

ヒラメ養殖場における *Edwardsiella tarda* の分布

金井欣也*・田脇誠一*・内田洋祐*

(1987年11月4日受付)

An Ecological Study of *Edwardsiella tarda* in Flounder Farm

Kinya KANAI, Seiichi TAWAKI and Yousuke UCHIDA

Faculty of Fisheries, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi,
Nagasaki 852, Japan

(Received November 4, 1987)

Edwardsiella tarda, a well-known freshwater fish pathogen, has been recognized as an important pathogen of marine fish recently. Flounder (*Paralichthys olivaceus*) is one of such species.

For elucidating the ecology of *E. tarda* in marine environment, the distribution of the bacterium in a flounder farm in Nagasaki city was examined in 1985 and 1986 by means of direct plating method on SS (*Salmonella* and *Shigella*) agar and enrichment culture method in DSSS (WYATT *et al.*, 1979) and strontium chloride B (IVESON, 1971) medium.

E. tarda was hardly detected from sea water or fouling materials on net cages except for during epizootic, but was isolated everytime from the intestines of 10 to 50% of apparently healthy flounder. During the epizootic the incidence of *E. tarda* in the intestines rose to 60 to 100% of the samples. When the number of *E. tarda* in the intestines rose more than 10^8 CFU/g, the bacterium was also tend to isolate from the kidney. All of 13 selected isolates from environment and the intestines were found to be virulent to eel.

ヒラメ養殖が普及するにつれ、1980年頃より腸内細菌科の細菌 *Edwardsiella tarda* を原因菌とするエドワジエラ症が発生しており、各地で少なからぬ被害を与えている(安永ら, 1982; 中津川, 1983)。本症は初夏から秋までの高水温期に流行しやすく、短期間に大量に死ぬことは少ないものの、一旦発生すると長期間斃死が続くことが多い。

E. tarda は米国ではキャットフィッシュ、日本ではウナギ、ティラピアなど淡水魚の魚病菌としてよく知られているが(MEYER and BULLOCK, 1973; WAKABAYASHI and EGUSA, 1973; 宮下, 1984)、生態調査により本菌が養魚環境や健康魚の腸内に常在化していることが明らかにされている(WYATT *et al.*, 1979; 渡辺・古橋, 1981; 皆川ら, 1983)。また、養鰻池に分布する *E. tarda* にはいくつかの血清型の菌が存在し、特定の血清型が疾病の流行に関与している可能性が示唆されている

(朴ら, 1983)。一方、ヒラメ由来の *E. tarda* は、発育至適塩分濃度が0~0.5%であり、塩分が3%を越えると増殖性が著しく低下する(安永ら, 1982)ことから陸上由来の菌と思われるが、養殖場における *E. tarda* の生態やエドワジエラ症の流行のメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。

そこで、著者らは1985年と1986年に長崎市内のヒラメ養殖場において *E. tarda* の分布を調査し、原因菌の動態とエドワジエラ症の発生との関係を検討した。

材料および方法

Fig. 1は長崎市牧島周辺の養殖筏配置図である。ここではヒラメのほか、マダイやトラフグなども養殖されている。

1985年6月は長崎市水産種苗センターの陸上水槽、7月から翌年3月まではセンターの海面網いけすを対象に毎月1回、10尾のヒラメ当歳魚の体表および腸管、

* 長崎大学水産学部

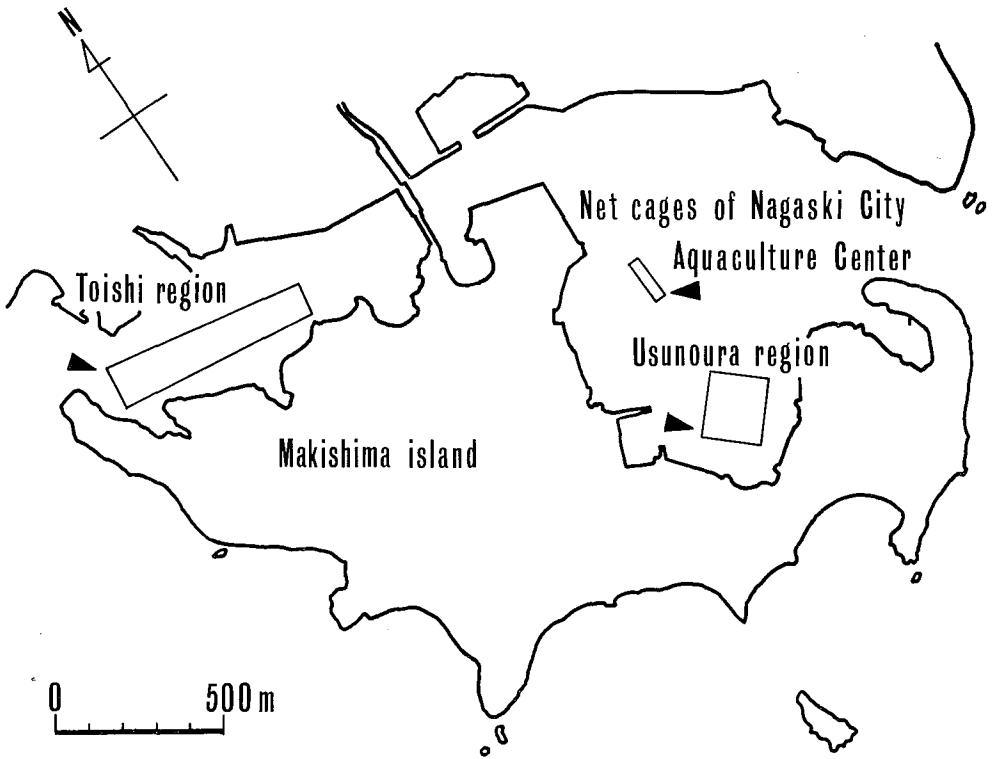


Fig. 1. Distribution of culturing net cages around Makishima island. Arrows indicate the sampling sites.

環境水、網付着物などから *E. tarda* の定量的検出を試みた。1986年6月から12月までは、戸石、白の浦両地区の予め定めた業者のいけすよりヒラメ当歳魚を毎回各々20尾ずつ取り上げ、腎臓や腸管などからの試料について、定量法と増菌法を併用して *E. tarda* の検出を行った。すなわち、鰓蓋後方から尾柄部にかけて軀幹部体表粘液を掻き取りSS寒天に塗抹した後、無菌的に解剖して、普通寒天を用いて腎臓から細菌の分離を行った。腸管後部を内容物ごと切り出し、PBSを加えて摩砕後、定量的に希釈して希釈液の0.1mlをSS寒天に塗抹した。海水は懸濁物を遠心分離(10,000rpm, 30分)で集め試料とした。増菌法では、摩砕した各試料を5mlのDSSSブイヨン(WYATT *et al.*, 1979)およびストロンチウムBブイヨン(IVESON, 1971)にそれぞれ0.5mlずつ接種し、37°Cで3~4日間培養後、培養液の白金耳量をSS寒天に塗抹した。

27°Cあるいは37°Cで2~4日間培養後、周囲が透明で中心部が黒色のコロニーをSS寒天より釣菌し、性状試験とスライド凝集試験を行った。そして、グラム陰

性の通性嫌気性菌であり、チトクロームオキシダーゼが陰性、TSI培地で硫化水素を産生し、リジン脱炭酸およびインドール試験が陽性で、運動性を有するものを *E. tarda* と同定した。スライド凝集試験にはウナギ病魚由来菌株NUF 49で作製したウサギO抗血清(凝集価1:2048)の10倍希釈液を使用した。なお、定量凝集試験は供試菌の121°C、90分加熱死菌を抗原とし、マイクロタイター法で行った。

結 果

1985年度の調査のうち、腸管からの *E. tarda* の検出状況を Fig. 2 に示す。6月は陸上の種苗について調べたが、沖出し後の7月の調査とともに *E. tarda* は検出されなかった。10月以降は調査したいけすで時折病魚がみられ、腸管1gあたり 10^4 CFU以上の *E. tarda* を保菌している個体がしばしば見られた。体表では11月に2尾、12月に1尾から検出されたに過ぎなかった(Table 1)。海水および網付着物は何れの月も検出限界以下であった。

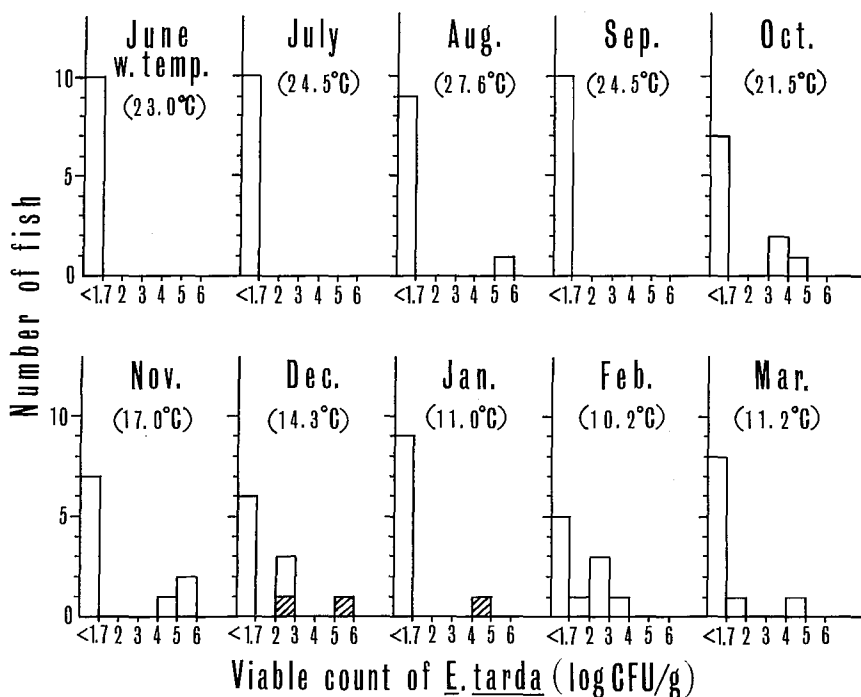


Fig. 2. Viable count of *E. tarda* in the intestines of flounder cultured in a net cage of Nagasaki City Aquaculture Center (June in 1985 to Mar. in 1986).

▨: Fish, *E. tarda* was isolated from the kidney.

Table 1. Incidence of *E. tarda* in sea water, fouling materials of net cage and body surface of flounder (June in 1985 to Mar. in 1986).

Month	Sea water	Fouling materials of net cage	Body surface
June	<10CFU/l	<100CFU/g	0/10*
July	<10CFU/l	<100CFU/g	0/10
Aug.	<10CFU/l	<100CFU/g	0/10
Sep.	<10CFU/l	<100CFU/g	0/10
Oct.	<10CFU/l	<100CFU/g	0/10
Nov.	<10CFU/l	<100CFU/g	2/10
Dec.	<10CFU/l	<100CFU/g	1/10
Jan.	<10CFU/l	<100CFU/g	0/10
Feb.	<10CFU/l	<100CFU/g	0/10
Mar.	<10CFU/l	<100CFU/g	0/10

* No. of positive/no. of sample.

1986年度の調査結果は Fig. 3, Fig. 4 ならびに Table 2 のようであった。戸石地区では7月に調査対象いけすでエドワジエラ症の発生が認められ、それ以降慢性的な斃死が続いた。供試魚の腸管からは7月24日

から12月の調査まで高率に *E. tarda* が検出された (Fig. 3)。白の浦地区で調査した3つのいけすは互いに近接した位置にあったが、いけす a では6月26日の調査時にエドワジエラ症が発生し、腸管からの検出率も高かった。一方、いけす b の飼育魚はいけす a に比べて摂餌が活発であったが、*E. tarda* の検出率はほぼ同じ時期の調査にも拘らず比較的低かった。いけす c の飼育魚については7月24日以降調査したが、戸石地区と同様、高水温期に特に高い検出率であった (Fig. 4)。環境の調査は8月にのみ行ったが、戸石、白の浦両地区とも海水および底泥から *E. tarda* が検出された (Table 2)。

一部の供試魚について腎臓の *E. tarda* の生菌数を測定したところ、腸管の *E. tarda* の菌数が多くなるに従い、腎臓からも *E. tarda* が分離されやすく、また生菌数も多くなる傾向が認められた (Table 3)。また、腸管から内容物を絞り出して別々に生菌数を測定すると、菌数が低い場合は内容物からのみ検出されるが、内容物中の菌数が多くなるに従い、腸管さらには腎臓からも検出される個体が見られた (Table 4)。

Table 5 は今回の調査あるいはそれ以前に分離された

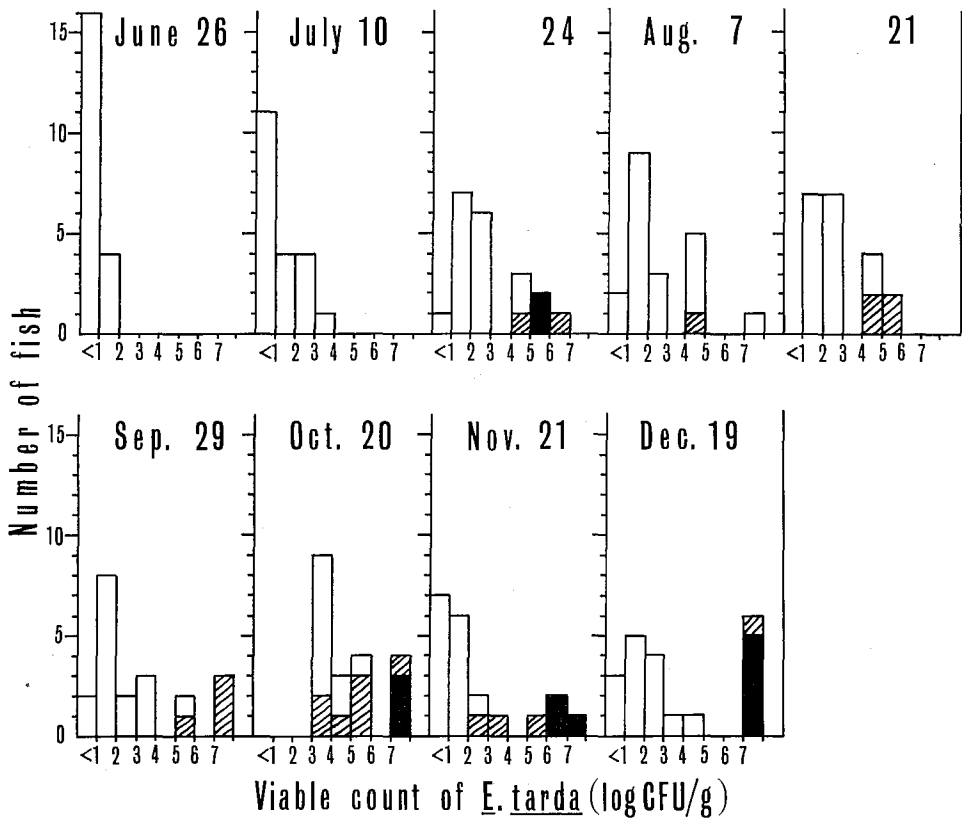


Fig. 3. Viable count of *E. tarda* in the intestines of flounder cultured in a net cage in Toishi region (1986). ▨: Fish, *E. tarda* was isolated from the kidney. ■: Fish suffered from edwardsiellosis.

Table 2. Detection of *E. tarda* in sea water and sediment around flounder farm (Aug. in 1986)

Location	Sea water	Sediment
Toishi	68CFU/ml	20~100CFU/g
Usunoura	2CFU/ml	100CFU/g

E. tarda 13 株の病原性とウサギ抗血清に対するO凝集価を示したものである。病原性試験は供試菌の新鮮培養をPBSに懸濁させ、ウナギに対し各3尾宛腹腔内接種して行った。その結果、いずれも高い死亡率を示し、毒力が強いものと判断された。また、調査期間中に分離された *E. tarda* はスライド凝集試験ですべて陽性であったものの、凝集価では免疫原の株に比べてやや低い値を示す菌株もあった。

考 察

環境あるいは魚体から *E. tarda* を選択的に分離する培地として、SS寒天の有用性は多くの研究者によって認められている (WYATT *et al.*, 1979; 皆川ら, 1973)。本研究でも調査に先立ち、ヒラメ由来株のSS寒天における発育性を検討したが、普通寒天とほぼ同程度の発育性を示し、また実際調査に供したところ、コロニー形態による雑菌との識別も容易であった。1986年度の調査で *E. tarda* が検出された個体数は供試魚全体の78%であったが、SS寒天への直接塗抹法での検出率は58%であり、残り20%は直接塗抹法で検出されずに増菌法によって検出されたものであった。また、増菌法のみによって検出された個体のうちDSSSブイヨンとストロンチウムBブイヨンの両方から検出されたものは33%だけであり、あとの43%はDSSSのみ、24%はスト

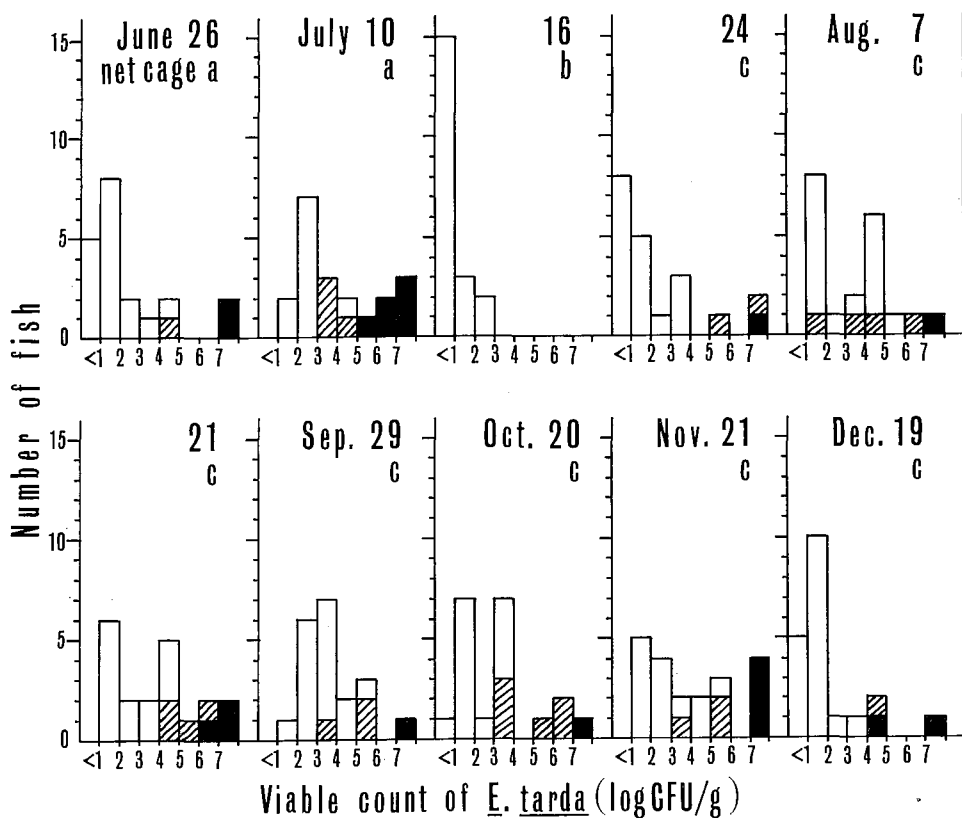


Fig. 4. Viable count of *E. tarda* in the intestines of flounder cultured in net cages in Usunoura region (1986). ▨: Fish, *E. tarda* was isolated from the kidney. ■: Fish suffered from edwardsiellosis.

ロンチウムBブイオンのみで検出されたものであった。この様に、ややDSSSブイオンの方が検出率が高かったが、ストロンチウムBブイオンも他の培地と併用すれば十分活用できると思われる。

養鰻場では感染症（パラコロ病）の流行と関係なしに、周年環境やウナギの腸内に *E. tarda* が存在することが明らかにされている（渡辺・古橋, 1981; 皆川ら, 1983）。しかし、今回行った1985年6月から翌年3月までのセンターのヒラメ養殖場での調査では、海水や網付着物から *E. tarda* を検出することはできなかった。*E. tarda* は養鰻池水中では長期間生存できるのに対し（石原・楠田, 1982）、海水中での生存期間は比較的短く（未発表）、また、塩分が3%を越えると増殖性が著しく低下すること（安永ら, 1982）から海水養魚環境中には常在化しにくいと思われる。なお、1986年8月に海水と底泥から *E. tarda* が検出されたが、その時期は調査

地点でエドワジエラ症が発生していたことから、病魚や死魚から排泄されて間もない菌が一時的に環境に存在していた可能性が高い。

一方、腸管からは比較的多くの個体で *E. tarda* が検出され（Fig. 1）、また、エドワジエラ症の流行中は検出率、生菌数ともに高くなること、腸管の *E. tarda* の生菌数が高い個体ほど腎臓からも *E. tarda* が検出される割合が高まることが明らかになった。もし腸内の *E. tarda* が腸壁などを通過して体内に侵入するとすれば、腸内の菌数が多いほど体内に侵入する菌数も増加し、発症へと進む可能性が高いと考えられる。

E. tarda は河川などを介して陸上から常時侵入していることが疑われるが、Fig. 2に示したように、3月でも腸管から検出される個体があったことから、流行を耐過した魚が保菌魚となって次の流行の感染源になることも十分考えられる。なお、餌については十分な調査を行っ

Table 3. Comparison of the viable count (log CFU/g) of *E. tarda* in the kidney and the intestines of flounder

Fish No.	Kidney	Intestine
1	—*	+
2	—	+
3	+	+
4	+	+
5	2.00	+
6	—	1.70
7	+	1.70
8	+	3.00
9	2.60	3.04
10	2.60	3.08
11	4.32	3.18
12	+	3.57
13	2.90	4.00
14	>5.00	5.48
15	3.85	6.18

* +: 1.30~2.00/g (kidney)
1.00~1.70/g (intestine)
—: <1.30/g (kidney)
<1.00/g (intestine).

Table 4. Comparison of the viable count (log CFU/g) of *E. tarda* in the kidney, the intestinal tract and the intestinal content of flounder

Fish No.	Kidney	Intestinal tract	Intestinal content
1	—*	—	1.70
2	—	—	2.00
3	—	—	2.00
4	—	—	2.30
5	—	—	2.60
6	—	—	2.93
7	—	1.70	3.00
8	—	2.74	3.20
9	4.26	3.54	3.56
10	>5.00	5.11	3.97
11	+	1.70	4.18
12	4.11	6.18	5.04
13	—	1.70	5.57

* +: 1.30~2.00/g
—: <1.30/g (kidney)
<1.00/g (intestine).

ていないが、調べた限りでは、イカナゴ、ワムシ、アルテミアなどから *E. tarda* は検出されなかった。

養鰻場には少なくとも5種類以上の血清型の *E. tarda* が存在し、強毒株は特定の血清型に集中していることが

Table 5. Virulence and agglutination titer of *E. tarda* isolated from environment and intestines of flounder

Culture No.	Source	Mortality in eel* ¹	Agglutination titer* ²
1	Sep., '84, sea water	3/3	N.T.* ³
2	Jan., '85, intestine	3/3	N.T.
3	Jan., '85, body surface	3/3	N.T.
4	Jan., '85, fouling materials of aquarium	3/3	N.T.
5	Oct., '85, intestine	3/3	1024
6	Oct., '85, intestine	2/3	1024
7	Nov., '85, intestine	3/3	512
8	Nov., '85, intestine	3/3	1024
9	Nov., '85, body surface	3/3	1024
10	Dec., '85, intestine	2/3	1024
11	Jan., '86, intestine	3/3	1024
12	Mar., '86, intestine	3/3	512
13	Oct., '86, intestine	3/3	2048
NUF49	diseased eel	N.T.	2048

*¹ No. of dead/no. of tested.
Dose: 1 mg/100 g (No. 1~4), 0.5 mg/100 g (No. 5~13).

*² Agglutination titer with O-antiserum against *E. tarda* NUF49.

*³ Not tested.

報告されている (朴ら, 1983)。ヒラメ養殖場から分離された *E. tarda* 13 株の病原性を調べたところ、すべてウナギに対して毒力が強かった。一方、血清学的に見ると、スライド凝集試験ではウナギ病魚由来株で作製した O 抗血清と明瞭に凝集するものの、凝集価では免疫原株と比較してやや低い値を示す菌株もあった。従って、ウナギ由来株とヒラメ由来株の抗原構造の異同については、さらに詳しく検討する必要がある。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、材料魚の提供と有益な御助言を賜った長崎市水産種苗センターの久原俊之所長ならびに所員の方々に厚く御礼申し上げる。

文 献

- 石原秀平・楠田理一 (1982): 種々の環境水中における *Edwardsiella tarda* の発育性および生存性. 日本誌, 48 (4), 483-488.
- IVESON, J. B. (1971): Strontium chloride B and E. E. enrichment broth media for the isolation of *Edwardsiella*, *Salmonella* and *Arizona* species from tiger

- snakes. *J. Hyg.*, **69**, 323-330.
- MEYER, F. P. and G. L. BULLOCK (1973): *Edwardsiella tarda* a new pathogen of channel catfish (*Ictalus punctatus*). *Appl. Microbiol.*, **25**, 155-156.
- 皆川武夫・中井敏博・室賀清邦 (1983): 養鰻環境中における *Edwardsiella tarda*. 魚病研究, **17** (4), 243-250.
- 宮下敏夫 (1984): ティラピア病魚から分離された *Pseudomonas fluorescens* および *Edwardsiella tarda*. 同誌, **19** (1), 45-50.
- 中津川俊雄 (1983): ヒラメ幼魚から分離された *Edwardsiella tarda*. 同誌, **18** (2), 99-101.
- 朴 守一・若林久嗣・渡辺佳一郎 (1983): 養鰻池に分布する *Edwardsiella tarda* の血清型と病原性. 同誌, **18** (2), 85-89.
- WAKABAYASHI, H. and S. EGUSA (1973): *Edwardsiella tarda* (*Paracolobactrum anguillimortiferum*) associated with pond-cultured eel disease. *Nippon Suisan gakkai*, **39**, 931-936.
- 渡辺佳一郎・古橋宏基 (1981): ウナギのパラコロ病に関する研究—ハウス式養鰻池の病原菌の消長. 昭和55年度静岡県水産試験場事業報告, 247-249.
- WYATT, L. E., R. NICKELSON, II. and C. VANDERZANT (1979): *Edwardsiella tarda* in freshwater catfish and their environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 710-714.
- 安永統男・小川七朗・畑井喜司雄 (1982): 数種の海産養殖魚から分離された病原性 *Edwardsiella* の性状について. 長崎県水産試験場研究報告, **8**, 57-65.