養殖ウナギから分離された病原性 *Vibrio*—II.

生理学的性状および病原性

室賀清邦*・西淵光昭*・城 泰彦**

(昭和 51 年 9 月 8 日受理)

Pathogenic *Vibrio* Isolated from Cultured Eels—II.

Physiological Characteristics and Pathogenicity

Kiyokuni MUROGA*, Mitsuaki NISHIBUCHI* and Yasuhiko Jō**

*Dept. Fish., Fac. Fish. & Animal Husband., Hiroshima Univ., Fukuyama, Japan

**Fish. Exp. Station of Tokushima Pref., Hiwasa, Tokushima, Japan

(Received September 8, 1976)

In the previous report biochemical characteristics of an isolate from a vibriosis in eels were presented and the taxonomic status of the isolate was discussed, though a definite conclusion could not be drawn. In this paper, physiological characteristics and pathogenicity of the organism are described.

The experimental results are summarized as follows.

1) Effects of sodium chloride, temperature and pH on the growth of the organism: It grew in nutrient broth at NaCl 0.1–4% (optimum range 1–2%), and in peptone water at temperatures from 18°C to 39°C (optimum 30–35°C) and at pH 6–10.

2) Pathogenicity to eel (*Anguilla japonica*) and mouse: The organism injected intramuscularly killed eels at 18, 20 and 26°C, but not at 15°C. It also killed mice.

These results coincide with the fact that the vibriosis due to the organism prevails mainly in brackish-water ponds and at the water temperatures above 18°C.

前報 (室賀ら 1976) で養殖ウナギの red pest より分離された *vibrio* の生化学的性状を報告し、それは *Vibrio anguillcida* BRUUN and HEIBERG 1932 に同定しうと思われるが *V. fischeri* にも非常に近いことから、本菌の分類学的位置を明らかにするためには更に詳細な検討が必要であると述べた。

本報では本菌の増殖に及ぼす培地食塩濃度、培養温度、pH の影響、ならびにウナギおよびマウスに対する実験的病原性について報告する。

材料および方法

生理学的性状：実験に用いた菌株は 1975 年 9 月に徳島県下のウナギ病魚から分離し、前報でその性状を報告した *Vibrio* sp. ET-517 および ET-520 の 2 株である。本菌の増殖に及ぼす塩分、温度ならびに pH の影響を調

べるため、1% ペプトン水ないしは Difco nutrient broth を基礎培地とし、食塩濃度、培養温度および pH を変えて振盪培養を行い 6 時間後あるいは 8 時間後の増殖の程度を光学的に判定した。

生存試験：蒸留水、生理食塩水、淡水、海水ならびに Difco nutrient broth (NaCl 0.5% および 3%) を試験水として用い、それぞれにおける本菌 (ET-517, ET-520) の生存時間を調べた。

病原性試験：前記 2 株 (ET-517, 520) のほかに ET-513, 514 を加えた 4 株をそれぞれ健康なニホンウナギ (*Anguilla japonica*) に筋肉内接種 (0.01–1 mg 湿菌重量/100 g 魚体重、実験水温 25–26°C) を行った。次に 15°C, 18°C, 20°C および 26°C という 4 段階の実験水温下においたニホンウナギに 1 株 (ET-517) を筋肉内接種 (0.1 mg/100 g 魚体重) して、これらの水温下での本菌の病原性の発現の差を調べた。

またマウスに対する病原性を調べるため 2 株を腹腔内

* 広島大学水産学部

** 徳島県水産試験場

接種 (0.1, 0.5 mg/100 g 体重) した。

結 果

生理学的性状：2株についての実験結果はほぼ同じであったので、ここでは ET-517 株の結果を図 1～3 に示した。

図 1 には食塩濃度の影響を示した。この図に見られるように、基礎培地が Difco nutrient broth の場合と 1% ペプトン水の場合ではわずかに結果が異なっている。それらを合わせてみると、本菌は NaCl 1～2% の範囲で最も良く増殖することがわかった。そして NaCl 0% および 5% では増殖しなかった。なお、48 時間静置培養 (1% ペプトン水) を行くと NaCl 0% ではやはり増殖しないが、NaCl 5% では一応増殖可能であったことは前報で述べた。

図 2 には温度の影響を示した。この場合も培地の食塩濃度によって多少結果は異なっているが、18°C から

Fig. 1. Effect of NaCl concentration on the growth of *Vibrio* sp. (ET-517) isolated from diseased eels. (Temperature: 25°C, Incubation: 8 hr shaking culture)

図 1. ウナギ病魚より分離された *Vibrio* sp. の発育に及ぼす NaCl 濃度の影響

39°C の範囲で増殖可能であり、30°C から 35°C の範囲が至適温度と考えられた。

図 3 には NaCl 0.5%, 培養温度 25°C とした時の pH の影響を示した。図に見られるように、pH 6～10 の範囲で増殖可能であり、pH 6～9.3 の範囲ではほぼ差がなく良好な増殖が認められた。

生存：本実験においても 2 株の実験結果はほぼ同じであったので ET-517 株の結果のみを表 1 に示した。本菌は 25°C という実験温度下において、蒸留水では 1 時間以内に、0.85% 食塩水および淡水中では 24 ないし 48 時間以内に死滅した。それらに対し、海水および Difco nutrient broth (NaCl 0.5%, 3%) 中では 84 日以上生存が確認された。

なお本菌を 0.5% 食塩加普通培地 (高層) に接種し生存を試みたところ、5°C においたものは 9 日目に死滅していたが、25°C においた場合は 114 日以上生存が認められ、本菌の保存は 5°C より 25°C で行う方がよいことがわかった。また凍結乾燥法 (10% 脱脂粉乳液を分散媒として使用) による保存でも少なくとも 5 か月以上は保存可能であることが確められた。

Fig. 2. Effect of temperature on the growth of *Vibrio* sp. (ET-517). (Medium: 1% peptone water, Incubation: 6 hr shaking culture)

図 2. *Vibrio* sp. の発育に及ぼす温度の影響

Table 2. Pathogenicity of *Vibrio* sp. for the Japanese eel (*Anguilla japonica*)
by intramuscular injection
(Experimental water temperature 25–26°C)

表 2. 筋肉内接種による *Vibrio* sp. のニホンウナギに対する病原性

Strain	Dose (mg/100g fish body weight)	Average body weight of eels injected (g)	Number of fish died/tested	Time to death
ET-513	1	120	5/5	Within 24 hrs
	0.5	116	5/5	"
ET-514	1	110	5/5	Within 24 hrs
	0.5	106	5/5	"
ET-517	0.1	88	5/5	Average 18 hrs
	0.05	85	1/1	32 hrs
	0.01	121	1/1	"
ET-520	0.1	97	5/5	Average 22 hrs

Table 3. Effect of water temperature on the pathogenicity of *Vibrio* sp.
(ET-517) for the Japanese eel
(Dose 0.1 mg/100 g fish body weight, intramuscular injection)

表 3. *Vibrio* sp. (ET-517) のニホンウナギに対する病原性におよぼす水温の影響

Experimental water temperature (°C)	Average body weight of eels injected (g)	Number of fish died/tested	Average time to death (hr)
15 (13.5–16.4)	83	0/5	—
18 (17.8–18.0)	77	5/5	46
20 (19.8–20.2)	87	5/5	38
26 (25.4–26.5)	88	5/5	18

In each temperature group additional one eel was served as a control, and all of them survived.

Table 4. Pathogenicity of *Vibrio* sp. for mouse by intraperitoneal injection

表 4. 腹腔内接種による *Vibrio* sp. のマウスに対する病原性

Strain	Dose (mg/100 g body weight)	No.	Mouse Body weight (g)	Time to death
ET-517	0.5	1	27.1	Within 6 hrs
		2	28.5	"
	0.1	3	34.2	21 hrs
		4	30.0	Within 6 hrs
	0.5	5	37.6	Within 6 hrs
ET-520	0.1	6	31.5	"
		7	28.4	Within 6 hrs
		8	35.6	"
Control injected with 0.85% NaCl soln.		9	29.5	Survived
		10	33.5	"

の塩分が必要と考えられた。このことは本病が塩分を含む池にのみ発生した事実と結びつくものであり、また今後完全な淡水池では本病は発生しにくいものと考えられる。

なお本菌の発育可能塩分範囲 (0.1~5%) は *V. anguillarum* のそれと比べやや狭いように思われるが、pH 範囲 (6~10) にはほとんど差がない。BRUUN and HEIBERG (1932) は *V. anguillcida* の発育至適塩分および pH については記載していない。また HENDRIE *et al.* (1971) によれば *V. fischeri* の発育塩分濃度は NaCl 0.5%~5%、発育 pH は 6~9 となっており、本菌はこの点では *V. fischeri* とほぼ一致する。

次に温度に関してみると、本菌は 15°C 以下ではまったく増殖せず、至適温度は 30~35°C にあった。またウナギに対する接種実験においても、水温 15°C の場合は病原性が発揮されず、18°C 以上の時にのみ強い病原性が発揮された。*V. anguillarum* は著者らの実験では 10°C で十分増殖可能であり (Bergey's Manual では 5°C で増殖可能となっている)、水温 10°C の下においたウナギを死亡させることができる (室賀 1975)。従って本菌は温度の点において *V. anguillarum* とは著しく異なり、少なくとも今回の分離株に関する限り *V. anguillarum* より高温性であることがわかった。本菌感染症は水温 20°C 以上の高水温期ないしは加温池に限って発生しているが、これは本菌の温度に対する特性が原因しているものと思われる。そしてこのことは、本菌と極めて類似した性状を有する *Vibrio* sp. が分離されたイギリスでのウナギの red pest がやはり高水温時に発生していたことと共通している (McCarthy 1976)。

なお本菌の発育適温 (30~35°C) は BRUUN and HEIBERG の報告にある *V. anguillcida* の発育適温 15~22°C とはかなり異なっている。しかしながら、彼等の場合実験方法が明示されていないことや、彼等の分離株を *V. anguillarum* B type に分類した NYBELIN (1935) の報告によれば発育温度は株によってバラツキがあると述べられていることなどもあり、この発育適温の

違いが本菌を *V. anguillcida* と分類することの大きな障害になるとは必ずしも考えられない。むしろ、BRUUN and HEIBERG によれば *V. anguillcida* によるウナギの red disease は水温 17°C 以上の水域に多発するとあり、この点から見ると今回の発病例は *V. anguillcida* による red disease とよく似ていると考えられる。

前報でも述べたように、この発育温度の点は本菌と *V. fischeri* との重要な相違点ともなっている。すなわち *V. fischeri* は通常 5°C で発育し 37°C では発育しない (HENDRIE *et al.* 1971) となっているのに対し、本菌は 18°C 以上でしか発育せずまた 39°C でも十分に発育し、*V. fischeri* とは著しく異なっている。そして本菌のこの温度における特性は、本菌感染症が高水温時にのみ発生する点、あるいはマウスに対する病原性にも関係している重要な性状であると考えられる。

引用文献

- BRUUN, A. and B. HEIBERG (1932): The "red disease" of the eel in Danish waters. *Meddelelser fra Kommissionen for Danmarks Fiskeri- og Havundersøgelser*, Serie: Fiskeri, Bind IX, Nr. 6, København, 1-19.
- HENDRIE, M. S., W. HODGKISS, and J. M. SHEWAN (1971): Proposal that *Vibrio marinus* (RUSSELL 1891) FORD 1927 be amalgamated with *Vibrio fischeri* (BEIJERINCK 1889) LEHMANN and NEUMANN 1896. *Int. J. Syst. Bact.*, 21, 217-221.
- MCCARTHY, D. H. (1976): *Vibrio* disease in eels. *J. Fish. Biol.*, 8, 317-320.
- 室賀清邦 (1975): *Vibrio anguillarum* およびその感染症に関する研究, 広大水畜産学部紀要, 14, 101-215.
- 室賀清邦・城 泰彦・西淵光昭 (1976): 養殖ウナギから分離された病原性 *Vibrio*—I. 性状と分類学的位置, 本誌, 11, 141-145.
- NYBELIN, O. (1935): Untersuchungen über den bei Fischen krankheitserregenden Spaltpilz *Vibrio anguillarum*. *Medd. Statens Unders Forsogsanst Sotvattenfisket.*, Nr. 8, 5-62.