Ministry of Agri. Fish. Food, 107 pp.
- 宮崎照雄・江草周三 (1976) : ニホンウナギの *Edwardsiella tarda* 感染症の病理組織学的研究—I. 自然感染—化膿性造血組織交型. 魚病研究, **11**, 33-43.
- MURRAY, C. K. and T. C. FLETCHER (1976) : The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. *J. Fish Biol.*, **9**, 329-334.
- 日本水産資源保護協会 (1981) : 水産用医薬品使用指針 **2**, 202 pp.
- 二階堂薄 (1967) : 細菌のリポ多糖類. 蛋白質・核酸・酵素, **12**, 1446-1458.
- NYBELIN, O. (1935) : Untersuchungen über den bei Fischen Krankheitserregenden Spaltpilz *Vibrio anguillarum*. *Medd. Undersökn-Anst. Sötvattenfisk. Stockholm*, No. 8, 62 pp.
- 大島泰雄・江草周三 (1966) : 冬の蓄養コイ及び海水飼育アユを冒す細菌について. 昭和40年度農林漁業試験研究報告, 1-4.
- 大島康夫・長田泰明・赤川美恵子・中沢信彦 (1970) : 魚類感染症に対する Potassium-1-methy-1, 4-dihydro-7-[2-(5-nitro-2-furyl)-vinyl]-4-oxo-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acid (DS-677K) の化学療法的研究. 日水誌, **36**, 1186-1199.
- 尾崎久雄 (1959) : ニジマスの肝変性と貧血を伴う一流行病に関する研究 (X病と仮称する) 2. 滋賀県醒井養鱒場報告, **2**, 17-19.
- PILLEMER, L. and K. C. ROBBINS (1949) : Chemistry of toxins. *Ann. Rev. Microbiol.*, **3**, 265-288.

- POPOFF, M. and M. VÉRON (1976) : A taxonomic study of *Aeromonas hyarophila*-*Aeromonas punctata* group. *Jour. Gener. Microbiol.*, **94**, 11-22.
- PLISZKA, F. v. (1939) : Untersuchungen über die Agglutinine bei Karpfen-Vorläufige Mitteilung. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Orig.*, **143**, 262-264.
- RAMOS, F. and A. C. SMITH (1978) : The C-reactive protein (CRP) test for the detection of early disease in fishes. *Aquaculture*, **14**, 261-266.
- ROBERTS, R. J. (1980) : 硬骨魚類の解剖学と生理学, P 31-35. 魚病学 (佐野徳夫訳). 文永堂, 東京, 360 pp.
- RUCKER, R.R., EARP, B.J. and E.J. ORDEL (1954) : Infectious diseases of Pacific salmon. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **83**, 297-312.
- SCHÄEPERCLAUS, W. (1930) : *Pseudomonas punctata* als Krankheitserreger bei Fischen Untersuchungen über Süßwasseraalrotseuche der Weissfische. *Zeit. Fisch.*, **28**, 289-370.
- SCHÄEPERCLAUS, W. and K. MANN (1939) : Untersuchungen über die ansteckende Bauchwassersucht des Karpfens und ihre Bekämpfung-1. *Zeit. Fisch.*, **37**, 1-182.
- SCHARMANN, W. (1972) : Vorkommen von Elastase bei *Pseudomonas* und *Aeromonas* *Zbl. Bakt. Hyg., I. Orig.*, **A 220**, 435-442.
- SCHLICHER, J. (1927) : Vergleichend-physiologische Untersuchungen der Blutkörperchenzahlen bei Knochenfischen. *Zool. Tahrh. Abt. 3.*, **43**, 121-200.
- SCHUBERT, R. H. W. (1960) : Untersuchungen über die Merkmale der Gattung *Aeromonas*. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Orig.*, **180**, 310-326.
- SCHUBERT, R.H.W. (1961) : Über die biochemischen Merkmale von *Aeromonas salmonicida*. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Orig.*, **183**, 485-494.
- SCHUBERT, R. H. W. (1962) : Über die biochemischen Eigenschaften der anaerogenen Aeromonaden. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Orig.*, **185**, 503-511.
- SCHUBERT, R. H. W. (1963 a) : Über die biochemischen Eigenschaften von *Aeromonas hydrophila* für die Wasserbakteriologie. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Orig.*, **188**, 62-69.
- SCHUBERT, R. H. W. (1963 b) : Über die Bedeutung der Aeromonaden und der sogenannten Paracolobacterien. *Arch. f. Hyg. Bacteriol.*, **147**, 178-188.
- SCHUBERT, R. H. W. (1964 a) : Zur Taxonomie der Voges-Proskauer-negativen "hydrophila-ähnlichen" Aeromonaden. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Orig.*, **193**, 482-490.
- SCHUBERT, R.H.W. (1964 b) : Zur Taxonomie der anaerogenen Aeromonaden. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Orig.*, **193**, 343-352.
- SCHUBERT, R. H. W. (1967 a) : The taxonomy and nomenclature of the genus *Aeromonas* KLUYVER and VAN NIEL 1936. Part I. Suggestions on the taxonomy and nomenclature of the aerogenic *Aeromonas* species. *Intl. Jour. Syst. Bacteriol.*, **17**, 23-37.
- SCHUBERT, R.H.W. (1967 b) : The taxonomy and nomenclature of the genus *Aeromonas* KLUYVER and VAN NIEL 1936. Part II. Suggestions on the taxonomy and nomenclature of the anaerogenic aeromonads. *Intl. Jour. Syst. Bacteriol.*, **17**, 273-279.
- SCHUBERT, R.H.W. (1968) : The taxonomy and nomenclature of the genus *Aeromonas* KLUYVER and VAN NIEL 1936. Part III. Suggestions on the definition of the genus *Aeromonas* KLUYVER and VAN NIEL 1936. *Intl. Jour. Syst. Bacteriol.*, **18**, 1-7.
- 清水朋子・江草周三 (1968) : ウナギのワタカブリ病から分離された *Aeromonas liquefaciens* の血清学的菌型について. 魚病研究, **3**, 12-15.
- 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, 魚病研究, **4**, 19-30.
- SNIESZKO, S.F. (1957) : Genus IV. *Aeromonas*. P 189-193 in BUCHANAN, R.E., H.J. HOLF, and E.F. LESSEL (eds.) *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 7th ed. Williams and Wilkins, Co., Baltimore.
- SOKAL, R.R. and C. D. MICHENER (1958) : A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas Sci. Bull.*, **38**, 1409-1438.
- 反町稔・江草周三 (1971) : 養殖ウナギの腸内好気性細菌について. 魚病研究, **6**, 1-7.
- 蕭世民・陳孝禹 (1977) : 台湾地区牛蛙, 淡水長脚大蝦及淡水養殖魚類発現之細菌及寄生蟲病. *JCRR Fisheries Series No. 29*, 13-21.
- 高橋耿之介・川名俊雄・中村多恵子 (1975) : キンギョの穴あき病に関する研究—VI. 病魚からの分離菌について. 魚病研究, **10**, 22-30.
- 高橋幸則・楠田理一 (1971) : コイ科魚類の立鱗病に関する研究—II. *Aeromonas liquefaciens* に対するコイの免疫

- 反応. 魚病研究, 6, 24-29.
- 高橋幸則・楠田理一(1977):コイ科魚類の立鱗病に関する研究—Ⅲ. 病魚から分離された *Aeromonas liquefaciens* の血清学的性状について. 魚病研究, 12, 15-19.
- TAKAHASHI, Y. and R. KUSUDA (1979): Studies on the aeromonas disease of carp fishes-IV. On the change of erythrocyte characters in colored carp inoculated with *Aeromonas liquefaciens*. Rept. Usa. Mar. Biol. Inst., No.1, 33-39.
- 高橋幸則(1984 a):コイのエロモナス病における発病機構. 水産大研報, 32, 41-48.
- 高橋幸則(1984 b):コイのエロモナス病における血液学的変化の発現機構. 水産大研報, 32, 67-74.
- 高橋幸則・藤野博文(1984):コイの体表, 皮膚, 鰓ならびに腸管における飼育条件別の付着・増殖細菌数. 日水誌, 50, 735-742.
- 田村修・保田正人・藤木哲夫(1962):赤血球などの量的変動による魚類生理状態の判定—I. 日水誌, 28, 504-509.
- 田中伸一・宮下安忠・山田雄三(1958):パントテン酸の生理作用と臨床的応用. 診療, 11, 1255-1259.
- TOMASEC, I. (1965): The etiology of infectious dropsy of carp. Ann. N. Y. Acad. Sci., 126(Art.1), 606-615.
- TOMASEC, I. (1966): Considerations générales sur le probleme de l'étiologie de l'Hydropisie infectieuse de la carpe. Bull. Off. Int. Epiz., 65, 721-730.
- 植竹久雄(1967):溶原化変換と抗原多糖体の構造. 蛋白質・核酸・酵素, 12, 1436-1445.
- 若林久嗣・金井欣也・江草周三(1976):養鰻環境における魚病細菌の生態に関する研究—I. 池水中の一般細菌について. 魚病研究, 11, 63-66.
- 若林久嗣(1981):運動性エロモナス, エドワルジエラ, 滑走細菌類の生態と分布に関する研究. 昭和55年魚病対策技術開発研究成果報告書(日本水産資源保護協会), 24pp.
- WEDEMEYER, G. (1973): Some physiological aspects of sublethal heat stress in the juvenile steelhead trout (*Salmo gairdneri*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). J. Fish Res. Board Can., 30, 831-834.
- WESTPHAL, O. (1960): Récentes recherches sur la chimie et biologie des endotoxines des bactéries à gram négatif. Ann. Inst. Pasteur, 98, 789-813.
- WUNDER, W. (1949): Fortschrittliche Karpfenteichwirtschaft. Schweizerbartische Verlagsbuchhandlung, Stuttgart. 358 pp.
- WUNDER, W. and H. DOMBRWSKI (1953): Untersuchungen über die ansteckende Bauchwassersucht des Karpfens (Ascites). Zeit. Fisch. 2 N.F., 327-416.
- 山下秀夫(1967):カサゴの血液学的研究—I. 環境水の塩素量と血液水分量・比重・血清蛋白量および赤血球との相互関係. 日水誌, 33, 81-90.
- 結城了吾(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. 日水誌, 26, 490-492.

Summary

This study was intended to clarify the causes, infection, mechanism of attack and methods of prevention and treatment of the *Aeromonas* disease which occurs in various types of carp including carp, goldfish, crucian carp and river dodger. First, the characteristics to serve as standards in the diagnosis of this disease were clarified from external symptoms and anatomical, histopathological and hematological findings using 203 fishes of the above four species with this disease obtained from various areas throughout Japan. This disease is characterized by hemorrhages on body surface, hyperemia of the fins, scale protrusion, congestion of liver and hyperemia of intestine. There is marked exudative and hemorrhagic inflammation in all tissues, and decreases in erythrocyte counts, hematocrit values and anemia appear in serious case. 72 strains isolated from infected fish were identified to be pathogens, and then the strains were classified by examination of 125 items. It was found that 83.3% of the strains were *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila*, and the remainder were *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes*.

The above-mentioned strains were present in water and intestinal tract. Strains showing strong pathogenicity for carp accounted for 5.6% of those detected in water and 9.4% of those in the intestinal tract. Strains showing rather weak pathogenicity accounted for 35.2% of those

detected in water and 45.3% in the intestinal tract. It was considered that there is a high possibility that these strains, especially, strong toxic strains cause this disease.

Furthermore, an attempt was made to clarify the mechanism of infection under two stress load conditions: variations in water temperature and fasting. When the water temperature was changed even under feeding conditions, there was considerable accumulation of bacteria on the skin and gill in the water, and there was an increase in bacteria in the intestinal tract. However, this tendency was remarkably seen when the water temperature was changed under fasting conditions. As a result of attempts at infection percutaneously, through the gill and in the intestinal tract (orally) under water temperature change and fasting conditions, no infections were seen through the skin and gill, but infection was seen with pathogenic *Aeromonas* from the intestinal tract, and the LD₅₀ values of the inoculated bacteria were markedly decreased under fasting conditions and water temperature change. From these results, it was considered that at least one mechanism of infection of this disease is that the pathogenic *Aeromonas* bacteria existing in the intestinal tract of carp at comparatively high rates proliferate abnormally due to factors such as change in water temperature and fasting.

In the following step, pathogenic *Aeromonas* and sonic extracts of these bacteria were inoculated into healthy fish, which were then examined anatomically and histopathologically. As a result, it was found that the results were closely similar when the bacteria themselves were inoculated and when sonic extracts were inoculated. The following appearance mechanisms of symptoms were considered: (1) after abnormal proliferation of pathogenic *Aeromonas* in the intestinal tract, the bacteria enter the blood vessel from the intestinal tract; (2) the intravascular bacteria proliferate further and are distributed to all tissues via the blood; on the other hand, the permeability of the blood vessels is enhanced by the bacterial endotoxins released by self-dissolution of the bacteria; (3) hemorrhages occur because of transudation of erythrocytes in areas of severe vascular wall damage, while in areas of minor injury, only plasma is exuded and edema occurs; and (4) as a result of accumulation of plasma exuded from the capillary walls of the dermis in the intercellular spaces in the scale sacks, those tissues become swollen, and the scales are pushed upwards to protrude.

The mechanisms of appearance of the anemia which occurs in naturally infected fish were clarified by inoculating healthy carp with pathogenic *Aeromonas* from hematological and histopathological findings. Namely erythrocytes were destroyed by hemolysin produced by the bacteria entering the blood, while there was also transudation of erythrocytes from the vascular wall. Regressive changes such as necrosis of the kidney and spleen tissue occurred and, as a result, there was a decrease in hematopoietic function.

Then, carps were inoculated with heat and formalin-killed cells of pathogenic *Aeromonas*, and antibody production and the presence of infection preventive capacity were investigated. As a result, it was found that antibodies to all antigens were detected in the serum of the carps and these antibodies persisted for at least 27 weeks. When carps which produced antibodies were challenged with live pathogenic *Aeromonas*, these antibodies were able to defend against the infection. The possibility of a preventive vaccine against this disease was indicated.

Lastly, treatment methods by drugs were investigated, and in consideration of safety and efficacy for the fish, it was found that dipping 20 ppm of chloramphenicol or oxytetracycline for 30 minutes and oral administration 100 mg/kg b.w./day of sulfamonomethoxine or 10 mg/kg/day of oxolinic acid for 5 days were effective.

Explanation of Plate I

- A. External symptoms which appeared in naturally infected fancy red carp.
- B. External symptoms which appeared in naturally infected gold fish.
- C. External symptoms which appeared in naturally infected crucian carp.
- D. External symptoms which appeared in naturally infected river dodger.
- E. Scale sack lesion which appeared in naturally infected fish. HE stain, $\times 400$.
- F. Kidney lesion which appeared in naturally infected fish. HE stain, $\times 150$.
- G. Spleen lesion which appeared in naturally infected fish. HE stain, $\times 200$.
- H. Intestinal lesion which appeared in naturally infected fish. HE stain, $\times 200$.

Explanation of Plate II

- I. External symptoms of fancy red carp which appeared 48 hrs after intramuscular injection with isolated organisms.
- J. Electron microscopic photograph of the isolated organism, $\times 15,000$.
- K. External symptoms of carp which appeared 48 hrs after peroral inoculation with *A. hydrophila*. 24 hrs after injection with India ink. Right: inoculated fish. Left; control fish.
- L. Internal symptoms of carp which appeared 28 hrs after intraarterial injection with sonic extracts of *A. hydrophila*. 4 hrs after injection with India ink. Left: injected fish with the extracts. Right; control fish.
- M. Scale sack lesion in carp which passed 48 hrs after peroral inoculation with *A. hydrophila*. HE stain, $\times 400$.
- N. Scale sack lesion in carp which passed 48 hrs after intraarterial injection with sonic extracts of *A. hydrophila*. 24 hrs after injection with India ink. HE stain, $\times 200$.
- O. Kidney lesion in carp which passed 48 hrs after peroral inoculation with *A. hydrophila*. HE stain, $\times 100$.
- P. Kidney lesion in carp which passed 28 hrs after intraarterial injection with sonic extracts of *A. hydrophila*. 4 hrs after injection with India ink. HE stain, $\times 200$.

Explanation of Plate III

- Q. Spleen lesion in carp which passed 48 hrs after peroral inoculation with *A. hydrophila*. 24 hrs after injection with India ink. HE stain, $\times 100$.
- R. Spleen lesion in carp which passed 28 hrs after intraarterial injection with sonic extracts of *A. hydrophila*. 4 hrs after injection with India ink. HE stain, $\times 200$.
- S. Intestinal lesion in carp which passed 48 hrs after peroral inoculation with *A. hydrophila*. 24 hrs after injection with India ink. HE stain, $\times 100$.
- T. Intestinal lesion in carp which passed 48 hrs after intraarterial injection with sonic extracts of *A. hydrophila*. 24 hrs after injection with India ink. HE stain, $\times 200$.
- U. Photomicrograph from the GIEMSA's staining of the erythrocytes in the normal fancy red carp, $\times 400$.
- V. Photomicrograph from the GIEMSA's staining of the erythrocytes, 24 hrs after inoculating with *A. hydrophila* in the fancy red carp, $\times 400$.
- W. Photomicrograph from the GIEMSA's staining of the erythrocytes, 96 hrs after inoculating with *A. hydrophila* in the fancy red carp, $\times 400$.

Plate I

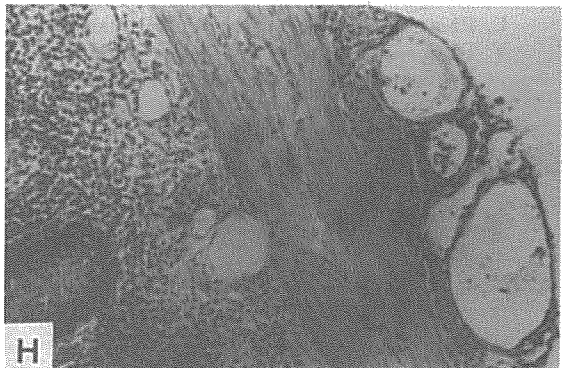
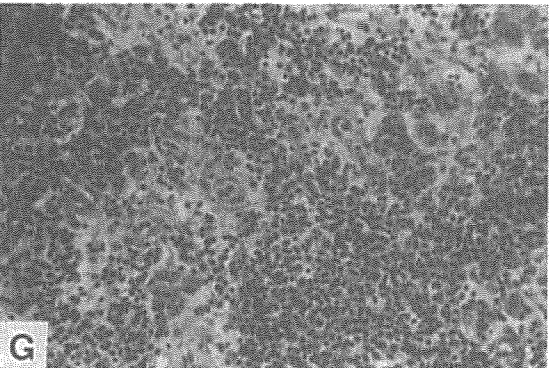
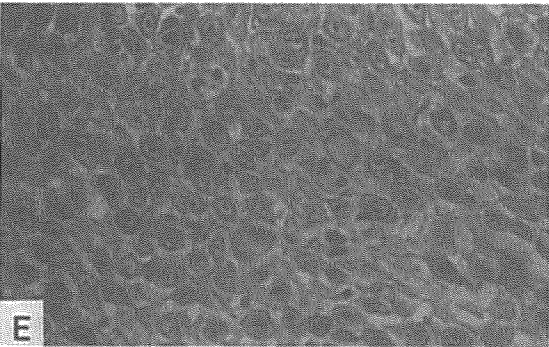
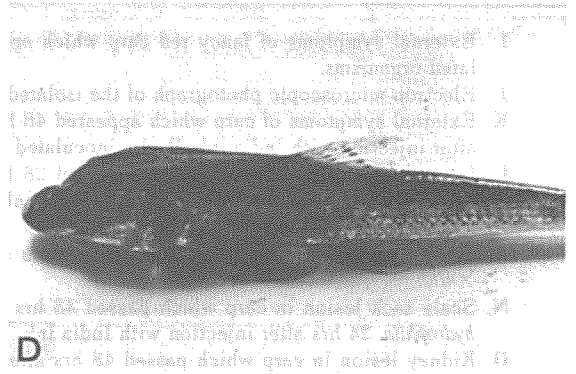
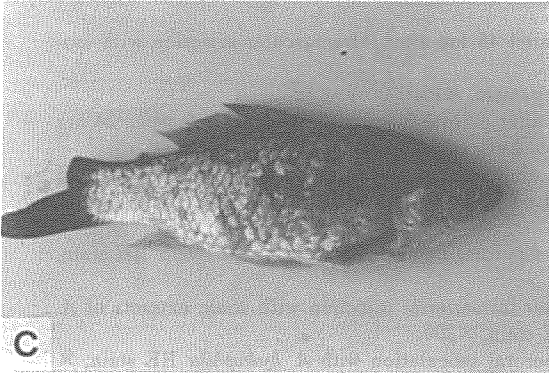
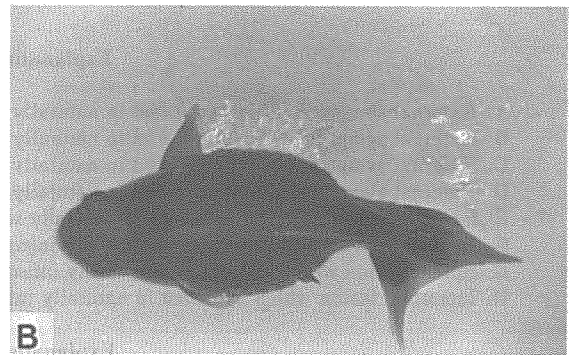
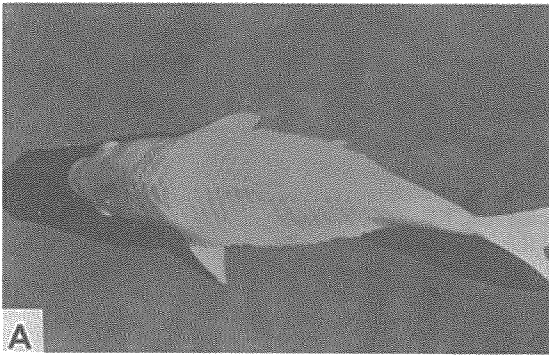


Plate II

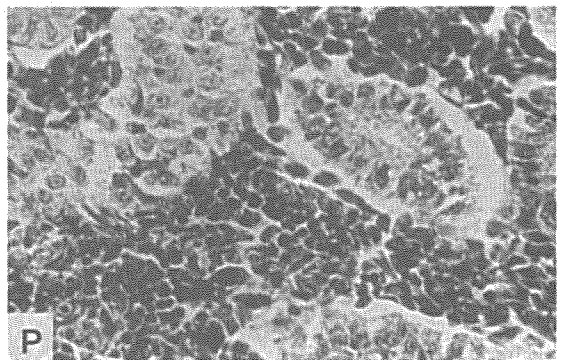
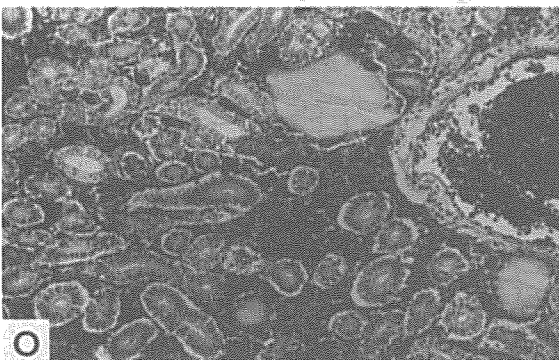
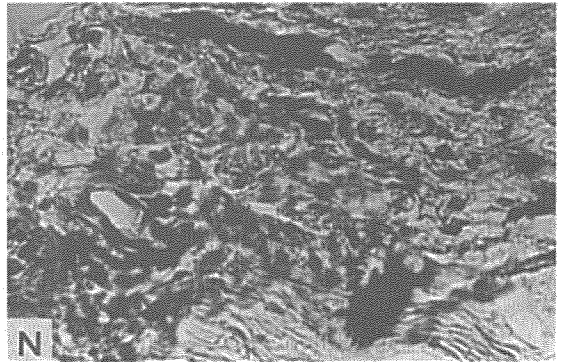
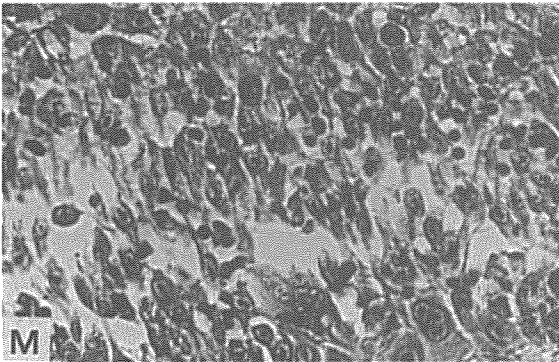
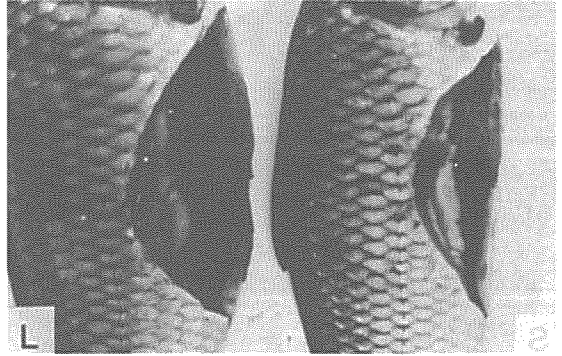
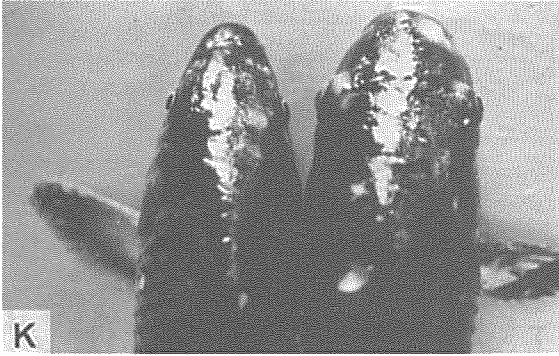
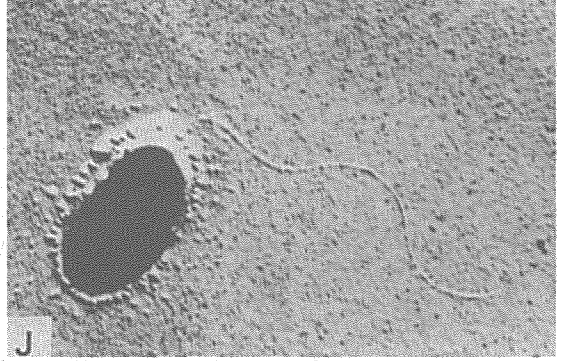
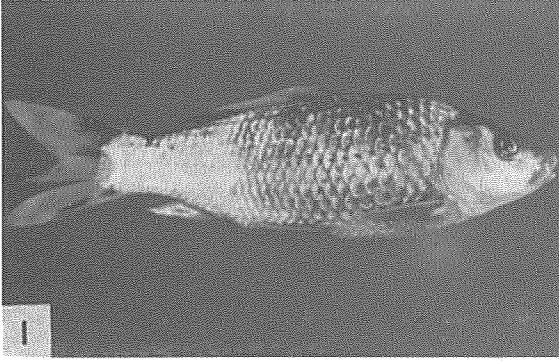


Plate III

