浜名湖稚アユのビブリオ病の疫学に関する研究—I.

Vibrio anguillarum の分離・同定とその血清型

三淵一二*・柳原保武*・清水忠順*・牛山宗弘**

(昭和 58 年 4 月 2 日受理)

Epidemiological Studies on Vibriosis of Young Ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Hamana Lake—I.

Identification and Incidence of *Vibrio anguillarum* and Their Serotypes

Ichiji MIFUCHI*, Yasutake YANAGIHARA*, Tadayori SHIMIZU* and
Munehiro USHIYAMA**

*Department of Microbiology, Shizuoka College of Pharmacy, Oshika
2-2-1, Shizuoka 422, Japan

**Shizuoka Prefectural Fisheries Exp. Station, Hamanako Branch, Shizuoka, Japan

(Received April 2, 1983)

Forty two strains of *Vibrio anguillarum* were isolated from the spleen of young Ayu in Hamana Lake in 1978. Of the 42 strains 17 were isolated from apparently normal 81 fish captured by small set nets (Kakudate-ami), isolation rate being 21%. The remaining 25 strains were isolated from 25 diseased fish which had been kept in a stocking pond for a few days, isolation rate being 100%. Sixteen strains out of the former 17 strains were classified as serotype B and C, but 24 strains out of the latter 25 strains were serotype A. Twenty five strains were isolated from 34 adult fish which had been cultured in ponds for a few months, and almost all of them were serotype A.

These results suggest that the succession of serotype of the bacterium is affected by medication and some other unknown factors during the period of cultivation in ponds.

緒 論

浜名湖稚アユの斃死原因の病原細菌は、江草、室賀らによって、1965 年から 1967 年にわたる調査研究において *Vibrio anguillarum* と同定された (MUROGA and EGUSA, 1967)。しかし、その後の浜名湖産稚アユのビブリオ菌の疫学的な研究は、ほとんどみられない。

養殖用の種苗として用いられる稚アユの保菌を正確に把握することは、アユのビブリオ病の予防対策上、極めて重要である。

この目的のため、著者らは 1975 年以来、浜名湖で採捕された直後の稚アユの保菌状況の検索を行ってきた。一般に 12 月～2 月採捕のものは保菌率が低い、3 月から 4 月に入って採捕したものは保菌率が高くなる

傾向を認めた。

このため、保菌率の高い 3 月下旬以降の角建網で採捕した稚アユに注目し、ビブリオ菌の検索を行なった。その結果、浜名湖では 1965 年、江草、室賀らの分離・同定した PB-1 型 (血清型 C 型) の感染が高率に検出されること、また、A 型ならびに B 型菌にも感染保菌していることを明らかにした。さらに、養殖池で斃死したアユから分離されたビブリオ菌は A 型菌であることも明らかにした。

実験材料と方法

使用稚アユ

1) 角建採捕稚アユ

- a. 1978 年 3 月 25 日採捕, 42 尾
- b. 1978 年 4 月 25 日採捕, 39 尾
- c. 1978 年 5 月 8 日採捕, (養殖池での病魚) 25 尾

* 静岡薬科大学微生物学教室

** 静岡県水産試験場浜名湖分場

Table 1. Incidence of *V. anguillarum* in the spleen of young Ayu caught in Hamana Lake

Date	No. of fish examined	No. of fish <i>Vibrio</i> positive (%)	Serotype		
			A	B	C
March, 25, 1978	42	6 (14)	1	1	4
April, 25, 1978	39	11 (28)	0	9	2
May, 8, 1978*	25	25 (100)	24	0	1

* Diseased fish in a stocking pond.

Table 2. Biochemical characteristics and serotype of *V. anguillarum*

Fish* No.	BTB-teepol plate colonies			TSI with 3% NaCl				Growth in peptone water with NaCl %			
	yellow	green		slant	butt	gas	H ₂ S	0	3	7	10
10-15	ND ^{a)}										
16	11	9	2	y ^{b)}	y	—	—	—	≡	—	—
17	7	6	1	y	y	—	—	—	≡	—	—
18	200	200	0	y	y	—	—	—	≡	—	—
19	3	3	0	y	y	—	—	—	≡	—	—
20-21	ND										
22	2	2	0	y	y	—	—	—	≡	—	—
23-34	ND										
35	38	38	0	y	y	—	—	—	≡	—	—
36-48	ND										
49	3	3 (ry)		r ^{c)}	r	—	—				
50-51	ND										
52	2	2	0	y	y	—	—	—	≡	—	—
53	2	2	0	y	y	+	—	+	≡	—	—
54	3	3	0	y	y	—	—	—	≡	—	—
55-59	ND										
60	1	1	0	y	y	—	—	—	≡	—	—
61-64	ND										
65	1	1	0	y	y	—	—	—	≡	—	—
66-70	ND										
71	3	3	0	y	y	—	—	—	≡	—	—
72-74	ND										
75	1	1	0	y	y	—	—	—	≡	—	—
76-80	ND										
81	5	5	0	y	y	—	—	—	≡	—	—
82-83	ND										
84	1	1	0	y	y	—	—	—	≡	—	—
85	4	4	0	y	y	—	—	—	≡	—	—
86	ND										
87	9	9	0	y	y	—	—	—	≡	—	—
88	3	3	0	y	y	—	—	—	≡	—	—
89	ND										
90	1	1	0	y	y	—	—	—	≡	—	—

* No. 10-51; March, 25, 1978. No. 52-90; April, 25, 1978.

a) Not detected.

b) Yellow color.

c) Red color.

2) 養殖池の病魚ならびに斃死魚 1978 年 3 月 28 日, 4 月 25 日, 5 月 8 日に浜名湖産稚アユ養成中の養殖池 HS, TA, YA, KA で出荷時の病魚, または斃死魚を入手し, 菌検索を行なった。

ピブリオ菌の分離・同定法

稚アユを開腹, 脾臓を摘出して, BTB-teepol 平板寒天上で塗抹, 分離培養した。BERGEY の分類 (1974) に

よる分離・同定の手順は Fig. 1 に示した。

分離培地 BTB-teepol 寒天平板 (栄研) 上で白糖分解の黄色コロニー形成菌を選び出し, この黄色コロニーを TSI 培地 (栄研) に接種し, 24 時間後, 斜面部の黄変, 高層部の黄変, H_2S 産生 (—), ガス産生 (—) を確認, 次に耐塩性を調べ, 3% 食塩水加ペプトン水でのみ増殖する菌について, Voges-Proskauer 反応, アミノ酸のアルギニン分解性 (+), リジンおよびオルニチン分解

isolated from young Ayu caught in Hamana Lake

Arginine dihydrolase	Lysine decarboxylase	Ornithine decarboxylase	O/129 sensitivity	Voges- Proskauer	Sero type	Strain No.
+	—	—	+	+	C	H-16
+	—	—	+	+	A	H-17
+	—	—	+	+	C	H-18
+	—	—	+	+	C	H-19
..	—	—	+	+	B	H-22
—	—	—	+	+	C	H-35
..	—	—	+	—	B	H-52
+	—	—	+	+	B	H-54
+	—	—	+	+	B	H-60
+	—	—	+	+	C	H-65
+	—	—	+	—	B	H-71
+	—	—	+	+	B	H-75
+	—	—	+	+	B	H-81
+	—	—	+	—	B	H-84
+	—	—	+	+	C	H-85
+	—	—	+	—	B	H-87
+	—	—	+	—	B	H-88
			—			

Table 3. Biochemical characteristics and serotype of *V. anguillarum* isolated from young diseased Ayu from a stocking pond (May, 8, 1978)

Fish No.	BTB-teepol plase colonies ^{a)}	TSI with		3% NaCl gas	H ₂ S	Growth in peptone water with NaCl %				Arginine dihydro- lase	Lysine decarbo- xylase	Ornithine decarbo- xylase	O/129 sensi- tivity	Voges- Proskauer	Sero- type	Strain No.
		slant	butt			0	3	7	10							
1	≡	y ^{b)}	y	—	—	—	≡	—	—	+	—	—	+	—	A	H-101
2	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—	+	—	—	+	+	C	H-102
3	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—	+	—	—	+	—	A	H-103
4	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—				+	—	A	H-104
5	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—				+	—	A	H-105
6	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—				+	—	A	H-106
7	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—					—	A	H-107
8	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—					—	A	H-108
9	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—					—	A	H-109
10	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—					—	A	H-110
11	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—				+	—	A	H-111
12	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—					—	A	H-112
13	7	y	y	—	—	—	≡	—	—	+	—	—	+	—	A	H-113
14	56	y	y	—	—	—	≡	—	—					—	A	H-114
15	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—					—	A	H-115
16	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—					—	A	H-116
17	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—					—	A	H-117
18	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—	+	—	—	+	—	A	H-118
19	++	y	y	—	—	—	≡	—	—					—	A	H-119
20	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—					—	A	H-120
21	++	y	y	—	—	—	≡	—	—				+	—	A	H-121
22	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—					—	A	H-122
23	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—					—	A	H-123
24	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—					—	A	H-124
25	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—	+	—	—	+	—	A	H-125

^{a)} ++=100~500 colonies, ≡>500 colonies.

^{b)} Yellow color.

Fig. 1. Identification of *Vibrio anguillarum* from young Ayu in Hamana Lake.

性 (一) で、かつビブリオ菌増殖阻害剤 (*Vibrio static agent*) O/129* に感受性の菌を *V. anguillarum* と同定した。

分離菌の血清型の判定 抗 PT-24 (A 型) 血清, 抗 PT-514 (B 型) 血清は宮崎大学農学部, 北尾教授, 青木助教授, ならびに北里研究所, 合田教授より分与されたものを用いた。抗 PB-1 (C 型) 血清, 型不明の PB-6, PB-15 に対する抗血清はウサギを免疫して調製した。凝

集反応はスライドグラス法で行ない, 分離菌の血清型を判定した。

結果と考察

角建網採捕稚アユの保菌状況および分離同定した菌の血清型は Table 1 に総括した。また, 各々の生化学的性状, 血清型の詳細は Table 2, 3 に示した。

1978 年 3 月 25 日採捕のものでは 42 尾中, 保菌魚は 6 尾 (14%) であったが, その分離菌の血清型は, 古くから同定されていた PB-1 (C 型) と同型の菌が 4 株で最も多く, A, B 型菌は, それぞれ 1 株のみであった。

同じく, 1978 年 4 月 25 日のものでは, 調べた 39 尾中, 保菌魚は 11 尾で保菌率 (28%) が高く, 菌の血清型は B 型が最も多い。これに加えて, C 型が 2 株で A 型は認められなかった。これに対して, 1978 年 5 月 8 日に調べた蓄養中の角建採捕直後の稚アユでは, 重症 (瀕死状態) の病魚が多く, 25 尾中 25 尾 (100%) に保菌を認め, かつ, 脾臓中の菌数もきわめて多い。血清型は 1 株のみが C 型菌で, 残り 24 株は, すべて A 型菌であった。

一方, 養殖池で採取した出荷時の病魚と斃死魚の保菌を調べ, Table 4 に結果を示した。

養殖池 HS では 5 尾中 4 尾 (80%) に, TA では 6 尾中 2 尾 (33%), YA で 16 尾中 9 尾 (56%), KA では 7 尾中 5 尾 (71%) とそれぞれ高率に菌を分離した。これらの養殖池からの分離菌は, すべて A 型菌である点は注目すべきことである (Table 5)。

本研究の結果から, 浜名湖稚アユから分離されるビブリオ菌は, 採捕直後には血清型 B, C が多く, ある程度の飼育期間を経ると主体は A 型菌に移行することが認められた。

著者らが調べた浜名湖稚アユの *V. anguillarum* の血清型は A, B, C の 3 種類であった。しかし, その後

Table 4. Incidence of *V. anguillarum* in diseased- and dead-adult Ayu in culture ponds

Name of place	Date	No of fish examined	No. of fish <i>Vibrio</i> positive (%)	Serotype		
				A	B	C
HS	April, 25, 1978	2	1 (50)	1	0	0
	May, 8, 1978	3	3 (100)	3	0	0
TA	April, 25, 1978	6	2 (33)	2	0	0
YA	May, 8, 1978	16	9 (56)	9	0	0
KA	March, 28, 1978	7	5 (71)	5	0	0

* 2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine.

Table 5. Biochemical characteristics and serotype of *V. anguillarum* isolated from diseased and dead adult Ayu in culture ponds

Fish No.	BTB teepol plate colonies ^{a)}	TSI with slant	butt	3% gas	NaCl H ₂ S	Growth in peptone water with NaCl %				Agrinine dihydro-lase	Lysine decarbo-xylase	Ornithine decarbo-xylase	O/129 sensi-tivity	Voges-Proskauer	Sero-type	Strain No.
HS 2	10	y ^{b)}	y	—	—	—	≡	—	—	+	—	—	+	—	A	HS-2
TA 1	ND															
2	ND															
3	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—	+	—	—	+	—	A	TA-3
4	ND															
5	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—	+	—	—	+	—	A	TA-5
6	ND															
HS 29	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—	+	—	—	+	—	A	HS-29
32	20	y	y	—	—	—	≡	—	—	+	—	—	+	—	A	HS-32
33	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—	+	—	—	+	—	A	HS-33
YA 34	ND															
35	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—	+	—	—	+	—	A	YA-35
36	ND															
37	≡	y	y	—	—	—	≡	—	—	+	—	—	+	—	A	YA-37
38	ND															
39	ND															
40	ND															
41	ND															

^{a)} ND: Not detected, ≡=100~500 colonies, ≡≡>500 colonies.

^{b)} Yellow color.

A~F の 6 種類の血清型の存在が報告されており (KITAO *et al.*, 1983), さらに血清型が細分化されることも予想される。我々が分離した A, B, C 型菌の O 抗原リポ多糖体の糖組成は血清型と強い相関性のあることが明らかになった (久恒ら, 1981)。また, 青木らは A~F 型の *V. anguillarum* 菌体の膜構成蛋白が, それぞれの血清型に特異的に相違することを示した (AOKI *et al.*, 1981)。*V. anguillarum* の保菌率と血清型を調べることは, 本菌の感染経路の解明ならびに分類上, 重要であり, さらに菌体成分の化学構成の追求は予防, 診断, 新たなワクチン開発に必要と思われる。

謝 辞

本研究に当り, 貴重な御助言をいただいた東京大学名誉教授, 江草周三博士に厚く御礼申し上げます。また, 菌株と抗血清を分与していただいた宮崎大学農学部, 北尾忠利教授, 青木 宙助教授, ならびに北里研究所, 合田 郎教授に感謝いたします。試料採取ならびに研究に御援助いただいた静岡県水産試験場浜名湖分場長, 阿井敏夫, 元分場長, 野中 忠の両氏に深謝いたします。実験に御協力いただいた岩崎 緑, 斎藤仁子, 高木明美の各氏に感謝いたします。

文 献

- AOKI, T., T. KITAO, T. ITABASHI, Y. WADA and M. SAKAI (1981): Proteins and lipopolysaccharides in the membrane of *Vibrio anguillarum*. in *International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines*, S. Karger, Basel, pp. 225-232.
- BUCHANAN, R. E. and N. E. GIBBONS (1974): *Bergey's manual of determinative bacteriology* 8th ed., Williams & Wilkins, Co., Baltimore, pp. 340-345.
- 久恒和仁・井口毅裕・近藤誠一・稲熊 真・清水忠順・柳原保武・三淵一二 (1981): 浜名湖の稚アユから分離された *Vibrio anguillarum* のリポ多糖 (LPS). 日細菌誌, **36**, 351.
- KITAO, T., T. AOKI, M. FUKUDOME, K. KAWANO, Y. WADA and Y. MIZUNO (1983): Serotyping of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased freshwater fish in Japan. *J. Fish Dis.*, **6** (in press).
- MUROGA, T. and S. EGUSA (1967): *Vibrio anguillarum* from an endemic disease of ayu in Lake Hamana. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **33**, 636-640.