

アユ病魚から分離された *Vibrio anguillarum* の各種塩分濃度における生存性ならびに病原性*¹

伊丹利明・楠田理一*²

Viability and Pathogenicity of *Vibrio anguillarum*,
in NaCl Solutions of Various Concentrations,
Isolated from Ayu Cultured in Freshwater

By
Toshiaki ITAMI and Riichi KUSUDA

The viability and the pathogenicity of *Vibrio anguillarum*, the etiological agent of vibriosis in cultured ayu, *Plecoglossus altivelis* were investigated in the diluted seawater and NaCl solutions of various concentrations prepared by using distilled water and pond water.

In 1% seawater the viable cell counts became below 10 cells per ml within 12 hours but the organisms were able to survive over 30 days at a level of 10^4 viable cells per ml in 10, 25, 50, and 100% seawater. In the NaCl solutions prepared with distilled water ranging in concentration from 0 to 10,000 ppm, they became undetectable (below 10 viable cells per ml) within 1 minute in 0 and 5 ppm, 10 minutes in 50 ppm, 20 minutes in 500 ppm, 3 days in 5,000 ppm and 15 days in 10,000 ppm. In the pond water they became undetectable within 6 hours, but they were able to survive over 30 days at a level of $10^2 - 10^3$ viable cells per ml in 0.2 and 0.85% NaCl-added pond water. The virulence of *V. anguillarum* to ayu was examined by means of the artificial water-borne challenge, using 0, 0.2 and 0.85% NaCl-added pond water. The per cent of survivors were 50% in the pond water and 20% in 0.2% NaCl-added pond water 10 days after the challenge, and all the fish died in 8 days in 0.85% NaCl-added pond water.

These results suggested that *V. anguillarum* isolated from ayu cultured in freshwater is originated in the seawater, and that the high mortality of the fish is due to the increases in the pathogenicity of *V. anguillarum* suspended in NaCl solutions of high concentrations and also in the stress caused in the fish by the transfer from freshwater to NaCl-added water.

* 1 水産大学校研究業績 第1005号, 1983年10月5日受理。
Contribution from the Shimonoseki University of Fisheries, No. 1005. Received Oct. 5, 1983.

* 2 高知大学農学部,
Department of Cultural Fisheries, Faculty of Agriculture, Kochi University, Nangoku, Kochi Prefecture.
本研究は昭和58年8月, 日本水産学会中国・四国支部例会において発表した。

1. 結 言

アユのピブリオ病の原因菌である *Vibrio anguillarum* は養殖用種苗に用いられる海産稚アユ¹⁾からも、湖産稚アユ^{2,3)}からも分離され、海水および淡水両域のアユに病原性を示すことが知られている。本菌の生化学的ならびに血清学的性状については楠田ら⁴⁾、北尾ら⁵⁾、絵面ら⁶⁾および KITAO *et al.*⁷⁾ によって詳細に検討されている。その結果、アユ由来の本菌の血清型は3～5群に分類されているが、それらのうち、淡水域由来株はいずれも1群のみで構成され、その他の血清型は海水域由来株であるとされている。このように、本菌の分類については比較的よく研究されているが、病害を予防するために必要な本菌の生態学的知見は得られていない。

そこで、著者らは養殖アユに最も多発し産業上大きな被害を与えている淡水域由来の *V. anguillarum* の感染環の一端を明らかにするために、各種塩分濃度における本菌の生存性ならびにアユに対する病原性について検討したので報告する。

2. 方 法

2・1 各種塩分濃度における *V. anguillarum* の生存性

2・1・1 供試菌 1978年徳島県阿南市の養殖場のアユ病魚から分離した *V. anguillarum* の新鮮分離菌で、血清型が淡水型であることを確認したものをを用いた。本菌を2%食塩加普通寒天培地(日水)で25°C、20時間培養したのち、滅菌生理食塩水に約 10^{10} cells/ml となるように再懸濁したものを供試菌液とした。

2・1・2 各種塩分濃度系列 海水希釈系列と食塩濃度系列の2系列を作製し、それぞれの試水における本菌の生存性を検討した。海水希釈系列は蒸留水で希釈した1, 10, 25, 50および100%海水の5試水を作製した。食塩濃度系列は食塩を蒸留水に0, 5, 50, 500, 5,000および10,000 ppm になるように添加した6試水、ならびにアユ飼育水に0, 0.2および0.85%添加した3試水の合計9種類の試水を作製した。各試水は121°C、20分間高圧滅菌して用いた。なお、海水は高知県手結海岸で、飼育水は地下水を用いている徳島県阿南市のアユ養殖池で採水した。

2・1・3 生存菌数の測定 各試水100 ml に供試菌液0.1 ml を加え、十分に攪拌したのち、18°C に静置して一定期間ごとに生菌数を測定した。なお、生菌数の測定は平板塗抹法により、2%食塩加普通寒天培地(日水)で25°C、48時間培養して行った。

2・2 塩分濃度による *V. anguillarum* の病原性の差異

2・2・1 供試魚 屋外の500 l流水式角型実験水槽で予備飼育した平均体重28 gのアユを用いた。餌料は予備飼育から実験終了まで毎日1回ペレットを投与した。

2・2・2 供試菌液 前項と同じ淡水型の *V. anguillarum* 新鮮分離菌を2%食塩加ブイオン(日水)に接種し、25°Cで20時間攪拌培養したものをを用いた。

2・2・3 攻撃試験用試水 アユ飼育水を用いて、食塩濃度0, 0.2および0.85%の3種類の攻撃試験用試水を作製した。

2・2・4 攻撃試験方法 供試菌液を 6.4×10^6 cells/ml の濃度となるように各攻撃試験用試水に添加し、通気しながら供試魚を20分間浸漬して菌浴攻撃を行った。攻撃後、供試魚を実験水槽にもどし、10日間飼育して斃死の有無を観察するとともに、斃死魚の腎臓から菌の分離を試みた。なお、供試尾数は食塩濃度が0%攻撃区で10尾、0.2%攻撃区で15尾および0.85%攻撃区で16尾とした。

3. 結果および考察

3・1 各種塩分濃度における *V. anguillarum* の生存性

海水希釈系列における *V. anguillarum* の生菌数の経時的变化は、Table 1 と Fig. 1 に示すとおりである。1%海水では菌接種後12時間以内に10 cells/ml 未満となったが、10, 25, 50および100%海水では30日後においても 10^4 cells/ml 以上で推移した。

蒸留水に食塩を添加した食塩濃度系列における生菌数の経時的变化は、Table 2 と Fig. 2 に示すとおりである。供試菌接種後、食塩濃度0および5 ppm では1分以内に、50 ppm では10分以内に、500 ppm では20分以内に、5,000 ppm では3日以内に、10,000 ppm では15日以内にそれぞれ菌数が10 cells/ml 未満となった。このように、食塩無添加あるいは食塩低濃度区において供試菌の生存性が短い原因は、低張液中での溶菌あるいは低塩分濃度に基づく生理活性の低下によるものと考えられる。

つぎに、飼育水に食塩を添加した塩分濃度系列における生菌数の経時的变化は、Table 3 と Fig. 3 に示すとおりである。供試菌接種後、食塩濃度0%では6時間後に10 cells/ml 未満となったが、食塩濃度0.2および0.85%では30日後も $10^2 \sim 10^4$ cells/ml で推移した。後者は海水中での生存能とほぼ一致し、蒸留水に食塩10,000 ppm を添加した場合の生存期間よりも長い。これは、海水および飼育水中の有機物ならびに各種イオンの共存による効果に基づくものと考えられる。

室賀ら¹⁰⁾によると、塩分を含む養魚池水で飼育されたウナギのビブリオ病原菌 *Vibrio* sp. は蒸留水中で1時間以内、生理食塩水中で6時間以内、および淡水中では24時間以内に死滅するのに対し、海水中では84日以上生存した

としている。この報告では接種菌量が明示されておらず、また実験温度も25°Cであり、著者らの場合とは条件が異なるので詳細な比較はできない。しかし、少なくとも海水中での生存性が長い点については、著者らの結果と一致する。

Table 1. Changes in viable cell number of *V. anguillarum* inoculated in diluted seawater and non-diluted seawater

	Number of viable cells (cells/ml)									
	Inoculation	1-h	6-h	12-h	1-day	5-day	10-day	15-day	20-day	30-day
1% seawater	1.1×10^7	2.1×10^4	7.0×10	<10	<10	—	—	—	—	—
10% seawater	1.1×10^7	6.4×10^7	6.0×10^7	7.3×10^6	1.1×10^7	2.2×10^5	3.5×10^5	2.2×10^5	1.5×10^5	1.3×10^4
25% seawater	7.6×10^7	4.6×10^7	4.3×10^6	7.8×10^7	4.7×10^7	1.2×10^7	3.3×10^6	2.2×10^6	5.8×10^5	2.9×10^4
50% seawater	7.6×10^7	4.6×10^7	5.2×10^7	6.5×10^7	9.9×10^7	6.4×10^7	2.0×10^6	8.9×10^5	5.7×10^5	3.9×10^4
non-diluted seawater	7.6×10^7	2.9×10^7	1.9×10^7	2.3×10^7	2.4×10^7	1.1×10^7	1.7×10^6	2.1×10^6	9.9×10^5	4.1×10^4

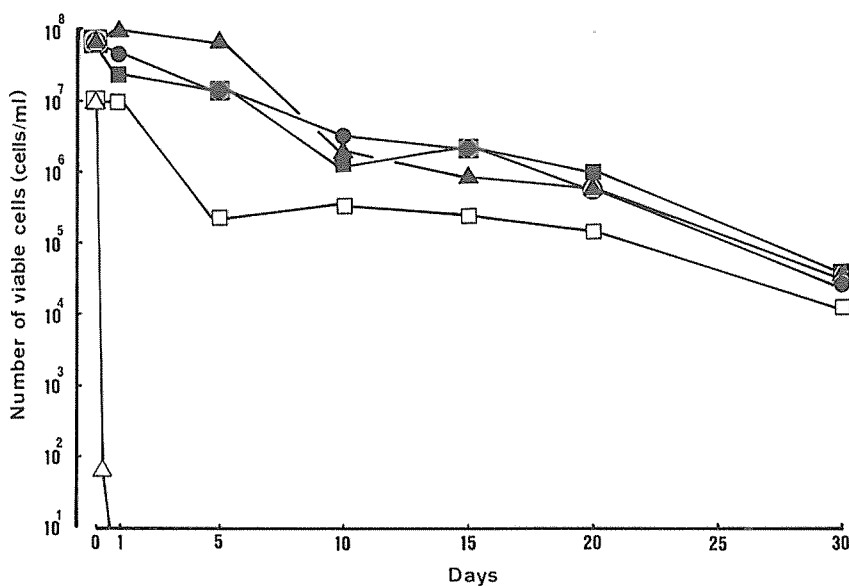


Fig. 1. Changes in viable cell number of *V. anguillarum* inoculated in diluted seawater and non-diluted seawater.

△; 1% seawater, □; 10% seawater, ●; 25% seawater,
▲; 50% seawater, ■; non-diluted seawater

また、楠田¹¹⁾は海産魚の潰瘍病原因菌 *Vibrio* sp. K-3 株に したとしており、著者らの結果と一致する。
 ついて海水中での生存能を調査したところ、40日以上生存

Table 2. Changes in viable cell number of *V. anguillarum* inoculated in distilled water and NaCl-added distilled water

NaCl concentration (ppm)	Number of viable cells (cells/ml)													
	Inoculation	1-min	10-min	20-min	1-h	6-h	12-h	18-h	24-h	36-h	2-day	3-day	10-day	15-day
0	2.3×10^6	<10	<10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	4.9×10^6	<10	<10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
50	4.9×10^6	1.1×10^2	<10	<10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
500	2.0×10^7	4.9×10	2.0×10	<10	<10	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5,000	7.0×10^7	2.0×10^7	1.6×10^7	1.6×10^7	4.1×10^7	1.6×10^6	7.3×10^5	3.7×10^5	8.1×10^4	5.5×10^3	4.7×10^2	<10	—	—
10,000	7.0×10^7	9.0×10^6	1.6×10^7	1.0×10^7	3.2×10^6	4.0×10^6	2.5×10^6	1.4×10^6	3.9×10^5	2.8×10^5	3.2×10^5	1.8×10^5	3.8×10^2	<10

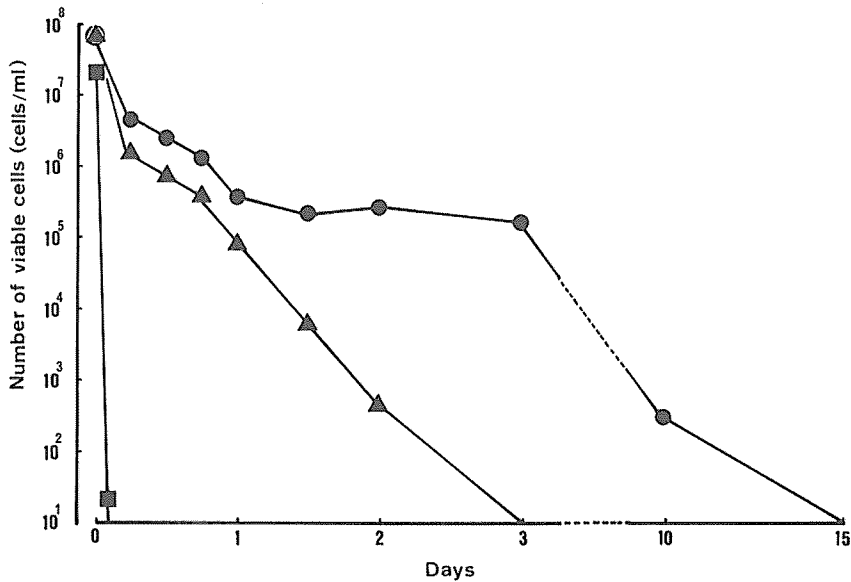


Fig. 2. Changes in viable cell number of *V. anguillarum* inoculated in NaCl-added distilled water.

■; 500 ppm, ▲; 5,000 ppm, ●; 10,000 ppm,

このように、供試菌は淡水飼育アユ由来であるにもかかわらず、海水中で生存期間が長い。このことから、供試菌は元来海水中に生息していたものが、淡水域に移行したのではないかと考えられる。

淡水型 *V. anguillarum* の由来を明らかにするためには、海水および汽水域に生息する病魚由来株との生存能を比較するとともに、血清学的手法などを用いた疫学調査を行って、本菌の感染環を明らかにする必要があると思われる。

Table 3. Changes in viable cell number of *V. anguillarum* inoculated in pond water and NaCl-added pond water

	Number of viable cells (cells/ml)									
	Inoculation	3-h	6-h	12-h	1-day	5-day	10-day	15-day	20-day	30-day
pond water	3.9×10^6	1.1×10^2	<10	<10	—	—	—	—	—	—
0.2% NaCl-added pond water	3.9×10^6	3.5×10^6	6.0×10^5	3.2×10^5	9.9×10^4	1.0×10^5	9.7×10^4	3.6×10^4	1.7×10^4	9.1×10^2
0.85% NaCl-added pond water	3.9×10^6	1.0×10^6	1.3×10^6	1.1×10^6	8.0×10^5	6.5×10^5	4.9×10^5	3.7×10^5	1.2×10^5	8.6×10^3

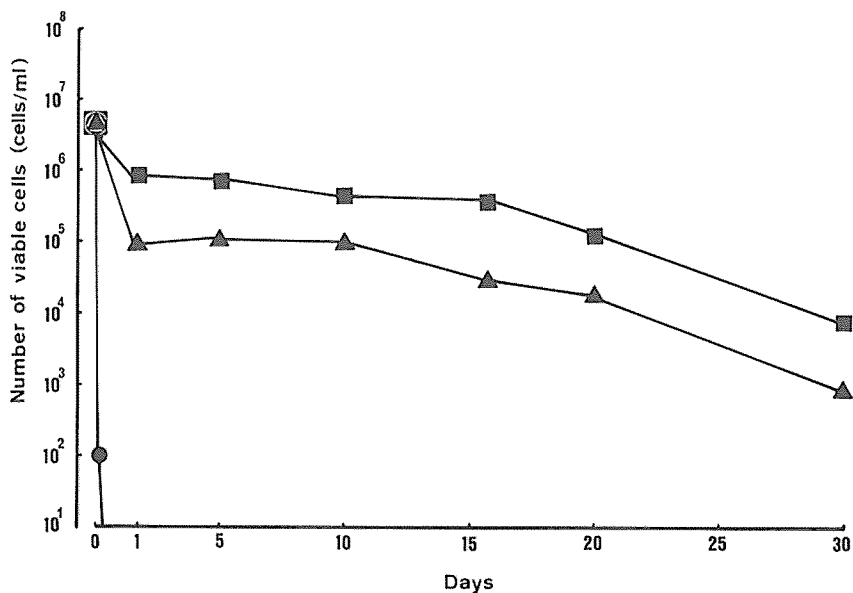


Fig. 3. Changes in viable cell number of *V. anguillarum* inoculated in pond water and NaCl-added pond water.

●; pond water, ▲; 0.2% NaCl-added pond water, ■; 0.85% NaCl-added pond water

3・2 塩分濃度による *V. anguillarum* の病原性の差異

攻撃後の供試魚の生存率の推移は、Fig. 4 に示すとおりである。すなわち、攻撃用試水の食塩濃度が0および0.2%の場合には、10日後にそれぞれ50および20%が生じたのに対し、0.85%では8日後にすべて斃死し、生存率は0%となった。

斃死魚の典型的な症状は、食塩濃度が0%では胸鰭および腹鰭基部の発赤ならびに体側に発赤を伴う膨隆あるいは潰瘍が認められ、腸管の発赤はまれであった。0.2%では胸鰭および腹鰭基部の発赤、体側部の潰瘍および腸管の発赤が認められた。0.85%では体表全体の発赤と腫張、体側部に2~3か所の出血性潰瘍および腸管の発赤などが認められた。なお、すべての斃死個体から淡水型の *V. anguillarum* が純培養液に分離された。実験期間中の水温は17.0~17.5°Cであった。

このように、菌浴攻撃を行った場合、攻撃用飼育水への塩分添加量の増加とともにアユの斃死率が上昇し、症状の

重症化する傾向が認められた。これらの現象は供試菌株の病原性が強化されるだけでなく、急激な塩分の変化によってアユの浸透圧調節不全が生じ、その結果感染防御能力が低下したことも考えられる。

今後は、海水および汽水域の病魚由来 *V. anguillarum* のアユに対する病原性と塩分濃度との関係についても、検討すべきであると思われる。

4. 要 約

アユのピブリオ病の疫学的調査の基礎資料を得るために、その原因菌である *V. anguillarum* の各種塩分濃度における生存性と、養殖アユに対する病原性について検討した。その結果、本菌の海水希釈系列における生存性は1%海水では菌接種後12時間で10 cells/ml未滿となるが、10、25、50および100%海水では30日後においても10⁴ cells/ml以上が生じた。

また、蒸留水に食塩を添加した食塩濃度系列では、0お

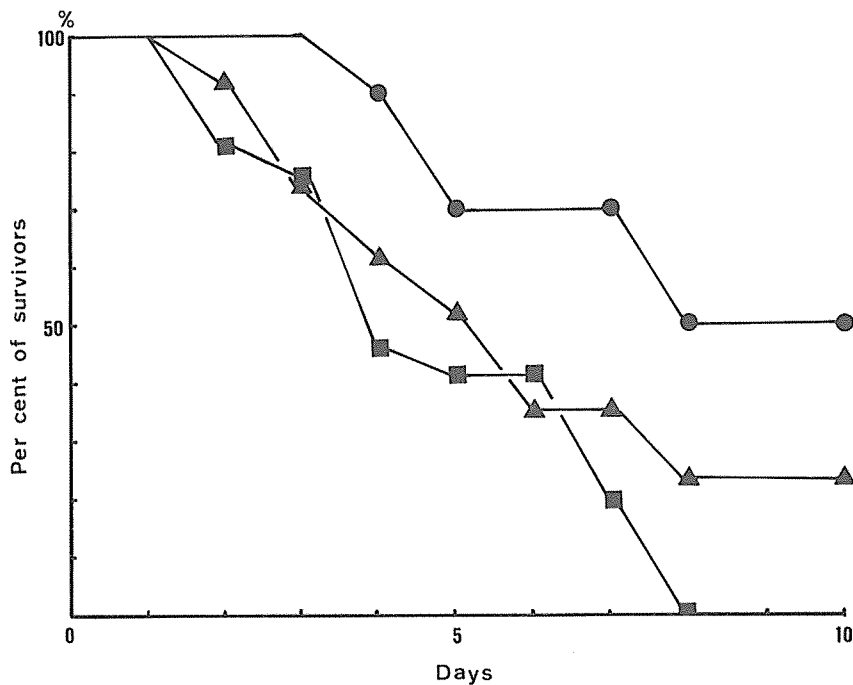


Fig. 4. Changes of survival ratio of Ayu after water-borne challenge with different NaCl concentrations.

●; pond water, ▲; 0.2% NaCl-added pond water, ■; 0.85% NaCl-added pond water

よび5 ppm では菌接種後1分, 50 ppm では10分, 500 ppm では20分, 5,000 ppm では3日および10,000 ppm では15日後に10 cells/ml未満となった。

そして、飼育水に食塩を添加した食塩濃度系列では、食塩濃度が0%で菌接種後6時間で10 cells/ml未満となるのに対し、0.2および0.85%では30日後においても、 $10^2 \sim 10^4$ cells/mlの菌が生存した。

さらに、菌浴攻撃用試水の塩分濃度の差異による本菌の養殖アユに対する病原性を検討した結果、最終生存率は食塩濃度が0および0.2%では50および20%となり、0.85%では攻撃後8日ですべて斃死して0%となった。また、斃死魚の症状は食塩濃度の増加に伴って重症化した。

以上の結果から、供試菌の起源は海水由来であると推定された。また、攻撃用飼育水への食塩の添加は、本菌の病原性の強化とアユの感染防御能力の低下を招くものと考えられる。

文 献

- 1) K. MUROGA and S. EGUSA : *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 33, 636~640 (1967).
- 2) 室賀清邦・江草周三 : 魚病研究, 5, 16~20 (1970).
- 3) 室賀清邦・属 博夫・杉山瑛之・田原恒男・城 泰彦 : 魚病研究, 8, 147~151 (1974).
- 4) 楠田理一・佐古 浩・川合研児 : 魚病研究, 13, 123~127 (1979).
- 5) 楠田理一・川合研児・佐古 浩 : 高知大海洋生物教育センター研報, 3, 89~95 (1981).
- 6) 楠田理一・川合研児・佐古 浩 : 昭和50年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p. 71.
- 7) 北尾忠利・青木 宙・佐々木武二・合田 朗 : 昭和50年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p. 72.
- 8) 絵面良男・田島研一・吉水 守・木村喬久 : 魚病研究, 14, 167~179 (1980).
- 9) T. KITAO, T. AOKI, M. FUKUDOME, K. KAWANO, Y. WADA, and Y. MIZUNO : *J. Fish Dis.*, 6, 175~181 (1983).
- 10) 室賀清邦・西淵光昭・城 泰彦 : 魚病研究, 11, 147~151 (1976).
- 11) 楠田理一 : 海洋の生態系と微生物 (日本水産学会編), 水産学シリーズ10, 恒星社厚生閣, 東京, 1975, pp. 85~96.