

## ハタハタに発生した非定型 *Aeromonas salmonicida* 感染症

反町 稔\*・堀田和夫\*・大津 順\*

(1999年3月25日受理)

Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in  
Japanese sandfish, *Arctoscopus japonicus*

Minoru SORIMACHI, Kazuo HOTTA and Jun OHTSU

### Abstract

In 1998, a sub-acute disease occurred among Japanese sandfish, *Arctoscopus japonicus*, cultured in Toyama Prefectural Fisheries Research Institute. The affected fish were characterized by ulcerative lesions on the trunk and hemorrhage around the eye and the lip. A kind of bacterium was isolated from the kidney of the diseased fish. The bacteria were Gram negative, non-motile short rod. Cytochrome oxidase and catalase were positive, and it formed brown pigment. The isolate was identified as an atypical *Aeromonas salmonicida* on the basis of those characteristics. Intraperitoneal injection of an isolate to cod, *Gadus macrocephalus*, confirmed the virulence to cod. This atypical *A. salmonicida* is thought to be the causative agent of the mortality of Japanese sandfish.

Key words: *Arctoscopus japonicus*, atypical *Aeromonas salmonicida*, bacterial disease, Japanese sandfish

*Aeromonas salmonicida* は淡水のサケ科魚類の病原細菌として著名であるが、それらと一部の性状が一致しない、いわゆる非定型 *A. salmonicida* も我が国ではコイ、フナ、キンギョの穴あき病 (Elliott and Shotts 1980) やウナギの頭部潰瘍病の原因菌 (大塚ら 1984, 飯田ら 1984, Kitao *et al.* 1984) として報告されている。また、非定型 *A. salmonicida* は、近年、海産魚においてもイシガレイ (大滝ら 1986), ムシガレイ (中津川 1994), アイナメ, ヒラメ, クロソイ (飯田ら 1997), クロソイ (泉川・植木 1997) から報告されている。一方海外においては、海産魚においても非定型 *A. salmonicida* は比較的古くから分離されており, sablefish (Evelyn 1971), 大西洋タラ (Cornick *et al.* 1984), sand-eels (Dalsgaard and Paulsen 1986), 太平洋ニシン (Traxler and Bell 1988), pike (Wiklund 1990), flounder (Wiklund and Bylund 1993), turbot (Pedersen *et al.* 1994), European flounder, dab, plaice (Wiklund and

\* 富山県水産試験場 (Toyama Prefectural Fisheries Research Institute, Namerikawa, Toyama 936-0861, Japan)

Dalsgaard 1995) などで報告されている。

1998年3月から5月にかけて、富山県水産試験場で飼育していたハタハタ *Arctoscopus japonicus* に、長期間にわたって死亡が続く病気が発生した。それらの原因を調べたところ、非定型 *A. salmonicida* による感染症であることが明らかになったので報告する。

## 材 料 と 方 法

### 本病の発生状況

1997年2月に秋田県で採卵し、日本栽培漁業協会能登島事業場において孵化・育成されていたハタハタ稚魚を、同年5月に富山県水産試験場に搬入し、上屋付きの屋外コンクリート水槽(2×4×0.8m)で当初は表層海水と深層海水を混合した調温水で、6月上旬以降は調温した深層海水のみで飼育していたところ、翌年3月頃から慢性的な死亡が発生したことから、死亡状況を調査するとともに原因解明のため細菌検査を行った。

### 細菌検査

1998年3月14日および3月23日に、死亡魚(瀕死魚を含む)をそれぞれ4尾ずつ計8尾(体重16.4~35.5g)取りあげ、肉眼的に症状を観察した後、腎臓からブレインハートインフュージョン(BHI)寒天培地(ニッスイ)に塗抹して15℃で培養し、細菌分離を行った。

### 生化学的性状試験

病死魚4個体から3月23日に分離した4株を試験に供した。生化学的性状は常法により、グラム染色性、運動性、オキシダーゼ、カタラーゼ、OF試験、硝酸塩還元、インドール産生能、硫化水素産性能、MR・VP反応、炭水化物分解能などを検査した。発育可能塩分濃度は、1%ブドウ糖・トリプトン・ペプトン水にNaClを0, 0.5, 1, 2, 3, 3.5, 4, 4.5, 5および7%添加して5日間培養し、発育の有無を肉眼観察によって判定した。培養温度はすべて20℃とした。

供試菌のスライド凝集反応は、せっそう病診断用抗血清(抗 *A. salmonicida* 家兎血清; 動生協作製)を用い、常法により行った。

### 薬剤感受性試験

BHI ブイヨン(ニッスイ)で前培養した上記4株を、パールコア感受性ディスク用培地(栄研化学)に塗抹後、トリディスク(栄研化学)を用いて20℃、24時間培養して感受性を判定した。試験には硫酸カナマイシン(5, 10, 30μg)、エリスロマイシン(0.5, 2, 10μg)、塩酸ドキシサイクリン(2, 5, 30μg)、アミノベンジルペニシリン(2, 5, 20μg)、ナリジクス酸(2, 5, 15μg)、チアンフェニコール(5, 10, 60μg)の6種の薬剤を用いた。

### 病原性試験

上記菌株のうちの1株を用い、マダラ当歳魚に対する病原性試験を2回実施した。試験には30×60×40cmのアクリル水槽(水量約30ℓ)を用い、表層海水と深層海水を混合して調温し、流水中で飼育した。試験期間中、供試魚には市販配合餌料(大洋飼料; ひらめ1号)を1日2回、適量投与した。

第1回の試験では、平均体重9.4gの魚に $1.7 \times 10^7$ および $10^6$ CFU/0.1ml/尾の菌液を各5尾に、対照として生理食塩水0.1ml/尾を10尾にそれぞれ腹腔内接種し、10日間観察して死亡の有無を

調べた。試験期間中の水温は8.8～10.3℃であった。なお、すべての死亡魚ならびに10日後の生残魚の腎臓から BHI 寒天培地を用いて接種菌の再分離を行った。

第2回の試験では、平均体重9.0gの魚に $5.3 \times 10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  CFU/0.1ml/尾の菌液を各5尾に、対照として生理食塩水0.1ml/尾を10尾にそれぞれ腹腔内接種し、12日間観察した。試験期間中の水温は8.4～9.3℃であった。供試魚の処理は第1回と同様に行った。

## 結 果

### 本病の発生状況

1997年11月中旬に、飼育中のハタハタ約970尾を上記コンクリート水槽に再度放養し、生餌(コウナゴ)を投与して養成していたが、1998年2月までは目立った死亡は認められなかった。死亡魚は2月下旬からみられ始め、3月中旬から増加した。3月下旬には、チアンフェニコールを50mg/kg体重/日で6日間経口投与したが、その後も死亡魚は慢性的にみられ、5月中旬までに約570尾が死亡した。この間の累積死亡率は60%程度と推定された。なお、2月上旬から5月中旬までの飼育水温は6.5～9.5℃であったが、死亡が増加した3月中旬以降は7℃以上であった。

病魚の症状は、外観的には頭部、背鰭基部、躯幹の出血・潰瘍形成と一部融解、眼球周辺、口唇部の出血などが特徴であり、剖検すると鰓の貧血や肝臓の褪色も顕著であった。血液が少量混ざった腹水が貯溜している個体もあった。

### 細菌検査

供試した8個体のいずれの腎臓からも露滴状の半透明、灰白色のコロニーがほぼ純粋に分離され、3～4日経過すると褐色色素の産生が認められた。

### 生化学的性状試験

供試した4株の生化学的性状試験の結果を Table 1 に示した。4株の性状はすべて一致した。主な性状は、グラム陰性、非運動性短桿菌で、カタラーゼおよびオキシダーゼ陽性、グルコースを発酵的に分解した。発育可能塩分濃度を調べた結果、0.5～2% NaCl 下で最もよく増殖した。次いで0%での増殖がよく、3%ではそれよりも明らかに劣った。1株のみ4% NaCl 下でわずかに増殖したが、他の3株は3.5% NaCl 下では増殖しなかった。抗 *A. salmonicida* 家兔血清によるスライド凝集反応では、供試した4株いずれも陽性であった。

### 薬剤感受性

供試した4株は、いずれもチアンフェニコール、塩酸ドキシサイクリンおよびアミノベンジルペニシリンに対して顕著な感受性を示した。カナマイシン、エリスロマイシンに対する感受性は低く、ナリジクス酸には感受性を示さなかった。

### 病原性試験

第1回の試験では $1.7 \times 10^7$  CFU/0.1ml/尾接種したマダラ当歳魚は、3、4日目にそれぞれ2尾が、 $1.7 \times 10^6$  CFU/0.1ml/尾接種したものでは4、5、6日目にそれぞれ1、2、1尾が死亡し、いずれも死亡率は80%であった。生残魚は7日目以降わずかながら摂餌をするようになった。すべての死亡魚から接種菌はほぼ純粋に再分離されたが、生残した2尾からは再分離されな

Table 1. Biochemical characteristics of the isolates from diseased Japanese sandfish.

Gram stain	—	Growth in 0%NaCl	+
Cytochrome oxidase	+	3%NaCl	+
Catalase	+	5%NaCl	—
Motility	—	Gas from Glucose	+
Form	SR* <sup>1</sup>	Acid from	
Brown pigment	+	D-Galactose	+
OF test	F* <sup>2</sup>	Glucose	+
Gelatinase	+	Inositol	—
Nitrate reduction	+	Lactose	—
Indole production	—	Maltose	+
H <sup>2</sup> S production	—	Mannitol	+
Lysine	—	Mannose	+
VP test	—	Rhamnose	—
MR test	—	Salicin	—
Malonate	—	Sucrose	+
Citrate			

\*<sup>1</sup>Short rod \*<sup>2</sup>Fermentative

かった。

死亡魚は外観的には、3、4日目のものでは特徴的な症状は乏しかったが、5、6日目のものでは頭部の発赤、鰓蓋や躯幹部の出血などが認められた。剖検すると、いずれの個体にも鰓と肝臓の褪色がみられ、一部の個体の鰓には部分的な出血も認められた。

第2回目の試験では、死亡は接種菌量が多いほど早く、 $5.1 \times 10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$  CFU/0.1 ml/尾の接種で、死亡率はそれぞれ100、80、40、および20%であった。第1回の試験と同様に、死亡魚からはすべて接種菌が再分離されたが、生残魚からは再分離されなかった。症状も第1回と類似するものであった。

## 考 察

ハタハタ由来の分離菌株は、性状試験の結果から *A. salmonicida* に同定されるものと考えられる。しかし、*A. salmonicida* 3亜種、subsp. *salmonicida*、subsp. *achromogenes*、subsp. *masoucida* の性状と比較したところ (Table 2)、いずれとも一致しなかったことから、非定型 *A. salmonicida* とするのが妥当であると考えられる。

海産魚から分離された非定型 *A. salmonicida* には、前述したように大滝ら (1986)、中津川 (1994)、飯田ら (1997)、泉川・植木 (1997) などの報告があるが、ハタハタから分離された菌はそれらと褐色色素産生能、インドール産生能、VP反応、リジン脱炭酸酵素などで、また、海

Table 2. Comparison of biochemical characteristics between the isolate used in this study and 3 subspecies of *Aeromonas salmonicida*.

Characteristic	Isolate used in this study	<i>A. salmonicida</i> subsp.		
		<i>salmonicida</i>	<i>achromogenes</i>	<i>masoucida</i>
Brown pigment	+	+	-	-
Indole	-	-	-	+
Hydrogen sulfide	-	-	-	(+)
Gelatinase	+	+	-	+
Lysine	-	-	-	+
MR test	-	+	-	-
VP test	-	-	-	+
L-arabinose	-	AG	-	AG
Lactose	-	-	-	(AG)
Salicin	AG	-	-	(A)
Sucrose	AG	-	A	AG

( );Weakly, A;Acid, G;Gas

外の海産魚からの分離菌とも何らかの性状で異なっていた。したがって、今回ハタハタから分離された菌は非定型 *A. salmonicida* に分類されるものの、既報の菌の性状と完全に一致するものはなかった。

ハタハタと同様に低水温の環境で生育するマダラを用いて病原性を調べたところ、自然発病魚と類似する出血性の病変を形成して致死せしめた。ハタハタに対する病原性試験は行っていないことから断定することはできないが、このたびハタハタに発生した病気は、非定型 *A. salmonicida* による感染症であると考えてよいであろう。しかし、マダラに対しては $10^6 \sim 10^6$  CFU/尾程度の大量の菌の腹腔内攻撃でのみ病原性を示した。飯田ら(1997)はヒラメに対して水温 $15 \sim 16^\circ\text{C}$ で、 $2.5 \times 10^5$  CFU/g 魚体重以上の腹腔内攻撃で、泉川・植木(1997)はクロソイに対して $12 \sim 14^\circ\text{C}$ で、 $0.36$  CFU/尾以上の筋肉内接種で病原性を示したことを報告している。後者と比べると今回の分離菌の病原性はかなり低いものであった。今回の攻撃試験は、分離菌の至適増殖温度よりもかなり低いと考えられる $8 \sim 10^\circ\text{C}$ で行ったこともその一因と考えられる。また、分離菌に対するハタハタとマダラの感受性の差異については調べていないが、自然発病時の死亡状況などから考えると病原性はさほど高いものではないと思われる。

ハタハタでの発病は、1～2月の最低水温期を過ぎ、水温が上昇し始めた3月中旬以降、 $7^\circ\text{C}$ 以上の水温でみられた。ハタハタは成育期は水深 $150 \sim 300\text{m}$ 、水温 $2 \sim 4^\circ\text{C}$ の水域を中心に生息していると考えられている。水温からみれば、 $7^\circ\text{C}$ 以上の環境はハタハタにとって正常な生育環境を超えたストレスの高い状態にあるともいえよう。そのような状況下で病原細菌に遭遇すれば、温度条件から急性発病の可能性は低い、慢性的に感染・発病が繰り返されるものと推察される。

病気の抑制を目的に、ハタハタにチアンフェニコールの経口投与を行ったが、効果は認められなかった。分離菌はチアンフェニコールに比較的高い感受性を示したが、生餌のミンチに薬剤を混ぜて投与した際に、摂餌が不活発で規定量の薬剤が摂取されなかったこと、低水温の影響で薬剤の吸収が悪かったことなどが原因として考えられる。

ハタハタから分離された非定型 *A. salmonicida* の発育可能塩分濃度は1株を除き0～3%であった。ムシガレイ由来株（中津川 1994）は5%まで、アイナメ、ヒラメ、クロソイ由来株（飯田ら 1994）は4.5%まで発育可能であったが、それらと比べると塩分耐性は低く、ウナギ由来の非定型 *A. salmonicida*（Kitao *et al.* 1984）や、サケ科魚類由来の *A. salmonicida* と近いものであった。本菌の海水中での生存能については調べていないが、本菌がどこから来て海水環境にどの程度順応しているのか、どのような伝播様式をとるのか、病害防除の観点からも明らかにする必要があろう。

非定型 *A. salmonicida* 感染症は、全国各地の海産魚の種苗生産施設や養殖場において発生が問題となりつつある。海外では我が国以上に多魚種で発病が報告されており、今後も養殖対象魚種の拡大とともに罹病魚種の増大が懸念されることから、種苗生産施設等では防疫対策に十分注意をはらう必要があろう。

## 文 献

- Cornick, J. W., C. M. Morrison, B. Zwicker and G. Shum 1984. Atypical *Aeromonas salmonicida* in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. J. Fish Dis., 7, 495-499.
- Dalsgaard, I. and H. Paulsen 1986. Atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from diseased sand-eels, *Ammodytes lancea* (Cuvier) and *Hyperoplus lanceolatus* (Lesauvage). J. Fish Dis., 9, 361-364.
- Elliott, D. G. and E. B. Shotts Jr 1980. Aetiology of an ulcerative disease in goldfish, *Carassius auratus* (L): microbiological examination of diseased fish from seven locations. J. Fish Dis., 3, 133-143.
- Evelyn, T. P. T. 1971. An aberrant strain of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* isolated from a marine host, the sablefish (*Anoplopoma fimbria*), and from two species of cultured Pacific salmon. J. Fish. Res. Bd. Canada, 28, 1629-1634.
- 飯田貴次・中越一統・若林久嗣 1984. ウナギ病魚からの非定型 *Aeromonas salmonicida* の分離. 魚病研究, 19, 109-112.
- 飯田貴次・坂田千夏・川津浩嗣・福田 穰 1997. 海産魚の非定型 *Aeromonas salmonicida* 感染症. 魚病研究, 32, 65-66.
- 泉川晃一・植木範行 1997. クロソイに発生した非定型 *Aeromonas salmonicida* 感染症. 魚病研究, 32, 67-68.
- Kitao, T., T. Yoshida, T. Aoki and M. Fukudome 1984. Atypical *Aeromonas salmonicida*, the causative agent of an ulcer disease of eel occurred in Kagoshima Prefecture. Fish

Pathol., 19, 113-117.

- 中津川俊雄 1994. ムシガレイから分離された非定型 *Aeromonas salmonicida*. 魚病研究, 29, 193-198.
- 大滝勝久・吉水 守・田島研一 1986. イシガレイ稚魚より検出した非定型 *Aeromonas salmonicida*. 福島県水産種苗研究所, 昭和60年度事業報告書, pp.52-55.
- 大塚弘之・中井敏博・室賀清邦・城 泰彦 1984. ウナギ病魚から分離された非定型 *Aeromonas salmonicida*. 魚病研究, 19, 101-107.
- Pedersen, K., H. Kofod, I. Dalsgaard and J. L.Larsen 1994. Isolation of oxidase-negative *Aeromonas salmonicida* from diseased turbot *Scophthalmus maximus*. Dis.aquat. Org., 18, 149-154.
- Traxler, G. S. and G. R. Bell 1988. Pathogens associated with impounded Pacific herring *Clupea harengus pallasii*, with emphasis on viral erythrocytic necrosis (VEN) and atypical *Aeromonas salmonicida*. Dis. aquat. Org., 5, 93-100.
- Wiklund, T. 1990. Atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from ulcer of pike, *Esox lucius* L. J. Fish Dis., 13, 541-544.
- Wiklund, T. and G. Bylund 1993. Skin ulcer disease of flounder *Platichthys flesus* in the northern Baltic Sea. Dis. aquat. Org., 17, 165-174.
- Wiklund, T. and I. Dalsgaard 1995. Atypical *Aeromonas salmonicida* associated with ulcerated flatfish species in the Baltic Sea and the North Sea. J. Aquat. Anim. Health, 7, 218-224.