

# 飼育水温によるパラコロ病実験的感染ウナギからの放出菌数の差異について

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	石原, 秀平 楠田, 理一
巻/号	49巻9号
掲載ページ	p. 1341-1345
発行年月	1983年9月

## 飼育水温によるパラコロ病実験的感染ウナギからの 放出菌数の差異について<sup>\*1</sup>

石原 秀平・楠田 理一

(1982年12月24日受理)

### Variations in Viable Cell Counts of Released *Edwardsiella tarda* from Experimentally Infected Eel at Different Temperatures

Syuhei ISHIHARA and Riichi KUSUDA<sup>\*2</sup>

To obtain necessary information about the infection mechanisms of edwardsiellosis in eel, variation in the number of pathogenic bacterial cells released from the diseased eel was investigated. Eel were injected with *Edwardsiella tarda* intramuscularly and kept individually in aquaria incubated at 20°C, 25°C and 30°C respectively. Two sets of aquaria were prepared at specified temperature. Dead eel were taken off from one set while they were left in the other set.

The number of released cells reached almost the same level ranging from  $10^5$  to  $10^6$  cells/ml at the three temperatures in common, but the increase in the number of cells was faster at higher temperature than at lower temperature. The number of cells increased very much in aquaria in which dead eel were left, and reached about 1,000 times as many as that in aquaria from which dead eel were taken off. The level of the number was maintained throughout the experimental period of 21 days.

From these results, it is confirmed that diseased eel release a great number of pathogenic bacteria, consequently the infection would spread throughout the pond if diseased eel are not taken off.

*Edwardsiella tarda* に起因するウナギのパラコロ病の感染機構を解析するためには、伝染源を明らかにする必要がある。伝染源に関して、若林ら<sup>1)</sup>は養鰻池水から本菌が分離されることはまれであるとしており、また反町ら<sup>2)</sup>は健康なウナギから検出されることも少ないことを報告している。

いっぽう、楠田ら<sup>3)</sup>は本菌の強毒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、致死量以上接種するとすべての臓器で増殖してウナギを致死させ、斃死魚からは多数の菌が検出されることを報告している。また、致死量以下でも魚体内に長時間存在することから、保菌魚となる可能性のあることを示唆している。これらのことから、病魚あるいは保菌魚から菌が放出され、伝染源の一つとなるのではないかと考えられた。

そこで、本研究では本病の伝染源を明らかにするために、種々の飼育水温における実験的感染ウナギから放出される本菌の経時的变化を、感染後に斃死した魚体を取

り上げた場合と、そのまま放置した場合について検討した。また、斃死しなかった魚体についても調査し、実験終了後に保菌状態の調査を行った。

#### 実験方法

**実験水槽の設置** 飼育水槽には 14×24×19 cm のアクリル水槽を用いた。これに 5 l の地下水を入れたのち、水温調節用の外水槽に収容した。外水槽はヒーターとサーモスタットを使用し、水温が 20°C、25°C および 30°C となるように調節した。なお、飼育水槽は各温度について、それぞれ 6 個ずつ設置した。

**供試魚** 本病に対して感染経験のない、体重 100~160 g (平均体重 120 g) のウナギをハウス加温池から採取して用いた。これらの供試魚を飼育水槽にそれぞれ 1 尾ずつ収容し、5 日間予備飼育した。

**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 *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)

\*1 本研究は 1980 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).

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, アンプルに注入したのち凍結する方法で行った。

**感染方法** 感染に用いる菌液の調製は次の方法で行った。すなわち, 自然解凍した凍結保存菌液およそ 0.05 ml を 1.5% 食塩加 BHI 寒天 (Difco 社製) 斜面に接種したのち, 37°C で 24 時間培養した。これを 1.5% 食塩加 BHI プイオンに接種して 37°C で 6 時間培養後, 1.5% 食塩加 BHI 寒天で 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整して接種菌液を作製した。接種菌量は 1 尾あたり  $10^{7.6}$  個とし, これをウナギ背鰭前端付近の筋肉内に接種して実験的に感染させた。

**放出菌数の算定** 経時的に各飼育水槽から 1 ml ずつ採水してそのまま, あるい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 48 時間培養後に生じた黑色コロニー数と希釈倍数から, 試水 1 ml あたりの菌数を測定した。なお, 感染後に斃死したウナギは, ただちに取り上げた場合とそのまま放置した場合に分け, それらについて継続して菌数の測定を行った。

**生残魚からの菌検出** 菌接種 21 日後まで生残したウナギを供試し, 次の方法で行った。すなわち, ウナギから腎臓を無菌的に摘出したのち, これに 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 1 ml を放出菌数の算定と同様の培地を用いて混釈し, 37°C で 48 時間培養した。そして, 出現した黑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って本菌であることを確認した。

## 結 果

飼育水温が 30°C のとき, 供試したウナギ 6 尾は菌接種 5~6 日後にすべて斃死した。感染後に斃死したウナギをただちに取り上げた場合と, そのまま放置した場合の飼育水中における本菌の経時変化は Fig. 1 に示すとおりである。すなわち, 接種 2 日後までの菌数は一定でなく個体差が認められたが, 3 日後からはすべての水槽において検出されるようになり, その後は急激に増加した。そして, 斃死直前には飼育水 1 ml あたり  $10^{4.2} \sim 10^{4.9}$  個の菌が検出された。斃死したウナギをただちに取り上げると, 菌数はすみやかに減少し, はやいものでは斃死 3 日後に, おそいものでも 10 日後には検出限界以下となった。これに対して, 斃死魚をそのまま放置すると, 菌数は急激に増加して斃死 3 日後には  $10^{7.3} \sim 10^{7.5}$  個となり, その後は一定数を維持した。なお, 斃死魚は

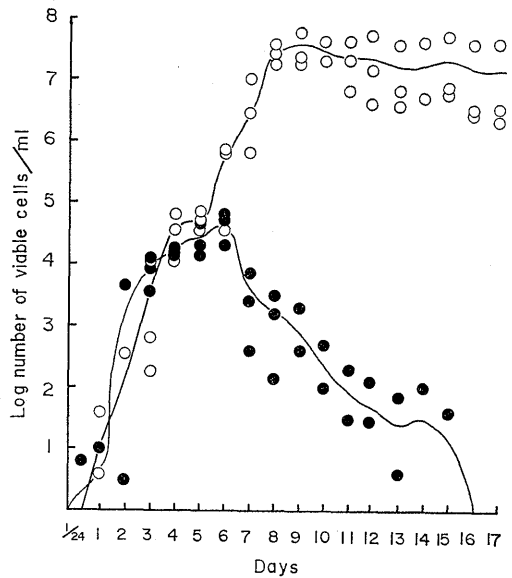


Fig. 1. Changes in number of viable *E. tarda* cells in the aquarium water at 30°C after injection.

●: Eel were taken off from the aquarium after death.

○: Dead eel were left in the aquarium.

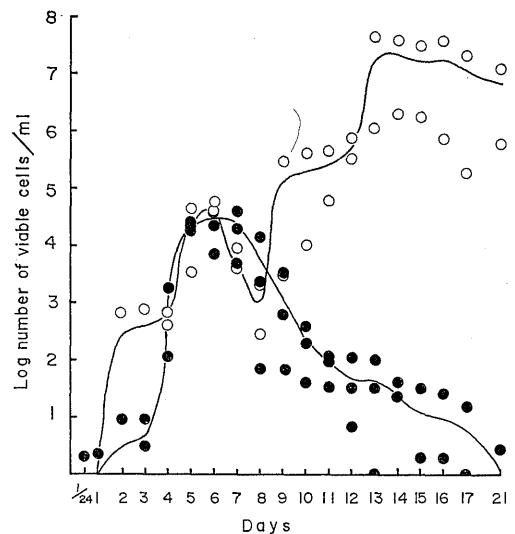


Fig. 2. Changes in number of viable *E. tarda* cells in the aquarium water at 25°C after injection.

●: Eel were taken off from the aquarium after death.

○: Dead eel were left in the aquarium.

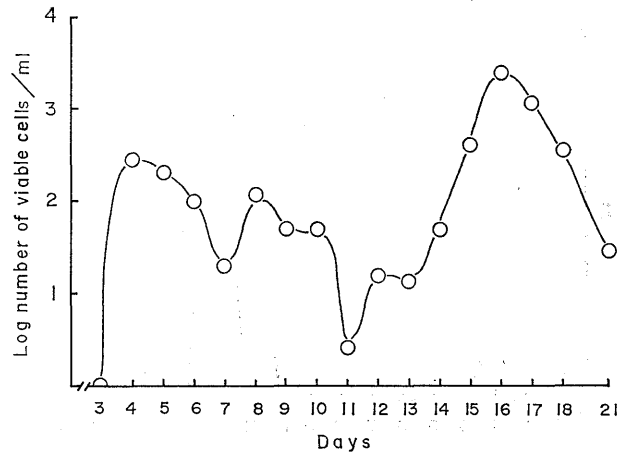


Fig. 3. Changes in the number of viable *E. tarda* cells in the aquarium water at 25°C after injection. The injected eel survived.

実験終了後に完全に腐乱し、筋肉組織が融解していた。

飼育水温が 25°C のとき、供試したウナギ 6 尾中 5 尾は接種 7 日後に斃死した。感染後に斃死したウナギをただちに取り上げた場合と、そのまま放置した場合の飼育水中における本菌の経時的变化は Fig. 2 に示すとおりである。すなわち、接種 4 日後までの菌数は 30°C のときと同じく一定でなく、かなりの個体差が認められたが、5 日後からはすべての水槽においてほぼ一定の菌が検出された。そして、斃死直前には飼育水 1 ml あたり  $10^{3.8} \sim 10^{4.8}$  個の菌が検出された。斃死したウナギをただちに取り上げると、菌数は徐々に減少して斃死 6 日～15 日後には検出限界以下となった。これに対して、斃死魚をそのまま放置すると、菌数は斃死 2 日後まで減少して  $10^{2.5} \sim 10^{3.4}$  個となるが、その後は急激に増加して 6 日後には  $10^{3.0} \sim 10^{7.6}$  個となった。なお、斃死魚は 30°C のときと同じく実験終了後に完全に腐乱し、筋肉組織が融解していた。

飼育水温が 25°C のとき、斃死しなかったウナギを収容した飼育水における本菌の経時的变化は Fig. 3 に示すとおりである。すなわち、接種 4 日後に  $10^{2.5}$  個の菌が検出された。その後は増減をくり返しながら、接種 21 日後まで検出されたが、 $10^{3.4}$  個以上の菌が認められることはなかった。なお、本菌は接種 21 日後の保菌状態の調査においても検出された。

飼育水温が 20°C のとき、供試したウナギ 6 尾中 2 尾は接種 9 日および 11 日後に斃死した。感染後に斃死したウナギをただちに取り上げた場合と、そのまま放置した場合の飼育水中における本菌の経時的变化は Fig. 4 に示すとおりである。すなわち、本菌は接種 5 日後までほとんど検出されなかったが、6～7 日後に  $10^{2.8} \sim 10^{3.4}$

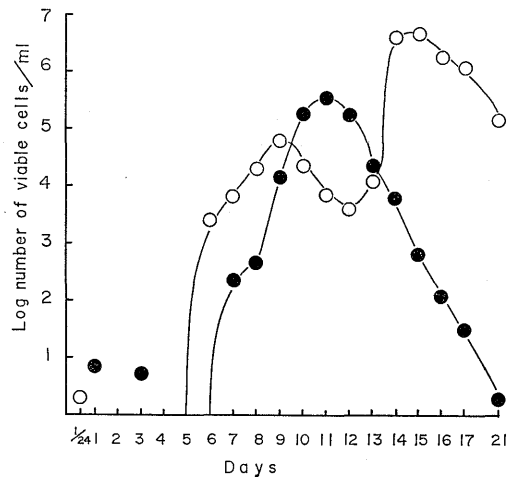


Fig. 4. Changes in the number of viable *E. tarda* cells in the aquarium water at 20°C after injection.

●: Eel were taken off from the aquarium after death.

○: Dead eel were left in the aquarium.

個認められ、その後は徐々に増加した。斃死したウナギをただちに取り上げると、菌数は徐々に減少して斃死 10 日後には 3 個となった。これに対して、そのまま放置すると菌数は斃死 3 日後まで減少して  $10^{3.6}$  個となるが、その後は急激に増加して 5 日後には  $10^{6.6}$  個となった。

飼育水温が 20°C のとき、斃死しなかったウナギを収容した飼育水中における本菌の経時的变化は Fig. 5 に示すとおりである。すなわち、検出される菌数に個体差が認められたが、 $10^{4.1}$  個以上の菌が検出されることはなかった。また、本菌は接種 21 日後の保菌状態の調査においても No. 2～4 の魚体から検出された。

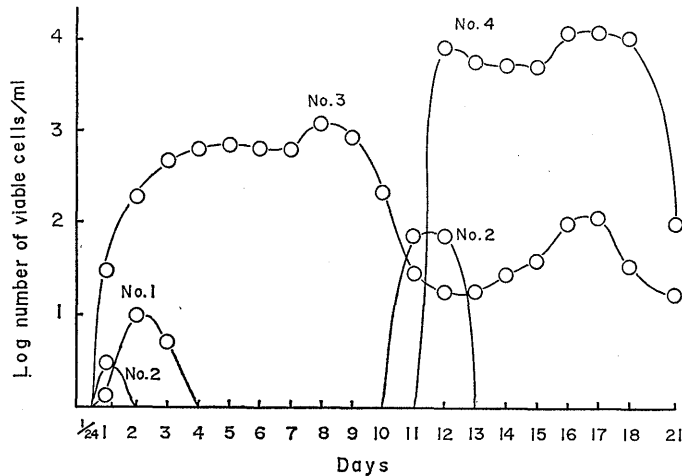


Fig. 5. Changes in the number of viable *E. tarda* cells in the aquarium water at 20°C after injection. All the injected eel survived. Numbers in the figure indicate each experimental aquarium.

## 考 察

本病の感染機構を解析するためには、伝染源の一つと考えられる病魚から放出される菌について詳細に検討しなければならない。そのためには、菌が放出される部位やその数を的確に把握する必要があるが、菌が放出されると考えられる病魚の患部や排泄物から、直接菌を計数することは困難である。そこで、本研究では実験的感染ウナギを種々の水温で飼育し、飼育水中における本菌の経時的变化について検討した。

本法において検出される菌数は、放出された菌が死滅あるいは増殖することが考えられるので、絶対数であるとはいえない。しかし、現状では病魚からの放出菌数を把握する最善の方法であると思われる。

各飼育水温において、感染してから斃死するまでの経時的变化を検討した結果、本菌は飼育水温が高いほどすみやかに放出されることが明らかとなった。すなわち、30°Cでは接種3日後からすべての水槽において検出されるようになり、その後は急激に増加して5~6日後にピークに達した。これに対して、25°Cでは接種5日後から検出されるようになり、7日後にピークとなった。また、20°Cでは接種5日後までほとんど検出されず、6~7日後から徐々に増加して9~12日後にピークとなった。この理由としては、本菌の活性温度が高いためと考えられる。著者ら<sup>4)</sup>は本菌の発育に対する温度の影響について検討し、発育至適温度は30~37°Cであることを報告した。したがって、飼育水温が高い場合、本菌は魚体内においてもすみやかに増殖して体外に放出される速度がはやくなるのではないかと考えられる。

楠田ら<sup>3)</sup>はウナギに対して本菌による実験的感染を行って、菌の分布ならびに消長について検討し、各臓器内菌数は斃死直前に急激に増加することを報告している。本実験においても、いずれの水温でも斃死直前に菌数が著しく増加することを確認しており、斃死直前には魚体内で増殖した多数の菌が体外に放出されるものと思われる。

斃死直前に検出される菌数を、各飼育水温について比較すると、30°Cでは $10^{4.2} \sim 10^{4.9}$ 個、25°Cでは $10^{3.0} \sim 10^{4.8}$ 個、20°Cでは $10^{4.8} \sim 10^{5.5}$ 個であった。このように、本実験においては飼育水温の差異によって、斃死するまでの放出菌数に大差は認められなかった。しかし、20°Cの場合にはほかの温度と比較して、わずかに多くの菌が検出された。この理由としては、水温が低い場合には病気の進行がおそいため、長期間にわたって菌が放出されるためと考えられるが、20°Cの場合には供試魚が1尾なのではっきりとしたことはわからない。

本病の伝染を防ぐためには、養鰻場において斃死魚をすみやかに除去しなければならないと考えられる。しかし、斃死魚の取り上げ効果がどの程度認められるかについては、実際には検討されていない。そこで、本実験では感染後斃死した魚体をすみやかに取り上げた場合と、そのまま放置した場合における本菌の経時的变化について検討した。その結果、斃死魚を取り上げると、菌数はいずれの飼育水温においても減少することが明らかとなった。すなわち、30°Cでは菌数はすみやかに減少して、斃死3日~10日後に検出限界以下となった。また、25°Cでは斃死6~15日後に、20°Cでは10日後にほとんど検出されなくなった。このように、斃死魚を取り上

げると菌数が減少して検出されなくなることは、病魚から放出された菌が飼育水中で生存できなくなり、死滅するためだと考えられる。

いっぽう、斃死魚をそのまま放置すると、30°C では菌数はただちに増加して、斃死3日後に  $10^{7.8} \sim 10^{7.5}$  個となった。また、25°C では斃死2日後まで減少して  $10^{6.5} \sim 10^{6.4}$  個となったのち急激に増加し、6日後に  $10^{8.0} \sim 10^{7.6}$  個となった。さらに、20°C でも斃死3日後まで減少して  $10^{3.6}$  となったのち増加して5日後に  $10^{3.6}$  個となった。若林ら<sup>5)</sup>は *Chondrococcus columnaris* を一定量入れた水槽にドジョウを収容し、飼育水中における菌の消長について検討した結果、ドジョウが斃死すると菌数は急激に増加することを報告している。本実験においても斃死魚をそのまま放置しておく、いずれの温度においても菌数は増加して、斃死直前の数千倍となった。これは、斃死魚が腐敗細菌によって急激に分解されるために、体内に存在する *Edwardsiella tarda* が水槽中に放出されるものと考えられる。また、飼育水温が25°Cと20°Cの場合には菌数が斃死後にいったん減少することを確認した。この理由としては、斃死後の一定時間は菌が放出されないか、放出されてもわずかであるために、飼育水中で死滅する菌の方が放出される菌よりも多くなり減少するのではないかと思われる。しかし、菌の放出が止まる、あるいは減少する原因については不明である。

感染後に斃死しなかった魚体は25°Cで1尾、20°Cで4尾存在した。しかし、いずれの水槽からも本菌が検出され、これら魚体からも菌が放出されることが確認された。また、接種21日後に保菌調査を行った結果、20°Cにおける1尾を除いて、そのほかの魚体からは本菌が検出された。このことから、一度感染した魚体は保菌魚となる可能性のあることが示唆された。

なお、いずれの飼育水温においても接種1時間後に、わずかに菌が検出される水槽が認められたが、これは接種菌がもれたものと考えられる。

以上のことから、放出菌数は飼育水温の差異によって大差は認められなかったが、菌の放出は水温が高いほどすみやかであった。また、斃死直前には魚体内で増殖した多数の菌が放出されることが明らかとなった。斃死魚を取り上げると、いずれの水温においても菌は減少したのに対して、そのまま放置した場合には、斃死直前の数千倍の菌が検出された。また、水温が低い場合には斃死魚をそのまま放置しても、菌数はいったん減少すること

が確認された。さらに、斃死しなかった魚体からも菌が放出されることが明らかとなり、実験終了後にもほとんどの魚体が保菌していた。これらのことから、病魚あるいは斃死魚から放出される菌は伝染源になることが明らかとなった。今後は菌が放出される部位を詳細に検討するとともに、本病の流行している養鰻池水中における本菌の動態を明らかにする必要があるものと思われる。

## 要 約

*Edwardsiella tarda* に起因するウナギのバラコロ病の伝染源を明らかにするために、種々の飼育水温における実験的感染ウナギから放出される本菌の経時的变化を、感染後に斃死した魚体を取り上げた場合と、そのまま放置した場合について検討した。また、斃死しなかった魚体についても調査し、実験終了後に保菌状態の調査を行った。

その結果、放出菌数は飼育水温の差異によって大差は認められなかったが、菌の放出は水温が高いほどすみやかであった。また、斃死直前には魚体内で増殖した多数の菌が放出されることが明らかとなった。斃死魚を取り上げると、いずれの水温においても菌は減少したのに対して、そのまま放置した場合には斃死直前の数千倍の菌が検出された。また、水温が低い場合には斃死魚をそのまま放置していても、菌数はいったん減少することが確認された。さらに、斃死しなかった魚体からも菌が放出されることが明らかとなり、実験終了後にもほとんどの魚体が保菌していた。

これらのことから、病魚あるいは斃死魚から放出される菌が伝染源になりうることが明らかとなった。したがって、養鰻場において本病の蔓延を防止するためには、斃死魚を発見しだい除去し、環境を衛生的な状態に保つよう努力すべきことが示唆された。

## 文 献

- 1) 若林久嗣・金井欣也・江草周三：魚病研究，**11**，63-66 (1976).
- 2) 反町 稔・江草周三：魚病研究，**6**，1-7 (1971).
- 3) 楠田理一・石原秀平：日水誌，**47**，475-479 (1981).
- 4) 石原秀平・楠田理一：日水誌，**48**，483-488 (1982).
- 5) 若林久嗣・江草周三：魚病研究，**7**，58-63 (1972).