短 報

体表面の膨隆や出血症状を示す アユから分離された *Aeromonas hydrophila* の 性状および病原性

永井崇裕*

(2020年 4 月24日受付)

Characterization and Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* Isolates from Diseased Ayu *Plecoglossus altivelis* Showing Hemorrhagic and Swelling Lesions on the Body Surface

Takahiro Nagai*

Fisheries and Marine Technology Center,
Hiroshima Prefectural Technology Research Institute,
Hiroshima 737-1207, Japan

(Received April 24, 2020)

ABSTRACT—In August 2017, a mass mortality of cultured ayu *Plecoglossus altivelis* occurred in Hiroshima Prefecture. Most of the diseased fish showed hemorrhagic and swelling lesions on the body surface. Bacterial isolates from diseased ayu were identified as *Aeromonas hydrophila* by conventional characterization tests and genetic analysis. However, the clinical signs differed from previously reported *A. hydrophila* infection in ayu. The present isolate caused higher mortality in ayu without clinical signs at 24°C than at 19°C. These results indicate that the present mass mortality was caused by *A. hydrophila* and the pathogenicity of the isolates was related to water temperature.

Key words: *Aeromonas hydrophila*, pathogenicity, ayu, *Plecoglossus altivelis*

Aeromonas hydrophila を原因細菌とする運動性エロモナス症は、淡水性魚類に認められる細菌感染症である。養殖アユ *Plecoglossus altivelis* でも複数の報告例があり、1978年10月に徳島県の養殖場で発生した症例では分離された *A. hydrophila* の性状が調べられ、病魚の病理組織観察が行われた（城・大西, 1980; Miyazaki and Jo, 1985）。また、1984年の9月から10月にかけて山口県の養殖場で発生した症例においても、分離菌の性状や病原性が報告されている（高橋ら, 1986）。両症例ともに、病気の進行は比較的緩慢であり、尾柄部の皮下出血および肛門の発赤・拡張を特徴とする症状が認められている（城・大西, 1980; 高橋ら, 1986）。

2017年8月に広島県内のアユ養殖場において、体表面の膨隆や出血症状を特徴とする大量死が発生した。発生当初は細菌性冷水病が疑われたが、検査した全ての死亡魚からは *A. hydrophila* が分離されたことから、運動性エロモナス症であると推定された。しかし、過去の症例と比較すると病勢に違いがみられ、症状も大きく異なっていた。そこで本研究では、分離菌株の生理・生化学的性状、溶血性、培養温度と増殖性の関係および薬剤感受性を調べた。また、人為感染試験により分離菌の病原性を確認するとともに、本症例では細菌性冷水病対策として昇温処理の実施が検討された経緯があったことから、飼育水温が分離菌の病原性に及ぼす影響についても検討した。

材料および方法

死亡した平均体重 55 g（7尾）のアユを魚病検査に供試した。肉眼により病魚の体表や内臓組織を観察した後、腎臓および体表の膨隆や出血部のスタンプ標本を作製し、メチレンブルー染色を施して観察を行った。また、体表膨隆や出血部の筋肉や腎臓に無菌的に滅菌綿棒を挿入し、ハートインヒュージョン寒天培地（HIA, 日本製薬）に接種・画線し、20°C で2日間培養を行った。結果として、多数の同一コロニーの発育が確認されたことから、純粋培養を行い、得られた計7株を分離菌株として実験に用いた。

まず、筋肉内の膿瘍から分離された PH-1735 株および腎臓から分離された PH-1739 株を代表株として、20F および1500R プライマー（Weisburg *et al.*, 1991）を用いて 16S rRNA 領域の PCR 増幅を行い、常法に従い塩基配列を決定した。得られた塩基配列について、DDBJ (<https://www.ddbj.nig.ac.jp/index.html>) の BLAST 解析を行った。結果として *A. hydrophila* の塩基配列情報と一致したため、全供試株を対象として、*Aeromonas* 属または *A. hydrophila* 特異的プライマーによる PCR 法（Pollard *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2003; Persson *et al.*, 2015）を行った。

分離菌株の生理・生化学的性状は、25°C 培養を基本として常法により調べた。また、分離菌株を羊血液寒天培地 M58（栄研化学）に塗抹し、25°C で4日間培養することで溶血性を判定した。培養温度と増殖性の関係解析

広島県立総合技術研究所水産海洋技術センター

* Corresponding author

E-mail: t-nagai86032@pref.hiroshima.lg.jp

は、分離菌株をハートインヒュージョンブイヨン（日水製薬）に接種後、10～37°Cの間で6または12時間振盪（60 rpm）培養し660 nmの吸光度を測定することにより行った。さらに、動物用抗菌剤研究会 MIC 測定法標準化委員会（2004）に記載された寒天平板希釈法に準じ、分離菌株の薬剤感受性を調べた。すなわち、薬剤としてオキシリン酸（和光純薬）、スルフィソゾールナトリウム（和光純薬）およびフロルフェニコール（LKT Labs）を選択し、ミューラーヒントン寒天培地（BD）を用いて25°Cで24時間培養することにより MIC（最小発育阻止濃度）を判定した。

最後に、人為感染試験によりアユに対する病原性を調べた。供試魚には、著者の所属機関の紫外線処理水を用いた循環ろ過水槽（水温21°C）で飼育されていた人工アユ2系統（累代系：平均体重6.4 g、灰塚宮崎系：5.6 g）を用いた。なお、累代系は *Flavobacterium psychrophilum* 高感受性系統であり（Nagai et al., 2004）、灰塚宮崎系は同菌低感受性系統であることが明らかになっている*。人為感染試験には PH-1735 株を用いた。同株を HIA により20°Cで24時間培養後、PBS（-）に懸濁し、 10^{-1} ～ 10^{-4} の10倍希釈系列を調整した。各希釈段階の菌液を10尾のアユの腹腔内に0.1 mL/尾接種し、水温19または24°Cに調温した脱塩素水道水注水（0.2 L/min）によるかけ流し式水槽（30 L）に移した。以後、無給餌で7日間死亡状況を観察した。なお、PBS（-）のみを接種した対照区も設けた。死亡魚は直ちにに取り上げ、HIAを用いて腎臓から菌分離を行い、AHH1FおよびAHH1Rプライマーを用いたPCR法（Wang et al., 2003）により *A. hydrophila* の感染確認を実施した。

結果および考察

アユにおける *Aeromonas* 属細菌による感染症の報告は夏季に多く、1967年夏には、多くの河川で *Aeromonas* 属細菌による大量死が発生し、渇水と高水温が原因と推察されている（若林，1988）。また、2016年7月には、多摩川で *A. veronii* biovar *sobria* によるアユの死亡が発生し、分離菌のアユに対する高い病原性も確認されている（Takeuchi et al., 2018）。高水温期に河川や養殖場で発生し、アユに被害を与える感染症としては *Edwardsiella ictaluri* 感染症が挙げられるが（Sakai et al., 2008）、*A. hydrophila* を含めた *Aeromonas* 属細菌による感染症も考慮に入れる必要がある。

しかし本症例は、高水温とはいえない約19°Cの水温で飼育されていた体重50–60 gのアユ（約5,000尾飼育）に発生した。最初の3日間で約10%、その後の4日間で約5%のアユが死亡した。その後、1週間程度かけて自然終息したが、全体的には約20%のアユが死亡した。体表面の出血症状は細菌性冷水病に類似していたが、PCR

Fig. 1. Typical clinical signs in ayu (mean body weight: 55 g): hemorrhagic and swelling lesions on the body surface (A), and an abscess under a swelling lesion (B).

Fig. 2. The effect of temperature on the growth of *A. hydrophila* isolate PH-1735. The isolate was cultured in the heart infusion broth by shaking at 60 rpm.

法（吉浦ら，2006）ではいずれの死亡魚の出血部や腎臓からも *F. psychrophilum* は検出されなかった。そこで、他の感染症に罹患している可能性が考えられたことから詳細な魚病検査を行った。なお、本症例の養殖アユは広島県内で種苗生産された *F. psychrophilum* 低感受性の人工アユであり、発生前に他の魚病の発生は確認されていない。

死亡したアユは、体表面の出血症状が共通して観察されたが、内臓には目立った病変は認められなかった（Fig. 1A）。一部の個体の体表には膨隆がみられ、筋肉内部に膿瘍が形成されていた（Fig. 1B）。体表患部が筋肉を貫通して腹腔に達している個体や、血液の混ざった腹水を貯留している個体も観察された。体表患部下の筋肉と腎臓には同一形態を示す短桿菌が認められ、特に筋肉において多数の菌体が観察された。そこで、体表患部下の筋肉、筋肉内の膿瘍および腎臓から細菌分離を試みたところ、純培養状に細菌が分離され、計7株を得た。2株を選定して16S rRNAの塩基配列を調べたところ、*A. hydrophila*（Accession No. MN493074）と100%（1,370 bp/1,370 bp）一致した。全分離菌がグラム陰性桿菌で運動性を有し、チトクローム・オキシダーゼ陽性を示したことから、全て運動性エロモナス症原因菌である *A. hydrophila* と同定した。なお、同時に実施した *A. hydrophila* 特異的PCR法において、菌株間の差はなかったものの陽性反応が認められない反応系があったことから、少なくともアユから分離された *A. hydrophila* の同定に関するPCR法においてはその選定に注意が必要である（Table 1）。

本症例で分離された菌株は全て羊血液寒天培地においてβ溶血性を示し、過去にアユ病魚から分離された *A.*

* 永井崇裕・平川浩司（2016）、海産系人工アユの冷水病菌に対する感受性、平成29年度日本魚病学会秋季大会講演要旨集，p. 15

Table 1. Polymerase chain reaction (PCR) tests for *Aeromonas* species identification

Target organism (gene)	Primer pair	Amplicon size (bp)	Reference	Present 7 isolates
<i>A. hydrophila</i> (<i>aerA</i>)	Aero1a Aero1b	209	Pollard <i>et al.</i> (1990)	–
<i>A. hydrophila</i> (<i>ahh1</i>)	AHH1F AHH1R	130		+
<i>A. hydrophila</i> (<i>aerA</i>)	AH-aerAF AH-aerAR	309	Wang <i>et al.</i> (2003)	–
<i>A. sobria</i> (<i>asa1</i>)	ASA1F ASA1R	249		–
<i>A. hydrophila</i> , <i>A. sobria</i> (16S rRNA)	A16SF A16SR	356		+
<i>A. hydrophila</i> (<i>gyrB</i>)	A-hyd F(533) A-hyd R(677)	144	Persson <i>et al.</i> (2015)	+
<i>Aeromonas</i> universal (16S rRNA)	A-16S F(270) A-16S R(731)	461		+

hydrophila と多くの性状が一致した。特に高橋ら (1986) の菌株とは O/129 感受性以外の項目が全て一致した (Table 2)。分離菌株の増殖性と培養温度の関係解析では、全分離菌株で同じ傾向が認められたため、PH-1735 株の結果を Fig. 2 に示した。培養 6 時間では 20°C 以下での増殖はほとんど認められず、34°C で最も高い増殖性がみられた。一方、培養 12 時間になると自然発病時の水温に近い 19°C で増殖が確認され、23°C から 37°C では高い増殖性がみられた。これらの結果は、アユ (城・大西, 1980; 高橋ら, 1986) やウナギ *Anguilla japonica* (室賀ら, 1984) 由来の *A. hydrophila* 株と類似している。また、アユ養殖で用いられることの多い薬剤 3 種の MIC を調べたところ、7 株ともに MIC は同じで、オキシリン酸で < 0.125 µg/mL、スルフィソゾールナトリウムで 64 µg/mL、フロルフェニコールで 1 µg/mL となり、城・大西 (1980) の報告と同様にオキシリン酸に対して最も高い感受性が認められた。

アユの運動性エロモナス症は、これまでの報告では眼球突出や肛門の発赤・拡張を特徴としていたのに対し (城・大西, 1980; 高橋ら, 1986)、本症例では体表の出血や膨隆の形成が主要な特徴であり、症状が大きく異なっていた。本発症時と同じ 19°C の飼育水温において、PH-1735 株を用いた腹腔内注射による人為感染実験を行ったところ、 7.6×10^5 CFU/fish 以上の試験区では感染 1 ~ 2 日後までにすべての個体が死亡し、より低濃度の試験区では主に感染 2 ~ 3 日後にかけて死亡した (Table 3)。一方、対照区においては実験期間を通して死亡がみられなかったことから、本症例の病原体は *A. hydrophila* であると判断した。なお、死亡魚の腹腔内には濁った血液が観察され、腎臓から *A. hydrophila* が再分離されたが、自然発病魚のような外観症状は再現できなかった。体表における炎症性の膨隆患部や筋肉の出血症状はドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* でも観察されており (江草, 1967)、本症例で認められた症状はそれに近いものと考えられた。徳島県で報告されたアユの症例では最初の感染部位は眼球と推定されている

Table 2. Morphological, physiological and biochemical characteristics of *A. hydrophila* isolates from diseased ayu

Characteristic	Present 7 isolates	<i>A. hydrophila</i> *1	<i>A. hydrophila</i> *2
Gram stain	–	–	–
Form	Short rod	Short rod	Short rod
Motility	+	+	+
Cytochrome oxidase	+	+	+
Catalase	+	+	+
OF test	F	F	F
VP test	+	+	+
MR test	–	–	–
Arginine decomposition	+	+	+
Lysine decarboxylation	+	–	+
Ornithine decarboxylation	–	–	–
Nitrate reduction	+	+	+
Indole production	+	+	+
Urease	–	–	–
Esculin hydrolysis	+	nd	+
Gelatin liquefaction	+	+	+
β-galactosidase	+	nd	+
Simmons' citrate	–	–	–
O/129 sensitivity	–	–	+
Hemolysis	+	+	+
Utilization of			
Glucose	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Mannose	+	+	+
Arabinose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Cellobiose	(+)	–	(+)
Mannitol	+	+	+
Maltose	+	+	+
Lactose	(+)	–	(+)
Sorbitol	(+)	–	(+)
Trehalose	+	+	+
Starch	+	+	+
Gluconate	+	+	+

*1: Jo and Ohnishi (1980), *2: Takahashi *et al.* (1986), nd: not determined, (+): Weakly or delayed positive

(Miyazaki and Jo, 1985) が、本症例では眼球に異常を示す個体は認められなかった。本症例では体表に著しい病変や細菌の侵襲が観察されたことから、主要な侵入門戸は体表であると推察している。アユの細菌性冷水病では、

Table 3. Mortality of two ayu stocks injected intraperitoneally with *A. hydrophila* isolate PH-1735 at different water temperatures

Water temperature	Challenge dose (CFU/fish)	DS ^{*1}		HMS ^{*1}	
		Mortality (%)	LD ₅₀ (CFU/fish)	Mortality (%)	LD ₅₀ (CFU/fish)
19°C (18.5 ± 0.8°C ^{*2})	7.6 × 10 ⁶	100	1.9 × 10 ⁵	100	2.4 × 10 ⁵
	7.6 × 10 ⁵	90		90	
	7.6 × 10 ⁴	20		10	
	7.6 × 10 ³	0		0	
	Control	0		0	
24°C (23.8 ± 0.3°C)	7.6 × 10 ⁶	100	< 7.6 × 10 ³	100	7.8 × 10 ³
	7.6 × 10 ⁵	100		100	
	7.6 × 10 ⁴	100		90	
	7.6 × 10 ³	70		50	
	Control	0		0	

*1: DS: domesticated stock, HMS: Haizuka-Miyazaki stock

*2: mean ± standard deviation

創傷後の浸漬攻撃により症状が再現されることが報告されており (Miwa and Nakayasu, 2005), 今後, 浸漬法による人為感染試験により症状が再現されるか検討を行う必要がある。

当初, 発症時の飼育水温やその症状から細菌性冷水病の発生が疑われ, 昇温処理 (Sugahara *et al.*, 2010) による治療対策が検討された。そこで, 24°C の飼育水温でも人為感染実験を行い, 感染 7 日後の半数致死菌数 (LD₅₀) について 19°C と比較した (Table 3)。結果として, 水温 19°C では累代系で 1.9×10^5 CFU/fish, 灰塚宮崎系で 2.4×10^5 CFU/fish, 24°C ではそれぞれ $< 7.6 \times 10^3$ CFU/fish, 7.8×10^3 CFU/fish となり, アユ系統間での差は小さかったのに対し, 水温間では大きな差がみられた (Table 3)。また, 城・大西 (1980) や高橋ら (1986) の注射感染実験では病原性と水温の関係は明らかにされていないが, 城・大西 (1980) は地下水を導入することで発病時の水温 23°C を 17°C まで低下させたところ死亡が減少したことを報告している。以上のことから, 本症例において細菌性冷水病対策として昇温治療が実施されていた場合, 被害がより大きくなっていた可能性が示唆された。

文 献

- 動物用抗菌剤研究会 MIC 測定法標準化委員会 (2004): 動物由来細菌に対する抗菌性物質の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法の改定について. 魚病研究, **39**, 47–67.
- 江草周三 (1967): 運動性エロモナス菌について. 魚病研究, **2**, 36–49.
- 城 泰彦・大西圭二 (1980): 養殖アユから分離された *Aeromonas hydrophila*. 魚病研究, **15**, 85–89.
- Miwa, S. and C. Nakayasu (2005): Pathogenesis of experimentally induced bacterial cold water disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 93–105.
- Miyazaki, T. and Y. Jo (1985): A histopathological study of motile aeromonad disease in ayu. *Fish Pathol.*, **20**, 55–59.
- 室賀清邦・佐藤公一・中井敏博 (1984): 5 種のウナギ病原菌の増殖温度. 魚病研究, **19**, 193–196.
- Nagai, T., T. Tamura, Y. Iida and T. Yoneji (2004): Differences in susceptibility of *Flavobacterium psychrophilum* among three stocks of ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, **39**, 159–164.
- Persson, S., S. Al-Shuweli, S. Yapici, J. N. Jensen and K. E. P. Olsen (2015): Identification of clinical *Aeromonas* species by *rpoB* and *gyrB* sequencing and development of a multiplex PCR method for detection of *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, and *A. media*. *J. Clin. Microbiol.*, **53**, 653–656.
- Pollard, D. R., W. M. Johnson, H. Lior, S. D. Tyler and K. R. Rozee (1990): Detection of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 2477–2481.
- Sakai, T., T. Kamaishi, M. Sano, K. Tensha, T. Arima, Y. Iida, T. Nagai, T. Nakai and T. Iida (2009): Outbreaks of *Edwardsiella ictaluri* infection in ayu *Plecoglossus altivelis* in Japanese rivers. *Fish Pathol.*, **43**, 152–157.
- Sugahara, K., E. Fujiwara-Nagata and M. Eguchi (2010): Dynamics of the bacterial cold-water disease pathogen, *Flavobacterium psychrophilum*, in infected fish organs and rearing water after warmed water treatment. *Fish Pathol.*, **45**, 58–65.
- 高橋幸則・梶脇利彦・伊丹利明 (1986): 養殖アユから分離された Vibriostatic agent O/129 感受性 *Aeromonas* の性状ならびにアユに対する病原性. 日水誌, **52**, 1727–1733.
- Takeuchi, H., A. Namba, K. Hori, S. Kashiwada and N. Mano (2018): *Aeromonas veronii* biovar *sobria* associated with mortalities of riverine ayu *Plecoglossus altivelis* in the Tama River. *Fish Pathol.*, **53**, 86–89.
- 若林久嗣 (1988): コイ, キンギョ, アユ, その他のエロモナス病. 「魚病学 (感染症・寄生虫病篇)」, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 99–101.
- Wang, G., C. G. Clark, C. Liu, C. Pucknell, C. K. Munro, T. M. A. C. Kruk, R. Caldeira, D. L. Woodward and F. G. Rodgers (2003): Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 1048–1054.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier and D. J. Lane (1991): 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, **173**, 697–703.
- 吉浦康寿・釜石 隆・中易千早・乙竹 充 (2006): Peptidylprolyl cis-trans isomerase C 遺伝子を標的とした PCR による *Flavobacterium psychrophilum* の判別と遺伝子型. 魚病研究, **41**, 67–71.