

## 養殖ウナギにおける健康魚と病魚との腸内細菌叢の比較、 相違について

金井欣也\*・若林久嗣\*・江草周三\*

(昭和 52 年 9 月 3 日受理)

### Comparison of Intestinal Microflora between Healthy and Diseased Pond-cultured Eels

Kinya KANAI, Hisatsugu WAKABAYASHI and Syuzo EGUSA

Dept. Fish., Fac. Agr., Univ. of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

(Received September 3, 1977)

Quantitative and qualitative investigations of intestinal microflora were made on healthy and diseased eels collected from culturing ponds in Yoshida, Shizuoka Prefecture. The whole intestine of each eel was homogenized in sterile 0.85%NaCl solution. Tenfold dilutions were prepared and 0.1 ml of which was inoculated on the surface of nutrient agar (Difco). Plate cultures were incubated for five or seven days at 25°C and colonies were counted. Every colony within a given area of the plate of suitable dilutions was subcultured for identification.

The numbers of viable bacteria per gram of intestinal tract with contents in healthy eels were ranged from 10 to 10<sup>9</sup> through the year. The percentage of *Aeromonas* spp. (mostly *A. hydrophila*) was relatively higher in winter, while that of *Enterobacteriaceae* was higher from spring to fall. *Vibrio* sp. appeared only in October. *Streptococcus* sp. was always present 20% to 80% in the intestine of fed eels. Viable counts of intestinal bacteria of diseased eels were 10 to 10<sup>6</sup> higher than those of the healthy ones (Fig. 1 and Table 4). The percentage of *A. hydrophila* tended to be higher (Fig. 2), especially in the case of red disease. Moreover, virulent strains from eels suffered from red disease were greater in number than those from healthy ones or eels infected with *Edwardsiella tarda* (Table 5).

魚類の腸内細菌叢は、栄養学的、衛生学的な立場からの研究は多いが、魚病の面からの研究は少ない。魚類の細菌性疾病の中には腸管感染と考えられるものがあり、例えば、運動性エロモナス（主として *Aeromonas hydrophila*）感染症はウナギをはじめ種々の淡水魚を冒す代表的な魚病であるが、激しい腸炎を伴うことが特徴の一つとして知られている。一方、運動性エロモナスは健康魚の腸管内に普通に存在しており、したがって、これらが何らかの条件のもとで異常増殖したり、毒性が強まったりすることにより発病すると考えられる。しかし、その機序については不明の点が多く、腸管内の運動性エロモナスの挙動についても殆んど明らかにされていない。

そこで、筆者らは健康ウナギの腸内細菌叢のおおまかな季節的変動とそのときどきにみられた病魚の腸内細菌

叢を調べ、両者を比較した。

#### 材料および方法

調査は1975年10月より翌年12月までの間に7回静岡県吉田地区の養殖ウナギについて行なった。なお、健康魚については予め定めた一池のウナギを調査対象とした。

総ての供試魚について、まず、その鰓、肝臓、腎臓より細菌の分離を試みた。鰓には改変サイトファガ培地（トリプトン 2g、酵母エキス 0.5g、肉エキス 0.2g、酢酸ナトリウム 0.2g、塩化カルシウム 0.2g、寒天末 15g、純水 1000ml、pH 7.4）、肝臓、腎臓には普通寒天培地（バクトペプトン 5g、肉エキス 3g、塩化ナトリウム 5g、寒天末 15g、純水 1000ml、pH 7.2）を使用し、各小組織片を培地上にスタンプし、白金耳で全体に広げる方法により行なった。次に、全腸管を内容物ごと切り出し、これに

\* 東京大学農学部

9容の0.85% 滅菌食塩水を加えてホモジナイズした。これを10倍段階希釈し各段階の0.1 mlを平板培地上に塗抹し25°Cで培養した。分離培地には普通寒天培地を使用した。5~7日間培養後、出現したすべてのコロニーを計数し、任意の区画内のすべてのコロニーを釣菌した。分離菌はグラム鑑別(劉の方法)、チトクロームオキシダーゼ試験、運動性試験、OF試験のほか、必要に応じて形態学的、生物学的、生化学的性状を調べ、Bergey's manual 第8版に準じて分類した。なお、生菌数は内容物を含む腸管1gあたりの菌数で表わした。

次に、健康魚および病魚の腸管あるいは環境水から分離した *A. hydrophila* について病原性試験を行なった。試験には10~30gのドジョウを使用し、新鮮培養菌を0.85% 滅菌食塩水に懸濁し魚体重100gあたり湿菌重量で1mgの割合で背鰭前方の筋肉に接種した。各菌株に3尾宛の実験魚を用い、1週間までに3尾とも死亡したものを強毒株(++)、一部死亡あるいは患部の形成のみら

れたものを弱毒株(+), 全く異常の見られなかったものを無毒株(-), として病原性の強さを表わした。

## 結 果

### 1) 健康魚の腸内細菌叢

予め定めた一池より毎回2, 3尾取り上げ調べた。その結果を表1に示す。なお、この池では調査日前後に病気の発生はなかった。また、ここに示した菌叢は投餌8~12時間後のものである。

腸内生菌数は摂餌開始および水温の上昇とともに5月より増加が見られた。水温の下降期である10月に $10^9$ に達し最も高い値が得られたが、その後急激に減少した。出現した菌種を見ると、*Aeromonas* (ほとんど *A. hydrophila*) は比較的冬期に多く、*Enterobacteriaceae* (主に *Citrobacter* spp.) は冬期に少なく春から秋にかけて多かった。*Vibrio* は秋にのみ見られた。また、*Streptococcus* は季節にかかわらず摂餌魚の腸管内に高率で

表 1. ある池のウナギの腸内細菌叢の季節的变化  
Table 1. Seasonal changes of intestinal microflora of healthy eels

Month	Water temp. (°C)	Fish no.	<i>Aeromonas</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Streptococcus</i>	Others	No. of isolates	Viable counts/ gram of intestine	Intestinal contents
Oct. '75	15.9	1		47%		2%		38%	13%	43	$1.8 \times 10^5$	+
		2	6%	34%		2%	3%	41%	14%	64	$2.9 \times 10^6$	+
Feb. '76	—	3	46%				48%		6%	76	$1.7 \times 10^4$	—
		4	12%			4%	33%		51%	52	$2.3 \times 10^4$	—
		5	3%				61%		36%	39	$4.1 \times 10^4$	—
May '76	20.0	6	7%			11%	15%	60%	7%	27	$4.2 \times 10^5$	+
		7				7%	3%	40%	50%	30	$2.8 \times 10^5$	+
		8	45%		50%	5%				40	$4.2 \times 10^4$	+
Jul. '76	28.0	9				100%				25	$7.9 \times 10^7$	—
		10				100%				25	$1.0 \times 10^6$	—
		11				100%				25	$4.1 \times 10^6$	—
Aug. '76	27.8	12	7%			7%		69%	17%	30	$1.2 \times 10^7$	+
		13				16%		20%	64%	25	$8.9 \times 10^5$	+
		14				17%		80%	3%	30	$3.6 \times 10^5$	+
Oct. '76	19.5	15	5%	59%		9%		27%		22	$7.1 \times 10^5$	+
		16		40%		10%		50%		20	$1.7 \times 10^5$	+
		17		45%		13%		42%		24	$1.2 \times 10^5$	+
Dec. '76	8.0	18	100%							25	$1.9 \times 10^3$	—
		19								0	$7.5 \times 10$	—
		20						4%		96%	24	$3.3 \times 10^5$

表 2. パラコロ病魚および同池の健康魚の腸内細菌叢  
Table 2. Intestinal microflora of eels infected with *Edwardsiella tarda*

Month	Pond	Fish no.	<i>Aeromonas</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Edwardsiella</i>	Other <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	Others	No. of isolates	Viable counts/ gram of intestine	Isolation of bacteria from internal organs besides <i>E. tarda</i>
Oct. '75	A	1	4%			56%	36%		4%	25	$8.6 \times 10^8$	—
May '76	B	2	77%		3%		3%	17%		35	$2.9 \times 10^8$	Ae.**
		3	18%			75%	7%			28	$2.8 \times 10^8$	—
		4*								0	$4.2 \times 10^2$	—
		5*								0	$3.0 \times 10^2$	—
		6	77%			15%			8%	26	$1.8 \times 10^8$	Ae.
	C	7	67%				20%	13%		15	$1.4 \times 10^7$	—
		8	7%			93%				14	$2.1 \times 10^7$	—
		9	27%		33%	7%	7%	13%	13%	15	$1.5 \times 10^8$	—
Jul. '76	D	10			40%			60%		25	$3.4 \times 10^7$	—
		11		4%		88%	4%	4%		25	$9.4 \times 10^8$	—
		12	12%	70%				18%		17	$1.0 \times 10^8$	Vi.***
Aug. '76	F	13	20%		10%	65%	5%			20	$1.7 \times 10^7$	Ae.
		14	95%		5%					20	$1.1 \times 10^8$	—
		15	45%		50%	5%				20	$8.7 \times 10^7$	—
		16	5%			85%	10%			20	$2.9 \times 10^8$	—
		17*			5%	45%	50%			20	$4.0 \times 10^8$	—
		18*	10%				90%			20	$1.9 \times 10^8$	—
		19	25%		5%	40%	25%		5%	20	$7.5 \times 10^7$	Ae.
G	20	10%		50%	30%	5%		5%	20	$8.7 \times 10^7$	—	
	21	40%		60%					20	$3.1 \times 10^7$	Ae.	
	22*	5%				5%		90%	20	$1.0 \times 10^8$	—	
	23*	75%		15%		5%		5%	20	$8.4 \times 10^8$	—	

\* Healthy eel. \*\* *Aeromonas*. \*\*\* *Vibrio*.

存在していた。

2) 病魚の腸内細菌叢

供試魚の病気の内訳はパラコロ病魚が 17 尾、鱧赤病魚 4 尾および主要臓器中から細菌は分離されなかったが明らかに鱧赤病様の症状を呈する病魚が 11 尾、ワタカブリ病魚が 4 尾、ベコ病や鰓病などその他の病魚が 5 尾であった。

表 2 はパラコロ病魚の腸内細菌叢を示したものである。原因菌 *Edwardsiella tarda* が主要臓器から分離されたものをパラコロ病魚としたが、腸管では必ずしも主体を占めていなかった。また、パラコロ病特有の菌種、菌叢は認められなかった。ただ、*Aeromonas* との混合感染魚では *Aeromonas* が多く分離される傾向が見られた。

次に鱧赤病魚および鱧赤病様症状を呈する病魚合計 15 尾の腸内細菌叢を表 3 に示す。病原菌である *Aeromonas* が主要臓器から分離され明らかに *Aeromonas* 感染魚と判断されたのはわずか 4 尾であったが、残りの 11 尾も腸内で *Aeromonas* が多数増殖している場合が多かった。なお、E 池の病魚の腸管からは *Aeromonas* はわずかししか分離されず、*Vibrio* が多数分離された。

ワタカブリ病魚は 1 池 4 尾についてのみ調べたが、いずれも *Aeromonas* の割合が大きかった。

3) 病魚と健康魚の比較

病魚と健康魚の腸内細菌叢を比較すると、生菌数では図 1 に示す通り '76 年 10 月を除いていずれも病魚の方が平均値で  $10 \sim 10^8$  程度多かった。また、表 4 に示す通り同じ池からとった病魚と健康魚を比較した場合にもこ

表 3. 鱈赤病魚および鱈赤病様症状を呈する病魚および同池の健康魚の腸内細菌叢  
 Table 3. Intestinal microflora of eels suffered from red disease

Month	Pond	Fish no.	<i>Aeromonas</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	Others	No. of isolates	Viable counts/ gram of intestine	Isolation of <i>Aeromonas</i> from internal organs		
Oct. '75	A	1	57%	5%		23%		15%	65	$2.1 \times 10^7$	+		
May '76	B	2	79%		13%		8%		24	$1.9 \times 10^7$	+		
Oct. '76	C	3	74%	21%	5%				19	$1.7 \times 10^8$	+		
		4	5%	95%					22	$2.0 \times 10^8$	+		
		5	82%	12%	6%				17	$1.9 \times 10^8$	-		
		6*	21%	43%			7%	29%	14	$9.0 \times 10^2$	-		
		7*							0	$1.0 \times 10^2$	-		
	D	8	88%				6%		6%	18	$1.8 \times 10^7$	-	
		9	70%				10%		20%	20	$6.9 \times 10^7$	-	
		10*			25%	65%		10%		20	$3.9 \times 10^7$	-	
		11*	25%		5%	70%				20	$1.3 \times 10^7$	-	
		12*	95%			5%				20	$6.0 \times 10^6$	-	
		Dec. '76	E	13		83%			17%		23	$7.5 \times 10^7$	-
				14		86%			14%		22	$4.3 \times 10^7$	-
15	4%			79%			17%		24	$2.4 \times 10^7$	-		
16				20%			80%		25	$6.8 \times 10^6$	-		
F	17		77%			23%			26	$5.8 \times 10^8$	-		
	18		95%				5%		21	$2.1 \times 10^8$	-		
G	19			85%		15%			20	$1.2 \times 10^7$	-		
	20	50%		41%	9%				22	$5.7 \times 10^6$	-		
	21*							100%	25	$1.6 \times 10^6$	-		
	22*							100%	22	$2.2 \times 10^4$	-		

\* Healthy eel.

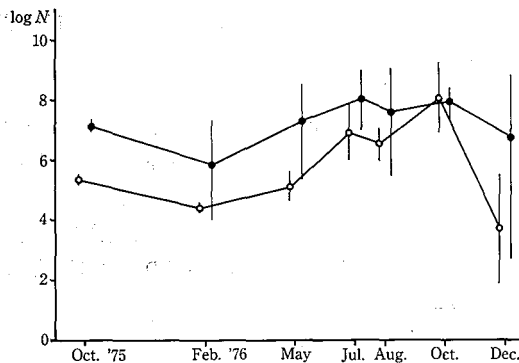


Fig. 1. Numbers of bacteria per gram of intestine of healthy (○) and diseased (●) eels.

図 1. 健康魚と病魚の腸内細菌数

の傾向が認められた。病魚はどの調査魚も摂餌をしていないと判断されたが、A、D池のように健康魚も絶食させた池ではその差は $10^8$ にも達した。

また、出現した菌種の中で、とくに *Aeromonas* には図2に示すように '76年12月を除いて病魚では健康魚に比べ高率に分離される傾向が認められた。

#### 4) *A. hydrophila* の病原性

供試菌株の由来はパラコロ病魚7尾より45株、同じ池の健康魚3尾より9株、鱈赤病様症状を呈している病魚2尾より28株、同じ池の健康魚3尾より27株、東大水産実験所の健康魚7尾より22株、養鰻池9池の池水より134株であった。

その結果を表5に示したが、鱈赤病様症状を呈した病魚で病原性の強い菌の割合が高かった。また、その池の健康魚も病魚ほどではないが比較的病原性の強い菌が多

表 4. 発病池の病魚および健康魚の腸内細菌叢  
 Table 4. Numbers of bacteria (long *N*) per gram of intestines of diseased and healthy eels in the same pond

Month	Pond	Diseased fish		Healthy fish		Intestinal contents
		Mean (Range)	<i>n</i>	Mean (Range)	<i>n</i>	
May '76	A	8.06(7.28-8.46)	3	2.55(2.48-2.62)	2	-
Aug. '76	B	7.42(5.46-9.04)	4	6.94(5.28-8.60)	2	+
Aug. '76	C	7.77(7.49-7.94)	3	6.46(6.00-6.92)	2	+
Oct. '76	D	8.27(8.23-8.28)	3	2.48(2.00-2.95)	2	-
Oct. '76	E	7.55(7.26-7.84)	2	7.16(6.78-7.59)	3	+
Dec. '76	F	6.92(6.76-7.08)	2	4.77(4.34-5.20)	2	+

表 5. 分離された *Aeromonas hydrophila* の病原性  
 Table 5. Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* isolated from intestine or pond water

Pathogenicity	Source of strains					
	<i>E. tarda</i> infect.	Healthy eels in the same pond	Red disease	Healthy eels in the same pond	Healthy eels	Pond water
++	2(4.4%)	0(0%)	10(35.7%)	7(25.9%)	5(22.7%)	13(9.7%)
+	33(73.4)	5(55.6)	17(60.7)	12(44.5)	13(59.1)	62(46.3)
-	10(22.2)	4(44.4)	1(3.6)	8(29.6)	4(18.2)	59(44.0)
	45(100)	9(100)	28(100)	27(100)	22(100)	134(100)

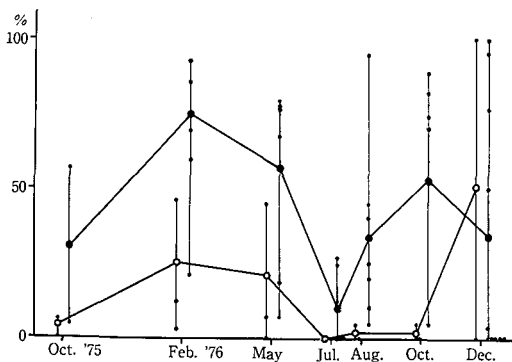


Fig. 2. Percentage of *Aeromonas* in the intestinal microflora of healthy (○) and diseased (●) eels.

図 2. 健康魚および病魚の腸内細菌叢における *Aeromonas* の比率

かった。これに対し、バラコロ病魚から分離された菌株には強毒株は少なく、大部分が弱毒株ないし無毒株であった。

考 察

1) 健康魚の腸内細菌叢

反町・江草 (1971) はウナギの腸内細菌叢の季節的変

化を調べ、*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter-Alcaligenes* は特に冬に多く、*Vibrio* は夏から秋にかけて多く、*Aeromonas* は春先に多く以後減少し冬には認められなかったと述べている。今回の調査では比較的冬に *Aeromonas* が多く検出された点が相違するが、*Pseudomonas* が冬を中心として出現した点や10月に *Vibrio* が分離された点などはほぼ一致する。また、若林ら (1976) は養鰻池の池水の調査を行ない、*Enterobacteriaceae* は高水温期に優勢で低水温期に少なく、*Aeromonas* は逆に低水温期に優勢で両者の間には相補的な関係が認められたと述べているが、この点は腸内細菌叢にもあてはまると思われる。

2) 病魚の腸内細菌叢および健康魚との比較

病魚の腸内細菌数は摂餌していないにもかかわらず、健康魚に比べて明らかに多く、このことは腸の粘膜上皮において細菌が増殖していることを示唆するが、実際、病魚の腸管を開いてみると粘液の異常分泌やカタル性炎症のみられる場合が多かった。YANKOV, G. Y. (1968) は伝染性腹水症のコイでは腸管前部で菌数の増加が起り、*Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* などが増加し、とくに *Aeromonas* の増加が著しいと述べている。今回の調査では病気の種類に特有の細菌叢は認め

られなかったが、全体的に *Aeromonas* が増加している場合が多いことは YANKOV の結果と似ており注目される。腸管内の *Aeromonas* の増加は何らかの原因による腸管内の異常をきっかけに起り、強毒性の *Aeromonas* の選択的な異常増殖が腸管の病変をさらに激しいものにすると考えられる。なぜならば鱸赤病様症状を呈した病魚では腸管内に病原性の強い *Aeromonas* が多いこと、*Aeromonas* は毒素を産生し、出血、壊死などがこの毒素によって起される (SIMIZU, 1969) こと、さらに経験的に鱸赤病のウナギでは主要臓器から分離される *Aeromonas* の量が比較的少ないことなどが知られているからである。今後、何を契機に腸内の *Aeromonas* が異常増殖を始めるのか追求することが必要と思われる。

#### 謝 辞

本研究は静岡県吉田町養鰻研究所の方々の御協力によ

って行なわれた。ここに感謝の意を表します。

#### 引用文献

- SIMIZU, T. (1969): Studies on pathogenic properties of *Aeromonas liquifaciens*—IV. Necrotic factor for eel and guinea pig. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **35** (7), 613–618.
- 反町 稔・江草周三 (1971): 養殖ウナギの腸内好気性細菌について. 魚病研究, **6** (1), 1–7.
- 若林久嗣・金井欣也・江草周三 (1976): 養鰻環境における魚病細菌の生態に関する研究—I. 池水中の一般細菌について. 魚病研究, **11** (2), 63–66.
- YANKOV, G. Y. (1968): Recherches sur la microflore intestinale des Carpes atteintes d'Hydropisie infectieuse. *Bull. Off. int. Epiz.*, **69**(7–8), 1057–1072.