

# アユ冷水病に対する加温処理の治療効果

菅原和宏・江口 充

(環境グループ)

近畿大学大学院農学研究科

冷水病菌 *Flavobacterium psychrophilum*<sup>1)</sup>は、冷水病 Bacterial Cold Water Disease (BCWD)の原因菌として知られており、1948年に北米のギンザケから初めて分離された。<sup>2)</sup>日本では、冷水病菌は1987年にアユから初めて分離され、<sup>3)</sup>冷水病はサケ科魚類よりもむしろアユに深刻な被害を与えており、養殖場や天然水域で発生している。<sup>4,5)</sup>

冷水病の治療には投薬が行われてきた。<sup>6)</sup>スルフィゾールナトリウムは日本において、アユ冷水病の唯一の治療薬として1999年に承認されており、高い治療効果がある。<sup>7)</sup>しかし過度の投薬は、薬剤耐性菌の出現や<sup>8-10)</sup>、魚体や環境への薬の残留<sup>11)</sup>が問題となる。

加温処理は飼育水温を上げてアユの冷水病を治療する方法である。冷水病菌の最適増殖温度は15~20°Cで、25°C以上では増殖しない。<sup>12-16)</sup>加温処理は、この冷水病菌の生理特性を利用している。魚を昇温に順応させるために、23°Cで3日間の加温処理を行い、通常水温で数日間維持した後に、28°Cで3日間の加温処理を行う方法が用いられている。この方法は養殖現場にも普及し、いくつかのアユ養殖業者が実施している。しかし、現在行われている加温処理法は、経験的に試行錯誤を繰り返して開発されたため、治療中や治療後の菌の魚体内や飼育環境での動態は不明である。そこで本研究では、人為的に冷水病に感染させたアユに対して種々の治療を行い、その時の

魚体内および飼育水中の冷水病菌の動態を調べた。

## 材料および方法

**供試菌と培養条件** 冷水病菌 *F. psychrophilum* PH0424株を試験に用いた。-85°Cで凍結保存された冷水病菌を200 mLのMCY液体培地に接種し、15°Cで24時間振とう培養(160 rpm)した。次に6800 mLのMCY液体培地に培養した菌液を全量接種し、15°Cで16時間攪拌培養し、次の攻撃試験に用いた。

**供試アユと攻撃試験** 2007年2月に琵琶湖で採捕され、滋賀県水産試験場のコンクリート池で、地下水を注水して飼育された冷水病感染歴のない琵琶湖産アユ(平均体重4.3 g)を試験に用いた。培養した冷水病菌液( $2.0 \times 10^8$  CFU/mL)を約18°Cの地下水で10倍希釈し、アユを30分間浸漬して冷水病に感染させた。その後700 Lのコンクリート池8面に約280尾ずつ収容した。収容後は地下水を10回転/日になるように注水し、21日間飼育した。給餌は14日後までは無給餌とし、14日後からは市販の配合飼料を毎日魚体重の約1%与えた。

**治療方法** 試験区は投薬区、23°C加温区、28°C加温区および無処理の対照区を設けた。投薬区はスルフィゾールナトリウム(200 mg/kg 魚体重/

日)を市販の配合飼料に混ぜて、感染 1 日後から 5 日間経口投与した。23℃加温区および 28℃加温区は、加温した地下水を注水して飼育水温を上昇させた。感染 1 日後から加温した地下水を注水して、約 5 時間でそれぞれの水温になるように調整し、3 日間維持した。その後、通常水温へ約 5 時間かけて戻した。対照区は感染後に治療を行わなかった。1 試験区当たり 2 池を使用した。

**冷水病菌の計数方法** アユ臓器中の冷水病菌の定量は、培養法で行った。1 池当たりアユ 3 尾をサンプリングした。アユの腎臓、肝臓、脾臓、鰓を無菌的に約 5 mg 摘出し、重量を測定後、300 μL の PBS(-)を加えてホモジナイズした。血液は 20 μL を無菌的に採取し、280 μL の PBS(-)に希釈した。それぞれ PBS(-)で段階希釈し、MCY 平板培地へ 100 μL 接種した。腎臓、肝臓、脾臓および血液サンプルは 15℃で 5 日間培養し、鰓サンプルは 5℃で 14 日間培養し、冷水病菌コロニーを計数した。

飼育水中の冷水病菌の定量は、Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法 (Nagata & Eguchi, 2009) で行った。飼育水 500 mL を毎日採取し、0.22 μm フィルター上に細菌細胞を濾過捕集した。フィルターを滅菌蒸留水でよく洗浄し、遠心分離 (18,750 ×g, 4℃, 20 分) して

上清を捨てた。Capture Column Kit (GENERATION) を用いて沈殿させた細菌細胞から DNA を抽出し、*parE* 領域を標的とした LAMP 法で冷水病菌を定量した。

## 結果

飼育終了時のアユの生残率を図 1 に示した。生残率はそれぞれ 28℃加温区 99.7%、23℃加温区 77.7%、投薬区 93.3%であった。いずれも対照区 (15.7%) と有意な差が認められた ( $\chi^2$  検定、 $P < 0.01$ )。

魚体内の各部位における冷水病菌生菌数の推移を図 2 に示した。対照区の冷水病菌生菌数は感染 2 日後にピークとなり、アユの死亡のピークより早く認められた。最も濃度が高かった脾臓では、冷水病菌生菌数は  $10^8$  CFU/g 近くに達した。その後冷水病菌生菌数は緩やかに減少したが、アユの死亡が終息した感染 14 日後でも、生残したアユから  $10^2 \sim 10^3$  CFU/g の冷水病菌生菌が検出された。投薬区は投薬開始の翌日から冷水病菌生菌数は減少し、投薬 4 日目には鰓を除く 4 部位で一時的に検出限界以下となったが、その後再び検出された。23℃加温区では、加温開始翌日に冷水病菌生菌数は減少したが、その後しばらく横ばい状態で推移した。一方、28℃加温区では加温開始翌日以降はすべての部位で冷水病菌生菌数は検出限界以下となった。

飼育水中における冷水病菌数の変化を図 3 に示した。対照区の飼育水中の冷水病菌数は 3 日後にピークとなり、 $10^3$  cells/mL であった。飼育水中での冷水病菌のピークは魚体内の冷水病菌生菌数のピーク (2 日目) より 1 日遅く認められた。

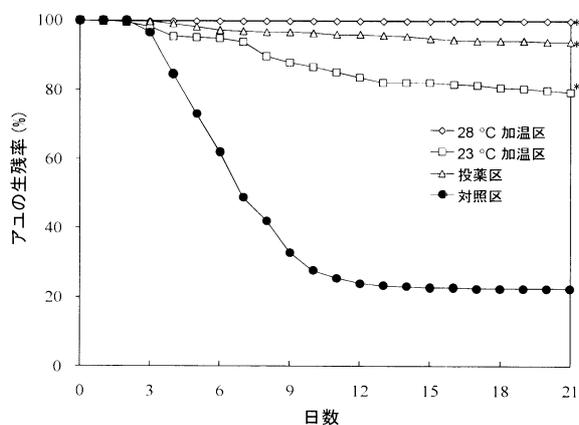


図1 アユの生残率  
\*対照区と比較して有意差あり

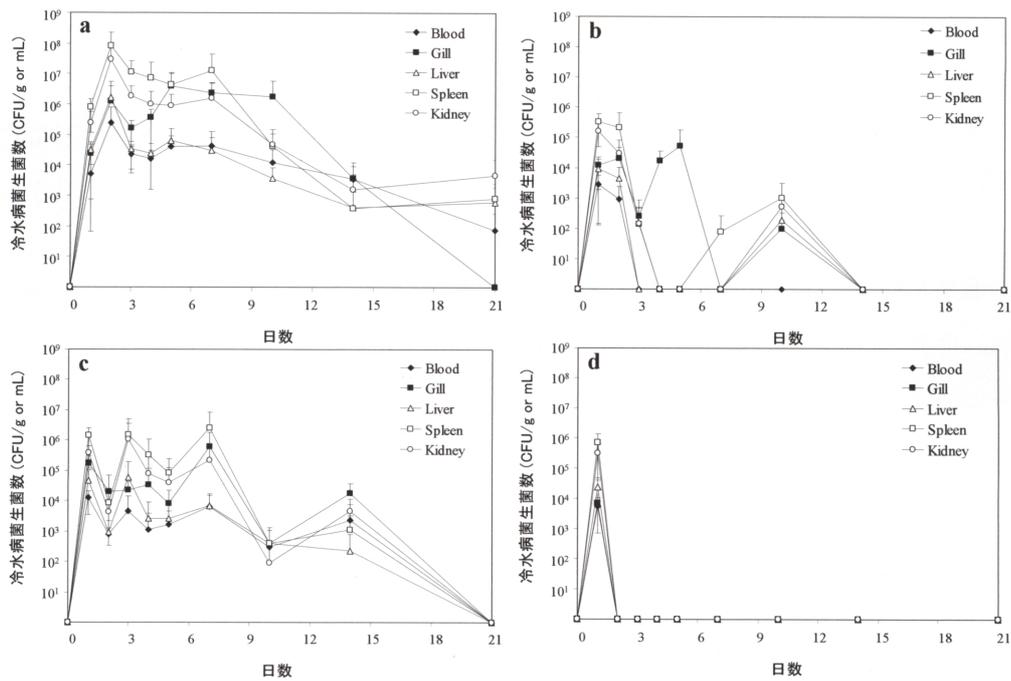


図2 魚体内の冷水病菌生菌数の推移  
(a: 対照区、b: 投薬区、c: 23°C加温区、d: 28°C加温区)

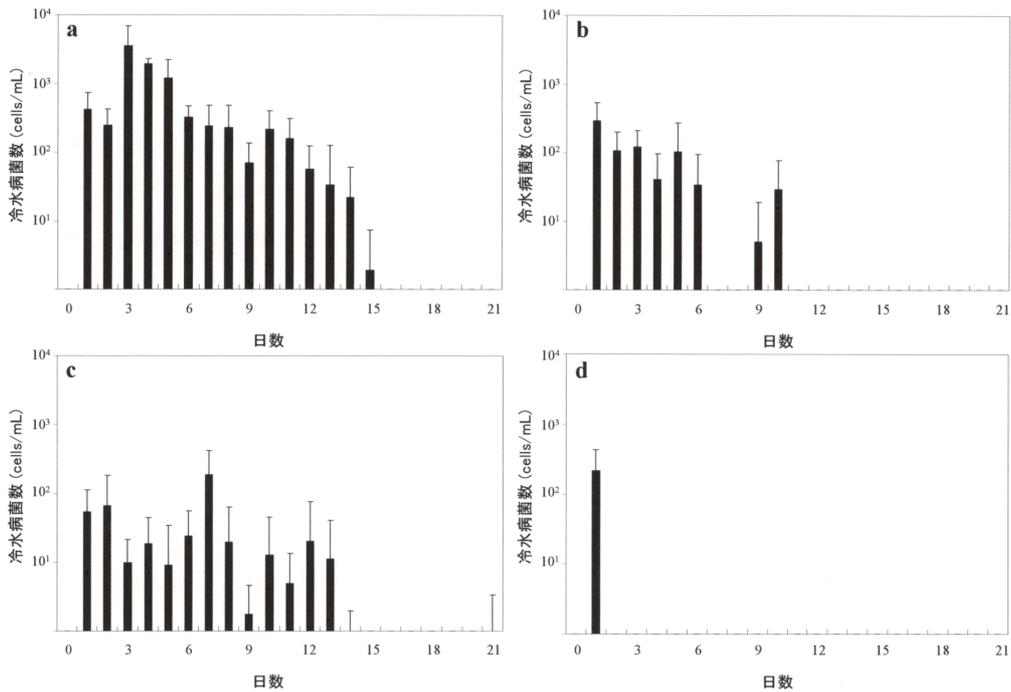


図3 飼育水中の冷水病菌数の推移  
(a: 対照区、b: 投薬区、c: 23°C加温区、d: 28°C加温区)

その後、飼育水中の冷水病菌数は緩やかに減少し、16日目以降は検出されなかった。投薬区は投薬開始翌日から冷水病菌数は減少し、11日目以降は検出されなかった。23°C加温区では、加温

開始後は冷水病菌数は低位で推移するものの、加温終了後10日目までは常に飼育水中から冷水病菌が検出された。一方、28°C加温区では加温開始翌日以降は飼育水から全く冷水病菌が検

出されなかった。

### 考察

人為的に冷水病に感染させたアユに対して投薬を行ったところ、投薬開始翌日には魚体内の冷水病菌の増殖が抑制された(図 2b)。試験期間中に冷水病の再発は認められなかったが、治療後も魚体内や飼育水中から冷水病菌が検出された(図 2b, 3b)。冷水病菌は病原性を保持したまま環境水中で生存することが報告されている。<sup>17)</sup>このことから、投薬で治療したアユは、冷水病の感染源となる可能性がある。

23°Cの加温処理を行った場合、加温開始翌日には魚体内の冷水病菌の増殖が抑制された(図 2c)。冷水病菌のプロテアーゼ産生能は最適増殖温度より低く、13°Cと報告されている。<sup>15)</sup>さらに、飼育水温を上げることによって魚の免疫活性が上がると報告されている。<sup>18)</sup>水温を 23°Cに上昇させると冷水病菌のプロテアーゼ産生能が低下し、それに加えて魚の免疫活性が上昇する。これにより魚体内での冷水病菌の増殖が抑制されたのであろう。しかし、23°Cの加温処理では冷水病が再発する可能性がある。本研究においては 23°Cの加温処理が終了した後も魚体内および飼育水中から冷水病菌が検出された(図 2c, 3c)。加温処理終了 3 日目～9 日目にかけてアユの死亡率が増加し(図 1)、死亡魚には冷水病の症状が認められた。これらのことから 23°Cの加温処理の治療効果は一時的なものであると考えられる。

冷水病感染アユに対する 28°Cで 3 日間の加温処理に高い治療効果が認められた理由は、魚体内および飼育水中の冷水病菌が死滅したためであると考えられる。本研究では、冷水病感染アユ

に対して 28°Cで 3 日間の加温処理を行ったところ、魚体内から冷水病菌が全く検出されず(図 2d)、飼育水中からも冷水病菌 DNA は全く検出されなかった(図 3d)。これは、28°Cで 3 日間の加温処理には冷水病菌の再発を防止する効果もあること、排水を通して冷水病菌が環境中へ流出するのを防止できることを示している。養殖現場において、28°Cで 3 日間の加温処理を施したアユを放流種苗として河川に放流することは、冷水病の蔓延防止の有効な手段になると考えられる。

### 参考文献

- 1) Bernardet J.F., Sergers P., Vancanneyt M., Berthe F., Kersters K. & Vandamme P. (1996) Cutting a Gordian Knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 128-148.
- 2) Borg A.F. (1960) *Studies on Myxobacteria Associated with Diseases in Salmonid Fishes*. American Association for the Advancement of Science, Wildlife Disease No. 8, Washington, DC, pp. 1-85.
- 3) Wakabayashi H., Toyama T. & Iida T. (1994) A study on serotyping of *Cytophaga psychrophila* isolated from fishes in Japan. *Fish Pathology* **29**, 101-104.
- 4) Iida Y. & Mizokami A. (1996) Outbreaks of coldwater disease in wild ayu and pale chub. *Fish Pathology* **31**, 157-164.

- 5) Amita K., Hoshino M., Honma T. & Wakabayashi H. (2000) An investigation on the distribution of *Flavobacterium psychrophilum* in the Umikawa river. *Fish Pathology* **35**, 193-197 (in Japanese, English abstract).
- 6) Nematollahi A., Decostere A., Pasmans F. & Haesebrouck F. (2003) *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases* **26**, 563-574.
- 7) Ninomiya K. & Yamamoto M. (2001) Therapeutic attempt to control of coldwater disease in ayu, *Plecoglossus altivelis* by using Sulfisozole-Na. *Bulletin of Shiga Prefectural Fisheries Experimental Station* **48**, 17-20 (in Japanese, English abstract).
- 8) Rangdale R.E., Richards R.H. & Alderman D.J. (1997) Minimum inhibitory concentrations of selected antimicrobial compounds against *Flavobacterium psychrophilum* the causal agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS). *Aquaculture* **158**, 193-201.
- 9) Bruun M.S., Schmidt A.S., Madsen L. & Dalsgaard I. (2000) Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. *Aquaculture* **187**, 201-212.
- 10) Bruun M.S., Madsen L. & Dalsgaard I. (2003) Efficiency of oxytetracycline treatment in rainbow trout experimentally infected with *Flavobacterium psychrophilum* strains having different in vitro antibiotic susceptibilities. *Aquaculture* **215**, 11-20.
- 11) Cabello F.C. (2006) Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* **8**, 1137-1144.
- 12) Pacha R.E. (1968) Characteristics of *Cytophaga psychrophila* (Borg) isolated during outbreaks of bacterial cold-water disease. *Applied Microbiology* **16**, 97-101.
- 13) Bernardet J.F. & Kerouault B. (1989) Phenotypic and genomic studies of “*Cytophaga psychrophila*” isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in France. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 1796-1800.
- 14) Holt R.A. & Amandi A. (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.
- 15) Uddin M.N. & Wakabayashi H. (1997) Effects of temperature on growth and protease production of *Cytophaga psychrophila*. *Fish Pathology* **32**, 225-226.
- 16) Lee K.B. & Heo G.J. (1998) First isolation and identification of *Cytophaga psychrophila* from cultured ayu in Korea. *Fish Pathology* **33**, 37-38.
- 17) Madetoja J., Nystedt S. & Wiklund T. (2003) Survival and virulence of *Flavobacterium psychrophilum* in water microcosms. *FEMS Microbiology Ecology* **43**, 217-223.
- 18) Bly J.E. & Clem L.W. (1992) Temperature and teleost immune functions. *Fish & Shellfish Immunology* **2**, 159-171.