

## 養殖マダイの新しい細菌性疾病について

安永 統男・平川 榮一

A New Bacterial Disease of Cultured Red Sea Bream,  
*Pagrus major*

Norio YASUNAGA and Eiichi HIRAKAWA

From Dec. 1985 to Jan. 1986, an epizootic occurred in a population of cultured red sea bream, *Pagrus major*, in Nagasaki Prefecture. The diseased fish showed marked reddening of the anal region, light hemorrhage in a part of the body surface and distension with light ascites of the abdomen. A bacterium was purely isolated by streaking materials taken from kidney, liver or ascitic fluid onto CTA agar. CTA agar and Mueller-Hinton agar were comparatively preferable for the growth of the organism. Inoculation experiments using red sea bream showed that the organism was the causative agent. The biological characterization of 4 strains of the organism isolated from diseased red sea bream showed that the organism might be belonged to the genus *Yersinia*.

The organism grew at a temperature range of 7-25 °C, with the optimum of 15-20 °C. It grew at a range of NaCl contents between 0 and 3.5 %, with the optimum of 0.5-1 %. Also, it grew at a pH range of 6-9, with the optimum of 7-8.

The organism was very susceptible to CP, TP, OTC and EM, but resistant to SP, ABPC and SMM.

1985年12月から翌年1月にかけて長崎県北松浦郡小佐々町内にあるマダイ養殖場でへい死を伴う疾病が発生した。細菌学的な検討を行ったところ、本病は既知の魚病細菌のいずれにも同定できない細菌による感染症と判断された。今のところ腸内細菌の *Yersinia* 属の細菌である可能性が強いが、もしそうであれば海産魚の病原細菌としては初めての症例である。そこで、今回の症例について行った調査と分離菌の性状検査等の結果を以下に報告する。

### 材料および方法

**細菌の分離・培養** 1986年1月9日に現地調査を実施し、病魚の肝・腎臓および腹水から細菌の分離を試みた。培地はブレインハートインヒュージョン (BHI) 寒天培地、2%食塩加 BHI 寒天培地、BTB ティポール寒天培地および CTA 寒天培

地を用いた。

**発育最適培地の検討** 表2に示す13種類の市販乾燥培地を用い、ミスラ法<sup>1)</sup>に準じ検討した。

**病原性試験** NB-3株をCTA寒天培地で20°C、3日間培養後生理的食塩水に懸濁し、0.2mlあて4尾の健康マダイの筋肉内に接種した。へい死魚については、症状の観察を行うとともに腎・肝臓から菌の再分離を試みた。

**分離菌の性状試験** 上記の分離4株を用い、常法に従い実施した。なお、炭水化物からの酸産生等については、基礎培地としてCTA培地を用いた。

**温度・食塩・pH耐性試験** 温度耐性試験は、CTAプロス (CTA培地を冷水で溶解後、ろ紙で寒天を除去した液) を10mlずつ試験管に分注し、温度勾配培養装置 (Model TN-3, 東洋科学産業) を使って実施した。本試験ではNB-1株を使用

し、CTA プロスで20°C、4日間振とう培養後その0.1mlを接種した。本培養は7日後まで行い、菌の発育の有無を肉眼的に観察した。発育が認められなかった場合は、CTA 寒天培地に接種して20°Cで培養を行い、菌が生存していたか否かの確認を行った。食塩耐性試験は、pH7.0の1%ペプトン水 (Bacto-peptone) へ種々の濃度に食塩を添加した培地を用いた。本試験ではNB-1とNB-3株を使用し、pH7.0の0.5%食塩加1%ペプトン水 (Bacto-peptone)で18°C、1日間振とう培養後その0.1mlを接種した。本培養は上記培養装置にて4日後まで行い、菌の発育の有無を観察した。発育が認められなかった場合は、0.5%食塩加1%ペプトン水 (Bacto-peptone) で作った寒天培地 (pH7.0)に接種して20°Cで培養を行い、菌が生存していたか否かの確認を行った。pH 耐性試験は、各 pH 値に調整された0.5%食塩加1%ペプトン水 (Bacto-peptone)を用い、食塩耐性試験と同様な方法で行った。

**薬剤感受性試験** NB-1～4の4株を供試し各種抗菌剤に対する感受性を調べた。培地はミュラーヒントン寒天培地を使用し、ディスク法により測定した。

**結果および考察**

**本症の発生概要** 疾病の発生がみられたのは長崎県北松浦郡小佐々町にあるマダイ養殖場で、2年魚と5年魚(1生簀あたり3～4,000尾飼育)に1985年12月下旬から1生簀あたり1日数尾のへい死がみられ、翌年1月下旬まで続いた。発病時の水温は14°C程度であったが1月に入ってから12°C前後で経過した。病魚の遊泳は不活発で、水面近くをふらふらと泳ぎ、やがて死に至るものとみられた。これらの病魚の体表には部分的に軽度の発赤が、また肛門においては発赤と拡張が認められた。腹部は膨満していたが、これは鰾のガス充満によるものであった。その他、数ml程度ながら腹水の貯留がみられ、また肝臓は退色していた。

**細菌の分離・培養** 前記の4種類の分離用培地のうち、菌の発育がみられたのはBHIとCTA寒天培地で、その他の培地には発育は認められなかった。そのなかでもCTA寒天培地での発育が

良好で、純培養状に集落が出現した4枚の平板上から表1に示すように4株を分離した。

表1. 供試菌株の由来

Table 1. Bacterial strains isolated from diseased red sea bream in 1986

Strain No.	Location	Date	Fish No.	Site
NB-1	Kozasa, Nagasaki Pref.	9, Jan.	1(2+)	Liver
NB-2	"	"	1(2+)	Ascites
NB-3	"	"	2(2+)	Liver
NB-4	"	"	3(5+)	Liver

**発育最適培地の検討** 表2に示すように、供試13種類の培地のうち卅と判定されたものはCTA寒天培地とミュラーヒントン寒天培地であった。その他の培地では、卅と判定されたものは3種類、十と判定されたものは2種類で、残りの6種類はすべて一と判定された。CTA寒天培地が本菌の発育に好適であることは病魚からの分離例でも示唆されたが、ミュラーヒントン寒天培地も本菌分離には実用的とみられる。これらの培地のどのような成分が本菌の発育に必要なのかという点については今後の検討を要しよう。

表2. 種々の培地における本分離菌NB-1およびNB-3株の発育

Table 2. Growth of the present strains NB-1 and NB-3 on various media by Misra's method

Media	Growth
CTA agar "Nissui"	卅
Mueller Hinton agar "Difco"	卅
Brain heart infusion agar "Eiken"	卅
Sellers differential agar "Nissui"	卅
Endo agar "Eiken"	卅
Nutrient agar "Eiken"	+
Heart infusion agar "Eiken"	+
NAC agar "Eiken"	—
Sensitivity disk agar "Nissui"	—
Mac Conkey agar "Eiken"	—
DHL Agar "Nissui"	—
BTB teepol agar "Nissui"	—
Bile esculin agar "Difco"	—

Incubated at 20 °C for 4 days.

**病原性試験** マダイに対する病原性試験の結果を表3に示す。NB-3株は320～440gのマダイに対し、1尾あたり $2.6 \times 10^8$ CFUの接種で13および16日後、 $2.6 \times 10^6$ CFUの接種で23および28日後に致死させる病原性を示した。これらのへい死魚の腎・肝臓から例外なく接種菌を回収できたことか

ら、本菌を本病の原因菌と断定することができた。また、症状については腹部膨満、肛門の発赤・拡張、肝臓の退色と発赤が共通的に認められ、また一部には少量の腹水の貯留がみられた。これらの症状は自然発病魚と類似しており、NB-3株の復元性が確かめられた。

表3. 筋肉内接種による本分離菌 NB-3 株のマダイへの病原性

Table 3. Pathogenicity of the present isolate NB-3 to red sea bream by intramuscularly inoculation

Red sea bream	Body weight (g)	Inoculated cells (CFU/fish)	Time to death (days)
No 1	440	2.6×10 <sup>8</sup>	13
2	310	2.6×10 <sup>8</sup>	16
3	350	2.6×10 <sup>8</sup>	23
4	320	2.6×10 <sup>8</sup>	28

Water temperature : 10.0~10.2°C.

**分離菌の性状試験** 性状試験に供した4株はすべて同一性状を有したことから表4および表5に一括して示した。本菌はグラム陰性の短桿菌で、チトクロームオキシダーゼ(-), カタラーゼ(+), ブドウ糖を発酵的に利用するがガスは産生しない。これらの基本的性状からは腸内細菌科に類似する菌であることがうかがわれる。また、硫化水素(-), クエン酸の炭素原としての利用(-), リシンデカルボキシラーゼ(-), VP試験(-), ゼラチン液化(-), 乳糖発酵(-)などの性状を加味すると *Yersinia* 属<sup>2)</sup> に最も近似する菌とみなされ得る。今後は本菌のDNAのG+C%を確かめるとともに、類縁菌のそれとの相同性を検討することが望まれる。*Yersinia* 属の魚病細菌としてはサケ科魚のレッドマウス病<sup>3)</sup>の原因菌として *Y. ruckeri* が知られているが、本邦での *Y. ruckeri* の分離例はまだない。*Yersinia* 属各菌種の鑑別的性状<sup>4)</sup>として提示されている表のなかから、参考までに *Y. ruckeri* の性状を取上げ今回の分離菌株のそれと対比させたのが表6である。恐らく今回の分離菌株は *Y. ruckeri* とは異なる菌種と思われる。

**温度・食塩・pH 耐性試験** 温度耐性試験の結果は表7に示すように、本菌の増殖可能な温度域はおおよそ7~25°Cで、至適温度は15~20°Cであった。また、1°Cでも生存できたが、30°C以上では死滅

表4. 分離菌株の生物学的性状  
Table 4. Characteristics of the present isolates

Test	Present isolates NB-1~4
Cell-form	Short rods
Motility	-
Gram staining	-
Cytochrome oxidase	-
Catalase	+
Hugh-Leifson test (CTA medium)	Fermentative
Gass from glucose	-
Gelatin liquefaction	-
Casein digestion	-
Litmus milk	-
Indole production	-
H <sub>2</sub> S production	-
Nitrate reduction	-
Urease	NG*
Voges-Proskauer	-
Methyl red	+
Citrate	-
Malonate	-
d-Tartrate	-
Mucate	-
2,3-Butandiol dehydration	+
Hydrolysis of:	
Starch	-
Arginine	-
Esculin	-
Dissolution of:	
Tyrosine	-
Xantine	-
Arginine decarboxylation	-
Lysine decarboxylation	-
Ornithine decarboxylation	-
Pigment production (King A)	-
" (King B)	-

\* no growth.

表5. 分離菌株の炭水化物分解性  
Table 5. Carbohydrate utilization of the present isolates

Test	Present isolates NB-1~4
Acid from:	
Glucose	-
Galactose	-
Mannose	-
Glycerin	+
Xylose	-
Arabinose	-
Rhamnose	-
Sucrose	-
Maltose	-
Lactose	-
Threhalose	+
Raffinose	-
Cellobiose	-
Starch	-
Dextrin	-
Inulin	-
Glycogen	-
Adonitol	-
Mannitol	+
Sorbitol	-
Inositol	-
Dulcitol	-
Erythritol	-
Salicin	-
Melibiose	-
Melezitose	-
Esculin	-
Levlose	-
Sorbitose	-

Incubated at 20 °C for 4 weeks.

表 6. 本分離菌株と魚類由来 *Yersinia ruckeri* との性状の比較  
Table 6. Comparison in general characteristics of the present isolates with those of *Yersinia ruckeri*

Test	Present isolates	<i>Y. ruckeri</i>
Indole production	—	—
Voges-Proskauer	—	—
Citrate	—	(+)* <sup>3</sup>
Nitrate reduction	—	+
Urease	NG* <sup>1</sup>	—
Lysine decarboxylation	—	+
Ornithine decarboxylation	—	+
Motility	—	d
$\beta$ -galactosidase	NT* <sup>2</sup>	+
Acid from;		
Arabinose	—	—
Lactose	—	—
Raffinose	—	—
Rhamnose	—	—
Sucrose	—	—
Threhalose	+	+
Xylose	—	—
Melibiose	—	—
Sorbitol	—	—
Salicin	—	—
Inositol	—	—
Esculin	—	—

\* 1 No growth.  
\* 2 Not tested.  
\* 3 Weakly positive.

することが分った。食塩耐性試験と pH 耐性試験の結果はまとめて表 8 に示した。本菌は食塩 0

表 7. 本分離菌 NB-1 株の発育に及ぼす温度の影響  
Table 7. Effect of temperature on growth of the present isolate NB-1 in CTA broth

Temperature (°C)	Growth at day after incubation							Survival*
	1	2	3	4	5	6	7	
1~1.5	—	—	—	—	—	—	—	+
4~5	—	—	—	—	—	—	—	+
7.5~8	—	—	—	+	+	+	+	
10~10.5	—	—	+	+	+	+	+	
13	—	—	+	+	+	+	+	
15.5	—	+	+	+	+	+	+	
18	—	+	+	+	+	+	+	
20~20.5	—	+	+	+	+	+	+	
22.5~23	—	—	—	+	+	+	+	
25	—	—	—	+	+	+	+	
27.5~28	—	—	—	—	—	—	—	+
30~30.5	—	—	—	—	—	—	—	—

\* Viability of inoculated cells was checked by reincubation on CTA agar.

表 8. 本分離菌 NB-1 および NB-3 株の発育に及ぼす食塩濃度との pH の影響  
Table 8. Effect of NaCl concentration or pH on growth of the present isolates NB-1 and NB-3

	Concn(%) Values	Growth at day after incubation				Survival*
		1	2	3	4	
NaCl	0	—	+	+	+	
	0.5	+	+	+	+	
	1.0	+	+	+	+	
	1.5	+	+	+	+	
	2.0	+	+	+	+	
	2.5	—	+	+	+	
	3.0	—	+	+	+	
	3.5	—	—	+	+	
	4.0	—	—	—	—	+
pH	3.02	—	—	—	—	—
	4.02	—	—	—	—	—
	5.01	—	—	—	—	+
	6.04	—	+	+	+	
	7.02	+	+	+	+	
	8.04	+	+	+	+	
	9.00	—	+	+	+	
10.00	—	—	—	—	—	

\* Viability of inoculated cells was checked by reincubation on 1 % Bacto-peptone agar with 0.5 % NaCl.

～3.5%の範囲内で増殖を示し、至適食塩濃度は 0.5～1%程度とみなされた。しかし、食塩 4%でも生存可能なことが分った。また、本菌は pH 6～9 の範囲内で増殖を示し、至適 pH は 7～8 と判断された。なお、pH 5 では生存が認められたが、pH10 では死滅することが分った。

**薬剤感受性試験** 9種類の抗菌剤による試験結果を表 9 に示す。本菌は CP, TP, OTC, EM に強い感受性を示したが、SP, ABPC, SMM には感受性を示さなかった。また、NF-Na には弱い感受性を示した。したがって、適当な抗菌剤を選ぶことによって現場での治療が可能とみられる。しかし、本病の発生時期が低水温期であることから、摂餌不良のため経口投薬の効果はあまり期待できない。

表 9. 分離菌株の薬剤に対する感受性  
(ディスク法)

Table 9. Antibiotic sensitivity of the present isolates

	Present isolates			
	NB-1	NB-2	NB-3	NB-4
Chloramphenicol	卄	卄	卄	卄
Thiamphenicol	卄	卄	卄	卄
Oxytetracycline	卄	卄	卄	卄
Erythromycin	卄	卄	卄	卄
Spiramycin	—	—	—	—
Aminobenzyl penicilin	—	—	—	—
Sulfamonomethoxine	—	—	—	—
Oxolinic acid	卄	卄	卄	卄
Sodium nifurstyrenate	+	+	+	+

Incubated at 20 °C for 4 days on Mueller-Hinton agar.

### 要 約

- 1985年12月から翌年1月にかけて養殖マダいの2年と5年魚にへい死を伴う疾病が発生した。1月9日に現地にて調査を行った。
- 病魚の遊泳は不活発で、体表に軽度の出血がみられ、肛門の発赤・拡張および腹部膨満等を特徴とした。また、少量の腹水貯留、肝臓の退色がみられた。
- 病魚を検査した結果、肝・腎臓と腹水から純培養的に復元性を示す細菌が分離されたことから、本病は細菌性疾病であると診断された。
- 本菌はグラム陰性の短桿菌でチトクロームオキシダーゼ(-)、カタラーゼ(+)、ブドウ糖を発酵的に利用するがガスを産生しない。現在のところ、腸内細菌科の *Yersinia* 属に含め得る菌とみられる。
- 本菌はミュラー-ヒントン、CTA 培地に良好に発育し、至適温度、pH 域、食塩濃度はそれぞれ15~20°C、7~8、0.5~1%であった。
- 本菌はCP, TP, OTC, EM に強い感受性を示し、SP, ABPC, SMM に対しては耐性であった。

### 文 献

- 坂崎利一, 1978: 新細菌培地学講座(上), 近代出版, 東京, 419pp.
- 坂崎利一, 1978: 腸内細菌学講座(理論編) 59. メディヤ・サークル, 23(3), 45-51.

- 江草周三, 1978: 魚の感染症, 恒星社厚生閣, 東京, 554pp.
- 坂崎利一, 1978: 腸内細菌学講座(理論編) 61. メディヤ・サークル, 23(6), 134-137.