

アユのカビ病に関する研究 — III

病魚より分離したカビの生理生態と感染試験

および薬剤予防試験について

里 井 晋 一

アユのカビ病は昭和47年には県内の養魚場で多発し大きな問題となったのであるが、昭和48年にはわずかに2養魚場で発生が見られたに過ぎず、昭和49年には全く発生が見られなくなった。

本病は体表各所に出血斑を伴う腫脹や、そこがくずれて赤色化した筋肉が露出した潰瘍を形成するのが特徴的である。この患部にはSaprolegnia属のカビ菌糸が多数存在していて、このカビが主因と考えられている。昭和47年に県内の6養魚場と昭和48年に2養魚場の病魚から多数のカビを採集したが、各養魚場から共通して出現したカビはSaprolegnia属のものであった。

このカビの生理生態と2・3の感染試験及び薬剤による予防試験を行なったので、その結果を報告する。

1. カビの種類について

昭和47年9月から11月にかけて6養魚場から、又昭和48年9月に2養魚場から病魚を採集し、カビの分離を行なった。採集した病魚はどれも肉芽腫を形成したものであった。カビの分離法は患部の筋肉片をサブロー寒天培地上に置く方法と麻の実で培養する方法を用いて、純粋分離を行なった。患部の筋肉片をサブロー寒天培地上に置く方法では有隔のある不完全菌が分離されることが多く、麻の実で培養する方法に比べて肉芽腫内のカビを分離出来る成績は非常に悪かった。採集した病魚から上記の方法で水生菌科のカビを32株純粋分離した。この分離したカビを17℃～20℃で2～14日間麻の実で培養して、遊走子のう・遊走子・Gemmaの形成及び遊走子の放出形態を観察し、属の分類を行なった。その結果を表1に示した。

表1. 昭和47年に6養魚場及び昭和48年に2養魚場から分離した水生菌の種類

昭和47年				昭和48年			
養魚場名	分離株数		カビの種類	養魚場名	分離株数		カビの種類
I	4	4	Saprolegnia sp	Chi	6	6	Saprolegnia sp [※]
O	7	5	Saprolegnia sp [※]	U	6	5	Saprolegnia sp
		1	Achlya sp			1	Achlya sp
		1	Pythiopsis sp				
		2	2			Saprolegnia sp	※ 有性生殖の観察出来た株 O養魚場1株 Chi養魚場2株
Te	2	2	Saprolegnia sp				
Chi	2	2	Saprolegnia sp				
Shi	3	2	Saprolegnia sp				
		1	Aphanomyces sp				

出現した水生菌の種類はSaprolegnia・Achlya・Pythiopsis・Aphanomyces属の4種類であった。Saprolegnia属は32株中28株と圧倒的に多く、しかも各養魚場で共通

して出現性が認められた。その他に、Achlya 属は 2 株、Pythiopsis 属とAphanomyces 属は 1 株であった。この Saprolegnia 属 28 株中 3 株に有性生殖が観察出来たので、種の同定を行なった。いずれも Saprolegnia Paracitica に同定出来るものであった。

2. 分離したカビの生理生態について

1) 供試株から均質な Zoospore を入手する方法

麻の実で Saprolegnia 属のカビを長時間培養すると、菌糸の増殖が進むにつれて、培地中に老廃物が蓄積され、或は栄養分が非常に希薄な状態になると、菌糸の生長が停止し、その先端や中間部に多数の Gemma を形成する。Gemma は休眠状態にあり、菌糸に比べていく分か環境条件の悪化に対して抵抗性が強く、環境条件がよくなれば内部の細胞質が分割されて遊走子を形成し遊走子発芽を行なりか、或は Gemma から連接発芽管をのばして発芽する。自然条件下では遊走子の大部分は遊走子の由来のものと考えられるが、Gemma 遊走子は一時に多量の遊走子が得られるのと、発生段階のそろった均質な遊走子が得られるので、感染実験材料として好適である。そこで Gemma の形成条件と遊走子の一斉放出条件の検討を行なった。

① Gemma の形成に及ぼす温度の影響

麻の実を磨碎して 100 ml の滅菌蒸留水に懸濁させ Gemma 形成用培地とした。サブロー-寒天培地で培養した Saprolegnia sp の菌糸を 5 mm 四方に切り取り、シャーレの培地中に接種した後、種々の温度で 1 週間培養した。接種 1 週間後には菌糸の増殖が止まり多数の Gemma が形成された。培養温度は 10 ~ 30 °C の範囲の 5 段階で行ない Gemma の形成量を比較した。

表 2. Gemma の形成に及ぼす温度の影響

培養温度°C	10	15	20	25	30	Gemma の数 - 0 + 0~100コ ++ 100コ以上
Gemma 形成量	+	++	++	++	-	

Gemma の形成温度は 15 °C ~ 25 °C の範囲で良好であった。

② Gemma の形成に及ぼす pH の影響

M/100 Trisaminomethane と M/100 Sodiumsuccinate の混合液を緩衝液として用いた。緩衝能は pH 3 ~ 9 の間ではほぼ一定であった。この緩衝液中において Gemma を形成させ、洗浄して 24 時間中に放出された遊走子量を比較した。表 3 に見られる通り pH 4.0 ~ 10.0 の間ではほとんど差はなかった。従って Gemma 形成量に対する pH の影響はほとんどないものと考えられる。

表 3. Gemma の形成に及ぼす pH の影響

pH	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	培養温度 20 °C
遊走子量 × 10 ³ / ml	2.9	2.3	3.0	2.5	2.8	3.2	3.3	

③ Gemma 形成後の遊走子放出に及ぼす温度の影響

麻の実を磨碎して 50 ml の滅菌蒸留水を加えた培地に 5 mm 四方に切り取った菌糸を接種して 100 ml の三角フラスコで培養した。10 日間培養して Gemma を形成させた後、数回蒸留水で攪拌洗浄し、新たに 50 ml の蒸留水を遊走子形成用培地として加え、10 ~ 25 °C の温度範囲の 4 段階で培養した。培地中に放出された遊走子を計数し、培地一定量当たりの遊走子数として比較した。

表 4. Gemma 形成後の遊走子放出に及ぼす温度の影響

培養温度 (°C)	遊走子形成用培地に移してからの培養時間 (hours)					
	5	10	15	20	25	30
10	0	0	0.2×10^4	0.3×10^4	0.5×10^4	0.5×10^4
15	0	0.1×10^4 ※	0.9×10^4	1.5×10^4	1.9×10^4	1.8×10^4
20	0	0.2×10^4	1.2×10^4	3.0×10^4	4.0×10^4	3.0×10^4
25	0	0	0.4×10^4	0.6×10^4	0.8×10^4	0.8×10^4

※ 培地 1 ml 当りの遊走子数

Gemma からの遊走子の放出量は 20°C で最も多かった。遊走子の放出は洗浄後 10 時間で始まり 30 時間後まで続いた。Gemma は一旦形成されると、その後環境条件が良くなれば遊走子を形成し始める。環境条件改良の最も簡単な方法は Gemma 形成培地である蒸留水を取りかえることであり、これは菌糸増殖によって蓄積された老廃物が Gemma を形成させ、除去することによって遊走子形成を起こさせるものと考えられる。

④ 遊走子の遊泳時間に及ぼす温度の影響

10°C, 15°C, 20°C, 25°C における遊走子の遊泳時間を調べた。20°C 12 時間の培養によって得られた遊走子懸濁液を 100 ml の三角フラスコに 30 ml ずつ分注して、それぞれの培養温度に調整して保ち、一定時間毎に遊泳する遊走子の割合を計数した。

表 5. 遊走子の遊泳時間に及ぼす温度の影響

培養温度 (°C)	経過時間 (hours)							
	0	1	2	3	4	5	7	9
10	100.0※	78.3	44.0	29.1	13.4	14.5	16.2	24.7
15	100.0	63.2	34.8	20.0	33.8	40.9	66.2	46.4
20	100.0	39.8	19.7	31.6	86.6	90.7	82.7	52.1
25	100.0	30.6	15.2	39.3	84.1	83.6	80.4	48.7

※ 0 時間における遊泳遊走子の割合を 100% とした。

結果を表 5 に示した。10°C においては遊泳遊走子は 5 時間後にはほとんど休眠状態になった。15~25°C においては比較的早く 2~3 時間後には大部分の遊泳遊走子は休眠し、その後二次遊走子となって遊泳するものが増加した。又 10~15°C の温度に比べて 20~25°C の温度の方が二次遊走子の出現率ははるかに高い割合を示した。

2) 遊走子に対するマラカイトグリーンの影響

マラカイトグリーンが遊泳孢子, 休眠孢子, 発芽孢子に与える影響について調べた。遊走子形成用培地から得られた遊走子懸濁液にマラカイトグリーンを添加して, 20°C で培養をつづけて, 一定時間毎の全遊走子量に対する各段階の遊走子の割合を求めた。マラカイトグリーンの濃度は 0.1 ppm, 0.01 ppm, 対照の 3 段階である。

表 6. 遊走子に対するマラカイトグリーンの影響

マラカイト グリーンの 濃度 ppm	各段階の 遊走子	経 過 時 間 (hours)								
		0	1	2	3	4	5	7	9	
0.1	遊泳孢子	39.8※	29.1	13.7	7.6	0.0	0.0	0.0	0.0	
	休眠孢子	60.2	70.9	86.3	92.4	100.0	100.0	100.0	100.0	
	発芽孢子	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
0.01	遊泳孢子	46.3	27.6	9.7	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	
	休眠孢子	53.7	72.4	90.3	97.7	96.4	95.9	90.2	84.0	
	発芽孢子	0.0	0.0	0.0	0.0	3.6	4.1	9.8	16.0	
0 (対照)	遊泳孢子	54.2	21.1	5.5	5.5	30.0	47.8	41.0	19.9	
	休眠孢子	45.8	78.9	94.5	93.7	66.8	47.2	41.6	58.9	
	発芽孢子	0.0	0.0	0.0	0.8	3.2	5.0	17.4	21.2	

※ 全遊走子量に対する各段階の遊走子の割合(%)

マラカイトグリーン添加後の遊泳孢子の割合は対照に比べて著しい低下は見られなかったが、2次遊走子はマラカイトグリーンの0.01 ppm以上の濃度においては全く出現せず、発芽孢子の割合もマラカイトグリーンの濃度が高くなるほど低下し、0.1 ppmでは全く発芽が見られなかった。発芽が行なわれないことが遊走子の死滅を意味すると考えると、遊走子はマラカイトグリーン0.1 ppmの濃度で完全に死滅すると考えられ、魚への感染予防のためには0.1 ppmのマラカイトグリーンの適応が効果を表わすものと考えられる。

3. 魚へのカビ感染試験

感染方法を確立することは、魚へのカビ感染の予防治療法を究明するために必要なことである。昭和47年と48年に病魚からカビを分離し、保存しておいた株を使って感染試験を行なった。

1) 供試魚はカビ感染のおこり易い9月以後の生殖腺の成熟したアユを用いた。カビは昭和47年に6養魚場の病魚から分離した6株と昭和48年に2養魚場から分離した2株の計8株を用いた。これらの株はいずれも *Saprolegnia paracitica* か *Saprolegnia* sp である。これらの株を麻の実で培養して遊走子を多数形成させ遊泳孢子、休眠孢子、発芽孢子を供試魚の皮下に接種してカビの寄生状況を観察した。

表 7. カビ感染試験結果

供試株	接種孢子数(個)	カビ寄生状況(経過日数)											計尾	斃死率%
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
I	約4000	0	1※	3	0	0	0	1	1	0	0	0	6	60
O	約800	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	5	50
Na	約4000	0	0	1	1	2	0	0	1	0	1	1	7	70
Te	約2800	0	0	0	0	5	3	0	1	1	0	0	10	100
水温	℃	17.8	17.6	17.3	16.8	16.5	16.3	-	-	16.7	17.5	16.7		

※ カビ寄生による斃死魚数、供試魚は各区10尾

供試株	接種胞子数(個)	カビ寄生状況(経過日数)									計尾	斃死率%
		1	2	3	4	5	6	7	8			
chi	約3200	0	1	2	2	3	0	1	0		9	90
shi	約3200	0	0	1	2	1	2	0	0		6	60
※※ chi	約2800	0	0	2	2	4	0	1	1		10	100
※※ U	約4000	0	0	3	3	0	1	1	0		8	80
水温	℃	17.9	17.8	17.9	17.8	17.8	17.0	17.0	16.8			

※※ 昭和48年に分離した株, 他は昭和47年に分離した株

結果は表7に示す通りである。供試株はいづれも魚に感染して斃死率は50~100%であったが、斃死魚のカビの寄生状態をよく観察して見ると、養魚場の病魚に見られるようなカビ菌糸が筋肉内へ浸入して肉芽組織を形成しているようには思われなかった。肉芽腫を形成するには、カビが感染してかなり長時間かかるのか、或はカビ菌糸が体内に浸入する条件が十分にととっていないのかもしれない。

- 2) カビ胞子を直接皮下に接種する方法では肉芽腫を形成させることが出来なかったため、カビ胞子接種魚を感染源として、人工的に作ったチョーテン病様魚に自然感染させることにした。供試魚は10月以後の生殖腺の成熟したアユを用いた。供試カビは昭和47年にTΘ養魚場から分離した *Saprolegnia* sp を用いた。このカビの胞子を供試魚10尾に接種(接種胞子数約3000個/尾)して感染源とし、他の供試魚40尾は背筋部の表皮を剝離してチョーテン病様の患部を作り、1m四方の網生スにカビ胞子接種魚と共に収容した。試験期間中の水温は17~20℃であった。網生スに収容10日後にチョーテン病様魚の患部にカビの寄生が認められた。2週間後にカビ寄生魚をサンプリングして患部の組織標本を作製して肉芽組織の形成の有無を観察した。結果、患部の筋肉組織はほとんど崩壊して、多核巨細胞、組織球、類上皮細胞、新生毛細血管などと置きかわり、肉芽組織を形成していた。又、多核巨細胞の一端には共通してカビ菌糸が認められた。明らかにチョーテン病の患部の組織像とは異なるものであった。このことより、不確実ながら分離培養したカビを用いて肉芽腫症を再現することが出来たが、なおより確実な感染方法を検討する必要があると思われる。

4. カビ感染予防試験

- 1) アユのカビ病は生殖腺の成熟期に集中的に発生していることから、カビの感染と魚の栄養状態或は成熟とは関係が深いと思われるので、予防対策の一つとして魚の栄養生理学的な面からの対策が考えられる。そこで表8のとおり飼料に栄養剤やミネラルなどを加えてカビ感染の予防が可能であるか否かを検討した。

表8. カビ感染予防試験区

試験区	添加剤	投与量(日)	給餌量(日) (市販配合飼料)	供試魚数 (平均体重6.0g)
1区	ハマチエードS	1.5g (油に添加)	60g	500尾
2区	コハク酸鉄	0.32g (油に添加)	60g	500尾
3区	NaI	0.65g (水に溶解)	60g	500尾
4区	control	-	60g	500尾

投薬期間は昭和48年9月5日～9月24日までの20日間。感染方法は投薬終了の翌日9月25日に病魚を各区に10尾ずつ放養して、カビ感染源とした。試験期間中の水温は20～24℃であった。病魚放養10日後の10月4日頃よりカビ感染魚が見られ、10月20までのカビ感染魚数は表9に示す通りであった。コハク酸鉄投与区と対照区にカビ感染魚が見られたが、感染率が低く、添加剤の効果を論ずることは出来なかった。

表9. カビ感染予防試験結果

試験区	添加剤	10月20日までのカビ感染魚数※	感染率(%)
1区	ハマチエードS	0	0
2区	コハク酸鉄	42尾	8.4
3区	NaI	0	0
4区	control	23尾	4.6

※ カビ感染による斃死魚数も含む

2) 人の真菌症の治療剤として使用されている抗生物質のグリセオフルビンとヨード剤のNaIを用いて表10のとおりカビ感染治療試験を行なった。

表10. カビ感染予防治療試験区

試験区	薬剤	投与量(日)	給餌量(日)	供試魚数 (平均体重85.7g)	カビ感染魚数※
1区	グリセオフルビン	0.5g (油に添加)	200g	257	38
2区	NaI	3.0g (水に溶解)	200g	210	30
3区	control	-	200g	233	31

※ 脂鱗を切除して標識した(感染源)。

表11. カビ感染予防治療試験結果

試験期間	薬剤		NaI		control	
	カビ感染魚数	斃死魚数	カビ感染魚数	斃死魚数	カビ感染魚数	斃死魚数
9月10日～9月19日	-	8	-	1	-	4
9月20日～9月29日	-	13	-	3	-	10
9月30日～10月10日	120	7	59	7	117	6
カビ感染魚の合計	120	28	59	11	117	20
	148尾		70尾		137尾	
感染率(%)	57.6		33.3		58.8	

投薬期間は昭和48年9月10日～10月10日までの31日間。感染方法は試験開始時に病魚を1区38尾、2区30尾、3区31尾放養してカビ感染源とした。試験期間中の水温は17～21℃であった。試験開始10日後の9月19日頃よりカビ感染魚が1区と3区に多く見られ、10月10日の取り揚げ時には1区は120尾、2区は比較的少なく59尾、3区は117尾であった。10月10日までのカビ感染率は表11に示す通りである。この結果から、グリセオフ

ルビン投与区は対照区と感染率でほとんど差はないが、NaI 投与区は対照区の約1/2であり、ヨード剤はカビ感染の予防剤として期待が持てそうに思われる。しかし、in vitro での抗真菌作用はきわめて弱く、なぜ有効であるのかよくわからない。ヨード剤以外にもさらによりよい抗真菌剤のスクリーニングを行なう必要がある。

5. 要 約

- 1) 昭和47年に6養魚場と昭和48年に2養魚場から病魚を採集し、32株の水生菌を分離した。分離菌の培養形態から、これらは *Saprolegnia*, *Achlya*, *Pythiopsis*, *Aphanomyces* 属に属するものであった。
- 2) *Saprolegnia* 属のものは他の属のものに比べて圧倒的に多く、しかも各養魚場で共通して出現性が認められた。
- 3) 感染実験材料として、分離した *Saprolegnia* sp 株から均質な遊走子を入手する方法を検討した。
- 4) Gemma 遊走子を多量に得る方法は 20℃で1週間培養して Gemma を多数形成させた菌糸を、新しい蒸留水に移しかえることである。Gemma 遊走子は蒸留水に移し返えた後、10時間で放出が始まり25時間後には最も多量の遊走子が得られるものと考えられた。
- 5) Gemma 遊走子の形成は、カビ菌糸の増殖に伴って蓄積された老廃物が Gemma を形成させ、これを除去することによって遊走子の形成が起るものと考えられた。
- 6) 遊泳遊走子は 20~25℃の温度では約2時間後には休眠状態となり、4~5時間後には2次遊走子となって遊泳した。10℃の温度では5時間後にはほとんど休眠状態になった。
- 7) 各段階の遊走子に対するマラカイトグリーンの影響については、マラカイトグリーンの 0.01 ppm 以上の濃度では2次遊走子は全く出現せず、又、発芽胞子もマラカイトグリーンの濃度が高くなるほど出現率は低下し、0.1 ppm では全く発芽が認められなかった。
- 8) カビ感染試験を行ない、分離培養したカビを用いて肉芽腫症を再現することが出来たが、より確実な感染方法を検討する必要がある。
- 9) カビ感染の予防治療薬のスクリーニングを行ない、ヨード剤が予防剤としてかなり有効であると考えられた。

6. 文 献

- 1) 江草周三・益田信之
1971: 養殖アユに見られた新しいカビ病
魚病研究 6(1) 41~46
- 2) 宮崎照雄・江草周三
1973: 淡水魚の真菌性肉芽腫症に関する研究 - II アユに流行した真菌性肉芽腫症
魚病研究 7(2) 125~133
- 3) 新崎盛敏・野沢治治・三宅 真
1958: 病原性水生糸状菌の生理生態に関する研究 - I
日水誌 Vol. 23(9) 534~538
- 4) 新崎盛敏・野沢治治・三宅 真
1958: 病原性水生糸状菌の生理生態に関する研究 - II
日水誌 Vol. 23(10) 593~598