

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

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

(指導教授 : 畑井喜司雄)

平成 22 年 3 月

目次

	頁
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
2-1 材料および方法.....	6
2-1-1 ニジマス卵の水カビ病発生に及ぼす銅ファイバーの影響.....	6
2-1-2 銅によるミズカビ菌糸の発育阻止試験.....	7
2-1-3 銅によるミズカビ遊走子の発芽阻止試験.....	7
2-2 結果.....	9
2-2-1 ニジマス卵の水カビ病発生に及ぼす銅ファイバーの影響.....	9
2-2-2 銅によるミズカビ菌糸の発育阻止試験.....	9
2-2-3 銅によるミズカビ遊走子の発芽阻止試験.....	10
2-3 考察.....	11
2-4 小括.....	14
2-5 表および図.....	16
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
3-1 材料および方法.....	26
3-1-1 アユ卵の水カビ病発生に及ぼす銅ファイバーの影響.....	26
3-1-2 コイ卵の水カビ病発生に及ぼす銅ファイバーの影響.....	27
3-2 結果.....	29
3-2-1 アユ卵の水カビ病発生に及ぼす銅ファイバーの影響.....	29
3-2-2 コイ卵の水カビ病発生に及ぼす銅ファイバーの影響.....	30
3-3 考察.....	31

3-4	小括.....	34
3-5	表および図.....	36
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
4-1	材料および方法.....	41
4-1-1	KCl による水カビ菌糸の発育阻止試験	41
4-1-2	KCl による水カビ遊走子の発芽阻止試験	41
4-1-3	水カビ遊走子の運動性に及ぼす KCl の影響.....	42
4-1-4	アユ卵の水カビ病発生に及ぼす KCl の影響.....	43
4-2	結果.....	44
4-2-1	KCl による水カビ菌糸の発育阻止試験	44
4-2-2	KCl による水カビ遊走子の発芽阻止試験	44
4-2-3	水カビ遊走子の運動性に及ぼす KCl の影響.....	44
4-2-4	アユ卵の水カビ病発生に及ぼす KCl の影響.....	45
4-3	考察.....	46
4-4	小括.....	49
4-5	表および図.....	51
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
5-1	材料および方法.....	61
5-1-1	低濃度人工海水によるミズカビ菌糸の発育阻止試験.....	61
5-1-2	低濃度人工海水によるミズカビ遊走子の発芽阻止試験.....	61
5-1-3	ミズカビ遊走子の運動性に及ぼす低濃度人工海水の影響.....	62

5-1-4	低濃度人工海水中でアユ発眼卵を孵化まで管理した場合の安全性.....	62
5-2	結果.....	64
5-2-1	低濃度人工海水によるミズカビ菌糸の発育阻止試験.....	64
5-2-2	低濃度人工海水によるミズカビ遊走子の発芽阻止試験.....	64
5-2-3	ミズカビ遊走子の運動性に及ぼす低濃度人工海水の影響.....	64
5-2-4	低濃度人工海水中でアユ発眼卵を孵化まで管理した場合の安全性.....	64
5-3	考察.....	65
5-4	小括.....	67
5-5	表および図.....	69
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
6-1	材料および方法.....	79
6-1-1	発生状況および病原体の分離・培養.....	79
6-1-2	分離菌の同定.....	79
6-1-3	病理組織検査.....	80
6-1-4	感染実験.....	80
6-1-5	水温および人工海水の塩分濃度調整による防除.....	81
6-2	結果.....	84
6-2-1	発生状況および病原体の分離・培養.....	84
6-2-2	分離菌の同定.....	84
6-2-3	病理組織検査.....	85
6-2-4	感染実験.....	85
6-2-5	水温および人工海水の塩分濃度調整による防除.....	86
6-3	考察.....	88
6-4	小括.....	92

6-5 表および図.....	94
第7章 総括.....	108
謝辞.....	113
引用文献.....	114
Summary.....	122

第1章 緒言

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 (畑井, 1980; Kitancharoen *et al.*, 1997a)。これらに起因する病気はサケ科魚類ならびにその卵に発生する水カビ病 (Hatai and Hoshiai, 1992; Hussein *et al.*, 2001), サケ科魚類稚魚の内臓真菌症 (宮崎ら, 1977; 畑井・江草, 1977), アユ *Plecoglossus altivelis* の真菌性肉芽腫症 (宮崎・江草, 1973; 畑井ら, 1984; Chinabut, 1998) などがあるが, これらのうち水カビ病はもっとも一般的な病気であり, 魚類の鰓, 鱗, 体表または魚卵に綿毛状の菌糸塊が繁茂することを特徴とする。また, 飼育用水中には原因菌が常在しているため, 水カビ病は防疫による対策が困難である病気であり, 特に受精卵の場合, 死卵が存在するとそこに極めて高い確率で水カビ類が感染繁殖するため, 防除対策を施さない限り死卵から感染が拡大して甚大な被害をもたらすことになる。このため, 淡水養殖における魚卵の水カビ病対策は避けては通れない課題である。なお, 水カビ病原菌が属する卵菌綱の上位の分類階級は菌界であったが, 近年の Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi (Hawksworth *et al.*, 1995) の分類では, 従来の菌界が原生動物界 (Protozoa), クロミスタ界 (Chromista) および菌界 (Fungi) の 3 界に分かれ, 卵菌綱はクロミスタ界に再分類された。菌界に含められるものだけが真菌類であるとされるため, 今後, 魚介類の卵菌類に起因する病気は真菌病として扱えなくなる可能性があるが (畑井, 2004), 本研究では従来どおり卵菌類に起因する病気を真菌病として扱うこととする。

従来, 水カビ病の予防・治療にはアリルメタン系の染色剤であるマラカイトグリーンが使用されてきた (Cline and Post, 1972; Alderman, 1985)。マラカイトグリーンは承認されている水産用医薬品ではなかったものの, 卵および 1 g 未満の稚仔魚に対して廃液を吸着または中和するという条件を満たせば使用可能であり, 他の薬剤に比べ低濃度で水カビ病原菌に対する殺菌効果を示し (湯浅・畑井, 1995), 使用コストも低いことから, 淡水魚類

養殖の間では広く普及していた。しかし、本剤は動物に催奇形性や腫瘍を誘発するなどの安全性の問題も指摘され続けてきた (Meyer and Jorgenson, 1983; Monisha *et al.*, 2001)。また、近年の食品の安全性に対する消費者の意識の高まりは著しく (農林水産省消費安全局安全政策課, 2004)、養殖魚はより安全・安心に配慮した生産が求められるようになった。このような背景の中、2003年に施行された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。

マラカイトグリーンに代わる水カビ病防除法に関する研究は古くから行われてきたが、その中で、ホルマリンはニジマス *Oncorhynchus mykiss* 卵の水カビ病防除に有効であるが (Marking *et al.*, 1994; Schreier *et al.*, 1996; Michael *et al.*, 1997)、発ガン性を有することも報告されており (Dalbey, 1982)、我が国では承認に至っていない。また、スズキ目およびフグ目の外部寄生虫駆除剤として製造承認されている過酸化水素 (H_2O_2) は実用化可能なマラカイトグリーン代替薬として有望であったが (Marking *et al.*, 1994; Schreier *et al.*, 1996; Kitancharoen *et al.*, 1997b, 1998; 山本ら, 2001)、水カビ病に有効である 1,000 ppm の濃度はニジマス卵には問題がないが (Kitancharoen *et al.*, 1997b, 1998; 山本ら, 2001)、サクラマス *Oncorhynchus masou*、アメマス *Salvelinus leucomaenis leucomaenis*、シロサケ *Oncorhynchus keta* 卵では毒性が発現することから (山本ら, 2001; 熊谷ら, 2004) 実用化に至っていない。一方、欧州では、マラカイトグリーンの代替薬としてプロノポール (2-ブロモ-2-ニトロプロパン-1,3 ジオール) が承認されているが (Branson, 2002)、我が国においてもニジマス卵、アユ卵に対してその水カビ病防除効果が確認され (Oono *et al.*, 2007a, 2007b, 2008a, 2008b)、現在、サケ科魚類やアユなどを含むニシン目の魚類卵に対して唯一承認された水産用医薬品となっている (農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課, 2008)。但し、プロノポールには使用コストの問題やコイ科魚類卵に対して使用することができないなどの問題が残されている。

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、現状においても、水カビ病治療薬の選択肢は極めて少ないと言わざるを得ず、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。そして、新たな方法を検討する場合、市場規模の小さい淡水養殖の分野では、製薬メーカーが新規に薬剤の開発を行うことは極めて稀であることに加え、前述のとおり消費者の食の安全性への関心が高まっていることから、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。以上述べたことから、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。

卵菌類に起因する淡水魚の病気のうちミズカビ科の菌によって引き起こされる真菌病については述べてきたが、ミズカビ科以外の卵菌類によって引き起こされる真菌病については、過去に問題となる病気はほとんど知られていなかった。しかし、フハカビ科の *Pythium* 属菌によるアユの内臓真菌症が 2007 年に山梨県で確認され、仔魚期のアユに大量死を引き起こしたことから、その対策について検討することが急務となった。淡水魚の内臓真菌症については、サケ科魚類稚魚の内臓真菌症が知られているが（宮崎ら, 1977; 畑井・江草, 1977）、*Pythium* 属菌に起因する内臓真菌症の報告は過去になく、その原因菌、原因菌の性状、感染機序などは全く明らかにされていないため、それらを明らかにした上で防除方法を検討することが重要である。また、魚類の内臓真菌症に対して承認されている医薬品はないため、対策については、薬剤を用いない方法でなくてはならない。本研究では、新たに発生した *Pythium* 属菌によるアユ仔魚の内臓真菌症に関する基礎的な知見を得るための調査・研究を行うとともに、その結果に基づき、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を行った。なお、アユ仔魚期における感染症に関する研究は *Vibrio anguillarum* に起因する病気（田畑ら, 1982）、卵菌類以外の真菌が原因となる内臓真菌症（落合ら, 1977; Hatai *et al.*, 1986）の報告があるが、その数は極めて少なく、またアユ仔魚の初期減耗に関わる感染症については明らかにされていないことが多く、本研究はアユの初期減耗要因を探る上でも重要な研究である。

本論文は、第1章では緒言、第2章では、ニジマス卵の水カビ病に対して、銅製の繊維（以下、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卵を管理することで防除を試みた。そして、銅ファイバーが水カビ病に有効であった要因について、*in vitro* での原因菌に対する影響を調べることでその作用機序を検討した。第3章では、ニジマス卵で有効性が確認された銅ファイバーがサケ科魚類卵以外のアユ卵およびコイ *Cyprinus carpio* 卵にも有効であるかどうかを検討した。第4章では、塩化カリウム溶液中で受精卵を管理することでアユ卵の水カビ病を防除できるかどうかを検討した。第5章では、アユの発眼卵を低濃度の人工海水中で管理する方法で水カビ病を防除できるかどうかについて検討を行った。第6章では、新たなアユ仔魚の病気である *Pythium* 属の菌に起因する内臓真菌症について研究を行い、薬剤を用いない方法でこの病気を防除できるかどうかについて検討を行った。第7章では、本論文の総括を記載した。

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

淡水魚卵に発生する水カビ病は、主に孵化用水中に常在する卵菌綱、ミズカビ科の菌によって惹起される病気であり、何らかの処置を施さなければ歩留まりの大幅な低下は避けられない。このため、本病の防除対策は種苗生産時の重要な課題のひとつとなっている。

これまで水カビ病の予防・治療には、アリルメタン系の色素剤であるマラカイトグリーンが原因菌に対する発育阻止効果（湯浅・畑井, 1995）、使用時の簡便さ、価格などの点で優れており、国内で広く使用されてきた。しかし、本剤は安全性などの問題も指摘され（Meyer and Jorgenson, 1983; Monisha *et al.*, 2001）、2005年に食用に供する養殖魚への使用が法的に禁止された。マラカイトグリーンに代わる水カビ病防除剤については過去に多くの研究がなされてきたが、現在我が国で水カビ病に対して承認されている水産用医薬品はブロンポールのみであり（Oono *et al.*, 2007a, 2007b, 2008a, 2008b）、現在に至っても本病の防除法は限られている。

銅は微量で殺菌効果を有することが知られており（久賀, 1997）、ヒトに肺炎を引き起こすレジオネラやヒトおよび家畜に下痢症状を引き起こす原虫 *Cryptosporidium parvum* のオーシストを不活化させる効果を有し（Lin *et al.*, 2002; 菊野ら, 2004）、さらに、衣料などに用いられる繊維に織り込むことにより、細菌の増殖を抑制し、繊維を清潔に保持する効果も報告されている（Nakashima *et al.*, 2001a, 2001b）。

本章では、新たな水カビ病防除法として銅の殺菌力に着目し、繊維状の銅（以下、銅ファイバー）を使用する方法が有効であるか否かを検討した。

2-1 材料および方法

2-1-1 ニジマス卵の水カビ病発生に及ぼす銅ファイバーの影響

供試卵は山梨県水産技術センター忍野支所（以下、忍野支所）で飼育中のニジマス3年魚から採卵後、卵に直接精子をかけて受精させ（以下、乾導法）（井塚, 2005）、1時間以上吸水させたものを用いた。

試験は市販のFRP製タテ型孵化槽（アース社製）の卵を収容する5区画（1区画あたりの容積0.05 m³）のうち最上流の区画に所定の重量の銅ファイバー（日本スチールウール社製; 1 kgあたりの表面積65 cm²）を均一に広げて浸漬し、表2-1の水質を示す忍野支所の地下水を200 mL/sの割合でかけ流し、その下流の区画に供試卵を収容して、受精から発眼までの約2週間、水カビ病の発生の有無などを観察した（図2-1）。試験区は銅ファイバーをそれぞれ50, 100, 200, 400 および800 g浸漬した5区と対照区の計6区とした。試験は4回実施し、試験ごとに銅ファイバーを交換することなく使用した。第1回目は銅ファイバー浸漬後0日後、第2回目は7日後、第3回目は14日後、第4回目は21日後にそれぞれ受精卵を収容した。また、孵化用水中の銅濃度は山梨県衛生公害研究所に依頼し、原子吸光分析法により測定した。銅濃度の測定は200 g区では24時間後、その後は1週間または2週間ごとに126日後まで実施したが、その他の区では24時間後のみ実施した。

なお、供試卵は1区あたり吸水後の受精卵1,200 gを容積2,250 cm³の孵化盆1枚に入れて収容した。それぞれの区の収容卵数および発眼卵数は以下の式より算出した。

収容卵数 = 1,200 g / 吸水後の受精卵1粒の平均重量 (70.6~77.1 mg)

発眼卵数 = 発眼期における各区の発眼卵の総重量 / 発眼卵1粒の平均重量 (71.5~77.0 mg)

発眼率は収容卵数に対する発眼卵数から算出した。また、水カビ着生率は発眼時に無作為に選択した生卵、死卵それぞれ100粒ずつを実体顕微鏡下で観察することにより水カビの菌糸が着生している卵の割合を求めた。その後、それぞれの処理区の発眼卵200粒ずつを別の水槽に移し、忍野支所の通常の孵化用水をかけ流して孵化まで管理した。孵化率は

発眼卵数に対する孵化尾数から、また奇形率は孵化尾数に対する奇形（肉眼観察での形態異常）尾数から算出した。

2-1-2 銅によるミズカビ菌糸の発育阻止試験

供試菌は 2002 年に岐阜県淡水魚研究所でアユ卵から分離された *Saprolegnia diclina* NJM 0246 を用いた。なお、通常腐生菌である本種はサケ科魚類卵の水カビ病に最も大きく関与する卵菌類であるとされており、忍野支所で発生したニジマス卵の水カビ病においても優占種であることが報告されている (Kitancharoen *et al.*, 1997b)。

供試薬剤は $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ を成分とする銅標準液（和光純薬社製）を用いた。銅濃度は 0, 0.003, 0.006, 0.013, 0.026, 0.052 および 0.104 ppm の計 7 区とした。供試菌は GY 寒天培地（畑井・江草, 1979）を用い、20 °C で 3 日間培養したものをを用いた。試験は 10 mL の試験管内に各銅濃度に調製した 5 mL の GY 液体培地を分注し、それらに培養菌集落の辺縁を No. 2 コルクボーラー（内径 5.5 mm）で打ち抜いた寒天小片を 1 個加え、20 °C に静置する方法で実施した。菌の発育は 24, 48 および 72 時間後に寒天小片の上端から伸長した菌糸の最上部までの長さを測定した（図 2-2）。

2-1-3 銅によるミズカビ遊走子の発芽阻止試験

供試菌は前述の *S. diclina* NJM 0246 を用いた。遊走子は、GY 寒天培地上に発育した集落を寒天ごと約 8 mm 角に切り取った小片 2 個を GY 液体培地に接種し、2 日間、20 °C で培養した後に菌糸体のみを滅菌水道水に移し、20 °C で 1 日水培養を行う方法で産生させた。遊走子数は改良ノイバウエル式血球計算板（萱垣医理科工業社製）を用いて計測した結果、 2.2×10^4 個 /mL であり、これを接種用遊走子浮遊液として用いた。試験は薬剤添加の 5 区（0.003, 0.006, 0.013, 0.026 および 0.052 ppm）、さらに薬剤を添加しない対照区の計 6 区とし、銅溶液 0.1 mL と蒸留水 28.9 mL とをプラスチックシャーレ内で混合し（4 枚/濃度）、所定の濃度となるように調製した後、それぞれに遊走子浮遊液を 1 mL 接種した。

その後 30, 60, 120 分および 24 時間後に各濃度のシャーレ 1 枚ずつに遊走子の発芽を促すために GY 液体培地を 1 mL 添加し (Yuasa *et al.*, 1997), その 3 時間後に無作為に選択した 50 個の遊走子の発芽の有無を光学顕微鏡 (正立型) を用いて観察し, 発芽率を算出した (図 2-3)。

2-2 結果

2-2-1 ニジマス卵の水カビ病発生に及ぼす銅ファイバーの影響

浸漬 24 時間後の孵化用水の銅濃度を測定した結果、対照区は 0.001 ppm, 50 g 区は 0.003 ppm, 100 g 区は 0.004 ppm, 200 g 区は 0.006 ppm, 400 g 区は 0.014 ppm, 800 g 区は 0.027 ppm であった。200 g 区の 7~126 日目の銅濃度は 0.006~0.026 ppm であり、6 週間後まで濃度は上昇し、その後徐々に下降した (図 2-4)。また、24 時間後の浸漬ファイバー重量と銅濃度との間には正の相関がみられた (図 2-5, ピアソンの相関係数の検定, $p < 0.01$)。

銅ファイバーによる水カビ病防除効果を表 2-2 に示した。水カビ着生率は浸漬ファイバー重量の増加に伴って低くなる傾向がみられ、200 g 以上浸漬した区では、4 回の試験を通じて水カビ着生率は 0~3% であり、対照区の 8.5~86.5% と比較して水カビの着生を顕著に抑制した。また、50~100 g 区もある程度の水カビ病防除効果は確認された。発眼率は 800 g 区で 1.8~60.9% とばらつきがみられ第 1 回、第 3 回および第 4 回の試験では対照区よりも著しい低下を示したが (χ^2 検定, $p < 0.01$)、その他の区では、400 g 区の第 1 回を除いて有意な低下はみられなかった。孵化率は、800 g 区で発眼率同様、第 1 回、第 3 回、第 4 回に対照区よりも著しく劣る結果であったが ($p < 0.01$)、50~400 g 区では、すべての区で 90% 以上の孵化率を示し、対照区と同等もしくは高値であった ($p < 0.01$)。奇形率は、すべての試験を通じてどの区も対照区と比較して差はみられなかった。

2-2-2 銅によるミズカビ菌糸の発育阻止試験

72 時間後の伸長した菌糸の長さは最小が 0.006 ppm 区で 42.2 cm, 最大が 0.104 ppm 区の 47.8 cm であり、銅濃度の上昇に伴って菌糸の発育が抑制される傾向はみられず、0.104 ppm までの銅濃度は菌糸の発育に影響を与えないと判断された (表 2-3)。

2-2-3 銅によるミズカビ遊走子の発芽阻止試験

銅濃度 0 ppm 区はすべての浸漬時間において 90%以上の発芽率を示したが, 0.006 ppm 以上の区では発芽率が 0~26%であり, 0 ppm 区と比較して有意に発芽を抑制し (Fisher の直接確率法, $p < 0.01$), 特に 24 時間浸漬した区では遊走子の発芽を完全に抑制した (表 2-4)。

2-3 考察

本試験の結果では、0.104 ppm までの銅濃度はミズカビ菌糸の発育を抑制することはできなかつたが、遊走子の発芽は濃度 0.006 ppm 以上、30 分間以上の浸漬で抑制された。さらに、銅ファイバーがニジマス卵の水カビ病発生を防除するか否かについて検討した結果、注水量 200 mL/s あたり 200 g の銅ファイバーを浸漬した区では、対照区と比較して水カビ着生率は低く抑えられ、発眼率や孵化率の低下および奇形率の増加などの影響は確認できなかった。この実験条件下では銅の毒性は極めて小さく、影響を無視できる程度であったと判断された。この 200 g 区で水カビ着生率が低く抑えられた要因は飼育水中の銅濃度が常に遊走子の発芽を抑制する 0.006 ppm 以上であったためと考えられた。また、50 g 区と 100 g 区は第 1 回試験開始時の銅濃度がそれぞれ 0.003 および 0.004 ppm と低濃度であったが、対照区と比較して水カビ病を防除した。これも 200 g 区と同様に水カビ遊走子の発芽抑制効果に起因するものと考えられた。なお、200 g 区の銅濃度は 6 週間後まで経時的に上昇したことから、50 g 区および 100 g 区においても第 1 回試験開始時の銅濃度よりも上昇していたことが考えられる。一方、400 g 区と 800 g 区は水カビの着生を抑制することはできたが、発眼率、孵化率が対照区よりも有意に低下し、特に 800 g 区では第 3 回および第 4 回の試験で発眼率の著しい低下を示したことから、銅濃度の上昇に伴い、銅が卵に毒性を示したものと考えられた。400 g 区の発眼率の低下については、試験開始時の銅濃度が 0.012 ppm であったことと、最も銅濃度が低いと考えられる第 1 回試験のみ低下したことから銅による影響とは異なる要因が原因と考えられた。

以上の結果から、忍野支所の水質においては、銅濃度を 0.006 ppm 以上に保持することはニジマス卵の水カビ病の防除に有効であることが示唆された。銅の毒性は硬度やアルカリ度に影響され、硬度、アルカリ度が低いほど銅の毒性が発現しやすい(尾崎・山本, 1979)。Servizi and Martens (1978) は硬度 (以下, CaCO_3 として) 83.1 mg/L, アルカリ度 (以下, CaCO_3 として) 62.5 mg/L の下で、ベニザケ *Oncorhynchus nerka* とカラフトマス *Oncorhynchus*

gorbuscha を受精後から浮上稚魚までの間継続的に銅に暴露させた結果、ベニザケでは 0.037 ppm, カラフトマスでは 0.025 ppm 以下の濃度は孵化までに大きな影響を及ぼさなかったと報告している。また, Mckim and Benoit (1971, 1974) は硬度 45.4 mg/L, アルカリ度 41.6 mg/L の下でカワマス *Salvelinus fontinalis* を 2 世代にわたって銅に暴露させた結果, 0.0094 ppm 以下の銅濃度であれば, 抱卵数, 孵化率, 孵化稚魚の生残率および成長などに影響がみられなかったと報告している。また, Hazel and Meith (1970) は硬度 44 mg/L, アルカリ度 21 mg/L の孵化用水で, マスノスケ *Oncorhynchus tshawytscha* 卵を発眼期から銅に暴露させた結果, 0.08 ppm の銅濃度は孵化に影響を与えなかったと報告している。一方, Grande (1967) は硬度 14 mg/L の軟水で, 受精から孵化までの期間, 0.01 ppm の銅濃度でニジマス卵およびタイセイヨウサケ *Salmo salar* 卵を管理した結果, ニジマスでは孵化率が 90%から 87%, タイセイヨウサケでは 85%から 60%に低下したと報告している。

これらの報告は受精から発眼までの間卵を銅に暴露させた本研究とは銅の暴露期間が異なるが, 本研究で用いた孵化用水 (硬度 62.3 mg/L, アルカリ度 60.1 mg/L) の水質であれば, 遊走子の発芽を阻止する 0.006 ppm の銅濃度中で銅の毒性による問題が起こりにくいことを示唆している。また, 本研究では 200 g 区の第 4 回目の試験時の銅濃度 0.020 ppm までは孵化までに影響を及ぼさなかったが, 銅の安全性については, さらに, 本研究では未検討の孵化後の銅の影響についても調査した上で, 明確にしていく必要があると言える。

以上の結果から, ニジマス卵の水カビ病の防除方法として, 銅が有効であると判断された。なお, 本手法では浸漬銅ファイバー重量が一定であっても, 銅濃度は 6 週間後まで経時的に上昇した。この現象は, 銅イオンの溶出などで銅ファイバーの表面に細かい凹凸ができることにより表面積が増大したことに起因するものと考えられる。また, 6 週間後以降銅濃度が下降したのは, 時間の経過とともに表面に亜酸化銅および塩基性炭酸銅などの保護被膜が形成されたことによる可能性が高い (久賀, 1997)。これらの現象は銅ファイバー浸漬時には必然的に起こる現象であり, 銅濃度の上昇は卵に毒性を発現させる可能性があるため, これらのことを考慮に入れた上で銅濃度を目的の濃度に保ち, 毒性を発現させ

ない注意が必要である。また、水質が忍野支所と異なる養魚場での銅の溶出量、毒性やニジマス以外の魚種に対する本法の有効性などについてもさらに検討する必要がある。

2-4 小括

淡水魚卵に発生する水カビ病は主に孵化用水に常在する卵菌綱，ミズカビ科の菌によって惹起される病気であり，何らかの対策を施さない限り歩留まりの大幅な低下をもたらす。水カビ病の予防・治療には，アリルメタン系の染色剤であるマラカイトグリーンが国内で広く普及していたが，安全性などの問題も指摘されている本薬剤は2005年に食用に供する養殖魚に対する使用が法的に禁止された。マラカイトグリーンに代わる水カビ病防除手段は古くから数多く研究されてきたが，我が国において，水カビ病に対して承認されている医薬品はブロナポールのみであり，現在に至っても本病の防除法は数少ない。本章では，新たな水カビ病防除法として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，その下流で魚卵を管理する効果についてニジマス *Oncorhynchus mykiss* 卵を用いて検討を行った。

山梨県水産技術センター忍野支所において，FRP製タテ型孵化槽の最上流の区画に200 mL/sあたり50～800 gの銅ファイバー（日本スチールウール社製；1 kgあたりの表面積65 cm²）を浸漬し，その下流にニジマス卵を設置して流水下で受精から発眼までの約2週間管理した。水カビ着生率は銅ファイバー重量の増加に伴って低下する傾向がみられ，200 g以上浸漬した区では4回の試験を通じて水カビ着生率は0～3%であり，対照区の8.5～86.5%と比較して水カビの着生を顕著に抑制した。また，50～100 g区においてもある程度の水カビ病防除効果は確認された。銅ファイバーによる卵の発生への影響について，400 g区での第1回，800 g区での第1回，第3回および第4回の試験で発眼率および孵化率などが対照区よりも低下する場合があったが，その他の区では，銅による悪影響は確認されなかった。以上の結果から，山梨県水産技術センター忍野支所におけるニジマス卵の水カビ病の防除には，銅ファイバーを200 mL/sあたり200 g浸漬した状態で卵管理を行うことが有効であると考えられた。なお，4回の試験期間中の200 g区における銅濃度は0.006～0.020 ppmであり，銅濃度は浸漬後の時間の経過とともに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について *Saprolegnia diclina* NJM 0246 を用いて検討を行った。供試薬剤は $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ を成分とする銅標準液（和光純薬社製）を用いた。菌糸の伸長に及ぼす影響について、10 mL の試験管内に分注された 5 mL の各種銅濃度（0, 0.003, 0.006, 0.013, 0.026, 0.052 および 0.104 ppm）の GY 液体培地に菌糸が生育した寒天小片を 1 個投入し、菌糸の伸長速度を比較した。72 時間後の菌糸の発育は最小が 0.006 ppm 区で 42.2 cm, 最大が 0.104 ppm 区の 47.8 cm であり、銅濃度の上昇に伴って菌糸の発育が抑制される傾向はみられず、0.104 ppm までの銅濃度は菌糸の発育に影響を与えないと判断された。

銅が遊走子の発芽に及ぼす影響について、水培養によって得られた供試菌の遊走子浮遊液を銅水溶液（0, 0.003, 0.006, 0.013, 0.026 および 0.052 ppm）に所定時間（30, 60, 120 分および 24 時間）浸漬した後に、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。その結果、銅濃度 0 ppm 区はすべての浸漬時間で 90%以上の発芽率を示したが、0.006 ppm 以上の区では発芽率が 0~26%であり、すべての浸漬時間で 0 ppm 区と比較して有意に発芽を抑制し、特に 24 時間浸漬した区では遊走子の発芽を完全に抑制した。この結果から、銅ファイバーを 200 g 浸漬した試験区でニジマス卵の水カビ病が防除された要因は銅濃度が常に水カビの遊走子の発芽を抑制する濃度に達していたことによるものと考えられた。

表 2-1. 忍野支所の孵化用水の水質

項目	
水温	12.5 °C
pH	7.2
硬度 (CaCO ₃ として)	62.3 mg/L
アルカリ度 (CaCO ₃ として)	60.1 mg/L
電気伝導度	129 μS/cm

表 2-2. ニジマス卵および水カビ病に対する銅ファイバーの影響

銅ファイバー重量 (g)	水カビ着生率 (%)	発眼率 (%)	孵化率 (%)	奇形率 (%)
第1回 対照区	8.5	48.1	89.5	0.5
50	5.5	50.8**	96.0*	1.5
100	2.5**	47.2	97.5**	2.5
200	0.0**	52.3**	93.0	0.5
400	0.0**	45.1**	95.0*	1.5
800	0.0**	37.7**	73.0**	1.0
第2回 対照区	80.0	52.9	86.0	0.5
50	31.5**	51.8	95.0**	0.5
100	24.0**	63.3**	93.5*	1.0
200	3.0**	65.6**	100.0**	2.5
400	0.0**	64.6**	93.5*	2.5
800	0.0**	60.9**	87.5	0.0
第3回 対照区	86.5	29.9	30.0	0.0
50	35.5**	66.0**	99.0**	0.5
100	22.0**	66.2**	100.0**	0.5
200	1.5**	72.5**	97.5**	1.5
400	0.5**	76.0**	96.5**	1.0
800	0.0**	21.2**	23.5**	0.0
第4回 対照区	69.0	49.7	85.5	1.5
50	21.0**	54.3**	99.0**	1.0
100	11.0**	53.9**	95.5**	0.5
200	0.0**	58.5**	93.5**	0.0
400	0.0**	60.0**	91.5	0.0
800	0.0**	1.8**	13.5**	0.0

*対照区と比較して $p < 0.05$ で有意差 **対照区と比較して $p < 0.01$ で有意差

4回の試験は各区同一のタテ型孵化槽を用いて、銅ファイバーを交換せずに行った
 水カビ着生率および発眼率は、ニジマス卵を発眼期 まで飼育した後（受精後約2週間後）に算出し、孵化率および奇形率は、銅を含まない通常の孵化用水で発眼卵を飼育し、孵化が完了した後に算出した

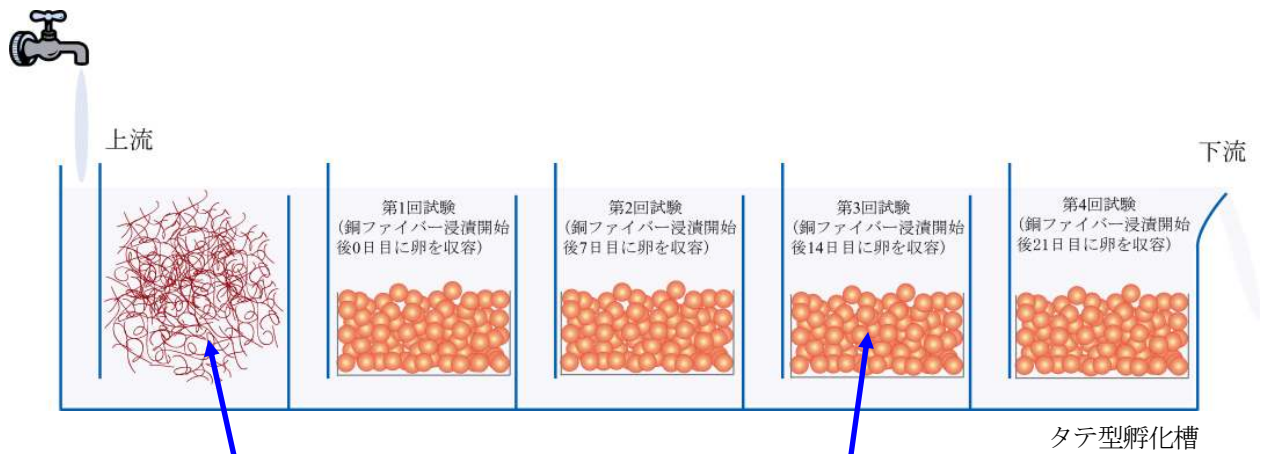
表 2-3. 銅濃度とミズカビ菌糸の伸長

銅濃度 (ppm)	菌糸の発育 (mm)		
	24時間後	48時間後	72時間後
0	13.7	27.1	44.3
0.03	13.8	26.5	42.9
0.06	13.6	27.7	42.2
0.013	14.1	26.9	42.4
0.026	13.6	27.2	43.2
0.052	14.1	28.6	46.0
0.104	14.4	28.5	47.8

表 2-4. 浸漬時間ごとの銅濃度とミズカビ遊走子の発芽率

浸漬時間	銅濃度 (ppm)	遊走子の発芽率 (%)
30 分	0	94.0
	0.003	92.0
	0.006	26.0*
	0.013	0.0*
	0.026	4.0*
	0.052	0.0*
60 分	0	98.0
	0.003	72.0*
	0.006	2.0*
	0.013	0.0*
	0.026	0.0*
	0.052	0.0*
120 分	0	96.0
	0.003	94.0
	0.006	2.0*
	0.013	0.0*
	0.026	0.0*
	0.052	0.0*
24 時間	0	100.0
	0.003	92.0
	0.006	0.0*
	0.013	0.0*
	0.026	0.0*
	0.052	0.0*

*0 ppmと比較して $p < 0.01$ で有意差



銅ファイバー



ニジマス卵

図 2-1. 銅ファイバー浸漬によるニジマス卵の水カビ病防除試験

タテ型孵化槽の最上流区画に、所定量の銅ファイバーを均一に広げて浸漬し、その下流にニジマス卵を設置し、流水下 (200 mL/s) で受精から発眼期まで管理した。

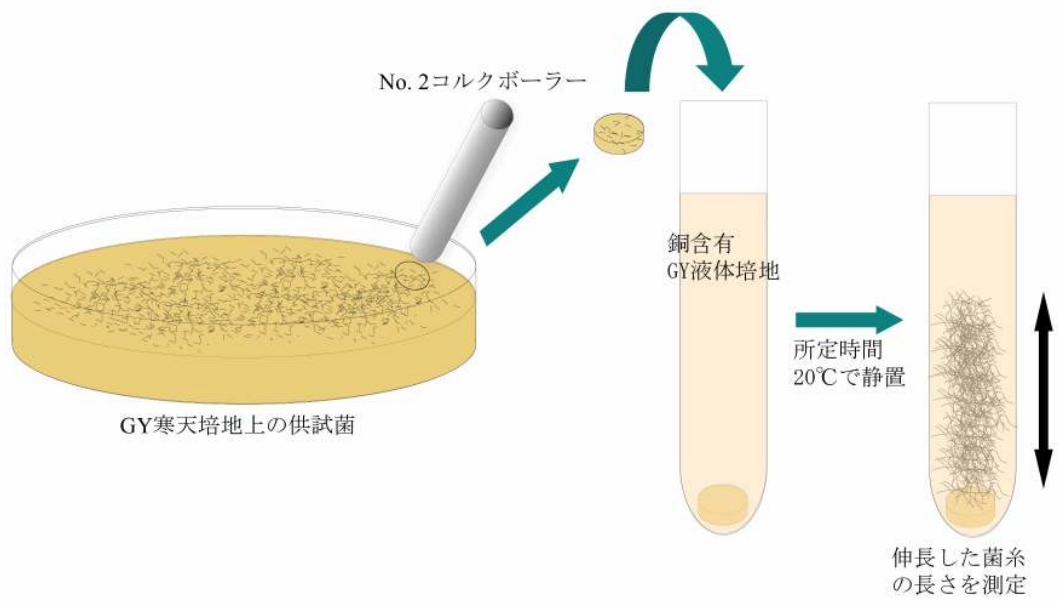
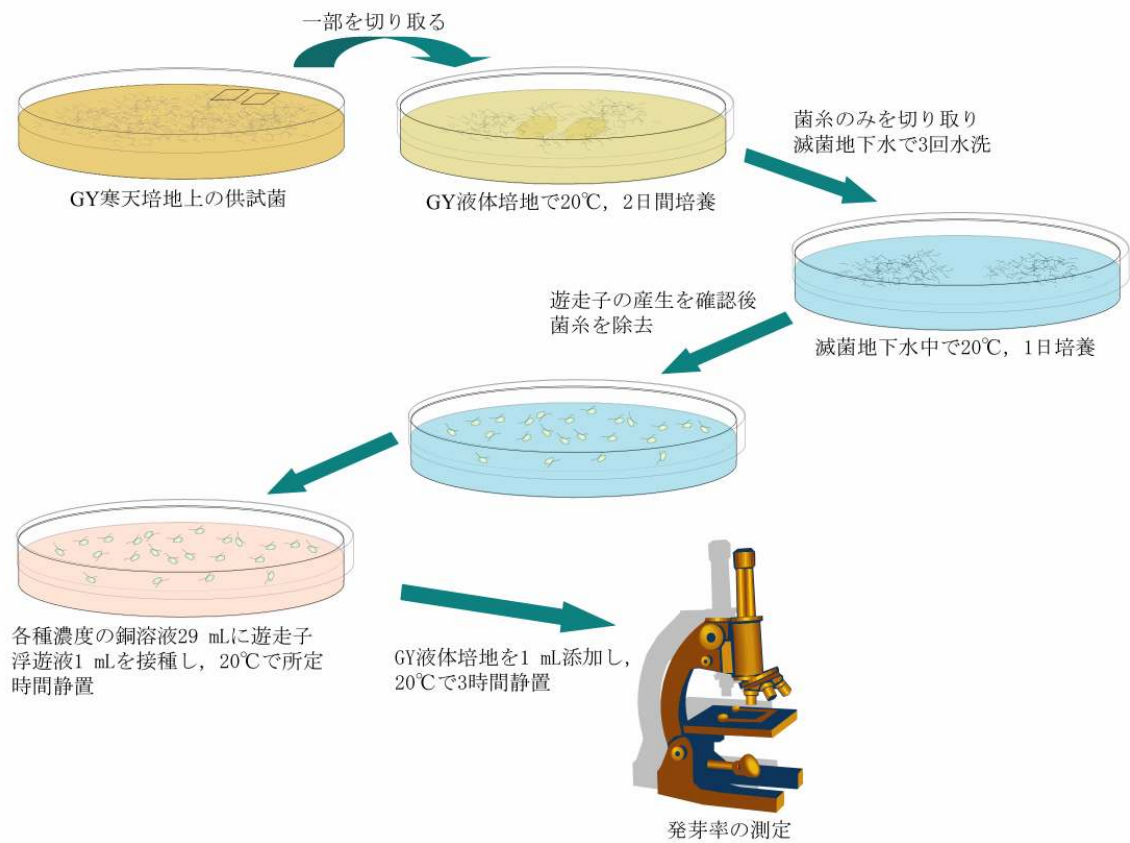


図 2-2. 銅による水カビ菌糸の発育阻止試験

GY 寒天培地上の *Saprolegnia diclina* の集落の辺縁を No. 2 コルクボーラーを用いて打ち抜いた寒天小片を、所定濃度の銅を含有した GY 液体培地が入った試験管中に入れ、20℃で静置し、24、48 および 72 時間後に寒天小片の上端から、伸長した菌糸の最上部までの長さを測定した。



発芽していない遊走子



発芽した遊走子

図 2-3. 銅による水カビ遊走子の発芽阻止試験

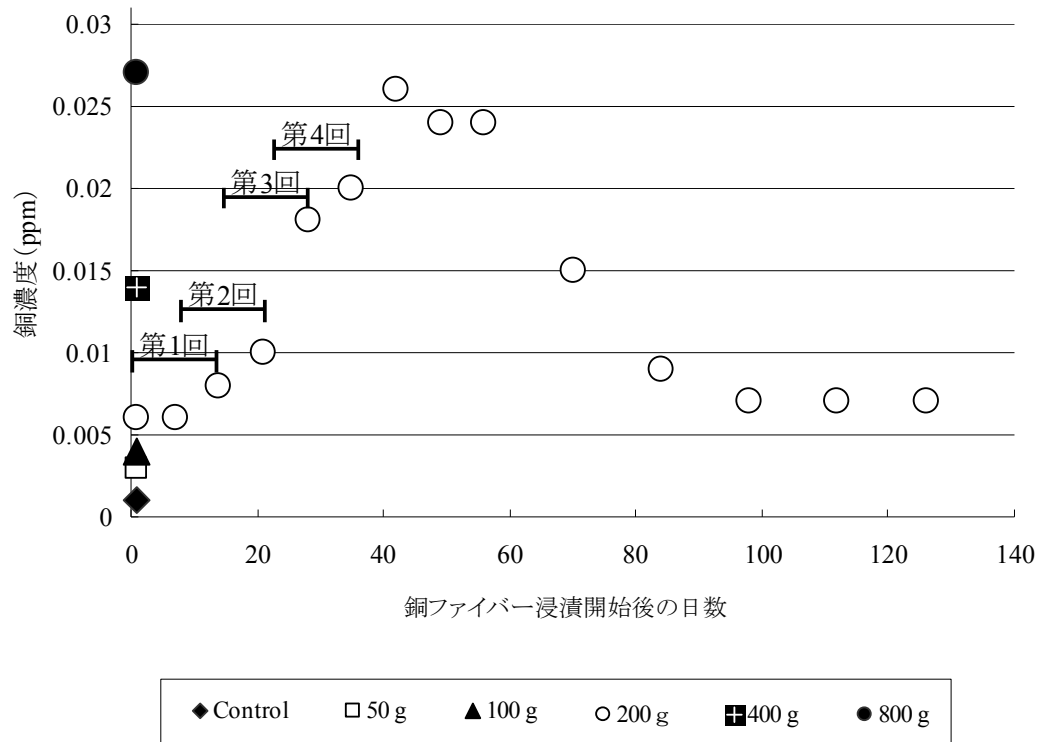


図 2-4. ニジマス卵の管理を行った水槽における銅ファイバー浸漬後の日数と銅濃度
第 1~4 回試験におけるニジマス卵管理期間を図中に示した

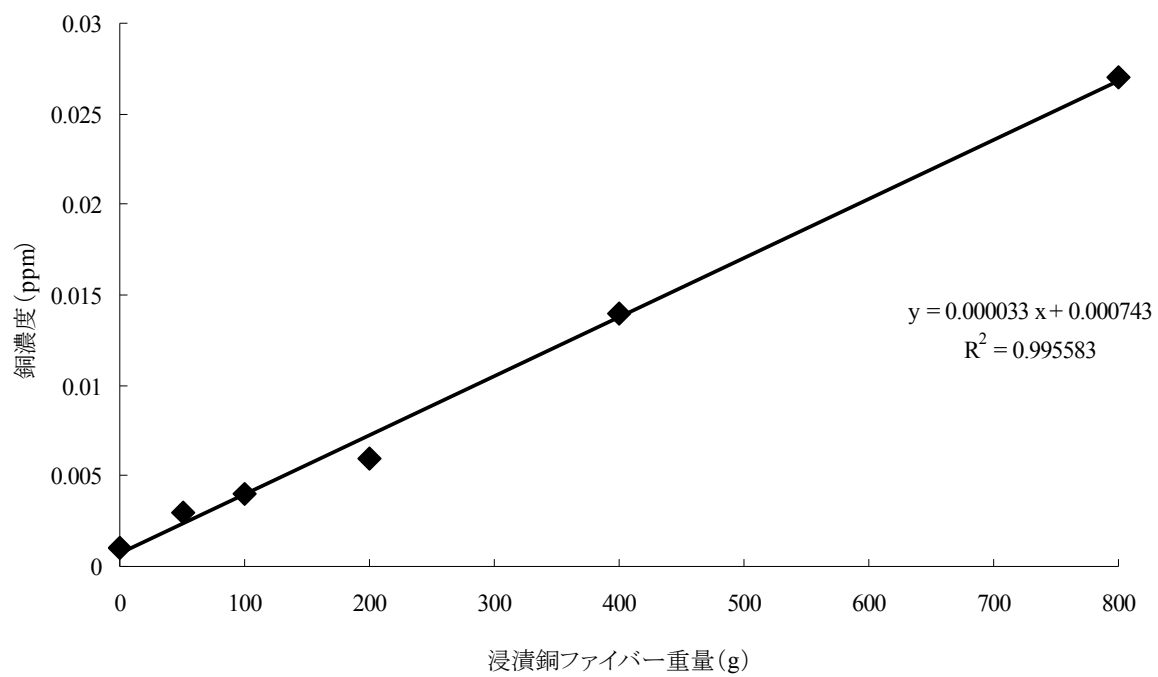


図 2-5. 浸漬開始 24 時間後の銅ファイバー重量と銅濃度との関係

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

アユおよびコイなどの種苗生産過程では、サケ科魚類と同様に卵の水カビ病対策には従来からマラカイトグリーンが使用されていた。2005年8月以降マラカイトグリーンは食用に供する養殖魚に対する使用が法的に禁止されているが、アユに対しては水カビ病防除剤としてブロンポール (Oono and Hatai, 2007) を主成分としたパイセス® (ノバルティスアニマルヘルス社製) が承認されている。沈性付着卵であるアユ卵は、サケ科魚類卵と異なり、比較的広い面積の付着器材に受精卵を付着させた状態で管理されるため、卵管理用の水槽は一般的に容積が大きいものが用いられる。このため、卵の水カビ病対策には必然的に薬剤の大量使用を余儀なくされ、多くの種苗生産施設において価格面での問題が生じている。

また、ブロンポールはニシン目魚類のみを対象として承認されているため (農林水産省消費安全局畜水産安全管理課, 2008), コイに対しては使用することができない。すなわち、マラカイトグリーンの使用が禁止された後は、コイ卵で使用可能な水カビ病防除剤はないのが現状である。このため、コイ卵で使用可能なマラカイトグリーンに代わる新たな水カビ病防除法の開発が求められている。

本章では、アユ卵およびコイ卵の新たな水カビ病防除方法の開発を目的として、ニジマス卵において有効性が確認された銅ファイバーによる水カビ病防除の可能性について検討を行った。

3-1 材料および方法

3-1-1 アユ卵の水カビ病発生に及ぼす銅ファイバーの影響

試験は3回行った。供試卵は成熟した人工産アユのメス数尾から採卵したものを使用した。採精は同一群の雄親魚数尾から行い、精子をその20倍量の高橋の人工精漿（高橋, 1985）で希釈後、15℃で1時間静置した。

受精は受精率の向上を目的として供試卵とコイの受精液（0.4% NaCl・0.3% 尿素）を混合させた後に、上記の精液を用いて行い、受精卵をスライドグラス1枚あたり、第1回試験では400粒程度、第2回、3回試験では100粒程度付着させ、約30分間吸水させたものを試験に供した。

本試験はアユ卵に対する銅の有効性の検証が第一の目的であったため、第2章で用いた手法と同様の方法を用いた。すなわち、FRP製タテ型孵化槽（アース）の卵を収容する区画のうち最上流の区画に銅ファイバー（日本スチールウール:1gあたりの表面積65 cm²）を浸漬し、表3-1の水質を示す山梨県水産技術センターの地下水を200 mL/sの割合でかけ流し、下流の区画で供試卵を発眼期まで管理した（図3-1）。なお、供試卵は受精後30分間吸水させ、1区あたり第1回試験ではスライドグラス2枚、第2回、3回試験では4枚をステンレス製染色金具に入れて収容した。

試験区は第1回と第2回試験では、対照区と銅ファイバーをそれぞれ200gおよび400gを浸漬した区の計3区とした。第3回試験では、対照区と銅ファイバーを100g浸漬した区の計2区とした。銅ファイバーの浸漬は供試卵を収容する直前に行い、3回の試験それぞれで新しいものを浸漬した。

発眼率および水カビ着生率は受精後7日目にそれぞれ試験開始時の着卵数に対する発眼卵数および水カビ着生卵数から算出した。また、発眼後は死卵のみを丁寧に除去した後、地下水を満たした500 mL容のポリ瓶にスライドグラスを個別

に收容し、18.0 °C のインキュベーター内で孵化まで無通気で管理した。孵化率は発眼卵数に対する孵化尾数の割合から、また奇形率は孵化尾数に対する奇形尾数（肉眼観察での形態異常）の割合から算出した。

銅濃度の測定は山梨県衛生公害研究所に依頼し、原子吸光分析法により行った。銅濃度の測定時期は、銅ファイバーを浸漬した試験区では浸漬開始後 24 時間および 7 日後とし、対照区は第 1 回試験の 24 時間後のみとした。

3-1-2 コイ卵の水カビ病発生に及ぼす銅ファイバーの影響

山梨県水産技術センターで飼育中のマゴイ（メス 2 尾、オス 4 尾）を採卵日前日の夕方に水温約 18.0 °C の地下水をかけ流してある 17 t 水槽に收容した。翌日の明け方、オスの追尾行動が始まったことを確認した後にメス 1 尾より採卵し、オス 2 尾の精子を用いて乾導法（井塚, 2005）によって受精させた。受精後はスライドグラスに 1 枚あたり 50 粒程度の受精卵を付着させ、約 30 分間吸水させたものを供試卵とした。

今回の試験はコイ卵に対する銅の有効性の検証が第一の目的であったため、第 2 章で用いた手法と同様の方法を用いた。すなわち、FRP 製タテ型孵化槽（アース）の卵を收容する区画のうち最上流の区画に銅ファイバー（日本スチールウール:1 g あたりの表面積 65 cm²）を均一に広げて浸漬し、表 3-1 の地下水を 200 mL/s の割合でかけ流し、その下流の区画で供試卵を管理した（図 3-1）。なお、供試卵は受精後 30 分間吸水させ、1 区あたりスライドグラス 4 枚をステンレス製染色金具に入れて收容した。また、銅ファイバーの浸漬は供試卵を收容する直前に行った。試験区は対照区および前述の銅ファイバー 100, 200, 400 g をそれぞれ浸漬した 3 区の計 4 区とした。

発眼率および水カビ着生率は受精後 3 日目にそれぞれ試験開始時の着卵数に対する発眼卵数の割合および水カビ着生卵数の割合から算出した。また、発眼後は

アユ卵での試験同様，死卵のみを丁寧に除去した後，地下水を満たした 500 mL 容のポリ瓶にスライドガラスを個別に収容し，18.0 °C のインキュベーター内で孵化まで無通気で管理した。孵化率は発眼卵数に対する孵化尾数から，また奇形率は孵化尾数に対する奇形（肉眼観察での形態異常）尾数から算出した。

3-2 結果

3-2-1 アユ卵の水カビ病発生に及ぼす銅ファイバーの影響

第1回試験では、銅ファイバー浸漬開始24時間後～7日目までの銅濃度は200g区、400g区でそれぞれ0.013～0.015, 0.017～0.020 ppmであった。水カビ着生率は200g区、400g区ともに0%であり、対照区の35.8%よりも有意に低く（Fisherの直接確率法, $p < 0.01$ ）、水カビ病の発生を顕著に抑制した。発眼率は200g区、400g区でそれぞれ41.8, 24.1%であり、対照区の57.2%と比較して有意に低かった（ $p < 0.01$ ）。孵化率はすべての試験区間で有意差は認められなかった。また、奇形率は200g区、400g区でそれぞれ18.0, 28.3%であり、ともに対照区の1.7%と比較して有意に高かった（ $p < 0.01$ ）（表3-2）。

第2回試験では、銅ファイバー浸漬開始24時間後～7日目までの銅濃度は200g区、400g区でそれぞれ0.008～0.013, 0.020～0.028 ppmであった。水カビ着生率は第1回試験同様200g区、400g区ともに0%であり、対照区の47.4%よりも有意に低く（ $p < 0.01$ ）、水カビ病の発生を顕著に抑制した。発眼率は200g区、400g区でそれぞれ46.0, 9.8%であり、200g区は対照区の48.4%と比較して有意差は認められなかったが、400g区は有意に低かった（ $p < 0.01$ ）。孵化率は200g区で82.2%であり、対照区の74.7%と比較して有意差はなかったが、400g区の40.5%は有意に低かった（ $p < 0.01$ ）。奇形率は200g区、400g区でそれぞれ19.1, 46.7%であり、ともに対照区の2.0%と比較して有意に高かった（ $p < 0.01$ ）（表3-2）。

第3回試験では、銅ファイバー浸漬開始24時間後～7日目の100g区の銅濃度は0.006 ppmであった。100g区の水カビ着生率は0.4%であり、対照区の56.5%よりも有意に低く（ $p < 0.01$ ）、水カビ病の発生を顕著に抑制した。発眼率は64.5%であり、対照区の65.5%と比較して有意差は認められず、孵化率は86.9%で対照区の78.7%と比較して、有意に高かった（ $p < 0.01$ ）。しかし、奇形率は5.9%で対

照区の 2.0%よりも有意に高かった ($p < 0.05$) (表 3-2)。

3-2-2 コイ卵の水カビ病発生に及ぼす銅ファイバーの影響

水カビ着生率は、すべての試験区で 0%であった。発眼率は 400 g 区で 46.6%であり、対照区の 43.8%と比較して有意差は認められなかったが、100 g 区および 200 g 区では、それぞれ 66.3, 60.1%で対照区よりも有意に高値を示した ($p < 0.01$)。孵化率は銅ファイバーを浸漬したすべての試験区において、対照区との有意差は認められなかった。奇形率は 200 g 区, 400 g 区でそれぞれ 7.7, 7.5%であり、対照区の 1.1%と比較して有意に高かったが ($p < 0.05$)、100 g 区では 1.1%であり、対照区と比較して有意差は認められなかった (表 3-3)。

3-3 考察

忍野支所でニジマス卵を用いて行った第 2 章の試験では、銅ファイバーを用いることで、ニジマス卵の水カビ病の発生を防除できる可能性を示した。本章では、アユ卵を用いて第 2 章と同様の試験を行った結果、200 g 以上の銅ファイバーはアユ卵に対して毒性を示したため、さらに、浸漬重量を 100 g にして試験を行った。その結果、水カビ着生率は対照区よりも低かったが、奇形率は対照区よりも高値を示した。これらの結果から、山梨県水産技術センターで銅ファイバーを使用する場合、アユ卵に悪影響を及ぼさない浸漬重量は 100 g よりも軽量であると考えられた。しかし、100 g 区の浸漬開始時の銅濃度は 0.006 ppm であり、第 2 章の結果をふまえると、この濃度より低濃度では水カビ病防除効果の低下が予想され、結論的に山梨県水産技術センターの水質下では、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考えられた。

次に、コイ卵を用いて試験を行った結果、対照区も含めたすべての試験区で水カビ着生率が 0%であったことから、銅ファイバーの水カビ病防除効果を論ずることができないと判断された。しかし、前述のアユ卵を用いて行った試験では、山梨県水産技術センターの水質下において、注水量 200 mL/s あたり 100 g の銅ファイバーを浸漬することで浸漬開始時の銅濃度が 0.006 ppm となり水カビ病の感染が抑制されたことから、コイ卵を管理する場合においても、この重量以上の銅ファイバーを浸漬すれば、水カビ病の発生を抑制できる可能性があると思われた。発眼率および孵化率は銅ファイバーを浸漬したすべての区で対照区よりも低値を示すことはなかったが、奇形率は 200 g 区、400 g 区で対照区よりも有意に高値を示した。このことから、これらの浸漬重量ではアユ卵同様銅はコイ卵に毒性を有すると考えられた。ただし、100 g 区の奇形率は対照区との差が認められなかったことから、山梨県水産技術センターで銅ファイバーによるコイ卵の水カビ病防

除を検討する場合、注水量 200 mL/s あたり 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示唆された。

第 2 章で行ったニジマス卵の結果によれば忍野支所の水質下では 0.020 ppm までの銅濃度は孵化までに影響を与えないことが示唆されている。アユ卵における第 1 回, 第 2 回試験の 200 g 区の試験期間中の銅濃度はそれぞれ 0.013~0.015 ppm, 0.008~0.010 ppm であったが、発眼率の低下, 奇形率の上昇が確認された。このことは、アユ卵の銅に対する感受性がニジマス卵と比較して高い、もしくは、山梨県水産技術センターの地下水が忍野支所のそれと比較して銅の毒性を発現させやすい水質である、あるいはその両方であること示している。また、コイ卵ではアユ卵と比較して銅の影響を受けにくかったが、200 g 以上の浸漬重量で銅の影響が確認されたことから、ニジマス卵の結果と比較した場合にアユ卵と同様の考察が可能である。本章の結果が魚種による感受性の差異なのか、水質の違いによるものかを検証するためには、忍野支所の水質下で同様の試験区を設定し、アユ卵およびコイ卵を管理することが必要である。なお、銅の毒性と関連がある硬度、アルカリ度、水温、pH などのうち (尾崎・山本, 1979), 山梨県水産技術センターでは忍野支所と比較して、硬度、アルカリ度が低く、水温が高かった。

銅ファイバーからの銅の溶出量について、第 2 章の結果では、忍野支所の孵化用水中に銅ファイバーを注水量 200 mL/s あたり 200 g および 400 g 浸漬した場合、24 時間後の銅濃度はそれぞれ 0.006, 0.014 ppm であったことから、山梨県水産技術センターの地下水は忍野支所よりも銅が溶出しやすい水質であったことがわかる。銅の溶出量は水温、pH、遊離炭酸などの水質に影響を受けることがわかっており (久賀, 1997), 今回の溶出量の違いもこれらの水質に起因している可能性がある。

以上の結果から、山梨県水産技術センターの水質下で、アユ卵の水カビ病防除に銅ファイバーを使用することは不適であるという結論に達した。また、コイ卵

については注水量 200 mL/s あたり 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ことが示された。しかし、200 g 以上浸漬した区で奇形率の上昇が確認されたことから、水カビ病防除効果が見られ始める濃度と銅の毒性が発現される濃度までの幅が小さいため、銅濃度の管理にはニジマス卵以上に注意を払う必要があると思われた。また、コイの場合、通常自然に産卵させるので、産卵が確認されたら速やかに卵を銅に暴露させる必要がある。これは銅が遊走子の発芽抑制には有効であるが、菌糸の生育を阻止しないことによる。

今後、他魚種または他の水質下において銅ファイバーを使用する場合、銅に対する魚種ごとの感受性、水質による毒性および溶出量の差異に注意し、使用の検討がなされるべきである。

3-4 小括

サケ科魚類卵以外のアユ *Plecoglossus altivelis* およびコイ *Cyprinus carpio* などの卵の水カビ病の防除には従来からマラカイトグリーンが使用されてきた。しかし、マラカイトグリーンの食用に供する養殖魚への使用は 2005 年に法的に禁止された。マラカイトグリーンに代わる水カビ病防除剤としてプロノポールを主成分としたパイセス® (ノバルティスアニマルヘルス社製) が承認されているが、アユ卵に使用する際、価格の点で問題があり、また、コイ卵ではその使用が承認されていないため使用することができない。本章では、ニジマス卵において有効性が確認された繊維状の銅 (銅ファイバー) を用いた水カビ病防除法がアユ卵およびコイ卵にも有効であるかどうか同様の手法を用いて検討を行った。

山梨県水産技術センターにおいて、FRP 製タテ型孵化槽の最上流の区画に 200 mL/s の地下水の注水に対して所定量の銅ファイバー (日本スチールウール社製; 1 kg あたりの表面積 65 cm²) を浸漬し、その下流にアユ卵またはコイ卵を設置し、流水下で受精から発眼まで管理した。

アユ卵を用いて 3 回の試験を行った結果、第 1 回および第 2 回試験では、200 g 区、400 g 区ともに対照区と比較して水カビ着生率は有意に低下したが、両区ともに銅の毒性が確認された。第 3 回試験では、浸漬重量を 100 g にして試験を行った。その結果、水カビ着生率は対照区よりも低かったが、奇形率は対照区よりも高値を示した。これらの結果から、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あまり期待できないと考えられ、山梨県水産技術センターの水質下では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 100~400 g の浸漬重量で同様の試験を行った結果、水カビ着生

率は対照区も含めてすべての試験区で 0%であったため、水カビ病防除効果については論ずることができなかったが、アユ卵を用いた試験の結果から、コイ卵においても同様の効果が期待できると考えられた。発眼率、孵化率は 100~400 g の浸漬重量において、対照区よりも低値を示すことはなかったが、奇形率は 200, 400 g 区で対照区よりも高値を示した。ただし、100 g 区では対照区との差が認められなかった。このことから、山梨県水産技術センターで、銅ファイバーによるコイ卵の水カビ病を防除する場合、注水量 200 mL/s あたり 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。

表 3-1. 山梨県水産技術センターの孵化用水の水質

項目	
水温	アユ卵試験: 17.5 °C コイ卵試験: 18.0 °C
pH	7.6
硬度 (CaCO ₃ として)	34.8 mg/L
アルカリ度 (CaCO ₃ として)	31.0 mg/L
電気伝導度	175.3 μS/cm

表3-2. アユ卵および水カビ病に対する銅フアイバーの影響と試験時の銅濃度

銅フアイバー重量 (g)	供試卵数 (粒)	水カビ着生率 (%)	発眼率 (%)	孵化率 (%)	奇形率 (%)	24時間後の銅濃度 (ppm)	7日後の銅濃度 (ppm)
第1回 対照区	785	35.8	57.2	77.7	1.7	<0.001	NT
200	730	0.0**	41.8**	80.3	18.0**	0.015	0.013
400	849	0.0**	24.1**	84.4	28.3**	0.020	0.017
第2回 対照区	409	47.4	48.4	74.7	2.0	NT	NT
200	402	0.0**	46.0	82.2**	19.1**	0.008	0.010
400	379	0.0**	9.8**	40.5**	46.7**	0.020	0.028
第3回 対照区	423	56.5	65.5	78.7	2.0	NT	NT
100	544	0.4**	64.5	86.9**	5.9*	0.006	0.006

* 対照区と比較して $p < 0.05$ で有意差 ** 対照区と比較して $p < 0.01$ で有意差

NT：試験せず

表3-3. コイ卵および水カビ病に対する銅フアイバーの影響

銅フアイバー重量 (g)	供試卵数 (粒)	水カビ着生率 (%)	発眼率 (%)	孵化率 (%)	奇形率 (%)
対照区	258	0.0	43.8	89.5	1.1
100	160	0.0	66.3**	93.1	1.1
200	288	0.0	60.1**	94.5	7.7*
400	193	0.0	46.6	93.0	7.5*

* 対照区と比較して $p < 0.05$ で有意差 ** 対照区と比較して $p < 0.01$ で有意差.

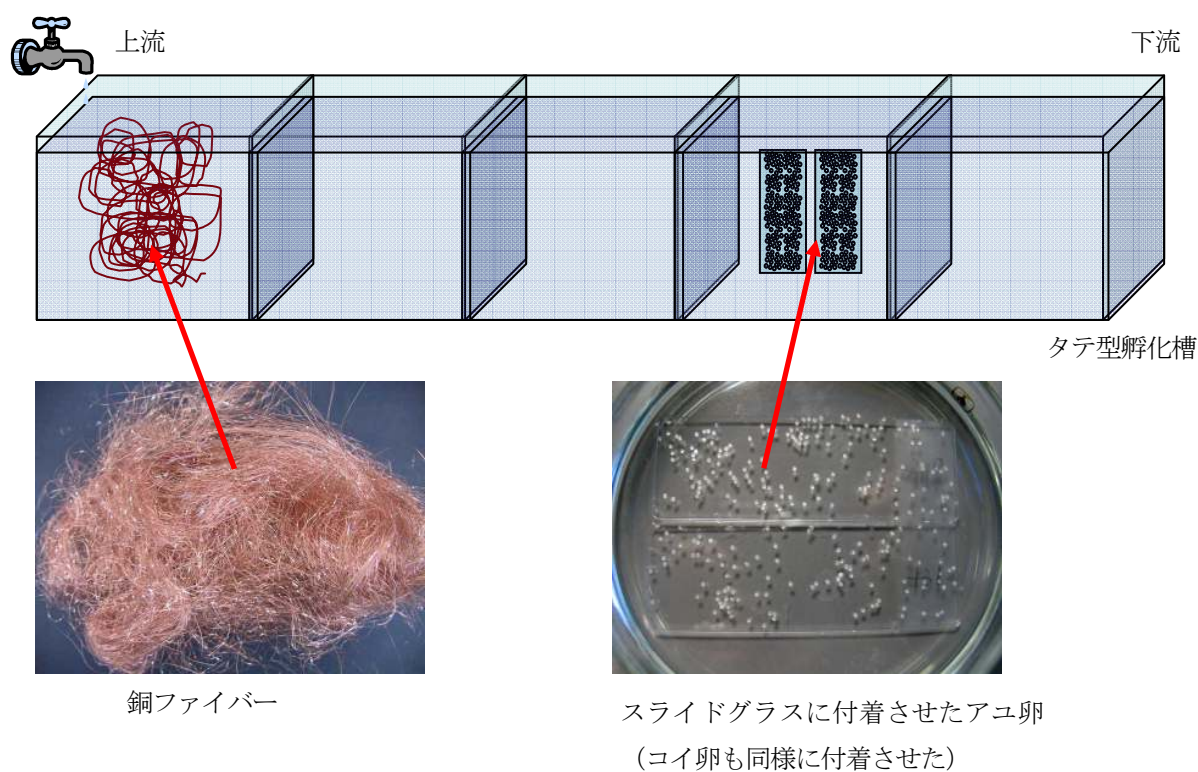


図 3-1. 銅ファイバー浸漬によるアユ卵およびコイ卵の水カビ病防除試験

タテ型孵化槽の最上流区画に、所定量の銅ファイバーを均一に広げて浸漬し、その下流にスライドグラスに付着させたアユ卵またはコイ卵を設置し、流水下（200 mL/s）で受精から発眼期まで管理した。

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

淡水魚卵に発生する水カビ病は、主に孵化用水中に常在する卵菌綱、ミズカビ科の真菌によって惹起される病気であり、何らかの対策を実施しなければ、歩留まりの大幅な低下は避けられない。このため、本病の防除対策は種苗生産時の重要な課題のひとつとされる。

水カビ病の予防・治療には、アリルメタン系の染色剤であるマラカイトグリーンが原因菌に対する発育阻止効果（湯浅・畑井, 1995）、使用時の簡便さ、コストなどの点で優れており、国内で広く普及していたが、安全性などの点から（Mayer and Jorgenson, 1983; Monisha *et al.*, 2001）、2005年に食用に供する養殖魚に対する使用が法的に禁止された。マラカイトグリーンに代わる水カビ病防除法は古くから研究されてきたが（Marking *et al.*, 1994; Schreier *et al.*, 1996; Michael *et al.*, 1997; Kitancharoen *et al.*, 1997b, 1998; 山本ら, 2001）、我が国で、魚卵の水カビ病防除を目的として承認されている医薬品は、ブロンポール（Branson, 2002）を主成分としたパイセス[®]（ノバルティスアニマルヘルス社製）のみであり、現在に至っても本病の防除法は限られている。

このため、今回は水カビ病防除を目的として過去に検討されたことがない、塩化カリウム（以下、KCl）の3種類の水カビ病原菌に対する影響を試験するとともにアユ卵の水カビ病防除効果を検討した。

なお、KClは結晶の構造などの化学的性質は塩化ナトリウムに類似する物質であり（岩波, 1978）、一般的には農業用の肥料、食品添加物として、また、水産分野では養殖時に使用する人工海水などに利用されており、自然界では鉱質、土壌、底質および天然水などの環境中の至るところに存在する物質である。

4-1 材料および方法

4-1-1 KCl による水カビ菌糸の発育阻止試験

供試菌は *Saprolegnia diclina* NJM 0246, *Saprolegnia parasitica* ATCC 90213 および *Achlya* sp. NJM 0323 を用いた (表 4-1)。なお, *Saprolegnia* 属菌, *Achlya* 属菌は淡水魚卵の水カビ病原菌として一般的に知られているが, 特に *S. diclina*, *Achlya* sp. は過去にサケ科魚類卵を対象に行われた調査でいくつかの養魚場の水カビ感染卵の優占種であることが報告されている (Kitancharoen *et al.*, 1997a)。また, 日本国内 14 箇所の水産試験場などで行われたアユ卵の水カビ病原菌調査で, 水カビ病感染アユ卵から *Saprolegnia diclina*, *Saprolegnia parasitica*, *Achlya* sp. が分離されている (大野, 2008)。

供試薬剤は塩化カリウム (試薬特級, 和光純薬社製) を用いた。KCl 濃度は 0, 0.03, 0.06, 0.12, 0.24 および 0.48% (w/v) KCl 溶液の計 6 区とした。供試菌は GY 寒天培地 (畑井・江草, 1979) を用い, *S. diclina*, *S. parasitica* は 3 日間, *Achlya* sp. は 4 日間 20 °C で培養したものをを用いた。10 mL のガラス試験管内に各種 KCl 濃度に調製した 5 mL の GY 液体培地を分注し, それらに培養菌集落の辺縁を No. 2 コルクボーラー (内径 5.5 mm) で打ち抜いた寒天小片を 1 個加え, 20 °C に静置し, 24, 48 および 72 時間後に寒天小片の上端から, 伸長した菌糸の最上部までの長さを測定した (図 4-1)。

4-1-2 KCl による水カビ遊走子の発芽阻止試験

供試菌は前述の *S. diclina* NJM 0246, *S. parasitica* ATCC 90213 および *Achlya* sp. NJM 0323 を用いた。遊走子の産生は, GY 寒天培地上に発育した集落を, 寒天ごと約 8 mm 角に切り取った小片 2 個を GY 液体培地に接種し, 2 日間, 20 °C で培養した後に, 菌糸体のみを滅菌地下水に移し, 20 °C で 1 日水培養を行う方法で行った。その後, 定量濾紙 No. 541 (ワットマン社製) を用いて菌糸体を取り除き, 遊走子浮遊液中の遊走子数を改良ノイバウエル式血球計算板 (萱垣医理科工業社製) を用いて計数した。計数後に, 遊走子数を 1.0×10^5

個 /mL に調製し、供試遊走子浮遊液とした。試験区は 0, 0.03, 0.06, 0.12, 0.24 および 0.48% (w/v) KCl 溶液の計 6 区とし、各 KCl 溶液 15 mL と遊走子浮遊液 15 mL をプラスチックシャーレ内で混合し、20 °C で 24 時間静置した。その後、遊走子の発芽を促すために GY 液体培地を 1 mL 添加し (Yuasa *et al.*, 1997), その 3 時間後に無作為に選択した 100 個の遊走子の発芽状況を倒立顕微鏡を用いて倍率 100 倍で観察し、発芽率を算出した(図 4-2)。

4-1-3 水カビ遊走子の運動性に及ぼす KCl の影響

供試菌は前述の *S. diclina* NJM 0246, *S. parasitica* ATCC 90213 および *Achlya* sp. NJM 0323 を用いた。水カビ遊走子の発芽阻止試験と同様の方法で遊走子浮遊液を調製し、これを供試用遊走子浮遊液とした。試験区は 0, 0.0025, 0.005, 0.01, 0.015, 0.03, 0.06, 0.12, 0.24 および 0.48% (w/v) KCl 溶液の計 10 区とし、各 KCl 溶液 10 mL と遊走子浮遊液 10 mL をガラスシャーレ内で混合した後に、20 秒間静かに攪拌し、その 40 秒後および 9 分 40 秒後に遊走子を倒立顕微鏡を用いて倍率 40 倍で観察し、その運動状況を以下の 4 段階で評価した (図 4-3)。なお、*Saprolegnia* 属の場合、試験時には一次遊走子と二次遊走子が混在していたと考えられるが、本試験はそれらを特に区別せずに行った。また、今回供試した 3 株では、遊走子浮遊液調製後 3 時間後であっても通常の運動性を有する遊走子が確認されている。

A : 1 視野中の遊走子すべてが運動性を有しない

B : 1 視野中の遊走子のほとんどが運動性を有しないが、一部の遊走子が極めて微弱な運動性を有する

C : 運動性は B と D の間

D : 1 視野中の遊走子の多くが活発に動いている

4-1-4 アユ卵の水カビ病発生に及ぼす KCl の影響

試験は 3 回行った。成熟した人工産アユのメス 3 尾から採卵後、5 尾分のオスから搾出した精子で乾導法（井塚, 2005）によって受精させ、地下水で約 30 分間吸水させたものを供試卵とした。なお、受精卵はスライドグラス 1 枚あたり 120 粒程度付着させ、1 区あたりスライドグラス 2 枚をステンレス製染色金具に入れ、これを試験に供した。

試験区は 0, 0.03, 0.06 および 0.12% (w/v) KCl 溶液の計 4 区とした。3 L 容ガラス製ビーカー中に地下水を用いて調製した所定濃度の KCl 溶液または通常の地下水 2 L を用意し、この中で受精から発眼までの 7 日間止水および無通気で卵を管理した。卵管理用のビーカーは 18 °C に設定したインキュベーター中で管理することによって、水温を一定に保持した（図 4-4）。第 3 回試験のみ感染強度を高めるため、各区のビーカー内にあらかじめ自然感染によって水カビ菌糸が繁茂した死卵を 1 粒ずつ投入した。なお、予備試験の結果、水カビ菌糸が繁茂した死卵 1 粒は 24 時間後に約 6.0×10^4 個の遊走子を産生した。

発眼時に試験開始時の着卵数に対する発眼卵数から発眼率を算出した。また、着卵数に対する水カビ着生卵数から水カビ着生率を算出した。第 2 回、第 3 回試験では、発眼後に死卵をピンセットで丁寧に取り除いた後に、供試卵を付着させたスライドグラスを 1 粒ずつ通常の地下水を満たした 500 mL 容のポリ瓶に収容し、孵化まで 18 °C のインキュベーター中で管理した。孵化後に、ポリ瓶に収容した発眼卵数に対する孵化尾数から孵化率を算出した。また、孵化尾数に対する奇形（肉眼観察での形態異常）尾数から奇形率を算出した。

4-2 結果

4-2-1 KClによる水カビ菌糸の発育阻止試験

S. diclina では菌糸の伸長はいずれの試験区でも確認された。72 時間後の菌糸の長さは 35.4 (0.48% KCl) ~40.5 (0.06% KCl) cm であり、菌糸の発育は KCl 濃度にほとんど影響を受けなかった (表 4-2)。*S. parasitica* では菌糸の伸長はいずれの試験区でも確認された。72 時間後の菌糸の長さは 31.1 (0.48% KCl) ~32.9 (0.12% KCl) cm であり、菌糸の発育は KCl 濃度にほとんど影響を受けなかった。*Achlya* sp. では 0.48% KCl だけ菌糸の伸長が確認されなかった。また、0.12%と 0.24% KCl とでは 72 時間後の菌糸の長さが 0%と比較して半分程度となった。0.06%以下の KCl 濃度では菌糸の発育は KCl 濃度にほとんど影響を受けなかった。

4-2-2 KClによる水カビ遊走子の発芽阻止試験

S. diclina と *S. parasitica* では最も濃度が高い 0.48% KCl 溶液中でもほぼ 100%の発芽率であり、どの区も 0%と比較して有意差はみられなかった (表 4-3)。また、*Achlya* sp. では 0.48% KCl 溶液だけ 0%と比較して有意差が認められたが (Fisher の直接確率法, $p < 0.05$)、それ以外の試験区では 0%と比較して有意差は認められなかった。

4-2-3 水カビ遊走子の運動性に及ぼす KCl の影響

S. diclina の遊走子の運動は 0.03~0.12% KCl 溶液中で 1 分後に微弱となり、10 分後には停止した (表 4-4)。また、0.24%以上の濃度では 1 分以内に停止した。*S. parasitica* の遊走子の運動は 0.015% KCl 溶液中では 1 分後に微弱となり、10 分後には停止した。また、0.03%以上の濃度では 1 分後に停止した。また、*Achlya* sp.の遊走子の運動は 0.015%以上の濃度で 1 分後に停止した。

4-2-4 アユ卵の水カビ病発生に及ぼす KCl の影響

水カビ着生率は、第 1 回試験では KCl を含有した 3 試験区が 0~18.5%であり、3 試験区とも 0% KCl 区の 29.3%に対して有意に低値を示した (Fisher の直接確率法, $p < 0.01$) (表 4-5)。また、第 2 回試験では KCl を含有した 3 試験区の水カビ着生率は 0.5~3.5%であり、第 1 回試験と同様に 0% KCl 区の 37.3%と比較して 3 試験区とも有意に低値を示した ($p < 0.01$)。菌糸を繁茂させた死卵を投入した第 3 回試験では 0.06% KCl 区と 0.12% KCl 区で水カビ着生率はそれぞれ 1.9%と 0.9%であり、0% KCl 区の 64.5%と比較して有意に低値を示した ($p < 0.01$)。0.03% KCl 区は第 1 回と第 2 回試験の結果と異なり、水カビ着生率が 59.3%であり、0% KCl 区と比較して有意差は認められなかった。

発眼率は、3 回の試験を通じて KCl を含有した試験区は 0% KCl 区よりも低値を示すことはなく、同等もしくは高い値を示した ($p < 0.01$ または $p < 0.05$)。孵化率および奇形率は第 2 回と第 3 回の試験で検討したが、孵化率は KCl を含有した試験区が 0% KCl 区よりも低値を示すことはなく、同等もしくは高値を示し ($p < 0.01$ または $p < 0.05$)、奇形率は、KCl を含有したすべての試験区で 0% KCl 区との間に有意差は認められなかった。

4-3 考察

塩類を用いた水カビ病防除について検討された事例はいくつかあるが (Taylor and Bailey, 1979; Edgell *et al.*, 1993; Kitancharoen *et al.*, 1997c), KCl 単独の効果について検討された報告はない。

本試験の結果から, KCl は水カビ病原菌の菌糸の発育を 0.48%以下の濃度ではほとんど阻止できないと判断され, 遊走子の発芽も 0.48%以下の KCl 濃度では阻止できないと考えられた。しかしながら, 遊走子の運動性に及ぼす KCl の影響を試験した結果, 0.03%以上の濃度であれば 3 種類の原因菌の遊走子の運動性を極めて短時間に抑制できることが示唆された。

これまで卵菌類に起因する水生生物の真菌病原菌についてその遊走子の運動性を阻止させることに着目した研究はほとんどないが, 安信 (2006) はガザミ *Portunus trituberculatus* 幼生の真菌症には飼育水を pH9.25 に調整することが感染防除に有効であり, pH9.25 の飼育水は原因菌 *Halocrusticida okinawaensis* の遊走子の発芽を阻止するとともに浸漬 30 分後には遊走子の運動が停止すると報告しており, 防除に関与したのは主に遊走子の発芽阻止効果であったと結論付けている。また, 加治ら (1991) はホルマリン浴がノコギリガザミ *Scylla serrata* のハリフトロス症の防除に有効であり, ホルマリンは原因菌である *Haliphthoros* sp. の遊走子の運動および遊出を抑制すると報告しているが, そのどちらがハリフトロス症の防除に関与したかは示していない。これらの研究では遊走子の運動性は供試溶液に浸漬後 30 分後に調べられており, 本試験のように浸漬後速やかに遊走子の運動性を観察することはしていない。従って, 本研究は遊走子の運動性を浸漬後極めて短時間で観察する方法で, 有効性の検討を行った最初の報告であると言える。

S. diclina の遊走子はカワマス卵の卵膜抽出物やあるアミノ酸や炭水化物へ向かっての正の走化性を示すことが知られている (Rand and Munden, 1993)。また, *S. parasitica* の遊走子はいくつかのアミノ酸, 炭水化物, 脂肪酸および魚類組織抽出物に対して正の走化性を

示すことが報告されていることから (El-Feki *et al.*, 2003), 遊走子が運動することは宿主への遊走子の付着および水カビ病の発生に重要な役割を果たしていると言える。

遊走子の運動性を抑制させる方法が実際にアユ卵の水カビ病防除に有効か否かを検討した結果, KCl 溶液中でアユ卵を管理した試験区のほとんどで水カビ病防除効果が確認され, 本手法で水カビ病の発生を防除可能であることが確認された。今後, 本手法の実用化を考える場合, 3 回の試験すべてで有効性が確認された 0.06%の KCl 濃度で実用化に関する検討を行う必要があると思われた。また, アユ卵に対する安全性に関しては 0.06%区で 3 回の試験を通じて発眼率, 孵化率および奇形率に影響が認められなかったことから, 受精後から発眼期までの期間この KCl 濃度でアユ卵を管理することは問題がないと判断された。

Kitancharoen *et al.* (1997c) は, 0.3% NaCl 溶液でニジマス卵を飼育することは水カビ病に有効であると報告している。0.3% NaCl は水カビ病原菌の菌糸の伸長および遊走子の発芽に影響を与えないが (湯浅・畑井, 1995; Koeypudsa *et al.*, 2005), 遊走子の運動性は速やかに停止させる (三浦, 未発表)。そして, 本章で行った試験結果からも, 菌糸を殺菌したり遊走子の発芽を抑制しなくても遊走子の運動性を停止させることができれば魚卵の水カビ病を防除する上で有効となることが確認されたと言える。

本試験で KCl の水カビ病防除効果が明らかとなったが, 前述のとおり KCl は農業用肥料, 食品添加物および人工海水の成分などに利用されており, 食の安全性という面からも問題は少ない。また, 0.06%という濃度で効果が確認されたことは価格の面でも有利である。但し, 本手法は KCl の水カビ病原菌の遊走子の発芽, 菌糸の伸長にはあまり影響を与えず遊走子の運動性を抑制するという性質を利用していることから, 菌糸の殺菌効果を有するプロノポール (Oono *et al.*, 2007, 2008a, 2008b), 遊走子の発芽抑制効果を有する銅ファイバー (第 2 章) などの手法と比較して効果は劣る可能性がある。従って, 本手法を用いる場合には運動性を失った遊走子が偶然宿主に付着する機会を減らすために, 卵は可能な限り低密度で管理した方がよいと思われる。また, カリウムイオンは人体において血圧調整

に關与し、体内に大量に取り込まれると血圧の急激な低下を引き起こすことは使用者が知っておくべきである。

4-3 小括

淡水魚卵に発生する水カビ病は防疫による対策が困難な病気である。本章では、過去に水カビ病防除法として検討されることがない塩化カリウム（以下、KCl）の3種類の水カビ病原菌に対する *in vitro* での効果とアユ *Plecoglossus altivelis* 卵の水カビ病防除効果を試験した。

3種類の水カビ病原菌, *Saprolegnia diclina* NJM 0246, *Saprolegnia parasitica* ATCC 90213 および *Achlya* sp. NJM 0323 を供試して菌糸の伸長, 遊走子の発芽および遊走子の運動性に対する KCl の影響を試験した。

菌糸の発育への影響を, 10 mL の試験管内に分注された 5 mL の各種 KCl 濃度 (0, 0.03, 0.06, 0.12, 0.24 および 0.48%) の GY 液体培地に供試菌の菌糸を生育させた寒天小片をそれぞれ 1 個ずつ投入し, 菌糸の伸長速度を比較する方法で調べた。*S. diclina* および *S. parasitica* ではいずれの試験区でも菌糸の発育が確認され, 菌糸の発育は KCl 濃度にほとんど影響を受けなかった。*Achlya* sp. では 0.48% KCl 区だけ菌糸の伸長が確認されなかった。また, その他の区では, 0.12% および 0.24% KCl で菌糸の発育速度が低下したものの, すべての区で菌糸の発育が確認された。遊走子の発芽への影響を, 水培養によって得られた供試菌の遊走子浮遊液を各種濃度の KCl 水溶液中 (0, 0.03, 0.06, 0.12, 0.24 および 0.48%) に 24 時間浸漬した後に, その溶液中に GY 液体培地を加えることで発芽を促し, 発芽率を比較する方法で調べた。その結果, *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% と比較して有意差が認められたが, それ以外の試験区では有意差は認められなかった。遊走子の運動性への影響を, 水培養によって得られた供試菌の遊走子浮遊液をガラスシャーレ内で各種濃度の KCl 水溶液 (0, 0.0025, 0.005, 0.01, 0.015, 0.03, 0.06, 0.12, 0.24 および 0.48%) と混合し, 1 および 10 分後の遊走子の運動状況を観察し, 4 段階で評価する方法で調べた。その結果, *S. diclina* の遊走子の運動は 0.03~0.12% の KCl 溶液中で 1 分後

に微弱となり、10分後に停止した。*S. parasitica* の遊走子の運動は0.03%以上のKCl溶液中で1分後に停止した。また、*Achlya* sp.の遊走子の運動は0.015%以上のKCl溶液中で1分後に停止した。以上の結果から、0.48%までのKCl溶液は水カビ病原菌の菌糸の発育および遊走子の発芽を抑制する効果は期待できないが、遊走子の運動性は0.03%以上の濃度であれば抑制できることが明らかとなった。

水カビの遊走子の運動性が抑制されると考えられるKCl濃度で、実際にアユ卵を用いて水カビ病防除効果を検討した。スライドグラスに付着させたアユ卵をビーカー内の各種濃度のKCl水溶液(0, 0.03, 0.06 および0.12%)中で受精から発眼期まで管理した。試験は3回行った。その結果、第1, 2回試験ではKClを含有したすべての試験区で、第3回試験では0.06 および0.12%のKCl濃度で0%と比較して水カビ着生率が低く抑えられ、水カビ病防除効果が確認された。実用化には3回の試験すべてで水カビ病を防除した0.06%のKCl濃度が望ましいと考えられ、このKCl濃度では発眼率、孵化率、奇形率に影響は確認されなかった。

表 4-1. 供試菌株

菌株	由来宿主	起源	採材地	分離年
<i>Saprolegnia diclina</i> NJM 0246	アユ <i>Plecoglossus altivelis</i>	卵	岐阜県	2002
<i>Saprolegnia parasitica</i> ATCC 90213	ギンザケ <i>Oncorhynchus kistch</i>	体表患部	宮城県	1986
<i>Achlya</i> sp. NJM 0312	ニジマス <i>Plecoglossus altivelis</i>	卵	福島県	2003

表 4-2. KCl 濃度と水カビ菌糸の伸長

供試菌	KCl濃度(%)	菌糸の発育(mm)		
		24時間後	48時間後	72時間後
<i>S. diclina</i> NJM 0246	0	10.3	24.1	39.4
	0.03	11.0	25.8	40.4
	0.06	11.3	23.6	40.5
	0.12	9.8	23.2	38.0
	0.24	10.0	21.6	36.5
	0.48	8.5	20.9	35.4
<i>S. parasitica</i> ATCC 90213	0	8.8	19.7	31.9
	0.03	8.2	18.6	31.3
	0.06	9.5	21.3	32.5
	0.12	9.9	21.5	32.9
	0.24	7.7	19.8	32.6
	0.48	8.0	18.9	31.1
<i>Achlya</i> sp. NJM 0323	0	8.0	17.7	28.0
	0.03	8.4	16.8	27.0
	0.06	6.3	16.3	23.8
	0.12	5.1	10.1	14.9
	0.24	4.6	8.8	11.2
	0.48	0.0	0.0	0.0

表 4-3. KCl 濃度と水カビ遊走子の発芽率

菌株	KCl 濃度 (%)	発芽率 (%)
<i>S.diclina</i> NJM 0246	0	98
	0.03	99
	0.06	100
	0.12	98
	0.24	99
	0.48	100
	<i>S.parasitica</i> ATCC 90213	0
0.03		99
0.06		100
0.12		99
0.24		100
0.48		100
<i>Achlya</i> sp. NJM 0323		0
	0.03	77
	0.06	79
	0.12	75
	0.24	71
	0.48	8*

*, 0%と比較して $p < 0.01$ で有意差

表 4-4. 水カビ遊走子の運動性に及ぼす KCl の影響

菌株	KCl濃度(%)	暴露1分後	暴露10分後
<i>S.diclina</i> NJM 0246	0	D	D
	0.0025	D	D
	0.005	D	D
	0.01	C	C
	0.015	C	B
	0.03	B	A
	0.06	B	A
	0.12	B	A
	0.24	A	A
	0.48	A	A
<i>S.parasitica</i> ATCC 90213	0	D	D
	0.0025	D	D
	0.005	C	C
	0.01	C	C
	0.015	B	A
	0.03	A	A
	0.06	A	A
	0.12	A	A
	0.24	A	A
	0.48	A	A
<i>Achlya</i> sp. NJM 0323	0	D	D
	0.0025	D	D
	0.005	D	D
	0.01	C	C
	0.015	A	A
	0.03	A	A
	0.06	A	A
	0.12	A	A
	0.24	A	A
	0.48	A	A

A : 1視野中の遊走子すべてが運動性を有しない

B : 1視野中の遊走子のほとんどが運動性を有しないが、一部の遊走子が極めて微弱な運動性を有する

C : 運動性はBとDの間

D : 1視野中の遊走子の多くが活発に動いている

表4-5. アユ卵および水カビ病に及ぼすKClの影響

試験区	供試卵数 (粒)	水カビ着生率 (%)	発眼率 (%)	孵化率 (%)	奇形率 (%)
第一回					
対照区	283	29.3	67.8	NT	NT
0.03% KCl	292	10.6**	70.9	NT	NT
0.06% KCl	250	0.0**	77.6*	NT	NT
0.12% KCl	233	18.5**	65.7	NT	NT
第二回					
対照区	217	37.3	53.9	91.6	2.0
0.03% KCl	233	2.6**	60.1	99.1**	0.9
0.06% KCl	257	3.5**	59.9	91.6	2.0
0.12% KCl	196	0.5**	55.6	96.2	2.6
第三回					
対照区	251	64.5	23.9	81.4	0.0
0.03% KCl	243	59.3	41.2**	84.6	1.9
0.06% KCl	265	1.9**	66.8**	93.7*	2.6
0.12% KCl	212	0.9**	67.9**	92.2**	2.2

* 対照区と比較して $p < 0.05$ で有意差 ** 対照区と比較して $p < 0.01$ で有意差

NT, 試験せず

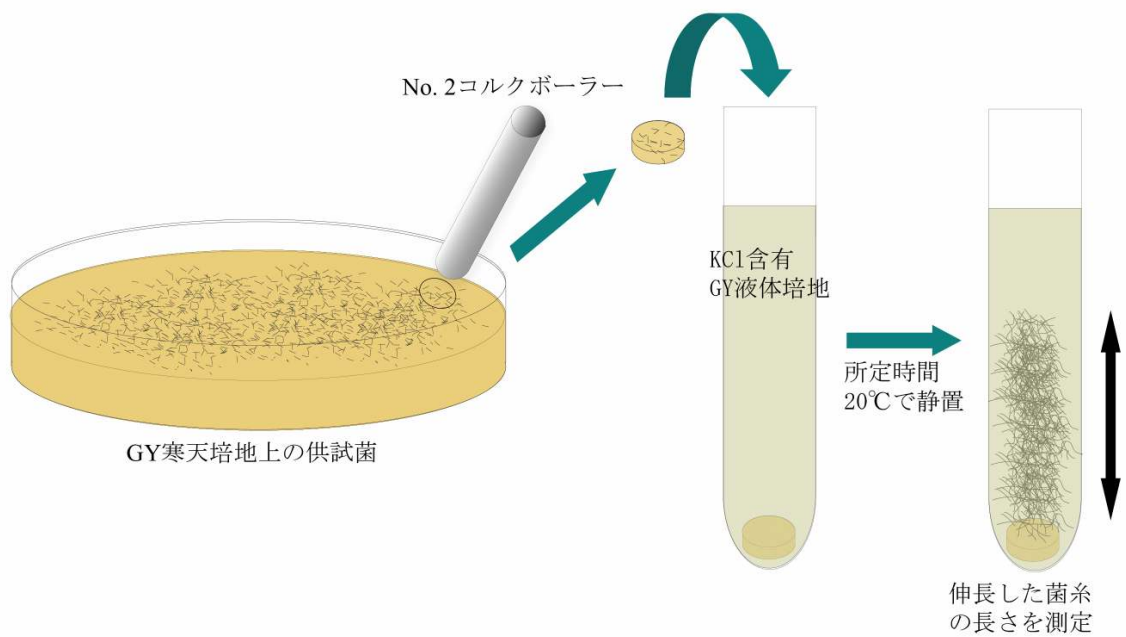


図 4-1. KCl による水カビ菌糸の生育阻止試験

GY 寒天培地上の供試菌集落の辺縁を No. 2 コルクボーラーで打ち抜いた寒天小片を、所定濃度の KCl を含有した GY 液体培地が入った試験管中に入れ、20℃で静置し、24、48 および 72 時間後に寒天小片の上端から、伸長した菌糸の最上部までの長さを測定した。

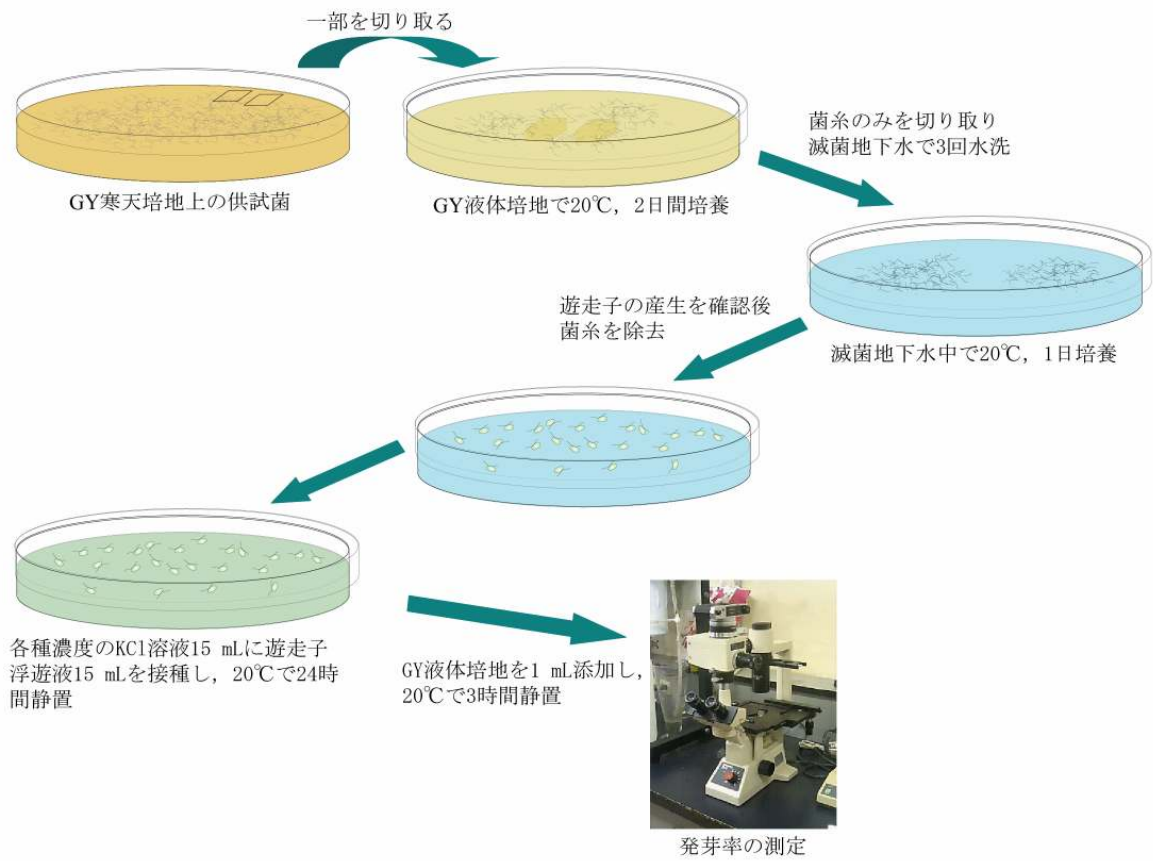


図 4-2. KCl による水カビ遊走子の発芽阻止試験

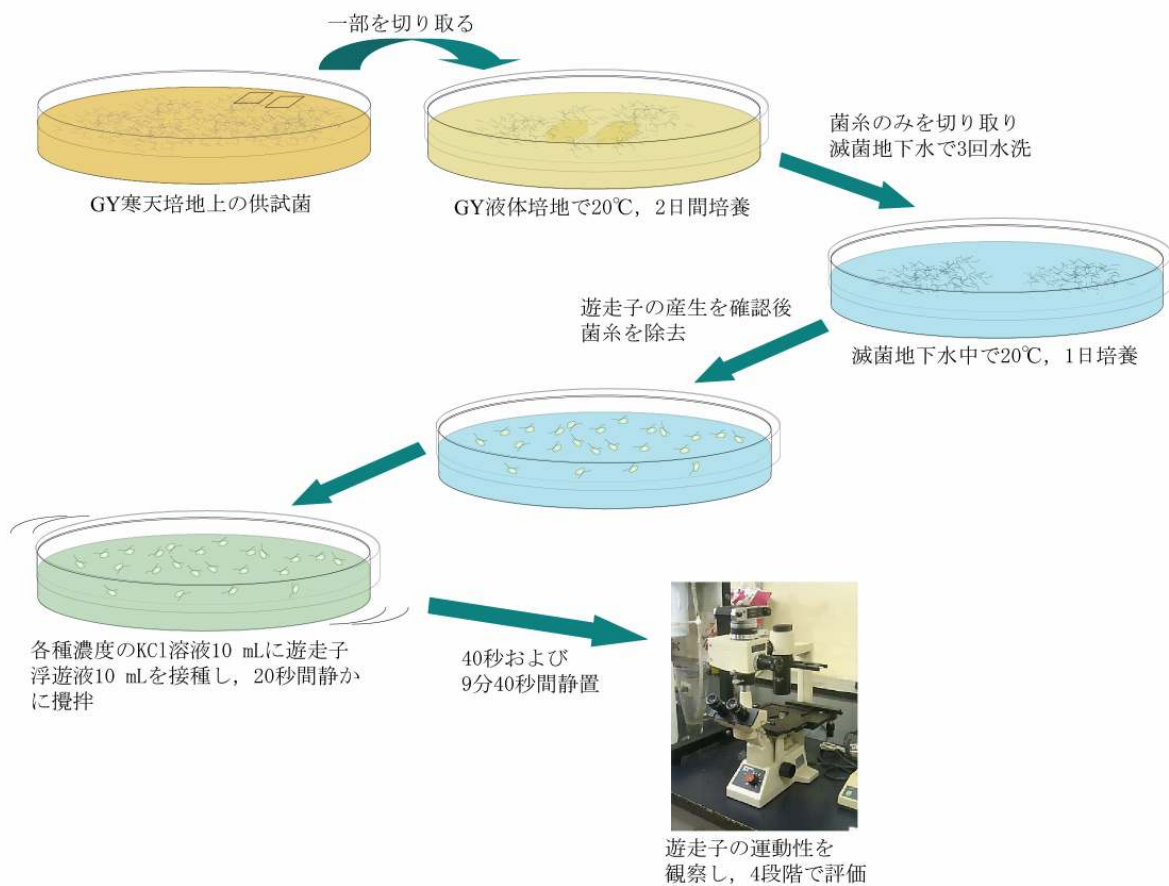


図 4-3. 水カビ遊走子の運動性に及ぼす KCl の影響

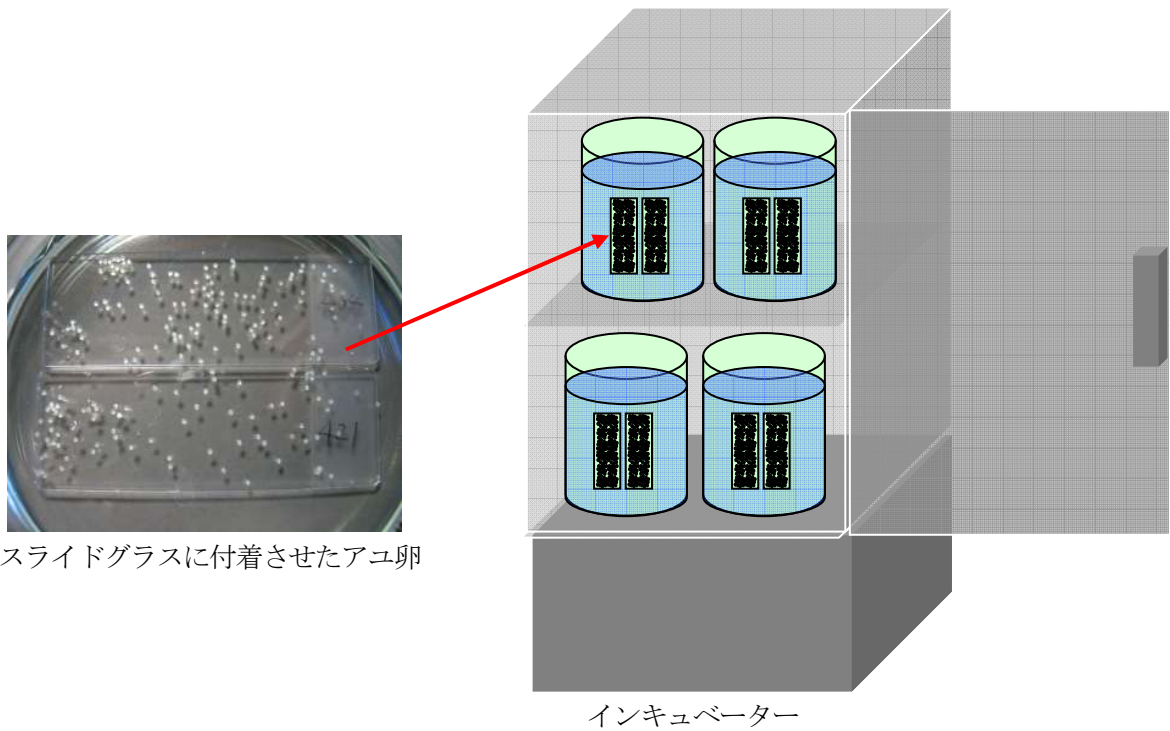


図 4-4. KCl によるアユ卵の水カビ病防除

3L 容ガラス製ビーカー中に地下水を用いて作成した所定濃度の KCl 溶液または通常の地下水 2L を用意し、この中で受精から発眼までの 7 日間止水および無通気でアユ卵を管理した。なお、卵管理用のビーカーは 18 °C に設定したインキュベーター中で管理することによって、水温を一定に保持した。

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

淡水魚卵に発生する水カビ病は、主に孵化用水中に常在する卵菌綱、ミズカビ科の真菌によって惹起される病気であり、何らかの対策を施さなければ、歩留まりは大幅に低下する。このため、本病の防除対策は淡水魚種苗生産時の重要な課題のひとつとされる。アユ卵の場合、受精から発眼期までの水カビ病防除はブロナポール (Branson, 2002) を主成分としたパイセス[®] (ノバルティスアニマルヘルス社製) または第4章で述べた塩化カリウムを用いた防除法がある。

沈性付着卵であるアユ卵は通常、付着器材に受精卵を付着させた状態で管理され、その大きさもサケ科魚類卵と比較して小さいため、サケ科魚類卵のように発眼期に死卵のみを完全に取り除く作業 (桐生, 2005) が行われることはなく、死卵は付着器材を水中で揺ることによって軽く振り落とされる程度である。このため、発眼から孵化までの期間に死卵が混在しており、場合によっては水カビ病の発生によって孵化率が大幅に低下することがあるが、その対策については十分な検討がなされていない。

通常、孵化直後のアユは海水もしくは人工海水を用いて飼育されるが、海水を取水することができない内陸部に位置する種苗生産施設では、海水よりも薄い塩分の人工海水 (以下、低濃度人工海水) を用いて飼育が行われる。低濃度の塩分中で継続的に魚類卵を管理する手法による水カビ病防除法は Kitanchaoren *et al.* (1997c) および 中居ら (2005) によって報告されている。このことから、発眼後のアユ卵を低濃度の人工海水中で管理し、安全に孵化させることができれば水カビ病を抑制しながらアユ卵を孵化させることが可能となる。

本章では、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 *in vitro* で調査するとともに、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。

5-1 材料および方法

5-1-1 低濃度人工海水によるミズカビ菌糸の発育阻止試験

供試菌は 2002 年に岐阜県淡水魚研究所でアユ卵から分離された *Saprolegnia diclina* NJM 0246 を用いた。なお、日本国内 14 箇所の水産試験場などにおいて行われた水カビ病原菌調査によれば、アユ卵から分離されたミズカビ科 80 株のうち 76 株が *Saprolegnia* 属であり、そのうち種の同定が可能であった 29 株中 26 株が *Saprolegnia diclina* であったと報告されている（大野，2008）。

試験区は人工海水区（1/7 人工海水区，2/7 人工海水区，3/7 人工海水区）および塩類を添加しない対照区の計 4 区とした（表 5-1）。低濃度人工海水は塩化ナトリウム（試薬特級，和光純薬社製），無水硫酸マグネシウム（試薬特級，和光純薬社製），塩化マグネシウム（無水物，99%）（和光純薬社製），無水塩化カルシウム（和光純薬社製），塩化カリウム（試薬特級，和光純薬社製）および炭酸水素ナトリウム（試薬特級，和光純薬社製）を用いて調製した。供試菌は GY 寒天培地（畑井・江草，1979）を用いて 3 日間，20 °C で培養したものをを用いた。10 mL のガラス試験管内に前述の人工海水濃度に調製した 5 mL の GY 液体培地を分注し，それらに培養菌集落の辺縁を No. 2 コルクボーラー（内径 5.5 mm）で打ち抜いた寒天小片を 1 個加え，20 °C に静置し，24，48 および 72 時間後に寒天小片の上端から，伸長した菌糸の最上部までの長さを測定した（図 5-1）。

5-1-2 低濃度人工海水によるミズカビ遊走子の発芽阻止試験

供試菌は前述の *S. diclina* NJM 0246 を用いた。遊走子の産生は，GY 寒天培地上に発育した集落を寒天ごと約 8 mm 角に切り取った小片 2 個を GY 液体培地に接種し，2 日間，20 °C で培養した後に，菌糸体のみを滅菌地下水に移し，20 °C で 1 日水培養を行う方法で行った。その後，定量濾紙 No. 541（ワットマン社製）を用いて菌糸体を取り除き，遊走子浮遊液中の遊走子数を改良ノイバウエル式血球計算板（萱垣医理科工業社製）を用いて算定し

た。算定後に、遊走子数を 1.0×10^5 個 /mL に調製し、供試遊走子浮遊液とした。試験区は表 5-1 に示す人工海水の 3 区（1/7 人工海水区、2/7 人工海水区、3/7 人工海水区）および塩類を添加しない対照区の計 4 区とし、終濃度が供試濃度となるよう調製した人工海水 15 mL と遊走子浮遊液 15 mL をプラスチックシャーレ内で混合し、20 °C で 24 時間静置した。その後、遊走子の発芽を促すために GY 液体培地を 1 mL 添加し（Yuasa *et al.*, 1997）、その 3 時間後に無作為に選択した 100 個の遊走子の発芽状況を倒立顕微鏡を用いて倍率 100 倍で計数し、発芽率を算出した（図 5-2）。

5-1-3 ミズカビ遊走子の運動性に及ぼす低濃度人工海水の影響

供試菌は前述の *S. diclina* NJM 0246 を用いた。遊走子の発芽阻止試験と同様の方法で遊走子浮遊液を調製し、これを供試用遊走子浮遊液とした。試験区は表 5-1 に示す人工海水の 3 区（1/7 人工海水区、2/7 人工海水区、3/7 人工海水区）および塩類を添加しない対照区の計 4 区とし、終濃度が供試濃度となるよう調製した人工海水 10 mL と遊走子浮遊液 10 mL をガラスシャーレ内で混合した後に 20 秒間静かに攪拌し、その 40 秒後および 9 分 40 秒後に遊走子を倒立顕微鏡を用いて倍率 40 倍で観察し、その運動状況を 4 段階（42 頁参照）で評価した（図 5-3）。なお、*Saprolegnia* 属に関しては、試験時には一次遊走子と二次遊走子が混在していたと考えられるが、本試験はそれらを特に区別せずに行った。また、今回供試した *S. diclina* NJM 0246 では、遊走子浮遊液作成後 3 時間後であっても通常の運動性を有する遊走子が確認されている。

5-1-4 低濃度人工海水中でアユ発眼卵を孵化まで管理した場合の安全性

供試発眼卵は成熟した人工産アユのメス 3 尾から採卵後、3 尾分のオスから搾出した精子で乾導法（井塚, 2005）によって受精させたアユ卵をスライドガラス 8 枚に 150 粒程度ずつ附着させ、発眼期までの 7 日間、水温 17.5°C の地下水をかけ流しながら管理を行った後に、死卵などの発眼が確認できない卵をすべてスライドガラスから除去したものをを用いた。

なお、受精卵は受精翌日から試験に供するまでの7日間、パイセス®（ノバルティスアニマルヘルス社製）を用いてブロナポール濃度 50 ppm で30分間の薬浴を毎日行った。

試験区は表 5-1 に示す人工海水の3区(1/7人工海水区, 2/7人工海水区, 3/7人工海水区), および塩類を添加しない対照区の計4区とし, 発眼卵を付着させたスライドグラスを各区2枚ずつ供試した。3L容のガラスビーカー中に地下水を用いて調製した所定濃度の人工海水または通常の地下水2Lを満たし, 供試発眼卵を付着させたスライドグラスを2枚ずつ収容し, 孵化まで18℃のインキュベーター中で管理した(図5-4)。孵化完了後に, 収容した発眼卵数に対する孵化尾数から孵化率を算出した。また, 孵化尾数に対する奇形(肉眼観察での形態異常)から奇形率を算出した。

5-2 結果

5-2-1 低濃度人工海水によるミズカビ菌糸の発育阻止試験

菌糸の伸長はいずれの試験区でも確認された(表 5-2)。72 時間後の寒天小片の上端から、伸長した菌糸の最上部までの長さは対照区, 1/7 人工海水区, 2/7 人工海水区, 3/7 人工海水区でそれぞれ 45.6, 44.2, 29.1, 18.0 cm であり, 2/7 以上の人工海水区で塩分濃度の上昇に伴い菌糸の伸長が抑制された。

5-2-2 低濃度人工海水によるミズカビ遊走子の発芽阻止試験

1/7 人工海水区, 2/7 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(表 5-3)。3/7 人工海水区では発芽率が 47.0%であり, 対照区の 98.0%と比較して有意に低い発芽率を示したが (Fisher の直接確率法, $p < 0.05$), 約半数の遊走子に発芽が確認された。

5-2-3 ミズカビ遊走子の運動性に及ぼす低濃度人工海水の影響

S. diclina の遊走子の運動は, 1/7 人工海水区では 1 分後に微弱となり, 10 分後も同様であった。また, 遊走子の運動性は 2/7 および 3/7 人工海水区では 1 分後に認められなくなった(表 5-4)。

5-2-4 低濃度人工海水中でアユ発眼卵を孵化まで管理した場合の安全性

孵化率は 1/7, 2/7 および 3/7 人工海水区でそれぞれ 94.6, 94.3, 94.4%であり, 対照区の 95.4%と比較して有意差はみられなかった(表 5-5)。奇形率は 1/7, 2/7 人工海水区でそれぞれ 7.0, 6.0%であり, 対照区の 6.8%と比較して有意差は認められなかったが, 3/7 人工海水区では 14.6%であり, 対照区と比較して高値を示した (Fisher の直接確率法, $p < 0.05$)。

5-3 考察

低濃度人工海水（1/7～2/7 倍希釈）中でアユの発眼卵を管理した場合、孵化率の低下と奇形率の上昇は確認されなかった。アユは系統による塩分耐性に差があることが報告されている（井口・武島, 2007）。従って、人工海水が孵化に与える影響は系統ごとに詳細に検討されるべきであるが、本研究で水カビ病に有効であると考えられる塩分濃度の人工海水中でアユを安全に孵化させることができたことは価値ある知見が得られたと言える。

今回、低濃度人工海水が水カビ病に有効であった要因を検討した結果、*S. diclina* の遊走子の運動性が 1/7 倍希釈の塩分濃度の人工海水中では浸漬開始後 1 分以内にほとんど失われ、さらに 2/7～3/7 倍希釈の塩分濃度では、1 分以内に完全に失われ、低濃度の人工海水は *S. diclina* の遊走子の運動性を抑制する効果を有することが示唆された。本章では低濃度の人工海水の水カビ病防除効果について、実際にアユ卵を用いた試験は実施していないが、遊走子の運動性を抑制することが可能であれば水カビ病の発生を防除できることはすでに KCl を用いた実験で証明している（第 4 章）。また、低濃度の塩分中での卵管理は Kitancharoen *et al.* (1997c) および 中居ら (2005) も水カビ病の防除に有効であると推察している。

なお、低濃度の人工海水は水カビ病原因菌 *S. diclina* の菌糸の伸長および遊走子の発芽をあまり抑制しなかったことから、ブロンポール (Oono *et al.*, 2007, 2008a, 2008b)、および銅ファイバー（第 2 章）と比較して直接的な水カビ病に対する効果は劣ることは明らかである。従って、本法を応用する場合にはアユの発眼卵を可能な限り低密度で管理するなどの配慮が必要であると考えられる。

アユの種苗生産では、通常アユの飼育が開始される前に、生物濾過用の硝酸化成細菌（木俣ら, 1961）の定着を目的として、濾過装置を併設した飼育池に海水の 1/5～1/7 程度の塩分濃度の人工海水を数週間から 1 ヶ月程度あらかじめ循環させておく。本章の結果を基に、この人工海水中でアユの孵化を行うことが可能となれば、水カビ病の被害軽減により孵化

率の向上が見込めるだけでなく、作業効率の向上にも繋がると考えられる。

5-4 小括

淡水魚卵に発生する水カビ病は、主に孵化用水中に常在する卵菌綱、ミズカビ科の真菌によって惹起される病気であり、何らかの対策を施さなければ、歩留まりは大幅に低下する。沈性付着卵であるアユ卵は通常、付着器材に受精卵を付着させた状態で管理され、大きさもサケ科魚類卵と比較して非常に小さいため、発眼期に死卵のみを取り除く作業（検卵作業）が行われることはない。このため、サケ科魚類卵と異なり、発眼後も水カビ病の発生によって孵化率が大幅に低下することがある。しかし、受精から発眼期までの水カビ病防除法はプロノポールによる薬浴などの対策が知られている一方、発眼期以降の水カビ病に対する検討は十分行われていない。

本章では、発眼期から孵化までのアユ卵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。

まず、低濃度人工海水（通常の海水の 1/7～3/7 倍の塩分濃度）が水カビ病原菌 *Saprolegnia 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。

菌糸への影響を、10 mL の試験管内に分注された 5 mL の 1/7～3/7 倍希釈の人工海水濃度の GY 液体培地に供試菌の菌糸が生育した寒天小片をそれぞれ 1 個ずつ投入し、塩類を含まない GY 液体培地（対照区）と伸長速度を比較する方法で調べた。その結果、2/7 倍希釈以上の人工海水区で濃度の上昇に伴う若干の菌糸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。

遊走子の発芽への影響を、水培養によって得られた供試菌の遊走子浮遊液を 1/7～3/7 倍希釈の人工海水および塩類を含まない滅菌地下水（対照区）に 24 時間浸漬した後に、その溶液中に GY 液体培地を加えることで発芽を促し、発芽率を比較する方法で調べた。その結果、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 倍希釈人工海水区では発芽率が 47.0%であり、対照区の 98.0%と比較して有意に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。

遊走子の運動性を、水培養によって得られた供試菌の遊走子浮遊液をガラスシャーレ内で各種終濃度の人工海水溶液（1/7, 2/7, 3/7 倍希釈および塩類を含まない対照区）と混合した後に20秒間静かに攪拌し、その40秒後に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 倍希釈人工海水中では1分後には微弱となり、10分後も同様であった。また、2/7, 3/7 倍希釈人工海水中では遊走子の運動は1分後に停止した。

アユの発眼卵を低濃度人工海水中に収容し、孵化させた場合の安全性を検討したところ、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。

以上の結果から、低濃度人工海水は遊走子の運動性を抑制することが明らかとなり、第4章で示した塩化カリウムと同様の水カビ病防除効果が期待できると判断され、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。

表 5-1. 各試験区の人工海水の組成

	対照区	1/7人工海水区	2/7人工海水区	3/7人工海水区
塩化ナトリウム (NaCl)	0	3.01 [*]	6.02	9.03
硫酸マグネシウム (MgSO ₄)	0	0.78	1.56	2.34
塩化マグネシウム (MgCl ₂)	0	0.60	1.20	1.80
塩化カルシウム (CaCl ₂)	0	0.18	0.36	0.54
塩化カリウム (KCl)	0	0.08	0.16	0.24
炭酸水素ナトリウム (NaHCO ₃)	0	0.03	0.06	0.09

^{*}水1Lあたりのg数

表 5-2. 人工海水濃度とミズカビ菌糸の伸長

試験区	菌糸の発育 (mm)		
	24時間後	48時間後	72時間後
対照区	12.5	29.6	45.6
1/7人工海水区	12.1	29.1	44.2
2/7人工海水区	9.2	17.2	29.1
3/7人工海水区	5.3	10.7	18.0

表 5-3. 人工海水濃度とミズカビ遊走子の発芽率

試験区	遊走子の発芽率 (%)
対照区	98.0
1/7人工海水区	98.0
2/7人工海水区	97.0
3/7人工海水区	47.0*

*対照区と比較して $p < 0.01$ で有意差

表 5-4. 低濃度人工海水がミズカビ遊走子の運動性に及ぼす影響

試験区	暴露1分後	暴露10分後
対照区	D	D
1/7人工海水区	B	B
2/7人工海水区	A	A
3/7人工海水区	A	A

A： 1視野中の遊走子すべてが運動性を有しない

B： 1視野中の遊走子のほとんどが運動性を有しないが，一部の遊走子が極めて微弱な運動性を有する

C： 運動性はBとDの間

D： 1視野中の遊走子の多くが活発に動いている

表 5-5. 低濃度人工海水中でアユを孵化させた場合の孵化率および奇形率

試験区	供試卵数 (粒)	孵化率 (%)	奇形率 (%)
対照区	154	95.4	6.8
1/7人工海水区	166	94.6	7.0
2/7人工海水区	159	94.3	6.0
3/7人工海水区	160	94.4	14.6 *

*対照区と比較して $p < 0.05$ で有意差

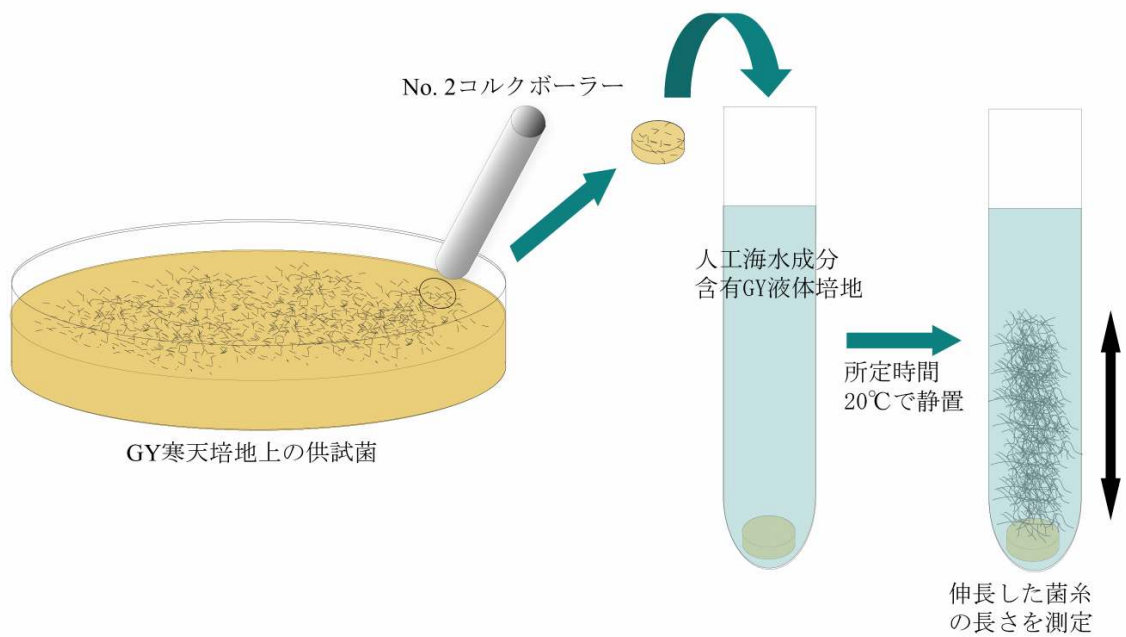


図 5-1. 低濃度人工海水によるミズカビ菌糸の発育阻止

GY 寒天培地上の *Saprolegnia diclina* の集落の辺縁を No. 2 コルクボーラーを用いて打ち抜いた寒天小片を，所定濃度の人工海水を含有した GY 液体培地が入った試験管中に入れ，20℃で静置し，24, 48 および 72 時間後に寒天小片の上端から，伸長した菌糸の最上部までの長さを測定した。

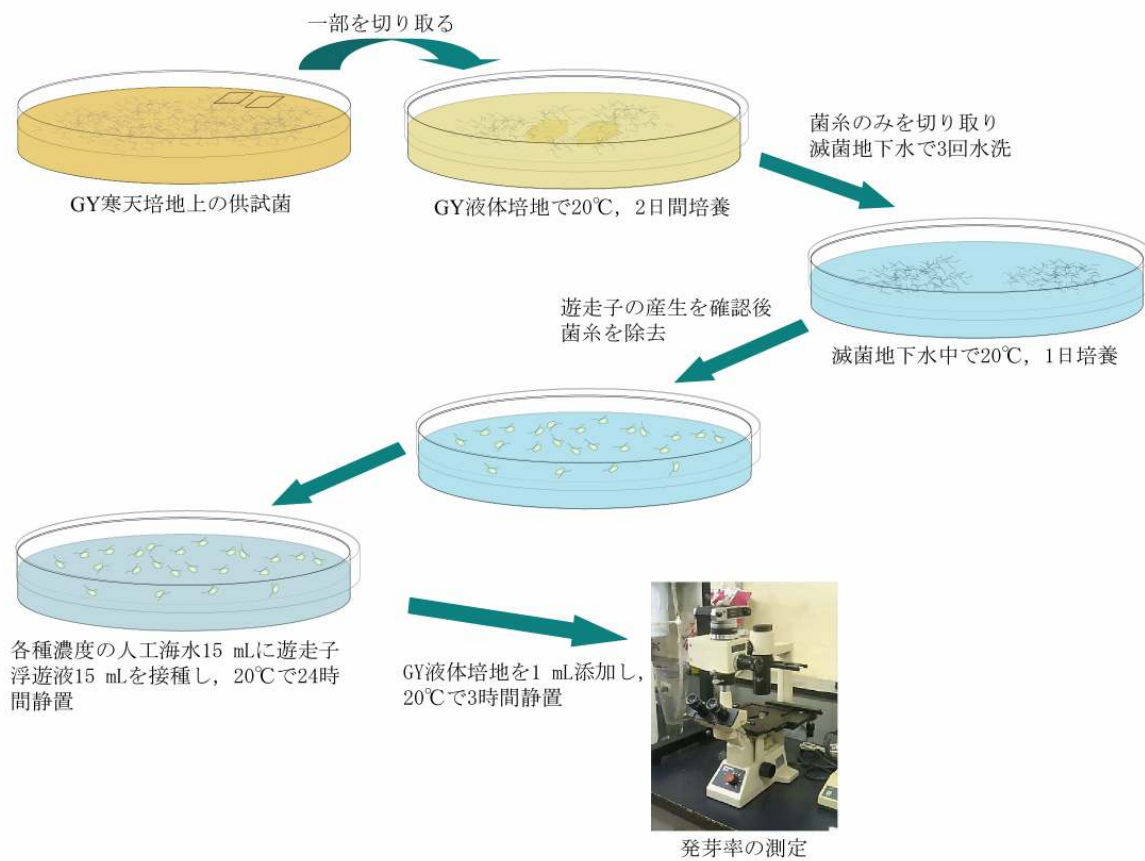


図 5-2. 低濃度人工海水によるミズカビ遊走子の発芽阻止試験

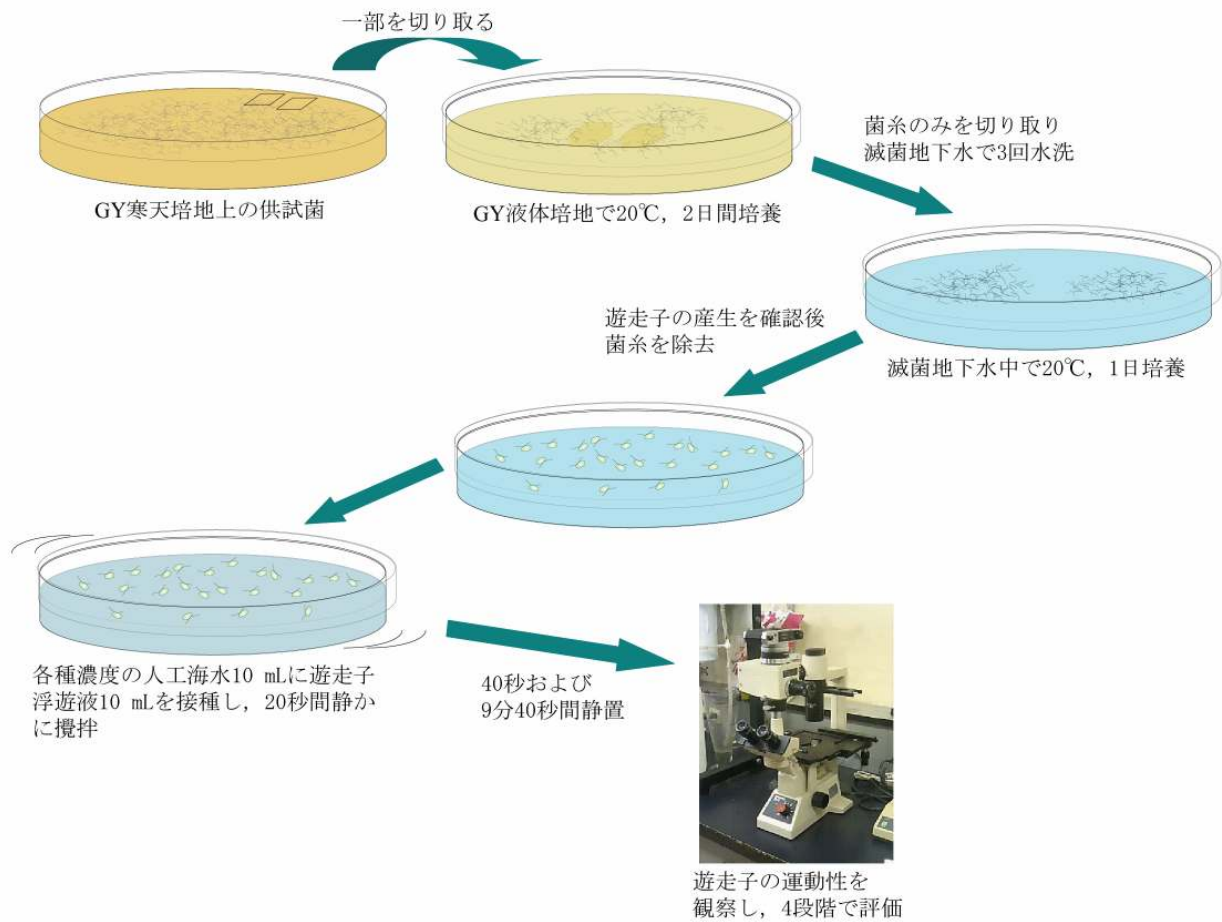
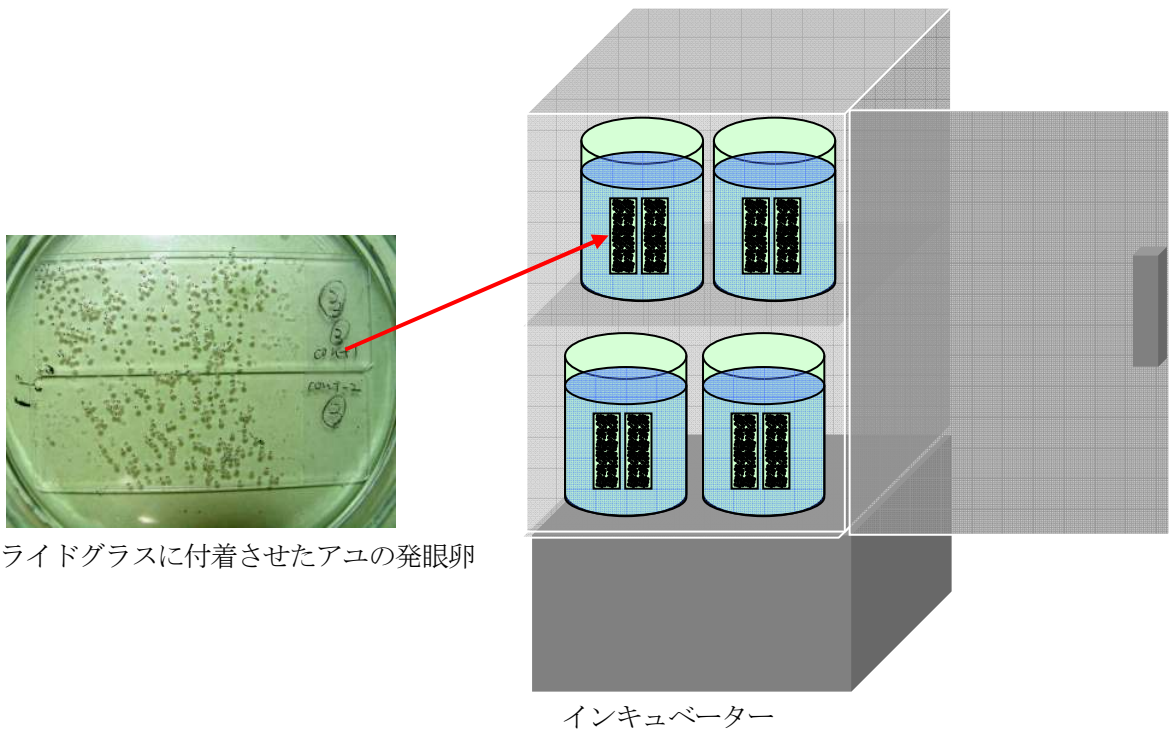


図 5-3. ミズカビ遊走子の運動性に及ぼす低濃度人工海水の影響



スライドグラスに付着させたアユの発眼卵

図 5-4. 低濃度人工海水中でアユ発眼卵を孵化まで管理した場合の安全性

3 L 容ガラスビーカー中に地下水を用いて作成した所定濃度の人工海水または通常の地下水 2 L を用意し、この中に発眼卵を収容し、孵化まで無通気で管理した。なお、ガラスビーカーは 18℃ に設定したインキュベーター中で管理することで、水温を一定に保持した。

第6章 アユ仔魚に発生した *Pythium* 属菌による内臓真菌症

アユは日本における養殖対象魚種で、全国各地で種苗生産が行われている。一般的な種苗生産方法は、アユが孵化してから3~4ヶ月程度の仔魚期に海水もしくは汽水中で飼育され、その後、成育状況に応じて淡水中での飼育に切り替えられる。山梨県水産技術センターのアユ種苗生産施設では、仔魚期には、海水の1/7程度の塩分濃度の人工海水を用いて飼育が行われている。

アユの稚魚および成魚に発生する病気として、冷水病 (Iida and Mizokami, 1996)、ビブリオ病 (室賀ら, 1974; Nagai *et al.*, 2008)、細菌性出血性腹水病 (若林ら, 1996)、真菌性肉芽腫症 (宮崎・江草, 1971; 畑井ら, 1984; Chinabut, 1998) およびイクチオホヌス症 (Miyazaki and Jo, 1985) などが報告されているが、海水飼育中の仔魚では、*Vibrio anguillarum* の関与を示唆する大量死亡の報告 (田畑ら, 1982)、*Phoma* sp.による内臓真菌症 (Hatai *et al.*, 1986) および細菌または真菌に起因する誤嚥に基づく感染症 (落合ら, 1977) などの報告があるに過ぎない。このことは、アユ仔魚に大量死が発生してもそれが自然減耗死とみなされ詳細な検討が行われてこなかったためと考えられる。しかし、初期減耗の要因を検討することは種苗生産技術を向上させる上で今後重要な課題になるものと思われる。

2007年から山梨県水産技術センターで飼育中のアユ仔魚に過去に報告がないフハイカビ科の *Pythium* 属菌の関与が疑われる内臓真菌症が毎年発生している。病魚は腹部に白濁を呈しているのが特徴で、アユ仔魚に大量死を引き起こすことから、その対策について検討することは急務である。本章では、そ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防除法について検討を行った。

6-1 材料および方法

6-1-1 発生状況および病原体の分離・培養

2006年度以降山梨県水産技術センターで飼育中のアユ仔魚に腹部の白濁を伴う死亡が毎年発生している。このため、2006年度（2007年1～2月）および2007年度（2007年11月～2008年1月）に、本病の発生状況を詳細に調査した。両年度に発生した合計4症例の瀕死魚および死亡魚の多くに腹部の白濁が確認されたことから、各症例10尾について、白濁部位の圧扁標本を作製し、光学顕微鏡を用いて観察した。また、原因菌の分離は、GY寒天培地（畑井・江草, 1979）を用いて行った。すなわち、病魚の白濁部位または魚体ごとGY寒天培地の中心部に静置し、雑菌の増殖を抑制するために少量のアンピシリンナトリウム（川崎三鷹製薬社製）と硫酸ストレプトマイシン（明治製菓社製）を接種部位周辺に少量散布した後に15°Cで培養した。2008年1月には、死亡魚がみられた飼育池1池について、数ヶ所の池底堆積物から同様の方法で菌の分離培養を行った。

2008年度にも同様の病気が発生したため、2008年12月に前述と同様の方法で病魚から原因菌の分離を試みた。さらに、病気発生池の池底の堆積物を直接鏡検するとともに、ここからの原因菌の分離を試みた。

6-1-2 分離菌の同定

2006年度に分離されたNJM 0702株、2007年度に分離されたYFTM 0701株および2008年度に分離されたYFTM 0804株の形態観察を行った。形態観察は、改変CM寒天培地（市販のスイートコーン200gと煮干0.5gを乳鉢で磨り潰し、200mLの蒸留水と混合の後に煮沸し、さらにそれを布で濾したものを蒸留水で1,000mLにメスアップし、これに寒天を1.5%加えた培地）で15°Cで7日間前培養した後に、芝の葉片培養（Martin, 1992）を用いて15～20°Cで5～14日間培養を行い観察した。菌の形態は正立型もしくは倒立型の光学顕微鏡下で観察し、van der plaats-Niterink（1981）によって報告されている既知の種の形態

学的特徴と比較した。

また、2006年度に病魚から分離した NJM 0702 株、2007年度に病魚から分離した YFTM 0701, YFTM 0702, YFTM 0703 株および飼育池底堆積物から分離した YFTM 0704 株、2008年度に病魚から分離した YFTM 0803 株および飼育池底堆積物から分離した YFTM 0804 株の計 7 株について、rRNA 遺伝子の internal transcribed spacer 領域（以下、ITS 領域）である ITS1, ITS2 およびその間のサブユニット領域である 5.8rRNA 遺伝子の塩基配列解析を行った。各分離菌株から Puregene Yeast and Gram-Positive Bacteria Kit（Gentra System 社製）を用いて核酸を抽出し、ITS5 および ITS4（White *et al.*, 1990）をプライマー（ITS5 : GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG, ITS4 : TCCTCCGCTTATTGATATGC）として用いて Perkin Elmer 9700 thermal cycler（Perkin Elmer 社製）で DNA を増幅した。PCR の反応条件は、95 °C で 5 分間加熱した後、95 °C で 30 秒、55 °C で 30 秒、72°C で 1 分の行程を 35 回繰り返す、最後に 72 °C で 7 分保温した。増幅した PCR 産物について、QIAquick PCR purification Kit（QIAGEN 社製）を用いて精製し、ITS1, ITS2, ITS3, ITS4（White *et al.*, 1990）をプライマー（ITS1 : TCCGTAGGTGAACCTGCGG, ITS2 : GCTGCGTTCTTCATCGATGC, ITS3 : GCATCGATGAAGAACGCAGC）としてシーケンサー（301 DNA sequencer, Perkin Elmer 社製）を用いて塩基配列解析を行った。

6-1-3 病理組織検査

2007 年度に採材した腹部の白濁を呈する 5 尾の瀕死魚を、10%中性緩衝ホルマリン水（Mildform[®]10N, 和光純薬社製）で固定し、常法に従って 4 μm のパラフィン切片とし、HE 染色およびグロコット HE 染色を施した後に病理組織検査に供した。

6-1-4 感染実験

供試 YFTM 0701 株を改変 CM 液体培地を用いて 15 °C で 1 ヶ月間培養した後、芝の葉片培養によって遊走子を産生させ、これを感染源として使用した（図 6-1）。なお、芝の葉片

培養では、オートクレーブで滅菌した芝の葉片と YFTM 0701 株の菌糸体をガラスシャーレ中の滅菌アユ飼育水に投入し、15℃で24時間培養した後に、芝および菌糸体を滅菌ガーゼを用いて取り除いたものを供試用遊走子浮遊液とした。遊走子数は改良ノイバウエル式血球計算板（萱垣医理科工業社製）で算定した結果、 6.9×10^4 個/mLであった。

供試魚は山梨県水産技術センターで飼育中の健康なアユ仔魚（平均体重 0.092 g）を用いた。3 L 容のガラスビーカー中に 2 L の人工海水（表 6-1）を入れ、2 個のビーカーにアユ仔魚 25 尾を収容した。アユ仔魚は取り扱いに弱く、収容作業に伴う死亡が発生するため、収容した 25 尾のうち、約 1 日間の馴致後に各ビーカーで死亡したそれぞれ 2 尾、3 尾を取り除いた生残魚計 45 尾を供試魚とした。なお、試験期間中はビーカー周囲に水温約 16℃の地下水をかけ流すことで、水温を一定に保つとともに、通気を行うことで供試魚に酸素を補給した。また、実験期間中は無給餌とした。

感染試験は感染区と対照区とを各々 1 区ずつ設け、感染区のビーカーには前述の遊走子浮遊液を 30 mL 加え、対照区には滅菌した人工海水を 30 mL 加えた。遊走子接種後は 7 日間毎日死亡状況を観察し、供試魚が死亡した場合には腹部の白濁などの症状の有無を確認した。症状が確認されなかった場合には圧扁標本を作製し、光学顕微鏡下で菌糸の有無を確認し、菌糸が確認されなかった場合は死因不明とした。また、症状が確認された場合には魚体の白濁部位の一部を切り取り圧扁標本を作製し、菌糸の確認を行うとともに接種菌の再分離を試みた。残りの部位は 10%リン酸緩衝ホルマリン水（Mildform[®]10N, 和光純薬社製）で固定し、病理組織検査に供した。なお、病理組織標本の作製および観察は前述の方法に準じた。試験終了後には、生残魚すべてについて、圧扁標本を作製し光学顕微鏡下で菌糸の有無を確認した。

6-1-5 水温および人工海水の塩分濃度調整による防除

分離菌の発育適温試験と塩分耐性試験は YFTM 0701 株を用いて以下のように実施した。発育適温試験は、前培養菌集落の辺縁を No. 2 コルクボーラー（内径 5.5 mm）で打ち抜い

た寒天小片を7枚のGY寒天培地の中心部に1個ずつ静置し、それぞれ5, 10, 15, 20, 25, 30 および36.5 °Cで培養した。集落の直径は培養開始5日後に測定し、菌糸の発育径は集落の直径からコルクボーラーの内径を差し引き2で割った値とした。

塩分耐性試験は、0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 および4.0% (w/v) NaCl加GY寒天培地上に寒天小片を静置し、25 °Cで5日間培養し、培養終了後の菌糸の発育径を前述と同様の方法で算出した。また、塩分耐性試験は液体培地についても同様の試験を行った。すなわち、0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 および4.0% (w/v) NaCl加GY液体培地を、滅菌プラスチックシャーレ(直径90 mm×深さ20 mm)に30 mLずつ分注し、それぞれに寒天小片を1個ずつ接種し、25 °Cで5日間培養した。発育した菌糸体は培養終了後に蒸留水で軽く水洗した後に、寒天小片ごと50 °Cで約12時間乾燥し、乾燥重量を求めた。

飼育水の塩分濃度を調整することで発病を防除できるか否かを検討するために、飼育水の塩分濃度高めることに伴うアユ仔魚への影響を試験した。供試魚は山梨県水産技術センターで飼育中の健康なアユ仔魚(平均体重0.089 g)を用いた。供試魚は表6-1に示した人工海水を3 L容のガラスビーカー中に2 L入れた後にアユ仔魚25尾を収容し、約1日間の馴致後に死亡した魚を取り除いた生残魚とした。なお、水温を一定に保つなどの飼育環境は前述と同様に設定した。

試験区は表6-1に示す塩分約0.5%の人工海水の組成を基準として0.5%区(対照区)、1.0%区、2.0%区、3.0%区 および4.0%区を設けた。試験は2回行い、第1回目の試験では、アユを収容している2 Lの飼育水に1 Lの塩類溶液(混合後に飼育水が目的の濃度となるように塩類がすでに溶解してあるもの)を速やかに混合し、その後7日間死亡尾数を計数した。

第2回目の試験では、目的の濃度とするまでに1日かけ2段階で濃度を上昇させた。すなわち、試験開始日には塩分が目的濃度の半分となるように、飼育水に500 mLの塩類溶液を混合し(対照区のみ濃度は一定であるため塩類溶液を添加後も濃度は変わらないようにした)、その翌日にさらに500 mLの塩類溶液を飼育水に混合することで最終的な目的の

濃度とした。その後の7日間死亡尾数を計数した。

6-2 結果

6-2-1 発生状況および病原体の分離・培養

山梨県水産技術センターでは、アユ仔魚の飼育には表 6-1 に示した人工海水が用いられていた。また、飼育池は飼育開始前に次亜塩素酸ナトリウムによって消毒され、その後に仔魚が収容された。なお、飼育アユ仔魚はすべて山梨県水産技術センターで継代飼育されている親魚から生まれた個体である。

2006 および 2007 年度の病気発生は、2006 年度が 2007 年 1～2 月に、2007 年度が 2007 年 11 月～2008 年 1 月に認められた（表 6-2）。病気発生時の仔魚の日齢は 2006 年度が 64～85 日（魚体重：43～214 mg）で、2007 年度が 51～79 日（14～82 mg）であった。また、2006 年度の水温は 12～15℃で、病気発生池 2 面の累積死亡率はそれぞれ 19, 33%であり、これらのうち日間死亡率は最大で 9.3%に達した。一方、2007 年度の水温は 15℃で、病気発生池の 2 面の累積死亡率はともに 22%であり、これらのうち日間死亡率は最大で 3.5%に達した。なお、2006 および 2007 年度のすべての発生例において、多くの死亡魚に腹部の白濁（図 6-2）が確認された。

白濁部位を鏡検した結果、すべての個体に約 5 μm の無隔壁の菌糸が繁殖しているのが観察された（図 6-3）。GY 寒天培地を用いて菌の分離を試みた結果、すべての病魚から集落が白色を呈する菌が純培養的に分離された（図 6-4）。また、同様の菌は病気発生池底の堆積物から、2007 と 2008 年度ともに、すべての試料から分離された。2008 年 12 月に行った池底の堆積物の直接鏡検では卵胞子が多数観察された（図 6-5）。

なお、GY 液体培地で培養された菌の菌糸径は病魚腹部の直接鏡検時に観察されたものと同様で、無隔壁であった（図 6-6）。

6-2-2 分離菌の同定

分離菌の形態観察の結果を表 6-3 に示す。NJM 0702 株, YFTM 0701 株および YFTM 0804

株の主要な菌糸の径はいずれも 6 μm 未満であった。どの株も遊走子のうは糸状で菌糸の形状と類似していた (図 6-7)。また、造卵器は球形、平滑で、直径はそれぞれ 22.0~31.0 μm (平均 27.3 μm)、19.0~35.0 μm (平均 26.8 μm) および 21.0~28.0 μm (平均 24.3 μm) あった (図 6-8)。どの株も造卵器には複数の造精器が複雑に絡みつくように付着しており (図 6-8)、付着形態はディクリナス型またはモノクリナス型であった。卵胞子は非充満性であり (図 6-8)、直径はそれぞれ 18.0~27.0 μm (平均 22.4 μm)、18.0~27.0 μm (平均 22.4 μm) および 17.3~23.0 μm (平均 19.5 μm) で、卵胞子の壁の厚さはそれぞれ 1.0~2.0 μm (平均 1.5 μm)、0.5~2.0 μm (平均 1.2 μm) および 1.0~1.5 μm (平均 1.1 μm) であった。前述の形態学的特長は van der plaats-Niterink (1981) によって報告されている *P. flevoense* の形態的特徴と極めて類似していた。

塩基配列解析の結果、試験に供した 7 株の ITS 領域の全長は 774 bp ですべて同一の塩基配列を示した。また、この塩基配列は *Pythium flevoense* CBS 234.72 (Lévesque and de Cock, 2004) の ITS 領域の配列と 100%一致した。

6-2-3 病理組織検査

病魚の病理組織検査の結果、鰓、腎臓、腸管、膀胱、脾臓、腹腔、筋肉および脊索など広範囲にわたり無隔壁の菌糸が観察された。特に鰓後端部での感染が重篤であり、菌糸は鰓を貫通、崩壊させるとともに、腎臓、腸管、筋肉および脊索へと伸長していた (図 6-9 および 6-10)。鰓後端部に近接していない組織、すなわち膀胱および脾臓などでは、菌糸は確認されるものの鰓後端部周辺の組織と比較してその量は少なかった。なお、菌糸の繁殖部位では炎症性細胞の浸潤はほとんど認められず、わずかに類円形細胞が観察される程度であった。

6-2-4 感染実験

感染区での死亡尾数は供試魚 23 尾のうち、2 尾であった。そのうち 1 尾 (接種 6 日後に

死亡)は外観症状が認められず、圧扁標本からも菌糸を確認することができなかつたため死因は不明とした。残りの1尾(接種5日後に死亡)は腹部から尾柄にかけて自然発病魚と同様の白濁が確認されたため(図6-11)、尾柄部のみ圧扁標本を作製し、光学顕微鏡で観察したところ、径約5 μm の無隔壁の菌糸が多数観察された。また、尾柄部から原因菌の分離を試みた結果、接種菌が再分離された。圧扁標本および接種菌の分離に供した尾柄部を除いた残りの部位の病理組織検査を行ったところ、総排泄孔、腸管、腎臓、筋肉、脊索および腹腔など広範囲にわたり無隔壁の菌糸が確認された(図6-12, 6-13)。また、鰻では菌糸は観察されず、総排泄孔での菌糸の繁殖が顕著であったことが自然発病魚と異なつた。自然発病魚同様菌糸の繁殖部位では炎症性細胞の浸潤はほとんど認められなかつた。対照区の死亡尾数は供試尾数22尾中1尾(接種4日後に死亡)であつたが、外観症状はなく、圧扁標本からも菌糸は確認されず死因は不明であつた。なお、試験終了後、両区の生残魚すべての圧扁標本を鏡検したが、菌糸は確認されなかつた。

6-2-5 水温および人工海水の塩分濃度調整による防除

供試菌の発育は5~30 $^{\circ}\text{C}$ で認められ、36.5 $^{\circ}\text{C}$ では認められなかつた。また、25 $^{\circ}\text{C}$ で最も良好な発育を示し、培養開始5日後の発育径は30 mm以上であつた(図6-14)。

NaCl耐性試験では、供試菌は0.5%で最良な発育を示し、次いで0%が良好であり、ともに培養開始5日後の発育径は30 mm以上に達した(図6-15)。また、1.0%以上のNaCl濃度では、濃度が増加するのに伴って発育は抑制され、2.0%では15.0 mmであり、さらに、4.0%では完全に発育が抑制された。

続いて、液体培地での試験の結果、4.0%のNaCl濃度では、肉眼的に菌糸の発育が全く確認されなかつたため、4.0%の乾燥重量の値が0となるように各濃度の値を補正し、菌糸の発育量を算出した。液体培地中で最も良好な発育を示した濃度は0%であり、次いで0.5%での発育が良好であつた(図6-16)。また、1.0%以上の濃度では、寒天培地上で行つた試験よりもNaCl濃度の影響を受けやすく、2.0%以上の濃度では、乾燥重量は0に近い値と

なった。

飼育水の塩分上昇がアユ仔魚へ及ぼす影響を検討した結果、急激に濃度を上昇させた第1回目の試験では、試験終了時の生残率が対照区、1.0、2.0、3.0および4.0%区でそれぞれ91.3、95.5、90.5、50.5および12.5%であり、3.0%以上の試験区では対照区と比較して生残率が有意に低かった（Fisherの直接確率法、 $p < 0.01$ ）（図6-17）。その他の試験区では対照区との有意差は確認されなかった。なお、3.0%以上の試験区では塩類投入翌日の死亡が特に多く、その生残率は3.0、4.0%区でそれぞれ59.1、20.8%であった。

2段階で濃度を上昇させた第2回目の試験では、試験終了時の生残率が対照区、1.0、2.0、3.0および4.0%区でそれぞれ95.2、90.9、92.0、96.0および45.5%であり、4.0%区のみ対照区と比較して有意に低かったが（ $p < 0.01$ ）、その他の試験区では、対照区と比較して、有意な差は認められなかった（図6-18）。第2回目の試験では、第1回目の試験と比較して3.0、4.0%区における塩類投入完了後翌日の死亡が大幅に減少し、試験終了時の生残率が向上した。

6-3 考察

死亡魚の多くは内臓が白濁しており、白濁部位からはすべて同種の菌が分離された。また、病魚患部の圧扁標本を観察した結果、分離菌の菌糸と同一形状を有する菌糸が観察された。さらに、分離菌の遊走子を用いた感染実験で、供試魚 23 尾のうち 1 尾で内臓の白濁を伴う接種菌に起因する感染が確認されたことから、本病は後述する分離菌によって引き起こされた新たなアユの感染症であることが判明した。

分離菌の形態的特徴（菌糸径、遊走子の産生様式、有性生殖器官）は van der plaats-Niterink (1981) が示した *Pythium flevoense* の特徴と極めて類似していた。また、分離菌の ITS 領域の塩基配列解析では、5.8S rDNA 領域を含む ITS 領域 1 および 2 の全長は 774 bp であり、その塩基配列は *P. flevoense* CBS 234.72 (Lévesque and de Cock, 2004) のそれと 100%一致した。Sugita *et al.* (1999) は *Trichosporon* 属を用いて rRNA 遺伝子の ITS 領域の塩基配列類似性を絶対的同定基準である染色体 DNA-DNA 交雑実験に基づく DNA 相同値と比較した結果、塩基配列の類似性が約 99%以上であれば同一種以内の変種以上の関係であることを示し、種レベルの真菌の同定は ITS 領域の塩基配列解析で可能であるとしている。以上の結果から、分離菌は *P. flevoense* であると考えられた。

Pythium 属菌は卵菌綱、フハイカビ目、フハイカビ科に属し、植物の根、茎などに腐敗を引き起こす根腐れ病、立ち枯れ病などの原因菌として、植物病学の中では極めて重要な種を含む属であると位置づけられており (van der plaats-Niterink, 1981; Jarvis, 1992)、植物への感染性が認められている *Pythium* 属種、ならびに、それに関する研究も非常に多く、わが国においても、本属菌による病気の被害が報告されている (Tojo *et al.*, 1998; Tojo *et al.*, 2005; Tojo *et al.*, 2007)。また、*P. porphyrae* はノリの赤腐れ病の原因菌としてノリ養殖で問題となっている (Kawamura *et al.*, 2005)。一方、*Pythium* 属菌のうち動物に対する病原性が認められている種は人を含む哺乳類への感染種である *Pythium insidiosum* が知られている (Mendoza *et al.*, 1993)、植物感染種に関する報告と比較してその報告数は極端に少ない。

また、水生動物では病原体としての *Pythium* 属菌の報告ほとんどなく、ホッコクアカエビなどの *Lagenidium* 症 (Hatai and Lawhavit, 1988) (現在, 原因菌 *Lagenidium myophilum* は分子系統解析により *Pythium* 属に移された) や魚卵からの *Pythium* 属菌の分離事例があるものの (Czeczuga, 1996; Kitanchaen *et al.*, 1997c), 今回の症例のように *Pythium* 属菌が魚体内に感染し, 大量死を引き起こした報告はない。

なお, 今回の病気の原因菌である *P. flevoense* は van der plaats-Niterink (1972) によってオランダのフレボラント州の干拓地から分離された種である。その後, 本種はオーストラリアで稲の根 (Cother and Gilbert, 1993), リトアニアで観賞用植物の鉢植えの根圏土壌 (Stankevičiene and Lugauskas, 2003) から分離されているが, 植物に対して重篤な被害を及ぼす種としての報告はない。その他, アメリカのカリフォルニア州において, 蚊の一種である *Ochlerotatus sierrensis* の幼生への感染事例が知られている (Saunders *et al.*, 1988)。本種の魚類への感染事例はない。今回本種がアユに病気を引き起こした経緯は不明であるが, *Pythium* 属菌は土壌中に存在する場合もあることから, 山梨県水産技術センターの土壌中に本種が存在している可能性も考慮した上で, 今後, 本種の存在箇所を明らかにする必要がある。

アユ仔魚の内臓真菌症についての報告はいくつかあるが, 落合ら (1977) は, 原因菌の誤嚥による鰾内感染が発病に至る要因であると推察している。この研究中では, 病魚からの真菌分離は行われておらず, 原因菌が何であったかは明らかになっていないが, 病理組織標本中に観察された菌糸が隔壁を有していたことから, 今回の症例の原因菌とは異なることは明らかである。また, Hatai *et al.* (1986) は *Phoma* sp.によるアユ仔魚の内臓真菌症 (ホーマ症) について報告しているが, 落合ら (1977) の報告と同様に誤嚥による鰾内感染が基となり, 腎臓を中心とした他の組織に感染が拡大すると報告している。山梨県水産技術センターで発生した内臓真菌症の自然発病魚に共通して鰾への原因菌の重篤な感染が確認され, 周辺組織への菌糸の伸長が特徴的な病変であったことから, ホーマ症と同様の感染機序, すなわち, アユの鰾内に誤嚥によって *P. flevoense* が取り込まれることで感染が

成立し、鰓周辺組織である腎臓および腸管などが崩壊することで、アユ仔魚が死亡したことが容易に推察できる。但し、実験感染魚では鰓に菌糸は確認されず、総排泄孔の崩壊および菌糸の繁殖が著しかったことから、総排泄孔からの感染も起こり得ることが示唆されたが、感染が成立した個体が23尾中1尾のみであったことから、このことについては引き続き検討が必要である。

本病の防除法に関しては、他魚種を含めても内臓真菌症に有効な水産用医薬品はなく、将来的にみても薬剤を用いた有効な治療法が見出される可能性は低い。また、飼育池への侵入経路が不明であるため、感染経路の遮断によって発生を未然に防ぐことも現段階では難しい課題である。但し、飼育環境の改善による、被害軽減の可能性については検討の余地がある。今回の調査によって、飼育池底の残餌、糞などを含んだ堆積物中に本菌の卵胞子が多数観察され、実際に本病の原因菌も分離されたことから、池底の堆積物が感染源のひとつである可能性が考えられる。従って、池掃除の徹底および池掃除時に堆積物を巻き上げないような注意をすることは重要な対策となり得るであろう。また、分離菌の発育至適温度を調査した結果、5～30℃まで発育が確認されたことから、水温の制御による病気の発生防除は難しいと判断された。しかし、NaCl濃度の影響について調査した結果では、濃度の上昇に伴い菌糸の発育が抑制される傾向がみられた。特に2% NaCl以上の濃度の液体培地中では発育がほとんど確認されなかった。塩分濃度が*Pythium*属菌による病気の発生に重要な影響を与えることは、*P. porphyrae*を原因とするノリの赤腐れ病の研究で指摘されているが(Kawamura *et al.*, 2005)、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日後の死亡率に影響が出なかったという本章の結果からも、塩分濃度の調整による本病の防除法については引き続き検討する価値はある。

本病は過去に報告がない新たな病気であるとともに、山梨県水産技術センターで3年間連続して発生し、累積死亡率も2～3割と決して低くないことから、引き続き注意を要する病気である。アユ仔魚の減耗要因は生産方法が確立された現在であっても、未だ不明な部

分も多い。本研究のように減耗要因を解明していくことはアユ種苗を計画的に生産していく上で重要な課題である。

6-4 小括

2006年度から山梨県水産技術センターで飼育中のアユ *Plecoglossus altivelis* 仔魚にフハイカビ科の *Pythium* 属菌に起因する病気が毎年発生している。本章ではそ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、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。

2006 および 2007 年度に、本病の発生状況を詳細に調査した。病気発生時の水温は 12～15℃、仔魚の日齢は 51～85 日、魚体重は 14～214 mg であり、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。累積死亡率は 19～33% で、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。白濁部位の鏡検を行ったところ、菌糸径約 5 μm 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。分離された菌は、病魚の白濁部位の直接鏡検時に観察されたものと同様の菌糸径を有し、無隔壁であった。2008 年度にも同様の病気が発生したため、2008 年 12 月に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たことから、池底の堆積物が感染源のひとつであ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 株の形態観察を行った結果、形態は *P. 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、ITS 領域の塩基配列は 7 株すべて同一であり、*Pythium 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* と同定された。

病魚の病理組織学的検査を行った結果、鰾、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、特に鰾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鰾内感染が発病の要因であると推察された。

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。試験区は

感染区と対照区をそれぞれ1区ずつ設けた。実験感染の結果、感染区で供試魚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た。白濁部位を鏡検したところ、菌糸径約5 μm の無隔壁の菌糸が多数観察された。また、この部位から接種菌が再分離された。死亡魚の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、鰾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。

水温および人工海水の塩分濃度調製による防除法を検討するために分離菌の発育至適温度と塩分耐性について試験を行った。供試菌は YFTM 0701 株を用いた。供試菌の発育は5~30 $^{\circ}\text{C}$ で認められたが、36.5 $^{\circ}\text{C}$ では認められなかった。また、25 $^{\circ}\text{C}$ 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%で最良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。

以上の結果から、本病は *P. flevoense* によって引き起こされたアユの新しい病気であることが明らかとなり、防除法としては本病の感染源のひとつであると推察される飼育池底堆積物の除去および飼育水の塩分濃度の調製などが有効な対策となり得ると考えられた。

表 6-1. アユ仔魚飼育用人工海水の組成

塩類等	重量(g)
NaCl	3,010*
MgSO ₄	780
MgCl ₂	600
KCl	80
CaCl ₂	180
NaHCO ₃	30

*水 1,000 L あたりの g 数

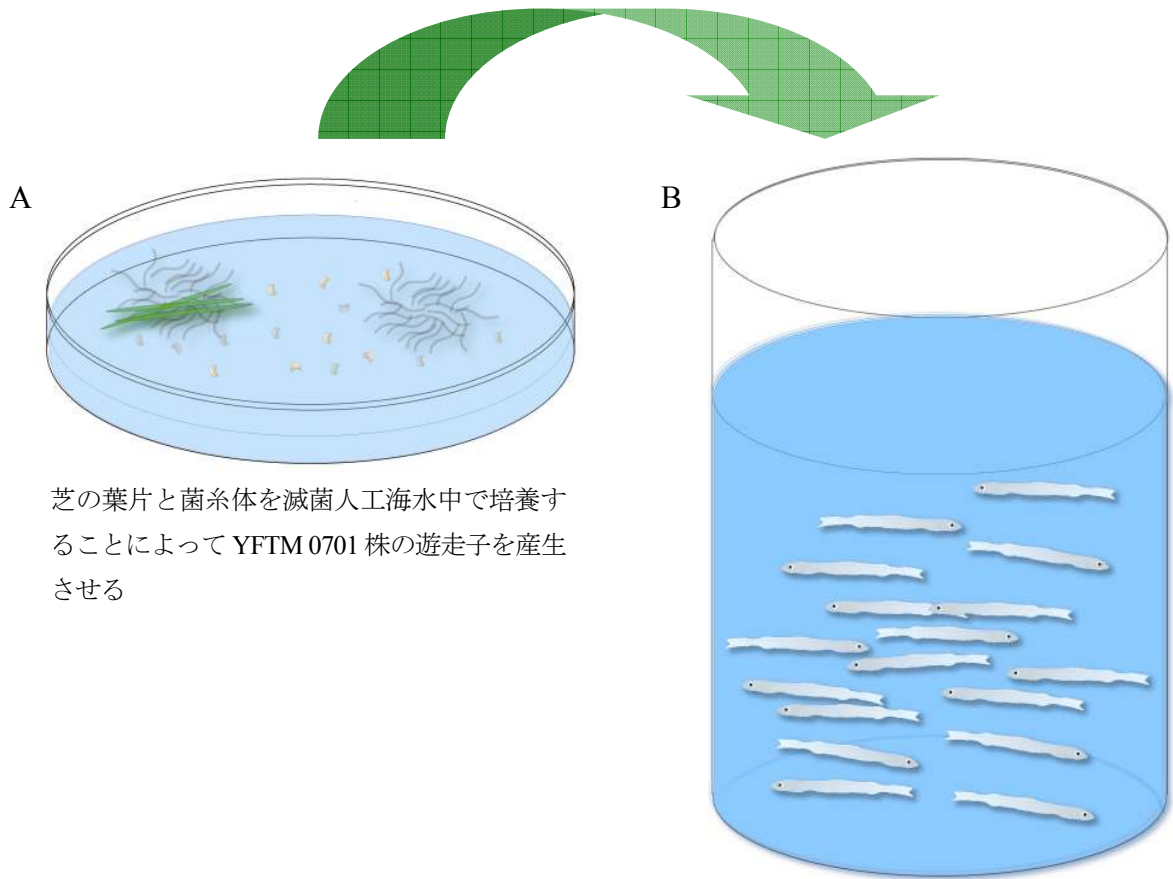
表 6-2. 2006年度および2007年度の本病の発生状況

年度	池番号	疾病発生期間 (孵化後日数)	水温 (°C)	魚体重 (mg)	累積死亡率 (%)	最大日間死亡率 (%)
2006	B-23	2007年1-2月 (66-85日)	12-15	57-214	19	2.5
	D-33	2007年1-2月 (64-85日)	15	43-161	33	9.3
2007	D-37	2007年11-12月 (51-68日)	15	20-59	22	3.5
	D-31	2007年12-1月 (52-79日)	15	14-82	22	3.1

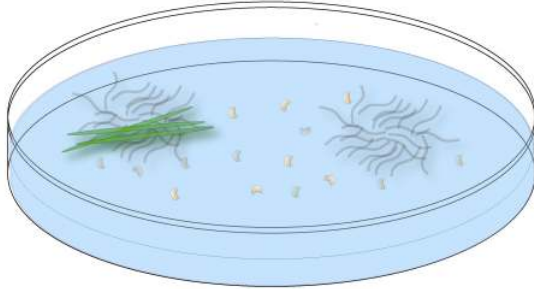
表6-3. 分離菌の形態的特徴

菌の形状	NJM 0702株	YFTM 0701株	YFTM 0804株	<i>Pythium flevoense</i> van der plaats-Niterink (1972)
菌糸の径 (μm)	< 6.0	< 6.0	< 6.0	< 6.0
遊走子のう	糸状	糸状	糸状	糸状
造卵器の形態	球形, 平滑	球形, 平滑	球形, 平滑	球形, 平滑
造卵器の径 (μm)	22.0-31.0 (平均 27.3)	19.0-35.0 (平均 26.8)	21.0-28.0 (平均 24.3)	17.0-20.0 (30.0) (平均 19.0)
造精器	ダイククリナス型およびモノクリナス型 1個の造卵器につき複数付着	ダイククリナス型およびモノクリナス型 1個の造卵器につき複数付着	ダイククリナス型およびモノクリナス型 1個の造卵器につき複数付着	ダイククリナス型 1個の造卵器につき複数付着
卵胞子	非充満性	非充満性	非充満性	非充満性 (場合によっては, ほば充満性)
卵胞子の径 (μm)	18.0-27.0 (平均 22.4)	18.0-27.0 (平均 22.4)	17.3-23.0 (平均 19.5)	(14) 16-18 (24) (平均 17.7)
卵胞子の壁の厚さ (μm)	1.0-2.0 (平均 1.5)	0.5-2.0 (平均 1.2)	1.0-1.5 (平均 1.1)	2-4

滅菌ガーゼで芝の葉片および菌糸体を取り除いた後に、遊走子浮遊液をアユ仔魚飼育水へ投入



A



芝の葉片と菌糸体を滅菌人工海水中で培養することによって YFTM 0701 株の遊走子を発生させる

B

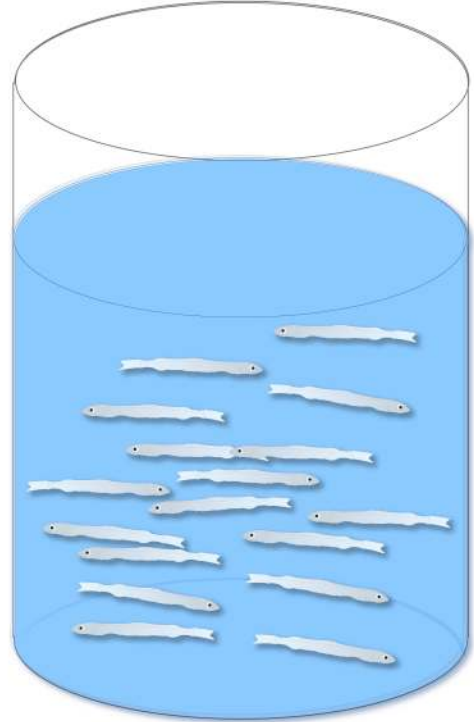


図 6-1. 感染実験の概要

3 L 容ガラスビーカー中に 2 L の人工海水を入れ、その中にアユ仔魚を収容し (B)、この中に芝の葉片培養によって発生させた遊走子浮遊液 30 mL (A) を加え、1 週間死亡状況などを観察した。対照区には滅菌した人工海水を 30 mL 加えた。なお、試験期間中はビーカー周囲に水温約 16 °C の地下水をかけ流すことで、水温を一定に保つとともに、通気を行うことで供試魚に酸素を補給した。また、実験期間中は無給餌とした。



図 6-2. 自然発病魚の外観

仔魚期のアユは体が透明であるが、体の中心部に本病原菌の感染による白濁が観察される

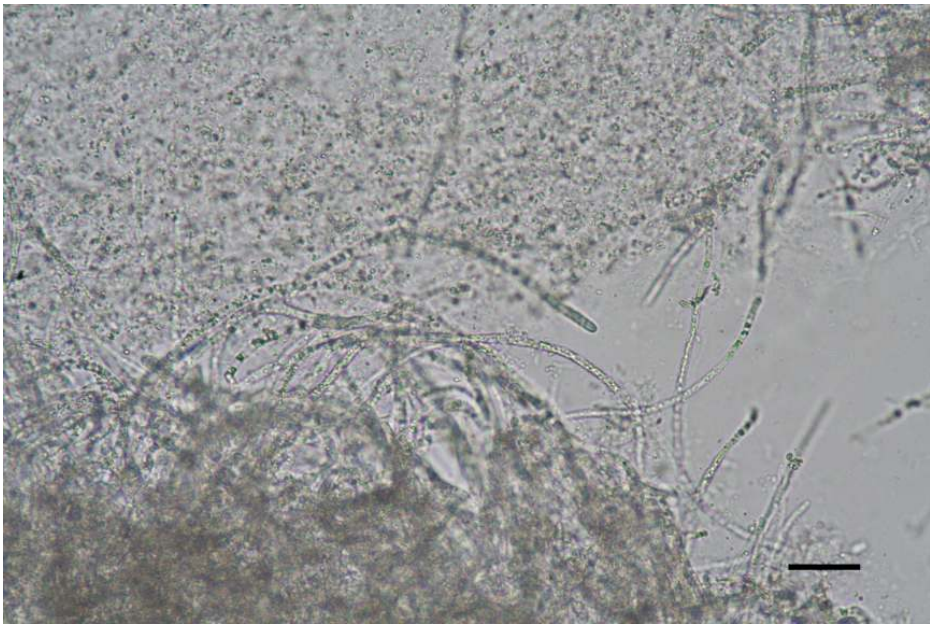


図 6-3. 自然発病魚の内臓白濁部位の鏡検像

病魚の白濁部位には、径約 $5\ \mu\text{m}$ の無隔壁の菌糸が繁殖しているのが観察される

Scale bar = $50\ \mu\text{m}$.

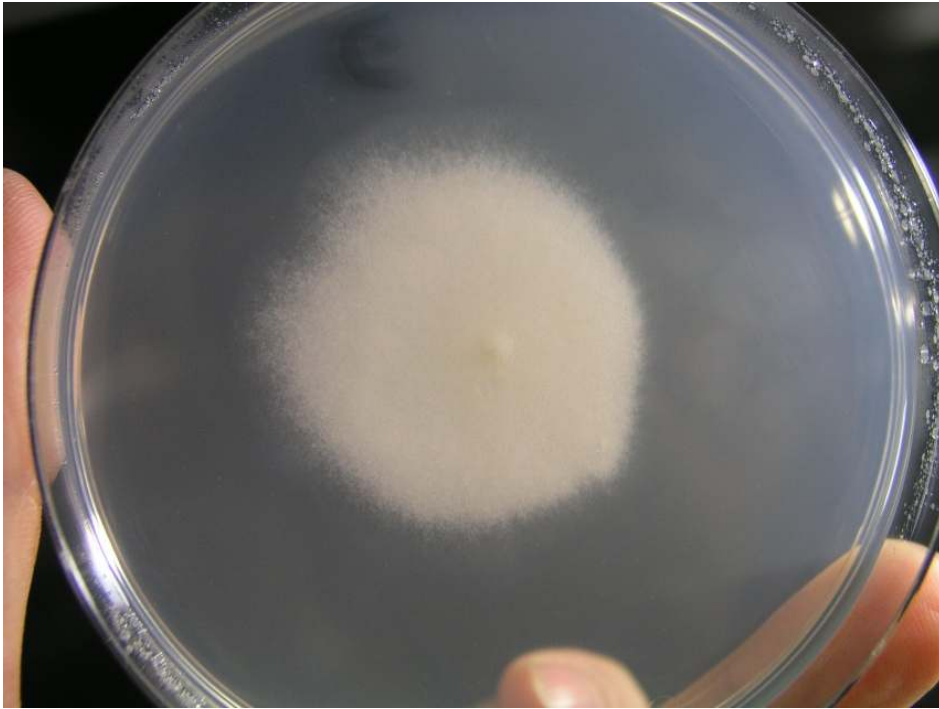


図 6-4. 病魚から分離した菌の集落 (15 °C, 5 日間培養)

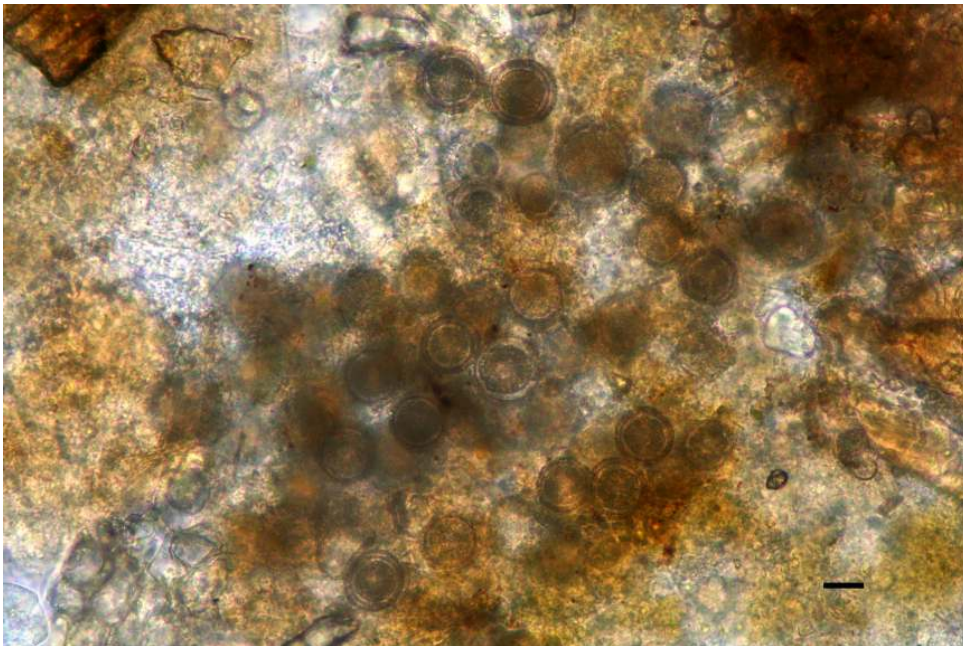


図 6-5. 病気発生池の池底の堆積物中に観察された卵胞子 Scale bar =20 μ m.

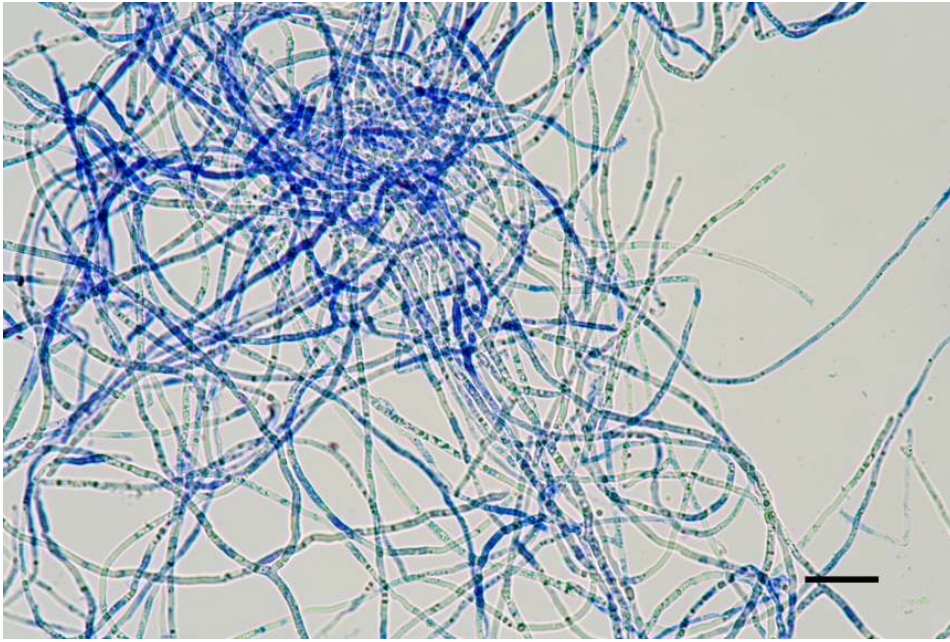


図 6-6. GY 液体培地中の YFTM 0701 株の菌糸の外観
ラクトフェノールコットンブルー染色 Scale bar = 50 μm .



図 6-7. NJM 0702 株の遊走子のう（無性生殖器官） Scale bar = 10 μm .



図 6-8. NJM 0702 株の有性生殖器官 Scale bar =10 μ m.

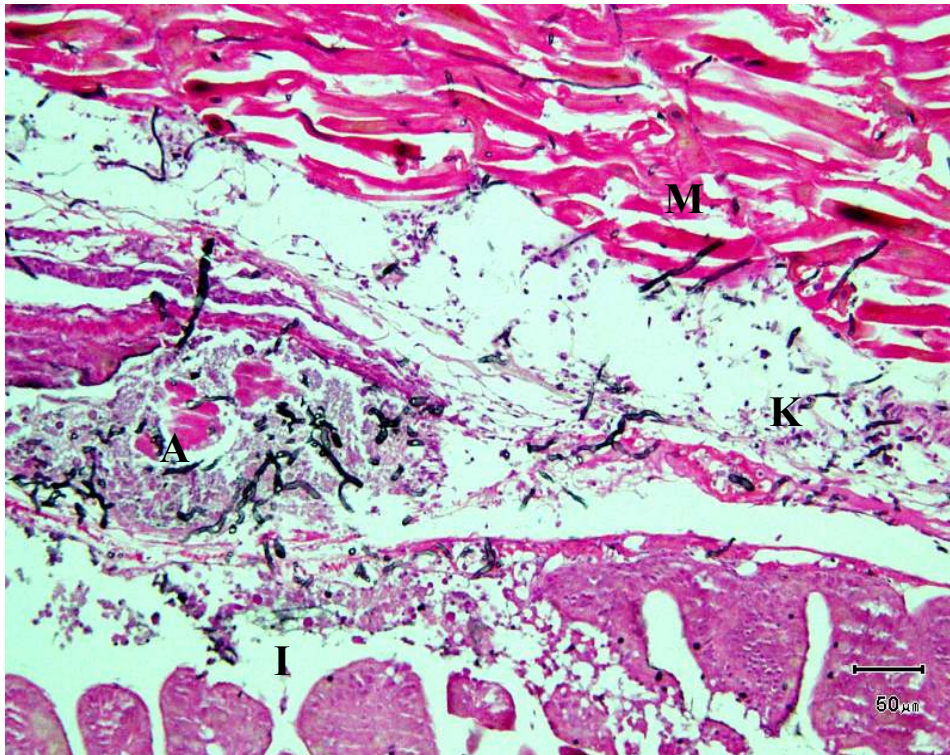


図 6-9. 病魚の腹部白濁部位の病理組織像

A : 鰓 K : 腎臓 I : 腸管 M : 筋肉 グロコット HE 染色 Scale bar = 50 μm.

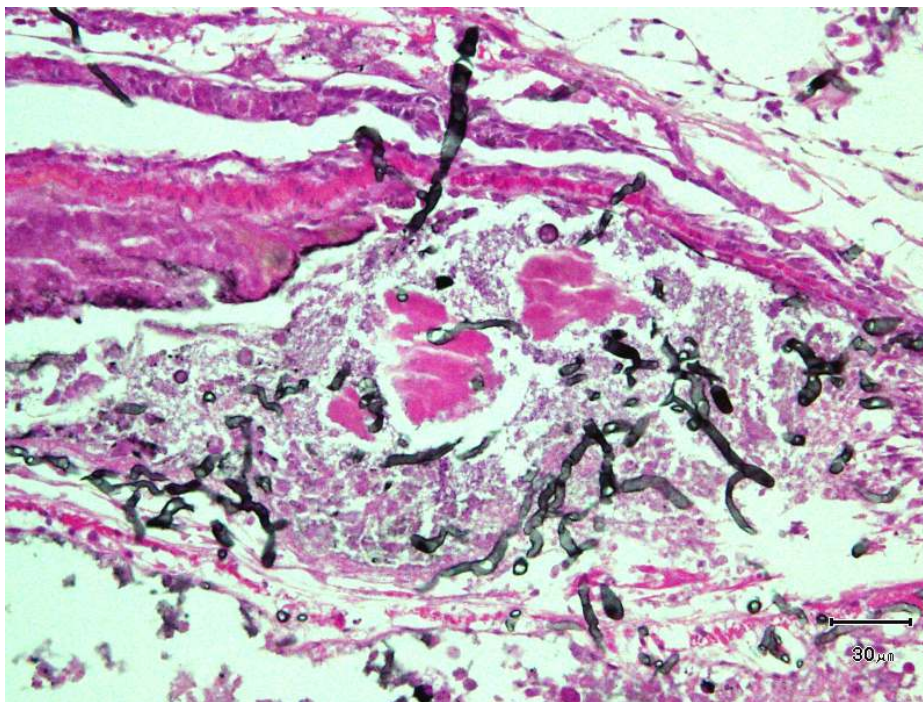


図 6-10. 病魚の鰓で繁殖する菌糸

グロコット HE 染色 Scale bar = 30 μm.

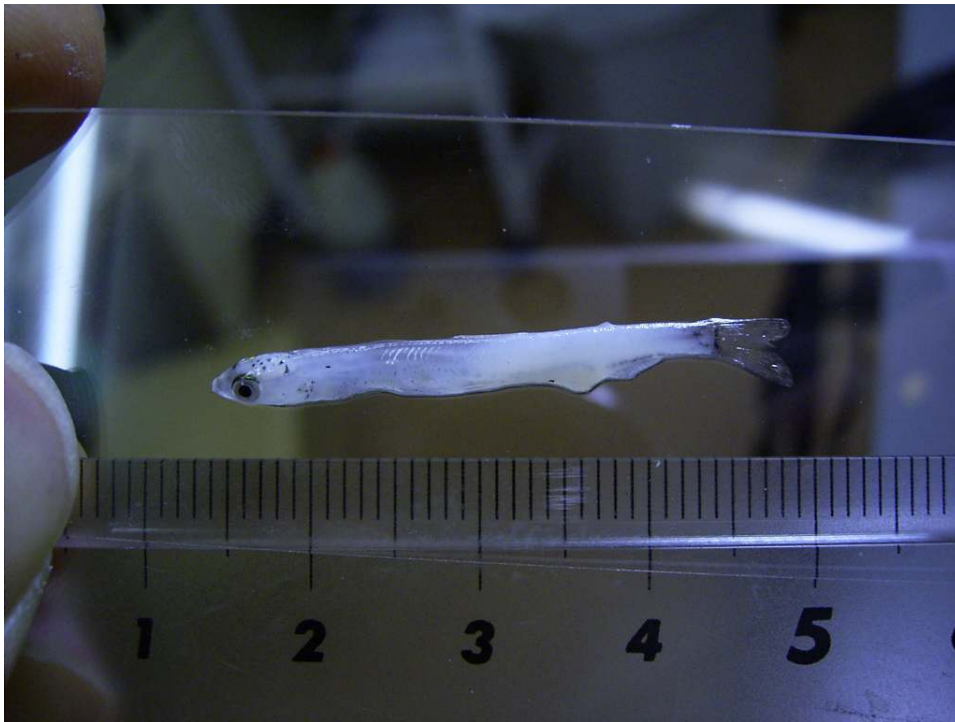


図 6-11. 実験感染による死亡魚の外観
接種菌の感染によるものと考えられる白濁が腹部から尾柄にかけて認められる

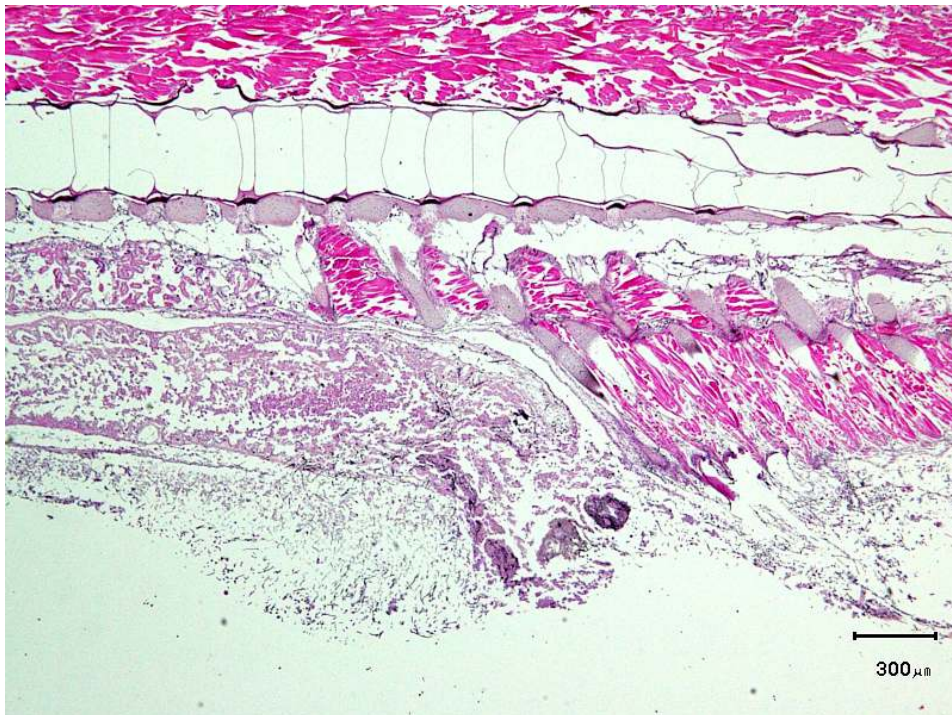


図 6-12. 実験感染死亡魚の病理組織像
総排泄孔の崩壊および菌糸の繁殖が確認される グロコット HE 染色 Scale bar = 300 μm.

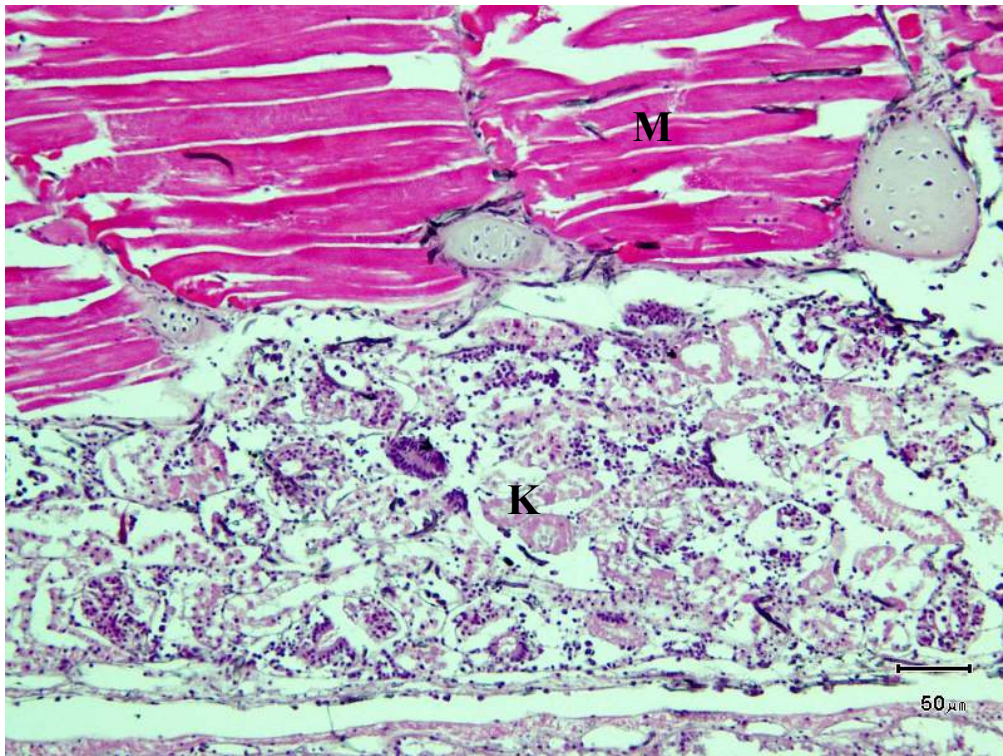


図 6-13. 実験感染死亡魚における腎臓 (K) および筋肉 (M) の病理組織像
腎臓, 筋肉で無隔壁の菌糸が観察される グロコット HE 染色 Scale bar = 50 μ m.

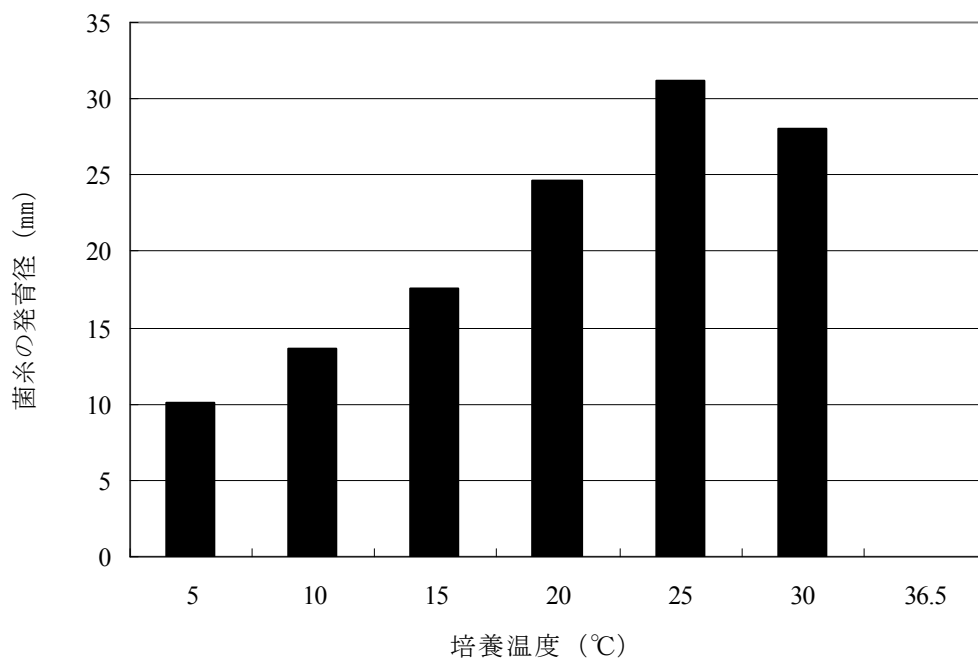


図 6-14. YFTM 0701 株の発育に及ぼす温度の影響 (GY 寒天培地, 5 日間培養)

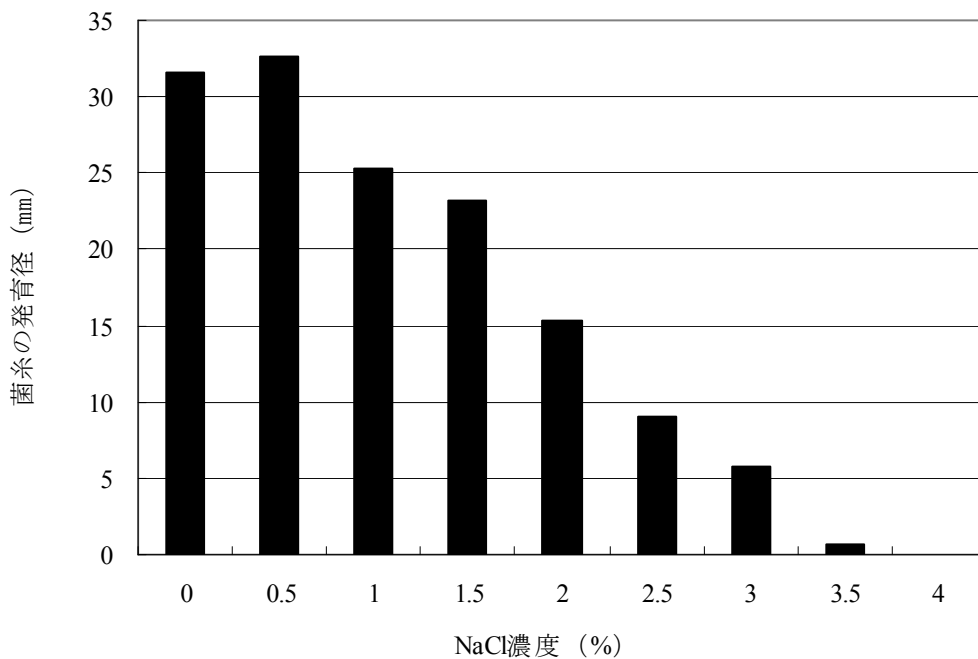


図 6-15. YFTM 0701 株の発育に及ぼす NaCl 濃度の影響 (GY 寒天培地, 25 °C, 5 日間培養)

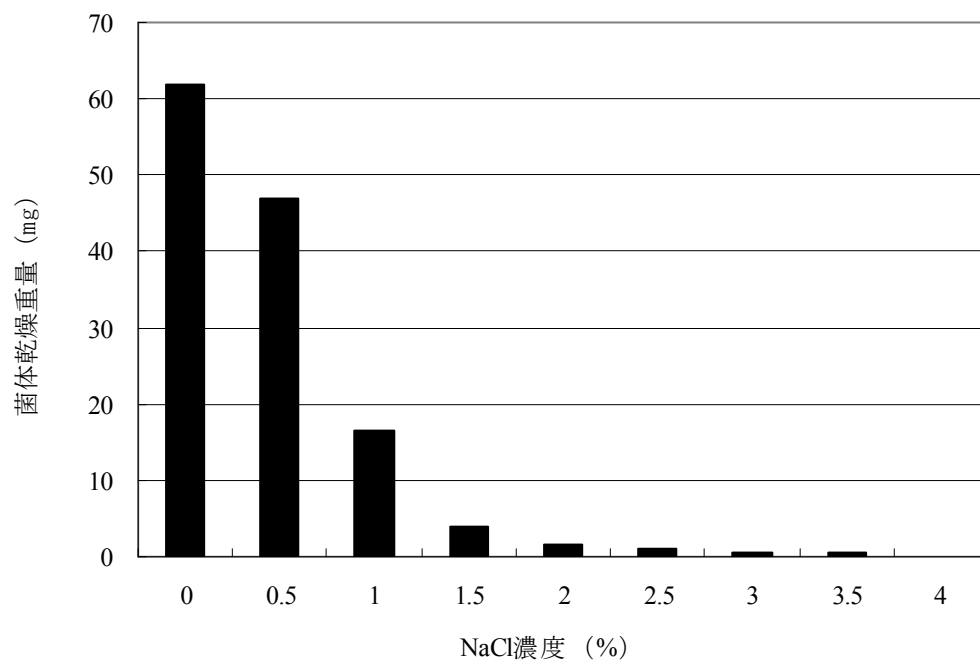


図 6-16. YFTM 0701 株の発育に及ぼす NaCl 濃度の影響 (GY 液体培地, 25°C, 5 日間培養)

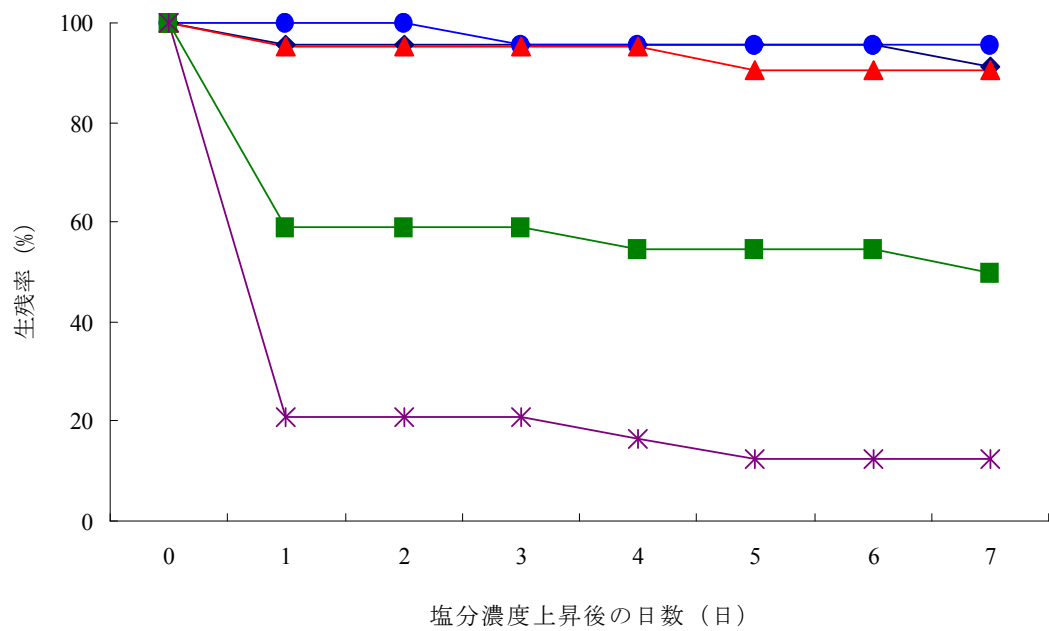


図6-17. 飼育水の塩分上昇がアユ仔魚の生残に及ぼす影響（第1回試験）

◆ 対照区(0.5%) ● 1.0% ▲ 2.0% ■ 3.0% * 4.0%

飼育水の塩分濃度を急激に上昇させた

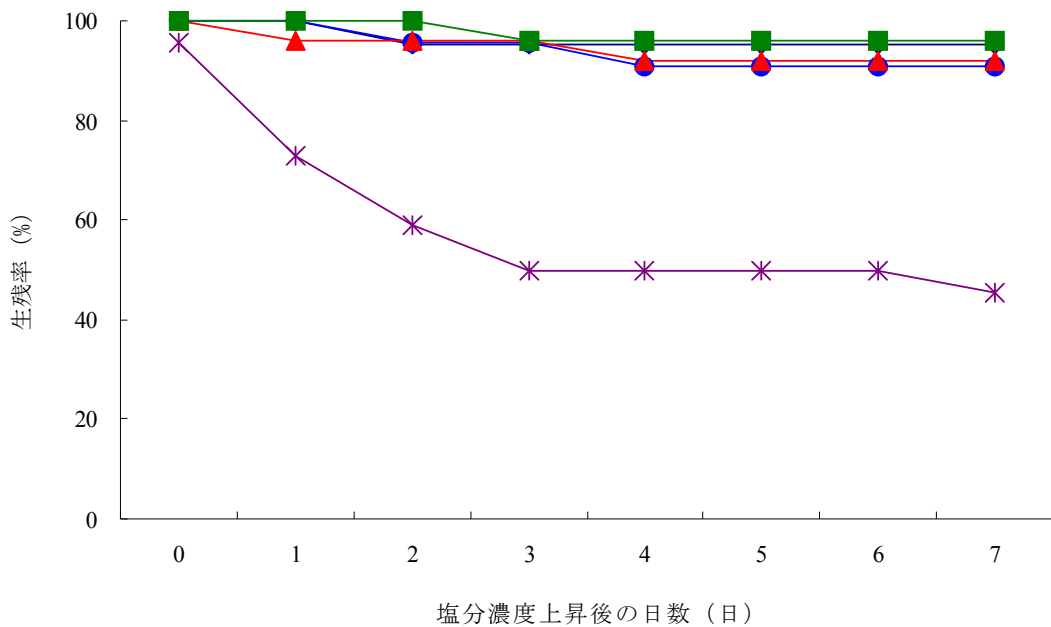


図6-18. 飼育水の塩分上昇がアユ仔魚の生残に及ぼす影響（第2回試験）

◆ 対照区(0.5%) ● 1.0% ▲ 2.0% ■ 3.0% * 4.0%

飼育水の塩分濃度を1日間かけて2段階で上昇させた

第7章 総括

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ブ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

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（通常の海水の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 μm 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、*P. 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、*Pythium 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、鰾、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% で最良な発育を示し、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。

謝辞

本研究をとりまとめるにあたり、終始ご懇篤なご指導とご鞭撻をいただき、さらに本稿をご校閲いただいた日本獣医生命科学大学、畑井喜司雄教授に衷心より深謝申し上げます。

本研究に貴重なご助言並びにご協力をいただいた東武医学技術専門学校、大野平祐講師、大阪府立大学、東條元昭准教授、日本獣医生命科学大学、和田新平准教授並びに大阪府立大学、小林咲麗氏に厚く御礼申し上げます。

試験時の水質測定にご協力いただいた山梨県衛生公害研究所、吉澤一家主幹研究員並びに山梨県森林環境部大気水質保全課、有泉和紀副主査に深謝の意を表します。また、有益な情報を提供していただいた山梨県果樹試験、村上芳照研究員並びに新潟県内水面試験場、樋口正仁主任研究員に厚く深謝の意を表します。

日本獣医生命科学大学に大学院研究生として在籍中にお世話になりました日本獣医生命科学大学、倉田 修講師並びに田熊大祐氏を始め、魚病学教室の方々に厚く感謝の意を表します。

この研究はすべて著者が所属する山梨県水産技術センターにて行いました。施設・機器の利用および研究の遂行において特段のご配慮とご協力をいただいた芳賀 稔前所長、桐生 透前特別研究員、三井 潔所長には厚く御礼申し上げます。研究の遂行上有益なご助言と多大なご協力をいただいた岡崎 巧研究員、名倉 盾研究員、加地弘一研究員、加地 奈々研究員、大森洋治主任技能員には深謝の意を表します。また、長期間多方面に渡って様々なご協力をいただいた山梨県水産技術センターの職員の方々には心から感謝申し上げます。

引用文献

- Alderman, D. J. (1985): Malachite green: a review. *J. Fish Dis.*, **8**, 289-298.
- Branson, E. (2002): Efficacy of bronopol against infection of rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*) with the fungus *Saprolegnia* species. *Vet. Rec.*, **151**, 539-541.
- Chinabut, S. (1998): Epizootic ulcerative syndrome: information up to 1997. *Fish Pathol.*, **33**, 321-326.
- Cline, T. F. and G. Post (1972): Therapy for trout eggs infected with *Saprolegnia*. *Prog. Fish-Cult.*, **34**, 148-151.
- Cothier, E. J. and R. L. Gilbert (1993): Comparative pathogenicity of *Pythium* species associated with poor seedling establishment in southern Australia. *Plant Pathol.*, **42**, 151-157.
- Czeczuga, B. (1996): Species of *Pythium* isolated from eggs of fresh-water fish. *Acta Mycol.*, **36**, 587-588.
- Dalbey, W. E. (1982): Formaldehyde and tumors in hamster respiratory tract. *Toxicology*, **24**, 9-14.
- Edgell, P., D. Lawseth, W. E. Mclean and E. W. Britton (1993): The use of salt solutions to control fungus (*Saprolegnia*) infestations on salmon eggs. *Prog. Fish-Cult.*, **55**, 48-52.
- El-Feki, M., K. Hatai and M. M. A. Hussein (2003): Chemotactic and chemokinetic activities of *Saprolegnia parasitica* toward different metabolites and fish tissue extracts. *Mycoscience*, **44**, 159-162.
- Grande, M. (1967): Effect of copper and zinc on salmonid fishes. *Advances in Water Pollution Research. Proc. 3rd Int. Conf. on Water Poll. Res.*, Washington, D. C, 97-108.
- 畑井喜司雄 (1980) : 水カビ病について. *魚病研究*, **14**, 199-206.
- 畑井喜司雄 (2004) : 真菌病「魚類の感染症・寄生虫病」, 恒星社厚生閣, 東京, 263-284.
- 畑井喜司雄・江草周三 (1977) : サケ科魚類の内臓真菌症に関する研究－II. アマゴ稚魚の腹腔内より分離された真菌の性状. *魚病研究*, **11**, 187-193.

- 畑井喜司雄・江草周三 (1979) : 真菌性肉芽腫症起病真菌に関する研究－Ⅲ. MG-fungus 用人工培地の開発. 魚病研究, **13**, 147-152.
- Hatai, K. and G. Hoshiai (1992): Mass mortality in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) due to *Saprolegnia parasitica* Coker. J. Wildl. Dis., **28**, 532-536.
- Hatai, K. and O. A. Lawhavit (1988): *Lagenidium myophilum* sp. nov., a new parasite on adult northern shrimp (*Pandalus borealis* Kroyer). Trans. Mycol. Soc. Japan, **29**, 175-184.
- 畑井喜司雄・高橋 誓・江草周三 (1984) : 真菌性肉芽腫症起病真菌に関する研究－Ⅳ. 人為感染および自然感染アユの血液性状. 魚病研究, **19**, 17-23.
- Hatai, K., Y. Fujimaki, S. Egusa and Y. Jo (1986): A visceral mycosis in ayu fry, *Plecoglossus altivelis* Temminck & Schlegel, caused by a species of *Phoma*. J. Fish Dis., **9**, 111-116.
- Hawksworth, D. L., P. M. Kirk, B. C. Sutton and D. N. Pegler (1995): Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi, 8th ed. CAB International, Wallingford, UK.
- Hazel, C. R., and S. J. Meith (1970): Bioassay of king salmon eggs and sac fry in copper solutions. Calif. Fish Game, **56**, 121-124.
- Hussein, M. M. A., K. Hatai and T. Nomura (2001): Saprolegniosis in salmonids and their eggs in Japan. J. Wildl. Dis., **37**, 204-207.
- Iida, Y. and A. Mizokami (1986): Outbreak of cold water disease in wild ayu and pale chub. Fish Pathol., **31**, 157-164.
- 井塚 隆 (2005) : ワカサギ「水産増養殖システム 2－淡水魚」, 恒星社厚生閣, 東京, 103-113.
- 井口恵一郎・武島弘彦 (2007) : アユ孵化仔魚の塩分耐性評価法に関する提案. 水産増殖, **55**, 417-421.
- 岩波雄二郎 (1978) : 岩波理化学辞典第 3 版, 岩波書店, 東京, 162.
- Jarvis, W. R. (1992): Managing diseases in greenhouse crops. American Phytopathological Society, Saint Paul, 288p.
- 加治俊二・兼松正衛・手塚信弘・伏見 浩・畑井喜司雄 (1991) : ノコギリガザミの卵およ

- びふ化幼生のハリフトロス症に対するホルマリン浴の効果. 日水誌, **57**, 51-55.
- Kawamura, Y., K. Yokoo, M. Tojo and M. Hishiike (2005): Distribution of *Pythium porphyrae*, the causal agent of red rot disease of *Porphyra* spp., in the Ariake Sea, Japan. Plant Dis., **89**, 1041-1047.
- 菊野理津子・笹原武志・関口朋子・高橋晃・曾我英久・青木正人・佐藤義則・高山陽子・北里英郎・井上松久 (2004) : 銅イオンの *Cryptosporidium parvum* オーシスト感染性に対する不活化効果. 感染症誌, **78**, 138-140.
- 木俣正夫・河合 章・吉田陽一 (1961) : 海洋性硝酸化成細菌に関する研究—I. 培養法ならびに分布について (予報) . 日水誌, **27**, 593-597.
- 桐生 透 (2005) : ニジマス「水産増養殖システム 2—淡水魚」, 恒星社厚生閣, 東京, 29-55.
- Kitancharoen, N., A. Yamamoto and K. Hatai (1997a): Aquatic fungi developing on eggs of salmonids. J. Aquat. Anim. Health, **9**, 314-316.
- Kitancharoen, N., A. Yamamoto and K. Hatai (1997b): Fungicidal effect of hydrogen peroxide on fungal infection of rainbow trout eggs. Mycoscience, **38**, 375-378.
- Kitancharoen, N., A. Ono, A. Yamamoto and K. Hatai (1997c): The fungistatic effect of NaCl on rainbow trout egg saprolegniasis. Fish Pathol., **32**, 159-162.
- Kitancharoen, N., A. Yamamoto and K. Hatai (1998): Effect of sodium chloride, hydrogen peroxide and malachite green on fungal infection of rainbow trout eggs. Biocontrol Sci., **3**, 113-115.
- Koeypudsa, W., P. Phadee, J. Tangtrongpiros and K. Hatai (2005): Influence of pH, temperature and sodium chloride concentration on growth rate of *Saprolegnia* sp. J. Sci. Res. Chulalongkorn Univ., **30**, 123-130.
- 久賀俊正 (1997) : 銅と衛生. 社団法人日本銅センター, 東京, 45-78.
- 熊谷明・須藤篤 (2004) : 過酸化水素製剤等によるサケマス卵のミズカビ病防除法の実用化に関する研究. 平成 15 年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 11-23.
- Lévesque, C. A. and A. W. A. M. de Cock (2004): Molecular phylogeny and taxonomy of the genus

- Pythium*. Mycol. Res., **108**, 1363-1383.
- Lin, Y. E., R. D. Vidic, J. E. Stout and V. L. Yu (2002): Negative effect of high pH on biocidal efficacy of copper and silver ions in controlling *Legionella pneumophila*. Appl. Environ. Microbiol., **68**, 2711-2715.
- 宮崎照雄・江草周三 (1973) : 淡水魚の真菌性肉芽腫症に関する研究－II. アユに流行した真菌性肉芽腫症. 魚病研究, **7**, 125-133.
- 宮崎照雄・窪田三郎・田代文男 (1977) : サケ科魚類稚魚の内臓真菌症に関する研究－I. 病理組織. 魚病研究, **11**, 183-186.
- Marking, L. L., J. J. Rach and T. M. Schreier (1994): Evaluation of antifungal agents for fish culture. Prog. Fish-Cult., **56**, 225-231.
- Martin, F. N. (1992): *Pythium*. In "Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi" (ed. by Singleton, L. L., J. D. Mihail and C. M. Rush). American Phytopathological Society, Saint Paul, 39-49.
- Mckim, J. M. and D. A. Benoit (1971): Effect of long-term expose to copper on survival, growth, and reproduction of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). J. Fish. Res. Board Canada, **28**, 655-662.
- Mckim, J. M. and D. A. Benoit (1974): Duration of toxicity test for establishing "no effect" concentrations for copper with brook trout (*Salvelinus fontinalis*). J. Fish. Res. Board Canada, **31**, 449-452.
- Mendoza, L., F. Hernandez and L. Ajello (1993): Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. J. Clin. Microbiol., **31**, 2967-2973.
- Meyer, F. P. and T. A. Jorgenson (1983): Teratological and other effects of malachite green on the development of rainbow trout and rabbit. Tran. Amer. Fish. Soci., **112**, 814-824.
- Michael, E. B., J. C. Rick and A. S. William (1997): Use of formalin incubation of eyed eggs of inland fall chinook salmon. Prog. Fish-Cult., **59**, 303-306.
- Miyazaki, T. and Y. Jo (1985): Studies on Ichthyophonous disease of ayu. Fish Pathol., **20**, 45-48.

- Monisha, S., S. Prabhudesai, S. C. Krishnamurthy and K. V. K. Rao (2001): Effect of yellow and malachite green on DNA synthesis in N-nitrosodienthylamine induced preneoplastic rat livers. *Indian J. Exp. Biol.*, **39**, 845-52.
- 室賀清邦・属博夫・杉山瑛之・田原恒男・城泰彦（1974）：1973 年春から夏にかけて徳島および岡山県下に流行したアユのビブリオ病の原因菌について. *魚病研究*, **8**, 147-151.
- Nagai, T., Y. Iida, E. Iwamoto and T. Nakai (2008): A new vibriosis of cultured Ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, **41**, 49-54.
- 中居裕・景山哲史・大野平祐・畑井喜司雄（2005）：人工海水によるアユ卵水カビ病予防の可能性. 平成 17 年度日本魚病学会講演要旨集, 49.
- Nakashima, T., H. Ito and M. Matsuo (2001a): Antibacterial activity of cellulose fabrics modified with *met allic* salts. *Textile Res. J.*, **71**, 688-694.
- Nakashima, T., Y. Sagami and M. Matsuo (2001b): Antibacterial efficacy of cotton fabrics chemically modified by *met al* salts. *Biocontrol Sci.*, **2**, 83-90.
- 農林水産省消費安全局消費安全政策課（2004）：食品の安全性について. 平成 16 年度食料品消費モニター第 4 回定期調査結果, 3-11.
- 農林水産省消費安全局畜水産安全管理課（2008）：水産用医薬品の使用について. 第 21 報.
- 落合忍人・小寺和朗・今攸・宮崎照雄・窪田三郎（1977）：アユ稚魚の誤嚥に基づく疾病について. *魚病研究*, **12**, 135-139.
- 大野平祐（2008）：魚類卵の水カビ病防除に関する研究. 日本獣医生命科学大学博士論文.
- Oono, H. and K. Hatai (2007a): Antifungal activities of bronopol and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one (MT) against *Saprolegnia*. *Biocontrol Sci.*, **12**, 145-148.
- Oono, H., K. Hatai, M. Miura, N. Tsuchida and T. Kiryu (2007b): The use of bronopol to control fungal infection in rainbow trout eggs. *Biocontrol Sci.*, **12**, 55-57.
- Oono, H., K. Hatai, H. Aikawa and H. Hara (2008a): The use of bronopol to control fungal infection in ayu eggs. *Aquaculture Sci.*, **56**, 9-12.

- Oono, H., K. Hatai, H. Aikawa, H. Hara, M. Miura, N. Tsuchida and K. Mitsui (2008b): Effects of 2-methyl-4-isothiazolin-one (MT) and bronopol against fungal infection control of ayu and rainbow trout eggs and the toxicity to their fingerlings. *Aquaculture Sci.*, **56**, 559-565.
- 尾崎久雄・山本義和（1979）：水生生物と重金属 [1] 銅, サイエンティスト社, 東京, 159-172.
- Rand, T. G. and D. Munden (1993): Chemotaxis of zoospores of two fish-egg-pathogenic strains of *Saprolegnia diclina* (Oomycotina: Saprolegniaceae) toward salmonid egg chorion extracts and selected amino acids and sugars. *J. Aquat. Anim. Health*, **5**, 240-245.
- Saunders, G. A., J. O. Washburn, D. E. Egerter and J. R. Anderson (1988): Pathogenicity of fungi isolated from field-collected larvae of the western treehole mosquito, *Aedes sierrensis* (Diptera:Culicidae). *J. Invertebrate Pathol.*, **52**, 360-363.
- Schreier, T. M., J. J. Rach and G. E. Howe (1996): Efficacy of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride on fungal-infected rainbow trout eggs. *Aquaculture*, **140**, 323-331.
- Servizi, J. A. and D. W. Martens (1978): Effect of selected heavy metals on early life of sockeye and pink salmon. *Int. Pac. Salmon Fish. Comm. Prog. Rep. Canada*, **39**, 1-26.
- Stankevičiene, A. and A. Lugauskas (2003): Micromycetes of the *Pythium* genus associated with pot-plants. *Botanica Lithuanica*, **9**, 185-189.
- Sugita, T., A. Nishikawa, R. Ikeda and T. Shinoda (1999): Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 1985-1993.
- 田畑和男・柄多 哲・M. S. Ruiz (1982) :海水によるアユ種苗生産過程の病害研究－II. *Vibrio anguillarum* の動態. 魚病研究, **17**, 205-212.
- 高橋一孝 (1985) :マス類の染色体操作による育種試験－I (温度ショックによるニジマス染色体の倍数化) . 山梨県魚苗センター事業報告書, **13**, 81-91.
- Taylor, S. G. and J. E. Bailey (1979): *Saprolegnia*: control of fungus on incubating eggs of pink

- salmon by treatment with seawater. *Prog. Fish-Cult.*, **41**, 181-183.
- Tojo, M., E. Nakazono, S. Tsushima, T. Morikawa and N. Matsumoto (1998): Characterization of two morphological groups of isolates of *Pythium ultimum* var. *ultimum* in a vegetable field. *Mycoscience.*, **39**, 135-144.
- Tojo, M., T. Shigematsu, H. Morita, Y. Li, T. Matsumoto and S. Ohki (2005): Pythium rot of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis*) caused by *Pythium aphanidermatum*. *J. Gen. Plant. Pathol.*, **71**, 384-384.
- Tojo, M., K. Watanabe, K. Kida, Y. Li and S. Numata (2007): Mottle necrosis of sweet potato caused by *pythium scleroteichum* in Japan and *varietal* difference in susceptibility to the disease. *J. Gen. Plant. Pathol.*, **73**, 121-124.
- van der Plaats-Niterink, A. J. (1972): The occurrence of *Pythium* in the Netherlands. 3. *Pythium frevoense* sp. n. *Acta. Bot. Neerl.*, **21**, 633-639.
- van der Plaats-Niterink, A. J. (1981): Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Mycology*, **21**, 1-242.
- 若林久嗣・沢田建蔵・二宮浩司・西森栄太 (1996) : シュードモナス属細菌によるアユの細菌性出血性腹水病. *魚病研究*, **31**, 239-240.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In "PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications" (ed. by Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White). Academic Press, San Diego, 315-322.
- 山本 淳・豊村真之介・実吉峯郎・畑井喜司雄 (2001) : 過酸化水素によるサケ科魚卵の水カビ病の防除. *魚病研究*, **36**, 241-246.
- 安信秀樹 (2006) : 飼育水の pH 調整によるガザミ幼生真菌症の感染防御機構. *水産増殖*, **54**, 531-535.
- 湯浅 啓・畑井喜司雄 (1995) : 淡水魚類の水カビ病原菌の薬剤感受性. *防菌防黴*, **23**,

213-219.

Yuasa, K., N. Kitanchoen and K. Hatai (1997): Simple method to distinguish between *Saprolegnia parasitica* and *S. diclina* isolated from fishes with saprolegniasis. Fish Pathol., **32**, 175-176.

Summary

Water mold infection is a serious problem in the seed production of fresh water fish and may cause mass mortalities of freshwater fish eggs unless prevention measures are taken. It is mainly caused by fungi of the family Saprolegniaceae (order Oomycota) that reside in freshwater. Until 2005, malachite green was used for the prevention of water mold infection in seed production tanks at Japanese fish farms. This chemical is an effective fungicide that is convenient and cost-effective. However, the use of malachite green on edible cultured fish was prohibited in 2005 for safety reasons. Alternatives to malachite green have been extensively studied. However, in Japan, few anti-fungal agents are available to Japanese fish farms.

Although fungi in the family Saprolegniaceae are common disease organisms in freshwater fish, fungal disease may also be caused by species in other families in the order Oomycota. An unknown visceral mycosis caused by an Oomycota species first occurred in January 2007 in Yamanashi Prefecture. This disease also caused mass mortality of ayu (*Plecoglossus altivelis*) larvae in November to December, 2007 and December, 2008.

This study aimed to develop new fungal preventive methods, to increase available treatments for water mold infection, to identify the cause of the unknown visceral mycosis of ayu larvae, and to find preventive methods for this disease.

The study was conducted at Oshino Trout Hatchery, Yamanashi Prefectural Fisheries Technology Center (Oshino Trout Hatchery) in Oshino Village and Yamanashi Prefectural Fisheries Technology Center (Fisheries Technology Center) in Kai City.

Control of water mold infection in rainbow trout eggs by using copper fiber (Chapter 2)

The antifungal efficacy of continuous treatment of copper ions against water mold infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs was evaluated. Copper ions were introduced into egg

raising tanks by placing 50–800 g of copper fiber (surface area 65 cm²/kg) into the water supply. Tanks were supplied with 200 mL/s of inflow groundwater, which was drawn at Oshino Trout Hatchery. The number of eggs infected with fungi between fertilization and eye-development stage was recorded. Four trials were attempted.

The fungal infection rate of the groups supplied with water treated with >200 g of copper fiber in all four trials was 0–3.0%, which was remarkably lower than that of the control groups of 8.5–86.5%. The minimum weight of copper fiber that was effective on water mold infection of rainbow trout eggs was 200 g. The concentrations of copper in this experimental tank was 0.006–0.020 ppm and no adverse effects on the rate of development to eye stage, or hatching and deformity rates of eggs transferred after eye stage to water without copper, were observed.

Copper nitrate was used to assess the effect of copper on *Saprolegnia diclina* *in vitro*. *S. diclina* was grown in glucose (1%) yeast extract (0.25%) (GY) broth with the following seven concentrations of copper nitrate: 0.000, 0.003, 0.006, 0.013, 0.260, 0.520 and 0.104 ppm. The hyphal growth rate of *S. diclina* was not affected below 0.104 ppm copper nitrate.

The rate of zoospore germination of *S. diclina* was measured at the following six concentrations of copper nitrate: 0.000, 0.003, 0.006, 0.013, 0.260, and 0.520 ppm. Soaking zoospores of *S. diclina* in >0.006 ppm copper nitrate inhibited germination. The results suggest that low concentrations of copper ions released by the copper fiber inhibit zoospore germination. This may provide an effective fungal preventive treatment.

Control of water mold infection in ayu eggs and carp eggs by using copper fiber (Chapter 3)

The antifungal efficacy of copper fiber was confirmed in subsequent trials with ayu eggs and carp (*Cyprinus carpio*) eggs.

Between 100 and 400 g copper fiber was placed in the water supply of tanks containing ayu or carp eggs. Tanks were provided with a continuous water supply at 200 mL/s of inflow

groundwater, which was drawn at the Fisheries Technology Center.

In the trial of ayu eggs, a 35.8–56.1% reduction in infection rate was observed in tanks supplied with treated water. However, the author observed an increase in larval deformity rate even at the lowest (100 g) copper fiber treatment. The copper concentration in the water supply for this group was 0.006 ppm over the test period. This is the minimum copper concentration that inhibits zoospore germination and provides a fungal preventive effect. This suggests that copper fiber is not a suitable fungal preventive for ayu eggs.

In the trial of carp eggs, water mold infection was not observed in all groups (including the control group). However, from results of the trial with ayu eggs, the author proposes that a similar preventive effect may be obtained for carp eggs. An increase in larval deformity rates was observed in the 200–400 g treatments, but no adverse effects were observed on the embryonic development of carp eggs in the 100 g copper fiber treatment.

Copper ion concentrations were only measured in the ayu egg trial. If water with the same quality is used, the author assumes that the concentration of copper ion derived from a given weight of copper fiber would be similar. That is, 100 g of copper fiber in 200 mL/s water supply would result in a copper concentration of 0.006 ppm to the carp eggs breeding tank. This suggests that treatments with 100 g of copper fiber may be a practical fungal preventive for carp eggs in this facility.

Antifungal effect of potassium chloride (KCl) on water mold infection in ayu eggs (Chapter4)

The antifungal effects of potassium chloride (KCl) against *S. diclina*, *S. parasitica* and *Achlya* sp. were investigated in pure culture. The hyphal growth and zoospore germination rates for each species were examined in GY broth at six concentrations of KCl (0.00, 0.03, 0.06, 0.12, 0.24 and 0.48%).

Concentrations of KCl equal to or less than 0.24% did not inhibit hyphal growth or zoospore

germination. However, fungal zoospore motility was inhibited within 1 min in 0.03% KCl. These results suggest that zoospore motility is more susceptible to KCl than hyphal growth and zoospore germination.

The preventive effect of continuous treatment with KCl on water mold infection was investigated using ayu eggs. In three trials, fertilized ayu eggs were kept in 0.03–0.12% KCl until the eye development stage. The fungal infection rate of the three KCl groups was lower than that of the control group in 8 of 9 groups. Treatment at a concentration of 0.06% KCl decreased the rate of fungal infection compared with the control group in all three trials. No adverse effects were observed on the rate of development to eye stage, or on the hatching or deformity rates of eggs after they were transferred to water without KCl. A concentration of 0.06% KCl could be an effective, practical fungal inhibitor.

Antifungal effect of low concentration artificial sea water on water mold infection in ayu eggs after the eyed egg stage (Chapter 5)

The effect of dilute, artificial seawater (1/7–3/7 dilution compared with salinity of natural sea water, (that is about 0.5–1.5% NaCl) on *S. diclina* was investigated. (The salinity of artificial seawater for ayu larval breeding is usually 0.5% NaCl.) GY broth was prepared at four salinities by dilution of artificial seawater (0/7 (control), 1/7, 2/7 and 3/7). Hyphal growth of *S. diclina* was observed in each dilution. Growth rates at 2/7 and 3/7 times dilutions were slower than growth in the control treatment.

The zoospore germination rate of *S. diclina* was not affected in 1/7 and 2/7 treatments but was half that of control in 3/7 treatment. Zoospore motility of *S. diclina* was inhibited within 1 min in 1/7–3/7 dilution.

Eyed eggs of ayu were hatched at each test salinity. Artificial seawater at 1/7–2/7 dilution did not affect the hatching or deformity rates.

In contrast to salmonid egg management, hatchery practice does not remove dead ayu eggs at the eyed egg stage. This increases the risk of infection to ayu eggs by water-mold disease after the eyed egg stage. The results of this study suggest that a low concentration of artificial seawater will reduce the risk of fungal infection after the eyed egg stage.

A visceral mycosis in ayu larva caused by *Pythium flevoense* (Chapter 6)

In 2007, an unknown visceral mycosis caused by an Oomycota first occurred in ayu larva in Yamanashi Prefecture. At the time of disease outbreak, the body weight of larval ayu was 43–214 mg and the age was 51–85 days. Ayu larvae were reared in artificial seawater with about 0.5% NaCl, and the temperature of the breeding water was 12–15°C. The cumulative mortality was 19–33% and the daily mortality reached a maximum 9.3%.

In almost all cases, the abdomen of moribund or dying fish was opaque. On microscopic examination, abundant non-septate hyphae about 5 µm width were observed in the opaque area. Similar white hyphae were isolated from all examined fish with GY agar. Similar hyphae were also isolated from sediment samples taken from ponds that held diseased fish. On microscopic examination of sediment samples, the author observed spherical particles similar to oospores of *Pythium* sp.

A total of 22 isolates of the genus *Pythium* were isolated from ayu larvae and pond sediment. The morphology of isolates was similar. Three isolates were used for morphological identification, seven isolates for molecular identification, one isolate to test optimal temperature, NaCl tolerance and experimental infection.

Morphological characteristics of fungal sexual and asexual organs grown on glass leaf in water were examined. The characteristics of the three isolates examined correspond with those of *P. flevoense*. The rDNA sequences of the internal transcribed spacer (ITS) regions (ITS1 and ITS2) and the intervening 5.8 S were determined using seven isolates. The sequences of all isolates

examined were identical to *Pythium flevoense* CBS 234.72 (CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures). From these results, all isolates examined were identified as *P. flevoense*.

Histopathological examinations of five moribund larvae showed non-septate hyphae in the airbladder, kidney, intestine, pancreas, spleen, abdominal cavity, musculature and notochord. The author observed heavy hyphal propagation and rhexis in the airbladder. The author suggests abnormal ingestion by aspiration of *P. flevoense* into airbladder is primary factor of current disease.

Twenty-three healthy ayu larvae were immersed in a suspension of zoospores cultured from one isolate. One ayu larva died. The abdomen of this larva was opaque and the inoculated pathogen was re-isolated from larval tissue.

Histopathological examinations of this fish showed dense hyphal propagation in the cloaca but no hyphae were observed in airbladder. This result suggests that the infection may have occurred from the cloaca.

The effect of temperature and NaCl concentration on the growth of the isolate was examined. Hyphal growth was observed at 5–30°C, but growth ceased at 36.5°C. The fungus grew well at 25°C. The hyphae grew at 0–3.5% NaCl, but not at 4.0% NaCl. The hyphal growth rate slowed with increasing concentration NaCl above 1.0%.

The influence of salinity on ayu larval survival was examined. Salinity was increased from 0.5 to 3.0‰ slowly over one day. Larval survival to day 7 was unaffected. These results suggest that increased salinity may prevent the fungal infection of ayu larva caused by *P. flevoense*.