シラスウナギおよびクロコに対する *Edwardsiella tarda* の実験的感染について

石原 秀平・楠田 理一

(1981 年 3 月 14 日受理)

Experimental Infection of Elvers and Anguilletes with *Edwardsiella tarda* Bacteria

Syuhei ISHIHARA* and Riichi KUSUDA*

At present, there is no available information or other previous reports on the mechanism of infection in edwardsiellosis. This study therefore, deals on the effect of *E. tarda* on the elvers and anguilletes mortality by means of water borne and oral infection.

On the water borne method, two groups of elvers and anguilletes were treated to about $10^6/g$ for 1 and 3 hours respectively, and placed in a tank filled with subterranean water for 20 days observation. On the other hand, four groups each of elvers and anguilletes were fed orally with *E. tarda* mixed to a prepared feed. Corresponding to each group, variable doses of *E. tarda* were challenged once and 5 times during the 20 day experimental period with $10^{5.6}$ and $10^{7.0}/g$.

As a result 15 and 60% mortalities were observed on the elvers treated for 1 and 3 hours respectively in the water borne method. While in the oral method, the following results on mortality rate corresponding to each group of dose challenged were observed: 10%– $10^{5.6}/g$, inoculated once; 25%– $10^{6.0}/g$, inoculated times; 45%– $10^{7.0}/g$, inoculated once and 50%– $10^{7.0}/g$, inoculated 5 times. But in the anguilletes, no mortality occurred in either case.

From the results obtained, it is assumed that the sensitivity of elvers to *E. tarda* is higher than anguilletes.

魚類における実験的感染は、主として病魚から分離した菌の病原性確認や、感染機構の解析のために行なわれている。病魚からの分離菌による復元実験では、一般に筋肉内や腹腔内に分離菌を接種する方法が用いられている。これに対して、感染機構を解析するためには自然発症に近い状態で感染を行なう必要がある。そのためには、感染経路を推定した種々の実験的感染方法が用いられている。

感染経路は大きく分けると経皮、経鰓および経口が考えられる。経皮および経鰓感染実験では、培養菌を直接皮膚や鰓に塗抹する方法¹⁻⁷⁾や、培養菌を投入した飼育水に魚体を浸漬する方法^{1, 3-5, 7-13)}が用いられている。また、経口感染実験には培養菌を餌に混合して投与したり、^{1, 3, 8, 11, 13)}強制的にビニールチューブやゾンデなどで投与する方法^{1, 2, 14, 15)}がある。さらに、直腸内に注入する方法^{1, 2)}も知られている。

ウナギの疾病における感染機構について記載されたものは少なく、*Edwardsiella tarda* に起因するパラコロ病では保科¹³⁾および伊藤¹⁸⁾の報告があるにすぎない。また、

本病は餌付期間中のシラスウナギに発生すると大きな被害をもたらすのに対して、クロコでは比較的小さいように思われる。

そこで、本研究では本病の感染機構を解析するための研究の一環として、シラスウナギとクロコに対して菌浴および経口感染を行ない、感受性の差異について検討したので報告する。

実験方法

供試魚 シラスウナギとクロコを用いた。シラスウナギは採捕後、無給餌で淡水馴致した平均体重 0.15 g のものを用いた。これらを 14°C の地下水 40 l を入れた 40×60×40 cm のアクリル水槽に収容した。水槽中にはヒーターおよび濾過器を設置し、エアレーションを行なった。地下水は徐々に加温し、5 日後に 25°C となるように調節した。また、クロコは平均体重が 3.5 g のものを養鰻池から採取して用いた。これを 25°C の地下水 40 l を入れたアクリル水槽に収容した。水槽の設備はシラスウナギと同じである。なお、シラスウナギおよびク

* 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).

クロコは5日間予備飼育したのも実験に供した。

供試菌株 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 *E. tarda* EF-1 株を用いた。凍結保存は本菌株を BHI ブイヨン (Difco) で 37°C, 24 時間培養した菌液 1 ml に滅菌したスキムミルク 1 ml を加え、アンプルに注入したのち凍結する方法で行なった。

感染に用いる菌液の調製 菌浴感染に用いる菌液は次の方法で調製した。まず、自然解凍した凍結保存菌液約 0.05 ml を 1.5% 食塩加 BHI 寒天 (Difco) 斜面に接種したのち、37°C で 24 時間培養した。そして、1.5% 食塩加 BHI ブイヨンで 37°C, 24 時間培養したものを地下水で 10 倍に希釈して用いた。なお、このときの菌液の濃度は 1 ml あたり約 $10^{8.0}$ 個であった。また、経口感染においては BHI 寒天斜面に培養した菌を 1.5% 食塩加 BHI ブイヨンに接種し、37°C で 6 時間培養した。これを 1.5% 食塩加 BHI 寒天に接種し、37°C で 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、3,000 rpm で 10 分間、2 回の遠心洗浄を行なったのち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。

感染方法 菌浴感染においてはシラスウナギとクロコは同じ方法で行なった。すなわち、菌浴感染用水槽には 14×24×19 cm のアクリル水槽を用いた。これに地下水で希釈した菌液 5 l を入れ、エアレーションを行なった。そして、ヒーターで 25°C となるように調節した水温調節用の外水槽に収容したのち、供試魚を入れて菌浴感染を行なった。菌浴時間は 1 時間ならびに 3 時間の 2 種類とした。また、経口感染は自由摂餌により行ない、攻撃菌量はシラスウナギ、クロコともに魚体重 1 g あたり $10^{5.0}$ 個および $10^{7.0}$ 個の 2 段階とした。菌液は毎日調整して用い、攻撃は 1 日 1 回とした。攻撃回数は 1 回ならびに 5 回の 2 種類とした。さらに、菌液はシラスウナギではイトミミズに、クロコでは市販の配合飼料に混合して投与した。クロコの実験においては対照区に無処理魚を使用した。なお、いずれの実験区においても供試尾数は 20 尾とし、経口感染における攻撃期間を除いて無給餌で飼育して、攻撃開始後 20 日間致死の有無を観察した。

致死魚からの菌分離 実験期間中に致死した魚体の腎臓から、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) を用いて菌を分離した。そして、出現した黒色コロニーについては、さらに本菌株のウサギ抗血清に対するスライド凝集反応を行ない、本菌であることを確認した。

生残魚における菌の検出ならびに凝集抗体価の測定 シラスウナギでは菌の検出についてのみ行なった。菌の検出は生残魚の腎臓から、1.5% 食塩ならびに 0.01%

Fig. 1. Changes in the mortality of elvers inoculated with *E. tarda* EF-1 by water borne method. ○: $10^{5.0}$ cells/ml, 1 hr. ●: $10^{8.0}$ cells/ml, 3 hr.

ラウリル硫酸ナトリウム加 TSI 寒天を用いて行なった。また、尾部切断により採血して遠心処理を行ない血清を分離した。血清は 2 尾分をプールし、マイクロタイター法により凝集抗体価を測定した。反応抗原には本菌株のホルマリン不活化菌体を用いた。

結 果

シラスウナギに対する菌浴感染の結果は Fig. 1 に示すとおりである。すなわち、いずれの菌浴時間においても感染が成立した。1 時間菌浴区では 5 日後に 1 尾が致死した。その後 8 日後に 1 尾、さらに 9 日後に 1 尾が致死して致死率は 15% となった。また、3 時間菌浴区においては 4 日後に 4 尾が致死した。その後、致死魚は徐々に増加して致死率は 60% となった。

次にシラスウナギに対する経口感染の結果は Fig. 2 に示すとおりである。すなわち、魚体重 1 g あたり本菌を $10^{5.0}$ 個投与した場合には、1 回攻撃区では 7 日後に 2 尾が致死して致死率は 10% となった。また、5 回攻撃区では 7 日後に 2 尾、8 日後に 2 尾、9 日後に 1 尾が致死して致死率は 25% となった。 $10^{7.0}$ 個投与した場合には、1 回攻撃区では 6 日後に 4 尾、8 日後に 5 尾が致死して致死率は 45% となった。また、5 回攻撃区では 6 日後に 2 尾、7 日および 8 日後にそれぞれ 4 尾が致死して致死率は 50% となった。なお、菌浴ならびに経口感染におけるすべての致死魚から本菌が純培養状に分離された。しかし、生残魚からは本菌はまったく分離されなかった。

次にクロコに対して菌浴ならびに経口感染を行なった結果、いずれの攻撃方法においても致死魚はまったく認められなかった。また、生残魚からも本菌は分離されなかった。凝集抗体価は 3 時間菌浴区において 1:4~1:16, $10^{7.0}$ 個を経口投与した場合の 5 回攻撃区で 1:8 以下であった。これに対して、そのほかの攻撃区ならびに

Fig. 2. Changes in the mortality of elvers inoculated with *E. tarda* EF-1 orally. □: $10^{5.6}$ cells/g, once. ■: $10^{6.8}$ cells/g, 5 times. ○: $10^{7.6}$ cells/g, once. ●: $10^{7.6}$ cells/g, 5 times.

対照区ではすべて 1:4 以下であった。

考 察

ウナギのパラコロ病における感染機構について記載されたものは少なく、保科¹⁾および伊藤¹³⁾の報告があるにすぎない。また、本病は餌付期間中のシラスウナギに発生すると大きな被害をもたらすのに対して、クロコあるいは成鰻においては、その被害が比較的小さいように思われる。このことから、ウナギは成長段階によって本菌に対する感受性が異なるのではないかと考えられた。そこで、著者らはシラスウナギとクロコを用いて菌浴および経口感染実験を行ない、感受性の差異について検討した。

まず、シラスウナギに対して1時間ならびに3時間菌浴感染を行なった結果、いずれにおいても感染が成立し、死亡率はそれぞれ15%および60%となった。伊藤¹³⁾は本菌が1mlあたり 7.4×10^5 個存在する菌液にシラスウナギを10分間浸漬したが、感染しなかったことを報告している。このように、これまでにシラスウナギに対して菌浴感染が成立した報告はみあたらない。今回の実験で感染した理由としては菌浴時間が長かったこと、あるいはブイヨン培養菌液を用いたことにより、シラスウナギになんらかのストレスを与えて本菌の増殖を助長したことなどが考えられる。また、菌浴感染において感染してから死亡するまでの日数は、はやいもので4~5日であることが明らかとなった。

次にシラスウナギに対して経口感染を行なった結果、すべての実験区で感染が成立し、攻撃菌量の多い方が死亡率も高くなることが明らかとなった。また、攻撃菌量が少ない場合の死亡率は攻撃回数が多い方がわずかに高かった。しかし、攻撃菌量の多い場合には大差が認められなかった。このことから、本菌による感染は初回の攻

撃時から始まっており、本菌に対して感受性の高いシラスウナギでは1回の攻撃で十分感染しうるものと思われる。また、経口感染において感染してから死亡するまでの日数は、はやいもので5~7日であることが明らかとなった。さらに、保科¹⁾は本菌をミジンコに、伊藤¹³⁾はイトミミズに取り込ませてシラスウナギに投与すると発病し、死亡率はそれぞれ最高で17%および39.4%であることを報告している。これに対して、本実験では最高50%の死亡率をえることができた。

これらのシラスウナギに対する菌浴ならびに経口感染実験から、本菌は経皮、経鰓あるいは経口によるいずれかの経路で感染しうることが示唆された。しかし、本実験における菌濃度は自然状態では考えられないほど高いために、今後は低濃度におけるさらに詳細な検討が必要であると思われる。また、本実験ではいずれの感染方法でも50%以上の死亡率をえることができたことから、本法はワクチンの効果判定などの攻撃実験として利用できるものと思われる。

いっぽう、クロコにおいてはまったく病徴が出現しなかった。しかし、3時間菌浴区では凝集抗体価が1:4~1:16と対照区に比べて高い値を示したことから、本菌はクロコの血液中に侵入し、その後除菌されたのではないと思われる。

以上のように、シラスウナギに対して1時間ならびに3時間菌浴感染を行なうと、いずれにおいても感染が成立し、死亡率はそれぞれ15%および60%となった。また、シラスウナギに対して攻撃菌量と回数をかえて経口感染を行なうと、すべての実験区で感染が成立し、攻撃菌量の多い方が死亡率も高くなることが明らかとなった。しかし、攻撃回数のちがいによる死亡率に大差は認められなかった。これに対して、クロコではいずれの感染方法においても病徴が出現しなかった。これらのことから、本菌に対する感受性はシラスウナギのほうが、クロコよりも高いことが明らかとなった。今後はこれらの現象をさらに詳しく検討して、感染機構を解明することが必要であると思われる。

要 約

ウナギのパラコロ病の感染機構を解析するための研究の一環として、シラスウナギとクロコに対して菌浴ならびに経口感染を行ない、感受性の差異について検討した。

その結果、シラスウナギに対して1時間ならびに3時間菌浴感染を行なうと、いずれにおいても感染が成立し、死亡率はそれぞれ15%および60%となった。また、シラスウナギに対して攻撃菌量と回数をかえて経口感染を行なうと、すべての実験区で感染が成立し、攻撃

菌量の多い方が斃死率も高くなることが明らかとなった。しかし、攻撃回数の方がいいによる斃死率に大差は認められなかった。これに対して、クロコではいずれの感染方法においても病徴が出現しなかった。

これらのことから、本菌に対する感受性はシラスウナギのほうが、クロコよりも高いことが明らかとなった。

文 献

- 1) 保科利一：東水大特別研究報告，**6**，1-104 (1962).
- 2) Y. SAITO, M. OTSURU, T. FURUKAWA, K. KANDA, and A. SATO: *Acta Medica et Biologica*, **11**, 267-295 (1964).
- 3) 楠田理一：京都水試業績，**25**，1-116 (1965).
- 4) 若林久嗣・吉原桂子・江草周三：日水誌，**36**，147-155 (1970).
- 5) 畑井喜司雄・保科利一：魚病研究，**5**，100-106 (1971).
- 6) 小寺和郎・舟橋紀男・宮崎照雄・窪田三朗：魚病研究，**8**，185-189 (1974).
- 7) 増村和彦・若林久嗣：魚病研究，**12**，171-177 (1977).
- 8) 村江通之・岩村 昇・高野正明・亀家朗介・木下千城・星野 暹・日野淑美・内田守雄・松田正男：米子医誌，**10**，1371-1379 (1959).
- 9) W. M. LEWIS and M. BENDER: *Prog. Fish-Cult.*, **23**，124-126 (1961).
- 10) 若林久嗣・江草周三：魚病研究，**7**，58-63 (1972).
- 11) 室賀清邦：広大水畜産紀要，**14**，101-215 (1975).
- 12) G. L. BULLOCK, H. M. STUCKEY, and R. L. HERMAN: *Jour. Wildl. Dis.*, **12**，376-379 (1976).
- 13) 伊藤 進：昭和 53 年度愛知水試業務報告，1979, pp. 138-141.
- 14) 若林久嗣・豊田 宏・江草周三：魚病研究，**11**，207-211 (1977).
- 15) R. KUSUDA and H. KIMURA: *J. Fish Dis.*, **1**，109-114 (1978).