

加温処理によるアユ冷水病の防除に関する研究^{*1}

菅原 和宏

Prevention of bacterial cold-water disease in ayu by warmed water
treatment

Kazuhiro Sugahara

キーワード アユ、冷水病、加温処理、抗病性

*1 本論文は 2011 年に近畿大学大学院に提出した学位論文である

目次

第1章 序論	73
第2章 種々の温度で培養した冷水病菌の生育特性	75
第3章 種々の温度で培養した冷水病菌の VBNC への移行とその後の病原性	78
第4章 投薬および加温処理時の冷水病菌の魚体内および飼育水中の動態と治療効果	85
第5章 人為的に冷水病を感染させたアユの加温処理による抗病性の獲得	91
第6章 総括	100
Summary	102
謝辞	105
参考文献	106

第1章 序論

アユ (*Plecoglossus altivelis*) は両側回遊魚で、北海道西部から南九州までの日本各地、朝鮮半島からベトナム国境近くまでの中国大陸に分布する。¹⁾ 奄美大島のみにも分布するリュウキュウアユ (*Plecoglossus altivelis ryukyuensis*) は別亜種である。

²⁾ アユは春から秋にかけて、若年期から成魚期を主として川の中流域で生息するが、孵化した仔魚は秋に海に下り、翌春まで仔稚魚期を海で送る。¹⁾ 特徴的なのは、琵琶湖産アユである。琵琶湖産アユは、海の代わりに湖で冬を越し、湖とそこへの流入河川で生活を完結させる、いわゆる陸封型なのである。

¹⁾ アユは1年で生活史を完結させるため、年魚とも呼ばれる。アユは河川に定住するようになると、餌場となる石を中心に 1 m² 前後の広さでなわばりを形成する。¹⁾ このなわばりを形成する習性を利用した釣法がアユの友釣りである。1913年に東京都多摩川に琵琶湖産アユが放流され、この事業の成功によって琵琶湖産アユは友釣り用種苗として全国の河川への放流が始まり、現在まで営々と続けられてきた。

³⁾ 琵琶湖産アユはなわばりを持つ性質がより強いいため、釣り人や漁業関係者に好まれている。³⁾ これは、琵琶湖産アユは海産アユと比較して産卵期が早く、^{4,5)} なわばり形成の習性が強くなる成魚期に早く達すること、琵琶湖産アユが低水温でも生理活性を維持できる適応形質を備えていること⁶⁾ が理由であると考えられている。琵琶湖産アユの河川への放流は、最盛期は全国の河川放流アユの 70%以上を占めていた。しかし、その割合は平成 12 年度では 42.2%、平成 21 年度では 21.2%と年々減少の一途をたどっている。⁷⁾ これは、琵琶湖産アユは再生産に寄与しないことや、⁸⁾ 冷水病菌を保菌している確率が高いこと⁹⁾ によって、各県で海産系人工種苗が生産され、自県産のアユが放流されるようになったことが原因である。冷水病菌の保菌率が高い琵琶湖産アユの放流が、河川における冷水病の蔓延の主要な原因になっていると考えられており、^{9,10)} 一部の県では琵琶湖産アユの放流を控える動きもある。しかし、琵琶湖産アユを放流していない河川においても冷水病の発生が報告されていることから、⁹⁾ 琵琶湖産アユの放流だけが河川における冷水病の蔓延の原

因であるとは言い切れない。いずれにしても、琵琶湖産アユの河川放流アユとしてのシェアを回復するためには、冷水病の解決が最も重要な課題である。

冷水病 (Bacterial Cold-water Disease) は、冷水病菌 *Flavobacterium psychrophilum*¹¹⁾ を原因菌とする細菌性の疾病で、1948年に北米のギンザケから初めて分離された。¹²⁾ ヨーロッパではニジマス稚魚に大きな被害があることから、¹³⁾ Rainbow Trout Fry Syndrome (RTFS) と呼ばれている。これまで、アメリカ、フランス、ドイツ、デンマーク、イギリス、スペイン、イタリア、フィンランド、ベルギー、オーストラリア、チリ、韓国および日本で冷水病の発生が確認されている。¹⁴⁾ 冷水病菌は、サケ科魚類ではギンザケ、ニジマス、ベニザケ、シロザケ、サクラマス、lake trout、chinook salmon、brook trout および cutthroat trout から分離されており、¹⁴⁾ サケ科魚類以外ではヨーロッパウナギ、コイ、テンチ、オイカワ、ウグイ、ドンコ、アブラハヤ、ドジョウ、シマドジョウ、ヨシノボリ、フナおよびワカサギから分離されている。^{9,14)} 日本においては、冷水病菌は 1987年にアユから初めて分離され、¹⁵⁾ 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いる。滋賀県で冷水病が初めて確認されたのは 1991 年である。

冷水病の治療には投薬が行われてきた。¹⁴⁾ 冷水病の治療薬として承認されている医薬品は各国によって異なっており、イギリスではトリメトプリムとサルファダイアジンの合剤、オキシリン酸、オキシテトラサイクリンおよびアモキシシリンである。¹⁶⁾ デンマークではトリメトプリムとサルファダイアジンの合剤、オキシリン酸が承認されているが、オキシテトラサイクリンは昔から使われており、アモキシシリンとフロルフェニコールも使用されている。¹⁷⁾ 日本では、スルフィソゾールナトリウムが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、高い治療効果が報告されている。¹⁸⁾ しかし過度の投薬は、薬剤耐性菌の出現^{16,17,19)} や、魚体や環境への薬の残留²⁰⁾ といった問題を誘起する。現時点においては、スルフィソゾールナトリウムに耐性を示す冷水病菌は確認されていないもの (滋賀県水産試験場、未発表)、食の安全・安心が求められる今日に

においては、薬剤の使用はできるだけ減らす必要がある。

薬剤に代わる治療方法として開発されたのが加温処理である。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℃であり、25℃以上では冷水病菌は増殖することができない。^{13, 21-25)} 一方、湖産アユの生存限界温度は32℃である。²⁶⁾ 加温処理は、この冷水病菌とアユの生理特性を利用している。これまでの研究で、冷水病感染魚に対して飼育水温を23℃以上で3日間以上維持すると治療効果があることが報告されたが、^{27, 28)} 水温が27℃で3日間の加温処理でも、処理後2週間目に再発するケースが報告された。²⁹⁾ 現在では、まず魚を昇温に順応させるために23℃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℃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、数件のアユ養殖業者が使用している。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、魚体内や飼育環境中での治療中や治療後の菌の動態は不明である。23℃で治療効果がある理由や、27℃で再発した原因についても科学的な検証はなされていない。このため、加温処理の治療効果を詳細に明らかにすることは、本治療法を確立するために急務である。

アユの冷水病は養殖場だけではなく天然水域でも発生している。^{23, 30)} そのため、たとえ治療したアユを河川へ放流しても、河川に冷水病菌が常在している場合は、放流後のアユは冷水病に感染する可能性がある。これを防ぐためには冷水病に対するワクチンが必要である。

冷水病に対するワクチンは、様々な視点から研究が行われており、効果を示すワクチンも報告されている。しかし、作業効率の悪さや効果の安定性や持

続性が低いことなどの理由により、未だにワクチンの商品化には至っていない。

一方、冷水病に人為感染させて生き残った冷水病耐過アユは、冷水病に対して高い抗病性を獲得することが報告されている。³¹⁾ また、冷水病の再発を繰り返し経験した養殖アユは、冷水病に対する抗病性を獲得することも知られている。³²⁾ 病原体に感染した宿主が、その病原体に対して抗病性を獲得するという現象をうまく利用して、効率よく抗病性を獲得させる技術や、抗病性獲得のメカニズムを明らかにすることは、ワクチン開発など冷水病対策に繋がる。さらに、28℃で3日間の加温処理を組み合わせることによって、冷水病に対して抗病性をもち、且つ冷水病菌を保菌しないアユを作出することができれば、冷水病の蔓延防止にも役立つ。

本研究では、加温処理の治療効果を科学的に明らかにするため、冷水病菌の種々の温度に対する生理特性と、冷水病感染アユに対して加温処理を行った時の冷水病菌の魚体内動態を調べた。さらに、冷水病に対する抗病性を獲得する現象を人為的に再現し、加温処理を組み合わせることによって、冷水病菌を保菌せず、冷水病に対して抗病性を持つアユの作出を試みた。

本研究の概要は次の通りである。

1. 種々の温度で培養した冷水病菌の生育特性 (第2章)。
2. 種々の温度で培養した冷水病菌の VBNC への移行とその後の病原性 (第3章)。
3. 投薬および加温処理時の冷水病菌の魚体内および飼育水中の動態と治療効果 (第4章)。
4. 人為的に冷水病を感染させたアユの加温処理による抗病性の獲得 (第5章)。
5. 総括 (第6章)。

第2章 種々の温度で培養した冷水病菌の生育特性

背景と目的

加温処理は飼育水温を冷水病菌が増殖できない温度まで上昇させて治療する方法である。そのため、加温処理の治療効果を検証するためには、まず冷水病菌の増殖可能温度を詳細に調べる必要がある。これまで、冷水病菌の増殖温度については多くの研究が行われてきた。冷水病菌の増殖可能温度は、4～23℃、²¹⁾ 6～25℃、¹³⁾ 5～25℃、²²⁾ 5～20℃、²³⁾ 5.5～24℃、²⁴⁾ 10～20℃²⁵⁾ であり、最適増殖温度は19.6℃、²⁴⁾ 約20℃²¹⁾ と報告されている。冷水病菌が増殖できない温度については、25℃、²⁵⁾ 27℃、²³⁾ 30℃^{13, 21, 22)} と報告されている。これらの報告から、25～30℃付近に冷水病菌の増殖限界温度があると推察されるが、その詳細について検討する必要がある。

本章では、冷水病菌の増殖限界温度を詳細に調べるために、1℃単位で試験区を設定し、魚体内を想定した有機栄養物の豊富な栄養環境および飼育水中を想定した飢餓環境における冷水病菌の種々の温度に対する増殖・生残特性を調べた。

材料と方法

供試菌株 本研究に使用した冷水病菌株を Table 2-1 に示した。栄養環境における増殖試験には、*F. psychrophilum* PH0424、OH0501、NCIMB1947 および SG030207 の4株を用いた。飢餓環境における生残試験には、PH0424 および OH0501 株の2株を用いた。PH0424 株は2004年にアユの腎臓から、OH0501 株

は2005年にアマゴの腎臓から、NCIMB1947 株は1973年にギンザケの腎臓から、¹⁶⁾ SG030207 株は2003年にビワマスの腎臓からそれぞれ分離された。

菌液の調製 -85℃で凍結保存していた菌株を解凍し、MCY 平板培地 (0.2%トリプトン [Difco]、0.05%酵母エキス [Difco]、0.02%肉エキス [極東製薬工業]、0.02%酢酸ナトリウム三水和物、0.02%塩化カルシウム二水和物、寒天1.5%、pH7.2) に接種し、15℃で3日間培養した。培養した菌を白金耳で取り、50mLのMCY液体培地 (0.2%トリプトン、0.05%酵母エキス、0.02%肉エキス、0.02%酢酸ナトリウム三水和物、0.02%塩化カルシウム二水和物、pH7.2) に接種し15℃で24時間振とう培養 (160rpm) した。すべての操作は無菌的に行った。

有機栄養環境における増殖試験では、MCY液体培地中での増殖特性を調べた。培養して得られた菌液を、菌の濃度が約 10^6 CFU/mLになるようにMCY液体培地が15mL入ったL字型試験管 (直径18mm) に接種した。

飢餓環境における生残試験では、アユの飼育に使用される地下水での生残特性を調べた。地下水を孔径0.22μmフィルターで濾過した後、オートクレーブ (121℃・15分) を行って滅菌地下水を調製した。培養して得られた菌液を5℃で15分間遠心分離 (3,000×g) した。上清を捨てて滅菌地下水で細菌細胞を洗浄し、再度同様に遠心分離した。菌の濃度が約 10^7 CFU/mLになるように滅菌地下水が15mL入ったL字型試験管に懸濁した。

培養条件と菌数計数 菌液が入ったL字型試験管を温度勾配培養装置 (東洋科学産業) にセットし、

Table 2-1 *F. psychrophilum* strains used in this study

Strain	Host	Origin of isolation		
		Tissue	Location	Year
PH0424	<i>Plecoglossus altivelis</i>	Kidney	Hiroshima, Japan	2004
OH0501	<i>Oncorhynchus masou ishikawae</i>	Kidney	Hiroshima, Japan	2005
NCIMB1947	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Kidney	USA	1973
SG030207	<i>Oncorhynchus masou</i> subsp.	Kidney	Shiga, Japan	2003

15、22、23、24、25、26、27 および 28 °C で 10 日間振とう (30 rpm) 培養した。温度勾配培養装置は、外気温の影響を少なくするために、15 °C のインキュベーター内に設置した。1 試験区当たり 2 本の試験管を使用した。コロニー数は、ドロップ法³³⁾ で求めた。培養 0、0.25、0.5、1、2、3、4、5、6、7、10 日目に試料を滅菌 PBS(-) で 10 倍ずつ段階希釈し、MCY 平板培地に各希釈段階当たり 20 μ L を 5 点滴下し、15 °C で 5 日間培養してコロニーを計数した。この方法における冷水病菌の検出限界値は 50 CFU/mL である。

結果

MCY 液体培地を用いて冷水病菌 4 株について異なる温度に対する増殖を調べた結果を Fig. 2-1 に示した。15~25 °C ではすべての冷水病菌株で増殖が認められた。いずれの冷水病菌株においてもコロニー

数は約 10^9 CFU/mL まで増加し、その後は速やかに減少した。25~27 °C では、菌株間で異なる増殖パターンを示した。しかし、28 °C ではすべての菌株で増殖は認められず、培養 2 日以内でコロニー形成能を失った。

次に滅菌地下水を用いて冷水病菌 2 株について異なる温度条件での飢餓生残を調べた結果を Fig. 2-2 に示した。いずれの温度でも細胞数の増加はまったく認められず、温度が高ければ高いほど、コロニー数は早く減少した。15 °C ではいずれの菌株においても、10 日後でもコロニーが検出された。それに対して、28 °C ではすべての菌株において 2 日以内でコロニー形成能を失った。

考察

有機栄養培地中で冷水病菌を 28 °C で培養したところ、4 株の冷水病菌いずれも培養 2 日以内にコロ

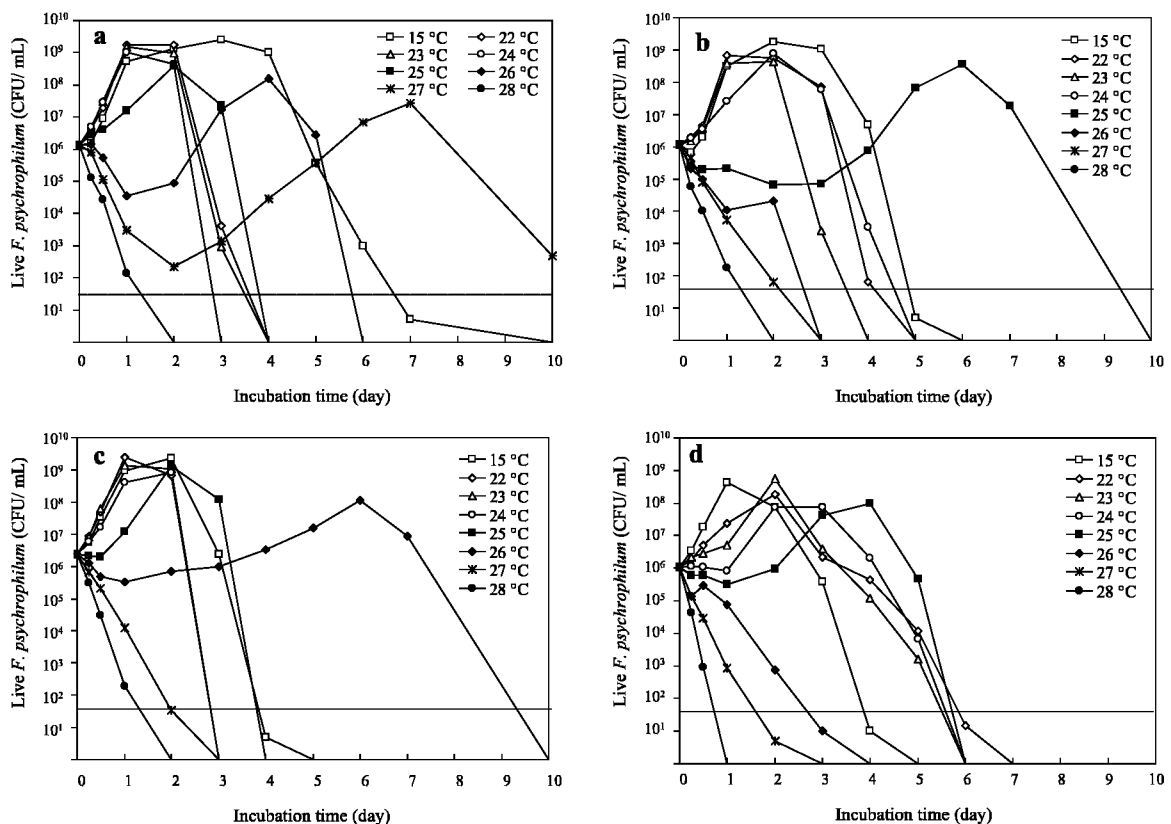


Fig. 2-1. Growth patterns of *F. psychrophilum* strains at various temperatures in modified cytophaga (MCY) broth. a, PH0424; b, OH0501; c, NCIMB1947; d, SG030207. The values indicate means (n=2). Dotted lines show the detection limit (50 CFU/mL). Under the detection limit, number of bacteria in the broth was treated as 0.

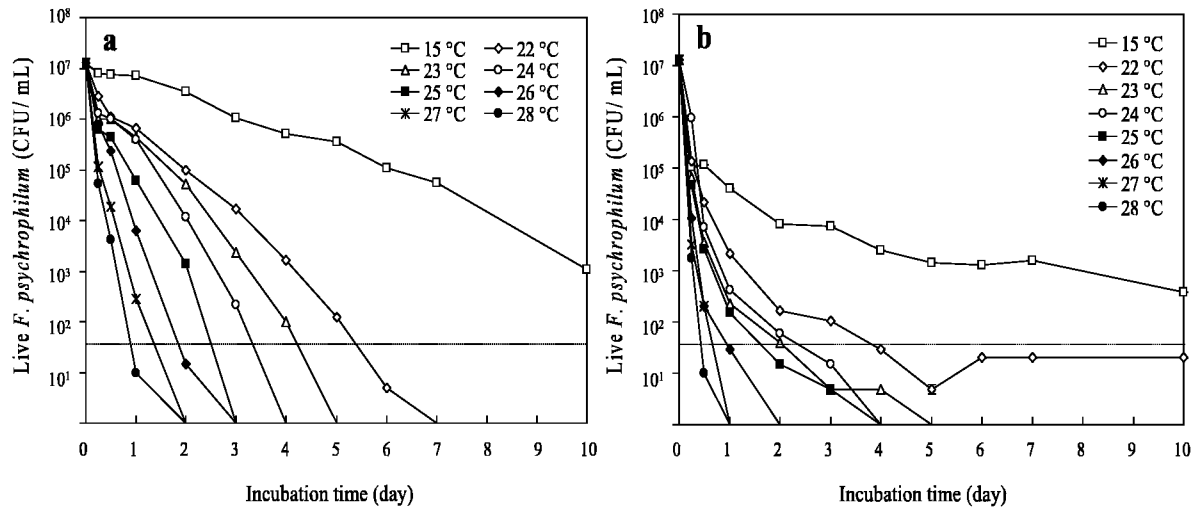


Fig. 2-2. Survival patterns of *F. psychrophilum* strains at various temperatures in sterilized underground water. a, PH0424; b, OH0501. The values indicate means (n=2). Dotted lines show the detection limit (50 CFU/mL). Under the detection limit, number of bacteria in the water was treated as 0.

ニー形成能を消失し、その後も検出されなかった (Fig. 2-1)。25~27 °Cでは菌株によって反応が異なり、増殖する場合としない場合があった。菌数が一度減少してから、数日後に増殖する場合もあった。本研究においては、試験区の温度を1 °C単位で設定することによって、25~27 °Cが冷水病菌にとって増殖できる限界の温度であることを明らかにした。15~24 °Cでは、4株中3株では温度の違いによる増殖スピードに大きな違いは認められなかったが、SG030207株は温度が低い方が冷水病菌の増殖が早い傾向を示した。

滅菌地下水では、2株の冷水病菌のいずれも28 °Cで2日以内にコロニー形成能を消失し、その後も検出されなかった (Fig. 2-2)。この結果は、有機栄養培地を用いた試験と一致した。飢餓環境に晒され

た直後、一時的に細胞数が増加することが数種の細菌において報告されている。³⁴⁾しかし本研究においては、いずれの温度においても滅菌地下水では冷水病菌の細胞数の増加は認められず、温度が高ければ高いほど、菌数は早く減少した (Fig. 2-2)。このことから15~28 °Cにおいては、温度の低い方が冷水病菌にとって生残しやすい環境であることがわかる。Vatsos *et al.*³⁵⁾は、冷水病菌は14 °Cの滅菌河川水中で19週間生残したと報告している。Madetoja *et al.*³⁶⁾は、15 °Cの滅菌湖水中で300日間生残したと報告している。本研究においても、15 °Cでは2株とも実験期間中(10日間)は生残していた。無機培地において、冷水病菌は15 °C付近では長期間生残すると考えられる。

第3章 種々の温度で培養した冷水病菌の VBNC への移行とその後の病原性

背景と目的

第2章において、冷水病菌を 28 °C の MCY 液体培地または滅菌地下水で保置したところ、2 日間でコロニー形成能を消失することを明らかにした。ただ、細菌のコロニー形成能の消失が細胞の「死」とは言えない。環境ストレスを受けた細菌には、コロニー形成能を失うものの、生理活性を保持し続けた完全に死滅していない状態、すなわち Viable But Non-Culturable (VBNC) 状態へ移行する場合がある。³⁷⁾ VBNC 状態の細菌は、ヒートショック、³⁸⁾ 低温から室温への移動、³⁹⁾ 液体培地への接種、³⁵⁾ 動物体内への接種⁴⁰⁾ などにより蘇生する可能性が指摘されている。このことから、28 °C に保置された冷水病菌がコロニー形成能を失ったとしても、冷水病菌が死滅したとは言い切れず、冷水病菌が再び増殖状態へ戻り、病原性を発揮する可能性は否定できない。

そこで本章では、滅菌地下水および MCY 液体培地を用いて、様々な温度での冷水病菌の生理状態、コロニー形成能、細胞膜の構造安定性から評価した。さらに、コロニー形成能を消失した冷水病菌が増殖状態へ戻り、病原性を発揮する状態へ復帰するか否かを、MCY 液体培地への接種およびアユへの攻撃試験によって調べた。

材料と方法

供試菌株と培養条件 *F. psychrophilum* PH0424 株を試験に用いた。本株はアユに対して強毒性として知られている。-85 °C で凍結保存された菌株を解凍し、100 µL を 50 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、定常期初期の細胞 (10^9 CFU/mL) を前培養液として実験に供した。

培養には、滅菌地下水および MCY 液体培地を用い、第2章と同様の方法で行った。試験開始時の菌濃度がいずれも約 10^8 CFU/mL になるように調整した。培養温度は、滅菌地下水を用いた生残試験にお

いては、15、23、28 および 33 °C とし、MCY 液体培地を用いた増殖試験においては、28 °C のみとした。培養 0、0.25、0.5、1、2、3、5 および 10 日目に各試験管内の試料を一定量採取し、以下の実験に供した。

総菌数、コロニー数、MPN 法および LIVE/DEAD 法 総菌数は、直接計数法⁴¹⁾ で求めた。試料に 20 % グルタルアルデヒドを 1 % になるように加え、細胞を固定した。この固定試料に、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 和光純薬) 溶液を 0.5 µg/mL となるように加えて、5 °C の暗所で 30 分間染色した後、孔径 0.22 µm 黒色ポリカーボネートフィルター (ミリポア) 上に細菌細胞を濾過捕集した。フィルターをスライドガラスに乗せ、微量の無蛍光グリセリンを滴下し、カバーガラスで封入した。この試料を、蛍光顕微鏡 (Eclipse 80i, ニコン) を用いて UV 励起 (UV-1A フィルター, ニコン) で検鏡した。接眼レンズに装着したグリッド (10 マス × 10 マス) 中の青白い蛍光を発する細胞数を計数し、菌濃度を算出した。

コロニー数は、ドロップ法³⁹⁾ で求めた (第2章参照)。

最確数 (most probable number, MPN) 法⁴²⁾ による生菌数の計数は次のように実施した。96 穴マイクロタイタープレートに MCY 液体培地を 180 µL 入れ、試料 20 µL を 5 穴に入れた。 10^{-1} ~ 10^{-9} まで段階希釈し、15 °C で 7 日間静地培養した。冷水病菌の増殖によって濁りの見られた希釈段階を陽性と判定し、MPN 表から MPN 値を算出した。

冷水病菌の生死は、細胞膜の構造安定性を指標として細菌の生死を判定する LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit for microscopy L7007 (Molecular Probes) からも評価した。これは、2 種類の試薬 (SYTO9 と propidium iodide) を用いて細胞を染め分ける方法である。SYTO9 はすべての細菌の細胞膜を透過し、青色 (約 480 nm) の励起光下で緑色に発光する。propidium iodide は傷ついた細胞膜のみ透過し、2 つの染色液が混合した場合は赤色になる。よ

って、生細胞は緑色、生理機能を消失した死細胞は赤色に染色される。

まず SYTO 9 と propidium iodide を 1 : 1 の割合で混合した。この混合液 30 μL を 970 μL の滅菌 PBS(-) で希釈し、試料 90 μL に染色液 10 μL を加えて 15 $^{\circ}\text{C}$ の暗所で 1 時間染色した。染色した試料 5 μL をスライドガラスに滴下し、カバーガラスで封入した。この試料を、蛍光顕微鏡を用いて B 励起 (B-2A フィルター, ニコン) で検鏡し、形態変化を観察した。緑色に蛍光する細胞を生細胞、赤色に蛍光する細胞を死細胞として合計 300 細胞以上を計数し、比率を求めた。事前に直接計数法で求めた総菌数と、今回求めた LIVE/DEAD による生細胞と死細胞の比率から、生菌数と死菌数を算出した。

アユに対する冷水病菌の病原性 滅菌地下水に晒された冷水病菌の病原性を調べるために、攻撃試験を行った。2008 年 12 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。アユに麻酔 (FA-100, 田辺製薬) を施し、上述の 15、23、28 および 33 $^{\circ}\text{C}$ の滅菌地下水に 1、2 および 3 日間晒された冷水病菌液 20 μL をアユの腹腔内に注射した。地下水を通水 (500 mL/min) した 60 L 水槽に注射したアユを 25 尾ずつ収容した。1 試験区当たり 2 水槽とし、3 週間無給餌で飼育した。試験期間中に死亡した魚はすぐに水槽から取り出し、鰓や肝臓の貧血、下顎や体表の潰瘍等の冷水病症状の有無を調べた。

上述の感染実験と比較するために、最適条件 (MCY 液体培地、培養温度 15 $^{\circ}\text{C}$) で培養した冷水病菌のアユに対する半数致死濃度 (Lethal dose 50 % [LD50]) を求めた。-85 $^{\circ}\text{C}$ で凍結保存された *F. psychrophilum* PH0424 株を解凍し、100 μL を 50 mL の MCY 液体培地に接種し、15 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間振とう培養 (160 rpm) した。培養した冷水病菌液を滅菌 PBS(-) で 10 倍段階希釈し、4 段階の濃度 (2.0×10^7 、 2.0×10^5 、 2.0×10^3 および 2.0×10^1 CFU/mL) に調整した。その後、アユに同様の方法で注射感染させた。対照区は滅菌 PBS(-) を同様に注射した。地下水を通水 (500 mL/min) した 60 L 水槽に 25 尾ずつ収容した。1 試験区当たり 2 水槽とし、3 週間飼育した。各区の死亡魚数から Reed and Muench⁴³⁾ の方法により LD50 を算出した。

結果

滅菌地下水に保置された冷水病菌の総菌数、コロニー数、MPN、LIVE/DEAD 生菌数および LIVE/DEAD 死菌数の経時変化を Fig. 3-1 に示した。試験開始時の総菌数は 10^9 cells/mL であり、いずれの試験区においても細胞数の増加は認められず、ほぼ横ばいであった。コロニー数もいずれの試験区においても増加は認められなかった。15 $^{\circ}\text{C}$ 区および 23 $^{\circ}\text{C}$ 区のコロニー数は、試験開始直後から緩やかに減少したが、試験終了時 (10 日後) でもそれぞれ 10^5 および 10^4 CFU/mL 検出された。それに対して 28 $^{\circ}\text{C}$ 区および 33 $^{\circ}\text{C}$ 区のコロニー数は、それぞれ 2 日後および 1 日後に検出限界値以下となった。MPN もいずれの試験区においても増加は認められず、試験開始から終了までコロニー数とほぼ同様に推移した。

滅菌地下水または MCY 液体培地に保置された冷水病菌の LIVE/DEAD 生菌数の割合を Table 3-1 に示した。滅菌地下水において、28 $^{\circ}\text{C}$ 区および 33 $^{\circ}\text{C}$ 区ではコロニーが検出されなくなった 2 日および 1 日後でも、LIVE/DEAD 計数ではそれぞれ総菌数の約 13 % が生菌として検出された。

LIVE/DEAD 法で染色した冷水病菌を Fig. 3-2 に示した。試験前の冷水病菌は、典型的な長桿型を示した。MCY 液体培地を用いて 28 $^{\circ}\text{C}$ で培養した試験区では、培養 6 時間後に約 2 倍に伸長した冷水病菌が観察され、試験終了時まで観察された。それ以外のいずれの試験区においても、冷水病菌の形態的な変化は認められなかった。

滅菌地下水に保置された冷水病菌を注射したアユの死亡率の変化を Fig. 3-3 に示した。15 $^{\circ}\text{C}$ および 23 $^{\circ}\text{C}$ の滅菌地下水で 1、2 および 3 日間保置された冷水病菌は、高い濃度の LIVE/DEAD 生菌数 ($10^7 \sim 10^8$ cells/mL) およびコロニー数 ($10^6 \sim 10^8$ CFU/mL) を維持しており、これらの菌をアユに注射した時のアユの死亡率は、40~66 % であった。それに対して 28 $^{\circ}\text{C}$ および 33 $^{\circ}\text{C}$ で保置され、コロニー形成能を失った冷水病菌は、 $10^5 \sim 10^7$ cells/mL の LIVE/DEAD 生菌数を維持していたにもかかわらず、アユに病原性を示さなかった。

最適条件で培養した冷水病菌を注射したアユの死亡率の変化を Fig. 3-4 に示した。 2.0×10^7 および 2.0

$\times 10^5$ CFU/mL の冷水病菌を注射したアユの死亡率は、それぞれ 46 および 14 %であった。それに対して、 2.0×10^3 、 2.0×10^1 CFU/mL および PBS(-) を注

射したアユは、冷水病による死亡は認められなかった。LD50 は 1.8×10^7 CFU/mL であった。

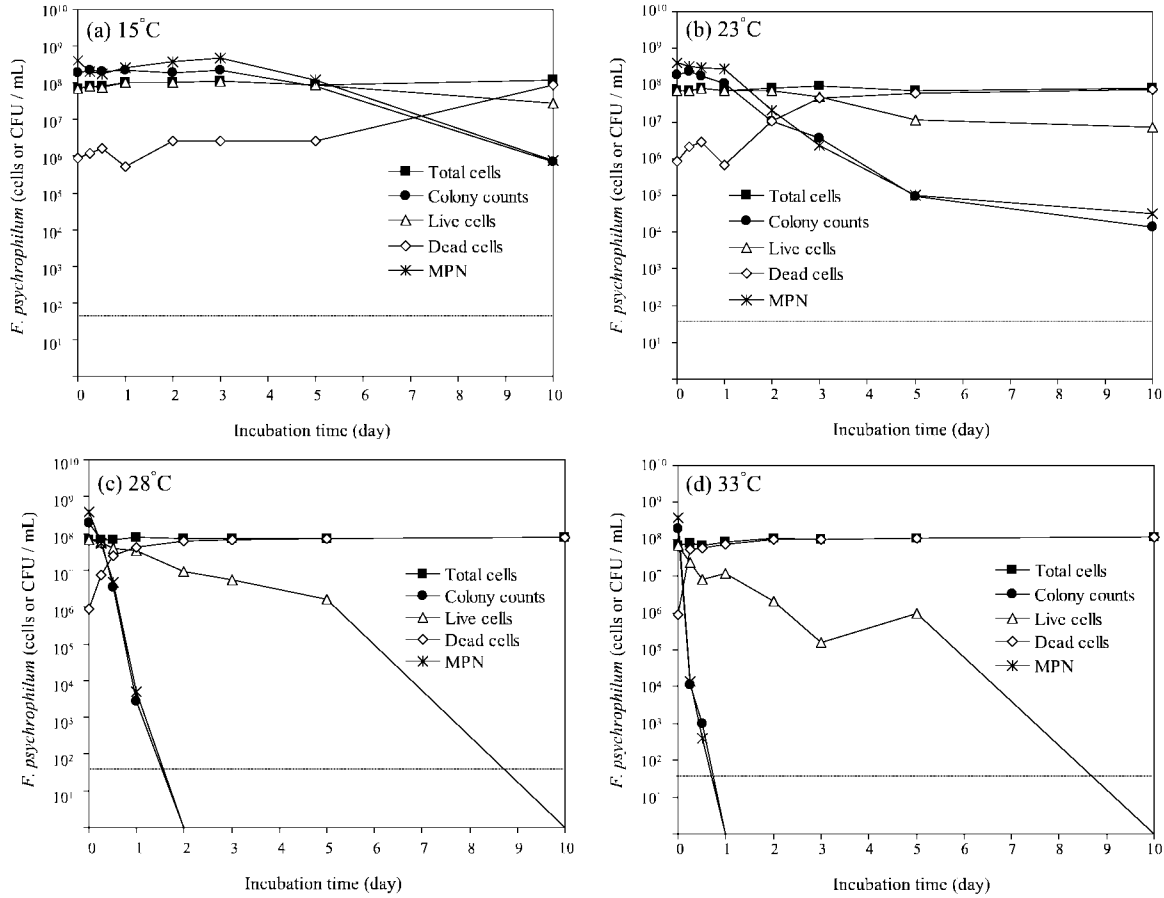


Fig. 3-1. Number of total cells, colony counts, numbers of live and dead cells, and MPN of *F. psychrophilum* in sterilized underground water, incubated at (a) 15°C, (b) 23°C, (c) 28°C, and (d) 33°C. Each point shows mean (n=2). Dotted lines show the detection limit (50 CFU/mL) of colony count. Under the detection limit of colony count, number of bacteria in the water was treated as 0.

Table 3-1 Percentage of live cells of *F. psychrophilum* at various temperatures in sterilized underground water or MCY broth estimated by LIVE/DEAD kit.

	Incubation temperature (°C)	Incubation time							
		0	Hour 6	Hour 12	Day 1	Day 2	Day 3	Day 5	Day 10
Sterilized underground water	15°C	98.7*	98.5	97.8	99.5	97.4	97.7	97.1	24.4
	23°C	98.7	97.0	96.4	99.0	87.4	52.2	15.8	8.8
	28°C	98.7	88.8	62.4	44.8	13.3	7.6	2.3	0.0
	33°C	98.7	30.6	12.7	12.9	2.1	0.2	0.8	0.0
MCY broth	28°C	97.0	71.4	74.2	63.6	55.0	38.1	8.2	0.7

*, mean (n=2)

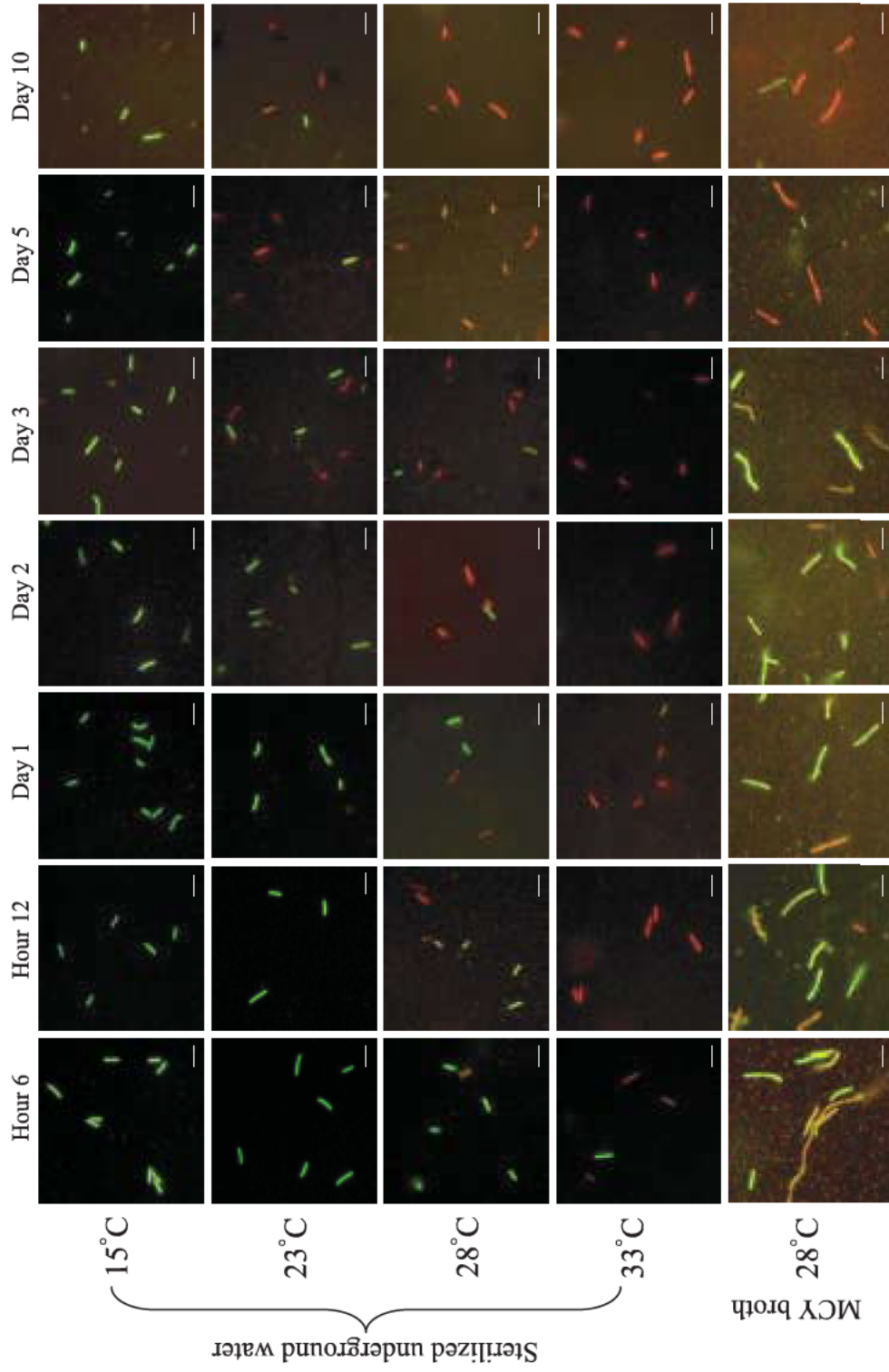


Fig. 3-2. *F. psychrophilum* in sterilized underground water or MCY broth stained by LIVE/DEAD kit. Green fluorescence indicates bacterial cells with intact membranes; red fluorescence indicates bacterial cells with damaged membranes. The bars indicate 5 μ m.

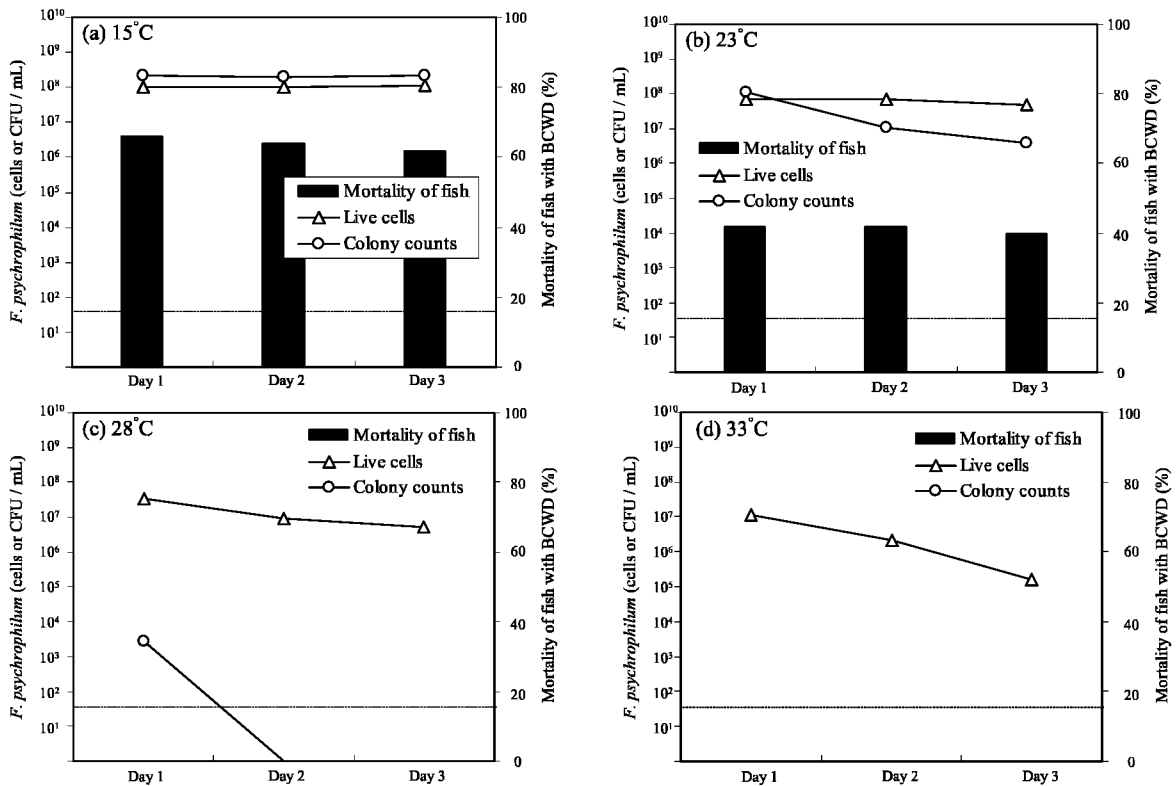


Fig. 3-3. Changes in the pathogenicity of *F. psychrophilum* after incubation at various temperatures (15, 23, 28 and 33 °C) in sterilized underground water. The bacterial suspension (20 μ L/fish) was injected into the peritoneal cavity of ayu. Mortality rates were calculated at 21 days after the bacterial challenge. Each point shows mean (n=2). Dotted lines show the detection limit (50 CFU/mL) of colony count. Under the detection limit of colony count, number of bacteria in the water was treated as 0.

考察

冷水病菌は高温には弱く、最適増殖温度は 15～20 °C であり、^{13, 21-25)} 増殖限界温度は 25～27 °C である (第 2 章参照)。冷水病菌は至適温度範囲の場合、滅菌河川水や滅菌湖水のような低栄養環境では長期間生存でき、病原性も維持することが報告されており、^{35, 36)} 本研究においても、15 および 23 °C の滅菌地下水では、冷水病菌は試験終了時 (10 日後) でもコロニー形成能を保っていた (Fig. 3-1a, 3-1b)。ただし、冷水病菌は浸透圧変化の影響を受けやすく、滅菌蒸留水のような極度の低張な環境においては、細胞膜に損傷を受けてすぐに死滅する。^{35, 44)}

コロニー形成能を失って培養はできなくても、生

理活性が保たれている状態の細菌は Viable But Non-Culturable (VBNC) と呼ばれ、環境条件の悪化など、ストレス下に置かれると VBNC 状態へ移行する可能性がある。³⁷⁾ 魚病細菌では、*Vibrio anguillarum*、⁴⁵⁾ *Aeromonas salmonicida*、⁴⁶⁾ *Pasteurella piscicida*、⁴⁰⁾ *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* ³⁹⁾ などで VBNC に移行することが報告されている。MCY 液体培地を用いて 14 °C で冷水病菌を培養した場合、コロニーは培養 2 週間後には検出されなくなったが、LIVE/DEAD で生菌と判定された冷水病菌は少なくとも培養 10 週間後まで確認された。³⁵⁾ 本研究において、コロニー形成能を消失したが細胞膜の構造安定性は保たれていた冷水病菌は、従来の VBNC の判断基準から考えると VBNC 状態へ移行したと言え

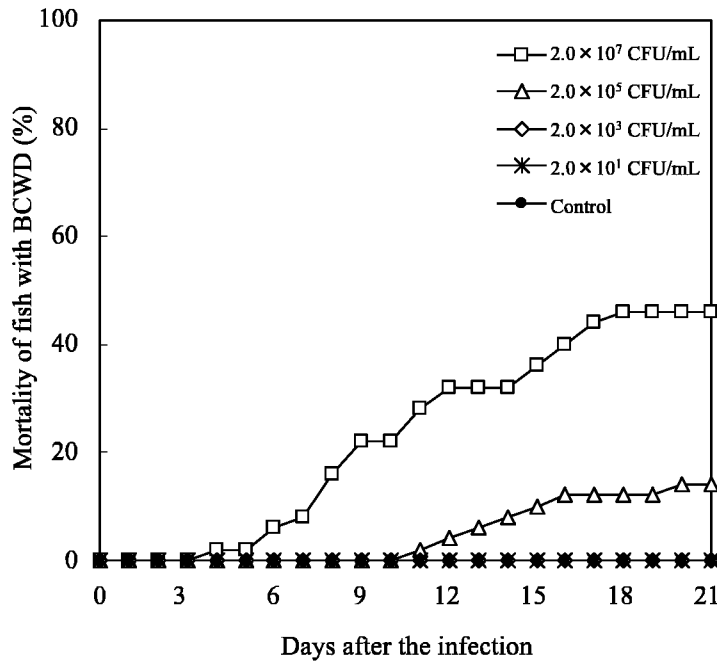


Fig. 3-4. Mortality of fish after injection with *F. psychrophilum*. Bacteria were incubated optimum conditions (MCY broth, 15°C). The bacterial suspension (20 µL/fish) was injected into the peritoneal cavity of ayu. Mortality rates were calculated at 21 days after the bacterial challenge. Each point shows mean (n=2).

る。加えて、冷水病菌が増殖できない 28 °C以上の温度においても、冷水病菌は VBNC へ移行することを明らかにした。

VBNC に移行した細菌は、細胞が小型化する場合があり、これは細菌が環境の変化から身を守る応答の一つである。^{34, 35, 39, 45, 46)} 冷水病菌については、滅菌河川水中で 14 °C で 4 週間保置後に菌の形が短くなったという報告がある。³⁵⁾ 本研究においては、冷水病菌の小型化は認められなかった (Fig. 3-2)。これは、試験期間が 10 日間と短かったことが原因かもしれない。一方、本研究においては、既報とは異なった形態変化が観察された。MCY 液体培地を用いて冷水病菌を 28 °C で培養したところ、6 時間後に約 2 倍に伸長した冷水病菌が観察され (Fig. 3-2)、試験終了時まで認められた。その他の試験区では、いずれも冷水病菌の形態に変化は認められなかった。薬剤や高温によって細胞分裂が阻害された細菌は、伸長する場合がある。^{47, 48)} 細胞分裂を阻害するナリジキシン酸を MCY 培地に添加して、冷水病菌を 15 °C で培養したところ、同様の菌の伸長が認められ

た (data not shown)。これらのことから、本研究において MCY 液体培地中で 28 °C で培養された冷水病菌が伸長した原因は、温度によって細胞分裂の機能が阻害されたものの、タンパク質合成機能は損傷を受けなかったため、細胞サイズを増大させてしまったのかもしれない。

VBNC 状態の細菌は、ヒートショック、³⁸⁾ 低温から室温への移動、³⁹⁾ 液体培地への接種、³⁵⁾ 動物体内への接種⁴⁰⁾ などにより蘇生する可能性が指摘されている。本研究では、液体培地への接種とアユへの感染実験によって VBNC 冷水病菌が蘇生するかを調べた。滅菌地下水中で保置した冷水病菌の生菌数を、MCY 液体培地を用いた MPN 法で計数したところ、MCY 寒天培地を用いたコロニーカウントとほぼ同様の値を示し、コロニーカウントで検出されなかった VBNC 冷水病菌は、MPN 法でも検出されなかった (Fig. 3-1)。このことから、VBNC 冷水病菌は液体培地へ接種しても増殖状態へ移行しないことが明らかとなった。次に、滅菌地下水に保置された冷水病菌をアユに接種して病原性の有無を調

べたところ、28 °Cで1日間保置された冷水病菌は、コロニー数が 10^3 CFU/mLであり、LIVE/DEADによる生菌が60%以上を占めていたにもかかわらず、アユへの病原性は認められなかった。一方、15 °Cおよび23 °Cに保置された冷水病菌は、注射されたアユの多くが冷水病に感染して死亡した (Fig. 3-3)。これは、注射した冷水病菌液にはいずれも、コロニー形成能を保持した冷水病菌が高い割合で含まれていたためである。最適な培養環境で培養した冷水病菌をアユに注射したところ、 2.0×10^7 および 2.0×10^5 CFU/mLの菌液を注射したアユの死亡率はそれぞれ46 および 14 %であった。それに対して、 2.0×10^3 CFU/mL およびそれ以下の菌液を注射した試験区では、アユの死亡は認められなかった (Fig. 3-4)。これは、冷水病菌のアユへの病原性は、接種する冷水病菌液に含まれるコロニー形成能を保持した冷水病菌の濃度に依存することを示している。このことから、28 °Cで1日間保置された冷水病菌は、コロニー形成能を保持した菌濃度が低いために病原性を示さなかったと考えられる。コロニー形成能を消失しVBNC状態である28 °C2日目および3日目、33 °C1、2 および3日目の冷水病菌には、アユへの病原性が認められなかった (Fig. 3-3)。このことから、たとえ細

胞膜の構造安定性が保たれていたとしても、コロニー形成能を失ったVBNC状態の冷水病菌には、アユへの病原性がないと考えられた。

今回認められたVBNC状態の冷水病菌は、増殖状態へ戻ることはなく、アユへの病原性も認められなかった。本菌の場合、28 °C以上の加温処理を施したときに見られるVBNC状態は、蘇生可能な一過性の生理状態ではなく、細胞が死滅の方向へ向かっている過程を捉えたものであると考えられた。これまでの研究で、28 °CのMCY液体培地や滅菌地下水中に晒され冷水病菌は、2日以内にコロニー形成能を消失した (第2章参照)。しかし、冷水病菌が完全に死んでいるかどうかや、再び増殖状態に戻る可能性については不明であった。本研究では、28 °Cに保置された冷水病菌は、試験開始2日目でコロニー形成能を失ったが、細胞膜の安定性は保たれていたことから、VBNC状態に移行したと考えられた。しかし、VBNC状態の冷水病菌は、MCY液体培地中で培養しても増殖状態へ戻ることはなく、アユに注射しても病原性は認められなかった。このことは、冷水病菌にとって28 °Cは、致命的な温度であることを示している。

第4章 投薬および加温処理時の冷水病菌の魚体内および飼育水中の動態と治療効果

背景と目的

第2章および第3章において、28℃で培養した冷水病菌は2日以内でコロニー形成能を失うこと、コロニー形成能を失った冷水病菌が増殖状態へ復帰せず、アユに対して病原性を示さないことを明らかにした。これは、28℃の加温処理の治療効果を *in vitro* で示したと言える。しかし、実際にアユに感染した冷水病菌に対して加温処理を行った場合、MCY 液体培地および滅菌地下水とは異なる反応を示す可能性もある。これまでの研究で、冷水病感染魚に対して飼育水温を23℃以上で3日間以上維持すると治療効果があることが報告されたが、^{27,28)} 27℃で3日間の加温処理でも、処理後2週間目に再発するケースが報告されている。²⁹⁾ 現在行われている28℃で3日間の加温処理は高い治療効果が知られているが、治療中や治療後の冷水病菌の魚体内や飼育水中での動態は明らかになっていない。そこで、本章では実際に冷水病に感染したアユに対して、種々の治療を行った際の冷水病菌の動態を調べた。

冷水病菌の検出には、培養法、PCR法、⁴⁹⁻⁵¹⁾ *in situ* hybridization、⁵²⁾ リアルタイムPCR法、^{53,54)} Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法^{55,56)} 等が報告されている。本研究では、治療の効果を調べることが目的であるため、生きている菌を定量できる方法を用いることが好ましいこと、遺伝子増幅反応は血液中の成分によって阻害されること⁵⁷⁾ から、魚体内の冷水病菌の定量には培養法を用いた。飼育水中には冷水病菌以外の雑菌やカビが多く含まれており、飼育水中の冷水病菌の定量に培養法を用いると、増殖の早い細菌やカビによって冷水病菌の増殖が阻害されたり、冷水病菌コロニーが覆われて正確に計数できない可能性がある。そのため、飼育水中の冷水病菌の定量はLAMP法を用いた。

LAMP法⁵⁸⁾ は、標的遺伝子の6つの領域に対して4種類のプライマーを設定し、鎖置換反応を利用して一定温度で反応させることを特徴としている。サンプルとなる遺伝子、プライマー、鎖置換型DNA

合成酵素、基質等を混合し、一定温度(65℃付近)で保温することによって反応が進み、検出までの工程を1ステップで行うことができる。増幅効率が高いことからDNAを15分~1時間で $10^9 \sim 10^{10}$ 倍に増幅することができ、極めて高い特異性から増幅産物の有無で目的とする標的遺伝子配列の有無を判定することができる。

材料と方法

供試菌と培養条件 *F. psychrophilum* PH0424株を試験に用いた。-85℃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℃で24時間振とう培養(160 rpm)した。次に6,800 mLのMCY液体培地に培養した菌液を全量接種し、15℃で16時間攪拌培養(300 rpm)して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 4.2 ± 0.9 g)を試験に用いた。培養した冷水病菌液(2.0×10^8 CFU/mL)を約18℃の地下水で10倍希釈(総量140 L)し、アユ(約10 kg)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日目までは無給餌とし、14日後からは市販の配合飼料(魚体重の1%量)を毎日与えた。

治療方法 試験区は投薬区、23℃加温区、28℃加温区および無処理の対照区の4区を設けた。投薬区はスルフィソゾールナトリウム(200 mg/kg 魚体重/日)を市販の配合飼料(魚体重の1%量)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。23℃加温区およ

び 28 °C 加温区における加温処理期間中の水温はそれぞれ、23.3 ± 0.3 °C、28.2 ± 0.3 °C であった。その後、通常水温 (18 °C) 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。

アユ臓器中の冷水病菌の定量 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 (1 試験区当たり 6 尾) を感染 0、1、2、3、4、5、7、10、14 および 21 日目にサンプリングした。サンプリングは冷水病症状のないアユを選択した。腎臓、肝臓、脾臓および鰓を無菌的に約 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 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冷水病菌の最適増殖温度である 15 °C で 5 日間培養し、冷水病菌コロニーを計数した。鰓サンプルには冷水病菌以外の他の雑菌やカビも含まれており、15 °C で培養すると増殖の早いこれらの菌によって冷水病菌コロニーが覆われ、計数できなくなる可能性がある。そのため、鰓サンプルは低温で長期間 (5 °C・14 日間) 培養した。それでも他の雑菌が増殖して冷水病菌コロニーの判別が困難な場合は、日本水産資源保護協会から提供された抗冷水病菌ウサギ血清を用いた凝集反応で識別し、冷水病菌コロニーを計数した。この方法における冷水病菌の検出限界値は、血液は 150 CFU/mL、その他の臓器は約 610 CFU/g である。1 枚の平板上にコロニーが全く検出されなかった場合は、0 CFU/mL or g として扱った。実験開始前のアユの腎臓、肝臓、脾臓、鰓および血液からは冷水病菌は全く検出されなかった。

飼育水中の冷水病菌の定量 飼育水中の冷水病菌の定量は、*parE* 領域を標的とした LAMP 法^{55,56)}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 °C、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 を抽出した。LAMP 法に用いたプライマーの配列を Table 4-1 に示した。LAMP 反応液 (25 µL) の組成は、8 U *Bst* DNA polymerase large fragment、0.8 mM dNTPs、1.6 µM FIP-17、1.6 µM BIP-17、0.2 µM F3-17、0.2 µM B3-17、0.8 M betaine、20 mM Tris-HCl (pH 8.8)、10 mM KCl、10 mM (NH₄)₂SO₄、8 mM MgSO₄、0.1 % Tween 20 および 2 µL 抽出 DNA とした。対照区は、抽出 DNA の代わりに滅菌蒸留水を同量用いた。LAMP 反応は、リアルタイム濁度測定装置 (Realoop-30, モリテックス) を用いて 65 °C で 80 分間行い、続いて反応を停止するために 80 °C で 5 分間行った。既知量の冷水病菌 DNA を 10 倍段階希釈し、LAMP 反応を行って作成した検量線から、冷水病菌数を算出した。この方法における冷水病菌の検出限界値は、20 cells/mL であった。実験開始前の飼育水からは、冷水病菌は全く検出されなかった。

結果

アユの累積死亡率の推移を Fig. 4-1 に示した。試験終了時の累積死亡率はそれぞれ 28 °C 加温区 0.3 %、23 °C 加温区 20.6 %、投薬区 6.1 % であった。いずれも対照区 (77.6 %) と比較して有意な差が認められた (χ^2 検定、 $P < 0.01$)。

Table 4-1 The LAMP primers

Primer	Sequence
BIP-17	5'-CTGCCATTGTAGTTCGTGTCGGGTCCCATATCTGTAGATCC-3'
FIP-17	5'-CTGAGGCTTCGAATGGTTTGTGAGGTACACATTTAGGCGC-3'
B3-17	5'-ATGTTCTCACCGAAGGCA-3'
F3-17	5'-ACTCCTTTGTAAACGGGC-3'

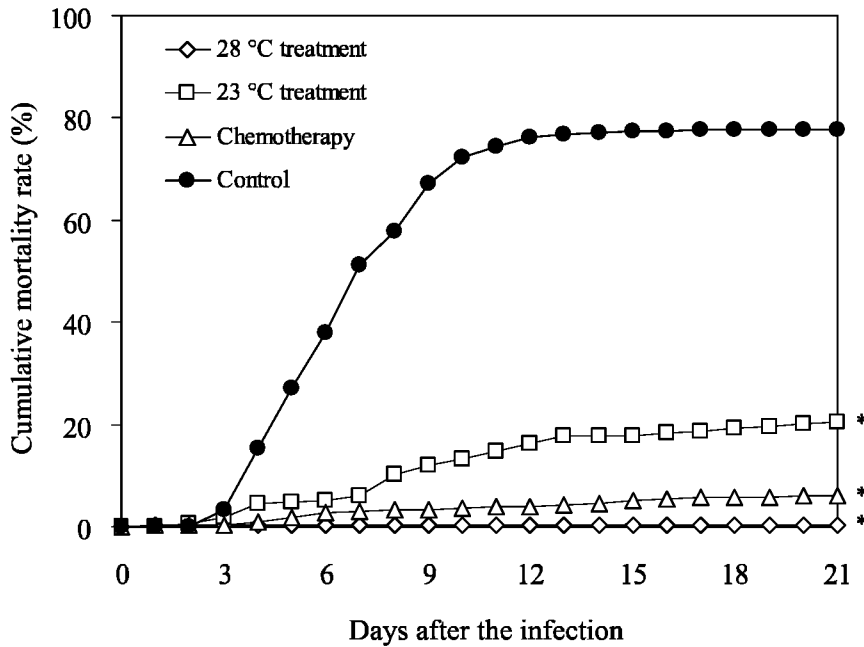


Fig. 4-1. Cumulative mortality rates of fish artificially infected with *F. psychrophilum*. The 28 °C treatment increased water temperature up to 28 °C by running warmed underground water for 3 days. The 23 °C treatment raised water temperature up to 23 °C by running warmed underground water for 3 days. Chemotherapy comprised oral administration of sulfisozole sodium (200 mg/kg fish/day) mixed with a commercial diet of 1% of fish body weight for 5 days. These 3 treatments were started 1 day after the infection. Control was non-treatment in all cases. *Significant difference from control ($P < 0.01$, χ^2 test).

魚体内の各部位における冷水病菌生菌数の推移を Fig. 4-2 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、冷水病菌の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 の冷水病菌の生菌が検出された。投薬区は投薬開始の翌日から冷水病菌の生菌数は減少し、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 °C 加温区では、加温開始翌日に冷水病菌の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 °C 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 Fig. 4-3 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。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 (Fig. 4-2b)。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 (Fig. 4-2b,

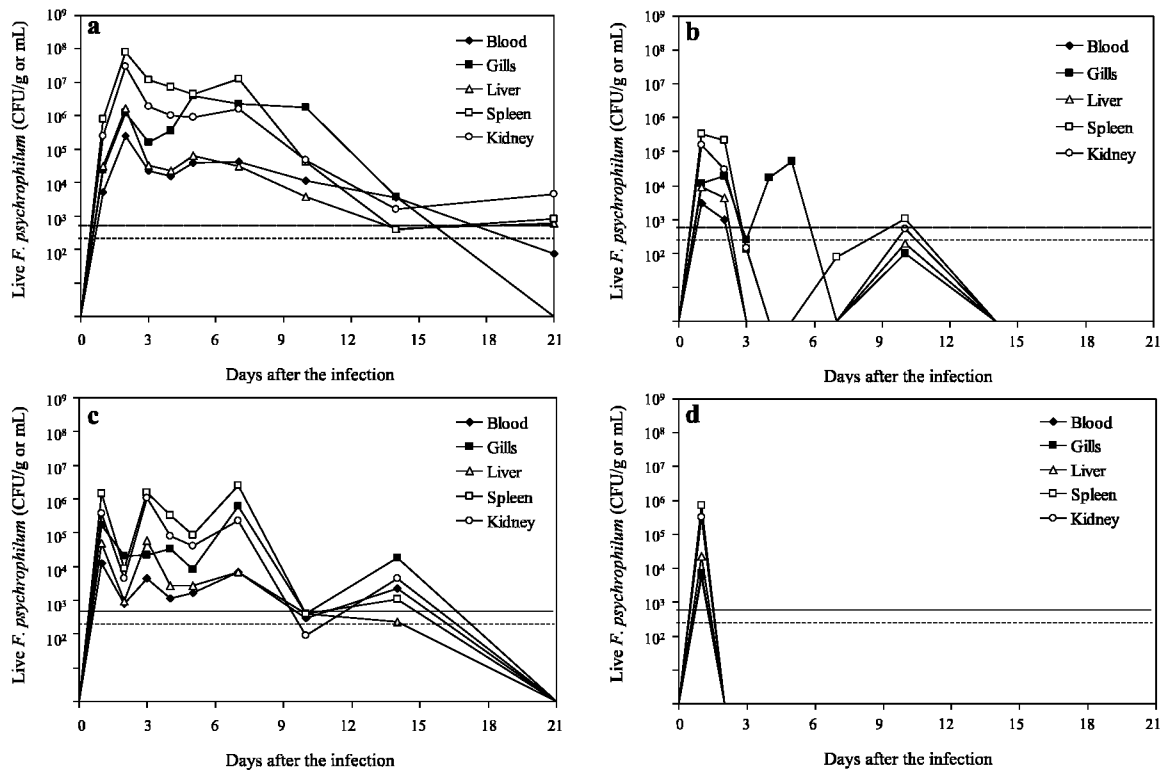


Fig. 4-2. Dynamics of *F. psychrophilum* in the ayu samples after infection with *F. psychrophilum*. For the 28 °C or 23 °C treatment, running underground water temperature was warmed up to 28 °C or 23 °C for 3 days, respectively. Chemotherapy comprised oral administration of sulfisozole sodium (200 mg/kg fish/day) mixed with a commercial diet of 1% of fish body weight for 5 days. These three treatments were started 1 day after the infection. Control was non-treatment in all cases. a, control; b, chemotherapy; c, 23 °C treatment; d, 28 °C treatment. The values indicate means (n=2). Dashed lines show the detection limit of blood samples (150 CFU/mL); dotted lines show the detection limit of the other samples (about 610 CFU/g). Under the detection limit, number of bacteria in the samples was treated as 0.

4-3b)。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。³⁶⁾ このことから、投薬は治療効果はあるものの、治療後の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 (Fig. 4-2c)。これは、MCY 培地を用いて 23 °Cで冷水病菌を培養した時の結果と一致しない。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。²⁴⁾ 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。⁵⁹⁾ したがって、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、魚の免疫活性が上昇することが考えられる。これにより魚体内での冷水病

菌の増殖が抑制されたため、MCY 液体培地内とは異なる挙動を示したのかもしれない。Holt *et al.*²²⁾ は、ギンザケ、ニジマス、マスノスケに冷水病を感染させ、3~23 °Cの異なる水温で飼育したところ、いずれの魚種においても 23 °Cでは冷水病は発生しなかったと報告している。彼らはこの理由について、治療効果が認められた温度では感染に対する魚の免疫反応が早くなり、冷水病菌の増殖は遅くなるために、魚に有利になったと考察している。

27 °C以下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 (Fig. 4-2c, 4-3c)。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 (Fig. 4-1)、死亡

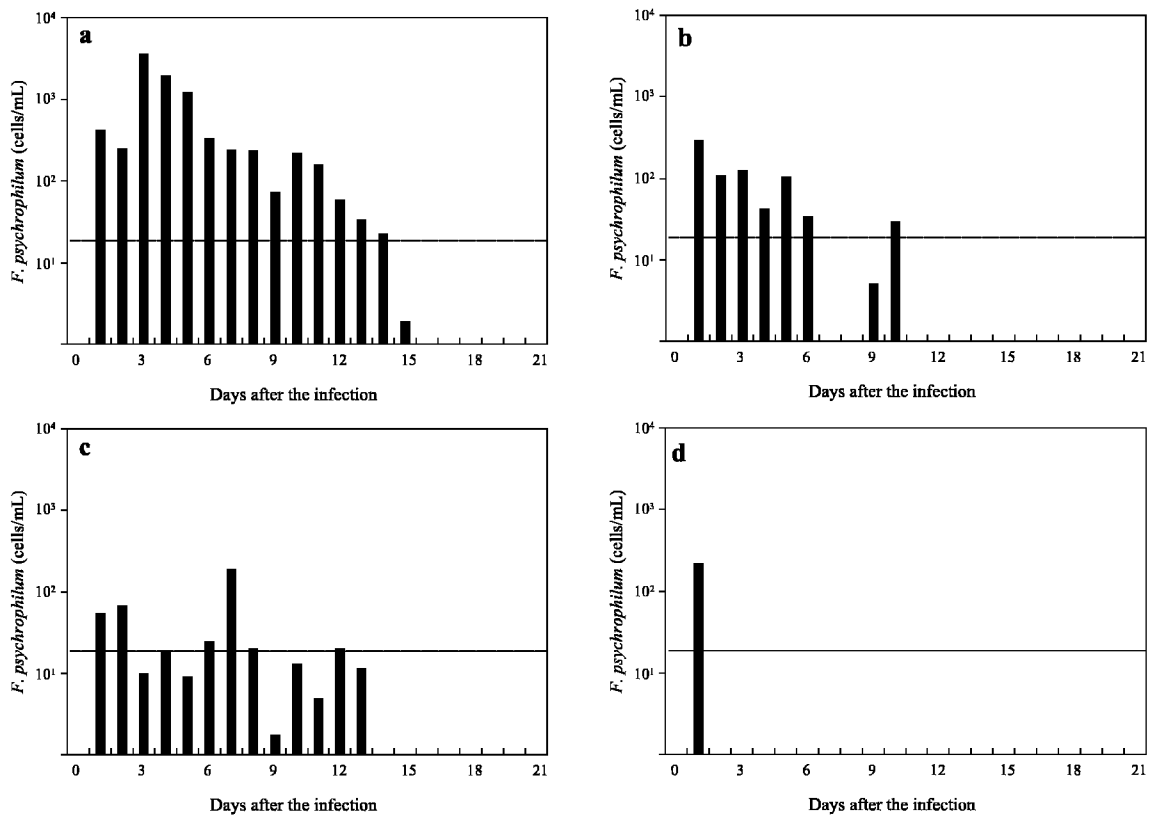


Fig. 4-3. Change of *F. psychrophilum* numbers in the rearing water after infection with *F. psychrophilum*. See the text and the figure legend of Fig. 4-2 for the details of the treatment. a, control; b, chemotherapy; c, 23 °C treatment; d, 28 °C treatment. The values indicate means (n=2). Dotted lines show the detection limit (20 cells/mL). Under the detection limit, number of bacteria in the water was treated as 0.

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。27 °C で 3 日間の加温処理でも治療 2 週間後に再発するケースが報告されている。²⁹⁾ PH0424 株を MCY 液体培地で 27 °C で培養したところ、冷水病菌は一度は減少するものの、数日後から増殖した (第 2 章参照)。これらのことから、27 °C の加温処理で冷水病の再発を防ぐには不十分であると考えられる。27 °C と 28 °C に対する冷水病菌の反応には、大きな違いがあるようである。

冷水病感染アユに対する 28 °C で 3 日間の加温処理は、高い治療効果が認められた。飼育水温を上昇させて病気を治療する方法は、細菌病、^{22,60)} ウイルス病、^{61,62)} 寄生虫症⁶³⁾ などいくつかの病気について報告されている。しかし、治療効果は認められても、治療後も病原体が魚体に残る場合があることか

ら、^{60,61,63)} 再発する可能性が完全に否定できない。本研究では、冷水病に感染したアユに対して 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 (Fig. 4-2d)、飼育水中からも冷水病菌 DNA は全く検出されなかった (Fig. 4-3d)。これは、28 °C で 3 日間の加温処理には冷水病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。さらに、本研究の結果は、28 °C の加温処理の日数を 1 日短縮できる可能性も示している (Fig. 4-2d, 4-3d)。加温処理には燃料費などランニングコストがかかる。これは加温処理が現場で手軽に出来ない理由の一つである。加温処理の期間を 3 日

から2日に短縮できれば、ランニングコストを現行の2/3に低減できるかもしれない。

ただし、28℃の加温処理が万能であるという訳ではない。飼育水を高温にすることは、他の疾病の発生、酸欠、水質低下など多くの危険を伴う。Takahashi

and Ogawa⁶³⁾ は、アユの飼育水温を29℃まで上昇させることによってカラムナリス症が発生したと報告している。これらのリスクを避けるため、養殖場で加温処理を行う場合は、魚の健康状態に十分注意する必要がある。

第 5 章 人為的に冷水病を感染させたアユの加温処理による抗病性の獲得

背景と目的

第 2~4 章において、冷水病菌を 28 °C で 3 日間培養すると、コロニー形成能と病原性を消失すること、冷水病に感染させたアユに対して 28 °C で 3 日間の加温処理を行うと、魚体内および飼育水中から冷水病菌は検出されないことを明らかにした。このことは、加温処理は養殖場で発生した冷水病に対する治療法としては非常に有効であることを示している。しかし、アユの冷水病は養殖場だけではなく天然水域でも発生しており、^{23,30)} たゞ治療したアユを河川へ放流しても、河川に冷水病菌が常在している場合は、放流後のアユは冷水病に感染する危険性がある。これを防ぐためには冷水病に対するワクチンが必要になる。

冷水病に対するワクチンは、様々な視点から研究が行われている。これまで、熱不活化ワクチン、^{64,65)} アジュバント添加ホルマリン不活化注射ワクチン、⁶⁶⁻⁶⁸⁾ 経口ワクチン、⁶⁹⁾ 外膜タンパク質注射ワクチン、⁷⁰⁻⁷²⁾ 生ワクチン^{73,74)} などが試作されている。しかし、作業効率の悪さや効果の安定性や持続性が低いことなどの理由により、未だにワクチンの商品化には至っていない。

一方、冷水病に人為感染させて生き残った冷水病耐過アユは、本病に対して高い抗病性を獲得することが報告されており、³¹⁾ 冷水病の発生を繰り返し経験した養殖アユは、本病に対する抗病性を獲得することが知られている。³²⁾ この現象をうまく利用することや、冷水病に対する抗病性の機序を明らかにすることは、ワクチン開発等の冷水病対策に有用な知見になる。さらに、28 °C で 3 日間の加温処理を組み合わせることによって、冷水病に対して抗病性を持ち、且つ冷水病菌を持たないアユを作出することができれば、冷水病の蔓延防止にも役立つと思われる。

そこで、本章ではアユを人為的に冷水病菌液に 30 分間浸漬して冷水病に感染させ、その後 28 °C で 3 日間の加温処理で治療することによって、冷水病に対する抗病性をアユに獲得させることを試みた。ア

ユが抗病性を獲得したか否かは、菌液に浸漬した 2 週間後に再び菌液に浸漬して冷水病に感染させ、さらに 2 週間後のアユの死亡率を比較することで確認した。アユが冷水病に対する抗病性を獲得するための種々の条件や、抗病性を獲得したアユの特性については、次の 4 つの実験系により検証した。

実験 1 は「冷水病菌液の浸漬から加温処理までの期間の検討」として、冷水病の感染の程度と獲得する抗病性との関係について調べた。ここでは、アユを冷水病菌に浸漬し、1 時間後、6 時間後または 1 日後に加温処理を開始する試験区を設けた。それぞれの試験区の加温処理直前の魚体内の冷水病菌数を測定し、感染の程度を調べた。その後、抗病性を評価するために浸漬感染を行い、アユの死亡率を比較した。また、抗病性を獲得したアユの血中の冷水病菌に対する凝集抗体価と、抗病性の程度との関係についても調べた。

実験 2 は「冷水病菌液の浸漬濃度の検討」として、アユに浸漬する冷水病菌液の濃度と獲得する抗病性との関係を調べた。菌液を希釈して $4.5 \times 10^3 \sim 10^7$ CFU/mL の 5 段階の 10 倍希釈系列を調製し、その菌液にアユを浸漬して 1 日後に加温処理を行った。そして抗病性を評価するために浸漬感染を行い、アユの死亡率を比較した。

実験 3 は「冷水病菌液の菌株の検討」として、由来の異なる種々の冷水病菌株を用いて調製した菌液を浸漬した場合の抗病性の程度を比較した。6 種類の冷水病菌株からそれぞれ調製した菌液にアユを浸漬し、1 日後に加温処理を行った。抗病性を評価するためにこれまでの実験と同様に陽性対照としての強毒株で浸漬感染を行い、アユの死亡率を比較した。また、各菌株のアユに対する病原性についても調べた。

最後に実験 4 は「抗病性を獲得したアユの冷水病感染時の魚体内の冷水病菌の動態」として、冷水病に対して抗病性を獲得したアユの特性について調べた。冷水病菌液にアユを浸漬して 1 日後に加温処理を行い、抗病性を獲得させた。そのアユを再び冷水

病菌液に浸漬し、浸漬後の魚体内の冷水病菌の生菌数の推移を調べた。

材料および方法

細菌培養とワクチン作製 実験 1、2 および 4 では *F. psychrophilum* PH0424 株を、実験 3 では PH0424 株、SG990302 株、GM2129 株、NCIMB1947 株、ZH9348 株および SG040302 株の合計 6 種類の冷水病菌株を実験に使用した (Table 5-1)。PH0424 株および SG990302 株はアユから、GM2129 株はニジマスから、NCIMB1947 株はギンザケから、ZH9348 株はオイカワから、SG040302 株はワカサギからそれぞれ分離された株である。

各菌株ともに、-85 °C で凍結保存された菌株を解凍して用いた。培養は、菌液の容量等は下記の通りやや異なるものの、すべての実験において前培養を 15 °C で 24 時間、本培養を 15 °C で 16 時間とした。

実験 1 では菌液 100 μ L 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。培養した菌液全量を 6,800 mL の MCY 液体培地に接種し、15 °C で 16 時間攪拌培養 (300 rpm) したものを実験に供した。

実験 2 および 4 では、菌液 250 μ L 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。培養した菌液 25 mL を 1,225 mL の MCY 液体培地に接種し、15 °C で 16 時間振とう培養 (160 rpm) したものを実験に供した。

実験 3 では、菌液 100 μ L を MCY 平板培地に接種して 15 °C で 2 日間培養した。培養した菌を白金耳で取り、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。培養した菌液 25 mL を 1,225 mL の MCY 液体培地に接種し、15 °C で 16 時間振とう培養 (160 rpm) したものを実験に供した。

生菌と死菌 (ワクチン) の免疫効果の違いを比較するために、実験 1 および 2 ではワクチンを作製して使用した。ワクチンはそれぞれ同様の方法で培養した菌液に、終濃度が 0.3 % となるようにホルマリンを添加して菌を不活化し、使用時まで 5 °C で保存した。

アユへの免疫 実験 1 および 4 では 2007 年 2 月に、実験 2 および 3 では 2006 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 1.4~4.4 g) を使用した。

培養した冷水病菌液を 18 °C の地下水で 4 または 10 倍希釈し、そこにアユを 30 分間浸漬した。浸漬した菌液の濃度は、実験 1、3 および 4 は $1.6 \times 10^7 \sim 4.3 \times 10^8$ CFU/mL とした。実験 2 では菌液を地下水で希釈して $4.5 \times 10^3 \sim 10^7$ CFU/mL の 5 段階の 10 倍希釈系列を調製して用いた。MCY 液体培地のみを同様に希釈してアユを浸漬した区を陰性対照区とした。実験 1 および 2 で設けたワクチン区は、同様にワクチン液を希釈して ($3.3 \sim 4.8 \times 10^7$ CFU/mL)、アユを浸漬した。

処理後のアユは、18 °C の地下水を通水した 700 L のコンクリート池に収容した。収容した尾数は、実験 1 は 150 尾、実験 2 は 80 尾、実験 3 は 110 尾、実験 4 は 100 尾ずつとした。実験 1 においては、冷水病菌に 30 分間浸漬後、加温処理を行わない陽性対照区を設け、その区のみ 1 池 300 尾とした。実験 1 お

Table 5-1 *F. psychrophilum* strains used in this study

Strain	Host	Origin of isolation		
		Tissue	Location	Year
PH0424	<i>Plecoglossus altivelis</i>	Kidney	Hiroshima, Japan	2004
SG990302	<i>Plecoglossus altivelis</i>	Kidney	Shiga, Japan	1999
GM2129	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	unknown	Gunma, Japan	1999
NCIMB1947	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Kidney	USA	1973
ZH9348	<i>Zacco platypus</i>	Kidney	Hiroshima, Japan	1993
SG040302	<i>Hypomesus transpacificus nipponensis</i>	Kidney	Shiga, Japan	2004

よび4は1試験区当たり2池とし、それ以外は1試験区当たり1池とした。

加温処理 加温処理は28℃で3日間行った(第4章参照)。実験1では、菌液浸漬から1時間後に加温処理を開始する試験区を生菌浸漬1時間後区とし、同様に12時間後区および1日後区を設け、陽性対照区は加温処理を行わずそのまま放置した。それ以外の実験はすべて免疫1日後に加温処理を開始した。

感染実験 抗病性を評価するために、免疫2週間後に感染実験を行った。感染にはすべての実験についてPH0424株を用いた。感染は、前述と同様の方法で培養した冷水病菌を18℃の地下水で4または10倍希釈し($9.3 \times 10^6 \sim 7.1 \times 10^7$ CFU/mL)、そこにアユを30分間浸漬した。感染後のアユは、18℃の地下水を通水した60L水槽に25尾ずつ収容し、2週間無給餌で飼育した。試験期間中に死亡した魚はすぐに水槽から取り出し、鰓や肝臓の貧血、下顎や体表の潰瘍等の冷水病症状の有無を調べた。

実験4において、感染後の魚体内の冷水病菌の生菌数の動態を調べる試験では、感染後のアユを18℃の地下水を通水した700Lのコンクリート池に60尾ずつ収容し、3週間無給餌で飼育した。

魚体内の冷水病菌の生菌数測定 実験1では、生菌浸漬1時間後、12時間後および1日後に加温処理を行った試験区については加温処理を行う直前の魚体内の冷水病菌の生菌数を培養法で定量した(第4章参照)。実験4では感染後のアユについて、魚体内の冷水病菌の生菌数の推移を培養法で定量した(第4章参照)。

冷水病菌に対する凝集抗体価測定 実験1について、冷水病菌に対するアユ血清中の凝集抗体価は次のように測定した。免疫2週間後に1池50尾(陽性対照区は1池25尾)のアユをサンプリングした。尾柄部を切断して血液を採取し、5尾分を1検体とした。採血後の血液は室温で約1時間放置した後、5℃で一晩保存した。その後遠心分離($1,500 \times g$, 4℃, 10分間)して上清(血清)を回収し、使用時まで-85℃で保存した。

凝集抗体価はマイクロタイター法で測定した。⁷⁵⁾血清を解凍後、補体の非働化を目的として55℃で30分間加熱した。加熱後の血清にPBS(-)を加えて2倍希釈系列を作製し、96穴マイクロタイタープレートに25μLずつ加えた。反応に用いた冷水病菌液

は、前述のワクチン作製方法と同様にして作製したホルマリン不活化冷水病菌液(2.2×10^8 CFU/mL)を用いた。菌液は遠心分離($8,000 \times g$, 10分, 4℃)して、PBS(-)で1回洗浄し、吸光度計を用いて630nmで1.8に濃度を調整した。調整した菌液を25μLずつ96穴マイクロタイタープレートに加えた。15℃で24時間反応させて凝集の有無を目視観察した。事前にPBS(-)のみでは凝集しないこと、日本水産資源保護協会から提供された抗冷水病菌ウサギ血清では凝集することを確認した。

冷水病菌株のアユへの病原性 実験3においては、それぞれの冷水病菌株のアユに対する病原性を事前に調べるため、感染実験を行った。2006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2.5g)を試験に用いた。培養した冷水病菌を18℃の地下水で4倍希釈し($1.6 \times 10^7 \sim 3.0 \times 10^8$ CFU/mL)、アユを30分間浸漬した。MCY液体培地のみを同様に4倍希釈してアユを浸漬した区を対照区とした。感染後のアユは18℃の地下水を通水した60L水槽に25尾ずつ収容し、2週間無給餌で飼育した。1試験区当たり2水槽とした。試験期間中に死亡した魚はすぐに水槽から取り出し、鰓や肝臓の貧血、下顎や体表の潰瘍等の冷水病症状の有無を調べた。

結果

実験1：冷水病菌液浸漬から加温処理までの期間の検討

感染試験後のアユの累積死亡率 感染後のアユの累積死亡率の推移をFig. 5-1に示した。1時間後、6時間後および1日後加温区の浸漬感染2週間後のアユの累積死亡率は、それぞれ36、30および18%であり、感染期間が長いほど累積死亡率は低かった。陽性対象区の累積死亡率は2%であり、これらはいずれも陰性対照区(90%)と比較して有意に低い値であった($P < 0.01$, χ^2 test)。ワクチン区の累積死亡率は70%であり、陰性対照区より有意に低かった($P < 0.05$, χ^2 test)。

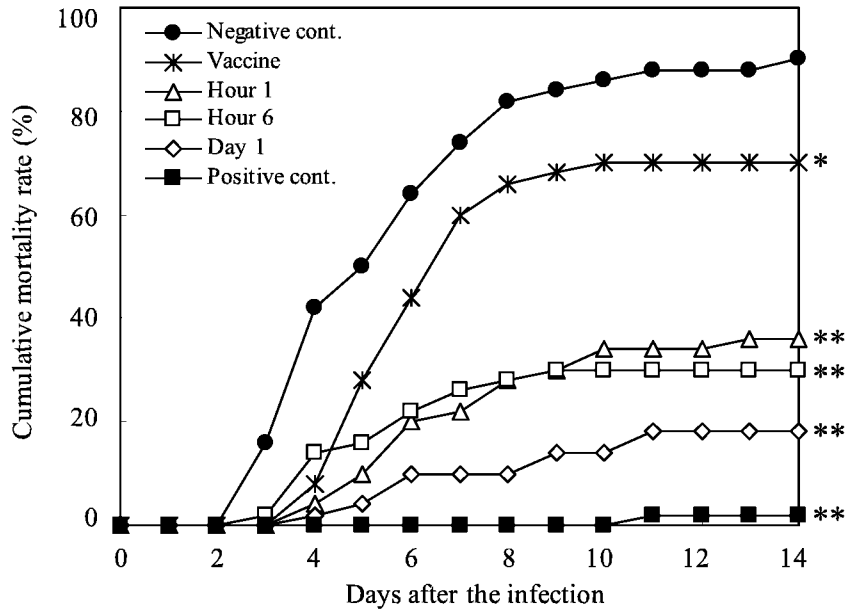


Fig. 5-1. Cumulative mortality rates of fish after bath challenge with *F. psychrophilum*. The fish were immersed in live bacterial suspension for 30 min and were placed into 700-L concrete tanks. The warmed water treatment at 28°C was started 1 hour, 6 hours or 1 day after the live bacteria immunization for 3 days. Fish remained with no treatment as positive control. For a negative control, the fish were immersed in MCY broth. For comparison vaccine consisting of cells of *F. psychrophilum* inactivated by use of formalin was included in experiment. Fourteen days after the immunization, the fish were infected by bath challenge with *F. psychrophilum*. χ^2 test was used for judging significant difference from negative control (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

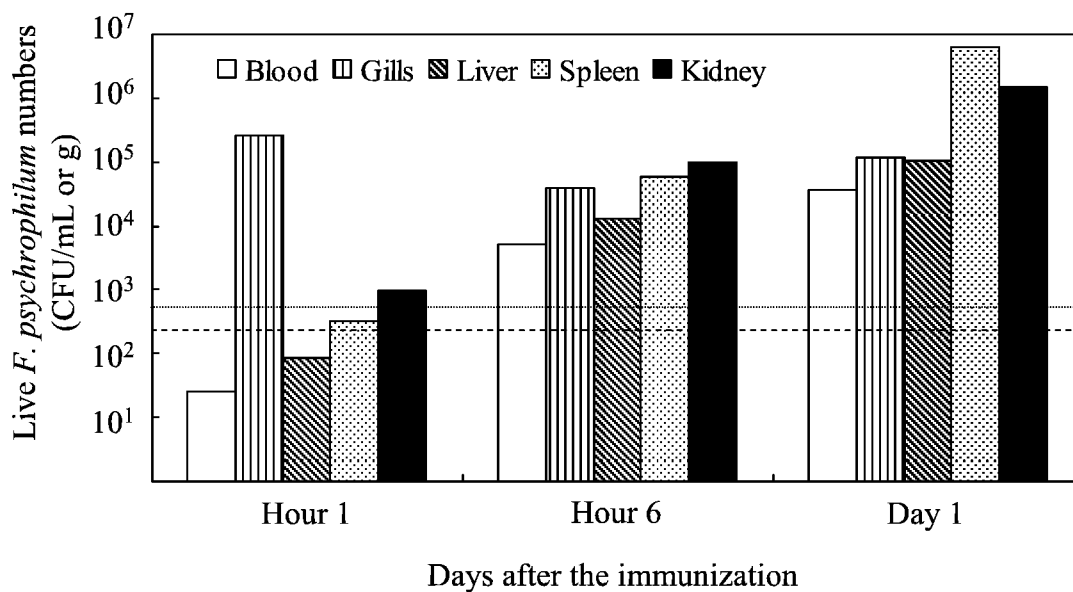


Fig. 5-2. Live *F. psychrophilum* numbers in the blood, gill, liver, spleen and kidney after immunization with live *F. psychrophilum*. The values indicate means (n=2). Dashed line indicates the detection limit of blood samples (150 CFU/mL); dotted line indicates the detection limit of the other samples (about 610 CFU/g). Under the detection limit, number of bacteria in the samples was treated as 0.

加温処理前の魚体内の冷水病菌生菌数 菌液浸漬 1 時間後、6 時間後および 1 日後のアユ魚体内の冷水病菌生菌数を Fig. 5-2 に示した。血液、肝臓、腎臓および脾臓の菌数は、浸漬 1 時間後は $10^1 \sim 10^3$ CFU/mL or g、6 時間後は $10^3 \sim 10^5$ CFU/mL or g、1 日後は $10^4 \sim 10^6$ CFU/mL or g であり、浸漬から加温処理までの期間が長いほど菌数は高かった。鰓の菌数は浸漬 1 時間後が 10^5 CFU/g と最も高く、その後はほぼ横ばいであった。

冷水病菌に対する凝集抗体価 免疫 2 週間後のアユ血中の冷水病菌に対する凝集抗体価を Fig. 5-3 に示した。1 時間後、6 時間後および 1 日後加温区の凝集抗体価はそれぞれ 9.2、17.8 および 27.9 であった。陽性対照区の凝集抗体価は 207.9 であった。これらはいずれも陰性対照区 (2.1) と比較して有意に高い値であった ($P < 0.01$, One-way ANOVA, Tukey-Kramer test)。ワクチン区の凝集抗体価は 3.0 であり、陰性対照区と比較して有意な差は認められなかった ($P > 0.05$, One-way ANOVA, Tukey-Kramer test)。

実験 2 : 冷水病菌液の浸漬濃度の検討

感染後のアユの累積死亡率の推移を Fig. 5-4 に示した。濃度の異なる冷水病菌液 (4.5×10^7 、 4.5×10^6 、 4.5×10^5 、 4.5×10^4 および 4.5×10^3 CFU/mL) で免疫したアユの累積死亡率はそれぞれ 12、20、24、60 および 68 % であり、冷水病菌液の濃度が高ければ高いほど、免疫効果は高かった。ワクチン区の累積死亡率は 60 % であった。これらはいずれも対照区 (92 %) と比較して有意に低い値であった ($P < 0.01$, χ^2 test)。

実験 3 : 冷水病菌液の菌株の検討

感染試験後のアユの累積死亡率 種々の冷水病菌株で免疫し、加温処理で治療後に PH0424 株で感染させたアユの累積死亡率の推移を Fig. 5-5 に示した。PH0424 株で免疫したアユの累積死亡率は 34 % であり、対照区の累積死亡率 (78 %) と比較して有

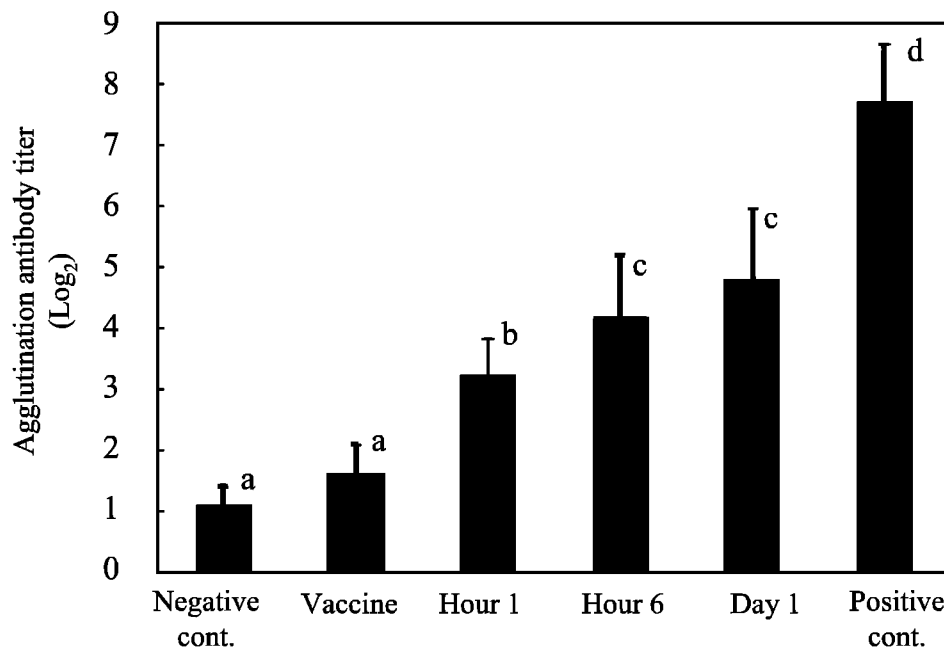


Fig. 5-3. Agglutination antibody titers against *F. psychrophilum* 14 days after the immunization. See the text and the figure legend of Fig. 5-1 for the details of the treatment. The values indicate geometric means (positive control: n=10, the other treatments: n=20). Different symbols indicate significant differences (One-way ANOVA, Tukey-Kramer test, $P < 0.01$).

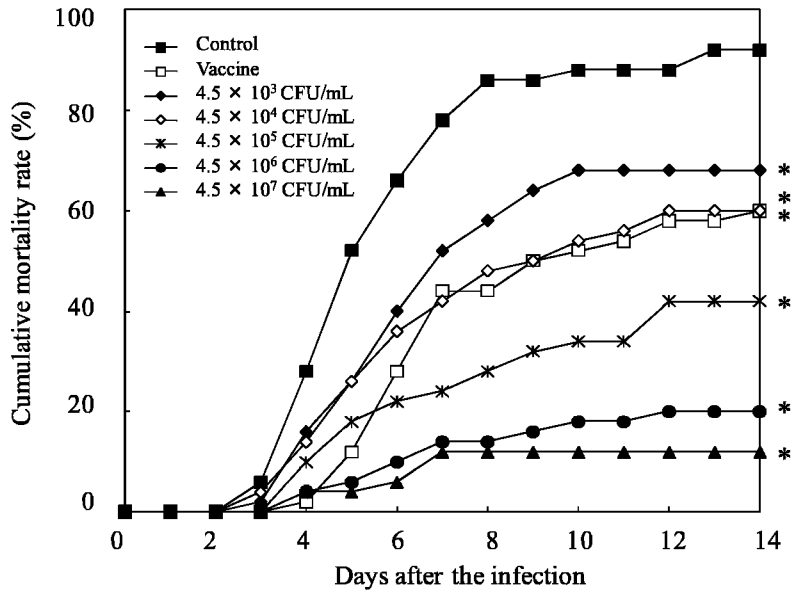


Fig. 5-4. Cumulative mortality rates of fish after bath challenge with *F. psychrophilum*. The fish were immersed in live bacterial suspension for 30 min and were placed into 700-L concrete tanks. The warmed water treatment at 28°C was started 1 day after the live bacteria immunization for 3 days. For a control, the fish were immersed in MCY broth. For comparison vaccine consisting of cells of *F. psychrophilum* inactivated by use of formalin was included in experiment. Fourteen days after the immunization, the fish were infected by bath challenge with *F. psychrophilum* and were placed into 60 L tanks. χ^2 test was used for judging significant difference from control (* $P < 0.01$).

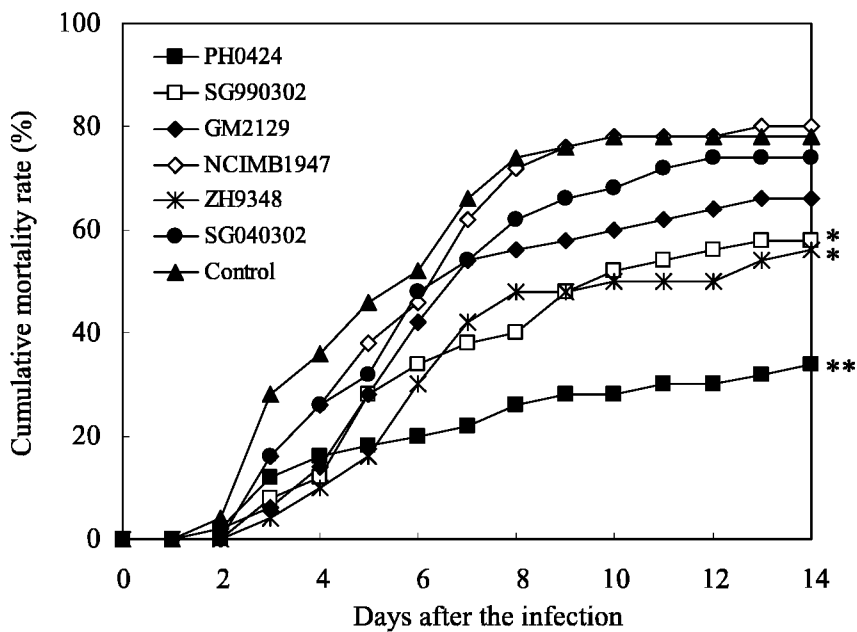


Fig. 5-5. Cumulative mortality rates of fish after bath challenge with *F. psychrophilum* PH0424. The fish were immersed in each live *F. psychrophilum* strain for 30 min and were placed into 700-L concrete tanks. The warmed water treatment at 28°C was started 1 day after the live bacteria immunization for 3 days. For a control, the fish were immersed in MCY broth. Fourteen days after the immunization, the fish were infected by bath challenge with *F. psychrophilum* PH0424 and were placed into 60 L tanks. χ^2 test was used for judging significant difference from control (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

意に低い値であった ($P < 0.01$, χ^2 test)。ZH9348 株および SG990302 株で免疫したアユの累積死亡率はそれぞれ 56 % および 58 % であり、対照区と比較して有意に低い値であった ($P < 0.05$, χ^2 test)。GM2129 株、SG040302 株および NCIMB1947 株で免疫したアユの累積死亡率はそれぞれ 66 %、74 % および 80 % であり、対照区と比較して有意な差は認められなかった ($P > 0.05$, χ^2 test)。

冷水病菌株のアユへの病原性 使用した冷水病菌株のアユに対する病原性を調べるために、各菌株をアユに浸漬感染させた場合のアユの累積死亡率の推移を Fig. 5-6 に示した。PH0424 株を感染させたアユの累積死亡率は 88 % であり、本株はアユに対して高い病原性を示した。SG990302 株を感染させたアユの累積死亡率は 30 % であった。死亡魚は冷水病の症状を示しており、本株はアユに対して低い病原性を示した。GM2129 株、NCIMB1947 株、ZH9348 株および SG040302 株に感染させた試験区と対照区のアユの累積死亡率は 0~8 % であり、いずれの死亡魚にも冷水病の症状は認められなかった。

実験 4：抗病性を獲得したアユの冷水病感染時の臓

器中の冷水病菌の動態

感染試験後のアユの累積死亡率 感染後のアユの累積死亡率の推移を Fig. 5-7 に示した。生菌で免疫した試験区のアユの累積死亡率は 22 % であり、対照区のアユの累積死亡率 (68 %) と比較して有意に低い値であった。

魚体内の冷水病菌の生菌数 感染後の魚体内における冷水病菌の生菌数の動態を Fig. 5-8 に示した。対照区の冷水病菌の生菌数は、いずれの臓器においても感染後急激に増加し、鰓を除く 4 つの部位で 5 日後にピークに達した。脾臓の冷水病菌の生菌数が最も高く、 3.5×10^7 CFU/g であった。その後、冷水病菌の生菌数は減少したが、試験終了時 (感染 21 日後) においても冷水病菌が検出された。一方、生菌で免疫した試験区においては、冷水病菌の生菌数は感染 2 日後にピークに達したが、その時の菌数は最も高かった脾臓でも 1.3×10^5 CFU/g であり、対照区と比較して著しく低かった。その後、冷水病菌の生菌数は減少し、7 日目以降は検出限界値以下であった。

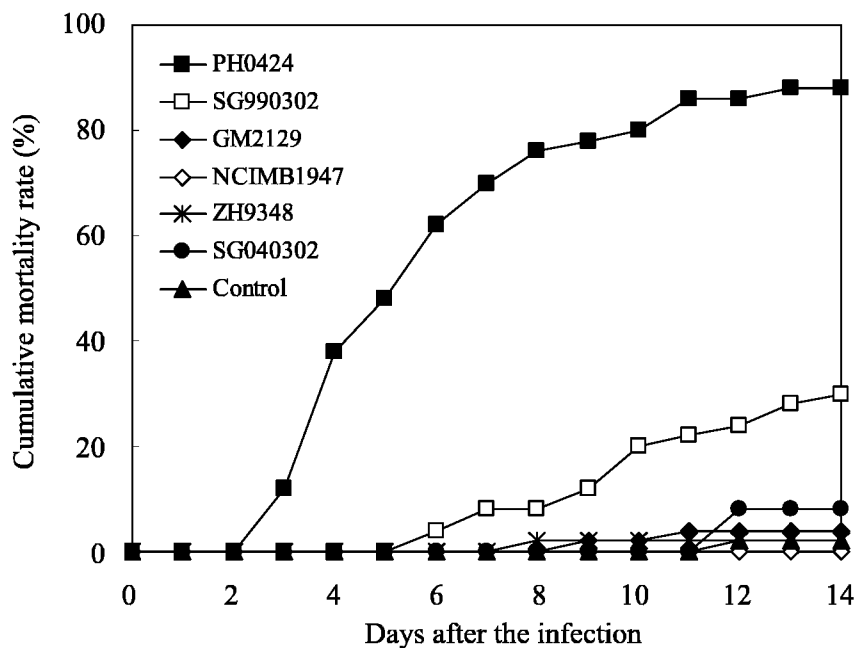


Fig. 5-6. Cumulative mortality rates of fish after bath challenge with *F. psychrophilum* strains. The fish were immersed in each live *F. psychrophilum* strain for 30 min and were placed into 60-L tanks.

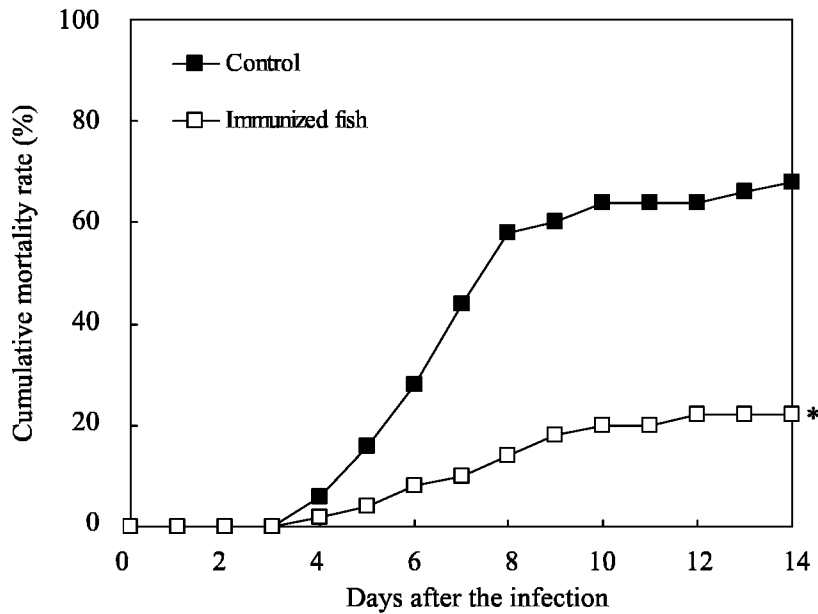


Fig. 5-7. Cumulative mortality rates of fish after bath challenge with *F. psychrophilum* PH0424. The fish were immersed in live *F. psychrophilum* PH0424 for 30 min and were placed into 700-L concrete tanks. The warmed water treatment at 28°C was started 1 day after the live bacteria immunization for 3 days. For a control, the fish were immersed in MCY broth. Fourteen days after the immunization, the fish were infected by bath challenge with *F. psychrophilum* PH0424 and were placed into 60 L tanks. χ^2 test was used for judging significant difference from control (* $P < 0.01$).

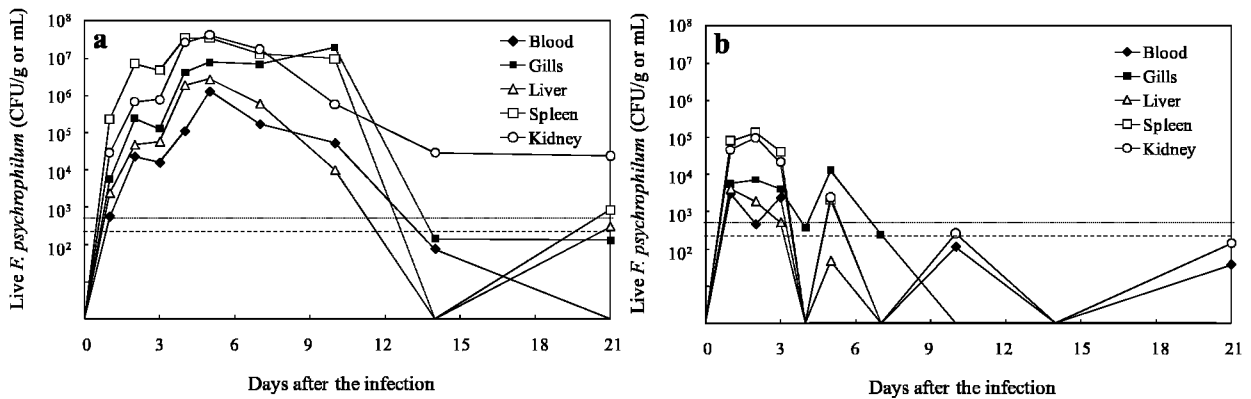


Fig. 5-8. Distribution of live *F. psychrophilum* in the blood, gills, liver, spleen, and kidney after infection with *F. psychrophilum*. a, Control; b, Immunized fish. The values are shown means ($n=2$). Dashed lines indicate the detection limit of blood samples (150 CFU/mL). Dotted lines indicate the detection limit of the other organ samples (about 610 CFU/g). The numbers below the detection limit are references. Averaging of CFUs put the numbers below the detection limit.

考察

本研究において、冷水病に人為感染させたアユを 28 °C の加温処理で治療することにより、治療後のア

ユが本病に対する抗病性を獲得することを明らかにした。これまでの研究で、冷水病に人為感染させて生き残ったアユや、養殖場において冷水病の感染を何度も経験したアユは、冷水病に対して抗病性を獲得することが知られている。^{31,32)} しかし、冷水病に

何度も感染させるといった現象を利用して冷水病に対して抗病性を持ったアユを作るとすると、時間がかかる上に最終的なアユの歩留まりが低くなる。本研究では、アユに冷水病を人為的に感染させてから1日以内に加温処理で治療を行ったため、感染から治療までの間に冷水病によるアユの死亡はなく、冷水病を治療した上に、短期間で効率よく冷水病に対する抗病性を獲得させることができた (Fig. 5-1)。

田中ら⁶²⁾は、赤血球封入体症候群 (EIBS) に感染したギンザケに対して 16 °C の加温処理で治療したところ、治療後のギンザケは EIBS に対する抗病性を獲得したが、治療後のギンザケにウイルスが残るかどうかは不明であると報告している。一方、冷水病に感染させたアユに対して 28 °C で3日間の加温処理を行うと、魚体内および飼育水中から冷水病菌は検出されないこと (第4章参照)、冷水病菌を 28 °C で3日間培養すると、コロニー形成能と病原性を消失することを確認している (第3章参照)。このことから、冷水病に人為感染させたアユを 28 °C で3日間の加温処理で治療することにより、治療後のアユは冷水病菌を保菌することなく冷水病に対する抗病性を獲得すると考えられる。

高い抗病性を獲得したアユほど、冷水病菌に対するアユ血中の凝集抗体価は高い値を示した (Fig. 5-3)。冷水病に対して免疫を持った魚では、冷水病菌に対する抗体価が上昇することが報告されている。^{65-68,70-73,76,77)} LaFrentz *et al.*⁷⁶⁾ は、冷水病菌で免疫されたニジマスの血清を冷水病未経験のニジマスに注射したところ、受動免疫が成立したと報告している。これらのことは、冷水病に対する防御免疫では、特異抗体が重要な役割を果たしていることを示している。冷水病に対して免疫を持ったアユの血清中で冷水病菌を培養すると、冷水病菌の増殖が抑制された。⁷⁸⁾ 冷水病に対して抗病性を獲得したアユに冷水病菌の浸漬感染を行ったところ、魚体内の冷水病菌の生菌数は冷水病に感染経験のないアユと比較して著しく低かった (Fig. 5-8)。これらの結果は、冷水病に対して抗病性を獲得したアユの体内では、冷水病菌に対する抗体によって冷水病菌の増殖が抑制された可能性を示す。

冷水病菌浸漬から加温処理までの期間が長い試験区ほど、鰓を除くアユ臓器中の冷水病菌の濃度が高かった (Fig. 5-2)。アユ臓器中の冷水病菌の濃度が高い試験区ほど、加温処理後に高い抗病性を獲得した。このことから冷水病菌が魚体内、特に脾臓や腎臓のような免疫機能を担った組織に多く入ることが、アユが冷水病に対する免疫を獲得するためには重要であると考えられる。浸漬する菌液濃度や、菌株の種類を変えて同様に浸漬しその後の抗病性について調べたところ、菌液濃度が高ければ高いほど、また菌株の病原性が高ければ高いほど、アユはより高い抗病性を獲得した (Fig. 5-4, 5-5)。これは、浸漬する菌液濃度が高いほど、また病原性が高い菌株を用いるほどアユ体内へより多くの冷水病菌が侵入するためであると考えられる。

本研究では生菌と死菌の免疫効果を比較するために、ホルマリン不活化ワクチンを浸漬した試験区を設けた。その結果、ワクチンを浸漬した試験区の免疫効果は低かった (Fig. 5-1, 5-4)。このことは、菌の生死は免疫獲得に重要であることを示している。水中の微粒子は魚の体表の創傷部位から取り込まれ、腎臓や脾臓まで運ばれることが報告されている。^{79,80)} 生菌は能動的に魚体内に侵入して増殖するのに対し、死菌は受動的に魚体内に取り込まれることから、生菌と死菌の免疫効果の違いは、取り込まれる抗原の量の違いではないかと考えられる。実際に、強制的に体内へ冷水病菌の死菌を注射するホルマリン不活化注射ワクチンは高い免疫効果を示す。⁶⁶⁻⁶⁸⁾ このことも、取り込まれる抗原量の違いが免疫効果に影響することを支持する。

ただ、実用化という観点から考えると、この方法は培養した冷水病菌を人為的にアユに感染させる操作を伴うため、養殖現場で直接応用することは、技術的にも倫理的にも解決すべき課題が残る。本研究の結果を生産現場へ応用する際に重要なことは、冷水病の自然発生時における加温処理のタイミングの調整である。加温処理をタイミング良く行うことは、単に治療するだけでなく、積極的に冷水病に対する抗病性をアユに付与することを可能にする。

第6章 総括

アユの冷水病は、日本で発生が確認されてからすでに10年以上が経過しているが、未だにアユ養殖場および天然水域において深刻な被害を与えている。現在のところ、スルフィソゾールナトリウムの投薬は冷水病の治療に対して十分効果が認められているものの、薬剤耐性菌の出現や、魚体や環境への薬の残留を考慮すると、頻繁な使用は避けるべきである。一方、加温処理は飼育水温を上昇させるだけで冷水病を治療することができるため、環境への負荷は少ない。加温処理の治療効果を科学的に明らかにすることは、加温処理の普及および治療後のアユの価値を高めることに繋がる。

冷水病に感染経験のあるアユは、その後の冷水病感染に対して高い抗病性を示すことが確認されている。冷水病に対するワクチン対策が難航している昨今において、冷水病に対して抗病性を持ったアユを人為的に作出することができれば、ワクチン開発などの冷水病対策に有効な手立てとなる。

本研究では、加温処理の治療効果を科学的に明らかにするため、冷水病菌の種々の温度に対する生育特性と、冷水病に感染させたアユに対して加温処理を行った時の魚体内および飼育水中の冷水病菌の動態を調べた。さらに、冷水病に感染させたアユを加温処理で治療することによって、冷水病に対する抗病性をアユに獲得させることを試みた。

本研究で得られた成果は次の通りである。

種々の温度で培養した冷水病菌の生育特性

MCY 液体培地および滅菌地下水において15～28℃で冷水病菌を培養し、MCY 寒天培地を用いてコロニー数を計数した。MCY 液体培地を用いた場合、冷水病菌は15～25℃では試験に用いた4株すべてで増殖が認められた。25～27℃では、菌株間で異なった増殖パターンを示した。しかし、28℃ではすべての菌株で増殖は認められず、培養2日以内にコロニー形成能を失った。滅菌地下水を用いた場合、いずれの温度でも細胞数の増加はまったく認められず、温度が高ければ高いほど、コロニー数は早く減少した。28℃ではすべての菌株が2日以内にコロニー形成能を失った。これらの結果から、加温処理で

用いられている28℃という温度は、冷水病菌にとって過酷な環境であり、この温度に晒された冷水病菌は速やかにコロニー形成能を消失することが明らかとなった。

しかし、コロニー形成能を消失した冷水病菌が死滅したとは言い切れず、病原性を持った状態へ復帰する可能性も考えられる。そのため、次にこの点について検討した。

種々の温度で培養した冷水病菌の VBNC への移行とその後の病原性

滅菌地下水を用いて、15、23、28 および 33℃で冷水病菌を保置し、コロニー形成能と細胞膜の構造安定性 (LIVE/DEAD 染色法) を調べた。さらに、コロニー形成能を消失した冷水病菌が増殖状態へ戻り、病原性を発揮する状態へ復帰するか否かを、MCY 液体培地への接種およびアユへの攻撃試験によって調べた。その結果、冷水病菌は28℃および33℃ではコロニー数の増加は認められず、2日以内にコロニー形成能を消失した。このコロニー形成能を消失した冷水病菌は、細胞膜の構造が安定的に保たれていたことから、“生きているが、培養できない”VBNC (Viable But Non-Culturable) 状態へ移行したと考えられた。滅菌地下水中で28℃および33℃で保置され、VBNC 状態へ移行した冷水病菌をアユの腹腔内に注射したところ、アユへの病原性は認められず、コロニー形成が可能な生理状態へ復活することもなかった。このことから、滅菌地下水中で28℃および33℃に加温するときに見られた冷水病菌のVBNC 状態は、蘇生可能な一過性の生理状態ではなく、細胞が死滅の方向へ向かっている過程を捉えたものであろう。

投薬および加温処理時の冷水病菌の魚体内および飼育水中の動態と治療効果

加温処理の治療効果を調べるため、冷水病に感染させたアユに対してスルフィソゾールナトリウムの投薬、23℃または28℃で3日間の加温処理を行い、それぞれの処理区について魚体内および飼育水中の冷水病菌の動態を調べた。魚体内の冷水病菌の計数

は MCY 平板培地を用いた培養法で行い、飼育水中の冷水病菌の計数は LAMP 法で行った。その結果、投薬や 23 °C の加温処理で一応の治療効果は認められたが、治療後に魚体内および飼育水中から冷水病菌が検出された。一方、28 °C の加温処理では、加温開始翌日には魚体内および飼育水中から冷水病菌が検出されなかった。これは、28 °C の加温処理によって冷水病菌が死滅したためであると考えられる。このことは、28 °C の加温処理が高い治療効果に加えて、冷水病の再発を防止できることを示す。

人為的に冷水病を感染させたアユの加温処理による抗病性の獲得

アユを人為的に冷水病菌液に 30 分間浸漬して冷水病に感染させ、その後 28 °C で 3 日間の加温処理で治療することにより、本病に対する抗病性をアユに獲得させることを試みた。アユが抗病性を獲得したか否かは、菌液に浸漬した 2 週間後に再び菌液に浸漬して冷水病に感染させ、さらに 2 週間後のアユの死亡率を比較することで確認した。その結果、生菌を浸漬してから加温処理で治療するまでの期間が長ければ長いほど、アユは冷水病に対して高い抗病性を獲得した。高い抗病性を獲得したアユほど、冷水病菌に対するアユ血中の凝集抗体価は高い値を示した。抗病性を獲得したアユを冷水病菌液に浸漬後、魚体内の冷水病菌の動態を調べた。その結果、抗病性を獲得したアユの体内では冷水病菌の増殖が抑制されていた。これらのことから、冷水病に人為感染させたアユを 28 °C の加温処理で治療すること

により、治療後のアユが本病に対する抗病性を獲得することが明らかとなった。冷水病に対して抗病性を獲得したアユの体内では、冷水病菌に対する抗体が重要な役割を果たしており、再感染時にはこの抗体によって魚体内の冷水病菌の増殖が抑制されるようである。

本研究では、28 °C で冷水病菌がコロニー形成能および病原性を失うこと、冷水病に感染させたアユに対して 28 °C の加温処理を行うと、魚体内および飼育水中から冷水病菌が検出されなくなることを明らかにし、加温処理の治療効果を科学的に検証した。さらに、アユに冷水病を浸漬感染後、加温処理で治療することによって、冷水病に対する抗病性を獲得したアユを人為的に作出することができた。このアユは冷水病に対する抗病性を持ち、しかも冷水病菌を保菌しないことから、養殖種苗および河川放流用種苗として非常に有用である。ただ、実用化という観点から考えると、この方法は培養した冷水病菌を人為的にアユに感染させる操作を伴うため、養殖現場で直接応用することは、技術的にも倫理的にも解決すべき課題が残る。

本研究の結果を生産現場へ応用する際に重要なことは、冷水病の自然発生時における加温処理のタイミングの調整である。加温処理をタイミング良く行うことは、単に治療するだけでなく、積極的に冷水病に対する抗病性をアユに付与することを可能にする。

Summary

Ayu (*Plecoglossus altivelis*) is distributed from west of Hokkaido to south of Kyusyu and it is important fish for freshwater fishery and aquaculture. In the rivers, ayu has a territory in the area of feeding. "Fishing for ayu with a live decoy" is a popular method for catching ayu using their behavioral characteristics of territoriality. As ayu from Lake Biwa has the strong behavioral characteristics, it is released into many rivers in Japan. However, the amount of the released ayu from Lake Biwa has decreased gradually. That is why the released ayu possibly causes the spread of bacterial cold-water disease (BCWD).

BCWD is bacterial fish disease caused by *Flavobacterium psychrophilum*. The disease is called BCWD because of its occurrence in low water temperatures in salmon farms in North America. In Japan, the disease was first recognized in 1987. Although BCWD is a serious problem in salmon farms in Europe and the United States, the disease is serious in ayu farms in Japan. Chemotherapy has been successfully used to cure BCWD. Oral administration of sulfisozole sodium is effective to cure BCWD. However, the excessive use of antibiotics sometimes results in the development of drug resistance among bacteria; residues of bactericidal drugs in fish and the environment are an increasingly important problem, especially with respect to food safety.

An alternative to curing BCWD with chemotherapy is warmed water treatment. For warmed water treatment, as a drastic change of water temperature is not good for fish health: in the first step, water temperature is raised up to 23 °C for 3 days, then, it is returned to normal temperature (18 °C), kept at the level temperature for several days, and then raised again up to 28 °C for 3 days. The warmed water treatment takes advantage of the psychrophilic characteristics of *F. psychrophilum*. However, the upper limit of growth temperature of *F. psychrophilum* and distribution of *F. psychrophilum* in fish organs and rearing water before and after the warmed water treatment are still unclear.

For establishment of warmed water treatment, it is necessary to demonstrate scientifically the effect of the treatment.

BCWD occurs not only in fish farms but also in natural rivers in Japan. When *F. psychrophilum* exist in natural rivers, BCWD probably occurs even if *F. psychrophilum*-free ayu (treated ayu) are released there. Therefore, vaccine against BCWD is needed. Although there is no commercial vaccine available, it has been reported that significant protection can be achieved under experimental conditions. Despite these findings, the data on immunity to this pathogen were limited and the role that antibody plays in conferring protection is unknown.

On the other hand, ayu that survived from BCWD were induced protective immunity against *F. psychrophilum* infection. It is also said at real production sites that ayu experienced the infection with BCWD several times came to be more and more resistant against BCWD. Thus, as for the countermeasure against BCWD, it must be useful to study the combination of this phenomenon and a warmed water treatment for vaccine development. The warmed water treatment is probably able to help the BCWD infected fish to develop the protective immunity against BCWD in addition to the cure for BCWD.

In the present study, we investigated growth and survival patterns of *F. psychrophilum* at various temperatures under two nutritional conditions and the distribution of *F. psychrophilum* in fish organs and in rearing water before and after various treatments. We also investigated the induction of protective immunity in ayu against *F. psychrophilum* by the warmed water treatment after artificial infection.

Growth/survival of *F. psychrophilum* at various temperatures in MCY broth or sterilized underground water

We investigated the growth/survival of *F. psychrophilum* at 15–28 °C under two nutritional

conditions: in modified cytophaga (MCY) broth and sterilized underground water. MCY broth is used for culturing *F. psychrophilum* and underground water is used for rearing of ayu. Numbers of culturable *F. psychrophilum* were estimated by a drop-plate method with MCY agar. In MCY broth, all 4 strains grew in the temperature range of 15–25 °C. At 25–27 °C, different growth patterns were seen among the strains. However, at 28 °C, none of the strains could grow. All of them lost their colony-forming abilities within 2 days. In sterilized underground water, cell numbers of live *F. psychrophilum* never increased. The higher the incubation temperatures were, the faster CFU decreased. At 28 °C, live *F. psychrophilum* totally lost its colony-forming ability within 2 days. Therefore, the temperature of 28 °C used for the warmed water treatment is severe environment for *F. psychrophilum* and they lost their colony-forming abilities quickly at 28 °C. However, the loss of colony-forming ability is not equal to cell death. The cells are possibly resuscitated and returned to culturable state. Therefore, in the next step, we investigated colony formation, membrane potential and pathogenicity of *F. psychrophilum* at various temperatures.

Viable but non-culturable state of *F. psychrophilum* at various temperatures and their pathogenicity to ayu

We investigated colony formation, membrane potential (using LIVE/DEAD kit) of *F. psychrophilum* at various temperatures (15 °C, 23 °C, 28 °C and 33 °C) in sterilized underground water. In order to investigate whether *F. psychrophilum* that lost colony-forming ability resuscitate and return to culturable state or not, we tried to resuscitate the bacteria by inoculating them into MCY broth and infecting them into the host. Within 2 days at 28 °C and 33 °C, *F. psychrophilum* completely lost their colony-forming abilities but still maintained their membrane potentials. It seemed that these cells entered into viable but non-culturable (VBNC) state. However, experimental ayu infection revealed that VBNC *F. psychrophilum* cells were unable to cause BCWD, suggesting that the cells were progressing

towards death at 28 °C and 33 °C.

Distribution of *F. psychrophilum* in fish organs and rearing water before and after various treatments

In order to demonstrate scientifically the effect of warmed water treatment, we investigated distribution of *F. psychrophilum* in infected fish organs and in rearing water before and after various treatments. Fish were immersed in the bacterial suspension and they were then divided and placed into concrete tanks. Three different treatments to cure BCWD were compared. Chemotherapy included oral administration of sulfisozole sodium. For the 23 °C and 28 °C treatments, the rearing water temperature of 18 °C was warmed to 23 °C and 28 °C for 3 days, respectively. These three treatments were started 1 day after the infection. Numbers of culturable *F. psychrophilum* in the fish organs were estimated using a colony-counting method. Numbers of *F. psychrophilum* cells in the rearing water were estimated using the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method that is one of the nucleic acid amplification methods. Chemotherapy and 23 °C treatment were effective to cure BCWD. However, *F. psychrophilum* was detected in the fish organs and rearing water even after the treatment. On the other hand, warmed water treatment at 28 °C was the most effective in curing BCWD. *F. psychrophilum* was detected neither in any fish organs nor in the rearing water after the 28 °C treatment. It seemed that the treatment killed *F. psychrophilum* completely. These results indicate the possibility that warmed water treatment at 28 °C for 3 days not only cures BCWD effectively but also prevents recurrence of BCWD.

Protective immunity in ayu against *F. psychrophilum* induced by warmed water treatment after artificial infection

We investigated the induction of protective immunity in ayu against *F. psychrophilum* by the warmed water treatment. The fish was immersed in live bacterial suspension and placed into concrete tanks. The warmed water treatment at 28 °C for 3 days was started at 1 hour, 6 hours or 1 day after the immersion. As a

negative control, the fish was immersed in sterilized MCY broth. Fourteen days after the immersion, agglutination antibody titer of the fish serum against *F. psychrophilum* was determined by using the micro-titer method. Furthermore, treated fish were infected by bath challenge with *F. psychrophilum*. The cumulative mortality rate of the fish treated with warmed water at 1 hour, 6 hours or 1 day after the live bacterial immersion were 36 %, 30 % and 18 %, respectively. They were significantly lower than that of the negative control (90 %). Ayu that was induced high protective immunity against BCWD had high agglutination antibody titer against *F. psychrophilum*. These results suggested that the warmed water treatment applied to BCWD ayu could not only cure the disease but also immunize the fish against *F. psychrophilum*.

In the present study, we demonstrated that *F. psychrophilum* lost their colony-forming abilities and

pathogenicity against ayu at 28 °C and *F. psychrophilum* was detected neither in any fish organs nor in the rearing water after the warmed water treatment at 28 °C. We also demonstrated the induction of protective immunity in ayu against *F. psychrophilum* induced by warmed water treatment after artificial infection. The fish is useful as aquaculture fish and releasing fish because the fish not only is induced protective immunity but also has no *F. psychrophilum*. However, in view of a practical use, the technique that includes artificial infection with live bacteria is difficult technically and ethically in the real aquaculture production site.

In order to use the technique in the production sites, it is important to control timing of curing with warmed water treatment against naturally infected fish. The warmed water treatment can be used for not only curing BCWD but also inducing the protective immunity against BCWD to fish.

謝辞

本研究の終わりにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜った、近畿大学農学部教授 江口 充先生に深く感謝の意を表します。

また、本論文をまとめるにあたり、有益なご助言をいただき、校閲の労をお取りいただいた近畿大学水産研究所教授 滝井健二先生、近畿大学農学部教授 安藤正史先生に厚くお礼申し上げます。

本研究の遂行にあたって多くのご助言を賜りました、近畿大学農学部助教 永田恵里奈博士、元滋賀県水産試験場醒井養鱒分場長 高橋 誓博士、独立行政法人水産大学校准教授 近藤昌和博士、フランス国立

農業研究機構 Jean-francois Bernardet 博士に心よりお礼申し上げます。

社会人大学院生として近畿大学大学院に進学するにあたり、ご理解とご協力を賜りました、滋賀県水産試験場および滋賀県農政水産部水産課の職員の皆様に心より感謝いたします。

最後に、本研究の遂行にあたり、多くのご助言とご協力を頂いた近畿大学農学部水族環境学研究室の博士研究員、大学院生、学部学生ならびに卒業生の皆様に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 西田 睦 (1989): アユ。「日本の淡水魚, 川那部浩哉・水野信彦編」, 山と溪谷社, 東京, pp. 66-79.
- 2) Nishida, M. (1988): A new subspecies of the ayu, *Plecoglossus altivelis*, (Plecoglossidae) from the Ryukyu Islands. *Jpn. J. Ichthyol.*, **35**, 236-242.
- 3) 谷口順彦・池田 実 (2009): 「アユ学 アユの遺伝的多様性の利用と保全」, 築地書館, 東京, 352p.
- 4) 関 伸吾・谷口順彦 (1988): アイソザイム遺伝標識による放流湖産アユの追跡. 日水誌, **54**, 745-749.
- 5) 辻村明夫・谷口順彦 (1995): 生殖形質に見られた湖産および海産アユ間の遺伝的差異. 日水誌, **61**, 165-169.
- 6) 滋谷竜太郎・関 伸吾・谷口順彦 (1995): 海系アユおよび琵琶湖系アユのなわばり行動の水温別比較. 水産増殖, **43**, 415-421.
- 7) 全国内水面漁業協同組合連合会 (2010): アユ種苗別河川放流実績. 機関誌ぜんない, **15**, 30.
- 8) 岩田祐士・武島弘彦・田子泰彦・渡辺勝敏・井口恵一朗・西田 睦 (2007): ミトコンドリア SNP 標識で追跡した放流琵琶湖産アユの行方. 日水誌, **73**, 278-283.
- 9) 井上 潔 (2000): アユの冷水病. 海洋と生物, **126**, 35-38.
- 10) 谷口順彦 (2002): シンポジウム「魚病研究の現状と展望」. アユの種苗放流と冷水病被害について, 魚病研究, **37**, 205-223.
- 11) Bernardet, J. F., P. Segers, M. Vancanneyt, F. Berthe, K. Kersters and P. Vandamme (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). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 128-148.
- 12) 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.
- 13) Bernardet, J. F. and B. Kerouault (1989): Phenotypic and genomic studies of “*Cytophaga psychrophila*” isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in France. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1796-1800.
- 14) Nematollahi, A., A. Decostere, F. Pasmans and F. Haesebrouck (2003): *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *J. Fish Dis.*, **26**, 563-574.
- 15) Wakabayashi, H., T. Toyama and T. Iida (1994): A study on serotyping of *Cytophaga psychrophila* isolated from fishes in Japan. *Fish Pathol.*, **29**, 101-104.
- 16) Rangdale, R. E., R. H. Richards and D. J. Alderman (1997): Minimum inhibitory concentrations of selected antimicrobial compounds against *Flavobacterium psychrophilum* the causal agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS). *Aquaculture*, **158**, 193-201.
- 17) Bruun, M. S., A. S. Schmidt, L. Madsen and I. Dalsgaard (2000): Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. *Aquaculture*, **187**, 201-212.
- 18) 二宮浩司・山本充孝 (2001): アユの冷水病に対するスルフィゾゾールナトリウムの治療効果. 滋賀水試研報, **48**, 17-20.
- 19) Bruun, M. S., L. Madsen and I. Dalsgaard (2003): Efficiency of oxytetracycline treatment in rainbow trout experimentally infected with *Flavobacterium psychrophilum* strains having different in vitro antibiotic susceptibilities. *Aquaculture*, **215**, 11-20.
- 20) Cabello, F. C. (2006): Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.*, **8**, 1137-1144.
- 21) Pacha, R. E. (1968): Characteristics of *Cytophaga psychrophila* (Borg) isolated during outbreaks of bacterial cold-water disease. *Appl. Microbiol.*, **16**, 97-101.
- 22) Holt, R. A., A. Amandi, J. S. Rohovec and J. L. Fryer (1989): Relation of water temperature to

- bacterial cold-water disease in coho salmon, chinook salmon, and rainbow trout. *J. Aquat. Anim. Health*, **1**, 94-101.
- 23) Iida, Y. and A. Mizokami (1996): Outbreaks of coldwater disease in wild ayu and pale chub. *Fish Pathol.*, **31**, 157-164.
- 24) Uddin, M. N. and H. Wakabayashi (1997): Effects of temperature on growth and protease production of *Cytophaga psychrophila*. *Fish Pathol.*, **32**, 225-226.
- 25) Lee, K. B and G. J. Heo (1998): First isolation and identification of *Cytophaga psychrophila* from cultured ayu in Korea. *Fish Pathol.*, **33**, 37-38.
- 26) 岡部正也・関 伸吾・西山 勝・桑原秀俊・佐伯昭・山岡耕作 (2003): 同一環境下で継代飼育されたアユ *Plecoglossus altivelis* 3 品種間における温度適応力の差異. 日水誌, **69**, 717-725.
- 27) 遠藤 誠・孝橋賢一・高橋 誓・岩崎治臣 (2001): アユの冷水病に対する加温処理の予防効果 I. 滋賀水試研報, **48**, 1-4.
- 28) 酒井明久・二宮浩司・太田滋規・遠藤 誠 (2001): アユの冷水病に対する加温処理の予防効果 II. 滋賀水試研報, **48**, 5-10.
- 29) 山本充孝・二宮浩司・高橋 誓 (2001): 加温と薬剤を併用したアユ冷水病の予防効果. 滋賀水試研報, **48**, 11-16.
- 30) 網田健次郎・星野正邦・本間智晴・若林久嗣 (2000): 河川における *Flavobacterium psychrophilum* の分布調査. 魚病研究, **35**, 193-197.
- 31) 金辻宏明・山本充孝・二宮浩司 (2007): 冷水病感染耐過アユの抗病性. 魚病研究, **42**, 159-161.
- 32) 二宮浩司・金辻宏明・山本充孝・菅原和宏 (2003): 冷水病経験アユの冷水病に対する抗病性実証試験 (2), 滋賀水試事報, 160-161.
- 33) Hoben, H. J. and P. Somasegaran (1982): Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 1246-1247.
- 34) Morita, R. Y. (1993): Bioavailability of energy and the starvation state. In: Starvation in Bacteria (ed. by Staffan Kjelleberg), Plenum Press, New York, pp. 1-23.
- 35) Vatsos, I. N., K. D. Thompson and A. Adams (2003): Starvation of *Flavobacterium psychrophilum* in broth, stream water and distilled water. *Dis. Aquat. Org.*, **56**, 115-126.
- 36) Madetoja, J., S. Nystedt and T. Wiklund (2003): Survival and virulence of *Flavobacterium psychrophilum* in water microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **43**, 217-223.
- 37) Colwell, R. R., P. R. Brayton, D. J. Grimes, D. B. Roszak, S. A. Huq and L. M. Palmer (1985): Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: Implications for release of genetically engineered microorganisms. *Bio/Technology*, **3**, 817-820.
- 38) Wai, S. N., T. Moriya, K. Kondo, H. Misumi and K. Amako (1996): Resuscitation of *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 from a viable but nonculturable state by heat shock. *FEMS Microbiol. Lett.*, **136**, 187-191.
- 39) Fouz, B., A. E. Toranzo, E. Marco-Noales and C. Amaro (1998): Survival of fish-virulent strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* in seawater under starvation conditions. *FEMS Microbiol. Lett.*, **168**, 181-186.
- 40) Magariños, B., J. L. Romalde, J. L. Barja and A. E. Toranzo (1994): Evidence of a dormant but infective state of the fish pathogen *Pasteurella piscicida* in seawater and sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 180-186.
- 41) Porter, K. G. and Y. S. Feig (1980): The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, **25**, 943-948.
- 42) Rowe, R., R. Todd and J. Waide (1977): Microtechnique for most-probable-number analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 675-680.
- 43) Reed, L. J., and H. Muench (1938): A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* **27**, 493-497.
- 44) Michel, C., D. Antonio and R. P. Hedrick (1999): Production of viable cultures of *Flavobacterium psychrophilum*: approach and control. *Res. Microbiol.*, **150**, 351-358.
- 45) Eguchi, M., E. Fujiwara-Nagata and N. Miyamoto (2003): Physiological state of *Vibrio anguillarum*, a

- fish pathogen, under starved and low-osmotic environments. *Microbes Environ.*, **18**, 160-166.
- 46) Morgan, J. A. W., P. A. Cranwell and R. W. Pickup (1991): Survival of *Aeromonas salmonicida* in lake water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1777-1782.
- 47) Kogure, K., U. Simidu and N. Taga (1979): A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **25**, 415-420.
- 48) Addinall, S.G., E. Bi and J. Lutkenhaus (1996): FtsZ ring formation in *fts* mutants. *J. Bacteriol.*, **178**, 3877-3884.
- 49) Toyama, T., K. Kita-Tsukamoto and H. Wakabayashi (1994): Identification of *Cytophaga psychrophila* by PCR targeted 16S ribosomal RNA. *Fish Pathol.*, **29**, 271-275.
- 50) Izumi, S. and H. Wakabayashi (2000): Sequencing of *gyrB* and their application in the identification of *Flavobacterium psychrophilum* by PCR. *Fish Pathol.*, **35**, 93-94.
- 51) 吉浦康寿・釜石 隆・中易千早・乙竹 充 (2006): Peptidyl-prolyl cis-trans isomerise 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, **41**, 67-71.
- 52) Liu, H., S. Izumi and H. Wakabayashi (2001): Detection of *Flavobacterium psychrophilum* in various organs of ayu *Plecoglossus altivelis* by in situ hybridization. *Fish pathol.*, **36**, 7-11.
- 53) Del Cerro, A., M. C. Mendoza and J. A. Guijarro (2002): Usefulness of a TaqMan-based polymerase chain reaction assay for the detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Appl. Microbiol.* **93**, 149-156.
- 54) 大原健一・景山哲史・桑田知宣・海野徹也・古澤修一・吉浦康寿 (2009): リアルタイム PCR を用いたアユ冷水病魚における *Flavobacterium psychrophilum* の定量性の検討. 日水誌, **75**, 258-260.
- 55) 永田恵里奈・江口 充 (2007): 環境水におけるアユ冷水病菌 *Flavobacterium psychrophilum* の定量的モニタリング. 日水誌, **73**, 306-309.
- 56) Fujiwara-Nagata, E. and M. Eguchi (2009): Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish Dis.*, **32**, 873-881.
- 57) Willson, I. G. (1997): Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3741-3751.
- 58) Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino and T. Hase (2000): Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **28**, e63.
- 59) Bly, J. E. and L. W. Clem (1992): Temperature and teleost immune functions. *Fish Shellfish Immunol.*, **2**, 159-171.
- 60) 室賀清邦 (1978): ウナギの赤点病. 魚病研究, **13**, 35-39.
- 61) Sano, N., M. Moriwake and T. Sano (1993): *Herpesvirus cyprini*: Thermal effects on pathogenicity and oncogenicity. *Gyobyo Kenkyu*, **28**, 171-175.
- 62) 田中 真・岡本信明・鈴木基生・五十嵐保正・高橋清孝・J. S. Rohovec (1994): EIBS 自然発病淡水飼育ギンザケの昇温飼育 (16 °C) による治療試験. 魚病研究, **29**, 91-94.
- 63) Takahashi, S. and K. Ogawa (1997): Efficacy of elevated water temperature treatment of ayu infected with the microsporidian *Glugea plecoglossi*. *Fish Pathol.*, **32**, 193-198.
- 64) Obach, A. and F. B. Laurencin (1991): Vaccination of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* against the visceral form of coldwater disease. *Dis. Aquat. Org.*, **12**, 13-15.
- 65) Madetoja, J., L-G. Lönnström, C. Björklom, G. Uluköy, G. Bylund, C. Syvertsen, K. Gravningen, E-A. Norderhus and T. Wiklund (2006): Efficacy of injection vaccines against *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, **29**, 9-20.
- 66) Rahman, M. H., M. Ototake, Y. Iida, Y. Yokomizo and T. Nakanishi (2000): Efficacy of oil-adjuvanted vaccine for coldwater disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, **35**, 199-203.
- 67) Rahman, M. H., M. Ototake and T. Nakanishi (2003): Water-soluble adjuvants enhance the protective effect of *Flavobacterium psychrophilum*

- vaccines in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, **38**, 171-176.
- 68) LaFrentz B. R., S. E. LaPatra, G. R. Jones, J. L. Congleton, B. Sun and K. D. Cain (2002): Characterization of serum and mucosal antibody responses and relative per cent survival in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following immunization and challenge with *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish Dis.*, **25**, 703-713.
- 69) Kondo, M., K. Kawai, M. Okabe, N. Nakano and S. Oshima (2003): Efficacy of oral vaccine against bacterial coldwater disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 261-264.
- 70) Rahman, M. H., A. Kuroda, J. M. Dijkstra, I. Kiryu, T. Nakanishi and M. Ototake (2002): The outer membrane fraction of *Flavobacterium psychrophilum* induces protective immunity in rainbow trout and ayu. *Fish shellfish immunol.*, **12**, 169-179.
- 71) LaFrentz B. R., S. E. LaPatra, G. R. Jones and K. D. Cain (2004): Protective immunity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* following immunization with distinct molecular mass fractions isolated from *Flavobacterium psychrophilum*. *Dis. Aquat. Org.*, **59**, 17-26.
- 72) Dumetz, F., E. Duchaud, S. E. LaPatra, C. L. Marrec, S. Claverol, M-C. Urdaci and M. L. Hénaff (2006): A protective immune response is generated in rainbow trout by an OmpH-like surface antigen (P18) of *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 4845-4852.
- 73) LaFrentz, B. R., S. E. LaPatra, D. R. Call and K. D. Cain (2008): Isolation of rifampicin resistant *Flavobacterium psychrophilum* strains and their potential as live attenuated vaccine candidates. *Vaccine*, **26**, 5582-5589.
- 74) Álvarez, B., J. Álvarez, A. Menéndez and J. A. Guijarro (2008): A mutant in one of two *exbD* loci of a TonB system in *Flavobacterium psychrophilum* shows attenuated virulence and confers protection against cold water disease. *Microbiology*, **154**, 1144-1151.
- 75) Nowotny, A. (1969): Basic exercises in immunochemistry. A laboratory manual, Springer-Verlag, New York, pp. 138-139.
- 76) LaFrentz B. R., S. E. LaPatra, G. R. Jones and K. D. Cain (2003): Passive immunization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Flavobacterium psychrophilum*, the causative agent of bacterial coldwater disease and rainbow trout fry syndrome. *J. Fish Dis.*, **26**, 377-384.
- 77) Lorenzen, E., B. E. Brudeseth, T. Wiklund and N. Lorenzen (2010): Immersion exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry to wildtype *Flavobacterium psychrophilum* induces no mortality, but protects against later intraperitoneal challenge. *Fish shellfish immunol.*, **28**, 440-444.
- 78) Wiklund, T. and I. Dalsgaard (2002): Survival of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum *in vitro*. *Fish shellfish immunol.*, **12**, 141-153.
- 79) Kiryu, I., M. Ototake, T. Nakanishi and H. Wakabayashi (2000a): The uptake of fluorescent microspheres into the skin, fins and gills of rainbow trout during immersion. *Fish Pathol.*, **35**, 41-48.
- 80) Kiryu, I., M. Ototake, T. Nakanishi and H. Wakabayashi (2000b): Transfer of fluorescent microspheres from the integumental tissues to the kidney and spleen in rainbow trout. *Fish Pathol.*, **35**, 165-166.