シュードモナス属細菌によるアユの細菌性 出血性腹水病

若林久嗣^{*1}・沢田健蔵^{*2}・二宮浩司^{*3}・
西森栄太^{*1}

(^{*1} 東京大学大学院農学生命科学研究科, ^{*2} 徳島県試験場,

^{*3} 滋賀県水産試験場)

(1996年8月1日受付)

Bacterial Hemorrhagic Ascites of Ayu Caused by *Pseudomonas* sp.

Hisatsugu Wakabayashi^{*1}, Kenzo Sawada^{*2},
Kouji Ninomiya^{*3} and Eita Nishimori^{*1}

^{*1} Graduate School of Agricultural and Life Sciences,
University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

^{*2} Tokushima Prefectural Fisheries Experimental Station,
Hiwasa, Tokushima 779-23, Japan

^{*3} Shiga Prefectural Fisheries Experimental Station,
Hikone, Shiga 522, Japan

(Received August 1, 1996)

A new bacterial disease, causing mass mortalities among pond-cultured ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Shiga and Tokushima prefectures, was studied. Bloody ascites appeared to be the most characteristic sign of the disease. The causative organism was similar to *Pseudomonas putida*, but it did not produce fluorescent pigment and reduced nitrate to nitrite. Most of the isolates showed the API 20NE profile number of 1-140-457. An antiserum against the causative organism did not react with *Ps. putida* ATCC-12633^T.

Key words: ayu, *Plecoglossus altivelis*, *Pseudomonas*, *Ps. putida*, bacterial hemorrhagic ascites

最近数年間のアユ (*Plecoglossus altivelis*) の疾病動向をアユ生産県の水産試験場などの診断記録でみるとシュードモナス属細菌の感染症が年々増加しており、冷水病と首位を争うまでになっている。そこで、本病の特徴と原因菌の性状を明らかにすることを目的として、1994～1995年に滋賀、徳島の両県で発生した疾病と分離菌株について調査した。

発病状況と症状: 本病は、種苗を養成池に入れてから10日以降に発生する場合が多く、また、冷水病対策として、種苗を加温処理したり投薬したりした後に本病が発生した例もあった。

主な外見症状として、眼球の軽い出血、肛門の拡張・出血のほか、頭部や下顎の発赤・出血や鰓の軽い貧血が観察された。また、解剖所見としては、血液の混じった腹水の貯溜、腹腔壁や内臓の点状出血、直腸部の内出血などが観察された。とくに血液混じりの腹水の貯溜は殆んど全ての病魚に観察され、最も特徴的な症状であった (Fig. 1)。

原因菌の分離培養: 原因菌は病魚の腎臓などの内臓試料をトリプトソーヤ培地などの普通培地の寒天平板に接種し、20～25℃で24～48時間培養することによって無色の円形コロニーとして容易に分離されたほか、TY培地やサイトファーガ培地など冷水病菌用の分離培地によっても分離された。多くの場合は純粋培養状に分離されたが、*Cytophaga psychrophila* や *Aeromonas hydrophila* が同時に分離された場合もあった。

形態: 1994年に滋賀県で病アユから分離された菌株 FPC940 と FPC941、および同年徳島県で病アユから分離された菌株 FPC951 と FPC952 について観察した。供試4菌株は、いずれも運動をするグラム陰性桿菌で、鞭毛染色により極毛が観察された。また、1株について電顕観察したところ、複極毛であった (Fig. 2)。

生理学的性状: 上記4菌株のトリプトソーヤ液体培地 (日水) における発育温度を5℃間隔で調べたところ、いずれの菌株も24時間培養では15～30℃、48時間培養では10～30℃で、発育が肉眼的に認められた。発育塩分濃度をベプトン (Difco) 水を基礎培地として食塩1%間隔で調べたところ、いずれの菌株も24時間培養では0～2%、48時間培養では0～5%で、発育が肉眼的に認められた。また、発育pHをトリプトソーヤ液体培地のpHをHClとNaOHで調整して調べたところ、24時間培養でも48時間培養でもpH5～9で、発育が肉眼的に認められた。

生化学的性状: 常法に従って試験を行い、25℃で24ないし48時間培養後に判定した。また、非腸内細菌科細

Fig. 1. Ayu infected with *Pseudomonas* sp., showing bloody ascites.

Fig. 2. Electron micrograph of *Pseudomonas* sp. strain FPC941.

菌同定キット API20NE システム (BioMerieux) を用いて簡易検査を行った。

供試4菌株の試験の結果は、チトクローム・オキシダーゼ産生 (+), カタラーゼ産生 (+), OF 試験 (O), ピオシアニン産生 (-), フルオレシシン産生 (-), ゼラチン加水分解 (-), 硝酸塩還元 (+) であった。また, API20NE については, 上記4菌株のほかに, 1995年に徳島県で病アユから分離された13菌株および1995年に滋賀県で病アユから分離された20菌株について試験したところ, 上記4菌株と1995年徳島県株13菌株はすべて同じ数値プロファイル1-140-457を示したが, 滋賀県株の数値プロファイルは, 1-140-457が9菌株, 1-142-457が5菌株, 1-143-457, 1-144-457, 1-146-457, 1-140-455, 0-157-755, 2-674-305, がそれぞれ1菌株ずつであった。(追記: 1996年1~6月に滋賀県で分離された11菌株の数値プロファイルはすべて1-140-457であった)

G+C 含量: 菌株 FPC940 と FPC951 の DNA の G+C 含量を熱変性法で測定したところ, それぞれ 63.2% と 62.8% であった。

血清学的性状: 菌株 FPC940 と FPC951 それぞれのホルマリン不活化菌体に対する家兎抗血清を常法により作製した。これら2つの抗血清は, 1994年分離菌株の FPC940, FPC941, FPC951, FPC952 のいずれに対しても同じ凝集素価をしめたが, *Pseudomonas putida* の標準菌株 ATCC12633 とは反応しなかった。1995年に滋賀県で病アユから分離された前記20菌株について凝集反応を試みたところ, API20NE の数値プロファイルが 0-157-755 と 2-264-305 であった2つの菌株はいずれの抗血清とも反応しなかったが, その他の菌株はいずれの抗血清とも反応した。

Fig. 3. Challenge of ayu weighing 10-20 g with *Pseudomonas* sp. by i.p. injection.

感染実験: ①前記1994年分離菌株4株の病原性を調べた。各菌株について3尾ずつのアユ (1.8~2.0 g) を用い, 生理食塩水に懸濁した供試菌株を約 10^4 ずつ腹腔内注射し, 水温約 20°C の水槽に収容した。対照区のアユには生理食塩水を腹腔内注射した。どの菌株においても2日以内に全ての供試魚が死亡し, いずれの死亡魚からも供試菌株が再分離された。

②1995年に滋賀県で分離された1菌株について, 菌濃度を変えて感染実験を行った。生理食塩水に懸濁した菌液を各濃度について5尾ずつのアユ (10~20 g) に腹腔内注射し, 水温約 20°C の水槽に収容した。その結果, Fig. 3のように菌濃度に依存した死亡がおこり, 本病の定型的な症状が再現され, 供試菌株が再分離された。

考察: 病魚から分離された菌株は, 既知菌種のなかでは *Ps. putida* にもっとも近い性状をもつが, 蛍光色素を産生せず, 硝酸塩を還元するなどの点で, 定型的な *Ps. putida* とは異なる。また, 大部分の分離菌株は, 簡易同定システム API20NE の数値プロファイル 1-140-457 を示し, その他の分離菌株の数値プロファイルも2株 (0-157-755, 2-647-305) 以外は僅かな違いである。なお, BioMerieux 社によれば, 数値プロファイル 1-140-457 の既知種に対する類似値は, *Ps. putida*, %id=58.4, $T=0.71$; *Ps. mendocina*, %id=32.6, $T=0.50$ とされている。これらのことから, 本病は特定の細菌による未報告の流行病であり, その原因菌は *Ps. putida* の新亜種あるいは *Pseudomonas* 属の新種と考察される。

文 献

- 1) N. J. Palleroni (1984): In "Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1" (ed. by N. R. Krieg). Williams & Wilkins, Baltimore/London, pp. 141-219.