

せっそう病と冷水病に混合感染したサケ科魚類からの細菌分離について

誌名	事業報告書
ISSN	02862166
著者名	三浦,正之
発行元	山梨県水産技術センター
巻/号	31号
掲載ページ	p. 2-6
発行年月	2003年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



せつそう病と冷水病に混合感染したサケ科魚類からの細菌分離について

三浦 正之

わが国のサケ科魚類における細菌性疾病のうち、被害量の多いものとして、せつそう病、冷水病が挙げられる。当支所ではせつそう病の原因菌 *Aeromonas salmonicida* (以下「せつそう病菌」という) の分離を目的としてトリプトソーヤ寒天培地(以下「TSA」培地という)、冷水病の原因菌 *Flavobacterium psychrophilum* (以下「冷水病菌」という) の分離を目的として改変サイトファーガ寒天培地(以下「mCPA培地」という) を用いて細菌分離を行なっている。ただし、せつそう病菌はTSA培地だけでなく、mCPA培地にも生育する。

当支所において、せつそう病と診断される病魚の中には、冷水病の症状を呈しているものも多数観察されるが、必ずしも、両方の菌が同時に分離されるとは限らない。この原因として、mCPA培地に冷水病菌と比べ増殖速度の速いせつそう病菌が優先的に生育することによって、検査臓器中に冷水病菌が存在するにもかかわらず、冷水病菌が分離できていない可能性が考えられる。もしそうであれば、このことは正確な診断に支障をきたしており、改善する必要がある。

せつそう病菌が冷水病菌の分離に及ぼす影響を調査した報告は過去に無く、今回は、冷水病菌の分離にせつそう病菌がどの程度影響を及ぼしているのかを調査した。また、現在アユなどにおいて、体表、鰓等の雑菌が多い部分から冷水病菌を分離する際に、有効性が示唆されている¹⁾ tobramycin(以下「TOB」という) を培地に添加することによって、冷水病とせつそう病の混合感染病魚から冷水病菌を効率的に分離できる可能性についても検討を行なった。

材料および方法

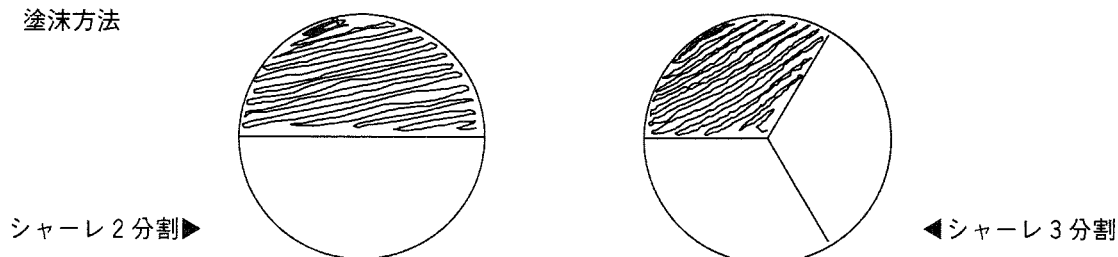
せつそう病、冷水病罹病魚の臓器中の生菌数

当支所で県下のサケ科魚類養殖業者より診断依頼のあった病魚、および養殖場巡回指導時に採集した病魚を本調査に供試した。当支所では通常検査魚1ロットあたり5尾～10尾検査しているが、このうち、せつそう病罹病魚における臓器中のせつそう病菌の菌数測定には、体表の出血、膨隆、鰭基部の出血等せつそう病の症状を呈した瀕死魚のうち最も症状が顕著な1～2尾を用いた。また、冷水病罹病魚における臓器中の冷水病菌の菌数測定には鰭の擦り切れ、鰓の貧血等冷水病の症状を呈した瀕死魚のうち最も症状が顕著な1～3尾を供試魚として、腎臓、および脾臓1gあたりの菌数を定量的に調査した。菌数の測定は病魚の腎臓、脾臓を滅菌地下水で約50倍に希釈し、磨砕したものを原液とし、これらの10倍量希釈系列を作製し、各希釈段階の50 μ Lを平板上に均一に塗抹する方法を用い、出現した集落数より臓器1g中の生菌数を算定した。

せつそう病菌が冷水病菌の分離に及ぼす影響

せつそう病菌(OTH0012株)をTSA培地で48h培養後、コロニーを滅菌地下水中に懸濁したものを10倍段階希釈し、 3.9×10^8 CFU/mL～ 3.9×10^3 CFU/mLまでの6段階の濃度の菌液を作成した。また、冷水病菌(OTH0228株)も同様にmCPA培地にて72h培養後、滅菌地下水中に懸濁させ、 2.4×10^7 CFU/mL～ 2.4×10^2 CFU/mLまでの5段階の濃度の菌液を作成した。これら、各種菌濃度のせつそう病菌液と冷水病菌液を試験管中に1mLずつ混合したものを供試菌液とした。試験はシャーレを2分割した場合と3分割した場合について行い、白金耳に膜が張る程度に供試菌液を附着させ、mCPA培地にそれぞれ図1のように塗抹し、18 $^{\circ}$ C、72h培養後にそれぞれの菌の生育状況を調査した。また、対照として2種の菌を混合せず、単独のものを図1のように塗抹した。なお、試験に使用した白金耳はニクロム線を直径約4.5mmの円形となるように曲げたものを用いた。また、予備試験においてmCPA培地中の馬血清の有無は結果にほとんど影響を及ぼさないことが明らかとなったため、mCPA培地はすべて2.5%馬血清を添加したのを用いた。

図1 塗抹方法



せつそう病菌および冷水病菌のTOBに対する最小発育阻止濃度（以下「MIC」という）

1997年度から2002年度の間に県下のサケ科魚類養殖場より診断依頼のあった病魚、および養殖場巡回指導時に採集した病魚から分離し、当支所において凍結保存中のせつそう病菌45株、冷水病菌52株を供試菌株とした。

薬剤感受性試験は日本化学療法学会標準法に準じて行なった。せつそう病菌にはミューラー-ヒントンス寒天培地(栄研化学)、冷水病菌にはmCPA培地を使用した。TOBとしてトブラシン注60mg(塩野義製薬)を使用し、TOB1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の溶液を作製し、これを原液として、2倍階段希釈したものを適量培地中に混合し、培地中の最終薬剤濃度が0.05~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となる薬剤培地系列を作製した。細菌の接種方法はTSA培地、およびmCPA培地にて増菌した供試菌1白金耳を滅菌地下水1mLに懸濁させ、滅菌綿棒を用いて接種した。MICの判定は接種後18 $^{\circ}\text{C}$ で培養し、48h後におこなった。

mCPA培地中へのTOB添加効果

試験1と同様の方法でせつそう病菌 $2.6 \times 10^8 \text{CFU}/\text{mL}$ ~ $2.6 \times 10^3 \text{CFU}/\text{mL}$ までの6段階の濃度の菌液を作成した。また、冷水病菌は $3.2 \times 10^7 \text{CFU}/\text{mL}$ ~ $3.2 \times 10^3 \text{CFU}/\text{mL}$ までの5段階の濃度の菌液を作成した。これら、各種菌濃度のせつそう病菌液と冷水病菌液を試験管中に1mLずつ混合したものを供試菌液とした。また、TOBの添加量はせつそう病菌および冷水病菌のMIC測定結果および熊谷¹⁾の結果から、mCPA培地中にTOBを5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とすることが適当と考えられた。そこで、TOBを5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加したmCPA培地に供試菌液を塗抹し、冷水病菌の分離状況を調査した。

結 果

せつそう病、冷水病罹病魚における臓器中の生菌数

結果を表1および表2に示した。せつそう病菌の腎臓1gあたりの菌数は 2.5×10^7 ~ $8.5 \times 10^8 \text{CFU}$ であった。また、脾臓1gあたりの菌数は 5.6×10^5 ~ $1.1 \times 10^9 \text{CFU}$ であった。冷水病菌の腎臓1gあたりの菌数は 3.7×10^3 ~ $5.7 \times 10^6 \text{CFU}$ であった。また、脾臓1gあたりの菌数は $5.1 \times 10^2 \text{CFU}$ ~ $9.0 \times 10^6 \text{CFU}$ であった。

表1 せつそう病菌の腎臓および脾臓中の生菌数

魚体No.	業者番号	魚種	体重	検出臓器	生菌数/g
1	023	カワマス	50 g	腎臓	1.6×10^8
2	124	アマゴ	45	腎臓	6.2×10^8
				脾臓	2.9×10^8
3	020	ヤマメ	76	腎臓	8.1×10^7
				脾臓	5.6×10^5
4	008	イワナ	85	腎臓	1.5×10^8
				脾臓	1.0×10^9
5	008	イワナ	85	腎臓	8.5×10^8
				脾臓	1.1×10^9
6	026	イワナ	65	腎臓	1.2×10^8
				脾臓	1.1×10^8
7	026	イワナ	65	腎臓	2.5×10^7
				脾臓	9.4×10^6

表2 冷水病菌の腎臓および脾臓中の生菌数

魚体No.	業者番号	魚種	体重	検出臓器	生菌数/g
1	023	ニジマス	8 g	腎臓	2.2×10^6
2	022	ニジマス	10	腎臓	2.9×10^5
				脾臓	9.0×10^6
3	022	ニジマス	10	腎臓	2.8×10^4
				脾臓	5.1×10^2
4	022	ニジマス	10	腎臓	1.1×10^5
				脾臓	8.0×10^2
5	036	ニジマス	19	腎臓	5.7×10^6
				脾臓	1.4×10^6
6	031	ニジマス	19	腎臓	3.7×10^3
				脾臓	1.8×10^3
7	031	ニジマス	90	腎臓	1.5×10^4
				脾臓	1.2×10^4

せつそう病菌が冷水病菌の分離に及ぼす影響

シャーレを2分割した場合の結果を表3に示した。 $3.9 \times 10^8 \text{CFU}/\text{mL}$ のせつそう病菌液と冷水病菌液を混合した場合は、すべての区において冷水病菌の発育は確認されなかった。 $3.9 \times 10^7 \text{CFU}/\text{mL}$ のせつそう病菌液と冷水病菌液を混合した場合は、冷水病菌液濃度が $2.4 \times 10^7 \text{CFU}/\text{mL}$ 以上でなければ、冷水病菌の発育は確認されなかった。 $3.9 \times 10^6 \text{CFU}/\text{mL}$ のせつそう病菌液と冷水病菌液を混合した場合は、冷水病菌液濃度が $2.4 \times 10^6 \text{CFU}/\text{mL}$ 以上でなければ、冷水病菌の発育は確認されず、冷水病菌液濃度が $2.4 \times 10^6 \text{CFU}/\text{mL}$ であっても、冷水病菌の発育はかなり抑制された。 $3.9 \times 10^5 \text{CFU}/\text{mL}$ のせつそう病菌液と冷水病菌液を混合した場合は、冷水病菌液濃度が $2.4 \times 10^6 \text{CFU}/\text{mL}$ 以上でなければ、冷水病菌の発育は確認されなかった。 $3.9 \times 10^4 \text{CFU}/\text{mL}$ のせつそう病菌液と冷水病菌液を混合した

場合は、すべての区において冷水病菌の発育は確認されたが、冷水病菌液濃度が 2.4×10^3 CFU/mLの場合には、冷水病菌の発育はかなり抑制された。 3.9×10^3 CFU/mLのせつそう病菌液と冷水病菌液を混合した場合は、冷水病菌の発育はすべての区において対照と同程度であった。

シャーレを3分割した場合の結果も表3に示したが、シャーレを2分割した場合の結果とほぼ同様であった。

表3 mCPA培地での細菌の分離状況

せつそう病菌液濃度 (CFU/mL)	混合した冷水病菌液濃度 (CFU/mL)	細菌の分離状況(シャーレ2分割)		細菌の分離状況(シャーレ3分割)	
		冷水病菌	せつそう病菌	冷水病菌	せつそう病菌
3.9×10^8	2.4×10^7	×	○	×	○
	2.4×10^6	×	○	×	○
	2.4×10^5	×	○	×	○
	2.4×10^4	×	○	×	○
	2.4×10^3	×	○	×	○
3.9×10^7	2.4×10^7	○	○	○	○
	2.4×10^6	×	○	×	○
	2.4×10^5	×	○	×	○
	2.4×10^4	×	○	×	○
	2.4×10^3	×	○	×	○
3.9×10^6	2.4×10^7	○	○	○	○
	2.4×10^6	△	○	△	○
	2.4×10^5	×	○	×	○
	2.4×10^4	×	○	×	○
	2.4×10^3	×	○	×	○
3.9×10^5	2.4×10^7	○	○	○	○
	2.4×10^6	○	○	○	○
	2.4×10^5	×	○	△	○
	2.4×10^4	×	○	△	○
	2.4×10^3	×	○	×	○
3.9×10^4	2.4×10^7	○	○	○	○
	2.4×10^6	○	○	○	○
	2.4×10^5	○	○	○	○
	2.4×10^4	○	○	○	○
	2.4×10^3	△	○	○	○
3.9×10^3	2.4×10^7	○	○	○	○
	2.4×10^6	○	○	○	○
	2.4×10^5	○	○	○	○
	2.4×10^4	○	○	○	○
	2.4×10^3	○	○	○	○

○；対照と同程度の発育 △；かなり発育が抑制される ×；発育が確認されない

せつそう病菌および冷水病菌のTOBに対する最小発育阻止濃度

結果を図2に示した。せつそう病菌のTOBに対するMICはすべて $1.56 \mu\text{g/mL}$ 以下であり、TOBに対して感受性を示した。一方、冷水病菌のTOBに対するMICはすべて $25 \mu\text{g/mL}$ 以上であり、TOBに対して耐性を示した。

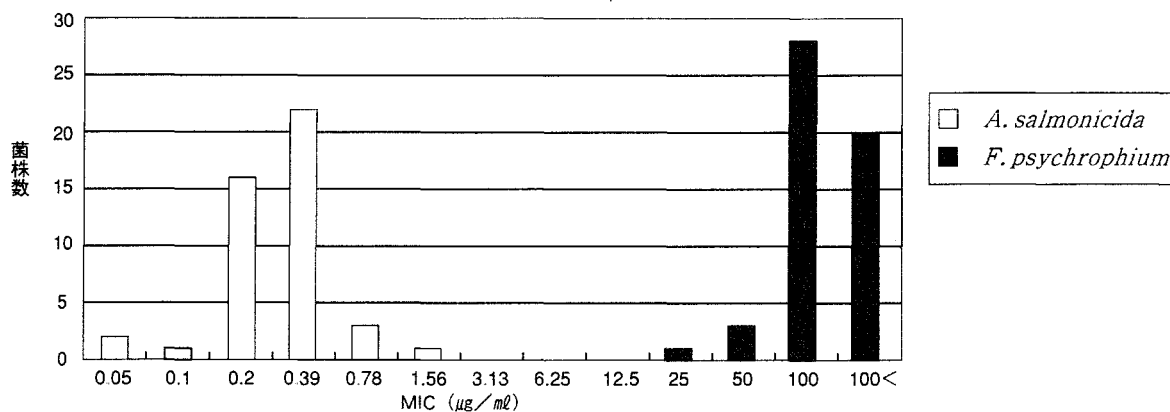


図1 せつそう病と冷水病菌のTOBに対するMIC

mCPA培地中へのトブラマイシン添加効果

結果を表4に示した。シャーレ2分割、3分割ともに、せつそう病菌の濃度にかかわらず、すべての区において、冷水病菌は対照とほぼ同程度に分離された。

表4 TOB添加mCPA培地での細菌の分離状況

せつそう病菌液濃度 (CFU/mL)	混合した冷水病菌液濃度 (CFU/mL)	細菌の分離状況(シャーレ2分割)		細菌の分離状況(シャーレ3分割)	
		冷水病菌	せつそう病菌	冷水病菌	せつそう病菌
3.9×10 ⁸	2.4×10 ⁷	○	×	○	×
	2.4×10 ⁶	○	×	○	×
	2.4×10 ⁵	○	×	○	×
	2.4×10 ⁴	○	×	○	×
	2.4×10 ³	○	×	○	×
3.9×10 ⁷	2.4×10 ⁷	○	×	○	×
	2.4×10 ⁶	○	×	○	×
	2.4×10 ⁵	○	×	○	×
	2.4×10 ⁴	○	×	○	×
	2.4×10 ³	○	×	○	×
3.9×10 ⁶	2.4×10 ⁷	○	×	○	×
	2.4×10 ⁶	○	×	○	×
	2.4×10 ⁵	○	×	○	×
	2.4×10 ⁴	○	×	○	×
	2.4×10 ³	○	×	○	×
3.9×10 ⁵	2.4×10 ⁷	○	×	○	×
	2.4×10 ⁶	○	×	○	×
	2.4×10 ⁵	○	×	○	×
	2.4×10 ⁴	○	×	○	×
	2.4×10 ³	○	×	○	×
3.9×10 ⁴	2.4×10 ⁷	○	×	○	×
	2.4×10 ⁶	○	×	○	×
	2.4×10 ⁵	○	×	○	×
	2.4×10 ⁴	○	×	○	×
	2.4×10 ³	○	×	○	×
3.9×10 ³	2.4×10 ⁷	○	×	○	×
	2.4×10 ⁶	○	×	○	×
	2.4×10 ⁵	○	×	○	×
	2.4×10 ⁴	○	×	○	×
	2.4×10 ³	○	×	○	×

○；対照と同程度の発育 △；かなり発育が抑制される ×；発育が確認されない

考 察

ノルウェーでは現在細菌性疾病に対する各種ワクチンが開発されており、細菌性疾病の発生は減少し、抗菌薬を用いる場合は非常に少なくなっているといわれている。これに対して日本では、サケ科魚類に使用できるワクチンはジブリオ病に対してのみであり、せつそう病および冷水病による被害は現在でも続いている。また、これらの疾病の治療には基本的に抗菌薬の投薬による治療が行なわれており、病魚検査における細菌分離、薬剤感受性試験による有効薬剤の選定は疾病の治療上重要な役割を果たしているといえる。本調査は、このような理由から細菌分離の精度向上を目的として行なった。

せつそう病罹病魚および冷水病罹病魚の腎臓、脾臓の1gあたりの菌数を測定した結果、せつそう病罹病魚では腎臓、脾臓ともにせつそう病菌が10⁸オーダー以上存在している場合が多かった。一方、冷水病罹病魚の臓器中の菌数は多い場合でも10⁶オーダーであった。森川ら³⁾がアマゴにせつそう病菌を接種し、その生菌数の消長を調査した結果、臓器中の菌数が10⁶⁻⁷CFU/mLに達すると斃死が始まると推測され、また、臓器中の菌数は脾臓、腎臓ともに多い場合で10⁹オーダーで存在していたという結果があるが、本試験の結果とよく一致している。これらの結果から、冷水病

病罹病魚の内臓菌数がせつそう病罹病魚と比較して少量であることが示唆された。また、せつそう病菌が冷水病菌の分離に及ぼす影響を調査した結果、シャーレを2分割した場合、3分割した場合ともに、せつそう病菌が1 mLあたり $10^7 \sim 10^8$ オーダーで存在していた場合には、冷水病菌が 10^7 オーダー以上存在していなければ、冷水病菌は分離されず、また、冷水病罹病魚検査臓器1 gあたりの冷水病菌の生菌数が多くとも 10^6 オーダーであったという結果からも、せつそう病と冷水病の混合感染病魚から冷水病菌は分離されにくいということが明らかとなった。

このことから、せつそう病、冷水病混合感染病魚からせつそう病菌の増殖のみを抑え、冷水病菌を効率的に分離することを目的として、TOBについて検討した。なお、TOBについては、Decosere²⁾がカラムナリス病原菌*Flexibacter columnare*を選択的に分離することを目的として有効性を確認し、熊谷¹⁾がアユなどにおいて、体表、鰓など雑菌の多い部位から冷水病菌の分離を試みる際、雑菌を抑え、冷水病菌の分離率が上昇することを確認している。TOBに対する、せつそう病菌、冷水病菌のMICを測定した結果、せつそう病菌のMICは全て $1.56 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であり、これとは対照的に冷水病菌のMICは $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であった。これらの結果と、冷水病菌は培地中に $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のTOBの存在下においても増殖がほとんど妨げられないという熊谷¹⁾の結果から、本試験ではmCPA培地中に $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のTOBを添加し、その効果について検証した。その結果、混合したせつそう病菌の菌量にかかわらず、全ての区において冷水病菌が対照と同程度分離された。このとき、せつそう病菌の生育は完全に阻止されており、in vitroにおいてTOBの効果は十分確認されたといえる。

細菌の分離は検査者の技量、塗抹方法等にかなり左右されるものであるとはいえ、本試験の結果から、せつそう病菌が冷水病菌の分離に多大な影響を及ぼしていることは間違いないと考えられた。つまり、せつそう病罹病魚から細菌分離を行なう場合に、同時にこの魚が冷水病にも感染していたとしても、通常のmCPA培地を用いて検査を行なった場合、かなり広い面積にでも塗抹しない限りは、冷水病菌の分離率は大きく低下してしまうことが予想される。本試験の結果、TOBを添加したmCPA培地を用いて検査を行なえば、検査臓器中のせつそう病菌の菌数にかかわらず冷水病菌の分離が可能となることが示され、実際の魚病診断業務にも必要に応じて、この培地を用いて行く必要があると考えられた。著者らは2002年度、魚病診断業務にTOBを添加したmCPA培地を使用した。せつそう病と冷水病の混合感染病魚から、通常のmCPA培地には冷水病菌の生育は確認されないが、TOB添加mCPA培地には冷水病菌のコロニーが確認された例が数例あり、実際の魚病診断業務においてもTOB添加mCPA培地は十分効果を示しているといえる。

要 約

- ・ せつそう病罹病魚における検査臓器1 gあたりの生菌数は 10^8 オーダー以上の場合が多く、冷水病罹病魚の臓器1 gあたりの生菌数は多くとも 10^6 オーダーであった。
- ・ せつそう病菌が冷水病菌の分離に及ぼす影響を調査した結果、せつそう病菌が1 mLあたり $10^7 \sim 10^8$ オーダーで存在していた場合、冷水病菌が 10^7 オーダー以上存在していなければ、冷水病菌は分離されなかったことから、せつそう病と冷水病の混合感染病魚から冷水病菌は分離されにくいことが明らかとなった。
- ・ TOBのせつそう病菌に対するMICは $1.56 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、冷水病菌に対するMICは $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であった。
- ・ TOB $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ をmCPA培地に添加すれば、存在するせつそう病菌の菌数にかかわらず、冷水病菌が分離可能であった。

文 献

- 1) 熊谷明 (2002) : 冷水病分離用培地へのトブラマイシン添加培地の有効性について. 社団法人日本水産資源保護協会月報, 449, 13-14.
- 2) Decosere, A., Haesebrouck, F. and Devriese, L. A (1997) : Shieh medium supplemented with tobramycin for selective isolation of *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) for diseased fish. J. Clinical Microbiology, 35 (1), 314-316.
- 3) 森川進・三木知・田代文男 (1981) : アマゴに *Aeromonas salmonicida* を接種した時の血液性状および生菌数の消長. 魚病研究, 16, 1, 43-49