静岡県下のアユ養殖場におけるビブリオ病の 発生状況, 1984~1990*¹ —原因菌の血清型と薬剤感受性—

田中 眞*²・花田 博*³・吉川 昌之

(1993年1月7日受付)

Vibriosis of Ayu in Shizuoka Prefecture, from 1984 to 1990 —Serotype and Drug Sensitivity—

Makoto Tanaka*², Hiroshi Hanada*³ and Masayuki Yoshikawa

Hamanako Branch, Shizuoka Prefectural Fisheries Experimental Station,
Maisakacho 3550, Shizuoka, 431-02 Japan

(Received January 7, 1993)

Serotype and drug sensitivity were studied for vibriosis in ayu *Plecoglossus altivelis* farms in Shizuoka Prefecture from December 1984 to November 1990. Among 149 strains of *V. anguillarum* isolated from the diseased fish, 115 (77.2%) and 34 (22.8%) strains were classified to the serotype A (J-O-1) and C (J-O-3), respectively. Serotype C was isolated mostly from cultured ayu raised from seedlings of sea water origin. Fifty one percent of isolated serotype A were from ayu raised from freshwater seedlings while other 49% were from those from sea water origin. Serotype C isolates were found from December to May and the most frequently in February. On the other hand, serotype A appeared in January and dominated from June to September.

Drug resistant *V. anguillarum* was most frequently isolated from April to July. Incidence of drug resistant isolates were higher in serotype A than in serotype C.

Based on these results, the application of vaccination for ayu seedlings of sea water origin is also recommended. Development of a bivalent vaccine for both serotype A and C is needed.

アユ養殖においてビブリオ病は最も被害の大きな疾病である。本病の原因菌である *Vibrio anguillarum* に対しては1960年代後半から薬剤による治療が行われてきたが、その結果として1970年代から薬剤耐性菌が出現し、治療を困難にした(室賀ら, 1974; Aoki *et al.*, 1974)。

一方, *V. anguillarum* 感染症に対する予防免疫の研究が活発になされ, 1989年3月に日本の魚類ワクチンとして初めてのビブリオ病不活化ワクチンが実用化された。本ワクチンの効果は養殖場で確認され(田中, 1988), 現在琵琶湖産種苗を中心に普及している。

V. anguillarum には主な血清型として三つ報告されて

おり, それらを絵面ら(1980)はJ-O-1, J-O-2, J-O-3と, またKitao *et al.* (1983)はA, B, Cとそれぞれ名付けている。現在使用が認可されているワクチンはそのなかの一つA型(=J-O-1型)株に対する単価ワクチンである*⁴。静岡県では, 第1回目の種苗アユが11月末から翌年の2月までの間に海産種苗である浜名湖産を中心に, 第2回目の種苗アユが5月初旬から7月初旬までの間に琵琶湖産を中心に導入される。他県と比べると海産種苗の比率が高い特徴をもっている。海産種苗からはJ-O-1型, J-O-2型(=B型)およびJ-O-3型(=C型)の*V. anguillarum* が検出されることが報告されている(Muroga *et al.*, 1984)ことから, 海産種苗を用いて養殖を行った場合, B型およびC型によるビブリオ病が発生し, ワクチン効果が期待できない場合が推定される。

したがって, アユ養殖場, とくに海産種苗を用いてい

*¹ 静岡県水産試験場浜名湖分場業績第93号

*² 現在 静岡県水産試験場富士養鱒場

*³ 現在 静岡県栽培漁業センター

*⁴ パンフレット「水産用ワクチンの使用について」水産庁(1988)

る養殖場ではビブリオ病対策としてワクチン投与のみならず現状では薬剤投与も考慮しなければならない。すなわち、ワクチン効果を高めるために病魚から分離される *V. anguillarum* の血清型について調査し、その出現パターンを把握すること、また、薬剤投与効果をあげるために耐性菌の出現状況を正確に把握することが必要である。そこで、1984年から1990年にかけて静岡県下のアユ養殖場で発生したビブリオ病から分離した *V. anguillarum* の血清型と薬剤感受性を調査した。

材料および方法

供試魚の採集および *V. anguillarum* の分離方法

1984年12月から1990年11月の6年間に県下のアユ養殖業者より診断依頼のあった病魚および養殖場巡回時に採集した病魚を本調査に供試した。典型的なビブリオ病症状を示した病魚の腎臓組織片をTSA（トリプト・ソイ・アガー：栄研科学）培地およびBTBティーボール寒天培地に塗抹し、25℃で48時間培養し、細菌を分離した。

V. anguillarum の同定および薬剤感受性

分離菌について魚病診断指針（水産庁）の簡易鑑別図式による性状検査を行うとともに、水産庁配布の抗 *V. anguillarum* 家兎血清を用いて、A、B、Cの血清型の判定を行った。

同時に、現在アユ養殖場で使用が認められている主要な薬剤および以前使用が認められていた薬剤のうち、スルファモノメトキシシン（SMM）、エクテシン（スルファモノメトキシシン＋オルメトプリム、SMM＋OMP）、塩酸オ

キシテトラサイクリン（OTC）、ナリジクス酸（NA）、オキソリン酸（OA）の5種類の薬剤についてディスク法で感受性を調査した。なお、前3者の薬剤に対しては昭和薬品工業製の、後2者に対しては栄研化学製の薬剤感受性ディスクを供試した。

結 果

1. アユ養殖場でのビブリオ病の発生状況

1984年12月から1990年11月までの6年間に静岡県下のアユ養殖場でビブリオ病の発生時に魚から分離した *V. anguillarum* 149株について、分離年度別および分離月別にまとめTable 1およびFig. 1に示した。アユの養殖年度は前年の12月から当年の11月までとした。

Fig. 1. Monthly diagnostic test results of vibriosis of ayu between December 1984 and November 1990. □, Vibriosis with serotype A ■, Vibriosis with serotype C

Table 1. Serotype of *Vibrio anguillarum* strains isolated from cultured ayu in Shizuoka Prefecture from 1985 to 1990

Serotype of <i>V. anguillarum</i>	1985	1986	1987	1988	1989	1990	Total
Serotype A* ¹	14	15	9	12	50	15	115
(Freshwater)* ²	(6)	(7)	(7)	(5)	(30)	(4)	(59)
(Seawater)* ³	(8)	(8)	(2)	(7)	(20)	(11)	(56)
Serotype B* ¹	0	0	0	0	0	0	0
Serotype C* ¹	9	4	3	6	1	11	34
(Freshwater)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(1)
(Seawater)	(9)	(4)	(3)	(5)	(1)	(11)	(33)
Total	23	19	12	18	51	26	149

*¹ Serotype A=J-0-1, Serotype B=J-0-2, Serotype C=J-0-3.
*² Isolation from ayu of freshwater origin.
*³ Isolation from ayu of seawater origin.

1) 年度別発生状況

V. anguillarum の血清型別の出現状況を見ると、調査全体で A 型が 77%、C 型が 23% で、B 型の出現は認められなかった。しかし、年度により血清型の出現状況は異なり、1989 年のように C 型が 1 株で A 型が 50 株と圧倒的に A 型が多い年があった。

血清型と種苗の由来の関係をみると、C 型による vibrio 病は、1988 年に琵琶湖産種苗に発生した 1 回を除き、すべて浜名湖産あるいは駿河湾産などの海産種苗に発生した。この琵琶湖産種苗での C 型による vibrio 病の発生は、同一養魚場内の海産種苗に発生した C 型による vibrio 病が感染源であると推定された。一方、A 型によるものは、琵琶湖産などの淡水産種苗が 51% と海産種苗が 49% であった。また、淡水飼育期間が長くなるにつれて C 型によるものは減少し、成魚から分離したものはほとんど A 型であった。

2) 月別発生状況

vibrio 病は 12 月から 9 月までほぼ養殖の全期間を通して発生した。診断件数は 12 月から 2 月にかけて急激に増加し、2 月をピークに 9 月まで徐々に減少した。しかし、年により vibrio 病の発生時期にかなり偏りがみられた。

原因菌 *V. anguillarum* の血清型別の出現状況を見ると、12 月は C 型のみであったが、1 月には A 型も認められ、C 型の割合が 69% と低下した。その後、A 型の割合が月を追うごとに増加し、逆に C 型の割合は減少した。6 月になると C 型の発生はなくなり、C 型から A 型への移行がみられた。

2. *V. anguillarum* の薬剤感受性

1984 年 12 月から 1990 年 11 月までの間にアユの vibrio 病病魚から分離した *V. anguillarum* 149 株の薬剤感受性を試験した結果について、年度別、月別および血清型別にまとめ、Figs. 2~4 に示した。

1) 年度別の薬剤感受性の変化

耐性菌の出現状況を SMM についてみると、1985 年度が 9%、1986 年度が 32%、1987 年度は 75% と耐性化が進んだ。しかし、1988 年度には 28% と一転して出現率が減少した。その後は年により出現率が大きく変化した。エクトシンについてみると SMM とほぼ同様な耐性菌の出現パターンを示した。OA 耐性菌は 1985、'86 年度に約 10%、1988 年度には 20% 出現したが、その他の 3 年間は出現がみられなかった。NA は OA と同様な耐性菌出現パターンを示したが、OA より耐性菌の出現が多

Fig. 2. Annual drug sensitivity test results of *V. anguillarum* isolated from pond-cultured diseased ayu in Shizuoka Prefecture from 1985 to 1990.

く、1987 年度と 1988 年度にも耐性菌がみられた。概して、SMM およびエクトシンは OA と NA より耐性菌の出現割合が多く、OTC に対する耐性菌の出現頻度は少なかった。

2) 月別の薬剤感受性の変化

耐性菌の出現状況について月別にみると、SMM に対しては 12 月に分離された株はすべて感受性を示した。1 月になると耐性株が出現しその割合は 9% となった。2 月には耐性菌の出現割合が 15% と増加し、その増加傾向は 4~5 月まで続き最高 71% となった。しかし、6 月以降減少傾向を示した。エクトシンは 1 か月遅れて 2 月

Fig. 3. Monthly drug sensitivity test results of *V. anguillarum* isolated from pond-cultured diseased ayu in Shizuoka Prefecture from 1985 to 1990.

から耐性菌が出現し、その後は SMM と同様の傾向を示した。OA は 4 月から耐性菌が出現し、その出現率は 4 月が 21%、5 月には 35% と増加したが、6 月には 17% と減少し、その後出現はなく、SMM およびエクトシンより耐性化率はかなり低かった。NA は OA とほぼ同様の傾向を示した。

3) 血清型別と薬剤感受性

C 型の菌株には OA 耐性菌も NA 耐性菌も認められなかったが、A 型の菌株では OA で 6%、NA で 11% 耐性

Fig. 4. Serotype and drug sensitivity of *V. anguillarum* isolated from pond-cultured diseased ayu in Shizuoka Prefecture.

■, Resistance; ▨, middle sensitivity; ▩, low sensitivity; □, high sensitivity

菌が出現した。SMM とエクトシンに対する、耐性株は A 型ではそれぞれ 52% と 46% であったが、C 型では 10% と 3% と少なく、血清型の違いにより耐性株の出現割合が異なっていた。

考 察

静岡県ではビブリオ病の発生は種苗導入直後の 12 月からみられる。12 月の発生件数は極めて少ないが、1 月に入ると増加、2 月にはピークに達し、3 月以降は減少する。Muroga *et al.* (1984) は 12 月から 3 月までの浜名湖産種苗の *V. anguillarum* 保有率を調査し、月を追うごとに保菌率が増加し、この保菌により淡水養殖場へ *V. anguillarum* が持ち込まれることを推定している。この時期の種苗の中心が浜名湖産であることから、*V. anguillarum* は種苗と共に養殖場へ持ち込まれ、これが感染源となっているものと推定される。また、3 月以降ビブリオ病の診断件数は減少するが、これは第 1 回目の種苗導入の中心が 12 月から 2 月までで、3 月以降は種苗の導入が少なくなることによるものと考えられる。

城 (1981) は徳島県下の養殖アユ病魚より分離した *V. anguillarum* の血清型を調査し、A 型が 84.0%、B 型が 6.6%、C 型が 9.4% であったと報告している。今回調査した静岡県での血清型別の出現頻度を見ると、A 型が 77%、B 型が 0%、C 型が 23% であり、徳島県と比べるとここ数年間は B 型の発生のないこと、および C 型の発生の多いことが特徴的であった。C 型の発生割合が多いのは、徳島県が淡水由来種苗である琵琶湖産に多くを依存しているのに対し、静岡県は浜名湖産や駿河湾産などの海産由来種苗の比率が高いことに起因していると考えられる。

月別に血清型の出現状況を見ると、12 月から 2 月に発

生するビブリオ病の血清型はC型が中心であったが、月を経るごとにC型の割合は減少した。C型の減少に伴い、A型が増加し、6月以降は完全にA型のみになった。絵面ら(1980)は養殖魚のビブリオ病から分離された*V. anguillarum*の血清型を調査し、J-O-3型(=C型)の82%は海水飼育魚由来で、J-O-1型(=A型)の85%は淡水飼育魚由来であることを報告している。C型のビブリオ病の発生の多い12月から3月までの種苗は浜名湖産、駿河湾産といった海産種苗が中心で、A型のビブリオ病の発生の多い6月以降は琵琶湖産の淡水種苗が中心となることから、種苗の由来により発生するビブリオ病の血清型が異なったものと考えられる。

また、琵琶湖産種苗からは特別な場合を除きC型によるビブリオ病の発生は知られていないものの、海産種苗からはA型によるビブリオ病が発生することから、海産種苗にもワクチン投与が必要と考える。

一方、耐性菌の出現状況については、その出現率は年度により大きく異なり、一定の傾向は見られなかった。しかし、一つの薬剤に耐性菌の出現率が多い年は他の薬剤にも耐性菌の出現が多い傾向が認められた。

耐性菌の月別出現状況についてみると、12月には耐性菌の出現はなく、1月に入ると薬剤により異なるが耐性菌が出現し始め、5月まで耐性菌の出現率は増加し、その後、減少する傾向を示した。青木ら(1980)は河川で採捕された化学療法剤に触れていないと思われる天然のアユの腸管からは耐性菌が検出されないこと、および、化学療法剤の使用頻度の高い養殖場ほど薬剤耐性菌の出現率が高いことを報告し、養殖場で薬剤が使用されることによりアユ腸管内で耐性菌が選択され増加することを推察している。今回の結果はアユ天然種苗に対する薬剤の繰り返し使用により耐性菌の出現がうながされたものと推定される。この耐性化機構についてはRプラスミドの関与が報告されているが(Aoki *et al.*, 1974), 今回はRプラスミドについては試験していない。また、6月以降耐性菌の出現率が減少したが、これは5月からの再度の天然種苗の導入により、新たに種苗と共に持ち込まれた薬剤感受性の*V. anguillarum*によってビブリオ病が発生したためと推察される。

*V. anguillarum*の血清型別と薬剤耐性菌の出現状況を見ると、C型よりA型のほうが耐性株の出現率が多い傾向が認められた。三淵ら(1983)も同様の傾向を認めている。また、海産種苗の導入直後の病魚からはA型およびC型の*V. anguillarum*が分離されたが、成魚ではA型が圧倒的に多くC型はまれであった。淡水産アユ病魚

から分離される*V. anguillarum*は、感染源が他の池にあった1回のC型の発生を除き、すべてA型であった。このように淡水飼育が長期間にわたった場合、発生するビブリオ病は殆どがA型によるものであったが、なぜC型株が消失しA型株が養殖池で永く生残するかは明かにし得なかった。

以上のように、A型の*V. anguillarum*によるビブリオ病は淡水由来種苗だけでなく、海産種苗でも発生し、さらに成魚では種苗の由来にかかわらず発生することから、淡水由来種苗に限らず、海産種苗にもワクチン処理を実施しておくことが必要と考える。

また、静岡県ではC型の*V. anguillarum*によるビブリオ病の発生割合が多いことから、ビブリオ病ワクチンが効果を示さない場合が推定される。C型の*V. anguillarum*によるビブリオ病は成魚で発生することが少ないこと、および耐性菌の出現頻度が低いことから、投薬で対処していくことも可能ではあるが、今後はA+Cの2価ワクチンの開発が望まれる。

謝 辞

本研究の遂行にあたり御協力いただいた岩村宙史氏、塚本恵則氏におよび Sataporn Direkbusarakom 氏に感謝する。また、本稿を御校閲いただいた北海道大学水産学部吉水守博士に深謝する。

文 献

- Aoki, T., S. Egusa and T. Arai (1974): Detection of R factors in naturally occurring *Vibrio anguillarum* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **6**, 534-538.
- 青木 宙・城 泰彦・江草周三(1980): アユ養殖場における薬剤耐性菌増加について、魚病研究, **15**, 1-6.
- 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**, 167-179.
- 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**, 175-181.
- 城 泰彦(1981): アユの *Vibrio anguillarum* 感染症とその予防免疫、四国医学雑誌, **37**, 82-110.
- 三淵一二・高瀬善行・柳原保武・清水忠順(1983): 浜名湖稚アユのビブリオ病の疫学に関する研究-II、魚病研究, **18**, 27-30.
- 室賀清邦・属 博夫・杉山瑛之・田原恒男・城 泰彦(1974): 1973年春から夏にかけて徳島および岡山県下に流行したアユのビブリオ病の原因菌について、魚病研究, **8**, 147-151.

Muroga, K., H. Yamanoi, Y. Hironaka, S. Yamamoto, M. Tatani, Y. Jo, S. Takahashi and H. Hanada (1984): Detection of *Vibrio anguillarum* wild fingerling of Ayu *Plecoglossus altivelis*, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**, 591–

596.

田中 眞 (1988): アユのビブリオ病に対する低濃度長時間法による浸漬ワクチンの実用化, 静岡水試研報, **23**, 49–57.