

養殖中のクロアワビ 1 年貝における *Vibrio* 属 細菌による大量死

中津川 俊 雄



2001年7月～9月に、京都府伊根町蒲入にあるアワビ育成場で養殖中のクロアワビ1年貝に大量死が発生し、累積死亡率は約48%に達した。これらの1年貝に筋萎縮症の罹病歴がなく、発生時期の水温が24°C以上であったことや外観症状が一致しなかったことから、同症とは異なると判断した。大量死発生期間中の衰弱貝4個体および外観上活力のある非衰弱貝5個体の計9個体の腹足筋肉から、細菌の分離を試みたところ、衰弱貝2個体および非衰弱貝1個体から1種の細菌がほぼ純培養状に分離された。性状検査の結果、分離菌は *V. campbellii* に近いと推定されたが、種の同定には至らず *Vibrio* sp. とした。感染試験で分離菌のクロアワビ稚貝に対する病原性が確認され、本菌が大量死の原因と推察された。また、高水温がその誘因と考えられた。

我が国においては、様々な淡水魚および海産魚が養殖されており、こうした養殖魚においては、*Vibrio* 属細菌による、いわゆるビブリオ病の発生が、これまで多数報告されている。魚類ばかりでなく、海産甲殻類の中で重要な養殖対象種であるクルマエビ *Penaeus japonicus* においてもビブリオ病の報告がある（高橋ほか，1985）。また、軟体類においても、トリガイ *Fulvia mutica* あるいはマガキ *Crassostrea gigas* といった二枚貝類の幼生において、*Vibrio* 属細菌によると考えられる大量死事例の報告がある（藤原ほか，1993；SUGUMAR *et al.*，1998）。最近では、巻貝類のトコブシ *Sulculus diversicolor supratexta* の大量死の原因菌として *Vibrio carchariae* の報告がなされた（NISHIMORI *et al.*，1998）。

2001年7月～9月に京都府下にあるアワビ育成場（陸上施設）で養殖中のクロアワビ *Haliotis discus discus* 1年貝において、大量死亡事例が発生した。大量死の発生時期および水温や外観症状から、死亡原因は筋萎縮症（中津川，2000）とは異なると推察された。これらのクロアワビ衰弱貝からは、ほぼ純培養状に1種の細菌が分離され、分離菌は性状検査の結果 *Vibrio* 属に分類された。本報では、大量死の発生状況、原因菌の分離と分離菌の性状およびクロアワビ稚貝に対する病原性について報告する。

材料および方法

発生状況 2001年7月～9月に京都府伊根町蒲入にあるアワビ育成場で、養殖中のクロアワビ1年貝約50,000個体に大量死が発生した。発生期間中の8月7日に採材された9個体（殻長39.8±1.7 mm）の観察および検査を行った。

9個体のうち5個体は外観上活力のある非衰弱貝で、4個体が衰弱貝であった。

細菌の分離 衰弱貝の観察を行ったところ、目立った外観症状はなく、軟体部は痩せていなかった。当該クロアワビ1年貝は、京都府栽培漁業センターで生産された稚貝を育成したもので、筋萎縮症の罹病歴はなかった。死亡発生時の水温が24°C以上であり、外観症状も異なることから、筋萎縮症による死亡ではないと判断した。そこで、衰弱貝4個体の腹足筋肉部を十分アルコール消毒しメスを入れて、その切れ目から滲出した血リンパ液から、細菌の分離培養を試み、室温で培養した。培養用培地は、1% NaCl 加 TSA 培地 (BBL), TCBS 寒天培地 (DIFCO) およびマリーニアガー2216 (DIFCO) を用いた。同様に、非衰弱貝5個体からも細菌の分離を試みた。

供試菌 クロアワビ1年貝から分離された3株 (HK-0101, 0102, 0103) を供した。供試菌は、0.5% NaCl 加 BHI 寒天培地 (OXOID) により室温で前培養し、以下の性状検査や病原性試験に供した。

生化学的性状検査 供試菌の生化学的性状検査は、坂崎ほか (1988) の方法に従い、グラム染色性、運動性、オ

キシダーゼ、カタラーゼ、OF 試験、vibrio static agent O/129 感受性 (OXOID; 10 μg), LAO 試験および炭素源としての有機化合物利用能 (以下 CS テストと略記) 等について検査した。また、細菌簡易同定キット API20E (bio Merieux) を用いた検査も実施した。なお、培養温度は 25°C とした。

薬剤感受性 感性ディスク培地 (口水) を用いて、昭和1濃度ディスク法による薬剤感受性試験を行った。供した薬剤は、OTC, OA, ABPC, CL, CP, NB, NFT, SiX, FF, ST および NA であった。

病原性試験

筋注攻撃 健全なクロアワビ稚貝30個体 (殻長20.9 ± 1.3 mm) に対し、供試3株の生菌懸濁液 10 μl をそれぞれ10個体ずつ腹足筋肉中に注射した。懸濁液中の生菌数は、5.46~6.86 × 10⁸ CFU/ml であった。対照として、健全稚貝10個体に滅菌 PBS (-) 10 μl を筋注した。攻撃後は、紫外線殺菌海水を流して無給餌飼育し、死亡状況を観察した。飼育中の水温は 25.2~27.6°C であった。

浸漬攻撃 同じく健全稚貝30個体 (殻長16.5 ± 0.7mm) を10個体ずつ3群に分けて、供試3株の浸漬攻撃に供し

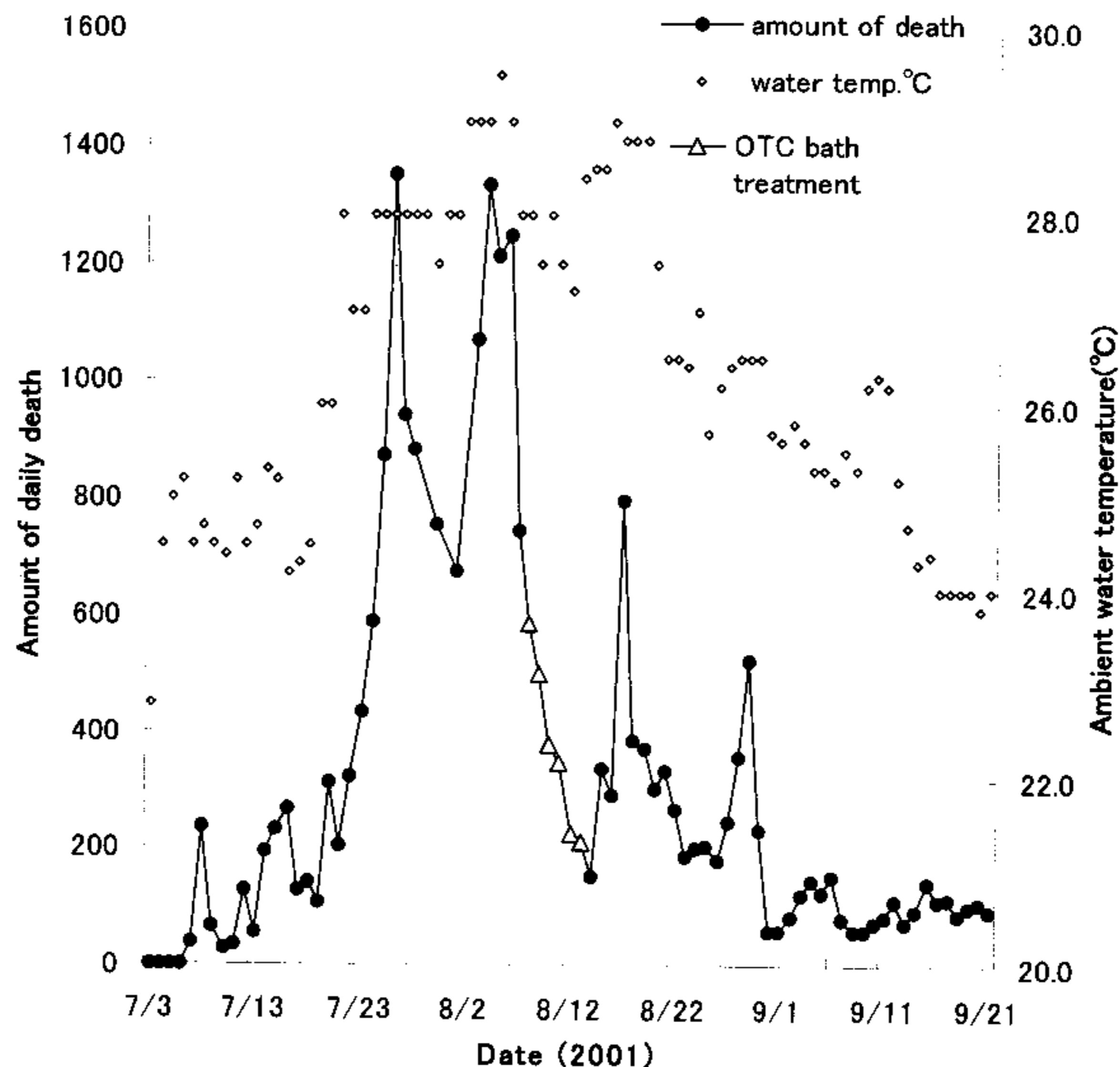


Fig. 1. Amount of daily deaths and ambient water temperature during mass mortality of cultured Japanese black abalone.

た。500 ml の滅菌海水に生菌を懸濁させ、この海水中に20分間稚貝を浸漬し、攻撃試験を実施した。攻撃液中の生菌数は、HK-0101 株および HK-0102 株ではそれぞれ 6.53×10^7 CFU/ml であり、HK-0103 株では 1.41×10^8 CFU/ml であった。対照として、滅菌海水 500 ml 中に20分間稚貝を浸漬した。攻撃後は筋注攻撃と同様に6日間飼育、観察した。飼育中の水温は 26.2~26.7°C であった。試験終了時の生残貝から接種菌の再分離を試みた。なお、HK-0102 区における攻撃2日後の死亡貝1個体は、中性ホルマリンにて固定後、常法によりヘマトキシリン・エオシン染色を施し、病理組織観察に供した。

結果

発生状況 2001年7月7日頃から徐々に養殖貝の死亡が

始まり、水温が 28°C 以上に上昇した頃に日間死亡数がピークに達した (Fig. 1)。死亡がほぼ終息した9月21日までの累積推定死亡数は24,330個体で、死亡率は約48%に達した。8月8日~13日にかけて毎日 OTC 薬浴 (有効薬剤濃度 20 ppm, 2時間) が6回実施され、その後は、水温の下降あるいは生残数の減少とともに死亡数は減少傾向となった。

細菌の分離 細菌の分離に供試したクロアワビ衰弱貝4個体のうち2個体の腹足筋肉から採取した血リンパ液から、供試した3種いずれの培地においても1種の細菌が純培養状に分離された。TCBS 寒天培地では緑色のコロニーが観察され、シュークロースを分解しなかった。他の衰弱貝2個体からは何も分離できなかった。外観上活力のある非衰弱貝5個体のうち1個体からも1種の細菌がほぼ純培養状に分離され、衰弱貝の場合と同様にシュークロースを

Table 1. Biochemical characteristics of the isolates from Japanese black abalone

| Characteristics | 3 isolates | Characteristics | 3 isolates |
|-----------------------------|--------------|-----------------|------------|
| Gram stain | —* | CS test | |
| Motility | + | D-cellobiose | — |
| Swarming on TSA (1.5% NaCl) | — | dulcitol | — |
| Catalase | + | m-erythritol | — |
| Cytochrome oxidase | + | esculin | — |
| OF test | Fermentative | D-fructose | + |
| Gas from glucose | — | D-galactose | — |
| Growth on TCBS agar | +G | D-glucose | + |
| O/129(10 µlg) sensitivity | + | glycerol | — |
| Growth at 0% NaCl | — | glycogene | + |
| Growth at 1% NaCl | + | inositol | — |
| Growth at 3% NaCl | + | inuline | — |
| Lysine | + | D-lactose | — |
| Arginine | — | D-maltose | + |
| Ornithine | — | mannitol | — |
| Indole production | + | D-mannose | + |
| Gelatinase | + | melibiose | — |
| Nitrate reduction | + | raffinose | — |
| Simmon's citrate | — | L-rhamnose | — |
| ONPG | — | D-ribose | + |
| VP test | — | salicine | — |
| Hydrogen sulfide | — | D-sorbitol | — |
| CS test | | L-sorbose | — |
| L-arabinose | — | starch | + |
| Adonitol | — | sucrose | — |
| p-arbutin | — | D-trehalose | + |
| D-amygdaline | — | D-xylose | — |

* Symbols: +, positive; —, negative; G, colonies green.

分解しない菌であった。分離菌のコロニーは、露滴状でやや乳濁した黄白色で、光沢があった。上記のように、衰弱貝2個体および非衰弱貝1個体の、いずれも1% NaCl 加 TSA 培地での分離株3株 (HK-0101, 0102, 0103) を供試菌株とした。

生化学的性状 供試した3菌株は、グラム陰性桿菌 ($1.5 \times 0.8 \mu\text{m}$) で極単鞭毛を有して運動性があり、オキシダーゼ、カタラーゼ陽性で、グルコースを発酵的に分解し、ガスを産生しなかった。Vibrio static agent O/129 (10 μg) に感受性があった。なお、継代後1週間~10日間程すると、菌体が長大化する傾向 ($2.6 \times 0.9 \mu\text{m}$) があり、長大化した菌体では運動性を示さなくなった。TCBS 寒天培地に増殖可能であり、0% NaCl では増殖せず、1~3% NaCl で増殖した。LAO 試験では、+であった。インドールを産生し、ゼラチンを液化した。クエン酸は利用せず、ONPG 陰性で、スウォーミングしなかった。シュークロースは分解せず、VP は陰性であった。CS テストでは、D-フラクトース、D-グルコース、グリコーゲン、D-マルトース、D-マンノース、D-リボース、スターチおよびD-トレハロースの8種が陽性であった。L-アラビノース、アドニトール、p-アルブチン、D-アミグダリン、D-セロピオース、ズルシトール、m-エリスリトール、エスクリン、D-ガラクトース、グリセロール、イノシトール、イヌリン、D-ラクトース、マニトール、メリピオース、ラフィノース、L-ラムノース、サリシン、D-ソルビトール、L-ソルボース、シュークロースおよびD-キシロースの22種は陰性であった (Table 1)。

一方、簡易同定キット API20E では、リジン脱炭酸、インドール産生、VP、グルコース、D-アミグダリン、オキシダーゼおよび硝酸塩還元が陽性、ゼラチナーゼが弱陽性であった。ONPG、アルギニン、オルニチン、クエン酸、硫化水素産生、尿素分解、トリプトファンデアミナーゼ、マニトール、イノシトール、D-ソルビトール、L-ラムノース、シュークロース、メリピオースおよびL-アラビノースは陰性であった。

薬剤感受性 供試した3菌株は、供試薬剤のうち、OTC、OA、CP および FF には高い感受性を示し、ABPG、NB、NFT、ST および NA に感受性を示したが、CL および SiX には耐性であった。

病原性試験

筋注攻撃 死亡状況は Fig. 2 のとおりであった。いずれの菌株の接種区でも、攻撃後3日以内に10個体すべてが死亡した。死亡個体からの接種菌の再分離では、3日後の死亡個体以外からはすべて可能であったが、3日後の死亡個体はすでに腐敗しており、再分離はできなかった。攻撃

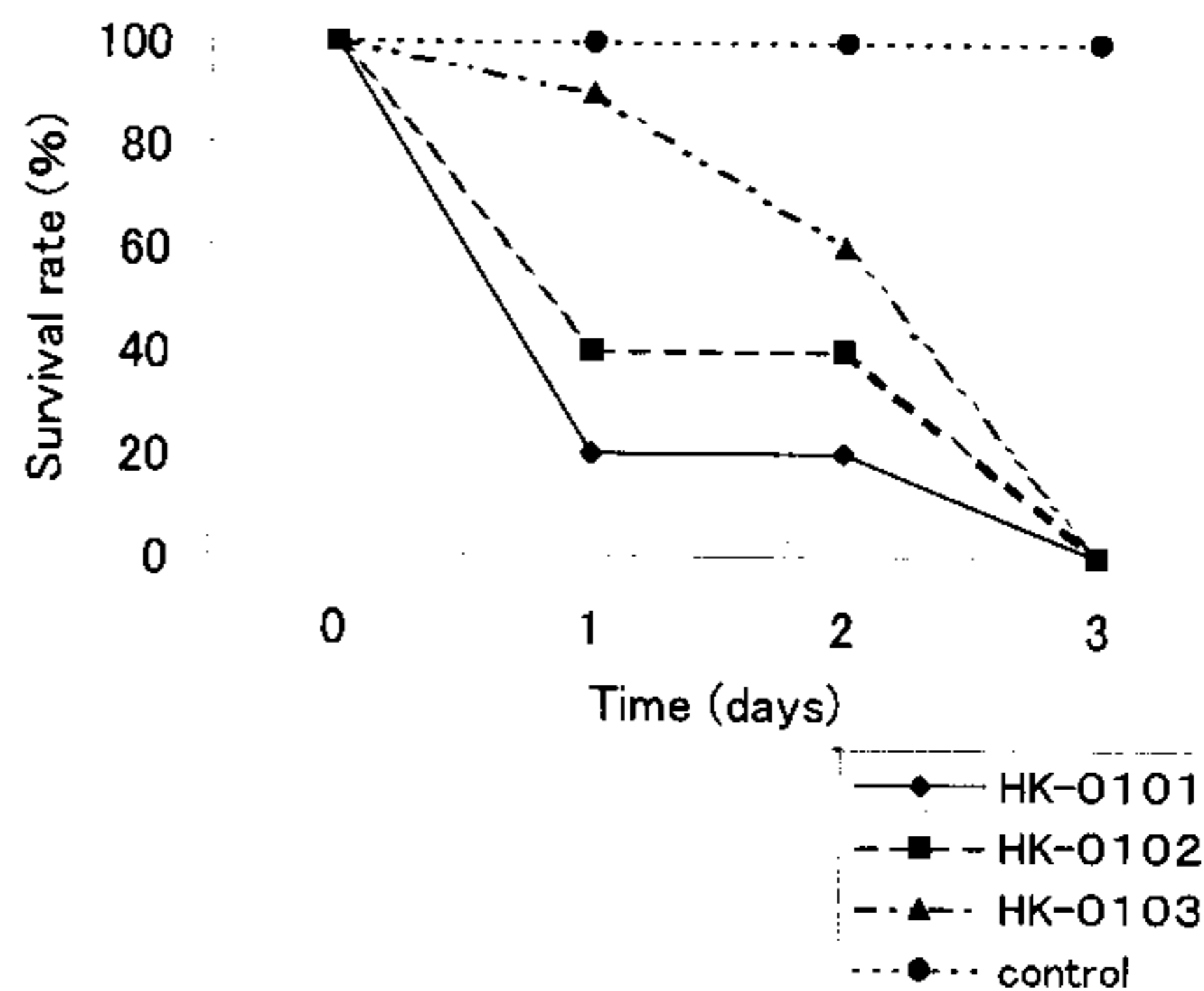


Fig. 2. Pathogenicity of the isolated *Vibrio* sp. to juvenile abalone by injection into the pleuro-pedal muscle.

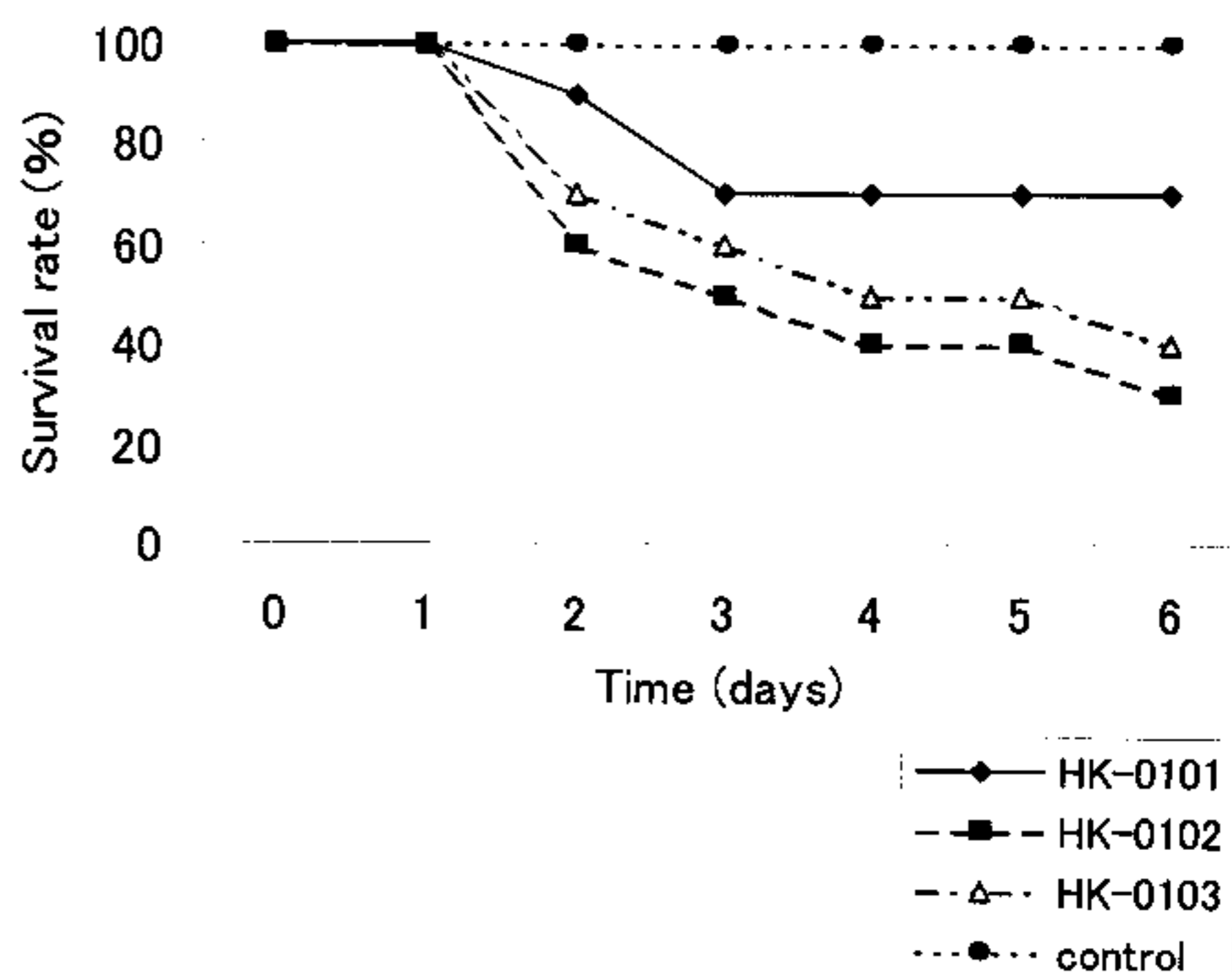


Fig. 3. Pathogenicity of the isolated *Vibrio* sp. to juvenile abalone by immersion for 20 minutes.

1日および2日後の死亡18個体の腹足筋肉内血リンパから接種菌と考えられる菌が再分離できた。

浸漬攻撃 いずれの試験区でも、攻撃2日後に死亡が始まり、3日後には HK-0101 区では70%の生残率となり、HK-0102 区では50%および HK-0103 区では60%となった。HK-0102 区および HK-0103 区では終了時には30%および40%の生残率となったが、HK-0101 区では3日後以降死亡せず、終了時まで70%のままであった (Fig. 3)。攻撃2日後の HK-0102 区の死亡貝1個体と試験終了時の6日後の死亡貝2個体は既に腐敗していたため、再分離はできなかった。しかし、他の供試貝12個体からは接種菌と考えられる菌が再分離できた。試験終了時の生残貝14個体からは全く分離できなかった。なお、病理組織観察に供した、HK-0102 区の死亡貝1個体では、筋萎縮症に特徴的

な病変はまったく観察されず、死亡は筋萎縮症によるものではなかった。

NaCl では増殖せず、運動性があり、カタラーゼ、オキシダーゼ陽性で、vibrio static agent O/129 に感受性があることから、*Vibrio* 属細菌に分類された。

ALSINA & BLANCH (1994) は、グラム陰性、オキシダーゼ陽性、TCBS 寒天培地に増殖する条件性嫌気性桿菌である *Vibrio* 属細菌において、LAO 試験の結果に基づく生化学的な性状の組み合わせで分類し、種の同定のキーを示し

考察

大量死を起したクロアワビ 1 年貝から分離された細菌は、グラム陰性桿菌でグルコースを発酵的に分解し、0%

Table 2. Comparison in biochemical characteristics between the isolates used in this study and *V. campbellii* described in Bergey's manual of systematic bacteriology and *V. carchariae* from *Sulculus diversicolor supratexta* (NISHIMORI *et al.*, 1998)

| Characteristics | Present isolates | <i>V. campbellii</i> | <i>V. carchariae</i> |
|--------------------|------------------|----------------------|----------------------|
| Swarming | —* | — | — |
| Arginine | — | — | — |
| Lysine | + | + | + |
| Ornithine | — | — | — |
| Cytochrome oxidase | + | + | + |
| Gas from glucose | — | — | — |
| VP test | — | — | +W |
| Gelatinase | + | + | — |
| Nitrate reduction | + | + | + |
| Growth on TCBS | +G | +G | +G |
| ONPG | — | — | — |
| O/129 sensitivity | + | + | — |
| Growth at 0% NaCl | — | — | |
| CS test | | | |
| L-arabinose | — | — | — |
| D-cellobiose | — | d | + |
| m-erythritol | — | — | — |
| D-fructose | + | + | + |
| D-galactose | — | — | + |
| D-glucose | + | + | + |
| Glycerol | — | + | +W |
| Inositol | — | — | — |
| D-lactose | — | — | — |
| D-maltose | + | + | + |
| Mannitol | — | d | + |
| D-mannose | + | d | + |
| Melibiose | — | — | — |
| L-rhamnose | — | — | — |
| D-ribose | + | + | + |
| Salicine | — | — | — |
| Sucrose | — | — | — |
| D-trecharose | + | + | + |
| D-xylose | — | — | — |

Symbols: +, positive; —, negative; G, colonies green; W, week reactiond, 11-89% of strains are positive.

た。それに従うと、今回の分離株は、A-/L+/O- のグループに分類された。さらに、このグループ内での分類に従うと、分離菌はインドール産生でVP陰性であり、ゼラチンを液化しシュークロースを分解しないことから、*V. campbellii* と分類された。そこで、Bergey's manual of systematic bacteriology に記載された *V. campbellii* の性状と比較検討した (Table 2)。その結果、CS テストにおけるグリセロールの項目以外はすべて一致した。ただし、本分離菌における検査項目が少ない上、遺伝子レベルでの検討がなされていないため、*V. campbellii* と同定することはできず、ここでは単に *Vibrio* sp. とするにとどめた。また、NISHIMORI *et al.* (1998) が、トコブシから分離した *V. carchariae* の性状と比較したところ (Table 2)、VP テスト、ゼラチン液化および vibrio static agent O/129 (10 µg) に対する感受性の項目で異なった。

病原性試験の結果から、本分離菌は健全なクロアワビ稚貝に対して病原性を示した。自然発症貝での病理組織学的な検討がなされていないため、明確には断定できないが、今回の養殖クロアワビ1年貝で発生した大量死の原因は、分離された *Vibrio* sp. によるものと推定された。また、大量死発生時期の水温が 24°C 以上と高いうえ、死亡数が急激に上昇した時期には水温が 26~29°C 台にまで上昇しており、このような高水温が今回の大量死の誘因となったと推察された。なお、OTC の薬浴が実施された後は、一旦死亡数が急減していることと薬剤感受性試験で本分離菌は OTC に高い感受性を有していることから、薬浴は有効であったと判断された。

文 献

- Alsina, M. & Blanch, A.R.. 1994. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J. Appl. Bacteriology*, **76**: 79-85.
- Baumann, P., Furniss, A.L. & Lee, J.V.. 1984. Genus *Vibrio*. In "Bergey's manual of systematic bacteriology, volume 1" (ed. by N.R. KRIEG & J.G. HOLT), 518-538. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA.
- 藤原正夢・上野陽一郎・岩尾敦志. 1993. トリガイ浮遊幼生の斃死因と考えられる *Vibrio* 属細菌について. 魚病研究, **28**: 83-89.
- 中津川俊雄. 2000. クロアワビの筋萎縮症に関する研究. 京都府立海洋センター研究論文, 5, 61 pp.
- Nishimori, E., Hasegawa, O., Numata, T. & Wakabayashi, H.. 1998. *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supertexta*. *Fish Pathol.*, **33**: 495-502.
- 坂崎利一・吉崎悦郎・三木寛二. 1988. 新細菌培地学講座・下, 第2版, 218 pp, 近代出版, 東京.
- Sugumar, G., Nakai, T., Hirata, Y., Matsubara, D. & Muroga, K.. 1998. Pathogenicity of *Vibrio splendidus* biovar II, the causative bacterium of bacillary necrosis of Japanese oyster larvae. *Fish Pathol.*, **33**: 79-84.
- 高橋幸則・下山泰正・桃山和夫. 1985. 養殖クルマエビから分離された *Vibrio* 属細菌の病原性ならびに性状. 日水誌, **51**: 721-730.

Synopsis

Mass Mortality Caused by *Vibrio* sp. in Cultured Japanese Black Abalone

Toshio NAKATSUGAWA

In July to September in 2001, a mass mortality occurred in 1-year-old cultured Japanese black abalone, *Haliotis discus discus*, in Kyoto Prefecture. The cumulative mortality reached about 48% when ambient water temperature reached 24°C. Although moribund abalones showed no characteristic signs of disease such as amyotrophy, *Vibrio* sp. was isolated in almost all cases from the pleuro-pedal muscle. Based on its biochemical characteristics, the isolated *Vibrio* sp. was estimated to be *V. campbellii* and was confirmed in artificial infection experiments to be pathogenic to Japanese black abalone.