

淡水魚の卵菌類に起因する真菌病の防除法に関する研究

(Studies on prevention of fungal diseases caused by Oomycota in freshwater fish)

三浦正之

目次

第 1 章 緒言.....	1
第 2 章 銅ファイバーを用いたニジマス卵の水カビ病防除.....	5
第 3 章 銅ファイバーを用いたアユ卵およびコイ卵の水カビ病防除.....	25
第 4 章 塩化カリウムが水カビ病原菌に及ぼす影響とアユ卵に対する水カビ病防除効果.....	40
第 5 章 低濃度人工海水が水カビ病原菌に及ぼす影響と発眼期以降のアユ卵管理.....	60
第 6 章 アユ仔魚に発生した <i>Pythium</i> 属菌による内臓真菌症.....	78
第 7 章 総括.....	108
謝辞.....	113
引用文献.....	114
Summary.....	122

論文要旨

淡水魚に発生する真菌病の多くは卵菌綱 (Oomycetes), ミズカビ目 (Saprolegniales), ミズカビ科 (Saprolegniaceae) の *Saprolegnia* 属, *Achlya* 属, *Aphanomyces* 属, *Leptolegnia* 属などの菌が感染することによって引き起こされる。これらのうち水カビ病はもっとも一般的な病気である。従来, 水カビ病の予防・治療には染色剤であるマラカイトグリーンが使用されてきたが, 薬事法関係省令の改正に伴い, 2005 年 8 月以降, 食用に供される魚に対するマラカイトグリーンの使用は完全に禁止された。現在, 水カビ病の防除を目的としてサケ科魚類卵およびアユ *Plecoglossus altivelis* 卵に対して承認されている水産用医薬品はプロノポールのみであり, また, コイ科の魚類卵に対して承認されている水産用医薬品はひとつもないことから, 新たな淡水魚卵の水カビ病防除法について検討することは依然として重要な課題である。新たな方法を検討する場合, 薬剤を用いない手法による水カビ病防除法を開発することが実用化を検討する上で有利となる。従って, 本論文では薬剤を用いないことに重点をおき, 水カビ病の防除法開発に関する研究を行った。さらに, ミズカビ科以外の卵菌類に起因するアユの内臓真菌症が 2007 年に山梨県で初めて確認され, その対策について検討することが急務となったため, 本病に関する基礎的な知見を得るための調査を行うとともに, その結果に基づき, 水カビ病同様薬剤を用いない方法での本病の防除の可能性について検討した。

第 2 章では, 銅の殺菌力に着目し, 繊維状の銅 (銅ファイバー) を卵管理用水槽の上流部に浸漬し, その下流でニジマス *Oncorhynchus mykiss* 卵を管理する効果について検討を行った。山梨県水産技術センター忍野支所で, FRP 製タテ型孵化槽の最上流の区画に銅ファイバーを浸漬し, その下流にニジマス卵を設置し, 流水下で受精から発眼までの約 2 週間管理した。その結果, 注水量 200 mL/s に対して 200 g の銅ファイバーを浸漬した区では水カビの着生が顕著に抑制され, 発眼率, 孵化率, 奇形率にも銅の毒性が確認されなかった。なお, 試験期間中の 200 g 区の銅濃度は 0.006 ~ 0.020 ppm で, 浸漬後の時間の経過とともに銅濃度が変化することが明らかとなった。

次に, 銅ファイバーがニジマス卵の水カビ病防除に有効であった要因を検討した。銅を含有した GY 液体培地中で *Saprolegnia diclina* NJM 0246 の菌糸を発育させた結果, 0.104 ppm までの銅濃度は菌糸の伸長に影響を与えないと判断された。遊走子を所定濃度の銅溶液中で発芽させ, 発芽率を比較した結果, 24 時間浸漬した試験区で

は 0.006 ppm 以上の区では発芽率が 0% であり、遊走子の発芽が抑制された。従って、銅ファイバーが水カビ病に効果を示した要因は遊走子の発芽抑制によるものと考えられた。

第 3 章では、銅ファイバーがアユ卵およびコイ *Cyprinus carpio* 卵の水カビ病にも有効か否か同様の手法を用いて検討した。山梨県水産技術センターで、第 2 章と同様の方法でアユ卵またはコイ卵を受精から発眼まで管理した。アユ卵では注水量 200 mL/s あたり 100 ~ 400 g 銅ファイバーを浸漬した区では水カビ病は抑制されたが、銅の毒性が確認された。このため、アユ卵に影響を及ぼさない浸漬重量は 100 g よりも軽量であると判断されたが、100 g 区の浸漬開始時の銅濃度は 0.006 ppm であったことから、これより軽量では水カビ病防除効果は期待できないと考えられ、アユ卵の水カビ病防除に銅ファイバーは適していないと判断された。

コイ卵を用いて同様の試験を行った結果、200 ~ 400 g 浸漬した区では銅の毒性が確認されたが、100 g 区では影響はみられなかった。このため、コイ卵の水カビ病を防除する場合、100 g の浸漬重量であれば水カビ病を防除できる可能性があると考えられた。

第 4 章では、塩化カリウム (KCl) の 3 種類の水カビ病原菌 *S. diclina* NJM 0246, *S. parasitica* ATCC 90213 および *Achlya* sp. NJM 0323 に対する *in vitro* での効果とアユ卵の水カビ病防除効果を試験した。KCl を含有した GY 液体培地中での菌糸の発育を調べた結果、*S. diclina* および *S. parasitica* の菌糸の伸長は 0.48% までの KCl 濃度にほとんど影響を受けなかった。*Achlya* sp. では 0.48% の KCl 濃度中だけ菌糸の伸長が確認されなかった。それ以下の濃度では 0.12% および 0.24% KCl で菌糸の伸長速度が低下したものの、すべての区で菌糸の伸長が確認された。遊走子を KCl 溶液中に 24 時間浸漬し、その溶液中に GY 液体培地を加えることで発芽を促し、発芽率を比較した結果、*S. diclina*, *S. parasitica* では、最も濃度が高い 0.48% の KCl 溶液中であってもほぼ 100% の発芽率を示した。また、*Achlya* sp. では 0.48% の KCl 濃度で 0% と比較して発芽が抑制されたが、それ以下の濃度では発芽は抑制されなかった。遊走子の運動性への影響を、遊走子を所定濃度の KCl 溶液に接種し、1 および 10 分後の遊走子の運動状況を観察する方法で調べた。その結果、*S. diclina* の遊走子の運動は 0.03% の KCl 溶液中で 1 分後に微弱となり、10 分後に停止した。同濃度で *S. parasitica* および *Achlya* sp. の遊走子の運動は 1 分後に停止した。

実際にスライドグラスに付着させたアユ卵をビーカー内の KCl 水溶液中で受精から発眼期まで管理する方法で KCl の水カビ病防除効果を検討した。試験は 3 回行った。その結果、0.06% の KCl 濃度では 3 回の試験ともに水カビ病防除効果が確認され、発眼率、孵化率、奇形率に影響は確認されなかったため、本濃度が実用化に適していると考えられた。

第 5 章では、サケ科魚類卵と異なり、発眼後も水カビ病の発生のリスクが高いアユ卵において、発眼期から孵化までの水カビ病対策として、アユ種苗生産で一般的に用いられている低濃度人工海水が水カビ病原菌に及ぼす影響を調べるとともに、発眼後のアユ卵をこれらの人工海水で孵化させることによる安全性について検討した。

低濃度人工海水 (通常海水の 1/7 ~ 3/7 倍の塩分濃度) が水カビ病原菌 *S. diclina* NJM 0246 の菌糸の発育、遊走子の発芽および遊走子の運動性に及ぼす影響を検討した。1/7 ~ 3/7 倍希釈の人工海水濃度に調製した GY 液体培地中での菌糸の発育を調べた結果、2/7 倍希釈以上の人工海水区で若干の菌糸の伸長速度の低下がみられたが、いずれの試験区でも菌糸の伸長が確認された。遊走子を 1/7 ~ 3/7 倍希釈の人工海水に 24 時間浸漬し、その溶液中に GY 液体培地を加えることで発芽を促し、発芽率を比較した結果、1/7, 2/7 倍希釈の人工海水区の発芽率はそれぞれ 98.0, 97.0% であり、対照区の 98.0% と比較して有意差は認められなかった。3/7 倍希釈の人工海水区では発芽率が 47.0% であり、対照区と比較して発芽率が低かったが、発芽を完全に抑制することはできなかった。遊走子の運動性への影響を、遊走子を所定濃度の人工海水に接種し、1 および 10 分後の遊走子の運動状況を観察する方法で調べた。その結果、遊走子の運動は、1/7 倍希釈の人工海水中では 1 分後には微弱となり、2/7, 3/7 倍希釈の人工海水中では 1 分後に停止した。アユの発眼卵を 1/7 ~ 3/7 倍希釈の人工海水中に収容して孵化させたところ、2/7 倍希釈の人工海水濃度までは孵化率、奇形率に影響は観察されなかったため、低濃度人工海水中で発眼期以降のアユ卵を管理することで水カビ病の被害を軽減しながらアユを孵化させられる可能性が示された。

第 6 章では、2007 年から山梨県水産技術センターでアユ仔魚に発生しているフハイカビ科の *Pythium* 属菌に起因する病気の原因菌を同定するとともに、感染機序、死亡状況などの調査・研究を行い、これらの結果に基づき水カビ病と同様に薬剤を用いない方法で本病を防除可能か否かについて検討を行った。

2007 年 1 ~ 2 月および 2007 年 11 月 ~ 2008 年 1 月に本病の発生状況を詳細に調査した。病気発生時のアユ仔魚

の飼育水には塩分濃度約 0.5% の人工海水が用いられていた。病気発生時の水温は 12 ~ 15 °C, 仔魚の日齢は 51 ~ 85 日, 魚体重は 14 ~ 214 mg であった。累積死亡率は 19 ~ 33% であり, 日間死亡率は最大で 9.3% であった。死亡魚の多くに腹部の白濁が確認された。白濁部位では菌糸径約 5 μ m の無隔壁の菌糸が大量に観察された。また, 白濁部位からは白色の集落を形成する菌が純培養的に分離された。2008 年 12 月にも同様の病気が発生したため病気発生池の池底の堆積物を直接鏡検した結果, *Pythium* 属菌の卵胞子が多数観察されるとともに前述と同様の菌が分離され, 池底の堆積物が本病の感染源となっている可能性が示唆された。

病魚または飼育池底堆積物から分離した計 3 株の有性生殖器官および無性生殖器官などの形態観察を行った結果, *Pythium flevoense* の形態的特徴と極めて類似していた。また, 病魚または飼育池底堆積物から分離した計 7 株について, rRNA 遺伝子の ITS 領域の塩基配列を解析した結果, 試験に供した 7 株の ITS 領域の塩基配列はすべて同一であり, *P. flevoense* CBS 234.72 のそれと 100% 一致した。形態観察および塩基配列解析の結果から分離菌は *P. flevoense* に同定された。

病魚の病理組織学的検査を行った結果, 鰓, 腎臓, 腸管, 筋肉など広範囲にわたり無隔壁の菌糸が観察された。これらのうち, 鰓後端部での感染が重篤であったことから, 本病は原因菌の誤嚥による鰓内感染に起因して発病に至ったものと推察された。

次に, 分離菌 YFTM 0701 株の遊走子を用いてアユ仔魚への実験感染を試みた。その結果, 供試魚 23 尾のうち 1 尾で体側中心部から尾柄にかけて自然発病魚同様の白濁を伴う死亡が確認され, 接種菌が再分離された。病理組織検査を行った結果, 総排泄孔, 腸管, 腎臓, 筋肉など広範囲にわたり無隔壁の菌糸が確認された。但し, 鰓には菌糸が観察されず, 総排泄孔での菌糸の繁殖が顕著であった。このため, 本菌の感染は総排泄孔からも起こる可能性があることが示唆された。

YFTM 0701 株の発育至適温度と塩分耐性を調べた結果, 供試菌の発育は 5 ~ 30 °C で認められたが, 36.5 °C では認められなかった。また, 25 °C で最も良好な発育を示した。塩分耐性試験の結果, 寒天培地では 0.5% で最も良好な発育を示し, 次いで 0% での発育が良好であった。また, 1.0% 以上の NaCl 濃度では濃度が濃くなるにつれて発育は抑制され, 4.0% では完全に発育が認められなくなった。一方, 液体培地中では菌の発育は 0% が最良であり, 次いで 0.5% が良好であった。また, 1.0% 以上の濃度では寒天培地上で行った試験よりも NaCl 濃度の影響を受けやすく, 2.0% 以上の濃度では発育は 0 に近い値となった。アユ仔魚の飼育水の塩分濃度を上昇させることによるアユ仔魚の生残率への影響を調査した結果, アユ仔魚の飼育水の塩分濃度を 1 日以上かけて上昇させれば, 約 0.5 から 3.0% までの濃度上昇であっても 7 日後の生残率に影響が現れなかった。従って, 飼育水の塩分濃度の調整で本病を防除できる可能性が示唆された。また, 本病の感染源のひとつとして疑われる飼育池底堆積物の除去も有効な対策となり得ると考えられた。

本学位論文については, 目次及び論文要旨のみを掲載し, 本文は当センターのホームページ上に掲載した。