アユのビブリオ病に関する研究—I.

Vibrio anguillarum の病原性

城 泰彦*・室賀清邦**

(昭和 52 年 7 月 9 日受理)

Studies on Vibriosis in Ayu—I. Virulence of a Culture of *Vibrio anguillarum*

Yasuhiko JO* and Kiyokuni MUROGA**

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

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

(Received July 9, 1977)

The present authors have been studying on vibriosis (*Vibrio anguillarum* infection) in ayu (*Plecoglossus altivelis*) from the viewpoint of control.

Prior to the main experiment, several experimental challenge methods were examined in order to establish a reproducible artificial challenge system of vibriosis.

This paper deals with the validity of the artificial challenge system by intramuscular inoculation and a practical application of this system to testing the efficacy of oral-administered drugs for ayu.

The results are summarized as follows.

1) The minimal lethal dose of a strain of *Vibrio anguillarum* used in this study proved to be 8.75 cells or 1×10^{-8} in wet weight per 100 g of body weight of ayu.

2) A clear correlation was observed between inoculation dose and mean time to death in the challenge system tested.

3) A satisfactory result was obtained in the experiment of drug efficacy, and the intramuscular inoculation was found applicable to tests for drug efficacy.

アユのビブリオ病は、ここ数年耐性菌の出現によって全国的に大きな被害を与え、アユ養殖において大きな問題となっている。そのため新薬あるいはワクチンの開発が強く要求され、現にワクチンの有効性に関する実験も試みられている(徳島県 1976***).

ところで、薬剤の有効性やワクチンの効果を判定する場合、自然感染に対して試験してみるのが最も実際的な結果が得られると考えられるが、その場合必要な時期に必ずしもそのような機会にめぐり合えるとは限らず実験上いろいろ問題がある。そのため自然感染に近い形での実験的感染方法の確立が望まれている。著者らは薬剤あるいはワクチンによるアユのビブリオ病の治療・予防に

関する研究に着手しているが、薬剤あるいはワクチンの有効性を検討する上で不可欠な再現性の高い感染方法を確立するために一連の研究を行った。ここでは筋肉内接種による再現実験での接種菌量と感染・死亡との間の量的関係の検討とこの手法を使った人為感染魚による薬剤の効力評価について報告する。

材料および方法

実験 I. 筋肉内接種による人為感染

供試魚は徳島県海部郡日和佐町の養鮎業者が飼育中の琵琶湖産アユ(平均体重 61.0 g)を購入し実験に用いた。なお、実験魚を購入した年(1974年)にはその業者の池ではビブリオ病の発生は認められなかった。

実験水槽として周囲を黒色ビニールで被った塩化ビニール製水槽(99×47×40 cm)を数個用い、各水槽に 10 尾ずつのアユを収容した。飼育水は地下水を用い実験中の水温は 18.5~19.4°C であった。

* 徳島県水産試験場

** 広島大学水産学部

*** 徳島県 1976「アユのビブリオ病に対するワクチンの実用化研究報告書」(楠田理一, 川合研児, 城 泰彦, 小竹子之助, 秋月友治, 田原恒男, 福永 稔)

実験に供した *Vibrio anguillarum* (PT-316) は 1974 年 5 月に徳島県阿南市のアユ養殖場においてビブリオ病病魚から分離した多剤耐性菌である。この菌株を予め実験前にウナギで 2 回、更にアユで 1 回の魚体通過を行い病原性の回復をはかり実験に用いた。

本菌株を普通寒水培地で 25°C 24 時間培養後に滅菌生理食塩水 (NaCl 0.85%) に 0.8 mg/ml の濃度になるように懸濁し、それを希釈し、数濃度の接種菌液を作製した。なお、本菌を 25°C 24 時間平板培養した場合、湿菌重量にして 1 mg の菌量は 8.75×10^8 細胞に相当することが確かめられた。

接種部位は背部筋肉とし 1% ウレタン溶液で麻酔した魚に魚体重 100 g 当り各希釈菌液を 0.1 cc ずつ各区原則として 10 尾あて接種した。実験結果では接種量を菌数で示したが、 $8.75 \times 10^6 \sim 7.0 \times 10^7$ 細胞/100 g 魚体重と 8 段階設けた。また予備実験で滅菌生理食塩水のみを接種したアユは死亡しないことが確かめられたので本実験では対照区は特にはおこななかった。観察は接種後 7 日間続け、死亡魚については接種菌の再分離を試み症状の観察とあわせてビブリオ病による死亡であることを確認した。

実験 II. 人為筋肉内感染魚に対する薬剤投与効果の検討

実験 I により筋肉内接種によるアユの死亡状況および死亡率が明らかになったので、この感染方法を用いて薬剤による治療実験を試みた。

供試魚としては先と同様、民間の養鮎場で飼育されていた健康な琵琶湖産アユを購入し、試験場に運び 0.5 トン角型水槽に収容し、2 日間馴致した後、実験に供した。この実験に使用したアユの平均体重は 75.3 g であ

った。

飼育水は地下水で水温は 18.4~19.1°C であった。供試菌としては先と同じ *V. anguillarum* PT-316 株を用い接種方法も実験 I と同一方法によったが接種菌量は魚体重 100 g 当り 8.81×10^8 細胞とした。

用いた薬剤はスルフィソゾール (Sulfisozole) および AMF-16 [トリメトプリム (trimethoprim) 1: スルフィソゾール 5] で、1 回の投薬量は魚体重 1 kg 当りスルフィソゾールでは 200 mg, AMF-16 では 10, 20, 30, 40 mg とし、それぞれ薬剤を 1% α 化デンプンによく混合し、ウレタン麻酔したアユに菌接種と同時に強制的にゾンデを用いて 3 日間にわたり 3 回経口投与した。

結 果

筋肉内接種による人為感染の実験結果は表 1 の通りであったが、更に時間的な変化を明らかにするためにそれらの結果を図 1 に示した。まず注目されたことは、実験した 9 つの接種区うちの 8 区のアユが全部死亡した点であり、体重 100 g 当り 8.75×10 細胞というごく僅かな接種量によっても接種魚が 67 時間以内に全数死亡したことである。さらに、接種量 8.75 細胞/100 g 魚体重の区においても 7 尾中 4 尾が死亡した。また、図 1 を見ると、接種菌量の減少にともない致死時間の延長が認められ、しかも、8.75 細胞/100 g 魚体重接種区を除けばいずれの接種区においても最初の死亡魚がみられてから 13 時間以内に残りの供試魚は全て死亡したことが判る。

なお、本菌株を接種されたアユはいずれも接種部位の発赤ないし出血性膨隆あるいは胸鰭基部の充血を示したのみで、自然感染魚で一般に認められる出血性の潰瘍は認められなかった。

表 1. アユの実験的 *Vibrio anguillarum* 感染における接種菌量と死亡率との関係
Table 1. Relationship between the inoculation dose and mortality in the experimental infection of ayu with *Vibrio anguillarum*

Number of the viable cells inoculated per 100 g fish body weight (wet weight of the organism)	Mean weight of fish used	Number of fish died tested	Mortality	Mean time to death (range)
$7.00 \times 10^7 (8 \times 10^{-2} \text{ mg})$	63.2 g	10/10	100%	13.6 hr. (7~20 hr.)
$1.75 \times 10^7 (2 \times 10^{-2} \text{ })$	61.2	10/10	100	22.3 (20~24)
$8.75 \times 10^6 (1 \times 10^{-2} \text{ })$	44.5	10/10	100	27.2 (24~30)
$1.75 \times 10^6 (2 \times 10^{-3} \text{ })$	46.0	10/10	100	36.2 (30~41)
$1.75 \times 10^4 (2 \times 10^{-5} \text{ })$	44.4	9/9	100	41.0 (36~49)
$8.75 \times 10^3 (1 \times 10^{-6} \text{ })$	82.9	10/10	100	54.2 (47~60)
$8.75 \times 10 (1 \times 10^{-7} \text{ })$	78.5	8/8	100	60.6 (54~67)
$8.75 (1 \times 10^{-8} \text{ })$	81.9	4/7	57.1	71.5 (59~)

Inoculation route : intramuscular, Experimental water temperature : 18.5~19.5°C

Fig. 1. Dose response curve in the experimental infection of ayu with *V. anguillarum*.

図 1. アユの実験的 *Vibrio anguillarum* 感染における接種量と死亡率および死亡時間の関係

Fig. 2. Effects of oral-administered sulfisoxazole and AMF-16 on the mortality of ayu injected intramuscularly with *V. anguillarum*.

図 2. *Vibrio anguillarum* を筋肉内接種したアユのへい死に対するスルフィソゾールおよび AMF-16 の経口投与の有効性

Inoculation dose, 8.81×10^2 cells/100 g fish body weight; Experimental water temperature, 18.4~19.1°C; Mean body weight of ayu used, 75.3 g; AMF-16, trimethoprim (1)+sulfisoxazole (5).

次に、筋肉内接種による人為感染魚を用いた薬剤治療効果試験の結果を図2に示した。対照区の魚が3日以内に全数死亡したのに対して、AMF-16投与区では10, 20, 30, 40 mgと投薬量の増加にともないそれぞれ死亡率は70, 30, 10, 0%と低くなり40 mg投与区では全く死亡魚は認められなかった。しかし、スルフィソゾール投与区では対照区に比較して僅かに延命効果が認められたにすぎず5日以内に全供試魚が死亡した。

考 察

これまで魚病菌の主要な侵入門戸としては皮膚、鰓あるいは消化管などが考えられており各研究者により種々の再現実験に関する検討がなされてきている。感染方法の比較あるいは自然感染との比較に関することは次の機会にゆずるとして、ここでは筋肉内接種における接種量と再現性について論じる。

筋肉内接種は魚における感染方法としては最も一般的な方法であり、実験結果も多く報告されているが、接種量と再現性の関係について検討した研究は比較的少ない。*V. anguillarum*についてみると、SAITO *et al.* (1964), LEVIN *et al.* (1972) および室賀 (1975) などの報告があげられる。

SAITO *et al.* (1964) は *V. anguillarum* (*V. piscium* var. *japonicus*) をニジマス、カワマス、ウグイ、コイ、キンギョ、カムルチー、数種の熱帯魚およびウナギに筋肉内接種し、14日間観察してそれぞれの魚種における最少致死量 (minimum lethal dose, MLD) と半数致死量 (median lethal dose, LD₅₀) を求めている。それによるとニジマスでのMLD値は 10^{-8} mg/1尾、LD₅₀値は $10^{-7.8}$ mg/1尾であり、カワマス、熱帯魚およびキンギョに対するMLDは 10^{-3} ~ 10^{-5} mgであり、コイ、カムルチー、ウグイに対するMLDは 10^{-4} ~ 10^{-3} mgあったがウナギには0.1 mgの接種量でも致命的な病原性を示さなかったことなどが明らかにされている。なお、彼等が実験に用いたニジマスの体重は示されていないが1才魚となっていることからそのMLDは 10^{-8} mg/100 g 魚体重と読みかえてもあまり大きな違いはないと思われる。

また、LEVIN *et al.* (1972) は *V. anguillarum* を winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) に腹腔内および皮内接種を行い6400細胞/1尾の接種量ではいずれの方法でも病原性を示し、640細胞/1尾の接種量では皮内接種の場合のみ病原性が発揮されたのに対し、64細胞/1尾の接種量ではいずれの方法でも病原性

は発揮されなかったと報告している。

一方、著者の1人である室賀 (1975) はアユおよびニホンウナギに対していくつかの接種量を設けて筋肉内接種を試みている。すなわち、アユに対して接種菌量0.01~5.0 mg/100 g 魚体重の6段階を設けて検討した結果、多くの接種魚は1日ないし2日後に死亡したことおよび最少接種量0.01 mgを接種した魚も3日後には死亡したことを明らかにしている。しかしながら、ニホンウナギを材料魚とした場合は0.01 mgの接種量では致死せしめることができなかったことを示し、本菌のニホンウナギに対するMLDは菌株あるいは分離してから時間によっても異なるが一応0.05 mg/100 g以上であったことを報告している。

ところで、今回の著者らの実験によれば *V. anguillarum* をアユに筋肉内接種した場合 8.75×10 細胞 (湿菌重量 1×10^{-7} mg) という接種量でも接種魚を100%死亡せしめることがわかった。また、8.75細胞 (1×10^{-8} mg) の接種量でも半数以上の魚が死亡したことから本菌株のアユに対するMLDは8.75細胞/100 g 魚体重ないしそれ以下とすることができよう。なお、この接種区の魚の大きさは平均約80 gであったから、実際には1尾当たり7細胞を接種したことになる。ところでこのMLD値は前述したSAITO *et al.*, がニジマスで出している値、すなわち 10^{-8} mg/1尾とまったく一致するものであり、*V. anguillarum* のニジマスあるいはアユに対する最少致死量は 10^{-8} mg/100 g 魚体重のレベルにあると結論しうる。過去に報告された *V. anguillarum* のアユへの筋肉内接種実験においてはこのような低いレベルまで検討されていないが少なくとも室賀 (1975) の結果をみる限り 10^{-2} mgの接種量で死亡するのに3日も要していることから考え、すべての場合に今回の実験結果のようなごくわずかな量あるいは菌数のMLDが得られるとは限らず、恐らく菌株による違いがかなりあるものと思われる。

また、図1に示された実験結果をみると、同一接種区においては比較的まとまった時間内に死亡が見られている。すなわち、結果で述べたように最初に死亡魚が見られてから13時間以内に残るすべての魚が死亡しており、かなりそろった反応を示すことがわかった。また、接種菌量と平均死亡時間の間にはほぼ比例関係が認められている。

以上のことから接種量と感染・死亡の間にはかなり安定した量的関係が認められ薬剤あるいはワクチンなどの効果判定にも十分応用しうると考える。事実実験 II

において、特に AMF-16 の投薬量と死亡率の関係によく示されるようになり正確に効果を判定することができた。無論、筋肉内接種による感染方法と自然感染の関係が明確にされていないので、この場合の有効投薬量が実用上適切な投薬量とみなしうるか否かは問題の残るところであるが、一般的には筋肉注射法は自然感染に比較して過激な感染方法と考えられるので、筋肉内注射攻撃による実験で得られた有効投薬量は実際には十分有効な薬量となりうると思われる。

最後に本研究を行う上で、いろいろ御便宜ならびに御助言を賜った徳島県水産試験場 小竹子之助場長および薬剤を提供していただいた武田製薬の福井晴夫氏に感

謝の意を表します。

引用文献

- LEVIN, M. A., R. E. WOLKE and V. J. CABELLI (1972): *Vibrio anguillarum* as a cause of disease in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Can. J. Microbiol.*, **18**, 1585-1592.
- 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.
- SAITO, Y., M. OTSURU, T. FURUKAWA, K. KANDA and A. SATO (1964): Studies on an infectious disease of rainbow-trouts. *Acta Med. Biol.*, **11** (3/4), 267-295.