

数種の海産養殖魚から分離された病原性 *Edwardsiella* の性状について

安永 統男・小川 七朗・畑井喜司雄

Characteristics of the Fish Pathogen *Edwardsiella* Isolated from
Several Species of Cultured Marine Fishes

Norio YASUNAGA, Shichiro OGAWA, and Kishio HATAI

*Edwardsiella*による海産養殖魚の疾病としての最初の明確な記載は楠田・伊丹ら¹⁾によってなされ、1974年三重県で発生した養殖チダイのへい死が *Edwardsiella tarda* の変種に起因するとし、エドワルツ病(仮称)が提案された。

楠田・豊島ら²⁾は1973年に高知県で野生のボラにおける病死例から原因菌である *E. tarda* を分離しており、海産養殖魚に対する *Edwardsiella* 感染の機会が常時存在することをうかがわせる。果して最近になって海産養殖魚にしばしば本病の発生がみられるようになり、罹病魚種および症状ともに多様化の傾向にある。

一般に *Edwardsiella* による魚類の感染症については、魚種により症状に相違がみられる場合のあることから病理の面で関心を呼んでおり、また分離病原菌によっては定型的 *E. tarda* との性状の差異が種または亜種レベルに係わる分類上の問題をかもし出している。

このような問題とも関連して、海産養殖魚における本病の原因菌の性状を明らかにする必要性から、長崎県内の養殖場で1980年から1981年にかけて養殖マダイ、チダイ、ブリおよびヒラメの各病魚から分離され病原性の認められた菌株について検討を行った。また、安永³⁾によって1975年に養殖



図1. 非運動性 *Edwardsiella tarda* に感染したマダイの肝すい臓における小白斑
Fig. 1. Hepatopancreas with white spots, bacterial colonies, of red sea bream infected with non-motile *Edwardsiella tarda*.



図2. 運動性 *Edwardsiella tarda* の感染による腹水症状のヒラメ
Fig. 2. Plaice exhibiting ascites by infection of motile *Edwardsiella tarda*.

マダイの新疾病から分離された未同定の病原株が、保存中に性状変異を起し、近時類似症から分離される *Edwardsiella* と一致する性状を示すことが分かったので併せ報告する。なお、淡水養殖のウ

ナギおよびティラピアから分離された病原性 *Edwardsiella* を海産養殖魚由来の菌株との比較のために供試した。

表1 供試 *Edwardsiella* 菌株の由来

Table 1. Source of the strains used in this study

Strain	Specimen		Site	Location
	Name (Age)	Sampling date		
NB-8030	Red sea bream (3)	Oct. 14, '80	Tail ^a	Toisu, Nagasaki
NB-8031	Red sea bream (3)	Oct. 14, '80	Gill ^a	Toisu, Nagasaki
NB-8032	Red sea bream (3)	Oct. 14, '80	Head ^a	Toisu, Nagasaki
NB-8033	Red sea bream (3)	Oct. 14, '80	Kidney ^b	Toisu, Nagasaki
NB-8034	Red sea bream (3)	Oct. 14, '80	Kidney ^b	Toisu, Nagasaki
NE-8001	Plaice (0)	Aug. 1, '80	Kidney	Mitsushima, Shimoagata
NE-8002	Plaice (0)	Nov. 19, '80	Kidney	Mitsushima, Shimoagata
NE-8003	Plaice (0)	Nov. 19, '80	Kidney	Mitsushima, Shimoagata
NB-8102	Red sea bream (2)	Aug. 26, '81	Kidney ^b	Kosaza, Kitamatsuura
NB-8103	Red sea bream (3)	Sept. 21, 81	Kidney ^b	Tabira, Kitamatsuura
NB-8105	Red sea bream (3)	Sept. 30, 81	Spleen ^b	Kosaza, Kitamatsuura
NE-8153	Plaice (0)	Jun. 15, '81	Kidney	Kosaza, Kitamatsuura
NE-8154	Plaice (0)	Sept. 14, '81	Kidney	Shikamachi, Kitamatsuura
NE-8158	Plaice (0)	Oct. 6, '81	Kidney	Kosaza, Kitamatsuura
NA-8160	Yellowtail (0)	Jul. 3, '81	Kidney ^b	Chijiwa, Minamitakaki
NL-8101	Crimson sea bream (2)	Oct. 10, '81	Kidney ^b	Naru, Minamimatsuura
GT-6	Red sea bream (4)	Aug. 29, '75	Head ^a	Tamanoura, Minamimatsuura

^a Isolations were performed from abscess.

^b Isolations were performed from white spot, bacterial colony.

実験方法

検体魚と菌株の由来 表1に示す。供試魚のうち長崎市のマダイが網仕切で、またヒラメは陸上のコンクリート水槽で養殖されていたものである。その他の供試魚はすべて小割生簀での養殖魚である。症状はマダイとチダイが共通しており、頭部、尾柄部、背びれ基部、などにおける膿瘍形成、および腎臓の腫大と肝・腎・脾臓に形成される多数の結節様の小白斑が特徴で、一部に腹部のガス膨満がみられた。ヒラメでは腹水による膨満を主

徴とし、内臓では肝臓が褪色している程度であった。ブリではマダイと同様の小白斑が腎・脾臓に多数みられたが外見的には著変はなかった。大多数の症例でへい死は慢性的に進行し、病魚の症状もさまざまで、重篤な場合も想像以上の延命がみられた。これらの症状の一部を図1, 2に示す。なお、比較のために供試した淡水魚については、ウナギが1981年3月7日に長崎県南高来郡千々石町で採捕のパラコロ病に罹った0年魚で、ティラピアは同3月5日に同西彼杵郡琴海町で採捕した死亡寸前の一年魚で目立った症状は認められなかった。

安永・小川・畑井：数種の海産養殖魚から分離された病原性 *Edwardsiella* の性状について

表 2. 分離 *Edwardsiella* 菌株と *E. tarda* およびその変種の生化学的性状

Table 2. Biochemical characteristics of the present strains, compared with those of *Edwardsiella tarda* and its variant

Test or substrate	<i>Present strains</i> ^a			<i>Edwardsiella tarda</i> ^e		Variant of <i>E. tarda</i> ^f
	I ^b	II ^c	III ^d			
Motility	—	+	+	+	96.8 %+	—
Catalase	+	+	+	+	100	+
Cytochrome oxidase	—	—	—	—	100	—
Hydrogen sulfide (TSI)	+	+	+	+	98.6	1.4 %(+) ^h
Hugh-Leifson's agar	F ^g	F	F	F	100	F
Gas from glucose	+	+	+	+	99.6	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	100	+
Voges-Proskauer	—	—	—	—	0	—
Methyl red	+	+	+	+	100	+
2, 3-Butandiol	+	+	+	—		+
ONPG	—	—	—	—	0	—
Starch hydrolysis	—	—	—	—		—
Esculin hydrolysis	—	—	—	—	0	—
Arginine hydrolysis	—	—	—	—		—
Indole	+	+	+	+	99.0	0.6
Chorela red	+	+	+			(+)
Kauffmann-Peterson :						
Citrate	+	+	+	+	99.0	+
d-Tartrate	—	—	—	—	0	(+)
Mucate	—	—	—	—	0	—
Ammonium	—	—	—	—		(+)
Casein digestion	—	—	—	—		—
Urease	—	—	—	—	0	—
Gelatin	—	—	—	—	0	—
Arginine dehydro.	—	—	—	—	0	—
Lysine decarbo.	+	+	+	+	100	+
Ornithine decarbo.	+	+	+	+	99.2	0.8
Christensen's citrate	+	+	+	+	99.0	(+)
Simmons's citrate	—	—	—	—	0	—
Malonate	—	—	—	—	0	—
KCN	—	—	—	—	0	(+)
Phenylalanine deami.	—	—	—	—	0	—
TTC reduction	+	+	+			+
MB reduction	+	+	+			(+)
Carbohydrate (Acid) :						
Glucose	+G ⁱ	+G	+G	+	100	+G
Arabinose	+G	—	—	—	2.0	0.4
Xylose	—	—	—	—	0	—
Rhamnose	—	—	—	—	0	—
Fructose	+G	+G	+G			+G
Mannose	+G	—	—			+G
Galactose	+G	—	—			+G
Lactose	—	—	—	—	0	—
Sucrose	—	—	—	—	1.2	0.6
Maltose	+G	+G	+G	—	99.8	0.2
Trehalose	—	—	—	—	0	0.4
Cellobiose	—	—	—	—	0	—
Melibiose	—	—	—	—	0	—
Raffinose	—	—	—	—	0	—
Dextrin	—	+G	+G			—
Glycerol	(+)	+G	+G	d ^j	0	28.4
Erythritol	—	—	—	—	0	—
Adonitol	—	—	—	—	0	—
Mannitol	+G	—	—	—	0	1.6
Sorbitol	—	—	—	—	0	(+)
Salicin	—	—	—	—	0	1.8
Inositol	—	—	—	—	0	—

表2 - 続き

Table 2 - Continued

- a* Agglutinated in anti-*E. tarda* serum prepared by using isolate from the Japanese eed diseased in Shizuoka Prefecture.
- b* NB-, NA-, NL-, and GT-strains (GT-6 was from 6 years stock-culture) from 3 species of marine fishes indicated in table 1.
- c* NE-strains from a species of marine fish indicated in table 1.
- d* Reference strains from freshwater cultured-fishes, *Anguilla japonica* and *Tilapia nilotica*, in Nagasaki Prefecture by the present authors.
- e* Strains (780) from various specimens by Sakazaki⁶⁾.
- f* Strains from crimson sea bream by Kusuda¹⁾.
- g* Fermentative.
- h* Weakly or delayed positive.
- i* Gas production.
- j* Diverse by strain or serovar.

表3. マダイ病魚からの分離菌株GT-6の生化学的性状変異

Table 3. Biochemical variation of strain GT-6 from diseased red sea bream

Test or substrate	Original culture ^a (1975)	Present culture (1981)
Motility	-	-
Cytochrome oxidase	-	-
Catalase	+	+
Urease	-	-
Indole	+	+
Gelatin	-	-
Hydrogen sulfide (TSI)	+	+
Malonate	-	-
Simmons's citrate	-	-
Starch hydrolysis	-	-
Voges - Proskauer	-	-
Methyl red	+	+
Hugh - Leifson's agar	F ^b	F
Gas from glucose	-	+
Arginine dehydro.	-	-
Ornithine decarbo.	+	+
Lysine decarbo.	-	+
Carbohydrate (Acid):		
Lactose	-	-
Rhamnose	-	-
Sucrose	-	-
Inositol	-	-
Mannitol	-	+
Sorbitol	-	-
Maltose	+	+
Salicin	-	-
Trehalose	-	-
Raffinose	-	-
Xylose	-	-
Arabinose	-	+

a Preserved at room temperature in rubber stopped glass-broth medium.

b Fermentative.

菌株の分離と性状検査 細菌の分離はBHI寒天，普通寒天（1/3海水希釈），SS寒天，BTBティポール寒天などを使用し，諸臓器から直接塗抹した後，25℃で培養する方法で実施した。いずれも純培養状に細菌の発育がみられ，これらの菌集落から得た分離菌株について常法通り各種性状を検査した。性状検査時の培養は概ね25℃で行った。温度，pHおよび食塩濃度と発育性との関係については，各種の液体培地を使用し振盪培養を行い，菌の増殖による混濁度を光学的に測定した。血清型は静岡県ウナギ由来株（パラコロ病からのEdk-1）で作成（北里研究所）の抗血清を用いスライド凝集反応により調べた。性状変異の観察は約3ml普通ブイヨン（ゴム栓付小試験管）で室温保存の菌株について行った。

結 果

分離菌株はすべてグラム陰性の短桿菌である。マッコンキー寒天，SS寒天，デソキシコーレイト寒天の各培地に発育するが，BTBティポール寒天培地には発育しない。生化学的性状は表2に示すとおりで，マダイ，チダイ，ブリ由来の菌株は非運動性でアラビノースとマンニトールを分解するが，ヒラメ由来の菌株は運動性がありアラビノースとマンニトールは分解しない。また，ヒラメ由来の菌株はウナギとティラピア由来の菌株と同一性状を示した。運動性株は周毛を有する。

供試菌の発育温度域は非運動性株が10～40℃，運動性株が10～44℃で，適温はともに30℃付近にある（図3）。発育pH域は非運動性，運動性株とも3.0～10.0で，前者は5.0，後者は7.0で最もよく発育する（図4）。塩分濃度による発育性

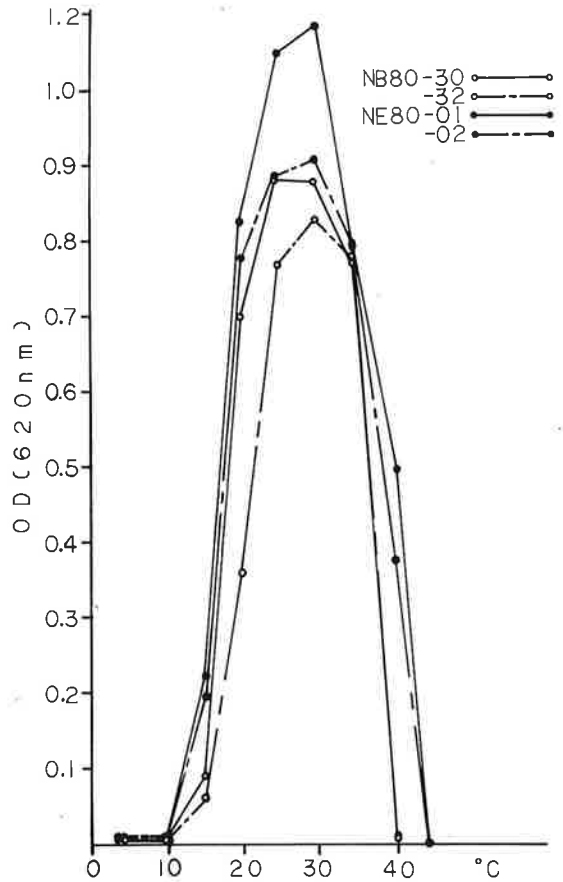


図3. 分離 *Edwardsiella* 4 菌株の増殖に対する温度の影響

Fig. 3. Dependence of the growth of 4 isolates upon temperature. (Medium, BHI broth; pH, 7.4; NaCl, 0.5%; Incubation, 24 hr shaking culture)

は非運動性，運動性株とも0～1.5%近くまでは良好であるが，濃度が高くなるにしたがって発育性は低下し，4.0%に至るとほとんど発育しない（図5）。

1975年にマダイから分離した菌株は，表3に示すように，分離直後と6年間保存の後とではブドウ糖からのガス産生，リシン・デカルボキシラーゼ産生，アラビノースとマンニトール分解性で相違がみられ，いずれも陰性が陽性に変化していた。なお，保存菌株はすべての生化学性状が1980年か

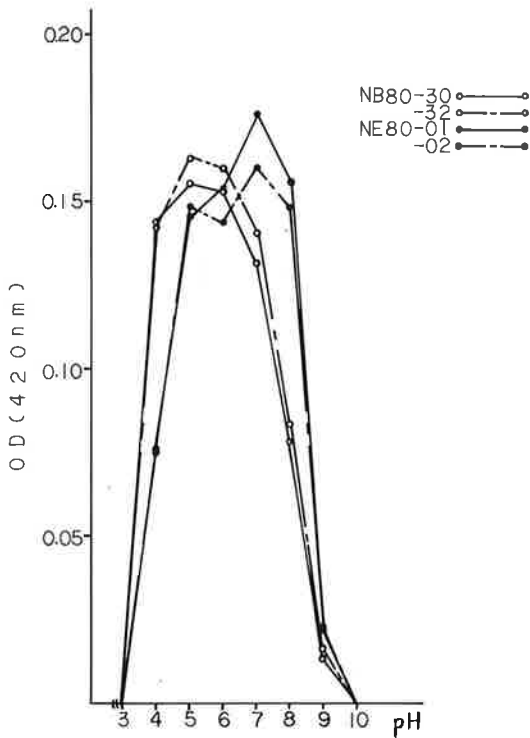


図4. 分離 *Edwardsiella* 4 菌株の増殖に対する pH の影響
 Fig. 4. Dependence of the growth of 4 isolates upon pH. (Medium, 1% peptone water; Temperature, 25 °C; NaCl, 0%; Incubation, 24 hr shaking culture)

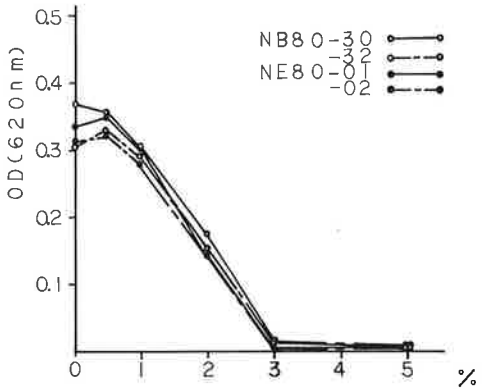


図5. 分離 *Edwardsiella* 4 菌株の増殖に対する 食塩濃度の影響
 Fig. 5. Dependence of the growth of 4 isolates upon NaCl concentration. (Medium, nutrient broth; Temperature, 25 °C; pH, 7.4; Incubation, 24 hr shaking culture)

ら1981年にかけてマダイ、チダイ、ブリから分離された菌株と同一であることが認められた。

本研究で使用の抗血清に対する凝集試験では、上記変異株を含む今回分離のすべての菌株が明瞭な陽性反応を示した。

考 察

Bergey's manual 第8版⁴⁾ および Cowan and Steel's manual 第2版⁵⁾ によれば, *Edwardsiella* 属の定義のなかで運動性状に関する部分は両方とも“運動性菌”と明記されていて、非運動性菌については触れていない。しかし、その後坂崎⁶⁾の腸内細菌学講座に示された定義では“運動性または非運動性”となっている。また、これらの分類書はともに *Edwardsiella* 属には *Edwardsiella tarda* 1 菌種のみを含めている。この点について坂崎⁶⁾は当初、*E. tarda*には糖発酵上二、三の生物型が認められるが、各生物型間には少なくとも種あるいは亜種として分けるほどの大きな相違はないとの見方に立っていた。ところが、ごく最近になってこの見解は *E. hoshinae* および *E. idalura* の2菌種の追加によって変り、部分的な修正がなされた。⁷⁾

本研究に供試の菌株は *E. hoshinae* とはマロン酸塩の利用性などで、また *E. idalura* とは硫化水素およびインドール産生性などで基本的な相違がみられるが、表2で明らかなように、坂崎⁶⁾の示す諸症状に照し *E. tarda* には同定可能で、その中の運動性株は定型的 *E. tarda*⁷⁾ に該当する。非運動性株は非定型的であるが、既に提示の非定型的 *E. tarda*⁷⁾ とは相違する。本分離菌株は血清型では区別できなかったが、運動性状で大別され

る菌群を生物型で分けておくだけで良いのかどうか、なお問題なしとしない。楠田・伊丹¹⁾はチダイ由来の菌株が非運動性であること、マンニトールやソルビトールを分解することなどで、*E. tarda* とは相違するとし、*E. tarda* の変種と同定している。ただし、1976年に改正された国際細菌命名規約では、変種 *Varietas* は廃止され亜種 *Subspecies* に統一されている⁸⁾ので、*E. tarda* の亜種とすべきであろう。ともあれ、今回マダイ、チダイおよびブリから分離された非運動性株は、今回ヒラメや淡水産のウナギとティラピアから分離された対照の運動性株とは、表2に比較して示すように、楠田・伊丹¹⁾のチダイ由来株ほどの相違はみられない。また、発育性と環境要因との関係(図3, 4 および5)でも、運動性株と非運動性株との間で、pHについて多少差異が認められる程度である。だがここで問題となるのは、分離してから6年間の保存期間中に性状変異を起し、結果として非運動性の *E. tarda* に同定できた菌株の存在である(表3)。なかでもリシン・カルボキシラーゼ産生性は属レベルに関係する重要性状であり、これが変化したことは分類学的な面から無視できない現象といえよう。現在のところ非運動性株は、魚類では海産養殖魚のみから検出されており、しかも症状的にも運動性株とは異なるところがあって、両者の間で疫学的または生態的な隔りがあるように見える。楠田・伊丹¹⁾の思想をよりどころに、以上の諸点を勘案すれば、今回分離の非運動性株は *E. tarda* の亜種とみなしてさしつかえないように思われる。今後はDNA相同性などに加え、先述の変異現象が普遍的にみられるものなのかどうかなど、データの集積が必要で、それによって真に亜種を設けるべきか、

さらには楠田・伊丹¹⁾の菌株とは別の亜種に位置づけるべきか、などの問題に結論が得られよう。

なお、上記変異株について敢えて付言すれば、本来の性状が変異以前の分離直後に示された方であるならば、*Edwardsiella* の分類は根本から見直すべきかもしれない。Cowan and Steel's manual 第2版⁵⁾には“*Edwardsiella* は不必要な菌属であるように思われる。”とし“*Edwardsiella tarda* としておくことはあまり適切でなく、*Escherichia coli* の生物型とみなしたほうがよい。”と記してある。このような見方は細菌検索に伴う疫学調査などの実用的な面では問題があるが、生物学的観点からは重視すべきで、細菌種相互の遺伝的關係はもっと明らかにされる必要がある。

要 約

1. 1980年から1981年にかけて、長崎県下の養殖場で養殖マダイ、チダイ、ブリの各病魚(腎・脾臓などに多数の結節様小白斑形成)および養殖ヒラメの病魚(腹水貯留)から腸内細菌を分離し、各種試験に供した。また同じく、淡水養殖のウナギおよびティラピアの各病魚から腸内細菌を分離し、海産魚由来菌と性状を比較した。
2. その結果、マダイ、チダイ、ブリ由来菌は非運動性の非定型的 *Edwardsiella tarda* に、またヒラメ由来菌はウナギおよびティラピア由来菌と同一性状を示し、運動性を有する定型的 *E. tarda* に同定し得た。
3. 1975年に長崎県五島で養殖マダイの新病から分離された未同定菌が、6年間の保存中に性状変異を起していることが分り、結果として非定

型的 *E. tarda* に同定された。

て考察を加えた。

4. *Edwardsiella* の分類学的現状および上記変

異現象の意義をふまえ、今回分離の非運動性菌
をさらに亜種として分類すべきかどうかについ

終わりにあたり、貴重な抗血清の提供をいただ
いた宮崎大学北尾忠利教授に深く感謝いたします。

Abstract

The present study was carried out to reveal to bacteriological properties of enteric bacterial disease prevailing frequently among cultured marine fishes in recent years.

All of fish samples were obtained in the culture farms in Nagasaki Prefecture. Of these, red sea bream (*Chrysophrys major*), crimson sea bream (*Evynnis japonicus*) and yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) were characterized chiefly by numerous greyish white spots in the spleen, the kidney and/or the hepatopancreas, and plaice (*Paralichthys olivaceus*) was by ascites. The strains of enteric pathogen isolated from the former three species of the marine fishes were negative for motility and identified as biochemically atypical *Edwardsiella tarda*, and those from the last one were positive for motility and identified as typical *E. tarda*. Also, the reference strains isolated from diseased fishes (*Anguilla japonica* and *Tilapia nieotica*) cultured in freshwater could not distinguish from the non-motile strains from marine fish in biochemical characteristics.

On the other hand, it was observed that some characters of unidentified pathogen isolated previously from red sea bream by one³⁾ of the present authors changed after 6 years of stock culture on broth medium, resulted in atypical member of *E. tarda* mentioned above. Thus, further taxonomic studies are necessary concerning the present non-motile isolates.

文 献

- 1) 楠田理一・伊丹利明・宗清正広・中島博司,
1977: 養殖チダイから分離された病原性
Edwardsiella の性状について. 日本水産学会誌,
43(2) 129 - 134.
- 2) 楠田理一・豊嶋利雄・岩村善利・佐古 浩,
1976: 高知県興津湾のボラ病魚から分離された
Edwardsiella tarda について, 同誌, 42 (3)
271 - 275.
- 3) 安永統男, 1977: 膿瘍・結節を伴う養殖マダ
イの新疾病の原因菌. 長崎県水産試験場研究報
告, 第3号, 1 - 4.
- 4) BUCHAMAN, R. E. and N. E. GIBONS,
1974: Bergy's manual of determinative
bacteriology, 8th ed., Williams and
Wilkins Co., Baltimore, 1246 pp.
- 5) COWAN, S. T., 1975: Cowan and

安永・小川・畑井：数種の高産養殖魚から分離された病原性 *Edwardsiella* の性状について

- Steel 医学細菌同定の手びき，第2版，坂崎利一訳，近代出版，東京，355 pp.
- 6) 坂崎利一，1976：腸内細菌学講座(理論篇) 43. メディヤサークル，**21**(5)，138 - 142.
- 7) 坂崎利一，1981：腸内細菌学講座“追補” 2. メディヤサークル，**26**(12)，565 - 566.
- 8) 長谷川武治，1981：国際細菌命名規約とその周辺(1). 化学と生物，**19**(1)，63 - 68.

