

# 魚類養殖試験（マダイのエドワジエラ症対策）

田中真二

## 目的

当県の養殖マダイに最も大きな被害を及ぼす病気であるエドワジエラ症の対策を確立するため、漁場における原因菌の分布状況を調査するとともに、効果の薄い抗生物質等の投与に代わる有効な対策について検討する。

## 材料および方法

### 1. *Edwardsiella tarda*分布調査

尾鷲市および海山町のマダイ養殖場1カ所ずつを選定し、平成15年7～12月に底泥表層部2g、5m層海水2ℓおよびマダイ0歳魚10尾（正常遊泳魚）の腎臓と腸管を採取し、SS寒天平板による直接法およびDSSSブイヨンで増菌後にSS寒天平板に1白金耳量塗抹する増菌法の2方法により細菌分離を行った。平板上の黒色コロニーについては抗*E. tarda*ウサギ血清を用いたスライド凝集反応により*E. tarda*であるかどうか確認した。

### 2. 人為感染手法の検討

*E. tarda*は腸内細菌の一種であり、腸管から感染するのではないかと考えられていることから、今後ワクチン等の有効性試験を行うにあたっては、自然感染に近いと思われる腸管感染の手法を確立しておくことが望ましい。そこで、主に腸管からの感染手法を確立するための人為感染試験を2回行った。いずれの試験においても、供試魚には13～20尾ずつ100ℓ水槽に収容し、25℃で7日間馴致したマダイ幼魚（平均体重25g）を用いた。供試菌株にはマダイ自然発病魚由来のMEE0301株を用い、HI寒天平板あるいはHIブイヨンにより25℃で48時

間培養したものを用いた。

試験1では、確実に腸管からの感染を成立させるため、予め過酸化水素処理によりマダイの腸管上皮に傷害を起こさせた後に人為感染を行った。すなわち、マダイの肛門から5%過酸化水素を0.05ml注入し、表1のとおり*E. tarda*をゾンデによる経肛門感染あるいは市販エクストルーダーペレット（EP）に添加して自由摂餌による経口感染を行った。感染後は毎日1回EPを飽食給餌して25℃で22日間観察した。

試験2では、過酸化水素処理の有無による人為感染時の死亡率を比較するとともに、浸漬感染についても検討した。すなわち、表2のとおり、1区と2区の魚に試験1と同様の過酸化水素処理を行い、1日後に*E. tarda*の経口あるいは経肛門感染を行った。3区と4区の魚は過酸化水素処理を行わず、*E. tarda*の感染のみを行った。5区の魚は過酸化水素処理をせず、浸漬感染を行った。感染後は毎日1回EPを飽食給餌して25℃で12日間観察した。

いずれの試験においても、死亡魚について肉眼観察による膿瘍と肉芽腫形成の確認およびSS寒天平板を用いた腎臓からの細菌分離により、エドワジエラ症による死亡であることを確認した。

## 結果および考察

### 1. *E. tarda*分布調査

両漁場における*E. tarda*の検出状況を表3に示す。7～12月にエドワジエラ症が発生していた海山町の採材

表1 過酸化水素を経肛門注入されたマダイに対する*E. tarda*人為感染

試験区	過酸化水素処理後の攻撃日	攻撃方法	死亡率(%)
1	2～4日後	経口 : $2.1 \times 10^8$ cfu / 尾 / 3日間	54
2	2日後	経肛門 : $1.1 \times 10^8$ cfu / 尾	70
3	1～3日後	経口 : $2.1 \times 10^8$ cfu / 尾 / 3日間	63
4	1日後	経肛門 : $1.1 \times 10^8$ cfu / 尾	100

表2 マダイに対する*E. tarda*人為感染手法の比較

試験区	過酸化水素処理	攻撃方法	死亡率(%)
1	有	経口 : $8.6 \times 10^8$ cfu / 尾 / 2日間	25
2	有	経肛門 : $2.0 \times 10^8$ cfu / 尾	31
3	無	経口 : $8.6 \times 10^8$ cfu / 尾 / 2日間	13
4	無	経肛門 : $2.0 \times 10^8$ cfu / 尾	40
5	無	浸漬 : $2.4 \times 10^7$ cfu / mL で1時間	60

群において、7、8、10月に1～3尾の腸管または腎臓から*E. tarda*が分離されたのみであった。分離菌数は10月の1尾の腎臓で直接法により $1.1 \times 10^5$  cfu/gを示し

たものの、他の陽性検体では直接法では菌は分離されず、増菌法のみで分離された。

表3 マダイ養殖場における*E. tarda*検出状況

月. 日	尾鷲				海山			
	海水	底泥	腸管	腎臓	海水	底泥	腸管	腎臓
7.18	0	0	0	0	0	0	1	0
8.28	0	0	0	0	0	0	3	0
10.27	0	0	0	0	0	0	1	1
12.17	0	0	0	0	0	0	0	0

10尾のうちの*E. tarda*陽性尾数

## 2. 人為感染手法の検討

試験1におけるエドワジエラ症による死亡率は表1のとおりで、過酸化水素処理の1日後に経肛門感染させた4区が100%と最も高く、過酸化水素処理2日後あるいは経口感染させた1～3区の死亡率は54～70%と低かった。このことから、過酸化水素処理1日後の経肛門感染が本症の再現に適していると考えられた。しかし、試験2では、表2のとおり過酸化水素処理区(1、2区)の死亡率は25および31%、過酸化水素非処理区(3、4区)の死亡率は13および40%であり、過酸化水素処理の有無による死亡率の差は認められなかったことから、過酸化水素処理は必ずしも必要ではないかもしれな

い。また、試験1と試験2では経口および経肛門感染区の試験条件(供試魚の大きさ、感染手技、菌量等)に大きな違いはないにも拘わらず、試験2における死亡率は試験1に比べて全体的に低く、安定した死亡率が得られなかった。供試菌株の選択や培養法、供試魚の大きさ、飼育水温等の条件をさらに検討し、安定して高い死亡率が得られる感染手法を確立する必要がある。なお、試験2では浸漬感染を行った5区の死亡率が60%と最も高かった。浸漬による感染経路としては体表や鰓の上皮の他、飲水による腸管感染も考えられる。次年度は経肛門感染および浸漬感染の条件についてさらに詳しく検討し、最適な人為感染手法を確立したい。