

養殖ウナギの頭部潰瘍症の原因菌について*¹

日高 富男*²・矢野原良民*³・柴田 俊幸*²

On the Causative Bacteria of Head Ulcer Disease in Cultured Eels*¹

Tomio HIDAKA*², Yoshitami YANOHARA*³ and Toshiyuki SHIBATA*²

abstract

The authors isolated the causative bacteria of head ulcer disease in cultured eels (*Anguilla japonica*). And then the isolates were examined their characteristics and were identified as three bacterial species. We also estimated the pathogenicity of the causative bacteria to eels and the seasonal distribution of them in water of a eel culture pond. The obtained results were as follows.

1) The three species of causative bacteria were isolated from ulcer in eels at three eel culture farms respectively. They were *Aeromonas hydrophila*, from fresh-water ponds in Sendai and Miyakoshima farms, *Vibrio* sp., from brackish-water ponds in Miyakoshima farm, and *Edwardsilla tarda*, from fresh-water ponds in Hiyoshi farm.

2) The pathogenicity of the causative bacteria, *A. hydrophila* and *E. tarda*, against eels were tested by means of intramuscular injection. About 10^7 cells of each bacterium per 100 g of eel body weight was the adequate dose for inoculation. Under this condition, more than 80 % of the tested eels ulcerated and died in four days after the inoculation of *A. hydrophila*. In case of *E. tarda*, 80 % of the tested eels ulcerated and 70 % of them died in six days after the inoculation. The pathogenicity of *E. tarda* was slightly weak than *A. hydrophila*.

3) Field surveys of the abundance of *A. hydrophila* and *E. tarda* in water of a eel culture pond were made nine times in Hiyoshi farm. There were $3-30 \times 10^5$ cells of total bacteria, $1-10 \times 10^4$ cells of *A. hydrophila*, and $1-4 \times 10^3$ cells of *E. tarda* in one ml of the water. The seasonal fluctuation of the bacterial cell counts was not observed, because the water temperature was controled at 22°-26 °C. When some eels with head ulcer disease by *E. tarda* were found in the pond, the *E. tarda* cell counts in the water were fourfold higher than at other times.

4) All of the causative bacteria are facultative pathogens. It seems that they infect through some damages at head skin tissue of eels.

*¹ 本報告の一部は昭和 55 年度日本水産学会九州支部大会 (福岡) において講演発表した。

*² 鹿児島大学水産学部微生物学研究室 (Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Kagoshima University)

*³ 鹿児島大学教養部生物学教室 (Laboratory of Biology, College of General Education, Kagoshima University)

各種魚類の増養殖業が普及しつつあるなかで、高密度・速成養殖を指向する養殖技術の改変は、時には養殖環境を悪化して養殖魚に強いストレスを与える。その結果、魚の生理機能は乱され、抵抗力は低下して、いろいろなタイプの魚病を誘発している。ある場合には、それが流行病の様相を呈して、大量の斃死魚を出すことになる。なかでも細菌性疾病は、その伝染が速く被害が大きいことから、恐れられるものである。

養殖ウナギの細菌性疾病の主なものについては、江草(1978)の成書や水産庁編(1979)の指針などに詳細な記述がある。それらには鱧赤病(病原菌, *Aeromonas hydrophila*), パラコロ病(同, *Edwardsilla tarda*), 赤点病(同, *Pseudomonas anguilliseptica*), ビブリオ病(同, *Vibrio angillarum*), カラムナリス病(同, *Flexibacter columnaris*)などが記載されている。それらいずれの病気とも、必発症状でないにしても、軀幹局部や鰭の基部などに発赤、膨隆、潰瘍の症状がしばしば見かけられる。

近年、'78年頃から鹿児島県下の加温式や半流水式養鰻場の一部で、体重50~100g位の大きさのニホンウナギ(*Anguilla japonica*, 以下単にウナギという)に特異的に頭部にのみ潰瘍を生ずる疾病が発生し始めた。著者らはこのような魚病に対しウナギ頭部潰瘍症とよんでいる。それは、当初ある限られた養鰻場で散発する程度で注目されるほどのものではなく、その治療法や予防対策が確立されないまま経過した。その後発病率は徐々に高まり、広域に拡まる傾向がみられてきた。そこでその防除、治療の手がかりを得るため、それら病魚から発症原因菌を検索・分離して、それらを鑑別・同定した。その結果、それらの原因菌は、養鰻場によって異なり、*Aeromonas hydrophila* や *Edwardsilla tarda* または *Vibrio* sp. に同定される菌種が認められた。ここではそれらの知見に若干の考察をそえて報告する。

実験材料および方法

供試病魚：1979年4月に、鹿児島県川内市の養鰻場で発生したウナギの頭部に潰瘍を生じた病魚がもちこまれたのに始まる。その後2年間に、同養鰻場から3回、沖縄県宮古島の養鰻場から3回、鹿児島県日吉町の養鰻場から2回の計8回にわたって供与うけた病魚を原因菌の検索、分離実験に供した。病魚はいずれも体重50~100g程度のもので、症状に軽重の違いはあったが、典型的な頭部潰瘍症を呈したものであった。

細菌の分離法：供試病魚の患部や臓器(腎臓、肝臓)および血液などから細菌の分離を試みた。使用培地は普通寒天培地、1%食塩加普通寒天培地、ゼラチン培地、1%食塩加ゼラチン培地の他に選択培地としてDHL寒天培地(市販)、BTBティポール寒天培地(市販)、リムラー・ショット培地(SHOTTs and RIMLER, 1973)、サイトファーガ寒天培地(ANACKE and ORDAL, 1955)などである。試料魚すべてにこれら培地の全部を適用したわけではなく、例えば1%食塩を加えた各種培地やBTBティポール寒天培地は汽水池で養殖されていて発症した試料病魚から細菌を分離する場合に用いるなど適宜使い分けた。使用培地の平板に試料を塗抹して、所定条件で培養した。普通寒天培地、1%食塩加普通寒天培地、DHL寒天培地、サイトファーガ寒天培地、BTBティポール寒天培地は25℃で2~3日間、ゼラチン培地および1%食塩加ゼラチン培地は20℃で3~5日間、リムラー・ショット培地は37℃で18~24時間培養した。所定期間培養後、各平板上に現れたコロニーの形状や培地相互の出現

状況を勘案して、1試料あたり約30菌株ずつを分離、純化した。分離菌は普通液体培地(又は1%食塩加普通液体培地)25°C 1晩培養し、その培養液0.1 mlを体重50 g位の正常なウナギの頭部あるいは軀幹部の数ヶ所に皮下注射して潰瘍発症性を確かめて、潰瘍症の原因菌を探索した。

原因菌の性状検査と鑑別：発症原因菌株の形態学的、生理・生化学的性状検査および分類学上の鑑別は“Laboratory Methods in Microbiology”(HARRIGAN and McCANCE, 1966), “Manual for the Identification of Medical Bacteria”, 第2版 (COWAN, 1974), “Identification Methods for Microbiologist”, 第2版 (SKINNER and LOVELOCK, 1979), やBERGEY's Manual, 第8版 (BUCHANAN and GIBBONS, 1974)に記載の手順や方法に従った。供試菌株の培養温度は特記しない限り25°Cであった。汽水池の病魚から分離された菌株の性状検査では使用培地すべてに食塩を1%濃度に加えた。

原因菌の病原性試験法：供試菌は、まずその液体培養物0.1 mlを健康なウナギの軀幹部に皮下注射して潰瘍を発症させ、それから原因菌を再分離する生体通過法によって菌力の回復を計った。その魚体を通過した供試菌を普通肉汁寒天平板上に塗抹して1晩培養し、それを集菌して滅菌生理食塩水に懸濁(10^{10} cells/ml)し、接種菌懸濁液とした。これを適宜希釈して供試した。供試魚は体重50 g程度の健康なウナギを水槽に移し、水温20~23°C, ポンプで通気し、毎日1/2量を換水する条件下で3日間馴致させた。それらのウナギに対する供試菌の感染発症試験は、飼育水槽水中に供試菌を懸濁させ、その中で頭部に各種の傷をつけたウナギを菌浴させる方法と、ウナギの頭部に供試菌懸濁液を注射する方法の2つの方法で検討した。ここでは注射法について詳述する。供試ウナギはMS 222の2万倍希釈液中に5分間程入れて麻酔をかけ、その頭部または軀幹部に菌液0.1 mlを皮下注射後、直ちに麻酔をとき前記条件下で飼育を続け、7日間観察して潰瘍の発症や致死を確かめた。この飼育期間中に餌料は投与はしなかった。

実験結果

1. 本病発生の状況 鹿児島県川内市地域にある養鰻場では、1975年頃からウナギの頭部に潰瘍症が見かけられたという。その頃は鱧赤病やパラコロ病発生のあとに本症が見られ、専ら本来の病気の治療にあっていた。'77~'78年頃から本症を主徴とする病魚の発生が目立ちはじめ、あらゆる水産薬を使用した。一時的な防止効果しかなかったとしている。その地方の1つの養鰻場、そこはビニールハウス6つの内にそれぞれ6~9つのコンクリート製の加温・半流水式池をもち、全放養量200トン位の規模である。それら6つのビニールハウス相互、あるいは同じハウス内の池相互間にも頭部潰瘍発症パターンに違いがあり、発症に係わる要因をつきとめられなかった。そこで1979年6月から12月までの毎日の発症魚取り除き尾数を全体規模において図示すればFig. 1のようである。この図にはその日々の気温と池水温度をも併記した。Fig. 1から言えることは、6月に発症尾数がやや高いが、気温が高まった7月、8月に発症尾数は減じ、むしろ秋口から冬季にかけて気温と水温の差が大きくなる頃から発症尾数が増えはじめている。12月には10日前後と27~29日頃の2回にわたり明らかなピークが見られている。この原因が何であるかは判然とはしなかった。何れにせよこの半年

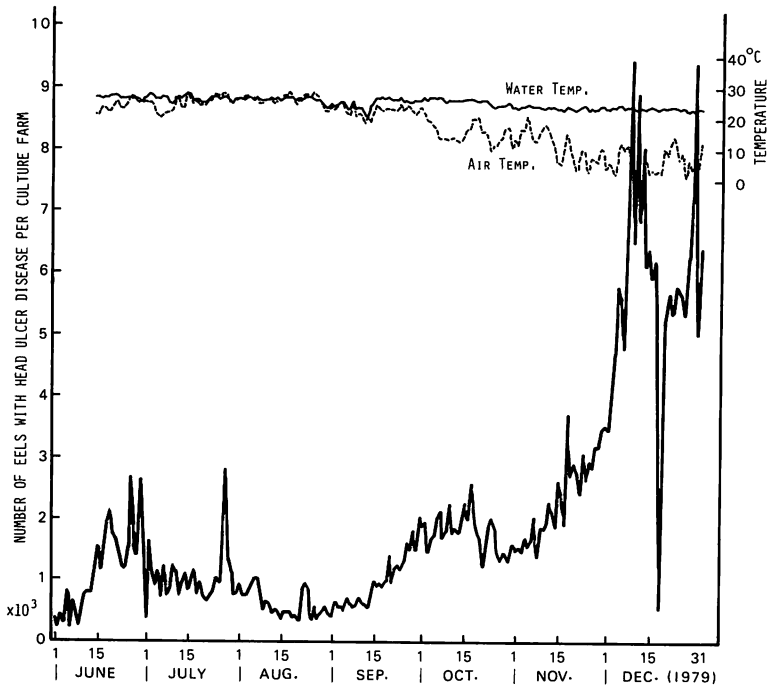


Fig. 1. Seasonal fluctuation in number of eels with head ulcer disease in a eel culture farm.

間に40万尾(20トン)以上のウナギがこの病気のため破棄されたことになり、その被害は大きいものであった。

2. 病魚の症状

本病の潰瘍患部は頭部に限られて、鰓蓋より前方部位に形成されるのが普通である。まず口吻や眼球周辺あるいは頭部などの表皮に白斑が見えはじめ、やがてそこが充血発赤して半球状の膨隆患部を形成する。そこには崩壊した真皮組織や病原菌などが混った膿様物が含まれている。膨隆部が小さいうちに崩れると表皮に穴があいた患部を呈する。その後症状の進行に伴い表皮がびらん崩壊して潰瘍化する。重症のものは顎は欠け眼球は潰れ、頭部骨格を露呈して醜い頭部を呈する (Plate I-1,2,3,4 参照)。業者はこの重症魚の状態を四谷怪談のお岩の醜悪な面相になぞらえて「お岩病」と俗称している程である。患部を切り出し、ブアン氏液で固定し、常法によって作成したパラフィン切片標本をヘマトキシリン-エオシンで染色した切片写真を Plate II-5 に示した。それには、崩壊した組織の中に原因細菌細胞の広範な繁殖が見られる。

3. 原因菌の分離と確認

供試病魚の由来は Table 1 に示した。各供試病魚の患部からはその原因菌と思われる菌株のコロニーが優占的に現われた。それらは各養殖場の病魚によって各種培地上に発育したコロニー形態に差異があった。川内市の病魚の患部から分離された菌は普通寒天平板上によく

Table 1. List of the strains isolated from cultured eels with head ulcer disease.

Location of culture farm	Water of pond	Date of sampling	Site of isolation	Designation of isolates
Sendai-shi Kagoshima, Pref.	Fresh	Apr. 19, '79	Head ulcer	S94-1
	Fresh	Dec. 6, '79	Head ulcer	S9Z-1
	Fresh	Mar. 14, '80	Head ulcer	S03-1
Miyakoshima Okinawa, Pref.	Fresh	Jan. 12, '80	Head ulcer	M01-1
	Brackish	Jan. 24, '80	Head ulcer	M01-2
	Fresh	May 12, '80	Head ulcer	M05-1
Hiyoshi-chō Kagoshima, Pref.	Fresh	May 26, '80	Head ulcer	H05-1
	Fresh	June 4, '80	Head ulcer	H06-1

発育し、灰白色ないし肌色をした光沢ある円形コロニーを作り、ゼラチン培地を液化するコロニーで、リムラー・ショット培地で黄色コロニーを作る菌であった。また、沖縄宮古島の淡水池での病魚からは、川内市の養鰻場の病魚からと同じ状態の菌が分離された。別に、汽水池での病魚からは1%食塩加普通寒天平板で拡散（swarming）しない灰黄色の円形コロニーを形成し、それらは1%食塩加ゼラチン培地を液化し、かつBTBティポール寒天平板に発育する菌が主体であった。一方鹿児島県日吉町の養鰻場で発症した病魚の患部からは、前2者とは異なり、普通肉汁寒天平板上で直径1~1.2mm位の小さな乳白色コロニーを作り、DHL寒天平板上では半透明で中心部が黒色のコロニーを形成するものが、ほぼ純培養の形で分離された。それら分離菌は、継代培養しない新しい培養菌について、ウナギへの潰瘍発症性を検査したところ、各分離主要菌の多くは発症性を示した。しかし同じような形状の分離菌の中にも発症性がないものも見かけられ、菌株の違いによって発症性が異なっていた。

供試病魚はいずれも臓器及び血液には著しい病変は観察されず、それらからは発症原因菌も分離されなかった。またいずれの供試病魚からもサイトファーグ培地に発育する *Flexibacter columnaris* に類する細菌は見出されなかった。

このように病魚の患部から分離された多くの菌株は性状検査を行ったが、同じ養鰻場の病魚からは同一原因菌が得られていた。従って本報では調査試料病魚毎に1株の代表菌株について以下の事項で記述する。その菌株番号はTable 1に掲げた。

4. 発症原因菌の鑑別と同定

分離された潰瘍原因菌株の分類学的位置を決定するために形態学的、生理・生化学的状を検査した。まず菌属レベルで鑑別するための主要な性状をTable 2に示した。Table 2に見られるとおり、すべての供試菌株はグラム陰性、無芽胞性桿状の通性嫌気菌であった。そして川内市の養鰻場の病魚および宮古島の淡水池での病魚から分離されたS94-1, S9Z-1, S03-1, M03-1, M05-1は、鞭毛は極毛性、オキシダーゼ陽性、グルコースを発酵的に代謝し、0/129に非感受性、グルコースからガス産生、アルギニン分解性で *Aeromonas* 属に属することがわかった。また、宮古島の汽水池での病魚から分離されたM01-2は、鞭毛は極毛性で、オキシダーゼ陽性、グルコースを発酵的に代謝し、0/129に感受性、グルコースからガスを産生せず、アルギニン非分解性で *Vibrio* 属に属することがわかった。一方、日吉町の養鰻場の病

Table 2. Comparison of brief characters among the causative strains isolated from head ulcer disease of cultured eels.

Character	Strain		
	S94-1 S9Z-1 S03-1 M01-1 M05-1	M01-2	H05-1 H06-1
Flagellation*	P	P	Pr
Oxidase (Kovacs)	+	+	-
Glucose metabolism* (O/F medium)	F	F	F
Sensitivity to 0/129	-	+	-
Gas from glucose	+	-	+
Arginine dihydrolase	+	-	-

+ = positive, - = negative

* P = polar, Pr = peritrichous, F = fermentative.

魚から分離された H05-1, H06-1 は鞭毛は周毛で, オキジダーゼ陰性, グルコースを発酵的に代謝し, 0/129 に非感受性, グルコースからガスを産生し, アルギニン分解性陰性であり, *Eenterobacteriaceae* 科の性状と一致した。

次いで, 各菌科, 菌属に属する菌株を菌種レベルで鑑別するために, さらに詳細な性状検査を行った。各菌属によってその菌属を菌種に細分するための指標とする検査項目には差異があるが, ここではそれらを取りまとめて Table 3 と Table 4 に示した。

BERGEY'S Manual, 第 8 版によれば *Aeromonas* 属菌は *hydrophila*, *punctata*, *salmonicida* の 3 菌種に分けられている。このうち *salmonicida* は運動性がなく, 水溶性褐色色素を生成するなど, いくつかの重要な点で前 2 菌種と相違していて鑑別し易い。これに対して *hydrophila*, *punctata* は共に運動性があり, 基質利用性などにも共通性が多く鑑別しにくく, これら 2 菌種を総称して運動性 *Aeromonas* とよんでいる。供試菌 S94-1, S9Z-1, S03-1, M01-1, M05-1 は明らかに運動性 *Aeromonas* であり, かつ 2・3-ブタンジオール脱水酵素を産生することから *A. hydrophila* であることがわかる。この菌種はさらに 3 亜種に細分されるが, グルコースとグリセロールからガスを産生し, V. P. 反応陽性, グルコン酸を酸化することなどから *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* に同定された。POPOFF and VÉRON (1976) は運動性 *Aeromonas* の分類について, BERGEY'S Manual, 第 8 版において *A. hydrophila* と *A. punctata* を区別しているグリセロールからのガス産生性と 2・3-ブタンジオール脱水酵素産生性は分類学的価値がないとし, *A. hydrophila* (biovar X₁, X₂) と *A. sobria* の 2 種を提案した。彼らはこれら 2 種を次のように定義している。すなわち *A. hydrophila*, *A. sobria* は, BERGEY'S Manual, 第 8 版の *Aeromonas* 属の基本的な性状を有しているが, *A. hydrophila* は単独炭素源として L-ヒスチジン, L-アルギニン, L-アラビノース, サリシンを利用し, KCN 培地で発育, エスクリンを加水分解, サリシンを発酵する。それに対して, *A. sobria* はこれらの性状がすべて陰性である。また *A.*

Table 3. Biochemical and physiological characteristics of the causative strains.

Character	Strain		
	S94 - 1 S9Z - 1 S03 - 1 M01 - 1 M05 - 1	M01 - 2	H05 - 1 H06 - 1
Nitrate reduction	+	+	+
Indole production	+	+	+
H ₂ S production	+	-	+
M. R. test	-	+	+
V. P. reaction	+	-	-
Gas from glycerol	+	-	-
Gelatin liquefaction	+	+	-
Catalase	+	+	+
Urease	-	+	-
Phosphatase	+		(+)
2·3-butanediol dehydrogenase	+	-	+
Gulconate oxidase	+	-	-
Phenylalanine deaminase	-		-
Citrate utilization:			
Koser's medium	-	+	-
Simmons's medium	-	+	-
Decarboxylases:			
L-Lysine	(+)	+	(+)
Ornithine	-	-	(+)
L-Arginine	-	-	
L-Glutamic acid	-		
Amino acid as sole source of carbon:			
L-Arginine	+		
L-Asparagine	+		
L-Histidine	+		
L-Glutamic acid	+		
L-Serine	+		
Growth in KCN broth	+		-
Growth at 37°C	+	+	
Growth in 7.5% NaCl	-	-	
Haemolysis	+	+	-

+, positive; -, negative; (+), weak or delayed positive

hydrophila は2つの Biovar に分かれ、*A. hydrophila* biovar X₁ は、V. P. 反応陽性、グルコースよりガスを産生するが、*A. hydrophila* biovar X₂ のV. P. 反応とグルコースからのガス生成は陰性である。

Table 4. Carbohydrate utilization of the causative strains.

Carbohydrate	Strain		
	S94 - 1 S9Z - 1 S03 - 1 M01 - 1 M05 - 1	M01 - 2	H05 - 1 H06 - 1
Acid from			
Arabinose	-	-	-
Xylose	-	-	-
Glucose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Mannose	+	+	+
Sorbose	-	-	-
Sucrose	+	-	-
Lactose	-	-	-
Maltose			+
Melbiose	-	+	-
Trehalose	+	+	-
Cellobiose	-	+	-
Raffinose	-	-	-
Starch	+	+	
Dextrin	+	+	
Glycerol	+	+	
Adonitol	-	-	-
Mannitol	+	+	+
Dulcitol	-	-	-
Sorbitol	-	+	-
Inositol	-	-	-
Salicin	+	+	-
Esculin	+	-	-

そこで、ここで分離された S94-1, S9Z-1, S03-1, M01-1, M05-1 を POPOFF and VÉRON の分類に照らすと、KCN 培地で発育，エスクリン加水分解し，サリシンを発酵する。また，単独炭素源としてヒスチジンとアルギニンを利用，V. P. 反応陽性，グルコースよりガスを生成するという諸性状より *A. hydrophila* biovar X₁ に同定される。この新しく発表された分類体系に対して MACLNNES and TRUST (1979) は，*A. hydrophila* と *A. sobria* の DNA ハイブリッド形成を行った結果，ゲノムの大きさを考慮すれば POPOFF and VÉRON の分類は遺伝学的に妥当であることを報告している。このようなことから，最近 *Aeromonas* 属に関する文献の中には POPOFF and VÉRON の分類を採用している向きがあるのでその鑑別結果も付記した。

次に，*Vibrio* 属は，*cholerae*, *parahaemolyticus*, *anguillarum*, *fisheri*, *costicola* の 5 つの菌種に分けられている。ここに分離された M01-2 は *parahaemolyticus* と *anguillarum* のいずれかの菌種に属させるべき性状を示している。しかし，V. P. 反応，

アルギニン加水分解性，リジンおよびアルギニン脱炭酸性，シュークロース，メリビオース，サリシンからの酸の生成性などの性状は *anguillarum* と異なり，また 7.5% 食塩加肉汁培地に発育しないことは *parahaemolyticus* とも異なっている。従ってそのいずれに属するかは決めかねるあいまいなところがある。楠田ら (1979) は従来から魚病の原因菌として分離されている *Vibrio* 属細菌を総括して第 I, II, III 群と *V. parahaemolyticus* 類似菌とに群別していて，その第 I 群が *V. anguillarum* に相当する。この群別に従えばここで分離した M05-2 は，その第 II 群に近似する菌であることが知られた。よってここでは，あえて種名を決めず *Vibrio* sp. とする。

次いで，H05-1, H06-1 は，IMViC 反応は +-+- で硫化水素産生陽性，マルトース，フラクトース，マンノースを分解し酸を生成するがアラビノースをはじめその他 13 種の糖は分解しなかった。これらの性状からこれら両菌株は *Edwardsiella* 属に属するものと思われる。*Edwardsiella* は 1 属 1 種で菌種として *tarda* のみが記載されており，従って H05-1, H06-1 は *Edwardsiella tarda* と同定された。

このようにウナギ頭部潰瘍症の原因菌は，養鰻場によって異なっており，川内市および宮古島の淡水池のものは *A. hydrophila*，宮古島の汽水池のものは *Vibrio* sp.，そして日吉町のものは *E. tarda* であった。いずれも頭部にかぎって潰瘍を形成する点や，臓器に顕著な病変が認められないことなど，起病性は類似している。また，汽水池の発症原因菌 *Vibrio* sp. は 1 回の検索に止まっているが，数回の検索を行った他の 2 つの養鰻場において，潰瘍症の原因菌は時期が違っても同じ原因菌が分離された。このことは，養鰻場ごとに池水中の基本的な細菌相は異なり，それらはあまり変動しないことを示唆している。また各菌種による潰瘍の症状には軽重の差が認められた。すなわち *A. hydrophila* による潰瘍は，多くがびらん崩壊して頭部全体に拡がっているのに対し，*Vibrio* sp. によるものは，小さくびらんしている程度である。*E. tarda* によるものは，多くは膨隆患部を形成してその中に膿汁が貯っており，これが崩壊してもクレーター状に陥没した状態を呈するに止まった。それはそれらの菌種のタンパク質分解力の違いによると思われる。つまり *A. hydrophila* はゼラチン培地を速かに液化するのに対し，*Vibrio* sp. はそれが劣り，*E. tarda* にはそれが無い。結局ウナギの頭部潰瘍症は *A. hydrophila* によるものが症状が重く被害も大きい，他の 2 種によるものは症状が軽く被害も少ないので，ややもすれば見逃されるか，あるいは重症な *A. hydrophila* による潰瘍の初期段階と誤認されている向きがある。

5. 分離原因菌の病原性

試料病魚からの分離菌は，分離後すぐにその発症性を検査して陽性のものを原因菌と見なした。そこで，ここではそれよりさらに詳細に定量的な病原性試験を行なった。この試験の供試菌は *A. hydrophila* (S94-1) と *E. tarda* (H05-1) である。実験方法の項で述べたように，病原性試験は飼育水中に供試菌を懸濁させ菌浴させる方法と供試菌を皮下注射する方法で行なった。

まず菌浴法では，供試菌懸濁液を飼育水中に加えて約 10^6 cells/ml の濃度に懸濁した。そしてその中に，頭部を解剖用のメスで切り傷やこすり傷を，あるいはむしピン 5～6 本を束ねたもので刺し傷をつけたたりしたウナギを入れて飼育した。各供試菌について 5 尾のウナギを用いて試験した。その結果，7 日間の観察期間中に，当初傷の部分にうすく白斑を生じたも

Table 5. Pathogenicity of *A. hydrophila* (S94-1) and *E. tarda* (H05-1) against Japanese eels by intramuscular injection.

Strain	Ulceration or Death	Rate*						
		Days after injection						
		1	2	3	4	5	6	7
<i>A. hydrophila</i> (S94-1)	Ulceration	12/20	16/20	16/20	16/20	16/20	16/20	16/20
	Death	8/20	12/20	14/20	16/20	16/20	16/20	16/20
<i>E. tarda</i> (H05-1)	Ulceration	1/25	6/25	12/25	15/25	18/25	21/25	21/25
	Death	0/25	1/25	6/25	12/25	15/25	18/25	18/25

Injection dose, 10^7 cells per 100 g body weight; Fish mean body weight, 50 g; Water temperature, 20-23 °C. * Number of eels ulcerated or died / Number of eels tested

のが見られたが、それらを含めすべての試験魚に潰瘍の発生は見られなかった。

次に注射法では、さきに病魚からの細菌分離に際して行なった発症性検索実験において、ほぼ 10^7 cells の注射によって発症することが知られている。そこで、ここでは実験方法の項で述べた手順に従ってウナギ体重 100 g に対し 10^7 cells の菌量を多数のウナギに皮下注射して飼育し、それらの発症率、致死率を検討した。その結果は Table 5 に示されている。Table 5 からわかるように、接種菌種によって病原性に差が認められた。すなわち *A. hydrophila* (S94-1) を接種されたウナギは、1 日後には試験魚 20 尾中 12 尾が潰瘍を発症しており、そのうち 8 尾は斃死していた。2 日後には 16 尾が発症し、すでに 12 尾は死亡、4 日後には発症した 16 尾のすべてが死亡してしまつた。7 日後に生き残っていた 4 尾は初期に注射部に白斑を生じたが、それが潰瘍にまで至らずそのまま耐過した。このようにウナギの個体によっても感受性が異なる様子がうかがえた。致死魚はいずれも頭部、軀幹部に潰瘍を形成しており (Plate II-6, 7 参照)、それらは自然発症の病魚に認められる潰瘍と似ていた。斃死魚からは患部はもちろん、腎臓、肝臓からも接種菌をほぼ純培養の状態でも再分離することができた。このことは、被接種魚が全身的な敗血症まで進行して斃死に至つたことを示している。一方 *E. tarda* (H05-1) を同じように注射したウナギについてみれば、上述の *A. hydrophila* の病原性に比べて弱い傾向が見られた。すなわち、接種魚 25 尾のなかで接種 1 日後では 1 尾だけが軽く潰瘍を発症した。接種 2~3 日後に注射部の潰瘍が目立ちはじめ、2 日後に 6 尾、3 日後に 12 尾が発症していた。致死魚も 2 日後に 1 尾、3 日後に 6 尾と増加している。接種後 3~4 日目に発症魚、致死魚の現れが多かつた。その後 7 日目までに発症魚 21 尾、致死魚 18 尾で、残り 4 尾は潰瘍も発生せず生き残つた。潰瘍を生じながら、または潰瘍を生じることなく生き残つた接種魚の臓器からは接種菌の再分離はできなかつた。先に、自然発症において *A. hydrophila* に比し、*E. tarda* による症状が軽症であることを述べたが、そのことを実験的にも認め得た (Plate II-8 参照)。分離 *Vibrio* sp. (M01-2) の病原性は、汽水池で養殖された健康なウナギの入手がおくれ試験できなかつた。

6. 養鰻池水中における全生菌数および *A. hydrophila* と *E. tarda* 生菌数の変動

養殖ウナギの頭部潰瘍症の原因菌は淡水池のものでは *A. hydrophila* と *E. tarda* である

ことがわかったが、本実験では養鰻池水中の全生菌数および *A. hydrophila* と *E. tarda* の生菌数を選択培地を用いて測定し、これら生菌数の変動と疾病の発生との関係を検討した。

調査養鰻池は鹿児島県日吉町の養鰻場の1つの池を指定した。その池は *E. tarda* による頭部潰瘍症が発生した池である。調査池の供給水は、地下水で塩分をほとんど含まず、飲料水にも適する。それをボイラーで加温しつつ供給し、池水は1日1回転の割合で交換している。調査した池は面積が1,400 m²、平均水深が35 cmで、池底は砂である。一般に池水は濁っており、池水中にアオコは認められないが、ユスリカ幼虫が発生していた。そこには大型の成鰻ばかりを放養していた。調査は1981年5月から11月にかけて9回行なった。試水採取時刻は午後1時前後で、水温を測定後、表層から約10~15 cm深さの水を滅菌ポリビンで採取した。試水はクーラー中で水冷し、急ぎ研究室まで持ち帰り、採水後1時間内には菌数測定を行なった。使用培地は全生菌数測定用として普通寒天培地を、*A. hydrophila* の選択計数にはリムラー・ショット培地を、*E. tarda* の選択計数にはDHL培地を用いた。試水の5倍希釈系列を作り、その適当な5段階の0.1 mlを各培地の平板に塗抹接種した。培養方法は実験方法の項に記した通りであり、普通寒天平板に現れたコロニーの全てを数えて全生菌数を、リムラー・ショット寒天平板上の黄色コロニーを数えて *A. hydrophila* 生菌数を、DHL寒天平板上で中心部黒色半透明円形コロニーを数えて *E. tarda* 生菌数を、それぞれ算出した。

池水採水時の水温と各菌種の生菌数の変動は Fig. 2 に示した。それによると、調査期間中、水温は20℃以下になることはなく、5月~6月は23℃前後、7月~9月は25~26℃、10月~11月は23℃前後であった。池水中の全生菌数の変動についてみれば、調査期間中、それは3~30×10⁵ cells/mlであった。また *A. hydrophila* 生菌数は1~10×10⁴ cells/mlで、

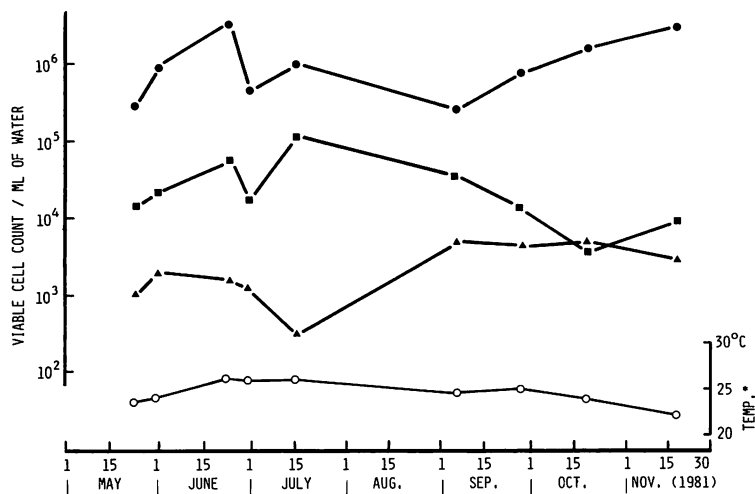


Fig. 2. Seasonal changes in viable cell count of total bacteria, *A. hydrophila* and *E. tarda* in the water of a eel culture pond.

Symbols: ●—●, Total bacterial cells; ■—■, *A. hydrophila* cells; ▲—▲, *E. tarda* cells; ○—○, water temperature.

* Temperature of the pond water.

全生菌数の3%位であった。一般に水温の上昇期(6月下旬~7月中旬)には、その生菌数が増大する傾向がみられた。*E. tarda* 生菌数は $1\sim 4\times 10^3$ cells/mlで、全生菌数の0.3%、*A. hydrophila* の4~10%に相当する菌数であった。全生菌数と*A. hydrophila* 生菌数の相互関係について、両者は5月から7月中旬まではよく似た増減パターンを示したが、9月から11月には、全生菌数の増加に反比例して*A. hydrophila* 生菌数は減少した。一方、全生菌数と*E. tarda* 生菌数の間には判然とした相互関係は見出されなかった。この池において、10月17日の調査時に頭部潰瘍症病魚が認められ、その患部から*E. tarda* が分離確認できた。そこで、その頃の池水中での*E. tarda* 生菌数を見ると、本病が発生する前の5月~7月の5回の調査時よりも、本病発生後の9月~10月の3回の調査時の方が*E. tarda* 生菌数は高かった。すなわち前5回の平均が 1.3×10^3 cells/mlであったのに対し、後3回のそれは 5.3×10^3 cells/mlと約4倍に増加していた。また病魚の発生が認められた頃、全生菌数は増加し、逆に*A. hydrophila* 生菌数は減少していた。そしてその頃池水は以前に増して濁っていた。このように頭部潰瘍症発生時は、池水中の細菌相が量的に変化し、かつ水質も悪化していたと思われる。これらのことから、主な菌種の生菌数を定期的に計数しておれば、病原菌の増加により病魚の発生を予知しえて、未然に対策を講じ得よう。ついでに、調査池の水中には*E. tarda* 生菌数にまさる*A. hydrophila* 生菌数がありながら、それによる潰瘍症は発生しなかった。その理由を知るには、実験に使用した選択培地の選択性の精度やその菌種中の病原株と非病原株の区別など細かな検討を要する問題が残されている。

考 察

養殖ウナギ頭部潰瘍症の原因菌の1つと認められた*A. hydrophila* は、現在ウナギ鱧赤病の原因菌として知られているものである。また古く欧州で見られたヨーロッパウナギのRed Pestの原因菌でもある。保科(1962)は鱧赤病の外観的病状を、(i) 軀幹部に腫瘍性あるいは潰瘍性の患部が見られるものと、(ii) このような患部がなく鱧、皮膚などの発赤が著明で鱧赤病の名にふさわしい病状を呈するものとの2型に区別している。そして、病理解剖学的変化の頻度について、採集された鱧赤病魚664尾の中で、腸炎の見られるものが最も多く80%、体表のどこかに発赤のあるもの57%、軀幹部に化膿性あるいは潰瘍性患部をもつもの15.7%であったと述べている。江草(1978)は著書のなかで、古くヨーロッパウナギのRed Pestでは、頭部に膨隆患部を生じ、その皮膚が崩壊して潰瘍となることが多いと報告されていたが、近年かなり多数の病魚を観察してきたところでは、そのような患部はごくまれにしか観察されなかったと記述している。これらのことから本報の知見は、かつて副次的病状として時たま見られていた潰瘍、それを主徴とする魚病が近年流行し始めていることを示唆している。保科(1962)が鱧赤病魚から分離した*A. punctata* (現在では*A. hydrophila* に再同定されている) 菌株のゼラチン液化性は16~20°C培養で10mlのゼラチン培地を3週間液化したと報告している。これに対して本報で分離した*A. hydrophila* 菌株は20°C培養で約6mlのゼラチン培地を3~5日間で完全に液化した。またカゼインや凝固卵白をも分解し、タンパク分解力の強い菌株であった。そして分離菌株の中で、タンパク分解力の強い菌株ほど潰瘍発症性も強かった。よって本報の分離菌株は、強力なタンパク分解作用によって

特徴づけられる潰瘍型の病原菌株である。BOJLANGER *et al.* (1977)や OLIVER *et al.* (1981)は、ウナギを含む数種の淡水性の健康魚や病魚から多数の運動性 *Aeromonas* 菌を分離し、それらを POPOFF and VÉRON の規準に照らして、*A. hydrophila* (biovar X₁, X₂) と *A. sobria* に鑑別した。それらはプロテアーゼ、レシチナーゼ、溶血素、細胞毒素などの細胞外酵素を生産し、またエンテロトキシン活性や皮膚壊死活性を有することを見出した。そして、それらの活性は菌種、菌株によって異なることを見出している。例えば皮膚壊死活性は病魚から分離された *A. hydrophila* biovar X₁ で強く、健康魚から多く分離された *A. sobria* では弱かったと報告している。その点、本報で分離された *A. hydrophila* が POPOFF and VÉRON の分類の biovar X₁ と同定されたことは、上記の性格ともよく符号している。

SHOTTS and RIMLER (1973)は、*A. hydrophila* の選択培地としてリムラー・ショット培地を考案した。この培地の平板上(37°C, 18~24時間培養)で、その菌は黄色コロニーを形成する。これに似た黄色コロニーを作るものとして腸内細菌科の *Citrobacter* 属菌の一部がある。従って黄色コロニーを釣菌してオキシダーゼ試験を行ない、その陽性菌株を *A. hydrophila* 類似菌とみなす。また、*A. hydrophila* でもノボピオン感受性株やリジン脱炭酸陽性株はこの培地では選択できない。(KAPER *et al.*, 1979)。このようにリムラー・ショット培地の *A. hydrophila* 選択性にはなお誤認の余地がある。よって、Fig. 2で示された *A. hydrophila* 生菌数の精度には疑問があるが、菌数の変動傾向を知る一応の目安にはなろう。*A. hydrophila* は魚類に対する病原性ばかりでなく、ヒトに対しても腸炎起病性を有し食中毒原因の一員に数えられている。従って、公衆衛生面からも、この菌が汚染指標菌として役立つとされ、この菌の検出、計数法の確立や鑑別の簡易化が計られている。KAPER *et al.* (1979)はAH培地と呼ばれるこの菌の選択培地を新しく考案している。それはリムラー・ショット培地における *Citrobacter* 菌誤認の欠陥を避け、*A. hydrophila* と腸内細菌科菌との細部にわたる鑑別をおこなった選択培地である。

河川水や沿岸水など自然水における *A. hydrophila* の分布やその季節的変動が、選択培地を用いて調べられている。HAZEN *et al.* (1978)は米国とプエルトリコの147の水域を調査し、そのうち135水域から *A. hydrophila* を検出した。そしてその菌数は10~10³ cells/mlの範囲で変動する程度であった。また CAVARI *et al.* (1981)は米国 Anacostia 川の水深6m層におけるこの菌数の季節変動を調べた。それは8月水温27~28°Cの頃に最も高い300 cells/mlで、2月水温0.5°Cの頃には10 cells/mlと最低であった。その川底の堆積物中のそれは8月に最高の10⁵ cells/gで、水温低下に伴って減少し2月に最低の10 cells/gであった。また、その川でダイビングの訓練中の人々は、潜水後、水中眼鏡や耳から *A. hydrophila* が分離され、その検出率は8~10月に高かったと報告されている(SEIDLER *et al.*, 1980)。さらに *A. hydrophila* の生育に関する温度特性を、温泉水や原子力発電所の温排水が流入する河川水の温度勾配の中で検討した HAZEN and FLIERMANS (1979)は、この菌の生育温度域は約11~40°Cで、適温は21~32°Cであったとしている。本報で調査した養鰻池の水温は22~26°Cに調節されており、この温度は *A. hydrophila* にとって適温である。加えて池水が残餌などによって富栄養化されることと相俟って、養鰻池水中のその菌数は河川水の中のそれよりも相当高い値になることがわかる。

ヒトに対する *A. hydrophila* の感染症例について、HANSON *et al.* (1977)は、水泳中、

額を負傷し、そこからこの菌が感染して蜂巣炎を起こした患者について報告している。彼らはこの菌の外傷感染における特徴的な症候群について、(i)急激な化膿を伴う局所的な炎症の発生、(ii)遅延性発熱(38°~40°C)、(iii)白血球増加症などをあげている。そしてこの外傷感染の抗生物質治療には、gentamicin, aminoglycosideが望ましいとしている。また、この菌はかなり頻繁にヒトの病原菌となっているとも付記している。別に JOSEPH *et al.* (1979)も、川で潜水訓練中のダイバーが被った刺し傷が化膿し、そこから *A. hydrophila* と *A. sobria* が検出されたと報告している。このように、*A. hydrophila* が人体に対して皮膚感染するには、皮膚の外傷がその前提条件になっていることがわかる。そのことからウナギの潰瘍症の感染経過をも類推しうる。すなわち本症もまた何らかの原因によって傷つけられた頭部が感染の足場になっていると思われる。

次に、淡水養鰻池でのウナギ頭部潰瘍症の原因菌のもう1つ、*E. tarda* について言えば、この菌種はウナギのパラコロの原因菌であるばかりでなく、他の魚類に対する病原菌としても知られている。例えば、楠田ら(1977)は頭部や体側の皮膚に出血性びらん、腎臓と脾臓に多数の小白斑が認められる養殖チダイの病魚からこの菌種を分離している。WYATT *et al.* (1979)は、ナマズ養殖池の水から、彼らが考案した選択培地を用いた最確数法によって、*E. tarda* の生菌数を計数している。その結果は、水温の変動に伴って菌数の変動が大きく、水温が高い8月に1,100 MPN/100 mlを数え、それは4月の20~100倍も高かった。本報の調査池での測定値(Fig. 2)は上記の値を100倍する菌数であった。この菌種のヒトへの感染例は、熱帯性下痢症が知られている。DAMME and VANDEPITTE (1980)は、*E. tarda* による熱帯性下痢症は淡水魚の摂取もしくは接触によって発病すると考えた。そしてアフリカの河川や湖で捕獲されたティラピアなどの腸管内からこの菌の分離を試み、59尾のうち34尾から本菌種が分離されたと報告している。このように *E. tarda* も淡水系に広く分布している菌種である。

次いで、汽水池でのウナギ頭部潰瘍症の原因菌、*Vibrio* sp. も、それに類する菌種が古くからヒトの腸炎や魚病原因菌として知られている。*Vibrio* 属菌を原因菌とする魚病はピブリオ病とよばれているが、各原因菌株の鑑別に関しては細部に至ると未整理の部分がある。*V. anguillarum* を原因菌とするウナギのピブリオ病の外観病状は、軀幹部や鰭に発赤があり、一部には体表に出血性の潰瘍が見られた(城・室賀, 1972)。本報で分離した *Vibrio* 菌は、分類学的な細部にわたる検討が十分でなく、*Vibrio* sp. とし、楠田ら(1979)のII群に類する菌株であると述べるに止めた。このII群は海産魚の潰瘍病の原因菌を含む菌群であり、汽水性の菌株が多い。

本報で分離されたこれら3種の細菌はいずれも条件性病原菌(Facultative pathogen)のカテゴリーに入るものである。従ってこれらによって起こる疾病は、宿主が何らかの原因で損傷をうけ、その防御機構が弱まっていることが前提になる。若林ら(1970)は、1966年以後にウナギのカラムナリス病が急速に流行し、その時期が配合飼料の使用が普及した頃と符合していることから、ウナギが配合飼料を摂餌するとき、飼料中の粗い粒子が鰓葉間を通過する際に鰓上皮に微細な傷ができ、そこからカラムナリス菌が侵入するのではないかと示唆している。このようにカラムナリス病では、鰓の損傷が感染要因の1つに数えられている。本報のウナギ頭部潰瘍症は、その症状からみて明らかなように、原因菌の皮膚感染によって

起っている。しかし、頭部に小さく傷をつけたウナギを菌浴させても発病しなかったことを考え合わせると、かなり深い傷を感染門戸としていると思われる。ウナギの体表が傷つく場合として、(i) 池替えや選別の時、(ii) 水車や池壁への衝突によって、(iii) 投餌の際不備なエサカゴによって、(iv) 飼料中のある種配合素材による口吻部の損傷、さらには(v) ストレスを負ったウナギ同志が咬み合う場合、などがあげられる。もともとウナギの軀幹部には微小鱗があって保護されているが、頭部にはそれがなく損傷を受け易いと言えるが、特に頭部前面に限って傷をうけるのは上記(iii)、(iv)、(v)の場合が考えられる。(iii)について、ウナギがエサカゴの外側から餌に食いつく様は激しく、エサカゴが使い古されたりして少しでも不備があれば、頭部に傷を負うことは十分うなづけることである。また(v)について、高密度養殖されている池で、水温の変化や水質の悪化などによってストレスを負ったウナギは神経過敏となり、しばしばお互いに首をもち上げて頭部を攻撃し合う行動を見せる。その際、頭部前面にかなり深い傷を負っている魚を見かける。(iv)について、現場で投餌されている配合飼料を調べた限りでは、口吻部、口腔内に傷を負わせる要素は見あたらなかった。従って、頭部潰瘍症の感染門戸となる損傷は、(iii)、(v)の場合に生じるものであろう。感染発症したウナギの患部は、殆んどがびらん崩壊しているため、そこから病原性の強い菌が水中へ排菌されて他のウナギへと伝播していると考えるのが妥当であろう。条件性病原菌による魚病の発症要因を検索する場合、病原菌についての検討は勿論であるが、宿主である魚がそれらの菌に対して感受性を増した理由をも究明すべきである。この種条件性病原菌による発病は今後ますます増加し多様化するだろう。少なくとも養殖池水にはいろいろな条件性病原菌が存在して魚の隙を狙っている。それに冒されないためには、養殖池の構造や大きさに応じた適正な養殖密度を把握して、魚の生理、生態的習性にそった養殖環境を整え、水温の変化や水質の悪化などストレス要因を排除することが肝要である。それらの病原菌は前述のように人に対しても条件的に病原性を発揮して腸炎や化膿症をひきおこすので、この種の業務に関わる人々は、健康や衛生面の管理に十分留意すべきである。

要 約

近年、養殖ウナギの頭部に潰瘍を生じる疾病が発生している。本報ではその原因菌を分離し、細菌学的性状を究明し菌種を同定した。次いでそれら菌種のウナギに対する病原性や養殖池水中における分布をも検討した。それらの結果から、次のような知見を得た。

1, 川内市の養鰻場と宮古島の淡水池で発生したウナギ頭部潰瘍症の患部から分離された原因菌は *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* と同定された。また宮古島の汽水池でのそれは *Vibrio* sp., 日吉町の養鰻池でのそれは, *Edwardsiella tarda* であった。このように原因菌は養鰻場によって異なったが、同じ養鰻場では2年間に行った数回の調査では、同一原因菌が検出された。

2, 原因菌の病原性は、接種(皮下注射)菌量 10^7 cells/100 g ウナギ体重で、*A. hydrophila* では接種4日後に試験魚の80%が典型的な潰瘍を生じ、発症魚の全てが死に致る程度であった。他方、*E. tarda* では接種6日後に80%が発症し重症のもの70%が死に致る程度で、*E. tarda* の発症性は *A. hydrophila* のそれよりやや弱かった。

3. 日吉町の淡水養鰻池水中にあって、全生菌数 $3\sim 30\times 10^5/\text{ml}$ に対し、*A. hydrophila* 生菌数は $1\sim 10\times 10^4/\text{ml}$ 、*E. tarda* 生菌数は $1\sim 4\times 10^3/\text{ml}$ 程度が常時存在していた。そして、その池で *E. tarda* による潰瘍症が発生した頃には、全生菌数は増加し、*A. hydrophila* は減少し、原因菌である *E. tarda* はふつう時の4倍に増加し、池水中の細菌相に量的変化が現れた。

4. ウナギ頭部潰瘍症の発症要因は、投餌の際エサカゴの不備などによって被ったウナギ頭部の損傷、あるいはストレスを負ったウナギの咬み合いによって受けた頭部の傷などを感染門戸として、原因菌が感染し、ストレスの負荷などによって抵抗力が低下していたことなどと相俟って発病に至ったと考えられる。

文 献

- ANACKER, R. L. and E. J. ORDAL (1955): Study of a bacteriophage infecting the myxobacterium *Chondrococcus columnaris*. *J. Bacteriol.*, **70**, 738-741.
- BOULANGER, Y., R. LALLTER and G. COUSINEAU (1977): Isolation of enterotoxigenic *Aeromonas* from fish. *Can. J. Microbiol.*, **23**, 1161-1164.
- BUCHANAN, R. E. and N. E. GIBBONS (1974): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- CAVARI, B. Z., D. A. ALLEN and R. R. COLWELL (1981): Effect of temperature on growth and activity of *Aeromonas* spp. and mixed bacterial populations in the Anacostica River. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **41**, 1052-1054.
- COWAN, S. T. (1974): *Manual for Identification of Medical Bacteria*. 2nd ed., Cambridge University Press, England.
- DAMME, L. R. VAN. and J. VANDEPITTE (1980): Frequent isolation of *Edwardsiella tarda* and *Plesiomonas shigelloides* from healthy Zairese freshwater fish: A possible source of sporadic diarrhoea in the tropics. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **39**, 475-479.
- 江草周三 (1978): 魚の感染症. 97~272, 恒星社厚生閣, 東京.
- FLIERMANS, C. B., R. W. CORDEN, T. C. HAZEN, and G. W. ESCH (1977): *Aeromonas* distribution and survival in a thermally altered lake. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **33**, 114-122.
- GROBERG, W. J., JR., R. H. MCCOY, K. S. PILCHER and J. L. FRYER (1978): Relation of water temperature to infections of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*), Chinook Salmon (*O. tshawytscha*), and Steel head Trout (*Salmo gairdneri*) with *Aeromonas salmonicida* and *A. hydrophila*. *J. Fish. Res. Board Can.*, **35**, 1-17.
- HANSON, P. G., J. STANDRIDGE, F. JARRET and D. G. MAKI (1977): Fresh water wound infection due to *Aeromonas hydrophila*. *J. Am. Med. Assoc.*, **238**, 1053-1054.
- HARRIGAN, W. F. and M. E. MCCANCE (1966): *Laboratory Methods in Microbiology*. 51-67, Academic Press, New York.
- HAZEN, T. C., C. B. FLIERMANS, R. P. HIRSCH and C. W. ESCH (1978): Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **36**, 731-738.
- HAZEN, T. C. and C. B. FLIERMANS (1979): Distribution of *Aeromonas hydrophila* in natural and man-made thermal effluents. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **38**, 166-168.
- 保料利一 (1962): ウナギ鱗赤病に関する研究, 東京水産大学特別研究報告, **6**, 1-104.
- JOSEPH, S. W., O. P. DAILY, W. S. HUNT, R. J. SEIDLER, D. A. ALLEN and R. R. COLWELL (1979): *Aeromonas* primary wound infection of diver in polluted waters. *Jour. Clin. Microbiol.*, **10**, 46-49.

- 城 泰彦・室賀清郎 (1972): 淡水養殖ウナギから分離された *Vibrio anguillarum* について。魚病研究, 6 (2), 117-119.
- KAPER, J., R. J. SEIDLER, H. LOCKMAN and R. R. COLWELL (1979): Medium for the presumptive identification of *Aeromonas hydrophila* and *Enterobacteriaceae*. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **38**, 1023-1026.
- 楠田理一・伊丹利明・宗清正広・中島博司 (1977): 養殖チダイから分離された病原性 *Edwardsiella tarda* の性状について。日水誌, 43, 129-134.
- 楠田理一・佐古 浩・川合研児 (1979): 病魚から分離された *Vibrio* 属細菌の分類学的研究—I. 形態学的, 生物学的ならびに生化学的性状による検討。魚病研究, 13 (3), 123-137.
- MACINNES, J. I. and T. J. TRUST (1979): Deoxyribonucleic acid relationship among members of *Aeromonas*. *Can. J. Microbiol.*, **25**, 579-586.
- OLIVIER, G., R. LALLIER and S. LARIVIER (1981): A toxigenic profile of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* isolated from fish. *Can. J. Microbiol.*, **27**, 330-333.
- POPOFF, M. and M. VERON (1976): A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* group. *J. Gen. Microbiol.*, **94**, 11-22.
- SEIDLER, R. J., D. A. ALLEN, R. R. COLWELL, S. W. JOSEPH, H. LOCKMAN and O. P. DAILY (1980): Isolation, enumeration, and characterization of *Aeromonas* from polluted waters encountered in diving operations. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **39**, 1010-1018.
- SHOTTS, E. B., JR. and R. RIMLER (1973): Medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Microbiol.*, **26**, 550-553.
- SKINNER, F. A. and D. W. LOVELOCK (1979): Identification Methods for Microbiologists. 2nd ed., Academic Press, New York.
- 水産庁編 (1979): 魚類等防疫指針 2, 細菌病
- 若林久嗣・吉良桂子・江草周三 (1970): 養殖ウナギの *Chondrococcus columnaris* 感染症に関する研究—II, 養殖ウナギの鰓病と *Chondrococcus columnaris* の関係。日水誌, 36, 678-685.
- WYATT, L. E., R. NICKELSON II and C. VANDERZANT (1979): *Edwardsiella tarda* in freshwater catfish and their environment.. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **38**, 710-714.

Explanation of Plates

- Plate I** — 1 Eel (1) with head ulcer disease caught in Sendai-shi
 2 Eel (2) with head ulcer disease caught in Sendai-shi
 3 Eel with head ulcer disease caught in Hiyoshi-chō
 4 Eel with head ulcer disease caught in brackish-water pond, Miyakoshima
- Plate II** — 5 Bacterial cells occurred by extensive growth in the ulcer (E-H staining)
 6 Induced ulcer disease in eel by intramuscular injection of *A. hydrophila*
 7 Eels died by injection of *A. hydrophila*
 8 Induced ulcer disease in eel by intramuscular injection of *E. tarda*

Plate I



Plate II

