

養殖マダイから分離された *Edwardsiella tarda* の病原性について

畑井 喜司雄・小川 七朗・安永 統男

Pathogenicity of *Edwardsiella tarda* Isolated from Cultured Red Sea Bream,

Pagrus major.

Kishio HATAI, Shichiro OGAWA, and Norio YASUNAGA

1980年8～11月に長崎県長崎市内の一養魚場で飼育されているマダイの2～3年魚にへい死を伴う流行病が発生した。その後、本症は安永ら¹⁾により非運動性の非定型的 *Edwardsiella tarda* に起因するエドワルツ病²⁾であることが明らかにされた。

本症は1981年9月に長崎県北松地区において、マダイの0年魚および2年魚にも発生が確認されたことから県下における本症の蔓延が危惧されている。

エドワルツ病は比較的慢性的に進行する疾病であるため、原因菌の病原性に関しては興味深いものがある。しかし、これまで *E. tarda* の病原性に関する研究はウナギ由来 *E. tarda* に関するものだけであり^{3, 4, 5)}、海産魚由来 *E. tarda* に関してはほとんど研究されていない。

そこで、本報ではマダイ由来 *E. tarda* の病原性について検討した結果について述べる。

材料および方法

供試菌株 各病原性試験は *Edwardsiella tarda* NB-8030 を用いた。本株は1980年10月14日に

長崎市内のマダイ養殖場で罹病魚の尾柄部に形成された膿瘍から分離したものである¹⁾。なお、マダイ由来 *E. tarda* は非運動性であり、この点が他魚種由来のものとは異っている。

人為感染方法 BHI寒天培地での25℃、48時間培養菌の各量(湿菌量)を体重100g宛0.2mlの生理食塩水に懸濁させ、MS222で麻酔した各供試魚の背部筋肉内に接種する方法によった。

接種菌量の差異による病原性 1, 0.1, 0.01, 0.001mgの各菌量を体重90～280g(平均208.3g)のマダイに接種し、2週間後までのへい死状況を観察した。各接種群の供試数は5尾(1mg接種群のみ3尾)で、試験期間中の水温は17.2～21.3℃(平均19.2℃)であった。

数魚種に対する病原性 接種菌量は各魚種とも0.1mgとし、マダイ、イシダイ、メジナ、ブリ、マアジ、ウナギおよびヒラメを用いて実施した。各供試魚の体重はマダイが22～30g(平均26g)、イシダイが134～230g(平均164g)、メジナが116～175g(平均136g)、ブリが196～290g(平均246g)、マアジが8～18g(平均13g)、ウナギが72～127g(平均96g)、ヒラメが40～158g(平均80g)であった。供試

尾数は各魚種宛 4～5尾で、試験期間中の水温は 15.8～19.6℃（平均 17.7℃）であった。

魚体内における接種菌の消長 接種菌量は 0.1 mg および 0.001 mg とし、0.1 mg 接種群は体重 18～50 g（平均 27.7 g）のマダイを 25尾、0.001 mg 接種群は体重 16～38 g（平均 25.8 g）のマダイを 30尾用いた。菌接種後、0.1 mg 接種群は 1, 3, 4 日後に各 3尾ずつ、また 0.001 mg 接種群は 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 19, 23 日後に各 3尾ずつ無作為に取揚げ、個体ごとに肝臓および腎臓中の生菌数を測定した。菌数測定にあたり、肝臓は組織重量の 10 倍量の、また腎臓は組織重量の 10～20 倍量の生理食塩水を加えホモジナイズした試料液を原液とし、これらの 100 倍希釈液系列を作製し、各希釈段階の 0.1 ml を BHI 寒天培地に均一に塗抹した。そして、25℃、48 時間培養後、出現した集落数より各臓器 1 g 中の生菌数を求めた。

試験期間中の水温は 13.5～19.6℃（平均 17.1℃）であった。

結果および考察

接種菌量の差異による病原性 結果は表 1 に示した。1 mg 接種群は菌接種後 2 日以内に全数へい死したが、これらの致死魚には特に病徴は認められなかった。0.1 および 0.01 mg 接種群は菌接種後 4～10 日の間に全数へい死したが、これらの致死魚の脾臓には明瞭な多数の小白点の形成が認められた。しかし、外観上体表等における膿瘍は認められなかった。いっぽう、0.001 mg 接種群は 2 週間後まで遊泳等に異常は認められず全数生残した。

以上述べた結果から、マダイに対する *E. tarda* NB-8030 の致死量は 0.01 mg 以上で、また、自然発症魚と同一な脾臓への小白点形成される菌量は 0.1 mg 以下ということがいえる。

数魚種に対する病原性 上述の結果から、人為感染を行う場合の最適接種菌量は 0.1 mg と判定された。そこで、この菌量を 7 種類の供試魚に接種した結果（表 2）、いわば対照魚であるマダイは 3～4 日で全数へい死した。この結果は致死まで

表 1. *E. tarda* NB-8030 の人為感染に起因するマダイのへい死

Table 1. Mortality of red sea bream (*Pagrus major*) due to artificial injection of *Edwardsiella tarda* NB-8030 isolated from red sea bream.

Injection size per 100 g B. W.	No. of fish used*	Number of fish died									Mortality (%)
		Days after inoculation									
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1 mg	3	3									100
0.1	5			1	1	2	1				100
0.01	5			1	1		1		1	1	100
0.001	5										0

* The body weight of fish used was 90 to 280 g, average 208.3 g, at the beginning of experiment.

The water temperature was 17.2 to 21.3℃, average 19.2℃, during the course of experiment.

表2 *E. tarda* NB-8030 に対する7魚種の感受性に関する接種試験結果

Table 2. Results of inoculation experiments on the susceptibility of 7 species of fishes to *Edwardsiella tarda* NB-8030 isolated from red sea bream (*Pagrus major*)

Japanese name of fish used	Common name of fish used*	Average weight of fish (g)	No. of fish used	Number of fish died											Mortality (%)		
				Days after inoculation													
				2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
Madai	Red sea bream	26	5	4	1												100
Shidai	Japanese striped knifejaw	164	5	2	2	1											100
Mejina	Rudder fish	136	4	4													100
Buri	Yellowtail	246	5	3	1					1							100
Maaji	Japanese horse mackerel	13	5	3	2												100
Unagi	Japanese eel	96	5					3			1		1				100
Hirame	Japanese flounder	80	4			3	1										100

* Scientific name of fish; Red sea bream (*Pagrus major*), Japanese striped knifejaw (*Oplegnathus fasciatus*), Rudder fish (*Girella punctata*), Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), Japanese horse mackerel (*Trachurus japonicus*), Japanese eel (*Anguilla japonica*), Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*).

The water temperature was 15.8 to 19.6°C, average 17.7°C, during the course of experiment. Each fish was intramuscularly injected with 0.1 mg of cells of *E. tarda* NB-8030 per 100g of fish body.

に4~7日を要した前述の結果と比較すると若干強い病原性を示しているが、これは魚体を通過させた再分離株を用いたことによる結果と思われる。

マダイ由来 *E. tarda* NB-8030 のインダイに対する致死性は供試した7魚種中最も強く発現され、菌接種後2~3日で全尾致死した。従って、インダイは本菌に対して極めて高い感受性を有すると判定された。また、マアジ、メジナ、ブリおよびヒラメに対する致死性はマダイに対するものとはほぼ同一結果を示した。従って、以上述べたマダイ以外の5魚種は非運動性 *E. tarda* に感受性を有すると判定されるので養殖場における発症が危惧されるが、現在のところ本菌による感染症はマダイ¹⁾ およびチダイ²⁾ 以外では報告されてい

い。

いっぽう、本菌はウナギに対しても致死性を有すると判定されたが、致死日数から判断して海産魚よりも本菌に対する感受性は低いと推察された。

なお、接種菌はすべてのへい死魚から回収されたが、肉眼的に結節などの病徴を認めることはできなかった。

魚体内における接種菌の消長 致死量である0.1 mgを接種した結果、へい死は菌接種3日後からみられ、5日後までにすべての供試魚がへい死した。3、4、5日後におけるへい死魚数は各々5、9、2尾であった。この間、接種1日後は正常遊泳魚を、また、3および4日後は瀕死魚を供試して魚体内菌数を測定した。その結果(表3, 図1),

1日後の肝臓からは 2.4×10^4 細胞, 腎臓からは 1.9×10^6 細胞の *E. tarda* が検出された。そして、3日後には肝臓で 3.6×10^6 細胞, 腎臓で 3.5×10^8 細胞と増加を示し、4日後には肝臓で 4.2×10^5 細胞, 腎臓で 3.4×10^7 細胞と若干の減少を示す結果が得られた。

接種菌は肝臓よりも腎臓から多く検出されたが、同様の現象は楠田ら⁴⁾がウナギ筋肉内に *E. tarda* を接種した実験, および畑井⁶⁾がウナギの血流中に *Aeromonas liquefaciens* を接種した実験などにおいてもみられており、一般的に魚類では腎臓に接種菌が集まる傾向があるといえよう。

表3 *E. tarda* NB-8030 を接種されたマダイの肝臓および腎臓中における生菌数の経時的変化

Table 3. Changes with day in number of viable cells in liver and kidney of red sea bream (*Pagrus major*) intramuscularly injected with *E. tarda* NB-8030

Injection size per 100 grams body weight	Days after injection	Number of fish*	Number of viable cells				
			per gram of liver Mean		per gram of Kidney Mean		
0.1mg	1	1	4.3×10^4	2.4×10^4	1.7×10^6	1.9×10^6	
		2	2.0×10^4		8.9×10^5		
		3	1.7×10^4		4.7×10^6		
	3	4	5.3×10^5	3.6×10^6	4.1×10^7	3.5×10^8	
		5	8.9×10^6		1.6×10^9		
		6	1.0×10^7		6.6×10^8		
	4	7	1.4×10^6	4.2×10^5	1.5×10^8	3.4×10^7	
		8	1.4×10^5		2.4×10^6		
		9	3.7×10^5		1.1×10^8		
	0.001mg	1	10	2.4×10^3	2.4×10^3	4.2×10^5	3.2×10^5
			11	2.6×10^3		3.8×10^5	
			12	2.1×10^3		2.0×10^5	
3		13	4.0×10^2	1.2×10^3	1.2×10^3	3.4×10^4	
		14	1.6×10^3		1.6×10^5		
		15	2.8×10^3		2.0×10^5		
5		16	3.7×10^4	3.9×10^3	4.3×10^6	4.3×10^5	
		17	3.9×10^3		3.7×10^5		
		18	4.0×10^2		5.0×10^4		
7		19	2.9×10^5	1.3×10^5	2.0×10^5	4.7×10^6	
		20	2.5×10^5		9.9×10^7		
		21	3.0×10^4		5.4×10^6		
9		22	3.2×10^3	1.2×10^4	5.2×10^4	1.4×10^6	
		23	4.3×10^5		4.7×10^5		
		24	1.1×10^5		1.1×10^8		
12		25	2.8×10^4	1.5×10^3	1.8×10^5	7.8×10^4	
		26	5.0×10^2		1.3×10^5		
		27	2.5×10^2		2.0×10^4		
15		28	1.0×10^3	1.7×10^3	1.5×10^7	7.7×10^6	
		29	1.2×10^2		1.1×10^5		
		30	3.9×10^4		2.8×10^8		
19		31	4.7×10^5	6.2×10^4	1.1×10^7	8.7×10^5	
		32	5.6×10^3		7.6×10^5		
		33	9.0×10^4		8.0×10^4		
23	34	6.0×10^4	1.8×10^4	1.1×10^7	2.0×10^6		
	35	7.0×10^2		7.5×10^3			
	36	1.3×10^5		1.0×10^8			

* The body weight of fish used was 16 to 50 g, average 26.8 g, at the beginning of experiment. The water temperature was 13.5 to 19.6 °C, average 17.1 °C, during the course of experiment.

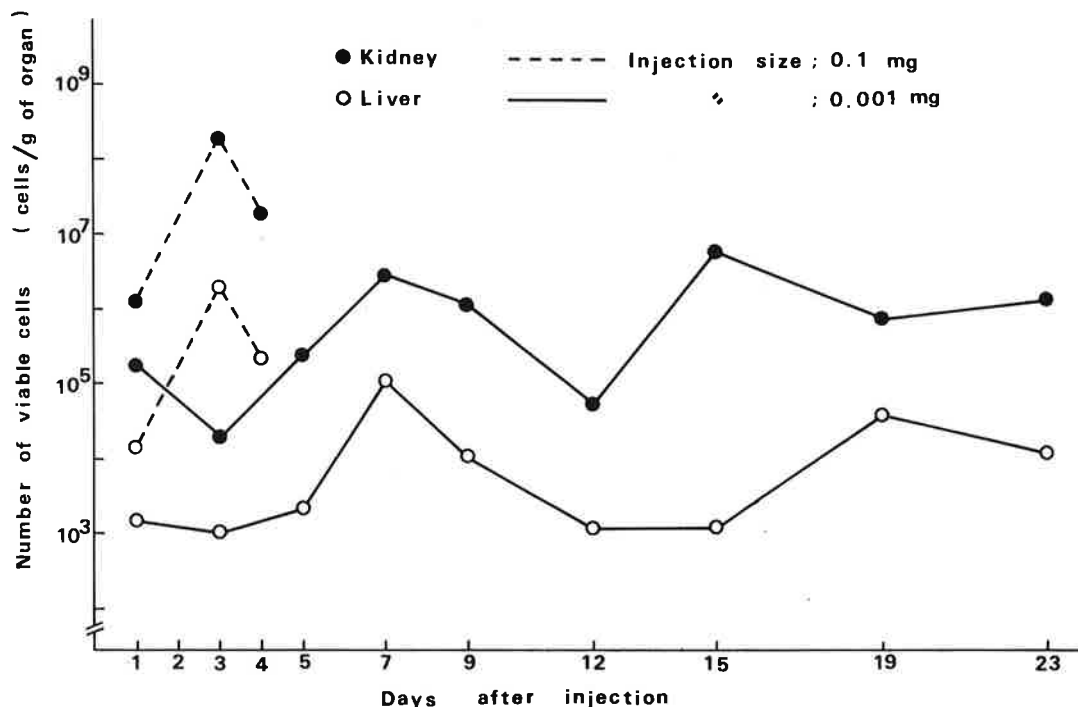


Fig. 1. Changes with day in number of viable cells in kidney and liver of red sea bream, *Pagrus major* intramuscularly injected with 0.1 mg (lethal) and 0.001 mg (not lethal) of *E. tarda* cells per 100 grams of body weight.

図1 魚体重100g宛0.1mg又は0.001mgの*E. tarda*を接種されたマダイの腎臓および肝臓中における生菌数の経時的変化

致死量以下である0.001mgを接種した結果、供試魚は23日後まで1尾もへい死することなく経過した。この間、9回にわたり魚体内菌数を測定した結果(表3, 図1), 菌接種23日後にも肝臓で 1.8×10^4 細胞, 腎臓で 2.0×10^6 細胞の接種菌が培養された。すなわち, 菌接種後23日目まで肝臓では $10^3 \sim 10^5$ 細胞, 腎臓では $10^4 \sim 10^6$ 細胞の*E. tarda*が存在したことになる。これは一旦臓器中に取込まれた*E. tarda*が除菌されるまでにはかなりの日数がかかることを示しており, また, この間に何らかの要因に遭遇すれば発症する可能性があることを示唆している。楠田ら⁴⁾はウナギ由来*E. tarda*を用いた試験において, 致死量以下の

強毒株をウナギ筋肉内に接種した場合には*E. tarda*が長時間魚体内に生残する現象をみている。このことから, 強毒株はウナギ生体防御能に対して抵抗性が強いのではないかと推察している。従って, 本報の場合も, 接種菌量が致死量以下であっても供試株の病原性が強かったことが除菌されにくい原因になっていたのではないかと考えられる。

なお, *E. tarda*は極めて多量に, しかも長期間マダイの体内に分布していたことになるが, この間マダイにへい死がみられなかったメカニズムに関しては今後さらに検討すべき興味ある問題と思われる。

要 約

1. マダイ由来の *Edwardsiella tarda* NB-8030 の病原性について検討した。
2. マダイに体重 100g 宛 1, 0.1, 0.01 および 0.001mg の供試菌を筋注した結果, 1mg 接種魚は 2 日以内に, 0.1 および 0.01mg 接種魚は 4~10 日の間に全数へい死したが, 0.001mg 接種魚ではへい死がみられなかった。
3. マダイ, イシダイ, メジナ, ブリ, マアジ, ウナギおよびヒラメに体重 100g 宛 0.1mg の供

試菌を筋注した結果, イシダイは 2~3 日で, マダイ, メジナ, ブリ, マアジでは概略 3~4 日で, ウナギでは 7~12 日で全数へい死した。

4. マダイ筋肉内に供試菌を接種し, その後の接種菌の消長を検討した結果, 0.1mg 接種群 (致死量) は 3~5 日後に全数へい死したが, 4 日後の肝臓および腎臓中の生菌数は各々 4.2×10^5 および 3.4×10^7 細胞であった。0.001mg (致死量以下) 接種群は 23 日後まで全数生残したが, この期間中, 肝臓からは $10^3 \sim 10^5$ 細胞の, また, 腎臓からは $10^4 \sim 10^6$ 細胞の *E. tarda* が検出された。

Abstract

Susceptibilities of several marine fishes to *Edwardsiella tarda* NB-8030 isolated from red sea bream with edwardsiellosis were tested by means of intramuscular injection.

An attempt was made first to infect red sea bream. Injections of 1 to 0.01 mg of *E. tarda* cells in wet weight per 100 grams of body weight killed all animals within 10 days, while no fish were killed by injection of 0.001 mg of viable cells.

As the result of the injection experiments on the susceptibility of 7 species of marine fishes to *E. tarda*, it appeared that all of them were susceptible.

Fate of viable cells in kidney and liver of red sea bream injected with *E. tarda* cells were investigated. Injections of 0.1 mg of *E. tarda* cells killed all animals within 4 days. The number of viable cells in red sea bream dying from the injection were 10^7 to 10^8 cells per gram and 10^5 to 10^6 cells per gram in kidney and liver, respectively. The red sea bream injected with 0.001 mg of *E. tarda* cells survived without external symptoms even 23 days after injection, and then showed the number of viable cells of 1.8×10^4 cells per gram and 2.0×10^6 cells per gram in liver and kidney, respectively. It was confirmed that *E. tarda* cells per gram in liver were less in number than those in kidney.

文 献

- 1) 安永統男・小川七朗・畑井喜司雄 (1982) :
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, 長崎県水試研報,
8, 57 - 65.
- 2) 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, 日水誌, **43** (2),
129 - 134.
- 3) 保科利一 (1962) : ウナギの鱗赤病に関する
研究, 東水大特別研究報告, **6** (1), 1 - 105.
- 4) 楠田理一・石原秀平 (1981) : ウナギ筋肉内
に接種した *Edwardsiella tarda* の消長について,
日水誌, **47** (4), 475 - 479.
- 5) 石原秀平・楠田理一 (1981) : シラスウナギ
およびクロコに対する *Edwardsiella tarda* の
実験的感染について, 日水誌, **47** (8), 999 -
1002.
- 6) 畑井喜司雄 (1972) : 魚における血流中接種
細菌の動態に関する研究-1. ウナギの血流中
に接種された *Aeromonas* 菌の消長, 魚病研究,
7 (1), 26 - 33.

