

ハマチの連鎖球菌症における餌料経由の人為経口感染について

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	谷口, 道子
巻/号	48巻12号
掲載ページ	p. 1717-1720
発行年月	1982年12月

ハマチの連鎖球菌症における餌料経由の人為経口感染について*¹

谷 口 道 子

(1982年5月11日受理)

Experiment on Peroral Inoculation via Food to Induce Yellowtail Streptococciosis

Michiko TANIGUCHI*²

The peroral inoculation experiments are considered to be important in the study for establishing preventive measures against the streptococciosis of yellowtail. Until now, it has not been possible to reproduce the streptococciosis in yellowtail with typical symptoms, so that in this study it was examined how to reproduce the typical symptoms by the peroral inoculation method through food. The typical symptoms of the disease observed in the peroral inoculation tests were as follows: ophthalmitis with bloody pus, redness at eyeball; melting of branchiostegal membrane, caseous pus and redness at inside of operculum; caseous pus at basal part of fins and caudal peduncle; bloody pus, redness at the part between palatine and vomer; redness of arterial bulb, thickening of epicardium and adhesive epicarditis; thickening of serosa, congestion and bleeding at liver. These symptoms appeared within 2 weeks after doseing the pathogen, when the pathogen was mixed into homogenized fish meat or injected under the skin of food fish. It was not so important to add the culture fluid of pathogen for promoting the appearance of symptoms. The effective number of pathogens dosed was 10^6 cells per individual yellowtail weighing 300-500 g in body weight in the case of mixing pathogen into homogenized fish meat, and 10^9 cells per individual yellowtail in the case of injecting pathogen under the skin of food fish.

昭和49年夏に発生が確認されて以来今日まで大きな被害を与えている養殖ハマチの連鎖球菌症の対策として、絶食や栄養剤の使用、餌料魚の選択、解凍方法の改善など餌に関連したことが数多く提案されている。¹⁾ また、本疾病の病原細菌が、餌料魚から検出されたという事例が報告されてから、^{1,2)} 本疾病の感染経路の一つとして、餌からの経口感染の可能性が考えられるようになった。本疾病に対する防疫対策を立案するうえで、餌からの経口感染の有無を確めることは重要であり、また、前述のような餌料にかかわる諸対策が真に有効なものであるかどうか実証することが必要である。このためには、種々の事例を想定した人為経口感染実験により、それらの発病要因を解析する必要があると考えられる。従来、ハマチの疾病において、人為経口感染によって発症させることは困難であると言われているが、連鎖球菌症においても成功したという報告は著者の知る限りでは見当らない。ここでは、病原細菌を餌とともに投与する方法を工夫することにより、養殖場で見られる病魚と同様の症状を示して高率で発病することが明らかにされたのでここに報告する。

実験方法

供試魚 高知県水産試験場の専用海面においてモジャコの時期から小割網生簀で養成されたハマチ *Seriola quinqueradiata* を用いた。供試魚の魚体重は300~500gであった。その餌料には冷凍イカナゴもしくは冷凍オオナゴに総合栄養剤を添加したものをを用いた。このようにして飼育した期間を養成期間と呼び、馴致期間や予備飼育期間と区別した。

感染方法 アクリル樹脂またはコンクリート水槽に、前日から餌止めをしておいた供試魚を収容し、後述の方法で病原細菌を投与した。菌投与後は無給餌、止水飼育とし、加温又は冷却によって水温を25°Cに保つように努めた。

供試菌株 高知県水産試験場で病魚から分離した *Streptococcus* sp. St-34 を用いた。

菌液の調整 加塩 BHI 寒天斜面培地で2日間の前培養の後、加塩 BHI ブイヨンで一昼夜培養したものを遠心分離によって集菌し、滅菌生理食塩水で一回洗浄後、所定の濃度に懸濁した。ただし、菌を培養液とともに投与する場合には、遠心分離後、上澄液として得た培養液

*¹ この研究の一部には、水産庁都道府県水産試験場育成強化事業費が用いられた。

*² 高知県内水面漁業センター (Kochi Pref. Freshwater Fish. Lab., Tosayamada, Kochi 782, Japan).

を用いて所定の濃度に懸濁した。投与菌数は、懸濁液中の菌量を平板希釈法を用いて計数し、菌投与に用いた菌液の量から計算によって求めた。

菌投与方法 魚肉汁を用いて投与する場合には、つぎのような方法によった。すなわち、冷凍オオナゴを同量の生理食塩水とともにホモジナイザーで乳糜状にした後、高圧滅菌を施した。これに上述の菌液を所定量加え、シリコン製ゾンデを用いて供試魚へ強制的に経口投与した (Exp-1)。魚肉をそのまま用いて投与する場合には、冷凍餌料魚を解凍した後、切身 (Exp-2a) か丸餌 (Exp-2b) の状態で適当な大きさにそろえ、前述の菌液を所定量ずつ、注射器を用いてすべての餌料魚の皮下に注入し、これを自由摂餌により摂取させた。病原細菌を餌料魚の表面に付着して投与する実験 (Table 3) においては、上述の菌液を餌料魚の表面に所定量滴下したのち、展着剤 (武田薬品工業製マイリッチ) を用いて餌料魚の表面を被覆した。

自由摂餌による菌投与にあたっては、実験水槽内で十分に餌につくようになるまで馴致してから実験を開始した。この期間を馴致期間、用いた餌料を馴致餌料と呼ぶ。馴致餌料は、特別の事情がないかぎり、菌投与餌料と同じものを、同じ形状で用いた。菌投与に際しての餌の量は、馴致期間中の摂餌量を参考にして、食べ残しが出ないように、かつ、すべての供試魚に行きわたるようにできるだけ多く与えることを配慮して、実験の都度決定した。このような方法で供試魚がほぼ均等に餌料魚を摂取することを、投餌直後の全供試魚の胃内容量を見ることにより、あらかじめ確かめた。

発病の判定 発病の判定は症状の有無、病原細菌の再検出、へい死率によって判定した。症状の有無の判定にあたっては、他の原因によるまぎらわしい症状を除外するため連鎖球菌症のみ現われる症状を対象とした。すなわち、眼球突出、心外膜炎、鰓蓋内側の発赤、乾酪膿もしくは血膿、鰓条骨間膜融解、鱗基部、尾柄部の乾酪膿もしくは血膿、口蓋骨歯と鋤骨歯周辺の乾酪膿もしくは血膿のいずれかが出現した場合を発症陽性とし、その他の症状は除外した。連鎖球菌症に特有の症状を呈したことを発症と呼び、供試尾数に対する発症魚の占める割合を発症率とし、百分率で表わした。病原細菌の再検出は、肝臓および心臓から、組織および血液を1白金耳かき取り、加塩 BHI 寒天平板に塗抹し、コロニー形成の有無を見る方法によった。病原細菌が再検出された尾数の全供試魚に占める割合をもって菌検出率とし百分率で表わした。このようにして求めた発症率、菌検出率、へい死率をもって、発病の難易を総合的に判断した。観察期間は、菌投与後2週間とした。

なお、実験が独立して行われた場合には単独の実験番

号 (Exp-No.) を付し、同時に平行して行われた実験には同一実験番号に a, b という符号を付して区別した。

結果ならびに考察

種々の方法で菌を投与した場合に見られた症状を各部位ごとにまとめて出現頻度を求め、Table 1 に示した。これによると、病原細菌を魚肉汁に混じたり、魚肉の皮下に注入して投与すれば、養殖場で見られる病魚と同様の症状を示して発病することが明らかになった。ただし、本疾病の特徴の一つとされている眼球突出は、今回の実験 46 例中 1 例も認めることはできなかった。また、この実験以後ひきつづいて実施した感染実験においても、1,100 例中わずかに 8 例認めたとどまった。一方、心外膜の肥厚、癒着、各部位における乾酪膿、血膿の形成は、病原細菌が再検出されたグループにおいて高率で出現した。これまで、肝臓のうっ血斑も本疾病の特徴とされてきたが、病原細菌を投与しなかった対照区においても高率で認められており、逆に、菌投与区の病原細菌が再検出されたグループにおいてもあまり高い出現率ではなかった。したがって、肝臓のうっ血斑は、今回のような実験条件のもとでは、連鎖球菌症の発症を判断する症状から除外すべきであると思われる。同様の理由によって、鰓蓋内側の毛細血管の充血による赤変や、腸の毛細血管の充血、粘膜の発赤および崩壊も本疾病によるものと他の原因によるものととの区別がつけ難いので、発症の有無を判定するための症状からは除外すべきであると考えた。一方、これまで報告のなかった口腔内の口蓋骨歯と鋤骨歯周辺部にも、尾柄部などに見られるのと同様の乾酪膿や血膿が形成された。この膿からは連鎖球菌が検出され、しかも、この症状は菌投与区のうち菌再検出グループにのみ認められたので、他の部位における乾酪膿、血膿と同質のものと判断され、本疾病の症状の一つに加えた。菌投与区の病原細菌再検出陰性グループで見られた症状を見ると、上述のような連鎖球菌症に特有の症状はほとんど出現せず、46 例中 5 例において認められたにとどまった。一方、病原細菌再検出陽性グループにおいて、連鎖球菌症の症状が全くどの部位にも出現しなかったのは 46 例中 3 例であった。

Table 1 の Exp-2a と Exp-2b を比較して見ると、全体の発症率、菌検出率に大きな差が認められる。この実験は菌投与に用いた餌の種類および形状が異なる他は、すべて同一の条件で同時に実施された。したがって餌の種類の違い又は形状の違いが発病に影響を及ぼした可能性が考えられる。また、この実験においては、菌を投与するまでの馴致に2週間を要したので、この期間中に用いた餌の種類の違いが発病の素因としてはたらいいたことも考えられる。いずれにせよ、この点については、防疫

Table 1. Symptoms of the streptococciosis caused by peroral inoculation and their incidence (%)

Symptoms	Exp-1* ¹		Exp-2a* ²		Exp-2b* ³		Control	
	Pathogen Positive (7)* ⁴	Negative (9)	Pathogen Positive (7)	Negative (3)	Pathogen Positive (1)	Negative (9)	Pathogen Positive (0)	Negative (10)
Eyeball								
exophthalmus	0	0	0	0	0	0	—	0
ophthalmitis with bloody pus	0	0	29	0	0	0	—	0
redness of cornea	6	0	0	0	0	0	—	0
no symptom	94	100	71	100	100	100	—	100
Inside of operculum								
melting of branchiostegal membrane	0	0	43	0	0	0	—	0
caseous pus	42	33	43	0	0	0	—	0
redness	29	0	43	0	0	0	—	0
congestion	43	56	0	0	0	0	—	30
no symptom	14	11	43	100	100	100	—	70
Basal part of fins and caudal peduncle								
caseous pus	57	11	43	0	0	0	—	0
no symptom	43	89	57	100	100	100	—	100
Space between palatin and vomer								
bloody pus	29	0	0	0	0	0	—	0
caseous pus	0	0	43	0	0	0	—	0
redness around bones	29	0	43	0	0	0	—	0
no symptom	71	100	57	100	100	100	—	100
Heart								
redness of arterial bulb	14	11	0	0	0	0	—	0
thickening of epicardium	86	11	71	67	100	11	—	0
adhesive epicardium	43	11	71	67	100	0	—	0
no symptom	14	78	29	33	0	89	—	100
Liver								
thickening of serosa congestion and bleeding	0	0	14	0	0	0	—	0
no symptom	71	7	43	67	0	22	—	80
no symptom	29	33	43	33	100	78	—	20
Stomach								
redness	43	56	0	0	0	0	—	0
congestion	43	11	0	0	0	0	—	0
no symptom	0	33	86	100	100	100	—	100
Intestine								
fall of mucus membrane	100	56	26	67	0	89	—	40
redness	71	33	71	100	100	67	—	90
congestion	0	22	14	0	0	22	—	10
no symptom	0	11	0	0	0	0	—	0
Symptom positive (%)	56		70		10		0	
Pathogen positive (%)	44		70		10		0	
Mortality (%)	31		10		0		0	

*¹ Inoculation was executed by mixing pathogen counted 4×10^8 cells into homogenized food.*² Inoculation by injecting pathogen counted 7×10^9 under the skin of chopped mackerel as food fish.*³ Same to the Exp-2a, but used whole sand lance as food fish.*⁴ Observed number of fishes.

Strain St-34 was used as the pathogen in these experiments.

Table 2. Influence of culture fluid on the streptococcosis of yellowtail by peroral inoculation test

	Without culture fluid	With culture fluid
Symptom positive (%)	40	50
Pathogen positive (%)	60	50
Mortality (%)	40	20

The inoculation test was executed by mixing pathogen into homogenized food. Strain St-34 was used as the pathogen. Dosed number of inoculum was 4×10^4 cells per individual.

Table 3. Comparison of incidence between inoculation methods by the peroral inoculation test of streptococcosis for yellowtail

	Application method of pathogen	
	On the surface of food fish	Under the skin of food fish
Symptom positive (%)	0	0
Pathogen positive (%)	0	50
Mortality (%)	0	10

Dosed number of inoculum was 1×10^9 cells per individual. Strain St-34 was used.

対策とも結びつく重要な問題であるので、次報において更に詳しく検討したい。

つぎに、病原細菌を投与する際の培養液の効果について述べる。木村³⁾らによれば、培養液中の毒素が魚体内での病原細菌のまんえんを促進したり、へい死に導くことが報告されている。しかしながら、今回の実験では Table 2 に示すように、発症率、菌検出率、へい死率のいずれにおいても発病を促進する効果は認められなかった。

病原細菌を餌料魚に混入する方法と発病との関係については、Table 3 に示すように、餌料魚の外側に付着させただけでは発病せず、餌料魚の皮下に注入して投与する必要のあることが明らかになった。

発病に必要な投与菌量は、魚肉汁に混じてゾンデを用いて投与する場合には、ハマチ 1 尾あたり 10^5 個で充分であったが、餌料魚の皮下に注入して投与する場合に

は、 10^9 個またはそれ以上必要であった。

終りに臨み、本研究は、高知県水産試験場において、当試験場の病害防除試験の一部として行われたものであり、研究を進めるにあたり、多大のご理解とご協力をいただいた場長はじめ職員諸氏に感謝いたします。

要 約

ハマチの連鎖球菌症において、人為経口感染を成功させることを目的として種々の方法を試みたところ、つぎのような結果が得られた。

1. 餌料魚に病原細菌を混入して投与したところ、養殖場で見られる病魚と同様の症状を示して発病した。
2. 餌料魚とともに病原細菌を投与した場合、病原細菌の培養液の存在の有無は発病に影響を与えなかった。
3. 餌料魚に病原細菌を混入する方法として、餌料魚の表面に展着剤を用いて病原細菌を付着させる方法と、病原細菌を皮下に注入する方法を比較したところ、前者の方法では発病させることが困難であり、後者の方法を用いたほうが発病させやすいことが明らかになった。
4. 発病に必要な投与菌数は、魚肉汁を用いた場合は、 $300 \sim 500$ g のハマチ 1 尾あたり 10^5 個であり、餌料魚の皮下に注入して投与した場合は、 10^9 個またはそれ以上必要であった。
5. 菌投与に用いた餌の形状、種類や、飼育に用いた餌料が発病に大きな影響を与える可能性が示唆され、本疾病の予防対策にも関連する重要な課題として提起された。

文 献

- 1) 谷口道子：海産養殖魚類の病害対策の現状と問題（南西海区ブロック会議 魚貝類研究会魚病班編），日本水産資源保護協会，東京，1980，pp. 259-268.
- 2) 楠田理一：養殖魚における病害の予防に関する研究，農林水産技術会議事務局，1980，pp. 115-121.
- 3) 木村 創・楠田理一：昭和 54 年度魚病対策技術開発研究成果報告書，日本水産資源保護協会，東京，1980，pp. 12-39.