養殖ブリ“黄疸症”の原因

反町 稔^{*1}・前野 幸男^{*1}・中島 員洋^{*1}・井上 潔^{*2}・乾 靖夫^{*1}

(1993年5月11日受付)

Causative Agent of Jaundice of Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*

Minoru Sorimachi^{*1}, Yukio Maeno^{*1}, Kazuhiro Nakajima^{*1}, Kiyoshi Inouye^{*2}
and Yasuo Inui^{*1}

^{*1} National Research Institute of Aquaculture, Nansei, Mie 516-01, Japan

^{*2} Inland Station, National Research Institute of Aquaculture, Tamaki, Mie 519-04, Japan

(Received May 11, 1993)

Since 1980, a disease called “Jaundice”, which is characterized by a yellow coloration of the skin and muscle, has been known to cause varying mortalities of 5–20 percent in cultured yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, in Japan. Hematological and bacteriological studies were carried out to clarify the cause of the disease.

The diseased fish exhibited low hematocrit values and high plasma bilirubin concentrations. Thin rod-shaped organisms stained with Giemsa were found on the blood smear preparations of all the diseased fish examined. Among 8 culture media examined, only L-15 medium supplemented with 10% fetal calf serum and nutrient broth gave successful result to culture the organisms, the former yielding better growth. On electron microscopy the organism is a single cell, having a cell wall and an inner membrane but no nuclear membrane. Thus, the organism is considered as a bacterium. Morphological and culture characteristics together with its pathogenicity indicate that the bacterium is different from any known species of fish pathogenic bacteria.

Inoculation of the isolated bacteria to yellowtail produced high mortalities and symptoms similar to those observed in spontaneous jaundice yellowtail, and the same bacteria were reisolated from all the dead fish in the infection experiment. From these results, it is concluded that the jaundice of yellowtail is an infection caused by an unknown pathogenic bacteria.

近年、九州、四国、紀伊半島沿岸などの西日本各地のブリ養殖場において“黄疸症”と呼ばれ、外観的に体色の黄変を特徴とする疾病が発生している。本疾病は、主として2年魚以上の大型魚が罹病することから、一旦発生すると被害も大きく、産業的に大きな問題となっている。原因に関しては、伝染性疾患の可能性、投与飼料や飼育環境などとの関連、あるいは肝臓内の脂質過酸化の関与 (Sakai *et al.*, 1989) など示唆されたが、いずれも原因解明までには至らなかった。本研究では、“黄疸症”の原因解明を目的として病魚の血液、内臓などについて細菌学的検討を行ったところ、血液中に細長い桿状微生物が存在し、培養したその微生物をブリに接種すると自

然発病魚と同様の黄疸症状を呈して致死させることを確認したので、その結果を報告する。

材料と方法

病原体検査のための供試魚

1991年10月に香川県下の養魚場で採集した2年魚のブリ, *Seriola quinqueradiata*, 病魚10尾(体重 2,625～3,575 g)と、対照として別の養魚場から得られた外観的に正常な2年魚5尾(体重 2,470～3,265 g)を用いた。病魚はいずれも顕著に体色が黄色化するいわゆる“黄疸症”を呈し、明らかに衰弱していた。正常魚にはそれらの症状はまったく認められなかった。供試魚は採血、体長・体重の測定、外部および内部の症状の観察を行った後、細菌検査および臓器重量の測定に供した。なお、病

^{*1} 養殖研究所

^{*2} 養殖研究所玉城庁舎

魚および対照魚採集時の水温は 24°C であった。

採血および血液検査

供試魚は取りあげ後、それぞれ直ちに心臓から無菌的に採血し、一部をヘマトクリット値の測定および塗抹標本の作製のために用い、残りの血液は細菌検査材料として冷蔵した。血液塗抹標本はメタノール固定後ギムザ染色を施し、細菌の有無を観察した。

細菌の培養

細菌培養には、一般の魚病細菌の培養を目的として普通ブイヨン（ニッスイ）、1.5% NaCl 加 BHI 寒天培地（ニッスイ）と未知の病原体の可能性を考えて変法バツラー寒天培地（ニッスイ）、牛胎児血清（FCS, MAB）あるいは正常なブリから得た血清をそれぞれ 10% 添加したフレッチャー培地およびコルトフ培地、FCS を 10% 添加した L-15 培地（Flow）（以下 L-15₁₀ 略す）の 8 種類を用いた。BHI 寒天培地には腎臓、バツラー寒天培地には脾臓材料をそれぞれ直接塗抹し、残る 6 種類の液体培地には無菌的に採血した血液を 0.2 ml ずつ接種し、いずれも 25°C で培養して 2 週間観察した。

走査電顕および透過電顕観察

病魚 3 尾について血液の一部を位相差顕微鏡で観察し、前後に緩やかな直線運動あるいは反転運動を示す細長い桿状の微生物の存在を確認した後、血液を直ちに Karnovsky 液で固定した。0.2 M カゴジル酸緩衝液で 3 回洗浄後脱水し、常法により臨界点乾燥および金蒸着を行って、走査型電子顕微鏡 JSM-T220A（日本電子）で観察した。同様に、血液を Karnovsky 液と 2% オスミウム酸液で二重固定し、エタノール系列で脱水後 Spurr Resin (TABB) に包埋して超薄切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色を施して透過型電子顕微鏡 JEM 100CX（日本電子）で観察した。なお、後述の L-15₁₀ 培地で培養した微生物についても同様に処理して走査電顕で観察した。

感染実験の供試魚と方法

供試魚には、市販のクランブルあるいはペレットを投与してモジャコ期から陸上水槽で 5 ヶ月間飼育した平均体重 165 g のブリ幼魚を用い、感染実験には L-15₁₀ 培地で 25°C で 7 日間培養した 2 継代目の分離株を用いた。

試験区は桿状微生物を含む培養液 0.2 ml を尾柄部血管内に接種した区、腹腔内に接種した区、培養液を 3,000 倍に希釈した海水に 60 分間浸漬した区および対照として L-15₁₀ 培地 0.2 ml を血管内に接種した区の計 4 区を設けた。供試尾数は、血管内および腹腔内接種区は 5 尾、

浸漬区と対照区は 3 尾とした。血管内および腹腔内接種区における接種量はおよそ 10⁶ cells/尾、浸漬区における懸濁液の濃度は 10³ cells/ml であった。飼育水温は 24°C に保ち、試験期間中は市販のペレットを 1 日 2 回投与して 16 日間観察した。

期間中は摂餌状況、症状ならびに死亡を観察するとともに、瀕死魚については無菌的に採血した血液を、死亡魚については剖検後心臓を切開して白金耳によって採取した血液を、L-15₁₀ 培地に接種して接種微生物の再分離を行い、さらに自然発病魚の場合と同様に臓器重量の測定と血液検査を行った。

実験感染魚の血液検査

ヘマトクリット値は無菌的に採血した血液を毛細管にとり遠心分離して、血中ヘモグロビン量はシアンメトヘモグロビン法で測定した。血漿ビリルビン量は、6,000 rpm で 1 分間遠心分離して得られた血漿を、スポットケム SP-440（京都第一科学）を用いてジアゾ法で測定した。

結 果

“黄疸症”ブリの内臓重量比とヘマトクリット値

養魚場から得られたブリ病魚 10 尾と正常魚 5 尾の肝臓および脾臓の体重に対する重量比、ならびにヘマトクリット値を Table 1 に示した。病魚の肝臓および脾臓重量比は、正常魚のそれと比べてそれぞれ約 3 倍および約 6 倍に増加しており、肝臓および脾臓がいずれも著しく腫大していた。ヘマトクリット値は正常魚が 50% 前後であったのに対して病魚は 20% 前後と低かった。

血液ギムザ染色標本の観察

検査した病魚 10 尾すべての血液塗抹標本において、赤血球およびリンパ球の周辺にギムザ染色液に染まる長さ 4~6 μm の細長い桿状微生物が多数認められた (Fig. 1)。一方、正常魚の塗抹標本にはそれらの微生物はまったく観察されなかった。

細菌の培養

各種培地による細菌培養の結果を Table 2 に示した。正常魚 5 尾からはいずれの培地においても細菌の増殖はまったくみられなかった。病魚からは、L-15₁₀ 培地において 10 尾中 8 尾、普通ブイヨンでは 6 尾に緩やかな前後運動をする細長い桿状微生物の増殖が認められた。L-15₁₀ 培地で培養した残りの 2 尾の血液材料については、当該微生物とは明らかに異なる運動性短桿菌の増殖が活発で、上記の桿状微生物の存在は確認できなかった。普通ブイヨンでは L-15₁₀ 培地に比べると桿状微生物の増

Table 1. Relative liver and spleen weights and hematocrit values of jaundice and normal cultured yellowtail

	No. of fish examined	LW/BW* ¹ (%)	SW/BW* ² (%)	Hematocrit value (%)
Jaundice	10	3.33 (2.39–4.81)* ³	1.00 (0.55–1.85)	19.4 (13.0–25.0)
Normal	5	1.11 (1.03–1.25)	0.17 (0.13–0.20)	52.8 (43.8–59.0)

*¹ Liver weight/Body weight $\times 100$; *² Spleen weight/Body weight $\times 100$; *³ Numerals in parentheses indicate the range.

Table 2. Growth of the rod-shaped organisms in several media

Medium	Isolation site	No. of positive growth	
		Normal (/5)	Jaundice (/10)
BHI Agar (2% NaCl)	Kidney	0	0
Butzler Agar, Modified	Spleen	0	0
Fletcher medium + 10% FCS* ¹	Blood	0	0
Fletcher medium + 10% YS* ²	Blood	0	0
Korthof medium + 10% FCS	Blood	0	0
Korthof medium + 10% YS	Blood	0	0
Nutrient broth	Blood	0	6
L-15 medium + 10% FCS	Blood	0	8

*¹ FCS: Fetal calf serum; *² YS: Yellowtail serum.

殖は少なく、運動活性もはるかに弱かった。BHI 寒天培地、バツラー寒天培地、フレッチャー培地、コルトフ培地では細菌の増殖は認められなかった。

走査電顕観察

自然発病魚の血液標本では、細長い桿状微生物が赤血球表面に付着するような形で、多いものでは一つの赤血球に十数個体観察された (Fig.2)。また、この微生物は血漿中にも認められた (Fig.3)。L-15₁₀ 培地で培養した微生物は病魚血液中に観察されたものと形態学的にきわめてよく類似し、長さが4~6 μm 、幅が0.3 μm 程度であった。

透過電顕観察

透過電顕で観察すると、走査電顕でみられた微生物は赤血球周辺に付着するようにして多数観察されたが、赤血球内に穿入している像は認められなかった (Fig. 4)。この微生物は単細胞で明瞭な細胞壁を有し、核膜は認められなかった。また、鞭毛や線毛などは認められず、屈曲などもみられなかった (Fig. 5)。

感染実験

実験感染魚の死亡状況を Fig. 6 に示した。血管内接種区の魚は接種3日後にはほとんど摂餌しなくなり、次第に体色が黒化するとともに動きが緩慢となって5日から6日後にはすべての供試魚が死亡した。腹腔内接種区においても同様の経過をたどり、6日後までに80%が死亡

したが、残る1尾は次第に体色、摂餌ともに回復し生残した。浸漬区では10日過ぎに1尾の摂餌が鈍くなり、体色が黒化するとともに衰弱して13日後に死亡したが、他の魚には異常は観察されなかった。期間中対照区の魚には異常は認められず、摂餌も良好であった。すべての瀕死魚および死亡魚の血液から、接種した桿状微生物が再分離された。

実験感染魚の症状

感染・発病した瀕死魚および死亡魚では、外観的には背部の黒化、腹部の黄色化、口吻部と眼球周辺および体側筋の黄色化が顕著に認められた。剖検すると鰓は褪色もしくは茶褐色に変色して貧血症状を呈しており、脾臓は著しく腫大・脆弱化し、肝臓も腫大し暗赤色を呈していた。これらの症状は血管内接種区、腹腔内接種区、浸漬区のいずれの発病魚にも観察された。

実験感染魚の内臓重量比

感染実験における瀕死および死亡魚と対照魚の体重に対する肝臓および脾臓重量比を Table 3 に示した。発病魚は対照魚と比べて肝臓重量比が約2倍、脾臓重量比が10~20倍に増加していた。

実験感染魚の血液性状

感染実験における瀕死魚のヘマトクリット値、血中のヘモグロビン量および血漿中の総ビリルビン量の測定結

- Fig. 1.** Light micrograph of blood smear of jaundice yellowtail. Long rod-shaped organisms stained with Giemsa are observed around erythrocytes and lymphocytes. Bar=10 μ m.
- Fig. 2.** Scanning electron micrograph of a erythrocyte of jaundice yellowtail. Long rod-shaped organisms adhering to the erythrocyte are observed. Bar=1 μ m.
- Fig. 3.** Scanning electron micrograph. Long rod-shaped organisms are observed in the blood plasma. Bar=1 μ m.
- Fig. 4.** Transmission electron micrograph of erythrocytes of jaundice yellowtail. Long rod-shaped organisms are observed around erythrocytes. Bar=2 μ m.
- Fig. 5.** Transmission electron micrograph of the long rod-shaped organism. The organism is a single cell, has a cell wall but no nuclear membrane. Bar=0.2 μ m.

果を Table 4 に示した。実験開始時および終了時の対照魚のヘマトクリット値は 49.2~59.1% であったが、瀕死魚では 3.1~18.2% と著しく減少し、血中ヘモグロビン量も対照魚が 10.0~15.0 g/dl であるのに対して、0.7~2.9 g/dl と著しく低下した。また、血漿中の総ビリルビン量は、対照魚がいずれも検出限界の 0.2 mg/dl 以下であったのに対して、瀕死魚では 1.0~5.8 mg/dl と急激な上昇が認められた。

考 察

ブリの“黄疸症”は、1980年代に入って各地のブリ養殖場で発生が報告されるようになり、80年代後半には産業的にも被害が増大し、大きな問題となった。本病は周年発生し、1年魚よりも2年魚以上の大型魚に多くみられ、7月、8月の水温の上昇期に発生が増大し、9月をピークとして水温の下降にともない徐々に終息することが知られている。

本病の原因に関しては、伝染性疾病の可能性や投与餌

Fig. 6. Cumulative mortality of yellowtail experimentally infected with the bacteria isolated from jaundice yellowtail.

●: Intravascular infection, ▲: Intraperitoneal infection, ■: Bath infection, ○: Control.

Table 3. Relative liver and spleen weights of yellowtail experimentally infected with the isolated bacteria

	No. of fish examined	LW/BW ^{*1} (%)	SW/BW ^{*2} (%)
Control			
Initial	5	0.66 (0.58–0.75) ^{*3}	0.08 (0.06–0.10)
Final	3	1.01 (0.94–1.09)	0.05 (0.04–0.06)
Infected			
Intravascular	5	2.03 (1.50–2.63)	1.33 (0.80–1.57)
Intraperitoneal	4	1.56 (1.42–1.69)	1.56 (1.11–1.90)
Bath	1	1.89	1.02

^{*1} Liver weight/Body weight × 100; ^{*2} Spleen weight/Body weight × 100; ^{*3} Numerals in parentheses indicate the range.

Table 4. Hematological characteristics of yellowtail experimentally infected with the isolated bacteria

	No. of fish examined	Hematocrit value (%)	Hemoglobin (g/dl)	Bilirubin (mg/dl)
Control				
Initial	5	53.5 (49.2–59.1) ^{*1}	11.7 (10.0–13.1)	< 0.2 (< 0.2)
Final	3	53.9 (49.6–57.0)	13.4 (11.9–15.0)	< 0.2 (< 0.2)
Infected				
Intravascular	3	8.0 (3.2–11.6)	2.7 (2.6– 2.9)	4.1 (1.4–5.8)
Intraperitoneal	4	6.6 (3.1– 9.6)	1.8 (0.7– 2.6)	2.3 (1.0–3.4)
Bath	1	18.2	NT ^{*2}	NT

^{*1} Numerals in parentheses indicate the range; ^{*2} Not tested.

料との関連などが示唆され、自然発病魚に関する病理学的所見の記載はあるが(和田ら, 1989), 原因の解明には至らなかった。一方、養殖現場においては“黄疸症”は発生域が徐々に伝播・拡大していくこと、マクロライド系抗生物質の投与効果が認められることなどから伝染性疾病の可能性が強く疑われていた。

本研究において、供試した病魚の血液を位相差顕微鏡で観察すると、緩やかに前後運動する細長い桿状微生物

が観察され、血液の塗抹標本ではギムザ染色液に染まる桿状微生物がすべての個体に観察された。一方、正常魚の血液中にはこれらの微生物はまったく認められなかった。

当該微生物の培養には、その形態から *Campylobacter* や *Leptospira* の可能性を考えて、変法バツラー寒天培地、FCS あるいはブリ血清を 10% 添加したフレッチャー培地およびコルトフ培地を用いたが、これらの培地では細

菌の増殖はまったくみられなかった。緩やかな前後運動あるいは反転運動を示す桿状微生物の発育が認められたのは、普通ブイヨンおよび L-15₁₀ 培地のみであった。しかし、普通ブイヨンでの増殖および運動活性は L-15₁₀ 培地に比べると著しく低いものであった。

病魚血液および L-15₁₀ 培地で培養した微生物を透過電顕で観察すると、この微生物は単細胞であり、明瞭な細胞壁を有し核膜がないことから細菌の一種と考えられた。しかし、本菌は運動性を有するにもかかわらず走査電顕および透過電顕による観察では、菌体には鞭毛や線毛などは認められず、*Spirochaeta* や *Leptospira* の特徴であるらせん状構造もみられなかった。本菌は特徴的な運動を有する長い桿状細菌であること、一般の魚病細菌と比べて培養が著しく困難なことなどから考えて、既報の魚病細菌とはまったく異なる新しい細菌と考えられる。現状では、本菌は寒天を添加した培地ではまったく増殖せず、L-15₁₀ 培地における継代は可能であるものの継代とともに溶血活性が消失するなど、安定的な培養手法は確立されておらず、分類学的位置は明らかではない。

本菌を正常なブリに接種すると、血管内、腹腔内接種、浸漬のいずれの方法によっても感染・発病し、自然発病の“黄疸症”と同様の症状を再現して致死させた。すなわち、実験感染魚には急激なヘマトクリット値と血中ヘモグロビン量の低下および血漿ビリルビン量の増加が認められ、病魚に認められた強度の貧血は赤血球の破壊つまり溶血による貧血であることが強く示唆された。また、すべての発病魚の血液から先に述べた特異な形態と

運動をする接種菌が再分離されたことから、本菌の感染によって養殖ブリに“黄疸症”が引き起こされることが明らかとなった。

以上のことから、養殖ブリにみられる“黄疸症”は血液中に認められた長桿菌に起因し、溶血性の黄疸である可能性が強く示唆された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、貴重な情報と資料の提供ならびに病魚の採集に御協力くださった香川県水産試験場の松本紀男主席研究員ならびに長野泰三研究員、三重、長崎、鹿児島、愛媛、和歌山をはじめとする各県水産試験場、漁業協同組合の職員各位および全国漁業協同組合連合会に感謝する。

なお、本研究の一部は農林水産省 Preceded Research Program（プロジェクト研究調整費による研究 PRP92-10-1）によって行われた。

文 献

- Sakai, T., H. Murata, M. Endo, K. Yamauchi, N. Tabata and M. Fukudome (1989): 2-Thioburbituric acid values and contents of α -tocopherol and bile pigment in the liver and muscle of jaundiced yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1739-1740.
- 和田新平・畑井喜司雄・窪田三郎 (1989): 体色黄化を特徴とする養殖ブリの光学顕微鏡所見。魚病研究, **24**, 211-218.