

ノート

アユ非生息期における河川環境中からの冷水病菌の初分離 培養法による検討

田畑和男*

First isolation of *Flavobacterium psychrophilum* by incubation method from the environment in season when ayu *Plecoglossus altivelis* do not live in a river

Kazuo TABATA*

キーワード：冷水病菌，遺伝子型別，培養法，感度比較，自然環境

アユの冷水病は，養殖場だけではなく，河川においても被害を出すことから大きな問題となっている（井上2000，アユ冷水病対策協議会2005，田畑2004）。特に冷水病菌の検査で陰性と判定された種苗が放流された河川域においても，しばしば冷水病が発生することがあるため河川生態系を対象にした冷水病菌の動態に関する調査・研究が行われてきた（アユ冷水病対策協議会2005）。最初に問題にされたのは，オイカワ等のコイ科在来魚種による水平感染であったが，コイ科魚類の冷水病菌の遺伝子型は主にBS型で（Izumi *et al.* 2003），サケ科魚類では主にBR型であるのに対し（Izumi *et al.* 2003），アユではA型が多いことと（Izumi *et al.* 2003），アユ以外の在来魚固有の遺伝子型の冷水病菌（B型）を保菌することはあってもB型菌にはアユの感受性が低いこと（田畑2004）が明らかになり，在来魚の問題は一応解決した。

しかし，環境中における冷水病菌の残留，垂直感染 および外部からの持ち込みに関する問題は未解明である。その中で，環境中における冷水病菌の存否に関しては，アユ特有の冷水病菌の遺伝子型が明らかになるにつれて，冷水病菌が河川に残留しているとすれ

ばその遺伝子型が何であるかということに関心が集まっている。

また冷水病の発生には，縄張りを巡るアユ同士の競合や，アユ独特の摂餌行動自体が深くかかわっている可能性がある。そこで，アユ生息期（春季から秋季）には主要な生活の場となる瀬に注目し，アユ非生息期（冬季から早春）における冷水病菌の存否を，まず常法（培養法）によって調査した。

その結果，わずか1株ではあるが冷水病菌を分離し，その遺伝子型を明らかにすることができた。これは河川からの遺伝子型の記載を伴った本邦最初の検出例であるのでここに報告する。

なお，河川環境中における冷水病菌の培養法による分離が非常に困難であることが予備調査から予想されたので，まず培養法による最適な分離方法を明らかにするため，カビの繁殖防止法，並びに4種類の培地を用い，純培養および細菌相互の競争関係のもとでの冷水病菌の発育状況について検討した。

カビ繁殖の防止方法 カビの繁殖を防止する目的で，改変サイトファーガ培地（CAM，Wakabayashi and Egusa 1974）にナイスタチン200U/ml（通常の細胞培

*Tel: 078-941-8601. Fax: 078-941-8604. Email: kazuo_tabata@pref.hyogo.jp

兵庫県立農林水産技術総合センター内水面漁業センター（679-3442 兵庫県朝来市田路1134）

現所属：兵庫県立農林水産技術総合センター水産技術センター（674-0093 兵庫県明石市二見町南二見22-2）

養に使用されている濃度)を加えた培地(CAMN)でのミズカビの発育状況を検討した。内水面漁業センターで飼育中の、ミズカビ病とエロモナス菌 *Aeromonas hydrophira* に混合感染しているイワナ患部から採取した適量のミズカビ (*Saprolegnia* sp) を 500 μ l PBS- に混和した後、その 50 μ l を CAM および CAMN 平板の 4 箇所に滴下した (計 200 μ l)。培養は 18 で 5 日間行った (第 1 表)。ミズカビ菌系は

第 1 表 ナイスタチン加 CAM 培地 (CAMN) における細菌とミズカビの増殖状況 (18 5 日後)。

培地	試験No.	<i>A. hydrophira</i> の増殖	ミズカビの増殖
CAM	1	+	+
	2	+	+
CAMN	1	+	-
	2	+	-
	3	+	-
	4	+	-

CAM: 改変サイトファーガ培地, CAMN: ナイスタチン加改変サイトファーガ培地。

ナイスタチン無添加の CAM では発育したが, CAMN では発育しなかった。なお, エロモナス菌はナイスタチンの有無にかかわらず発育した。このように CAMN は, ミズカビの繁殖を防ぐことが確認された。純培養株に対する培地の検討 純培養した冷水病菌 (以下単一試料) の増殖状況を, 既知の培地を含む 4 種類の培地間で比較した。使用した培地は, CAM, TYFBS 培地 (中津川ら 2006), トブラマイシン加改変

サイトファーガ培地 (CAMT, Kumagai *et al* 2004), および CAMN の 4 種類である。試験に使用した冷水病菌 (菌株 0473, 冷水病罹患アマゴから分離) の 10^8 CFU/ml (PBS-) 菌液を作り, その 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} および 10^{-6} 希釈液をそれぞれ 10 μ l ずつ各培地につき 10 箇所に分けて滴下し (計 100 μ l / 平板), 18 で 3 日間培養した (第 2 表)。CAM 上に形成されたコロニー数を 1 とした場合, 各培地の相対コロニー形成比は, TYFBS が 1.6 ~ 2.8, CAMT が 0.3, CAMN が 0.3 ~ 1 となった。TYFBS のコロニー形成比は高かったが, コロニーの発育は CAM と比べて良くなかった。逆に CAMT, CAMN は, CAM に比べてコロニー形成比は低かった。

細菌相互間の競争 連鎖球菌が約 10% 混入している冷水病菌のサンプル (以下, 混入試料) を使用して, 細菌相互間の競争のもとでのコロニー形成状況を 4 種類の培地 (CAM, TYFBS, CAMT および CAMN) を用いて比較した。接種方法は前項と同様の方法とし, 18 で 5 日間培養した後, 形成されたコロニーが冷水病菌 (黄色) あるいは連鎖球菌 (白色) 主体のものを肉眼的に大まかな比率として求めた (第 3 表)。CAM については, 混入試料が高密度 (10^{-3} 希釈) の場合, 大部分が冷水病菌のコロニーであったが, 低密度 (10^{-6} 希釈) では, すべてが冷水病菌のコロニーであった。

第 2 表 冷水病菌の培地別増殖状況 (18, 3 日)。

培地	菌株	冷水病菌原液の希釈倍率				CAM に対する コロニー形成比
		10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	
CAM	0473	NR	NR	NR	12	1
	0474	NR	NR	NR	12	1
TYFBS	0473	NR	NR	NR	19	1.6
	0474	NR	NR	NR	34	2.8
CAMT	0473	NR	NR	43	4	0.3
	0474	NR	NR	63	3	0.3
CAMN	0473	NR	NR	NR	13	1
	0474	NR	NR	53	4	0.3

CAM: 改変サイトファーガ培地, TYFBS: TYFBS 培地, CAMT: トブラマイシン加改変サイトファーガ培地, CAMN: ナイスタチン加改変サイトファーガ培地, NR: コロニー数多数。

TYFBSについては、混入試料が高密度の場合、すべて連鎖球菌のコロニーであったが、低密度ではほとんどが冷水病菌のコロニーであった。CAMTでは密度にかかわらず連鎖球菌のコロニーは形成されず、冷水病菌のコロニーのみが形成された。CAMNについては 10^4 希釈区のみを観察であったが、すべて連鎖球菌であった。

第3表 連鎖球菌が混入している冷水病菌の培地別増殖状況(18, 5日)。

培地	冷水病菌原液の希釈倍率			
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
CAM	F>>S	F	F	F
TYFBS	S	F=S	F>S	F>>S
CAMT	F	F	F	F
CAMN	S			

F: 100% 冷水病菌, S: 100% 連鎖球菌, F>>S: 大部分冷水病菌, 一部連鎖球菌, F>S: 冷水病菌は連鎖球菌より多数, F=S: 冷水病菌と連鎖球菌ほぼ同数, 空白はデータなし。

単一試料および混入試料の試験結果をまとめると、CAMでは混入試料(高密度)においても冷水病菌のコロニーが形成され、さらに、コロニーの発育もみられた。これに対して、TYFBSでは混入試料(高密度)においては冷水病菌のコロニーが形成されなかったが、低密度になるほど冷水病菌のコロニーが多く形成された。しかし、単一試料においても冷水病菌のコロニーは多く形成されたが、発育は抑制された。CAMTでは、混入試料(高密度)においても冷水病菌コロニーのみが形成されたが、冷水病菌のコロニー形成は抑制された。CAMNでは、混入試料(10^4 区)においては冷水病菌のコロニーは形成されず、しかも単一試料においても冷水病菌のコロニー形成が抑制された。

以上からCAMTとCAMが有効と考えられた。しかし、CAMTについては、予備的に河川環境サンプルの培養試験を行ったところ、種々の菌のコロニーが形成された。このことからトブラマイシン抵抗性の菌が環境中には極めて多いことがわかった。したがって、

環境サンプルを対象とする場合には、CAMTは特に有効とはいえないと考えられる。また、TYFBSとCAMNについては、他の環境細菌の混入が多い場合、冷水病菌のコロニー形成が阻害されると考えられる。

したがって、環境中からの冷水病菌分離のためには、試料を充分希釈して、他の環境細菌の冷水病菌に対する干渉をできるだけ低下させ、さらに、冷水病菌の発育の抑制要因となる薬剤を混入せずに、CAMを使用することが最善の方法であると考えられた。

河川環境中からの検出 2004, 2005年の、アユ非生息期の1月から4月にかけて兵庫県内の4河川の瀬でサンプリングを実施した。1河川につき2~3地点、1地点につき2~3の試料を採取した。1つのサンプルは瀬の20cm大の2-3個の石に付着する水生昆虫の巣や付着物を火炎滅菌したピンセットで採取したものである。なお、A河川のA-2, A-3地点は人工生産アユと自河川の溯上アユが混在しているが、他の3河川的全調査地点は人工生産アユのみが放流されている。

サンプルは氷冷状態で実験室に持ち帰った後、1.5ml チューブに200-400 μ lのサンプルと600 μ lのPBS-を入れ、5分間Vortex処理をおこなった。これを 10^1 , 10^2 , 10^3 倍に希釈し、それぞれ、その10 μ lをCAMに添加しコンラージ棒で平板上に広げ、18で4日間培養した。

Chelex 100法により分離菌からDNAを抽出し、2種類のPCR法「16S rRNA (Toyama 1994)とPSY-G (Izumi and Wakabayashi 2000)」で冷水病菌であるかどうかを確認した後、Izumi *et al* (2003)の方法により遺伝子型を決定した。

2004年は、2河川(A, B), 5地点, 13サンプルのうち、分離された冷水病菌はA河川のA-1地点の1サンプルからの1株のみにすぎなかった。なお、この遺伝子型はコイ科魚類に多いBS型であった。2005年は、2河川(C, D), 5地点, 10サンプルについて検出を試みたが、1株も分離できなかった。今回の検出は、河川環境中から遺伝子型の記載を伴ったものでは本邦最

初であるが,さらに,研究を重ねて分離例を増やすことが必要である。

文 献

- 井上 潔(2000)アユの冷水病,海洋と生物, **126**, 35-38.
- Izumi S, Wakabayashi H (2000) Sequencing of *gyrB* and their application in the identification of *Flavobacterium psychrophilum* by PCR. *Fish Pathol.* **35**, 93-94.
- Izumi S, Aranishi F, Wakabayashi H (2003) Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. *Diseases of Aquatic Organisms*, **56**, 207-214.
- Kumagai A, Nakayasu C, Oseko N (2004) Effect of tobramycin supplementation to medium on isolation of *Flavobacterium psychrophilum* from ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.* **39**, 75-78.
- 中津川俊雄・今西裕一・新井 肇・永井崇裕・泉 庄太郎(2005) *Flavobacterium psychrophilum* ための新しい分離用培地. 京都府立海洋センター研究報告, **28**, 33-38.
- 田畑和男(2004) 河川における冷水病菌をめぐる在来魚と放流アユとの関係. 日水誌, **70**, 318-323.
- Toyama T. (1994) Identification of *Cytophaga psychrophila* by PCR target 16s ribosomal RNA. *Fish Pathol.* **29**, 271-275.
- Wakabayashi H, Egusa S (1974) Characteristics of myxobacteria associated with some freshwater fish diseases in Japan, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **40**, 751-757.