

ニジマス雌親魚の採卵後の斃死について-II

Aeromonas salmonicida の検出率

野 村 哲 一

Pathological Studies on the Brood Rainbow Trout Died after Egg-Stripping-II.

Occurrence of *Aeromonas salmonicida*.

Tetsuichi NOMURA.

Abstract

In the previous paper of this series, it was recorded that boils due to furunculosis were observed to some examples of rainbow trout brood fish died after egg-stripping at Koide Branch, Niigata Prefectural Freshwater Fisheries Experimental Station. In this report, the incidence of *Aeromonas salmonicida*, which is causative agents of furunculosis, in kidney after egg-stripping rainbow trout was studied, and also number of viable microorganisms in kidney, liver and spleen of the moribund trouts was determined.

In total, 557 fish were employed to examine for presence of *A. salmonicida* in kidney during 1974 to 1976. The incidence of fish with *A. salmonicida* was 18.6% in 1974, 42.6% in 1975 and 15.9% in 1976.

In experiment-1, the number of viable microorganisms in kidney of the trout was determined by plate count method. It varied from 2.08×10^2 to 1.00×10^8 per gram of them. *A. salmonicida* was isolated to 9 out of 19 samples.

In experiment-2, the number of viable microorganisms in kidney, spleen and liver was determined by surface smear plate method. It was higher in kidney and spleen than that of liver. *A. salmonicida* was isolated from kidney to 4 out of 14 samples.

前報(野村・関 1977)において著者他は新潟県内水面水産試験場小出支場における採卵後のニジマス親魚の斃死状況とその症状について観察し、症状から判断して斃死原因の一つとしてせつそう病が考えられる事を報告した。せつそう病はサケ科魚類に大きな被害を与える細菌性疾病として古くから知られているが(MCCRAW, 1952 HERMAN, 1968 SNIESZKO, 1972), 一般にニジマスはサケ科魚類の中で最も本病に感染しにくいとされている。しかし採卵後の親魚のように、取り扱いによる物理的障害、成熟に伴う生理的变化等により体力の低下した個体では本病の発生が考えられ、これら採卵後の親魚の斃死との関連において充分検討する必要があると考えられる。本報告では前報にひき続きニジマス親魚の採卵後の斃死の原因に関する一連の研究として、新潟県内水面水産試験場小出支場における採卵後のニジマス雌親魚について *Aeromonas salmonicida* の検出率と臓器中の生菌数を観察した結果を報告する。

北海道さけ・ますふ化場研究業績 第256号

Hokkaido Salmon Hatchery, Nakanoshima, Toyohiraku, Sapporo, Japan.

材料および方法

採卵方法および採卵後の親魚の飼育条件は前報(野村・関 1977)に報告したとおりである。

斃死魚からの *A. salmonicida* の検出法 採卵後斃死した死後 12 時間以内の親魚の腎中央部を滅菌白金耳で穿刺し、普通寒天培地上に両線塗沫後 20°C で培養して、出現した褐色々素を産生する集落を純粋分離し、HUCKER 変法によるグラム染色性陰性、SIM 培地における運動性陰性、チトクロームディスク(栄研)によるチトクロームオキシダーゼ試験陽性、普通ブイオン中での 37°C における発育陰性を示した場合 *A. salmonicida* 検出陽性と判定した。さらに 1975 年の試料から分離された 90 株、1976 年に分離された 38 株の計 128 株の分離菌株については坂崎(1974)、木村(1970) BUCHANAN, and GIBBONS, (1974) に従ってより詳しく各種性状を調べ既往の *A. salmonicida* の記載性状と比較検討した。供試尾数・実験期間については Table-1 に示した。

腎臓および肝臓、脾臓における生菌数 1976 年 1 月に採卵後の頻死の親魚 19 尾について腎臓中の生菌数を測定した実験-1 においては、取り出した腎中央部を秤量後ホモジナイズし普通寒天培地を用いて混釈平板法により生菌数を求めた。比較のため同様の方法で体表に水生菌の着生の見られない外見上健康と考えられる採卵後の親魚 10 尾について腎臓中の生菌数を求めた。

ところで、混釈平板法では培地の温度により生菌数が減少することが考えられたので、1976 年 12 月に行なった実験-2 では上記と同様にホモジナイズした試料を滅菌コンラージ棒で培地上に一様に広げ生菌数を求めた。測定は 14 尾の頻死の親魚の腎臓、肝臓、脾臓について行なった。

実験-1 および実験-2 において褐色々素を産生する集落が出現した 13 個体の腎臓については生菌数測定後の寒天平板中央部から 30 集落を任意に釣菌し、前記の方法で *A. salmonicida* を検出し、その占める割合を求めた。

結 果

斃死魚からの *A. salmonicida* の検出率 腎臓からの *A. salmonicida* の検出率は年度により大きな差が見られたが、供試した 557 尾の 27.6%にあたる 154 尾から *A. salmonicida* が検出された。最も高い検出率は 1975 年の 2 年魚に見られ、供試魚の 44.6%から *A. salmonicida* が検出された。同一年度における親魚の年齢と *A. salmonicida* の検出率との関係ではわずかではあるが 2 年魚における検出率が高い傾向を示した (Table-1)。

供試魚中 1975 年には 2 尾、1976 年には 3 尾の 2 年魚に体表の膨隆した定型的せつそう病患部が認められた。

前述の 128 株の分離菌についてさらに詳しく性状を検査した結果は Table-2 に示すごとくで、分離菌は全てサッカロースの分解陽性を示した以外は主要な多くの性状で坂崎(1974) BUCHANAN (1974)、丹治(1972)の

Table-1 Percentage of fish within samples from which *Aeromonas salmonicida* were isolated

Year	Date	Age of fish	Number of fish		Incidence of <i>A. salmonicida</i> in kidney. %	Mortality %
			Examined	<i>A. salmonicida</i> isolated		
1974	Dec/74-Jun/75	2-3	102	19	18.6	14.2
1975	Dec/75-Jun/76	2	130	58	44.6	25.0
		3	105	42	40.0	35.2
1976	Dec/76	2	110	19	17.2	23.0
		3	110	16	14.5	45.8
Total			557	154	27.6	

ニジマス雌親魚の採卵後の斃死について-II

Table-2 Characteristics of *Aeromonas salmonicida* isolated from brood rainbow trout after egg-stripping in 1975 and 1976

Character	Strains isolated in	
	1975 ¹⁾	1976 ²⁾
Gram stain	-	-
Motility	-	-
I. P. A.	-	-
H ₂ S production	-	-
O/F test	F	F
Cytochrome oxidase	+	+
Catalase	+	+
water soluble pigment production	+	+
Growth at 6% NaCl	-	*
7% NaCl	*	-
Growth at 37 C	-	-
Indole	-	-
Nitrate reduction	+	+
Gelatin liquefaction	+	+
Starch hydrolysis	+	*
V P test	-	-
M R test	+	*
Citrate utilization	-	*
Argine hydrolysis	+	*
Lysine decarboxylase reaction	*	-
KCN broth	*	-
Gas from glucose	+	+
glycerol	+	+
Acid from mannitol	+	+
inositol	+	*
lactose	-	*
saccharose	+	+
galactose	*	+
Amino acids as sole souce of carbon		
L-Arginine	*	-
L-Asparagine	*	-
L-Glutamic acids	*	-
L-Serine	*	-
L-Alanine	*	-

* Not examined + Positive reaction - Negative reaction

1) 90 strains 2) 38 strains

示した *A. salmonicida* の性状と一致し、これらはいずれも *A. salmonicida* と同定して差しつかえないものと考えられた。

腎臓および肝臓脾臓の生菌数 実験-1, 供試した頻死の19尾の腎臓全てから生菌が検出され、その生菌数は腎臓 1g 当り 2.08×10^2 個から 1.00×10^3 個を示し内9尾の腎臓から *A. salmonicida* が検出された。*A. salmonicida* の検出の有無と生菌数の関連では *A. salmonicida* の検出された個体の生菌数が一般に高い傾向を示した (Fig-1)。なお本実験の供試魚には全て水生菌の着生が認められた。

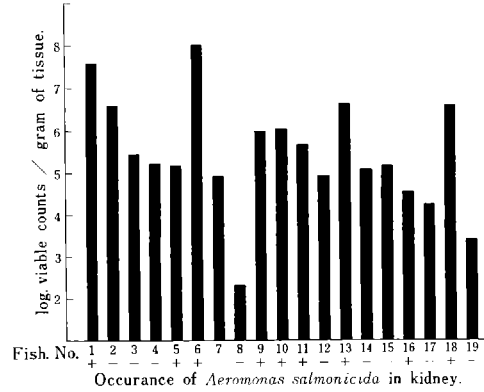


Fig 1 Viable counts of microorganisms in kidney of moribund brood fish after egg-stripping in January 1976. Viable counts were measured by plate count method

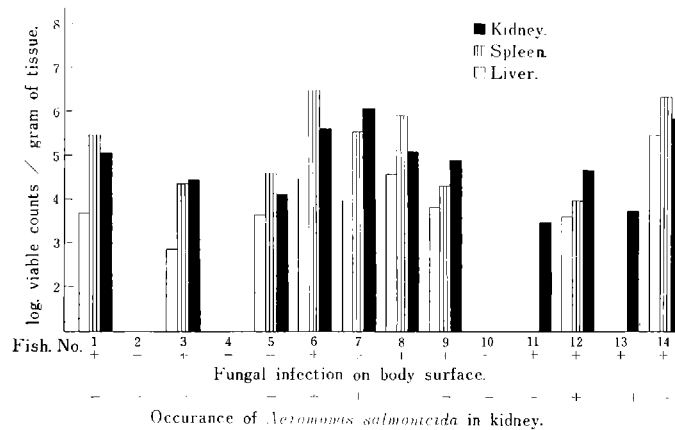
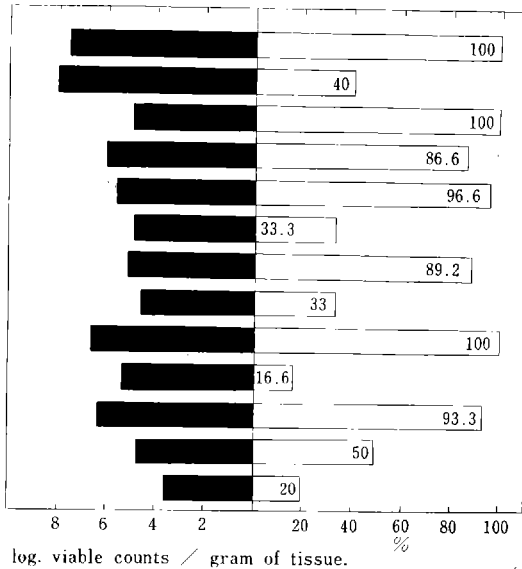


Fig 2 Viable counts of microorganisms in kidney, liver and spleen of moribund rainbow trout after egg-stripping in December 1976. Viable counts were measured by surface smear plate method

比較のため行なった外見上健康と考えられる 10 尾の生菌数の測定結果では、一尾の腎臓に 6.8×10^2 個/1 g の生菌数が測定されたが他の 9 尾からは全く菌は検出されなかった。

実験-2、本実験の供試魚の腎臓の生菌数は多い個体で 1.1×10^6 個を示したが、供試した 14 尾中体表に水生菌の着生のみられなかった 3 尾の供試魚からは生菌は検出されなかった。同一個体の腎臓・脾臓における生菌数はほぼ同じ値を示したが肝臓では前二者に比較して一般に少なく、また 14 尾中 2 尾では腎臓からのみ生菌が検出された。供試魚 14 尾中 4 尾の腎臓から *A. salmonicida* が検出された (Fig-2)。

実験-1 および実験-2 において合計 34 尾の供試魚中 13 尾から *A. salmonicida* が検出されたが、それらの供試魚の腎臓における生菌中に占める *A. salmonicida* の割合を前述の方法で求めた結果は 13.0~100% と個体により大きな差が認められた。13 個体中 3 個体からはほぼ純粋に *A. salmonicida* が検出された (Fig-3)。



Rate of *A. salmonicida* in viable microorganisms.

Fig 3 Relation between number of viable microorganisms in kidney and rate of incidence of *A. salmonicida* in viable microorganisms

を示し、肝臓での生菌数は腎臓での生菌数より低かった事を報告している。本報告における結果では、臓器による生菌数の多少は畑井 (1972) の報告と一致したが (Fig-2), 生菌数では腎臓 1g 当り 10^8 個ときわめて多い個体も認められた (Fig-1), このことは ANDERSON (1972) の示しているように *A. salmonicida* 自体の病原性や、ニジマスがせつそう病に対して感受性が低い事に起因するものと考えられる。

前報で観察した症状と本報において認められたように *A. salmonicida* が腎臓中にはほぼ純粋に近い状態で検出される個体が存在することなどから考えると、採卵後のニジマス親魚の内にせつそう病による斃死魚がかなり存在することは容易に推察できる。しかし *A. salmonicida* が検出されない個体や、検出されても生菌数に占める割合の低い個体が存在することから斃死が全てせつそう病によるものとは考えられない。また採卵後の斃死率と *A. salmonicida* の検出率には直接的な関連性を認められず (Table-1) この点からも、これら斃死の全てがせつそう病によるものとは考えられない。Table-1 に示した供試魚の腎臓からの *A. salmonicida* の検出率が一般に高かったのは BULLOCK and STUCKEY (1975) がストレスにより *A. salmonicida* の検出率が増加することを報告しているように、採卵作業や成熟に伴う生理変化等により親魚の体力が低下し、保菌の状態にあった個体の体内の菌が増殖し高い検出率を示したものとするのが妥当であろう。

本報告の供試魚には前報 (野村・関 1977) で報告したと同様に体表および鰓に水生菌の着生が見られるものが多かった。EGUSA (1965)^a (1965)^b はウナギのワタカブリ病が *Aeromonas liquefacience* の感染と強い関連があることを報告しているが、同様に採卵後のニジマス親魚においても *A. salmonicida* の感染により水カビの着生が促進されることも考えられる。今後この点についても詳細に検討する必要がある。

考 察

BULLOCK and SNIESZKO (1969), は外見上健康と考えられる体長 18~25 cm のニジマス・カワマス・ブラウンマスの腎臓および血液の中から、細菌の検出を試み、供試魚 244 尾中 3 尾から *A. salmonicida* が検出された事を報告し、さらに BULLOCK and STUCKEY (1975) はニジマス・カワマス計 94 尾の腎臓からの *A. salmonicida* の検出を試み、腎臓の一部を直接培地に塗抹する方法では *A. salmonicida* は検出されなかった事を報告している。それらの報告に比べると本報告における腎臓からの *A. salmonicida* の検出率は高く、採卵後のニジマス斃死魚では *A. salmonicida* を保菌している個体の多いことが推定された。

畑井 (1972) はウナギに *Aeromonas liquefacience* Y-62 株を致死量接種した場合、斃死期の腎臓、肝臓および血液中の生菌数は約 10^8 個/1g

要 約

1. 採卵後の雌親魚について腎臓からの *A. salmonicida* の検出率ならびに臓器中の生菌数について検討した。
2. 供試 557 尾中 27.6%にあたる 154 尾から *A. salmonicida* が検出された。
3. 臓器中の生菌数は高いものでは 10⁸ 個/g におよぶものがあり, *A. salmonicida* が純粹に検出された個体も存在した。

謝 辞

本研究に対し御助言をいただき, 原稿の御校閲をいただいた北海道大学木村喬久教授, 御助言をいただいた淡水区水産研究所川津浩嗣病理室長に深謝いたします。

文 献

- Anderson, D. P. 1972. Virulence and persistence of rough and smooth forms of *Aeromonas salmonicida* inoculated into coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). J. Fish. Res. Board Can., 29 (2), 204-205.
- Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons 1974. Bergeys manual of determinative bacteriology. Eighth edition. The Williams and Wilkins Company, 1243 pp., Baltimore.
- Bullock, G. L. and S. F. Snieszko 1969. Bacteria in blood and kidney of apparently health hatchery trout. Trans. Am. Fish. Soc. 98 (2), 268-271.
- Bullock, G. L. and H. M. Stuckey 1975. *Aeromonas salmonicida*: detection of asymptotically infected trout. Prog. Fish-Cult., 37 (4), 237-239.
- Egusa S. 1965^a. The existence of a primary infectious disease in the so-called "fungus disease" in pond-reared eels. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 31 (7), 517-526.
- Egusa S. 1965^b. Studies of a primary infectious disease in the so-called fungus disease of eels. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 31 (10), 804-813.
- 畑井喜司雄 1972. 魚における血流中接種菌の動態に関する研究-I. ウナギ血流中に接種された *Aeromonas* の消長. 魚病研究, 7 (1), 26-33.
- Herman, R. L. 1968. Fish furunculosis 1952-1966. Trans. Amer. Fish. Soc., 97 (9) 221-230.
- 木村喬久 1970. 催熟蓄養中のサクラマスならびにカラフトマス 親魚に発生した細菌性疾病に関する研究. 北海道さけ・ますふ化場研報, (24), 9-100.
- McCraw, B. M. 1952. Furunculosis of fish. U. S. Fish. and Wildl. Serv. Sp. Sci. Rep. Fish., (84), 87 pp.
- 野村哲一・関 泰夫 1977. ニジマス雌親魚の採卵後の斃死について-I. 出現率と症状. 魚病研究, 12 (2), 121-128.
- 坂崎利一 1974. 医学細菌同定の手びき. (第2版) 近代出版, 335 pp., 東京.
- Snieszko, S. F. 1972. Panel review on furunculosis of salmonidae. FI: EIFAC 72/SC, II-Symp., 6, 1-7.
- 丹治一義 1972. アマゴおよびヒメマスの癩瘡病から分離した *Aeromonas salmonicida* について. 魚病研究, 6 (2), 91-96.