情 報

海水によるアユ種苗生産過程の病害研究—II.

Vibrio anguillarum の動態

田畑和男*・柄多 哲*・Maria SACRISTAN RUIZ*

(昭和 57 年 6 月 21 日受理)

Studies on naturally occurring Disease during the Production of Ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Sea Water—II.

Dynamics of *Vibrio anguillarum*

Kazuo TABATA, Satoshi KARATA, and Maria SACRISTAN RUIZ

Fish. Exp. Stn. of Hyogo Pref., Hyogo, Japan

(Received June 21, 1982)

The following results were obtained from investigation about the dynamics of *V. anguillarum* in process of artificial seedling production of ayu (*Plecoglossus altivelis*).

When ayu reared in sea water, serotype A strains of *V. anguillarum* were detected from fish and other samples at the first half and serotype C strains were isolated from fish and other samples at the latter half in rearing periods. Continuously, when these fish were transferred to fresh water ponds, there was recognized occurrence of the vibriosis caused by serotype A strains again.

Among the serotype A strains were isolated from ayu reared in sea water and fresh water ponds, were demonstrated some differences in biochemical characteristics. Pathogenicity of the isolates was confirmed using ayu and amago (*Oncorhynchus rhodurus*).

Serotype A strains from ayu reared in sea water ponds were observed excellent growth in 2-3% NaCl concentration at 20°C, but serotype C strains did not. Serotype A strains from ayu reared in fresh water ponds were shown favourable growth in 1% NaCl concentration at 20 c.

As *V. anguillarum* was never detected from both the new sea water and the newly hatched ayu in our survey, the source of *V. anguillarum* seemed to be rotifer.

Drug bathing of rotifers before administrate it to fish considered to be one of the useful control method of the vibriosis in seedling production of ayu.

海水によるアユ種苗生産過程における細菌学的検討は充分になされていないのが現状である。そこで、特に仔魚期における減耗の原因を明らかにし、またその対策を考えていくための基礎資料を得る目的で、昭和 55 年度と 56 年度の両年にわたってアユ種苗生産過程における *Vibrio anguillarum* の動態を検討したので報告する。

材 料 と 方 法

供試材料からの *V. anguillarum* の分離は室賀ら (1981) の方法を改変した Fig. 1 に示す方法によった。

* 兵庫県立水産試験場

すなわち、新海水（水試地先から揚水し、砂濾過した未使用海水）とアユのふ化直後の仔魚については菌数が少ないことが予想されたので、3% 食塩加アルカリ性ペプトン水 (pH 9.4) で選択、増菌後、1.5% 食塩加 TSA 平板培地 (BBL) で分離操作をおこなった。ふ化後約 2 ヶ月（全長約 30 mm）までのアユとシオミズツボワムシ（以下ワムシと略記）については、滅菌生理食塩水で洗浄後全体を摩砕し試料とした。全長約 30 mm 以上のアユについては、必要に応じて実体顕微鏡下で開腹し、肝臓から菌を分離した。ワムシ培養水、アユ飼育水の菌分離および菌数測定にも全て 1.5% 食塩加 TSA 平板培地

Fig. 1. Scheme for detection of *Vibrio anguillarum* from new sea water, ayu-fry and others.

(BBL)を使用した。*V. anguillarum*の血清型別検査には宮崎大学北尾教授から分与されたO型別用抗血清を使用した。

分離菌の10および20°Cにおける0~6%食塩加培地中での増殖は分光光度計(日立110型)によるOD(610 nm)によって比較した。

生化学的性状試験は常法により実施した。

病原性試験は二通りの方法で行った。すなわち、TSB(BBL)で48時間(25°C)培養した供試菌(海水飼育時分離の*V. anguillarum* A, C型菌および淡水飼育時分離のA型菌の3菌株)を各々3尾ずつのアモ稚魚(体重2~4 g)の腹腔内に 1×10^8 細胞 $\times 50 \mu\text{l}$ /尾を接種した。対照区には50 μl のTSBを接種した。観察期間は14°C 5日間とした。第二の方法は海水飼育時分離の*V. anguillarum*(A型菌)を使用して、ふ化後9日目のアモ仔魚に対する病原性を試験した。供試菌をTSB(BBL)で48時間(25°C)培養後、アモ仔魚を10尾ずつ放養した5 l飼育海水中に、 $10^8/\text{ml}$ と $10^9/\text{ml}$ となるように投入した。3日間ワムシを投餌しながら18.5°C

前後で止水飼育した後、生残数を計数した。この実験と同時にフラネース®(ニフルピリノール)とコリミキサー®(コリスチン)を、菌投入後1時間後に各々1 ppmとなるように飼育水中に投入(永久浴)し、薬浴による治療効果を調べた。

ビブリオ菌の感染経路にワムシが関係している疑いがあるので、ワムシの薬浴実験をおこなった。すなわち 4×10^8 個体のワムシを収容した、100 mlの海水中に2~100 ppmの濃度になるようにフラネース®を溶解した。20°Cで30分から24時間作用後にミリポアフィルター(10 μm)上にワムシを集め、これをホモジナイズし菌数を測定した。

当場におけるアモ種苗生産工程の概略は次のとおりである。11月初旬にふ化した後、翌年3月中下旬までの約140日間海水流水式で飼育(70 Kl池3面)し、河川漁協の淡水池に移送する(体重約0.5 g)。ここで約40日間飼育した後、川に放流する(3~5 g)。

結 果

へい死状況と投薬効果について

昭和55年度(1980年11月から1981年3月)におけるへい死状況と投薬状況を72号池を例としてFig. 2に示した。へい死数の増加がみられたり、その徴候がある場合にはフラネース®(1 ppm, 24時間, 水温12~18°C)の薬浴(ふ化後60日前後まで)、パラザン油剤®(オキソリン酸, 0.5~1 ml/kg, 5日間, 水温11~13°C)の経口投与(ふ化後60日以後)を行なった。投薬の結果へい死数は減少した。海水飼育を終了するふ化後4ヶ月後には30~50%の生残率であった(柄多他, 1981)。

昭和56年度(1981年11~12月)には、ふ化後20日目ごろから急激にへい死数が増加し、フラネース®と

Fig. 2. Number of ayu *Plecoglossus altivelis* died and drugs dosed in rearing period by sea water.

NP: Nifurpirinol, OX: Oxolinic acid, H: Days after hatching.

Pond No.	Origin of strain	Month Day	November		February		March	
			21	29	13	26	5	16, 17, 24
		Kind of rearing water	← Sea water		Sea water →			
71	Ayu	Rearing water			A (HFW-80-67)	A (80-71)	C (80-77)	C (80-80)
					A (HFW-80-72)			
72	Ayu	Rearing water					C (HFW-80-76)	C (80-79)
73	Ayu	Rearing water						A (HFW-80-78)
				A (HFW-80-35)	A (80-36)			
Pond No.	Origin of strain	Month Day	March		April			
			29	7	10	21	27	
		Kind of rearing water	← Fresh water →					
71	Maruyama-riv. (Pond No.1)	Ayu			A (HFW-81-02)			
	(Pond No.5)	Ayu		C (HFW-80-81)	A (81-01)	A (81-05)		
	Fish.Exp.Stn.	Ayu			C (HFW-81-03)	A (81-04)		

* Transported on 25th and 26th March, 1981.

** Numbers in parentheses indicate strain number.

Fig. 3. Change of serotype of *Vibrio anguillarum* on seedling production of ayu *Plecoglossus altivelis* A and C in the table indicate serotype of *V. anguillarum*.

コリミキサー®の薬浴（ともに 1 ppm, 24 時間, 水温 18~14°C）を行なったが, 効果がみられずふ化後 30~40 日目には生残率が 10% 程度となった。このため 56 年度は飼育を 40 日前後で打ち切った（柄多他, 1982）。

V. anguillarum の血清型の変遷

昭和 55 年度の結果を Fig. 3 に示した。飼育当初の 11 月には飼育海水から *V. anguillarum* A 型菌が検出された。後期（2~3 月）のひん死魚からも A 型菌が, また 3 月にはひん死魚から C 型菌が各々純培養状に分

離された。その後河川漁協による淡水飼育に入ると, 移送後 4 日目の病魚からは C 型菌が分離されたが, 13 日目には A 型菌が変わった。同じ池で海水飼育されたアユの一部を当水試に残し淡水で飼育したところ, 淡水化後 16 日目の病魚からは C 型菌が, 33 日目の病魚からは A 型菌が各々分離された。C 型から A 型への変遷は漁協の淡水池に比べて約 20 日の遅れがみられた。

薬剤感受性について

1980 年に分離された *V. anguillarum* 菌株 (12 株)

Table 1. Number of *Vibrio anguillarum* in filtered sea water and rearing water (1980)

Date	1980 Nov. 21	Nov. 29	Nov. 30	Dec. 5	Dec. 22
Filtered sea water	—	ND	ND	ND	ND
Pond No. 73	3-6 × 10 ³ /ml (Type A)	1 × 10 ³ /ml (Type A)	—	ND*	ND*
Date	1981 Jan. 20	Feb. 26	Feb. 27	Feb. 28	
Filtered sea water	—	—	—	ND	
Pond No. 73	ND*	—	—	ND	
Pond No. 71	—	4 × 10 ² /ml (Type A)	3 × 10 ² /ml (Type A)	—	

—: not determined.

ND: not detectable.

* Detectable limit is 10²/ml or more. Others are 10¹/ml or more.

について薬剤感受性試験（ディスク法）を行った。

海水飼育時分離の A, C 型菌はオキシテトラサイクリン、クロラムフェニコール、ニフルピリノールおよびオキシリン酸に感受性がみられたが、淡水飼育時に分離された A 型菌は最初スルファモノメトキシシンとフラゾリドンに対して感受性が低く、また淡水飼育後半ではオキシリン酸とナリジック酸に対して感受性が低かった。

V. anguillarum 汚染源の探索

V. anguillarum の汚染源と経路を明らかにする目的で、新鮮海水、アユ飼育水、ワムシ、ワムシ培養水、アユふ化仔魚および病アユからの検出を試みた。

昭和 55 年度の新鮮海水とアユ飼育水における *V. anguillarum* 数の変化を Table 1 に示した。新鮮海水から *V. anguillarum* は全く検出されなかった。アユの飼育水からは 11 月には A 型菌が $10^3/\text{ml}$ 個検出されたが、12 月には減少し、2 月下旬には $10^2/\text{ml}$ 個となった。

昭和 56 年度における新鮮海水、アユ飼育水およびワムシ培養水の検査結果を Fig. 4 に示した。新鮮海水からは、増菌法によっても *V. anguillarum* は検出されなかった。アユの飼育水からは 11 月、12 月とも A 型菌が $10^3/\text{ml}$ 個検出された。ワムシ培養水中には $10^4 \sim$

Fig. 4. Number of bacteria (○) and *V. anguillarum* (●) in the new sea water, the rearing water of ayu-fry (×), and the cultivation water of rotifer (I).

Fig. 5. Number of *V. anguillarum* in rotifer.

Fig. 6. Number of *V. anguillarum* in ayu-fry.

$10^5/\text{ml}$ 個がみられた。ワムシ中における *V. anguillarum* (A 型菌) 数の変化を培養法別（グリーンウォーター、イースト、および併用方式）に Fig. 5 に示した。ワムシ中には $10^0 \sim 10^4/\text{個体}$ が検出された。グリーンウォーターを餌として生産されたワムシ中の菌数は低い傾向にあった。

昭和 56 年度におけるアユ仔魚からの *V. anguillarum* の検出状況を Fig. 6 に示した。ふ化仔魚については増菌過程を入れたが、*V. anguillarum* およびその他の菌は全く検出されなかった。ふ化後 14 日目と 35 日目の病アユ仔魚からは、*V. anguillarum* (A 型菌) が検出された。しかし、他の菌も含めて未検出の検体が半数近くを占めた。

感染試験と薬浴試験

1980 年に分離した *V. anguillarum* (海水飼育時に分離された A, C 型菌と淡水飼育時に分離された A 型菌)

Table 2. Pathogenicity for ayu-fry *Plecoglossus altivelis* of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased ayu and drug bathing test

Number of <i>V. ang.</i> /ml	Drug	Survival rate (3 days)	Number of isolated/indiv.
0	—	90%	ND
10^3	—	83%	—
10^5	—	10%	1.7×10^3
10^3	Furanace (1 ppm)	100%	—
10^5	Furanace (1 ppm)	87%	5.2×10^2
10^3	Colimixer (1 ppm)	83%	—
10^5	Colimixer (1 ppm)	73%	1.3×10^1

WT.; 18.4–18.7°C.

Ayu-fry tested; H-9.

V. anguillarum; Sea water (type A), HFW81-69.

Table 3. Biochemical characteristics of strains isolated from rearing water and diseased ayu *Plecoglossus altivelis*

	1980				1981		MUROGA	
	SW(A)	SW(C)	FW(C)	FW(A)	SW(A)	SEA	RIV.	LAKE
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+
Single polar flagellum						+	+	+
Gram stain	—	—	—	—	—	—	—	—
Fermentation of glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas from glucose	—	—	—	—	—	—	—	—
Cytochrome oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Sensitivity to 0/129	+	+	+	+	+	+	+	—
novobiocin	+	+	+	+	+	+	+	+
Litmus milk peptoniz.	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole production	+	+	+	—	+	+	+	+
Voges-Proskauer test	+	+	+	+	+	+	+	+
Methyl red test	—	—	—	—	±	—*	—	—
2,3-butanediol produc.	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S production	—	—	—	—	—	—	—	—
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+
Lysine	—	—	—	—	—	—	—	—
Ornithine	—	—	—	—	—	—	—	—
Phenylalanine deamin.	—	—	—	—	—	—	—	—
Urease	—	—	—	—	—	—	—	—
Cholera red						—	—	—
Citrate (Simmons)	+	+	+	+	+	+	+	+
Tartrate (Jordan)	+	+	+	+	+	+	+	+
Malonate	+	—	—	+	+	—*	—	—
Starch hydrolysis						+	+	+
Chitin decomposition						—	—	—
β-galactosidase								+
KCN								—
NaCl 0%	—	—	—	—	—	—	—	+
0.5%	+	+	+	+	+	+	+	+
5%	+	+	+	+	+	+	+	+
7%	—	+	+	—	—	+	—*	—
10%	—	—	—	—	—	—	—	—
Acid from								
glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
fructose	+	+	+	+	+	+	+	+
galactose	+	+	+	—	+	+	+	—
mannose	+	+	+	+	+	+	+	+
maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
trehalose						+	+	+
dextrin	+	+	+	+	+	+	+	+
mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+
starch	+	+	+	+	+	+	+	+
sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+
glycogen	+	+	+	+	+	+	+	+
glycerin						+	—*	—

Table 3. (continued)

	1980				1981		MUROGA	
	SW(A)	SW(C)	FW(C)	FW(A)	SW(A)	SEA	RIV.	LAKE
cellobiose	+	—	—	—	+	+	+	—
arabinose	+	+	+	—	+	+	+	—
sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+
inositol	—	—	—	—	—	—	—	—
inulin	—	—	—	—	—	—	—	—
rhamnose	—	—	—	—	—	—	—	—
xylose	—	—	—	—	—	—	—	—
raffinose	—	—	—	—	—	—	—	+
adonitol	—	—	—	—	—	—	—	—
salicin	—	—	—	—	—	—	—	—
lactose	—	—	—	—	—	—	—	—
dulcitol	—	—	—	—	—	—	—	—

* indicate the existence of exceptional strains.

の病原性をアマゴを用い腹腔内接種法で調べた結果、いずれの菌接種区も 24 時間以内に全数がへい死し、へい死魚の腎臓から純培養状に接種菌が回収された。またへい死魚は肛門、腹腔内筋部、腸管に共通して出血がみられた。一方対照区は 5 日間の観察期間中へい死はなかった。以上の結果から各分離菌の病原性が認められた。

1981 年 11 月に海水で飼育中のふ化後 14 日目の病アユ仔魚から分離した *V. anguillarum* (A 型菌) を飼育海水中に添加 (10^3 , 10^5 /ml) して、ふ化後 9 日目のアユ仔魚に対する病原性と、フラネース®, コリミキサー® の薬浴効果を調べた。結果を Table 2 に示した。3 日後までには 10^3 /ml では発病しなかったが、 10^5 /ml では高いへい死率がみられ、また生残魚は弱々しく水面を泳ぎ、体の白濁もみられた。そしてこれらの仔魚から 10^3 /尾の *V. anguillarum* (A 型菌) が回収された。薬浴区では 10^5 /ml 菌浴の場合でも 70% 以上の生残率であった。

分離菌の生化学的性状

Table 3 に、昭和 55 年度および 56 年度の分離菌の生化学的性状試験の結果を示した。比較のために室賀ら (1981) の結果 (湖産、海産、河川産稚アユからの分離株) を併記した。

海水飼育期に分離される A 型菌は昭和 55 年と 56 年分離株とも性状は一致した。C 型菌は海水淡水飼育時分離菌とも性状は一致した。海水 A 型菌と C 型菌にはマロン酸とセロビオースの成績が異なっている。淡水飼育時に分離された A 型菌は、海水 A 型菌とインドール産生、およびガラクトース、セロビオース、アラビノース分解の点で異なった。

Fig. 7. Effect of NaCl concentration and temperature on the growth of *Vibrio anguillarum*.

Medium used: 1% Difco Bacto-Peptone. Incubation: 48 hr stationary culture. Sea water being (type A); 1, HFW80-35. 2, HFW80-66. Sea water being (type C); 3, HFW80-79. 4, HFW80-80. Fresh water being (type C); 5, HFW-80-81. Fresh water being (type A); 6, HFW-81-02. 7, HFW81-04.

分離菌の生物学的性状

昭和 55 年度の由来別の分離菌を用い、温度および食塩濃度と発育との関係について調べた結果を Fig. 7 に示した。

海水飼育時に分離された A 型菌は 20°C では 2~3% 食塩濃度で優れた発育を示すが、10°C についてはむしろ海水飼育時に分離した C 型菌の増殖が優れてくる。淡水飼育時に分離された A 型菌の増殖は低塩分においてよく増殖する傾向がみられた。

薬剤によるワムシ中の *V. anguillarum* 数の減少方法の検討

フラネースによる短時間薬浴 (20 ppm 10~60 分, 100 ppm 30 分) と長時間薬浴 (2 ppm 24 時間, 10 ppm 24 時間) による *V. anguillarum* の減少率を試験した結果、短時間薬浴は減少率 58~90% であり、長時間薬浴の 2 ppm は 56~60%, 10 ppm では 93~99% であった。

考 察

アユ種苗生産の海水飼育時において、まず *V. anguillarum* A 型菌が出現し、その後 C 型へと推移し、淡水馴致後再び A 型菌が出現することが観察された。A 型菌は湖産アユ種苗に、C 型菌は海産アユ種苗に多いといわれている (絵面ら, 1980; 室賀ら, 1981) が、ここに報告した飼育例でも海水および淡水飼育の池出し時点においては、これらと一致した結果が得られた。しかし海水飼育時に C 型に先行して A 型菌が出現するということは新しい知見である。

海水飼育時に分離した A 型菌の生化学的性状は C 型菌と 2 項目で異なっているが、これらは室賀らの海産アユ種苗分離菌 (C 型) の性状とほぼ一致している。一方淡水飼育時に分離した A 型は、海水の A 型とはインドール産生を始めとして 4 項目で異なっているが、湖産アユ種苗分離菌 (A 型) (室賀ら, 1981) の性状に近似している。

塩分と温度に対する増殖の特徴は、分離の時期やその時点の環境をよく反映していると思われる。海水飼育時における A 型菌から C 型菌への変遷および淡水飼育時に C 型菌から A 型菌へと移るメカニズムについては今後の研究課題といえよう。

アユ種苗生産池への *V. anguillarum* の汚染経路はワムシを介在している可能性が大きいと考えられる。なぜなら、アユのふ化仔魚と新鮮海水から *V. anguillarum* は検出されず、ワムシとその培養水中から多量に検

出されるからである。

昭和 56 年度の大量へい死については、病魚から *V. anguillarum* が検出されるものと全く検出されないものがみられた。アユ仔魚の感染試験において、へい死直前の仔魚から 10³/尾のビブリオ菌が検出されたことから、多数のビブリオ菌が検出される病アユについてはビブリオ感染魚と推定される。しかし非検出個体が半数近くあったことから、*V. anguillarum* が全ての原因であったとはいえないようである。

V. anguillarum が全ての原因ではないにしても、*V. anguillarum* の菌数を低下させることは、大量へい死の予防対策に役立つものと思われる。アユへの投与前にワムシを薬浴することは一つの方法であろうが、短時間よりも長時間薬浴処理が必要であるという示唆が得られた。

ふ化後 9 日目のアユ仔魚を使ったフラネースとコリミキサーの薬浴試験から、海水中においても 1 ppm で永久浴をすることによって、ビブリオ病の感染を防止できる可能性が示された。

要 約

アユ種苗生産過程における仔稚魚の減耗原因を明らかにし、またその対策を考えていくための基礎資料を得る目的で、1980, 1981 年の両年にわたって *V. anguillarum* の動態を検討した。

V. anguillarum は海水飼育当初の 11 月から後半の 2~3 月にかけて A 型菌が、3 月には C 型菌が出現し、淡水飼育期になると再び A 型菌に変わる。しかし、海水 A 型菌と淡水 A 型菌とは若干生化学的性状に異なる点があることがわかった。

シオミズツボワムシと飼育水中との *V. anguillarum* の増減には関係があり、新鮮海水とふ化仔魚からは *V. anguillarum* は検出されないことから、*V. anguillarum* の供給源はシオミズツボワムシである可能性が確認できた。

1981 年の大量へい死の原因は *V. anguillarum* によるもの以外に他の原因も加わっていたものと思われる。

投与前にワムシを薬浴することは、有効なビブリオ病予防対策となり得るものと思われる。

謝 辞

終りに *V. anguillarum* の抗血清を分与していただき、本文のご校閲を賜った宮崎大学農学部北尾忠利教授に深謝します。

文 献

絵面良男・田島研一・吉水 守・木村喬久 (1980):
魚類 *Vibrio* 属病原菌の分類学的ならびに血清学的
検討. 魚病研究, 14 (4), 167-180.
柄多 哲・田畑和男・山本 強・金尾博和・杉野雅彦
(1981): 昭和 55 年度アユ種苗生産事業. 昭 55 年

度兵水試事報, 257-267.

柄多 哲・田畑和男・山本 強・金尾博和・杉野雅彦
(1982): 昭和 56 年度アユ種苗生産事業. 昭 56 年
度兵水試事報, (投稿中).

室賀清邦 (1981): 養殖用アユ種苗の *Vibrio anguil-*
larum の保菌状態に関する研究. 昭和 55 年度魚病
対策技術開発研究報告書, 1-11.