

〈1988年 5月 春季學術發表會 特別講演〉

## サケ科魚類の細菌性鰓病(Bacterial Gill Disease)についで

若林久嗣

東京大学農学部水産学科

### Bacterial Gill Disease in Salmonids

Hisatsugu WAKABAYASHI

Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, University of Tokyo,

Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

#### 序

細菌に起因する鰓の疾患として、滑走細菌の *Flexibacter columnaris* の感染による鰓辨の壊死・欠損がよく知られているが、これは、カラムナリス病 (Columnaris Disease) であり、いわゆる細菌性鰓病 (Bacterial Gill Disease) とは明瞭に區別される。それでは細菌性鰓病は何かという点 Davis(1926,1927) が米國 Vermont州のHolden 孵化場のマス類の稚魚に最初に発見した疾病を意味する。彼によれば 1926年夏、まずカワマス稚魚に發生し間もなくニジマスその他のマス類も被害を受けた。平均水温 約13℃で發生が認められたが、水温上昇(約15℃)にともなう死亡率が急増した。病魚の鰓を注意深く顯微鏡觀察したところ、その表面に敷き詰めたように細長い糸状の細菌が付着していた。鰓辨上皮は増生・肥厚し棍棒化や癒合が觀察された。また、粘液の異常分泌も認められた。細菌は鰓の表面にしか存在せず、病魚を硫酸銅の1/2000溶液に1分間浸漬することによって細菌は鰓から速やかに除去され、比較的容易に治療することができた。

Davis(1926,1927)の記載した疾病と同じと判断

される疾病はその後、米國各地の養鱒場でしばしば發生し處置が遅れると大量死をまねく稚魚の疾病として知られるようになった。しかし、病原菌を特定することができず、久しく細菌性鰓病(Bacterial Gill Disease)と呼び習わされてきた。すなわち、Rucker, Johnson and Ordal(1949)は病魚の鰓から *Cytophaga* spp. を分離し、また、Borg(1948,1960)やBullock(1972)も同様に粘液細菌類(現在の分類では滑走細菌)を分離しそれぞれ感染實驗を試みたが、種種の工夫にもかかわらず、これらの分離菌による感染實驗はいずれも成功しなかった。

細菌性鰓病と見做される疾病は日本のニジマス稚魚にも古くから知られていた。木村・若林・工藤(1978)は群馬縣のいくつかの養鱒場のニジマスおよびヤマメの病魚の鰓から1種の細菌を分離し、感染實驗を行なったところ、この細菌は飼育水中に混入するだけで實驗魚の鰓に感染し、速やかに繁殖することを見出した。分離菌は細長い糸状のグラム陰性細菌であったが、滑走運動あるいは寒天平板上での遊走が全く認められない点で、それまで細菌性鰓病の原因菌として有力視されていた滑走細菌類とは異なる細菌

であった。すなわち Bergey's manualの第8版に準拠して *Flavobacterium* 属に分離するのが もっとも妥当と判断された。

さらに Wakabayashi, Egusa and Fryer(1980)は 米國オレゴン州のいくつかの孵化場のサケ料魚類の細菌性鰓病の病魚から木村らの分離株(日本株)と同種と判断される菌株(アメリカ株)を分離し、感染性を明らかにした。また Farkas(1985)はヨーロッパのニジマス、シルバーカープ、シートフィッシュの病魚から同種の分離菌株(ヨーロッパ株)を報告した。なお、日本でもサケ料魚類の他にアユでも細菌性鰓病の発生が認められている。

以下に、現在、細菌性鰓病のもっとも有力な原因菌と考えられる上記の *Flavobacterium* sp. (*F. branchiophila* sp. nov. なる種名を提案中, Wakabayashi, Huh and Kimura 1988) とその感染症に関するこれまでの知見をとりまとめて紹介したい。

### 細菌分類學的性状

*F. 'branchiophila'* は幅 0.3~0.5 $\mu$ m, 長さ 5~15 $\mu$ m のグラム陰性桿菌であるが、培養菌の塗抹標本では 2~3 菌體が連鎖しているものも多い。太さは一様で鈍端、鞭毛は持たないが、電顕像では菌體の周囲に多数の線毛が観察される。これらの線毛の機能は不詳であるが、菌浮遊液をホモジナイザーで激しく攪拌すると感染力が著しく低下することから、鰓上皮表面への付着において重要な働きをしているものと推測される(Ototake and Wakabayashi 1985)。

滑走や屈曲などの運動性はなく、寒天平板上での遊走性も認められない。分離・培養にはサイトファグ培地 (Anacker and Ordal 1959) が用いられる、18 $^{\circ}$ C 5 日間の培養によって約 0.5mm 径の淡黄色、半透明の圓形コロニーが得られる。患部組織からの分離の際は近隣の雑菌の発育に妨げられて、コロニーの大きさが小さく不揃いになる。サイトファグ液體培地に比較的良く発育し、一様に混濁して菌膜は作らない。発育温度は 10~25 $^{\circ}$ C であるが、5 $^{\circ}$ C あるいは 30 $^{\circ}$ C で発育する菌株もある。培地に食鹽を含まない方が良く発育し、0.05~0.2% 以上食鹽を含む培地には発育しない。また、嫌氣

条件下(ガスブツク法 BBL) では発育しない。

日本株、アメリカ株、ヨーロッパ株との間に生化学的性状において差は認められない。おもな性状は表1のとおりである。なお、これらの性状試験はサイトユファグ培地ないしは TY 培地(トリプトン 0.02%, 酵母エキス 0.05%) を基礎培地として既往の方法(Pacha and Porter 1968, Bullock 1972) に準じて行なわれた。熱變性曲線から計算された DNA の G+C 含量は 29.2~30.6mol% である。なお、Wakabayashi *et al.*(1980) では、32.9~34.1mol% としたが、その後の測定の結果、前記の値となった。

Table 1. Characteristics of a gill disease filamentous bacterium, *Flavobacterium 'branchiophila'*.

	15 strains*
Gram staining	-
Shape	slender rod (0.3-0.5 $\times$ 5-15)
Motility	-
Aerobic growth	+
Anaerobic growth	-
Growth at 5 $^{\circ}$ C	d
10 $^{\circ}$ C	+
25 $^{\circ}$ C	+
30 $^{\circ}$ C	-
NaCl tolerance	
Growth in 0%	+
0.025%	+
0.05%	d
0.1%	d
0.2%	-
Production of	
Catalase	+
Cytochrome oxidase	+
Hydrogen sulfide	-
Indole	-
Reduction of nitrate	-
Degradation of	
Gelatin	+
Casein	+

Starch	+
Chitin	-
Fermentation of	
Glucose	+
Fructose	+
Galactose	-
Lactose	-
Sucrose	+
Maltose	+
Trehalose	+
Cellobiose	+W
Melibiose	+W
Arabinose	-
Xylose	-
Rhamnose	-
Raffinose	+W
Inulin	+W
Andonitol	-
Mannitol	-
Dulcitol	-
Sorbitol	-
Inositol	-
Salicin	-
G+C content of DNA	29.2~30.6**

+ : positive, - : negative  
 +W : weakly poitive, d ; diverse.  
 \* Five Gunma strains and 10 Oregon strains.  
 \*\* Values in 6 strains.

血清學的性狀

日本株, アメリカ株, ヨーロッパ株は, 生化学的性狀には全く差が見られず, 生物型として區別することはできないが, 血清型を異にする(Huh and Wakabayashi 1988). 日本株 TS-1, TW-1, OD-1, アメリカ株 BV-1, FDL-1, ヨーロッパ株 FL-15 の合計6菌株に對する家兔抗血清を作成し, 凝集反應を調べたところ, すべての供試菌株に共通の耐熱性抗原と易熱性抗原が存在する一方, 吸収試験によつて日本株だけが持つ抗原とアメリカ株とヨーロッパ株には共通であるが日本株にはない抗原のあることが明らかとなった. このことはOuchterlony法や免疫電気泳動法によつても確認され, 供試菌株には3つの耐熱性可溶性抗原(a,b,e) と1つの易熱性可溶性抗原(k) の共通抗原, また, 耐熱性可溶性抗原(g) は日本株だけに, 耐熱性可溶性抗原(h) と易熱性可溶性抗原(f) はアメリカ株とヨーロッパ株にだけあることが明らかにされた (表2).

病原性

*F. 'branchiophila'* の培養菌を  $10^5 \sim 10^6$  CFU/ml の濃度に加えた水槽にニジマスなどの稚魚を入れるこゝとによつて比較的容易に感染させることができる. すなわち, 多くの場合, 24~48 時間以内に實驗魚の鰓の表面に本菌の旺盛な繁殖が觀察される(圖1). しかし, そのように感染が成立しても實驗魚は必ずしも死には致らず, 數日後には鰓表面から細菌が消失し, 自然

Table 2. Immunoelectrophoretic analysis of *Flavobacterium 'branchiophila'*. - I.

Antiserum	Strain	Precipitin Line														
		a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o
TS-1	TS-1	⊕	⊕	+	-	⊕	-	⊕	-	-	+	+	+	+	+	-
	TW-1	⊕	⊕	-	-	⊕	-	⊕	-	-	-	+	+	+	-	-
	OD-1	⊕	⊕	-	-	⊕	-	⊕	-	-	+	+	-	-	-	-
	BV-1	⊕	⊕	-	-	⊕	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
	FDL-1	⊕	⊕	-	-	⊕	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
	FL-15	⊕	⊕	-	-	⊕	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-

Tw-1	TS-1	⊕	⊕	-	-	⊕	-	⊕	-	-	-	-	+	-	-	-	+	
	TW-1	⊕	⊕	+	-	⊕	-	⊕	-	-	+	+	+	-	-	-	+	
	OD-1	⊕	⊕	-	-	⊕	-	⊕	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
	BV-1	⊕	⊕	+	-	⊕	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
	FDL-1	⊕	⊕	-	⊕	⊕	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	
	FL-15	⊕	⊕	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
OD-1	Ts-1	⊕	⊕	-	-	⊕	-	⊕	-	-	-	+	+	-	-	+	-	
	TW-1	⊕	⊕	-	-	⊕	-	⊕	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
	OD-1	⊕	⊕	+	-	⊕	-	⊕	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
	BV-1	⊕	⊕	-	-	⊕	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
	FDL-1	⊕	⊕	-	-	⊕	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
	FL-15	⊕	⊕	+	-	⊕	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
BV-1	TS-1	⊕	⊕	-	-	⊕	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	
	TW-1	⊕	⊕	+	-	⊕	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	
	OD-1	⊕	⊕	-	-	⊕	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
	BV-1	⊕	⊕	+	-	⊕	+	-	⊕	-	⊕	+	+	+	+	-	-	+
	FDL-1	⊕	⊕	-	⊕	⊕	+	-	⊕	-	⊕	+	-	+	-	+	-	+
	FL-15	⊕	⊕	-	-	⊕	+	-	⊕	-	⊕	+	+	+	+	-	-	+
FDL-1	Ts-1	⊕	⊕	-	-	⊕	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	
	Tw-1	⊕	⊕	-	-	⊕	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	
	OD-1	⊕	⊕	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
	BV-1	⊕	⊕	-	-	⊕	+	-	⊕	-	⊕	-	+	+	-	-	-	-
	FDL-1	⊕	⊕	-	-	⊕	+	-	⊕	-	⊕	-	+	+	-	+	-	-
	FL-15	⊕	⊕	-	-	⊕	+	-	⊕	-	⊕	-	+	+	-	+	-	-
FL-15	TS-1	⊕	⊕	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
	TW-1	⊕	⊕	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
	OD-1	⊕	⊕	+	-	⊕	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
	BV-1	⊕	⊕	-	-	⊕	+	-	⊕	-	⊕	+	-	+	-	-	-	-
	FDL-1	⊕	⊕	-	-	⊕	+	-	⊕	-	⊕	-	+	+	-	+	-	-
	FL-15	⊕	⊕	+	-	⊕	+	-	⊕	-	⊕	+	-	+	-	-	-	-

+ : Reaction to heat-labile antigen.

⊕ : Reaction to heat-stable antigen (121°C, 30min).

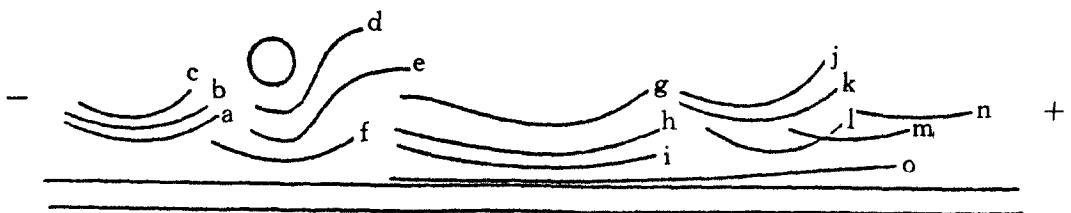


Fig. 1. Scanning electron micrograph of *Flavobacterium 'branchiophila'* and the lamellae 18 hours after exposure of a rainbow trout fingerling to the bacterial suspension in an aquarium.

治癒する鰓辨組織を顕微鏡観察しないかぎり、感染したのか、しなかつたのか分からない場合が多い。

*F. 'branchiophila'* 感染魚の死亡の原因は、鰓辨上皮の増生・肥厚、癒着・棍棒化、粘液の過剰分泌による鰓表面積の減少と機能低下と考えられ、とりわけ呼吸機能の低下による窒息が直接の死因となる場合が多いと思われる。Wakabayashi and Iwado(1985a,b) は、ニジマス稚魚を用いて、実験感染魚の呼吸機能を調べ、つぎのような諸点を明らかにした。まず、水路型の実験水槽をいくつかに仕切って、それぞれに実験感染魚を收容したところ(圖2)、下流の仕切ほど累積死亡率(2週間)が高くなった(仕切 A 28%、B 70%、C 73%、D

88%、E 100%)。また、鰓表面の感染菌数の最も多い感染5日後の実験魚の酸素攝取能力(標準酸素消費量)は  $155 \sim 167 \text{ ml O}_2 / \text{Kg} / \text{hr}$  で無感染魚の  $251 \sim 289 \text{ ml O}_2 / \text{Kg} / \text{hr}$  に比べ著しく低かった。また、同様の実験魚をエアレーションをしない水中に置いたところ、感染魚は無感染魚がまだ耐え得る溶存酸素量で横轉してしまつた。実験感染魚の筋肉中のグリコーゲン、ピルピソ酸、乳酸の含量を経時的に調べたところ、死亡直前の感染魚の筋肉中のこれらの物質の挙動は、窒息させた無感染魚のそれとよく似ていることが分つた(圖3)。

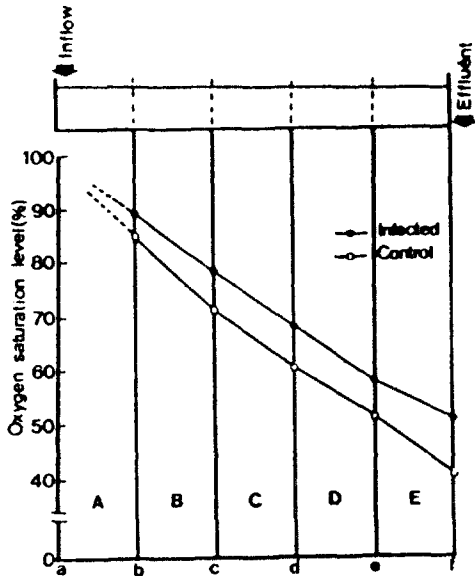


Fig. 2. Diagram of an aquarium, the situation of the fish (upper), and the oxygen saturation level of each compartment (lower).

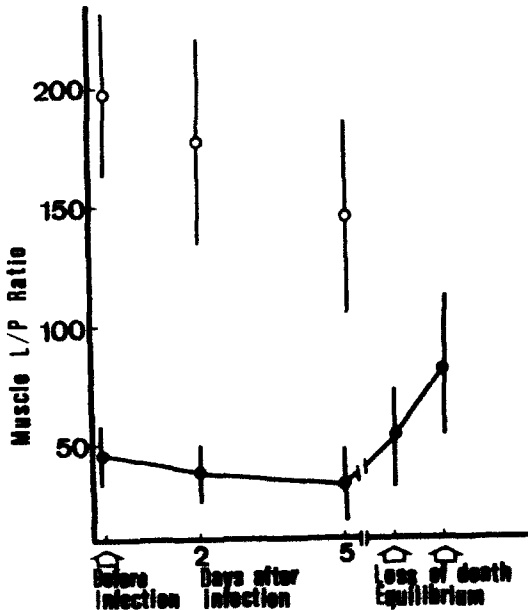


Fig. 3. Changes in muscle L/P ratio of the experimentally infected rainbow trout (●). Some of the fish were picked and subjected to environmental hypoxia (○).

疫 學

細菌性鰓病は、米國、カナダのほか、スイス、ポルトガル、イタリア、イギリスなどヨーロッパ各國のマス類で知られている。しかし、Farkas(1985)の報告したハンガリーとデンマークの例のほかは*F. 'branchiophila'*によるものか否かは不明である。

日本でもニジマス稚魚の疾病として古くから知られ、水温が13℃を越え攝餌が活発になる5月頃によく發生する。また、近年、ヤマメの養殖や放流用のサケの中間育成が盛んになって、これらにも頻發するようになったが、これらの場合も、と水温の低い1~2月頃にも發生する。なお、大量斃死は浮上稚魚から體重10g位までのものに限られている。病原菌は養魚池あるいは天然水域に常在し、魚の過密、水中アンモニアの増加、溶存酸素の低下、水中浮遊物、などが感染・發病を促進するといわれている(Bullock 1972)、が、詳細はまだ明らかでない。

*F. 'branchiophila'*は發育が遅く、また試料に雑菌が多く含まれていると分離・培養の際にコロニーの發育が著しく抑制される。このため、培養法による感染魚や池水などからの檢出は、長時間を費やすばかりでなく、檢出率も低い。そこで、この問題を解決する方法として螢光抗體法が檢討された(許, 若林 1987)。すでに血清型の項で述べたように本菌は各菌株間に共通の抗原もつ。一方、他種の細菌に對する特異性については、弱い交差性の認められる菌種もあったが、タイターに大きな開きがあるため吸收操作や希釋すれば實用上問題のないことが分った。また、感染實驗魚および自然感染魚に對して、螢光抗體法(間接法)、培養法、檢鏡(位相差)の3つの方法を比較したところ、螢光抗體法の感度も、とも高かった。1986年 4月から9月にかけて東京都水産試験場奥多摩分場の養鱒池での調査結果は表3のとおりであった。高價な螢光顯微鏡を必要とする點に問題があるものの、螢光抗體法は、短時間に多數の試料を處理できるなど、疫學的調査の優れた方法であるといえる。

Table 3. Detection of *Flavobacterium* sp. from the gill filaments of naturally infected trouts cultured in Okutama branch, Tokyo Pref. Fish. Exp. Stn.

Fish lot. No.	Date	Incidence of detection (%)	No. of detected bacteria* (Geometric mean value)	
			IFAT	Plating method
1	86. 4. 10	0	not detected	not detected
2	4. 24	0	not detected	not detected
3	5. 6	0	not detected	not detected
4	5. 20	0	not detected	not detected
5	6. 5	0	not detected	not detected
6	6. 19	30	$4.02 \times 10^4$	not detected
7	7. 1	100	$6.05 \times 10^7$	$3.25 \times 10^7$
8	7. 3	50	$1.36 \times 10^5$	not detected
9	7. 5	0	not detected	not detected
10	7. 10	10	$2.78 \times 10^5$	not detected
11	7. 12	70	$4.76 \times 10^7$	$2.94 \times 10^5$
12	7. 15	20	$7.72 \times 10^4$	not detected
13	8. 2	20	not detected	not detected
14	8. 18	0	not detected	not detected
15	9. 1	0	not detected	not detected

\* Limit of detection :  $1.00 \times 10^4$  cells/g (IFAT).  
 $1.00 \times 10^3$  CFU/g (plating method).

## 對 策

Davis(1927)は魚のいない水源を利用している孵化場には細菌性鰓病の発生がみられないと述べており、また、Borg(1960), Bullock(1972), Larmoyeux and Piper(1973) は細菌性鰓病が環境的ストレスを契機に発生することを指摘している。良い環境条件、とくに飼育水の溶存酸素量を高く保つことが重要である。

治療法としては、かつては硫酸銅や過マンガン酸カリ、また、比較的最近までニトロフラン剤の薬浴が廣く行なわれていたが、いずれも公衆衛生上の観点から使用されなくなった。現在日本の養鱒場では、5%食鹽水に2分間浸漬する方法が廣くおこなわれている。この方法は安全で有効であるが、規模の大きな施設では大量の食鹽を必要とする点に問題がある。なお、米

國ではクロラミンTが有効であり、實用性が高いと報じられている(BULLOCK 1988)。

## Reference

- Anacker, R. L., and E. J. Ordal(1959) : J. Bacteriol., 78, 25-32.  
 Borg, A. F. (1960) : J. Wildlife Dis. 8, 1-85(2 microcarids).  
 Bullock, G. L. (1972) : Tech. Paper, 60, 1-30. Bureau of Sport Fish. & Wildlife.  
 Bullock, B. L. (1988) : FHS/AFS Newsletter, 16(3), p6.  
 Davis, H. S. (1926) : Trans. Am. Fish. Soc., 56, 156-160.

- Davis, H. S. (1927) : *Trans. Am. Fish. Soc.*, 57, 210-216.
- Farkas, J. (1985) : *Aquaculture*, 44, 1-10.
- Huh, G. J., and H. Wakabayashi (1988) : *Jour. Aquatic Animal Health* に投稿中.
- 許康俊・若林久嗣 (1987) : *魚病研究* 22, 215-220.
- 木村紀彦・若林久嗣・工藤重治 (1978) : *魚病研究* 12, 233-242.
- Larmoyeux, J. D. and R. G. Piper (1973) : *Prog. Fish-Cult.*, 35, 2-8.
- Ototake, M., and H. Wakabayashi (1985) : *魚病研究* 20, 167-171.
- Pacha, R., and S. Porter (1968) : *J. Appl. Microbiol.*, 16, 1901-1906.
- Ruceker, R. R., H. E. Johnson and E. J. Ordal (1949) : *J. Bacteriol.*, 57, 225-234.
- Wakabayashi, H., S. Egusa and J. L. Fryer (1980) : *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37, 1499-1504.
- Wakabayashi, H. and T. Iwado (1985a) : 'Fish and Shellfish Pathology' (ed. A. Ellis), Academic Press, 153-160.
- Wakabayashi, H. and T. Iwado (1985b) : *魚病研究* 20, 161-165.
- Wakabayashi, H., G.J. Huh and N. Kimura (1988) : *Intern. Jour. Syst. Bacteriol.* に投稿中.