養殖ウナギから分離された病原性 *Vibrio*—VI.

本菌感染症の診断法

西淵光昭*・室賀清邦*・城泰彦**

(昭和54年8月27日受理)

Pathogenic *Vibrio* Isolated from Cultured Eels—VI. Diagnostic Tests for the Disease Due to the Present Bacterium

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

*Fac. Applied Biological Science, Hiroshima University, Fukuyama

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

(Received August 27, 1979)

A search was made for the diagnostic tests for the disease of cultured eels due to the present bacterium.

It is considered impossible to differentiate the disease of eels caused by the present bacterium, by means of external signs of diseased fish, from that caused by other eel pathogens such as *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio anguillarum*, and *Pseudomonas anguilliseptica*. This necessitates the isolation and identification of the infectious agent for diagnosis.

Positive proof was obtained that the diluted rabbit antisera prepared against representative strains of the present bacterium can be used for diagnostic purpose. In addition, a simplified identification method by the use of API 20E was shown.

It was proposed that the disease of cultured eels caused by the present vibrio be named as vibriosis of eels Type B; that due to *V. anguillarum* as Type A.

著者らは1975年夏以来、徳島県、静岡県、高知県の養殖ウナギ病魚から分離されている1種の細菌が*Vibrio*属の新らしい菌種であることを明らかにしてきた(室賀ら, 1976 a, b; 西淵・室賀, 1977, 1980; NISHIBUCHI *et al.*, 1979 投稿中)。本菌による養殖ウナギの流行病は現在でも散発的に発生しており、著者らが1979年4月に徳島県の養鰻場を対象に行なった調査でも加温池で発生していることが確認された。しかし後述するように、本病の場合単に病魚の症状や分離菌の培養性状に基づく診断は比較的困難であり、本病の疫学については正確には把握されていないと考えられる。そこで、今後本病の調査を進めてゆくためには本病の簡便かつ確実な診断法を確立しておく必要があると考えられる。

第I報(室賀ら, 1976 a)でも述べたように、病気の進行が比較的緩やかな場合、本菌に感染した病魚の軀幹

局所には特徴的な膨隆(図1-A)または潰瘍(図1-B)が認められ、症状からそれと推定できる場合がある。しかし病状の進行がすみやかで短期間に大量斃死を招くような場合には、病魚の外観的症狀は単に体表もしくは各鰭の発赤、ないし肛門の拡張・充血にとどまる場合が多い(図1-Cおよび図1-D)。このような症状は我が国の養鰻場でしばしば発生する *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio anguillarum* もしくは *Pseudomonas anguilliseptica* による出血性敗血症の症状と類似しており、外観的症狀からは本菌による感染症をそれらの出血性敗血症と区別し難い。

また、前述の従来知られている4種のウナギ病原菌は本菌同様20~25°Cの培養温度で、普通寒天培地上に比較的よく発育し、しかもすべてグラム陰性の運動性を有する短桿菌である。ただ本菌は他菌種に比べ普通寒天培地上での発育がはやく、経験的に培養性状から他の4菌種と区別することはある程度可能であろうが、必ずしも

* 広島大学生物生産学部

** 徳島県水産試験場

<i>V. fischeri</i>	ATCC 7744	Dead squid	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ATCC 15382	Cod	+	—	—	+	—	—	+	—	—
<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	Shirasu food poisoning	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>V. alginolyticus</i>	V374	Marine sample	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>V. cholerae</i>	NIH35A3	Outbreak of cholera	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Vibrio</i> sp.* ¹	K-3	Ayu	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Vibrio</i> sp.* ²	RF-4	Rainbow trout	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	RST-1	do.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	RF-7602	do.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Aeromonas salmonicida</i>											
subsp. <i>salmonicida</i>	NCMB 1102	Salmon	—	—	—	—	—	—	—	—	—
subsp. <i>masoucida</i>	NCMB 2020	Japanese salmon	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. hydrophila</i>	ET-2	Eel	+	—	—	+	—	—	+	—	—
	ET-4	do.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Edwardsiella tarda</i>	ET-78039	Eel	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ET-78043	do.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ET-7601	Eel	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	ET-2	do.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	NE-2	do.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ET-7413	do.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. fluorescens</i>	ATCC 13525	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. putida</i>	ATCC 12633	—	+	+	—	+	+	—	—	—	—
<i>Pasteurella piscicida</i>	K-1	Yellowtail	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Escherichia coli</i>	WP2	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—

*¹ KUSUDA (1965).

*² OHNISHI and MUROGA (1976, 1977).

Fig. 1. External signs of diseased eels due to the present vibrio.

- A. Swelling surrounded by zone of hemorrhage in the dorso-lateral area of the body
- B. Putrefactive ulcer lesion on the body surface
- C. Red coloration of the head part
- D. Congestion of the anal fin and dilatation of the anus

正確な鑑別基準とは言い難い。

そこで本報では、前報（西淵・室賀，1980）で検討した本菌の家兎抗血清を用いたスライト凝集試験が養殖ウナギにおける本菌感染症の診断に使えるか否かを吟味し、併わせて腸内細菌の簡易同定キットとして市販されている API 20 E システム (Analytab Products) を準用した本病原菌の簡易同定法も検討した。

材料および方法

家兎抗血清 前報で示した本菌の代表 3 菌株に対する抗血清を用いた。

スライト凝集試験 本病原菌、他の各種ビブリオ属細菌、その他の魚病原菌、および *Escherichia coli* の計 49 菌株を本試験に供した。寒天平板培地上に発育した培養菌をたっぷり 2 白金耳（約 60 mg 湿菌量）かき取り、1 ml のリン酸緩衝食塩水 (pH 7.0) に浮遊させて反応抗原とした。凹ガラス上で抗原に等量の抗血清を加

えて反応させ、3 分以内に判定した。

API 20 E を用いたウナギ分離菌の簡易同定 ウナギ病魚からの分離菌の簡易同定に API 20 E を準用した。1971 年から 1979 年にかけて著者らによって徳島県をはじめとする各県の養殖ウナギ病魚より分離された菌株ならびに高知大学の楠田理一教授から分与されたウナギ分離菌のうちから *A. hydrophila*, *E. tarda*, *V. anguillarum*, *P. anguilliseptica* および本研究の主対象である *V. anguillarum* (仮称) の計 88 菌株を検査に供した。

まず検査の第一段階として、属レベルでこれらの細菌を簡単に鑑別するための 6 項目の性状を調べた。すなわちグラム染色性、チトクロムオキシダーゼ反応、運動性、および O/129 感受性を常法に従って検査し、また O-F 試験およびブドウ糖からのガスの産生を WALTERS & PLUMB (1978) の簡便法に従って試験した。次に API 20 E システムを用い、その検査法に準じて 22 項目（上

述のチトクロムオキシダーゼ反応を含めると 23 項目)の生化学性状を検査した。本実験においては普通寒天培地 (NaCl 0.5%) 上に 25°C で 24 時間培養した菌の浮遊液を接種し、25°C で培養して、最終判定は 48 時間後 (24 時間培養では多くの反応が微弱であったため) に行なった。

結果および考察

まず、本病原菌および対照の各種細菌を対象としてスライド凝集試験を行ない、抗血清の特異的凝集反応および類属凝集反応の有無を検査した。代表 3 菌株に対する家兎抗血清はいずれも、原液、5 倍希釈液および 10 倍希釈液として使用した。結果は表 1 にまとめた。本病原菌との反応においては、抗血清原液および 5 倍希釈抗血清ではすべての菌株が陽性を示したが、10 倍希釈抗血清では一部に陰性反応が認められた。対照の他菌種のうち、*P. putida* ATCC 12633 株および *E. coli* WP 2 株がともに抗 ET-517 および抗 KV-1 血清とのみ強い陽性反応を示した。そこで吸収試験を行なってみたところ、表 2 に示した結果にみられるように、これらは本菌に対する特異的な抗体による反応ではないことが明らかになった。これらを除くと、供試抗血清の違いによる差は認められず、*V. fischeri* ATCC 15382 株および *A. hydrophila* ET-2 株が抗血清原液と陽性反応を示した以外は類属凝集反応は認められなかった。従っていずれの菌株に対する抗血清でも適度に希釈して使用すれば診断に利用しうると判断された。

そこで、養殖ウナギの出血性敗血症の原因菌として従来から知られている前述の 4 種の細菌と本病原菌とを鑑別する手段として、本菌の抗血清によるスライド凝集反応が有用であることをさらに確認するため、数年にわたり各地の養殖ウナギより分離されたこれらの細菌をスライド凝集試験に供した。まず収集したウナギ病魚からの各種分離菌を API 20 E システムを取り入れた簡易同定試験に供した結果、表 3 に示したような形態学およ

び生化学的性状が得られた。なお、前述したように当初は 88 菌株を試験に供したが、第 2 段目の試験、すなわち API 20 E システムによる検査を行なったところ、8 菌株についてはそれらの初期の同定に問題があると考えられるため除き、最終的に本病原菌 24 菌株、*V. anguillarum* 7 菌株、*A. hydrophila* 11 菌株、*E. tarda* 18 菌株、*P. anguilliseptica* 20 菌株の計 80 菌株を残し、以後の実験に供した。これらのうち、本菌 19 菌株、*V. anguillarum* 3 菌株、*A. hydrophila* 4 菌株、*E. tarda* 4 菌株、*P. anguilliseptica* 20 菌株については通常の一般性状検査法による検査を実施し、API 20 E システムによる結果と一致することを確認した。

前述の 80 菌株を対象に、本病原菌に対する抗血清のうち抗 ET-7617 血清の原液および 5 倍希釈液を用いたスライド凝集試験を行なった結果を表 4 に示した。表に見られるように、本病原菌全菌株が抗血清原液および 5 倍希釈液と陽性反応を示したのに対し、他の菌株との反応においては、*A. hydrophila* 1 菌株が抗血清原液と陽性反応を示しただけで、その他の菌株ではすべて陰性であった。

以上の結果から、本実験で用いた抗血清を 5 倍程度に希釈して使用すると養殖ウナギにおける本病の血清学的診断に利用可能と考えられる。しかし、血清学的診断をさらに確実なものにするには、表 3 に示したような分離菌の簡易同定試験を行なうことも必要と考えられる。同表に見られるように、従来から知られている属レベルでの鑑別法では本菌と *V. anguillarum* を区別することは不可能であるが、これに API 20 E システムを付加すると、*V. anguillarum* を含む他の細菌と本菌とは容易に区別されかなり信頼性の高い同定が可能となる。

著者らは第 I 報 (室賀ら, 1976 a) で、本菌による養殖ウナギの流行病の発生は使用水に塩分を含む養鰻池で、しかもその水温が 20°C 以上になる高水温期もしくは加温池に限ってみられることを指摘し、第 II 報 (室賀ら, 1976 b) で、これは本病原菌の塩分と温度に対

Table 2. Relationship of the agglutinogens of eel isolate KV-1, *Escherichia coli* WP2, and *Pseudomonas putida* ATCC 12633

Antiserum against	Adsorbed with organism	Agglutinin titer with the formalin-killed cells of organism		
		<i>Vibrio</i> sp. KV-1	<i>Escherichia coli</i> WP2	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633
KV-1	Unadsorbed	1024	32	16
	<i>Vibrio</i> sp. KV-1	<2	32	16
	<i>E. coli</i> WP2	1024	<2	4

Table 3. Results of simplified identification tests of eel isolates

Item	Eel isolates identified as				
	Present vibrio 24 strains	<i>Vibrio</i> <i>anguillarum</i> 7 strains	<i>Aeromonas</i> <i>hydrophila</i> 11 strains	<i>Edwardsiella</i> <i>tarda</i> 18 strains	<i>Pseudomonas</i> <i>anguilliseptica</i> 20 strains
Step 1 (Conventional tests for differentiation)					
Gram-negative short rod	+	+	+	+	+
Motility (Wet mount)	+	+	+	+	+
O-F test (WALTERS & PLUMB's medium* ¹)	F	F	F	F	—* ²
Gas from glucose	—	—	+	+	—
Cytochrome oxidase test	+	+	+	—	+
Sensitivity to O/129	+	+	—	—	—
Step 2 (API 20E system* ³)					
ONPG (= Beta-galactosidase)	d (.96)	+	d (.91)	—	—
ADH (= Arginine dihydrolase)	—	+	+	—	d (.35)
LDC (= Lysine decarboxylase)	+	—	—	+	—
ODC (= Ornithine decarboxyl)	—	—	—	+	—
CIT (= Citrate utilization)	d (.92)	+	+	+	+
H ₂ S (= Hydrogen sulfide production)	—	—	—	d (.50)	—
URE (= Urease)	d (.04)	—	—	—	—
TDA (= Tryptophane deaminase)	—	—	—	—	—
IND (= Indole production)	—	+	+	+	—
VP (= Voges-Proskauer reaction)	—	+	+	—	+
GEL (= Gelatinase)	+	+	+	—	d (.20)
GLU (= Glucose utilization)	+	+	+	+	—
MAN (= Mannitol util.)	—	+	+	—	—
INO (= Inositol util.)	—	d (.14)	—	—	—
SOR (= Sorbitol util.)	—	d (.86)	d (.18)	—	—
RHA (= Rhamnose util.)	—	—	—	—	—
SAC (= Sucrose util.)	—	+	+	—	—
MEL (= Melibiose util.)	—	—	d (.09)	—	—
AMY (= Amygdalin util.)	+	d (.42)	d (.45)	—	—
ARA (= Arabinose util.)	—	+	d (.09)	—	—
OXI* ⁴ (= Cytochrome oxidase)	+	+	+	—	+
NO ₂ (= Nitrate reduction)	+	d (.56)	+	+	—
GAS (= ditto)	—	d (.14)	—	—	—

+: all strains positive, —: all strains negative, d (): either positive or negative (frequency of occurrence of positive reaction), (L): linear, (W): wiggling, F: fermentative.

*¹ WALTERS and PLUMB (1978).

*² Glucose not utilized.

*³ Judged after 48 hrs of incubation at 25°C.

*⁴ Same as cytochrome oxidase test.

する生理学的特性に基づくものであることを明らかにした。その後、観察された本病の発生もすべてそのような養鰻池に限られており、これらの環境要因も本病の診断に当たり忘れてはならない要素であり、これらを含めた

総合的な診断がなされなければならないであろう。

最後に、本菌による養殖ウナギの流行病の呼称について提案したい。本菌による養殖ウナギの流行病は、当初潰瘍病と呼ばれたが、先にも述べたように病魚は必ずし

Table 4. Results of rapid slide agglutination tests against various eel pathogens with rabbit anti-ET-7617 serum

Bacterial antigen		Reaction with rabbit anti-ET-7617 serum	
Species	No. of strains tested	Neat	Diluted 1:5
Present vibrio	24	+	+
<i>Vibrio anguillarum</i>	7	—	—
<i>Aeromonas hydrophila</i>	11	d (.09)	—
<i>Edwardsiella tarda</i>	18	—	—
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	20	—	—

+: all strains positive, —: all strains negative, d (): either positive or negative (frequency of occurrence of positive reaction).

も体表に潰瘍形成を伴わず、また *Vibrio* sp. による海産魚の潰瘍病 (楠田, 1965) との混同を避けるため、むしろウナギのビブリオ病と呼ぶ方が適当であると考えられる。さらに、*V. anguillarum* によるウナギのビブリオ病と区別するため、*V. anguillicida* がかつて *V. anguillarum* の B 型とされていたことにちなんで、*V. anguillarum* によるものをビブリオ病 A 型、本菌によるものをビブリオ病 B 型と名づけたい。

謝 辞

貴重なる菌株を分与くださり、かつ本稿の御校閲をいただいた北海道大学の木村喬久教授、ならびに菌株の分与をたまわった高知大学の楠田理一教授に心から御礼を申し上げます。

文 献

- 楠田理一 (1965): 海産魚の潰瘍病に関する研究. 京都府水試業績, **25**, 1-116.
- 室賀清邦・城 泰彦・西淵光昭 (1976a): 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. 魚病研究, **11**, 141-145.
- 室賀清邦・西淵光昭・城 泰彦 (1976b): 同上—II. 生理学的性状および病原性. 同誌, **11**, 147-151.
- 西淵光昭・室賀清邦 (1977): 同上—III. 塩分耐性および鞭毛形態. 同誌, **12**, 87-92.
- NISHIBUCHI, M., K. MUROGA, R. J. SEIDLER, and J. L. FRYER (1979): ditto—IV. Deoxyribonucleic acid studies. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **45**, 投稿中.
- 西淵光昭・室賀清邦 (1980): 同上—V. 血清学的検討. 魚病研究, **14**, 117-124.
- 大西圭二・室賀清邦 (1976): 養殖ニジマス のビブリオ病の一原因菌—I. 生化学的性状. 同誌, **11**, 159-165.
- 大西圭二・室賀清邦 (1977): 同上—II. 生理学的性状および病原性. 同誌, **12**, 51-55.
- WALTERS, G. R. and J. A. RUMB (1978): Modified oxidation/fermentation medium for use identification of bacterial fish pathogens. *J. Fish. Res. Board Can.*, **35**, 1629-1630.