

蒸留水・淡水・人工海水中の アユ由来エドワジエラ・イクタルリ感染症原因菌の生存性

中居 裕, 武藤義範

Survival of *Edwardsiella ictaluri* from ayu, *Plecoglossus altivelis altivelis*
in distilled water, fresh water, and artificial sea water

YUTAKA NAKAI AND YOSHINORI MUTO

若林 (2004) によると、エドワジエラ・イクタルリ感染症の原因菌である *Edwardsiella ictaluri* は、アメリカナマズ *Ictalurus punctatus* の腸内細菌性敗血症を引き起こすことで知られるが、国内での感染例は報告されていなかった。しかし、アユ *Plecoglossus altivelis altivelis* において、2007 年に東京都、広島県、山口県で初めて感染・発病が確認されたことが Sakai et al. (2008)、Nagai et al. (2008) により報告されている。また、その後、初発を含む河川では、アユを含む複数の魚種で保菌魚が確認され (天社・畑間, 2009, Hassan et al. 2012, 竹内, 2016)、その後、日本各地から *E. ictaluri* が分離されている (鈴木ほか, 2018)。

Plumb and Quinlan (1986) によると、*E. ictaluri* は池水中で 10 日間生存したとしている。また、Hassan et al. (2012) はバクテリオファージを用いて、竹内 (2016) は分子生物学的手法により、河川内の *E. ictaluri* の分布・動態を詳細に検討している。これら報告から、河川水中等では長期間生存する可能性が考えられる。しかし、淡水中での *E. ictaluri* の生存状況についてはこれ以上の知見は見つからない。また、アユ種苗生産施設において孵化後の飼育に用いられる人工海水中の生存性については検討されていない。*E. ictaluri* の淡水および人工海水における生存性については、河川、アユ養殖および種苗生産施設での本菌の生態を考える上での基礎的知見として把握する必要がある。

本研究は、上記の未検討の知見を得る目的で実施した。

キーワード：エドワジエラ・イクタルリ感染症、*Edwardsiella ictaluri*、アユ、河川水、人工海水、生存性、VBNC

材料と方法

E. ictaluri の生存性を、蒸留水、淡水、およびそれぞれを溶媒とした人工海水 (アユ人工種苗生産時の使用濃度) 中について検討した。また、配管等の消毒を目的とした NaCl 溶液中の生存性についても併せて実施した。

供試菌株

EI-2014-01 株 (2014 年に 27.3g のアユ病魚「河川採捕」より分離) を用いた。本菌株は Panangala et al. (2007) が示したプライマーを用いて、PCR で同定した。

溶媒

蒸留水: 全自動蒸留水製造装置 (GSR-200: アドバンテック東洋株式会社製) で作製した。

淡水: 当所下呂支所第 5 井戸用水 (飛騨川の伏流水)

なお、蒸留水・淡水は高圧蒸気滅菌後、供試した。

菌液調製

ハートインフュージョン液体培地 (日水製薬製) で 25°C・24 時間振盪培養 (120rpm の円振盪) し、菌液を 36190g、20 分間の遠心沈殿後、上清を捨て、それと同量の溶媒 (蒸留水及び淡水) に再懸濁したものを供試菌液とした。供試前の菌数は 1.8×10^8 CFU/mL (蒸留水)、

7.5×10⁷CFU/mL (淡水) であった。

NaCl 溶液および人工海水

蒸留水および淡水を用いて、以下の溶液を作製した。

1・2・3・4・5%NaCl 溶液

人工海水

Allen(1914)を基にその 1/7 となるよう調製した。

なお、本処方はアユ人工種苗生産の仔魚期に使用する飼育水とほぼ同じである。

1/7 アレン処方 (1L 中)

NaCl:4.23g MgCl₂:0.383g KCl:0.116g

CaCl₂:0.18g MgSO₄:0.526g NaHCO₃:0.033g

なお、調製後、NaCl 溶液は高圧蒸気滅菌、人工海水は濾過滅菌後、供試した。また、NaCl 溶液と人工海水は、いずれも後述する菌液と混合後の濃度を示した。

菌液と供試水の混合およびその後の培養

蒸留水と淡水については、それぞれ 9mL と菌液 1mL を混合後、15°C に静置した。なお、NaCl 溶液と人工海水については、菌液 1mL と混合後に所定濃度かつ総容量が 10mL となるよう、菌液による希釈を考慮した濃度に調製した。その後、1 週間間隔、4 週後以降は原則として 4 週間間隔でハートインフュージョン寒天培地 (日水製薬製 以下 HIA) に供試水と菌液の混合溶液 0.1mL を接種して、25°C で培養後、菌数測定を行った。検出限界は、1 週目は 10⁵CFU/mL、2 週目は 10²CFU/mL、3 週目以降は 10CFU/mL (3 週目の蒸留水溶媒の 2%NaCl 区のみ 10²CFU/mL) とした。なお、HIA 培養で 3 回連続して検出限界 (10CFU/mL) 未満となった場合、供試菌は死滅したと判断し、その後の実験を行わなかった。

なお、再分離された菌は、Panangalal et al.(2007)が示したプライマーを用いて、適宜 PCR で同定した。

結 果

結果を第 1・2 表に示した。また、溶媒が蒸留水の NaCl 溶液中における生菌数の推移を第 1 図、溶媒が淡水の NaCl 溶液中における生菌数の推移を第 2 図に、蒸留水および淡水中における生菌数の推移を第 3 図に示した。

NaCl 区において、蒸留水溶媒では、1%区を除き、56 日 (8 週) 後までに検出限界以下となり、1%区は 84 日 (12 週) 後検出限界以下となった。淡水溶媒では、1%区を除き、7 日 (1 週) 後までに検出限界以下となったが、1%区は 353 日 (約 50 週) 後に検出限界以下となった。従って、生菌数減少の速度は、2-5%では蒸留水溶媒区よりも淡水溶媒区の方が大きかったが、1%ではその逆となった (第 1・2 図)。

蒸留水溶媒のみでは、接種 7 日 (第 1 週) 後に約 1/10、56

日 (8 週) 後には約 1/10000、353 日 (約 10 週) 後には約 1/20000 に生菌数が減少し、1998 日 (約 285 週) 後には検出限界以下となった。蒸留水溶媒人工海水区は、接種 14 日 (2 週) 後に約 1/100、56 日 (8 週) 後に約 1/1000、353 日 (約 10 週) 後には約 1/100000 に菌数が減少し、1619 日 (約 231 週) 後に検出限界以下となった (第 3 図)。

淡水溶媒のみでは、接種 14 日 (2 週) 後に約 1/10、56 日 (8 週) 後に約 1/700、353 日 (約 10 週) 後には約 1/5000 に生菌数が減少し、1998 日 (約 285 週) 後には検出限界以下となった。淡水溶媒人工海水区は、接種 7 日 (1 週) 後に約 1/30、56 日 (8 週) 後には約 1/500、353 日 (約 10 週) 後には約 1/50000 に菌数が減少し、2566 日 (約 367 週) 後には検出限界以下となった (第 3 図)。

以上のことから、蒸留水溶媒のみと淡水溶媒のみとはほぼ同様の経過を辿った。しかし、蒸留水溶媒人工海水区は、蒸留水溶媒のみよりも早く検出限界以下となったのに対して、淡水溶媒人工海水区は、淡水溶媒のみよりも遅く検出限界以下となった (第 3 図)。

なお、1619 日 (約 231 週) 以降、コロニーの出現まで 1 週間程度かかるようになり、新たなコロニーが出現しなくなるまで 3 週間程度の観察期間が必要となった。

考 察

Plumb and Quinlan(1986)によると、*E. ictaluri* は淡水中では、5°C で 10 日間 (15 日後検出限界以下)、25°C で 7 日間 (10 日後検出限界以下) 生存したとしている。それに対して、本研究では淡水中で 1619 日 (約 231 週) 間生存した (第 2 表)。供試菌株、供試水等の実験条件および培養条件が異なるので、本研究と Plumb and Quinlan(1986)の結果を一概には比較できない。ただし、本研究における設定温度は、アユ養殖における適水温付近である 15°C であることから、少なくともアユ由来株において、常時アユ養殖の適水温が使用可能な養殖場では、通年本菌が飼育水中で生存する可能性があるため、本菌の侵入を阻止する防疫対策が必要と考えられた。

また、Plumb and Quinlan(1986)によると、*E. ictaluri* は養殖池泥中において 25°C で 95 日間、18°C で 30 日間生菌数に大きな変化なく生存したが、5°C では 15 日後に検出限界以下であったことを見ている。この結果から、*E. ictaluri* は泥等の堆積物中では長く活性を維持するが、その中でも 5°C では生存できないと考えられる。しかし、竹内(2016)は、冬季の河川内の水底堆積物から *E. ictaluri* を検出している。その時の平均水温は約 12°C であったことから、本研究の結果と併せて考えると、国内河川において、少なくとも水温が 10°C 以上

第1表 供試水(溶媒:蒸留水)に接種後の生菌数の推移

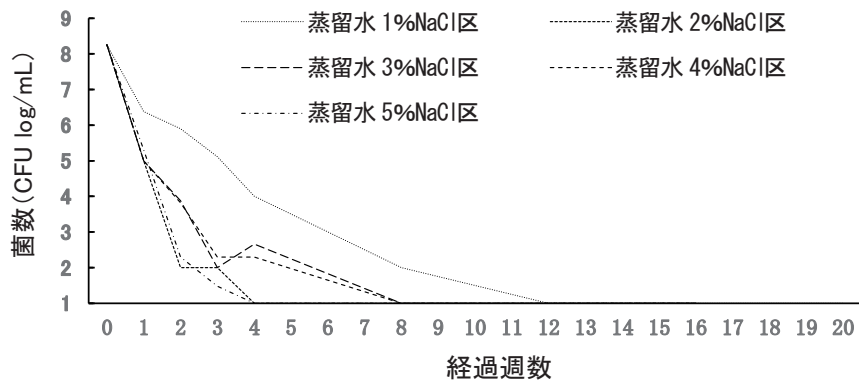
経過日数 (経過週数)	蒸留水(溶媒)						
	生菌数(CFU/mL)						
	蒸留水区	1%NaCl区	2%NaCl区	3%NaCl区	4%NaCl区	5%NaCl区	人工海水区
0(0)	1.8×10^8	1.8×10^8	1.8×10^8	1.8×10^8	1.8×10^8	1.8×10^8	1.8×10^8
7(1)	1.1×10^7	2.4×10^6	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$	2.0×10^5	5.1×10^6
14(2)	7.6×10^6	7.9×10^5	$<10^2$	7.6×10^3	6.6×10^3	2.0×10^2	2.1×10^6
21(3)	7.2×10^5	1.3×10^5	$<10^2$	1.0×10^2	2.0×10^2	3.0×10	1.3×10^6
28(4)	5.0×10^4	1.0×10^4	1.0×10	4.6×10^2	2.0×10^2	<10	2.0×10^4
56(8)	2.3×10^4	$<10^2$	<10	<10	<10	<10	1.4×10^5
84(12)	3.9×10^3	<10	<10	<10	<10	<10	5.2×10^4
112(16)	7.8×10^4	<10	<10	<10	<10	<10	1.3×10^4
140(20)	7.7×10^4	<10	NT	NT	NT	NT	3.9×10^4
169(約24)	7.8×10^4	<10	NT	NT	NT	NT	1.4×10^4
202(約29)	3.0×10^3	NT	NT	NT	NT	NT	1.3×10^4
264(約38)	8.0×10^3	NT	NT	NT	NT	NT	4.0×10^3
353(約50)	1.0×10^4	NT	NT	NT	NT	NT	2.0×10^3
469(67)	1.9×10^4	NT	NT	NT	NT	NT	8.3×10^3
1619(約231)	4.5×10^3	NT	NT	NT	NT	NT	<10
1998(約285)	<10	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2206(約315)	<10	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2566(約367)	<10	NT	NT	NT	NT	NT	NT

NT: 未実施

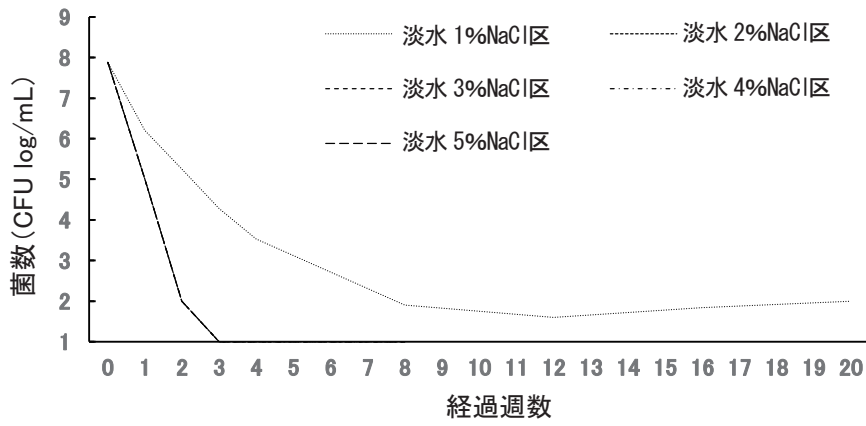
第2表 供試水(溶媒:淡水)に接種後の生菌数の推移

経過日数 (経過週数)	淡水(溶媒)						
	生菌数(CFU/mL)						
	淡水区	1%NaCl区	2%NaCl区	3%NaCl区	4%NaCl区	5%NaCl区	人工海水区
0(0)	7.5×10^7	7.5×10^7	7.5×10^7	7.5×10^7	7.5×10^7	7.5×10^7	7.5×10^7
7(1)	1.6×10^7	1.6×10^6	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$	2.5×10^6
14(2)	8.1×10^6	1.8×10^5	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	1.2×10^6
21(3)	8.3×10^5	1.9×10^4	<10	<10	<10	<10	3.0×10^4
28(4)	1.1×10^6	3.4×10^3	<10	<10	<10	<10	1.9×10^4
56(8)	1.1×10^5	8.0×10	<10	<10	<10	<10	1.5×10^5
84(12)	1.2×10^5	4.0×10	NT	NT	NT	NT	1.7×10^5
112(16)	1.0×10^5	7.0×10	NT	NT	NT	NT	4.0×10^4
140(20)	1.3×10^5	1.0×10^2	NT	NT	NT	NT	4.2×10^4
169(約24)	5.7×10^4	3.0×10	NT	NT	NT	NT	1.6×10^4
202(約29)	1.2×10^4	1.4×10^2	NT	NT	NT	NT	1.4×10^4
264(約38)	3.5×10^4	1.0×10^3	NT	NT	NT	NT	2.1×10^4
353(約50)	1.5×10^4	<10	NT	NT	NT	NT	1.5×10^3
469(67)	1.3×10^4	<10	NT	NT	NT	NT	1.2×10^4
1619(約231)	4.5×10^3	<10	NT	NT	NT	NT	3.1×10^3
1998(約285)	<10	NT	NT	NT	NT	NT	5.9×10^2
2206(約315)	<10	NT	NT	NT	NT	NT	4.8×10^2
2566(約367)	<10	NT	NT	NT	NT	NT	<10

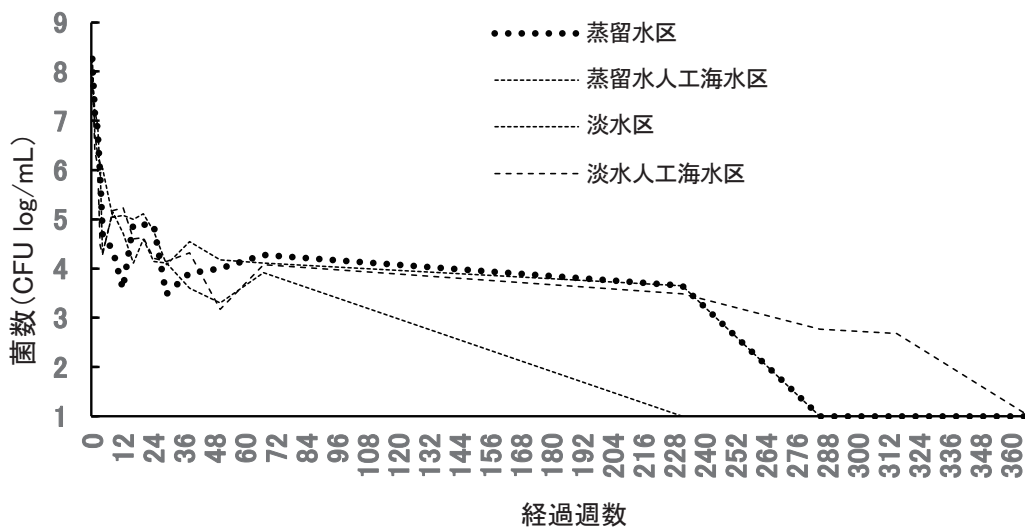
NT: 未実施



第1図 NaCl 溶液（溶媒：蒸留水）に接種後の生菌数の推移



第2図 NaCl 溶液（溶媒：淡水）に接種後の生菌数の推移



第3図 蒸留水・淡水に接種後の生菌数の推移

に保たれている河川においては、河川堆積物中に *E. ictaluri* が生存している可能性が高いと考えられた。

次に、淡水および淡水人工海水中での生存性の挙動については、1619 日(約 231 週)後までは両区とも同程度の生存率であった。しかし、淡水では 1998 日(約 285 週)後に、淡水人工海水中では 2566 日(約 367 週)後には検出限界以下となった(第 2 表・第 3 図)。中居(2009)は、冷水病原菌で同様の観察を行い、淡水人工海水中(242 日)より淡水(970 日)の方が遥かに長く生存していることを見ている。Pacha(1968)は、冷水病原菌は 1%NaCl 濃度で増殖できない株があるとしているのに対して、Nagai et al.(2008)は、アユ由来 *E. ictaluri* は NaCl 濃度 1.5%で増殖することを見ている。以上の背景が、*E. ictaluri* が淡水中よりも淡水人工海水中で長く生存した理由の一つと考えられる。しかし、両区とも、1619 日(約 231 週)後までは同程度の生存率であったことから、アユの種苗生産周期が 1 年であることを考慮すると、アユ種苗生産において、飼育水の相違を問わず *E. ictaluri* が環境水中で生存を続けることを念頭に置いた防疫対策を講ずる必要があるものと考えられた。

淡水を溶媒とした NaCl 溶液中における供試菌の生存性は、1%では 264 日まで生存したのに対し、2-5%では 7 日で検出限界以下となった(第 2 表・第 2 図)。Nagai et al.(2008)は、アユ由来 *E. ictaluri* は NaCl 濃度 1.5%で増殖するが 4.0%では増殖しないことを見ている。このことを踏まえて本研究における NaCl による生存性への影響を見ると、概ね符合していることになる。今回得られた知見は、乾燥が難しい配管中の消毒に利用できるものと考えられた。

次に、溶媒を蒸留水および淡水とした場合の、蒸留水、淡水、人工海水、NaCl 溶液中での生存性の挙動について考える。蒸留水区と淡水区は、ほぼ同じ挙動をたどり、それぞれの溶液中で 1619 日(約 231 週)後まで生存した(第 1 図・第 2 図・第 3 図)。従って、蒸留水および淡水における供試菌の生存性はほとんど変わらないと考えられた。中居(2009)は、冷水病原菌で同様の観察を行い、蒸留水中では 32 日まで生存していたのに対し、淡水中では 970 日後も生存していることを見ている。なお、中居・原(2016)は、淡水中の生存性を継続して観察し、4169 日後も生存していることを確認している(筆者注:その後も観察を継続して、6346 日後も生存を確認している)。このことから、冷水病原菌では、淡水中に含まれる種々の微量成分が生存性に大きく影響するのに対して、*E. ictaluri* は影響を受けないのかもしれない。

人工海水区においては、469 日(67 週)までは、溶媒をとわずほぼ同じ挙動を示した(第 3 図)。しかし、蒸留水が溶媒の場合は 1619 日(約 231 週)後には検出限界以下となったのに

対し、淡水が溶媒では、2206 日(約 315 週)まで生存した。以上のことから、淡水中に混入する微量成分は、生存性において 469 日(67 週)までは影響なく、それ以降で好影響となったことになる。

それらに対して NaCl 溶液中の挙動は興味深い。1%区は溶媒が蒸留水の場合、28 日(4 週)後まで生存したのに対して、溶媒が淡水では 264 日(約 38 週)後まで生存した。しかし、2~5%区では蒸留水溶媒区よりも淡水溶媒区の方が生菌数減少の速度が大きかった。このことから、淡水中に混入する微量成分は、生存性において 1%では好影響、2~5%では悪影響となったことになる。

以上のことから、生存性における淡水の微量成分の影響は、溶液により相違が大きい。しかし、微量成分がほとんどない蒸留水でも、人工海水でも 1 年以上生存することが確認されたことから、種々異なる各河川環境中において、*E. ictaluri* は長期に渡って生存する可能性が高いと考えられる。

細菌が自然環境中、または自然環境を模した実験条件下で、VBNC(viable but nonculturable 生きてはいるが培養できない)細菌細胞になることが知られている(Colwell and Grimes, 2004)。本研究の実験条件下で自然環境を模した項目は飢餓環境であり、その場合、細菌が VBNC に移行する事は多くの研究例がある(Colwell and Grimes, 2004)。また、VBNC 状態となった細菌は栄養改善によりコロニー形成能が回復することが知られている(Roszak et al., 1984)。1619 日(約 231 週)以降、コロニーの出現まで 1 週間程度かかるようになり、新たなコロニーが出現しなくなるまで 3 週間程度の観察期間が必要となったことは、VBNC 状態となった供試菌が寒天培地に触れることによりコロニー形成能を回復するものの、その回復までに時間を要したためと考えられた。

要 約

1. 蒸留水・淡水・人工海水中のアユ由来エドワジエラ・イクタルリ感染症原因菌の生存性を 15℃で調査した。
2. 蒸留水溶媒のみでは、接種 7 日(1 週)後に約 1/10、56 日(8 週)後には約 1/10000、353 日(約 50 週)後には約 1/20000 に生菌数が減少し、1998 日(約 285 週)後には検出限界以下となった。蒸留水溶媒人工海水区は、接種 14 日(2 週)後に約 1/100、56 日(8 週)後に約 1/1000、353 日(約 50 週)後には約 1/100000 に菌数が減少し、1619 日(約 231 週)後に検出限界以下となった。
3. 淡水溶媒のみでは、接種 14 日(2 週)後に約 1/10、56 日(8 週)後に約 1/700、353 日(50 週)後には約 1/5000 に生菌数が減少し、1998 日(約 285 週)後には検出限界以下

下となった。淡水溶媒人工海水区は、接種7日(1週)後に約1/30、56日(8週)後には約1/500、353日(約50週)後には約1/50000に菌数が減少し、2566日(約367週)後には検出限界以下となった。

4. 1~5%NaCl溶液中において、蒸留水溶媒では、1%区を除き、56日(8週)後までに検出限界以下となり、1%区は84日(12週)後検出限界以下となった。淡水溶媒では、1%区を除き、7日(1週)後までに検出限界以下となったが、1%区は353日後(約50週)に検出限界以下となった。
5. 本研究の結果、アユ由来エドワジエラ・イクタルリ感染症原因菌は飢餓状態で、蒸留水、淡水、人工海水中において1年以上の長期にわたり生存することが明らかとなり、養魚環境中および河川環境中でも長期にわたり生存する可能性が示された。また、淡水溶媒でのNaCl溶液中において、2%以上で7日(1週)後までに検出限界以下となったことから、配管等の消毒に利用可能と考えられた。

文 献

- Allen, E. J. 1914. On the Culture of the Plankton Diatom *Thalassiosira gravida* Cleve, in Artificial Sea-water. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 10: 417-439.
- Colwell, R. R. and D. J. Grimes (遠藤圭子訳). 2004. 培養できない微生物たち. 学会出版センター. 東京. 329pp.
- Hassan, E. S., M. M. Mahmoud, Y. Kawato, T. Nagai, O. Kawaguchi, Y. Iida, K. Yuasa and T. Nakai. 2012. Subclinical *Edwardsiella ictaluri* infection of wild ayu *Plecoglossus altivelis*. Fish Pathol., 47: 64-73.
- Nagai, T., E. Iwamoto, T. Sakai, T. Arima, K. Tensha, Y. Iida, T. Iida and T. Nakai. 2008. Characterization of *Edwardsiella ictaluri* isolated from wild ayu *Plecoglossus altivelis* in Japan. Fish Pathol., 43: 158-163.
- 中居 裕. 2009. 蒸留水・淡水・人工海水中的のアユ由来冷水病原菌の生存性. 岐河環研報, 54: 15-17.
- 中居 裕・原 徹. 2016. 淡水中におけるアユ由来冷水病原菌の生存性. 岐阜県水産研究所研究報告, 60: 17-20.
- Pacha, R. E. 1968. Characteristics of *Cytophaga psychrophila*(Borg) isolated during outbreaks of bacterial cold-water disease. Appl. Environ. Microbiol., 16: 97-101.
- Panangala, V. S., C. A. Shoemaker, V. L. van Santen, K. Dybvig and P. H. Klesius. 2007. Multiplex-PCR for simultaneous detection of 3 bacterial fish pathogens, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella ictaluri*, and *Aeromonas hydrophila*. Dis. Aquat. Org., 74: 199-208.
- Plumb, J. A. and E. E. Quinlan. 1986. Survival of *Edwardsiella ictaluri* in pond water and bottom mud. Progressive Fish-Culturist., 48: 212-214.
- Rozzak, D. B., D. J. Grimes and R. R. Colwell. 1984. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. Can. J. Microbiol. 30: 334-338.
- Sakai T, T. Kamaishi, M. Sano, K. Tensha, T. Arima, Y. Iida, T. Nagai, T. Nakai and T. Iida. 2008. Outbreaks of *Edwardsiella ictaluri* infection in ayu *Plecoglossus altivelis* in Japanese rivers. Fish Pathol., 43: 152-157.
- 鈴木究真・泉庄太郎・熊川真二・坂井貴光・中易千早. 2019. 4種のアユ病原細菌を同時に検出するマルチプレックスR法. 日本水産学会誌, 85: 340-342.
- 竹内久登. 2016. 河川におけるアユのエドワジエラ・イクタルリ感染症の疫学的研究. 日本大学学位(博士)論文, 107pp.
- 天社こずえ・畑間俊弘. 2009. 錦川で採集されたアユ及びその他の魚類からのPCRによる *Edwardsiella ictaluri* の検出状況. 山口県水産研究センター研究報告, 7: 77-81.
- 若林久嗣. 2004. 第三章 細菌病 エドワジエラ症 (Edwardsiellosis). 若林久嗣・室賀清邦(編), 江草周三(監修), pp. 186-196. 魚介類の感染症・寄生虫病. 恒星社厚生閣, 東京.