

フナの養殖水田で死亡したフナ、ニホンアマガエル幼生およびドジョウから分離された *Aeromonas hydrophila* の病原性

熊川真二

Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* isolated from Crucian carp, Japanese tree frog larvae and Oriental weather loach in rice fields

Shinji Kumakawa

運動性エロモナス症の原因菌である *Aeromonas hydrophila* は、養魚池、河川湖沼などあらゆる淡水域に広範に分布するグラム陰性桿菌で、ほとんど全ての温水性淡水魚とマス類、さらには両生類、爬虫類など魚類以外の諸動物も感受性を持つと言われる^{1,2)}。長野県の佐久地域では水田（休耕田を含む）を利用した食用フナの養殖が1970年代後半から行われているが、1997年から1999年にかけて *A. hydrophila* もしくは *A. sobria* を原因菌とする運動性エロモナス症が多発した^{3,4)}。以降、フナの養殖水田でフナの死亡に前後して、ニホンアマガエル幼生（以下、アマガエル幼生）やドジョウが死亡する事象が見られることから、本菌の関与が強く疑われた。

本研究ではフナの養殖水田で死亡したフナ、アマガエル幼生およびドジョウから分離された *A. hydrophila* のフナおよびアマガエル幼生に対する病原性を検討した。

材料と方法

供試菌株

2007年7月から8月にかけて、佐久市内のフナ養殖水田で死亡していたフナ、アマガエルの幼生およびドジョウの腎臓からBHI寒天平板培地（Merck）を用いて細菌分離を試みた。25℃で3～4日間培養し、API20NE（Bio Merieux）による簡易同定を行い、98.7%の高い同定確率で *A. hydrophila* に同定されたフナ由来、アマガエル幼生由来およびドジョウ由来の3菌株を試験に供試した（表1）。

病原性試験

3菌株のフナおよびアマガエル幼生に対する人為感染

は腹腔内接種法により行った。供試魚にはいずれも運動性エロモナス症の発症歴がない平均体重1.5gのフナ稚魚と平均体重1.4gのアマガエル幼生を用いた。

攻撃菌液は各供試菌株をNB液体培地（栄研）に接種して25℃で48時間振とう培養後、PBS(-)溶液で生菌数を調整した。フナに対する人為感染では、フナおよびアマガエル幼生由来株を $10^{8.3} \sim 10^{4.3}$ CFU/尾、ドジョウ由来株を $10^{8.7} \sim 10^{4.7}$ CFU/尾となるよう各区10尾それぞれに1尾あたり0.05mLずつ腹腔内接種した。対照区には菌液の代わりにPBS(-)溶液を同様に接種した。

アマガエル幼生に対する人為感染では、アマガエル幼生およびフナ由来株をそれぞれ $10^{8.3}$ 、 $10^{6.3}$ CFU/尾となるよう各区10尾それぞれに1尾あたり0.05mLずつ腹腔内接種した。対照区には菌液の代わりにPBS(-)溶液を同様に接種した。

攻撃後はそれぞれ容積4Lの水槽に收容し、18.2～20.8℃（平均19.5℃）の地下水で飼育し、15日間死亡状況を観察した。死亡魚はBHI寒天平板培地を用いて腎臓から菌の再分離を行い、接種菌による死亡を確認した。試験終了時の生残魚は、保菌の有無を確認するため死亡魚と同様に菌分離を行った。

薬剤感受性試験

フナ由来およびアマガエル幼生由来の2菌株を代表株として、ディスク法によりオキシリン酸（OA）、フロルフェニコール（FF）、塩酸オキシテトラサイクリン（OTC）の薬剤感受性を調べた。培地はBHI寒天平板培地を用い、25℃で24時間培養後、発育阻止円の大きさから薬剤感受性の強さを判定した。

表1 供試した *Aeromonas hydrophila* 3菌株の由来

菌株	年月日	宿主	体重	部位	場所
CC-7702	2007/7/2	フナ稚魚 (<i>Carassius carassius</i> sp.)	0.4 g	腎臓	佐久市中込(フナ養殖水田)
TF-7702	"	アマガエル幼生 (<i>Hyla japonica</i>)	0.7 g	腎臓	同上
WL-7718	2007/7/18	ドジョウ稚魚 (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>)	1.5 g	腎臓	佐久市高柳(フナ養殖水田)

結果

フナに対する病原性試験

フナ由来、アマガエル幼生由来およびドジョウ由来株区による死亡は、 $10^{8.3} \sim 10^{8.7}$ CFU/尾の菌量の接種区で接種2日後から始まり、各区とも4日後までに累積死亡率は70～100%に達した。 $10^{6.3} \sim 10^{6.7}$ CFU/尾以下の菌量の接種区および対照区には死亡は認められなかった(表2)。

死亡魚の外観所見として、胸鰭や腹鰭基部および腹面の発赤や、肛門部の拡張・発赤、血液混じりの腹水貯留などの症状が各区に共通して観察された。

*A. hydrophila*は全ての死亡魚から再分離された。生残魚からも60～100%の高い頻度で分離された(表2)。

表2 *Aeromonas hydrophila* 3菌株の腹腔内接種試験におけるフナの累積死亡率と生残魚からの菌分離率

供試菌株	注射菌量 (CFU/尾)	累積死亡率 (%)	菌分離率* (%)
CC-7702	$10^{8.3}$	100	—
	$10^{6.3}$	0	100
	$10^{4.3}$	0	70
TF-7702	$10^{8.3}$	70	100
	$10^{6.3}$	0	80
	$10^{4.3}$	0	80
WL-7718	$10^{8.7}$	100	—
	$10^{6.7}$	0	80
	$10^{4.7}$	0	60
対照区	PBS(-)	0	—

*15日以降まで生残した供試魚からの*A. hydrophila*分離率

アマガエル幼生に対する病原性試験

アマガエル幼生由来株区では接種3日後から死亡が始まり、累積死亡率は $10^{8.3}$ CFU/尾の菌量の接種区で90%、 $10^{6.3}$ CFU/尾の菌量の接種区で80%に達した。フナ由来株区においても同様に接種3日後から死亡が始まり、 $10^{8.3}$ CFU/尾の菌量の接種区で90%、 $10^{6.3}$ CFU/尾の菌量

表3 *Aeromonas hydrophila* 2菌株の腹腔内接種試験におけるアマガエル幼生の累積死亡率

供試菌株	注射菌量 (CFU/尾)	累積死亡率 (%)	菌分離率* (%)
CC-7702	$10^{8.3}$	90	—
	$10^{6.3}$	70	—
TF-7702	$10^{8.3}$	90	—
	$10^{6.3}$	80	—
対照区	PBS(-)	0	—

*生残個体からの菌分離は未実施

の接種区で70%に達した。対照区には死亡は認められなかった(表3)。

死亡個体の外観所見として、喉元または腹部が充血してやや赤みを帯びるなどの症状が各区に共通して観察された。*A. hydrophila*は全ての死亡個体から再分離された。

薬剤感受性試験

フナ由来およびアマガエル幼生由来の2菌株は、いずれもオキシリン酸(OA)に対して強い感受性を示した。比較のために供試したフロルフェニコール(FF)、塩酸オキシテトラサイクリン(OTC)に対しても強い感受性が認められた(表4)。

表4 *Aeromonas hydrophila* 2菌株の薬剤感受性

供試菌株(宿主)	OA	FF	OTC
CC-7702(フナ)	+++	+++	+++
TF-7702(アマガエル)	+++	+++	+++

*薬剤感受性の強さ +++> ++>+ (各ディスクの判定基準による)

考察

フナ由来*A. hydrophila*のフナに対する病原性は小原ら⁴⁾によって報告されており、腹腔内接種では 10^7 CFU/尾以上の菌量で攻撃しないとフナは死亡しない。今回の試験でもフナ由来株では $10^{8.3}$ CFU/尾の菌量の攻撃で死亡が認められたが、 $10^{6.3}$ CFU/尾以下の菌量の攻撃では死亡は見られず、小原らの結果と一致した。また、ドジョウ由来およびアマガエル幼生由来株のフナに対する病原性も確認され、フナ由来株とほぼ同じ $10^{8.7}$ CFU/尾の菌量の攻撃でフナを死亡させることがわかった。

フナ由来およびアマガエル幼生由来株のアマガエル幼生に対する病原性を腹腔内接種で検討した。その結果、 $10^{6.3}$ CFU/尾以上の菌量の攻撃で死亡が確認されたことから、フナ由来株はアマガエル幼生に対して病原性を有することが明らかになった。タイで養殖されている食用ガエルの一種、*Rana rugulosa*(中国ウシガエル)では、別亜種の*A. hydrophila* subsp. *ranae*に感染し、敗血症を起こして死亡する症例が報告されている⁶⁾。また、両生類の*A. hydrophila*感染症は赤足病⁵⁾として知られるが、本研究の死亡個体にはこれに酷似する喉元や腹部の発赤などの外観症状も観察されたことから、アマガエル幼生はフナ由来株に感染して*A. hydrophila*感染症を発症するものと推定された。

さらに、今回行った腹腔内接種試験において、アマガエル幼生は $10^{6.3}$ CFU/尾の菌量の攻撃で死亡が見られたが、フナは $10^{8.3}$ CFU/尾の攻撃で死亡が見られた。このことから、アマガエル幼生の*A. hydrophila*に対する感受性

はフナよりも高いことが推定された。

水田におけるフナ養殖は、5月下旬～6月上旬に水入れを行い、親フナを収容して産卵させることから始まる⁷⁾。この時期はカエルの産卵期でもあり、水田の中にカエルの幼生が大量に発生し、水路から入り込んだドジョウもフナと一緒に生活を始める。フナの運動性エロモナス症は、ふ化後約1か月経過した7月上旬から8月上旬にかけての夏場に発生しやすい³⁾。ドジョウは*A. hydrophila*に対する感受性が高いと言われており⁸⁾、フナの養殖水田でアマガエル幼生やドジョウの死亡が認められた場合には、フナの運動性エロモナス症発生の予兆の一つと捉え、水田への通水量を増やすなど積極的に飼育環境の改善を図ることが必要と考えられた。フナが発症してしまった場合にはフナに使用が認められているオキシリン酸製剤の投与など早急に魚病対策を図ることも必要である。

要 約

- 1 フナの養殖水田で死亡していたフナ、ニホンアマガエル幼生およびドジョウから分離された *A. hydrophila* 3 菌株を用いて、フナおよびニホンアマガエル幼生に対する病原性を腹腔内接種法で調べた。
- 2 これらの *A. hydrophila* 3 菌株は $10^{8.3} \sim 10^{8.7}$ CFU/尾の菌量の攻撃でフナに病原性を示し、累積死亡率は 70～100%に達した。
- 3 ニホンアマガエル幼生およびフナから分離された *A. hydrophila* 菌株は、いずれも $10^{6.3}$ CFU/尾以上の菌量の攻撃でニホンアマガエル幼生に病原性を示し、累積死亡率は 70%以上に達した。
- 4 フナの養殖水田においてニホンアマガエル幼生やドジョウが死亡する事象は、フナの運動性エロモナス症発生の予兆の一つと考えられた。

文 献

- 1) 木村喬久 (訳) (1982) : 運動性エロモナス敗血症. 「魚類保健ブルーブック. 魚類病原体の検出法ならびに同定法」. 日本水産資源保護協会, 東京, pp.41-42.
- 2) 水産庁 (1978) : 「魚類等防疫指針2, 細菌病」. 水産庁編, 106p.
- 3) 三城 勇 (1999) : 水田養殖フナに発生した運動性エロモナス症. 平成9年度長野県水産試験場事業報告, 34.
- 4) 小原昌和・山本 聡 (2001) : 水田養殖フナの運動性エロモナス症の人為感染実験. 平成11年度長野県水産試験場事業報告, 47.
- 5) 松井正文 (編) (2005) : これからの両棲類学. 裳華房, 東京. 316p.
- 6) G.Huys, M.Pearson, P.kämpfer, R.Denys, M.Cnockaert, V.Inglis and J.Swings (2003) : *Aeromonas hydrophila* subsp. *ranae* subsp.nov., isolated from septicemic farmed frogs in Thailand. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53, 885-891.
- 7) 熊川真二 (2003) : 水田を舞台とした魚と米の共生. 信州佐久地方の「改良フナ養殖」と「フナ米」. 月刊アクアネット, 6(7), 46-49.
- 8) 江草周三 (1984) : 細菌症. 「訂正版 魚の感染症」, 恒星社厚生閣, 東京, pp.97-272.