

## 総説

# サケ科魚類の細菌性冷水病の垂直感染の防除

熊谷 明\*

Prevention of vertical transmission of *Flavobacterium psychrophilum*, the causative agent of bacterial coldwater disease, in salmonid fish

Akira KUMAGAI\*

キーワード：細菌性冷水病, 垂直感染, 防除, サケ科魚類

サケ科魚類の細菌性冷水病は、1940年代から北米の主に太平洋沿岸のサケマスふ化場において、ギンザケやマスノスケ等の稚魚<sup>1)</sup>、1980年以降にはヨーロッパの養殖ニジマスで問題になっている<sup>2)</sup>。日本においては、1990年頃から米国からの輸入卵由来のギンザケ稚魚、1990年代後半からは養魚場のニジマスやイワナ等のサケ科魚類稚魚で冷水病が多発している。

本論では、これまで取り組んできた、(1) 国内でサケ科魚類の冷水病として初めて確認された、輸入卵ギンザケ稚魚での発病事例、(2) 実験的な冷水病菌の垂直感染方法の確立、(3) その他のサケ科魚類における冷水病菌の蔓延と垂直感染の関与の可能性、(4) 卵消毒によるサケ科魚類の冷水病菌の垂直感染の防除法、等について概説する。

### 1 ギンザケ冷水病

国内のギンザケ養殖は、1976年に宮城県志津川湾で開始されて以来、毎年1万t以上が生産されている。これらの養殖用の卵は、国内に天然魚が生息していないため、1993年までは全てを北米からの輸入卵に依存していたが、1990年頃から複数の養魚場のギンザケ稚魚（魚体重0.5～2g）で、これまで国内では見られなかった新しい疾病が発生した。この疾病は、尾柄部や体側のびらん、尾鰭の

欠損を特徴的な症状とするもので、餌付け後の稚魚に大量斃死をもたらした（図1）。宮城県内水面水産試験場と東京大学が共同で原因究明に当たり、体表患部と腎臓から、北米で発見されているものと同じ冷水病菌を分離した。さらに、この分離菌を健康なニジマス稚魚に注射した結果、同様の病徴が再現され、この実験感染魚から接種菌が再分離された。以上の結果から、若林ら<sup>3)</sup>は、本疾病が日本のサケ科魚類では初めて確認された冷水病であり、おそらくギンザケの種卵とともに米国より持ち込まれたものであろうと報告した。その後、Wakabayashiら<sup>4)</sup>やIzumiら<sup>5)</sup>により、国内と米国のギンザケ病魚から分離された冷水病が同一の血清型であること、Izumiら<sup>6)</sup>やKumagaiら<sup>7)</sup>の疫学調査により、ギンザケ冷水病が輸入卵由来であることが確認された。

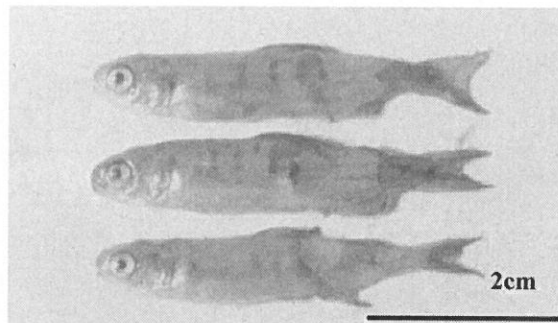


図1 ギンザケ冷水病魚

\*内水面水産試験場

Kumagaiら<sup>7)</sup>は、1995年12月に宮城県内の内水面養魚場に搬入された輸入卵と国産卵の冷水病菌の汚染状況ならびに、それら卵から得た稚魚について冷水病の発生状況を調査した。その結果、一部の輸入卵が冷水病菌陽性を示し、これら由来の稚魚が発症したが、国産卵とその稚魚はいずれも陰性であったことから、ギンザケ冷水病の主な感染源は輸入卵であると報告した。また、卵をヨード剤消毒(50ppm, 15分間)したにもかかわらず発病したことから、冷水病菌に汚染された卵に対してはヨード剤消毒が無効である可能性を報告した。なお、1997年にはBrownら<sup>8)</sup>によって、河川に回帰したスチールヘッドの卵における冷水病菌の卵内感染が報告された。

ギンザケ発眼卵の輸出国であるアメリカのふ化場では冷水病が多発しており、卵のヨード剤消毒が無効な現状では、輸入卵に依存している限り、本病の国内発生は避けられない。これに対し、国産卵からは冷水病菌が検出されず、それらの稚魚においても発病していないことから、国産卵の導入は冷水病の防疫対策上極めて有効である。これらの知見から、国産卵の評価が高まり、宮城県内の種苗生産用ギンザケ卵は、1993年までは全て輸入卵であったが、1995年以降、国産卵の割合が70%に増加した。これに伴って、ギンザケ稚魚における冷水病の被害も減少した<sup>9)</sup>(図2)。なお、この1990年代半ばまでに輸入されたギンザケ卵は全て野生魚から得られたもので、冷水病菌に高頻度に汚染されていた。現在も毎年米国からギンザケ卵が数百万粒輸入されているが、全てが高成長を目的として育種された養成親魚からの卵であり、ここ数年間の卵検査で冷水病菌は陰性で、輸入卵由来の冷水病は発生していない。

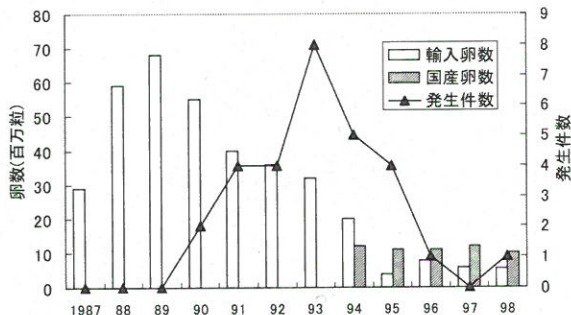


図2 宮城県における輸入卵・国産卵導入数と冷水病発生件数

## 2 冷水病菌の垂直感染(卵内感染)方法の確立と卵消毒の無効性の証明

冷水病に対し卵消毒が無効であるという養殖現場での状況から、菌が消毒剤の届かない卵内に感染している可能性が考えられた。次に、実験的に冷水病菌を卵内感染させることが可能かどうか、さらに、得られた実験感染卵に対するヨード剤消毒の有効性を検討した<sup>10,11)</sup>。

### (1) 菌液吸水法による卵の実験感染

媒精直後のギンザケ受精卵(吸水前)、吸水後の受精卵および発眼卵をそれぞれ $10^8$ ,  $10^6$ ,  $10^4$ CFU/mLの菌液(改変サイトファガ液体培地)に30分間浸漬した後、個別に収容した。1週間毎に10粒ずつサンプリングし、ヨード剤消毒した後、プールした卵全体のホモジネートをAOAE寒天培地<sup>12)</sup>に接種して15°Cで1週間培養する方法により実験感染の成立の有無を検討した。その結果、吸水前の受精卵を $10^8$ CFU/mLの菌液に浸漬した場合に感染が成立し、7日目以降 $10^4 \sim 10^6$ CFU/gの生菌が確認されたが、同じ卵を $10^4$ ,  $10^6$ CFU/mLの菌液に浸漬した場合や、吸水後の卵や発眼卵を $10^8$ CFU/mLの菌液に浸漬した場合には、感染が成立しなかった(表1)。吸水に使用した菌培養液は卵内容物に比べて低張であると考えられ、実際に吸水前の卵をこの菌培養液に30分間浸漬すると、浸漬前より卵表面が硬化し、卵重も増加したことから、菌液で吸水されたと判断された<sup>10)</sup>。

表1 ステージ別の実験感染卵における生菌数の経時変化

卵	感染菌濃度 (CFU/mL)	試験区	感染後の日数			
			7	14	21	28
受精卵 (吸水前)	$1.0 \times 10^8$	I	$1.3 \times 10^{6*1}$	$7.7 \times 10^5$	$1.6 \times 10^4$	$3.2 \times 10^5$
		II	$2.4 \times 10^5$	$8.0 \times 10^2$	$3.3 \times 10^5$	$2.6 \times 10^9$
	$1.0 \times 10^6$	I	—*2	—	—	—
		II	—	—	—	—
	$1.0 \times 10^4$	I	—	—	—	—
		II	—	—	—	—
0	I	—	—	—	—	
0	II	—	—	—	—	
受精卵 (吸水後)	$1.0 \times 10^8$	I	—	—	—	—
	II	—	—	—	—	
0	I	—	—	—	—	
	II	—	—	—	—	
発眼卵	$1.0 \times 10^8$	I	—	—	—	—
	II	—	—	—	—	
0	I	—	—	—	—	
	II	—	—	—	—	

\*1 生菌数(CFU/g)

\*2 非検出。検出限界: $4.0 \times 10^3$ CFU/g

次に、前述の媒精したギンザケ卵を菌液で吸水する方法で作出した陽性卵を材料とし、卵膜と卵内容物に分けて培養する方法ならびに凍結切片標本の蛍光抗体法により、卵内における菌の存在部位を検討した結果、菌の卵内侵入が確認された。以上の結果から、吸水前の卵を冷水菌が高濃度に含まれる低張な培養液に浸漬したことから、吸水が起こり、その過程でこれらの菌が受動的に卵門を經由して侵入することが考えられた<sup>11)</sup>。

## (2) 表面が菌に汚染された未受精卵の実験感染

冷水病菌が成熟期に親魚の体腔液または精液中に存在することは、マスノスケ<sup>1)</sup>、ギンザケ<sup>1)</sup>、ニジマス<sup>13,14)</sup>、タイセイヨウサケ<sup>15)</sup>で報告されていることから、媒精前後の卵表面は冷水病菌で汚染されていることが考えられる。次に、このように表面が冷水病菌に汚染されている卵を通常の方法で受精・吸水した場合、卵内感染が起こる可能性について、実験的に検討した。

実験1として、少量の5段階濃度の菌液(PBSで $10^9 \sim 10^3$  CFU/mLにPBSで調整)とPBS(対照区)をそれぞれ未受精卵に添加する方法により卵表面を冷水病菌で汚染した後、定法により媒精・吸水し、個別に収容した。そして、感染2~3週間後に60粒ずつ正常卵を採取し、卵内の冷水病菌の有無を培養法で確認した。その結果、各菌濃度での陽性率は $10^9$ 区で27%、 $10^8$ 区では12%、 $10^7$ 区で2%であり、菌濃度が高いほど陽性率が高くなること、および、卵表面が $10^7$  CFU/mL以上の菌液で汚染されていると、卵内感染が成立することが明らかとなった(表2A)。また、対照区、 $10^9$ 区、 $10^8$ 区の発眼率は、いずれも90~94%で有意差はなかった<sup>16)</sup>。

実験2として、未成熟の雌親魚15尾にPBSで調整した菌液( $6.5 \times 10^8$  CFU/mL)を5mLずつ腹腔注射する方法で卵表面を汚染した後、成熟時(注射5, 9日後)に体腔液中の冷水病菌数を測定するとともに採卵し、そのまま洗卵せずに、定法により媒精・吸水・収容し、同様の方法で検査した。その結果、得られた合計7ロットの試験区のうち体腔液中の菌濃度が $10^6 \sim 10^8$  CFU/mLの3ロットで卵内感染が成立し、陽性率は1.7~3.3%であった(表2B)<sup>16)</sup>。

以上、実験1と2により、未受精卵の表面が高濃度( $10^6$  CFU/mL以上)に汚染された状態のまま受精すると卵内感染が起こるといふ、卵内感染の1つのメカニズムが明らかとなった。なお、この $10^6$  CFU/mLの菌濃度は、

60粒を調べた場合の感染成立条件であり、10万粒や100万粒を生産する養魚場の現場では、さらに低い菌濃度条件であっても、生産した卵の中に陽性卵が含まれる可能性は十分に考えられる。

表2 卵表面の菌濃度と垂直感染成立の有無

### A 未受精卵表面の菌液汚染による感染

試験区	菌濃度	感染後の検査日数	検体数	陽性検体数	陽性率%
1	$5.0 \times 10^9$	14-21	60	16	26.7
2	$5.0 \times 10^8$	14-21	60	7	11.7
3	$5.0 \times 10^7$	14-21	60	1	1.7
4	$5.0 \times 10^5$	18-21	60	0	0
5	$5.0 \times 10^3$	18-21	60	0	0
Cont	0	23	60	0	0

### B 親魚への菌液注射による感染

親魚注射から受精までの日数 <sup>*1</sup>	Lot	雌親魚数	体腔液の生菌数(CFU/mL)	受精から検査までの日数	検体数	陽性検体数	陽性率%	
5	E1	2	$2.4 \times 10^7 \sim 1.4 \times 10^8$	21-25	60	2	3.3	
	E2	2	$6.6 \times 10^6 \sim 1.1 \times 10^7$	21-25	60	2	3.3	
	E3	2	$1.5 \times 10^5 \sim 4.2 \times 10^6$	21-25	60	0	0	
	E4	2	$1.0 \times 10^4 \sim 2.0 \times 10^4$	21-25	60	0	0	
	C1	2	ND <sup>*2</sup>	21-25	60	0	0	
	C2	2	ND	21-25	60	0	0	
	C3	2	ND	21-25	60	0	0	
	9	E5	1	$1.2 \times 10^8$	21-25	60	1	1.7
		E6	1	$1.5 \times 10^5$	17-20	60	0	0
E7		1	$2.0 \times 10^5$	17-20	60	0	0	
C1		1	ND	21-25	60	0	0	
C2		1	ND	21-25	60	0	0	
C3		1	ND	21-25	60	0	0	

\*1 雌親魚に $6.5 \times 10^8$  CFU/mLの菌液を腹腔注射

\*2 検出限界( $10$  CFU/mL)以下

## (3) 卵内における菌の増殖と卵の生存性

表面を約 $10^8$  CFU/mLの菌液で汚染した卵を受精する方法により得られた、生きた実験感染卵内における冷水病菌の生菌数を経時的に測定した結果、感染1日目には検出限界以下であったが、4日目には約 $10^2$  CFU/粒、8日目には約 $10^3$  CFU/粒、14日目以降には約 $10^6 \sim 10^7$  CFU/粒と経時的に生菌数は増加した(図3)。本実験では、正常に発生している卵の10~30%から冷水病菌が分離され、また、前述のとおり、実験感染区と対照区の発眼率に差がないことから、1粒当たり $10^7$ 程度の冷水病菌の感染は卵の発生に影響を与えないと考えられた。実験感染卵の組織切片を観察した結果、菌は主に困卵腔内に存在している可能性が高いことから<sup>11)</sup>、吸水時に卵門を經由して少数の菌が困卵腔に侵入し、そこで胚に影響を与えずに増殖していると考えられる。IHNの場合は、人為的にウイルスを卵内に感染させると、ウイルスは不活化され胚も全て死ぬことから<sup>17)</sup>、検卵と卵消毒を完璧におこなえば垂直感染を防げると考えられているが、冷水病菌の場合は、菌

が卵内に侵入しても卵は死ぬことがなく、陽性卵が流通している可能性が考えられる。

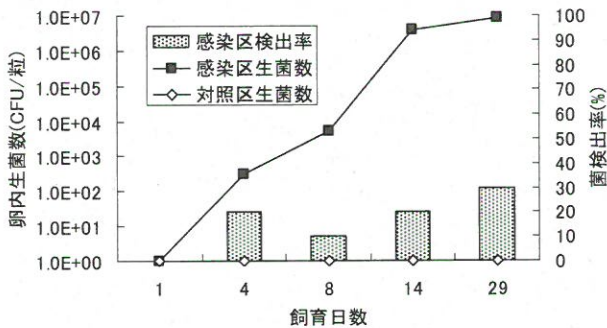


図3 実験感染卵内における冷水病菌の生菌数の経時変化

(4) 実験感染卵における卵消毒の無効性

冷水病菌はin vitroの試験でヨード剤20ppm・1分以上、40ppm・30秒の作用で完全に殺菌されるが<sup>10)</sup>、上記の方法で得られたギンザケ等の実験感染卵を1,000ppm・15分または200ppm・120分作用させても、消毒後の卵から10<sup>4</sup>~10<sup>6</sup>CFU/gの生菌が分離され、ヨード剤の消毒効果は認められなかった<sup>10)</sup>。一般的に養魚場では、防疫対策として50ppm、15分間のヨード剤消毒が励行されているが、卵内に侵入している菌に対してはこの20倍の濃度のヨード剤でも消毒効果がないことが再確認された。

3 ギンザケ以外のサケ科魚類等の冷水病

1990年代後半からは養魚場のニジマスを中心としたサケ科魚類稚魚でも冷水病が多発しており、全国のサケ科魚類の総診断件数においてせつそう病とならび本病の占める割合が多くなっている。また、本病の症例では混合感染が多いことが特徴的で、全体の50~60%を占める<sup>18)</sup>。特にニジマスではIHNとの混合感染が全体の90%を超えており、大型魚の死亡が問題となっている。現在の冷水病の多発に垂直感染が関与しているかどうかを明らかにするために、親魚の保菌状況と卵内感染の有無を調べた。

(1) 冷水病菌の蔓延状況

2006~2007年に宮城県内の民間養魚場等5施設のサケ科魚類5種(ヤマメ, イワナ, ギンザケ, シロサケ, ニジマス), 合計8ロットの親魚875尾から可及的無菌的に体腔

液または精液を採取し、培養法により生菌数を測定した。その結果、8ロットの親魚はいずれも冷水病菌を保菌(陽性率48%)し、A施設のヤマメ, ギンザケ, ニジマス, D河川のシロサケのように陽性率が70%以上のロットも見られた。また、体腔液中の生菌数は平均10<sup>1.1</sup>~10<sup>2.8</sup>CFU/mLとそれほど高くなかったが、A施設のヤマメとギンザケの中には、卵内感染の成立条件である10<sup>6</sup>CFU/mL以上の個体もみられた(表3)。冷水病菌がサケ科魚類の養殖魚ならびにシロサケ回帰親魚に広く分布していることが明らかとなった<sup>16)</sup>。なお、ニジマス等の養殖魚から分離された菌、および1990年頃から現在まで全国的に大きな問題になっているアユ冷水病<sup>4,19,20)</sup>の菌の血清型は一致せず、さらに、輸入ギンザケのものとも異なることが既に報告されており<sup>4,5)</sup>、これらの感染源は不明である。

表3 サケ科魚類親魚の冷水病菌保菌状況

魚種	場所	雌雄	検査個体数	陽性個体数	陽性率(%)	平均生菌数 (log CFU/mL) (最小-最大)
ヤマメ	A	♀	75	54	72.0	2.7 (1-6.9)
		♂	14	9	64.3	1.7 (1-3.0)
イワナ	A	♀	109	22	20.2	1.2 (1-1.6)
		♂	12	0	0	—
ギンザケ	A	♀	40	31	77.5	2.8 (1-7.0)
		♂	131	74	56.5	2.8 (1-4.0)
	B	♀	60	16	26.7	1.6 (1-2.4)
		♂	60	14	23.3	1.3 (1-1.7)
	C	♀	56	25	44.6	1.5 (1-3.0)
		♂	9	1	11.1	2.1
ニジマス	A	♀	76	56	74.0	2.2 (1-5.0)
		♂	23	7	30.0	1.1 (1-1.6)
シロサケ	D	♀	64	48	75.0	1.8 (1-3.2)
		♂	48	41	85.4	1.7 (1-2.9)
	E	♀	63	9	14.3	1.2 (1-1.6)
		♂	35	15	42.9	1.4 (1-2.2)
	合計		875	422	48.2	2.1 (1-7.0)

分離した378株について、Izumi et al.<sup>21)</sup> および吉浦ら<sup>22)</sup>の方法によりPCR-RFLP解析を行い、遺伝子型(RS型およびAB型)を判定した結果、全てBR型かBS型で、両者の割合は魚種によって明確に異なった。BR型はギンザケではAで99%, BとCでは100%, ヤマメで94%, ニジマスで77%と高く、BS型はシロサケで65~100%, イワナで84%と高かった。Aでは同じ飼育水を使用しているにもかかわらず、魚種によって優先する遺伝子型が異なった(図4)。また、D河川のシロサケ調査地点の上流域にBのギンザケ施設が位置し、これらシロサケ親魚はギンザケ施設の排水が流入する河川を遡上してきているにもかかわらず、両者の遺伝子型が異なった。飼育用水や環境水以外の感染源が存在する可能性が示唆された<sup>16)</sup>。

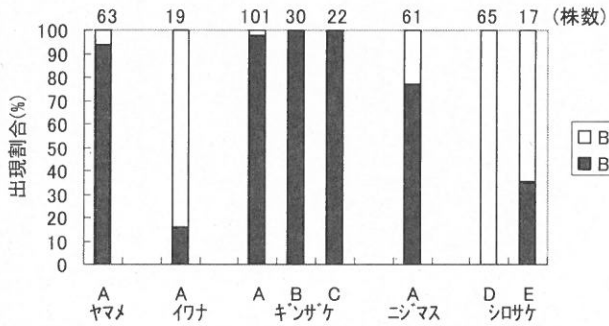


図4 サケ科魚類親魚から分離された冷水病菌の遺伝子型  
アルファベットは施設等の略称  
表3に対応

## (2) 卵内感染の可能性

2006～2007年に宮城県等で生産または導入されたヤマメ卵4検体、サクラマス卵1検体、イワナ2検体、ギンザケ22検体（輸入卵8、北海道卵7、自家生産7）について、卵内から菌分離を試みた。サンプル数は1検体当たり60～100粒、合計2,172粒で、これらの中には前述の陽性親魚からの採卵群合計15検体、900粒を含んでいたが、検査結果は、いずれからも冷水病菌は検出されず、卵内感染を直接的に証明することはできなかった<sup>16)</sup>。現在、これら稚魚における冷水病の発病状況と分離菌株の遺伝子型を調査中である。

## 4 卵消毒によるサケ科魚類の冷水病菌の垂直感染の防除法

体腔液に高濃度の冷水病菌が含まれる親魚から得られた卵の表面は、当然のことながら、冷水病菌に汚染されており、これら卵を消毒することなく受精した場合には、卵内感染が起こる可能性が十分に考えられる。養殖現場において、体腔液由来の卵表面の菌を殺菌するために、媒精前に未受精卵をヨード剤消毒すること、さらに、未受精卵の消毒後に感染する可能性のある精液由来の冷水病菌を消毒するために、ヨード剤で吸水することにより、親魚由来の菌による卵内感染を防除できる可能性が考えられる。このことを明らかにするために、未受精卵のヨード剤消毒と受精卵のヨード剤吸水の安全性を検討し、さらに、実験感染卵における両消毒方法の有効性を検討した。

### (1) ニジマス卵のヨード剤消毒の安全性

ニジマスの未受精卵（約1,500粒/区）をPBSで調整した

ヨード剤（50ppm）で15分間消毒した後、定法により媒精、吸水し、発眼期まで管理し、発眼率を求めた。その結果、消毒区と対照区の発眼率の差はいずれでも1～2%で、有意差はみられず、未受精卵消毒の安全性が確認された<sup>16)</sup>。同じ手法による未受精卵の消毒については、長野県水産試験場がIHN対策として試験を実施し、同様の結果を得ている<sup>23)</sup>。

ニジマス卵（約1,500粒/区）を媒精した後、飼育水で調整した50～400ppmのヨード剤で吸水し、浮上期まで個別に管理し、発眼率、ふ化率、及び浮上時に正常稚魚の割合を調査した。その結果、200ppm以下のヨード剤であれば、ニジマス卵の吸水に使用しても、発眼率、ふ化率、奇形魚等の出現に影響を与えないと判断された<sup>16)</sup>。なお、Evelyn and Lee<sup>24)</sup>は、BKDの垂直感染を防除する目的で、ヨード剤吸水について検討し、250ppm・2時間処理により卵の生残率が低下したことを報告している。

### (2) 卵消毒による垂直感染の防除

人為的に卵表面を約 $10^8$ CFU/mLの冷水病菌で汚染したヤマメ未受精卵を対象に、媒精前にヨード剤消毒および媒精後にヨード剤吸水をそれぞれ行い、垂直感染が防除できるかどうかを検討した。その結果、実験感染後に、未受精卵の時点でのヨード剤消毒や受精後のヨード剤吸水を実施しなかった試験区の陽性率は20%であった。一方、未受精卵の時点でヨード剤消毒し、ヨード剤吸水を実施しなかった試験区、および未受精卵の時点でヨード剤消毒し、さらに50、100、150、200ppmのヨード剤で吸水した試験区では、全く感染が確認されなかった。発眼率は、いずれの試験区でも60～70%で、有意差はなかった。以上の結果から、受精前の時点でのヨード剤消毒および受精後のヨード剤吸水により、安全に卵内感染を防除することが可能であると判断された（表4）。毎年、稚魚期に冷水病が発生し、原因として垂直感染が疑われる養魚場では、本法により冷水病を防除できると考えられる。

## 5 おわりに

ギンザケ輸入卵に伴って冷水病菌が侵入したように、これまで多くの疾病の病原体が輸入種苗とともに国内に持ち込まれた。現在の輸入防疫制度の基となる水産資源保護法の対象疾病は、OIEへの届け出疾病に指定されて

いる世界的に認知された重大な疾病であり、ある程度研究が進み、診断方法等も確立されたものである。養殖および天然の魚介類はそれら以外にも多くの既知や未知の病原体を保菌していることは言うまでもない。これまでに輸入種苗に伴って国内に侵入した病原体の中には、垂直感染するため卵消毒が無効であったもの<sup>8,25)</sup>や、養殖サイクルの違い<sup>26)</sup>や宿主転換<sup>27)</sup>により輸出国では影響の少ない病原体が日本に入ると甚大な被害を及ぼしたもの等も報告されている<sup>28)</sup>。病原体が垂直感染するか否かについては、その疾病に関する疫学研究が進展した時点で初めて解明されるため、時間がかかる。また、養殖サイクルの違いや宿主転換により、輸出先で被害が拡大することを予想することは不可能に近い。したがって、現在得られている魚介類病原体に関する知見のみを基にして、新しい病原体が国内に侵入した場合のリスクを分析することは極めて困難である。魚介類の種苗の輸入についてはくれぐれも慎重に行うべきである。

表4 ヨード剤消毒による冷水病菌の垂直感染防除試験結果

試験区	感染の有無	未受精卵消毒の有無	吸水に使用したヨード剤濃度(ppm)	感染後の検査日数	検体数	陽性検体数	陽性率%	発眼率%
1	+	+	200	32	60	0	0	62
2	+	+	150	32	60	0	0	60
3	+	+	100	32	60	0	0	70
4	+	+	50	32	60	0	0	64
5	+	+	0	34	60	0	0	63
6 (感染未消毒区)	+	-	-	34	60	12	20	65
7 (未感染区)	-	-	-	34	60	0	0	63

\*1  $6.7 \times 10^8$  CFU/mLで攻撃

## 要 約

これまで取り組んできた、(1) 国内でサケ科魚類の冷水病として初めて確認された、輸入卵ギンザケ稚魚での発病事例、(2) 実験的な冷水病菌の垂直感染方法の確立、(3) その他のサケ科魚類における冷水病菌の蔓延と垂直感染の関与の可能性、(4) 卵消毒によるサケ科魚類の冷水病菌の垂直感染の防除法、等について概説した。

1) 1995年の宮城県内の内水面養魚場の疫学調査で、一部の輸入卵が冷水病菌陽性を示し、卵をヨード剤消毒したにもかかわらず、これら由来の稚魚が発病した。一

方、国産卵とその稚魚はいずれも陰性であった。ギンザケ冷水病の主な感染源は輸入卵であり、冷水病菌に汚染された輸入卵に対しヨード剤消毒が無効である可能性が考えられた。現在宮城県では国産卵が普及し、本病の被害が大きく減少した。

- 2) 実験感染における冷水病菌の卵内への侵入条件を検討した結果、未吸水の受精卵を $10^7 \sim 10^8$  CFU/mLの菌液で吸水する方法、および、あらかじめ $10^6 \sim 10^7$  CFU/mL以上の菌濃度で人為的に表面を汚染した未受精卵を定法により受精・吸水する方法により、卵内感染が成立した。卵表面に存在した菌が吸水時に卵門経路で卵内に侵入すると考えられる。実験感染後、卵内の菌濃度は経時的に増加したが、発眼率は低下しなかったことから、このルートを通じて卵内に侵入した菌は胚の発生に影響を与えず、稚魚期の発病原因になると判断された。
- 3) 冷水病菌は*in vitro*ではヨード剤20ppm・1分以上の作用で殺菌されるが、実験感染卵は1,000ppm・15分作用させても、消毒効果は認められなかった。
- 4) 2006～2007年に宮城県内の5養魚場の親魚や発眼卵における冷水病菌の汚染状況を調査した結果、サケ科魚類5種、合計8ロットの親魚はいずれも冷水病菌を保菌(検出率48%)し、体腔液中の生菌数が $10^7$  CFU/mL以上の個体もみられた。分離した378株の遺伝子型はBR型かBS型で、両者の割合は魚種によって明確に異なった。4種の発眼卵約2,200粒の卵内からは冷水病菌は分離されなかった。
- 5) 人為的に卵表面を冷水病菌で汚染したヤマメ未受精卵を、PBSで調整したヨード剤(50ppm)で受精前に消毒する方法および受精卵をヨード剤で吸水(50～200ppm)する方法により卵内感染を防除することが可能であった。

## 謝 辞

養魚場での疫学調査の実施にあたり、宮城県内の内水面養殖業者の方々に多大な御協力をいただいた。ここに厚く御礼申し上げます。また、本研究推進に御協力いただいた内水面水産試験場職員に感謝申し上げます。本研究は(社)日本水産資源保護協会の魚病対策技術開発研

究委託事業「ギンザケ冷水病の防疫に関する研究（平成6～8年度）」および養殖衛生管理技術開発研究委託事業「サケ科魚類冷水病の垂直感染防除に関する研究（平成18～19年度）」により実施した。記して謝意を表します。

### 参考文献

- 1) Holt RA, Rohovec JS, Fryer JL. (1993) Bacterial cold-water disease. In: Inglis V, Roberts RJ, Bromage NR (eds) Bacterial diseases of fish, Blackwell Scientific Publications, Oxford; 3-23.
- 2) Bernardet JF, Kerouault B. (1989) Phenotypic and genomic studies of '*Cytophaga psychrophila*' isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in France. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1796-1800.
- 3) 若林久嗣, 堀内三津幸, 文谷俊雄, 星合愿一 (1991) 日本で発生したギンザケ稚魚の冷水病. *魚病研究*, **26**, 211-212.
- 4) Wakabayashi H, Toyama T, Iida T. (1994) A study on serotyping of *Cytophaga psychrophila*' isolated from fishes in Japan. *Fish Pathol.*, **29**, 101-104.
- 5) Izumi S, Wakabayashi H. (1999) Further study on serotyping of *Flavobacterium psychrophilum*. *Fish Pathol.*, **34**, 89-90.
- 6) Izumi S, Wakabayashi H. (1997) Use of PCR to detected *Cytophaga psychrophila*' from apparently healthy juvenile ayu and coho salmon. *Fish Pathol.*, **32**, 169-173.
- 7) Kumagai A, Takahashi K. (1997) Imported eggs responsible for the outbreaks of cold-water disease among cultured coho salmon in Japan. *Fish Pathol.*, **32**, 231-232.
- 8) Brown LL, Cox WT, Levine RP. (1997) Evidence that the causal agent of bacterial cold-water disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted within salmonid eggs. *Dis. Aquat. Org.*, **29**, 213-218.
- 9) Kumagai, A. (2001) Cold-water disease of coho salmon in Japan. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult. Suppl.*, **5**, 45-48.
- 10) Kumagai A, Takahashi K, Yamaoka S, Wakabayashi H. (1998) Ineffectiveness of iodophore treatment in disinfecting salmonid eggs carrying *Cytophaga psychrophila*. *Fish Pathol.*, **33**, 123-128.
- 11) Kumagai A, Yamaoka S, Takahashi K, Fukuda H, Wakabayashi H. (2000) Waterborne transmission of *Flavobacterium psychrophilum* in coho salmon eggs. *Fish Pathol.* **35**, 25-28.
- 12) Lorenzen E, Karas N. (1992) Detection of *Flexibacter psychrophilus* by immunofluorescence in fish suffered from fry mortality syndrome: a rapid diagnostic method. *Dis. Aquat. Org.* **13**, 231-234.
- 13) Rangdale RE, Richards RE, Alderman DJ. (1996) Isolation of *Cytophaga psychrophila*, agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS) from reproductive fluids and egg surfaces of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **16**, 63-67.
- 14) Madetoja J, Dalsgaard I, Wiklund T. (2002) Occurrence of *Flavobacterium psychrophilum* in fish-farming environments. *Dis. Aquat. Org.*, **52**, 109-118.
- 15) Ekman E, Borjeson H, Johansson N. (1999) *Flavobacterium psychrophilum* in Baltic salmon *salmo salar* brood fish and the offspring. *Dis. Aquat. Org.* , **37**, 159-163.
- 16) 熊谷 明・縄田 暁 (2007) サケ科魚類冷水病の垂直感染防除に関する研究. 平成18年度養殖衛生管理技術開発研究報告書
- 17) Yoshimizu, M., M. Sami, T. Kimura (1989) Survivability of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in fertilized eggs of masu (*Oncorhynchus masou*) and chum salmon (*O. keta*) . *J. Aquat. Anim. Health*, **1**, 13- 20
- 18) 青島秀治 (2007) 水産試験場等の診断記録からみた我が国における養殖サケ科魚類の疾病問題 (1978～2002年) 魚病

- 研究, **42**, 119-122.
- 19) Iida Y, Mizokami A. (1996) Outbreaks of coldwater disease in wild ayu and pale chub. *Fish Pathol.*, **31**, 157-164.
  - 20) 井上 潔 (2000) アユの冷水病. 海洋と生物, 126, 35-38.
  - 21) Izumi S, Aranishi F, Wakabayashi H. (2003) Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. *Dis. Aquat. Org.*, **56**, 207-214.
  - 22) 吉浦康寿・釜石 隆・中易千早・乙竹 充 (2006) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C遺伝子を標的としたPCRによる *Flavobacterium psychrophilum* の判別と遺伝子型. 魚病研究2006, **41**: 67-71.
  - 23) 長野県 (1975) 指定調査研究総合助成事業「病害研究」報告書21-22.
  - 24) Evelyn TPT, Prosperi-Porta L, Ketcheson JE. (1986) Persistence of the kidney-disease bacterium, *Renibacterium salmoninarum* in coho salmon, *Oncorhynchus kisuth* (Walbaum), eggs treated during and after water-hardening with povidone-iodine. *J. Fish Dis.* **9**: 461-464.
  - 25) Evelyn TPT, Ketcheson JE, Prosperi-Porta L. (1984) Further evidence for the presence of *Renibacterium salmoninarum* in salmonid eggs and for the failure of povidone-iodine to reduce the intra-ovum infection rate in water-hardened eggs. *J. Fish Dis.*, **7**, 173-182.
  - 26) 高橋清孝 (1992) 養殖ギンザケの赤血球封入体症候群 (EIBS) に関する研究. 博士論文, 東京水産大学, 東京.
  - 27) 堤 伸幸, 良永知義, 小川和夫 (2004) ヒラメの *Neoheterobothrium hirame* の由来. 平成16年度日本魚病学会大会講演要旨, 67.
  - 28) 熊谷 明 (2005) ギンザケの冷水病, 日水誌, **71**, 645-649.