短 報

シロサケ回帰親魚の細菌性冷水病原因菌
Flavobacterium psychrophilum の
保有とふ化場での垂直感染の防除小林俊将^{1*}・高橋憲明²

(2020年1月17日受付)

Detection of *Flavobacterium psychrophilum* in Adult Chum Salmon and Prevention of Vertical Transmission in a HatcheryToshimasa Kobayashi^{1*} and Noriaki Takahashi²¹Iwate Prefectural Inland Fisheries Technology Center,
Iwate 028-7302, Japan²Fisheries Promotion Center Miyako Branch of Coastal
Regional Development Bureau of Iwate Prefecture,
Iwate 027-0072, Japan

(Received January 17, 2020)

ABSTRACT—*Flavobacterium psychrophilum*, which causes bacterial cold-water disease, was detected in the ovarian fluid of female chum salmon used for mating in a hatchery in Iwate Prefecture in 2018. The detection rate of *F. psychrophilum* in chum salmon was 0.0–91.7% in individuals captured from a river; 0.0–100.0% in individuals captured from the sea and stocked in fresh water before testing; and 21.4% in individuals captured from the sea and not stocked in fresh water. Pre-water-hardening disinfection of fertilized eggs was performed for 21,165 thousand eggs in the hatchery, where the average eyed-egg ratio was 92.4%. Intra-ovum infection was not detected in the disinfected eggs, but 23.3% of non-disinfected eggs became infected.

Key words: *Flavobacterium psychrophilum*, bacterial cold-water disease, vertical transmission, *Oncorhynchus keta*

近年、我が国のシロサケ *Oncorhynchus keta* 増殖事業では、放流種苗の回帰率の低下が問題となっており、その対策として健苗生産が求められている。岩手県のシロサケふ化場では2019年の調査で、細菌性冷水病の病原菌である *Flavobacterium psychrophilum* が30施設中20施設で検出され、うち2施設で冷水病の発生が確認されており、シロサケの健苗生産において冷水病の防除は重要である。サケ科魚類では受精後の吸水時に卵表面の冷水病菌が卵門から卵内に侵入して卵内感染することが明らかになっており (Kumagai and Nawata, 2010a; Kohara et al., 2012; 小原ら, 2018)、親魚から稚魚への垂直感染が懸念されている。北海道及び宮城県では河川に天然遡上したシロサケ親魚が高率で冷水病菌を保有していることが報告されており (熊谷・縄田, 2007; Misaka and Suzuki, 2007; Hatakeyama, 2013; 畑山ら, 2018)、シロサケふ化場でも冷水病菌の垂直感染が懸念されている。しかし、岩手県沿岸に回帰するシロサケ親魚については冷水病菌の保有は調べられていないことから、本研究では岩手県沿岸域に回帰するシロサケについて、冷水病菌の保有状況を調べた。その際、河川遡上前後の親魚を調べるにより、シロサケ親魚がどの段階で冷水病菌に感染したのか推察した。

また、サケ科魚類における冷水病菌の卵内感染を防ぐ方法として、受精卵の吸水前消毒の有効性が報告されている (熊谷, 2015)。これは等張液で希釈したポビドンヨード剤で吸水前の受精卵の表面を消毒することにより、吸水時の冷水病菌の卵内感染を防除する手法で、多くのサケ科魚類の種苗生産において導入が進められてきている。しかし、数千万粒/年の規模で種苗生産が行われているシロサケふ化場では事業規模での吸水前消毒は実施されていない。そこで、本研究ではシロサケふ化場において事業規模での吸水前消毒を実施し、その実用性と冷水病菌の卵内感染の防除効果を検証した。

材料および方法

親魚からの体腔液の採取

2018年9月27日、10月2日、10月31日、11月21日、12月4日に岩手県の田野畑村漁業協同組合明戸川さけ・ますふ化場で採卵に使用したシロサケの雌親魚から体腔液を採取した (Table 1)。この際、岩手県田野畑村の明戸川で採捕された河川遡上親魚と、岩手県田野畑村地先海面の小型定置網及び定置網で採捕された海産親魚に分けて体腔液を採取した。なお、海産親魚は採捕時に排卵していない個体が多いので、同ふ化場内の飼育池に蓄養して成熟、排卵した後に採卵に使用している。蓄養する飼育池には明戸川の伏流水をポンプアップした淡水を使用している。海産親魚の採卵前の蓄養期間は9月27日及び10月2日の採卵群で2週間、10月31日及び11月21日の

¹ 岩手県内水面水産技術センター² 岩手県沿岸広域振興局水産部宮古水産振興センター

* Corresponding author

E-mail: t-kobayashi@pref.iwate.jp

Table 1. Detection of *Flavobacterium psychrophilum* in the ovarian fluid of chum salmon captured in Akedo River or along the Tanohata coast, Iwate Prefecture

Sampling date	No. of positive fish/No. of fish examined (%)			
	Captured from a river		Captured from the sea	
Sep 27, 2018	0/3	(0.0)	0/8	(0.0)* ¹
Oct 2, 2018	9/11	(81.8)	3/19	(15.8)* ¹
Oct 31, 2018	13/17	(76.5)	13/30	(43.3)* ²
Nov 21, 2018	11/12	(91.7)	40/40	(100.0)* ²
Dec 4, 2018	—		6/28	(21.4)

*¹: Stocked in fresh water for two weeks before sampling.*²: Stocked in fresh water for one week before sampling.**Table 2.** Intra-ovum detection rate of chum salmon eggs by *Flavobacterium psychrophilum* after pre-water-hardening disinfection by povidone-iodine treatment at a hatchery in Iwate Prefecture

Group	Fertilization days	Sampling days	Cumulative temperature: (°C · day)	Intra-ovum detection rate of eyed eggs. No. positive/No. examined
Exp.	Sep 27–Oct 2, 2018	Nov 1, 2018	375–409	0/50
	Oct 31, 2018	Nov 21, 2018	266	0/60
	Oct 31, 2018	Dec 4, 2018	422	0/60
	Nov 21, 2018	Dec 21, 2018	369	0/60
Cont.	Oct 31, 2018	Nov 21, 2018	266	14/60
	Nov 9, 2018	Dec 4, 2018	313	0/60
	Nov 24, 2018	Dec 21, 2018	333	0/60

採卵群で1週間だった。また、12月4日の採卵群は定置網で採捕した時点で排卵していた個体からふ化場内の飼育池に入れる前に体腔液を採取した。体腔液は、雌親魚の総排泄口を70%エタノールで消毒した後、滅菌した1,000 μ Lのチップを装着したマイクロピペットを挿入して、採卵前に個体ごとに採取した。

細菌性冷水病菌の検出

採取した体腔液は1.5 μ Lをマイクロチューブに分注して冷蔵状態で岩手県内水面水産技術センターに搬入し、その日のうちにトブラマイシン5 μ g/mLを添加した改変サイトファーガ平板培地(Kumagai *et al.*, 2004)に滅菌した綿棒で塗抹した。15°Cで1週間培養した後、黄色のコロニーを100 μ LのTEバッファーに懸濁し、95°C10分処理の熱抽出法により核酸を抽出し、ロタマーズ法によるPCR(吉浦ら, 2006)により冷水病菌を鑑別した。

受精卵の吸水前消毒

2018年9月～12月に明戸川さけ・ますふ化場で交配した受精卵は一部の対照区を除き、全て吸水前消毒を実施した。受精卵の吸水前消毒は熊谷(2015)の手法を参考に、シロサケふ化場での採卵作業工程に合わせて以下のとおり実施した。

雌親魚を約8尾ずつ開腹し、排卵している未受精卵を約2万粒ずつ受卵盆に採卵した。未受精卵が入った受卵盆に等張液3Lを加えて攪拌した後にザルで等張液を濾す方法で2回洗卵した。等張液は標準等張液を使用し、水10Lあたり、NaCl 90.4 g, KCl 2.4 g, CaCl₂ · 2H₂O 3.4 gを溶解して作製した。洗卵後、4～5尾の雄の精液12～15 mLを媒精し、攪拌した後に等張液3Lを加えて受精させた。精子が混ざった等張液をザルで濾し、再度、等張液3Lを加えてザルで濾して、余分な精子を除去した。その後、等張液で200倍に希釈したポビドンヨード剤(ムンディファーマ株式会社製:水産用イソジン液10%)中に受精卵を浸漬して15分間卵表面を消毒した。均一に消毒されるように、消毒液中の卵を5分ごとに緩やかに攪拌した。消毒卵数は消毒液10Lに対して卵2万粒を上限とした。消毒後に受精卵を真水で洗卵し、真水をかけ流している吸水槽に収容して約1時間吸水させた。吸水完了後に卵重量を測定し、採卵数を計数した。また、発眼後に発眼率を算出した。

吸水前消毒効果の検証

2018年9月～12月に明戸川さけ・ますふ化場で吸水前消毒をして交配した卵を試験区とし、吸水前消毒をしないで従来どおりの乾導法で交配した卵を対照区として準

備した。対照区では採卵後に接水することなく、複数個体の雄の精子を媒精し、攪拌後に真水を加えて受精させ、真水で洗卵後に真水をかけ流している吸水槽に収容して約1時間吸水させた。対照区は約2万粒ずつ計3回作製した。冷水病菌の卵内感染の検査は対照区では10月31日～11月24日に採卵した3群、試験区では9月27日～11月21日に採卵した4群について実施した（Table 2）。各群の発眼卵50～60粒をボビドンヨード剤で15分間消毒後にマイクロチューブに1粒ずつ入れ、滅菌した柄付き針で卵を潰し、得られた卵内からの抽出液を綿棒で採取して改変サイトファーガ平板培地（トブラマイシン 5 µg/mL 添加）に滅菌した綿棒で塗抹し、前述と同様の手法により菌を培養、鑑別した。

冷水病菌の塩分耐性の検証

シロサケの海洋生活期での冷水病感染の可能性を検討するために、冷水病菌の塩分耐性を調べた。試験には2019年5月に岩手県釜石市にあるふ化場で飼育されていたシロサケ稚魚から分離した冷水病菌株を用いた。冷水病菌のコロニーから滅菌綿棒でかき取った菌を0%, 1%, 2%, 3%, 4%のNaClを含む改変サイトファーガ平板培地（トブラマイシン 5 µg/mL 添加）に塗抹し、前述と同様の手法により菌を培養、鑑別した。

結 果

シロサケ雌親魚の体腔液からの冷水病菌の検出結果をTable 1に示した。9月27日に採取した検体からは河川遡上親魚、海産親魚のいずれからも冷水病菌は検出されなかったが、10月2日以降に採取した検体では河川遡上親魚では76.5%～91.7%、海産親魚では15.8%～100.0%から冷水病菌が検出された。また、淡水の飼育池での畜養を行う前に検体を採取した12月4日の海産親魚からも21.4%で冷水病菌が検出された。

2018年9月～12月の期間に、明戸川さけ・ますふ化場では累計で21,165,000粒の卵を吸水前消毒した。作業人数は7人で、一日で処理した卵数は最大96万粒、その際、採卵から収容までの所要時間は約6時間だった。平均発眼率は92.4%（最低84.6%～最高97.5%）で、ふ化後の発生に異常は認められなかった。

試験区及び対照区での冷水病菌の検出率をTable 2に示した。吸水前消毒を実施した試験区では4回の検査の全ての発眼卵において卵内から冷水病菌は検出されなかった。一方で、吸水前消毒を実施しなかった対照区では10月31日の採卵群で60粒の発眼卵のうち23.3%にあたる14粒の卵内から冷水病菌が検出された。11月9日及び11月24日の採卵群での検査ではいずれも卵内から冷水病菌は検出されなかった。

塩分耐性の検証の結果、塩分濃度0%, 1%, 2%の改

変サイトファーガ平板培地では冷水病菌が増殖したが、塩分濃度3%及び4%の培地では冷水病菌の増殖は認められなかった。

考 察

本研究結果から、北海道及び宮城県の河川のみでなく、岩手県沿岸に回帰するシロサケ親魚も冷水病菌を保有していることが明らかになった。冷水病菌の検出率は時期により異なるが、11月21日の調査では90%以上の親魚から冷水病菌が検出されており、北海道や宮城県での事例（熊谷・縄田, 2007; Misaka and Suzuki, 2007; Hatakeyama *et al.*, 2013; 畑山ら, 2018）と同様に高率で冷水病菌を保有していた。

本研究では河川遡上親魚のみでなく海産親魚からも冷水病菌が検出された。9月～11月に使用する海産親魚は定置網で採捕した時点では未成熟の個体が多く、採捕後に1～2週間ふ化場内の淡水で蓄養することから、これらの期間に調査した海産親魚は淡水での蓄養期間に冷水病菌に感染した可能性がある。しかし、12月4日の調査では定置網で採捕された時点で排卵していた海産親魚から淡水の飼育池に収容する前に体腔液を採取しており、これらの個体は海面の定置網で採捕された時点で冷水病菌を保有していたことになる。Madetoja *et al.* (2003) はニジマスから分離した冷水病菌が塩分濃度30‰の海水中では24時間以内に死亡することを報告している。本研究ではシロサケ稚魚から分離された冷水病菌株が塩分濃度3%の条件下で増殖できなかった。これらのことからシロサケが外洋での回遊中に冷水病に感染することはないと考えられる。12月4日の検体を採捕した定置網（定第102号羅賀）は、最も近い明戸川の河口から約2 km離れた外洋に位置しており河川水の影響は少ない状況にある。このことから、本研究において淡水蓄養前の海産親魚から検出された冷水病菌は、降海する前の稚魚期に感染した可能性が高いと考えられる。ただし、河川に一旦遡上して冷水病に感染した個体が降海して定置網で採捕された可能性も否定できないことから、海産親魚が冷水病に感染した時期については更なる調査が期待される。

本研究では吸水前消毒を行わずに通常の交配作業を行った対照区の発眼卵から冷水病菌が検出された。このことは、親魚が冷水病菌を保有しているシロサケふ化場では実際に冷水病菌の卵内感染が生じることを示している。一方で、吸水前消毒を行った試験区では冷水病菌が卵内感染している発眼卵は確認されなかった。また、吸水前消毒をした試験区における平均発眼率（92.4%）は明戸川さけ・ますふ化場における過去5年間の平均値（94.6%）と同程度であり吸水前消毒による初期発生への悪影響は認められなかった。更に吸水前消毒した受精卵から生産した稚魚は放流までの間に冷水病の発生は認め

られず、成育も良好だった。これらのことから、シロサケふ化場における数千万粒規模の種苗生産においても、吸水前消毒は冷水病菌の卵内感染の防除、あるいは低減に有効であることが示唆された。

本研究で冷水病菌の卵内感染が確認されたのは対照区の3ロット中1ロットのみであったが、ニジマスでは卵内感染した冷水病菌が囲卵腔内で 10^7 CFU/mL レベルまで増殖することが報告されている (Kumagai and Nawata, 2010b)。たとえ少数でも卵内感染している卵が存在すると、それらがふ化した際には、ふ化槽内に多くの冷水病菌が放出されることになり、多くの稚魚が冷水病菌に感染することが懸念される。特に岩手県内のシロサケふ化場で多く用いられている浮上槽方式は、飼育池に発眼卵を撒く直撒式より高密度で発眼卵が収容されていることから、孵化直後の感染リスクは高まると考えられる。

謝 辞

本研究に協力していただいた明戸川さけ・ます孵化場の橋場明彦場長および職員の皆様、研究にご助言いただいた宮城県水産技術総合センターの熊谷 明氏に感謝いたします。

文 献

- Hatakeyama, M. (2013): Detection of *Flavobacterium psychrophilum* in chum salmon *Oncorhynchus keta* and virulence of isolated strains to salmonid fishes. *Fish Pathol.*, **42**, 201–209.
- 畑山 誠・藤原 真・水野伸也 (2018)：サケ回帰親魚の体腔液中の冷水病原菌 *Flavobacterium psychrophilum* 濃度 (短

- 報). 北水試研報, **93**, 89–92.
- Kohara, M., H. Kasai and M. Yoshimizu (2012): Intra-ovum infection in salmonid eggs artificially contaminated with fish pathogenic bacteria: *Flavobacterium psychrophilum*, *Renibacterium salmoninarum* and *Aeromonas salmonicida*. *Fish Pathol.*, **47**, 49–55.
- 小原昌和・野村哲一・笠井久会・吉水 守 (2018)：走査型電子顕微鏡によるニジマス未受精卵および吸水卵の卵門形態の観察. 魚病研究, **53**, 90–93.
- 熊谷 明 (2015)：冷水病菌の卵内感染防除のための新しいサケマス卵消毒法 (後編). 養殖ビジネス, 緑書房, 東京, **52**, 22–26.
- 熊谷 明・縄田 暁 (2007)：サケ科魚類冷水病の垂直感染防除に関する研究. 平成18年度 養殖衛生管理技術開発研究成果報告書, pp. 3–15.
- Kumagai, A. and A. Nawata (2010a): Mode of the intra-ovum infection of *Flavobacterium psychrophilum* in salmonid eggs. *Fish Pathol.*, **45**, 31–36.
- Kumagai, A. and A. Nawata (2010b): Prevention of *Flavobacterium psychrophilum* vertical transmission by iodophor treatment of unfertilized eggs in salmonids. *Fish Pathol.*, **45**, 164–168.
- Kumagai, A., C. Nakayasu and N. Oseko (2004): Effect of tobramycin supplementation to medium on isolation of *Flavobacterium psychrophilum* from ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, **39**, 75–78.
- Madetoja, J., S. Nystedt and T. Wiklund (2003): Survival and virulence of *Flavobacterium psychrophilum* in water microcosms. *FEMS microbiology ecology*, **43**, 217–223.
- Misaka, N. and K. Suzuki (2007): Detection of *Flavobacterium psychrophilum* in chum salmon *Oncorhynchus keta* and virulence of isolated strains to salmonid fishes. *Fish Pathol.*, **42**, 201–209.
- 吉浦康寿・釜石 隆・中易千早・乙竹 充 (2006)：Peptidylprolyl cis-trans isomerase C 遺伝子を標的とした PCR による *Flavobacterium psychrophilum* の判別と遺伝子型. 魚病研究, **41**, 67–71.