

養殖アマゴに発生した冷水病

魚住香織^{*1}・川村芳浩^{*2}・安信秀樹^{*1}

(1996年4月23日受付)

Cold-Water Disease Infection in Cultured Amago Salmon *Oncorhynchus rhodurus*

Kaori FURUTSUKA-UOZUMI^{*1}, Yoshihiro KAWAMURA^{*2}, and Hideki YASUNOBU^{*1}

In October 1993, an epizootic infection occurred in amago salmon *Oncorhynchus rhodurus* at a local private fish farm in Hyogo Prefecture. A large number of long rods were found in the liver, kidney, and brain of diseased fish. So we tried to isolate bacteria from the diseased fish. Bacteria were isolated from the liver and identified as *Cytophaga psychrophila* which causes cold-water disease. Thirty % mortality was observed by subdermal injection. Details of the epizootiological features are reported.

冷水病は国内未侵入魚病と考えられていたが、1990年に岩手県および宮城県の孵化養殖場のギンザケ稚魚で発症が確認された。¹⁾その後アユ、ニジマス、およびヤマメにも発生が見られ、被害は全国的に拡大している。²⁾

治療については、アユにおいてスルフィゾールで、³⁾ニジマスではオキシリン酸、塩酸オキシテトラサイクリンで効果が認められたと報告されている。⁴⁾投薬以外の治療方法として、アユおよびギンザケでは加温による治療も検討されている。⁵⁻⁷⁾また、サケ科魚類についてはホルマリン死菌を用いてワクチンの効果があったという報告もある。⁸⁾

兵庫県では、1993年10月に県内の1養魚場のアマゴ(1年魚)に大量斃死を伴う疾病が発生し、その病魚から冷水病の原因菌である *Cytophaga psychrophila* が分離され、アマゴの冷水病を確認した。これまで、ギンザケ、アユ、ニジマス、およびヤマメにおける冷水病の発症例はあるが、アマゴでの発症を記載した報告はない。そこで、本報ではその発生状況、分離菌の性状、温度耐性、および病原性について報告する。

材料と方法

細菌の分離と性状試験 養魚場内で瀕死状態あるいは死亡直後のアマゴを持ち帰り、肝臓、腎臓、および脳の塗抹標本をグラム染色すると同時に、その各部位よりトリプトソーヤ寒天培地と改変サイトファガ寒天培地(トリプトン2g、酵母エキス0.5g、肉エキス0.2g、酢酸ナトリウム0.2g、塩化カルシウム0.2g、寒天10~15g、蒸留水1,000ml)の2種類を用い、25℃および15℃の培養温度で細菌の分離を試みた。なお、ウィルスの関与を確認するために、常法により検体の腎臓および肝臓の磨砕液を0.45μmのフィルターで濾過し、その濾液を10倍に希釈したものをRTG-2細胞に接種した。

検体の肝臓から分離された菌株AL9301と *C. psychrophila* の標準菌株であるNCIMB1947を性状試験に供した。菌の培養は15℃で行い、フレキシルビン型色素、コンゴレッド吸着、チトクロームオキシダーゼ、カタラーゼ産生、インドール産生、硫化水素産生、カゼイン加水分解、チロシン加水分解、スターチ加水分解、エスクリン加水分解、およびTween80加水分解試験については若林ら¹⁾と同様の方法で実施し、その他の性状試験は、改変サイトファガ培地を基礎培地にして実施した。

*1 兵庫県立水産試験場 (Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station, Minami-Futami, Akashi 674)

*2 兵庫県立水産試験場 内水面漁業センタ (Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station Inland Fisheries Department, Toji, Asago 679-34)

また、抗 *C. psychrophila* 家兔血清（ギンザケ由来菌株 FPC 828, 東京大学農学部若林教授より分与）を用い、常法によりスライド凝集反応を試みた。

温度耐性試験 分離菌株の最適増殖温度を調べるため、液体培地を用いて温度耐性試験を実施した。改変サイトファガ液体培地 9 ml に、 1.7×10^5 CFU/ml の濃度になるよう菌液を接種し、4, 10, 15, 20, 25, および 30°C の温度で培養し、経時的に 600nm の波長における吸光度を測定した。

病原性試験 アマゴ 1 年魚（平均魚体重 43.0 g）を用いて、分離菌株 AL9301 の病原性試験を行った。接種菌濃度は 1.7×10^5 , 10^6 , および 10^7 CFU/尾 とし、0.1 ml の菌液をそれぞれ 10 尾の尾柄部に皮下注射により接種した。対照区として、滅菌 PBS 0.1 ml を 10 尾に同様の方法で接種した。水温は 10~13°C で、換水率は 24 回/日、2 日おきに魚体重の約 1% の配合餌料を給餌し、死亡状況を観察した。

結果

被害状況 1993年10月に本県中部の民間養魚場のアマゴ 1 年魚（全長 174~205mm, 体重 48.4~81.9g）に大量斃死を伴う疾病が発生した。この養魚場では飼育水に河川水を用いており、疾病発症時の水温は 10°C, 換水率は 24 回/日で、直径 8 m, 深さ 0.5 m の円形コンクリート水槽に約 7000 尾を放養していた。また餌料として市販配合餌料を給餌していた。

種苗は 1992 年 10 月に他県から発眼卵で購入し、孵化後は特に異常もなく、1993 年の 9 月まで順調に成長していた。9 月中旬に池替えを実施したところ、9 月下旬から排水口付近に集まっている体色黒化の著しい個体が斃死し始め、10 月上旬に斃死数が急増した。日間斃死率は 9 月下旬に 0.07% であったが徐々に増加し、10 月上旬には 1.43%（最高値）まで上昇した。その後、斃死数は減少傾向にあったが終息しなかったため、10 月下旬に全個体を取り上げ、水槽の消毒を行った。9 月下旬から 10 月下旬までの累積斃死率は約 35% に至った。

Table 1. Characteristics of *Cytophaga psychrophila* isolated from diseased amago salmon *Oncorhynchus rhodurus*

Character	AL9301*1	NCIMB1947*2	Character	L9301	CIMB1947
Gram stain	-	-	Flexirubin type pigment	+	+
Motility	+	+	Congo red absorption	-	-
Form	Long rod	Long rod	Growth in Trypticase soy broth	-	-
Cytochrome oxidase	+	+	Trybutirin	+	+
Catalase production	+	+	Chitin hydrolysis	-	-
Indole production	-	-	Agar hydrolysis	-	-
Nitrate reduction	-	-	β -galactosidase	-	-
MR test	-	-	Decomposition:		
VP test	+	+	L-arabinose	-	-
H ₂ S production	-	-	D-xylose	-	-
Simmons citrate	-	-	L-rhamnose	-	-
Gelatin liquefaction	+	+	Dextrose	-	-
Casein hydrolysis	+	+	D-galactose	-	-
Tyrosine hydrolysis	+	+	succharose	-	-
Pigment on tyrosine agar	-	-	lactose	-	-
Tween 80 hydrolysis	+	+	dextrin	-	-
Decarboxylation :			starch	-	-
Arginine	+	+	mannitol	-	-
Lysine	-	-	esculin	-	-
Ornithine	-	-	inositol	-	-
Growth at			NaCl tolerance		
4 °C	+	+	0%	+	+
15 °C	+	+	1	+	-
20 °C	+	+(W)*3	1.5	-	-
25 °C	-	-	2	-	-

*1 Present strain: *2 Type strain: *3 Weakly positive.

細菌の分離と性状試験 外観症状は、脱鱗、体色黒化が顕著で、胸鰭基部の出血、腹部の点状出血が見られるものもあった。またほとんどの個体の鰓は退色していた。解剖したところ、全ての個体において肝臓の退色が顕著であったが、その他の臓器については、一部の個体で腎臓に若干の退色が認められた程度であった。

細菌検査では全個体の肝臓、腎臓および脳に多数のグラム陰性長桿菌を確認した。25℃の培養温度では、いずれの培地および部位からも細菌は分離できなかった。15℃でサイトファガ寒天培地を用いた場合に、肝臓から黄色のコロニーが分離されたが、その他の部位からは分離されなかった。

性状試験の結果をTable 1 に示した。分離菌株AL9301

はグラム陰性長桿菌で、フレキシリビン型色素陽性、チトクロームオキシダーゼ陽性、カタラーゼを産生した。炭水化物は利用できず、蛋白質および脂質を利用している傾向が見られた。NCIMB1947の性状と比較すると、塩分耐性以外が全て一致したことより、分離菌は*C. psychrophila*と同定された。また、スライド凝集反応の結果は陽性を示した。

ウィルス検査の結果、RTG-2細胞にCPE（細胞の球形化）が確認された。

温度耐性試験 温度別の増殖曲線をFig. 1 に示した。本菌は4～25℃の範囲で発育が認められ、15℃で最も増殖し、30℃では発育しなかった。

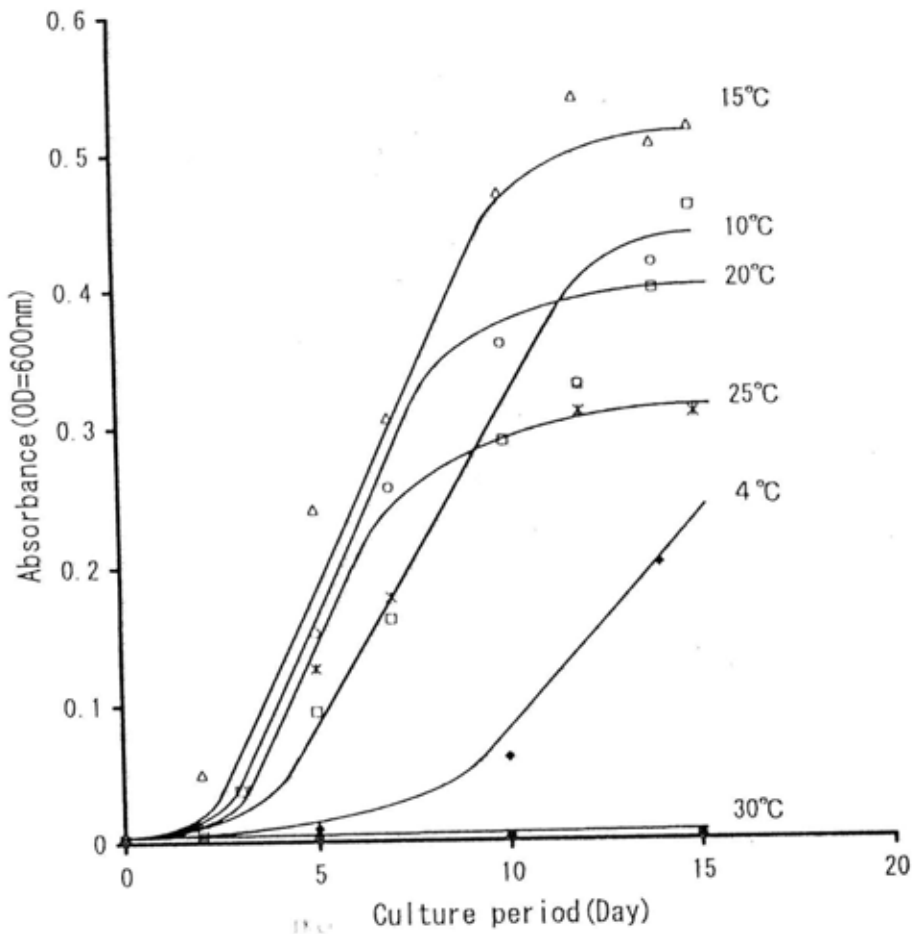


Fig. 1. Growth curve of *Cytophaga psychrophila* at different temperatures.

病原性試験 10^5 , 10^6 CFU/尾, および対照区において死亡はなかったが, 10^7 CFU/尾攻撃区において接種後7~10日の間に3尾が死亡した。7日目に死亡した2尾については体色の黒化, 鰓および肝臓の退色が顕著で自然発症時の症状と同様であった。10日目に死亡した個体ではそれらと異なった症状を示し, 菌を接種した部位に潰瘍が形成されたが, 鰓および肝臓に退色は見られなかった。しかし, 全ての斃死魚の肝臓および腎臓から接種菌が純粋培養状に再分離された。なお, 3尾中2尾からは脳から, 3尾からは鰓からも分離された。このため, 10日目までの死亡は接種菌によるものと考えられ, AL9301の病原性が確認された。

接種後11日目以降に死亡はなく, 接種後40日目に対照区を含めた4試験区から無作為にそれぞれ2尾ずつ抽出し, 脳, 肝臓, 腎臓, 鰓, および体表から *C. psychrophila* の分離を試みたが, 分離されなかった。

考察

一連の試験結果より, アマゴの冷水病が初めて確認された。

冷水病罹病魚の症状は, 魚種を問わず鰓および肝臓の退色が共通しているが, 外観症状は, 魚種により異なっている。ギンザケ稚魚では尾柄部の脱鱗, びらん, および尾鰭の欠損等であるが,¹⁾ 稚アユでは体表の白濁, 脂鱗から尾柄部のびらんや潰瘍等である。²⁾ ニジマスでは特徴的な外観症状はなく, 体色の黒化, 一部の個体で眼球突出, 腹部膨満が確認され, IHNVウィルス罹病魚と似た症状である。⁴⁾ アマゴの場合は, その後の発症事例で確認した異なる成長段階の病魚(0.32~158.22g)でも, 外観症状には脱鱗, 体色の黒化以外に特徴がなく, ニジマスの症例に近いと考えられる。

C. psychrophila の性状を, アマゴ由来菌株と, ギンザケおよびニジマス由来の菌株と比較すると,¹⁰⁾ 塩分耐性の結果を除き全て一致した。アマゴ由来菌株では1%の塩化ナトリウム添加培地で菌の発育を確認したが, 他では陰性であった。本菌だけが塩分耐性が高いのか, アマゴ由来菌株すべてに共通しているのかは今後検討する必要があると考えられる。

今までにギンザケ, アユ, およびニジマスから分離された *C. psychrophila* の菌株は共通抗原をもち, 血清学的に2タイプあることが報告されているが,¹¹⁾ 今回分離した菌株の血清型については検討しなかった。

過去に行われた *C. psychrophila* の病原性試験の結果は, 3~10gのギンザケを用いた場合, 水温10℃で 10^{6-7} CFU/尾の尾柄部注射により45~100%が死亡し,^{1, 7)} 1~4gの稚アユについては水温10℃で 10^6 CFU/尾の背筋部注射により100%死亡している。⁹⁾ それらと比較すると, 今回実施した感染試験の結果は, 10^7 CFU/尾で死亡率が30%と低い値であったが, 本菌はアマゴに対し病原性を示すことが確認された。既報に比べ死亡率が低かった原因として, 供試魚のサイズが大型であったこと, 水温が10℃一定でなかったこと, 本菌の40gサイズのアマゴに対する病原性が低かったことが考えられる。

ウィルス検査の結果より, 今回の死亡原因にはウィルスも関与していることを確認した。しかし, 検体の磨砕希釈液をRTG-2細胞に接種後, 8日目に確認したCPEの程度より, ウィルス力価は低かったと考えている。

以上の結果より, 今回発生した疾病は, 冷水病とウィルス病の合併による相乗効果のため, 死亡率が高くなったと考えられた。

1993年以降, 兵庫県内で確認したアマゴの冷水病の発生は, 春と秋の2シーズンに集中している。水温9~17℃の4~6月には, 年度内の冷水病発生件数の55~75%を占め, 水温7~14℃の10~12月には10~19%を占めている。また, 飼育水温が18℃を超えると終息する傾向が見られる。これらの結果と温度耐性試験の結果は, アマゴの冷水病の発生に水温が影響していることの裏付けとなり, アユおよびギンザケで既に検討されている加温による治療方法が, アマゴにも有効である可能性が高いことが示唆された。アユでは23℃で3日間加温処理することにより, 冷水病の発生を防除した例があり,⁹⁾ また10gサイズのギンザケを用いた温度別感染試験の結果では, 10℃の場合斃死率が65%であったが, 17.5℃以上では20%以下に抑えられることが報告されている。⁷⁾ しかし, 民間養魚場において25℃で5日間の加温処理により, アユの斃死を減少させることができたが, 後に別の池に移動したところ, 移動後10日目以降に冷水病が再発した例もあり,⁶⁾ 処理後の扱いについても検討が必要なが

示唆される。また今回実施した温度耐性試験の結果より、液体培地では25℃でも本菌は増殖するので、水温制御による治療を試みる場合、高温が魚体に与える影響を検討するとともに、処理水温および加温期間を再検討する必要があると思われる。

謝辞

本研究を進めるに当たってご協力いただいた東京大学農学部若林久嗣教授、ならびに広島県水産試験場淡水魚支場飯田悦左研究員に感謝致します。

要約

- 1) 兵庫県内の養魚場でアマゴに大量斃死を伴う疾病が発生した。
- 2) 原因と思われる細菌を分離、同定し、温度耐性試験を実施した。
- 3) 病原性試験により、分離菌の病原性を確認した。
- 4) アマゴでは初めての冷水病発症例であることが判明した。

文献

- 1) 若林久嗣・堀内三津幸・文谷俊雄・星合愿一：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 (1991).
- 2) 最近問題となっている魚病（サケ科魚類およびアユ）。魚類防疫技術書シリーズⅥ。社団法人日本水産資源保護協会, pp. 14-26 (1995)。
- 3) 二宮浩司・里井晋一：養殖アユの冷水病について、平成6年度滋賀県水産試験場事業報告, 100-101 (1995).
- 4) ニジマスの冷水病に関する研究。東京都水産試験場平成5年度事業報告, p. 11 (1995).
- 5) 遠藤 誠・孝橋賢一・高橋 誓：アユの冷水病に対する加温処理の効果。平成5年度滋賀県水産試験場事業報告, 61-62 (1994).
- 6) 沢本良宏：高水温によるアユの冷水病の治療。平成5年度長野県水産試験場事業報告, 48-49 (1994).
- 7) 熊谷明・佐藤靖・高橋清孝：ギンザケ冷水病の防疫に関する研究。平成6年度魚病対策技術開発研究成果報告書, pp. 207-212, (社)日本水産資源保護協会 (1995).
- 8) A. Oback, F. Baudin Laurencin : Vaccination of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* against the visceral form of cold water disease, *Dis. Aquat. Org.*, 12, 13-15 (1991).
- 9) 里井晋一・津村祐司：養殖アユの冷水病について、平成4年度滋賀県水産試験場事業報告, p. 71 (1994).
- 10) Bernardet, J. F., and P. A. D. Grimont: Deoxy-ribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39 (3), 346-354 (1989).
- 11) H. Wakabayashi, T. Toyama and T. Iida : A study on serotyping of *Cytophaga psychrophila* isolated from fishes in Japan, *Fish Pathol.*, 29 (2), 101-104 (1994).