

ハマチ幼稚魚期のビブリオ病の原因菌について

安永 統男・小川 七郎・畠井喜司雄

The Causative Organisms of Vibriosis in Cultured Young Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*

Norio YASUNAGA, Shichiro OGAWA, and Kishio HATAI

稚魚期のハマチ（ブリ *Seriola quinqueradiata*）に流行する細菌性疾病としては主に類結節症、連鎖球菌症およびビブリオ病が知られている。ビブリオ病の場合古くから存在していたにもかかわらず稚魚期のハマチでは前二者に対比しこれまでそれほどの関心は向けられなかった。しかしここ数年来、モジャコ放養後の初期減耗にビブリオ病の関与する割合がきわめて高いものになってきたことから、にわかに研究の進展がみられてきた。

長崎県下のハマチ養殖場における実情も同じような傾向にあり、本病対策は緊急課題の一つとなっている。そこでまず本症の実態を明らかにする必要性にかんがみ、昭和55年6月から7月にかけて同県下のハマチ養殖場でモジャコの感染症について調査を行った。他県での調査結果^{1, 2)}から予想されていたように長崎県の場合も *Vibrio anguillarum* による感染症が大部分を占めたが、同じ流行魚群中に本菌と異なる *Vibrio* 菌による感染症が存在すること、およびこれらと病状が相違する *V. alginolyticus* による感染症も小規模ながら存在することが認められた。本調査ではまた、モジャコとともに採捕され飼育さ

れていたウマヅラハギ (*Navodon modestus*) および生簀周辺の野生のウマヅラハギとスズメダイ (*Chromis notatus*) に *V. anguillarum* の感染が確認された。

本報ではこれらの分離菌株の各種性状等について述べる。

材料および方法

1980年6月から7月にかけ長崎県下のハマチ養殖場で、生簀内からモジャコの病魚と死魚、およびウマヅラハギの死魚を、また生簀周辺から外見的には全く健康なウマヅラハギとスズメダイを採集した（表1）。生簀内から得た検体魚は体表その他にほとんど異常の認められないものが大多数で、一部のモジャコで背部に潰瘍形成がみられる小数魚群が存在した。いずれもへい死前においては無気力遊泳を行うので病魚であることの識別は容易であった。

これらの検体魚の腎臓または潰瘍部分を70%エタノールで消毒した後普通寒天培地（調製には1/3海水を使用）を用い直接塗抹培養を行って細菌を分離した。分離菌株（表2）は通常の用法に従い細菌学的性状検査に供したが、試験用培地は一般に2%

表1. 飼育中のモジャコおよび生簀内外の雑魚からの*Vibrio anguillarum* を含む細菌の検出状況Table 1. Incidence of *Vibrio anguillarum* and other bacteria from cultured yellowtail and other fishes in 1980

Source	Location	Date	Body length range (cm)	Number of fish from which each bacterium was isolated / Number of fish examined		
				<i>Vibrio</i> <i>anguillarum</i>	<i>Vibrio</i> spp.	Others
Yellowtail	Minamikushiyama	6, Jun., 1980	5.0 - 7.6	3 / 5	0 / 5	2 / 5
	Obama	9, Jun., 1980	4.1 - 7.0	3 / 3	0 / 3	0 / 3
	Tijiwa	〃	5.4 - 7.3	3 / 3	0 / 3	0 / 3
	Minamikushiyama	〃	6.5 - 6.6	0 / 3	3 / 3	0 / 3
	Tamanoura	10, Jun., 1980	6.5 - 8.5	3 / 3	0 / 3	0 / 3
	Kozasa	12, Jun., 1980	6.5 - 6.7	0 / 2	2 / 2	0 / 2
	Minamikushiyama	13, Jun., 1980	8.2 - 9.1	2 / 2	0 / 2	0 / 2
	Kitagushi	19, Jun., 1980	6.5 - 8.5	3 / 3	0 / 3	0 / 3
	Usuka	20, Jun., 1980	10.0 - 11.0	2 / 2	0 / 2	0 / 2
	Minamikushiyama	24, Jun., 1980	6.5 - 7.2	2 / 2	0 / 2	0 / 2
	Kutinotu	〃	5.2 - 7.2	2 / 2	0 / 2	0 / 2
	Kozasa	26, Jun., 1980	6.5 - 7.3	2 / 2	0 / 2	0 / 2
	Ooshima	27, Jun., 1980	7.7 - 12.2	5 / 5	0 / 5	0 / 5
	Nomo	29, Jun., 1980	5.5 - 6.1	2 / 2	0 / 2	0 / 2
	Wakimisaki	1, Jul., 1980	5.8 - 7.5	5 / 5	0 / 5	0 / 5
	Minamikushiyama	7, Jul., 1980	6.3 - 9.0	4 / 4	1 / 4	0 / 4
	Kutinotu	〃	6.3 - 7.5	2 / 2	0 / 2	0 / 2
	Obama	〃	7.5 - 9.4	0 / 4	4 / 4	0 / 4
	Minamikushiyama	16, Jul., 1980	7.7 - 8.3	0 / 2	2 / 2	0 / 2
	Wakimisaki	19, Jul., 1980	8.4 - 11.5	3 / 5	2 / 5	0 / 5
	Minamikushiyama	24, Jul., 1980	11.0 - 11.2	0 / 2	2 / 2	0 / 2
Blackscraper (Umazurahagi)	Tijiwa	9, Jun., 1980	3.9 - 4.7	2 / 2	0 / 2	0 / 2
	Kozasa	12, Jun., 1980	4.0	0 / 1	1 / 1	0 / 1
	Minamikushiyama	13, Jun., 1980	4.1 - 4.8	4 / 4	0 / 4	0 / 4
	〃	24, Jun., 1980	5.0 - 5.1	1 / 2	0 / 2	0 / 2
Damselfish (Suzumedai)	Minamikushiyama	13, Jun., 1980	5.0 - 6.1	1 / 2	0 / 2	0 / 2

食塩濃度とし22°Cで培養後判定した。血清学的型別試験は抗*V. anguillarum* O—D血清（宮崎大学北尾忠利教授より分与）を用いるスライド凝集反応によって行った。増殖と温度との関係については、2%食塩加1%ペプトン水を使用し24時間振盪培養を行

い、菌の増殖による混濁度を光学的に測定した。薬剤感受性は日本化学療法学会標準法に準拠し、トリプトソーヤブイヨン（日水）での培養菌を用い、ハートインフェュジョン寒天培地（栄研）にて7薬剤、（表5）の最小発育阻止濃度（MIC）を求めた。

病原性試験には6魚種（表6）を供試し、魚体重100g当たり湿菌量1mgを背筋肉内に接種して飼育を行い、病状とへい死状況を観察した。また死魚については腎臓から接種菌の再分離を試みた。

結果および考察

本調査を通じ73菌株が検体魚から分離された。そのうちの2株を除き基本的性状³⁾からはすべて*Vibrio*属に入る菌株であった（表1）。これらの*Vibrio*属の71菌株中54菌株は、代表株を用いたその他の性状試験で*V. anguillarum*⁴⁾に同定でき、全株についての血清学的型別試験では抗*V. anguillarum* 血清O-D（宮崎大学北尾ら提唱）に凝集反応を示した。他方、徳島県で分離された菌株の場合、同血清O-A, B, C（同上）に明瞭な凝集反応を示すものはなく¹⁾、また鹿児島県、宮崎県で分離された菌株については、*O-A, B, C*に凝集しなかつたが、*V. anguillarum* 52011-1（和歌山県にてアユ病魚から分離された菌株）抗血清に凝集性を示している²⁾。北尾⁴⁾は、

本邦各地でモジャコのビブリオ

表2. 供試ビブリオ菌株の由来

Table 2. Source of strains of bacteria isolated from cultured yellowtail and other fishes

Source	Strain		
	No.	Location	Date
Yellowtail	MA80-02	Minamikushiyama	6, Jun., 1980
	03	Obama	9, Jun., 1980
	04	Tijiwa	〃
	06	Minamikushiyama	〃
	07	〃	〃
	08	〃	〃
	09	Tamanoura	10, Jun., 1980
	10	Kozasa	12, Jun., 1980
	11	〃	〃
	12	Minamikushiyama	13, Jun., 1980
	13	Kitagushi	19, Jun., 1980
	14	Usaka	20, Jun., 1980
	15	Minamikushiyama	24, Jun., 1980
	16	Kutinotu	〃
	17	Kozasa	26, Jun., 1980
	18	Ooshima	27, Jun., 1980
	19	Nomo	29, Jun., 1980
	20	Wakimisaki	1, Jul., 1980
	21	Minamikushiyama	7, Jul., 1980
	22	Kutinotu	〃
	23	Minamikushiyama	〃
	24	Obama	〃
	25	〃	〃
	26	Minamikushiyama	16, Jul., 1980
	27	Wakimisaki	19, Jul., 1980
	28	〃	〃
	29	Minamikushiyama	24, Jul., 1980
Blackscraper (Umazurahagi)	NH80-01	Tijiwa	9, Jun., 1980
	02	Kozasa	12, Jun., 1980
	03	Minamikushiyama	13, Jun., 1980
	04	〃	〃
	05	〃	24, Jun., 1980
Damselfish (Suzumeda)	NI80-01	Minamikushiyama	13, Jun., 1980

表3. 分離ビブリオ菌株の性状

Table 3. Characteristics of bacteria isolated from diseased yellowtail and other fishes

Character	<i>Vibrio anguillarum</i> (21 strains)				<i>Vibro alginolyticus</i> (4 strains)				<i>Vibrio</i> spp. (8 strains)							
	NA80 - 02 to 04, 09, 12 to 22, 27	NH80 - 01, 03 to 05	NA80 - 10, 11, 23 NH80 - 02	NI80 - 01	NA80 - 06	07	08	24	25	26	28	29				
Form	rod		rod				rod									
Flagella	Single polar flagellum		Single polar flagellum				Single polar flagellum									
Motility	+		+				+	+	+	+	+	+				
Gram stain	-		-				-	-	-	-	-	-				
Swarming	-		+				-	+	+	-	-	-				
O-F test	F		F				F	F	F	F	F	F				
Gas from glucose	-		-				-	-	-	-	-	-				
Cytochrome oxidase	+		+				+	+	+	+	+	+				
Catalase	+		+				+	+	+	+	+	+				
Urease	-		-				-	+	+	-	-	-				
Phenylalanine deaminase	-		-				-	-	-	-	-	-				
Nitrate red.	+		+				+	+	+	+	+	+				
Gelatin lique.	+		+				+	+	+	+	+	+				
Indol	+		+				+	+	+	+	+	+				
VP test	+		+				-	-	-	-	-	-				
2,3-butanediol	+		+				-	-	+	+	+	-				
MR test	+		+ (1), + w (2), - (1)				+	+	-	+	+	+				
IPA test	-		-				-	-	-	-	-	-				
H ₂ S Production	-		-				-	-	-	+ w	-	+ w				
Arginine hydrolysis	+		-				-	-	-	-	-	-				
Starch hydrolysis	+		+				+	+	+	+	+	+				
Arginine dihydrolase	+		-				-	-	-	-	-	-				
Lysin decarboxylase	-		+				+	+	+	+	-	+				
Ornithine decarboxylase	-		+				+	+	-	+	+	+				
Casein digestion	+		+				+	+	+	+	+	+				
Citrate(Simmons)	+		+				+	+	+	+	+	+				
Tartrate(Jordan)	+ w		+				+	+	+	+	+	+				
Malonate	+ w		+				+ w	+	+	+ w	+	+				
Cholera red	+ w		+				+	+	+	+	+	+				
ONPG	+		+ (1), - (3)				+	-	+	-	+	-				
NaCl 0 %	-		-				-	-	-	-	-	-				
0.5	+		+				+	+	+	+	+	+				
7	-		+				-	-	+	-	-	-				
10	-		+				-	-	+	-	-	-				
Temperature																
37 °C	-		+				+	+	+	+	+	+				
42	-		+				-	-	+	-	-	-				
Sensitivity to																
0 / 129	+		+				+	+	+	+	+	+				
Novobiocin	+		+				+	+	+	+	+	+				
Penicillin	-		-				-	-	-	-	-	-				

():number of strain, + w:weakly positive.

表4. 分離ビブリオ菌株の炭水化物分解性

Table 4. Carbohydrate utilization of bacteria isolated from diseased yellowtail and other fishes

Carbohydrate	<i>Vibrio anguillarum</i> (21 strains)	<i>Vibro alginolyticus</i> (4 strains)	<i>Vibrio spp.</i> (8 strains)
	NA80 - 02 to 04, 09, 12 to 22, 27	NA80 - 10, 11, 23 NH80 - 02	NA80 - 06 07 08 24 25 26 28 29
NH80 - 01, 03 to 05			
NI80 - 01			
Acid from			
Arabinose	+	-	- - - - - - - - -
Xylose	-	-	- - - - - - - - -
Rhamnose	-	-	- - - - - - - - -
Levulose	+	+	+ + + + + + + + +
Galactose	+	+	+ + + + + + + + +
Mannose	+	+	+ + + + + + + + +
Sorbose	+	+	+ + + + + + + + +
Cellobiose	+	+	+ + + + + + + + +
Lactose	-	+ (1), -(3)	- - + - - - - -
Maltose	+	+	+ + + + + + + + +
Sucrose	+	+	+ + + + + - - + +
Melibiose	-	-	+ + + + - + + + +
Trehalose	-	+	+ + + + + + + + +
Melezitose	-	-	- + + - - + + + +
Raffinose	-	+ (1), -(3)	- - - - - - - - +
Glycogen	+	+	+ + + + + + + + +
Inulin	-	-	- - - - - - - - -
Dextrin	+	+	+ + + + + + + + +
Starch	+	+	+ + + + + + + + +
Adonitol	-	-	- - - - - - - - -
Esculin	-	-	- - - - - - - - -
Salicin	-	-	- - - - - - - - -
Mannitol	+ (20), -(1)	+	+ + + + + + + + +
Sorbitol	+	-	+ + + - - - - - -
Inositol	-	-	- - - - - - - - -
Dulcitol	-	-	- - - - - - - - -
Erythritol	-	-	- - - - - - - - -

() : number of strain.

症から分離された *V. anguillarum* 菌株はすべて同一血清に強い凝集を示すので、おそらく血清型は一つであると考えられると述べ、淡水魚由来の *V. anguillarum* C型（上記 O-C）と共に抗原を有することからこれと混同をさける意味で *V. anguillarum*

K S型（上記O-D）として区別している。以上の諸結果、見解を総合すると長崎、徳島、鹿児島および宮崎各県で分離されたモジャコ由来の *V. anguillarum* 菌株は、性状を比較すると相互に多少の相違はみられるが、すべて同じ biovar および serovar に

表5. *Vibrio anguillarum* NA80-21株の病原性Table 5. Results of inoculation experiments on the susceptibility of 6 species of fishes to *Vibrio anguillarum* NA80-21 isolated from diseased yellowtail

Common name of fish used	Body weight range(g)	Number of fish sample	Number of fish died				
			1	2	3	4	Total
Yellowtail (Buri)	32 - 44	2		2			2
Opaleye (Mejina)	2 - 6	4			4		4
Red sea bream (Madaï)	6 - 16	3			1		1
Japanese horse mackerel(Aji)	4 - 12	3		2	1		3
Japanese striped knifejaw(Ishidai) (Ishigakidai)	84	1			1		1
	30	1		1			1

* Each fish was intramuscularly injected with 1.0 mg of viable cells per 100 g of fish body weight.

含めてさしつかえないと思われる。ただし、今回長崎県で観察された *V. anguillarum* 感染モジャコの症状が、他県での症状^{1, 2)} に較べて外的にはきわめて軽症であったことは一考の要がある。北尾⁵⁾は経口感染以外にスレなどからの経皮感染も考えられるとしているが、この点において本調査でハマチ以外の魚種からも *V. anguillarum* が分離されたことは注目される。特に生簀外の野生の健康魚については、もしも不顕性感染魚であれば感染源としての役割は無視できないであろう。どのような経路で保菌したのか明らかでないが、生簀内の病魚とともにハマチ以外の魚種が *V. anguillarum* の感染を受ける事実は本症の疫学上興味深いものがある。

Vibrio spp. とされた菌株（表1）のうち潰瘍形成ハマチならびに生簀内のウマヅラハギ死魚由來の4株は *V. alginolyticus* に近似の性状⁶⁾ を示した。

異論もあるがここではひとまず本菌種に含めておく。また、上記の *V. anguillarum* 感染症と同一病状の魚群からは、現在のところ同定不能な *Vibrio* 菌株（代表8株の性状検査に基づく）が分離された。これらの結果はモジャコ期のビブリオ病が必ずしも単一菌種によるものではなく、多様な菌種あるいは菌群の潜在を示唆するものであろう。とりわけ *V. alginolyticus* はこれまででも魚病菌として知られており^{7, 8)}、しかも *V. parahaemolyticus* とともに広く近海に分布している⁹⁾ことから、モジャコの重要な病原菌となる可能性が考えられる。

今回分離された *Vibrio* 菌株のうち代表33株の来歴と各種性状は表2～4にそれぞれ示すとおりである。*V. anguillarum* および *V. alginolyticus* 株については平板培地上の集落性状、菌細胞の特徴もこれまで報告^{1, 6)}の記載に照し差異は認められず、生物

表 6. 分離ビブリオ菌株の薬剤感受性

Table 6. Minimal inhibitory concentrations(M.I.C.) of 7 chemotherapeutics for *Vibrio anguillarum* and *Vibrio* spp.

Bacteria	Chemotherapeutics	M. I. C. (mcg / ml)										No. of strains tested
		25	12.5	6.3	3.1	1.6	0.8	0.4	0.2	0.1	0.05	
<i>Vibrio anguillarum</i>	OTC				19	2						21
	TC			2	15	4						〃
	CTC				5	16						〃
	CP					21						〃
	TP				1	20						〃
	OX								3	18		〃
	NFS - Na						4	17				
<i>Vibrio alginolyticus</i>	OTC				4							4
	TC		1		3							〃
	CTC			1	3							〃
	CP					4						〃
	TP	1	2	1								〃
	OX					3	1					〃
	NFS - Na			3	1							〃
<i>Vibrio</i> spp.	OTC				8							8
	TC			3	5							〃
	CTC				5	3						〃
	CP				5	3						〃
	TP	2	1	5								〃
	OX					3	3	1				〃
	NFS - Na				4	4						〃

OTC : Oxytetracycline, TC : Tetracycline hydrochloride, CTC : Chlortetracycline,

CP : Chloramphenicol, TP : Thiamphenicol, NFS - Na : Sodium nifurstyrenate,

OX : Oxolinic acid

学的諸性状に基づく上述の菌種についての判断は妥当であろう。

図1に代表6株についての温度と増殖との関係を示す。*V. anguillarum*の2株は25~30°C付近に最適温度があり、37°C近くに至ると増殖の停止がみられた。また、*V. alginolyticus*と*V. spp.*の各2株は類似した傾向を示し、最適温度は37~38°C付近にあり、42°C以上でも増殖可能であった。

病原性試験の結果は表5に示すように、供試*V.*

anguillarum 菌株はブリ、メジナ、アジ、イシダイおよびイシガキダイを接種後2日以内にすべて死亡させた。マダイでは3尾中2尾が観察期間中（接種後4日）生存した。へい死魚の腎臓からはすべて接種菌が再分離され当該菌の致死作用が証明できたが、魚種による毒力の差は自然感染における現象を示すものかも知れない。なお、特に表示しなかったが、*V. alginolyticus*菌株(NA80-10, NH80-02) および*V. spp.*菌株(NA80-06, -24)の4株を使用しブリ(平均体

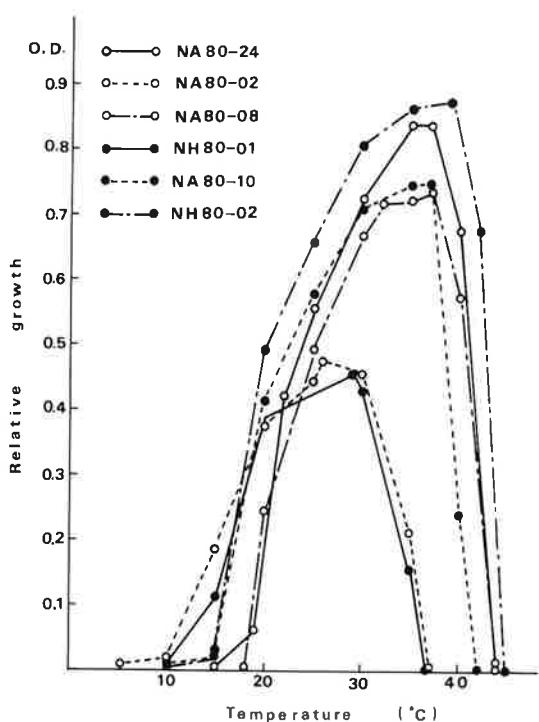


図1. 分離ビブリオ菌株の増殖に及ぼす温度の影響
Fig.1. Effect of temperature on growth of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio* spp. isolated from diseased yellowtail and other fishes (Medium, 1% peptone water; Nacl, 2%; pH, 7.2; Incubation, 24hr shaking culture)

重25g)各3尾に対する病原性を筋注により調べたところ、すべて接種後3日以内にへい死し、腎臓内から菌の再分離もできた。*V.alginolyticus*菌株による死魚には自然感染魚と同様に接種部位に潰瘍の形成が認められた。

供試32株の薬剤感受性は表6に示す。*V.anguillarum* 21株はオキソリン酸、ニフルスチレン酸ナトリウム、クロラムフェニコールおよびチアンフェニコール等に、*V. alginolyticus* 4株はオキソリン酸およびクロラムフェニコール等に、また *V. spp.* 8株はオキソリン酸、ニフルスチレン酸ナトリウム、クロルテトラサイクリンおよびクロラムフェニコール等に対してそれぞれ強い感受性を示した。今後はこれらの薬剤について実用的効力の検討が望まれる。

本研究を行うにあたり貴重な抗血清の提供をいただいた宮崎大学北尾教授に深く感謝いたします。

Abstract

Vibriosis has caused severe losses among cultured young yellowtails in recent years in Japan. Major objective of this study was to investigate the occurrence of the causative organisms of the vibriosis in the culture farms of young yellowtail in Nagasaki Prefecture.

In the course of the diagnostic works, it was recognized that the majority of affected yellowtails had little injury or a few large ulcer in the body surface. In addition to pen-cultured yellowtail, fishes of several species found near the pens or confined after capture with yellowtail were collected as specimens for bacterial isolation. The confined specimens were moribund or recently dead and the feral ones appeared normal. Seventy three isolates obtained from kidney tissue or ulcer lesion were submitted to characterization test, and 71 were assigned to the genus *Vibrio*. Of these *Vibrio* isolates, 54 were identified as *V. anguillarum* O-antigen type D(KITAO), 4 as *V. alginolyticus* and 13 as *V. spp.*. In consequence, it was shown that the feral fishes were infected with *V. anguillarum*

and that the ulcer disease of yellowtail was caused by *V. alginolyticus*. In growth-temperature relationship, characteristic patterns were observed on respective species of *Vibrio* isolates. *Vibrio* isolates of the above-mentioned two species and others, arbitrarily selected for pathogenicity test, proved to cause vibriosis, and displayed same symptoms as the naturally infected fish respectively. Generally, the present *Vibrio* isolates were confirmed to have high sensitivities to oxolinic acid.

文 献

- 1) 城 泰彦・大西圭二・室賀清邦, 1979: 養殖ハマチから分離された *Vibrio anguillarum*. 魚病研究, 14(1), 43-47.
- 2) 塩満捷夫・福留己樹夫・九万田一己・北尾忠利他, 1955: *Vibrio* sp. によるモジャコの感染症. 昭和53年度鹿児島県水産試験場事業報告, 97-102.
- 3) 坂崎利一, 1972: ビブリオの分類 (第2回国際ビブリオ分類委員会の記録から). モダンメディア, 18(4), 193-200.
- 4) BUCHAMAN, R. E. and N. E. GIBBONS, 1974: Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed.. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1246 pp.
- 5) 北尾忠利, 1980: 養殖ハマチの稚魚期における細菌性疾病を中心として, 動薬研究, (23), 6-8.
- 6) 坂崎利一, 1969: 医学で扱われるブドウ糖発酵性のグラム陰性かん菌 (その2). モダンメディア, 15(7), 394-400.
- 7) 安永統男, 1975: 外部を滅菌処理したマダイ卵, 仔魚および筋肉からのマダイ病原菌の分離. 長崎県水産試験場研究報告, (1), 59-69.
- 8) 岩田一夫・石橋 制・北尾忠利・青木 宙, 1977: マダイ種苗生産過程におけるへい死の原因について—1. 昭和50年度宮崎県水産試験場事業報告, 23-29.
- 9) 畠井 稔, 1974: 腸炎ビブリオ, 「海洋学講座11 海洋微生物」, 多賀信夫編, 230, 東京大学出版会, 東京」 106-127.

