

ミズカビ病原菌*Saprolegnia parasitica*に対する クエン酸溶液短時間浸漬の発育抑制効果

泉川 晃一・佐藤 二郎

Inhibitory Effect of Short-term Immersion in a Diluted Citric Acid on the Growth of *Saprolegnia parasitica*

Koichi IZUMIKAWA and Jiro SATO

キーワード：クエン酸溶液，発育抑制，ミズカビ病，*Saprolegnia parasitica*

サケ科魚類に発生するミズカビ病は，卵及び魚体表面に環境水中に存在する淡水性卵菌類*Saprolegnia*属菌が寄生することに起因する¹⁾。受精後の卵管理中，死卵に菌が寄生し菌糸を伸長することにより他の死卵や生卵へも感染が拡大し，放置した場合には菌糸の繁茂により多くの卵が死滅する。また，産卵期の親魚の体表に菌が寄生し，重篤な症状を示すものでは死に至ることがあり種苗生産現場で支障をきたしている²⁾。菌の感染を受けた卵や魚体は外観的に綿毛状となり，一旦感染が進行すると防除することは困難である。

卵及び魚体に見られる本病の予防やまん延を防止するため，これまでマラカイトグリーン（以下，MG）が使用されてきた³⁻⁵⁾。しかし，MGが卵や魚体に長期間残留すること^{6, 7)}，催奇形成及び発がん性^{8, 9)}が疑われていることから，わが国では2005年8月以降全面的に使用が禁止されている。一方，MGの代替薬としてプロノポール¹⁰⁾を主成分とした水産用医薬品が現在承認されており，本病の防除薬としてサケ科魚類養魚場において使用されている。しかし，この医薬品は受精卵管理時の使用に限定されており，それ以外のステージで本病に有効な防除方法は皆無に等しい。そこで，医療，食品産業及び農業分野で殺菌・消毒に利用されている強酸性水¹¹⁻¹⁶⁾に着目し，本病原菌の防除を検討した。強酸性水はpH2.7以下とされているため，pH調整には養殖魚の食品としての安全面から，食品添加物として知られるクエン酸を用いた。そして，アマゴ *Oncorhynchus masou ishikawae* 成魚から分離した菌をクエン酸溶液に短時間浸漬した後，菌糸の発育状況を確認するとともに，アマゴのクエン酸溶液に対する感受性についても検討した。その結果，原因菌の菌糸をクエン酸溶液に短時間浸漬することで菌

糸の発育が著しく抑制されることが明らかになったので，以下に報告する。

材料と方法

原因菌の分離と培養 原因菌の分離は，'10年1月15日に岡山県内の養魚場においてミズカビ病に罹病したアマゴ1歳魚を採取し，患部内筋肉の小片を無菌的に取り出し，それをGY寒天培地¹⁷⁾へ接種する方法で行った。分離菌は1週間に1度の頻度でGY寒天培地を用いて継代培養した。培養温度は15℃とした。なお，細菌の繁殖を抑制させるため，培地上の接種部位周辺に微量のストレプトマイシン及びアンピシリンを散布した。

原因菌の同定 GY寒天培地上に発育させた菌糸の先端部を寒天ごと切り取り，滅菌シャーレに分注したGY液体培地に接種し，15℃で3～4日間培養した。伸長した菌糸を滅菌水道水（以下，TW）で数回洗浄後，新たなTW中に収容し，15℃で培養することにより遊走子の産生を促した。遊走子産生様式を観察することにより，属レベルまで同定した。さらに，シーケンサーを用いてrRNA遺伝子のITS領域及びD1D2領域の塩基配列を解析し，種の同定を行った。

菌糸に対するクエン酸溶液浸漬の発育抑制効果 クエン酸（無水）を用いてpHを2.10（クエン酸1%），1.99（同2%），1.91（同3%），1.84（同4%）及び1.77（同5%）に調整した滅菌蒸留水（以下，DW）を50ml容量の滅菌チューブにそれぞれ20mlずつ分注したクエン酸溶液を用いた。対照区は，pH7.69のDW20mlとした。蓋を除去した滅菌済みの1.5ml容量マイクロチューブの口部分（直径10mm）を使用してGY寒天培地上の寒天と

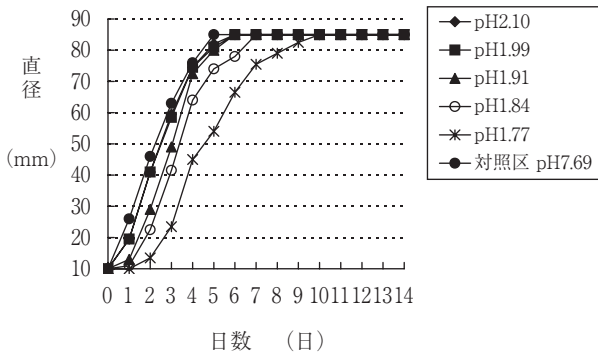


図1 クエン酸溶液に1秒間浸漬した後の菌糸の発育

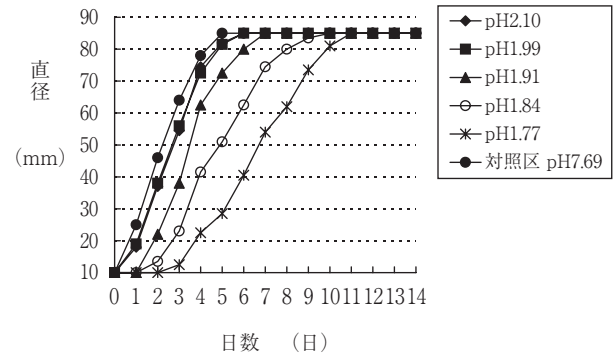


図2 クエン酸溶液に3秒間浸漬した後の菌糸の発育

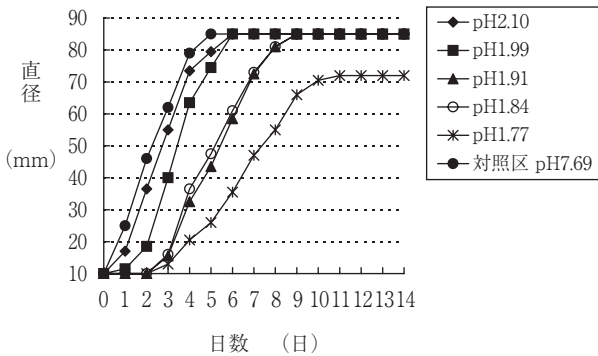


図3 クエン酸溶液に5秒間浸漬した後の菌糸の発育

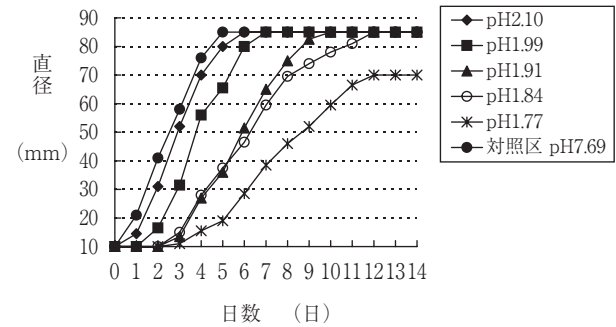


図4 クエン酸溶液に10秒間浸漬した後の菌糸の発育

もに採取した菌集落（以下、寒天ブロック）を用いた。各クエン酸溶液に寒天ブロックを1つずつ収容し、1、3、5、10秒間それぞれ浸漬する区を設けた。浸漬時の水温はすべて15.7℃であった。浸漬後は寒天ブロックを取り出し、DWで2回洗浄しGY寒天培地の中央に接種後、15℃で14日間培養した。試験区は各クエン酸溶液で2区ずつ、対照区は1区とした。発育した菌集落の直径を毎日計測し、各区の平均値を算出した。使用したシャーレの直径が90mmであることから、菌集落の発育直径の最高値を85mmとした。

アマゴ1歳魚のクエン酸溶液に対する感受性 クエン酸（無水）を用いてpHを1.75～1.77に調整した井戸水10lにアマゴ1歳魚（平均体重60.1g）をそれぞれ3、5、10秒間浸漬する区（以下、3、5、10秒浸漬区）を設け、各区20尾ずつ浸漬した。対照区には井戸水（pH6.50）を用いた。浸漬は5日おきに合計5回実施した。供試魚は試験開始から終了まで同じものを用い、この間の遊泳状況を観察するとともに通算死亡率を算出した。浸漬後の魚は毎回コンクリート水槽（2.3×0.8×0.7m）に戻し、水温12.1～14.0℃の井戸水でかけ流し飼育した。給餌は土、日、祝日、浸漬前日及び当日を除いて毎日適量を行った。

結 果

原因菌の分離と培養 感染個体から得られた菌は純培養的に分離された。菌集落は綿糸状の菌糸体を形成し、培地上においてほぼ同心円状に伸長した。分離した菌を以下の試験に用いた。

原因菌の同定 産生された遊走子のうの様式から *Saprolegnia* 属に同定された。本株は有性生殖が発現されない不稔株であったため、さらに遺伝子解析を行った結果、*Saprolegnia parasitica* に同定された。

菌糸に対するクエン酸溶液浸漬の発育抑制効果 結果を図1～4に示した。1秒間浸漬した区では、pH2.10～1.91については対照区とほぼ同様の発育を示した。pH1.84及び1.77は、対照区と比較して2～5日発育が遅かった。

3秒間浸漬した区では、pH2.10及び1.99は対照区と同様な発育傾向を示したが、pH1.91、1.84及び1.77において各々、2、5及び6日程度対照区より発育が遅かった。特に、pH1.77では培養開始5日目に対照区が最高値（直径85mm）に達したにもかかわらず、その約1/3の直径28mmしか発育していなかった。

表1 アマゴ1歳魚のクエン酸溶液に対する感受性

浸漬回数 (回目)	日数 (日)	pH	3秒浸漬区			5秒浸漬区			10秒浸漬区		
			浸漬開始時尾数 (尾)	浸漬終了後5日目 までの生存尾数 (尾)	通算生残率 (%)	浸漬開始時尾数 (尾)	浸漬終了後5日目 までの生存尾数 (尾)	通算生残率 (%)	浸漬開始時尾数 (尾)	浸漬終了後5日目 までの生存尾数 (尾)	通算生残率 (%)
1	0	1.75	20	20	100	20	18	90	20	0	0
2	5	1.76	20	20	100	18	17	85	-	-	-
3	10	1.76	20	20	100	17	17	85	-	-	-
4	15	1.77	20	20	100	17	16	80	-	-	-
5	20	1.75	20	20	100	16	16	80	-	-	-

※ 対照区の通算生残率は、すべての区で100%であった。

5秒間浸漬した区では、pH2.10は対照区とほぼ同様の発育を示した。pH1.99は当初発育の遅れが見られたが、最終的には対照区の1日遅れで最高値に達した。pH1.91及び1.84は培養開始時から両区とも同様の発育形態を示し、対照区と比較してともに4日発育が遅かった。pH1.77は14日間培養したが、直径72mmまでしか伸長せず、対照区より著しく発育が悪かった。

10秒間浸漬した区では、pH2.10は対照区とほぼ同様の発育が見られ、pH1.99はpH2.10より発育が遅かったが最終的には対照区の2日遅れで最高値に達した。pH1.91及び1.84は、ともに培養開始5日目まではほぼ同様の発育形態を示していたが、6日目以降発育に差が見られ始め、最終的にはpH1.84は1.91より2日遅れて最高値に達した。また、これら2区と対照区を比較すると、pH1.91及び1.84で各々、5及び7日発育が遅かった。pH1.77では培養開始12日目以降は発育が停滞し、14日目までに直径70mmまでしか発育しなかった。培養開始5日目には対照区では最高値に達したのに対し、pH1.91以下のクエン酸溶液ではその半分以下（直径19～39mm）しか発育していなかった。

アマゴ1歳魚のクエン酸溶液に対する感受性 結果を表1に示した。3秒浸漬区では、試験終了時の通算生残率は100%であった。5秒浸漬区は1、2及び4回目浸漬後、それぞれ2、1及び1尾死亡したが、いずれも浸漬日の翌日に死亡が確認されたものであった。5秒浸漬区の試験終了時の通算生残率は80%であった。10秒浸漬区では、1回目浸漬直後にアマゴは狂奔し、すべて死亡した。3及び5秒浸漬区において浸漬後供試魚を飼育水槽に戻した際、20分程度ほとんどの魚は鰓蓋を激しく動かし、水槽の四隅に蝟集していたがおよそ30分経過した時点で正常な遊泳に回復した。正常な遊泳に回復するまでの時間を正確に計測していないが、浸漬回数が増加するに従い、正常な遊泳に回復するまでの時間が短くなる傾向を示した。

5及び10秒浸漬区において、死亡魚の一部で尾柄部周辺の筋肉が露出している個体が見られた。また、10秒浸漬区のすべての死亡魚において魚体の膨満が観察された。

考 察

今回の結果から、ミズカビ病原菌である*Saprolegnia parasitica*の菌糸をクエン酸溶液に浸漬することで菌糸の発育が阻害されることが明らかになった。pHの低下及び浸漬時間の増加に従い、菌糸の発育はより強く阻害される傾向を示した。このこととアマゴのクエン酸溶液に対する感受性を考慮すると、実用的なpH及び浸漬時間はpH1.77～1.84及び3秒間が望ましいと思われた。例えば、ミズカビが魚体表面に目視され始めた感染初期段階から、5日ごとにpH1.77のクエン酸溶液にアマゴを3秒間浸漬することで、急激なカビのまん延を防止することが期待される。

これまでに、pH調整水によるミズカビ病防除に関して柏木ら¹⁸⁾は無隔膜式の電解装置を用いて電解水を作製し、得られた弱アルカリ性電解水が遊走子及び菌糸に対し発育阻止効果が認められたと報告しているが、その際弱アルカリ性電解水の魚類の生残に及ぼす毒性の検討がなされていなかった。今回の試験で用いたクエン酸は、一般的に食品添加物として広く使用されており、食品衛生上特に問題なく催奇性もないものと考えられた。しかし、浸漬後のクエン酸廃液は強酸性であるため、そのまま河川等に排水することは水産動植物に及ぼす影響が大きい。従って、廃液は希釈あるいは中和等を行い適切に処理する必要がある。さらに、クエン酸は金属を腐食させる恐れがあるので、使用する器具の取り扱いには十分留意しなければならないであろう。

受精卵管理時の本病の防除薬として水産用医薬品に承認されているプロノポール以外では、サケ科魚類におい

ては、NaCl¹⁹⁾、過酸化水素²⁰⁾、銅繊維²¹⁾及びニッケル系合金めっき²²⁾の利用が報告されているが、その中でニッケル系合金めっきを施したふ化盆は実用化段階まで研究が進んでいる。また、アユ*Plecoglossus altivelis altivelis*の卵に関して、塩化カリウムは遊走子の運動性を抑制する効果はあるが、菌糸の伸長や遊走子の発芽は抑制しないと報告されている²³⁾。これらの報告にはいずれも成魚に寄生する菌の防除に関する記載はない。アマゴでは産卵期になると、まず雄に、続いて雌に本病の発生が見られ、多くの雄が本病で死亡するために採卵時に雄が不足することがしばしば問題となっている²⁾。そのため、アマゴの養殖現場では産卵期の親魚について本病の防除対策が急務となっている。今回の試験では、クエン酸溶液に数秒間浸漬する方法が親魚の生殖及びその後の卵の発生に及ぼす影響について確認していないが、仮にそれらの影響がない場合、本法は有効なまん延防止策となり得ると思われた。現時点では、本法は産卵の影響を受けない1歳魚において本病のまん延防止に有効であると考えられた。

5及び10秒浸漬区の死亡魚の一部で尾柄部周辺の筋肉が露出した個体が見られたが、これは岩田²⁴⁾らがイワナ*Salvelinus leucomaenis* 1歳魚を用いてpH3.9環境下で1週間暴露試験を行った際と同様の症状を示しており、酸性環境下において表皮細胞に障害が起こったものと推測された。また、正常な魚類では浸透圧調節に伴う水や電解質の輸送の90%以上は鰓で行われていることが知られている²⁵⁾。10秒浸漬区の死亡魚は魚体が膨満していたことから、酸性環境下で鰓表皮細胞に破損を受け、正常な浸透圧調節が行われなかったものと考えられた。今回試験したpH2以下の酸性環境下では、浸漬時間やpHのわずかな差が魚の表皮細胞や鰓細胞に悪影響を与え魚の生死に大きく影響するため、浸漬時間やpHの管理には細心の注意を払う必要がある。

今回用いた供試菌は有性生殖が発現されない不稔株であったため、遊走子の産生がほとんど見られなかった。今後、同種の遊走子を産生する株を用いてクエン酸溶液に対する遊走子産生能力について検討を加え、実際にクエン酸溶液短時間浸漬処理したアマゴが本病の感染を抑制できるか否か確認するため、人為感染試験を実施する必要がある。

謝 辞

分離菌を同定していただいた日本獣医生命科学大学魚

病学教室の倉田 修准教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 畑井喜司雄, 2008:改訂・魚病学概論(小川和夫・室賀清邦編), 恒星社厚生閣, 82-84.
- 2) 畑井喜司雄, 2004:魚介類の感染症・寄生虫病(若林久嗣・室賀清邦編), 恒星社厚生閣, 263-268.
- 3) T. F. CLINE and G. POST, 1972: Therapy for trout eggs infected with *Saprolegnia*. *Prog. Fish-Cult.*, **34**, 148-151.
- 4) D. J. ALDERMAN, 1985: Malachine green: a review. *J. Fish Dis.*, **8**, 289-298.
- 5) 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.
- 6) 春日洋二・菱田美由起・棚橋寛康・荒井 真, 1992: 養殖ニジマスにおけるマラカイトグリーン消長の消長について, 食衛誌, **33**, 539-542.
- 7) J. R. MEINERTZ, G. R. STEHLY, W. H. GINGERICH, and J. L. ALLEN, 1995: Residues of [¹⁴C]-malachite green in eggs and fry of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), after treatment of eggs. *J. Fish Dis.*, **18**, 239-247.
- 8) F. P. MEYER and T. A. JORGENSEN, 1983: Teratological and other effects of malachine green on the development of rainbow trout and rabbits. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **112**, 818-824.
- 9) S. MONISHA, S. PRABHUDESAL, S. C. KRISHNAMURTHY and K. V. K. RAO, 2001: Effect of metanil yellow and malachine green on DNA synthesis in N-nitrosodienthylamine induced preneoplastic rat livers. *Indian J. Exp. Biol.*, **39**, 845-852.
- 10) 三柴 徹・野村哲一・熊谷 明・土田奈々・小川 滋・梶原敬太・大野平祐・畑井喜司雄, 2004: サケ科魚類卵のミズカビ病に対するプロノボールの薬効効果, 平成16年度日本魚病学大会講演要旨, 62.
- 11) 大久保 憲・新太喜治・小林寛伊・大ヶ瀬浩史・奥住捷子・加見谷将人・草地信也・白石 正・三宅寿美・矢野久子, 1994: 電解酸性水に関する調査報告, 日本手術医誌, **15**, 508-520.
- 12) 久保田昌治, 1995: 強酸化水の開発と利用, 食品と開発, **30**, 9-13.
- 13) 酒井重男, 1995: 機能水の開発と応用の現状, 食品工業, **4**, 35-41.
- 14) 山中真介, 1995: 電解酸性水を利用した衛生管理技術, 食品加工技術, **15**, 7-16.
- 15) 岩沢篤郎・中村良子, 1995: 病院感染防止におけるアクア酸

- 化水の有用性, 防塵防黴, **23**, 166-168.
- 16) 石井営次, 1995: 水の電気分解により得られた強酸性水による野菜の消毒実験, 環境管理技術, **13**, 179-187.
- 17) 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.
- 18) 柏木正章・前川 緑・田中洋美・吉岡 基・上野隆二・星合 愿一・畑井喜司雄・出野 裕・中村雅昭, 2000: 弱アルカリ性電解水のみズカビ病原菌, *Saprolegnia parasitica*に対する殺菌効果, 水産増殖, **48**, 565-569.
- 19) N. KITANCHAROEN, A. ONO, A. YAMAMOTO and K. HATAI, 1997: The Fungistatic Effect of NaCl on Rainbow trout Egg Saprolegniasis. *Fish Pathology*, **32**, 159-162.
- 20) 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.
- 21) 三浦正之・大野平祐・土田奈々・畑井喜司雄・桐生 透, 2005: 銅ファイバー浸漬によるニジマス卵のみズカビ病の防除, 魚病研究, **40**, 81-86.
- 22) 中村永介・青島秀治・渡辺 清・中山武典・田中俊夫, 2008: ニジマス種卵管理における抗菌めっきを利用した水カビ病の防除, 静岡水技研研報, **43**, 29-34.
- 23) M. MIURA, K. HATAI, H. OONO, N. KAJI and J. NAGURA, 2009: Antifungal Effect of Potassium Chloride (KCl) on Water Mold Infection in Ayu *Plecoglossus altivelis* Eggs. *Fish Pathology*, **44**, 166-171.
- 24) 岩田宗彦・下山友三・酒井典久・鈴木敬二・井田 齋・武藤光司・阿久津梅二, 1990: 硫酸による酸性環境がイワナの浸透圧調節能に与える影響, 養殖研報, **18**, 31-37.
- 25) G. P. HAYWOOD, J. ISAIA, and J. MAETZ, 1977: Epinephrine effects on branchial water and urea flux in rainbow trout. *Am. J. Physiol.*, **232**, 110-115.