

養鰻における疾病の早期検知技術の開発

中城 岳

1 目的

県内ではウナギ養殖が盛んに行われており、その産業規模は年間生産量 300～600 トン、年間生産金額 10～20 億円と、本県における重要な産業となっている。しかし、以前から疾病によるへい死被害が大きな問題となっており、魚病による年間被害金額（平成 27～31 年（令和元年）の 5 カ年平均）は約 9 千万円にもものぼる。ウナギ養殖で被害をもたらす疾病はウイルス病、細菌病、寄生虫病の 3 種に大別されるが、県内ではこのうち細菌病の発生頻度が最も高く、特に腸内細菌科の 1 種である *Edwardsiella tarda*（以下、*E. tarda*）に起因する「パラコロ病」の被害が最も多い。当該疾病による年間被害金額（平成 27～31 年（令和元年）の 5 カ年平均）は約 6 千万円であり、年間の疾病被害の大多数を占める（図 1）。パラコロ病は他の疾病と比較すると、発症後の症状の進行や感染拡大が早く、一定数のへい死魚が発生した段階では既に飼育池全体に感染が広まっており、給餌制限や抗菌剤の投薬を行っても思うような効果が得られず、その後もへい死被害が継続する場合が多い。

養殖池内における細菌性疾病は、初期に感染した個体の放出する原因菌が飼育水を介して他の個体に感染することで飼育池全体に蔓延していくと考えられる。そのため、発症しへい死が発生する前の段階で、飼育水中の原因菌の細菌量が増加する傾向にあると推察される。これまでの研究によって、パラコロ病と同じ細菌性疾病であるカラムナリス病の原因菌 *Flavobacterium columnare* について、環境水をメンブレンフィルターでろ過後、このフィルターから DNA を抽出し、リアルタイム PCR（以下、qPCR）に供することで、抽出サンプル中に存在する当該細菌の遺伝子のコピー数から細菌量を定量する手法が確立されている（占部ら、2015）。そこで、*E. tarda* についても、同様の手法により養殖池中の細菌量を定期的にモニタリングすることで、細菌量の増加を判断基準として疾病の発生を早期に検知できる可能性がある。

本事業では、パラコロ病発生の早期検知技術の開発を目的として、①qPCR を用いた環境水からの *E. tarda* 細菌量の定量検出手法の確立、②当該手法を用いた感染試験による *E. tarda* の細菌量動態のモニタリング、③実際の養鰻池における *E. tarda* の細菌量動態及び水質項目のモニタリングを行う。なお、本事業は令和 3 年度から 5 年度までの 3 カ年事業であり、令和 3 年度については、①と②の感染試験で用いる病魚の作出方法の検討を実施した。

2 材料と方法

(1) *E. tarda* 菌株の再分類

E. tarda は魚病以外にもヒトの胃腸炎の原因菌としても知られており、人畜共通病原体とされてきたが、最近の遺伝子解析の結果、ヒト由来株と魚類由来株は別種であると報告され、魚類由来株については、*Edwardsiella piscicida* (以下、*E. piscicida*) と *Edwardsiella anguillarum* (以下、*E. anguillarum*) の2種類に再分類された (Abayneh et al.,2012;Shao et al.,2015)。なお、国内の報告によると、日本のマダイ由来2株は *E. anguillarum* に、ヒラメ由来株2株は *E. piscicida* に、ニホンウナギ由来株については、日本で分離された1株は *E. piscicida* に、中国で分離された3株は *E. anguillarum* に分類されている (飯田ら,2016)。そこで、当所保有の *E. tarda* 菌株92株について、DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen)を用いてDNA抽出を行い、これらのDNAサンプルを対象として、Reichleyら (2015) が設計した *E. piscicida* を特異的に検出するプライマー (EP14529F 及び EP14659R) 及びプローブ (EP14615P) と、*E. anguillarum* を特異的に検出するプライマー (EPL1583F 及び EPL1708R) 及びプローブ (EPL1611P) を用いた qPCR を行い、菌株を再分類した。なお、両方のプローブの5'末端に6-FAM、3'末端にBHQ-1を付加した。また、qPCR反応液の組成は、テンプレートDNA 2.0 μ L、Probe qPCR Mix(タカラバイオ)10.0 μ L、フォワード及びリバースプライマー各0.4 μ L (最終濃度各0.2 μ M)、プローブ0.8 μ L (最終濃度0.4 μ M)を混合し、超純水で最終液量20.0 μ Lに調整した。qPCR反応はLight Cycler 96 (Roche)を用い、初期熱変性を95 $^{\circ}$ C30秒、続いて2ステップサイクル (95 $^{\circ}$ C5秒、60 $^{\circ}$ C30秒)を50サイクル行った。

(2) 菌株の選択

当所保有の *E. tarda* 菌株90株のうち、細菌分離を行った供試魚の症状等を考慮し、感染試験に供する病原性の高い菌株を選択した。

(3) qPCRによる増幅確認

本研究で用いるプライマー及びプローブが他の病原細菌や環境細菌と非特異的に反応する可能性があることから、これらの特異性を再確認するため、*E. tarda* 5株 (KFCB-0639株、KFCB-0644株、KFCB-0661株、KFCB-0671株及びKFCB-0714株)、*Flavobacterium psychrophilum* 1株 (KFCB-0686株)、*Aeromonas hydrophila* 1株 (KFCB-0616株)、*Aeromonas salomnicida* 1株 (KFCB-0569株)、*Edwardsiella ictaluri* 1株 (KFCB-0620株) 及び *Vibrio cholerae* 1株 (KFCB-0732株) の合計10株 (表1) について、DNeasy Blood & Tissue Kitを用いてDNAを抽出し、これらのDNAサンプルに対するqPCR増幅反応を調べた。なお、qPCR反応液の組成及び反応条件は(1)と同様とした。

(4) qPCRの検量線の作成

(2)で選択した供試菌株をSS寒天培地上に展開し、30 $^{\circ}$ Cで24時間静置培養後、培地上に出現した中心部黒色のコロニーを釣菌し、DNeasy Blood & Tissue Kitを用いてDNA抽出

を行った。得られた DNA サンプルは Amplitaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems) で PCR 反応を行った。反応液の組成は、テンプレート DNA 1.0 μ L、Master Mix 12.5 μ L、フォワード及びリバースプライマー各 1.0 μ L (最終濃度各 0.4 μ M)、を混合し、超純水で最終液量 25.0 μ L に調整した。反応条件は、初期熱変性を 95 $^{\circ}$ C 10 分、続いて 2 ステップサイクル (95 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ C 1 分) を 45 サイクル行った。PCR 増幅産物は 2%アガロースゲル電気泳動に供し、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス) を用いてゲル内の増幅産物を精製した。その後、精製物の DNA 濃度を Qubit Fluorometer (Thermo Fisher SCIENTIFIC) で測定し、DNA 濃度と分子量及びアボガドロ定数からコピー濃度 (copies/ μ L) を算出した。測定した精製物を Easy Dilution (タカラバイオ) で 10^0 - 10^{-9} の 9 段階に希釈し、スタンダードを作成した。各スタンダードを用いて 3 回の qPCR を行い、各希釈系列の Ct 値 (Threshold cycle) の平均を求め、検量線を作成した。

(5) フィルターろ過による DNA 抽出方法の検討と冷凍保存による検出感度の比較

(2) で選択した供試菌株を SS 液体培地 5.0mL に接種後、30 $^{\circ}$ C、24 時間静置培養し、その培養液を超純水で 10^0 - 10^{-9} の 9 段階に希釈した。各希釈系列の菌液 10 μ L を DNeasy Blood & Tissue Kit により DNA を直接抽出する方法をコントロール区、各希釈系列の菌液 200 μ L を 40ml の超純水に懸濁させ、この懸濁液を孔径 0.2 μ m のサイクロポアメンブレンフィルター (Whatman) でろ過し、フィルターから DNA を抽出する方法を試験区 1 として、それぞれの手法で得られた DNA サンプルを qPCR に供し、各希釈系列のコピー濃度を測定し比較した。また、凍結保存による検出感度の比較を行うため、各希釈系列の菌液 200 μ L に超純水 40mL を加えた懸濁液を -20 $^{\circ}$ C で 24 時間冷凍保存し、懸濁液を解凍して試験区 1 と同様の手法で DNA を抽出する方法を試験区 2 として、コピー濃度を測定し、試験区 1 と比較した。なお、ろ過したフィルターからの DNA 抽出・精製方法は、嶋原ら (2015) に従った。

また、各希釈系列の菌液 10 μ L を SS 寒天培地に塗布し、30 $^{\circ}$ C、24 時間培養後、培地上のコロニー数を計数し、培養液 1.0mL あたりの生菌数 (CFU/mL) を算出した。得られた生菌数から各希釈系列の菌液の生菌数を算出し、コントロール区のコピー濃度と比較した。

(6) 病魚作出手法の検討

パラコロ病の感染試験について、過去の文献を参照すると、稚魚期には細菌懸濁液への直接浸漬、もしくは細菌懸濁液へ浸漬したイトミミズの投餌で、人工感染が成立した (石原・楠田, 1981) が、大型魚では浸漬法による人工感染が成立しないとの報告がある。一方、宮崎ら (1992) は、成魚サイズのウナギの腸内に過酸化水素水を注入し、1 尾あたり一定の細菌量を飼料に混入し強制経口投与したところ、細菌量が 2.6×10^6 CFU であった場合、15 尾中 14 尾は 5~23 日経過する間に瀕死ないしへい死し、1 尾あたり 7.9×10^6 CFU であった場合、18 尾中 13 尾が 4 日以内に急激に発症しへい死した、と報告している。そこでこれらの手法を参考に、急性死せず、感染後 10 日前後でへい死する手法を検討した。

供試魚及び供試菌株

供試魚は過去5年間でパラコロ病の発生歴のない県内養鰻業者から入手した、魚体重150～200g/尾のニホンウナギを用いた。供試菌株は(2)で選択した菌株を用いた。病原性の向上を目的として、当該菌株をHI液体培地5.0mLに接種後、30℃、24時間静置培養し、その後、培養液を供試魚1尾の腹腔内に接種し、死亡した魚の腎臓からSS寒天培地で分離した菌株を80%グリセロールで冷凍保存(-80℃)し、攻撃用菌株として使用した。

飼育条件

50Lアクリル水槽に1尾を収容し、各試験区2水槽(1試験区あたり計2尾)とした。飼育水はヒーターで水温を28℃に維持し、十分なエアレーションを行い、一定の溶存酸素量が保持されるようにした。また、飼育水の換水は行わず、後述する飼育水中の細菌量のモニタリング用の採水分をその都度補充した。なお、飼育期間中は無給餌とした。

供試魚及び飼育水の分析

供試魚については、死亡個体は取り上げ後、症状の確認、肝臓及び腎臓組織の塗抹標本の観察、SS寒天培地による菌分離を行い、肝臓及び腎臓組織からDNeasy Blood & Tissue Kitを用いて抽出したDNAサンプルをqPCRに供し、陽性が確認されたサンプルについては、各抽出DNA1.0ngあたりの原因菌DNAコピー数を算出した。なお、生存魚は試験終了日に全て取り上げ、同様の検査を実施した。また、飼育水については、試験開始0日目から試験終了日まで、毎日250mLを採水し、全量を孔径0.1mmのGF/Fガラスフィルター(Whatman)及び孔径0.2µmのサイクロポアメンブレンフィルターでろ過後、これらのフィルターから抽出したDNAサンプルをqPCRに供し、飼育水中の細菌量(CFU/L)を推定した。

感染試験

攻撃方法として、①腸内への過酸化水素水注入及び菌液入り飼料の強制投与方法、②菌液の腹腔内注射法、③浸漬感染法の3種類の方法を実施した。

①腸内への過酸化水素水注入及び菌液入り飼料の強制投与方法

まず、腸内への過酸化水素水注入による魚体への影響を調べるために、30%過酸化水素水を1倍、5倍、25倍の3段階に希釈し、供試魚3尾に対して、各希釈系列5.0mLを1尾ずつ肛門内に注射器で注入し、各希釈系列別に50L水槽に収容後、経過観察した。また、感染試験については、攻撃用菌株をHI液体培地5.0mLに接種後、30℃で24時間静置培養し、培養液を 10^0 (原液)、 10^{-3} 、 10^{-5} の3段階に希釈し、各希釈系列1.0mLを乾重量0.8gのウナギ育成用飼料「皇帝」(フィード・ワン)と混合し、先端を切除した2.5mLシリンジを用いて、1尾ずつ強制的にウナギの胃内へ挿入した。対照区については、同量の滅菌PBSで調整した飼料を投与した。なお、供試魚は 10^0 (原液)区、 10^{-3} 希釈区、 10^{-5} 区希釈区及び対照区の計4区で各2尾ずつ、計8尾とした。

②菌液の腹腔内注射法

攻撃用菌株をHI液体培地5.0mLに接種後、30℃で24時間静置培養し、培養液を 10^0 (原

液)、 10^{-3} 、 10^{-5} の3段階に希釈し、試験区ごとに1尾あたり0.1mLをウナギの腹腔内へ注射した。対照区については、同量の滅菌PBSを腹腔内へ注射した。また、攻撃用菌株の培養液を超純水で 10^0 – 10^{-9} の9段階に希釈後、各希釈系列10 μ LをSS寒天培地に塗布し、30°Cで24時間培養後、培地上のコロニー数を計数し、1尾あたりに投与した生菌数(CFU/尾)を算出した。なお、供試魚は 10^0 (原液)区、 10^{-3} 希釈区、 10^{-5} 区希釈区及び対照区の計4区で各2尾ずつ、計8尾とした。

③浸漬感染法

攻撃用菌株をHI液体培地100mLに接種後、30°Cで24時間静置培養し、さらにその培養液をHI液体培地1Lへ接種後、30°Cで24時間静置培養した。この培養液1Lを地下水9Lと混合し、浸漬攻撃液とした。浸漬時間は試験区ごとに30分間、15分間、5分間の3段階とした。対照区については、地下水10Lへ30分間浸漬した。また、②と同様の手法で浸漬攻撃液の生菌数(CFU/mL)を算出した。なお、供試魚は30分浸漬区、15分浸漬区、5分浸漬区及び対照区の計4区で各2尾ずつ、計8尾とした。

3 結果及び考察

(1) *E. tarda* 菌株の再分類

供試した*E. tarda*菌株90株のうち、5株が*E. piscicida*、85株が*E. anguillarum*に分類された(表2)。特に2020年以降の分離株は全て*E. anguillarum*であり、本試験においては、*E. anguillarum*を実験対象とすることとした。

(2) 菌株の選択

肝臓上に顕著な膿瘍症状が見られた供試魚から分離された、KFFCB0671株を感染試験における攻撃用菌株として選定した。

(3) qPCRによる増幅確認

供試した10株のうちqPCRにより増幅が確認できたのは*E. tarda* (*E. anguillarum*)5株のみであり、その他の菌株の遺伝子は増幅されなかった(図2)。このことから、本qPCR法により*E. anguillarum*を特異的に検出することができるものと判断された。

(4) qPCRの検量線の作成

KFCB-0617株から得られた精製物のDNA濃度は1.11ng/ μ Lで、コピー濃度は 8.80×10^9 copies/ μ Lであった。この精製物を 10^0 – 10^{-9} に段階希釈したスタンダードをqPCR反応に供したところ、相関係数0.9986、増幅効率1.02、傾き-3.29、Y切片37.33からなる検量線が得られた(図3)。これにより、qPCRで得られたCt値からコピー濃度が算出可能であることが分かった。

(5) フィルターろ過による DNA 抽出方法の検討と冷凍保存による検出感度の比較

10^0-10^{-5} の希釈系列の生菌数は、 $7.0 \times 10^5-7.0 \times 10^0$ CFU/ μ L で、 $10^{-6}-10^{-9}$ の希釈系列を接種した培地上にコロニーは出現しなかった。qPCR で測定したコピー濃度は、コントロール区では、 $10^{-7}-10^{-9}$ で検出限界値以下、 $10^0 - 10^{-6}$ で $4.52 \times 10^5 - 2.79 \times 10^0$ copies/ μ L であった。また、試験区 1 では $10^{-6}-10^{-9}$ で検出限界値以下、 $10^0 - 10^{-5}$ で $5.54 \times 10^5 - 8.67 \times 10^0$ copies/ μ L であった。(表 3)。培養液の各希釈系列の生菌数とコントロール区のコピー濃度は、1 細菌あたり 1 コピー濃度とした時の検量線とほぼ一致したことから、本 qPCR 法で得られたコピー濃度は細菌量に置き換えられることが分かった (図 4)。

また、試験区 1 及び 2 のコピー濃度が概ね一致したことから (表 3)、懸濁液を冷凍保存しても当該細菌の DNA 回収率は変わらず、飼育水を冷凍保存し、検査に供することも可能であることが分かった。

(6) 病魚作出手法の検討

各感染試験の実施前に、供試魚の飼育群から 5 尾を無作為抽出し、保菌検査に供したところ、パラコロ病を含む主要疾病の病原体の保有は確認されなかった。

①腸内への過酸化水素水注入及び菌液入り飼料の強制投与法

腸内へ過酸化水素水を注入したところ、いずれの希釈段階においても、注入直後に鰭の発赤、魚体の白化及び硬直等見られ、最終的に全ての供試魚が死亡したため、過酸化水素水の注入を行わず、菌液入り飼料の強制投与のみで感染試験を実施した。

試験開始後、1 日目に 3 試験区の供試魚計 6 尾が強制投与した飼料を吐き戻した。また、2 日目に対照区の 2 尾も同様に飼料を吐き戻したため、感染試験を中断した。そのため、供試魚及び飼育水の分析は実施しなかった。

②菌液の腹腔内注射法

攻撃用菌株培養液の細菌量は 1.3×10^9 CFU/mL であり、1 尾あたりの投与細菌量は原液区で 1.3×10^8 CFU/尾、 10^{-3} 希釈区で 1.3×10^5 CFU/尾、 10^{-5} 希釈区で 1.3×10^3 CFU/尾であった。

試験開始 2 日目及び 4 日目に原液区の供試魚 2 尾が死亡し、その他の試験区の供試魚は試験終了日の 13 日目においても死亡が見られなかった。供試魚の症状の確認等、各種検査の結果については表 4 の通りであった。死亡した 10^0 希釈区の供試魚 2 尾は、出現した症状や塗抹標本に見られた細菌群の形態、qPCR の結果から、パラコロ病の発症により死亡したと考えられた。当該手法によって感染が成立することが明らかになったが、いずれも急性的な死亡であり、自然感染による死亡の状態とは異なることから、当該手法は病魚作出手法としては不適當であると考えられた。

また、試験期間中の飼育水中の *E. anguillarum* 細菌量の推移は図 5 の通りであった。原液区では試験開始後から細菌量が増加し、特に②原液区-2 水槽においては、死亡前日に細菌量が 2.38×10^6 CFU/L で最大となり、供試魚の回収後は緩やかに減少する傾向が見られた。一方、 10^{-3} 希釈区及び 10^{-5} 希釈区においても同様に細菌量の増加が見られたが、供試魚は

死亡せず、魚体から原因菌が検出されなかったことから、何らかの理由で感染が成立しなかったと考えられた。また、対照区の2水槽で細菌量の増加が見られた。これについては、採水時やろ過作業時におけるサンプルのコンタミネーションが疑われたため、作業方法を改善する必要があると考えられた。

③浸漬感染法

攻撃用菌株培養液の細菌量は 6.0×10^7 CFU/mL、浸漬攻撃液の細菌量は 6.0×10^6 CFU/mL であった。

試験開始8日目に30分間浸漬区、15分間浸漬区、5分間浸漬区の供試魚各1尾、計3尾が死亡し、その他の供試魚は試験終了日の11日目においても死亡が見られなかった。供試魚の症状の確認等、各種検査の結果については表4の通りであった。死亡した供試魚3尾は、出現した症状や塗抹標本に見られた細菌群の形態、qPCRの結果から、いずれもパラコロ病の発症により死亡したと考えられた。当該手法による死亡までの日数は8日間であり、自然感染による死亡までの日数（約10日間）に近似していることから、当該手法は病魚作出手法として適当であると考えられた。

また、試験期間中の飼育水中の *E. anguillarum* 細菌量の推移は図6の通りであった。試験区の全水槽において、試験開始直後から細菌量が急激に増加し、供試魚が死亡した③30分浸漬区-1、③15分浸漬区-2、③5分浸漬区-1では、死亡前日まで細菌量が高い状態が維持され、供試魚の回収後は緩やかに減少する傾向が見られた。一方、その他の水槽においても同様に細菌量の増加が見られたが、供試魚は死亡せず、魚体から原因菌が検出されなかったことから、何らかの理由で感染が成立しなかったと考えられた。

【引用文献】

- 占部敦史、長岩理央（2015）ウナギ養殖における生産効率向上化試験．平成27年度事業報告書（事業報告）. **26**. 16-20.
- Abayneh, T., D. J. Colquhoun and H. Sorum（2012）: *Edwardsiella piscicida* sp. nov., a novel species pathogenic to fish. J. Appl. Microbiol., **114**, 644-654.
- Shao, S., Q. Liu, H. Wu, J. Xiao, Z. Shao, Q. Wang and Y. Zhang（2015）: Phylogenomics characterization of a highly virulent *Edwardsiella* strain ET080813T encoding two distinct T3SS and three T6SS gene clusters: Propose a novel species as *Edwardsiella anguillarum* sp. nov., Syst. Appl. Microbiol., **38**, 36-47.
- 飯田貴次、坂井貴光、高野倫一（2016）: エドワジエラ症. 魚病研究, **51(3)**, 87-91.
- Reichley, S. R., Ware, C., Greenway, T. E., Wise, D. J., and Griffin, M. J.（2015）: Real-time polymerase chain reaction assays for the detection and quantification of *Edwardsiella tarda*, *Edwardsiella piscicida*, and *Edwardsiella piscicida*-like species in catfish tissues and pond water. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation **27(2)**, 130-139.
- 嶋原佳子、河東康彦、柳宗悦、前野幸二、釜石隆（2015）養殖場における *Nocardia seriolae* の分布に関する研究．平成27年度日本魚病学会春季大会.
- 石原秀平、楠田理一（1982）: 飼育水温によるパラコ病実験的感染ウナギからの放出菌量の差異について. Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries **49(9)**, 1341-1395
- 宮崎照雄、Miguel A. Gutierrez、田中真二（1992）: ニホンウナギのパラコ病の実験感染に関する研究. 魚病研究, **27(1)**, 39-47.

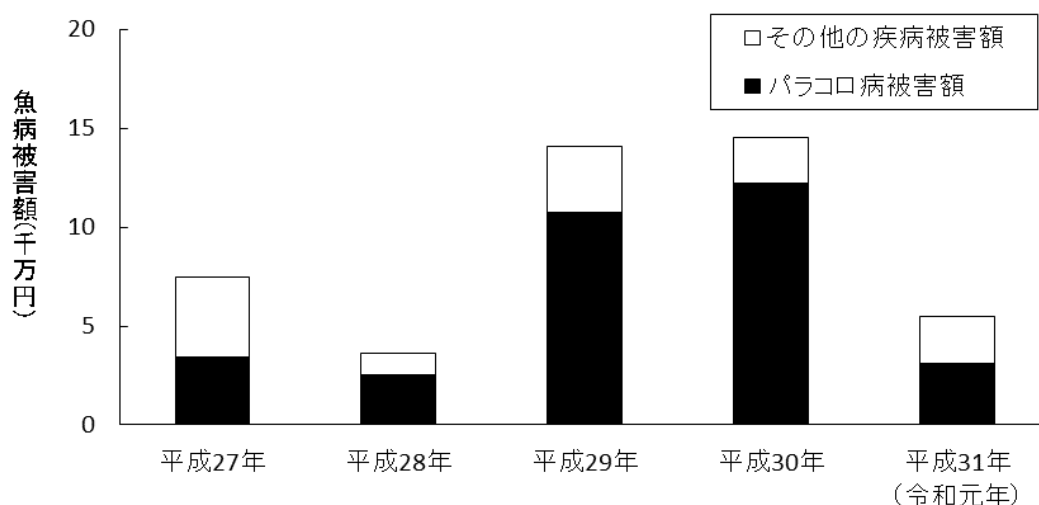


図1 高知県の養鰻業における魚病被害額の推移

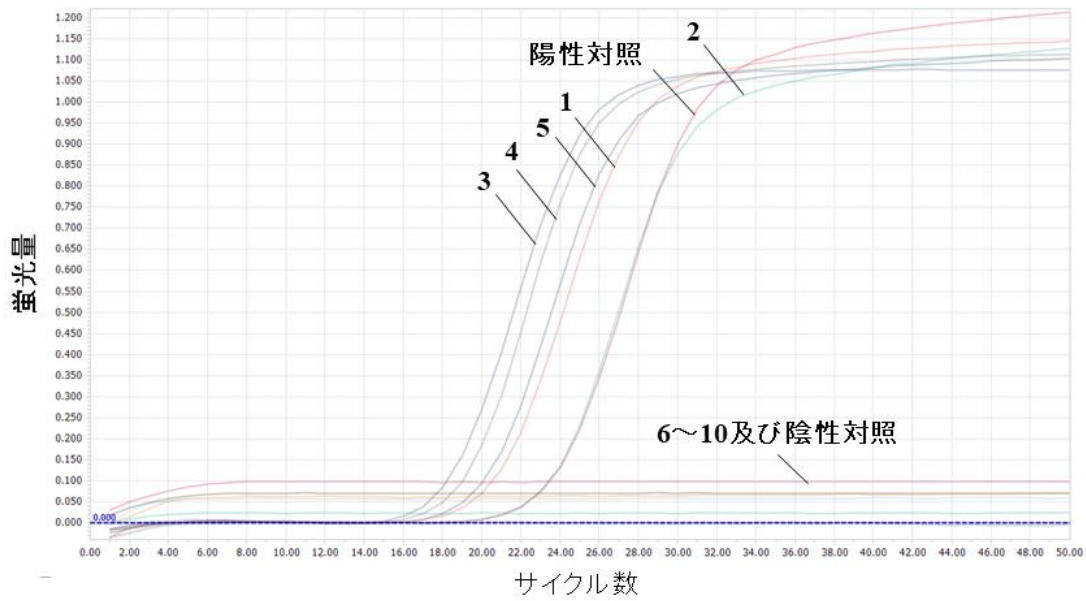


図2 qPCRによる菌株抽出DNAの検出確認

1-10 : サンプル番号 (表1参照)

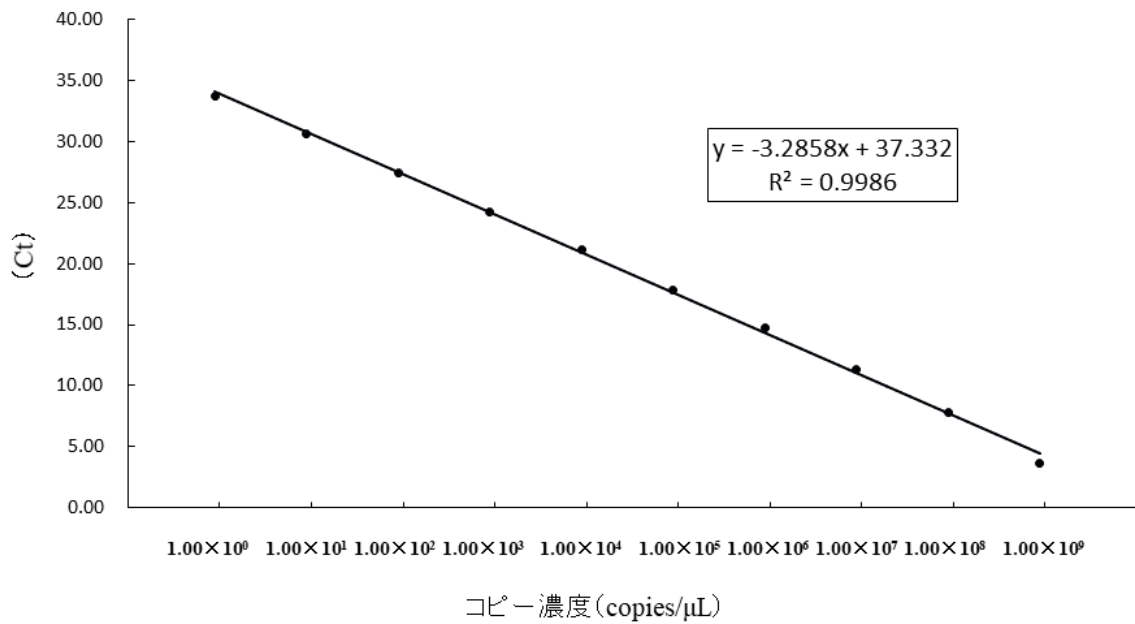


図3 検量線

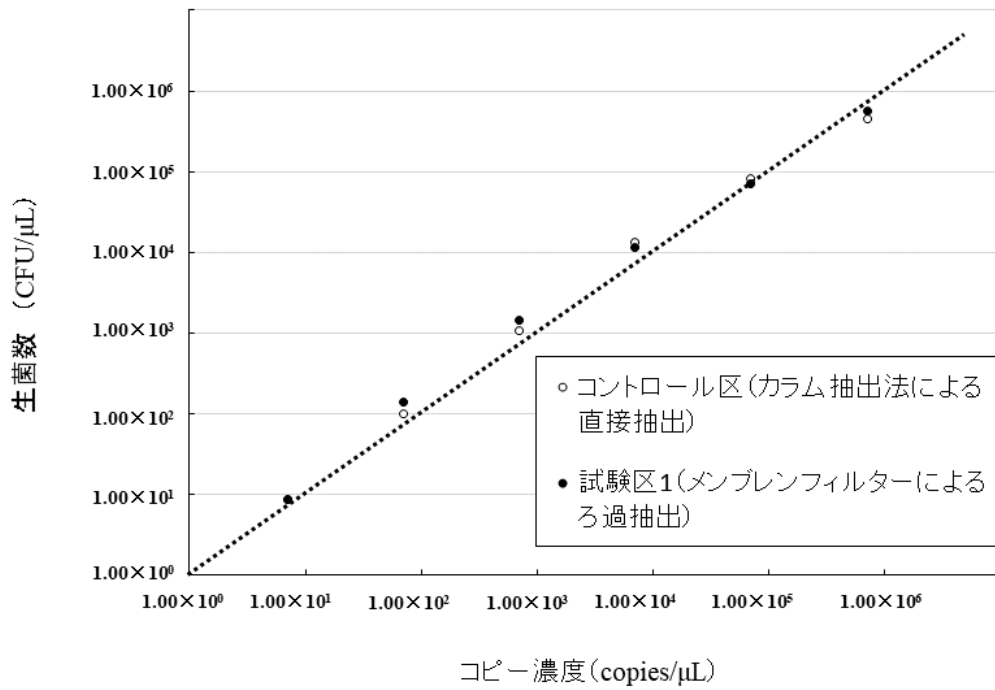


図4 培養液の菌濃度とコピー濃度

(点線：1細菌あたり1コピー数濃度である時に得られる線)

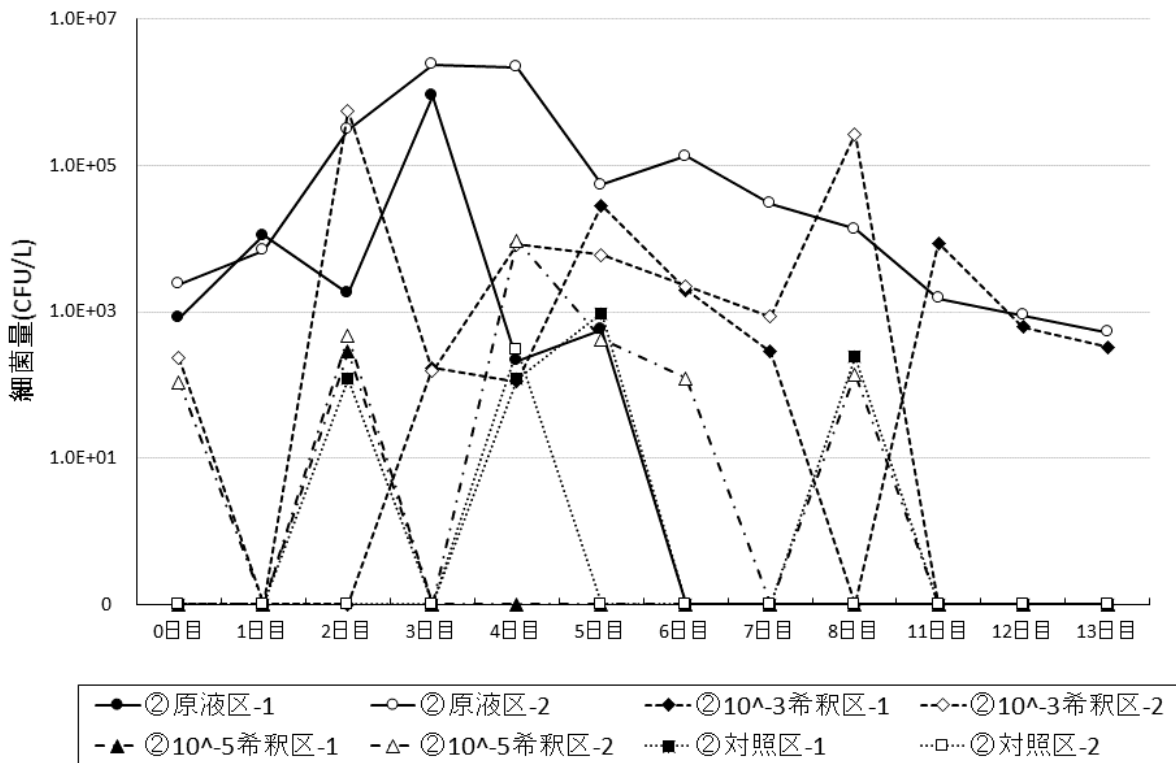


図5 ②菌液の腹腔内注射法を用いた感染試験における飼育水中の細菌量推移

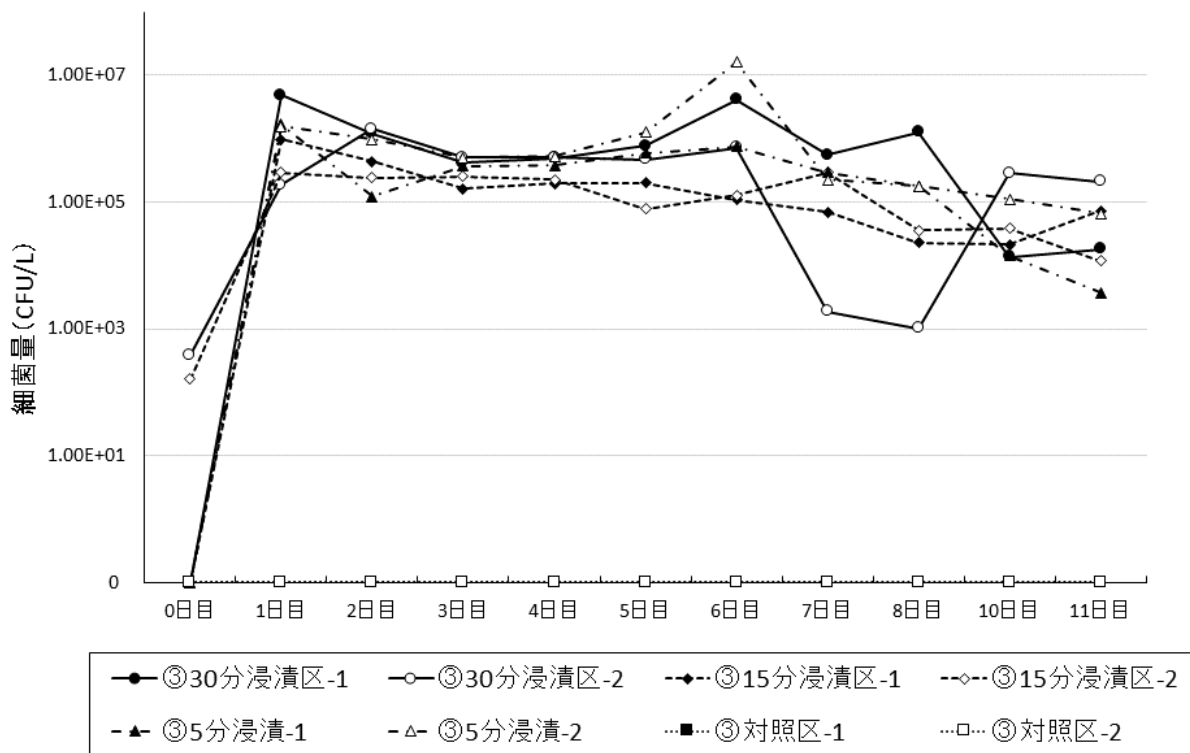


図6 ③浸漬感染法を用いた感染試験における飼育水中の細菌量推移

表1 qPCRによる増幅確認に供した菌株の情報

図2中 番号	菌株No.	細菌名	分離情報		
			年月日	魚種	部位
1	KFCB0639	<i>Edwardsiella tarda</i>	2021/1/15	ウナギ	腎臓
2	KFCB0644	<i>Edwardsiella tarda</i>	2021/2/10	ウナギ	腎臓
3	KFCB0661	<i>Edwardsiella tarda</i>	2021/3/25	ウナギ	肝臓
4	KFCB0671	<i>Edwardsiella tarda</i>	2021/3/26	ウナギ	肝臓
5	KFCB0714	<i>Edwardsiella tarda</i>	2021/6/17	ウナギ	肝臓
6	KFCB0686	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	2021/4/26	アユ	体表
7	KFCB0616	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2020/6/18	カワムツ	腎臓
8	KFCB0569	<i>Aeromonas salmonicida</i>	2018/12/25	アマゴ	腎臓
9	KFCB0620	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	2020/9/7	アユ	体表
10	KFCB0732	<i>Vibrio cholerae</i>	2021/8/2	アユ	腎臓

表 2 *E. tarda* 菌株の再分類結果

菌株No.	分離情報				qPCR結果(○:陽性、×:陰性)	
	分離日	魚種	分離部位	分離培地	<i>E.piscicida</i>	<i>E.anguillarum</i>
KFCB-0024	2013/2/1	ウナギ	肝臓	HI	×	○
KFCB-0027	2013/1/16	ウナギ	肝臓	NA	○	×
KFCB-0029	2013/2/2	ウナギ	肝臓	BHI	×	○
KFCB-0035	2013/2/5	ウナギ	肝臓	SS	×	○
KFCB-0036	2013/2/5	ウナギ	腎臓	SS	×	○
KFCB-0038	2013/2/5	ウナギ	消化管	TSA	×	○
KFCB-0040	2013/2/6	ウナギ	腎臓	SS	○	×
KFCB-0064	2013/2/25	ウナギ	肝臓	SS	×	○
KFCB-0065	2013/2/25	ウナギ	肝臓	SS	×	○
KFCB-0070	2013/2/25	ウナギ	消化管	NA	×	○
KFCB-0089	2013/4/11	ウナギ	腎臓	SS	○	×
KFCB-0090	2013/4/11	ウナギ	肝臓	NA	○	×
KFCB-0093	2013/4/10	ウナギ	肝臓	SS	×	○
KFCB-0096	2013/3/29	ウナギ	腎臓	HI	○	×
KFCB-0332	2015/12/1	ウナギ	肝臓	SS	×	○
KFCB-0334	2015/11/27	ウナギ	肝臓	SS	×	○
KFCB-0622	2020/10/29	ウナギ	腎臓	SS	×	○
KFCB-0623	2020/10/29	ウナギ	腎臓	SS	×	○
KFCB-0624	2020/10/29	ウナギ	肝臓	SS	×	○
KFCB-0625	2020/10/29	ウナギ	肝臓	SS	×	○
KFCB-0626	2020/11/17	ウナギ	肝臓	SS	×	○
KFCB-0627	2020/11/17	ウナギ	肝臓	SS	×	○
KFCB-0628	2020/11/17	ウナギ	肝臓	SS	×	○
KFCB-0629	2020/11/17	ウナギ	体表	SS	×	○
KFCB-0630	2020/11/17	ウナギ	腎臓	SS	×	○
KFCB-0631	2020/11/17	ウナギ	腎臓	SS	×	○
KFCB-0632	2020/12/23	ウナギ	腎臓	SS	×	○
KFCB-0633	2020/12/23	ウナギ	肝臓	SS	×	○
KFCB-0634	2020/12/23	ウナギ	腎臓	SS	×	○
KFCB-0635	2020/12/23	ウナギ	肝臓	SS	×	○
KFCB-0636	2020/12/23	ウナギ	腎臓	SS	×	○
KFCB-0638	2021/1/15	ウナギ	腎臓	SS	×	○
KFCB-0639	2021/1/18	ウナギ	腎臓	SS	×	○
KFCB-0640	2021/1/18	ウナギ	腎臓	BHI→SS	×	○
KFCB-0641	2021/1/18	ウナギ	腎臓	NA→SS	×	○
KFCB-0644	2021/2/10	ウナギ	腎臓	SS	×	○
KFCB-0645	2021/2/10	ウナギ	腎臓	SS	×	○
KFCB-0646	2021/2/10	ウナギ	腎臓	SS	×	○
KFCB-0657	2021/3/13	ウナギ	肝臓	SS	×	○
KFCB-0661	2021/3/25	ウナギ	肝臓	SS→SS	×	○
KFCB-0662	2021/3/25	ウナギ	肝臓	SS→SS	×	○
KFCB-0663	2021/3/26	ウナギ	腎臓	SS→SS	×	○
KFCB-0664	2021/3/26	ウナギ	肝臓	SS→SS	×	○
KFCB-0665	2021/3/26	ウナギ	腎臓	SS→SS	×	○
KFCB-0666	2021/3/26	ウナギ	体表	SS→SS	×	○
KFCB-0667	2021/3/26	ウナギ	肝臓	SS→SS	×	○
KFCB-0668	2021/3/26	ウナギ	腎臓	SS→SS	×	○
KFCB-0669	2021/3/26	ウナギ	肝臓	SS→SS	×	○
KFCB-0670	2021/3/26	ウナギ	体表	SS→SS	×	○
KFCB-0671	2021/3/26	ウナギ	肝臓	SS→SS	×	○
KFCB-0674	2021/4/12	ウナギ	肝臓	SS→SS	×	○
KFCB-0675	2021/4/12	ウナギ	腎臓	SS→SS	×	○
KFCB-0676	2021/4/12	ウナギ	肝臓	SS→SS	×	○
KFCB-0677	2021/4/12	ウナギ	腎臓	SS→SS	×	○
KFCB-0678	2021/4/12	ウナギ	肝臓	SS→SS	×	○
KFCB-0679	2021/4/12	ウナギ	腎臓	SS→SS	×	○
KFCB-0680	2021/4/22	ウナギ	肝臓	BHI→SS	×	○
KFCB-0681	2021/4/22	ウナギ	腎臓	BHI→SS	×	○
KFCB-0682	2021/4/22	ウナギ	肝臓	BHI→SS	×	○
KFCB-0683	2021/4/22	ウナギ	腎臓	BHI→SS	×	○
KFCB-0684	2021/4/22	ウナギ	肝臓	BHI→SS	×	○
KFCB-0685	2021/4/22	ウナギ	腎臓	BHI→SS	×	○
KFCB-0688	2021/4/27	ウナギ	肝臓	SS→SS	×	○
KFCB-0689	2021/4/27	ウナギ	肝臓	SS→SS	×	○
KFCB-0690	2021/4/27	ウナギ	肝臓	SS→SS	×	○
KFCB-0691	2021/5/6	ウナギ	肝臓	SS→SS	×	○
KFCB-0692	2021/5/6	ウナギ	腎臓	SS→SS	×	○
KFCB-0693	2021/5/6	ウナギ	腎臓	SS→SS	×	○
KFCB-0694	2021/5/6	ウナギ	肝臓	SS→SS	×	○
KFCB-0695	2021/5/6	ウナギ	腎臓	SS→SS	×	○
KFCB-0701	2021/5/19	ウナギ	肝臓	BHI→SS	×	○
KFCB-0702	2021/5/28	ウナギ	肝臓	BHI→SS	×	○
KFCB-0703	2021/5/28	ウナギ	腎臓	BHI→SS	×	○
KFCB-0704	2021/5/28	ウナギ	肝臓	BHI→SS	×	○
KFCB-0705	2021/5/28	ウナギ	腎臓	BHI→SS	×	○
KFCB-0706	2021/5/28	ウナギ	肝臓	BHI→SS	×	○
KFCB-0707	2021/5/28	ウナギ	腎臓	BHI→SS	×	○
KFCB-0708	2021/6/7	ウナギ	肝臓	BHI→SS	×	○
KFCB-0709	2021/6/7	ウナギ	腎臓	BHI→SS	×	○
KFCB-0710	2021/6/7	ウナギ	肝臓	BHI→SS	×	○
KFCB-0711	2021/6/7	ウナギ	腎臓	BHI→SS	×	○
KFCB-0712	2021/6/7	ウナギ	肝臓	BHI→SS	×	○
KFCB-0713	2021/6/7	ウナギ	腎臓	BHI→SS	×	○
KFCB-0714	2021/6/17	ウナギ	肝臓	SS→SS	×	○
KFCB-0715	2021/6/17	ウナギ	肝臓	SS→SS	×	○
KFCB-0716	2021/6/17	ウナギ	腎臓	SS→SS	×	○
KFCB-0722	2021/6/21	ウナギ	腎臓	SS→SS	×	○
KFCB-0723	2021/6/21	ウナギ	肝臓	SS→SS	×	○
KFCB-0724	2021/6/21	ウナギ	腎臓	SS→SS	×	○
KFCB-0725	2021/6/21	ウナギ	腎臓	SS→SS	×	○

表3 菌濃度とコピー濃度

	菌濃度 菌数/μL	コントロール copies/μL	試験区1 copies/μL	試験区2 copies/μL
10 ⁰	7.0×10 ⁵	4.52×10 ⁵	5.54×10 ⁵	5.46×10 ⁵
10 ⁻¹	7.0×10 ⁴	8.24×10 ⁴	7.06×10 ⁴	7.41×10 ⁴
10 ⁻²	7.0×10 ³	1.34×10 ⁴	1.15×10 ⁴	7.82×10 ³
10 ⁻³	7.0×10 ²	1.06×10 ³	1.41×10 ³	1.38×10 ²
10 ⁻⁴	7.0×10 ¹	9.44×10 ¹	1.37×10 ²	1.29×10 ²
10 ⁻⁵	7.0×10 ⁰	8.73×10 ⁰	8.67×10 ⁰	2.97×10 ⁰
10 ⁻⁶	ns	2.79×10 ⁰	ns	ns
10 ⁻⁷	ns	ns	ns	ns
10 ⁻⁸	ns	ns	ns	ns
10 ⁻⁹	ns	ns	ns	ns

ns: 未検出

表4 感染試験結果概要

手法及び 試験期間	試験区	供試魚No.	魚体重 (g)	死亡日	症状	部位別検査結果				
						肝臓:L 腎臓:K	塗抹標本 観察結果	SS寒天培地による 菌分離結果	qPCR結果 (○:陽性、 x:陰性)	抽出DNA1.0ng あたりの原因菌 DNAコピー数 (copies/ng)
①腸内への過酸化水素水注入及び菌液入り飼料の強制投与法	原液区	①原液区-1	216.9							
		①原液区-2	175.5							
	10 ⁻³ 希釈区	①10 ⁻³ 希釈区-1	192.3							
		①10 ⁻³ 希釈区-2	186.5							
	10 ⁻⁵ 希釈区	①10 ⁻⁵ 希釈区-1	200.7							
		①10 ⁻⁵ 希釈区-2	201.6							
	対照区	①対照区-1	198.2							
		①対照区-2	207.0							
	②菌液の腹腔内注射法 (R4/1/13~ 1/26)	原液区	②原液区-1	175.6	R4/1/15	肛門拡張及び発赤 消化管炎症	L 短桿菌及び雑菌 K 短桿菌	中心黒コロニー出現	○	3.87E+03 1.86E+03
			②原液区-2	204.1	R4/1/17	肝臓褐色 消化管炎症	L 雑菌 K 短桿菌及び雑菌	中心黒コロニー出現	○	2.88E+03 2.67E+03
10 ⁻³ 希釈区		②10 ⁻³ 希釈区-1	195.4	生存	症状なし	L 細菌類の増殖見られず K 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	x	-	
		②10 ⁻³ 希釈区-2	191.1	生存	症状なし	L 細菌類の増殖見られず K 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	x	-	
10 ⁻⁵ 希釈区		②10 ⁻⁵ 希釈区-1	167.2	生存	症状なし	L 細菌類の増殖見られず K 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	x	-	
		②10 ⁻⁵ 希釈区-2	178.3	生存	症状なし	L 細菌類の増殖見られず K 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	x	-	
対照区		②対照区-1	208.8	生存	症状なし	L 細菌類の増殖見られず K 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	x	-	
		②対照区-2	178.1	生存	症状なし	L 細菌類の増殖見られず K 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	x	-	
③浸漬感染法 (R4/2/14~ 2/25)		30分浸漬区	③30分浸漬区-1	156.6	R4/2/21	肛門拡張	L 短桿菌 K 短桿菌	中心黒コロニー出現	○	5.35E+03 6.71E+03
			③30分浸漬区-2	217.3	生存	腸管内緑色便	L 細菌類の増殖見られず K 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	x	-
		③15分浸漬区-1	158.8	生存	症状なし	L 細菌類の増殖見られず K 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	x	-	
	15分浸漬区	③15分浸漬区-2	172.2	R4/2/21	肛門拡張及び発赤 体表発赤 肝臓腫瘍 消化管炎症	L 短桿菌及び雑菌 K 短桿菌	中心黒コロニー出現	○	3.23E+01 1.44E+01	
	5分浸漬区	③5分浸漬-1	157.1	R4/2/21	肛門拡張及び発赤 体表発赤	L 雑菌 K 短桿菌及び雑菌	中心黒コロニー出現	○	2.51E+01 3.09E+02	
		③5分浸漬-2	227.1	生存	症状なし	L 細菌類の増殖見られず K 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	x	-	
	対照区	③対照区-1	153.2	生存	症状なし	L 細菌類の増殖見られず K 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	x	-	
		③対照区-2	165.4	生存	症状なし	L 細菌類の増殖見られず K 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	x	-	