

## アユ及びニジマス由来冷水病原菌のニジマスに対する病原性

中居 裕

Virulence of *Flavobacterium psychrophilum* Strains  
from Ayu (*Plecoglossus altivelis*) and Rainbow trout  
(*Oncorhynchus mykiss*) to Rainbow trout

Yutaka NAKAI

わが国での冷水病は、1987年にアユで発病したのが最初の確認例<sup>1)</sup>とされているが、ギンザケでは1985年ごろから冷水病と考えられる症状の病魚が散見されていた。<sup>1)</sup> ニジマスでは1990年が最初の確認例とされている(全国養鱒技術協議会調査)。

現在では全国に蔓延したアユの冷水病は、アユ漁業及び養殖業に大きな被害をもたらしている。そのため、アユの冷水病については多くの知見が集積されつつあるが、ギンザケ以外のサケ科魚類については、国内での研究例は非常に少ない。

本研究では本症の感染動態の一端を明らかにする目的で、アユ及びニジマスから分離された株を用いて、ニジマス稚魚に対する病原性を検討した。

## 方 法

## 実験 1

供試魚：ニジマス(平均体重12.9 g:山梨県水産技術センター忍野支所産) 1区25尾供試

なお、当所産のニジマスを用いなかったのは実験時に適当な魚体重のニジマスがいなかったため、他の目的で飼育していた本供試魚を用いた。後述の実験も同様の理由である。

供試菌株：CS-1(岐阜県分離株 1995年にアユ12.9 gより分離 自発凝集株)

CS-5(岐阜県分離株 1995年にニジマス2.4 gより分離 自発凝集株)

改変サイトファーガ液体培地を用いて、15°Cで48時間培養した。培養中は時々手で攪拌した。培養菌液の菌数は以下のとおりであった(原液)。

CS-1  $9.0 \times 10^7$  CFU/ml

CS-5  $3.9 \times 10^7$  CFU/ml

感染方法：

麻酔(2-フェノキシエタノール150ppm:通気)をかけながら、作製した菌液の $10^0$ および $10^{-1}$ 希釈液(希釈液:改変サイトファーガ液体培地)0.05ml/尾を背鰭左下部へ筋肉内接種した。対照区には改変サイトファーガ液体培地を同様に接種した。

飼育：

接種後、20 lのプラスチック水槽(実容18 l)に收容した。飼育水は水道水(活性炭で遊離塩素除去処理を行った)で、注水量は300ml/minとした。なお、飼育期間中は配合飼料を適宜給餌した。

観察期間：14日間

観察項目：

飼育期間中は、供試魚の状態や外観を記録した。死亡魚および生残魚は、腎臓及び接種部位から常法により改変サイトファーガ寒天培地を用いて細菌分離を行った(培養温度:15°C)。

## 実験 2

供試魚：ニジマス(平均体重14.2 g:山梨県水産技術センター忍野支所産) 1区20尾供試

供試菌株：CS-1P（実験1での斃死魚からの再分離株）

CS-5P（実験1での接種部位膨隆患部「生存魚」からの再分離株）

培養方法は実験1と同じである。培養菌液の菌数は以下のとおりであった（原液）。

CS-1P  $2.4 \times 10^8$  CFU/ml

CS-5P  $2.4 \times 10^8$  CFU/ml

感染方法：

麻酔（2-フェノキシエタノール150ppm：通気）をかけながら、作製した菌液の原液0.05ml/尾を背鰭左下部へ筋肉内接種した。対照区には改変サイトファーガ液体培地を同様に接種した。

飼育：実験1と同じ方法で飼育した。

観察期間：14日間

観察項目：実験1と同じである。

### 実験3

供試魚：ニジマス（山梨県水産技術センター忍野支所産）

大（平均体重18.1g）

小（平均体重3.2g）

供試菌株：CS-1（実験1と同じ）

CS-5（実験1と同じ）

上記の菌株の培養原液を3500rpm・15分の冷却遠心後、上清の90%を除去して、残りの上清に遠心沈殿した菌体を再懸濁したものをニジマス（大）に用いた。

CS-1

CS-1P

CS-5

CS-5P

上記の菌株はニジマス（小）に用いた。

培養方法は実験1と同じである。培養菌液の菌数は以下のとおりであった。

CS-1  $1.8 \times 10^7$  CFU/ml

CS-1（濃縮後）  $2.3 \times 10^8$  CFU/ml

CS-1P  $1.2 \times 10^7$  CFU/ml

CS-5  $1.0 \times 10^7$  CFU/ml

CS-5（濃縮後）  $3.0 \times 10^8$  CFU/ml

CS-5P  $1.0 \times 10^7$  CFU/ml

感染方法：

ニジマス（小）の接種量が0.02ml/尾である以外は実験2と同じ方法で実施した。

飼育：実験1と同じである。

観察期間：14日間（大）及び15日間（小）

観察項目：実験1と同じである。

### 実験4

供試魚：ニジマス（平均体重3.6g：山梨県水産技術センター忍野支所産）1区15尾供試

供試菌株：CS-1P（実験2と同じ）

上記の菌株の培養原液を3500rpm・15分の冷却遠心後、上清の90%を除去して、残りの上清に遠心沈殿した菌体を再懸濁したものを用いた。

培養方法は実験1と同じである。培養菌液の菌数は以下のとおりであった。

CS-1P  $1.8 \times 10^7$  CFU/ml

CS-1P（濃縮後）  $2.3 \times 10^8$  CFU/ml

感染方法：

接種部位に腹腔内を追加したこと、作製した菌液の $10^9$ および $10$ 倍濃縮液を接種した以外は実験1と同じである。

飼育：実験1と同じ方法で飼育した。

観察期間：13日間

観察項目：

生残魚の細菌分離を実施しなかった以外は実験1と同じである。

## 結 果

実験1の結果を第1表に示した。なお、飼育期間中の水温は $10.0 \sim 14.0^\circ\text{C}$ であった。斃死魚はCS-1( $10^9$ )接種区のみに見られた。右背部に広範な膨隆患部が形成されたほか、貧血症状、腎臓の透明化、脾臓の肥大、腸の炎症などが見られた。ただし、斃死期間の終了付近の斃死魚や生残魚では、膨隆患部が消失する代わりに、その部分に穴あき状の筋肉露出が見られた。生残魚の中には穴あき状の筋肉露出も治癒し、その痕跡が見られるか、あるいは痕跡すら見られないものもあった。生残魚からはCS-1接種区の外、CS-5接種区からも接種菌が再分離された。

実験2の結果を第2表に示した。なお、飼育期間中の水温は $13.8 \sim 15.0^\circ\text{C}$ であった。斃死魚はCS-1( $10^9$ )接種区のみに見られたが、その率は実験1の半分に低下した。その他の状況は実験1と同様の結果であった。

実験3の結果を第3表に示した。なお、飼育期間中の水温は $13.6 \sim 16.3^\circ\text{C}$ であった。ニジマス（大）での斃死魚はCS-1（濃縮）接種区のみに見られた。累積斃死率が40%であった他は、実験1と同様の結果であった。

ニジマス（小）ではCS-1及びCS-1P接種区ともに高

第1表：実験1における各区の累積斃死率と、斃死魚及び生残魚の接種菌再分離状況

菌株（希釈）	供試尾数	死亡尾数 （腎臓・接種部位） <sup>*1</sup>	累積斃死率 （%）	生残尾数 （腎臓・接種部位） <sup>*1</sup>
CS-1（原液）	25	9(4・9)	36.0	16(1・1) <sup>*2</sup>
（10 <sup>-1</sup> ）	25	0	0	25(1・0)
CS-5（原液）	25	0	0	25(3・0)
（10 <sup>-1</sup> ）	25	0	0	25(0・1)
対照区	25	0	0	25(0・0)

\*1：各部位における接種菌の分離された尾数を示した。

\*2：1尾は腎臓のみ、もう1尾は接種部位のみから分離された。

第2表：実験2における各区の累積斃死率と斃死魚及び生残魚の接種菌再分離状況

菌株（希釈）	供試尾数	死亡尾数 （腎臓・接種部位） <sup>*1</sup>	累積斃死率 （%）	生残尾数 （腎臓・接種部位） <sup>*1</sup>
CS-1P(原液)	20	3(2・2) <sup>*2</sup>	15.0	17(1・8) <sup>*3</sup>
CS-5P(原液)	20	0	0	20(0・1)
対 照 区	20	0	0	20(0・0)

\*1：各部位における接種菌の分離された尾数を示した。

\*2：1尾は腎臓のみ、もう1尾は接種部位のみから分離された。

\*3：腎臓から分離された生残魚は接種部位からも分離された。

第3表：実験3における各区の累積斃死率と、斃死魚及び生残魚の接種菌再分離状況

菌株（希釈）	供試尾数	死亡尾数 （腎臓・接種部位） <sup>*1</sup>	累積斃死率 （%）	生残尾数 （腎臓・接種部位） <sup>*1</sup>
（ニジマス「大」） CS-1(濃縮)	20	8(3・8)	40.0	12(0・6)
CS-5(濃縮)	20	0	0	20(1・5) <sup>*2</sup>
対 照 区	20	0	0	20(0・0)
（ニジマス「小」） CS-1（原液）	50	31(21・31)	62.0	19(0・0)
CS-1P(原液)	50	44(32・44)	88.0	6(0・0)
CS-5（原液）	50	2(2・2)	4	48(0・3)
CS-5P(原液)	50	2(1・2)	4	48(0・1)
対 照 区	50	0	0	50(0・0)

\*1：各部位における接種菌の分離された尾数を示した。

\*2：腎臓から分離された生残魚は接種部位からも分離された。

い累積斃死率が観察された。その結果はFisherの直接確率計算法によると1%以下の危険率で有意差が認められた。一方、CS-5及びCS-5P接種区ではいずれも4%で

あった。生残魚からの接種菌再分離はCS-1及びCS-1P接種区では認められなかったが、CS-5及びCS-5P接種区ではわずかに認められた。症状は実験1と同様であっ

第4表：実験4における各区の累積斃死率と、斃死魚の接種菌再分離状況

菌株（希釈）	供試尾数	死亡尾数 （腎臓・接種部位）*1	累積斃死率 （%）	生残尾数
（腹腔内）				
CS-1P（原液）	15	5(3)	33.3	10
CS-1P（濃縮）	15	0	0	15
対 照 区	15	1(0)	6.7	19
（筋肉内）				
CS-1P（原液）	15	7(2・5)*2	46.7	8
CS-1P（濃縮）	15	7(4・6)*2	46.7	8
対 照 区	15	0	0	15

\*1：各部位における接種菌の分離された尾数を示した（腹腔内は腎臓のみ）。

\*2：腎臓から分離された生残魚は接種部位からも分離された。

た。

実験4の結果を第4表に示した。なお、飼育期間中の水温は15.5～19.3℃であった。腹腔内接種ではCS-1接種区のみで斃死が5尾認められたが、うち2尾からは接種菌が再分離されなかった。ただし、斃死魚すべてに強い貧血症状が認められた。対照区にも1尾の斃死が認められたが、細菌は分離されず、その他の異常も認められなかった。筋肉内接種での斃死魚はCS-1P及びCS-1P（濃縮）接種区ともに7尾の斃死が認められたが、CS-1P接種区では2尾、CS-1P（濃縮）接種区では1尾で接種菌が再分離されなかった。ただし、斃死魚すべてに実験1と同様の症状が認められた。

## 考 察

実験1～3の結果から、以下のことが考えられた。

CS-1（アユ由来）株はニジマス（3.2g）に強い病原性を示すが、15g前後のニジマスでは病原性は低下した。また、CS-5（ニジマス由来）株はニジマス（3.2g）への病原性は微弱で、15g前後のニジマスでは全く斃死を引き起こさなかった。

CS-5株はIHN発病終期のニジマス稚魚（平均体重2g）群で冷水病の発病が起こった斃死魚から分離された株であり、その時の冷水病発病時からの累積斃死率は推定で10%前後と考えられる発病事例である。この状況から、CS-5株は元々弱毒株であった可能性があり、本研究の結果はその反映とも考えられる。

一方、ニジマス由来株でニジマスに強い病原性を持つ

株もいくつか報告されている。<sup>2) 3)</sup> また、ヨーロッパではニジマス仔魚症候群（RTFS）として冷水病が問題になっている<sup>1)</sup> ことから考えて、今後のニジマスの冷水病を検討するためにはニジマス由来強毒株の検索が必要であると考えられる。

ニジマス（3.2g）に強い病原性を示したCS-1株は10gを越えるニジマスでは3.2gの時ほどの病原性を示さなかった。培養菌液を濃縮して接種菌量を増やしても3.2gの時ほどの病原性を示さなかった。ニジマス（3.2g）に微弱な病原性を示したCS-5株は10gを越えるニジマスでは全く斃死をおこすことはできなかった。このことから、冷水病原因菌は魚体重の増加によりその病原性が低下することを示している。その結果は冷水病の自然発病状況と一致する。<sup>1)</sup> また、同様の実験結果もすでに示されている。<sup>3)</sup>

実験4から、腹腔内接種は筋肉内接種に比べて斃死率が低下した。同様の結果はすでに示されている<sup>2)</sup> ことから、感染実験法としては筋肉内接種の方が高斃死率を見込めるものと考えられた。なお、濃縮菌液接種区に斃死がなかった原因は不明であった。また、筋肉内接種の斃死率が実験3に比較して低かった。水温が高いほど斃死率が低下し、斃死魚からの接種菌の再分離率が低下することがすでに報告されている。<sup>4)</sup> 実験4の結果はその報告と一致することから、その原因は水温が実験3に比較して高かったことと考えられた。

ところで、CS-1株は1回の魚体通過で有意に病原性の向上が認められた（3.2gのニジマス）。それに対してCS-5株では1回の魚体通過では全く病原性の向上は認められなかった。このことは、アユ由来株がニジマスで

の魚体通過でも病原性が向上すること、ニジマス由来株がニジマスでの魚体通過では病原性が向上しないということを示している。アユ由来弱毒株では1回の魚体通過で著しい病原性の回復が認められた例があること<sup>5)</sup>と合わせて考えると興味深いものがある。

本実験に用いたCS-1及びCS-5株のアユに対する病原性は既に検討されている。<sup>5)</sup> その結果は、CS-1株では強い病原性を示したが、CS-5株の病原性は微弱であった(筋肉内接種)。その他、アユ由来アユ強毒株のアユ以外の魚種に対する病原性を検討した例として、オイカワへの病原性の検討例がある。<sup>6)</sup> その結果はオイカワにも強い病原性を示している。このことと、本研究の結果を考えあわせると、アユ由来強毒株はニジマスやオイカワ等、由来魚種以外にも強い病原性を保持している可能性がある。また、前述の魚体通過による病原性の変化及び冷水病原菌の血清型は少なくとも4血清型が存在し、うちO-1型はアユ以外からは分離されていない<sup>7)</sup> ことも考えあわせると、わが国の冷水病を考える場合、アユ及びアユ由来株が鍵となる可能性があり、今後の研究の視点として十分に踏まえる必要があるものと思われる。

## 要 約

1. 冷水病原菌のアユ由来株はニジマス(3.2g)に強い病原性を示したが、15g前後のニジマスでは病原性は低下した。
2. 冷水病原菌のニジマス由来株はニジマス(3.2g)への病原性は微弱で、15g前後のニジマスでは全く斃死を引き起こさなかった。
3. 冷水病原菌のアユ由来株はニジマスへの魚体通過で病原性の強化が認められたが、本研究で用いたニジマス由来株ではそのようなことは認められなかった。
4. 感染実験の接種方法の比較では、筋肉内接種の方が腹腔内接種よりも斃死率が高かった。
5. 感染実験の生残魚からは少数ながら、接種菌が再分離された。

今回の研究に際し、ニジマス稚魚を分与して下さった山梨県水産技術センター忍野支所に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 若林久嗣, 1995; 魚類防疫技術書シリーズ-VIII 最近問題となっている魚病(サケ科魚類およびアユ). 14-26.
- 2) 若林久嗣・堀内三津幸・文谷俊雄・星合懸一, 1991; 日本で発生したギンザケ稚魚の冷水病. 魚病研究, 26(4), 211-212.
- 3) Madsen, L. and I. Dalsgaard, 1999; Reproducible methods for experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Diseases of Aquatic Organisms, 36, 169-176.
- 4) Holt, R. A. and A. Amandi, 1989; Relation of water temperature to bacterial cold-water disease in coho salmon, chinook salmon, and rainbow trout. Journal of Aquatic Animal Health, 1, 94-101.
- 5) 岐阜県水産試験場, 1999; 新しい疾病の防疫に関する研究 アユの冷水病および細菌性出血性腹水病(シュードモナス病)に関する研究. 平成10年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 197-208.
- 6) Iida Y. and A. Mizokami, 1996; Outbreaks of cold-water in wild ayu and pale chub. Fish Pathology, 31(3), 157-164.
- 7) Izumi S. and H. Wakabayashi, 1999; Further study on serotyping of *Flavobacterium psychrophilum*. Fish Pathology, 34(2), 89-90.