

ブリ類結節・連鎖球菌による実験的混合感染方法の検討

安元 進・森江 尋之*・安永 統男

Experimental Mixed-Infection of Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, with *Pasteurella piscicida* and *Streptococcus* sp.

Susumu YASUMOTO, Hiroyuki MORIE*, and Norio YASUNAGA

近年、ブリ養殖において類結節症と連鎖球菌症との混合感染症が次第に増加し、大きな被害をもたらすようになってきた。本混合感染症は現在、難病の一つとされており、治療が困難であるとされている¹⁾。そこで本報では、本症の治療対策を確立させる上で必要となる実験的混合感染の方法について、1984年9月13日から23日までの期間に、長崎県水産試験場魚病指導総合センターにおいて検討したので報告する。

材料および方法

供試魚 平均体重70~110gのブリ幼魚を用い、屋内の10tコンクリート水槽に設置した50cm角網生簀15張に5尾ずつ収容し、供試した。試験期間中の水温は25.0~26.2℃(平均25.5℃)であった。

供試菌株 病魚より分離後、BHIプロス(栄研)にて-80℃のフリーザーにストックしていた類結節菌 *Pasteurella piscicida* NA8431株(以下類結菌と略称)および非溶血性連鎖球菌 *Streptococcus* sp. NX8424株(以下連鎖菌と略称)を用いた。各菌株の由来は表1に示すとおりである。類結菌(分離後38日経過)は2% NaCl加 BHI 寒天培地に、また連鎖菌(分離後15日経過)は0.5% NaCl加 BHI 寒天培地に、それぞれ BHIプロス中の保存菌液から1白金耳あて塗抹し、25℃ 1夜培養した。

実験的感染 生食水に懸濁させた上記培養菌を魚体重100g当り菌液0.2mlずつ、オイゲノールで麻酔したブリ幼魚の背部筋肉内に接種した。なお、2種類の菌を同時に接種するときは右体側に類結菌を、

左体側に連鎖菌をそれぞれ筋注した。

表1. 供試菌株の由来

菌株名	分離年月日	魚種(魚齢)	分離場所	部位
NA 8431	1984年8月29日	ブリ(0歳)	佐世保市大崎	腎
NX 8424	〃 8月 6日	〃 (〃)	西彼杵郡三和町	脳

表2. 類結節、連鎖球菌症の人為的混合感染法における供試魚と接種菌量

実験No.	魚群	接種菌量(湿菌量 mg/100g BW)		供試魚	
		<i>P. piscicida</i>	<i>Streptococcus</i> sp	尾数	平均体重
実験-I	A	0.01	—	5尾	90g
	B	0.001	—	〃	〃
	C	0.0001	—	〃	〃
実験-II	D	0.01	0.1	〃	100
	E	〃	0.01	〃	110
	F	〃	0.001	〃	〃
実験-III	G	0.001	0.1	〃	〃
	H	〃	0.01	〃	〃
	I	〃	0.001	〃	〃
実験IV	J	0.0001	0.1	〃	〃
	K	〃	0.01	〃	〃
	L	〃	0.001	〃	90
実験V	M	—	0.1	〃	70
	N	—	0.01	〃	〃
	O	—	0.001	〃	〃

実験区と接種菌量 設定した各実験区と供試菌株の接種菌量を表2に示す。実験Iにおいては、魚体重100g当り類結菌を0.01, 0.001および0.0001mg(湿菌量)接種して、類結菌単独での病原性を調べた。実験II~IVにおいては、類結菌と連鎖菌を種々

*現在、九州大学農学部研究生

の組合せで同時に接種したときの起病力および混合感染症の発症尾数を調べた。すなわち類結菌の接種菌量を、実験Ⅱでは魚体重100g当り0.01mg、実験Ⅲでは0.001mg、実験Ⅳでは0.0001mgとし、それぞれに連鎖球菌を魚体重100g当り0.1、0.01および0.001mg接種して計9通りの組合せをつくった。実験Ⅴにおいては、魚体重100g当り連鎖球菌を0.1、0.01および0.001mg接種して連鎖球菌単独での病原性を調べた。

菌接種魚の飼育と再分離 菌接種後は10日間無給餌で飼育した。へい死魚が出現した場合は剖検により病徴を調べ、また、次に述べる各選択培地を用いて腎臓より原因菌を分離した。類結菌の選択培地には、エリスロマイシンを1μg/mlになるように添加した2% NaCl 加 BHI 寒天培地を、また、連鎖球菌の選択培地には、AE 培地を各々用いた。なお、エリスロマイシンを添加して類結菌用の選択培地としたのは、類結菌に対する本剤のMIC値が12.5~25μg/mlであるのに対し、連鎖球菌に対するMIC値が0.1~0.2μg/mgで、両菌間に感受性の差が認められたためである。

再分離菌の同定および混合感染症の判定 再分離菌については、診断用血清(宮崎大学北尾教授供与)により凝集反応を調べた後、病原細菌鑑別法⁴⁾に従い各種性状検査を行った。また、類結菌と連鎖球菌とが同一個体から分離された場合、または類結節症および連鎖球菌症の両症状を示した場合を混合感染症とした。なお、本実験においては脾臓に結節様の白点が形成された場合を類結節症とし、また、心外膜が白濁した場合を連鎖球菌症とした。

結 果

菌接種後の供試魚は図1に示したように、いずれの実験区においても人為感染後3日後から9日後にほぼ全数へい死した。へい死魚における病徴ならびに細菌の分離結果は図2に示したとおりである。

実験Ⅰ 脾臓に結節様白点を形成したへい死魚は、A群では供試した5尾中5尾から、B、C群では各3尾から見出された。しかし、類結菌はA群で3尾、B、C群で各1尾から検出されたのみで、類結節症の病徴とは一致しなかった。類結菌が分離されなかった検体からは、すべてビブリオ菌(未同定)が検

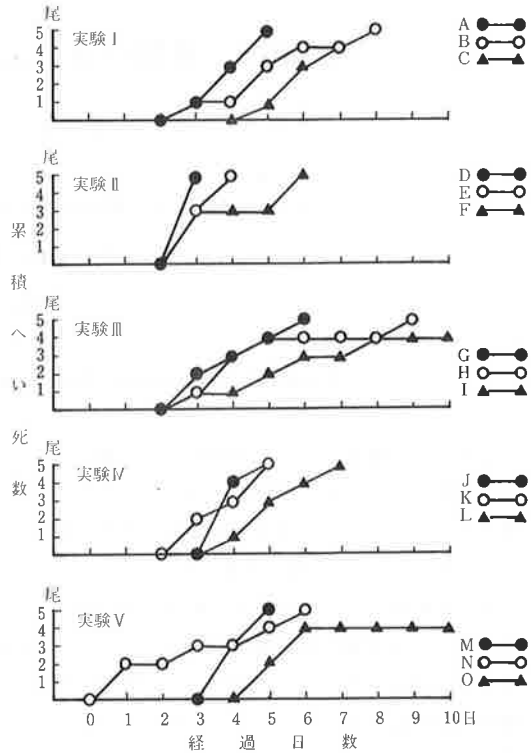


図1. 人為感染後のへい死数の推移。

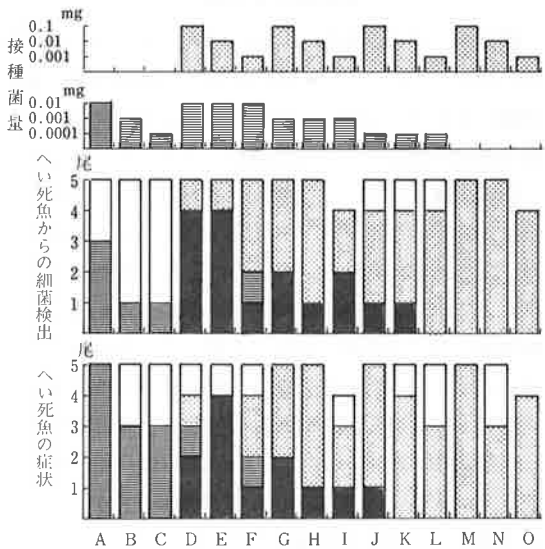
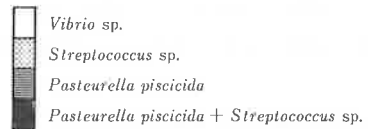


図2. 類結節, 連鎖球菌の接種菌量と細菌検出状況および発症との関係。



出されたが、本菌はブリ幼魚に魚体重100g当り湿菌量として1mg筋注しても致死させることができなかった。

実験Ⅱ D群は菌接種3日後に、E群は4日後に、F群は6日後に全数へい死し、他の実験区に較べ全数へい死するまでの期間が短かった。へい死魚からの細菌分離結果をみると、DおよびE群では4尾から類結菌と連鎖球菌が同時に検出され、また、D群およびE群の残る1尾からは連鎖球菌のみが検出された。F群のへい死魚の内訳は、類結菌および連鎖球菌が単独で分離された検体が各々1尾と3尾で、残る1尾から両菌が分離された。一方、病徴については、混合感染症はE群では4尾に、D群では2尾に、F群では1尾に認められた。以上の結果、魚体重100g当り湿菌量として類結菌を0.01mg接種し、同時に連鎖球菌を0.1mgまたは0.01mg筋注することにより、人為的に混合感染症を高率（80%）に発症させることができた。

実験Ⅲ へい死はすべて菌接種3日後からはじまり、G群で6日後、H群で9日後に全数へい死したが、I群では試験終了時に1尾の生残がみられた。へい死魚の細菌検出状況は実験Ⅱとは異なり、連鎖球菌が単一に分離されるものが増加し、混合感染症の発生率は低下した。すなわち、G群およびI群では2尾から、またH群からは1尾から両菌が検出されたが、他はすべて連鎖球菌のみが分離された。一方、剖検所見も細菌分離結果とほぼ類似した結果が得られた。

実験Ⅳ J群およびK群は接種後5日後に、また、L群は7日後に全尾へい死した。混合感染症はJ、K群では各1尾ずつ発生し、L群では全く混合感染症が発生しなかった。

実験Ⅴ M群は接種後5日後に、N群は6日後に各々全尾へい死した。しかし、連鎖球菌の接種量が最も少なかったO群は試験終了時に1尾だけ生残した。へい死魚の細菌検査結果、すべて連鎖球菌が純培養的に分離された。

考 察

養殖ブリの類結・連鎖球菌による人為的混合感染方法についての報告は皆無である。そこで、類結・連鎖球菌を種々の組合せでブリ幼魚に接種することに

より、実験的に混合感染症を発生させる方法について検討したところ、本混合感染症を高率に発生させるためには、ブリ幼魚100g当り湿菌量として、類結菌を0.01mg接種し、同時に連鎖球菌を0.1mgまたは0.01mg接種すれば可能であることが判明した。

実験ⅠおよびⅤの結果から、本実験で用いた類結・連鎖球菌の各接種菌量は単独感染が可能であり、供試魚をほぼ全数へい死させることが判った。これらの接種菌量においては、単独感染と混合感染の間に起病力の差はほとんど認められなかったが、混合感染症の発生率は連鎖球菌の菌量よりも類結菌の菌量に影響される傾向が認められ、類結菌の菌量が多いもの程、その発生率が高くなる傾向を示した。

実験Ⅰにおいて、類結菌が分離されなかった検体からすべてピブリオ菌が分離されたが、病原性試験の結果、本菌は病原性がほとんど認められなかった。従って、類結菌が検出されなかった原因はピブリオ菌が優勢に発育したため、類結菌の発育が抑制されたものと推定され、へい死原因とは直接関係ないものと考えられた。しかしながら、多数の検体からピブリオ菌が分離されたことは類結菌を接種したこととなんらかの関連があると思われる、今後、ピブリオ菌が分離された原因について検討を加える必要があると思われる。また、類結菌の検出率を高める選択培地の研究も今後の課題であると思われる。

要 約

平均体重約70～110gのブリ幼魚に *Pasteurella piscicida* および *Streptococcus* sp. を種々の濃度で筋注することにより、混合感染症を実験的に発症させる方法について検討した。その結果、類結節・連鎖球菌による混合感染症は魚体重100g当り湿菌量として *Pasteurella piscicida* を0.01mg、*Streptococcus* sp. を0.1mgまたは0.01mg筋注した場合に最も高率（へい死魚の80%）で発生した。

文 献

- 1) 岩田一夫：難病対策，混合感染症，養殖臨時増刊号，50—52（1984）。
- 2) 畑井喜司雄他：1982年に長崎県内の養殖魚から分離された各種魚病細菌の薬剤感受性，長崎水試研究報告，9，13—23（1983）。

- 3) 塚原淳一郎他：昭和58年に分離された各種魚病細菌の薬剤感受性，昭和58年度長崎水試事業報告書，331—338 (1984).
- 4) 水産庁：魚類等防疫指針3，ウイルス病・真菌水産庁編，東京，1979，pp. 69—100.