

博士論文

アユに発生する細菌性疾病の防除技術に関する研究

平成 21 年 3 月

広島大学大学院生物圏科学研究科  
生物資源科学専攻

永井崇裕

## 第 I 章 序 論

アユ *Plecoglossus altivelis* はキュウリウオ目・アユ科に分類され、主には北海道から九州までの日本各地に分布し、朝鮮半島からベトナム北部までの東アジア一帯にも分布している。また、奄美大島には亜種のリュウキュウアユ *P. altivelis ryukyuensis* が生息している。アユは一年のうちに川と海を行き来する回遊魚であり、その寿命は一年である。海から遡上したアユは、河川で生活し産卵し仔稚魚は海で生活する。一方、琵琶湖などに生息する湖沼陸封型アユは湖を海の代わりとして生活する。日本において、アユは代表的な川釣りの対象魚であり、縄張りに侵入してきた他の個体を攻撃する性質を利用した“友釣り”が広く行われている。また、投網や刺し網でも漁獲され、内水面漁業における最も重要な魚種の一つとなっている。また、成長が良く食味も良いことから内水面養殖業の重要な対象魚種にもなっている。2007年には、内水面漁業の漁獲量は 38,988 トン（239 億円）でそのうちアユは 3,229 トン（79 億円）、内水面養殖業の生産量は 42,345 トン（544 億円）でそのうちアユは 5,807 トン（94 億円）であった（農林水産省ホームページ、<http://www.maff.go.jp/www/info/bunrui/bun06.html>）。

河川環境の悪化や沿岸環境の悪化による天然アユ資源の減少に伴い、全国各地でアユの河川放流が行われ、人工的に種苗生産したアユも放流に用いられている。広島県では社団法人広島県栽培漁業協会が約 290 万尾が、財団法人広島市農林水産振興センター水産部で約 110 万尾のアユが毎年種苗生産され、県内各地の中間育成場に出荷されている。これらのアユは、4 月から 5 月にかけて県内各地の河川に放流され、琵琶湖産アユおよび他県産の海産アユを含めると最近では 1 シーズンで 620 万尾のアユが放流されている（広島県内水面漁業協同組合連合会）。また、県内には大規模なアユ養殖場はないものの、小規模なアユ養殖場が 10 件程度散在し、主に広島県産の人工アユが養殖され食用や友釣りのオトリとして販売されている。

このように、アユは内水面漁業や養殖において重要な魚種であるが、河川や養殖場で様々な細菌性疾病が発生し問題となっている。これまでに報告されているアユの細菌性疾病について Table 1-1 に示した。ビブリオ病は *Vibrio anguillarum* または *V. ordalii* を原因菌とし、特に前者を原因とするビブリオ病は 1970 年代から 1980 年代にかけてアユ養殖に多大な被害を与えた（室賀ら、1986；Muroga and Egusa, 1988；室賀，2004）。この被害の大きさからワクチン開発が行われ、1988 年に日本最初の水産用ワクチンとしてアユのビブリオ病に対する浸漬ワクチンが発売されるに至った（室賀，2004）。しかし、その理由は不明であるがワクチン市販の前後から病気の発生件数が激減したため、ワクチン使用実績は低い。広島県においても、1990 年代以降、種苗生産期や中間育成開始時に *V. anguillarum* J-O-3 型

による発病が時々確認されるが、淡水を使用している養殖場での発生は確認されていない。ナグビブリオ病は *V. cholerae* non-O1 を原因菌とし、1970 年代後半に琵琶湖周辺の河川や養殖場で確認された (Muroga *et al.*, 1979; 山野井ら, 1980)。その後、日本各地で発生が確認されているが (Kiiyukia *et al.*, 1992)、広島県では未確認である。エロモナス症は *Aeromonas hydrophila* を原因菌とし、雨が少なく高水温であった 1967 年の夏に各地の河川において発生した大量死が最初の確認例であり、養殖アユにおける被害も報告されているが (城・大西, 1980)、広島県における被害はほとんどない。細菌性出血性腹水病は *Pseudomonas plecoglossicida* を原因菌とし、1990 年頃から各地のアユ養殖場において見られるようになった (中津川・飯田, 1996; 若林ら, 1996; Nishimori *et al.*, 2000)。本菌は薬剤に対する感受性が低く治療困難な疾病であるが、最近では発生件数が減少する傾向にある。広島県においては、1995 年と 2008 年に養殖アユで発生が確認された。

アユの冷水病 (Bacterial coldwater disease: BCWD, 細菌性冷水病) の原因菌はグラム陰性長桿菌の *Flavobacterium psychrophilum* (Fig. 1-1) であるが、世界的には本菌はニジマス *Oncorhynchus mykiss* の冷水病 (Rainbow trout fry syndrome: RTFS) の原因菌として知られる (若林, 2004d)。本菌は最初、*Cytophaga psychrophila* と命名されたが (Borg, 1960)、*Flexibacter psychrophilus* に分類し直され (Bernardet and Grimont, 1989)、さらに *Flavobacterium psychrophilum* に再分類され現在に至っている (Bernardet *et al.*, 1996; 2002)。最近、ニジマス由来の *F. psychrophilum* の遺伝子の全塩基配列が、魚類病原細菌としては初めて明らかにされている (Duchaud *et al.*, 2007)。本病を世界で最初に記載したのは Davis (1946) で、1941 年と 1945 年のアメリカのニジマスでの発生を報告し、その後アメリカのギンザケ *O. kisutch* から原因菌が分離されている (若林, 2004d)。本病はその後しばらく問題にはならなかったが、1984 年にフランスのニジマスで確認され、それ以来ヨーロッパ諸国に拡大した (若林, 2004d)。

日本では、1987 年に徳島県のアユ養殖場で初めて発生が確認され (Wakabayashi *et al.*, 1994)、1993 年には広島県の河川で冷水病によるアユとオイカワ *Zacco platypus* の大量死が確認されている (Iida and Mizokami, 1996)。その後、約 10 年間で全国の河川や養殖場に拡大し、養殖場のみならず河川でも大きな被害を与え問題となっている (井上, 2000)。琵琶湖産のアユに *F. psychrophilum* の保菌が確認されたことから、琵琶湖産アユの河川放流が自粛される傾向にある (原, 2007)。アユの冷水病は小型魚から大型魚まで大きさに関わらず発生し、罹患魚は体表の穴あきや下顎の崩壊など外観上特徴的な症状を示す (Fig. 1-2)。*F. psychrophilum* は韓国の養殖アユからも分離されている (Lee and Heo, 1998)。日本では 1990 年にギンザケ孵化場で冷水病の発生が確認されたが (若林ら, 1991)、ギンザケ孵化場において同様の症状は 1990 年以前から既に散見されていたという事実から (熊谷, 2005)、日本での冷水病の最初の発生が、アユとギンザケのどちらであるかは不明である。本菌が検出された魚種の範囲は広く、アユ、ニジマス以外にも、ほとんどのサケ科魚類、オイカワ、ウグイ *Tribolodon hakonensis*、ヨシノボリ *Rhinogobius brunneus* およびアカザ *Liobagrus reini* などの淡水魚からも検出されている (網田ら, 2000; 若林, 2004d; 新井ら,

2006)。さらに、本菌は魚以外の付着藻類や砂、泥といった河川環境中からも検出されている(網田ら, 2000; Izumi *et al.*, 2005)。国および都道府県などで構成されているアユ冷水病対策協議会でまとめられた河川と養殖場における冷水病発生件数を Fig. 1-3 に示した。広島県においても 1993 年の初確認以降、各地の河川や養殖場で発生が確認されている。水産海洋技術センターで病気のアユから *F. psychrophilum* を分離し冷水病を確認した件数を Fig. 1-4 に示したが、発生が減少する傾向は見られない。広島県における河川での冷水病の発生は、アユの河川放流が終わった 5 月下旬から 7 月上旬に確認されることが多く、全国的な傾向と同じである(原, 2007)。また、養殖場での発生は河川での発生後に確認されることが多い。広島県の養殖場では *F. psychrophilum* に汚染されていない人工アユを飼育している場合がほとんどであることから、これらの養殖場での発生は河川からの感染が強く疑われる。また、これまで一部の例外を除き、魚の疾病は天然水域と比較すると極めて特殊な環境である養殖場で発生することがほとんどであったが、アユの冷水病に関しては河川での発生が恒常的に認められ、魚の疾病の中では特殊な例と考えられている(原, 2007)。このように、冷水病をはじめ様々な細菌感染症がアユにおいて発生し被害を与えていることから、防除技術の開発が強く求められている。

本論文では、まずアユの冷水病の防除技術に関する検討結果について述べ(第 II 章)、次に広島県で確認したアユの新しい細菌感染症についての検討結果について述べる(第三章～第 V 章)。第 II 章 第 1 節では、広島県内でアユを含む様々な魚種から分離した *F. psychrophilum* を材料として分子生物学的手法を用いて疫学的解析を行った。第 2 節では、*F. psychrophilum* の淡水中での生存性を *in vitro* で調べるとともに、生存菌の病原性について検討した。また、*F. psychrophilum* の増殖温度を調べ、高温適応した株のアユに対する病原性を検討した。第 3 節では、河川での冷水病の発生を予防するためのホルマリン不活化ワクチンに関する検討を行った。注射ワクチン、浸漬ワクチンおよびスタンプワクチンの効果を検討し、また、免疫賦活剤投与による効果の増強法についても検討した。第 4 節では、冷水病耐病性を有する人工アユに関する検討を行った。県内で生産されている複数の人工アユ系統の冷水病感受性の比較を行い、耐病性要因について検討した。第 5 節では、*F. psychrophilum* の病原因子の検討を行った。アユおよびアマゴ *O. masou ishikawae* 血清での *F. psychrophilum* の増殖性を検討し、感染実験で菌株の病原性を比較した。続く第三章では、養殖アユに発生した細菌性腎臓病に関する研究を行った。細菌性腎臓病はこれまでサケ科魚類のみで発生が確認されていたが、アユにおける発生を初めて確認した。第四章では、養殖アユにおいて発生した新型ビブリオ病に関する研究を行った。アユのビブリオ病の原因菌として、これまで *V. anguillarum* および *V. ordalii* が知られていたが、これらとは異なる新種の *Vibrio* 属細菌によるビブリオ病を確認した。第五章では、河川のアユに発生した *Edwardsiella ictaluri* 感染症に関する研究を行った。*E. ictaluri* は海外の養殖ナマズの病原菌として知られているが、日本の天然アユで初めて確認した。



Table 1-1. Bacterial diseases of ayu reported in Japan

Disease	Pathogen	Location	Reference
Vibriosis	<i>Vibrio anguillarum</i> <i>V. ordalii</i>	Farm	Muroga and Egusa, 1988 Muroga <i>et al.</i> , 1986
NAG-vibriosis	<i>V. cholerae</i> non-O1	Farm River	Muroga <i>et al.</i> , 1979 Yamanoi <i>et al.</i> , 1980
Motile aeromonad disease	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Farm River	Jo and Onishi, 1980
Pseudomonas infection	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	Farm	Nakai <i>et al.</i> , 1985
Bacterial hemorrhagic ascites	<i>P. plecoglossicida</i>	Farm	Nakatsugawa and Iida, 1996 Wakabayashi <i>et al.</i> , 1996 Nishimori <i>et al.</i> , 2000
Bacterial gill disease	<i>Flavobacterium branchiophilum</i>	Farm	Wakabayashi, 2004b
Columnaris disease	<i>F. columnare</i>	Farm River	Wakabayashi, 2004c
Bacterial coldwater disease	<i>F. psychrophilum</i>	Farm River	Wakabayashi <i>et al.</i> , 1994 Iida and Mizokami, 1996
Streptococciosis	<i>Streptococcus iniae</i>	Farm	Kitao <i>et al.</i> , 1981 Onishi and Jo, 1981 Ugajin, 1981

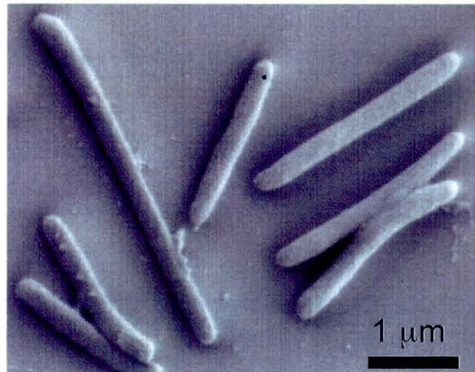


Fig. 1-1. *Flavobacterium psychrophilum* isolated from diseased ayu, observed by scanning electron microscopy.

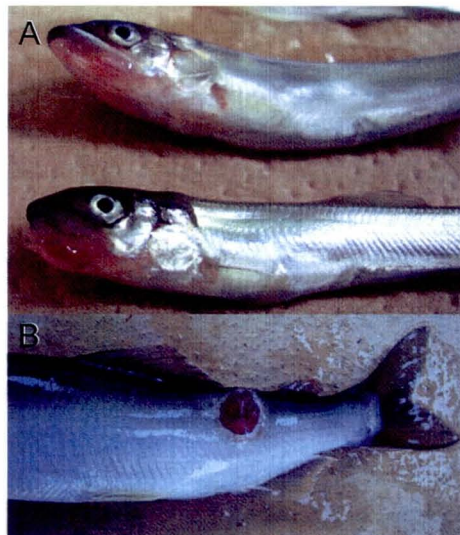


Fig. 1-2. Ayu affected with bacterial coldwater disease (BCWD). The hemorrhagic and ulcerative lesions on the lower jaw (A) and the body surface (B).

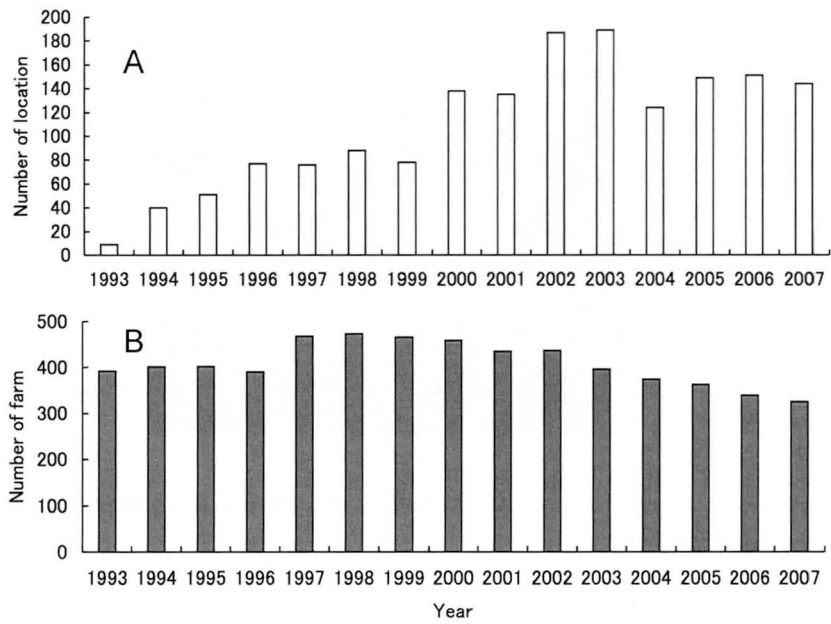


Fig. 1-3. Occurrence of BCWD at rivers (A) and farms (B) in Japan in 1993-2007.

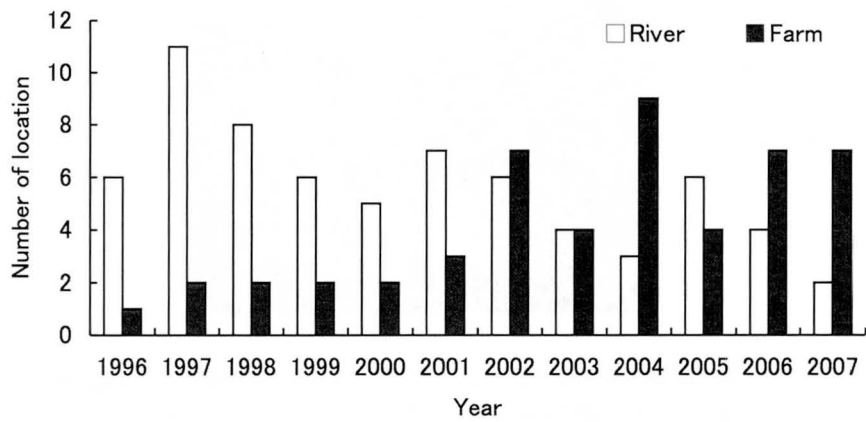


Fig. 1-4. Occurrence of BCWD in Hiroshima Prefecture in 1996-2007.

## 第 II 章 アユの細菌性冷水病

### 第 1 節 広島県で分離された *Flavobacterium psychrophilum* の遺伝子型と分離魚種の関係

これまでに *F. psychrophilum* は様々な淡水魚から分離されており、分離された *F. psychrophilum* の血清学および遺伝学的性状が株間で比較され、分離魚種との関係がすでに検討されている。血清学的には、ギンザケ *Oncorhynchus kisutch* 分離株は O-1 型、アユ分離株は O-2 型およびニジマス *O. mykiss* 分離株の大部分が O-3 型であることが明らかにされている (Wakabayashi *et al.*, 1994; Izumi and Wakabayashi, 1999)。遺伝学的検討では、RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) -PCR (Chakroun *et al.*, 1997)、プラスミド型 (Chakroun *et al.*, 1998; Izumi and Aranishi, 2004)、PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Izumi *et al.*, 2003; 吉浦ら, 2006)、16S rDNA 遺伝子の多型解析 (Soule *et al.*, 2005) および DNA の制限酵素切断パターンの解析 (Arai *et al.*, 2007) が行われ、分離魚種と遺伝子型には一定の関係が認められる。

本研究では、2000 年から 2007 年に広島県下で様々な淡水魚から分離された *F. psychrophilum* を PCR-RFLP 法により解析し、分離魚種と遺伝子型との関係を検討した。さらに、より詳細な遺伝子型に区別することが可能な RAPD-PCR 法を用いて解析を行った。また、アユとアユ以外の魚種に共通する遺伝子型について、それらのアユに対する病原性を調べた。

### 材料および方法

#### 供試菌株

2000 年から 2007 年に広島県内の養殖場および河川において採取したアユから分離した 168 株、ヤマメ *O. masou* から分離した 8 株、アマゴ *O. masou ishikawae* から分離した 29 株、ニジマスから分離した 5 株、オイカワ *Zacco platypus* から分離した 6 株およびギンブナ *Carassius gibelio langsdorfi* から分離した 1 株を含む 217 株の *F. psychrophilum* を用いた。また、1993 年に広島県でアユおよびオイカワから分離された 4 株の *F. psychrophilum* も用いた (Iida and Mizokami, 1996)。改変サイトファーガ寒天培地<sup>1</sup> (Wakabayashi and Egusa, 1974) を用いて魚から分離した *F. psychrophilum* は、実験に用いるまで -80°C で保存した。菌株の情報については Appendix 1 に示した。

#### PCR-RFLP

5% (w/v) になるように超純水に懸濁した Chelex 100 (Sigma) をオートクレーブで滅菌

<sup>1</sup> 2 g/L Bacto-tryptone (Difco), 0.5 g/L Yeast extract (Oxoid), 0.2 g/L Lab-Lemco powder (Oxoid), 0.2 g/L 酢酸ナトリウム, 0.2 g/L 塩化カルシウム, 0.2 g/L 硫酸マグネシウム, 10 g/L Bacto-agar (Difco)

し、1.5 mL チューブに 300  $\mu$ L ずつ分注した。約 5 mg の菌体を Chelex 100 溶液に懸濁し沸騰水中で 10 分間加熱処理後、遠心分離 (10,000 $\times$ g, 10 分間, 4 $^{\circ}$ C) で得られた上清を抽出 DNA とし PCR に用いた。ジャイレース B 遺伝子およびロタマーゼ (peptidyl-prpIyl cis-trans isomerase C) 遺伝子の一部は、それぞれプライマーセット PSY-G1F, PSY-G1R (Izumi *et al.*, 2003) および fpPPIC1F, fpPPIC1R (吉浦ら, 2006) を用いて増幅した。ジャイレース B 遺伝子の増幅では、最初に 94 $^{\circ}$ C で 1 分間反応させた後、94 $^{\circ}$ C $\cdot$ 15 秒, 51 $^{\circ}$ C $\cdot$ 30 秒, 72 $^{\circ}$ C $\cdot$ 30 秒を 1 サイクルとして 40 サイクル反応させ、最後に 72 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させた (増幅産物: 1178 bp)。ロタマーゼ遺伝子の増幅では、最初に 94 $^{\circ}$ C で 1 分間反応させた後、94 $^{\circ}$ C $\cdot$ 15 秒, 60 $^{\circ}$ C $\cdot$ 30 秒, 72 $^{\circ}$ C $\cdot$ 30 秒を 1 サイクルとして 40 サイクル反応させ、最後に 72 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させた (増幅産物: 346 bp)。PCR 産物を 1.5% アガロースゲル-TAE<sup>2</sup>電気泳動で確認してから、ジャイレース B 遺伝子の PCR 産物を *RsaI* で、ロタマーゼ遺伝子の PCR 産物を *HinI* で制限酵素処理した。制限酵素処理した PCR 産物は 2.0% アガロースゲル-TAE で電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し観察した。ジャイレース B 遺伝子の PCR 産物の消化の有無により R 型および S 型を、ロタマーゼ遺伝子の PCR 産物の消化の有無により A 型および B 型を判別した (Fig. 2-1-1)。

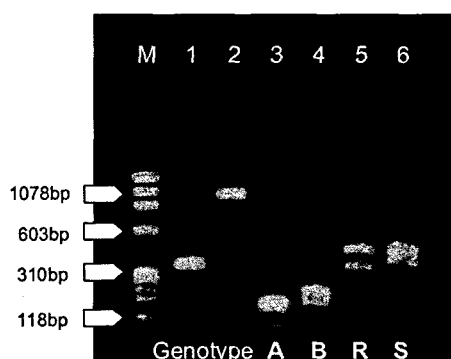


Fig. 2-1-1. PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) patterns of *Flavobacterium psychrophilum*. M: Molecular marker ( $\phi$ x174 *HaeIII* digest); 1: PCR product amplified with fpPPIC1F and fpPPIC1R; 2: PCR product amplified with PSY-G1F and PSY-G1R; 3, 4: PCR product (fpPPIC1F and fpPPIC1R) digested with *HinI*; 5, 6: PCR product (PSY-G1F and PSY-G1R) digested with *RsaI*.

#### RAPD-PCR

プライマーとして、市販の 20 種類のランダムプライマー (10 塩基: A-01~20, Operon) をそれぞれ 1 種類ずつ用いた。耐熱性ポリメラーゼとして Smart Taq DNA polymerase (ABgene) または Bio Taq DNA polymerase (Bioline) を使い、9  $\mu$ L の反応液に TE<sup>3</sup>で 10 ng/ $\mu$ L に調整した抽出 DNA を 1  $\mu$ L 添加し、以下のプログラムで反応させた。最初に 94 $^{\circ}$ C

<sup>2</sup> 400mM Tris-酢酸, 1mM EDTA pH 8.0

<sup>3</sup> 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0

で1分反応させてから、94℃・1分、35℃・2分、72℃・3分を45サイクル繰り返し、最後に72℃で10分間反応させた(PC808, アステック)。PCR産物は1.5%アガロースゲル-TAEで電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し観察した。

### 感染実験

感染実験には、水産海洋技術センターで飼育していた累代系アユを用いた。これらのアユは紫外線処理脱塩素水道水を用いた循環濾過で飼育され、健康状態は良好であった。アユから分離されたPH-0215株(遺伝子型:AS/3)、PH-0526株(BS/4)、PH-0529株(BS/4)、ギンブナから分離されたCH-0411株(BS/4)、オイカワから分離されたZH-0220株(BS/7)、ヤマメから分離されたOH-0221株(BS/7)およびアマゴから分離されたOH-0540株(BS/7)を感染実験に用いた(Appendix 1)。改変サイトファーガ寒天培地を用い18℃で1日間培養した菌株を生理食塩水(0.8%食塩水)に懸濁し、感染実験に用いた。アユ(平均体重20.0g)をFA-100<sup>4</sup>(大日本住友製薬)で麻酔し、腹鰭基部後方から腹腔内に菌液を注射器で0.1mLずつ各20尾に接種した。接種したアユはそれぞれ水温18.0-18.2℃の紫外線処理脱塩素水道水を用いて8日間流水飼育した。実験期間中に死亡したアユの腎臓からは、改変サイトファーガ寒天培地で細菌の分離を行った。

### 結果および考察

これまで日本国内で分離された*F. psychrophilum*の遺伝子型についてジャイレースB遺伝子およびロタマーゼ遺伝子を標的としたPCR-RFLP法によって調べられ、AR、AS、BRおよびBSの4型に分けられることが明らかにされ(Izumi *et al.*, 2003; 吉浦ら, 2006)、各県でも*F. psychrophilum*の疫学調査に広く用いられている。それによると、A型はアユ分離株にしか存在せず、B型は全ての魚種の分離株に存在するがアユにおいてその出現割合は低く、R型およびS型と宿主との関係性は低い。

2000年から2007年にかけて広島県の様々な魚種から分離された*F. psychrophilum*の遺伝子型をIzumi *et al.* (2003) および吉浦ら (2006) のPCR-RFLP法で調べ、分離魚と遺伝子型との関係を再検討した。その結果、アユから分離した菌株はAR型が24.4%、AS型が70.2%、BR型が1.8%およびBS型が3.6%であり(Table 2-1-1)、A型が94.6%とその大部分を占めており、またR型とS型との関連は認められない点においてIzumi *et al.* (2003) および吉浦ら (2006) の結果とほぼ一致する。一方、アユ以外の魚種から分離された株は全てB型であり、その大半がBS型(94.0%)でニジマスからは3株(6%)のBR型が分離された。Izumi *et al.* (2003) はニジマス分離株でBR型の割合が高いことを示しているが、広島県のニジマス分離株も同様であると考えられた。これらのことから、広島県の魚から分離され

<sup>4</sup> オイゲノール 10.7 g, ラウリル硫酸ナトリウム 5.0 g, ピロ亜硫酸ナトリウム 0.1 g, メタノール 42.8 mL, 精製水 55.5 mL

た *F. psychrophilum* の PCR-RFLP 法による遺伝子型と分離魚種の関係は、Izumi *et al.* (2003) および吉浦ら (2006) の結果とほぼ同じであることが明らかになった。

さらに詳細な *F. psychrophilum* の遺伝子型分けの方法として、全 DNA の制限酵素切断多型をパルスフィールド電気泳動法によって解析する方法が検討されている (Arai *et al.*, 2007)。それによると *F. psychrophilum* は 42 の遺伝子型を含む 20 のクラスターに分けられ、アユ分離株とその他の魚から分離された株とは明らかに区別できた。しかしながら、パルスフィールド電気泳動法は、その手法が煩雑で結果が得られるまで数日を要す。このことから、本研究ではランダムプライマーを用いたより簡便な方法である RAPD-PCR 法を用いて *F. psychrophilum* の遺伝子型を検討した。これまで魚類病原菌では、*Lactococcus garvieae* や *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* などで RAPD-PCR 法による遺伝子型分けが行われている (Ravelo *et al.*, 2003; Kawanishi *et al.*, 2006)。また、*F. psychrophilum* においても本法による解析がなされ、アユ分離株とニジマスおよびギンザケ分離株の遺伝子型の違いが明らかにされている (Chakroun *et al.*, 1997)。しかし、Chakroun *et al.* (1997) が解析に用いた日本の株は 9 株で、その中でもアユ分離株は 3 株と少なかったことから、広島県下でアユから分離された多くの株について RAPD-PCR 法による解析を行った。

最初に、アユ、アマゴおよびオイカワの分離菌を用いて Chakroun *et al.* (1997) が用いたものとは異なる 20 種類のプライマーにより多型性を検討した結果、プライマー A-02 (TGCCGAGCTG) で再現性のある多型性が得られた。このことから、以降の実験は A-02 を用いて遺伝子型を検討した。また、2 種類の耐熱性ポリメラーゼの増幅パターンを比較したところ、同じ結果が得られた。217 株から抽出した DNA を A-02 で増幅した結果、8 型の DNA 増幅パターンが得られた (Fig. 2-1-2)。Table 2-1-2 に示すように、アユ分離株は 1-4 型に属するが、アユ以外の分離株は 4-8 型に属した。4 型のみアユ以外に、ヤマメ、オイカワおよびギンブナ分離株が含まれた。PCR-RFLP 法と RAPD-PCR 法で得られた遺伝子型を比較した結果、AR 型および AS 型の菌株の全てが 1-3 型で、BS 型は大部分が 4-7 型となり両者に密接な関係が認められた (Table 2-1-3)。また、PCR-RFLP 法と RAPD-PCR 法で得られた遺伝子型を組み合わせることで *F. psychrophilum* の遺伝子型は 13 型に分けられ、宿主との関係をより細かく検討することが可能となった (Table 2-1-4)。そこでは、アユ分離株は 9 型に分けられ、そのうち AS/1 型の割合が 51.2% で最も優先的に出現した。アユ分離株とアユ以外の分離株とは BS/4 型に属す 7 株を除いて明確に分けられ、これまでの知見と一致した (Chakroun *et al.*, 1997; Izumi *et al.*, 2003; 吉浦ら, 2006; Arai *et al.*, 2007)。また、1993 年に広島県でアユから分離された PH-9304 株および PH-9334 株の遺伝子型はいずれも AS/1 型、オイカワから分離された ZH-9306 株および ZH-9348 株の遺伝子型はいずれも BS/6 型であった。当時、同時期に発生したアユおよびオイカワの大量死の原因菌は同じものと考えられていたが、それぞれの魚から分離された *F. psychrophilum* の遺伝子型は異なっていたことが明らかになった。すなわち、アユから分離された 2 株とも AS/1 型であり、これはその後のアユ分離株の大半 (51.2%) を占める型であった。一方、オイカワから分離された 2 株は BS/6 型であり、これもその後のオイカワ分離株の大半 (67.7%) を占める型であった。県内全地域、江の川水系および太田川水系におけるアユ分

離株の遺伝子型を Table 2-1-5 に示した。いずれの地域も AS/1 型が主要な遺伝子型で、AS/3 型が太田川水系に多いものの、その他の遺伝子型の分布割合には大きな違いはなかった。一方、少数の菌株のみが属す遺伝子型には、出現地域が限定される傾向が見られた。また、アユ以外の株では分離された地域と遺伝子型の関連はほとんどなかった。これらのことから、1993 年に広島県に侵入した AS/1 型の *F. psychrophilum* が県内各地に拡散した可能性、または県外から県内各地に AS/1 型の *F. psychrophilum* が別々に侵入した可能性が考えられた。

7 株と少数ではあるが BS/4 型の遺伝子型を持つ菌株が、アユおよびアユ以外の魚種から分離された (Table 2-1-4)。そこで両者に共通する BS/4 型株のアユに対する病原性を明らかにするため、アユから分離された BS/4 型株およびギンブナから分離された BS/4 型株を用いて感染実験を行った。その結果、アユ分離の BS/4 型 2 株 (PH-0526 株, PH-0529 株) はアユ分離の AS/3 型 1 株 (PH-0215 株) と同様にアユに対して病原性を示したが、ギンブナ分離の BS/4 型 1 株 (CH-0411 株) はオイカワ、ヤマメおよびアマゴ分離の BS/7 型 3 株 (ZH-0220 株, OH-0221 株, OH-0540 株) と同様にアユに対して病原性を示さなかった (Table 2-1-6)。従って、これらの遺伝子型は *F. psychrophilum* の病原因子と直結したものではないことが示された。これまで、オイカワに由来する BS 型株がアユに対して病原性を示さないことが明らかにされているが (田畑, 2004), アユ以外の魚種から分離された BS/4 型または BS/7 型株がアユに対して病原性を示さなかった本結果はそれと一致している。

本研究により、PCR-RFLP 法と RAPD-PCR 法を組み合わせることにより、広島県で分離された *F. psychrophilum* が 13 の遺伝子型に分けられ、PCR-RFLP 法のみを用いた場合よりも詳細な疫学的解析が可能となった。RAPD-PCR 法においてはアニーリング条件などの初期条件を検討する必要があるが、PCR 法を行っている施設では比較的応用しやすい。このことから、この手法での解析は今後、*F. psychrophilum* の感染源の推定などの疫学的調査に役立つものと考えられる。

Table 2-1-1. PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from freshwater fish species in Hiroshima Prefecture in 2000-2007

Fish	Genotype (PCR-RFLP*)			
	AR	AS	BR	BS
Ayu	41 (24.4)	118 (70.2)	3 (1.8)	6 (3.6)
Masu salmon				8
Red spotted masu trout				29
Rainbow trout			3 (60.0)	2 (40.0)
Pale chub				6
Silver crucian carp				1

Number of strains (% in each fish).

\* according to Izumi *et al.* (2003) and Yoshiura *et al.* (2006).



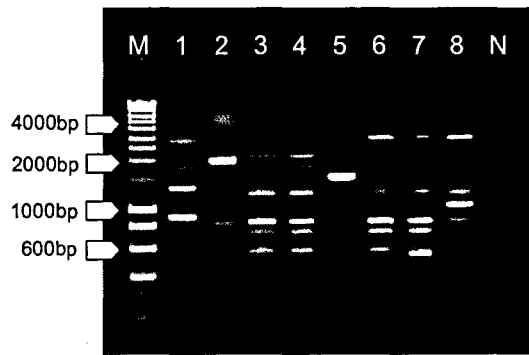


Fig. 2-1-2. RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) fingerprints of *F. psychrophilum* strains with a primer A-02. M: Molecular marker (HyperLadder I); 1-8: *F. psychrophilum* strains from some fish species; N: negative control.

Table 2-1-2. RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)-PCR analysis of *F. psychrophilum* isolated from freshwater fish species in Hiroshima Prefecture in 2000-2007

Fish	Genotype (RAPD-PCR)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Ayu	96 (57.1)	33 (19.6)	35 (20.8)	4 (2.4)				
Masu salmon				1 (12.5)		2 (25.0)	5 (62.5)	
Red spotted masu trout					17 (58.6)	1 (3.4)	11 (37.9)	
Rainbow trout						2 (40.0)		3 (60.0)
Pale chub				1 (16.7)		4 (66.7)	1 (16.7)	
Silver crucian carp				1				

Number of strains (% in each fish).

Table 2-1-3. Comparison between PCR-RFLP and RAPD-PCR analysis on *F. psychrophilum* genotypes

Genotype	PCR-RFLP			
	AR	AS	BR	BS
1	10	86		
2	29	4		
3	2	28	3	2
4				7
5				17
6				9
7				17
8			3	

Number of strains.

Table 2-1-4. Genotypes of *F. psychrophilum* isolated from freshwater fish species in Hiroshima Prefecture by the PCR-RFLP and RAPD-PCR analyses

Fish	Genotype (PCR-RFLP and RAPD-PCR)												
	AR/1*	AS/1	AR/2	AS/2	AR/3	AS/3	BR/3	BS/3	BS/4	BS/5	BS/6	BS/7	BR/8
Ayu	10** (6.0)	86 (51.2)	29 (17.3)	4 (2.4)	2 (1.2)	28 (16.7)	3 (1.8)	2 (1.2)	4 (2.4)				
Masu salmon									1 (12.5)		2 (25.0)	5 (62.5)	
Red spotted masu trout										17 (58.6)	1 (3.4)	11 (37.9)	
Rainbow trout											2 (40.0)		3 (60.0)
Pale chub									1 (16.7)		4 (66.7)	1 (16.7)	
Silver crucian carp									1				

\* AR, AS, BR and BS by PCR-RFLP, 1-8 by RAPD-PCR.

\*\* Number of strains (% in each fish).

Table 2-1-5. Genotypes of *F. psychrophilum* isolated from ayu in two areas of Hiroshima Prefecture

Area	Genotype (PCR-RFLP and RAPD-PCR)								
	AR/1*	AS/1	AR/2	AS/2	AR/3	AS/3	BR/3	BS/3	BS/4
All area	10** (6.0)	86 (51.2)	29 (17.3)	4 (2.4)	2 (1.2)	28 (16.7)	3 (1.8)	2 (1.2)	4 (2.4)
Otagawa river	8 (7.6)	50 (47.6)	17 (16.2)	3 (2.9)	1 (1.0)	22 (21.0)			4 (3.8)
Gonokawa river	2 (4.4)	23 (51.1)	12 (26.7)	1 (2.2)	1 (2.2)	4 (8.9)		2 (4.4)	

\* AR, AS, BR and BS by PCR-RFLP, 1-8 by RAPD-PCR.

\*\* Number of strains (% in each area).

Table 2-1-6. Mortalities of ayu challenged by intraperitoneal injection with *F. psychrophilum*

Strain	Host fish	Genotype	Challenge dose (Log <sub>10</sub> CFU/fish)	Mortality (%)
PH-0215	Ayu	AS/3	7.0	80
PH-0526	Ayu	BS/4	6.7	80
PH-0529	Ayu	BS/4	7.4	75
CH-0411	Silver crucian carp	BS/4	7.4	0
ZH-0220	Pale chub	BS/7	7.5	0
OH-0221	Masu salmon	BS/7	7.9	0
OH-0540	Red spotted masu trout	BS/7	7.7	0

Fish (domesticated stock, mean body weight: 20 g) were intraperitoneally injected with the strains and observed at 18.0-18.2°C for 8 days.

## 第2節 *Flavobacterium psychrophilum* の環境生存性と増殖温度

河川における冷水病の感染源として *F. psychrophilum* によって汚染された放流アユが考えられることから、放流アユの保菌検査が全国各地で行われている。一方、*F. psychrophilum* によって汚染されていないアユを放流した河川でも冷水病の発生がみられることから、河川環境中に生存している *F. psychrophilum* による感染も疑われている。日本において、*F. psychrophilum* の環境中における生態学的な研究としては、河川水、石に付着していた微細藻類および底泥からの PCR 法による *F. psychrophilum* 遺伝子の検出（網田ら, 2000; Izumi *et al.*, 2005）、河川の石付着物からの培養法による分離（田畑, 2006）が報告されている。また、ヨーロッパにおいては、本菌はサケ科魚類の養殖場周辺から検出され（Madetoja and Wiklund, 2002; Madsen *et al.*, 2005）、サケ科魚類由来の *F. psychrophilum* が滅菌淡水中において 15°C で 300 日以上生存することが示されている（Madetoja *et al.*, 2003）。彼らは淡水生存 49 日後まで、ニジマスに対する病原性を確認しているが、その後の病原性は調べていない。一方、アユに病原性を持つ *F. psychrophilum* の河川環境中での生存性や、また環境中に生存している *F. psychrophilum* の病原性に関する知見はない。

*F. psychrophilum* の増殖可能温度は 5°C から 23°C とされているが、25°C で増殖する菌株もある（若林, 2004d）。一般的には増殖適温で培養した細菌を用いて感染実験を行うことから、適温よりも高い温度で増殖した時の *F. psychrophilum* のアユに対する病原性についての報告は見当たらない。

本研究では、アユ病魚から分離した *F. psychrophilum* の水中での生存性を調べるとともに、長期間水中に生存した *F. psychrophilum* のアユに対する病原性について検討した。また、*F. psychrophilum* 複数株についてそれらの増殖適温を明らかにするとともに、高温適応させた *F. psychrophilum* のアユに対する病原性を調べた。

### 材料および方法

#### 供試菌株および菌液の調整

実験には、*F. psychrophilum* PH-0215 株（Appendix 1）を用いた。実験に先立ち、PH-0215 株を改変サイトファーガ液体培地<sup>5</sup>で対数増殖期（OD 660nm = 0.3 程度）まで 15°C で振盪培養（60 rpm）した。培養液から菌体を遠心分離（12,000×g, 1 分間, 4°C）により回収し、10% (v/v) グリセリンを含む改変サイトファーガ液体培地に懸濁してから複数の 1.5 mL チューブに分注し -80°C で保存した。一部のチューブは、数日後に解凍し生菌数の測定を行った。

<sup>5</sup> 2 g/L Bacto-tryptone (Difco), 0.5 g/L Yeast extract (Oxoid), 0.2 g/L Lab-Lemco powder (Oxoid), 0.2 g/L 酢酸ナトリウム, 0.2 g/L 塩化カルシウム, 0.2 g/L 硫酸マグネシウム

## 供試水

生存性を検討するための試験水として、活性炭により塩素を除去した水道水（水道水）、太田川漁業協同組合養魚場で採取した太田川伏流水（井戸水）、砂濾過した海水（海水、塩分濃度 33‰）および Mill-Q（日本ミリポア）処理した水（超純水）を用いた。水道水および超純水はオートクレーブ滅菌（121℃、15 分間）し、井戸水および海水は濾過滅菌（0.45 μm）した。

## 滅菌水中での生存性

最初に、水道水、超純水および海水における生存性を検討した。解凍した菌液を遠心分離（12,000×g、1 分間、4℃）し、上清を除去してから元の 10 倍量の試験水に懸濁した。懸濁した菌液を 1.5 mL チューブに分注し 18℃で静置した。一定時間経過後、それぞれのチューブの生菌数を測定した。次に、水道水での生存性を 15℃、25℃および 30℃において、井戸水での生存性を 15℃において検討した。前述と同様に菌体を懸濁した試験水を各温度で静置し、一定期間経過後に生菌数を測定した。さらに、初期菌数と生存性との関係について水道水を用いて 25℃で検討した。菌体懸濁液の 1/10 希釈列を水道水によって作製し、一定時間経過後に生菌数を測定した。

## 淡水生存菌を用いた感染実験

感染実験には、水産海洋技術センターで飼育していた累代系アユを用いた。これらのアユは紫外線処理脱塩素水道水を用いた循環濾過で飼育され、健康状態は良好であった。最初に、15℃および 25℃で 140 日間および 240 日間水道水にインキュベートした後の生存株を用いた（Exp. 1）。次に、再現性をみるための実験として、別に 25℃において 58 日間水道水にインキュベートした後の生存株を用いた（Exp. 2）。生存菌は改変サイトファーガ液体培地を用い 15℃で振盪培養し、前述と同様に -80℃に保存し生菌数を測定した。また、水道水にインキュベートする前の PH-0215 株も同様に培養し -80℃で保存した（初期菌液）。解凍した菌液を生理食塩水で 3 段階の菌数に希釈し、感染実験に用いた。

アユを FA-100 で麻酔し、腹鰭基部後方から腹腔内に菌液を注射器で 100 μL/fish 接種した。対照区のアユには生理食塩水のみを同様に 100 μL/fish 接種した。Exp. 1 では 13.1 g（140 日間生存菌）および 20.9 g（240 日間生存菌）のアユを、また Exp. 2 では 21.3 g のアユをそれぞれ用いた。接種後、アユはそれぞれ水温 18.0～18.5℃（140 日生存菌）、16.9～18.0℃（240 日生存菌）および 16.0～17.0℃（58 日生存菌）で紫外線処理脱塩素水道水を用いて 10 日間流水飼育した。実験期間中に死亡したアユの腎臓から、改変サイトファーガ寒天培地で細菌分離を行った。実験期間中の死亡数から各実験区における LD<sub>50</sub> をプロビット法により算出した。

## F. psychrophilum の増殖温度

アユから分離された 5 株、サケ科魚類から分離された 4 株およびコイ科魚類から分離さ

れた3株 (Table 2-2-3) について増殖温度を調べた。菌株の情報は Appendix 1 に示した。それぞれの菌株は改変サイトファーガ寒天培地を用いて 18°C で予備培養し、L 型試験管に入れた改変サイトファーガ液体培地に 0.01 mg/mL となるように接種した。温度勾配インキュベーター (バイオフォトレコーダー, アドバンテック東洋) を用い 10°C から 30°C で振盪培養 (60 rpm) し、30 分毎に 660 nm の吸光度を測定した。

#### 高温適応株を用いた感染実験

**高温適応:** 温度勾配インキュベーター (10–30°C) で培養した PH-0215 株を用い、最も高い温度で増殖を確認した菌液を新たな培地に継代することで、高温に適応させた。すなわち、最初の培養において 22.8°C で増殖した菌液を新たな培地に継代し、10°C から 30°C で培養した。次に、24.1°C で増殖した菌液を新たな培地に継代し、10°C から 30°C で培養した (培養液を感染実験に使用)。

**感染実験:** 供試魚には前述の淡水生存菌を用いた感染実験と同様のアユを用いた。24.1°C で培養した PH-0215 株を 10°C から 30°C の温度勾配で振盪培養し、対数増殖期 (OD 660nm = 0.2–0.3) に 13.2°C, 18.9°C および 24.1°C の培養液をそれぞれ回収した。希釈していない培養液と生理食塩水で 1/10 に希釈した培養液を、麻酔した 2.5 g のアユそれぞれ 20 尾の腹腔内に 25  $\mu$ L/fish 接種し、16°C の紫外線処理脱塩素水道水を用いて 14 日間流水飼育した。同様に 18°C および 23°C で培養した PH-0215 株を、18°C および 23°C で飼育していた 14.2 g および 11.4 g のアユそれぞれ 20 尾の腹腔内に 100  $\mu$ L/fish 接種し、18°C および 23°C でそれぞれ 9 日間流水飼育した。

#### 結果および考察

最初に、*F. psychrophilum* の水道水、超純水および海水中における生存性を検討した (Fig. 2-2-1)。超純水や海水においては生菌数が徐々に減少し、海水では 42 時間後には検出限界以下となった。一方、水道水では菌数は 3 時間後には減少したが、その後一定した。Madetoja *et al.* (2003) は、人工海水中では 1 日後に検出限界以下となったことを示している。また、アユ病魚から分離した *F. psychrophilum* が食塩を 1.5% 以上添加すると増殖しないことが示されていることから (Iida and Mizokami, 1996)、海水中で死滅したことはこれらの知見と一致した。また、超純水中では水道水と異なり菌数は徐々に減少した。Madetoja *et al.* (2003) は淡水に自然海砂を入れることで *F. psychrophilum* の生存期間が延長することを示し、これは海砂に含まれる何らかの成分が関与したためではないかと考察している。また、*F. psychrophilum* の増殖に鉄が必要なことも示されている (Moller *et al.*, 2005)。従って、超純水中での菌数の減少は微量成分の欠如によるものと推察された。

淡水中での *F. psychrophilum* の生存性を 15°C, 25°C および 30°C において検討した。30°C では 1 日後には検出限界以下となった。15°C および 25°C では初期に 1/10 から 1/10<sup>4</sup> まで菌数が減少したが、その後は緩やかに減少する傾向を示し 288 日後での生存も確認された。

(Fig. 2-2-2)。また、15°Cにおいて水道水とアユ養殖用の井戸水を比較したが、長期間の生存が両者で確認された (Fig. 2-2-2B)。Madetoja *et al.* (2003) はサケ科魚類分離菌において5°C、10°Cおよび15°Cで60日後まで滅菌淡水中での生存を確認している。また、15°Cのみで長期間の生存性を検討した結果、少なくとも300日間生存したことが示されており、本研究で得られた結果はこれらとほぼ一致した。本研究において、生菌数測定時に培地で増殖しない *F. psychrophilum* が、viable but non-culturable なのか死滅したのかは不明であり、この点に関しては Madetoja *et al.* (2003) も同じことを指摘している。*Flavobacterium* 属細菌には水中の腐敗菌が多く、環境中の有機物の循環に大きな役割を果たしている (Reichenbach, 1981)。このことから、*F. psychrophilum* も環境中で長期間生存する能力を有する可能性が考えられた。

これまでの実験では、初期菌数を約  $10^8$  CFU/mL とした。次に、より少ない初期菌数での生存性を調べるために試験水で 1/10 希釈列を作製し、より生存に厳しい条件である 25°C で検討した。その結果、 $10^9$  および  $10^8$  CFU/mL では 60 時間後までの生存が確認されたが、 $10^7$  から  $10^5$  CFU/mL では 7 時間後に、 $10^4$  から  $10^2$  CFU/mL では 1 時間後に検出限界以下となった (Fig. 2-2-3)。高濃度区でも初期に菌数が大幅に減少してから、その後は穏やかに減少する傾向となっているが (Fig. 2-2-3)、初期の生菌数の大幅な減少については、Madetoja *et al.* (2003) も指摘している。前述のように、*F. psychrophilum* の生存に何らかの成分が関与する可能性があることから、初期に死滅した菌体が生存菌にとって必要なその成分になっている可能性が考えられた。

淡水中で長期間生存した *F. psychrophilum* のアユに対する病原性を調べた。最初に 15°C または 25°C で 140 日間または 240 日間生存した *F. psychrophilum* の病原性を調べた。その結果、試験開始時の菌と同様に病原性が確認されたが、保存温度が高くなるにつれ病原性が低下する傾向を示した (Table 2-2-1)。なお、25°C で 58 日間保存した菌について検討したところ、病原性の低下は認められなかった (Table 2-2-2)。ところで、本研究では実施時期の遅い実験ほど試験開始時の菌液を含むいずれの実験区でも病原性が高まっている傾向が認められたが、供試アユの成長 (成熟) による生体防御能低下の影響によるものと考えられた。

前述のように *F. psychrophilum* の増殖にとって極限温度と考えられる 25°C (淡水中) においても *F. psychrophilum* が長期間生存したことから、至適増殖温度よりも高い温度に適応させた株 (アユ分離株) のアユに対する病原性を検討した。病原性試験に先立ち、アユ、サケ科魚類およびコイ科魚類から分離した *F. psychrophilum* の増殖温度を比較した。Table 2-2-3 に示したように、至適温度および増殖可能温度はサケ科分離株と比較してアユ分離株のほうがやや高い傾向を示したが、これは宿主の生息水温の違いによるのかも知れない。また、コイ科魚類分離株はアユ分離株と同様の傾向を示した。この至適温度については、サケ科魚類分離株で 19.2°C から 20.0°C、アユ分離株で 20°C、オイカワ分離株で 19.0°C と報告されているが (Uddin and Wakabayashi, 1997)、本研究で得られたアユ分離株の結果ではやや高い株が認められた。

次に、PH-0215 株を用いて高温適応実験を行った結果、実験開始時の状態では至適増殖温度が 18.9℃であったものが、1 回目には 19.5℃、2 回目には 20.5℃と徐々に上昇し、最終的には実験開始時の状態では増殖しなかった 25℃での増殖も確認された (Fig. 2-2-4)。同様の実験を再度行い 4 回の継代培養まで試みたところ、25.4℃までの増殖が確認された。これらの結果から、*F. psychrophilum* は高い温度に適応し増殖することが示された。続いて、高い温度に適応した PH-0215 株のアユに対する病原性を検討し、死亡率を Fig. 2-2-5 に示した。培養温度が高くなるにつれ死亡率が低下する傾向を示したが、24.1℃で増殖した PH-0215 株においても病原性を維持していた。病原性が低下したのは、接種後のアユの飼育水温が 16℃と培養温度よりも低かったためと考えられたことから、18℃および 23℃で培養した PH-0215 株の病原性を 18℃および 23℃で飼育しているアユを用いて調べた。その結果、23℃で飼育しているアユでは全く死亡が認められず、18℃飼育アユでは 18℃培養菌の病原性が 23℃培養菌よりも高かった (Fig. 2-2-6)。アユの冷水病対策として 23℃の一次加温および 27-28℃の二次加温による治療効果が報告されている (若林, 2004d)。23℃で飼育していたアユが死亡しなかった原因は *F. psychrophilum* の増殖温度に依存したのではなく、23℃飼育におけるアユの生体防御能の活性化によるものと考えられた。これらのことから、*F. psychrophilum* は夏期の比較的高い河川水温に適応できると考えられるが、同時期に河川に生息するアユには病原性を発揮できる可能性は低く、これは河川水温の上昇に伴い冷水病が終息する現象と一致している。

本研究により、滅菌淡水中で *F. psychrophilum* が長期間生存し、その生存菌はアユに対する病原性を維持していることが示された。河川環境と *in vitro* においては条件の違いはあるが、河川環境中における *F. psychrophilum* の長期間生存の可能性が示唆された。サケ科魚類を飼育している養殖場の排水から *F. psychrophilum* が検出されている (Madetoja and Wiklund, 2002; Madsen *et al.*, 2005)。また、ニジマス死魚からは多量の生菌が排出されることが示されていることから (Madetoja *et al.*, 2000)、河川で冷水病により死亡したアユから多数の *F. psychrophilum* が排出され、それらは河川環境中で長期間生存していると推察される。従って、感染魚の放流によって新たな *F. psychrophilum* 株を河川に持ち込まないことも重要であるが、環境中には病原性を有する *F. psychrophilum* が常在化していると想定し、放流アユの感染防除対策を構築する必要がある。

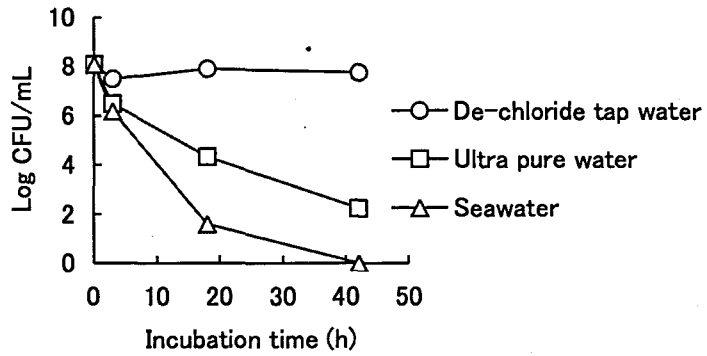


Fig. 2-2-1. Survival of *Flavobacterium psychrophilum* PH-0215 in sterilized de-chloride tap water, ultra pure water or seawater at 18°C.

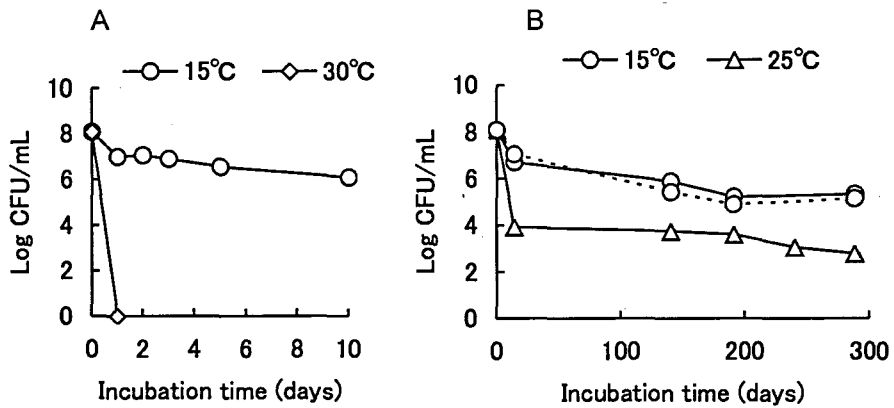


Fig. 2-2-2. Survival of *F. psychrophilum* PH-0215 in sterilized de-chloride tap water (solid line) and well water (broken line). Examination in well water was conducted only at 15°C.



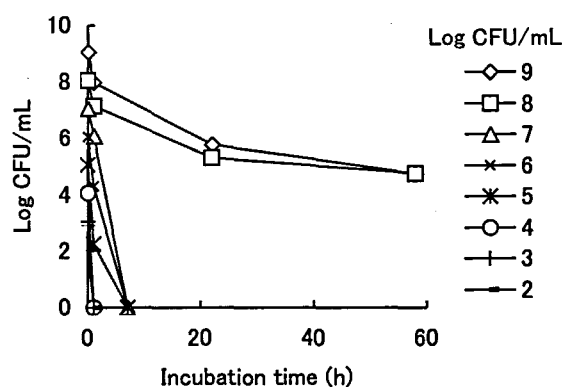


Fig. 2-2-3. Survival of *F. psychrophilum* PH-0215 inoculated at various initial concentrations in sterilized de-chloride tap water at 25°C.

Table 2-2-1. Pathogenicity of *Flavobacterium psychrophilum* PH-0215 after incubation in fresh water (Exp. 1)

Incubation	Dose (Log <sub>10</sub> CFU/fish)	Examined Fish	Mortality (%)	LD <sub>50</sub> (Log <sub>10</sub> CFU/fish)	
140 days	Initial	8.1	18	100	6.1
		7.1	20	70.0	
		6.1	21	52.4	
	15°C	8.2	21	95.2	6.6
		7.2	20	85.0	
		6.2	19	31.6	
25°C	8.1	19	42.1	8.4	
	7.1	20	10.0		
	6.1	21	4.8		
240 days	Initial	8.2	20	90	5.8
		7.2	20	70	
		6.2	20	60	
	15°C	8.2	20	100	6.3
		7.2	20	60	
		6.2	20	55	
	25°C	8.3	20	50	8.2
		7.3	20	35	
		6.3	20	15	

The strain PH-0215 was incubated in sterilized de-chloride tap water for 140 or 240 days at 15°C or 25°C and examined for the pathogenicity to ayu. Fish [domesticated stock, mean body weight: 13.1 g (140 days), 20.9 g (240 days)] were intraperitoneally injected with bacteria and observed at 18.0-18.5°C (140 days) and 16.9-18.0°C (240 days) for 10 days.

Table 2-2-2. Pathogenicity of *F. psychrophilum* PH-0215 after incubation in fresh water (Exp. 2)

Incubation	Dose (Log <sub>10</sub> CFU/fish)	Examined fish	Mortality (%)	LD <sub>50</sub> (Log <sub>10</sub> CFU/fish)
Initial	7.2	20	100	5.1
	6.2	20	75	
58 days	5.2	20	55	4.9
	7.3	20	90	
25°C	6.3	20	70	4.9
	5.3	20	60	

The strain PH-0215 was incubated in sterilized de-chloride tap water for 58 days at 25°C and examined for the pathogenicity to ayu. Fish (domesticated stock, mean body weight: 21.3 g) were intraperitoneally injected with bacteria and observed at 16.0-17.0°C for 10 days.

Table 2-2-3. Effect of temperature on the growth of *F. psychrophilum* strains isolated from different fishes.

Host fish	Strain	Optimal growth temperature (°C)	Growth temperature (°C)			
			21.5	23.1	24.6	26.1
Ayu	PH-0215	18.9	+	+	-	-
	PH-0424	21.4	+	+	+	-
	PH-0613	21.4	+	+	+	-
	PH-0616	21.6	+	+	+	-
	PH-0618	21.5	+	+	+	-
Salmonid	OH-0221	19.9	+	+	+	-
	OH-0224	19.9	+	+	-	-
	OH-0501	19.8	+	-	-	-
	OH-0519	18.4	+	+	-	-
Cyprinid	ZH-0220	19.8	+	+	-	-
	ZH-0412	21.4	+	+	+	-
	CH-0411	18.3	+	+	+	-

Bacteria were cultured in MCY broth by shaking at 60 rpm for 72 h.

+: growth, -: no growth.

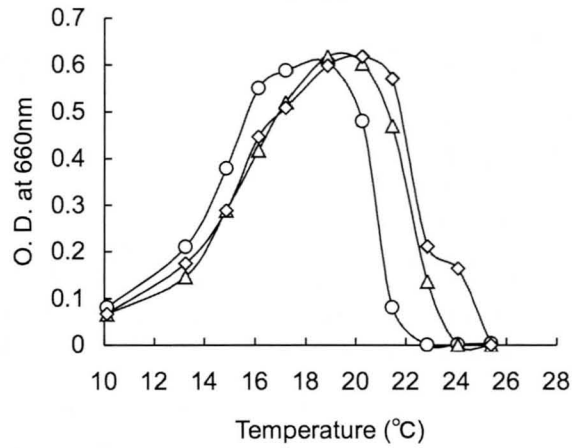


Fig. 2-2-4. Effect of incubation temperature on the growth of *F. psychrophilum* PH-0215. (O): initial condition, (Δ): growth of PH-0215 tolerable at 22.8°C, (◇): growth of PH-0215 tolerable at 24.1°C.

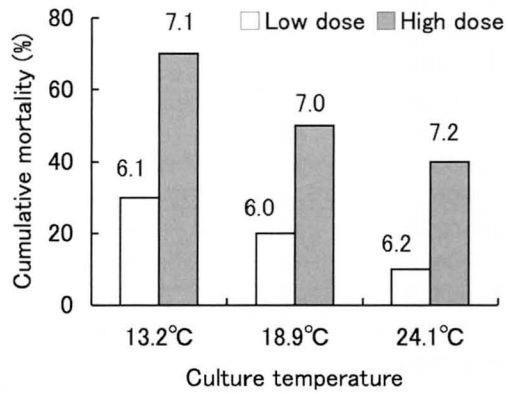


Fig. 2-2-5. Pathogenicity of *F. psychrophilum* PH-0215 cultured at different temperatures in ayu. Fish (domesticated stock, mean body weight: 2.5 g, n=20) were intraperitoneally injected with bacteria and observed at 16.0°C for 14 days. Letters above the bars indicate doses (Log<sub>10</sub> CFU/fish).

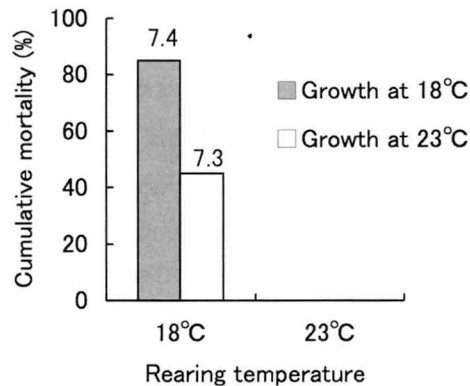


Fig. 2-2-6. Pathogenicity of *F. psychrophilum* PH-0215 cultured at 18°C or 23°C in ayu. Fish [domesticated stock, mean body weight: 14.2 g (18°C), 11.4 g (23°C), n=20] were intraperitoneally injected with bacteria and observed at 18°C or 23°C for 9 days. Letters above the bars indicate doses ( $\text{Log}_{10}$  CFU/fish).

### 第3節 冷水病に対する不活化ワクチンの開発

冷水病の原因菌である *Flavobacterium psychrophilum* はアユ以外の魚種や河川の一部の微細藻類および水から検出されている (網田ら, 2000; Izumi *et al.*, 2005; 田畑, 2006)。また, 第2節で明らかにしたように, 病原性を維持した状態で *F. psychrophilum* は淡水中で長期間生存し得る。このように, 河川環境中に原因菌が存在する状況下では, 河川に放流するアユの感染防除対策としては予防免疫が唯一の手段と考えられる。

冷水病の被害軽減のために, 国, 都道府県などで「アユ冷水病対策協議会」が組織され, その中の調査研究の一環としてワクチン開発が進められ, 注射ワクチン, 浸漬ワクチンおよび経口ワクチンに関する検討がなされた。

本節では, 広島県で検討したホルマリン不活化ワクチン (formalin killed bacterin: FKB) の有効性について述べる。第1項では注射ワクチンの有効性を室内試験および野外試験で調べた。また, 垂直感染防止の視点から, ワクチン処理したアユを親魚まで養成することで親魚の生殖腺の無菌化を図った。第2項では浸漬ワクチンおよびスタンプワクチンの有効性を室内試験および野外試験で調べた。第3項ではワクチン処理時の飼育水温およびワクチン作製用の培地の検討を行った。第4項では浸漬ワクチン処理前の免疫賦活剤の投与効果について調べた。

## 第1項 注射ワクチンの有効性

水溶性アジュバントおよびオイルアジュバントを添加した FKB による注射ワクチンの有効性を室内試験および野外試験で調べた。また、注射ワクチンを用いたアユ親魚の *F. psychrophilum* 無菌化についても検討した。

### 材料および方法

#### 供試魚

実験には、累代系アユを用いた。アユは4月まで水産試験場（水産海洋技術センター）<sup>6</sup> 地先海面の小割生け簀で飼育した後、水産試験場淡水魚支場または内水面実験地<sup>7</sup>（庄原市）に希釈海水（海水：淡水 = 1：2）を用いて輸送し、紫外線処理地下水を用いた屋内水槽または河川水を用いた屋外コンクリート池で飼育した。いずれのアユも飼育期間中は市販のアユ用配合飼料を給餌した。実験供試前のアユに冷水病の発生は見られなかった。なお、海水育成後に抗 *F. psychrophilum* 血清を用いた間接蛍光抗体法、または PCR 法（Izumi and Wakabayashi, 1997）によって60尾のアユの鰓および腎臓から *F. psychrophilum* の検出を試みたが、*F. psychrophilum* は検出されなかった。なお、以下の第2項から第4項においても生産年度は異なるが、同じように飼育された累代系アユを用いた。

#### ホルマリン不活化ワクチン(FKB)の作製

アユ病魚から分離された *F. psychrophilum* PH-9304 株（Iida and Mizokami, 1996）を改変サイトファーガ（MCY）液体培地にて18℃で2日間浸漬培養後、0.3%（v/v）量のホルマリンを添加し4℃で48時間静置して不活化し FKB とした。不活化前の菌数は  $10^{8.0-8.6}$  CFU/mL であり、菌の不活化は改変サイトファーガ寒天培地を用いた培養試験により確認した。

#### 水溶性アジュバント添加注射ワクチンの有効性(Exp. 1)

FKB のみ（FKB）、水溶性アジュバント Montanidae IMS 1312（Seppic, France）を添加したワクチン液（FKB with IMS 1312）および PBS<sup>8</sup>（Control）をそれぞれ接種した3区を設定した。IMS 1312 は等量の FKB と発泡しないように穏やかに混合し、ワクチン液のみの接種と菌数が同じになるように調整した。FA-100 で麻酔した平均体重 13 g のアユの腹鰭基部後方から腹腔内にそれぞれ 0.1 mL を注射器で接種し、1回目接種の2週間後に同様の接種（追加接種）を行った。追加接種の2週間後に、効果判定のための感染実験を、冷水病自然発病魚の飼育排水を用いて接種魚を14日間飼育することで行った。免疫期間中の水温は18.4～22.1℃で、感染実験時の水温は18.2～22.9℃であった。また、感染実験前に各区

<sup>6</sup> 実験実施時の名称は水産試験場（現在は水産海洋技術センター）

<sup>7</sup> 淡水魚支場は2001年に内水面実験地に名称変更、内水面実験地は2003年に閉鎖

<sup>8</sup> NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2.9 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/L

3尾ずつの採血を行った後、PH-9304株のFKB(1 mg/mL)に対する血清の凝集抗体価をマイクロタイター法で調べた。

### 水溶性アジュバントとオイルアジュバント添加注射ワクチンの有効性比較(Exp. 2)

IMS 1312 およびオイルアジュバント Montanidae ISA 763A (Seppic, France) の有効性を検討した。IMS 1312 と FKB の混合は前述の通りで、ISA 763A は FKB と 7 : 3 (w/w) の割合で連結注射器によりエマルジョン化して用いた。平均体重 5.5 g のアユの腹腔内に 50  $\mu$  L のワクチンを接種した。また、FKB のみの試験区および PBS (Control) を同様に接種した試験区も設定した。ワクチン処理後、各試験区のアユには鰭切除標識を施し試験区が判別できるようにした。ワクチン接種 26 日後に各試験区のアユを同じ水槽に収容し、自然発病した冷水病死亡魚 5 尾を 24 時間収容し、その後の経過を 21 日間観察した。試験期間中のアユは水温 14.5~17.4°C の紫外線処理脱塩素水道水を用いて流水飼育した。

### 野外試験

2000 年、2001 年および 2002 年に水産試験場淡水魚支場または内水面実験地において河川水飼育による野外試験を行った。アジュバントとしては 2000 年および 2001 年には IMS 1312 を、2002 年には ISA 763A 用いた。いずれの年も免疫期間中の飼育水温は 13~15°C であった。

**2000 年の実験：** ワクチン 2 回接種区 (Vaccinated twice) および無処理の対照区 (Control) を設定し、給餌率 (給餌量 / 魚体重  $\times$  100) の異なる 3 組の実験区 (Trials 1~3 : 3%, 2% および 1%) で行った。4 月 18 日に平均体重 6.9 g のアユに対して 50  $\mu$  L/fish のワクチン液を腹腔内接種し、14 日後 (5 月 2 日) に同様の接種 (追加接種) を行った。アユは 1 回目の処理前から河川水を用いて飼育されており、ワクチン処理後は鰭切除標識を行い Trial 毎にワクチン区および対照区のアユを混合し、屋外のコンクリート水槽 (4  $\times$  1 m, 水深 0.5 m) 3 面に収容後、市販のアユ用配合飼料を給餌し飼育を行った。なお、飼育には河川水原水 (江の川水系西城川) を用いた。飼育は 10 月 5 日まで継続し、ワクチン区および対照区で雌雄それぞれ 15 尾ずつについて腹腔内にアジュバント残存の有無を確認し、成長への影響を調べた。

**2001 年の実験：** 1 回免疫区 (Vaccinated once), 2 回免疫区 (Vaccinated twice) および無処理の対照区 (Control) の 3 区を設定した。4 月 6 日に平均体重 6.5 g のアユに対して 50  $\mu$  L/fish のワクチン液を腹腔内接種し、2 回免疫区については 13 日後 (4 月 19 日) に追加接種した。全てのアユはワクチン追加接種時までは海水飼育し、4 月 20 日に希釈海水 (海水 : 淡水 = 1 : 2) を用い淡水馴致しながら河川水飼育池に 3 時間かけて輸送した。各試験区のアユは鰭切除標識を行った後、混合して屋外のコンクリート円形池 (直径 6.4 m, 水深 0.5 m) に収容し 2000 年と同様に飼育を行った。また、冷水病が発生するまでに 2 回の採血を行い、PH-9304 株の FKB (1 mg/mL) に対する血清の凝集抗体価をマイクロタイター法で調べた。冷水病の自然発病が終息してからも、実験魚は屋外池で継続飼育した。9 月 4 日 (水温 22.2°C), 9 月 26 日 (20.3°C) および 10 月 9 日 (18.8°C) に血清の凝集抗体価の測定を上述の方法で、また生殖腺および腎臓から *F. psychrophilum* の検出を PCR 法 (Izumi

and Wakabayashi, 1997) で行った。

2002 年の実験：4 月 24 日に 1 回ワクチン接種の 4 月接種区：Vaccinated once (Apr.)、9 月 4 日に 1 回接種の 9 月接種区：Vaccinated once (Sept.)、4 月 24 日と 9 月 4 日にそれぞれ接種した 4・9 月接種区：Vaccinated twice および無処理の対照区：Control を設定した。ワクチン接種した 4 月接種区および対照区は鱭切除標識を行った後、河川水を用いた屋外池（コンクリート製丸池、直径 6.4 m、水深 0.5 m）で混合飼育した。9 月 4 日に再び、冷水病自然発病で生残した 4 月接種区および対照区の一部のアユにワクチン接種を行った。4 月には平均体重 4.0 g のアユに 50  $\mu$  L/fish、および 9 月には 57.8 g のアユに 100  $\mu$  L/fish のワクチン液を腹腔内接種した。また、9 月 4 日（水温 24.4℃）および 10 月 22 日（14.6℃）に、各試験区で雌雄 5 尾ずつの血清の凝集抗体価の測定、生殖腺、腎臓および鰓から *F. psychrophilum* の検出を前述の方法で行った。

### 死因の確認

各試験区の死亡魚について、冷水病の症状および体表患部や腎臓の塗抹試料を用いた間接蛍光抗体法（indirect fluorescence antibody technique: IFAT）により *F. psychrophilum* による死亡を確認した。IFAT では、一次抗体として抗 *F. psychrophilum* PH-9304 ウサギ血清（Iida and Mizokami, 1996）を PBS で 100 倍に希釈したものを、二次抗体として FITC 標識ウサギ IgG ヤギ血清（生化学工業）を PBS で 500 倍に希釈したものをを用いた。

### 有効性の判定

各実験区間の死亡数の差は、Fisher の直接確率計数法で検定し  $P < 0.05$  を有意な差とみなした。また、ワクチンの有効率（relative percent survival: RPS）は Croy and Amed（1977）に従い以下の式で計算した。

$$\text{有効率 (RPS)} = (1 - \text{免疫区死亡率} / \text{対照区死亡率}) \times 100$$

## 結果

### 水溶性アジュバントとオイルアジュバント添加注射ワクチンの有効性

Exp. 1：冷水病による死亡は攻撃試験開始 6 日後から始まった。14 日後の死亡率、有効率および攻撃試験時の凝集抗体価を Table 2-3-1 に示した。FKB 区および水溶性アジュバントを添加した FKB 区でワクチンの有意な有効性が認められ、水溶性アジュバントを添加することで有効率が高まる傾向が見られた。また、両ワクチン接種区とも抗体が検出されたが抗体価は低かった。

Exp. 2：攻撃試験において死亡魚投入 9 日後から冷水病による大量死が始まり、21 日後には対照区の死亡率が 80%に達した。いずれのワクチン接種区の死亡率も対照区と比較して有意に低かった（Table 2-3-2）。ISA 763A 添加ワクチンの有効率は 50%で、IMS 1312 添加ワクチンの有効率は 39.6%であった。

Table 2-3-1. Efficacy of formalin killed bacterin (FKB) with water-soluble adjuvant IMS 1312 by intraperitoneal immunization (Exp. 1)

Fish group	Agglutinin titers at challenge test		Challenge test		
			Dead / examined fish	Mortality (%)	RPS (%)
FKB	2 <sup>2,3</sup>	(3/3) <sup>*1</sup>	14/30	46.7 <sup>*2</sup>	39.3
FKB with IMS 1312	2 <sup>3,3</sup>	(3/3)	13/31	41.9 <sup>*2</sup>	45.5
Control	< 2	(0/3)	20/26	76.9	—

Fish (domesticated stock, mean body weight: 13 g) were intraperitoneally vaccinated twice (water temperature: 18.4-22.1°C) and challenged using water from tank of BCWD infected fish at 2 weeks post-vaccination (18.2-22.9°C).

\*<sup>1</sup> Detected / examined fish.

\*<sup>2</sup> Significantly lower ( $P < 0.05$ ) than control.

Table 2-3-2. Comparison in protective effects water-soluble adjuvant IMS 1312 and oil adjuvant ISA 763A by intraperitoneal immunization (Exp. 2)

Fish group	Examined fish	Dead fish	Mortality (%)	RPS (%)
FKB	60	32	53.3 <sup>*1</sup>	33.3
FKB with IMS1312	60	29	48.3 <sup>*1</sup>	39.6
FKB with ISA 763A	60	24	40.0 <sup>*1</sup>	50.0
Control	60	48	80.0	—

Fish (domesticated stock, mean body weight: 5.5 g) were intraperitoneally vaccinated once and challenged with cohabitation of BCWD infected fish at 26 days post-vaccination (water temperature: 14.5-17.4°C).

\*Significantly lower ( $P < 0.05$ ) than control.

## 野外試験

**2000年の実験:**冷水病の発生は5月17日から6月15日まで確認された。Fig. 2-3-1にワクチン区と対照区の死亡状況を示し、各区の6月15日時点での死亡率および有効率をTable 2-3-3に示した。冷水病発生時の水温は16.2~20.5°Cであったが、6月中旬以降は水温の上昇とともに冷水病による死亡は見られなくなった。いずれの水槽でもワクチン区の冷水病による死亡率は対照区の死亡率より有意に低く、3水槽を平均した有効率は6月15日の時点で33.0%であった。10月に体重測定と腹腔内のアジュバント残存の有無を調べた結果、ワクチン接種によると考えられる腹膜と腸管の癒着が一部の個体で認められたが、アジュバントの残存は認められなかった。各水槽間で給餌率が異なったので体重は大きく異なったが、ワクチン区と対照区のアユの成長に差は認められなかった (Fig. 2-3-2)。

**2001年の実験:**Fig. 2-3-3に示すように、冷水病による死亡は5月12日に初めて確認され、7月中旬まで続いた (水温 13.3~23.8°C)。1回免疫区および2回免疫区ともに、対照区と比較して有意にそれらの死亡率は低かったが、2回免疫区のほうが1回免疫区よりもさらに有意に低かった (Table 2-3-4)。Table 2-3-4には免疫12および26日後の凝集抗体価を示したが、1回免疫区および2回免疫区で差は見られなかった。9月4日および9月26日の保菌検査では生殖腺および腎臓から *F. psychrophilum* は検出されなかったが、10月9日



の検査では一部のアユの生殖腺および腎臓で陽性となった (Table 2-3-5)。またその際、凝集抗体価はいずれの区でもそれらの一部のアユから検出された。平均抗体価の点では各区間に差は認められなかったが、9月4日と比較して9月26日および10月9日の検出率がやや低かった。

**2002年の実験：**冷水病による死亡は、5月中旬から6月中旬にかけて確認され、水温上昇に伴い6月中旬以降は冷水病による大量死は確認されなかった (Fig. 2-3-4)。7月11日時点での死亡率はワクチン区で有意に低く、ワクチンの有効率は46.2%であった (Table 2-3-6)。9月4日および10月22日の保菌検査および凝集抗体価の結果を Table 2-3-7 に示した。9月4日に *F. psychrophilum* は全く検出されなかったが、10月22日には鰓から検出されるものが多く、また生殖腺および腎臓から少数ではあるが検出された。しかし、ワクチン区と対照区で保菌率に差は見られなかった。凝集抗体価については、10月22日の測定でいずれの免疫区も対照区より検出率、抗体価ともに高かった。

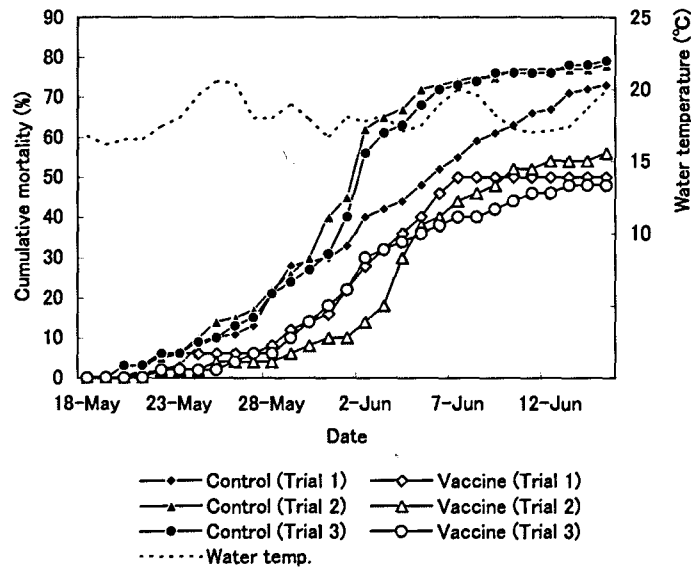


Fig. 2-3-1. Cumulative mortality of ayu immunized with FKB-IMS 1312 under field condition in 2000. Fish (domesticated stock, mean body weight: 6.9 g) were intraperitoneally vaccinated twice (Apr. 18 and May 2) and reared using river water. Feeding rates in trial 1, 2 and 3 were 3%, 2% and 1% (feed weight / body weight). See Table 2-3-3.

Table 2-3-3. Efficacy of FKB with IMS 1312 under field condition in 2000

Trial	Fish group	Examined fish	Dead fish	Mortality (%)	RPS (%)
1	Vaccinated twice	50	25	50.0*	31.5
	Control	100	73	73.0	—
2	Vaccinated twice	50	28	56.0*	28.2
	Control	100	78	78.0	—
3	Vaccinated twice	50	24	48.0*	39.2
	Control	100	79	79.0	—

Fish (domesticated stock, mean body weight: 6.9 g) were intraperitoneally vaccinated twice (Apr. 18 and May 2) and reared using river water. Feeding rates in trial 1, 2 and 3 were 3%, 2% and 1% (feed weight / body weight). See Fig. 2-3-1.

\*Significantly lower ( $P < 0.05$ ) than control.

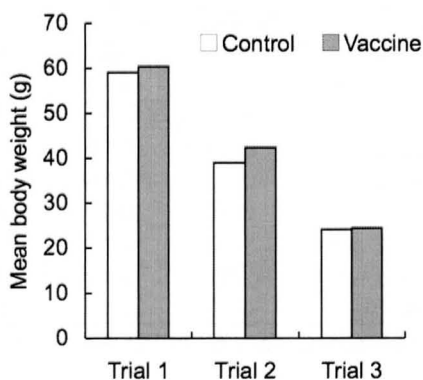


Fig. 2-3-2. Comparison of mean body weight in ayu immunized with FKB-IMS 1312 in Oct. 5, 2000. See Fig. 2-3-1.

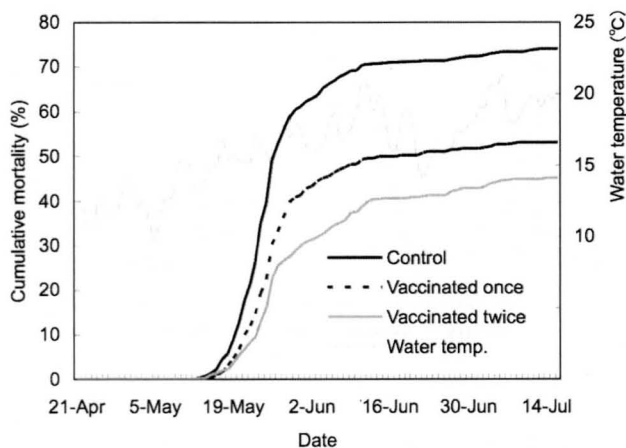


Fig. 2-3-3. Cumulative mortality of ayu immunized with FKB-IMS 1312 under field condition in 2001. Fish (domesticated stock, mean body weight: 6.5 g) were intraperitoneally vaccinated (once: Apr. 6, twice: Apr. 6 and Apr. 19) and reared using river water. See Table 2-3-4.

Table 2-3-4. Efficacy of FKB with IMS 1312 under field condition in 2001

Fish group	Agglutinin titers at post-immunization				Challenge test		
	12 days (May 1)		26 days (May 15)		Dead / examined fish	Mortality (%)	RPS (%)
	2 <sup>1.7</sup>	(6/6)* <sup>1</sup>	2 <sup>1.4</sup>	(5/6)			
Vaccinated once	2 <sup>1.7</sup>	(6/6)* <sup>1</sup>	2 <sup>1.4</sup>	(5/6)	239/437	54.7* <sup>2</sup>	25.1
Vaccinated twice	2 <sup>1.7</sup>	(3/6)	2 <sup>1.5</sup>	(6/6)	203/460	44.1* <sup>2</sup>	39.6
Control	< 2	(0/6)	< 2	(0/6)	815/1116	73.0* <sup>2</sup>	—

Fish (domesticated stock, mean body weight: 6.5 g) were intraperitoneally vaccinated (once: Apr. 6, twice: Apr. 6 and Apr. 19) and reared using river water. See Fig. 2-3-3.

\*<sup>1</sup> Detected / examined fish.

\*<sup>2</sup> Significantly difference ( $P < 0.05$ ) among the group.

Table 2-3-5. Detection of *Flavobacterium psychrophilum* by PCR and serum agglutinin titers at the termination of the field examination in 2001 (Table 2-3-4)

Sampling Date	Group	Detection by PCR		Agglutinin titer	
		Gonad*	Kidney*	Serum*	Mean
Sep. 4	Vaccinated once	0/8	0/8	4/8	2 <sup>2.0</sup>
	Vaccinated twice	0/8	0/8	5/8	2 <sup>2.3</sup>
	Control	0/9	0/9	5/8	2 <sup>2.0</sup>
Sep. 26	Vaccinated once	0/10	0/10	4/10	2 <sup>2.5</sup>
	Vaccinated twice	0/10	0/10	1/10	2 <sup>2.0</sup>
	Control	0/10	0/10	3/10	2 <sup>2.0</sup>
Oct. 9	Vaccinated once	1/10	4/10	1/10	2 <sup>2.0</sup>
	Vaccinated twice	2/10	3/10	1/10	2 <sup>3.0</sup>
	Control	0/10	1/10	4/10	2 <sup>2.3</sup>

Fish were intraperitoneally vaccinated (once: Apr. 6, twice: Apr. 6 and Apr. 19) and reared using river water. See Table 2-3-4.

\* Detection / examined fish.

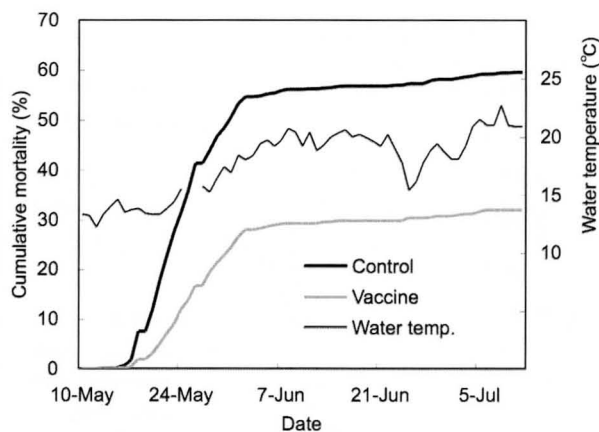


Fig. 2-3-4. Cumulative mortality of ayu immunized with FKB-ISA 763A under field condition in 2002. Fish (domesticated stock, mean body weight: 4.0 g) were intraperitoneally vaccinated once (Apr. 24) and reared using river water. See Table 2-3-6.

Table 2-3-6. Efficacy of FKB with ISA 763A under field condition in 2002

Group	Examined fish	Dead fish	Mortality (%)	RPS (%)
Vaccinated once (Apr.)	870	279	32.1*	46.2
Control	1200	715	59.6	—

Fish (domesticated stock, mean body weight: 4.0 g) were intraperitoneally vaccinated once (Apr. 24) and reared using river water. See Fig. 2-3-4.

\*Significantly lower ( $P < 0.05$ ) than control.

Table 2-3-7. Detection of *F. psychrophilum* by PCR and serum agglutinin titers at the termination of the field examination in 2002 (Table 2-3-6)

Sampling Date	Group	Detection by PCR			Agglutinin titer	
		Gonad*	Kidney*	Gill*	Serum*	Mean
Sep. 4	Vaccinated once (Apr.)	0/10	0/10	0/10	7/10	2 <sup>1.1</sup>
	Control	0/9	0/9	0/9	7/9	2 <sup>1.1</sup>
Oct. 22	Vaccinated once (Apr.)	0/10	0/10	5/10	8/10	2 <sup>4.6</sup>
	Vaccinated once (Sept.)	1/10	1/10	2/10	9/10	2 <sup>5.5</sup>
	Vaccination twice	0/10	2/10	3/10	9/10	2 <sup>4.9</sup>
	Control	0/10	1/10	1/10	2/10	2 <sup>1.2</sup>

Vaccinated once in Apr. 24 or Sept. 4, and vaccinated twice in Apr. 24 and Sept. 4. Detection / examined fish.

## 第 2 項 浸漬ワクチンおよびスタンプワクチンの有効性

FKB を用いた浸漬ワクチンおよびスタンプワクチンの有効性について、室内試験および野外試験で調べた。

### 材料および方法

#### 浸漬法およびスタンプ法の有効性(室内試験)

浸漬法では、希釈していない FKB に 5 分間 (Immersion 1/1) または淡水で 1/10 に希釈した FKB に 5 分間 (Immersion 1/10) 通気しながらアユを浸漬した。スタンプ法 (Stamp) では、希釈していない FKB に FA-100 で麻酔したアユを浸し、ディスポ BCG 接種用管針 (有隣特殊工業) を用いてアユ胴体側面にスタンプ処理した。対照区 (Control) は FKB を含まない淡水で 5 分間の浸漬処理を行った。ワクチン処理時の処理水温は 20℃であり、平均体重 17.4 g のアユを各区 35 尾ずつ用いた。1 回目のワクチン処理の 2 週間後に同様の処理を行い (追加免疫)、さらに 2 週間後に効果判定のための感染実験を行った。鰭切除標識した各区のアユを収容した水槽に、約 1 ヶ月間凍結保存 (-80℃) されていた冷水病罹患アユ 10 尾 (平均体重 15 g) を投入した。24 時間後に病魚を取り上げ、その後紫外線処理水を用いた流水飼育 (水温 18℃) を行い、前項と同様に冷水病による死亡を確認した。

### 浸漬法の有効性(野外試験)

実験区として2回のFKB浸漬処理を行う浸漬区(Immersion)、1回のISA 763A添加FKB注射を行う注射区(Injection)および無処理の対照区(Control)の3区を設定した。1回目のワクチン処理は4月23日に浸漬区および注射区で行い、2回目のワクチン接種は5月7日に浸漬区でのみ行った。1回目のワクチン処理時のアユの平均体重は6gであった。浸漬区では希釈していない5LのFKBにアユ200尾を収容し5分間通気しながら浸漬処理し、ワクチン液は4回反復使用した。注射ワクチン区は、アユの腹腔内にISA 763A添加FKBを50  $\mu$ L/fish接種した。有効性判定のための感染実験は、河川水を用いた自然感染により行った。アユはワクチン接種前の4月18日から河川水を用いた屋外池(コンクリート製丸池、直径6.4m、水深0.5m)で飼育されていた。各実験区のアユはワクチン処理後に鱗切除標識を施し、同じ池に収容し前項と同様に冷水病による死亡を確認した。

### スタンプ法の有効性(野外試験)

実験区として2回のスタンプ処理を行うスタンプ区(Stamp)、1回のISA 763A添加FKB接種を行う注射区(Injection)および無処理の対照区(Control)の3区を設定した。1回目のワクチン処理は4月23日にスタンプ区および注射区で行い、2回目のワクチン接種は5月7日にスタンプ区でのみ行った。1回目のワクチン処理時のアユの平均体重は6gであった。スタンプ区では希釈していないFKBに麻酔したアユを浸し、ディスポBCG接種用管針でアユ体側にスタンプ処理した。注射ワクチン区では、アユの腹腔内にISA 763A添加FKBを50  $\mu$ L/fish接種した。有効性判定のための感染実験は、河川水を用いた自然感染により行った。アユは、ワクチン接種前の4月18日から河川水を用いた屋外池(コンクリート製丸池、直径6.4m、水深0.5m)で飼育されていた。各実験区のアユはワクチン処理後に鱗切除標識を施し、同じ池に収容し前項と同様に冷水病による死亡を確認した。

## 結果

### 浸漬法およびスタンプ法の有効性(室内試験)

感染実験による死亡状況を Fig. 2-3-5 に示した。感染源としての病魚を投入してから5日目から冷水病による死亡が始まり3週間で対照区の死亡率は94%に達した。実験終了時の死亡率および有効率を Table 2-3-8 に示した。希釈していないFKBを用いた浸漬法およびスタンプ法の有効性が確認されたが、1/10希釈FKB浸漬の免疫効果は認められなかった。

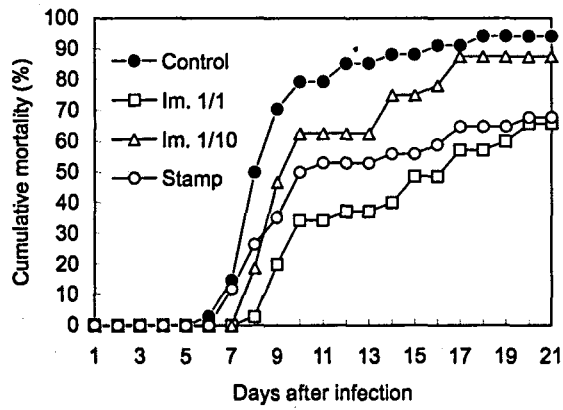


Fig. 2-3-5. Efficacy of immersion vaccine and stamp immunization with FKB. Fish (domesticated stock, mean body weight: 17.4 g) were vaccinated twice (water temperature: 20°C) and challenged using BCWD infected fish at 18°C. See Table 2-3-8.

Table 2-3-8. Efficacy of immersion and stamp immunization with FKB under laboratory condition

Group	Examined fish	Dead fish	Mortality (%)	RPS (%)
Immersion 1/1	35	23	65.7*	30.2
Immersion 1/10	32	28	87.5	7.0
Stamp	34	23	67.6*	28.1
Control	34	32	94.1	—

Fish (domesticated stock, mean body weight: 17.4 g) were vaccinated twice (water temperature: 20°C) and challenged using BCWD infected fish at 18°C. See Fig. 2-3-5.

\*Significantly lower ( $P < 0.05$ ) than control.

### 浸漬法の有効性(野外試験)

野外試験における死亡状況を Fig. 2-3-6 に示した。冷水病による死亡は5月中旬から6月中旬にかけて確認され、水温上昇に伴い6月中旬以降は冷水病による死亡は確認されなかった。7月11日時点での死亡率および有効率を Table 2-3-9 に示した。いずれの免疫区でもその死亡率は対照区に比べて有意に低かった。浸漬区の有効率は 20.9%および注射区の有効率は 32.4%であった。

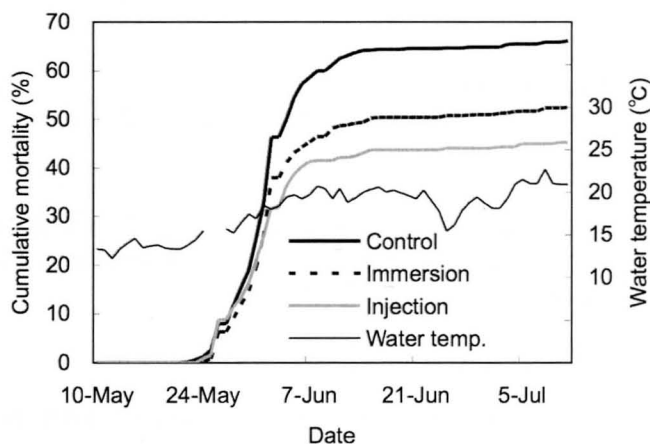


Fig. 2-3-6. Cumulative mortality of ayu immunized by the injection or immersion method under field condition. Fish (domesticated stock, mean body weight: 6.0 g) were vaccinated twice (Apr. 23 and May 7) and reared using river water. See Table 2-3-9.

Table 2-3-9. Efficacy of immersion and injection immunization with FKB under field condition

Group	Examined fish	Dead fish	Mortality (%)	RPS (%)
Immersion	830	434	52.3*	20.9
Injection	320	143	44.7*	32.4
Control	610	403	66.1	—

Fish (domesticated stock, mean body weight: 6.0 g) were vaccinated twice (Apr. 23 and May 7) and reared using river water. See Fig. 2-3-6.

\*Significantly lower ( $P < 0.05$ ) than control.

### スタンプ法の有効性(野外試験)

野外試験における死亡状況を Fig. 2-3-7 に示した。冷水病による死亡は5月中旬から6月中旬にかけて確認され、水温上昇に伴い6月中旬以降は冷水病による死亡は確認されなかった。7月11日時点での死亡率および有効率を Table 2-3-10 に示した。スタンプ区、注射区ともに死亡率は対照区と比べて有意に低かった。スタンプ区の有効率は15.7%、注射区の有効率は29.4%であった。

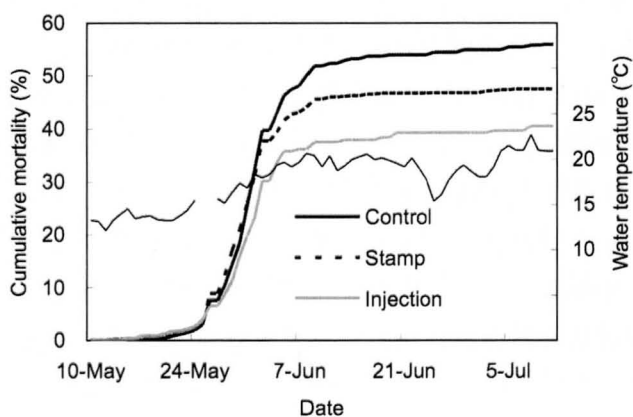


Fig. 2-3-7. Cumulative mortality of ayu immunized by the stamp or injection method under field condition. Fish (domesticated stock, mean body weight: 6.0 g) were vaccinated (stamp: Apr. 23 and May 7, injection: Apr. 23) and reared using river water. See Table 2-3-10.

Table 2-3-10. Efficacy of stamp and injection immunization under field condition

Group	Examined fish	Dead fish	Mortality (%)	RPS (%)
Stamp	750	351	46.8*	15.7
Injection	240	94	39.2*	29.4
Control	600	333	55.5	—

Fish (domesticated stock, mean body weight: 6.0 g) were vaccinated (stamp: Apr. 23 and May 7, injection: Apr. 23) and reared using river water. See Fig. 2-3-7.

\*Significantly lower ( $P < 0.05$ ) than control.



### 第3項 ホルマリン不活化ワクチンにおける条件検討

ホルマリン不活化ワクチン免疫における検討項目として、免疫時の水温およびワクチン作製に適した培地について調べた。

#### 材料および方法

##### 免疫期間中の飼育水温の検討

実験に用いたFKBは、滋賀県で病気のアユから分離された *F. psychrophilum* SG990302株を用いて前述（第1項）と同様の方法で作製した。12～15℃で飼育されていた平均体重3.8gのアユを3つの水槽（200L）に収容後、10℃、15℃および20℃に調温し1週間飼育した。各水温にアユを馴致させた後、水温毎に無処理の対照区（Control）、FKBを50μL/fish腹腔内注射した注射区（Injection）および希釈していないFKBで5分間浸漬処理する浸漬区（Immersion）の3区を設定した。浸漬ワクチン処理時のワクチン液の温度は飼育水温と同じにした。同様のワクチン処理を2週間後に再び行った（追加免疫）。各試験区のアユはワクチン処理後、鰭切除標識を行い水温毎に1水槽で混養した。ワクチン追加処理後、各水温で2週間の飼育を行ってから各水温のアユを15℃に1週間馴致し感染実験に供した。感染実験は36尾（平均体重5g程度）の冷水病自然発病アユをホモジナイズした後、各水槽（100L）に20gずつ投入することで行った。投入後は紫外線処理水を用いた流水飼育（16.1～18.5℃）を行い、第1項と同様に冷水病による死亡を確認した。

##### ワクチン作製培地の検討

ワクチンの作製：改変サイトファーガ培地（MCY）、羊血液寒天培地（SBA、栄研化学）およびKDM-2培地<sup>9</sup>（KDM、血清は含まず）を用いてワクチンを作製した。菌株として *F. psychrophilum* PH-9304株を用い、セロファン紙を重層した培地で15℃・10日間培養した菌体をPBSによって回収した。得られた菌液に0.3%（v/v）量のホルマリンを添加し4℃で不活化しワクチン液とした。菌数の計数は菌数計数板を用いて顕微鏡下で行い、全てのワクチンで $10^{9.7}$  cells/mLとなるようにPBSで調整した。

ワクチン効果試験（Exp. 1）：MCY、SBAおよびKDMで作製したワクチンを用いて浸漬法と注射法で免疫した。浸漬法では、飼育水で20倍に希釈したワクチン液（ $10^{8.4}$  cells/mL）を用いて、アユ（平均体重3.2g）を通気しながら5分間処理した。浸漬ワクチンの対照区は、飼育水のみで同様の処理を行った。注射法では、麻酔したアユ（3.0g）の腹鰭基部後方から腹腔内に希釈していないワクチン液を25μL/fish（ $10^{7.9}$  cells）接種した。注射ワクチンの対照区は、PBSのみを同様に接種した。いずれのワクチン処理も1回で、ワクチン

<sup>9</sup> 1%ペプトン（Difco）、0.05%酵母エキス（Oxoid）、0.1%塩酸システイン、pH 6.5

処理時の水温は 15℃であった。ワクチン処理 14 日後に、冷水病罹病アユ (-80℃保存) を水槽に 24 時間投入することにより感染実験を行った (21 日間, 流水飼育: 15.2~17.2℃)。  
**ワクチン効果試験(Exp. 2)** : MCY および SBA で作製したワクチンを用いて浸漬法と注射法で免疫した。浸漬法では、飼育水で 20 倍に希釈したワクチン液 ( $10^{8.4}$  cells/mL) を用いて、アユを 5 分間通気しながら処理した。注射ワクチンでは、希釈していないワクチン液を腹腔内に 50  $\mu$ L/fish ( $10^{8.4}$  cells) 接種した。浸漬ワクチンと注射ワクチンの対照区は無処理とした。いずれのワクチン処理に用いたアユも平均体重が 6.0 g で、ワクチン処理は 14 日間隔で 2 回行った。1 回目の処理時の水温が 15℃で、2 回目の処理時の水温は 17℃であった。ワクチン再処理の 19 日後に、冷水病罹病アユ (-80℃保存) を水槽に 24 時間投入することにより感染試験を行った (16 日間, 流水飼育: 17.9~19.0℃)。

## 結果

### 免疫時の飼育水温の検討

15℃下で行った感染実験 7 日後から冷水病による死亡が確認された。21 日後の死亡率および有効率を Table 2-3-11 に示した。免疫期間中の水温が 15℃および 20℃では注射区および浸漬区の死亡率が対照区よりも有意に低くなり、ワクチンの有効性が確認された。

Table 2-3-11. Effect of rearing water temperature in efficacy of FKB

Rearing Temperature	Group	Examined fish	Dead fish	Mortality (%)	RPS (%)
10℃	Injection	60	16	26.7	27.3
	Immersion	60	17	28.3	22.7
	Control	60	22	36.7	—
15℃	Injection	60	9	15.0*	64.0
	Immersion	60	12	20.0*	52.0
	Control	60	25	41.7	—
20℃	Injection	53	8	15.1*	64.6
	Immersion	61	15	24.6*	42.3
	Control	68	29	42.6	—

Fish (domesticated stock, mean body weight: 3.8 g) were immunized with the injection or immersion method twice (water temperature: 10℃, 15℃ or 20℃) and challenged using BCWD infected fish at 2 weeks post-vaccination (16.1-18.5℃) for 21 days.

\*Significantly lower ( $P < 0.05$ ) than control.

### ワクチン作製培地の検討

Exp. 1 においては、浸漬ワクチン区では感染 11 日後から、注射ワクチン区では感染 9 日後から冷水病による死亡が確認された。21 日後の死亡率および有効率を Table 2-3-12 に示した。浸漬ワクチンにおいては SBA 区の有効性が認められ、注射ワクチンにおいては MCY 区および KDM 区で有効性が認められた。

Exp. 2 においては、感染 6 日後から冷水病による死亡が確認された。21 日後の死亡率お

よび有効率を Table 2-3-13 に示した。MCY を用いた注射ワクチンのみに有効性が認められた。

Table 2-3-12. Comparison of culture media for bacterin preparation (Exp. 1)

Immunization method	Group	Examined fish	Dead fish	Mortality (%)	RPS (%)
Immersion	MCY	60	40	66.7	14.9
	SBA	60	32	53.3*	31.9
	KDM	60	40	66.7	14.9
	Control	60	47	78.3	—
Injection	MCY	70	31	44.3*	41.5
	SBA	70	47	67.1	11.3
	KDM	70	34	48.6*	35.8
	Control	70	53	75.7	—

Fish (domesticated stock, mean body weight: immersion, 3.2 g, injection, 3.0 g) were immunized with the injection or immersion method (water temperature: 15°C) and challenged using BCWD infected fish at 2 weeks post-vaccination (observed at 15.2-17.2°C for 21 days).

\*Significantly lower ( $P < 0.05$ ) than control.

Table 2-3-13. Comparison of culture media for bacterin preparation (Exp. 2)

Vaccination	Group	Examined fish	Dead fish	Mortality (%)	RPS (%)
Immersion	MCY	54	43	79.6	2.3
	SBA	55	38	69.1	15.2
Injection	MCY	54	29	53.7*	34.1
	SBA	49	43	87.8	-7.7
	Control	54	44	81.5	—

Fish (domesticated stock, mean body weight: 6.0 g) were immunized with the injection or immersion method (water temperature: 15-17°C) and challenged using BCWD infected fish at 2 weeks post-vaccination (observed at 17.9-19.0°C for 16 days).

\*Significantly lower ( $P < 0.05$ ) than control.

#### 第 4 項 浸漬ワクチン処理前の免疫賦活剤投与の効果

浸漬ワクチン処理前のアユに免疫賦活剤を経口投与し、ワクチンの有効性に及ぼす影響を調べた。免疫賦活剤として、小麦共生菌 *Pantoea agglomerans* 由来の低分子 LPS (lipopolysaccharide) および酵母抽出 RNA を用いた。

#### 材料および方法

##### 小麦共生菌抽出 LPS の効果

小麦共生菌 *P. agglomerans* 由来の低分子 LPS (オリエンタル酵母工業提供) を添加した

アユ用配合飼料を18日間アユに給餌した後、浸漬ワクチン処理を行った。LPSの飼料への混合は、飼料に魚体重1kg当たりLPS量で20 $\mu$ g/日となるよう添加した後、飼料の3%量(w/w)の食用油でコーティングすることで行った。実験区として、LPSを投与した後に浸漬ワクチン処理を行うLPSワクチン区(LPS vaccine)および無処理のLPS対照区(LPS control)、またLPSを含まない飼料のみを投与した後に浸漬ワクチン処理を行う対照ワクチン区(Vaccine)および無処理の対照区(Control)の合計4区を設定した。ワクチンの処理は1回のみとして、ワクチン処理後のアユは内水面実験地の屋外池(コンクリート製水槽、4 $\times$ 1 m、水深50 cm)に収容して、河川水を用いて冷水病の自然感染試験を行った。なお、各区のアユは鱗切り標識処理を行って混合飼育した。冷水病による死亡はIFATにより確認した。

Exp. 1: 試験は2002年にワクチン処理時の平均体重が5.2 gのアユを用いて行った。ワクチン処理には、改変サイトファーガ液体培地で15 $^{\circ}$ C $\cdot$ 3日間培養したPH-9304株を0.3%量(v/v)のホルマリンで不活化し作製したワクチンを希釈せずに用いて( $10^8$  CFU/mL)、5分間アユを通気しながら浸漬した。ワクチン処理は4月12日(水温13.2 $^{\circ}$ C)に行い、6月17日まで観察した。

Exp. 2: 試験は2003年にワクチン処理時の平均体重が4.2 gのアユを用いて行った。ワクチン処理には、セロファン紙を重層した羊血液寒天培地(SBA)で15 $^{\circ}$ C $\cdot$ 10日間培養したPH-9304株をPBSで回収した後、0.3%量(v/v)のホルマリンで不活化したワクチンを用いた。ワクチンは飼育水で1/20倍に希釈して( $10^{7.9}$  cells/mL)5分間アユを浸漬した。ワクチン処理は4月11日(水温13.0 $^{\circ}$ C)に行い、7月4日まで観察した。

### 酵母抽出RNAの効果

酵母抽出RNA(酵母エキスNT, オリエンタル酵母工業提供)を添加したアユ用配合飼料をアユに一定期間給餌した後、浸漬ワクチン処理を行った。酵母抽出RNAは飼料に添加し、飼料の3%量(w/w)の食用油でコーティングした。混合した飼料は魚体重の3%となるように給餌し、RNA非投与区(Control)も設定した。酵母抽出RNAを一定期間投与してから、希釈していないFKBにアユを通気しながら5分間収容した。ワクチンの対照として同様の処理を飼育水のみで行った。ワクチン処理後は感染実験までアユ用配合飼料のみを給餌した。Exp. 1(平均体重2.0 g)では、配合飼料に対して0.2%および1.0%(w/w)の酵母抽出RNAを2週間(10日間)投与した。Exp. 2(9.6 g)では、1.0%(w/w)を2週間(10日間)投与した。Exp. 3(13.5 g)では、1.0%(w/w)を1週間(5日間)または2週間(10日間)投与した。いずれの実験においても、ワクチン処理14日後から冷水病死亡魚を用いた感染試験を行った。Exp. 1では14.7 $\sim$ 18.9 $^{\circ}$ Cで21日間、Exp. 2では17.2 $\sim$ 18.5 $^{\circ}$ Cで21日間およびExp. 3では18.0 $\sim$ 18.1 $^{\circ}$ Cで18日間流水飼育し、冷水病による死亡をIFATで確認した。

## 結果

### 小麦共生菌抽出 LPS の効果

Exp. 1 および Exp. 2 の実験終了時の死亡率および有効率を Table 2-3-14 に示した。兩年とも冷水病の発生は 5 月下旬から確認され、6 月中旬まで死亡が続いた。いずれの実験でも LPS 投与後に浸漬ワクチン処理を行った試験区でのみ死亡率が有意に低かった。

Table 2-3-14. Effect of oral administration of *Pantoea agglomerans* LPS prior to immersion immunization with FKB

Experiment	Group	Examined fish	Dead fish	Mortality (%)	RPS (%)	
Exp. 1	LPS vaccine	82	27	32.9*	31.9	35.4
	LPS control	91	44	48.4	—	—
	Vaccine	46	19	41.3	19.0	—
	Control	104	53	51.0	—	—
Exp. 2	LPS vaccine	49	24	49.0*	27.9	40.1
	LPS control	53	36	67.9	—	—
	Vaccine	56	37	66.1	19.2	—
	Control	55	45	81.8	—	—

Fish [domesticated stock, mean body weight: 5.2 g (Exp. 1), 4.2 g (Exp. 2)] were immunized with the immersion method (water temperature: 13.0-13.2°C) and reared using river water. *Pantoea agglomerans* LPS was given to the fish prior to immersion immunization.

\*Significantly lower ( $P < 0.05$ ) than control.

### 酵母抽出 RNA の効果

Exp. 1, Exp. 2 および Exp. 3 の実験終了時の死亡率および有効率を Table 2-3-15 に示した。Exp. 1 においていずれの RNA 投与量でも RNA を投与しないアユと比較してワクチンの有効性が高まった。また、Exp. 2 において RNA1%の投与で有効性が高まる傾向が見られた。Exp. 3 においては、1 週間の投与よりも 2 週間の投与の効果が高かった。

Table 2-3-15. Effect of oral administration of yeast RNA prior to immersion immunization with FKB

Experiment	Group	Examined fish	Dead fish	Mortality (%)	RPS (%)		
Exp. 1	0.2%	Vaccinated	33	12	36.4*	48.3	
		Non-vaccinated	32	23	71.9	—	
	1%	Vaccinated	25	9	36.0*	48.8	
		Non-vaccinated	25	20	80.0	—	
	Control	Vaccinated	28	18	64.3	8.6	
		Non-vaccinated	27	19	70.4	—	
Exp. 2	1%	Vaccinated	25	14	56.0	28.9	
		Non-vaccinated	24	17	70.8	—	
	Control	Vaccinated	34	21	61.8	21.6	
		Non-vaccinated	33	26	78.8	—	
	Exp. 3	1% (1 week)	Vaccinated	30	23	77.0	8.0
			Non-vaccinated	30	25	83.0	—
1% (2 weeks)		Vaccinated	30	16	53.0*	36.0	
		Non-vaccinated	30	21	70.0	—	
Control	Vaccinated	30	25	83.0	0		
	Non-vaccinated	30	25	83.0	—		

Fish [domesticated stock, mean body weight: 2.0 g (Exp. 1), 9.6 g (Exp. 2), 13.5 g (Exp. 3)] were immunized with the immersion method (water temperature: 13.0-13.2°C) and challenged using BCWD infected fish at 2 weeks post-vaccination (Exp. 1: 14.7-18.9°C for 21 days, Exp. 2: 17.2-18.5°C for 21 days, Exp. 3: 18.0-18.1°C for 18 days). Yeast RNA was given to the fish prior to immersion immunization.

\*Significantly lower ( $P < 0.05$ ) than control.

## 考察

最初に有効性が期待される注射ワクチンについて検討した。ワクチンには作製が比較的容易なホルマリン不活化ワクチンを用いた。日本においては、水産用のホルマリン不活化ワクチンはアユのピブリオ病ワクチン、ブリの $\alpha$ 溶血性連鎖球菌症ワクチンおよびヒラメの $\beta$ 溶血性連鎖球菌症ワクチンなどにおいて実用化され、注射法、浸漬法および経口法による投与がなされている。まず、注射ワクチンの効果を高めるために、水溶性アジュバント (IMS1312) を添加したワクチンの効果を検討した (第1項)。水溶性アジュバントには、オイルアジュバントと比較してワクチン液との混合が容易であること、また体内に残留しにくく食品としての安全性に問題が生じにくいという利点がある。室内試験の結果、FKB単独よりも有効性が向上する傾向が見られ抗体価もやや高くなったことから、ワクチンの有効性を高める効果があると考えられた (Table 2-3-1)。一方、オイルアジュバントを添加した FKB と比較した場合、水溶性アジュバントの有効性はやや低かった (Table 2-3-2)。Rhaman *et al.* (2000) は冷水病ワクチンにおいてオイルアジュバント (ISA 763A) およびスクワレンをアジュバントとして用い、それぞれ有効率が 68% および 60% という結果を報告している。本研究の ISA 763A の有効率 50% よりも数値が高いが、Rhaman *et al.* (2000) の実験では注射感染で有効性を評価しており、本研究での病魚を用いた感染方法と異なるため両者は一律に比較できない。室内試験の結果では、ISA 763A の効果が IMS

1312 よりも高かったが、ISA 763A を添加したワクチンの粘性が非常に高く接種が困難であったことから、野外試験では主に IMS 1312 を用いた。

野外試験においては 2000 年および 2001 年は IMS 1312 を用い、2002 年は ISA 763A を用いたが、いずれの年もワクチンの有効性が確認された (Fig. 2-3-1, 2-3-3, 2-3-4)。2000 年の有効率は 33.0%、2001 年の有効率は 39.6% および 2002 年の有効率は 46.2% となった。これらは室内試験や上述の Rhaman *et al.* (2000) の有効率よりもやや低い有効率となったが、河川水を用いた感染実験では、河川からの濁流の流入や飼育池内への汚泥の沈殿などが生じ、水槽を用いた室内実験よりもさらに条件が厳しいことによると考えられた。2001 年の実験では 1 回免疫と 2 回免疫で有効性を比較したが、2 回免疫でワクチンの有効性が有意に高まった (Fig. 2-3-3)。しかし、免疫後の抗体価に差は認められなかった。また、2002 年には前年までとは異なりオイルアジュバントを用いたが、水溶性アジュバントを用いた 2001 年および 2002 年よりも高い有効性が確認された。実施年が異なることから単純には比較はできないが、室内実験の結果が再現されたと考えられた。一方、海水飼育時にワクチン処理 (2001 年) しても淡水時処理 (2000 年) と同様の有効性が得られ、淡水馴致前の海産アユに注射免疫することも可能であることが示された。また、野外試験で用いたアユを秋まで飼育した結果、ワクチン処理による考えられる悪影響は確認されなかった。本研究ではアジュバントを添加した FKB の野外での有効性が示され、河川での冷水病によるアユの死亡を軽減できる可能性が示された。

アユ親魚からはしばしば *F. psychrophilum* が検出され垂直感染が危惧されることから (井上, 2000)、注射ワクチンによってアユ親魚における *F. psychrophilum* の無菌化の可能性を検討した (第 1 項)。ワクチン接種したアユを採卵期まで飼育し、生殖腺および腎臓から *F. psychrophilum* の検出を行った。その結果、水温の低下に伴い *F. psychrophilum* が検出されるアユの割合が増加したが、実験区間における保菌率の差は 2001 年および 2002 年とも確認されなかった (Table 2-3-5, 2-3-7)。2001 年にワクチンの効果が十分に得られなかった原因として、注射ワクチンを接種したのが 4 月であり、採卵時まで約 6 ヶ月経過しており免疫能が維持されなかったことが考えられた。このことから、2002 年には 4 月の免疫に加え 9 月にも免疫を行ったが、免疫した一部のアユからも *F. psychrophilum* が検出された (Table 2-3-7)。これらの結果から、注射ワクチン処理により親魚の無菌化を図るのは困難と考えられた。また、凝集抗体価を比較した結果、生殖腺および腎臓に保菌しているアユでの平均が  $2^{3.8}$  および保菌していないアユでの平均が  $2^{4.1}$  となり、保菌しているアユでも凝集抗体価を有していた。アユにおいては *F. psychrophilum* の卵内感染の可能性が低く、消毒剤による殺菌が有効であることが示されており (Kumagai *et al.*, 2004)、*F. psychrophilum* に汚染された受精卵の消毒も考慮する必要があると考えられた。一方、親魚の生殖腺が *F. psychrophilum* に汚染されている可能性があるものの、これまで広島県において垂直感染と考えられる事例は確認されていない。海水中では *F. psychrophilum* は長期間生存できないことから (第 II 章 第 2 節)、孵化後海水を用いてアユの種苗生産を行う場合には垂直感染を危惧する必要はないものと考えられる。

浸漬ワクチンは、ワクチン液に対象魚を一定時間浸漬することで免疫するワクチンであ

り、アユのビブリオ病ワクチンなどで既に実用化されている。浸漬ワクチンでは大量処理が可能なことから、放流種苗を対象としたワクチンに適していると考えられる。*F. psychrophilum* に対するFKBを用いた浸漬免疫の有効性はニジマスでは報告されているが (Obachi and Laurencin, 1991)、アユの冷水病では確認されていない。一方、ニジマスの $\beta$ 溶血性連鎖球菌症において、BCG接種針を用いたスタンプワクチンの有効性が明らかにされているが (Nakanishi *et al.*, 2002)、アユの冷水病ワクチンにおいては検討されていない。そこで本研究では、FKBを用いて浸漬法およびスタンプ法による免疫の有効性を検討した (第2項)。室内試験で、希釈していないFKBと1/10に希釈したFKBを用いて浸漬ワクチンの有効性を比較したところ、希釈していないFKBでより高い有効性が得られた (Fig. 2-3-5)。また、BCG接種針を用いたスタンプ法の有効性も確認された (Fig. 2-3-5)。続いて、それぞれの免疫法の自然感染に対する有効性を検討した結果、浸漬ワクチンの自然感染での有効率は20.9%で、これはオイルアジュバント添加注射ワクチンの32.4%に比べやや低かった (Fig. 2-3-6)。また、スタンプワクチンの自然感染での有効率は15.7%で、これもオイルアジュバント添加注射ワクチンの29.4%に比べて低かった (Fig. 2-3-7)。このように、いずれの免疫法でも自然感染における有効性が確認されたが、その有効性はオイルアジュバント添加注射ワクチンと比較して低かった。ニジマスの $\beta$ 溶血性連鎖球菌症ワクチンにおいては浸漬法では効果が全く得られないが、スタンプ法では注射法と同程度の有効性が得られている (Nakanishi *et al.*, 2002)。アユの冷水病においては同じ傾向とはならなかったが、本研究では、FKBを用いた浸漬法およびスタンプ法による冷水病に対する免疫の有効性を初めて明らかにした。

人工生産アユの放流種苗を対象としたワクチン処理では、中間育成される2月から3月の低水温期 (約10–15°C) におけるワクチン処理が想定される。そこで、低水温飼育のワクチン効果に対する影響を検討するために、10°C、15°Cおよび20°Cで飼育したアユを用いてワクチン処理試験を行った (第3項)。その結果、10°Cと比較して15°Cおよび20°Cで免疫したアユで、注射ワクチンおよび浸漬ワクチンともに有効率が高いことが明らかになった (Table 2-3-11)。ただし、12°Cから15°Cで飼育していたアユを20°Cに加温すると成熟するアユが一部見られた。また、20°Cでは注射ワクチンおよび浸漬ワクチンともに処理後に死亡するアユが見られた。これらのことから、15°C程度で飼育されているアユに冷水病ワクチン処理することが理想であると考えられた。アユのビブリオ病ワクチンでは10°C、15°C、20°Cおよび25°Cで有効性が比較された結果、10°Cでわずかに有効率が低下することが示されている (城・大西, 1983)。冷水病のワクチンにおいても同じような結果が得られ、10°C程度でのワクチン処理は適さないものと考えられた。また、この試験では注射ワクチンと浸漬ワクチンの有効性の比較も行ったが、免疫期間の水温と有効性の関係は同じであった (Table 2-3-11)。ところで、飼育水温がアユの胸腺の発達に与える影響が検討され、20°C程度の高水温で稚魚を飼育すると胸腺の発達が抑制されることが明らかにされている (Miwa *et al.*, 2003; 原ら, 2006)。10°C飼育のアユに関しては検討されていないが、10°C飼育でワクチンの有効性が低かったことは胸腺などの免疫系の発達と何らかの関係を



持つものと考えられた。

冷水病の浸漬ワクチンには一定の有効性は認められるものの、注射ワクチンと比較するとその有効率は低かった。これまで、改変サイトファーガ培地で作製したFKBを用いて、浸漬ワクチンの有効性を検討したが有効率は30%程度であった。このため、改変サイトファーガ培地に加えて、羊血液寒天培地およびKDM-2培地でワクチンを作製し、浸漬ワクチンおよび注射ワクチンの有効性を検討した(第3項)。KDM-2培地は細菌性腎臓病の原因菌 *Renibacterium salmoninarum* を培養するための培地であるが、今西(2003)によって *F. psychrophilum* の培養が可能であることが報告されている。今西(2003)は牛胎児血清(FBS)を含む培地を用いているが、今回の実験では将来の実用化をふまえFBSを含まないKDM培地を用いた。しかしながら、Exp. 1において改変サイトファーガ培地で作製したワクチンと同様の有効性しか得られなかったため(Table 2-3-12)、Exp. 2においてKDM培地で作製したワクチンを用いなかった。両実験ともに、浸漬ワクチンでは羊血液寒天培地で作製したワクチンの有効性が高く、注射ワクチンにおいては改変サイトファーガ培地で作製したワクチンの有効性が高かった(Table 2-3-12, 2-3-13)。羊血液寒天培地で培養した *F. psychrophilum* の性状は、改変サイトファーガ培地で培養した菌体とは明らかに異なり、高い粘稠性を有していた。この性状が、浸漬ワクチンの有効性を高める一因ではないかと考えられたが、注射ワクチンの有効性が低い理由は明らかではなかった。

浸漬ワクチンの効果を高めるために、ワクチン処理前に免疫賦活剤を投与し細胞性免疫を活性化させることを想定して実験を行った(第4項)。最初に、*P. agglomerans* 由来の低分子LPSを一定期間アユに投与した後、浸漬ワクチン処理し自然感染で効果を検討した。*P. agglomerans* 低分子LPSは哺乳類のマクロファージを活性化させ(Kohchi *et al.*, 2006)、クルマエビに対する経口投与で免疫賦活作用を有することが明らかにされている(Takahashi *et al.*, 2000)。2回の実験ともにLPS経口投与後に浸漬ワクチン処理した試験区の死亡率が最も低くなり、LPS投与によるワクチン有効性の向上が示された(Table 2-3-14)。次に、酵母抽出RNAの効果について検討した。酵母から抽出したRNAを魚に経口投与することで、免疫が活性化され感染症に対する抵抗性が高まることが示されている(Li *et al.*, 2004; Choudhury *et al.*, 2005)。本研究では、アユに一定期間RNAを投与した後に、浸漬ワクチン処理を行い有効性の検討を行った。その結果、RNAの投与により浸漬ワクチンの有効性が向上することが確認され、投与期間や投与回数が多いと効果がより高まる傾向が示された(Table 2-3-15)。酵母抽出RNAは食品添加物として用いられていることから、安全性が高くまた比較的安価であることから実用化に有利である。これまで、LPSやRNAの他にも酵母抽出グルカン(永井, 2005)、市販ラクトフェリン添加物(永井, 2003)および市販混合添加物(永井, 2006)の有効性を同じように検討したが、LPSおよびRNA以外では効果が確認されなかった。詳細は不明であるが、免疫賦活剤の作用機序の違いが効果の有無につながるものと考えられた。

これまでアユの冷水病ワクチンの有効性は、オイルアジュバントを添加したFKBの注射ワクチン(Rhman *et al.*, 2000)、水溶性アジュバントを添加したFKBの注射ワクチン[永

井ら, 2003 (第1項); Rahman *et al.*, 2003], 菌体外膜成分の注射ワクチン (Rhaman *et al.*, 2001), FKB の浸漬ワクチン [永井・坂本, 2006 (第4節 第4項)], FKB の経口ワクチン (Kondo *et al.*, 2003) および腸溶性マイクロカプセルの経口ワクチン (原, 2004) において報告されている。FKB を用いた冷水病ワクチンの有効性はビブリオ病ワクチンの有効性よりは低い, 冷水病被害の軽減に役立つものと考えられている。アユ冷水病対策は緊急の課題であることから, 独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所を中心に広島県, 神奈川県および滋賀県で FKB を用いた浸漬ワクチンおよび経口ワクチン実用化の共同研究<sup>10</sup>が行われた。そこでは, ワクチン株として広島県で分離された PH-0424 株が採用され, 浸漬ワクチン実用化試験においてはワクチン減量および毒性軽減のため凍結乾燥化した FKB の有効性が示された (乙竹ら, 2008)。これらの結果を受けて, ワクチンメーカーを中心とした実用化研究が継続して行われている。

最近, サケ科魚類由来の *F. psychrophilum* の細胞表面の物質について精力的な研究がなされ, 203 残基のアミノ酸から成る FsPA と称されるタンパク質 (Crump *et al.*, 2005), 菌体表面の糖タンパク質 (LaFrenz *et al.*, 2007) および OmpH 様の分子量 18 kDa の菌体表面のタンパク質 (Dumetz *et al.*, 2008) などがワクチン候補として報告されている。また, 冷水病から回復したアユは冷水病に対して強い抗病性を示すことから, 感染魚が認識している抗原とワクチン抗原とが異なっている可能性も示唆されている (金辻ら, 2007)。従って, 今後は FKB に代わるより有効なワクチンが開発される可能性も考えられる。また, *F. psychrophilum* の全遺伝子の塩基配列が決定されたことから (Duchaud *et al.*, 2007), 遺伝情報に基づいたワクチンの開発も期待される。

---

∴ 先端技術を活用した農林水産研究高度化事業 (アユ冷水病の実用的ワクチン開発, 2005-2007 年度)

#### 第4節 冷水病耐病性形質を有する人工アユに関する検討

広島県においては、由来の異なる複数系統のアユが人工生産され河川放流に用いられている (Fig. 2-4-1)。養殖場での飼育において、これらのアユ系統の冷水病感受性に差のあることが経験的に知られていた。本研究では、*Flavobacterium psychrophilum* に対する人工生産アユ数系統の感受性を調べ、感受性の差が何に起因するのかを検討した。第1項においては、県内で主に生産されていた3系統の人工アユの冷水病感受性を比較した。また、冷水病感受性とビブリオ病感受性との関係についても調べた。第2項においては、県内で生産されているその他の人工アユ5系統の冷水病感受性を比較した。第3項においては、冷水病感受性と非特異的生体防御能の関係について検討するとともに、感受性系統と耐病性系統における *F. psychrophilum* の腹腔内注射後の体内消長を比較した。第4項においては、冷水病感受性の遺伝性を交配によって確認するとともに、感受性と免疫応答との関連を調べた。

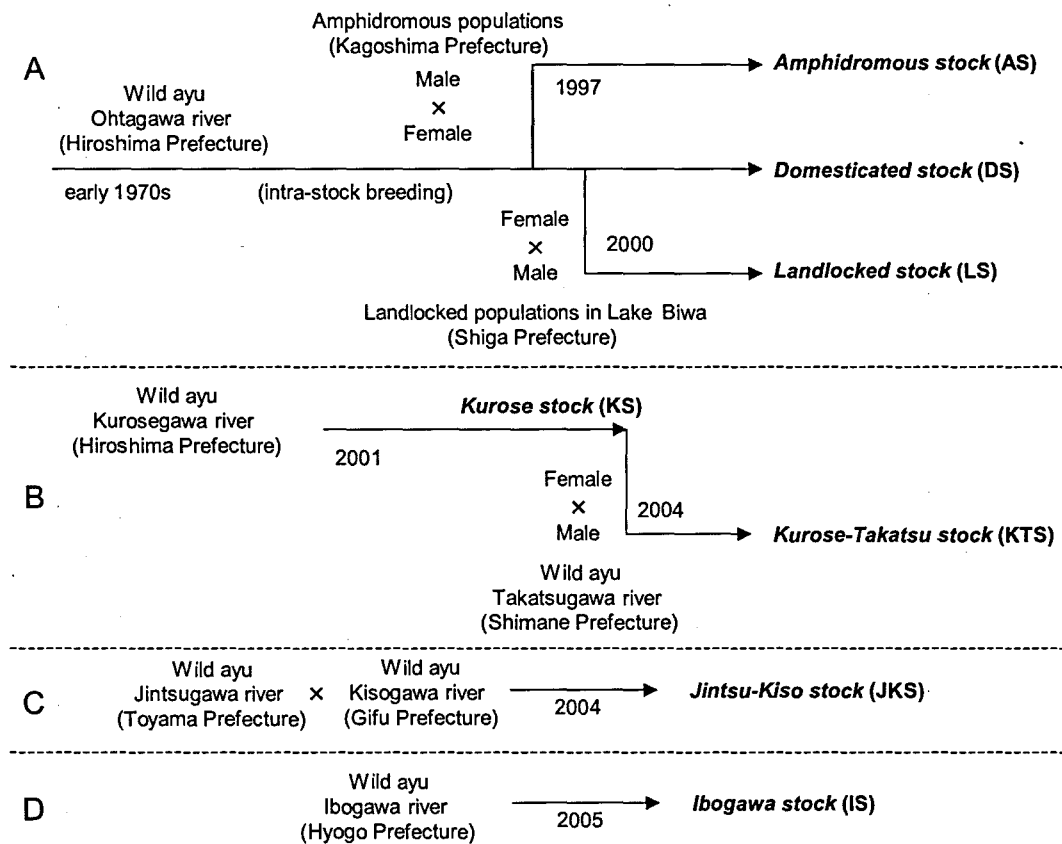


Fig. 2-4-1. Ayu stocks, which were produced in Hiroshima Prefecture, used in this study.

## 第1項 広島県内で主に生産されているアユ系統における冷水病感受性

広島県内で主に生産されている人工アユ3系統の冷水病感受性を感染実験により比較した。また、ビブリオ病に対する感受性についても感染実験により調べた。

### 材料および方法

#### 供試魚

Fig. 2-4-1A に示した3系統の人工生産アユを用いた。累代系アユ (Domesticated stock : DS, F28, F29) は1970年代初旬に太田川で捕獲されたアユに由来する系統で、これまで継代飼育されていた。海産交配系アユ (Amphidromous stock : AS, F4, F5) は1997年に海産アユ (鹿児島県産) のオスと累代系アユのメスを交配させたアユ系統で、継代飼育されていた。湖産交配系アユ (Landlocked stock : LS, F1, F2) は2000年に琵琶湖産アユのオスと累代系アユのメスを交配させ作出された。

これらのアユは、2002年および2003年の1月に種苗が生産された社団法人広島県栽培漁業協会から太田川漁業協同組合養殖場に輸送され、体重、飼育密度、水温および飼育池の大きさが同じくして、太田川伏流水を用いて飼育された。加えて、2003年にはそれぞれ2群の海産交配系アユ (AS 1 および AS 2) および湖産交配系アユ (LS 1 および LS 2) も実験に供した。これらのアユには冷水病の感染歴はなく、またビブリオ病の感染歴もなかった。また、実験前に60尾を採取し *F. psychrophilum* 検出用のPCR法 (Izumi and Wakabayashi, 1997) に供したが、腎臓および鰓から *F. psychrophilum* は検出されなかった。

#### 感染実験(冷水病)

**自然感染実験(野外実験, Exp. 1, 2) :** 内水面実験地<sup>11</sup>の屋外池において、西城川(江の川水系)の河川水を用いて実験を行った。これまで、西城川の河川水でアユを飼育すると毎年冷水病の発生が確認されていた。4月中旬に太田川漁業協同組合養殖場から輸送した供試魚を、鰭切除標識によって各区を識別できるようにしてから、コンクリート水槽(1×4 m, 水深50 cm)に収容した。2002年(Exp.1)には収容時の平均体重が5.2 gのアユを、2003年(Exp.2)には4.5 gのアユを用いた。アユには市販のアユ用配合飼料を給餌し、冷水病による死亡が終息するまで飼育を行った。死亡した魚については症状の観察を行うとともに、一部は体表患部や腎臓の塗抹試料について前述した間接蛍光抗体法(IFAT, 第Ⅱ章 第3節 第1項)により診断した。

**自然感染実験(室内実験, Exp. 3) :** 県内の養殖場で採取した冷水病で死亡したアユ(-80℃で保存)を感染源として用いた。実験(Exp. 3)は同じ内容の2区で行った。海産交配系アユ [AS (1) : 平均体重5.3 g, AS (2) : 5.3 g] および湖産交配系アユ [LS (1) : 6.0 g,

<sup>11</sup> 実験実施時は水産試験場内水面実験地

LS (2) : 5.6 g] を 100 L 水槽に収容し、ネットに入れた合計体重 80 g の冷水病罹病アユ 10 尾を水槽に投入した。24 時間後に感染源のアユを除去してから、紫外線処理淡水で 21 日間流水飼育した。実験中の水温は 17.1℃から 19.1℃であった。死亡魚の患部を用いた IFAT により、冷水病による死亡を確認した。

注射感染実験(室内実験, Exp. 4, 5) : 改変サイトファーガ寒天培地を用いて 18℃で 1 日間培養した *F. psychrophilum* PH-0215 株を PBS に懸濁し菌液とした。10<sup>7.0</sup> CFU/fish (Exp. 4) または 10<sup>4.8</sup> CFU/fish (Exp. 5) となるように、FA-100 で麻酔した供試魚の腹腔内に注射した。接種した魚は紫外線処理淡水で 14 日間流水飼育した。実験中の水温は 14.6℃から 18.2℃であった。死亡魚の腎臓を用いた IFAT により、冷水病による死亡を確認した。

#### 感染実験(ビブリオ病, Exp. 6, 7)

実験には、1987 年に徳島県の養殖アユから分離された *Vibrio anguillarum* PT-87050 株を用いた。トリプトソーヤ寒天培地(TSA, 日水製薬)を用いて 18℃で 1 日間培養した PT-87050 株を、1% (w/v) 食塩を添加した紫外線処理淡水に懸濁し菌液とした。Exp. 6 においては、累代系アユ (平均体重 3.1 g) および海産交配系アユ (3.2 g) を、Exp. 7 においては湖産交配系アユ (42.7 g) および海産交配系アユ (49.9 g) を用い、菌液に 5 分間浸漬した。Exp. 6 においては 1 濃度の菌液を、Exp. 7 においては 2 濃度の菌液を用い、それぞれ 10<sup>3.5</sup> CFU/mL (Exp. 1) , 10<sup>5.1</sup> および 10<sup>6.1</sup> CFU/mL (Exp. 2) とした。浸漬後のアユは、水温 16.5℃から 18.5℃の紫外線処理淡水を用いて 10 日間流水飼育した。死亡したアユの腎臓から TSA 培地で細菌の再分離を行い、死因を確認した。

#### 統計処理

感染実験による死亡数の差については Fisher の直接確率計数法で検討し、 $P < 0.05$  を有意な差とみなした。

### 結果

#### 感染実験(冷水病)

Exp. 1, 2 および 3 の結果は Table 2-4-1 にまとめ、死亡状況については Exp. 1 を Fig. 2-4-2 に、Exp. 2 を Fig. 2-4-3 に示した。2002 年および 2003 年ともに 5 月下旬からアユは冷水病で死に始め、2002 年においては 6 月中旬まで (Fig. 2-4-2) , 2003 年においては 7 月上旬まで (Fig. 2-4-3) 死亡が続いた。両年ともに、海産交配系アユ (AS) の死亡率は湖産交配系アユ (LS) および累代系アユ (DS) の死亡率よりも有意に低かった (Table 2-4-1) 。Exp. 3 においても、海産交配系アユ (AS) の死亡率は湖産交配系アユ (LS) よりも有意に低かった (Table 2-4-1) 。Exp. 4 および 5 の結果を Table 2-4-2 に示した。いずれの実験においても、海産交配系アユ (AS) の死亡率は湖産交配系アユ (LS) よりも有意に低かった。

Table 2-4-1. Mortalities of different ayu stocks caused by spontaneous or experimental bacterial coldwater disease (BCWD)

Experiment	Stock* <sup>1</sup>	Examined fish	Dead fish	Mortality (%)
Exp. 1	LS	104	53	50.1
	AS	95	5	5.2 * <sup>3</sup>
	DS	128	74	57.8
	LS	96	47	49.0
	AS	99	11	11.1* <sup>3</sup>
Exp. 2	LS (1)* <sup>2</sup>	105	84	80.0
	LS (2)	122	82	67.2
	AS (1)	138	36	26.1* <sup>3</sup>
	AS (2)	160	35	21.9* <sup>3</sup>
	DS	118	89	75.4
Exp. 3	LS (1)	60	52	86.7
	LS (2)	60	55	91.7
	AS (1)	60	30	50.0* <sup>3</sup>
	AS (2)	60	32	53.3* <sup>3</sup>

Exp.1 (fish mean weight: 5.2 g, Fig. 2-4-2) and Exp. 2 (4.5 g, Fig. 2-4-3) were conducted under field conditions (spontaneous infection) in 2002 and 2003, and Exp. 3 (5.3-6.0 g) was conducted under a laboratory condition (experimental infection) by cohabitation with dead fish affected with BCWD (observed at 17.1-19.1°C for 21 days).

\*<sup>1</sup> LS: landlocked stock, AS: amphidromous stock, DS: domesticated stock

\*<sup>2</sup> ( ): Experiments were carried out using 2 groups of the same stock.

\*<sup>3</sup> Significantly lower ( $P < 0.05$ ) than the other stocks.

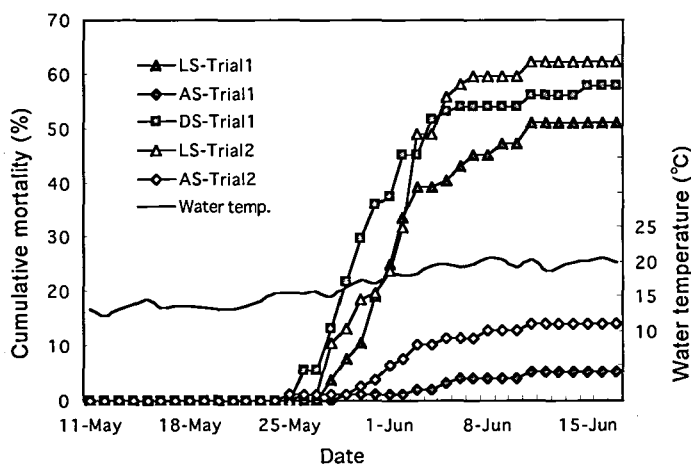


Fig. 2-4-2. Cumulative mortalities caused by spontaneous BCWD (bacterial coldwater disease) in ayu reared in river water in 2002 (Exp. 1). Trial 1 and 2 were conducted in different ponds at the same time. LS: landlocked stock, AS: amphidromous stock, DS: domesticated stock. See Table 2-4-1.

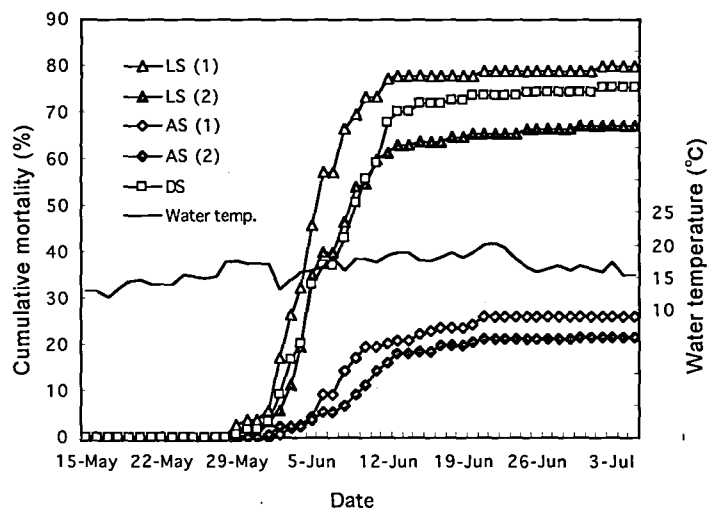


Fig. 2-4-3. Cumulative mortalities caused by spontaneous BCWD in ayu reared in river water in 2003 (Exp. 2). Experiments were carried out using 2 groups (1 and 2) of the same stock. LS: landlocked stock, AS: amphidromous stock, DS: domesticated stock. See Table 2-4-1.

Table 2-4-2. Mortalities of different ayu stocks challenged by intraperitoneal injection with *Flavobacterium psychrophilum*

Experiment (injection dose)	Stock <sup>*1</sup>	Mean weight (g)	Examined fish	Dead fish	Mortality (%)
Exp. 4 (10 <sup>7.0</sup> CFU/fish)	LS (1) <sup>*2</sup>	3.3	20	15	75
	LS (2)	2.9	20	15	75
	AS (1)	2.6	20	6	30 <sup>*3</sup>
	AS (2)	2.6	20	2	10 <sup>*3</sup>
Exp. 5 (10 <sup>4.8</sup> CFU/fish)	LS (1)	5.9	20	11	55
	LS (2)	5.6	20	11	55
	AS (1)	5.3	20	1	5 <sup>*3</sup>
	AS (2)	5.3	20	0	0 <sup>*3</sup>

Fish were intraperitoneally challenged with *F. psychrophilum* PH-0215 and observed at 14.6-18.2°C for 14 days.

<sup>\*1</sup> LS: landlocked stock, AS: amphidromous stock.

<sup>\*2</sup> ( ): Experiments were carried out using 2 groups of the same stock.

<sup>\*3</sup> Significantly lower ( $P < 0.05$ ) than LS.

## 感染実験(ビブリオ病)

感染実験の結果を Table 2-4-3 に示した。Exp. 6 に示したように、冷水病に対する結果とは異なり、累代系アユ (DS) の死亡率は海産交配系アユ (AS) の死亡率より有意に低かった。また、大型のアユを用いた Exp. 7 においても、供試尾数が少なく有意差は認められなかったが、湖産交配系アユ (LS) の死亡率が海産交配系アユ (AS) の死亡率よりも低かった。

Table 2-4-3. Mortalities of different ayu stocks challenged by immersion method with *Vibrio anguillarum*

Experiment	Challenge dose (Log <sub>10</sub> CFU/mL)	Stock* <sup>1</sup>	Examined fish	Dead fish	Mortality (%)
Exp. 6	3.5	DS	60	35	58.3
		AS	60	57	95.0* <sup>2</sup>
Exp. 7	6.1	LS	10	3	30.0
		AS	10	8	80.0
	5.1	LS	10	1	10.0
		AS	10	4	40.0

Fish, mean weights were 3.1 g (DS) and 3.2 g (AS) in Exp. 6, and 42.7 g (LS) and 49.9 g (AS) in Exp. 7, were challenged by immersion method with *V. anguillarum* PT-87050 and observed at 16.5-18.5°C for 10 days.

\*<sup>1</sup> DS: domesticated stock, AS: amphidromous stock, LS: landlocked stock.

\*<sup>2</sup> Significantly higher ( $P < 0.05$ ) than DS.

## 第 2 項 広島県内で生産されているその他のアユ系統における冷水病感受性

広島県内で生産されている人工アユ 5 系統の冷水病感受性を感染実験により比較した。

### 材料および方法

#### 供試魚

実験には、湖産交配系アユを除く 6 系統の人工生産アユを用いた (Fig. 2-4-1)。累代系および海産交配系の由来は第 1 項のとおりである。黒瀬川系 (Kurose stock : KS) は 2001 年に黒瀬川 (呉市) で捕獲されたアユを親にして作られた系統で、以後毎年黒瀬川で捕獲されたオスを交配させていた。なお、黒瀬川系の生産は後述の黒瀬高津川系が作出されたため 2004 年で中止された。黒瀬高津川系 (Kurose-Takatsu stock : KTS) は、2004 年に黒瀬川系のメスに高津川 (島根県) で捕獲されたオスを交配させて作られた。神通木曾川系 (Jintsu-Kiso stock : JKS) は、神通川 (富山県) 産アユのオスと木曾川 (岐阜県) 産アユのメスを交配させて作られており、2004 年に受精卵が広島県に移入された。揖保川系 (Ibogawa stock : IS) は揖保川 (兵庫県) で捕獲されたアユに由来し、2005 年に受精卵が



広島県に移入された。神通木曾川系および揖保川系は揖保川漁業協同組合（兵庫県）によって作出された系統であった。これらのアユは社団法人広島県栽培漁業協会によって生産され、水産海洋技術センターに輸送し淡水馴致してから実験に用いた。実験に供する前に、これらのアユに冷水病の発生や *F. psychrophilum* の保菌は確認されなかった。

#### 自然感染実験(野外実験)

2002年および2003年には内水面実験地において実験を行い、供試魚として累代系(F28, 29)および黒瀬川系(F1, 2)を用いた。実験開始時の平均体重、収容尾数および収容密度をTable 2-4-4に示した。2005年、2006年および2007年には県内の養殖場(湯来町)で実験を行い、供試魚として累代系(F31, 32, 33)、海産交配系(F7, 8, 9)、神通木曾川系(F1, 2, 3)および揖保川系(F1)を用いた。

内水面実験地での実験では、2002年は4月12日に、2003年は4月15日にコンクリート製円形水槽(直径6.4m)にそれぞれの系統毎にアユを収容し、西城川から取水した河川水を用いて飼育した。試験期間中は市販の配合飼料を適量給餌して飼育するとともに、冷水病発生時には死亡魚を取り上げ計数した後、患部を用いたIFATにより死因を確認した。

県内の養殖場での実験では、2005年は5月11日に、2006年は5月9日に、2007年は5月14日に養殖場に供試魚を運搬した後、水内川(太田川水系)から取水した河川水を用いて飼育した。この養殖場では河川水を用いてアユが飼育されており、河川水が感染源と考えられる冷水病の発生が毎年確認されていた。用いたアユ系統および供試尾数についてはTable 2-4-5に示した。供試魚は系統が判別できるように鱗切除標識を行った後、コンクリート製角形水槽(3×4m)に収容した。飼育および死因の確認については内水面実験地の実験と同様に行った。

#### 同居感染実験(室内実験)

累代系(F29)および黒瀬川系(F2)を用いたExp. 1と、累代系(F31)、海産交配系(F7)、黒瀬高津川系(F1)および神通木曾川系(F1)を用いたExp. 2およびExp. 3を行い、Exp. 2およびExp. 3では同様の実験区を2区設定した。

冷水病の発病を確認し冷凍保存(-80℃)していたアユ(10~20g)を感染源として用い、各系統のアユを収容した300L水槽に感染源のアユ(5~6尾)を24時間投入し除去後、紫外線処理淡水で流水飼育し冷水病による死亡を観察した。Exp. 1では14日間の観察を行い飼育期間中の水温は17.8℃から19.5℃で、Exp. 2では21日間の観察を行い水温は14.9℃から15.7℃で、またExp. 3では20日間の観察を行い水温は15.9℃から16.9℃となった。死亡魚の患部を用いたIFATにより、冷水病による死亡を確認した。

#### 注射感染実験(室内実験)

累代系(F31, 32, 33)、海産交配系(F7, 8, 9)、黒瀬高津系(F1)、神通木曾川系(F1, 2, 3)、揖保川系(F1)を用いたExp. 4~7を行った。

改変サイトファーガ寒天培地を用い 18℃で 1 日間培養した *F. psychrophilum* PH-0215 株を、生理食塩水に懸濁しアユの腹腔内に 0.1 mL/fish 接種した。接種した菌数、供試尾数および平均体重を Table 2-4-7 に示した。接種後のアユは 300 L 水槽に収容し、紫外線処理淡水を用いて流水飼育し冷水病による死亡を観察した。Exp. 4 では 13 日間の観察を行い飼育期間中の水温は 16.9℃から 18.0℃であり、Exp. 5 では 11 日間で 19.0℃から 19.3℃であり、Exp. 6 では 11 日間で 15.0 から 15.8℃であり、Exp. 7 では 16 日間で 15.2℃から 16.0℃であった。死亡魚の死因については、腎臓から改変サイトファーガ寒天培地を用いて *F. psychrophilum* を再分離することにより確認した。

### 統計処理

感染実験による死亡数の差については Fisher の直接確率計数法で検討し、 $P < 0.05$  を有意な差とみなした。

## 結果

### 自然感染実験

2002 年および 2003 年の実験における死亡率を Table 2-4-4 に示した。2002 年の実験においては、黒瀬川系アユ (KS) では 5 月中旬から冷水病による死亡が増え始め、累代系アユ (DS) では 5 月下旬から冷水病による死亡が急増した。両系統とも 6 月中旬までに大量死は終息し、7 月上旬には冷水病の発生が見られなくなった。冷水病発生時の水温は 15.5℃から 20.7℃であった。2003 年の実験においては、黒瀬川系アユ (KS) では 5 月中旬から冷水病による死亡が増え始め、累代系アユ (DS) では 6 月初旬から冷水病による死亡が増加した。両系統とも 6 月下旬までに大量死は終息し、7 月上旬には冷水病の発生が見られなくなった。冷水病発生時の水温は 13.2℃から 20.3℃であった。

2005 年、2006 年および 2007 年の実験における死亡率を Table 2-4-5 に、2006 年の死亡状況を Fig. 2-4-4 に示した。2005 年には 5 月下旬から、2006 年には 6 月中旬から、2007 年には 6 月初旬から冷水病による死亡が観察され始めた。2005 年には 6 月下旬まで、2006 年には 7 月上旬まで、2007 年には 7 月上旬まで死亡が続いた。いずれの年も累代系アユ (DS) の死亡率が海産交配系 (AS)、神通木曾川系 (JKS) および揖保川系 (IS) よりも有意に高くなった。なお、いずれの年も死亡魚には冷水病の症状の他にミズカビ病の症状も確認されたが、冷水病が主な死因であると判断し冷水病の死亡率に含めた。冷水病発生時の水温は、2005 年が 12.4℃から 20.6℃、2006 年が 13.0℃から 19.6℃、2007 年が 12.5℃から 21.6℃であった。

Table 2-4-4. Spontaneous infection challenge against different ayu stocks performed in Freshwater Fish Branch in 2002 and 2003

Year (Period)	Stock* <sup>1</sup>	Initial			Final
		Mean weight (g)	Examined fish	Density (kg/m <sup>3</sup> )	Mortality (%)
2002 (Apr. 12-Jul. 11)	DS (F28)	6.0	1750	0.351	66.2
	KS (F1)	3.4	3060	0.346	65.4
2003 (Apr. 15-Jul. 11)	DS (F29)	5.1	2500	0.425	95.0
	KS (F2)	3.0	2600	0.260	78.7

BCWD occurred at 15.5-20.7°C (2002) and 13.2-20.3°C (2003).

\*<sup>1</sup> DS: domesticated stock, KS: Kurose stock.

Table 2-4-5. Spontaneous infection challenge against different ayu stocks performed in field condition of the private farm in 2005-2007

Year (Period)	Stocks* <sup>1</sup>	Examined fish	Dead fish	Mortality (%)
2005 (May 16-Jul. 15)	DS (F31)	200	146	73
	AS (F7)	200	98	49 <sup>*2</sup>
	JKS (F1)	200	78	39 <sup>*2</sup>
2006 (Jun. 1-Jul. 20)	DS (F32)	150	118	78.7
	AS (F8)	150	22	14.7 <sup>*2</sup>
	JKS (F2)	150	36	24.0 <sup>*2</sup>
	IS (F1)	150	45	30.0 <sup>*2</sup>
2007 (May 15-Jul. 25)	DS (F33)	227	138	60.8
	AS (F9)	236	75	31.8 <sup>*2</sup>
	JKS (F3)	133	63	47.4 <sup>*2</sup>

BCWD occurred at 12.4-20.6°C (2005), 13.0-19.6°C (2006) and 12.5-21.6°C (2007). Challenge test in 2006 was shown in Fig. 2-4-4.

\*<sup>1</sup> DS: domesticated stock, AS: amphidromous stock, JKS: Jintsu-Kiso stock, IS: Ibogawa stock.

\*<sup>2</sup> Significantly lower ( $P < 0.05$ ) than DS.

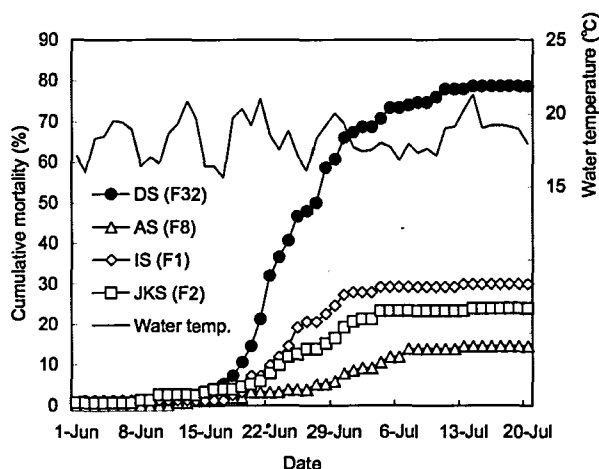


Fig. 2-4-4. Cumulative mortalities caused by spontaneous BCWD in ayu reared in river water in 2006. DS: domesticated stock, AS: amphidromous stock, IS: Ibogawa stock, JKS: Jintsu-Kiso stock. See Table 2-4-5.

## 同居感染実験

いずれの実験でも、実験を始めて7日目前後から冷水病による死亡が確認され、実験終了時の死亡率を Table 2-4-6 に示した。Exp. 1 では累代系 (DS) と黒瀬川系 (KS) の死亡率は同程度であった。また、Exp. 2 および Exp. 3 では、いずれの試験区でも海産交配系 (AS)、神通木曾川系 (JKS) および黒瀬高津川系 (KTS) の死亡率は累代系 (DS) よりも有意に低かった。

Table 2-4-6. Cohabitation infection challenge with *F. psychrophilum* against different ayu stocks (Exp. 1-3)

Experiment	Stock <sup>*1</sup>	Mean weight (g)	Examined fish	Dead fish	Mortality (%)	
Exp. 1 <sup>*2</sup>	DS	5.7	30	29	96.7	
	KS	4.8	30	30	100	
Exp. 2 <sup>*3</sup>	Trial 1	DS	3.3	30	27	90.0
		AS	2.4	30	1	3.3 <sup>*4</sup>
	Trial 2	JKS	3.1	30	5	16.7 <sup>*4</sup>
		DS	2.9	30	25	83.3
Exp. 3 <sup>*3</sup>	Trial 1	AS	2.7	30	1	3.3 <sup>*4</sup>
		JKS	2.8	30	3	10.0 <sup>*4</sup>
		DS	5.1	30	24	80.0
	Trial 2	AS	3.8	30	2	6.7 <sup>*4</sup>
		JKS	4.6	30	1	3.3 <sup>*4</sup>
		KTS	2.7	30	7	23.3 <sup>*4</sup>
	Trial 2	DS	5.1	30	23	76.7
		AS	3.7	30	2	6.7 <sup>*4</sup>
JKS		4.9	30	3	10.0 <sup>*4</sup>	
	KTS	2.8	30	2	6.7 <sup>*4</sup>	

Fish were challenged by cohabitation with dead fish affected with BCWD and observed at 17.8-19.5°C for 14 days (Exp. 1), 14.9-15.7°C for 21 days (Exp. 2) and 15.9-16.9°C for 20 days (Exp. 3).

<sup>\*1</sup> DS: domesticated stock, KS: Kurose stock, AS: amphidromous stock, JKS: Jintsu-Kiso stock, KTS: Kurose-Takatsu stock.

<sup>\*2</sup> DS (F29), KS (F2).

<sup>\*3</sup> DS (F31), AS (F7), JKS (F1), KTS (F1).

<sup>\*4</sup> Significantly lower ( $P < 0.05$ ) than DS.

## 注射感染実験

PH-0215 株を接種したアユは1日から3日後に死亡し始めた。実験終了時の死亡率を Table 2-4-7 に示した。Exp. 4 では、海産交配系 (AS)、黒瀬高津川系 (KTS) および神通木曾川系 (JKS) の死亡率は累代系 (DS) よりも有意に低かった。Exp. 5 では海産交配系 (AS) と黒瀬高津川系 (KTS) の死亡率に差はなかった。Exp. 6 では、海産交配系 (AS)、神通木曾川系 (JKS) および揖保川系 (IS) の死亡率は累代系 (DS) よりも有意に低かった。Exp. 7 では、海産交配系 (AS) および神通木曾川系 (JKS) の死亡率は累代系 (DS) よりも有意に低かった。

Table 2-4-7. Intraperitoneal challenge with *F. psychrophilum* against different ayu stocks (Exp. 4-7)

Experiment	Stock <sup>*1</sup>	Dose <sup>*2</sup>	Mean weight (g)	Examined fish	Dead fish	Mortality (%)
Exp. 4	DS	7.0	5.2	30	23	76.7
	AS		5.4	30	12	40.0 <sup>*3</sup>
	KTS		3.2	30	13	43.4 <sup>*3</sup>
	JKS		5.1	30	14	46.7 <sup>*3</sup>
Exp. 5	AS	7.8	11.8	20	9	45.0
	KTS		8.2	20	11	55.0
	AS	6.8	11.8	20	3	15.0
	KTS		8.2	20	3	15.0
Exp. 6	DS	6.7	5.2	20	16	80
	AS		2.9	30	3	10 <sup>*3</sup>
	JKS		2.2	30	7	23.3 <sup>*3</sup>
	IS		2.4	30	14	46.7 <sup>*3</sup>
Exp. 7	DS	7.0	2.6	30	17	56.7
	AS		3.4	31	2	6.5 <sup>*3</sup>
	JKS		2.6	29	9	31.0 <sup>*3</sup>

Fish were intraperitoneally challenged with *F. psychrophilum* PH-0215 and observed at 16.9-18.0°C for 13 days (Exp. 4), 19.0-19.3°C for 11 days (Exp. 5), 15.0-15.8°C for 11 days (Exp. 6) and 15.2-16.0°C for 16 days (Exp. 7).

<sup>\*1</sup> DS: domesticated stock, AS: amphidromous stock, KTS: Kurose-Takatsu stock, JKS: Jintsu-Kiso stock, IS: Ibogawa stock, Exp. 4 and 5: DS (F31), AS (F7), KTS (F1), JKS (F1), Exp. 6: DS (F32), AS (F8), JKS (F2), IS (F1), Exp. 7: DS (F33), AS (F9), JKS (F3).

<sup>\*2</sup> Log<sub>10</sub> CFU/fish.

<sup>\*3</sup> Significantly lower ( $P < 0.05$ ) than DS.

### 第3項 冷水病耐病性要因の検討

冷水病感受性の低い海産交配系アユ (AS) および感受性の高い湖産交配系アユ (LS) を用いて非特異的生体防御能の比較を行った。また、海産交配系アユ (AS) および冷水病感受性の高い累代系アユ (DS) を用いて *F. psychrophilum* 接種後の体内消長の比較を行った。

#### 材料および方法

##### 非特異的生体防御能の比較

海産交配系アユ (AS) および湖産交配系アユ (LS) の非特異的生体防御能の比較を行った。

**活性酸素産生能：**白血球の活性酸素産生能 (respiratory burst 活性および WST-1 還元能) の測定を、Miyazaki (1998) および宮崎 (2002) の方法を一部改変して行った。平均体重 15.0 g のアユ各 10 尾の尾部血管からヘパリン処理した注射器で採血した 100 μL の血液を、プラスチック製キャピラリーに封入した。遠心分離 (1,000×g, 20 分間, 4°C) の後、白血球層の上から 20 mm の部分および白血球層と赤血球層の境を切断した。白血球を含む内容液を 1.5 mL チューブに移し、50 μL の RPMI 1640 (シグマ) を加え穏やかに混合した。15 μ

Lの白血球懸濁液は等量のRPMI 1640, RPMI 1640で1 mg/mLに調整したWST-1<sup>12</sup> (同人化学研究所) 溶液, またはWST-1溶液で5 mg/mLに調整したザイモサン (シグマ) 溶液と1.5 mLチューブで混合し20°Cで1時間静置した。WST-1ホルマザンを抽出するために400  $\mu$ Lの超純水を各チューブに加え激しく混合した。遠心分離 (3,000 $\times$ g, 15分間, 4°C) によって得た上清250  $\mu$ Lを96穴プレートに移し, 450 nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。WST-1還元能はWST-1溶液の吸光度とRPMI 1640の吸光度の差とし, respiratory burst活性はザイモサン溶液の吸光度とWST-1溶液の吸光度の差とした。

**貪食能:** 血液50  $\mu$ LとRPMI 1640で0.5 mg/mLに調整したザイモサン溶液50  $\mu$ Lを混合し, プラスチック製キャピラリーに封入した。20°Cで30分間静置してから遠心分離 (1,000 $\times$ g, 5分間, 4°C) し, 白血球層と赤血球層の境で切断した。白血球を含む内容液を穏やかに混合してから, スライドグラスに塗抹しMay-Grünwald-Giemsa染色した。100以上の好中球および単球を観察し, ザイモサン貪食の有無を確認し貪食率を算出した。

**血清における *F. psychrophilum* の生存性:** Wiklund and Dalsgaard (2002) の方法を一部改変して実験した。実験は異なる体重のアユを用いて2回行い, 各5尾 (平均体重10.9 g : first trial, 14.3 g : second trial) の尾部血管から採血した。4°Cで一晩静置し凝固させた血液から遠心分離 (5,000 $\times$ g, 5分間, 4°C) で血清を回収し, 実験まで-80°Cで保存した。改変サイトファーガ寒天培地を用いて18°Cで1日間培養したPH-0215株を生理食塩水に懸濁し, 10<sup>4.0</sup> CFU/mLに調整した。菌液10  $\mu$ Lと40  $\mu$ Lの血清, または対照とした40  $\mu$ Lの改変サイトファーガ液体培地とを混合し, 18°Cで6時間静置し生菌数の測定を行った。

**血清コルチゾル濃度の測定:** 実験は異なる体重のアユを用いて2回行い, 各10尾のアユ (平均体重7.2 g : first trial, 28.0 g : second trial) から得た血清は実験まで-80°Cで保存した。コルチゾル濃度は, 酵素抗体法 (Enzyme Immunoassay for Cortisol, Oxford Biomedical Research) により測定した。

海産交配系および湖産交配系の各検討項目における差はMann-WhitneyのU検定によって検定し,  $P < 0.05$  を有意な差とみなした。

#### 体内における *F. psychrophilum* の消長

累代系アユ (DS) および海産交配系アユ (AS) を用いて, 腹腔内接種した *F. psychrophilum* の消長を血液, 腹腔内液, 腎臓, 脾臓および肝臓において検討した。

**血液および腹腔内液における比較:** 改変サイトファーガ寒天培地を用いて18°Cで1日間培養したPH-0215株を生理食塩水で1 mg/mLに調整し, FA-100で麻酔したアユの腹腔内に0.1 mL/fish接種した。体重が異なるアユを用いて同様の実験を2回 (Exp. 1および2) 行った。平均体重はExp. 1の累代系アユが6.4 g, 海産交配系アユが5.5 gおよびExp. 2ではそれぞれ8.5 g, 7.8 gであった。Exp. 1および2の接種菌数はそれぞれ10<sup>7.4</sup> および10<sup>7.6</sup> CFU /fishとなった。接種後のアユは水温18°Cで流水飼育し, Exp. 1では6, 30および54時間後に,

<sup>12</sup> 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt

Exp. 2 では 1, 6, 24 および 48 時間後に 3 尾ずつ水槽から取り上げ、血液および腹腔内液を採取した。尾鰭を切断し流出した血液を、10  $\mu$ L の 160 U/mL ヘパリン-PBS 溶液を入れた 1.5 mL チューブに 100  $\mu$ L 採取した。腹腔内液として、腹腔内に注射器を用い PBS を 500  $\mu$ L 注入し、約 1 分間経過してから開腹し回収した液を用いた。Exp. 1 においては 54 時間後、Exp. 2 においては 48 時間後に一部のアユの死亡が確認されたが、血液および腹腔内液は生存しているアユから採取した。

腎臓、脾臓および肝臓における比較：菌液の調整および接種方法は前述と同様で、接種菌数は  $10^{7.8}$  CFU/fish であった。供試したアユの平均体重は累代系アユが 9.5 g および海産交配系アユが 9.2 g であった。接種 24 および 48 時間後に 5 尾ずつ水槽から取り上げ、腎臓、脾臓および肝臓を無菌的に採取した。採取後の臓器に 9 倍量の生理食塩水を加えホモジナイズし、生菌数を計数した。

累代系アユおよび海産交配系アユにおける菌数の差は Mann-Whitney の U 検定で検定し、 $P < 0.05$  を有意な差と見なした。

## 結果

### 非特異的生体防御能の比較

白血球の respiratory burst 活性, WST-1 還元能および貪食率について Fig. 2-4-5 に示した。海産交配系 (AS) と湖産交配系 (LS) において、これらの項目に差は認められなかった。次に、アユ血清における *F. psychrophilum* の生存性について Fig. 2-4-6 に示した。対照とした改変サイトファーガ液体培地と同様にアユ血清でも *F. psychrophilum* の増殖が確認されたが、海産交配系 (AS) と湖産交配系 (LS) において菌数に差はなかった。また、Fig. 2-4-7 に海産交配系 (AS) および湖産交配系 (LS) の血清コルチゾル濃度を示したが、系統間に差は認められなかった。

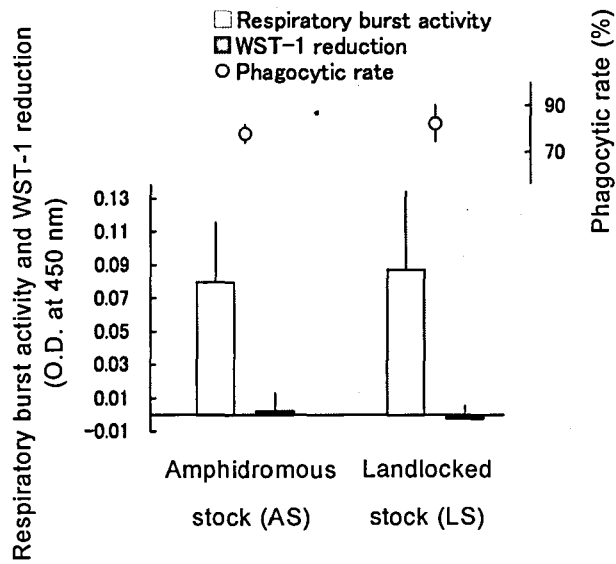


Fig. 2-4-5. Respiratory burst activity, WST-1 reduction activity, and phagocytic rate of peripheral blood leukocytes obtained from two ayu stocks. Vertical bars indicate standard deviation (n=10).

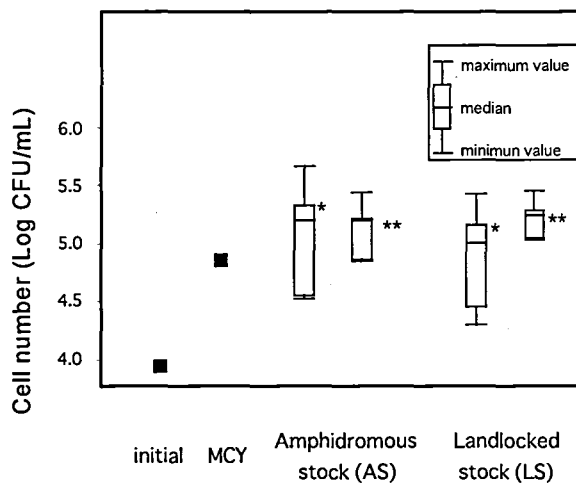


Fig. 2-4-6. Survival and growth of *Flavobacterium psychrophilum* in the serum of two ayu stocks. Left (\*) and right (\*\*) columns indicate the results of fish (n=5) with 10.9 g and 14.3 g in mean body weight, respectively.



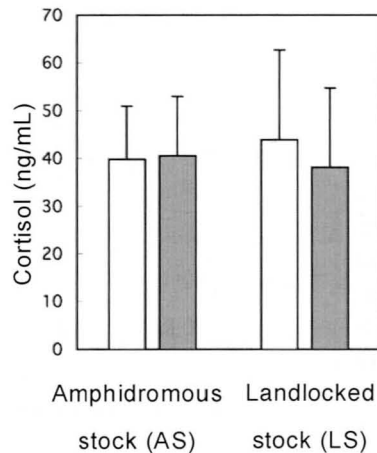


Fig. 2-4-7. Cortisol concentrations in the serum of two ayu stocks (AS and LS). Vertical bars indicate standard deviation. Serum samples (n=10) were obtained from each 2 group with mean different body weight: 7.2 g for □ and 28.0 g for ■.

#### 体内における *F. psychrophilum* の消長

血液および腹腔内液における比較：Exp. 1 および 2 における菌数の増減を Fig. 2-4-8 に示した。Exp. 1 において、接種 6 時間後の菌数に系統間における差はなかったが、30 および 54 時間後には有意な差が生じた。海産交配系アユ (AS) では血液および腹腔内液のいずれにおいても菌数は減少したが、累代系アユ (DS) では逆に増加した。54 時間後に累代系アユ (DS) において死亡魚が観察されたが (死亡率：31.7%)，海産交配系アユ (AS) において死亡魚は観察されなかった。Exp. 2 において、接種 1 時間後には血液からも *F. psychrophilum* が検出されたが、系統間に差はなかった。菌数の増減の傾向は Exp. 1 と同様で、海産交配系アユ (AS) の菌数は減少し累代系アユ (DS) の菌数は増加した。6 時間後までは系統間の菌数に差は見られなかったが、24 および 48 時間後には有意な差が生じた。48 時間後に累代系アユ (DS) において死亡魚が観察されたが (死亡率：17.4%)，海産交配系アユ (AS) において死亡魚は観察されなかった。また、Exp. 1 の 30、54 時間後および Exp. 2 の 24、48 時間後に採取した累代系アユ (DS) の腹腔内液にはいずれも血液の混入が確認されたが、海産交配系アユ (AS) においては血液の混入は確認されなかった。

腎臓、脾臓および肝臓における比較：接種 24 および 48 時間における各臓器における菌数を Fig. 2-4-9 に示した。24 および 48 時間で菌数を比較すると、海産交配系アユ (AS) ではいずれの臓器においても減少したが、逆に累代系アユ (DS) ではいずれも増加した。48 時間後には海産交配系アユ (AS) および累代系アユ (DS) の菌数の差は広がり、いずれの臓器においても海産交配系アユ (AS) における菌数が累代系アユ (DS) よりも有意に少なかった。また、この実験では 48 時間後に死亡するアユは観察されなかった。

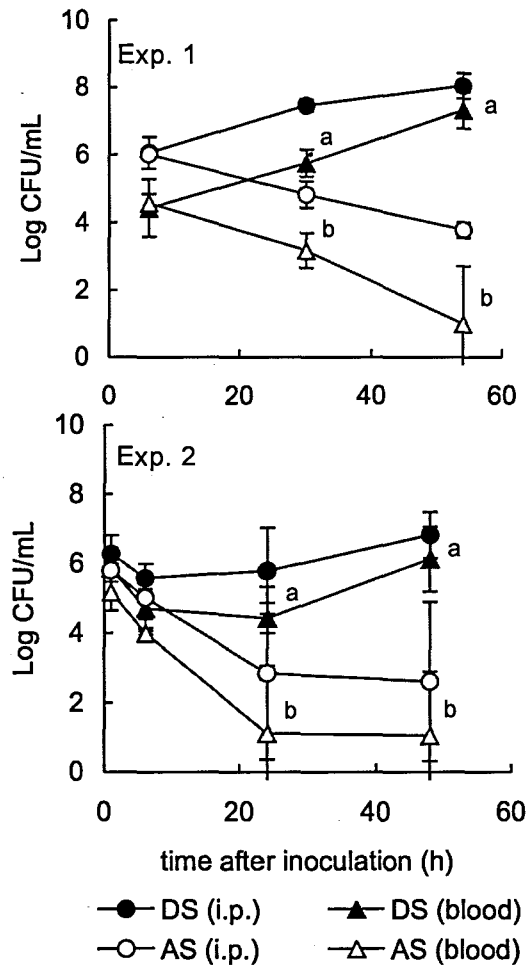


Fig. 2-4-8. Differences of *F. psychrophilum* distribution in intraperitoneal fluid (i.p.) and peritoneal blood between domesticated stock (DS) and amphidromous stock (AS). Fish were injected intraperitoneally with bacterial suspension at  $10^{7.4}$  CFU /fish (Exp. 1) or  $10^{7.6}$  CFU /fish (Exp. 2). Different letters (a or b) indicate significantly difference ( $P < 0.05$ ) between stocks. Vertical bars indicate standard deviation ( $n=3$ ).

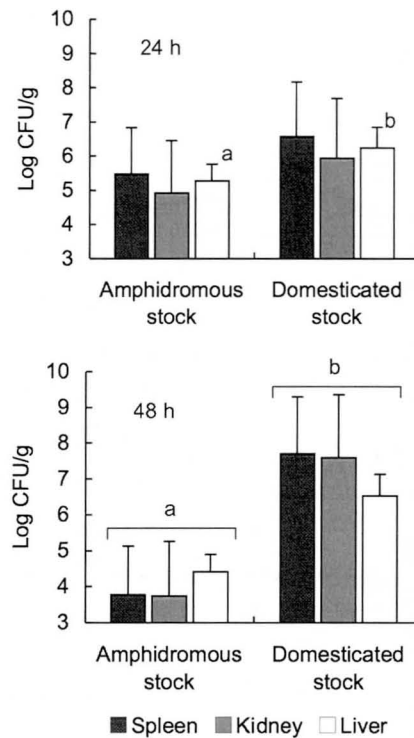


Fig. 2-4-9. Differences of *F. psychrophilum* distribution in spleen, kidney and liver between amphidromous stock and domesticated stock at 24 h or 48 h post-injection. Fish were injected intraperitoneally with bacterial suspension at  $10^{7.8}$  CFU/fish. Different letters (a or b) indicate significantly difference ( $P < 0.05$ ) between stocks. Vertical bars indicate standard deviation (n=5).

#### 第 4 項 冷水病耐病性の遺伝性および免疫応答

冷水病感受性の高い累代系 (DS) と低い海産交配系 (AS) を交配させたアユを用いて、冷水病感受性の遺伝性について調べた。また、これらのアユの *F. psychrophilum* に対する獲得免疫能を比較するために浸漬ワクチンの有効性を自然感染試験で調べた。さらに、*F. psychrophilum* および *V. anguillarum* に対する抗体産生能の比較も行った。

#### 材料および方法

##### 供試魚

実験には冷水病の感染歴がなく、*F. psychrophilum* を保菌していない 3 系統の人工生産アユ (累代系、海産交配系および交配系アユ) を用いた。累代系および海産交配系の由来は前述 (第 II 章 第 4 節 第 1 項) のとおりであり、交配系アユ (DS-AS hybrid, F1) は海産交配系と累代系を交配させたアユ系統で、20 尾の海産交配系 (F6) の雄親魚および 50 尾の累代系 (F29) の雌親魚を用いて生産された。これらのアユは社団法人広島県栽培漁業協会

で生産され、水産海洋技術センターに輸送し淡水馴致してから実験に用いた。これらのアユにはアユ用配合飼料を適量給餌し、紫外線処理脱塩素水道水を用い循環濾過で飼育した。また、飼育水槽の容積（4 kL 水槽）、飼育密度（200 尾/kL）、水温（15～18℃）などの飼育条件は各系統で同じとなるようにした。

### 感染実験による感受性の比較

改変サイトファーガ寒天培地を用い 18℃で 1 日間培養した PH-0215 株を生理食塩水に懸濁後、FA-100 で麻酔したアユの腹鳍基部後方から腹腔内に 0.1 mL/fish 接種した。実験は異なる体重のアユを用いて 2 回（Exp. 1 および 2）行い、Exp. 1 においては 2 濃度（ $10^{7.3}$ 、 $10^{6.3}$  CFU /fish）を、Exp. 2 においては 1 濃度（ $10^{7.5}$  CFU /fish）を接種した。接種後のアユは水温 16.5℃から 18.2℃の紫外線処理脱塩素水道水を用いて流水飼育し、14 日間の観察を行った。冷水病による死亡の確認は、死亡魚の腎臓から改変サイトファーガ寒天培地を用い *F. psychrophilum* を再分離することで行った。

### 冷水病に対する浸漬ワクチンの有効性の検討

ワクチンの作製には、滋賀県でアユから分離された *F. psychrophilum* SG990302 株を用いた。SG990302 株を NBF 培地<sup>13</sup>（Secades *et al.*, 2001）を用いて 12℃で 4 日間振盪培養した後、0.3%（v/v）量のホルマリンを添加し 4℃で 48 時間静置しワクチン液とした。ホルマリン不活化前の培養液の生菌数は  $10^{8.3}$  CFU/mL であった。希釈していないワクチン液 1 L にアユ 50 尾（平均体重 6.3 g）を入れ、5 分間通気しながら浸漬処理した。なお、同一区の実験区については同じワクチン液を繰り返し 5 回用いた。対照区のアユは無処理とした。ワクチン処理時の飼育水温は 16℃で、ワクチン液の温度も飼育水温と同じにした。ワクチンの処理は 2004 年 4 月 16 日に行い、同様の処理を 2 週間後の 4 月 30 日にも行った。2 回目のワクチン処理の 11 日後の 5 月 11 日に県内の養殖場（湯来町）にアユを移動させ、河川水原水を用水とした屋外池（コンクリート製、3×3 m、水深 0.5 m）に収容し、7 月上旬まで飼育を行った。なお、この養殖場では河川水を用いてアユが飼育されており、河川水が感染源と考えられる冷水病の発生が毎年確認されていた。1 回目のワクチン処理時の各系統のアユの平均体重は累代系が 6.4 g、交配系が 6.1 g、海産交配系が 6.3 g であった。飼育期間中はアユ用配合飼料を給餌するとともに、死亡魚は毎日取り上げ-20℃で冷凍保存した。死亡魚の死因が冷水病であることの確認は、解凍後の死亡魚の体表患部の症状の観察、および一部の死亡魚については IFAT に供し死因を確認した。

### *F. psychrophilum* および *V. anguillarum* に対する血清凝集抗体価の比較

免疫には、SG990302 株および *V. anguillarum* PT87050 株のホルマリン死菌をそれぞれ抗原として用いた。SG990302 株は改変サイトファーガ寒天培地および PT87050 株は TSA 培

<sup>13</sup> 0.5% Bacto-pepton (Difco), 0.3% Lab-Lemco Powder (Oxoid), 10 mM CaCl<sub>2</sub> pH 6.0

地を用いて 18°C で 1 日間培養し、PBS に 1 mg/mL となるように懸濁してから、0.3% (v/v) 量のホルマリンを添加し 4°C で 48 時間静置して不活化した。ホルマリン死菌は、麻酔したアユの腹腔内に体重 10 g 当たり 50  $\mu$ L (菌重量 0.05 mg) となるように注射した。注射後のアユは水温 17°C から 18°C で 2 週間飼育して採血に用いた。尾鰭切除により尾部血管から採取した血液を 4°C で一晩静置した後、5 分間の遠心分離 (5,000 $\times$ g, 4°C) によって血清を回収した。血清凝集抗体価はマイクロタイター法で測定し、免疫に用いたホルマリン死菌を遠心分離 (10,000 $\times$ g, 1 分間) し PBS に再懸濁した後、抗原として用いた。なお、実験は時期をずらして 2 回 (Exp. 1 および 2) 行い、Exp. 1 におけるアユの平均体重は累代系が 15.5 g、交配系が 15.8 g および海産交配系が 15.0 g で、Exp. 2 においてはそれぞれ 19.2 g、16.8 g および 17.3 g であった。各実験ではそれぞれの抗原で免疫したアユ 20 尾ずつから採血し、凝集抗体価の測定を行った。なお、免疫前に各系統のアユ 10 尾から採血し SG990302 株および PT87050 株を抗原として血清凝集抗体価を測定した結果、いずれのアユの凝集抗体価も検出限界未満 (<2) であった。

#### 統計処理

浸漬ワクチンの有効率 (RPS) は第 3 節と同様に算出した。感染実験およびワクチン実験の死亡数の差については Fisher の直接確率計数法で検討した。また、血清凝集抗体価の比較は分散分析 (ANOVA) および Bonferroni 検定で検討した。いずれの検定においても  $P < 0.05$  を有意な差と見なした。

### 結果

#### 感染実験による感受性の比較

注射感染実験 (Exp. 1 および 2) の結果を Table 2-4-8 に、Exp. 2 における死亡状況を Fig. 2-4-10 に示した。いずれの実験においても累代系 (DS)、交配系 (DS-AS hybrid)、海産交配系アユ (AS) の順に冷水病による死亡率は有意に低くなり、交配系アユ (DS-AS hybrid) の死亡率は累代系 (DS) および海産交配系アユ (AS) の中間程度となった。また、Exp. 1 における死亡状況も Fig. 2-4-10 と同様の傾向となり、供試したアユの大きさや接種した菌数による違いは見られなかった。

Table 2-4-8. Intraperitoneal challenge with *F. psychrophilum* against different ayu stocks (Exp. 1, 2)

Experiment	Dose* <sup>1</sup>	Stock* <sup>2</sup>	Mean weight (g)	Examined fish	Dead fish	Mortality* <sup>3</sup> (%)
Exp. 1	7.3	DS	3.8	20	17	85 <sup>a</sup>
		DS-AS hybrid	3.9	20	9	45 <sup>b</sup>
		AS	3.6	20	0	0 <sup>c</sup>
	6.3	DS	3.8	20	9	45 <sup>a</sup>
		DS-AS hybrid	3.9	20	5	25
		AS	3.6	20	1	5 <sup>b</sup>
Exp. 2	7.5	DS	6.4	48	45	93.8 <sup>a</sup>
		DS-AS hybrid	6.1	47	30	63.8 <sup>b</sup>
		AS	5.5	48	11	22.9 <sup>c</sup>

Fish were intraperitoneally challenged with *F. psychrophilum* PH-0215 and observed at 16.5-18.2°C for 14 days.

\*<sup>1</sup> Log<sub>10</sub> CFU/fish.

\*<sup>2</sup> DS: domesticated stock, DS-AS hybrid: hybrid stock between domesticated and amphidromous stocks, AS: amphidromous stock.

\*<sup>3</sup> Different letters (a, b or c) indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between stocks.

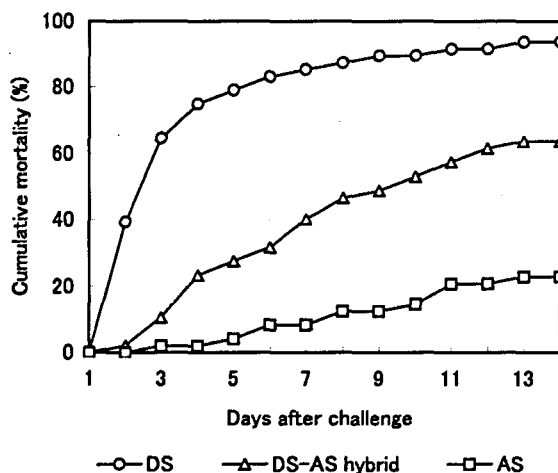


Fig. 2-4-10. Cumulative mortalities of ayu after intraperitoneal injection with *F. psychrophilum* at 10<sup>7.5</sup> CFU/fish (Exp. 2). DS: domesticated stock, DS-AS hybrid: hybrid stock between domesticated and amphidromous stocks, AS: amphidromous stock.

### 浸漬ワクチン実験

浸漬ワクチン実験における死亡状況および実験期間中の水温を Fig. 2-4-11 に示した。冷水病の発生は、河川水飼育を開始して12日後の5月23日から確認され、6月下旬まで死亡が続いた。7月上旬以降は水温の上昇に伴い冷水病による死亡は確認されなくなったので、6月末までを実験期間とした。累積死亡率およびワクチンの有効率については Table 2-4-9 に示した。注射感染実験の結果と同様に、自然発生した冷水病による死亡率も累代系 (DS)、交配系 (DS-AS hybrid)、海産交配系アユ (AS) の順に低くなった。また、いず

れの系統のアユにおいても浸漬ワクチン処理を行ったアユの死亡率は、対照区のアユと比較して有意に低かった。

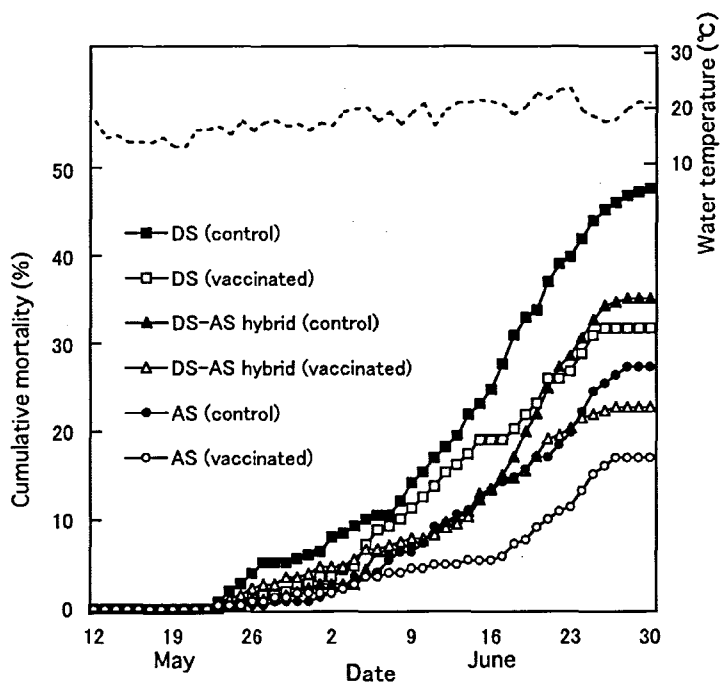


Fig. 2-4-11. Cumulative mortalities caused by spontaneous BCWD in immunized ayu reared in river water. Fish were vaccinated twice by immersion method with formalin-killed bacterin. DS: domesticated stock, DS-AS hybrid: hybrid stock between domesticated and amphidromous stocks, AS: amphidromous stock.

Table 2-4-9. Spontaneous infection challenge against immunized different ayu stocks

Stock <sup>*1</sup>	Group	Examined fish	Dead fish	Mortality (%)	RPS (%)
DS	Control	244	117	48.0	-
	Vaccinated	244	78	32.0 <sup>*2</sup>	33.3
DS-AS hybrid	Control	243	86	35.4 <sup>*3</sup>	-
	Vaccinated	248	57	23.0 <sup>*2</sup>	35.1
AS	Control	214	59	27.6 <sup>*3</sup>	-
	Vaccinated	215	37	17.2 <sup>*2</sup>	37.6

Fish vaccinated twice by immersion method with formalin-killed bacterin were reared in river water under a field condition in 2004 (see Fig. 2-4-11).

<sup>\*1</sup> DS: domesticated stock, DS-AS hybrid: hybrid stock between domesticated and amphidromous stocks, AS: amphidromous stock.

<sup>\*2</sup> Significantly lower ( $P < 0.05$ ) than control in the same stock.

<sup>\*3</sup> Significantly lower ( $P < 0.05$ ) than control in DS.

### 血清凝集抗体価の比較

免疫を行った各系統のアユの *F. psychrophilum* および *V. anguillarum* に対する凝集抗体価を Fig. 2-4-12 に示した。いずれの抗原を接種しても、海産交配系アユ (AS) の凝集抗体価は累代系アユ (DS) と比較して有意に高くなった。また、交配系アユ (DS-AS hybrid) の凝集抗体価は海産交配系 (AS)、累代系アユ (DS) の中間程度となった。いずれの系統のアユにおいても、*V. anguillarum* に対する凝集抗体価は *F. psychrophilum* に対する凝集抗体価よりも有意に高かった。

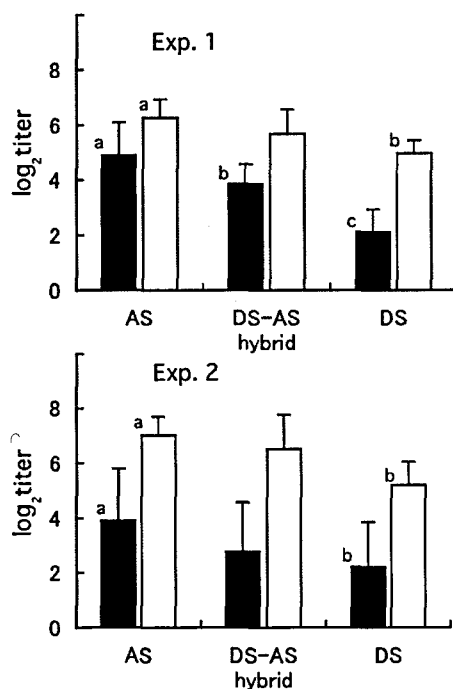


Fig. 2-4-12. Agglutinin titers in serum of ayu immunized with formalin-killed cells of *F. psychrophilum* (black bars) and *Vibrio anguillarum* (white bars). Experiments were conducted two times (Exp. 1 and 2) using fish with different body weights. Different letters (a, b or c) indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) between stocks. Vertical bars indicate standard deviations. AS: amphidromous stock, DS-AS hybrid: hybrid stock between domesticated and amphidromous stocks, DS: domesticated stock.

### 考察

最初に、人工アユ系統間の冷水病感受性の差を実験的に明らかにするために、広島県内で主に生産されている累代系、海産交配系および湖産交配系アユを感染実験に供した (第 1 項)。その結果、湖産交配系や累代系よりも海産交配系アユの冷水病感受性が低いことが明らかになった (Fig. 2-4-2, 2-4-3)。自然感染、同居感染および注射感染と感染方法が異なっても、また生産年が異なるアユを用いても、海産交配系アユのこの性質は一定していた (Table 2-4-1, 2-4-2)。これまで広島県では累代系アユが最も多く生産され、これらが



主として河川放流に用いられてきたが、冷水病に感受性の低い海産交配系の生産量および河川放流量を増やすことで、河川での冷水病被害を軽減できると考えられる。現在広島県では、冷水病感受性の高い湖産交配系の生産は中止されるとともに累代系の生産割合は縮小され、海産交配系の生産割合が増加している。

これら3系統の冷水病以外の細菌感染症に対する感受性をみるために、*V. anguillarum*による感染実験を行った。その結果、冷水病とは逆に、海産交配系アユのピブリオ病に対する死亡率は累代系や湖産交配系のそれよりも高かった (Table 2-4-3)。

県内では、上記3系統のアユ以外にも海産アユに由来する黒瀬川系、黒瀬高津川系、神通木曾川系および揖保川系アユが生産され河川放流されていることから、これらのアユに関しても冷水病感受性の検討を行った (第2項)。感染実験の結果、黒瀬川系は累代系と同程度の高い冷水病感受性を持つものと考えられた (Table 2-4-4)。この黒瀬川系に高津川のアユを交配させた黒瀬高津川系と新たに導入された神通木曾川系および揖保川系に対して感染実験を行った結果、いずれの系統とも海産交配系と同様に死亡率は低く、これらは冷水病耐病性を有するものと考えられた (Table 2-4-5, 2-4-6, 2-4-7)。黒瀬川系は冷水病耐病性を高津川のアユから獲得したのと考えられるため、高津川のアユの冷水病感受性に関しても今後検討する必要があると考えられた。冷水病耐病性系統と考えられる海産交配系、黒瀬高津川系、神通木曾川系および揖保川系の間に、明確な感受性の差は確認されなかった。一方、岡山県で生産されている木曾川由来の系統は累代系よりも冷水病感受性が低かったことが報告されており (増成ら, 2003), 今回用いた木曾川由来の神通木曾川系の冷水病感受性が低かった結果と一致した。このように海産アユに由来する人工生産アユの冷水病感受性は全体的に低い傾向が見られるが、海産アユの一つと考えられる黒瀬川系の感受性が高かったことから、全ての海産アユが冷水病耐病性を有しているわけではないことになる。

冷水病耐病性機構を明らかにするために海産交配系アユおよび湖産交配系アユの生体防御能の比較を行った (第3項)。感染初期には病原体の侵入門戸である体表が、そして病原体の体内侵入後には液性および細胞性免疫が生体防御において重要な役割を果たす (Ellis, 1999)。海産交配系の冷水病耐病性は自然感染と同様に腹腔内注射によっても確認されたことから、*F. psychrophilum* の体内侵入後の生体防御が大きな役割を果たしていると考えられる。魚の非特異的生体防御能の評価において、白血球の貪食能および活性酸素産生能が指標の一つになる (Secombes, 1990)。また、ヒラメ *Paralichthys olivaceus* において、白血球の活性酸素産生量を簡便に測定できるニトロブルーテトラゾリウム (NBT) を用いた方法が開発されている (Miyazaki, 1998)。NBT は活性酸素で還元されると難水溶性のホルマザンを生成し、ジメチルホルムアミドで抽出しなければ吸光度を測定できない。一方、WST-1 は還元されると水溶性のホルマザンを生成することから有機溶媒を用いた抽出の必要がなく、また NBT より高い感度を得られる (Tan and Berridge, 2000)。このことから、本研究では WST-1 を用いてアユ白血球の活性酸素産生量を測定した。しかし、海産交配系および湖産交配系の respiratory burst 活性、WST-1 還元能および貪食率に系統間の差は見ら

れなかった (Fig. 2-4-5)。一方、血液中の補体による殺菌作用は生体防御において大きな役割を果たすが (Ellis, 1999)、ニジマス由来の *F. psychrophilum* はニジマス血清に対して抵抗性を示し、血清中で増殖することが報告されている (Wiklund and Dalsgaard, 2002)。このことから、海産交配系と湖産交配系アユの血清における *F. psychrophilum* の殺菌作用の差を検討したが、両者の血清中で *F. psychrophilum* は増殖し、増殖後の菌数にも差はなかった (Fig. 2-4-6)。また、ストレス負荷による血中コルチゾル濃度の上昇で免疫抑制作用が生じ感染症の感受性が高くなることから (Muiswinkel *et al.*, 1999)、両系統の血清コルチゾル濃度を比較したがこれにも差は見られなかった (Fig. 2-4-7)。本研究で検討した項目では耐病性系統と感受性系統に差は認められず、冷水病耐病性の要因は明らかにはできなかった。

次に、*F. psychrophilum* の血液および腹腔内液の消長を系統間で比較した結果、腹腔内接種 6 時間まで海産交配系および累代系アユの菌数に差はなかったが、24 および 30 時間後には海産交配系アユにおいては菌数が減少し、累代系アユでは逆に増加することが明らかとなった (Fig. 2-4-8)。また、脾臓、腎臓および肝臓における菌数も海産交配系アユでは減少することが明らかになった (Fig. 2-4-9)。このことから、海産交配系アユの *F. psychrophilum* を体内から排菌する、または体内での増殖を抑える能力は累代系アユより高いことが明らかになり、冷水病に対する耐病性に直接関係するものであると考えられた。前述の通り、血清中における *F. psychrophilum* の増殖性に系統間において差がないことが明らかになっていることから、体内からの *F. psychrophilum* の排除には細胞性免疫が関与しているものと考えられた。Miwa and Nakayasu (2005) はアユ体内からの *F. psychrophilum* の排除において白血球の貪食作用が重要であることを示しており、これは冷水病耐病性における細胞性免疫の重要性を裏付けているものと考えられた。

冷水病感受性が系統間で異なることが実験的に示されたが、冷水病感受性が遺伝するかどうかについては明らかではない。このことから、海産交配系アユと累代系アユの交配系統を作出して注射感染や自然感染実験を行ったところ (第 4 項)、冷水病による死亡率が両系統の中間となり、冷水病感受性に関わる性質が両系統のアユから交配系統に遺伝したと考えられた (Table 2-4-8)。従って、海産交配系アユの持つ冷水病耐病性に関与した遺伝子が、今後の冷水病耐病性育種において重要な役割を果たす可能性が示唆された。

前述のとおり、末梢血から分離した白血球のザイモサンに対する respiratory burst 活性および貪食能、血清中における *F. psychrophilum* の増殖性は耐病性系統と感受性系統間に差はなく冷水病耐病性に関わる自然免疫的な要因は明らかにならなかった。そこで、*F. psychrophilum* に対する獲得免疫能の系統間における差を明らかにするために、冷水病感受性の異なるアユに浸漬ワクチン処理を行いその有効性の差を検討した。また、多数の魚を処理することに適していることから、本実験では浸漬ワクチンを用いた。これまでにワクチンの有効性を検討する感染方法として、野外における自然感染試験を行い有効であったことから (第 II 章 第 3 節)、同様の方法で実験を行った。その結果、いずれの系統においても浸漬ワクチン処理によって冷水病の死亡率は有意に低くなったが (Fig. 2-4-11)、各系

統における対照区の死亡率が異なったこともあり、アユ系統間におけるワクチンの有効性の差については明らかにはならなかった。一方、浸漬ワクチンの有効率は33.3%から37.6%と低かったものの、自然感染に対する有効性が認められた (Table 2-4-9)。水溶性アジュバントを添加した注射ワクチンの野外実験における有効率は28.2%から39.6%であったことから (第II章 第3節 第1項)、本実験では実験条件は異なるものの注射ワクチンと同程度の有効性を示したのではないかと考えられた。また、ワクチン処理を行った海産交配系アユの死亡率が最も低かったことから、予防免疫した冷水病耐病性系統を養殖や河川放流に用いることで冷水病被害がさらに軽減できると考えられた。

*F. psychrophilum* および *V. anguillarum* のホルマリン死菌でアユを免疫することで、冷水病感受性の異なる3系統間の抗体産生能の差を比較した。その結果、どちらの抗原で免疫しても海産交配系アユの血中凝集抗体価は累代系アユよりも有意に高くなり、また交配系アユの凝集抗体価は感染実験の死亡率と同様に両系統の中間程度となることが明らかとなった (Fig. 2-4-12)。従って、海産交配系アユの *F. psychrophilum* および *V. anguillarum* に対する抗体産生能は累代系アユよりも高いと考えられ、また冷水病感受性と同様にこの性質も遺伝する可能性が示された。このことから、海産交配系アユが持つ冷水病耐病性は抗体産生能の高さと関係している可能性がある。一方、前述のとおり海産交配系の *V. anguillarum* に対する感受性は累代系アユよりも高く、冷水病感受性と逆の関係であったが、海産交配系アユの *V. anguillarum* に対する抗体産生能は *F. psychrophilum* に対する抗体産生能と同様に累代系アユよりも高く、ビブリオ病感受性の関係とは一致しなかった。この原因として、*V. anguillarum* と *F. psychrophilum* のアユに対する病原性や病原因子の違いが考えられた。

主要組織適合性遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: MHC) は免疫応答を調整し、感染症に対する抵抗性の遺伝的要因になっている可能性が示されている (Muiswinlel *et al.*, 1999)。タイセイヨウサケ *Salmo salar* においては、細菌およびウイルス感染症の感受性と MHC 多型との関連が示されている (Langefors *et al.*, 2001; Lohm *et al.*, 2002; Grimholt *et al.*, 2003)。また、ニジマスの冷水病感受性と MHC マーカーとの関連も示唆されている (Johnson *et al.*, 2008)。従って、アユにおける MHC の解析が冷水病耐病性機構を説明する手掛かりになる可能性が考えられる。一方、ニジマスの伝染性腭臓壊死症や伝染性造血器壊死症耐病性に関連する染色体領域の一部分が、マイクロサテライト (MS) マーカーを用いた連鎖解析により同定されている (Okamoto *et al.*, 2002; Khoo *et al.*, 2004)。アユの冷水病においても海産交配系と累代系を交配させたアユを用いて QTL (Quantitative trait locus) 解析が行われた結果、冷水病耐病性と有意に関連する MS マーカーが明らかにされている (Sakamoto *et al.*, 2008)。今後は、この DNA マーカーを用いることで高度な親魚選別が可能となり、冷水病耐病性を有した人工アユの安定生産、または耐病性を増強した人工アユの生産が可能になると考えられる。

## 第 5 節 *Flavobacterium psychrophilum* の病原因子の検討

*F. psychrophilum* は広い宿主域を有すると考えられるが、本菌の主要病原因子については依然として不明と言っても過言ではない (Nematollashi *et al.*, 2003)。これまで、サケ科魚類において *F. psychrophilum* 菌株間のプロテアーゼ産生能の差異が病原性に関係することが示唆され (Dalsgaard and Madsen, 2000; Ostland *et al.*, 2000)、メタロプロテアーゼが精製され詳しく解析されている (Secades *et al.*, 2001; 2003)。一方、*F. psychrophilum* の病原性は対数増殖期に最も強くなり、この理由として対数増殖期に菌体表面に生じる構造変化によることが示唆されている (Kondo *et al.*, 2001)。また、魚の体表に対する *F. psychrophilum* の付着性についての検討もなされており (Kondo *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2004)、アユにおいては体表の傷が本菌の侵入門戸であることが示されている (Miwa and Nakayasu, 2005)。

細菌感染に対する初期の生体防御において血清に含まれる補体は重要であるが、魚類病原細菌の多くが補体の殺菌作用に対する抵抗性を持っている (Ellis, 1999)。また、ニジマスから分離された *F. psychrophilum* は、病原性の有無に関わらずニジマス血清に抵抗性を持つことが示されている (Wiklund and Dalsgaard, 2002)。しかし、アユから分離された *F. psychrophilum* のアユ血清に対する抵抗性は明らかにされておらず、アユ以外の魚の血清に対する抵抗性も不明である。本研究では、アユおよびアユ以外の魚から分離された *F. psychrophilum* を用いてアユ血清における増殖性を比較するとともに、アユ以外の魚の血清としてアマゴの血清を用いその増殖性を比較した。また、血清増殖性との関係を明らかにするために、アユおよびアマゴに対する病原性についても調べた。

### 材料および方法

#### 供試菌株

実験には、2000年から2005年に広島県内の養殖場および河川で採取した魚から分離した36株の *F. psychrophilum* を用いた (Table 2-5-1)。その内訳は、アユから分離した19株、ヤマメから分離した4株、アマゴから分離した4株、ニジマスから分離した2株、オイカワから分離した6株およびギンブナから分離した1株であった。

#### 供試魚および血清の調整

水産海洋技術センターで飼育されていたアユ (累代系) およびアマゴを採血および感染実験に供した。これらの魚は、紫外線処理脱塩素水道水を用いた循環濾過で飼育され、*F. psychrophilum* の感染歴はなく健康状態は良好であった。尾部血管から注射器によって採取した血液を4℃で一晩静置し凝固させた。凝固した血液から遠心分離 (5,000×g, 5分間, 4℃) により血清 (新鮮血清) を回収し、直ちに実験に用いた。また、直ちに実験に用いなかった場合は-80℃で保存した。一部の血清は45℃で30分間の処理をし、非動化血清とし

て実験に用いた。体重が約 30 g のアユおよび約 80 g のアマゴから採血し、アユは 20 尾分およびアマゴは 10 尾分の血清をそれぞれプールして用いた。また、県内の養殖場において冷水病自然発病から回復したアユから血清を採取し、これを免疫血清とした。体重約 70 g のアユ 2 尾から血液を採取し、前述の方法で血清を採取した。*F. psychrophilum* に対する凝集抗体価は、0.3%ホルマリン (v/v) で不活化した *F. psychrophilum* PH-0215 株 (0.1 mg/mL) を用いマイクロタイター法で測定した。

#### 血清中での *F. psychrophilum* の増殖性の検討

*F. psychrophilum* を改変サイトファーガ液体培地で、対数増殖期 (OD 660nm = 0.3 程度) まで 15°C で振盪培養 (60 rpm) した。培養液から菌体を遠心分離 (12,000×g, 1 分間, 4°C) により回収し、10% (v/v) グリセリンを含む改変サイトファーガ液体培地に懸濁してから複数の 1.5 mL チューブに分注し-80°C で保存した。一部のチューブは、数日後に解凍し生菌数の測定を行った (約  $10^9$  CFU/mL)。解凍した菌液を生理食塩水で希釈し、菌数を調整してから実験に用いた。希釈した菌液 50  $\mu$ L と等量の血清を混合し 18°C で静置した。血清にはアユおよびアマゴから採取した新鮮血清を用い、一部の実験には非動化血清および免疫血清を用いた。血清と混合した菌液の菌数 (初期菌数) は約  $10^3$  CFU/mL (免疫血清では約  $10^4$  CFU/mL) となるようにした。生菌数の測定は 24 時間後に行い、24 時間後の菌数を初期菌数で除して増殖率 (Growth rate) とした。

#### 感染実験

アユおよびアマゴに対する病原性を 22 株の *F. psychrophilum* (アユから分離した 8 株, サケ科魚類から分離した 9 株, コイ科魚類から分離した 5 株) を用いて検討した。アユ (平均体重 1.9 g) およびアマゴ (0.9 g) を FA-100 で麻酔し、腹鰭基部後方から腹腔内に前述の方法で調整した菌液を  $5.3 \times 10^5$ – $8.3 \times 10^6$  CFU/fish となるように 25  $\mu$ L ずつ接種した。対照区のアユおよびアマゴには生理食塩水のみを 25  $\mu$ L ずつ接種した。アユおよびアマゴはそれぞれ 20 尾用いた。接種したアユは水温 16.0–16.5°C, アマゴは水温 12.8–14.0°C の紫外線処理脱塩素水道水を用いて 10–14 日間流水飼育した。実験期間中に死亡した魚の腎臓からは、改変サイトファーガ寒天培地で菌分離を行った。

*F. psychrophilum* PH-0215 株および ZH-0412 株を用いて注射感染後のアユ血液中の菌数の測定を行った。それぞれ 15 尾のアユ (25.7 g) の腹腔内に PH-0215 株を  $9.0 \times 10^7$  CFU/fish および ZH-0412 株を  $8.7 \times 10^7$  CFU/fish 注射した。対照区のアユには生理食塩水のみを接種した。水温 18.8–19.1°C で飼育し、24 時間および 72 時間後にそれぞれ 5 尾ずつヘパリン処理した注射器により尾部血管から採血し、血液中の菌数を測定した。

## 結果

### *F. psychrophilum* の血清での増殖性

アユ分離 2 株，サケ科魚類分離 2 株およびコイ科魚類分離 2 株のアユおよびアマゴの新鮮血清および非動化血清での増殖性を Fig. 2-5-1 に示した。PH-0215 株および PH-0424 株はアユ血清で増殖したが，OH-0221 株，OH-0224 株，ZH-0412 株および CH-0411 株は検出限界以下となった。逆に，OH-0221 株および OH-0224 株はアマゴ血清で増殖したが，PH-0215 株，PH-0424 株および ZH-0412 株は減少し，CH-0411 株は検出限界以下となった。一方，アユ非動化血清では OH-0224 株を除いた 5 株が，アマゴ非動化血清では全ての株が増殖した (Fig. 2-5-1)。

供試した全株のアユおよびアマゴ血清での増殖性を Table 2-5-1 に示した。アユから分離した全株はアユ血清で 9 倍から 116 倍に増殖したが，アマゴ血清では 0.21 倍から検出限界以下となった。逆に，アユ以外から分離した全株はアユ血清で検出限界以下となったが，サケ科魚類から分離した 10 株中 5 株がアマゴ血清で 1.2 倍から 23.5 倍に増殖した。

アユの免疫血清中での PH-0215 株の増殖性を Fig. 2-5-2 に示した。2 尾の凝集抗体価はそれぞれ  $1:2^4$  (Serum A) および  $1:2^6$  (Serum B) であった。この免疫血清中では，18°C で 24 時間インキュベートしても菌数は増加しなかった。

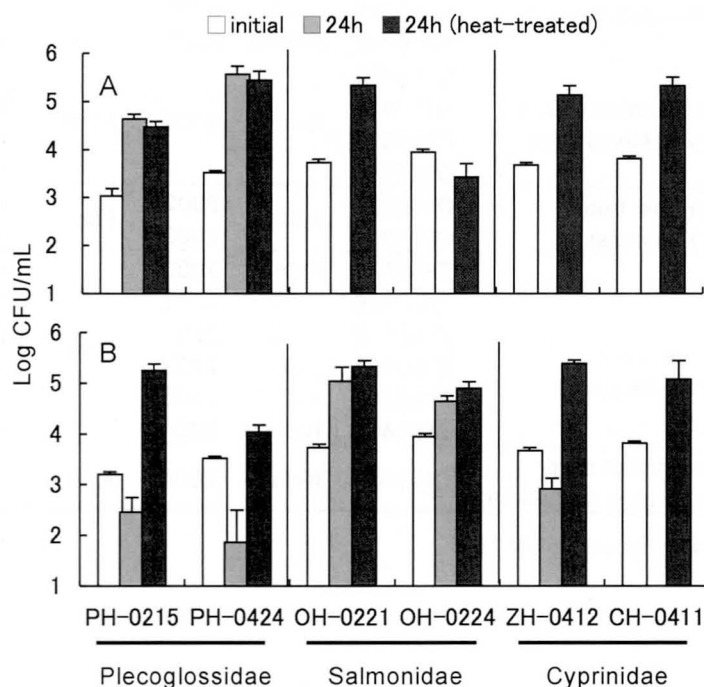


Fig. 2-5-1. Growth and survival of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated from different host fish in ayu (A) and red spotted masu trout serum (B). Bacteria were inoculated to serum and incubated at 18°C for 24 h. Heat treatment for complement inactivation was done at 45°C for 30 min. The values shown are means and standard deviations (n=3).

Table 2-5-1. Sources of *Flavobacterium psychrophilum* used in this study, and growth rates of the bacterium in serum of ayu and red spotted masu trout (RSMT)

Host fish	Strain	Isolation			Growth rate*	
		Organ	Year	Location	Ayu	RSMT
Plecoglossidae  Ayu ( <i>Plecoglossus altivelis</i> )	PH-0003		2000	Farm	28.7	<0.01
	PH-0035		2000	Farm	20.4	0.02
	PH-0037		2000	Farm	9.0	<0.01
	PH-0103		2001	Farm	9.1	<0.01
	PH-0108		2001	River	10.9	<0.01
	PH-0215		2002	Farm	38.8	0.21
	PH-0316		2003	Farm	53.1	<0.01
	PH-0415		2004	Farm	35.7	<0.01
	PH-0418		2004	Farm	66.7	<0.01
	PH-0419	Kidney	2004	Farm	22.2	<0.01
	PH-0420		2004	Farm	54.2	<0.01
	PH-0424		2004	Farm	116.0	0.05
	PH-0443		2004	Farm	25.7	0.01
	PH-0447		2004	Farm	61.9	0.03
	PH-0526		2005	River	33.3	<0.01
	PH-0527		2005	Farm	44.5	0.01
	PH-0529		2005	Farm	34.0	<0.01
	PH-0534		2005	Farm	14.0	<0.01
	PH-0539		2005	Farm	33.9	0.01
Salmonidae	OH-0016	Kidney	2000		<0.01	13.3
Masu salmon ( <i>Oncorhynchus masou</i> )	OH-0221	Gill	2002	Farm	<0.01	23.5
	OH-0224	Gill	2002		<0.01	5.0
	OH-0305	Kidney	2003		<0.01	<0.01
	OH-0501				<0.01	0.11
Red spotted masu trout ( <i>O. masou ishikawae</i> )	OH-0519	Kidney	2005	Farm	<0.01	<0.01
	OH-0533				<0.01	0.02
	OH-0540				<0.01	1.6
Rainbow trout ( <i>O. mykiss</i> )	OH-0203	Kidney	2002	Farm	<0.01	1.2
	OH-0306		2003		<0.01	0.04
Cyprinidae	ZH-0001	Kidney	2000		<0.01	<0.01
	ZH-0220	Gill	2002		<0.01	0.51
Pale chub ( <i>Zacco platypus</i> )	ZH-0339	Gill	2003	River	<0.01	0.47
	ZH-0351	Gill	2003		<0.01	0.09
	ZH-0355	Kidney	2003		<0.01	0.09
	ZH-0412	Kidney	2004		<0.01	0.19
Silver crucian carp ( <i>Carassius auratus langsdorfi</i> )	CH-0411	Kidney	2004	River	<0.01	<0.01

\* Examined after 24 h inoculation at 18°C.

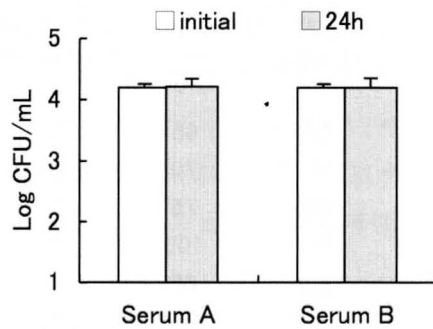


Fig. 2-5-2. Growth and survival of *F. psychrophilum* PH-0215 (ayu strain) in immune ayu serum. Serum was collected from two ayu (A and B). Agglutination titers against *F. psychrophilum* were 1 : 2<sup>4</sup> (A) and 1 : 2<sup>6</sup> (B). Bacteria were inoculated to serum and incubated at 18°C for 24 h. The values shown are means and standard deviations (n=3).

#### 感染実験

アユおよびアマゴを用いた感染実験の結果を Table 2-5-2 に示した。アユから分離した 8 株はアユに対する病原性を示したが、アマゴには病原性を示さなかった。アユ分離株を注射したアユは 3-8 日後に死に始め、14 日後には死亡率が 20-100% に達した。一方、アユ以外の魚から分離した 14 株はアユに対する病原性を示さなかった。サケ科魚類から分離した 9 株中 7 株およびコイ科魚類から分離した 5 株中 2 株がアマゴに対する病原性を示した。これらの株を注射したアマゴは 1-3 日後には死に始め、10 日後には死亡率が 5-70% に達した。いずれの魚の対照区にも死亡は見られなかった。また、死亡した魚の腎臓からは細菌が再分離された。

注射感染したアユ血液中の菌数を Table 2-5-3 に示した。PH-0215 株を注射したアユにおいては、24 時間後および 72 時間後に採血した 5 尾全ての血液から細菌が検出された。72 時間後には残りの 10 尾のアユの内 5 尾が死亡していたので、生残していた 5 尾から採血した。一方、ZH-0412 株においてはいずれの魚からも検出されず、死亡もなかった。



Table 2-5-2. Pathogenicity of *F. psychrophilum* strains in ayu and red spotted masu trout (RSMT)

Strain	Ayu		RSMT	
	Log <sub>10</sub> CFU/g (fish weight)	Mortality (%)	Log <sub>10</sub> CFU/g (fish weight)	Mortality (%)
<b>Plecoglossidae</b>				
PH-0035	5.7	65	5.7	0
PH-0037	5.7	70	5.7	0
PH-0215	6.2	75	6.3	0
PH-0316	5.7	100	5.8	0
PH-0418	5.7	65	5.7	0
PH-0424	5.7	55	5.8	0
PH-0526	5.7	20	5.8	0
PH-0529	5.7	35	5.8	0
<b>Salmonidae</b>				
OH-0016	4.7	0	4.8	55
OH-0221	5.7	0	6.0	40
OH-0224	5.7	0	5.8	70
OH-0305	5.7	0	5.8	25
OH-0501	5.7	0	5.7	15
OH-0519	5.9	0	5.8	5
OH-0533	6.4	0	5.8	0
OH-0540	5.7	0	5.8	10
OH-0306	5.7	0	5.8	0
<b>Cyprinidae</b>				
ZH-0001	6.2	0	5.7	0
ZH-0220	5.8	0	5.9	15
ZH-0339	5.9	0	5.8	10
ZH-0412	5.8	0	5.9	0
CH-0411	5.7	0	5.8	0

Fish, ayu (domesticated stock, mean body weight: 1.9 g, each n=20) and RSMT (0.9 g, each n=20), were intraperitoneally injected with the strains and observed at 16.0-16.5°C (ayu) and 12.8-14.0°C (RSMT) for 14 days (ayu) and 10 days (RSMT).

Table 2-5-3. Viable cell counts in peritoneal blood of ayu after intraperitoneal injection with *F. psychrophilum* PH-0215 (ayu strain) and ZH-0412 (pale chub strain).

Strain	Time after injection	Log <sub>10</sub> CFU/mL in peritoneal blood
PH-0215	24 h	3.5 ± 0.8* <sup>1</sup> (5/5)* <sup>2</sup>
	72 h	4.2 ± 0.8 (5/5)
ZH-0412	24 h	<1.0 (0/5)
	72 h	<1.0 (0/5)

Fish: domesticated stock (25.7 g). Water temperature: 18.8-19.1°C.

\*<sup>1</sup> Mean ± standard deviation (n=5).

\*<sup>2</sup> Detection / examined fish.

## 考察

血清抵抗性は魚類病原細菌の病原因子として広く知られ (Ellis, 1999), これまで *Pseudomonas anguilliseptica*, *Aeromonas hydrophila* および *Vibrio anguillarum* などで病原性と血清抵抗性の関係が明らかにされている (Nakai, 1985; 中井ら, 1985; Leung *et al.*, 1994; Boesen *et al.*, 1999)。本研究ではアユおよびアユ以外の淡水魚から分離された *F. psychrophilum* を用いて, アユおよびアマゴ血清での増殖性ならびにアユおよびアマゴに対する病原性を比較した。

アユおよびアマゴ血清での増殖性を調べたところ, 全てのアユ分離株はアユ血清中で増殖した (Table 2-5-1)。しかし, アユ以外の魚から分離した全ての株はアユ血清で 24 時間後には検出限界以下となり, 血清中で殺菌されたものと考えられた。一方, アマゴ血清ではアユ分離株は初期菌数より大幅に減少したが, サケ科魚類分離株の一部では増殖が確認された (Table 2-5-1)。これらのことから, アユ血清中でアユ分離株が増殖し, アマゴ血清でアユ以外の魚の分離株の一部が増殖することが明らかになった。また, 血清を 45°C で 30 分間処理することで, 新鮮血清で殺菌または増殖を抑制された菌株が増殖するようになった (Fig. 2-5-1)。矢野ら (1988) は, アユおよびニジマス血清を 43°C で最低 20 分間処理することで補体が不活化することを示している。アマゴ補体の不活化条件は調べられていないが, ニジマス補体と同程度であると考えられる。これらのことから, アユおよびアマゴ血清での *F. psychrophilum* の殺菌には補体が関与していると考えられた。Wiklund and Dalsgaard (2002) はニジマス病原株および非病原株のニジマスの血清に対する抵抗性を検討したが, いずれの株も抵抗性を示したと報告している。しかし, 24 時間後の菌数は減少または初期菌数と同程度であり, 本研究においてアユ分離株がアユ血清中で示した 9.0 倍から 116 倍に達した増殖性はみられない。従って, アユ血清におけるアユ分離株の増殖能はかなり強いものと考えられた。硬骨魚類の補体の第二経路, すなわち抗体の関与なしに病原体を非特異的に処理する補体の活性は哺乳類より大幅に高く, 硬骨魚類の生体防御において重要な役割を果たすと考えられている (矢野ら, 1988)。また, アユの補体活性はニジマスより高いことが示されており (矢野ら, 1988), アユにおいてはより重要な役割を果たしていると考えられる。従って, アユ分離株のアユ血清における高い増殖能は, アユに対する *F. psychrophilum* の病原因子の一つであると考えられた。哺乳類とは異なり硬骨魚類の抗体や補体は, 一部の例外を除いて他魚種の抗体や補体と適合しないことが明らかにされており (松山ら, 1988), アユ分離株と他魚種分離株に見られた魚種特異的な血清抵抗性は, アユとアマゴの補体成分の種間の差異によるものと考えられた。

冷水病自然感染から回復したアユから得た血清を免疫血清としてアユ分離株の増殖性を調べたところ, 非免疫血清とは異なり 24 時間後でも菌数に変化がなく増殖は抑制された (Fig. 2-5-2)。しかし, 殺菌作用は認められなかった。Wiklund and Dalsgaard (2002) は, ニジマスの免疫血清でも同様の結果を示している。*F. psychrophilum* に対する抗体を含むニジマス血清を用いた受動免疫の有効性がニジマスにおいて示されていることから

(LaFrentz *et al.*, 2003) , 生体内においては *F. psychrophilum* の処理に抗体が大きく関与しているものと考えられた。

注射感染実験の結果、アユから分離した株はアユに対して病原性を示したが、アマゴに対して病原性を示さなかった (Table 2-5-2) 。一方、サケ科魚類およびコイ科魚類から分離した株はアユに対して病原性を示さなかったが、一部の株はアマゴに対する病原性を示した (Table 2-5-2) 。血清増殖性と病原性の関係はアユにおいて一致したが、血清での増殖率と死亡率の高低は必ずしも一致しなかった。次に、注射感染後のアユにおける菌数変化を検討したところ、アユ血清で増殖する PH-0215 株では 24 時間後には血液から検出された (Table 2-5-3) 。しかし、アユ血清で増殖しない ZH-0412 株が血液から検出されることはなく、体内で処理されたものと考えられた。従って、*in vivo* での *F. psychrophilum* の増殖性と *in vitro* での増殖性とはよく一致する。

本研究により、アユ血清中におけるアユ分離株の強い増殖性が示され、アユに対する病原性との関係が明らかになった。*F. psychrophilum* がアユ血清での増殖性を獲得したことで、アユに対する病原性を獲得した可能性も考えられた。このことは、*F. psychrophilum* のアユ血清での増殖性を *in vitro* で検討することで、アユに対する病原性を推定できる可能性を示唆する。病原細菌は細胞表面の何らかの構造により血清に対する抵抗性を持つが (Ellis, 1999) , *F. psychrophilum* の血清抵抗性の機序は全く不明である。*F. psychrophilum* の細胞表面の物質解析がなされていることから (LaFrentz *et al.*, 2007; Dumetz *et al.*, 2008) , 今後は血清抵抗性の機序に関する研究が望まれる。

最近、ニジマス病魚由来の *F. psychrophilum* のゲノムの全塩基配列が決定され、病原性に関与すると考えられる遺伝子の候補がリストアップされている (Duchaud *et al.*, 2007) 。そこから予想されるタンパク質の内、ストレス応答伝達物質、滑走運動に関わるタンパク質、付着因子および分泌型プロテアーゼが宿主細胞への定着、侵入および破壊に関与している可能性が示唆されている (Duchaud *et al.*, 2007) 。これらの結果から、*F. psychrophilum* の病原因子の理解がさらに深まり、優れた防除技術の開発につながるものと期待される。

### 第三章 養殖アユに発生した細菌性腎臓病(BKD)

*Renibacterium salmoninarum* を原因とする細菌性腎臓病 (Bacterial kidney disease : BKD) は、多くの国で養殖場や天然河川のサケ科魚類で問題となっている細菌性疾病である (若林, 2004a)。日本においては、1973年に北海道のマスノスケ *Oncorhynchus tshawytscha*, ヒメマス *O. nerka*, カラフトマス *O. gorbuscha* およびヤマメ *O. masou* で初確認されてから、全国各地の養殖場に急速に広がった (木村・栗倉, 1977)。広島県では、1980年代の後半から養殖場のヤマメおよびアマゴ *O. masou ishikawae* で散見されるようになり、最近でも年に1件以上は確認されている。*R. salmoninarum* は細胞内に寄生することから抗菌剤の投与効果が低く、また卵黄を介して垂直感染することから (Evelyn *et al.*, 1984), BKDは完治させるのが困難な疾病である (Evelyn, 1993; Evenden *et al.*, 1993)。これまで、BKDの自然発生はサケ科魚類のみで確認されており、その他の魚種においては確認されていない (Wiens and Kaattari, 1999; 吉水, 2000)。

2001年4月から6月にかけて、広島県内で養殖されていたアユに大量死が発生した。死亡したアユの腹部は膨満し腹水の貯留が確認され、さらに腎臓に白い結節が認められた。これらの症状は、サケ科魚類のBKDの症状に類似していたことから、BKDの発生が強く疑われた。本研究では、アユの死亡原因を明らかにするために、アユから分離した細菌の分類学的検討を行うとともに、感染実験で病原性を調べた。さらに、感染源を明らかにするために、種苗導入元の養殖場の調査を行った。

#### 材料および方法

##### 病魚および細菌分離

2001年6月に、県内の養殖場(養殖場A)で体重16.9~39.0gの瀕死のアユを採取した。外部および内臓を観察した後、トリプトソーヤ寒天培地(TSA, 日水製薬)およびKDM-2培地<sup>14</sup>を用いて腎臓から細菌分離を行った(18℃)。また、腎臓の塗抹標本からは抗*R. salmoninarum* ATCC33209ウサギ血清(日本水産資源保護協会)を用いた間接蛍光抗体法により、*R. salmoninarum*の検出を試みた。

##### 細菌学的検討

アユの腎臓からKDM-2培地によって分離された細菌が*R. salmoninarum*であることを確認するために、間接蛍光抗体法およびPCR法を行った。また、分離された細菌のKDM-C培地(Daly and Stevenson, 1985)およびFBS(牛胎児血清)を添加していないKDM-2培地での増殖性も調べた。PCR法では、*R. salmoninarum*が産生するp57タンパク質の遺伝子を

<sup>14</sup> 1%ペプトン, 0.05%酵母エキス, 0.1%塩酸システイン, 20%FBS, 1.5%寒天, pH 6.5

標的とした方法を用いた (Brown *et al.*, 1994; 1995)。細菌および腎臓に、核酸抽出液 (1.0 mg/mL Proteinase K, 0.5% Tween 20) を加えてホモジナイズした後、37°Cで 15 分間インキュベートした。これに、TE<sup>15</sup>飽和フェノールを加えて混合し遠心分離 (12,000×g, 5 分間) を行った。この上澄み液にさらに TE 飽和フェノールを加えて混合し遠心分離 (12,000×g, 5 分間) した後、上澄み液にクロロホルム・イソアミルアルコール混液 (24 : 1) を加えて混合し、遠心分離 (12,000×g, 1 分間) を行った。得られた水層を抽出核酸として PCR に供した。プライマーには Rs1 および Rs2 を用い (増幅産物 : 501 bp) (Brown *et al.* 1994), PCR の反応条件として、94°Cで 5 分間反応させた後、94°C・1 分、55°C・1 分、72°C・2 分を 1 サイクルとして 30 サイクル反応させ、最後に 72°Cで 5 分間反応させた。*R. salmoninarum* ATCC33209 (Sanders and Fryer, 1980) を陽性対照として用いた。

### アユ分離菌の病原性試験

水産試験場<sup>16</sup>で飼育されていた平均体重 35 g のアユ (累代系) および 22 g のヤマメを感染実験に用いた。これらの魚は紫外線処理された地下水および脱塩素水道水で飼育されていた。アユから分離された PH-0110 株は KDM-2 培地を用いて 18°Cで 10 日間培養し、1 mg/mL となるように PBS に懸濁した。菌数計数板を用いて光学顕微鏡下で懸濁液を計数した結果、1 mg/mL は 10<sup>9</sup> cells/mL となった。供試魚は FA-100 (大日本住友製薬) で麻酔し、腹鰭基部後方から腹腔内に菌液を 10<sup>7</sup> および 10<sup>3</sup> cells/fish となるように、注射器で 0.1 mL ずつ接種した。対照区の魚には PBS のみを同様に 0.1 mL ずつ接種した。それぞれの実験区で 15 尾のアユおよび 30 尾のヤマメを用いた。接種した魚は水温 18°Cの紫外線処理脱塩素水道水を用いて流水飼育した。また、発病に及ぼす水温の影響を検討するために、別に 10<sup>7</sup> cells/fish 接種したアユをそれぞれ 10 尾ずつ 18°Cおよび 25°Cで飼育した。

実験期間中に死亡した魚は症状を観察するとともに、腎臓の塗抹標本を間接蛍光抗体法に供し、一部の魚からは KDM-2 培地で細菌分離も行った。また、実験終了後に生残していた全ての魚について腎臓の症状の観察を行うとともに、PCR 法により *R. salmoninarum* の検出を行った。

### 感染源の調査

2001 年 10 月に感染源の調査を県内の養殖場 (養殖場 B) で行った。養殖場 A のアユは 4 月に養殖場 B から購入されていた。養殖場 B では、2001 年の 1 月から 4 月までアユ飼育池に隣接した飼育池でニジマスおよびヤマメを飼育していた。13.4°Cの地下水で飼育されていたメスのニジマス 6 尾 (平均体重 : 1003 g), およびメスのヤマメ 21 尾 (168 g) を採取した。採取した魚の外部と内臓の観察を行った後、腎臓、生殖液および卵から *R. salmoninarum* の検出を PCR 法によって行った。生殖液は 10,000×g で 10 分間 (4°C) 遠心分離した後、得られた沈殿物から前述の方法で DNA を抽出し、卵は 1 個毎に DNA を抽出

<sup>15</sup> 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA

<sup>16</sup> 実験実施時は水産試験場

した。腎臓に白色結節が認められた魚については、KDM-2 培地によって細菌分離を行い、PCR 法によって *R. salmoninarum* であることを確認した。

#### サケ科魚類分離菌の病原性試験

浸漬感染実験の感染源として、BKD の自然発病が確認された県内の養殖場（養殖場 C）で採取した罹病アマゴの腎臓を用いた。3 尾のアマゴ（平均体重：102.9 g）から採取した腎臓をプールした後、PBS を 24 倍量（w/v）加えてホモジナイズした。なお、実験に用いたいずれの腎臓からも PCR 法により *R. salmoninarum* が検出された。水産試験場で飼育されていた健康なアユ（累代系：4.6 g）およびヤマメ（3.8 g）を 12～15 尾収容した水量 10 L の水槽に、腎臓ホモジネートを 20 mL ずつ添加した。水槽に添加した腎臓重量は元の重量の 12,500 倍希釈となった。このまま止水状態で 24 時間維持した後、流水式飼育に切り替えた。飼育水の水温は 15.0℃から 17.6℃で、36 日間飼育し死亡状況を観察した。対照区では、腎臓磨砕液を加えずに同様の処理を行った。なお、供試したアマゴの腎臓が魚類病原ウイルスおよび *R. salmoninarum* 以外の細菌で汚染されていないことを確認するため、ウイルス分離および細菌分離を行った。ホモジネートを 10,000×g で 5 分間（4℃）遠心分離し、0.45 μm のフィルターで濾過してから FHM 細胞に接種し 15℃で 14 日間培養したが、FHM 細胞は細胞変性効果（CPE）を示さなかった。また、濾過する前のホモジネートを TSA 培地に塗布して 15℃で 7 日間培養したが細菌は増殖しなかった。このことから、供試した腎臓は *R. salmoninarum* 以外の既知の魚類病原ウイルスや細菌に汚染されていないものと判断された。

注射感染実験には、*R. salmoninarum* PH-0110 株、OH-0114 株および OH-0208 株を用いた。PH-0110 株は養殖場 A のアユから分離された菌株で、OH-0114 は養殖場 B のヤマメから分離された菌株で、OH-0208 株は養殖場 C のアマゴから分離された菌株である。いずれの菌株も FBS を添加していない KDM-2 培地を用いて 18℃で 9 日間培養した。PBS に細菌を懸濁した後、健康なアユ（累代系：10 g）およびヤマメ（16 g）それぞれ 5 尾に  $10^7$  cells、 $10^4$  cells および  $10^1$  cells/fish の菌数となるように 0.1 mL ずつ腹腔内に接種した。接種した魚は 17.1℃から 18.9℃の水温で、50 日間流水飼育した。いずれの感染実験においても、死亡魚の腎臓から *R. salmoninarum* の検出を PCR 法により行い死因を確認した。また、実験終了後に生残していた全ての魚について腎臓の症状の観察を行うとともに、PCR 法により *R. salmoninarum* の検出を行った。

## 結果

#### 病気の発生状況と細菌分離

アユの死亡は、水温が 15℃から 21℃の 4 月から 6 月にかけて慢性的に発生し、累積死亡率は 50%以上に達した。7 尾のアユの外部および内蔵の観察を行ったところ、いずれのアユにも腹部膨満、眼球突出および透明な腹水の貯留が確認され、腎臓には白色の結節が認

められた (Fig. 3-1)。その内、2尾では肝臓にも白色の結節が観察された (Fig. 3-1A)。また、グラム陽性短桿菌が全てのアユの腎臓で確認され (Fig. 3-2)、それらは抗 *R. salmoninarum* 血清を用いた間接蛍光抗体法で陽性となった。病魚からの細菌分離では、18°C で14日間の培養を行った結果、TSA培地では細菌が分離されなかったが、KDM-2培地では全ての魚の腎臓から純培養状に細菌が分離された。代表的な株とした PH-0110 株は、KDM-2培地と同様に KDM-C培地や FBS を加えていない KDM-2培地でも増殖した。PH-0110 株を PCR 法に供した結果、*R. salmoninarum* の標準株と同じ位置にバンドが認められた (Fig. 3-3)。同じ PCR 産物は、病魚の腎臓をサンプルとした場合にも認められた。

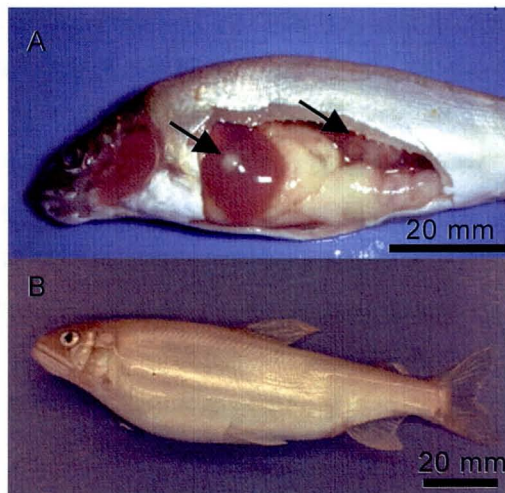


Fig. 3-1. Ayu affected with bacterial kidney disease (BKD). A: Naturally affected ayu showing white nodules in the kidney and liver (arrows). B: Experimentally infected ayu showing swollen abdomen.

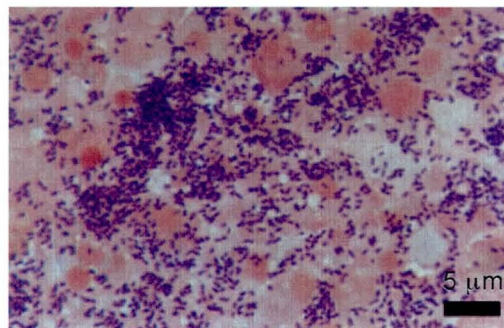


Fig. 3-2. Smear of the kidney of affected ayu showing Gram-positive bacilli.

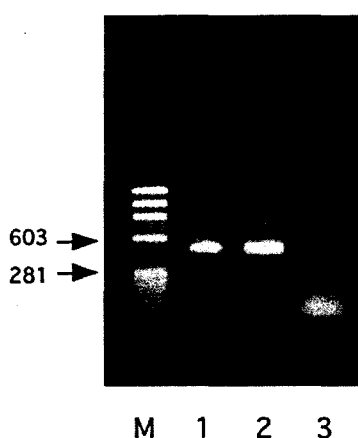


Fig. 3-3. Agarose gel electrophoresis of PCR products from nucleic acids extracted from *Renibacterium salmoninarum*. M: markers ( $\phi$ X174 *Hae*III digest), Lane 1: *R. salmoninarum* ATCC33209, Lane 2: The isolate PH-0110, Lane 3: negative control.

#### アユ分離菌の病原性試験

PH-0110 株を腹腔内注射したアユおよびヤマメの死亡状況を Fig. 3-4 に示した。 $10^7$  cells 接種したアユでは 15 日後から死亡が認められ、17 日後に全て死亡した。 $10^3$  cells 接種したアユでは 28 日後から死亡が認められ、52 日後に全て死亡した。また、 $10^7$  cells 接種したヤマメでは 18 日後から死亡し始め、61 日後には累積死亡率が 60% に達した。一方、 $10^3$  cells 接種したヤマメは 61 日の実験期間で死亡しなかった。また、いずれの対照区にも死亡は見られなかった。死亡したアユおよびヤマメには、腹部膨満、眼球突出および透明な腹水の貯留が認められた。しかし、白色の結節は腎臓にも肝臓にもほとんど確認されなかった。死亡した魚の腎臓からは間接蛍光抗体法で *R. salmoninarum* が検出され、細菌も再分離された。 $10^7$  cells 接種し生残したヤマメ 12 尾のうち 1 尾の腎臓から PCR 法によって *R. salmoninarum* が検出されたが、その他の実験区の生残魚から *R. salmoninarum* は検出されなかった。 $10^7$  cells 接種したアユを 18°C および 25°C で飼育した実験における死亡状況を Fig. 3-5 に示した。21 日間の実験期間において、アユは 25°C では死亡しなかったが、18°C では全て死亡した。



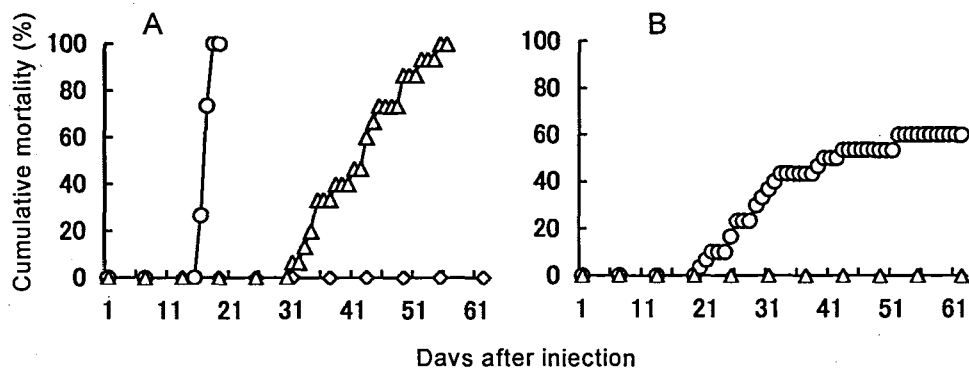


Fig. 3-4. Pathogenicity of the isolate PH-0110 to ayu (A) and masu salmon (B) by intraperitoneal injection. Injection dose: 10<sup>7</sup> cells/fish (○), 10<sup>3</sup> cells/fish (△), control (◇). Fish: ayu (35 g, each n=15), masu salmon (22 g, each n=30). Water temperature: 18°C.

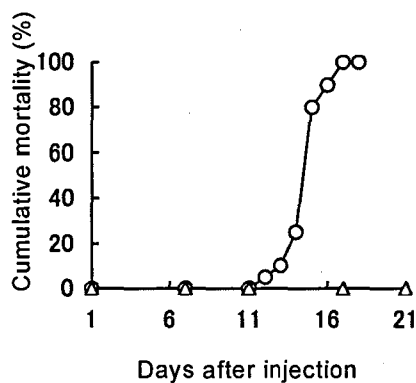


Fig. 3-5. Cumulative mortalities of ayu intraperitoneally injected with the isolate PH-0110 at 18°C (○) or 25°C (△). Injection dose: 10<sup>7</sup> cells/fish. Ayu: 35 g (each n=10).

### 感染源の調査

養殖場 B で採取したニジマスおよびヤマメの検査結果を Table 3-1 に示した。いずれのニジマスの腎臓にも白色の結節は認められなかったが、1尾 (No. 4) のヤマメの腎臓には結節が認められた。ヤマメの結節にはグラム陽性短桿菌が認められ、それらは間接蛍光抗体法で陽性となった。No. 4 のヤマメの腎臓からは、間接蛍光抗体法および PCR 法で *R. salmoninarum* と同定された細菌 (OH-0114 株) が分離された。全てのニジマスは PCR 法で陰性であったが、ヤマメにおいては 21 検体の腎臓のうち 1 検体から、19 検体の生殖液沈殿物のうち 4 検体から、21 検体の卵のうち 3 検体から *R. salmoninarum* が PCR 法により検出された。なお、これまで、養殖場 B で BKD の発生が確認されたことはなかった。

Table 3-1. Detection of *Renibacterium salmoninarum* by PCR from rainbow trout and masu salmon cultured in the farm B from which ayu derived

Species	Fish No.	PCR		
		Kidney	Ovarian fluid deposit	Egg
Rainbow trout (n=6)	1-4	-	-	-
	5, 6	-	NT* <sup>1</sup>	-
Masu salmon (n=21)	1	-	+	+
	2	-	+	-
	3	-	+	+
	4	+* <sup>2</sup>	+	+
	5-19	-	-	-
	20, 21	-	NT	-

\*<sup>1</sup> NT: not tested.

\*<sup>2</sup> White nodules were observed in the kidney.

#### サケ科魚類分離菌の病原性試験

浸漬感染実験の死亡尾数および感染尾数について Table 3-2 に示した。アユと比較するために供試したヤマメについては、腎臓を添加して 27 日後から死亡が始まり、36 日後の累積死亡率は 77% に達した。また、実験終了時の生残魚 1 尾の腎臓から *R. salmoninarum* が PCR 法によって検出された。一方、アユについては 30 日後に 1 尾死亡したのみで、その後の死亡はなかった。しかし、11 尾の生残魚のうち 9 尾の腎臓に白色の結節が確認され、さらに *R. salmoninarum* が PCR 法によって検出された。

注射感染実験の死亡尾数および感染尾数を Table 3-3 に示した。10<sup>7</sup> cells 接種したアユでは、いずれの菌株を用いても注射 15 日後から 25 日後の間に全ての魚が死亡し、10<sup>4</sup> cells では接種した 5 尾中、3 尾から 5 尾の魚が死亡した。一方、10<sup>7</sup> cells を接種したヤマメにおいては、OH-0114 株では 25 日目から 41 日目に全てが死亡し、OH-0208 株では 24 日目から 39 日目に 4 尾が死亡し、PH-0110 株では 41 日後に 1 尾が死亡した。10<sup>4</sup> cells 接種したヤマメで死亡したのは、OH-0114 株のみであった。

Table 3-2. Experimental infection to ayu and masu salmon by immersion method using the homogenized kidney of diseased red spotted masu trout infected with *R. salmoninarum*

Fish species	Group	Examined fish	Dead fish in 36 days	Infected fish*
Ayu	Experiment	12	1	9 (9)
	Control	13	0	0 (0)
Masu salmon	Experiment	13	10	1 (0)
	Control	15	0	0 (0)

Fish: ayu (4.6 g), masu salmon (3.8 g). Water temperature: 15.0-17.6°C.

\* *R. salmoninarum* were detected by PCR from the kidney of survival fish at 36 days post-inoculation.

( ): White nodules were observed in the kidney.

Table 3-3. Experimental infection to ayu and masu salmon by intraperitoneal injection using *R. salmoninarum* isolated from ayu, masu salmon and red spotted masu trout

<i>R. salmoninarum</i> strain (isolated from)	Test fish species	Dose (Log <sub>10</sub> cells/fish)	Dead fish in 50 days	Infected fish*
PH-0110 (ayu)	Ayu	7.2	5	-
		4.2	4	0
		1.2	0	0
	Masu salmon	7.2	1	1
		4.2	0	0
		1.2	0	0
OH-0114 (masu salmon)	Ayu	7.1	5	-
		4.1	3	1
		1.1	0	0
	Masu salmon	7.1	5	-
		4.1	1	1
		1.1	0	0
OH-0208 (red spotted masu trout)	Ayu	7.1	5	-
		4.1	5	-
		1.1	0	0
	Masu salmon	7.1	4	1
		4.1	0	0
		1.1	0	0

Five fish (ayu: 10 g, masu salmon: 16 g) were examined in each experiment. Water temperature: 17.1-18.9°C.

\**R. salmoninarum* were detected by PCR from the kidney of survival fish at 50 days post-injection.

### 考察

瀕死のアユに観察された眼球突出、腹部膨満、腹水貯留および腎臓や肝臓に形成された白い結節は、サケ科魚類のBKDの症状に類似していた (Fig. 3-1)。特に腎臓の白い結節はBKD罹病魚の典型的な症状として広く知られているものであり (若林, 2004a), 抗 *R. salmoninarum* 血清を用いた間接蛍光抗体法で陽性反応を示した。また, KDM-2 培地によって腎臓から分離された PH-0110 株は, 間接蛍光抗体法で陽性となり, *R. salmoninarum* 検出用の PCR 法でも陽性となった。さらに, PH-0110 株を用いた感染実験によりアユに対する病原性が確認され症状の一部も再現された。これらの結果から, PH-0110 株は *R. salmoninarum* と同定され, アユの大量死の原因はBKDであると判断された。

*R. salmoninarum* は, サケ科魚類以外では5種類の魚 (ニシン *Clupea harengus pallasii*, ギンダラ *Anoplopoma fimbria*, シャイナーサーフパーチ *Cymatogaster aggregata*, コモンシャイナー *Notropis cornutus*, ファットヘッドミノー *Pimephales promelas*) に対する病原性が実験的に示されている (Evelyn, 1993)。しかし, 産業上あまり重要でない魚種を含めても, サケ科魚類以外でのBKDの自然発生は報告されていない (Evelyn, 1993; 若林, 2004a)。従って, 本研究はサケ科魚類以外でのBKDの自然発生を確認した最初の報告となる。

アユとヤマメに対する PH-0110 株の病原性を検討した結果, 接種菌数の多少に関わらず

アユの死亡率がヤマメよりも高くなった (Fig. 3-4)。このことから、PH-0110 株はヤマメよりもアユに対してより強い病原性を示すものと考えられた。また、感染実験では自然発病と同じ症状がほぼ再現されたが、腎臓および肝臓の白い結節は確認されなかった。これは、感染実験においては一度に体内に入る菌数が自然感染よりも多いことで病勢が急速に進行し、腎臓に結節が形成される前に死亡に至ったことによると考えられた。Sakai *et al.* (1991) は、 $1.2 \times 10^8$  cells の *R. salmoninarum* KU8503 をヤマメに注射感染させたところ、水温 12°C で死亡率が 91% に達したと報告している。本研究では、水温 18°C で実験を行ったことから全く同じ条件とは言えないが、PH-0110 株もほぼ同様の病原性を示したものと考えられた。

BKD によるアユの死亡は、水温が 22°C 以上となった 7 月中旬には終息した。従って、病気の進行に及ぼす飼育水温の影響を検討した結果、18°C では 100% 死亡したものの、25°C では全く死亡しなかった (Fig. 3-5)。この結果は、*R. salmoninarum* は 15°C から 18°C で最もよく増殖し、25°C では全く増殖しないことと一致していた (Evelyn, 1993)。従って、飼育水温を 25°C 以上に加温することでアユの BKD が治療できる可能性が示された。

アユに対する *R. salmoninarum* の感染源を明らかにするために、アユの購入元である養殖場 B で調査を行ったところ、養殖されていたヤマメが BKD の症状を示し、また複数のヤマメから *R. salmoninarum* が検出された (Table 3-1)。養殖場 B では、養殖場 A にアユが輸送されるまで隣接する池でこれらのヤマメが飼育されていた。養殖サケにおいて、病魚から排泄される *R. salmoninarum* に汚染された糞により経口感染が生じる可能性が示されている (Balfry *et al.*, 1996)。今回の例で具体的な感染経路は不明であったが、養殖場 B でヤマメ由来の *R. salmoninarum* が隣接した池で飼育されていたアユに水平感染した可能性が示唆された。

サケ科魚類の BKD が水を介してアユに伝播することは実験的に確認されておらず、また、サケ科魚類から分離された *R. salmoninarum* がアユに対して病原性を持つかどうかも明らかにされていない。そこで、サケ科魚類の BKD のアユに対しての感染性について、BKD 罹病アマゴの腎臓を磨碎してアユの飼育水中に添加し、アユの発病を確認するとともに、ヤマメおよびアマゴから分離された *R. salmoninarum* をアユに注射して、その病原性を検討した。罹病アマゴの腎臓を用いた浸漬感染実験では、ヤマメの死亡率が 77% であったのに対して、アユの死亡率は 8% であった。しかし、実験終了時に生存していた 82% のアユの腎臓に BKD 罹病魚の特徴である白色の結節が確認され、さらに *R. salmoninarum* も検出された (Table 3-2)。BKD は潜伏期間が長く死亡が継続的に続く疾病であることから (若林, 2004a)、飼育を継続した場合にはこれらのアユは死亡したものと考えられた。この結果から、BKD により死亡したサケ科魚類から *R. salmoninarum* がアユに水平感染することが示唆された。さらに、注射感染実験の結果から、ヤマメやアマゴから分離された *R. salmoninarum* はアユから分離された *R. salmoninarum* と同様に、アユに対して強い病原性を示すことが明らかになった。また、いずれの菌株においても、アユの死亡尾数および感染尾数はヤマメのそれを上回り、*R. salmoninarum* はヤマメよりもアユに対してより強い病原

性を示すことが明らかになった (Table 3-3)。

本研究では、広島県内の養殖場で発生したアユの大量死が BKD によるものであることを明らかにし、サケ科魚類からアユに *R. salmoninarum* が水平感染することを実験的に確認した。また、*R. salmoninarum* がヤマメよりもアユに対して強い病原性を示すことも確認した。アユにおいては、サケ科魚類とは異なり 25°C による加温治療の可能性はあるが、アユ養殖場においては加温装置を備えた施設はほとんどないため、今のところ実施困難である。前述のように *R. salmoninarum* はアユに対して強い病原性を持つことから、アユが *R. salmoninarum* に感染すればサケ科魚類よりもその被害が大きくなる可能性が考えられる。従って、サケ科魚類とアユを同じ施設内で飼育している養殖場においては、*R. salmoninarum* 感染の疑われるサケ科魚類を飼育しないととも、BKD 発生時にはアユへの水平感染を念頭に置き隔離飼育などの処置を行う必要がある。

## 第IV章 養殖アユに発生した新型ビブリオ病

*Vibrio anguillarum* を原因とするビブリオ病は、1960年代から1980年代にかけて養殖アユに大きな被害を与えた細菌性疾患である (Muroga and Egusa, 1988)。しかし、この疾患は1990年頃から突如として発生しなくなったが、その原因は明らかにされていない。*V. anguillarum* 以外の *Vibrio* 属細菌としては *V. ordalii* もアユの病原体として知られているが、産業的被害は軽微である。

2006年5月から6月にかけて、広島県内の養殖アユにおいて大量死が発生した。死亡したアユには眼球突出、頭部の赤変および体の屈曲が見られ、通常の培地では培養困難なグラム陰性細菌が分離された。この細菌はその性状から *Vibrio* 属細菌に分離されたが、既知の *Vibrio* 属細菌とは異なった。本研究では、アユから分離された細菌について分類学的検討を行うとともに、アユに対する病原性を調べた。

### 材料および方法

#### 病魚および原因体の分離

2006年5月に、体重5~15gの死亡したアユを県内の一養殖場および水産海洋技術センター屋外水槽で採取した。養殖場では河川水を用いて飼育されていたものであり、水産海洋技術センターでは砂濾過海水を用いて飼育されていた。死亡魚の脳および腎臓から、羊血液寒天培地 (SBA, 栄研化学)、ハートインフュージョン寒天培地 (HIA, 栄研化学)、トリプトソーヤ寒天培地 (TSA, 日水製薬) およびブレインハートインフュージョン寒天培地 (BHIA, 栄研化学) を用いて18℃で細菌分離を行った。

ウイルス分離を行うために、脳および腎臓の磨砕濾液 (0.45  $\mu\text{m}$ ) を MEM-5 培地 (日水製薬) で培養した FHM 細胞に接種し、18℃で培養した。

#### 細菌学的検討

アユから分離された細菌は SBA 以外での培養は困難であったので、培地の検討を最初に行った。0.1N 水酸化ナトリウム溶液に溶解したヘミン (ナカライ) を 1.25, 5, 25, 50, 100 および 200  $\mu\text{g/mL}$  となるように滅菌した HIA に添加した。アユから分離された PH-0604 株を SBA で培養し、滅菌生理食塩水で 1/10 希釈液を作製後、ヘミンを添加した HIA および添加していない HIA に接種した。コロニーの計数は 18℃で7日間培養後に行った。

形態学および生化学的性状は常法に従って検討した。べん毛形態は1%酢酸ウラニルでネガティブ染色してから、透過型電子顕微鏡 (JEM-1011, JEOL) で観察した。後述する結果に基づいて、性状試験に用いる全ての培地にヘミンを 25  $\mu\text{g/mL}$  となるように添加した。性状試験には、養殖場のアユから分離された3株および水産海洋技術センターのアユから

分離された3株を用いた。分離された細菌が *V. anguillarum* または *V. ordalii* である可能性を検討するために、抗 *V. anguillarum* ウサギ血清（血清型 A, B, C, D: 日本水産資源保護協会）を用いたスライド凝集反応試験を行った。なお、*V. ordalii* は *V. anguillarum* A 血清型と共通抗原を有する。ヘミンを 25  $\mu\text{g/mL}$  となるように添加したハートインフュージョン液体培地（栄研化学）に PH-0604 株を接種し、10°C から 30°C で 48 時間振盪培養（60 rpm）することで増殖温度を調べた。

### 遺伝学的検討

PH-0604 株および PH-0608 株について、16S rDNA および 16S と 23S rDNA 間にある ITS 非コード領域の一部の塩基配列を決定し、*V. anguillarum* のヘモリジン遺伝子を PCR 法で検出した。Chelex 100 (Sigma) を用いて菌体から抽出した DNA を PCR に供した。16S rDNA は、ユニバーサルプライマーである 20F および 1500R (Weisburg *et al.*, 1991) を用いて増幅した。最初に 94°C で 5 分間反応させた後、94°C・30 秒、51°C・60 秒、72°C・60 秒を 1 サイクルとして 30 サイクル反応させ、最後に 72°C で 5 分間反応させた (PC880, アステック)。ITS 非コード領域は、VITSF および VITSR プライマー (Matsuyama *et al.*, 2006) を用いて増幅した。最初に 94°C で 5 分間反応させた後、94°C・30 秒、55°C・30 秒、72°C・60 秒を 1 サイクルとして 40 サイクル反応させ、最後に 72°C で 5 分間反応させた。5 種類のヘモリジン遺伝子 (*vah1*, *vah2*, *vah3*, *vah4* および *vah5*) は、それぞれのプライマーセット (Rodkhum *et al.*, 2006) を用いて増幅した。最初に 94°C で 5 分間反応させた後、94°C・60 秒、58°C・60 秒、72°C・60 秒を 1 サイクルとして 30 サイクル反応させ、最後に 72°C で 5 分間反応させた。ヘモリジン遺伝子の検出においては、2003 年にアユから分離された *V. anguillarum* PH-0301 株を対照として用いた。PCR 産物は MiniElute PCR purification kit (Quiagen) で精製し、BigDye terminator cycle sequencing kit v.1.1 (Applied Biosystems) および 310 genetic analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、DDBJ の BLAST を利用してデータベースと比較した。

### 感染実験

PH-0604 株を用いた感染実験に、水産海洋技術センターで飼育していた平均体重 14.8 g のアユ（累代系）を供した。これらのアユは、紫外線処理脱塩素水道水を用いた循環濾過で飼育され、健康状態は良好であった。PH-0604 株はヘミンを 25  $\mu\text{g/mL}$  含む HIA (H-HIA) を用いて、18°C で 4 日間培養し、滅菌生理食塩水に懸濁した。アユは FA-100 (大日本住友製薬) で麻酔し、腹鰭基部後方から腹腔内に菌液を  $2.7 \times 10^6$ ,  $2.7 \times 10^4$  および  $2.7 \times 10^2$  CFU/fish となるように、注射器で 0.1 mL ずつ接種した。対照区のアユには滅菌生理食塩水のみを同様に 0.1 mL 接種した。各区のアユはそれぞれ 25 尾用いた。接種したアユは、水温 18°C から 19°C の紫外線処理脱塩素水道水を用いて流水飼育した。実験期間中に死亡したアユの症状を観察するとともに、脳および腎臓から H-HIA で細菌分離を行った。LD<sub>50</sub> はプロビット法によって算出した。死亡率を求める実験とは別に、PH-0604 株を  $2.7 \times 10^4$  CFU

接種したアユを用いて、瀕死魚の脳、脾臓、肝臓および腎臓の生菌数を測定した。瀕死魚から無菌的に採取した各臓器には9倍量の滅菌生理食塩水を加えて磨碎し、H-HIAを用いて18°Cで7日間培養して生菌数を測定した。

#### 病理組織学的検討

自然発病魚および人為感染魚2尾ずつを用いて、病理組織学的検討を行った。脳、眼球、心臓、脾臓、肝臓および鰓はDavidson液<sup>17</sup>で固定してから、常法に従いパラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオシン(H&E)染色およびギムザ染色を施し観察した。

### 結果

#### 病気の発生状況および細菌分離

病気発生から2~3週間における死亡率は、養殖場では約20%、水産海洋技術センター屋外水槽では約80%であった。病気発生時の水温は15.5°Cから19.0°Cであった。瀕死魚の大半には、眼球突出、頭部の赤変および体の屈曲が顕著に認められた(Fig. 4-1)。SBAを用いて18°Cで4日間培養すると腎臓および脳から純培養状に細菌が分離され、脳から分離された細菌のコロニー数が腎臓よりも多かった。TSA、HIAおよびBHIAでは細菌は分離されなかった。また、SBAを用いて18°Cで10日間以上培養するとβ溶血が観察された。一方、腎臓および脳からFHM細胞を用いてウイルス分離を試みたところ、18°Cで7日間培養しても細胞変性効果(CPE)は確認されなかった。



Fig. 4-1. A naturally affected ayu showing exophthalmous, reddening of the head and curvature of the body.

<sup>17</sup> 95%エタノール 33 mL, ホルマリン 22 mL, 氷酢酸 11.5 mL, 蒸留水 33.5 mL



### ヘミンの添加効果

ヘミン無添加および 1.25  $\mu\text{g/mL}$  添加 HIA では細菌の増殖は確認されなかった。ヘミンを 25  $\mu\text{g/mL}$  以上添加すると細菌の増殖が良好となり、SBA に匹敵するコロニー数が得られた (Table 4-1)。

Table 4-1. Effect of hemin on the viable cell count of the isolate PH-0604

Medium	Hemin ( $\mu\text{g/mL}$ )	Log <sub>10</sub> CFU/mg in wet weight
	0	0
	1.25	0
Heart infusion agar (HIA)	5	8.1
	25	8.5
	50	8.5
	100	8.6
	200	8.5
Sheep blood agar (SBA)	-	8.8

### 細菌学的検討

供試した 6 株はいずれも同じ性状を示し、グラム陰性通性嫌気性短桿菌で運動性を有し、チトクロム・オキシダーゼおよびカタラーゼ陽性であり Vibriostatic agent O/129 (150  $\mu\text{g}$ ) に感受性を有した (Table 4-2)。また、透過型電子顕微鏡により局在性多べん毛が確認された (Fig. 4-2)。これらの性状から、本菌は *Vibrio* 属細菌に分類されたが、*V. anguillarum* および *V. ordalii* の性状とは異なった (Table 4-2)。一方、4 種類の抗 *V. anguillarum* 血清を用いたスライド凝集反応は全て陰性となった。PH-0604 株を用いた増殖温度試験では、13.5°C から 26.1°C で増殖し、22°C から 23°C で最も良好に増殖した (Fig. 4-3)。

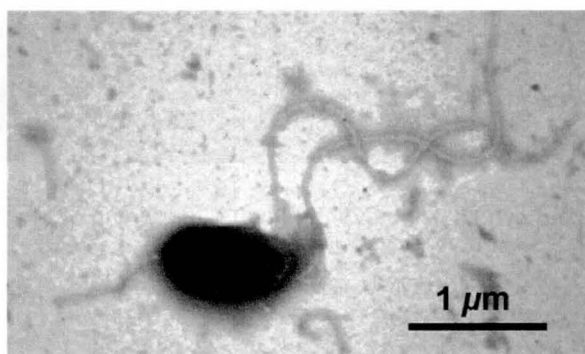


Fig. 4-2. Lophotrichous flagellation of the isolate PH-0604 from a diseased ayu.

Table 4-2. Morphological, physiological and biochemical characteristics of the present bacterium, *Vibrio anguillarum*, and *V. ordalii*

Characteristic	Present isolates (6 strains)	<i>V. anguillarum</i> * <sup>1</sup>	<i>V. ordalii</i> * <sup>2</sup>
Gram stain	—	—	—
Motility	+	+	+
Flagella	Lophotrichous	Monotrichous	Monotrichous
Form	Short rod	Short rod	Short rod
Catalase	+	+	+
Cytochrome oxidase	+	+	+
OF test	F	F	F
O/129 sensitivity	+	+	+
Indole production	—	+	—
H <sub>2</sub> S production	—	—	—
MR test	—	—	—
VP test	+	+	—
Nitrate reduction	—	+	+
ONPG test	—	nd	nd
Citrate (Simmon's)	—	+	—
Arginine decomposition	—	+	—
Lysine decarboxylation	—	—	—
Ornithine decarboxylation	—	—	—
Growth in the presence of			
NaCl 0%	—	—	—
NaCl 0.5%	+	+	+
NaCl 5%	+	+	+
NaCl 7%	—	—	—
Acid production from			
Glucose	+	+	+
Sucrose	—	+	+
Mannose	—	+	nd
Arabinose	—	—	—
Fructose	—	+	+
Galactose	—	+	—
Cellobiose	—	+	+
Mannitol	—	+	—
Starch	—	+	—
Maltose	—	+	+
Lactose	—	—	—
Dulcitol	—	—	—

\*<sup>1</sup>Muroga (1975), \*<sup>2</sup>Muroga *et al.* (1986), nd: not determined.

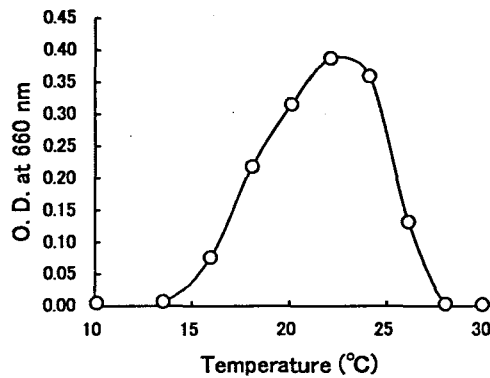


Fig. 4-3. Effect of temperature on the growth of the isolate PH-0604. The bacterium was cultured in hemin-containing (25 µg/mL) HIA broth by shaking at 60 rpm for 48 h.

#### 遺伝学的検討

PH-0604 株と PH-0608 株の 16S rDNA (1446 bp) および ITS 非コード領域 (261 bp) の塩基配列は完全に一致した。16S rDNA の塩基配列を他の真正細菌の 16S rDNA と比較した結果, *Vibrio* 属細菌と高い相同性を示した (Table 4-3)。特に *V. ordalii* とは 99.7%, *V. anguillarum* とは 98.6%と高い相同性を示した。ITS 非コード領域の塩基配列をもまた *V. anguillarum* とは 98.8%と高い相同性を示したが, *V. ordalii* とは 66.9%とその相同性は低かった (Table 4-3)。決定した塩基配列は, DDBJ に Accession No. AB367436 および AB365353 として登録した。

ヘモリジン遺伝子については, 対照とした *V. anguillarum* PH-0301 株では予想される PCR 産物が 5 種類全てで得られたが, 分離菌では *vah1* および *vah4* において PCR 産物が得られなかった (Fig. 4-4)。また, *vah2* では PH-0301 株と同じ位置にバンドが認められたが, *vah3* および *vah5* では PH-0301 株とは異なる泳動位置にバンドが観察された (Fig. 4-4)。

Table 4-3. Sequence similarities of 16S rDNA and the 16S and 23S intergenic transcribed spacers (ITS non-coding region) among *Vibrio* species

Bacteria	16S rDNA		ITS non-coding region	
	Similarity (%)	Accession No.*	Similarity (%)	Accession No.
<i>V. ordalii</i>	99.7	AY530930	66.9	AB255727
<i>V. anguillarum</i>	98.6	AM235737	98.8	AY227665
<i>V. diazotrophicus</i>	97.2	X74701	76.4	AF413004
<i>V. vulnificus</i>	97.2	X76334	87.8	DQ854745
<i>V. aestuarianus</i>	96.1	AJ845015	91.9	AF412993
<i>V. alginolyticus</i>	92.4	AF513447	74.8	AB255708

\* Accession No. in DDBJ.

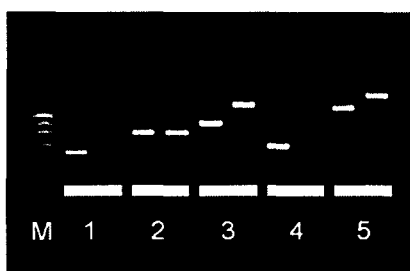


Fig. 4-4. Detection of hemolysin genes (*vah1*, *vah2*, *vah3*, *vah4* and *vah5*) by PCR. M: makers ( $\phi$  X174 *Hae*III digest), 1: *vah1*, 2: *vah2*, 3: *vah3*, 4: *vah4*, 5: *vah5*, left sides: *Vibrio anguillarum* PH-0301, right sides: the isolate PH-0604.

### 感染実験

感染実験における死亡状況および死亡率を Fig. 4-5 に示した。実験終了時の 27 日後には、 $2.7 \times 10^6$  CFU、 $2.7 \times 10^4$  CFU および  $2.7 \times 10^2$  CFU 接種したアユの死亡率はそれぞれ 100%、80% および 32% となった。これらの結果から PH-0604 株のアユに対する  $LD_{50}$  は、 $1.4 \times 10^3$  CFU/fish と計算された。大半の死亡魚が眼球突出および頭部の赤変症状を示し、H-HIA により腎臓や脳から接種菌が再分離された。

$2.7 \times 10^4$  CFU/fish を接種してから 16 日後および 20 日後に瀕死状態となったアユを各 1 尾ずつ採取した。それらの各臓器中の生菌数を Fig. 4-6 に示した。脳における細菌数は約  $10^7$  CFU/g に達し他臓器と比較して極端に多かった。

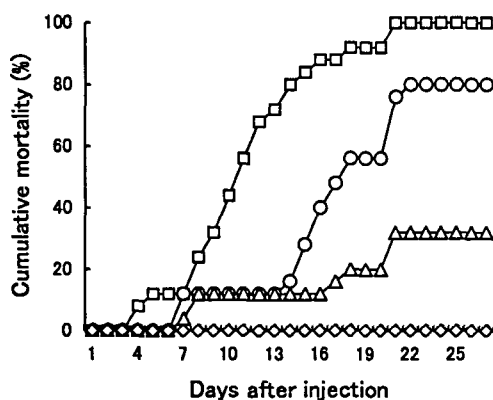


Fig. 4-5. Pathogenicity of the isolate PH-0604 in ayu. Fish were intraperitoneally injected with the isolate at doses of  $2.7 \times 10^6$  (□),  $2.7 \times 10^4$  (○) and  $2.7 \times 10^2$  (△) CFU/fish, or with saline (◇) as a control. Fish: 14.8 g (each n=25). Water temperature: 18-19°C.

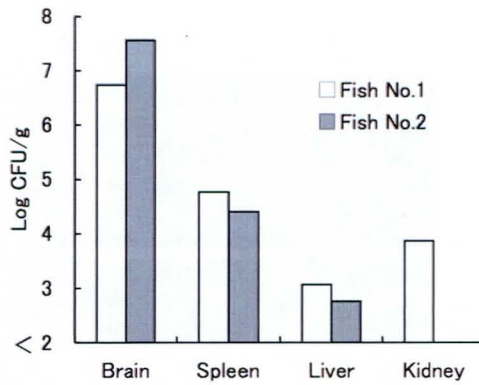


Fig. 4-6. Tissue distribution of the isolate PH-0604 in experimentally infected ayu. Fish (14.8 g) were intraperitoneally injected at a dose of  $2.7 \times 10^4$  CFU/fish and two fish were subjected for the bacterial cell count at the moribund stage.

#### 病理組織学的検討

自然感染魚および人為感染魚の脳には広範囲に壊死像が認められた。しかし、細菌の増殖は顕著ではなかった (Fig. 4-7)。同様の壊死像は眼球にも認められたが、脾臓にヘモジデリンの沈着がわずかに認められたこと以外には肝臓、心臓および鰓において病変は観察されなかった。

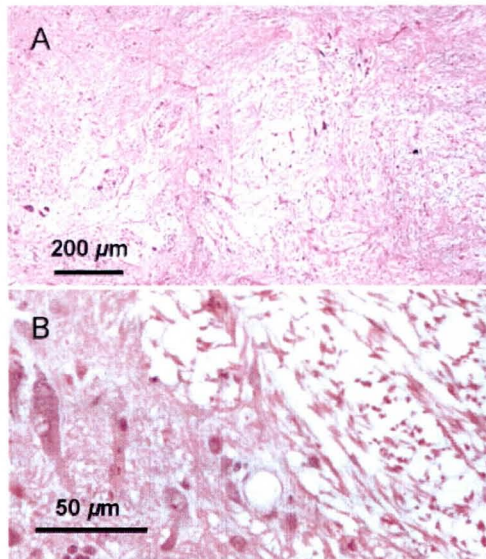


Fig. 4-7. Extended necrotic lesion in the brain of experimentally affected ayu at the moribund stage (16 days post-injection). A: low magnification, B: high magnification; H & E stain.

## 考察

本研究では広島県内で発生した養殖アユの大量死の原因について検討した。アユの脳および腎臓から、SBA でグラム陰性細菌が純培養状に分離されたが、SBA 以外の培地では細菌が分離されなかったことから、血液寒天培地中に存在する増殖支持因子の一つと考えられるヘミンについてまずその培地への添加効果を調べた。その結果、HIA にヘミンを 25  $\mu$ g/mL 以上添加することで、SBA と同等の増殖支持性が得られることが明らかになった (Table 4-1)。このことから、以後の全ての実験にはヘミンを添加した培地を用いた。これまで、魚病細菌においては非定型 *Aeromonas salmonicida* がヘミンを要求することが明らかにされているが (Ishiguro *et al.*, 1986; Nakai *et al.*, 1989), *Vibrio* 属細菌ではそのような報告例はない。

アユから分離された細菌は、形態学的特徴や生化学的性状から *Vibrio* 属細菌に分類されたが、その性状からは既知の *Vibrio* 属細菌のどれにも分類されなかった。魚類病原性 *V. anguillarum* および *V. ordalii* と比較すると、本分離菌は局在多べん毛であること、インドール非産生、硝酸塩非還元、グルコース以外の糖利用能がない点においてそれらとは一致しない (Table 4-2)。一方、遺伝学的性状の点では、16S rDNA の塩基配列は *V. ordalii* および *V. anguillarum* と高い相同性を有した。しかしながら、16S rDNA の塩基配列のみで *Vibrio* 属細菌の種同定を行うことは困難であることから (Chun *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2005), 魚類病原性 *Vibrio* 属細菌および *Photobacterium* 属細菌の同定に用いられた ITS 非コード領域 (Matsuyama *et al.*, 2006) の塩基配列について比較した。その結果、本菌の ITS 非コード領域の塩基配列は *V. ordalii* と相同性は低かったが、*V. anguillarum* とは高い相同性を示した (Table 4-3)。また、*V. anguillarum* の病原因子の一つとして考えられているヘモリジン遺伝子の検出を PCR 法により試みたが、5 種類のうち 3 種類しか陽性反応を示さず、その内 2 種類は予想される産物長と異なった。これらの結果から、アユから分離された細菌は *V. anguillarum* と遺伝的に近い関係にあるが、その表現型は大きく異なることから、種同定を行うためには DNA-DNA 相同性を含めさらに詳細な検討を行う必要がある。

病原性を確認するために行った感染実験の結果、本菌のアユに対する強い病原性が示された。人為感染魚には、自然感染魚と同様に眼球突出および頭部の赤変が認められ、脳からは接種菌が再分離された。従って、本菌はアユの大量死の原因菌であることが認められた。また、脳における菌数が他臓器と比較して多く、脳における広範囲な壊死像も確認されたことから、本菌は脳を主要標的臓器としているものと考えられた (Fig. 4-6, 4-7)。これらの病理的な特徴は、体表の出血を特徴とする *V. anguillarum* 感染症 (Muroga and Egusa, 1988) および体表の膨隆を特徴とする *V. ordalii* 感染症 (室賀ら, 1986) とは明らかに異なった。

今回のアユの大量死は 2006 年 5 月から 6 月にかけて県内の 2 施設において突如発生した。これらのアユは、社団法人広島県栽培漁業協会によって 2 月初旬から水産海洋技術センター地先海面の小割り生簀で飼育されており、その後 4 月下旬に県内の養殖場に出荷され、

残りの一部が水産海洋技術センター屋外飼育水槽で海水を用いて継続飼育されていた。海面生簀から取り上げられ輸送した約15日後から死亡が見られるようになった。大量死が発生する前に検査を行わなかったことから証拠はないものの、海面飼育時にアユが本菌に感染していた可能性が考えられる。その後、2007年、2008年と本菌によるアユの大量死は少なくとも広島県下では確認されていないが、アユの新しい感染症として今後注意していく必要がある。

## 第V章 河川のアユに発生した *Edwardsiella ictaluri* 感染症

魚類の増養殖時に発生して多大な被害をもたらす細菌病として、*Edwardsiella tarda* および *E. ictaluri* 感染症がある。*E. tarda* は、世界各地において養殖されている淡水魚および海水魚のエドワジエラ症の原因菌であり (Plumb, 1999; Muroga, 2001), 本菌および本菌感染症は日本での養殖ウナギ *Anguilla japonica* で最初に報告された (Wakabayashi and Egusa, 1973)。その後、種々の養殖魚でエドワジエラ症の発生が報告され、日本では時にヒラメ *Paralichthys olivaceus* およびマダイ *Pagrus major* 養殖においては被害の大きさから深刻な問題となっている (楠田ら, 1977; 安永ら, 1982; 中津川, 1983)。

一方、*E. ictaluri* (Hawke et al., 1981) は養殖ナマズの腸内細菌性敗血症 (Enteric septicemia of catfish: ESC) の原因菌として知られ、この疾病はアメリカで養殖されているアメリカナマズ *Ictalurus punctatus* において最も重要な疾病の一つとなっている (Plumb, 1999)。これまで、*E. ictaluri* はタイ (Kasornchandra et al., 1987), ベトナム (Crumlish et al., 2002) およびインドネシア (Yuasa et al., 2003) の養殖ナマズからも分離されているが、日本における分離例は報告されていない。

2007年8月から10月にかけて、東京都、山口県および広島県の河川において発見された病的状態のアユから、同一種と考えられるグラム陰性細菌が分離された。本研究では、3か所のアユから分離された4株について分類学的検討を行うとともに、広島県のアユから分離された菌株のアユに対する病原性を調べた。

### 材料および方法

#### 病魚からの細菌分離および供試菌

2007年10月初旬に、江の川水系で刺網により捕獲された病的状態のアユから細菌分離を行った。アユの外観および内臓の観察を行った後、腎臓のスタンプ標本をメチレンブルーで染色し細菌の有無を観察した。また、トリプトソーヤ寒天培地 (TSA, 日水製薬) を用いて腎臓から細菌分離を試みた。菌の培養は20℃で3日間行った。なお、分離菌の分類学検討では、山口県および東京都で同様に河川のアユから分離された3株の細菌も供試した。使用した菌株名および由来を Table 5-1 に示した。

Table 5-1. Four ayu strains used in this study

Strain	Isolation		
	Organ	Location (prefecture)	Date
FPC1091	Kidney	Yamaguchi	Sep. 12, 2007
FPC1092	Kidney	Tokyo	Aug. 14, 2007
FPC1093	Kidney	Tokyo	Aug. 14, 2007
PH-0744	Kidney	Hiroshima	Oct. 5, 2007

All strains were isolated from diseased ayu, which were caught in rivers.



## 細菌学的検討

分離された細菌の形態観察は、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡 (S-4300, 日立) を用いて行った。また、生化学的性状および生理学的性状は常法に従って検討し、培養温度は 25°C を基本として行った。運動性については、ウェットマウント法による直接観察法および SIM 培地 (日水製薬) を用いた間接法で調べた。至適増殖温度試験では、L 型試験管を使用しハートインフュージョン液体培地 (HI, 栄研化学) に菌を接種し、10°C から 37°C で振盪培養 (60 rpm) した。一部の試験では、*E. ictaluri* JCM1680 (=ATCC33202), ヒラメから分離された *E. tarda* FK1051 (運動性株) およびマダイから分離された *E. tarda* E01-14 (非運動性株) (Okuda *et al.*, 2007) を対照として用いた。

## 遺伝学的検討

遺伝学的検討には、16S rDNA および *E. tarda* の *typel* 線毛遺伝子 (*etfA*, *etfB*, *etfC* および *etfD*) を用いた (Sakai *et al.*, 2007)。300  $\mu$ L の TE<sup>18</sup> に 1 コロニーを懸濁し、5 分間煮沸してから遠心分離 (10,000 $\times$ g, 10 分間, 4°C) により得た上清を抽出 DNA とした。16S rDNA は、ユニバーサルプライマーである 20F および 1500R (Weisburg *et al.*, 1991) を用いて増幅した。最初に 94°C で 5 分間反応させた後、94°C $\cdot$ 30 秒, 51°C $\cdot$ 60 秒, 72°C $\cdot$ 60 秒を 1 サイクルとして 30 サイクル反応させ、最後に 72°C で 5 分間反応させた (PC880, アステック)。 *typel* 線毛遺伝子は、プライマーセット A (*etfA*), B (*etfB*), C (*etfC*) および D (*etfD*) (Sakai *et al.*, 2007) を用いて増幅した。最初に 94°C で 5 分間反応させた後、94°C $\cdot$ 20 秒, 55°C $\cdot$ 20 秒, 72°C $\cdot$ 60 秒を 1 サイクルとして 30 サイクル反応させ、最後に 72°C で 5 分間反応させた。16S rDNA および *etfA* については、PCR 産物を MiniElute PCR purification kit (Quiagen) で精製し、BigDye terminator cycle sequencing kit v.1.1 (Applied Biosystems) および 310 genetic analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、DDBJ の BLAST を利用してデータベースとの比較を行った。

## 感染実験

感染実験には、水産海洋技術センターで飼育されていた海産交配系アユ (平均体重: 17.8 g) および累代系アユ (22.7 g) を用いた。これらのアユは紫外線処理脱塩素水道水を用いた循環濾過で飼育され、健康状態は良好であった。TSA 培地を用いて 20°C で 48 時間培養した PH-0744 株を、生理食塩水に懸濁させたものを接種菌液とした。アユを FA-100 (大日本住友製薬) で麻酔し、腹鰭基部後方から腹腔内に菌液を  $6.5 \times 10^6$ ,  $6.5 \times 10^4$  および  $6.5 \times 10^2$  CFU/fish となるように、注射器で 0.1 mL ずつ接種した。対照区のアユには生理食塩水のみを同様に 0.1 mL ずつ接種した。各区のアユはそれぞれ 20–21 尾を用いた。接種したアユは水温 16.8–17.8°C の紫外線処理脱塩素水道水を用いて 15 日間流水飼育した。実験期間中に死亡したアユは症状を観察するとともに、腎臓から TSA 培地で細菌分離を行った。

<sup>18</sup> 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH8.0

また、試験終了時の15日後に生存していたアユについても腎臓からの細菌分離を行った。

## 結果

### 病魚の観察および細菌分離

江の川水系で捕獲された病的状態のアユは標準体長190 mm、体重95 gの雄アユ1尾であり、体表には点状に隆起した患部が見られ (Fig. 5-1A), 腹腔内には血液の混ざった腹水が貯留し、精巣には広範囲にわたる出血斑が確認された (Fig. 5-1B)。また、腎臓のスタンプ標本には短桿菌が観察され (Fig. 5-2), TSA 培地により純培養状に細菌が分離された。

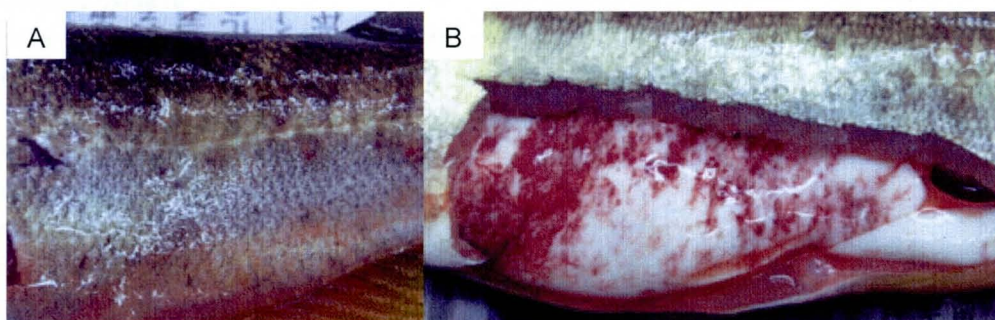


Fig. 5-1. Clinical signs of diseased wild ayu caught in Gonokawa river. (A) Protruded lesion on the body surface, (B) Redding of the gonad.

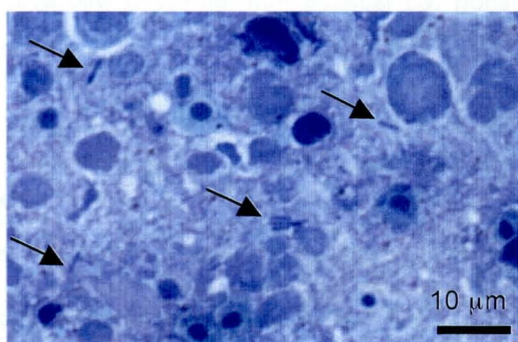


Fig. 5-2. Smear of the kidney of affected wild ayu stained by methylene blue. Arrows indicate short rods.

### 細菌学的検討

広島県および他県で分離されたアユ由来4株の細菌はいずれもグラム陰性短桿菌 (Fig. 5-3A) で、通性嫌気性、カタラーゼ陽性、チトクロム・オキシダーゼ陰性であり、その他の生理学および生化学的性状も完全に一致した。得られた結果は、参照とした *E. ictaluri* および *E. tarda* の性状とともに Table 5-2 に示した。4株の至適増殖温度試験では、いずれ

の株も 10°C から 34.2°C で増殖し、30°C で最もよく増殖したが、37°C では全く増殖しなかった (Fig. 5-4A)。一方、対照とした *E. tarda* FK1051 株は 37°C でも増殖した (Fig. 5-4B)。後述のように、アユ分離株の分類学的位置の決定において重要となると考えられる運動性、硫化水素産生およびインドール産生について、試験の結果を Fig. 5-5 に示した。ウェットマウント法による観察では 4 株に運動性は認められず、また、走査電子顕微鏡による観察でもべん毛は確認されなかった (Fig. 5-3B)。SIM 培地を用いた運動性試験では、非運動性の *E. tarda* E01-14 と比較すると、アユ由来 4 株と *E. ictaluri* JCM1680 は接種した部分からわずかに拡散する像が認められた (Fig. 5-5A)。また、25°C で 48 時間培養するとアユ由来 4 株においては、非運動性の *E. tarda* E01-14 と同様に接種部分の黒変が認められた。しかし、*E. ictaluri* JCM1680 においてはそのような培地の黒変は観察されなかった (Fig. 5-5A, B)。また、アユ由来 4 株と *E. ictaluri* JCM1680 においてはインドールの産生は認められなかった (Fig. 5-5B, C)。

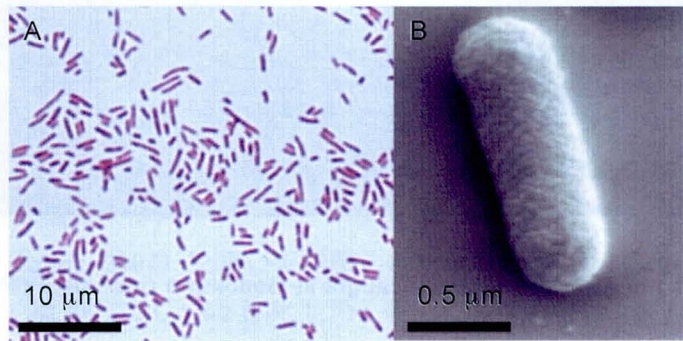


Fig. 5-3. Gram-negative short rod isolated from diseased wild ayu. (A) Light microscopy (Gram staining), (B) Scanning electron microscopy.

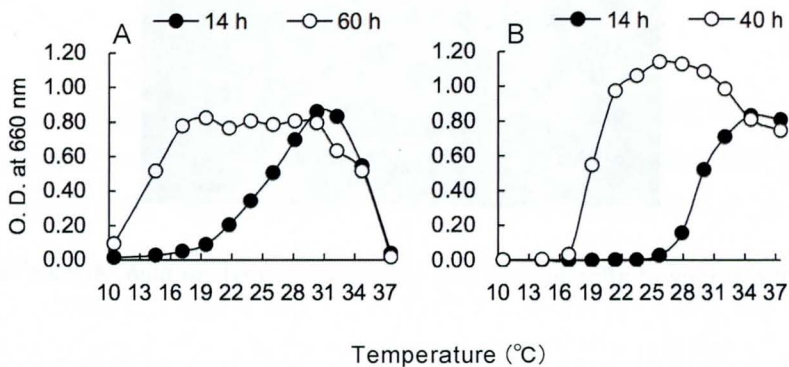


Fig. 5-4. Effect of temperature on the growth of the present isolate PH-0744 (A) and *Edwardsiella tarda* FK1051 (B). Bacteria were cultured in heart infusion broth by shaking at 60 rpm, and the growth was shown as optical density (O. D.) at 660 nm.

Table 5-2. Morphological, physiological and biochemical characteristics of the present ayu isolates, *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda*

Characteristic	Present isolates	<i>E. ictaluri</i> * <sup>1</sup>	<i>E. tarda</i> * <sup>1</sup>
Gram stain	—	—	—
Form	short rod	short rod	short rod
Motility at 25°C	+* <sup>2</sup>	+	+
Growth at 37°C	—	±	+
NaCl tolerance			
0%	+	+	+
1.5%	+	+	+
4.0%	—	—	+
Cytochrome oxidase	—	—	—
Catalase	+	+	+
OF test	F	F	F
H <sub>2</sub> S	+* <sup>3</sup>	—	+
Indole	—	—	+
Methyl red test	+	—	+
Voges-Proskauer test	—	—	—
Citrate	—* <sup>4</sup>	—* <sup>5</sup>	—* <sup>5</sup>
Arginin dihydrolase	—	—	—
Lysine decarboxylase	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	+
Gas from glucose	+	+	+
Acid production from			
D-mannose	+	+	+
Maltose	+	+	+
D-mannitol	—	—	—
Sucrose	—	—	—
Trehalose	—	—	—
L-arabinose	—	—	—

\*<sup>1</sup> Plumb (1999) partly modified.

\*<sup>2</sup> Weak motility was observed in SIM medium at 25°C, but not by the wet mount method under light microscopy.

\*<sup>3</sup> Weak H<sub>2</sub>S production was observed in SIM medium at 25°C.

\*<sup>4</sup> Simmon's.

\*<sup>5</sup> Christensen's.



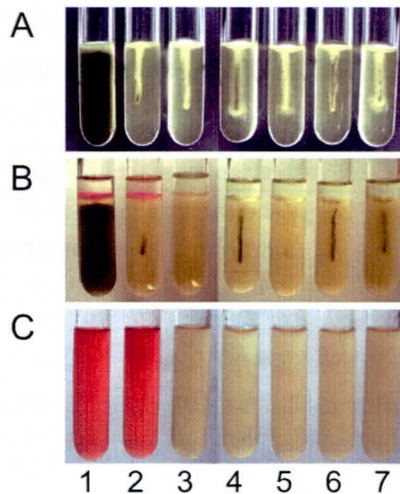


Fig. 5-5. Motility, H<sub>2</sub>S and indole tests with SIM medium. Bacteria were cultured at 25°C for 48 h. (A) for motility, (B) for H<sub>2</sub>S and indole production (Ehrlich-Böhne reagent-I), (C) for indole production 10 min after addition of Ehrlich-Böhne reagent-II. 1: *E. tarda* FK1051, 2: *E. tarda* E01-14, 3: *E. ictaluri* JCM1680, 4-7: the present ayu isolates, PH-0744, FPC1091, FPC1092, FPC1093.

#### 遺伝学的検討

アユ分離株から4種の type 1 線毛遺伝子を PCR 法によって検出した結果、対照とした *E. tarda* FK1051 と同じ大きさのバンドがいずれも得られたが、*etfA*、*etfB* および *etfC* では異なった大きさのバンドも同時に確認された (Fig. 5-6)。供試した4株の 16S rDNA (1426 bp) および *etfA* (372 bp) の塩基配列は互いに完全に一致した。本菌の塩基配列と *Edwardsiella* 属細菌との相同性を Table 5-3 に示した。16S rDNA の塩基配列は *E. ictaluri* と完全に一致し、*E. tarda* とも 99.7% の相同性であった。また、*etfA* の塩基配列は *E. ictaluri* と 99.7%、*E. tarda* と 92.5% の相同性であった。決定した塩基配列は、DDBJ に Accession No. AB453281 および AB453282 として登録した。

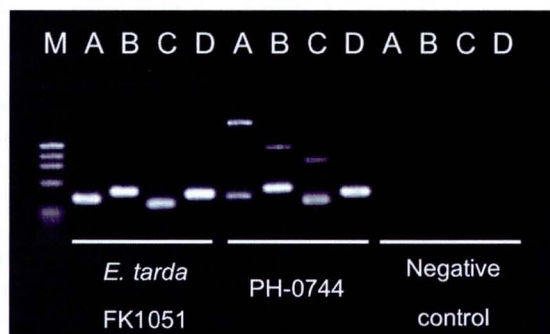


Fig. 5-6. Agarose gel electrophoresis of PCR products from nucleic acids extracted from *E. tarda* FK1051 and the isolate PH-0744. M: markers ( $\phi$ X174 *Hae*III digest), A: *etfA*, B: *etfB*, C: *etfC*, D: *etfD*.

Table 5-3. Similarities in the partial sequences of 16S rDNA and *effA* among the present ayu isolates, *E. ictaluri* and *E. tarda*.

Gene (target size)	Bacteria	Percent similarity to the present isolates (FPC1091, FPC1092, FPC1093, PH-0744)
16S rDNA (1426 bp)	<i>E. ictaluri</i> (AB050826*)	100
	<i>E. tarda</i> (AB050832)	99.7
<i>effA</i> (372 bp)	<i>E. ictaluri</i> (AY626368)	99.7
	<i>E. tarda</i> (AF491964)	92.5

\* Accession No. in DDBJ.

### 感染実験

海産交配系アユおよび累代系アユの死亡状況および累積死亡率を Fig. 5-7 に示した。海産交配系アユにおいて、 $6.5 \times 10^6$ 、 $6.5 \times 10^4$  および  $6.5 \times 10^2$  CFU/fish を接種した区の死亡率は、それぞれ 100、100 および 15% となった (Fig. 5-7A)。一方、累代系アユにおいて  $6.5 \times 10^6$ 、 $6.5 \times 10^4$  および  $6.5 \times 10^2$  CFU/fish を接種した区の死亡率は、それぞれ 100、81 および 15% となった (Fig. 5-7B)。死亡したアユ 33 尾全てに腹水貯留が、12 尾 (36.4%) に眼球突出が認められた。また、死亡したアユの腎臓から接種菌が再分離された。累代系アユにおける  $LD_{50}$  はプロビット法によって  $1.3 \times 10^4$  CFU/fish と計算されたが、海産交配系アユにおいては 2 区の死亡率が 100% となったことから計算できなかった。いずれのアユにおいても対照区に死亡は確認されなかった。一方、実験終了時の生残魚の腎臓から細菌分離を行った結果、海産交配系アユの  $6.5 \times 10^2$  CFU/fish を接種した区の 41.2% から、累代系アユの  $6.5 \times 10^4$  および  $6.5 \times 10^2$  CFU/fish を接種した区の 100% および 57.9% から接種菌が再分離された。

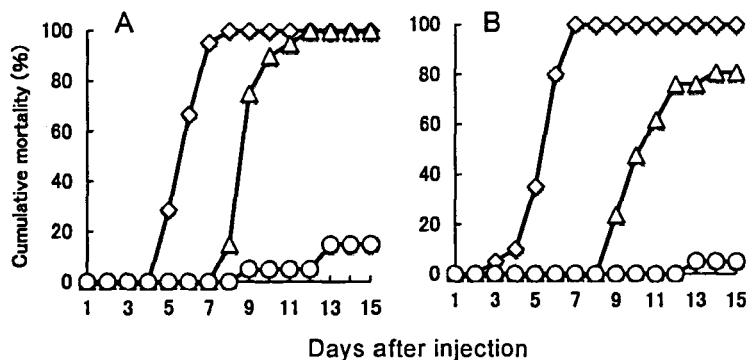


Fig. 5-7. Pathogenicity of the isolate PH-0744 in ayu, (A) amphidromous stock and (B) domesticated stock. Fish (each n=20 or 21) were intraperitoneally injected with the isolate at doses of  $6.5 \times 10^6$  (◇),  $6.5 \times 10^4$  (△) and  $6.5 \times 10^2$  (○) CFU/fish. Water temperature: 16.8-17.8°C.

## 考察

本研究では、広島県内の江の川水系で捕獲された病的状態のアユの病因を明らかにするために、アユから分離された細菌の分類学的検討を行うとともに、アユに対する病原性を調べた。また、同時期に東京都および山口県で病的状態のアユから同様に分離された細菌についても分類学的検討を行った。

アユから分離された4株は全て同じ性状を示し、グラム陰性短桿菌、通性嫌気性、カタラーゼ陽性、チトクロム・オキシダーゼ陰性であることから *Edwardsiella* 属に分類された。*Edwardsiella* 属の魚病細菌として知られている *E. tarda* および *E. ictaluri* は、インドール産生能および硫化水素産生能で大きく識別され、*E. tarda* はそれらを両方とも産生するが、*E. ictaluri* は両方とも産生しない (Plumb, 1999)。また、増殖温度も異なり *E. tarda* は 37°C で良好に増殖するが、*E. ictaluri* は 37°C ではわずかに増殖するか、または全く増殖しない (Plumb, 1999)。アユから分離された細菌は、インドール非産生であり 37°C で増殖しないことから *E. tarda* とは明らかに異なり、硫化水素を産生することと、MR 陽性であることを除けば *E. ictaluri* と一致した (Table 5-2)。Waltman *et al.* (1986) は、SIM 培地を用いた *E. ictaluri* の培養試験では 20°C、30°C および 37°C のいずれにおいても硫化水素は産生しないが、より高感度の酢酸鉛紙を用いた試験ではいくつかの株で硫化水素が検出されたと報告している。また、MR 試験についても陰性という報告 (Plumb, 1999) と、陽性という報告 (Waltman *et al.*, 1986) がある。以上のように *E. ictaluri* の硫化水素産生性と MR 試験について相反する報告があることから、株間の性状に差がある可能性が考えられる。従って、硫化水素産生性と MR 試験については標準株を含めてさらに詳細に検討する必要がある。いずれにせよ、アユから分離した細菌はその表現型において *E. ictaluri* に類似していることが明らかになった。

次に、アユから分離された細菌について遺伝学的な検討を行った。最初に 16S rDNA の解析を行った結果、本菌の塩基配列は *E. ictaluri* と 100% 一致した (Table 5-3)。*E. ictaluri* および *E. tarda* の 16S rDNA の塩基配列においては、決定した 1426 bp の中でわずかに 4 bp しか変わらないことから、両者はかなり近縁の関係にあると考えられた。次に、病原性に関与すると考えられる *E. tarda* の *type1* 線毛遺伝子 (Sakai *et al.*, 2007) について検討した。まず、4 種類のプライマーを用いて、*etfA*、*etfB*、*etfC* および *etfD* の検出を試みた結果、*E. tarda* と同様のバンドが得られたが、Sakai *et al.* (2007) の報告とは異なるバンドも一部観察された。これは、使用したプライマーが、本菌の *type1* 線毛遺伝子の塩基配列と完全に一致していなかったことによると考えられた。4 種類の *type1* 線毛遺伝子の中から *etfA* について PCR 産物の塩基配列を決定した結果、*E. tarda* とは 92.5% とその相同性は低かったが、*E. ictaluri* とは 99.7% と高い相同性を示した (Table 5-3)。以上得られた表現型および遺伝学的性状から、本菌は *E. ictaluri* に同定された。なお、坂井博士 (独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所) は *dnaJ* 遺伝子を標的として本アユ由来株とその他の *Edwardsiella* 属細菌との系統関係を解析し、アユ由来株は *E. ictaluri* と同一のクラスターに分類される

ことを明らかにしている (Nagai *et al.*, 2008)。

広島県で分離された PH-0744 株のアユに対する病原性を、2 系統の人工生産アユを用いて検討し、本菌はアユに対して強い病原性を持つことが確かめられた (Fig. 5-7)。なお、これらの海産交配系アユは冷水病に対する感受性が低く、逆に累代系アユは冷水病に対する感受性が高いことが既に明らかにされている (第 II 章 第 4 節 第 1 項)。また、試験終了時の 15 日後に生残した多くのアユからも接種菌が再分離されることから、生残はしているもののアユ体内での完全な菌の排除は起こっておらず、保菌状態に移行する可能性を示唆している。Stanley *et al.* (1994) は、アメリカナマズに対する *E. ictaluri* の LD<sub>50</sub> を 10<sup>3</sup>–10<sup>5</sup> CFU/fish と報告している。PH-0744 株の累代系アユに対する LD<sub>50</sub> が 1.3×10<sup>4</sup> CFU/fish と算出され、これはアメリカナマズに対する病原性とほぼ一致している。本実験では、冷水病感受性に差のある 2 系統のアユを用いて感染実験を行ったが、2 系統のアユの本菌に対する感受性は同程度であった。*F. psychrophilum* の感受性の低い海産交配系アユが *V. anguillarum* には逆に感受性が高いこと (第 II 章 第 4 節 第 1 項) を考え合わせると、それぞれの病原因子に対して異なる宿主の防御因子が対応していることになる。従って、今後の冷水病に対する耐病性育種の研究にはこの点を考慮して進める必要がある。

本研究では、河川で採取された病的状態のアユから分離された細菌が *E. ictaluri* であることを明らかにし、アユに対する病原性も確認した。これまで、天然域で発生したアユの死亡原因としては、*V. cholerae* non-01 によるナグビブリオ病 (Muroga *et al.*, 1979) および冷水病 (Iida and Mizokami, 1996) などが知られ、冷水病に関しては現在においても各地の河川に蔓延し問題となっている。河川への冷水病の蔓延の原因としては、*F. psychrophilum* によって汚染したアユの各地の河川への放流にあることが示唆されている (原, 2007)。本研究で確認された *E. ictaluri* 感染症の発生原因については、東京都、山口県および広島県の河川で放流されたアユの由来はそれぞれ異なり、その他の放流魚についても共通点はなく、感染源を推察することはできなかった。今後、感染源を推定するためにも、外国での分離株とアユ分離株を詳細に比較する必要がある。

ESC は、アメリカや東南アジアなどの限られた地域でしか確認されておらず、また原因菌である *E. ictaluri* は他の温水魚の魚病細菌と比較して宿主域が狭い (Plumb, 1999)。これまで、*E. ictaluri* はナマズ類以外ではグリーンナイフフィッシュ *Eigemannia virescens* およびゼブラフィッシュ *Danio devario* などの観賞魚や (Plumb, 1999)、トルコの養殖ニジマス *Oncorhynchus mykiss* から分離されている (Keskin *et al.*, 2004)。また、実験感染ではティラピア *Sarotherodon aureus* およびマスノスケ *O. tshawytscha* も感受性を有する (Plumb and Sanchez, 1983; Baxa *et al.*, 1990)。以上のことから、本研究は新たな地域 (日本) における非養殖魚 (天然魚)・非ナマズ類 (アユ) からの *E. ictaluri* の初報告ということになる。

今後は、河川に生息するアユ以外の魚類、特にナマズ類への本菌の病原性を明らかにする必要がある。前述したように *E. ictaluri* は観賞魚から検出された例もあることから、輸入される観賞魚の汚染状況についても調査を行う必要がある。*E. ictaluri* は 2007 年に河川



のアユから初めて分離されたが、2008年8月に島根県の江の川、高津川<sup>19</sup>、山口県の錦川<sup>20</sup>、広島県の江の川<sup>21</sup>および鳥取県の日野川<sup>22</sup>で死亡したアユから *E. ictaluri* が分離されている。今のところ、これらの発生における共通点は全く不明である。今後は、各地の河川での冷水病の蔓延を阻止できなかった教訓を生かし、他河川や他地域への病気の拡散に注意を払う必要がある。

---

<sup>19</sup> 島根県水産課による報道発表，8月5日：江の川，8月6日：高津川

<sup>20</sup> 山口県水産振興課による報道発表，8月28日

<sup>21</sup> 中国新聞，8月13日

<sup>22</sup> 鳥取県水産課による報道発表，8月26日

## 第VI章 総合考察

本論文では、アユにおいて被害が深刻な冷水病に加えて、アユにおける発生を初めて確認した細菌性腎臓病（BKD）、新型ピブリオ病および *Edwardsiella ictaluri* 感染症を取り上げ、それらの原因菌の性状や病原性に関する研究結果を述べた。冷水病に関してはさらに、不活化ワクチンを用いた予防免疫および耐病性種苗に関する検討結果について述べた。

冷水病の原因菌である *Flavobacterium psychrophilum* は元々外国のサケ科魚類の病原菌として知られていたことや、北米から輸入したギンザケ卵が *F. psychrophilum* に汚染されていたことから (Izumi and Wakabayashi, 1997)、海外からの侵入が強く疑われてきた。また、アユにおいて冷水病が全国に蔓延した原因として、*F. psychrophilum* に汚染された琵琶湖産のアユ種苗の各地での放流が考えられている (原, 2007)。琵琶湖産アユの放流は冷水病発生以前から広く行われていたことから、冷水病がアユで初確認された 1987 年以前に *F. psychrophilum* が琵琶湖に侵入した可能性が高い。しかし、これまで明らかにされているように、サケ科魚類由来の *F. psychrophilum* とアユ由来の *F. psychrophilum* ではそれらの血清学的性状や遺伝学的性状が異なり (Wakabayashi *et al.*, 1994; Izumi and Wakabayashi, 1999; Izumi *et al.*, 2003; 吉浦ら, 2006)、本研究で調べた広島県内で分離した菌株でもアユとサケ科魚類では遺伝子型が異なった (第II章 第1節)。また、海外でサケ科魚類以外の魚類としてヨーロッパウナギ *Anguilla anguilla* およびコイ *Cyprinus carpio* 由来の *F. psychrophilum* の遺伝子型が調べられているが、それらはアユのものとは異なり (Chakroun *et al.*, 1997; Nicolas *et al.*, 2008)、現在のところアユと共通する遺伝子型の菌株は見つかっていない。さらに、補体抵抗性や病原性の点においてアユ分離株に強い宿主特異性が認められたことから (第II章 第5節)、アユに病原性を持つ *F. psychrophilum* が外国から侵入したとの確証はない。今後、外国においてアユ分離株と同じ血清型や遺伝子型を持つ菌株の分布調査が期待される。一方、国内においても、サケ科魚類由来の *F. psychrophilum* がアユに病原性を示すような変異をした可能性も含めて、アユ病原株の由来を検討する必要がある。

近年、様々な魚類の病原体が海外から侵入し国内で被害を与えている。最近の事例では、2003年にコイヘルペスウイルス (KHV) が海外から侵入し、養殖コイや天然コイに大きな被害を与えた (飯田, 2007)。一般的に宿主が新しい病原体に遭遇した場合、致死的结果になりやすい。コイの病原体として世界的に知られていた KHV はそれまで日本には存在せず、その KHV に日本在来のコイが 2003年に初めて接触したことで、わずか半年のうちに日本全土を席卷するという未曾有の流行が起こったと考えられている (飯田, 2007)。これに対し、本論文で述べた *F. psychrophilum*、*Renibacterium salmoninarum*、新型ピブリオ病原菌および *E. ictaluri* は、本来の宿主からアユという新しい宿主に遭遇したことで、致死的な病原菌になったと考えられる。本研究においてアユでの発生を初めて確認した BKD についても、その原因菌である *R. salmoninarum* はそもそもサケ科魚類の病原体とし

て知られていたものであり、これもまた北米から侵入した可能性が高い(室賀, 2007)。本研究では、アユBKDの感染源は同一養魚場で飼育されていたサケ科魚類のヤマメと推定された(第Ⅲ章)。新型ビブリオ病の原因菌は新種であることから起源は不明であるが、その遺伝学的性状がアユを含む淡水魚や海水魚の病原体として古くから知られている *Vibrio anguillarum* に類似していることから、アユという宿主の中で出現した *V. anguillarum* の変異体とも考えられる。一方、*E. ictaluri* については海外から侵入した可能性が高い。*E. ictaluri* は、米国、東南アジアおよびトルコで養殖魚(ナマズ類)から分離されているが、観賞魚からの分離例も報告されている(Plumb, 1999)。現在のところ我が国への感染経路は不明であるが、国内の異なった地域で分離された4株の生化学的・遺伝学的性状が全く同じであったことから、海外の複数地域から別々に侵入したとは考えにくい。詳細な疫学調査は今後の研究にゆだねられるが、海外からの輸入魚をふくめ感染源の特定が緊急の課題であり、全国の河川あるいは養殖アユへの感染の拡大、またナマズ在来種への感染には十分注意を払う必要がある。

本研究により、河川環境中でアユ病魚由来の *F. psychrophilum* が長期間病原性を維持し生存する可能性が示された(第Ⅱ章第2節)。これは、自然環境中の *F. psychrophilum* が感染源になり得ることを意味し、自然河川のアユ資源の多くを放流種苗に依存している現状を考えると、河川における冷水病に対しては放流種苗に積極的な対策を講じる必要がある。そこで、放流種苗の予防免疫および放流種苗としての冷水病耐病性系統に関する検討を行い(第Ⅱ章第3,4節)、自然感染に対するワクチンの有効性を実証するとともに耐病性系統の存在を明らかにした。他の都道府県と比較して天然遡上が少なく放流種苗への依存度が高い広島県内の河川では、種苗の予防免疫や耐病性種苗を用いることで冷水病の被害軽減が可能であると考えられる。毎年、広島県内の河川に放流される約600万尾のアユのうち、約400万尾の人工アユについては耐病性種苗を用い、約200万尾の琵琶湖産アユなどの種苗に対してはワクチンによる予防免疫を行うことで、冷水病の被害軽減につながることを期待される。これらの対策が養殖場においても有効であることは論を待たない。一方、天然遡上の割合が多く放流種苗の少ない河川ではこれらの対策の意義は低い。保菌している放流種苗が感染源(汚染源)となる可能性を考えると、種苗の保菌率を低減するとの観点では価値があろう。冷水病耐病性系統に関して海産交配系が冷水病に耐性を有することが明らかになったことから、海産アユに由来する天然アユの冷水病感受性は低い可能性があるが、一部の海産アユの冷水病感受性は高いことが示された(第Ⅱ章第4節)。従って、河川ごとに天然アユ集団の冷水病感受性は異なると考えられ、今後、詳細な調査が必要である。一方、自然河川におけるアユの冷水病の感染経路として、友釣りに用いられるオトリアユや釣具を介した感染も疑われている(原, 2007)。アユの放流種苗を対象とした保菌検査は広く行われているが、釣人や漁業者を対象とした啓発活動は未だ不十分と言える。冷水病のみならず新たに確認された *E. ictaluri* の河川における蔓延を防ぐためにも、放流アユの検査に加えて釣人や漁業者への啓発を強化していく必要がある。

冒頭で述べたように(Table 1-1)、これまでにアユにおいて種々の細菌病が報告されて

いる。これらの原因菌の大部分はアユ固有のものでなく、他の淡水魚と共通したものである。本研究においても、アユ以外の淡水魚からの感染が疑われるBKDおよび*E. ictaluri*感染症を新たに確認した。アユはサケ科魚類が生息する上流域から、コイ科魚類が生息する中下流域まで広く分布し、仔稚魚期は海でも生活している。このことから、海洋環境に由来する*Vibrio*属細菌から冷水性淡水魚に由来する*F. psychrophilum*や*R. salmoninarum*まで多くの病原菌に接する機会が多いものと考えられる。また、冷水病やBKDの感染実験では、アユの感受性はサケ科魚類よりも高いことが明らかになり（第Ⅱ章 第5節、第Ⅲ章）、ビブリオ病（*V. anguillarum*感染症）においてもウナギやサケ科魚類と比較して感受性が非常に高い（Muroga and Egusa, 1988）。このことが、他の魚とは異なってアユにおいては養殖場だけでなく自然環境である河川でも細菌病が流行し、しばしば大量死が発生する理由の一つになると考えられる。

アユ好中球のrespiratory burst活性はコイ、ニジマス、ウナギおよびワカサギ*Hypomesus nipponensis*と比較して非常に高いことが明らかにされている（Moritomo *et al.*, 2003）。寿命が一年のアユにおいては、獲得免疫よりも細菌感染に対して即時応答できる好中球などによる自然免疫に依存した生体防御能を強化することが生存戦略上有利なためではないかと考察されている（Moritomo *et al.*, 2003）。また、コイやニジマスと比較してアユの補体活性が高いことも、自然免疫に依存した生体防御能であることを示唆している（矢野ら, 1988）。しかしながら、冷水病においては、耐病性系統と非耐病性系統の補体殺菌能、食細胞のrespiratory burst活性および食食能に差がなかったことから、冷水病耐病性が自然免疫能に起因する可能性は示されなかった。一方、ホルマリン死菌を用いた免疫後の抗体価の比較により抗体価の高さが冷水病耐病性と一致し、冷水病耐病性が獲得免疫能に起因する可能性が示唆された（第Ⅱ章 第4節）。このことから、少なくとも冷水病に対しては、自然免疫よりも獲得免疫が生体防御上重要な役割を果たすのではないかと考えられる。従って、アユの自然免疫に対して抵抗性を持つ病原菌、すなわちアユ補体に抵抗性を示す*F. psychrophilum*にアユが感染した場合、病原菌が自然免疫を一旦突破すると、自然免疫に傾いたアユの生体防御では十分な抵抗ができず、致死的経過をたどるのではないかと考えられる。今後、アユと他の魚種における比較免疫学的な研究が進展すると、アユの細菌感染症の感受性が他魚種と高い理由が明らかになると考えられる。また、アユの生体防御能の特徴を利用した新規な感染症防除技術の開発も期待される。

## 引用文献

- 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.
- 新井 肇・藤田雅弘・鈴木究真・片桐孝之・久下敏宏 (2006) : オイカワとアカザから分離された *Flavobacterium psychrophilum* のアユに対する病原性. 水産増殖, **54**, 575-576.
- Arai, H., Y. Morita, S. Izumi, T. Katagiri and H. Kimura (2007): Molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis of *Flavobacterium psychrophilum* isolates derived from Japanese fish. *J. Fish Dis.*, **30**, 345-355.
- Balfry, S. K., L. J. Albright and T. P. T. Evelyn (1996): Horizontal transfer of *Renibacterium salmoninarum* among farmed salmonids via the fecal-oral route. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 63-69.
- Baxa, D. V., J. M. Groff, A. Wishkovsky and R. P. Hedrick (1990): Susceptibility of nonictalurid fishes to experimental infection with *Edwardsiella ictaluri*. *Dis. Aquat. Org.*, **8**, 113-117.
- Bernardet, J. F. and P. A. D. Grimont (1989): Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida and Masumura 1986. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 346-354.
- 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.
- Bernardet J. F., Y. Nakagawa and B. Holmes (2002): Proposed minimal standards for describing new taxa of the family *Flavobacteriaceae* and emended description of the family. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 1049-70.
- Boesen, H. T., K. Pedersen, J. L. Larsen, C. Koch and A. A. Ellis (1999): *Vibrio anguillarum* resistance to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum: role of o-antigen structure of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.*, **67**, 294-301.
- Borg, A. F. (1960): Studies on myxobacteria associated with diseases of salmonid fishes. *J. Wildlife Dis.*, **8**, 1-85.
- Brown, L. L., G. K. Iwama, T. P. T. Evelyn, W. S. Nelson and R. P. Levine (1994): Use of the polymerase chain reaction (PCR) to detect DNA from *Renibacterium salmoninarum* within individual salmon eggs. *Dis. Aquat. Org.*, **18**, 165-171.
- Brown, L. L., T. P. T. Evelyn, G. K. Iwama, W. S. Nelson and R. P. Levine (1995): Bacterial species other than *Renibacterium salmoninarum* cross-react with antisera against *R. salmoninarum* but are negative for the p57 gene of *R. salmoninarum* as detected by the polymerase chain reaction (PCR). *Dis. Aquat. Org.*, **21**, 227-231.
- Chakroun, C., M. C. Urdaci, D. Faure, F. Grimont and J. F. Bernardet (1997): Random amplified polymorphic DNA analysis provides rapid differentiation among isolates of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* and among *Flavobacterium* species. *Dis. Aquat. Org.*, **31**, 187-196.
- Chakroun, C., F. Grimont, M. C. Urdaci and J. F. Bernardet (1998): Fingerprinting of *Flavobacterium psychrophilum* isolates by ribotyping and plasmid profiling. *Dis. Aquat. Org.*,

33, 167-177.

- Choudhury, D., A. K. Pal, N. P. Sahu, S. Kumara, S. S. Das and S. C. Mukherjee (2005): Dietary yeast RNA supplementation reduces mortality by *Aeromonas hydrophila* in rohu (*Labeo rohita* L.) juveniles. *Fish Shellfish Immunol.*, **19**, 281-291.
- Chun, J., A. Huq and R. R. Colwell (1999): Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 2202-2208.
- Croy, T. R. and D. F. Amend (1977): Immunization of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) against vibriosis using the hyperosmotic infiltration technique. *Aquaculture*, **12**, 317-325.
- Crumlish, M., T. T. Dung, J. F. Turnbull, N. T. N. Ngoc and H. W. Ferguson (2002): Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam. *J. Fish Dis.*, **25**, 733-736.
- Crump, E. M., J. Burian, P. D. Allen and W. W. Kay (2005): Identification and expression of a host-recognized antigen, FspA, from *Flavobacterium psychrophilum*. *Microbiol.*, **151**, 3127-3135.
- Dalsgaard, I. and L. Madsen (2000): Bacterial pathogens in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), reared at Danish freshwater farms. *J. Fish Dis.*, **23**, 199-209.
- Daly, J. G. and R. M. W. Stevenson (1985): Charcoal agar, a new growth medium for the fish disease bacterium *Renibacterium salmoninarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 868-871.
- Davis, H. S. (1946): Care and disease of trout. US Department of the Interior Research Report No. 12., US Government Printing Office, Washington, DC, 98pp.
- Duchaud, E., M. Boussaha, V. Loux, J. Bernardet, C. Michel, B. Kerouault, S. Mondot, P. Nicolas, R. Bossy, C. Caron, P. Bessieres, J. Gibrat, S. Claverol, F. Dumetz, M. L. Henaff and A. Benmansour (2007): Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Nature Biotechnol.*, **25**, 763-769.
- Dumetz, F., E. Duchaud, S. Claverol, N. Orioux, S. Papillon, D. Lapaillerie and M. L. Henaff (2008): Analysis of the *Flavobacterium psychrophilum* outer-membrane subproteome and identification of new antigenic targets for vaccine by immunomics. *Microbiol.*, **154**, 1793-1801.
- Ellis, A. E. (1999): Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol.*, **9**, 291-308.
- Evelyn, T. P. T., J. E. Ketcheson and L. Prosperi-Porta (1984): Further evidence for the presence of *Renibacterium salmoninarum* in salmonid eggs and for the failure of povidone-iodine to reduce the intra-ovum infection rate in water-hardened eggs. *J. Fish Dis.*, **7**, 173-182.
- Evelyn, T. P. T. (1993): Bacterial kidney disease-BKD. In: "Bacterial disease of fish" (ed. by V. Inglis, R. J. Roberts and N. R. Bromage), Blackwell Sci. Publ., London, pp. 177-195.
- Evenden, A. J., T. H. Grayson, M. L. Gilpin and C. B. Munn (1993): *Renibacterium salmoninarum* and bacterial kidney disease-the unfinished jigsaw. *Annu. Rev. Fish Dis.*, **3**, 87-104.
- Grimholt, U., S. Larsen, R. Nordmo, P. Midtlyng, S. Kjoeglum, A. Storset, S. Saebø and R. Stet (2003): MHC polymorphism and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*); facing pathogens with single expressed major histocompatibility class I and class II loci. *Immunogenetics*, **55**, 210-219.
- 原 日出夫 (2004) : アユの冷水病に対する経口ワクチンの研究-Ⅲ, ワクチン内包腸溶性マイクロカプセルに対する水溶性アジュバントの添加について. 神奈川県水産研究所研究報告, **9**, 65-68.
- 原 日出夫・山本充孝・村木誠一・三輪 理 (2006) : 飼育水温および飼育密度がアユ胸

- 腺の発達に与える影響. 日水誌, **72**, 182-185.
- 原 日出夫 (2007) : アユの冷水病の現状と対策. 防菌防黴, **35**, 57-63.
- Hawke, J. P., A. C. McWhorter, A. C. Steigerwalt and D. J. Brenner (1981): *Edwardsiella ictaluri* sp. nov., the causative agent of enteric septicemia of catfish. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **31**, 396-400.
- Iida, Y. and A. Mizokami (1996): Outbreaks of coldwater disease in wild ayu and pale chub. *Fish Pathol.*, **31**, 157-164.
- 飯田貴次 (2007) : コイヘルペスウイルス病. 海洋と生物, **171**, 309-315.
- 今西裕一 (2003) : 牛胎児血清添加培地における *Flavobacterium psychrophilum* の増殖. 京都府立海洋センター研究報告, **25**, 9-11.
- 井上 潔 (2000) : アユの冷水病. 海洋と生物, **126**, 35-38.
- Ishiguro, E. E., T. Ainsworth, W. W. Kay and T. J. Trust (1986): Heme requirement for growth of fastidious atypical strains of *Aeromonas salmonicida*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 668-670.
- Izumi, S. and H. Wakabayashi (1997): Use of PCR to detect *Cytophaga psychrophila* from apparently healthy juvenile ayu and coho salmon eggs. *Fish Pathol.*, **31**, 157-164.
- Izumi, S. and H. Wakabayashi (1999): Further study on serotyping of *Flavobacterium psychrophilum*. *Fish Pathol.*, **32**, 169-173.
- Izumi, S., F. Aranishi and H. Wakabayashi (2003): Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. *Dis. Aquat. Org.*, **56**, 207-214.
- Izumi, S. and F. Aranishi (2004): Plasmid profiling of Japanese *Flavobacterium psychrophilum* isolates. *J. Aquat. Anim. Health*, **16**, 99-103.
- Izumi, S., H. Fujii and F. Aranishi (2005): Detection and identification of *Flavobacterium psychrophilum* from gill washing and benthic diatoms by PCR-based sequencing analysis. *J. Fish Dis.*, **28**, 559-564.
- 城 泰彦・大西圭二 (1980) : 養殖アユから分離された *Aeromonas hydrophila*. 魚病研究, **15**, 85-89.
- 城 泰彦・大西圭二 (1983) : アユビブリオ病ワクチンの効果判定法に関する研究. 魚病対策技術開発研究委託事業研究結果報告書, 日本水産資源保護協会, 1-12.
- Johnson, N. A., R. L. Vallejo, J. T. Silverstein, T. J. Welch, G. D. Wiens, E. M. Hallerman and Y. Palti (2008): Suggestive association of major histocompatibility IB genetic markers with resistance to bacterial cold water disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar. Biotechnol.*, **10**, 429-437.
- Kasornchandra, J., W. A. Rogers and J. A. Plumb (1987): *Edwardsiella ictaluri* from walking catfish, *Clarias batrachus* L., in Thailand. *J. Fish Dis.*, **10**, 137-138.
- Kawanishi, M., M. Kijima, A. Kojima, K. Ishihara, H. Esaki, K. Yagyū, T. Takahashi, S. Suzuki and Y. Tamura (2006): Drug resistance and random amplified polymorphic DNA analysis of *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* isolates from cultured *Seriola* (yellowtail, amberjack and kingfish) in Japan. *Lett. Appl. Microbiol.*, **42**, 648-653.
- Keskın, O., S. Seçer, M. İzgür, S. Türkyılmaz and R. S. Mkakosya (2004): *Edwardsiella ictaluri* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **28**, 649-653.
- Khoo, S. K., A. Ozaki, F. Nakamura, T. Arakawa, S. Ishimoto, R. Nickolov, T. Sakamoto, T. Akutsu, M. Mochizuki, I. Denda and N. Okamoto (2004): Identification of a novel chromosomal region associated with infectious hematopoietic necrosis (IHN) resistance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathol.*, **39**, 95-101.

- Kiiyukia, C., A. Nakajima, T. Nakai, K. Muroga, H. Kawakami and H. Hashimoto (1992): *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from ayu fish (*Plecoglossus altivelis*) in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3078-3082.
- 木村喬久・栗倉輝彦 (1977) : わが国で初めて見いだされた養殖サケ科魚類の細菌性腎臓病 (Bacterial kidney disease) について. 日水誌, **47**, 1173-1183.
- 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.
- Kitao, T., T. Aoki, M. Fukudome, K. Kawano, Y. Wada and Y. Mizuno (1981): Epizootic caused by  $\beta$ -hemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. *Fish Pathol.*, **15**, 301-307.
- Kohchi, C., H. Inagawa, T. Nishizawa, T. Yamaguchi, S. Nagai and G. Soma (2006): Applications of lipopolysaccharide derived from *Pantoea agglomerans* (IP-PA1) for health care based on macrophage network theory. *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 485-96.
- Kondo, M., K. Kawai, K. Yagyu, K. Nakayama, K. Kurohara and S. Oshima (2001): Changes in the cell structure of *Flavobacterium psychrophilum* with length of culture. *Microbiol. Immunol.*, **45**, 813-818.
- Kondo, M., K. Kawai, K. Kurohara and S. Oshima (2002): Adherence of *Flavobacterium psychrophilum* on the body surface of the ayu *Plecoglossus altivelis*. *Microbes Infect.*, **4**, 279-283.
- Kondo, M., K. Kawai, M. Okabe, N. Nakano and S. Ohshima (2003): Efficacy of oral vaccine against bacterial coldwater disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 261-264.
- Kumagai, A., C. Nakayasu and N. Oseko (2004): No evidence for the presence of *Flavobacterium psychrophilum* within ayu eggs. *Fish Pathol.*, **39**, 183-187.
- 熊谷 明 (2005) : ギンザケの冷水病. 日水誌, **71**, 645-649.
- 楠田理一・伊丹利明・宗清正弘・中島博司 (1977) : 養殖チダイから分離された病原性 *Edwardsiella* の性状について. 日水誌, **43**, 129-134.
- 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.
- LaFrentz, B. R., N. M. Lindstrom, S. E. LaPatra, D. R. Call and K. D. Cain (2007): Electrophoretic and western blot analyses of the lipopolysaccharide and glycocalyx of *Flavobacterium psychrophilum*. *Fish Shellfish Immunol.*, **23**, 770-780.
- Langefors, Å., J. Lohm, M. Grahn, Ø. Andersen and T. Schantz (2001): Association between major histocompatibility complex class IIB alleles and resistance to *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **268**, 479-485.
- Lee, K. and G. Heo (1998): First isolation and identification of *Cytophaga psychrophila* from cultured ayu in Korea. *Fish Pathol.*, **33**, 37-38.
- Leung, K. Y., I. V. Yeap, T. J. Lam and Y. M. Sin (1994): Serum resistance as a good indicator for virulence in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from diseased fish in south-east Asia. *J. Fish Dis.*, **18**, 511-518.
- Li, P., D. H. Lewis and D. M. Gatlin III (2004): Dietary oligonucleotides from yeast RNA influence immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Fish Shellfish Immunol.*, **16**, 561-569.
- Lohm, J., M. Grahn, Å. Langefors, Ø. Andersen, A. Storset and T. Schantz (2002): Experimental



- evidence for major histocompatibility complex-allele-specific resistance to a bacterial infection. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **269**, 2029-2033.
- Madetoja, J., P. Nyman and T. Wiklund (2000): *Flavobacterium psychrophilum*, invasion into and shedding by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.*, **43**, 27-38.
- Madetoja, J. and T. Wiklund (2002): Detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* in water from fish farms. *Syst. Appl. Microbiol.*, **25**, 259-266.
- Madetoja, J., S. Nystedt and T. Wiklund (2003): Survival and virulence of *Flavobacterium psychrophilum* in water microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **43**, 217-223.
- Madsen, L., J. D. Møller and I. Dalsgaard (2005): *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), hatcheries: studies on broodstock, eggs, fry and environment. *J. Fish Dis.*, **28**, 39-47.
- Martínez1, J. L., A. Casado and R. Enríquez (2004): Experimental infection of *Flavobacterium psychrophilum* in fins of Atlantic salmon *Salmo salar* revealed by scanning electron microscopy. *Dis. Aquat. Org.*, **59**, 79-84.
- 増成伸文・難波洋平・植木範行 (2003) : 親魚が異なる人工生産アユにおける冷水病に対する感受性の差. 平成 15 年度日本水産学会中国四国支部大会講演要旨集.
- 松山博子・中尾実樹・矢野友紀 (1988) : 魚類の抗体および補体の種間適合性. 日水誌, **54**, 1993-1996.
- Matsuyama, T., T. Kamaishi and N. Oseko (2006): Rapid discrimination of fish pathogenic *Vibrio* and *Photobacterium* species by oligonucleotide DNA array. *Fish. Pathol.*, **41**, 105-112.
- Miwa, S., A. Sakai and M. Nakane (2003): Impairment of thymus development in cultured osmerid fish, the ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Aquaculture*, **221**, 535-548.
- Miwa, S. and C. Nakayasu (2005): Pathogenesis of experimentally induced bacterial cold water disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 93-104.
- Miyazaki, T. (1998): A simple method to evaluate respiratory burst activity of blood phagocytes from Japanese flounder. *Fish Pathol.*, **33**, 141-142.
- 宮崎統五 (2002) : エドワジエラ症に伴ってみられたヒラメ集団の血液成分及び血中生体防御指標の変動係数の変化. 魚病研究, **37**, 59-63.
- Møller, J. D., A. E. Ellis, A. C. Barnes and I. Dalsgaard (2005): Iron acquisition mechanisms of *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish Dis.*, **28**, 391-398.
- Moritomo, T., K. Serata, K. Teshirogi, H. Aikawa, Y. Inoue, T. Itou and T. Nakanishi (2003): Flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst of ayu, *Plecoglossus altivelis*: comparison with other fresh water fish. *Fish Shellfish Immunol.*, **15**, 29-38.
- Muiswinkel, W. V., G. Wiegertjes and R. M. Stet (1999): The influence of environmental and genetic factors on the disease resistance of fish. *Aquaculture*, **172**, 103-110.
- 室賀清邦 (1975) : *Vibrio anguillarum* およびその感染症に関する研究. 広大水畜産学部紀要, **14**, 101-215.
- Muroga, K., S. Takahashi, H. Yamanoi and M. Nishibuchi (1979): Non-cholera vibrio isolated from diseased ayu. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **45**, 829-834.
- 室賀清邦・城 泰彦・増村和彦 (1986) : アユおよびクロソイ病魚から分離された *Vibrio ordalii*. 魚病研究, **21**, 239-243.
- Muroga, K. and S. Egusa (1988): Vibriosis of ayu: a review. *J. Fac. Appl. Biol. Sci. Hiroshima Univ.*, **27**, 1-17.
- Muroga, K. (2001): Viral and bacterial diseases of marine fish and shellfish in Japanese hatcheries.

- Aquaculture*, **202**, 23-44.
- 室賀清邦 (2004) : ビブリオ病-1「魚介類の感染症・寄生虫病, 若林久嗣・室賀清邦編, 恒星社厚生閣, 東京」, 158-163.
- 室賀清邦 (2007) : 輸入魚介類の疾病: 総論. 海洋と生物, **171**, 303-308.
- 永井崇裕・飯田悦左・米司 隆 (2003) : アユ冷水病に対する水溶性アジュバント添加ワクチンの野外試験. 魚病研究, **38**, 63-65.
- 永井崇裕 (2003) : アユの冷水病に対するワクチンの有効性等に関する研究. 平成 14 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, 63-75.
- 永井崇裕 (2005) : アユの冷水病ワクチン等に関する研究. 平成 16 年度養殖衛生対策技術開発研究成果報告書, 日本水産資源保護協会, 68-80.
- 永井崇裕 (2006) : アユの冷水病ワクチン等に関する研究. 平成 17 年度養殖衛生対策技術開発研究成果報告書, 日本水産資源保護協会, 89-97.
- 永井崇裕・坂本 崇 (2006) : 異なるアユ系統間の冷水病感受性と免疫応答. 魚病研究, **41**, 99-104.
- Nagai T., E. Iwamoto, T. Sakai, T. Arima, K. Tensha, Y. Iida, T. Iida and T. Nakai (2008): Characterization of *Edwardsiella ictaluri* isolated from wild ayu *Plecoglossus altivelis* in Japan. *Fish Pathol.*, **43**, 158-163.
- Nakai, T. (1985): Resistance of *Pseudomonas anguilliseptica* to bactericidal action of fish serum. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **51**, 1431-1436.
- 中井敏博・花田 博・室賀清邦 (1985) : 養殖アユに発生した *Pseudomonas anguilliseptica* 感染症. 魚病研究, **20**, 481-484.
- Nakai, T., M. Miyakawa, K. Muroga and K. Kamito (1989): The tissue distribution of atypical *Aeromonas salmonicida* in artificially infected Japanese eels, *Anguilla japonica*. *Fish. Pathol.*, **24**, 23-28.
- Nakanishi, T., I. Kiryu and M. Ototake (2002): Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument. *Vaccine*, **20**, 2764-3769.
- 中津川俊雄 (1983) : ヒラメ幼魚から分離された *Edwardsiella tarda*. 魚病研究, **18**, 99-101.
- 中津川俊雄・飯田悦左 (1996) : アユ病魚から分離された *Pseudomonas* sp. 魚病研究, **31**, 221-227.
- Nematollahi, A., A. Decostere, F. Pasmans and F. Haesebrouck (2003): *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *J. Fish Dis.*, **26**, 563-574.
- Nicolas, P., S. Mondot, G. Achaz, C. Bouchenot, J. F. Bernardet and E. Duchaud (2008): Population Structure of the Fish-Pathogenic Bacterium *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 3702-3709.
- Nishimori, E., K. Kita-Tsukamoto and H. Wakabayashi (2000): *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 83-89.
- 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.
- Okamoto, N., T. Sakamoto and A. Ozaki (2002): Quantitative trait loci (QTL) responsible for resistance to a viral disease in fish. *Fish Genet. Breed. Sci.*, **32**, 75-86.
- Okuda, J., F. Murayama, E. Yamanoi, E. Iwamoto, S. Matsuoka, M. Nishibuchi and T. Nakai (2007): Base changes in the *fliC* gene of *Edwardsiella tarda*, possible effects on flagellation

- and motility. *Dis. Aquat. Org.*, **76**, 113-121.
- 大西圭二・城 泰彦 (1981) : 淡水養殖魚の連鎖球菌症に関する研究-I. 1977年および1978年に養殖アユおよびアマゴから分離されたβ溶血性連鎖球菌の性状. 魚病研究, **16**, 63-67.
- Ostland, V. E., P. J. Byrne, G. Hoover and H. W. Ferguson (2000): Necrotic myositis of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): proteolytic characteristics of a crude extracellular preparation from *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish Dis.*, **23**, 329-336.
- 乙竹 充・原 日出夫・佐野聡哉・永井崇裕・井上喜久治 (2008) : アユ冷水病ワクチン開発の現状. 獣医畜産新報, **61**, 833-834.
- Plumb, J. A. and D. J. Sanchez (1983): Susceptibility of five species of fish to *Edwardsiella ictaluri*. *J. Fish Dis.*, **6**, 261-266.
- Plumb, J. A. (1999): Catfish bacterial diseases. In "Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fish". Iowa State University Press, Iowa, pp.181-209.
- 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.
- Rahman, M. H., A. Kuroda, J. M. Dijkstra, I. Kiryu, T. Nakanishi and M. Otokake (2002): The outer membrane fraction of *Flavobacterium psychrophilum* induces protective immunity in rainbow trout and ayu. *Fish Shellfish Immunol.*, **12**, 169-179.
- 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.
- Ravelo, C., B. Magariños, S. López-Romalde, A. E. Toranzo and J. L. Romalde (2003): Molecular fingerprinting of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 751-756.
- Reichenbach, H. (1981): Taxonomy of the gliding bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, **35**, 339-364.
- Rodkhum, C., I. Hirono, J. H. Crosa and T. Aoki (2006): Multiplex PCR for simultaneous detection of five virulence hemolysin genes in *Vibrio anguillarum*. *J. Microbiol. Met.*, **65**, 612-618.
- Sakai, M., S. Atsuta and M. Kobayashi (1991): Susceptibility of five salmonid fishes to *Renibacterium salmoninarum*. *Fish Pathol.*, **26**, 159-160.
- Sakai, T., T. Iida, K. Osatomi and K. Kanai (2007): Detection of type 1 fimbrial genes in fish pathogenic and non-pathogenic *Edwardsiella tarda* strains by PCR. *Fish Pathol.*, **42**, 115-117.
- Sakamoto, T., T. Uchiyama, E. Koshimizu, S. Morimoto, M. Okochi, H. Koshio, T. Nagai, Y. Iida and H. Murakami (2008): Construction of genetic linkage map and identification of disease resistance locus against bacterial coldwater disease in ayu (*Plecoglossus altivelis*). 5th International Symposium of The Japanese Society for Fish Pathology. Program & abstracts, pp. 58.
- Sanders, J. E. and J. L. Fryer (1980): *Renibacterium salmoninarum* gen. nov., sp. nov., the causative agent of bacterial kidney disease in salmonid fishes. *Int. J. Syst. Bact.*, **30**, 496-502.
- Secades, P., B. Alvarez and J. A. Guijarro (2001): Purification and characterization of a psychrophilic, calcium-induced, growth-phase-dependent metalloprotease from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 2436-2444.
- Secades, P., B. Alvarez and J. A. Guijarro (2003): Purification and properties of a new

- psychrophilic metalloprotease (Fpp2) in the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **226**, 273-279.
- Secombes, C. J. (1990): Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In "Techniques in fish immunology 1" (ed. by Stolen, J. S., T. C. Fletcher, D. P. Anderson, B. S. Roberson and W. B. van Muiswinkel), SOS publications, Fair Haven, pp. 137-154.
- Soule, M., S. LaFrentz, K. Cain, S. LaPatra and D. R. Call (2005): Polymorphisms in 16S rRNA genes of *Flavobacterium psychrophilum* correlate with elastin hydrolysis and tetracycline resistance. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 209-216.
- Stanley, L. A., J. S. Hudson, T. E. Schwedler and S. S. Hayasaka (1994): Extracellular products associated with virulent and avirulent strains of *Edwardsiella ictaluri* from channel catfish. *J. Aquat. Anim. Health*, **6**, 36-43.
- 田畑和男 (2004) : 河川における冷水病菌をめぐる在来魚と放流アユとの関係. 日水誌, **70**, 318-323.
- 田畑和男 (2006) : アユ非生息期における河川環境中からの冷水病菌の初分離 (培養法による検討). 兵庫農技総研報 (水産), **39**, 25-28.
- Takahashi, Y., M. Kondo, T. Itami, T. Honda, H. Inagawa, T. Nishizawa, G. Soma and Y. Yokomizo (2000): Enhancement of disease resistance against penaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, by oral administration of *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide (LPS). *Fish Shellfish Immunol.*, **10**, 555-558.
- Tan, A. S. and M. V. Berridge (2000): Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents. *J. Immunol. Methods*, **238**, 59-68.
- Thompson, F. L., D. Gevers, C. C. Thompson, P. Dawyndt, S. Naser, B. Hoste, C. B. Munn and J. Swings (2005): Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 5107-5115.
- Uddin, M. N. and H. Wakabayashi (1997): Effects of temperature on growth and protease production of *Cytophaga psychrophila*. *Fish Pathol.*, **32**, 225-226.
- 宇賀神光夫 (1981) : 1980年栃木県下の養殖アユの流行病の原因である連鎖球菌に関する研究. 魚病研究, **16**, 119-127.
- Wakabayashi, H. and S. Egusa (1973): *Edwardsiella tarda* (*Paracolobactrum anguillimortiferum*) associated with pond-cultured eel diseases. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **39**, 931-939.
- Wakabayashi, H. and S. Egusa (1974): Characteristics of myxobacteria associated with some freshwater fish disease in Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **40**, 751-757.
- 若林久嗣・堀内三津幸・文谷俊雄・星合愿一 (1991) : 日本で発生したギンザケ稚魚の冷水病. 魚病研究, **26**, 211-212.
- 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.
- 若林久嗣・沢田健蔵・二宮浩司・西森栄太 (1996) : シュードモナス細菌によるアユの細菌性出血性腹水病. 魚病研究, **31**, 239-240.
- 若林久嗣 (2004a) : サケ科魚類の細菌性腎臓病「魚介類の感染症・寄生虫病, 若林久嗣・室賀清邦編, 恒星社厚生閣, 東京」, 136-141.
- 若林久嗣 (2004b) : 細菌性鰓病「魚介類の感染症・寄生虫病, 若林久嗣・室賀清邦編, 恒

- 星社厚生閣, 東京」, 169-173.
- 若林久嗣 (2004c) : カラムナリス病「魚介類の感染症・寄生虫病, 若林久嗣・室賀清邦編, 恒星社厚生閣, 東京」, 173-177.
- 若林久嗣 (2004d) : 細菌性冷水病「魚介類の感染症・寄生虫病, 若林久嗣・室賀清邦編, 恒星社厚生閣, 東京」, 177-183.
- Waltman, W. D., E. B. Shotts and T. C. Hsu (1986): Biochemical characteristics of *Edwardsiella ictaluri*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 101-104.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier and D. J. Lane (1991): 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, **173**, 697-703.
- Wiens, G. D. and S. L. Kaattari (1999): Bacterial kidney disease (*Renibacterium salmoninarum*). In: "Fish disease and disorders Vol. 3 Vial, bacterial and fangal infections" (ed. by P. T. K. Woo and D. W. Bruno), CABI Publishing, New York, pp. 269-301.
- Wiklund, T. and I. Dalsgaard (2002): Survival of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum *in vitro*. *Fish shellfish Immunol.*, **12**, 141-153.
- 山野井英夫・室賀清邦・高橋 誓 (1980) : アユから分離された NAG ビブリオの生理学的性状および病原性. 魚病研究, **15**, 69-73.
- 矢野友紀・畑山幸宏・松山博子・中尾実樹 (1988) : 主要養殖魚の補体代替経路活性の測定法について. 日水誌, **54**, 1049-1054.
- 安永統男・小川七朗・畑井喜司雄 (1982) : 数種の海産養殖魚から分離された病原性 *Edwardsiella* の性状について. 長崎県水産試験場研究報告, **8**, 57-65.
- 吉水 守 (2000) : 本邦の在来疾病と輸入疾病ならびに未侵入疾病. 海洋と生物, **126**, 18-27.
- 吉浦康寿・釜石 隆・中易千早・乙竹 充 (2006) : Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C 遺伝子を標的にした PCR による *Flavobacterium psychrophilum* の判別と遺伝子型. 魚病研究, **41**, 67-71.
- Yuasa, K., E. B. Kholidin, N. Panigoro and K. Hatai (2003): First isolation of *Edwardsiella ictaluri* from cultured striped catfish *Pangasius hypophthalmus* in Indonesia. *Fish Pathol.*, **38**, 181-183.

付 表

Appendix 1. *Flavobacterium psychrophilum*, which were isolated in Hiroshima Prefecture, used in this study

Strain	Isolation				Genotype*1		
	Year	Fish*2	Organ	Location*3	Area	RFLP	RAPD
ZH-0001	2000	Pale chub	Kidney	HPFES	Gonokawa	BS	4
PH-0003	2000	Ayu	Kidney	HPFES	Gonokawa	AR	2
PH-0004	2000	Ayu	Kidney	HPFES	Gonokawa	AR	3
PH-0010	2000	Ayu	Skin lesion	Farm OJ	Otagawa	BS	4
OH-0016	2000	Masu salmon	Kidney	Farm SS	Gonokawa	BS	7
PH-0035	2000	Ayu	Kidney	Farm GK	Gonokawa	AR	2
PH-0037	2000	Ayu	Kidney	Farm GK	Gonokawa	AR	2
PH-0103	2001	Ayu	Kidney	HPFES	Gonokawa	AR	2
PH-0107	2001	Ayu	Kidney	River	Gonokawa	AR	2
PH-0108	2001	Ayu	Kidney	River	Otagawa	AS	1
PH-0109	2001	Ayu	Skin lesion	River	Gonokawa	AR	2
PH-0111	2001	Ayu	Kidney	Farm NG	Nutagawa	AS	3
PH-0112	2001	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AS	3
PH-0113	2001	Ayu	Kidney	HPFES	Gonokawa	AR	1
OH-0203	2002	Rainbow trout	Kidney	Farm BK	Ozegawa	BR	8
PH-0209	2002	Ayu	Kidney	Farm GK	Gonokawa	AR	2
PH-0210	2002	Ayu	Kidney	HPFES	Gonokawa	AR	2
PH-0212	2002	Ayu	Kidney	River	Gonokawa	AR	2
PH-0213	2002	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AR	2
PH-0214	2002	Ayu	Kidney	Farm NG	Nutagawa	AS	1
PH-0215	2002	Ayu	Kidney	Farm SD	Otagawa	AS	3
PH-0216	2002	Ayu	Kidney	River	Otagawa	AR	2
ZH-0220	2002	Pale chub	Gill	HPFES	Gonokawa	BS	7
OH-0221	2002	Masu salmon	Gill	HPFES	Gonokawa	BS	7
OH-0224	2002	Masu salmon	Gill	HPFES	Gonokawa	BS	7
OH-0304	2003	Masu salmon	Skin lesion	HPFES	Gonokawa	BS	7
OH-0305	2003	Masu salmon	Kidney	HPFES	Gonokawa	BS	7
OH-0306	2003	Rainbow trout	Kidney	Farm TS	Takahashigawa	BR	8
OH-0306.2	2003	Rainbow trout	Kidney	Farm TS	Takahashigawa	BR	8
OH-0306.3	2003	Rainbow trout	Kidney	Farm TS	Takahashigawa	BS	6
OH-0306.4	2003	Rainbow trout	Kidney	Farm TS	Takahashigawa	BS	6
PH-0307	2003	Ayu	Kidney	River	Otagawa	AR	2
PH-0308	2003	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AS	1
PH-0308.2	2003	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AS	1
PH-0308.3	2003	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AS	1
PH-0309	2003	Ayu	Kidney	Farm SA	Gonokawa	AR	2
PH-0309.2	2003	Ayu	Kidney	Farm SA	Gonokawa	AS	3
PH-0309.3	2003	Ayu	Kidney	Farm SA	Gonokawa	AS	2
PH-0311.1	2003	Ayu	Kidney	Farm NG	Nutagawa	AS	1
PH-0311.2	2003	Ayu	Kidney	Farm NG	Nutagawa	AS	1

PH-0311.3	2003	Ayu	Kidney	Farm NG	Nutagawa	AS	1
PH-0312.3	2003	Ayu	Kidney	Farm OJ	Otagawa	AS	2
PH-0313	2003	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AS	1
PH-0313.2	2003	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AS	1
PH-0315	2003	Ayu	Kidney	Farm NG	Nutagawa	AS	1
PH-0315.2	2003	Ayu	Kidney	Farm NG	Nutagawa	AS	1
PH-0315.3	2003	Ayu	Kidney	Farm NG	Nutagawa	AS	1
PH-0315.4	2003	Ayu	Kidney	Farm NG	Nutagawa	AS	1
PH-0316	2003	Ayu	Kidney	Farm OJ	Otagawa	AS	3
PH-0316.2	2003	Ayu	Kidney	Farm OJ	Otagawa	AS	3
PH-0317	2003	Ayu	Kidney	River	Takahashigawa	AS	3
PH-0323	2003	Ayu	Skin lesion	Farm OT	Otagawa	AS	3
PH-0324	2003	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AR	2
PH-0324.2	2003	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AR	2
PH-0325	2003	Ayu	Kidney	Farm GK	Gonokawa	AS	1
PH-0326	2003	Ayu	Kidney	Farm GK	Gonokawa	AS	1
PH-0327	2003	Ayu	Kidney	Farm GK	Gonokawa	AS	1
PH-0328	2003	Ayu	Kidney	Farm GK	Gonokawa	AS	1
PH-0329	2003	Ayu	Kidney	Farm GK	Gonokawa	AS	1
PH-0330	2003	Ayu	Kidney	Farm GK	Gonokawa	AS	1
OH-0336	2003	Masu salmon	Gill	HPFES	Gonokawa	BS	6
OH-0337	2003	Masu salmon	Gill	HPFES	Gonokawa	BS	6
PH-0338	2003	Ayu	Gill	HPFES	Gonokawa	BS	3
ZH-0339	2003	Pale chub	Gill	HPFES	Gonokawa	BS	6
OH-0340	2003	Masu salmon	Gill	HPFES	Gonokawa	BS	4
PH-0341	2003	Ayu	Gill	HPFES	Gonokawa	BS	3
PH-0342	2003	Ayu	Kidney	HPFES	Gonokawa	AS	1
PH-0344	2003	Ayu	Kidney	HPFES	Gonokawa	AS	1
PH-0345	2003	Ayu	Kidney	HPFES	Gonokawa	AS	1
PH-0346	2003	Ayu	Kidney	HPFES	Gonokawa	AS	1
PH-0347	2003	Ayu	Kidney	HPFES	Gonokawa	AS	1
PH-0348	2003	Ayu	Kidney	HPFES	Gonokawa	AS	1
PH-0349	2003	Ayu	Kidney	HPFES	Gonokawa	AS	1
PH-0350	2003	Ayu	Kidney	HPFES	Gonokawa	AS	1
ZH-0351	2003	Pale chub	Gill	HPFES	Gonokawa	BS	6
PH-0352	2003	Ayu	Kidney	HPFES	Gonokawa	AR	2
PH-0353	2003	Ayu	Kidney	HPFES	Gonokawa	AR	2
PH-0354	2003	Ayu	Kidney	HPFES	Gonokawa	AS	3
ZH-0355	2003	Pale chub	Kidney	HPFES	Gonokawa	BS	6
OH-0406	2004	Red spotted masu trout	Gill	Farm YK	Otagawa	BS	6
CH-0411	2004	Silver crucian carp	Kidney	River	Gonokawa	BS	4
ZH-0412	2004	Pale chub	Kidney	Farm YK	Otagawa	BS	6
PH-0413	2004	Ayu	Kidney	Farm OJ	Otagawa	AS	1
PH-0414	2004	Ayu	Kidney	Farm OJ	Otagawa	AS	1
PH-0415	2004	Ayu	Kidney	Farm OJ	Otagawa	AS	1
PH-0416	2004	Ayu	Kidney	River	Otagawa	AS	1
PH-0418	2004	Ayu	Kidney	Farm OJ	Otagawa	AS	1

PH-0419	2004	Ayu	Kidney	Farm OJ	Otagawa	AS	1
PH-0420	2004	Ayu	Kidney	Farm OJ	Otagawa	AS	1
PH-0422	2004	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
PH-0423	2004	Ayu	Kidney	River	Otagawa	AR	2
PH-0424	2004	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
PH-0425	2004	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	2
PH-0430	2004	Ayu	Skin lesion	Farm OJ	Otagawa	AS	1
PH-0431	2004	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AS	1
PH-0432	2004	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AS	1
PH-0433	2004	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AS	1
PH-0436	2004	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AS	1
PH-0437	2004	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AS	1
PH-0439	2004	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AS	1
PH-0441	2004	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	3
PH-0443	2004	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
PH-0445	2004	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AR	2
PH-0447	2004	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AS	1
OH-0501	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm NM	Otagawa	BS	7
OH-0502	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm NM	Otagawa	BS	7
OH-0503	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm NM	Otagawa	BS	5
OH-0504	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm NM	Otagawa	BS	5
OH-0505	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm NM	Otagawa	BS	5
OH-0507	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm NM	Otagawa	BS	5
OH-0508	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm NM	Otagawa	BS	7
OH-0509	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm NM	Otagawa	BS	5
OH-0510	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm NM	Otagawa	BS	5
PH-0511	2005	Ayu	Kidney	Farm GK	Gonokawa	AS	1
PH-0512	2005	Ayu	Kidney	Farm GK	Gonokawa	AS	1
PH-0513	2005	Ayu	Kidney	Farm GK	Gonokawa	AS	1
PH-0514	2005	Ayu	Kidney	Farm GK	Gonokawa	AS	1
PH-0515	2005	Ayu	Kidney	Farm GK	Gonokawa	AS	1
PH-0516	2005	Ayu	Kidney	Farm GK	Gonokawa	AS	1
PH-0517	2005	Ayu	Kidney	Farm GK	Gonokawa	AS	1
OH-0519	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm OG	Otagawa	BS	7
OH-0520	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm OG	Otagawa	BS	7
OH-0521	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm OG	Otagawa	BS	7
OH-0522	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm OG	Otagawa	BS	7
OH-0524	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm OG	Otagawa	BS	7
PH-0526	2005	Ayu	Kidney	River	Otagawa	BS	4
PH-0527	2005	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AR	2
PH-0528	2005	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AR	2
PH-0529	2005	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	BS	4
PH-0530	2005	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AR	2
PH-0531	2005	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AR	2
OH-0533	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm NM	Otagawa	BS	5
PH-0534	2005	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	2
PH-0535	2005	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	3



PH-0536	2005	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AR	2
PH-0537	2005	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AR	2
PH-0538	2005	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
PH-0539	2005	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
OH-0540	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm YK	Otagawa	BS	7
OH-0541	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm YK	Otagawa	BS	7
PH-0547	2005	Ayu	Kidney	River	Otagawa	AS	3
PH-0548	2005	Ayu	Kidney	River	Otagawa	AS	1
PH-0549	2005	Ayu	Kidney	River	Otagawa	AS	1
PH-0550	2005	Ayu	Kidney	River	Otagawa	AS	1
PH-0552	2005	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	3
PH-0553	2005	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	3
PH-0554	2005	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	3
PH-0555	2005	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	3
PH-0556	2005	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	3
OH-0558	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm NM	Otagawa	BS	5
OH-0559	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm NM	Otagawa	BS	5
OH-0560	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm NM	Otagawa	BS	5
PH-0561	2005	Ayu	Kidney	Farm SD	Otagawa	AS	1
PH-0562	2005	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
PH-0563	2005	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
PH-0564	2005	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AS	3
PH-0565	2005	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AS	3
PH-0566	2005	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AS	3
PH-0567	2005	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AS	3
PH-0568	2005	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AS	3
PH-0569	2005	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AS	3
PH-0570	2005	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AS	3
PH-0571	2005	Ayu	Kidney	River	Gonokawa	AR	1
PH-0572	2005	Ayu	Kidney	River	Gonokawa	AS	1
PH-0573	2005	Ayu	Kidney	River	Gonokawa	AS	1
PH-0574	2005	Ayu	Kidney	River	Gonokawa	AS	3
PH-0575	2005	Ayu	Kidney	River	Gonokawa	AS	3
OH-0576	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm NM	Otagawa	BS	5
OH-0577	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm NM	Otagawa	BS	7
OH-0578	2005	Red spotted masu trout	Kidney	Farm NM	Otagawa	BS	5
PH-0601	2006	Ayu	Skin lesion	Farm NG	Nutagawa	BR	3
PH-0602	2006	Ayu	Skin lesion	Farm NG	Nutagawa	BR	3
PH-0603	2006	Ayu	Skin lesion	Farm NG	Nutagawa	BR	3
PH-0611	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
PH-0612	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
PH-0613	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
PH-0614	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
PH-0615	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
PH-0616	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
PH-0617	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
PH-0618	2006	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AS	1

PH-0619	2006	Ayu	Kidney	River	Nutagawa	AS	1
PH-0620	2006	Ayu	Kidney	River	Nutagawa	AS	1
PH-0621	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
PH-0622	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
PH-0623	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
PH-0624	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
PH-0625	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
PH-0626	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AR	1
PH-0627	2006	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AR	2
PH-0628	2006	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AR	2
PH-0629	2006	Ayu	Kidney	Farm OT	Otagawa	AR	2
PH-0630	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AR	1
PH-0631	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AR	1
PH-0632	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AR	2
PH-0633	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	3
PH-0634	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	3
PH-0635	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
PH-0636	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
PH-0637	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AR	1
PH-0638	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AR	1
PH-0639	2006	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AR	1
PH-0707	2007	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
PH-0708	2007	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AR	1
PH-0709	2007	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AR	1
OH-0710	2007	Red spotted masu trout	Kidney	Farm YG	Otagawa	BS	5
OH-0711	2007	Red spotted masu trout	Kidney	Farm YG	Otagawa	BS	5
PH-0713	2007	Ayu	Kidney	River	Otagawa	AS	1
PH-0714	2007	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	BS	4
PH-0715	2007	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AS	1
OH-0719	2007	Red spotted masu trout	Kidney	Farm NM	Otagawa	BS	5
OH-0720	2007	Red spotted masu trout	Kidney	Farm NM	Otagawa	BS	5
OH-0721	2007	Red spotted masu trout	Kidney	Farm NM	Otagawa	BS	5
PH-0722	2007	Ayu	Kidney	Farm YK	Otagawa	AR	3
PH-0728	2007	Ayu	Kidney	Farm NG	Nutagawa	AS	1
PH-0729	2007	Ayu	Kidney	Farm NG	Nutagawa	AS	1
PH-0730	2007	Ayu	Kidney	Farm NG	Nutagawa	AS	1

\*<sup>1</sup> See Chapter II -1.

\*<sup>2</sup> Pale chub *Zacco platypus*, Ayu *Plecoglossus altivelis*, Masu salmon *Oncorhynchus masou*, Rainbow trout *O. mykiss*, Red spotted masu trout *O. masou ishikawae*, Silver crucian carp *Carassius gibelio langsdorfi*

\*<sup>3</sup> HPFES: Hiroshima Prefectural Fisheries Experiment Station, Farm: private farms

## 要 約

アユ *Plecoglossus altivelis* は我が国の内水面漁業および養殖業における最も重要な魚種の一つであるが、河川や養殖場において種々の細菌性疾病が発生している。なかでも *Flavobacterium psychrophilum* を原因とする細菌性冷水病は、1987年に徳島県のアユ養殖場で初めて確認されて以来、全国各地の養殖場および河川で毎年発生し、現在でもアユにおける最重要疾病となっている。この細菌性冷水病に加えて、2000年以降は新興性の細菌感染症が続発し、これらは産業的被害はもとより社会環境的にも重大な問題を提起している。

本論文は、アユに発生する細菌性冷水病を主たる課題として、その他の細菌性疾病、すなわち、細菌性腎臓病、新型ビブリオ病、および *Edwardsiella ictaluri* 感染症について、それらの防除対策の確立に資するべく、細菌学および病理学的検討をおこなったものである。得られた結果は以下のように要約される。

### 細菌性冷水病(第II章)

1) 2000年から2007年に広島県下のアユ、サケ科魚類およびコイ科魚類から分離した217株の *F. psychrophilum* を材料として分子生物学的手法による疫学的解析を行った(第1節)。PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)と RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)-PCRを組み合わせることで *F. psychrophilum* を13の遺伝子型に分けることができた。アユから分離した菌株とアユ以外の魚種から分離した菌株は、7株の例外を除いて全く異なる遺伝子型となった。アユ由来の菌株は9つの遺伝子型に分かれたが、出現頻度の低い遺伝子型において出現地域に偏りが見られた。また、1993年に広島県でアユおよびオイカワから分離された菌株は、それぞれ遺伝子型が異なった。これらの遺伝子型分けを用いることで *F. psychrophilum* の感染経路を明らかにすることができ、防除対策に役立つものと考えられる。

2) *F. psychrophilum* の淡水中での生存性を *in vitro* で調べ、長期間生存した菌株の病原性について検討した(第2節)。滅菌水道水中において、15℃および25℃で240日間の生存が確認され、その生存菌株はアユに対して病原性を有していることが感染実験により確かめられた。*F. psychrophilum* が環境中で長期間病原性を維持し、これが自然河川での感染源になりうると考えられることから、河川への放流においてはアユへの特異的免疫の賦与もしくは耐病性アユを用いることが必要と考えられる。

3) 冷水病に対する予防免疫に用いるホルマリン不活化ワクチンに関する検討を行った(第3節)。最初に、注射ワクチンの有効性を室内試験および野外試験で検討した結果、アジュバントを添加したワクチンの有効性が確認された。次に、浸漬ワクチンおよびスタンプリングワクチンの効果を室内試験および野外試験で検討した結果、免疫有効率は注射ワクチンには劣るがいずれも有効性が確認された。免疫処理期間中の水温は15℃および20℃で有効であった。浸漬ワクチン処理前の免疫賦活剤の経口投与の効果を検討した結果、小麦共

生菌 *Pantoea agglomerans* 由来 LPS または酵母抽出 RNA を一定量飼料に混ぜて与えるとワクチンの有効性が高まった。大量のアユを処理できる浸漬ワクチンの有効性が自然感染において確認されたことから、河川や養殖場での冷水病の被害を予防免疫で軽減できると考えられる。

4) 広島県で生産されている複数の人工アユ系統についてそれらの冷水病感受性を比較した(第4節)。*F. psychrophilum* に対する感受性を注射感染および自然感染により調べた結果、海産アユに由来する海産交配系アユの死亡率が累代系や湖産交配系アユに比較して低いことが明らかになった。しかし、海産交配系と湖産交配系アユの非特異的生体防御能においては両者に差は見られなかった。冷水病感受性の低い海産交配系アユと高い累代系アユの交配系統を作出したところ、冷水病の感受性は両系統の中間になり、この性質は遺伝する可能性が示された。ホルマリン不活化ワクチンでの浸漬免疫において自然感染に対する感染防御能には両系統間に有意差は認められなかったが、抗体価は海産交配系が高かったことから、抗体を含む液性因子の関与が示唆された。これらの結果から、海産交配系アユを放流および養殖種苗として用いることにより冷水病被害を軽減できると考えられる。

5) *F. psychrophilum* の病原因子のうち、宿主魚の血清中での増殖性と病原性との関係について検討した(第5節)。種々の魚種から分離された *F. psychrophilum* についてそれらのアユおよびアマゴ血清での増殖性とアユおよびアマゴに対する病原性を比較した結果、アユから分離した菌株はアユ血清で増殖するが、アマゴ血清では増殖しなかった。逆に、アユ以外の魚から分離した菌株はアユ血清では増殖しなかったが、サケ科魚類から分離した一部の菌株はアマゴ血清で増殖した。一方、アユ分離株はアユに対して病原性を示したがアマゴに対しては病原性を示さず、逆に、アユ以外の魚から分離した菌株はアユに対して病原性を示さなかったが、アユ以外の魚から分離した菌株の一部はアマゴに対して病原性を示した。これらの結果から、血清での増殖性は *F. psychrophilum* の病原因子の一つと考えられ、特にアユにおける血清増殖性と病原性には密接な関係が認められた。これらの結果は、本菌の宿主特異性を考える上で興味深く、また本菌の防御抗原および新規ワクチンの開発につながるものと考えられる。

### 細菌性腎臓病(第Ⅲ章)

腎臓に結節様の病変を伴うアユの大量死事例について検討し、病魚の腎臓から一種の細菌を分離した。分離菌は、抗 *Renibacterium salmoninarum* 血清を用いた蛍光抗体法および *R. salmoninarum* 検出用 PCR で陽性反応を示した。アユを用いた感染実験により分離菌の病原性が確認されたことから、このアユの大量死は *R. salmoninarum* を原因とする細菌性腎臓病(BKD)と診断された。また、発病したアユの種苗出荷元である養殖場を調査した結果、そこで飼育されていたヤマメから *R. salmoninarum* が分離され、分離株のアユに対する病原性も確認された。BKDはこれまでサケ科魚類のみで発生が知られていたが、本事例はアユにおけるBKDの初報告である。サケ科魚類のBKDがアユに水平感染する可能性が示されたことから、サケ科魚類とアユを同じ施設内で飼育している養殖場においては、サケ科魚

類からのアユへの水平感染を念頭におき、隔離飼育等の防疫体制を強化する必要がある。

#### 新型ビブリオ病(第IV章)

養殖中のアユに新しい細菌感染症が発生した。眼球突出、頭部の赤変、および体の屈曲を特徴とする大量死が発生し、病魚から血液寒天培地により1種類の細菌が分離された。分離菌は血液を含まない培地では増殖しなかったが、ヘミンを25 µg/mL以上加えるとよく増殖した。生化学的性状等の表現型、また16S rDNA および16S-23SのITS領域の塩基配列解析において分離菌は*Vibrio*属に分類されたが、既知の*Vibrio*属細菌とは一致しなかった。感染実験において分離菌はアユに対して強い病原性(LD<sub>50</sub>=10<sup>3</sup> CFU/fish)を示し、感染魚の生菌数測定および病理組織学的検討結果から、本菌の標的臓器は脳であると考えられた。アユのビブリオ病の原因菌としてこれまで*V. anguillarum* および*V. ordalii*が知られてきたが、これらとは異なる新種の*Vibrio*属細菌によるビブリオ病の発生を確認した。証拠に乏しいが、感染源は飼育海水環境にあると考えられ、海産種苗の病気として今後は検査対象とする必要があろう。

#### *Edwardsiella ictaluri* 感染症(第V章)

2007年8月中旬から10月上旬にかけて、東京都、山口県および広島県の河川でアユの死亡が観察され、死亡魚から1種類の細菌が分離された。分離菌はグラム陰性通性嫌気性の運動性桿菌で、カタラーゼ陽性・チトクロームオキシダーゼ陰性から*Edwardsiella*属に分類された。分離菌は37°Cで増殖せずインドール陰性である点において同属の魚類病原菌*E. tarda*とは区別され、その表現型性状はもう1種の*E. ictaluri*に類似した。また、16S rDNA および*etfA*遺伝子の塩基配列においても*E. ictaluri*と高い相同性(100%, 99.7%)を示したことから、分離菌は*E. ictaluri*に同定された。感染実験によりアユに対する病原性が確認されたことから(LD<sub>50</sub>=10<sup>4</sup> CFU/fish)、河川アユの死亡は本菌感染によると考えられた。*E. ictaluri*はアメリカおよび東南アジアの養殖ナマズの病原菌として知られていたものであり、日本での天然アユにおける*E. ictaluri*感染症の初めての報告である。詳細な疫学調査は今後の研究にゆだねられるが、海外からの輸入魚をふくめ感染源の特定が緊急の課題であり、全国河川あるいは養殖アユへの感染の拡大、またナマズ在来種への感染には十分注意を払う必要がある。

## 謝 辞

本研究を進めるにあたり、終始ご指導頂いた広島大学大学院生物圏科学研究科中井敏博教授に感謝の意を表します。また、本論文に関して種々の有益なご指摘を頂いた同研究科植松一真教授、長澤和也教授、海野徹也准教授に感謝の意を表します。

本研究は以下の皆様の多大なる協力により行われましたので、感謝の意を表します。柳川建氏（現広島県福山地域事務所）には水産試験場淡水魚支場および県庁水産振興室でアユの細菌性腎臓病の感染源の調査などに協力して頂きました。広瀬久巳氏（現広島県備北地域事務所）には水産試験場淡水魚支場、内水面実験地および水産海洋技術センターで、山口安資氏（現広島県備北地域事務所）には水産試験場淡水魚支場および内水面実験地でアユの飼育、感染実験などに協力して頂きました。濱田よしみ氏、村重一成氏、中野健子氏には水産海洋技術センターでアユの飼育、感染実験などに協力して頂きました。太田川漁業協同組合の田村龍弘氏には、冷水病耐病性アユ研究のきっかけを与えて頂き、実験魚の提供、冷水病耐病性アユの交配などに協力して頂きました。社団法人広島県栽培漁業協会の村上啓士氏をはじめ職員の方々には実験魚の提供、冷水病耐病性アユの作出などに協力して頂きました。独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所の乙竹充博士にはワクチン開発研究にあたり様々な助言や協力を頂きました。古橋真氏（元オリエンタル酵母工業）には免疫賦活剤の提供などの協力を頂きました。東京海洋大学の坂本崇博士には冷水病耐病性アユ研究において様々な助言や協力を頂きました。高山晴義博士（元広島県水産試験場）には細菌の走査電子顕微鏡による写真撮影に協力して頂きました。岩本恵美氏（広島大学大学院）には細菌同定などに協力して頂きました。

また、魚病研究に関する多くの知識や技術をご指導頂いた室賀清邦博士（広島大学名誉教授）、西澤豊彦博士（北海道大学大学院准教授）に感謝の意を表します。

本研究は、筆者が広島県水産試験場淡水魚支場、広島県水産試験場内水面部、広島県立水産海洋技術センター裁培養殖部および広島県立総合技術研究所水産海洋技術センター水産研究部に所属した9年間に行われた。その間に組織体制は大きく変化した、一貫して内水面の魚類防疫に関する研究の機会を与えて頂いた歴代の所属長に感謝を申し上げます。また、水産試験場および水産海洋技術センターで協力を頂いた米司隆氏（元内水面部長・裁培養殖部長）、様々な助言や指導を頂いた飯田悦左博士、また様々な協力を頂いた職員の方々に感謝の意を表します。

最後に、本研究は社団法人日本水産資源保護協会魚病技術開発研究委託金をはじめ様々な研究費で行われたことから、関係各位にお礼を申し上げます。

## 公表論文

1. Nagai T., Y. Iida (2002): Occurrence of bacterial kidney disease in cultured ayu. *Fish Pathology*, **37**, 77-81.
2. 永井崇裕・飯田悦左・米司 隆 (2003) : アユ冷水病に対する水溶性アジュバント添加ワクチンの野外試験. 魚病研究, **38**, 63-65.
3. Nagai T, T. Tamura, Y. Iida, T. Yoneji (2004): Differences in susceptibility of *Flavobacterium psychrophilum* among three stocks of ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathology*, **39**, 159-164.
4. 永井崇裕 (2005) : 細菌性腎臓病原因菌 *Renibacterium salmoninarum* のアユに対する感染性. 広島県水産試験場研究報告, No.23, 1-3.
5. 永井崇裕 (2006) : 人工生産アユ数系統の冷水病感受性について. 広島県立水産海洋技術センター研究報告, No.1, 27-31.
6. 永井崇裕・坂本 崇 (2006) : 異なるアユ系統間の冷水病感受性と免疫応答. 魚病研究, **41**, 99-104.
7. Nagai T., Y. Iida, E. Iwamoto, T. Nakai (2008): A new vibriosis of cultured ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathology*, **43**, 49-54.
8. Nagai T., E. Iwamoto, T. Sakai, T. Arima, K. Tensha, Y. Iida, T. Iida, T. Nakai (2008): Characterization of *Edwardsiella ictaluri* isolated from wild ayu *Plecoglossus altivelis* in Japan. *Fish Pathology*, **43**, 158-163.