

鮭稚魚集団斃死の細菌学的研究 (I)

斃死稚魚より分離した桿菌について

西 野 一 彦
(北海道さけ・ますふ化場)

尾 崎 豊 志
(北海道さけ・ますふ化場)

Bacteriological Investigations on the Death in groups of Salmon Fry. (I)
Observations on the Bacillus isolated from Dead Salmon Fry.

Kazuhiko NISHINO and Yasuji OZAKI

十勝支場幕別事業場に於いて1955年、1956年と2ヶ年にわたり養魚池に放養中の鮭稚魚が全放養尾数の夫々40%、15%と大量に斃死した。この様な集団斃死の例は今日迄認められず、その原因としてはまず水質の汚濁が考えられる。即ち孵化用水引用河川(旧途別川)は両側が畑地であり、これに使用した農薬が雪融水と共に河川に流入して稚魚に悪影響を及ぼす可能性がある。次いで稚魚管理面又は池自体の欠陥による窒息、その他細菌の感染等も考慮される。

水の汚濁については水質調査の結果、影響すべき異常成分は全く認められなかつた。更に念のため化成肥料を使用して、稚魚の農業に対する抵抗試験をしたが斃死の直接原因とは認め難い。又管理面、池自体の欠陥の有無についても稚魚の交換飼育比較試験の結果何れも集団斃死の原因とは思われなかつた。

発生の状況から見て病原細菌による斃死の疑いもかなり強かつたので吾々は病魚に対し細菌学的検査を行つた結果病原性を保有する桿菌を分離した。これら細菌の性状につき種々検査を続行し、未だ結論を得るには至つていないが、予報として検索経過の概要を記載する事とする。

なお本試験を実施するに当り、終始御指導を賜り御便宜を計つて戴いた帯広畜産大学細菌学教室西武教授、小野悌二助教授、並びに試験の機会を与えられた荒井本場長、水戸部十勝支場長に深甚なる謝意を表するものである。

1. 幕別事業場養魚池の構造及び放養尾数

幕別事業場の養魚池は巾4間、長さ48間、192坪の池が上流部より第1区、第2区、第3区と3区分され、各々64坪で、各区は更に縦に4列に仕切られている。

1956年は第1区は2月18日～2月27日の間に1,788,100尾、第2区は2月16日～2月17日の間1,113,400尾、第3区は2月6日～2月15日の間1,685,100尾を夫々放養し、総計4,586,600尾で第1区と第3区は坪当たり約30,000尾、第2区は16,000尾で、平均坪当たり約25,000尾であつた。

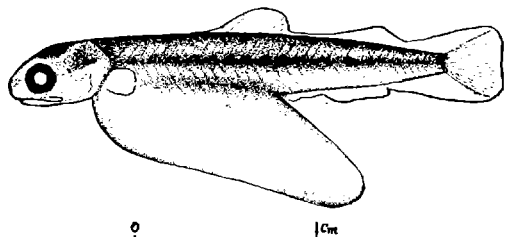
2. 集団斃死の状況

最初に放養した第3区の稚魚が孵化後40～50日を経過した3月22日に約50,000尾程度の集団斃死を発見し、その後徐々にその尾数は増大し、1週間後には約700,000尾と推定された。この斃死尾数は第3区放養数の約40%に当り、それ等の稚魚は大半臍嚢後部が異常突出、白変していた。又斃死を免れた稚魚の間にも相当数の異常突出を認め、その後徐々に回復し臍嚢も完全に吸収され、順調に河川放流された。

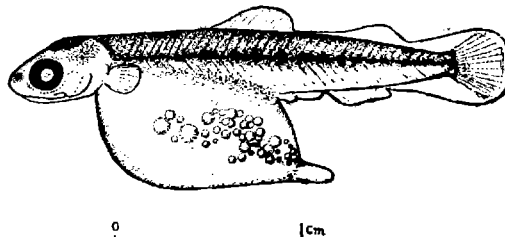
一方第2区に放養された稚魚にも若干異常魚が認められたが斃死魚は殆んど無く漸次臍嚢は吸収された。第1区には全く異常魚を認めなかつた。

3. 病魚の症状

鮭稚魚の臍嚢は一般に丸味を帯び、徐々に吸収されるものであるが、(第1図)、これらの斃死魚は第2図の様に臍嚢後部が異常に突出し、しかも先端が白変していた。この症状を呈する前にこの部分が水腫の様に膨隆し、次いで消散すると同時に突出白変するもの様である。この症状の稚魚は死期の切迫に伴って群団から脱離して池底に横転し、時々急激に運動を開始して表面迄浮上するが、その後は運動を停止し、自然に沈んで行く状態を繰返えし、その間1日~2日を経過し遂に斃死するもの様に観察された。



第1図 正常鮭稚魚



第2図 異常鮭稚魚

4. 細菌学的観察

(A) 分離方法

前述の如き症状を呈し、異常運動を続行している稚魚を掬い揚げ、70%アルコール中に漬けて体表面を消毒し次いで滅菌水中に入れてアルコールを洗い落とす。白金線を以つて臍嚢突出部より突き刺して臍嚢中央部の太い血管を破り、附着した少量の血液及び臍嚢組織液を普通寒天斜面に塗抹培養し、その後更に普通寒天平板培養を経て純粋分離を行い4株の細菌を得た。なお培養の際この他2~3株の細菌を認めしたが、これ等は常には認められず試験の結果により雑菌として処理し、4株について後述の如き試験を実施した。

(B) 形態学的所見

分離した各菌株の形態は石炭酸フクシン又はグラム氏法による塗抹染色標本若しくはそのまま生理食塩水を以て懸滴標本を作成し顕微鏡を用いて観察した。

その結果は第1表に示した様に菌株1と4、及び2と3は夫々近似種か又は同一種と推定され、更にこの両者4株は相互に一致点を得るもの様に観察された。

第1表

区分 Number	形態	菌体の軸	大 き さ		菌体の側面	両端	配列	固 有 運 動	芽 胞	グ ラ ム 染 色
			長 さ	巾						
1	中桿菌	直線又はわずかに彎曲	(m) 2.5~3.0	(m) 0.5~0.6	平行	やや鈍	単独	(H)	(+)	(-)
2	大桿菌	同上	3.5~4.0	0.5~0.6	同上	同上	同上	(+)	(+)	(-)
3	大桿菌	同上	3.5~4.5	0.4~0.5	同上	同上	同上	(+)	(+)	(-)
4	中桿菌	同上	2.5~3.0	0.5~0.6	同上	同上	同上	(H)	(+)	(-)

(C) 培養所見

(1) 固型培地 好気性37°Cにおける発育

分離各菌株を普通寒天平板培地上に移植し、好気性、37°C、24時間培養し、その表面に発育した集落の形状を観察した。その結果は第2表の如くである。

第2表

区分 Number	外形	大きさ 直経mm	隆起	構造	表面	辺縁	色	透明度	硬度	臭気
1	不正形	3.5	扁平状	顆粒状	中等顆粒	波状	灰色	不透明	膜状	有
2	同上	2.5	同上	均質	平滑	同上	白色	同上	同上	〃
3	同上	3.0	同上	同上	同上	同上	白色	同上	同上	〃
4	同上	3.0	同上	顆粒状	中等顆粒	同上	灰色	同上	同上	〃

(2) 液体培地 37°Cにおける発育

液体培地として Bouillon を選び、これに各菌株を移植し、37°C、24時間培養した、その結果は第3表に示す如くである。

第3表

区分 Number	菌膜	沈澱	濁濁	発育の程度
1	(+)	(-)	(++)	(++)
2	(+)	(-)	(+++)	(+++)
3	(-)	(-)	(+)	(+)
4	(+)	(-)	(++)	(++)

(3) 発育温度

普通寒天平板培地に於てこれら菌株は室温 (15°C)、孵卵器 (37°C) 何れも良好な発育を示し、表面凝膜に富む集落を形成する。

(D) 生物学的性状

分離各菌株の生物学的性状として運動性、牛乳に及ぼす影響、インドール及び硫化水素産生性、葡萄糖、乳糖並びに蔗糖の各分解性を検したが、その結果は第4表に示す如くである。

なお運動性、インドール及び硫化水素の産生性検査培地は肉汁を基礎にして3%ペプトン、0.5%ハイポ、0.5%寒天及び0.5%枸橼酸鉄アンモンを添加した。牛乳培地は脂肪乳に指示薬としてB.T.Bを加え、又糖分解検定培地はペプトン水に当該糖類を1%に加え、これに指示薬としてB.T.Bを添加し、各培地何れも所定の滅菌を施して調製した。

第4表

区分 Number	Motility	IndorI	B.T.B. Milk	H ₂ S	Glucose	Lactose	Sucrose	摘 要
1	+++	-	y+ or g+	-	+++△	+△	+++△	y: 黄色
2	+	-	g+++	-	+++△	-△	+++△	g: 緑色
3	+	-	y or g++	-	+++△	-△	+++△	△: 菌膜
4	+++	-	g+++	-	+++△	-△	+++△	

(E) 病原性

以上の各性状より4株の分離菌株は互に同一或いは極めて近似のものと考えられるので、その代表として菌株2を用いて試験をした。即ち斜面培養試験管1本の培養菌体を清水に混入し、更に各濃度に稀釈し、この水中に稚魚を飼育する方法を採用した。

(1) 第1回接種試験

第1回接種試験は300c.c容フラスコに孵化用清水200c.cを入れ、これに接種菌液を濁濁度比較法による10段稀

釈法を用いて第5表の様な各濃度の菌液を作製混和し、その中で稚魚を10日間飼育観察した。なお水中の酸素補給には流水ポンプを使用し、溶存酸素は常に飽和量になる様調節した。又接種試験実施中のフラスコ内の水温は11°C~13°C、であつた。

その成績は第5表に示す如くである。

第5表

区分	濃 度	飼 育 数	斃 死 状 況										生 存	
			1 日 目	2 日 目	3 日 間	4 日 間	5 日 間	6 日 間	7 日 間	8 日 間	9 日 間	10 日 間		
(a)	150,000,000/cc	10尾								5尾	5尾			
(b)	15,000,000/cc	10 "									10 "			
(c)	1,500,000/cc	10 "									5 "	5 "		
(d)	150,000/cc	10 "											10 "	
(e)	対照	10 "												10 "

即ち(a)区は(150,000,000/cc)試験開始後7日目に5尾,8日目に5尾と斃死し,(b)区,(c)区と濃度の高い順序で斃死した。しかし対照区は10日目に至るも斃死は認められなかつたが11日目に至り突然全部斃死した。対照区の斃死には実験上の失敗の疑いがあつたので更に実験を反復した。

(2) 第2回接種試験

第2回接種試験は第1回目の試験方法を踏襲した。唯容量500c.c.のフラスコを使用し、これに300c.c.の各濃度の菌液を入れ、24時間だけその濃度の水中に飼育し、その後清水と取換えて飼育した。その結果は第6表の如くである。

第6表

区分	濃 度	飼 育 数	斃 死 状 況										生 存	
			1 日 目	2 日 目	3 日 目	4 日 目	5 日 目	6 日 目	7 日 目	8 日 目	9 日 目	10 日 目		
(a)	15,000,000/cc	10尾		8尾										2尾
(b)	1,000,000/cc	10 "		8 "										2 "
(c)	150,000/cc	10 "		6 "										4 "
(d)	15,000/cc	10 "		6 "										4 "
(e)	1,500/cc	10 "		6 "										4 "
(f)	対照	10 "								6尾				4 "

即ち2日目に各区共斃死し特に菌液濃度の高い順に斃死数が多いが、第1回試験の様に全部が斃死した訳ではなかつた。その原因は24時間後フラスコ内の飼育菌液を清水と交換したので菌の魚体内浸入の数量と頻度に差異のあることに基くものと思われる。なお生存稚魚は疲弊こそしていたが斃死せず、その後10日間の継続観察中も生存した。

以上の接種試験の結果から見ると菌株2は病原性を保有するものと推察される。

なお本試験供試魚体は試験実施の时期的関係から、臍嚢吸収後40~50日を経過した成長稚魚を止むを得ず使用したので、この菌に対する感受性にも或いは差異を来しているのかも知れない。又この試験の斃死魚は自然における集団斃死の際の症状である臍嚢後部の突出は認められなかつた。

(3) 接種稚魚の臓器内における接種菌の証明

接種した稚魚が頻死の状態に陥り回復の見込のないものと推察された場合、又は斃死した場合直ちに取揚げ、外表面をアルコールで滅菌し、魚体を解剖して、心臓、肝臓を摘出し、腎臓はその一部分を採取して、普通寒天平板面に塗抹し、37°C、24時間培養し、結果を鏡検観察に付すと共に、各臓器の塗抹標本を作製して直接鏡検した。

培養の結果死亡稚魚臓器よりの菌の検出は第7表の如く、概して菌の接種量の多い程多く認められた。

第7表

菌量	死亡期間	臓器名 死亡尾数	個体番号																							
			1			2			3			4			5			6			7			8		
			L	H	K	L	H	K	L	H	K	L	H	K	L	H	K	L	H	K	L	H	K	L	H	K
15,000,000/cc	2日	8尾	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,500,000/cc	2日	8 "				+	+		+												+	+	+			
150,000/cc	2日	6 "	+			+	+		+	+		+	+	+		+	+									
15,000/cc	2日	6 "												+												
1,500/cc	2日	6 "						+						+												
対照	5日	6 "																								

註 +は接種菌が認められた臓器、Lは肝臓、Hは心臓、Kは腎臓。

各臓器を直接塗抹してギムザ染色して鏡検に付した場合、接種菌の培養基上における如き菌体は認められず、これより遙かに小さい小型の球状小粒子が無数に認められた。本粒子は特に腎臓に多い。これは接種菌が生体内に於いて変異を起したと称して良いかどうかは不明であるが、培養後には典型的な菌体が純粋に多数証明される事から、本菌には培養型の外にかくの如き感染型が存在するものかも知れない。

(F) 抵抗力

(1) 熱に対する抵抗力

菌株1及び2は有芽胞菌で、この芽胞が相当抵抗力の強いものと推察されたので下記の様に耐熱試験を実施した。

小試験管にブイオンを分注し、この中に菌液を1滴づつ注加し種々な温度に調節した温水槽に一定時間保ち、選定した時間毎にこれを取揚げ37°Cに培養して生死を鑑察した。その結果100°Cの熱湯中に60分間浸漬しても死滅を見ず抵抗力が極めて強い事を知った。

(2) 薬品に対する抵抗力

本菌株は熱に対する抵抗力が強く各種消毒薬に対しても抵抗力が強いものと考えられたので、先ずホルマリンに対する抵抗力を鑑察し、次いで6種類の抗生物質に対する感受性を試験した。特にホルマリンを選んだのは以前孵化事業の作業行程にホルマリン消毒を取入れた事があるからである。

a) ホルマリンに対する抵抗力

菌株1及び2の培養後2日を経過し芽胞を形成したものを使用し、これを各種濃度のホルマリン液に懸濁液として一定時間経過後に斜面培養基に接種培養して発育の有無を検してホルマリンに対する抵抗力を試験した。その結果は第8表の通りである。

第8表

ホルマリン濃度	時間		5時間		10時間		15時間		25時間		40時間	
	菌株		(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
	(1)	(2)										
1.0%	卅	卅	卅	卅	+	+	+	+	+	-	(-)	(-)
2.0 "	卅	卅	+	+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3.0 "	卅	卅	+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5.0 "	卅	+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
10.0 "	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

a) 抗性物質に対する感受性

始め簡単な試験によつてその効果を検するため Penicillin, Streptomycin, Oxytetracycline, Chlortetracycline, Sulphathiazol, Chloramphenicol の6種類に亘る感応錠 (Sensitivity Tablets, デンマーク, ロスキルド社製) を使用したが本菌はこれら各抗生物質に対する感受性が極めて高い。これらの中 Penicillin 及び Streptomycin が比較的安価で事業的にも使用可能かと思われたのでこの両者について抵抗性を試験した。

Streptomycin Penicillin はに比べて殺力が低かつたのでここでは Denicillin についてだけ記載する。又50unit/c.c. 以上の各濃度のものは24時間後何れも-であつたので省略する。

第9表

単 位	抗生物質名 時間 菌株	Penicillin			
		24時間		48時間	
		1	2	1	2
5unit/c.c.		(±)	(±)	(+)	(+)
10 "		(±)	(-)	(-)	(-)
20 "		(-)	(-)	(-)	(-)

Penicillin は第9表の如く5 unit/c.c. 24時間で±であつたものが48時間では+となり明かに抵抗性が形成されていた。それで充分な抗菌力を発揮するには 20unit/c.c. の抵抗株の形成されない濃度を使用すべきと思ふ。

なお Penicillin が鮭稚魚に及ぼす影響については既に適当な鮭稚魚が無かつたので虹鱒稚魚を代用供試した処、50 unit/c.c. の Penicillin 水溶液中で5日間何等変化を認めることなく生存した。

5. 要 約

1955年、1956年の2ケ年に亘り、北海道さけ・ますふ化場、十勝支場管下幕別事業場養魚池に放養中の鮭稚魚が原因不明のまま大量集団斃死した。この斃死尾数は1955年には全放養尾数の約40%、1956年には約15%に及んだ。

これ等の斃死稚魚は殆んど臍囊後部が異常突出し、しかもこの部分が白変していた。かかる斃死直前の鮭稚魚10尾より4菌株を分離し形態、培養所見、生物学的性状等を検索したが菌種の同定については未だ該当する報告に接していない。然して4菌株中の代表的1菌株についてのみ鮭稚魚接種試験を行い、同様4株中の2株を選択して熱並びに薬品に対する抵抗性を測定した。その結果を要約すれば次の如くである。

(1) 接種試験及び抵抗性の検索を行つた代表的菌株の形態は大桿菌、大きさ $3.5\sim 4.0\mu \times 0.5\sim 0.6\mu$ 、固有運動(+),芽胞(+),グラム染色(-),インドール(-),硫化水素(-),牛乳を凝固, 酸産生(-),糖分解性は葡萄糖(+),乳糖(-),蔗糖(+),である。

(2) 接種試験は15,000,000/c.c.~1,500/c.c.迄の10段階稀釈菌液中にて鮭稚魚を飼育した処濃度の高いものより順次斃死し、これらの鮭稚魚の臓器からは接種菌が認められた。

(3) 本菌株は有芽胞菌であつて100°C 1時間の加熱に対しても死滅せず、ホルマリン10%溶液をもつてしても殺菌には25時間を要するが Penicillin に対しては感受性が極めて高く10unit/c.c. 24時間で容易に不活化される。

(4) 以上の成績より本菌株には相当の病原性を認めるが、幕別養魚池における稚魚集団斃死の原因が否かについては未だ断定する事は出来ない。

文 献

谷川 英一：水産細菌学 1949
 藤田 経信：魚病学 1937
 宮路 重嗣：微生物学 1942
 伝染病研究所学友会：細菌学実習提要 1955
 秋葉朝一郎・田中穰：薬物領域の微生物学 1943
 滝 元 清 透：微生物学及び植物病理学実験法 1942
 近 藤 正 一：家畜細菌及び免疫学 1945
 H. S. Davis: Care and Diseases of trout 1946 Fish and Wildlife Service.