

養殖イサキのリケッチア症対策（感染条件の検討）

増養殖対策科 黒原健朗

1. 経緯および目的

数年前から宿毛湾のイサキ養殖場において、腎腫大や腎臓・脾臓に病変を伴う原因不明のへい死がみられている。本疾病はBHI培地や小川培地等の一般的な培地では培養できず、当初はリケッチア症であることが強く疑われ、当水試において平成13年度よりその対策のための事業を実施している。その後、本症が*Francisella*属細菌の細胞内寄生が原因であることが判明し、診断に際しては分離培養、PCR検査ならびに蛍光抗体法が利用できることが明らかにされた¹⁻²⁾。また、病名も細菌性肉芽腫症（仮称）として示されている。しかし、本疾病については他魚種における感受性も含めてまだまだ不明な点が多い。

そこで本年度は感染条件解明のための知見収集を目的として、水温別感受性試験、同居感染試験、およびイサキ以外の魚種（ブリ・マダイ）における感受性試験を実施した。

2. 材料および方法

(1) 感染試験用病魚の入手および接種液の調製方法

宿毛湾において疾病の発生している小割生け簀より衰弱魚もしくはへい死魚をサンプリングし、それらから脾臓および腎臓を取り出し、福田らの方法に準じて19倍量の滅菌PBS(-)と共に磨砕して接種液（以下、臓器磨砕液）を調製した³⁾。

(2) 実験1 水温別感受性試験

当初、本疾病の発生盛期は晩夏から秋期であったが、発生状況調査結果から近年では周年発生の傾向がうかがわれる。そこで、水温が本疾病の発病に影響するか否かを調べるための試験を実施した。

試験条件は以下のとおりである。設定水温は本

疾病の発生盛期と思われる秋期と、夏場の一般的な疾病流行期を基準にして25および29℃に設定し、それぞれに感染区と対照区を設けた。試験に際し、各区に15尾ずつの健康な日本産イサキ稚魚（人工種苗、平均体重15.9g）を130Lポリエチレン製角形水槽に収容し、設定水温で5日間馴致を行った。そして臓器磨砕液を1尾あたり0.2mlの割合で腹腔内接種して20日間経過観察した。対照区には滅菌PBS(-)を同様に接種し、試験期間中は市販のEP飼料を1日1回飽食量与えた。

(3) 実験2 同居感染試験

イサキにおいて本疾病が水平感染するか否かを調べることを目的として、病魚と健康魚との同居感染試験を行った。

健康魚と同居させる病魚は以下のように準備した。まず、65尾の健康な日本産イサキに1尾あたり0.1mlの割合で臓器磨砕液を接種し、右腹鰭切除により標識して発病がみられるまで観察した。図1にその間の状況を示しているが、へい死は3日目からみられ、7日目以降増加した。本疾病によるへい死であることを確認した後に、9日目に生残魚を感染魚とみなして取り上げ、本試験に供した。

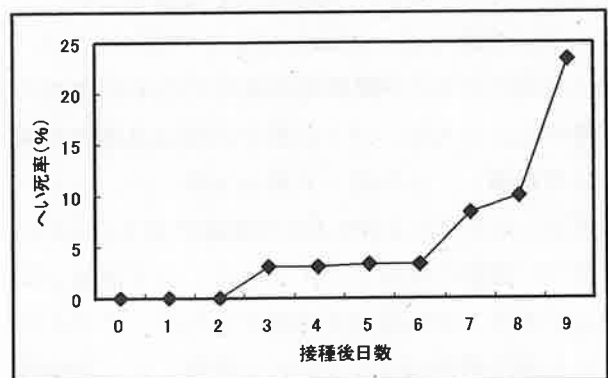


図1 接種魚のへい死状況

本試験では接種魚と非接種魚（平均体重15.9g）

を16:44 (25%同居区)、30:30 (50%同居区) の割合で計60尾を200Lダイライト水槽に同居させ、30日間経過観察した。対照区には予備飼育魚をそのまま60尾収容し、へい死魚はその都度取り上げて確定診断した。試験期間中の水温は23.8~24.6℃であった。

(4) 実験3 他魚種における感受性試験

本疾病が本県の主要な養殖魚についても感受性を有するかを調べることを目的とした飼育試験を実施した。

供試魚としてブリおよびマダイを用い、ブリは地先の養殖業者より購入した稚魚を室内水槽で養成した体重185.4gのものを、またマダイは種苗生産した体重49.0gのものをを用いた。なお、両魚種とも本試験前に予備飼育魚を取り上げて腎臓を10尾ずつプールし、PCR検査により保菌していないことを確認した。

ブリ試験では供試魚のうち10尾に0.5ml、別の10尾に1.0mlの臓器磨砕液をそれぞれ腹腔内接種するとともに、高濃度接種魚は右腹鰭切除により標識して計20尾を500Lダイライト水槽に収容した。また、対照区には0.5mlおよび1.0mlの滅菌PBS(-)を10尾ずつに腹腔内接種した。さらに、本接種液のイサキでの病原性を確認するため、平均体重12.1gの健康な日本産イサキ10尾についても同様の臓器磨砕液を1尾あたりに0.1ml接種した。試験期間は20日とし、その間市販のEP飼料を1日1回与えた。なお、水温は27℃に設定した。

マダイ試験では、供試魚のうち15尾に0.2ml、別の15尾に0.5mlの臓器磨砕液をそれぞれ腹腔内接種するとともに、ブリ試験と同様に高濃度接種魚には標識し、計30尾で試験を実施した。また、対照区には0.2および0.5mlの滅菌PBS(-)を15尾ずつに腹腔内接種した。さらに、ブリ試験と同様にイサキでの病原性を確認するため、イサキ30尾にも臓器磨砕液を0.1mlずつ接種した。試験期間はブリ試験同様20日とし、その間は市販EP飼料を1日1回与えた。試験中の水温は26℃に設定した。

(5) 実験魚の感染判定法

へい死魚および試験終了時における生残魚はすべて取り上げ、腎臓および脾臓のスタンプ標本作製し、メチレンブルー (以下 MB) 染色により菌体の有無を調べた。また、菌分離はヘモグロビンパウダー (BBL社製) を2%添加したシステインハート培地 (Difco社製) を用い、25℃、48時間培養してコロニーを確認した。PCR検査はニッポンジーンのIsogenを用いて腎臓からDNAを抽出し、Nested法により行った。

3. 結果および考察

(1) 実験1 水温別感受性試験

試験期間中の累積へい死率の推移を図2に示した。25℃接種区では5日目からへい死がみられ始め、最終的なへい死率は86.7%であった。いずれのへい死魚でも腎腫大や腎臓および脾臓における肉芽腫が認められ、MB染色により確定診断した。しかし、25℃対照区、29℃対照区および29℃接種区ではへい死は全く認められなかった。

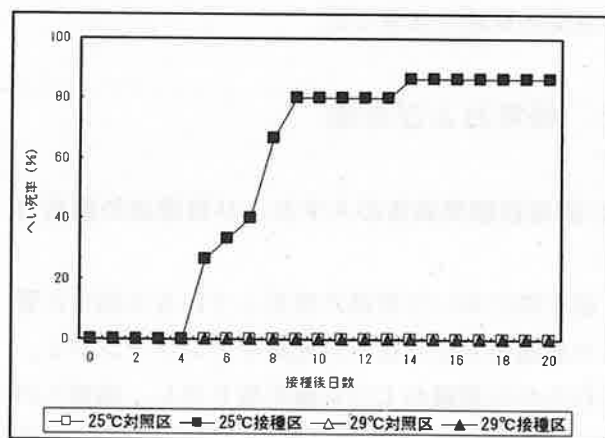


図2 水温別感受性試験における累積へい死率の推移

終了時の生残魚はすべて取り上げ、症状や腎臓および脾臓のMB染色により感染の有無を調べた。その結果は表1に示したとおりであり、25℃感染区ではいずれも発病が認められた。29℃感染区ではへい死はなかったものの、15尾中4尾(26.7%)で発病が認められた。両水温区とも発病が認

められたにもかかわらず25℃感染区でのみへい死がみられ、水温が感染率およびへい死率に影響することが示唆された。

表2 試験終了時における生残魚の状況

	生残尾数	症状あり ^{※1}	菌体あり ^{※2}	感染尾数 ^{※3}
25℃対照区	15/15	0/15	0/15	0/15
25℃感染区	2/15	2/2	2/2	2/2
29℃対照区	15/15	0/15	0/15	0/15
29℃感染区	15/15	7/15	4/15	4/15

※1 腎臓および脾臓に結節が確認されたもの

※2 脾臓および腎臓スタンプのMB染色により菌体を確認したもの

※3 症状、菌体とも確認された尾数

(2) 実験2 同居感染試験

試験期間中の累積へい死率の推移を図3に示した。対照区ではへい死は認められなかったが、25%同居区・50%同居区とも試験開始直後からへい死がみられ、最終的なへい死率は50%同居区で45.0%、25%同居区で16.7%であった。

へい死魚を接種魚と非接種魚すなわち自然感染魚とに分けて比較すると図4のようになる。接種魚についてみると、25%同居区、50%同居区とも本試験開始からへい死がみられ、同居開始から1週間前後、接種日から数えると2週間前後で終息した。その後、磨砕液を接種していない魚でも自然感染により、50%同居区で5尾、25%同居区でも1尾のへい死がみられたことから、水平感染が成立することが確認された。

50%同居区のへい死率は接種魚で80.0%、自然感染魚で16.7%、一方の25%同居区では接種魚で56.3%、自然感染魚で2.3%となり、接種魚・自然感染魚とも50%同居区で高い値を示した。また、自然感染魚は接種魚のへい死が終息してから1週間後、すなわち本試験開始から2週間後よりみられ始めたことから、本症の潜伏期間は概ね2週間前後と考えられた。

試験終了時における生残魚の発病状況を実験1における判定法と同様にして臓器の状態とMB染色により調べ、その結果を表5に示した。25%同居区・50%同居区とも感染魚が確認されたものの、どちらの区でも接種魚・自然感染魚で同等の結果がみられ、病魚の収容尾数による差異は小さかった。

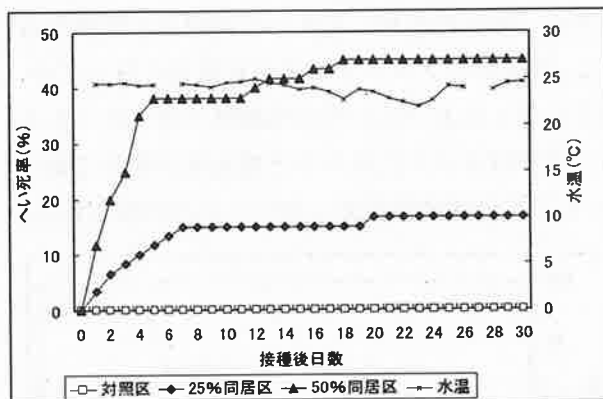


図3 同居感染試験における累積へい死率の推移

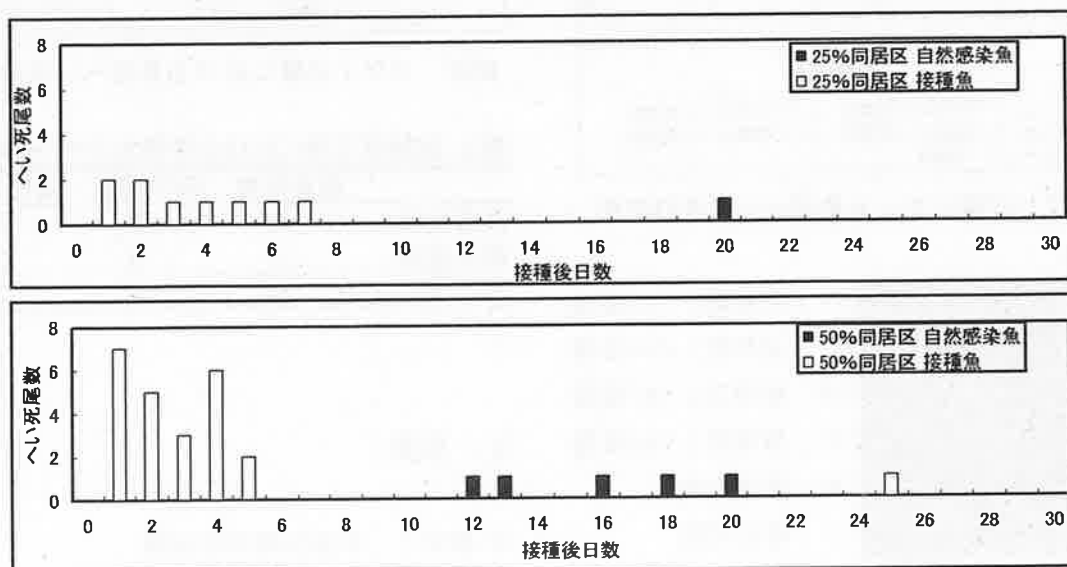


図4 両試験区におけるへい死魚の内訳

表5 同居感染試験における生残魚の発病状況

	25%同居区	50%同居区
全体	10/49(20.4)	8/32(25.0)
被感染	3/7(42.9)	3/6(50.0)
自然感染	7/42(16.7)	5/26(19.2)

()は%

(3)実験3 他魚種における感受性試験

1)ブリ試験

累積へい死率の推移を図6に示した。イサキ区では試験開始9日目よりへい死がみられ始め、最終のへい死率は90%であった。しかし、ブリでは接種区・対照区ともへい死は認められず、生残魚について解剖および臓器のMB染色を実施した結果でも症状と菌体は確認されなかった。

また、両区の生残したすべての魚から腎臓を採取し、10尾ずつプールしてPCR検査に供したが、図7に示したようにいずれも陰性であったことから、ブリはイサキに比べると感受性が極めて低いか、もしくは感受性が全くないことが示唆された。

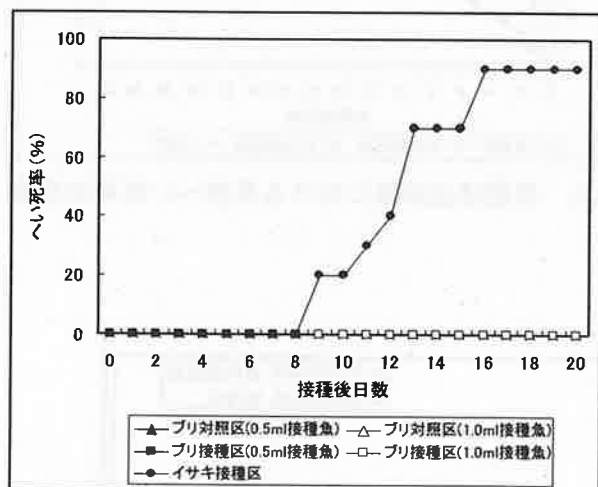
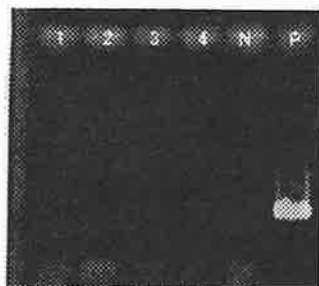


図6 ブリ試験における累積へい死率の推移



1 : 対照区0.5ml接種
2 : 対照区1.0ml接種
3 : 接種区0.5ml接種
4 : 接種区1.0ml接種
N : 陰性対照
P : 陽性対照

図7 ブリ試験における生残魚のPCR検査結果

2)マダイ試験

図8に累積へい死率の推移を示した。イサキ区では試験開始9日目よりへい死がみられ始め、試験終了時におけるへい死率は40%であった。マダイでは対照区で1尾のへい死がみられたが、この個体からは症状・菌体とも確認されず、接種魚のへい死は認められなかった。しかし、表2に示したように試験終了時に接種魚個別に行ったPCR検査では、接種濃度との相関はなかったものの8尾で陽性が認められた。よって、マダイでもブリ同様に本疾病に対する感受性はイサキに比べると極めて低いと考えられたが、マダイでは本疾病のキャリアーとなる可能性が示唆された。

今後はマダイからイサキへの感染があるか否かを調べる必要がある。

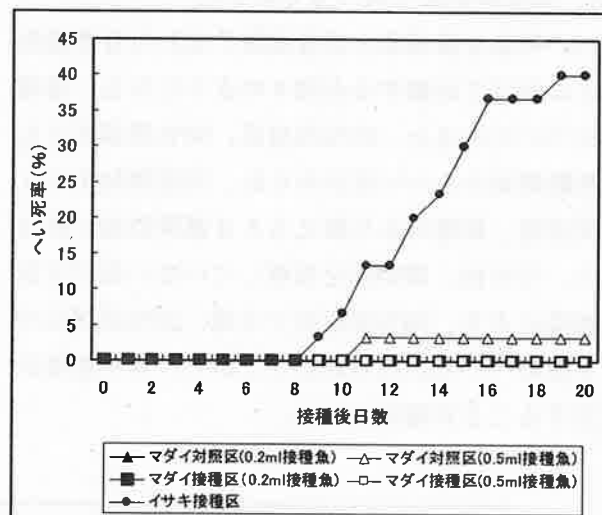


図8 マダイ試験における累積へい死率の推移

表2 試験終了時における接種魚のPCR検査結果

	検査尾数	陽性尾数	陽性率(%)
高濃度区	15	3	20.0
低濃度区	15	5	33.3
合計	30	8	26.7

4. 要約

(1)実験1 水温別感受性試験

25および29℃条件下で水温の発病への影響を調

べた結果、25℃区で高いへい死が認められた。29℃区ではへい死はなかったが発病はみられ、水温によるへい死率と発病率への影響が示唆された。

(2) 実験2 同居感染試験

病魚の臓器磨砕液を接種して発病がみられた魚と健康魚とを25%もしくは50%の割合で同居させた。その結果、50%同居区では接種魚の80.0%がへい死し、非接種魚でもへい死率が16.7%であった。25%同居区でも感染率は低いものの同様の結果が認められたことから、同居感染が成立した。接種魚と非接種魚の発病時期の違いから、本疾病の潜伏期間は2週間前後と推察された。

(3) 実験3 他魚種における感受性試験

マダイ・ブリにおける感受性の有無を調べるため、病魚の磨砕液を2段階の濃度で接種し、イサキのそれと比較した。その結果、イサキでは40もしくは90%のへい死がみられたが、ブリ・マダイでは濃度の高低にかかわらず、本疾病に起因するへい死は認められなかった。PCR検査の結果、ブリでは保菌魚は全く認められず、感受性がないことも推察されたが、マダイでは30尾中8尾で陽性がみられ、マダイがキャリアーとなる可能性が示唆された。

5. 参考文献

- 1) 釜石 隆・福田 穰・西山 勝・良永知義 (2002) : イサキのリケッチャ様微生物のSrRNA配列. 2002年度日本水産学会大会講演要旨集, 131.
- 2) 福田 穰 (2002) : イサキの細菌性肉芽腫症 (仮称). 養殖2002.12, 35-36.
- 3) 福田 穰・岡村 愛・西山 勝・川上秀昌・釜石 隆・吉永知義 (2002) : 養殖イサキに寄生した細胞内寄生細菌による肉芽腫症. 魚病研究, 37(3), 119-124.