ウナギ筋肉内に接種した *Edwardsiella tarda* の消長について^{*1}

楠 田 理 一・石 原 秀 平

(1980 年 12 月 2 日受理)

The Fate of *Edwardsiella tarda* Bacteria after Intramuscular Injection of Eels, *Anguilla japonica*Riichi KUSUDA^{*2} and Syuhei ISHIHARA^{*2}

The spread of edwardsiellosis in cultured eels has been associated with a great and increasing loss but no informations is presently available with respect to the mechanism of infection and pathogenincity. Th present study deals with the growth of the bacteria in the fish body at various periods after interamuscular challenge of virulent EF-1 strain and avirulent E-1 strain of *E. tarda*.

An hour after injection, a large number of bacteria were detected in the kidney and the spleen, irrespective of the inocula size or virulence differentiation of strain. A large number of bacteria in various organs except the intestine was detected on the virulent strain injected eel having about 10 times more than the avirulent strain injected one. The multiplication of bacteria was observed on all organs examined in eels injected with a lethal dose of the virulent strain. The bacteria survived for more than 8 days in the eels injected with lowered lethal dose of virulent strain and with a large number of avirulent strain.

From the result obtained it is assumed that the virulent strain has the ability to resist the clearance function of the eel.

実験的感染を行なった動物生体内における菌の動態を明らかにすることは、菌の病原性や感染機構を解析するための重要な手段の一つである。このために種々の方法が考案されているが¹⁻³⁾、一般的な方法として、生体内における菌を定量する方法が古くから用いられている。哺乳動物においてはこの方法により数多くの研究が行なわれているが、魚類では畑井⁴⁾、室賀⁵⁾、KUSUDA ら⁶⁾および KIMURA ら⁷⁾の報告があるにすぎない。

そこで、本研究では魚類の代表的病原菌 *Edwardsiella tarda* の病原性を解析するための研究の一環として、毒力の異なる菌株をウナギ筋肉内に接種して、菌の分布ならびに消長について検討したので報告する。

実 験 方 法

供試魚 本病に対して、感染経験のない体重 50~130 g のウナギを養鰻池から採取して用いた。これらの供試魚を地下水を入れた市販のアクリル水槽 (40×60×40 cm) に収容し、水温 26±1°C で 3 日間予備飼育した。

供試菌株 強毒株には 1979 年 6 月に養殖ウナギから分離後ただちに凍結保存した *Edwardsiella tarda* EF-1

株を用いた。凍結保存は本菌株を BHI ブイヨン (Difco 社製) で 37°C, 24 時間培養した菌液 1 ml に滅菌した 10% スキムミルク 1 ml を加えてアンプルに注入したのち凍結する方法で行なった。弱毒株には 1973 年に東京大学農学部若林博士から分与されたちのち、継代を重ねた E-1 株を用いた。

感染に用いる菌液の調製 いずれの菌株とも 1.5% 食塩加 BHI ブイヨンで 37°C, 6 時間培養後、1.5% 食塩加 BHI 寒天 (Difco 社製) で 37°C, 18 時間培養してえられた菌苔に滅菌生理食塩水を加えて集菌した。そして、所定の濃度となるように滅菌生理食塩水で調節し、菌浮遊液を作製した。

接種菌量ならびに感染方法 強毒株の EF-1 株では 1 尾あたり $10^{7.0}$ 、 $10^{6.8}$ および $10^{6.7}$ 個の 3 段階とし、弱毒株の E-1 株では $10^{6.0}$ および $10^{7.0}$ 個の 2 段階とした。これらをウナギ背鰭前端付近の筋肉内に接種して感染させた。

臓器内菌数の算定 まず、ウナギを MS 222 (三共製) で麻酔し、心臓穿刺により血液を採取した。次いで開腹して腎臓、脾臓、肝臓および腸管をすべて摘出して秤量

^{*1} 本研究は 1979 年 10 月、日本水産学会秋季大会において発表した。

^{*2} 高知大学農学部水族病理学講座 (Fish Disease Laboratory, Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku, Kochi 783, Japan).

したのち、4.5 ml の滅菌生理食塩水を加えてホモジナイズした。これら被検原液をそのまま、または滅菌生理食塩水で希釈し、その 1 ml を 1.5% 食塩ならびに 0.01% ラウリル硫酸ナトリウム加 TSI 寒天 (栄研化学製) を用いて混釈した。そして、37°C で 24 時間培養後に生じた黑色コロニー数と希釈倍数から、血液では 1 ml あたり、各臓器では 1 g あたりの菌数を測定した。各プロットは 2~3 尾の測定値を平均して求めたものである。なお、斃死した魚体はただちにに取り上げ、血液を除いた各臓器について同様に調査した。

結 果

強毒株の EF-1 株を 1 尾あたり $10^{7.0}$ 個接種したときの、各種臓器ならびに血液中における菌の消長は Fig. 1 に示すとおりである。すなわち、接種 1 時間後には腎臓と脾臓で $10^{7.0}$ 個、肝臓と血液で $10^{5.0}$ 個、腸管では $10^{3.4}$ 個の菌が検出された。その後、菌数は徐々に増加して接種 6 時間後からは、各鱗の発赤および腹部の出血が認められるようになり、24 時間後からは斃死が始まった。本実験では接種 54 時間以内にすべての魚体が各鱗の発赤、腹部の出血、肛門の拡張ならびに接種部位の膿瘍に伴う筋肉組織の崩壊などの症状を呈して斃死した。なお、斃死魚では腎臓で $10^{9.0} \sim 10^{10.0}$ 個、脾臓で $10^{8.6} \sim 10^{9.0}$ 個、肝臓で $10^{8.3} \sim 10^{8.9}$ 個、腸管では $10^{8.1} \sim 10^{8.0}$ 個の菌が検出された。

次に EF-1 株を $10^{8.8}$ 個接種したときの菌の消長は

Fig. 1. Changes in number of *E. tarda* cells in tissues of eels injected intramuscularly with $10^{7.0}$ cells of EF-1 strain.

Fig. 2 に示すとおりである。すなわち、接種 1 時間後には腎臓と脾臓で $10^{5.0}$ 個、肝臓と血液で $10^{3.0}$ 個、腸管では $10^{2.0}$ 個の菌が検出された。その後、菌数は腸管を除いて腎臓と肝臓で接種 6 時間後まで、脾臓と血液で 12 時間後までわずかに減少傾向を示したが、その後は増加して、15 時間後からは各鱗の発赤が認められるようになった。接種 24 時間後には接種部位の粘膜上皮の剝離に伴う点状出血が認められ、48 時間後には接種部位に膿瘍が形成された。本実験では接種 82 時間後から斃死が始まり、120 時間後までに 2 尾を残して 4 尾が斃死した。生残魚はいずれも瀕死の状態であった。これら 2 尾の生残魚から検出された菌は腎臓および脾臓で $10^{9.0}$ 個、肝臓で $10^{8.3}$ 個、腸管と血液で $10^{7.7}$ 個であった。なお、斃死魚では腎臓で $10^{9.2} \sim 10^{10.5}$ 個、脾臓で $10^{9.2} \sim 10^{10.8}$ 個、肝臓で $10^{8.3} \sim 10^{8.8}$ 個、腸管では $10^{7.2} \sim 10^{8.8}$ 個の菌が検出された。

次に EF-1 株を $10^{8.7}$ 個接種したときの菌の消長は Fig. 3 に示すとおりである。すなわち、接種 1 時間後には脾臓で $10^{4.0}$ 個、腎臓と腸管で $10^{3.4}$ 個、肝臓と血液では $10^{2.0}$ 個の菌が検出された。接種 12 時間後には各鱗が発赤した魚体がわずかに認められたが、菌数は徐々に減少する傾向を示した。接種 120 時間後ならびに 192 時間後には、3 尾中 2 尾ではすべての部位で検出限界以下となつたが、残り 1 尾からは菌が検出された。菌が検出された魚体のうち、接種 120 時間後には接種部位に小さな膿瘍の形成が認められた。一方、192 時間後には膿瘍は

Fig. 2. Changes in number of *E. tarda* cells in tissues of eels injected intramuscularly with $10^{8.8}$ cells of EF-1 strain.

Fig. 3. Changes in number of *E. tarda* cells in tissues of eels injected intramuscularly with $10^{6.7}$ cells of EF-1 strain.

ほとんど治ゆして痕跡を示すにすぎなかつた。本実験では斃死魚はまったく認められなかつた。

次に弱毒株の E-1 株を $10^{6.0}$ 個接種したときの、各種臓器ならびに血液における菌の消長は Fig. 4 に示すとおりである。すなわち、接種 1 時間後には腎臓と脾臓で $10^{6.0}$ 個、血液で $10^{4.4}$ 個、肝臓と腸管では $10^{3.8}$ 個の菌が検出された。その後、菌数は血液では徐々に減少し、接種 120 時間後には $10^{2.8}$ 個になつた。これに対して、各種臓器での顕著な減少は認められず、腎臓で

Fig. 4. Changes in number of *E. tarda* cells in tissues of eels injected intramuscularly with $10^{6.0}$ cells of E-1 strain.

Fig. 5. Changes in number of *E. tarda* cells in tissues of eels injected intramuscularly with $10^{7.0}$ cells of E-1 strain.

$10^{3.5}$ 個、脾臓で $10^{4.7}$ 個、肝臓と腸管で $10^{3.4}$ 個の菌が検出された。接種 192 時間後には血液では検出限界以下となつたが、腎臓と脾臓では $10^{4.5}$ 個、肝臓と腸管では $10^{1.9}$ 個の菌が検出された。本実験においては本病の症状を呈した魚体はなく、そのほかの異常もまったく認められなかつた。

次に E-1 株を $10^{7.0}$ 個接種したときの菌の消長は Fig. 5 に示すとおりである。すなわち、接種 1 時間後には腎臓、脾臓および腸管で $10^{4.0}$ 個、肝臓と血液で $10^{2.8}$ 個の菌が検出された。その後、菌数はいずれの臓器においてもすみやかに減少し、血液では 24 時間後に、脾臓と肝臓では 48 時間後に、腎臓と腸管では 72 時間後に検出限界以下となつた。本実験において本病の症状を呈した魚体はなく、そのほかの異常もまったく認められなかつた。

考 察

実験的感染を行なつた動物生体内における菌の動態の解明には、接種菌の各臓器における菌数を経時的に定量する方法が古くから用いられている。哺乳動物においては、この方法により数多くの研究が行なわれ、菌の病原性や感染機構が解明されてきた。しかし、魚類においてこの方法による研究は少なく、畑井⁹⁾によるウナギにおける *Aeromonas liquefaciens* の、室賀⁷⁾によるウナギにおける *Vibrio anguillarum* の、KUSUDA ら⁸⁾および KIMURA ら¹⁰⁾によるハマチにおける *Streptococcus* sp. の消長についての観察があるにすぎない。

そこで、著者らは毒力の異なる *E. tarda* をウナギ筋

肉内に接種して、菌の分布ならびに消長について検討したところ、接種1時間後には毒力や接種菌量に関係なく、腎臓と脾臓から最も多くの菌が検出されることが明らかとなった。畑井⁹⁾、KUSUDA ら⁹⁾および KIMURA ら⁹⁾は脾臓については調べていないが、腎臓からは感染後短時間のうちに最も多くの菌が検出されるとしている。また、室賀⁷⁾は腎臓の菌数も多いが、脾臓の方がより多くの菌が検出されるとしている。哺乳動物においては感染後短時間のうちに菌が最も多く検出される臓器は肝臓および脾臓であり、これらは除菌作用をもつ重要な臓器であるとされている¹⁾。また、畑井⁹⁾はウナギにおいても腎臓が除菌をする重要な臓器ではないかと推論している。しかし、病原菌にとつて標的器官となる臓器では、短時間のうちに多くの菌が定着することも考えられ、菌数の多い臓器が必ずしも除菌を行なう臓器であるとは考えられない。したがって、本実験からは除菌を行なっている臓器を推論することはできないが、ウナギにおいては *E. tarda* 接種後短時間のうちに最も多くの菌の検出される臓器は、腎臓および脾臓であるといえる。

強毒株と弱毒株について、接種1時間後の各臓器ならびに血液中から検出される菌の分布を比較してみると、強毒株を1尾あたり $10^{7.0}$ 個接種した場合には、腎臓と脾臓で $10^{7.0}$ 個、肝臓と血液で $10^{5.0}$ 個、腸管では $10^{3.4}$ 個の菌が検出された。これに対して、弱毒株では $10^{0.0}$ 個接種したにもかかわらず、腎臓と脾臓で $10^{0.0}$ 個、血液で $10^{1.4}$ 個、肝臓と腸管では $10^{3.8}$ 個の菌が検出されたにすぎない。また、強毒株を $10^{6.8}$ 個、弱毒株を $10^{7.0}$ 個接種した場合を比較しても同じような傾向が認められた。SMITH ら¹⁰⁾は毒力の異なる *Staphylococcus* sp. をマウスの尾静脈内に、畑井⁹⁾は *A. liquefaciens* の病原性株と非病原性株をウナギの血管内に接種して菌の消長を検討しているが、このような傾向は認められていない。しかし、本実験では強毒株は弱毒株よりも接種菌量が少ないにもかかわらず、接種1時間後には腸管を除いたほかの臓器から、弱毒株のおよそ10倍の菌が検出された。これらのことから、本菌の強毒株は弱毒株よりもウナギの白血球による貪食作用などの生体防禦能に対して、抵抗性が強いものと考えられる。しかし、このような傾向は *E. tarda* をウナギに接種したときのみに認められる現象であるのかどうかを、ほかの魚病細菌について検討しなければならない。なお、腸管においては菌数に違いが認められないが、その理由については明らかでない。

強毒株を致死量である $10^{7.0}$ 個および $10^{6.8}$ 個接種すると、菌数は徐々に増加して前者では接種24時間後から、後者では82時間後から死が始まった。しかし、各臓器ならびに血液中における菌の消長はほぼ平行しており、とくに菌数の増加する臓器は認められなかった。

このことは、畑井⁹⁾および室賀⁷⁾の報告と一致する。哺乳動物においては、感染に用いる菌や動物あるいは攻撃方法などによつて一定ではないが、菌が最も増殖する臓器は腎臓であるとする報告が多い¹⁰⁻¹³⁾。しかし、本実験ではこのような臓器における菌の増殖は認められなかった。これらのことから、ウナギにおいては菌の増殖に適する特異的な臓器は限定されないものと思われる。また、強毒株を接種した死寸前のウナギの各臓器における菌数は、腎臓では $10^{9.0} \sim 10^{9.2}$ 個、脾臓では $10^{8.8} \sim 10^{9.0}$ 個、肝臓では $10^{8.6} \sim 10^{9.8}$ 個、腸管では $10^{8.8} \sim 10^{7.8}$ 個であつた。これに対して、死直後には腎臓では $10^{9.0} \sim 10^{10.0}$ 個、脾臓では $10^{9.0} \sim 10^{10.0}$ 個、肝臓では $10^{9.8} \sim 10^{9.9}$ 個、腸管では $10^{7.2} \sim 10^{9.0}$ 個の菌が検出された。このように、死直後の菌数が、死寸前のものと比較しておよそ10倍に増加することは興味深い現象であると思われる。この理由としては、死後ウナギの生体防禦能が失われたために、急激に増菌することが考えられる。次に強毒株を $10^{5.7}$ 個接種した実験では、接種12時間後に各鱗の発赤した魚体が認められたが、いずれの魚体においても菌数は徐々に減少する傾向を示した。しかし、120時間後および192時間後においても3尾中1尾からは菌が検出された。畑井⁹⁾は *A. liquefaciens* の病原性株を致死量以下接種した実験において、168時間後にも菌が検出されたことを報告している。一方、室賀⁷⁾は *V. anguillarum* を致死量以下接種すると、菌は72時間後には10個以下となり、ほぼ消失したとしている。本実験においては、接種菌が $10^{5.7}$ 個では致死量とはならなかったが、接種菌は長時間にわたつて検出された。

弱毒株を接種した実験では、 $10^{0.0}$ 個接種すると192時間後にも血液を除いた各臓器からは、かなり多くの菌が検出された。これに対して、 $10^{7.0}$ 個接種では菌数はすみやかに減少し、72時間後にはすべての臓器で検出限界以下となつた。畑井⁹⁾は *A. liquefaciens* の非病原性株を10mg接種すると、168時間後にも菌が検出されることを報告している。本実験においても、弱毒株は強毒株に比べて除菌されやすい傾向が認められた。また、体内に侵入した毒力の弱い *E. tarda* を除菌するウナギの生体防禦能は、かなり安定していることが明らかとなった。しかし、弱毒株においても接種菌量が $10^{6.0}$ 個と大量である場合には長時間にわたつて除菌されないでウナギ生体内に存在した。このことから、大量の菌が生体内に侵入した場合には、弱毒株であつても除菌されにくいことが示唆された。

以上のように、本菌は毒力や接種菌量に関係なく、接種1時間後に腎臓および脾臓から最も多く検出された。また、強毒株は弱毒株とは異なり、ウナギの生体防禦能

に対して抵抗性が強く除菌されにくいことが示唆された。さらに、致死量以上の菌を接種するとすべての臓器で増殖し、ウナギを致死させた。しかし、弱毒株でも大量の菌を接種するとウナギ生体内で長時間存在することが明らかとなった。今後はこれら現象をより詳しく検討するとともに、感染の機構を解明することが必要である。

要 約

魚類の代表的病原菌 *Edwardsiella tarda* の病原性を解析するための研究の一環として、毒力の異なる菌株をウナギ筋肉内に接種して、菌の分布ならびに消長について検討した。

その結果、本菌は毒力や接種菌量に関係なく、接種1時間後に腎臓および脾臓から最も多く検出された。強毒株は弱毒株よりも接種菌量が少ないにもかかわらず、接種1時間後には腸管を除いたほかの臓器から、弱毒株のおよそ10倍の菌が検出された。致死量以上の強毒株を接種するとすべての臓器で増殖し、ウナギを致死させた。致死量以下の強毒株、あるいは弱毒株でも大量の菌を接種するとウナギ生体内で長時間生存した。

これらのことから、強毒株は弱毒株とは異なり、ウナギ生体防禦能に対して抵抗性が強いことが示唆された。

文 献

1) D. E. ROGERS: *Bact. Rev.*, **24**, 50-66 (1960).

- 2) P. F. BONVENTRE, B. K. NORDBERG, and C. G. SCHMITERLÖW: *J. Infect. Dis.*, **108**, 205-212 (1961).
- 3) P. F. BONVENTER, B. K. NORDBERG, and C. G. SCHMITERLÖW: *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **51**, 157-163 (1961).
- 4) 佐久間真理・佐藤善重: 薬学雑誌, **89**, 1740-1741 (1969).
- 5) 佐久間真理・栗田田重美・佐藤善重: 薬学雑誌, **90**, 1100-1106 (1970).
- 6) 畑井喜司雄: 魚病研究, **7**, 26-33 (1972).
- 7) 室賀清邦: 広大水畜紀要, **14**, 101-215 (1975).
- 8) R. KUSUDA and H. KIMURA: *J. Fish Dis.*, **1**, 109-114 (1978).
- 9) H. KIMURA and R. KUSUDA: *J. Fish Dis.*, **2**, 501-510 (1979).
- 10) J. M. SMITH and R. J. DUBOS: *J. Exp. Med.*, **103**, 87-108 (1955).
- 11) 水之江公英・梁慶雲・金容鉉・居合亮・権寧範・高崎宗陽: 感染のシンポジウム (安東洪次・川喜田愛郎・牛場大蔵・田嶋嘉雄・三橋進編), 第1集, 南江堂, 東京, 1959, pp. 167-177.
- 12) 木村晃三: 日細誌, **26**, 1-8 (1971).
- 13) K. MAEJIMA, T. URANO, K. FUJIWARA, and Y. HOMMA: *Japan. J. Exp. Med.*, **42**, 569-574 (1972).