

魚病対策試験*

杉山昭博

1. 目的および内容

栽培漁業の発展で新魚種の飼育技術の開発と種苗の量産化がおこなわれ、それにとまなう施設の改善などは全国的に良く進んでいる。また、養殖業においては大部分のところで大量生産方式による相対的生産経費の軽減がはかられている。しかし、このような人工的環境下における高密度飼育では疾病の発生率も高く、対策も事前の予防が困難で対症療法的となっているのが現状である。そこで水産関係の各研究機関では特定の疾病の発生予防を目的としたワクチンの開発、健全種苗生産のための栄養学的研究などがおこなわれている。

本県は他の都道府県と自然条件などで大きく異なり、そのため有効な技術の吸収とあわせて独自の技術開発がのぞまれており、魚病対策についても進んだ知見の収集とあわせて独自の研究をおこなう必要がある。そこで、本年度は疾病の発生状況を正しく把握するためにも種苗生産時や親魚に発生した疾病の症状を調査し、あわせて細菌学的検査をおこなった。そして、病魚から分離した菌株の病原性を確認し、その強さについても検討した。

なお水産試験場八重山支場、多和田研究員には供試魚の提供などで大変お世話になり感謝いたします。

2. 材料および方法

(1) 魚病発生調査

1983年4月2日から1984年2月27日にかけて石垣島内の養鰻場および水産試験場八重山支場で飼育中に発病した魚を検査した。症状は外観的診断と開腹してからの内臓所見を記載し、その後各臓器から細菌の分離をおこなった。分離に使用した培地はBHI-寒天培地、サイトファーガ培地、および普通寒天培地で、海水魚由来にはNaCl濃度を2%になるように調整して用いた。

(2) 分離菌株の病原性再現試験

天然採捕して飼育中に発病し、1983年10月29日に検査したアイゴ(表1-2、No. 3 個体)の腎臓から2種類の細菌を分離したので、これらの菌株の生理食塩水懸濁液を 10^8 CFU(コロニー形成単位)/1尾になるように筋肉内接種した。対照区は生理食塩水のみを同量接種し、各区とも2日間観察した。なお、供試魚は病魚と同じ大きさの健康なアイゴを用いた。

(3) 分離菌株の病原性の強さの検討

病原性再現試験で病原性を確認した上記の細菌の病原性の強さを検討するため、6種の濃度の生理食塩水懸濁液を健康なアイゴの筋肉内に接種し、その後7日間観察して各区の斃死率を求めた。そして、Fisherの方法に基づいてLD₅₀(半数致死濃度)を算出した。

* 県単独事業

3. 結 果

(1) 魚病発生調査

表1-1、1-2、および2に示すとおりである。

表 1 - 1 魚病発生調査

Date (1983)	Fish name body No.	FL (mm)	B W (g)	Symptom
4.2	Eel No.1	430	100	Break of the upper jaw , a little of turn red of the pectoral and the anal fins,and the congestive liver Hemorrhage and opening of two parts of the head,opening of the belly(dia.2cm),and a little hemorrhage of the gill and the liver
	2	483	162	
4.15	Black sea bream			
	No.1	34	0.5	Separation of the epidermis of the body
	2	32	0.5	Turn red of the upper and the lower jaws
	3	31	0.4	Turn red of the upper and the lower jaws
6.20	Carp			
	No.1	380	830	Turn red of the base of each fin, exophthalmos of the left eye,turn red and opening of the anus,fluid in the peritoneal cavity,hemorrhage of the wall of the peritoneal cavity,and congestion of the intestine
	2	520	980	Exophthalmos of the left eye,and turn red and opening of the anus
	3	470	1810	Opening of the anus
	4	410	1030	Opening of the anus
7.16	Golden travally			
	No.1			Spinning swim,rapid respiration,grow dull in color of the liver
	2			Spinning swim,rapid respiration,grow dull in color of the liver
	3			Spinning swim,rapid respiration,grow dull in color of the liver
7.20	Spangled emperor			
	No.1	510	2180	Died fish,Separation of the epidermis of the body, picked like opening of the muscle of the body,hemorrhagic ulcer of the caudal peduncle near the caudal fin,and fluid in the peritoneal cavity,atrophy of the liver
	2	505	2420	Survived fish,separation of the scale and the epidermis of the body, petechial homorrhage of the caudal fin and in some places of the body,hemorrhage of the periphery of,petechial fading and atrophy of the liver,and hypertrophy of the spleen
8.24	Golden travalley			
	No.1	27	0.34	Died No.=200 body/day,turn red of the head
	2		0.22	
	3		0.26	
	4		0.36	
5		0.23		
9.7	Red sea beam	No.1 364	1000	Separation of the scale and the epidermis of the caudal peduncle,and turn red of the base of the pectoral,anal,and dorsal fins , and the liver
9.9	Red sea bream	No.1 450	1360	Hemorrhage of the opercle,the breast,the base of the caudal fin,the base of, and the pectoral fin,and the base of the pelvic fin,the congestive liver, and congestion of the intestine
	2	257	360	A little turn red of the base of the caudal fin,a little hemorrhage of the nape, the congestive liver, and the thined intestine wall
10.29	Rabbit fish	No.1 98	12	During breeding of the wild fish, separation of the epidermis of the caudal peduncle
	2	85	8	During breeding of the wild fish, separation of the epidermis of the caudal peduncle

4月2日に検査したウナギの症状の特徴は上顎の欠損や頭部の開孔であり、これらの症状は九州各県の病魚にも最近良く見られている。各臓器から細菌を分離したが、凝集反応ではE.tardaおよびV B (Vibrio anguillarum Btype)抗血清に対していずれも陰性であった。4月15日に検査したミナミクロダイの症状は上、下顎に発赤がみられる程度であったが、斃死はかなりの数であった。6月20日に検査したコイはひどい腐敗臭を発していた。7月16日に検査したコガネシマアジ幼魚は神経性の症状と思われるが、細菌は分離できなかった。7月20日に検査したハマフエフキ親魚からはほとんど細菌が分離できず、培地上に発育したコロニーも雑菌と思われる。8月24日に検査したコガネシマアジは大量の斃死がみられ、細菌検査でも多量の細菌を分離した。9月7日に検査したマダイ親魚の臓器から細菌を分離した。9月9日に検査したマダイ親魚には鰓蓋の出血、肝臓のうっ血、および腸管の充血などの症状がみられるが細菌検査はおこなっていない。10月29日に検査し

表1-2. 魚病発生調査

Date (1983)	Fish name body No.	FL (mm)	B W (g)	Symptom
	No.3	118	24	During breeding of the wild fish, separation of the epidermis of the body near the base of the pectoral fin, and congestion of the periphery of the liver
11.7	Black sea bream No.1	393	1250	Hemorrhage and separation of the epidermis of the body, hemorrhage of the base of the caudal fin, the pectoral fin, and the anal fin, grow dull in color of the liver, and congestion of the intestine
	Red sea bream No.1	262	400	Depression of the base of the dorsal fin, swelling of the belly, and grow dull in color of a part of the liver
	Rabbit fish No.1	320	450	Hemorrhage of the caudal peduncle and the caudal fin, and the green liver
11.14	Black sea bream No.1	374	1020	Fall off of the eyes, adhered mucus on the body, separation of the epidermis of the snout, grow dull in color of the liver, and the thinned intestine wall
	Red sea bream No.1	241	360	The abnormal vertebra and grow dull in color of the liver
	2	233	290	The abnormal vertebra and grow dull in color of the liver
1.7 (1984)	Golden travally No.1	708	6350	Survived fish, congestion of the periphery of and exophthalmos of the eyes, hemorrhage of the inside of the opercle, and the white liver
2.6	Black sea bream (young) No.1	(17 bodies)		Survived fish, weakness
	2	(10 bodies)		Died fish
2.27	Black sea bream (female adult) No.1	393	1220	A little congestion of the inside of the opercle, a little of turn red of the breast, and grow dull in color of the liver

たアイゴは屋内飼育水槽での斃死が急性で激しく、細菌検査の結果でも各臓器から細菌を多量に分離した。11月7日に検査したミナミクロダイ、マダイ、およびアイゴ、11月14日に検査したミナミ

表2. 病魚の細菌検査

Date of isolation (1983)	Source	Organ of isolation			Affected part	Note
		Brain	Gill	Intestine		
4.2	Eel No.1 2	+++	++	++	+++	} The isolates of the liver and the kidney are two species, Agglutination of the isolates
		+++	++	++	+++	
4.15	Black sea bream No.1 2 3		+	++	+++	} The isolate of No.1 body's liver kidney
			+	++	+++	
			+	++	+++	
6.20	Carp No.1 2 3 4		+	+	+	} The isolates of each body and organ are two species.
			+	+	+	
			++	++	++	
			++	++	++	
7.16	Golden travally No.1 2 3		-	-	-	} The isolate will be a contamination.
			-	-	-	
			-	-	-	
7.20	Spangled emperor No.1 2		+	+	+	} The isolates of each body and organ are more than two species.
			+	+	+	
8.24	Golden travally No.1 2 3 4 5		-	-	-	} The isolate of the liver and the kidney doesn't grow on the cytophaga medium. } The isolates of the liver are two species. } The isolates of the liver and the kidney are two species.
			+++ ^c	+++ ^{bc*}	+++ ^{bc}	
			+++ ^c	+++ ^{bc*}	+++ ^{bc}	
			+++ ^{c*}	+++ ^{bc*}	+++ ^{bc}	
			+++ ^c	+++ ^{bc}	+++ ^{bc}	
9.7	Red sea bream No.1 2	+++ ^{bc}	+	+	+	} The homogenized solution of the body is a culture.
		+++ ^{bc}	+	+	+	
10.29 (1984)	Rabbit fish No.1 2 3	+++	+++	+++	+++	} The homogenized solution of the body is a culture.
		+++	+++	+++	+++	
		+++ [*]	+++ [*]	+++ [*]	+++ [*]	
11.7	Black sea bream No.1 2	+++	+++	+++	+++	} The homogenized solution of the body is a culture.
		+++	+++	+++	+++	
11.14	Red sea bream No.1 2 3 4	+++	+++	+++	+++	} The homogenized solution of the body is a culture.
		+++	+++	+++	+++	
		+++	+++	+++	+++	
		+++	+++	+++	+++	
1.7 (1984)	Golden travally No.1 2	+++	+++	+++	+++	} The homogenized solution of the body is a culture.
		+++	+++	+++	+++	
2.6	Black sea bream No.1(17 bod) 2(10 bod)	+++	+++	+++	+++	} The homogenized solution of the body is a culture.
		+++	+++	+++	+++	
2.27	Black sea bream No.1	+++	+++	+++	+++	

*: Preserved strain, c: Used of cytophaga medium, b: Used of BHI-agar medium, n: Used of nutrient agar medium, no mark: Used of BHI-agar medium

クロダイとマダイなどは特徴的な症状はみられたが細菌検査の結果では原因は不明である。1984年1月7日に検査したコガネシマアジは摂餌をほとんどしないまでに衰弱していた。2月6日に検査したミナミクロダイは斃死がかなりみられたので、魚体を生理食塩水とともにホモジナイズしてから細菌を培養した。2月27日に検査したミナミクロダイ親魚からは細菌が分離できず、症状などから水質の悪化に原因があると思われる。

なお、表2の備考は培地上のコロニーの特徴から判断したものである。

(2) 分離菌株の病原性再現試験

結果は表3に示すとおりである。

表3. 分離菌株の病原性再現試験

A株は白濁したコロニーを形成し、顕微鏡観察から運動性のある短桿菌であった。B株は透明なコロニーを形成して運動性がある。A株接種区では攻撃後24時間以内に100%の斃死率である。B株接種区と対照区では48時間後においても斃死魚はみられなかつた。

Hour after the challenge	8	24	48
A	2/5*	5/5	—
B	0/5	0/5	0/5
Control	0/3	0/3	0/3

A: Challenge with the suspended solution of the whitish colony

B: Challenge with the suspended solution of the transparent colony

Control: Challenge with 0.85% NaCl solution

*: No. of died fish/No. of used fish

た。すなわち、A株にはアイゴに対しての病原性が認められ、B株は分離操作途中に混入した雑菌であると思われる。

(3) 病原性の強さの検討

病原性再現試験の結果病原性が認められたアイゴ分離株についてのLD₅₀を算出するため、各種濃度における斃死率を求めた。結果は表4に示すとおりで、 1.06×10^6 と $\times 10^5$ CFU/body区が斃死率100%、 $\times 10^4$ と $\times 10^2$ CFU/body区が50%、 $\times 10^0$ と $\times 10^{-2}$ CFU/body区が33.3%であった。

表4. 分離菌株の病原性の強さの検討

Day after the challenge Concentration*	1	2	3	4	5	6	7	Died rate (%)
1.06×10^6	3/3**	-	-	-	-	-	-	100
$\times 10^5$	4/4	-	-	-	-	-	-	100
$\times 10^4$	0/4	1/4	2/4	2/4	2/4	2/4	2/4	50
$\times 10^2$	0/4	2/4	2/4	2/4	2/4	2/4	2/4	50
$\times 10^0$	0/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	33.3
$\times 10^{-2}$	0/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	33.3

*: Colony forming unit/body

** : No. of died fish/No. of used fish

4. 考 察

魚病発生調査について本年度は主として細菌検査のみをおこなったが、周年にわたり散発的に疾病が発生し、原因についても細菌性の場合やそれ以外の不明なものまでみられた。なお、分離菌株のうち感染症原因菌の凝いの濃いものは現在継代保存している。

分離菌株の病原性はアイゴからの分離菌株で確認した。総ての分離菌株で確認すべきであると思われるが、試験に用いる供試魚等の関係で充分におこなえない。

病魚から分離した細菌の病原性について、城らはアユにおいて *V. anguillarum* を魚体重 100g あたり 8.75×10^1 cells 筋肉内接種し、攻撃66時間後に 100% の斃死率を報告している。また、楠田らは魚体重約 17g のアユに *V. anguillarum* を 8.2×10^0 cells 筋肉内接種して 4 日後に 100% 斃死するとのべている。さらに、*V. anguillarum* の経口接種と菌浴攻撃での LD_{50} はそれぞれ 6.26×10^5 と 1.18×10^4 cells/fish であるとのべている。また、同時に分離した *Streptococcus* sp. の病原性について筋肉内接種では 6.2×10^2 cells/fish で 100% の斃死率を認めている。経口接種と菌浴攻撃による LD_{50} はそれぞれ 3.40×10^7 と 1.16×10^6 cells/fish であると報告している。これらのことから同じ細菌でも魚に対する攻撃方法が異なれば病原性の強さも異なり、また細菌独自の持つ病原性にも明らかな違いがみられる。*V. anguillarum* などは比較的すみやかに宿主に対する病原性を示し、養殖場での被害も急性型を示す場合が多い。それに対して *Streptococcus* 感染症は比較的ゆっくりと長期間にわたって発生し、積算被害の多いことで知られている。なお、アユにおける人為的な *Streptococcus* sp. 感染症では斃死直前の魚体内臓器での生菌数は $10^8 \sim 10^9$ cells/body までに上昇し、体内侵入後に急激に増加して敗血症状を示して斃死することが考えられる。

表 4 の結果からアイゴ病魚由来分離菌株の LD_{50} を算定すると 2.30×10^1 CFU/body で、自由度 4 の χ^2 -検定では使用した回帰直線に各点が良く集合して方法自体の妥当性も確認できた。また、推計学上の誤差から信頼度 95% の信頼限界は $1.91 \times 10^1 \leq LD_{50} \leq 2.70 \times 10^1$ CFU/body である。すなわち、この細菌の約 23 個が直接体内に侵入すれば 50% のアイゴを斃死させる。この数字は魚体重等を考えれば先の *V. anguillarum* や *Streptococcus* sp. よりも多少病原性が弱いように思われるが、この病原菌の分類学的位置や培養条件、アユに比べたアイゴの耐病性等病原性を比較するためには様々な要因を考慮する必要がある。また、今回は筋肉内接種のみで他の攻撃方法をおこなわなかったが、他の攻撃方法による LD_{50} は多少高い値になることが予想される。

5. 要 約

- (1) 魚病発生調査の結果周年にわたる疾病の発生が認められた。
- (2) アイゴ病魚由来菌株の病原性を確認した。
- (3) 上記菌株の病原性の強さを求め LD_{50} は 2.30×10^1 CFU/body、その 95% の信頼限界は $1.91 \times 10^1 \leq LD_{50} \leq 2.70 \times 10^1$ CFU/body と算定した。

6. 今後の課題

- (1) 保存菌株の分類学的位置の検討

- (2) 周年にわたる疾病の発生がみられるが、業務の都合等により対応の不充分さが感じられる。
- (3) 試験場内の情報は入手しやすいが 場外の情報がほとんど入らない。正確な病的被害を把握するためには対外的な活動が必要であると思われる。
- (4) 外観的症状の記載と細菌検査に重点を置いた魚病発生調査をおこなっているが、今後は組織学的知識に基づいた症状の検討、また寄生虫、細菌、およびウイルス性疾病、生理障害などの総合的考察が必要であると考ええる。
- (5) 人為的感染実験などに使用する供試魚の確保。
- (6) 文献等新しい知見の収集。

文 献

- 城 泰産・室賀清邦（1977）：アユのビブリオ病に関する研究－I. *Vibrio anguillarum* の病原性. 魚病研究、12（3）、151-155.
- 楠田理一・杉山昭博・川合研児・稲田善和・米田 実（1981）：アユに対する *Streptococcus* sp. ならびに *Vibrio anguillarum* の病原性について. 日水誌、47（8）、993-997.
- 杉山昭博・楠田理一・川合研児・稲田善和・米田 実（1981）：感染アユの体内における *Streptococcus* sp. の分布と消長. 日水誌、47（8）、1003-1007.
- 鳥居敏雄・高橋暁正・土肥一郎（1979）：医学・生物学のための推計学、第1版、東京大学出版会、東京、pp.38-118.