

加温と薬剤を併用したアユ冷水病の予防効果

山本充孝・二宮浩司・高橋 誓

Efficacy of the Combined Elevated Water Temperature Treatment and Chemotherapy for the Bacterial Coldwater Disease in Ayu

Michitaka Yamamoto, Koji Ninomiya and Sei Takahashi

Cold water disease is a bacterial disease of culture and wild ayu caused by *Flavobacterium psychrophilum*. This disease relatively goes on uneventfully depending on how it is treated with chemotherapy or elevated water temperature treatment at temperature above 23°C, but often recurs. Then, in order to prevent this cold water disease recurring, we examined several measures of combined two step elevated water temperature treatment at 23°C and 27°C, and chemotherapy (FF or SIZ).

The disease occurred in the groups only chemotherapy or chemotherapy & once elevated water temperature treatment (27°C). On the other hand, in the groups treated chemotherapy & two step elevated water temperature treatment or two step elevated water temperature treatment, the disease did not occur. In the groups treated chemotherapy & two step elevated water temperature treatment, the fish was diagnosed as a negative result for the presence of *F. psychrophilum* by cultivation on modified *Cytophaga* agar at the end of examination.

キーワード：アユ、冷水病、再発、加温、薬剤投与、予防

アユ *Plecoglossus altives* の冷水病は、*Flavobacterium psychrophilum* を原因とする細菌性疾病であり、アユ養殖場のみならず、天然水域でも発生し、大きな被害を与えている^{1,2)}。冷水病の治療には、水産用医薬品であるスルフィソゾールナトリウム塩³⁾やフロルフェニコール⁴⁾を用いる方法や、飼育水温を数日間23°C以上に保つ加温処理が可能であることが明らかになっている⁵⁾。しかし、上記処置を施しても数週間後に再発する事例が多く見受けられる^{6,7)}。また、加温中にカラムナリス病等の他の細菌性疾病を誘発する恐れもある⁸⁾。したがって、これまで明らかにされている薬剤投与や加温処理等の冷水病対策は、現時点では十分とはいえない。そこで、本研究では、薬剤投与と加温処理を組み合わせた併用処理を行うことにより、冷水病の予防効果を検討したので報告する。

材料および方法

供試魚

本試験には、1998年4月23日（試験1）、1998年11月27日（試験2）および1999年3月10日（試験3）に琵琶湖でエリによって漁獲されたアユを用いた。これらのアユ3群の漁獲時の水温と平均体重をまとめてTable 1に示した。

Table 1 Conditions in each experiment group at the catch

Exp. No.	Catch		
	Date	W.T. ^{*1} (°C)	B.W. ^{*2} (g)
1	23Apr.1998	15.6	2.1±1.672
2	27Nov.1998	12.0	0.55±0.223
3	10Mar.1999	8.8	0.59±0.444

*1 Surface water temperature of Lake Biwa at the catch.

*2 Mean ± standard deviation in body weight.

飼育方法

漁獲されたアユは、直ちに水産試験場に輸送し、試験1では水量0.3 tの円形FRP水槽にそれぞれ1.0kgずつ、試験2および試験3では水量0.7 tのコンクリート水槽にそれぞれ1.5kgおよび0.9kgずつ収容した。なお、漁獲アユの輸送と池への収容時の用水には、塩分濃度0.7%となるように天然海水を原料とした塩（商品名：白塩うず塩、(株)鳴門塩業）を添加した。また、収容時、輸送時の水槽水温は、琵琶湖表層水との水温差を3℃以内に調整した。注水は、アユを収容した日の夕方から開始し、水温約19℃の地下水を1日目0.7 t/日、2日目1.4 t/日、3日目3.5 t/日、4日目以降8.4 t/日となるように調節した。餌は市販配合飼料（日配養魚用初期飼料、(株)日本配合飼料）を用いて2日目から与え始め、4日目以降は自動給餌器により体重の1～1.5%を給餌した。また、試験期間中は飼育水温とアユの死亡尾数を毎日記録した。

投薬の方法

実験にはフロルフェニコール（以下、FF）とスルフィンゾールナトリウム塩（以下、SIZ）を用いた。FFはアクアフェンL（(株)武田薬品工業）を力価にして10mg/kgBW/day、SIZはイスランソーダ（(株)甲陽化学工業）を力価にして200mg/kgBW/dayをそれぞれ1日分の飼料に添加し、1日6回程度に分けて給餌した。投薬は何れも5日間連続して行った。

加温処理の方法

加温水は省エネ・チタン製海水加温冷却装置MCH-40T（宮原冷熱機工作所）を用いて作成した。すなわち、約19℃の地下水を用い、水温23℃の加温を行うときは、外気による水温低下を考慮して水温約25℃の加温水を、27℃の加温を行う場合には約29℃加温

水を注水した。昇温は、23℃の加温時には1℃/hで、27℃加温時には2℃/hとともに6時間程度かけて急激な水温の上昇や低下を避けるようにして行った。

試験区の設定

漁獲時期およびサイズが異なるアユを用いて、加温処理と薬剤投与を組み合わせた以下の3つの試験を設定した（Table 2）。

試験1

4つの条件を設定して試験を行った。すなわち、無処理の対照区、試験開始8日目からFFを5日間連続投与した区（FF投与区）、8日目からFFを5日間連続投与しその最終日から27℃の加温を3日間行った区（FF投与および27℃加温区）、試験開始6日目から23℃の加温を3日間行い、14日目からFF投与を5日間、その薬剤投与最終日から27℃の加温を3日間行った区（FF投与および加温2回区）の4区で、薬剤投与および加温処理終了から30日間の経過観察を行った。

試験2

無処理の対照区、試験開始5日目からFFを5日間連続投与し、さらに14日目から2回目のFFを5日間連続投与した区（FF投与2回区）、試験開始6日目から23℃の加温を3日間行い、14日目からFFを5日間連続投与し、その最終日から27℃の加温を3日間行った区（FF投与および加温2回区）、および上記のFFをSIZに置き換えて投与した区（SIZ投与および加温2回区）の4区を設定し、62日間にわたり試験を行った。

試験3

以下の5つの条件で試験を行った。すなわち、無処理の対照区、試験開始5日目からFFを5日間連続投与し、さらに14日目から2回目のFFを5日間連続投与した区（FF投与2回区）、試験開始6日目から23℃の加温を3日間行い、18日目から27℃の加温を3日間行った区（加温2回区）、試験開始6日目から23℃の加温を3日間行い、14日目からFFを5日間連続投与し、その最終日から27℃の加温を3日間行った区（FF投与および加温2回区）、および上記のFFをSIZに置き換えて投与した区（SIZ投与および加温2回区）の5区（SIZ投与および加温2回区）で、52日

Table 2. Methods of combined chemotherapy and elevated water temperature treatment of ayu

Exp. No.	Treatment	E.W.T.T (23°C) ¹		Chemotherapy ²		E.W.T.T (27°C) ³	
		W.T. (°C)	Period	Period	W.T.(°C)	Period	
1	Non-treatment	—	—	—	—	—	—
	Chemotherapy(FF)	—	—	8-12	—	—	—
	E.W.T.T +Chemotherapy(FF)	—	—	8-12	—	27.1-27.8	12-15
	E.W.T.T twice+ Chemotherapy(FF)	22.2-23.4	6-9	14-18	—	26.9-27.4	18-21
2	Non-treatment	—	—	—	—	—	—
	Chemotherapy twice	—	—	6-10, 14-18	—	—	—
	E.W.T.T twice+ Chemotherapy(FF)	23.4-23.7	6-9	14-18	—	27.7-29.0	18-21
	E.W.T.T twice+ Chemotherapy(SIZ)	23.5-23.6	6-9	14-18	—	27.5-28.1	18-21
3	Non-treatment	—	—	—	—	—	—
	Chemotherapy twice	—	—	6-10, 14-18	—	—	—
	E.W.T.T twice	22.5-23.1	6-9	—	—	27.4-27.9	18-21
	E.W.T.T twice+ Chemotherapy(FF)	23.2	6-9	14-18	—	26.6-27.3	18-21
	E.W.T.T twice+ Chemotherapy(SIZ)	23.3-23.4	6-9	14-18	—	27.5-27.8	18-21

¹ The treatments at 23°C were maintained for 3 days.

(E.W.T.T = elevated water temperature treatment)

² Chemotherapy in culture.

³ The treatments at 27°C were maintained for 3 days.

間にわたり試験を行った。

へい死魚検査

死亡魚のうち検査可能なものについては、検鏡を行うとともに、病変患部および腎臓については、改変サイトファーガ寒天培地（トリプトン0.2%、イースト0.05%、肉エキス0.02%、酢酸ナトリウム0.02%、塩化カルシウム0.02%、硫酸マグネシウム0.02%、寒天1.5%、pH7.2）を用いて15℃で培養し、黄橙色を呈したコロニーが観察された場合は、抗*F. psychrophilum*家兎血清を用いたスライド凝集試験を行い、冷水病か否かを検査した。また、腎臓からハートインフュージョン寒天培地（Nissui Co.）を用いてその他の細菌性疾病についても検査した。

冷水病原因菌の保菌検査

試験1で用いたアユに対し、平板培養法による冷水病原因菌の保菌検査を実施した。すなわち、処理終了から7日目、15日目、22日目、29日目に任意に5尾ずつ（試験終了時には10尾ずつ）を取り上げ検査標本とした。検査は鰓（第一鰓弓または第二鰓弓）と腎臓を用い、改変サイトファーガ寒天培地に画線塗抹し、鰓は5℃で14日間、腎臓は15℃で7日間まで培養し、黄橙色を呈したコロニーが分離された場合、抗*F. psychrophilum*家兎血清を用いたスライド凝集試験により冷水病原因菌であることを確認した。

結 果

試験 1

各試験区の日間死亡率および水温の推移をFig.1に示した。各区とも試験開始4日目に収容時のスレ症と飼育水の塩分低下が原因と思われるへい死が見られた。この間、検鏡、細菌検査において病原体は確認されなかったが、7日目までに各区とも30%程度死亡した。対照区（A-1）では、12日目頃から冷水病が発生し、試験終了まで続いた。FF投与区（B-1）は、FF投与終了1週間後から冷水病が発生した。FF投与および27℃加温区（C-1）は、27℃加温開始時に冷水病が見られたが、3日間の加温により終息した。その後、27℃加温処理2週間後から再び冷水病が発生した。FF投与&加温2回区は、処理時に冷水病とは異なる若干のへい死が見られたが、その後は、

ほとんどへい死はなく、試験期間中冷水病の発生は認められなかった。なお、試験開始32~34日目の死亡は細菌性鰓病によるものであり、餌止めを行うことにより治癒した。また、各試験区の最終的な生残率は対照区が12.6%、FF投与区が31.6%、FF投与および27℃加温区が16.9%、FF投与および加温2回区が58.5%であった（Table 3）。

試験 2

各試験区の日間死亡率および水温の推移をFig.2に示した。試験2においても試験開始3~5日目に収容時のスレ症と飼育水の塩分低下が原因と思われるへい死が若干見られた。対照区（A-2）では、16日目頃から冷水病が発生し、試験終了まで続いた。FF投与2回区（B-2）は、20日目頃から冷水病が発生した。これに対し、FF投与および加温2回区（C-

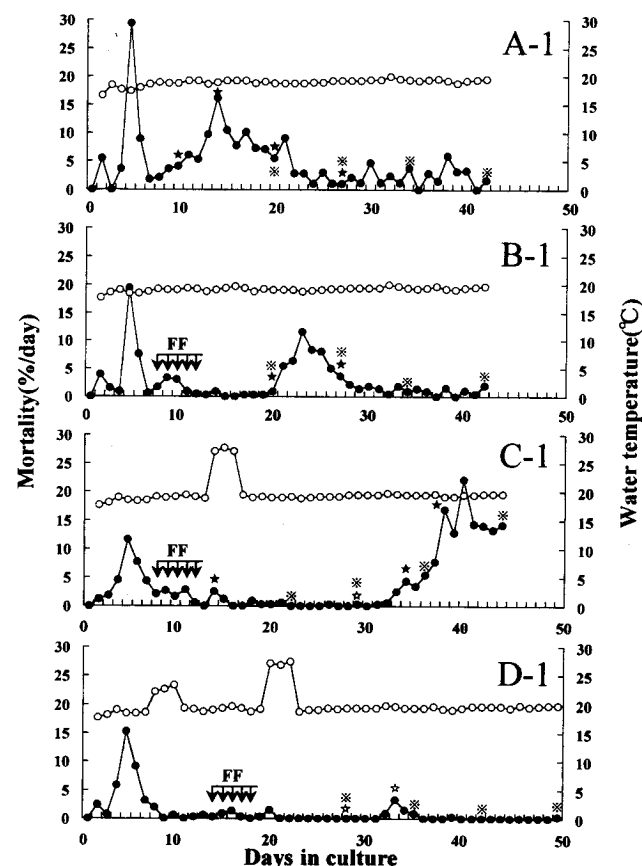


Fig.1 Changes in daily mortality and water temperature in the experiment 1.

- A-1 : Non-treatment
- B-1 : Chemotherapy(FF)
- C-1 : Chemotherapy(FF) and E.W.T. treatment
- D-1 : Chemotherapy(FF) and twice treatment of E.W.T.
- : Water temperature ● : Daily mortality
- ☆ : *F. psychrophilum* were not isolated from dead ayu.
- ★ : *F. psychrophilum* were isolated from dead ayu.
- ※ : Inspection for *F. psychrophilum*.

2)、SIZ投与および加温2回区(D-2)は、27℃の加温時に死亡が見られたものの試験終了まで冷水病は発生しなかった。また、各試験区の最終的な生残率は対照区が16.7%、FF投与2回区が37.8%、FF投与および加温2回区が62.9%、SIZ投与および加温2回

区が60.8%であった (Table 3)。

試験 3

各試験区の日間死亡率および水温の推移をFig.3に

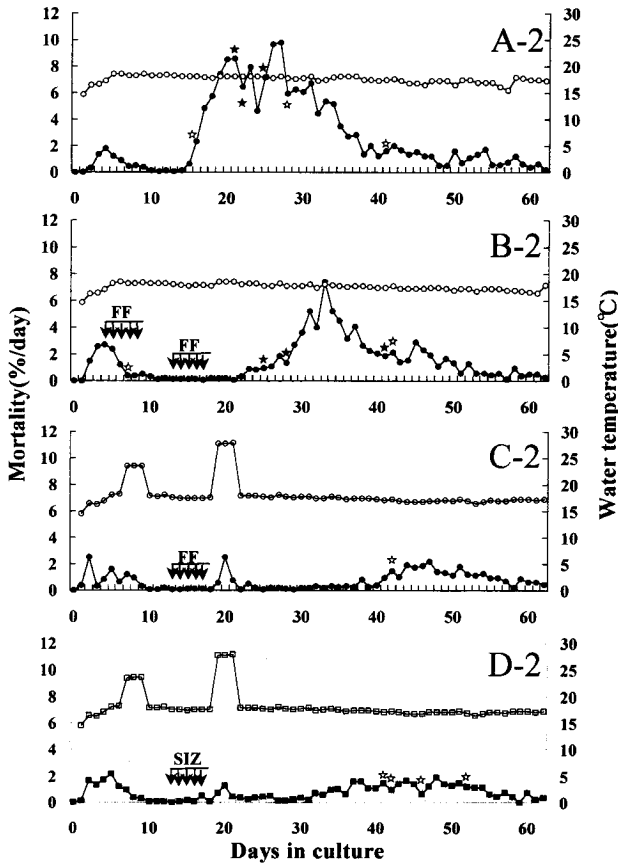


Fig.2 Changes in daily mortality and water temperature in the experiment 2.

- A - 2 : Non- treatment
- B - 2 : Chemotherapy(FF) twice
- C - 2 : Chemotherapy(FF) and twice treatment of E.W.T.
- D - 2 : Chemotherapy(SIZ) and twice treatment of E.W.T.

- : Water temperature ● : Daily mortality
- ☆ : *F. psychrophilum* were not isolated from dead ayu.
- ★ : *F. psychrophilum* were isolated from dead ayu.

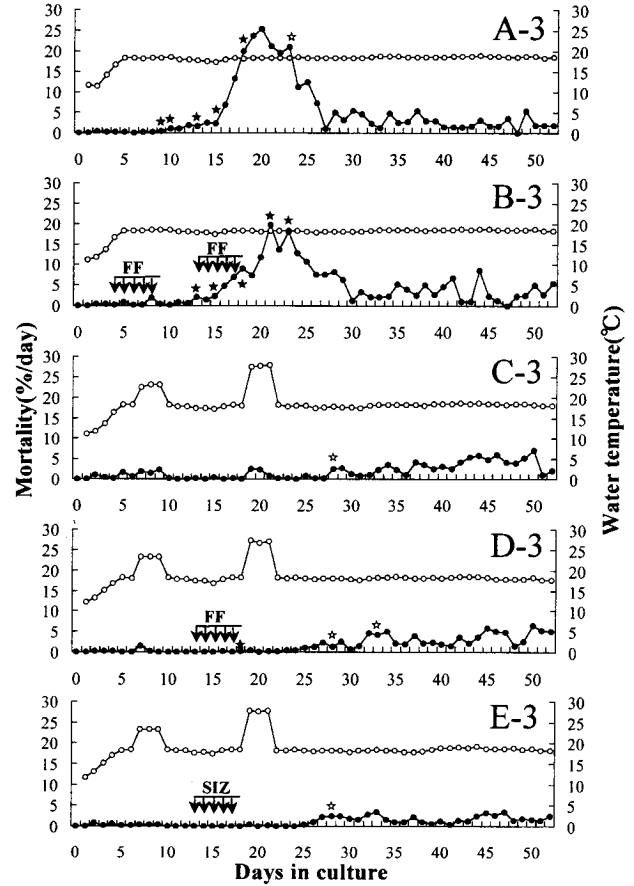


Fig.3 Changes in daily mortality and water temperature in the experiment 3.

- A - 3 : Non- treatment
- B - 3 : Chemotherapy(FF) twice
- C - 3 : E.W.T treatment twice
- D - 3 : Chemotherapy(FF) and twice treatment of E.W.T.
- E - 3 : Chemotherapy(SIZ) and twice treatment of E.W.T.

- : Water temperature ● : Daily mortality
- ☆ : *F. psychrophilum* were not isolated from dead ayu.
- ★ : *F. psychrophilum* were isolated from dead ayu.

Table 3. Results of experiment chemotherapy and elevated water temperature treatment

Exp. No.	Treatment	No. of fish	Duration (day)	B. W. (g)	Survival rate (%)	Coldwater disease ¹⁾
1	Non-treatment	576	41	7.1	12.6	○
	Chemotherapy(FF)	659	41	5.2	31.6	○
	E. W. T. T + Chemotherapy(FF)	522	43	4.8	16.9	○
	E. W. T. T twice + Chemotherapy(FF)	549	49	4.1	58.5	×
2	Non-treatment	2,865	62	1.3	16.7	○
	Chemotherapy twice(FF)	2,134		1.2	37.8	○
	E. W. T. T twice + Chemotherapy(FF)	2,140		0.8	62.9	×
	E. W. T. T twice + Chemotherapy(SIZ)	1,777		1.3	60.8	×
3	Non-treatment	896	52	3.8	5.6	○
	Chemotherapy twice(FF)	788		4.3	8.8	○
	E. W. T. T twice	776		4.1	35.2	×
	E. W. T. T twice + Chemotherapy(FF)	653		4.2	39.7	×
	E. W. T. T twice + Chemotherapy(SIZ)	686		3.4	57.3	×

¹⁾ Mass occurrence of Coldwater disease
○ : occurrence, × : unoccurrence

Table 4. Inspection for *F. psychrophilum* from ayu gill and kidney in experiment 1.

Day	Non-treatment		Chemotherapy(FF)		E.W.T.T + Chemotherapy(FF)		E.W.T.T twice+ Chemotherapy(FF)	
	Gill	Kidny	Gill	Kidny	Gill	Kidny	Gill	Kidny
20	2/5 ¹	1/5	5/5	1/5				
22					0/5	0/5		
27	0/5	2/5	4/5	2/5				
28							0/5	0/5
29					0/5	0/5		
34	3/5	0/5	5/5	1/5			0/5	1/5
35					5/5	3/5		
36								
41	3/10	1/10	8/10	3/10			5/5	1/5
42								
43					9/10	4/10		
49							0/10	0/10

¹Number of fish showed positive result/number of fish examined.

示した。対照区 (A-3) では16日目頃から冷水病が発生し、試験終了まで続いた。FF投与2回区 (B-3) は、16日目頃から冷水病が発生した。これに対し、加温2回区 (C-3)、FF投与および加温2回区 (D-3)、SIZ投与および加温2回区 (E-3) は、23℃および27℃の加温時に温度変化によるストレスが原因と考えられる若干の死亡が見られたものの試験終了まで冷水病は発生しなかった。また、各試験区の最終的な生残率は対照区が5.6%、FF投与2回区が8.8%、加温2回区が35.2%、FF投与および加温2回区が39.7%、SIZ投与および加温2回区が57.3%であった (Table 3)。なお、加温を行ったすべての試験区で30日目過ぎから冷水病とは異なる未同定の細菌性疾病が発生した。

冷水病原因菌の保菌検査

試験1の対照区とFF投与区では、4回のすべての検査において冷水病原因菌が分離された (Table 4)。FF投与および27℃加温区では27℃加温後に菌は検出されなかったが、病魚から冷水病原因菌が分離された34日目以降に採取した標本においては菌が分離された。FF投与および加温2回区は併用処理直後に行った検査では、菌は分離されなかったものの35および42日目の検査では分離された。しかし、試験終了時に採取した標本からは全く分離されなかった。なお、試験開始時にも20尾の鰓および腎臓から保菌検査を実施したが、菌は分離されなかった。

考 察

冷水病の予防を目的とした本試験の加温と薬剤投与を組み合わせた処理は、過去に行われたさまざまな冷水病の予防治療対策試験^{5,6,7}、アユの高温耐性試験⁸および冷水病原因菌の温度耐性試験^{6,10,11,12}等をもとに設定した。冷水病原因菌は、ほとんどの株は25℃では

増殖できず¹⁰、淡水中では1日以内に死滅する¹¹と報告されているが、25℃の培養液中では7日間後も生存可能である事例⁸や、25℃以下の加温処理の後に冷水病が再発する事例^{6,7}がみられている。一方、27℃以上の加温処理では、冷水病の予防・治療により高い効果を持つことが報告されている⁸。しかし、湖産アユを天然から漁獲し飼育する際には、酒井ら⁹が報告しているように、琵琶湖表層水が10℃以下または平均体重が0.6g以下の場合、収容後6日以内に25℃で行う加温はアユに水温変化によるストレスを与え、へい死率を増加させる可能性がある。一方で、15~20℃で十分に馴致したアユの高温耐性は29~32℃⁸とされている。したがって本試験では、1度目の加温処理を飼育開始6日目から3日間実施し、処理水温は冷水病原因菌の増殖抑制効果のある23℃とした。この後18℃で一定期間飼育してからより治療効果の高い27℃で3日間の加温を行った。次に薬剤投与は冷水病原因菌の増殖を抑制するとともに高水温時にカラムナリス病等、他の細菌性疾病を誘発した事例⁸もあるため、冷水病以外の細菌性疾病の予防も含め行った。また、薬剤投与の開始時期は漁獲後十分に餌付けがなされることも考慮した。

本試験の結果、薬剤投与のみの試験区および試験1のFF投与および27℃加温区では、対照区と比較して発病の遅延効果、死亡率の軽減効果は認められたものの、冷水病の発病は防げなかった。しかし、加温と薬剤投与の併用処理を行った何れの試験区でも冷水病の発生はみられなかった。また、試験3の薬剤投与を行わなかった加温2回区においても冷水病は発生していないことから、薬剤投与は冷水病の予防対策としては補足的なもので、冷水病の発生を抑止するには間隔をあけた2回の加温による効果が大きいと考えられる。

試験1におけるアユ体内の冷水病原因菌の動態については、試験開始時には、鰓、腎臓ともに冷水病原因

菌は確認されなかったが、その後各試験区において確認されていることから、冷水病原菌は収容時から群全体に存在するのではなく、少なくとも20尾の保菌検査では検出できないレベルで個体に存在していて、その後増殖し伝播していくと思われる。また、FF投与および27℃加温区、FF投与および加温2回区では、27℃加温による予防対策終了後、一時的に保菌が確認されなくなったが、その後ともに保菌が確認された。しかし、冷水病はFF投与および27℃加温区のみで発生し、FF投与および加温2回区では発病せず、試験終了時の保菌検査においても菌は検出されなかった。この理由としては、処理後アユ体内および池中の生菌数がFF投与および加温2回区においてより大きく減少し、僅かに冷水病原菌が体内に存在してもアユ自体が持つ生体防御能により発病を抑制したと考えられる。また、FF投与および27℃加温区では、処理後の冷水病原菌には起病力があつたのに対し、FF投与および加温2回区ではすでに起病力がなかったとも考えられる。

この結果から、アユが冷水病原菌を保菌している場合、収容施設に馴致した後、できるだけ早期に対策を開始し、23℃程度で菌の増殖を抑えた後27℃以上の加温を行うことが冷水病予防対策として有効と思われる。また逆に、一連の加温と薬剤の併用処理を行っても、その後菌が確認されていることから一定のレベルまで菌数を減らせなかった場合には、冷水病が発生する可能性も考えられる。

摘 要

- ①薬剤投与、薬剤投与+27℃加温を行った場合には歩留まり向上効果、冷水病の発病の遅延効果は見られたが、冷水病が発病した。
- ②加温と薬剤の併用処理は冷水病の予防対策として有効であり、何れの試験区においても冷水病の発生は見られなかった。
- ③冷水病原菌の保菌検査において、FF投与および加温2回の併用処理後、一時的に菌が分離されたが、試験終了時には分離されなかった。

謝 辞

本研究を行うに当たり、ご助言を頂くとともに、有

益なご指導をいただいた東京大学大学院農学生命科学研究科の若林久嗣教授に深謝いたします。

文 献

- 1) アユ冷水病対策研究会・水産庁(1999):アユ冷水病の現状と対策-上-, 養殖, 8, 91-96.
- 2) 井上 潔(2000):アユの冷水病, 海洋と生物, 22(1), 35-38.
- 3) 二宮浩司・酒井明久(1996):アユの冷水病に対する薬剤の治療効果(1), 平成7年度滋賀県水産試験場事業報告, 106-107.
- 4) 宇野 悦夫(1997):冷水病人為感染アユに対する薬剤による治療試験-I, 平成8年度和歌山県内水面漁業センター事業報告, 33-34.
- 5) 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効果I, 滋賀県水産試験場研究報告, 48, 1-4.
- 6) 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, 滋賀県水産試験場研究報告, 48, 5-10.
- 7) 福永 剛(1996):アユ冷水病の防疫技術に関する研究, 平成7年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 日本水産資源保護協会, 東京, 175-181.
- 8) Takahashi, S. and K. Ogawa(1997): Efficacy of Elevated Water Temperature Treatment of Ayu Infected with the Microsporidian *Glugea plecoglossi*, Fish Pathology, 32(4), 193-198.
- 9) 岡部正也・西山 勝・佐伯 昭(1999):アユの高水温耐性系統作出技術の開発試験, 高知県内水面漁業センター事業報告書, 8, 42-51.
- 10) Naim Uddin, Md. and H. Wakabayashi(1997): Effects of Temperature on Growth and Protease Production of *Cytophaga psychrophila*. Fish Pathology, 32(4), 225-226.
- 11) 澤田健蔵・杉本善彦(1998):冷水病菌の水中での生存性, 徳島県水産試験場事業報告(平成8年度), 186.
- 12) Holt, R.A., J.S. Rohovec, and J.L. Fryer.(1993): Bacterial cold-water disease of salmonid fish. Bacterial diseases of fish. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 3-22.