

サケ回帰親魚の体腔液中の冷水病原菌*Flavobacterium psychrophilum*濃度 (短報)

畑山 誠*, 藤原 真, 水野伸也

北海道立総合研究機構さけ・ます内水面水産試験場

The concentration of *Flavobacterium psychrophilum* in the ovarian fluid of returning chum salmon (Short paper)

MAKOTO HATAKEYAMA*, MAKOTO FUJIWARA and SHINYA MIZUNO

Salmon and Freshwater Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization, Eniwa, Hokkaido 061-1433, Japan

We determined the concentration of *Flavobacterium psychrophilum* in the ovarian fluid of returning chum salmon that were captured from 6 rivers in Hokkaido, Japan. The detection rate of the bacterium ranged from 28%–90% of the samples from each river. The concentration found in each specimen was below 7 log CFU/mL. The incidence of specimens carrying a high concentration of this bacterium tended to be low. We also examined the effects that different sample storage methods had on the concentration of viable bacteria. Incubating samples at 4 °C for 24 h resulted in a reduction in bacterial concentration. Freezing and thawing produced an approximately 90% reduction. These results indicate that bacterial counts based on CFU may lead to underestimation depending on the method of specimen storage.

キーワード：サケ, 冷水病, *Flavobacterium psychrophilum*, 体腔液, 卵内感染

Flavobacterium psychrophilum (Bernardet *et al.*, 1996) は冷水病の原因菌である。本疾病がサケ科魚類増養殖にもたらす損失は国際的に大きく、日本では多くのサケ科魚類の他、アユ*Plecoglossus altivelis*でも報告がある (Borg, 1960; Wakabayashi *et al.*, 1994; Lorenzen *et al.*, 1997; Izumi and Aranishi, 2004)。Misaka and Suzuki (2007) は北海道内のサケ*Oncorhynchus keta*の回帰親魚を調査し、その体腔液から*F. psychrophilum*が高率に分離されることを報告している。また、Hatakeyama *et al.* (2013) は、北海道内のある河川に回帰した親魚群とその親魚群由来の稚魚群から、同じ遺伝子型の*F. psychrophilum*が高率に分離されたことから、何らかの様式で本菌が親魚から稚魚へ伝播した可能性があることを報告している。サケ科魚類回帰親魚の冷水病感染はサケのほかギンザケ*O. kisutch*, マスノスケ*O. tshawytscha*, 大西洋サケ*Salmo salar*で報告があり、これらの感染親魚より得られた卵、精液を人工授精した場合、しばしば卵内感染が起こるとされている (Brown *et al.*, 1997; Taylor, 2004; Cipriano, 2005)。これら

の報告は、北海道内のサケ増殖事業においても、*F. psychrophilum*の卵内感染の危険性は否定できないことを示唆している。*F. psychrophilum*の卵内感染の機序については、ニジマス*O. mykiss*を用いた実験から、本菌が受精時あるいは吸水時に卵門より侵入し、胚発生を阻害することなく卵内で増殖する現象と理解されている (Kumagai and Nawata, 2010a)。この卵内感染は受精時、卵周辺の*F. psychrophilum*生菌濃度が高いほど高率に起こるとされているため (Kumagai and Nawata, 2010a; 小原ら, 2010)、雌親魚の体腔液中の生菌濃度が卵内感染のリスクを考察する上で重要と考えられるが、これまでに北海道内のサケ回帰親魚の体腔液中の生菌濃度を測定した事例はない。また、病原体保有状況調査において、現場での試料採取から実験室での検査までに輸送等による経過時間がある場合、冷蔵あるいは凍結等の何らかの方法で試料を保存することになるが、特に病原体の濃度測定を目的とした調査では、試料の保存方法が病原体濃度に与える影響を把握する必要がある。そこで、本研究では2012年、2013

年に道内の6河川で捕獲され、孵化場にて蓄養されていたサケ雌親魚を対象に体腔液中の*F. psychrophilum*生菌濃度を測定し、あわせて保存のための冷蔵や冷凍が体腔液中の生菌濃度に与える影響について基礎的な実験を行った。

材料および方法

サケ雌親魚の体腔液中の*F. psychrophilum*生菌濃度
2012年および2013年、北海道内の6河川で捕獲され、それぞれの孵化場で蓄養されていたサケ雌親魚を対象に、体腔液中の*F. psychrophilum*生菌濃度を測定した。体腔液は1河川あたり60個体から個体別に、Yoshimizu *et al.* (1985)の方法に従い採取し、実験室（さけます・内水面水産試験場、北海道恵庭市）までは冷蔵（約4°C）で輸送した。その後、体腔液は実験室にて滅菌生理食塩水で10倍階段希釈し、各希釈10 µLを改変サイトファーガ寒天培地（Wakabayashi and Egusa, 1974）に滴下し、15°Cで7日間培養した。目視にて発育が確認できた培地上の黄色のコロニーは、プライマーPSY-GIFおよびPSY-G1Rを用いたPCR法（Izumi and Wakabayashi, 2000）により他種のコロニーを除外した上、それぞれ希釈倍率とコロニー数から*F. psychrophilum*生菌濃度を測定した（検出限界: 3 log CFU/mL）。

保存方法が*F. psychrophilum*生菌濃度に与える影響 冷蔵、凍結がサケ体腔液中の*F. psychrophilum*生菌濃度に与える影響について、次のとおりの実験を行った。*F. psychrophilum*標準株（NCIMB1947）を300 mLの三角フラスコを用い、30 mLの改変サイトファーガ液体培地（前出寒天培地の寒天を除いた組成）で15°C、5日間振盪培養した。培養後、4°C、8,000 × gで10分間、遠心分離し、上澄の液体培地を除いた。沈殿物として得られた菌体は滅菌生理食塩水に再び懸濁したのち、4°C、8,000 × gで遠心分離し、上澄の生理食塩水を除いた。これらの作業により洗浄した菌体は、メンブレンフィルター（ポアサイズ0.45 µm）を用い濾過滅菌したサケ体腔液（20個体分のプール）に懸濁し、試験用の菌液とした。この菌液は初発の生菌濃度を体腔液の検査と同様の方法で測定するとともに、1.5 mLのチューブに1 mlずつ分注し、4°Cで冷蔵、あるいはドライアイス上で凍結した。冷蔵状態の菌液は2, 4, 6, 24, 48時間後に前述と同様の方法で生菌濃度を測定した。ドライアイス上で凍結した菌液は、48時間後に室温で再融解した。この凍結と再融解を1および2回繰り返す、それぞれ再融解後に速やかに生菌濃度を同様に測定した。

結果および考察

サケ体腔液中の*F. psychrophilum*生菌濃度測定について、調査対象とした6河川（A, B, C, D, E, F）における体腔液採取日、採取から検査までのおおよその冷蔵時間、*F. psychrophilum*の検出率をTable 1に示す。体腔液採取から検査までの冷蔵時間は、概ね4, 6, 30時間だった。どの河川のサケ雌親魚からも2012年と2013年の両年で*F. psychrophilum*が検出されており、その検出率は28%から90%だった。河川Dの検出率は、2012年で90.0%、2013年で88.3%と、両年共に6河川の中で最も検出率が高かった。採取年別、河川別の生菌濃度の頻度分布をFig. 1に示す。いずれも生菌濃度は7 log CFU/mL未満だった。全体的には高濃度なものほど出現頻度は低かったが、採取年別、河川別にみると2012年採取分では河川Dにおいて、2013年採取分では河川Aおよび河川Cにおいて、3 log CFU/mL台よりも4 log CFU/mL台の出現頻度が高かった。また、6 log CFU/mLを超える濃度の個体は2012年採取分では河川Dと河川E、2013年採取分では河川Bと河川Dで確認された。

保存のための冷蔵や冷凍が体腔液中の*F. psychrophilum*生菌濃度に与える影響について検証した実験結果をTable 2に示す。冷蔵が体腔液中の*F. psychrophilum*生菌濃度に及ぼす影響について、4°Cで2時間から48時間静置した場合、生菌濃度は少なくとも6時間後までは大きく変化しなかったが、24時間後では初発濃度の概ね25%に、48時間後では初発濃度の4%に低下した。また、体腔液の凍結保存を想定した実験では、ドライアイスによ

Table 1 Relationships between the source river, date of sampling, sample storage time, and rate of fish found positive for *F. psychrophilum*

River*	Sampling date	Storage time**	No. of positive fish/No. of fish examined (%)
A	5 Oct. 2012	6 h	35/60 (58.3)
	16 Oct. 2013	6 h	47/60 (78.3)
B	31 Oct. 2012	30 h	25/60 (41.7)
	29 Oct. 2013	30 h	46/60 (76.7)
C	22 Oct. 2012	4 h	22/60 (36.7)
	28 Oct. 2013	4 h	45/60 (75.0)
D	25 Oct. 2012	4 h	54/60 (90.0)
	24 Oct. 2013	4 h	53/60 (88.3)
E	22 Oct. 2012	30 h	34/60 (56.7)
	21 Oct. 2013	30 h	17/60 (28.3)
F	24 Oct. 2012	30 h	25/60 (41.7)
	22 Oct. 2013	30 h	27/60 (45.0)

*: Code of river where chum salmon were captured

** : Storage time at 4°C before examination (Approx.)

る1回の凍結と再融解により、生菌濃度は初発濃度の10%に、これを2回繰り返した場合は初発濃度の0.6%に低下するという結果を得た。凍結が生物に与える障害について、氷晶が細胞に与える物理的障害、氷晶の成長過程において氷晶外に作られる濃縮した水溶液が細胞に与える化学的障害が知られている（藤川, 2012）。このことか

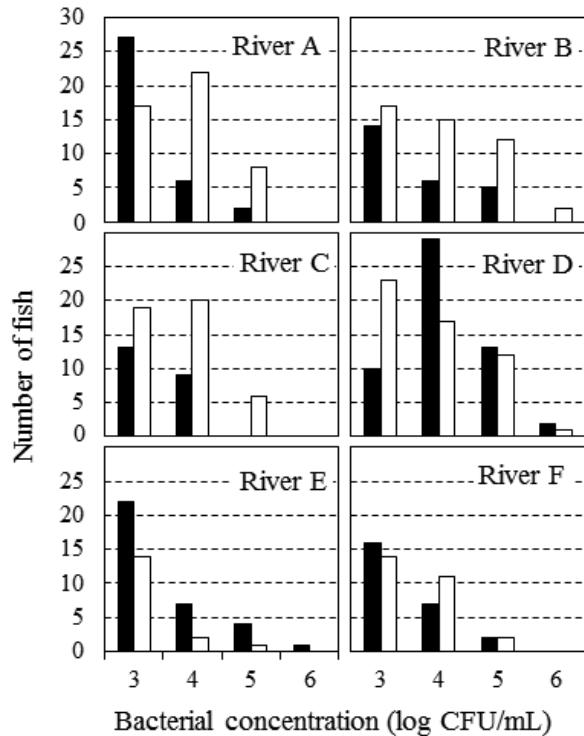


Fig.1 The frequency distribution of *F. psychrophilum* concentration measured in the ovarian fluid of returning chum salmon captured from the river. Black and white columns indicate the results from 2012 and 2013, respectively.

Table 2 The effect of storage conditions on the concentration of *F. psychrophilum* in ovarian fluid

Storage condition		Concentration of <i>F. psychrophilum</i> (log CFU/ml)
Incubation at 4 °C		
Incubation time	0 h	7.8
	2 h	7.8
	4 h	7.7
	6 h	7.8
	24 h	7.2
	48 h	6.4
Freezing and thawing*		
Number of Cycles	None	7.8
	Once	6.8
	Twice	5.6

*: Freezing on dry ice for 48 h followed by thawing at room temperature

ら、液体中の細菌を冷凍する場合についても、氷晶の形成に関係がある冷凍時の経時的温度変化、細胞内外の水溶液成分等により、細菌の生存率は大きく異なると考えられる。今回は、現場での体腔液の簡易な保存、採取から概ね2日以内の実験室での検査を想定し、実験を設定したが、生菌濃度を保持する最適な体腔液の凍結保存については更なる検討が必要と考えられる。

*F. psychrophilum*濃度と卵内感染の関係について、ニジマスを用いた実験では、体腔液の生菌濃度が6 log CFU/mL以上の場合に卵内感染が確認され、濃度が高いほど卵内感染は高率に起きるとされている（Kumagai and Nawata, 2010a）。また、全国の養殖場にて実際に飼育されていたニジマス、アメマス *Salvelinus leucomaenis*、ギンザケ、サクラマス *O. masou*、ヒメマス *O. nerka* の調査事例では、個体別にみた場合、ニジマス、ギンザケ、サクラマスの体腔液中には6 log CFU/mLを超える生菌濃度で *F. psychrophilum* が確認されたが、精液については、どの魚種でも4.5 log CFU/mL以下であったため、精液中の本菌が卵内感染に関与する可能性は低いと考察されている（Kumagai and Nawata, 2011）。本研究においては、全調査河川のサケ回帰親魚で *F. psychrophilum* が検出されたことから、本菌は北海道のサケに広くまん延し、稀には Kumagai and Nawata (2010a) が卵内感染を確認した生菌濃度である6 log CFU/mLを超える濃度で体腔液中に存在することがわかった。また、冷蔵時間が体腔液中の *F. psychrophilum* 生菌濃度を与える影響について検証した実験結果から、今回の北海道内各河川におけるサケ回帰親魚の生菌濃度の測定において、輸送に30時間程度の冷蔵時間を要した体腔液では、時間相当分の濃度の低下があった可能性がある。

実際のサケの人工授精においては、複数の雌親魚から得られた卵を一つの容器内で授精する方法が採用されており、今回の生菌濃度の頻度分布（Fig. 1）に冷蔵時間相当分の濃度低下を考慮しても、多くの場合6 log CFU/mLを下回る平均的な濃度下で授精作業が反復されていると考えられる。しかし、前述のとおり、受精時の生菌濃度が高いほど卵内感染率（卵内感染を受けた受精卵/全受精卵）は高いとされていることから（Kumagai and Nawata, 2010a）、*F. psychrophilum* の卵内感染は確率的な現象と考えられ、6 log CFU/mLを下回る濃度であっても、実験作業上、検出が不可能な低い率で卵内感染が発生している可能性は否定できない。また、河川Dは両年共に検出率が最も高く、生菌濃度も高い傾向があったことから、卵内感染の危険性は道内一様ではない可能性がある。小原ら（2010）は未受精卵を等調液により洗浄することで、受精時に混入する菌数を減少させ、卵内感染

を防除する方法を提案している。また、有機ヨード剤を含む等調液で未受精卵の洗浄を行った場合、殺菌効果が増加し、更に大きく卵内感染率を低減できるとの報告もある (Kumagai and Nawata, 2010b)。今後も体腔液中の *F. psychrophilum* 生菌濃度を測定し、地域別にリスクを評価し、必要に応じて、これら防除方法をサケの人工授精作業に応用することで北海道内のサケ増殖事業における冷水病原菌の卵内感染の危険性は大きく低減できるものと考えられる。

謝 辞

本研究の実施にあたり、北海道内の各管内さけます増殖事業協会の皆様に多大なご協力を頂きました。ここに記して厚くお礼申し上げます。

引用文献

- Bernardet JF, Segers P, Vancanneyt M, Berthe F, Kersters K, Vandamme P. Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *Int. J. Syst. Microbiol.* 1996; 46: 128–148.
- Borg AF. Studies on myxobacteria associated with diseases in salmonid fishes. *Wildl. Dis.* 1960; 8: 1–85.
- Brown LL, Cox WT, Levine RP. Evidence that the causal agent of bacterial cold-water disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted within salmonid eggs. *Dis. Aquat. Org.* 1997; 29: 213–218.
- Cipriano RC. Intraovum infection caused by *Flavobacterium psychrophilum* among eggs from captive Atlantic salmon broodfish. *J. Aquat. Anim. Health* 2005; 17: 275–283.
- 藤川清三. 生物の凍結に関する基礎研究. 低温生物学会誌 2012; 58: 1–7.
- Hatakeyama M, Misaka N, Mizuno S, Koide N. Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from chum salmon *Oncorhynchus keta* in Hokkaido, Japan. *Fish Pathol.* 2013; 48: 135–138.
- Izumi S, Aranishi F. Plasmid profiling of Japanese *Flavobacterium psychrophilum* isolates. *J. Aquat. Anim. Health* 2004; 16: 99–103.
- Izumi S, Wakabayashi H. Sequencing of *gyrB* and their application in the identification of *Flavobacterium psychrophilum* by PCR. *Fish Pathol.* 2000; 35: 93–94.
- 小原昌和, 小川滋, 笠井久会, 吉水守. 養殖サケ科魚類の人工採卵における等調液洗卵法の除菌効果. 水産増殖 2010; 58: 37–43.
- Kumagai A, Nawata A. Mode of the intra-ovum infection of *Flavobacterium psychrophilum* in salmonid eggs. *Fish Pathol.* 2010a; 45: 31–36.
- Kumagai A, Nawata A. Prevention of *Flavobacterium psychrophilum* vertical transmission by iodophor treatment of unfertilized eggs in salmonids. *Fish Pathol.* 2010b; 45: 164–168.
- Kumagai A, Nawata A. Concentration of *Flavobacterium psychrophilum* in the ovarian fluid and milt of cultured salmonids. *Fish Pathol.* 2011; 46: 116–119.
- Lorenzen E, Dalsgaard I, Bernardet JF. Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with cold-water disease or rainbow trout fry syndrome I: phenotypic and genomic studies. *Dis. Aquat. Org.* 1997; 31: 197–208.
- Misaka N, Suzuki K. Detection of *Flavobacterium psychrophilum* in chum salmon *Oncorhynchus keta* and virulence of isolated strains to salmonid fishes. *Fish Pathol.* 2007; 42: 201–209.
- Taylor PW. Detection of *Flavobacterium psychrophilum* in eggs and sexual fluids of Pacific salmonids by a polymerase chain reaction assay: implications for vertical transmission of bacterial coldwater disease. *J. Aquat. Anim. Health* 2004; 16: 104–108.
- Wakabayashi H, Egusa S. Characteristics of myxobacteria associated with some freshwater fish diseases in Japan. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 1974; 40: 751–757.
- Wakabayashi H, Toyama T, Iida T. A study on serotyping of *Cytophaga psychrophila* isolated from fishes in Japan. *Fish pathol.* 1994; 29: 101–104.
- Yoshimizu M, Kimura T, Winton JR. An improved technique for collecting reproductive fluid samples from salmonid fishes. *Prog. Fish-Cult.* 1985; 47: 199–200.